

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2008年12月31日 (31.12.2008)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2009/001840 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 15/09 (2006.01) C07K 16/46 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) C07K 16/18 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(21) 国際出願番号:

PCT/JP2008/061516

(22) 国際出願日:

2008年6月25日 (25.06.2008)

(25) 国際出願の言語:

日本語

(26) 国際公開の言語:

日本語

(30) 優先権データ:

特願2007-166253 2007年6月25日 (25.06.2007) JP

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 株式会社未来創薬研究所 (FORERUNNER PHARMA RESEARCH CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1530041 東京都目黒区駒場四丁目2番16号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 吉田 賢二 (YOSHIDA, Kenji) [JP/JP]; 〒1530041 東京都目黒区駒場四丁目2番16号 株式会社未来創薬研究所内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 清水 初志, 外 (SHIMIZU, Hatushi et al.); 〒3000847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki (JP).

(54) Title: ANTI-PROMININ-1 ANTIBODY HAVING ADCC ACTIVITY OR CDC ACTIVITY

(54) 発明の名称: ADCC活性又はCDC活性を有する抗Prominin-1抗体

(57) Abstract: Disclosed is an antibody capable of binding to Prominin-1 and having an ADCC activity and/or a CDC activity. Also disclosed is a pharmaceutical composition comprising the antibody as an active ingredient. A nucleotide sequence of a variable region of an AC133 antibody is cloned to produce a recombinant antibody, and it is found that the recombinant antibody is imparted with an ADCC/CDC-inducing activity which is not found in the original AC133 antibody. It is also found that a chimeric antibody in which the sequence of a constant region is changed to human IgG1/k can induce potent ADCC when used in combination with a human effector cell. A humanized antibody having a CDR of an AC133 antibody grafted into a human antibody sequence therein is produced. The substitution of an amino acid residue is introduced into a humanized L-chain sequence in the humanized antibody to produce a humanized antibody having the same level of binding activity as that of the chimeric antibody. Thus, it becomes possible to provide an unlabeled AC133 human chimeric antibody having an anti-tumor activity and a humanized antibody.

(57) 要約: 本発明は、Prominin-1に結合し、ADCC活性及び/又はCDC活性を有する抗体、並びに該抗体を有効成分とする医薬組成物を提供することを目的とする。 本発明者らは、上記の課題を解決するために、AC133の抗体可変領域塩基配列をクローニングし、組換え抗体を作製することで、もともとのAC133抗体には存在しないADCC/CDC誘導作用が組換え抗体に付与されていることを見出し、本発明を完成させた。定常領域配列をヒトIgG1/kに変換したキメラ抗体は、ヒトキメラ抗体・ヒトエフェクター細胞との組み合わせにおいて強いADCCが誘導されることを見出した。また、本発明者らはAC133抗体のCDRをヒト抗体配列に移植したヒト化抗体を作製し、さらにヒト化L鎖配列にアミノ酸置換を導入することでキメラ抗体と同等の結合活性を有するヒト化抗体を作製した。本発明により抗腫瘍作用を有する非標識のAC133ヒトキメラ抗体、そしてヒト化抗体が提供される。

WO 2009/001840 A1

明細書

ADCC活性又はCDC活性を有する抗Prominin-1抗体

技術分野

[0001] 本発明は、Prominin-1に結合し、ADCC活性及び／又はCDC活性を有する抗体、並びに該抗体を有効成分とする医薬組成物に関する。

背景技術

[0002] AC133は造血幹細胞マーカーを認識する抗体として単離された(非特許文献1)、5回膜貫通蛋白質Prominin-1(CD133)の糖修飾構造を認識するマウスモノクローナル抗体である(非特許文献2)。AC133で認識されるエピトープは、胎児肝、骨髓、末梢血由来のCD34陽性造血幹細胞に加えて、内皮前駆細胞や組織特異的幹細胞・前駆細胞などに存在することが報告されている(非特許文献3－6)。また血液腫瘍(AML, CLL)や固体腫瘍(大腸、胃、肺、肝、腎、前立腺などの各種癌)など広範な癌種でのProminin-1過剰発現が報告されている(非特許文献7)。AC133抗体によるエピトープ検出は、Prominin-1遺伝子発現および蛋白質発現と単純には相関せず、その理由として細胞特異的な翻訳後糖修飾の存在が指摘されている(非特許文献2、8)。

[0003] 癌でのProminin-1過剰発現という点に関連して、癌組織にAC133エピトープを有する未分化な副次細胞集団が存在し、この集団に含まれる癌幹細胞が増殖と分化を繰り返すことで腫瘍形成と維持が起こるとの報告が近年相次いでいる。これまで脳腫瘍(非特許文献9)、上衣腫(非特許文献10)、前立腺癌(非特許文献11)、乳癌(非特許文献12)、大腸癌(非特許文献13、14)でこのような癌幹細胞の存在が見つかっている。癌組織からAC133エピトープ(CD133)陽性を指標に濃縮した少数の癌細胞を免疫不全マウスに移植するとオリジナルの癌組織と組織形態的に似た腫瘍形成が高頻度で起こる一方で、AC133エピトープ陰性群では数十倍量の細胞を移植しても腫瘍形成は起きない。この結果は、癌幹細胞を選択的に叩くことで腫瘍増殖は抑制されるかもしれない可能性を示しており、癌の新たな治療ターゲッティング方法として注目に値する。従来の化学療法剤の多くは非特異的な増殖抑制、細胞毒性をその作用機序としてもち、正常組織への副作用が治療上の問題とされてきた。増殖する

未分化癌細胞を標的とすることで、癌転移を抑制し、原発腫瘍層を縮小方向へと進め、かつ正常細胞への副作用を軽減することが実現できるかもしれない。

[0004] Smithらは、Hep3B細胞をSCIDマウスに移植したモデルにおいて、強力な細胞毒性物質monomethyl auristatin F (MMAF)を標識したAC133抗体が腫瘍体積縮小作用を持つことを示した(非特許文献7)。MMAFは細胞膜を透過しない化合物であることから、MMAF標識抗体の細胞内取り込みが起こることが薬剤作用機序の一過程であることが推察される。トキシン標識抗体を用いた癌の治療に関してはそのコンセプトが示されてから20年以上の月日がたっているが、臨床応用上、遊離した薬剤が正常組織に対して示す重篤な毒性など、未解決な問題が存在する。一方、AC133が抗原結合後にすみやかに細胞内に取り込まれてしまうと仮定すると、抗体結合に依存した補体依存性細胞傷害(complement dependent cytotoxicity; CDC)活性や抗体依存性細胞介在性細胞傷害(antibody dependent cellular cytotoxicity; ADCC)活性の誘導に関してはその可能性が低いと考えられた。

[0005] なお、本出願の発明に関連する先行技術文献情報を以下に示す。

非特許文献1:Yin et al. (1997) Blood 90, 5002-12.

非特許文献2:Miraglia et al. (1997) Blood 90, 5013-21.

非特許文献3:Gehling et al. (2000) Blood 95, 3106-12.

非特許文献4:Thill et al. (2004) Invest Ophthalmol Vis Sci 45:U160, 3519.

非特許文献5:Bussolati et al. (2005) Am J Pathol 166, 545-55.

非特許文献6:Richardson et al. (2004) J Cell Sci 117, 3539-45.

非特許文献7:Smith et al. (2007) AACR 100th Annual Meeting, poster session #133 2.

非特許文献8:Florek et al. (2005) Cell Tissue Res 319, 15-26.

非特許文献9:Sheila et al. (2004) Nature 432, 396-401.

非特許文献10:Taylor et al. (2005) Cancer Cell 8, 323-35.

非特許文献11:Collins et al. (2005) Cancer Res 65, 10946-10951.

非特許文献12:Al-Hajj et al. (2003) Proc Natl Acad Sci USA 100, 3983-8.

非特許文献13:O'Brien et al. (2007) Nature 445, 106-110.

非特許文献14: Ricci-Vitiani et al. (2007) Nature 445, 111-5.

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明は、このような状況に鑑みてなされたものであり、その目的は、Prominin-1に結合し、ADCC活性及び／又はCDC活性を有する抗体、並びに該抗体を有効成分とする医薬組成物を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは、上記の課題を解決するために、AC133の抗体可変領域塩基配列をクローニングし、組換え抗体を作製することで、もともとのAC133抗体には存在しないADCC/CDC誘導作用が組換え抗体に付与されていることを見出し、本発明を完成させた。ハイブリドーマが產生するサブタイプIgG1のAC133マウス抗体にはCDC、ADC作用とともに全く認められなかった。サブタイプIgG1のマウス抗体に関してはCDC誘導がほとんど認められないことを考慮に入れ、発明者らは最初にIgG1マウス定常領域配列をIgG2a配列へと置き換えた組換えIgG2a抗体を作製した。組換えIgG2aマウス抗体でCDC誘導は起きたがADCC誘導は起こらなかった。ターゲットに用いたWER I-Rb-1細胞にはADCC誘導に十分と判断される抗原量が存在したため、ADCC誘導にAC133エピトープ部位が不適である、もしくはエピトープに結合した抗体複合体は速やかにインターナライズされてしまうために薬効機序的に不適であると考えられた。しかし、定常領域配列をヒトIgG1/kに変換することでさらに検討を重ね、ヒトキメラ抗体・ヒトエフェクター細胞との組み合わせにおいて強いADCCが誘導されることを見出した。

さらに、本発明者らはAC133抗体のCDRをヒト抗体配列に移植したヒト化抗体の作製を試みた。CDRを移植する抗体配列として、AF174028(H鎖)、AB064105(L鎖)を用いてヒト化を行ったがヒトキメラ抗体と比較して、抗原に対する結合アフィニティーが低かった。しかし、ヒト化L鎖配列にアミノ酸置換を導入することでさらに検討を重ね、ヒト化L鎖可変領域FR1の15番目のアミノ酸がPhe、さらにヒト化L鎖可変領域FR1の18番目のアミノ酸がGlnである場合に、キメラ抗体と同等の結合活性を有することを見出した。

マウス抗体からのヒトIgG1/kまたはヒト化抗体への変換は、抗体をヒトに医薬組成物として投与する際、免疫原性を低減するという点において優っており、分子としてより望ましい形である。本発明により抗腫瘍作用を有する非標識のAC133ヒトキメラ抗体、そしてヒト化抗体が提供される。

[0008] 本発明は、より具体的には以下の[1]～[16]を提供するものである。

- [1] Prominin-1に結合する抗体であって、かつADCC活性又はCDC活性を有する抗体。
- [2] AC133抗体が認識するエピトープと同じエピトープを認識することを特徴とする[1]に記載の抗体。
- [3] キメラ抗体又はヒト化抗体である[1]または[2]に記載の抗体。
- [4] 重鎖可変領域CDR1として配列番号12のアミノ酸配列を有し、重鎖可変領域CDR2として配列番号14のアミノ酸配列を有し、重鎖可変領域CDR3として配列番号16のアミノ酸配列を有することを特徴とする[1]～[3]いずれかに記載の抗体。
- [5] 軽鎖可変領域CDR1として配列番号20のアミノ酸配列を有し、軽鎖可変領域CDR2として配列番号22のアミノ酸配列を有し、軽鎖可変領域CDR3として配列番号24のアミノ酸配列を有することを特徴とする[1]～[4]いずれかに記載の抗体。
- [6] 配列番号34のアミノ酸配列の15位に相当する、軽鎖可変領域FR1の15番目のアミノ酸がPheである[5]に記載の抗体。
- [7] 配列番号34のアミノ酸配列の18位に相当する、軽鎖可変領域FR1の18番目のアミノ酸がGlnである[6]に記載の抗体。
- [8] 以下の(a)～(f)いずれかに記載の抗体。
 - (a) 配列番号32(h133Hアミノ酸配列)の1番目～114番目のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を含む抗体、
 - (b) 配列番号42(h133VL(c)アミノ酸配列)の1番目～112番目のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含む抗体、
 - (c) 配列番号46(h133VL(e)アミノ酸配列)の1番目～112番目のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含む抗体、
 - (d) 配列番号32(h133VHアミノ酸配列)の1番目～114番目のアミノ酸配列を有する

重鎖可変領域と配列番号42(h133VL(c)アミノ酸配列)の1番目～112番目のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含む抗体、

(e) 配列番号32(h133VHアミノ酸配列)の1番目～114番目のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域と配列番号46(h133VL(e)アミノ酸配列)の1番目～112番目のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含む抗体、

(f) (a)～(e)いずれかに記載の抗体と機能的に同等な抗体

[9] 重鎖定常領域がマウスIgG1でないことを特徴とする[1]～[8]いずれかに記載の抗体。

[10] 重鎖定常領域がヒトIgG1であり、軽鎖定常領域がヒトIg κ である[9]記載の抗体。

[11] 細胞傷害性物質が結合していないことを特徴とする[10]に記載の抗体。

[12] [1]～[11]いずれかに記載の抗体を有効成分とする医薬組成物。

[13] 抗癌剤である[12]に記載の医薬組成物。

[14] [1]～[11]いずれかに記載の抗体を対象に投与する工程を含む癌を予防または治療する方法。

[15] 抗癌剤の製造における、[1]～[11]いずれかに記載の抗体の使用。

[16] 癌を治療するための方法に使用するための、[1]～[11]いずれかに記載の抗体。

[0009] [発明の実施の形態]

本発明は、Prominin-1に結合し、ADCC活性及び／又はCDC活性を有する抗体、並びに該抗体を有効成分とする医薬組成物に関する。

[0010] 本発明者らは、AC133の抗体可変領域塩基配列をクローニングし、組換え抗体を作製することで、もともとのAC133抗体には存在しないADCC/CDC誘導作用が組換え抗体に付与されていることを見出した。本発明はこれらの知見に基づくものである。

[0011] 本発明の抗Prominin-1抗体はProminin-1に結合する限りその由来(マウス、ラット、ヒト、等)、種類(モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体)および形状(改変抗体、低分子化抗体、修飾抗体、など)等は問われない。

[0012] 本発明においてProminin-1とは、好ましくはヒトProminin-1を意味する。ヒトProminin

-1の塩基配列又はアミノ酸配列は既に公知である(Miraglia et al. (1997) Blood 90, 5 013-21、GenBank accession no. is NM_006017)。

[0013] 本発明の抗Prominin-1抗体は特異的にProminin-1に結合することが好ましい。又、本発明の抗Prominin-1抗体はモノクローナル抗体であることが好ましい。

これらの抗Prominin-1抗体は、後述の方法によって得ることができる。

[0014] 本発明の抗Prominin-1抗体は通常、抗体依存性細胞介在性細胞傷害(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity:ADCC)活性または補体依存性細胞傷害(complement-dependent cytotoxicity:CDC)活性を有し、好ましくはADCC活性とCDC活性の両方を有する。本発明において、CDC活性とは補体系による細胞傷害活性を意味する。一方ADCC活性とは標的細胞の細胞表面抗原に特異的抗体が付着した際、そのFc部分にFc γ 受容体保有細胞(免疫細胞等)がFc γ 受容体を介して結合し、標的細胞に傷害を与える活性を意味する。

[0015] 特に限定されないが、本発明の抗体は癌幹細胞やヒト網膜芽腫細胞株WERI-Rb-1などの癌細胞に対してADCC活性および／又はCDC活性を有していることが好ましい。

[0016] ADCC活性又はCDC活性の測定は当業者に公知の方法により行うことが可能である(例えば、Current protocols in Immunology, Chapter7. Immunologic studies in humans, Editor, John E, Coligan et al., John Wiley & Sons, Inc.,(1993)等)。

具体的には、例えば以下の方法により測定することが可能である。

[0017] まず、エフェクター細胞、補体溶液、標的細胞の調製が実施される。

(1) エフェクター細胞の調製

CBA/Nマウスなどから脾臓を摘出し、RPMI1640培地(Invitrogen社製)中で脾臓細胞が分離される。10%ウシ胎児血清(FBS、HyClone社製)を含む同培地で洗浄後、細胞濃度を 5×10^6 /mlに調製することによって、エフェクター細胞が調製できる。

(2) 補体溶液の調製

Baby Rabbit Complement(CEDARLANE社製)を10% FBS含有培地(Invitrogen社製)にて10倍希釈し、補体溶液が調製できる。

(3) 標的細胞の調製

Prominin-1タンパク質を発現する細胞を0.2 mCiの⁵¹Cr-クロム酸ナトリウム(GEヘルスケアバイオサイエンス社製)とともに、10% FBS含有DMEM培地中で37°Cにて1時間培養することにより該標的細胞を放射性標識できる。Prominin-1タンパク質を発現する細胞としては、Prominin-1タンパク質をコードする遺伝子で形質転換された細胞、癌細胞(癌幹細胞、ヒト網膜芽腫細胞株WERI-Rb-1など)等を利用することができます。放射性標識後、細胞を10% FBS含有RPMI1640培地にて3回洗浄し、細胞濃度を $2 \times 10^5/\text{ml}$ に調製することによって、該標的細胞が調製できる。

- [0018] ADCC活性、又はCDC活性は下記に述べる方法により測定できる。ADCC活性の測定の場合は、96ウェルU底プレート(Becton Dickinson社製)に、標的細胞と、抗Prominin-1抗体を50 μl ずつ加え、氷上にて15分間反応させる。その後、エフェクター細胞100 μl を加え、炭酸ガスインキュベーター内で4時間培養する。抗体の終濃度は0または10 $\mu\text{g/ml}$ とする。培養後、100 μl の上清を回収し、ガンマカウンター(COBRAII AUTO-GAMMA、MODEL D5005、Packard Instrument Company社製)で放射活性を測定する。細胞傷害活性(%)は得られた値を使用して $(A-C) / (B-C) \times 100$ の計算式に基づいて計算できる。Aは各試料における放射活性(cpm)、Bは1% NP-40(nacalai tesque社製)を加えた試料における放射活性(cpm)、Cは標的細胞のみを含む試料の放射活性(cpm)を示す。
- [0019] 一方、CDC活性の測定の場合は、96ウェル平底プレート(Becton Dickinson社製)に、標的細胞と、抗Prominin-1抗体を50 μl ずつ加え、氷上にて15分間反応させる。その後、補体溶液100 μl を加え、炭酸ガスインキュベーター内で4時間培養する。抗体の終濃度は0または3 $\mu\text{g/ml}$ とする。培養後、100 μl の上清を回収し、ガンマカウンターで放射活性を測定する。細胞傷害活性はADCC活性の測定と同様にして計算できる。
- [0020] 本発明の抗体の好ましい態様の一つとして、AC133抗体が認識するエピトープと同じエピトープを認識する抗体を挙げることができる。AC133は既に公知の抗体であり、ATCCに寄託されたハイブリドーマ細胞HB-12346から取得することが可能である。
- [0021] 被検抗体が、ある抗体とエピトープを共有することは、両者の同じエピトープに対する競合によって確認することができる。抗体間の競合は、交叉ブロッキングアッセイな

