

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2022-529703

(P2022-529703A)

(43)公表日 令和4年6月23日(2022.6.23)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	Z N A 4 B 0 6 5
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63	Z 4 C 0 8 4
C 1 2 N 1/11 (2006.01)	C 1 2 N 1/11	4 C 0 8 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C 0 8 6
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 C 0 8 7
審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全64頁) 最終頁に続く		

(21)出願番号	特願2021-562118(P2021-562118)	(71)出願人	520488148
(86)(22)出願日	令和2年4月15日(2020.4.15)		康 諾 亞 生物医药科技(成都)有 限公司
(85)翻訳文提出日	令和3年12月16日(2021.12.16)		Keymed Biosciences Co., Ltd
(86)国際出願番号	PCT/CN2020/084991		中華人民共和国、6 1 0 2 0 0、四川省 成都市双流区成都天府国 際 生物城中 路 1 8 号生物 産 業 孵化 園 デ ィー 2 号楼 3 楼
(87)国際公開番号	WO2020/211792		
(87)国際公開日	令和2年10月22日(2020.10.22)		
(31)優先権主張番号	201910315634.9	(74)代理人	110000729
(32)優先日	平成31年4月19日(2019.4.19)		特許業務法人 ユニアス国際特許事務所
(33)優先権主張国・地域又は機関	中国(CN)	(72)発明者	徐 剛
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA ,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く		中華人民共和国、6 1 0 2 1 9、四川省 成都市双流区成都天府国 際 生物城中 路 1 8 号 D 2 号楼 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 腫瘍治療薬及びその応用

(57)【要約】

本開示は、クローディンを認識する抗体、その製造方法及び応用に関するものである。

【選択図】図 1

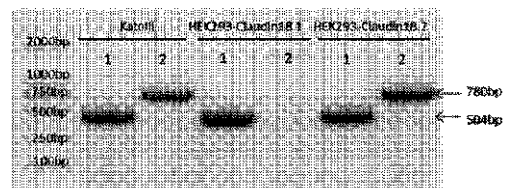


図 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

アミノ酸配列の配列番号 2 - 4、12 - 14、22 - 24、32 - 34、42 - 44、52 - 54、62 - 64、72 - 74、82 - 84、92 - 94、102 - 104、112 - 114、122 - 124、132 - 134、142 - 144、152 - 154、157 - 159、162 - 164、167 - 169、172 - 174、177 - 179、182 - 184、187 - 189、192 - 194、197 - 199、202 - 204、207 - 209、212 - 214、217 - 219、222 - 224、227 - 229、232 - 234 又はそれらの任意の変異体から選択された重鎖 CDR、及び / 又は、アミノ酸配列の配列番号 7 - 9、17 - 19、27 - 29、37 - 39、47 - 49、57 - 59、67 - 69、77 - 79、87 - 89、97 - 99、107 - 109、117 - 119、127 - 129、137 - 139、147 - 149、237 - 239、242 - 244、247 - 249、252 - 254、257 - 259、262 - 264、267 - 269 又はそれらの任意の変異体から選択された軽鎖 CDR を含む、ヒトクローディング 18 . 2 に結合する抗体又はその抗原結合部分。

【請求項 2】

アミノ酸配列の配列番号 2、12、22、32、42、52、62、72、82、92、102、112、122、132、142、152、157、162、167、172、177、182、187、192、197、202、207、212、217、222、227、232 又はそれらの任意の変異体から選択された重鎖 CDR 1、アミノ酸配列の配列番号 3、13、23、33、43、53、63、73、83、93、103、113、123、133、143、153、158、163、168、173、178、183、188、193、198、203、208、213、218、223、228、233 又はそれらの任意の変異体から選択された重鎖 CDR 2、アミノ酸配列の配列番号 4、14、24、34、44、54、64、74、84、94、104、114、124、134、144、154、159、164、169、174、179、184、189、194、199、204、209、214、219、224、229、234 又はそれらの任意の変異体から選択された重鎖 CDR 3、及び / 又は、アミノ酸配列の配列番号 7、17、27、37、47、57、67、77、87、97、107、117、127、137、147、237、242、247、252、257、262、267 又はそれらの任意の変異体から選択された軽鎖 CDR 1、アミノ酸配列の配列番号 8、18、28、38、48、58、68、78、88、98、108、118、128、138、148、238、243、248、253、258、263、268 又はそれらの任意の変異体から選択された軽鎖 CDR 2、アミノ酸配列の配列番号 9、19、29、39、49、59、69、79、89、99、109、119、129、139、149、239、244、249、254、259、264、269 又はそれらの任意の変異体から選択された軽鎖 CDR 3 を含む、請求項 1 に記載の抗体又はその抗原結合部分。

【請求項 3】

アミノ酸配列の配列番号 1、11、21、31、41、51、61、71、81、91、101、111、121、131、141、151、156、161、166、171、176、181、186、191、196、201、206、211、216、221、226、231 又はそれらの任意の変異体から選択された重鎖可変領域、及び / 又は、アミノ酸配列の配列番号 6、16、26、36、46、56、66、76、86、96、106、116、126、136、146、236、241、246、251、256、261、266 又はそれらの任意の変異体から選択された軽鎖可変領域を含む、請求項 1 又は 2 に記載の抗体又はその抗原結合部分。

【請求項 4】

(1) それぞれ配列番号 152 - 154 を含む重鎖 CDR 1、CDR 2 及び CDR 3 配列、及び / 又はそれぞれ配列番号 237 - 239 を含む軽鎖 CDR 1、CDR 2 及び CDR 3 配列、(2) それぞれ配列番号 152 - 154 を含む重鎖 CDR 1、CDR 2 及び CDR 3 配列、

50

それぞれ配列番号 202 - 204 を含む重鎖 CDR1、CDR2 及び CDR3 配列、及び / 又はそれぞれ配列番号 257 - 259 を含む軽鎖 CDR1、CDR2 及び CDR3 配列、(27) それぞれ配列番号 207 - 209 を含む重鎖 CDR1、CDR2 及び CDR3 配列、及び / 又はそれぞれ配列番号 262 - 264 を含む軽鎖 CDR1、CDR2 及び CDR3 配列、(28) それぞれ配列番号 207 - 209 を含む重鎖 CDR1、CDR2 及び CDR3 配列、及び / 又はそれぞれ配列番号 267 - 269 を含む軽鎖 CDR1、CDR2 及び CDR3 配列、(29) それぞれ配列番号 212 - 214 を含む重鎖 CDR1、CDR2 及び CDR3 配列、及び / 又はそれぞれ配列番号 262 - 264 を含む軽鎖 CDR1、CDR2 及び CDR3 配列、(30) それぞれ配列番号 212 - 214 を含む重鎖 CDR1、CDR2 及び CDR3 配列、及び / 又はそれぞれ配列番号 267 - 269 を含む軽鎖 CDR1、CDR2 及び CDR3 配列、(31) それぞれ配列番号 217 - 219 を含む重鎖 CDR1、CDR2 及び CDR3 配列、及び / 又はそれぞれ配列番号 262 - 264 を含む軽鎖 CDR1、CDR2 及び CDR3 配列、(32) それぞれ配列番号 217 - 219 を含む重鎖 CDR1、CDR2 及び CDR3 配列、及び / 又はそれぞれ配列番号 267 - 269 を含む軽鎖 CDR1、CDR2 及び CDR3 配列、(33) それぞれ配列番号 222 - 224 を含む重鎖 CDR1、CDR2 及び CDR3 配列、及び / 又はそれぞれ配列番号 262 - 264 を含む軽鎖 CDR1、CDR2 及び CDR3 配列、(34) それぞれ配列番号 222 - 224 を含む重鎖 CDR1、CDR2 及び CDR3 配列、及び / 又はそれぞれ配列番号 267 - 269 を含む軽鎖 CDR1、CDR2 及び CDR3 配列、(35) それぞれ配列番号 227 - 229 を含む重鎖 CDR1、CDR2 及び CDR3 配列、及び / 又はそれぞれ配列番号 262 - 264 を含む軽鎖 CDR1、CDR2 及び CDR3 配列、(36) それぞれ配列番号 227 - 229 を含む重鎖 CDR1、CDR2 及び CDR3 配列、及び / 又はそれぞれ配列番号 267 - 269 を含む軽鎖 CDR1、CDR2 及び CDR3 配列、(37) それぞれ配列番号 232 - 234 を含む重鎖 CDR1、CDR2 及び CDR3 配列、及び / 又はそれぞれ配列番号 262 - 264 を含む軽鎖 CDR1、CDR2 及び CDR3 配列、(38) それぞれ配列番号 232 - 234 を含む重鎖 CDR1、CDR2 及び CDR3 配列、及び / 又はそれぞれ配列番号 267 - 269 を含む軽鎖 CDR1、CDR2 及び CDR3 配列という重鎖及び軽鎖の CDR 組み合わせを含む、前記請求項のいずれか 1 項に記載の抗体又はその抗原結合部分。

【請求項 5】

前記抗体又はその抗原結合部分はヒト化される、前記請求項のいずれか 1 項に記載の抗体又はその抗原結合部分。

【請求項 6】

前記請求項のいずれか 1 項に記載の抗体又はその抗原結合部分をコードする核酸分子、又はそれに対して少なくとも 60 % より高く、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % より高い配列同一性を有する核酸分子。

【請求項 7】

請求項 6 に記載の核酸を含む、担体。

【請求項 8】

請求項 7 に記載の担体を含む、細胞又はキット。

【請求項 9】

前記請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の抗体又はその抗原結合部分、又は請求項 6 に記載の核酸、請求項 7 に記載の担体、又は請求項 8 に記載の細胞又はキットを含む、医薬組成物。

【請求項 10】

前記請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の抗体又はその抗原結合部分、又は請求項 6 に記載の核酸、請求項 7 に記載の担体、又は請求項 8 に記載の細胞又はキット、又は請求項 9 に記載の医薬組成物の、哺乳動物の癌を治療するための薬物又はキットの調製における用途であって、任意選択で、前記癌は胃癌であり、任意選択で、前記抗体は、ADC 又は

C D C 作用によって癌細胞を死滅させ、任意選択で、前記抗体は、その他の細胞毒性薬物と結合する、用途。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本開示は、クロードインを認識する抗体、その製造方法及び応用に関する。

【背景技術】

【0002】

クロードイン18 (Claudin18) は、高度な組織特異的分布を有するクロードインファミリーメンバーであり、正常組織において、主に胃又は肺部の上皮及び内皮細胞に分布している。細胞間の密着結合の形成に関与し、溶液及び分子の細胞間隙への浸透を制限し、内皮細胞の外膜及び基底膜の完全性を維持するために重要な役割を果たしており、シグナル伝達に関与する可能性がある。

【0003】

クロードイン18は、複数回膜貫通タンパク質であり、分子内に4つの膜貫通領域を有し、そのうち2つの断片が細胞外に細胞外領域(loop1及びloop2)を形成し、2つの膜貫通断片が細胞内に細胞内領域を形成する。RNAの選択的スプライシングのために、クロードイン18.1(Uniprot U56856)及びクロードイン18.2(Uniprot U56856-2)という2種類の異なる膜タンパク質サブタイプが組織に存在しており、この2種類の膜タンパク質サブタイプの相違点は、N末端にある膜貫通領域(アミノ酸残基1~27)と第1の細胞外領域(loop1、アミノ酸残基28~80)であり、loop1領域の配列類似性は約85%であるため、クロードイン18.2を特異的に標的とする抗体を生成する可能性がある。クロードイン18の膜タンパク質サブタイプは、正常組織において分布が異なり、クロードイン18.1は正常な肺組織に選択的に発現するが、クロードイン18.2は高分化型胃粘膜細胞の表面のみに高度に特異的に発現し、胃組織の粘膜下に近い幹細胞領域では検出されない。研究によると、腫瘍組織において、クロードイン18.2は、70%の原発性胃癌及びその転移に発現するだけでなく、異所性活性化が存在し、膵臓癌(50%)、食道癌(30%)、非小細胞肺癌(25%)、乳癌及び耳鼻咽喉腫瘍などの多くの他の癌に発現することが明らかになっている。消化管腫瘍において広く発現するため、クロードイン18は、新たな腫瘍マーカー及び潜在的な治療標的となる可能性がある。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

広範囲の詳細な研究及びマスキングを通して、本発明者らは、予想外に、極めて優れた親和性及び特異性を有する抗クロードイン18.2抗体、及び該抗体に基づいて得られるヒト化抗体を得た。本発明の抗体は、クロードイン18.2に高度に特異的に結合することが可能であり、親和性が高く、細胞殺傷作用を媒介することにより、胃癌、膵臓癌などのいくつかの悪性腫瘍の診断及び治療に使用することができる。これに基づいて、本発明を完成した。

【課題を解決するための手段】

【0005】

一態様において、本開示は、ヒトクロードイン18.2に結合する抗体又はその抗原結合部分を提供する。

【0006】

一態様において、本開示は、上記態様に係る抗体又はその抗原結合部分をコードする核酸分子を提供する。

【0007】

一態様において、本開示は、上記態様に係る核酸を含む担体を提供する。

【0008】

10

20

30

40

50

一態様において、本開示は、上記態様に係る担体を含む細胞を提供する。

【0009】

上記いずれかの態様に係る抗体又はその抗原結合部分において、前記抗体又はその抗原結合部分はヒト化される。

【0010】

一態様において、本開示は、上記いずれかの態様に係る抗体又はその抗原結合部分又はそのコード核酸及び薬学的に許容される担体を含む医薬組成物又はキットを提供する。

【0011】

一態様に係る癌を治療する方法は、治療有効量の上記いずれかの態様に係る抗体又はその抗原結合断片又は核酸分子又は担体又は細胞又は医薬組成物を前記哺乳動物に投与するステップを含む。 10

【0012】

一態様に係る用途は、上記いずれかの態様に係る抗体又はその抗原結合断片又は核酸分子又は担体又は細胞又は医薬組成物の、哺乳動物の癌を治療するための薬物又はキットの調製における用途である。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】RT-PCRは、HEK293安定形質転換細胞株がそれぞれクロードイン18.1及びクロードイン18.2を発現することを示す。HEK293-クロードイン18.2安定形質転換細胞株及び対照KATO III細胞は、いずれもクロードイン18.2の特異的な780bpの特徴的なバンドを増幅することができ、HEK293-クロードイン18.1は、504bpの共通断片のみを増幅することができる。 20

【図2】FACS実験で高発現のHEK293-クロードイン18.2安定形質転換細胞株をスクリーニングした結果を示す。図中、黒色点は、陰性対照であり、灰色点は、高発現のHEK293-クロードイン18.2安定形質転換細胞株である。

【図3】FACS実験で高発現のNIH3T3-クロードイン18.2安定形質転換細胞株をスクリーニングした結果を示す。図中、黒色の線は、陰性対照であり、灰色の陰影は、3T3-クロードイン18.2安定形質転換細胞株である。NO.32-Hは、高発現の3T3-クロードイン18.2安定形質転換細胞株であり、NO.18-Mは、中発現の3T3-クロードイン18.2安定形質転換細胞株であり、NO.6-Lは、低発現の3T3-クロードイン18.2安定形質転換細胞株である。 30

【図4】モノクローナル抗体によるクロードイン18.2の特異的認識を示す。フローサイトメトリー(FACS)によると、得られたキメラクロードイン18.2 IgG1抗体は、クロードイン18.2をトランスフェクトしたHEK293-クロードイン18.2細胞のみを認識し(図4B)、HEK293(図4A)及びHEK293-クロードイン18.1(図4C)といずれも結合しないことを示す。

【図5】クロードイン18.2抗体と細胞を37℃で異なる時間インキュベートした後、細胞内取り込み作用に伴う細胞表面の抗体数の変化を示す。

【図6】クロードイン18.2ヒト化抗体によるKATO III細胞のADCC細胞殺傷活性を示す。 40

【図7】クロードイン18.2ヒト化抗体による腫瘍細胞のCDC細胞殺傷活性を示す。

【図8】クロードイン18.2抗体の細胞内取り込みを示す。レーザー共焦点によると、ヒト化クロードイン18.2抗体(赤色)が細胞膜に結合し、その一部が細胞内に取り込まれた後にリソソーム(緑色)と重なり、矢印で示される黄色のスポット領域を形成する(青色が細胞核である)ことを示す。

【発明を実施するための形態】

【0014】

I. 定義

本発明において、特に断りのない限り、本明細書で使用される科学用語及び技術用語は、当業者が一般的に理解する意味を有する。また、本明細書において使用されるタンパク質 50

及び核酸化学、分子生物学、細胞及び組織培養、微生物学、免疫学の関連用語及び実験室の操作ステップは、いずれも対応する分野で広く使用されている用語及び一般的なステップである。また、本発明をよりよく理解するために、以下、関連する用語の定義及び解釈を提供する。

【0015】

一態様において、本明細書は、クローディング 18 . 2 に特異的に結合する抗体（例えば、モノクローナル抗体）及びその抗原結合断片を提供する。具体的な態様において、本明細書は、ヒトクローディング 18 . 2 に特異的に結合する抗クローディング 18 . 2 モノクローナル抗体を提供し、上記抗クローディング 18 . 2 抗体は、親抗体の変異体を含む。具体的な態様において、本明細書は、クローディング 18 . 2（例えば、ヒトクローディング 18 . 2）に特異的に結合する抗体を提供する。特定の態様において、本明細書は、1つ以上のアミノ酸残基の修飾を含み、上記修飾のない親抗体と比べて、抗原との親和性を維持する抗クローディング 18 . 2 抗体（例えば、重鎖可変領域のフレームワーク領域における 5 ~ 13 個のアミノ酸置換）を提供する。

10

【0016】

本明細書において使用されるとき、用語「約」又は「およそ」は、特に断りのない限り、所定の値又は範囲のプラス又はマイナス 10 % 以内を意味する。整数にする場合、これらの用語は、所定の値又は範囲のプラス又はマイナス 10 % 以内において、最も近い整数に切り上げる又は切り下げることを意味する。

【0017】

抗体鎖のポリペプチド配列に関して、語句「実質的に同一」は、参照ポリペプチド配列に対して、少なくとも 60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % 以上の配列同一性を示す抗体鎖として解釈され得る。核酸配列に関して、該用語は、参照核酸配列に対して、少なくとも 60 % より高く、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % より高い配列同一性を示すヌクレオチド配列として解釈され得る。

20

【0018】

配列「相同性」又は「同一性」は、本分野で一致して認められている意味であり、開示された技術を用いて、2つの核酸又はポリペプチド分子又は領域間の配列同一性のパーセンテージを算出することができる。配列相同性は、ポリヌクレオチド又はポリペプチドの全長に沿って、又は該分子の領域に沿って測定することができる。2つのポリヌクレオチド又はポリペプチド間の相同性を測定するための方法は多数あるが、用語「相同性」は、当業者に周知である (Carri llo, H. & Lipman, D., S I A M J A p p l i e d M a t h 48:1073 (1988))。

30

【0019】

「置換」変異体は、天然配列中の少なくとも1つのアミノ酸残基が除去され、同じ位置に異なるアミノ酸が挿入された変異体である。上記置換は、単一とすることができ、ここでは分子における1つのアミノ酸のみが置換されており、或いは、上記置換は、複数とすることができ、ここでは同じ分子における2つ以上のアミノ酸が置換されている。複数の置換は、連続した部位に存在することができる。同様に、1つのアミノ酸は、複数の残基で置換されてよく、その場合、このような変異体は、置換と挿入の両方を含む。「挿入」変異体は、1つ以上のアミノ酸が天然配列中の特定の位置におけるあるアミノ酸に直接隣接して挿入された変異体である。あるアミノ酸に直接隣接するとは、該アミノ酸の - カルボキシル官能基又は - アミノ官能基に連結することを意味する。「欠失」変異体は、天然アミノ酸配列中の1つ以上のアミノ酸が除去された変異体である。通常、欠失変異体では、分子の特定の領域中の1つ又は2つのアミノ酸が欠失している。

40

【0020】

抗体の可変ドメインの文脈における用語「可変」は、抗体間で配列が大きく異なり、その特定の標的に対する特定の抗体の特異的認識及び結合において使用される、関連する分子のいくつかの部分を目指す。しかしながら、可変性は、抗体の可変ドメインにわたって均等

50

に分布していない。可変性は、軽鎖可変ドメイン及び重鎖可変ドメインの両方における、相補性決定領域（CDRs、すなわち、CDR1、CDR2及びCDR3）又は超可変領域と呼ばれる3つのセグメントに集中している。可変ドメインのより高度に保存された部分は、フレームワーク（FR）領域又はフレームワーク配列と呼ばれる。天然重鎖及び軽鎖の可変ドメインはそれぞれ、3つのCDRsによって連結し、 β -シート配置を主に取る4つのFR領域を含み、CDRsは、 β -シート構造に連結するループを形成し、ある場合には β -シート構造の一部を形成する。各鎖におけるCDRは、FR領域によって接近して連結することが多く、他の鎖由来のCDRと共に、抗体の標的結合部位（エピトープ又は決定基）の形成に寄与する。本明細書において使用されるとき、免疫グロブリンアミノ酸残基の番号付けは、特に断りのない限り、Kabataらの免疫グロブリンアミノ酸残基の番号付けシステムに従って行われる。1つのCDRは、同族エピトープに特異的に結合する能力を有することができる。

10

【0021】

本明細書において使用されるとき、抗体の「抗体断片」又は「抗原結合断片」は、全長未満であるが、抗原に結合する抗体の可変領域の一部（例えば、1つ以上のCDR及び/又は1つ以上の抗体結合部位）を少なくとも含有し、したがって、結合特異性及び全長抗体の特異的結合能の少なくとも一部を保持する全長抗体の任意の部分を目指す。したがって、抗原結合断片は、抗体断片が由来する抗体と同一の抗原に結合する抗原結合部分を含有する抗体断片を目指す。抗体断片は、全長抗体の酵素的処理によって産生された抗体誘導体と、合成的に、例えば、組換えによって産生された誘導体とを含む。抗体は、抗体断片を含む。抗体断片の例は、Fab、Fab'、F(ab')₂、一本鎖Fv(scFv)、Fv、dsFv、ダイアボディ、Fd、及びFd'断片、並びに修飾断片を含めたその他の断片を含むが、これらに限定されない。上記断片は、例えば、ジスルフィド結合によって、及び/又はペプチドリンカーによって互いに連結している複数の鎖を含むことができる。抗体断片は、一般的に、少なくとも又は約50個のアミノ酸、通常、少なくとも又は約200個のアミノ酸を含有する。抗原結合断片は、抗体フレームワーク中に挿入された場合に（対応する領域を置換することなどによって）、抗原に免疫特異的に結合する（すなわち、少なくとも又は少なくとも約10⁷～10⁸ M⁻¹のK_aを示す）抗体をもたらす任意の抗体断片を含む。「機能的断片」又は「抗クロードイン18.2抗体の類似体」は、リガンドに結合するか又はシグナル伝達を開始する上記受容体の能力を抑止するか又は実質的に低下させることができる断片又は類似体である。本明細書において使用されるとき、機能的断片は、一般的に「抗体断片」と同義であり、そして抗体に関しては、リガンドに結合するか又はシグナル伝達を開始する上記受容体の能力を抑止するか又は実質的に低下させることができる、Fv、Fab、F(ab')₂などの断片を指すことができる。

20

30

「Fv」断片は、非共有結合において、1つの重鎖可変ドメイン及び1つの軽鎖可変ドメインの二量体（V_H-V_L二量体）からなる。該立体配置では、各可変ドメインの3つのCDRsが相互作用して、インタクト抗体中のようにV_H-V_L二量体の表面上で標的結合部位を決定する。全体として、上記6つのCDRsは、インタクト抗体に標的結合特異性を与える。しかしながら、単一の可変ドメイン（又は標的に特異的な3つのCDRsのみを含むFvの半分）でさえ、標的を認識し、結合する能力を有することができる。

40

【0022】

本明細書において使用されるとき、「モノクローナル抗体」は、同一抗体の集団を指し、これは、モノクローナル抗体の集団中の個々の抗体分子各々が、他の抗体分子に対して同一であることを意味する。このような特性は、複数の異なる配列を有する抗体を含有する抗体のポリクローナル集団の特性とは対照的である。モノクローナル抗体は、いくつかの周知の方法によって調製できる（Smith et al. (2004) J. Clin. Pathol. 57, 912-917; 及びNelson et al., J. Clin. Pathol. (2000), 53, 111-117）。例えば、モノクローナル抗体は、例えば、骨髄腫細胞と融合して、ハイブリドーマ細胞株を産生することによるB細胞の不活化によって、又はEBVなどのウイルスによるB細胞の感染によって

50

調製できる。組換え技術は、インビトロで、抗体をコードするヌクレオチドの人工配列を保有するプラスミドを用いて、宿主細胞を形質転換することによって、宿主細胞のクローン集団から抗体を調製することもできる。

【0023】

本明細書において使用されるとき、用語「ハイブリドーマ」又は「ハイブリドーマ細胞」は、抗体を産生するリンパ球と抗体を産生しない癌細胞を融合することにより産生される細胞又は細胞株（通常、骨髄腫又はリンパ腫細胞）を指す。当業者に知られているように、ハイブリドーマは、特定のモノクローナル抗体を産生し、持続的に供給することができる。ハイブリドーマを産生するための方法は、本分野において周知である。用語「ハイブリドーマ」又は「ハイブリドーマ細胞」に言及する場合、それは、ハイブリドーマのサブクローン及び子孫細胞をさらに含む。

10

【0024】

本明細書において使用されるとき、全長抗体は、2つの全長重鎖（例えば、 $VH - CH1 - CH2 - CH3$ 又は $VH - CH1 - CH2 - CH3 - CH4$ ）と、2つの全長軽鎖（ $VL - CL$ ）と、ヒンジ領域とを有する抗体、例えば、抗体を分泌するB細胞によって天然に産生される抗体と合成的に産生される同ドメインを有する抗体である。

【0025】

用語「キメラ抗体」は、可変領域配列が1つの種に由来し定常領域配列が別の種に由来する抗体、例えば、可変領域配列がマウス抗体に由来し定常領域配列がヒト抗体に由来する抗体を指す。

20

【0026】

「ヒト化」抗体は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含有する、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖、又はその断片（例えば Fv 、 Fab 、 Fab' 、 $F(ab')_2$ 、又は抗体の他の抗原結合サブ配列）である、非ヒト（例えばマウス）抗体の形態を指す。好ましくは、ヒト化抗体は、レシピエントの相補性決定領域（ CDR ）の残基が、所望の特異性、親和性及び能力を有するマウス、ラット又はウサギなどの非ヒト種（ドナー抗体）の CDR の残基によって置換されている、ヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）である。

