明　細　書

発明の名称 ： 放射性金属標識抗カドヘリン抗体

技術分野

[0001] 本発明は、癌細胞特異的に高集積する放射性金属標識抗カドヘリン抗体、さらにこれを含有する癌治療薬および癌診断薬に関する。

背景技術

[0002] 癌は死因の一位であり、新たな治療法が希求されている。癌の治療法としては、外科療法、放射線療法、化学療法（抗がん剤）があるが、外科手術後でも抗癌剤による治療が用いられる。

抗癌剤としては、アルキル化剤、代謝拮抗剤、アルカロイド系抗癌剤、抗生物質抗癌剤、白金製剤等が用いられているが、これらの治療効果は未だ十分とはいえず、癌細胞特異的でなく、副作用の発生頻度が高いという問題がある。かかる観点から、より優れた抗癌剤の開発が望まれている。

[0003] 一方、カドヘリン（Ｃａｄｈｅｒｉｎ）は、細胞表面に発現するCa^{2+}依存的な接着分子である。当該カドヘリンには、Ｅカドヘリン、Ｎカドヘリン、Ｐカドヘリン（ＣＤＨ３）等のクラシックカドヘリンの他にプロトカドヘリン、デスモソームカドヘリン等が知られている。これらのカドヘリンは、ホモフィリックに結合し、アドヘレンス・ジャンクションを形成し、細胞内のカテニンを介して細胞内骨格系（アクチン繊維）に連結することが知られており、このような機序により細胞接着を司っていると考えられる。

[0004] またカドヘリンは細胞接着以外に、胚発生、形態形成、シナプス形成、シナプス可塑性、さらには癌の浸潤、転移にも関与しているといわれている。従って、抗カドヘリン抗体は、癌治療に有用であることが報告されている（特許文献１～３）。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特表２００５－５２２９８２号公報

特許文献2：特表２００８－５３８９０９号公報

特許文献3：特表２００９－５２８２５７号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] しかしながら、抗カドヘリン抗体の抗癌効果は十分とは言えず、さらに優れた癌治療薬の開発が望まれていた。

従って、本発明の課題は、癌組織集積性の高い放射性金属標識抗カドヘリン抗体を提供し、これを有効成分とする抗癌効果の高い癌治療薬、およびその有効性予測や治療効果確認に使用できる癌診断薬を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0007] そこで本発明者は、上記課題を解決すべく種々検討した結果、抗カドヘリン抗体に金属キレート試薬を介して放射性金属元素を結合させた放射性金属標識抗カドヘリン抗体が担癌動物の癌組織に特異的に集積し、かつその抗癌効果が抗カドヘリン抗体投与群に比べて格別顕著に向上することを見出し、本発明を完成した。

[0008] すなわち、本発明は、放射性金属元素が金属キレート試薬を介して結合してなる抗カドヘリン抗体、さらにこれを有効成分とする癌治療薬および癌診断薬を提供するものである。

[0009] また、本発明は、癌治療又は癌診断に用いるための、上記抗カドヘリン抗体を提供するものである。

また、本発明は、癌治療薬又は癌診断薬製造のための、上記抗カドヘリン抗体の使用を提供するものである。

さらに本発明は、上記抗カドヘリン抗体の有効量を投与することを特徴とする癌治療方法又は癌診断方法を提供するものである。

発明の効果

[0010] 本発明の放射性金属標識抗カドヘリン抗体を有効成分とする癌治療薬は、癌組織への集積性が高く、かつ癌組織縮小効果が高いため、これを用いれば

副作用が少なく、効率的に癌治療を行うことができる。また、本発明の癌診断薬を用いることにより、本発明の癌治療薬の有効性の予測や治療効果の確認をすることができる。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]フローサイトメトリを用いた抗体の親和性評価の結果を示す。

[図2]^{67}Ｇａ－ＤＯＴＡ－ＰＰＭＸ２０１６抗体（仕込比１：１０）投与９６時間後の体内分布を示す。

[図3]^{67}Ｇａ－ＤＯＴＡ－ＰＰＭＸ２０１６抗体（仕込比１：３）投与９６時間後の体内分布を示す。

[図4]^{67}Ｇａ－ＤＯＴＡ－ＰＰＭＸ２０２９抗体（仕込比１：１０）投与９６時間後の体内分布を示す。

[図5]^{67}Ｇａ－ＤＯＴＡ－ＰＰＭＸ２０２９抗体（仕込比１：３）投与９６時間後の体内分布を示す。

[図6]^{67}Ｇａ－ＤＯＴＡ－ＰＰＭＸ２０２５抗体（仕込比１：１０）投与９６時間後の体内分布を示す。

[図7]^{67}Ｇａ－ＤＯＴＡ－ＰＰＭＸ２０２５抗体（仕込比１：３）投与９６時間後の体内分布を示す。

[図8]^{67}Ｇａ－ＤＯＴＡ－ＰＰＭＸ２０２５抗体のＤＯＴＡ仕込比を１：１、１：３、１：１０としたときの投与９６時間後の体内分布を示す。

[図9]^{111}Ｉｎ－ＤＯＴＡ－ＰＰＡＴ－０５２－２７ｃ抗体（仕込比１：３）投与９６時間後の体内分布を示す。

[図10]^{111}Ｉｎ－ＤＯＴＡ－ＰＰＡＴ－０５２－２７ｃ抗体（仕込比１：３）投与４８時間後の体内分布を示す。

[図11]^{111}Ｉｎ－ＤＯＴＡ－ＰＰＡＴ－０５２－２８ｃ抗体（仕込比１：３）投与４８時間後及び９６時間後の体内分布を示す。

[図12]^{90}Ｙ－ＤＯＴＡ－ＰＰＭＸ２０２９抗体（仕込比１：３）のゼノグラフトモデルにおける抗腫瘍効果を示す。

[図13]^{90}Ｙ－ＤＯＴＡ－ＰＰＡＴ－０５２－２７ｃ抗体（仕込比１：３）の

ゼノグラフトモデルにおける抗腫瘍効果を示す。

[図14]ＣＤＨ３タンパク質の発現を確認した免疫組織化学染色の結果を示す。

発明を実施するための形態

[0012] 本発明の放射性金属標識抗カドヘリン抗体は、放射性金属元素が金属キレート試薬を介して結合してなる抗カドヘリン抗体であり、癌治療薬及び癌診断薬は、これを含有する。

抗カドヘリン抗体は、カドヘリンに特異的に結合する抗体であれば特に制限されない。ここで、カドヘリンとしては、Ｅカドヘリン、Ｎカドヘリン、Ｐカドヘリン等が挙げられるが、Ｐカドヘリンがより好ましい。

[0013] 抗カドヘリン抗体には、モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体、ならびに抗原決定基に特異的に結合する能力を保持している抗体およびＴ－細胞レセプターフラグメント等の抗体の変種および誘導体が含まれる。

[0014] 又、抗カドヘリン抗体の種類は特に制限されず、マウス抗体、ヒト抗体、ラット抗体、ウサギ抗体、ヒツジ抗体、ラクダ抗体、トリ抗体等や、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺伝子組換え型抗体、例えば、キメラ抗体、ヒト化抗体等を適宜用いることができる。遺伝子組換え型抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。キメラ抗体は、ヒト以外の哺乳動物、例えば、マウス抗体の重鎖、軽鎖の可変領域とヒト抗体の重鎖、軽鎖の定常領域からなる抗体であり、マウス抗体の可変領域をコードするＤＮＡをヒト抗体の定常領域をコードするＤＮＡと連結し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入し産生させることにより得ることができる（例えば、Ｃａｂｉｌｌｙ Ｓ．ら、Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ．１９８４ ８１（１１）３２７３－７、Ｍｏｒｒｉｓｏｎら、Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ．１９８４ ８１（２１）６８５１-５、欧州特許出願公開番号第１７１４９６号を参照）。ヒト化抗体は、再構成（ｒｅｓｈａｐｅｄ）ヒト抗体とも称され、ヒト以外の哺乳動物、たとえばマウス抗体の相補性決定領域（ＣＤＲ；ｃｏｍｐ

ｌｅｍｅｎｔａｒｉｔｙ ｄｅｔｅｒｍｉｎｉｎｇ ｒｅｇｉｏｎ）をヒト抗体の相補性決定領域へ移植したものであり、その一般的な遺伝子組換え手法も知られている。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（ｆｒａｍｅｗｏｒｋ ｒｅｇｉｏｎ；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んで、これを宿主に導入し産生させることにより得られる（欧州特許出願公開番号ＥＰ２３９４００、国際特許出願公開番号ＷＯ９６／０２５７６参照）。ＣＤＲを介して連結されるヒト抗体のＦＲは、相補性決定領域が良好な抗原結合部位を形成するものが選択される。必要に応じ、再構成ヒト抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成するように抗体の可変領域のフレームワーク領域のアミノ酸を置換してもよい（Ｓａｔｏ，Ｋ．ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ，１９９３，５３，８５１－８５６．）。

[0015] キメラ化、ヒト化抗体のアミノ酸配列は、寄託ハイブリドーマの発現するｃＤＮＡに由来するＶｈ又はＶｌ領域のアミノ酸配列と１００％同一であることも好ましいが、遺伝子工学的な改変により、９０％以上同一である配列を有する抗体であることも好ましい。ヒト化、キメラ化の過程で抗原の結合を改善することを目的とした残基置換の調整は従来から行われている。このような、配列を一部改変した抗体は、基本的にはもとのハイブリドーマに由来する抗体と考えられるからである。