どによって検出される。例えば競合ELISAアッセイは、好ましい交叉ブロッキングアッセイである。具体的には、交叉ブロッキングアッセイにおいては、マイクロタイタープレートのウェル上にコートしたProminin-1タンパク質を、候補の競合抗体の存在下、または非存在下でブレインキュベートした後に、本発明の抗Prominin-1抗体が添加される。ウェル中のProminin-1タンパク質に結合した本発明の抗Prominin-1抗体の量は、同じエピトープへの結合に対して競合する候補競合抗体(被検抗体)の結合能に間接的に相関している。すなわち同一エピトープに対する被検抗体の親和性が大きくなればなる程、本発明の抗Prominin-1抗体のProminin-1タンパク質をコートしたウェルへの結合量は低下し、被検抗体のProminin-1タンパク質をコートしたウェルへの結合量は増加する。

- [0022] ウェルに結合した抗体量は、予め抗体を標識しておくことによって、容易に測定することができる。たとえば、ビオチン標識された抗体は、アビジンペルオキシダーゼコンジュゲートと適切な基質を使用することにより測定できる。ペルオキシダーゼなどの酵素標識を利用した交叉ブロッキングアッセイを、特に競合ELISAアッセイと言う。抗体は、検出あるいは測定が可能な他の標識物質で標識することができる。具体的には、放射標識あるいは蛍光標識などが公知である。
- [0023] 更に被検抗体が本発明の抗Prominin-1抗体と異なる種に由来する定常領域を有する場合には、ウェルに結合した抗体の量を、その抗体の定常領域を認識する標識抗体によって測定することもできる。あるいは同種由来の抗体であっても、クラスが相違する場合には、各クラスを識別する抗体によって、ウェルに結合した抗体の量を測定することができる。
- [0024] 候補の競合抗体非存在下で実施されるコントロール試験において得られる結合活性と比較して、候補抗体が、少なくとも20%、好ましくは少なくとも20-50%、さらに好ましくは少なくとも50%、抗Prominin-1抗体の結合をブロックできるならば、該候補競合抗体は本発明の抗Prominin-1抗体と実質的に同じエピトープに結合するか、又は同じエピトープへの結合に対して競合する抗体である。
- [0025] AC133抗体が認識するエピトープと同じエピトープを認識する抗体の具体例として、例えばAC133のCDR配列と同一のCDR配列を有する抗体を挙げることができる。

- [0026] AC133は重鎖可変領域のCDR1として配列番号12のアミノ酸配列を有し、重鎖可変領域のCDR2として配列番号14のアミノ酸配列を有し、重鎖可変領域のCDR3として配列番号16のアミノ酸配列を有する。従って、本発明のAC133抗体が認識するエピトープと同じエピトープを認識する抗体の一つの態様として、重鎖可変領域のCDR1として配列番号12に記載のアミノ酸配列を有し、重鎖可変領域のCDR2として配列番号14のアミノ酸配列を有し、重鎖可変領域のCDR3として配列番号16のアミノ酸配列を有する抗体を挙げることができる。
- [0027] 又、AC133は軽鎖可変領域のCDR1として配列番号20に記載のアミノ酸配列を有し、軽鎖可変領域のCDR2として配列番号22に記載のアミノ酸配列を有し、軽鎖可変領域のCDR3として配列番号24に記載のアミノ酸配列を有する。従って、本発明のAC133抗体が認識するエピトープと同じエピトープを認識する抗体の一つの態様として、軽鎖可変領域のCDR1として配列番号20に記載のアミノ酸配列を有し、軽鎖可変領域のCDR2として配列番号22に記載のアミノ酸配列を有し、軽鎖可変領域のCDR3として配列番号24に記載のアミノ酸配列を有する抗体を挙げることができる。
- [0028] さらに、本発明のAC133が認識するエピトープと同じエピトープを認識する抗体の一つの態様として、重鎖可変領域のCDR1として配列番号12に記載のアミノ酸配列を有し、重鎖可変領域のCDR2として配列番号14のアミノ酸配列を有し、重鎖可変領域のCDR3として配列番号16のアミノ酸配列を有し、軽鎖可変領域のCDR1として配列番号20に記載のアミノ酸配列を有し、軽鎖可変領域のCDR2として配列番号22に記載のアミノ酸配列を有し、軽鎖可変領域のCDR3として配列番号24に記載のアミノ酸配列を有する抗体を挙げることができる。
- [0029] このような抗体の好ましい例として、特に限定されないが、キメラ抗体やヒト化抗体を挙げることができる。
- [0030] 本発明の抗体の好ましい態様の一つとしてキメラ抗体またはヒト化抗体を挙げることができる。
- [0031] キメラ抗体は、互いに由来の異なる領域同士を連結した抗体を言う。一般にキメラ抗体は、ヒト以外の動物由来抗体のV領域とヒト抗体由来のC領域とから構成される。例えば、マウス抗体の重鎖、軽鎖の可変領域と、ヒト抗体の重鎖、軽鎖の定常領域か

らなる抗体は、マウスヒト異種キメラ抗体である。

- [0032] 本発明において、キメラ抗体の作製に用いられるマウス抗体の重鎖、軽鎖の可変領域の具体的な例としては、配列番号10に記載のアミノ酸配列を有するVH、または配列番号18に記載のアミノ酸配列を有するVLを挙げることができる。また、配列番号18に記載のアミノ酸配列を有するVH、または配列番号17に記載のポリヌクレオチドがコードするアミノ酸配列を有するVLもまた、上記マウス抗体の重鎖、軽鎖の可変領域の具体例として挙げることができる。
- [0033] これに対してヒト化抗体は、ヒト以外の動物由来抗体の相補性決定領域(CDR; copr ementarity determining region)と、ヒト抗体由来のフレームワーク領域(FR; framework region)およびヒト抗体由来のC領域とから構成される。ヒト化抗体はヒト体内における抗原性が低下しているため、本発明の治療剤の有効成分として有用である。ヒト化抗体は、再構成(reshaped)ヒト抗体とも称される。具体的には、ヒト以外の動物、たとえばマウス抗体のCDRをヒト抗体に移植したヒト化抗体などが公知である。ヒト化抗体を得るための一般的な遺伝子組換え手法も知られている。
- [0034] 具体的には、マウスの抗体のCDRをヒトのFRに移植するための方法として、たとえばOverlap Extension PCRが公知である。Overlap Extension PCRにおいては、ヒト抗体のFRを合成するためのプライマーに、移植すべきマウス抗体のCDRをコードする塩基配列が付加される。プライマーは4つのFRのそれぞれについて用意される。一般に、マウスCDRのヒトFRへの移植においては、マウスのFRと相同性の高いヒトFRを選択するのが、CDRの機能の維持において有利であるとされている。すなわち、一般に、移植すべきマウスCDRに隣接しているFRのアミノ酸配列と相同性の高いアミノ酸配列からなるヒトFRを利用するのが好ましい。
- [0035] また連結される塩基配列は、互いにインフレームで接続されるようにデザインされる。それぞれのプライマーによってヒトFRが個別に合成される。その結果、各FRにマウスCDRをコードするDNAが付加された産物が得られる。各産物のマウスCDRをコードする塩基配列は、互いにオーバーラップするようにデザインされている。続いて、ヒト抗体遺伝子を鋳型として合成された産物のオーバーラップしたCDR部分を互いにアニールさせて相補鎖合成反応が行われる。この反応によって、ヒトFRがマウスCDRの

配列を介して連結される。

- [0036] 最終的に3つのCDRと4つのFRが連結されたV領域遺伝子は、その5'末端と3'末端にアニールし適当な制限酵素認識配列を付加されたプライマーによってその全長が増幅される。上記のように得られたDNAとヒト抗体C領域をコードするDNAとをインフレームで融合するように発現ベクター中に挿入することによって、ヒト型抗体発現用ベクターが作成できる。該組込みベクターを宿主に導入して組換え細胞を樹立した後に、該組換え細胞を培養し、該ヒト化抗体をコードするDNAを発現させることによって、該ヒト化抗体が該培養細胞の培養物中に產生される(欧州特許公開EP 239400、国際公開WO 96/02576参照)。
- [0037] 上述のように作製されたヒト化抗体の抗原への結合活性を定性的又は定量的に測定し、評価することによって、CDRを介して連結されたときに該CDRが良好な抗原結合部位を形成するようなヒト抗体のFRが好適に選択できる。必要に応じ、再構成ヒト抗体のCDRが適切な抗原結合部位を形成するようにFRのアミノ酸残基を置換することもできる。たとえば、マウスCDRのヒトFRへの移植に用いたPCR法を応用して、FRにアミノ酸配列の変異を導入することができる。具体的には、FRにアニーリングするプライマーに部分的な塩基配列の変異を導入することができる。このようなプライマーによって合成されたFRには、塩基配列の変異が導入される。アミノ酸を置換した変異型抗体の抗原への結合活性を上記の方法で測定し評価することによって所望の性質を有する変異FR配列が選択できる(Sato, K. et al., Cancer Res, 1993, 53, 851-856)。
- 。
- [0038] 本発明のヒト化抗体に移植する重鎖可変領域FRの具体的な例として、以下の(1)～(4)のFRを挙げることができる。
- (1)配列番号32の1～30番目のアミノ酸配列を有するFR1
(2)配列番号32の36～49番目のアミノ酸を有するFR2
(3)配列番号32の67～98番目のアミノ酸を有するFR3
(4)配列番号32の104～114番目のアミノ酸を有するFR4
- また、本発明のヒト化抗体に移植する軽鎖可変領域FRの具体的な例として、以下の(5)～(8)のFRを挙げることができる。

- (5)配列番号34の1～23番目のアミノ酸配列を有するFR1
- (6)配列番号34の40～54番目のアミノ酸配列を有するFR2
- (7)配列番号34の62～93番目のアミノ酸配列を有するFR3
- (8)配列番号34の103～112番目のアミノ酸配列を有するFR4

また、本発明のヒト化抗体に移植する軽鎖可変領域FRの具体的な例として、以下の(9)～(12)のFRを挙げることができる。

- (9)配列番号42の1～23番目のアミノ酸配列を有するFR1
- (10)配列番号42の40～54番目のアミノ酸配列を有するFR2
- (11)配列番号42の62～93番目のアミノ酸配列を有するFR3
- (12)配列番号42の103～112番目のアミノ酸配列を有するFR4

また、本発明のヒト化抗体に移植する軽鎖可変領域FRの具体的な例として、以下の(13)～(16)のFRを挙げることができる。

- (13)配列番号46の1～23番目のアミノ酸配列を有するFR1
- (14)配列番号46の40～54番目のアミノ酸配列を有するFR2
- (15)配列番号46の62～93番目のアミノ酸配列を有するFR3
- (16)配列番号46の103～112番目のアミノ酸配列を有するFR4

本発明のヒト化抗体に使用されるFRは上記配列に限定されるものではない。また、ヒト化抗体の機能を向上させるために、ヒトFRアミノ酸配列において、1又は複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および／または挿入されたFR配列も本願のFRに含まれる。

[0039] 本発明の抗体の好ましい態様の一つとして、抗体の重鎖定常領域がマウスIgG1ではない抗体を挙げることができる。マウスIgG1以外の抗体としては、特に限定されないが、例えばマウスIgG2a、マウスIgG2b、マウスIgG3、ヒトIgG1、ヒトIgG2、ヒトIgG3、ヒトIgG4などを挙げることができる。本発明において好ましいサブタイプはヒトIgG1である。軽鎖は特に限定されず、 κ 鎖または λ 鎖のいずれでもよいが、 κ 鎖が好ましく、特にヒト κ 鎖が好ましい。

[0040] 本発明の抗体の好ましい態様の一つとして、細胞傷害性物質が結合していない抗体を挙げることができる。細胞傷害性物質は、細胞に細胞死を誘導する物質であり、

具体的にはトキシン、放射性物質または化学療法剤である。トキシンの具体例としては次のものを挙げることができる。ジフテリアトキシンA鎖 (Diphtheria toxin A Chain)(Langone J.J., et al., Methods in Enzymology, 93, 307–308, 1983) ;シュードモナスエンドトキシン (Pseudomonas Exotoxin)(Nature Medicine, 2, 350–353, 1996);リシン鎖 (Ricin A Chain) (Fulton R.J., et al., J.Biol.Chem., 261, 5314–5319, 1986 ; Sivam G., et al., Cancer Res., 47, 3169–3173, 1987 ; Cumber A.J. et al., J.Immunol.Methods, 135, 15–24, 1990 ; Wawrzynczak E.J.,et al., Cancer Res., 50, 7519–7562, 1990 ; G heeite V., et al.,J.Immunol.Methods, 142, 223–230, 1991) ;無糖鎖リシンA鎖 (Deglycosylated Ricin A Chain) (Thorpe P.E., et al.,Cancer Res., 47, 5924–5931, 1987) ;アブリノンA鎖 (Abrin A Chain) (Wawrzynczak E.J., et al., Br.J.Cancer, 66, 361–366, 1992 ; Wawrzynczak E.J., et al., Cancer Res., 50, 7519–7562,1990 ; Sivam G., et al., Cancer Res., 47, 3169–3173, 1987 ; Thorpe P.E., et al., Cancer Res., 47, 5924–5931, 1987) ;ゲロニン (Gelonin) (Sivam G., et al., Cancer Res., 47, 3169–3173, 1987; C umber A.J. et al., J.Immunol.Methods, 135, 15–24, 1990 ; Wawrzynczak E.J., et al., Cancer Res., 50, 7519–7562, 1990 ; Bolognesi A., et al.,Clin.exp.Immunol., 89, 341–346, 1992) ;ポークウイード抗ウィルス蛋白 (PAP-s ; Pokeweed anti-viral protein from seeds) (Bolognesi A., et al., Clin.exp.Immunol., 89, 341–346, 1992) ;ブリオジン (Briodin) (Bolognesi A., et al., Clin.exp.Immunol., 89, 341–346, 1992) ;サボリノン (Sap orin) (Bolognesi A., et al., Clin.exp.Immunol., 89, 341–346, 1992) ;モモルジン (Mommordin) (Cumber A.J., et al., J.Immunol.Methods, 135, 15–24, 1990 ; Wawrzynczak E.J., et al., Cancer Res., 50, 7519–7562, 1990 ;Bolognesi A., et al., Clin.exp.Immunol., 89, 341–346, 1992) ;モモルコキン(Momorcochin) (Bolognesi A., et al., Clin.exp. Immunol., 89, 341–346, 1992) ;ジアンシン32 (Dianthin 32) (Bolognesi A., et al., Cli n.exp.Immunol.,89, 341–346, 1992) ;ジアンシン30 (Dianthin 30) (Stirpe F., Barbieri L., FEBS letter 195,1–8, 1986) ;モデッシン (Modeccin) (Stirpe F., Barbieri L., FEB S letter 195, 1–8, 1986) ;ビスカミン (Viscumin) (Stirpe F., Barbieri L., FEBS letter 195, 1–8, 1986) ;ボルケシン (Volkesin) (Stirpe F., Barbieri L., FEBS letter 195, 1–8, 1986) ;ドデカンドリン (Dodecandrin) (Stirpe F., Barbieri L., FEBS letter 195,1–8, 1992)

86) ;トリチン (Tritin) (Stirpe F., Barbieri L., FEBS letter 195, 1-8, 1986);ルフィン (Luffin) (Stirpe F., Barbieri L., FEBS letter 195, 1-8, 1986);トリコキリン(Trichokirin) (Casellas P., et al., Eur.J.Biochem. 176, 581-588, 1988 ; Bolognesi A., et al., Clin.exp.Immunol., 89, 341-346, 1992)。

放射性物質とは、放射性同位体を含む物質のことをいい、³²P、¹⁴C、¹²⁵I、³H、¹³¹I、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Reが含まれる。

[0041] 化学療法剤にはサイトカイン、抗腫瘍剤、酵素が含まれる。化学療法剤は通常、200～1000の分子量を有する。化学療法剤の例として以下の物質を挙げることができる。*monomethyl auristatin F(MMAF)*、*メルファラン(Melphalan)* (Rowland G.F., et al., Nature 255, 487-488, 1975) ;*シスプラチン (Cis-platinum)* (Hurwitz E. and Haimovich J., Method In Enzymology 178, 369-375, 1986 ; Schechter B., et al., Int.J.Cancer 48, 167-172, 1991) ;*カルボプラチン (Carboplatin)* (Ota, Y., et al., Asia-Oceania J.Obstet.Gynaecol. 19, 449-457, 1993) ;*マイトマイシンC (Mitomycin C)* (Noguchi, A., et al., Bioconjugate Chem. 3, 132-137, 1992) ;*アドリアマイシン (Adriamycin (Doxorubicin))* (Shih, L.B., et al., Cancer Res. 51 4192-4198, 1991 ; Zhu, Z., et al., Cancer Immunol.Immunother 40, 257-267, 1995 ; Trail, P.A., et al., Science 261, 212-215, 1993 ; Kondo, Y., et al., Jpn. J.Cancer Res. 86 1072-1079, 1995) ;*ダウノルビシン (Daunorubicin)* (Dillman, R.O., et al., Cancer Res. 48, 6097-6102, 1988 ; Hudecz, F., et al., Bioconjugate Chem. 1, 197-204, 1990 ; Tukada Y. et al., J.Natl. Cancer Inst. 75, 721-729, 1984) ;*ブレオマイシン (Bleomycin)* (Manabe, Y., et al., Biochem. Biophys.Res.Commun. 115, 1009-1014, 1983) ;*ネオカルチノスタチン (Neocarzinostatin)* (Kitamura K., et al., Cancer Immunol.Immunother 36, 177-184, 1993 ; Yamaguchi T., et al., Jpn. J.Cancer Res. 85, 167-171, 1994) ;*メトトレキセート (Methotrexate)* (Kralovec,J., et al., Cancer Immunol.Immunother 29, 293-302, 1989 ; Kulkarni, P. N., et al., Cancer Res. 41, 2700-2706, 1981 ; Shin, L.B., et al., Int.J.Cancer 41, 832-839, 1988 ; Gamett M.C., et al., Int.J.Cancer 31, 661-670, 1983) ;*5-フルオロウリジン (5-Fluorouridine)* (Shin, L.B., Int.J.Cancer 46, 1101-1106, 1990) ;*5-フルオロ-2' -デオキシリジン (5-Fluoro-2'-deoxyuridine)* (Goerlach A., et al., Bioconj

ugate Chem. 2, 96–101, 1991) ;シトシンアラビノシド (Cytosine arabinoside) (Hurwitz E., et al., J.Med.Chem. 28, 137–140, 1985) ;アミノプテリン (Aminopterin) (Kanellos J., et al., Immunol.Cell.Biol. 65, 483–493, 1987) ;ビンクリスチン (Vincristine) (Johnson J.R., et al., Br.J.Cancer 42, 17, 1980) ;ビンデシン (Vindesine) (Johnson J.R., et al., Br.J.Cancer 44, 472–475, 1981) ;インターロイキン2(IL-2)、腫瘍壊死因子アルファ (TNF α)、インターフェロン(INF)、カルボキシペプチダーゼ (Carboxypeptidase)、アルカリフォスファターゼ (Alkaline Phosphatase)、ベータラクタマーゼ (β -lactamase)、シチジンデアミナーゼ (Cytidine deaminase)。