【0027】

また、ヒト化において、 VH 及び/又は VL の $CDR1$ 、 $CDR2$ 及び/又は $CDR3$ 内のアミノ酸残基を突然変異させることにより、抗体の1つ以上の結合特性（例えば親和性）を改善することも可能である。突然変異は、例えば、 PCR によって媒介される突然変異を行うことにより導入することができ、抗体の結合又は他の機能特性への影響は、本明細書に記載のインビトロ又はインビボ試験により評価することができる。一般的には、保存的突然変異が導入される。このような突然変異は、アミノ酸置換、添加又は欠失であってよい。また、 CDR 内の突然変異は、通常、1つ又は2つを超えない。したがって、本発明に係るヒト化抗体は、 CDR 内に1又は2個のアミノ酸変異を含有する抗体をさらにカバーする。

30

【0028】

本明細書において使用されるとき、用語「エピトープ」は、抗体のパラトープが結合する、抗原上の任意の抗原決定基を指す。エピトープ決定基は、通常、アミノ酸又は糖側鎖などの分子の化学的に活性な表面群を含有し、通常、特定の三次元構造的特徴及び特定の荷電特徴を有する。

40

【0029】

本明細書において使用されるとき、抗体又はその抗原結合断片に関して、用語「特異的に結合する」又は用語「免疫特異的に結合する」は、本明細書において交換可能に使用され、抗体又は抗原結合断片の、抗体と抗原の抗体結合部位との間の非共有結合相互作用によって、同族抗原と1つ以上の非共有結合を形成する能力を指す。上記抗原は、単離された抗原であってもよく、腫瘍細胞中に存在してもよい。通常、抗原に免疫特異的に結合する（又は特異的に結合する）抗体は、約 $1 \times 10^7 M^{-1}$ 若しくは $1 \times 10^8 M^{-1}$ 若しく

50

はそれ以上の親和性定数 K_a (又は $1 \times 10^{-7} M$ 若しくは $1 \times 10^{-8} M$ 若しくはそれ以下の解離定数 (K_d)) で上記抗原に結合する。親和性定数は、抗体反応の標準的動力学的方法、例えば、免疫測定、表面プラズモン共鳴 (SPR) (Rich and Myszk a (2000) Curr. Opin. Biotechnol 11:54; Englebi enne (1998) Analyst. 123:1599)、等温滴定熱量測定法 (ITC) 又は本分野で周知のその他の動力学的作用測定によって測定することができる (さらに、抗体の結合親和性を算出するための例示的 SPR 及び ITC 法の説明については、米国特許第 7,229,619 号を参照)。結合速度のリアルタイム検出及びモニタリングのための装置及び方法は周知であり、市販されている。

【0030】

10

本明細書において使用されるとき、抗体に関する用語「競合」は、第 1 の抗体又はその抗原結合断片が、第 2 の抗体又はその抗原結合断片の結合と十分に類似した方式でエピトープに結合し、それによって、第 1 の抗体とその同族エピトープの結合の結果が、第 2 の抗体の非存在下よりも、第 2 の抗体の存在下で、検出可能に低下することを意味する。或いは、第 2 の抗体とそのエピトープの結合も第 1 の抗体の存在下で検出可能に低下する場合もありうるが、そうである必要はない。すなわち、第 1 の抗体によって第 2 の抗体とそのエピトープとの結合を抑制することができ、第 2 の抗体によって第 1 の抗体とその各自のエピトープとの結合を抑制する必要はない。しかしながら、それぞれの抗体が、同レベルか、より高いレベルか、より低いレベルかにかかわらず、他の抗体とその同族エピトープ又はリガンドとの結合を検出可能に抑制する場合、上記抗体は、その各自のエピトープの結合について互いに「交差競合する」と言われる。競合及び交差競合抗体はどちらも本発明に含まれる。このような競合又は交差競合がどのようなメカニズムで発生するかにかかわらず (例えば、立体障害、立体配位変化、又は共通エピトープ若しくはその断片との結合)、当業者であれば、本発明の教示に基づいて、このような競合及び / 又は交差競合抗体が本発明に含まれ、本発明に開示された方法に適用可能であることを認識することができる。

20

【0031】

本明細書において使用されるとき、用語「ポリヌクレオチド」及び「核酸分子」は、少なくとも 2 つの連結しているヌクレオチド又はヌクレオチド誘導体を含むオリゴマー又はポリマーであり、通常、リン酸ジエステル結合を介して連結するデオキシリボ核酸 (DNA) 及びリボ核酸を含む (RNA)。本明細書において使用されるとき、用語「核酸分子」は、DNA 分子及び RNA 分子を含むことを意図する。核酸分子は、一本鎖又は二本鎖であってもよく、かつ cDNA であってもよい。

30

【0032】

本明細書において使用されるとき、単離された核酸分子は、核酸分子の天然供給源中に存在するその他の核酸分子から分離される核酸分子である。cDNA 分子などの「単離された」核酸分子は、組換え技術によって調製される場合に、その他の細胞性物質若しくは培地を実質的に含まないもの、又は化学的に合成される場合に、化学前駆体若しくはその他の化学物質を実質的に含まないものであってよい。本明細書に係る例示的な単離された核酸分子は、提供される抗体又は抗原結合断片をコードする単離された核酸分子を含む。

40

【0033】

本明細書において使用されるとき、核酸配列、領域、エレメント又はドメインに関して、用語「作動可能に連結する」は、核酸領域が互いに機能的に関連していることを示す。例えば、プロモーターは、ポリペプチドをコードする核酸に作動可能に連結することができ、それによって、上記プロモーターは、上記核酸の転写を調節又は媒介する。

【0034】

本明細書に記載の配列表における上記配列の「保存的配列修飾」、すなわち、ヌクレオチド配列によりコードされるか又はアミノ酸配列を含む抗体と抗原との結合を排除しないヌクレオチド及びアミノ酸配列修飾も提供される。これらの保存的配列修飾は、保存的ヌクレオチド、アミノ酸置換、及び、ヌクレオチド及びアミノ酸の付加及び欠失を含む。例え

50

ば、本分野で周知の標準技術（例えば、部位特異的変異及びPCR媒介性変異誘発）により修飾を本明細書に記載の配列表に導入することができる。保存的配列修飾は、保存的アミノ酸置換を含み、アミノ酸残基は、類似の側鎖を有するアミノ酸残基で置換される。類似の側鎖を有するアミノ酸残基ファミリーは、本分野において定義されている。これらのファミリーは、塩基性側鎖を有するアミノ酸（例えば、リジン、アルギニン及びヒスチジン）、酸性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非帯電極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン、トリプトファン）、非極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン）、分岐側鎖を有するアミノ酸（例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン）及び芳香族側鎖を有するアミノ酸（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を含む。したがって、抗クローディン18.2抗体における予測される非必須アミノ酸残基は、好ましくは、同じ側鎖ファミリーからの別のアミノ酸残基で置換される。抗原結合を排除しないヌクレオチド及びアミノ酸の保存的置換を同定する方法は、本分野において周知である（例えば、Blommesteinら, Biochem. J. 32: 1180-1187 (1993); Kobayashiら, Protein Eng. 12 (10): 879-884 (1999); 及びBurksら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 412-417 (1997)を参照）。

10

【0035】

他の選択肢として、別の実施形態において、例えば飽和変異誘発により、抗クローディン18.2抗体をコードする配列の全部又は一部に沿ってランダムに変異を導入することができ、得られた修飾された抗クローディン18.2抗体を、改善された結合活性についてスクリーニングすることができる。

20

【0036】

本明細書において使用されるとき、「発現」は、ポリヌクレオチドの転写及び翻訳によってポリペプチドを産生するプロセスを指す。ポリペプチドの発現レベルは、例えば、宿主細胞から産生されたポリペプチドの量を測定する方法を含む、本分野で周知の任意の方法を使用して評価することができる。このような方法は、ELISAによる細胞溶解物中のポリペプチドの定量、ゲル電気泳動法後のクーマシーブルー染色、Lowryタンパク質アッセイ及びBradfordタンパク質アッセイを含むことができるが、これらに限定

30

【0037】

本明細書において使用されるとき、「宿主細胞」は、担体を受け取り、維持し、複製し、増幅するための細胞である。宿主細胞は、さらに、担体によってコードされるポリペプチドを発現するために使用することができる。宿主細胞が分裂するとき、担体に含有される核酸が複製されて、核酸を増幅する。宿主細胞は、真核細胞であってもよく、原核細胞であってもよい。好適な宿主細胞は、CHO細胞、様々なCOS細胞、HeLa細胞、HEK細胞、例えば、HEK293細胞を含むが、これらに限定されない。

【0038】

本明細書において使用されるとき、「担体」は、複製可能な核酸であり、担体を適切な宿主細胞に形質転換するとき、該担体から1つ以上の異種のタンパク質を発現させることができる。担体についての言及は、一般的に制限消化及び連結によって、ポリペプチド又はその断片をコードする核酸を導入できる担体を含む。担体についての言及は、ポリペプチドをコードする核酸を含有する担体をさらに含む。担体は、核酸の増幅のために、又は核酸によってコードされるポリペプチドの発現/提示のために、ポリペプチドをコードする核酸を宿主細胞に導入するために使用される。担体は、一般的にエピソードのままであるが、遺伝子又はその部分をゲノム染色体に組み込むことを引き起こすように設計されてもよい。また、酵母人工染色体及び哺乳動物人工染色体などの人工染色体である担体も考慮される。このような媒体の選択及び用途は、当業者に周知である。

40

【0039】

50

本明細書において使用されるとき、担体は、「ウイルス担体」又は「ウイルスの担体」をさらに含む。ウイルスの担体は、外因性遺伝子を（媒体又はシャトル（shuttle）として）細胞に移行するように、外因性遺伝子に作動可能に連結した、操作されたウイルスである。

【0040】

本明細書において使用されるとき、「発現担体」は、DNAを発現することができる担体を含み、上記DNAは、例えば、プロモーター領域の、DNA断片の発現に影響を与える調節配列に作動可能に連結する。このような追加の断片は、プロモーター及びターミネーター配列を含むことがあり、任意選択で、1つ以上の複製起点、1つ以上の選択可能マーカ、エンハンサー、ポリアデニル化シグナル等を含むことができる。発現担体は、一般的に、プラスミド又はウイルスDNAに由来するか、又は両方のエレメントを含有することができる。したがって、発現担体は、組換えDNA又はRNA構築物、例えば、プラスミド、ファージ、組換えウイルス、又は適切な宿主細胞への導入に際してクローニングされたDNAの発現をもたらす他の担体を指す。適切な発現担体は、当業者に周知であり、真核細胞及び/又は原核細胞において複製可能な発現担体、及びエピソームのままである発現担体又は宿主細胞ゲノムに組み込まれる発現担体を含む。

10

【0041】

本明細書において使用されるとき、疾患を有する又は疾患状態にある個体を「治療する」とは、上記個体の症状が、部分的又は全体的に寛解するか、又は治療後そのまま変化しないことを意味する。したがって、治療は、予防、治療及び/又は治癒を含む。予防は、潜在的な疾患の防止及び/又は症状の悪化若しくは疾患の進行の防止を指す。治療は、提供される任意の抗体若しくはその抗原結合断片、及び本明細書において提供される組成物の任意の薬学的用途をさらに含む。

20

【0042】

本明細書において使用されるとき、「治療効果」は、個体の治療によって得られる効果を意味し、疾患若しくは疾患状態の症状の変化、通常は改良若しくは改善、又は疾患若しくは疾患状態の治癒である。

【0043】

本明細書において使用されるとき、「治療有効量」又は「治療有効用量」は、対象への投与後に治療効果を達成するのに少なくとも十分な、薬剤、化合物、物質又は化合物を含有する組成物の量を指す。したがって、それは、疾患又は病症の症状を防止、治癒、改善、抑制又は部分的に抑制するために必要な量である。

30

【0044】

本明細書において使用されるとき、「予防有効量」又は「予防有効用量」は、対象への投与時に、例えば疾患又は症状の発生又は再発の防止又は遅延、疾患又は症状の発生又は再発の可能性の低減など、意図される予防効果を有する薬剤、化合物、物質又は化合物を含有する組成物の量を指す。完全な予防有効用量は、1用量の投与で達成する必要はなく、一連の用量が投与されたときのみ達成されてもよい。したがって、予防有効量は、1回又は複数回の投与において投与し得る。

40

【0045】

本明細書において使用されるとき、用語「患者」は、哺乳動物、例えばヒトを指す。

【0046】

II. 発明を実施するための形態

一態様において、本開示は、アミノ酸配列の配列番号2-4、12-14、22-24、32-34、42-44、52-54、62-64、72-74、82-84、92-94、102-104、112-114、122-124、132-134、142-144、152-154、157-159、162-164、167-169、172-174、177-179、182-184、187-189、192-194、197-199、202-204、207-209、212-214、217-219、222-224、227-229、232-234又はそれらの任意の変異体から選択された重鎖CD

50

R、及び／又は、アミノ酸配列の配列番号 7 - 9、17 - 19、27 - 29、37 - 39、47 - 49、57 - 59、67 - 69、77 - 79、87 - 89、97 - 99、107 - 109、117 - 119、127 - 129、137 - 139、147 - 149、237 - 239、242 - 244、247 - 249、252 - 254、257 - 259、262 - 264、267 - 269 又はそれらの任意の変異体から選択された軽鎖 CDR を含む、ヒトクローディング 18.2 に結合する抗体又はその抗原結合部分を提供する。

【0047】

前の態様に係る抗体又はその抗原結合部分は、アミノ酸配列の配列番号 2、12、22、32、42、52、62、72、82、92、102、112、122、132、142、152、157、162、167、172、177、182、187、192、197、202、207、212、217、222、227、232 又はそれらの任意の変異体から選択された重鎖 CDR 1、アミノ酸配列の配列番号 3、13、23、33、43、53、63、73、83、93、103、113、123、133、143、153、158、163、168、173、178、183、188、193、198、203、208、213、218、223、228、233 又はそれらの任意の変異体から選択された重鎖 CDR 2、アミノ酸配列の配列番号 4、14、24、34、44、54、64、74、84、94、104、114、124、134、144、154、159、164、169、174、179、184、189、194、199、204、209、214、219、224、229、234 又はそれらの任意の変異体から選択された重鎖 CDR 3、及び／又は、アミノ酸配列の配列番号 7、17、27、37、47、57、67、77、87、97、107、117、127、137、147、237、242、247、252、257、262、267 又はそれらの任意の変異体から選択された軽鎖 CDR 1、アミノ酸配列の配列番号 8、18、28、38、48、58、68、78、88、98、108、118、128、138、148、238、243、248、253、258、263、268 又はそれらの任意の変異体から選択された軽鎖 CDR 2、アミノ酸配列の配列番号 9、19、29、39、49、59、69、79、89、99、109、119、129、139、149、239、244、249、254、259、264、269 又はそれらの任意の変異体から選択された軽鎖 CDR 3 を含む。

【0048】

上記いずれかの態様に係る抗体又はその抗原結合部分は、アミノ酸配列の配列番号 1、11、21、31、41、51、61、71、81、91、101、111、121、131、141、151、156、161、166、171、176、181、186、191、196、201、206、211、216、221、226、231 又はそれらの任意の変異体から選択された重鎖可変領域、及び／又は、アミノ酸配列の配列番号 6、16、26、36、46、56、66、76、86、96、106、116、126、136、146、236、241、246、251、256、261、266 又はそれらの任意の変異体から選択された軽鎖可変領域を含む。

【0049】

上記いずれかの態様に係る抗体又はその抗原結合部分をコードする核酸分子は、配列番号 5、15、25、35、45、55、65、75、85、95、105、115、125、135、145、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、205、210、215、220、225、230、235 又はそれらの任意の変異体から選択された抗体重鎖核酸配列、及び／又は、配列番号 10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、240、245、250、255、260、265、270 又はそれらの任意の変異体から選択された抗体軽鎖核酸配列を含む。

【0050】

一態様において、本開示は、アミノ酸配列の配列番号 151、156、161、166、171、176、181、186、191、196、201、206、211、216、221、226、231 又はそれらの任意の変異体から選択された重鎖可変領域、及び／

又は、アミノ酸配列の配列番号 236、241、246、251、256、261、266 又はそれらの任意の変異体から選択された軽鎖可変領域を含む、ヒトクローディン 18 . 2 に結合する抗体又はその抗原結合部分に関する。

【0051】

一態様において、本開示は、アミノ酸配列の配列番号 151 又はその任意の変異体から選択された重鎖可変領域、及び / 又は、アミノ酸配列の配列番号 236 又はその任意の変異体から選択された軽鎖可変領域を含む、ヒトクローディン 18 . 2 に結合する抗体又はその抗原結合部分に関する。

【0052】

一態様において、本開示は、アミノ酸配列の配列番号 151 又はその任意の変異体から選択された重鎖可変領域、及び / 又は、アミノ酸配列の配列番号 241 又はその任意の変異体から選択された軽鎖可変領域を含む、ヒトクローディン 18 . 2 に結合する抗体又はその抗原結合部分に関する。

【0053】

一態様において、本開示は、アミノ酸配列の配列番号 151 又はその任意の変異体から選択された重鎖可変領域、及び / 又は、アミノ酸配列の配列番号 256 又はその任意の変異体から選択された軽鎖可変領域を含む、ヒトクローディン 18 . 2 に結合する抗体又はその抗原結合部分に関する。

【0054】

一態様において、本開示は、アミノ酸配列の配列番号 156 又はその任意の変異体から選択された重鎖可変領域、及び / 又は、アミノ酸配列の配列番号 236 又はその任意の変異体から選択された軽鎖可変領域を含む、ヒトクローディン 18 . 2 に結合する抗体又はその抗原結合部分に関する。

【0055】

一態様において、本開示は、アミノ酸配列の配列番号 156 又はその任意の変異体から選択された重鎖可変領域、及び / 又は、アミノ酸配列の配列番号 241 又はその任意の変異体から選択された軽鎖可変領域を含む、ヒトクローディン 18 . 2 に結合する抗体又はその抗原結合部分に関する。

【0056】

一態様において、本開示は、アミノ酸配列の配列番号 156 又はその任意の変異体から選択された重鎖可変領域、及び / 又は、アミノ酸配列の配列番号 256 又はその任意の変異体から選択された軽鎖可変領域を含む、ヒトクローディン 18 . 2 に結合する抗体又はその抗原結合部分に関する。

【0057】

一態様において、本開示は、アミノ酸配列の配列番号 161 又はその任意の変異体から選択された重鎖可変領域、及び / 又は、アミノ酸配列の配列番号 236 又はその任意の変異体から選択された軽鎖可変領域を含む、ヒトクローディン 18 . 2 に結合する抗体又はその抗原結合部分に関する。

【0058】

一態様において、本開示は、アミノ酸配列の配列番号 161 又はその任意の変異体から選択された重鎖可変領域、及び / 又は、アミノ酸配列の配列番号 241 又はその任意の変異体から選択された軽鎖可変領域を含む、ヒトクローディン 18 . 2 に結合する抗体又はその抗原結合部分に関する。

【0059】

一態様において、本開示は、アミノ酸配列の配列番号 161 又はその任意の変異体から選択された重鎖可変領域、及び / 又は、アミノ酸配列の配列番号 256 又はその任意の変異体から選択された軽鎖可変領域を含む、ヒトクローディン 18 . 2 に結合する抗体又はその抗原結合部分に関する。

【0060】

一態様において、本開示は、アミノ酸配列の配列番号 166 又はその任意の変異体から選

10

20

30

40

50

択された重鎖可変領域、及び／又は、アミノ酸配列の配列番号 236 又はその任意の変異体から選択された軽鎖可変領域を含む、ヒトクローディング 18.2 に結合する抗体又はその抗原結合部分に関する。

【0061】

一態様において、本開示は、アミノ酸配列の配列番号 166 又はその任意の変異体から選択された重鎖可変領域、及び／又は、アミノ酸配列の配列番号 241 又はその任意の変異体から選択された軽鎖可変領域を含む、ヒトクローディング 18.2 に結合する抗体又はその抗原結合部分に関する。

【0062】

一態様において、本開示は、アミノ酸配列の配列番号 166 又はその任意の変異体から選択された重鎖可変領域、及び／又は、アミノ酸配列の配列番号 256 又はその任意の変異体から選択された軽鎖可変領域を含む、ヒトクローディング 18.2 に結合する抗体又はその抗原結合部分に関する。

10

【0063】

一態様において、本開示は、アミノ酸配列の配列番号 171 又はその任意の変異体から選択された重鎖可変領域、及び／又は、アミノ酸配列の配列番号 251 又はその任意の変異体から選択された軽鎖可変領域を含む、ヒトクローディング 18.2 に結合する抗体又はその抗原結合部分に関する。

【0064】

一態様において、本開示は、アミノ酸配列の配列番号 171 又はその任意の変異体から選択された重鎖可変領域、及び／又は、アミノ酸配列の配列番号 256 又はその任意の変異体から選択された軽鎖可変領域を含む、ヒトクローディング 18.2 に結合する抗体又はその抗原結合部分に関する。

20

【0065】

一態様において、本開示は、アミノ酸配列の配列番号 176 又はその任意の変異体から選択された重鎖可変領域、及び／又は、アミノ酸配列の配列番号 251 又はその任意の変異体から選択された軽鎖可変領域を含む、ヒトクローディング 18.2 に結合する抗体又はその抗原結合部分に関する。

【0066】

一態様において、本開示は、アミノ酸配列の配列番号 176 又はその任意の変異体から選択された重鎖可変領域、及び／又は、アミノ酸配列の配列番号 256 又はその任意の変異体から選択された軽鎖可変領域を含む、ヒトクローディング 18.2 に結合する抗体又はその抗原結合部分に関する。

30

【0067】

一態様において、本開示は、アミノ酸配列の配列番号 181 又はその任意の変異体から選択された重鎖可変領域、及び／又は、アミノ酸配列の配列番号 251 又はその任意の変異体から選択された軽鎖可変領域を含む、ヒトクローディング 18.2 に結合する抗体又はその抗原結合部分に関する。

【0068】

一態様において、本開示は、アミノ酸配列の配列番号 181 又はその任意の変異体から選択された重鎖可変領域、及び／又は、アミノ酸配列の配列番号 256 又はその任意の変異体から選択された軽鎖可変領域を含む、ヒトクローディング 18.2 に結合する抗体又はその抗原結合部分に関する。

40

【0069】

一態様において、本開示は、アミノ酸配列の配列番号 186 又はその任意の変異体から選択された重鎖可変領域、及び／又は、アミノ酸配列の配列番号 251 又はその任意の変異体から選択された軽鎖可変領域を含む、ヒトクローディング 18.2 に結合する抗体又はその抗原結合部分に関する。

【0070】

一態様において、本開示は、アミノ酸配列の配列番号 186 又はその任意の変異体から選

50

択された重鎖可変領域、及び／又は、アミノ酸配列の配列番号 256 又はその任意の変異体から選択された軽鎖可変領域を含む、ヒトクローディング 18.2 に結合する抗体又はその抗原結合部分に関する。

【0071】

一態様において、本開示は、アミノ酸配列の配列番号 191 又はその任意の変異体から選択された重鎖可変領域、及び／又は、アミノ酸配列の配列番号 251 又はその任意の変異体から選択された軽鎖可変領域を含む、ヒトクローディング 18.2 に結合する抗体又はその抗原結合部分に関する。

【0072】

一態様において、本開示は、アミノ酸配列の配列番号 191 又はその任意の変異体から選択された重鎖可変領域、及び／又は、アミノ酸配列の配列番号 256 又はその任意の変異体から選択された軽鎖可変領域を含む、ヒトクローディング 18.2 に結合する抗体又はその抗原結合部分に関する。

10

【0073】

一態様において、本開示は、アミノ酸配列の配列番号 196 又はその任意の変異体から選択された重鎖可変領域、及び／又は、アミノ酸配列の配列番号 251 又はその任意の変異体から選択された軽鎖可変領域を含む、ヒトクローディング 18.2 に結合する抗体又はその抗原結合部分に関する。

【0074】

一態様において、本開示は、アミノ酸配列の配列番号 196 又はその任意の変異体から選択された重鎖可変領域、及び／又は、アミノ酸配列の配列番号 256 又はその任意の変異体から選択された軽鎖可変領域を含む、ヒトクローディング 18.2 に結合する抗体又はその抗原結合部分に関する。

20

【0075】

一態様において、本開示は、アミノ酸配列の配列番号 201 又はその任意の変異体から選択された重鎖可変領域、及び／又は、アミノ酸配列の配列番号 251 又はその任意の変異体から選択された軽鎖可変領域を含む、ヒトクローディング 18.2 に結合する抗体又はその抗原結合部分に関する。

【0076】

一態様において、本開示は、アミノ酸配列の配列番号 201 又はその任意の変異体から選択された重鎖可変領域、及び／又は、アミノ酸配列の配列番号 256 又はその任意の変異体から選択された軽鎖可変領域を含む、ヒトクローディング 18.2 に結合する抗体又はその抗原結合部分に関する。

30

【0077】

一態様において、本開示は、アミノ酸配列の配列番号 206 又はその任意の変異体から選択された重鎖可変領域、及び／又は、アミノ酸配列の配列番号 261 又はその任意の変異体から選択された軽鎖可変領域を含む、ヒトクローディング 18.2 に結合する抗体又はその抗原結合部分に関する。

【0078】

一態様において、本開示は、アミノ酸配列の配列番号 206 又はその任意の変異体から選択された重鎖可変領域、及び／又は、アミノ酸配列の配列番号 266 又はその任意の変異体から選択された軽鎖可変領域を含む、ヒトクローディング 18.2 に結合する抗体又はその抗原結合部分に関する。

40

【0079】

一態様において、本開示は、アミノ酸配列の配列番号 211 又はその任意の変異体から選択された重鎖可変領域、及び／又は、アミノ酸配列の配列番号 261 又はその任意の変異体から選択された軽鎖可変領域を含む、ヒトクローディング 18.2 に結合する抗体又はその抗原結合部分に関する。

【0080】

一態様において、本開示は、アミノ酸配列の配列番号 211 又はその任意の変異体から選

50

択された重鎖可変領域、及び／又は、アミノ酸配列の配列番号 2 6 6 又はその任意の変異体から選択された軽鎖可変領域を含む、ヒトクローディング 1 8 . 2 に結合する抗体又はその抗原結合部分に関する。

【 0 0 8 1 】

一態様において、本開示は、アミノ酸配列の配列番号 2 1 6 又はその任意の変異体から選択された重鎖可変領域、及び／又は、アミノ酸配列の配列番号 2 6 1 又はその任意の変異体から選択された軽鎖可変領域を含む、ヒトクローディング 1 8 . 2 に結合する抗体又はその抗原結合部分に関する。

【 0 0 8 2 】

一態様において、本開示は、アミノ酸配列の配列番号 2 1 6 又はその任意の変異体から選択された重鎖可変領域、及び／又は、アミノ酸配列の配列番号 2 6 6 又はその任意の変異体から選択された軽鎖可変領域を含む、ヒトクローディング 1 8 . 2 に結合する抗体又はその抗原結合部分に関する。

