明　細　書

発明の名称 ： 抗ＣＤＨ３ヒト化抗体及びそれらの使用

技術分野

[0001]　本発明は、抗ＣＤＨ３ヒト化抗体、その免疫複合体、及び医薬に関する。

背景技術

[0002]　がんは、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、がん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がん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Ｐ－カドヘリン（ＣＤＨ３）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。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]　ある種のがん細胞においてはＣＤＨ３の発現上昇例が報告されており、正常組織と比較してがん組織でのＣＤＨ３の発現が高いがん細胞に対して抗体を用いたがん治療が検討されている。

[0005]　抗体の抗がん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（薬物）との連結があげられる。強力な毒性を有する物質はそれ単独で患者に投与すると正常組織にも傷害を及ぼし、有効な治療手段とはなり得ない。しかしながら、がん細胞特異的な抗原と結合する抗体と薬物を連結することにより、正常な組織に悪影響を及ぼさず、がん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、薬物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、薬物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薬物が放出され、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。

[0006] 特許文献１および特許文献２には、抗ＣＤＨ３抗体、およびその薬剤コンジュゲートが記載されている。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：国際公開ＷＯ２０１３／１５０６２３号公報

特許文献2：国際公開ＷＯ２０１４／１２６１９８号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 本発明は、新たな抗ＣＤＨ３抗体を作出し、更にはＣＤＨ３を発現するがん細胞をより効率的に殺傷する抗体薬剤コンジュゲートを作出するのに適した抗ＣＤＨ３ヒト化抗体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

[0009] 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相補性決定領域（ＣＤＲ）配列と、種々のヒト由来フレームワーク領域（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を発現するがん細胞をより効率的に殺傷する免疫複合体である抗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。本発明によれば、以下の発明が提供される。

[0010] ＜１＞ 以下の何れかの抗体。

（１）配列番号１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域と、配列番号２に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域とを有する抗ＣＤＨ３ヒト化

抗体；または

（２）配列番号３に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域と、配列番号４に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域とを有する抗ＣＤＨ３ヒト化抗体。

＜２＞　以下の何れかの抗体である、＜１＞に記載の抗体。

（１）配列番号５に記載のアミノ酸配列からなる重鎖と、配列番号６に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖とを有する抗ＣＤＨ３ヒト化抗体

（２）配列番号７に記載のアミノ酸配列からなる重鎖と、配列番号８に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖とを有する抗ＣＤＨ３ヒト化抗体。

＜３＞　ＣＤＨ３との結合能を有する、＜１＞又は＜２＞に記載の抗ＣＤＨ３ヒト化抗体の断片。

＜４＞　Ｆａｂ，Ｆ（ａｂ′）$_2$、又はｓｃＦｖである、＜３＞に記載の抗ＣＤＨ３ヒト化抗体の断片。

＜５＞　ＣＤＨ３との結合能を有する、＜１＞又は＜２＞に記載した抗体の部分配列。

＜６＞　＜１＞から＜５＞のいずれか一に記載の抗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。

＜７＞　化学療法剤が、細胞障害性物質である、＜６＞に記載の免疫複合体。

＜８＞　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、＜６＞又は＜７＞に記載の免疫複合体。

＜９＞　＜６＞から＜８＞の何れか一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。

＜１０＞　ＣＤＨ３の過剰発現によって特徴づけられる疾患が、がんである、＜９＞に記載の医薬。

[0011]　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。

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の治療において使用するための、上記した免疫複合体が提供される。

発明の効果

[0012] 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を発現するがん細胞に対して強力な細胞傷害活性を示す。

ＣＤＨ３を発現するがん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、高い抗がん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、抗がん剤として有用である。

図面の簡単な説明

[0013] [図1]図１は、画像化キャピラリー等電点電気泳動の結果を示す。Ａ：ｃｈ２０１２、Ｂ：ｈｕ２０１２ｃ、Ｃ：ｈｕ２０１２ｄ。

[図2]図２は熱安定性をＴｈｅｍａｌ　Ｓｈｉｆｔ　Ａｓｓａｙで測定した結果を示す。Ａ：ｃｈ２０１２、Ｂ：ｈｕ２０１２ｃ、Ｃ：ｈｕ２０１２ｄ。

[図3]図３はヒト化抗ＣＤＨ３抗体を肺がん由来細胞株ＮＣＩ－Ｈ３５８に反

応させたフローサイトメトリの結果を示す。左側のピークが陰性対象を示す。

[図4]図４は内在化能を測定した表１の結果のグラフを示す。

[図5]図５はＣＤＨ３キメラ化及びヒト化抗体薬剤コンジュゲートを用いた動物試験結果（ＨＣＣ１９５４乳がんモデル）を示す。

発明を実施するための形態

[0014] 以下、本発明について更に詳細に説明する。

本発明の抗体は、以下の何れかの抗体である。

（１）配列番号１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域と、配列番号２に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域とを有する抗ＣＤＨ３ヒト化抗体；または