[0016] 遺伝子工学的な手法を用いる、キメラ化抗体や、ヒト化抗体の作成方法は既に既知のものである。つまり、確認された基となるモノクローナル抗体のＶｈ、ＶＬ配列を、遺伝子工学的に改変したのち、通常の方法により、キメラ化またはヒト化する。

[0017] また、ヒト抗体の取得方法も知られている。例えば、ヒトリンパ球をｉｎｖｉｔｒｏで所望の抗原または所望の抗原を発現する細胞で感作し、感作

リンパ球をヒトミエローマ細胞、例えばＵ２６６と融合させ、抗原への結合活性を有する所望のヒト抗体を得ることもできる（特公平１－５９８７８参照）。また、ヒト抗体遺伝子の全てのレパートリーを有するトランスジェニック動物を所望の抗原で免疫することで所望のヒト抗体を取得することができる（ＷＯ９３／１２２２７，ＷＯ９２／０３９１８，ＷＯ９４／０２６０２，ＷＯ９４／２５５８５，ＷＯ９６／３４０９６，ＷＯ９６／３３７３５参照）。さらに、ヒト抗体ライブラリーを用いて、パンニングによりヒト抗体を取得する技術も知られている。例えば、ヒト抗体の可変領域を一本鎖抗体（ｓｃＦｖ）としてファージディスプレイ法によりファージの表面に発現させ、抗原に結合するファージを選択することができる。選択されたファージの遺伝子を解析すれば、抗原に結合するヒト抗体の可変領域をコードするＤＮＡ配列を決定することができる。抗原に結合するｓｃＦｖのＤＮＡ配列が明らかになれば、当該配列を適当な発現ベクターを作製し、ヒト抗体を取得することができる。これらの方法は既に周知であり、ＷＯ９２／０１０４７，ＷＯ９２／２０７９１，ＷＯ９３／０６２１３，ＷＯ９３／１１２３６，ＷＯ９３／１９１７２，ＷＯ９５／０１４３８，ＷＯ９５／１５３８８を参考にすることができる。

[0018] また、これらの抗カドヘリン抗体は、カドヘリン遺伝子によってコードされる蛋白質の全長または一部を認識する特性を失わない限り、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。抗体断片の具体例としては、例えば、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）２、Ｆｖ、Ｄｉａｂｏｄｙなどを挙げることができる。このような抗体断片を得るには、これら抗体断片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（例えば、Ｃｏ，Ｍ．Ｓ．ｅｔａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．（１９９４）１５２，２９６８－２９７６；Ｂｅｔｔｅｒ，Ｍ．ａｎｄ Ｈｏｒｗｉｔｚ，Ａ．Ｈ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏｌ．（１９８９）１７８，４７６－４９６；Ｐｌｕｃｋｔｈｕｎ，Ａ．ａｎｄ Ｓｋｅｒｒａ，Ａ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏｌ

．（１９８９）１７８，４９７－５１５；Ｌａｍｏｙｉ，Ｅ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏｌ．（１９８６）１２１，６５２－６６３；Ｒｏｕｓｓｅａｕｘ，Ｊ．ｅｔ ａｌ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏｌ．（１９８６）１２１，６６３－６６９；Ｂｉｒｄ，Ｒ．Ｅ．ａｎｄ Ｗａｌｋｅｒ，Ｂ．Ｗ．，Ｔｒｅｎｄｓ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．（１９９１）９，１３２－１３７参照）。

[0019] 抗体の修飾物として、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）等の各種分子と結合した抗体を使用することもできる。このような抗体修飾物は、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。なお、抗体の修飾方法はこの分野においてすでに確立されている。

[0020] 又、本発明においては、細胞傷害活性を増強する目的などで、糖鎖を改変した抗体などを用いることも可能である。抗体の糖鎖改変技術は既に知られている（例えば、ＷＯ００／６１７３９、ＷＯ０２／３１１４０など）。

[0021] 又、本発明においては、２種以上の異なる抗原に対して特異性を有する多特異性抗体も含まれる。通常このような分子は２個の抗原を結合するものであるが（すなわち、二重特異性抗体）、本発明における「多特異性抗体」は、それ以上（例えば、３種類の）抗原に対して特異性を有する抗体を包含するものである。多特異性抗体は全長からなる抗体、またはそのような抗体の断片（例えば、Ｆ（ａｂ’）$_2$二特異性抗体）であり得る。

[0022] 本発明の抗カドヘリン抗体およびその抗体フラグメントは、任意の適当な方法、例えば、インビボ、培養細胞、インビトロ翻訳反応、および組換えＤＮＡ発現系により製造することができる。

[0023] モノクローナル抗体および抗体産生細胞（ハイブリドーマ）を製造する手法は当該技術分野においてよく知られている（Ｃａｍｐｂｅｌｌ，“Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ：Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ｉｎ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ”、Ｅｌｓｅｖｉｅｒ Ｓｃｉｅｎｃｅ Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ，Ａｍｓｔｅｒｄａｍ，Ｔｈｅ Ｎｅｔｈｅ

ｒｌａｎｄｓ，１９８４；Ｓｔ．Ｇｒｏｔｈ ｅｔ ａｌ．、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ ３５：１－２１，１９８０）。カドヘリン遺伝子によりコードされる蛋白質またはフラグメントを免疫原として用いて、抗体を生成することが知られている任意の動物（マウス、ウサギ等）に皮下または腹腔内注射することにより免疫することができる。免疫に際してアジュバントを用いてもよく、そのようなアジュバントは当該技術分野においてよく知られている。

[0024] ポリクローナル抗体は、免疫した動物から抗体を含有する抗血清を単離し、ＥＬＩＳＡアッセイ、ウエスタンブロット分析、またはラジオイムノアッセイ等の当該技術分野においてよく知られる方法を用いて、所望の特異性を有する抗体の存在についてスクリーニングすることにより得ることができる。

[0025] モノクローナル抗体は、免疫した動物から脾臓細胞を切除し、ミエローマ細胞と融合させ、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞を作製することにより得ることができる。ＥＬＩＳＡアッセイ、ウエスタンブロット分析、またはラジオイムノアッセイ等の当該技術分野においてよく知られる方法を用いて、目的とする蛋白質またはそのフラグメントを認識する抗体を産生するハイブリドーマ細胞を選択する。所望の抗体を分泌するハイブリドーマをクローニングし、適切な条件下で培養し、分泌された抗体を回収し、当該技術分野においてよく知られる方法、例えばイオン交換カラム、アフィニティークロマトグラフィー等を用いて精製することができる。あるいは、ゼノマウス株を用いてヒト型モノクローナル抗体を製造してもよい（Ｇｒｅｅｎ，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ ２３１：１１－２３，１９９９；Ｗｅｌｌｓ，Ｅｅｋ，Ｃｈｅｍ Ｂｉｏｌ ２０００ Ａｕｇ；７（８）：Ｒ１８５－６を参照）。また、免疫を行わないファージディスプレイに基づいたモノクローナル抗体の作製も現在行われており、本発明のモノクローナル抗体は、単一の抗体産生細胞または、それから得られた抗体をコードするＤＮＡを用いて生産される単一分子種の抗体を示し、前述の方法のい

ずれで製造されてもかまわない。

[0026] モノクローナル抗体をコードするＤＮＡは、慣用な方法（例えば、モノクローナル抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを用いて）により容易に単離、配列決定できる。ハイブリドーマ細胞はこのようなＤＮＡの好ましい出発材料である。一度単離したならば、ＤＮＡを発現ベクターに挿入し、Ｅ．ｃｏｌｉ細胞、サルＣＯＳ細胞、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞または形質転換されなければ免疫グロブリンを産生しないミエローマ細胞等の宿主細胞へ組換え、組換え宿主細胞からモノクローナル抗体を産生させる。また別の態様として、ＭｃＣａｆｆｅｒｔｙら（Ｎａｔｕｒｅ ３４８：５５２－５５４（１９９０））により記載された技術を用いて製造された抗体ファージライブラリーより抗体、または抗体断片は単離することができる。

[0027] モノクローナル抗体発現に使用する宿主細胞系は、哺乳動物起源のものを用いるのが好ましい。発現させたいモノクローナル抗体に最も適する宿主細胞系を選択できる。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）、および２９３（ヒト腎臓）、２９３Ｔ（ＳＶ４０Ｔ抗原をする２９３の誘導体）が挙げられるがそれらに限定されない。宿主細胞系は商業施設やｔｈｅ Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｉｓｓｕｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（ＡＴＣＣ）から、または発表された文献の発表機関から入手することができる。

