

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2011年1月13日(13.01.2011)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2011/004837 A1

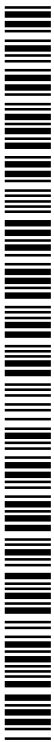
- (51) 国際特許分類:
C07K 16/30 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01) C12N 5/10 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2010/061526
- (22) 国際出願日: 2010年7月7日(07.07.2010)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2009-162193 2009年7月8日(08.07.2009) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 株式会社 A C T G e n (ACTGen Inc.) [JP/JP]; 〒3994117 長野県駒ヶ根市赤穂15番地502 Nagano (JP).
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 梶川 益紀 (KAJIKAWA Masunori) [JP/JP]; 〒3994117 長野県駒ヶ根市赤穂15番地502 株式会社 A C T G e n 内 Nagano (JP). 杉浦 雅仁 (SUGIURA Masahito) [JP/JP]; 〒3994117 長野県駒ヶ根市赤穂15番地502 株式会社 A C T G e n 内 Nagano (JP). 新 和之 (ATARASHI Kazuyuki) [JP/JP]; 〒3994117 長野県駒ヶ根市赤穂15番地502 株式会社 A C T G e n 内 Nagano (JP). 清水 絵美 (SHIMIZU Emi) [JP/JP]; 〒3994117 長野県駒ヶ根市赤穂15番地502 株式会社 A C T G e n 内 Nagano (JP). 松見 千恵美 (MATSUMI Chiemi) [JP/JP]; 〒3994117 長野県駒ヶ根市赤穂15番地502 株式会社 A C T G e n 内 Nagano (JP). 斎藤 由紀恵 (SAITOH Yukie) [JP/JP]; 〒3994117 長野県駒ヶ根市赤穂15番地502 株式会社 A C T G e n 内 Nagano (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人セントクレスト国際特許事務所(CENTCREST IP ATTORNEYS); 〒1040031 東京都中央区京橋2-8-21 金鳳堂ビル9階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告(条約第21条(3))
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト(規則5.2(a))

(54) Title: ANTIBODY HAVING ANTI-CANCER ACTIVITY

(54) 発明の名称: 抗癌活性を有する抗体

(57) Abstract: cDNA that encodes a protein expressed on the surface of a cell or secreted from a cell is selected among from a cDNA library derived from a cancer cell strain utilizing an SST-REX method, a monoclonal antibody against the protein encoded by the selected cDNA is prepared, and the bindability to various types of cancer cell strains and the *in vitro* and *in vivo* anti-cancer activity of the monoclonal antibody are examined. As a result, a monoclonal antibody that can bind to PODXL2 protein and has an excellent anti-cancer activity can be found. A region containing an epitope in the antibody can be successfully identified, and the amino acid sequences for variable regions in a light chain and a heavy chain of the antibody can also be successfully determined.

(57) 要約: SST-REX法を利用して、癌細胞株由来のcDNAライブラリから細胞表面に発現あるいは細胞から分泌される蛋白質をコードするcDNAを選抜し、選抜したcDNAがコードする蛋白質に対するモノクローナル抗体を作製して、各種癌細胞株に対する結合性、ならびに *in vitro* および *in vivo* における抗癌活性を検討した結果、PODXL2蛋白質に結合し、優れた抗癌活性を有するモノクローナル抗体を見出した。さらに、この抗体のエピトープを含む領域を同定すると共に、軽鎖および重鎖の可変領域のアミノ酸配列を決定することに成功した。



WO 2011/004837 A1

明 細 書

発明の名称：抗癌活性を有する抗体

技術分野

[0001] 本発明は、抗癌活性を有する抗体およびその用途に関する。

背景技術

[0002] 癌(腫瘍)は、わが国における死亡原因の第一位を占める疾患である。独立行政法人国立がん研究センター内がん対策情報センターの統計によると、2006年に癌で死亡した人数はおよそ32万9千例あり、部位別に見ると、男性では肺(23%)、胃(17%)、肝臓(11%)、結腸(7%、大腸と併せると11%)、膵臓(6%)の順となっており、女性では、胃(13%)、肺(13%)、結腸(10%、大腸と併せると14%)、乳房(9%)、肝臓(8%)の順となっている。癌患者数は年々増加しており、有効性および安全性の高い薬剤や治療法の開発が強く望まれている。

[0003] 胃癌は、日本において罹患率、死亡率ともに非常に高い癌のひとつであるが、診断方法、および手術による外科的切除や化学療法を主とした治療方法の進歩により、現在では比較的治りやすい癌の一つともされている。しかしながら、スキルス胃癌に関しては、非常に悪性度の高い、治療が困難な胃癌の一つとされている。スキルス胃癌は、癌細胞が粘膜表面に現れずに胃壁全体あるいは半分~1/3以上にびまん性に浸潤し、肉眼的に明らかな腫瘍を形成せずに胃壁の肥厚や硬化をもたらし、病巣と周囲粘膜との境界が不明瞭であるという特徴を有する。スキルス胃癌は、通常の胃癌より発症年齢が低くて進行も早く、診断も困難である。診断がついた時点では、既に腹膜播種や転移を起こして6割が手術できない状態にあり、手術により切除された場合でも、5年生存率は、わずか15~20%である。

[0004] 近年、抗癌剤としての抗体の使用は、種々の病態(癌型)の治療におけるアプローチとして、その重要性が認められつつある。例えば、腫瘍特異的な抗原を標的とした抗体であれば、投与した抗体は腫瘍に集積することが推定さ

れるため、補体依存性細胞傷害活性（CDC）や抗体依存的細胞性細胞傷害活性（ADCC）による、免疫システムを介した癌細胞への攻撃が期待できる。また、抗体に放射性核種や細胞毒性物質などの薬剤を結合しておくことにより、結合した薬剤を効率よく腫瘍部位に送達することが可能となる。これにより、他組織への薬剤到達量を減少させ、ひいては副作用の軽減を見込むことができる。腫瘍特異的抗原に細胞死を誘導する活性がある場合は、アゴニスティックな活性を持つ抗体を投与することで、また、腫瘍特異的抗原が細胞の増殖および生存に関与する場合は、中和活性を持つ抗体を投与することで、腫瘍特異的な抗体の集積と抗体の活性によって、腫瘍の増殖停止または退縮が期待できる。このような特性から、抗体は、抗癌剤として適用に好適であると考えられている。

[0005] これまでに上市された抗体医薬としては、白血病・リンパ腫を対象として、CD20を標的としたrituximab（商品名rituxan）やiburimumab tiuxetan（商品名Zevailn）、CD33を標的としたgemutumab ozogamitin（商品名Mylotarg）などが開発されている。また、上皮性固形癌を対象としたものとしては、乳癌では、Her2/neuを標的としたtrastuzumab（商品名Herceptin）やVEGFを標的としたbevacizumab（商品名Avastin）などが開発されている。このほか癌以外を対象疾患とするものとして、関節リウマチやキャッスルマン病に対して、ヒトIL-6受容体抗体であるtocilizumab（商品名Actemula）などが開発されている。

[0006] しかしながら、2008年までに認可された抗体医薬は、米国でも20種類程度、日本でも10種類程度であり、特に固形癌に関してはまだ有効とされる抗体医薬は少ない。このため、さらなる有効な抗体医薬の開発が望まれている。

[0007] ところで、細胞膜に存在し、細胞外領域が高度にグリコシル化されたI型膜貫通型糖蛋白質として、「Homo sapiens podocalyxin-like (PODXL)、transcript variant 2 (NM_005397.3)」(以下、「PODXL2」と称する)が知られている。ヒト由来PODXL2分子は、ウサギにおける糸球体上皮細胞 (podocyte) の足突起でグリコシル化されたpodocalyxin分子の、ヒト糸球体足突起お

よび内皮細胞表面における糖蛋白質ホモログ分子として同定された(非特許文献1、非特許文献2)。

[0008] PODXL2は、N末端の細胞外領域が特徴的な糖鎖修飾を受けることから、シアロムチンファミリーに分類され、同ファミリーには、CD34、CD164、CD162、CD43、Endoglycan等の造血細胞もしくは造血微小環境(血管内皮細胞等)に発現するものが属している。PODXL2は、これまでに、ラット、ウサギ、マウス、ヒトにおいてホモログ分子が見出されており、その他の脊椎動物にもPODXL2様分子の存在が予想されている。これら分子は、同様の組織局在性を有することから、同様の機能を持つ分子であることも予想されているが、細胞外領域であると考えられるN末端アミノ酸配列は、種間における保存性が低いことが知られている。

[0009] 一方、宮島らは、成体型造血が発生するとされているAGM領域(大動脈・生殖隆起・中腎 Aorta-Gonad-Mesonephros)において、血液細胞と血管内皮細胞の共通祖先であるヘマンジオブラストの存在を明らかにした。さらに、ヘマンジオブラストを単離し、その培養方法を確立し、マウスAGM由来の細胞株の表面抗原に対するモノクローナル抗体を用いた発現クローニングにより、マウスPODXLホモログ分子(PCLP1)を同定した。PCLP1陽性/CD45陰性細胞を分画して*in vitro*で培養すると、内皮様細胞、アンジオブラスト様細胞、および造血細胞に分化し、また、PCLP1陽性/CD45陰性細胞を、造血能を欠損させたマウスに移入すると、長期にわたり造血系が再構築された。これら事実から、PCLP1陽性/CD45陰性細胞は、長期再構築性造血幹細胞(LTR-HSC)としての活性を発現しうる哺乳類のヘマンジオブラストを含むことが示され、PCLP1が血液細胞と血管内皮細胞の共通の祖先であるヘマンジオブラストのマーカールとして機能することが明らかとなった(特許文献1、特許文献2、非特許文献3)。また、マイクロアレイによる解析などから、PCLP1は、幹細胞の分化前後あるいは泡沫細胞分化や血管新生などで発現に差のある遺伝子の一つとして見出されている(特許文献3から6)。

[0010] PODXL2に対する抗体については、造血幹細胞などの分離・増幅への利用が

開示されている(特許文献7)。また、腎障害の診断マーカーとして、PODXL2に対する抗体を用いた測定を行うことが開示されている(特許文献8)。また、PODXL分子が、癌細胞系で多様なスプライシングフォームをとることから、これに対応する抗体の治療・診断への利用が示唆されている(特許文献9)。

[0011] しかしながら、これらの文献のいずれにも、PODXL2を標的とした、特定の疾患の治療効果を示す抗体に関する実施例は開示されておらず、PODXL2に対する抗体が、抗癌活性を持ちうるかについては、いまだ明らかになっていない。

先行技術文献

特許文献

- [0012] 特許文献1：国際公開2005/054459号パンフレット
特許文献2：国際公開2001/034797号パンフレット
特許文献3：国際公開2007/102787号パンフレット
特許文献4：国際公開2004/109286号パンフレット
特許文献5：国際公開2006/113671号パンフレット
特許文献6：国際公開2002/079492号パンフレット
特許文献7：特開2007-14229号公報
特許文献8：特許2932837号公報
特許文献9：米国特許出願公開20060294607号公報

非特許文献

- [0013] 非特許文献1：J. Biol. Chem. 270, 29439-29446 (1995)
非特許文献2：J. Biol. Chem. 272, 15708-15714 (1997)
非特許文献3：造血幹細胞：基礎から遺伝子治療・再生医療へ、小澤敬也編著、中外医学社2002年、p38-45

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0014] 本発明は、このような状況に鑑みてなされたものであり、その目的は、優れた抗癌活性を有する新規抗体を提供することにある。さらなる本発明の目的は、このような抗体を有効成分とする抗癌剤を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0015] 本発明者らは上記課題を解決すべく、まず、癌細胞株であるGC1Y細胞由来のcDNAライブラリを作製し、SST-REX法により、その中から、細胞表面に発現あるいは細胞から分泌される蛋白質をコードするものを選抜した。次いで、選抜したcDNAがコードする蛋白質に対するモノクローナル抗体を作製して、各種癌細胞株に対する結合性、*in vitro*および*in vivo*における抗癌活性を検討した。その結果、得られたモノクローナル抗体の一つである「ACT36-27_5D1」抗体が、PODXL2蛋白質に結合し、*in vitro*および*in vivo*において優れた抗癌活性を有することを見出した。さらに、本発明者は、この抗体のエピトープを含む領域を同定すると共に、軽鎖および重鎖の可変領域のアミノ酸配列を決定することに成功し、本発明を完成するに至った。

[0016] 即ち、本発明は、PODXL2蛋白質に結合し、抗癌活性を有するモノクローナル抗体および該抗体を有効成分とする抗癌剤に関し、より詳しくは、

- (1) ヒト由来のPODXL2蛋白質に結合し、かつ、抗癌活性を有する抗体、
- (2) ヒト由来のPODXL2蛋白質の細胞外領域に結合する、(1)に記載の抗体、
- (3) 癌が胃癌である、(1)に記載の抗体、
- (4) 配列番号：3から5に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、配列番号：6から8に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を保持する、(1)に記載の抗体、
- (5) (4)に記載の抗体における配列番号：3から8に記載のアミノ酸配列の少なくともいずれかにおいて、1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および/または挿入されており、かつ、(4)に記載の抗体と同等の活性を有する抗体、
- (6) (4)に記載の抗体における配列番号：3から8に記載のアミノ酸

配列の少なくともいずれかにおいて、1若しくは複数のアミノ酸が保存的に置換されており、かつ、(4)に記載の抗体と同等の活性を有する抗体、

(7) 配列番号：10に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、配列番号：12に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を保持する、(1)に記載の抗体、

(8) (7)に記載の抗体における配列番号：10および12に記載のアミノ酸配列少なくともいずれかにおいて、1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および/または挿入されており、かつ、(7)に記載の抗体と同等の活性を有する抗体、

(9) (7)に記載の抗体における配列番号：10および12に記載のアミノ酸配列の少なくともいずれかにおいて、1若しくは複数のアミノ酸が保存的に置換されており、かつ、(7)に記載の抗体と同等の活性を有する抗体、

(10) (7)に記載の抗体における配列番号：10および12に記載のアミノ酸配列の少なくともいずれかにおいてシグナル配列が除去されており、かつ、(7)に記載の抗体と同等の活性を有する抗体、

