明　細　書

発明の名称 ：

抗ＣＤＨ３ヒト化抗体、その薬剤コンジュゲート、及びそれらの使用

技術分野

[0001] 本発明は、抗ＣＤＨ３ヒト化抗体、及びその免疫複合体、特にはその薬剤コンジュゲートに関する。さらに本発明は、抗ＣＤＨ３ヒト化抗体及びその免疫複合体の使用方法に関する。

背景技術

[0002] 癌は、死亡原因の上位を占める重要な疾患であるが、その治療ニーズはいまだ満たされていない。近年、従来の化学療法の正常細胞にもダメージを与えるという問題点を解決するために、癌細胞に特異的に発現する特定の分子を標的として薬剤を設計し治療を行う分子標的薬による癌治療が盛んに研究されている。

[0003] その標的のひとつとして細胞膜表面抗原であるＣＤＨ３（Ｐ－カドヘリン）が同定された。ＣＤＨ３はカルシウム依存的に同種親和性の細胞接着に関与する分子として発見された膜タンパク質である（Ｙｏｓｈｉｄａ　ａｎｄ　Ｔａｋｅｉｃｈｉ，　Ｃｅｌｌ　２８：２１７－２２４，１９８２（非特許文献１））。相互にホモロジーが高い約１１０アミノ酸残基からなるカドヘリンリピートを持つタンパク質はカドヘリンスーパーファミリーと呼ばれ、ＣＤＨ３はその主要メンバーに属する。

[0004] ある種の癌細胞においてはＣＤＨ３の発現上昇例が報告されており、正常組織と比較して癌組織でのＣＤＨ３の発現が高い癌細胞に対して抗体を用いた癌治療が検討されている（ＷＯ２００２／０９７３９５号公報（特許文献１）、ＷＯ２００７／１０２５２５号公報（特許文献２）、特表２０１１－５２６５８３（特許文献４）、ＷＯ２０１１／０８０７９６　Ａ１（特許文献５））。

[0005] このように特定の抗原を標的とした分子標的薬は、抗体医薬としてすでに

多くが実際に上市されており、その多くは抗体依存性細胞傷害活性（ＡＤＣＣ、Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ Ｃｅｌｌｕｌａｒ Ｃｙｔｏｔｏｘｉｃｉｔｙ）を主な作用機序としている。しかしながら、その薬効は必ずしも十分なものではなく、より強力な抗癌作用を目指した技術開発も同時に進められている。

[0006] 抗体の抗癌作用を増強する有効な手段の一つとして、抗体と強力な毒性を有する物質（毒素）との連結があげられる。毒素はそれ単独で患者に投与すると正常組織にも障害を及ぼし、有効な治療手段とはなり得ない。しかしながら、癌細胞特異的な抗原と結合する抗体と毒素を連結することにより、正常な組織に悪影響を及ぼさず、癌細胞のみ殺傷しえる能力を持つに至る。こうした薬剤は抗体薬物コンジュゲート（ＡＤＣ、 Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｄｒｕｇ Ｃｏｎｊｕｇａｔｅ）と呼ばれる。即ち、毒素は抗体と結合した状態では何ら毒性を示さない。しかし、ある種の抗体は標的とする抗原を発現する細胞に結合するとその細胞内に取り込まれ、リソソームにて分解される。したがって、毒素を結合したその種の抗体が細胞内に取り込まれた後、細胞内で分解される事で毒素が放出され、特定の細胞内部においてのみ毒性が発現し、その効果により細胞は殺傷される。

[0007] ＡＤＣに用いられる薬剤成分には、ジフテリア毒素などの細菌性タンパク質毒素、リシンなどの植物タンパク質毒素、アウリスタチン、メイタンシノイド、カリケアマイシンなどの低分子毒素及びその誘導体が含まれる。

[0008] ＡＤＣにおいて、抗体に結合している薬剤は血液中を循環し、標的とする腫瘍に集積した後に薬効をしめす。腫瘍部位以外での薬剤の放出（抗体からの離脱）は、副作用を生じる危険性があるため必ずしも好ましくはない。つまり、抗体に結合している薬剤は細胞内に取り込まれた後に抗体から離脱する設計が好ましい。

[0009] 近年ジェネンテック社はこのような観点から、乳癌治療薬としてすでに上市されているトラスツズマブに非開裂型リンカー（ＳＭＣＣ）を介して毒素を結合した薬剤（開発名：Ｔ－ＤＭ１）を開発し、非常に高い臨床効果を得

ている（Ｎ．Ｅｎｇｌ．Ｊ．Ｍｅｄ．　２０１２　Ｎｏｖ　８；３６７（１９）：１７８３－９１（非特許文献２））。また、開裂性リンカーを介して薬剤成分と連結した抗体薬剤コンジュゲートも開発され、例えばＮＣＡＭ抗原を発現する疾患を対象に、開裂型リンカー（ＳＰＰ）を介して薬剤とＨｕＮ９０１抗体を結合させた抗体薬剤コンジュゲートの開発がＩｍｍｕｎｏＧｅｎ社により進められている。

[0010] また、抗体に放射性物質を結合させ治療に供するような放射性免疫療法薬も開発され、キメラ化抗ＣＤ２０抗体に放射性物質９０Ｙ（イットリウム）あるいは１１１Ｉｎ（インジウム）を結合させた薬剤として、ゼヴァリン（一般名：イブリツモマブチウキセタン）が上市されている。

[0011] なお、当該抗体を薬剤コンジュゲートなどとして用いる時、特に患者への投与期間が長期に及ぶ場合、異種免疫グロブリンに対する抗体（例えばヒト抗マウス抗体、　ＨＡＭＡ）、などを生じさせる可能性がある投与抗体自身の免疫原性は、最小限度あるいは全く無いことが望ましく、そのような抗体を利用して薬剤コンジュゲートを作出することは有益である。

[0012] このような抗体を得る手段として、例えばマウス等の異種生物に由来して取得された抗体の相補性決定領域（ＣＤＲ、　Ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔａｒｉｔｙ　ｄｅｔｅｒｍｉｎｉｎｇ　ｒｅｇｉｏｎ）とヒトに由来した抗体のフレームワーク領域（ＦＲ、　Ｆｒａｍｅｗｏｒｋ　Ｒｅｇｉｏｎ）をつなぎ合わせて作出されるヒト化抗体技術が、当業者では常套的に用いられる（特開２００５－０００１６９（特許文献１２）、及び特許第４８３６１４７号（特許文献１３））。しかし、ＣＤＲと組み合わされるＦＲが適切でない場合、親和性の消失、安定性の低下といった望ましくない結果となることもしばしば見られる。こうした事象に対応するため、その設計に移植元となった抗体に由来するアミノ酸残基をフレームワーク領域の該当する位置のアミノ酸残基と置換するｒｅｓｈａｐｅと呼ばれる方法も試みられ、適切な置換を行なう事が出来れば、ヒト化によって生じうる親和性低下の改善が図られることもある（Ｎａｔｕｒｅ；３３２，ｐ３２３（１９８８）（非特許文献３

）、及び米国特許６１８０３７０号（特許文献３））。

[0013] このように、当該ヒト化抗体のマウス等の異種生物に由来したＣＤＲ配列とヒトに由来したＦＲ配列は、それぞれその元となったアミノ酸配列と１００％同一であることは好ましいが、ヒト化、キメラ化の過程で抗原との結合を維持を目的としたアミノ酸残基置換は常套的に試みられる。ＣＤＨ３との結合性を維持し、その免疫原性を極端に上げない範囲で、親和性維持を目的に遺伝子工学的な改変を加えることもまた好ましく、ヒト化により組み合わされたＣＤＲ及びＦＲから成る元配列に対する配列相同性の程度は、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％以上、または１００％同一である。このような配列の一部改変した抗体は、ＣＤＨ３の特定のエピトープと特異的に結合性するという意味において、もとのハイブリドーマに由来したＣＤＲの性質をそのまま維持した抗体と考えられる。

[0014] このようにして得られたヒト化抗体を用いることでその免疫原性を最小限に留め、更にＡＤＣのような強力な細胞傷害性を有する免疫複合体として疾患の治療に供することは、その薬剤投与を受ける患者にとって明確な利益となりえる。また当分野では、肺がん、大腸がん、乳癌といった様々な癌を治療するための更なる薬剤に対する需要がある。この目的のために特に有用な薬剤に、有意に毒性が低いが有益な治療的有効性がある抗ＣＤＨ３ヒト化抗体薬剤コンジュゲートが含まれる。

先行技術文献

特許文献

[0015] 特許文献1：ＷＯ２００２／０９７３９５号公報

特許文献2：ＷＯ２００７／１０２５２５号公報

特許文献3：米国特許６１８０３７０号

特許文献4：特表２０１１－５２６５８３

特許文献5：ＷＯ２０１１／０８０７９６　Ａ１

特許文献6：ＷＯ２０１３／１５０６２３

特許文献7：ＥＰ２３９４００号公報

特許文献8：国際公開ＷＯ９６／０２５７６号公報

特許文献9：特表２００８－５１６８９６号公報

特許文献10：米国特許第５，２０８，０２０号

特許文献11：米国特許第６，３３３，４１０Ｂ１号

特許文献12：特開２００５－０００１６９

特許文献13：特許第４８３６１４７号

非特許文献

[0016] 非特許文献1：Ｙｏｓｈｉｄａ ａｎｄ Ｔａｋｅｉｃｈｉ，Ｃｅｌｌ ２８：２１７－２２４，１９８２

非特許文献2：Ｎ．Ｅｎｇｌ．Ｊ．Ｍｅｄ．２０１２ Ｎｏｖ ８；３６７（１９）：１７８３－９１

非特許文献3：Ｎａｔｕｒｅ；３３２，ｐ３２３（１９８８）

非特許文献4：Ｓｏｍａｔ．Ｃｅｌｌ．Ｍｏｌ．Ｇｅｎｅｔ．；１２，ｐ５５５５（１９８６）

非特許文献5：Ｎａｔｕｒｅ；２７６，ｐ２６９（１９７８）

非特許文献6：Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．；６８（２２），ｐ９２８０（２００８）

非特許文献7：Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ；２６（８），ｐ９２５（２００８）

非特許文献8：Ｂｉｏ Ｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ；１９，ｐ１６７３（２００８）

非特許文献9：Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．；６８（１５），ｐ６３００（２００８）

非特許文献10：Ａｎａｌｙｔｉｃａｌ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｙ；１７３，ｐ９３（１９８８）

非特許文献11：「Ｐｈａｇｅ Ｄｉｓｐｌａｙ －Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ－」 ＰＲＯＴＯＣＯＬ ９．５

非特許文献12：Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．；４９，ｐ４３９２（２００６）
非特許文献13：Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．；５２，ｐ１２７（１９９２）
非特許文献14：Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ；１６９，ｐ１１１９（２００２）
非特許文献15：Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ　ｏｆ　ｐｒｏｔｅｉｎｓ　ｏｆ　ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ　ｉｎｔｅｒｅｓｔ，　５ｔｈ　Ｅｄ．，　Ｐｕｂｌｉｃ　Ｈｅａｌｔｈ　Ｓｅｒｖｉｃｅ，　Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ　ｏｆ　Ｈｅａｌｔｈ，　Ｂｅｔｈｅｓｄａ，　ＭＤ　（１９９１）
非特許文献16：Ｊ．Ｍｏｌ　Ｂｉｏｌ．；１９６，ｐ９０１（１９８７）
非特許文献17：Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．；１５１，ｐ２２９６（１９９３）
非特許文献18：Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．；１９６：ｐ９０１（１９８７））
非特許文献19：Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ；９，ｐ２６６（１９９１）
非特許文献20：Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ；８９，ｐ４２８５（１９９２）
非特許文献21：Ｍｅｔｈｏｄｓ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．；５２５，ｐ４４５（２００９）

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0017] 本発明は、より免疫原性の少ない抗ＣＤＨ３ヒト化抗体を作出し、これを用いてＣＤＨ３を発現する癌細胞をより効率的に殺傷する抗ＣＤＨ３ヒト化抗体薬剤コンジュゲートを提供することを解決すべき課題とした。

課題を解決するための手段

[0018] 本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討した結果、ＣＤＨ３を特異的に認識する抗体から規定されるＣＤＲ配列と、種々のヒト由来ＦＲ配列とを組み合わせることによって、そして親和性を改善するために適切なアミノ酸変異を導入することによって、免疫原性の少ない抗ＣＤＨ３ヒト化抗体を作出し、これを用いてＣＤＨ３を発現する癌細胞をより効率的に殺傷する

抗ＣＤＨ３ヒト化抗体薬剤コンジュゲートを作出することに成功し、本発明を完成するに至った。

[0019] 本発明によれば、受託番号ＮＩＴＥ　ＢＰ－１５３６を有する細胞が産生する抗体（以下、このマウス抗体を抗体番号：ＰＰＡＴ－０７６－４４Ｍとする）の重鎖可変領域由来の相補性決定領域配列（以下、ＣＤＲ－Ｈ１、Ｈ２、Ｈ３）及び軽鎖可変領域由来の相補性決定領域配列（以下、ＣＤＲ－Ｌ１、Ｌ２、Ｌ３）を含み、かつフレームワーク領域配列が重鎖可変領域が重鎖ヒトサブグループＩＩＩコンセンサスフレームワーク配列であり、軽鎖可変領域が軽鎖ヒトκサブグループＩコンセンサスフレームワーク配列を含有してなる抗ＣＤＨ３ヒト化抗体が提供される。

[0020] 本発明によればさらに、ＣＤＲ－Ｈ１、Ｈ２、Ｈ３が、それぞれ配列番号５６、配列番号５７、及び配列番号５８であり、ＣＤＲ－Ｌ１、Ｌ２、Ｌ３がそれぞれ配列番号５９、配列番号６０、及び配列番号６１を含み、かつフレームワーク領域配列が重鎖可変領域が重鎖ヒトサブグループＩＩＩコンセンサスフレームワーク配列であり、軽鎖可変領域が軽鎖ヒトκサブグループＩコンセンサスフレームワーク配列を含有してなる抗ＣＤＨ３ヒト化抗体が提供される。

[0021] 本発明によればさらに、受託番号ＮＩＴＥ　ＢＰ－１５３６を有する細胞が産生する抗体の重鎖可変領域由来の相補性決定領域配列（ＣＤＲ－Ｈ１、Ｈ２、Ｈ３）及び軽鎖可変領域由来の相補性決定領域配列（ＣＤＲ－Ｌ１、Ｌ２、Ｌ３）を含み、かつフレームワーク領域配列が最適なアライメントのもとで選択されたヒトの生殖系列に由来する配列を含有してなる抗ＣＤＨ３ヒト化抗体が提供される。

[0022] 本発明によればさらに、ＣＤＲ－Ｈ１、Ｈ２、Ｈ３がそれぞれ配列番号５６、配列番号５７、及び配列番号５８であり、ＣＤＲ－Ｌ１、Ｌ２、Ｌ３がそれぞれ配列番号５９、配列番号６０、及び配列番号６１を含み、かつフレームワーク領域配列が最適なアライメントのもとで選択されたヒトの生殖系列に由来する配列を含有してなる抗ＣＤＨ３ヒト化抗体が提供される。

[0023] 本発明によればさらに、上記の抗ＣＤＨ３ヒト化抗体との配列相同性が少なくとも９０％以上であり、かつＣＤＨ３を認識できる抗ＣＤＨ３ヒト化抗体が提供される。

[0024] 本発明によればさらに、上記した抗体のフレームワーク領域部分における１から数個のアミノ酸が他のアミノ酸に置換しており、かつＣＤＨ３を認識できる、抗ＣＤＨ３ヒト化抗体が提供される。

[0025] 本発明によればさらに、上記した抗体の相補性決定領域配列のうちフレームワーク領域との境界における１から数個のアミノ酸が他のアミノ酸に置換しており、かつＣＤＨ３を認識できる抗ＣＤＨ３ヒト化抗体が提供される。

[0026] 好ましくは、置換されるアミノ酸が軽鎖可変領域におけるＫａｂａｔナンバリングによる５５位のアミノ酸である。

好ましくは、置換されるアミノ酸が重鎖可変領域におけるＫａｂａｔナンバリングによる４９位、７１位、あるいは７８位から１つ以上が選ばれるアミノ酸である。

[0027] 好ましくは、軽鎖可変領域におけるＫａｂａｔナンバリングによる５５位のアミノ酸がアラニンに置換している。

好ましくは、重鎖可変領域におけるＫａｂａｔナンバリングによる７１位のアミノ酸がリジンに置換している。

好ましくは、重鎖可変領域におけるＫａｂａｔナンバリングによる７８位のアミノ酸がバリンに置換している。

好ましくは、重鎖可変領域におけるＫａｂａｔナンバリングによる４９位のアミノ酸がアラニンに置換している。

[0028] 好ましくは、上記抗体は、重鎖可変領域におけるＫａｂａｔナンバリングによる４９位のアミノ酸残基のアラニンへの置換、７１位のアミノ酸残基のリジンへの置換、７８位のアミノ酸残基のバリンへの置換、及び軽鎖可変領域におけるＫａｂａｔナンバリングによる５５位のアミノ酸残基のアラニンへの置換から選択される１以上の置換を有する。

[0029] 本発明によれば、以下の何れかの抗体が提供される。

（１）重鎖可変領域に配列番号４８に記載のアミノ酸配列を有し、軽鎖可変領域に配列番号４９に記載のアミノ酸配列を有する、抗ＣＤＨ３ヒト化抗体；（抗体番号：ＰＰＡＴ－０７６－４４Ｈａ）

（２）重鎖可変領域に配列番号５０に記載のアミノ酸配列を有し、軽鎖可変領域に配列番号５１に記載のアミノ酸配列を有する、抗ＣＤＨ３ヒト化抗体；（抗体番号：ＰＰＡＴ－０７６－４４Ｈｂ）