[0028] 好ましい宿主細胞系はｄｈｆｒ遺伝子の発現欠損であるＣＨＯ由来細胞株かＳＰ２／０のいずれかである。Ｕｒｌａｎｄ，Ｇ．ら、Ｅｆｆｅｃｔ ｏｆ ｇａｍｍａ ｒａｙｓ ａｔ ｔｈｅ ｄｉｈｙｄｒｏｆｏｌａｔｅ ｒｅｄｕｃｔａｓｅ ｌｏｃｕｓ：ｄｅｌｅｔｉｏｎｓ ａｎｄ ｉｎｖｅｒｓｉｏｎｓ，Ｓｏｍａｔ．Ｃｅｌｌ．Ｍｏｌ．Ｇｅｎｅｔ．Ｖｏｌ．１２，１９８６，ｐ５５５５－５６６、および、Ｓｃｈｕｌｍａｎ，Ｍ．ら、Ａ

better cell line for making hybridomas secreting specific antibodies, Nature Vol. 276, 1978, p269－270をそれぞれ参照のこと。最も好ましくは、宿主細胞系はＤＨＦＲ欠失ＣＨＯである。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行うことができる。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それらに限定されない。Current Protocols in Molecular Biology, Chapter 9 Introduction of DNA into Mammalian Cells, John Wiley and Sons, Inc. を参照のこと。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。

[0029] 本発明の抗カドヘリン抗体のカドヘリン中の認識部位は、配列番号２の１－６５５部分であるのが好ましい。

[0030] また、本発明の抗カドヘリン抗体としては、ハイブリドーマＰＰＭＸ２０１６、ＰＰＭＸ２０２５、ＰＰＭＸ２０２９、ＰＰＡＴ－０５２－０２、ＰＰＡＴ－０５２－０３、ＰＰＡＴ－０５２－０９、ＰＰＡＴ－０５２－２４、ＰＰＡＴ－０５２－２５、ＰＰＡＴ－０５２－２６、ＰＰＡＴ－０５２－２８及び遺伝子導入ＣＨＯ細胞株ＰＰＡＴ－０５２－２７ｃ、ＰＰＡＴ－０５２－０２ｃ、ＰＰＡＴ－０５２－０３ｃ、ＰＰＡＴ－０５２－０９ｃ、ＰＰＡＴ－０５２－２１ｃ、ＰＰＡＴ－０５２－２４ｃ、ＰＰＡＴ－０５２－２５ｃ、ＰＰＡＴ－０５２－２６ｃ、ＰＰＡＴ－０５２－２８ｃ、ＰＰＡＴ－０５２－２９ｃが産生する抗体が好ましい。なお、本明細書においてＰＰＭＸやＰＰＡＴを冠する番号は、抗体生産細胞または当該抗体生産細胞が産生する抗体の何れの意味にも用いられる。

[0031] 前記抗カドヘリン抗体と結合させる放射性金属としては、癌治療薬として用いる場合には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のが好ましい。

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（^{90}Ｙ）、レニウム１８６（^{186}Ｒｅ）、レニウム１８８（^{188}Ｒｅ）、銅６７（^{67}Ｃｕ）、鉄５９（^{59}Ｆｅ）、ストロンチウム８９（^{89}Ｓｒ）、金１９８（^{198}Ａｕ）、水銀２０３（^{203}Ｈｇ）、鉛２１２（^{212}Ｐｂ）、ジスプロシウム１６５（^{165}Ｄｙ）、ルテニウム１０３（^{103}Ｒｕ）、ビスマス２１２（^{212}Ｂｉ）、ビスマス２１３（^{213}Ｂｉ）、ホルミウム１６６（^{166}Ｈｏ）、サマリウム１５３（^{153}Ｓｍ）、ルテチウム１７７（^{177}Ｌｕ）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、^{90}Ｙ、^{153}Ｓｍ、^{177}Ｌｕ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。

[0032] 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（^{99m}Ｔｃ）、インジウム１１１（^{111}Ｉｎ）、インジウム１１３ｍ（^{113m}Ｉｎ）、ガリウム６７（^{67}Ｇａ）、ガリウム６８（^{68}Ｇａ）、タリウム２０１（^{201}Ｔｌ）、クロム５１（^{51}Ｃｒ）、コバルト５７（^{57}Ｃｏ）、コバルト５８（^{58}Ｃｏ）、コバルト６０（^{60}Ｃｏ）、ストロンチウム８５（^{85}Ｓｒ）、水銀１９７（^{197}Ｈｇ）、銅６４（^{64}Ｃｕ）が好適に用いられるが、これに限定されるものではない。

[0033] 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抗カドヘリン抗体に結合している。

[0034] 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。

[0035] 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。

[0036] 抗カドヘリン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。例えば抗カドヘリン抗体に金属キレート試薬を反応させ、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。

[0037] 本発明の癌治療薬及び癌診断薬においては、抗カドヘリン抗体と金属キレート試薬とのモル比が癌細胞集積性及び抗癌効果に重要であり、そのモル比（抗体：キレート試薬）は１：０．１～１：４．５が好ましく、１：０．５～１：３がさらに好ましい。このようなモル比にするには、抗体とキレート試薬を１：０．１～１：５未満、特に１：１～１：３のモル比で仕込んで反応させるのが好ましい。抗体のキレート修飾数は、ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ質量分析法等を用いて分子量を測定し、未修飾抗体と修飾抗体の分子量を比較することにより算出することができる（米国特許公報第７５１４０７８号、Ｌｕら、Ｊ Ｐｈａｒｍ Ｓｃｉ．９４（４），２００５，ｐ７８８－７９７、Ｔｅｄｅｓｃｏら、Ｊ Ｃｌｉｎ Ｏｎｃｏ．２３（１６Ｓ），２００５，４７６５）。また、抗体のキレート修飾数はキレート滴定法により測定することもできる。アルカリ土類金属比色試薬（アルセナゾIII）を用いた方法が知られている（Ｂｒａｄｙｒら、Ｎｕｃｌ Ｍｅｄ Ｂｉｏｌ．３１，７９５－８０２，２００４、Ｄａｄａｃｈｏｖａら、Ｎｕｃｌ Ｍｅｄ Ｂｉｏｌ．２６，９７７－９８２，１９９９）。

[0038] 本発明の癌治療薬または癌診断薬は、既標識製剤として提供する方法と、標識前駆体を含有するキット製剤として提供する方法があるが、本発明ではいずれの方法でもよい。既標識製剤として提供する場合には、標識済みの抗カドヘリン抗体を含有する癌治療薬または癌診断薬をそのまま投与に用いる

ことができる。キット製剤として提供する場合には、所望の放射性金属元素で標識を行ってから投与に用いることができる。

[0039] 放射性金属元素が結合してなる抗カドヘリン抗体は、癌組織への集積性が高く、かつ癌細胞傷害活性が高いので、癌組織以外の組織への傷害性が少なく、安全性の高い癌治療薬として有用である。また、放射性金属元素が結合してなる抗カドヘリン抗体の抗癌活性は、抗カドヘリン抗体単独の抗癌活性に比べて顕著に高いという特徴を有する。その抗癌活性は、抗体：キレート試薬のモル比が１：０．１～１：４．５の場合に特に顕著である。

[0040] 本発明の癌治療薬は、他の抗癌剤と併用してもよい。そのような他の抗癌剤としては、アルキル化剤、代謝拮抗剤、微小管阻害剤、抗生物質抗がん剤、トポイソメラーゼ阻害剤、白金製剤、分子標的薬、ホルモン剤、生物製剤等が挙げられる。アルキル化剤としてはシクロホスファミド等のナイトロジェンマスタード系抗癌剤、ラニムスチン等のニトロソウレア系抗癌剤、ダカルバジン等が挙げられる。代謝拮抗剤としては、５－ＦＵ、ユーエフティ、カルモフール、カペシタビン、テガフール、ＴＳ－１、ゲムシタビン、シタラビン等が挙げられる。微小管阻害剤としては、ビンクリスチン等のアルカロイド系抗癌剤、ドセタキセル、パクリタキセル等のタキサン系抗がん剤が挙げられる。抗生物質抗がん剤としては、マイトマイシンＣ、ドキソルビシン、エピルビシン、ダウノルビシン、ブレオマイシン等が挙げられる。トポイソメラーゼ阻害剤としてはトポイソメラーゼＩ阻害作用を有するイリノテカンやノギテカン、トポイソメラーゼＩＩ阻害作用をもつエトポシドが挙げられる。白金製剤としては、シスプラチン、パラプラチン、ネダプラチン、オキサリプラチン等が挙げられる。分子標的薬としては、トラスツズマブ、リツキシマブ、イマチニブ、ゲフィチニブ、エルロチニブ、ベバシズマブ、ボルテゾミブ、スニチニブ、ソラフェニブ等が挙げられる。ホルモン剤としては、デキサメタゾン、フィナステリド、タモキシフェン等が挙げられる。生物製剤としてはインターフェロンα、βおよびγ、インターロイキン２が挙げられる。

[0041] また本発明の癌治療薬は、癌治療法と併用してもよく、外科手術の他、放射線療法（ガンマーナイフ療法、サイバーナイフ療法、ホウ素中性子捕捉療法、陽子線治療・重粒子線治療法を含む）、ＭＲガイド下集束超音波手術、凍結療法、ラジオ波凝固療法、エタノール注入療法、動脈塞栓療法等と併用することができる。

[0042] 本発明の癌治療薬は、ヒトを含む哺乳類の、多岐にわたるがんに対して有効であり、例えば咽頭癌、喉頭癌、舌癌、肺癌、乳癌、食道癌、胃癌、大腸癌、子宮癌、卵巣癌、肝臓癌、膵臓癌、胆嚢癌、腎臓癌、前立腺癌、悪性黒色腫、甲状腺癌などの上皮癌；骨肉腫、軟骨肉腫、横紋筋肉腫、平滑筋肉腫、脂肪肉腫、血管肉腫、繊維肉腫、白血病や悪性リンパ腫、骨髄腫などの非上皮癌が挙げられる。