[0042] 本発明の抗体は糖鎖が改変されていてもよい。抗体の糖鎖を改変することにより抗体の細胞傷害活性を増強できることが知られている。

糖鎖が改変された抗体の例としては、例えば、グリコシリ化された抗体(WO99/54342など)、糖鎖に付加するフコースが欠損した抗体(WO00/61739、WO02/31140、WO2006/067847、WO2006/067913など)、バイセクティングGlcNAcを有する糖鎖を有する抗体(WO02/79255など)などを挙げることができる。

[0043] 本発明の好ましい糖鎖改変抗体としてフコースが欠損した抗体を挙げができる。抗体に結合する糖鎖には、抗体分子のアスパラギンの側鎖のN原子に結合するN-グリコシド結合糖鎖と、抗体分子のセリンまたはスレオニンの側鎖ヒドロキシル基に結合するO-グリコシル結合糖鎖があるが、本発明においてフコースの存否が問題となるのはN-グリコシド結合糖鎖である。

[0044] 本発明においてフコースが欠損した抗体とは、組成物中の抗体のN-グリコシド結合糖鎖のうち、20%以上、好ましくは50%以上、より好ましくは70%以上、さらに好ましくは90%以上のN-グリコシド結合糖鎖においてフコースが欠損していることをいう。

[0045] フコースが欠損した抗体は当業者に公知の方法により作製することが可能であり、例えば、 α -1,6コアフコース(α -1,6core fucose)を付加する能力を有しないかまたはその能力が低い宿主細胞中で抗体を発現させることにより製造することができる。フコースを付加する能力を有しないまたはその能力が低い宿主細胞は特に限定されないが、例えば、ラットミエローマYB2/3HL.P2.G11.16Ag.20細胞(YB2/0細胞と略される)(ATCC CRL 1662として保存されている)、FTVIIIノックアウトCHO細胞(WO 02/

31140)、Lec13 細胞(WO03/035835)、フコーストランスポーター欠損細胞(WO2006/067847、WO2006/067913)などを挙げることができる。

- [0046] 糖鎖の解析は当業者に公知の方法で行うことができる。例えば、抗体にN-Glycosidase F(Roche)等を作用させ、糖鎖を抗体から遊離させる。その後、セルロースカートリッジを用いた固相抽出(Shimizu Y. et al., Carbohydrate Research 332(2001), 381-388)による脱塩後に濃縮乾固し、2-アミノピリジンによる蛍光標識を行う(Kondo A. et al., Agricultural and Biological Chemistry 54:8(1990), 2169-2170)。得られたPA化糖鎖を、セルロースカートリッジを用いた固相抽出により脱試薬した後遠心濃縮し、精製PA化糖鎖とする。その後、ODSカラムによる逆相HPLC分析を行うことにより測定することができる。また、PA化糖鎖の調製を行った後、ODSカラムによる逆相HPLC分析およびアミンカラムによる順相HPLC分析を組み合わせた、二次元マッピングを実施することにより行うことも可能である。
- [0047] 本発明の抗体は、抗体の全長分子に限られず、Prominin-1タンパク質に結合する限り、低分子化抗体またはその修飾物であってもよい。
- [0048] 低分子化抗体は、全長抗体(whole antibody、例えばwhole IgG等)の一部分が欠損している抗体断片を含む。Prominin-1抗原への結合能を有する限り、抗体分子の部分的な欠損は許容される。本発明における抗体断片は、重鎖可変領域(VH)および軽鎖可変領域(VL)のいずれか、または両方を含んでいることが好ましい。VHまたはVLのアミノ酸配列は、置換、欠失、付加及び／又は挿入を含むことができる。
- [0049] さらにProminin-1抗原への結合能を有する限り、VHおよびVLのいずれか、または両方の一部を欠損させることもできる。又、可変領域はキメラ化やヒト化されていてもよい。抗体断片の具体例としては、例えば、Fab、Fab'、F(ab')2、Fvなどを挙げることができる。また、低分子化抗体の具体例としては、例えば、Fab、Fab'、F(ab')2、Fv、scFv(single chain Fv)、ディアボディー(Diabody)、sc(Fv)2(single chain (Fv)2)などを挙げることができる。これら抗体の多量体(例えば、ダイマー、トリマー、テトラマー、ポリマー)も、本発明の低分子化抗体に含まれる。
- [0050] さらに、本発明の抗体は二重特異性抗体(bispecific antibody)であってもよい。二重特異性抗体とは、異なるエピトープを認識する可変領域を同一の抗体分子内に有

する抗体をいうが、当該エピトープは異なる分子中に存在していてもよいし、同一の分子中に存在していてもよい。すなわち本発明において、二重特異性抗体はProminin-1タンパク質上の異なるエピトープを認識する抗原結合部位を有することができる。このような二重特異性抗体は、1分子のProminin-1に対して2分子の抗体分子が結合できる。その結果、より強力な細胞傷害作用を期待できる。本発明における「抗体」にはこれらの抗体も包含される。

- [0051] また本発明においては、Prominin-1以外の抗原を認識する二重特異性抗体を組み合わせることもできる。たとえば、Prominin-1と同様に標的とする癌細胞の細胞表面に特異的に発現する抗原であって、Prominin-1とは異なる抗原を認識するような二重特異性抗体を組み合わせることができる。
- [0052] 二重特異性抗体を製造するための方法は公知である。たとえば、認識抗原が異なる2種類の抗体を結合させて、二重特異性抗体を作製することができる。結合させる抗体は、それぞれがH鎖とL鎖を有する1／2分子であっても良いし、H鎖のみからなる1／4分子であっても良い。あるいは、異なるモノクローナル抗体を產生するハイブリドーマを融合させて、二重特異性抗体產生融合細胞を作製することもできる。さらに、遺伝子工学的手法により二重特異性抗体が作製できる。
- [0053] 本発明の抗Prominin-1抗体として、特に哺乳動物由来のモノクローナル抗体を、好ましい態様として挙げることができる。抗Prominin-1モノクローナル抗体は、公知の手段を用いて取得できる。哺乳動物由来のモノクローナル抗体は、ハイブリドーマにより產生されるもの、および遺伝子工学的手法により抗体遺伝子を含む発現ベクターで形質転換した宿主により產生されるもの等を含む。
- [0054] 例えば、モノクローナル抗体產生ハイブリドーマは、基本的には公知技術を使用し、以下のようにして作製できる。すなわち、Prominin-1タンパク質又はProminin-1発現細胞を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナルな抗体產生細胞をスクリーニングすることによって作製できる。
- [0055] 具体的には、モノクローナル抗体を作製するには次のようにすればよい。

まず、抗体取得の感作抗原として使用されるProminin-1タンパク質を得る。すなわち、Prominin-1をコードする遺伝子配列を公知の発現ベクター系に挿入して適当な宿主細胞を形質転換させた後、その宿主細胞中または培養上清中から目的のヒトProminin-1タンパク質を公知の方法で精製する。

- [0056] 次に、この精製Prominin-1タンパク質を感作抗原として用いる。あるいは、Prominin-1の部分ペプチドを感作抗原として使用することもできる。この際、部分ペプチドはヒトProminin-1のアミノ酸配列より化学合成により得ることも可能である。
- [0057] 本発明の抗Prominin-1抗体の認識するProminin-1分子上のエピトープは特定のものに限定されず、Prominin-1分子上に存在するエピトープならばどのエピトープを認識してもよい。従って、本発明の抗Prominin-1抗体を作製するための抗原は、Prominin-1分子上に存在するエピトープを含む断片ならば、如何なる断片も用いることが可能である。
- [0058] 感作抗原で免疫される哺乳動物としては、特に限定されるものではないが、細胞融合に使用する親細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましく、一般的にはげつ歯類の動物、例えば、マウス、ラット、ハムスター、あるいはウサギ、サル等が使用される。
- [0059] 感作抗原を動物に免疫するには、公知の方法にしたがって行われる。例えば、一般的な方法として、感作抗原を哺乳動物の腹腔内または皮下に注射することにより行われる。具体的には、感作抗原をPBS(Phosphate-Buffered Saline)や生理食塩水等で適量に希釈、懸濁したものに所望により通常のアジュバント、例えばプロイント完全アジュバントを適量混合し、乳化後、哺乳動物に4-21日毎に数回投与する。また、感作抗原免疫時に適当な担体を使用することもできる。
- [0060] このように哺乳動物を免疫し、血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを確認した後に、哺乳動物から免疫細胞を採取し、細胞融合に付されるが、好ましい免疫細胞としては、特に脾細胞が挙げられる。
- [0061] 前記免疫細胞と融合される他方の親細胞として、哺乳動物のミエローマ細胞を用いる。このミエローマ細胞は、公知の種々の細胞株、例えば、P3(P3x63Ag8.653)(J. Immunol. (1979) 123, 1548-1550)、P3x63Ag8U.1(Current Topics in Microbiology and I

mmunology (1978) 81, 1-7)、NS-1 (Kohler. G. and Milstein, C. Eur. J. Immunol. (1976) 6, 511-519)、MPC-11 (Margulies. D.H. et al., Cell (1976) 8, 405-415)、SP2/0 (Shulman, M. et al., Nature (1978) 276, 269-270)、FO (deSt. Groth, S. F. et al., J. Immunol. Methods (1980) 35, 1-21)、S194 (Trowbridge, I. S. J. Exp. Med. (1978) 148, 313-323)、R210 (Galfre, G. et al., Nature (1979) 277, 131-133) 等が好適に使用される。

- [0062] 前記免疫細胞とミエローマ細胞との細胞融合は、基本的には公知の方法、たとえば、ケーラーとミルステインらの方法 (Kohler. G. and Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73, 3-46) 等に準じて行うことができる。
- [0063] より具体的には、前記細胞融合は、例えば細胞融合促進剤の存在下に通常の栄養培養液中で実施される。融合促進剤としては、例えばポリエチレングリコール(PEG)、センダイウイルス(HVJ)等が使用され、更に所望により融合効率を高めるためにジメチルスルホキシド等の補助剤を添加使用することもできる。
- [0064] 免疫細胞とミエローマ細胞との使用割合は任意に設定することができる。例えば、ミエローマ細胞に対して免疫細胞を1-10倍とするのが好ましい。前記細胞融合に用いる培養液としては、例えば、前記ミエローマ細胞株の増殖に好適なRPMI1640培養液、MEM培養液、その他、この種の細胞培養に用いられる通常の培養液が使用可能であり、さらに、牛胎児血清(FCS)等の血清補液を併用することもできる。
- [0065] 細胞融合は、前記免疫細胞とミエローマ細胞との所定量を前記培養液中でよく混合し、予め37°C程度に加温したPEG溶液(例えば平均分子量1000-6000程度)を通常30-60% (w/v)の濃度で添加し、混合することによって目的とする融合細胞(ハイブリドーマ)を形成する。続いて、適当な培養液を逐次添加し、遠心して上清を除去する操作を繰り返すことによりハイブリドーマの生育に好ましくない細胞融合剤等を除去する。
- [0066] このようにして得られたハイブリドーマは、通常の選択培養液、例えばHAT培養液(ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養液)で培養することにより選択される。上記HAT培養液での培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞(非融合細胞)が死滅するのに十分な時間(通常、数日～数週間)継続する。ついで、通常

の限界希釈法を実施し、目的とする抗体を產生するハイブリドーマのスクリーニングおよび单一クローニングを行う。

- [0067] また、ヒト以外の動物に抗原を免疫して上記ハイブリドーマを得る他に、ヒトリンパ球をin vitroでProminin-1に感作し、感作リンパ球をヒト由来の永久分裂能を有するミエローマ細胞と融合させ、Prominin-1への結合活性を有する所望のヒト抗体を得ることもできる(特公平1-59878号公報参照)。さらに、ヒト抗体遺伝子の全てのレパートリーを有するトランスジェニック動物に抗原となるProminin-1を投与して抗Prominin-1抗体產生細胞を取得し、これを不死化させた細胞からProminin-1に対するヒト抗体を取得してもよい(国際特許出願公開番号WO 94/25585号公報、WO 93/12227号公報、WO92/03918号公報、WO 94/02602号公報参照)。
- [0068] このようにして作製されるモノクローナル抗体を產生するハイブリドーマは、通常の培養液中で継代培養することが可能であり、また、液体窒素中で長期保存することが可能である。
- [0069] 当該ハイブリドーマからモノクローナル抗体を取得するには、当該ハイブリドーマを通常の方法にしたがい培養し、その培養上清として得る方法、あるいはハイブリドーマをこれと適合性がある哺乳動物に投与して増殖させ、その腹水として得る方法などが採用される。前者の方法は、高純度の抗体を得るのに適しており、一方、後者の方法は、抗体の大量生産に適している。
- [0070] 抗体遺伝子をハイブリドーマからクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し、遺伝子組換え技術を用いて產生させた組換え型の抗体を作製することも可能である(例えば、Vandamme, A. M. et al., Eur. J. Biochem. (1990) 192, 767-775, 1990参照)。
- [0071] 具体的には、抗Prominin-1抗体を產生するハイブリドーマから、抗Prominin-1抗体の可変(V)領域をコードするmRNAを単離する。mRNAの単離は、公知の方法、例えば、グアニジン超遠心法(Chirgwin, J. M. et al., Biochemistry (1979) 18, 5294-5299)、AGPC法(Chomczynski, P. et al., Anal. Biochem. (1987) 162, 156-159)等により行って全RNAを調製し、mRNA Purification Kit (Pharmacia製)等を使用して目的のmRNAを調製する。また、QuickPrep mRNA Purification Kit (Pharmacia製)を用いること

によりmRNAを直接調製することもできる。

- [0072] 得られたmRNAから逆転写酵素を用いて抗体V領域のcDNAを合成する。cDNAの合成は、AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit(生化学工業社製)等を用いて行う。また、cDNAの合成および増幅を行うには、5'-Ampli FINDER RACE Kit(Clontech製)およびPCRを用いた5'-RACE法(Frohman, M. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA(1988)85, 8998-9002, Belyavsky, A. et al., Nucleic Acids Res.(1989)17, 2919-2932)等を使用することができる。
- [0073] 得られたPCR産物から目的とするDNA断片を精製し、ベクターDNAと連結する。さらに、これより組換えベクターを作製し、大腸菌等に導入してコロニーを選択して所望の組換えベクターを調製する。そして、目的とするDNAの塩基配列を公知の方法、例えば、ジデオキシヌクレオチドチェインターミネーション法等により確認する。
- [0074] 目的とする抗Prominin-1抗体のV領域をコードするDNAを得たのち、これを、所望の抗体定常領域(C領域)をコードするDNAを含有する発現ベクターへ組み込む。
- [0075] 本発明で使用される抗Prominin-1抗体を製造するには、通常、抗体遺伝子を発現制御領域、例えば、エンハンサー、プロモーターの制御のもとで発現するよう発現ベクターに組み込む。次に、この発現ベクターにより、宿主細胞を形質転換し、抗体を発現させる。
- [0076] 抗体遺伝子の発現は、H鎖またはL鎖をコードするポリヌクレオチドを別々に発現ベクターに組み込んで宿主細胞を同時形質転換させてもよいし、あるいはH鎖およびL鎖をコードするポリヌクレオチドを单一の発現ベクターに組み込んで宿主細胞を形質転換させてもよい(WO 94/11523号公報参照)。
- [0077] 本発明の抗体の具体的な例として、以下のような定常領域を持つキメラ抗体が挙げられる。また、該定常領域のアミノ酸配列において1又は複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および／または挿入され、かつ該キメラ抗体と同等の活性を有する抗体が挙げられるが、本発明はこれらの抗体に限定されるものではない。
- (a)重鎖定常領域がマウスIgG2aであるキメラ抗体(重鎖塩基配列、配列番号1;重鎖アミノ酸配列、配列番号2)(アミノ酸番号1～19はシグナル配列)
- (b)軽鎖定常領域がマウスIg κ であるキメラ抗体(軽鎖塩基配列、配列番号3;軽鎖ア

ミノ酸配列、配列番号4) (アミノ酸番号1～20はシグナル配列)

(c) 重鎖定常領域がヒトIgG1であるヒトキメラ抗体(重鎖塩基配列、配列番号5; 重鎖アミノ酸配列、配列番号6) (アミノ酸番号1～19はシグナル配列)

(d) 軽鎖定常領域がヒトIg κ であるヒトキメラ抗体(軽鎖塩基配列、配列番号7; 軽鎖アミノ酸配列、配列番号8) (アミノ酸番号1～20はシグナル配列)

[0078] また、本発明の抗体の具体的な例として、以下のようなヒト化抗体が挙げられるが、本発明はこれらの抗体に限定されるものではない。

(i) 配列番号34のアミノ酸配列の15位に相当する、軽鎖可変領域FR1の15番目のアミノ酸がPheであるヒト化抗体。

(ii) 配列番号34のアミノ酸配列の15位に相当する軽鎖可変領域FR1の15番目のアミノ酸がPheであり、かつ配列番号34のアミノ酸配列の18位に相当する軽鎖可変領域FR1の18番目のアミノ酸がGlnであるヒト化抗体。

上述の抗体は特に限定されないが、重鎖可変領域CDR1として配列番号12のアミノ酸配列を有し、重鎖可変領域CDR2として配列番号14のアミノ酸配列を有し、重鎖可変領域CDR3として配列番号16のアミノ酸配列を有することが好ましい。又、軽鎖可変領域CDR1として配列番号20のアミノ酸配列を有し、軽鎖可変領域CDR2として配列番号22のアミノ酸配列を有し、軽鎖可変領域CDR3として配列番号24のアミノ酸配列を有することが好ましい。

さらに、本発明の抗体の具体的な例として、以下のようなヒト化抗体が挙げられるが、本発明はこれらの抗体に限定されるものではない。

(1) 重鎖がヒト化抗体H鎖(h133H)であるヒト化抗体(重鎖塩基配列、配列番号31; 重鎖アミノ酸配列、配列番号32) (アミノ酸番号-19～-1はシグナル配列)

(2) 軽鎖がヒト化抗体L鎖(h133L)であるヒト化抗体(軽鎖塩基配列、配列番号33; 軽鎖アミノ酸配列、配列番号34) (アミノ酸番号-22～-1はシグナル配列)