（３）重鎖可変領域に配列番号５２に記載のアミノ酸配列を有し、軽鎖可変領域に配列番号５３に記載のアミノ酸配列を有する、抗ＣＤＨ３ヒト化抗体；（抗体番号：ＰＰＡＴ－０７６－４４Ｈｃ）

（４）重鎖可変領域に配列番号５４に記載のアミノ酸配列を有し、軽鎖可変領域に配列番号５５に記載のアミノ酸配列を有する、抗ＣＤＨ３ヒト化抗体；（抗体番号：ＰＰＡＴ－０７６－４４Ｈｄ）

[0030] 好ましくは、本発明の抗体は、ＣＤＨ３との結合能を有する。

好ましくは、本発明の抗体は、Ｆａｂ，Ｆ（ａｂ′）$_2$、又はｓｃＦｖである。

[0031] 本発明によればさらに、ＣＤＨ３との結合能を有する、上記抗体の部分配列が提供される。

好ましくは、ＣＤＨ３がヒトＣＤＨ３である。

好ましくは、ＣＤＨ３が配列番号２の細胞外領域（配列番号２の１から６５４アミノ酸に相当する）である。

[0032] 本発明によればさらに、上記した抗ＣＤＨ３ヒト化抗体、その断片又はその部分配列と、化学療法剤又は放射性物質とが連結している、免疫複合体が提供される。

[0033] 好ましくは、化学療法剤が、細胞障害性物質である。

好ましくは、細胞傷害性物質が、メイタンシノイド又はその誘導体、あるいはアウリスタチン又はその誘導体である。

好ましくは、細胞傷害性物質が、ＤＭ１、ＤＭ３又はＤＭ４から選択されるメイタンシノイド又はその誘導体、あるいはＭＭＡＥあるいはＭＭＡＦか

ら選択されるアウリスタチン又はその誘導体である。

好ましくは、抗ＣＤＨ３ヒト化抗体、その断片又はその部分配列１分子あたり平均１～７個のＤＭ１が結合している。この平均薬剤結合個数は抗体親和性に影響を及ぼさない。

[0034] 好ましくは、抗ＣＤＨ３ヒト化抗体、その断片又はその部分配列と、化学療法剤とがリンカーを介して連結している。

好ましくは、抗ＣＤＨ３ヒト化抗体、その断片又はその部分配列と、化学療法剤とが、抗体のＦｃ領域の分子内ジスルフィド結合を介して連結しているか、又は抗体のＦｃ領域を遺伝子工学的に改変して連結している。

好ましくは、リンカーが、２価反応性架橋試薬である。

[0035] 好ましくは、リンカーが、Ｎ－スクシンイミジル４－（マレイミドメチル）シクロヘキサンカルボキシレート（ＳＭＣＣ）、スルホスクシイミジル－４－（Ｎ－マレイミドメチル）－シクロヘキサン－１－カルボキシレート（Ｓｕｌｆｏ－ＳＭＣＣ）、Ｎ－スクシンイミジル－４－（Ｎ－マレイミドメチル）－シクロヘキサン－１－カルボキシ－（６－アミドカプロエート）（ＬＣ－ＳＭＣＣ）、κ－マレイミドウンデカン酸Ｎ－スクシンイミジルエステル（ＫＭＵＡ）、γ－マレイミド酪酸Ｎ－スクシンイミジルエステル（ＧＭＢＳ）、ε－マレイミドカプロン酸Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル（ＥＭＣＳ）、ｍ－マレイミドベンゾイル－Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル（ＭＢＳ）、Ｎ－（α－マレイミドアセトキシ）－スクシンイミドエステル（ＡＭＡＳ）、スクシンイミジル－６－（β－マレイミドプロピオンアミド）ヘキサノエート（ＳＭＰＨ）、Ｎ－スクシンイミジル４－（ｐ－マレイミドフェニル）－ブチレート（ＳＭＰＢ）、Ｎ－（ｐ－マレイミドフェニル）イソシアネート（ＰＭＰＩ）、Ｎ－スクシンイミジル４（２－ピリジルチオ）ペンタノエート（ＳＰＰ）、Ｎ－スクシンイミジル（４－イオドアセチル）アミノ安息香酸エステル（ＳＩＡＢ）、６－マレイミドカプロイル（ＭＣ）、マレイミドプロパノイル（ＭＰ）、ｐ－アミノベンジルオキシカルボンイル（ＰＡＢ）、及びＮ－スクシンイミジル４（２－ピリジ

ルチオ）ブタノエート（ＳＰＤＢ）から成る群より選択される。

[0036] 好ましくは、リンカーがプロテアーゼによって切断される。

好ましくは、リンカーが、バリン－シトルリン（Ｖａｌ－Ｃｉｔ）、アラニン－フェニルアラニン（ａｌａ－ｐｈｅ）、及びパラアミノベンゾイック酸（ＰＡＢＡ）の少なくとも１以上を含む。

好ましくは、細胞傷害性能が抗体可変領域のフレームワーク領域配列のヒト化によって増強されている。

[0037] 本発明によればさらに、上記した免疫複合体を含む、ＣＤＨ３の過剰発現によって特徴づけられる疾患を治療するための医薬が提供される。

好ましくは、ＣＤＨ３の過剰発現によって特徴づけられる疾患が癌である。

好ましくは、癌は、結腸直腸癌、非小細胞肺癌、乳癌、頭頸部癌、卵巣癌、肺癌、浸潤性膀胱癌、膵臓癌、脳の転移性癌、甲状腺癌、頭頸部扁平上皮癌、食道扁平上皮癌、肺扁平上皮癌、皮膚扁平上皮癌、メラノーマ、乳腺癌、肺腺癌、子宮頸部扁平上皮癌、膵臓扁平上皮癌、結腸扁平上皮癌、又は胃扁平上皮癌、前立腺癌、骨肉腫又は軟組織肉腫から選択される。

好ましくは、本発明の医薬は、抗腫瘍剤として使用する。

[0038] 本発明によればさらに、上記した免疫複合体を患者に投与することを含む、ＣＤＨ３の過剰発現によって特徴づけられる疾患を治療する方法が提供される。

本発明によればさらに、ＣＤＨ３の過剰発現によって特徴づけられる疾患を治療するための医薬の製造のための、上記した免疫複合体の使用が提供される。

発明の効果

[0039] 抗ＣＤＨ３ヒト化抗体は、その元となる抗体と比較して免疫原性の低減が期待される。ヒト化抗体は、元となった抗体のＣＤＲ配列とヒト由来ＦＲ配列の適切な組み合わせにより構成される。もしこれが抗原との親和性を示さない時は、更に抗体可変領域へのアミノ酸変異を導入することで親和性回復

の試みもなされる。ＣＤＲ配列と適切なＦＲ配列との組み合わせ、及び必要に応じたアミノ酸変異導入により、ＣＤＨ３と特異的に結合する抗ＣＤＨ３ヒト化抗体が得られる。このようにして得られた本発明の抗ＣＤＨ３ヒト化抗体と化学療法剤とを連結して成る免疫複合体は、化学療法剤を結合しない抗体と比較して、ＣＤＨ３を発現する癌細胞に対して強力な細胞傷害活性を示す。更に本発明の抗ＣＤＨ３ヒト化抗体と化学療法剤とを連結して成る免疫複合体は、ＷＯ２０１３／１５０６２３（特許文献６）に記載されるような抗ＣＤＨ３キメラ化抗体に比して親和性も向上し、抗ＣＤＨ３キメラ化抗体と化学療法剤とを連結して成る免疫複合体と比較して、より強力な細胞傷害活性を示す。従って、ＣＤＨ３を発現する癌細胞を有する患者に本発明による免疫複合体を投与することによって、高い抗癌作用を発揮できるとともに、それ自身の免疫原性の低減も達成できる。本発明の免疫複合体は、抗癌剤として有用である。

図面の簡単な説明

[0040] [図1]図１は、ヒトＣＤＨ３強制発現細胞株と市販抗ヒトＣＤＨ３抗体を反応させたフローサイトメトリの結果を示す。Ａ：ＣＨＯ細胞、Ｂ：ＣＤＨ３強制発現ＣＨＯ細胞。Ｃ：肺がん由来細胞株ＮＣＩ－Ｈ３５８。ａ：抗ＣＤＨ３抗体０．０１ｕｇ／ｍＬ、ｂ：抗ＣＤＨ３抗体０．１ｕｇ／ｍＬ、ｃ：抗ＣＤＨ３抗体１ｕｇ／ｍＬ

[図2]図２は、取得抗体のフローサイトメトリ結果を示す。取得抗体群の典型的なフローサイトメトリ結果３例をＡ－Ｃに示す。Ａ：ＣＤＨ３強制発現ＣＨＯ細胞、Ｂ：ＣＨＯ細胞、Ｃ：肺がん由来細胞株ＮＣＩ－Ｈ３５８。ａ：抗ＣＤＨ３抗体０．０１ｕｇ／ｍＬ、ｂ：抗ＣＤＨ３抗体０．１ｕｇ／ｍＬ、ｃ：抗ＣＤＨ３抗体１ｕｇ／ｍＬ。Ｄには受託番号ＮＩＴＥ　ＢＰ－１５３６に由来するハイブリドーマから精製したマウス抗体（ＰＰＡＴ－０７６－４４Ｍ）のフローサイトメトリ結果を示す。Ｄの各図右側ピークは、アイソタイプ一致抗体を用いた陰性対照を示し、左側ピークはＰＰＡＴ－０７６－４４Ｍを１０ｕｇ／ｍＬで測定した結果を示す。

[図3]図３は、各種腫瘍組織のＣＤＨ３のｍＲＮＡの発現結果を示す。Ａ：正常組織、Ｂ：各種癌組織、Ｃ：膵臓癌分化度

[図4]図４は、各種ヒト腫瘍組織でのＣＤＨ３の発現結果を示す。

[図5]図５は、各ＣＤＨ３抗体を反応させたフローサイトメトリの結果を示す。使用細胞株はＡ：肺がん由来細胞株ＮＣＩ－Ｈ３５８、Ｂ：ＣＨＯ細胞、Ｃ：ＣＤＨ３強制発現ＣＨＯ細胞。各図左側のピークが陰性対照を示す。

[図6]図６は、ＤＭ１ＳＭｅの構造を示す。

[図7]図７は、ＣＤＨ３抗体薬剤コンジュゲートの細胞傷害性試験結果を示す。Ａ：ＮＣＩ－Ｈ３５８細胞株、抗体薬剤コンジュゲート（ＰＰＡＴ－０７６－４４Ｈｂ、ＰＰＡＴ－０７６－４４Ｈｄに薬剤結合）、Ｂ：ＨＣＣ１９５４細胞株、抗体薬剤コンジュゲート（ＰＰＡＴ－０７６－４４Ｈｄに薬剤結合）、Ｃ：ＨＣＣ７０細胞株、抗体薬剤コンジュゲート（ＰＰＡＴ－０７６－４４Ｈｄに薬剤結合）、Ｄ：表１に示した細胞株、抗体コンジュゲート（ＰＰＡＴ－０７６－４４Ｈｄに薬剤結合）。

[図8]図８は、ＣＤＨ３抗体薬剤コンジュゲート（ＰＰＡＴ－０７６－４４Ｈｂ、及びＰＰＡＴ－０７６－４４Ｈｄに薬剤結合）を用いた動物試験結果（ＨＣＣ１９５４乳がんモデル）を示す。

[図9]図９は、ＣＤＨ３ヒト化抗体薬剤コンジュゲート（ＰＰＡＴ－０７６－４４Ｈｂに薬剤結合）を用いた動物試験結果（ＨＣＣ７０乳がんモデル）による用量依存性、及びキメラ化抗体薬剤コンジュゲート（ＰＰＡＴ－０７６－４４Ｃに薬剤結合）との比較結果を示す。

[図10]図１０は、ＣＤＨ３ヒト化抗体薬剤コンジュゲート（ＰＰＡＴ－０７６－４４Ｈｄに薬剤結合）を用いた動物試験結果（ＨＣＣ７０乳がんモデル）による用量依存性、及びキメラ化抗体薬剤コンジュゲート（ＰＰＡＴ－０７６－４４Ｃに薬剤結合）との比較結果を示す。

[図11]図１１は、ＣＤＨ３ヒト化抗体薬剤コンジュゲート（ＰＰＡＴ－０７６－４４Ｈｄに薬剤結合）を用いた動物試験結果（ＯＫａ－Ｃ－１肺がんモデル）を示す。

[図12]図１２は、ＣＤＨ３Ｎ末部分長タンパク質の発現結果を示す。Ａ：ＣＢＢ染色（右側レーンが発現産物。左側レーンは分子量マーカー）。Ｂ：ウェスタンブロット（Ｍ：サイズマーカー、１：市販ＣＤＨ３抗体（ＢＤ　ＢＩＯＳＣＩＥＮＣＥ社）、２：市販ＣＤＨ３抗体（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ社）、３：抗体無し）。

[図13]図１３は、ＣＤＨ３Ｎ末部分長タンパク質を固相としたＥＬＩＳＡの測定結果を示す。

[図14]図１４は、ＰＰＡＴ－０７６－４４Ｈｄ（ヒト化抗体）と、その親抗体であるＰＰＡＴ－０７６－４４Ｍ（マウス抗体）、及びＰＰＡＴ－０７６－４４Ｃ（キメラ化抗体）の親和性比較結果を示す。

[図15]図１５は、平均薬剤結合数（ＤＡＲ）の異なるＣＤＨ３抗体薬剤コンジュゲートと薬剤を結合していない抗体との相対的な親和性を示す。Ａ：ＰＰＡＴ－０７６－４４Ｈｂ、Ｂ：ＰＰＡＴ－０７６－４４Ｈｄ。

[図16]図１６は、動物試験で用いたマウス担癌モデルの担癌腫瘍組織部分のＣＤＨ３発現を示す。Ａ：ＨＣＣ１９５４、Ｂ：ＨＣＣ７０、Ｃ：Ｏｋａ－Ｃ－１。

発明を実施するための形態

[0041] 以下、本発明について更に詳細に説明する。

本発明は、抗ＣＤＨ３ヒト化抗体及びその使用方法に関する。本発明の抗ＣＤＨ３ヒト化抗体は、ＣＤＨ３を特異的に認識する抗体から規定されるＣＤＲ配列と種々の適切なヒト由来ＦＲ配列を組み合わせることにより提供され、更には親和性を改善するために適切なアミノ酸変異を導入することにより提供される。一態様では、本発明の抗体は細胞表面に発現されるＣＤＨ３に結合する。一態様では、本発明の抗体はＣＤＨ３領域内のエピトープに結合する。好ましくは、本発明の抗体は、ヒト細胞表面に発現されるＣＤＨ３に結合し、特に好ましくは癌細胞表面に発現されるＣＤＨ３に結合する。一態様では、本発明の抗体は、Ｆａｂ、Ｆａｂ’－ＳＨ、Ｆｖ、ｓｃＦｖ又は（Ｆａｂ’）$_2$断片から選択されるヒト化抗体断片でもよい。このような抗体

は、例えば各種リンカーを介して効率的に化学療法剤と結合することによって、抗体薬剤コンジュゲートとして用いることができる。また本発明の抗体は、任意のスペーサー配列を介して毒素と結合することもできる。即ち、本発明によれば、癌細胞を効率的に殺傷する抗ＣＤＨ３ヒト化抗体薬剤コンジュゲートが提供される。

[0042] 本発明の抗体を作成するための抗原としては、ＣＤＨ３又はその部分ペプチドを用いることができる。一例としては、ＣＤＨ３細胞外領域（配列番号２の１から６５４アミノ酸に相当する）に相当する可溶型ＣＤＨ３タンパク質などを用いることができるが、これに限定されるものではない。

[0043] 本発明の抗体は、ヒト化モノクローナル抗体である。ヒト化モノクローナル抗体を取得するための材料として、本発明ではマウスへの免疫を経てハイブリドーマを取得する。このような材料は当該分野で周知な種々の方法で取得することができる。例えば以下に記載する方法でも得ることが出来るが、これに限定されるものではない。

[0044] ＣＤＨ３特異的に結合する抗体を産生するハイブリドーマ樹立のためには、先ずＣＤＨ３又はその部分ペプチドを抗原としてマウスに投与する。１匹当たりの投与量は、アジュバントを用いないときは０．１～１００ｍｇであり、アジュバントを用いるときは１～１００μｇである。アジュバントとしては、フロイント完全アジュバント（ＦＣＡ）、フロイント不完全アジュバント（ＦＩＡ）、水酸化アルミニウムアジュバント等が挙げられる。免疫は、主として静脈内、皮下、腹腔内に注入することにより行われる。また、免疫の間隔は特に限定されず、数日から数週間間隔、好ましくは２～５週間間隔で、１～１０回、好ましくは２～５回免疫を行う。そして、最終の免疫日から１～６０日後、好ましくは１～１４日後に抗体産生細胞を採集する。抗体産生細胞としては、脾臓細胞、リンパ節細胞、末梢血細胞等が挙げられるが、脾臓細胞又は局所リンパ節細胞が好ましい。

[0045] ハイブリドーマを得るため、抗体産生細胞とミエローマ細胞との細胞融合を行う。ミエローマ細胞は、ＨＡＴ培地等への薬剤選択性を有し一般に入手

可能なマウス由来の株化細胞を使用することができる。例えば　Ｐ３Ｘ６３－Ａｇ．８．Ｕ１（Ｐ３Ｕ１）、ＮＳ－１などが挙げられる。

[0046] 細胞融合は、血清を含まないＤＭＥＭ、ＲＰＭＩ－１６４０培地などの動物細胞培養用培地中で、１×１０^{6}～１×１０^{7}個／ｍＬの抗体産生細胞と２×１０^{5}～２×１０^{6}個／ｍＬのミエローマ細胞とを混合し、細胞融合促進剤存在のもとで融合反応を行うことができる。細胞融合促進剤として、平均分子量１０００～６０００ダルトンのポリエチレングリコール等を使用することができる。また、電気刺激を利用した市販の細胞融合装置を用いて抗体産生細胞とミエローマ細胞とを融合させることもできる。