(11) ヒト由来のPODXL2蛋白質における、(7)に記載の抗体のエピトープに結合し、かつ、抗癌活性を有する抗体、

(12) 配列番号：3から5に記載のアミノ酸配列を含む、(1)に記載の抗体の軽鎖またはその可変領域からなるペプチド、

(13) 配列番号：10に記載のアミノ酸配列または該アミノ酸配列からシグナル配列が除去されたアミノ酸配列を含む、(12)に記載のペプチド、

(14) 配列番号：6から8に記載のアミノ酸配列を含む、(1)に記載の抗体の重鎖またはその可変領域からなるペプチド、

(15) 配列番号：12に記載のアミノ酸配列または該アミノ酸配列からシグナル配列が除去されたアミノ酸配列を含む、(14)に記載のペプチド、

- (16) (1) から (10) のいずれかに記載の抗体または (12) から (15) のいずれかに記載のペプチドをコードするDNA、
- (17) (1) から (10) のいずれかに記載の抗体を産生する、または、(16) に記載のDNAを含む、ハイブリドーマ、
- (18) (17) に記載のハイブリドーマにより産生された抗体、
- (19) (1) から (10) のいずれかに記載の抗体を有効成分とする、抗癌剤、
- (20) 癌が胃癌である、(19) に記載の抗癌剤、
- (21) ヒト由来のPODXL2蛋白質またはその一部を含む、癌ワクチン組成物、および
- (22) 癌が胃癌である、(21) に記載の癌ワクチン組成物、を提供するものである。

発明の効果

[0017] 本発明により、ヒト由来のPODXL2蛋白質に結合し、in vitroおよびin vivoにおいて優れた抗癌活性を有する抗体が提供された。本発明の抗体を用いれば、癌の治療や予防が可能となる。本発明の抗体は、特に、胃癌細胞の増殖抑制に効果的である。

図面の簡単な説明

[0018] [図1]ACT36-27_5D1抗体と、PODXL2遺伝子を発現するBa/F3細胞との反応性を示す図である。免疫原細胞であるPODXL2全長遺伝子を発現するトランスフェクタントBa/F3細胞(トランスフェクタント)と、PODXL2細胞を発現していない、別のトランスフェクタントBa/F3細胞(モック)に対する各抗体の反応をフローサイトメーターで解析した。各フローサイトメーターデータの塗りつぶしヒストグラム部分は、それぞれのサンプル抗体との反応を、白のヒストグラム部分は、対照としたマウスIgG2aの反応を示す。

[図2]ACT36-27_5D1抗体と、各種培養癌細胞との反応性をフローサイトメーターで解析した結果を示す図である。各フローサイトメーターデータの塗りつぶしヒストグラム部分は、それぞれのサンプル抗体との反応を、白のヒスト

グラム部分是对照として用いたマウスIgG2aとの反応を示す。対象癌細胞株として、胃癌細胞株（GC1Y、MKN1）、膀胱癌細胞株（T24）、前立腺癌細胞株（Du145、PC3）、グリオーマ細胞株（T98G、U251、U87MG）を用いた。

[図3A]ACT36-27_5D1抗体と、各種培養癌細胞表面との反応性を細胞染色で解析した結果を示す図である。癌細胞株として、胃癌細胞株（GC1Y、MKN1）を用いた。図左は、Hoechst33342を用いた核染色像、図中は、抗体による染色像、図右は、Hoechst33342を用いた核染色像と抗体による染色像とを重ねた像を示す（以下、図3B～Fについても同様）。

[図3B]ACT36-27_5D1抗体と、各種培養癌細胞表面との反応性を細胞染色で解析した結果を示す図である。癌細胞株として、膀胱癌細胞株（T24）を用いた。

[図3C]ACT36-27_5D1抗体と、各種培養癌細胞表面との反応性を細胞染色で解析した結果を示す図である。癌細胞株として、胃前立腺癌細胞株（Du145、PC3）を用いた。

[図3D]ACT36-27_5D1抗体と、各種培養癌細胞表面との反応性を細胞染色で解析した結果を示す図である。癌細胞株として、グリオーマ細胞株（T98G、U251、U87MG）を用いた。

[図3E]ACT36-27_5D1抗体と、各種培養癌細胞表面との反応性を細胞染色で解析した結果を示す図である。癌細胞株として、腎臓癌細胞株（KMRC3、786-0、A498）を用いた。

[図3F]ACT36-27_5D1抗体と、胎児胃腸細胞混合物との反応性を細胞染色で解析した結果を示す図である。

[図4]ACT36-27_5D1抗体で、各種培養癌細胞の表面および細胞内を染色した結果を示す図である。対象癌細胞株として、胃癌細胞株（GC1Y、MKN1）、膀胱癌細胞株（T24）、前立腺癌細胞株（Du145、PC3）、グリオーマ細胞株（T98G、U251、U87MG）を用いた。図左は、Hoechst33342を用いた核染色像、図中は、抗体による染色像、図右は、Hoechst33342を用いた核染色像と抗体による染色像とを重ねた像を示す。

[図5A]抗ACT36-27_5D1モノクローナル抗体の癌細胞の増殖に与える影響について、MTTアッセイで解析した結果を示す図である。縦軸はWST-1添加3時間後のO. D. (O. D. 450nm-O. D. 630nm)値を示す。対象癌細胞株として、胃癌細胞株 (GCIY)、グリオーマ細胞株 (T98G、U251、U87MG) を用いた。

[図5B]抗ACT36-27_5D1モノクローナル抗体の癌細胞の増殖に与える影響について、MTTアッセイで解析した結果を示す図である。縦軸はWST-1添加3時間後のO. D. (O. D. 450nm-O. D. 630nm)値を示す。対象癌細胞株として、膀胱癌細胞株 (T24)、前立腺癌細胞株 (Du145、PC3) を用いた。

[図6]ACT36-27_5D1抗体を投与したマウス担癌モデルにおける腫瘍体積推移を示す図である。対照として生理食塩水を、陽性対照としてTaxotereを用いた。

[図7]ACT36-27_5D1抗体の投与3週間後のマウス担癌モデルにおける摘出腫瘍重量を示す図である。対照として生理食塩水を、陽性対照としてTaxotereを用いた。

[図8]ACT36-27_5D1抗体を投与したマウス担癌モデルにおける体重推移を示す図である。対照として生理食塩水を、陽性対照としてTaxotereを用いた。

[図9]ACT36-27_5D1抗体の可変領域のアミノ酸配列とCDR予測を示した図である。CDR予測の結果を破線で、軽鎖および重鎖のシグナル配列を実線で示す。

[図10]ACT36-27_5D1抗体と、様々な長さのPODXL2遺伝子を発現するトランスフェクタントBa/F3細胞との反応性を示す図である。抗原であるPODXL2分子のN末端を含む異なる鎖長の複数のペプチドを発現させたBa/F3細胞に対する、ACT36-27_5D1抗体および対照としてのMPL抗体の反応性を、フローサイトメーターで解析した。各フローサイトメーターデータの塗りつぶしヒストグラム部分は、各PODXL2分子に対する抗体との反応を、白のヒストグラム部分は対照として用いたマウスIgG2aの反応を示す。

発明を実施するための形態

[0019] 本発明は、ヒト由来のPODXL2蛋白質に結合し、抗癌活性を有する抗体を提供する。本発明における「抗体」は、免疫グロブリンのすべてのクラスおよ

びサブクラスを含む。「抗体」には、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体が含まれ、また、抗体の機能的断片の形態も含む意である。「ポリクローナル抗体」は、異なるエピトープに対する異なる抗体を含む抗体調製物である。また、「モノクローナル抗体」とは、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体（抗体断片を含む）を意味する。ポリクローナル抗体とは対照的に、モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基を認識するものである。本発明の抗体は、好ましくはモノクローナル抗体である。本発明の抗体は、自然環境の成分から分離されおよび/または回収された（即ち、単離された）抗体である。

[0020] 本発明の抗体が結合する「ヒト由来のPODXL2蛋白質（NM_005397.3；Homo sapiens podocalyxin-like(PODXL), transcript variant 2）」は、細胞膜に存在し、細胞外領域が高度にグリコシル化されたI型膜貫通型糖蛋白質である。ヒト由来のPODXL2蛋白質は、526アミノ酸配列からなる糖蛋白質であり、そのうち、N末端から22アミノ酸部分をシグナル配列、23番目から429番目までを細胞外領域、430番目から450番目までを膜貫通領域、451番目以降を膜内領域とする1回膜貫通型蛋白質であると推定される。典型的なヒト由来のPODXL2蛋白質のアミノ酸配列を配列番号：2に、PODXL2遺伝子の塩基配列を配列番号：1に示す。ヒト由来のPODXL2蛋白質は、このような典型的なアミノ酸配列を有するもの以外に、天然においてアミノ酸が変異したものも存在する。従って、本発明における「ヒト由来のPODXL2蛋白質」は、好ましくは、配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質であるが、それ以外に、配列番号：2で表されるアミノ酸配列において、1もしくは複数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列からなるものも含まれる。アミノ酸配列の置換、欠失、挿入もしくは付加は、一般的には、10アミノ酸以内（例えば、5アミノ酸以内、3アミノ酸以内、1アミノ酸）である。

[0021] 本発明において「抗癌活性」とは、in vitroおよび/またはin vivoにおいて、癌細胞の増殖を抑制する活性を意味する。抗癌活性は、例えば、実施

例7に記載のMTTアッセイあるいは実施例8に記載の担癌モデルを用いた解析により評価することができる。本発明の抗体の好ましい態様は、実施例7に記載のMTTアッセイを行った場合に、抗体添加3時間後において、胃癌細胞株（例えば、GCIY）の増殖を、対照と比較して、50%以上（例えば、60%以上、70%以上）抑制する抗体である。

[0022] また、本発明の抗体の他の好ましい態様は、実施例8に記載の担癌モデルを用いた解析により、抗体投与3週間後において、腫瘍体積あるいは摘出腫瘍重量を、対照と比較して、50%以上（例えば、60%以上）減少させる抗体である。抗癌剤として用いる場合、これら抗体は、さらに、投与対象の体重を減少させないという特性を持つことが好ましい。

[0023] 本発明の抗体の他の好ましい態様は、軽鎖CDR1～CDR3（配列番号：3～配列番号：5に記載のアミノ酸配列）を含む軽鎖可変領域と、重鎖CDR1～CDR3（配列番号：6～配列番号：8に記載のアミノ酸配列）を含む重鎖可変領域を保持する抗体である。例えば、軽鎖可変領域が配列番号：10に記載のアミノ酸配列（または該アミノ酸配列からシグナル配列が除去されたアミノ酸配列）からなり、重鎖可変領域が配列番号：12に記載のアミノ酸配列（または該アミノ酸配列からシグナル配列が除去されたアミノ酸配列）からなる抗体が挙げられる。

[0024] 一旦、軽鎖可変領域が配列番号：10に記載のアミノ酸配列からなり、重鎖可変領域が配列番号：12に記載のアミノ酸配列からなる抗体が得られた場合、当業者であれば、その抗体が認識するヒト由来のPODXL2蛋白質上のペプチド領域（エピトープ）を特定して、その領域に結合し、かつ、抗癌活性を示す種々の抗体を作製することができる。抗体のエピトープは、ヒト由来のPODXL2蛋白質のアミノ酸配列から得られたオーバーラップする合成オリゴペプチドへの結合を調べるなどの周知の方法によって決定することができる（例えば、本願の実施例10、Ed Harlow and D.Lane, Using Antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press,、米国特許4708871号）。ファージディスプレイによるペプチドライブラリーを

エピトープマッピングに用いることもできる。二つの抗体が同一または立体的に重なり合ったエピトープと結合するかどうかは、競合アッセイ法により決定することができる。本発明の抗体が認識するPODXL2蛋白質上のペプチド領域は、好ましくは、PODXL2蛋白質の細胞外領域である。本発明の抗体が認識するPODXL2蛋白質上のペプチド領域は、より好ましくは、PODXL2蛋白質のアミノ酸配列の400位から428位の範囲内の領域である。

[0025] 本発明の抗体には、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、および、これら抗体の機能的断片が含まれる。本発明の抗体を医薬としてヒトに投与する場合は、副作用低減の観点から、キメラ抗体、ヒト化抗体、あるいはヒト抗体が望ましい。

[0026] 本発明において「キメラ抗体」とは、ある種の抗体の可変領域とそれとは異種の抗体の定常領域とを連結した抗体である。キメラ抗体は、例えば、抗原をマウスに免役し、そのマウスモノクローナル抗体の遺伝子から抗原と結合する抗体可変部（可変領域）を切り出して、ヒト骨髄由来の抗体定常部（定常領域）遺伝子と結合し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入して産生させることにより取得することができる（例えば、特開平8-280387号公報、米国特許第4816397号公報、米国特許第4816567号公報、米国特許第5807715号公報）。また、本発明において「ヒト化抗体」とは、非ヒト由来の抗体の抗原結合部位（CDR）の遺伝子配列をヒト抗体遺伝子に移植（CDRグラフトリング）した抗体であり、その作製方法は、公知である（例えば、EP239400、EP125023、W090/07861、W096/02576参照）。本発明において、「ヒト抗体」とは、すべての領域がヒト由来の抗体である。ヒト抗体の作製においては、免疫することで、ヒト抗体のレパートリーを生産することが可能なトランスジェニック動物（例えばマウス）を利用することが可能である。ヒト抗体の作製手法は、公知である（例えば、Nature, 1993, 362, 255-258、Intern. Rev. Immunol, 1995, 13, 65-93、J. Mol. Biol, 1991, 222, 581-597、Nature Genetics, 1997, 15, 146-156、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, 97: 722-727、特開平10-146194号公報、特開平10-1

55492号公報、特許2938569号公報、特開平11-206387号公報、特表平8-509612号公報、特表平11-505107号公報）。

[0027] 本発明において抗体の「機能的断片」とは、抗体の一部（部分断片）であって、ヒト由来のPODXL2蛋白質を特異的に認識するものを意味する。具体的には、Fab、Fab'、F(ab')₂、可変領域断片（Fv）、ジスルフィド結合Fv、一本鎖Fv（scFv）、sc（Fv）₂、ダイアボディー、多特異性抗体、およびこれらの重合体などが挙げられる。

[0028] ここで「Fab」とは、1つの軽鎖および重鎖の一部からなる免疫グロブリンの一価の抗原結合断片を意味する。抗体のパパイン消化によって、また、組換え方法によって得ることができる。「Fab'」は、抗体のヒンジ領域の1つまたはそれより多いシステインを含めて、重鎖CH1ドメインのカルボキシ末端でのわずかの残基の付加によって、Fabとは異なる。「F(ab')₂」とは、両方の軽鎖と両方の重鎖の部分からなる免疫グロブリンの二価の抗原結合断片を意味する。

[0029] 「可変領域断片（Fv）」は、完全な抗原認識および結合部位を有する最少の抗体断片である。Fvは、重鎖可変領域および軽鎖可変領域が非共有結合により強く連結されたダイマーである。ラクダ科の動物（例えば、ヒトコブラクダ、フタコブラクダ、ラマ、アルパカ、ビクーニャ）に由来する抗体は、重鎖の可変領域（VHH）のみで、抗原を認識することが可能であり、「ナノ抗体」と呼ばれている。本発明の抗体は、ナノ抗体であってもよい。