（２）配列番号３に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域と、配列番号４に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域とを有する抗ＣＤＨ３ヒト化抗体。

[0015] 本発明の抗体は、好ましくは、以下の何れかの抗体である。

（１）配列番号５に記載のアミノ酸配列からなる重鎖と、配列番号６に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖とを有する抗ＣＤＨ３ヒト化抗体

（２）配列番号７に記載のアミノ酸配列からなる重鎖と、配列番号８に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖とを有する抗ＣＤＨ３ヒト化抗体。

[0016] 本発明の抗ＣＤＨ３ヒト化抗体は、ＣＤＨ３（好ましくはヒト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。

[0017] 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、特に好ましくはがん細胞表面に発現されるＣＤＨ３に結合する。

[0018] 本発明の抗体を作成するための抗原としては、ＣＤＨ３（好ましくはヒト

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（国際公開ＷＯ２０１４／１２６１９８号公報の配列番号２の１０８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。

[0019] 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。

[0020] 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。

[0021] 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。

[0022] 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。

[0023] 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。

[0024] 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。

[0025] 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配列とヒト抗体のＦＲ配列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、国際公開ＷＯ９６／０２５７６号公報など）。

[0026] 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）によって配列比較により規定され、Ｃｈｏｔｈｉａら（Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．；１９６，ｐ９０１（１９８７））により三次元構造によっても規定される。

[0027] Ｋａｂａｔが規定したＣＤＲ配列は、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配列と完全に一致するという訳では無い。

[0028] ＦＲ配列は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ものを使用した。

[0029] 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ＦＲ配列として用いることができる（Ｓｉｍｓら，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．；１５１，ｐ２２９６（１９９３）、Ｃｈｏｔｈｉａら，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．；１９６，ｐ９０１（１９８７）、Ｔｅｍｐｅｓｔら．，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ；９，ｐ２６６（１９９１））。

[0030] 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（ｈｔｔｐｓ：／／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。

[0031] 選ばれた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。

[0032] もしＣＤＲ配列とヒトに由来したＦＲ配列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配列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。

[0033] 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））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。

[0034] 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。

[0035] 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。

[0036] 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。

[0037] これらの抗体は、ＣＤＨ３との結合能を有する限り、一価抗体、二価抗体、多価抗体のいずれでもよい。また、これらの抗体は、ＣＤＨ３との結合能を有する限り、抗体断片（フラグメント）等の低分子化抗体、抗体の修飾物、または抗体の部分配列などであってもよい。抗体断片（フラグメント）等の低分子化抗体としては、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$、Ｆｖ、ＳｃＦｖ（ｓｉｎｇｌｅ　ｃｈａｉｎ　Ｆｖ）、Ｄｉａｂｏｄｙなどが挙げられる。さらに、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。

[0038] ＜免疫複合体＞

本発明によれば、本発明の抗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、免疫複合体が提供される。即ち、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又は放射性物質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を発現しているがん細胞と接触させることによりがん細胞を傷害することができる。

[0039] 化学療法剤は、好ましくは細胞傷害性物質である。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）、メイタンシノイド又はその誘導体（例えば、メイタンシン、メイタンシンアナログ、ＤＭ１，ＤＭ４など）、アウリスタチン又はその誘導体（例えば、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）など）、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、エキサテカン、デルクステカン、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、アマニチン、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。

[0040] 抗ＣＤＨ３ヒト化抗体、その断片又はその部分配列１分子あたりに結合している化学療法剤の分子数は特に限定されないが、好ましくは平均１～１０分子、より好ましくは平均３～５分子の化学療法剤が結合している。一例としては、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１～１０個のＤＭ１が結合していてもよい。

[0041] 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。

[0042] 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、抗体のＦｃ領域を遺伝子工学的に改変して導入することもできる。例えば、抗体内にシステインを遺伝子工学的に導入する方法がある。

[0043] 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。リンカーは、好ましくは２価反応性架橋試薬である。

[0044] 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）、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。

[0045] 一例においては、リンカーは、プロテアーゼによって切断されるものでもよい。

さらに、リンカーは、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つ以上を含むものでもよい。

[0046] 薬剤と抗体との結合方法に関しては、例えば、Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．；５２，ｐ１２７（１９９２）、Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．；６８（２２），ｐ９２８０（２００８）、Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ；２６（８），ｐ９２５（２００８）、Ｂｉｏ Ｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ；１９，ｐ１６７３（２００８）、Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．；６８（１５），ｐ６３００（２００８）、又は特表２００８－５１６８９６号公報などに記載の方法に準じて行うことができる。