[0047] ハイブリドーマは、選択培地の培養操作により得ることができる。細胞懸濁液を例えばウシ胎児血清含有ＲＰＭＩ－１６４０培地などで適当に希釈後、マイクロタイタープレート上に３×１０^{5}個／ｗｅｌｌ程度まき、各ウェルに選択培地を加え、以後適当に選択培地を交換して培養を行う。その結果、選択培地で培養開始後、１４日前後から生育してくる細胞をハイブリドーマとして得ることができる。

[0048] 次に、増殖してきたハイブリドーマの培養上清中に、目的とする抗体が存在するか否かをスクリーニングする。ハイブリドーマのスクリーニングは、通常の方法に従えばよく、特に限定されるものではない。例えば、ハイブリドーマとして生育したウェルに含まれる培養上清の一部を採集し、酵素免疫測定法、放射性免疫測定法等によって、ＣＤＨ３と結合する抗体を産生するハイブリドーマをスクリーニングすることができる。融合細胞のクローニングは、限界希釈法等により行い、最終的にモノクローナル抗体産生細胞であるハイブリドーマを樹立することができる。

[0049] 樹立したハイブリドーマを材料とすれば、これに由来した抗体のヒト化は既知の方法で達成することができる。具体的には、マウス抗体のＣＤＲとヒト抗体のフレームワーク領域（ＦＲ）を連結するように設計したＤＮＡ配列を、末端部にオーバーラップする部分を有するように作製した数個のオリゴヌクレオチドからＰＣＲ法により合成する。得られたＤＮＡをヒト抗体定常

領域をコードするＤＮＡと連結し、次いで発現ベクターに組み込み、これを宿主に導入し産生させることにより得られる（ＥＰ２３９４００号公報（特許文献７）、国際公開ＷＯ９６／０２５７６号公報（特許文献８）など）。

[0050] 相補性決定領域（ＣＤＲ）配列は、抗体間の可変領域で特に相違が激しく、その抗体の特異性決定に極めて重要な役割を果たす配列領域を示す。この領域に属するアミノ酸残基は、抗原に対する結合性および特異性に直接的に関わる残基を多く含んでいると考えられ、軽鎖及び重鎖可変領域に各々３領域が存在する。

ＣＤＲはＫａｂａｔら（Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ ｉｎｔｅｒｅｓｔ, ５ｔｈ Ｅｄ., Ｐｕｂｌｉｃ Ｈｅａｌｔｈ Ｓｅｒｖｉｃｅ, Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ, Ｂｅｔｈｅｓｄａ, ＭＤ（１９９１）（非特許文献１５））によって配列比較により規定され、Ｃｈｏｔｈｉａら（Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．；１９６，ｐ９０１（１９８７）（非特許文献１６））により三次元構造によっても規定される。

[0051] Ｋａｂａｔが規定したＣＤＲは、一般的に軽鎖可変領域は残基２４－３４付近、残基５０－５６付近、残基８９－９７付近に位置し、重鎖可変領域では残基３１－３５付近、残基５０－６５付近、残基９５－１０２付近に位置するとされるが、この領域の全ての残基が抗原結合に直接関与するとは必ずしも限らず、三次元構造から規定されたＣＤＲ領域と完全に一致するという訳では無い。なお、本明細書中にアミノ酸の残基番号が表記される時の番号付与体系はＫａｂａｔのナンバリングに従っている。

[0052] 選択されるヒトＦＲ配列は、適時適切なものが選ばれる。本願明細書において、選択されたヒトＦＲ配列は、ヒトコンセンサスフレームワーク配列から得られる軽鎖可変領域あるいは重鎖可変領域を含有する配列である。

[0053] ヒトコンセンサスフレームワーク配列は、ヒト免疫グロブリン軽鎖あるいは重鎖可変領域において、最も共通して生じるアミノ酸残基を表すＦＲ配列である。通常、ヒト免疫グロブリン軽鎖あるいは重鎖可変領域配列は、可変

領域配列のサブグループから選別される。Ｋａｂａｔ等によると、軽鎖可変領域は軽鎖ヒトκサブグループＩであり、重鎖可変領域が重鎖ヒトサブグループＩＩＩである。

[0054] 一実施態様では、軽鎖ヒトκサブグループＩのコンセンサス配列は少なくとも以下の配列の一部あるいは全部が含まれ、ＦＲ－Ｌ１、ＦＲ－Ｌ２、ＦＲ－Ｌ３、ＦＲ－Ｌ４の各配列の一部あるいは全部にＣＤＲ配列が挟み込まれた形で構成される。

ＤＩＱＭＴＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＲＡＳＱ：配列番号６２（ＦＲ－Ｌ１）

ＷＹＱＱＫＰＧＫＡＰＫ：配列番号６３（ＦＲ－Ｌ２）

ＬＱＳＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＦＡＴＹＹＣ：配列番号６４（ＦＲ－Ｌ３）

ＦＧＱＧＴＫＶＥＩＫ：配列番号６５（ＦＲ－Ｌ４）

[0055] 一実施態様では、重鎖ヒトサブグループＩＩＩのコンセンサス配列は少なくとも以下の配列の一部あるいは全部が含まれ、ＦＲ－Ｈ１、ＦＲ－Ｈ２、ＦＲ－Ｈ３、ＦＲ－Ｈ４の各配列の一部あるいは全部にＣＤＲ配列が挟み込まれた形で構成される。

ＥＶＱＬＶＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＦ：配列番号６６（ＦＲ－Ｈ１）

ＷＶＲＱＡＰＧＫＧＬＥＷＶ：配列番号６７（ＦＲ－Ｈ２）

ＹＡＤＳＶＫＧＲＦＴＩＳＲＤＮＳＫＮＴＬＹＬＱＭＮＳＬＲＡＥＤＴＡＶＹＹＣ：配列番号６８（ＦＲ－Ｈ３）

ＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ：配列番号６９（ＦＲ－Ｈ４）

[0056] 以上のヒトコンセンサスフレームワーク配列は、各サブグループで最も高頻度に出現するアミノ酸残基により構成される。

[0057] また、本発明においては、最適なアライメントのもとで選択されたヒトの生殖系列に由来するフレームワーク配列を使用することもできる。これは、ヒトコンセンサスフレームワーク配列が抗体ヒト化において必ずしも適切で

ない場合も有り得ることに対応し、ベストフィット法として知られる。

[0058] 即ち、マウス抗体の可変領域配列を既知の公開されたヒト可変領域配列ライブラリーに対してスクリーニングする。その中で最も配列的に近似したヒト可変領域配列をヒト化抗体の生殖系列に由来したヒトフレームワーク配列として用いることができる（Ｓｉｍｓら，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．；１５１，ｐ２２９６（１９９３）（非特許文献１７）、Ｃｈｏｔｈｉａら，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．；１９６，ｐ９０１（１９８７）（非特許文献１８）、Ｔｅｍｐｅｓｔら．，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ；９，ｐ２６６（１９９１）（非特許文献１９））。

[0059] 最も配列的に近似した生殖系列配列は、そのようなライブラリーを多数登録したデータベースにおいて元抗体の配列に対するアライメント（例えば、ＩＭＧＴ／Ｖ－ＱＵＥＳＴ（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｉｍｇｔ．ｏｒｇ／ＩＭＧＴ＿ｖｑｕｅｓｔ／ｖｑｕｅｓｔ？ｌｉｖｒｅｔ＝０＆Ｏｐｔｉｏｎ＝ｈｕｍａｎｌｇ））を実施することで確かめることができる。

[0060] 一実施態様では、軽鎖生殖系列配列は少なくとも以下の配列の一部あるいは全部が含まれ、ＦＲ－Ｌ１、ＦＲ－Ｌ２、ＦＲ－Ｌ３、ＦＲ－Ｌ４の各配列の一部あるいは全部にＣＤＲ配列が挟み込まれた形で構成される。

ＤＩＱＬＴＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＲＡＳＱ：配列番号７２（ＦＲ－Ｌ１）

ＷＹＱＱＫＰＧＫＡＰＫ：配列番号７３（ＦＲ－Ｌ２）

ＬＥＳＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＦＡＴＹＹＣ：配列番号７４（ＦＲ－Ｌ３）

ＦＧＱＧＴＫＶＥＩＫ：配列番号７５（ＦＲ－Ｌ４）

[0061] 一実施態様では、重鎖生殖系列配列は少なくとも以下の配列の一部あるいは全部が含まれ、ＦＲ－Ｈ１、ＦＲ－Ｈ２、ＦＲ－Ｈ３、ＦＲ－Ｈ４の各配列の一部あるいは全部にＣＤＲ配列が挟み込まれた形で構成される。

ＱＶＱＬＶＥＳＧＧＧＶＶＱＰＧＲＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＦ：配列番号７６（ＦＲ－Ｈ１）

ＷＶＲＱＡＰＧＫＧＬＥＷＶ：配列番号７７（ＦＲ－Ｈ２）

ＹＡＤＳＶＫＧＲＦＴＩＳＲＤＮＳＫＮＴＬＹＬＱＭＮＳＬＲＡＥＤＴＡＶＹＹＣ：配列番号７８（ＦＲ－Ｈ３）

ＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ：配列番号７９（ＦＲ－Ｈ４）

[0062] 何れかの方法で選ばれたフレームワーク（ＦＲ）配列がヒト化に適当であるかどうかは、各抗体クローンＣＤＲ配列との組み合わせが適切であり、結合を目指す抗原に対して適切な立体構造を維持しえたか否かによって判断することができる。

[0063] もしＣＤＲ配列とヒトに由来したＦＲ領域を挟んで移植することで発現したヒト化抗体が、その配列選択が適切でない場合には親和性が低下することもしばしば起こりえる。これはＦＲ領域中に存在する残基も、その構造維持において重要な役割を果たすものが存在することを意味する。この事象に対応したアミノ酸残基置換を行うことができる。例えば、アライメントの結果、ヒト由来の配列と位置的に相同な場所に存在するマウス抗体由来のアミノ酸と同じ残基へと置換（ｒｅｓｈａｐｅ）することができる。これによりヒト化によって生じた親和性の低下を改善することができる場合がある。

[0064] 置換されるべきアミノ酸残基の位置は、対象とする抗体によって異なり、多くの場合、実際に発現させるまで特定されない。以下の実施例においては、比較的多くの文献（例えば、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ；８９，ｐ４２８５（１９９２）（非特許文献２０））において置換が実施される軽鎖可変領域の５５位、重鎖可変領域の４９位、７１位、及び７８位から選択される１以上の位置のアミノ酸残基を置換することによって、親和性低下に対する向上を図ることが意図されたが、その置換位置、組み合わせ及び置換後のアミノ酸残基の種類は任意であり、これに限定されるものではない。

[0065] 抗体を生産するための宿主は哺乳動物起源のものが多いが、当業者であれば、発現したい遺伝子産物に最も適する特定の宿主細胞系を適宜選択することができる。一般的な宿主細胞系としては、ＣＨＯ由来細胞株（チャイニー

ズハムスター卵巣細胞系）、ＣＶ１（サル腎臓系）、ＣＯＳ（ＳＶ４０Ｔ抗原をするＣＶ１の誘導体）、ＳＰ２／０（マウスミエローマ）、Ｐ３ｘ６３－Ａｇ３．６５３（マウスミエローマ）、２９３（ヒト腎臓）、及び２９３Ｔ（ＳＶ４０Ｔ抗原をする２９３の誘導体）などが挙げられるが、これらに限定されない。宿主細胞系は、各種メーカー、ｔｈｅ Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｉｓｓｕｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（ＡＴＣＣ）、または文献に記載の論文発表機関から入手することができる。

[0066] 宿主細胞系としては、好ましくはｄｇｆｒ遺伝子の発現欠損であるＣＨＯ由来細胞株又はＳＰ２／０を使用することができる（Ｕｒｌａｎｄ， Ｇ．ら、Ｓｏｍａｔ．Ｃｅｌｌ．Ｍｏｌ．Ｇｅｎｅｔ．；１２，ｐ５５５５（１９８６）（非特許文献４）、およびＳｃｈｕｌｍａｎ， Ｍ．ら、Ｎａｔｕｒｅ；２７６，ｐ２６９（１９７８）（非特許文献５））。最も好ましくは、宿主細胞系はＤＨＦＲ欠失ＣＨＯである。

[0067] 宿主細胞中へのプラスミドのトランスフェクションは、任意の技術を使って実施できる。具体的な方法としては、トランスフェクション（リン酸カルシウム法、ＤＥＡＥ法、リポフェクション、およびエレクトロポレーションを含む）、センダイウイルス等のエンベロープを利用してＤＮＡを導入する方法、マイクロインジェクション、およびレトロウイルスウイルスやアデノウイルス等のウイルスベクターを用いた感染が挙げられるが、これらに限定されるものではない（Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｃｈａｐｔｅｒ ９ Ｉｎｔｒｏｄｕｃｔｉｏｎ ｏｆ ＤＮＡ ｉｎｔｏ Ｍａｍｍａｌｉａｎ Ｃｅｌｌｓ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ａｎｄ Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．）。最も好ましいのは、エレクトロポレーションによる宿主中へのプラスミド導入である。

[0068] これらの抗体は、ＣＤＨ３を認識する限り、一価抗体、二価抗体、多価抗体のいずれでもよく、抗体断片（フラグメント）等の低分子化抗体や抗体の修飾物などであってもよい。また、抗体断片や低分子化抗体、例えば、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$、Ｆｖ、ＳｃＦｖ（ｓｉｎｇｌｅ ｃｈａｉｎ

Ｆｖ）、ＤｉａｂｏｄｙなどにＦｃ部分を融合したものでもよい。このような抗体を得るには、これら抗体をコードする遺伝子を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させればよい。

[0069] 本発明の抗体の好ましい使用態様としては、抗体に細胞傷害性物質等の化学療法剤を結合させた免疫複合体、即ち、抗体薬物コンジュゲート（ＡＤＣ）を挙げることができる。本発明の免疫複合体は、例えばＣＤＨ３を発現している癌細胞と接触させることにより癌細胞を傷害することができる。

[0070] 本発明で用いられる化学療法剤の例としては、デュオカルマイシン、デュオカルマイシンのアナログ及び誘導剤、ＣＣ－１０６５、ＣＢＩを主成分とするデュオカルマイシンアナログ、ＭＣＢＩを主成分とするデュオカルマイシンアナログ、ＣＣＢＩを主成分とするデュオカルマイシンアナログ、ドキソルビシン、ドキソルビシンコンジュゲート、モルフォリノ－ドキソルビシン、シアノモルフォリノ－ドキソルビシン、ドラスタチン、ドレスタチン－１０、コンブレタスタチン、カリケアマイシン（ｃａｌｉｃｈｅａｍｉｃｉｎ）、メイタンシン、メイタンシンアナログ、ＤＭ１，ＤＭ２，ＤＭ３，ＤＭ４、ＤＭＩ、アウリスタチンＥ、アウリスタチンＥＢ（ＡＥＢ）、アウリスタチンＥＦＰ（ＡＥＦＰ）、モノメチルアウリスタチンＥ（ＭＭＡＥ）、モノメチルアウリスタチンＦ（ＭＭＡＦ）、５－ベンゾイルバレリン酸ＡＥエステル（ＡＥＶＢ）、チューブリシン、ジソラゾール、エポシロン、パクリタキセル、ドセタキセル、ＳＮ－３８、トポテカン、リゾキシン、エキノマイシン、コルヒチン、ビンブラスチン、ビンデシン、エストラムスチン、セマドチン、エリューテロビン、メトトレキサート、メトプテリン、ジクロロメトトレキサート、５－フルオロウラシル、６－メルカプトプリン、シトシンアラビノシド、メルファラン、リューロシン、リューロシダイン、アクチノマイシン、ダウノルビシン、ダウノルビシンコンジュゲート、マイトマイシンＣ、マイトマイシンＡ、カルミノマイシン、アミノプテリン、タリソマイシン、ポドフィロトキシン、ポドフィロトキシン誘導体、エトポシド、エトポシドリン酸塩、ビンクリスチン、タキソール、タキソテールレチノイ

ン酸、酪酸、N^8－アセチルスペルミジン並びにカンプトセシン等を挙げることができるが、これらに限定されるわけではない。

[0071] 本発明における免疫複合体は、前記の化学療法剤と抗体とを公知の方法により結合することにより作製できる。抗体と化学療法剤は、それら自身が有する連結基などを介して直接結合されてもよいし、また、リンカーや他の物質を介して間接的に結合されてもよい。

[0072] 薬剤が直接結合される場合の連結基は、例えばＳＨ基を用いたジスルフィド結合やマレイミドを介する結合が挙げられる。例えば、抗体のＦｃ領域の分子内ジスルフィド結合と、薬剤のジスルフィド結合を還元して、両者をジスルフィド結合にて結合する。また、マレイミドを介する方法もある。また別の方法として、抗体内にシステインを遺伝子工学的に導入する方法もある。

[0073] 抗体と化学療法剤を、他の物質（リンカー）を介して間接的に結合することも可能である。リンカーには、抗体または薬剤または両方と反応する官能基を１または２種類以上有することが望ましい。官能基の例としてはアミノ基、カルボキシル基、メルカプト基、，マレイミド基、ピリジニル基等をあげることができる。

[0074] リンカーの例としては、Ｎ－スクシンイミジル４－（マレイミドメチル）シクロヘキサンカルボキシレート（ＳＭＣＣ）、スルホスクシイミジル－４－（Ｎ－マレイミドメチル）－シクロヘキサン－１－カルボキシレート（Ｓｕｌｆｏ－ＳＭＣＣ）、Ｎ－スクシンイミジル－４－（Ｎ－マレイミドメチル）－シクロヘキサン－１－カルボキシ－（６－アミドカプロエート）　（ＬＣ－ＳＭＣＣ）、κ－マレイミドウンデカン酸Ｎ－スクシンイミジルエステル（ＫＭＵＡ）、γ－マレイミド酪酸Ｎ－スクシンイミジルエステル（ＧＭＢＳ）、ε－マレイミドカプロン酸Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル（ＥＭＣＳ）、ｍ－マレイミドベンゾイル－Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル（ＭＢＳ）、Ｎ－（α－マレイミドアセトキシ）－スクシンイミドエステル（ＡＭＡＳ）、スクシンイミジル－６－（β－マレイミドプロピ