(3) 軽鎖がFR1マウス配列(シグナル配列もマウス抗体配列由来)をもつヒト化抗体L鎖(hybridL1)であるヒト化抗体(軽鎖塩基配列、配列番号35; 軽鎖アミノ酸配列、配列番号36) (アミノ酸番号-20～-1はシグナル配列)

(4) 軽鎖がFR1ヒト化配列(シグナル配列もヒト化抗体配列由来)をもつヒト化抗体L鎖

(hybridL2)であるヒト化抗体(軽鎖塩基配列、配列番号37;軽鎖アミノ酸配列、配列番号38) (アミノ酸番号-22~-1はシグナル配列)

(5) 軽鎖がヒト化抗体L鎖(h133L(b))であるヒト化抗体(軽鎖塩基配列、配列番号39;軽鎖アミノ酸配列、配列番号40) (アミノ酸番号-22~-1はシグナル配列)

(6) 軽鎖がヒト化抗体L鎖(h133L(c))であるヒト化抗体(軽鎖塩基配列、配列番号41;軽鎖アミノ酸配列、配列番号42) (アミノ酸番号-22~-1はシグナル配列)

(7) 軽鎖がヒト化抗体L鎖(h133L(d))であるヒト化抗体(軽鎖塩基配列、配列番号43;軽鎖アミノ酸配列、配列番号44) (アミノ酸番号-22~-1はシグナル配列)

(8) 軽鎖がヒト化抗体L鎖(h133L(e))であるヒト化抗体(軽鎖塩基配列、配列番号45;軽鎖アミノ酸配列、配列番号46) (アミノ酸番号-22~-1はシグナル配列)

(9) 軽鎖がヒト化抗体L鎖(h133L(f))であるヒト化抗体(軽鎖塩基配列、配列番号47;軽鎖アミノ酸配列、配列番号48) (アミノ酸番号-22~-1はシグナル配列)

(10) 軽鎖がヒト化抗体L鎖(h133L(g))であるヒト化抗体(軽鎖塩基配列、配列番号49;軽鎖アミノ酸配列、配列番号50) (アミノ酸番号-22~-1はシグナル配列)

(11) 軽鎖がヒト化抗体L鎖(h133L(h))であるヒト化抗体(軽鎖塩基配列、配列番号51;軽鎖アミノ酸配列、配列番号52) (アミノ酸番号-22~-1はシグナル配列)

(12) (1)のH鎖(h133H)と(6)のL鎖(h133L(c))を有するヒト化抗体

(13) (1)のH鎖(h133H)と(8)のL鎖(h133L(e))を有するヒト化抗体

(14) 配列番号32の1番目~114番目のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域(h133VH)を含むヒト化抗体

(15) 配列番号34の1番目~112番目のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域(h133VL)を含むヒト化抗体

(16) 配列番号36の1番目~112番目のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域(hybrid L1)を含むヒト化抗体

(17) 配列番号38の1番目~112番目のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域(hybrid L2)を含むヒト化抗体

(18) 配列番号40の1番目~112番目のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域(h133VL(b))を含むヒト化抗体

- (19)配列番号42の1番目～112番目のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域(h133VL(c))を含むヒト化抗体
- (20)配列番号44の1番目～112番目のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域(h133VL(d))を含むヒト化抗体
- (21)配列番号46の1番目～112番目のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域(h133VL(e))を含むヒト化抗体
- (22)配列番号48の1番目～112番目のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域(h133VL(f))を含むヒト化抗体
- (23)配列番号50の1番目～112番目のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域(h133VL(g))を含むヒト化抗体
- (24)配列番号52の1番目～112番目のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域(h133VL(h))を含むヒト化抗体
- (25)(14)の重鎖可変領域と(19)の軽鎖可変領域を含むヒト化抗体
- (26)(14)の重鎖可変領域と(21)の軽鎖可変領域を含むヒト化抗体
- (27)(1)～(26)いずれかの抗体と機能的に同等なヒト化抗体。

[0079] ここで「機能的に同等」とは、対象となる抗体が本発明の抗体と同様の生物学的あるいは生化学的活性を有することを指す。このような活性としては、例えば、結合活性あるいはADCC活性またはCDC活性を例示することができる。

本発明において、「同等」とは、必ずしも同程度の活性である必要はなく、活性が増強されてもよいし、又、活性を有する限り活性が減少してもよい。活性が減少している抗体としては、例えば、との抗体と比較して30%以上の活性、好ましくは50%以上の活性、より好ましくは80%以上の活性を有する抗体を挙げることができる。

[0080] あるポリペプチドと機能的に同等なポリペプチドを調製するための、当業者によく知られた方法としては、ポリペプチドに変異を導入する方法が知られている。例えば、当業者であれば、部位特異的変異誘発法(Hashimoto-Gotoh, T. et al. (1995) Gene 152, 271-275、Zoller, MJ, and Smith, M.(1983) Methods Enzymol. 100, 468-500、Kramer, W. et al. (1984) Nucleic Acids Res. 12, 9441-9456、Kramer W, and Fritz HJ(1987) Methods. Enzymol. 154, 350-367、Kunkel, TA(1985) Proc Natl Acad Sci USA.

82, 488-492、Kunkel (1988) Methods Enzymol. 85, 2763-2766)などを用いて、本発明の抗体に適宜変異を導入することにより、該抗体と機能的に同等な抗体を調製することができる。また、アミノ酸の変異は自然界においても生じうる。このように、本発明の抗体のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が変異したアミノ酸配列を有し、該抗体と機能的に同等な抗体もまた本発明の抗体に含まれる。このような変異体における、変異数は、活性が保持されている限り、特に制限されない。変異するアミノ酸数は、通常、50アミノ酸以内であり、好ましくは30アミノ酸以内であり、さらに好ましくは10アミノ酸以内(例えば、5アミノ酸以内)であると考えられる。さらに、変異部位は、活性が保持されている限り、特に制限されない。

[0081] アミノ酸変異は、1または複数のアミノ酸残基(好ましくは非必須アミノ酸残基)に生じうる。ここで、「非必須アミノ酸残基」とは、生物学的な活性を変化させずに、タンパク質の野生型アミノ酸配列から変化可能なアミノ酸残基であるが、「必須アミノ酸残基」とは、生物学的な活性に必要なアミノ酸残基である。アミノ酸は、好ましくは、アミノ酸側鎖の性質の保存を可能にする異なるアミノ酸に置換される。よって、本願において「保存的アミノ酸置換」とは、下記のグループの1つに属するアミノ酸残基を、化学的に同様な側鎖を有する同じグループに属する他のアミノ酸残基で置換することを意味する。化学的に同様なアミノ酸側鎖を有するアミノ酸残基のグループは、本願分野でよく知られている。変異するアミノ酸残基においては、アミノ酸側鎖の性質が保存されている別のアミノ酸に変異されることが望ましい。例えばアミノ酸側鎖の性質としては、疎水性アミノ酸(A、I、L、M、F、P、W、Y、V)、親水性アミノ酸(R、D、N、C、E、Q、G、H、K、S、T)、脂肪族側鎖を有するアミノ酸(G、A、V、L、I、P)、水酸基含有側鎖を有するアミノ酸(S、T、Y)、硫黄原子含有側鎖を有するアミノ酸(C、M)、カルボン酸及びアミド含有側鎖を有するアミノ酸(D、N、E、Q)、塩基含有側鎖を有するアミノ酸(R、K、H)、芳香族含有側鎖を有するアミノ酸(H、F、Y、W)を挙げることができる(括弧内はいずれもアミノ酸の一文字標記を表す)。

[0082] あるアミノ酸配列に対する1又は複数個のアミノ酸残基の欠失、付加及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列を有するポリペプチドがその生物学的活性を維持することはすでに知られている(Mark, D. F. et al., Proc. Natl. Acad.

. Sci. USA (1984) 81, 5662-5666 , Zoller, M. J. & Smith, M. Nucleic Acids Research (1982) 10, 6487-6500 , Wang, A. et al., Science 224, 1431-1433 , Dalbadie-McFarland, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1982) 79, 6409-6413).

[0083] また本発明は、上記キメラ抗体をコードするポリヌクレオチド、または該ポリヌクレオチドとストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつ本発明の抗体と同等の活性を有する抗体をコードするポリヌクレオチドを提供する。本発明のポリヌクレオチドは、本発明の抗体をコードする限り、特に限定されず、複数のデオキシリボ核酸(DNA)またはリボ核酸(RNA)等の塩基または塩基対からなる重合体である。天然以外の塩基を含んでいてよい。本発明のポリヌクレオチドは、抗体を遺伝子工学的な手法により発現させる際に使用することができる。また本発明の抗体と同等な機能を有する抗体をスクリーニングする際に、プローブとして用いることもできる。即ち本発明の抗体をコードするポリヌクレオチド、またはその一部をプローブとして用い、ハイブリダイゼーション、遺伝子増幅技術(例えばPCR)等の技術により、該ポリヌクレオチドとストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつ本発明の抗体と同等の活性を有する抗体をコードするDNAを得ることができる。このようなDNAも本発明のポリヌクレオチドに含まれる。ハイブリダイゼーション技術(Sambrook,J et al., Molecular Cloning 2nd ed., 9.47-9.58, Cold Spring Harbor Lab. press, 1989)は当業者によく知られた技術である。一例を示せば、25%ホルムアミド、より厳しい条件では50%ホルムアミド、4×SSC、50mM Hepes pH7.0、10×デンハルト溶液、20 μg/ml変性サケ精子DNAを含むハイブリダイゼーション溶液中、42°Cで一晩プレハイブリダイゼーションを行った後、標識したプローブを添加し、42°Cで一晩保温することによりハイブリダイゼーションを行う。その後の洗浄における洗浄液および温度条件は、「1×SSC、0.1% SDS、37°C」程度で、より厳しい条件としては「0.5×SSC、0.1% SDS、42°C」程度で、さらに厳しい条件としては「0.2×SSC、0.1% SDS、65°C」程度で実施することができる。このようにハイブリダイゼーションの洗浄の条件が厳しくなるほどプローブ配列と高い相同意を有するDNAの単離を期待しうる。但し、上記SSC、SDSおよび温度の条件の組み合わせは例示であり、当業者であれば、ハイブリダイゼーションのストリンジエンシーを決定する上記若しくは他の要素(例えば、プローブ濃度、プローブの長さ、ハイブリダイゼーション反

応時間など)を適宜組み合わせることにより、上記と同様のストリンジエンシーを実現することが可能である。

- [0084] これらハイブリダイゼーション技術や遺伝子増幅技術により得られるポリヌクレオチドがコードする、本発明の抗体と機能的に同等な抗体は、通常、これら抗体とアミノ酸配列において高い相同性を有する。本発明の抗体には、本発明の抗体と機能的に同等であり、かつ該抗体のアミノ酸配列と高い相同性を有する抗体も含まれる。高い相同性とは、アミノ酸レベルにおいて、通常、少なくとも50%以上の同一性、好ましくは75%以上の同一性、さらに好ましくは85%以上の同一性、さらに好ましくは95%以上の同一性を指す。ポリペプチドの相同性を決定するには、文献(Wilbur, W. J. and Lipman, D. J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1983) 80, 726-730)に記載のアルゴリズムにしたがえばよい。
- [0085] 本発明は上述の抗Prominin-1抗体を有効成分として含有する医薬組成物を提供する。又、本発明は上述の抗Prominin-1抗体を有効成分として含有する抗癌剤に関する。本発明の抗癌剤は、癌を罹患している対象または再発する可能性がある対象に投与されることが好ましい。
- [0086] また、本発明において、抗Prominin-1抗体を有効成分として含有する抗癌剤は、抗Prominin-1抗体を対象に投与する工程を含む癌を予防または治療する方法、または、抗癌剤の製造における抗Prominin-1抗体の使用と表現することもできる。
- [0087] 本発明の抗癌剤により治療される癌の種類は特に限定されないが、通常、Prominin-1タンパク質が発現する癌であり、好ましくは癌幹細胞が存在する癌である。Prominin-1タンパク質が発現する癌の例としては大腸癌、乳癌、脳腫瘍、上衣腫、胃癌、胰癌、肝癌、腎臓癌、前立腺癌、血液腫瘍(AML、CLL)等を挙げることができる。
- [0088] 本発明において、「抗Prominin-1抗体を有効成分として含有する」とは、抗Prominin-1抗体を主要な活性成分として含むという意味であり、モノクローナル抗体の含有率を制限するものではない。
- [0089] 更に本発明における医薬組成物、あるいは抗癌剤には、必要に応じて複数種類の抗体を配合することができる。たとえば、複数の抗Prominin-1抗体のカクテルとすることによって、Prominin-1発現細胞に対する細胞傷害作用を強化できる可能性がある。

あるいは、抗Prominin-1抗体に加えて、他の腫瘍関連抗原を認識する抗体を配合することにより、治療効果を高めることもできる。

- [0090] 本発明の医薬組成物、あるいは抗癌剤は、経口、非経口投与のいずれかによって患者に投与することができる。好ましくは非経口投与である。係る投与方法としては具体的には、注射投与、経鼻投与、経肺投与、経皮投与などが挙げられる。注射投与の例としては、例えば、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射などによって本発明の医薬組成物が全身または局部的に投与できる。また、患者の年齢、症状により適宜投与方法を選択することができる。投与量としては、例えば、一回の投与につき体重1 kgあたり0.0001mgから1000mgの範囲で投与量が選択できる。あるいは、例えば、患者あたり0.001から100000mg/bodyの範囲で投与量が選択できる。しかしながら、本発明の医薬組成物はこれらの投与量に制限されるものではない。
- [0091] 本発明の医薬組成物は、常法に従って製剤化することができ(例えば、Remington's Pharmaceutical Science, latest edition, Mark Publishing Company, Easton, U.S.A)、医薬的に許容される担体や添加物を共に含むものであってもよい。例えば界面活性剤、賦形剤、着色料、着香料、保存料、安定剤、緩衝剤、懸濁剤、等張化剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、流動性促進剤、矯味剤等が挙げられる。更にこれらに制限されず、その他常用の担体が適宜使用できる。具体的には、軽質無水ケイ酸、乳糖、結晶セルロース、マンニトール、デンプン、カルメロースカルシウム、カルメロースナトリウム、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルアセタールジエチルアミノアセテート、ポリビニルピロリドン、ゼラチン、中鎖脂肪酸トリグリセライド、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油60、白糖、カルボキシメチルセルロース、コーンスター、無機塩類等を担体として挙げることができる。
- [0092] また、本発明は、Prominin-1発現細胞と抗Prominin-1抗体とを接触させることによりProminin-1発現細胞に傷害を引き起こす方法又は細胞の増殖を抑制する方法を提供する。抗Prominin-1抗体は上述したとおりである。抗Prominin-1抗体が結合する細胞はProminin-1が発現している細胞であれば特に限定されない。本発明における好ましいProminin-1発現細胞は癌細胞であり、さらに好ましくは癌幹細胞である。
- [0093] 本発明において「接触」は、in vitroで行われてもよいし、in vivoで行われてもよい。

例えば、試験管内で培養しているProminin-1発現細胞の培養液に抗体を添加することにより行われる。

[0094] また本発明において「接触」は更に、別の態様では、Prominin-1発現細胞を体内に移植した非ヒト動物や内在的にProminin-1を発現する癌細胞を有する動物に投与することによって行われる。投与方法は経口、非経口投与のいずれかによって実施できる。特に好ましくは非経口投与による投与方法であり、係る投与方法としては具体的には、注射投与、経鼻投与、経肺投与、経皮投与などが挙げられる。注射投与の例としては、例えば、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射などによって本発明の医薬組成物細胞増殖阻害剤および抗癌剤が全身または局部的に投与できる。また、被験動物の年齢、症状により適宜投与方法を選択することができる。水溶液として投与される場合にあっては純粋に抗体のみを含有する水溶液であってもよいし、例えば上記記載の界面活性剤、賦形剤、着色料、着香料、保存料、安定剤、緩衝剤、懸濁剤、等張化剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、流動性促進剤、矯味剤等を含む溶液であってもよい。投与量としては、例えば、一回の投与につき体重1 kgあたり0.0001mgから1000mgの範囲で投与量が選択できる。あるいは、例えば、患者あたり0.001から100000mg/bodyの範囲で投与量が選択できる。しかしながら、本発明の抗体投与量はこれらの投与量に制限されるものではない。

なお、本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

図面の簡単な説明

[0095] [図1]WERI-Rb-1細胞に組換え抗体が結合することを示す図である。ヒストグラム点線は陰性対照マウスIgG抗体(5 μ g/ml)による染色結果を示す。黒く塗りつぶしたヒストグラムは(a)組換えIgG2a抗体(5 μ g/ml), (b)陽性対照であるハイブリドーマ產生IgG1抗体(5 μ g/ml)の染色結果を示す。

[図2]ハイブリドーマおよび組換え抗体による細胞傷害性誘導(a)CDC活性、(b)ADCC活性を示す図である。組換え抗体IgG2aはCDC作用を有する。マウスIgG1, IgG2a抗体にはADCC誘導能が認められない。

[図3]WERI-Rb-1細胞にヒトキメラ抗体が結合することを示す図である。点線ヒストグラ

ムは陰性対照ヒトIgG抗体による染色結果を示す。黒く塗りつぶしたヒストグラムは組換えキメラ抗体による染色結果を示す。

[図4]ヒトキメラ抗体が(a)WERI-Rb-1、(b)HuH7細胞に対してADCC活性を誘導することを示す図である。

[図5]CDR移植対象となるヒト抗体可変領域配列とAC133可変領域配列のアライメントの図である。(A)H鎖可変領域配列 (B)L鎖可変領域配列を示す。

[図6]h133H/h133Laからなるヒト化抗体の抗原発現細胞WERI-Rb-1への結合能を示す図である。h133H/h133Laからなるヒト化抗体は容量依存的にWERI-Rb-1細胞に結合する。

[図7]H鎖L鎖の組み合わせにより、抗体の結合活性を比較した結果を示す図である。ヒト化抗体L鎖の組み合わせで結合活性低下を生じる。

[図8]ヒト化配列を基にしたマウス配列とのアミノ酸残基の相違、結合活性向上のためヒト化配列に対し置換を行ったアミノ酸残基を示す図である。(A)H鎖可変領域配列 (B)L鎖可変領域配列を示す。

[図9]図7の組み合わせに、hybridL1鎖およびhybridL2鎖を加えて結合活性を比較した結果を示す図である。hybridL1鎖はキメラL鎖同等の抗原結合活性を示す。