「一本鎖Fv（sFv）」は、抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含み、これらの領域は、単一のポリペプチド鎖に存在する。「sc（Fv）₂」は、2つの重鎖可変領域および2つの軽鎖可変領域をリンカー等で結合して一本鎖にしたものである。「ダイアボディー」とは、二つの抗原結合部位を有する小さな抗体断片であり、この断片は、同一ポリペプチド鎖の中に軽鎖可変領域に結合した重鎖可変領域を含み、各領域は別の鎖の相補的領域とペアを形成している。「多特異性抗体」は、少なくとも2つの異なる抗原に対して結合特異性を有するモノクローナル抗体である。例えば、二つの重鎖が異なる特異

性を持つ二つの免疫グロブリン重鎖／軽鎖対の同時発現により調製することができる。

[0030] 本発明においては、本発明において同定されたCDRを含む抗体の軽鎖若しくは重鎖またはそれらの可変領域からなるペプチドを提供する。好ましいペプチドは、配列番号：3から5に記載のアミノ酸配列を含む本発明の抗体の軽鎖またはその可変領域からなるペプチドであり、特に好ましくは、配列番号：10に記載のアミノ酸配列または該アミノ酸配列からシグナル配列が除去されたアミノ酸配列を含むペプチドである。他の好ましいペプチドは、配列番号：6から8に記載のアミノ酸配列を含む本発明の抗体の重鎖またはその可変領域からなるペプチドであり、特に好ましくは、配列番号：12に記載のアミノ酸配列または該アミノ酸配列からシグナル配列が除去されたアミノ酸配列を含むペプチドである。これらペプチドを、例えば、リンカー等により連結することで、機能的な抗体を作製することが可能である。

[0031] 本発明の抗体には、望ましい活性（抗原への結合活性、抗癌活性、および／または他の生物学的特性）を減少させることなく、そのアミノ酸配列が修飾された抗体が含まれる。本発明の抗体のアミノ酸配列変異体は、本発明の抗体鎖をコードするDNAへの変異導入によって、またはペプチド合成によって作製することができる。そのような修飾には、例えば、本発明の抗体のアミノ酸配列内の残基の置換、欠失、付加および／または挿入を含む。抗体のアミノ酸配列が改変される部位は、改変される前の抗体と同等の活性を有する限り、抗体の重鎖または軽鎖の定常領域であってもよく、また、可変領域（フレームワーク領域およびCDR）であってもよい。CDR以外のアミノ酸の改変は、抗原との結合親和性への影響が相対的に少ないと考えられるが、現在では、CDRのアミノ酸を改変して、抗原へのアフィニティーが高められた抗体をスクリーニングする手法が公知である（PNAS, 102, 8466-8471 (2005)、Protein Engineering, Design & Selection, 21, 485-493 (2008)、国際公開第2002/051870号、J. Biol. Chem., 280, 24880-24887 (2005)、Protein Engineering, Design & Selection, 21, 345-351 (2008)）

。

[0032] 改変されるアミノ酸数は、好ましくは、10アミノ酸以内、より好ましくは5アミノ酸以内、最も好ましくは3アミノ酸以内（例えば、2アミノ酸以内、1アミノ酸）である。アミノ酸の改変は、好ましくは、保存的な置換である。本発明において「保存的な置換」とは、化学的に同様な側鎖を有する他のアミノ酸残基で置換することを意味する。化学的に同様なアミノ酸側鎖を有するアミノ酸残基のグループは、本発明の属する技術分野でよく知られている。例えば、酸性アミノ酸（アスパラギン酸およびグルタミン酸）、塩基性アミノ酸（リシン・アルギニン・ヒスチジン）、中性アミノ酸においては、炭化水素鎖を持つアミノ酸（グリシン・アラニン・バリン・ロイシン・イソロイシン・プロリン）、ヒドロキシ基を持つアミノ酸（セリン・トレオニン）、硫黄を含むアミノ酸（システイン・メチオニン）、アミド基を持つアミノ酸（アスパラギン・グルタミン）、イミノ基を持つアミノ酸（プロリン）、芳香族基を持つアミノ酸（フェニルアラニン・チロシン・トリプトファン）で分類することができる。また、「同等の活性を有する」とは、抗原への結合活性または抗癌活性が対象抗体（代表的には、ACT36-27_5D1抗体）と同等（例えば、70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上）であることを意味する。抗原への結合活性は、例えば、抗原を発現するBa/F3細胞を作製し、抗体サンプルとの反応性をフローサイトメーターで解析することにより評価することができる（実施例4、10）。また、抗癌活性は、上記した通り、例えば、実施例7に記載のMTTアッセイあるいは実施例8に記載の担癌モデルを用いた解析により評価することができる。

[0033] また、本発明の抗体の改変は、例えば、グリコシル化部位の数または位置を変化させるなどの抗体の翻訳後プロセスの改変であってもよい。これにより、例えば、抗体のADCC活性を向上させることができる。抗体のグリコシル化とは、典型的には、N-結合またはO-結合である。抗体のグリコシル化は、抗体を発現するために用いる宿主細胞に大きく依存する。グリコシル化パターンの改変は、糖生産に関わる特定の酵素の導入または欠失などの公知の方

法で行うことができる（特開2008-113663、米国特許第5047335号、米国特許第5510261号、米国特許第5278299号、国際公開第99/54342号）。さらに、本発明においては、抗体の安定性を増加させる等の目的で脱アミド化されるアミノ酸若しくは脱アミド化されるアミノ酸に隣接するアミノ酸を他のアミノ酸に置換することにより脱アミド化を抑制してもよい。また、グルタミン酸を他のアミノ酸へ置換して、抗体の安定性を増加させることもできる。本発明は、こうして安定化された抗体をも提供するものである。

[0034] 本発明の抗体は、ポリクローナル抗体であれば、抗原（ヒト由来のPODXL2蛋白質、その部分ペプチド、またはこれらを発現する細胞など）で免疫動物を免疫し、その抗血清から、従来手段（例えば、塩析、遠心分離、透析、カラムクロマトグラフィーなど）によって、精製して取得することができる。また、モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ法や組換えDNA法によって作製することができる。

[0035] ハイブリドーマ法としては、代表的には、コーラーおよびミルスタインの方法（Kohler & Milstein、Nature、1975年、第256巻、p 495）が挙げられる。この方法における細胞融合工程に使用される抗体産生細胞は、抗原（ヒト由来のPODXL2蛋白質、その部分ペプチド、またはこれらを発現する細胞など）で免疫された動物（例えば、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、サル、ヤギ）の脾臓細胞、リンパ節細胞、末梢血白血球などである。免疫されていない動物から予め単離された上記の細胞またはリンパ球などに対して、抗原を培地中で作用させることによって得られた抗体産生細胞も使用することが可能である。ミエローマ細胞としては公知の種々の細胞株を使用することが可能である。抗体産生細胞およびミエローマ細胞は、それらが融合可能であれば、異なる動物種起源のものでもよいが、好ましくは、同一の動物種起源のものである。ハイブリドーマは、例えば、抗原で免疫されたマウスから得られた脾臓細胞と、マウスミエローマ細胞との間の細胞融合により産生され、その後のスクリーニングにより、ヒト由来のPODXL2蛋白質に特異的なモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを得ることができる。ヒト由

来のPODXL2蛋白質に対するモノクローナル抗体は、ハイブリドーマを培養することにより、また、ハイブリドーマを投与した哺乳動物の腹水から、取得することができる。

[0036] 組換えDNA法は、上記本発明の抗体またはペプチドをコードするDNAをハイブリドーマやB細胞等からクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主細胞（例えば哺乳類細胞株、大腸菌、酵母細胞、昆虫細胞、植物細胞など）に導入し、本発明の抗体を組換え抗体として産生させる手法である（例えば、P. J. Delves, *Antibody Production: Essential Techniques*, 1997 WILEY、P. Shepherd and G. Dean *Monoclonal Antibodies*, 2000 OXFORD UNIVERSITY PRESS、Vandamme A.M. et al., *Eur. J. Biochem.* 192:767-775(1990)）。本発明の抗体をコードするDNAの発現においては、重鎖または軽鎖をコードするDNAを別々に発現ベクターに組み込んで宿主細胞を形質転換してもよく、重鎖および軽鎖をコードするDNAを単一の発現ベクターに組み込んで宿主細胞を形質転換してもよい（W094/11523号公報参照）。本発明の抗体は、上記宿主細胞を培養し、宿主細胞内または培養液から分離・精製し、実質的に純粋で均一な形態で取得することができる。抗体の分離・精製は、通常のポリペプチドの精製で使用されている方法を使用することができる。トランスジェニック動物作製技術を用いて、抗体遺伝子が組み込まれたトランスジェニック動物（ウシ、ヤギ、ヒツジまたはブタなど）を作製すれば、そのトランスジェニック動物のミルクから、抗体遺伝子由来するモノクローナル抗体を大量に取得することも可能である。

[0037] 本発明は、上記本発明の抗体またはペプチドをコードするDNA、該DNAを含むベクター、該DNAを保持する宿主細胞、および該宿主細胞を培養し、抗体を回収することを含む抗体の生産方法をも提供するものである。

[0038] 本発明の抗体は、抗癌活性を有することから、癌の治療または予防に利用することができる。従って、本発明は、本発明の抗体を有効成分とする抗癌剤、および、本発明の抗体の治療上または予防上の有効量を、ヒトを含む哺乳類に投与する工程を含んでなる、癌の治療または予防の方法をも提供する

ものである。本発明の治療または予防の方法は、ヒト以外にも、例えば、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ウサギなどを含各種哺乳動物に応用することが可能である。

[0039] 本実施例において、本発明の抗体は、癌の中でも、特に胃癌細胞の増殖を強く抑制したことから、胃癌（例えば、スキルス胃癌）の治療または予防に特に効果的である。

[0040] 本発明の抗体を有効成分とする抗癌剤は、本発明の抗体と任意の成分、例えば生理食塩水、葡萄糖水溶液または燐酸塩緩衝液などを含有する組成物の形態で使用することができる。本発明の抗癌剤は、必要に応じて液体または凍結乾燥した形態で製形化しても良く、任意に薬学的に許容される担体もしくは媒体、例えば、安定化剤、防腐剤、等張化剤などを含有させることもできる。

[0041] 薬学的に許容される担体としては、凍結乾燥した製剤の場合、マンニトール、ラクトース、サッカロース、ヒトアルブミンなどを例として挙げることができ、液状製剤の場合には、生理食塩水、注射用水、燐酸塩緩衝液、水酸化アルミニウムなどを例として挙げることができるが、これらに限定されるものではない。

[0042] 抗癌剤の投与方法は、投与対象の年齢、体重、性別、健康状態などにより異なるが、経口投与、非経口投与（例えば、静脈投与、動脈投与、局所投与）のいずれかの投与経路で投与することができる。好ましい投与方法は、非経口投与である。抗癌剤の投与量は、患者の年齢、体重、性別、健康状態、癌の進行の程度および投与する抗癌剤の成分により変動するが、一般的に静脈内投与の場合、成人には体重1kg当たり1日0.1~1000mg、好ましくは1~100mgである。

[0043] 本発明の抗体は、癌細胞の細胞表面に結合する活性を有するため、癌の治療や予防のみならず、癌の診断への応用も考えられる。本発明の抗体を癌の診断に用いる場合あるいは癌の治療における腫瘍部位の検出に用いる場合、本発明の抗体は、標識したものであってもよい。標識としては、例えば、放

放射性物質、蛍光色素、化学発光物質、酵素、補酵素を用いることが可能であり、具体的には、ラジオアイソトープ、フルオレセイン、ローダミン、ダンシルクロリド、ルシフェラーゼ、ペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、リゾチーム、ビオチン／アビジンなどが挙げられる。本発明の抗体を診断剤として調剤するには、合目的な任意の手段を採用して任意の剤型でこれを得ることができる。例えば、精製した抗体についてその抗体価を測定し、適当にPBS（生理食塩を含むリン酸緩衝液）等で希釈した後、0.1%アジ化ナトリウム等を防腐剤として加えることができる。また、例えば、ラテックス等に本発明の抗体を吸着させたものについて抗体価を求め、適当に希釈し、防腐剤を添加して用いることもできる。

[0044] また、本発明において、PODXL2蛋白質に対する抗体が抗癌活性を有することが判明したことから、PODXL2蛋白質またはその部分ペプチドを癌ワクチンとして、ヒトを含む哺乳動物に投与することも可能である（例えば、特開2007-277251、特開2006-052216を参照のこと）。本発明は、このような癌ワクチン用途に用いられる、PODXL2蛋白質またはその部分ペプチドを含む癌ワクチン組成物をも提供するものである。製剤化する場合には、上記本発明の抗癌剤と同様に、薬学的に許容される担体もしくは媒体、例えば、安定化剤、防腐剤、等張化剤などを含有させることができる。

実施例

[0045] 以下、本発明を実施例により、さらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

[実施例1] SST-REXの実施

スキルス胃癌株化細胞GCIY細胞細胞表面に発現している膜あるいは分泌遺伝子情報を網羅的に得るためにSST-REXを実施した。

(1) cDNAの作製

GCIY細胞 2×10^7 個をTrizol (invitrogen, #15596-026) 1mlに懸濁して5分放置し、クロロフォルムを $200 \mu\text{l}$ 添加して15秒間懸濁後、 $12,000 \times g$ で15分間遠心した。この遠心後の上清と $500 \mu\text{l}$ のイソプロパノールを混ぜ合わせた後、12,

000×gで10分間遠心を行った。得られたペレットを80%エタノールで洗浄し、全RNA 200 μg以上を得て、以後の実験に供した。

[0046] 得られた全RNAすべてを100 μlの水に溶かし、FastTrack2.0 mRNA Isolation kit(invitrogen, #K1593-02)を用いて、mRNA 3 μgを得た。SuperScript™ Choice System (invitrogen, #18090-019)を用いて、得られたmRNAから2本鎖cDNAの作製を行った。

[0047] なお、GC1Y細胞は、BorrmanIV型胃癌および、その腹膜播種性転移に罹患した女性の淡血性黄色透明手術時の腹水から樹立された胃癌細胞株であり、多剤耐性遺伝子(mdr-1)の発現、ならびに、CEA、CA19-9、およびαFPの分泌が見られる低分化型腺癌細胞である。

(2) pMX-SSTベクターへのcDNA配列の組み込み(キメラ化)

レトロウイルスベクターpMX-SSTに得られたcDNAを組み込むためにpMX-SSTベクター(Nature Biotechnology 17, p487-490, 1999)5 μgを制限酵素BstXIを用いて、100 μlの反応系で45度で4時間処理した。反応液すべてを1%アガロースゲルにて電気泳動したところ、約5000塩基の長さのDNA断片と約500塩基の長さのDNA断片が検出された。約5000塩基の長さのDNA断片を保有している部分のアガロースゲルを切り出した。さらにWizard^(R) SV Gel and PCR Clean-Up System (promega, #A9282)を用いて、約5000塩基の長さのDNA断片を精製した。このようにして得られたDNA断片をpMX-SSTベクターをBstXIで制限酵素処理したものとし、これを1 μl当たり50ng含む水溶液となるよう調製した。