[0043] 本発明の癌治療薬は、水性溶液、好ましくはハンクス溶液、リンゲル溶液、または生理的食塩緩衝液等の生理学的に適合性の緩衝液中に溶解することができる。さらに、油性または水性のベヒクル中で、懸濁液、溶液、または乳濁液等の形状をとることができる。

[0044] 本発明癌治療薬の投与量は、患者の症状、投与経路、体重、年令等によっても異なるが、例えば、成人の１回の投与量は３７～３７００ＭＢｑであるのが好ましい。

[0045] 本発明の癌治療薬は、通常非経口投与経路で、例えば注射剤（皮下注、静注、筋注、腹腔内注など）、経皮、経粘膜、経鼻、経肺などで投与される。

[0046] 本発明の癌診断薬は、腫瘍のイメージングに使用することができる。体内にＣＤＨ３タンパクを発現する腫瘍が存在するとき、本発明の診断薬は腫瘍に集積し、シングルフォトン断層撮像装置（ＳＰＥＣＴ）、ポジトロン断層撮像装置（ＰＥＴ）、シンチカメラ等の機器を用いて放射線を検出することにより腫瘍を撮像することができる。例えば、本発明の治療薬を投与する前に、治療効果の予測に用いることができる。治療の前に診断薬を投与し、腫瘍をイメージングし、高い集積性があるほど治療薬の効果が高いと予測することができる。また、治療効果の判定に用いることもできる。本発明の治療

薬のみならず、いずれかの治療を受けた患者に対し、本発明の診断薬を投与し腫瘍をイメージングし、経時的な集積性の変化を観察することにより腫瘍が経時的に縮小しているか、増大しているかを把握することができる。

[0047] 診断薬に用いる抗体は、治療薬と競合するエピトープを認識するものが望ましく、さらに望ましくは治療薬と同一のエピトープを認識する抗体である。最も望ましくは治療薬と同一の抗体である。

[0048] 投与経路は、通常は静脈から血管内に投与されるが動脈を介して投与することもできる。投与量は患者の症状、投与経路、体重、年令等によっても異なるが、例えば、成人の１回の投与量は３７～１１２０ＭＢｑであるのが好ましい。

実施例

[0049] 次に実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれに何ら限定されるものではない。

[0050] 実施例１　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２の１－６５４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（配列番号３：ＣＧＣＧＧＴＡＣＣＡＴＧＧＧＧＣＴＣＣＣＴＣＧＴ、（ｈＣＤＨ３ＦｕｌｌＦＷ））とリバースプライマー（配列番号４：ＣＣＧＴＣＴＡＧＡＴＡＡＣＣＴＣＣＣＴＴＣＣＡＧＧＧＴＣＣ、（ｈＣＤＨ３ＳｏｌｂＲＶ））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℃－１５秒、５５℃－３０秒、６８℃－９０秒、３０サイクルの反応条件で行った。

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、キア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。

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およびＸｂａＩで処理した後、同じくＫｐｎＩおよびＸｂａＩで処理したｐＥＦ４／ｍｙｃ－ＨｉｓＢにＴ４　ＤＮＡ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。

[0051] （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。

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　ＢＩＯＴＥＣＨＮＯＬＯＹ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。

[0052] 実施例２　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細胞の樹立を行った。

（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ＫｐｎＩ（タカラバイオ社）およびＸｂａＩ（タカラバイオ社）で３７℃、1時間処理した後、同じくＫｐｎＩおよびＸｂａＩ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。

[0053] （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ＲＰＭＩ １６４０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。

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 ＢＩＯＴＥＣＨＮＯＬＯＹ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。ＥＸＺ１５０１の市販抗ＣＤＨ３抗体（Ｒ＆Ｄ ＳＹＳＴＥＭＳ社）との反応をフローサイトメーターにより確認し、ＥＸＺ１５０１の細胞膜上にＣＤＨ３タンパク質が発現していることを確認した。

[0054] 実施例３ 抗ＣＤＨ３モノクローナル抗体の作製

（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

する事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。

[0055] （２）抗ＣＤＨ３抗体産生ハイブリドーマの選抜

抗ＣＤＨ３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、ＡｌｅｘａＦｌｕｏｒ４８８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細胞と結合する抗体を産生するハイブリドーマを選抜しＰＰＭＸ２０１６～ＰＰＡＴ－０５２－２８の４０クローンを得た。選抜したハイブリドーマの全ては、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フローサイトメトリにより確認した。抗体は、ハイブリドーマの培養上清よりプロテインＧカラムを用いて精製し以後の実験に用いた。選抜したハイブリドーマのうち、ＰＰＭＸ２０１６（ＮＩＴＥ　ＢＰ－８９７）、ＰＰＭＸ２０２５（ＮＩＴＥ　ＢＰ－８９８）、ＰＰＭＸ２０２９（ＮＩＴＥ　ＢＰ－８９９）、ＰＰＡＴ－０５２－０２（ＮＩＴＥ　ＢＰ－１０３４）、ＰＰＡＴ－０５２－０３（ＮＩＴＥ　ＢＰ－１０３５）、ＰＰＡＴ－０５２－０９（ＮＩＴＥ　ＢＰ－１０３６）、ＰＰＡＴ－０５２－２４（ＮＩＴＥ　ＢＰ－１０

３７）、ＰＰＡＴ－０５２－２５（ＮＩＴＥ　ＢＰ－１０３８）、ＰＰＡＴ－０５２－２６（ＮＩＴＥ　ＢＰ－１０３９）及びＰＰＡＴ－０５２－２８（ＮＩＴＥ　ＢＰ－１０４０）を、２０１０年２月１０日及び２０１１年１月１８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（日本国千葉県木更津市かずさ鎌足２－５－８）に寄託した。

[0056] 実施例４　抗体遺伝子のクローニング

（１）ヒトＣＤＨ３に対するマウスモノクローナル抗体のＶ領域をコードするＤＮＡを次のようにクローン化した。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）に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；１　ｍＭ　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２００μＬ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２００μＬ細胞質上清に２００μＬ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。

[0057] （２）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ランダムプライマー、０．５ｍＭ　ｄＮＴＰ、２００ユニットのＳｕｐｅｒｓｃｒｉｐｔ　ＩＩ（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°Ｃ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。

[0058] （３）抗ＣＤＨ３抗体可変領域をコードする遺伝子のＰＣＲ法による増幅

実験に用いたプライマーはすべて北海道システムサイエンスで合成した。

[0059] Ａ．マウスＬ鎖Ｖ領域をコードする遺伝子をＰＣＲ法で増幅するために使用するプライマー５’末端においてＦＲ１部分と相同性を有するＤＮＡプライマーと３’末端においてマウスＬ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（ｉ）、あるいは、５’末端においてＬ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（ｉｉ）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Ｌ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。

[0060] （ｉ）マウスＬ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を参考にＳｅｎｓｅ　Ｐｒｉｍｅｒ　１７種、Ｒｅｖｅｒｓｅ　Ｐｒｉｍｅｒ　３種を北海道システムサイエンスで合成した。

