(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
2009 年3 月5 日 (05.03.2009)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2009/028639 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 15/02 (2006.01) *C07K 16/28* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *C07K 16/46* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C12P 21/08* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2008/065486

(22) 国際出願日: 2008 年8 月29 日 (29.08.2008)

(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2007-224007 2007 年8 月30 日 (30.08.2007) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 第一三共株式会社 (DAIICHI SANKYO COMPANY,LIMITED) [JP/JP]; 〒1038426 東京都中央区日本橋本町三丁目５番１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): 長谷川 純 (HASEGAWA, Jun). 大塚 敏明 (OHTSUKA, Toshiaki). 浦野 敦司 (URANO, Atsushi). 山口 淳子 (YAMAGUCHI, Junko). 我妻 利紀 (AGATSUMA, Toshinori). 中原 かおり (NAKAHARA, Kaori). 滝沢 剛 (TAKIZAWA, Takeshi).

(74) 代理人: 石橋 公樹, 外(ISHIBASHI, Koki et al.); 〒1340081 東京都江戸川区北葛西一丁目１６番１３号 第一三共株式会社内 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書
— 明細書とは別に規則１３の２に基づいて提出された生物材料の寄託に関する表示.
— 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

(54) **Title:** ANTI-EPHA2 ANTIBODY

(54) 発明の名称: 抗ＥＰＨＡ２抗体

(57) **Abstract:** Disclosed are: an antibody capable of inhibiting the canceration of a cell and/or the proliferation of a tumor cell; and others. Specifically disclosed are: an antibody which can recognize an epitope that can be recognized by an antibody produced by a hybridoma SH 348-1 (FERM BP-10836) or a hybridoma SH 357-1 (FERM BP-10837); an antibody produced by a hybridoma SH 348-1 or a hybridoma SH 357-1; an antibody which is produced by humanizing an antibody produced by a hybridoma SH 348-1 or a hybridoma SH 357-1; a pharmaceutical agent comprising any one of the aforementioned antibodies as an active ingredient; and others.

(57) 要約: 細胞の癌化及び／又は腫瘍細胞増殖抑制活性を有する抗体等を提供すること。ハイブリドーマＳＨ３４８－１（ＦＥＲＭ ＢＰ－１０８３６）又はハイブリドーマＳＨ３５７－１（ＦＥＲＭ ＢＰ－１０８３７）が産生する抗体によって認識されるエピトープを認識する抗体、ハイブリドーマＳＨ３４８－１又はハイブリドーマＳＨ３５７－１が産生する抗体、ハイブリドーマＳＨ３４８－１又はハイブリドーマＳＨ３５７－１が産生する抗体をヒト化した抗体、該抗体を有効成分として含有する医薬等の提供。

WO 2009/028639 A1

明 細 書

抗EPHA2抗体

技術分野

[0001] 本発明は、細胞の癌化及び／又は腫瘍細胞増殖抑制活性を有する抗体、より具体的には、EPHA2に対する抗体、該抗体を含有する医薬組成物に関する。

背景技術

[0002] EPHA2は、分子量130kDaの1回膜貫通構造を有するレセプター型チロシンキナーゼである(Mocecular and Cellular Biology、1990年、第10巻、p. 6316－6324)。EPHA2のN末端側の細胞外領域には、リガンド結合ドメインと2ヶ所のフィブロネクチンタイプ3ドメインが存在し、C末端側の細胞内領域にはチロシンキナーゼドメインとsterile－α－motif(SAM)ドメインが存在している。

[0003] EPHA2のリガンドとしては、GPIアンカー型細胞膜蛋白質のEphrin－A1～A5が知られている(Annual Review of Neuroscience、1998年、第21巻、p. 309－345)。EPHA2にリガンドが結合することによりチロシンキナーゼドメインが活性化され、EPHA2の細胞内領域に存在するチロシン残基がリン酸化され、細胞内にシグナルが伝達される。また、リガンドと結合したEPHA2はエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれ、最終的にプロテアソームで分解されることが報告されている(Molecular Cancer Research、2002年、第1巻、p. 79－87)。

[0004] EPHA2は臨床的に多くの癌、特に乳癌、食道癌、前立腺癌、胃癌、非小細胞肺癌、大腸癌、多形神経膠芽腫での高発現が報告されている(Cancer Research、2001年、第61巻、p. 2301－2306、International Journal of Cancer、2003年、第103巻、p. 657－663、The Prostate、1999年、第41巻、p. 275－280、American Journal of Pathology、2003年、第163巻、p. 2271－2276、Cancer Science、2005年、第96巻、p. 42－47、Clinical Cancer Research、2003年、第9巻、p. 613－618、Oncology Reports、2004年、第11巻、p. 605－611、Molecular Cancer Research、2005年、第3巻、p. 541－551)。また、食道癌では、EPHA2発現陽性の患者で局所リンパ節転移の頻度やリンパ節転移の

数、癌の低分化度が高いこと、また、EPHA2発現陽性の患者では5年生存率が低いこと(International Journal of Cancer、2003年、第103巻、p. 657－663)、非小細胞肺癌ではEPHA2を高発現している患者で無病生存率が低いこと、再発、特に脳への転移が起こりやすいこと(Clinical Cancer Research、2003年、第9巻、p. 613－618)、大腸癌においてはEPHA2発現陽性の患者で肝転移、リンパ管浸潤、リンパ節転移が起こりやすいこと、臨床ステージの高い患者にEPHA2発現陽性の患者が多いことが報告されている(Oncology Reports、2004年、第11巻、p. 605－611)。

[0005] また、EPHA2遺伝子を細胞に導入することによって、非癌細胞が足場非依存的増殖能や細胞外基質上での管状形態形成能、in vivoでの腫瘍増殖能といった癌形質を獲得するようになること(Cancer Research、2001年、第61巻、p. 2301－2306)、癌細胞の細胞外基質に対する浸潤性が亢進すること(Biochemical and Biophysical Research Communications、2004年、第320巻、 p. 1096－1102、Oncogene、2004年、第23巻、p. 1448－1456)が報告されている。逆にEPHA2の発現をsiRNAで抑制すると癌細胞の浸潤性や足場非依存的増殖、in vivoでの腫瘍増殖が抑制されること(Oncogene、2004年、第23巻、p. 1448－1456、Cancer Research、2002年、第62巻、p. 2840－2847)及び、リガンドであるEphrin－A1とヒトIgGのFc領域との融合蛋白質を使用してEPHA2を活性化し、エンドサイトーシスによるEPHA2の分解を誘導することで癌細胞の浸潤性や足場非依存的増殖、管状形態形成能が抑制されること(Cancer Research、2001年、第61巻、p. 2301－2306、Molecular Cancer Research、2005年、第3巻、p. 541－551、Biochemical and Biophysical Research Communications、2004年、第320巻、 p. 1096－1102)が報告されている。

[0006] 一方でEPHA2は、癌細胞のみならず腫瘍内または周囲の血管にも発現していることが報告されている(Oncogene、2000年、第19巻、p. 6043－6052)。マウスにおいてはEphrin－A1によって誘導される血管新生にEPHA2シグナルが関与していること、特に血管内皮細胞に発現するEPHA2が血管内皮細胞の管空形成や生存に必要とされることが報告されており(Journal of Cell Science、2004年、第1

17巻、p. 2037－2049)、EPHA2の細胞外領域とヒトIgGのFc領域との融合蛋白質がin vivoで血管新生を抑制し、抗腫瘍効果を示すことも報告されている(Oncogene、2002年、第21巻、p. 7011－7026)。

[0007] モノクローナル抗体は、診断薬としてのみならず治療薬としても有用であり、特に癌治療の分野でモノクローナル抗体の利用が積極的に行われており、HER2やEGFRなどのレセプター型チロシンキナーゼやCD20の細胞外領域に対するモノクローナル抗体が癌治療に用いられ優れた効果を発揮している(The New England Journal of Medicine、2007年、第357巻、p. 39－51、Oncogene、2007年、第26巻、p. 3661－3678、Oncogene、2007年、第26巻、p. 3603－3613)。癌治療に用いられるモノクローナル抗体の作用機構としては、アポトーシスの誘導や増殖シグナルの阻害の他、ADCCやCDCなどの免疫反応を介した作用も非常に重要な役割を果たしていると考えられている。実際、抗HER2抗体(trastuzumab)や抗CD20抗体(rituximab)を、ADCCの誘導に必要なFcγRを欠損させたヌードマウスxenograftに投与すると、FcγRを欠損していないヌードマウスに投与した場合と比較しこれらの抗体の抗腫瘍効果が著しく減弱されることが報告されており(Nature Medicine、2000年、第6巻、p. 443－446)、また、コブラ毒素を投与し補体を枯渇させたマウスに抗CD20抗体(rituximab)を投与すると、補体を枯渇させていないマウスに投与した場合と比較し抗腫瘍効果が減弱することが報告されている(Blood、2004年、第103巻、p. 2738－2743)。

[0008] EPHA2に関しては、リガンドと同じようにEPHA2チロシン残基のリン酸化誘導活性とEPHA2の分解誘導活性を持つアゴニスト抗EPHA2モノクローナル抗体が乳癌細胞株の足場非依存的増殖や細胞外基質上での管状形態形成を阻害することが報告されている(Cancer Research、2002年、第62巻、p. 2840－2847)。また、非癌細胞に比べ癌細胞で露出しているEPHA2上のエピトープを認識し、EPHA2チロシン残基のリン酸化誘導活性とEPHA2の分解誘導活性を有するアゴニスト抗EPHA2モノクローナル抗体がin vivoで抗腫瘍効果を示すことが報告されている(Cancer Research、2003年、第63巻、p. 7907－7912、国際公開第WO03／094859号パンフレット)。一方で、Kiewlichらの抗EPHA2モノクローナル抗体は、EP

HA2チロシン残基のリン酸化誘導活性とEPHA2の分解誘導活性を有するもののin vivoで抗腫瘍効果を示さなかったことが報告されている(Neoplasia、2006年、第8巻、p. 18－30)。

[0009] また、国際公開WO2006／084226号パンフレットには、癌細胞をマウスに免疫して取得した抗EPHA2モノクローナル抗体であるLUCA19、SG5、LUCA40、SPL1が記載されており、これらの抗体については、LUCA19とSG5がEPHA2チロシン残基のリン酸化に影響を及ぼさないこと、LUCA40がin vitroで癌細胞の増殖を阻害すること、LUCA19、SG5及びLUCA40が毒素(saporin)標識された抗マウス抗体存在下で癌細胞内にインターナライズされることが記載されている。また、LUCA40とSPL1については、in vivoで抗腫瘍効果を示すことが報告されているが、アゴニスト活性を有するか否かについては明らかとなっていない。

[0010] これらの研究にもかかわらず、現在までのところin vivoで抗腫瘍効果を示す抗EPHA2抗体のエピトープについては明確になっておらず、EPHA2の細胞外領域中の特定のアミノ酸配列が癌治療を目的としたモノクローナル抗体のエピトープとして有用であるという報告はない。

[0011] 同一の抗原に対する抗体であっても、エピトープや抗体の配列が異なることによって、抗体の性質は異なる。そして、これらの性質が異なることによって、臨床でヒトに投与した場合に薬剤の有効性や治療応答性の頻度、副作用や薬剤耐性の発生頻度等の点で異なる反応を示すことになる。

[0012] したがって、どのような性質を持つ薬剤が臨床上最良かは患者によっても異なり、実際に薬剤を投与してみないと分からない場合も多く、新規作用機作を有する薬剤の創出が強く望まれている。EPHA2に対する抗体についても、従来とは異なる性質を有する抗体の創出が強く求められていた。

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0013] 本発明の1つの課題は、EPHA2に対する抗体を提供することである。

[0014] 本発明の他の1つの課題は癌に対して治療効果を有する抗EPHA2抗体を含有する医薬組成物等を提供することである。

[0015] 本発明の他の一つの課題は、該抗体の製造方法を提供することである。

[0016] 本発明の他の一つの課題は、該抗体を用いた腫瘍の増殖の抑制方法等を提供することである。

課題を解決するための手段

[0017] 本発明者らは上記課題を解決するために鋭意、検討を行ったところ、EPHA2のチロシン残基のリン酸化誘導活性を有さずにEPHA2発現癌細胞に対しADCC、CDC活性を有する新規の抗EPHA2モノクローナル抗体を取得することに成功した。そして、この抗体のエピトープを調べることによりEPHA2中に2つ存在するフィブロネクチンタイプ3ドメインのC末端側のドメインを含む領域に結合する抗体がin vivoで優れた抗腫瘍活性を持つことを初めて見出し、本発明を完成した。

[0018] すなわち、本発明は、

(1)ハイブリドーマSH348－1(FERM BP－10836)が産生する抗体によって認識されるエピトープを認識する抗体、

(2)以下のa)乃至d)に示される性質を有する、(1)に記載の抗体:

a)EPHA2チロシン残基のリン酸化能を有さない;

b)EPHA2発現細胞に対してADCC活性を有する;

c)EPHA2発現細胞に対してCDC活性を有する;

d)In vivoで抗腫瘍活性を有する、

(3)以下のa)乃至e)に示される性質を有する、(1)に記載の抗体:

a)EPHA2チロシン残基のリン酸化能を有さない;

b)EPHA2蛋白質量の減少作用を示す;

c)EPHA2発現細胞に対してADCC活性を有する;

d)EPHA2発現細胞に対してCDC活性を有する;

e)In vivoで抗腫瘍活性を有する、

(4)配列表の配列番号8のアミノ酸番号426乃至534に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドに特異的に結合する抗体、

(5)配列表の配列番号8のアミノ酸番号426乃至534に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドに特異的に結合し、以下のa)乃至d)に示される性質を有する抗体:

a）EPHA2チロシン残基のリン酸化能を有さない；

b）EPHA2発現細胞に対してADCC活性を有する；

c）EPHA2発現細胞に対してCDC活性を有する；

d）In vivoで抗腫瘍活性を有する、

（6）配列表の配列番号8のアミノ酸番号426乃至534に示されるアミノ酸配列からなるペプチドに特異的に結合し、以下のa）乃至e）に示される性質を有する抗体：

a）EPHA2チロシン残基のリン酸化能を有さない；

b）EPHA2蛋白質量の減少作用を示す；

c）EPHA2発現細胞に対してADCC活性を有する；

d）EPHA2発現細胞に対してCDC活性を有する；

e）In vivoで抗腫瘍活性を有する、

（7）配列表の配列番号8のアミノ酸番号439乃至534に示されるアミノ酸配列からなるペプチドに特異的に結合する、（1）乃至（6）から選択されるいずれか一つに記載の抗体、

（8）EPHA2リガンドにより誘導されるEPHA2チロシン残基のリン酸化を抑制する、（1）乃至（7）から選択されるいずれか一つに記載の抗体、

（9）EPHA2リガンドのEPHA2に対する結合を阻害するのではなく、リガンドにより誘導されるEPHA2チロシン残基のリン酸化を抑制する、（1）乃至（7）から選択されるいずれか一つに記載の抗体、