[0048] 先に調製した2本鎖cDNAは、平滑末端であり、BstXIで制限酵素処理したpMX-SSTと直接結合させることはできない。そこで、2本鎖cDNAにBstXIの制限酵素処理したのと同じのDNA配列を持たせるための作業を行った。BstXI Adapter (invitrogen, #N408-18) 9 μgを10 μlの水に溶かしたBstXI Adapter水溶液に2本鎖cDNAを溶かした。これにLigationHigh(TOYOBO, #LGK-201)を5 μl添加し、懸濁して、16度で16時間反応させて、BstXI Adapterと2本鎖cDNAとを結合させた。その後、SuperScript™ Choice System (invitrogen, #180

90-019) に添付のサイズ分画カラムを用いて、鎖長が約400塩基以下のDNA断片を除去した。その後、得られた容量の10分の1量の3M酢酸ナトリウムと2.5倍量のエタノールを添加し、転倒混和した後、20,400×gで30分遠心した。遠心後の上清を除去して得た沈殿を15μlの水に溶かし、1.5%のアガロースゲルにて電気泳動を行った。その後、約500塩基から約4000塩基の長さを持った2本鎖cDNA断片とBstXI Adapterとの結合体を含んだゲルを切り出した。さらにWizard^(R) SV Gel and PCR Clean-Up System (promega, #A9282) を用いて、2本鎖cDNAとBstXI Adapterとの結合体を精製した。

[0049] pMX-SSTベクターをBstXIで制限酵素処理したもの50ng、取得した2本鎖cDNAとBstXI Adapterとの結合体の全量、およびT4 DNA ligaseを、20μlの反応系にて室温で3時間処理し、pMX-SSTベクターをBstXIで制限酵素処理したものと上記結合体とを結合させた。反応液の組成は能書にしたがって調整した。

(3) cDNAライブラリの増幅

pMX-SSTベクターを用いて構築したcDNAライブラリを大腸菌に導入して増幅を行った。cDNAライブラリに、5μgのtRNA、12.5μlの7.5M酢酸ナトリウム、および70μlのエタノールを加え、転倒混和した後、20,400×gで30分遠心し、上清を捨て沈殿を得た。得られた沈殿に500μlの70%エタノールを加え、20,400×gで5分遠心し、上清を捨て得られた沈殿を10μlの水に溶かした。cDNAを大腸菌内で増幅させるために、そのうちの2μlを、コンピテントセル (in vitrogen, #18920-015) 23μlと混ぜ、1.8kVの条件でエレクトロポレーションを行い、1mlのSOC培地 (in vitrogen, #15544-034) 全量を懸濁した。この作業を2回行い、大腸菌を懸濁したSOC培地を37度で90分間、振とう培養した。その後、この培養溶液全量を、培地1ml当たりアンピシリン100μgを含むLB培地500mlに投入し、37度で16時間、振とう培養を行った。

[0050] cDNAライブラリの大腸菌への導入数、およびpMX-SSTベクターと結合したcDNAの鎖長を確認するために、培養液5μlを取り出し、50μg/mlのアンピシリンを含むLB寒天培地にプレーティングを行った。

[0051] その結果、5 μ lをプレーティングしたLB寒天培地に150個のコロニーの生育が見られた。これにより培養液500ml中に 1.5×10^7 個の独立したcDNAライブラリがあると考えられた。また、コロニーのうち任意の16個についてプラスミドを抽出し、制限酵素BstXIで制限酵素処理し、処理物を1%アガロースゲルにて電気泳動を行い、pMX-SSTベクター上のcDNAの長さを計測した。その結果、平均値は約1000塩基であった。

[0052] 残りの培養液から集菌し、10 NucleoBond^(R) AX 500 columns (日本ジエネティクス、#740574)を用いてプラスミドを精製し、増幅されたcDNAライブラリ系を確立した。

(4) cDNAライブラリのパッケージングおよびSST-REX法の実施

cDNAライブラリ由来遺伝子が組み込まれたpMX-SSTレトロウイルスベクターRNAを含むレトロウイルスを産生させるため、ウイルスパッケージング細胞Plat-E (Gene Ther. 2000Jun;7(12):1063-6.) 2×10^6 個を、4mlのDMEM培地 (Wako, #044-29765)を含む6cmディッシュに懸濁し、37度で5%CO₂の条件で24時間培養した。一方、100 μ lのopti-MEM (GIBCO, #31985070)と9 μ lのFugene (Roche, #1814443)を混ぜ、5分室温で放置後、3 μ gのcDNAライブラリを添加し、15分室温で放置した。cDNAライブラリを含む溶液を、培養後のPlat-E細胞に滴下し、24時間後に上清を入れ替えて同一条件で培養を続けた。さらに24時間後の上清を0.45 μ mのフィルターを通してろ過した。

[0053] この取得したろ過上清0.5mlを、 4×10^6 個のBa/F3細胞を含むRPMI-1640培地 (コージンバイオ)9.5mlが入れられた10cm dish中に加えた。

[0054] さらに10 μ lのポリブレン (CHEMICON, #TR-1003-G)と10ngのIL-3を添加し、24時間培養した。その後、細胞を3回RPMI-1640培地で洗浄し、新しいRPMI-1640培地200mlに懸濁して96ウェルプレート20枚に均等分量になるようにまき、Ba/F3細胞の自律増殖能に基づくセレクションおよびクローニングを試みた。10日後から20日後までに増殖が見られた細胞をSST-REXに基づいて選抜されたものとし、該細胞が各ウェルいっぱい増殖するまでさらに培養を続けた。

(5) SST-REXで得られた遺伝子産物の解析

各ウェルから得られた細胞の半分量は拡大培養して、細胞ストックとした。さらに、細胞ストックからの細胞を培養して、組み込まれたcDNA由来のペプチド分子を細胞外に発現するトランスフェクタントBa/F3細胞を、抗体作製のための免疫源細胞として、また、スクリーニング対象の細胞として用いた。各ウェルから得られた細胞の残り半分からはゲノムを抽出してシーケンスを行い、導入されたcDNA由来の遺伝子を解析した。シーケンスにおいては、得られたゲノムに対して、LA taq DNA polymerase (Takara, #RR002) またはPrimeSTAR MAX DNA polymerase (TaKaRa, #R045A) を用いて、PCRを行った。PCRプライマーには、以下の配列を用いた。

SST3' -T7 5' -TAATACGACTCACTATAGGGCGCGCAGCTGTAAACGGTAG-3' (配列番号: 13)

SST5' -T3 5' -ATTAACCCTCACTAAAGGGAGGGGGTGGACCATCCTCTA-3' (配列番号: 14)

PCR産物をWizard^(R) SV Gel and PCR Clean-Up System (promega, #A9282) などを用いて精製した。その後、精製したPCR産物について、BigDye Terminator v3.1 Cycle sequencing (ABI, #4337456) およびDNAシーケンサーABI3100XLを用いて、シーケンスを行った。シーケンスのプライマーには以下のものを用いた。

SST5' -T3 5' -ATTAACCCTCACTAAAGGGAGGGGGTGGACCATCCTCTA-3' (配列番号: 15)

得られたシーケンスデータは、BLAST検索 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) とSignalP 3.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) を利用して解析した。

[0055] 上記の通り、細胞を材料として、SST-REX法を実施した結果、1回目の実施では、87個のトランスフェクタントBa/F3細胞からのcDNA由来の遺伝子のシーケンスを行い、異なる遺伝子40種類を取得できた。2回目の実施では176個のトランスフェクタントBa/F3細胞からのcDNA由来の遺伝子のシーケンスを行い、異なる遺伝子56種類を取得できた。なお、1回目と2回目で重複した遺伝子が15種類あり、2度の実施で合計81種類のcDNA由来の遺伝子を取得することができた。遺伝子解析に供したトランスフェクタントBa/F3細胞系には、cDNA由来の遺伝子1種類のみ含まれていることを確認し、以降の実験に供した（以後このようにして得られたcDNA由来遺伝子を含む細胞を「SSTクローン細胞」と称する）。

[実施例2] PODXL2全長遺伝子のクローニングと、それを発現するBa/F3細胞株の樹立

さらに、実施例1で得られたcDNA由来遺伝子リスト中に含まれた、PODXL2遺伝子について、遺伝子全長を含むSSTクローン細胞を得るためにクローニングを行った。

[0056] GCIY細胞のSST-REXで作製したcDNAのうち30ngをテンプレートとし、NCBIのヌクレオチド検索サイト (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>) におけるNM_005397の情報に基づく設計プライマーとPrimeSTAR MAX DNA polymerase (TaKaRa, #R045A) を用い、PCR反応を行った。

フォワードプライマー: ccggaattcagaggcgacgacacgatgcg (配列番号: 16)

リバースプライマー: ttttcocttttgcggccgcgaggtgtgtgtcttcoct (配列番号: 17)

得られたPCR産物を1%アガロースゲルで電気泳動し、目的の長さのDNA断片をゲルから抽出した。抽出したDNA断片をEcoRI (TaKaRa, #1040A) とNotI (TaKaRa, #1166A) で制限酵素処理した。同時に、pMX-SSTベクターについても

、EcoRIとNotIで制限酵素処理した。制限酵素処理したDNA断片100ngとpMX-SS Tベクター40ngとをLigationHigh(TOYOBO, #LGK-201)を用いて、2時間かけて結合させた。

[0057] 結合させたもの全量に、熱ショック用の大腸菌コンピテントセルを100 μ l 加え、氷上に30分放置した後、42度で90秒インキュベートし、その後1mlのLB培地を加え37度で1時間インキュベートした。その後、15,000 \times gで1分の遠心を行い、上清を除去し、残存液で大腸菌ペレットを懸濁した。この全量をアンピシリン50 μ g/mL含むLB寒天培地に塗りこみ、37度で1晩インキュベートし、得られたコロニーを用いて、実施例1(4)のシーケンス解析と同様の方法で、PCRおよびシーケンス解析を行った。目的の長さのDNA断片が確認できたクローンについては、PCR産物をシーケンスして、目的の配列が挿入されていることを確認した。なお、シーケンス解析の際のPCR用ポリメラーゼにはPrimeSTAR MAX DNA polymeraseを用いた。

[0058] その後、目的の配列が挿入されているコロニーをLB液体培地3mlに植菌し、37度で1晩の培養を行った。培養物全量に対して、3,000 \times g、15分の遠心を行い、上清を除去し、QuickLyse Miniprep Kit(QIAGEN, #27406)を用いて精製し、PODXL2遺伝子全長を含むプラスミドを得た。

[0059] その後、得られたプラスミドを用いて、実施例1(4)以降に示すcDNAライブラリのパッケージング以降と同様の操作にて、ベクターを含むレトロウイルスの作製を行った。次いで、全長PODXL2遺伝子を発現するBa/F3細胞株を樹立し、以降の実験に供した。

[実施例3] PODXL2モノクローナル抗体の作製

免疫動物はマウスBalb/cを使用し、まず、免疫賦活剤として、TiterMax Gold(Alexis Biochemicals, ALX-510-002-L010)を等量のPBSと混和して乳化したもの50 μ lを投与した。翌日、PODXL2遺伝子を有するSSTクローン細胞を免疫原細胞として5 \times 10⁶個投与し、さらに免疫原細胞を2日おきに4回注入した。最初の免疫から約2週間後、摘出した二次リンパ組織をすりつぶし、抗体産生

細胞を含む細胞集団を得た。それらの細胞と融合パートナー細胞を混合し、ポリエチレングリコール(MERCK, 1. 09727. 0100)を用いた細胞融合によりハイブリドーマを作製した。融合パートナー細胞としては、マウスミエローマ細胞P3U1 (P3-X63-Ag8. U1)を用いた。

[0060] ハイブリドーマは、HAT (SIGMA, H0262) 、5%BM-condimed (Roche, 663573)、15%FBS、1%ペニシリン/ストレプトマイシン溶液(GIBCO, 15140-122)を含むRPMI 1640選択培地(Wako) で10~14日間培養した。次に、実施例4に示すフローサイトメトリーにより免疫原細胞に反応し、免疫源細胞に抗原遺伝子を含まないSSTクローン細胞(陰性対照細胞)に反応しないハイブリドーマを選択した。限界希釈によりモノクローン化し、抗PODXL2抗体ACT36-27_5D1を産生するハイブリドーマクローンを得た(図1)。

[0061] 得られたハイブリドーマは、必要量HT(SIGMA, HT media supplement (50 X) Hybri-Max(Sigma-Aldrich, H0137)、15%FBS、1%ペニシリン/ストレプトマイシン溶液(GIBCO, 15140-122)を含むRPMI-1640培地を用いて、維持した。産生抗体のアイソタイプを、アイソストリップキット(Roche, 1493027)を用いて決定した結果、IgG2a/ κ であった。

[0062] モノクローン化されたハイブリドーマからの精製されたACT36-27_5D1抗体の取得は、次のように行った。ハイブリドーマを無血清培地(Hybridoma-SFM: GIBCO, 12045-076)に馴化して拡大培養後、一定期間培養して培養上清を得た。次いで、この培養上清に含まれるIgG画分をProtein A セファロース(GEヘルスケア, 17-1279-03)、MAPS-II結合バッファー(BIO-RAD, 153-6161)、MAPS-II溶出バッファー(BIO-RAD, 153-6162)を用いて精製した。溶出されたIgGをPBSで透析し、精製抗体画分を得た。

[実施例4] フローサイトメトリーを用いた抗体スクリーニング

ACT36-27_5D1抗体と、各種細胞(目的遺伝子を発現するBa/F3細胞、目的遺伝子を発現していないBa/F3細胞、各種癌細胞など)との反応性を、フローサイトメトリーを用いて解析した。