10

【 0 0 8 3 】

一態様において、本開示は、アミノ酸配列の配列番号 2 2 1 又はその任意の変異体から選択された重鎖可変領域、及び／又は、アミノ酸配列の配列番号 2 6 1 又はその任意の変異体から選択された軽鎖可変領域を含む、ヒトクローディング 1 8 . 2 に結合する抗体又はその抗原結合部分に関する。

【 0 0 8 4 】

一態様において、本開示は、アミノ酸配列の配列番号 2 2 1 又はその任意の変異体から選択された重鎖可変領域、及び／又は、アミノ酸配列の配列番号 2 6 6 又はその任意の変異体から選択された軽鎖可変領域を含む、ヒトクローディング 1 8 . 2 に結合する抗体又はその抗原結合部分に関する。

20

【 0 0 8 5 】

一態様において、本開示は、アミノ酸配列の配列番号 2 2 6 又はその任意の変異体から選択された重鎖可変領域、及び／又は、アミノ酸配列の配列番号 2 6 1 又はその任意の変異体から選択された軽鎖可変領域を含む、ヒトクローディング 1 8 . 2 に結合する抗体又はその抗原結合部分に関する。

【 0 0 8 6 】

一態様において、本開示は、アミノ酸配列の配列番号 2 2 6 又はその任意の変異体から選択された重鎖可変領域、及び／又は、アミノ酸配列の配列番号 2 6 6 又はその任意の変異体から選択された軽鎖可変領域を含む、ヒトクローディング 1 8 . 2 に結合する抗体又はその抗原結合部分に関する。

30

【 0 0 8 7 】

一態様において、本開示は、アミノ酸配列の配列番号 2 3 1 又はその任意の変異体から選択された重鎖可変領域、及び／又は、アミノ酸配列の配列番号 2 6 1 又はその任意の変異体から選択された軽鎖可変領域を含む、ヒトクローディング 1 8 . 2 に結合する抗体又はその抗原結合部分に関する。

【 0 0 8 8 】

一態様において、本開示は、アミノ酸配列の配列番号 2 3 1 又はその任意の変異体から選択された重鎖可変領域、及び／又は、アミノ酸配列の配列番号 2 6 6 又はその任意の変異体から選択された軽鎖可変領域を含む、ヒトクローディング 1 8 . 2 に結合する抗体又はその抗原結合部分に関する。

40

【 0 0 8 9 】

1 つの具体的な実施形態において、本開示は、アミノ酸配列の配列番号 1 5 2 - 1 5 4、1 5 7 - 1 5 9、1 6 2 - 1 6 4、1 6 7 - 1 6 9、1 7 2 - 1 7 4、1 7 7 - 1 7 9、1 8 2 - 1 8 4、1 8 7 - 1 8 9、1 9 2 - 1 9 4、1 9 7 - 1 9 9、2 0 2 - 2 0 4、2 0 7 - 2 0 9、2 1 2 - 2 1 4、2 1 7 - 2 1 9、2 2 2 - 2 2 4、2 2 7 - 2 2 9、2 3 2 - 2 3 4 又はそれらの任意の変異体から選択された重鎖 C D R、及び／又は、アミノ酸配列の配列番号 2 3 7 - 2 3 9、2 4 2 - 2 4 4、2 4 7 - 2 4 9、2 5 2 - 2 5 4

50

、 2 5 7 - 2 5 9、 2 6 2 - 2 6 4、 2 6 7 - 2 6 9 又はそれらの任意の変異体から選択された軽鎖 C D R を含む、ヒトクローデイン 1 8 . 2 に結合する抗体又はその抗原結合部分を提供する。

【 0 0 9 0 】

一態様に係るヒトクローデイン 1 8 . 2 に結合する抗体又はその抗原結合部分は、(1) それぞれ配列番号 1 5 2 - 1 5 4 を含む重鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 配列、及び / 又はそれぞれ配列番号 2 3 7 - 2 3 9 を含む軽鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 配列、(2) それぞれ配列番号 1 5 2 - 1 5 4 を含む重鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 配列、及び / 又はそれぞれ配列番号 2 4 2 - 2 4 4 を含む軽鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 配列、(3) それぞれ配列番号 1 5 2 - 1 5 4 を含む重鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 配列、及び / 又はそれぞれ配列番号 2 4 7 - 2 4 9 を含む軽鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 配列、(4) それぞれ配列番号 1 5 7 - 1 5 9 を含む重鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 配列、及び / 又はそれぞれ配列番号 2 3 7 - 2 3 9 を含む軽鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 配列、(5) それぞれ配列番号 1 5 7 - 1 5 9 を含む重鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 配列、及び / 又はそれぞれ配列番号 2 4 2 - 2 4 4 を含む軽鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 配列、(6) それぞれ配列番号 1 5 7 - 1 5 9 を含む重鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 配列、及び / 又はそれぞれ配列番号 2 4 7 - 2 4 9 を含む軽鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 配列、(7) それぞれ配列番号 1 6 2 - 1 6 4 を含む重鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 配列、及び / 又はそれぞれ配列番号 2 3 7 - 2 3 9 を含む軽鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 配列、(8) それぞれ配列番号 1 6 2 - 1 6 4 を含む重鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 配列、及び / 又はそれぞれ配列番号 2 4 2 - 2 4 4 を含む軽鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 配列、(9) それぞれ配列番号 1 6 2 - 1 6 4 を含む重鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 配列、及び / 又はそれぞれ配列番号 2 4 7 - 2 4 9 を含む軽鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 配列、(1 0) それぞれ配列番号 1 6 7 - 1 6 9 を含む重鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 配列、及び / 又はそれぞれ配列番号 2 3 7 - 2 3 9 を含む軽鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 配列、(1 1) それぞれ配列番号 1 6 7 - 1 6 9 を含む重鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 配列、及び / 又はそれぞれ配列番号 2 4 2 - 2 4 4 を含む軽鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 配列、(1 2) それぞれ配列番号 1 6 7 - 1 6 9 を含む重鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 配列、及び / 又はそれぞれ配列番号 2 4 7 - 2 4 9 を含む軽鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 配列、(1 3) それぞれ配列番号 1 7 2 - 1 7 4 を含む重鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 配列、及び / 又はそれぞれ配列番号 2 5 2 - 2 5 4 を含む軽鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 配列、(1 4) それぞれ配列番号 1 7 2 - 1 7 4 を含む重鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 配列、及び / 又はそれぞれ配列番号 2 5 7 - 2 5 9 を含む軽鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 配列、(1 5) それぞれ配列番号 1 7 7 - 1 7 9 を含む重鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 配列、及び / 又はそれぞれ配列番号 2 5 2 - 2 5 4 を含む軽鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 配列、(1 6) それぞれ配列番号 1 7 7 - 1 7 9 を含む重鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 配列、及び / 又はそれぞれ配列番号 2 5 7 - 2 5 9 を含む軽鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 配列、(1 7) それぞれ配列番号 1 8 2 - 1 8 4 を含む重鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 配列、及び / 又はそれぞれ配列番号 2 5 2 - 2 5 4 を含む軽鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 配列、(1 8) それぞれ配列番号 1 8 2 - 1 8 4 を含む重鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 配列、及び / 又はそれぞれ配列番号 2 5 7 - 2 5 9 を含む軽鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 配列、(1 9) それぞれ配列番号 1 8 7 - 1 8 9 を含む重鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 配列、及び / 又はそれぞれ配列番号 2 5 2 - 2 5 4 を含む軽鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 配列、(2 0) それぞれ配列番号 1 8 7 - 1 8 9 を含む重鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 配列、及び / 又はそれぞれ配列番号 2 5 7 - 2 5 9 を含む軽鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 配列、(2 1) それぞれ配列番号 1 9 2 - 1 9 4 を含む重鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 配列、及び / 又はそれぞれ配列番号 2 5 2 - 2 5 4 を含む軽鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 配列、(2 2) それぞれ配列番号 1 9 2 - 1 9 4 を含む重鎖 C D R

1、CDR2及びCDR3配列、及び/又はそれぞれ配列番号257-259を含む軽鎖 CDR1、CDR2及びCDR3配列、(23)それぞれ配列番号197-199を含む 重鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列、及び/又はそれぞれ配列番号252-254 を含む軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列、(24)それぞれ配列番号197-1 99を含む重鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列、及び/又はそれぞれ配列番号25 7-259を含む軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列、(25)それぞれ配列番号 202-204を含む重鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列、及び/又はそれぞれ配 列番号252-254を含む軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列、(26)それぞ れ配列番号202-204を含む重鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列、及び/又は それぞれ配列番号257-259を含む軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列、(2 7)それぞれ配列番号207-209を含む重鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列、 及び/又はそれぞれ配列番号262-264を含む軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3 配列、(28)それぞれ配列番号207-209を含む重鎖CDR1、CDR2及びCD R3配列、及び/又はそれぞれ配列番号267-269を含む軽鎖CDR1、CDR2及 びCDR3配列、(29)それぞれ配列番号212-214を含む重鎖CDR1、CDR 2及びCDR3配列、及び/又はそれぞれ配列番号262-264を含む軽鎖CDR1、 CDR2及びCDR3配列、(30)それぞれ配列番号212-214を含む重鎖CDR 1、CDR2及びCDR3配列、及び/又はそれぞれ配列番号267-269を含む軽鎖 CDR1、CDR2及びCDR3配列、(31)それぞれ配列番号217-219を含む 重鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列、及び/又はそれぞれ配列番号262-264 20 を含む軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列、(32)それぞれ配列番号217-2 19を含む重鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列、及び/又はそれぞれ配列番号26 7-269を含む軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列、(33)それぞれ配列番号 222-224を含む重鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列、及び/又はそれぞれ配 列番号262-264を含む軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列、(34)それぞ れ配列番号222-224を含む重鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列、及び/又は それぞれ配列番号267-269を含む軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列、(3 5)それぞれ配列番号227-229を含む重鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列、 及び/又はそれぞれ配列番号262-264を含む軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3 30 配列、(36)それぞれ配列番号227-229を含む重鎖CDR1、CDR2及びCD R3配列、及び/又はそれぞれ配列番号267-269を含む軽鎖CDR1、CDR2及 びCDR3配列、(37)それぞれ配列番号232-234を含む重鎖CDR1、CDR 2及びCDR3配列、及び/又はそれぞれ配列番号262-264を含む軽鎖CDR1、 CDR2及びCDR3配列、(38)それぞれ配列番号232-234を含む重鎖CDR 1、CDR2及びCDR3配列、及び/又はそれぞれ配列番号267-269を含む軽鎖 CDR1、CDR2及びCDR3配列という重鎖及び軽鎖のCDR組み合わせを含む。

【0091】

一態様に係るヒトクローニン18.2に結合する抗体又はその抗原結合部分は、上記い ずれかの態様に係る抗体又はその抗原結合部分に対して、少なくとも60%より高く、6 5%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、9 40 9%より高い配列同一性を有する。

【0092】

一態様に係る核酸分子は、上記いずれかの態様に係る抗体又はその抗原結合部分をコード する核酸分子、又はそれに対して少なくとも60%より高く、65%、70%、75%、 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%より高い配列同一性 を有する。

【0093】

一態様に係る担体は、上記いずれかの態様に係る核酸を含む。

【0094】

一態様に係る細胞は、上記いずれかの態様に係る担体を含む。

【 0 0 9 5 】

一態様に係る医薬組成物は、上記いずれかの態様に係る抗体又はその抗原結合部分又はそのコード核酸及び薬学的に許容される担体を含む。

【 0 0 9 6 】

一態様に係る癌を治療する方法は、治療有効量の上記いずれかの態様に係る抗体又はその抗原結合断片又は核酸分子又は担体又は細胞又は医薬組成物を上記哺乳動物に投与するステップを含む。

【 0 0 9 7 】

一態様に係る用途は、上記いずれかの態様に係る抗体又はその抗原結合断片又は核酸分子又は担体又は細胞又は医薬組成物の、哺乳動物の癌を治療するための薬物の調製における用途である。

【 0 0 9 8 】

上記いずれかの態様において、任意選択で、上記癌は胃癌であり、任意選択で、上記抗体は、A D C C又はC D C効果によって癌細胞を死滅させ、任意選択で、上記抗体は、その他の薬物、例えば、標識化接合体又は細胞毒性接合体と結合する。

【 0 0 9 9 】

一態様において、本開示は、抗体、その断片、相同体、その誘導體等、例えば、標識化接合体又は細胞毒性接合体、並びに抗体、特定の細胞型を死滅させる接合体などの使用についての使用説明書を含むキットをさらに含む。該説明書は、インビトロ、インビボ又はエキソビボでの抗体、接合体などを使用するための指示を含むことができる。抗体は、液体形態であってもよく、一般的に凍結乾燥された固体であってもよい。該キットは、適切な他の試薬、例えば、緩衝液、再構成溶液及び所定の用途に必要な他の成分を含むことができる。その用途のための、例えば、治療上の用途又は診断アッセイの実施のための説明書と共に、所定量の包装された試薬の組み合わせが検討される。抗体が標識され、例えば酵素で標識される場合、該キットは、基質と酵素に必要な補因子（例えば、検出可能な発色団又は発蛍光団を提供する基質前駆体）とを含むことができる。また、他の添加剤、例えば、安定剤、緩衝液（例えば、ブロッキング用緩衝液又は溶解用緩衝液）などを含むこともできる。様々な試薬の相対量を変更して、試薬溶液の濃縮物を提供してもよく、それによって使用者に柔軟性、空間の節約、試薬の節約等がもたらされる。これらの試薬は、一般的に凍結乾燥された乾燥粉末として提供され、溶解時に適切な濃度を有する試薬溶液を提供する賦形剤を含む。

【 0 1 0 0 】

一態様に係る用途は、上記いずれかの態様に係る抗体又はその機能的断片又は核酸分子又は担体又は細胞又は医薬組成物又はキットの、細胞表面のクロードイン 1 8 . 2 の細胞内取り込みを媒介する試薬の調製における用途である。

【 0 1 0 1 】

本発明は、二重特異的抗クロードイン 1 8 . 2 抗体を含む多価抗体をさらに含み、この抗体は、該抗体に連結し、診断又は治療の機能を有するエフェクター分子、原子又は他の物質を有する。例えば、抗体は、該抗体に連結し、癌をインビボで診断又は治療するために使用される放射性診断標識、又は放射性細胞毒性原子若しくは金属、又は細胞毒性物質（例えば、リシン鎖）を有することができる。

【 0 1 0 2 】

また、本発明に係る抗体は、免疫測定法、精製方法、及び免疫グロブリン又はその断片を使用する他の方法において使用されてもよい。このような用途は、本分野において周知である。

【 0 1 0 3 】

したがって、本発明は、本発明に係る抗クロードイン 1 8 . 2 抗体又はその断片を含む組成物をさらに提供し、上記抗体は、薬学的に許容される担体、希釈剤又は賦形剤と組み合わせやすく、これは本分野において一般的な手法である。

【 0 1 0 4 】

10

20

30

40

50

本発明において使用される用語「医薬組成物」は、様々な調製物の製剤を指す。治療有効量の多価抗体を含む製剤は、滅菌液体溶液、液体懸濁液又は凍結乾燥形態であり、任意選択で安定剤又は賦形剤を含有する。

【0105】

本発明において使用される用語「癌」は、哺乳動物、特にヒトの生理的状态を指すか又は説明しており、その典型的な特徴は、細胞が無秩序に増殖することである。癌の例は、癌腫 (c a r c i n o m a)、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫及び白血病を含むが、これらに限定されない。

【0106】

本発明に係る抗体は、単独で投与される組成物として使用されてもよく、他の活性剤と併用されてもよい。

【0107】

なお、上記実施形態に係る治療薬は、適切な薬学的に許容される担体、賦形剤、及び製剤中に組み込まれて移行、送達、耐性などを改善する他の試薬とともに投与されることを理解されたい。多数の適切な製剤は、すべての医薬品化学者にとって周知の薬局方、特に B l a u g、S e y m o u r による第 87 章に見出すことができる。これらの製剤は、例えば、粉末、ペースト、軟膏、ゼリー剤、ワックス、オイル、脂質、脂質 (カチオン性又はアニオン性) 含有担体 (例えば、L i p o f e c t i n T M)、DNA 接合体、無水吸収性ペースト、水中油型及び油中水型エマルション、エマルションカーボワックス (異なる分子量のポリエチレングリコール)、半固体ゲル、及びカーボワックスを含む半固体混合物を含む。製剤中の有効成分が製剤によって不活性化されず、製剤が投与経路において生理学的に適合性及び忍容性を示すものである限り、上記いずれかの混合物は、いずれも本発明に係る治療及び治療方法に適用可能である。

【0108】

1つの実施形態において、上記抗体を治療薬として使用することができる。このような試薬は、一般的に、被験体の、異常なクローディン 18 . 2 の発現、活性及び / 又はシグナル伝達に関連する疾患又は病態を治療、緩和及び / 又は予防するために使用される。治療レジメンは、標準的な方法を用いて、例えば異常なクローディン 18 . 2 の発現、活性及び / 又はシグナル伝達に関連する疾患又は障害、例えば癌又は他の腫瘍性障害に罹患した (又はそれらを発症するリスクを有するか又はそれらが進行している) ヒト患者などの被験体を特定することによって、実施することができる。抗体製剤、好ましくはその標的抗原に対して高い特異性及び高い親和性を有する抗体製剤は、被験体に投与されると、標的との結合による作用を一般的に示す。抗体の投与によって、標的 (例えばクローディン 18 . 2) の発現、活性及び / 又はシグナル伝達機能を除去又は抑制又は阻止することができる。抗体の投与によって、標的 (例えばクローディン 18 . 2) とそれが天然に結合する内因性リガンドとの結合を除去又は抑制又は阻止することができる。例えば、抗体は標的に結合して、クローディン 18 . 2 の発現、活性及び / 又はシグナル伝達を調節、遮断、抑制、減少、阻害、中和するか、又は他の形で妨げる。いくつかの実施形態において、異常なクローディン 18 . 2 の発現に関連する疾患又は障害を治療するために、重鎖及び軽鎖の C D R を有する抗体を被験体に投与することができる。1つの実施形態において、異常なクローディン 18 . 2 の発現に関連する疾患又は障害は、癌であってもよい。

【0109】

非限定的な例として、異常なクローディン 18 . 2 の発現、活性及び / 又はシグナル伝達に関連した疾患又は障害は、血液癌及び / 又は固形腫瘍を含む。血液癌は、例えば、白血病、リンパ腫及び骨髄腫を含む。非限定的な例として、いくつかの形態の白血病は、急性リンパ性白血病 (A L L)、急性骨髄性白血病 (A M L)、慢性リンパ性白血病 (C L L)、慢性骨髄性白血病 (C M L)、骨髄増殖性疾患 / 腫瘍 (M P D S)、及び骨髄異形成症候群を含む。非限定的な例として、いくつかの形態のリンパ腫は、ホジキンリンパ腫、低悪性度及び侵襲性非ホジキンリンパ腫、バーキットリンパ腫、及び濾胞性リンパ腫 (小細胞型及び大細胞型) を含む。非限定的な例として、いくつかの形態の骨髄腫は、多発性

10

20

30

40

50

骨髓腫（MM）、巨細胞骨髓腫、重鎖骨髓腫、及び軽鎖又はBence-Jones 骨髓腫を含む。固形腫瘍は、例えば、乳房腫瘍、卵巣腫瘍、肺腫瘍、膵臓腫瘍、前立腺腫瘍、黒色腫、結腸直腸腫瘍、肺腫瘍、頭頸部腫瘍、膀胱腫瘍、食道腫瘍、肝臓腫瘍、及び腎臓腫瘍を含む。

【0110】

癌及び他の腫瘍性障害に関連する症状は、例えば、炎症、熱、全身倦怠感、熱、疼痛、しばしば局所炎症、食欲減退、体重減少、浮腫、頭痛、疲労、発疹、貧血、筋力低下、筋疲労、及び腹痛、下痢又は便秘などの腹部症状を含む。

【0111】

別の実施形態において、クローディン18.2を標的とする抗体は、クローディン18.2の局在化及び/又は定量に関連した、本分野で周知の方法により使用することができる（例えば、適切な生理学的試料中のクローディン18.2及び/又はクローディン18.2のレベルを測定するための使用、診断方法における使用、タンパク質のイメージングにおける使用など）。1つの特定の実施形態において、クローディン18.2又はその誘導体、断片、類似体若しくは相同体に対して特異的であり、抗体由来の抗原結合ドメインを含む抗体は、薬理学的に活性な化合物（以下、「治療薬」と呼ばれる）として使用される。

【0112】

別の実施形態において、免疫アフィニティー、クロマトグラフィー又は免疫沈降法などの標準的な方法によって、クローディン18.2に対して特異的な抗体を使用してクローディン18.2ポリペプチドを単離することができる。クローディン18.2タンパク質を標的とする抗体（又はその断片）を使用して、生物学的試料中のタンパク質を検出することができる。いくつかの実施形態において、例えば所定の治療レジメンの効果を判定するという目的で、臨床試験手順の一環として生物学的試料中のクローディン18.2を検出することができる。抗体を検出可能な物質と結合する（すなわち物理的に連結する）ことによって、検出を促進することができる。検出可能な物質の例は、様々な酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質、生物発光物質及び放射性物質を含む。適切な酵素の例は、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼ又はアセチルコリンエステラーゼを含み、適切な補欠分子族複合体の例は、ストレプトアビジン/ビオチン及びアビジン/ビオチンを含み、適切な蛍光物質の例は、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、塩化ダンシル又はフィコエリトリンを含み、発光物質の1つの例は、ルミノールを含み、生物発光物質の例は、ルシフェラーゼ、フルオレセイン及びイクオリンを含み、適切な放射性物質の例は、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 又は ^3H を含む。

【0113】

別の実施形態において、本開示に係る抗体は、試料中のクローディン18.2又はそのタンパク質断片の両方を検出するための試薬として使用することができる。いくつかの実施形態において、抗体は、検出可能な標識を含む。抗体は、ポリクローナル抗体であるか、又はより好ましくはモノクローナル抗体である。完全な抗体又はその断片（例えば、Fab、scFv、又はF(ab')₂）が使用される。抗体に関して用語「標識」は、検出可能な物質を該抗体と結合する（すなわち物理的に連結する）ことによる該抗体の直接的標識と、直接標識された別の試薬との反応による該抗体の間接的標識とを含むことを意図している。間接的標識の例は、蛍光標識された第2の抗体を用いて第1の抗体を検出することと、蛍光標識されたストレプトアビジンによって検出されるようにビオチンで抗体を末端標識することを含む。用語「生物学的試料」は、被験体から単離された組織、細胞及び生物学的液体、並びに被験体の体内に存在する組織、細胞及び液体を含むことを意図している。したがって、使用される用語「生物学的試料」は、血液、及び血清、血漿又はリンパ液を含む血液の画分又は成分を含む。換言すれば、上記実施形態の検出方法を用いて、生物学的試料中の分析物mRNA、タンパク質又はゲノムDNAをインビトロ及びインビボで検出することができる。例えば、分析物mRNAをインビトロで検出する技術は

、Northernハイブリダイゼーション及びインサイチュハイブリダイゼーションを含む。分析物タンパク質をインビトロで検出する技術は、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、Westernブロット、免疫沈降法及び免疫蛍光法を含む。分析物ゲノムDNAをインビトロで検出する技術は、Southernハイブリダイゼーションを含む。また、分析物タンパク質をインビボで検出する技術は、標識した抗分析物タンパク質抗体を被験体の体内に導入することを含む。例えば、放射性マーカーで抗体を標識し、次に標準的なイメージング法によって被験体の体内における該放射性マーカーの存在又は位置を検出することができる。

【0114】

本明細書に記載の抗体及びその誘導体、断片、類似体及び相同体を、投与に適した医薬組成物中に添加することができる。このような組成物の調製に関連する原理及び考慮事項、並びに成分の選択のガイダンスは、本分野において周知である。

【0115】

このような組成物は、一般的に、抗体及び薬学的に許容される担体を含む。抗体断片を使用するとき、標的タンパク質の結合ドメインに特異的に結合する最も小さい阻害性断片が好ましい。例えば、抗体の可変領域配列に基づいて、標的タンパク質配列に結合する能力を維持したペプチド分子を設計することができる。このようなペプチドは、化学的に合成されるか、及び/又は組換えDNA技術によって産生される（例えば、Marascoら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7889 - 7893 (1993)を参照）。

【0116】

本明細書において使用されるとき、用語「薬学的に許容される担体」は、薬物投与に適合する任意及びすべての溶媒、分散媒、コーティング、抗細菌剤及び抗真菌剤、等張剤及び吸収遅延剤などを含むことを意図している。適切な薬学的に許容される担体について、本分野では標準的な参考書であるRemington's Pharmaceutical Sciencesの最新版に述べられており、該書籍は、参照によって本明細書に組み込まれる。このような担体又は希釈剤の好ましい例は、水、生理食塩水、リンゲル液、グルコース溶液及び5%ヒト血清アルブミンを含むが、これらに限定されない。リポソーム、及び固定油などの非水性担体を使用することもできる。このような媒体及び試薬を薬学的活性物質において使用することは、本分野で周知である。任意の従来の媒体又は試薬が抗体と不適合でない限り、組成物におけるその用途が考えられる。

【0117】

上記実施形態の医薬組成物は、その意図される投与経路に適合するように配合される。投与経路の例は、非経口投与、例えば静脈内投与、皮内投与、皮下投与、経口投与（例えば吸入）、経皮投与（例えば局所投与）、経粘膜投与及び直腸内投与を含む。非経口投与、皮内投与又は皮下投与に使用される溶液又は懸濁液は、水、生理食塩水、固定油、ポリエチレングリコール系、グリセリン、プロピレングリコール、又は他の合成溶媒などの注射用滅菌希釈剤と、ベンジルアルコール又はメチルパラベンなどの抗細菌剤と、アスコルビン酸又は亜硫酸水素ナトリウムなどの酸化防止剤と、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）などのキレート剤と、酢酸塩、クエン酸塩又はリン酸塩などの緩衝剤と、塩化ナトリウム又はデキストロースなどの浸透圧調節用試薬とを含むことができる。pHは、塩酸又は水酸化ナトリウムなどの酸又は塩基で調整することができる。非経口製剤は、アンプル、使い捨て注射器、又はガラスやプラスチックで作られた多数回投与バイアルに封入することができる。

【0118】

注射用途に適した医薬組成物は、滅菌水溶液（本明細書において水溶性である）又は分散液と、滅菌注射溶液又は分散液の即時調製用の滅菌粉末とを含む。静脈内投与について、適切な薬学的に許容される担体は、生理食塩水、静菌水、Cremophor E L T M（BASF社、Parsippany、N. J.）又はリン酸緩衝生理食塩水（PBS）を含む。すべての場合に、組成物は滅菌でなければならず、かつ容易に注射可能である程