（10）重鎖可変領域の相補性決定領域として、配列表の配列番号59、61及び63に示されるアミノ酸配列又はこれらのアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、軽鎖可変領域の相補性決定領域として、配列表の配列番号65、67及び69に示されるアミノ酸配列又はこれらのアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有する、配列表の配列番号8に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドに特異的に結合する抗体、

（11）以下の1）及び2）の特徴を有する、配列表の配列番号8に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドに特異的に結合する抗体：

1）一般式（I）で示されるアミノ酸配列を含む重鎖ペプチドを有する；

$-FRH_1-CDRH_1-FRH_2-CDRH_2-FRH_3-CDRH_3-FRH_4-$（I）

（式中、FRH_1は18乃至30個のアミノ酸からなる任意のアミノ酸配列を示し、$CDRH_1$は配列表の配列番号59で示されるアミノ酸配列又は1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を示し、FRH_2は14個のアミノ酸からなる任意のアミノ酸配列を表し、$CDRH_2$は配列表の配列番号61で示されるアミノ酸配列又は1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を示し、FRH_3は32個のアミノ酸からなる任意のアミノ酸配列を表し、$CDRH_3$は配列表の配列番号63で示されるアミノ酸配列又は1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を示し、FRH_4は11個のアミノ酸からなる任意のアミノ酸配列を示し、各アミノ酸はそれぞれペプチド結合で連結している。）；

2）一般式（II）で示されるアミノ酸配列を含むことからなる軽鎖ポリペプチドを有する；

$-FRL_1-CDRL_1-FRL_2-CDRL_2-FRL_3-CDRL_3-FRL_4-$（II）

（式中、FRL_1は23個のアミノ酸からなる任意のアミノ酸配列を示し、$CDRL_1$は配列表の配列番号65で示されるアミノ酸配列又は1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を示し、FRL_2は15個のアミノ酸からなる任意のアミノ酸配列を表し、$CDRL_2$は配列表の配列番号67で示されるアミノ酸配列を示し、FRL_3は32個のアミノ酸からなる任意のアミノ酸配列を表し、$CDRL_3$は配列表の配列番号69で示されるアミノ酸配列又は1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を示し、FRL_4は10個のアミノ酸からなる任意のアミノ酸配列を示し、各アミノ酸はそれぞれペプチド結合で連結している。）、

（12）ハイブリドーマSH357－1（FERM BP－10837）が産生する抗体によって認識されるエピトープを認識する抗体、

（13）以下のa）乃至d）に示される性質を有する、（12）に記載の抗体：

a）EPHA2チロシン残基のリン酸化能を有さない；

b）EPHA2発現細胞に対してADCC活性を有する；

c）EPHA2発現細胞に対してCDC活性を有する；

d）In vivoで抗腫瘍活性を有する、

（14）配列表の配列番号8のアミノ酸番号426乃至534に示されるアミノ酸配列からなるペプチドに特異的に結合し、以下のa）乃至e）に示される性質を有する抗体：

a）EPHA2チロシン残基のリン酸化能を有さない；

b）EPHA2蛋白質量の減少作用を示さない；

c）EPHA2発現細胞に対してADCC活性を有する；

d）EPHA2発現細胞に対してCDC活性を有する；

e）In vivoで抗腫瘍活性を有する、

（15）配列表の配列番号8のアミノ酸番号439乃至534に示されるアミノ酸配列からなるペプチドに特異的に結合する、（12）乃至（14）から選択されるいずれか一つに記載の抗体、

（16）EPHA2リガンドにより誘導されるEPHA2チロシン残基のリン酸化を抑制する、（12）乃至（15）から選択されるいずれか一つに記載の抗体、

（17）EPHA2リガンドのEPHA2に対する結合を阻害するのではなく、リガンドにより誘導されるEPHA2チロシン残基のリン酸化を抑制する、（12）乃至（15）から選択されるいずれか一つに記載の抗体、

（18）重鎖可変領域の相補性決定領域として、配列表の配列番号71、73及び75に示されるアミノ酸配列又はこれらのアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、軽鎖可変領域の相補性決定領域として、配列表の配列番号77、79及び81に示されるアミノ酸配列又はこれらのアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有する、配列表の配列番号8に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドに特異的に結合する抗体、

（19）以下の1）及び2）に示される特徴を有する、配列表の配列番号8に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドに特異的に結合する抗体：

1）一般式（I）で示されるアミノ酸配列を含む重鎖ペプチドを有する；

$$-FRH_1-CDRH_1-FRH_2-CDRH_2-FRH_3-CDRH_3-FRH_4-\quad(I)$$

（式中、FRH1は18乃至30個のアミノ酸からなる任意のアミノ酸配列を示し、$CDRH_1$は配列表の配列番号71で示されるアミノ酸配列又は1若しくは数個のアミノ酸が欠

失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を示し、FRH_2は14個のアミノ酸からなる任意のアミノ酸配列を表し、$CDRH_2$は配列表の配列番号73で示されるアミノ酸配列又は1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を示し、FRH_3は32個のアミノ酸からなる任意のアミノ酸配列を表し、$CDRH_3$は配列表の配列番号75で示されるアミノ酸配列又は1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を示し、FRH_4は11個のアミノ酸からなる任意のアミノ酸配列を示し、各アミノ酸はそれぞれペプチド結合で連結している。);

2)一般式(II)で示されるアミノ酸配列を含むことからなる軽鎖ポリペプチドを有する;

$$-FRL_1-CDRL_1-FRL_2-CDRL_2-FRL_3-CDRL_3-FRL_4-\quad(II)$$

(式中、FRL_1は23個のアミノ酸からなる任意のアミノ酸配列を示し、$CDRL_1$は配列表の配列番号77で示されるアミノ酸配列又は1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を示し、FRL_2は15個のアミノ酸からなる任意のアミノ酸配列を表し、$CDRL_2$は配列表の配列番号79で示されるアミノ酸配列又は1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を示し、FRL_3は32個のアミノ酸からなる任意のアミノ酸配列を表し、$CDRL_3$は配列表の配列番号81で示されるアミノ酸配列又は1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を示し、FRL_4は10個のアミノ酸からなる任意のアミノ酸配列を示し、各アミノ酸はそれぞれペプチド結合で連結している。)、

(20)ヒト化抗体であることを特徴とする、(1)乃至(19)から選択されるいずれか1つに記載の抗体、

(21)ヒト抗体であることを特徴とする、(1)乃至(19)から選択されるいずれか1つに記載の抗体、

(22)IgG抗体であることを特徴とする、(1)乃至(19)から選択されるいずれか1つに記載の抗体、

(23)Fab、F(ab')2、Fv、scFV、ディアボディー、線状抗体及び多特異的抗体から選択されるいずれかであることを特徴とする、(1)乃至(9)及び、(12)乃至(17)から選択されるいずれか1つに記載の抗体、

(24)ハイブリドーマSH348－1(FERM BP－10836)が産生する抗体、

(25)ハイブリドーマSH357－1(FERM BP－10837)が産生する抗体、

(26)以下の1)及び2)からなる抗体:

1)配列表の配列番号35のアミノ酸番号1乃至119に示されるアミノ酸配列を含む重鎖ポリペプチド又は配列表の配列番号39のアミノ酸番号1乃至119に示されるアミノ酸配列を含む重鎖ポリペプチド;

2)配列表の配列番号37のアミノ酸番号1乃至112に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖ポリペプチド又は配列表の配列番号41のアミノ酸番号1乃至112に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖ポリペプチド、

(27)以下の1)又は2)からなる抗体:

1)配列表の配列番号35のアミノ酸番号1乃至119に示されるアミノ酸配列を含む重鎖ポリペプチド及び、配列表の配列番号37のアミノ酸番号1乃至112に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖ポリペプチド;

2)配列表の配列番号39のアミノ酸番号1乃至119に示されるアミノ酸配列を含む重鎖ポリペプチド及び、配列表の配列番号41のアミノ酸番号1乃至112に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖ポリペプチド、

(28)以下の1)及び2)からなる抗体:

1)配列表の配列番号35に示されるアミノ酸配列を含む重鎖ポリペプチド又は配列表の配列番号39に示されるアミノ酸配列を含む重鎖ポリペプチド;

2)配列表の配列番号37に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖ポリペプチド又は配列表の配列番号41に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖ポリペプチド。

(29)以下の1)又は2)からなる抗体:

1)配列表の配列番号35に示されるアミノ酸配列を含む重鎖ポリペプチド及び、配列表の配列番号37に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖ポリペプチド;

2)配列表の配列番号39に示されるアミノ酸配列を含む重鎖ポリペプチド及び、配列表の配列番号41に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖ポリペプチド、

(30)(24)乃至(29)から選択されるいずれか1つに記載の抗体をヒト化した抗体、

(31)以下の1)及び2)からなる抗体:

1)配列表の配列番号107のアミノ酸番号20乃至468に示されるアミノ酸配列を含む

重鎖ポリペプチド又は配列表の配列番号115のアミノ酸番号20乃至468に示されるアミノ酸配列を含む重鎖ポリペプチド;

2)配列表の配列番号91のアミノ酸番号21乃至239に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖ポリペプチド又は配列表の配列番号99のアミノ酸番号21乃至239に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖ポリペプチド、

(32)以下の1)又は2)からなる抗体:

1)配列表の配列番号107のアミノ酸番号20乃至468に示されるアミノ酸配列を含む重鎖ポリペプチド及び、配列表の配列番号91のアミノ酸番号21乃至239に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖ポリペプチド;

2)配列表の配列番号115のアミノ酸番号20乃至468に示されるアミノ酸配列を含む重鎖ポリペプチド及び、配列表の配列番号99のアミノ酸番号21乃至239に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖ポリペプチド、

(33)以下の1)及び2)からなる抗体:

1)配列表の配列番号139のアミノ酸番号20乃至468に示されるアミノ酸配列を含む重鎖ポリペプチド又は配列表の配列番号147のアミノ酸番号20乃至468に示されるアミノ酸配列を含む重鎖ポリペプチド;

2)配列表の配列番号123のアミノ酸番号21乃至239に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖ポリペプチド又は配列表の配列番号131のアミノ酸番号21乃至239に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖ポリペプチド、

(34)以下の1)又は2)からなる抗体:

1)配列表の配列番号139のアミノ酸番号20乃至468に示されるアミノ酸配列を含む重鎖ポリペプチド及び、配列表の配列番号123のアミノ酸番号21乃至239に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖ポリペプチド;

2)配列表の配列番号147のアミノ酸番号20乃至468に示されるアミノ酸配列を含む重鎖ポリペプチド及び、配列表の配列番号131のアミノ酸番号21乃至239に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖ポリペプチド、

(35)(24)乃至(34)から選択されるいずれかに記載の抗体の、Fab、F(ab')2、Fv、scFV、ディアボディー、線状抗体及び多特異的抗体から選択されるいずれか一つ

、

(36)以下の1)乃至20)からなる群から選択されるいずれか一つのポリペプチド:

1)配列表の配列番号35のアミノ酸番号1乃至119に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチド

2)配列表の配列番号39のアミノ酸番号1乃至119に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチド;

3)配列表の配列番号37のアミノ酸番号1乃至112に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチド;

4)配列表の配列番号41のアミノ酸番号1乃至112に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチド;

5)配列表の配列番号107のアミノ酸番号20乃至468に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチド;

6)配列表の配列番号115のアミノ酸番号20乃至468に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチド;

7)配列表の配列番号107のアミノ酸番号20乃至138に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチド;

8)配列表の配列番号115のアミノ酸番号20乃至138に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチド;

9)配列表の配列番号91のアミノ酸番号21乃至239に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチド;

10)配列表の配列番号99のアミノ酸番号21乃至239に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチド;

11)配列表の配列表の配列番号91のアミノ酸番号21乃至134に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチド;

12)配列表の配列番号99のアミノ酸番号21乃至134に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチド;

13)配列表の配列番号139のアミノ酸番号20乃至468に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチド;

14)配列表の配列番号147のアミノ酸番号20乃至468に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチド;

15)配列表の配列番号139のアミノ酸番号20乃至138に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチド;

16)配列表の配列番号147のアミノ酸番号20乃至138に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチド;

17)配列表の配列番号123のアミノ酸番号21乃至239に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチド;

18)配列表の配列番号131のアミノ酸番号21乃至239に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチド。

19)配列表の配列番号123のアミノ酸番号21乃至134に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチド;

20)配列表の配列番号131のアミノ酸番号21乃至134に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチド、

(37)マウスハイブリドーマSH－348－1(FERM BP－10836)、

(38)マウスハイブリドーマSH－357－1(FERM BP－10837)

(39)(1)乃至(36)から選択される抗体の少なくともいずれか1つを含有することを特徴とする、医薬組成物、

(40(1)乃至(36)から選択される抗体の少なくともいずれか一つを含有することを特徴とする、癌の治療用医薬組成物、

(41)(1)乃至(36)、及び、(39)、(40)からなる群から選択されるいずれかを投与することによる、哺乳動物の有する腫瘍の増殖の抑制方法、

(42)腫瘍が、EPHA2を発現している腫瘍であることを特徴とする、(41)に記載の腫瘍の増殖の抑制方法、

(43)(1)乃至(36)から選択されるいずれか一つに記載の抗体をコードするポリヌクレオチド、

(44)(43)に記載のポリヌクレオチドによって形質転換された宿主細胞、

(45)(44)に記載の宿主細胞を用いた抗体の製造方法、

からなる。

発明の効果

[0019] 本発明により、EPHA2のチロシン残基のリン酸化誘導活性を有さずにEPHA2発現癌細胞に対しADCC、CDC活性を有する新規の抗EPHA2モノクローナル抗体を取得することに成功した。そして、該抗体がin vivoで優れた抗腫瘍活性を持つことが見出された。

[0020] そして、該抗体を含む癌治療用医薬組成物が提供された。

図面の簡単な説明

[0021] [図1]抗EPHA2抗体によるEPHA2チロシン残基のリン酸化誘導活性の有無を示すウエスタンブロッティングの結果を示す図。A):架橋抗体非存在下の結果を示す図、上段は4G10抗体の結果を示し、下段は抗EPHA2抗体(D7)の結果を示す。B):架橋抗体存在下の結果を示す図、上段は4G10抗体での結果を示し、下段は抗EPHA2抗体(D7)での結果を示す。

[図2]抗EPHA2抗体によるEPHA2蛋白質量の低下を誘導する活性の有無を示すウエスタンブロッティングの結果を示す図。A):架橋抗体非存在下の結果を示す図、上段は抗EPHA2抗体(D7)での結果を示し、下段は抗b－actin抗体での結果を示す。B):架橋抗体存在下の結果を示す図、上段は抗EPHA2抗体(D7)での結果を示し、下段は抗b－actin抗体での結果を示す。

[図3]抗EPHA2抗体の各種細胞に対するADCC活性の有無を示す図。図中の「＊＊」はP＜0．01を示し、「＊＊＊」はP＜0．001を示す。A):MDA－MB－231細胞に対するADCC活性を示す図。B):A549細胞に対するADCC活性を示す図。C):PC－3細胞に対するADCC活性を示す図。

