

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2021-518758
(P2021-518758A)

(43) 公表日 令和3年8月5日(2021.8.5)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	4 B 0 6 4
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28 Z N A	4 B 0 6 5
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63 Z	4 C 0 7 6
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C 0 8 4
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C 0 8 5
審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 64 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2020-552830 (P2020-552830)
 (86) (22) 出願日 平成31年3月27日 (2019. 3. 27)
 (85) 翻訳文提出日 令和2年11月18日 (2020. 11. 18)
 (86) 国際出願番号 PCT/KR2019/003594
 (87) 国際公開番号 WO2019/190206
 (87) 国際公開日 令和1年10月3日 (2019. 10. 3)
 (31) 優先権主張番号 10-2018-0036190
 (32) 優先日 平成30年3月28日 (2018. 3. 28)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 韓国 (KR)

(71) 出願人 520371286
 エイビオン インク.
 A B I O N I N C .
 大韓民国、08394 ソウル市、グロ
 グ、デジタルーロ、242、#915 (グ
 ロードン、ハンファ ビズメトロ 1ーチ
 ャ)
 (74) 代理人 110001999
 特許業務法人はなぶさ特許商標事務所
 (72) 発明者 シン, ヨン キ
 大韓民国、08826 ソウル市、クァナ
 クーグ クァナクーロ、1 (シリムードン
)、ソウル大学、分子医学及び生物薬剤学
 科内

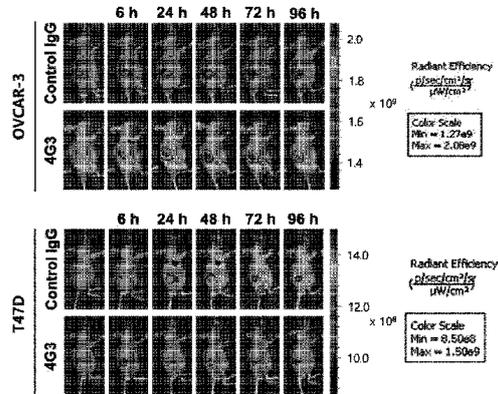
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 クローディン3のECL-2に特異的に結合する抗体、その断片及びその使用

(57) 【要約】

本発明は、クローディン3のECL-2に特異的に結合する抗体及びその機能的断片の癌細胞検出、診断、映像化、癌の治療への適用（抗体自体の抗癌使用、ACD及びCAR-発現細胞（特に、免疫細胞）への適用）と、このような使用において著しい効果を示す特有のCDR配列を含む抗体及びその機能的断片に関するものである。

【選択図】 図14a



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 3 で表されるアミノ酸配列を含む重鎖相補決定部位 1 (V H - C D R 1)、配列番号 4 で表されるアミノ酸配列を含む重鎖相補決定部位 2 (V H - C D R 2)、及び配列番号 5 で表されるアミノ酸配列を含む重鎖相補決定部位 3 (V H - C D R 3) を含む重鎖可変領域; 及び配列番号 6 で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖相補決定部位 1 (V L - C D R 1)、配列番号 7 で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖相補決定部位 2 (V L - C D R 2)、及び配列番号 8 で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖相補決定部位 3 (V L - C D R 3) を含む軽鎖可変領域を含む抗体又はその機能的断片。

【請求項 2】

前記抗体は、I g G、I g A、I g M、I g E、および I g D からなる群から選択され、前記機能的断片は、ディアボディー、F a b、F、(a b ')、F (a b ') 2、F v、d s F v と s c F v からなる群から選択されることを特徴とする、請求項 1 に記載の抗体又はその機能的断片。

【請求項 3】

前記抗体又はその機能的断片はクローニン 3 に結合した後、細胞内に内在化 (i n t e r n a l i z a t i o n) されることを特徴とする、請求項 1 に記載の抗体又はその機能的断片。

【請求項 4】

前記抗体又はその機能的断片はクローニン 3 の細胞外第二ループに特異的に結合することを特徴とする、請求項 3 に記載の抗体又はその機能的断片。

【請求項 5】

請求項 1 に記載の抗体又はその機能的断片を暗号化するポリヌクレオチド。

【請求項 6】

請求項 5 に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項 7】

請求項 6 に記載のベクターを含む細胞。

【請求項 8】

請求項 7 の細胞を培養して軽鎖及び重鎖可変領域を含むポリペプチドを生産する段階; 及び前記細胞又はそれを培養した培養培地から前記ポリペプチドを回収する段階を含む、クローニン 3 タンパク質に特異的に結合する抗体又はその機能的断片の製作方法

【請求項 9】

請求項 1 の抗体又はその機能的断片を試料と接触させる段階; 及び前記抗体又はその機能的断片を検出する段階を含むクローニン 3 の検出方法。

【請求項 10】

請求項 1 の抗体又はその機能的断片を有効成分として含むクローニン 3 検出用組成物。

【請求項 11】

前記抗体又はその機能的断片は発色酵素、放射性同元素、クロモフォア (c h r o m o p h o r e)、発光物質、蛍光物質 (f l u o r e s c e r)、常磁性粒子 (s u p e r p a r a m a g n e t i c p a r t i c l e s) と超常磁性粒子 (u l t r a s u p e r p a r a m a g n e t i c p a r t i c l e s) からなる群から選択される1つ以上のものをカバーされていることを特徴とする、請求項 10 に記載の組成物。

【請求項 12】

請求項 1 の抗体又はその機能的断片を有効成分として含む癌診断用組成物。

【請求項 13】

前記癌は卵巣癌、結腸癌、膀胱癌、肺癌、肝臓癌、胃癌、食道癌、乳房癌、前立腺癌、膵臓癌、子宮がん、子宮頸がん、メラノーマ、大腸がん、腎臓がん、および転移性胸膜腫瘍からなる群から選択されることを特徴とする、請求項 12 に記載の組成物。

【請求項 14】

請求項 1 の抗体又はその機能的断片を有効成分として含む癌映像化用組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 15】

請求項 1 の抗体又はその機能的断片を有効成分として含む癌の予防及び治療用組成物。

【請求項 16】

前記癌は卵巣癌、結腸癌、膀胱癌、肺癌、肝臓癌、胃癌、食道癌、乳房癌、前立腺癌、膵臓癌、子宮がん、子宮頸がん、メラノーマ、大腸がん、腎臓がん、および転移性胸膜腫瘍からなる群から選択されることを特徴とする、請求項 15 に記載の組成物。

【請求項 17】

請求項 1 の抗体又はその機能的断片;及び薬物が結合された抗体 - 薬物複合体 (a n t i b o d y - d r u g c o n j u g a t e) 。

【請求項 18】

前記薬物はマイクロチューブリン (m i c r o t u b u l i n) 構造の形成の抑制剤、有糸分裂 (m e i o s i s) 抑制剤、トポアイソメラーゼ (t o p o i s o m e r a s e) 抑制剤、DNA インターカレーター (D N A i n t e r c a l a t o r s)、毒素 (t o x i n)、サイトカイン、ケモカイン、抗生剤、放射性核種、光感覚剤、光熱ナノ素材、ナノパーティクル及びミセルからなる群から選択されることを特徴とする、請求項 17 に記載の結合体。

10

【請求項 19】

前記薬物は抗癌剤であることを特徴とする、請求項 17 に記載の結合体。

【請求項 20】

請求項 1 の抗体またはその機能的断片を有効成分として含む癌細胞特異的薬物伝達用組成物。

20

【請求項 21】

請求項 1 の抗体又はその機能的断片;及びそれと結合された薬物を有効成分として含む癌の予防及び治療用組成物。

【請求項 22】

請求項 1 の抗体又はその機能的断片を含む C A R (キメラ抗原受容体) タンパク質。

【請求項 23】

前記 C A R は、

i) 請求項 1 の抗体又はその機能的断片;

ii) 膜通過ドメイン (t r a n s m e m b r a n e d o m a i n);及び

iii) 細胞内シグナル伝達ドメイン (i n t r a c e l l u l a r s i g n a l i n g d o m a i n) を含むことを特徴とする、請求項 22 に記載の C A R タンパク質。

30

【請求項 24】

前記 iii) の細胞は免疫細胞であることを特徴とする、請求項 23 に記載の C A R タンパク質。

【請求項 25】

前記免疫細胞は T 細胞、NK (N a t u r a l K i l l e r) 細胞、NKT (N a t u r a l K i l l e r T) 細胞、単核球、マクロファージ及び樹状細胞からなる群から選択されることを特徴とする、請求項 24 に記載の C A R タンパク質。

【請求項 26】

前記細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3ゼータ (, z e t a)、TCRゼータ、FcRガンマ、FcRベータ、CD3ガンマ、CD3デルタ、CD3エプシロン、CDS、CD22、CD79a、CD79b、CD278、CD66d、DAP10、DAP12、FcRI 及びその組み合わせにより、なる群から選択されたシグナル伝達ドメインであることを特徴とする、請求項 23 に記載の C A R タンパク質。

40

【請求項 27】

前記細胞内シグナル伝達ドメインは共同刺激ドメイン (c o s t i m u l t a t o r y d o m a i n) をさらに含むことを特徴とする、請求項 23 に記載の C A R タンパク質。

【請求項 28】

50

前記の共同刺激ドメインはMHCクラスI分子(MHC class I molecules)、TNF受容体タンパク質(TNF receptor proteins)、免疫グロブリン-類似タンパク質(Immunoglobulin-like proteins)、サイトカイン受容体(cytokine receptors)、インテグリン(integrins)、SLAMタンパク質(signaling lymphocytic activation molecules)、NK細胞の活性化受容体(NK cell activating receptors)、BTLA、Tollリガンド受容体(Toll ligand receptor)、OX40、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CDS、ICAM-1、LFA-1(CD11a/CD18、lymphocyte function-associated antigen-1)、4-1BB(CD137)、B7-H3、CDS、ICAM-1、ICOS(CD278)、GITR、BAFFR、LIGHT、HVEM(LIGHTR)、KIRDS2、SLAMF7、NKp80(KLRF1)、NKp44、NKp30、NKp46、CD19、CD4、CD8alpha、CD8beta、IL2R beta、IL2R gamma、IL7R alpha、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、NKG2D、NKG2C、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1(CD226)、SLAMF4(CD244、2B4)、CD84、CD96(Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9(CD229)、CD160(BY55)、PSGL1、CD100(SEMA4D)、CD69、SLAMF6(NTB-A、Ly108)、SLAM(SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME(SLAMF8)、SELP1G(CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19a、CD83と特異的に結合するリガンド、PD-1およびその組み合わせからなる群から選択された共同刺激分子から由来したことを特徴とする、請求項27に記載のCARタンパク質。

【請求項29】

請求項22のCARタンパク質を暗号化するポリヌクレオチド。

【請求項30】

請求項22のCARタンパク質を暗号化するポリヌクレオチドを含む組換えベクター。

【請求項31】

請求項30の組換えベクターで形質転換された細胞。

【請求項32】

前記細胞は免疫細胞であることを特徴とする、請求項31に記載の形質転換された細胞。

【請求項33】

クローディングの細胞外第二ループ(extracellular second loop, ECL-2)に特異的結合する抗体又はその機能的断片を有効成分として含む細胞内薬物伝達用組成物。

【請求項34】

前記の断片はクローディングに結合した後、細胞質に内在化(internalization)されることを特徴とする、請求項28の組成物。

【請求項35】

クローディングの細胞外第二ループ(extracellular second loop, ECL-2)に特異的結合する抗体又はその機能的断片；及び薬物が結合された抗体-薬物複合体(antibody-drug conjugate)。

【請求項36】

前記薬物は、マイクロチューブリン(microtubulin)構造の形成の抑制剤、有糸分裂(meiosis)抑制剤、トポアイソマラーゼ(topoisomerase)抑制剤、DNAインターカレーター(DNA intercalators)、毒素(tox

10

20

30

40

50

in)、サイトカイン、ケモカイン、抗生剤、放射性核種、光感剤、光熱ナノ素材、ナノパーティクル及びミセルからなる群から選択されることを特徴とする、請求項35に記載の複合体。

【請求項37】

前記薬物は抗癌剤であることを特徴とする、請求項35に記載の複合体。

【請求項38】

クローディングの細胞外第二ループ(extracellular second loop, ECL-2)に特異的結合する抗体又はその機能的断片;及びそれと結合された薬物を有効成分として含む癌の予防及び治療用組成物。

【請求項39】

i)クローディングの細胞外第二ループ(extracellular second loop, ECL-2)に特異的結合する抗体又はその機能的断片;
ii)膜通過ドメイン(transmembrane domain);及び
iii)前記抗体に抗原が結合するとT細胞活性化をもたらす細胞内シグナル伝達ドメイン(intracellular signaling domain)を含CAR(chimeric antigen receptor)タンパク質。

10

【請求項40】

前記細胞内シグナル伝達ドメインは共同刺激ドメイン(costimulatory domain)をさらに含むことを特徴とするCAR(chimeric antigen receptor)タンパク質。

20

【請求項41】

請求項39のCARタンパク質を暗号化するポリヌクレオチド。

【請求項42】

請求項39のCARタンパク質を暗号化するポリヌクレオチドを含む組換えベクター。

【請求項43】

請求項42の組換えベクターで形質転換された細胞。

【請求項44】

クローディング検出用製剤を製造するための請求項1の抗体またはその機能的断片。

【請求項45】

請求項1の抗体又はその機能的断片を有効成分として含む組成物の有効量を、それを必要とする個体に投与する段階を含む癌の診断方法。

30

【請求項46】

癌診断用製剤を製造するための請求項1の抗体又はその機能的断片。

【請求項47】

請求項1の抗体又はその機能的断片を有効成分として含む組成物の有効量を、それを必要とする個体に投与する段階を含む癌診断方法。

【請求項48】

癌映像化用製剤を製造するための請求項1の抗体又はその機能的断片。

【請求項49】

請求項1の抗体又はその機能的断片を有効成分として含む組成物の有効量を、それを必要とする個体に投与する段階を含む癌映像化方法

40

【請求項50】

癌の予防及び治療用製剤を製造するための請求項1の抗体又はその機能的断片。

【請求項51】

請求項1の抗体又を有効成分として含む組成物の有効量をそれを必要とする個体に投与する段階を含む癌の治療方法。

【請求項52】

癌細胞特異的薬物伝達用製剤を製造するための請求項1の抗体又はその機能的断片。

【請求項53】

請求項1の抗体又はその機能的断片を有効成分として含む組成物の有効量を、それを必要

50

とする個体に投与する段階を含む癌細胞特異的薬物伝達方法。

【請求項 5 4】

癌の予防及び治療用製剤を製造するための請求項 1 の抗体又はその機能的断片；及び薬物が結合された抗体 - 薬物重合体。

【請求項 5 5】

請求項 1 の抗体又はその機能的断片；及び薬物が結合された抗体 - 薬物重合体を有効成分として含む組成物の有効量を、それを必要とする個体に投与する段階を含む癌の予防及び治療方法。

【請求項 5 6】

細胞内薬物伝達用製剤を製造するためのクローディン 3 の細胞外第二ループ (e x t r a c e l l u l a r s e c o n d l o o p , E C L - 2) に特異的結合する抗体又はその機能的断片。

10

【請求項 5 7】

クローディン 3 の細胞外第二ループ (e x t r a c e l l u l a r s e c o n d l o o p , E C L - 2) に特異的結合する抗体又はその機能的断片を有効成分として含む組成物の有効量を、それを必要とする個体に投与することを特徴する細胞内薬物伝達方法。

【請求項 5 8】

癌の予防及び治療用製剤を製造するためのクローディン 3 の細胞外第二ループ (e x t r a c e l l u l a r s e c o n d l o o p , E C L - 2) に特異的結合する抗体又はその機能的断片；及びそれと結合された薬物。

20

【請求項 5 9】

クローディン 3 の細胞外第二ループ (e x t r a c e l l u l a r s e c o n d l o o p , E C L - 2) に特異的結合する抗体又はその機能的断片；及びそれと結合された薬物を有効成分として含む組成物の有効量を、それを必要とする個体に投与する段階を含む癌の治療方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は 2018 年 3 月 28 日に出願された大韓民国特許出願第 10 - 2018 - 0036190 号を優先権として主張し、前記の明細書全体は出願の参考文献である。

30

【0002】

本発明はクローディン 3 の E C L - 2 (e x t r a c e l l u l a r s e c o n d l o o p) に特異的に結合する抗体、その断片及びその使用に関するもので、より詳しくはクローディン 3 の E C L - 2 に特異的に結合する抗体及びその機能的断片らの癌細胞検出、診断、映像化、癌の治療への適用使用（抗体自体の抗がん使用、A D C 及び C A R - 発現細胞（特に、免疫細胞）への適用）と、このような使用において顕著な効果を示す特有の C D R 配列を含む抗体及びその機能的断片に関するものである。

【背景技術】

【0003】

クローディン (c l a u d i n) は、細胞間の密着結合 (t h i g h j u n c t i o n , T J) の主要必須膜タンパク質として哺乳類の場合 27 個のファミリーがあり、ヒトの場合は哺乳類からクローディン 13 を除いたクローディンファミリーを有している。クローディンファミリーは細胞壁を透過して刺されている形態の類似した構造を有し、殆ど 2 つの細胞外ループ (e x t r a c e l l u l a r l o o p) を有している構造を有している。クローディンは細胞間分子らの流れを制御する役割をすることが知られているが、最近様々な研究を通して結腸癌、胃癌、乳房癌、食道癌及び卵巣癌など、癌の発生にも密接な関連性があるという研究が報告されている。悪性腫瘍の約 90% は上皮 (e p i t h e l i u m) に由来する。正常上皮細胞では、細胞は上皮面 (e p i t h e l i a l p l a n e) と平行に配置される。したがって、正常的な上皮組織の間の T J を成すクローディンは組織又は器官の表面から検出され難いが、上皮腫瘍細胞発生の初期段階から有系

40

50

分裂紡錘体 (mitotic spindle) の調節が解除され、細胞が平面から外れた分裂により増殖されることで、クラウディンが組織表面に露出される。

【0004】

特に、明確な症状が無く、手術と科学的療法以外に適切な治療方法が無い場合、予後が思わしくないと知られている卵巣癌からクラウディンファミリーの内、クラウジン3とクラウジン4が過剰発現されることが報告された (Claudin Proteins in Human Cancer: Promising New Targets for Diagnosis and Therapy, P. J. Morin, Cancer Res. 65:9604-9006 (2005))。又、84人の卵巣漿液腺癌 (ovarian serous adenocarcinoma) 患者の生存率とクラウジン3の発現率をKaplan-Meier法の生存カーブで確認した結果、クラウジン3の発現率は患者の寿命短縮と密接な関係があるという研究が報告された (Expression profile of tight junction protein claudin 3 and claudin 4 in ovarian serous adenocarcinoma with prognostic, Choi et al., Histol. Histopathol. 22:1185~1195 (2005))。このように、癌の組織で特異性が高いクラウジン発現の増減有無は癌の生成に対する予測指示因子として使うことが可能なため、又、癌の診断と治療においてクラウジンが有用なバイオマーカーとされ、様々なグループでクラウジンをターゲットにする治療剤の開発を試みている。

10

20

【0005】

一方、抗体-薬物-複合体 (ADC, antibody drug conjugate) は単クローン抗体の標的特異性と薬物の効能 (例えば、細胞毒性) の特性を組み合わせたものである。ADCは薬物、単クローン抗体、そして抗体と薬物を繋ぐリンカー (linker) を含む3つの主要要素で構成されており、ADCテクノロジーは主に癌細胞の表面に発現された特定抗原に特異的に結合する抗体を使用して、薬物を腫瘍細胞に伝達する方法として使われている。しかし、単に特定癌抗原を標的とする抗体がADCに全て適用できるのではない。

【0006】

従来抗体は、大きいサイズと親水性の特徴のため、生きている細胞の内部に直接浸透することができない。したがって、従来殆どの抗体は細胞外に分泌されたタンパク質又は細胞膜タンパク質を特異的に標的している。一般的な抗体と高分子バイオ医薬品は疎水性である細胞膜の通過が不可能であり、それによって細胞質内部の多様な病気関連物質と結合及び阻害できない限界がある。一般的に細胞の生長、特異的抑制等の機構研究のための実験で使われる細胞内部物質と特異的結合する商業的抗体は生きている細胞に対して直接処理ができず、細胞内部物質と結合するためには両親媒性グリコサイドのサポニン (saponin) を利用した細胞膜透過化 (permeabilization) 過程を通じて、細胞膜に穿孔を形成するための前処理過程が必ず必要である。低分子物質、核酸又はナノ粒子等の場合、様々な試薬、電気穿孔法又は熱衝撃などの方法を使うことで、生きている細胞内部へ輸送できるようになるが、タンパク質及び抗体の場合、前記の殆どの試薬と実験条件等が固有な3次構造に悪影響を及ぼし、活性を消失する可能性がある。細胞内部タンパク質を特異的に結合し、活性を阻害する細胞内抗体 (intracellular antibody, intrabody) が開発されているが、それもまた生きている細胞の細胞膜を浸透する活性がないため、遺伝子治療 (gene therapy) の使用のみに適用が可能なため、今後の応用可能性が極めて制限される (Manikandan Jet al., Protein i:interference at protein level by intrabodies, Front Biosci, 2007 Jan 1; 12:1344-52)。

30

40

【0007】

抗体-薬物複合体 (ADC)、免疫毒素、そして標的化された核酸伝達をはじめとする幾

50

つかの治療的アプローチは、受容体に結合するだけでなく、結合時に細胞内に内在化 (i n t e r n a l i z a t i o n) する抗体を必要とする。ADCが優れた薬効を示すためにはADCが細胞内に入る (i n t e r n a l i z a t i o n 、 内在化) 過程が必要であることが知られているが、抗体によっては細胞内に入れる能力が無いが、又はこれに対する偏差が極めて大きいため、実際にADCで開発可能な抗体とこれらの効果が制限的であることが実情である。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

そこで、本発明者等はADC (抗体 - 薬物複合体) に使用に適した様々な特徴を兼備する抗体を開発するため研究していた中、クローニン3 E C L - 2 に特異的に結合する抗体及びその機能的断片の癌細胞検出、診断、映像化、癌治療への適用 (ADC 及び C A R - 発現細胞 (特に、免疫細胞) への適用等) 価値を確認し、このような具体的な一例として本発明で提供する特有のCDR配列を含む抗体が自ら抗癌能力を有しているだけでなく、他のクローニンファミリーとの交差反応性が無く、優れた癌細胞標的能力を示し、従来公知のクローニン3抗体と比べて極めて優れた結合力 (親和度) を示し、細胞内在化 (i n t e r n a l i z a t i o n) などの特性を保有し、前記の適用において著しい効果を示すことを確認し、本発明を完成させた。

10

【0009】

従って、本発明の目的は、配列番号3で表されるアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定部位1 (V H - C D R 1) 、配列番号4で表されるアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定部位2 (V H - C D R 2) 、及び配列番号5で表されるアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定部位3 (V H - C D R 3) を含む重鎖可変領域 ; 及び配列番号6で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定部位1 (V L - C D R 1) 、配列番号7で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定部位2 (V L - C D R 2) 、及び配列番号8で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定部位3 (V L - C D R 3) を含む軽鎖可変領域を含む抗体又はその機能的断片を提供することである。

20

【0010】

本発明の他の目的は、前記の抗体又はその機能的断片を暗号化するポリヌクレオチド、それを含むベクター、それを含む細胞及びそれを利用した前記の抗体又はその機能的断片を生産する方法を提供することである。

30

【0011】

本発明の他の目的は、前記の抗体又はその機能的断片を有効成分と含むクローニン3検出用組成物及びそれを利用したクローニン3の検出方法を提供することである。

【0012】

また、前記の抗体又はその機能的断片で構成されるクローニン3の検出用組成物及びそれを利用したクローニン3の検出方法を提供することである。

【0013】

また、前記の抗体又はその機能的断片で必須的に構成されるクローニン3の検出用組成物お及びそれを利用したクローニン3の検出方法を提供することである。

40

【0014】

本発明のさらに他の目的は、前記の抗体又はその機能的断片を有効成分として含む癌診断用又は映像化用組成物を提供することである。

【0015】

また、前記の抗体又はその機能的断片で構成される癌診断用又は映像化用組成物を提供することである。

【0016】

また、前記の抗体又はその機能的断片で必須的に構成される癌診断用又は映像化用組成物を提供することである。

【0017】

50

本発明のさらに他の目的は、具体的に前記の抗体又はその機能的断片を有効成分として含む癌細胞特異的薬物伝達用組成物を提供することである。

【0018】

また、前記の抗体又はその機能的断片で構成される癌細胞特異的薬物伝達用組成物を提供することである。

【0019】

また、前記の抗体又はその機能的断片で必須的に構成される癌細胞特異的薬物伝達用組成物提供することである。

【0020】

また、本発明のさらに他の目的は、クローディング3の細胞外第二ループ (extracellular second loop, ECL-2) に特異的に結合する抗体又はその機能的断片を有効成分として含む細胞内薬物伝達用組成物を提供することである。

