

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6696043号
(P6696043)

(45) 発行日 令和2年5月20日(2020.5.20)

(24) 登録日 令和2年4月24日(2020.4.24)

(51) Int.Cl.	F I
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00 Z N A H
C 0 7 K 16/30 (2006.01)	C 0 7 K 16/30
C 0 7 K 16/46 (2006.01)	C 0 7 K 16/46
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00

請求項の数 11 (全 41 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2019-500812 (P2019-500812)	(73) 特許権者	515330007 インダストリー アカデミック コオペレーション ファウンデーション、ハルリムユニヴァーシティ 大韓民国、24252 ガンウォンード、チュンチョン、ハルリムダエハッカーギル1、ハルリム ユニヴァーシティ
(86) (22) 出願日	平成29年7月11日(2017.7.11)	(74) 代理人	110002262 TRY国際特許業務法人
(65) 公表番号	特表2019-532015 (P2019-532015A)	(72) 発明者	クォン ヒョンジュ 大韓民国 28774 チュンチョンブロード チョンジューシ サンダン-グ ジュンフン-ロ 70 ヒョンデ 3-チャアパート 306-1204
(43) 公表日	令和1年11月7日(2019.11.7)		
(86) 国際出願番号	PCT/KR2017/007407		
(87) 国際公開番号	W02018/034434		
(87) 国際公開日	平成30年2月22日(2018.2.22)		
審査請求日	平成31年1月10日(2019.1.10)		
(31) 優先権主張番号	10-2016-0104343		
(32) 優先日	平成28年8月17日(2016.8.17)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	韓国 (KR)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 環状ペプチドを含むワクチン組成物、環状ペプチドに対する抗体又はそれを含む抗腫組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列表の第1配列及び配列表の第2配列で構成される群から選択されるアミノ酸配列からなるペプチド、

又は配列表の第1配列及び配列表の第2配列中の、3番目のシステインと26番目のシステインアミノ酸との間にジスルフィド結合で連結された環状ペプチドで構成される群から選択されるアミノ酸配列からなるペプチドを有効成分として含む、ワクチン組成物。

【請求項2】

前記ペプチドワクチン組成物は、免疫刺激オリゴヌクレオチド及びリポソームに捕集されたことを特徴とする、請求項1に記載のペプチドワクチン組成物。

【請求項3】

配列表の第1配列及び配列表の第2配列で構成される群から選択されるアミノ酸配列からなるペプチド、

又は配列表の第1配列及び配列表の第2配列中の、3番目のシステインと26番目のシステインアミノ酸との間にジスルフィド結合で連結された環状ペプチドで構成される群から選択されるアミノ酸配列からなるペプチドに対する抗体又はその抗原結合断片であって、

前記抗体は、配列表の第3配列又は第4配列からなるCDRH1、配列表の第5配列又は第6配列からなるCDRH2、及び配列表の第7配列又は第8配列からなるCDRH3の重鎖CDR (complementarity determining regio

n) アミノ酸配列を有する重鎖可変領域と、

配列表の第9配列又は第10配列からなるCDRL1、配列表の第11配列又は第12配列からなるCDRL2、及び配列表の第13配列又は第14配列からなるCDRL3の軽鎖CDRAミノ酸配列を有する軽鎖可変領域とを含む、抗体又はその抗原結合断片。

【請求項4】

前記重鎖可変領域は、配列表の第15配列又は第16配列のアミノ酸配列を有することを特徴とする、請求項3に記載の抗体又はその抗原結合断片。

【請求項5】

前記軽鎖可変領域は、配列表の第17配列又は第18配列のアミノ酸配列を有することを特徴とする、請求項3に記載の抗体又はその抗原結合断片。

10

【請求項6】

請求項3に記載の抗体又はその抗原結合断片の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域をコードする核酸分子であって、前記重鎖可変領域をコードする核酸分子は、配列表の第19配列又は第20配列のヌクレオチド配列を有し、前記軽鎖可変領域をコードする核酸分子は、配列表の第21配列又は第22配列のヌクレオチド配列を有することを特徴とする、核酸分子。

【請求項7】

(a) 請求項3に記載の抗体又はその抗原結合断片の薬学的有効量と、(b) 薬学的に許容される担体とを含む、癌の予防又は治療用薬学的組成物。

【請求項8】

前記癌は、肝癌、大腸癌、膵臓癌、肺癌、胃癌、直腸癌、軟部組織肉腫(soft-tissue sarcoma)、結腸癌、十二指腸乳頭部上皮癌(carcinoma of the papilla vateri)、非内分泌肺腫瘍(nonendocrine lung tumor)及び気管支類癌腫(bronchial carcinoid tumor)で構成される群から選択されることを特徴とする、請求項7に記載の薬学的組成物。

20

【請求項9】

前記組成物は、癌細胞の転移又は癌細胞の浸潤を抑制することを特徴とする、請求項7に記載の組成物。

【請求項10】

請求項3に記載の抗体又はその抗原結合断片を含む癌診断用キット。

30

【請求項11】

前記癌は、肝癌、大腸癌、膵臓癌、肺癌、胃癌、直腸癌、軟部組織肉腫(soft-tissue sarcoma)、結腸癌、十二指腸乳頭部上皮癌(carcinoma of the papilla vateri)、非内分泌肺腫瘍(nonendocrine lung tumor)及び気管支類癌腫(bronchial carcinoid tumor)で構成される群から選択されることを特徴とする、請求項10に記載の診断用キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

40

【0001】

本発明は、環状ペプチドを含むワクチン組成物、環状ペプチドに対する抗体又はそれを含む抗癌組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

ヒト癌においてTM4SF5(transmembrane 4 superfamily member 5 protein)のmRNAの発現は、膵臓癌、軟部組織肉腫(soft tissue sarcoma)、胃癌、十二指腸乳頭部上皮癌(carcinoma of the papilla vateri)及び大腸癌で観察されている。TM4SF5は、誘導された形態学的伸長及び上皮細胞の間葉細胞への転換(epi

50

thelial-mesenchymal transition)により肝細胞癌(hepatocellular carcinoma、HCC)の形成に重要な役割を果たし、インビトロで異常な細胞成長及びインビボで腫瘍形成を引き起こす。TM4SF5とインテグリン 2との間の細胞外相互作用によるコラーゲンタイプI環境でインテグリン 2の機能を抑制する場合、TM4SF5発現-誘導された調節されていない細胞増殖及び新生血管形成が起こるという事実が報告された。TM4SF5をターゲティングする合成抑制剤であるTSAHC(4'-(p-toluenesulfonyl-amido)-4-hydroxychalcone)は、インビトロ及びインビボでHCCの成長及び転移を抑制した。これらの事実は、HCCの形成におけるTM4SF5の役割が、HCCの治療薬物の開発のための新規な分子ターゲットであることを示す。

10

【0003】

HCCは、全世界的に最もよく見られる癌の一つであり、特に、アジアとサハラ砂漠以南のアフリカ(sub-Saharan Africa)で広く発症している。ほとんどのHCCの発達は、異形成結節(dysplastic nodule)、初期HCC、高分化度HCC、並びに中分化度及び低HCCを含む多段階の過程であることが知られている。

【0004】

大腸癌は、全世界で3番目によく見られる癌であり、開発途上国よりも先進国でさらによく見られる癌である。大腸癌において最もよく見られる突然変異遺伝子は、Wnt-APC-β-カテニン信号伝達経路と関連するAPC、β-カテニン、AXIN1、AXIN2、TCF7L2又はNKD1である。

20

【0005】

一方、生体による腫瘍細胞とウイルス感染細胞などの排除は、細胞性免疫、特に細胞毒性T細胞(CTLと称する)が重要な役割を果たしている。腫瘍細胞の排除の場合、CTLは、腫瘍細胞上の抗原ペプチド(腫瘍抗原ペプチド)とMHC(Major Histocompatibility Complex)クラスI抗原(ヒトの場合はHLAクラスI抗原と称する)の複合体を認識し、腫瘍細胞を攻撃及び破壊する。すなわち、腫瘍抗原ペプチドは、腫瘍に特有のタンパク質、すなわち腫瘍抗原タンパク質が細胞内で合成された後、プロテアーゼにより細胞内で分解されることによって生成される。生成された腫瘍抗原ペプチドは、小胞体内でMHCクラスI抗原(HLAクラスI抗原)と結合して複合体を形成し、細胞表面に運ばれて抗原提示される。この抗原提示に係る複合体を腫瘍特異的なCTLが認識し、細胞毒性作用とリンフォカイン(lymphokine)の産生を介して抗腫瘍効果を示す。このような一連の作用の解明に伴い、腫瘍抗原タンパク質又は腫瘍抗原ペプチドを、いわゆる癌免疫療法剤(癌ワクチン)として利用することによって、癌患者の体内の癌特異的CTLを増強させる治療法が開発されている。

30

【0006】

本明細書全体にわたって多数の論文及び特許文献が参照され、その引用が表示されている。引用された論文及び特許文献の開示内容は、その全体が本明細書に参照として組み込まれ、本発明の属する技術分野のレベル及び本発明の内容がより明確に説明される。

【先行技術文献】

40

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】大韓民国特許公開第10-2015-0122159号

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明者らは、癌を診断、予防及び治療できるワクチン及び抗体を開発するために鋭意研究した。その結果、腫瘍特異抗原であるTM4SF5のペプチドに対して高い親和力で結合する新規な抗体及びその抗原結合断片を製造し、癌細胞の成長、転移及び浸潤に対する前記抗体の優れた抑制活性を確認することによって、本発明を完成した。

50

【0009】

したがって、本発明の目的は、環状ペプチドワクチン組成物を提供することにある。

【0010】

本発明の他の目的は、その環状ペプチドに対する抗体又はその抗原結合断片を提供することにある。

【0011】

本発明の他の目的は、前記抗体又はその抗原結合断片の重鎖可変領域をコードする核酸分子を提供することにある。

【0012】

本発明の更に他の目的は、前記抗体又はその抗原結合断片の軽鎖可変領域をコードする核酸分子を提供することにある。

10

【0013】

本発明の更に他の目的は、癌の予防又は治療用薬学的組成物を提供することにある。

【0014】

本発明の更に他の目的は、癌診断用キットを提供することにある。

【0015】

本発明の他の目的及び利点は、下記の発明の詳細な説明、特許請求の範囲及び図面によってより明確になる。

【課題を解決するための手段】

【0016】

上記の目的を達成するために、本発明は、配列表の第1配列及び配列表の第2配列で構成される群から選択されるアミノ酸配列からなるペプチド；又は配列表の第1配列及び配列表の第2配列中の、3番目のシステインと26番目のシステインアミノ酸との間にジスルフィド結合で連結された環状ペプチドで構成される群から選択されるアミノ酸配列からなるペプチドを有効成分として含むワクチン組成物を提供する。

20

【0017】

本発明の一具現例において、前記ペプチドワクチン組成物は、免疫刺激オリゴヌクレオチド及びリポソームに捕集されることが好ましいが、これに限定されない。

【0018】

本明細書において、「リポソーム (liposome)」という用語は、脂質二重膜を形成することによって製造される脂質運搬体を意味する。一般に、リポソームは、生体親和的であり、両親媒性を有しているため、内部の親水性物質を含んだまま、疎水性膜を通過することができる。リポソームの直径は、一般的に20~2,000nmであるが、これに制限されず、製造方法及び運搬されるヌクレオチドの長さによって様々な大きさであってもよい。

30

【0019】

本発明の好ましい具現例によれば、本発明のリポソームは、CHEMS及びDOPEの混合物である。本発明で使用するリポソーム内でのDOPE：CHEMSのモル比は、好ましくは7：3~3：7であり、より好ましくは4.5：5.5~5.5：4.5であり、最も好ましくは5.0：5.0である。

40

【0020】

本発明のリポソームの製造は、当業界で公知の様々な方法により行うことができるが、好ましくは、有機溶媒 - 混合方法又は界面剤 - 混合方法を用いる（米国特許登録第5,705,385号；米国特許出願第08/660,025号）。より好ましくは、リポソームは、DOPE及びCHEMSを混合し、これを窒素ガスと共に蒸発させて無溶媒 (solvent free) 脂質フィルムを作った後、アルコール溶液中で溶解させ、最終的に水溶性ヌクレオチド混合物と混合する過程により製造する。

【0021】

本発明のリポソームの製造を有機溶媒の混合により行う場合、これに用いられる有機溶媒は、クロロホルム、メタノール、エタノール、n-プロパノール又はブタノールを含む

50

。好ましくは、前記有機溶媒はエタノールである。

【0022】

本明細書において、「捕集(encapsulation)」という用語は、効率的なインピボ運搬のために、運搬される物質を相対的に安定したシェル内に封入(enclosure)ことを意味する。

【0023】

本明細書において、「免疫刺激(immunostimulatory)」という用語は、初期免疫反応を誘導するか、又は抗原に対する既存の免疫反応を測定可能レベルに増加させることを意味する。

【0024】

本発明で利用できる免疫刺激オリゴヌクレオチドは、当業界で公知のいかなる免疫刺激オリゴヌクレオチドも含む。例えば、前記免疫刺激オリゴヌクレオチドは、ヘアピン二次構造を形成するパリンドローム、CpGモチーフ、CpTモチーフ又は多重Gドメインを含むオリゴヌクレオチド、又は他の公知のISS(immunostimulatory sequence)であってもよい。例えば、本発明で利用される免疫刺激オリゴヌクレオチドは、米国特許出願公開第20080045473号、WO2006/063152又はWO1998/18810に開示された免疫刺激オリゴヌクレオチドを含む。前記CpGモチーフを含む免疫刺激オリゴヌクレオチドの具体的な例は、WO2006/080596に開示の本発明者らによって開発されたCpGオリゴヌクレオチドを含む。

【0025】

本発明で有効成分として用いられる免疫刺激オリゴヌクレオチドは、天然(natural-occurring)ヌクレオチド、骨格(backbone)変形されたヌクレオチド(例えば、ペプチド核酸(PNA)(M. Egholm, et al., Nature, 365:566-568(1993))、ホスホロチオエートDNA、ホスホロジチオエートDNA、ホスホロアミデートDNA、アミド連結されたDNA、MMI連結されたDNA、2'-O-メチルRNA、-DNA及びメチルホスホネートDNA、糖変形されたヌクレオチド(例えば、2'-O-メチルRNA、2'-フルオロRNA、2'-アミノRNA、2'-O-アルキルDNA、2'-O-アリルDNA、2'-O-アルキニルDNA、ヘキソースDNA、ピラノシルRNA及びアンヒドロヘキシトールDNA)、及び塩基変形されたヌクレオチド(例えば、C-5置

【0026】

換されたピリミジン(置換基は、フルオロ-、プロモ-、クロロ-、ヨード-、メチル-、エチル-、ビニル-、ホルミル-、エチニル-、プロピニル-、アルキニル-、チアゾリル-、イミダゾリル-及びピリジル-を含む)、C-7置換基を有する7-デアザプリン(置換基は、フルオロ-、プロモ-、クロロ-、ヨード-、メチル-、エチル-、ビニル-、ホルミル-、アルキニル-、アルケニル-、チアゾリル-、イミダゾリル-、ピリジル-を含む)、イノシン及びジアミノプリン)を含む。好ましくは、本発明のオリゴヌクレオチドは天然ヌクレオチドである。

【0027】

本発明の好ましい具現例によれば、本発明の免疫刺激オリゴヌクレオチドは、ホスホロジエステル骨格又はホスホロチオエート骨格を有する。

【0028】

本発明で用いられる免疫刺激オリゴヌクレオチドの長さは、特に制限されないが、好ましくは、8~100ヌクレオチド長であり、より好ましくは15~50ヌクレオチド長であり、最も好ましくは、約13~25ヌクレオチド長である。好ましくは、本発明の免疫刺激オリゴヌクレオチドは、配列表の第23配列のオリゴヌクレオチドである。

【0029】

本明細書において、「エピトープ(epitope)」という用語は、抗体と相互作用する抗原の部位を意味する。より詳しくは、エピトープは、免疫グロブリン(immunoglobulin)又はT細胞受容体に特異的に結合できるタンパク質決定部位(de

10

20

30

40

50

terminant)を意味する。また、本発明のエピトープは、免疫反応を増加させることができる分子又は物質を含む。例えば、本発明のエピトープは、ペプチド、これらのペプチドをエンコードする核酸及び糖タンパク質を含むが、これらに限定されるものではない。

【0030】

本明細書において、「ペプチド(peptide)」という用語は、アミノ酸残基間のペプチド結合によって形成された線形の分子を意味し、本明細書において、「ペプチドエピトープ(peptide epitope)」という用語は、B細胞及び/又はT細胞の特異的反応を誘導できるエピトープを含むペプチドを意味する。

【0031】

本発明の組成物には、その他の薬物又は他の免疫補助剤が含まれて追加的な免疫刺激効果を提供することができる。免疫補強剤の種類は、当分野に公知である(Vaccine Design - The Subunit and Adjuvant Approach, 1995, Pharmaceutical Biotechnology, Volume 6, Eds. Powell, M. F., and Newman, M. J., Plenum Press, New York and London, ISBN 0-306-44867-X)。好ましくは、本発明の組成物に含まれる免疫補強剤は、アルミニウム塩又はカルシウム塩(例えば、ヒドロキシド又はホスフェート)を含む。

【0032】

好ましい免疫補強剤の具体例は、次の通りである：アルミニウム塩又はカルシウム塩(ヒドロキシド又はホスフェート)、水中油(oil-in-water)エマルジョン(WO95/17210、EP0 399 843)又はリポソームのような微粒性キャリア(WO96/33739)、南アメリカの樹木であるキラヤ・サポナリア・モリナ(Quillaja Saponaria Molina)由来の免疫学的に抗原補強剤活性を有するサポニン画分(例えば、Quil A)、3-De-O-アシル化されたモノホスホリル脂質A、ムラミルジペプチド、3-DMP L(3-O-デアシル化されたモノホスホリル脂質A)を含むが、これに限定されるものではない。