[0061] ＶＫセンス（ＦＲ１部分）下記１７のプライマーの混合物をＶＫセンスプライマーとして使用

５’－ＧＡＹ　ＡＴＣ　ＣＡＧ　ＣＴＧ　ＡＣＴ　ＣＡＧ　ＣＣ－３’（縮重度２）：配列番号５

５’－ＧＡＹ　ＡＴＴ　ＧＴＴ　ＣＴＣ　ＷＣＣ　ＣＡＧ　ＴＣ

－３’（縮重度４）：配列番号６

５’－ＧＡＹ　ＡＴＴ　ＧＴＧ　ＭＴＭ　ＡＣＴ　ＣＡＧ　ＴＣ

－３’（縮重度８）：配列番号７

５’　ＧＡＹ　ＡＴＴ　ＧＴＧ　ＹＴＲ　ＡＣＡ　ＣＡＧ　ＴＣ

－３’（縮重度８）：配列番号８

５’　ＧＡＹ　ＡＴＴ　ＧＴＲ　ＡＴＧ　ＡＣＭ　ＣＡＧ　ＴＣ

－３’（縮重度８）：配列番号９

５’　ＧＡＹ　ＡＴＴ　ＭＡＧ　ＡＴＲ　ＡＭＣ　ＣＡＧ　ＴＣ

－３’（縮重度１６）：配列番号１０

５’　ＧＡＹ　ＡＴＴ　ＣＡＧ　ＡＴＧ　ＡＹＤ　ＣＡＧ　ＴＣ

－３’（縮重度１２）：配列番号１１

５’　ＧＡＹ　ＡＴＹ　ＣＡＧ　ＡＴＧ　ＡＣＡ　ＣＡＧ　ＡＣ

－３’（縮重度４）：配列番号１２

５’　ＧＡＹ　ＡＴＴ　ＧＴＴ　ＣＴＣ　ＡＷＣ　ＣＡＧ　ＴＣ

－３’（縮重度４）：配列番号１３

５’　ＧＡＹ　ＡＴＴ　ＧＷＧ　ＣＴＳ　ＡＣＣ　ＣＡＡ　ＴＣ

－３’（縮重度８）：配列番号１４

５’　ＧＡＹ　ＡＴＴ　ＳＴＲ　ＡＴＧ　ＡＣＣ　ＣＡＲ　ＴＣ

－３’（縮重度１６）：配列番号１５

５’　ＧＡＹ　ＲＴＴ　ＫＴＧ　ＡＴＧ　ＡＣＣ　ＣＡＲ　ＡＣ

－３’（縮重度１６）：配列番号１６

５’　ＧＡＹ　ＡＴＴ　ＧＴＧ　ＡＴＧ　ＡＣＢ　ＣＡＧ　ＫＣ

－３’（縮重度１２）：配列番号１７

５’　ＧＡＹ　ＡＴＴ　ＧＴＧ　ＡＴＡ　ＡＣＹ　ＣＡＧ　ＧＡ

－３’（縮重度４）：配列番号１８

５’　ＧＡＹ　ＡＴＴ　ＧＴＧ　ＡＴＧ　ＡＣＣ　ＣＡＧ　ＷＴ

－３’（縮重度４）：配列番号１９

５’　ＧＡＹ　ＡＴＴ　ＧＴＧ　ＡＴＧ　ＡＣＡ　ＣＡＡ　ＣＣ

－３’（縮重度２）：配列番号２０

５’ ＧＡＹ ＡＴＴ ＴＴＧ ＣＴＧ ＡＣＴ ＣＡＧ ＴＣ

－３’（縮重度２）：配列番号２１

[0062] 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’－ＧＧＳ ＡＣＣ ＡＡＲ ＣＴＧ ＧＡＡ ＡＴＭ ＡＡＡ －３’（縮重度：８）：配列番号２２

Ｊ４アンチセンスプライマー（２）

５’－ＧＧＧ ＡＣＡ ＡＡＧ ＴＴＧ ＧＡＡ ＡＴＡ ＡＡＡ －３’：配列番号２３

Ｊ５アンチセンスプライマー（３）

５’－ＧＧＧ ＡＣＣ ＡＡＧ ＣＴＧ ＧＡＧ ＣＴＧ ＡＡＡ －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）

[0063] （ｉｉ）マウスＬ鎖可変域クローニング７セットプライマー

ＶＫセンス（シグナルペプチド部分）

このプライマーはノバジェン社のマウスＩｇ－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した。

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種類のプライマーの混合物を使用）

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種類のプライマーの混合物を使用）

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種類のプライマーの混合物を使用）

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種類のプライマーの混合物を使用）

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

ＡＣＴＧＧＡＴＧＧＴＧＧＧＡＡＧＡＴＧＧＡ：配列番号４１

[0064] Ｂ．マウスＨ鎖Ｖ領域をコードする遺伝子をＰＣＲ法で増幅するために使用するプライマー

５’末端においてマウスＨ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Ｈ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Ｈ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。

[0065] （ｉ）マウスＨ鎖可変域クローニングプライマー

ＶＨセンス（シグナル部分：４セットプライマー）

このプライマーは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’－ ＡＴＧ ＧＲＡ ＴＧＳ ＡＧＣ ＴＧＫ ＧＴＭ ＡＴＳ ＣＴＣ ＴＴ －３’（縮重度：３２）：配列番号４２

5’－ＡＴＧ ＲＡＣ ＴＴＣ ＧＧＧ ＹＴＧ ＡＧＣ ＴＫＧ ＧＴＴ ＴＴ －３’（縮重度：８）：配列番号４３

5’－ＡＴＧ ＧＣＴ ＧＴＣ ＴＴＧ ＧＧＧ ＣＴＧ ＣＴＣ ＴＴＣ Ｔ －３’：配列番号４４

5’－ＡＴＧ ＧＲＣ ＡＧＲ ＣＴＴ ＡＣＷ ＴＹＹ －３’（縮重度：３２）：配列番号４５

[0066] （ｉｉ）マウスH鎖可変域クローニングプライマー

ＶＨセンス（ＦＲ１部分）

このプライマーはＴａｎら、”Ｓｕｐｅｒｈｕｍａｎｉｚｅｄ”Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ｒｅｄｕｃｔｉｏｎ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｇｅｎｉｃ Ｐｏｔｅｎｔｉａｌ ｂｙ Ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔａｒｉｔｙ－Ｄｅｔｅｒｍｉｎｉｎｇ Ｒｅｇｉｏｎ Ｇｒａｆｔｉｎｇ ｗｉｔｈ Ｈｕｍａｎ Ｇｅｒｍｌｉｎｅ Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ：Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎ ｔｏ ａｎ Ａｎｔｉ－ＣＤ２８１，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ １６９（２００２）ｐ１１１９－１１２５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’－ＳＡＧ ＧＴＳ ＭＡＲ ＣＴＫ ＳＡＧ ＳＡＧ ＴＣＷ ＧＧ －３’（縮重度：２５６）：配列番号４６

ＶＨアンチセンス（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’－ＣＡＳ ＣＣＣ ＣＡＴ ＣＤＧ ＴＣＴ ＡＴＣ Ｃ－３’（縮重度：６）：配列番号４７

[0067] 実施例５

キメラ抗ＣＤＨ３免疫グロブリン発現ベクターの作製

発現プラスミドの作製：ＤＮＡ Ｅｎｇｉｎｅ（Ｐｅｌｔｉｅｒ Ｔｈｅｒｍａｌ Ｃｙｃｌｅｒ，ＭＪ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，Ｂｉｏ－Ｒａｄ）を用いたＰＣＲ法により抗ＣＤＨ３マウスモノクローナル抗体Ｌ鎖、H鎖それぞれの可変領域を実施例４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プロモーターに結合するユニバーサルプライマーを用いて塩基配列を決定した。得られた抗ＣＤＨ３抗体のＬ鎖、および、H鎖の可変域塩基配列をＩＭＧＴ／Ｖ－ＱＵＥＳＴ Ｓｅａｒｃｈ ｐａｇｅ（ｈｔｔｐ：／／ｉｍｇｔ．ｃｉｎｅｓ．ｆｒ／ＩＭＧＴ＿ｖ

ｑｕｅｓｔ／ｖｑｕｅｓｔ？ｌｉｖｒｅｔ＝０＆Ｏｐｔｉｏｎ＝ｍｏｕｓｅＩｇ）で検索し、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。

次に、クローン化された抗ＣＤＨ３抗体Ｌ鎖のＶ領域をコードする遺伝子にはヒトＣκ領域をコードする遺伝子を、Ｈ鎖のＶ領域をコードする遺伝子にはヒトＣκ１領域をコードする遺伝子をそれぞれ接続した遺伝子をデザインして、これらＬ鎖、Ｈ鎖キメラ抗体遺伝子をＧｅｎＳｃｒｉｐｔ社によって全長人工合成した。その際、生産細胞での遺伝子発現が有利になるようにコドン使用頻度の最適化（Ｋｉｍら、Ｃｏｄｏｎ ｏｐｔｉｍｉｚａｔｉｏｎ ｆｏｒ ｈｉｇｈ－ｌｅｖｅｌ ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ ｏｆ ｈｕｍａｎ ｅｒｙｔｈｒｏｐｏｉｅｔｉｎ（ＥＰＯ）ｉｎ ｍａｍｍａｌｉａｎ ｃｅｌｌｓ，Ｇｅｎｅ，１９９，１９９７，ｐ２９３－３０１の方法に従った）を行なった。具体的には、Ｌ鎖の場合、効率的な翻訳のために必須のＤＮＡ配列（Ｋｏｚａｋ，Ｍ．，Ｊ．，Ａｔ ｌｅａｓｔ ｓｉｘ ｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ ｐｒｅｃｅｄｉｎｇ ｔｈｅ ＡＵＧ ｉｎｉｔｉａｔｏｒ ｃｏｄｏｎ ｅｎｈａｎｃｅ ｔｒａｎｓｌａｔｉｏｎ ｉｎ ｍａｍｍａｌｉａｎ ｃｅｌｌｓ．Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９６，ｐ９４７－９５０，１９８７）、マウスＩＧＫＶのシグナルペプチド、抗ＣＤＨ３抗体のＬ鎖のＶ領域、ヒトＣκ領域の順に遺伝子を並列し、その両端には制限酵素部位（５’側にＮｈｅＩ，３’側にＥｃｏＲＩ）を付加した。キメラＨ鎖も同様に作製した。これら人工合成遺伝子をＮｈｅＩとＥｃｏＲＩで切断し、発現ベクターｐＣＡＧＧＳのＮｈｅＩとＥｃｏＲＩ部位に組み込み、抗ＣＤＨ３キメラ抗体Ｌ鎖発現ベクターｐＣＡＧＧＳ－ＩＧＫ，Ｈ鎖発現ベクターｐＣＡＧＧＳ－ＩＧＨを得た。

[0068] 実施例６　キメラ抗ＣＤＨ３免疫グロブリンの安定発現ベクターの作製

遺伝子操作された抗体遺伝子をＣＨＯ細胞を用いて高レベルで発現させるために、ＣＭＶプロモーター配列に連結し、ポリＡシグナルを有したジヒドロフォレートレダクターゼ（ｄｈｆｒ）遺伝子を組み込んだ発現ベクターを

