

明 細 書

発明の名称：抗CDCP1抗体

技術分野

[0001] 本発明は、抗CDCP1抗体に関する。より具体的には、健常人骨髓造血幹細胞との結合性が低い抗ヒトCDCP1抗体およびその断片、ならびにそれらの使用に関する。

背景技術

[0002] ヒトCDCP1 (cub domain containing protein 1) (以下hCDCP1とも称する) は、全長836アミノ酸からなり、3つのCUBドメイン (complement C1r/C1s, Uegf, Bmp1ドメイン) を有するI型細胞膜貫通タンパク質である (非特許文献1 参照)。CUBドメインは、BMP1やC1rの他、TMPRSS7などのプロテアーゼ活性を持つタンパク質、LRP3、NRP1およびTLL2などの細胞間相互作用に関わるタンパク質など多くのタンパク質に存在するが、分子機能の統一的な理解は不足している。細胞外ドメインのN末側には多数のN-グリコシル化部位があり、グリコシル化の程度とがん細胞の転移性状態との間に関連性がみとめられている (非特許文献2 参照)。hCDCP1は種々の細胞で発現しているがその可溶性リガンドは不明であり、一方でEGFRなど様々な膜タンパク質と相互作用することが示唆されている (非特許文献3 参照)。hCDCP1タンパク質は、電気泳動において135kDaのバンドサイズを示すが、CUB1ドメインとCUB2ドメインの間の368/369番目ないしは369/370番目のアミノ酸の部位がセリンプロテアーゼによって切断されると、70kDaの断片が生じる。 (非特許文献1 参照)。

[0003] hCDCP1は、細胞内領域にある734番目、743番目、762番目のチロシン残基がSrcファミリーキナーゼの働きなどによりリン酸化される。リン酸化されたhCDCP1はPKC δ のリン酸化などにより下流のシグナルを惹起し、足場非依存的増殖、細胞外マトリックスの分解、細胞遊走および上皮間葉転換などを促進し、がん細胞の転移を引き起こす。また、hCDCP1はEGFR、HER2などさまざまな

分子と相互作用してがん細胞の増殖、転移を促進することが知られている。

[0004] hCDCP1は、様々ながん細胞および正常組織において発現していることが報告されている。例えば、前立腺がん、肺癌、大腸癌、卵巣がんなどのがん細胞、それらより樹立された細胞株、さらには結腸、皮膚、小腸、および前立腺などの正常組織においてhCDCP1 mRNAおよびタンパク質の発現が報告されている（特許文献1、特許文献2参照）。

[0005] 現在までにいくつかのhCDCP1に対する抗体（以下、抗ヒトCDCP1ないし抗hCDCP1抗体と称することもある）が知られている。

特許文献2には、抗hCDCP1ポリクローナル抗体ならびにこの抗体を用いた卵巣がんのスクリーニング方法、診断方法および治療方法が開示されている。特許文献1には抗hCDCP1モノクローナル抗体（クローン名：25A11）が開示されている。25A11にサボリンを結合させたADC（antibody-drug-conjugate）化抗体が、*in vitro*においてPC3癌細胞株に対して細胞傷害活性を示し、このADC化抗体を静脈内投与することにより顕著な腫瘍成長阻害活性が発揮されることが示されている。

また、特許文献4には、複数の抗hCDCP1抗体が開示されており、PBD（pyrrolizidine）でADC化した抗hCDCP1抗体が、*in vitro*において前立腺がん細胞株に対して細胞傷害活性を示すこと、MMAE（monomethyl auristatin E）でADC化した抗hCDCP1抗体が、乳がん細胞株、大腸癌細胞株または前立腺がん細胞株を移植したマウスゼノグラフトモデルにおいて抗腫瘍活性を示すことが開示されている。

[0006] さらに、特許文献3には、4つの抗hCDCP1モノクローナル抗体（CUB1抗体、CUB2抗体、CUB3抗体およびCUB4抗体；各々、ハイブリドーマクローンCUB1～4由来）が開示されている。これらの抗hCDCP1モノクローナル抗体は、正常CD34陽性（CD34⁺）細胞および正常CD133陽性（CD133⁺）細胞に発現するhCDCP1タンパク質に結合するため、当該抗体を用いた造血幹細胞、間葉幹細胞および神経幹細胞などの分離および同定に使用できることが開示されている。

先行技術文献

特許文献

- [0007] 特許文献1：国際公報WO 2 0 0 8 / 1 3 3 8 5 1号
特許文献2：欧州特許公開公報 1 6 7 7 8 7 5 号
特許文献3：米国特許公開公報 7, 5 4 1, 0 3 0 号
特許文献4：国際公報WO 2 0 1 8 / 1 1 2 3 3 4 号

非特許文献

- [0008] 非特許文献1：Mostageerら, Oncogene 20:4402-4408 2001.
非特許文献2：Yangら, Oncotarget 6:43743-58 2015.
非特許文献3：Heら, Oncoscience 3:5-8 2016.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0009] 上述のように、hCDCP1 mRNAおよびhCDCP1タンパク質は正常組織／細胞およびがん組織／細胞において発現が確認されており、特許文献3に開示されているCUB1抗体は、hCDCP1を発現するK562細胞（ヒト慢性骨髄性白血病細胞）の他、正常なCD34⁺/CD38⁻骨髄細胞にも強く結合することが示されている。

さらに、本発明者らは、特許文献2に開示されている25A11由来の抗hCDCP1抗体、特許文献3に開示されているCUB4抗体およびBioLegend社から市販されている抗hCDCP1抗体（クローン名：CUB1）は、hCDCP1を発現する各種癌細胞の他、正常なCD34陽性骨髄細胞にも強く結合することを確認した（図11、図12、図13A、図15および図16参照）。

骨髄細胞のうちCD34陽性の細胞集団には、ヒトの血液系細胞全体を再生する能力のある造血幹細胞が含まれており、CD34はヒト造血幹細胞の細胞表面マーカーの一つであると考えられている。

- [0010] これら既知の抗体の造血幹細胞に対して強く結合するという性質は、抗腫瘍薬としてこれらの抗hCDCP1抗体を用いる場合に深刻な問題を引き起こす。すなわち、抗hCDCP1抗体が結合した正常な骨髄細胞が免疫機能（例えばADCC活性）により攻撃され、細胞が属する組織の機能阻害および機能抑制が生じ

、重篤な副作用を生じる可能性が高い。さらには、抗hCDCP1抗体をADC化した場合、ADC化抗体が正常組織及び細胞にも害を及ぼすことにより、一層顕著かつ深刻な悪影響を与えてしまう。

[0011] したがって、本発明の目的は、上記重篤な副作用を惹起する可能性が低い、抗hCDCP1抗体の提供である。

課題を解決するための手段

[0012] 本発明者らは、様々な抗hCDCP1抗体の抗原結合特性を検討したところ、hCDCP1を発現する種々のがん細胞に結合する一方、hCDCP1を発現する造血幹細胞などのCD34陽性細胞に対しては相対的に弱く結合する性質を有する新規の抗hCDCP1抗体を調製することに成功した。

従って、本発明は、CDCP1に結合する抗体であって、CD34陽性細胞との結合性が低いことを特徴とする抗体およびその抗原結合断片である。

発明の効果

[0013] 本発明により、CD34陽性細胞（例えば、CD34陽性骨髄細胞）に対する結合性が低い抗hCDCP1抗体が提供される。本発明にかかる抗hCDCP1抗体は、ADC化することによって抗腫瘍活性を示すことから、副作用の少ない抗がん剤として効果を発揮する。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]hCDCP1細胞外ドメイン精製タンパクのゲル浸透クロマトグラフィーのヒストグラムを示す。

[図2]hCDCP1細胞外ドメイン精製タンパクをプラスミンによって切断処理したタンパクのSDS-PAGEの結果を示す。

[図3]hCDCP1を強制発現するBa/F3細胞の細胞表面のhCDCP1タンパク発現量のフローサイトメトリーによる観察結果を示す。

[図4]hCDCP1を強制発現するBa/F3細胞のトリプシン処理による細胞表面CDCP1の切断結果を示す。Aはフローサイトメトリーにより測定された、細胞集団のPEの平均蛍光強度の経時的変化を示す。Bは切断型hCDCP1分子に対するウェスタンブロットティングの結果である。

[図5]PC3細胞とhCDCP1欠損PC3細胞を用いた細胞ELISAによる、抗hCDCP1抗体産生ハイブリドーマのスクリーニング結果を示す。実験1、実験2および実験3（実施例の項を参照のこと）における各免疫動物から作製されたハイブリドーマの培養上清を用いた細胞ELISAの結果を、A、BおよびCとDに示す。

[図6A]マウス・ヒトキメラ抗体（mh12A041シリーズ、mh14A025シリーズ）を作製した配列のCDR変異導入箇所を示す。

[図6B]マウス・ヒトキメラ抗体（mh14A043シリーズ、mh14A063シリーズ）を作製した配列のCDR変異導入箇所を示す。

[図7]マウス・ヒトキメラ抗体のhCDCP1強制発現細胞への反応性のフローサイトメトリーによる観察結果を示す。

[図8]マウス・ヒトキメラ抗体のトリプシン処理したhCDCP1強制発現Ba/F3細胞に対する反応性のフローサイトメトリーによる観察結果を示す。

[図9]マウス・ヒトキメラ抗体のカニクイザルCDCP1に対する反応性のフローサイトメトリーによる観察結果を示す。

[図10A]マウス・ヒトキメラ抗体のがん細胞株（SK-MES-1、H358、MDA-MB-231、HCC1143、Capan-2、DLD-1およびOVCA3）への反応性のフローサイトメトリーによる観察結果を示す。

[図10B]マウス・ヒトキメラ抗体のがん細胞株（SK-OV-3、TFK-1、PC3およびDU145）および正常組織由来初代培養細胞（HMEpCおよびNHEK）への反応性のフローサイトメトリーによる観察結果を示す。

[図11]ハイブリドーマの産生するマウス抗体の、 $10\mu\text{g/mL}$ の比較抗体濃度において健常人骨髄CD34陽性細胞に対する反応性を比較した、フローサイトメトリーによる観察結果を示す。

[図12]マウス・ヒトキメラ抗体の、 $10\mu\text{g/mL}$ の比較抗体濃度において健常人骨髄CD34陽性細胞に対する反応性を比較した、フローサイトメトリーによる観察結果を示す。

[図13]A～Cは、ビオチン化したマウス・ヒトキメラ抗体の健常人骨髄CD34陽性細胞に対する反応性のフローサイトメトリーによる観察結果を示す。D

は、A～Cで用いた抗RSウイルス抗体ビオチン化抗体と、正常ヒト血清由来精製IgGビオチン化タンパクの、10ng/mLの比較抗体濃度における、骨髓CD34陽性細胞に対する反応性を比較した図を示す。

[図14]ヒト化された抗hCDCP1抗体のhCDCP1強制発現Ba/F3細胞に対する反応性のフローサイトメトリーによる観察結果を示す。

[図15]ビオチン化したヒト化抗hCDCP1抗体、ビオチン化した比較対象抗体の、10ng/mLの比較抗体濃度における、健常人骨髓CD34陽性細胞に対する反応性のフローサイトメトリーによる観察結果を示す。

[図16]ビオチン化したヒト化抗体の健常人骨髓CD34陽性細胞に対する反応性の濃度依存性を、フローサイトメトリーによって観察した結果を示す。

[図17]PBDを結合させた抗hCDCP1マウス・ヒトキメラ抗体薬物複合体のがん細胞株および正常組織由来初代培養細胞に対するin vitroにおける細胞傷害活性を示す。

[図18]PBDを結合させたヒト化抗hCDCP1抗体薬物複合体の、癌細胞株および正常ヒト表皮角化細胞初代培養細胞に対するin vitroにおける細胞傷害活性を示す。

[図19]AおよびBは、PBDを結合させた抗hCDCP1マウス・ヒトキメラ抗体薬物複合体のPC3細胞株ゼノグラフトモデル（scidマウスモデル）における抗腫瘍活性を示す。CおよびDは、PBDを結合させた抗hCDCP1マウス・ヒトキメラ抗体薬物複合体のPC3細胞株ゼノグラフトモデル（ヌードマウスモデル）における抗腫瘍活性を示す。

[図20]Aは、PBDを結合させたヒト化抗hCDCP1抗体薬物複合体のPC3細胞株ゼノグラフトモデル（ヌードマウスモデル）における抗腫瘍活性を示す。Bは、PBDを結合させたヒト化抗hCDCP1抗体薬物複合体の大腸癌細胞株HCT116細胞株ゼノグラフトモデルにおける抗腫瘍活性を示す。

[図21]MMAEを結合させたヒト化抗hCDCP1抗体薬物複合体のHCT116細胞株ゼノグラフトモデルにおける抗腫瘍活性を示す。

発明を実施するための形態

[0015] 本発明の第1の実施形態は、ヒトCDCP1に結合する抗体であって、CD34陽性(CD34⁺)細胞との結合性が低いことを特徴とする、前記抗体(以下「本発明の抗hCDCP1抗体」とも記載する)またはその抗原結合断片である。

CD34陽性細胞とは、その細胞表面にCD34抗原を発現している細胞のことである。CD34は、分子量約110kDaの単鎖膜貫通型リン酸化糖タンパクで、細胞外部に構造の異なる2のドメインを有している。CD34は様々な体性幹細胞の表面抗原マーカーであり、骨髓由来の造血幹細胞／血管内皮前駆細胞、骨格筋衛星細胞、毛包幹細胞、脂肪組織間葉系幹細胞などに発現している。

ここで、CD34陽性細胞の例を挙げるとすれば、例えば、血球系細胞に分化可能な造血幹細胞などが挙げられる。造血幹細胞においては最も未分化な細胞で最も高く発現しており、各細胞系統に分化するに従って発現が低下していく。

[0016] ここで、本発明のhCDCP1抗体のCD34陽性細胞に対する「結合性」とは、当該抗hCDCP1抗体がCD34陽性細胞のいずれかの部位と結合する能力(結合能)のことである。第1の実施形態において、抗hCDCP1抗体とヒトCD34陽性細胞との結合性の評価は、非特異的ヒトIgGのCD34陽性細胞に対する結合能と比較して、相対的に評価する。ここで「非特異的ヒトIgG」とは、ヒトCDCP1タンパク質に対する特異的反応性を有さないヒト由来のIgGのことであり、具体的にはヒトCDCP1に対して特異的反応性を有しないことが知られているモノクローナル抗体、あるいはより好ましくは、CDCP1に対して特異的反応性を有しない複数のモノクローナル抗体の混合物、あるいはより好ましくは、ヒト生体血清よりアフィニティクロマトグラフィーなどの手法により精製抽出したIgG混合物を指す。具体的な評価方法としては、抗hCDCP1抗体と非特異的ヒトIgGが同一の抗体濃度(以下「比較抗体濃度」とする)の条件下(すなわち、抗hCDCP1抗体の濃度と非特異的ヒトIgGの濃度が同一である条件下)において、ヒトCD34陽性細胞に対して抗hCDCP1抗体が非特異的ヒトIgGと同程度の結合能を示したときには抗hCDCP1抗体のヒトCD34陽性細胞に対する結合性は低いと評価する。例えば、ヒトCD34陽性細胞に対して抗hCDCP1抗体が非特異的ヒトI

gGと比較して、統計的に有意に高い結合能を示さない場合は、結合性は低いと評価してもよい。また、抗hCDCP1抗体が非特異的ヒトIgGと比較して高い結合能を示したときには抗hCDCP1抗体のヒトCD34陽性細胞に対する結合性は高いと評価するものとする。例えば、ヒトCD34陽性細胞に対して抗hCDCP1抗体が非特異的ヒトIgGと比較して、統計的に有意に高い結合能を示した場合は、結合性は高いと評価してもよい。