オンアミド）ヘキサノエート（ＳＭＰＨ）、Ｎ－スクシンイミジル４－（ｐ－マレイミドフェニル）－ブチレート（ＳＭＰＢ）、およびＮ－（ｐ－マレイミドフェニル）イソシアネート（ＰＭＰＩ）、Ｎ－スクシンイミジル４（２－ピリジルチオ）ペンタノエート（ＳＰＰ）、Ｎ－スクシンイミジル（４－イオドーアセチル）アミノ安息香酸エステル（ＳＩＡＢ）、６－マレイミドカプロイル（ＭＣ）、マレイミドプロパノイル（ＭＰ）、ｐ－アミノベンジルオキシカルボンイル（ＰＡＢ）、及びＮ－スクシンイミジル４（２－ピリジルチオ）ブタノエート（ＳＰＤＢ）等があげられるが、これらに限定されるものではない。このリンカーは例えば、パラアミノベンゾイック酸（ＰＡＢＡ）に、バリン－シトルリン（Ｖａｌ－Ｃｉｔ）、アラニン－フェニルアラニン（ａｌａ－ｐｈｅ）のようなペプチドリンカーが組み合わさってもよいし、上記にあげたリンカーをそれぞれ適時組み合わせて使用しても良い。

[0075] 薬剤と抗体との結合方法に関しては、例えば、Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．；５２，ｐ１２７（１９９２）（非特許文献１３）、Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．；６８（２２），ｐ９２８０（２００８）（非特許文献６）、Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ；２６（８），ｐ９２５（２００８）（非特許文献７）、Ｂｉｏ Ｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ；１９，ｐ１６７３（２００８）（非特許文献８）、Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．；６８（１５），ｐ６３００（２００８）（非特許文献９）、又は特表２００８－５１６８９６号公報（（特許文献９））などに記載の方法に準じて行うことができる。

[0076] 本発明の別の実施形態としては、抗体に毒素を化学的または遺伝子工学的に結合した、いわゆるイムノトキシンをあげることができる。用いられる毒素としては、例えば、ジフテリアトキシンＡ鎖、シュードモナスエンドトキシン、リシンＡ鎖、アブリンＡ鎖、モデクシンＡ鎖、ゲロニン、サポリン等をあげることができるが、これに限定されるものではない。

[0077] 更に本発明の別の実施形態として、抗体に放射性物質を結合させることも

できる。放射性物質としては、癌治療薬として用いる場合、細胞傷害性放射性金属が好ましく、癌診断薬として用いる場合には細胞非傷害性放射性金属であることが好ましい。

[0078] このような細胞傷害性放射性金属としては、例えばイットリウム９０（９０Ｙ）、レニウム１８６（１８６Ｒｅ）、レニウム１８８（１８８Ｒｅ）、銅６７（６７Ｃｕ）、鉄５９（５９Ｆｅ）、ストロンチウム８９（８９Ｓｒ）、金１９８（１９８Ａｕ）、水銀２０３（２０３Ｈｇ）、鉛２１２（２１２Ｐｂ）、ジスプロシウム１６５（１６５Ｄｙ）、ルテニウム１０３（１０３Ｒｕ）、ビスマス２１２（２１２Ｂｉ）、ビスマス２１３（２１３Ｂｉ）、ホルミウム１６６（１６６Ｈｏ）、サマリウム１５３（１５３Ｓｍ）、ルテチウム１７７（１７７Ｌｕ）などを挙げることができる。これらの放射性金属の中でも、９０Ｙ、１５３Ｓｍ、１７７Ｌｕが、半減期、放射線エネルギー、容易な標識反応、標識率、錯体の安定性等の点から好ましいが、これらに限定されるものではない。

[0079] 一方、診断薬に用いる細胞非傷害性放射性金属としては、テクネシウム９９ｍ（９９ｍＴｃ）、インジウム１１１（１１１Ｉｎ）、インジウム１１３ｍ（１１３ｍＩｎ）、ガリウム６７（６７Ｇａ）、ガリウム６８（６８Ｇａ）、タリウム２０１（２０１Ｔｌ）、クロム５１（５１Ｃｒ）、コバルト５７（５７Ｃｏ）、コバルト５８（５８Ｃｏ）、コバルト６０（６０Ｃｏ）、ストロンチウム８５（８５Ｓｒ）、水銀１９７（１９７Ｈｇ）、銅６４（６４Ｃｕ）が好適に用いられるが、これらに限定されるものではない。

[0080] これらの放射性金属元素を抗カドヘリン抗体に結合させるには、該抗体に金属キレート試薬を反応させ、これに放射性金属元素を反応させて錯体とするのが好ましい。このようにして得られた修飾抗体は、放射性金属元素が金属キレート試薬を介して結合している。

[0081] このような錯体形成に用いられる金属キレート試薬の例としては、例えば（１）８－ヒドロキシキノリン、８－アセトキシキノリン、８－ヒドロキシキナルジン、硫酸オキシキノリン、Ｏ－アセチルオキシン、Ｏ－ベンゾイル

オキシン、Ｏ－ｐ－ニトロベンゾイルオキシン、キノリン骨格を有するキノロン系化合物であるノルフロキサシン、オフロキサシン、エノキサシン、シプロフロキサシン、ロメフロキサシン、トスフロキサシン、フレロキサシン、スパルフロキサシン等のキノリン誘導体；（２）クロラニル酸、アルミノン、チオ尿素、ピロガロール、クペロン、ビスムチオール（ＩＩ）、ガロイル没食子酸、チオリド、２－メルカプトベンゾチアゾール、テトラフェニルアルソニウムクロライド等の化合物；（３）エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）、ジエチレントリアミン五酢酸（ＤＴＰＡ）およびこれらに類似した骨格を有するジヒドロキシエチルグリシン、ジアミノプロパノール四酢酸、エチレンジアミン二酢酸、エチレンジアミン二プロピオン酸塩酸塩、ヒドロキシエチルエチレンジアミン三酢酸、エチレンジアミンテトラキス（メチレンホスホン酸）、グリコールエーテルジアミン四酢酸、ヘキサメチレンジアミン四酢酸、ヒドロキシエチルイミノ二酢酸、イミノ二酢酸、ジアミノプロパン四酢酸、ニトリロ三酢酸、ニトリロ三プロピオン酸、ニトリロトリス（メチレンスルホン酸）三ナトリウム塩、トリエチレンテトラミン六酢酸、メチルＤＴＰＡ、シクロヘキシルＤＴＰＡ、アミノベンジルＥＤＴＡ、イソチオシアノベンジルＥＤＴＡ、イソチオシアノベンジルＤＴＰＡ、メチルイソチオシアノベンジルＤＴＰＡ、シクロヘキシルイソチオシアノベンジルＤＴＰＡ、マレイミドプロピルアミドベンジルＥＤＴＡ、マレイミドペンチルアミドベンジルＥＤＴＡ、マレイミドデシルアミドベンジルＥＤＴＡ、マレイミドペンチルアミドベンジルＤＴＰＡ、マレイミドデシルアミドベンジルＥＤＴＡ、マレイミドデシルアミドベンジルＤＴＰＡ；（４）１，４，７，１０－テトラアザシクロドデカン－１，４，７，１０－四酢酸（ＤＯＴＡ）、１，４，７－トリアザシクロノナン－１，４，７－三酢酸（ＮＯＴＡ）、１，４，８，１１－テトラアザシクロテトラデカン－１，４，８，１１－四酢酸（ＴＥＴＡ）、１，４，７，１０－テトラアザシクロドデカン（Ｃｙｃｌｅｎ）、１，４，８，１１－テトラアザシクロテトラデカン（Ｃｙｃｌａｍ）、イソチオシアノベンジルＤＯＴＡ、イソチオシアノベンジルＮＯＴＡ等

が挙げられる。

[0082] これらの金属キレート試薬のうち、イソチオシアノベンジルＤＯＴＡ、メチルイソチオシアノベンジルＤＴＰＡ、シクロヘキシルイソチオシアノベンジルＤＴＰＡが金属キレートの容易な抗体への導入反応、標識率、錯体の安定性等の点で好ましい。

[0083] 抗体への放射性金属元素の結合は、常法に従って行うことができる。例えば抗体と金属キレート試薬とを反応させ、予め標識前駆体を調製しておき、次いで放射性金属元素を反応させることにより行うことができる。

[0084] なお、本発明により提供される免疫複合体は、その薬剤の安定的な状態を保持に対応するため薬学的に許容される担体、賦形剤、希釈剤などを適宜含有させることができる。本発明の免疫複合体は、例えば注射剤として製剤することができる。本発明の免疫複合体の投与量は、患者の症状の程度、年令及び体重、投与方法などに依存し、有効成分である抗体の重量としては通常、約１０ｎｇ～約１００ｍｇ／ｋｇ体重の範囲である。

[0085] 本発明の免疫複合体により治療されうる疾患はＣＤＨ３がその細胞に発現しているものであれば特に限定されない。例えば、結腸直腸癌、非小細胞肺癌、乳癌、頭頸部癌、卵巣癌、肺癌、浸潤性膀胱癌、膵臓癌、脳の転移性癌、甲状腺癌、頭頸部扁平上皮癌、食道扁平上皮癌、肺扁平上皮癌、皮膚扁平上皮癌、メラノーマ、乳腺癌、肺腺癌、子宮頸部扁平上皮癌、膵臓扁平上皮癌、結腸扁平上皮癌、又は胃扁平上皮癌、前立腺癌、骨肉腫又は軟組織肉腫などをあげることが出来るが、これに限定されるものではない。

[0086] 以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、これの目的は例示的なものであって、本発明の内容が実施例によって限定されるものではない。 なお本明細書において引用されたすべての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

実施例

[0087] 実施例１：ＣＤＨ３発現ＣＨＯ細胞株の樹立

抗ＣＤＨ３抗体スクリーニング用細胞株を得るため、全長ＣＤＨ３を発現

するＣＨＯ細胞を樹立した。

（１）ＣＤＨ３遺伝子発現ベクターの作製

配列番号１に示す全長ヒトＣＤＨ３ＤＮＡを哺乳類発現ベクターｐＥＦ４／ｍｙｃ－ＨｉｓＢ（インビトロジェン社）へ挿入するため、２種類の制限酵素Ｋｐｎｌ（タカラバイオ社）及びＸｂａｌ（タカラバイオ社）で３７℃、１時間処理した後、同じくＫｐｎｌ及びＸｂａｌで処理したｐＥＦ４／ｍｙｃ－ＨｉｓBへＴ４　ＤＮＡリガーゼ（プロメガ社）により常法に従って挿入し、発現ベクターｐＥＦ４－ＣＤＨ３－ｍｙｃ－Ｈｉｓを得た。

[0088] （２）ＣＤＨ３安定発現株の取得

ＦｕＧＥＮＥ（登録商標）６トランスフェクション試薬（ロシュ・ダイアグノスティックス社）のプロトコールに準じ、トランスフェクション前日に径１０ｃｍディッシュに８×１０^{5}細胞のＣＨＯ細胞を播種し一晩培養後、８μｇの発現ベクターｐＥＦ４－ＣＤＨ３－ｍｙｃ－Ｈｉｓと１６μＬのＦｕＧＥＮＥ６試薬を４００μＬの無血清ＲＰＭＩ１６４０培地（ＳＩＧＭＡ－ＡＬＤＲＩＣＨ社）に混合し１５分間室温放置後、細胞培養液に加えトランスフェクションを行った。トランスフェクション翌々日に選択試薬（Ｚｅｏｃｉｎ（登録商標））を用いて限界希釈法にてクローニングを行った。

[0089] ＣＤＨ３全長発現ＣＨＯのクローン選抜は、抗ｃ－Ｍｙｃモノクローナル抗体（ＳＡＮＴＡ　ＣＲＵＺ　ＢＩＯＴＥＣＨＮＯＬＯＧＹ社）を用いたウェスタンブロット法により行い、その結果、発現量が高く、かつ増殖が良好なＣＤＨ３全長発現ＣＨＯ細胞株（ＥＸＺ１５０１）を得た。この細胞株、親株であるＣＨＯ細胞、およびＣＤＨ３発現が確認されているＮＣＩ－Ｈ３５８肺癌細胞株と市販抗ＣＤＨ３抗体（Ｒ＆Ｄ　ＳＹＳＴＥＭＳ社）のフローサイトメーターによる測定結果を図１に示す。

[0090] 実施例２：可溶型ＣＤＨ３抗原の作製

抗ＣＤＨ３抗体作製の免疫原とするため、Ｃ末端膜貫通領域以降を欠損させた可溶型ＣＤＨ３（ｓＣＤＨ３）タンパク質を作製した。

（１）可溶型ＣＤＨ３抗原発現ベクターの作製

ＣＤＨ３全長ｃＤＮＡをテンプレートとして、ＣＤＨ３細胞外領域に相当する部分（配列番号１の１－２０１０に相当、以下ｓＣＤＨ３ｃＤＮＡ）を増幅するように設計されたフォワードプライマー（ＣＧＣＧＧＴＡＣＣＡＴＧＧＧＧＣＴＣＣＣＴＣＧＴ：配列番号３）とリバースプライマー（ＣＣＧＴＣＴＡＧＡＴＡＡＣＣＴＣＣＣＴＴＣＣＡＧＧＧＴＣＣ：配列番号４）を用いてＰＣＲ反応を行った。反応にはＫＯＤ－Ｐｌｕｓ（東洋紡社）を用い、９４℃で１５秒、５５℃で３０秒、６８℃で９０秒を３０サイクルの反応条件で行った。

[0091] その後、アガロースゲル電気泳動で目的サイズである約２．０ｋｂｐのバンドを含むゲル断片を切り出し、ＱＩＡ（登録商標）クイックゲル抽出キット（キアゲン社）を用いて、目的のｓＣＤＨ３ｃＤＮＡを得た。

[0092] このｓＣＤＨ３ｃＤＮＡを発現用ベクターｐＥＦ４／ｍｙｃ－ＨｉｓＢへ挿入するために、２種類の制限酵素ＫｐｎＩ及びＸｂａＩで処理した後、同じくＫｐｎＩ及びＸｂａＩで処理したｐＥＦ４／ｍｙｃ－ＨｉｓＢにＴ４ＤＮＡリガーゼを用いて常法に従い挿入し、発現ベクターｐＥＦ４－ｓＣＤＨ３－ｍｙｃ－Ｈｉｓを得た。

[0093] （２）可溶型ＣＤＨ３タンパク質の発現

ＦｕＧＥＮＥ６トランスフェクション試薬のプロトコールに準じ、トランスフェクション前日に径１０ｃｍディッシュに8×10^5個のＣＨＯ細胞を播種し一晩培養後、８μｇの発現ベクターｐＥＦ４－ｓＣＤＨ３－ｍｙｃ－Ｈｉｓと１６μＬのＦｕＧＥＮＥ６試薬を４００μＬの無血清ＲＰＭＩ１６４０培地に混合、１５分間室温放置後、細胞培養液に加えトランスフェクションを行った。トランスフェクション翌々日に選択試薬（Ｚｅｏｃｉｎ）を用いて限界希釈法にてクローニングを行った。

[0094] 可溶型ＣＤＨ３発現ＣＨＯ細胞の選抜は、抗ｃ－Ｍｙｃモノクローナル抗体（ＳＡＮＴＡ　ＣＲＵＺ　ＢＩＯＴＥＣＨＮＯＬＯＧＹ社）を用いたウェスタンブロット法で行った。培養上清中への分泌量が多く増殖が良好な細胞株を選択した結果、可溶型ＣＤＨ３発現ＣＨＯ細胞株（ＥＸＺ１７０２）が

得られた。選択された可溶型ＣＤＨ３発現ＣＨＯ細胞株（ＥＸＺ１７０２）は、培養面積１，５００ｃｍ^{2}のローラーボトル３本を用い、ローラーボトル１本あたり無血清培地ＣＨＯ－Ｓ－ＳＦＭ－ＩＩ（インビトロジェン社）３３３ｍＬにて７２時間培養を行い、培養上清を回収した。得られた培養上清からＨｉｓＴｒａｐ（登録商標）ＨＰカラム（ＧＥヘルスケアバイオサイエンス社）によるアフィニティークロマトグラフィーとＳｕｐｅｒｄｅｘ（登録商標）２００ｐｇカラム（ＧＥヘルスケアバイオサイエンス社）によるゲル濾過クロマトグラフィーにより可溶型ＣＤＨ３タンパク質を得た。

[0095] 実施例３：抗ＣＤＨ３マウス抗体の作製

（１）可溶型ＣＤＨ３タンパク質を免疫原としたモノクローナル抗体の作製

生理食塩水に溶解した５０μｇの可溶型ＣＤＨ３タンパク質とＴｉｔｅｒ－ＭＡＸ　Ｇｏｌｄ（登録商標）（タイターマックス社）を等量混合し、ＭＲＬ／ｌｐｒマウス（日本エスエルシー株式会社）の腹腔内および皮下に注射することにより初回免疫を行った。２回目以降の免疫は同様に調製した２５μｇタンパク質量相当の可溶型ＣＤＨ３タンパク質とＴｉｔｅｒ－ＭＡＸ　Ｇｏｌｄを混合して腹腔内および皮下に注射することにより実施した。最終免疫から３日後にマウスから脾臓細胞を無菌的に調製し、常法に従って、ポリエチレングリコール法によりマウスミエローマ細胞ＳＰ２／０－Ａｇ１４あるいはＰ３－Ｘ６３－Ａｇ８．６５３との細胞融合を行った。