10

20

30

40

50

度に流動性を有さなければならない。組成物は、製造及び保存条件下で安定でなければならない。かつ細菌及び真菌などの微生物の汚染作用を防止しなければならない。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール及び液体ポリエチレングリコールなど）を含有する溶媒又は分散媒、及びそれらの適切な混合物であってよい。例えば、レシチンなどのコーティングを使用することにより、分散液の場合に必要な粒径を維持することにより、また、界面活性剤を使用することにより、適正な流動性を保つことができる。微生物の作用に対する防止は、様々な抗細菌剤及び抗真菌剤、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサルによって実現することができる。多くの場合に、組成物中に等張剤、例えば糖類、多価アルコール（例えば、マンニトール、ソルビトール）、塩化ナトリウムを含むことが好ましい。上記組成物中に、吸収を遅延させる試薬、例えば、モノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンを含有することによって、注射用組成物の持続的吸収を実現することができる。

10

【0119】

必要に応じて、必要量の抗体を、上記に列挙した成分の1つ又は組み合わせ（必要に応じて）を有する適切な溶媒に添加した後、濾過滅菌を行うことにより、滅菌注射溶液を調製することができる。一般的に、塩基性分散媒と上記に列挙したものから選ばれた他の必要な成分とを含む滅菌担体に抗体を添加することにより、分散液を調製する。滅菌注射溶液の調製用の滅菌粉末の場合、調製方法は、有効成分及び任意の更なる所望の成分を含む粉末が得られる真空乾燥及び凍結乾燥であり、それらの成分は上記成分の滅菌濾過溶液由来である。

20

【0120】

吸入投与について、二酸化炭素などの気体などの適切な推進剤を含む加圧容器、ディスペンサー又は噴霧器からエアロゾルスプレーの形で化合物を投与する。

【0121】

経粘膜的又は経皮的手段によって全身投与を行うこともできる。経粘膜投与又は経皮投与については、製剤中に、浸透すべきバリアに適した浸透剤を使用する。このような浸透剤は、本分野において周知であり、例えば、経粘膜投与のための洗浄剤、胆汁酸塩及びフシジン酸誘導体を含む。経粘膜投与は、鼻スプレー又は坐剤を使用することによって行うことができる。経皮投与については、1つ以上の上記抗体を本分野で周知の膏薬、軟膏、ゲル又はクリームに配合することができる。

30

【0122】

さらに、直腸投与のために、化合物を坐剤（例えばココアバター又は他のグリセリドなど、従来の坐剤基剤を有するもの）又は停留性浣腸剤の形で調製することができる。

【0123】

1つの実施形態において、上記抗体は、インプラント及びマイクロカプセル化送達システムを含む持続/制御放出製剤などの、身体からの速やかな排出を防ぐ担体を用いて調製することができる。エチレン-酢酸ビニル、ポリ酸無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル及びポリ乳酸などの生分解性、生体適合性ポリマーを使用することができる。このような製剤を調製する方法は、当業者にとって自明である。

【0124】

投与を容易にし、用量を均一にするために、非経口組成物を単位剤形として調製することが特に有利である。本明細書において使用されるとき、単位剤形は、治療される被験体に用いられ、単位用量として適した物理的に別個の単位を指し、各単位は、必要な医薬担体とともに所望の治療効果を達成するように計算された所定量の1つ以上の上記抗体を含むものである。上記実施形態の単位剤形の仕様は、抗体の固有の特性及び達成されるべき具体的な治療効果と、個体を治療するためのこのような抗体を配合する技術分野に固有の制限とによって決定され、且つこれらに直接依存する。

40

【0125】

上記医薬組成物は、投与のための説明書とともに容器、パック又はディスペンサーに入れることができる。

50

【 0 1 2 6 】

本明細書に記載の製剤は、治療される具体的な疾患に応じて複数の上記抗体、好ましくは相補的活性を有するが互いに悪影響を及ぼさないものを含んでもよい。代替的に又はそれに加えて、組成物は、細胞毒性剤、サイトカイン、化学治療薬又は増殖阻害剤などの、その機能を高める試薬を含むことができる。このような分子は、意図する目的に対して有効な量で適切に組み合わせて存在する。例えば、キット内で共存することも、使用中に共存することもできる。

【 0 1 2 7 】

1つの実施形態において、1つ以上の上記抗体を併用療法において投与することができる。すなわち、治療薬（様々な形態の癌、自己免疫疾患及び炎症性疾患などの病理学的症状又は障害を治療するために使用される）などの他の試薬と併用して投与することができる。用語「併用」は、本明細書において、試薬をほぼ同じ時点で、同時に又は順次投与することを意味する。順次投与する場合、第2の化合物の投与を開始するとき、2つの化合物のうち第1の化合物が治療部位において依然として有効濃度で検出可能であることが好ましい。1つの場合において、「併用」はまた、本発明の抗体及び他の治療薬がキットに含まれることを意味する。

【 0 1 2 8 】

例えば、併用療法は、本明細書に記載の1つ以上の抗体と、1つ以上の追加の治療薬（例えば、下記に詳細に述べるような、1つ以上のサイトカイン及び増殖因子阻害剤、免疫抑制剤、抗炎症剤、代謝阻害剤、酵素阻害剤、及び/又は細胞毒性剤若しくは細胞増殖抑制剤）との同時配合及び/又は同時投与を含むことができる。このような併用療法は、投与される治療薬を低用量で有利に使用することができ、それにより単独療法に関連する様々な潜在的な毒性又は合併症が回避される。

【 0 1 2 9 】

明確かつ簡潔な説明の目的のために、本明細書では、同じ又は別個の実施形態の一部として特徴を説明しているが、本発明の範囲は、説明される特徴の全部又は一部を組み合わせたいいくつかの実施形態を含み得ることが理解されるであろう。

（実施例）

【 実施例 1 】

【 0 1 3 0 】

< 抗クロードイン 18 . 2 モノクローナル抗体の調製 >

B a l b / c マウスを免疫するとともにスクリーニングして、クロードイン 18 . 2 にのみ特異的に結合し、クロードイン 18 の異なるスプライセオソームであるクロードイン 18 . 1 に結合しないモノクローナル抗体を取得するために複数のポリシーが同時に適用される。具体的には以下のとおりである。

【 0 1 3 1 】

1) クロードイン 18 . 2 安定形質転換細胞株の構築

ヒトクロードイン 18 . 1 (U n i P r o t K B - P 5 6 8 5 6) の全長配列を含むプラスミド遺伝子クロードイン 18 . 1 - p u c 5 7 - A m p (蘇州鴻迅生物、S y n b i o T e c h) を合成した。該プラスミドをテンプレートとし、上流プライマー 5 ' - t t g g c a a a g a a t t g c t a g a t g t c c a c c a c c a c a t g c c - 3 ' 及び下流プライマー 5 ' - t g t t c g g g c c c t c c t c g a t t a c a c a t a g t c g t g c t t g g - 3 ' を使用して、ヒトクロードイン 18 . 1 の全長断片 (M e t 1 - V a l 2 6 1) を P C R で増幅した。増幅産物を、N E B u i l d e r H i F i D N A A s s e m b l y M a s t e r M i x (N E B , C a t : M 0 5 3 0 L) により酵素に連結した後、真核発現プラスミドシステムにクローニングした。同様に、ヒトクロードイン 18 . 2 (U n i P r o t K B - P 5 6 8 5 6 - 2) の全長配列を含むプラスミド遺伝子クロードイン 18 . 2 - p u c 5 7 - A m p (蘇州鴻迅生物、S y n b i o T e c h) を合成した。該プラスミドをテンプレートとし、上流プライマー 5 ' - t t g g c a a a g a a t t g c t a g a t g g c c g t g a c t g c c t g t c - 3 ' 及び下流プライ

10

20

30

40

50

マー 5' - t g t t c g g g c c c t c c t c g a t t a c a c a t a g t c g t g c t t g g - 3' を使用して、ヒトクローニン 18.2 の全長断片 (Met 1 - Val 261) を PCR で増幅した。増幅産物を、NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix (NEB、Cat: M0530L) により酵素に連結した後、真核発現プラスミドシステムにクローニングした。このプラスミドをそれぞれ NIH3T3 細胞と HEK293 細胞に電氣的に形質転換し、1 ~ 10 µg / mL の Puromycin (Gibco、Cat: A1113803) を使用して安定発現細胞株を段階的に加圧してスクリーニングした。

【0132】

得られた HEK293 - クローニン 18.1 及び HEK293 - クローニン 18.2 安定形質転換細胞株について、まず RT-PCR 方法で検証した。Trizol RNA 抽出キットを使用して陽性クローン細胞から全 RNA を抽出し、逆転写キット (SuperScript™ First-Strand Synthesis System、Cat: 18080051) を使用して、Oligo (dT) プライマーを使用して逆転写を行い、cDNA ライブラリを得た。クローニンの 2 つのスプライス断片であるクローニン 18.1 とクローニン 18.2 は、N 末端から 1 番目の細胞外領域 (Loop 1) までが異なるため、プライマー KNB14 (5' - t g t g c g c c a c c a t g g c c g t g - 3')、KNB15 (5' - t g g a a g g a t a a g a t t g t a c c - 3') を設計することにより、クローニン 18.1 とクローニン 18.2 の Loop 1 から C 末端までの領域 (504 bp) を増幅することができる。プライマー KNB16 (5' - t g g g t g c c a t t g g c c t c c t g - 3') を設計することにより、クローニン 18.2 の N 末端に特異的に相補的に結合し、クローニン 18.1 の N 末端領域に結合せず、クローニン 18.2 の N 末端から C 末端までの全長断片 (780 bp) のみを増幅して、クローニン 18.2 を発現する KATO III 細胞 (ATCC HTB-103) を陽性対照とした。結果を図 1 に示す。RT-PCR により、HEK293 安定形質転換細胞株がそれぞれクローニン 18.1 及びクローニン 18.2 を発現することが示されている。HEK293 - クローニン 18.2 安定形質転換細胞株及び対照 KATO III 細胞は、いずれもクローニン 18.2 の特異的な 780 bp の特徴的なバンドを増幅することができ、HEK293 - クローニン 18.1 は、504 bp の共通断片のみを増幅することができる。

【0133】

構築された安定形質転換細胞株 HEK293 - クローニン 18.2 細胞及び NIH3T3 - クローニン 18.2 細胞を消化して収集し、PBS で 2 回洗浄し、管あたり 1 : 200 で希釈された第 1 の抗体ウサギ抗クローニン 18.2 (Abcam、EPR19202、品番: ab222512) を 100 µL 加え、4 で 60 分間培養し、0.5 % BSA / PBS で余分な第 1 の抗体溶液を洗浄し、さらに 50 µL の第 2 の抗体ヤギ抗ウサギ IgG Fc - AF647 (Jackson ImmunoResearch、品番: 111-606-046) を加え、4 で 45 分間インキュベートし、その後 0.5 % BSA / PBS で余分な第 2 の抗体を洗浄し、最後に 100 µL の PBS 溶液で細胞を再懸濁させ、直ちにフローサイトメーターで検出した。結果を図 2、図 3 に示す。

【0134】

図 2 は、FACS 実験により、クローニン 18.2 の全長遺伝子をトランスフェクトした HEK293 - クローニン 18.2 安定形質転換細胞株を検出した結果を示している。図中、黒色点は、トランスフェクトされていない HEK293 細胞であり、灰色点は、HEK293 - クローニン 18.2 安定形質転換細胞株であり、HEK293 細胞は、クローニン 18.2 を発現させず、HEK293 - クローニン 18.2 安定形質転換細胞株は、細胞膜表面にクローニン 18.2 を高度に発現させている。

【0135】

図 3 は、FACS 実験により、クローニン 18.2 が NIH3T3 - クローニン 18.2 において高度に発現した安定形質転換細胞株を検出した結果を示している。図中、黒

色の線は、陰性対照であり、灰色の陰影は、3 T 3 - クローディン 1 8 . 2 安定形質転換細胞株である。NO . 3 2 - H は、クローディン 1 8 . 2 が高度に発現した 3 T 3 - クローディン 1 8 . 2 安定形質転換細胞株であり、NO . 1 8 - M は、クローディン 1 8 . 2 が中度に発現した 3 T 3 - クローディン 1 8 . 2 安定形質転換細胞株であり、NO . 6 - L は、クローディン 1 8 . 2 が低度に発現した 3 T 3 - クローディン 1 8 . 2 安定形質転換細胞株である。

【 0 1 3 6 】

増殖された陽性の安定形質転換細胞株を収集して凍結保存し、NIH 3 T 3 - クローディン 1 8 . 2 安定形質転換細胞株が動物の免疫に用いられる。

【 0 1 3 7 】

2) ハイブリドーマからの抗クローディン 1 8 . 2 モノクローナル抗体の調製
6 ~ 8 週間の雌性 B a l b / c マウスに対して、3 T 3 - クローディン 1 8 . 2 安定形質転換細胞又はクローディン 1 8 . 2 をコードするプラスミドでそれぞれ免疫を行い、又は交互に免疫を行った。細胞で免疫を行う場合、毎回 1×10^6 3 T 3 - クローディン 1 8 . 2 安定形質転換細胞を完全フロイントアジュバント又は不完全フロイントアジュバントと混合した後、大腿部と足蹠に注射し、2 週間後に異なる部位で再び免疫した。DNA で免疫を行う場合、20 μ g のプラスミドを 1 μ g の CpG と混合した後、遺伝子銃 (B i o r a d) を用いて 40 p s i でマウスの腹部に直接投与し、毎週 1 回免疫した。融合準備の 3 日前に、高発現の HEK 2 9 3 - クローディン 1 8 . 2 安定形質転換細胞株を 1×10^6 細胞 / 50 μ L / 匹とし、ショック免疫のために尾静脈注射した。3 日後、マウスを殺し、膝窩リンパ節、鼠径リンパ節及び腸骨リンパ節を収集し、DMEM で研磨して B 細胞に富む懸濁液を得、マウスの脾臓を取り出し、DMEM で研磨した後に遠心分離し、脾臓細胞懸濁液を得た。適量のリンパ節及び脾細胞の懸濁液と SP 2 / 0 を混合して、エレクトロフュージョン装置を用いて細胞融合を行った。

【 0 1 3 8 】

3) 抗クローディン 1 8 . 2 ファージ抗体ライブラリの構築
収集された一部のマウス脾臓と末梢リンパ節の細胞懸濁液に対して、Trizol RNA 抽出キットで全 RNA を抽出し、逆転写キット (Super Script First - Strand Synthesis System、品番 1 8 0 8 0 0 5 1) を用いて、軽鎖、重鎖の特異的プライマーを使用して逆転写を行い、それぞれ抗体の軽鎖、重鎖 cDNA ライブラリを得た。当該 cDNA をテンプレートとし、軽鎖、重鎖可変領域プライマー PCR で抗体の軽鎖、重鎖可変領域断片を増幅し、ヒト抗体軽鎖定常領域 C k a p p a 又はヒト I g G 1 重鎖定常領域 C H 1 を含むファージプラスミド担体に制限酵素クロニングし、それぞれキメラ軽鎖ライブラリと重鎖ライブラリを形成した。軽鎖ライブラリにおける抗体断片を B s p Q I と S f i I で二重酵素切断した後、重鎖ライブラリに連結し、糸状ファージ M 1 3 に基づくマウスキメラ F a b ファージ表示ライブラリを形成し、ライブラリサイズは 1.2×10^{10} 個であった。0.8 mL のファージ (力価が約 1×10^{13} / mL である) と 200 μ L の 5 % B S A / P B S を混合した後、 1×10^7 個の HEK 2 9 3 - クローディン 1 8 . 1 細胞を加え、1 時間氷浴し、1000 rpm で 10 分間遠心分離し、上清を収集し、上清と 1×10^6 個の HEK 2 9 3 - クローディン 1 8 . 2 細胞を混合し、1 時間氷浴し、1000 rpm で 3 分間遠心分離し、上清を捨て、1 % B S A / P B S を 1 mL 加え、5 ~ 10 回繰り返して洗浄し、100 mM の T E A (トリエチルアミン) 溶解細胞を 1 mL 加え、室温で 10 分間静置し、1 M の T r i s - H C l (p H 7 . 5) を 0.5 mL 加えて中和した後、対数増殖期にある T G 1 E . c o l i 細胞を 10 mL 感染し、37 °C で 30 分間静置した。分子生物学の従来のプロセスに従って、ファージを回収し、力価を検出し、次のスクリーニングを行った。

【 実施例 2 】

【 0 1 3 9 】

< 抗クローディン 1 8 . 2 特異的抗体のスクリーニング及び配列取得 >

HEK 2 9 3 - クローディン 1 8 . 1、HEK 2 9 3 - クローディン 1 8 . 2 及び HEK

293に対して、それぞれ5 μ M、0.5 μ M及び0 μ MのCell Tracker Green CMFDA Dye (Thermo、品番C2925)で指定されたように生細胞予備染色を行い、染料を洗浄した後、1:1:1で混合し、96ウェルプレート(2 x 10⁵細胞/ウェル)に加え、ハイブリドーマ上清又は細菌誘導上清と結合し、氷浴で1時間インキュベートした後、AlexaFluor 647で標識された第2の抗体抗mouse IgG Fc又は抗ヒトIgG F(ab)'₂ (Jackson ImmunoResearch)を加え、氷上で45分間インキュベートした。洗浄した後、PBS再懸濁細胞をウェルあたり100 μ L加え、フローサイトメーター(iQue Screener)を準備し、FL2チャンネルの蛍光強度によって、それぞれ3種類の異なる細胞群を特定した後、FL4チャンネルの被験抗体と各細胞群の結合状況を検出した。スクリーニングした抗体は、高い親和性でHEK293-クローディング18.2安定形質転換細胞に特異的に結合し、HEK293-クローディング18.1安定形質転換細胞及びHEK293細胞には結合しなかった。FACS検出により、クローディング18.2に結合できるがクローディング18.1に結合しないクローンをハイブリドーマ細胞から合計320個スクリーニングし、3回のpanningを経て、クローディング18.2に高い親和性で結合するがクローディング18.1に結合しないクローンをファージFabライブラリから62個スクリーニングした。

10

【0140】

ファージライブラリからスクリーニングした陽性クローンに対して、プラスミドを抽出して配列を決定し、全長IgG発現のために重鎖及び軽鎖定常領域担体に可変領域配列をクローニングした。ハイブリドーマから得られた陽性細胞において、TRNzolを1 mL加えて分裂分解し、グアニジンイソチオシアネート法で全RNAを抽出した。これをテンプレートとし、第一鎖cDNAを合成した後、第一鎖cDNAを後続のテンプレートとしてハイブリドーマ細胞に対応する可変領域DNA配列を増幅した。増幅産物の配列決定した後、候補ハイブリドーマの重鎖及び軽鎖可変領域配列を得た(以下のとおりである)。

20

【0141】

クローン8C11: 配列番号1-10

重鎖VH

< - - - - - FR1 - - - - - > CDR1 < - - - -
FR2 - - - - - > CDR2 < - - - - -
QVQLQQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTF TTFGINWVRQR
PEQGLEWIGWIFPGDGSIKYNEKFKGKATLT TTDKSSS
- - - - - FR3 - - - - - > CDR3 < - - - - FR4 - - - >
TAYMQISSLTSEDSAVYFCARFY YGNSFVSWGQG TLT VTS
A

30

核酸配列

CAGGTTTCAGCTG CAGCAGTCTGGAGCTGA AACTGGTAAAGC
CTGGGGGCTTTCAGTGAAGTTGT CCTGCAAGGCTTCTGGGCTA
CACATTCACAACTTTTGGTATAAACTGGGTGAGGCAGAGG
CCTGAACAGGGACTTGAATGGATTGGATT TTTTCTCTG
GAGATGGTAGTATTAAGTACAATGAGAAAGTTTCAAGGGCAA
GGCCACACTGACTACAGACAAATCCTCCAGTACAGCCCTAC
ATGCAGATCAGCAGTTT GACATCTGAGGACTCGGCTGTCT
ATTTCTGTGCAAGGTTCTACTATGGTA AACTCCTTTGT TTT
CTGGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

40

軽鎖

< - - - - - FR1 - - - - - > CDR1 < -
- - - - - FR2 - - - - - > CDR2 < - - - - -
DIVMTQSPSSLAVTAG EKVTMTCKSSQSLLNSGNQKNYLT
WYQQRPGQP PKLLLYWASTRESGV PDRFTGSGSGTDF

50

FR 3 - - - - - > CDR 3 < - - FR 4 - - - >
 A L T I T S V Q A E D L A V Y Y C Q N D Y T Y P F T F G S G T K L E I K

核酸配列

G A C A T T G T G A T G A C A C A G T C T C C A T C C T C C C T G G C T G T G A
 C T G C A G G A G A G A A G G T C A C T A T G A C C T G C A A G T C C A G T C A
 G A G T C T G T T A A A C A G T G G A A A T C A A A A G A A C T A C T T G A C C
 T G G T A C C A A C A G A G A C C A G G G C A G C C T C C T A A A C T T T T G C
 T C T A C T G G G C A T C C A C T A G G G A A T C T G G G G T C C C T G A T C G
 C T T C A C A G G C A G T G G A T C T G G A A C A G A T T T C G C T C T C A C C
 A T C A C C A G T G T G C A G G C T G A A G A C C T G G C A G T T T A T T A C T
 G T C A G A A T G A T T A T A C T T A T C C A T T C A C G T T C G G C T C G G G
 G A C A A A G T T G G A A A T A A A A

クローン 9 A 8 : 配列番号 1 1 - 2 0

重鎖

< - - - - - FR 1 - - - - - > CDR 1 < - - - -
 FR 2 - - - - - > CDR 2 < - - - - -
 Q V Q L Q Q S G R E V V R P G T S V K V S C K P S G Y A F T N Y L I D W V K Q R
 P G Q G L E W I G G I N P G S G D T V Y N E K F K A K A T L T A D K S S M
 - - - - - FR 3 - - - - - > CDR 3 < - - - FR 4 - - - >
 T A N M Q L S S L T S D D S A V Y F C A R R V R G N S F D S W G Q G T L V T V S
 A

核酸配列

C A G G T C C A G C T G C A G C A G T C T G G A C G T G A G G T G G T A A G G C
 C T G G G A C T T C A G T G A A G G T G T C C T G C A A G C C T T C T G G A T A
 C G C C T T C A C T A A T T A C T T G A T A G A C T G G G T A A A A C A G A G G
 C C T G G A C A G G G C C T T G A G T G G A T T G G A G G G A T T A A T C C T G
 G A A G T G G T G A C A C T G T G T A C A A T G A G A A G T T C A A G G C C A A
 G G C A A C A C T G A C T G C A G A C A A A T C C T C C A T G A C T G C C A A C
 A T G C A G C T C A G C A G C C T G A C A T C T G A T G A C T C T G C G G T C T
 A T T T C T G C G C A A G A A G G G T C C G T G G T A A T T C G T T T G A T T C
 C T G G G G C C A A G G G A C T C T G G T C A C T G T C T C T G C A

軽鎖

< - - - - - FR 1 - - - - - > CDR 1 < -
 - - - - FR 2 - - - - - > CDR 2 < - - - - -
 D I Q M T Q S P S S L T V T A G E K V T M S C K S S Q S L L N S G N Q R N Y L T
 W Y Q Q K T G Q P P K L L I Y W A S T R E S G V P D R F T G S G S G T D F
 FR 3 - - - - - > CDR 3 < - - FR 4 - - - >
 T L T I N S V Q A E D L A V Y Y C Q N N Y Y Y P L T F G A G T K L E I K

核酸配列

G A C A T T C A G A T G A C C C A G T C T C C A T C C T C C C T G A C T G T G A
 C A G C A G G A G A G A A G G T C A C T A T G A G C T G C A A G T C C A G T C A
 G A G T C T G T T A A A C A G T G G A A A T C A A A G G A A C T A C T T G A C C
 T G G T A C C A G C A G A A A A C A G G G C A G C C T C C T A A A C T G T T G A
 T C T A C T G G G C A T C C A C T A G G G A A T C T G G G G T C C C T G A T C G
 C T T C A C A G G C A G T G G A T C T G G A A C T G A T T T C A C T C T C A C C
 A T C A A C A G T G T G C A G G C T G A A G A C C T G G C A G T T T A T T A C T
 G T C A G A A T A A T T A T T A T T A T C C G C T C A C G T T C G G T G C T G G
 G A C C A A G C T G G A A A T A A A A

クローン 9 C 9 : 配列番号 2 1 - 3 0

重鎖

< - - - - - F R 1 - - - - - > C D R 1 < - - - -
- F R 2 - - - - > C D R 2 < - - - - -
E V Q L K E S G P G L V A P S Q S L S I T C T V S G F S L T N Y G V S W I R Q P
P G K G L E W L G A I W A G G N T N Y N S A L M S R L S I R K D N S K S Q
- - - - - F R 3 - - - - - > C D R 3 < - - - F R 4 - - - >
V F L K M N S L Q T D D T A M Y Y C A R V G Y G N S F A N W G Q G T L V T V S A

核酸配列

G A G G T C C A G C T G A A G G A G T C A G G A C C T G G C C T G G T G G C G C
C C T C A C A G A G C C T G T C C A T C A C T T G C A C T G T C T C T G G G T T
T T C A T T G A C C A A C T A T G G T G T T T C C T G G A T T C G C C A G C C T
C C A G G A A A G G G T C T G G A G T G G C T G G G A G C A A T A T G G G C T G
G T G G A A A C A C A A A T T A T A A T T C G G C T C T C A T G T C C A G A C T
G A G C A T C A G G A A A G A C A A T T C C A A G A G C C A A G T T T T C T T A
A A A A T G A A C A G T C T C C A A A C T G A T G A C A C A G C C A T G T A C T
A C T G T G C C A G A G T A G G G T A T G G T A A C T C G T T T G C T A A C T G
G G G C C A A G G G A C T C T G G T C A C T G T C T C T G C A G

軽鎖

< - - - - - F R 1 - - - - - > C D R 1 < -
- - - - F R 2 - - - - > C D R 2 < - - - - -
D I V M T Q S P S S L T V T A G E K V T L S C K S S Q T L L N S G N Q K N Y L T
W Y Q Q K P G Q P P K L L I Y W A S T R E S G V P D R F T G S G S G T D F
F R 3 - - - - - > C D R 3 < - - F R 4 - - - >
T L T I S S V Q A E D L A V Y Y C Q N N Y F Y P L T F G A G T R L E I K

核酸配列

G A C A T T G T G A T G A C A C A G T C T C C A T C C T C C C T G A C T G T G A
C A G C A G G A G A G A A G G T C A C T C T G A G C T G C A A G T C C A G T C A
G A C T C T G T T A A A C A G T G G A A A T C A A A A G A A C T A C T T G A C G
T G G T A C C A G C A G A A A C C A G G G C A G C C T C C T A A A C T G T T G A
T C T A C T G G G C A T C C A C T A G G G A A T C T G G G G T C C C T G A T C G
C T T C A C A G G C A G T G G A T C T G G A A C A G A T T T C A C T C T C A C C
A T C A G C A G C G T G C A G G C T G A A G A C C T G G C A G T T T A T T A C T
G T C A G A A T A A T T A T T T T A T C C G C T C A C G T T C G G T G C T G G
G A C C A G A C T G G A A A T A A A A