10

【0021】

また、クローディング3の細胞外2番目ループ (extracellular second loop, ECL-2) に特異的に結合する抗体又はその機能的断片で構成される細胞内薬物伝達用組成物を提供することである。

【0022】

また、クローディング3の細胞外2番目ループ (extracellular second loop, ECL-2) に特異的に結合する抗体又はその機能的断片で必須的に構成される細胞内薬物伝達用組成物を提供することである。

20

【0023】

本発明のさらに他の目的は、前記の抗体又はその機能的断片；及び薬物が結合された抗体-薬物複合体 (antibody-drug conjugate) とそれを有効成分として含む癌の予防及び治療用組成物を提供することである。

【0024】

また、前記の抗体又はその機能的断片；及び薬物が結合された抗体-薬物複合体 (antibody-drug conjugate) とそれを有効成分として構成される癌の予防及び治療用組成物を提供することである。

【0025】

また、前記の抗体又はその機能的断片；及び薬物が結合された抗体-薬物複合体 (antibody-drug conjugate) とそれを有効成分として必須的に構成される癌の予防及び治療用組成物を提供することである。

30

【0026】

また、本発明のさらに他の目的はクローディング3の細胞外第二ループ (extracellular second loop, ECL-2) に特異的に結合する抗体又はその機能的断片；及び薬物が結合された抗体-薬物複合体とそれを有効成分として含む癌の予防及び治療用組成物を提供することである。

【0027】

また、クローディング3の細胞外第二ループ (extracellular second loop, ECL-2) に特異的に結合する抗体又はその機能的断片；及び薬物が結合された抗体-薬物複合体 (antibody-drug conjugate) とそれを有効成分として構成される癌の予防及び治療用組成物を提供することである。

40

【0028】

本発明のさらに他の目的は、i) 前記の本発明の抗体又はその機能的断片；ii) 膜通過ドメイン (transmembrane domain)；及びiii) 細胞内シグナル伝達ドメイン (intracellular signaling domain) を含むCAR (chimeric antigen receptor) タンパク質を提供することである。また、i) クローディング3細胞外第二ループ (extracellular second loop, ECL-2) に特異的に結合する抗体又はその機能的断片；ii) 膜通過ドメイン (transmembrane domain)；及びiii)

50

細胞内シグナル伝達ドメイン (intracellular signaling domain) を含む CAR (chimeric antigen receptor) タンパク質を提供することである。

【0029】

本発明のさらに他の目的は、前記の CAR (chimeric antigen receptor) タンパク質を暗号化するポリヌクレオチドと、それを含む組換えベクター、及び前記のベクターで形質転換された細胞 (特に、免疫細胞) を提供することである。

【0030】

本発明のさらに他の目的は、クローディング 3 検出用製剤、癌診断用製剤、癌映像用製剤、癌細胞特異的薬物伝達用製剤を製造するための前記の抗体又はその機能的断片の使用を提供することである。

10

【0031】

本発明のさらに他の目的は、前記の抗体又はその機能的断片を有効成分として含む組成物の有効量はそれを必要とする個体に投与する段階を含むクローディング 3 の特異的検出方法、癌診断方法、癌映像化方法、癌細胞特異的薬物伝達方法を提供することである。

【0032】

本発明のさらに他の目的は、癌の予防及び治療用製剤を製造するための前記の抗体の使用又は前記の抗体又はその機能的断片；及び薬物が結合された抗体 - 薬物重合体の使用を提供することである。

【0033】

本発明のさらに他の目的は、前記の抗体を有効成分として含む組成物又は前記の抗体又はその機能的断片；及び薬物が結合された抗体 - 薬物重合体を有効成分として含む組成物の有効量を、それを必要とする個体に投与する段階を含む癌の予防及び治療方法を提供することである。

20

【0034】

本発明のさらに他の目的は、細胞内薬物伝達用製剤を製造するためのクローディング 3 の細胞外第二ループ (extracellular second loop, ECL - 2) に特異的に結合する抗体又はその機能的断片の使用を提供することである。

【0035】

本発明のさらに他の目的は、クローディング 3 の細胞外第二ループ (extracellular second loop, ECL - 2) に特異的に結合する抗体又はその機能的断片を有効成分として含む組成物の有効量を、それを必要とする個体に投与する段階を含む細胞内薬物伝達方法を提供することである。

30

【0036】

本発明のさらに他の目的は、クローディング 3 の細胞外第二ループ (extracellular second loop, ECL - 2) に特異的に結合する抗体又はその機能的断片；及び薬物が結合された抗体 - 薬物重合体の使用を提供することである。

【0037】

本発明のさらに他の目的は、クローディング 3 の細胞外第二ループ (extracellular second loop, ECL - 2) に特異的に結合する抗体又はその機能的断片；及び薬物が結合された抗体 - 薬物重合体を有効成分として含む組成物の有効量を、それを必要とする個体に投与する段階を含む癌の予防及び治療方法を提供することである。

40

【課題を解決するための手段】

【0038】

前記のような目的を達成するために、本発明は配列番号 3 から表されるアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定領域 1 (VH - CDR 1)、配列番号 4 から表されるアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定領域 2 (VH - CDR 2)、配列番号 5 から表されるアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定領域 3 (VH - CDR 3) を含む重鎖可変領域；及び

配列番号 6 で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定領域 1 (VL - CDR 1)、配

50

列番号7で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定領域2 (VL-CDR2)、及び配列番号8で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定領域3 (VL-CDR3)を含む軽鎖可変領域を含む抗体又はその機能的断片を提供する。

【0039】

本発明の他の目的を達成するため、本発明は前記の抗体又はその機能的断片を暗号化するポリヌクレオチド、それを含むベクター、それを含む細胞及びそれを利用した前記の抗体又はその機能的断片を生産する方法を提供する。

【0040】

本発明のさらに他の目的を達成するため、本発明は前記の抗体又はその機能的断片を有効成分として含むクローニン3検出用組成物及びそれを利用したクローニン3の検出方法を提供する。

10

【0041】

また、本発明は前記の抗体及びその機能的断片で構成されるクローニン3検出用組成物及びそれを利用したクローニン3の検出方法を提供する。

【0042】

また、本発明は前記の抗体及びその機能的断片で必須的に構成されるクローニン3検出用組成物及びそれを利用したクローニン3の検出方法を提供する。

【0043】

本発明のさらに他の目的を達成するために、本発明は前記の抗体又はその機能的断片を有効成分として含む癌診断用又は映像化用組成物を提供する。

20

【0044】

また、本発明は前記の抗体又はその機能的断片で構成される癌診断用又は映像化用組成物を提供する。

【0045】

また、本発明は前記の抗体又はその機能的断片で必須的に構成される癌診断用又は映像化用組成物を提供する。

【0046】

本発明のさらに他の目的を達成するために、本発明は前記の抗体を有効成分として含む癌の予防及び治療用組成物を提供する。

【0047】

また、本発明は前記の抗体で構成される癌の予防及び治療用組成物を提供する。

30

【0048】

また、本発明は前記の抗体で必須的に構成される癌の予防及び治療用組成物を提供する。

【0049】

本発明のさらに他の目的を達成するために、本発明は前記の抗体又は、その機能的断片を有効成分として含む癌細胞特異的薬物伝達用組成物を提供する。

【0050】

また、本発明は前記の抗体又はその機能的断片で構成される癌細胞特異的薬物伝達用組成物を提供する。

【0051】

また、本発明は前記の抗体又はその機能的断片で必須的に構成される癌細胞特異的薬物伝達用組成物を提供する。

40

【0052】

また、本発明のさらに他の目的を達成するために、本発明はクローニン3の細胞外第二ループ (extracellular second loop, ECL-2) に特異的に結合する抗体又はその機能的断片で構成される細胞内薬物伝達用組成物を提供する。

【0053】

また、本発明のさらに他の目的を達成するために、本発明はクローニン3の細胞外第二ループ (extracellular second loop, ECL-2) に特異的に結合する抗体又はその機能的断片で必須的に構成される細胞内薬物伝達用組成物を提供

50

する。

【0054】

本発明のさらに他の目的を達成するために、本発明は前記の抗体又はその機能的断片；及び薬物が結合された抗体-薬物複合体 (antibody-drug conjugate) とそれを有効成分として含む癌の予防及び治療用組成物を提供する。

【0055】

また、本発明は前記の抗体又はその機能的断片；及び薬物が結合された抗体-薬物複合体 (antibody-drug conjugate) とそれを有効成分として構成される癌の予防及び治療用組成物を提供する。

【0056】

また、本発明は前記の抗体又はその機能的断片；及び薬物が結合された抗体-薬物複合体 (antibody-drug conjugate) とそれを有効成分として必須的に構成される癌の予防及び治療用組成物を提供する。

【0057】

また、本発明のさらに他の目的を達成するために、本発明はクローディン3の細胞外第二ループ (extracellular second loop, ECL-2) に特異的に結合する抗体-薬物複合体とそれを有効成分として構成される癌の予防及び治療用組成物を提供する。

【0058】

また、本発明のさらに他の目的を達成するために、本発明はクローディン3の細胞外第二ループ (extracellular second loop, ECL-2) に特異的に結合する抗体-薬物複合体とそれを有効成分として必須的に構成される癌の予防及び治療用組成物を提供する。

【0059】

本発明のさらに他の目的を達成するために、本発明は i) クローディン3の細胞外第二ループ (extracellular second loop, ECL-2) に特異的に結合する抗体又はその機能的断片；ii) 膜通過ドメイン (transmembrane domain)；及び iii) 細胞内シグナル伝達ドメイン (intracellular signaling domain) を含む CAR (chimeric antigen receptor) タンパク質を提供する。また、i) クローディン3細胞外第二ループ (extracellular second loop, ECL-2) に特異的に結合する抗体又はその機能的断片；ii) 膜通過ドメイン (transmembrane domain)；及び iii) 細胞内シグナル伝達ドメイン (intracellular signaling domain) を含む CAR (chimeric antigen receptor) タンパク質を提供する。

【0060】

本発明のさらに他の目的を達成するために、本発明は前記の CAR (chimeric antigen receptor) タンパク質を暗号化するポリヌクレオチドと、それを含む組換えベクター、及び前記のベクターで形質転換された細胞 (特に、免疫細胞) を提供する。

【0061】

本発明のさらに他の目的を達成するために、クローディン3検出用製剤、癌診断用製剤、癌映像用製剤、癌細胞特異的薬物伝達用製剤を製造するための前記抗体又はその機能的断片の使用を提供する。

【0062】

本発明のさらに他の目的を達成するために、前記の抗体又はその機能的断片を有効成分と含む組成物の有効量はそれを必要とする個体に投与する段階を含むクローディン3の特異的検出方法、癌診断方法、癌映像化方法、癌細胞特異的薬物伝達方法を提供する。

【0063】

本発明のさらに他の目的を達成するために、癌の予防及び治療用製剤を製造するための前

10

20

30

40

50

記抗体の使用又は前記抗体又はその機能的断片；及び薬物が結合された抗体 - 薬物重合体の使用を提供する。

【0064】

本発明のさらに他の目的を達成するために、前記抗体を有効成分として含む組成物又は前記抗体又はその機能的断片；及び薬物が結合された抗体 - 薬物重合体を有効成分として含む組成物の有効量を、それを必要とする個体に投与する段階を含む癌の予防及び治療方法を提供する。

【0065】

本発明のさらに他の目的を達成するために、細胞内薬物伝達用製剤を製造するためのクローディングの細胞外第二ループ (extracellular second loop, ECL-2) に特異的に結合する抗体又はその機能的断片の使用を提供する。

10

【0066】

本発明のさらに他の目的を達成するために、クローディングの細胞外第二ループ (extracellular second loop, ECL-2) に特異的に結合する抗体又はその機能的断片を有効成分として含む組成物の有効量を、それを必要とする個体に投与する段階を含む細胞内薬物伝達方法を提供する。

【0067】

本発明のさらに他の目的を達成するために、クローディングの細胞外第二ループ (extracellular second loop, ECL-2) に特異的に結合する抗体又はその機能的断片；及び薬物が結合された抗体 - 薬物重合体の使用を提供する。

20

【0068】

本発明のさらに他の目的を達成するために、クローディングの細胞外第二ループ (extracellular second loop, ECL-2) に特異的に結合する抗体又はその機能的断片；及び薬物が結合された抗体 - 薬物重合体を有効成分として含む組成物の有効量を、それを必要とする個体に投与する段階を含む癌の予防及び治療方法を提供する。

【0069】

以下、本発明を詳しく説明する。

本発明への用語“抗体 (antibody)”とは、免疫グロブリン (immunoglobulin, Ig) とも称され、抗原に選択的に作用して生態免疫に関与するタンパク質の総称である。自然で発現される全体抗体 (whole antibody) は一般に複数のドメインからなるポリペプチドの軽鎖 (light chain, LC) 及び重鎖 (heavy chain, HC) の2つのペアからなるか、それら HC / LC の2つのペアで成している構造を基本単位とする。哺乳類の抗体を構成する重鎖の種類はギリシャアルファベット、 α 、 β 、 γ 、 μ 、及び δ で表示される5つのタイプがあって、重鎖の種類によりそれぞれ IgA、IgD、IgE、IgG 及び IgM 等、他の種類の抗体を構成するようになる。哺乳類の抗体を構成する軽鎖の種類は κ 及び λ で表示される2つの種類が存在する。

30

【0070】

抗体の重鎖と軽鎖は構造的にアミノ酸配列の可変性により可変領域と不変領域に区切られる。重鎖の不変領域は抗体の種類により CH1、CH2 及び CH3 (IgA、IgD 及び IgG 抗体) 及び CH4 (IgE 及び IgM 抗体) 等、3つ又は4つの重鎖不変領域で構成されていて、軽鎖は1つの不変領域の CL で構成されている。重鎖と軽鎖の可変領域はそれぞれ重鎖可変領域 (VH) 又は軽鎖可変領域 (VL) の一つのドメインから成っている。軽鎖と重鎖はそれぞれの可変領域と不変領域が並べて一つの共有ジスルフィド結合 (disulfide bond) により連結され、軽鎖と結合した2つの分子の重鎖は、2つの共有ジスルフィド結合を通過して連結されて、全体抗体の形を形成する。全体抗体は重鎖及び軽鎖の可変領域を介して、抗原に特異的に結合し、全体抗体は2つの重鎖及び軽鎖の双 (HC / LC) で構成されているため、1つの分子の全体抗体は2つの可変領域を通過して同一な2つの抗原に結合する二価の単一特異性を有することになる。

40

50

【0071】

抗体が抗原に結合する部位を含む可変領域は配列可変性の少ないフレームワーク領域 (framework region , FR) と配列可変性の高い超可変領域 (hypervariable region) の相補性決定領域 (complementary determining region , CDR) に細分される。VHとVLはそれぞれ3つのCDR及び4つのFRがN - 末端からC - 末端の方向にFR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4順で配列されている。抗体の可変領域の中でも配列可変性の一番高いCDRが抗原と直接結合する部位であって、抗体の抗原特異性に最も重要である。

【0072】

本発明で用語“親和度”は分子(例、抗体)の単一結合部位とその結合相手(例、抗原)の間に非共有的相互作用の総合の強度を意味する。他に示さない限り、本願で使われたように、“結合親和度”は結合対の構成員等(例えば、抗体及び抗原)の間の1:1相互作用を反映する固有結合親和度を意味する。分子Xのその相手Yに対する親和度は一般に解離定数(Kd)に表される。本発明で、抗体の“親和度”はKdで表現され、それは前述したように抗体 - 抗原相互作用の平衡解離定数を意味する。抗原に対する抗体結合においてKdの値が大きいほど、特定抗原に対する結合親和度はさらに弱い。前記Kd又は親和度は当該分野に公知された通常の方法により測定可能であって、例え、Surface Plasmon Resonance , Ligand Tracer Green等の測定機器を利用することができる。

【0073】

本発明で“クローディン3 (claudin 3 , CLDN3にも表記) ”はクローディンファミリーに属するタンパク質であり、密着結合 (tight junctions) が発するところに存在し、密着結合から細胞間の空間を除去する特有の役割を有する。密着結合 (tight junctions) は動物のような有機体の組織から引接した細胞膜を連結する頑固な構造物である。クローディン3はイオンのような小さい溶質 (solute) の細胞間透過性を調節する構造タンパク質である。クローディン3は4つの膜通過 (transmembrane) 領域を有するタンパク質であり、2つのペプチドループ (loop) を細胞外部に露出させる構造を有している。2つのペプチドループの内、クローディン3全体タンパク質配列により、N - 末端に近いアミノ酸領域のループを細胞外第一ループ (本発明でECL - 1又はEL1で表記) と称し、もう一つのループを本発明で細胞外第二ループ (本発明でECL - 2又はEL2で表記) と称する。好ましくは、前記細胞外第一ループは、クローディン3タンパク質アミノ酸配列の27乃至80番目のアミノ酸を含む領域で、細胞外第二ループは、クローディン3タンパク質アミノ酸配列の144乃至159番目アミノ酸を含む領域 (配列番号2参照) を意味する。

【0074】

Claudin3はウエルシュ菌エンテロトキシン (Clostridium perfringens enterotoxin) (CPE) に対する毒素受容体として機能すると知られている。CPEはClaudin3とClaudin4に結合すり次第、細胞壊死を起こす大きな複合体を形成して細胞膜に空隙を生成する。

【0075】

一方、クローディンタンパク質の細胞外ドメインはTJ (密着結合) の形成に關与するが、正常の上皮細胞単一層 (normal confluent epithelial cell monolayer) でClaudin3は側面膜の最頂端部 (apical site of the lateral membrane) のTJストランドの中に存在するとされるが、上皮腫瘍形成及び腫瘍細胞からの非表面 (out-of-plane) 分化の間の有糸分裂紡錘体の調節障害は細胞表面のTJ成分の非常識的位置を誘導することと推測される (Saeki R , et al . , Potency of claudin-targeting as antitumor therapy Mol Cell Pharmacol . 2010 ; 2 : 47 - 51 .) 。それに関して、Cla

10

20

30

40

50

u d i n 3 タンパク質は卵巣癌、前立腺癌、乳房癌、子宮癌、肝臓癌、肺癌、膵臓癌、胃癌、膀胱癌及び結腸癌のような多くの癌組織からの露出程度が増加することと報告された。Swedish Human Protein Atlas (HPA) ウェブサイト (<http://www.proteinatlas.org/>) を病気に対する Claudin 3 の発現プロファイルの参考資料として用いられる。Claudin 3 と Claudin 4 の発現は化学用法耐性及び / 又は再発性子宮癌で特に高まるが、それはアメリカで婦人科の癌の内、最も致死率が高いと知られている。しかし、今まで腫瘍状態から露出される Claudin 3 を特異的に検出するには限界を示しているのが実情である。

【0076】

本発明でクローディング 3 は、当業界でクローディング 3 として知られたものなら、その具体的生物起源及び配列に特別な制限が無い。一例で本発明のクローディング 3 はマウス (Mus musculus) 由来のものとして、NCBI (Genbank) Accession No. Q9Z0G9 等で公知されたもの、ラット (Rattus norvegicus) 由来のものとして、NCBI (Genbank) Accession No. Q63400 等で公知されたもの、トリ (Gallus gallus) 由来のものとして、NCBI (Genbank) Accession No. Q98SR2 等で公知されたもの、イヌ (Canis lupus familiaris) 由来のものとして、NCBI (Genbank) Accession No. Q95KM5 等で公知されたもの、サル (Macaca mulatta) 由来のものとして、UniProtKB Entry . F6RQF6 等で公知されたもの、ヒト (homo sapiens) 由来のものとして、NCBI (Genbank) Accession No. O15551 (配列番号 1 参照) 等で公知されたものを含むことができる。

【0077】

そして、このような抗体及びその機能的断片の一例として、本発明から提供する特有の CDR 配列を有する抗体がクローディング 3 発現細胞に対する ADCC (Antibody dependent cell cytotoxicity、抗体依存性細胞障害作用) 効果が著しく、自ら抗癌効果を有しているだけでなく、他のクローディングファミリーとの交差反応性が無く、クローディング 3 のみを特異的に標的する能力が優れていて、従来公知のクローディング 3 抗体と比較して極めて優れた結合能力 (親和度) を示し、また細胞内部に入る (internalize、内在化する) 能力を有して癌の診断、映像化及び薬物伝達体としての機能が優れていることを確認した。特に本発明の抗体及びその機能的断片はクローディング 3 の ECL-2 領域に特異的に付着するが、それによりクローディング 3 が表面に露出されない通常の正常組織とは違い、不完全な接続 (junction) を形成する腫瘍組織に本発明の抗体が (又はその機能的断片が) 選択的接近可能になり、そのような能力は正常細胞に対する抗癌薬物の毒性問題を凄まじく低減させるもので、より技術的意義が大きい。

【0078】

具体的に本発明は、後記の CDR 配列を含むことを特徴とする重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む抗体又はその機能的断片を提供する：

【0079】

配列番号 3 で表されるアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定部位 1 (VH-CDR1)、配列番号 4 で表されるアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定部位 2 (VH-CDR2)、及び配列番号 5 で表されるアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定部位 3 (VH-CDR3) を含む重鎖可変領域；及び
配列番号 6 で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖相補決定部位 1 (VL-CDR1)、配列番号 7 で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖相補決定部位 2 (VL-CDR2)、配列番号 8 で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖相補決定部位 3 (VL-CDR3) を含む軽鎖可変領域。

【0080】

また本発明は、後記の CDR 配列を含むことを特徴とする重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を

含む抗体及びその機能的断片を提供する：

【0081】

配列番号18で表されるアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定部位1 (VH - CDR1)、配列番号19で表されるアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定部位2 (VH - CDR2)、及び配列番号20で表されるアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定部位3 (VH - CDR3)を含む重鎖可変領域；及び

配列番号21で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖相補決定部位1 (VL - CDR1)、配列番号22で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖相補決定部位2 (VL - CDR2)、配列番号23で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖相補決定部位3 (VL - CDR3)を含む軽鎖可変領域。

10

【0082】

本発明による抗体は前記のCDRの組合せを有するのであれば、その種類に制限はない。具体的にはIgG、IgA、IgM、IgE及びIgDからなる群から選ばれるものもあり、特にIgG抗体であることが望ましい。前記IgGはその亜型としてIgG1、IgG2、IgG3、IgG4等を含むが、それに限定されない。また1つのB細胞から由来する単クローン (monoclonal) 抗体の可能性があり、複数のB細胞から由来するポリクローナル (polyclonal) 抗体の可能性もあるが、抗体の重鎖と軽鎖のアミノ酸配列が実質的に同一の抗体の集団の単クローン抗体であることが望ましい。また、本発明の抗体又はその断片は酵素、蛍光物質、放射線物質及びタンパク質等と接合したものもあるが、これに限定されない。

20

【0083】

本発明の抗体はヒトを含む哺乳動物、鳥類等を含む任意の動物から由来したものもあり、望ましくはヒトから由来するものか、ヒトから由来した抗体の部分と別種の動物から由来した抗体の部分を含むキメリック (chimeric) 抗体もある。

【0084】

また、本発明から抗体の機能的断片は全体抗体の抗原特異的結合力を維持している断片を意味し、具体的にはFab、F(ab')、F(ab')₂、Fv、scFv、ディアボディ (diabody) 又はdsFvなどの形態もある。

【0085】

Fab (fragment antigen-binding) は抗体の抗原結合断片で、重鎖と軽鎖それぞれの一つの可変ドメインと不変ドメインで構成される。F(ab')₂ は抗体をペプシンで加水分解させて生成される断片で、2つのFabが重鎖ヒンジ (hinge) でジスルフィド結合 (disulfide bond) により繋がる形をしている。F(ab') はF(ab')₂ 断片のジスルフィド結合を還元して分離させたFabに重鎖ヒンジが加わった形の段量体抗体断片である。Fv (variable fragment) は重鎖と軽鎖それぞれの可変領域のみに構成される抗体の断片である。scFv (single chain variable fragment) は重鎖可変領域 (VH) と軽鎖可変領域 (VL) が柔軟なペプチドリンカーで繋がれている組換え抗体断片である。ディアボディ (diabody) はscFvのVHとVLが極めて短いリンカーで連結され、互いに結合できず、同一な形の他のscFvのVLとVHとそれぞれ結合し、二量体を形成している形の断片を意味する。dsFvはVH及びVLのうちそれぞれ一つのアミノ酸残基をシステイン残基に置換したポリペプチドを、当該システイン残基間のS-S結合を介在して結合させたものを意味する。システイン残基に置換されるアミノ酸残基はReiter等により記載された方法 [参照：Protein Engineering, 7, 697 (1994)] により抗体の立体構造予測に根拠して選択できる。

30

40

【0086】

本発明の前記又はその機能的断片はクローディン3に特異的に結合し、特にクローディン3のECL-2 (extracellular loop 2) に極めて高い親和度 (affinity) に特異的に付着して細胞内部に内在化 (internalization)

50

n) することを特徴とする。

【0087】

前記のクローディン3は当業界にクローディン3として知られたものなら、その具体的生物起源に特に制限は無く、一例で前述したものと同様のマウス由来、ヒト由来、ラット由来、トリ由来、イヌ由来又はサル由来のものなどを含む。望ましくヒト由来のものを意味するものもあり、ヒトクローディン3のECL-2は望ましく配列番号2で表されるアミノ酸配列を含む。