[0096] （２）抗ＣＤＨ３マウス抗体産生ハイブリドーマの選抜

抗ＣＤＨ３マウス抗体の選抜は、全長ＣＤＨ３を発現するＣＨＯ細胞株（ＥＸＺ１５０１）を用いたフローサイトメトリで行った。すなわち、全長ＣＤＨ３を発現するＣＨＯ細胞株（ＥＸＺ１５０１）を２ｍＭ　ＥＤＴＡ－ＰＢＳで処理することで培養プレートから剥離後、１×１０^{6}個／ｍＬとなるようにＦＡＣＳ溶液（１％ＢＳＡ，２ｍＭ　ＥＤＴＡ，０．１％ＮａＮ$_3$入りＰＢＳ）に懸濁した。この細胞懸濁液を５０μＬ／ウェルとなるように９６ウェルプレートに播種し、ハイブリドーマ培養上清を加えて４℃で６０分間反応させ、ＦＡＣＳ溶液（２００μＬ／ウェル）で２回洗浄した後、Ａｌｅｘ

ａＦｌｕｏｒ４８８標識抗マウスＩｇＧ・ヤギＦ（ａｂ‘）$_2$（インビトロジェン社）を加えて、４℃で３０分間反応させた。その後ＦＡＣＳ溶液で２回洗浄した後、フローサイトメトリを実施し、ＣＤＨ３発現ＣＨＯ細胞との反応が認められるハイブリドーマを選抜した。

[0097] 当該ハイブリドーマより得られた抗体と、ＣＤＨ３発現ＣＨＯ細胞（ＥＸＺ１５０１）、親株であるＣＨＯ細胞及びＣＤＨ３が高発現であると確認されているヒト細気管支肺胞上皮癌細胞株ＮＣＩ－Ｈ３５８との典型的な反応結果を図２Ａ-Ｃに示す。選抜したハイブリドーマ全てが、ＣＤＨ３発現ＣＨＯ細胞（ＥＸＺ１５０１）およびＮＣＩ－Ｈ３５８と反応し、ＣＨＯ細胞とは反応しないことを確認した。図２Ｄには受託番号ＮＩＴＥ　ＢＰ－１５３６に由来するハイブリドーマから精製したマウス抗体（抗体番号：ＰＰＡＴ－０７６－４４Ｍ）のフローサイトメトリ結果を示す。

[0098] 実施例４：正常組織および癌組織でのＣＤＨ３ｍＲＮＡの発現

正常ヒト組織および各種癌組織より、レーザーマイクロダイセクション法（Ｌａｓｅｒ　Ｃａｐｔｕｒｅ　Ｍｉｃｒｏｄｉｓｓｅｃｔｉｏｎ）で回収したサンプルよりＩＳＯＧＥＮ（ニッポンジーン社）を用い定法に従って全ＲＮＡを調製した。ＲＮＡ各１０ｎｇをＧｅｎｅＣｈｉｐＵ－１３３Ｂ（Ａｆｆｙｍｅｔｒｉｘ社）を用い、Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　Ａｎａｌｙｓｉｓ　Ｔｅｃｈｎｉｃａｌ　Ｍａｎｕａｌ（Ａｆｆｙｍｅｔｒｉｘ社）に準じて遺伝子発現を解析した。全遺伝子の発現スコアの平均値を１００とし、癌細胞において発現が亢進する遺伝子を探索したところ、ＣＤＨ３は正常ヒト組織では発現が限られ、肺癌、大腸癌、膵臓癌で発現が高かった（図３Ａ、Ｂ）。また、分化度の異なる膵臓癌組織におけるＣＤＨ３ｍＲＮＡの発現を検討したところ、分化度に関わらず発現が高い組織が認められた（図３Ｃ）。

[0099] 実施例５：免疫組織化学染色による癌組織でのＣＤＨ３タンパク質の発現

癌臨床検体でのＣＤＨ３タンパク質の発現を確認するため、癌検体組織アレイで免疫染色を行った。癌細胞組織アレイは、上海芯超生物科技有限公司社（Ｓｈａｎｇｈａｉ　Ｏｕｔｄｏ　Ｂｉｏｔｅｃｈ　Ｃｏ．，Ｌｔｄ．）

製の、膵癌（腺癌）、肺癌（腺癌）、肺癌（扁平上皮癌）および大腸癌（腺癌）を使用した。

[0100] 各組織アレイスライドを脱パラフィン処理し、１０ｍＭＴｒｉｓ、１ｍＭＥＤＴＡ（ｐＨ９．０）で９５℃、４０分賦活化を行った。ＥＮＶＩＳＩＯＮ＋Ｋｉｔ（Ｄａｋｏ社）付属のブロッキング試薬にて内在性ペルオキシダーゼの不活性化を行った後、抗ＣＤＨ３抗体６１０２２７（ＢＤ ＢＩＯＳＣＩＥＮＣＥ社）、およびネガティブコントロールとして抗ＨＢｓ抗体Ｈｙｂ－３４２３と５μｇ／ｍＬの濃度で４℃一晩反応させた。抗体溶液を洗い流した後に、ＥＮＶＩＳＩＯＮ＋Ｋｉｔ付属のポリマー二次抗体試薬と室温３０分間反応させた。ＥＮＶＩＳＩＯＮ＋Ｋｉｔ付属の発色試薬にて発色を行い、ヘマトキシリンエオジン溶液にて核染色を行った。

図４に結果を示す。癌細胞は抗ＣＤＨ３抗体で染色され、正常細胞は染色されなかった。

[0101] 実施例６：ハイブリドーマからのＲＮＡの精製

ＣＤＨ３抗体を産生するマウスハイブリドーマ細胞から、細胞質に存在するＲＮＡをＧｏｕｇｈ，Ｒａｐｉｄ ａｎｄ ｑｕａｎｔｉｔａｔｉｖｅ ｐｒｅｐａｒａｔｉｏｎ ｏｆ ｃｙｔｏｐｌａｓｍｉｃ ＲＮＡ ｆｒｏｍ ｓｍａｌｌ ｎｕｍｂｅｒｓ ｏｆ ｃｅｌｌｓ，Ａｎａｌｙｔｉｃａｌ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｙ，１７３，ｐ９３－９５（１９８８）（非特許文献１０）により記載されている方法（ただし、この論文に記されている溶解緩衝液のかわりに別のＴＮＥ緩衝液 ２５ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５；１％ＮＰ－４０；１５０ｍＭ ＮａＣｌ；１ｍＭ ＥＤＴＡ，ｐＨ８．０を用いた）に従って単離した。具体的な操作方法としては、５×１０^{6}個のハイブリドーマ細胞を０．２ｍＬのＴＮＥ緩衝液に懸濁して細胞膜を溶解後、遠心により細胞核を除去した。得られた約０．２ｍＬ細胞質上清に０．２ｍＬの抽出緩衝液（１０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５；０．３５Ｍ ＮａＣｌ；１％（ｗ／ｖ）ＳＤＳ；１０ｍＭ ＥＤＴＡ，ｐＨ８．０；７Ｍ尿素）を加えた。この混合物をフェノールおよびクロロホ

ルムで抽出し、得られたＲＮＡ溶液にキャリアとしてグリコーゲン（ロッシュ、Ｃａｔ　Ｎｏ．９０１３９３）を加えてから、エタノールで沈澱させた。次にＲＮＡ沈殿物を、細胞質ＲＮＡ濃度が０．５～２μｇ／μＬになるように１０～５０μＬの滅菌蒸留水を加えて溶解した。

[0102] 実施例７：ハイブリドーマから調製したＲＮＡからのｃＤＮＡライブラリーの作製

一本鎖ｃＤＮＡを合成するため、前記のように調製した細胞質ＲＮＡの０．５～３μｇを５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ８．３（室温）；７５ｍＭ　ＫＣｌ；３ｍＭ　$MgCl_2$；１０ｍＭ　ＤＴＴ、１００ｎｇのランダムプライマー、０．５ｍＭ　ｄＮＴＰ、２００ユニットのＳｕｐｅｒｓｃｒｉｐｔＩＩ（逆転写酵素、インビトロジェン社）を含む２０μＬ反応混合液を調製し、４２℃で５０分間インキュベートした。このように合成したｃＤＮＡライブラリーをポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）法の鋳型として直接使用した。

[0103] 実施例８：抗ＣＤＨ３マウス抗体可変領域をコードする遺伝子のＰＣＲ法による増幅

抗ＣＤＨ３マウス抗体可変領域の配列を決定するため、実施例７で得られたｃＤＮＡライブラリーをテンプレートとして、ＰＣＲ法により抗ＣＤＨ３マウス抗体可変領域の遺伝子増幅を実施した。プライマーは全て北海道システムサイエンス株式会社に合成依頼し、以下に記載するような組み合わせで実施した。

[0104] Ａ．マウス軽鎖可変領域コード遺伝子のＰＣＲプライマー

５’末端においてＦＲ１部分と相同性を有するＰＣＲプライマーと３’末端においてマウス軽鎖内のＪ鎖遺伝子と相同性を有する４セットプライマー（１）、あるいは５’末端において軽鎖シグナル部分（７セットプライマー）と３’末端においてＫＣ部分（ＫＶＬアンチセンスプライマー）と相同性を有するプライマーセット（２）の２種類のプライマーセットを用いてポリメラーゼ連鎖反応により、該ｃＤＮＡからマウス免疫グロブリン軽鎖可変域

ＤＮＡを単離した。プライマー配列は次のとおりであった。

なお、塩基配列において、ＭはＡまたはＣ、ＲはＡまたはＧ、ＷはＡまたはＴ、ＳはＣまたはＧ、ＹはＣまたはＴ、ＫはＧまたはＴ、ＶはＡまたはＣまたはＧ、ＨはＡまたはＣまたはＴ、ＤはＡまたはＧまたはＴ、ＢはＣまたはＧまたはＴ、ＮはＡまたはＣまたはＧまたはＴをそれぞれ示す。

[0105] （１）マウス軽鎖可変域クローニング４セットセンスプライマー

「Ｐｈａｇｅ Ｄｉｓｐｌａｙ －Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ－, Ｂａｒｂａｓ Ｂｕｒｔｏｎ Ｓｃｏｔｔ Ｓｉｌｖｅｒｍａｎ」ＰＲＯＴＯＣＯＬ ９．５（非特許文献１１）を参考にＳｅｎｓｅ Ｐｒｉｍｅｒ １７種、Ｒｅｖｅｒｓｅ Ｐｒｉｍｅｒ ３種を合成した。

ＶＫセンスプライマー（ＦＲ１部分、下記１７プライマーの混合物）

５’-ＧＡＹＡＴＣＣＡＧＣＴＧＡＣＴＣＡＧＣＣ-３’（縮重度２）：配列番号５

５’-ＧＡＹＡＴＴＧＴＴＣＴＣＷＣＣＣＡＧＴＣ-３’（縮重度４）：配列番号６

５’-ＧＡＹＡＴＴＧＴＧＭＴＭＡＣＴＣＡＧＴＣ-３’（縮重度８）：配列番号７

５’-ＧＡＹＡＴＴＧＴＧＹＴＲＡＣＡＣＡＧＴＣ-３’（縮重度８）：配列番号８

５’-ＧＡＹＡＴＴＧＴＲＡＴＧＡＣＭＣＡＧＴＣ-３’（縮重度８）：配列番号９

５’-ＧＡＹＡＴＴＭＡＧＡＴＲＡＭＣＣＡＧＴＣ-３’（縮重度１６）：配列番号１０

５’-ＧＡＹＡＴＴＣＡＧＡＴＧＡＹＤＣＡＧＴＣ-３’（縮重度１２）：配列番号１１

５’-ＧＡＹＡＴＹＣＡＧＡＴＧＡＣＡＣＡＧＡＣ-３’（縮重度４）：配列番号１２

５’-ＧＡＹＡＴＴＧＴＴＣＴＣＡＷＣＣＡＧＴＣ-３’（縮重度４）：配列番

号１３

５’-ＧＡＹＡＴＴＧＷＧＣＴＳＡＣＣＣＡＡＴＣ-３’（縮重度８）：配列番号１４

５’-ＧＡＹＡＴＴＳＴＲＡＴＧＡＣＣＣＡＲＴＣ-３’（縮重度１６）：配列番号１５

５’-ＧＡＹＲＴＴＫＴＧＡＴＧＡＣＣＣＡＲＡＣ-３’（縮重度１６）：配列番号１６

５’-ＧＡＹＡＴＴＧＴＧＡＴＧＡＣＢＣＡＧＫＣ-３’（縮重度１２）：配列番号１７

５’-ＧＡＹＡＴＴＧＴＧＡＴＡＡＣＹＣＡＧＧＡ-３’（縮重度４）：配列番号１８

５’-ＧＡＹＡＴＴＧＴＧＡＴＧＡＣＣＣＡＧＷＴ-３’（縮重度４）：配列番号１９

５’-ＧＡＹＡＴＴＧＴＧＡＴＧＡＣＡＣＡＡＣＣ-３’（縮重度２）：配列番号２０

５’-ＧＡＹＡＴＴＴＴＧＣＴＧＡＣＴＣＡＧＴＣ-３’（縮重度２）：配列番号２１

[0106] Ｊアンチセンス（４セットプライマー）

Ｊ１／Ｊ２アンチセンスプライマー（１）

５’-ＧＧＳＡＣＣＡＡＲＣＴＧＧＡＡＡＴＭＡＡＡ-３’（縮重度：８）：配列番号２２

Ｊ４アンチセンスプライマー（２）

５’-ＧＧＧＡＣＡＡＡＧＴＴＧＧＡＡＡＴＡＡＡＡ-３’：配列番号２３

Ｊ５アンチセンスプライマー（３）

５’-ＧＧＧＡＣＣＡＡＧＣＴＧＧＡＧＣＴＧＡＡＡ-３’：配列番号２４

Ｊ１／Ｊ２，Ｊ４，Ｊ５アンチセンスプライマー混合物（４）

[0107] （２）マウス軽鎖可変域クローニング７セットプライマー

ＶＫセンスプライマー（シグナルペプチド部分、ノバジェン社のマウスＩ

ｇ－プライマーセット（Ｎｏｖａｇｅｎ；Ｍｅｒｃｋ，Ｃａｔ．Ｎｏ．６９８３１－３）を元に制限酵素部位を除去するように塩基配列を改変）

Ａセットセンスプライマー

5’-ＡＴＧＲＡＧＷＣＡＣＡＫＷＣＹＣＡＧＧＴＣＴＴＴ-3’：配列番号２５

Ｂセットセンスプライマー

5’-ＡＴＧＧＡＧＡＣＡＧＡＣＡＣＡＣＴＣＣＴＧＣＴＡＴ-3’：配列番号２６

Ｃセットセンスプライマー

5’-ＡＴＧＧＡＧＷＣＡＧＡＣＡＣＡＣＴＳＣＴＧＹＴＡＴＧＧＧＴ-3’：配列番号２７

Ｄセットセンスプライマー（下記２プライマーの混合物）

5’-ＡＴＧＡＧＧＲＣＣＣＣＴＧＣＴＣＡＧＷＴＴＹＴＴＧＧＩＷＴＣＴＴ-3’：配列番号２８

5’-ＡＴＧＧＧＣＷＴＣＡＡＧＡＴＧＲＡＧＴＣＡＣＡＫＷＹＹＣＷＧＧ-3’：配列番号２９

Ｅセットセンスプライマー（下記３プライマーの混合物）

5’-ＡＴＧＡＧＴＧＴＧＣＹＣＡＣＴＣＡＧＧＴＣＣＴＧＧＳＧＴＴ-3’：配列番号３０

5’-ＡＴＧＴＧＧＧＧＡＹＣＧＫＴＴＴＹＡＭＭＣＴＴＴＴＣＡＡＴＴＧ-3’：配列番号３１

5’-ＡＴＧＧＡＡＧＣＣＣＣＡＧＣＴＣＡＧＣＴＴＣＴＣＴＴＣＣ-3’：配列番号３２

Ｆセットセンスプライマー（下記４プライマーの混合物）

5’-ＡＴＧＡＧＩＭＭＫＴＣＩＭＴＴＣＡＩＴＴＣＹＴＧＧＧ-3’：配列番号３３

5’-ＡＴＧＡＫＧＴＨＣＹＣＩＧＣＴＣＡＧＹＴＹＣＴＩＲＧ-3’：配列番号３４

５’-ＡＴＧＧＴＲＴＣＣＷＣＡＳＣＴＣＡＧＴＴＣＣＴＴＧ-３’：配列番号３５

５’-ＡＴＧＴＡＴＡＴＡＴＧＴＴＴＧＴＴＧＴＣＴＡＴＴＴＣＴ-３’：配列番号３６

Ｇセットセンスプライマー（下記４プライマーの混合物）

５’-ＡＴＧＡＡＧＴＴＧＣＣＴＧＴＴＡＧＧＣＴＧＴＴＧＧＴＧＣＴ-３’：配列番号３７

５’-ＡＴＧＧＡＴＴＴＷＣＡＲＧＴＧＣＡＧＡＴＴＷＴＣＡＧＣＴＴ-３’：配列番号３８

５’-ＡＴＧＧＴＹＣＴＹＡＴＶＴＣＣＴＴＧＣＴＧＴＴＣＴＧＧ-３’：配列番号３９

５’-ＡＴＧＧＴＹＣＴＹＡＴＶＴＴＲＣＴＧＣＴＧＣＴＡＴＧＧ-３’：配列番号４０

ＫＶＬアンチセンスプライマー

５’-ＡＣＴＧＧＡＴＧＧＴＧＧＧＡＡＧＡＴＧＧＡ-３’：配列番号４１

[0108] Ｂ．マウス重鎖可変領域コード遺伝子のＰＣＲプライマー

５’末端においてマウス重鎖シグナル部分（４セットプライマー）と相同性を有するプライマーと３’末端においてＫＣ部分と相同性を有するプライマー、あるいは５’末端においてＦＲ１部分と相同性を有する１セットのプライマーと３’末端においてマウス重鎖の定常領域（ＩＧＨＣ）と相同性を有する２種類のプライマーセットを用いてポリメラーゼ連鎖反応により、該ｃＤＮＡからマウス免疫グロブリン重鎖可変域ＤＮＡを単離した。プライマー配列は次のとおりであった。