[図10]ヒト化L鎖改変体の結合活性を示す図である。

[図11]ヒト化L鎖改変体の結合活性を示す図である。

実施例

[0096] 以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

[0097] [実施例1] 抗体可変領域クローニングと組換え抗体発現株の作製

AC133.1抗体を発現するマウスハイブリドーマ細胞(HB-12346)をATCCより入手した。10%胎児牛血清(FBS)を含むDMEM培地を用いてハイブリドーマ細胞を培養し、細胞を回収した。約 3×10^6 細胞よりRNeasy mini(QIAGEN)を用いてtotal RNAを精製した。Smart RACE cDNA Amplification kit(Clontech)を用いて精製total RNA 1 μg より、添付マニュアルの指示に従い5' RACE cDNAライブラリを作製した。抗体重鎖可変領域(VH)(塩基配列、配列番号9;アミノ酸配列、配列番号10)および軽鎖可変

領域(VL) (塩基配列、配列番号17; アミノ酸配列、配列番号18)をそれぞれ抗体定常領域部分にアニールするプライマーとSmart RACE cDNA Amplification kitに付属するUniversal Primer Mixの組み合わせでPCR増幅した。

重鎖(IgG1)増幅プライマー: 5'-CCATGGAGTTAGTTGGGCAGCAGATCC-3' (配列番号25)

軽鎖(Ig κ)増幅プライマー: 5'-GGCACCTCCAGATGTTAACTGCTCACT-3' (配列番号26)

[0098] RACEキットに付属するAdvantage 2 DNA polymeraseを用いて製造者の指示に従い反応液の調製を行った。94°C30秒の変性反応の後、30サイクルの94°C10秒、68°C30秒、72°C60秒の増幅反応を行った。アガロースゲル電気泳動で予想サイズのDNA断片が増幅されていることを確認し、これを切り出し精製した。精製した増幅断片をpGEMT Easyベクターに組み込み、この組換えプラスミドを用いて大腸菌DH5 α を形質転換した。抗体可変領域増幅断片が組み込まれたプラスミドクローンを選抜し、この塩基配列を決定した。

[0099] T7プライマーと可変領域3'にアニールするよう設計したプライマーでVHおよびVLをPCR増幅し、マウスIgG2a重鎖定常領域をもつ動物細胞発現ベクター、マウスIg κ軽鎖定常領域をもつ動物細胞発現ベクターへと抗体翻訳配列がインフレームになるように組み込んだ。この動物細胞発現ベクターにおいて抗体遺伝子はマウスCMVプロモーター下で転写されるように設計されている。構築した重鎖抗体発現ベクター中の重鎖抗体塩基配列を配列番号1にその翻訳配列を配列番号2に示した。マウスIg κ軽鎖塩基配列を配列番号3にその翻訳配列を配列番号4に示した。重鎖、軽鎖抗体発現ベクターをPvuI処理により線形化したのち、エレクトポレーション法にてDG44細胞(Invitrogen)を形質転換した。重鎖、軽鎖発現ベクター上に存在する選択マーカーにより獲得される、ジェネティシン耐性、核酸非要求性を指標に組換え細胞クローン選択を行った。クローン化された組換え細胞培養上清中の抗体量を、抗マウス抗体を用いたサンドイッチELISA法で検出し、組換え抗体高発現細胞を選抜した。選抜した組換え細胞をCHO-S-SFMII培地(Invitrogen)を用いて培養し、培養上清よりHiTrap Protein Gカラム(Amersham Bioscience)を用いて添付マニュアルに従い、組換えマ

ウスIgG2a抗体の精製を行った。陽性コントロールとしてハイブリドーマ培養上清より、HiTrap Protein Gカラムを用いてAC133.1抗体(サブタイプIgG1)を精製した。

[0100] [実施例2] 組換え抗体の結合活性の確認および細胞傷害活性の評価

抗体可変領域をクローニングして作製した組換え抗体がハイブリドーマ產生抗体と同じ結合特性を有することを、フローサイトメトリー法で確認した。AC133.1抗体はヒト網膜芽腫細胞株WERI-Rb-1に結合することが報告されている[Yin et al. (1997) Blood 90, 5002-12]。WERI-Rb-1細胞(HTB-169)をATCCより入手した。WERI-Rb-1細胞は10%牛胎児血清を含むRPMI1640培地を用いて37°C、5% CO₂条件下で培養した。細胞培養液を遠心し、上清を取り除き、細胞をFACSバッファー(2%牛胎児血清を含むリン酸緩衝液)に懸濁した。組換え抗体、ハイブリドーマ抗体、陰性対照となるマウスIgG抗体をそれぞれ終濃度5 μg/mlとなるように添加し、4°C、30分間インキュベーションした。遠心し、上清を取り除き、FACSバッファーで再懸濁し、もう一度遠心した。細胞沈殿物をFACSバッファーで150倍希釈したFITC標識ヤギF(ab')₂抗マウスIgG(H+L)抗体液(Beckman-Coulter, IM0819)で懸濁し、暗所にて4°C、30分間インキュベーションした。遠心後、細胞をFACSバッファーで懸濁し、細胞への抗体の結合をFACSCalibur(BD)で解析した。組換え抗体がハイブリドーマ產生抗体同様に、WERI-Rb-1細胞に結合することを確認した(図1)。

[0101] ハイブリドーマ產生抗体、組換えIgG2a抗体のWERI-Rb-1細胞に対する補体依存性細胞傷害(CDC)活性、抗体依存性細胞介在性細胞傷害(ADCC)活性をクロム放出法で調べた。WERI-Rb-1細胞培養液にChromium-51 (Amersham Bioscience, CJS 4)を添加して培養を数時間つづけた。細胞を培養液で洗浄した後、放射標識された細胞を96ウェル培養プレートに伝播した。続いて終濃度1 μg/mlとなるように抗体を添加した。CDC活性評価にあたり、さらに幼ウサギ補体を終濃度5%となるように添加し、プレートを5% CO₂インキュベーター中で37°Cにて1.5時間静置した。ADCC活性評価の場合、各ウェルにターゲット細胞WERI-Rb-1に細胞量比で過剰のエフェクター細胞を添加し、プレートを5% CO₂インキュベーター中で37°Cにて6時間静置した。エフェクター細胞としてC3H/HeNCrlCrljマウス(日本チャールス・リバー)の脾臓細胞をヒトインターロイキン2 (Peprotech, 200-02)を含む培地で培養したもの(対ターゲット

細胞比50倍)、もしくは骨髓細胞をヒトインターロイキン2 およびマウスGM-CSF (Pepr otech, 315-03)を含む培地で培養したもの(対ターゲット細胞比25倍)を添加使用した。静置後プレートを遠心し、各ウェルより一定量の上清を回収してガンマカウンター Wallac 1480を用いて放射活性を測定した。下式により特異的クロム放出(%)を求めた。

$$\text{特異的クロム放出} = (A-C)/(B-C) \times 100$$

ここで、Aは各ウェルにおける放射活性、Bは終濃度1% Nonidet P-40で細胞溶解して培地へ放出される放射活性平均値、Cは培地のみ添加した場合における放射活性平均値である。

[0102] 各々の実験条件において2点測定し、平均値を算出した(図2)。ハイブリドーマが産生するIgG1型のAC133抗体にCDC活性が認められない一方で、組換えIgG2a抗体にはCDC活性の誘導が認められた。ADCC活性に関しては、ハイブリドーマ抗体、組換え抗体両者ともに認められなかった。

[0103] [実施例3] ヒトキメラ抗体の調製とADCC活性の評価

重鎖可変領域配列を以下に示すプライマーを用いてPCR增幅し、EcoRI/NheI処理後、ヒトキメラ抗体発現ベクター重鎖クローニングサイトに組み込んだ。軽鎖可変領域配列も同様にして以下に示すプライマーセットでPCR增幅し、BamHI/BsiWI処理後、上述の重鎖を組み込んだヒトキメラ抗体発現ベクターの軽鎖クローニングサイトに組み込んだ。構築した細胞発現ベクターにおいて重鎖、軽鎖とともに抗体遺伝子はマウスCMVプロモータ一下で転写されるように設計されている。

VHキメラ化プライマー1: 5'-CTTGAATTCCACCATGGAATGGAGCTGGTCTTT C-3' (配列番号27)

VHキメラ化プライマー2: 5'-CGCGCTAGCTGCAGAGACAGTGACCAGAGTCC-3' (配列番号28)

VLキメラ化プライマー1: 5'-CAGGGATCCACCATGAATTGCCTGTTCATCTCT T-3' (配列番号29)

VLキメラ化プライマー2: 5'-CGGCGTAGCTTTATTCCAGCTGGTCCC-3' (配列番号30)

- [0104] ヒトキメラ抗体重鎖塩基配列を配列番号5にその翻訳配列を配列番号6に示した。ヒトキメラ抗体軽鎖塩基配列を配列番号7にその翻訳配列を配列番号8に示した。
- [0105] ヒトキメラ抗体発現ベクターを用いて、エレクトポレーション法にてYB2/0(ATCC)を形質転換した。ヒトキメラ抗体発現ベクター上に存在する選択マーカーにより獲得される、ジェネティシン耐性を指標に組換え細胞クローニングを行った。クローニングされた組換え細胞培養上清中の抗体量を、抗ヒト抗体を用いたサンドイッチELISA法で検出し、組換え抗体発現細胞を選抜した。選抜した組換え細胞を10% Ultra-low IgG牛胎児血清 (Invitrogen)を含むRPMI1640培地を用いて培養し、培養上清よりHiTrap Protein Aカラム(Amersham Bioscience)を用いて添付マニュアルに従い、ヒトキメラ抗体の精製を行った。
- [0106] 精製したヒトキメラ抗体がWERI-Rb-1細胞に結合することを、フローサイトメトリー法で解析した。WERI-Rb-1細胞懸濁液にヒトキメラ抗体、陰性対照となるヒトポリクーナルIgG抗体をそれぞれ終濃度5 μ g/mlとなるように添加し、反応させた。細胞に結合した抗体をFITC標識ヤギF(ab')₂抗ヒトIgG(H+L)抗体(Beckman-Coulter, IM0839)を用いて標識し、FACSCaliburにて解析した。細胞へのヒトキメラ抗体の結合を確認した(図3)。
- [0107] ヒトキメラ抗体のWERI-Rb-1およびヒト肝癌細胞株HuH7に対するADCC活性をクロム放出法で調べた。HuH7細胞を96ウェルプレートに伝播し付着させた後、Chromium-51を添加して培養を数時間続けた。培養液を除去、培養液で細胞を洗浄したのちに新しい培養液を添加した。WERI-Rb-1細胞培養液にChromium-51を添加して培養を数時間つづけた。細胞を培養液で洗浄した後、放射標識された細胞を96ウェル培養プレートに伝播した。続いて抗体を添加し、各ウェルにターゲット細胞に比べて約5倍量のエフェクター細胞(NK-92 (ATCC, CRL-2407)にヒトFc-gamma受容体3(N M_000569)を強制発現させた組換え細胞)を添加し、プレートを5% CO₂ インキュベーター中に37°Cにて4時間静置した。静置後プレートを遠心し、各ウェルより一定量の上清を回収してガンマカウンターWallac 1480を用いて放射活性を測定し特異的クロム放出(%)を求めた。図4に示したように、ヒトキメラ抗体はWERI-Rb-1, HuH7細胞に対して抗体容量依存的なADCC活性を誘導した。

[0108] [実施例4] ヒトProminin-1強制発現細胞株の作製

Prominin-1(NM_006017)はAC133.1の抗原分子である。ヒト腎臓cDNAライブラリを鑄型にPCR法によりProminin-1翻訳配列を含むDNA断片を増幅し、動物細胞発現ベクターにクローニングした。エレクトロポレーション法で発現ベクターをDG44細胞に導入し、ジェネティシンを用いて、組換え細胞の選抜を行った。組換え細胞において、Prominin-1組換え蛋白質が発現していることを、組換え蛋白質C末端に人工的に付加したFLAGタグを利用した抗FLAG M2抗体によるウェスタンプロットで確認した。Prominin-1強制発現細胞特異的にA133.1抗体が結合することをフローサイトメトリー法で確認した。

[0109] [実施例5] ヒト化抗体配列のデザインおよびヒト化抗体の調製

ヒトに抗体を投与した際の免疫原性を低減させる目的で、AC133.1抗体のCDRをヒト抗体配列に移植したヒト化抗体を作製した。GenBank塩基配列データベースに対してAC133.1抗体可変領域フレームワークアミノ酸配列をクエリとしてBLAST相同性配列検索(プログラムTBLASTN2.2.12)を行った。検索の結果ヒットした相同性の高いヒト抗体配列の中から、CDR移植する抗体配列としてAF174028(H鎖)、AB064105(L鎖)を選択した。AC133抗体可変領域フレームワーク配列とCDR移植の鑄型として選択したヒト抗体配列のアライメントを図5に示した。CDR配列を移植したヒト化抗体H鎖配列(h133H)の塩基配列を配列番号31、アミノ酸配列を配列番号32に、ヒト化抗体L鎖配列(h133L)の塩基配列を配列番号33、アミノ酸配列を配列番号34に示した。

[0110] ヒト化L鎖可変領域配列を以下の方法で合成した。(表1)に示したオリゴヌクレオチドHuKf1とHuKr1、HuKf2とHuKr2、HuKf3とHuKr3、HuKf4とHuKr4、を終濃度 $10\ \mu\text{M}$ になるようにKOD DNA polymerase(TOYOBO)反応液中に混合し、94°C 2min、25サイクルの98°C 10sec、57°C 30sec、68°C 1minのオリゴヌクレオチドの二本鎖伸長反応を行った。上記二本鎖伸長反応液より各 $1\ \mu\text{L}$ ずつ、(表2)に示したhu133VKfSalおよびhu133VKrBsiプライマーをKOD DNA polymerase反応液中に混合し、フラグメントのアセンブリング反応(94°C 2min、25サイクルの98°C 10sec、57°C 30sec、68°C 1min)を行った。ExTaq DNAポリメラーゼを用いてアセンブリングしたDNA断片末端にA付加後、アガロース電気泳動を行った。目的サイズのバンドを切り出し、pGEMT Easy(

プロメガ)ベクターにクローニング、DNA配列解析を行い、正しい配列をもったプラスミドを選抜した。選抜されたプラスミドより、制限酵素Sall/BsiWI処理することで切り出されたL鎖可変領域配列断片をマウスCMVプロモータ下で転写制御される抗体動物細胞発現ベクターにヒトIgK抗体として正しく翻訳されるよう組み込んだ。

- [0111] (表1)ヒト化抗体可変領域配列作製のために用いた鋳型オリゴヌクレオチド
- huHf1(配列番号55);gcgaattcaccatggactggacacctggagcatccttcttggcaggcagcaacagggt
gcccaactcccaggttcagctg
- huHf2(配列番号56);gaagaaggctgggcctcagtgaaggctccgtcaaggctctggttacacccttacc
GACTTTGAAATGCACtgggtgc
- huHf3(配列番号57);cttgagtgatggaaGATATTGATCCTGGAACTGGTGATACTGC
CTACAATCTGAAGTTCAAGGGCagagtcaccatgac
- huHf4(配列番号58);cagcctacatggagctgaggagcctgagatctgacgacacggccgttattactgtgc
gttgGGGCCTTGTTCACtgg
- huHr1(配列番号59);gagaccttactgaggccccaggcttccactcacccatccagactgcaccagctgaa
cctggagtgccacctgttgc
- huHr2(配列番号60);TCCAGGATCAATATCteccatccactcaagccctgtccagggccctgtcg
cacccaGTGCATTCAAAGTCggtaaagg
- huHr3(配列番号61);atctcaggctctcagctccatgttaggctgtcgatgtgttgtcatggta
ctctGCCCTTGAACCTTCAGA
- huHr4(配列番号62);gcgctagctgaggagacggtgaccagggtccctggcccccagggtcgaaaccaGTA
AACAAAGGCCCCcaacgcacagta
- huKf1(配列番号63);gctgtcgaccaccatgaaatacctattgcctacggcagccgctggattttattactcgc
ggcccagccggccatggccg
- huKf2(配列番号64);ccactctccctgcccgtcacccctggagagccggccatctcctgcAGGTCTA
GTCAGAGTCTTGCACAGTTATGG
- huKf3(配列番号65);acctgcagaagccaggcagtcctccacagctcctgatctatGGGATTCCAA
CAGATTTCCTgggtccctgacaggttc
- huKf4(配列番号66);agattttacactgaaaatcagcagagtggaggctgaggatgtggggttattactgcT

TACAAGGTACACATCAGCCGT

huKr1(配列番号67) ; ctctccaggggtgacggcagggagactggagactgagtcatacacaacatcgccatgcggctggccgcgagaata

huKr2(配列番号68) ; gctgtggagactgccctggctctgcaggatccaAGACAAATAGGTGTTCCATAACTGTTGCAAGACTCTGACTAGAC

huKr3(配列番号69) ; tccactctgctgatttcagtgtaaaatctgtgcctgatccactgccactgaacctgtcaggaccccAGAAAATCTGTT

huKr4(配列番号70) ; cggcgtacgttgcattccagctggcccccggccaaaCGTGTACGGCTGATGTACCTTGTAAGcagtaat

[0112] (表2)ヒト化抗体可変領域配列およびその誘導体作製に使用したPCRプライマー

hu133VHfEco(配列番号71) ; GCGAATTCAACCATGGACTGGACCTGGAGCA

hu133VHrNhe(配列番号72) ; CGCGCTAGCTGAGGAGACGGTGACCAGGGT

hu133VKfSal(配列番号73) ; GCTGTCGACCACCATGAAATACCTATTGCC

hu133VKrBsi(配列番号74) ; CGGCGTACGTTGATCTCCAGCTTGGTCCC

FR4delta_f(配列番号75) ; GGGGCCTTGTACTGGGCCAGGAAACC

FR4delta_r(配列番号76) ; GGTTCCCTGGCCCCAGTAAACAAGGCC

MCMV-F1(配列番号77) ; TAACACCGCCCCGGTTTCC

G1kCH-r3(配列番号78) ; AGTAGAGTCCTGAGGACTGTAGG

G1kCL-r1(配列番号79) ; TCTAGGTGCTGTCCTTGCTGTCC

AC133CDR1f(配列番号80) ; TAGTCAGAGTCTTGCAAACAGTTATGGAA

AC133CDR1r(配列番号81) ; CAAATAGGTGTTCCCATAACTGTTGCAAG

M4V_f(配列番号82) ; atggccgatgttgGtgactcagtctcca

M4V_r(配列番号83) ; tggagactgagtcaCcacaacatcgccat

P15Ff(配列番号84) ; ctgccccgtcaccTTtggagagccggcctcc

P15Fr(配列番号85) ; ggaggccggctctccaAAGgtgacggcag

P18Qf(配列番号86) ; cacccctggagagcAAGcctccatctcctg

P18Qr(配列番号87) ; caggagatggaggcTTgctctccagggtg

PPFQf(配列番号88) ; ccgtcaccTTtggagagcAAGcctccatct

PPFQr(配列番号89) ; agatggaggcTTgctctccaAAggtgacgg
A19V_f(配列番号90) ; TGGAGAGCCGGTCTCCATCTCCTGCAGGTC
A19V_r(配列番号91) ; GACCTGCAGGAGATGGAGACCGGCTCTCCA
PAQV_f(配列番号92) ; TGGAGAGCAAGTCTCCATCTCCTGCAGGTC
PAQV_r(配列番号93) ; GACCTGCAGGAGATGGAGACTTGCTCTCCA