[図4]抗EPHA2抗体の各種細胞に対するCDC活性の有無を示す図。図中の「＊＊＊」はP＜0．001を示す。A):SH348－1のMDA－MB－231細胞に対するCDC活性を示す図。B):SH348－1のA549細胞に対するCDC活性を示す図。C):SH348－1のPC－3細胞に対するCDC活性を示す図。D):SH357－1のMDA－MB－231細胞に対するCDC活性を示す図。E):SH357－1のA549細胞に対するCDC活性を示す図。F):SH357－1のPC－3細胞に対するCDC活性を示す図。

[図5]A）EPHA2のドメイン構造予測及びエピトープ決定用のペプチドEPHA2－ECD、FNIII－NC、FNIII－N、FNIII－CのEPHA2中での位置を示す図。図中でLigand－BDはリガンド結合ドメイン、FN3はフィブロネクチンタイプ3ドメイン、TMは膜貫通領域、Trk kinaseはチロシンキナーゼドメイン、SAMはSAMドメインを示す。

[0022] B）EPHA2－ECD、FNIII－NC、FNIII－N及びFNIII－Cに対する抗EPHA2抗体の結合性の有無を示す図。

[図6]A）MDA－MB－231細胞を移植されたマウスに対するSH348－1の抗腫瘍活性を示す図。

[0023] B）MDA－MB－231細胞を移植されたマウスに対するSH357－1の抗腫瘍活性を示す図。図中のエラーバーは標準誤差（n＝9）を示す。

[図7]A）SH348－1のEPHA2細胞外領域ポリペプチドに対する結合活性を示す図。

[0024] B）SH357－1のEPHA2細胞外領域ポリペプチドに対する結合活性を示す図。

[0025] C）Ab96－1のEPHA2細胞外領域ポリペプチドに対する結合活性を示す図。

[図8]SH348－1、SH357－1及びAb96－1のリガンド結合阻害活性を示す図。

[図9]SH348－1及びSH357－1がEphrin－A1依存的EPHA2チロシン残基リン酸化を阻害する活性を有することを示す図。

[図10]エピトープ同定用のEPHA2欠損変異体の概略を示す図。

[図11]A）SH348－1のEPHA2欠損変異体に対する反応性を示す図。

[0026] B）図11A）のPVDF膜上のEPHA2欠損変異体の検出を示す図。

[0027] C）SH357－1のEPHA2欠損変異体に対する反応性を示す図。

[0028] D）図11C）のPVDF膜上のEPHA2欠損変異体の検出を示す図。

[図12]A）hSH348－1－T1のEPHA2細胞外領域ポリペプチドに対する結合活性を示す図。

[0029] B）hSH348－1－T3のEPHA2細胞外領域ポリペプチドに対する結合活性を示す図。

[0030] C）hSH357－1－T1のEPHA2細胞外領域ポリペプチドに対する結合活性を示

す図。

[0031] D)hSH357－1－T3のEPHA2細胞外領域ポリペプチドに対する結合活性を示す図。

[図13]A)SH348－1の抗原結合に対するhSH348－1－T1及びhSH348－1－T3の競合阻害活性を示す図。

[0032] B)SH357－1の抗原結合に対するhSH357－1－T1及びhSH357－1－T3の競合阻害活性を示す図。

[図14]A)hSH348－1－T1、hSH348－1－T3がEphrin－A1依存的EPHA2チロシン残基リン酸化を阻害する活性を示す図。

[0033] B)hSH357－1－T1、hSH357－1－T3がEphrin－A1依存的EPHA2チロシン残基リン酸化を阻害する活性を示す図。

発明を実施するための最良の形態

[0034] 1．定義

本明細書中においては、「癌」と「腫瘍」は同じ意味に用いている。

[0035] 本明細書中において、「遺伝子」という語には、DNAのみならずそのmRNA、cDNA及びそのcRNAも含まれるものとする。したがって、本発明における「EPHA2遺伝子」には、EPHA2のDNA、mRNA、cDNA及びcRNAが含まれる。

[0036] 本明細書中において、「ポリヌクレオチド」という語は核酸と同じ意味で用いており、DNA、RNA、プローブ、オリゴヌクレオチド、及びプライマーも含まれている。

[0037] 本明細中においては、「ポリペプチド」と「蛋白質」は区別せずに用いている。

[0038] 本明細書中において、「細胞」には、動物個体内の細胞、培養細胞も含んでいる。

[0039] 本明細書中において、「細胞の癌化」とは、細胞が接触阻止現象への感受性を喪失することや、足場非依存性増殖を示すこと等、細胞が異常な増殖を示すことをいい、このような異常な増殖を示す細胞を「癌細胞」という。

[0040] 本明細書中においては、EPHA2が有する細胞の癌化活性及び／又は細胞増殖活性等と同等の機能を有する蛋白質もEPHA2という。

[0041] 本明細書中における、「チロシン残基のリン酸化」とは、ペプチドのアミノ酸配列に含まれるチロシン残基がリン酸化されることをいい、チロシン残基がリン酸化されてい

るか否かは、例えば、ペプチドと抗リン酸化チロシン抗体（例えば、Anti－Phosphotyrosine, recombinant 4G10 HRP－conjugate（Millipore（Upsate）社製 ＃16－184）との結合性を調べ、該抗体と結合するときには、チロシン残基がリン酸化されていると判定することが出来る。本明細書中における「EPHA2チロシン残基のリン酸化能」とは、EPHA2のアミノ酸配列中のチロシン残基をリン酸化する能力をいい、抗体がEPHA2のチロシン残基のリン酸化能を有するか否かは、例えば、抗体とEPHA2をインキュベーションした後に、EPHA2と抗リン酸化チロシン抗体との結合性があるかないかで判定することが出来る。

[0042] 本明細書中において、「EPHA2蛋白質の発現量が減少する」とは、EPHA2蛋白質の量が減少することをいい、抗体がEPHA2蛋白質の量を減少させる作用を有するか否かは、例えば、抗体とEPHA2をインキュベーションした後に、EPHA2の量を定量することによって調べることが出来る。

[0043] 本明細書中において、「EPHA2リガンド」とは、EPHA2のリガンドとなり得る物質を示し、その具体例としては、GPIアンカー型細胞膜蛋白質のEphrin－A1～A5を挙げることができる（Annual Review of Neuroscience、1998年、第21巻、p. 309－345）。

[0044] 本明細書中における、「細胞傷害」とは、何らかの形で、細胞に病理的な変化をもたらすことをいい、直接的な外傷にとどまらず、DNAの切断や塩基の二量体の形成、染色体の切断、細胞分裂装置の損傷、各種酵素活性の低下などあらゆる細胞の構造や機能上の損傷をいう。本明細書中における「細胞障害活性」とは上記細胞傷害を引き起こすことをいう。

[0045] 本明細書中における、ADCCとは、抗体依存性細胞障害（Antibody－dependent cellular cytotoxicity）と同義であり、Fcγレセプター保有細胞が、標的細胞の表面抗原に結合した抗体のFc部分にFcγレセプターを介して付着し、標的細胞を殺す反応のことをいい、ADCC活性とは、抗体依存性細胞障害活性ともいい、上記反応の活性のことをいう。ADCC活性は当業者が通常行う方法で測定することが出来るが、例えば、本明細書中の実施例3の3）－2の項目に記載の方法によって測定することが出来る。

[0046] 本明細書中における、「CDC」とは、補体依存性細胞障害（complement－dependent cytotoxicity）と同義であり、CDC活性とは補体依存性細胞障害を起こす活性のことをいう。CDC活性は当業者が通常行う方法によって測定することが出来るが、例えば、本明細書中の実施例3の3）－3に記載の方法によって測定することが出来る。

[0047] 本明細書中において、「In vivoで抗腫瘍活性を有する。」とは、腫瘍を有する動物個体の腫瘍の増殖を抑制又は減少させる活性を有することを意味する。抗EPHA2抗体が「In vivoで抗腫瘍活性を有する。」か否かは当業者が通常行う方法によって調べることが出来るが、例えば以下の方法によっても調べることが出来る。すなわち、腫瘍細胞（例えば、MDA－MB－231細胞）が皮下移植されているヌードマウス（例えば、BALB／cAJc1－nu／nu；日本クレア社より入手）に被験物質として抗EPA2抗体を腹腔内に適当量投与し、腫瘍体積の経時変化を抗EPA2抗体を投与しなかったコントロールと比較し、コントロールに比して腫瘍の体積が有意に小さい場合には、被験物質である該抗EPA2抗体は「In vivoで抗腫瘍活性を有する。」と判断することが出来る。

[0048] 抗体分子の重鎖及び軽鎖にはそれぞれ3箇所の相補性決定領域（CDR：Complemetary deterring region）があることが知られている。本明細書中においては、抗体の相補性決定領域について、重鎖の相補性決定領域を$CDRH_1$、$CDRH_2$、$CDRH_3$と表記し、軽鎖の相補性決定領域を$CDRL_1$、$CDRL_2$、$CDRL_3$と表記する。

[0049] 本明細書における、「エピトープ」とは、動物、好ましくは、哺乳動物、より好ましくは、マウス又はヒトの体内において、抗原性及び／又は免疫原性を有するEPHA2の部分ペプチドを意味する。抗原性を有するEPHA2の部分ペプチドであるエピトープは、免疫アッセイ法等当業者によく知られている方法によって決定することができるが、例えば以下の方法によって行うことが出来る。EPHA2の様々な部分構造を作製する。部分構造の作製にあたっては、公知のオリゴペプチド合成技術を用いることが出来る。例えば、EPHA2のC末端あるいはN末端から適当な長さで順次短くした一連のポリペプチドを当業者に周知の遺伝子組み換え技術を用いて作製した後、それらに対する抗体の反応性を検討し、大まかな認識部位を決定した後に、さらに短いペ

プチドを合成してそれらのペプチドとの反応性を検討することによって、エピトープを決定することが出来る。

[0050] 1. EPHA2について

(1)EPHA2遺伝子

EPHA2遺伝子のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列はGenBankにEPH receptor A2(アクセッション番号はそれぞれNM_004431、NP_004422)として登録されている。また、EPHA2遺伝子のオープンリーディングフレーム(ORF)のヌクレオチド配列は配列表の配列番号1に記載されており、そのアミノ酸配列は配列表の配列番号2に記載されている。

[0051] なお、EPHA2のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、付加されたアミノ酸配列からなり、これらの酵素と同等の生物活性を有する蛋白質もEPHA2に含まれる。

(2)EPHA2遺伝子の癌部特異的発現

EPHA2遺伝子は、多くの癌、特に乳癌、食道癌、前立腺癌、胃癌、非小細胞肺癌、大腸癌、多形神経膠芽腫での高発現が報告されている。

[0052] すなわち、EPHA2の各細胞、及び/又は各組織における発現量を測定することで被験者のEPHA2の過剰発現に起因して発生する癌化及び/又は癌細胞の増殖の状態を判定することができる。

[0053] また、EPHA2の発現量及び/又は活性を抑制する物質はEPHA2に起因する細胞の癌化の抑制及び/又は癌細胞の増殖を抑制する活性を有する。

[0054] したがって、EPHA2を発現している細胞に、被験物質を接触させて、EPHA2の発現量及び/又は活性を抑制する物質を選択することによって、抗腫瘍物質をスクリーニングすることが可能となる。

[0055] なお、EPHA2に対するsiRNAはEPHA2の発現を抑制し、抗腫瘍剤となり得る。EPHA2に対するsiRNAは、EPHA2 mRNAの部分配列からなるRNA(センスRNA)と該RNAの塩基配列に相補的な塩基配列からなるRNA(アンチセンスRNA)とを、EPHA2 mRNAの塩基配列に基づいて設計し、自体公知の化学合成法により合成し、得られた両RNAをハイブリダイゼーションさせることにより製造できる。siR

NAを構成するセンスRNA及びアンチセンスRNAは、それぞれ、その3'末端に、オーバーハング配列と呼ばれる1個ないし数個の塩基配列からなるヌクレオチドを結合させることが好ましい。オーバーハング配列は、該RNAをヌクレアーゼから保護する限りにおいて特に制限されず、好ましくは1個ないし10個、より好ましくは1個ないし4個、さらに好ましくは2個のヌクレオチドからなるものをいずれも用いることができる。

[0056] 2. EPHA2に対する抗体

(1)抗原の調製

本発明のEPHA2に対する抗体を得るための抗原としては、EPHA2の全長ポリペプチド又はその部分ポリペプチドを挙げることができ、より具体的には、EPHA2の全長ポリペプチド又は、好ましくはEPHA2の細胞外領域ポリペプチド(配列表の配列番号8のアミノ酸番号1乃至534に示されるアミノ酸配列からなる。)、更に好ましくは配列表の配列番号8のアミノ酸番号426乃至534に示されるアミノ酸配列を含むEPHA2の細胞外領域ポリペプチドの部分ポリペプチド、更により好ましくは、配列表の配列番号8のアミノ酸番号439乃至534に示されるアミノ酸配列を含むEPHA2の細胞外領域ポリペプチドの部分ペプチド、あるいはこれらに任意のアミノ酸配列や担体が付加された誘導体を挙げることができる。また、上記各ポリペプチドの少なくとも6個の連続した部分アミノ酸配列からなるポリペプチド、あるいはこれらに任意のアミノ酸配列や担体が付加された誘導体を挙げることができる。

[0057] なお、抗原となる、EPHA2全長ポリペプチド又はその部分ポリペプチドはEPHA2遺伝子又はその部分ポリペプチドの遺伝子を遺伝子操作により宿主細胞に産生させることによって得ることができる。

[0058] EPHA2は、ヒトの腫瘍組織あるいは腫瘍細胞から直接精製して使用することができ、また、EPHA2全長ポリペプチド又はその部分ポリペプチドはin vitroにて合成する、あるいは遺伝子操作により宿主細胞に産生させることによって得ることができる。

[0059] 遺伝子操作では、具体的には、EPHA2又はその部分ポリペプチドを発現可能なベクターに組み込んだ後、転写と翻訳に必要な酵素、基質及びエネルギー物質を含む溶液中で合成する、あるいは他の原核生物、又は真核生物の宿主細胞を形質転

換させることによってEPHA2又はその部分ポリペプチドを発現させることにより、該蛋白質を得ることが出来る。

[0060] EPHA2のその部分ポリペプチドのcDNAは例えば、EPHA2を発現しているcDNAライブラリーを鋳型として、EPHA2 cDNA又はその部分ポリペプチドをコードするDNAを特異的に増幅するプライマーを用いてポリメラーゼ連鎖反応(以下「PCR」という)(Saiki, R. K., et al. Science(1988)239, p. 487－489参照)を行なう、いわゆるPCR法により取得することができる。

[0061] ポリペプチドのイン・ビトロ(in vitro)合成としては、例えばロシュ・ダイアグノスティックス社製のラピッドトランスレーションシステム(RTS)が挙げられるが、これに限定されない。

[0062] 原核細胞の宿主としては、例えば、大腸菌(Escherichia coli)や枯草菌(Bacillus subtilis)などが挙げられる。目的の遺伝子をこれらの宿主細胞内で形質転換させるには、宿主と適合し得る種由来のレプリコンすなわち複製起点と、調節配列を含んでいるプラスミドベクターで宿主細胞を形質転換させる。また、ベクターとしては、形質転換細胞に表現形質(表現型)の選択性を付与することができる配列を有するものが好ましい。