[0047] 本発明の別の実施形態としては、抗体に薬物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。用いられる薬物としては、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。

[0048] 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、がん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、がん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。

[0049] 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）、アスタチン２１１（２１１Ａｔ）、アクチニウム２２５（２２５Ａｃ）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。

[0050] 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（２０１ＴＩ）、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。

[0051] これらの放射性金属元素を抗ＣＤＨ３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。

[0052] 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。

[0053] 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。

[0054] 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。

[0055] ＜医薬＞

本発明によれば、本発明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が提供される。

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。

[0056] 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が、例えば、がんを挙げることができる。がんとしては、結腸直腸がん、非小細胞肺がん、乳がん、頭頚部がん、卵巣がん、肺がん、浸潤性膀胱がん、膵臓がん、脳の転移性がん、甲状腺がん、頭頚部扁平上皮がん、食道扁平上皮がん、肺扁平上皮がん、皮膚扁平上皮がん、メラノーマ、乳腺がん、肺腺がん、子宮頚部扁平上皮がん、膵臓扁平上皮がん、結腸扁平上皮がん、又は胃扁平上皮がん、前立腺がん、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。本発明の医薬は、抗腫瘍剤として使用することができる。

[0057] 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

[0058] 実施例１：ヒト化抗体作製方法

（１）抗ＣＤＨ３マウス抗体の作製

抗ＣＤＨ３マウス抗体を特許第６３７７６０１号の実施例１から実施例９に記載の通りに抗ＣＤＨ３マウス抗体を作製し、抗ＣＤＨ３マウス抗体の配列解析から可変領域の配列を得た。

[0059] 配列解析はＡｐＥ及びＧＥＮＥＴＹＸ（株式会社ゼネティックス）を使用した。遺伝子のアライメントにはＣＬＵＳＴＡＬＷを使用した。遺伝子、およびタンパク質情報取得・確認にはＨＰＲＤ，　ＮＣＢＩ　ＢＬＡＳＴ，ＵＣＳＦ（Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　ｏｆ　Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ，　Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ）－　Ｂｌａｔ，　ＵｎｉＰｒｏｔを使用した。

[0060] これにより配列決定されたマウスハイブリドーマに由来する抗ＣＤＨ３マ

ウス抗体の可変領域のうち、ＣＤＲに相当するアミノ酸配列を以下に示す。

ＧＹＳＦＴＡＹＮ：配列番号９（ＣＤＲ－Ｈ１）

ＩＤＰＹＳＧＩＩ：配列番号１０（ＣＤＲ－Ｈ２）

ＡＲＲＧＹＹＤＧＧＦＤＹ：配列番号１１（ＣＤＲ－Ｈ３）

ＱＤＩＴＮＹ：配列番号１２（ＣＤＲ－Ｌ１）

ＹＴＳ：配列番号１３（ＣＤＲ－Ｌ２）

ＱＱＤＳＫＨＰＲＴ：配列番号１４（ＣＤＲ－Ｌ３）

なお、ＣＤＲ－Ｈ１、Ｈ２及びＨ３は重鎖を、ＣＤＲ－Ｌ１、Ｌ２及びＬ３は軽鎖を構成するＣＤＲ配列を表す。示したＣＤＲのアミノ酸配列は抗ＣＤＨ３マウス抗体可変域の塩基配列をＩＭＧＴ／Ｖ－ＱＵＥＳＴ（ｈｔｔｐｓ：／／ｗｗｗ．ｉｍｇｔ．ｏｒｇ／ＩＭＧＴ＿ｖｑｕｅｓｔ／ｖｑｕｅｓｔ？ｌｉｖｒｅｔ＝０＆Ｏｐｔｉｏｎ＝ｈｕｍａｎｌｇ）で検索することにより得た。

[0061] （２）抗ＣＤＨ３抗体の一過性発現ベクターの作製

キメラ化に際し、軽鎖についてはヒトＣｋをコードするキメラ軽鎖発現ベクターにＣＤＨ３マウス抗体の軽鎖可変領域の遺伝子を接続した遺伝子を設計した。重鎖についてはヒトＣｇ１領域をコードするベクターにＣＤＨ３マウス抗体の重鎖可変領域をコードする遺伝子を接続し設計した。

[0062] ヒト化に際してはマウス由来ＣＤＲ配列とヒト由来ＦＲ配列を組み合わせ、更にヒトＦｃ領域を連結してヒト化抗体発現ベクターを用いて安定生産株を構築した。より具体的には以下の通りである。