クローン9D12：配列番号31-40

重鎖

< - - - - - F R 1 - - - - - > C D R 1 < - - - -
- F R 2 - - - - > C D R 2 < - - - - -
E V Q L Q Q S G R E V V R P G T S V K V S C K P S G Y A F T N Y L I D W V K Q R
P G Q G L E W I G G I N P G S G D T V Y N E R F K D K A T L T A D K S S S
- - - - - F R 3 - - - - - > C D R 3 < - - - F R 4 - - - >
S A N M Q L S S L T S D D S A V Y F C A R R V R G N S F D S W G Q G T L V T V S
A

核酸配列

G A G G T C C A G C T G C A G C A G T C T G G A C G T G A G G T G G T A A G G C
C T G G G A C T T C A G T G A A G G T G T C C T G C A A G C C T T C T G G A T A
C G C C T T C A C T A A T T A C T T G A T A G A C T G G G T T A A A C A G A G G
C C T G G A C A G G G C C T T G A G T G G A T T G G A G G G A T T A A T C C T G
G A A G T G G T G A C A C T G T G T A C A A T G A G A G G T T C A A G G A C A A
G G C A A C A C T G A C T G C A G A C A A A T C C T C C A G C T C T G C C A A C
A T G C A G C T C A G C A G C C T G A C A T C T G A T G A C T C T G C G G T C T

A T T T C T G C G C A A G A A G G G T C C G T G G T A A T T C G T T T G A T T C
C T G G G G C C A A G G G A C T C T G G T C A C T G T C T C T G C A

軽鎖

< - - - - - F R 1 - - - - - > C D R 1 < -
- - - - F R 2 - - - - - > C D R 2 < - - - - -
D I V M T Q S P S S L T V T A G Q K V T M S C K S S Q S L L N S G N Q K N Y L T
W Y Q Q K P G Q P P K L L I Y W A S T R E S G V P D R F T G S G S G K D F
F R 3 - - - - - > C D R 3 < - - F R 4 - - - >
T L T I S S V Q A E D L A V F Y C Q N N Y F Y P L T F G A G T K L E L K

核酸配列

G A C A T T G T G A T G A C T C A G T C T C C A T C C T C C C T A A C T G T G A
C A G C A G G A C A G A A G G T C A C T A T G A G C T G C A A G T C C A G T C A
G A G T C T G T T A A A C A G T G G A A A T C A A A A G A A C T A C T T G A C C
T G G T A C C A G C A G A A A C C G G G G C A G C C T C C T A A A C T G T T G A
T C T A C T G G G C A T C C A C T A G G G A A T C T G G G G T C C C T G A T C G
C T T C A C A G G C A G T G G G T C T G G A A A A G A T T T C A C T C T C A C C
A T C A G C A G T G T G C A G G C T G A A G A C C T G G C A G T T T T T T A C T
G T C A G A A T A A T T A T T T T T A T C C G C T C A C G T T C G G T G C T G G
G A C C A A G C T G G A G C T G A A A

クローン 13A8 : 配列番号 41 - 50

重鎖

< - - - - - F R 1 - - - - - > C D R 1 < - - - -
- F R 2 - - - - - > C D R 2 < - - - - -
E V K L V E S G G G L V R P G G S L K V S C A A S G I T F S R Y A I S W V R Q T
P E K R L E W V A T I S S G D S Y T Y Y L D S V K G R F T I S R D D A K N
- - - - - F R 3 - - - - - > C D R 3 < - - - F R 4 - - - >
T L Y L Q M S S L R S E D T A M Y Y C G R L G Y G N A M D Y W G Q G T S V T V S
S

核酸配列

G A G G T G A A G C T G G T G G A G T C T G G G G G A G G C T T A G T G A G G C
C T G G A G G G T C C C T G A A A G T G T C C T G T G C A G C C T C T G G A A T
C A C T T T C A G T C G C T A T G C C A T A T C T T G G G T T C G C C A G A C T
C C G G A G A A G A G G C T G G A G T G G G T C G C A A C T A T T A G T A G C G
G T G A T A G T T A C A C C T A C T A T T T G G A C A G T G T G A A G G G G C G
A T T C A C C A T C T C C A G A G A C G A T G C C A A G A A C A C C C T G T A T
C T G C A A A T G A G C A G T C T G A G G T C T G A G G A C A C G G C C A T G T
A T T A C T G T G G A A G A C T G G G G T A T G G T A A T G C T A T G G A C T A
C T G G G G T C A A G G A A C C T C A G T C A C C G T C T C C T C A

軽鎖

< - - - - - F R 1 - - - - - > C D R 1 < -
- - - - F R 2 - - - - - > C D R 2 < - - - - -
N I M M T Q S P S S L T V T A G E K V T M S C K S S Q S L L N S G N Q K N Y L T
W Y Q Q K P G Q P P K L L I Y W A S T R E S G V P D R F T G S G S G T D F
F R 3 - - - - - > C D R 3 < - - F R 4 - - - >
T L T I S S V Q A E D L A V Y Y C Q N D Y S Y P L T F G A G T K L E I K

核酸配列

A A C A T T A T G A T G A C A C A G T C T C C A T C C T C C C T G A C T G T G A
C A G C A G G A G A G A A G G T C A C T A T G A G C T G C A A G T C C A G T C A
G A G T C T G T T A A A C A G T G G A A A T C A A A A G A A C T A C T T G A C C
T G G T A C C A G C A G A A A C C A G G G C A G C C T C C T A A A C T G T T G A

10

20

30

40

50

TCTACTGGGCATCCACTAGGGGAATCTGGGGGTCCCTGATCG
CTTCACAGGCAGTGGATCTGGAACAGATTTCACTCTCACCC
ATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACT
GTCAGAATGATTATAGTTATCCTCTCACGTTTCGGGTGCTGG
GACCAAGCTGGAAATCAAA

クローン14H11：配列番号51-60

重鎖

< - - - - - FR 1 - - - - - > CDR 1 < - - - -
- FR 2 - - - - > CDR 2 < - - - - -
EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAVSGFTINNNGMSWVRQT 10
PEKRLIEWVA TIIGGGSSSTYYPDSLKGRFTISRDNANK
- - - - - FR 3 - - - - - > CDR 3 < - - - FR 4 - - - >
NLYLQMSSSLRSED TALYYCVRL LYFGNSFAYWGQGT LVTVS
A

核酸配列

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGGCTTAGTGAAAGC
CTGGAGGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGTCTCTGGATT
CACTATCAATAAACTATGGCATGTCTTGGGTTCGCCAGACT
CCGGAGAGAGAGGCTGGAGTGGGTTCGCAACCATTTATTGGTG
GTGGTAGTTTCCACCTACTATCCTGACAGTTTGAAGGGGGCG 20
ATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACAACTGTAC
CTGCAAAATGAGCAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCTTGT
ATTACTGTGTAAGACTCTACTTTGGTAACCTCTTTGCTTA
CTGGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

軽鎖

< - - - - - FR 1 - - - - - > CDR 1 < -
- - - - FR 2 - - - - - > CDR 2 < - - - - -
DIVMTQSPSSLT VTAGEKVT VSC KSSQSLSNSGNQRNYLT
WYQQKPGQP PKLLIYWASTRES GVPD RFTGSGSGTDF
FR 3 - - - - - > CDR 3 < - - FR 4 - - - > 30
TLTISSVQAEDLAVYYC QNNYFYPLTFGAGTKLELK

核酸配列

GACATTGTGATGACTCAGTCTCCATCCTCTCTGACTGTGA
CAGCAGGAGAGAAAGGTCAGTGTGAGCTGCAAGTCCAGTCA
GAGTCTGTCAAACAGTGGAAATCAAAGGAACCTACTTGACC
TGGTACCAGCAGAAACAGGGGCAGCCTCCTAAACTGTTGA
TCTACTGGGCATCCACTAGGGGAATCTGGGGGTCCCTGATCG
CTTCACAGGCAGTGGATCTGGAACAGATTTCACTCTCACCC
ATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACT
GTCAGAATAAATTTATTTTATCCGCTCACGTTTCGGGTGCTGG 40
GACCAAGCTGGAGCTGAAA

クローン15A7：配列番号61-70

重鎖

< - - - - - FR 1 - - - - - > CDR 1 < - - - -
- FR 2 - - - - > CDR 2 < - - - - -
QVQLQQSGAELVKPGYSVKLSCKASGYTFNFGINWVRQR
PEKGLEWIGW IFPGDGTTKY NENFKGKATLT TDKSSS
- - - - - FR 3 - - - - - > CDR 3 < - - - FR 4 - - - >
TAYMQLSRLTSEDSAVYFCAR FYYGNSFVNWGQGT LVTVS
A

核酸配列

C A G G T T C A G C T G C A A C A G T C T G G A G C T G A A C T G G T C A A G C
 C T G G G T A T T C A G T G A A G T T G T C C T G C A A G G C T T C T G G C T A
 C A C C T T C A C A A A T T T T G G T A T A A A C T G G G T G A G G C A G A G G
 C C T G A A A A G G G A C T T G A G T G G A T T G G A T G G A T T T T T C C T G
 G A G A T G G C A C T A C T A A A T A C A A T G A G A A C T T C A A G G G T A A
 G G C C A C A C T G A C A A C A G A C A A A T C C T C C A G C A C A G C C T A C
 A T G C A G C T C A G C A G G C T G A C A T C T G A A G A C T C T G C T G T C T
 A T T T C T G T G C A A G G T T C T A C T A C G G T A A C T C C T T T G T T A A
 C T G G G G C C A A G G G A C T C T G G T C A C T G T C T C T G C A G

10

軽鎖

< - - - - - F R 1 - - - - - > C D R 1 < -
 - - - - F R 2 - - - - > C D R 2 < - - - - -
 D I V M T Q S P S S L T V T A G E K V T L S C K S S Q T L L N S G N Q K N Y L T
 W Y Q Q K P G Q P P K L L I H W A S T R E S G V P D R F T G S G S G T D F
 F R 3 - - - - - > C D R 3 < - - F R 4 - - - >
 T L T I S S V Q A E D L A V Y Y C Q N N Y F Y P L T F G A G T K L E I K

核酸配列

G A C A T T G T G A T G A C A C A G T C T C C A T C C T C C C T G A C T G T G A
 C A G C A G G A G A G A A A G G T C A C T C T G A G C T G C A A G T C C A G T C A
 G A C T C T G T T A A A C A G T G G A A A T C A A A A G A A C T A C T T G A C G
 T G G T A C C A G C A G A A A C C G G G G C A G C C T C C T A A A C T G T T G A
 T C C A C T G G G C A T C C A C T A G G G A A T C T G G G G T C C C T G A T C G
 C T T C A C A G G C A G T G G A T C T G G A A C A G A T T T C A C T C T C A C C
 A T C A G C A G T G T G C A G G C T G A A G A C C T G G C A G T T T A T T A C T
 G T C A G A A T A A T T A T T T T A T C C G C T C A C G T T C G G T G C T G G
 G A C C A A G C T G G A A A T C A A A

20

クローン15D11：配列番号71-80

重鎖

< - - - - - F R 1 - - - - - > C D R 1 < - - - -
 - F R 2 - - - - > C D R 2 < - - - - -
 Q V Q L Q Q S G P G L V A P S Q S L S I T C T V S G F S L T N Y G V S W I R Q P
 P G K G L E W L G A I W A G G N T N Y N S A L M S R L S I R K D N S K S Q
 - - - - - F R 3 - - - - - > C D R 3 < - - - F R 4 - - - >
 V F L K M N S L Q T D D T A M Y Y C A R V G Y G N S F A N W G Q G T L V T V S A

30

核酸配列

C A G G T C C A G C T G C A G C A G T C A G G A C C T G G C C T G G T G G C G C
 C C T C A C A G A G C C T G T C C A T C A C T T G C A C T G T C T C T G G G T T
 T T C A T T G A C C A A C T A T G G T G T T T C C T G G A T T C G C C A G C C T
 C C A G G A A A G G G T C T G G A G T G G C T G G G A G C A A T A T G G G C T G
 G T G G A A A C A C A A A T T A T A A T T C G G C T C T C A T G T C C A G A C T
 G A G C A T C A G G A A A G A C A A T T C C A A G A G C C A A G T T T T C T T A
 A A A A T G A A C A G T C T C C A A A C T G A T G A C A C A G C C A T G T A C T
 A C T G T G C C A G A G T A G G G T A T G G T A A C T C G T T T G C T A A C T G
 G G G C C A A G G G A C T C T G G T C A C T G T C T C T G C A

40

軽鎖

< - - - - - F R 1 - - - - - > C D R 1 < -
 - - - - F R 2 - - - - > C D R 2 < - - - - -
 D I V M T Q S P S S L T V T A G E K V T M S C K S S Q S L L N S G N L R N Y L T
 W Y Q Q K P G R P P K L L I Y W A S T R E S G V P D R F T G S G S G T D F

50

FR 3 - - - - - > CDR 3 < - - FR 4 - - - >
 TLTISSVQAEDLAVYYC QNNYFYPLTFGAGTKLELK

核酸配列

GACATTGTGATGACACAGTCTCCATCCTCCCTGACTGTGA
 CAGCAGGAGAGAAAGGTCACCTATGAGCTGCAAGTCCAGTCA
 GAGTCTGTATAAACAGTGGAAATCTAAGGAACCTACTTGACC
 TGGTACCAAGCAGAAACCAGGGCGGGCCTCCTAAACTGTGTA
 TCTACTGGGCATCCACTAGGGAAATCTGGGGTCCCTGATCG
 CTTACACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCC
 ATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACT 10
 GTCAGAAATAATTATTTTATCCGCTCACGTTTCGGTGCTGG
 GACCAAGCTGGAGCTGAAA

クローン15F9：配列番号81-90

重鎖

< - - - - - FR 1 - - - - - > CDR 1 < - - - -
 - FR 2 - - - - - > CDR 2 < - - - - -
 EIQLVQSGPELK KPGETVKISCKAS GYTFNTNYGINWVKQA
 PGKGLKWMG WINPNTGETTYAEEFKGRFALSWKTSAS
 - - - - - FR 3 - - - - - > CDR 3 < - - - FR 4 - - - >
 TAYLQINN LKNEDTATYFCAR LYYGNRFDYWGQGTTTLTVS 20
 S

核酸配列

GAGATCCAGTTGGTGCAGTCTGGACCTGAGCTGAAGAAAGC
 CTGGAGAGACAGTCAAGATCTCCTGCAAGGCTTCTTGGA
 TACCTTTACAAACTATGGAATAAACTGGGGTGAAGCAGGCT
 CCAGGAAAGGGTTTAAAGTGGATGGGCTGGATAAAACCCCA
 ACACTGGAGAAACAACATATGCTGAAGAGTTCAAGGGACG
 GTTTGCCCTCTCTTTGGAAACCTCTGCCAGCACTGCCCTAT
 TTGCAGATCAACAACCTCAAAAATGAGGACACGGCTACAT 30
 ATTTCTGTGCAAGACTCTACTATGGTAATCGATTTGACTA
 CTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

軽鎖

< - - - - - FR 1 - - - - - > CDR 1 < -
 - - - - FR 2 - - - - - > CDR 2 < - - - - -
 DIVMTQSPSSLTVTAG EKVTMSCK KSSQSLLNSGNQRNYLT
 WYQQKPGQPPKLLIY WASTRESGVDPDRFTGSGSGTDF
 FR 3 - - - - - > CDR 3 < - - FR 4 - - - >
 TLTISSVQAEDLAVYYC QNAYYYPLTFGAGTKLEIK

核酸配列

GACATTGTGATGACACAGTCTCCCTCCTCCCTGACTGTGA 40
 CAGCAGGAGAGAAAGGTCACCTATGAGCTGCAAGTCCAGTCA
 GAGTCTATTAAACAGTGGAAATCAAAGGAACCTATTTGACC
 TGGTACCAAGCAGAAAGCCAGGGCAGCCTCCTAAACTATTGA
 TCTACTGGGCATCCACTAGGGAAATCTGGGGTCCCTGATCG
 CTTACACAGGCAGTGGATCTGGAAACAGATTTCACTCTCACCC
 ATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACT
 GCCAGAAATGCTTATTATTTATCCGCTCACGTTTCGGTGCTGG
 GACCAAGCTGGAAATCAAA

クローン18A9：配列番号91-100

重鎖

< - - - - - F R 1 - - - - - > C D R 1 < - - - -
 - F R 2 - - - - > C D R 2 < - - - - -
 Q V Q L Q Q S G R E V V R P G T S V K V S C K P S G Y A F T N Y L I D W V K Q R
 P G Q G L E W I G G I N P G S G D T V Y N E K F K A K A T L T A D K S S M
 - - - - - F R 3 - - - - - > C D R 3 < - - - F R 4 - - - >
 T A N M Q L S S L T S D D S A V Y F C A R R V R G N S F D S W G Q G T L V T V S
 A

核酸配列

C A G G T G C A G C T G C A G C A G T C T G G A C G T G A G G T G G T A A G G C
 C T G G G A C T T C A G T G A A G G T G T C C T G C A A G C C T T C T G G A T A 10
 C G C C T T C A C T A A T T A C T T G A T A G A C T G G G T A A A A C A G A G G
 C C T G G A C A G G G C C T T G A G T G G A T T G G A G G G A T T A A T C C T G
 G A A G T G G T G A C A C T G T G T A C A A T G A G A A G T T C A A G G C C A A
 G G C A A C A C T G A C T G C A G A C A A A T C C T C C A T G A C T G C C A A C
 A T G C A G C T C A G C A G C C T G A C A T C T G A T G A C T C T G C G G T C T
 A T T T C T G C G C A A G A A G G G T C C G T G G T A A T T C G T T T G A T T C
 C T G G G G C C A A G G G A C T C T G G T C A C T G T C T C T G C A

軽鎖

< - - - - - F R 1 - - - - - > C D R 1 < -
 - - - - F R 2 - - - - > C D R 2 < - - - - - 20
 D I V M S Q S P S S L T V T A G E K V T M S C K S S Q S L L N S G N Q K N Y L T
 W Y Q Q K P G Q P P K L L I Y W A S T R E S G V P D R F T G S G S G K D F
 F R 3 - - - - - > C D R 3 < - - F R 4 - - - >
 T L T I S S V Q A E D L A L Y Y C Q N N Y F Y P L T F G A G T K L E L K

核酸配列

G A C A T T G T G A T G T C A C A G T C T C C A T C C T C C C T G A C T G T G A
 C A G C A G G A G A G A A G G T C A C T A T G A G C T G C A A G T C C A G T C A
 G A G T C T G T T A A A C A G T G G A A A T C A A A A G A A C T A C T T G A C C
 T G G T A C C A G C A G A A A C C A G G G C A G C C T C C T A A A T T G T T G A
 T C T A C T G G G C A T C C A C T A G G G A A T C T G G G G T C C C T G A T C G 30
 C T T C A C A G G C A G T G G A T C T G G A A A A G A T T T C A C T C T C A C C
 A T C A G C A G T G T G C A G G C T G A A G A C C T G G C A C T T T A T T A C T
 G T C A G A A T A A T T A T T T T A T C C G C T C A C G T T C G G T G C T G G
 G A C C A A G C T G G A G C T G A A A

クローン 18 G 5 : 配列番号 101 - 110

重鎖

< - - - - - F R 1 - - - - - > C D R 1 < - - - -
 - F R 2 - - - - > C D R 2 < - - - - -
 E V Q L Q Q S G R E V V R P G T S V K V S C K P S G Y A F T N Y L I D W V K Q R
 P G Q G L E W I G G I N P G S G D T V Y N E K F K A K A T L T A D K S S M 40
 - - - - - F R 3 - - - - - > C D R 3 < - - - F R 4 - - - >
 T T N M Q L S S L T S D D S A V Y F C A R R V R G N S F D S W G Q G T L V T V S
 A

核酸配列

G A G G T C C A G C T G C A G C A G T C T G G A C G T G A G G T G G T A A G G C
 C T G G G A C T T C A G T G A A G G T G T C C T G C A A G C C T T C T G G A T A
 C G C C T T C A C T A A T T A C T T G A T A G A C T G G G T A A A A C A G A G G
 C C T G G A C A G G G C C T T G A G T G G A T T G G A G G G A T T A A T C C T G
 G A A G T G G T G A C A C T G T G T A C A A T G A G A A G T T C A A G G C C A A
 G G C A A C A C T G A C T G C A G A C A A A T C C T C C A T G A C T A C C A A C 50

A T G C A G C T C A G C A G C C T G A C A T C T G A T G A C T C T G C G G T C T
A T T T C T G C G C A A G A A G G G T C C G T G G T A A T T C G T T T G A T T C
C T G G G G C C A A G G G A C T C T G G T C A C T G T C T C T G C A

軽鎖

< - - - - - F R 1 - - - - - > C D R 1 < -
- - - - F R 2 - - - - - > C D R 2 < - - - - -
D I V M T Q S P S S L T V R A G E K V T M T C K S S Q S L F N S G N Q R N Y L T
W Y Q Q K P G Q P P K L L L Y W A T A R E S G V P D R F T G S G S G T D F
F R 3 - - - - - > C D R 3 < - - F R 4 - - - >
T L S I S S V Q A E D L A V Y Y C Q N V Y F Y P L T F G A G T K L E I K

10

核酸配列

G A C A T T G T G A T G A C A C A G T C T C C A T C C T C C C T G A C T G T G A
G A G C A G G A G A G A A A G G T C A C T A T G A C C T G C A A G T C C A G T C A
G A G T C T G T T T A A C A G T G G A A A T C A A A G G A A C T A C T T G A C C
T G G T A C C A G C A G A A A C C A G G G C A G C C T C C T A A A C T T T T G C
T C T A C T G G G C A A C C G C T A G G G A A T C T G G G G T C C C T G A T C G
C T T C A C A G G C A G T G G T T C T G G A A C A G A T T T C A C T C T C T C C
A T C A G C A G T G T G C A G G C T G A A G A C C T G G C A G T T T A T T A C T
G T C A G A A T G T T T A T T T T A T C C G C T C A C G T T C G G T G C T G G
G A C C A A G C T G G A A A T A A A A

20

クローン 18 D 10 : 配列番号 111 - 120

重鎖 V H

< - - - - - F R 1 - - - - - > C D R 1 < - - - -
F R 2 - - - - - > C D R 2 < - - - - -
D V Q L Q E S G P G L V K P S Q S L S L T C T V T G Y S I T S N Y A W N W I R Q
F P G N K L E W M G Y I N Y S G N T N Y N P S L K S R I S I T R D T S K N
- - - - - F R 3 - - - - - > C D R 3 < - - - F R 4 - - - >
Q F F L Q L N S V T A E D T A T Y Y C A T S Y Y G N S F I Y W G Q G T L V T V S
A

30

核酸配列

G A T G T G C A G C T T C A G G A G T C G G G A C C T G G C C T G G T G A A A C
C T T C T C A G T C T C T G T C C C T C A C C T G C A C T G T C A C T G G C T A
C T C A A T C A C C A G T A A T T A T G C C T G G A A C T G G A T C C G A C A G
T T T C C A G G A A A C A A A C T A G A G T G G A T G G G C T A C A T A A A C T
A C A G T G G G A A C A C T A A C T A T A A C C C A T C T C T C A A A A G T C G
A A T C T C T A T C A C T C G A G A C A C A T C C A A G A A C C A G T T C T T C
C T G C A G T T G A A T T C T G T G A C T G C T G A G G A C A C A G C C A C A T
A T T A T T G T G C A A C C T C C T A T T A T G G T A A T T C C T T T A T T T A
C T G G G G C C A A G G G A C T C T G G T C A C T G T C T C T G C A

40

軽鎖

< - - - - - F R 1 - - - - - > C D R 1 < -
- - - - F R 2 - - - - - > C D R 2 < - - - - -
D I V M T Q S P S S L T V T A G E K V T M S C K S S Q S L L N S G N Q K N Y L T
W Y Q Q K P G Q P P K L L I Y W A S T R E S G V P D R F T G S G S G T D F
F R 3 - - - - - > C D R 3 < - - F R 4 - - - >
T L T I S S V Q A E D L A V Y Y C Q N A Y S F P W T F G G G T K L E I K

核酸配列

G A C A T T G T G A T G A C A C A G T C T C C A T C C T C C C T G A C T G T G A
C A G C A G G A G A G A A A G G T C A C T A T G A G C T G C A A G T C C A G T C A
G A G T C T G T T A A A C A G T G G A A A T C A A A A G A A C T A C T T G A C C

50

TGGTACCAGCAGAAACCAGGGGCAGCCTCCTAAACTGTTGA
TCTACTGGGCATCCACTAGGGAGTCTGGGGGTCCCTGATCG
CTTCACAGGCAGTGGATCTGGAACAGATTTCACTCTCACCC
ATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGGCAGTTTATTACT
GTCAGAAATGCTTATAGTTTTTCCGTGGACGTTTCGGGTGGAGG
CACCAAGCTGGAAATCAAA

クローン19B2：配列番号121-130

重鎖

< - - - - - FR1 - - - - - > CDR1 < - - - -
- FR2 - - - - > CDR2 < - - - - -
QVQLQQSGAELVKPGTSLVKLSCKASGYSTFTYGLNWVRQR
PKQGLEWIGWIFPGDGNVNYNEKFQGGQATLTSTDKSSS
- - - - - FR3 - - - - - > CDR3 < - - - FR4 - - - >
TAYMQLSRLTSEDSAVYFCARFYYGNSLNYWGQGGLVTVS
A

核酸配列

CAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGAGCTGAACCTGGTTAAAGC
CTGGGACTTTCAGTGAAGTTGTCTCTGCAAGGCTTCTGGGCTA
CTCCTTTCACAACTATGGTCTAAACTGGGGTGAGGCAGAGG
CCTAAACAGGGACTTTGAGTGGATTGGATTGATTTCCTCTG
GAGATGGTAATGTTAACTACAATGAGAAATTTTCAGGGGCCA
GGCCACACTGACTACAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTAC
ATGCAGCTCAGCAGGCTGACATCTGAGGACTCTGCTGTCT
ATTTCTGTGCAAGGTTTTTATTACGGTAACCTCCTTAAATTA
CTGGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

軽鎖

< - - - - - FR1 - - - - - > CDR1 < -
- - - - FR2 - - - - > CDR2 < - - - - -
DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNSGNLRNYLT
WYQQKPGRPPLKLLIYWASTRESGVDPDRFTGSGSGTDF
FR3 - - - - - > CDR3 < - - - FR4 - - - >
TLTISSSVQAEDLAVYYCQNNYFYPLTFGAGTKLEIK