- [0063] 本実施例においては、細胞懸濁バッファーおよび以降の洗浄バッファーには、0.5%BSAと2mM EDTAを含有するPBSを用いた。抗体と反応させる各種細胞（対象細胞）を、96穴プレート（BD Falcon、353911）に、細胞懸濁液が1ウェルあたり 5×10^4 個の細胞を含み100 μ lに成るよう調整し、分注した。
- [0064] また、染色対象の細胞が癌細胞株の場合は、80%コンフルエントになった時点でCell Dissociation Buffer（GIBCO, 13151-014）を用いて培養プレートから剥がして回収した。
- [0065] 細胞懸濁液の各サンプルに、ハイブリドーマ培養上清あるいは2 μ g/mlの精製抗体（以降、「抗体溶液」と称する）50 μ lを添加し、抗体と細胞とを反応させた。抗体溶液のアイソタイプ対照としては、mouse IgG1（BioLegend, 400412）、mouse IgG2a（BioLegend, 400224）、mouse IgG2b（BioLegend, 400324）をそれぞれ2 μ g/mlずつ含む洗浄バッファーを用いた。ハイブリドーマの培養上清と対象細胞を室温で30分反応後、700 \times gで2分間の遠心を行って培養上清を除去し、さらに洗浄バッファーを100 μ l加え、再度700 \times gで2分間の遠心を行って上清を除去し、細胞を洗浄した。
- [0066] 次に、洗浄後の細胞ペレットに、検出用2次抗体として、Goat anti-mouse IgG, F(ab')₂-PE（PE=phycoerythrin, Beckman Coulter, IM0855）を洗浄バッファーで200倍に希釈したものを50 μ l添加し、暗所において室温で30分反応させた。反応後、700 \times gで2分間の遠心を行って上清を除去し、さらに洗浄バッファーを100 μ l加え、再度700 \times gで2分間の遠心を行って上清を除去し、細胞を洗浄した。その後、適量の洗浄バッファーで細胞を懸濁し、フローサイトメーター（Beckman Coulter, FC500MPL）により、抗体と細胞の反応性について解析した。
- [0067] 反応性の測定では、前方散乱と側方散乱の測定値より生細胞を選択するようにゲートをかけた。選択された生細胞に対して抗体との反応性に基づくPEの蛍光強度を測定し、アイソタイプ対照の反応強度を基準として、免疫原細胞に対して有意に反応性が認められるが、陰性対照細胞に対して反応性が認められない培養上清を産生するハイブリドーマ細胞を候補クローンとして選

択した。

[0068] 抗体と各種細胞との反応性解析では、該抗体とアイソタイプ対照抗体との反応強度を基準として、有意に反応性が認められる抗体を選択した。

[実施例5] 癌細胞を用いたフローサイトメトリー

染色対象とする癌細胞が80%コンフルエントになった時点でCell Dissociation Buffer (GIBCO, 13151-014) を用いて培養プレートから剥がして回収し、回収した細胞 1×10^5 個を0.5%BSA、2mM EDTA/PBS(実施例4に示す洗浄バッファ)に100 μ lずつ懸濁し、96ウェルプレート(BD Falcon, 353911)に分注した。以降実施例4と同様の方法で、癌細胞と抗体との反応性をフローサイトメーターを用いて解析した(図2)。

[0069] ACT36-27_5D1抗体との反応性を解析する癌細胞としては、胃癌細胞株(GCI Y、MKN1)、膀胱癌細胞株(T24)、前立腺癌細胞株(Du145、PC3)、グリオーマ細胞株(T98G、U251、U87MG)を用いた。その結果、実施したすべての癌細胞に対して、ACT36-27_5D1抗体は、アイソタイプ対照抗体と比較して有意に反応した。

[実施例6] 癌細胞の細胞染色

ACT36-27_5D1抗体と各種癌細胞との反応性を、細胞染色により解析した。黒色96ウェルプレート(BD Falcon, 353219)に、染色の対象とした癌細胞 1×10^4 個を100 μ lの培地に懸濁して播種し、24時間培養した。癌各種癌細胞の培地には、非働化処理した10%FBS (Equitech) および1%ペニシリン/ストレプトマイシン溶液(GIBCO Penicillin-streptomycin liquid, 15140122、以降「P/S」と略す)を含むDMEM培地(SIGMA)を用いた。本実施例では、洗浄バッファとして、25mM HEPES(pH7.4)、120mM NaCl、4.8mM KCl、1.2mM MgSO₄、1.3mM CaCl₂を含有するバッファを用いた。

[0070] 細胞表面のみを染色する場合、ハイブリドーマ培養上清もしくは精製抗体を2 μ g/mlで溶解させた洗浄バッファを、700 \times gで2分間の遠心により培養

上清を除去して得た細胞に対して、それぞれ50 μ l添加した。ACT36-27_5D1抗体に対する陰性対照としては、mouse IgG1 (BioLegend、400412)、mouse IgG2a (BioLegend、400224)、mouse IgG2b (BioLegend、400324) を2 μ g/mlの濃度で洗浄バッファーに溶解させ、50 μ l添加した溶液を用いた。各抗体を室温で30分反応後、700 \times gで2分間の遠心を行って上清を除去し、さらに洗浄バッファーを100 μ l加え、再度700 \times gで2分間の遠心を行って上清を除去して、細胞を洗浄した。

[0071] 洗浄後、Goat anti-mouse IgG, F(ab')₂-PE (Beckman Coulter, IM0855) を洗浄バッファーで200倍希釈し、さらに10mg/mlのHoechst33342 (Invitrogen, H1399) を2,000倍希釈したものを検出用2次抗体兼核染色試薬として、細胞に50 μ l添加し、室温で30分暗所にて反応させた。その後、上記と同様の洗浄を2回行い、100 μ lの洗浄バッファーを添加した後、In Cell Analyzer 1000 (GEヘルスケア)を用いて細胞染色を観察した。

[0072] 細胞表面と細胞内部を染色する場合は、遠心にて細胞培養液上清を除去し、得られた細胞を100 μ lの洗浄バッファーで1回上記と同様に洗浄した。その後、4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液 (Wako、161-20141) を50 μ l添加し、室温で10分反応させて細胞を固定した。その後、100 μ lの洗浄バッファーで2回洗浄した。次に、0.1%Triton X-100を含有する洗浄バッファーを100 μ l添加し、室温で10分反応させて、細胞膜の透過性を高め、その後100 μ lの洗浄バッファーで2回洗浄した。それ以降は、細胞表面のみを染色する方法と同様にして、染色および解析を行った。

[0073] 細胞の観察は、Hoechst33342で染色される核を細胞の位置の基準とし、PEの蛍光を測定することで抗体による染色の有無を検討した。抗体の染色強度の指標として、一定以上のPEの蛍光強度を有する細胞の割合をIn Cell Analyzer付属の解析ソフトであるDeveloper (GEヘルスケア)を用いて解析した。

[0074] 実施例5で用いた各種癌細胞株、腎臓癌細胞株 (KMRC3、786-0、A498)、および胎児胃腸細胞の混合物の細胞表面を抗ACT36-27_5D1で細胞染色したところ、胃癌細胞株 (GCIY、MKN1)、前立腺癌細胞株 (PC3)、膀胱癌細胞株 (T2

4) で反応性が見られた (図3)。実施例5で用いた各種癌細胞株の細胞表面と細胞内部を染色したところ、染色強度は変わるものの、胃癌細胞株 (GCIY、MKN1)、前立腺癌細胞株 (PC3)、膀胱癌細胞株 (T24) で反応性が見られた (図4)。このことから、これらの癌細胞には、PODXL2が発現しており、ACT36-27_5D1抗体がそれに反応していると考えられた。

[実施例7] 抗ACT36-27_5D1モノクローナル抗体の癌細胞の増殖に対する効果 (MTT)

ACT36-27_5D1抗体の癌細胞の増殖に与える影響について、MTTアッセイを用いて解析した。各種癌細胞の培地には、前立腺癌細胞株AsPC1については非働化処理した10%FBS (Equitech、以降同じ) と1%P/Sを含むRPMI1640培地 (WAKO) を、それ以外の癌細胞については非働化処理した10%FBSおよび1%P/S溶液を含むDMEM培地 (SIGMA) を用いた。対象抗体を産生するハイブリドーマ用培地には、必要量のHT (Sigma-Aldrich H0137、HT media supplement (50X) Hybri-Max)、15%FBS、1%P/S溶液を含むRPMI培地 (Wako) を用いた。

[0075] また、対照として、Mouse IgG1 (BECKMAN COULTER 731581)、IgG2a (MBL M076-3)、IgG2b (MBL M077-3)、IgG3 (MBL M078-3) を各1 μ lずつ、1mlのハイブリドーマ用培地に溶かしたマウスアイソタイプ対照混合液を用いた。

[0076] 各実験は、抗体培養上清1試験あたり3ウェルずつ行った。各種癌細胞を、1ウェルあたり、100 μ l培地中で 2×10^3 個ずつ、96ウェルプレート (IWAKI) に播種し、5%CO₂条件にて37°Cで24時間インキュベートした。

[0077] インキュベート後の96ウェルプレートに、ACT36-27_5D1抗体を含む培養上清あるいはマウスアイソタイプ対照を1ウェルあたり100 μ lずつ添加し、72時間インキュベートした。遠心により培養上清を除去して得たそれぞれの細胞に対して、新鮮な癌細胞用の培地に溶かして調整した5%WST-1溶液 (vol./vol., Roche 11 644 807 001) 100 μ lを加え、1~4時間インキュベートし、1時間おきにマイクロプレートリーダー (BIO-RAD) にて、WST-1の発色を測定した。

。

[0078] グラフ化した測定結果を図5に示す。このデータでは3時間後のWST-1の発色をO. D. 値 (O. D. 450nm-O. D. 630nm) で示した。MTTアッセイにおいて、ACT36-27_5D1抗体の癌細胞増殖抑制効果は、GCIY細胞において顕著に現れ、アイソタイプ対照に比べ、細胞の増殖を約28%にまで抑えた。

[実施例 8] マウス担癌モデルに対する尾静脈投与による抗体の効果

ACT36-27_5D1抗体の *in vivo*における効果についてマウス担癌モデルを用いて検討した。

[0079] 6週齢雄のSCIDマウス（日本クレア株式会社より5週齢で購入）の頸背部皮下に、GCIY細胞が 5×10^6 個/0.2ml saline/マウス個体となるように、細胞懸濁液を移植した。移植後3週間目に生着した腫瘍の大きさを計測し、各群の平均腫瘍体積がおよそ $55 \pm 5 \text{mm}^3$ となるように、担癌マウスを対照群、陽性対照群、抗ACT36-27_5D1抗体群の3群に分け、1群を5匹とした。

[0080] 各群それぞれへのサンプル投与は、細胞移植後3週間目から担癌マウスの尾静脈に対して行った。対照群に生理食塩水（大塚生食注）を、陽性対照群にTaxotere（マウス個体あたり $600 \mu\text{g}$ 、サノフィ・アベンティス株式会社）を、抗体投与群に抗ACT36-27_5D1モノクローナル抗体（ 10mg/kg ）を、それぞれ週に1回（3週間連続で合計3回）尾静脈より投与した。また毎回の投与直前には体重計測および腫瘍計測を行った。体重計測は動物天秤を使用し、腫瘍計測はデジマチックキャリパーにて長径および短径を計測し、次式により腫瘍体積を求めた。

$$\text{腫瘍体積} (\text{mm}^3) = 0.5 \times \text{長径} \times \text{短径} \times \text{短径}$$

腫瘍体積データを対照群と比較して、経時的な抗腫瘍効果を検討した。その結果を図6に示す。

[0081] 対照群では経時的に腫瘍は増大し、投与開始3週間後の実験終了時では、開始時の約25倍の腫瘍体積であった。これに対して、Taxotereを投与した群で

は投与開始後2週間目から腫瘍増殖抑制が観察され、実験終了となる3週間目では、実験開始時の約11倍程度に留まり、対照群に対する約59%の腫瘍体積抑制が観察された。また、ACT36-27_5D1抗体を投与した群では投与開始後1週間目より、対照群に対して腫瘍増殖抑制効果が観察された。その腫瘍増殖抑制効果は実験終了時ではさらに増強しており、腫瘍体積は投与開始時の約10倍程度に留まり、対照群の腫瘍体積を約61%抑制した。

[0082] 各サンプルの投与開始から3週間後、剖検を行った。担癌マウスをエーテル麻酔致死後、頸背部皮下より腫瘍を摘出してその重量を計測し、各群の腫瘍重量を比較した。その結果を図7に示す。摘出腫瘍重量はそれぞれ、対照群1.33g、陽性対照群0.87g、ACT36-27_5D1抗体群0.61gであった。ACT36-27_5D1抗体を投与した群では、対照群と比較して、摘出腫瘍重量が約54%程度減少しており、陽性対照群よりも強い腫瘍増殖抑制効果が観察された。

[0083] 体重測定の結果を図8に示す。体重推移に関しては、陽性対照群では投与開始2週間後から体重減少が顕著に認められたが、ACT36-27_5D1抗体群では体重の減少は認められなかった。剖検時体重から腫瘍重量を差し引いた算出体重においても、陽性対照群の体重減少は明らかであるが、ACT36-27_5D1抗体群では体重の増加が観察された。

[実施例9] 抗体可変領域決定方法

ACT36-27_5D1抗体の可変領域の遺伝子配列を明らかにするため、ACT36-27_5D1抗体産生細胞ハイブリドーマ細胞 2×10^6 個をTrizol (invitrogen, #15596-026) 1mlに懸濁し5分放置し、クロロフォルムを $200 \mu\text{l}$ 添加して、15秒間懸濁後、 $12,000 \times g$ で15分間遠心し、上清を得た。この上清と $500 \mu\text{l}$ のイソプロパノールを混合した後、 $12,000 \times g$ で10分間遠心した。得られたペレットを80%エタノールで洗浄し、全RNA $40 \mu\text{g}$ を得た。その全量を $20 \mu\text{l}$ の水で溶かした。そのうち、全RNA $5 \mu\text{g}$ 分の溶液を使用して、SuperScript™ Choice System (invitrogen, #18090-019) を用いて、全RNAから2本鎖cDNAを作製した。得られた2本鎖cDNAをエタノール沈殿後、LigationHigh (TOYOBO, #LGK-201) を用

いて2本鎖cDNAの5'末端と3'末端を結合させ、そのうち1 μ lを鋳型としてPCRを行った。プライマーとしては、重鎖と軽鎖の定常領域に対して設計したものを使用した。プライマーの配列は、次の通りである。

重鎖5' gtccacgaggtgctgcacaat (配列番号: 18)

重鎖3' gtcactggctcagggaaataacc (配列番号: 19)

軽鎖5' aagatggatacagttggtgc (配列番号: 20)

軽鎖3' tgtcaagagcttcaacagga (配列番号: 21)

PCR産物を1.5%ゲルにて電気泳動を行った後、切り出して精製を行った。精製したDNAを用いてシーケンスを行った。軽鎖については、精製したDNAをクローニングした後、シーケンスを行った。決定された軽鎖の可変領域の塩基配列を配列番号: 9に、アミノ酸配列を配列番号: 10に、重鎖の可変領域の塩基配列を配列番号: 11に、アミノ酸配列を配列番号: 12に示す。

[0084] また、これら可変領域のアミノ酸配列について、UCLの「Andrew C.R. Martin's Bioinformatics Group」のサイトにおける配列分析 (<http://www.bioinf.org.uk/abysis/tools/analyze.cgi>) を利用してナンバリングし、「Table of CDR Definitions」に記載の基準 (<http://www.bioinf.org.uk/abs/#kabatnum>) に従ってCDR領域を同定した。CDR予測の結果と軽鎖および重鎖のシグナル配列を図9に示す。また、軽鎖のCDR1、CDR2、CDR3のアミノ酸配列を配列番号:3~5に、重鎖のCDR1、CDR2、CDR3のアミノ酸配列を配列番号:6~8に示す。