作製した。

キメラ抗体の安定発現生産細胞株をつくるために、ｄｈｆｒ遺伝子を組み込んだｐＣＡＧＧＳ発現ベクターを作製した。具体的には、一過性の発現ベクターであるｐＣＡＧＧＳ－ＩＧＨ、および、ｐＣＡＧＧＳ－ＩＧＫに、ＣＭＶプロモーターとポリＡシグナルを有したｄｈｆｒ遺伝子を組み込むことである。ＣＭＶプロモーター、Ｋｏｚａｋ配列をもつマウスｄｈｆｒ遺伝子、ＳＶ４０ポリＡシグナルをそれぞれＰＣＲ法によって増幅し、これらの遺伝子の混合物をＰＣＲ法で接続するとともに両端にＨｉｎｄＩＩＩ部位を付加して、ＨｉｎｄＩＩＩ－ＣＭＶプロモーター－Ｋｏｚａｋ－ｄｈｆｒ－ポリＡ－ＨｉｎｄＩＩＩという遺伝子フラグメントを得た。このフラグメントをｐＣＡＧＧＳ－ＩＧＨ、あるいは、ｐＣＡＧＧＳ－ＩＧＫのＨｉｎｄＩＩＩ部位に組み込んでｐＣＡＧＧＳ－ＩＧＨ－ＣＭＶｐ－ｄｈｆｒ－Ａ、および、ｐＣＡＧＧＳ－ＩＧＫ－ＣＭＶｐ－ｄｈｆｒ－Ａを得た。これらの発現ベクターはキメラ抗体をＣＡＧプロモーターで、ｄｈｆｒ遺伝子をＣＭＶプロモーターで発現させることができ、効率的に遺伝子増幅を利用してキメラ抗体を生産することができる。

[0069] 実施例７　キメラ抗ＣＤＨ３生産ＣＨＯ細胞株の樹立

ＣＨＯ　ｄｈｆｒ-細胞（Ｇ．Ｕｒｌａｕｂら、Ｉｓｏｌａｔｉｏｎ ｏｆ Ｃｈｉｎｅｓｅ ｈａｍｓｔｅｒ ｃｅｌｌ ｍｕｔａｎｔｓ ｄｅｆｉｃｉｅｎｔ ｉｎ ｄｉｈｙｄｒｏｆｏｌａｔｅ ｒｅｄｕｃｔａｓｅ ａｃｔｉｖｉｔｙ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ７７，ｐ４２１６－４２２０，１９８０）を用いて、２種類のプラスミド（アンピシリン耐性遺伝子内のＰｖｕＩでプラスミドを切断して環状プラスミドから線状プラスミドにした）すなわち、キメラ抗ＣＤＨ３Ｌ鎖を発現するためのｐＣＡＧＧＳ－ＩＧＫ－ＣＭＶ－ｄｈｆｒ－Ａベクター、および、キメラ抗ＣＤＨ３Ｈ鎖を発現するためのｐＣＡＧＧＳ－ＩＧＨ－ＣＭＶ－ｄｈｆｒ－Ａベクターにより同時形質転換した。エレクトロポレーションはロンザ社製のＡｍａｘａでおこなった。ＤＮＡ（Ｌ鎖、Ｈ鎖各プラスミドにつき２μｇ

／試料）を３×１０^{3}細胞の０．１ｍＬのＡｍａｘａエレクトロポレーションＣＨＯ用緩衝液に加えてパルスを与えた。

[0070] エレクトロポレーション処理された細胞を、１０%の透析済みＦＢＳを含有し、ＨＴ（Ｈ，ヒポキサンチン：Ｔ，チミジン）を含まないＩｓｃｏｖｅ’ｓ Ｍｏｄｉｆｉｅｄ Ｄｕｌｂｅｃｃｏ培地（ＩＭＤＭ）に加えた。遺伝子導入から３日後、１０%透析ＦＢＳ、２ｍＭ Ｌ－グルタミン、ＨＴを含まないＩＭＤＭに培地を交換して１ｍｇ／ｍＬのＧ４１８でｎｅｏ＋形質転換細胞の選択をおこない、キメラ抗体産生陽性細胞株クローンを得た。次に、Ｇ４１８で選択されたクローンを用いて遺伝子増幅をおこなった。２５０ｎＭ、１０００ｎＭの２ラウンドのメソトレキセート（ＭＴＸ）中での増幅の後、１リットルの培養上清あたり約５０～１００ｍｇのキメラＣＤＨ３抗体を生産する細胞株を樹立できた。確立したキメラ抗ＣＤＨ３抗体安定発現ＣＨＯ細胞株は、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に寄与した。

[0071] [表1]

細胞名	寄託番号	細胞名	寄託番号
PPAT−052−02c	NITE BP−1041	PPAT−052−25c	NITE BP−1046
PPAT−052−03c	NITE BP−1042	PPAT−052−26c	NITE BP−1047
PPAT−052−09c	NITE BP−1043	PPAT−052−27c	NITE BP−1048
PPAT−052−21c	NITE BP−1044	PPAT−052−28c	NITE BP−1049
PPAT−052−24c	NITE BP−1045	PPAT−052−29c	NITE BP−1050

[0072] 実施例８ 精製抗体の取得

培養上清よりｐｒｏｔｅｉｎ Ａを用いて抗体の精製を行い、精製抗体を取得した。

[0073] 実施例９ 親和性の確認

競合法を用いて、マウス及びキメラ抗ＣＤＨ３抗体親和性の比較を行った。競合法による抗ＣＤＨ３抗体の親和性の測定は、ＣＤＨ３が高発現であると確認されている癌細胞ＮＣＩ－Ｈ３５８株を用いたフローサイトメトリ（ＢＤ社 ＦＡＣＳ Ｃａｌｉｂｕｒ）で行った。

[0074] すなわち、９６ウエルプレートに、抗体希釈系列（４００μｇ／ｍＬ～２

４ｎｇ／ｍＬ）５０μＬとＡｌｅｘａ４８８標識抗体（４μｇ／ｍＬ）５０μＬを混合した。ＮＣＩ－Ｈ３５８細胞を２ｍＭ　ＥＤＴＡ－ＰＢＳで処理することにより培養プレートから剥離し、１．５×１０^{6}／ｍＬとなるようＦＡＣＳ溶液（１％ＢＳＡ　ＰＢＳ）に懸濁し、１００μＬを抗体混合液の入ったウェルに添加した。添加後室温で６０分間反応させ、ＦＡＣＳ溶液２００μＬ／ウェル）で２回洗浄した後、フローサイトメトリを実施し、各ウェルの蛍光強度（ＧＥＯ　Ｍｅａｎ）を測定した。

Ａｌｅｘａ４８８標識抗体（１μｇ／ｍＬ）のみと反応させた細胞のＧＥＯ　Ｍｅａｎ値と比較して、得られたＧＥＯ　Ｍｅａｎ値よりＡｌｅｘａ４８８標識抗体の結合阻害率を計算した。５０％阻害を示す抗体濃度を算出し、比較を行った。

マウス抗体であるＰＰＭＸ２０１６と、そのキメラ抗体であるＰＰＡＴ－０５２－２７ｃの親和性評価の結果を図１に示す。両者の親和性には殆ど差がなかった。

[0075] 実施例１０　標識抗体の作製

（１）抗体へのＤＯＴＡの結合

抗体を緩衝液（５０ｍＭＢｉｃｉｎｅ－ＮａＯＨ、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ８．５）に溶解し、抗体濃度を１０ｍｇ／ｍＬに調整した。一方で、イソチオシアノベンジルＤＯＴＡ（Ｍａｃｒｏｃｙｃｌｉｃｓ社製　Ｂ－２０５））を、ＤＭＳＯに１０ｍｇ／ｍＬの濃度になる様に溶解した。抗体とＤＯＴＡのモル比が１：１（仕込比１：１）、１：３（仕込比１：３）または１：１０（仕込比１：１０）となるように混合、撹拌し、２５℃で１７時間静置した。反応終了後、脱塩カラム（ＰＤ－１０、ＧＥヘルスケア社製　１７－０４３５－０１）でＰＢＳを用いて精製した。使用抗体はＰＰＭＸ２０１６、ＰＰＭＸ２０２５、ＰＰＭＸ２０２９、ＰＰＡＴ－０５２－２７ｃ、ＰＰＡＴ－０５２－２８ｃのいずれかである。

[0076] （２）キレート導入率の確認

キレート滴定法により、抗体のキレート導入率を測定した。予め、修飾抗

体のタンパク質濃度を常法により測定し、ＩｇＧの分子量から修飾抗体のモル数を算出した。原子吸光分析法により定量された１ｍｇ／ｍＬの標準銅溶液１００μＬに、０．７７６ｍｇのアルセナゾＩＩＩ試薬と３ｍＬの金属を含有しない５Ｍ酢酸アンモニウム（シグマアルドリッチ社製）溶液を加え、さらに超純水を加えて最終容量を１０ｍＬとし暗所にて室温保存しアルセナゾＩＩＩ溶液とした。ＤＯＴＡを超純水に溶解しＤＯＴＡ標準液とした。修飾抗体を超純水に溶解し修飾抗体溶液とした。ＤＯＴＡ標準液又は修飾抗体溶液１０μＬとアルセナゾＩＩＩ溶液１９０μＬを混和し３７℃で３０分間インキュベーションした後に波長６３０ｎｍにおける吸光度を測定した。ＤＯＴＡ標準液の吸光度から標準曲線を作成し、修飾抗体に結合したＤＯＴＡの数を算出しＤＯＴＡ平均修飾数とした。