[0063] 真核細胞の宿主細胞には、脊椎動物、昆虫、酵母などの細胞が含まれ、脊椎動物細胞としては、例えば、サルの細胞であるCOS細胞(Gluzman, Y. Cell(1981)23, p. 175－182、ATCC CRL－1650)、マウス繊維芽細胞NIH3T3(ATCC No. CRL－1658)やチャイニーズ・ハムスター卵巣細胞(CHO細胞、ATCC CCL－61)のジヒドロ葉酸還元酵素欠損株(Urlaub, G. and Chasin, L. A. Proc. Natl. Acad. Sci. USA(1980)77, p. 4126－4220)等がよく用いられているが、これらに限定されない。

[0064] 上記のようにして得られる形質転換体は、常法に従い培養することができ、該培養により細胞内、又は細胞外に目的のポリペプチドが産生される。

[0065] 該培養に用いられる培地としては、採用した宿主細胞に応じて慣用される各種のものを適宜選択でき、大腸菌であれば、例えば、LB培地に必要に応じて、アンピシリン等の抗生物質やIPTGを添加して用いることができる。

[0066] 上記培養により、形質転換体の細胞内又は細胞外に産生される組換え蛋白質は、該蛋白質の物理的性質や化学的性質などを利用した各種の公知の分離操作法により分離・精製することができる。

[0067] 該方法としては、具体的には例えば、通常の蛋白質沈殿剤による処理、限外濾過、分子ふるいクロマトグラフィー(ゲル濾過)、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)などの各種液体クロマトグラフィー、透析法、これらの組合せなどを例示できる。

[0068] また、発現させる組換え蛋白質に6残基からなるヒスチジンを繋げることにより、ニッケルアフィニティーカラムで効率的に精製することができる。

[0069] 上記方法を組合せることにより容易に高収率、高純度で目的とするポリペプチドを大量に製造できる。

[0070] 本発明の抗体は、常法を用いて上記の抗原を動物に免疫し、生体内に産生される抗体を採取、精製することによって得ることができる。

[0071] また、公知の方法(例えば、Kohler and Milstein, Nature (1975)256, p. 495－497、Kennet, R. ed., Monoclonal Antibody, p. 365－367, Prenum Press, N. Y. (1980))に従って、EPHA2に対する抗体を産生する抗体産生細胞とミエローマ細胞とを融合させることによりハイブリドーマを樹立し、モノクローナル抗体を得ることもできる。

[0072] (2)抗EPHA2モノクローナル抗体の製造

EPHA2と特異的に結合する抗体の例として、EPHA2と特異的に結合するモノクローナル抗体を挙げることができるが、その取得方法は、以下に記載する通りである。

[0073] モノクローナル抗体の製造にあたっては、一般に下記のような作業工程が必要である。

すなわち、

(a)抗原として使用する生体高分子の精製、

(b)抗原を動物に注射することにより免疫した後、血液を採取しその抗体価を検定して脾臓摘出の時期を決定してから、抗体産生細胞を調製する工程、

(c)骨髄腫細胞(以下「ミエローマ」という)の調製、

(d)抗体産生細胞とミエローマとの細胞融合、

(e)目的とする抗体を産生するハイブリドーマ群の選別、

(f)単一細胞クローンへの分割(クローニング)、

(g)場合によっては、モノクローナル抗体を大量に製造するためのハイブリドーマの培養、又はハイブリドーマを移植した動物の飼育、

(h)このようにして製造されたモノクローナル抗体の生理活性、及びその結合特異性の検討、あるいは標識試薬としての特性の検定、等である。

[0074] 以下、モノクローナル抗体の作製法を上記工程に沿って詳述するが、該抗体の作製法はこれに制限されず、例えば脾細胞以外の抗体産生細胞及びミエローマを使用することもできる。

[0075] (a)抗原の精製

抗原としては、前記したような方法で調製したEPHA2又はその部分ポリペプチドを使用することができる。

[0076] また、EPHA2発現組換え体細胞より調製した膜画分、又はEPHA2発現組換え体細胞自身、さらに、当業者に周知の方法を用いて、化学合成した本発明の蛋白質の部分ペプチドを抗原として使用することもできる。

[0077] (b)抗体産生細胞の調製

工程(a)で得られた抗原と、当業者に周知のアジュバント、例えば、フロインドの完全又は不完全アジュバント、又はカリミョウバンのような助剤とを混合し、免疫原として実験動物に免疫する。実験動物は公知のハイブリドーマ作製法に用いられる動物を支障なく使用することができる。具体的には、たとえばマウス、ラット、ヤギ、ヒツジ、ウシ、ウマ等を使用することができる。ただし、摘出した抗体産生細胞と融合させるミエローマ細胞の入手容易性等の観点から、マウス又はラットを被免疫動物とするのが好ましい。

[0078] また、実際に使用するマウス及びラットの系統は特に制限はなく、マウスの場合には、たとえば各系統 A、AKR、BALB／c、BDP、BA、CE、C3H、57BL、C57BR、C57L、DBA、FL、HTH、HT1、LP、NZB、NZW、RF、R III、SJL、SWR、WB

、129等が、またラットの場合には、たとえば、Low、Lewis、Spraque、Daweley、ACI、BN、Fischer等を用いることができる。

[0079] これらのマウス及びラットは例えば日本クレア、日本チャールスリバー等実験動物飼育販売業者より入手することができる。

[0080] このうち、後述のミエローマ細胞との融合適合性を勘案すれば、マウスではBALB／c系統が、ラットではlow系統が被免疫動物として特に好ましい。

[0081] また、抗原のヒトとマウスでの相同性を考慮し、自己抗体を除去する生体機構を低下させたマウス、すなわち自己免疫疾患マウスを用いることも好ましい。

[0082] なお、これらマウス又はラットの免疫時の週齢は、好ましくは5～12週齢、さらに好ましくは6～8週齢である。

[0083] EPHA2又はこの組換え体によって動物を免疫するには、例えば、Weir, D. M., Handbook of Experimental Immunology Vol. I. II. III., Blackwell Scientific Publications, Oxford(1987)、Kabat, E. A. and Mayer, M. M., Experimental Immunochemistry, Charles C Thomas Publisher Spigfield, Illinois(1964)等に詳しく記載されている公知の方法を用いることができる。

[0084] これらの免疫法のうち、本発明において好適な方法を具体的に示せば、たとえば以下のとおりである。

[0085] すなわち、まず、抗原である膜蛋白画分、もしくは抗原を発現させた細胞を動物の皮内又は腹腔内に投与する。

[0086] ただし、免疫効率を高めるためには両者の併用が好ましく、前半は皮内投与を行い、後半又は最終回のみ腹腔内投与を行うと、特に免疫効率を高めることができる。

[0087] 抗原の投与スケジュールは、被免疫動物の種類、個体差等により異なるが、一般には、抗原投与回数3～6回、投与間隔2～6週間が好ましく、投与回数3～4回、投与間隔2～4週間がさらに好ましい。

[0088] また、抗原の投与量は、動物の種類、個体差等により異なるが、一般には、0.05～5mg、好ましくは0.1～0.5mg程度とする。

[0089] 追加免疫は、以上の通りの抗原投与の1～6週間後、好ましくは2～4週間後、さら

に好ましくは2～3週間後に行う。

[0090] なお、追加免疫を行う際の抗原投与量は、動物の種類、大きさ等により異なるが、一般に、例えばマウスの場合には、0．05～5mg、好ましくは0．1～0．5mg、さらに好ましくは0．1～0．2mg程度とする。

[0091] 上記追加免疫から1～10日後、好ましくは2～5日後、さらに好ましくは2～3日後に被免疫動物から抗体産生細胞を含む脾臓細胞又はリンパ球を無菌的に取り出す。

[0092] なお、その際に抗体価を測定し、抗体価が十分高くなった動物を抗体産生細胞の供給源として用いれば、以後の操作の効率を高めることができる。

[0093] ここで用いられる抗体価の測定法としては、例えば、RIA法又はELISA法を挙げることができるがこれらの方法に制限されない。

[0094] 本発明における抗体価の測定は、例えばELISA法によれば、以下に記載するような手順により行うことができる。

[0095] まず、精製又は部分精製した抗原をELISA用96穴プレート等の固相表面に吸着させ、さらに抗原が吸着していない固相表面を抗原と無関係な蛋白質、例えばウシ血清アルブミン（以下「BSA」という）により覆い、該表面を洗浄後、第一抗体として段階希釈した試料（例えばマウス血清）に接触させ、上記抗原に試料中の抗体を結合させる。

[0096] さらに第二抗体として酵素標識されたマウス抗体に対する抗体を加えてマウス抗体に結合させ、洗浄後該酵素の基質を加え、基質分解に基づく発色による吸光度の変化等を測定することにより、抗体価を算出する。

[0097] これらの脾臓細胞又はリンパ球からの抗体産生細胞の分離は、公知の方法（例えば、Kohler et al.，Nature（1975）256，p. 495，；Kohler et al.， Eur. J. Immnol.（1977）6，p. 511，；Milstein et al.， Nature（1977），266，p. 550，；Walsh，Nature，（1977）266，p. 495，）に従って行うことができる。

[0098] 例えば、脾臓細胞の場合には、細胞を細切してステンレスメッシュで濾過した後、イーグル最小必須培地（MEM）に浮遊させて抗体産生細胞を分離する一般的方法を採用することができる。

[0099] （c）骨髄腫細胞（以下、「ミエローマ」という）の調製

細胞融合に用いるミエローマ細胞には特段の制限はなく、公知の細胞株から適宜に選択して用いることができる。ただし、融合細胞からハイブリドーマを選択する際の利便性を考慮して、その選択手続が確立しているHGPRT(Hipoxanthine－guanine phosphoribosyl transferase)欠損株を用いるのが好ましい。

[0100] すなわち、マウス由来のX63－Ag8(X63)、NS1－ANS／1(NS1)、P3X63－Ag8. Ul(P3Ul)、X63－Ag8. 653(X63. 653)、SP2／0－Ag14(SP2／0)、MPC11－45. 6TG1. 7(45. 6TG)、FO、S149／5XXO、BU. 1等、ラット由来の210. RSY3. Ag. 1. 2. 3(Y3)等、ヒト由来のU266AR(SKO－007)、GM1500・GTG－A12(GM1500)、UC729－6、LICR－LOW－HMy2(HMy2)、8226AR／NIP4－1(NP41)等である。

[0101] これらのHGPRT欠損株は例えば、American Type Culture Collection(ATCC)等から入手することができる。

[0102] これらの細胞株は、適当な培地、例えば8－アザグアニン培地[RPMI－1640培地にグルタミン、2－メルカプトエタノール、ゲンタマイシン、及びウシ胎児血清(以下「FBS」という)を加えた培地に8－アザグアニンを加えた培地] 、イスコフ改変ダルベッコ培地(Iscove's Modified Dulbecco's Medium ;以下「IMDM」という)、又はダルベッコ改変イーグル培地(Dulbecco's Modified Eagle Medium;以下「DMEM」という)で継代培養するが、細胞融合の3乃至4日前に正常培地[例えば、10%FBSを含むASF104培地(味の素(株)社製)]で継代培養し、融合当日に2×10^7以上の細胞数を確保しておく。

[0103] (d)細胞融合

抗体産生細胞とミエローマ細胞との融合は、公知の方法(Weir, D. M. , Handbookof Experimental Immunology Vol. I. II. III. , Blackwell Scientific Publications, Oxford(1987)、Kabat, E. A. and Mayer, M. M. , Experimental Immunochemistry, Charles C Thomas Publisher Spigfield, Illinois(1964)等)に従い、細胞の生存率を極度に低下させない程度の条件下で適宜実施することができる。

[0104] そのような方法は、例えば、ポリエチレングリコール等の高濃度ポリマー溶液中で抗

体産生細胞とミエローマ細胞とを混合する化学的方法、電気的刺激を利用する物理的方法等を用いることができる。

[0105] このうち、上記化学的方法の具体例を示せば以下のとおりである。

すなわち、高濃度ポリマー溶液としてポリエチレングリコールを用いる場合には、分子量1500～6000、好ましくは2000～4000のポリエチレングリコール溶液中で、30～40℃、好ましくは35～38℃の温度で抗体産生細胞とミエローマ細胞とを1～10分間、好ましくは5～8分間混合する。

[0106] (e)ハイブリドーマ群の選択

上記細胞融合により得られるハイブリドーマの選択方法は特に制限はないが、通常HAT(ヒポキサンチン・アミノプテリン・チミジン)選択法(Kohler et al., Nature (1975)256, p. 495;Milstein et al., Nature(1977)266, p. 550)が用いられる。

[0107] この方法は、アミノプテリンで生存し得ないHGPRT欠損株のミエローマ細胞を用いてハイブリドーマを得る場合に有効である。

[0108] すなわち、未融合細胞及びハイブリドーマをHAT培地で培養することにより、アミノプテリンに対する耐性を持ち合わせたハイブリドーマのみを選択的に残存させ、かつ増殖させることができる。

[0109] (f)単一細胞クローンへの分割(クローニング)

ハイブリドーマのクローニング法としては、例えばメチルセルロース法、軟アガロース法、限界希釈法等の公知の方法を用いることができる(例えばBarbara, B. M. and Stanley, M. S. :Selected Methods in Cellular Immunology, W. H. Freeman and Company, San Francisco(1980)参照)。これらの方法のうち、特に限界希釈法が好適である。

[0110] この方法では、マイクロプレートにラット胎児由来繊維芽細胞株、あるいは正常マウス脾臓細胞、胸腺細胞、腹水細胞などのフィーダー(feeder)を接種しておく。

[0111] 一方、あらかじめハイブリドーマを0. 2～0. 5個／0. 2mlになるように培地中で希釈し、この希釈したハイブリドーマの浮遊液を各ウェルに0. 1mlずつ入れ、一定期間毎(例えば3日毎)に約1／3の培地を新しいものに交換しながら2週間程度培養を続

けることによってハイブリドーマのクローンを増殖させることができる。

[0112] 抗体価の認められたウェルについて、例えば限界希釈法によるクローニングを2～4回繰返し、安定して抗体価の認められたものを抗EPHA2モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ株として選択することができる。

[0113] このようにしてクローニングされたハイブリドーマ株の例としては、ハイブリドーマSH348－1及びハイブリドーマSH357－1を挙げることができる。ハイブリドーマSH348－1及びハイブリドーマSH357－1は日本国独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター(住所:日本国茨城県つくば市東1－1－1中央第6)に2007年6月8日付けで寄託され、ハイブリドーマSH348－1はSH348－1の名称で寄託番号FERM BP－10836が付与され、ハイブリドーマSH357－1はSH357－1の名称で寄託番号FERM BP－10837が付与されている。

[0114] なお、本明細書中においては、ハイブリドーマSH348－1が産生する抗体を、「SH348－1」といい、ハイブリドーマSH357－1が産生する抗体を、「SH357－1」と記載する。

[0115] (g)ハイブリドーマ培養によるモノクローナル抗体の調製

このようにして選択されたハイブリドーマは、これを培養することにより、モノクローナル抗体を効率よく得ることができるが、培養に先立ち、目的とするモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマをスクリーニングすることが望ましい。