[0063] マウスＦＲ配列に相当する領域をヒトに由来したＦＲ配列に入れ替え、ＧｅｎＳｃｒｉｐｔ社で全長人工合成した。ＦＲ配列に相当する領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖系列フレーム配列を用いた。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（ｈｔｔｐｓ：／／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。

[0064] 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ｈｕ２０１２ｃ及びｈｕ２０１２ｄは同じＣＤＲ配列を持つ。また、ｈｕ２０１２ｄは付記したようなアミノ酸配列の置換を導入している。

[0065] 抗体番号：ｈｕ２０１２ｃ－ＶＨ

ＥＶＱＬＶＱＳＧＡＥＶＫＫＰＧＡＴＶＫＩＳＣＫＶＳＧＹＳＦＴＡＹＮＭ
ＨＷＶＱＱＡＰＧＫＧＬＥＷＭＧＦＩＤＰＹＳＧＩＩＴＹＡＥＫＦＱＧＲＶ
ＴＩＴＡＤＴＳＴＤＴＡＹＭＥＬＳＳＬＲＳＥＤＴＡＶＹＹＣＡＲＲＧＹＹ
ＤＧＧＦＤＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ

（配列番号１）

[0066] 抗体番号：ｈｕ２０１２ｃ－ＶＬ

ＤＩＱＭＴＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＱＡＳＱＤＩＴＮＹＬＮ
ＷＹＱＱＫＰＧＫＡＰＫＬＬＩＹＹＴＳＲＬＥＴＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧ
ＴＤＦＴＦＴＩＳＳＬＱＰＥＤＩＡＴＹＹＣＱＱＤＳＫＨＰＲＴＦＧＱＧＴ
ＫＶＥＩＫ

（配列番号２）

[0067] 抗体番号：ｈｕ２０１２ｄ－ＶＨ

ＥＶＱＬＶＱＳＧＡＥＶＫＫＰＧＡＴＶＫＩＳＣＫＶＳＧＹＳＦＴＡＹＮＭ
ＨＷＶＱＱＡＰＧＫＧＬＥＷＭＧＦＩＤＰＹＳＧＩＩＴＹＡＥＫＦＱＧＲＶ
ＴＩＴＶＤＫＳＴＤＴＡＹＭＥＬＳＳＬＲＳＥＤＴＡＶＹＹＣＡＲＲＧＹＹ
ＤＧＧＦＤＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ

（配列番号３）

（ｈｕ２０１２ｃ－ＶＨに対してＡ７２Ｖ、Ｔ７４Ｋが置換されている）

[0068] 抗体番号：ｈｕ２０１２ｄ－ＶＬ

ＤＩＱＭＴＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＱＡＳＱＤＩＴＮＹＬＮ
ＷＹＱＱＫＰＧＫＡＰＫＬＬＩＹＹＴＳＲＬＨＴＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧ
ＴＤＦＴＦＴＩＳＳＬＱＰＥＤＩＡＴＹＹＣＱＱＤＳＫＨＰＲＴＦＧＱＧＴ

ＫＶＥＩＫ

（配列番号４）

（ｈｕ２０１２ｃ－ＶＬに対してＥ５５Ｈが置換されている）

[0069] これらの配列を持つように設計した人工合成配列遺伝子を、重鎖可変領域の遺伝子についてはヒトＩｇＧ１由来の定常領域の遺伝子が組み込まれたｐＣＸＮベクターに組み込み、軽鎖可変領域の遺伝子についてはヒトκ鎖由来の定常領域の遺伝子が組み込まれたｐＣＸＮベクターに組み込んだ。

[0070] これを発現させて得られた抗ＣＤＨ３ヒト化抗体のアミノ酸の全長配列を以下に示した。ここで抗ＣＤＨ３ヒト化抗体ｈｕ２０１２ｃはＨ鎖がｈｕ２０１２ｃ－Ｈ、Ｌ鎖がｈｕ２０１２ｃ－Ｌからなり、抗ＣＤＨ３ヒト化抗体ｈｕ２０１２ｄはＨ鎖がｈｕ２０１２ｄ－Ｈ、Ｌ鎖がｈｕ２０１２ｄ－Ｌからなるものを言うが、それぞれのＨ鎖とＬ鎖を相互に入れ替えて発現させても良い。