[0109] （３）マウス重鎖可変域クローニングプライマー

ＶＨセンスプライマー（シグナル部分：４セットプライマー、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ（Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ａｎｄ Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．），Ｕｎｉｔ ２．１２ Ｃｌｏｎｉｎｇ，Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ，ａｎｄ Ｍｏｄｉｆｉｃａｔｉｏｎ

ｏｆ　Ａｎｔｉｂｏｄｙ　Ｖ　ＲｅｇｉｏｎｓのＴａｂｌｅ　２．１２．２を参考にした）。

5’-ＡＴＧＧＲＡＴＧＳＡＧＣＴＧＫＧＴＭＡＴＳＣＴＣＴＴ-3’（縮重度：３２）：配列番号４２

5’-ＡＴＧＲＡＣＴＴＣＧＧＧＹＴＧＡＧＣＴＫＧＧＴＴＴＴ-3’（縮重度：８）：配列番号４３

5’-ＡＴＧＧＣＴＧＴＣＴＴＧＧＧＧＣＴＧＣＴＣＴＴＣＴ-3’：配列番号４４

5’-ＡＴＧＧＲＣＡＧＲＣＴＴＡＣＷＴＹＹ-3’（縮重度：３２）：配列番号４５

[0110] （４）　マウス重鎖可変域クローニングプライマー

ＶＨセンスプライマー（ＦＲ１部分、Ｔａｎら、Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ；１６９，ｐ１１１９（２００２）（非特許文献１４）のセンスプライマーの塩基配列を改変してデザインした）。

5’-ＳＡＧＧＴＳＭＡＲＣＴＫＳＡＧＳＡＧＴＣＷＧＧ-3’（縮重度：２５６）：配列番号４６

[0111] ＶＨアンチセンスプライマー（（３），（４）に共通のアンチセンスプライマー、マウスＩｇＧすべてのアイソフォームとアニーリングできるように塩基配列を縮重してデザインした）。

5’-ＣＡＳＣＣＣＣＡＴＣＤＧＴＣＴＡＴＣＣ-3’（縮重度：６）：配列番号４７

[0112] 実施例９：抗ＣＤＨ３マウス抗体の可変領域の配列決定

ＤＮＡ　Ｅｎｇｉｎｅ（Ｂｉｏ－Ｒａｄ社）を用いたＰＣＲ法により抗ＣＤＨ３マウス抗体軽鎖、重鎖それぞれの可変領域を実施例８に示したプライマーを用いて増幅した。増幅したＤＮＡフラグメントはサブクローニングベクターｐＧＥＭ（プロメガ社）に組み込んで、このベクターのＴ７，ＳＰ６ユニバーサルプライマーで塩基配列を決定した。

これにより配列決定された受託番号ＮＩＴＥ　ＢＰ－１５３６であるマウ

スハイブリドーマに由来する抗ＣＤＨ３マウス抗体（抗体番号：ＰＰＡＴ－０７６－４４Ｍ）の可変領域のうち、ＣＤＲに相当するアミノ酸配列を以下に示す。

[0113] ＳＬＴＳＹＧＶＨ：配列番号５６（ＣＤＲ－Ｈ１）

ＧＶＩＷＳＧＧＳＴＤ：配列番号５７（ＣＤＲ－Ｈ２）

ＡＲＮＳＮＮＧＦＡＹ：配列番号５８（ＣＤＲ－Ｈ３）

ＮＩＹＳＮＬＡ：配列番号５９（ＣＤＲ－Ｌ１）

ＬＬＶＹＡＡＫＮ：配列番号６０（ＣＤＲ－Ｌ２）

ＱＨＦＹＤＴＰＷＴ：配列番号６１（ＣＤＲ－Ｌ３）

[0114] なお、ＣＤＲ－Ｈ１、Ｈ２及びＨ３はそれぞれ各抗体重鎖を、ＣＤＲ－Ｌ１、Ｌ２及びＬ３はそれぞれ各抗体軽鎖を構成するＣＤＲ配列を表す。

両抗体の軽鎖、および重鎖可変域の塩基配列はＩＭＧＴ／Ｖ－ＱＵＥＳＴ（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｉｍｇｔ．ｏｒｇ／ＩＭＧＴ＿ｖｑｕｅｓｔ／ｖｑｕｅｓｔ？ｌｉｖｒｅｔ＝０＆Ｏｐｔｉｏｎ＝ｍｏｕｓｅｌｇ）で検索して、確かに抗体遺伝子がクローニングできていることを確認した。

[0115] 実施例１０：抗ＣＤＨ３抗体の一過性発現ベクターの作製

クローニングされた抗ＣＤＨ３マウス抗体の軽鎖及び重鎖のＶ領域をコードする遺伝子は、キメラ軽鎖発現ベクターにはヒトＣｋ領域をコードする遺伝子を、キメラ重鎖発現ベクターにはヒトＣｇ１領域をコードする遺伝子をそれぞれ接続した遺伝子を設計し、これら軽鎖、重鎖キメラ抗体遺伝子をＧｅｎＳｃｒｉｐｔ社によって全長人工合成した。両端には制限酵素部位（５’側にＮｈｅＩ，３’側にＥｃｏＲＩ）を付加した。

[0116] これにより、キメラ化抗体発現ベクターに供するため、受託番号ＮＩＴＥ　ＢＰ－１５３６を有する細胞由来の抗ＣＤＨ３キメラ化抗体（以下、抗体番号ＰＰＡＴ－０７６－４４Ｃとする。重鎖及び軽鎖可変領域配列がＰＰＡＴ－０７６－４４Ｍと同じ）が合成された。

受託番号ＮＩＴＥ　ＢＰ－１５３６を有する細胞は、２０１３年２月１３日に独立行政法人　製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センター（郵便番

号２９２－０８１８　日本国千葉県木更津市かずさ鎌足２－５－８）に寄託されている（国際寄託への移管請求は、２０１４年１月２４日：受領番号ＮＩＴＥ　ＡＢＰ－１５３６）。

[0117] ヒト化に際しては、ＦＲに相当する領域をヒトに由来したＦＲ配列に入れ替え、同様に全長人工合成した。ＦＲに相当する領域のアミノ酸配列は、ヒトコンセンサスフレーム配列（配列番号６２～６９）あるいは生殖系列フレーム配列（配列番号７２～７９）を用いた。生殖系列フレーム配列はクローニングされた抗ＣＤＨ３マウス抗体の塩基配列をＩＭＧＴ／Ｖ－ＱＵＥＳＴ（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｉｍｇｔ．ｏｒｇ／ＩＭＧＴ＿ｖｑｕｅｓｔ／ｖｑｕｅｓｔ？ｌｉｖｒｅｔ＝０＆Ｏｐｔｉｏｎ＝ｈｕｍａｎｌｇ）に入力し、最も類似度の高い配列を選択して設計した。また、親和性低下に対応したアミノ酸配列の置換（ｒｅｓｈａｐｅ）も実施した。

[0118] 今回用いた抗ＣＤＨ３ヒト化抗体の重鎖あるいは軽鎖可変領域のアミノ酸配列を以下に示した。

抗体番号ＰＰＡＴ－０７６－４４Ｈａ、ＰＰＡＴ－０７６－４４Ｈｂ、ＰＰＡＴ－０７６－４４Ｈｃ、およびＰＰＡＴ－０７６－４４Ｈｄは、抗体番号ＰＰＡＴ－０７６－４４Ｍと同じＣＤＲ配列を持つ。

[0119] 抗体番号ＰＰＡＴ－０７６－４４Ｈａ、ＰＰＡＴ－０７６－４４Ｈｂは、ＦＲにヒトコンセンサスフレームワーク配列を用い、抗体番号ＰＰＡＴ－０７６－４４Ｈｃ、ＰＰＡＴ－０７６－４４Ｈｄは、ＦＲに由来としたマウス抗体に最も類似したヒト生殖系列配列を用いている。また、ＰＰＡＴ－０７６－４４Ｈｂ、ＰＰＡＴ－０７６－４４Ｈｄは、付記したようなアミノ酸配列の置換を導入している。

[0120] 抗体番号；ＰＰＡＴ－０７６－４４Ｈａ（配列番号４８を重鎖可変領域、配列番号４９を軽鎖可変領域に持つ）

ＥＶＱＬＶＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＦＳＬＴＳＹＧＶＨＷＶＲＱＡＰＧＫＧＬＥＷＶＧＶＩＷＳＧＧＳＴＤＹＡＤＳＶＫＧＲＦＴＩＳＲＤＮＳＫＮＴＬＹＬＱＭＮＳＬＲＡＥＤＴＡＶＹＹＣＡＲＮＳＮＮＧ

ＦＡＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ：配列番号４８（重鎖可変領域）

ＤＩＱＭＴＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＲＡＳＱＮＩＹＳＮＬＡ

ＷＹＱＱＫＰＧＫＡＰＫＬＬＶＹＡＡＫＮＬＱＳＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧ

ＴＤＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＦＡＴＹＹＣＱＨＦＹＤＴＰＷＴＦＧＱＧＴ

ＫＶＥＩＫ：配列番号４９（軽鎖可変領域）

[0121] 抗体番号；ＰＰＡＴ－０７６－４４Ｈｂ（配列番号５０を重鎖可変領域、配列番号５１を軽鎖可変領域に持つ）

ＥＶＱＬＶＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＦＳＬＴＳＹＧＶ

ＨＷＶＲＱＡＰＧＫＧＬＥＷＶＡＶＩＷＳＧＧＳＴＤＹＡＤＳＶＫＧＲＦＴ

ＩＳＫＤＮＳＫＮＴＶＹＬＱＭＮＳＬＲＡＥＤＴＡＶＹＹＣＡＲＮＳＮＮＧ

ＦＡＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ：配列番号５０（重鎖可変領域）

（配列番号４８に対してＧ４９Ａ、Ｒ７１Ｋ、Ｌ７８Ｖが置換されている）

ＤＩＱＭＴＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＲＡＳＱＮＩＹＳＮＬＡ

ＷＹＱＱＫＰＧＫＡＰＫＬＬＶＹＡＡＫＮＬＡＳＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧ

ＴＤＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＦＡＴＹＹＣＱＨＦＹＤＴＰＷＴＦＧＱＧＴ

ＫＶＥＩＫ：配列番号５１（軽鎖可変領域）

（配列番号４９に対してＱ５５Ａが置換されている）

[0122] 抗体番号；ＰＰＡＴ－０７６－４４Ｈｃ（配列番号５２を重鎖可変領域、配列番号５３を軽鎖可変領域に持つ）

ＱＶＱＬＶＥＳＧＧＧＶＶＱＰＧＲＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＦＳＬＴＳＹＧＶ

ＨＷＶＲＱＡＰＧＫＧＬＥＷＶＧＶＩＷＳＧＧＳＴＤＹＡＤＳＶＫＧＲＦＴ

ＩＳＲＤＮＳＫＮＴＬＹＬＱＭＮＳＬＲＡＥＤＴＡＶＹＹＣＡＲＮＳＮＮＧ

ＦＡＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ：配列番号５２（重鎖可変領域）

ＤＩＱＬＴＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＲＡＳＱＮＩＹＳＮＬＡ

ＷＹＱＱＫＰＧＫＡＰＫＬＬＶＹＡＡＫＮＬＥＳＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧ

ＴＤＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＦＡＴＹＹＣＱＨＦＹＤＴＰＷＴＦＧＱＧＴ

ＫＶＥＩＫ：配列番号５３（軽鎖可変領域）

[0123] 抗体番号；ＰＰＡＴ－０７６－４４Ｈｄ（配列番号５４を重鎖可変領域、配

列番号５５を軽鎖可変領域に持つ）

ＱＶＱＬＶＥＳＧＧＧＶＶＱＰＧＲＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＦＳＬＴＳＹＧＶ

ＨＷＶＲＱＡＰＧＫＧＬＥＷＶＧＶＩＷＳＧＧＳＴＤＹＡＤＳＶＫＧＲＦＴ

ＩＳＫＤＮＳＫＮＴＶＹＬＱＭＮＳＬＲＡＥＤＴＡＶＹＹＣＡＲＮＳＮＮＧ

ＦＡＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ：配列番号５４（重鎖可変領域）

（配列番号５２に対してＲ７１Ｋ、Ｌ７８Ｖが置換されている）

ＤＩＱＬＴＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＲＡＳＱＮＩＹＳＮＬＡ

ＷＹＱＱＫＰＧＫＡＰＫＬＬＶＹＡＡＫＮＬＡＳＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧ

ＴＤＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＦＡＴＹＹＣＱＨＦＹＤＴＰＷＴＦＧＱＧＴ

ＫＶＥＩＫ：配列番号５５（軽鎖可変領域）

（配列番号５３に対してＥ５５Ａが置換されている）

[0124] アミノ酸配列変換後にこれらの配列を持つように設計した人工合成遺伝子を、ヒトＩｇＧ１由来の定常領域の遺伝子が組み込まれたｐＣＸＮ３ベクターに重鎖可変領域の遺伝子を、ヒトκ鎖由来の定常領域の遺伝子が組み込まれたｐＣＸＮ３ベクターに軽鎖可変領域の遺伝子をそれぞれ挿入した発現ベクターを構築し、抗ＣＤＨ３ヒト化抗体（またはキメラ化抗体）の軽鎖発現ベクター及び重鎖発現ベクターを得た。

[0125] 実施例１１：抗ＣＤＨ３抗体の一過性発現と精製

（１）抗ＣＤＨ３抗体の一過性発現

抗ＣＤＨ３抗体の一過性発現にはＦｒｅｅＳｔｙｌｅ（ライフテクノロジーズ社）を用いた。遺伝子導入用浮遊細胞である２９３－Ｆ（ライフテクノロジーズ社）は前日に継代した。トランスフェクション当日、一種類の抗体発現には、１ｘ１０^{6}細胞／ｍＬの細胞濃度に調製した４００ｍＬの細胞懸濁液を準備した。これに抗体重鎖発現ベクター１００μｇ及び軽鎖発現ベクター１００μｇの合計２００μｇのプラスミドをＯｐｔｉＰｒｏＳＦＭに懸濁した溶液（Ｉ）を調製した。次に２００μＬのＭＡＸ　ｒｅａｇｅｎｔを８ｍＬのＯｐｔｉＰＲＯ　ＳＦＭに加えて溶液（ＩＩ）とした。溶液（Ｉ）と溶液（ＩＩ）を混合して室温で１０分から２０分静置した。この合計１６ｍ

Ｌの反応液を２９３－Ｆ細胞を懸濁した４００ｍＬの２９３発現培地に加え、６日から７日間３７℃、８％CO_2で細胞培養震盪機ＴＡＩＴＥＣ　Ｂｉｏ　Ｓｈａｋｅｒ　ＢＲ-４３ＦＬで培養した。６日から７日間後、それぞれの組換え抗体を含む培養上清を回収し、これを用いて精製をおこなった。

[0126] （２）抗ＣＤＨ３抗体の精製

培養上清に含まれるＩｇＧ抗体タンパク質は、ＡＫＴＡｐｒｉｍｅ（ＧＥヘルスケア社）を用いたＡｂ-Ｃａｐｃｈｅｒ　ＥｘＴｒａ（プロテノバ）アフィニティーカラムで精製した。得られたピークフラクションは、溶媒としてダルベッコのＰＢＳで平衡化したセファクリルＳ-３００カラムによるゲルろ過をして、さらに精製した。精製したＩｇＧ抗体タンパク質の定量は、吸光係数を用いて算出した。ＩｇＧ抗体の吸光係数はＥＸＰＡＳＹのＰｒｏｔＰａｒａｍ（ｈｔｔｐ：／／ｗｅｂ．ｅｘｐａｓｙ．ｏｒｇ／ｐｒｏｔｐａｒａｍ／）に各抗体の全アミノ酸配列を用いて計算して求めた。

[0127] 実施例１２：酵素免疫測定法（ＥＬＩＳＡ）による抗体の定量

遺伝子導入したＣＨＯ細胞の培養上清をＥＬＩＳＡにより測定して、キメラ抗体が生産されていることを確認した。キメラ抗体を検出するため、プレートをヤギ抗ヒトＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ）（マウス、ウサギ、ウシ、マウスＩｇＧに対して吸収済み）（コスモバイオ：ＡＱＩ，　Ｃａｔ　Ａ－１１０ＵＤ）でコートした。ブロックした後、抗ＣＤＨ３キメラ抗体産生ＣＨＯ細胞からの培養上清を段階希釈し、各ウエルに加えた。プレートをインキュベーション、および洗浄後、ヤギ抗ヒトＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ）（マウス、ウサギ、ウシ、マウスＩｇＧに対して吸収済み）－ＨＲＰ（コスモバイオ：ＡＱＩ，Ｃａｔ．Ａ－１１０ＰＤ）を加えた。インキュベーション及び洗浄の後、ＴＭＢ発色液（エア・ブラウン社、Ｃａｔ．ＴＭ４９９９）を加えた。さらにインキュベーションした後、反応を停止しそして４５０ｎｍにおける吸光度を測定した。標準として精製ヒトＩｇＧを用いた。