[0116] このスクリーニングにはそれ自体既知の方法が採用できる。

[0117] 本発明における抗体価の測定は、例えば上記(b)の項目で説明したELISA法により行うことができる。

[0118] 以上の通りの方法によって得たハイブリドーマは、液体窒素中又は－80℃以下の冷凍庫中に凍結状態で保存することができる。

[0119] また、クローニングを完了したハイブリドーマは、HAT培地からアミノプテリンを除いたHT培地で数回継代した後、正常培地に換えて培養することができる。

[0120] 大量培養は、大型培養瓶を用いた回転培養、あるいはスピナー培養で行われる。

[0121] この大量培養における上清を、ゲル濾過等、当業者に周知の方法を用いて精製することにより、本発明の蛋白質に特異的に結合するモノクローナル抗体を得ることが

できる。

[0122] また、同系統のマウス(例えば、上記のBALB／c)、あるいはNu／Nuマウスの腹腔内にハイブリドーマを注射し、該ハイブリドーマを増殖させることにより、本発明のモノクローナル抗体を大量に含む腹水を得ることができる。

[0123] 腹腔内に投与する場合には、事前(3～7日前)に2, 6, 10, 14－テトラメチルペンタデカン(2, 6, 10, 14－tetramethyl pentadecane)(プリスタン)等の鉱物油を投与すると、より多量の腹水が得られる。

[0124] たとえば, ハイブリドーマと同系統のマウスの腹腔内に予め免疫抑制剤を注射し、T細胞を不活性化した後、20日後に10^6～10^7個のハイブリドーマ・クローン細胞を血清を含まない培地中に浮遊(0. 5ml)させて腹腔内に投与し、通常腹部が膨満し、腹水にたまったところでマウスより腹水を採取する。

[0125] この方法により、培養液中に比べて約100倍以上の濃度のモノクローナル抗体が得られる。

[0126] 上記方法により得たモノクローナル抗体は、例えばWeir, D. M. :Handbook of Experimental Immunology, Vol. I, II, III, Blackwell Scientific Publications, Oxford(1978)に記載されている方法で精製することができる。

[0127] すなわち、硫安塩析法、ゲル濾過法、イオン交換クロマトグラフィー法、アフィニティークロマトグラフィー法等である。

[0128] 精製の簡便な方法としては、市販のモノクローナル抗体精製キット(例えば、MAb Trap GIIキット;ファルマシア社製)等を利用することもできる。

[0129] かくして得られるモノクローナル抗体は、EPHA2に対して高い抗原特異性を有する。

[0130] (h)モノクローナル抗体の検定

かくして得られたモノクローナル抗体のアイソタイプ及びサブクラスの決定は以下のように行うことができる。

[0131] まず、同定法としてはオクテルロニー(Ouchterlony)法、ELISA法、又はRIA法が挙げられる。

[0132] オクテルロニー法は簡便ではあるが、モノクローナル抗体の濃度が低い場合には

濃縮操作が必要である。

[0133] 一方、ELISA法又はRIA法を用いた場合は、培養上清をそのまま抗原吸着固相と反応させ、さらに第二次抗体として各種イムノグロブリンアイソタイプ、サブクラスに対応する抗体を用いることにより、モノクローナル抗体のアイソタイプ、サブクラスを同定することが可能である。

[0134] また、さらに簡便な方法として、市販の同定用のキット(例えば、マウスタイパーキット;バイオラッド社製)等を利用することもできる。

[0135] さらに、蛋白質の定量は、フォーリンロウリー法、及び280nmにおける吸光度[1.4(OD280)＝イムノグロブリン1mg／ml]より算出する方法により行うことができる。

[0136] (3)その他の抗体

本発明の抗体には、上記EPHA2に対するモノクローナル抗体に加え、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺伝子組換え型抗体、例えば、キメラ(Chimeric)抗体、ヒト化(Humanized)抗体、ヒト抗体なども含まれる。これらの抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。

[0137] キメラ抗体としては、抗体の可変領域と定常領域が互いに異種である抗体が挙げられ、例えば、マウス由来抗体の可変領域をヒト由来の定常領域に接合したキメラ抗体が挙げられる(Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 81, 6851－6855, (1984)参照)。

[0138] ヒト化抗体としては、相補性決定領域(CDR;complementarity determining region)のみをヒト由来の抗体に組み込んだ抗体(Nature(1986)321, p. 522－525参照)、CDR移植法によって、CDRの配列に加え一部のフレームワークのアミノ酸残基もヒト抗体に移植した抗体(WO90／07861号、US6972323号公報参照)を挙げることができる。

[0139] さらに、抗ヒト抗体を挙げることができる。抗EPHA2ヒト抗体とは、ヒト染色体由来の抗体の遺伝子配列のみを有するヒト抗体を意味する。抗EPHA2ヒト抗体は、ヒト抗体のH鎖とL鎖の遺伝子を含むヒト染色体断片を有するヒト抗体産生マウスを用いた方法(Tomizuka, K. et al., Nature Genetics(1997)16, p. 133－143, ;Kuroiwa, Y. et. al., Nuc. Acids Res. (1998)26, p. 3447－3448;Yoshi

da, H. et. al., Animal Cell Technology:Basic and Applied Aspects vol. 10, p. 69－73(Kitagawa, Y., Matuda, T. and Iijima, S. eds.), Kluwer Academic Publishers, 1999.;Tomizuka, K. et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA(2000)97, p. 722－727等を参照。)によって取得することができる。

[0140] このようなトランスジェニック動物は、具体的には、非ヒト哺乳動物の内在性免疫グロブリン重鎖および軽鎖の遺伝子座が破壊され、代わりに酵母人工染色体(Yeast artificial chromosome, YAC)ベクターなどを介してヒト免疫グロブリン重鎖および軽鎖の遺伝子座が導入された遺伝子組み換え動物を、ノックアウト動物およびトランスジェニック動物の作製、およびこれらの動物同士を掛け合わせることにより作り出すことができる。

[0141] また、遺伝子組換え技術により、そのようなヒト抗体の重鎖及び軽鎖の各々をコードするcDNA、好ましくは該cDNAを含むベクターにより真核細胞を形質転換し、遺伝子組換えヒトモノクローナル抗体を産生する形質転換細胞を培養することにより、この抗体を培養上清中から得ることもできる。

[0142] ここで、宿主としては例えば真核細胞、好ましくはCHO細胞、リンパ球やミエローマ等の哺乳動物細胞を用いることができる。

[0143] また、ヒト抗体ライブラリーより選別したファージディスプレイ由来のヒト抗体を取得する方法(Wormstone, I. M. et. al, Investigative Ophthalmology & Visual Science. (2002)43(7), p. 2301－2308;Carmen, S. et. al., Briefings in Functional Genomics and Proteomics(2002), 1(2), p. 189－203;Siriwardena, D. et. al., Opthalmology(2002)109(3), p. 427－431等参照。)も知られている。

[0144] 例えば、ヒト抗体の可変領域を一本鎖抗体(scFv)としてファージ表面に発現させて、抗原に結合するファージを選択するファージディスプレイ法(Nature Biotechnology(2005), 23, (9), p. 1105－1116)を用いることができる。

[0145] また、同様にヒト抗体のFab(抗原結合断片;Antigen－binding Fragment)をファージ表面に発現させて、抗原に結合するファージを選択するファージディスプレイ

法(国際公開WO97／08320号、WO01／05950号)を用いることもできる。

[0146] 抗原に結合することで選択されたファージの遺伝子を解析することによって、抗原に結合するヒト抗体の可変領域をコードするDNA配列を決定することができる。

[0147] 抗原に結合するscFvやFabのDNA配列が明らかになれば、そこよりCDRの配列を取り出して当該配列を有する発現ベクターを作製し、適当な宿主に導入して発現させることによりヒト抗体を取得することができる(WO92／01047号, WO92／20791号, WO93／06213号, WO93／11236号, WO93／19172号, WO95／01438号, WO95／15388号, Annu. Rev. Immunol(1994)12, p. 433－455, Nature Biotechnology(2005)23(9), p. 1105－1116)。

[0148] 抗体遺伝子を一旦単離した後、適当な宿主に導入して抗体を作製する場合には、適当な宿主と発現ベクターの組み合わせを使用することができる。

[0149] 真核細胞を宿主として使用する場合、動物細胞、植物細胞、真核微生物を用いることができる。

[0150] 動物細胞としては、(1)哺乳類細胞、例えば、サルの細胞であるCOS細胞(Gluzman, Y. Cell(1981)23, p. 175－182、ATCC CRL－1650)、マウス繊維芽細胞NIH3T3(ATCC No. CRL－1658)やチャイニーズ・ハムスター卵巣細胞(CHO細胞、ATCC CCL－61)のジヒドロ葉酸還元酵素欠損株(Urlaub, G. and Chasin, L. A. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (1980)77, p. 4126－4220)を挙げることができる。

[0151] また、これらの宿主としては、糖鎖構造が改変され、抗体のADCC活性(抗体依存性細胞障害活性)やCDC活性が高められた抗体を発現するように改変された宿主を用いることもでき、そのような宿主としては、抗体のFc領域に結合するN－グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端のN－アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が20％以上である抗体組成物を産生する抗体分子をコードする遺伝子を導入されたCHO細胞を挙げることができる(WO02／31140号参照。)

原核細胞を使用する場合は、例えば、大腸菌、枯草菌を挙げることができる。

[0152] これらの細胞に、目的とする抗体遺伝子を形質転換により導入し、形質転換された

細胞をin vitroで培養することにより抗体が得られる。

[0153] 本発明の抗体のアイソタイプとしては制限はなく、例えばIgG（IgG1，IgG2，IgG3，IgG4）、IgM、IgA（IgA1，IgA2）、IgDあるいはIgE等が挙げられるが、好ましくはIgGまたはIgMを挙げることができる。

[0154] また本発明の抗体は、抗体の抗原結合部を有する抗体の断片又はその修飾物であってもよい。

[0155] 例えば、抗体の断片としては、Fab、F（ab'）2、Fv、または重鎖および軽鎖のFvを適当なリンカーで連結させたシングルチェインFv（scFv）、ディアボディー（diabody（diabodies））、線状抗体、及び抗体断片より形成された多特異性抗体などが挙げられる。

[0156] さらに、本発明の抗体は少なくとも2種類の異なる抗原に対して特異性を有する多特異性抗体であってもよい。

[0157] 通常このような分子は2個の抗原を結合するものであるが（即ち、二重特異性抗体（bispecific antibody））、本発明における「多特異性抗体」は、それ以上（例えば、3種類）の抗原に対して特異性を有する抗体を包含するものである。

[0158] 本発明の抗体は、多特異性抗体は全長からなる抗体、またはそのような抗体の断片（例えば、F（ab'）2二特異性抗体）でもよい。二重特異性抗体は2種類の抗体の重鎖と軽鎖（HL対）を結合させて作製することもできるし、異なるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを融合させて、二重特異性抗体産生融合細胞を作製することによっても、作製することができる（Millstein et al.，Nature（1983）305，p. 537－539）。

[0159] 本発明の抗体は一本鎖抗体（scFvとも記載する）でもよい。一本鎖抗体は、抗体の重鎖V領域と軽鎖V領域とをポリペプチドのリンカーで連結することにより得られる（Pluckthun，The Pharmacology of Monoclonal Antibodies，113（Rosenburg及びMoore編、Springer Verlag，New York，p. 269－315（1994），Nature Biotechnology（2005），23，p. 1126－1136）。

[0160] 一本鎖抗体を作成する方法は当技術分野において周知である（例えば、米国特許第4，946，778号、米国特許第5，260，203号、米国特許第5，091，513号、米

国特許第5，455，030号等を参照)。このscFvにおいて、重鎖V領域と軽鎖V領域は、コンジュゲートを作らないようなリンカー、好ましくはポリペプチドリンカーを介して連結される(Huston, J. S. et al. , Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (1988), 85, p. 5879－5883)。scFvにおける重鎖V領域および軽鎖V領域は、同一の抗体に由来してもよく、別々の抗体に由来してもよい。

[0161] V領域を連結するペプチドリンカーとしては、例えば12～19残基からなる任意の一本鎖ペプチドが用いられる。

[0162] scFvをコードするDNAは、前記抗体の重鎖または重鎖V領域をコードするDNA、および軽鎖または軽鎖V領域をコードするDNAのうち、それらの配列のうちの全部又は所望のアミノ酸配列をコードするDNA部分を鋳型とし、その両端を規定するプライマー対を用いてPCR法により増幅し、次いで、さらにペプチドリンカー部分をコードするDNA、およびその両端が各々重鎖、軽鎖と連結されるように規定するプライマー対を組み合わせて増幅することにより得られる。

[0163] また、一旦scFvをコードするDNAが作製されると、それらを含有する発現ベクター、および該発現ベクターにより形質転換された宿主を常法に従って得ることができ、また、その宿主を用いることにより、常法に従ってscFvを得ることができる。

[0164] これらの抗体断片は、前記と同様にして遺伝子を取得し発現させ、宿主により産生させることができる。

[0165] 本発明の抗体は、アミノ酸配列が異なる複数種類の抗EPHA2抗体の混合物である、ポリクローナル抗体であってもよい。ポリクローナル抗体の一例としては、CDRが異なる複数種類の抗体の混合物を挙げることができる。そのようなポリクローナル抗体としては、異なる抗体を産生する細胞の混合物を培養し、該培養物から精製された抗体を用いることが出来る(WO2004／061104号参照)。

[0166] 抗体の修飾物として、ポリエチレングリコール(PEG)等の各種分子と結合した抗体を使用することもできる。

[0167] 本発明の抗体は、更にこれらの抗体と他の薬剤とコンジュゲートを形成しているもの(Immunoconjugate)でもよい。このような抗体の例としては、該抗体が放射性物質や薬理作用を有する化合物と結合している物を挙げることができる(Nature Biotec

hnology(2005)23, p. 1137－1146)。

[0168] 得られた抗体は、均一にまで精製することができる。抗体の分離、精製は通常の蛋白質で使用されている分離、精製方法を使用すればよい。

[0169] 例えばクロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、透析、調製用ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動等を適宜選択、組み合わせれば、抗体を分離、精製することができる(Strategies for Protein Purification and Characterization:A Laboratoy Course Manual, Daniel R. Marshak et al. eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press(1996);Antibodies:A Laboratory Manual. Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory(1988))が、これらに限定されるものではない。

[0170] クロマトグラフィーとしては、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等が挙げられる。

[0171] これらのクロマトグラフィーは、HPLCやFPLC等の液相クロマトグラフィーを用いて行うことができる。

[0172] アフィニティークロマトグラフィーに用いるカラムとしては、プロテインAカラム、プロテインGカラムが挙げられる。

[0173] 例えばプロテインAカラムを用いたカラムとして、Hyper D, POROS, Sepharose F. F. (Pharmacia)等が挙げられる。