【0088】

本発明の一実施例では本発明の抗体がクローディン3と系統解析的に柔軟関係が高い他のクローディンファミリーとは交差反応性が無いことを確認し、本発明の抗体の結合特異性が相当に優れていることを証明している。このような高いレベルの結合特異性はクローディン3(特にヒトクローディン3)を検出し、それを特定の病気(特に、クローディン3の異常な(過剰)発現を特徴とする疾患)の診断及び映像化などに利用し、高い正確性を有する情報を提供することができるので、極めて意味が深い。

10

【0089】

したがって、本発明は前記抗体又はその機能的断片を有効成分として含むクローディン3検出用組成物及びキットを提供する。また、本発明は、(1)前記本発明の抗体又はその機能的断片を試料と接触させる段階、及び(2)前記抗体又はその機能的断片を検出する段階を含むクローディン3の特異的検出方法を提供する。

【0090】

また、本発明は前記抗体及びその機能的断片で構成されるクローディン3検出用組成物及びキットを提供する。

20

【0091】

また、本発明は前記抗体及びその機能的断片で必須的に構成されるクローディン3検出用組成物及びキットを提供する。

【0092】

本発明の前記抗体又はその機能的断片は、クローディン3との結合の有無を確認し、検出及び定量を容易にするために、標識された状態で提供されることができる。即ち、検出可能な標識にリンク(例:共有結合及び架橋)されて提供されることができる。前記検出可能な標識は、それに制限されないが、発色酵素(例:ペルオキシダーゼ、アルカラインホスファターゼ)、放射性同位元素(例: ^{18}F 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{67}Ga)、クロモフォア(chromophore)、発光物質又は蛍光物質(例:FITC、RITC、蛍光タンパク質(GFP(Green Fluorescent Protein);EGFP(Enhanced Green Fluorescent Protein)、RFP(Red Fluorescent Protein);DsRed(Discosoma sp. red fluorescent protein);CFP(Cyan Fluorescent Protein)、CGFP(Cyan Green Fluorescent Protein)、YFP(Yellow Fluorescent Protein)、Cy3、Cy5及びCy7.5)、自己共鳴映像物質(例:Gadolinium(Gd、ガドリニウム)、常磁性粒子(super paramagnetic particles)又は超常磁性粒子(ultrasuper paramagnetic particles))などもあり得る。

30

40

【0093】

本発明の抗体又はその機能的断片は、検出キット(Kit)又は診断分析を行うための診断キットとして提供することが可能なため、そのとき使用説明書と共に、前に指定された量で包装された試薬と一緒に提供できる。抗体が酵素で標識された場合、キットには基質及び発色端又は蛍光端を提供する基質前駆体として酵素により要求される補助因子(cofactor)が含まれる。また、安定化剤、緩衝液(例えば、遮断緩衝液又は溶解緩衝液)などと同じく他の添加剤が含まれる。様々な試薬の相対的量は分析の感度を十

50

分最適化させる試薬の溶液内濃度を提供するため幅広く変化できる。試薬は溶解時適切な濃度を有する試薬溶液を提供する賦形剤を含む、一般に凍結乾燥された、乾燥文末として提供できる。

【0094】

前記のキットはウエスタンブロット分析法、ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)、放射線免疫分析法、放射免疫拡散法、オクタロニー免疫拡散法、ロケット免疫電気泳動法、組織免疫染色、免疫沈降分析法、補体結合分析法、フローサイトメトリー (FACS)、プロテインチップ分析法などに使われるキットでもあって、それぞれの分析法により提供される試薬、補助物質、容器 (container)、固体支持体等は当業界に良く知られている。

10

【0095】

前記クローディン3特異的検出方法により、当業者は試料内に存在 (又は包含) するクローディン3タンパク質の有無と濃度を測定できる。

【0096】

本願で検出とは、定量及び/又は定性分析を含むことで、存在、不存在の検出及び濃度測定を含むことでそのような方法は当業界で公知されていて、当業者であれば本願の実施のための適切な方法を選択できる。

【0097】

前記 (1) 段階の前に、通常の技術者は抗体又はその機能的断片を利用してタンパク質を検出する公知の方法を適切に選択し、選択された方法に適合した試料を用意できる。また、試料はクローディン3の異常な (過剰) 発現を特徴とする疾患 (例えば、癌) の有無を診断しようとする被検体から採取した生検などから得られた細胞や組織、全血 (血液)、血清、血漿、唾液、脳脊髄液などもあるが、これに限定されない。前期抗体を利用してタンパク質を検出する方法とはそれに制限されるものではないが、例えば、ウエスタンブロット、免疫ブロット、ドット・ブロット、免疫組織化学染色、酵素免疫分析 (ELISA)、放射能免疫検定法 (radioimmunoassay)、競争結合分析、免疫沈降法などがある。例えば、免疫組織化学染色のためには、細胞や組織切片を固定し、ブロック (blocking) するなどの前処理をすることができる。

20

【0098】

続いて前記 (1) の段階では前述したように準備された試料に本発明による抗体又はその機能的断片を接触させる。前記の接触により抗原 (クローディン3) - 抗体複合体が形成される。

30

【0099】

前記 (2) 段階では試料に生成された抗原 - 抗体複合体を感知することで、試料内クローディン3タンパク質の存在有無とその水準を測定する段階である。前述したように検出に利用された本発明の前記抗体又はその機能的断片は、標識された状態で提供されることもあり、その場合直ぐに標識を検出することができる。それでない場合は、別途標識された2次抗体を用いられる。前記2次抗体とは、1次抗体 (その場合、本発明の抗体又はその機能的断片) のFc部位などに結合する抗体として、そのような2次抗体の使用については当業界に周知されている。

40

【0100】

標識による検出方法は当業界に広く知られているが、例えば次のような方法により遂行できる。若し検出可能な標識で蛍光物質を利用する場合は、免疫蛍光染色法を利用することができる。例え、蛍光物質で標識された本発明のペプチドを試料と反応させて未結合又は非特異的な結合産物を除去してから、蛍光顕微鏡下でペプチドによる蛍光を観察することができる。また、検出可能な標識で酵素 (例えば、ルシフェラーゼ、ペルオキシダーゼ、ガラクトシダーゼなど) を利用する場合には酵素反応を通った基質の発色反応により吸光度を測定し、放射線物質の場合には、放射線放出量 (例えば、シンチレーション係数 (scintillation counting) により測定) を測定することで遂行できる。それ以外にも本発明による抗体又はその断片はバイオティン (biotin) に接合

50

された形で製造され、適切に標識されたストレプトアビジン (streptavidin) と反応させて感知することができる。併せて、検出された結果は、検出標識による公知された映像化方法によって、映像化することができる。

【0101】

それによって前記本発明の抗体又はその機能的断片はクローディン3の(過剰)発現を特徴とする疾患の診断及び映像化に利用できる。本発明で診断及び映像化可能な疾患では、当業界にクローディン3の異常な発現(特に、過剰発現)を同伴するものと知られているものなら、その種類が特に限られてはいるが、望ましく癌を対象にする可能性がある。したがって、本発明は、前記本発明の抗体又はその機能的断片を有効成分として含む癌診断用組成物及び癌の映像化用組成物を提供する。

10

【0102】

また、前記本発明の抗体又はその機能的断片で構成される癌診断用組成物及び癌の映像化用組成物を提供する。

【0103】

また、前記本発明の抗体又はその機能的断片で必須的に構成される癌診断用組成物及び癌の映像化用組成物を提供する。

【0104】

本願から前記の癌(腫瘍)はその種類が特に限られてはいるが、望ましくは正常状態と比較してクローディン3の過剰発現を特徴とする癌の種類でもあり、より望ましくは上皮性癌でもあって、具体的一例としては卵巣癌、結腸癌、膀胱癌、肺癌、肝臓癌、胃癌、食道癌、乳房癌、前立腺癌、膵臓癌、子宮癌、子宮頸部癌又は黒色腫等を含むが、それに限られてはいない。

20

【0105】

また本発明の抗体又はその断片は前述したようにクローディン3に対する結合特異性が極めて高いだけでなく、クローディン3(特にECL-2)に結合した後、細胞内に内在化(internalization)されることを特徴とする。こうして細胞内部に入る特性は抗体-薬物複合体(ADC, antibody-drug conjugate)の開発において大きな利点を提供して、ADCが優れた薬効を示すためにはADCが細胞内に入る(internalization, 内在化)過程が必要であると知られている。

30

【0106】

本発明で前記内在化は細胞が内部に入ること(浸透すること)を意味することで、内在化されるタイプ又は種類が特に限られてはいるが、一例でエンドサイトーシス(endocytosis)されることもある。

【0107】

したがって、本発明は、前述した本発明の抗体及びその機能的断片を有効成分として含む癌細胞と特異的薬物伝達用組成物を提供する。

【0108】

また、前述した本発明の抗体又はその機能的断片で構成される癌細胞特異的薬物伝達用組成物を提供する。

40

【0109】

また、前述した本発明の抗体又はその機能的断片で必須的に構成される癌細胞特異的薬物伝達用組成物を提供する。

【0110】

具体的に、本発明は前述した本発明の抗体又はその機能的断片;及び薬物が結合された抗体-薬物複合体(antibody-drug conjugate)を提供する。また、本発明の抗体又はその機能的断片;及びそれと結合された薬物を有効成分として含む癌の予防及び治療用組成物を提供する。

【0111】

本発明において、用語“抗体-薬物複合体(antibody-drug conjugate)”

50

a t e , A D C) ” は本発明の抗体（又はその機能的断片）と薬物が連結された複合体を意味し、免疫複合体とも呼ばれる。前記抗体 - 薬物複合体は当業界に公知された様々な方法を利用して製造することができる。

【0112】

前記の抗体 - 薬物複合体は、直接2つの分子が結合されることもあって、またはリンカー等の任意の手段によって、間接的に2つの分子が結合されるものもある。前記リンカーは非切断性リンカー又は切断性リンカーでもある。一般に、ADCは、リンカー等の手段によって、間接的に結合されてから標的された細胞の内部で薬物が伝達できるように設計されることが理想的であると知られている。前記リンカーは細胞内環境、例えばリソゾーム又はエンドゾームに存在する切断剤によって切断可能なため、例えば、細胞内ペプチダーゼ又はプロテアーゼ酵素、例えばリソソーム又はエンドソームプロテアーゼにより切断できるペプチドリinkerでもある。一般にペプチドリinkerは少なくとも2つ以上のアミノ酸長さを有する。一例で、前記切断性リンカーはpH感受性で、特定のpHの値で加水分解に敏感なこともある。一般に、pH感受性リンカーは酸性条件で加水分解できることを示す。例えば、リソゾームで加水分解できる酸性不安定リンカー、例えば、ヒドラゾン、セミカバゾン、チオセミカバゾン、シス - アコニットアミド (c i s - a c o n i t i c a m i d e)、オルソエステル、アセタール、ケタールなどもある。他の一例で、前記リンカーは還元条件で切断されることもあり、例えばジスルフィド型リンカーがそれに該当することもある。SATA (N - s u c c i n i m i d y l - S - a c e t y l t h i o a c e t a t e、S - アセチルチオ酢酸スクシンイミジル)、SPDP (N - s u c c i n i m i d y l - 3 - (2 - p y r i d y l d i t h i o) p r o p i o n a t e、3 - (2 - ピリジルジチオ)プロピオン酸 N - スクシンイミジル)、SPDB (N - s u c c i n i m i d y l - 3 - (2 - p y r i d y l d i t h i o) b u t y r a t e、N - スクシンイミジル - 3 - (2 - ピリジルジチオ)ブチレート)及びSMPT (N - s u c c i n i m i d y l - o x y c a r b o n y l - a l p h a - m e t h y l - a l p h a - (2 - p y r i d y l - d i t h i o) t o l u e n e、N - スクシンイミジール - オキシカルボニル - アルファ - メチル - アルファ - (2 - ピリジル - ジチオ)トルエン)を使用して様々なジスルフィド結合が形成できる。

10

20

【0113】

前記の薬物及び/又は薬物 - リンカーは抗体のライシンを介して無作為に接合されるか、ジスルフィド結合鎖を還元したとき露出されるシステインを介して接合できる。場合によっては、遺伝工学的に製作されたタグには例えば、ペプチド又はタンパク質に存在するシステインを介してリンカー - 薬物が結合することができる。前記ペプチド又はタンパク質は、ペプチド又はタンパク質のカルボキシ末端から結実 (d e l e t i o n) を有するか、ペプチド又はタンパク質のカルボキシ (C) 末端にスペーサーユニットの共有結合を介して付加を有する。

30

【0114】

本発明において、用語“薬物”は、本発明の抗体に結合して治療抗体自体の効率を増加させたり、抗体の血中内の半減期を増加させる事もあったり、抗体が標的にする位置に到達して、前記標的内の癌などを死滅させて病気の治療に用いられる物質を無制限で含み、その例として、細胞毒性薬物、毒素、サイトカイン、ケモカイン、抗生物質、核酸分解酵素のような酵素、放射線核種、光感受剤、光熱ナノ素材、ナノパーティクル及びミセルなどがあるが、これらに限定されない。

40

【0115】

本発明において、前記薬物は、抗体に直接連結 (結合) されることもあり、公知の手段により間接的に連結されることもある。また、抗体に結合する薬物は、前記薬物の特定担持形態 (例えば、ミセル、ナノパーティクル、リポソーム、又はデンドリマー (d e n d r i m e r) など) に担持された形態等をすべて含む) でも適用可能である。

【0116】

前記の細胞毒性薬物は、病気の治療に用いられる薬物を意味し、一例では抗癌活性を有す

50

る薬物（抗癌剤）として、マイクロチューブリン（microtubulin）構造形成抑制剤、有糸分裂（meiosis）抑制剤、トポアイソメラーゼ（topoisomerase）抑制剤又はDNAインターカレータ（DNA intercalators）がある。前記の細胞毒性薬物は、メイタンシノイド（maytansinoid）、オーリスタチン（auristatin）、ドラスタチン（dolastatin）、トリコテセン（trichothecene）、CC-1065薬物（NSC 298223）、カリケアミシン（calicheamicin）、エンジイン（enediynes）、タキサン（taxane）、アントラサイクリン（anthracycline）、メトトレキサート（methotrexate）、アドリアマイシン（adriamycin）、ビンデシン（vindesine）、ビンカルカロイド（vincalcaloid）、ドキシソルピシン（doxorubicin）、メルファラン（melphalan）、マイトマイシンC（mitomycin C）、クロラムブシル（chlorambucil）、ダウノルピシン（daunorubicin）、ダウノマイシン（daunomycin）、エトポシド（etoposide）、テニポシド（teniposide）、カルミノマイシン（carminomycin）、アミノプテリン（aminopterin）、ダクチノマイシン（dactinomycin）、ブレオマイシン（bleomycin）、エスペラミシン（esperamicin）、5-フルオロウラシル（5-fluorouracil）、メルファラン（melphalan）、窒素マスタード（メクロレタミン塩酸塩）[nitrogen mustard (mechlorethamine HCL)]、シス-白金およびその同族体、シスプラチン（cisplatin）、CPT-11、ドセタキセル（docetaxel）、モノメチルアウリスタチンE（Monomethylauristatin E）、モノメチルアウリスタチンF（Monomethylauristatin F）又はエムタンシン（emtansine, DM1）等を含むことができ、これに限定されない。

10

20

【0117】

本発明において、用語“毒素（toxin）”は、生物体が生み出す毒性を有する薬物を意味し、その種類は特に限定されてはいないが、植物毒素、動物毒素、菌体外毒素又は細菌毒素などがある。

【0118】

本発明の抗体は、前述のようにクローディン3に対する結合特異性がかなり高いだけでなく、抗体自体がクローディン3に結合した後ADCC（Antibody dependent cell cytotoxicity、抗体依存性細胞毒性）による細胞毒性効果が著しいことが特徴である。それは本発明の明細書の一実施例によく示されている。したがって、本発明は本発明の前記抗体を有効成分として含む癌の予防及び治療用組成物を提供する。

30

【0119】

また、本発明の前記抗体で構成される癌の予防及び治療用組成物を提供する。
また、本発明の前記抗体で必須的に構成される癌の予防及び治療用組成物を提供する。

【0120】

抗体依存性細胞毒性（ADCC, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity）はNK細胞（natural killer cell）の癌細胞の死滅機構の一つとして知られた。NK細胞は免疫グロブリンG（IgG）のFcに対する受容体のCD16を発現し、この受容体を介して他の形のMHC非制限性殺害を行うことができる。即ち、NK細胞のADCCは標的細胞を認識する抗体の存在に依存するが、抗体が抗原と結合すると抗体のFc部位が露出され、露出されたFc部位がNK細胞の受容体と結合して橋を形成すると、受容体結合によって発生するシグナル伝達によりNK細胞から細胞傷害物質が放出されて、標的細胞が傷害を受ける。

40

【0121】

このように、本発明の抗体は、自らにも抗癌の効能を有するため、前記抗体を抗癌活性薬物を一緒に（特に、ADCの形に）提供する場合には著しいシナジー効果を示す。

50

【0122】

本発明は、また、前記抗体又はその機能的断片を暗号化するポリヌクレオチドを提供する。

【0123】

前記抗体又はその機能的断片を暗号化するポリヌクレオチドは、前述したものと同様のCD R構成を有する抗体又はその断片を暗号化できる限り、塩基の組合せに特に限定されない。アミノ酸配列が明かされた場合、当業界に公知されたコドン情報に基づいて前記アミノ酸配列を暗号化するポリヌクレオチドを製造する技術は、当業界に周知されている。前記ポリヌクレオチドはDNA、cDNA及びRNA配列を全て含む短鎖又は二重鎖の形態の核酸分子として提供されることができる。

10

【0124】

また、本発明は、本発明による抗体又はその断片を暗号化するポリヌクレオチドを含む組換え発現ベクターを提供する。

【0125】

本発明において、“組換え(recombinant)”は“遺伝子操作(genetic manipulation)”と互換して用いられ、遺伝子に変形を加え、切って、繋ぐ等の分子的クローニング(molecular cloning)実験技法を利用して自然の状態では存在しない形の遺伝子を製造することを意味する。

本発明において、“発現(expression)”は細胞へのタンパク質又は核酸が生成されることを意味する。

20

【0126】

本発明において、“組換え発現ベクター”とは、適した宿主細胞(host cell)から目的とするタンパク質又は核酸(RNA)を発現できるベクターとして、ポリヌクレオチド(遺伝子)インサートが発現できるよう作動可能に連結された重要な調節要素を含む遺伝子組換え体を意味する。“作動可能に連結される(operably linked)”とは、一般的機能を行うように、核酸発現調節配列と目的するタンパク質又はRNAをコーディングする核酸配列が機能的に連結(functional linkage)されているもので、発現調節配列により遺伝子が発現されるよう連結されたことを意味する。組換えベクターとの作動的連結は、当該技術分野でよく知られている遺伝子組換え技術を利用して製造することが可能なため、部位-特異的DNA切断及び連結は、当該技術分野から一般に知られた酵素等を使用する。前記“発現調節配列(expression control sequence)”とは特定の宿主細胞から作動可能に連結されたポリヌクレオチド配列の発現を調節するDNA配列を意味する。そのような調節配列は、転写を実施するためのプロモーター、転写を調節するための任意のオペレーター配列、適宜のmRNAリボソーム結合部位をコーディングする配列、転写及び解読の終結を調節する配列、開始コドン、終結コドン、ポリアデニル化シグナル及びエンハンサー等を含む。前記ベクターのプロモーターは、構成的又は誘導性であることもある。前記の作動可能に連結された遺伝子配列と発現調節配列はベクターを含む宿主細胞を選択するための選択マーカー及び/又は複製起点(replication origin)と一緒に含まれている一つの発現ベクター内に含まれることもある。また、前記発現ベクターは必要により膜標的化又は分泌のためのシグナル配列又はリーダー配列を含んでおり、目的によって多様に製造することができる。

30

40

【0127】

シグナル配列には、宿主がエシェリキア属菌の場合には、PhoAシグナル配列、OmpAシグナル配列等が、宿主がバチルス属菌の場合には、-アミラーゼシグナル配列、サブチリシンシグナル配列等が、宿主が酵母である場合には、MFシグナル配列、SUC2シグナル配列等が、宿主が動物細胞の場合には、インスリンシグナル配列、-インターフェロンシグナル配列、抗体分子シグナル配列等が用いられるが、これに限定されない。

【0128】

50

本発明の組換え発現ベクターは、クローニング分野において通常用いられるベクターであれば、種類は特に限らず、その例としては、プラスミドベクター、コスミドベクター、バクテリオファージベクター及びウイルスベクター等を含むが、それに限らない。前記プラスミドには、大腸菌由来プラスミド（pBR322、pBR325、pUC118及びpUC119、pET-22b(+)）、パチラスサブティリス由来プラスミド（pUB110及びpTP5）及び酵母由来のプラスミド（YEp13、YEp24及びYCP50）等があり、前記ウイルスはレトロウイルス、アデノウイルス又はワクシニアウイルスのような動物ウイルス、バキュロウイルスのような昆虫ウイルス等が用いられ、pcDNA等が用いられる。

【0129】

本発明で前記組換えベクターは抗体の軽鎖又はその機能的断片を暗号化するポリヌクレオチドと；重鎖又はその機能的断片を暗号化するポリヌクレオチドを一つのベクターに同時に包含（挿入）させた形で提供可能なため、又は2つの（他の種類を含む）のベクターにそれぞれ包含（挿入）させて提供できる。

【0130】

また、本発明は本発明による抗体又はその機能的断片を暗号化するポリヌクレオチドを含む組換え発現ベクターに形質転換された細胞を提供する。

【0131】

本発明において、用語宿主細胞（host cell）は、任意の手段（例：電気衝撃法、カルシウムホスファターゼ沈殿法、微細注入法、形質転換法、ウイルス感染など）によって細胞内に導入された異種性DNAを含む原核又は真核細胞を意味する。

【0132】

本発明の（宿主）細胞は、本発明の組換え発現ベクターの含まれる抗体又はその断片を暗号化するポリヌクレオチドを発現するに用いられる細胞であれば、その種類は特に限定されない。本発明による組換え発現ベクターで形質転換された細胞（宿主細胞）は、原核生物（例えば、大腸菌）、真核生物（例えば、酵母又は他の菌類）、植物細胞（例えば、タバコ又はトマト植物細胞）、動物細胞（例えば、ヒト細胞、サル細胞、ハムスター（hamster）細胞、ラット細胞（rat cell）、マウス細胞（mouse cell）、昆虫細胞又はそれらから由来するハイブリドーマでもある。望ましくはヒトを含む哺乳類から由来する細胞であることもある。

【0133】

より具体的一例として、原核生物はグラム陰性又はグラム陽性有機体、例えば、エンテロバクテリアセー（Enterobacteriaceae）、例えば、エシェリキア（Escherichia）、例えば、イ・コーライ、エンテロバクター（Enterobacter）、エルウィニア（Erwinia）、クレブシエラ（Klebsiella）、プロテウス（Proteus）、サルモネラ（Salmonella）、例えば、サルモネラ・ティフィムリウム（Salmonella Typhimurium）、セラチア（Serratia）、例えば、セラチア・マルセスカンス（Serratia marcescans）と及びシゲラ（Shigella）、及びバシリ（Bacilli）、例えば、ピ・ズブチリス（B. subtilis）及びピ・リケニフォルミス（B. licheniformis）、シュードモナス（Pseudomonas）、例えばピ・エルギノーザ（P. aeruginosa）及びストレプトマイセス（Streptomyces）を含む。本発明の細胞は、本発明のベクターを発現できるものであれば、特に限られることはないが、望ましくはイ・コーライ、それに限られないが、例えば、イ・コーライER2537、イ・コーライB、イ・コーライX1776（ATCC 31,537）、イ・コーライW31（ATCC 27,325）又はLacZが発現可能なイ・コーラである可能性があり、より望ましくは、イ・コーライER2537かもしれない。本発明の細胞として、真核生物はサッカロマイセス・セレビジアに（Saccharomyces cerevisiae）が最もよく用いられる。しかし、多くの他の属、種及び菌株、それに限られないが、例えばシジヨカロマイセスブムベ（Schizosac

10

20

30

40

50

charomyces pombe)、クルイベロマイセス宿主、例えばケイ・ラクティス(K. lactis)、ケイ・フラギリス(K. fragilis) (ATCC 12,424)、ケイ・ブルガリクス(K. bulgaricus) (ATCC 16,045)、ケイ・ウィカラミ(K. ickeramii) (ATCC 24,178)、ケイ・ワルティ(K. waltii) (ATCC 56,500)、ケイ・ドロソフィラルム(K. drosophilum) (ATCC 36,906)、ケイ・テルモレランス(K. thermotolerans)及びケイ・マルシアヌス(K. marxianus);ヤロウイア(yarrowia) (EP402,226);ピキア・パストリス(Pichia pastoris) (EP183,070);カンジダ(Candida);トリコデルマ・レエシア(Trichoderma reesia) (EP244,234);ニューロスポラクラサ(Neurospora crassa);シュバニッシュラウス(Schwanniomyces)、例えばニューロスボラ、ペニシリウム(Penicillium)、ポリポクラジウム(Tolyposcladium)及びアスパジラス(Aspergillus)の宿主、例えばエー・ニドゥランス(A. nidulans)及びエイ・ニーガー(A. niger)が用いられる。