[0017] また、他の視点としては、ある指標となる抗体のCD34陽性細胞への結合性よりも低いかまたは同程度の結合性を有する抗体が本願発明の範囲である。例えば、既知抗体であるCUB 4 よりもCD34陽性細胞に対する結合性が低い抗体（クローン名：h12A041VH1A/VL）と同程度又はそれより低い結合性を有する抗体が挙げられる。

[0018] ここで、「比較抗体濃度」は、特に限定はしないが、ある特定の濃度点を意味し、例えば、10 ng/mL以上のいずれかの濃度、100 ng/mL以上のいずれかの濃度、1 μ g/mL以上のいずれかの濃度、より好ましくは10 μ g/mL以上のいずれかの濃度である。

また、ここで、10 ng/mLの濃度点は、当該試験系においてCUB 4 が十分に反応する濃度、即ち、CUB4がCD34陽性細胞と十分に結合する濃度である。そのため、この濃度点において十分に結合性の比較評価が可能である。

また、抗hCDCP1抗体または非特異的ヒトIgGとCD34陽性細胞との結合性の評価は、特に限定はしないが、例えば、フローサイトメトリー分析、ELISA法、RIA法、表面プラズモン共鳴法などで実施することができる。

[0019] 本発明の抗hCDCP1抗体は、例えば、次のようにして調製することができる。ヒトCDCP1の細胞外ドメインの全体もしくはその一部、または細胞外ドメインの全体もしくはその一部が表面上に発現している細胞などを抗原として作製した抗体の中から、がん細胞上に発現するヒトCDCP1に反応する抗体をスクリーニングし、さらに、スクリーニングされた抗体群の中から、健常人骨髓細胞のCD34陽性細胞分画に対する反応性が低い抗体を選択することで、所望の抗体を調製することができる。

[0020] 本明細書における「抗体」は、その調製方法およびその構造は特に限定されるものではなく、例えば、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体またはナノ抗体など、所望の抗原と所望の特性で結合する「抗体」の全てが含まれる。

本発明の抗hCDP1抗体がポリクローナル抗体の場合、例えば、免疫動物（限定はしないが、例えば、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、ニワトリ、モルモット、マウス、ラットまたはブタなど）に対して、抗原およびアジュバントの混合物をインジェクトすることにより調製することができる。通常は、抗原および／またはアジュバントを免疫動物の皮下または腹腔内へ複数回インジェクトする。アジュバントとして、限定はしないが、例えば、完全フロイントおよびモノホスホリル脂質A合成ートレハロースジコリノミコレート（MPL-TMD）が含まれる。抗原の免疫後、免疫動物由来の血清から、定法により（例えば、ProteinAを保持したセファロースなどを用いる方法など）抗hCDP1抗体を精製することができる。

[0021] また、本発明の抗hCDP1抗体がモノクローナル抗体の場合、例えば、以下のようにして作製することができる。なお、本明細書において「モノクローナル」とは、実質的に均一な抗体の集団（抗体を構成する重鎖、軽鎖のアミノ酸配列が同一である抗体集団）から得られた抗体の特性を示唆するものであって、抗体が特定の方法（例えば、ハイブリドーマ法など）により作製されることを意味するものではない。

モノクローナル抗体の作製方法としては、例えば、ハイブリドーマ法（KohlerおよびMilstein, Nature 256 495 1975）、または、組換え法（米国特許第4,816,567号）などを挙げることができる。あるいは、本発明の抗hCDP1抗体は、ファージ抗体ライブラリ（例えば、Clacksonら, Nature 352 624-628 1991; Marksら, J.Mol.Biol. 222 581-597 1991など）や細胞ライブラリ（例えば、特許4214234号; Seoら, Nature Biotech., 23 731-735 2005など）から単離してもよい。より具体的に説明すると、ハイブリドーマ法を用いて調製する場合、その調製方法には、例えば、以下に示す4つの工程が含まれる

：（i）抗原を免疫動物に免疫する、（ii）モノクローナル抗体分泌性（または潜在的に分泌性）のリンパ球を回収する、（iii）リンパ球を不死化細胞に融合させる、（iv）所望のモノクローナル抗体を分泌する細胞を選択する。免疫動物としては、例えば、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギなどが選択可能である。免疫後、宿主動物から得られたリンパ球はハイブリドーマ細胞を樹立するために、ポリエチレングリコールなどの融合剤や電気融合法を用いて不死化細胞株と融合する。融合細胞としては、例えば、ラットもしくはマウスのミエローマ細胞株が使用される。細胞融合を行った後、融合しなかったリンパ球および不死化細胞株の成長または生存を阻害する1または複数の基質を含む適切な培地中で細胞を生育させる。通常の技術では、酵素のヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（HGPRTまたはHPRT）を欠く親細胞を使用する。この場合、ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンがHGPRT欠損細胞の成長を阻害し、ハイブリドーマの成長を許容する培地（HAT培地）に添加される。このようにして得られたハイブリドーマから、所望の抗体を産生するハイブリドーマを選択し、選択したハイブリドーマが生育する培地から、常法に従い、目的のモノクローナル抗体を取得することができる。

このようにして調製したハイブリドーマをインビトロ培養し、あるいは、マウス、ラット、モルモット、ハムスターなどの腹水中でインビボ培養し、目的の抗体を培養上清、あるいは、腹水から調製することができる。

[0022] ナノ抗体とは、抗体重鎖の可変領域（variable domain of the heavy chain of heavy chain antibody；VHH）からなるポリペプチドのことである。通常ヒトなどの抗体は重鎖と軽鎖から構成されているが、ラマ、アルパカおよびラクダなどのラクダ科の動物では、重鎖のみからなる1本鎖抗体（重鎖抗体）を産生する。重鎖抗体は、通常重鎖および軽鎖からなる抗体と同様に、標的抗原を認識し、抗原に結合することができる。重鎖抗体の可変領域は、抗原への結合親和性を有する最小単位であり、この可変領域断片は「ナノ抗体」と呼ばれている。ナノ抗体は、高耐熱性、消化耐性、常温安定性があり

、遺伝子工学的手法により容易に大量に調製することが可能である。

- [0023] ナノ抗体は、例えば、以下のようにして作製することができる。ラクダ科の動物に抗原を免疫し、採取した血清から目的の抗体の有無を検出し、所望の抗体価が検出された免疫動物の末梢血リンパ球由来のRNAからcDNAを作製する。得られたcDNAからVHHをコードするDNA断片を増幅して、これを、ファージミドに挿入して、VHHファージミドライブラリを調製する。作製したVHHファージミドライブラリから数回のスクリーニングを経て、所望のナノ抗体を作製することができる。
- [0024] 本発明の抗hCDCP1抗体は、遺伝子組換え抗体であってもよい。遺伝子組換え抗体としては、限定はされないが、例えば、ヒト抗体およびヒト抗体とのキメラ抗体が挙げられる。キメラ抗体とは、例えば、異なる動物種由来の可変領域と定常領域を連結した抗体（例えば、マウス由来抗体の可変領域をヒト由来の定常領域に結合させた抗体）などのことで（例えば、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81, 6851-6855, (1984) など）、遺伝子組換え技術によって容易に構築することができる。
- [0025] ヒト化抗体は、フレームワーク領域（FR）にヒト由来の配列を持ち、相補性決定領域（CDR）が他の動物種（例えば、マウスなど）由来の配列からなる抗体である。ヒト化抗体は、まず、他の動物種、ここではマウスで説明するが、マウス由来の抗体の可変領域からそのCDRをヒト抗体可変領域に移植し、重鎖および軽鎖可変領域を再構成した後、これらヒト化された再構成ヒト抗体可変領域をヒト抗体定常領域に連結することで作製することができる。このようなヒト化抗体の作製法は、当分野において周知である（例えば、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 10029-10033 (1989) など）。
- [0026] 本発明の抗体の抗原結合断片とは、本発明の抗体の一部分の領域であって、ヒトCDCP1に結合する抗体断片のことであり、断片としては、例えば、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv (variable fragment of antibody)、一本鎖抗体（重鎖、軽鎖、重鎖可変領域、軽鎖可変領域およびナノ抗体等）、scFv (single chain Fv)、diabody (scFv二量体)、dsFv (disulfide-stabilized Fv)

、ならびに、本発明の抗体のCDRを少なくとも一部に含むペプチド等が挙げられる。

- [0027] Fabは、抗体分子をタンパク質分解酵素パパインで処理して得られる断片のうち、重鎖のN末端側約半分と軽鎖全体とがジスルフィド結合で結合した、抗原結合活性を有する抗体断片である。Fabの作製は、抗体分子をパパインで処理して断片を取得する他、例えば、FabをコードするDNAを挿入した適当な発現ベクターを構築し、これを適当な宿主細胞（例えば、CHO細胞などの哺乳類細胞、酵母細胞、昆虫細胞など）に導入後、細胞内でFabを発現させることで実施することができる。
- [0028] $F(ab')_2$ は、抗体分子をタンパク質分解酵素ペプシンで処理して得られる断片のうち、Fabがヒンジ領域のジスルフィド結合を介して結合されたものよりやや大きい、抗原結合活性を有する抗体断片である。 $F(ab')_2$ は、抗体分子をペプシンで処理して断片を取得する他、Fabをチオエーテル結合あるいはジスルフィド結合させて作製することも可能で、さらに、Fabと同様に遺伝子工学的手法によっても作製することができる。
- [0029] Fab' は、上記 $F(ab')_2$ のヒンジ領域のジスルフィド結合を切断した、抗原結合活性を有する抗体断片である。 Fab' も、Fab等と同様に遺伝子工学的な手法により作製することができる。
- [0030] scFvは、1本の重鎖可変領域（VH）と1本の軽鎖可変領域（VL）とを適当なペプチドリンカーを用いて連結した、VH-リンカー-VLないしはVL-リンカー-VHポリペプチドであって、抗原結合活性を有する抗体断片である。scFvは、抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域をコードするcDNAを取得し、遺伝子工学的手法により作製することができる。
- [0031] diabodyは、scFvが二量体化した抗体断片で、2価の抗原結合活性を有する抗体断片である。2価の抗原結合活性は、同一抗原結合活性であっても、または、一方が異なる抗原結合活性であってもよい。diabodyは、抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域をコードするcDNAを取得し、重鎖可変領域と軽鎖可変領域をペプチドリンカーで結合したscFvをコードするcDNAを構築して、遺

伝子工学的手法により作製することができる。

- [0032] dsFvは、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域中のそれぞれ1アミノ酸残基をシステイン残基に置換したポリペプチドを、該システイン残基間のジスルフィド結合を介して結合させたものをいう。システイン残基に置換するアミノ酸残基は、抗体の立体構造予測に基づいて選択することができる。dsFvは、抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域をコードするcDNAを取得し、dsFvをコードするDNAを構築して遺伝子工学的手法により作製することができる。
- [0033] CDRを含むペプチドは、重鎖または軽鎖のCDR（CDR1～3）の少なくとも1領域以上を含むように構成される。複数のCDRを含むペプチドは、直接または適当なペプチドリンカーを介して結合させることができる。CDRを含むペプチドは、抗体の重鎖または軽鎖のCDRをコードするDNAを構築し、発現ベクターに挿入する。ベクターの種類としては特に限定はなく、その後に導入される宿主細胞の種類等によって適宜選択すればよい。これらを抗体として発現させるために適当な宿主細胞（例えば、CHO細胞などの哺乳類細胞、酵母細胞、昆虫細胞など）に導入し製造することができる。また、CDRを含むペプチドは、Fmoc法（フルオレニルメチルオキシカルボニル法）およびtBoc法（t-ブチルオキシカルボニル法）等の化学合成法によって製造することもできる。
- [0034] ヒト抗体（完全ヒト抗体）は、一般にV領域の抗原結合部位である超可変領域（Hypervariable region）、V領域のその他の部分および定常領域の構造が、ヒトの抗体と同じ構造を有するものである。ヒト抗体は、公知の技術により当業者であれば容易に作製することができる。ヒト抗体は、例えば、ヒト抗体のH鎖およびL鎖の遺伝子を含むヒト染色体断片を有するヒト抗体産生マウスを用いた方法（例えば、Tomizukaら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (2000) 97, 722-727など）や、ヒト抗体ライブラリーより選別したファージディスプレイ由来のヒト抗体を取得する方法（例えば、Siriwardenaら、Ophthalmology, (2002) 109 (3), 427-431等を参照）により取得することができる。
- [0035] 本発明の抗体の抗原結合断片を用いて、多重特異性抗体を構成することが

できる。多重特異性とは2つ以上の抗原に対して結合特異性を有することを意味し、例えば、2つ以上の抗原に対して結合特異性を有するモノクローナル抗体あるいは抗原結合断片を含むタンパク質の形態が挙げられる。これは既知の技術によって当業者によって実施される。多重特異性を構築する方法としては、異なる2種類の抗体重鎖分子がヘテロ二量体を形成するようにタンパク工学的操作を施した非対称IgGの構築技術、抗体から得た抗原結合断片どうしを連結するあるいは別の抗体分子と連結する技術、などに分類される手法が複数開発されている。具体的な構築法の例はたとえば以下の文献を参考にすることができる。Kontermann, R. E., & Brinkmann, U. (2015). Bisppecific antibodies. *Drug Discovery Today*, 20(7), 838-847.