【0033】

本発明のワクチン組成物は、様々な状態又は疾患の治療に適用することができ、前記状態又は疾患の例は、大腸癌、肝癌、胃癌、肺癌、乳癌、卵巣癌、肝臓癌、気管支癌、鼻咽頭癌、喉頭癌、膵臓癌、膀胱癌、結腸癌、子宮頸癌、脳癌、前立腺癌、骨癌、皮膚癌、甲状腺癌、副甲状腺癌及び尿管癌のような癌に適用することができる。

【0034】

本発明の薬学的組成物に含まれる薬学的に許容される担体は、製剤時に一般的に用いられるものであって、ラクトース、デキストロース、スクロース、ソルビトール、マンニトール、澱粉、アカシアゴム、リン酸カルシウム、アルギン酸塩、ゼラチン、ケイ酸カルシウム、微結晶性セルロース、ポリビニルピロリドン、セルロース、水、シロップ、メチルセルロース、メチルヒドロキシベンゾエート、プロピルヒドロキシベンゾエート、タルク、ステアリン酸マグネシウム及びミネラルオイルなどを含むが、これらに限定されるものではない。本発明の薬学的組成物は、前記成分以外に潤滑剤、湿潤剤、甘味剤、香味剤、乳化剤、懸濁剤、保存剤などをさらに含むことができる。適した薬学的に許容される担体及び製剤は、Remington's Pharmaceutical Sciences(19th ed., 1995)に詳細に記載されている。

【0035】

本発明の薬学的組成物は、経口又は非経口で投与することができるが、好ましくは非経口投与であり、非経口投与の場合には、静脈内注入、皮下注入、筋肉注入、腹腔注入、経皮投与などで投与することができる。

【0036】

本発明の薬学的組成物の適切な投与量は、製剤化方法、投与方式、患者の年齢、体重、性別、病的状態、食物、投与時間、投与経路、排泄速度、及び反応感応性のような要因に

10

20

30

40

50

よって多様に処方することができる。一方、本発明の薬学的組成物の経口投与量は、好ましくは、1日当たり0.001~10,000mg/kg(体重)である。

【0037】

本発明の薬学的組成物は、当該発明の属する技術分野における通常の知識を有する者が容易に実施できる方法によって、薬学的に許容される担体及び/又は賦形剤を用いて製剤化することによって、単位用量形態で製造されるか、又は多用量容器内に入れて製造されてもよい。このとき、剤形は、オイル又は水性媒質中の溶液、懸濁液又は乳化液の形態であるか、又はエキス剤、粉末剤、顆粒剤、錠剤又はカプセル剤の形態であってもよく、分散剤又は安定化剤をさらに含むことができる。

【0038】

また、本発明は、配列表の第1配列及び配列表の第2配列で構成される群から選択されるアミノ酸配列からなるペプチド；又は配列表の第1配列及び配列表の第2配列中の、3番目のシステインと26番目のシステインアミノ酸との間にジスルフィド結合で連結された環状ペプチドで構成される群から選択されるアミノ酸配列からなるペプチドに対する抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0039】

本発明の一具現例において、前記抗体は、配列表の第3配列又は第4配列からなるCDRH1、配列表の第5配列又は第6配列からなるCDRH2、及び配列表の第7配列又は第8配列からなるCDRH3の重鎖CDR(complementarity determining region)アミノ酸配列を有する重鎖可変領域；及び配列表の第9配列又は第10配列からなるCDRL1、配列表の第11配列又は第12配列からなるCDRL2、及び配列表の第13配列又は第14配列からなるCDRL3の軽鎖CDRアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含むことが好ましいが、これに限定されない。

【0040】

本発明において、本発明者らは、TM4SF5のEC2(extracellular domain 2)に該当する環状ペプチドを考案し、環状hTM4SF5ペプチド及びMB-ODN 4531(O)をphosphatidyl-oleoyl-palmitoyl ethanolamine(DOPE):cholesterol hemisuccinate(CHEMS)複合体にカプセル化し、免疫化後、マウスから環状ペプチド-特異的な抗体を産生した。転移モデルとして、マウスにマウス大腸癌細胞株CT-26の静脈内注射により肺で腫瘍を誘導した。ペプチドワクチンで免疫化されたマウスにおいて生存率は増加し、転移された肺結節の数及び肺腫瘍の成長は減少した。これは、そのペプチドワクチンの抗転移効果を示唆した。本発明者らは、抗原として、TM4SF5の環状ペプチド類似構造モチーフを使用し、低いオフレート(off rate)を有するTM4SF5タンパク質を認識するモノクローナル抗体を成功裏に分離した。また、本発明者らは、ヒト化された抗体を製造し、インビトロ及びインビボでその反応性を評価した。重要なことに、本発明者らは、本発明のヒト化されたanti-TM4SF5抗体の肝癌及び大腸癌の形成及び成長に対する阻害効果を見出した。また、静脈内注射されたそのヒト化されたanti-TM4SF5抗体は、マウス転移モデルに大腸癌細胞の静脈内注射によって確立された肺転移を阻害した。

【0041】

したがって、本発明の主な内容は、

i) TM4SF5が肝癌及び大腸癌などに発現されて癌の成長に影響を与え、

ii) TM4SF5のextracellular domain 2(EC2)に該当する環状ペプチドを合成して環状ペプチド-CpG-DNA-リボソーム複合体を製造してマウスに免疫すると、環状ペプチドに対する抗体が生成され、

iii) 環状ペプチド-CpG-DNA-リボソーム複合体をワクチンとして用い、大

10

20

30

40

50

腸癌（CT-26細胞を利用）の転移に対するワクチン効能を検証し、

i v) 環状ペプチド-CpG-DNA-リポソーム複合体を免疫したマウスの脾臓細胞を融合したモノクローナル抗体を製造し、

v) マウス anti-TM4SF5モノクローナル抗体に基づいてヒト化された anti-TM4SF5抗体を製造し、

vi) ヒト化された anti-TM4SF5抗体の肝臓、大腸癌の抑制効能及び大腸癌の転移抑制効能を評価することに関する。

【0042】

以下、本発明を詳細に説明する。

【0043】

抗TM4SF5ヒト化された抗体及びその抗原結合断片

【0044】

本発明の抗体は、TM4SF5に対して特異的結合能を有する。

【0045】

本明細書において、TM4SF5に言及しながら使用される「抗体」という用語は、TM4SF5に対する特異抗体であって、TM4SF5の特定のエピトープに対して特異的に結合するものを指し、完全な抗体の形態だけでなく、抗体分子の抗原結合断片（抗体断片）を含む。

【0046】

「ヒト化」という用語は、抗体が全体的又は部分的に非ヒト起源のもの、例えば、関心のある抗原でマウスを免疫化させて取得されたマウス抗体、又はそのようなマウス抗体に基づくキメラ抗体である場合、特に、重鎖及び軽鎖のフレームワーク領域及び不変ドメインにある特定のアミノ酸を置換させることで、ヒトにおいて免疫反応を回避又は最小化できるという事実を指す。すべての抗体は、論議されている抗体の「ヒト化(humanness)」のレベルとある程度関連するヒト抗-抗体反応を誘導する可能性を有するものと知られている。たとえ、免疫原性、そして、これによって特定の抗体のヒト抗-抗体反応を精密に予測することはできないが、非ヒト抗体は、ヒト抗体よりも免疫原性が高い傾向がある。外来（一般的にげっ歯類）不変領域がヒト起源の配列で置換されたキメラ抗体は、完全な外来起源の抗体よりも一般的に免疫原性が低いことが示されており、治療用抗体での趨勢は、ヒト化又は完全なヒト抗体を目指している。キメラ抗体又は非ヒト起源のその他の抗体の場合、その結果として、これらをヒト化させてヒト抗-抗体反応の危険性を減少させることが好ましい。

【0047】

抗体配列をヒト化する多くの方法は当分野で公知である；参照：例えば、Almagro & Fransson (2008) Front Biosci. 13:1619-1633によって概観される。通常使用される一つの方法は、例えば、マウス由来のキメラ抗体の場合、マウス可変領域遺伝子に対するヒト生殖細胞遺伝子対応部を同定し、マウスCDR配列をこのようなフレームワークにグラフトすることを含むCDRグラフトングである。CDRグラフトングは、カバットCDRの定義に基づき得るが、より最近の刊行物(Magdelaine-Beuzelin et al. (2007) Crit Rev. Oncol Hematol. 64:210-225)は、IMGT(登録商標)の定義(the international Immunogenetics information system(登録商標), www.imgt.org)がヒト化の結果を向上させ得ることを提案している(Lefranc et al. (2003), IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains, Dev. Comp Immunol. 27, 55-77参照)。CDRグラフトングは、CDRグラフトされた非ヒト抗体の結合特異性及び親和性、並びにこれによって生物学的活性を減少させることができるので、復帰突然変異(しばしば「フレームワーク復旧」と呼ばれる)

10

20

30

40

50

を、典型的にフレームワーク領域でCDRグラフトされた抗体の選択された位置に導入させて、親抗体の結合特異性及び親和性を再確立させることができる。可能な復帰突然変異のための位置の確認は、文献及び抗体データベースで利用可能な情報を用いて行うことができる。復帰突然変異の候補であるアミノ酸残基は、典型的に抗体分子の表面に位置したものである反面、埋もれている又は低いレベルの表面露出を有する残基は、一般的に変更されないはずである。CDRグラフティング及び復帰突然変異に代わるヒト化技法は、非ヒト起源の表面露出されていない残基を維持する一方、表面残基をヒト残基に変更させるリサーフェイシング (resurfacing) である。

【0048】

特定の場合に、標的エピトープに対する結合親和性を向上させるために、1つ以上のCDRアミノ酸残基を変更させることがまた好ましいことがある。これは、「親和性成熟化」として知られており、例えば、抗体のヒト化が減少された結合特異性又は親和性をもたらし、復帰突然変異単独で結合特異性又は親和性を十分に向上させることができない状況で、任意にヒト化と共に行われ得る。様々な親和性成熟化方法、例えば、文献 [Burks et al. (1997) PNAS USA, vol. 94, pp. 412 - 417] に記載された試験管内スキャニング飽和突然変異発生方法、及び文献 [Wu et al. (1998) PNAS USA, vol. 95, pp. 6037 - 6042] の段階式試験管内親和性成熟化方法が当分野で公知である。

【0049】

完全な抗体は、2個の全長の軽鎖及び2個の全長の重鎖を有する構造であり、それぞれの軽鎖は、重鎖とジスルフィド結合で連結されている。重鎖不変領域は、ガンマ()、ミュー(μ)、アルファ()、デルタ()及びイプシロン()タイプを有し、サブクラスとして、ガンマ1(1)、ガンマ2(2)、ガンマ3(3)、ガンマ4(4)、アルファ1(1)及びアルファ2(2)を有する。軽鎖の不変領域は、カッパ()及びラムダ()タイプを有する。

【0050】

抗体分子の抗原結合断片又は抗体断片とは、抗原結合機能を保持している断片を意味し、Fab、F(ab')、F(ab')₂及びFvなどを含む。抗体断片のうちFabは、軽鎖及び重鎖の可変領域、軽鎖の不変領域、及び重鎖の1番目の不変領域(CH1)を有する構造で、1個の抗原結合部位を有する。Fab'は、重鎖CH1ドメインのC末端に1つ以上のシステイン残基を含むヒンジ領域(hinge region)を有するという点でFabと差がある。F(ab')₂抗体は、Fab'のヒンジ領域のシステイン残基がジスルフィド結合して生成される。Fvは、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域のみを有している最小の抗体片であって、Fv断片を生成する組換え技術は、PCT国際公開特許出願WO88/10649、WO88/106630、WO88/07085、WO88/07086及びWO88/09344に開示されている。二重鎖Fv(two-chain Fv)は、非共有結合で重鎖可変領域と軽鎖可変領域が連結されており、単鎖Fv(single-chain Fv)は、一般的にペプチドリンカーを介して重鎖の可変領域と単鎖の可変領域とが共有結合で連結されるか、又はC末端で直接連結されているので、二重鎖Fvと同様にダイマーのような構造をなすことができる。このような抗体断片は、タンパク質加水分解酵素を用いて得ることができ(例えば、全体抗体をパパインで制限切断すると、Fabが得られ、ペプシンで切断すると、F(ab')₂断片が得られる)、遺伝子組換え技術により作製することもできる。

【0051】

本発明の一具現例によれば、本発明において抗体は、Fabの形態であるか、又は完全な抗体の形態である。また、重鎖不変領域は、ガンマ()、ミュー(μ)、アルファ()、デルタ()又はイプシロン()のいずれか一つのアイソタイプから選択される。一つの特例において、不変領域は、ガンマ1(IgG1)、ガンマ2(IgG2)、ガンマ3(IgG3)又はガンマ4(IgG4)であり、他の特例において、不変領域はIgG2aアイソタイプである。軽鎖不変領域は、カッパ又はラムダタイプであって

10

20

30

40

50

もよい。一つの特定期例において、前記軽鎖不変領域はカップタイプである。

【0052】

本明細書で使用される用語、「重鎖」は、抗原に特異性を付与するための十分な可変領域配列を有するアミノ酸配列を含む可変領域ドメインVH及び3個の不変領域ドメインCH1、CH2及びCH3を含む全長重鎖及びその断片をいずれも意味する。また、本明細書で使用される用語、「軽鎖」は、抗原に特異性を付与するための十分な可変領域配列を有するアミノ酸配列を含む可変領域ドメインVL及び不変領域ドメインCLを含む全長軽鎖及びその断片をいずれも意味する。

【0053】

本明細書において、用語「CDR (complementarity determining region)」は、免疫グロブリン重鎖及び軽鎖の高可変領域 (hyper variable region) のアミノ酸配列を意味する (Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4th Ed., U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987))。重鎖 (CDRH1、CDRH2及びCDRH3) 及び軽鎖 (CDRL1、CDRL2及びCDRL3) には、それぞれ3個のCDRsが含まれている。CDRは、抗体が抗原又はエピトープに結合する場合に主要な接触残基を提供する。

10

【0054】

本発明の抗体又は抗体断片は、TM4SF5を特異的に認識できる範囲内で、添付の配列表に記載されたアミノ酸配列の変異体を含むことができる。例えば、抗体の結合親和度及び/又はその他の生物学的特性をさらに改善するために、抗体のアミノ酸配列に追加的な変化を与えることができる。このような変形は、例えば、抗体のアミノ酸配列残基の欠失、挿入及び/又は置換を含む。このようなアミノ酸変異は、アミノ酸側鎖置換体の相対的類似性、例えば、疎水性、親水性、電荷、大きさなどに基づいてなされる。アミノ酸側鎖置換体の大きさ、形状及び種類に対する分析によって、アルギニン、リジン及びヒスチジンは、いずれも正電荷を帯びた残基であり；アラニン、グリシン及びセリンは、類似の大きさを有し；フェニルアラニン、トリプトファン及びチロシンは、類似の形状を有する

20

30

【0055】

変異を導入する場合、アミノ酸の疎水性インデックス (hydropathic index) が考慮され得る。それぞれのアミノ酸は、疎水性及び電荷によって疎水性インデックスが付与されている：イソロイシン (+4.5)；バリン (+4.2)；ロイシン (+3.8)；フェニルアラニン (+2.8)；システイン/シスチン (+2.5)；メチオニン (+1.9)；アラニン (+1.8)；グリシン (-0.4)；トレオニン (-0.7)；セリン (-0.8)；トリプトファン (-0.9)；チロシン (-1.3)；プロリン (-1.6)；ヒスチジン (-3.2)；グルタミン酸 (-3.5)；グルタミン (-3.5)；アスパラギン酸 (-3.5)；アスパラギン (-3.5)；リジン (-3.9)；及びアルギニン (-4.5)。

40

【0056】

タンパク質の相互的な生物学的機能 (interactive biological function) を付与するに当たり、疎水性アミノ酸インデックスは非常に重要である。類似の生物学的活性を保持するためには、類似の疎水性インデックスを有するアミノ酸で置換しなければならないということは公知の事実である。疎水性インデックスを参照して変異を導入させる場合、一つの特定期例では±2以内、他の特定期例では±1以内、更に他の特定期例では±0.5以内の疎水性インデックスの差を示すアミノ酸間で置換を行う。

50

【0057】

一方、類似の親水性値 (hydrophilicity value) を有するアミノ酸間の置換が、均等な生物学的活性を有するタンパク質をもたらすということもよく知られている。米国特許第4,554,101号に開示されたように、次の親水性値がそれぞれのアミノ酸残基に付与されている：アルギニン (+3.0)；リジン (+3.0)；アスパラギン酸 (+3.0 ± 1)；グルタミン酸 (+3.0 ± 1)；セリン (+0.3)；アスパラギン (+0.2)；グルタミン (+0.2)；グリシン (0)；トレオニン (-0.4)；プロリン (-0.5 ± 1)；アラニン (-0.5)；ヒスチジン (-0.5)；システイン (-1.0)；メチオニン (-1.3)；パリン (-1.5)；ロイシン (-1.8)；イソロイシン (-1.8)；チロシン (-2.3)；フェニルアラニン (-2.5)；トリプトファン (-3.4)。親水性値を参照して変異を導入させる場合、一つの特例では ± 2 以内、他の特例では ± 1 以内、更に他の特例では ± 0.5 以内の親水性値の差を示すアミノ酸間で置換を行う。

10

【0058】

分子の活性を全体的に変更させないタンパク質におけるアミノ酸交換は、当該分野で公知である (H. Neurath, R. L. Hill, The Proteins, Academic Press, New York, 1979)。最も一般的に起こる交換は、アミノ酸残基 Ala/Ser、Val/Ile、Asp/Glu、Thr/Ser、Ala/Gly、Ala/Thr、Ser/Asn、Ala/Val、Ser/Gly、Thr/Phe、Ala/Pro、Lys/Arg、Asp/Asn、Leu/Ile、Leu/Val、Ala/Glu、及び Asp/Gly 間の交換である。