【0134】

一方、本発明の細胞は動物細胞、特に脊椎動物細胞であることもある。培養(組織培養)において脊椎動物細胞の増殖は、慣用的な方法であり、様々な技術が幅広く利用できる。これに限定されないが、有用な哺乳動物宿主細胞の例は、SV40によって形質転換されたサル腎臓CV1ライン(COS-7, ATCC CRL1651)、ヒト胚腎臓ライン(懸濁培養からサブクローニングされた293又は293細胞[Graham等、1977、J Gen Virol. 36:59])、子ハムスター腎臓細胞(BHK, ATCC CL10)、チャニーズハムスター卵巣細胞/"DHFR"(CHO, Urlaub等、1980、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216;例えば、DG44)、マウスセルリー細胞(TM4, Mather, 1980, Biol. eprod. 23:243-251)、サル腎臓細胞(CV1 ATCC CCL 70)、アフリカ緑のサル腎臓細胞(VERO-76, ATCC CRL-1587)、ヒト頸部癌細胞(HELA, ATCC CCL 2)、イヌ腎臓細胞(MDCK, ATCC CCL 34)、バッファローラット肝細胞(BRL3A, ATCC CRL1442)、ヒト肺細胞(W138, ATCC CCL75)、ヒト肝細胞(Hep G2, HB8065)、マウス乳房腫瘍(MMT060562, ATCC CCL51)、TRI細胞(Mather等、1982、Annals NY. Acad. Sci. 383:44-68)、MRC5細胞、FS4細胞、ヒト肝癌細胞株(Hep G2)-HEK 293 cell(human embryonic kidney cell)及びExpi293 FTM cellであり、望ましくはCHO Cell、HEK293 cell(human embryonic kidney cell)又はExpi293 FTM cellであることもある。宿主細胞によってタンパク質の発現量や数式等が異なるため、当業者の目的に最も適した宿主細胞を選択して用いられる。本発明の一実施例では、CHO(Chinese hamster ovary)-S細胞を用いたことがある。

【0135】

前記形質転換は、核酸(本発明の抗体又はその機能的断片を暗号化するポリヌクレオチド)を有機体、細胞、組織又は器官に導入するどのような方法も含み、当分野で公知されたよう宿主細胞によって適した標準技術を選んで行うことができる。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(CaPO₄)沈殿、塩化カルシウム(CaCl₂)沈殿、シリコン炭化物ウイスキー(Silicon carbide whiskers)、超音波処理(sonication)、アグロバクテリア媒介の形質転換、PEG(polyethylenglycol)による沈殿法、デキストランサルフェート、リポフェクタミン、熱衝撃(heat shock)法、粒子総衝撃法(particle gun bombardment)等が含まれるが、それに限られない。

10

20

30

40

50

【0136】

前記の細胞には抗体の軽鎖又はその機能的断片を暗号化するポリヌクレオチドと；重鎖又はその機能的断片を暗号化するポリヌクレオチドを1つのベクターに同時に包含（挿入）させた形で提供された組換えベクターが導入可能なため、又は前記ポリヌクレオチドがそれぞれ2つ（他の種類を含む）のベクターに別々に包含（挿入）された形で提供された多数の組換えベクターを1つの細胞又は多数の細胞に導入できる。前記本発明による組換え発現ベクターで形質転換された細胞は本発明による抗体の重鎖、軽鎖又はその機能的断片を生産することになる。

【0137】

本発明はまた、

(a) 前記形質転換された細胞を（ポリヌクレオチドが発現される条件下で）培養して軽鎖及び重鎖可変領域を含むポリペプチドを生産する段階；及び

(b) 前記細胞又はそれを培養した培養培地から前記ポリペプチドを回収する段階を含む、クローニン3タンパク質に特異的に結合する抗体又はその機能的断片の生産方法を提供する。

【0138】

前記(a)段階は、前記形質変換された宿主細胞（ハイブリドーマを含む）を培養し、宿主細胞に導入された組換え発現ベクターから本発明による抗体の重鎖、軽鎖又は抗体の機能的断片のポリペプチドが生産されるようにする段階である。前記宿主細胞を培養するための培地組成と培養条件、培養時間などは当業界で通常用いられる方法により適切に選ぶことができる。一例で、商業的利用ができる培地、例えばハム（Ham's）F10（Sigma-Aldrich Co.、St. Louis、MO）、最小必須培地（MEM、Sigma-Aldrich Co.）、RPMI-1640（Sigma-Aldrich Co.）、及びダルベッコ（Dulbecco's）改質イーグル（Eagle's）培地（DMEM、Sigma-Aldrich Co.）が細胞を培養するのに適合するかもしれないが、これに限定されない。前記培地は必要であればホルモン及び/又は他の成長因子、塩、緩衝液、ヌクレオチド、抗生剤、微量元素及びグルコース又は同等のエネルギー源が追加できる。

【0139】

宿主細胞から生産される抗体分子は細胞の細胞質内に蓄積されるか、適切なシグナル配列により細胞の外部又は培養培地に分泌されるか、ペリプラズムなどで標的化（targeted）されるように可能なため、それは前述したことを参照にして理解される。

【0140】

また、本発明による抗体がクローニン3（特に、ECL-2）に対する結合特異性を維持するよう当業界に公知されている方法を利用し、タンパク質リフォールディング（refolding）させて機能性構造（conformation）を有するようにすることが望ましい。また、IgG形の抗体を生産する場合、重鎖と軽鎖は別の細胞から発現させて、別途の段階から重鎖と軽鎖を接触させ完全な抗体を構成するように製造することもでき、重鎖と軽鎖を同一の細胞から発現するようにして、細胞内部から完全な抗体を形成するようにすることもできる。

【0141】

前記(b)段階は、宿主細胞から生産された抗体又はその断片を収得する段階である。宿主細胞から生産された抗体又はその機能的断片ポリペプチドの特性、宿主細胞の特性、発現方式又はポリペプチドの標的化の有無等を考慮し、通常の技術者は収得方法を適切に選択及び調節できる。例えば、培養培地から分泌された抗体又はその断片は宿主細胞を培養した培地を収得し、遠心分離して不純物を除去する等の方法で抗体を回収できる。必要により細胞内特定小器官や細胞質に存在する抗体を細胞外部に放出して回収するために抗体またはその機能的断片の機能的構造に影響を及ぼさない範囲で細胞を融解することもできる。また、収得した抗体はクロマトグラフィー、フィルター等によるろ過、透析などの方法により、不純物をさらに除去して濃縮する過程をさらに踏むことができる。

10

20

30

40

50

【0142】

本発明による薬学的組成物は、本発明の抗体とその機能的断片、又はこれらを全部含むADCを単独で含むか、1つ以上の薬学的に許容される担体と一緒に適した形態に製剤化されることができ、賦形剤又は希釈剤をさらに含有することができる。前記で“薬学的に許容される”とは、生理学的に許容され、ヒトに投与されるとき、通常的に胃腸障害、目眩などのようなアレルギー反応又はそれと同様の反応を起こさない非毒性の組成物を意味する。

【0143】

薬学的に許容される担体では例えば、経口投与用担体又は非経口投与用担体をさらに含むことができる。経口投与用担体はラクトース、澱粉、セルロース誘導體、マグネシウムステアレート、ステアル酸等を含むことができる。併せて、ペプチド製剤に対する経口投与用に使われる様々な薬物伝達用物質を含むことができる。また、非経口投与用担体は水、適したオイル、食塩水、水性グルコース及びグリコール等を含むことができ、安定化剤及び保存剤をさらに含むことができる。適した安定化剤には亜硫酸水素ナトリウム、亜硫酸ナトリウム又は適合する保存剤としては、塩化ベンザルコニウム、メチル-又はプロピル-パラベン及びクロロブタノールがある。

10

【0144】

本発明の薬学的組成物は前記の成分意外に潤滑剤、湿潤剤、甘味料、香味剤、乳化剤、懸濁剤などをさらに含むことができる。それ以外の薬学的に許容される担体及び製剤は当業界から知られている全てのタイプのものを参考にできる。

20

【0145】

本発明の組成物はヒトを伴う哺乳動物にどのような方法にも投与することができる。例えば、経口又は非経口的に投与することができる。具体的に本発明の組成物の投与経路は公知された抗体投与方法、例えば静脈内、腹腔内、脳内、皮下、筋肉内、眼内、動脈内、脳脊髄内、又は病変内経路による注射又は注入、又は後記記載された徐放性(sustained release)システムによる注射又は注入の可能性があり、これに限定されない。一例で本発明の抗体は全身に又は局部的に投与できる。

【0146】

本発明の薬学的組成物は、前述のような投与経路に応じて経口投与用又は非経口投与用製剤として剤形化することができる。

30

【0147】

本発明による薬学的組成物において、前記の抗体、この機能的断片、又はそれらを含むADCは、臨床投与時に経口及び非経口の様々の剤形で投与できるが、製剤化する場合には普段使用する充電剤、増量剤、結合剤、湿潤剤、崩壊剤、界面活性剤などの希釈剤又は賦形剤を使用して製造できる。経口投与のための固形製剤には錠剤、丸剤、散剤、顆粒剤、カプセル剤、トローチ剤などが含まれ、このような固形製剤は、少なくとも1つ以上の賦形剤、例えば、澱粉、炭酸カルシウム、スクロース(sucrose)又はラクトース(lactose)又はゼラチンなどを混ぜて調剤できる。また、単純な賦形剤以外にステアリン酸マグネシウム、タルクなどの潤滑剤も使用することができる。経口投与のための液状製剤としては、懸濁剤、内用液剤、乳剤又はシロップ剤などが該当するが、よく使用される単純希釈剤である水、リキッドパラフィン以外にさまざまな賦形剤、例えば湿潤剤、甘味剤、芳香剤、保存剤などが含まれる。

40

【0148】

非経口投与のための製剤は滅菌された水溶液、非水性水溶液、懸濁用剤、乳剤、凍結乾燥製剤、坐剤が含まれる。本発明の治療用組成物は任意の生理学的に許容可能な担体、賦形剤又は安定化剤と望ましい純度を有する抗体を混合し貯蔵するため凍結乾燥されたケーキ又は安定化剤は使用された投与量及び濃度から需要者に非毒性であり、緩衝溶液、例えばリン酸、クエン酸、及び他の有機酸;アスコルビン酸をはじめとする抗酸化剤;低分子量(約10個未満の残基)ポリペプチド;タンパク質、例えば血清アルブミン、ゼラチン又は免疫グロブリン;親水性重合体、例えば、ポリビニルピロリドン;アミノ酸、例えばグリシ

50

ン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン又はリシン；単糖類、二糖類、およびグルコース、マンノース、又はデキストリンを含む他の炭水化物；キレート剤、例えばEDTA；糖アルコール、例えば、マンニトール又はソルビトール；塩 - 形成反対イオン、例えばナトリウム；と（又は）非イオン性界面活性剤、例えばツイン、フルロニクス又はポリエチレングリコール（PEG）が含まれる。

【0149】

非経口投与用製剤の場合には注射剤、クリーム剤、ローション剤、外用軟膏剤、オイル剤、保湿剤、ゲル剤、エアロゾル及び鼻腔吸入剤の形に、当業界に公知された方法により剤形化できる。それら剤形は全ての製薬会社に一般に公知された処方所に記載されている。特定実施様態で、薬学的組成物は鼻腔内スプレー、吸入及び／又は他のエアロゾル（aerosol）伝達ピークルにより伝達できる。遺伝子、ポリヌクレオチド及びペプチド組成物は鼻腔エアロゾルスプレーを通して肺に直接伝達するための方法は、例えばアメリカ特許第5,756,353号及びアメリカ特許5,804,212号に記載されたものを参照にできる。

10

【0150】

本発明の抗体又はその機能的断片の総有効量は、単一投与量（single dose）で投与されることもあり、多重投与量（multiple dose）が長期間投与される分割治療方法（fractionated treatment protocol）により投与されることもある。それらのADCで提供される場合はまた投与容量を異にすることができる。本発明の薬学的組成物は、疾患の程度及び／又は目的により有効成分（本発明の抗体又はその機能的断片）の含有量を異にすることができるが、通常には0.01mg/kg/day - 1000mg/kg/day、望ましくは0.1mg/kg/dayから100mg/kg/dayであり、さらに好ましくは1mg/kg/dayから20mg/kg/dayの有効容量に一定の間隔で数回反復投与することができる。しかし前記の薬学的組成物の容量は製剤化方法、投与経路及び治療回数だけでなく、患者の年齢、体重、健康状態、性別、疾患の重症度、食餌及び排泄率などの様々な要因を考慮して患者に対する有効投与量が決まるものであるから、このような点を考慮するとき、当分野の通常の知識を有する者であれば、本発明の組成物の適切な有効投与量を決定できるはずである。本発明による薬学的組成物は、本発明の効果を示す限りその剤形、投与経路及び投与方法に特に限定されない。

20

30

【0151】

前記のように、本発明の抗体又はその機能的断片は前述の特有のCDR構成を有することでクローディング3標的に対する特異性（specificity）及び親和性（affinity）がかなり優秀であることが特徴である。従って本発明の抗体又はその機能的断片は細胞、特に免疫細胞に対してクローディング3に対する標的能を付与するに利用可能である。

【0152】

したがって本発明は、前記本発明の抗体又はその機能的断片を含むCAR（キメラ抗原受容体；chimeric antigen receptor）を提供する。

【0153】

具体的に、本発明は

- i) 前述した本発明の抗体又はその機能的断片を含む細胞のドメイン；
- ii) 膜通過ドメイン（transmembrane domain）；及び
- iii) 細胞内シグナル伝達ドメイン（intracellular signaling domain）を含むCAR（chimeric antigen receptor）タンパク質を提供する。

40

【0154】

本発明で用語“CAR（chimeric antigen receptor）”は、免疫効果機細胞（immune effector cell）に特定抗原に対する特異性を与えられる、自然的存在しない受容体を意味する。普段、前記のCARは、T細胞に

50

単クローン抗体の特異性を移植するため用いられる受容体を意味する。CARは大概細胞外ドメイン (E c t o d o m a i n)、膜透過性ドメイン (t r a n s m e m b r a n e d o m a i n) 及び細胞内ドメイン (E c t o d o m a i n) で構成される。

【0155】

前記 (i) 細胞外ドメインは前述した本発明の抗体又はその機能的断片を含み、その抗原結合部位 (a n t i g e n r e c o g n i t i o n r e g i o n) を含んでいる。CARに使われる抗体は抗体断片の形であることが望ましく、より望ましくはFab又はscFvの形もあるが、特にそれに制限されることではない。

【0156】

また、前記CARの (i i) 膜通過ドメインは細胞外ドメインと連結された形で、自然的又は合成されたものから由来したものである。自然に存在するものから由来した場合、膜結合又は膜透過性タンパク質から由来したものであるもあって、T細胞受容体のアルファ、ベータ又はゼータチェーンCD28、CD3エプシロン、CD45、CD4、CD5、CD5、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154又はCD8などの様々なタンパク質のまく透過性領域から由来した部分でもあって、これに限定されない。このような膜通過ドメインの配列は膜透過性タンパク質のまく透過性領域部分を公知している当業界かから公知された文献などから得られる。

10

【0157】

前記CARから (i i i) 細胞内シグナル伝達ドメインは膜通過ドメインと連結された形として細胞内部に存在する。本発明の前記細胞内シグナル伝達ドメインはCARの抗原結合部位 (即ち、本発明の抗体又はその機能的断片) に抗原が結合すると1次的に細胞活性化をもたらすシグナルを発生又は / 及び伝達する領域である。

20

【0158】

前記“細胞”は、その種類が特に限定されないが、望ましくは免疫細胞 (免疫効果機細胞) の可能性がある。前期免疫細胞は当業界に身体の免疫機能に關与するものと知られている細胞であれば、その種類が特に限定されないが、例えばT細胞、NK (N a t u r a l K i l l e r) 細胞、NKT (N a t u r a l K i l l e r T) 細胞、単球、マクロファージ又は樹状細胞などを含み、その前駆細胞も含まれている意味である。

【0159】

前記の“細胞活性化”とは、該当細胞が有している活性が増加することを意味することで、このような活性の種類は特に限定されないが、一例で細胞の免疫反応促進もある。特に、前記細胞が免疫細胞の場合、前記活性化とは細胞自体の免疫反応の促進作用だけでなく、免疫細胞の数が増えることを全て含む意味として理解できる。

30

【0160】

前記細胞内シグナル伝達ドメインは、細胞外に位置する抗原結合部位 (本発明の抗体又はその機能的断片) に抗原が結合した場合、細胞 (特に、免疫細胞) 活性化をもたらすシグナルを伝達できるものなら、特にその種類に限られない。様々な種類の細胞内シグナル伝達ドメインが用いられ、その例としては免疫受容体チロシンベースの活性化モチーフ (t y r o s i n e - b a s e d a c t i v a t i o n m o t i f) 又はITAMであることができ、前記ITAMはCD3ゼータ (、 z e t a)、TCRゼータ、FcRガンマ、FcRベータ、CD3ガンマ、CD3デルタ、CD3イプシロン、CD5、CD22、CD79a、CD79b、CD278、CD66d、DAP10、DAP12、FcRI (特に、) 及びその組み合わせ (1個又は2個以上) に由来するものを含むことができるが、それらに限定されるものではない。

40

【0161】

また、本発明のCAR細胞の種類によって、細胞内シグナル伝達ドメインと共に共同刺激ドメイン (c o s t i m u l t a t o r y d o m a i n) をさらに含むことが望ましいかもしれないが、これに限定されない。

【0162】

50

前記共同刺激ドメインは、本発明のCARに含まれ、細胞内シグナル伝達ドメインによる1次シグナルに加え、該当細胞（特に、免疫細胞）に最大活性化シグナルを伝達する役割を行う部分として、共同刺激分子の細胞内ドメインを含む、CARの細胞内部分を意味する。即ち、一部免疫細胞、例えばTリンパ球及びNK細胞は、最大活性化のため2つのシグナル、即ち1次活性化シグナル及び共同刺激シグナルが必要で、CARはまた細胞外ドメインに対する抗原の結合が1次活性化シグナル及び共同刺激シグナル両方の転送を引き起こすため、任意に共同刺激ドメインを含むことができる。

【0163】

前記共同刺激分子は、細胞表面分子であって、抗原に対する免疫細胞の十分な反応をもたらすことに必要な分子を意味し、当業界に知られたものであれば、その種類が特に限られてはならないが、例えばMHCクラスI分子(MHC class I molecules)、TNF受容体タンパク質(TNF receptor proteins)、免疫グロブリン-類似タンパク質(Immunoglobulin-like proteins)、サイトカイン受容体(cytokine receptors)、インテグリン(integrins)、SLAMタンパク質(signaling lymphocytic activation molecules)、NK細胞の活性化受容体(NK cell activating receptors)、BTLA、Tollリガンド受容体(Toll ligand receptor)、OX40、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CDS、ICAM-1、LFA-1(CD11a/CD18、lymphocyte function-associated antigen-1)、4-1BB(CD137)、B7-H3、CDS、ICAM-1、ICOS(CD278)、GITR、BAFFR、LIGHT、HVEM(LIGHTR)、KIRDS2、SLAMF7、NKp80(KLRF1)、NKp44、NKp30、NKp46、CD19、CD4、CD8alpha、CD8beta、IL2R beta、IL2R gamma、IL7R alpha、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、NKG2D、NKG2C、TNFR2、TRANSCENDANT1、DNAM1(CD226)、SLAMF4(CD244、2B4)、CD84、CD96(Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9(CD229)、CD160(BY55)、PSGL1、CD100(SEMA4D)、CD69、SLAMF6(NTB-A、Ly108)、SLAM(SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME(SLAMF8)、SELPLG(CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19a、CD83と特異的結合するリガンド、PD-1およびその組み合わせからなる群から選択される可能性がある。前期共同刺激ドメインはこのような共同刺激分子及びその組合せ(1つ又は2つ以上)でできる群から選ばれた分子の細胞内部分でもある。

【0164】

前記共同刺激ドメインは、シグナル伝達ドメインのN-末端又はC-末端に繋ぐことができ、また複数でできているシグナル伝達ドメインの間に含まれることができる。

【0165】

前記CARを成す各ドメインは、直接連結することが可能なため、また、選択的に、短いオリゴペプチド又はポリペプチドリンカーがCARの細胞内ドメイン及び膜透過性ドメインを連結することが可能なため、前記のリンカーは本発明のCARに含まれても、細胞外に位置する抗体に抗原が結合したときの細胞内ドメインを介してT細胞活性化を誘導できるリンカーなら、特にその長さに制限は無く、その例で、(G₄S)₃リンカー、即ち、GGGGSGGGGSGGGGS(配列番号17)などを使用することができる。

【0166】

また、本発明は、前記のCAR(chimeric antigen receptor

10

20

30

40

50

）タンパク質をコーディングするポリヌクレオチド、及び前記ポリヌクレオチドを含む組換えベクターを提供する。前記ポリヌクレオチドは、本発明の抗体又はその機能的断片を含むCARタンパク質を暗号化する限りこの塩基の組合せに特に制限は無く、当業界に公知されたポリヌクレオチド合成技術により製作できる。また、前記ベクターは、CARタンパク質をコーディングするポリヌクレオチドを含み、このポリヌクレオチドを細胞内に伝達することに用いられる物質を意味することで、組換えベクターに関して、前述のことを参照する。

【0167】

また、本発明は、前記CARタンパク質をコーディングするポリヌクレオチドを含むベクターに形質転換された細胞を提供する。即ち、前記本発明が抗体又はその機能的断片を含むCARタンパク質が発現するよう変形された細胞（CAR-発現細胞）を提供する。

10

【0168】

前記細胞は、その種類に特に制限は無く、CARを成すドメイン構成の由来に応じて、シグナル伝達に有利な細胞種類を使用することができる。本発明でCARタンパク質が発現するよう変形される細胞は望ましくは、免疫細胞であり得る。前記免疫細胞は、当業界で身体の免疫機能に関与するものと知られている細胞であれば、その種類に特に限定はないが、例えばT細胞、NK（Natural Killer）細胞、NKT（Natural Killer T）細胞、単核球、マクロファージ又は樹状細胞等を含み、その前駆細胞も含む意味である。最も望ましいのはT細胞でもある。

【0169】

本発明で用語“T細胞”は、胸腺から由来するリンパ球であって、細胞の免疫に主な役割をするリンパ球を意味する。前記T細胞はCD4+T細胞（アシスタントT細胞、TH細胞）、CD8+T細胞（細胞毒性T細胞、CTL）、記憶T細胞、調節T細胞（Treg細胞）自然殺害T細胞等あり、本発明でCARが導入されるT細胞は、好ましくはCD8+T細胞である可能性があるが、それに限定されない。

20

【0170】

一例で、抗原特異的CD8+T細胞は癌の免疫治療に最も効果のある免疫細胞として評価されている。しかし、癌の免疫治療に使用する抗原特異的CD8+T細胞を分離するため複雑な過程と長い期間が必要である。それに、抗原特異的CD8+T細胞を早い時間内に大量生産するための方法の一つとして、キメリック抗原受容体（chimeric antigen receptor, CAR）-変形されたT細胞が考案された（Porter DL et al., N Engl J Med. 2011; 365: 725-33.）。これに限定されないが、一般的一例として、CARは、特定抗原を認識する抗体のscFvをT細胞活性化をもたらすシグナル伝達ドメイン、望ましくは共同刺激分子及びCD3のシグナル伝達ドメインと結合した形のタンパク質で、CARを構成する抗体部分が、特定の抗原を認識した場合には、強力なT細胞増殖シグナル伝達を誘導し、CD8+T細胞を選択的に増殖させる原理を有している。こうして増殖された細胞は癌の免疫治療作用に寄与する。

30

【0171】

このように免疫細胞の治療剤として、前記本発明のCARが発現するよう変形された免疫細胞は、正常細胞に比べ癌細胞に特異的に露出されたクローニン3（特に、ECL-2領域）を特異的に認知して結合し、それに伴う免疫細胞活性化により癌細胞治療効果を有することができることを示す。従来は血液癌中心のCAR-変形免疫細胞治療剤技術が多数を占め、また従来CAR基準の正常細胞にもターゲットされる可能性が高いことを考慮すると、本発明は、正常細胞に比べ固形癌のみを特異的にターゲットできて、副作用が少なく（特に、正常細胞に対する副作用）、固形癌に対する優れた治療効果を有することができる。したがって本発明は、前記本発明のCAR-発現細胞を有効成分として含む癌の予防又は治療用の薬学的組成物を提供することができる。

40

【0172】

さらに、本発明者等は、前述した抗体のように、クローニン3の細胞外第二ループ（e

50

extracellular second loop, ECL-2) に特異的に結合する抗体又はその機能的断片の前述した薬物伝達の使用、ADC、DAR及びCAR-発現細胞(特に、免疫細胞)技術への適用を提供する。それは前述した内容を借用して理解される。