[0036] 本発明の抗hCDP1抗体およびその抗原結合断片として、例えば、CDR (complementarity determining region) 1～3のアミノ酸配列が下記の(A)～(S)のいずれかを満たすことを特徴とする抗体およびその抗原結合断片を挙げることができる。

(A) 配列番号25で表されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR1、
配列番号26で表されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR2、
配列番号27で表されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR3、
配列番号29で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1、
配列番号30で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2、および
配列番号31で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3を有する。

[0037] (B) 配列番号33で表されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR1、
配列番号34で表されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR2、
配列番号35で表されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR3、
配列番号37で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1、
配列番号38で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2、および
配列番号39で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3を有する。

[0038] (C) 配列番号41で表されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR1、
配列番号42で表されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR2、

配列番号 43 で表されるアミノ酸配列を含む重鎖 CDR3、
配列番号 45 で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖 CDR1、
配列番号 46 で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖 CDR2、および
配列番号 47 で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖 CDR3 を有する。

[0039] (D) 配列番号 49 で表されるアミノ酸配列を含む重鎖 CDR1、
配列番号 50 で表されるアミノ酸配列を含む重鎖 CDR2、
配列番号 51 で表されるアミノ酸配列を含む重鎖 CDR3、
配列番号 53 で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖 CDR1、
配列番号 54 で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖 CDR2、および
配列番号 55 で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖 CDR3 を有する。

[0040] (E) 配列番号 57 で表されるアミノ酸配列を含む重鎖 CDR1、
配列番号 58 で表されるアミノ酸配列を含む重鎖 CDR2、
配列番号 59 で表されるアミノ酸配列を含む重鎖 CDR3、
配列番号 61 で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖 CDR1、
配列番号 62 で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖 CDR2、および
配列番号 63 で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖 CDR3 を有する。

[0041] (F) 配列番号 65 で表されるアミノ酸配列を含む重鎖 CDR1、
配列番号 66 で表されるアミノ酸配列を含む重鎖 CDR2、
配列番号 67 で表されるアミノ酸配列を含む重鎖 CDR3、
配列番号 69 で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖 CDR1、
配列番号 70 で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖 CDR2、
配列番号 71 で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖 CDR3 を有する。

[0042] (G) 配列番号 73 で表されるアミノ酸配列を含む重鎖 CDR1、
配列番号 74 で表されるアミノ酸配列を含む重鎖 CDR2、
配列番号 75 で表されるアミノ酸配列を含む重鎖 CDR3、
配列番号 77 で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖 CDR1、
配列番号 78 で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖 CDR2、および
配列番号 79 で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖 CDR3 を有する。

- [0043] (H) 配列番号 8 1 で表されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR1、
配列番号 8 2 で表されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR2、
配列番号 8 3 で表されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR3、
配列番号 8 5 で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1、
配列番号 8 6 で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2、および
配列番号 8 7 で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3を有する。
- [0044] (I) 配列番号 8 9 で表されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR1、
配列番号 9 0 で表されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR2、
配列番号 9 1 で表されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR3、
配列番号 9 3 で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1、
配列番号 9 4 で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2、および
配列番号 9 5 で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3を有する。
- [0045] (J) 配列番号 9 7 で表されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR1、
配列番号 9 8 で表されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR2、
配列番号 9 9 で表されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR3、
配列番号 1 0 1 で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1、
配列番号 1 0 2 で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2、
配列番号 1 0 3 で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3を有する。
- [0046] (K) 配列番号 1 0 5 で表されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR1、
配列番号 1 0 6 で表されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR2、
配列番号 1 0 7 で表されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR3、
配列番号 1 0 9 で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1、
配列番号 1 1 0 で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2、および
配列番号 1 1 1 で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3を有する。
- [0047] (L) 配列番号 4 9 で表されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR1、
配列番号 5 0 で表されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR2、
配列番号 5 1 で表されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR3、
配列番号 5 3 で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1、

配列番号 54 で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖 CDR2、および
配列番号 55 で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖 CDR3 を有する。

[0048] (M) 前記 (L) を満たす抗体において、Kabat 定義における軽鎖 28 番目および 29 番目のアミノ酸、および重鎖 102 番目のアミノ酸が他のアミノ酸に置換された軽鎖可変領域を有する。ここで他のアミノ酸として、限定はしないが、例えば、軽鎖 28 番目についてはセリン、トレオニン、アラニン、グリシン、ロイシン、イソロイシン、バリン、フェニルアラニン、アルギニン、トリプトファン、ヒスチジン、メチオニン、グルタミン、グルタミン酸、リジン、チロシンを挙げることができるが、好ましくはセリンである。軽鎖 29 番目についてはアラニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、メチオニン、アルギニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、リジンを挙げることができるが、好ましくはアラニンである。重鎖 102 番目についてはアラニン、グルタミン酸、セリン、トレオニン、グリシン、ロイシン、イソロイシン、バリン、フェニルアラニン、トリプトファン、メチオニン、リジン、ヒスチジン、グルタミンを挙げることができるが、好ましくはセリンである。

[0049] (N) 配列番号 65 で表されるアミノ酸配列を含む重鎖 CDR1、
配列番号 66 で表されるアミノ酸配列を含む重鎖 CDR2、
配列番号 67 で表されるアミノ酸配列を含む重鎖 CDR3、
配列番号 69 で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖 CDR1、
配列番号 70 で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖 CDR2、および
配列番号 71 で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖 CDR3 を有する。

[0050] (O) 前記 (N) を満たす抗体において、Kabat 定義における重鎖 54 番目および 55 番目のアミノ酸が他のアミノ酸に置換された重鎖可変領域を有する。ここで他のアミノ酸として、限定はしないが、例えば、重鎖 54 番目についてはセリン、トレオニン、アラニン、グリシン、ロイシン、イソロイシン、バリン、フェニルアラニン、アルギニン、トリプトファン、ヒスチジン、メチオニン、グルタミン、グルタミン酸、リジン、チロシンを挙げることができるが、好ましくは、セリン、フェニルアラニン、アルギニン、トレオニ

ン、トリプトファンである。重鎖55番目についてはアラニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、メチオニン、アルギニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、リジンを挙げることができるが、好ましくはアラニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ロイシン、メチオニンである。

- [0051] (P) 配列番号73で表されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR1、
配列番号74で表されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR2、
配列番号75で表されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR3、
配列番号77で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1、
配列番号78で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2、および
配列番号79で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3を有する。
- [0052] (Q) 前記(P)を満たす抗体において、Kabat定義における重鎖54番目および55番目のアミノ酸、軽鎖33番目のアミノ酸が他のアミノ酸に置換された重鎖および軽鎖可変領域を有する。ここで他のアミノ酸として、限定はしないが、例えば、重鎖54番目についてはセリン、トレオニン、アラニン、グリシン、ロイシン、イソロイシン、バリン、フェニルアラニン、アルギニン、トリプトファン、ヒスチジン、メチオニン、グルタミン、グルタミン酸、リジン、チロシンを挙げることができるが、好ましくはセリンである。重鎖55番目についてはアラニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、メチオニン、アルギニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、リジンを挙げることができるが、好ましくはアラニンである。軽鎖33番目のアミノ酸としては、セリン、トレオニン、アラニン、グリシン、ロイシン、イソロイシン、バリン、フェニルアラニン、アルギニン、トリプトファン、アスパラギン、アスパラギン酸、グルタミン、グルタミン酸、チロシン、リジン、ヒスチジンを挙げることができるが、好ましくはロイシンである。

- [0053] (R) 配列番号89で表されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR1、
配列番号90で表されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR2、
配列番号91で表されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR3、
配列番号93で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1、

配列番号 94 で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖 CDR2、および
配列番号 95 で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖 CDR3 を有する。

[0054] (S) 前記 (R) を満たす抗体において、Kabat 定義における重鎖 52a 番目
および 53 番目、軽鎖 33 番目が他のアミノ酸に置換された重鎖および軽鎖
可変領域を有する。ここで他のアミノ酸として、限定はしないが、例えば、
重鎖 52a 番目についてはセリン、トレオニン、アラニン、グリシン、ロイ
シン、イソロイシン、バリン、フェニルアラニン、アルギニン、トリプトフ
ァン、ヒスチジン、メチオニン、グルタミン、グルタミン酸、リジン、チロ
シンを挙げることができるが、好ましくは、セリンである。重鎖 53 番目
についてはアラニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、メチオニン、アルギ
ニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、リジンを挙げることができるが、好
ましくは、アラニンである。軽鎖 33 番目のアミノ酸としては、セリン、ト
レオニン、アラニン、グリシン、ロイシン、イソロイシン、バリン、フェ
ニルアラニン、アルギニン、トリプトファン、アスパラギン、アスパラギン酸
、グルタミン、グルタミン酸、チロシン、リジン、ヒスチジンを挙げること
ができるが、好ましくは、ロイシンである。

[0055] さらに、本発明の抗 hCDCP1 抗体およびその抗原結合断片として、例えば、
重鎖可変領域の CDR1~3 のアミノ酸配列が下記 (T) ~ (U) のいずれかを満
たし、軽鎖可変領域の CDR1~3 のアミノ酸配列が下記 (t) ~ (v) のいずれ
かを満たすことを特徴とする抗体またはその抗原結合断片を挙げることが
できる。

(T) 配列番号 49 で表されるアミノ酸配列を含む重鎖 CDR1、
配列番号 50 で表されるアミノ酸配列を含む重鎖 CDR2、および
配列番号 113 で表されるアミノ酸配列を含む重鎖 CDR3 を有する、

(U) 配列番号 183 で表されるアミノ酸配列を含む重鎖 CDR1、
配列番号 50 で表されるアミノ酸配列を含む重鎖 CDR2、および
配列番号 113 で表されるアミノ酸配列を含む重鎖 CDR3 を有する、

(t) 配列番号 117 で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖 CDR1、

配列番号54で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2、および

配列番号55で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3を有する、

(u) 配列番号186であらわされるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1、

配列番号54で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2、および配列番号55で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3。

(v) 配列番号188で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1、

配列番号54で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2、および

配列番号55で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3を有する、

[0056] さらにまた、本発明の抗hCDP1抗体およびその抗原結合断片として、配列番号24、配列番号32、配列番号40、配列番号48、配列番号56、配列番号64、配列番号72、配列番号80、配列番号88、配列番号96、配列番号104、配列番号112、配列番号114、配列番号124、配列番号126、配列番号128、配列番号130、配列番号132、配列番号134、配列番号136、配列番号138、配列番号140、配列番号142、配列番号144、配列番号146、配列番号150、配列番号152、配列番号169、配列番号170、配列番号172、配列番号173、配列番号177、配列番号178、配列番号179、配列番号182または配列番号184で表されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域のいずれか、および配列番号28、配列番号36、配列番号44、配列番号52、配列番号60、配列番号68、配列番号76、配列番号84、配列番号92、配列番号100、配列番号108、配列番号116、配列番号118、配列番号120、配列番号122、配列番号148、配列番号154、配列番号155、配列番号171、配列番号174、配列番号175、配列番号176、配列番号180、配列番号181、配列番号185または配列番号187で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域のいずれかを有する抗体、ならびに、これらの抗体を構成する重鎖可変領域および／または軽鎖可変領域の各アミノ酸配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、約81%以上、約82%以上、約83%以上、約84%以上、約85%以上、約86%以上、約87%以上、約88%以上、

約89%以上、より好ましくは約90%以上、約91%以上、約92%以上、約93%以上、約94%以上、約95%以上、約96%以上、約97%以上、約98%以上、最も好ましくは約99%以上のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列からなる抗体であって、ヒトCDCP1に結合し、ヒトCD34陽性細胞との結合性が低いことを特徴とする抗体、ならびにそれらの抗原結合断片を挙げることができる。

[0057] 本発明の第2の実施形態は、ヒトCDCP1に結合し、ヒトCD34陽性細胞との結合性が低いことを特徴とする抗体であって、第1の実施形態にかかる抗体（すなわち、本発明の抗hCDCP1抗体）とヒトCDCP1との結合を競合阻害する抗体（以下「本発明の競合抗体」とも記載する）またはその抗原結合断片である。本発明の競合抗体は、当業者において周知である競合実験などにより、調製および取得することができる。具体的には、第1の抗hCDCP1抗体（実施形態にかかる抗体）とヒトCDCP1との結合が、第2の抗hCDCP1抗体によって競合阻害を受けるとき、第1の抗hCDCP1抗体と第2の抗hCDCP1抗体は実質的に同一、または極近傍の抗原部位に結合していると判断される。そして、当該第2の抗hCDCP1抗体がCD34陽性細胞との結合性が低いときには、当該第2の抗hCDCP1抗体は本発明の競合抗体である。このような競合実験の方法として、例えば、Fab断片等を用いる方法が当該技術分野において、通常行われている。例えば、W095/11317、W094/07922、W02003/064473、W02008/118356およびW02004/046733などを参照のこと。

[0058] 本発明の第3の実施形態は、抗腫瘍活性を有する物質が結合している第1の実施形態にかかる抗体または第2の実施形態にかかる抗体またはその抗原結合断片である。

抗体に対し薬物などの抗腫瘍活性を有する物質を結合させ、がんの標的治療を行うことができる（このような複合体を以下「本発明の抗体薬物等複合体」と記載する）。この場合の抗腫瘍活性を有する物質とは、抗がん剤などの細胞傷害性の薬物、放射性同位元素、免疫系を操作して間接的に抗腫瘍活性を誘導する物質などが含まれるが、これに限るものではない。

[0059] 第3の実施形態において抗腫瘍活性を示す薬物を用いることができ、このような複合体を抗体薬物複合体と呼ぶ。使用される抗腫瘍活性を示す薬物として、例えば、Auristatin類（MMAE, MMAFなど）、Maytansine類（DM1、DM4など）、Tubulysin類、cryptophycin類、rhizoxinなどのチューブリン阻害剤および微小管重合阻害剤、Calicheamicin類、Doxorubicin、anthracycline類などの抗生物質類、Duocarmycin類、PBD（Benzodiazepine）類、IGNs（indolinobenzodiazepine）などのDNA合成阻害剤、Canptothecinアナログ（SN-38, DXdなど）のトポイソメラーゼII阻害剤、Amanitin類などのRNAポリメラーゼII阻害剤、spliceostatin類、thailanstatin類などのRNAスプライソソーム阻害剤などが知られているが、これらに限るものではない。

また抗腫瘍活性を示す薬物としては、光エネルギーによって励起され毒性を発現するような化合物を用いることもできる。このような抗体薬物複合体は、体内に投与して腫瘍細胞に結合させたのちに、体外から近赤外線などの光エネルギーを与えることによって腫瘍細胞を殺傷する、光免疫療法（photo immunotherapy : PIT）と呼ばれる治療法に使用することができる。本発明の抗hCDP1抗体も、光免疫療法に用いる抗体として使用してもよい。用いられる化合物としては、IR700などが知られているが、これに限るものではない。

[0060] また、抗体に放射性同位元素を結合させ、その同位元素の発する放射線を用いてがん細胞を殺傷する放射線免疫療法（radioimmunotherapy : RIT）が知られており、本発明の抗hCDP1抗体も放射線免疫療法に用いる抗体として使用することができる。本発明の第3の実施形態で用いられる放射性同位元素にはたとえば、 ^{131}I 、 ^{90}Y などの β 線核種、 ^{213}Bi 、 ^{211}At 、 ^{225}Ac 、 ^{223}Ra 、 ^{212}Pb などの α 線核種が知られているが、これらに限るものではない。

[0061] また、本発明の第3の実施形態において、腫瘍そのもの、あるいは免疫系など、腫瘍以外の組織の生理作用を操作することにより直接的・間接的に抗腫瘍活性を発揮する物質を使用することができる。免疫系を例にとると、操作する免疫系の要素としてはT細胞、B細胞、NK細胞などのリンパ球系細胞、単球、マクロファージ、樹状細胞、顆粒球などのミエロイド系細胞、あるい

はこれらの免疫系細胞に影響を与える物質を分泌・提示する免疫系細胞以外の細胞などを考えることができる。これらの細胞を操作する物質としては、がんワクチンペプチド、サイトカイン（インターロイキン類、インターフェロン類、コロニー刺激因子(CSF)類など）、ホルモン類、成長因子類（TGFファミリー、FGFファミリー、IGFファミリー、トロンボポエチン、エリスロポエチンなど）などを挙げることができるが、これらに限るものではない。

[0062] 抗体に抗腫瘍性物質を結合させる化学修飾の方法は、これまでに数多く知られており、例えば、以下のような方法が知られている。リジン残基側鎖への共有結合、システイン残基側鎖への共有結合などの化学的修飾方法、抗体ペプチド鎖中に非天然アミノ酸を導入し、その側鎖に対して部位特異的に化学的修飾を施す方法、抗体中の特定のアミノ酸配列や、修飾糖鎖に対して特異的な酵素反応を用いて修飾を施す方法、およびペプチド連結を行う酵素を用いた修飾方法などである。また、薬物等をタンパク質に結合させるために薬物等に化学的な改変を施し、タンパク質結合のためのリンカーとして用いることが一般的である。このような化学的リンカーには多くの種類が知られており、その性質によって、抗体薬物等複合体の体内における薬理作用が大きく変わる。たとえば、ヒドラゾンリンカー、バリナーシトルリンリンカー、SS結合リンカー、ピロリン酸リンカーなどは、体内の酵素などによって切断され、薬物が抗体から分離され、高い抗腫瘍効果を示す抗体薬物複合体を調製することが可能である。一方、このような化学的リンカーとして、体内での切断が起こりえないような化学構造を用いることも一般的に行われている。以上の方法に関する概要は例えば以下の文献に記載されている。TsuchikamaおよびAn, (2018). Antibody-drug conjugates: recent advances in conjugation and linker chemistries. Protein and Cell, 9 (1), 33-46.