20

【0059】

上述した生物学的均等活性を有する変異を考慮すれば、本発明の抗体又はそれをコードする核酸分子は、配列表に記載された配列と実質的な同一性 (substantial identity) を示す配列も含むものと解釈される。前記の実質的な同一性は、前記の本発明の配列と任意の他の配列とを最大限対応するようにアラインし、当業界で通常用いられるアルゴリズムを用いてアラインされた配列を分析した場合に、少なくとも 61% の相同性、一つの特例によれば、70% の相同性、他の特例によれば、80% の相同性、更に他の特例によれば、90% の相同性を示す配列を意味する。配列比較のためのアラインメント方法は当業界で公知である。アラインメントに対する様々な方法及びアルゴリズムは、Smith and Waterman, Adv. Appl. Math. (1981) 2: 482 Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. (1970) 48: 443; Pearson and Lipman, Methods in Mol. Biol. (1988) 24: 307-31; Higgins and Sharp, Gene (1988) 73: 237-44; Higgins and Sharp, CABIOS (1989) 5: 151-3; Corpet et al. Nucleic Acids Res. (1988) 16: 10881-90; Huang et al. Comp. Appl. Biosci. (1992) 8: 155-65 及び Pearson et al. Meth. Mol. Biol. (1994) 24: 307-31 に開示されている。NCBI Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul et al. J. Mol. Biol. (1990) 215: 403-10) は、NCBIなどでアクセス可能であり、インターネット上で blastp、blastm、blastx、tblastn 及び tblastx のような配列分析プログラムと連動して利用することができる。BLASTは、www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/でアクセス可能である。このプログラムを用いた配列相同性比較方法は、www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast_help.htmlで確認することができる。

30

40

【0060】

本発明の一具現例によれば、本発明の抗体は、配列表の第15配列又は第16配列のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を含む。

50

【 0 0 6 1 】

本発明の一具現例によれば、本発明の抗体は、配列表の第 1 7 配列又は第 1 8 配列のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含む。

【 0 0 6 2 】

本発明の抗体は、モノクローナル抗体、多特異的抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、単鎖 F v s (s c F V)、単鎖抗体、F a b 断片、F (a b ') 断片、ジスルフィド結合 F v s (s d F V)、及び抗イディオタイプ (抗 I d) 抗体、そして、前記抗体のエピトープ結合断片などを含むが、これらに限定されるものではない。

【 0 0 6 3 】

本発明によれば、本発明の抗体は、様々な形態の抗体として製造され得る。例えば、下記の実施例に記載されるように、本発明の抗体は、F a b 抗体として製造され得、また、F a b 抗体に得た軽鎖及び重鎖可変領域を用いてヒト由来の不変領域と組み換えることによって完全な (w h o l e) 形態の抗体を提供することもできる。

10

【 0 0 6 4 】

本発明の一具現例によれば、本発明の抗体はモノクローナル抗体である。「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に同じ抗体集団から取得した単一分子組成の抗体分子を意味し、モノクローナル抗体は、特定のエピトープに対して単一結合特異性及び親和度を示す。

【 0 0 6 5 】

本発明の抗体は、腫瘍特異抗原として知られた T M 4 S F 5 タンパク質に結合してその活性を減少 / 抑制 / 除去させることによって癌を治療することができる。

20

【 0 0 6 6 】

核酸分子及び組換えベクター

【 0 0 6 7 】

本発明の他の態様によれば、本発明は、前記抗体又はその抗原結合断片の重鎖可変領域をコードする核酸分子を提供する。

【 0 0 6 8 】

本発明の更に他の態様によれば、本発明は、前記 T M 4 S F 5 に対する抗体又はその抗原結合断片の軽鎖可変領域をコードする核酸分子を提供する。

【 0 0 6 9 】

本明細書で使用される用語、「核酸分子」は、DNA (g DNA 及び c DNA)、そして、RNA 分子を包括的に含む意味を有し、核酸分子において基本構成単位であるヌクレオチドは、自然のヌクレオチドだけでなく、糖又は塩基部位が変形された類似体 (a n a l o g u e) も含む (S c h e i t , N u c l e o t i d e A n a l o g s , J o h n W i l e y , N e w Y o r k (1 9 8 0) ; U h l m a n 及び P e y m a n , C h e m i c a l R e v i e w s , (1 9 9 0) 9 0 : 5 4 3 - 5 8 4)。本発明の重鎖及び軽鎖可変領域をコードする核酸分子の配列は変形可能である。前記変形は、ヌクレオチドの追加、欠失、又は非保存的置換又は保存的置換を含む。

30

【 0 0 7 0 】

本発明の一具現例によれば、前記重鎖可変領域をコードする核酸分子は、配列表の第 1 9 配列又は第 2 0 配列のヌクレオチドを含み、前記軽鎖可変領域をコードする核酸分子は、配列表の第 2 1 配列又は第 2 2 配列のヌクレオチドを含む。

40

【 0 0 7 1 】

本発明の核酸分子は、前記のヌクレオチド配列に対して実質的な同一性を示すヌクレオチド配列も含むものと解釈される。前記の実質的な同一性は、前記の本発明のヌクレオチド配列と任意の他の配列とを最大限対応するようにアラインし、当業界で通常用いられるアルゴリズムを用いてアラインされた配列を分析した場合に、少なくとも 8 0 % の相同性、一つの特例では、少なくとも 9 0 % の相同性、他の特例では、少なくとも 9 5 % の相同性を示すヌクレオチド配列を意味する。

【 0 0 7 2 】

50

本発明の更に他の態様によれば、本発明は、(a)本発明の重鎖可変領域をコードする核酸分子；及び(b)本発明の軽鎖可変領域をコードする核酸分子を含む組換えベクターを提供する。

【0073】

本明細書で使用される用語、「ベクター」は、宿主細胞で目的遺伝子を発現させるための手段であって、プラスミドベクター；コスミドベクター；そして、バクテリオファージベクター、アデノウイルスベクター、レトロウイルスベクター、及びアデノ関連ウイルスベクターのようなウイルスベクターなどを含む。

【0074】

本発明の一具現例によれば、本発明のベクターにおいて軽鎖可変領域をコードする核酸分子及び重鎖可変領域をコードする核酸分子は、プロモーターと作動的に結合(operatively linked)されている。

10

【0075】

本明細書で使用される用語、「作動的に結合された」は、核酸発現調節配列(例：プロモーター、シグナル配列、又は転写調節因子結合位置のアレイ)と他の核酸配列との間の機能的な結合を意味し、これによって、前記調節配列は、前記他の核酸配列の転写及び/又は解読を調節するようになる。

【0076】

本発明の好ましい具現例によれば、本発明の組換えベクターは、(a)配列表の第25配列の重鎖可変領域をコードする核酸分子；及び(b)配列表の第26配列の軽鎖可変領域をコードする核酸分子を含む。

20

【0077】

本発明の組換えベクターシステムは、当業界で公知の様々な方法により構築することができ、これについての具体的な方法は、Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001)に開示されており、この文献は、本明細書に参照として組み込まれる。

【0078】

本発明のベクターは、典型的にクローニングのためのベクター又は発現のためのベクターとして構築され得る。また、本発明のベクターは、原核細胞又は真核細胞を宿主として構築され得る。例えば、本発明のベクターが発現ベクターであり、原核細胞を宿主とする場合には、転写を進行させることができる強力なプロモーター(例えば、tacプロモーター、lacプロモーター、lacUV5プロモーター、lppプロモーター、pLプロモーター、pRプロモーター、rac5プロモーター、ampプロモーター、recAプロモーター、SP6プロモーター、trpプロモーター及びT7プロモーターなど)、解読の開始のためのリボソーム結合部位及び転写/解読終結配列を含むことが一般的である。宿主細胞として、E. coli(例えば、HB101、BL21、DH5など)が用いられる場合、E. coliトリプトファン合成経路のプロモーター及びオペレーター部位(Yanofsky, C. J. Bacteriol. 158:1018-1024(1984))、そして、ファージの左向きプロモーター(pLプロモーター、Herskowitz, I. and Hagen, D. Ann. Rev. Genet. 14:399-445(1980))が調節部位として用いられ得る。宿主細胞としてパチルス菌が用いられる場合、パチルス・チューリンゲンシスの毒素タンパク質遺伝子のプロモーター(Appl. Environ. Microbiol. 64:3932-3938(1998); Mol. Gen. Genet. 250:734-741(1996))、又はパチルス菌で発現可能ないかなるプロモーターでも調節部位として用いられ得る。

30

40

【0079】

一方、本発明の組換えベクターは、当業界でたびたび使用されるプラスミド(例：pCL、pSC101、pGV1106、pACYC177、ColE1、pKT230、pME290、pBR322、pUC8/9、pUC6、pBD9、pHC79、pIJ6

50

1、pLAFR1、pHV14、pGEXシリーズ、pETシリーズ及びpUC19など)、ファージ(例:gt4・B、-Charon、z1及びM13など)又はウイルス(例:SV40など)を操作して作製することができる。

【0080】

一方、本発明のベクターが発現ベクターであり、真核細胞を宿主とする場合には、哺乳動物細胞のゲノム由来のプロモーター(例:メタロチオネインプロモーター、-アクチンプロモーター、ヒトヘモグロビンプロモーター及びヒト筋肉クレアチンプロモーター)又は哺乳動物ウイルス由来のプロモーター(例:アデノウイルス後期プロモーター、ワクシニアウイルス7.5Kプロモーター、SV40プロモーター、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーター、HSVのtkプロモーター、マウス乳房腫瘍ウイルス(MMTV)プロモーター、HIVのLTRプロモーター、モロニーウイルスのプロモーター、エプスタイン・バーウイルス(EBV)のプロモーター及びラウス肉腫ウイルス(RSV)のプロモーター)が用いられ得、転写終結配列としてポリアデニル化配列を一般的に有する。

10

【0081】

本発明の組換えベクターは、それから発現される抗体の精製を容易にするために、他の配列と融合されてもよい。融合される配列は、例えば、グルタチオンS-トランスフェラーゼ(Pharmacia, USA); マルトース結合タンパク質(NEB, USA); FLAG(IBI, USA); 6x His(hexahistidine; QuiaGen, USA)、Pre-S1、c-Mycのようなタグ配列; OmpA、PelBのような先導配列などがある。また、本発明のベクターによって発現されるタンパク質が抗体であるため、精製のための追加的な配列がなくても、発現された抗体はタンパク質Aカラムなどにより容易に精製することができる。

20

【0082】

一方、本発明の組換えベクターは、選択標識として、当業界で通常用いられる抗生剤耐性遺伝子を含み、例えば、アンピシリン、ゲンタマイシン、カルベニシリン、クロラムフェニコール、ストレプトマイシン、カナマイシン、ジェネテシン、ネオマイシン及びテトラサイクリンに対する耐性遺伝子がある。

【0083】

本発明の抗体を発現するベクターは、軽鎖と重鎖が一つのベクターで同時に発現されるベクターシステム、又は軽鎖と重鎖をそれぞれ別途のベクターで発現させるシステムがいずれも可能である。後者の場合、2つのベクターは、同時形質転換(cotransformation)及び標的形質転換(targeted transformation)により宿主細胞に導入される。同時形質転換は、軽鎖及び重鎖をコードするそれぞれのベクターDNAを同時に宿主細胞に導入した後、軽鎖及び重鎖の両方を発現する細胞を選別する方法である。標的形質転換は、軽鎖(又は重鎖)を含むベクターで形質転換された細胞を選別し、軽鎖を発現する選別された細胞を重鎖(又は軽鎖)を含むベクターで再び形質転換して、軽鎖及び重鎖の両方を発現する細胞を最終的に選別する方法である。下記の実施例では、軽鎖(VL及びCL)と重鎖(VH及びCH1)が1つのベクターで同時に発現されるベクターシステムを用いて抗体を製造した。

30

40

【0084】

形質転換体

【0085】

本発明の更に他の態様によれば、本発明は、本発明の組換えベクターで形質転換された宿主細胞を提供する。

【0086】

本発明のベクターを安定かつ連続してクローニング及び発現させることができる宿主細胞は、当業界で公知のいかなる宿主細胞も利用可能であり、例えば、エシェリキアコリ(Escherichia coli)、バチルス・スプテリス及びバチルス・チューリンゲンシスのようなバチルス属菌株、ストレプトミセス(Streptomyces)、シ

50

ユードモナス (*Pseudomonas*) (例えば、シュードモナスプチダ (*Pseudomonas putida*))、プロテウス・ミラビリス (*Proteus mirabilis*) 又はスタフィロコッカス (*Staphylococcus*) (例えば、スタフィロコッカス・カルノーサス (*Staphylococcus carnosus*)) のような原核宿主細胞を含むが、これに制限されるものではない。

【0087】

前記ベクターの適した真核細胞宿主細胞は、アスペルギルス属 (*Aspergillus species*) のような真菌、ピキアパストリス (*Pichia pastoris*)、サッカロミセスセレビスシアエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、シゾサッカロミセス (*Schizosaccharomyces*) 及びニューロスポラ・クラッサ (*Neurospora crassa*) のような酵母、その他の下等真核細胞、昆虫由来の細胞のような高等真核生物の細胞、そして、植物又は哺乳動物由来の細胞を用いることができる。

10

【0088】

本明細書において、宿主細胞への「形質転換」及び/又は「形質感染」は、核酸を有機体、細胞、組織又は器官に導入するいかなる方法も含まれ、当分野で公知なように、宿主細胞に応じて適した標準技術を選択して行うことができる。このような方法には、電気穿孔法 (*electroporation*)、原形質融合、リン酸カルシウム (CaPO_4) 沈殿、塩化カルシウム (CaCl_2) 沈殿、シリコンカーバイド繊維を用いた攪拌、アグロバクテリア媒介された形質転換、PEG、デキストランサルフェート、リポフェクタ

20

【0089】

抗TM4SF5抗体の変異体又はその抗原結合断片の製造方法

【0090】

本発明の更に他の態様によれば、本発明は、(a) 本発明の組換えベクターで形質転換された宿主細胞を培養するステップ；及び (b) 前記宿主細胞で抗TM4SF5抗体又はその抗原結合断片を発現させるステップを含む抗TM4SF5抗体又はその抗原結合断片の製造方法を提供する。

【0091】

前記抗体の製造において、形質転換された宿主細胞の培養は、当業界において周知の適当な培地及び培養条件によって行われ得る。このような培養過程は、当業者であれば、選択される菌株に応じて容易に調整して用いることができる。このような様々な培養方法は、様々な文献 (例えば、James M. Lee, *Biochemical Engineering, Prentice-Hall International Editions*, 138-176) に開示されている。細胞の培養は、細胞の成長方式によって懸濁培養と付着培養、培養方法によって回分式、流加式及び連続培養式の方法に区分される。培養に使用される培地は、特定の菌株の要求条件を適切に満足させなければならない。

30

【0092】

動物細胞の培養において、前記培地は、様々な炭素源、窒素源及び微量元素成分を含む。使用可能な炭素源の例は、ブドウ糖、蔗糖、乳糖、果糖、マルトース、澱粉及びセルロースのような炭水化物、大豆油、ひまわり油、ヒマシ油及びココナッツ油のような脂肪、パルミチン酸、ステアリン酸及びリノール酸のような脂肪酸、グリセロール及びエタノールのようなアルコール、そして、酢酸のような有機酸を含む。これらの炭素源は、単独又は組み合わせて使用することができる。使用可能な窒素源の例は、ペプトン、酵母抽出物、肉汁、麦芽抽出物、トウモロコシ浸漬液 (CSL) 及び大豆麦のような有機窒素源、及びヨウ素、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム、炭酸アンモニウム及び硝酸アンモニウムのような無機窒素源を含む。これらの窒素源は、単独又は組み合わせて使用することができる。前記培地には、リン源として、リン酸二水素カリウム、リン酸水素二カリウム及び対応するナトリウム含有塩が含まれ得る。また、硫酸マグネシウム又は硫酸鉄のような金属塩を含むことができる。その他に、アミノ酸、ビタミン、及び

40

50

適切な前駆体などが含まれ得る。

【0093】

培養中に水酸化アンモニウム、水酸化カリウム、アンモニア、リン酸及び硫酸のような化合物を培養物に適切な方式で添加して、培養物のpHを調整することができる。また、培養中には、脂肪酸ポリグリコールエステルのような消泡剤を使用して気泡の生成を抑制することができる。また、培養物の好気状態を維持するために、培養物内に酸素又は酸素含有気体（例えば、空気）を注入する。培養物の温度は、通常、20 ~ 45、好ましくは25 ~ 40である。

【0094】

形質転換された宿主細胞を培養して取得した抗体は、精製していない状態で使用することができ、追加で様々な通常の方法、例えば、透析、塩沈澱及びクロマトグラフィーなどを用いて高純度に精製して使用することができる。その中でも、クロマトグラフィーを用いる方法が最も多く使用され、カラムの種類及び順序は、抗体の特性、培養方法などに応じて、イオン交換クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーなどから選択することができる。

10

【0095】

癌の予防又は治療用薬学的組成物

【0096】

本発明の更に他の態様によれば、本発明は、(a)本発明のTM4SF5に対する抗体又はその抗原結合断片の薬学的有効量；及び(b)薬学的に許容される担体を含む癌の予防又は治療用薬学的組成物を提供する。

20

【0097】

前記抗体は、TM4SF5に高い親和度で結合して、TM4SF5を発現する癌の成長、浸潤及び転移を抑制することができるので、抗体単独又は通常薬学的に許容される担体と共に癌の予防及び治療に使用可能である。

【0098】

本明細書で使用される用語、「予防」は、本発明の組成物の投与で癌を抑制させたり、進行を遅延させたりするあらゆる行為を意味し、「治療」は、癌の増殖の抑制、癌の軽減又は癌の除去を意味する。