【0173】

本発明は、クロードイン3検出用製剤、癌診断用製剤、癌映像化用製剤、癌細胞特異的薬物伝達用製剤を製造するための前記の抗体又はその機能的断片の使用を提供する。

【0174】

本発明は、前記の抗体又はその機能的断片を有効成分として含む組成物の有効量を、それを必要とする個体に投与する段階を含むクロードイン3の特異的検出方法、癌診断方法、癌映像化方法、癌細胞特異的薬物伝達方法を提供する。

10

【0175】

本発明は、癌の予防及び治療用製剤を製造するための前記抗体の使用又は前記抗体又はその機能的断片;及び薬物が結合された抗体-薬物重合体の使用を提供する。

【0176】

本発明は、前記抗体を有効成分として含む組成物又は前記抗体又はその機能的断片;及び薬物が結合された抗体-薬物重合体を有効成分として含む組成物の有効量を、それを必要とする個体に投与する段階を含む癌の予防及び治療方法を提供する。

【0177】

本発明は、細胞内薬物伝達用製剤を製造するためのクロードイン3の細胞外第二ループ(extracellular second loop, ECL-2) に特異的に結合する抗体又はその機能的断片の使用を提供する。

20

【0178】

本発明は、細胞内薬物伝達用製剤を製造するためのクロードイン3の細胞外第二ループ(extracellular second loop, ECL-2) に特異的に結合する抗体又はその機能的断片を有効成分として含む組成物を有効量を、それを必要とする個体に投与する段階を含む細胞内薬物伝達方法を提供する。

【0179】

本発明は、癌の予防及び治療用製剤を製造するためのクロードイン3の細胞外第二ループ(extracellular second loop, ECL-2) に特異的に結合する抗体又はその機能的断片;及び薬物が結合された抗体-薬物重合体の使用を提供する。

30

【0180】

本発明はクロードイン3の細胞外第二ループ(extracellular second loop, ECL-2) に特異的に結合する抗体又はその機能的断片;及び薬物が結合された抗体-薬物重合体を有効成分として含む組成物の有効量を、それを必要とする個体に投与する段階を含む癌の予防及び治療方法を提供する。

【0181】

本発明の前記の“有効量”とは、個体に投与した場合、癌の改善、治療、予防、検出、診断又は癌の抑制効果を示す量を言い、前記“個体”とは動物、望ましくは哺乳動物、特にヒトを含む動物の可能性があり、動物で由来した細胞、組織、器官の可能性もある。前記個体は、前記の効果が必要な患者(patient)の可能性もある。

40

【0182】

本発明の前記“治療”は、癌又は癌の症状を改善することを包括的に指し、それはこのような疾患を治癒したり、実質に予防したり、又は状態を改善させることを含むこともあり、癌から始まった一つの症状又は殆どの症状を緩和させたり、治癒したり予防することを含むが、それに制限されるのではない。

【0183】

本発明の用語“~を含む(comprising)”とは、“含有する”又は“特徴とする”と同じく使われ、組成物又は方法において、言及されない追加的な成分要素又は方法

50

段階等を排除しない。用語“～で構成される (*consisting of*) ”とは他に記載されていない追加的要素、段階又は成分等を除外することを意味する。用語“ 必須的に構成される (*essentially consisting of*) ”とは、組成物又は方法の範囲において、記載された成分要素又は段階と共に、その基本的特性に実質的に影響を及ぼさない成分要素又は段階等を含むことを意味する。

【発明の効果】

【0184】

クローディング3のECL-2に特異的に結合する抗体及びその機能的断片は、他の癌抗原又はクローディング3のECL-1を標的にする従来の抗体より癌細胞検出、診断、映像化、がん治療への適用 (ADC及びCAR-発現細胞 (特に、免疫細胞) への適用) などにおいて価値が大きい。時にこのような具体的一例として、本発明で提供する特有のCDR配列を含む抗体は、自ら抗癌能力を有するだけではなく、他のクローディングファミリーと交差反応性の無き、優れた癌細胞標的能力を示し、従来公知のクローディング3抗体と比較して非常に優れた結合力 (親和度) を示し、細胞内在化 (*internalization*) などの特性を有して前記使用への適用において著しい効果を示す。

10

【図面の簡単な説明】

【0185】

【図1】図1は、CHO-CLDN3細胞株のバイオパニングとL-クローディング3細胞株ELISAを利用して選別されたscFvのに対し、CHO-K1細胞 (*negative cell line*、対照群) の結合をフローサイトメトリー分析 (*Flow cytometry*) した結果である。

20

【図2】図2は、CHO-CLDN3細胞株のバイオパニングとL-クローディング3細胞株ELISAを利用して選別されたscFvのに対し、CHO-CLDN3細胞の結合をフローサイトメトリー分析 (*Flow cytometry*) した結果である。

【図3】図3は、それぞれ還元 (*reducing*) 条件および非還元 (*non-reducing*) 条件で生産された4G3 IgG抗体タンパク質のSDS-PAGE実験の結果として、各抗体の軽鎖と重鎖が予想される分子量で、すべてが上手く発現されていることを確認した。

【図4a】図4aは、クローディングファミリーの系統解析柔軟関係を示す。

【図4b】図4bは、CLDN3と系統解析に近く、CLDN4、CLDN5、CLDN6、CLDN8、CLDN9、CLDN17とCLDN1とマウスCLDN3の細胞外第一ループ (*EL1, Extracellular 1st loop*) と細胞外第二ループ (*EL2, Extracellular 2nd loop*) 領域の配列相同性を示す。

30

【図5a】、

【図5b】図5a及び図5bは、それぞれのヒトクローディングファミリータンパク質 (CLDN1、CLDN3、CLDN4、CLDN5、CLDN6、CLDN8、CLDN9、CLDN17) を発現するように形質転換されたHEK293細胞に、本発明の4G3抗体を処理してフローサイトメトリー分析し、CLDN3発現細胞の特異的結合能力を確認した結果を示す。

【図5c】図5cは、マウスCLDN3を発現するように形質転換されたHEK293細胞に、本発明の4G3抗体を処理してフローサイトメトリー分析し、CLDN3発現細胞に対する結合能力を確認した結果を示す。

40

【図6】図6は、卵巣癌としてクローディング3を過剰発現する細胞株であるOVCA3及びCaov-3と、クローディング3発現が極めて低い細胞株であるTOV-112D、ここにCLDN3を過剰発現するように形質転換させたhCLDN3/TOV-112D細胞に本発明の4G3抗体を処理してフローサイトメトリー分析して、4G3抗体の結合特異性比較的に確認した結果を示す。

【図7】図7は、OVCA3、Caov-3、TOV-112DとhCLDN3/TOV-112D細胞に対して、本発明の4G3抗体を用いて免疫沈降 (*Immunoprecipitation*) 分析を行った結果を示す (*input* : 細胞溶解物) 。

50

【図8a】図8aは、OVCA R - 3、Caov - 3、TOV - 112DとhCLDN3 / TOV - 112D細胞に対して対照抗体 (control IgG) を用いて免疫蛍光染色した結果を示す。

【図8b】図8bは、OVCA R - 3、Caov - 3、TOV - 112DとhCLDN3 / TOV - 112D細胞に対して4G3抗体を用いて免疫蛍光染色した結果を示す。

【図9a】図9aは、本発明の抗体 (4G3 IgG) のCHO - K1細胞 (negative cell line、対照群) に対する結合をフローサイトメトリー分析 (Flow cytometry) した結果である。

【図9b】図9bは、本発明の抗体 (4G3 IgG) のCHO - CLDN3細胞 (positive cell line、対照群) の結合をフローサイトメトリー分析 (Flow cytometry) した結果である。

【図9c】図9cは、CLDN3発現細胞 (hCLDN3 / HEK293とhCLDN3 / TOV - 112D) で本発明の抗体 (4G3 IgG) の結合親和性 (解離定数 (KD)) をLigandTracer Green (ridgeview) で測定した結果である。

【図10a】図10aは、細胞外第一ループ (extracellular 1st loop、EL1) としてCLDN1のアミノ酸1~104番の領域と細胞外第二ループ (extracellular 2nd loop、EL2) としてCLDN3のアミノ酸104~220回の領域を含む融合タンパク質を発現する細胞 (hCLDN1 - 3 / HEK293) と、EL1としてCLDN3のアミノ酸1~103番の領域とEL2としてCLDN1のアミノ酸105~211回の領域を含む融合タンパク質を発現する細胞 (hCLDN3 - 1 / HEK293) で、各融合タンパク質の発現 (構造) 面の模式図である。

【図10b】図10bは、hCLDN1 - 3 / HEK293又はhCLDN3 - 1 / HEK293細胞に対して4G3抗体を処理し、フローサイトメトリー分析した結果と (上部)、前記細胞から目的とする融合タンパク質が正常に発現されたことを確認したウェスタンブロッティングの結果を示す (下段)。

【図11a】図11aは、本発明の抗体がクローディン3に結合した後、細胞内にエンドサイトシス (endocytosis) されて入ることを卵巣癌細胞株であるOVCA R - 3およびCaov - 3に対して免疫蛍光染色法を利用して、時間の経過に応じて観察した結果を示す。

【図11b】図11bは、本発明の抗体特有の内在化の効果を、従来クローディン3に付着することで知られている他の抗体 (KM3907) とは対照的に示している。

【図12a】、

【図12b】、

【図12c】、

【図12d】、

【図12e】図12a乃至12eは、様々な癌細胞へのクローディン3発現程度を、本発明の4G3抗体を処理してフローサイトメトリー分析して、比較的確認した結果を示す。

【図13a】、

【図13b】、

【図13c】、

【図13d】、

【図13e】図13a乃至13eは、前記細胞の4G3抗体処理による抗体依存性細胞毒性 (Antibody - dependent cell - mediated cytotoxicity、ADCC) の効果を濃度依存的に確認した結果を示す。

【図14a】図14aは、腫瘍異種移植 (xenograft) 動物モデルで本発明4G3抗体のin vivo腫瘍標的能を確認した結果を示し、

【図14b】図14bは、前記動物モデルで臓器摘出後の蛍光強度を定量化した結果を示す。

10

20

30

40

50

【発明を実施するための形態】

【0186】

以下、本発明を詳細に説明する。

但し、後記実施例は、本発明を例示するのみ、本発明の内容が後記実施例に限定するものではない。

【0187】

実施例1: クローディング3 (CLDN3) に特異的に結合するScFvスクリーニング。

1-1. 抗原

抗原としてクローディング3はスクリーニングの過程で、それぞれクローディング3発現細胞株とクローディング3リボパーティクル (lipoparticle) の形で提供された。クローディング3 (NCBI reference number_O15551 (配列番号1参照)) の発現細胞株を作るためにCHO-K1細胞株を用いた。クローディング3発現ベクターを製作するためにpcDNA3.1 (invitrogen) に制限酵素HindIII、BamHIを用いてクローディング3遺伝子を挿入した。製作したクローディング3発現ベクターをトランスフェクション (transfection) の後、400 µg/mlのジェネティシン (geneticin, g418) を処理して形質転換体を選別した。前記クローディング3を表面に露出しているリボパーティクル (以下、クローディング3リボパーティクルに称する) は、インテグラルモレキュラ (Integral molecular, Cat. No. RR-0733A) から購入して使用した。

【0188】

1-2. scFv phage選別

クローディング3に特異的に結合する抗体をスクリーニングするために、ファージディスプレイ法 (phage library display) を用いた。ライブラリは、合成したヒトscFvライブラリを使用しており、ライブラリの具体的な情報は、A Novel Human scFv Library with Non-Combinatorial Synthetic CDR Diversity (Bai X. et al., PLoS ONE, 10(10): e0141045 (2015)) に示される。scFvライブラリで発現するscFvは、HA tagをタグging (tagging) してanti-HA FITC抗体 (Genscript, A01621) によって検出することができるようにした。前記scFvライブラリを使用して、次のようにバイオパニング (Biopanning) を行った。

【0189】

先ず、前記実施例1-1から製造したクローディング3発現CHO-K1細胞株 (以下、CHO-CLDN3と称する) を利用してバイオパニングを実施した。scFvライブラリストックを3% FBS/PBSで常温でブロックング (blocking) を進行した。Trypsinを利用しそれぞれ 1×10^7 個ずつ、CHO-CLDN3細胞とCHO-K1細胞 (negative cell line) を用意する。CHO-K1細胞 (negative cell line) を前記ブロックングされているライブラリのストックと混合して、室温で1時間ディプリーション (depletion) を進行する。ディプリーションが終わった後、遠心分離して得た上澄み液を抗原であるCHO-CLDN3細胞と混合して、室温で1時間反応させる。遠心分離して得られた細胞ペレットを3% FBS/PBSで洗浄した後、特異的に結合したscFv-ファージのみ溶出されるように、100mM TEA (triethylamine) で、室温で5分間反応させ、pH8.5 Trisで中和反応を経てscFv-抗原コンジュゲート (conjugate) の形で準備した。用意されたscFv-抗原コンジュゲート (conjugate) をE. coli TG1細胞に添加して感染させた後、LB/アンピシリン (ampicillin) /グルコース (glucose) アガ培地で37°Cで一晩培養した。前記E. coli TG1細胞をSB/アンピシリン培地に移動OD600値が0.5になるまで培養した後、 $1 \times 10^{11} \sim 1 \times 10^{12}$ のヘルパーファージ (helper phage) を添加し、再度1時間、37°Cで培養した後、カナマイシン (kanamycin

10

20

30

40

50

)を添加して再度一晚培養した。前記一晚培養した培養液を遠心分離し、上澄み液をPEG溶液と4で反応させた後、再び遠心分離してペレットを分離した。ペレットをPBSに溶かした後、それを遠心分離して得た上澄み液をscFvライブラリ溶液に確保した。このような過程を4回繰り返してクローディング3の抗原と特異的結合をするscFv候補群を確保した。

【0190】

2番目の方法としてリポパーティクルを利用してバイオパニングを進行させた。

scFvライブラリストックをリポパーティクルnull(クローディング3を含まないリポパーティクル)と混合し、4%脱脂乳(skim milk)で室温で1時間ブロッキング(blocking)とディプリーション(depletion)を同時に行った。免疫チューブ(immunotube)にクローディング3リポパーティクルを含むPBS 1mlを入れて、4で16時間反応させて、チューブの内側表面にコーティングした。抗原溶液に沿って1回洗浄してコーティングされていない抗原を除去した。前記免疫チューブにコーティングしておいた抗原(クローディング3リポパーティクル)を4%スキムミルク(skim milk)で室温で1時間ブロッキングを行った。ブロッキングの後、スキムミルクを除去し、scFvライブラリストックと混合して、室温で1時間反応させた。PBSで洗浄した後、特異的に結合したscFv-ファージのみ溶出されるように、100mM TEAに、室温で5分間反応させpH 8.5 Trisで中和反応を経てscFv-抗原コンジュゲート(conjugate)の形で準備した。用意されたscFv-抗原コンジュゲート(conjugate)をE. coli TG1細胞に添加して感染させた後、LB/アンピシリン(ampicillin)/グルコース(glucose)アガ培地で37で一晚培養した。前記E. coli TG1細胞をSB/アンピシリン培地に移動OD600値が0.5になるまで培養した後、 $1 \times 10^{11} \sim 1 \times 10^{12}$ のヘルパーファージ(helper phage)を添加し、再度1時間、37で培養した後、カナマイシン(kanamycin)を添加して再度一晚培養した。前記一晚培養した培養液を遠心分離し、上澄み液をPEG溶液と4で反応させた後、再び遠心分離してペレットを分離した。ペレットをPBSに溶かした後、それを遠心分離して上澄み液をscFvライブラリ溶液に確保した。このような過程を4回繰り返してクローディング3の抗原と特異的結合をするscFv候補群を確保した。

【0191】

1-3.クローディング3(CLDN3)に特異的に結合するscFv抗体選別

実施例1-2で確保されたscFv候補群から結合性に優れたscFvを選別するために、クローディング3発現細胞株に対してELISA分析を行った。クローディング3発現細胞株(以下、L-クローディング3細胞と称する)は、L cellに前記実施例1-1で作製したクローディング3発現ベクターをトランスフェクションした後、600 μ g/mlのジェネティシン(geneticin, g418)を処理して形質転換体を選別して使用した。前記実施例1-2の各段階のパニングが終わったライブラリストックそれぞれ(クローディング3発現細胞株またはクローディング3リポパーティクルを用いたスクリーニング結果に別に利用)をSB/アンピシリン(ampicillin)/グルコース(glucose)アガ培地で一晚培養した後、それぞれの単コロニー(single colony)をSB/アンピシリン培地200 μ lに接種して37で3時間培養した後、IPTG濃度が1mMになるように混ぜてから、再び30で一晚培養した。培養が終わったら、培養液を遠心分離して細胞のみを分離した後、TESバッファーを用いて細胞を溶解させてscFvを確保した。確保したscFvをL-クローディング3細胞が 1×10^5 ずつ分注したプレートに処理して、室温で1時間反応させた後、二次抗体(anti-HA HRP, santacruz, Cat. No. sc-7392)を添加して40分間反応させた。二次抗体反応が完了したら、TMBを添加して発色反応をさせてELISAリーダー(450nm)を用いて分析した。ELISA分析値を相対的に比較して、上位23個の優れたscFvを1次的に選別した(1C4, 1F11, 2A12, 2B4, 2E5, 2E12, 2F8, 3A2, 3H8, 4A2, 4A3, 4B7, 4B10, 4D7,

3 D 2 , 3 D 7 , 3 F 1 1 , 4 A 8 , 4 A 9 , 4 A 1 2 , 4 E 4 , 4 G 3 , 4 G 7) 。

【 0 1 9 2 】

前記 E L I S A を通って選別した s c F v 候補に対し、フローサイトメトリー (F l o w C y t o m e t r y) を用いて C H O - C L D N 3 細胞との結合するかどうかを確認した。対照群に本来の C H O - K 1 細胞を用いた。継代培養中の細胞を t r y p s i n を利用して、単一の細胞単位で分離して、3 % F B S / P B S で準備した。前記選別された s c F v 候補を S B / アンピシリン培地 5 m l に接種して 3 7 ° C で 3 時間培養した後、I P T G 濃度が 1 m M になるように混ぜた後、再び 3 0 ° C で一晩培養した。培養が完了したら、培養液を遠心分離して細胞のみを分離した後、T E S バッファーを用いて細胞を溶解させて s c F v を確保した。C H O - K 1 細胞 (n e g a t i v e c e l l l i n e 、対照群) と C H O - C L D N 3 細胞 (実験群) を、各グループ毎にそれぞれ 2×10^5 細胞ずつ入るように 3 % F B S / P B S で準備した後、前記確保された s c F v を処理して、室温で 1 時間反応した。反応が完了すると、3 % F B S / P B S で洗浄した後、a n t i - H A t a q F I T C 抗体を 1 : 1 0 0 に希釈 (3 % F B S / P B S 1 0 0 μ l で希釈) して 1 0 0 μ l を処理し、室温で 1 時間反応した。反応完了後洗浄し、B D F A C S C a l i b u r で分析した。この時、商業的に販売されている a n t i - C L D N 3 (F A B 4 6 2 0 F 、 R & D s y s t e m s) 抗体を比較群として使用した。対照群 (図 1 参照) に比べて実験群 (図 2 参照) のみのピークの移動が起こる s c F v 候補群を選別した (2 B 4 , 4 A 2 , 4 B 7 , 4 B 1 0 , 4 D 7 , 4 A 8 , 4 A 9 , 4 A 1 2 , 4 E 4 , 4 G 3 , 4 G 7) 。

10

20

【 0 1 9 3 】

次に、クローディング 3 リボパーティクルを用いた最終的なバイオニング結果 (データ未図示) と、前期の実験段階で選別された s c F v 候補群の結果を比較した。選別された s c F v についてシーケンシング (s e q u e n c i n g) を実行し、クローディング 3 リボパーティクルとクローディング 3 発現細胞株の (C H O C L D N 3 細胞株及び / 又は L - クローディング 3 細胞株) の実験では、2 つの 2 B 4 と 4 G 3 クロウンを確保した。2 B 4 、 4 G 3 s c F v のアミノ酸配列を分析した結果は、後記の表 1 の通りである。

【 0 1 9 4 】

【 表 1 】

【 表 1 】

30

抗体	重鎖可変領域		
	CDRH1	CDRH2	CDRH3
2 B 4	GYYSWS (配列番号 18)	TIHPGDS DTRY NPSLQG (配列番号 19)	RQGYS LFDI (配列番号 20)
4 G 3	SYAMS (配列番号 3)	I I N P S G A S T S H A Q R F Q G (配列番号 4)	R Y G R Y G S F D I (配列番号 5)
抗体	軽鎖可変領域		
	CDRL1	CDRL2	CDRL3
2 B 4	RASQSVASD LA (配列番号 21)	AASRLQS (配列番号 22)	QQYNSYPPT (配列番号 23)
4 G 3	SGSTSNIGR NYVS (配列番号 6)	DTSNKHF (配列番号 7)	QSYDSSKVV (配列番号 8)

40

【 0 1 9 5 】

実施例 2 : 4 G 3 s c F v 抗体の I g G への転換及び発現

【 0 1 9 6 】

2 - 1 . 全体 I g G 発現ベクター製作

先に選別された 4 G 3 s c F v をより通常的に使用される抗体の I g G の形に変換させ

50

た。前記 s c F v の C D R 部位を基盤に全体 I g G 形を発現できる発現ベクターを製作した。先ず、s c F v の軽鎖可変領域 (l i g h t c h a i n v a r i a b l e r e g i o n) と重鎖可変領域 (h e a v y c h a i n v a r i a b l e r e g i o n) をそれぞれ P C R を介して収得し、そのとき 4 G 3 においては後記の表 2 に図示されたプライマーを使用した。前記軽鎖可変領域配列は軽鎖不変領域 (l i g h t c h a i n c o n s t a n t r e g i o n) 配列が挿入されている発現ベクターの p O p t i v e c (I n v i t r o g e n) にクローニングし、前期重鎖可変領域配列は重鎖不変領域 (h e a v y c h a i n c o n s t a n t r e g i o n) が挿入されている発現ベクターの p c D N A 3 . 3 (I n v i t r o g e n) にそれぞれクローニングした。ベクターからクローニングした s c F v の軽鎖可変領域及び重鎖可変領域と一緒に軽鎖及び重鎖不変領域が発現され、結果には前記 s c F v の C D R 領域を含む全体 I g G 抗体が作られる。

10

20

40

50

【 0 1 9 7 】

【 表 2 】

【表2】

可変部位	プライマー配列	配列番号
軽鎖F	5'-ATTTCGATCGATATGGAGACAGACACTCCTG CTATGGGTTACTGCTGCTCTGGGTTCCAGGTTCCA CGTGGCAGAGCGTGCTGACCCAGCCT-3'	9
軽鎖R	5'-AGCCACCGTACGCAGCACGGTCAAGCTTGGTACC-3'	10
重鎖F	5'-ATTTCGATCGATATGGAGACAGACACTCCTG CTATGGGTTACTGCTGCTCTGGGTTCCAGGTTCCACGTGGGAAGTGCAGCTGCTGGAAAGT-3'	11
重鎖R	5'-CTTGGTGCTAGCGCTGCTCACGGTCACCCAGAGT-3'	12

【 0 1 9 8 】

2 - 2 . 全体 I g G 抗体発現 C H O - S 細胞株製作 (p o o l)

C H O - S 細胞 (L i f e T e c h n o l o g i e s I n c .) を利用し、それぞれ 4 G 3 1 g G 抗体発現細胞株を製作した。前記実施例 2 - 1 から収得した重鎖及び軽鎖をコーディングする遺伝子配列に対して *C r i c e t u l u s g r i s e u s* 種でコドン最適化 (c o d o n o p t i m i z a t i o n) し、それら配列を F r e e d o m (R) p C H O 1 . 0 V e c t o r でクローニングした後、トランスフェクション試薬 (F r e e S t y l e TM M A X R e a g e n t ; L i f e T e c h n o l o g i e s I n c .) で C H O - S 細胞に形質導入した。形質導入後の抗体発現細胞株を選別するために、ピューロマイシン (p u r o m y c i n) と M T X (m e t h o t r e x a t e) を利用して、2段階を経て選別した。具体的には、1次選別では、p u r o m y c i n 1 0 u g / m l の、M T X 1 0 0 n M または p u r o m y c i n 2 0 u g / m l の、M T X 2 0 0 n M で進行し、細胞生存率が基準内に入ってくると、2次処理を行った。2次選別では、p u r o m y c i n 3 0 u g / m l の、M T X 5 0 0 n M または p u r o m y c i n 5 0 u g / m l の、M T X 1 0 0 0 n M で進行して最終的な細胞生存率の基準に入ってきたとき、2次選別を終了して S F B (S i m p l e F e d B a t c h) を介して発現量が高い群を選択した。