[0174] また抗原を固定化した担体を用いて、抗原への結合性を利用して抗体を精製することも可能である。

[0175] 3. 本発明の抗体の性質

上記方法によって取得される本発明の抗EPHA2抗体は以下の性質を有する。

(1)本発明の1つの抗体は下記のa)乃至e)に示される性質を有する。

a)EPHA2チロシン残基のリン酸化能を有さない。:

b)EPHA2発現細胞に対してADCC活性を有する。:

c)EPHA2発現細胞に対してCDC活性を有する。:

d)In vivoで抗腫瘍活性を有する。:

e)配列表の配列番号8のアミノ酸番号426乃至534に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドに特異的に結合する。

[0176] このような性質を有する抗体の例としては、以下の1)乃至4)からなる群から選択されるいずれか1つの抗体を挙げることができる。

1)SH348－1、

2)ハイブリドーマSH348－1(FERM BP－10836)が産生する抗体によって認識されるエピトープを認識する抗体、

3)重鎖可変領域の相補性決定領域として、配列表の配列番号59、61及び63に示されるアミノ酸配列を有し、軽鎖可変領域の相補性決定領域として、配列表の配列番号65、67及び69に示されるアミノ酸配列を有する抗体、

4)以下のi)及びii)の特徴を有する抗体:

i)一般式(I)で示されるアミノ酸配列を含む重鎖ペプチドを有する:

$-FRH_1-CDRH_1-FRH_2-CDRH_2-FRH_3-CDRH_3-FRH_4-$ (I)

(式中、FRH_1は18乃至30個のアミノ酸からなる任意のアミノ酸配列を示し、$CDRH_1$は配列表の配列番号59で示されるアミノ酸配列を示し、FRH_2は14個のアミノ酸からなる任意のアミノ酸配列を表し、$CDRH_2$は配列表の配列番号61で示されるアミノ酸配列を示し、FRH_3は32個のアミノ酸からなる任意のアミノ酸配列を表し、$CDRH_3$は配列表の配列番号63で示されるアミノ酸配列を示し、FRH_4は11個のアミノ酸からなる任意のアミノ酸配列を示し、各アミノ酸はそれぞれペプチド結合で連結している。);

ii)一般式(II)で示されるアミノ酸配列を含むことからなる軽鎖ポリペプチドを有する:

$-FRL_1-CDRL_1-FRL_2-CDRL_2-FRL_3-CDRL_3-FRL_4-$ (II)

(式中、FRL_1は23個のアミノ酸からなる任意のアミノ酸配列を示し、$CDRL_1$は配列表の配列番号65で示されるアミノ酸配列を示し、FRL_2は15個のアミノ酸からなる任意のアミノ酸配列を表し、$CDRL_2$は配列表の配列番号67で示されるアミノ酸配列を示し、FRL_3は32個のアミノ酸からなる任意のアミノ酸配列を表し、$CDRL_3$は配列表の配列番号69で示されるアミノ酸配列を示し、FRL_4は10個のアミノ酸からなる任意のアミノ酸配列を示し、各アミノ酸はそれぞれペプチド結合で連結している。)、

5)SH357－1、

6）ハイブリドーマSH357－1（FERM BP－10837）が産生する抗体によって認識されるエピトープを認識する抗体、

7）重鎖可変領域の相補性決定領域として、配列表の配列番号71、73及び75に示されるアミノ酸配列を有し、軽鎖可変領域の相補性決定領域として、配列表の配列番号77、79及び81に示されるアミノ酸配列を有する抗体、

8）以下のi）及びii）に示される特徴を有する、5）乃至7）から選択されるいずれか1つに記載の抗体：

i）一般式（I）で示されるアミノ酸配列を含む重鎖ペプチドを有する：

$-FRH_1-CDRH_1-FRH_2-CDRH_2-FRH_3-CDRH_3-FRH_4-$（I）

（式中、FRH_1は18乃至30個のアミノ酸配列からなる任意のアミノ酸配列を示し、$CDRH_1$は配列表の配列番号71で示されるアミノ酸配列を示し、FRH_2は14個のアミノ酸からなる任意のアミノ酸配列を表し、$CDRH_2$は配列表の配列番号73で示されるアミノ酸配列を示し、FRH_3は32個のアミノ酸からなる任意のアミノ酸配列を表し、$CDRH_3$は配列表の配列番号75で示されるアミノ酸配列を示し、FRH_4は11個のアミノ酸からなる任意のアミノ酸配列を示し、各アミノ酸はそれぞれペプチド結合で連結している。）；

ii）一般式（II）で示されるアミノ酸配列を含むことからなる軽鎖ポリペプチドを有する：

$-FRL_1-CDRL_1-FRL_2-CDRL_2-FRL_3-CDRL_3-FRL_4-$（II）

（式中、FRL_1は23個のアミノ酸配列からなる任意のアミノ酸配列を示し、$CDRL_1$は配列表の配列番号77で示されるアミノ酸配列を示し、FRL_2は15個のアミノ酸からなる任意のアミノ酸配列を表し、$CDRL_2$は配列表の配列番号79で示されるアミノ酸配列を示し、FRL_3は32個のアミノ酸からなる任意のアミノ酸配列を表し、$CDRL_3$は配列表の配列番号81で示されるアミノ酸配列を示し、FRL_4は10個のアミノ酸からなる任意のアミノ酸配列を示し、各アミノ酸はそれぞれペプチド結合で連結している。）。

[0177] （2）本発明の他の1つの抗体は下記のa）乃至f）に示される性質を有する。

a）EPHA2チロシン残基のリン酸化能を有さない。：

b）EPHA2蛋白質量の減少作用を示す。

c）EPHA2発現細胞に対してADCC活性を有する。：

d)EPHA2発現細胞に対してCDC活性を有する。:

e)In vivoで抗腫瘍活性を有する。:

f)配列表の配列番号8のアミノ酸番号426乃至534に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドに特異的に結合する。

[0178] このような性質を有する抗体の例としては、以下の1)乃至4)からなる群から選択されるいずれか1つの抗体を挙げることができる。

1)SH348－1、

2)ハイブリドーマSH348－1(FERM BP－10836)が産生する抗体によって認識されるエピトープを認識する抗体、

3)重鎖可変領域の相補性決定領域として、配列表の配列番号59、61及び63に示されるアミノ酸配列を有し、軽鎖可変領域の相補性決定領域として、配列表の配列番号65、67及び69に示されるアミノ酸配列を有する抗体、

4)以下のi)及びii)の特徴を有する抗体:

i)一般式(I)で示されるアミノ酸配列を含む重鎖ペプチドを有する:

$-FRH_1-CDRH_1-FRH_2-CDRH_2-FRH_3-CDRH_3-FRH_4-$ (I)

(式中、FRH_1は18乃至30個のアミノ酸からなる任意のアミノ酸配列を示し、$CDRH_1$は配列表の配列番号59で示されるアミノ酸配列を示し、FRH_2は14個のアミノ酸からなる任意のアミノ酸配列を表し、$CDRH_2$は配列表の配列番号61で示されるアミノ酸配列を示し、FRH_3は32個のアミノ酸からなる任意のアミノ酸配列を表し、$CDRH_3$は配列表の配列番号63で示されるアミノ酸配列を示し、FRH_4は11個のアミノ酸からなる任意のアミノ酸配列を示し、各アミノ酸はそれぞれペプチド結合で連結している。);

ii)一般式(II)で示されるアミノ酸配列を含むことからなる軽鎖ポリペプチドを有する:

$-FRL_1-CDRL_1-FRL_2-CDRL_2-FRL_3-CDRL_3-FRL_4-$ (II)

(式中、FRL_1は23個のアミノ酸からなる任意のアミノ酸配列を示し、$CDRL_1$は配列表の配列番号65で示されるアミノ酸配列を示し、FRL_2は15個のアミノ酸からなる任意のアミノ酸配列を表し、$CDRL_2$は配列表の配列番号67で示されるアミノ酸配列を示し、FRL_3は32個のアミノ酸からなる任意のアミノ酸配列を表し、$CDRL_3$は配列表の配列番号69で示されるアミノ酸配列を示し、FRL_4は10個のアミノ酸からなる任意

のアミノ酸配列を示し、各アミノ酸はそれぞれペプチド結合で連結している。)。

[0179] (3)本発明の他の1つの抗体は下記のa)乃至e)に示される性質を有する。

a)EPHA2チロシン残基のリン酸化能を有さない。

b)EPHA2蛋白質量の減少作用を示さない。

c)ADCC活性を有する。

d)CDC活性を有する。

e)In vivoで抗腫瘍活性を有する。

f)配列表の配列番号8のアミノ酸番号426乃至534に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドに特異的に結合する。

[0180] このような性質を有する抗体の例としては、以下の1)乃至4)からなる群から選択されるいずれか1つの抗体を挙げることができる。

1)SH357−1、

2)ハイブリドーマSH357−1(FERM BP−10837)が産生する抗体によって認識されるエピトープを認識する抗体、

3)重鎖可変領域の相補性決定領域として、配列表の配列番号71、73及び75に示されるアミノ酸配列を有し、軽鎖可変領域の相補性決定領域として、配列表の配列番号77、79及び81に示されるアミノ酸配列を有する抗体、

4)以下のi)及びii)に示される性質を有する抗体:

i)一般式(I)で示されるアミノ酸配列を含む重鎖ペプチドを有する:

$-FRH_1-CDRH_1-FRH_2-CDRH_2-FRH_3-CDRH_3-FRH_4-$ (I)

(式中、FRH_1は18乃至30個のアミノ酸からなる任意のアミノ酸配列を示し、$CDRH_1$は配列表の配列番号71で示されるアミノ酸配列を示し、FRH_2は14個のアミノ酸からなる任意のアミノ酸配列を表し、$CDRH_2$は配列表の配列番号73で示されるアミノ酸配列を示し、FRH_3は32個のアミノ酸からなる任意のアミノ酸配列を表し、$CDRH_3$は配列表の配列番号75で示されるアミノ酸配列を示し、FRH_4は11個のアミノ酸からなる任意のアミノ酸配列を示し、各アミノ酸はそれぞれペプチド結合で連結している。);

ii)一般式(II)で示されるアミノ酸配列を含むことからなる軽鎖ポリペプチドを有する:

$-FRL_1-CDRL_1-FRL_2-CDRL_2-FRL_3-CDRL_3-FRL_4-$ (II)

（式中、FRL_1は23個のアミノ酸からなる任意のアミノ酸配列を示し、$CDRL_1$は配列表の配列番号77で示されるアミノ酸配列を示し、FRL_2は15個のアミノ酸からなる任意のアミノ酸配列を表し、$CDRL_2$は配列表の配列番号79で示されるアミノ酸配列を示し、FRL_3は32個のアミノ酸からなる任意のアミノ酸配列を表し、$CDRL_3$は配列表の配列番号81で示されるアミノ酸配列を示し、FRL_4は10個のアミノ酸からなる任意のアミノ酸配列を示し、各アミノ酸はそれぞれペプチド結合で連結している。）。

[0181] 4. 抗EPHA2抗体を含有する医薬

本発明の抗EPHA2抗体は、医薬として特に癌の治療を目的とした医薬組成物として、あるいはこのような疾患の免疫学的診断のための抗体として有用である。

[0182] 癌の種類としては、乳癌、食道癌、前立腺癌、胃癌、非小細胞肺癌、大腸癌及び多形神経膠芽腫を好適に挙げることができるがこれらに限定されない。

[0183] 本発明は、治療に有効な量の抗EPHA2抗体と薬学上許容される希釈剤、担体、可溶化剤、乳化剤、保存剤及び／又は補助剤を含む医薬組成物も提供する。

[0184] 本発明の医薬組成物において許容される製剤に用いる物質としては好ましくは投与量や投与濃度において、医薬組成物を投与される者に対して非毒性のものが好ましい。

[0185] 本発明の医薬組成物は、pH、浸透圧、粘度、透明度、色、等張性、無菌性、安定性、溶解率、徐放率、吸収率、浸透率を変えたり、維持したり、保持したりするための製剤用の物質を含むことができる。

[0186] 製剤用の物質として以下のものを挙げることができるが、これらに制限されない；グリシン、アラニン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン又はリジン等のアミノ酸類、抗菌剤、アスコルビン酸、硫酸ナトリウム又は亜硫酸水素ナトリウム等の抗酸化剤、リン酸、クエン酸、ホウ酸バッファー、炭酸水素、トリス－塩酸（Tris－Hcl）溶液等の緩衝剤、マンニトールやグリシン等の充填剤、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）等のキレート剤、カフェイン、ポリビニルピロリジン、β－シクロデキストリンやヒドロキシプロピル－β－シクロデキストリン等の錯化剤、グルコース、マンノース又はデキストリン等の増量剤、単糖類、二糖類やグルコース、マンノースやデキストリン等の他の炭水化物、着色剤、香味剤、希釈剤、乳化剤やポリビニルピロリジン等の親水ポリマー、低分子量

ポリペプチド、塩形成対イオン、塩化ベンズアルコニウム、安息香酸、サリチル酸、チメロサール、フェネチルアルコール、メチルパラベン、プロピルパラベン、クロレキシジン、ソルビン酸又は過酸化水素等の防腐剤、グリセリン、プロピレン・グリコール又はポリエチレングリコール等の溶媒、マンニトール又はソルビトール等の当アルコール、懸濁剤、PEG、ソルビタンエステル、ポリソルビテート20やポリソルビテート80等ポリソルビテート、トリトン(triton)、トロメタミン(tromethamine)、レシチン又はコレステロール等の界面活性剤、スクロースやソルビトール等の安定化増強剤、塩化ナトリウム、塩化カリウムやマンニトール・ソルビトール等の弾性増強剤、輸送剤、希釈剤、賦形剤、及び／又は薬学上の補助剤。

[0187] これらの製剤用の物質の添加量は、抗EPHA2抗体の重量に対して0．01～100倍、特に0．1～10倍添加するのが好ましい。

[0188] なお、抗EPHA2抗体をリポソーム中に含有するようにしたイムノリポソームや抗EPHA2抗体とリポソームを結合した抗体(米国特許第6214388号)を含有する医薬組成物も本発明に含まれる。

[0189] 製剤中の好適な医薬組成物の組成は当業者によって、適用疾患、適用投与経路などに応じて適宜決定することができる。

[0190] 医薬組成物中の賦形剤や担体は液体でも固体でもよい。

適当な賦形剤や担体は注射用の水や生理食塩水、人工脳脊髄液や非経口投与に通常用いられている他の物質でもよい。

[0191] 中性の生理食塩水や血清アルブミンを含む生理食塩水を担体に用いることもできる。

医薬組成物にはpH7．0－8．5のTrisバッファーやpH4．0－5．5の酢酸バッファーやそれらにソルビトールや他の化合物を含むこともできる。

本発明の医薬組成物は選択された組成で必要な純度で適当な薬剤として、凍結乾燥品あるいは液体として準備される。

[0192] 抗EPHA2抗体を含む医薬組成物はスクロースのような適当な賦形剤を用いた凍結乾燥品として成型されることもできる。

[0193] 本発明の医薬組成物は非経口投与用に調製することもできるし、経口による消化

管吸収用に調製することもできる。

[0194] 製剤の組成及び濃度は投与方法によって決定することができるし、本発明の医薬組成物に含まれる、抗EPHA2抗体のEPHA2に対する親和性、即ち、EPHA2に対する解離定数(Kd値)に対し、親和性が高い(Kd値が低い)ほど、ヒトへの投与量を少なく薬効を発揮することができるので、この結果に基づいて本発明の医薬組成物の人に対する投与量を決定することもできる。