【0099】

本発明の一具現例によれば、本発明の組成物に適用される疾患である癌は、TM4SF5を発現する癌であり、このような癌の例としては、肝癌、大腸癌、膵臓癌、肺癌、胃癌、直腸癌、軟部組織肉腫(soft-tissue sarcoma)、結腸癌、十二指腸乳頭部上皮癌(carcinoma of the papilla vateri)、非内分泌肺腫瘍(nonendocrine lung tumor)及び気管支類癌腫(bronchial carcinoid tumor)などを挙げることができる。

30

【0100】

本発明の薬学的組成物に含まれる薬学的に許容される担体は、製剤時に通常用いられるものであって、ラクトース、デキストロース、スクロース、ソルビトール、マンニトール、澱粉、アカシアゴム、リン酸カルシウム、アルギン酸塩、ゼラチン、ケイ酸カルシウム、微結晶性セルロース、ポリビニルピロリドン、セルロース、水、シロップ、メチルセルロース、メチルヒドロキシベンゾエート、プロピルヒドロキシベンゾエート、タルク、ステアリン酸マグネシウム及びミネラルオイルなどを含むが、これに限定されるものではない。本発明の薬学的組成物は、前記成分以外に潤滑剤、湿潤剤、甘味剤、香味剤、乳化剤、懸濁剤、保存剤などをさらに含むことができる。適した薬学的に許容される担体及び製剤は、Remington's Pharmaceutical Sciences (19th ed., 1995)に詳細に記載されている。

40

【0101】

本発明の薬学的組成物は、経口又は非経口で投与することができ、非経口投与の場合に

50

は、静脈内注入、皮下注入、筋肉注入、腹腔注入、内皮投与、局所投与、鼻内投与、肺内投与及び直腸内投与などで投与することができる。経口投与時に、タンパク質又はペプチドは消化されるため、経口用組成物は、活性薬剤をコーティングしたり、胃での分解から保護されるように剤形化したりしなければならない。また、薬学的組成物は、活性物質が標的細胞に移動できる任意の装置によって投与され得る。

【0102】

本発明の薬学的組成物の適切な投与量は、製剤化方法、投与方式、患者の年齢、体重、性別、病的状態、食物、投与時間、投与経路、排泄速度、及び反応感応性のような要因によって多様であり、通常の熟練した医師は、所望の治療又は予防に効果的な投与量を容易に決定及び処方することができる。本発明の一具現例によれば、本発明の薬学的組成物の1日投与量は、0.0001～100mg/kgである。本明細書において用語、「薬学的有効量」は、癌を予防又は治療するのに十分な量を意味する。

10

【0103】

本発明の薬学的組成物は、当該発明の属する技術分野における通常の知識を有する者が容易に実施できる方法によって、薬学的に許容される担体及び/又は賦形剤を用いて製剤化することによって、単位用量形態で製造されるか、又は多用量容器内に入れて製造されてもよい。このとき、剤形は、オイル又は水性媒質中の溶液、懸濁液又は乳化液の形態であるか、又はエキス剤、散剤、坐剤、粉末剤、顆粒剤、錠剤又はカプセル剤の形態であってもよく、分散剤又は安定化剤をさらに含むことができる。

【0104】

本発明の組成物は、個別治療剤として投与するか、又は他の治療剤と併用して投与することができる。従来剤とは順次又は同時に投与することができる。

20

【0105】

抗体は、抗体-治療剤結合体の形態で生体内に投入して癌の治療に用いることができる。治療剤は、化学治療剤、放射性核種、免疫治療剤、サイトカイン、ケモカイン、毒素、生物作用剤及び酵素阻害物質などを含む。本発明の抗体又はその断片とカップリングさせるのに好ましい機能性分子は、化学物質、サイトカイン又はケモカインである。前記化学物質は抗癌剤であり、例えば、アシピシン、アクラルピシン、アコダゾール、アクロナイシン、アドゼレシン、アラノシン、アルデスロイキン、アロプリノールナトリウム、アルトレタミン、アミノグルテチミド、アモナファイド、アンプリジェン、アムサクリン、アンドロゲン、アングイジン、アフィジコリングリシネート、アサレイ、アスパラギナーゼ、5-アザシチジン、アザチオプリン、パチルス・カルメット-ゲラン(BCG)、ペカーズアンチフォル、2-デオキシチオグアノシン、ビスアントレンHC1、プレオマイシンサルフェート、プスルファン、プチオニンスルホキシミン、BWA773U82、BW502U83/HC1、BW7U85メシレート、セラセמיד、カルベチマー、カルボプラチン、カルムスチン、クロラムブシル、クロロキノキサリンスルホンアミド、クロロゾトシン、クロモマイシンA3、シスプラチン、クラドリピン、コルチコステロイド、コリネバクテリウムバルブム、CPT-11、クリスナトール、シクロシチジン、シクロホスファミド、シタラピン、シテムベナ、ダビスマレアート、ダカルバジン、ダクチノマイシン、ダウノルピシンHC1、デアザウリジン、デクスラゾキサソ、ジアンヒドロガラクトール、ジアジクオン、ジプロモズルシトール、ジデムニンB、ジエチルジチオカルバメート、ジグリコアルデヒド、ジヒドロ-5-アザシチジン、ドキシソルピシン、エチノマイシン、エダトレキセート、エデルフォシン、エフロルニチン、エリオット溶液、エルサミトルシン、エピルピシン、エソルピシン、リン酸エストラムスチン、エストロゲン、エタニダゾール、エチオホス、エトボシド、ファドラゾール、ファザラピン、フェンレチニド、フィルグラスチム、フィナスチリド、フラボン酢酸、フロクスウリジン、リン酸フルダラピン、5'-フルオロウラシル、FluosolTM、フルタミド、硝酸ガリウム、ゲムシタピン、酢酸ゴセレリン、ヘプスルファミン、ヘキサメチレンビスアセトアミド、ホモハリントニン、硫酸ヒドラジン、4-ヒドロキシアンドロステンジオン、ヒドロキシウレア、イダルピシンHC1、イホスファミド、4-イボメアノール、イプロブ

30

40

50

ラチン、イソトレチノイン、ロイコボリンカルシウム、酢酸リユープロリド、レバミソール、リポソームダウノルピシン、リポソーム捕集ドキシソルピシン、ロムスチン、ロニダミン、メイタンシン、塩酸メクロレタミン、メルファラン、メノガリル、メルパロン、6-メルカプトプリン、メスナ、パチルス・カルメット-ゲランのメタノール抽出物、メトトレキサート、N-メチルホルムアミド、ミフェプリストン、ミトグアゾン、マイトマイシンC、ミトタン、塩酸ミトキサントロン、モノサイト/マクロファージコロニー刺激因子、ナビロン、ナフォキシジン、ネオカルチノスタチン、酢酸オクトレオチド、オルマプラチン、オキサリプラチン、パクリタキセル、パラ、ペントスタチン、ピペラジンジオン、ピポプロマン、ピラルピシン、ピリトレキシム、塩酸ピロキサントロン、P I X Y - 3 2 1、プリカマイシン、ポルフィマーナトリウム、ブレドニムスチン、プロカルバジン、プロゲスチン、ピラゾフリン、ラゾキサソ、サルグラモスチム、セムスチン、スピロゲルマニウム、スピロムスチン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、スロフェヌール、スラミンナトリウム、タモキシフェン、タキソテール、テガフル、テニボシド、テレフタルアミジン、テロキシロン、チオグアニン、チオテパ、チミジンインジェクション、チアゾフリン、トポテカン、トレミフェン、トレチノイン、塩酸トリフルオペラジン、トリフルリジン、トリメトレキサート、TNF (tumor necrosis factor)、ウラシルマスタード、硫酸ピンブラスチン、硫酸ピンクリスチン、ビンデシン、ビノレルピン、ピンゾリジン、Y o s h i 8 6 4、ゾルピシン、シトシンアラビノシド、エトボシド、メルファラン、タキソテール、タキソール、及びこれらの混合物であるが、これに限定されない。

10

20

【0106】

癌診断用組成物

【0107】

本発明の更に他の態様によれば、本発明は、前記本発明の抗体又はその抗原結合断片を含む癌診断用キットを提供する。

【0108】

本発明の抗体は、生物学的試料に適用されて癌の発症の有無を診断することができる。

【0109】

本明細書で使用される用語、「生物学的試料」とは、組織、細胞、全血、血清、血漿、組織剖検試料(脳、皮膚、リンパ節、脊髄など)、細胞培養上澄液、破裂した真核細胞及び細菌発現系などを挙げるができるが、これに制限されるものではない。これらの生物学的試料を操作した、又は操作していない状態で、本発明の抗体と反応させて癌の発症の有無を確認することができる。

30

【0110】

前記の抗原-抗体複合体の形成は、比色法 (colorimetric method)、電気化学法 (electrochemical method)、蛍光法 (fluorimetric method)、発光法 (luminometry)、粒子計数法 (particle counting method)、肉眼測定法 (visual assessment) 又は閃光計数法 (scintillation counting method) により検出することができる。本明細書上の「検出」は、抗原-抗体複合体を検出するためのものであって、様々な標識体を使用して行うことができる。標識体の具体例としては、酵素、蛍光物、リガンド、発光物、微小粒子又は放射性同位元素を含む。

40

【0111】

検出標識体として使用される酵素としては、アセチルコリンエステラーゼ、アルカリホスファターゼ、D-ガラクトシダーゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ及びラクタマーゼなどを含み、蛍光物としては、フルオレセイン、Eu³⁺、Eu³⁺キレート又はクリプタートなどを含み、リガンドとしては、ビオチン誘導体などを含み、発光物としては、アクリジニウムエステル及びイソルミノール誘導体などを含み、微小粒子としては、金コロイド及び着色されたラテックスなどを含み、放射性同位元素としては、5

50

7 C o、3 H、1 2 5 I 及び 1 2 5 I - ボルトン (B o l t o n) ハンター (H u n t e r) 試薬などを含む。

【 0 1 1 2 】

本発明の一具現例によれば、抗原 - 抗体複合体を酵素免疫吸着法 (E L I S A) を用いて検出することができる。酵素免疫吸着法には、固体支持体に付着した抗原を認知する標識された抗体を用いる直接 E L I S A、固体支持体に付着した抗原を認知する抗体の複合体において捕獲抗体を認知する標識された 2 次抗体を用いる間接 E L I S A、固体支持体に付着した抗体と抗原の複合体において抗原を認知する標識された別の抗体を用いる直接的サンドイッチ E L I S A、固体支持体に付着した抗体と抗原の複合体において抗原を認知する別の抗体と反応させた後、この抗体を認知する標識された 2 次抗体を用いる間接的

10

【 発明の 効果 】

【 0 1 1 3 】

本発明を通じて分かるように、環状ペプチドワクチンの免疫化及び T M 4 S F 5 - 特異的な抗体で注射は、マウスモデルにおいて大腸癌に対する抗転移効果を有し、また、そのヒト化された抗体は、患者の治療のための適用のための開始プラットフォームとして使用することができる。

【 図面の簡単な説明 】

20

【 0 1 1 4 】

【 図 1 】 T M 4 S F 5 環状ペプチドワクチンで免疫化されたマウスから抗体の誘導を示す。(A) T M 4 S F 5 ターゲット部位の配列。(B) 本発明に使用されたペプチドの配列。h T M 4 S F 5 E C 2 - C 及び m T M 4 S F 5 E C 2 - C は、ジスルフィド結合で連結された h T M 4 S F 5 E C 2 及び m T M 4 S F 5 E C 2 の環状ペプチドを示す。(C) B A L B / c マウスに 1 0 日間隔で 3 回、P B S 又は h T M 4 S F 5 E C 2 - C ペプチド及び L i p o p l e x (O) 複合体を注射した (n = 5 / グループ)。血清内の抗体のタイター及び反応性は、記載されたペプチドを使用して E L I S A で測定した。(D) h T M 4 S F 5 E C 2 - C ペプチドに対して反応する抗体のアイソタイプをアイソタイピングのために E L I S A で究明した。

30

【 図 2 】 異型移植の大腸癌モデルにおける T M 4 S F 5 環状ペプチドワクチンで免疫化による肺転移の阻害を示す。B A L B / c マウスに 1 0 日間隔で 3 回、P B S、L i p o p l e x (O)、h T M 4 S F 5 E C 2 - C ペプチド及び D O P E : C H E M S 内のカプセル化された C p G - D N A (L i p o p l e x (O)) 複合体を注射した ((P B S 対照群 n = 8、大腸癌細胞群 n = 1 5)。転移モデルは、処理された B A L B / c マウスに C T - 2 6 細胞を移植して確立し、マウスの体重及び生存率を調査した。(A) 実験スケジュール。(B) 体重は、C T - 2 6 細胞の移植後、2 0 日間、2 日ごとに測定した。(C) C T - 2 6 細胞の移植後、免疫化されたマウスの生存を示す。(D) 5 2 日に調査された肺の巨視的外観を示す。(E) 5 2 日にマウスの肺重量を示す。* P < 0 . 0 5 であった。(F) 肺組織の組織学的調査を示す。スケールバー、1 0 0 μ m。

40

【 図 3 】 異型移植の大腸癌モデルにおける T M 4 S F 5 環状ペプチドワクチンで免疫化による肺結節の数の減少を示す：B A L B / c マウスに 1 0 日間隔で 3 回、P B S 又は h T M 4 S F 5 E C 2 - C ペプチド及び L i p o p l e x (O) 複合体を注射した (n = 8 / グループ)。転移モデルは、処理された B A L B / c マウスに C T - 2 6 細胞を移植して確立し、腫瘍の成長を 4 6 又は 5 0 日間モニタリングした。(A) 実験スケジュールを示す。(B) 4 6 日 (C T - 2 6 群) 及び 5 0 日 (P B S 対照群、L i p o p l e x (O) + h T M 4 S F 5 E C 2 - C ペプチド / C T - 2 6 群 (n = 4 / 各群) に調査された肺の巨視的外観及び肺重量を示す。(C) 4 6 日 (C T - 2 6 群) 及び 5 0 日 (P B S 対照群、L i p o p l e x (O) + h T M 4 S F 5 E C 2 - C ペプチド / C T - 2 6 群 (n = 4 / 各群) に肺結節の数を示す。* * P < 0 . 0 1 であった。

50

【図4】TM4SF5環状ペプチドを認知するanti-TM4SF5モノクローナル抗体を産生するHAT培地でハイブリドーマクローンのスクリーニングを示す。(A)3つのBALB/cマウスを10日間隔で4回、DOPE:CHEMS複合体に同時にカプセル化されたhTM4SF5EC2-Cペプチド及びMB-ODN 4531(O)でi.p.(腹腔)に免疫化し、その血清を集めて全体IgGをELISAキットを使用してアッセイした。(B、C)hTM4SF5EC2-Cペプチドで免疫化されたマウスの脾臓細胞を使用したHAT培地で細胞-融合実験の初期スクリーニング由来のELISA結果を示す。(D)HEK 293F-EV(empty vector)及びHEK 293F-TM4SF5細胞のタンパク質をSDS-PAGEで分離して、ハイブリドーマクローン(Bの1H1クローン)培養上澄液、anti-Myc抗体を使用したウエスタン

10

ブロットで分析した。
【図5】TM4SF5環状ペプチドを認知するanti-TM4SF5モノクローナル抗体を産生するHT培地でハイブリドーマクローンのスクリーニングを示す。(A、B)図5由来のハイブリドーマクローンをモノクローナル抗体の産生のために選択し、リミッティング希釈法を用いてサブクローニングを行った。(C)環状ペプチドhTM4SF5EC2-Cに対するハイブリドーマクローン培養上澄液をELISAを使用して分析した。(D)HEK 293F-EV(empty vector)及びHEK 293F-TM4SF5細胞のタンパク質をSDS-PAGEで分離して、ハイブリドーマクローン培養上澄液を使用したウエスタンブロットで分析した。

【図6】TM4SF5環状ペプチドを認知するマウスanti-TM4SF5モノクローナル抗体の精製及び特性を示す。(A)図5由来のハイブリドーマクローン(2A10 clone)をi.p.腔に注射してBALB/cマウスで腹水を産生した。Anti-TM4SF5モノクローナル抗体をprotein-A agaroseカラムクロマトグラフィーを使用して精製し、その精製された抗体をSDS-PAGE及びクマシー・ブルー(Coomassie blue)染色で同定した。(B)適正曲線を精製されたモノクローナル抗体を使用して得てアイソタイプを決定した。(C)ELISAを使用した環状ペプチドhTM4SF5EC2-Cに対するモノクローナル抗体の結合親和度の決定を示す。(D)Reichert Analytical Instruments SPR 7500DC(Reichert)を使用した環状ペプチドhTM4SF5EC2-Cに対するモノクローナル抗体の結合親和度の決定を示す。ビオチン化されたペプチド

20

30

をストレプトアビジン(streptavidin)チップに固定化し、抗体の量を増加させた。結合反応のキネティック(Kinetic)パラメータをセンサーグラム(sensorgrams)下で示す。(E)HEK 293F-EV(empty vector)及びHEK 293F-TM4SF5細胞のタンパク質をSDS-PAGEで分離して、anti-TM4SF5モノクローナル抗体(mEC2-C)、anti-Myc抗体又はanti-actin抗体を使用したウエスタンブロットで分析した。HEK 293F-EV及びHEK 293F-TM4SF5細胞のタンパク質をmEC2-Cで免疫沈殿し、anti-Myc抗体を使用したウエスタンブロットで分析した。これらの結果は、少なくとも3回の独立した実験の代表値である。

40

【図7】異種移植マウスモデルにおける大腸癌の成長に対するanti-TM4SF5モノクローナル抗体の治療効果を示す。マウス腫瘍モデルを、HT-29細胞をBALB/cAnNCri-nu/nuマウスに移植して確立した。PBS又はanti-TM4SF5モノクローナル抗体を、腫瘍サイズが直径5mmに到達するときにマウスに注射し、その腫瘍の成長を31日間モニタリングした(各n=6)。(A)は実験スケジュールである。(B)は大腸癌組織の巨視的外観である。(C)は腫瘍体積(width x length/2)である。(D)は腫瘍重量である。(E)は体重である。