[0063] 薬物－抗体結合比率（Drug Antibody Ratio: DAR）は、抗体薬物複合体において一つの抗体分子に対していくつの薬物分子が結合しているかを示した数値である。DARは薬物を抗体に化学結合させる方法によって変化し、一般的には1から8であるが、化学結合の様式によっては9以上のDARを持った抗体

薬物複合体を作製することも可能である。

[0064] 本発明の第4の実施形態は、第3の実施形態にかかる本発明の抗体薬物等複合体またはその抗原結合断片を含む、がんの予防または治療のための医薬組成物（以下「本発明の医薬組成物」とも記載する）である。

本発明の医薬組成物は、有効成分である本発明の抗体薬物等複合体またはその抗原結合断片の他、1または2以上の製剤用添加物を含む医薬組成物の形態で投与してもよい。また、当該実施形態にかかる医薬組成物中には、公知の他の薬剤を併せて配合してもよい。

本発明の抗体薬物等複合体またはその抗原結合断片を用いて、ヒトに投与可能な治療用抗体を製造する場合、その製造過程において抗体の精製後に化学的な修飾がしばしば起こることが知られている。このような化学的修飾への対応は、精製抗体の品質確保および安全性の確保において重要であることとして、当該技術分野において認識されている。具体的には、抗体のCDR領域を含む配列の中に、N型糖鎖修飾、タンパク切断、脱アミド化、ラセミ化、酸化などの修飾を受やすいアミノ酸配列モチーフがあった場合に精製抗体の品質低下を招くことが予想される。修飾を受けやすいアミノ酸配列モチーフとしては、例えば、アスパラギン残基、アスパラギン酸残基を含むモチーフが知られており（例えば、Sydowら、（2014）. Structure-based prediction of asparagine and aspartate degradation sites in antibody variable regions, PLoS ONE, 9（6）など）、抗体の活性を保ったままそれらのアミノ酸モチーフを改変することが可能であることを示すことは、抗体の有用性をより高める。

[0065] 本発明の医薬組成物は、経口または非経口用の剤型であってもよく、特に限定はしないが、例えば、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、シロップ剤、懸濁剤、座剤、軟膏、クリーム剤、ゲル剤、貼付剤、吸入剤または注射剤等が挙げられる。これらの製剤は常法に従って調製される。なお、液体製剤にあっては、用時、水または他の適当な溶媒に溶解または懸濁するものであってもよい。また、錠剤、顆粒剤は周知の方法でコーティングしてもよい。注

射剤の場合には、本発明の抗体またはその機能的断片を水に溶解させて調製されるが、必要に応じて生理食塩水あるいはブドウ糖溶液に溶解させてもよく、また、緩衝剤や保存剤を添加してもよい。

[0066] 本発明の医薬組成物の製造に用いられる製剤用添加物の種類、有効成分に対する製剤用添加物の割合、あるいは、医薬組成物の製造方法は、その形態に応じて当業者が適宜選択することが可能である。製剤用添加物としては無機または有機物質、あるいは、固体または液体の物質を用いることができ、一般的には、有効成分重量に対して、例えば、0.1重量%~99.9重量%、1重量%~95.0重量%、または1重量%~90.0重量%の間で配合することができる。具体的には、製剤用添加物の例として乳糖、ブドウ糖、マンニット、デキストリン、シクロデキストリン、デンプン、蔗糖、メタケイ酸アルミン酸マグネシウム、合成ケイ酸アルミニウム、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ヒドロキシプロピルデンプン、カルボキシメチルセルロースカルシウム、イオン交換樹脂、メチルセルロース、ゼラチン、アラビアゴム、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、軽質無水ケイ酸、ステアリン酸マグネシウム、タルク、トラガント、ベントナイト、ビーガム、酸化チタン、ソルビタン脂肪酸エステル、ラウリル硫酸ナトリウム、グリセリン、脂肪酸グリセリンエステル、精製ラノリン、グリセロゼラチン、ポリソルベート、マクロゴール、植物油、ロウ、流動パラフィン、白色ワセリン、フルオロカーボン、非イオン性界面活性剤、プロピレングルコールまたは水等が挙げられる。

[0067] 経口投与用の固形製剤を製造するには、有効成分と賦形剤成分、例えば、乳糖、澱粉、結晶セルロース、乳酸カルシウムまたは無水ケイ酸などと混合して散剤とするか、さらに必要に応じて白糖、ヒドロキシプロピルセルロースまたはポリビニルピロリドンなどの結合剤、カルボキシメチルセルロースまたはカルボキシメチルセルロースカルシウムなどの崩壊剤などを加えて湿式または乾式造粒して顆粒剤とする。錠剤を製造するには、これらの散剤お

よび顆粒剤をそのまま、あるいは、ステアリン酸マグネシウムまたはタルクなどの滑沢剤を加えて打錠すればよい。これらの顆粒または錠剤は、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート、メタクリル酸-メタクリル酸メチルポリマーなどの腸溶剤基剤で被覆して腸溶剤製剤、あるいは、エチルセルロース、カルナウバロウまたは硬化油などで被覆して持続性製剤とすることもできる。また、カプセル剤を製造するには、散剤または顆粒剤を硬カプセルに充填するか、有効成分をそのまま、あるいは、グリセリン、ポリエチレングリコール、ゴマ油またはオリーブ油などに溶解した後ゼラチンで被覆し軟カプセルとすることができる。

[0068] 注射剤を製造するには、有効成分を必要に応じて、塩酸、水酸化ナトリウム、乳糖、乳酸、ナトリウム、リン酸-水素ナトリウムまたはリン酸二水素ナトリウムなどのpH調整剤、塩化ナトリウムまたはブドウ糖などの等張化剤と共に注射用蒸留水に溶解し、無菌濾過してアンプルに充填するか、さらに、マンニトール、デキストリン、シクロデキストリンまたはゼラチンなどを加えて真空凍結乾燥し、用事溶解型の注射剤としてもよい。また、有効成分にレチシン、ポリソルベート80またはポリオキシエチレン硬化ヒマシ油などを加えて水中で乳化させ、注射剤用乳剤とすることもできる。

[0069] 直腸投与剤を製造するには、有効成分をカカオ脂、脂肪酸のトリ、ジおよびモノグリセリドまたはポリエチレングリコールなどの座剤用基材と共に加湿して溶解し、型に流し込んで冷却するか、有効成分をポリエチレングリコールまたは大豆油などに溶解した後、ゼラチン膜等で被覆してもよい。

[0070] 本発明の医薬組成物の投与量および投与回数は特に限定されず、治療対象疾患の悪化・進展の防止および／または治療の目的、疾患の種類、患者の体重や年齢などの条件に応じて、医師または薬剤師の判断により適宜選択することが可能である。

一般的には、経口投与における成人1日あたりの投与量は0.01~1,000 mg（有効成分重量）程度であり、1日1回または数回に分けて、または数日ごとに投与することができる。注射剤として用いる場合には、成人に対して1日量0.

001~100mg（有効成分重量）を連続投与または間欠投与することが望ましい。

[0071] 本発明の医薬組成物の別の形態として、本発明の抗体あるいはその抗原結合断片を細胞表面上に発現するT細胞などの細胞傷害性細胞を挙げることができる。キメラ抗原受容体発現T細胞(CAR-T)療法は、抗体の抗原結合部位とT細胞受容体の一部の融合遺伝子（キメラ抗原受容体遺伝子）をT細胞に発現させたのちにがん患者の体内に移入し、移入したT細胞ががん細胞を特異的に攻撃して抗腫瘍活性をもたらすことを用いた治療法である。本発明の抗体あるいはその抗原結合断片をコードする遺伝子を、上記キメラ抗原受容体遺伝子の構成要素として用いて、発現T細胞を構築することによって、ヒトCDCP1分子を発現する腫瘍を特異的に攻撃するCAR-T療法を構築することができる。

[0072] 本発明の医薬組成物は、細胞表面にhCDCP1を発現しているがん細胞であれば攻撃し、殺傷することが可能である。従って、本発明の医薬組成物が治療対象とするがんは、いかなるものであってもよく、特に限定されない。あえて、典型的ながんを例示するならば、例えば、肝細胞がん、胆管細胞がん、腎細胞がん、扁平上皮がん、基底細胞がん、移行細胞がん、腺がん、悪性ガストリノーマ、メラノーマ、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、悪性奇形腫、血管肉腫、カポジ肉腫、骨肉腫、軟骨肉腫、リンパ管肉腫、悪性髄膜腫、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、白血病および脳腫瘍等の悪性腫瘍、上皮細胞由来新生物（上皮癌腫）、基底細胞癌腫、腺癌腫、口唇がん、口腔がん、食道がん、小腸がんおよび胃がんのような消化管がん、結腸がん、直腸がん、膀胱がん、膵臓がん、卵巣がん、子宮頸がん、肺がん、乳がん、皮膚がん、前立腺がんなどの悪性新生物の他、全身の上皮系細胞、間葉系細胞または血液細胞を冒す他の既知のがんなどを挙げることができる。

[0073] 本発明の第5の実施形態は、本発明の医薬組成物を患者に投与することを含む、がんの予防および／または治療方法（以下「本発明の予防または治療方法」とも記載する）である。

ここで「治療」とは、すでにかんに罹患した患者において、その病態の進行および悪化を阻止または緩和することを意味し、これによってがんの進行および悪化を阻止または緩和することを目的とする処置のことである。

また、「予防」とは、治療を要するがんを発症するおそれがある者について、その発症を予め阻止することを意味し、これによってがんの発症を予め阻止することを目的とする処置のことである。さらに、がん治療後の再発を阻止するための処置も「予防」に含まれる。

また、治療および予防の対象はヒトに限定されず、ヒト以外の哺乳動物、例えば、マウス、ラット、イヌ、ネコのほか、ウシ、ウマ、ヒツジなど家畜、サル、チンパンジーやゴリラなどの霊長類等であってもよく、特に好ましくは、ヒトである。

[0074] また本発明の別の実施形態においては、本発明の抗体を用いたがんの診断方法があげられる。本発明の抗体はヒトCDCP1分子に特異的に結合することができ、本発明の抗体を蛍光物質、放射性同位元素、酵素などで標識することによって、ヒトCDCP1分子を発現する腫瘍およびがん細胞、血液中に存在するヒトCDCP1分子あるいはその断片などを検出することができる。検出の方法としては、例えば免疫染色法、フローサイトメトリー法、ウェスタンブロッティング法、ELISA法、RIA法、CLIA法、PET法などがあげられる。体内のがん細胞を直接検出する、あるいは患者検体中のヒトCDCP1の発現量を観察することができ、それにより原発性腫瘍の有無、転移性腫瘍の有無などを評価することができる。さらには、がん症例におけるヒトCDCP1の発現量を本発明の抗体を用いた方法により事前に診断することによって、本発明の抗体を使用した医薬組成物の投与による治療効果を予測することが可能である。

診断の対象とするがんはいかなるものであってもよく、特に限定されない。あえて、典型的ながんを例示するならば、例えば、肝細胞がん、胆管細胞がん、腎細胞がん、扁平上皮がん、基底細胞がん、移行細胞がん、腺がん、悪性ガストリノーマ、メラノーマ、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、悪性奇形腫、血管肉腫、カポジ肉腫、骨肉腫、軟骨肉腫

、リンパ管肉腫、悪性髄膜腫、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、白血病および脳腫瘍等の悪性腫瘍、上皮細胞由来新生物（上皮癌腫）、基底細胞癌腫、腺癌腫、口唇がん、口腔がん、食道がん、小腸がんおよび胃がんのような消化管がん、結腸がん、直腸がん、膀胱がん、膵臓がん、卵巣がん、子宮頸がん、肺がん、乳がん、皮膚がん、前立腺がんなどの悪性新生物の他、全身の上皮、間葉または血液細胞を冒す他の既知のがんなどを挙げることができる。

- [0075] 本明細書において引用されたすべての文献の開示内容は、全体として明細書に参照により組み込まれる。また、本明細書全体において、単数形の「a」、「an」、および「the」の単語が含まれる場合、文脈から明らかにそうでないことが示されていない限り、単数のみならず複数のものを含むものとする。

以下に実施例を示してさらに本発明の説明を行うが、実施例は、あくまでも本発明の実施形態の例示にすぎず、本発明の範囲を限定するものではない。

実施例

- [0076] 1. 組み換えhCDCP1細胞外ドメインタンパクの発現と精製

hCDCP1タンパク質のアミノ酸配列はUniProt登録番号Q9H5V8のアイソフォーム1として登録されている（配列番号1）。この配列の30番目から666番目のアミノ酸に対し、N末側にCampath分泌シグナルを連結し、C末側に6×HisタグおよびFLAGタグを挿入した配列を設計した（配列番号2）。このアミノ酸配列を、哺乳類のコドン表を基に塩基配列に変換し、5'末端にKozak翻訳開始配列、3'側に翻訳終止コドン挿入したDNA配列（配列番号3）を遺伝子合成により合成した（GENEWIZ社）。合成したDNAはpEF1/V5-His A（サーモサイエンティフィック社）の制限酵素KpnI認識配列とPmeI認識配列の間に挿入した。以上により作製された発現ベクターを以下に用いた。

発現ベクタープラスミドを、ポリエチレンイミン法を用いてFreeStyle293細胞（サーモサイエンティフィック社）に一過性トランスフェクションした

後、37℃、5% CO₂インキュベータで5日間培養した。培養上清を回収し0.22 μm フィルターで濾過したのち、HisTrap excel カラム（GEヘルスケア社）に結合させた。次に、20mMリン酸バッファー/300mM NaCl/pH 7.5バッファー中で20mMから500mMイミダゾールの濃度勾配によって溶出した。溶出画分は1mLごとに分取し、SDS-PAGE法で約100kDaのバンドを認めたフラクションを回収した。

この溶出画分に9倍量の20mM Tris-HCl pH8.0を添加し、HiTrap Q（GEヘルスケア社）カラムに結合させた。溶出は20mM Tris-HCl pH8.0バッファー中で0Mから1MのNaCl濃度勾配によって行った。溶出画分は2.5mLごとに分取し、SDS-PAGE法でバンドが確認できたフラクションを回収した。

さらに、このイオン交換カラムの溶出画分を約1.7mLまで濃縮し、D-PBS（ナカライテスク）を移動相として、Superdex 200pg 16/60（GEヘルスケア）を用いて分画した。このゲル浸透クロマトグラフィーを用いた精製実験における溶出曲線を図1に示す。溶出画分は1.0mLごとに分取し、SDS-PAGE法でバンドが確認できたフラクションを回収した。回収されたタンパク質を、精製組み換えhCDCP1細胞外ドメインタンパク（以下hCDCP1-ECDタンパクと呼ぶ）として使用した。