30

40

【 0 1 9 9 】

2 - 3 . 全体 I g G 抗体生産及び精製

前記 2 - 2 から製造されたそれぞれの抗体生産細胞株を C D F o r t i C H O TM 培地から C O ₂ 8 % , 3 7 , 1 0 0 ~ 1 2 0 r p m 条件で、g l u c o s e を 3 日、5 日、7 日目にそれぞれ 4 g / L、4 g / L、6 g / L ずつ入れながら 1 4 日目に培養した。培養完了後、培養液を u l t r a - c e n t r i f u g e 6 0 0 0 g で遠心分離し、この

上澄み液を0.2 μm filterを用いてフィルタした。精製のためにProtein Aレジン(Mabselect SuRe、11-0026-01 AD、GE Healthcare Life Sciences)を使用して、平衡バッファー(20 mM Sodium Phosphate、150 mM NaCl、pH 7.2)、洗浄バッファー(35 mM Sodium Phosphate、500 mM NaCl、pH 7.2)、溶出バッファー(0.1 M Sodium Citrate、pH 3.6)を使用した。AKTATMavantを利用して、平衡バッファーは、カラム体積の2倍、洗浄バッファはカラム体積の5倍、溶出バッファーはカラム体積の5倍にして精製し、溶出時中和反応のためにpH 8.0 Tris-HCl溶液を1/5ずつ入れた。ろ過膜(CelluSep、1430-45)を使用して、PBSで2回バッファの切り替え後、遠心分離フィルター(Amicon Ultra-15、UFC905024、Merck)で濃縮した。

【0200】

それぞれ還元(reducing)条件および非還元(nonreducing)条件で生産されたIgG抗体タンパク質を通常のSDS-PAGE技法で確認して、各抗体の軽鎖と重鎖が予想される分子量で、すべてが上手く発現されていることを確認した。図3は、4G3 IgG抗体のSDS-PAGE確認結果を表す。

【0201】

実施例3:本発明抗体のクローディング3に対する結合特異性(binding specificity)及び結合力評価

3-1. 様々なクローディングに対するCLDN/HEK293細胞株製作

前記実施例2-3から製作された抗体の抗原特異性を確認するために、ヒトCLDN3と系統分析的に近く位置したクローディング、特にヒトCLDN4(NCBI accession number: O14493), CLDN5(O00501), CLDN6(P56747), CLDN8(P56748), CLDN9(O95484), CLDN17(P56750)に対する結合有無を比較評価した。(図4a又は図4b参照)。又、前期のクローディング種類よりは系統分析的に距離があるが、典型的なクローディングのCLDN1(O95832)が本事件に比較群に使用された。又、開発された抗体がマウスCLDN3(Q9Z0G9)にも結合するか調べてみた(4bを参照)。前述したクローディングをコーディングする遺伝子のそれぞれをpcDNA3.1(+)(Invitrogen)にクローニングしている。このように製作された、それぞれのクローディング発現ベクターを、Fugene HD(E231A、Promega)トランスクション試薬を用いてHEK293(KCLB)に形質導入した後、G418で耐性細胞株を選別した。このように製作されたヒトクローディングを持続発現する細胞株(hCLDN/HEK293)らに対し、各クローディングがよく発現されているかどうかの確認は、商業的に販売されているanti-CLDN1(FAB4618G、R&D systems)、anti-CLDN3(FAB4620F、R&D systems)、anti-CLDN4(FAB4219F、R&D systems)、anti-CLDN5(ab131259、Abcam)、anti-CLDN6(ABIN1720916、Antibodies-online)、anti-CLDN8(MAB5275、R&D systems)、anti-CLDN9(ab187116、Abcam)、anti-CLDN17(MAB4619、R&D systems)抗体を用いて確認した。

【0202】

3-2. CLDN/HEK293細胞株に対する本発明の抗体の交差反応性の評価

実施例3-1で製作された複数のクローディングのhCLDNs/HEK293細胞株とmCLDN3/HEK293者に対し、前記実施例2-3で製造された抗体の交差反応性を確認した。陰性対照群には、本来のHEK293細胞を使用した。まず、細胞分離バッファ(cell dissociation buffer、Gibco、13151-014)を用いて、単一の細胞に分離した後、 2.5×10^5 個ずつ分注(seeding)し、ここで、それぞれの抗体5 μg/mlを入れ、1時間の間に氷の上で反応させた。

反応後、1% BSA / PBS で洗浄し、二次抗体である goat anti-human IgG - FITC (109-095-098、Jackson ImmunoResearch) を 1 : 100 で処理して、1時間の間氷の上で反応させた。反応後、1% BSA / PBS で洗浄し、フローサイトメトリーとして BD FACSCalibur を使用して分析した。

【0203】

図5a及び図5bは、前記フローサイトメトリー分析の結果として、4G3抗体のクローディング3の結合特異性を比較的に示す。CLDN3と系統解析学的に近いCLDN4、CLDN5、CLDN6、CLDN8、CLDN9とCLDN17を利用したどの実験群でもピークの移動が見られなかった。マウスCLDN3を用いた実験の結果を図5cに示し、本発明の抗体は、マウス、ヒトCLDN3と相同性が高いマウスCLDN3とも結合することを確認した。

10

【0204】

それで本発明の各抗体は、ヒトCLDN3およびマウスCLDN3以外のクローディングファミリーとは結合しないことを確認した。すなわち、本発明の各抗体は、相同性が高い他のクローディング種類とは交差反応せず、CLDN3のみ特異的に結合する。

【0205】

3-3. in vitro 癌細胞の検出能力を確認__フローサイトメトリー分析

前記実施例2-3で製造された抗体の癌細胞に対する結合力を確認した。卵巣癌としてクローディング3を過剰発現する細胞株であるOVCAR-3(ATCC)とCaov-3(ATCC)と、クローディング3発現が極めて低い細胞株であるTOV-112D(ATCC)、ここCLDN3を過剰発現するように形質転換させたhCLDN3/TOV-112D細胞を用いた。hCLDN3/TOV-112D細胞の作製は、前記実施例3-1に記載されたのと同じ方法で行われた。前記細胞に対する抗体処理とフローサイトメトリー分析は、実施例3-2と同様の方法で行われた。

20

【0206】

実験の結果、クローディング3発現細胞であるOVCAR-3、Caov-3、hCLDN3/TOV-112Dは、ピークの移動が確認され、陰性細胞株であるTOV-112Dは、ピークの移動が見られなかった。代表的にも図6は、前記癌細胞に対する4G3抗体の結合特異性を比較的に示す。

30

【0207】

3-4. クローディング3特異的結合再確認_免疫沈降 (Immunoprecipitation)

免疫沈降法により、本発明の抗体が前記癌細胞でクローディング3に結合することを再確認した。抗体陰性対照群 (control IgG) としては、商業的に売るヒト全体抗体 (009-000-003、Jackson ImmunoResearch) を使用した。OVCAR-3(ATCC)、Caov-3(ATCC)、TOV-112D(ATCC)、hCLDN3/TOV-112Dの各細胞を protease inhibitor (11697498001、Roche) が添加されたPBSで解放した後、超音波破碎機で2秒 on / 5秒 off を10回行った後、15000rpm、4、15分間遠心分離して上澄み液を取った。BCA定量法では、各細胞溶解物 (上澄み液) のタンパク質濃度を測定した後、1mgずつタンパク質をとり、それぞれの抗体1ugを入れて4で1時間回転しながら反応させた。Protein A bead (11719408001、Roche) をPBSで平衡化させて、5% BSA / PBSで前記ビーズ (bead) を4で1時間回転しながらブロックした。前記抗体反応が終了したサンプルにビーズを50ul入れて、再び4で1時間の間に回転しながら反応させた。抗体とビーズの反応が終わると、PBSで3回洗浄した後、2X SDS loading バッファ30ulを入れて、100で10分間煮沸、12000rpmで3分間遠心分離して異議上澄み液を15% SDS gel電気泳動した。通常の方法でウエスタンブロッティング (western blotting) を行っており、この時、一次抗体としては、a

40

50

anti-CLDN3 (341700, Invitrogen)を使用した。

【0208】

分析の結果、control IgG処理群では、バンドが示されず、本発明の抗体は、OVCA R-3、Caov-3およびhCLDN3/TOV-112D細胞を用いた実験群へのみバンドが観察された。図7は、4G3抗体の前記細胞が発現するクローディング3の結合程度を示す。それにより、本発明の各抗体が癌細胞のクローディング3タンパク質に結合することを再確認した。

【0209】

3-5. クローディング3特異的結合再確認_免疫蛍光 (Immunofluorescence)

免疫蛍光法により、本発明の抗体が前記癌細胞でクローディング3を特異的に標的することを再確認した。OVCA R-3 (ATCC)、Caov-3 (ATCC)、TOV-112D (ATCC)、hCLDN3/TOV-112Dの各細胞を4 well cell culture slideに 2×10^5 個ずつ入れて24時間培養した。培養液に对照群の抗体 (ChromPure Human IgG、009-000-003、Jackson ImmunoResearch) または本発明の抗体を $5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ になるように入れ、4で1時間攪拌して反応させた。PBSで洗浄後、4%の細胞をホルムアルデヒドで、室温で15分間固定した。PBS洗浄後、5%BSA/PBSで、室温で1時間ブロッキングした。PBSで洗浄し、二次抗体としてgoat anti-human IgG-FITC (109-095-098、Jackson ImmunoResearch) を1:100になるように入れ、常温で1時間反応した。PBSで洗浄後、核染色のためにHoechst 33342 (H3570、Invitrogen) を1:5000になるように入れ、10分間、室温で反応させ、その後、PBSで2回以上洗浄した。FluoromountTM Aqueous Mounting Medium (F4680、SIGMA) でマウントした後、カバースライドを伏せてからコンフォーカル顕微鏡 (LSM700、Carl Zeiss, Inc.) で蛍光を観察した。

【0210】

分析の結果、对照群の抗体 (control IgG) 処理群では、すべての細胞株で蛍光が観察されていないのに対し (図8a参照)、本発明の抗体処理群では、CLDN3発現細胞株であるhCLDN3/TOV-112D、OVCA R-3、Caov-3の細胞表面への蛍光の全て観察されたCLDN3発現がないTOV-112D細胞株では、蛍光が観察されなかった。図8bは代表的に4G3抗体の前記実験の結果を示す。

【0211】

3-6. クローディング3の結合力の比較と結合親和性 (binding kinetics) を確認

前記実施例2-3で製造された4G3 IgG抗体について、そのクローディング3の結合力を確認した。CHO-CLDN3細胞を用いてフローサイトメトリー分析を実施し、具体的な実験方法は、前記実施例1-3と同様に行われた。对照群では、本来のCHO-K1細胞を用いており、商業的に販売されているanti-CLDN3 (FAB4620F、R&D systems) 抗体を比較群として使用した。

【0212】

また、クローディング3に対する抗体の結合親和性を確認するためにLigand Tracer Green (ridgeview) を使用して測定した。Ligand Tracer Green (ridgeview) は抗原を発現する細胞上でFITCが接合された抗体の抗原に対する結合するかどうかをリアルタイムで測定することができる細胞ベースの測定装置である。開発した抗体にFITC Antibody Labeling Kit (53027、Pierce) を用いてFITCを接合した。一日前blankとして5%ミルク/PBS $500 \mu\text{l}$ 、クローディング3発現が極めて低い基準細胞株、CLDN3過剰発現させた細胞株を $3 \times 10^5 \text{ cells}/\text{ml}$ の濃度で $500 \mu\text{l}$ を 100 m

10

20

30

40

50

m培養皿(172931、Thermo scientific)4象限にコインサイズで入れて5%CO₂、37℃で6時間培養後、培地を除去し、PBSで洗浄した後、再び培地10mlを入れて一晩培養した。リファレンス細胞株としてHEK293(KCLB)とTOV-112D(ATCC)を使用し、CLDN3過剰発現細胞株としてhCLDN3/HEK293とhCLDN3/TOV-112Dを使用した。実験当日培地をすべて削除し、3ml培地に交換した後、培養皿を装置に装着して安定化した後FITC接合された抗体を最終濃度で3nM、9nMになるように順次入れ、それぞれ蛍光値が平衡状態に達するまで反応させ最後に3mlの新しい培地に交換した後、解離程度を確認した。蛍光測定時間は15秒、測定遅延時間は4秒、測定間隔は72秒し、3回繰り返し実験してHEK293細胞に比べhCLDN3/HEK293細胞への蛍光値と、TOV-112D細胞比hCLDN3/TOV-112D細胞への蛍光値を一对一二状態適合モデル(one to one two state fitting model)で分析した。結果の値を図9c及び表3に示す。

【0213】

【表3】

【表3】

CLDN3 細胞株	適合 モデル	k _{a1} (M ⁻¹ s ⁻¹)	k _{d1} (s ⁻¹)	k _{s2} (s ⁻¹)	k _{d2} (s ⁻¹)	K _D (nM)	Chi2 (%)
hCLDN3/ HEK293	1:1, 2 state	4.66×10 ⁴	6.71×10 ⁻⁴	1.56×10 ⁻⁴	4.35×10 ⁻⁵	4.03	34.27
hCLDN3/ TOV-112D	1:1, 2 state	4.74×10 ⁴	3.37×10 ⁻⁴	7.77×10 ⁻⁴	2.57×10 ⁻⁵	2.35	10.15

【0214】

図9aおよび図9bに示したように、4G3 IgG抗体の両方のピークの移動が現れクロードイン3に結合したことを確認した。この時、4G3 IgG抗体処理群でピークの移動の差がより大きく現れ、それにより4G3 IgG抗体は、従来の商業的に販売されている抗体よりもクロードイン3特異的な結合力がより優れていることを確認された。

【0215】

また、結合親和性の分析結果図9c及び表3に示すように、4G3のクロードイン3発現細胞のkinetic value(KD)は、2つの細胞株で、それぞれ4.03nM(hCLDN3/HEK293)、2.35nM(hCLDN3/TOV-112D)に現れ4G3のクロードイン3の高い親和性を確認した。その結果は、本発明の4G3 IgG抗体が従来のanti-claudin3抗体と比べ著しく優れた親和性を保持することを示してのものであり、例えば、従来の“Chiara Romani et al. Oncotarget. 2015”のIgGH6抗体よりも親和性が5倍以上の優れたものである。

【0216】

実施例4：抗原結合部位を確認

細胞で自然に発現されたCLDN3細胞外に表れる領域の中で、具体的に、本発明の抗体が結合する抗原結合部位がどこなのか確認しようとした。そこで、CLDN3の細胞外第一ループ(extracellular 1st loop)と細胞外第二ループ(extracellular 2nd loop)に対応する領域のそれぞれをCLDN1に対応する領域と置換した融合タンパク質を作成確認した。CLDN1のアミノ酸1~104番のCLDN3アミノ酸104~220回を発現する遺伝子(hCLDN1-3)またはCLDN1のアミノ酸105~211番とCLDN3のアミノ酸1~103番を発現する

【0217】

遺伝子(hCLDN3-1)をそれぞれpcDNA 3.1(+)(Invitrogen)にクローニングした。各遺伝子をHEK293(KCLB)に形質導入させた後、G

10

20

30

40

50

418で耐性細胞株を選別して、hCLDN1-3またはhCLDN3-1の融合タンパク質を持続的に発現する細胞株を作製した。それぞれhCLDN1-3/HEK293、hCLDN3-1/HEK293と命名した(図10a参照)。各細胞株から、目的とする融合タンパク質が発現されたがanti-CLDN3(341700, Invitrogen)、anti-CLDN1(sc-137121, Santa Cruz Biotechnology, Inc.)を用いて、通常のエスタンプロテイングの方法で確認した(図10bの下部を参照)。hCLDN1-3/HEK293又はhCLDN3-1/HEK293細胞に対して4G3抗体の処理とフローサイトメトリー分析は、実施例3-2と同様の方法で行われた。

【0218】

分析結果図10bに示すように、hCLDN1-3/HEK293の実験では、ピークの移動が見られ、hCLDN3-1/HEK293の実験では、ピークの移動が見られなかった。それにより4G3抗体はhCLDN3の細胞外第二ループ(extracellular loop)部分に結合することを確認した。

【0219】

実施例5: IgG 4G3抗体の細胞内摂取(endocytosis)確認

本発明の抗体の細胞内への内在化(internalization)能力を確認するために、クローディン3過剰発現卵巣癌細胞株であるOVCA9-3(ATCC)とCaov-3(ATCC)を、4ウェル細胞培養スライド(well cell culture slide)に 2×10^5 個ずつ入れて24時間培養した。培養後、細胞にライソジウムを染色するLysoTracker Red DND-99(L7528, Life Technologies Inc.)1mMと、対照群の抗体としてcontrol IgG(ChromePure Human IgG, 009-000-003, Jackson ImmunoResearch)またはKM3907(配列番号13のVHおよび配列番号14のVLを有する抗体であって、実施例2-1と同様の方法で製作する(KM3907抗体全長配列は、配列番号15および16を参照)/CLDN3&CLDN4 target, ECL-1 binding)、および本明細書発明の4G3抗体を10ug/mlになるように処理し、37で1時間、2時間、4時間、6時間培養した。各時間によって培養が終わった後、PBSで洗浄し、4%ホルムアルデヒドで室温で15分間固定した。PBS洗浄後、0.1% Triton-X100/PBSで5分間3回処理した。PBSで洗浄後、5%BSA/PBSで室温で1時間ブロッキングした。PBSで洗浄し、二次抗体としてgoat anti-human IgG-FITC(109-095-098, Jackson ImmunoResearch)を1:100になるように入れ、常温で1時間反応した。PBS洗浄後、核染色のためにHoechst 33342(H3570, Invitrogen)を1:5000になるように入れて、10分間、室温で反応させ、その後、PBSで2回以上洗浄した。FluoromountTM Aqueous Mounting Medium(F4680, SIGMA)でマウントした後、カバースライドをカバーコンフォーカル顕微鏡(LSM700, Carl Zeiss, Inc.)で蛍光を観察した。

【0220】

観察結果図11aで示すように、4G3抗体が細胞内に入り、ライソジウム上に位置することを確認した。また、図11bに示すように、公知のanti-クローディン3抗体であるKM3907の場合には、細胞内への内在化が観察されなかった。

【0221】

実施例6: 癌細胞に対する抗体依存性細胞毒性の確認

本発明の抗体の抗体依存性細胞毒性(Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC)を確認するために、NK-92MIにFc receptorであるCD16遺伝子を持続的に発現する細胞株(以下、NK-92MI-CD16と呼ばれる)を使用した。NK-92MI-CD16細胞株を作製するためにpcDNA3.1(+)(Invitrogen)にNhe1、Ec

10

20

30

40

50

o R 1 制限酵素を用いて C D 1 6 遺伝子を挿入し、electroporation 技法で N K - 9 2 M I 細胞の C D 1 6 発現ベクターをトランスクションした。G 4 1 8 化合物で耐性細胞株を選別した後 F A C S A r i a 機器に過剰発現細胞株を分離した。様々な癌細胞でクローニン 3 発現による効果を確認するために、まず、各細胞のクローニン 3 発現程度を見た抗体でフローサイトメトリー分析で確認した後 M F I を比較した (図 1 2 a 乃至図 1 2 e を参照)。前記細胞に対する抗体処理とフローサイトメトリー分析は、実施例 3 - 2 と同様の方法で行われた。抗体依存性細胞毒性を示すために、各細胞を 9 6 ウェルプレートに 2×10^4 個ずつ入れて 2 4 時間培養した。対照群の抗体 (C h r o m e P u r e H u m a n I g G , 0 0 9 - 0 0 0 - 0 0 3 , J a c k s o n I m m o n o R e s e a r c h) または 4 G 3 抗体を 0 n g / m l の、0 . 1 n g / m l の、1 n g / m l の、1 0 n g / m l の、1 0 0 n g / m l の、1 0 0 0 n g / m l の、1 0 0 0 0 n g / m l の処理した後、N K - 9 2 M I - C D 1 6 細胞を 8×10^4 個ずつ入れて 3 7 で 4 時間培養した。細胞が溶解されて出てきた L D H (L a c t a t e d e h y d r o g e n a s e) を測定するために遠心分離した後、上澄み液を取って C y t o T o x 9 6 (R) N o n - R a d i o a c t i v e C y t o t o x i c i t y A s s a y (G 1 7 8 0 , P r o m e g a) を用いて 4 9 0 n m への吸光度を測定した。抗体依存性細胞毒性を測定するための計算式は以下の通りである。

$$\% \text{細胞毒性} = \frac{\text{実験値} - \text{効果機細胞自発的LDH放出} - \text{標的細胞自発的LDH放出}}{\text{標的細胞最大LDH放出} - \text{標的細胞自発的LDH放出}} \times 100$$

【 0 2 2 2 】

分析の結果図 1 3 a 乃至図 1 3 e に示すように、対照群の抗体 (c o n t r o l I g G) 処理群では、細胞毒性が示されず、4 G 3 抗体処理群では、クローニン 3 発現細胞で細胞毒性が確認された。クローニン 3 発現量に応じた A D C C 効果を比較してみたとき、クローニン 3 発現 M F I 値が高いほど、細胞毒性 E C 5 0 が低くなる傾向を示した。

【 0 2 2 3 】

前記実験では、C D 1 6 (F c R I I I a) を継続的に発現する N K - 9 2 M I - C D 1 6 細胞がクローニン 3 抗原に対する細胞毒性効果を示すことは C A R - N K 技術の原理と同様のメカニズムで癌細胞を死滅させることがあると示唆している。実際 A D C C 効果の評価でクローニン 3 の発現に基づいて効果の傾向が一致することを示しており、それは C A R - N K 細胞作製に本開発の抗体を適用することができることを示している。

【 0 2 2 4 】

実施例 7 : i n v i v o の腫瘍標的化能の確認

腫瘍異種移植 (x e n o g r a f t) 動物モデルは、ヒト卵巣癌細胞 O V C A R - 3 (A T C C) とヒトの乳癌細胞 T 4 7 D (A T C C) 5×10^6 個を 1 0 0 u l P B S に浮遊させ、それを 6 週齢の A t h y m i c n u d e 雌マウスの下部脇腹に皮下注射する方法で作製した。T 4 7 D の場合 1 7 - e s t r a d i o l p e l l e t (S E - 1 2 1 , I n n o v a t i v e R e s e a r c h o f A m e r i c a) を皮下に一緒に植えた。

【 0 2 2 5 】

本発明の抗体の i n v i v o 腫瘍標的化能を確認するために、対照群の抗体 (C h r o m e P u r e H u m a n I g G , 0 0 9 - 0 0 0 - 0 0 3 , J a c k s o n I m m o n o R e s e a r c h) と 4 G 3 抗体の C F 7 5 0 蛍光体を V i v o B r i t e T M R a p i d A n t i b o d y L a b e l i n g K i t (9 2 1 6 1 , B i o t i u m) を利用して接合した。蛍光 / 抗体モルラル比 (d e g r e e o f l a b e l i n g , D O L) は、キットで提供する公式に基づいて推奨される予想比に合わせて、それぞれ 2 . 2 9 と 2 . 8 2 で測定された。

【 0 2 2 6 】

前記動物モデルに腫瘍移植後 6 0 日目に、C F 7 5 0 蛍光が標識された対照群の抗体また

は4G3抗体を100ug/100ulの容量で静脈内注射した。6時間、24時間、48時間、72時間、96時間が経過した時点で小動物生体イメージングシステム(In Vivo Imaging System、IVIS SpectrumCT、PerkinElmer)を用いて、マウスから放出される蛍光シグナルを検出し、最後の時点で、肝臓、腎臓、肺、脾臓、小腸、および腫瘍を摘出して組織別の抗体分布の蛍光シグナルを確認した。出版社から供給されたLiving Imaging Softwareを用いて蛍光シグナルを分析した。

【0227】

実験結果図14aおよび図14bに示すように、対照群の抗体(control IgG)と比較して本発明の4G3抗体は、時間が経過するにつれて、移植腫瘍を特異的に標的

10

することを確認し、他の組織と比べ腫瘍に蓄積されていることを確認した。

【産業上の利用可能性】

【0228】

本発明はクローニン3のECL-2に特異的に結合する抗体及びその機能的断片の癌細胞検出、診断、映像化、癌治療剤への適用用途(抗体自体の抗癌用途、ADC及びCAR-発現細胞(特に、免疫細胞)への適用)と、このような用途において著しい効果を示す特有のCDR配列を含む抗体及びその機能的断片に関するものである。