【図8】ハイブリドーマ細胞クローンから分離された重鎖及び軽鎖の可変領域のcDNA配列を示す。(A)は重鎖可変ドメインの配列である。(B)は軽鎖可変ドメインの配列である。予測されたアミノ酸配列をcDNA配列の下段に表示する。

【図9】ヒト化抗体の構築のための配列分析及び本発明のヒト化抗体であるhEC2-C

50

- 1、hEC2-C-2、野生型マウス由来の抗体であるmEC2-C、ヒト化抗体の構築に使用されたヒトVH3-Vk1 subtype骨格を有するハーセプチン(Herceptin)抗体のアミノ酸配列を可変重鎖と可変軽鎖とに分けて一直線に整列した図である。大括弧〔 〕は、それぞれのCDR区域を示し、下線は、バーニヤゾーンに該当するアミノ酸を示し、アスタリスク(*)は、親和度の維持のためにマウスmEC2-C野生型抗体由来のアミノ酸に逆置換した部分を示す。このとき、CDR区域は、Kabatナンバリングに従って定義した。

【図10】CDR移植後、構造の変化を見るために、図9に示したmEC2-C、hEC2-C-1、hEC2-C-2抗体の可変部位(Fv)をそれぞれコンピュータモデリングしてPyMolソフトウェア内で重ね合わせた結果を正面から見た構造及び上から見た構造で示した図である。骨格部位(FR)は白黒で、各抗体のCDRは、図面内に表示された色と同じ色で表し、重鎖の各CDRはHC DR 1/2/3で、軽鎖の各CDRはLC DR 1/2/3で表した。

【図11】TM4SF5環状ペプチドを認知するヒト化されたanti-TM4SF5モノクローナル抗体の精製及び特性を示す。(A)ヒト化されたAnti-TM4SF5抗体をprotein-A agaroseカラムクロマトグラフィーを使用して精製し、その精製された抗体をSDS-PAGE及びクマシー・ブルー(Coomassie blue)染色で同定した。(B)ELISAを使用して環状ペプチドhTM4SF5EC2-Cに対するヒト化された抗体の結合親和度を分析した。(C)Reichert Analytical Instruments SPR 7500DC(Reichert)を使用して環状ペプチドhTM4SF5EC2-Cに対するヒト化抗体の結合親和度を分析した。(D)HEK 293F-EV及びHEK 293F-TM4SF5細胞のタンパク質をSDS-PAGEで分離して、anti-TM4SF5抗体(hEC2-C-2)又はanti-actin抗体を使用したウエスタンブロットで分析した。HEK 293F-EV及びHEK 293F-TM4SF5細胞のタンパク質破砕液をhEC2-C-2で免疫沈殿し、anti-Myc抗体を使用したウエスタンブロットで分析した。

【図12】大腸癌細胞の移動に対するヒト化されたanti-TM4SF5モノクローナル抗体の効果を示す。(A)移動アッセイ。スケールバー、100µm。(B)創傷治癒アッセイ。スケールバー、300µm。CT-26及びHCT-116細胞の移動特性をPBS、正常ヒトIgG、又はhEC2-C-2抗体で処理した後、比較した。これらの結果は、少なくとも3回の独立した実験の代表値である。*P<0.05、***P<0.001であった。

【図13】吸着(adhesion)分子の発現に対するヒト化されたanti-TM4SF5抗体の効果を示す。(A)CT-26及びHCT-116細胞をPBS、正常ヒトIgG、又はhEC2-C-2抗体で処理し、E-cadherin及びcateninの発現をanti-E-cadherin及びanti-catenin抗体を使用して共焦点顕微鏡法で分析した。スケールバー、20µm。(B)ウエスタンブロットで分析した。actin発現レベルをローディング対照群として使用した。E-cadherin及びcateninの発現をanti-E-cadherin及びanti-catenin抗体を使用して決定。バンド強度を測定し、定量的変化をグラフで示す。これらの結果は、少なくとも3回の独立した実験の代表値である。

【図14】異種移植マウスモデルにおいて、HCC腫瘍の成長に対する注射されたヒト化されたanti-TM4SF5モノクローナル抗体の治療効果を示す。マウス腫瘍モデルを、Huh-7細胞をBALB/cAnNCri-nu/nuマウスに移植して確立した。PBS又はヒト化されたanti-TM4SF5抗体を、腫瘍サイズが直径5mmに到達するときにマウスに注射し、その腫瘍の成長を44日間モニタリングした(各n=6)。(A)は実験スケジュールである。(B)はHCC腫瘍組織の巨視的外観である。(C)は腫瘍体積(width×length/2)である。(D)は腫瘍重量である。(E)は体重である。

10

20

30

40

50

【図15】異種移植マウスモデルにおいて、大腸癌の成長に対するヒト化された anti-TM4SF5モノクローナル抗体の治療効果を示す。マウス腫瘍モデルを、HT-29細胞をBALB/cAnNCri-nu/nuマウスに移植して確立した。PBS又はヒト化された anti-TM4SF5抗体を腫瘍サイズが直径5mmに到達するときにマウスに注射し、その腫瘍の成長を28日間モニタリングした(各n=6)。(A)は実験スケジュールである。(B)は大腸癌組織の巨視的外観である。(C)は腫瘍体積($width \times length / 2$)である。(D)は腫瘍重量である。(E)は体重である。

【図16】同種移植の大腸癌モデルにおいて、ヒト化された anti-TM4SF5モノクローナル抗体による肺転移の生存率を示す。CT-26細胞をBALB/cマウスに静脈内移植して注射。PBS、ヒトIgG又はhEC2-C-2をマウスに静脈内注射し、腫瘍の成長を22日間モニタリングした(PBS対照群n=8、癌細胞群の各n=12)。(A)は実験スケジュールである。(B)体重は、2日間隔で20日間測定した。(C)CT-26細胞の移植後、ヒト化された anti-TM4SF5抗体-注射されたマウスの生存を示す。

【図17】同種移植の大腸癌モデルにおいて、ヒト化された anti-TM4SF5モノクローナル抗体による肺転移の阻害を示す。CT-26細胞をBALB/cマウスに静脈内移植して注射。PBS、ヒトIgG又はhEC2-C-2をマウスに静脈内注射し、腫瘍の成長を19日後にモニタリングした(PBS対照群n=8、癌細胞群の各n=12)。(A)は実験スケジュールである。(B)19日に肺の形状を調査した。(C)19日目のマウスの肺重量である。* * P < 0.01であった。(D)肺組織の組織学的調査を示す。スケールバー：100X、100µm；400X、25µm。

【発明を実施するための形態】

【0115】

以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明する。これらの実施例は、単に本発明をより具体的に説明するためのものであって、本発明の趣旨によって本発明の範囲がこれらの実施例によって制限されないということは、当業界で通常の知識を有する者にとって自明である。

【0116】

実施例1：CpG-DNA及びhTM4SF5EC2の環状ペプチドの合成

【0117】

3つのCpGモチーフを有する20塩基で構成される天然CpG-DNA、MB-ODN 4531(O)(Kwon S, Kim D, Park BK, Cho S, Kim KD, Kim YE, Park CS, Ahn HJ, Seo JN, Choi KC, Kim DS, Lee Y, Kwon HJ. PLoS One. 2012; 7(3): e331214)は三千里製薬から提供される。MB-ODN 4531は、3つのCpGモチーフを有する20塩基で構成される：AGCAGCGTTCGTGTCGGCC T(配列番号23)。本発明者らは、ヒトTM4SF5の細胞外ドメイン2をミミックした環状ペプチド(hTM4SF5EC2-C、図1B)を考案して、ペプトロンから化学的に合成された環状ペプチド及び対照群ペプチドを購入した。

【0118】

実施例2：TM4SF5ターゲティングペプチドワクチンで環状ペプチド epitope及びCpG-DNAを同時にカプセル化したりポソーム複合体の製造

【0119】

リポソーム複合体は、DOPE：CHEMS(Lipoplex(O))と同時にカプセル化されたTM4SF5環状ペプチド(hTM4SF5EC2-C)及びCpG-DNAで構成され、Kwon S, Kim D, Park BK, Cho S, Kim KD, Kim YE, Park CS, Ahn HJ, Seo JN, Choi KC, Kim DS, Lee Y, Kwon HJ. PLoS One. 2012; 7(3): e331214に報告された通りに製造した。

【0120】

実施例 3 : 動物

【0121】

雌BALB/cマウス及びBALB/cAnNCri-nu/nuマウス(4週齢)をNara Biotech, Incから購入し、そのマウスを、無特異病原の条件下で20~25、32~37%の湿度で維持した。全ての動物実験の過程は、国立獣医科学検疫院の実験動物使用管理ガイドに従い、翰林大学の動物実験管理委員会の承認を受けて行った。本発明者らは、イソフルラン(isoflurane)吸入下でマウスを犠牲にし、苦しみを最小化するためのあらゆる努力を行った。

【0122】

実施例 4 : 抗原 - 特異的 Ig enzyme - linked immunosorbent assays (ELISA)

【0123】

各投与前及び最終投与10日後にマウスを犠牲にして血清を得た。全体IgGのタイトル及び量を確認するために、96ウェル免疫プレート(Nalgen Nunc International)を5µg/mlのhTM4SF5EC2-C環状ペプチドでコーティングし、1%BSAを含有する0.05%PBSTで2時間ブロックした。ブロッキング溶液を除去した後、培養上清液100µlを添加し、常温で2時間インキュベートした後、PBSTで洗浄し、HRP(horseradish peroxidase) - 結合された抗-IgG抗体のような検出抗体と共に2時間インキュベートした。TMB基質溶液で比色分析法を開発し、Spectra Max 250マイクロプレートリーダーを使用して450nmで吸光度を測定した。

【0124】

IgGアイソタイプを測定するために、96ウェル免疫プレートをhTM4SF5EC2-Cペプチドでコーティングし、血清と反応させた後、HRP-conjugated anti-mouse IgG(各アイソタイプ)抗体(BD Biosciences)で培養した。

【0125】

実施例 5 : 大腸癌の肺転移モデルにおける抗転移剤としてのTM4SF5ペプチドワクチンの評価

【0126】

CpG-DNAを含むDOPE:CHEMS(Lipoplex(O))と同時にカプセル化されたTM4SF5環状ペプチド(hTM4SF5EC2-C)で構成されるリポソーム複合体を、BALB/cマウスに10日間隔で3回免疫化した。対照群マウスをPBS又はLipoplex(O)で注射した。転移性癌の動物実験のために、マウスを1x10⁵細胞のCT-26マウス大腸癌細胞株(PBS対照群n=8、大腸癌細胞群n=15)を30日目に静脈内注射した。体重を2日間隔で測定した。CT-26細胞の注射後、22日目に、マウスを犠牲にし、肺重量を測定した。

【0127】

実施例 6 : 肺結節の調査

【0128】

BALB/cマウスを前記のように免疫化し、CT-26細胞に注射した。CT-26細胞の注射後、20日目に、マウスを犠牲にし、気管に20-gaugeカテーター(caterer)でカニューレを挿入し、1mlのIndia ink(Parker、PBSで1:16希釈)を肺に注射した。肺を抽出し、Fekete's溶液に浸して脱色した後、転移性結節をカウントした(Larive RM, Moriggi G, Nat Commun. 2014; 5:3881)。

【0129】

実施例 7 : TM4SF5に特異的なマウスモノクローナル抗体の産生

【0130】

ヒトTM4SF5(hTM4SF5)タンパク質のhTM4SF5EC2-C環状ペプ

10

20

30

40

50

チド(131TACAYLLNRTLWDRCEAPPRVVPWNCT157)は、ペプトロンで自動化されたペプチドシンセサイザー(Pepttron III-R24、Pepttron)により製造した。

【0131】

雌BALB/cマウスに10日間隔で4回、CpG-DNAを含むDOPE:CHEMS複合体と同時にカプセル化されたhTM4SF5EC2-C環状ペプチドを腹腔内投与した。免疫化された脾臓から脾臓細胞(Splenocytes)を得た後、標準ハイブリドーマ技術(Yokoyama WM, et al. Curr Protoc Immunol Chapter 2, Unit 2.5 (2006))に従って40%(w/v)ポリエチレングリコールの存在下で、HAT-sensitive SP2/0マウス骨髓種細胞と融合した。ハイブリドーマ細胞の培養上清液を、hTM4SF5EC2-C環状ペプチドに対する結合を確認するためにELISAでテストし、陽性ハイブリドーマ細胞をスクリーニングした。ELISA-陽性ハイブリドーマ細胞群をサブクロニングした後、腹水を生成させるためにBALB/cマウスの腹腔に注射した。タンパク質アカラムクロマトグラフィー(Amersham Pharmacia Biotech)を使用してanti-TM4SF5モノクローナル抗体(mEC2-C)を腹水液から精製した。

10

【0132】

実施例8: SPR(Surface plasmon resonance)分析

【0133】

hTM4SF5EC2-C環状ペプチドに結合するanti-hTM4SF5モノクローナル抗体(mEC2-C)及びヒト化されたanti-TM4SF5抗体(hEC2-C-2)の親和度を、Reichert SPRシステムを使用して25で測定した。ストレプトアビジンがコーティングされたセンサチップの各フローセルの表面でビオチン化ペプチドを捕獲(capture)した。ビオチンを陰性対照群として使用した。anti-hTM4SF5モノクローナル抗体(mEC2-C)及びヒト化されたanti-TM4SF5抗体を、30ml/分の流動速度で注入した。データは、Reichert SPR評価ソフトウェアを使用して評価した。

20

【0134】

実施例9: 細胞培養

30

【0135】

Huh7のようなヒトHCC細胞株、及びHT-29、及びHCT116のようなヒト大腸癌細胞株、及びマウス大腸癌細胞株CT-26は、韓国細胞株銀行から得た。CT-26細胞を、10%牛胎児血清(FBS; Hyclone)、2mMグルタミン、100U/mlペニシリン及び100µg/mlストレプトマイシンが含有されたDMEMで管理した。他の細胞株は、10%FBS、25mM HEPES、100U/mlペニシリン及び100µg/mlストレプトマイシンが含有されたRPMI 1640培地で管理した。全ての細胞を95%空気及び5%CO₂で37の温度で培養した。

【0136】

実施例10: 組換えヒトTM4SF5の発現

40

【0137】

ヒトTM4SF5cDNAをHuh-7 mRNAからRT-PCRを下記のプライマーセットを使用して増幅した: hTM4SF5 5' primer、5'-CTCGAGATGTGTACGGGAAAATGTGCC-3'; hTM4SF5 3' primer、5'-AAGCTTTTGTGAGGTGTGTCTCTGTTTTTT-3'。そのcDNA切片を、発現ベクターpcDNA-3.1/Myc-His(-)B(Invitrogen)にクローニングした。hTM4SF5を発現する安定した細胞株の生成のために、HEK 293F細胞(1x10⁶細胞/ml)を、2.5µg/mlのhTM4SF5/pcDNA及び7.5µg/mlのポリエチレンイミン(PEI、Polysciences)でトランスフェクションさせ、そのトランスフェクションされた

50

細胞を14日間、500 µg/mlのG418 (Calbiochem)を使用して収集した。Myc-tagged hTM4SF5の発現を、anti-Myc-tag抗体を使用したウエスタンブロット (Western blot) 分析により確認した。

【0138】

実施例11：ウエスタンブロット及び免疫沈殿法分析

【0139】

anti-TM4SF5モノクローナル抗体及びヒト化されたanti-TM4SF5抗体の特異性を分析するために、TM4SF5-過剰発現細胞破碎液をSDS-PAGE上で分離し、ウエスタンブロット及び免疫沈殿アッセイを、Kwon S、Kim D、Rhee JW、Park JA、Kim DW、Kim DS、Lee Y、Kwon HJ. BMC Biol. 2010; 8:23に記載された通りに行った。E-cadherin及び-cateninの発現を、ヒト化されたanti-TM4SF5抗体-処理された細胞で同定するために、細胞破碎液を、Kwon S、Choi KC、Kim YE、Ha YW、Kim D、Park BK、Wu G、Kim DS、Lee Y、Kwon HJ. Cancer Res. 2014; 74(14):3844-3856に記載された通りにSDS-PAGE及びウエスタンブロッティングにより分析した。

10

【0140】

実施例12：マウスanti-TM4SF5モノクローナル抗体に対する大腸癌マウス(異種移植)モデル

20

【0141】

12匹のBALB/cAnNCri-nu/nuマウスの背中の右側面に、50%マトリゲル(BD biosciences)を含有する5×10⁶のHT-29細胞を皮下注射した。腫瘍の直径が5mmに到達したとき、マウスをPBS、及びanti-TM4SF5モノクローナル抗体(mEC2-C)の2つの処理グループ(6匹のマウス/各グループ)に任意に分類した。抗体(25mg/kg)を週ごとに2回ずつ尾静脈に注射した。癌細胞の注入後、30日間、3日又は4日間隔で腫瘍の直径を測定し、腫瘍の体積を幅×長さ/2の式によって計算した。腫瘍サイズが±600mm³に到達したとき、BALB/cAnNCri-nu/nuマウスを犠牲にし、腫瘍の重量を測定した。