抗体番号：ｈｕ２０１２ｃ－Ｈ

ＥＶＱＬＶＱＳＧＡＥＶＫＫＰＧＡＴＶＫＩＳＣＫＶＳＧＹＳＦＴＡＹＮＭ
ＨＷＶＱＱＡＰＧＫＧＬＥＷＭＧＦＩＤＰＹＳＧＩＩＴＹＡＥＫＦＱＧＲＶ
ＴＩＴＡＤＴＳＴＤＴＡＹＭＥＬＳＳＬＲＳＥＤＴＡＶＹＹＣＡＲＲＧＹＹ
ＤＧＧＦＤＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳＡＳＴＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰＳＳＫＳ
ＴＳＧＧＴＡＡＬＧＣＬＶＫＤＹＦＰＥＰＶＴＶＳＷＮＳＧＡＬＴＳＧＶＨ
ＴＦＰＡＶＬＱＳＳＧＬＹＳＬＳＳＶＶＴＶＰＳＳＳＬＧＴＱＴＹＩＣＮＶ
ＮＨＫＰＳＮＴＫＶＤＫＫＶＥＰＰＫＳＣＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬ
ＧＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥ
ＤＰＥＶＫＦＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶ
ＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰＩＥＫＴＩＳ
ＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＤＥＬＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧ
ＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳＤＧＳＦＦ
ＬＹＳＫＬＴＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫ
ＳＬＳＬＳＰＧＫ（配列番号５）

[0071] 抗体番号：ｈｕ２０１２ｃ－Ｌ

ＤＩＱＭＴＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＱＡＳＱＤＩＴＮＹＬＮ
ＷＹＱＱＫＰＧＫＡＰＫＬＬＩＹＹＴＳＲＬＥＴＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧ
ＴＤＦＴＦＴＩＳＳＬＱＰＥＤＩＡＴＹＹＣＱＱＤＳＫＨＰＲＴＦＧＱＧＴ
ＫＶＥＩＫＲＴＶＡＡＰＳＶＦＩＦＰＰＳＤＥＱＬＫＳＧＴＡＳＶＶＣＬＬ
ＮＮＦＹＰＲＥＡＫＶＱＷＫＶＤＮＡＬＱＳＧＮＳＱＥＳＶＴＥＱＤＳＫＤ
ＳＴＹＳＬＳＳＴＬＴＬＳＫＡＤＹＥＫＨＫＶＹＡＣＥＶＴＨＱＧＬＳＳＰ
ＶＴＫＳＦＮＲＧＥＣ（配列番号６）

[0072] 抗体番号：ｈｕ２０１２ｄ－Ｈ

ＥＶＱＬＶＱＳＧＡＥＶＫＫＰＧＡＴＶＫＩＳＣＫＶＳＧＹＳＦＴＡＹＮＭ
ＨＷＶＱＱＡＰＧＫＧＬＥＷＭＧＦＩＤＰＹＳＧＩＩＴＹＡＥＫＦＱＧＲＶ
ＴＩＴＶＤＫＳＴＤＴＡＹＭＥＬＳＳＬＲＳＥＤＴＡＶＹＹＣＡＲＲＧＹＹ
ＤＧＧＦＤＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳＡＳＴＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰＳＳＫＳ
ＴＳＧＧＴＡＡＬＧＣＬＶＫＤＹＦＰＥＰＶＴＶＳＷＮＳＧＡＬＴＳＧＶＨ
ＴＦＰＡＶＬＱＳＳＧＬＹＳＬＳＳＶＶＴＶＰＳＳＳＬＧＴＱＴＹＩＣＮＶ
ＮＨＫＰＳＮＴＫＶＤＫＫＶＥＰＰＫＳＣＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬ
ＧＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥ
ＤＰＥＶＫＦＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶ
ＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰＩＥＫＴＩＳ
ＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＤＥＬＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧ
ＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳＤＧＳＦＦ
ＬＹＳＫＬＴＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫ
ＳＬＳＬＳＰＧＫ（配列番号７）

[0073] 抗体番号：ｈｕ２０１２ｄ－Ｌ

ＤＩＱＭＴＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＱＡＳＱＤＩＴＮＹＬＮ
ＷＹＱＱＫＰＧＫＡＰＫＬＬＩＹＹＴＳＲＬＨＴＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧ
ＴＤＦＴＦＴＩＳＳＬＱＰＥＤＩＡＴＹＹＣＱＱＤＳＫＨＰＲＴＦＧＱＧＴ
ＫＶＥＩＫＲＴＶＡＡＰＳＶＦＩＦＰＰＳＤＥＱＬＫＳＧＴＡＳＶＶＣＬＬ