核酸配列

GACATTGTGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGACTGTGA
CAGCAGGAGAGAAAGGTCACTATGAGCTGCAAGTCCAGTCA
GAGTCTGTTAAACAGTGGAAATCTAAGGAACCTACTTGACC
TGGTACCAGCAGAAACCAGGGCGGGCCTCCTAAACTGTTGA
TCTACTGGGCATCCACTAGGGGAATCTGGGGGTCCCTGATCG
CTTCACAGGCAGTGGATCTGGAACAGATTTCACTCTCACCC
ATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGGCAGTTTATTACT
GTCAGAAATAATTATTTTATATCCGCTCACGTTTCGGGTGCTGG
GACCAAGCTGGAAATCAAA

クローン25A5：配列番号131-140

重鎖

< - - - - - FR1 - - - - - > CDR1 < - - - -
- FR2 - - - - > CDR2 < - - - - -
EVQLKESGPGLVAPSQSLSTICTVSGFSLTNYGVSWIRQP
PGKGLEWLGAIWAGGNTNYNSALMSRLSIRKDNSKSKQ
- - - - - FR3 - - - - - > CDR3 < - - - FR4 - - - >
VFLKMNSLQTDDETAMYYCARVGYGNSFANWGQGGLVTVSA

核酸配列

G A G G T C C A G C T G A A G G A G T C A G G A C C T G G C C T G G T G G C G C
 C C T C A C A G A G C C T G T C C A T C A C T T G C A C T G T C T C T G G G T T
 T T C A T T G A C C A A C T A T G G T G T T T C C T G G A T T C G C C A G C C T
 C C A G G A A A G G G T C T G G A G T G G C T G G G A G C A A T A T G G G C T G
 G T G G A A A C A C A A A T T A T A A T T C G G C T C T C A T G T C C A G A C T
 G A G C A T C A G G A A A G A C A A T T C C A A G A G C C A A G T T T T C T T A
 A A A A T G A A C A G T C T C C A A A C T G A T G A C A C A G C C A T G T A C T
 A C T G T G C C A G A G T A G G G T A T G G T A A C T C G T T T G C T A A C T G
 G G G C C A A G G G A C T C T G G T C A C T G T C T C T G C A

10

軽鎖

< - - - - - F R 1 - - - - - > C D R 1 < -
 - - - - F R 2 - - - - > C D R 2 < - - - - -
 D I V M T Q S P S S L T V T A G E K V T M S C K S S Q S L L N S G N Q R N Y L T
 W Y Q Q K P G Q P P K L L I Y W A S T R E S G I P D R F I G S G S G T D F
 F R 3 - - - - - > C D R 3 < - - F R 4 - - - >
 T L T I S S V Q A E D V S V Y Y C Q N N Y I F P L T F G A G T K L E I K

核酸配列

G A C A T T G T G A T G A C A C A G T C T C C A T C C T C C C T G A C T G T G A
 C A G C A G G A G A G A A A G G T C A C T A T G A G C T G C A A G T C C A G T C A
 G A G T C T G T T A A A C A G T G G A A A T C A A A G G A A C T A C T T G A C C
 T G G T A C C A G C A G A A A C C A G G G C A G C C T C C T A A A C T G T T G A
 T C T A C T G G G C A T C C A C T A G G G A A T C T G G G A T C C C T G A T C G
 C T T C A T A G G C A G T G G A T C T G G A A C A G A T T T C A C T C T C A C C
 A T C A G C A G T G T G C A G G C T G A A G A C G T G T C A G T T T A T T A C T
 G T C A G A A T A A T T A T A T T T T C C T C T C A C G T T C G G T G C T G G
 G A C C A A G C T G G A A A T C A A A

20

クローン25F5：配列番号141-150

重鎖

< - - - - - F R 1 - - - - - > C D R 1 < - - - -
 - F R 2 - - - - > C D R 2 < - - - - -
 Q V Q L K Q S G A E L V K P G A S L K L S C K A S G Y T F T T Y G I N W V R Q R
 P E Q G L E W I G W I F P G D A T T M Y N E K F K G T A T L T A D K S S S
 - - - - - F R 3 - - - - - > C D R 3 < - - - F R 4 - - - >
 T A Y M Q L S G L T S E D S A V Y F C A R F Y Y G N S F V D W G Q G T L V T V S
 A

30

核酸配列

C A G G T C C A G C T G A A G C A G T C T G G A G C T G A A C T G G T C A A G C
 C T G G G G C T T C A C T C A A G T T G T C C T G C A A G G C T T C T G G C T A
 C A C C T T C A C A A C T T A T G G T A T A A A C T G G G T G A G G C A G A G G
 C C T G A A C A G G G A C T T G A G T G G A T T G G A T G G A T T T T T C C T G
 G A G A T G C A A C C A C T A T G T A C A A T G A G A A A T T C A A G G G C A C
 G G C C A C A C T G A C T G C A G A C A A A T C C T C C A G T A C A G C C T A C
 A T G C A G C T C A G C G G G T T G A C A T C T G A G G A C T C T G C T G T C T
 A T T T C T G T G C A A G G T T C T A C T A C G G T A A C T C C T T T G T T G A
 C T G G G G C C A A G G G A C T C T G G T C A C T G T C T C T G C A

40

軽鎖

< - - - - - F R 1 - - - - - > C D R 1 < -
 - - - - F R 2 - - - - > C D R 2 < - - - - -
 D I V M T Q S P S S L T V T A G E K V T M S C K S S Q S L L N S G N Q K N Y L T

50

W Y Q Q K P G Q P P K L L I Y W A S T R E S G V P D R F T G S G S G T D F
 F R 3 - - - - - > C D R 3 < - - F R 4 - - - >
 T L T I S S V Q A E D L A V Y Y C Q N A Y Y Y P L T F G A G T K L E I K

核酸配列

G A C A T T G T G A T G A C A C A G T C T C C A T C C T C C C T G A C T G T G A
 C A G C A G G A G A G A A A G G T C A C T A T G A G C T G C A A G T C C A G T C A
 G A G T C T G T T A A A C A G T G G A A A T C A A A A G A A C T A C T T G A C C
 T G G T A C C A G C A G A A G C C A G G G C A G C C T C C T A A A C T G T T G A
 T C T A C T G G G C A T C C A C T A G G G A A T C T G G G G T C C C T G A T C G
 C T T C A C A G G C A G T G G A T C T G G A A C A G A T T T C A C T C T C A C C
 A T C A G C A G T G T G C A G G C T G A A G A C C T G G C A G T T T A T T A C T
 G T C A G A A T G C T T A T T A T T A T C C G C T C A C G T T C G G T G C T G G
 G A C C A A G C T G G A A A T C A A A

10

20

30

40

【0142】

上記重鎖及び軽鎖可変領域配列断片をPCRで増幅し、ヒト重鎖定常領域を含む担体に重鎖可変領域をクローニングすることにより、哺乳動物細胞に完全なIgG1重鎖を発現させた。同様に、ヒト軽鎖定常領域を含む担体に軽鎖可変領域をクローニングすることにより、哺乳動物細胞に完全なkappa軽鎖を発現させた。配列を正しく決定した後にHEK293-6E哺乳動物細胞にトランスフェクトし、IgG1を発現させ、培地中に分泌させ、合わせて上清を収集し、濾過して精製した。Protein Aクロマトグラフィーを用いてIgGを精製し、培養上清を適切な大きさのProtein Aカラムにローディングし、50mMのTris-HCl(pH8.0)と250mMのNaClで洗浄し、結合したIgGを0.1MのGlycine-HCl(pH3.0)で溶出した。濃縮管(Millipore)を用いてタンパク質を限外濾過により濃縮し、OD280を検出し、分光光度法によりIgGの濃度を測定した。SDS-PAGEを用いてIgGの純度を分析した。

【0143】

対数増殖期にあるHEK293-クローディン18.1細胞、HEK293-クローディン18.2細胞及びHEK293細胞を消化した後に、 5×10^4 細胞/100μLで96ウェルU底プレートに加え、1100rpmで3分間遠心分離し、上清を捨て、細胞を軽く振動させて分散させ、段階希釈された抗体(抗体濃度を100nMから8段階に5倍希釈した)をウェルあたり50μL加え、4で1時間インキュベートした。インキュベーションが終了した後、0.5%BSAをウェルあたり140μL加えて3回洗浄し、30μL/ウェルの第2の抗体AlexaFluor647抗ヒトIgG(Jackson ImmunoResearch、品番:109-606-170)を加え、4で40分間インキュベートした。インキュベーションが終了した後、0.5%BSAをウェルあたり140μL加えて3回洗浄し、最後にウェルあたり50μLのPBSに再懸濁させ、フローサイトメーター(iQue Screener)で検出した。結果を図4及び表1に示す。図4においては、フローサイトメトリー(FACS)によると、得られたキメラクローディン18.2 IgG1抗体は、クローディン18.2をトランスフェクトしたHEK293-クローディン18.2細胞のみを認識し(図4B)、HEK293(図4A)及びHEK293-クローディン18.1(図4C)といずれも結合しないことを示している。

【0144】

【表 1】

クローディン18.2抗体と安定形質転換細胞株との結合
(N. B. 結合が検出されていない)

mAb	クローディン18.2	クローディン18.1	HEK293
	EC50 (nM)	EC50 (nM)	EC50 (nM)
8C11	0.23	N. B.	N. B.
9A8	0.21	N. B.	N. B.
9C9	1.46	N. B.	N. B.
9D12	6.78	N. B.	N. B.
13A8	0.25	N. B.	N. B.
14H11	0.22	N. B.	N. B.
15A7	0.59	N. B.	N. B.
15D11	0.21	N. B.	N. B.
15F9	0.17	N. B.	N. B.
18A9	0.31	N. B.	N. B.
18G5	3.79	N. B.	N. B.
18D10	0.37	N. B.	N. B.
19B2	0.20	N. B.	N. B.
25A5	0.19	N. B.	N. B.
25F5	2.14	N. B.	N. B.

10

20

【実施例3】

【0145】

< 抗体の細胞内取り込み実験 >

対数増殖期にある細胞を予熱培地で1回洗浄し、1000rpmで3分間遠心分離し、上清を捨て、血清を含まない培地を加えて、細胞を 1×10^6 細胞/mLに再懸濁させ、細胞をEP管に200 μ L/管で吸引し、予冷された0.5%BSA/PBSを500 μ L加え、1000rpmで3分間遠心分離し、上清を捨て、10 μ g/mLの抗体を加え、37℃で15分間、30分間、60分間、120分間、180分間、240分間それぞれインキュベートし、各時点で第1の抗体のインキュベートが終了した後、予冷された0.5%BSA/PBSを500 μ L加えて2回洗浄し、次に1:300で希釈された第2の抗体を直接加えて45分間インキュベートした。第2の抗体のインキュベートが終了した後、500 μ Lの0.5%BSA/PBSで2回洗浄し、細胞を200 μ Lに再懸濁させてFACS検出を行った。結果は図5に示すとおり、15D11、15F9、18A9及び18D10などの抗体は、細胞内取り込みを媒介する機能を有することが分かった。

30

40

【実施例4】

【0146】

< 抗クローディン18.2抗体のヒト化 >

選択されたモノクローナル抗体の可変領域配列をヒト胚抗体配列と比較し、相同性が高い配列を見つけてCDR移植を行い、その後にコンピュータを利用して相同性モデリングを行い、CDR領域及びその周辺のフレームワークアミノ酸配列を分析し、その空間立体結合方式を考察した。静電気力、ファンデルワールス力、親疎水性、及びエントロピーを計算することによって、陽性モノクローナル抗体の遺伝子配列における、標的と相互作用し空間的フレームワークを維持し得る重要な個々のアミノ酸を分析し、これに基づいて復帰

50

変異部位を設計した。HLA-DRの親和性を分析して考察し、免疫原性の低いヒト胚フレームワーク配列を選択した。発酵過程において修飾され得るアミノ酸残基を分析し、かつ突然変異を設計することにより修飾が発生する可能性を低減した。

【0147】

設計して異なる重鎖誘導体及び軽鎖誘導体を得、軽鎖、重鎖誘導体をそれぞれ全配列合成した後、抗体kappa鎖定常領域Ckappa又はヒトIgG1定常領域CH1-CH3を含む担体にクローニングし、同様な親本由来の軽鎖、重鎖誘導体プラスミドを組み合わせてペアリングした後、HEK293.6E細胞をトランスフェクトし、5～6日間発現させ、上清を収集してProtein Aカラムにより精製した。ヒト化抗体の可変領域配列は以下のとおりである。

10

【0148】

15F9VHv5：配列番号151-155

< - - - - - FR1 - - - - - > CDR1 < - - - -
- FR2 - - - - > CDR2 < - - - - -
Q I Q L V Q S G S E L K K P G A S V K V S C K A S G Y T F T N Y G I N W V R Q A
P G Q G L E W M G W I N P N T G E T T Y A E G F T G R F V L S W D T S V S
- - - - - FR3 - - - - - > CDR3 < - - - - FR4 - - - >
T A Y L Q I S S L K A E D T A V Y F C A R L L Y Y G N R F D S W G Q G T L V T V S
S

核酸配列

20

C A G A T T C A G C T G G T G C A G T C T G G C A G C G A G C T G A A G A A A C
C T G G C G C C T C T G T G A A G G T G T C C T G C A A G G C T A G C G G C T A
C A C A T T C A C C A A A C T A C G G C A T C A A C T G G G T C C G A C A G G C T
C C T G G A C A G G G A C T C G A A T G G A T G G G C T G G A T C A A C C C C A
A C A C C G G C G A G A C A A C A T A C G C C G A G G G C T T C A C A G G C A G
A T T C G T G C T G A G C T G G G A T A C C A G C G t C A G C A C A G C T T A C
C T G C A G A T C a G c A G C C T G A A G G C C G A G G A T A C C G C C G T G T
A C T T C T G C G C C A G A C T G T A C T A C G G C A A C A G A T T C G A C T C
T T G G G G C C A G G G C A C A C T G G T C A C A G T C T C T T C T

15F9VHv5r1：配列番号156-160

30

< - - - - - FR1 - - - - - > CDR1 < - - - -
- FR2 - - - - > CDR2 < - - - - -
Q V Q L V Q S G S E L K K P G A S V K V S C K A S G Y T F T N Y G I N W V R Q A
P G Q G L E W M G W I N P N T G E T T Y A E E F K G R F V F S L D T S V S
- - - - - FR3 - - - - - > CDR3 < - - - - FR4 - - - >
T A Y L Q I S S L K A E D T A V Y F C A R L L Y Y G N R F D S W G Q G T L V T V S
S

C A G g t g C A G C T G G T G C A G T C T G G C A G C G A G C T G A A G A A A C
C T G G C G C C T C T G T G A A G G T G T C C T G C A A G G C T A G C G G C T A
C A C A T T C A C C A A A C T A C G G C A T C A A C T G G G T C C G A C A G G C T
C C T G G A C A G G G A C T C G A A T G G A T G G G C T G G A T C A A C C C C A
A C A C C G G C G A G A C A A C A T A C G C C G A G G A G T T C A A G G G C A G
A T T C G T G t T c A G C c t g G A T A C C A G C g t c A G C A C A G C T T A C
C T G C A G A T C a G c A G C C T G A A G G C C G A G G A T A C C G C C G T G T
A C T T C T G C G C C A G A C T G T A C T A C G G C A A C A G A T T C G A C T C
T T G G G G C C A G G G C A C A C T G G T C A C A G T C T C T T C T

15F9VHv5r2：配列番号161-165

40

< - - - - - FR1 - - - - - > CDR1 < - - - -
- FR2 - - - - > CDR2 < - - - - -
E V Q L V Q S G S E L K K P G A S V K V S C K A S G Y T F T N Y G I N W V R Q A

50

P G Q G L E W M G W I N P Y T G E T T Y A E E F K G R F V F S L D T S V S
 - - - - - F R 3 - - - - - > C D R 3 < - - - F R 4 - - - >
 T A Y L Q I S S L K A E D T A V Y F C A R L Y Y G N R F D S W G Q G T L V T V S
 S
 G A G g t g C A G C T G G T G C A G T C T G G C A G C G A G C T G A A G A A A C
 C T G G C G C C T C T G T G A A G G T G T C C T G C A A G G C T A G C G G C T A
 C A C A T T C A C C A A C T A C G G C A T C A A C T G G G T C C G A C A G G C T
 C C T G G A C A G G G A C T C G A A T G G A T G G G C T G G A T C A A C C C C T
 A C A C C G G C G A G A C A A C A T A C G C C G A G G A G T T C A A G G G C A G
 A T T C G T G t T c A G C c t g G A T A C C A G C g t c A G C A C A G C T T A C 10
 C T G C A G A T C a G c A G C C T G A A G G C C G A G G A T A C C G C C G T G T
 A C T T C T G C G C C A G A C T G T A C T A C G G C A A C A G A T T C G A C T C
 T T G G G G C C A G G G C A C A C T G G T C A C A G T C T C T T C T
 1 5 F 9 V H v 6 : 配列番号 1 6 6 - 1 7 0
 < - - - - - F R 1 - - - - - > C D R 1 < - - - -
 - F R 2 - - - - > C D R 2 < - - - - -
 Q I Q L V Q S G S E L K K P G A S V K V S C K A S G Y T F T N Y G I N W V R Q A
 P G Q G L E W M G W I N P G T G E T T Y A E G F T G R F V L S W D T S V S
 - - - - - F R 3 - - - - - > C D R 3 < - - - F R 4 - - - > 20
 T A Y L Q I S S L K A E D T A V Y F C A R L Y Y G N R F D S W G Q G T L V T V S
 S

核酸配列

C A G A T T C A G C T G G T G C A G T C T G G C A G C G A G C T G A A G A A A C
 C T G G C G C C T C T G T G A A G G T G T C C T G C A A G G C T A G C G G C T A
 C A C A T T C A C C A A C T A C G G C A T C A A C T G G G T C C G A C A G G C T
 C C T G G A C A G G G A C T C G A A T G G A T G G G C T G G A T C A A C C C C G
 G C A C C G G C G A G A C A A C A T A C G C C G A G G G C T T C A C A G G C A G
 A T T C G T G C T G A G C T G G G A T A C C A G C G t C A G C A C A G C T T A C
 C T G C A G A T C a G c A G C C T G A A G G C C G A G G A T A C C G C C G T G T
 A C T T C T G C G C C A G A C T G T A C T A C G G C A A C A G A T T C G A C T C 30
 T T G G G G C C A G G G C A C A C T G G T C A C A G T C T C T T C T
 1 8 A 9 V H v 1 : 配列番号 1 7 1 - 1 7 5
 < - - - - - F R 1 - - - - - > C D R 1 < - - - -
 - F R 2 - - - - > C D R 2 < - - - - -
 Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V K V S C K P S G Y A F T N Y L I D W V R Q A
 P G Q G L E W M G G I N P G S G D T V Y N E K F Q G R V T L T A D K S S M
 - - - - - F R 3 - - - - - > C D R 3 < - - - F R 4 - - - >
 T A Y M E L S S L R S E D T A V Y F C A R R V R G N S F D S W G Q G T L V T V S
 S

核酸配列

C A G G T T C A G C T G G T T C A G T C T G G C G C C G A A G T G A A G A A A C
 C T G G C A G C A G C G T G A A G G T G T C C T G C A A G C C T T C T G G C T A
 C G C C T T C A C C A A C T A C C T G A T C G A C T G G G T C C G A C A G G C T
 C C T G G A C A G G G A C T T G A A T G G A T G G G C G G C A T C A A C C C T G
 G C A G C G G C G A T A C A G T G T A C A A C G A G A A G T T C C A G G G C A G
 A G T G A C C C T G A C C G C C G A C A A G T C T A G C A T G A C C G C C T A C
 A T G G A A C T G A G C A G C C T G A G A A G C G A G G A T A C C G C C G T G T
 A C T T C T G T G C C A G A A G A G T G C G G G G C A A C A G C T T C G A T T C
 T T G G G G C C A G G G A A C C C T G G T C A C C G T T T C T T C T
 1 8 A 9 V H v 2 : 配列番号 1 7 6 - 1 8 0

10

20

30

40

50

< - - - - - F R 1 - - - - - > C D R 1 < - - - -
- F R 2 - - - - > C D R 2 < - - - - -
Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V K V S C K P S G Y T F T N Y L I D W V R Q A
P G Q G L E W M G G I N P G S G D T V Y N E K F Q G R V T L T A D E S T S
- - - - - F R 3 - - - - - > C D R 3 < - - - F R 4 - - - >
T A Y M E L S S L R S E D T A V Y F C A R R V R G N S F D S W G Q G T L V T V S
S

核酸配列

C A G G T T C A G C T G G T T C A G T C T G G C G C C G A A G T G A A G A A A C
C T G G C A G C A G C G T G A A G G T G T C C T G C A A G C C T T C T G G C T A 10
C A C C T T C A C C A A C T A C C T G A T C G A C T G G G T C C G A C A G G C T
C C T G G A C A G G G A C T T G A A T G G A T G G G C G G C A T C A A C C C T G
G C A G C G G C G A T A C A G T G T A C A A C G A G A A G T T C C A G G G C A G
A G T G A C C C T G A C C G C C G A C G A G T C T A C C A G C A C C G C C T A C
A T G G A A C T G A G C A G C C T G A G A A G C G A G G A T A C C G C C G T G T
A C T T C T G T G C C A G A A G A G T G C G G G G C A A C A G C T T C G A T T C
T T G G G G C C A G G G A A C C C T G G T C A C C G T T T C T T C T

1 8 A 9 V H v 3 : 配列番号 1 8 1 - 1 8 5

< - - - - - F R 1 - - - - - > C D R 1 < - - - -
- F R 2 - - - - > C D R 2 < - - - - - 20
Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V K V S C K P S G Y T F T N Y L I D W V R Q A
P G Q G L E W M G G I N P G S G D T V Y N E K F Q G R V T L T A D K S S M
- - - - - F R 3 - - - - - > C D R 3 < - - - F R 4 - - - >
T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R R V R G N S F D S W G Q G T L V T V S
S

核酸配列

C A G G T T C A G C T G G T T C A G T C T G G C G C C G A A G T G A A G A A A C
C T G G C A G C A G C G T G A A G G T G T C C T G C A A G C C T T C T G G C T A
C A C C T T C A C C A A C T A C C T G A T C G A C T G G G T C C G A C A G G C T
C C T G G A C A G G G A C T T G A A T G G A T G G G C G G C A T C A A C C C T G 30
G C A G C G G C G A T A C A G T G T A C A A C G A G A A G T T C C A G G G C A G
A G T G A C C C T G A C C G C C G A C A A G T C T A G C A T G A C C G C C T A C
A T G G A A C T G A G C A G C C T G A G A A G C G A G G A T A C C G C C G T G T
A C T A C T G T G C C A G A A G A G T G C G G G G C A A C A G C T T C G A T T C
T T G G G G C C A G G G A A C C C T G G T C A C C G T T T C T T C T

1 8 A 9 V H v 4 : 配列番号 1 8 6 - 1 9 0

< - - - - - F R 1 - - - - - > C D R 1 < - - - -
- F R 2 - - - - > C D R 2 < - - - - -
Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V K V S C K A S G Y T F T N Y L I D W V R Q A
P G Q G L E W M G G I N P G S G D T V Y N E K F Q G R V T L T A D K S S M 40
- - - - - F R 3 - - - - - > C D R 3 < - - - F R 4 - - - >
T A Y M E L S S L R S E D T A V Y F C A R R V R G N S F D S W G Q G T L V T V S
S

核酸配列

C A G G T T C A G C T G G T T C A G T C T G G C G C C G A A G T G A A G A A A C
C T G G C A G C A G C G T G A A G G T G T C C T G C A A G G C T T C T G G C T A
C A C C T T C A C C A A C T A C C T G A T C G A C T G G G T C C G A C A G G C T
C C T G G A C A G G G A C T T G A A T G G A T G G G C G G C A T C A A C C C T G
G C A G C G G C G A T A C A G T G T A C A A C G A G A A G T T C C A G G G C A G
A G T G A C C C T G A C C G C C G A C A A G T C T A G C A T G A C C G C C T A C 50

A T G G A A C T G A G C A G C C T G A G A A G C G A G G A T A C C G C C G T G T
A C T T C T G T G C C A G A A G A G T G C G G G G C A A C A G C T T C G A T T C
T T G G G G C C A G G G A A C C C T G G T C A C C G T T T C T T C T

18A9VHv5 : 配列番号 191 - 195

< - - - - - F R 1 - - - - - > C D R 1 < - - - -
- F R 2 - - - - > C D R 2 < - - - - -
Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V K V S C K P S G Y T F T N Y L I D W V R Q A
P G Q G L E W M G G I N P G S G D T V Y N E K F Q G R V T I T A D E S T S
- - - - - F R 3 - - - - - > C D R 3 < - - - - F R 4 - - - >
T A Y M E L S S L R S E D T A V Y F C A R R V R G N S F D S W G Q G T L V T V S
S

核酸配列

C A G G T T C A G C T G G T T C A G T C T G G C G C C G A A G T G A A G A A A C
C T G G C A G C A G C G T G A A G G T G T C C T G C A A G C C T T C T G G C T A
C A C C T T C A C C A A C T A C C T G A T C G A C T G G G T C C G A C A G G C T
C C T G G A C A G G G A C T T G A A T G G A T G G G C G G C A T C A A C C C T G
G C A G C G G C G A T A C A G T G T A C A A C G A G A A G T T C C A G G G C A G
A G T G A C C A T C A C C G C C G A C G A G T C T A C C A G C A C C G C C T A C
A T G G A A C T G A G C A G C C T G A G A A G C G A G G A T A C C G C C G T G T
A C T T C T G T G C C A G A A G A G T G C G G G G C A A C A G C T T C G A T T C
T T G G G G C C A G G G A A C C C T G G T C A C C G T T T C T T C T

18A9VHv6 : 配列番号 196 - 200

< - - - - - F R 1 - - - - - > C D R 1 < - - - -
- F R 2 - - - - > C D R 2 < - - - - -
Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K P S G Y A F T N Y L I D W V R Q A
P G Q G L E W M G G I N P G S G D T V Y N E K F Q G R V T L T A D K S S S
- - - - - F R 3 - - - - - > C D R 3 < - - - - F R 4 - - - >
T A Y M E L S S L R S E D T A V Y F C A R R V R G N S F D S W G Q G T L V T V S
S

核酸配列

C A G G T T C A G C T G G T T C A G T C T G G C G C C G A A G T G A A G A A A C
C T G G C G C C A G C G T G A A G G T G T C C T G C A A G C C T T C T G G C T A
C G C C T T C A C C A A C T A C C T G A T C G A C T G G G T C C G A C A G G C T
C C T G G A C A G G G A C T T G A A T G G A T G G G C G G C A T C A A C C C T G
G C A G C G G C G A T A C A G T G T A C A A C G A G A A G T T C C A G G G C A G
A G T G A C C C T G A C C G C C G A C A A G T C T A G C A G C A C C G C C T A C
A T G G A A C T G A G C A G C C T G A G A A G C G A G G A T A C C G C C G T G T
A C T T C T G T G C C A G A A G A G T G C G G G G C A A C A G C T T C G A T T C
T T G G G G C C A G G G A A C C C T G G T C A C C G T T T C T T C T