[0077] その結果、ＤＯＴＡ仕込比と実際のＤＯＴＡ平均修飾数の関係は表２の通りであり、実際に抗体に結合するＤＯＴＡ数はＤＯＴＡの仕込比により決定することを確認した。

[0078] [表2]

抗体およびＤＯＴＡ仕込比	ＤＯＴＡ平均修飾数
ＰＰＭＸ２０２５（仕込比１：１）	０．９
ＰＰＭＸ２０２５（仕込比１：３）	２．０
ＰＰＭＸ２０２５（仕込比１：１０）	５．３
ＰＰＭＸ２０１６（仕込比１：１）	０．７
ＰＰＭＸ２０１６（仕込比１：３）	２．１
ＰＰＭＸ２０１６（仕込比１：１０）	５．２
ＰＰＡＴ－０５２－２７ｃ（仕込比１：３）	１．８

（注）ＰＰＡＴ－０５２－２７ｃは仕込比１：３のみを実施した。

[0079] （３）^{67}Ｇａ、^{111}Ｉｎまたは^{90}Ｙ標識抗体の調製

（ｉ）^{67}Ｇａ、^{111}Ｉｎ標識

精製したＰＰＭＸ２０１６、ＰＰＭＸ２０２５、ＰＰＭＸ２０２９、ＰＰＡＴ－０５２－２７ｃ抗体およびＰＰＡＴ－０５２－２８ｃ抗体を６ｍｇ／ｍＬとなるように緩衝液（０．２５Ｍ　酢酸アンモニウム－ＨＣｌ　ｐＨ５．５）に溶解し、^{67}ＧａＣｌ$_3$溶液（富士フイルムＲＩファーマ社製）或いは

$^{111}InCl_3$溶液（ＭＤＳ　Ｎｏｒｄｉｏｎ　Ｉｎｃ．社製）を加えて４５℃、１時間インキュベートした。

（ｉｉ）^{90}Y標識

精製したＰＰＭＸ２０２９、ＰＰＡＴ－０５２－２７ｃ抗体を６ｍｇ／ｍＬとなるように緩衝液（０．２５Ｍ　酢酸アンモニウム－ＨＣｌ　ｐＨ５．５）に溶解し、$^{90}YCl_3$溶液（ｎｕｃｌｉｔｅｃ社製）を加えて４５℃、１時間インキュベートした。

（ｉｉｉ）標識率の確認

標識反応液の一部をサンプリングし、薄層クロマトグラフィー（ＰＡＬＬ社製、６１８８５）を用いて標識率を確認した。展開溶媒を生理食塩水とし、ストリップの上端と下端の放射活性をγ－カウンターを用いて測定し標識率を以下の式により算出した。

[0080] [数1]

標識率＝（下端のカウント／（上端のカウント＋下端のカウント））×１００（％）

[0081] 標識率が９０％以上のときに後の実験に使用した。標識抗体は、脱塩カラム（ＰＤ－１０、ＧＥヘルスケア社製　１７－０４３５－０１）でＰＢＳを用いて精製した。

[0082] 実施例１１　キレート導入率と体内分布の関連の検討

ＰＰＭＸ２０１６、ＰＰＭＸ２０２５、ＰＰＭＸ２０２９について、キレート導入率の差による体内動態の違いを検討した。キレート導入率はＤＯＴＡ仕込比１：１、１：３、１：１０の３通りについて検討を行った。

まず、ＮＣＩ－Ｈ３５８を１０％ＦＢＳ含有ＲＰＭＩ１６４０培地中で培養し、ヌードマウス（メス、７週齢、日本クレア）の右腹側部皮下に1×10^7個／マウスとなるように移植し平均腫瘍体積が１００～１５０mm^3になるまで飼育した。

次に、ＮＣＩ－Ｈ３５８移植マウスに^{67}Ｇａ－ＤＯＴＡ－ＰＰＭＸ２０１６抗体（仕込比１：３、１：１０）、^{67}Ｇａ－ＤＯＴＡ－ＰＰＭＸ２０２５抗体（仕込比１：３、１：１０）、^{67}Ｇａ－ＤＯＴＡ－ＰＰＭＸ２０２９抗

体（仕込比１：３、１：１０）を３７０ｋＢｑ／匹となるよう投与した。

投与後９６時間が経過した時点で屠殺、解剖を行って組織および腫瘍を摘出し、組織および腫瘍の重量を測定した後にγ－カウンターにより放射活性を測定し以下の式により％ＩＤ／ｇを算出した。

[0083] [数2]

％ＩＤ／ｇ＝（集積ＲＩ量／総投与量ＲＩ量ｘ１００（％））／重量（ｇ）

[0084] 結果を図２～図７に示す。すべての抗体でＤＯＴＡ仕込比が１：１０のときより１：３のときに腫瘍への集積性が向上した。かかる集積性の向上は治療効果の増強をもたらす。さらに、他臓器に放射性物質が滞留することによる副作用を回避することができる。

[0085] さらに、^{67}Ｇａ－ＤＯＴＡ－ＰＰＭＸ２０２５抗体（仕込比１：１、１：３、１：１０）を非担癌ヌードマウス（メス、７週齢、日本クレア）に３７０ｋＢｑ／匹投与した結果を図８に示す。仕込比１：１０のときには肝臓への集積性が高かったのに対し、１：３および１：１のときには肝臓への集積性が低くなった。これは、肝臓への放射線障害等の副作用が起こりにくいことを意味する。

[0086] 実施例１２　抗ｃａｌｄｉｎａキメラ抗体の体内動態検討

キメラ抗体ＰＰＡＴ－０５２－２７ｃ及びＰＰＡＴ－０５２－２８ｃについて、体内動態を検討した。

まず、ＮＣＩ－Ｈ１３７３を１０％ＦＢＳ含有ＲＰＭＩ１６４０培地中で培養し、ヌードマウス（メス、９週齢、日本クレア）の右腹側部皮下に４×１０^{6}個／マウスとなるように移植し平均体積が１００～１５０ｍｍ^{3}になるまで飼育した。

次に、ＮＣＩ－Ｈ１３７３移植マウスに^{111}Ｉｎ－ＤＯＴＡ－ＰＰＡＴ－０５２－２７ｃ（仕込み比１：３）及び^{111}Ｉｎ－ＤＯＴＡ－ＰＰＡＴ－０５２－２８ｃ（仕込み比１：３）を３７０ｋＢｑ／匹となるよう投与した。

投与後４８時間ないし９６時間が経過した時間で屠殺、解剖を言って組織及び腫瘍を摘出し、組織及び腫瘍の重量を測定した後にγ－カウンターによ

り放射活性を測定し、％ＩＤ／ｇを算出した。

結果を図９～図１１に示す。ＰＰＡＴ－０５２－２７ｃにおいては投与後４８時間で腫瘍への集積が４６％ＩＤ／ｇと高い集積を示した。また、ＰＰＡＴ－０５２－２８ｃでは、４８時間後で４１％ＩＤ／ｇ、９６時間後で５２％ＩＤ／ｇと高い集積を示した。

[0087] 実施例１３　ゼノグラフト試験

ＮＣＩ－Ｈ３５８を１０％ＦＢＳ含有ＲＰＭＩ１６４０培地用いて培養し、ヌードマウス（メス、７週齢、日本クレア）の右腹側部皮下に1×10^{7}個／マウスとなるように移植した。

ＮＣＩ－Ｈ３５８移植マウスを６群に分け（ｎ＝８）、^{90}Ｙ－ＤＯＴＡ－ＰＰＭＸ２０２９抗体（仕込比１：３）を７．４ＭＢｑ／匹、５．６ＭＢｑ／匹、３．７ＭＢｑ／匹、１．９ＭＢｑ／匹投与した。対照として未標識ＰＰＭＸ２０２９を８０μｇ／匹、生理的食塩水を１００μＬ／匹を投与した。投与は、いずれの群においても平均腫瘍体積が１００～１５０mm^{3}となった時点で行った。

投与後、週２回（３日または４日毎）体重と腫瘍体積の測定を行い、投与後５１日目まで観察を行った。

[0088] 試験結果を図１２に示す。^{90}Ｙ－ＤＯＴＡ－ＰＰＭＸ２０２９抗体（仕込比１：３）は、放射活性と正比例する抗腫瘍効果を示した。

また、ＮＣＩ－Ｈ１３７３を１０％ＦＢＳ含有ＲＰＭＩ１６４０培地用いて培養し、ヌードマウス（メス、７週齢、日本クレア）の右腹側部皮下に5×10^{6}個／マウスとなるように移植した。

ＮＣＩ－Ｈ１３７３移植マウスを４群に分け（ｎ＝８）、^{90}Ｙ－ＤＯＴＡ－ＰＰＡＴ－０５２－２７ｃ抗体（仕込比１：３）を５．６ＭＢｑ／匹、３．７ＭＢｑ／匹投与した。対照として未標識ＰＰＭＸ２０２９を６０μｇ／匹、生理的食塩水を１００μＬ／匹を投与した。投与は、いずれの群においても平均腫瘍体積が１００～１５０mm^{3}となった時点で行った。