【0142】

実施例13：anti-TM4SF5モノクローナル抗体の可変重鎖及び軽鎖(Fab)のクローニング

30

【0143】

anti-TM4SF5モノクローナル抗体(mEC2-C)を産生するハイブリドーマ細胞を培養し、全体RNAをハイブリドーマ細胞から抽出し、cDNAを逆転写で合成した。anti-TM4SF5モノクローナル抗体のFab配列をクローニングするために、生成されたcDNAをVentポリメラーゼ(NEB)、及び次のプライマーを使用して増幅した。：重鎖primers、IGG3：GGAAGATCTAGGGACCAAGGGATAGACAGATGG、5' MH2：CTTCCGGAATTCSARGTNMAGCTGSAGSAGTCWGG；Kappa chain primers、3' Kc：GGTGCA TGCGGATACAGTTGGTGCAGCATC、5' Mk：GGGAGCTCGAYATTGTGMTSACMCARWCTMCA。標準PCR反応を25サイクル行った。PCR生産物を、pGEM-Tイーザーベクター(Promega)に直接ライゲーションした。クローニングされたマウスIg挿入物をDNA塩基配列分析法で分析した。

40

【0144】

実施例14：可変切片(Fv)の配列分析及び分子モデリング

【0145】

mEC2-Cの免疫グロブリン可変ドメイン配列は、IgBLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>)で分析した(Ye J

50

, Ma N, Madden TL, Ostell JM. IgBLAST: Nucleic Acids Res. 2013; 41 (Web Server issue): W34-4027)。6つのCDRs (complementarity determining regions) を、Kabatナンバリング (Kabat EA, Wu TT. J Immunol. 1991; 147 (5): 1709-171928) によって決定し、mEC2-C mAbの一部の骨格 (FR) 残基をヒトVH3-Vk1サブファミリーに接ぎ木した。この場合には、ハーセプチン (Herceptin) 骨格である。マウス及びヒト化されたEC2-C Fvアミノ酸配列の3次元構造をwebモデリングプログラム、ROSIIEを使用してシミュレーションした (Lyskov S, Chou FC, Conchuir SO, Der BS, Drew K, Kuroda D, Xu J, Weitzner BD, Renfrew PD, Sripakdeevong P, Borgo B, Havranek JJ, Kuhlman B, et al. PLoS One. 2013; 8 (5): e6390629)。このプログラムは、重鎖及び軽鎖のFRs及びCDRsに対するほとんどのホモログステンプレートを同定し、このステンプレートを最適化されたモデルとして組み合わせる。その結果、モデルの構造は、リボンモデルによってPymolソフトウェア (DeLano Scientific LLC) を使用してスーパーインポーズされた。

10

【0146】

実施例15: EC2-Cペプチド抗原に対するヒト化抗体の構築

【0147】

非ヒト (マウス) 由来の抗体のCDRs決定

20

【0148】

ヒト化を行うためには、一番最初に抗体のCDRsを決定することが必要である。CDRsを決定する方法には、アミノ酸配列の多様性を基準とするKabatナンバリング、ループ地域の構造を基準とするChothiaナンバリング (Jamesなど、Jan; 42: D1140-6, 2014)、可変部位構造の高い保存レベルを基準とするIMGTナンバリング (Lefranc MPなど、Front Immunol., 5; 5: 22, 2001) などがあるが、最も広く使用されるものがKabatナンバリングである。Kabatナンバリングによって、EC2-Cペプチド抗原に対するマウス由来の抗体のCDRsを決定した (図8及び図9参照)。

30

【0149】

ヒト化抗体の構築に適したヒト抗体骨格の選定及び野生型抗体のCDR部位移植

【0150】

ヒト抗体の可変部位は、アミノ酸配列によって、大きく、重鎖は7種のsubtype (VH1、VH2、VH3、VH4、VH5、VH6、VH7)、軽鎖は17種のsubtype (1、2、3、4、5、6、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11) に分かれる。それぞれのsubtypeは、アミノ酸配列が互いに異なるため、生物学的構造が異なり、それによって安定性も互いに異なり、これによって天然のヒト抗体レパートリー (repertoire) で使用される頻度数も異なる (Tiller Tなど、MAbs, 5 (3): 445-70, 2013)。

一般的にCDR移植法を用いてヒト化抗体を作製するときには、できる限りCDRの構造を維持させるために、野生型非ヒト由来の抗体と配列相同性が非常に高いヒト骨格に移すようになり、この場合に、移されるヒト化抗体のsubtypeが自然的に安定性や頻度数が低いsubtypeである場合、ヒト化後に安定性の低い抗体が得られる可能性がある。

40

【0151】

hTM4SF5EC2-Cペプチド抗原に対するマウス由来の抗体のヒト化に適したヒト骨格を決定するために、IgbLAST (URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>) により、既存の野生型抗体と最も配列相同性が高いヒト抗体可変部位のsubtypeを検索した。その結果、ヒト抗体のVH4、

50

Vk4 subtypeと最も相同性が高いことを確認した。しかし、参考文献によれば、前記の2つの subtype はそれぞれ、自然に発生するヒト抗体レパートリーで発見される頻度数及び安定性が非常に低い。したがって、本発明では、抗原に対する親和度及びその機能は維持しながら、安定性が高いヒト化抗体を構築するために、VH3 - Vk1 subtype のヒト抗体骨格に抗原結合部位を移植した。VH3 - Vk1 subtype は、商業化された治療用抗体 (Herceptin) の骨格であって、その熱力学的安定性及び発現収率が既存の研究結果によって十分に証明されており、特に、様々なマウス抗体のヒト化に成功裏に使用されてきた (Carter など、Proc Natl Acad Sci U S A 89 : 4285 - 4289 1992 ; Presta など、Cancer Res 57 : 4593 - 4599 1997 ;)。 10

【0152】

野生型マウス抗体のCDR部位移植及び親和度の維持のための追加的な保存アミノ酸の選定

【0153】

先に言及したように、単純なCDR移植法により構築されたヒト化抗体が、野生型非ヒト由来の抗体と比較したときにその機能が減少する場合がたびたび発生するため、EC2 - Cペプチド抗原に対するヒト化は、免疫原性の問題を減らすために単にCDRのみを移植したクローン (hEC2 - C - 1) と、機能の喪失を懸念して、CDR移植と同時に、抗体骨格に位置しながらCDRループ構造に影響を与えられるパーニヤゾーンに位置するアミノ酸を追加的に逆置換したクローン (hEC2 - C - 2) との2個で進行した。パーニヤゾーンに位置するアミノ酸は、可変部位内の総30個で、可変重鎖部位に16個、可変軽鎖部位に14個が存在し、野生型マウス抗体と選定されたVH3 - Vk1ヒト抗体骨格 subtype との間の配列分析により、計30個のパーニヤゾーンのアミノ酸のうち、可変重鎖部位に9個 (28、29、30、48、49、67、71、73、93)、可変軽鎖部位に2個 (49、66) のアミノ酸の配列が異なることを確認した (図9参照)。特に、可変重鎖部位内の26 - 30番の4個のアミノ酸は、文献上でCDR1とCDR2内の相互作用によるカノニカル (canonical) 構造の維持に重要な役割を果たす (Footе J など、J Mol Biol., 224 (2) : 487 - 99, 1992)。したがって、移植された野生型抗体のCDRの構造を安定化させると予想されるので、既存のマウス抗体の配列を用いることが好ましい。重鎖可変部位内の71番のアミノ酸もまた同様に、CDR1と2の配置を決定するのに重要な役割を果たし、この位置に、体積が大きい残基を有するアミノ酸 (リシンあるいはアルギニン) あるいは小さい残基を有するアミノ酸 (バリン、アラニン) のどちらが位置するかによって、CDRの特性が決定される。野生型マウス抗体は、重鎖内の71番にアルギニンを有しているが、これは、ヒトVH3 subtype 骨格内の71番のアラニンと反対の特性を有しているので、逆置換した。 20 30

【0154】

配列分析のためのヒトVH3 - Vk1 subtype の塩基及びアミノ酸配列は、前記の subtype の骨格を有していると共に、免疫原性や発現量に大きな問題なく商業化された抗体、ハーセプチン (Herceptin) のものを使用した。 40

【0155】

パーニヤゾーン以外にも、安定性に影響を与えるVH/VLインターフェースアミノ酸は、その残基が抗体の表面ではなく内部に向かっているため、可変重鎖部位及び軽鎖部位の結合を安定化させて抗体全体の安定性に影響を与える地域であり、このような理由から、ほとんどの抗体が同じアミノ酸残基からなっている。前記の抗体の場合にも、既存のマウス抗体とヒト抗体のアミノ酸残基が同一であることを確認し、ヒト化時に大きな影響を及ぼさないと考えられ、変形を与えなかった。

【0156】

構築された抗hTM4SF5EC2 - Cヒト化抗体の重鎖可変領域の塩基配列とアミノ酸配列は、それぞれ配列番号20及び16で示し、軽鎖可変領域の塩基配列とアミノ酸配 50

列は、それぞれ配列番号 22 及び 18 で示した。前記のヒト化抗体の構築のためのクローンは、アミノ酸配列だけでなく、コンピュータモデリングによる構造データの分析も共に併行した。まず、アミノ酸配列の分析により 1 次的に得られた候補クローン及び野生型マウス抗体の変部位配列をモデリングオンラインサーバー (URL: <http://rosie.rosettacommons.org/>; Lyskov S など、PLOS ONE, (5): e63906, 2013) 内の抗体モデリングパートにそれぞれ入力して予測された構造を得た。得られたそれぞれの構造は、CDR ループの構造的変化を観察するために、タンパク質の構造が見られる PyMOL ソフトウェアを用いて重畳させた。図 10 にその構造を示した。重畳構造上で、移植された 6 個の CDRs が、野生型マウス抗体の CDRs と比較したときに大きく外れない構造を有することを確認し、特に、抗原結合に影響を与えられる CDR ループ内のアミノ酸残基の方向が大部分一致することを確認した。

10

【0157】

実施例 16: ヒト化された hEC2-C 抗体の構築及び発現

【0158】

intact IgG フォーマットを有するヒト化された IgG1 Ab を得るために、VH 及び Vk コーディング遺伝子を 5' 及び 3' 末端の両方に制限酵素部位を含むように合成した (Bioneer, Korea)。これらの遺伝子を、HEK 293F 細胞から哺乳類細胞発現のために、ヒト IgG1 固定部位 (CH1-hinge-CH2-CH3) 又はヒトカッパ鎖固定部位 (CL) を運搬する変形された pCDNA 3.4 発現ベクター (Invitrogen) に挿入した。そのヒト化された EC2-C mAb を Choi HJ、Kim YJ、Lee S、Kim YS. Mol Cancer Ther. 2013; 12(12): 2748-2759 及び Choi DK、Bae J、Shin SM、Shin JY、Kim S、Kim YS. MAbs. 2014; 6(6): 1402-1414 に記載された通りに HEK 293F 発現システムを用いて産生し、5~7 日間培養後、製造業者のプロトコルに従って、Protein A アフィニティークロマトグラフィーを使用して精製した。マウスペアレント及びヒト化された抗体を、SDS-PAGE 分析によってその純度を評価した。

20

【0159】

実施例 17: IgG 形態のヒト化抗体遺伝子の作製

30

【0160】

設計されたヒト化抗体の塩基配列は、基本的に、商業化された高収率の治療用抗体ハーセプチン (Herceptin) の塩基配列に従うものの、それと異なる部分は、コドンの使用頻度を考慮 (Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991) して塩基配列に変換し、ヒト化抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域のアミノ酸配列を暗号化する塩基配列を設計する。設計した塩基配列は、5' と 3' の両方の末端に動物細胞発現ベクターへのクローニングのための制限酵素の認識配列を導入して合成した (Bioneer、韓国)。合成された遺伝子は、Bioneer 社で提供する基本ベクターである pBHA ベクターにクローニングされた状態で受けることができ、完全な IgG 形態への発現のために、重鎖不変領域、軽鎖不変領域がそれぞれ入っている動物発現ベクターに合成時に導入していた制限酵素認識配列を用いてクローニングした。このとき、重鎖及び軽鎖の不変領域のアミノ酸及び塩基配列は、同様に、治療用抗体ハーセプチン (Herceptin) の塩基配列に従う。

40

【0161】

実施例 18: 抗体の発現及び精製

【0162】

構築された抗 hTM4SF5EC2-C ヒト化抗体の発現は、軽鎖、重鎖発現ベクターとポリエチレンイミン (Polyethylenimine, PEI) (Polyscience) の混合物を HEK 293-F (Invitrogen) 細胞に一時的にトラン

50

スフェクション (transient transfection) して、無血清 Free Style 293 発現培地 (Invitrogen) が入っている振盪フラスコで培養することによってなされる。詳細な方法は、次の通りである。

【0163】

振盪フラスコ (Corning) に 200 mL トランスフェクション時に、HEK293-F 細胞を 2.0×10^6 細胞/mL の密度で培地 100 mL に播種して、150 rpm、8% CO₂ で培養した。それぞれのヒト化抗体を産生するために、それによる重鎖及び軽鎖プラスミドを 10 mL Free Style 293 発現培地 (Invitrogen) に重鎖 125 µg、軽鎖 125 µg の計 250 µg (2.5 µg/mL) で希釈し、PEI 750 µg (7.5 µg/mL) を希釈した 10 mL の培地と混合して、室温で 10 分間反応させた。その後、反応させた混合培地を、先の 100 mL で播種した細胞に入れ、150 rpm、8% CO₂ で 4 時間培養した後、残りの 100 mL の Free Style 293 発現培地を追加して、短くは 5 日、長くは 7 日間培養する場合、細胞が産生したタンパク質、すなわち、IgG 形態のヒト化抗体は、細胞によって細胞外に分泌されて培地に蓄積される。そのため、ヒト化抗体は、細胞培養後、2500 rpm で 20 分間遠心分離して採取した細胞培養上澄液からタンパク質 A セファロースカラム (protein A Sepharose column, GE healthcare) を用いて精製した。このとき、精製方法は、タンパク質 A カラム会社で提供する標準プロトコルを参照し、精製されたタンパク質は、BCA protein assay kit (Thermo) 内の溶液を用いて 562 nm の波長で吸光度を測定し、描かれた標準曲線に従ってその量を定量した。精製された抗体の大きさ及び純度は、還元性 SDS-PAGE で分析した。図 11 に示したように、本発明の抗 mEC2-C ヒト化抗体である hEC2-C-2 IgG は、約 150 kDa の分子量を有し、99% 以上の純度に精製されることを確認した。

【0164】

実施例 19：共焦点イメージ

【0165】

E-cadherin 及び β -catenin の発現に対するヒト化された anti-TM4SF5 抗体の効果と同定するために、CT-26 細胞及び HCT-116 細胞を培養し、対照群 IgG 又はヒト化された anti-TM4SF5 抗体 (10 µg/mL) で処理した。3 日後、細胞で E-cadherin 及び β -catenin の発現を、Kim YE、Kwon S、Wu G、Kim D、Park BK、Park JA、Choi KC、Kim DS、Kwon HJ、Lee Y. Oncotarget. 2014; 5(18): 8402-8415 によって分析した。

【0166】

実施例 20：インビトロ細胞移動分析

【0167】

8 µm の空隙を有するトランスウェルチャンバー (Corning Costar) を分析に使用した。移動分析のために、トランスウェルチャンバー膜の下面を 10 µg/mL のゼラチンでコーティングした。大腸細胞を、ヒト IgG 対照群又はヒト化された anti-TM4SF5 抗体 (hEC2-C-2 Ab) が含まれた無血清培地で懸濁し (1×10^5 細胞/mL)、トランスウェルの最上部に分注した。10% FBS を含有する RPMI 培地を下部チャンバーに置いた。空隙を介して移動する細胞がフィルターの低い表面に位置し、24 時間後、固定し、クリスタルバイオレットで 30 分間染色した後、顕微鏡 (Eclipse E-200, Nikon) で細胞数をカウントした。

【0168】

実施例 21：インビトロ創傷治療 (Wound-healing) 分析

【0169】

創傷治療の分析のために、 1×10^6 細胞 (Huh-7、及び CT-26) を 6 ウェルプレートに分注し、血清を含む培地で一晚培養した後、ピペットチップを用いて単一層に

10

20

30

40

50

創傷を誘発した。PBS、ヒトIgG対照群、又はヒト化されたanti-TM4SF5抗体(hEC2-C-2 Ab)(10ug/ml)をその培地に添加した。指示された時点で細胞を4%パラホルムアルデヒドで30分間固定し、ギームザ液で30分間染色した。創傷部位に移動した細胞数を、実験処理当たり3つのウェル及び各ウェル当たり3つの創傷でカウントした。

【0170】

実施例22：肝癌マウスモデル

【0171】

12匹のBALB/cAnNCri-nu/nuマウスの背中の右側面(dorsal right flank)に、50%マトリゲル(BD biosciences)を含む5x10⁶Huh-7細胞を皮下注射した。腫瘍の直径が5mmに到達したとき、マウスをPBS、及びヒト化されたanti-TM4SF5抗体(hEC2-C-2 Ab)の2つの処理グループ(6匹のマウス/各グループ)に任意に分類した。抗体(25mg/kg)を週ごとに2回ずつ尾静脈に注射した。癌細胞の注入後、44日間、4日間隔で腫瘍の直径を測定し、腫瘍の体積を幅2x長さ/2の式によって計算した。腫瘍サイズが2000mm³に到達したとき、BALB/cAnNCri-nu/nuマウスを犠牲にし、腫瘍の重量を測定した。

10

【0172】

実施例23：ヒト化されたanti-TM4SF5抗体に対する大腸癌マウスモデル(異種移植)

20

【0173】

12匹のBALB/cAnNCri-nu/nuマウスの背中の右側面に、50%マトリゲル(BD biosciences)を含有する5x10⁶のHT-29細胞を皮下注射した。腫瘍の直径が5mmに到達したとき、マウスをPBS、及びanti-TM4SF5モノクローナル抗体(mEC2-C)の2つの処理グループ(6匹のマウス/各グループ)に任意に分類した。抗体(25mg/kg)を週ごとに2回ずつ尾静脈に注射した。癌細胞の注入後、30日間、3日又は4日間隔で腫瘍の直径を測定し、腫瘍の体積を幅2x長さ/2の式によって計算した。腫瘍サイズが800mm³に到達したとき、BALB/cAnNCri-nu/nuマウスを犠牲にし、腫瘍の重量を測定した。