[実施例10] エピトープ解析のための目的因子領域発現細胞の作製とエピトープ解析

ACT36-27_5D1抗体のエピトープを特定するために、数種の鎖長のPODXL2ペプチドを発現するBa/F3細胞を作製し、抗体との反応性を評価した。

[0085] PODXL2、膜外領域全長である1-428位（N末端からのアミノ酸の位置を示す。以下、同様）、1-420位、1-410位、1-400位…とC末端を10アミノ酸ずつ短くしたペプチドを1-300位まで計14種類作製し、解析対象のペプチドとした。実施例1に示すGC1Yシグナルシーケンストラップ法を実施したcDNAライブラリを鋳型として、下記配列のDNAをプライマーとして使用し、PrimeSTAR MAX DNA polymerase (TaKaRa #R045A) をポリメラーゼとして使用して、14種類の遺伝子の単離を行った。

フォワードプライマー（14種類の遺伝子共通）は、以下の通りである。

ccggaattcagaggcgcgacacgatgcg（配列番号：22）

リバースプライマー（Rに付加した数値は、増幅産物がコードするペプチドの鎖長を意味する）は以下の通りである。

R300: ttttccttttgoggcgcgagagaaggtgttttgggtatc（配列番号：23）

R310: ttttccttttgoggcgcgtgccagttactotcatgag（配列番号：24）

R320: ttttccttttgoggcgcgtgtgtotgtgtotcaacatc（配列番号：25）

R330: ttttccttttgoggcgcgtgtgaagttcaggacgagc（配列番号：26）

R340: ttttccttttgoggcgcggaagcgccttgacacag（配列番号：27）

R350: ttttccttttgoggcgcgtcggcatatcagtgagatc（配列番号：28）

R360: ttttccttttgoggcgcgttggcgggttgaaggtgg（配列番号：29）

R370: ttttccttttgoggcgcgaacagatgccagccgtatgc（配列番号：30）

R380: ttttccttttgoggcgcgttctttgacgaccacggtc（配列番号：31）

R390: ttttccttttgoggcgccttggcagggagcttagtg（配列番号：32）

R400: ttttccttttgoggcgcctttgtccttcagccgc（配列番号：33）

R410: ttttccttttgoggcgcgtcactgaccctgcctcc（配列番号：34）

R420: ttttccttttgoggcgcctcgggtggccctgggtccc（配列番号：35）

R428: ttttccttttgoggcgcgatgaggggcatgctgaagc（配列番号：36）

得られた各PCR産物を1%アガロースゲルにて電気泳動を行った後、切り出し精製を行い、EcoRIとNotIで制限酵素処理を行った。pMX-SSTもEcoRIとNotIで制限酵素処理を行い切り出し精製した。さらにそれぞれをLigationHigh(TOYOBO#LGK-201)にて処理し、その後、実施例2(大腸菌にトランスホメーション以降)と同様の処理を行い、50 μ gアンピシリン含有LBアガロースプレートに、トランスホメーションした大腸菌をプレーティングした。37°Cで1晩培養して得られたコロニーからインサート部分を含有するようにPCRを行い、希望する配列を含んだpMX-SSTベクターであるかにつき、シーケンスにて確認した。シーケンス用PCRプライマーとしては、次のオリゴヌクレオチドを用いた。

SST3' -T7 5' -TAATACGACTCACTATAGGGCGCGCAGCTGTAAACGGTAG-3' (配列番号: 37)

SST5' -T3 5' -ATTAACCCTCACTAAAGGGAGGGGGTGGACCATCCTCTA-3' (配列番号: 38)

その後、実施例1(4)(ウイルスパッケージング以降)と同様の方法で、各種鎖長のPODXL2遺伝子配列を含むBa/F3細胞を作製した。さらに、実施例4と同様の手法で、各種鎖長のPODXL2分子を発現するBa/F3細胞とACT36-27_5D1抗体との反応性をフローサイトメーターにて解析した(図10)。その結果、ACT36-27_5D1抗体は、PODXL2分子の1-400位あるいはそれ以下まで発現させたクローンに対しては反応性を示さず、1-410位、1-420位、1-428位の間の領域を発現するクローンに対して反応性を示した。以上から、PODXL2分子の400-428位の間に抗体のエピトープが含まれることが明らかとなった。

[比較例1]

実施例3に記載の方法で、抗PODXL2抗体を産生する、ACT36-27_5D1以外の4つのクローン「ACT36-27_7G11K」、「ACT36-27_2C12E1B」、「ACT36-27_3D10

B]、「ACT36-27_7E2B」を得た。産生抗体のアイソタイプは、「ACT36-27_7G11K」と「ACT36-27_2G12E1B」はIgG2a/ κ 、「ACT36-27_3D10B」と「ACT36-27_7E2B」はIgG1/ κ であった。これらクローンが産生するモノクローナル抗体について、実施例7に記載の方法によりMTTアッセイを行ったところ、いずれも癌細胞の増殖抑制効果が見られなかった。また、実施例10に記載の方法によりエピトープ解析を行ったところ、いずれも1-310位の間のアミノ酸配列にエピトープが含まれることが明らかとなった。

[0086] このようにPODXL2の1-310位の間のアミノ酸配列を認識する抗体がいずれも癌細胞の増殖抑制効果を示さず、一方、400-428位の間のアミノ酸配列を認識するACT36-27_5D1抗体が、*in vitro*および*in vivo*において優れた癌細胞の増殖抑制効果を示したことから、抗PODXL2抗体が癌細胞の増殖抑制効果を示すためには、1-310位以外（311位-428位の間）のアミノ酸配列、特に、400-428位の間のアミノ酸配列を認識することが好ましいと考えられた。

産業上の利用可能性

[0087] 本発明のモノクローナル抗体は、優れた抗癌活性を有するため、癌の治療または予防に用いることができる。特に、胃癌に対しては、強い細胞増殖抑制効果を示すと共に、対象の体重減少抑制効果をも示す。本発明のモノクローナル抗体は、非常に悪性度の高く、これまで治療が困難とされてきたスキルス胃癌に対しても優れた効果を有すると考えられることから、医療上極めて有用である。また、本発明のモノクローナル抗体は、癌細胞の表面への結合性を有するため、癌の診断や癌細胞の検出・選別などへの応用も可能である。

請求の範囲

- [請求項1] ヒト由来のPODXL2蛋白質に結合し、かつ、抗癌活性を有する抗体。
- [請求項2] ヒト由来のPODXL2蛋白質の細胞外領域に結合する、請求項1に記載の抗体。
- [請求項3] 癌が胃癌である、請求項1に記載の抗体。
- [請求項4] 配列番号：3から5に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、配列番号：6から8に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を保持する、請求項1に記載の抗体。
- [請求項5] 請求項4に記載の抗体における配列番号：3から8に記載のアミノ酸配列の少なくともいずれかにおいて、1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および／または挿入されており、かつ、請求項4に記載の抗体と同等の活性を有する抗体。
- [請求項6] 請求項4に記載の抗体における配列番号：3から8に記載のアミノ酸配列の少なくともいずれかにおいて、1若しくは複数のアミノ酸が保存的に置換されており、かつ、請求項4に記載の抗体と同等の活性を有する抗体。
- [請求項7] 配列番号：10に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、配列番号：12に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を保持する、請求項1に記載の抗体。
- [請求項8] 請求項7に記載の抗体における配列番号：10および12に記載のアミノ酸配列の少なくともいずれかにおいて、1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および／または挿入されており、かつ、請求項7に記載の抗体と同等の活性を有する抗体。
- [請求項9] 請求項7に記載の抗体における配列番号：10および12に記載のアミノ酸配列の少なくともいずれかにおいて、1若しくは複数のアミノ酸が保存的に置換されており、かつ、請求項7に記載の抗体と同等の活性を有する抗体。
- [請求項10] 請求項7に記載の抗体における配列番号：10および12に記載の

アミノ酸配列の少なくともいずれかにおいてシグナル配列が除去されており、かつ、請求項 7 に記載の抗体と同等の活性を有する抗体。

[請求項11] ヒト由来のPODXL2蛋白質における、請求項 7 に記載の抗体のエピトープに結合し、かつ、抗癌活性を有する抗体。

[請求項12] 配列番号：3 から 5 に記載のアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の抗体の軽鎖またはその可変領域からなるペプチド。

[請求項13] 配列番号：10 に記載のアミノ酸配列または該アミノ酸配列からシグナル配列が除去されたアミノ酸配列を含む、請求項 12 に記載のペプチド。

[請求項14] 配列番号：6 から 8 に記載のアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の抗体の重鎖またはその可変領域からなるペプチド。

[請求項15] 配列番号：12 に記載のアミノ酸配列または該アミノ酸配列からシグナル配列が除去されたアミノ酸配列を含む、請求項 14 に記載のペプチド。

[請求項16] 請求項 1 から 10 のいずれかに記載の抗体または請求項 12 から 15 のいずれかに記載のペプチドをコードするDNA。

[請求項17] 請求項 1 から 10 のいずれかに記載の抗体を産生する、または、請求項 16 に記載のDNAを含む、ハイブリドーマ。

[請求項18] 請求項 17 に記載のハイブリドーマにより産生された抗体。

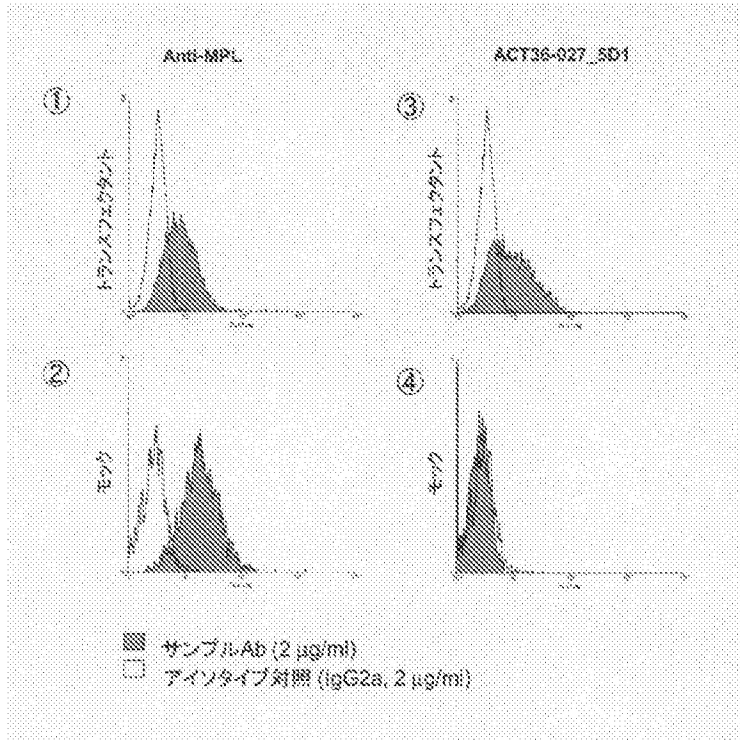
[請求項19] 請求項 1 から 10 のいずれかに記載の抗体を有効成分とする、抗癌剤。

[請求項20] 癌が胃癌である、請求項 19 に記載の抗癌剤。

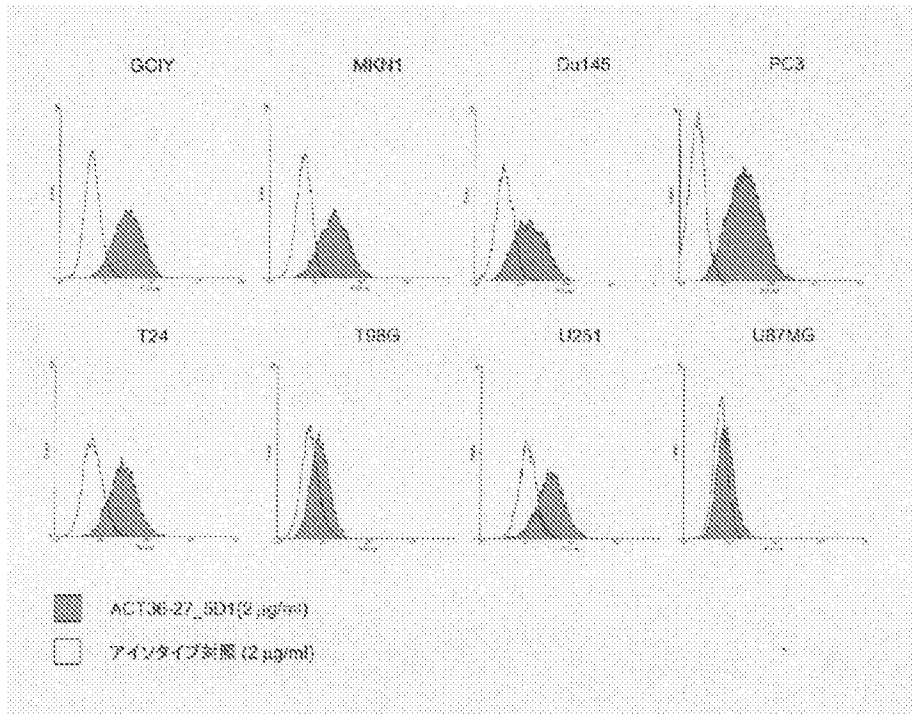
[請求項21] ヒト由来のPODXL2蛋白質またはその一部を含む、癌ワクチン組成物。

[請求項22] 癌が胃癌である、請求項 21 に記載の癌ワクチン組成物。

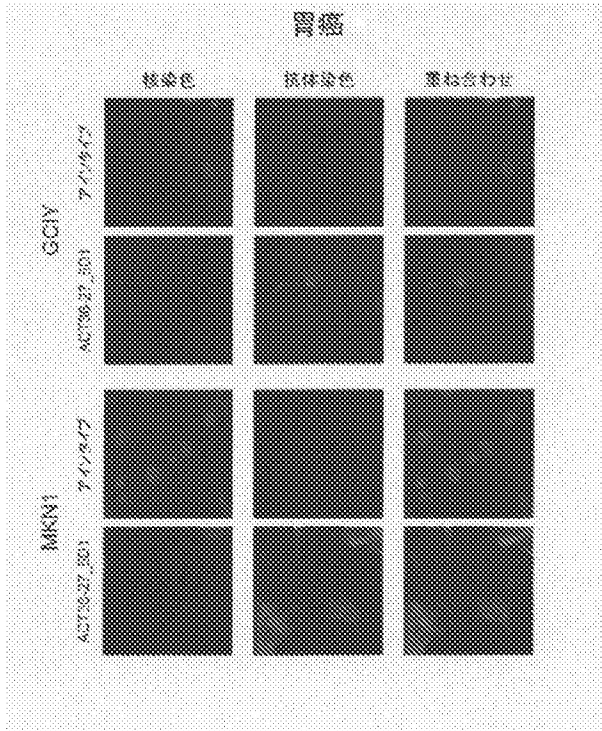
[図1]