投与後、週２回（３日または４日毎）体重と腫瘍体積の測定を行い、投与

後２６日目まで観察を行った。

試験結果を図１３に示す。^{90}Ｙ－ＤＯＴＡ－ＰＰＡＴ－０５２－２７ｃ抗体（仕込比１：３）は、放射活性と正比例する抗腫瘍効果を示した。

[0089] 実施例１４　免疫組織化学染色

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。

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１４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。

請求の範囲

[請求項1] 放射性金属元素が金属キレート試薬を介して抗カドヘリン抗体に結合してなる、放射性金属標識抗カドヘリン抗体。

[請求項2] 抗カドヘリン抗体が、配列番号２の１－６５５部分に結合することができるものである請求項１記載の放射性金属標識抗カドヘリン抗体。

[請求項3] 抗カドヘリン抗体が、モノクローナル抗体である請求項１又は２記載の放射性金属標識抗カドヘリン抗体。

[請求項4] 抗カドヘリン抗体が、キメラ抗体、ヒト化抗体およびヒト抗体からなる群から選択されるものである請求項１～３のいずれか１項記載の放射性金属標識抗カドヘリン抗体。

[請求項5] 抗カドヘリン抗体が、寄託番号ＮＩＴＥ ＢＰ－８９７、ＮＩＴＥ ＢＰ－８９８、ＮＩＴＥ ＢＰ－８９９、ＮＩＴＥ ＢＰ－１０３４、ＮＩＴＥ ＢＰ－１０３５、ＮＩＴＥ ＢＰ－１０３６、ＮＩＴＥ ＢＰ－１０３７、ＮＩＴＥ ＢＰ－１０３８、ＮＩＴＥ ＢＰ－１０３９、ＮＩＴＥ ＢＰ－１０４０、ＮＩＴＥ ＢＰ－１０４１、ＮＩＴＥ ＢＰ－１０４２、ＮＩＴＥ ＢＰ－１０４３、ＮＩＴＥ ＢＰ－１０４４、ＮＩＴＥ ＢＰ－１０４５、ＮＩＴＥ ＢＰ－１０４６、ＮＩＴＥ ＢＰ－１０４７、ＮＩＴＥ ＢＰ－１０４８、ＮＩＴＥ ＢＰ－１０４９またはＮＩＴＥ ＢＰ－１０５０である抗体産生細胞により生産されるモノクローナル抗体もしくはその遺伝子組み換え抗体またはいずれかのフラグメントである請求項１～４のいずれか１項記載の放射性金属標識抗カドヘリン抗体。

[請求項6] 抗カドヘリン抗体が、寄託番号ＮＩＴＥ ＢＰ－８９７、ＮＩＴＥ ＢＰ－８９８、ＮＩＴＥ ＢＰ－８９９、ＮＩＴＥ ＢＰ－１０３４、ＮＩＴＥ ＢＰ－１０３５、ＮＩＴＥ ＢＰ－１０３６、ＮＩＴＥ ＢＰ－１０３７、ＮＩＴＥ ＢＰ－１０３８、ＮＩＴＥ ＢＰ－１０３９またはＮＩＴＥ ＢＰ－１０４０である抗体産生細胞により

生産されるモノクローナル抗体もしくはその遺伝子組み換え抗体またはいずれかのフラグメントである請求項１～３のいずれか１項記載の放射性金属標識抗カドヘリン抗体。

[請求項7] 抗カドヘリン抗体が、請求項６に記載のモノクローナル抗体を改変して作られたキメラ抗体、ヒト化抗体またはその断片である請求項１～４のいずれか１項記載の放射性金属標識抗カドヘリン抗体。

[請求項8] 抗カドヘリン抗体が、請求項６に記載のモノクローナル抗体のＶＨ及び／またはＶＬドメインのアミノ酸配列と９０%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるＶＨ及び／またはＶＬドメインを有する抗体またはその断片である請求項１～４のいずれか１項記載の放射性金属標識抗カドヘリン抗体。

[請求項9] 金属キレート試薬が、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からなる群より選択されるものである請求項１～８のいずれか１項記載の放射性金属標識抗カドヘリン抗体。

[請求項10] 抗カドヘリン抗体と金属キレート試薬のモル比が１：０．１～１：４．５である請求項１～９のいずれか１項記載の放射性金属標識抗カドヘリン抗体。

[請求項11] 抗カドヘリン抗体と金属キレート試薬のモル比が１：０．５～１：３である請求項１～９のいずれか１項記載の放射性金属標識抗カドヘリン抗体。

[請求項12] 放射性金属元素が、癌治療として用いられる細胞障害性放射性金属である請求項１～１１のいずれか１項記載の放射性金属標識抗カドヘリン抗体。

[請求項13] 細胞障害性放射性金属が、イットリウム９０（^{90}Ｙ）、レニウム１８６（^{186}Ｒｅ）、レニウム１８８（^{188}Ｒｅ）、銅６７（^{67}Ｃｕ）、鉄５９（^{59}Ｆｅ）、ストロンチウム８９（^{89}Ｓｒ）、金１９８（^{198}Ａｕ）、ジスプロシウム１６５（^{165}Ｄｙ）、ルテニウム１０

３（^{103}Ｒｕ）、ホルミウム１６６（^{166}Ｈｏ）、サマリウム１５３（^{153}Ｓｍ）及びルテチウム１７７（^{177}Ｌｕ）からなる群から選択されるものである請求項１２記載の放射性金属標識抗カドヘリン抗体。

[請求項14] 細胞障害性放射性金属が、イットリウム９０（^{90}Ｙ）である請求項１２又は１３記載の放射性金属標識抗カドヘリン抗体。

[請求項15] 癌治療の対象がカドヘリンを発現する癌である請求項１２～１４のいずれか１項記載の放射性金属標識抗カドヘリン抗体。

[請求項16] 放射性金属元素が、癌診断として用いられる細胞非障害性放射性金属である請求項１～１１のいずれか１項記載の放射性金属標識抗カドヘリン抗体。

[請求項17] 細胞非障害性放射性金属が、テクネシウム９９ｍ（^{99m}Ｔｃ）、インジウム１１１（^{111}Ｉｎ）、インジウム１１３ｍ（^{113m}Ｉｎ）、ガリウム６７（^{67}Ｇａ）、ガリウム６８（^{68}Ｇａ）、タリウム２０１（^{201}Ｔｌ）、コバルト５７（^{57}Ｃｏ）、ストロンチウム８５（^{85}Ｓｒ）及び銅６４（^{64}Ｃｕ）からなる群から選択されるものである請求項１６記載の放射性金属標識抗カドヘリン抗体。

[請求項18] 細胞非障害性放射性金属が、インジウム１１１（^{111}Ｉｎ）及びガリウム６７（^{67}Ｇａ）から選択されるものである請求項１６又は１７記載の放射性金属標識抗カドヘリン抗体。

[請求項19] 請求項１２～１５のいずれか１項記載の放射性金属標識抗カドヘリン抗体を有効成分とする癌治療薬。

[請求項20] 請求項１６～１８のいずれか１項記載の放射性金属標識抗カドヘリン抗体を有効成分とする癌診断薬。

[請求項21] 寄託番号ＮＩＴＥ ＢＰ－８９７、ＮＩＴＥ ＢＰ－８９８、ＮＩＴＥ ＢＰ－８９９、ＮＩＴＥ ＢＰ－１０３４、ＮＩＴＥ ＢＰ－１０３５、ＮＩＴＥ ＢＰ－１０３６、ＮＩＴＥ ＢＰ－１０３７、ＮＩＴＥ ＢＰ－１０３８、ＮＩＴＥ ＢＰ－１０３９、ＮＩＴＥ

ＢＰ－１０４０、ＮＩＴＥ　ＢＰ－１０４１、ＮＩＴＥ　ＢＰ－１０４２、ＮＩＴＥ　ＢＰ－１０４３、ＮＩＴＥ　ＢＰ－１０４４、ＮＩＴＥ　ＢＰ－１０４５、ＮＩＴＥ　ＢＰ－１０４６、ＮＩＴＥ　ＢＰ－１０４７、ＮＩＴＥ　ＢＰ－１０４８、ＮＩＴＥ　ＢＰ－１０４９、またはＮＩＴＥ　ＢＰ－１０５０として寄託された抗体産生細胞。

[請求項22] 癌治療に用いるための、請求項１２～１５のいずれか１項記載の放射性金属標識抗カドヘリン抗体。

[請求項23] 癌診断に用いるための、請求項１６～１８のいずれか１項記載の放射性金属標識抗カドヘリン抗体。

[請求項24] 請求項１２～１５のいずれか１項記載の放射性金属標識抗カドヘリン抗体の、癌治療薬製造のための使用。

[請求項25] 請求項１６～１８のいずれか１項記載の放射性金属標識抗カドヘリン抗体の、癌診断薬製造のための使用。

[請求項26] 請求項１２～１５のいずれか１項記載の放射性金属標識抗カドヘリン抗体の有効量を投与することを特徴とする癌の治療方法。

[請求項27] 請求項１６～１８のいずれか１項記載の放射性金属標識抗カドヘリン抗体の有効量を投与することを特徴とする癌の癌診断方法。