[0077] 2. 全長ECDタンパクのプラスミン処理および精製

hCDCP1-ECDタンパクに対し、25分の1量のヒト血漿由来プラスミンタンパク（シグマアルドリッチ社）を添加し、4℃で18時間反応させた。SDS-PAGE法により、このプラスミン処理によってhCDCP1-ECDタンパクがほぼ完全に切断されたことを確認した。このタンパクサンプルをcOmplete His-Tag purification resin（シグマアルドリッチ社）および抗FLAG M2抗体 アフィニティーゲル（シグマアルドリッチ社）により精製を行い、そのサンプルを還元条件および非還元条件でSDS-PAGEにより観察した結果が図2である。溶出されたタンパクには、分子量の異なる二つの分子種が含まれていると考えられた。これら二つの分子種はhCDCP1-ECDが切断された結果生じる二つのペプチド断片であると考えられ、これらの二つの断片が切断後も何らかの様式により結合

状態を保ったまま精製されたと考えられた。

[0078] 3. 全長hCDCP1安定発現Ba/F3細胞の構築

UniProt番号Q9H5V8アイソフォーム1の30番目から836番目のアミノ酸に対し、N末側にCampath分泌シグナルおよびc-Mycタグを連結した配列を設計した（配列番号4）。このアミノ酸配列を、哺乳類のコドン表を基に塩基配列に変換し、この配列を含み5'末端にKozak配列および3'末端の翻訳終止コドンを入れたDNAを遺伝子合成により合成した（GENEWIZ社；配列番号5）。合成したDNAはpEF1/V5-His A（サーモサイエンティフィック社）のKpnI/PmeI認識配列の間に挿入し、発現ベクターGS01とした。

プラスミドGS01を制限酵素PmeIによって線状化し、 2×10^6 個のマウスB細胞由来細胞株Ba/F3細胞に対して $2 \mu\text{g}$ をNucleofector 2b（Lonza社）により導入した。遺伝子導入後、細胞を96 wellプレートに播種して最終濃度 $1 \mu\text{g/mL}$ のG418（ナカライテスク社）を添加した。6日後、G418耐性的な増殖のみられた24個のコロニーをウェルから回収し、抗hCDCP1抗体（R&D systems社；カタログ番号MAB26662）を用いたフローサイトメトリーによってhCDCP1の発現を確認し、確認できたコロニー由来の細胞の限界希釈を行った。増殖した細胞を回収し、抗hCDCP1抗体（R&D systems社）を用いたフローサイトメトリーによりhCDCP1の発現を確認し、最終的に単クローン由来の細胞株を選択した。この細胞を同じ抗hCDCP1抗体、抗Mycタグ抗体（和光純薬社）およびPE標識抗マウスIgG二次抗体で染色した結果を図3に示す。いずれのクローンも、抗hCDCP1抗体、抗Mycタグ抗体に陽性であり、遺伝子導入したN末端にMycタグが付加されたhCDCP1遺伝子の産物が細胞表面上に発現されていることを確認した。

この細胞をBa/F3-hCDCP1細胞株として、以下の実験に用いた。

[0079] 4. Ba/F3-hCDCP1のトリプシン処理による Δ N型分子の生成

前項で作製したhCDCP1発現Ba/F3細胞株（以下Ba/F3-hCDCP1）、および陰性対象としてBa/F3元株を用いた。細胞を、血清を含まない冷RPMI1640培地（シグマアルドリッチ社）で2回洗浄し、 1.25×10^7 細胞/mLの濃度でRPMI1640培地に懸濁した。細胞懸濁液 $800 \mu\text{L}$ に対し $200 \mu\text{L}$ の0.25% トリプシン/EDTA（ナ

カライテスク社)、あるいは陰性対照として1mM EDTAを含むHank's Balanced Salt Solution (以下HBSS) を添加し、37℃で0分、5分、15分、30分処理を行った。反応後9mLの10%の非働化済牛胎児血清 (以下FBS) 含むRPMI1640培地を添加し反応を停止させた。この細胞を、1% BSAを含むPBS (以下フローサイトメトリーバッファー、FCMバッファーと呼ぶ) で洗浄した後、これらの細胞を抗Mycタグ抗体 (和光純薬社) および抗hCDCP1抗体 (R&D systems社) を用いて染色した。細胞を洗浄後、PE標識抗マウスIgG抗体 (Becton Dickinson社) を用いて染色した。細胞を洗浄後FACSCantoII (Becton Dickinson社) により観察した。

フローサイトメトリーにより測定されたPEの蛍光強度から、細胞集団の平均蛍光強度の変化をグラフに表したものが図4 Aである。抗Mycタグ抗体の染色強度がトリプシン/EDTAを添加したときのみ経時的に減少しており、このことからBa/F3-hCDCP1上のhCDCP1分子のN末端がトリプシンにより消化されていることが示された。その一方で抗hCDCP1抗体による染色強度は変化せず、トリプシン処理によっても本実験で用いた抗hCDCP1抗体に認識されるhCDCP1分子の数は減少していないことが示された。

[0080] 次に、トリプシン処理によって産生した切断型hCDCP1分子の分子量をウェスタンブロッティングにより観察した。Ba/F3-hCDCP1細胞 4×10^6 個に対し、RPMI1640培地で5倍希釈した0.25%トリプシン/EDTA、あるいは50nM、500nMプラスミン (シグマアルドリッチ社) を含むPBSにより37℃で5分、10分、ないしは30分処理した。これらの細胞を回収しHBSSで洗浄したのち、1% TritonXとプロテアーゼインヒビターカクテル (サーモフィッシャーサイエンティフィック社) を含むTris緩衝生理食塩水で溶解し、Micro BCAキット (サーモフィッシャーサイエンティフィック社) によりタンパク定量を行って、20 μ gをSDS-PAGEにより泳動した。また同時に、切断型hCDCP1を発現していることが知られているヒト前立腺癌由来細胞株PC3 (ATCC) も、接着培養した状態で細胞溶解、ないしはBa/F3と同様に希釈トリプシン/EDTA溶液で処理したのちに細胞溶解し、合わせてSDS-PAGEを行った。泳動したゲルからタンパク質をPVDF

膜に転写して、検出用一次抗体として抗hCDCP1細胞内ドメイン抗体（Abcam社）、二次抗体としてアルカリフォスファターゼ標識抗ヤギIgG抗体（プロメガ社）、検出用試薬としてNBT/BCIP stock solution（ロシュ社）を用いてウェスタンブロッティングを行った。

ウェスタンブロッティングの結果を図4 Bに示す。トリプシン処理なしのBa/F3-hCDCP1細胞では130kDa付近にほぼ単一のバンドが認められるのに対し、トリプシン処理した細胞では70kDa付近に単一バンドが認められ、このバンドサイズはPC3細胞の溶解サンプルから検出されたバンドと同一の位置であると考えられるため、Ba/F3のトリプシン処理により生成した分子種はPC3の発現する切断型hCDCP1と同一であることが示唆された。500nMプラスミン処理によっても同じ移動度に切断タンパクのバンドが検出された。

これにより、Ba/F3-hCDCP1が発現しているhCDCP1はトリプシン、プラスミンの処理により切断されて、細胞上に切断型hCDCP1分子が残ることが示唆された。この手法を用いて、こののち切断型hCDCP1分子に反応する抗体のスクリーニングを行った。

[0081] 5. hCDCP1ノックアウト細胞株を用いたハイブリドーマのスクリーニング

前項までで作製したタンパク質および細胞を用いてハイブリドーマを作製し、hCDCP1特異的な反応を示す抗体を産生するハイブリドーマをスクリーニングした。

癌細胞の発現するhCDCP1に対して反応するクローンのスクリーニングを行うためのネガティブコントロールとして使用するため、hCDCP1分子をノックアウトしたPC3細胞を作製した。ヒト前立腺癌細胞株PC3はATCCから購入したものを使用した。PC3細胞 1×10^6 個に対し、CDCP1 CRISPR/Cas9 KO Plasmid (h) (SantaCruz社) をNucleofector 2b (Lonza) により遺伝子導入を行った。このプラスミドにはGFP遺伝子配列が含まれている。1日後、GFPの蛍光が陽性となった細胞を、FACS Aria II (Becton Dickinson社) を用いて、96ウェル培養プレートに単細胞ソーティングした。7~10日後に細胞の増殖がみられたクローンに対し、抗hCDCP1抗体 (R&D systems社) を用いたフローサイトメトリー

による発現確認を行い、hCDCP1を発現していない細胞クローンを増幅して、これをhCDCP1-K0 PC3細胞として以下の実験に用いた。

[0082] hCDCP1に対するモノクローナル抗体の作製は、hCDCP1精製タンパクあるいは強制発現細胞を免疫したマウスから単離したリンパ節細胞を用いて行った。

実験1においては、hCDCP1-ECDタンパクをマウス1匹あたり50 μ g、TiterMax Gold (TiterMax社) と混合して足底静脈投与を行った。7日後と10日後に、マウス1匹あたり10 μ gの抗原をTiterMaxGoldと混合して足底静脈投与を行うことで追加免疫を行った。

実験2においては、免疫物質として、Ba/F3-hCDCP1細胞を用いた。この細胞を前述の方法によってトリプシン処理を行ったのち、マウス1匹あたり 1×10^7 個の細胞をTiterMaxGold (TiterMax社) と混合して足底静脈投与を行った。7日後と10日後に、マウス1匹あたり 1×10^5 個のトリプシン処理したBa/F3-hCDCP1細胞をPBSに懸濁したものを腹腔内に投与することによって、追加免疫を行った。

実験3においては、hCDCP1-ECDタンパクを前項の方法に従ってプラスミンで切断処理したのちに、His-tag、FLAG-tagアフィニティ樹脂を用いて精製を行ったものを、マウス1匹あたり50 μ g、TiterMaxGoldと混合して足底静脈投与を行った。7日後と10日後に、マウス1匹あたり10 μ gの抗原をTiterMaxGoldと混合して足底静脈投与を行うことで追加免疫を行った。

[0083] 実験1、実験2、実験3それぞれについて、免疫終了後のマウスから膝窩リンパ節を採取して細胞懸濁液を調製したのち、血清を含まないRPMI1640 (ATCC modified; サーマフィッシャーサイエンティフィック社) 中でSP2/0-Ag14ミエローマ細胞と混合し、ポリエチレングリコール (ロシュ社) によって細胞融合を行った。融合後の細胞はHybridoma enhancing medium (シグマアルドリッチ社) を含むClonaCell™-HY Medium D (STEMCELL社) に懸濁してプラスチックシャーレに播種した。8~10日後に形成されたコロニーを培地 (RPMI1640/10% FBS/HAT supplement (サーマフィッシャーサイエンティフィック社))

／Hybridoma enhancing medium（シグマアルドリッチ社）を分注した96ウェルプラスチックプレート中に単離し、拡大培養を行って、培養上清を結合性評価に用いた。

PC3細胞およびhCDCP1-KO PC3細胞を用いた細胞ELISA法により、ハイブリドーマの産生する抗体のhCDCP1結合性スクリーニングを行った。384ウェルプレートに、PC3細胞およびhCDCP1-KO PC3細胞を5000細胞/wellで播種し、37℃で一晩培養した。培養培地を除去した後、ハイブリドーマの培養上清あるいは培地で希釈した抗体液を1ウェルあたり25 μ L添加し、4℃で1時間反応させた。培養上清を除去してPBSによる洗浄を行った後、二次抗体を培地で希釈して添加し4℃で1時間反応させた。さらにPBSで3回洗浄し、洗浄液を完全に除去したあと、基質液（ELISA POD substrate TMB Kit、ナカライテスク社）を反応させ、10分後1N硫酸で停止し、450nmの吸光度を測定した。

実験1、実験2、実験3のそれぞれ免疫動物から作製されたハイブリドーマの培養上清を用いたcell ELISAの結果を図5 A、図5 B、図5 C、図5 Dに示す。図の数値は、各クローンの測定値から、抗体を含まないハイブリドーマ培養培地を反応させた値を引いた数値を示した。この結果から、hCDCP1精製タンパク質あるいは強制発現細胞を用いた免疫マウスから、hCDCP1を発現する癌細胞であるPC3細胞に反応する抗体を産生するハイブリドーマが得られたことが示された。また図5 A、図5 B、図5 Cの結果からは、これらの図で示されたハイブリドーマの産生する抗体がhCDCP1-KO PC3細胞には反応しないことが示され、確かにこれらの抗体がPC3の発現するhCDCP1に特異的に反応していることが示された。

[0084] 6. 抗体配列解析

前項で述べた、PC3細胞の発現するhCDCP1に特異的に反応する抗体を産生するハイブリドーマについて、その免疫グロブリン遺伝子可変領域の配列の解析を以下の通り実施した。

ハイブリドーマ細胞を拡大培養し、SuperPrep II Cell Lysis & RT Kit（東洋紡社）を使用してRNA抽出および逆転写酵素によるcDNA合成を行った。合

成したcDNAより、PCR法により抗体遺伝子を増幅した。重鎖、軽鎖ともに可変領域上流、および定常領域下流を認識するプライマーを使用し増幅した。使用したプライマー配列は以下の通りである。

重鎖5' 増幅用 : 5' MsVHE (配列番号 6)

重鎖3' 増幅用 : 3' Cg1_outer (配列番号 7)、3' Cg2c_outer (配列番号 8)、3' Cg2b_outer (配列番号 9)、3' Cg3_outer (配列番号 10)、3' mIgG2a_CH (配列番号 11)

κ 軽鎖5' 増幅用 : 5' L-Vk_3 (配列番号 12)、5' L-Vk_4 (配列番号 13)、5' L-Vk_5 (配列番号 14)、5' L-Vk_6 (配列番号 15)、5' L-Vk_689 (配列番号 16)、5' L-Vk_14 (配列番号 17)、5' L-Vk_19 (配列番号 18)、5' L-Vk_20 (配列番号 19)

κ 軽鎖3' 増幅用 : 3' mCk (配列番号 20)

λ 軽鎖5' 増幅用 : 5' mV λ 1/2 (配列番号 21)、5' mV λ x (配列番号 22)

λ 軽鎖3' 増幅用 : 3' mC λ _outer (配列番号 23)

得られたDNA断片をTOPO TA cloning kit (サーモサイエンティフィック社) によってpcDNA3.4ベクターにクローニングを行い、DNA配列解析を行った。結果として得られた抗体配列について、Kabatらの方法 (Sequences of Proteins of Immunological Interests, Fifth edition, NIH Publication No. 91-3242, U.S. Department of Health and Human Services, 1991) に従ってCDR領域を決定した。解析されたクローンの抗体配列およびそのCDR領域配列は、以下の表1にまとめる通りである。

[表1]

	VH	CDRH1	CDRH2	CDRH3	VL	CDRL1	CDRL2	CDRL3
01A2C5	配列番号24	配列番号25	配列番号26	配列番号27	配列番号28	配列番号29	配列番号30	配列番号31
12A033	配列番号32	配列番号33	配列番号34	配列番号35	配列番号36	配列番号37	配列番号38	配列番号39
12A038	配列番号40	配列番号41	配列番号42	配列番号43	配列番号44	配列番号45	配列番号46	配列番号47
12A041	配列番号48	配列番号49	配列番号50	配列番号51	配列番号52	配列番号53	配列番号54	配列番号55
14A014	配列番号56	配列番号57	配列番号58	配列番号59	配列番号60	配列番号61	配列番号62	配列番号63
14A025	配列番号64	配列番号65	配列番号66	配列番号67	配列番号68	配列番号69	配列番号70	配列番号71
14A043	配列番号72	配列番号73	配列番号74	配列番号75	配列番号76	配列番号77	配列番号78	配列番号79
14A055	配列番号80	配列番号81	配列番号82	配列番号83	配列番号84	配列番号85	配列番号86	配列番号87
14A063	配列番号88	配列番号89	配列番号90	配列番号91	配列番号92	配列番号93	配列番号94	配列番号95
14A091	配列番号96	配列番号97	配列番号98	配列番号99	配列番号100	配列番号101	配列番号102	配列番号103
14C013	配列番号104	配列番号105	配列番号106	配列番号107	配列番号108	配列番号109	配列番号110	配列番号111