【0174】

実施例24：大腸癌の肺転移モデルにおける抗転移剤としてヒト化されたanti-TM4SF5抗体の評価

30

【0175】

BALB/cマウスに1x10⁵細胞のマウスCT-26大腸癌細胞株(PBS対照群n=8、大腸癌細胞n=36)を尾静脈に注射した。1日目に、癌細胞が注射されたマウスをPBS、ヒトIgG対照群、及びヒト化されたanti-TM4SF5抗体(hEC2-C-2 Ab)のような3つの処理群に分けた(n=12/各群)。抗体(25mg/kg)を尾静脈に週2回注射し、体重を2日間隔で測定した。マウスの生存を22日までモニタリングした(図16)。

【0176】

同じセッティングを有する他の実験を、肺の状態を調べるために準備した(n=12/各群)。19日目に、マウスを犠牲にし、肺重量を測定した(図17)。

40

【0177】

実施例25：組織学(Histology)

【0178】

組織病理学的検査のために腫瘍及び肺を除去し、4%ホルマリン溶液で一晩固定し、パラフィンに包埋した後、5µmの厚さのセクションに切断した。脱パラフィン化セクションをH&E(hematoxylin and eosin)で染色した。その後、サンプルをヘマトキシリン(hematoxylin)でカウンター染色し、全てのイメージをNikon Eclipse E-200顕微鏡(Nikon)を使用して調査した。

50

【0179】

前記の実施例の結果は、下記の通りである。

【0180】

TM4SF5ペプチドワクチンで免疫化及びTM4SF5の環状ペプチドに特異的な抗体の産生(図1)

【0181】

タイトな結合を維持しながら、構造的エピトープを認知する抗体を得るために、本発明者らは、TM4SF5 EC2 (extracellular domain 2)をミミックした環状ペプチドの構造的モチーフを考案した。図1A及び図1Bに示したように、本発明者らは、グリシン133及びバリン156をシステインで代替して突然変異ペプチドhTM4SF5EC2を作った。ペプチドの化学的変形により、本発明者らは、システイン残基の間にジスルフィド結合を有する環状ペプチドhTM4SF5EC2-Cを産生した。本発明者らは、hTM4SF5EC2-Cペプチド及びCpG-DNAを同時にカプセル化したphosphatidyl-oleoyl-palmitoyl ethanolamine (DOPE):cholesterol hemisuccinate (CHEMS)を含むリポソーム複合体(Lipoplex(O))でマウスを免疫化し、3番目のブースティング後、hTM4SF5EC2-C環状ペプチドを認知する抗体の産生を確認した(図1C)。抗体は、該当するマウス環状(cyclic)ペプチド(mTM4SF5EC2-C)と交差反応し、hTM4SF5EC2及びmTM4SF5EC2のような線状ペプチドに対する活性は、環状ペプチドよりも低かった。その抗体は、hTM4SF5R2-3又はマウス該当エピトープmTM4SF52-3を認知できなかった。これは、その産生された抗体が構造的エピトープを認知するということを示唆する。図1Dに示したように、その産生された抗体は、主にIgG2aであった。

【0182】

マウス肺転移モデルにおけるM4SF5ペプチドワクチンによる免疫化で大腸腫瘍の成長阻害(図2及び図3)

【0183】

マウスにおいて大腸癌の転移を調節するターゲットとしてTM4SF5の重要性を評価するために、本発明者らは、まず、BALB/cマウスを、環状TM4SF5ペプチド(hTM4SF5EC2-C)及びLipoplex(O)で構成されるTM4SF5ペプチドワクチンで免疫化した。その後、TM4SF5ペプチドワクチンの効果を、CT-26細胞の注射によって誘導された肺腫瘍の成長に対して決定した(図2A)。CT-26細胞が注射されたマウスは、細胞注射12日後、体重が減量した。しかし、TM4SF5ペプチドワクチンで免疫化されたマウスは、非処理された対照群マウスと類似のパターンを示した(図2B)。マウスの生存は、図2Cに示したように、PBS対照群と比較して、ペプチドワクチンによって大きく増加した(52日に80%対0%)。ペプチドのないCpG-DNA-liposome複合体(Lipoplex(O))による免疫化は、非特異的免疫促進効果により部分的な保護効果を誘導した(52日に27%)。腫瘍の体積及び重量を使用して、本発明者らは、ペプチドワクチンによる免疫化は、PBS又はLipoplex(O)対照群と比較して、肺転移腫瘍の進行を減少させたということを観察した(図2D~図2E)。組織学的調査は、適切にワクチン化されたマウスの肺組織は、正常マウスのもものと類似の形態を示した(図2F)。ペプチドワクチンの抗転移効果を確認するために、本発明者らは、類似の実験を繰り返し、肺において転移性結節をチェックした。ペプチドワクチンによる免疫化は、PBS対照群と比較して肺結節の数を著しく減少させた(図3)。これらの結果は、TM4SF5ペプチドワクチンによる免疫化は、マウスsyngeneicモデルにおいて大腸腫瘍の肺転移を減少させることができることを示唆する。

【0184】

TM4SF5環状ペプチドに特異的なモノクローナル抗体の生成

【0185】

10

20

30

40

50

h T M 4 S F 5 E C 2 - C ペプチド及び C p G - D N A を同時にカプセル化した D O P E : C H E M S を含むリポソーム複合体で4回免疫化した後、マウス血清から環状 T M 4 S F 5 ペプチド (h T M 4 S F 5 E C 2 - C) に対する抗体の適正曲線を E L I S A で得た (図 4 A) 。最終ブースターの3日後、最も高い抗体タイター (h T M 4 S F 5 E C 2 - C) を有する脾臓を得、その脾臓細胞を S P 2 / 0 m y e l o m a 細胞と通常のハイブリドーマ技術により融合した。14日後、上澄液を E L I S A 方法で分析して、h T M 4 S F 5 E C 2 - C ペプチドに対する特定の抗体を分泌するハイブリドーマ細胞をスクリーニングした。スクリーニング過程により、本発明者らは、h T M 4 S F 5 E C 2 - C ペプチドと反応する一つのハイブリドーマ細胞 (1 H 1) を分離した (図 4 B 及び図 4 C) 。本発明者らは、T M 4 S F 5 を過剰発現する H E K 2 9 3 F - T M 4 S F 4 細胞を使用してウエスタンブロット分析を行い、その抗体が組換え T M 4 S F 5 タンパク質を認知することを証明した (図 4 D) 。

10

【 0 1 8 6 】

その一つのハイブリドーマ細胞をリミッティング希釈方法によるサブクロニング後、モノクローナル抗体の生成を分析した (図 5 A 及び図 5 B) 。4つのハイブリドーマクローン (4つの 1 H 1 誘導体) を選択し、T M 4 S F 5 を過剰発現する H E K 2 9 3 F - T M 4 S F 4 細胞を使用してウエスタンブロット分析を行い、その抗体が組換え T M 4 S F 5 タンパク質を認知するということを証明した (図 5 D) 。結論的に、一つのハイブリドーマクローン (2 A 1 0) をモノクローナル抗体 (m E C 2 - C) の生成のために選択した (図 5 D) 。

20

【 0 1 8 7 】

T M 4 S F 5 環状ペプチドに特異的なモノクローナル抗体の特性

【 0 1 8 8 】

本発明者らは、ハイブリドーマ細胞株 (2 A 1 0) をスクリーニングし、h T M 4 S F 5 E C 2 - C ペプチドを認知するモノクローナル抗体を成功裏に分離した。a n t i - T M 4 S F 5 モノクローナル抗体 (m E C 2 - C) をプロテインAカラムクロマトグラフィーで腹水液から精製し、その純度が99%以上と測定された (図 6 A) 。本発明者らは、生成されたモノクローナル抗体は I g G 3 であることを見出した (図 6 B) 。本発明者らは、そのモノクローナル抗体を m E C 2 - C と命名し、環状ペプチド h T M 4 S F 5 E C 2 - C に対するその特異的な結合を E L I S A で確認した (図 6 C) 。図 6 D に示したように、h T M 4 S F 5 E C 2 - C ペプチドに対する抗体の結合親和度を S P R (s u r f a c e p l a s m o n r e s o n a n c e) 分析によって測定した。その抗体の平衡解離定数 (K d) は、 ~ 0.48 n M であった。その抗体のオフレート (k d) は、 10^{-5} / s e c であった。したがって、本発明者らは、この抗体が臨床的適用にさらに有用であり得ると結論を下した。本発明者らは、T M 4 S F 5 を過剰発現する H E K 2 9 3 F - T M 4 S F 4 細胞及び H E K 2 9 3 F 対照群細胞を使用して免疫沈殿及びウエスタンブロットを行い、その抗体が M y c - タグされた組換え T M 4 S F 5 タンパク質を認知するということを証明した (図 6 E) 。

30

【 0 1 8 9 】

A n t i - T M 4 S F 5 モノクローナル抗体 (m E C 2 - C) は、異種移植マウスモデルにおいて大腸癌の成長を阻害する

40

【 0 1 9 0 】

本発明者らは、異種移植マウスモデルを使用したインビボ大腸癌細胞の成長に対する T M 4 S F 5 - ターゲットされたモノクローナル抗体の効果を観察した。まず、本発明者らは、H T - 2 9 細胞をヌードマウスの背中に皮下注射して腫瘍を成長させた。腫瘍サイズが直径 5 m m に到達したとき、本発明者らは、週に2回、a n t i - T M 4 S F 5 モノクローナル抗体 (m E C 2 - C) を尾静脈に注射した。腫瘍の体積及び重量に基づいて、a n t i - T M 4 S F 5 モノクローナル抗体 (m E C 2 - C) は、P B S 対照群と比較して大腸癌の進行を弱体化させた (図 7 B ~ 図 7 D) 。その抗体処理は、実験の間、体重に影響がなかった (図 7 E) 。異種移植実験の分析は、大腸腫瘍細胞をターゲットとする a n t

50

i - T M 4 S F 5 モノクローナル抗体が、インビボで腫瘍の成長を減少させることができるということを示した。

【0191】

anti - T M 4 S F 5 モノクローナル抗体の可変ドメインのクローニング

【0192】

重鎖及び軽鎖の可変ドメイン (VH 及び VL) をコードする cDNA 配列を、通常の重鎖及び軽鎖プライマーを使用して anti - T M 4 S F 5 モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞 (mEC2 - C) からクローニングした。DNA シークエンシングによって確認された配列を図 8 に示した。その配列を、IgBLAST プログラムを使用して、公知の配列とのホモロジーを分析した (Ye J, Ma N, Madden TL, Ostell JM. IgBLAST: Nucleic Acids Res. 2013; 41 (Web Server issue): W34 - 40)。

10

【0193】

ヒト化されたモノクローナル抗体の産生及び特性

【0194】

臨床にモノクローナル抗体の適用のために、その抗体をヒトでの免疫原性を減少させるヒト化作業を行わなければならない。したがって、本発明者らは、得られたモノクローナル抗体 mEC2 - C の免疫グロブリン可変ドメイン配列を IgBLAST program (Ye J, Ma N, Madden TL, Ostell JM. IgBLAST: Nucleic Acids Res. 2013; 41 (Web Server issue): W34 - 40) を使用して分析し、その可変ドメインサブタイプがマウス VH2 - Vk8 に属するということを見出した。mEC2 - C mAb のヒト化のために、本発明者らは、VH3 - Vk1 骨格を、この骨格が最も共通的にヒト生殖系列 (germ line) レパートリーで観察されるという事実 (Caravella JA, Wang D, Glaser SM, Lugovskoy A. Curr Comput Aided Drug Des. 2010; 6 (2): 128 - 138) を参考にして選択した。本発明者らは、ヒト VH3 - Vk1 骨格に一部の骨格配列、この場合にはハーセプチン (Herceptin) 骨格と CDR 部位を一般に確立された方法で接ぎ木した (Kabata EA, Wu TT. J Immunol. 1991; 147 (5): 1709 - 1719)。mEC2 - 2 及びヒト化されたモノクローナル抗体 (hEC2 - C - 2) 由来の構造をモデル化して比較し、それらは互いに同一ではないが、類似するということを示した (図 9 及び図 10)。

20

30

【0195】

本発明者らは、組換えヒト化されたモノクローナル抗体 (hEC2 - C - 2) を HEK 293F 細胞を使用して産生し (図 11A)、その反応性を評価した (図 11B ~ 図 11D)。そのヒト化された抗体は、ELISA に基づいて環状ペプチド hTM4SF5EC2 - C に対しては特異的に反応するが、hTM4SF5R2 - 3 にはそうではなかった (図 11B)。その抗体の平衡解離定数 (Kd) は、~ 22.7 pM であり、それは、元のマウスモノクローナル抗体 mEC2 - C に比べて約 20 倍さらに低かった (図 11C)。そのヒト化された抗体は、ウエスタンブロット及び免疫沈殿分析に基づいて、TM4SF5 タンパク質を TM4SF5 を過剰発現する HEK 293F 細胞から検出することができた (図 11D)。

40

【0196】

したがって、本発明者らは、そのヒト化された抗体が TM4SF5 タンパク質に完全に反応し、元のモノクローナル抗体と比較してさらに高い親和度を有するという結論を得ることができる。

【0197】

ヒト化された anti - T M 4 S F 5 抗体の大腸癌細胞の - c a t e n i n 発現及び移動に対する効果

【0198】

50

TM4SF5は、腫瘍細胞の転移及び細胞の移動/侵襲に重要なインテグリン媒介信号経路を活性化する(Lee SA, Kim TY, Kwak TK, Kim H, Kim S, Lee HJ, Kim SH, Park KH, Kim HJ, Cho M, Lee JW. *J Cell Biochem.* 2010; 111(1): 59-66; Jung O, Choi S, Jang SB, Lee SA, Lim ST, Choi YJ, Kim HJ, Kim DH, Kwak TK, Kim H, Kang M, Lee MS, Park SY, et al. *J Cell Sci.* 2012; 125(Pt 24): 5960-5973)。したがって、本発明者らは、ヒト化されたanti-TM4SF5抗体のCT-26細胞及びHCT-116細胞を使用した細胞の移動に対するインビトロ効果を評価した。図12Aに示したように、本発明者らは、ヒト化されたanti-TM4SF5抗体の添加は、CT-26細胞の移動を阻害したが、PBS又はヒトIgGはそうではなかった。対照的に、その抗体は、TM4SF5を発現しないHCT-116細胞の移動には効果がなかった。また、本発明者らは、インビトロで創傷治癒アッセイを行った。図12Bに示したように、創傷部位へCT-26細胞の移動は、PBS又はヒトIgG対照群と比較して大きく阻害されたが、HCT-116細胞において創傷治癒能力には、PBS、ヒトIgG対照群、又はanti-TM4SF5の間に差がなかった。

10

【0199】

anti-TM4SF5抗体の細胞相互作用の特性に対する効果を究明するために、本発明者らは、E-cadherin及び-cateninの発現をCT-26細胞及びHCT-116細胞でチェックした(図13)。共焦点イメージデータは、-cateninの発現が、ヒト化されたanti-TM4SF5抗体に対してCT-26細胞で大きく増加した(図13A)。E-cadherinの発現は、処理にもかかわらず、CT-26細胞で観察されず、E-cadherinの基本発現がCT-26細胞で非常に低いということを示唆する。対照的に、E-cadherin及び-cateninの発現は、ヒト化されたanti-TM4SF5抗体で処理した後、HCT-116細胞で変化がなかった。ウエスタンブロット分析は、同じ結果を示した(図13B)。したがって、ヒト化されたanti-TM4SF5抗体は、TM4SF5を発現する細胞において移動能力を減少させ、細胞-細胞の相互作用を増加させる。

20

【0200】

ヒト化されたanti-TM4SF5抗体は、異種移植マウスモデルにおいてHCC腫瘍の成長を阻害する

30

【0201】

本発明者らは、異種移植マウスモデルを使用して、TM4SF5-ターゲットされたヒト化された抗体のHCC細胞の成長に対する効果を調べた。まず、本発明者らは、Huh-7細胞をマウスの背中に皮下注射して腫瘍を成長させた。腫瘍サイズが直径5mmに到達するとき、本発明者らは、PBS又はヒト化されたanti-TM4SF5抗体を、週に2回、尾静脈に投与した。腫瘍の体積及び重量によれば、ヒト化されたanti-TM4SF5抗体は、HCC腫瘍の進行を、PBS対照群と比較して弱化した(図14B~図14E)。異種移植実験の分析は、HCC腫瘍細胞をターゲットとするヒト化されたanti-TM4SF5抗体が、インビボで腫瘍の成長を減少させるのに十分であることを示した。

40

【0202】

ヒト化されたanti-TM4SF5抗体は、異種移植マウスモデルにおいて大腸癌の成長を阻害する

【0203】

本発明者らは、異種移植マウスモデルを使用したインビボ大腸癌細胞の成長に対するTM4SF5-ターゲットされたヒト化された抗体の効果を観察した。まず、本発明者らは、HT-29細胞をヌードマウスの背中に皮下注射して腫瘍を成長させた。腫瘍サイズが直径5mmに到達するとき、本発明者らは、週に2回、PBS又はヒト化されたanti

50

- T M 4 S F 5 抗体を尾静脈に投与した。腫瘍の体積及び重量によれば、ヒト化された a n t i - T M 4 S F 5 抗体は、大腸腫瘍の進行を、P B S 対照群と比較して弱化した (図 1 5 B ~ 図 1 5 D) 。その抗体処理は、実験の間、体重に影響がなかった (図 1 5 E) 。異種移植実験の分析は、大腸癌をターゲットとするヒト化された a n t i - T M 4 S F 5 抗体が、インビボで腫瘍の成長を減少させることができることを示した。