ＮＮＦＹＰＲＥＡＫＶＱＷＫＶＤＮＡＬＱＳＧＮＳＱＥＳＶＴＥＱＤＳＫＤＳＴＹＳＬＳＳＴＬＴＬＳＫＡＤＹＥＫＨＫＶＹＡＣＥＶＴＨＱＧＬＳＳＰＶＴＫＳＦＮＲＧＥＣ（配列番号８）

[0074] 実施例２：ｉｃＩＥＦ（画像化キャピラリー等電点電気泳動）

ｃｈ２０１２とｈｕ２０１２の画像化キャピラリー等電点電気泳動（ｉｃＩＥＦ）をｉＣＥ２８０アナライザー（プロテインシンプル社）を用いて行った。

[0075] （１）ｌｏａｄｉｎｇ　ｍｉｘｔｕｒｅの調製

Ｐｈａｒｍａｌｙｔｅ（ファルマライト）３－１０、ｐｌマーカーおよび０．５％メチルセルロース溶液を混合し、ｌｏａｄｉｎｇ　ｍｉｘｔｕｒｅを調製した。サンプル数に合わせて調製量は適宜調節した。

Ｐｈａｒｍａｌｙｔｅ　３－１０	２．０　ｕＬ／ｓａｍｐｌｅ
酸性側ｐｌマーカー（４．２２）	０．２５　ｕＬ／ｓａｍｐｌｅ
アルカリ性側ｐｌマーカー（９．４６）	０．２５　ｕＬ／ｓａｍｐｌｅ
０．５％メチルセルロース	１７．５　ｕＬ／ｓａｍｐｌｅ
Ｔｏｔａｌ	２０．０　ｕＬ／ｓａｍｐｌｅ

[0076] （２）サンプルの調製

サンプルが２０ｍＭ以上の塩を含む場合は２０ｍＭ　リン酸バッファー（ｐＨ６．０）で置換した。尿素は２０ｍＭ　リン酸バッファー（ｐＨ６．０）で溶解し１０Ｍ　尿素を用事調製した。

サンプルを以下の割合で調製した。サンプル濃度は抗体であれば１４０～２００ｕｇ／ｍＬ、薬剤標識抗体であれば４００ｕｇ／ｍＬとした。

[0077] ｎ＝１測定の場合

１０Ｍ　尿素	１０ｕＬ
抗体（１４０～２００ｕｇ／ｍＬ）	２０ｕＬ
ｌｏａｄｉｎｇ　ｍｉｘｔｕｒｅ	２０ｕＬ
Ｔｏｔａｌ	５０ｕＬ

[0078] （３）マーカーの調製

以下の割合でマーカーを調製した。

１０Ｍ　尿素	２０ｕＬ
２０ｍＭ　リン酸バッファー（ｐＨ６．０）	４０ｕＬ
ｌｏａｄｉｎｇ　ｍｉｘｔｕｒｅ	４０ｕＬ
Ｔｏｔａｌ	１００ｕＬ

[0079] 調整したサンプルとマーカーはＶｏｒｔｅｘミキサーでよく混和し、卓上用遠心器で３～５分遠心した。専用のグラスバイアルに、サンプルとマーカーを分注し、バイアル内の気泡を除くために卓上用遠心器で軽く遠心した後ｉＣＥ２８０アナライザーのバイアルホルダーにセットし、測定を行った。

[0080] （４）結果

図１はキメラ抗体ｃｈ２０１２、ヒト化抗体ｈｕ２０１２ｃおよびｈｕ２０１２ｄの画像化キャピラリー等電点電気泳動の電気泳動図を示している。ｃｈ２０１２は酸性および塩基性ピークが不均一かつ複数のピークを示した。一方、ヒト化抗体であるｈｕ２０１２ｃ、ｈｕ２０１２ｄのそれぞれの主要ピークの等電点（ｐｌ）はそれぞれ７．９９と８．６０であり主要ピーク以外のピークはほぼ検出されなかった。ｃｈ２０１２をヒト化することにより同等性評価しやすいほぼ単一ピークの抗体を取得した。

[0081] 実施例３：Ｔｈｅｒｍａｌ　Ｓｈｉｆｔ　Ａｓｓａｙ（ＴＳＡ）

（１）サンプルの調製

Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｔｈｅｒｍａｌ　Ｓｈｉｆｔ　Ｄｙｅ　ＫｉｔのＤｙｅ（１０００ｘ）１ｕＬをＭｉｌｌｉ　Ｑ水　１２４ｕＬで希釈してＤｙｅ（８ｘ）とした（１２５ｕＬ、５０サンプル分）。調製量はサンプル数によって適宜変更した。

サンプルとなる抗体は、ＤＰＢＳに置換し、濃度を０．２５ｍｇ／ｍＬに調製した。

氷上に指定の８連ＰＣＲチューブもしくは９６ウェルプレートを置き、ｎ＝１測定の場合は以下の割合で反応液を調製した。

[0082]