- [0113] ヒト化H鎖可変領域配列をL鎖同様の方法で合成した。(表1)に示したオリゴヌクレオチドHuHf1とHuHr1、HuHf2とHuHr2、HuHf3とHuHr3、HuHf4とHuHr4の二本鎖伸長反応液より各1 μLずつ、(表2)に示したhu133VHfEcoおよびhu133VHrNheプライマーをKOD DNA polymerase反応液中に混合してPCRアセンブリング反応した。PCR增幅断片をベクターにクローニング後、塩基配列解析を行い、プラスミドを選抜した。制限酵素EcoRI/NheI処理することで切り出されたH鎖可変領域配列断片をマウスCMVプロモータ下で転写制御されるヒトIgG1抗体動物細胞発現ベクターに組み込んだ。完成したH鎖可変領域配列に鋳型オリゴヌクレオチドの設計ミスに由来する挿入配列があつたことからこれを鋳型にFR4delta_fとベクター上配列に相補するG1kCH-r3プライマー、FR4delta_rとベクター上配列に相補するMCMV-F1プライマーでPCR增幅、2つの断片を再度アセンブルすることで当初意図した抗体可変領域配列をコードする配列断片を調製した。ヒトIgG1抗体発現ベクターに組み込み、塩基配列解析により構造を確認した。
- [0114] ヒト化抗体発現ベクターをPvuI処理により線形化したのち、エレクトポレーション法にてDG44細胞(Invitrogen)を形質転換した。発現ベクター上に存在する選択マーカーにより獲得されるジェネティシン耐性を指標に組換え細胞クローン選択を行った。クローン化された組換え細胞培養上清中の抗体量を、抗ヒト抗体を用いたサンドイッチELISA法で検出し、組換え抗体高発現細胞を選抜した。選抜した組換え細胞をCHO-S-SFMII培地(Invitrogen)を用いて培養し、培養上清よりHiTrap Protein Aカラム(Amersham Bioscience)を用いて添付マニュアルに従い、ヒト化抗体の精製を行った。陽性コントロールとして同様の方法にて樹立したキメラ抗体発現DG44細胞培養上清より、HiTrap Protein Aカラムを用いてキメラ抗体を精製した。
- [0115] ヒト化抗体の抗原結合活性をフローサイトメトリー法で解析した。段階希釈したヒト化

抗体、キメラ抗体をWERI-Rb-1と混合し、4°C、30分間インキュベーションした。遠心し、上清を取り除き、FACSバッファーで再懸濁し、もう一度遠心した。細胞沈殿物をFACSバッファーで150倍希釈したFITC標識ヤギF(ab')2抗ヒトIgG(H+L)抗体液(Beckman-Coulter)で懸濁し、暗所にて4°C、30分間インキュベーションした。遠心後、細胞をFACSバッファーで懸濁し、細胞あたりの結合抗体量をFACSCaliburで計測し、細胞蛍光強度の幾何平均値(X Geometric Mean)を付属解析ソフトウェアCELLQuest Proを用いて算出した。図6にまとめたように、ヒト化抗体H鎖配列(h133H)(塩基配列、配列番号31;アミノ酸配列、配列番号32)およびヒト化抗体L鎖配列(h133L)(塩基配列、配列番号33;アミノ酸配列、配列番号34)からなるヒト化抗体は容量依存的に抗原発現細胞であるWERI-Rb-1に結合した。しかしヒト化抗体の抗原に対する結合アフィニティはオリジナルのAC133マウス可変領域配列をもつキメラ抗体に比較して弱いことが明らかとなった。

[0116] [実施例6] アミノ酸残基置換導入によるヒト化抗体の結合活性増強

マウス抗体に比較してヒト化抗体で抗原に対する結合アフィニティが弱まった原因是、結合活性保持のために保存すべきアミノ酸残基をヒト化のプロセスで置換してしまったことにある。保存すべきアミノ酸残基がH鎖、L鎖のどちらに存在するのかをマップする目的で、キメラ抗体、ヒト化抗体のH鎖、L鎖の組み合わせを相互に変えて抗原に対する結合活性が保存されるかどうかを評価した。以下の組み合わせで抗体をCOS-7細胞で一過的に発現させ、その結合活性を評価した。

- (1) キメラH鎖(配列番号6)とキメラL鎖(配列番号8)
- (2) キメラH鎖(配列番号6)とヒト化L鎖(配列番号34)
- (3) ヒト化H鎖(配列番号32)とキメラL鎖(配列番号8)
- (4) ヒト化H鎖(配列番号32)とヒト化L鎖(配列番号34)

[0117] COS-7を 2×10^5 細胞/ウェルとなるよう6ウェルプレートにまき込み終夜培養した。DNAトランスフェクト試薬FuGENE-6(ロシュ・ディアグノティックス)を用い、製造者マニュアルに従い、それぞれの抗体発現ベクター組み合わせをCOS7細胞に導入した。3日間培養したのち、培養上清を回収した。回収した上清中の抗体濃度を、抗ヒト抗体を用いたサンドイッチELISAで決定した。実施例5に記載した方法で抗原に対する結合

をフローサイトメトリー解析し、結果を図7にまとめた。その結果、ヒト化抗体H鎖とキメラ抗体L鎖の組み合わせにおいてH鎖L鎖ともキメラ抗体と同等の結合活性が示されるのに対し、ヒト化L鎖を用いた組み合わせ、すなわちキメラH鎖とヒト化L鎖、ヒト化H鎖とヒト化L鎖の組み合わせにおいて結合活性の低下が見られた。この結果は、抗原結合活性を最大に保存させるにはヒト化L鎖配列上のいずれかのアミノ酸残基をマウス配列上のアミノ酸残基へと置換する必要があることを示す。次にヒト化L鎖可変配列上のどこに置換すべき部位が存在するかを明らかにする目的で、図8(B)に示したようなマウス-ヒトハイブリッド可変領域配列L鎖を作製した。すなわち、hybridL1はFR1マウス配列(シグナル配列もマウス抗体配列由来)をもつヒト化抗体配列(塩基配列、配列番号35;アミノ酸配列、配列番号36)、hybridL2はFR1ヒト化配列(シグナル配列もヒト化抗体配列由来)をもつキメラ抗体配列(塩基配列、配列番号37;アミノ酸配列、配列番号38)である。

[0118] hybridL1、hybridL2可変領域配列の作製方法は以下のとおりである。

hybridL1可変領域5'側断片として、キメラ抗体L鎖発現ベクターを鋳型にMCMV-F1とAC133CDR1rプライマーの組み合わせで増幅した。hybridL1の3'側断片は、ヒト化抗体L鎖発現ベクターを鋳型にG1kCLr1とAC133CDR1fプライマーの組み合わせで増幅した。反応はKOD DNA polymeraseを用いて製造者の指示通りに行った。アガロース電気泳動を行い目的サイズの断片を回収して精製後、二つの断片を混合し、MCMV-F1とG1kCLr1プライマーを用いてPCR増幅した。増幅後、アセンブルされた断片を切り出し、Sall/BsiWI処理したのちにL鎖発現ベクターへと組みこんだ。hybridL2可変領域も同様にして、hybridL2可変領域の5'側断片としてヒト化抗体L鎖発現ベクターを鋳型にMCMV-F1とAC133CDR1rプライマーの組み合わせで、3'側断片としてキメラ抗体L鎖発現ベクターを鋳型にG1kCLr1とAC133CDR1fプライマーの組み合わせでPCR増幅、その後アセンブル、発現ベクターにクローニングした。構築した発現ベクターが期待通りの配列をもつことを塩基配列解析により確認した。

[0119] 前述の組み合わせに以下のものを加えて抗体をCOS-7細胞で一過的に発現させ、その結合活性をフローサイトメトリー法で評価した(図9)。

(5) ヒト化H鎖とhybridL1

(6) ヒト化H鎖とhybridL2

その結果、hybridL1鎖にキメラL鎖同等の活性があることが明らかになった。以上の結果より、ヒト化L鎖フレームワーク1上にキイとなるアミノ酸残基があると考えられた。

そこで図8(B)に示したL鎖フレームワーク1上でヒト化に伴いのアミノ酸残基残基置換を伴う部位に変異を導入した改変体を作製し、結合活性への影響をみた。

[0120] ヒト化L鎖改変体の作製方法は以下のとおりである。

h133L(b)鎖(塩基配列、配列番号39;アミノ酸配列、配列番号40)の構築。ヒト化抗体L鎖発現ベクターを鋳型に5'側断片としてMCMV-F1とM4V_rプライマーの組み合わせで、3'側断片としてG1kCLr1とM4V_fプライマーの組み合わせでPCR増幅、その後アセンブルし、Sall/BsiWI制限酵素切断後、発現ベクターにクローニングした。

h133L(c)鎖(塩基配列、配列番号41;アミノ酸配列、配列番号42)の構築。ヒト化抗体L鎖発現ベクターを鋳型に5'側断片としてMCMV-F1とP15Frプライマーの組み合わせで、3'側断片としてG1kCLr1とP15Ffプライマーの組み合わせでPCR増幅、その後アセンブルし、Sall/BsiWI制限酵素切断後、発現ベクターにクローニングした。

h133L(d)鎖(塩基配列、配列番号43;アミノ酸配列、配列番号44)の構築。ヒト化抗体L鎖発現ベクターを鋳型に5'側断片としてMCMV-F1とP18Qrプライマーの組み合わせで、3'側断片としてG1kCLr1とP18Qfプライマーの組み合わせでPCR増幅、その後アセンブルし、Sall/BsiWI制限酵素切断後、発現ベクターにクローニングした。

h133L(e)鎖(塩基配列、配列番号45;アミノ酸配列、配列番号46)の構築。ヒト化抗体L鎖発現ベクターを鋳型に5'側断片としてMCMV-F1とPPFQrプライマーの組み合わせで、3'側断片としてG1kCLr1とPPFQfプライマーの組み合わせでPCR増幅、その後アセンブルし、Sall/BsiWI制限酵素切断後、発現ベクターにクローニングした。

h133L(f)鎖(塩基配列、配列番号47;アミノ酸配列、配列番号48)の構築。ヒト化抗体L鎖発現ベクターを鋳型に5'側断片としてMCMV-F1とA19V_rプライマーの組み合わせで、3'側断片としてG1kCLr1とA19V_fプライマーの組み合わせでPCR増幅、その後アセンブルし、Sall/BsiWI制限酵素切断後、発現ベクターにクローニングした。

h133L(g)鎖(塩基配列、配列番号49;アミノ酸配列、配列番号50)の構築。ヒト化抗体L(c)鎖発現ベクターを鋳型に5'側断片としてMCMV-F1とA19V_rプライマーの組

み合わせで、3'側断片としてG1kCLr1とA19V_fプライマーの組み合わせでPCR増幅、その後アセンブルし、Sall/BsiWI制限酵素切断後、発現ベクターにクローニングした。

h133L(h)鎖(塩基配列、配列番号51;アミノ酸配列、配列番号52)の構築。ヒト化抗体L(e)鎖発現ベクターを鋳型に5'側断片としてMCMV-F1とPAQV_rプライマーの組み合わせで、3'側断片としてG1kCLr1とPAQV_fプライマーの組み合わせでPCR増幅、その後アセンブルし、Sall/BsiWI制限酵素切断後、発現ベクターにクローニングした。

構築した発現ベクターすべてが期待通りの配列をもつことを塩基配列解析により確認した。

- [0121] ヒト化H鎖との組み合わせでヒト化L鎖改変体をCOS-7細胞で一過的に発現させた。ヒト化H鎖とヒト化L鎖、ヒト化H鎖とキメラL鎖、ヒト化H鎖とhybridL1鎖と組み合せた場合との結合活性比較をフローサイトメトリー法で評価した。
- [0122] h133L(b)改変体では、ヒト化L鎖以上の活性は観察されなかった(データは示していない)。P15Fの点変異L(c)改変体でヒト化L鎖に比べ結合活性の上昇が認められた(図10)。P15F, P18Qの二か所に変異を導入したL(e)改変体の結合活性はL(c)のそれとほぼ同等であった。
- [0123] L(f)改変体では、顕著な結合活性上昇は認められなかった(図11)。L(c)改変体に一ヵ所、二ヵ所追加して変異導入した改変体L(g), L(h)の結合活性はL(c)のそれを上回るものではなかった。
- [0124] ヒト化H鎖とヒト化L(c)鎖の組み合わせにおいて、キメラ抗体とほぼ同等の結合活性が認められた。以上の結果より、ヒト化抗体としてh133H(塩基配列、配列番号31;アミノ酸配列、配列番号32)のH鎖とh133L(c)鎖(塩基配列、配列番号41;アミノ酸配列、配列番号42)のL鎖の配列およびその組み合わせを決定した。

産業上の利用可能性

- [0125] 本発明により、もとのAC133抗体には存在しないADCC/CDC誘導作用が付与された組換え抗体が提供された。AC133抗体のエピトープは癌幹細胞で発現することから、本発明の抗体は、癌幹細胞を標的として腫瘍増殖を抑制することで、癌転移を抑

制し、原発腫瘍巣を縮小方向へと進めることのできる、効果的な抗癌剤として使用することができる。

[0126] また、従来の化学療法剤や、細胞毒性物質標識抗体では、正常細胞への副作用が問題となっているが、本発明の抗体は癌幹細胞を特異的に抑制することから、正常細胞への副作用を軽減できる抗癌剤として有用である。

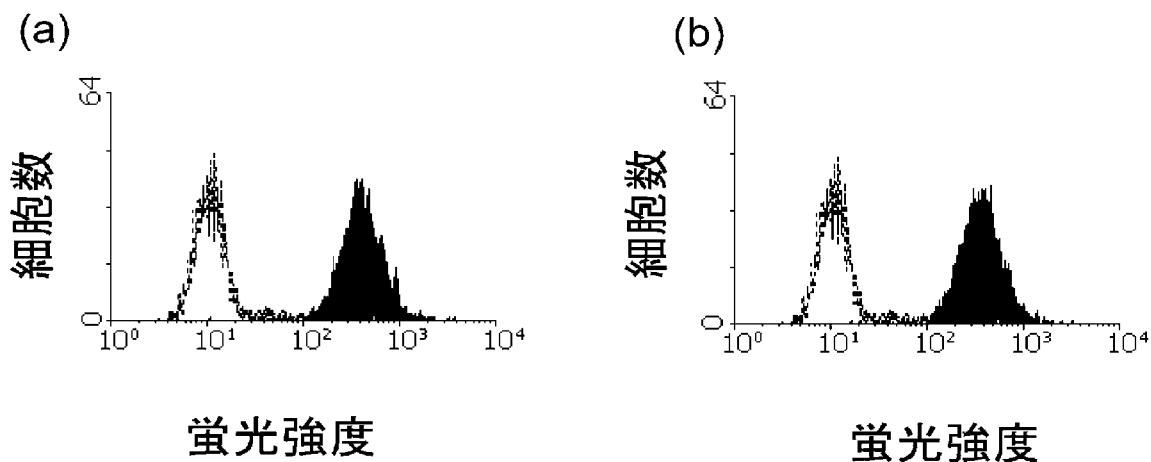
請求の範囲

- [1] Prominin-1に結合する抗体であって、かつADCC活性又はCDC活性を有する抗体。
- [2] AC133抗体が認識するエピトープと同じエピトープを認識することを特徴とする請求項1に記載の抗体。
- [3] キメラ抗体又はヒト化抗体である請求項1または2に記載の抗体。
- [4] 重鎖可変領域CDR1として配列番号12のアミノ酸配列を有し、重鎖可変領域CDR2として配列番号14のアミノ酸配列を有し、重鎖可変領域CDR3として配列番号16のアミノ酸配列を有することを特徴とする請求項1～3いずれかに記載の抗体。
- [5] 軽鎖可変領域CDR1として配列番号20のアミノ酸配列を有し、軽鎖可変領域CDR2として配列番号22のアミノ酸配列を有し、軽鎖可変領域CDR3として配列番号24のアミノ酸配列を有することを特徴とする請求項1～4いずれかに記載の抗体。
- [6] 配列番号34のアミノ酸配列の15位に相当する、軽鎖可変領域FR1の15番目のアミノ酸がPheである請求項5に記載の抗体。
- [7] 配列番号34のアミノ酸配列の18位に相当する、軽鎖可変領域FR1の18番目のアミノ酸がGlnである請求項6に記載の抗体。
- [8] 以下の(a)～(f)いずれかに記載の抗体。
 - (a) 配列番号32の1番目～114番目のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を含む抗体、
 - (b) 配列番号42の1番目～112番目のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含む抗体、
 - (c) 配列番号46の1番目～112番目のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含む抗体、
 - (d) 配列番号32の1番目～114番目のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域と配列番号42の1番目～112番目のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含む抗体、
 - (e) 配列番号32の1番目～114番目のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域と配列番号46の1番目～112番目のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含む抗体、
 - (f) (a)～(e)いずれかに記載の抗体と機能的に同等な抗体
- [9] 重鎖定常領域がマウスIgG1でないことを特徴とする請求項1～8いずれかに記載の