【 0 2 0 4 】

ヒト化された a n t i - T M 4 S F 5 抗体は、マウス肺転移モデルにおいて大腸腫瘍の成長を阻害する

【 0 2 0 5 】

T M 4 S F 5 ペプチドワクチンによるマウスの免疫化は、C T - 2 6 細胞の注射による肺腫瘍組織の成長を阻害するため、免疫化によって誘導された T M 4 S F 5 - 特異的な抗体が抗転移効果に直接的に寄与すると仮説化することができる。

10

【 0 2 0 6 】

したがって、次に、本発明者らは、図 1 6 A に示したような実験スケジュールに従って、肺転移に対するヒト化された a n t i - T M 4 S F 5 抗体の効果を調べた。C T - 2 6 細胞の注射 1 日後、本発明者らは、正常 I g G 又はヒト化された抗体 h E C 2 - C - 2 を尾静脈に注射し、マウスからその抗体の効果をチェックした。対照群マウスは、C T - 2 6 細胞の注射から約 1 6 日後、体重が減量した。しかし、ヒト化された抗体 h E C 2 - C - 2 で注射されたマウスは、非処理された対照群マウスと類似の体重を示した (図 1 6 B) 。マウスの生存は、図 1 6 C に示したように、ヒト I g G 対照群と比較して、ヒト化された a n t i - T M 4 S F 5 抗体によって大きく増加した (7 5 % 対 0 %) 。

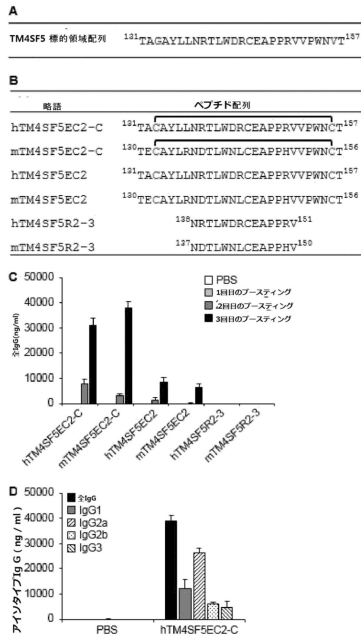
20

【 0 2 0 7 】

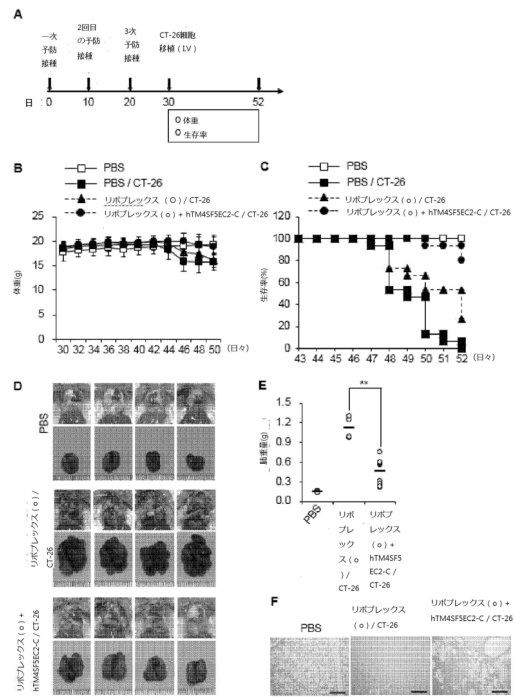
ヒト化された a n t i - T M 4 S F 5 抗体の抗転移効果を確認するために、本発明者らは、類似の実験を繰り返して肺転移をチェックした。ヒト化された抗体 h E C 2 - C - 2 で注射されたマウスは、P B S 対照群と比較して、肺転移された腫瘍の形成及び成長を著しく減少させた (図 1 7) 。腫瘍の体積及び重量の変化を考慮すると、a n t i - T M 4 S F 5 抗体は、ヒト I g G と比較して肺転移腫瘍の成長を減少させた (図 1 7 B ~ 図 1 7 D) 。したがって、本発明者らは、ヒト化された a n t i - T M 4 S F 5 モノクローナル抗体がマウスシンジェネティックモデルにおいて大腸腫瘍の肺転移を緩和させることができるという結論を得ることができる。

30

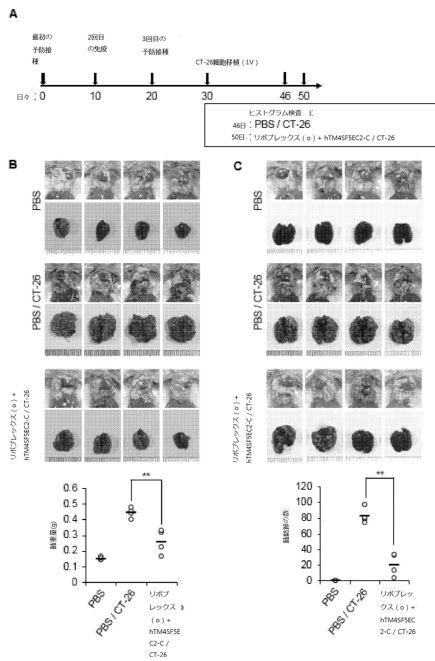
【 図 1 】



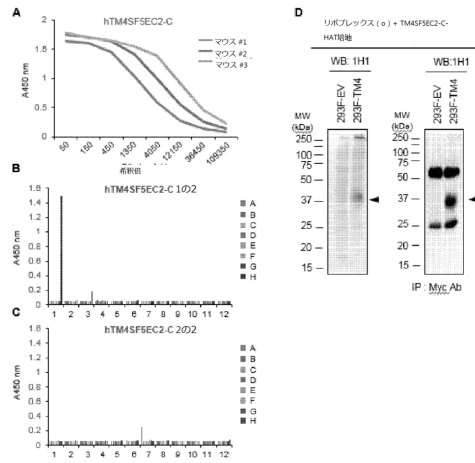
【 図 2 】



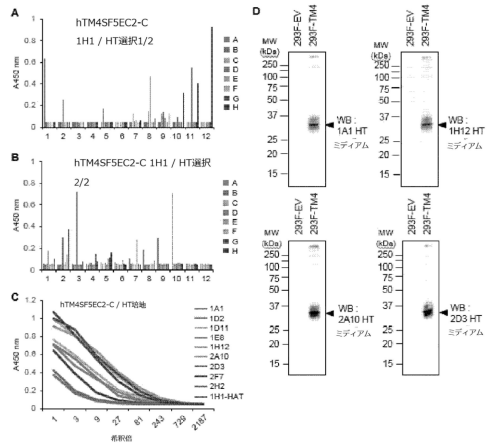
【 図 3 】



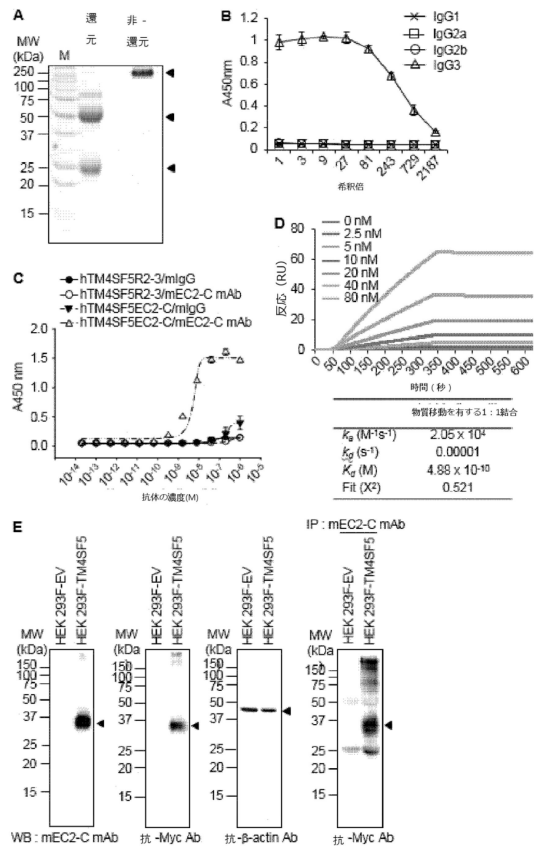
【 図 4 】



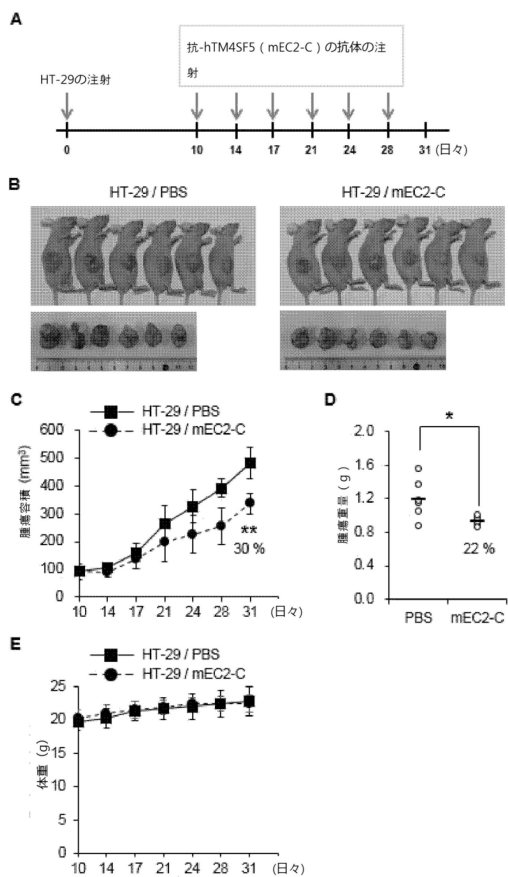
【 図 5 】



【 図 6 】



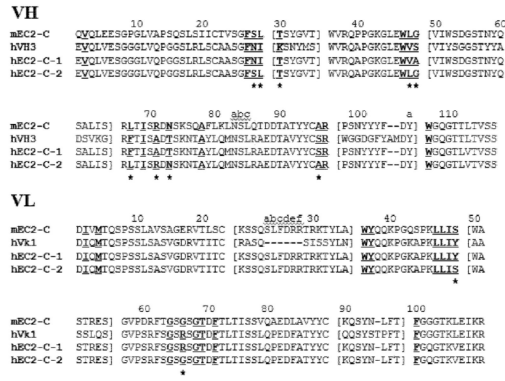
【 図 7 】



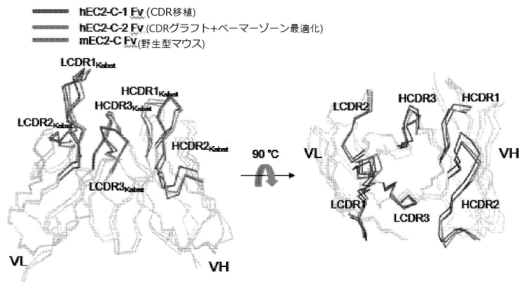
【 図 8 】



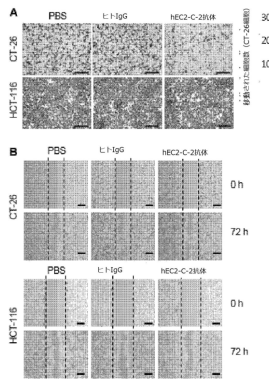
【 図 9 】



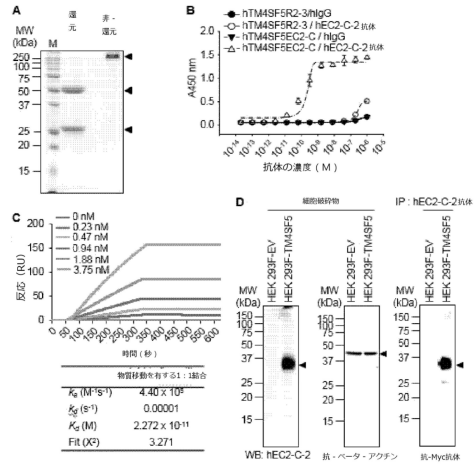
【 図 10 】



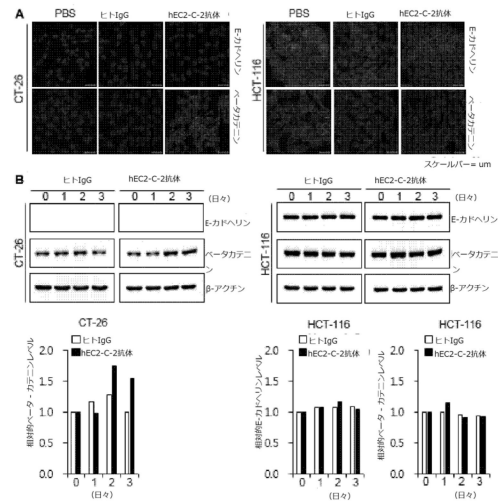
【 図 12 】



【 図 11 】



【 図 13 】



【配列表】

0006696043000001.app

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		
A 6 1 P 35/04	(2006.01)	A 6 1 P	35/04	
A 6 1 P 37/04	(2006.01)	A 6 1 P	37/04	
A 6 1 K 39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	T
G 0 1 N 33/574	(2006.01)	G 0 1 N	33/574	A
G 0 1 N 33/53	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	D

(72)発明者 キム ヨンソン
 大韓民国 16534 キョンギード スウォン-シ パルダル-グ グォングァン-ロ 246
 レミアン ノーブル クラス アパート 110-1703

審査官 柴原 直司

(56)参考文献 米国特許出願公開第2015/0239975 (US, A1)
 米国特許出願公開第2016/0002322 (US, A1)
 特表2012-533534 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 A 6 1 K 39/00 - 39/44
 REGISTRY (STN)
 CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)
 JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamIII)

專利名稱(译)	含有环肽的疫苗组合物，针对环肽的抗体或含有该化合物的抗癌组合物		
公开(公告)号	JP6696043B2	公开(公告)日	2020-05-20
申请号	JP2019500812	申请日	2017-07-11
[标]申请(专利权)人(译)	海运墨守成规コオベリ-ションファウンデ-ションハルリムユニヴァ-シティ		
申请(专利权)人(译)	行业学术交流合作基金会，Harurimu盐湖城		
当前申请(专利权)人(译)	行业学术交流合作基金会，Harurimu盐湖城		
[标]发明人	キムヨンソン		
发明人	クオン ヒョンジュ キム ヨンソン		
IPC分类号	A61K39/00 C07K16/30 C07K16/46 C12N15/13 A61P35/00 A61P35/04 A61P37/04 A61K39/395 G01N33/574 G01N33/53		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P35/04 C07K16/28 C07K2317/24 C07K2317/34 C07K2317/76 C07K2317/92 G01N33/57407 G01N33/57492 G01N2333/705 A61K39/3955 A61K2039/55516 C07K16/18 C07K2317/565 G01N33/574 A61K9/127 A61K39/001102 A61K2039/55561 A61K2039/572 C07K2317/73		
FI分类号	A61K39/00.ZNA.H C07K16/30 C07K16/46 C12N15/13 A61P35/00 A61P35/04 A61P37/04 A61K39/395. T G01N33/574.A G01N33/53.D		
优先权	1020160104343 2016-08-17 KR		
其他公开文献	JP2019532015A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)
 本发明涉及包含本发明的环肽的疫苗组合物，针对环肽的抗体或包含它们的抗癌组合物，并且本发明的疫苗组合物显示出对癌症转移的抑制活性。另外，本发明的抗体以高亲和力结合于肿瘤特异性抗原TM4SF5，并显著抑制表达肿瘤特异性抗原TM4SF5的癌细胞的生长，转移和侵袭，因此可用于诊断，预防。或治疗各种表达TM4SF5的癌症。

(19) 日本国特許庁 (JP)	(12) 特許公報 (B2)	(11) 特許番号 特許第6696043号 (P6696043)
(45) 発行日 令和2年5月20日 (2020. 5. 20)	(24) 登録日 令和2年4月24日 (2020. 4. 24)	
(5) Int. Cl. F I		
A 6 1 K 39/00 (2006. 01)	A 6 1 K 39/00	Z N A H
C 0 7 K 16/30 (2006. 01)	C 0 7 K 16/30	
C 0 7 K 16/46 (2006. 01)	C 0 7 K 16/46	
C 1 2 N 15/13 (2006. 01)	C 1 2 N 15/13	
A 6 1 P 35/00 (2006. 01)	A 6 1 P 35/00	
請求項の数 11 (全 41 頁) 最終頁に続く		
(21) 出願番号 特願2019-500812 (P2019-500812)	(73) 特許権者 515330007 インダストリー アカデミック コオベリ-ション ファウンデ-ション、ハルリムユニヴァ-シティ 大韓民国、24252 ガンウォン-ド、チュンチョン、ハルリムダエハック-ギル I、ハルリム、ユニヴァ-シティ	
(86) (22) 出願日 平成29年7月11日 (2017. 7. 11)	(74) 代理人 110002262 T R Y 国際特許業務法人 クオン ヒョンジュ 大韓民国 28774 チュンチョンブク-ド チョンジュ-シ サンダン-グ ジュンファン-ロ 70 ヒョンテ 3-チャア-パート 306-1204	
(65) 公表番号 特表2019-532015 (P2019-532015A)	(72) 発明者 クオン ヒョンジュ 大韓民国 28774 チュンチョンブク-ド チョンジュ-シ サンダン-グ ジュンファン-ロ 70 ヒョンテ 3-チャア-パート 306-1204	
(43) 公表日 令和1年11月7日 (2019. 11. 7)		
(88) 国際出願番号 PCT/KR2017/007407		
(87) 国際公開番号 W02018/034434		
(87) 国際公開日 平成30年2月22日 (2018. 2. 22)		
審査請求日 平成31年1月10日 (2019. 1. 10)		
(31) 優先権主張番号 10-2016-0104343		
(32) 優先日 平成28年8月17日 (2016. 8. 17)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関 韓国 (KR)		
最終頁に続く		
(54) 【発明の名称】 環状ペプチドを含むワクチン組成物、環状ペプチドに対する抗体又はそれを含む抗癌組成物		