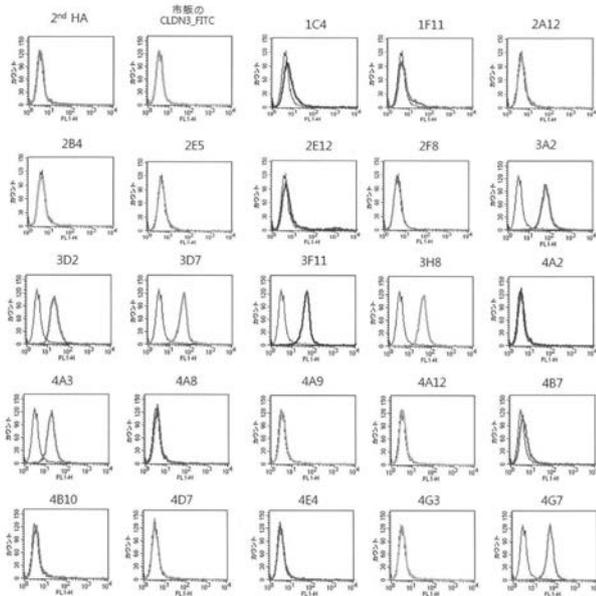
【0229】

クローニン3のECL-2に特異的に結合する抗体及びその機能的断片は、他の癌抗原またはクローニン3のECL-1を標的にする従来抗体より癌細胞検出、診断、映像化、癌の治療への適用(ADC及び発現細胞(特に免疫細胞)への適用)などにおいて価値が大きい。特にこのような具体的一例として、本発明として抗癌能力を有しているだけでなく、他のクローニンファミリーと交差反応性のなき優れた癌細胞標的化能を示し、マウスクローニン3とも結合するため、毒性及び効能評価の非臨床実験にも有利であり、従来公知のクローニン3抗体と比較し、非常に優れた結合力(親和度)を示し、細胞内在化(internalization)などを有して、前記用途への適応において著しい効果を示すため、診断及び医薬産業分野などにおいて産業上の利用可能性が高い。

20

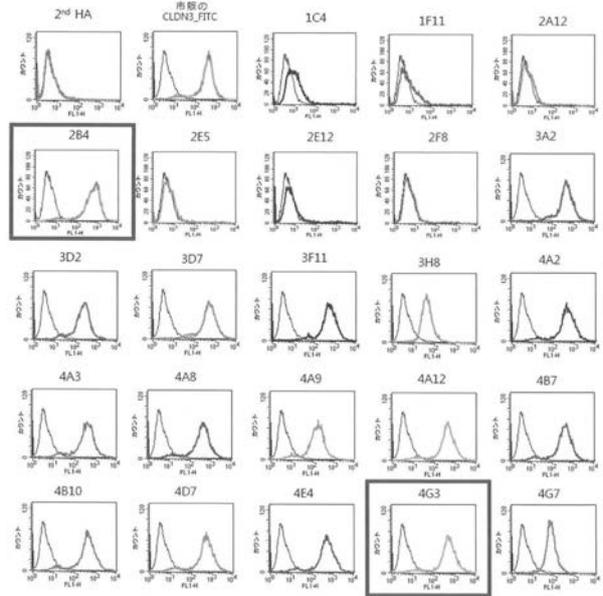
【 図 1 】

❖ CHO-K1 (CLDN3 -)

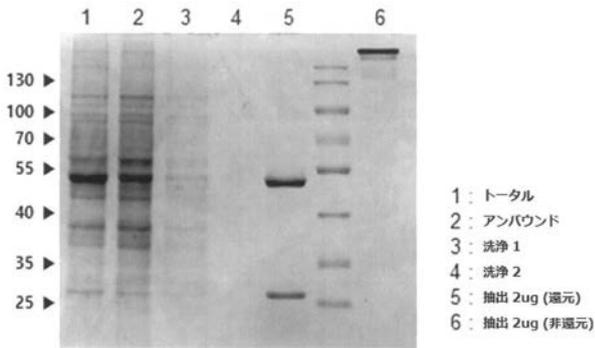


【 図 2 】

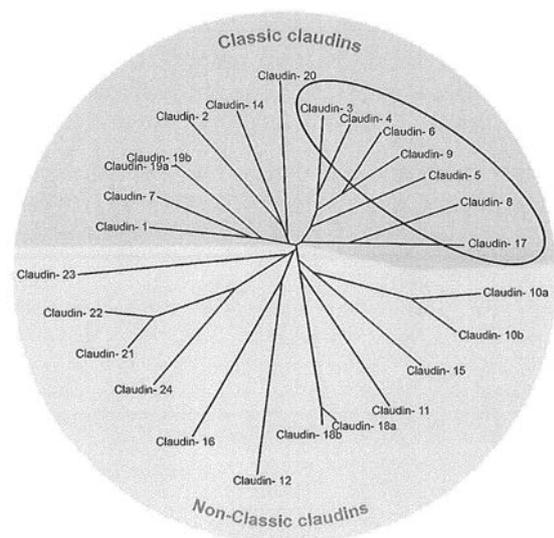
❖ CHO-CL3 (CLDN3 +)



【 図 3 】



【 図 4 a 】



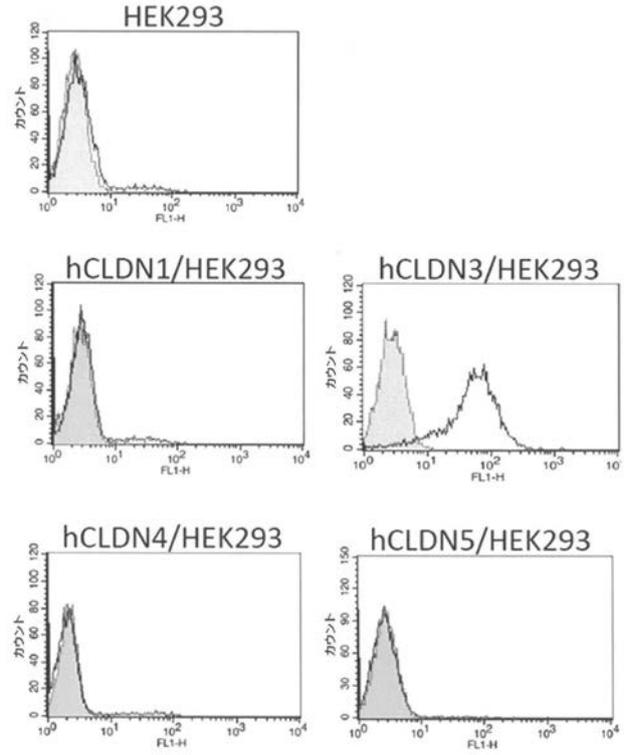
Classic claudins : クラシッククロードイン
Non-Classical claudins : 非クラシッククロードイン

【 図 4 b 】

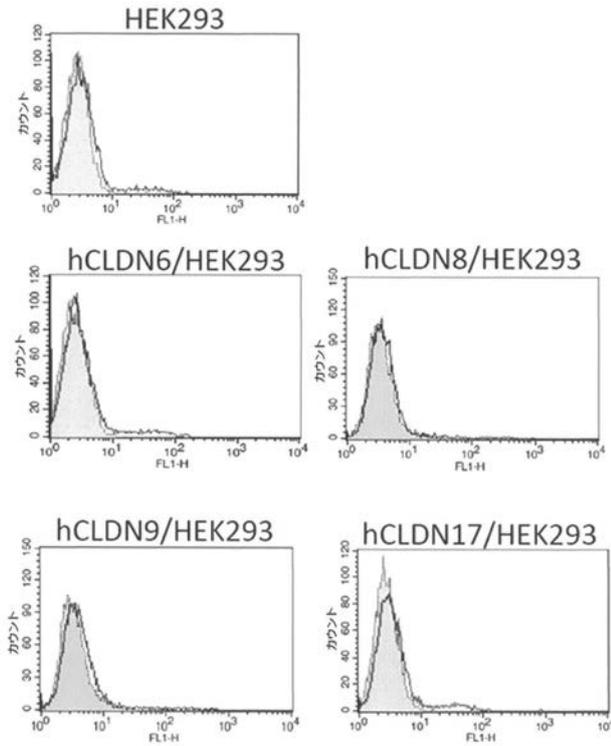
Human Claudin 3	EC11	27	P	PKKSTVSR	TSST	ITSDN	REGLAR	RCVGTG	QKQVYV	IGLLAL	QDQAKR	80	54	(94.3%)
Human Claudin 4	EC11	28	P	PKKSTVSR	TSST	ITSDN	REGLAR	RCVGTG	QKQVYV	IGLLAL	QDQAKR	81	51	(66.2%)
Human Claudin 5	EC11	28	P	PKKSTVSR	TSST	ITSDN	REGLAR	RCVGTG	QKQVYV	IGLLAL	QDQAKR	81	37	(66.2%)
Human Claudin 6	EC11	28	P	PKKSTVSR	TSST	ITSDN	REGLAR	RCVGTG	QKQVYV	IGLLAL	QDQAKR	81	44	(61.2%)
Human Claudin 9	EC11	28	P	PKKSTVSR	TSST	ITSDN	REGLAR	RCVGTG	QKQVYV	IGLLAL	QDQAKR	81	38	(70.4%)
Human Claudin 17	EC11	28	P	PKKSTVSR	TSST	ITSDN	REGLAR	RCVGTG	QKQVYV	IGLLAL	QDQAKR	81	43	(79.6%)
Human Claudin 3	EC11	28	P	PKKSTVSR	TSST	ITSDN	REGLAR	RCVGTG	QKQVYV	IGLLAL	QDQAKR	81	34	(63.0%)
Human Claudin 3	EC11	27	P	PKKSTVSR	TSST	ITSDN	REGLAR	RCVGTG	QKQVYV	IGLLAL	QDQAKR	80	33	(61.1%)
Human Claudin 3	EC11	27	P	PKKSTVSR	TSST	ITSDN	REGLAR	RCVGTG	QKQVYV	IGLLAL	QDQAKR	80	49	(90.7%)
Human Claudin 3	EC12	144	R	RTPTPTV	EAQRER	159	16							
Human Claudin 4	EC12	145	R	RTPTPTV	EAQRER	160	11	(68.8%)						
Human Claudin 5	EC12	145	R	RTPTPTV	EAQRER	160	9	(56.3%)						
Human Claudin 6	EC12	145	R	RTPTPTV	EAQRER	160	13	(81.3%)						
Human Claudin 8	EC12	146	R	RTPTPTV	EAQRER	161	11	(68.8%)						
Human Claudin 9	EC12	145	R	RTPTPTV	EAQRER	160	11	(68.8%)						
Human Claudin 17	EC12	146	R	RTPTPTV	EAQRER	161	19	(62.5%)						
Human Claudin 1	EC12	145	R	RTPTPTV	EAQRER	160	5	(31.3%)						
Human Claudin 3	EC12	144	R	RTPTPTV	EAQRER	159	15	(93.0%)						

本字：hCLDN3と一致するアミノ酸配列 Human Claudin:ヒトクロードリン Mouse Claudin:マウスクロードリン

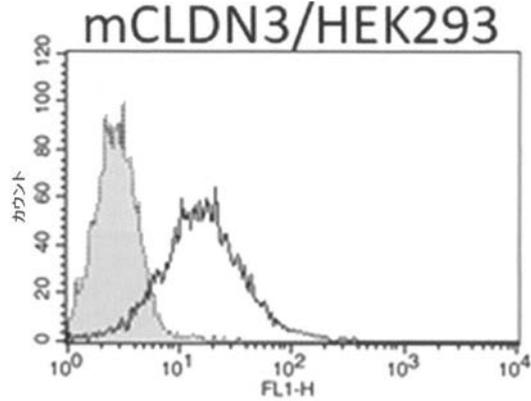
【 図 5 a 】



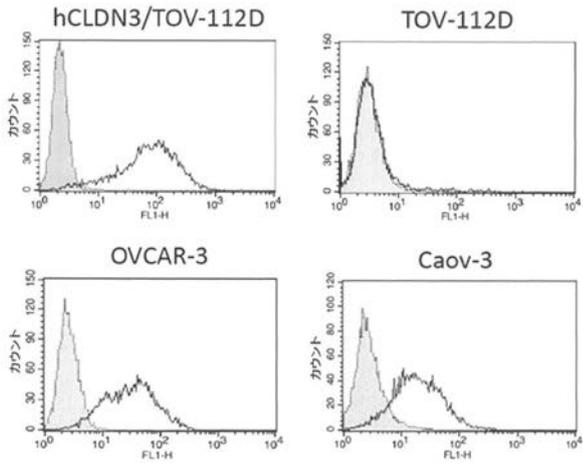
【 図 5 b 】



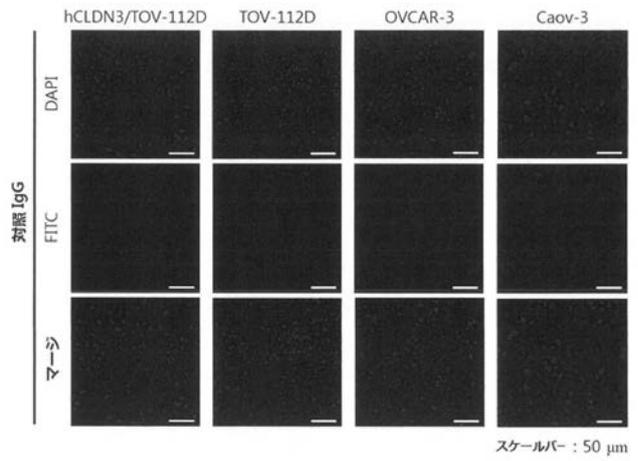
【 図 5 c 】



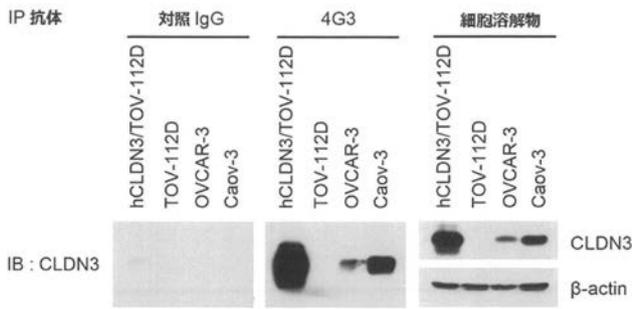
【 図 6 】



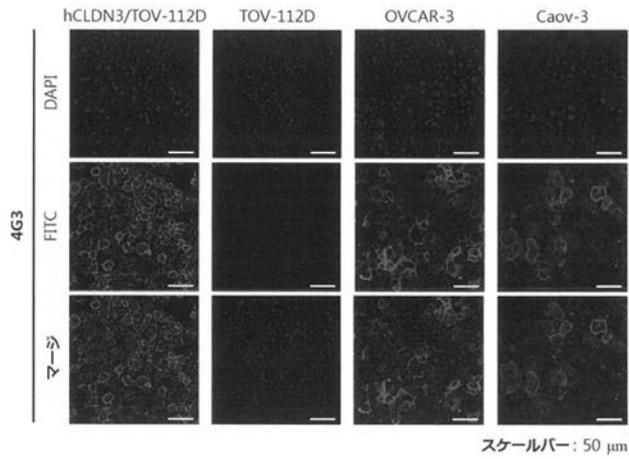
【 図 8 a 】



【 図 7 】

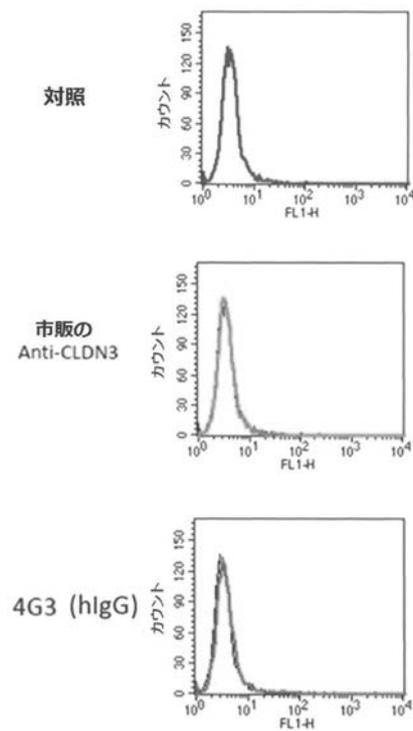


【 図 8 b 】



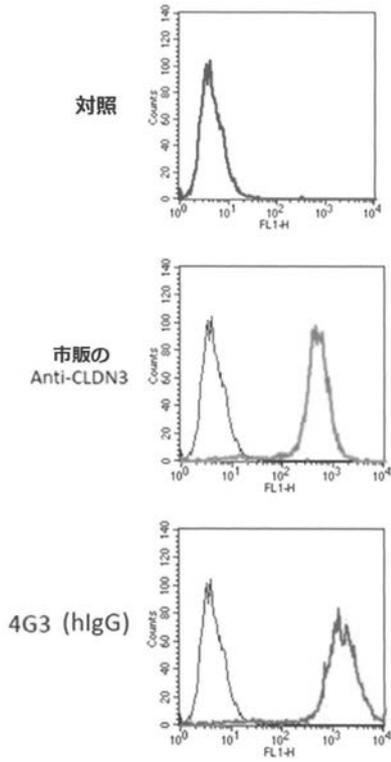
【 図 9 a 】

❖ CHO-K1 (CLDN3 -)

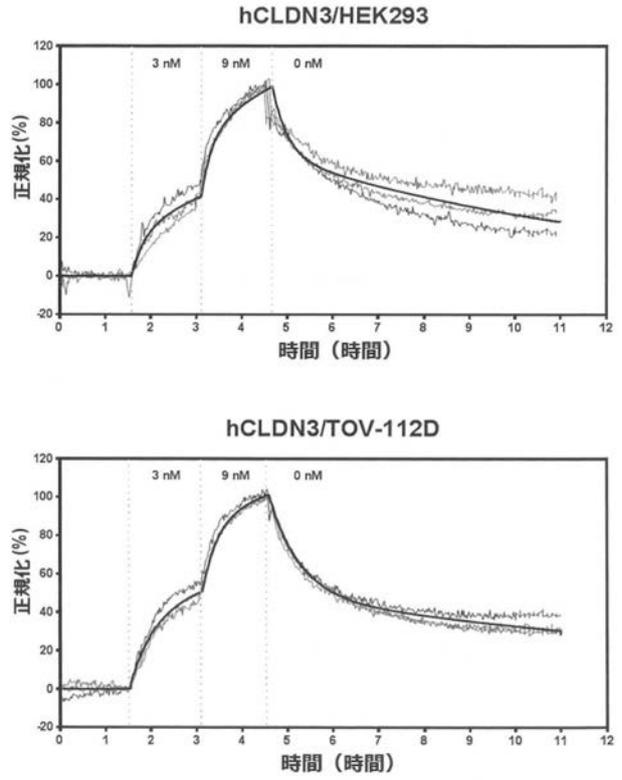


【 図 9 b 】

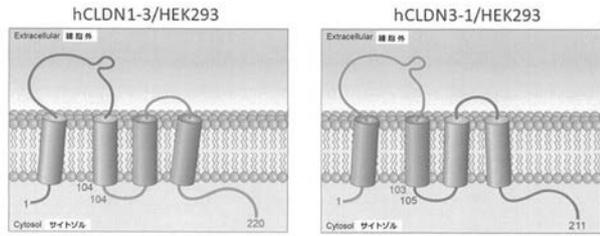
❖ CHO-K1 (CLDN3 +)