[0128] 実施例１３：抗体の結合活性

実施例１０に示した配列を持つ抗体は、その結合活性をフローサイトメト

リで評価した。

反応対象となる細胞株（ＣＤＨ３の高発現が確認されているＮＣＩ－Ｈ３５８細胞株）を２ｍＭ　ＥＤＴＡ－ＰＢＳで処理することにより培養プレートから剥離後、１×１０^{6}個／ｍＬとなるようにＦＡＣＳ溶液に懸濁した。この細胞懸濁液を５０μＬ／ウェルとなるように９６ウェルプレートに播種し、精製したキメラ抗体を１０μｇ／ｍＬになるように添加し、４℃で６０分間反応させた。ＦＡＣＳ溶液（１５０μＬ／ウェル）で２回洗浄した後、ＡｌｅｘａＦｌｕｏｒ４８８標識抗ヒトＩｇＧ・ヤギＦ（ａｂ‘）$_{2}$（インビトロジェン社）４μｇ／ｍｌを加えて、４℃で３０分間反応させた。その後ＦＡＣＳ溶液で２回洗浄した後、フローサイトメトリを実施した。

[0129] その結果、ヒト化を実施した抗体（ＰＰＡＴ－０７６－４４Ｈａ、ＰＰＡＴ－０７６－４４Ｈｃ）はＣＤＨ３発現癌細胞株（ＮＣＩ-Ｈ３５８）で弱い反応が認められた。更にＲｅｓｈａｐｅを施した抗体（ＰＰＡＴ－０７６－４４Ｈｂ、ＰＰＡＴ－０７６－４４Ｈｄ）ではＮＣＩ-Ｈ３５８に対し、強い反応性が認められた（図５Ａ）。また、ＰＰＡＴ－０７６－４４Ｈｂ、ＰＰＡＴ－０７６－４４Ｈｄは、ＣＨＯ細胞には反応しないが、ＣＤＨ３強制発現ＣＨＯ細胞においてはＮＣＩ-Ｈ３５８細胞株と同じく反応が認められた（図５Ｂ、Ｃ）。

[0130] ＰＰＡＴ－０７６－４４Ｍに由来したマウス抗体のヒト化は、ＣＤＲ配列として規定した配列と、コンセンサスあるいはヒト生殖系列に由来したフレーム配列との組み合わせによって、不十分ながら結合活性を示す抗体を得たことから、ここで規定したＣＤＲ配列は妥当なものであると推定される。なお、ＰＰＡＴ－０７６－４４Ｍに由来したヒト化抗体はＲｅｓｈａｐｅを実施することで結合活性が回復することから、いずれかのアミノ酸残基が構造維持に重要な役割を果たしていることが支持される。

[0131] 実施例１４：薬剤の合成

ＤＭ１ＳＭｅは、米国特許第５，２０８，０２０号（特許文献１０）および米国特許６，３３３，４１０Ｂ１号（特許文献１１）に記載されたように

調製した。合成は株式会社シンスタージャパンに委託した。その構造式を図６に示す。

[0132] 実施例１５：薬剤結合抗体の調製

１．結合薬剤の還元処理

エタノール３００μＬで溶解した０．７８ｍｇのＤＭ１ＳＭｅと５０ｍＭリン酸カリウム緩衝液（ｐＨ７．５）１８０μＬ及びＴＣＥＰ　Ｓｏｌｕｔｉｏｎ（Ｂｏｎｄ　Ｂｒｅａｋｅｒ、サーモフィッシャーサイエンティフィック社）２０μＬを混合し、窒素雰囲気下、室温で３０分以上反応させ、薬剤を還元した。

還元薬剤はＨＰＬＣを使用して精製した後に溶媒を留去し、１０ｍｇ／ｍＬになるようにジメチルアセトアミドに溶解した。

[0133] ２．マレイミド化抗体の調製

１ｍｇ／ｍＬ抗体にモル比３０倍過剰となる量のｓｕｌｆｏ－ＳＭＣＣ（ＰＩＥＲＣＥ社）を加え、３０℃、１時間反応させた。

過剰な架橋剤を除くため、５０ｍＭリン酸カリウム、５０ｍＭ　ＮａＣｌ、２ｍＭ　ＥＤＴＡ（ｐＨ６．５）で平衡化した脱塩カラムで脱塩処理（ＺｅｂａＳｐｉｎＣｏｌｕｍｎ、　サーモフィッシャーサイエンティフィック社）した。

[0134] ３．薬剤による抗体の修飾

１ｍｇ／ｍＬのマレイミド化した抗体と、結合したマレイミド基数の１．７倍に相当する還元薬剤とを５０ｍＭリン酸カリウム、５０ｍＭ　ＮａＣｌ、２ｍＭ　ＥＤＴＡ（ｐＨ６．５）中で、室温にて一晩反応させた。その後、過剰な薬剤をゲルろ過操作により除いた。

[0135] 実施例１６：抗体薬剤結合量の定量

抗体当たりの薬剤結合数は、２５２ｎｍ及び２８０ｎｍの吸光度を測定することで決定した。決定方法は（Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．，４９，４３９２－４４０８（２００６））（非特許文献１２）、及びＭｅｔｈｏｄｓ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．５２５、ｐ４４５－６７（２００９）（非特許文献２１））

に記載の方法を参考に、吸光係数も記載の値（εAb_{280}=223,000$M^{-1}cm^{-1}$, εAb_{252}=82,510$M^{-1}cm^{-1}$, $\varepsilon DM1_{280}$=5,180$M^{-1}cm^{-1}$, $\varepsilon DM1_{252}$=26,160$M^{-1}cm^{-1}$）を用いて行った。

[0136] 実施例１７：細胞障害試験

薬剤結合抗体の細胞傷害性と特異性はＷＳＴ－８を発色基質とした細胞増殖測定試薬（同仁化学研究所社，Ｃｅｌｌ　ｃｏｕｎｔｉｎｇ　ａｓｓａｙ　ｋｉｔ－８）を使用して評価した。

即ち、各種癌細胞株とヒト化抗体薬剤コンジュゲートを任意の量共存させ、３７℃で３日間、５％CO_2環境下でインキュベートした。培地はＦＢＳを添加した各細胞株所定のものとした。その後、細胞増殖測定試薬を添加放置後、Ａ４５０／６２０の吸光度を測定し、癌細胞株のみで抗体を加えないウェルより得られた吸光度の値を１００％としたときの相対的な値を細胞生存率として表記した。

[0137] 図７Ａでは、細胞株としてＮＣＩ－Ｈ３５８、抗体薬剤コンジュゲートとしてＰＰＡＴ－０７６－４４Ｈｂ及びＰＰＡＴ－０７６－４４Ｈｄに薬剤を結合したものを用いた。両抗体の薬剤コンジュゲートともに細胞傷害性を示した。

図７Ｂでは、細胞株としてＨＣＣ１９５４、抗体薬剤コンジュゲートとしてＰＰＡＴ－０７６－４４Ｈｄに薬剤を結合したものを用い、図７Ｃでは細胞株としてＨＣＣ７０、抗体薬剤コンジュゲートとしてＰＰＡＴ－０７６－４４Ｈｄに薬剤を結合したものを用いた。両細胞株ともにＣＤＨ３が発現するため、ＰＰＡＴ－０７６－４４Ｈｄの薬剤コンジュゲートは細胞傷害性を示す。

図７Ｄでは、細胞株は表１に記したものを用い、抗体薬剤コンジュゲートとして、ＰＰＡＴ－０７６－４４Ｈｄに薬剤を結合したものを用いた。薬剤は、それぞれ実施例１５に記載した方法で結合した。表１に記した細胞株のｍＲＮＡシグナル値は公開データベース（ｈｔｔｐｓ：／／ｃａｂｉｇ－ｓｔａｇｅ．ｎｃｉ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ｃｏｍｍｕｎｉｔｙ／ｃａＡｒｒａｙ

＿ＧＳＫｄａｔａ／）から平均値を取得し、シグナルの小さなもの（ＮＣＩＨ１９３０，　ＳＷ９６２）はＣＤＨ３発現陰性対照として試験した。ＣＤＨ３が発現する細胞株は癌腫に関わらず、細胞増殖が阻害された。

いずれの薬剤コンジュゲートもＤＡＲは３～４のものを用いた。

[0138] [表1]

表１：試験に用いた細胞株とその由来する疾患

細胞株名	由来する疾患名	平均ＣＤＨ３ｍＲＮＡシグナル
ＮＣＩＨ１９３０	ｌｕｎｇ　ｃａｎｃｅｒ	９．４
ＳＷ９６２	ｖｕｌｖａ　ｃａｒｃｉｎｏｍａ	５３９
Ｄｅｔｒｏｉｔ５６２	ｐｈａｒｙｎｘ　ｃａｒｃｉｎｏｍａ	１５０９
ＮＣＩＨ３２２	ｌｕｎｇ　ｃａｎｃｅｒ	１５６８
ＮＣＩＨ３５８	ｌｕｎｇ　ｃａｎｃｅｒ	２１７９
ＨＣＣ１９５４	ｂｒｅａｓｔ　ｃａｎｃｅｒ	２２６９

[0139] 実施例１８：ヒト化抗体を用いたＨＣＣ１９５４担癌動物試験

ヒト化抗体（ＰＰＡＴ－０７６－４４Ｈｂ、及びＰＰＡＴ－０７６－４４Ｈｄ）の抗体薬剤コンジュゲートによる腫瘍縮小効果を、乳がん細胞株ＨＣＣ１９５４を移植したゼノグラフトモデルで確認した。

実施例１６の方法で定量した両抗体薬剤コンジュゲートの薬剤結合数（ＤＡＲ）は、ＰＰＡＴ－０７６－４４Ｈｂ（ＤＡＲ３．６９）、ＰＰＡＴ－０７６－４４Ｈｄ（ＤＡＲ３．５１）であった。

担癌は、まず抗アシアロＧＭ１抗体（ＷＡＫＯ　０１４－０９８０１）を、大塚蒸留水１ｍＬで溶解後、大塚生理食塩水４ｍＬを加えて全量５ｍＬとした後、この溶液をマウス１匹あたり１００ｕＬ腹腔内に投与した。次にＨＣＣ１９５４は１０％ＦＢＳ含有ＲＰＭＩ１６４０培地を用いて培養し、ＳＣＩＤマウス（メス、日本クレア）の右腹側部皮下に５ｘ１０^{6}個／マウスになるように移植した　　。

試験は各群５匹とし、５ｍｇ／ｋｇで週に１度、計２回尾静脈より投与を行なった。

腫瘍体積を測定した結果を図８に示す。図８に示す通りヒト化抗体による抗体薬剤コンジュゲートは高い抗腫瘍効果を示した。

[0140] 実施例１９：ヒト化抗体を用いたＨＣＣ７０担癌動物試験（１）

ヒト化抗体（ＰＰＡＴ－０７６－４４Ｈｂ）とキメラ化抗体（ＰＰＡＴ－０７６－４４Ｃ）の抗体薬剤コンジュゲートによる腫瘍縮小効果を、乳がん細胞株ＨＣＣ７０を移植したゼノグラフトモデルにて確認した。

両抗体薬剤コンジュゲートのＤＡＲは、ＰＰＡＴ－０７６－４４Ｈｂ（ＤＡＲ２．９０）、ＰＰＡＴ－０７６－４４Ｃ（ＤＡＲ３．０７）であった。

担癌は、抗アシアロＧＭ１抗体（ＷＡＫＯ　０１４－０９８０１）を、大塚蒸留水１ｍＬで溶解後、大塚生理食塩水４ｍＬを加えて全量５ｍＬとした後、この溶液をマウス１匹あたり１００ｕＬ腹腔内に投与した。次にＨＣＣ７０は１０％ＦＢＳ含有ＲＰＭＩ６４０培地を用いて培養し、ＳＣＩＤマウス（メス、日本クレア）の右腹側部皮下に５ｘ１０^{6}個／マウスになるように移植した。

試験は各群５匹とし、ヒト化抗体コンジュゲートは０．６、３．０あるいは１５ｍｇ／ｋｇ、キメラ化抗体コンジュゲートは３．０ｍｇ／ｋｇ、薬剤非結合のヒト化抗体（Ｎａｋｅｄ）は１５ｍｇ／ｋｇの各用量で週に１度、計２回投与を行なった。腫瘍体積を測定した結果を図９に示す。図９に示す通り、ヒト化抗体による抗体薬剤コンジュゲートは、キメラ化抗体による抗体薬剤コンジュゲートに比して高い抗腫瘍効果が繰り返し示された。

[0141] 実施例２０：ヒト化抗体を用いたＨＣＣ７０担癌動物試験（２）

ヒト化抗体（ＰＰＡＴ－０７６－４４Ｈｄ）とキメラ化抗体（ＰＰＡＴ－０７６－４４Ｃ）の抗体薬剤コンジュゲートによる腫瘍縮小効果を、乳がん細胞株ＨＣＣ７０を移植したゼノグラフトモデルにて確認した。

担癌は実施例１９と同様に行ない、ヒト化抗体コンジュゲートは０．６、３．０あるいは１５ｍｇ／ｋｇ、キメラ化抗体コンジュゲートは３．０ｍｇ／ｋｇ、薬剤非結合のヒト化抗体（Ｎａｋｅｄ）は１５ｍｇ／ｋｇの各用量で週に１度、計２回尾静脈より投与を行なった。試験は各群５匹とした。両

抗体薬剤コンジュゲートのＤＡＲは、ＰＰＡＴ－０７６－４４Ｃ（ＤＡＲ３．０７）、ＰＰＡＴ－０７６－４４Ｈｄ（ＤＡＲ２．９８）だった。

腫瘍体積を測定した結果を図１０に示す。図１０に示した通り、ヒト化抗体は薬剤を結合する事で高い抗腫瘍効果を示し、用量に依存した抗腫瘍効果が確認された。また同じ投与量（３．０ｍｇ／ｋｇ）においては、実施例１９と同様にキメラ化抗体の抗体薬剤コンジュゲートに比して高い抗腫瘍効果が再度示された。

[0142] 実施例２１：ヒト化抗体を用いたＯＫａ－Ｃ－１担癌動物試験

本願発明の抗体薬剤コンジュゲートの腫瘍増殖抑制能を、肺がん細胞株ＯＫａ－Ｃ－１（独立行政法人医薬基盤研究所、ＪＣＲＢ１３４３）を移植したゼノグラフトモデルで確認した。担癌は、ＯＫａ－Ｃ－１を１０％ＦＢＳ含有ＲＰＭＩ１６４０培地を用いて培養し、ＳＣＩＤマウス（メス、日本クレア）の右腹側部皮下に６．５ｘ１０^{6}個／マウスになるように移植した。ヒト化抗体コンジュゲートは１５ｍｇ／ｋｇの用量で週に１度、計２回尾静脈より投与を行なった。試験は各群３匹とした。ここではヒト化抗体としてＰＰＡＴ－０７６－４４Ｈｄを使用し、それぞれに実施例１５に記載した方法で薬剤を結合した。各抗体分子当たりの平均薬剤結合数（ＤＡＲ）を実施例１６に記載した方法で定量したところ、ＤＡＲは３．０４だった。腫瘍体積を測定した結果を図１１に示す。図１１に示した通り、ヒト化抗体は薬剤を結合する事で、乳癌細胞株に対するものと同様に高い抗腫瘍効果が確認された。

[0143] 実施例２２：ＣＤＨ３Ｎ末部分長タンパク質の発現

（１）ＣＤＨ３Ｎ末部分長タンパク質の発現ベクター作製

取得したＣＤＨ３抗体の反応性を確認するため、ＣＤＨ３抗原のＮ末端領域をマウスＩｇＧ２ａのＦｃ部分と連結した融合蛋白質を調製した。融合タンパク質のｃＤＮＡ配列は配列番号７０、アミノ酸配列は配列番号７１に記載した。シグナルペプチドは抗体κ鎖のものを使用し、サブクローニングのために制限酵素部位を５プライム側にＮｈｅＩを、３プライム側にＥｃｏＲ

Ｉ部位を付加した（米ＧｅｎＳｃｒｉｐｔ社で合成）。これをＮｈｅＩとＥｃｏＲＩで消化した哺乳類用発現ベクターのｐＣＡＧＧＳ、あるいは遺伝子増幅用にマウスＤＨＦＲ遺伝子を組み込んだｐＣＡＧＧＳ－ＤＨＦＲに組み込んだ。

[0144] （２）　ＣＤＨ３Ｎ末部分長タンパク質の発現と精製

一過性発現はライフテクノロジー社のフリースタイルを用いた。生産細胞にはライフテクノロジー社の２９３Ｆを使用し、遺伝子導入試薬はフリースタイル・マックス・トランスフェクション試薬（ライフテクノロジー社）を用いた。Ｆｃ融合可溶性抗原の遺伝子を導入した２９３Ｆは、CO_2濃度を制御できるタイテック製の震盪機で４～７日間培養して生産した。生産した融合蛋白質はプロテインＡセファロース（プロテノバ社）カラムで精製した。一過性発現で発現・精製した抗原のＣＢＢ染色図を図１２Ａに示し、図１２Ｂに市販ＣＤＨ３抗体（ＢＤ　ＢＩＯＳＣＩＥＮＣＥ社、及びＲ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ社）を１次抗体として用いた染色像を示す。２次標識抗体にはＡｎｔｉ　Ｍｏｕｓｅ　ＩｇＧ　Ｆ（ａｂ’）２-ＨＲＰ（ｇｏａｔ　ＩｇＧ）（ＣＡＰＰＥＬ　＃５５５５３）を用いた。

[0145] 実施例２３：ＣＤＨ３Ｎ末部分長タンパク質固相ＥＬＩＳＡ

ＣＤＨ３Ｎ末部分長タンパク質をＰＢＳで２．５μｇ／ｍＬとし、９６ウェルプレートに１００μＬ／ウェルで分注して、４℃で一晩静置した。翌日、ウェル内の溶液を捨て、Ｂｕｆｆｅｒ　Ａ：　５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ／１５０ｍＭ　ＮａＣｌ／１ｍＭ　$CaCl_2$／０．０５％　Ｔｗｅｅｎ２０　（ｐＨ７．５）で洗浄した。次に被検物質（抗ＣＤＨ３抗体）を希釈系列を作って１００μＬ／ウェルで分注し、室温１時間震盪した。溶液を捨て、Ｂｕｆｆｅｒ　Ａで洗浄した後、ＨＲＰ標識抗体（ＨＲＰ－ｇｏａｔ　ａｎｔｉ　ｈｕｍａｎ　ＩｇＧ　（Ｈ＋Ｌ）　（ａｂｓｏｒｂｅｄ　ｗｉｔｈ　ｍｏｕｓｅ，　ｒａｂｂｉｔ，ｂｏｖｉｎｅ　ＩｇＧ）　（Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｑｕａｌｅｘ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ，　ｃａｔ．　Ａ－１１０ＰＤ））をｂｕｆｆｅｒＡで１０，０００倍希釈したものを調製し、１０