[0195] 投与量は、抗EPHA2抗体をヒトに対して投与する際には、通常約0．1～100mg／kgを1～180日間に1回投与すればよい。

[0196] 本発明の医薬組成物の形態としては、点滴を含む注射剤、坐剤、経鼻剤、舌下剤、経皮吸収剤などが挙げられる。

[0197] 本発明の医薬組成物を投与することによってEPHA2を発現している腫瘍の増殖を抑制することが可能になる。

実施例

[0198] 以下、実施例において本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されない。

[0199] なお、下記実施例において遺伝子操作に関する各操作は特に明示がない限り、「モレキュラークローニング(Molecular Cloning)」(Sambrook, J. , Fritsch, E. F. およびManiatis, T. 著, Cold SpringHarbor Laboratory Pressより1989年発刊)に記載の方法及びその他の当業者が使用する実験書に記載の方法により行うか、または、市販の試薬やキットを用いる場合には市販品の指示書に従って行った。

[0200] (実施例1)プラスミド作製

1)－1 ヒトEPHA2発現ベクターの作製

1)－1－1 全長ヒトEPHA2発現ベクターの作製

SK－OV－3細胞total RNAより合成したcDNAを鋳型にプライマーセット:

プライマー1:5'－ggggacaagtttgtacaaaaaagcaggcttcggggatcggaccgagagcgagaag－3'(配列表の配列番号3)及び、

プライマー2:

5'－ggggaccactttgtacaagaaagctgggtcctagatggggatccccacagtgttcacctggtc

ctt－3’

（配列表の配列番号4）

を用いてPCR反応を行い、ヒトEPHA2をコードするcDNAを増幅した。PCR産物をBP Clonase（Invitrogen社製）を用いてpDONR221（Invitrogen社製）に組み込みエントリーベクターを作製した。GeneTailor Site－Directed Mutagenesis System（Invitrogen社製）とプライマーセット：

プライマー3：5’－ctgtggggatccccatcgacccagctttc－3’（配列表の配列番号5）及び、

プライマー4：5’－gatggggatccccacagtgttcacctggtc－3’（配列表の配列番号6）

を用いて、エントリーベクター中のEPHA2遺伝子からストップコドンを除去した。得られたエントリーベクターからpcDNA－DEST40 Gateway Vector（Invitrogen社製）へLR Clonase（Invitrogen社製）を用いて組み換え反応を行い、pcDNA－DEST40－EPHA2を作製した（本ベクターはattB1とattB2配列の間に配列表の配列番号7に示されるヌクレオチド配列を有する。）。また本ベクターにクローニングされたEPHA2遺伝子のORF部分の配列は配列表の配列番号7のヌクレオチド番号33乃至2960に示されている。またEPHA2のアミノ酸配列は配列表の配列番号8に示されている。

[0201] 1）－1－2 EPHA2細胞外領域発現ベクターの作製

ヒトEPHA2細胞外領域ポリペプチド（配列表の配列番号8のアミノ酸番号1乃至534に示されるアミノ酸配列からなる。以下「EPHA2－ECD」と略す）をコードするcDNAをプライマーセット：

プライマー5：5’－aaaaagcttatggagctccaggcagcccgc－3’（配列表の配列番号9）及び、

プライマー6：5’－aaagggccctcagttgccagatccctccgg－3’（配列表の配列番号10）

を用いてPCR反応で増幅した。得られたPCR産物をHindIII及びApaIで切断し、pcDNA3．1のHindIII／ApaIサイトにクローニングした（以下「pcDNA3．1－EPHA2－ECD」と略す。また、以下及び図中で「pcDNA3．1－EPHA2－ECD」によっ

て発現する組換え蛋白質を「rEPHA2－ECD」と記す。)。

[0202] 1)－1－3 EPHA2部分蛋白質発現ベクターの作製

EPHA2の配列表の配列番号8のアミノ酸番号315－540に示されるアミノ酸配列からなる領域(以下「FnIII－NC」と記す。)、アミノ酸番号315－430に示されるアミノ酸配列からなる領域(以下「FnIII－N」と記す。)、アミノ酸番号426－540に示されるアミノ酸配列からなる領域(以下「FnIII－C」と記す。)を発現するベクターを構築するため、FnIII－NC増幅用プライマーセット:

プライマー7:5'－gcaggcttcatcgaaggtcgtgggcgggcacctcaggacccag－3'(配列表の配列番号11)及び、

プライマー8:5'－gtacaagaaagctgggtgctagccgccaatcaccgccaag－3'(配列表の配列番号12)、

FnIII－N増幅用プライマーセット:

プライマー7及び、

プライマー9:5'－gtacaagaaagctgggtgctaggcagtacggaagctgcgg－3'(配列表の配列番号13)、

FnIII－C増幅用プライマーセット:

プライマー10:5'－gcaggcttcatcgaaggtcgtgggagcttccgtactgccagtg－3'(配列表の配列番号14)及び、

プライマー8、

のそれぞれのプライマーセットを用いてpcDNA－DEST40－EPHA2を鋳型にしてPCR反応を行った。得られたPCR産物の両末端にattB1、attB2サイトを付加するため、各PCR産物を鋳型にプライマーセット:

プライマー11:5'－ggggacaagtttgtacaaaaaagcaggcttcatcgaaggtcgtggg－3'(配列表の配列番号15)及び、

プライマー12:5'－ggggaccactttgtacaagaaagctgggt－3'(配列表の配列番号16)、

を用いてPCR反応を行い、ここで得られたPCR産物をBP Clonaseを用いてpDONR221に組み込みエントリーベクターを作製した。各エントリーベクターからpET15

b（Novagen社製）のNdeIとBamHIサイトを制限酵素で切断後平滑化したサイトにGateway Vector Conversion System（Invitrogen社製）のReading Frame Cassette C．1を組み込んで作製したデスティネーションベクターとの間で、LR Clonaseを使用した組み換え反応を行い発現ベクターを作製した（以下、FnIII－NC、FnIII－N、FnIII－Cを組み込んだ発現ベクターによって発現する組換え蛋白質をそれぞれrFnIII－NC、rFnIII－N、rFnIII－Cと記す）。

[0203] 1）－2 ヒトEPHB2細胞外領域発現ベクターの作製

HCC70細胞total RNAより合成したcDNAを鋳型にプライマーセット：

プライマー13：5’－ggggacaagtttgtacaaaaaagcaggcttcgccccgggaagcgcagcc－3’（配列表の配列番号17）及び、

プライマー14：

5’－ggggaccactttgtacaagaaagctgggtcctaaacctccacagactgaatctggttcatctg－3’（配列表の配列番号18）

を用いてPCR反応を行い、ヒトEPHB2をコードするcDNAを取得した。ヒトEPHB2のcDNAのヌクレオチド配列を配列表の配列番号19に、アミノ酸配列を配列表の配列番号20に示した。ヒトEPHB2細胞外領域（配列表の配列番号20のアミノ酸番号1－542に示されるアミノ酸配列からなる領域）（以下「EPHB2－ECD」と略す）をコードするcDNAを増幅するためプライマーセット：

プライマー15：5’－aaaaagcttatggctctgcggaggctgggg－3’（配列表の配列番号21）及び、

プライマー16：5’－aaagatatctcatggcaacttctcctggat－3’（配列表の配列番号22）

を用いてPCR反応を行った。得られたPCR産物をHindIII及びEcoRVで切断し、pcDNA3．1のHindIII／EcoRVサイトにクローニングした（以下「pcDNA3．1－EPHB2－ECD」と略す。また、以下及び図中で「pcDNA3．1－EPHB2－ECD」によって発現する組換え蛋白質をrEPHB2－ECDと記す）。

[0204] 1）－3 ヒトERBB2発現ベクターの作製

Human clone collection（STRATAGENE社製 ＃C33830）を鋳型にプラ

イマーセット:

プライマー17:5'－caccatggagctggcggccttg－3'(配列表の配列番号23)及び、

プライマー18:5'－tcccactggcacgtccagacc－3'(配列表の配列番号24)

を用いPCR反応を行った。得られたPCR産物をpENTR Directional TOPO Cloning kit(Invitrogen社製)を用いてpENTR／D－TOPO(Invitrogen社製)に組み込みエントリーベクターを作製した。アミノ酸置換を伴う変異を修復するため、エントリーベクターを EcoRI処理して得られた断片の内、pENTR／D－TOPO由来配列を含む方の断片とHuman clone collection(STRATAGENE社製 #C14640)をEcoRI処理して得られた断片の内、2番目に大きな断片(約1．6kbp)とをライゲーションした。得られたエントリーベクターからpcDNA－DEST40 Gateway vectorへLR Clonaseを用いて組み換え反応を行い、pcDNA－DEST40－ERBB2を作製した(attB1とattB2配列の間に配列表の配列番号25に示されるヌクレオチド配列を有する。)。

[0205] (実施例2)モノクローナル抗体作製

2)－1 抗原蛋白質の調製

EPHA2－ECDを発現させるため、FreeStyle 293－F細胞(Invitorogen社製)にpcDNA3．1－EPHA2－ECDを293fectin(Invitorogen社製)を用いてトランスフェクションし、37℃、8% CO_2で5日間培養した。培養後、遠心分離により培養液を回収し、rEPHA2－ECDの精製原料とした。得られた培養上清を分子量分画15000の透析チューブを用いて20mM Tris－HCl pH7．5に対して透析し、フィルター濾過(0．45μm, PES)した後、20mM Tris－HCl pH7．5で平衡化されたHiPrep 16／10 Q XL(GE Healthcare Bio－Sciences社製)に添加した。溶出はNaClの直線濃度勾配(20mM Tris－HCl pH7．5、0－1M NaCl)で行った。溶出画分の一部をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(以下「SDS－PAGE」と略す。)で分離後、ゲルをクマシーブリリアントブルー染色(以下「CBB染色」と略す)し、rEPHA2－ECDの含まれる画分を確認した。次にrEPHA2－ECDを含む画分を集め、PBSで平衡化されたHiLoad 26／60 Superdex 200pg(GE Healthcare Bio－Sciences社製)に添加した。PBSで溶出し、溶出分画の一部

をSDS－PAGEにより分離後、ゲルをCBB染色し、rEPHA2－ECDの含まれる画分を確認した。rEPHA2－ECDを含む画分を集め、免疫用抗原、エピトープ決定時の抗原として使用した。蛋白質濃度はBCA Protein Assay Reagent(PIERCE社製)を用いて測定した。

[0206] 2)－2 免疫

4～6週齢のBALB／cAnNCrlCrljマウス(日本チャールス・リバー社)を使用した。0日目に50μgのrEPHA2－ECD とAdjuvant Complete Freund H37 Rv(和光純薬社製)を混合(体積比で1:1)したものをマウス背部皮下に投与した。同様に別の個体に50μgのrEPHA2－ECD とTiterMax Gold Adjuvant(SIGMA社製)を混合(体積比で1:1)したものを背部皮下に投与した。22日目と36日目に50μgのrEPHA2－ECDとAdjuvant Incomplete Freund(和光純薬社製)を混合(体積比で1:1)したものを各マウスの背部皮下に投与した。53日目に50μgのrEPHA2－ECDを各マウスの腹腔内に投与し、56日目にマウス脾臓を採取しハイブリドーマ作製に用いた。

[0207] 2)－3 ハイブリドーマ作製

脾臓細胞とマウスミエローマP3X63Ag8U．1細胞とをPEG4000(IBL社製)を用いて細胞融合しハイブリドーマを作製した。得られたハイブリドーマ培養上清用いて抗EPHA2抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングを行った。

[0208] 2)－4 抗体スクリーニング

2)－4－1 抗原遺伝子発現細胞の調製

293T細胞を5×10^{4}細胞／cm^{2}になるようcollagen type Iコートフラスコ(IWAKI社製)に播種し10% FBS含有DMEM中で37℃、5% CO_2の条件下で1晩培養した。翌日、pcDNA－DEST40－EPHA2とコントロールとしてpcDNA－DEST40－ERBB2をそれぞれ293T細胞にLipofectamine 2000(Invitrogen社製)を用いてトランスフェクションし、37℃、5% CO_2の条件下でさらに1晩培養した。翌日、トランスフェクションされた293T細胞をトリプシン処理し、10% FBS含有DMEMで細胞を洗浄した後、5% FBS含有PBSに懸濁した。得られた細胞懸濁液をCell－ELISA、フローサイトメトリー解析に使用した。

[0209] 2)－4－2 Cell－ELISA

2)－4－1で調製した細胞懸濁液を遠心し、上清を除去した後、EPHA2発現293T細胞とERBB2発現293T細胞のそれぞれに対しハイブリドーマ培養上清を加えて懸濁し、4℃で1時間静置した。ウェル中の細胞を5% FBS含有PBSで2回洗浄後、5% FBS含有PBSで500倍に希釈したGoat anti－Mouse IgG, Peroxidase Conjugated(Millipore(Chemicon)社製 #AP181P)を加えて懸濁し、4℃で1時間静置した。ウェル中の細胞を5% FBS含有PBSで2回洗浄した後、OPD発色液(OPD溶解液(0.05 M クエン酸3ナトリウム、0.1M リン酸水素2ナトリウム・12水 pH4.5)にo－フェニレンジアミン二塩酸塩(和光純薬社製)、H_2O_2をそれぞれ0.4mg／ml、0.6%(v／v)になるように溶解)を100μl／ウェルで添加した。攪拌しながら発色反応を行い、1M HClを100μl／ウェルで添加して発色反応を停止させた。遠心して細胞を沈殿させた後、上清を新しい96穴平底マイクロプレートに移し、プレートリーダー(ARVO:PerkinElmer社)で490nmの吸光度を測定した。細胞膜表面上に発現するEPHA2に特異的に結合する抗体を産生するハイブリドーマを選択するため、ERBB2発現293T細胞(コントロール)と比較し、EPHA2発現293T細胞の方でより高い吸光度を示す培養上清を産生するハイブリドーマを抗EPHA2抗体産生陽性として選択した。

[0210] 2)－4－3 フローサイトメトリー解析

Cell－ELISAでの擬陽性を除くため、Cell－ELISAで陽性と判定されたハイブリドーマが産生する抗体のEPHA2に対する結合特異性をフローサイトメトリー法によりさらに確認した。2)－4－1で調製した細胞懸濁液を遠心し、上清を除去した後、EPHA2発現293T細胞とERBB2発現293T細胞のそれぞれに対しハイブリドーマ培養上清を加えて懸濁し、4℃で1時間静置した。5% FBS含有PBSで2回洗浄した後、5% FBS含有PBSで1000倍に希釈したFluorescein－conjugated goat IgG fraction to mouse IgG(Whole Molecule)(ICN Pharmaceuticals社製 #55493)を加えて懸濁し、4℃で1時間静置した。5% FBS含有PBSで2回洗浄した後、2μg／ml 7－aminoactinomycin D(Invitrogen(Molecular Probes)社製)を含む5% FBS含有PBSに再懸濁し、フローサイトメーター(FC500:Be

ckmanCoulter社）で検出を行った。データ解析はFlowjo（TreeStar社）で行った。7－aminoactinomycin D陽性の死細胞をゲートで除外した後、生細胞のFITC蛍光強度のヒストグラムを作成した。コントロールであるERBB2発現293T細胞の蛍光強度ヒストグラムに対しEPHA2発現293T細胞のヒストグラムが強蛍光強度側にシフトしているサンプルを産生するハイブリドーマを抗EPHA2抗体産生ハイブリドーマとして取得した。