[0085] 7. マウス・ヒトキメラ抗体の作製

前項において得られた抗体配列を基に、マウス重鎖・軽鎖可変領域とヒトIgG1重鎖・ κ 軽鎖定常領域のキメラ抗体（以下マウス・ヒトキメラ抗体）を作製した。マウス・ヒトキメラ抗体は、前項で配列解析した抗体のうち、12A041、14A025、14A043、14A055、14A063、14A091の6つについて作製した。

12A041、14A025、14A043、14A063の各々の抗体配列については、前項で解析したアミノ酸配列と同じものを作製すると同時に、CDR領域のアミノ酸改変を試みた。配列改変の導入箇所と改変した後のアミノ酸、および改変後抗体配列の名称との対応関係は図6Aおよび図6Bに示すとおりであり、CDR領域中に存在するSS結合を形成しないと思われるシステイン、タンパク質の溶媒中での切断反応・酸化反応を受ける可能性の高い配列について実施した。

また、mh12A041HCoriについては、Kabat番号32番のセリン残基をフェニルアラニン残基に変異させることにより、またmh12A041LCoriに対しては、Kabat番号27d番のヒスチジン残基をチロシン残基に変異させること、あるいは27a番のセリン残基と28番のアスパラギン残基をそれぞれアスパラギン残基とアスパラギン酸残基に同時に変異させることにより、抗原に対する親和性が向上すると考えられたため、これらの変異を含む配列（mh12A041HCoriA、mh12A041LCoriA、mh12A041LCoriB）を設計した。

CDRの配列改変を施した抗体配列、およびそのもととなっている配列を以下の表2に示す

[表2]

	可変領域配列	CDR1	CDR2	CDR3
mh12A041HCori	配列番号 4 8	配列番号 4 9	配列番号 5 0	配列番号 5 1
mh12A041HCv1	配列番号 1 1 2	配列番号 4 9	配列番号 5 0	配列番号 1 1 3
mh12A041HCoriA	配列番号 1 1 4	配列番号 1 1 5	配列番号 5 0	配列番号 5 1
mh12A041LCori	配列番号 5 2	配列番号 5 3	配列番号 5 4	配列番号 5 5
mh12A041LCv1	配列番号 1 1 6	配列番号 1 1 7	配列番号 5 4	配列番号 5 5
mh12A041LCv2	配列番号 1 1 8	配列番号 1 1 9	配列番号 5 4	配列番号 5 5
mh12A041LCoriA	配列番号 1 2 0	配列番号 1 2 1	配列番号 5 4	配列番号 5 5
mh12A041LCoriB	配列番号 1 2 2	配列番号 1 2 3	配列番号 5 4	配列番号 5 5
mh14A025HCori	配列番号 6 4	配列番号 6 5	配列番号 6 6	配列番号 6 7
mh14A025HCv1	配列番号 1 2 4	配列番号 6 5	配列番号 1 2 5	配列番号 6 7
mh14A025HCv2	配列番号 1 2 6	配列番号 6 5	配列番号 1 2 7	配列番号 6 7
mh14A025HCv5	配列番号 1 2 8	配列番号 6 5	配列番号 1 2 9	配列番号 6 7
mh14A025HCv7	配列番号 1 3 0	配列番号 6 5	配列番号 1 3 1	配列番号 6 7
mh14A025HCv8	配列番号 1 3 2	配列番号 6 5	配列番号 1 3 3	配列番号 6 7
mh14A025HCv15	配列番号 1 3 4	配列番号 6 5	配列番号 1 3 5	配列番号 6 7
mh14A025HCv17	配列番号 1 3 6	配列番号 6 5	配列番号 1 3 7	配列番号 6 7
mh14A025HCv19	配列番号 1 3 8	配列番号 6 5	配列番号 1 3 9	配列番号 6 7
mh14A025HCv21	配列番号 1 4 0	配列番号 6 5	配列番号 1 4 1	配列番号 6 7
mh14A025HCv24	配列番号 1 4 2	配列番号 6 5	配列番号 1 4 3	配列番号 6 7
mh14A025LCori	配列番号 6 8	配列番号 6 9	配列番号 7 0	配列番号 7 1
mh14A043HCori	配列番号 7 2	配列番号 7 3	配列番号 7 4	配列番号 7 5
mh14A043HCv1	配列番号 1 4 4	配列番号 7 3	配列番号 1 4 5	配列番号 7 5
mh14A043HCv2	配列番号 1 4 6	配列番号 7 3	配列番号 1 4 7	配列番号 7 5
mh14A043LCori	配列番号 7 6	配列番号 7 7	配列番号 7 8	配列番号 7 9
mh14A043LCv1	配列番号 1 4 8	配列番号 1 4 9	配列番号 7 8	配列番号 7 9
mh14A063HCori	配列番号 8 8	配列番号 8 9	配列番号 9 0	配列番号 9 1
mh14A063HCv1	配列番号 1 5 0	配列番号 8 9	配列番号 1 5 1	配列番号 9 1
mh14A063HCv2	配列番号 1 5 2	配列番号 8 9	配列番号 1 5 3	配列番号 9 1
mh14A063LCori	配列番号 1 5 4	配列番号 9 3	配列番号 9 4	配列番号 9 5
mh14A063LCv1	配列番号 1 5 5	配列番号 1 5 6	配列番号 9 4	配列番号 9 5

[0086] 表 2 中の配列については、抗体分子のアミノ酸配列をもとに塩基配列を設計し遺伝子合成により発現ベクターを合成した。

また、14A055重鎖可変領域（配列番号 8 0）、14A055軽鎖可変領域（配列

番号84)、14A091重鎖可変領域(配列番号96)、14A091軽鎖可変領域(配列番号100)については、前項においてpcDNA3.4ベクターにサブクローニングされた配列からPCR法により可変領域DNAを増幅しサブクローニングすることにより発現ベクターを作製した。

使用したベクターは、mh12A041抗体群とmh14A025抗体群以外の抗体群の重鎖可変領域配列についてはpFUSE-CHIg-hG1ベクター(Invivogen社)、mh12A041抗体群とmh14A025抗体群の重鎖可変領域配列についてはpFUSE-CHIOME-HCベクター、すべての抗体群の軽鎖可変領域配列についてはpFUSE2-CLIg-hkベクター(Invivogen社)にクローニングを行った。これらの3つベクターの持つ抗体定常領域のアミノ酸配列をそれぞれ配列番号157、配列番号158、配列番号159に示す。

作製された発現ベクターをExpi293細胞(サーモフィッシュサイエンティフィック社)に発現させた。この際、mh12A041、mh14A025、mh14A043、mh14A063の各抗体群については、重鎖・軽鎖のベクターを以下のパターンで組み合わせさせて発現させた。

[0087] mh12A041 :

HCori/LCori、HCori/LCv1、HCori/LCv2、HCv1/LCori、HCv1/LCv1、HCv1/LCv2、HCori/LCoriA、HCori/LCoriB、HCoriA/LCori、HCoriA/LCoriA、HCoriA/LCoriB

mh14A025 :

HCori/LCori、HCv1/LCori、HCv2/LCori、HCv5/LCori、HCv7/LCori、HCv8/LCori、HCv15/LCori、HCv17/LCori、HCv19/LCori、HCv21/LCori、HCv24/LCori

mh14A043 :

HCori/LCori、HCori/LCv1、HCv1/LCori、HCv1/LCv1、HCv2/LCori、HCv2/LCv1

mh14A063 :

HCori/LCori、HCori/LCv1、HCv1/LCori、HCv1/LCv1、HCv2/LCori、HCv2/LCv1

[0088] 培養上清中に分泌された抗体タンパク濃度をAlphaLISA法により測定し、測定値を基に各濃度に希釈してBa/F3-hCD31細胞に結合させ、さらに二次抗体

としてPE標識抗ヒトIgG抗体（Becton Dickinson社）を反応させ、フローサイトメトリーによりPEの蛍光を測定することで、各抗体の反応性を評価した。その結果を図7に示す。図に示されたとおり、評価したすべての抗体はhCDCP1に対する反応性を保持していた。

[0089] 8. 抗体のトリプシン処理hCDCP1強制発現細胞への反応性

得られた抗hCDCP1マウス・ヒトキメラ抗体が、hCDCP1分子のセリンプロテアーゼ切断箇所（N末側）に結合するのか、あるいは膜貫通領域側に結合するのかを調べるため、前項で述べた手法によりトリプシン処理で切断したhCDCP1強制発現Ba/F3細胞に対する反応性を検証した。評価した抗hCDCP1マウス・ヒトキメラ抗体クローンは以下のとおりである。

mh12A041HCori/LCori、mh14A025HCori/LCori、mh14A043HCori/LCori、mh14A055、mh14A063HCori/LCori、mh14A091

Ba/F3-hCDCP1細胞を、0.05%トリプシンを含むRPMI1640培地中で、37℃で30分処理し、その後RPMI1640/10% FBSで2回洗浄した。この処理を行ったBa/F3-hCDCP1細胞において、hCDCP1の全長型が消滅し切断型のみになっていることは、前項で述べたのと同様のウェスタンブロッティングにより確認した。この細胞に対し、抗hCDCP1マウス・ヒトキメラ抗体を5 μ g/mLから5ng/mLまで希釈系列を作製して、4℃で30分反応させた。陰性対象としては、後の項に述べる抗RSウイルス抗体を非特異的ヒトIgGとして同様の希釈系列を作製して4℃で30分反応させた。次に二次抗体としてPE標識抗ヒトIgG Fc抗体（Southern Biotech社）を作用させ、洗浄後、蛍光強度をFACSCantoII（BECTON DICKINSON社）により観察した。

その結果を図8に示す。この結果から評価した6つの抗体はすべて、トリプシン処理によって切断されたhCDCP1分子をもつ細胞に、トリプシン処理をしない場合と同程度に反応すること、すなわち、これらの抗体がhCDCP1分子のセリンプロテアーゼ切断部位よりも細胞膜貫通領域側に結合することが示された。

[0090] 9. 抗体のカニクイザルCDCP1分子に対する反応性

カニクイザル (*Macaca fascicularis*) のCDCP1タンパク (isoform X1; NCBI Reference Sequence: XP_005546930.1; 配列番号 160) の30番目から836番目のアミノ酸に対し、N末側にCampath分泌シグナルおよびc-Mycタグを連結した配列を設計した (配列番号 161)。このアミノ酸配列を、哺乳類のコドン表を基に塩基配列に変換し、この配列を含み5'末端にKozak翻訳開始配列および3'末端に翻訳終止コドン挿入したDNAを遺伝子合成により合成した (GENEWIZ社; 配列番号 162)。合成したDNAはpEF1/V5-His A (サーモフィッシュサイエンティフィック社) のKpnI/PmeIサイトに接続し、発現ベクターGS02とした。

プラスミドGS01 (前項で作製) およびGS02を制限酵素PmeIによって線状化し、 2×10^6 個のCHO-K1細胞に対して $2 \mu\text{g}$ をNucleofector (Lonza社) により導入した。遺伝子導入作業後 $400 \mu\text{g/mL}$ ハイグロマイシン存在下で3日間培養し、その後の細胞を剥離・分散後、抗hCDCP1抗体 (R&D systems社) で染色し、陽性の細胞をFACS AriaII (Becton Dickinson社) を用いて単細胞ソーティングを行った。分離後増殖した細胞クローンを、さらに抗hCDCP1抗体 (R&D systems社) によって染色することによって、hCDCP1、カニクイザルCDCP1を発現するクローンを単離した。これらのクローンを拡大し、以下、hCDCP1発現CHO-K1細胞、カニクイザルCDCP1発現CHO-K1細胞として用いた。

hCDCP1発現CHO-K1細胞、カニクイザルCDCP1発現CHO-K1細胞を0.25% トリプシン/EDTA (ナカライテスク社) により剥離・分散させたのち、mh12A041HCori/LCori、mh14A025HCori/LCori、mh14A043HCori/LCori、mh14A055、mh14A063HCori/LCori、mh14A091の各マウス・ヒトキメラ抗体をさまざまな濃度で反応させ、フローサイトメトリーによる結合性を観察した (図9)。その結果、これらの6つの抗体はいずれもカニクイザルのCDCP1に対して反応し、特にmh14A055以外の5抗体については、ヒトとカニクイザルのCDCP1に対して同程度に反応した。

[0091] 10. 抗体のヒトがん細胞への反応性

抗hCDCP1抗体群の各ヒトがん細胞株への反応性を調べるため、フローサイ

トメトリーによる抗体の結合反応性の評価を行った。用いたヒトがん細胞株およびその入手先は以下のとおりである。

前立腺癌：PC3 (ATCC)、DU145 (理研バイオリソースセンター)

肺癌：H358 (ATCC)、SK-MES-1 (ATCC)

乳癌：MDA-MB-231 (ATCC)、HCC1143 (ATCC)

胆管癌：TFK-1 (理研バイオリソースセンター)

卵巣がん：SK-OV3 (ATCC)、OVCAR3 (ATCC)

膵がん：Capan-2 (ATCC)

大腸・直腸がん：DLD-1 (JCRB)

正常細胞：ヒト乳腺上皮細胞 (以下HMEpC) (Cell Applications社)、正常ヒト表皮角化細胞 (以下NHEK) (PromoCell社)

各ヒトがん細胞株・正常組織由来細胞は、10cmシャーレにて、個々の細胞に適した培養培地で培養した。シャーレの細胞は0.25% トリプシン/EDTA (ナカライテスク社) 処理により剥離処理および懸濁したのち、FCMバッファーを用いて洗浄し、そののちに各抗体をFCMバッファーで図中の各濃度に希釈したものを加えて4℃で30分反応させた。その後FCMバッファーで2回洗浄し、二次抗体としてPE標識マウス抗ヒトIgG抗体 (Becton Dickinson社) を用いて染色した。フローサイトメトリー解析はFACSCantoII (Becton Dickinson社) を用いて行った。

その結果を図10Aおよび図10Bに示す。候補クローンはすべてがん細胞に対して反応を示した。またNHEKおよびHMEpCに対しても反応性を示した。

[0092] 11. マウスハイブリドーマ由来抗体の骨髓細胞への反応性

健康人骨髓由来単核球細胞は、AllCells社、STEMCELL Technologies社、Lonza社のいずれかから購入した。

凍結細胞ストックは融解後、2% FBSを含むIMDM培地 (サーモフィッシュサイエンティフィック社) によって洗浄し、その後、FcR blocking reagent (ミルテニー社) で室温15分処理した。そのまま最終濃度10 μ g/mLの一次抗体サンプルを加えて4℃で30分反応させた。一次抗体サンプルとして、前項の