０μＬ／ウェルで分注し、室温１時間震盪した。Ｂｕｆｆｅｒ　Ａで洗浄した後、ＴＭＢ発色液を１００μＬ／ウェルで加え、暗所で１５分静置して発色を行った。停止液を１００μＬ／ウェルで加えた後、プレートリーダーで４５０ｎｍの吸光度を測定した。結果を図１３に示す。披検物質としてＰＰＡＴ－０７６－４４Ｈｂ、及びＰＰＡＴ－０７６－４４Ｈｄを用いた。

[0146] 実施例２４：Ａｌｅｘａ４８８標識抗体の作製

標識に用いる抗体を標識用緩衝液（５０ｍＭ　ＮａＨＣＯ３，　０．５Ｍ　ＮａＣｌ　ｐＨ８．５）に置換する。抗体１ｍｇに対し、２５ｍＭ　Ａｌｅｘａ４８８（１ｍｇをＤＭＦ６２．１μｌに溶解，　ライフテクノロジー社）０．５μｌを添加して、遮光下室温で１時間静置する。その後、ＰＢＳに緩衝液を交換した。

[0147] 実施例２５：抗体親和性比較試験（１）

ヒト化が親和性に及ぼす影響をフローサイトメーター（ＦＡＣＳ）を用いた競合試験で確かめた。測定は希釈系列を作った被験抗体、ＣＤＨ３が発現している細胞株、及び被験抗体と競合する一定量のＡｍａｘａ４８８標識抗体を共存させて、室温１時間反応、ＦＡＣＳ用液で洗浄後、ＦＡＣＳ測定を行なった。各抗体濃度のＧＥＯ　Ｍｅａｎ値から、競合抗体のみのＧＥＯ　Ｍｅａｎ値を１００％とした場合の阻害率を算出してＩＣ５０を求め、これを親和性の指標とした。

被験抗体と競合する抗体として、ＮＩＴＥ　ＢＰ－９８９細胞産生物から精製したマウス抗体を実施例２４の方法で標識し、被験抗体としてＰＰＡＴ－０７６－４４Ｈｄ、ＰＰＡＴ－０７６－４４Ｃ、及びＰＰＡＴ－０７６－４４Ｍを用いた。その結果を図１４に示す。被験抗体は全てＡｌｅｘａ４８８標識抗体と競合するがその度合いが異なり、マウス及びキメラ化抗体に比して、本願のヒト化抗体（ＰＰＡＴ－０７６－４４Ｈｄ）の親和性度合いが向上している事が示された。

[0148] 実施例２６：抗体親和性比較試験（２）

本願発明のヒト化抗体に結合した平均薬剤結合数（ＤＡＲ）が親和性に及

ぼす影響を実施例２５と同じくＦＡＣＳを用いた競合試験で確かめた。抗体薬剤コンジュゲートは、実施例１５に記載した方法で、平均ＤＡＲ０～８の範囲で調製した。ＤＡＲは実施例１６に記載した方法で定量した。

細胞株はＮＣＩ－Ｈ３５８を用い、ＰＰＡＴ－０７６－４４Ｈｂ及びＰＰＡＴ－０７６－４４Ｈｄを測定する時は、競合抗体として実施例２４の手順でＡｌｅｘａ４８８を標識したＮＩＴＥ　ＢＰ－９８９細胞産生物から精製したマウス抗体を用い、実施例２５で示したのと同じＦＡＣＳ競合試験により、親和性の指標として各ＩＣ５０値を算出した。

図１５（Ａ：ＰＰＡＴ－０７６－４４Ｈｂ、Ｂ：ＰＰＡＴ－０７６－４４Ｈｄ）に示した比較は、薬剤を結合していない各抗体のＩＣ５０値を１とした相対値を表している。いずれのヒト化抗体も薬剤が結合する事で親和性は低下しない事を示している。

[0149] 実施例２７：担癌モデル株のＣＤＨ３発現確認

担癌モデル株のＣＤＨ３タンパク質の発現を確認するため、担癌組織切片の免疫染色を行った。マウス皮下に細胞株を移植して所定日数経過させた担癌マウスから得た腫瘍組織を脱パラフィン処理し、オートクレーブで１２１℃、１５分賦活化を行った。０．３％　H_2O_2を含むメタノールにて内在性ペルオキシダーゼの不活性化、１０％ヤギ血清でブロッキング処理後、抗ＣＤＨ３抗体６１０２２７（ＢＤ　ＢＩＯＳＣＩＥＮＣＥ社）に４℃一晩反応させた。抗体溶液を洗い流した後に、ヒストファインシンプルステインＭＡＸ－ＰＯ二次抗体試薬と室温１時間反応させた。ヒストファインＤＡＢ基質キットを添付プロトコールのとおり使ってＤＡＢ発色を行い、ヘマトキシリンエオジン溶液にて核染色を行った。図１６（Ａ：ＨＣＣ１９５４、Ｂ：ＨＣＣ７０、Ｃ：ＯＫａ－Ｃ－１）に結果を示す。担癌腫瘍は細胞膜部分が抗ＣＤＨ３抗体で染色された。

請求の範囲

[請求項1] 受託番号ＮＩＴＥ　ＢＰ－１５３６を有する細胞が産生する抗体の重鎖可変領域由来の相補性決定領域配列（ＣＤＲ-Ｈ１、Ｈ２、Ｈ３）及び軽鎖可変領域由来の相補性決定領域配列（ＣＤＲ-Ｌ１、Ｌ２、Ｌ３）を含み、かつフレームワーク領域配列が重鎖可変領域が重鎖ヒトサブグループＩＩＩコンセンサスフレームワーク配列であり、軽鎖可変領域が軽鎖ヒトκサブグループＩコンセンサスフレームワーク配列を含有してなる抗ＣＤＨ３ヒト化抗体。

[請求項2] 重鎖可変領域の相補性決定領域配列が配列番号５６、配列番号５７、及び配列番号５８であり、軽鎖可変領域の相補性決定領域配列が配列番号５９、配列番号６０、及び配列番号６１を含み、かつフレームワーク領域配列が重鎖可変領域が重鎖ヒトサブグループＩＩＩコンセンサスフレームワーク配列であり、軽鎖可変領域が軽鎖ヒトκサブグループＩコンセンサスフレームワーク配列を含有してなる抗ＣＤＨ３ヒト化抗体。

[請求項3] 受託番号ＮＩＴＥ　ＢＰ－１５３６を有する細胞が産生する抗体の重鎖可変領域由来の相補性決定領域配列（ＣＤＲ-Ｈ１、Ｈ２、Ｈ３）及び軽鎖可変領域由来の相補性決定領域配列（ＣＤＲ-Ｌ１、Ｌ２、Ｌ３）を含み、かつフレームワーク領域配列が最適なアライメントのもとで選択されたヒトの生殖系列に由来する配列を含有してなる抗ＣＤＨ３ヒト化抗体。

[請求項4] 重鎖可変領域の相補性決定領域配列が配列番号５６、配列番号５７、及び配列番号５８であり、軽鎖可変領域の相補性決定領域配列が配列番号５９、配列番号６０、及び配列番号６１を含み、かつフレームワーク領域配列が最適なアライメントのもとで選択されたヒトの生殖系列に由来する配列を含有してなる抗ＣＤＨ３ヒト化抗体。

[請求項5] 請求項１から４のいずれか１項に記載した抗ＣＤＨ３ヒト化抗体との配列相同性が少なくとも９０％以上であり、かつＣＤＨ３を認識でき

る抗ＣＤＨ３ヒト化抗体。

[請求項6] 請求項１から４のいずれか１項に記載した抗体のフレームワーク領域部分における１から数個のアミノ酸が他のアミノ酸に置換しており、かつＣＤＨ３を認識できる、抗ＣＤＨ３ヒト化抗体。

[請求項7] 請求項１から４のいずれか１項に記載した抗体の相補性決定領域配列のうちフレームワーク領域との境界における１から数個のアミノ酸が他のアミノ酸に置換しており、かつＣＤＨ３を認識できる抗ＣＤＨ３ヒト化抗体。

[請求項8] 置換されるアミノ酸が軽鎖可変領域におけるＫａｂａｔナンバリングによる５５位のアミノ酸である、請求項６に記載の抗ＣＤＨ３ヒト化抗体。

[請求項9] 置換されるアミノ酸が重鎖可変領域におけるＫａｂａｔナンバリングによる７１位、及び７８位のアミノ酸から選ばれる１つ以上である、請求項６に記載の抗ＣＤＨ３ヒト化抗体。

[請求項10] 置換されるアミノ酸が重鎖可変領域におけるＫａｂａｔナンバリングによる４９位のアミノ酸である、請求項７に記載の抗ＣＤＨ３ヒト化抗体。

[請求項11] 軽鎖可変領域におけるＫａｂａｔナンバリングによる５５位のアミノ酸がアラニンに置換している、請求項６に記載の抗ＣＤＨ３ヒト化抗体。

[請求項12] 重鎖可変領域におけるＫａｂａｔナンバリングによる７１位のアミノ酸がリジンに置換している、請求項６に記載の抗ＣＤＨ３ヒト化抗体。

[請求項13] 重鎖可変領域におけるＫａｂａｔナンバリングによる７８位のアミノ酸がバリンに置換している、請求項６に記載の抗ＣＤＨ３ヒト化抗体。

[請求項14] 重鎖可変領域におけるＫａｂａｔナンバリングによる４９位のアミノ酸がアラニンに置換している、請求項７に記載の抗ＣＤＨ３ヒト化抗

体。

[請求項15] 重鎖可変領域におけるＫａｂａｔナンバリングによる４９位のアミノ酸残基のアラニンへの置換、７１位のアミノ酸残基のリジンへの置換、７８位のアミノ酸残基のバリンへの置換、及び軽鎖可変領域におけるＫａｂａｔナンバリングによる５５位のアミノ酸残基のアラニンへの置換から選択される１以上の置換を有する、請求項１又は２に記載の抗ＣＤＨ３ヒト化抗体。

[請求項16] 重鎖可変領域におけるＫａｂａｔナンバリングによる７１位のアミノ酸残基のリジンへの置換、７８位のアミノ酸残基のバリンへの置換、及び軽鎖可変領域におけるＫａｂａｔナンバリングによる５５位のアミノ酸残基のアラニンへの置換から選択される１以上の置換を有する、請求項３又は４に記載の抗ＣＤＨ３ヒト化抗体。

[請求項17] 以下の何れかの抗体。

（１）重鎖可変領域に配列番号４８に記載のアミノ酸配列を有し、軽鎖可変領域に配列番号４９に記載のアミノ酸配列を有する、抗ＣＤＨ３ヒト化抗体；

（２）重鎖可変領域に配列番号５０に記載のアミノ酸配列を有し、軽鎖可変領域に配列番号５１に記載のアミノ酸配列を有する、抗ＣＤＨ３ヒト化抗体；

（３）重鎖可変領域に配列番号５２に記載のアミノ酸配列を有し、軽鎖可変領域に配列番号５３に記載のアミノ酸配列を有する、抗ＣＤＨ３ヒト化抗体；及び

（４）重鎖可変領域に配列番号５４に記載のアミノ酸配列を有し、軽鎖可変領域に配列番号５５に記載のアミノ酸配列を有する、抗ＣＤＨ３ヒト化抗体：

[請求項18] ＣＤＨ３との結合能を有する、請求項１から１７のいずれか１項に記載の抗ＣＤＨ３ヒト化抗体の断片。

[請求項19] Ｆａｂ，Ｆ（ａｂ′）$_2$、又はｓｃＦｖである、請求項１８に記載の

抗ＣＤＨ３ヒト化抗体の断片。

[請求項20] ＣＤＨ３との結合能を有する、請求項１から１９のいずれか１項に記載した抗体の部分配列。

[請求項21] ＣＤＨ３がヒトＣＤＨ３である、請求項１から１７のいずれか１項に記載の抗ＣＤＨ３ヒト化抗体。

[請求項22] ＣＤＨ３が配列番号２の細胞外領域である、請求項１から１７のいずれか１項に記載の抗ＣＤＨ３ヒト化抗体。

[請求項23] 請求項１から２２のいずれか１項に記載の抗ＣＤＨ３ヒト化抗体、その断片又はその部分配列と、化学療法剤又は放射性物質とが連結している、免疫複合体。

[請求項24] 化学療法剤が、細胞障害性物質である、請求項２３に記載の免疫複合体。

[請求項25] 細胞傷害性物質が、メイタンシノイド又はその誘導体、あるいはアウリスタチン又はその誘導体である、請求項２４に記載の免疫複合体。

[請求項26] 細胞傷害性物質が、ＤＭ１、ＤＭ３又はＤＭ４から選択されるメイタンシノイド又はその誘導体、あるいはＭＭＡＥあるいはＭＭＡＦから選択されるアウリスタチン又はその誘導体である、請求項２４に記載の免疫複合体。

[請求項27] 抗ＣＤＨ３ヒト化抗体、その断片又はその部分配列１分子あたり平均１～７個のＤＭ１が結合している、請求項２４に記載の免疫複合体。

[請求項28] 抗ＣＤＨ３ヒト化抗体、その断片又はその部分配列と、化学療法剤とがリンカーを介して連結している、請求項２３から２７の何れか１項に記載の免疫複合体。

[請求項29] 抗ＣＤＨ３ヒト化抗体、その断片又はその部分配列と、化学療法剤とが、抗体のＦｃ領域の分子内ジスルフィド結合を介して連結しているか、又は抗体のＦｃ領域を遺伝子工学的に改変して連結しいる、請求項２３から２７の何れか１項に記載の免疫複合体。

[請求項30] リンカーが、２価反応性架橋試薬である、請求項２８に記載の免疫複

合体。

[請求項31] リンカーが、Ｎ－スクシンイミジル４－（マレイミドメチル）シクロヘキサンカルボキシレート（ＳＭＣＣ）、スルホスクシイミジル－４－（Ｎ－マレイミドメチル）－シクロヘキサン－１－カルボキシレート（Ｓｕｌｆｏ－ＳＭＣＣ）、Ｎ－スクシンイミジル－４－（Ｎ－マレイミドメチル）－シクロヘキサン－１－カルボキシ－（６－アミドカプロエート）　（ＬＣ－ＳＭＣＣ）、κ－マレイミドウンデカン酸Ｎ－スクシンイミジルエステル（ＫＭＵＡ）、γ－マレイミド酪酸Ｎ－スクシンイミジルエステル（ＧＭＢＳ）、ε－マレイミドカプロン酸Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル（ＥＭＣＳ）、ｍ－マレイミドベンゾイル－Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル（ＭＢＳ）、Ｎ－（α－マレイミドアセトキシ）－スクシンイミドエステル（ＡＭＡＳ）、スクシンイミジル－６－（β－マレイミドプロピオンアミド）ヘキサノエート（ＳＭＰＨ）、Ｎ－スクシンイミジル４－（ｐ－マレイミドフェニル）－ブチレート（ＳＭＰＢ）、Ｎ－（ｐ－マレイミドフェニル）イソシアネート（ＰＭＰＩ）、Ｎ－スクシンイミジル４（２－ピリジルチオ）ペンタノエート（ＳＰＰ）、Ｎ－スクシンイミジル（４－イオド－アセチル）アミノ安息香酸エステル（ＳＩＡＢ）、６－マレイミドカプロイル（ＭＣ）、マレイミドプロパノイル（ＭＰ）、ｐ－アミノベンジルオキシカルボンイル（ＰＡＢ）、及びＮ－スクシンイミジル４（２－ピリジルチオ）ブタノエート（ＳＰＤＢ）から成る群より選択される請求項２８に記載の免疫複合体。

[請求項32] リンカーがプロテアーゼによって切断される、請求項２８に記載の免疫複合体。

[請求項33] リンカーが、バリン－シトルリン（Ｖａｌ－Ｃｉｔ）、アラニン－フェニルアラニン（ａｌａ－ｐｈｅ）、及びパラアミノベンゾイック酸（ＰＡＢＡ）の少なくとも１以上を含む、請求項２８に記載の免疫複合体。

[請求項34] 細胞傷害性能が抗体可変領域のフレームワーク領域配列のヒト化によって増強されている、請求項２３に記載の免疫複合体。

[請求項35] 請求項２３から３４の何れか１項に記載の免疫複合体を含む、ＣＤＨ３の過剰発現によって特徴づけられる疾患を治療するための医薬。

[請求項36] ＣＤＨ３の過剰発現によって特徴づけられる疾患が癌である、請求項３５に記載の医薬。

[請求項37] 癌が、結腸直腸癌、非小細胞肺癌、乳癌、頭頸部癌、卵巣癌、肺癌、浸潤性膀胱癌、膵臓癌、脳の転移性癌、甲状腺癌、頭頸部扁平上皮癌、食道扁平上皮癌、肺扁平上皮癌、皮膚扁平上皮癌、メラノーマ、乳腺癌、肺腺癌、子宮頸部扁平上皮癌、膵臓扁平上皮癌、結腸扁平上皮癌、又は胃扁平上皮癌、前立腺癌、骨肉腫又は軟組織肉腫から選択される、請求項３６に記載の医薬。

[請求項38] 抗腫瘍剤として使用する、請求項３５から３７の何れか１項に記載の医薬。