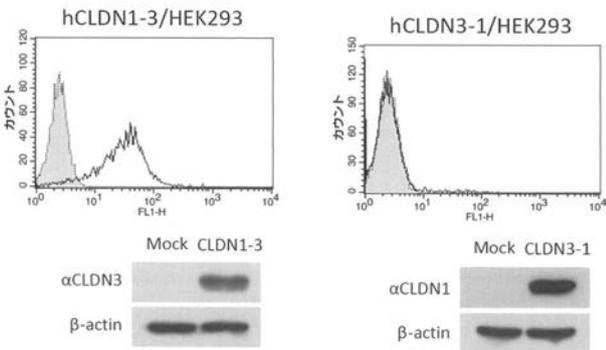
【 図 9 c 】



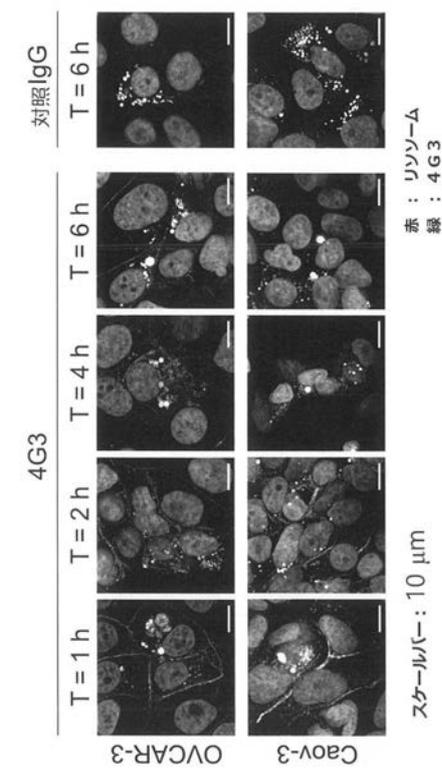
【 図 10 a 】



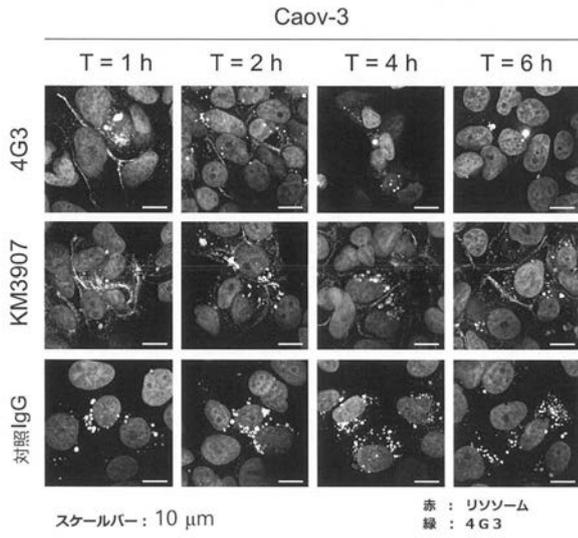
【 図 10 b 】



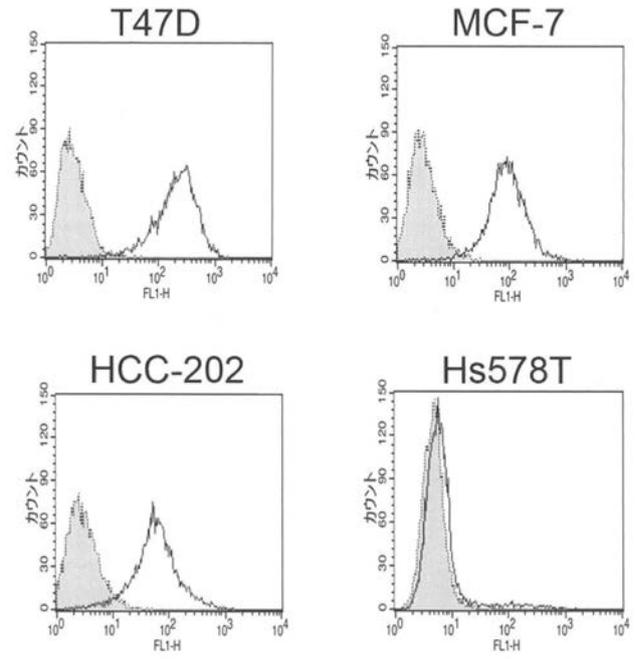
【 図 11 a 】



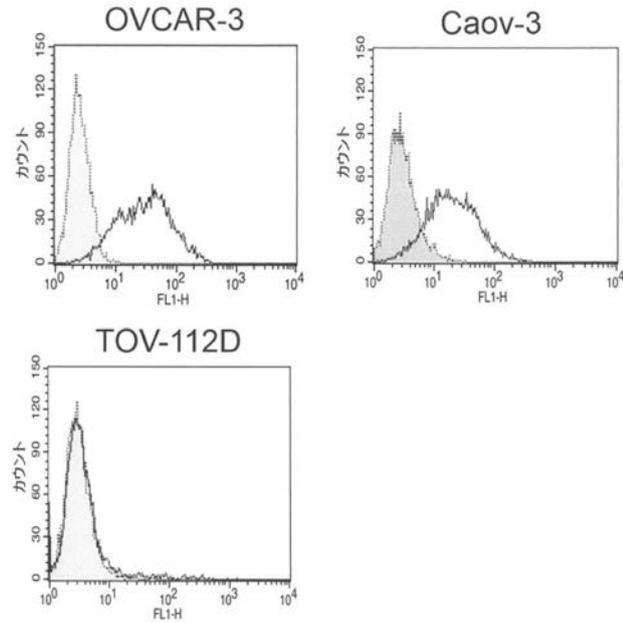
【 図 1 1 b 】



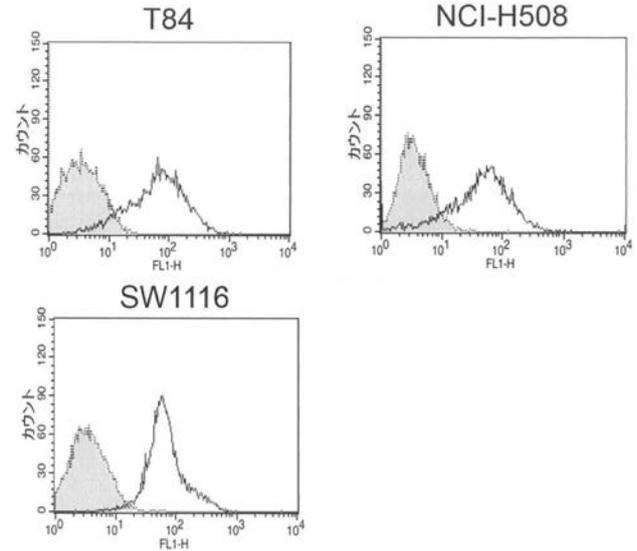
【 図 1 2 a 】



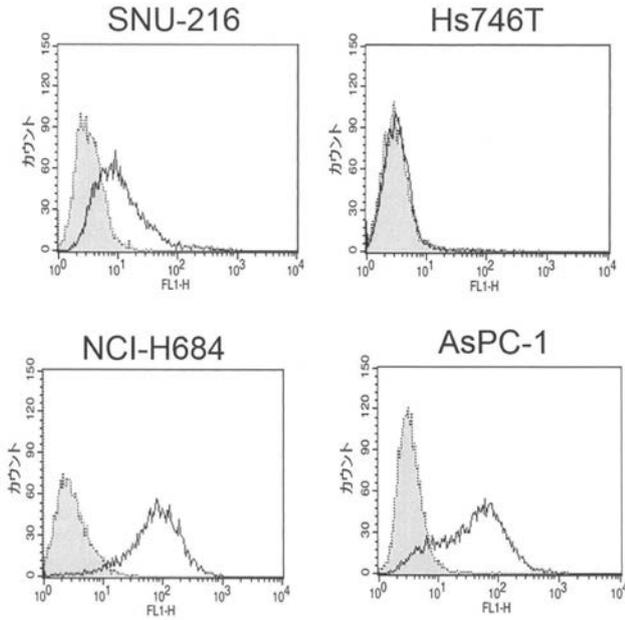
【 図 1 2 b 】



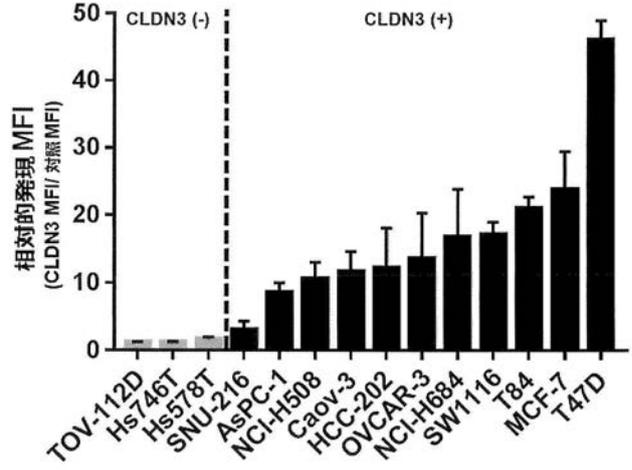
【 図 1 2 c 】



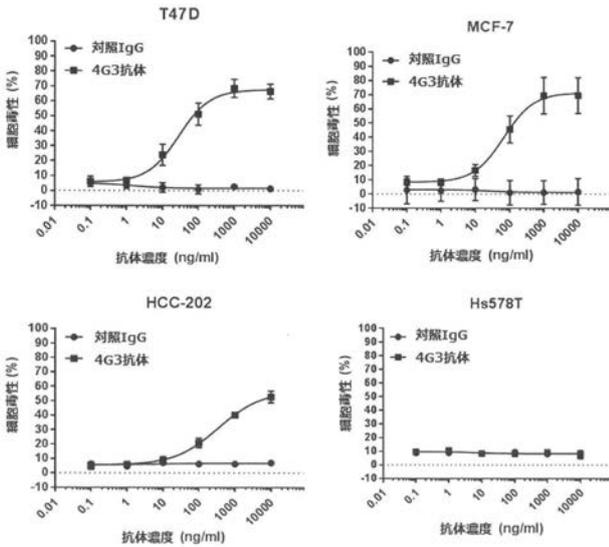
【 図 1 2 d 】



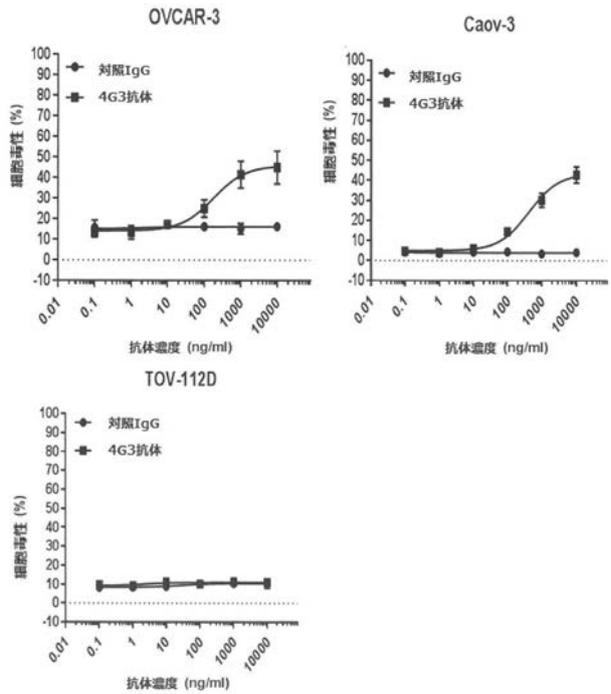
【 図 1 2 e 】



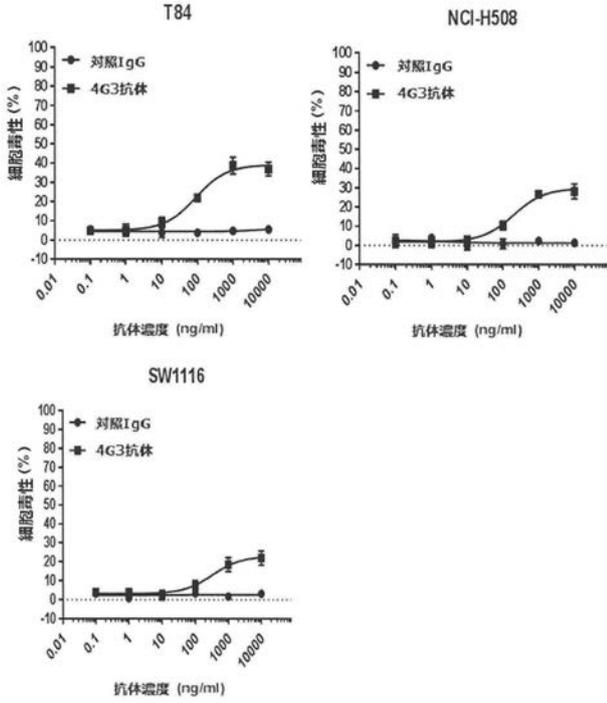
【 図 1 3 a 】



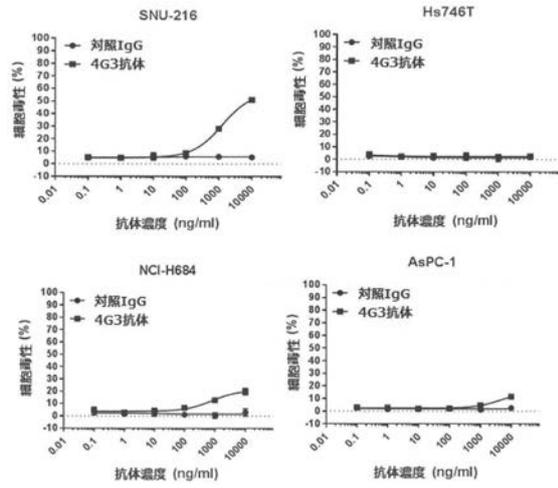
【 図 1 3 b 】



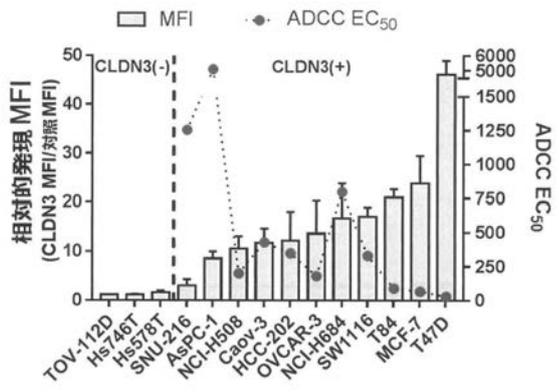
【 図 1 3 c 】



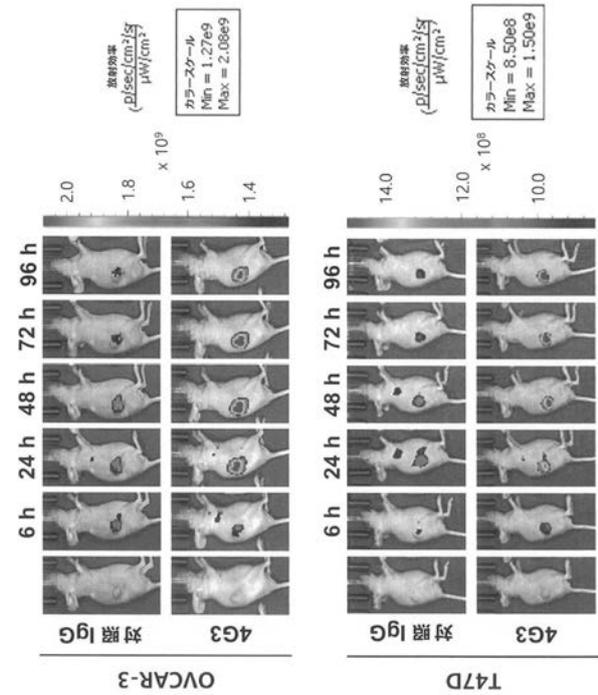
【 図 1 3 d 】



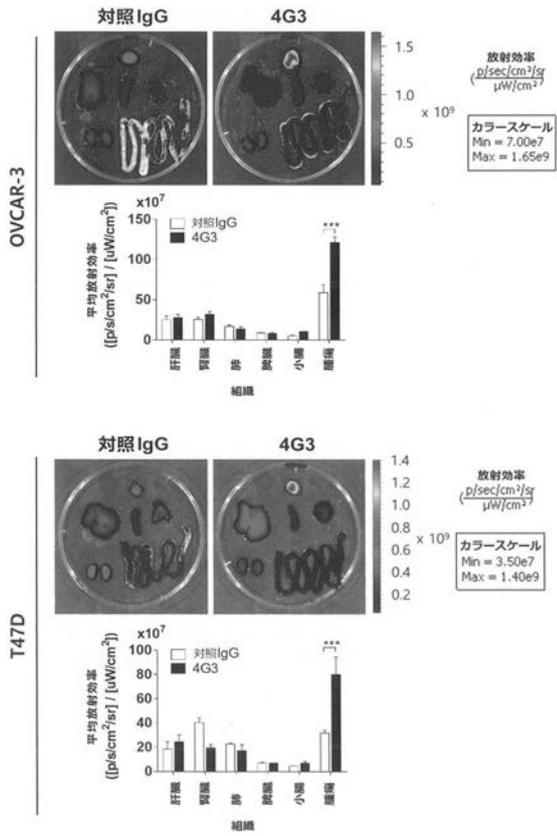
【 図 1 3 e 】



【 図 1 4 a 】



【 図 1 4 b 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/KR2019/003594
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>C07K 16/28(2006.01)i, C07K 14/705(2006.01)i, C12N 5/0783(2010.01)i, A61K 47/68(2017.01)i, G01N 33/574(2006.01)i</i> According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K 16/28; A61K 33/24; A61K 39/00; C07K 14/47; C07K 14/725; C07K 16/18; C07K 17/08; C07K 7/06; G01N 33/53; C07K 14/705; C12N 5/0783; A61K 47/68; G01N 33/574 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models: IPC as above Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: claudin 3, extracellular second loop, antibody, antibody-drug conjugate, cancer, treatment		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ROMANI, Chiara et al. Evaluation of a novel human IgG1 anti-claudin3 antibody that specifically recognizes its aberrantly localized antigen in ovarian cancer cells and that is suitable for selective drug delivery. <i>Oncotarget</i> . 2015, vol. 6, no. 33, pages 34617-34628 See abstract; and page 34618.	33-38,56,58
Y A		39-43 1-32,44,46,48,50 ,52,54
Y	KR 10-2016-0070191 A (STEMCENTRX, INC.) 17 June 2016 See paragraphs [0035], [0119], [0133], [0134].	39-43
X	US 2014-0274755 A1 (REFERENCE BIOLABS INC.) 18 September 2014 See paragraphs [0038], [0048], [0056], [0072]; and claims 3, 13.	33-38,56,58
X	KR 10-2013-0086591 A (REFERENCE BIOLABS CO., LTD.) 02 August 2013 See abstract; and paragraphs [0004], [0025], [0026], [0036], [0044].	33-38,56,58
X	KR 10-2017-0118633 A (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION et al.) 25 October 2017 See paragraphs [0095], [0099]-[0107], [0112], [0127]-[0129].	33-38,56,58
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search <p style="text-align: center;">05 JULY 2019 (05.07.2019)</p>		Date of mailing of the international search report <p style="text-align: center;">05 JULY 2019 (05.07.2019)</p>
Name and mailing address of the ISA/KR  Korea Intellectual Property Office Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon, 35208, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/003594

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KR 10-2017-0140266 A (BIONTECH CELL & GENE THERAPIES GMBH. et al.) 20 December 2017 See paragraphs [0029]-[0031]; and claims 19, 26-27, 33, 34.	39-43

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/003594

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57 and 59 pertain to a method for treatment of the human body by therapy, as well as a diagnostic method, and thus pertain to a subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2019/003594

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2016-0070191 A	17/06/2016	AR 102554 A1	08/03/2017
		AU 2014-346792 A1	02/06/2016
		AU 2015-343079 A1	25/05/2017
		BR 112016010169 A2	05/12/2017
		BR 112017009517 A2	19/12/2017
		CA 2928671 A1	14/05/2015
		CA 2966618 A1	12/05/2016
		CL 2016001102 A1	10/02/2017
		CL 2017001118 A1	05/01/2018
		CN 105813650 A	27/07/2016
		CN 107207580 A	26/09/2017
		GR 20170235 A	21/07/2017
		EA 201790967 A1	31/10/2017
		EP 3065776 A2	14/09/2016
		EP 3065776 A4	19/04/2017
		EP 3215523 A1	13/09/2017
		EP 3215523 A4	20/06/2018
		JP 2016-536020 A	24/11/2016
		JP 2017-535283 A	30/11/2017
		JP 6515111 B2	22/05/2019
		KR 10-2017-0085531 A	24/07/2017
		MX 2016005763 A	19/08/2016
		MX 2017005797 A	23/10/2017
		PE 08702016 A1	09/09/2016
		PE 10602017 A1	21/07/2017
		PH 12016500781 A1	13/06/2016
		PH 12017500825 A1	18/10/2017
		RU 2016-122041 A	11/12/2017
		RU 2016-122041 A3	27/03/2018
		SG 11201603397Q A	30/05/2016
		SG 11201703669Y A	29/06/2017
		TW 201625677 A	16/07/2016
		US 10053511 B2	21/08/2018
		US 2016-0289332 A1	06/10/2016
US 2017-0334991 A1	23/11/2017		
US 2019-0077876 A1	14/03/2019		
WO 2015-069794 A2	14/05/2015		
WO 2015-069794 A3	18/06/2015		
WO 2016-073649 A1	12/05/2016		
US 2014-0274755 A1	18/09/2014	US 9751941 B2	05/09/2017
KR 10-2013-0086591 A	02/08/2013	KR 10-1334207 B1	29/11/2013
		KR 10-1782623 B1	28/09/2017
		KR 10-2012-0091997 A	20/08/2012
KR 10-2017-0118633 A	25/10/2017	KR 10-2016-0104160 A	05/09/2016
		KR 10-2018-0108550 A	04/10/2018

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2019/003594

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2017-0140266 A	20/12/2017	AU 2016-259730 A1	19/10/2017
		AU 2016-259730 A8	02/11/2017
		BR 112017020894 A2	10/07/2018
		CA 2982422 A1	17/11/2016
		CN 107960056 A	24/04/2018
		EP 3294333 A1	21/03/2018
		JP 2018-524273 A	30/08/2018
		MX 2017014193 A	28/03/2018
		US 2018-0282389 A1	04/10/2018
		WO 2016-180468 A1	17/11/2016
		WO 2016-180782 A1	17/11/2016

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2019/003594

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C07K 16/28(2006.01)i, C07K 14/705(2006.01)i, C12N 5/0783(2010.01)i, A61K 47/68(2017.01)i, G01N 33/574(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C07K 16/28; A61K 33/24; A61K 39/00; C07K 14/47; C07K 14/725; C07K 16/18; C07K 17/08; C07K 7/06; G01N 33/53; C07K 14/705; C12N 5/0783; A61K 47/68; G01N 33/574 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC		
국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 클라우딘 3(claudin 3), 세포 외 두 번째 루프(extracellular second loop), 항체(antibody), 항체-약물 접합체(antibody-drug conjugate), 암(cancer), 치료(treatment)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	ROMANI, CHIARA 등, 'Evaluation of a novel human IgG1 anti-claudin3 antibody that specifically recognizes its aberrantly localized antigen in ovarian cancer cells and that is suitable for selective drug delivery', Oncotarget, 2015, 6권, 33호, 페이지 34617-34628 요약; 및 페이지 34618 참조.	33-38,56,58
Y		39-43
A		1-32,44,46,48,50,52,54
Y	KR 10-2016-0070191 A (스텐센트알엑스 인코포레이티드) 2016.06.17 단락 [0035], [0119], [0133], [0134] 참조.	39-43
X	US 2014-0274755 A1 (REFERENCE BIOLABS INC.) 2014.09.18 단락 [0038], [0048], [0056], [0072]; 및 청구항 3, 13 참조.	33-38,56,58
X	KR 10-2013-0086591 A ((주)레퍼런스바이오랩) 2013.08.02 요약; 및 단락 [0004], [0025], [0026], [0036], [0044] 참조.	33-38,56,58
X	KR 10-2017-0118633 A (서울대학교산학협력단 등) 2017.10.25 단락 [0095], [0099]-[0107], [0112], [0127]-[0129] 참조.	33-38,56,58
<input checked="" type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2019년 07월 05일 (05.07.2019)		국제조사보고서 발송일 2019년 07월 05일 (05.07.2019)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 감유림 전화번호 +82-42-481-3516

서식 PCT/ISA/210 (두 번째 용지) (2015년 1월)

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2019/003594

C (계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	RR 10-2017-0140266 A (비온테크 셀 & 제네 테라피스 게엠베하 등) 2017.12.20 단락 [0029]-[0031]; 및 청구항 19, 26-27, 33, 34 참조.	39-43

국제조사보고서

국제출원번호

PCT/KR2019/003594

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

- 1. 청구항: 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57 및 59는 치료에 의한 사람의 처치방법 및 진단방법에 관한 것이므로 PCT 조약 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
- 2. 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
- 3. 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

- 1. 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
- 2. 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
- 3. 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
- 4. 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에 관한 기재

- 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서 대응특허에 관한 정보		국제출원번호 PCT/KR2019/003594	
국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2016-0070191 A	2016/06/17	AR 102554 A1	2017/03/08
		AU 2014-346792 A1	2016/06/02
		AU 2015-343079 A1	2017/05/25
		BR 112016010169 A2	2017/12/05
		BR 112017009517 A2	2017/12/19
		CA 2928671 A1	2015/05/14
		CA 2966618 A1	2016/05/12
		CL 2016001102 A1	2017/02/10
		CL 2017001118 A1	2018/01/05
		CN 105813650 A	2016/07/27
		CN 107207580 A	2017/09/26
		CR 20170235 A	2017/07/21
		EA 201790967 A1	2017/10/31
		EP 3065776 A2	2016/09/14
		EP 3065776 A4	2017/04/19
		EP 3215523 A1	2017/09/13
		EP 3215523 A4	2018/06/20
		JP 2016-536020 A	2016/11/24
		JP 2017-535283 A	2017/11/30
		JP 6515111 B2	2019/05/22
		KR 10-2017-0085531 A	2017/07/24
		MX 2016005763 A	2016/08/19
		MX 2017005797 A	2017/10/23
		PE 08702016 A1	2016/09/09
		PE 10602017 A1	2017/07/21
		PH 12016500781 A1	2016/06/13
		PH 12017500825 A1	2017/10/18
		RU 2016-122041 A	2017/12/11
		RU 2016-122041 A3	2018/03/27
		SG 11201603397Q A	2016/05/30
		SG 11201703669Y A	2017/06/29
		TW 201625677 A	2016/07/16
		US 10053511 B2	2018/08/21
		US 2016-0289332 A1	2016/10/06
		US 2017-0334991 A1	2017/11/23
		US 2019-0077876 A1	2019/03/14
		WO 2015-069794 A2	2015/05/14
		WO 2015-069794 A3	2015/06/18
		WO 2016-073649 A1	2016/05/12
US 2014-0274755 A1	2014/09/18	US 9751941 B2	2017/09/05
KR 10-2013-0086591 A	2013/08/02	KR 10-1334207 B1	2013/11/29
		KR 10-1782623 B1	2017/09/28
		KR 10-2012-0091997 A	2012/08/20
KR 10-2017-0118633 A	2017/10/25	KR 10-2016-0104160 A	2016/09/05
		KR 10-2018-0108550 A	2018/10/04

서식 PCT/ISA/210 (대응특허 추가용지) (2015년 1월)

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2019/003594

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2017-0140266 A	2017/12/20	AU 2016-259730 A1 AU 2016-259730 A8 BR 112017020894 A2 CA 2982422 A1 CN 107960056 A EP 3294333 A1 JP 2018-524273 A MX 2017014193 A US 2018-0282389 A1 WO 2016-180468 A1 WO 2016-180782 A1	2017/10/19 2017/11/02 2018/07/10 2016/11/17 2018/04/24 2018/03/21 2018/08/30 2018/03/28 2018/10/04 2016/11/17 2016/11/17

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 H 0 4 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02	C
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	
C 0 7 K 14/725 (2006.01)	C 0 7 K 14/725	
C 0 7 K 14/74 (2006.01)	C 0 7 K 14/74	
C 0 7 K 14/705 (2006.01)	C 0 7 K 14/705	
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62	Z
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12	
C 1 2 N 5/078 (2010.01)	C 1 2 N 5/078	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 47/68 (2017.01)	A 6 1 K 47/68	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	E
A 6 1 P 35/04 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	C
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	Y
G 0 1 N 33/543 (2006.01)	A 6 1 P 35/04	
G 0 1 N 33/574 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/533 (2006.01)	G 0 1 N 33/543	5 4 1 A
G 0 1 N 33/534 (2006.01)	G 0 1 N 33/574	A
G 0 1 N 33/535 (2006.01)	G 0 1 N 33/533	
	G 0 1 N 33/534	
	G 0 1 N 33/535	

(81)指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T R I T O N

- (72)発明者 ホン, ソン ユル
大韓民国、0 8 8 2 6 ソウル市、クァナク - グ クァナク - ロ、1 (シリム - ドン)、ソウル大学、薬学研究所内
- (72)発明者 キム, ヨン ドグ
大韓民国、0 8 3 9 4 ソウル市、グロ - グ、デジタル - ロ、2 4 2、# 9 1 5 (グロ - ドン、ハンファ ビズメトロ 1 - チャ)、エイピオン インク . 内
- (72)発明者 チョイ, ジュン ヨン
大韓民国、0 8 3 9 4 ソウル市、グロ - グ、デジタル - ロ、2 4 2、# 9 1 5 (グロ - ドン、ハンファ ビズメトロ 1 - チャ)、エイピオン インク . 内
- (72)発明者 ヤン, ホ ピン
大韓民国、0 8 8 2 6 ソウル市、クァナク - グ クァナク - ロ、1 (シリム - ドン)、ソウル大学、薬学部内

(72)発明者 パク,ハ ヨン

大韓民国、08394 ソウル市、グロ-グ、デジタル-ロ、242、#915 (グロ-ドン、ハンファ ビズメトロ 1-チャ)、エイピオン インク.内

(72)発明者 キム,ソン ス

大韓民国、08754 ソウル市、クァナク-グ シリム-ロ、340、(シリム-ドン、ルネッサンス コンプレックス ビル)7F、バイオディン インク.内

Fターム(参考) 4B064 AG20 AG26 AG27 BJ12 CA02 CA05 CA08 CA09 CA10 CA11
CA19 CC24
4B065 AA01X AA57X AA83X AA86X AA87X AA87Y AA90X AA90Y AB01 AC14
BA02 CA24 CA25 CA44 CA46
4C076 AA95 BB01 BB11 BB13 BB14 BB15 BB16 BB21 BB24 CC27
EE41 EE59 FF31 FF68
4C084 AA17 MA05 MA13 MA16 MA21 MA28 MA52 MA55 MA56 MA58
MA59 MA63 MA65 NA13 ZB261 ZB262 ZC022
4C085 AA13 BB31 BB33 BB34 BB35 BB36 BB37 BB41 BB43 CC22
DD62 EE01 EE03 EE05 GG01 GG02 GG03 GG04 GG06 GG08
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA50 DA75 DA76
EA20 EA50 FA74