18A9VHv7 : 配列番号 201 - 205

< - - - - - F R 1 - - - - - > C D R 1 < - - - -
- F R 2 - - - - > C D R 2 < - - - - -
Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K P S G Y T F T N Y L I D W V R Q A
P G Q G L E W M G G I N P G S G D T V Y N E K F Q G R V T L T A D T S T S
- - - - - F R 3 - - - - - > C D R 3 < - - - - F R 4 - - - >
T V Y M E L S S L R S E D T A V Y F C A R R V R G N S F D S W G Q G T L V T V S
S

核酸配列

C A G G T T C A G C T G G T T C A G T C T G G C G C C G A A G T G A A G A A A C
C T G G C G C C A G C G T G A A G G T G T C C T G C A A G C C T T C T G G C T A

C A C C T T C A C C A A C T A C C T G A T C G A C T G G G T C C G A C A G G C T
C C T G G A C A G G G A C T T G A A T G G A T G G G C G G C A T C A A C C C T G
G C A G C G G C G A T A C A G T G T A C A A C G A G A A G T T C C A G G G C A G
A G T G A C C C T G A C C G C C G A C A C C T C T A C C A G C A C C G T C T A C
A T G G A A C T G A G C A G C C T G A G A A G C G A G G A T A C C G C C G T G T
A C T T C T G T G C C A G A A G A G T G C G G G G C A A C A G C T T C G A T T C
T T G G G G C C A G G G A A C C C T G G T C A C C G T T T C T T C T

18D10VHv1 : 配列番号 206 - 210

< - - - - - F R 1 - - - - - > C D R 1 < - - - -
- F R 2 - - - - > C D R 2 < - - - - -

10

Q V Q L Q E S G P G L V K P S E T L S L T C T V S G Y S I T S N Y A W N W I R Q
P P G K G L E W I G Y I N Y S G N T N Y N P S L K S R V T I S R D T S K N

- - - - - F R 3 - - - - - > C D R 3 < - - - F R 4 - - - >

Q F S L K L S S V T A A D T A V Y Y C A T S Y Y G N S F I Y W G Q G T L V T V S
S

核酸配列

C A G G T T C A G C T G C A A G A G T C T G G A C C T G G C C T G G T C A A G C
C T A G C G A G A C A C T G A G C C T G A C C T G T A C C G T G T C C G G C T A
C A G C A T C A C C A G C A A C T A C G C C T G G A A C T G G A T C A G A C A G
C C T C C T G G C A A A G G C C T C G A G T G G A T C G G C T A C A T C A A C T
A C A G C G G C A A C A C C A A C T A C A A C C C C A G C C T G A A G T C C A G
A G T G A C C A T C A G C A G A G A C A C C A G C A A G A A C C A G T T C T C C
C T G A A G C T G A G C A G C G T G A C A G C C G C C G A T A C A G C C G T G T
A C T A C T G T G C C A C A A G C T A C T A C G G C A A C A G C T T C A T C T A
C T G G G G C C A G G G C A C A C T G G T C A C C G T T T C T T C T

20

18D10VHv2 : 配列番号 211 - 215

< - - - - - F R 1 - - - - - > C D R 1 < - - - -
- F R 2 - - - - > C D R 2 < - - - - -

Q V Q L Q E S G P G L V K P S E T L S L T C T V S G G S I S S N Y A W N W I R Q
P P G K G L E W M G Y I N Y S G N T N Y N P S L K S R I T I S R D T S K N

30

- - - - - F R 3 - - - - - > C D R 3 < - - - F R 4 - - - >

Q F S L K L S S V T A A D T A V Y Y C A T S Y Y G N S F I Y W G Q G T L V T V S
S

核酸配列

C A G G T T C A G C T G C A A G A G T C T G G A C C T G G C C T G G T C A A G C
C T A G C G A G A C A C T G A G C C T G A C C T G T A C C G T G T C C G G C G G
C A G C A T C A G C A G C A A C T A C G C C T G G A A C T G G A T C A G A C A G
C C T C C T G G C A A A G G C C T C G A G T G G A T G G G C T A C A T C A A C T
A C A G C G G C A A C A C C A A C T A C A A C C C C A G C C T G A A G T C C A G
A A T C A C C A T C A G C A G A G A C A C C A G C A A G A A C C A G T T C T C C
C T G A A G C T G A G C A G C G T G A C A G C C G C C G A T A C A G C C G T G T
A C T A C T G T G C C A C A A G C T A C T A C G G C A A C A G C T T C A T C T A
C T G G G G C C A G G G C A C A C T G G T C A C C G T T T C T T C T

40

18D10VHv3 : 配列番号 216 - 220

< - - - - - F R 1 - - - - - > C D R 1 < - - - -
- F R 2 - - - - > C D R 2 < - - - - -

Q V Q L Q E S G P G L V K P S E T L S L T C T V S G G S I S S N Y A W N W I R Q
P P G K G L E W I G Y I N Y S G N T N Y N P S L K S R V T I S R D T S K N

- - - - - F R 3 - - - - - > C D R 3 < - - - F R 4 - - - >

Q F S L K L S S V T A A D T A V Y Y C A T S Y Y G N S F I Y W G Q G T L V T V S

50

S

核酸配列

C A G G T T C A G C T G C A A G A G T C T G G A C C T G G C C T G G T C A A G C
C T A G C G A G A C A C T G A G C C T G A C C T G T A C C G T G T C C G G C G G
C A G C A T C A G C A G C A A C T A C G C C T G G A A C T G G A T C A G A C A G
C C T C C T G G C A A A G G C C T C G A G T G G A T C G G C T A C A T C A A C T
A C A G C G G C A A C A C C A A C T A C A A C C C C A G C C T G A A G T C C A G
A G T G A C C A T C A G C A G A G A C A C C A G C A A G A A C C A G T T C T C C
C T G A A G C T G A G C A G C G T G A C A G C C G C C G A T A C A G C C G T G T
A C T A C T G T G C C A C A A G C T A C T A C G G C A A C A G C T T C A T C T A
C T G G G G C C A G G G C A C A C T G G T C A C C G T T T C T T C T
1 8 D 1 0 V H v 4 : 配列番号 2 2 1 - 2 2 5

< - - - - - F R 1 - - - - - > C D R 1 < - - - -
- F R 2 - - - - > C D R 2 < - - - - -
Q V Q L Q E S G P G L V K P S E T L S L T C T V S G G S I S S N Y A W N W I R Q
P P G K G L E W I G Y I N Y S G Y T N Y N P S L K S R V T I S R D T S K N
- - - - - F R 3 - - - - - > C D R 3 < - - - - F R 4 - - - >
Q F S L K L S S V T A A D T A V Y Y C A T S Y Y G N S F I Y W G Q G T L V T V S
S

核酸配列

C A G G T T C A G C T G C A A G A G T C T G G A C C T G G C C T G G T C A A G C
C T A G C G A G A C A C T G A G C C T G A C C T G T A C C G T G T C C G G C G G
C A G C A T C A G C A G C A A C T A C G C C T G G A A C T G G A T C A G A C A G
C C T C C T G G C A A A G G C C T C G A G T G G A T C G G C T A C A T C A A C T
A C A G C G G C T A C A C C A A C T A C A A C C C C A G C C T G A A G T C C A G
A G T G A C C A T C A G C A G A G A C A C C A G C A A G A A C C A G T T C T C C
C T G A A G C T G A G C A G C G T G A C A G C C G C C G A T A C A G C C G T G T
A C T A C T G T G C C A C A A G C T A C T A C G G C A A C A G C T T C A T C T A
C T G G G G C C A G G G C A C A C T G G T C A C C G T T T C T T C T
1 8 D 1 0 V H v 5 : 配列番号 2 2 6 - 2 3 0

< - - - - - F R 1 - - - - - > C D R 1 < - - - -
- F R 2 - - - - > C D R 2 < - - - - -
Q V Q L Q E S G P G L V K P S E T L S L T C T V S G G S I S S N Y A W N W I R Q
P P G K G L E W I G Y I N Y S G N T A Y N P S L K S R V T I S R D T S K N
- - - - - F R 3 - - - - - > C D R 3 < - - - - F R 4 - - - >
Q F S L K L S S V T A A D T A V Y Y C A T S Y Y G N S F I Y W G Q G T L V T V S
S

核酸配列

C A G G T T C A G C T G C A A G A G T C T G G A C C T G G C C T G G T C A A G C
C T A G C G A G A C A C T G A G C C T G A C C T G T A C C G T G T C C G G C G G
C A G C A T C A G C A G C A A C T A C G C C T G G A A C T G G A T C A G A C A G
C C T C C T G G C A A A G G C C T C G A G T G G A T C G G C T A C A T C A A C T
A C A G C G G C A A C A C C G C C T A C A A C C C C A G C C T G A A G T C C A G
A G T G A C C A T C A G C A G A G A C A C C A G C A A G A A C C A G T T C T C C
C T G A A G C T G A G C A G C G T G A C A G C C G C C G A T A C A G C C G T G T
A C T A C T G T G C C A C A A G C T A C T A C G G C A A C A G C T T C A T C T A
C T G G G G C C A G G G C A C A C T G G T C A C C G T T T C T T C T
1 8 D 1 0 V H v 6 : 配列番号 2 3 1 - 2 3 5

< - - - - - F R 1 - - - - - > C D R 1 < - - - -
- F R 2 - - - - > C D R 2 < - - - - -

10

20

30

40

50

Q V Q L Q E S G P G L V K P S E T L S L T C T V S G G S I S S N Y A W N W I R Q
P P G K G L E W I G Y I Y Y S G N T N Y N P S L K S R V T I S R D T S K N
- - - - - F R 3 - - - - - > C D R 3 < - - - F R 4 - - - >
Q F S L K L S S V T A A D T A V Y Y C A T S Y Y G N S F I Y W G Q G T L V T V S
S

核酸配列

C A G G T T C A G C T G C A A G A G T C T G G A C C T G G C C T G G T C A A G C
C T A G C G A G A C A C T G A G C C T G A C C T G T A C C G T G T C C G G C G G
C A G C A T C A G C A G C A A C T A C G C C T G G A A C T G G A T C A G A C A G
C C T C C T G G C A A A G G C C T C G A G T G G A T C G G C T A C A T C T A C T 10
A C A G C G G C A A C A C C A A C T A C A A C C C C A G C C T G A A G T C C A G
A G T G A C C A T C A G C A G A G A C A C C A G C A A G A A C C A G T T C T C C
C T G A A G C T G A G C A G C G T G A C A G C C G C C G A T A C A G C C G T G T
A C T A C T G T G C C A C A A G C T A C T A C G G C A A C A G C T T C A T C T A
C T G G G G C C A G G G C A C A C T G G T C A C C G T T T C T T C T

1 5 F 9 V L v 1 : 配列番号 2 3 6 - 2 4 0

< - - - - - F R 1 - - - - - > C D R 1 < -
- - - - F R 2 - - - - > C D R 2 < - - - - -
D I V M T Q S P D S L A V S L G E R A T I N C K S S Q S L L N S G N Q R N Y L T
W Y Q Q K P G Q P P K L L I Y W A S T R E S G V P D R F S G S G S G T D F 20
F R 3 - - - - - > C D R 3 < - - F R 4 - - - >
T L T I S S L Q A E D V A V Y Y C Q N A Y Y Y P L T F G G G T K V E I K

核酸配列

G A C A T C G T G A T G A C A C A G A G C C C T G A T A G C C T G G C C G T G T
C T C T G G G A G A G A G A G C C A C C A T C A A C T G C A A G A G C A G C C A
G A G C C T G C T G A A C A G C G G C A A C C A G A G A A A C T A C C T G A C C
T G G T A T C A G C A G A A G C C C G G C C A G C C T C C T A A G C T G C T G A
T C T A C T G G G C C A G C A C C A G A G A A T C T G G C G T G C C C G A T A G
A T T C A G C G G C A G C G G C T C T G G A A C C G A C T T C A C C C T G A C A
A T C A G C T C C C T G C A G G C C G A G G A T G T G G C C G T G T A C T A C T 30
G T C A G A A C G C C T A C T A C T A C C C T C T G A C C T T C G G C G G A G G
C A C C A A A G G T G G A A A T C A A G

1 5 F 9 V L v 2 : 配列番号 2 4 1 - 2 4 5

< - - - - - F R 1 - - - - - > C D R 1 < -
- - - - F R 2 - - - - > C D R 2 < - - - - -
D I V M T Q S P D S L A V S L G E R A T I N C K S S Q S L L N S G N Q R N Y L A
W Y Q Q K P G Q P P K L L I Y W A S T R E S G V P D R F S G S G S G T D F
F R 3 - - - - - > C D R 3 < - - F R 4 - - - >
T L T I S S L Q A E D V A V Y Y C Q Q A Y Y Y P L T F G G G T K V E I K

核酸配列

G A C A T C G T G A T G A C A C A G A G C C C T G A T A G C C T G G C C G T G T
C T C T G G G A G A G A G A G C C A C C A T C A A C T G C A A G A G C A G C C A
G A G C C T G C T G A A C A G C G G C A A C C A G A G A A A C T A C C T G G C C
T G G T A T C A G C A G A A G C C C G G C C A G C C T C C T A A G C T G C T G A
T C T A C T G G G C C A G C A C C A G A G A A T C T G G C G T G C C C G A T A G
A T T C A G C G G C A G C G G C T C T G G A A C C G A C T T C A C C C T G A C A
A T C A G C T C C C T G C A G G C C G A G G A T G T G G C C G T G T A C T A C T 40
G T C A G C A G G C C T A C T A C T A C C C T C T G A C C T T C G G C G G A G G
C A C C A A A G G T G G A A A T C A A G

1 5 F 9 V L v 3 : 配列番号 2 4 6 - 2 5 0

< - - - - - FR 1 - - - - - > CDR 1 < -
- - - - FR 2 - - - - - > CDR 2 < - - - - -
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSGNQRNYLA
WYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVDPDRFSGSGSGSGTDF
FR 3 - - - - - > CDR 3 < - - FR 4 - - - >
TLTISSSLQAEDVAVYYCQQAYYYPLTFGGGGTKVEIK

核酸配列

GACATCGTGATGACACAGAGCCCTGATAGCCTGGCCCGTGCT
CTCTGGGAGAGAGAGAGCCACCATCAACTGCAAGAGCAGCCCA
GAGCCTGCTGTACAGCGGCAACCAGAGAAACTACCTGGCC
TGGTATCAGCAGAAAGCCCGGCCAGCCTCCTAAGCTGCTGA
TCTACTGGGCCAGCACCCAGAGAAATCTGGCGTGCCCGATAG
ATTCAGCGGCAGCGGCTCTGGAAACCGACTTTCACCCCTGACA
ATCAGCTCCCTGCAAGGCCGAGGATGTGGCCCGTGTTACTACT
GTCAGCAGGCCTACTACTACCCCTCTGACCTTTCGGCGGGAGG
CACCAAGGTGGAAATCAAG

18A9VLv1: 配列番号 251 - 255

< - - - - - FR 1 - - - - - > CDR 1 < -
- - - - FR 2 - - - - - > CDR 2 < - - - - -
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLT
WYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVDPDRFSGSGSGSGKDF
FR 3 - - - - - > CDR 3 < - - FR 4 - - - >
TLTISSSLQAEDVAVYYCQNNYFYPLTFGGGGTKVEIK

核酸配列

GACATCGTGATGACACAGAGCCCTGATAGCCTGGCCCGTGCT
CTCTGGGAGAGAGAGAGCCACCATCAACTGCAAGAGCAGCCCA
GAGCCTGCTGAACAGCGGCAACCAGAAAGAACTACCTGACC
TGGTATCAGCAGAAAGCCCGGCCAGCCTCCTAAGCTGCTGA
TCTACTGGGCCAGCACCCAGAGAAAGCGGGCGTGCCAGATAG
ATTCAGCGGCAGCGGCTCTGGAAAGGACTTTCACCCCTGACA
ATCAGCTCCCTGCAAGGCCGAGGATGTGGCCCGTGTTACTACT
GCCAGAAACAACCTACTTCTACCCCTCTGACCTTTCGGCGGGAGG
CACCAAGGTGGAAATCAAG

18A9VLv2: 配列番号 256 - 260

< - - - - - FR 1 - - - - - > CDR 1 < -
- - - - FR 2 - - - - - > CDR 2 < - - - - -
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLA
WYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVDPDRFSGSGSGSGTDF
FR 3 - - - - - > CDR 3 < - - FR 4 - - - >
TLTISSSLQAEDVAVYYCQQNYFYPLTFGGGGTKVEIK

核酸配列

GACATCGTGATGACACAGAGCCCTGATAGCCTGGCCCGTGCT
CTCTGGGAGAGAGAGAGCCACCATCAACTGCAAGAGCAGCCCA
GAGCCTGCTGAACAGCGGCAACCAGAAAGAACTACCTGGCC
TGGTATCAGCAGAAAGCCCGGCCAGCCTCCTAAGCTGCTGA
TCTACTGGGCCAGCACCCAGAGAAAGCGGGCGTGCCAGATAG
ATTCAGCGGCAGCGGCTCTGGAAACCGACTTTCACCCCTGACA
ATCAGCTCCCTGCAAGGCCGAGGATGTGGCCCGTGTTACTACT
GCCAGCAGAACTACTTCTACCCCTCTGACCTTTCGGCGGGAGG
CACCAAGGTGGAAATCAAG

18D10VLv1 : 配列番号 261 - 265

< - - - - - FR1 - - - - - > CDR1 < -
 - - - - FR2 - - - - - > CDR2 < - - - - -
 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLT
 WYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGV PDRFSGSGSGTDF
 FR3 - - - - - > CDR3 < - - FR4 - - - >
 TLTISSSLQAEDVA VYYC QNAYSFPWTF GQG T KVEIK

核酸配列

GACATCGTGATGACACAGAGCCCTGATAGCCTGGCCCGTGTC
 CTCTGGGAGAGAGAGAGCCACCATCAACTGCAAGAGCAGCCCA
 GAGCCTGCTGAACAGCGGCAACCAAGAAAGAACTACCTGACC
 TGGTATCAGCAGAAAGCCCGGCCAGCCTCCTAAGCTGCTGA
 TCTACTGGGCCAGCACCAAGAGAAAGCGGCGTGCCAGATAG
 ATT CAGCGGCGAGCGGCTCTGGAACCGACTTCAACCCCTGACA
 ATCAGCTCCCTGCAAGGCCGAGGATGTGGCCCGTGTA CTACT
 GTCAGAAACGCCCTACAGCTTCCCCCTGGACATTTCGGGCCAGGG
 CACCAAGGTGGAAATCAAG

10

18D10VLv2 : 配列番号 266 - 270

< - - - - - FR1 - - - - - > CDR1 < -
 - - - - FR2 - - - - - > CDR2 < - - - - -
 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLA
 WYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGV PDRFSGSGSGTDF
 FR3 - - - - - > CDR3 < - - FR4 - - - >
 TLTISSSLQAEDVA VYYC QQAAYSFPWTF GQG T KVEIK

20

核酸配列

GACATCGTGATGACACAGAGCCCTGATAGCCTGGCCCGTGTC
 CTCTGGGAGAGAGAGAGCCACCATCAACTGCAAGAGCAGCCCA
 GAGCCTGCTGAACAGCGGCAACCAAGAAAGAACTACCTGGCC
 TGGTATCAGCAGAAAGCCCGGCCAGCCTCCTAAGCTGCTGA
 TCTACTGGGCCAGCACCAAGAGAAAGCGGCGTGCCAGATAG
 ATT CAGCGGCGAGCGGCTCTGGAACCGACTTCAACCCCTGACA
 ATCAGCTCCCTGCAAGGCCGAGGATGTGGCCCGTGTA CTACT
 GTCAGCAGGCCCTACAGCTTCCCCCTGGACATTTCGGGCCAGGG
 CACCAAGGTGGAAATCAAG

30

【実施例 5】

【0149】

< 抗クロードイン 18 . 2 ヒト化抗体の生物学的活性検出 >

1) ヒト化抗体の親和性測定 (EC50)

対数増殖期にある細胞を 3% BSA で 30 分間密封し、 5×10^4 細胞 / 100 μ L で 96 ウェル U 底プレートに播き、1100 rpm で 3 分間遠心分離し、上清を捨て、細胞を軽く振動させて分散させ、段階希釈された抗体 (抗体濃度を 100 nM から 8 段階に 5 倍希釈した) をウェルあたり 50 μ L 加え、4 で 1 時間インキュベートした。インキュベートが終了した後、0.5% BSA をウェルあたり 140 μ L 加えて 3 回洗浄し、30 μ L / ウェルで AF 647 APC 抗ヒト第 2 の抗体を加えて 4 で 40 分間インキュベートした。インキュベートが終了した後、0.5% BSA をウェルあたり 140 μ L 加えて 3 回洗浄し、最後にウェルあたり 50 μ L の PBS に再懸濁させ、iQue (Intellilicyt、USA) 検出を行った (表 2 参照)。

40

【0150】

【表 2】

抗体組み合わせ	VL	VH	EC50 (nM)
15F9キメラ	15F9mVL	15F9mVH	3.322
h15F9. v15	15F9VLv1	15F9VHv5	1.672
h15F9. v15r1	15F9VLv1	15F9VHv5r1	2.529
h15F9. v15r2	15F9VLv1	15F9VHv5r2	1.649
h15F9. v16	15F9VLv1	15F9VHv6	0.705
h15F9. v25	15F9VLv2	15F9VHv5	0.773
h15F9. v25r1	15F9VLv2	15F9VHv5r1	1.720
h15F9. v25r2	15F9VLv2	15F9VHv5r2	1.614
h15F9. v26	15F9VLv2	15F9VHv6	1.024
h15F9. v35	15F9VLv3	15F9VHv5	0.951
h15F9. v35r1	15F9VLv3	15F9VHv5r1	1.200
h15F9. v35r2	15F9VLv3	15F9VHv5r2	0.879
h15F9. v36	15F9VLv3	15F9VHv6	0.786
18A9キメラ	18A9mVL	18A9mVH	1.034
h18A9. v11	18A9VLv1	18A9VHv1	0.645
h18A9. v12	18A9VLv1	18A9VHv2	0.913
h18A9. v13	18A9VLv1	18A9VHv3	0.761
h18A9. v14	18A9VLv1	18A9VHv4	0.548
h18A9. v15	18A9VLv1	18A9VHv5	1.407
h18A9. v16	18A9VLv1	18A9VHv6	0.799
h18A9. v17	18A9VLv1	18A9VHv7	1.425
h18A9. v21	18A9VLv2	18A9VHv1	1.027
h18A9. v22	18A9VLv2	18A9VHv2	0.822
h18A9. v23	18A9VLv2	18A9VHv3	1.170
h18A9. v24	18A9VLv2	18A9VHv4	2.065
h18A9. v25	18A9VLv2	18A9VHv5	0.964
h18A9. v26	18A9VLv2	18A9VHv6	1.405
h18A9. v27	18A9VLv2	18A9VHv7	0.646
18D10キメラ	18D10mVL	18D10mVH	2.068
18D10. v11	18D10VLv1	18D10VHv1	1.131
18D10. v12	18D10VLv1	18D10VHv2	1.678
18D10. v13	18D10VLv1	18D10VHv3	0.912
18D10. v14	18D10VLv1	18D10VHv4	1.744
18D10. v15	18D10VLv1	18D10VHv5	2.687
18D10. v16	18D10VLv1	18D10VHv6	2.313
18D10. v21	18D10VLv2	18D10VHv1	1.069
18D10. v22	18D10VLv2	18D10VHv2	1.897
18D10. v23	18D10VLv2	18D10VHv3	0.982
18D10. v24	18D10VLv2	18D10VHv4	1.926
18D10. v25	18D10VLv2	18D10VHv5	1.265
18D10. v26	18D10VLv2	18D10VHv6	1.874

10

20

30

40

【0151】

2) 抗クローディン18.2ヒト化抗体による腫瘍細胞のADCC殺傷活性

新しく抽出した血液を30mL収集して50mLの遠心管に加え、15mLの1×PBSと均一に混合し、別の50mLの遠心管にFicoll.Paque Plusを20mL加え、次に上記希釈された新鮮な血液30mLを軽く加えてFicoll.Paque Plusの表面に広げ、それを20 に置き、2000rpmで30分間遠心分離した。遠心分離が終了した後、使い捨て吸引管を用いて遠心管中の最上層の血清を吸引し、上から下まで4層の液体のうち第2層の白膜層（即ちPBM C）を管あたり10mLで50mLの遠心管に吸引した。分離して得られたPBM Cを、その体積の3倍よりも大きい1×P

50

B Sに加えて均一に混合し、4 で10分間、1300rpmで遠心分離し、上清を吸引して除去した後、10mLの1×PBSを加えて再懸濁してカウントした。

【0152】

P B M Cを37 の5%CO₂インキュベーターに置いて2時間培養した。1300rpmで10分間遠心分離し、上清を除去し、予熱された2.5%FBS/RPMI 1640培地に懸濁させ、密度を8×10⁶細胞/mLに調整し、50μL/ウェル、即ち4×10⁵細胞/ウェルで96ウェルU底プレートに敷き、次に希釈された抗体(40μg/mLから6段階に2倍希釈した)を25μL/ウェルで加え、37 で5%CO₂インキュベーターにおいて30分間培養した。30分間インキュベートした後、希釈されたKato III細胞を8×10³細胞/ウェルで25μL加え、37 でCO₂5%のインキュベーターに置いて4時間培養を続けた。検出の30分前に、ウェルの最も大きい標的細胞に溶解液(10×)を2μL加え、そのまま培養を続けた。4時間後に、1000rpmで3分間遠心分離し、50μLの上清を黒色のマイクロタイタープレートに入れ、LDHを加えて、基質を50μL/ウェルで検出し、10分後に停止溶液を25μL/ウェルで加えて反応を停止させ、マイクロプレートリーダー(Biotek)を用いて読み取った。

10

【0153】

結果は以下のとおりに算出する。

【0154】

【数1】

20

$$\text{殺傷率}\% = \frac{\text{実験ウェル} - \text{対照ウェル}}{\text{最大放出ウェル} - \text{対照ウェル}} \times 100$$

【0155】

結果は図6に示したとおり、ヒト化組み換えた抗体18D10、18A9及び15F9は、いずれも強いADCC活性を維持していることが分かった。

【0156】

3) 抗クローディン18.2ヒト化抗体による腫瘍細胞のCDC細胞殺傷活性
対数増殖期にあるKato III細胞をPBSで洗浄した後に、密度1×10⁷細胞/mLに再懸濁させ、一定量のCFSE(Sigma、87444-5MG-F)を加えてその終濃度を1μMにした。細胞を室温で置いて10分間インキュベートした後、3倍体積の培地を追加して終了し、4 で5分間、1000rpmで遠心分離し、培地を追加して細胞の密度を2×10⁶細胞/mLに調整した。懸濁した細胞を50μL/ウェルで96ウェルプレートに播き、それぞれ希釈された抗体(抗体を30μg/mLから0.12μg/mLまで5段階に3倍希釈した)を50μL/ウェルで加え、最後に培地を用いて30%に希釈した補体を50μL/ウェルで加えた。5%CO₂インキュベーター内に置いて2時間培養した後、取り出して1000rpmで3分間遠心分離し、上清を捨て、1:200で希釈されたPI及び5×10⁴個/ウェルのSulfate latex(Inn vitrogen、S37227)を均一に混合し、96ウェルプレートに100μL/ウェルで加え、氷上で10分間インキュベートした後にFACS検出を行った。結果は図7に示したとおり、ヒト化組み換えた抗体18D10及び15F9は、いずれも強いCDC効果を有することが分かった。