Ｄｙｅ（８ｘ）	２．５ｕＬ

０．２５　ｍｇ／ｍＬ　Ａｂ　　１７．５ｕＬ

（反応液中抗体濃度：５．０　ｕｇ）

Ｔｏｔａｌ　　２０．０ｕＬ

[0083] 調整したサンプルはリアルタイムＰＣＲ　ＳｔｅｐＯｎｅＰｌｕｓ　（Ｔｈｅｒｍｏｆｉｓｈｅｒ　ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社，　ＳｔｅｐＯｎｅＰｌｕｓ－０１登録商標）を用いて測定した。

[0084] （２）測定条件

Ｔｅｍｐ．ｒａｎｇｅ　２０－９０℃

Ｈｅａｔｉｎｇ　ｒａｔｅ　０．２℃

Ｉｎｔｅｒｖａｌ　１０ｓｅｃ

Ｔｉｍｅｓ　３５０　ｔｉｍｅｓ

解析はＰｒｏｔｅｉｎ　Ｔｈｅｒｍａｌ　Ｓｈｉｆｔ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ（登録商標）を用いて行った。

[0085] （３）結果

ｃｈ２０１２、ｈｕ２０１２ｃ、ｈｕ２０１２ｄの　サーマルシフトアッセイの結果を図２に示した。

解析により得られたＴｍ値はｃｈ２０１２は　５９．０℃　、ｈｕ２０１２ｄでは６８．８℃となりヒト化したｈｕ２０１２ｄの方がＴｍ値が高いことが分かった。ｃｈ２０１２をヒト化することにより熱安定性が向上した。

[0086] 実施例４：抗体の結合活性

実施例１に示した配列を持つ抗体を作製し、その結合活性をフローサイトメトリで評価した。

反応対象となる各細胞株（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、１×１０６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ｈｕ２０１２ｃ及びｈｕ２０１２ｄ抗体を０．３ｕｇ／ｍＬになるように添加し、４℃で６０分間反応させた。ＦＡＣＳ溶液（１％ＢＳ

Ａ，２ｍＭ　ＥＤＴＡ，０．１％ＮａＮ　３入りＰＢＳ、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。その結果、ＣＤＨ３発現細胞株への強い反応性が認められた（図３）。ヒト化抗体ｈｕ２０１２ｄはｈｕ２０１２ｃより強い結合活性を示した。

[0087] 実施例５：内在化能の測定

サポリン標識抗ヒトＩｇＧ抗体（Ｈｕｍ　ＺＡＰ、Ａｄｖａｎｃｅｄ　Ｔａｒｇｅｔｉｎｇ　Ｓｙｓｔｅｍｓ社）を使用して行った。細胞殺傷はサポリンによる内部移行が必須のため、殺傷の程度を測定することにより内在化能の評価が可能である。サポリン標識抗ヒトＩｇＧ抗体を加えなかった時の細胞生存率を１００％とした相対活性で表した。より具体的には以下の通りである。

[0088] （１）測定方法

ヒトＣＤＨ３発現細胞としてヒト乳がん由来細胞株ＨＣＣ１９５４及びヒト肺がん由来細胞株ＮＣＩＨ３５８を用いた。各ウェル当り細胞数５０００個、ＨｕｍＺＡＰ１００ｎｇ（あるいは０ｎｇ）、抗ヒトＣＤＨ３キメラ抗体または抗ヒトＣＤＨ３ヒト化抗体１００ｎｇとなるように調製し、９６穴マイクロプレートに加え、５％ＣＯ２インキュベータ中で３７℃、３日間静置した。

[0089] その後、各ウェルにＣｅｌｌ　ｃｏｕｎｔｉｎｇ　Ｋｉｔ－８（株式会社同仁化学研究所）を１０ｕＬ添加、攪拌後静置し、２時間後にプレートリーダーにてＡ４５０／６２０を測定し生細胞数を計測した。

[0090] （２）内在性能の計算

抗体内在性能の比較は、以下の計算式に従った。

Ｓａｍｐｌｅ（ＺＡＰ＋）：ＨｕｍＺＡＰ存在下でのサンプルのシグナル平均値

Ｓａｍｐｌｅ（ＺＡＰ－）：ＨｕｍＺＡＰ非存在下でのサンプルのシグナル平均値

ＮｏＡｂ（ＺＡＰ＋）：ＨｕｍＺＡＰ存在下での抗体無しウェルのシグナル平均値

ＮｏＡｂ（ＺＡＰ－）：ＨｕｍＺＡＰ非存在下での抗体無しウェルのシグナル平均値

ＢＫ：Ｍｅｄｉｕｍのみウェルのシグナル平均値

[0091]（３）結果

結果を表１及び図４に示す。

ｈｕ２０１２ｃ及びｈｕ２０１２ｄはＮＣＩ－Ｈ３５８とＨＣＣ１９５４どちらの細胞においてもｃｈ２０１２よりも生細胞率が減少していた。これはサポニン標識抗ヒトＩｇＧ抗体がより内部移行したことを表すためヒト化によって内在化能が高くなることが示された。