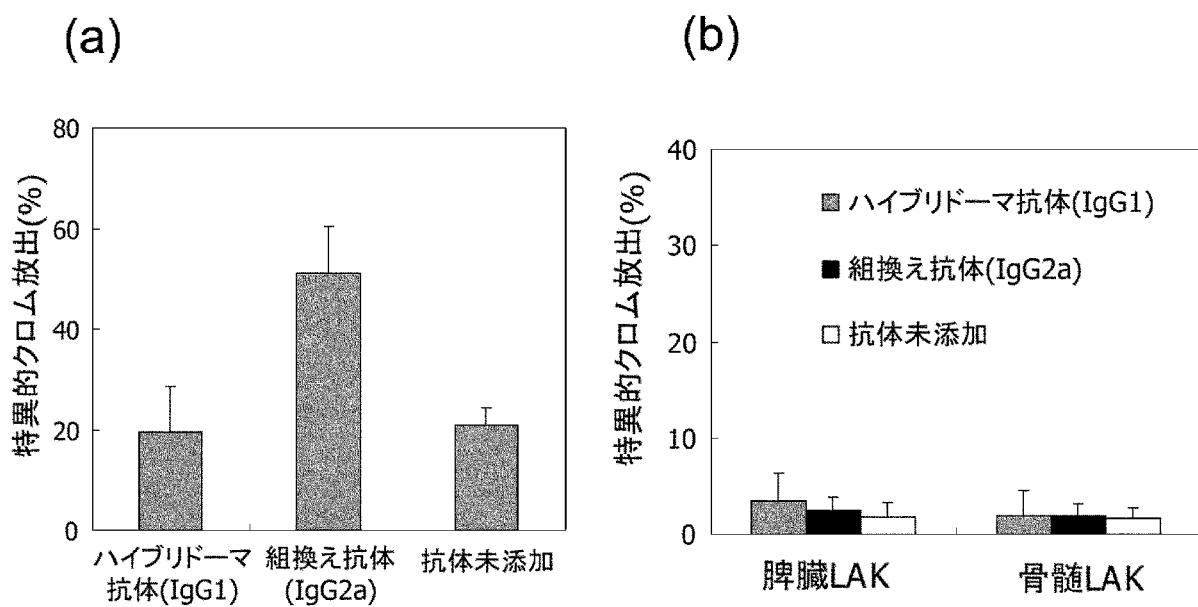
抗体。

- [10] 重鎖定常領域がヒトIgG1であり、軽鎖定常領域がヒトIg κ である請求項9記載の抗体。
 -
- [11] 細胞傷害性物質が結合していないことを特徴とする請求項10に記載の抗体。
- [12] 請求項1～11いずれかに記載の抗体を有効成分とする医薬組成物。
- [13] 抗癌剤である請求項12に記載の医薬組成物。
- [14] 請求項1～11いずれかに記載の抗体を対象に投与する工程を含む癌を予防または治療する方法。
- [15] 抗癌剤の製造における、請求項1～11いずれかに記載の抗体の使用。
- [16] 癌を治療するための方法に使用するための、請求項1～11いずれかに記載の抗体
 -

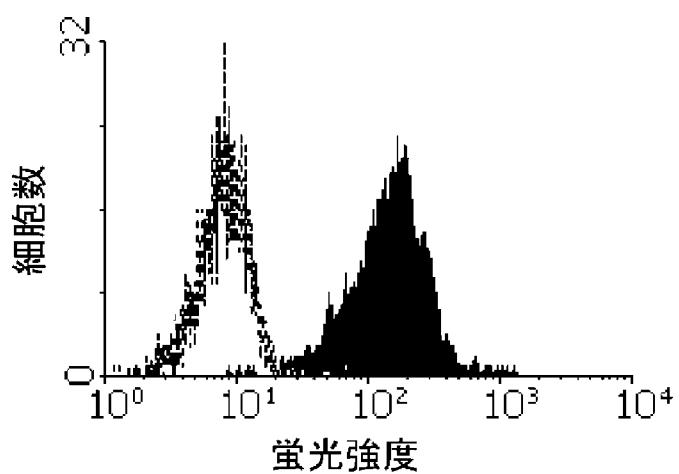
[図1]



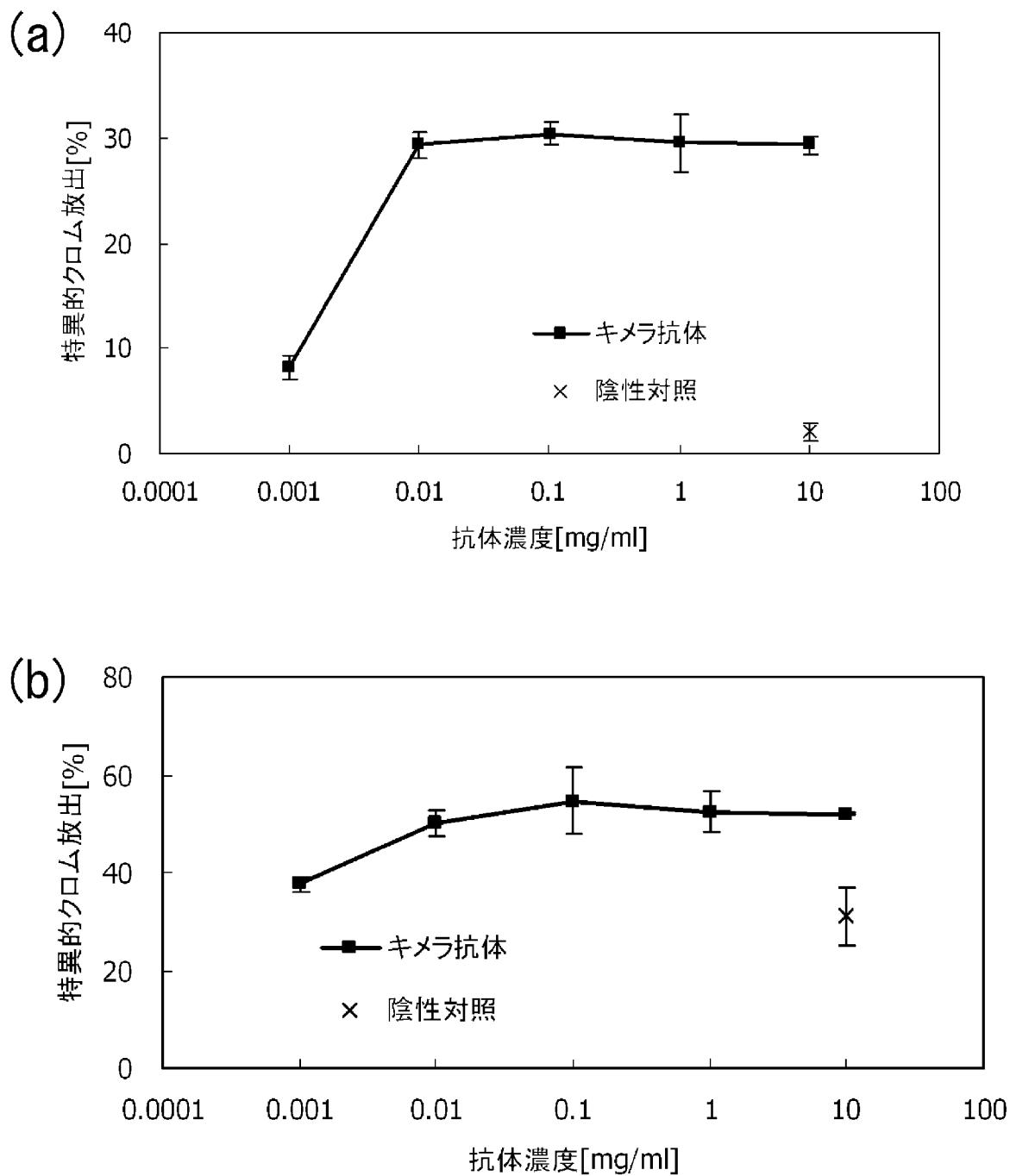
[図2]



[図3]



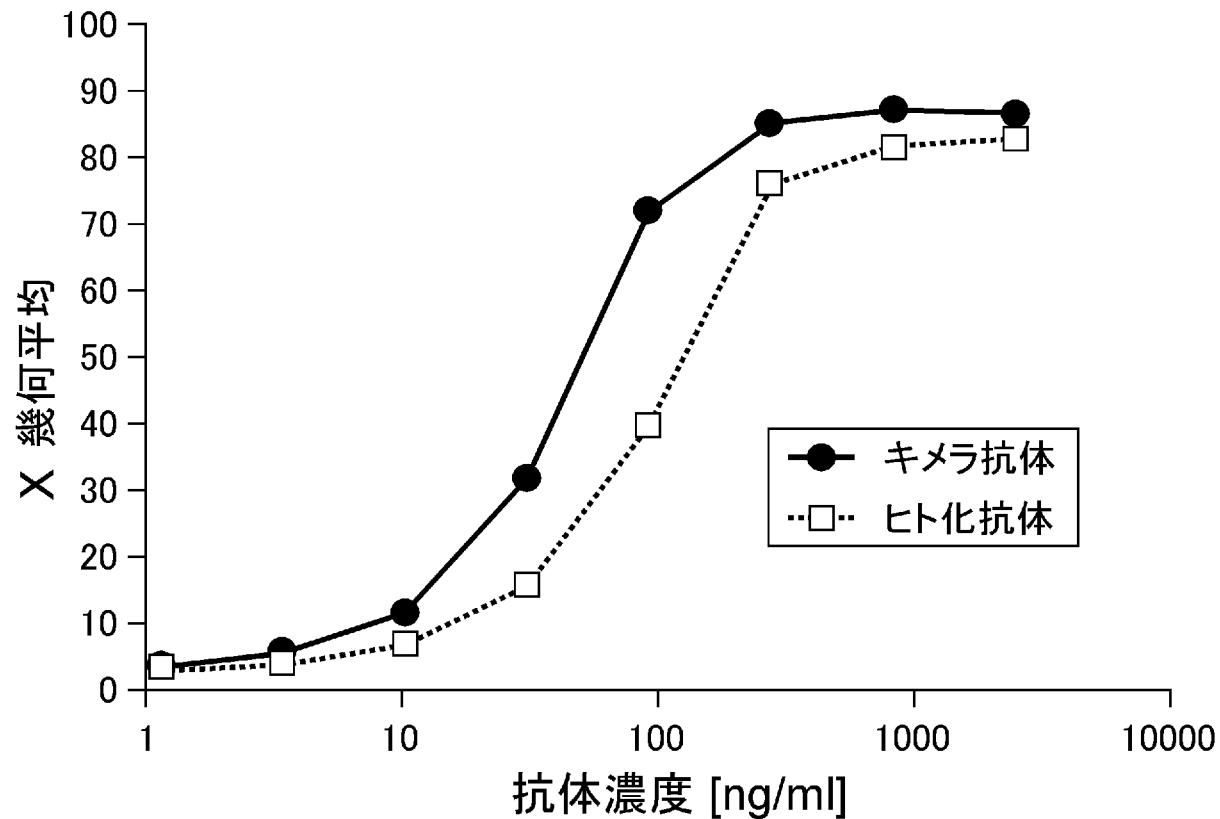
[図4]



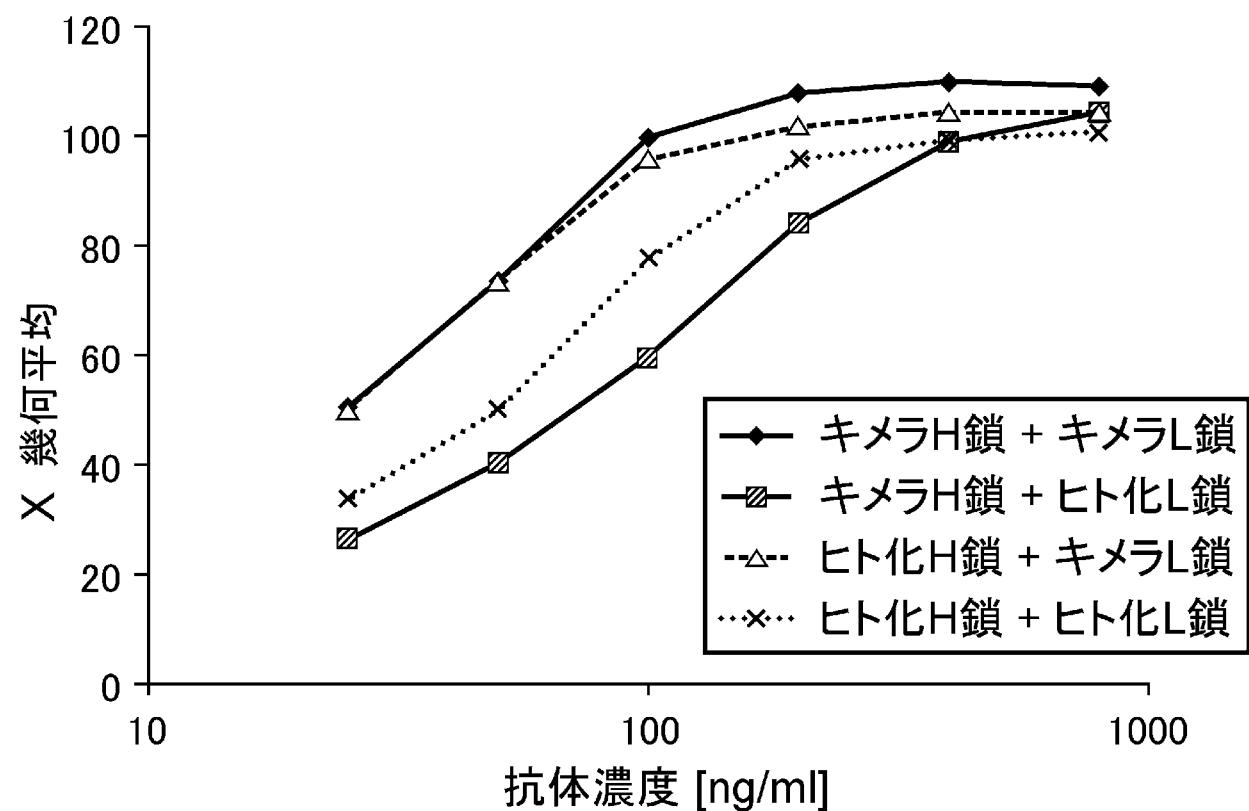
[図5]

(A)	AC133VH : 1	QVQLQQSGAELVRPGASVKL SCKASGYTFSXXXXWVKQTPVHGLEWIGXXXXXXX 60 QVQL QSGAE+ +PGASVK+ SCKASGYTF+ WV+Q P GLEW+G
	AF174028: 58	QVQLVQSGAEVKKP GASVKSCKASGYTFTSYG ISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNTNY 237
	AC133VH : 61	XXXXXXXXKATLTTDKSSSTAYMELRSL TSEDSAVYYCTL-----XXXXXWGQGTL 109 + T+TTD S+STAYMELRSL S+D+AVYYC L WGGTTL
	AF174028: 238	AQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYGALGGYCSGGSCPNNWFDPWGQGTL 417
	AC133VH : 110	VTVSA 114 (配列番号:10) VTVS+
	AF174028: 418	VTVSS 432 (配列番号:53)
(B)	AC133VL : 1	DVWVTQTPLSLPVSFQDVSI SCXXXXXXWYLHKPGQSPQLIYXXXXXX 60 DVW+TQ+PLSLPV+ G+ SIS C WYL KPQSPQLIY
	AB064105: 67	DVWMTQSPLSLPVTPGEPAISCRSSQSLLHSNNGNYLDWYLQKPGQSPQLIYLGSNRA 246
	AC133VL : 61	XGVPDFSGSGSGTDFTLKISTIKPEDLGMYYCXXXXXXFGGGTKLEIKR 113 (配列番号:18) GVPDRFSGSGSGTDFTLKIS ++ ED+G+YYC FG GTKLEIKR
	AB064105: 247	SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPTFGQQGTKLEIKR 405 (配列番号:54)

[図6]



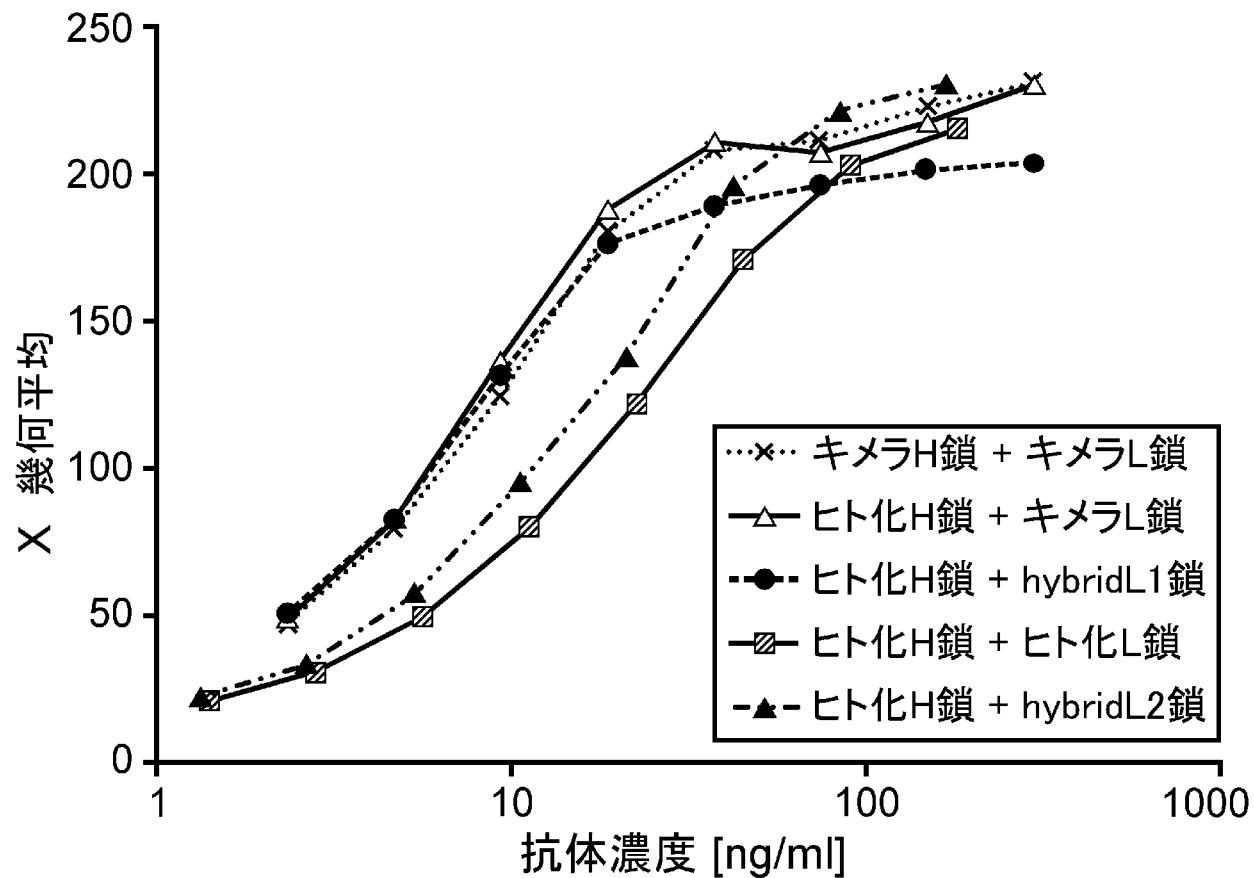
[図7]