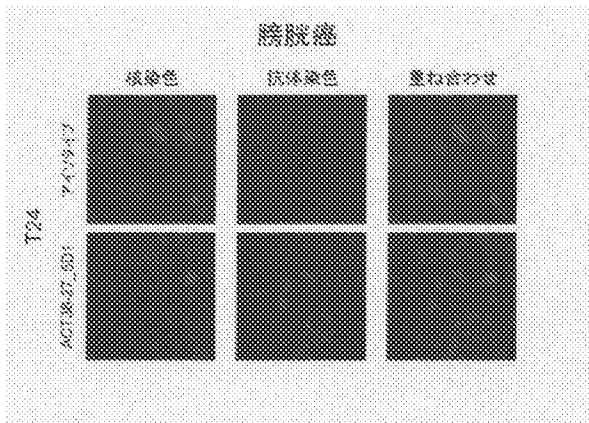
[図2]



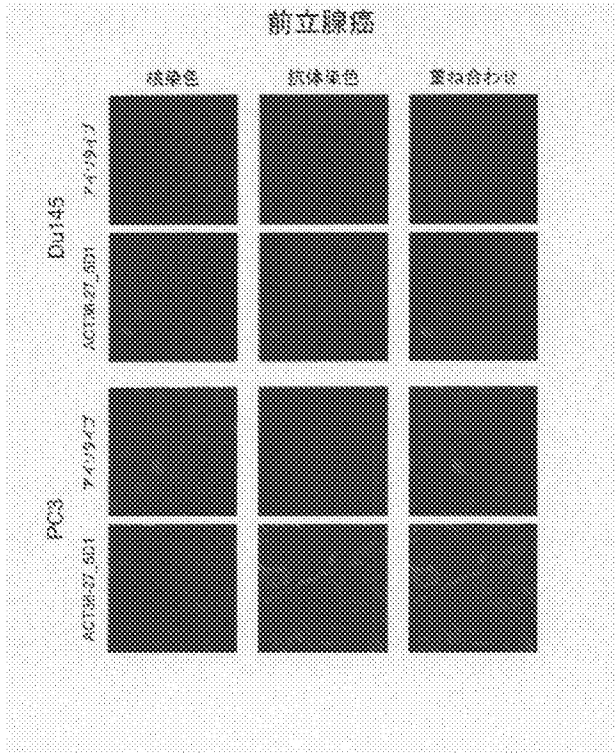
[図3A]



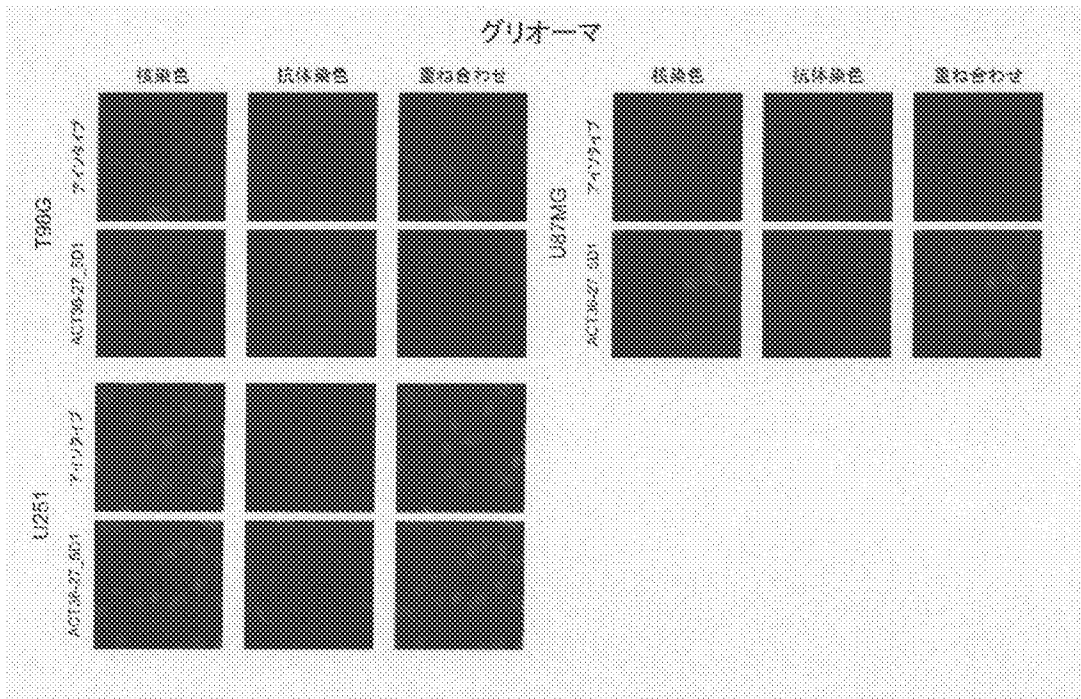
[図3B]



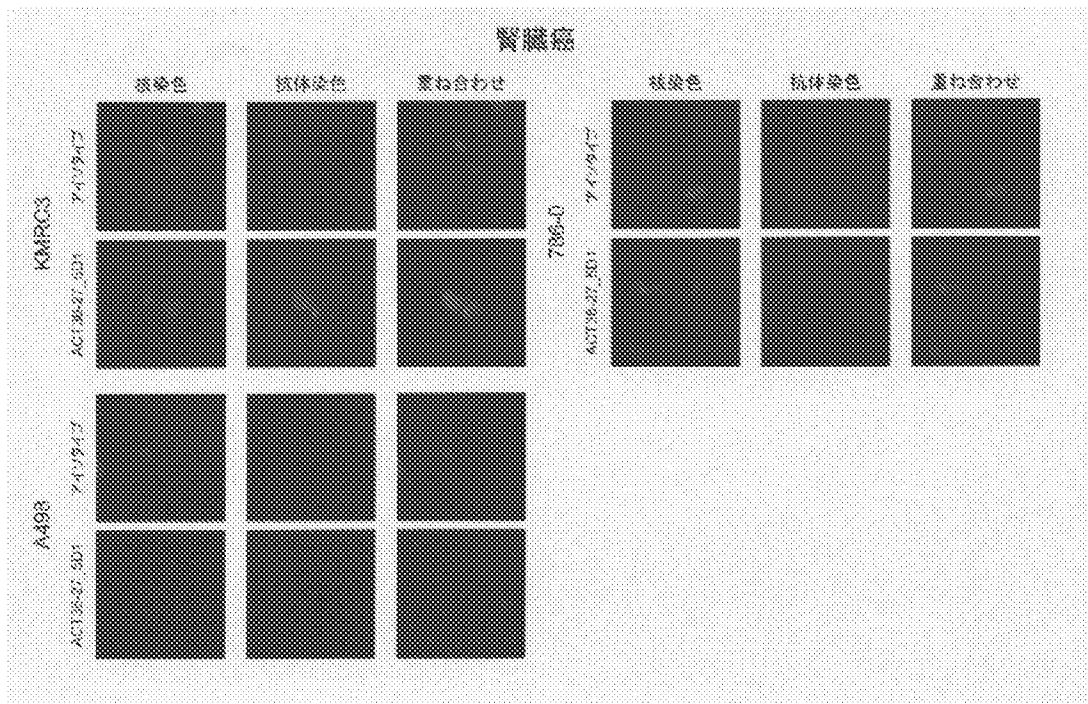
[図3C]



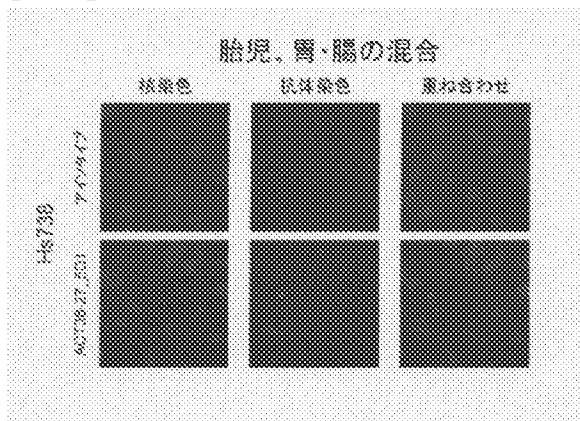
[図3D]



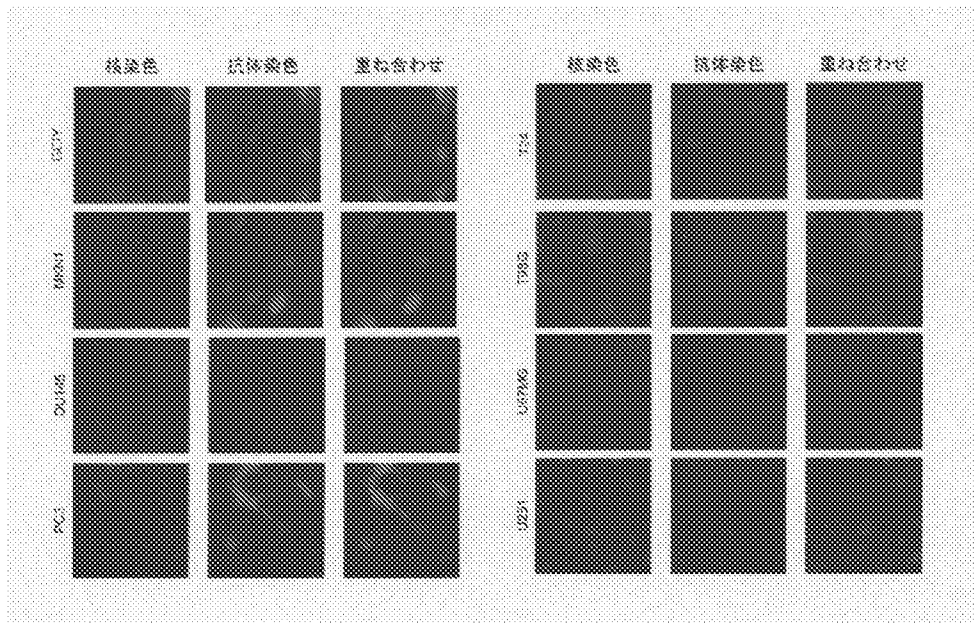
[図3E]



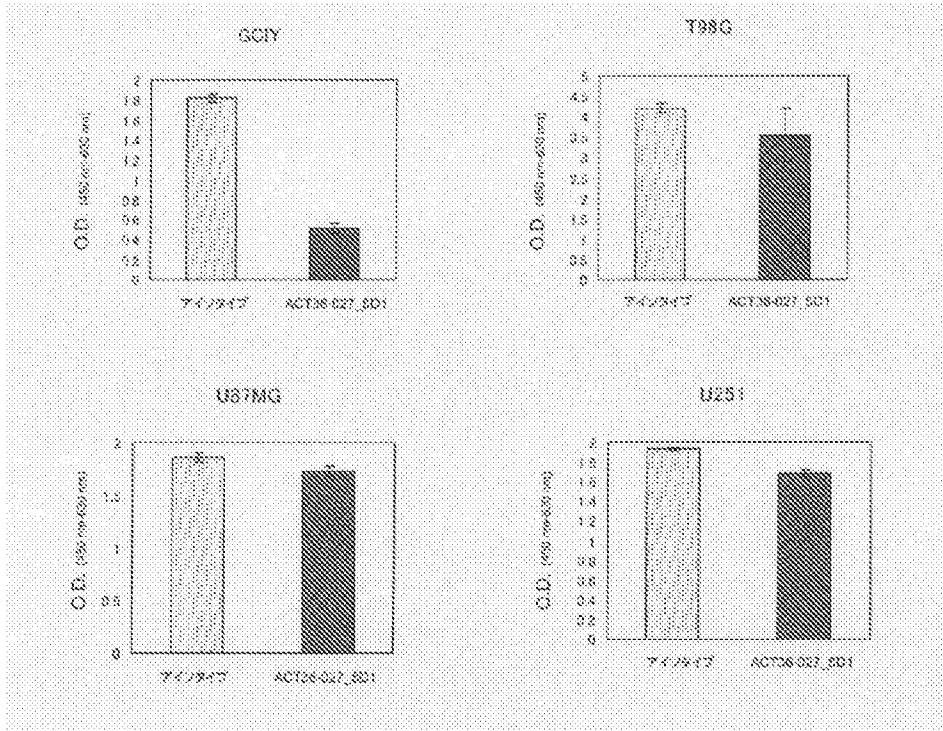
[図3F]



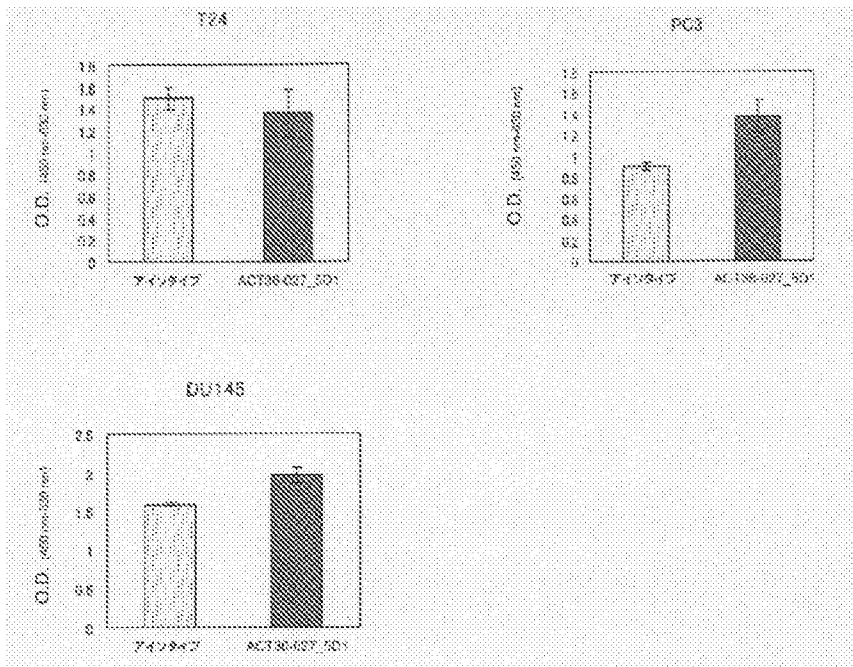
[図4]