[0092] [表1]

表１　生細胞率

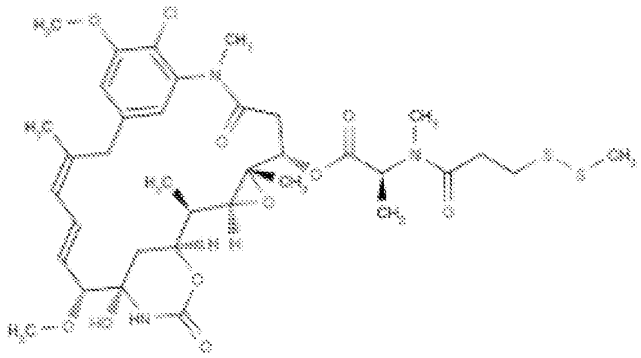
抗体名	生細胞％ NCIH358	生細胞％ HCC1954
ch2012	91.1	46.3
hu2012c	85.8	28.8
hu2012d	84.0	28.6

[0093] 実施例６：インビボ

（１）ＤＭ１標識抗体の作製

結合薬剤の出発物質としてＤＭ１ＳＭｅ（ＣＡＳ　１３８１４８－６８－２）を用いる場合はＴＣＥＰにより還元処理を行いＣ１８カラムを用いたＨＰＬＣ精製する事でＤＭ１ＳＨを得た。一方で抗体にｓｕｌｆｏ－ＳＭＣＣでマレイミド基を導入し、更にＤＭ１ＳＨを反応させる事で、ＤＭ１標識体を調製した。

[化1]



ＤＭ１ＳＭｅ構造式

[0094] （２）ゼノグラフト作製

ＨＣＣ１９５４細胞を培養し、移植必要量の２倍程度の数が得られるまで拡大した。また、細胞移植前日に、マウス右腹側部の剃毛を行った。

[0095] （３）移植

細胞をＰＢＳ（－）で洗浄した後、ＴｒｙｐｌｅＥｘｐｒｅｓｓ(Ｔｈｅｒｍｏｆｉｓｈｅｒ　ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社)で剥離し、１，０００　ｒｐｍ５分遠心してペレットを回収した。ペレットを抗生物質および血清不含ＲＰＭＩ－１６４０培地に懸濁して５×１０^{7}／ｍｌに調製し、その１００μｌをマウス右側部皮下に移植した。

インビボ試験は各群５匹とし、ｃｈ２０１２－ＤＭ１とｈｕ２０１２（ｃ／ｄ）－ＤＭ１の５ｍｇ／ｋｇを尾静脈より投与した。投与は平均腫瘍径が１００－１５０ｍｍ^{3}となった時点で１回目の投与し、１週間後に更に同量投与し、計２回投与を行なった。

結果を図５に示す。ｈｕ２０１２ｃ及びｈｕ２０１２ｄはｃｈ２０１２よりも薬効が高くなることが示された。ヒト化によって熱安定性及び内在化能が向上した結果、薬効が高くなることが示唆された。

請求の範囲

[請求項1] 以下の何れかの抗体。

（１）配列番号１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域と、配列番号２に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域とを有する抗ＣＤＨ３ヒト化抗体；または

（２）配列番号３に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域と、配列番号４に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域とを有する抗ＣＤＨ３ヒト化抗体。

[請求項2] 以下の何れかの抗体である、請求項１に記載の抗体。

（１）配列番号５に記載のアミノ酸配列からなる重鎖と、配列番号６に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖とを有する抗ＣＤＨ３ヒト化抗体

（２）配列番号７に記載のアミノ酸配列からなる重鎖と、配列番号８に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖とを有する抗ＣＤＨ３ヒト化抗体。

[請求項3] ＣＤＨ３との結合能を有する、請求項１又は２に記載の抗ＣＤＨ３ヒト化抗体の断片。

[請求項4] Ｆａｂ，Ｆ（ａｂ′）$_2$、又はｓｃＦｖである、請求項３に記載の抗ＣＤＨ３ヒト化抗体の断片。

[請求項5] ＣＤＨ３との結合能を有する、請求項１又は２に記載した抗体の部分配列。

[請求項6] 請求項１から５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7] 化学療法剤が、細胞障害性物質である、請求項６に記載の免疫複合体。

[請求項8] 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６又は７に記載の免疫複合体。

[請求項9] 請求項６から８の何れか一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10] ＣＤＨ３の過剰発現によって特徴づけられる疾患が、がんである、請求項９に記載の医薬。