スクリーニングによって得られたハイブリドーマクロンの培養上清からprotein G sepharose fast flow (GEヘルスケア社)を用いて精製した抗体サンプルを用いた。陽性対象の抗体として、抗hCDP1抗体クローンCUB1 (BioLegend社)を用いた。非特異的マウスIgG (モノクローナル抗体クローン2E12)はMBL社のものを用いた。FCMバッファーで2回洗浄後、PE標識抗マウスIgG抗体 (Becton Dickinson社)を4℃で30分反応させた。さらにFCMバッファーで2回洗浄後、APC標識抗ヒトCD34抗体 (BioLegend社)を4℃で30分反応させた。FCMバッファーで2回洗浄後、7-AAD (Becton Dickinson社)を含むFCMバッファー中に懸濁し、FACSCantoII (Becton Dickinson社)によりフローサイトメトリー観察した。

評価した抗体の反応性を図11に示す。フローサイトメトリーのデータからCD34-APC陽性生細胞のみをゲーティングし、そのPEの蛍光値のヒストグラムを作成した。図11が示す通り、CUB1抗体は非特異的マウスIgGと比較して強く骨髓単核球細胞のCD34陽性細胞分画に対して結合する一方で、図11に挙げられた以下の抗体クローンの反応性は十分に低く、10 µg/mLの比較抗体濃度においても非特異的マウスIgGと同程度であり、CD34陽性細胞分画に対する反応性が検出できないほど弱かった。

クローン : 01A2C5、12A033、12A038、12A041、14A025、14C013

[0093] 12. マウス・ヒトキメラ抗体の骨髓細胞への反応性

健常人骨髓由来単核球細胞は前項と同じものを用いた。凍結細胞ストックは融解後、FCMバッファーによって洗浄し、その後、FcR blocking reagent (ミルテニー社)を加え室温で15分処理した。そのまま最終濃度10 µg/mLの一次抗体サンプルを加えて4℃で30分反応させた。一次抗体サンプルとして、項7で作製したマウス・ヒトキメラ抗体をrProtein A Sepharose Fast Flow (GEヘルスケア社)を用いて精製した抗体を用いた。陽性対象の抗体として、抗hCDP1抗体クローンCUB1 (BioLegend社)を用いた。非CDP1特異的ヒトIgG (hIgG)はあとの項で述べる抗RSウイルス抗体を用いた。FCMバッファーで2回洗浄後、PE標識抗ヒトIgG抗体 (SantaCruz社)あるいはCUB1抗体についてはPE

標識抗マウスIgG抗体（Becton Dickinson社）を4℃で30分反応させた。さらにFCMバッファーで2回洗浄後、APC標識抗ヒトCD34抗体（BioLegend社）を4℃で30分反応させた。FCMバッファーで2回洗浄後、7-AAD（Becton Dickinson社）を含むFCMバッファー中に懸濁し、FACSCantoII（Becton Dickinson社）により観察した。

評価した抗体の反応性を図12に示す。フローサイトメトリーのデータからCD34陽性生細胞のみをゲーティングし、そのPEの蛍光値のヒストグラムを作成した。図12が示す通り、CUB1抗体は一次抗体非添加の細胞群と比較して強く骨髓単核球細胞のCD34陽性細胞分画に対して結合する一方で、図11に挙げられた以下の抗体クローンの反応性は十分に低く、比較抗体濃度を10 $\mu\text{g/mL}$ とした場合においても抗体非添加の細胞と同等の染色強度であり、CD34陽性細胞分画に対する反応性が検出できなかった。

クローン：mh12A041HCori/LCori、mh14A025HCori/LCori、mh14A043HCori/LCori、mh14A055、mh14A063HCori/LCori、mh14A091

[0094] 13. ビオチン化マウス・ヒトキメラ抗体の骨髓細胞への反応性

以下の抗体については、より感度の高い方法により健常人骨髓由来単核球細胞に対する反応性を詳細に検討するため、マウス・ヒトキメラ抗体を直接ビオチン化し、それを用いて骨髓単核球細胞に対するフローサイトメトリーを実施した。

mh12A041HCori/LCori、mh14A025HCori/LCori、mh14A043HCori/LCori、mh14A063HCori/LCori

上記のマウス・ヒトキメラ抗体の精製抗体に対して、EZ-Link Micro NHS-PEG4-Biotinylation Kit（サーモサイエンティフィック社）を用いてビオチン化を行った。比較対象としての25A11抗体、CUB4抗体、および抗RSウイルス抗体は、それぞれ以下に掲載された配列をもとに作製した。

25A11抗体：国際公開番号W0 2008/133851の配列番号20に掲載された重鎖可変領域配列、および配列番号4に掲載された軽鎖可変領域配列。本願において作製した重鎖可変領域を配列番号163、軽鎖可変領域を配列番号164

に示す。

CUB4抗体：米国特許 US 8394928の配列番号3に掲載された重鎖可変領域配列、および配列番号15に掲載された軽鎖可変領域配列。本願において作製した抗体の重鎖可変領域を配列番号165、軽鎖可変領域を配列番号166に示す。

抗RSウイルス抗体：PBDデータベース登録番号2hwzに登録された配列。重鎖可変領域は2hwz_Hの1番目から120番目まで、軽鎖可変領域は2hwz_Lの1番目から106番目まで。本願において作製した抗体の重鎖可変領域を配列番号167、軽鎖可変領域を配列番号168に示す。

これらをコードする塩基配列を遺伝子合成し、重鎖可変領域はpFUSE-CHIg-hG1ベクター、軽鎖可変領域はpFUSE2-CLIg-hkベクターにクローニングしたのち、Expi293細胞による発現、protein Aセファロースによる精製を経て精製した抗体サンプルを用いた。抗RSウイルス抗体は、以下、非特異的ヒトIgG（hIgG）として用いた。

同じく比較対象として、正常ヒト血清由来精製IgGタンパク質（シグマアルドリッチ社）および抗hCDP1抗体クローンCUB1（BioLegend社）に対しても同様の手法によるビオチン化を行い、実験に供した。

各抗体のビオチン化価数はBiotin Quantification Kit（サーモサイエンティフィック社）を用いて測定し、以下の表3に示す通りであることを確認した。

[表3]

抗体	
mh12A041HCori/LCori-biotin	1.37
mh14A025HCori/LCori-biotin	2.11
mh14A043HCori/LCori-biotin	2.14
mh14A063HCori/LCori-biotin	2.67
CUB4-biotin	2.36
CUB1-biotin	2.76
25A11-biotin	1.96
hIgG-biotin	1.91
ヒト血清由来 IgG-biotin	3.72

[0095] 健康人由来骨髓単核球細胞は前項と同じものを用いた。凍結細胞ストックは融解後、FCMバッファーあるいは2% FBSを含むIMDM培地によって洗浄し、その後、FcR blocking reagent（ミルテニー社）を加え室温で15分処理した。そのまま一次抗体サンプルを加えて4℃で30分反応させた。FCMバッファーで2回洗浄後、PE標識ヤギ抗ヒトIgG抗体（Southern Biotechnology社）、APC標識抗ヒトCD34抗体（BioLegend社）、PE-Cy7標識抗ヒトCD45抗体（BioLegend社）を混合したものと、4℃で30分反応させた。FCMバッファーで2回洗浄後、7-AAD（Becton Dickinson社）を含むFCMバッファー中に懸濁し、FACSCantoII（Becton Dickinson社）により観察した。

この実験による骨髓細胞への反応性を図13に示す。この図では、観察した結果に対しCD34／CD45両陽性の生細胞のみを抜き出して、そのPE蛍光強度の平均を算出し、添加した抗体濃度との関連を示した。この図から分かるとおり、CUB1、CUB4、25A11のビオチン化抗体が低濃度域においても骨髓CD34陽性細胞に対して十分な反応性を示すのに対して、mh12A041HCori/LCori、mh14A025HCori/LCori、mh14A043HCori/LCori、mh14A063HCori/LCoriの4つの抗体のビオチン化抗体のCD34陽性細胞に対する反応性は顕著に低く、特に10ng/mLの比較抗体濃度において、CUB1、CUB4、25A11のビオチン化抗体が強い反応性を示すのに対し、mh12A041HCori/LCori、mh14A025HCori/LCori、mh14A043HCo

ri/LCori、mh14A063HCori/LCoriの4つの抗体のビオチン化抗体はほぼビオチン化非特異的ヒトIgGと同レベルの弱い反応性であることが示された。

また図13Dには、図13A～Cまでで非特異的ヒトIgGとして用いた抗RSウイルス抗体ビオチン化抗体と、正常ヒト血清由来精製IgGビオチン化タンパクについて、10ng/mLの比較抗体濃度において、骨髓CD34陽性細胞に対する反応性を比較した図を示す。測定は独立した3サンプルについて行い、図13DにはPE平均蛍光強度の平均値と標準誤差を示した。これにより本発明で述べる抗hCDP1抗体群の反応性は、ヒト血清由来IgGタンパクと同程度の反応性であることが示された。

[0096] 14. 抗体のヒト化および強制発現細胞に対する反応性

次に、以下のマウス抗hCDP1抗体配列のヒト化を行った。mh12A041HCv1、mh12A041LCv1、mh14A043HCv2、mh14A043LCv1、mh14A063HCv1、mh14A063LCori。

各抗体可変領域の配列から、CDR移植法によるヒト化を行った。ヒト化配列の設計は、以下の論文に記載された方法をもとに実施した。Tsurushitaら、2005. Design of humanized antibodies: From anti-Tac to Zenapax. Methods 36:69-83.

最初に、マウス抗体の3次元分子モデルを定法により作成した。次にこの分子モデルをもとに、フレームワーク領域のアミノ酸配列の中で、CDRの構造形成に重要と考えられる残基、また抗原との反応に必須であると考えられた残基を推定した。並行して、ヒト抗体重鎖可変領域および軽鎖可変領域のcDNA配列データベースの中から、各抗hCDP1抗体の重鎖可変領域、軽鎖可変領域に相同性の高い配列を検索した。その後、検索したヒト抗体配列のフレームワーク部分の配列と各抗hCDP1抗体のCDR配列を連結した配列をデザインし、そこにさらにCDR構造形成あるいは抗原との反応に必須であると考えられた残基の配列を移植して、ヒト化抗体配列をデザインした。デザインされた配列は以下の表4のとおりである。ヒト化抗体配列の持つCDR配列はもととなったマウス抗体のものと同一であり、前掲の配列番号と同じ配列である。

[表4]

	可変領域配列	CDR1	CDR2	CDR3
h12A041VH1	配列番号169	配列番号49	配列番号50	配列番号113
h12A041VH2	配列番号170	配列番号49	配列番号50	配列番号113
h12A041VL	配列番号171	配列番号117	配列番号54	配列番号55
h14A043VH1	配列番号172	配列番号73	配列番号147	配列番号75
h14A043VH2	配列番号173	配列番号73	配列番号147	配列番号75
h14A043VL1	配列番号174	配列番号149	配列番号78	配列番号79
h14A043VL2	配列番号175	配列番号149	配列番号78	配列番号79
h14A043VL3	配列番号176	配列番号149	配列番号78	配列番号79
h14A063VH2	配列番号177	配列番号89	配列番号151	配列番号91
h14A063VH3	配列番号178	配列番号89	配列番号151	配列番号91
h14A063VH4	配列番号179	配列番号89	配列番号151	配列番号91
h14A063VL1	配列番号180	配列番号93	配列番号94	配列番号95
h14A063VL2	配列番号181	配列番号93	配列番号94	配列番号95

[0097] mh12A041HCv1については、Kabat番号32番のセリン残基をフェニルアラニン残基に変異させることにより、またmh12A041LCv1に対しては、Kabat番号27d番のヒスチジン残基をチロシン残基に変異させること、あるいは27a番のセリン残基と28番のセリン残基をそれぞれアスパラギン残基とアスパラギン酸残基に同時に変異させることにより、抗原に対する親和性が向上すると考えられたため、これらの変異を含む、以下の表5に示す配列を作成した。

[表5]

	可変領域配列	CDR1	CDR2	CDR3
h12A041VH1A	配列番号182	配列番号183	配列番号50	配列番号113
h12A041VH2A	配列番号184	配列番号183	配列番号50	配列番号113
h12A041VLA	配列番号185	配列番号186	配列番号54	配列番号55
h12A041VLB	配列番号187	配列番号188	配列番号54	配列番号55

[0098] デザインされた可変領域アミノ酸配列をコードするDNA配列を遺伝子合成によって合成した。重鎖可変領域配列DNAは、ヒト抗体分泌シグナルペプチドあるいはヒトIL-2の分泌シグナルペプチドを接続したうえで、ヒトIgG1定常領域を含むベクターであるpFUSE-CHlg-hg1にクローニングした。軽鎖可変領域配列DNAはヒト抗体分泌シグナルペプチドあるいはヒトIL-2の分泌シグナルペ

プチドを接続したうえで、ヒトIg κ 定常領域を含むベクターであるpFUSE2-CL Ig-hkベクターにクローニングした。

クローニングしたプラスミドを、Expi293細胞にExpifectamineによって遺伝子導入し、培養液中に抗体を発現させた。重鎖・軽鎖のベクターを以下のパターンで組み合わせて発現させた。

h12A041 : VH1/VL、VH2/VL、VH1/VLA、VH2/VLA、VH1/VLB、VH2/VLB、VH1A/VL、VH2A/VL、VH1A/VLA、VH2A/VLA、VH1A/VLB、VH2A/VLB

h14A043 : VH1/VL1、VH1/VL2、VH1/VL3、VH2/VL1、VH2/VL2、VH2/VL3

h14A063 : VH2/VL1、VH2/VL2、VH3/VL1、VH3/VL2、VH4/VL1、VH4/VL2

培養液を回収・フィルター清浄化し、AlphaLISA法により培養液中の抗体タンパク濃度を測定した。

作製されたヒト化抗hCDCP1抗体タンパク、および比較対象として元となったクローンのマウス・ヒトキメラ抗体を用い、それらのhCDCP1への反応性をフローサイトメトリーにより検討した。ターゲット細胞としてBa/F3-hCDCP1細胞を用いた。二次抗体としてはPE標識マウス抗ヒトIgG抗体（Becton Dickinson社）を用いた。図14に示したこの実験の結果から明らかとなり、デザインされたヒト化抗体はいずれも、元となったマウス・ヒトキメラ抗体と同程度ないしはそれ以上の反応性を示した。このことから、作製されたヒト化抗hCDCP1抗体群はhCDCP1に対する反応性を十分に保持していることが示された。

[0099] 15. ヒト化抗体の骨髓細胞に対する反応性

以下の重鎖・軽鎖の組み合わせをもつ抗体の精製タンパクについて、前項で述べた方法と同様の方法によって、直接ビオチン化を行った。

h12A041 : VH1/VL、VH1/VLA、VH1/VLB、VH1A/VL

h14A043 : VH1/VL1、VH1/VL2、VH1/VL3、VH2/VL1、VH2/VL2、VH2/VL3

h14A063 : VH4/VL1、VH4/VL2

また比較対象の抗体として、項13で作製した25A11抗体、CUB4抗体、CUB1抗体、非特異的ヒトIgG抗体として抗RSウイルス抗体、および正常ヒト血清由

来精製IgGタンパク質を直接ビオチン化したものを用いた。各抗体のビオチン化価数はBiotin Quantification Kit（サーモサイエンティフィック社）を用いて測定し、以下の表6に示す通りであった。

[表6]