30

40

【0157】

4) ヒト化抗体の細胞内取り込み作用

PBSで10μg/mLのポリリジン溶液を調製し、24ウェルプレートにウェルあたり0.5mL加え、37 で静置して15~30分間インキュベートした。2×10⁴細胞/ウェルで細胞を接種し、予熱されたDMEM培地で10μg/mLの抗体溶液を調製し、ウェルプレート中の上清を吸引し、対応する抗体を含む培地をウェルあたり0.5mL加え、37 のインキュベーターで30分間インキュベートした。上清を丁寧に吸引し、

50

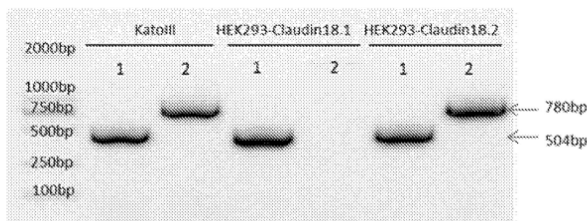
PBSを0.5 mL加え、5分間静置し、上記操作を繰り返して3回洗浄した。各ウェルに10%ホルムアルデヒドを加え、20~40分間固定した。ホルムアルデヒドを丁寧に吸引・除去し、0.2% Triton-PBSを0.5 mL加え、5分間静置し、上記操作を繰り返して3回洗浄した。PBSでAF594-F(ab')₂ヤギ抗hIgG(H+L)第2の抗体溶液(1:300)を調製し、ウェルあたり100 µL加え、室温で45分間インキュベートした。第2の抗体溶液を丁寧に吸引・除去し、0.2% Triton-PBSを0.5 mL加え、5分間静置し、上記操作を繰り返して3回洗浄した。8 µg/mLのヒトLamp-1/CD107a MAbsを調製し、ウェルあたり100 µL加え、室温で45分間インキュベートした。抗体溶液を丁寧に吸引・除去し、0.2% Triton-PBSを0.5 mL加え、5分間静置し、上記操作を繰り返して3回洗浄した。PBSでAF488-F(ab')₂ヤギ抗mIgG(H+L)溶液(1:300)を調製し、ウェルあたり100 µL加え、室温で45分間インキュベートした。上清を丁寧に吸引・除去し、0.1% Triton-PBSを0.5 mL加え、5分間静置し、上記操作を繰り返して3回洗浄した。PBSで1 µg/mLのDAPI溶液を調製し、室温で5分間染色し、上清を丁寧に吸引・除去し、0.1% Triton-PBSを0.5 mL加え、5分間静置し、上記操作を繰り返して3回洗浄した。90%グリセリンで密封し、写真を撮った。結果は図8に示したとおり、ヒト化Claudin18.2抗体が主に細胞膜に結合し、一部の抗体は細胞内に取り込まれた後にリソソームに入ることができる(矢印に示されたとおりである)ことが分かった。

10

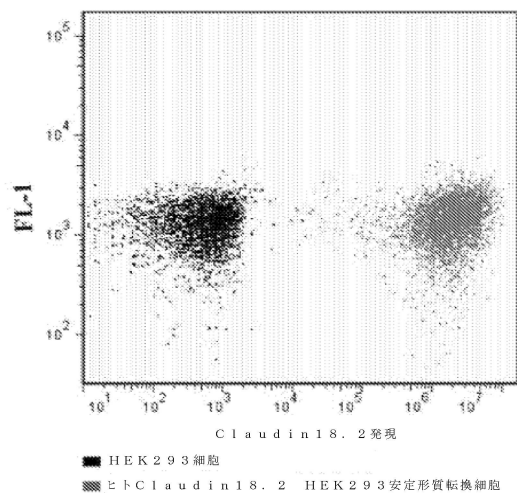
20

【図面】

【図1】



【図2】

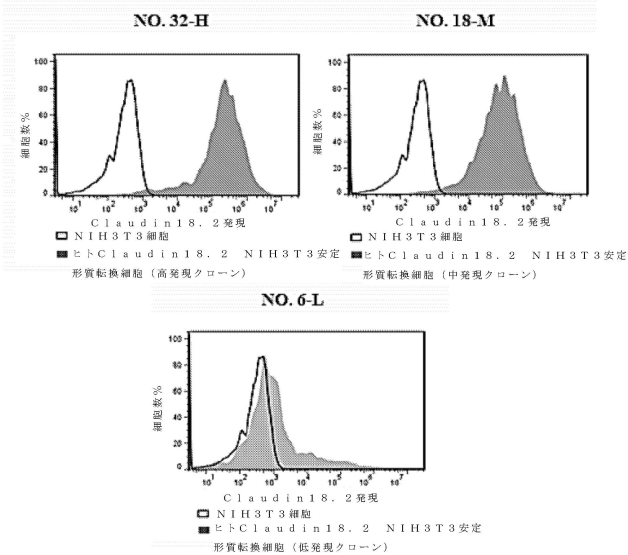


30

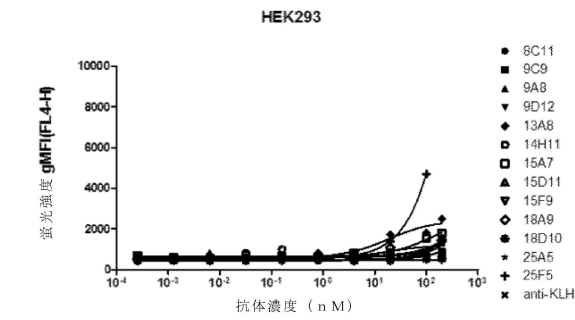
40

50

【 図 3 】

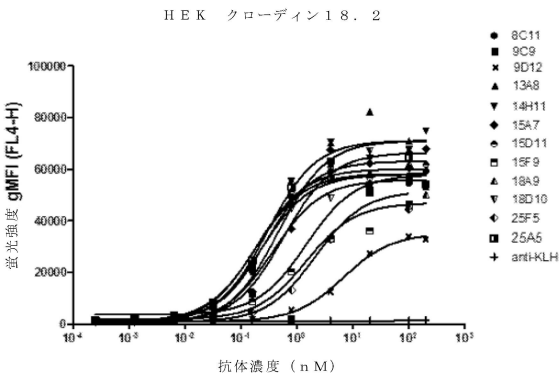


【 図 4 A 】

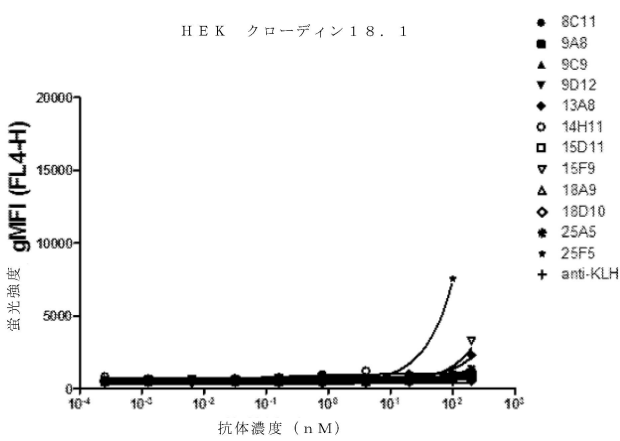


10

【 図 4 B 】



【 図 4 C 】

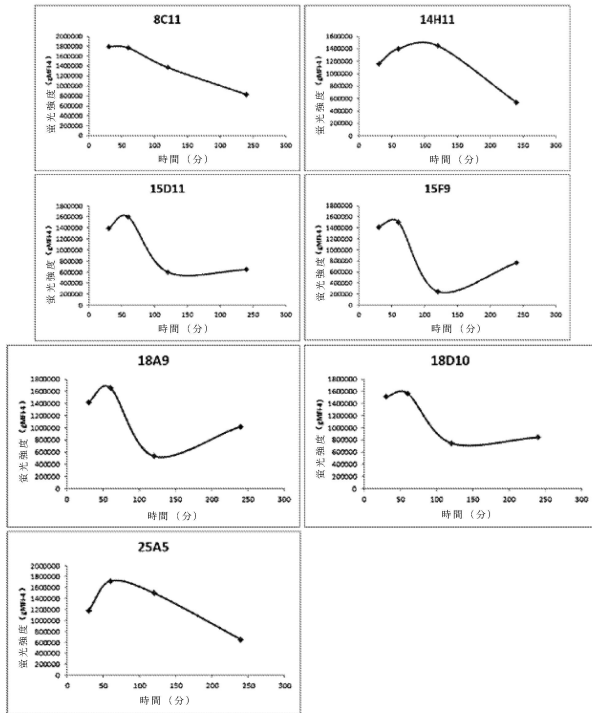


30

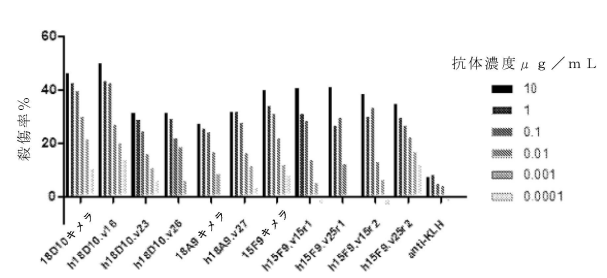
40

50

【図 5】



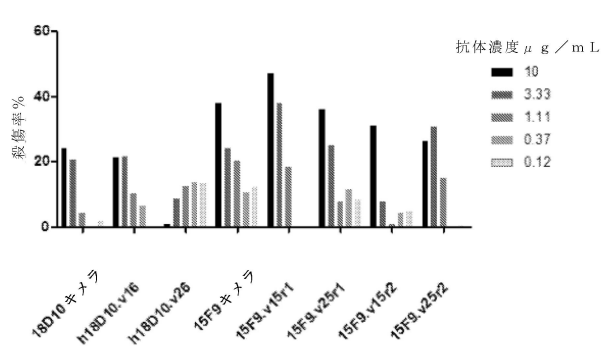
【図 6】



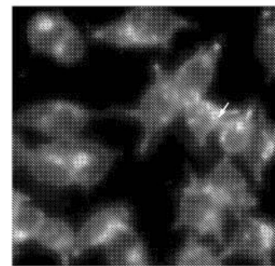
10

20

【図 7】



【図 8】



30

40

50

【配列表】

2022529703000001.app

10

20

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2020/084991									
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07K 16/30(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC											
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K; C12N; A61K; A61P Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNABS; VEN; CNKI; CNTXT; EPTXT; USTXT; WOTXT; ISI web of knowledge and Keywords: 紧密连接蛋白18.2, 抗体, claudin, CLDN, 18.2, antibod+ etc. 中国专利生物序列检索系统, Chinese Patent Biological Sequence Retrieval System; Genbank; EMBL和检索的序列, EMBL and sequence to be searched: SEQ ID NO: 1-40 etc.											
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>CN 105073776 A (BIONTECH AG et al.) 18 November 2015 (2015-11-18) see the abstract, claims 1-38, and description, paragraphs [0089] and [0235]-[0253], and embodiments 1-15</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>WO 2013167259 A1 (GANYMED PHARMACEUTICALS AG et al.) 14 November 2013 (2013-11-14) see claims 1-20, and figure 3</td> <td>1-3, 5-10</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	CN 105073776 A (BIONTECH AG et al.) 18 November 2015 (2015-11-18) see the abstract, claims 1-38, and description, paragraphs [0089] and [0235]-[0253], and embodiments 1-15	1-10	X	WO 2013167259 A1 (GANYMED PHARMACEUTICALS AG et al.) 14 November 2013 (2013-11-14) see claims 1-20, and figure 3	1-3, 5-10
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.									
X	CN 105073776 A (BIONTECH AG et al.) 18 November 2015 (2015-11-18) see the abstract, claims 1-38, and description, paragraphs [0089] and [0235]-[0253], and embodiments 1-15	1-10									
X	WO 2013167259 A1 (GANYMED PHARMACEUTICALS AG et al.) 14 November 2013 (2013-11-14) see claims 1-20, and figure 3	1-3, 5-10									
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.											
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family											
Date of the actual completion of the international search 06 July 2020		Date of mailing of the international search report 28 July 2020									
Name and mailing address of the ISA/CN China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088 China Facsimile No. (86-10)62019451		Authorized officer Telephone No.									

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/084991

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

- [1] Invention 1: claims 1-10 (in part) relate to an antibody or an antigen binding portion thereof that binds human CLDN 18.2 as respectively shown in SEQ ID NO: 7-9 of CDRs 1-3 that contains a light chain variable region, and also relate to a related coding nucleic acid molecule, a carrier, a cell, a kit, a pharmaceutical composition and the use. 10
- [2] Invention 2: claims 1-10 (in part) relate to an antibody or the antigen binding portion thereof that binds human CLDN 18.2 as respectively shown in SEQ ID NO: 17-19 of CDRs 1-3 that contains a light chain variable region, and also relate to a related coding nucleic acid molecule, a carrier, a cell, a kit, a pharmaceutical composition and the use.
- [3] Invention 3-Invention 22: claims 1-10 (in part) respectively relate to an antibody or the antigen binding portion thereof that binds human CLDN 18.2 as respectively shown in SEQ ID NO: 7-29, 37-39, 47-49, 57-59, 67-69, 77-79, 87-89, 97-99, 107-109, 117-119, 127-129, 137-139, 147-149, 237-239, 242-244, 247-249, 252-254, 257-259, 262-264 and 267-269 of CDRs 1-3 that contains a light chain variable region, and also relate to a related coding nucleic acid molecule, a carrier, a cell, a kit, a pharmaceutical composition and the use.
- [4] A same or corresponding technical feature shared by inventions 1-22 is that an antibody or the antigen binding portion thereof specifically binds the human CLDN 18.2, but the antibody specifically binding human CLDN 18.2 is disclosed in the prior art (e.g. CN104321345A, publication date: January 28 2015), and the antibody does not bind to CLDN 18.1. It is indicated that the same or corresponding technical feature has been disclosed in the prior art, and therefore inventions 1-22 do not share the same or corresponding special technical feature, and do not comply with the requirement of unity. 20

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.: 30
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

- Remark on Protest**
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees. 40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2020/084991

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	105073776	A	18 November 2015	CN	110144012	A	20 August 2019
				NZ	707831	A	30 November 2018
				JP	2019162104	A	26 September 2019
				US	2016272711	A1	22 September 2016
				RU	2015122484	A	10 January 2017
				ZA	201502737	B	27 September 2017
				IL	238464	D0	30 June 2015
				AU	2018211278	B2	28 March 2019
				JP	6499079	B2	10 April 2019
				KR	20150125642	A	09 November 2015
				RU	2019100107	A	25 February 2019
				MX	2015006003	A	09 December 2015
				CN	105073776	B	12 April 2019
				JP	2016500059	A	07 January 2016
				US	2019055311	A1	21 February 2019
				HK	1209434	A1	01 April 2016
				IL	238464	A	30 June 2015
				SG	11201503593U	A	29 June 2015
				AU	2013347184	A8	28 May 2015
				AU	2013347184	B2	14 June 2018
				UA	117741	C2	25 September 2018
				MX	369276	B	04 November 2019
				RU	2678127	C2	23 January 2019
				CA	2890438	A1	22 May 2014
				WO	2014075788	A1	22 May 2014
				AU	2018211278	A1	23 August 2018
				AU	2013347184	A1	21 May 2015
				MX	2019012846	A	28 November 2019
				US	10093736	B2	09 October 2018
WO	2013167259	A1	14 November 2013	DK	2847225	T3	20 January 2020
				PT	2847225	T	16 January 2020
				EP	2847225	B1	27 November 2019
				US	2018319891	A1	08 November 2018
				NZ	718280	A	27 April 2018
				SI	2847225	T1	31 March 2020
				AU	2013258432	B2	01 June 2017
				UA	116445	C2	26 March 2018
				US	9512232	B2	06 December 2016
				AU	2019222874	A1	19 September 2019
				AR	090973	A1	17 December 2014
				JP	2018052934	A	05 April 2018
				AU	2017216513	B2	30 May 2019
				IL	235261	D0	31 December 2014
				WO	2013167153	A1	14 November 2013
				EP	2847225	A1	18 March 2015
				US	10053512	B2	21 August 2018
				JP	2015517476	A	22 June 2015
				ZA	201407336	B	27 July 2016
				SG	11201406472W	A	27 November 2014
				HR	P20192347	T1	03 April 2020

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (January 2015)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2020/084991

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		RU 2661772 C2	19 July 2018
		NZ 700823 A	29 July 2016
		RS 59868 B1	31 March 2020
		US 2016333109 A1	17 November 2016
		US 2015147763 A1	28 May 2015
		LT 2847225 T	11 May 2020
		MX 2014013542 A	08 May 2015
		AU 2017216513 A1	31 August 2017
		SG 10201606048P A	29 September 2016
		JP 2019172675 A	10 October 2019
		BR 112014026755 A2	11 July 2017
		JP 6232646 B2	22 November 2017
		PL 2847225 T3	18 May 2020
		HK 1202557 A1	02 October 2015
		KR 20150008095 A	21 January 2015
		MX 369740 B	20 November 2019
		AU 2013258432 A1	30 October 2014
		CN 104321345 B	30 March 2018
		JP 6514294 B2	15 May 2019
		CA 2869725 A1	14 November 2013
		CN 104321345 A	28 January 2015
		RU 2014149332 A	27 June 2016
		CN 108047331 A	18 May 2018
<hr/>			

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (January 2015)

10

20

30

40

50

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2020/084991

A. 主题的分类 C07K 16/30(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) C07K; C12N; A61K; A61P 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CNABS; VEN; CNKI; CNTXT; EPTXT; USTXT; WOTXT; ISI web of knowledge和关键词: 紧密连接蛋白18.2, 抗体, claudin, CLDN, 18.2, antibod+ 等 中国专利生物序列检索系统; Genbank; EMBL和检索的序列: SEQ ID NO: 1-40等		
G. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	CN 105073776 A (拜恩科技股份有限公司等) 2015年 11月 18日 (2015 - 11 - 18) 见摘要, 权利要求1-38, 说明书第89、235-253段, 实施例1-15	1-10
X	WO 2013167259 A1 (GANYMED PHARMACEUTICALS AG等) 2013年 11月 14日 (2013 - 11 - 14) 见权利要求1-20, 图3	1-3、5-10
<input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期 2020年 7月 6日		国际检索报告邮寄日期 2020年 7月 28日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		授权官员 王金凤 电话号码 (86-10)-62412282

PCT/ISA/210 表(第2页) (2015年1月)

10

20

30

40

50

国际检索报告	国际申请号 PCT/CN2020/084991
第III栏 缺乏发明单一性的意见(续第I页第3项)	
本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明，即：	
[1] 发明1：权利要求1-10（部分），涉及包含轻链可变区的CDR 1-3分别如SEQ ID NO:7-9所示的结合人紧密连接蛋白18.2的抗体或其抗原结合部分，以及相关的编码核酸分子、载体、细胞、试剂盒、药物组合物和用途；	10
[2] 发明2：权利要求1-10（部分），涉及包含轻链可变区的CDR 1-3分别如SEQ ID NO:17-19所示的结合人紧密连接蛋白18.2的抗体或其抗原结合部分，以及相关的编码核酸分子、载体、细胞、试剂盒、药物组合物和用途；	
[3] 发明3-发明22：权利要求1-10（部分），分别涉及包含轻链可变区的CDR 1-3分别如SEQ ID NO: 27-29、37-39、47-49、57-59、67-69、77-79、87-89、97-99、107-109、117-119、127-129、137-139、147-149、237-239、242-244、247-249、252-254、257-259、262-264、267-269所示的结合人紧密连接蛋白18.2的抗体或其抗原结合部分，以及相关的编码核酸分子、载体、细胞、试剂盒、药物组合物和用途。	
[4] 发明1-22之间相同或相应的技术特征在于，所述抗体或其抗原结合部分特异性结合人紧密连接蛋白18.2，但现有技术（如CN104321345A，公开日为2015年01月28日）公开了特异性结合人CLDN18.2的抗体，其不与CLDN18.1结合。由此可知，所述相同或相应的特征已经被现有技术公开，因此发明1-22之间不具有相同或相应的特定技术特征，不具备单一性。	20
1. <input checked="" type="checkbox"/> 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费，本国际检索报告涉及全部可作检索的权利要求。	
2. <input type="checkbox"/> 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索，本单位未通知缴纳任何加费。	
3. <input type="checkbox"/> 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费，本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求，具体地说，是权利要求：	
4. <input type="checkbox"/> 申请人未按时缴纳被要求缴纳的附加检索费。因此，本国际检索报告仅涉及权利要求书中首先提及的发明；包含该发明的权利要求是：	
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 20%;">对异议的意见</div> <div style="width: 80%;"> <input type="checkbox"/> 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，适用时，缴纳了异议费。 <input type="checkbox"/> 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，但未在通知书规定的时间内缴纳异议费。 <input checked="" type="checkbox"/> 缴纳附加检索费时未提交异议书。 </div> </div>	

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2020/084991

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN 105073776 A	2015年 11月 18日	CN 110144012 A	2019年 8月 20日
		NZ 707831 A	2018年 11月 30日
		JP 2019162104 A	2019年 9月 26日
		US 2016272711 A1	2016年 9月 22日
		RU 2015122484 A	2017年 1月 10日
		ZA 201502737 B	2017年 9月 27日
		IL 238464 D0	2015年 6月 30日
		AU 2018211278 B2	2019年 3月 28日
		JP 6499079 B2	2019年 4月 10日
		KR 20150125642 A	2015年 11月 9日
		RU 2019100107 A	2019年 2月 25日
		MX 2015006003 A	2015年 12月 9日
		CN 105073776 B	2019年 4月 12日
		JP 2016500059 A	2016年 1月 7日
		US 2019055311 A1	2019年 2月 21日
		HK 1209434 A1	2016年 4月 1日
		IL 238464 A	2015年 6月 30日
		SG 11201503593U A	2015年 6月 29日
		AU 2013347184 A8	2015年 5月 28日
		AU 2013347184 B2	2018年 6月 14日
		UA 117741 C2	2018年 9月 25日
		MX 369276 B	2019年 11月 4日
		RU 2678127 C2	2019年 1月 23日
		CA 2890438 A1	2014年 5月 22日
		WO 2014075788 A1	2014年 5月 22日
		AU 2018211278 A1	2018年 8月 23日
		AU 2013347184 A1	2015年 5月 21日
		MX 2019012846 A	2019年 11月 28日
		US 10093736 B2	2018年 10月 9日
WO 2013167259 A1	2013年 11月 14日	DK 2847225 T3	2020年 1月 20日
		PT 2847225 T	2020年 1月 16日
		EP 2847225 B1	2019年 11月 27日
		US 2018319891 A1	2018年 11月 8日
		NZ 718280 A	2018年 4月 27日
		SI 2847225 T1	2020年 3月 31日
		AU 2013258432 B2	2017年 6月 1日
		UA 116445 C2	2018年 3月 26日
		US 9512232 B2	2016年 12月 6日
		AU 2019222874 A1	2019年 9月 19日
		AR 090973 A1	2014年 12月 17日
		JP 2018052934 A	2018年 4月 5日
		AU 2017216513 B2	2019年 5月 30日
		IL 235261 D0	2014年 12月 31日
		WO 2013167153 A1	2013年 11月 14日
		EP 2847225 A1	2015年 3月 18日
		US 10053512 B2	2018年 8月 21日
		JP 2015517476 A	2015年 6月 22日
		ZA 201407336 B	2016年 7月 27日
		SG 11201406472W A	2014年 11月 27日
		HR P20192347 T1	2020年 4月 3日

PCT/ISA/210 表(同族专利附件) (2015年1月)

10

20

30

40

50

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2020/084991

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
		RU 2661772 C2	2018年 7月 19日
		NZ 700823 A	2016年 7月 29日
		RS 59868 B1	2020年 3月 31日
		US 2016333109 A1	2016年 11月 17日
		US 2015147763 A1	2015年 5月 28日
		LT 2847225 T	2020年 5月 11日
		MX 2014013542 A	2015年 5月 8日
		AU 2017216513 A1	2017年 8月 31日
		SG 10201606048P A	2016年 9月 29日
		JP 2019172675 A	2019年 10月 10日
		BR 112014026755 A2	2017年 7月 11日
		JP 6232646 B2	2017年 11月 22日
		PL 2847225 T3	2020年 5月 18日
		HK 1202557 A1	2015年 10月 2日
		KR 20150008095 A	2015年 1月 21日
		MX 369740 B	2019年 11月 20日
		AU 2013258432 A1	2014年 10月 30日
		CN 104321345 B	2018年 3月 30日
		JP 6514294 B2	2019年 5月 15日
		CA 2869725 A1	2013年 11月 14日
		CN 104321345 A	2015年 1月 28日
		RU 2014149332 A	2016年 6月 27日
		CN 108047331 A	2018年 5月 18日

PCT/ISA/210 表(同族专利附件) (2015年1月)

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 N 5/10 (2006.01)
 C 0 7 K 16/28 (2006.01)
 A 6 1 P 35/00 (2006.01)
 A 6 1 K 39/395 (2006.01)
 A 6 1 K 31/7088 (2006.01)
 A 6 1 K 48/00 (2006.01)
 A 6 1 K 35/12 (2015.01)

C 1 2 N 5/10
 C 0 7 K 16/28
 A 6 1 P 35/00
 A 6 1 K 39/395 E
 A 6 1 K 39/395 T
 A 6 1 K 31/7088
 A 6 1 K 48/00
 A 6 1 K 35/12

4 H 0 4 5

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
 E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,
 CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,K
 G,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,N
 I,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,
 TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . T R I T O N

(72)発明者 陳 博

中華人民共和国、6 1 0 2 1 9、四川省成都市双流区成都天府国 際 生物城中路 1 8 号 D 2 号楼

(72)発明者 王 瑩

中華人民共和国、6 1 0 2 1 9、四川省成都市双流区成都天府国 際 生物城中路 1 8 号 D 2 号楼

F ターム (参考) 4B065 AA01X AA57X AA72X AA88X AA90X AA90Y AB01 AC14 BA01 CA25
 CA44

4C084 AA13 NA14 ZB26

4C085 AA13 AA14 BB11 EE01

4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB26

4C087 AA01 AA02 BB65 NA14 ZB26

4H045 AA11 AA30 BA72 CA40 DA76 EA20 FA74 GA26