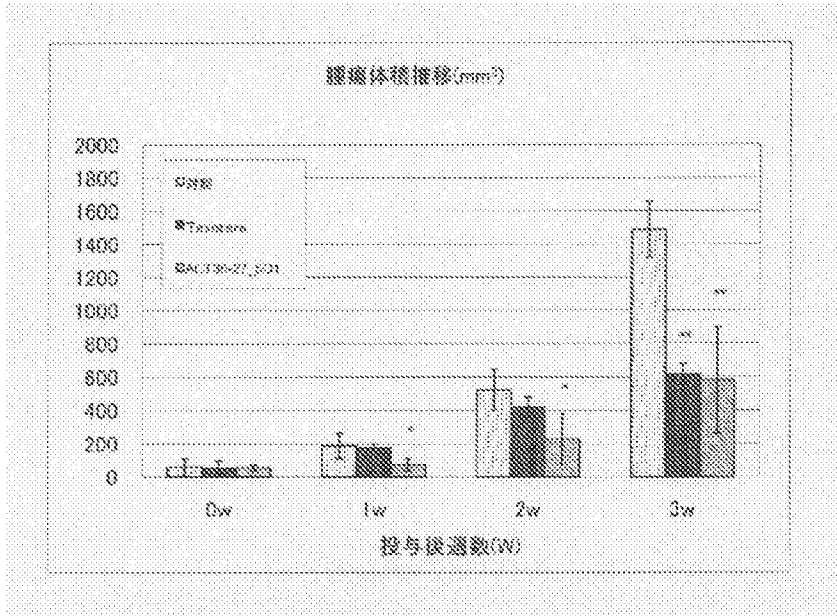
[図5A]



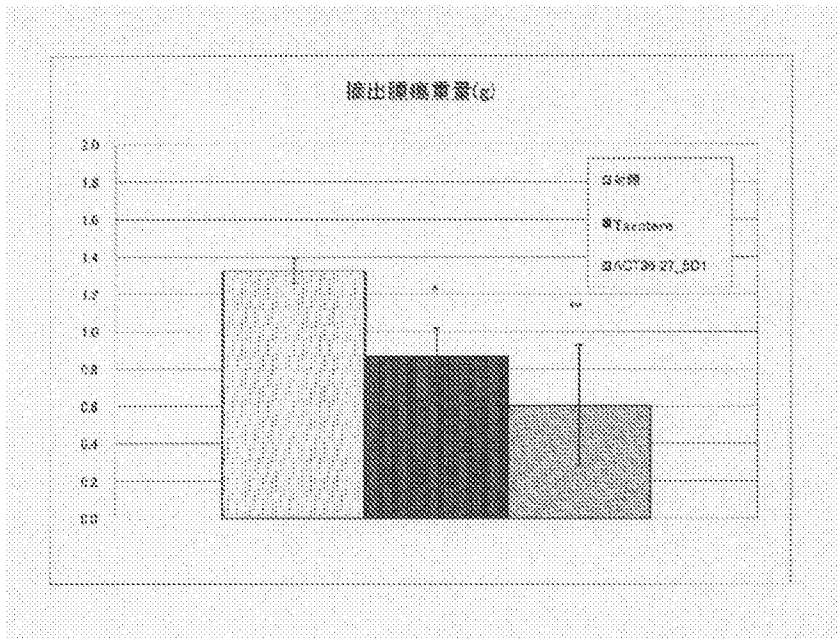
[図5B]



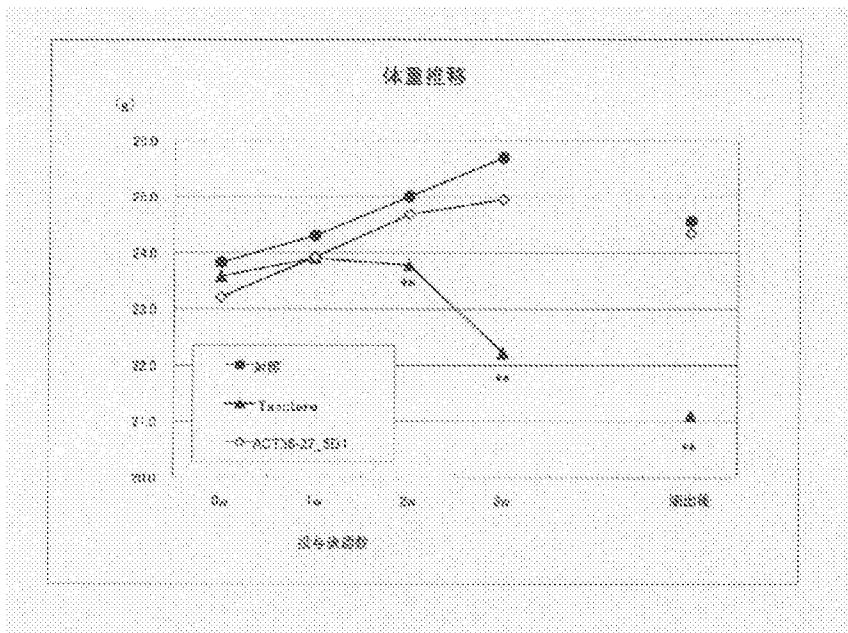
[图6]



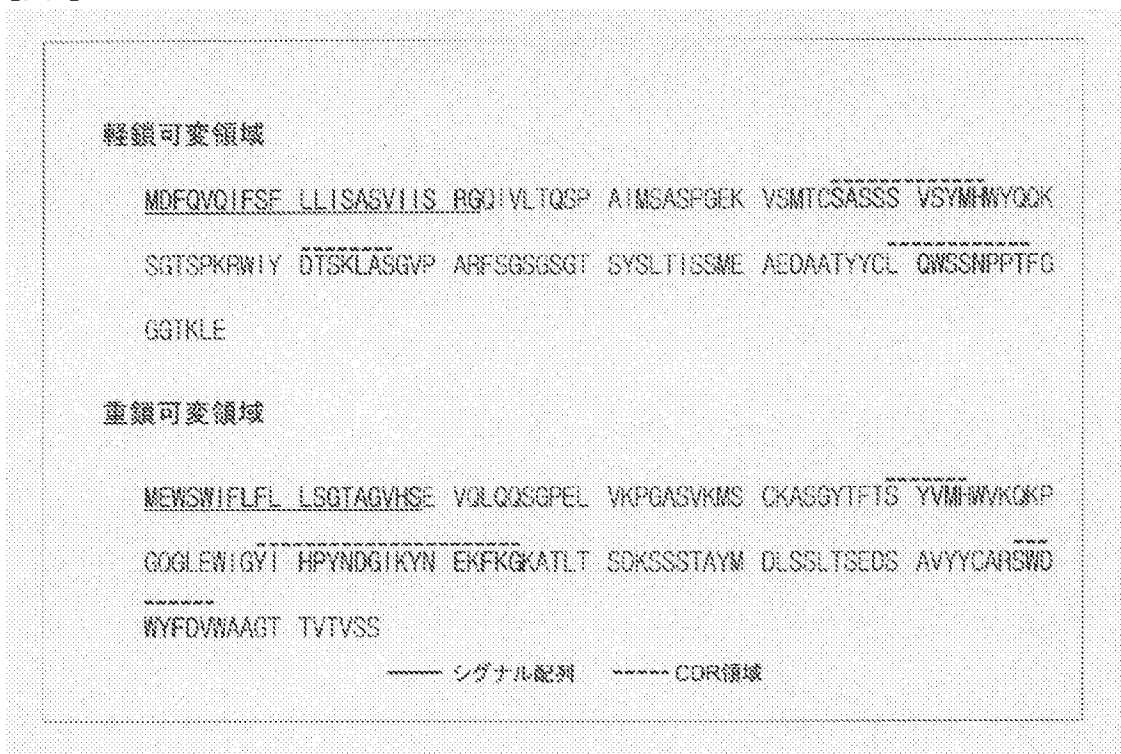
[图7]



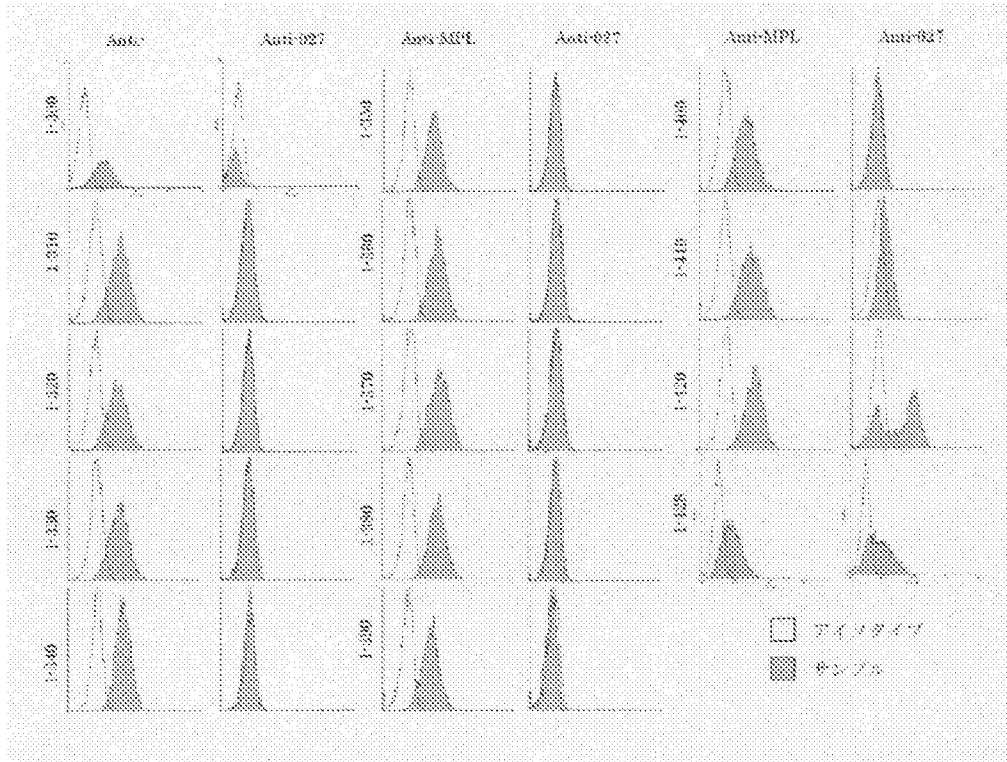
[図8]



[図9]



[図10]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/061526

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K16/30(2006.01)i, A61K39/00(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P1/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)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)

C07K16/30, A61K39/00, A61K39/395, A61P1/00, A61P35/00, C12N5/10, C12N15/09

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2010
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2010	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2010

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPlus/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), UniProt/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	Heng Liang TAN, et al., mAb 84, a Cytotoxic Antibody that Kills Undifferentiated Human Embryonic Stem Cells via Oncosis, STEM CELLS, 2009.08, Vol.27, p.1792-1801, entire text	1, 2, 17, 18
<u>X</u> Y	WO 2007/102787 A1 (AGENCY FOR SCIENCE, TECHNOLOGY & RESEARCH), 13 September 2007 (13.09.2007), particularly, example 1; page 31, lines 1 to 11 & JP 2009-528838 A & EP 1994144 A & CA 2644856 A & CN 101454441 A	<u>1, 2, 17, 18</u> 3-16, 19-22

 Further documents are listed in the continuation of Box C. 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
23 August, 2010 (23.08.10)Date of mailing of the international search report
31 August, 2010 (31.08.10)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/061526

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<p>X Y</p>	<p>Andre B. CHOO, et al., Selection Against Undifferentiated Human Embryonic Stem Cells by a Cytotoxic Antibody Recognizing Podocalyxin-Like Protein-1, STEM CELLS, 2008, Vol.26, p.1454-1463, particularly, page 1455, Generation of Monoclonal Antibodies, page 1456, Characterization of Cytotoxic Antibody mAb84, page 1461, left part, 20th to 7th lines from the bottom</p>	<p><u>1, 2, 17, 18</u> 3-16, 19-22</p>
<p>Y</p>	<p>US 2006/0294607 A1 (APPLERA CORP.), 28 December 2006 (28.12.2006), particularly, paragraphs [0005] to [0025], [0261] to [0297], [0311] to [0317] (Family: none)</p>	<p>3-16, 19-22</p>
<p>A</p>	<p>David B. KERSHAW, et al., Molecular Cloning and Characterization of Human Podocalyxin-like Protein, THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 1997, Vol.272, No.25, p.15708-15714</p>	<p>1-22</p>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/061526

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.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

- 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:

The inventions in claims 1 - 22 have no same or corresponding special technical feature on account of the following reason.
The technical feature of the inventions in claim 1 - 20 is relevant to "an antibody which is combined with a human-derived PODXL2 protein and has an anti-cancer activity".
On the other hand, the special technical feature of the inventions in claims 21, 22 is relevant to "a cancer vaccine composition containing a human-derived PODXL2 protein or a part thereof".

- 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.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C07K16/30(2006.01)i, A61K39/00(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P1/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C07K16/30, A61K39/00, A61K39/395, A61P1/00, A61P35/00, C12N5/10, C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2010年
日本国実用新案登録公報	1996-2010年
日本国登録実用新案公報	1994-2010年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPlus/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), UniProt/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
P, X	Heng Liang TAN, et al., mAb 84, a Cytotoxic Antibody that Kills Undifferentiated Human Embryonic Stem Cells via Oncosis, STEM CELLS, 2009.08, Vol.27, p.1792-1801, 全文参照	1, 2, 17, 18
X -	WO 2007/102787 A1 (AGENCY FOR SCIENCE, TECHNOLOGY & RESEARCH) 2007.09.13, 特に、実施例1、第31頁第1-11行参照 & JP	1, 2, 17, 18 -
Y	2009-528838 A & EP 1994144 A & CA 2644856 A & CN 101454441 A	3-16, 19-22

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

23.08.2010

国際調査報告の発送日

31.08.2010

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
 郵便番号100-8915
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

北村 悠美子

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

4N

4501

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X -	Andre B. CHOO, et al., Selection Against Undifferentiated Human Embryonic Stem Cells by a Cytotoxic Antibody Recognizing Podocalyxin-Like Protein-1, STEM CELLS, 2008, Vol.26, p.1454-1463, 特に、第1455頁 Generation of Monoclonal Antibodies の項、第1456頁 Characterization of Cytotoxic Antibody mAb84 の項、第1461頁左段下段から第7-20行参照	1, 2, 17, 18 -
Y	US 2006/0294607 A1 (APPLERA CORPORATION) 2006.12.28, 特に、段落 0005-0025, 0261-0297, 0311-0317 参照 (ファミリーなし)	3-16, 19-22
Y	US 2006/0294607 A1 (APPLERA CORPORATION) 2006.12.28, 特に、段落 0005-0025, 0261-0297, 0311-0317 参照 (ファミリーなし)	3-16, 19-22
A	David B. KERSHAW, et al., Molecular Cloning and Characterization of Human Podocalyxin-like Protein, THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 1997, Vol.272, No.25, p.15708-15714	1-22

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求項 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

2. 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

請求項1-22に係る発明は、以下の理由により、同一の又は対応する特別な技術的特徴を有さない。

請求項1-20に係る発明の技術的特徴は、「ヒト由来のPODXL2蛋白質に結合し、かつ、抗癌活性を有する抗体」である。

一方、請求項21、22に係る発明の特別な技術的特徴は、「ヒト由来のPODXL2蛋白質またはその一部を含む、癌ワクチン組成物」である。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。