抗体	
h12A041VH1/VL-biotin	1.61
h12A041VH1/VLA-biotin	2.02
h12A041VH1/VLB-biotin	1.51
h12A041VH1A/VL-biotin	2.37
h14A043VH1/VL1-biotin	2.14
h14A043VH1/VL2-biotin	1.89
h14A043VH1/VL3-biotin	1.94
h14A043VH2/VL1-biotin	1.89
h14A043VH2/VL2-biotin	2.30
h14A043VH2/VL3-biotin	2.14
h14A063VH4/VL1-biotin	1.74
h14A063VH4/VL2-biotin	1.35

これらの抗体を用いて、前項で述べたのと同様の手法により、フローサイトメトリーにより健常人骨髄由来単核球細胞に対する反応性を観察した。図15に以下のビオチン化抗体を10ng/mLの濃度において健常人骨髄由来単核球細胞に結合させたのちにフローサイトメトリーにより観察し、CD34/CD45両陽性生細胞集団のPE蛍光強度を観察した結果のヒストグラムを示す。

25A11-biotin、CUB4-biotin、CUB1-biotin、h12A041VH1/VLA-biotin、h14A043VH1/VL1-biotin、h14A063VH4/VL2-biotin、ヒト血清IgG-biotin

この結果より、本発明において述べる抗体は、比較対象の抗体に比較して、骨髄中のCD34陽性細胞に対する反応性が非常に低く、ヒト血清中のIgGと同じくほぼ反応性が無いことが示された。

さらに表6に示した抗体群について、作用させる抗体濃度を変化させて同様の実験を行った。フローサイトメトリーの測定結果から、CD34陽性生細胞におけるPEの平均蛍光強度の濃度依存性を両対数グラフに示したものが図16である。この結果、CUB4抗体は骨髄中のCD34陽性細胞に対し顕著な結合性を

示すのに対し、表6に示した抗体は、いずれも、陽性比較対象の抗体に対して十分に反応性が低く、少なくとも10ng/mLの比較抗体濃度において、陰性対象として観察した非特異的ヒトIgG抗体と同程度の反応性となった。このことから、本発明において述べる抗体は造血幹細胞に対する反応性が低く、したがってこれらから派生した抗腫瘍活性をもつ修飾抗体も、骨髄細胞に対する細胞傷害性が低いと考えられた。

[0100] 16. PBDコンジュゲート抗体の作成

以下の、項7において作製されたマウス・ヒトキメラ抗体、項14において作製されたヒト化抗体と、非特異的ヒトIgGとして前述の抗RSウイルス抗体について、その精製抗体に直接、抗がん剤であるPBD (Pyrrolobenzodiazepine) を結合させた抗体薬物複合体を作製し、その細胞傷害性を評価した。

mh12A041HCori/LCori、mh14A025HCori/LCori、mh14A043HCori/LCori、mh14A063HCori/LCori

h12A041VH1/VLA、h14A043VH1/VL1、h14A063VH4/VL2

2mgの精製抗体にたいしTCEP (Tris (2-carboxyethyl) phosphine Hydrochloride) によってジスルフィド結合を切断したのち、マレイミド-PEG4-Val-Ala-PBDを、マレイミド-スチレン間の付加結合反応により結合させた。その後、Sephadex G50カラムにより未反応のマレイミド-PEG4-Val-Ala-PBDを除去して、PBS pH7.2にバッファー置換を行った。作製されたPBDコンジュゲート抗体の名称は以下のとおりである。333nmの吸光と280nmの吸光の比によって測定された、1抗体分子あたりの結合PBD分子数 (DAR) とともに示す。

マウス・ヒトキメラ抗体PBDコンジュゲート抗体：mh12A041-PBD (DAR 2.1) ; mh14A025-PBD (DAR 1.7) ; mh14A043-PBD (DAR 1.8) ; mh14A063-PBD (DAR 2.0)

ヒト化抗体PBDコンジュゲート抗体：h12A041-PBD (DAR 3.8) ; h14A043-PBD (DAR 3.6) ; h14A063-PBD (DAR 3.4)

抗RSウイルス抗体PBDコンジュゲート抗体：hIgG-PBD (DAR 2.2)

[0101] 17. マウス・ヒトキメラ抗体PBDコンジュゲート抗体のがん細胞に対する細

胞傷害活性

前項で作製したマウス・ヒトキメラ抗体のPBDコンジュゲート抗体の、培養細胞に対する細胞傷害活性を、以下の方法により評価した。がん細胞株および正常組織由来初代培養細胞は前項で述べたものと同じものを用いた。

細胞は適切な培地を用いてプラスチックディッシュで培養した。細胞をトリプシン処理により剥離し、96ウェル平底プレートに1ウェルあたり1000細胞あるいは2000細胞を播種した。37℃で翌日まで培養後、培地によって各濃度にまで希釈したPBDコンジュゲート抗体を添加し、37℃インキュベータで3日間（DU145）、5日間（PC3）、7日間（そのほかの細胞）それぞれインキュベートした。その後、細胞の生存率をCell Titer Glo（Promega）によって測定した。各PBDコンジュゲート抗体の濃度に対し二つのウェルを同じ条件で処理し、測定値はその2ウェルの平均値を採用した。

テストした4つの抗hCDP1マウス・ヒトキメラ抗体PBDコンジュゲート抗体は肺癌、乳癌、卵巣がん、前立腺がん、大腸癌、膵がん、胆管癌の各細胞株に対して強い細胞傷害性を示した。ヒト乳腺上皮細胞（HMEpC）と正常ヒト表皮角化細胞（NHEK）に対しても、高濃度においては細胞傷害性を示したが、その細胞傷害性の程度はがん細胞株に対する細胞傷害性に比較して弱いものであった。実験結果より、50%阻害濃度（IC50）を算出したものが図17Aであり、これをグラフ化したものが図17Bである。これらの図から分かる通り、各抗体PBDコンジュゲートのNHEKおよびHMEpCに対する細胞傷害活性は、がん細胞株に対する傷害活性と比較して弱いものであった。

[0102] 18. ヒト化抗体PBDコンジュゲート抗体のがん細胞に対する細胞傷害活性

項16で作製したヒト化抗体PBDコンジュゲート抗体に対し、項17と同様の手法により、培養細胞に対する細胞傷害活性を評価した。使用した細胞株は、PC3、DU145、HCT116、MDA-MB-231、H358、SK-OV-3および正常ヒト表皮角化細胞（NHEK）であり、項10で述べたものと同じものを用いた。

細胞をトリプシン処理により剥離し、96ウェル平底プレートに1ウェルあたり1000細胞あるいは2000細胞を播種した。37℃で翌日まで培養後、培地によ

って各濃度にまで希釈したPBDコンジュゲート抗体を添加し、37℃インキュベータで3日間（DU145）、5日間（PC3）、7日間（それ以外の細胞）それぞれインキュベートした。その後、細胞の生存率をCell Titer Glo（Promega）によって測定した。各PBDコンジュゲート抗体の濃度に対し二つのウェルを同じ条件で処理し、測定値はその2ウェルの平均値を採用した。その結果を図18に示す。

テストした3つのヒト化抗hCDGP1抗体PBDコンジュゲートはPC3、DU145、HCT116、MDA-MB-231、H358に対して強い細胞傷害性を示した。SK-OV-3細胞に対する細胞傷害性はこれらよりは弱かった。正常ヒト表皮角化細胞（NHEK）に対しても、高濃度においては細胞傷害性を示したが、その細胞傷害性の程度はがん細胞株に対する細胞傷害性に比較して弱いものであった。実験結果より、50%阻害濃度（IC50）を算出すると以下の表のとおりとなる。

[表7]

IC50 (μ g/mL)	h12A041VH1/VLA-PBD	h14A043VH1/VL1-PBD	h14A063VH4/VL2-PBD
PC3	1.19×10^{-3}	3.57×10^{-4}	7.90×10^{-3}
DU145	2.55×10^{-4}	5.02×10^{-4}	1.44×10^{-2}
HCT116	2.18×10^{-4}	1.55×10^{-4}	1.51×10^{-3}
MDA-MB-231	2.01×10^{-3}	9.96×10^{-4}	1.32×10^{-2}
H358	2.43×10^{-4}	2.04×10^{-4}	3.32×10^{-3}
SK-OV3	6.11×10^{-2}	2.70×10^{-3}	2.66×10^{-1}
NHEK	2.39	3.46×10^{-1}	2.62×10^{-1}

表7から分かる通り、各抗体PBDコンジュゲートのNHEKに対する細胞傷害性は、がん細胞株に対する傷害活性と比較して弱いものであった。

[0103] 19. マウス・ヒトキメラ抗体PBDコンジュゲート抗体のゼノグラフトモデルに対する抗腫瘍活性

次に、抗CDGP1マウス・ヒトキメラ抗体PBDコンジュゲート抗体のin vivoでの抗腫瘍活性を以下の方法により評価した。マウスは、scidマウス（C.B17/Icr-scidJcl; 日本クレア）ないしはヌードマウス（BALB/cAJcl-nu/nu; 日本

クレア) 雌6~7週齢のものを用いた。PC3細胞はATCCより購入したものを用いた。PC3細胞は、Ham' s F-12K (和光純薬工業) に7%のFBSおよび10 μ g/mLのGentamicin (サーモサイエンティフィック社) を添加した培地で培養した。細胞を0.25%トリプシン/0.02% EDTA (サーモサイエンティフィック社) で剥離しPBSで洗浄したのち、1匹あたり 5×10^6 細胞を、Matrigel growth factor reducedフェノールレッドフリー (コーニング社) と1:1で混合し、マウス右脇腹皮下に移植した。

腫瘍が増殖して平均腫瘍体積が100mm³を超えた時点で、各個体の腫瘍体積にもとづきランダム化してグループ化 (一群8匹) した。群分け同日ないしは翌日に被験薬を、マウス体重あたり10 μ L/gにて1回尾静脈投与した。

腫瘍サイズならびに体重の測定は、細胞移植後3~4日から開始し、以降週に2回の頻度で実施した。ノギスを用いて腫瘍の短径と長径をそれぞれ計測し、腫瘍サイズは (短径 mm)² $\times$ (長径 mm) $\times$ 3.14/6 で算定した。

図19A、Bに、scidマウスモデルを用いた実験結果を示す。mh12A041-PBDおよびmh14A025-PBDは1mg/kg、0.3mg/kg群ともに、同じ濃度の非特異的hIgG-PBDを投与した群と比較して、有意に腫瘍を抑制した。

図19C、Dに、ヌードマウスモデルを用いた実験結果を示す。mh14A043-PBDおよびmh14A063-PBDは1mg/kg、0.3mg/kg群ともに、同じ濃度の非特異的hIgG-PBDを投与した群と比較して、有意に腫瘍を抑制した。

[0104] 20. ヒト化抗体PBDコンジュゲート抗体のゼノグラフトモデルに対する抗腫瘍活性

次に、抗CDCP1ヒト化抗体PBDコンジュゲート抗体のin vivoでの抗腫瘍活性を以下の方法により評価した。マウスは、ヌードマウス (BALB/cAJcl-nu/nu; 日本クレア) 雌6~7週齢のものを用いた。

PC3細胞およびHCT116細胞はATCCより購入したものを用いた。PC3細胞は、Ham' s F-12K (和光純薬工業) に7%のFBSおよび10 μ g/mLのGentamicin (サーモサイエンティフィック社) を添加した培地で培養した。HCT116細胞は、McCoy' s 5A (サーモサイエンティフィック社) に10%のFBSおよび1%ペニシリン/ストレプトマイシン (ナカライテ

スク社)を添加した培地で培養した。

細胞を0.25%トリプシン/0.02% EDTA (サーモサイエンティフィック社)で剥離しPBSで洗浄したのち、1匹あたり 5×10^6 細胞を、Matrigel growth factor reducedフェノールレッドフリー (コーニング社)と1:1で混合し、マウス右脇腹皮下に移植した。

腫瘍が増殖して平均腫瘍体積が 100mm^3 を超えた時点で、各個体の腫瘍体積にもとづきランダム化してグループ化 (一群8匹) した。群分け同日に被験薬を、マウス体重あたり $10\mu\text{L/g}$ にて1回尾静脈投与した。

腫瘍サイズならびに体重の測定は、項19と同様の手法により行った。

図20Aに、PC3細胞を用いたゼノグラフトモデルを用いた実験結果を示す。h12A041-PBD、h14A043-PBD、h14A063-PBDともに、 1mg/kg の単回投与によって、同じ濃度の非特異的hIgG-PBDを投与した群に比較して、有意に腫瘍を抑制した。

図20Bに、HCT116細胞を用いたゼノグラフトモデルを用いた実験結果を示す。h12A041-PBD、h14A043-PBD、h14A063-PBDともに、 0.3mg/kg の単回投与によって、同じ濃度の非特異的hIgG-PBDを投与した群に比較して、有意に腫瘍を抑制した。

[0105] 21. MMAEコンジュゲート抗体の作成

以下の、項14において作製されたヒト化抗体について、その精製抗体に直接、抗がん剤であるMMAE (monomethyl auristatin E) を結合させた抗体薬物複合体を作製し、その細胞傷害性を評価した。

h14A043VH1/VL1、h14A063VH4/VL2

約30 mgの精製抗体にたいしTCEP (Tris (2-carboxyethyl) phosphine Hydrochloride) によってジスルフィド結合を切断したのち、maleimidocaproyl-valine-citruline-p-aminobenzyloxycarbonyl-monomethyl auristatin E (MC-vc-PAB-MMAE). を、マレイミド-システイン間の付加結合反応により結合させた。その後、Sephadex G50カラムにより未反応のMC-vc-PAB-MMAEを除去して、PBS pH7.2にバッファー置換を行った。1抗体分子あたりの結合MMAE分子数

は248nmの吸光と280nmの吸光の比によって測定し、h14A043VH1/VL1についてはおよそ3.9、h14A063VH4/VL2についてはおよそ4.0と測定された。作製されたMMAEコンジュゲート抗体の名称は以下のとおりである。

h14A043-MMAE ; h14A063-MMAE

[0106] 2 2. ヒト化抗体MMAEコンジュゲート抗体のゼノグラフトモデルに対する抗腫瘍活性

次に、ヒト化抗体MMAEコンジュゲート抗体のin vivoでの抗腫瘍活性を以下の方法により評価した。マウスは、ヌードマウス (BALB/cAJcl-nu/nu; 日本クレア) 雌6~7週齢のものを用いた。HCT116細胞はATCCより購入したものを用いた。HCT116細胞は、項20と同様の手法により培養した。

細胞を0.25%トリプシン/0.02% EDTA (サーモサイエンティフィック社) で剥離しPBSで洗浄したのち、1匹あたり 5×10^6 細胞を、Matrigel growth factor reducedフェノールレッドフリー (コーニング社) と1:1で混合し、マウス右脇腹皮下に移植した。

腫瘍が増殖して平均腫瘍体積が 100mm^3 を超えた時点で、各個体の腫瘍体積にもとづきランダム化してグループ化 (一群8匹) した。被験薬および陰性対象として溶媒であるリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を、群分け当日を初回投与日として週2回、計4回投与した。投与は、マウス体重あたり $10\mu\text{L/g}$ にて尾静脈投与により行った。腫瘍サイズならびに体重の測定は、項19と同様の手法により行った。

図21に実験結果を示す。h14A043-PBD、h14A063-PBDともに、5mg/kgの4回投与によって、PBS投与群に比較して、有意に腫瘍を抑制した。

産業上の利用可能性

[0107] 本発明によって提供される抗体およびその抗原結合断片は、がんの予防または治療の提供、がんの予防または治療剤の開発等において重要な役割を果たすと考えられる、従って、本発明は医療分野、製薬分野等における利用が期待される。