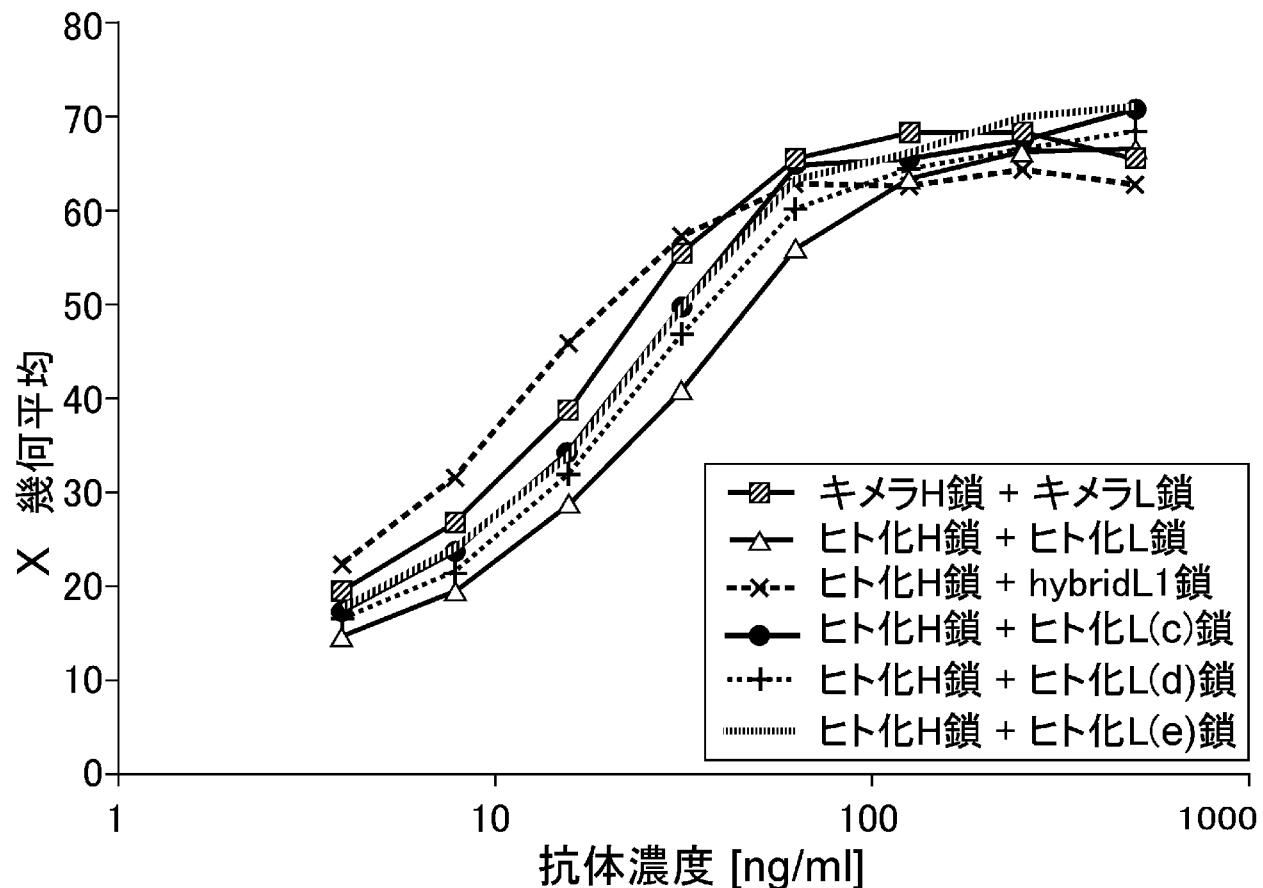
[図8]

	(A)				(B)								
	FR1	FR2	CDR2	FR3	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4	CDR3	FR4	配列番号 (位置)
h133VH	QVQLVQSGAEVKKPAGSYKVSCAKASGYTFT	DDEMHH	WVRQAPGQGLEWMG	DIDPGTGDTAYNLKFKG	RVTMTTDSTSTAYMELRSRSDDTAVYVCAL	KA-L-K-S	-T-E-S-T-	GAFVY	WGQGTIVTVSS	32 (1-114)	A	10 (1-114)	
mouse133VH	-----Q-----LVR-----S-----	-----K-T-VH-----I-----											
(A)													
h133VL	DVVMQTSPPLSLPVTPGEPAISCG	RSSQSLANSYGNLYL	S	WYLQKPGQSPALLIY	G1	SNRFS	GVPDRFSGSGSGTDFTLKI	SRVEAEDVGYYC	LGGTHQPYT	F6Q6TKLEIK	34 (1-112)		
mouse133VL	-----V-----T-----SF-DQV-----	-----V-----T-----SF-DQV-----		-----H-----			-----T-----K-----L-----M-----		-----G-----	-----G-----	18 (1-112)		
hybridVL1												36 (1-112)	
hybridVL2												38 (1-112)	
h133VLb	-----V-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	40 (1-112)	
h133VLC	-----F-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	42 (1-112)	
h133VLd	-----Q-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	44 (1-112)	
h133VLe	-----F-----Q-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	46 (1-112)	
h133VLF	-----V-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	48 (1-112)	
h133VLg	-----F-----V-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	50 (1-112)	
h133VLh	-----F-----QV-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	52 (1-112)	

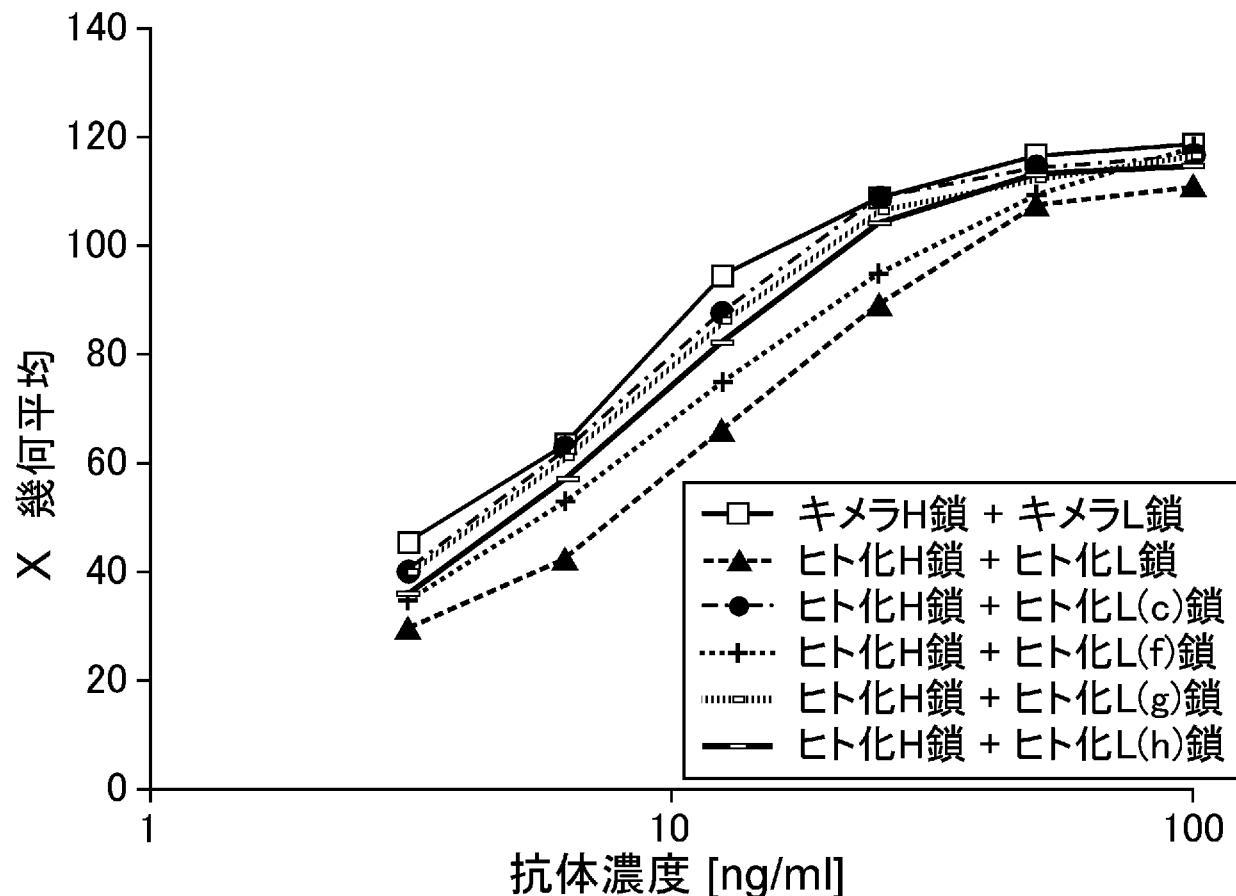
[図9]



[図10]



[図11]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/061516

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09 (2006.01)i, A61K39/395 (2006.01)i, A61P35/00 (2006.01)i, C07K16/46 (2006.01)i, C07K16/18 (2006.01)n

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)

C12N15/09, A61K39/395, A61P35/00, C07K16/46, C07K16/18

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2008
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2008	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2008

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/CAPLUS (STN), SwissProt/PIR/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2007/062138 A2 (APPLERA CORP. et al.), 31 May, 2007 (31.05.07), Par. No. [0082] to [0106], [0416] to [0443] (Family: none)	1-13, 15-16
Y	DALL' ACQUA F. William et al., Properties of Human IgG1s Engineered for Enhanced Binding to the Neonatal Fc Receptor (FcRn), J. Biol. Chem., 2006, Vol.281, No.33, pp.23514-23524	1-13, 15-16
Y	LAZAR A. Greg et al., Enginnered antibody Fc variants with enhanced effector function, PNAS, 2006, Vol.103, No.11, pp.4005-4010	1-13, 15-16

Further documents are listed in the continuation of Box C.

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
05 August, 2008 (05.08.08)

Date of mailing of the international search report
19 August, 2008 (19.08.08)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/061516

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MATSUMIYA Shigeki et al., Structural Comparison of Fucosylated and Nonfucosylated Fc Fragments of Human Immunoglobulin G1, <i>J. Mol. Biol.</i> , May 2007, Vol.368, pp.767-779	1-13,15-16
Y	NIWA Rinpei et al., Enhancement of the Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity of Low-Fucose IgG1 Is Independent of Fc γ RIIIa Functional Polymorphism, <i>Clin. Cancer Res.</i> , 2004, Vol.10, pp.6248-6255	1-13,15-16
Y	OKAZAKI Akira et al., Fucose Depletion from Human IgG1 Oligosaccharide Enhances Binding Enthalpy and Association Rate Between IgG1 and Fc γ RIIIa, <i>J. Mol. Biol.</i> , 2004, Vol.336, pp.1239-1249	1-13,15-16
Y	HODONICZKY Jason et al., Control of Recombinant Monoclonal Antibody Effector Fictions by Fc N-Glycan Remodeling in Vitro, <i>Biotechnol. Prog.</i> , 2005, Vol.21, pp.1644-1652	1-13,15-16
Y	EWERT Stefan et al., Stability Improvement of Antibodies for Extracellular and Intracellular Applications: CDR Grafting to Stable Frameworks and Structure-Based Framework Engineering, <i>Methods</i> , 2004, Vol.34, pp.184-199	4-13,15-16
Y	WU Herren et al., Humanization of a Murine Monoclonal Antibody by Simultaneous Optimization of Framework and CDR Residues, <i>J. Mol. Biol.</i> , 1999, Vol.294, pp.151-162	4-13,15-16
Y	ROGUSKA A. Michael et al., A Comparison of Two Murine Monoclonal Antibodies Humanized by CDR-Grafting and Variable Domain Resurfacing, <i>Protein Enginnering</i> , 1996, Vol.9, No.10, pp.895-904	4-13,15-16
Y	ONO Koichiro et al., The Humanized Anti-HM1.24 Antibody Effectively Kills Multiple Myeloma Cells by Human Effector Cell-Mediated Cytotoxicity, <i>Mol. Immunol.</i> , 1999, Vol.36, pp.387-395	9-13,15-16
P,X	WO 2008/070593 A2 (SEATTLE GENETICS INC.), 12 June, 2008 (12.06.08), Par. Nos. [0009], [0127], [0270] to [0299] (Family: none)	1-13,15-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/061516

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, Y	Osamu SHIMOZATO et al., "Antibody against Cancer Stem Cell Marker CD133 Down-Regulates Cell Cycle Progression in Colon Cancer Cells", Nihon Gan Gakka Gakujutsu Sokai Kiji, Aug. 2007, Dai 66 Kai, page 51	1-13, 15-16
P, Y	OGANESYAN Vaheh et al., Structual Characterization of a Mutated, ADCC-Enhaced Human FC Fragment, Mol. Immunol., Apr. 2008, Vol.45, pp.1872-1882	1-13, 15-16
A	SHMELKOV V. Sergy et al., AC133/CD133/ Prominin-1, Int. J. Biochem. Cel. Biol., 2005, Vol.37, pp.715-719	1-13, 15-16
A	FARGEAS A. Christine et al., AC133 Antigen, CD133, Prominin-1, Prominin-2, Etc.: Prominin Family Gene Products in Need of a Rational Nomenclature, Stem Cells, 2003, Vol.21, pp.506-508	1-13, 15-16
A	POTGENS J.G. Andy et al., Monoclonal Antibody CD133-2 (AC141) Against Hematopoietic Stem Cell Antigen CD133 Shows Crossactivity with Cytokeratin 18, J. Histochem. Cytochem., 2002, Vol.50, No.8, pp.1131-1134	1-13, 15-16
A	POTGENS A.J.G. et al., Human Trophoblast Contains an Intracellular Protein Reactive with an Antibody against CD133 - A Novel Marker for Trophoblast, Placenta, 2001, Vol.22, pp.639-645	1-13, 15-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/061516

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 14

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The invention of claim 14 relates to "a method for the prevention or treatment of cancer, which comprises the step of administering an antibody to a subject", and therefore relates to a subject matter which this international searching (continued to extra sheet)

2. Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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. 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.:

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

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, 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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/061516

Continuation of Box No.II-1 of continuation of first sheet (2)

authority is not required, under the provisions of PCT Article 17(2) (a) (i) and PCT Rule 39.1(iv), to search.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C07K16/46(2006.01)i,
C07K16/18(2006.01)n

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int.Cl. C12N15/09, A61K39/395, A61P35/00, C07K16/46, C07K16/18

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2008年
日本国実用新案登録公報	1996-2008年
日本国登録実用新案公報	1994-2008年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/CAPLUS(STN), SwissProt/PIR/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO 2007/062138 A2 (APPLERA CORPOLATION ほか) 2007.05.31 段落【0082】～【00106】及び【00416】～【00443】 (ファミリーなし)	1-13, 15-16
Y	DALL' ACQUA F. William et al., Properties of Human IgG1s Engineered for Enhanced Binding to the Neonatal Fc Receptor (FcRn), J. Biol. Chem., 2006, Vol. 281, No. 33, pp. 23514-23524	1-13, 15-16

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 05.08.2008	国際調査報告の発送日 19.08.2008
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ISA/JP） 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官（権限のある職員） 引地 進 電話番号 03-3581-1101 内線 3488 4N 9549

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	LAZAR A. Greg et al., Enginnered antibody Fc variants with enhanced effector function, PNAS, 2006, Vol. 103, No. 11, pp. 4005-4010	1-13, 15-16
Y	MATSUMIYA Shigeki et al., Structural Comparison of Fucosylated and Nonfucosylated Fc Fragments of Human Immunoglobulin G1, J. Mol. Biol., May 2007, Vol. 368, pp. 767-779	1-13, 15-16
Y	NIWA Rinpei et al., Enhancement of the Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity of Low-Fucose IgG1 Is Independent of Fc γ RIIIa Functional Polymorphism, Clin. Cancer Res., 2004, Vol. 10, pp. 6248-6255	1-13, 15-16
Y	OKAZAKI Akira et al., Fucose Depletion from Human IgG1 Oligosaccharide Enhances Binding Enthalpy and Association Rate Between IgG1 and Fc γ RIIIa, J. Mol. Biol., 2004, Vol. 336, pp. 1239-1249	1-13, 15-16
Y	HODONICZKY Jason et al., Control of Recombinant Monoclonal Antibody Effector Fictions by Fc N-Glycan Remodeling in Vitro, Biotechnol. Prog., 2005, Vol. 21, pp. 1644-1652	1-13, 15-16
Y	EWERT Stefan et al., Stability Improvement of Antibodies for Extracellular and Intracellular Applications: CDR Grafting to Stable Frameworks and Structure-Based Framework Engineering, Methods, 2004, Vol. 34, pp. 184-199	4-13, 15-16
Y	WU Herren et al., Humanization of a Murine Monoclonal Antibody by Simultaneous Optimization of Framework and CDR Residues, J. Mol. Biol., 1999, Vol. 294, pp. 151-162	4-13, 15-16
Y	ROGUSKA A. Michael et al., A Comparison of Two Murine Monoclonal Antibodies Humanized by CDR-Grafting and Variable Domain Resurfacing, Protein Enginnering, 1996, Vol. 9, No. 10, pp. 895-904	4-13, 15-16

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	ONO Koichiro et al., The Humanized Anti-HM1.24 Antibody Effectively Kills Multiple Myeloma Cells by Human Effector Cell-Mediated Cytotoxicity, Mol. Immunol., 1999, Vol. 36, pp. 387-395	9-13, 15-16
PX	WO 2008/070593 A2 (SEATTLE GENETICS INC.) 2008.06.12 段落【0009】、【0127】及び【0270】～【0299】 (ファミリーなし)	1-13, 15-16
PY	下里修ほか, Antibody against Cancer Stem Cell Marker CD133 Down-Regulates Cell Cycle Progression in Colon Cancer Cells, 日本癌学会学術総会記事, Aug. 2007, 第66回, p. 51	1-13, 15-16
PY	OGANESYAN Vaheh et al., Structual Characterization of a Mutated, ADCC-Enhaced Human FC Fragment, Mol. Immunol., Apr. 2008, Vol. 45, pp. 1872-1882	1-13, 15-16
A	SHMELKOV V. Sergy et al., AC133/CD133/Prominin-1, Int. J. Biochem. Cel. Biol., 2005, Vol. 37, pp. 715-719	1-13, 15-16
A	FARGEAS A. Christine et al., AC133 Antigen, CD133, Prominin-1, Prominin-2, Etc. : Prominin Family Gene Products in Need of a Rational Nomenclature, Stem Cells, 2003, Vol. 21, pp. 506-508	1-13, 15-16
A	POTGENS J. G. Andy et al., Monoclonal Antibody CD133-2 (AC141) Against Hematopoietic Stem Cell Antigen CD133 Shows Crossactivity with Cytokeratin 18, J. Histochem. Cytochem., 2002, Vol. 50, No. 8, pp. 1131-1134	1-13, 15-16
A	POTGENS A. J. G. et al., Human Trophoblast Contains an Intracellular Protein Reactive with an Antibody against CD133 - A Novel Marker for Trophoblast, Placenta, 2001, Vol. 22, pp. 639-645	1-13, 15-16

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT第17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 1 4 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

請求の範囲14に係る発明は、「抗体を対象に投与する工程を含む癌を予防又は治療する方法」に係る発明であるから、PCT第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。

2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかつた。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかつたので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかつたので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあつた。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあつたが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかつた。
- 追加調査手数料の納付はあつたが、異議申立てはなかつた。