[0211] 2）－5 ハイブリドーマのモノクローン化

抗EPHA2抗体を産生するハイブリドーマはClonaCell－HY Selection Medium D（StemCell Technologies社製 ＃03804）に希釈して培養され、出現したコロニーを回収することでモノクローン化された。回収された各コロニーを培養し、その培養上清を用いてEPHA2に対する結合性を2）－4－3と同じ方法で確認し、モノクローナル抗EPHA2抗体（SH348－1、SH357－1、Ab57－1、Ab65－1、Ab96－1、Ab100－1、Ab105－1、Ab106－13、Ab136－1、Ab148－1、Ab151－4、Ab230－1、Ab373－1、Ab382－1）を産生するハイブリドーマを樹立した。

[0212] 2）－6 モノクローナル抗体の癌細胞株に対する結合性の確認

2）－5で取得されたモノクローナル抗体がEPHA2を高発現する癌細胞に結合するかどうかを2）－4－3と同様のフローサイトメトリー法で検討した。トランスフェクションした293T細胞の代わりにヒト乳癌細胞株（MDA－MB－231）、ヒト肺癌細胞株（A549）、ヒト前立腺癌細胞株（PC－3）が用いられた。その結果、樹立したモノクローナル抗体はいずれもこれらの癌細胞株に結合することが確認された。

[0213] 2）－7 モノクローナル抗体のアイソタイプ決定

モノクローナル抗体のアイソタイプは、Mouse monoclonal isotyping kit（Serotec社製）により決定された。その結果、IgG1（Ab 57－1、Ab230－1）、IgG2a（SH348－1、SH357－1、Ab65－1、Ab96－1、Ab100－1、Ab136－1、Ab148－1、Ab151－4）、IgG2b（Ab105－1、Ab106－13、Ab373－1、Ab382－1）であった。

[0214] 2）－8 モノクローナル抗体の調製

モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ移植マウスの腹水またはハイブリドーマ培養

上清（以下「抗体精製原料」という。）から精製した。

[0215] マウス腹水は以下のように調製した。まず、7-8週齢のBALB／cAJcl－nu／nu（日本クレア）をプリスタン（Sigma社製）処理し、約3週間後に生理食塩水で洗浄したハイブリドーマをマウス1匹あたり1×10^{7}細胞で腹腔内に移植した。1-2週間後に腹腔内に貯留した腹水を採取し0．22μmのフィルターを通して滅菌し抗体精製原料として用いた。

[0216] ハイブリドーマ培養上清はCELLine（BD Biosciences社製）を使用し調製した。培地にClonaCell－HY Growth Medium E（StemCell Technologies社製 ＃03805）を用いる点以外はメーカーの指示書に従い培養した。回収された培養上清は0．45μmフィルターで濾過し、抗体精製原料として用いた。

[0217] 抗体はRecombinat Protein A rPA50（RepliGen社製）をホルミル－セルロファイン（生化学工業社製）に固定化したアフィニテイーカラム（以下「ホルミルセルロファインProtein A」と略す）もしくは Hitrap MabSelect SuRe（GE Healthcare Bio－Sciences社製）で精製された。ホルミルセルロファインProtein Aでは、抗体精製原料を結合バッファー（3M NaCl, 1．5M Glycine pH8．9）で3倍希釈したものをカラムに添加し、結合バッファーで洗浄後、0．1M クエン酸 pH4．0で溶出した。一方、Hitrap MabSelect SuReでは、抗体精製原料をカラムに添加しPBSで洗浄後、2M Arginine－HCl pH4．0で溶出した。溶出された抗体溶液は中和後、PBSにバッファー置換された。

[0218] 抗体の濃度はPOROS G 20μm Column, PEEK, 4．6mm×100mm, 1．7ml（Applied Biosystems）に結合させた抗体を溶出し、溶出液の吸光度（O．D．280nm）を測定することにより求めた。具体的には、平衡化バッファー（30．6mM リン酸2水素ナトリウム・12水、19．5mM リン酸1カリウム、0．15M NaCl、pH7．0）で平衡化したPOROS G 20μmにPBSで希釈した抗体サンプルを添加し、平衡化バッファーでカラムを洗浄後、カラムに結合した抗体を溶離液（0．1%（v／v） HCl、0．15M NaCl）で溶出した。溶出液の吸光度（O．D．280nm）のピーク面積を測定し、次式で濃度を算出した。

[0219] 抗体サンプル濃度（mg／ml）＝（抗体サンプルのピーク面積）／（標準品（ヒトIgG1

)のピーク面積)×標準品の濃度(mg／ml)×サンプルの希釈倍率

また、得られた抗体に含まれるエンドトキシン濃度をエンドスペシーES－50Mセット(生化学工業　#020150)とエンドトキシン標準品CSE－Lセット(生化学工業　#020055)を用いて測定し、1EU／mg以下であることを確認し以下の実験に使用した。

[0220] (実施例3)SH－348－1、SH357－1の性質

3)－1　抗EPHA2抗体によるEPHA2チロシン残基のリン酸化誘導活性及びEPHA2蛋白質量の低下を誘導する活性の検討

3)－1－1　抗体刺激細胞溶解液の調製

10%　FBS、50単位／mlペニシリン、50μg／mlストレプトマイシン含有RPMI1640(以下「10%　FBS含有RPMI1640(抗生物質入り)」と略す。)に懸濁したMDA－MB－231細胞を6×10^5細胞／ウェルになるよう6ウェルディッシュに播種し、37℃、5%　CO_2の条件下で一晩培養した。翌日、培地を捨てRPMI1640を添加し、37℃、5%　CO_2の条件下でさらに一晩培養した。その翌日、SH348－1、SH357－1、アイソタイプコントロール抗体としてMouse　IgG_{2A}　Isotype　Control(以下及び図中で「mIgG2a」と略す;R&D　Systems社製:#MAB003。)、EPHA2の可溶性リガンドとしてRecombinant　Mouse　Ephrin－A1／Fc　Chimera(以下及び図中で「Ephrin－A1／Fc」と略す;R&D　Systems社製:#602－A1－200。)、可溶性リガンドのコントロール蛋白質としてRecombinant　Human　IgG_1　Fc(以下及び図中で「hG_1Fc」と略す;R&D　Systems社製:#110－HG－100。)を図1、図2に示された濃度(SH348－1、SH357－1、mIgG2aは、図1Aでは10μg／ml又は50μg／ml、図2Aでは50μg／ml、Ephrin－A1／FcとhG_1Fcは、図1、図2で1μg／ml)になるようRPMI1640で希釈した溶液を、培地を捨てたMDA－MB－231細胞に添加し、37℃、5%　CO_2の条件下で指定の時間インキュベーションした。また、架橋抗体存在下の実験では、SH348－1、SH357－1、mIgG2aのそれぞれと架橋抗体としてGoat　anti－mouse　IgG,　Fcγ　fragment　specific(min　X　Hu,　Bov,　Hrs　Sr　Prot)(Jackson　ImmunoResearch　Laboratories社製　#115－005－071)をそれぞれ10μg／ml又は50μg／ml(図1B)

、50μg／ml（図2B）の濃度になるようRPMI1640中で混合した溶液を、培地を捨てたMDA－MB－231細胞に添加し、37℃、5％ CO_2 の条件下で指定の時間インキュベーションした。指定の時間になったところで上清を除去し、1mM PMSF（SIGMA社製）含有1×Cell Lysis Buffer（Cell Signaling technology社製）を加え細胞を溶解し、15000rpmで5分間遠心した細胞溶解液上清を免疫沈降、ウエスタンブロッティングのサンプルとして使用した。サンプルの蛋白質濃度はBCA Protein Assay Reagent（PIERCE社製）により測定した。

[0221] 3）－1－2 EPHA2チロシン残基のリン酸化誘導活性の検証

EPHA2を免疫沈降するため、まず1サンプル当たり25μlのProtein G magnetic beads懸濁液（NEW ENGLAND Bio－Labs社製）に8μgのanti－Eck／EphA2, clone D7（以下及び図中で「抗EPHA2抗体（D7）」と略す：Millipore（Upstate）社製 ＃05－480）を加え、4℃で2時間転倒混和した。

[0222] その後、終濃度で10％になるようFBSを加え、さらに4℃で30分間転倒混和した。ビーズを1mM PMSF含有1×Cell Lysis Bufferで3回洗浄したあと、3）－1－1で調製した細胞溶解液上清を200μg加え、4℃で一晩転倒混和した。翌日、ビーズを1mM PMSF含有1×Cell Lysis Bufferで3回洗浄した後、ビーズにSDS－sample buffer（56．3mM Tris－HCl pH6．8、1．8％（w／v） SDS、9％ glycerol、0．72M 2-メルカプトエタノール、0．045mg／ml ブロモフェノールブルー）を加えて98℃で5分間過熱し、ビーズから解離した蛋白質をSDS－PAGEで分離した。

[0223] ウエスタンブロッティングを行うため、分離後のゲルから蛋白質をポリビニリデンジフルオリド膜（以下「PVDF膜」と略す；ポアサイズ 0．45μm：Millipore社製）に転写した。転写後のPVDF膜をブロッキング液（ブロックエース粉末（大日本住友製薬（雪印乳業）社製）1袋を100mlの超純水に溶解後、Tween 20、アジ化ナトリウムをそれぞれ終濃度で0．1％（v／v）、0．02％（w／v）になるよう添加）中で振とうし、ブロッキングした。初めに、免疫沈降されたEPHA2を検出するため、ブロッキング後のPVDF膜をブロッキング液で0．25μg／mlに希釈した抗EPHA2抗体（D7）溶液に浸し、室温で1時間振とうした。PVDF膜をTBST（50mM Tris－HCl pH8．0、1

38mM NaCl、2．7mM KCl、0．1％(v／v) Tween 20)で10分間、3回洗浄した後、TBSTで3000倍に希釈したAnti－Mouse Ig, HRP－Linked Whole Ab Sheep(GE Healthcare Bio－Sciences社製)溶液に浸して室温で30分間振とうした。さらにPVDF膜をTBSTで10分間、3回洗浄した後、ECL Plus(GE Healthcare Bio－Sciences社製)を使用し化学発光用フィルムでシグナルを検出した。

[0224] 次に、このPVDF膜上から抗体を除去するため、PVDF膜をStrip液(50mM Tris－HCl pH6．8、2％(w／v) SDS、100mM 2-メルカプトエタノール)に浸して55℃で30分間振とうした後、Quench液(1％(v／v) H_2O_2、0．1％(w／v) NaN_3含有TBST)に浸して室温で20分間振とう処理を行い、さらにTBSTで10分間、3回洗浄した。EPHA2チロシン残基のリン酸化状態を検出するため、このPVDF膜をアジ化ナトリウム不含ブロッキング液(ブロックエース粉末1袋を100mlの超純水に溶解後、Tween 20を終濃度で0．1％(v／v)になるよう添加)中で振とうしてブロッキングした後、アジ化ナトリウム不含ブロッキング液で10000倍に希釈したAnti－Phosphotyrosine, recombinant 4G10 HRP－conjugate(図中で「4G10抗体」と略す;Millipore (Upsate)社製 ＃16－184)溶液に浸し室温で1時間振とうした。PVDF膜をTBSTで10分間、3回洗浄後、さらにH_2Oで5分間、3回洗浄し、ECL Plusを使用し化学発光用フィルムでシグナルを検出した。

[0225] その結果、可溶性リガンドであるEphrin－A1／Fcの添加によってインキュベーション後10分でEPHA2チロシン残基のリン酸化が検出されるのに対し、SH348－1、SH357－1では、10μg／ml、50μg／mlの濃度で10分後、30分後、60分後のいずれにおいてもリガンドのようなEPHA2チロシン残基のリン酸化を誘導する作用は認められなかった(図1A)。また、架橋抗体存在下においても同様にSH348－1、SH357－1にはリガンドのようなEPHA2チロシン残基のリン酸化を誘導する作用は認められなかった(図1B)。

[0226] 3)－1－3 EPHA2蛋白質量の低下を誘導する活性の検証

3)－1－1で調製した細胞溶解液上清10μgをSDS－PAGEで分離後、ゲル中の蛋白質をPVDF膜に転写し、抗EPHA2抗体(D7)とサンプル蛋白量のコントロール

としてMonoclonal Anti－β－Actin clone AC－15（以下及び図中では「抗β－actin抗体」と略す：SIGMA社製 ＃A－5441）でウエスタンブロッティングを行った。具体的には、転写したPVDF膜をブロッキング液中で振とうしてブロッキングした後、PVDF膜を分子量70kDa付近を中心に剃刀で切断した。70kDa以上のPVDF膜をブロッキング液で0．25μg／mlに希釈した抗EPHA2抗体（D7）溶液に、70kDa以下のPVDF膜をブロッキング液で1000倍希釈した抗β－actin抗体溶液に浸し室温で1時間振とうした。各PVDF膜をTBSTで10分間、3回洗浄後、TBSTで3000倍に希釈したAnti－Mouse Ig, HRP－Linked Whole Ab Sheep溶液に浸し室温で30分間振とうした。各PVDF膜をTBSTで10分間、3回洗浄した後、ECL Plusを使用してNightOWL LB983（Berthold Technologies社）で検出した。バンドのシグナル強度の定量はGel－Pro Analyzer Version 4．5 for Windows（登録商標；Media Cybernetics社）で行った。

[0227] その結果、可溶性リガンドであるEphrin－A1／Fcの添加によって顕著なEPHA2蛋白質の減少が観察された（図2A、B）。この効果と比較すると活性は弱いものの架橋抗体非存在下、存在下でともにSH348－1の添加によりEPHA2蛋白質の減少が観察された（図2A、B）。一方、SH357－1では、架橋抗体の有無にかかわらずEPHA2蛋白質の量にほとんど変化は観察されなかった（図2A、B）。

[0228] SH348－1添加24時間後におけるEPHA2蛋白質の量を解析するため、リガンド・抗体無添加サンプルで補正した3回の実験結果から「EPHA2バンドのシグナル強度／β－Actinバンドのシグナル強度」の平均値を算出したところ、架橋抗体非存在下ではmIgG2a添加24時間後の値を100％としたとき、SH348－1添加24時間後の値は70％であり、架橋抗体存在下ではmIgG2a添加24時間後の値を100％としたとき、SH348－1添加24時間後の値は69％であった。

[0229] 3）－2 ADCC活性

3）－2－1 エフェクター細胞の調製

ヌードマウスであるCAnN．Cg－Foxn1^{nu}／CrlCrlj（日本チャールス・リバー社）より無菌的に脾臓を採取した。採取した脾臓を2枚のスライドグラスでホモジナイズし、BD Pharm Lyse（BD Biosciences社製 ＃555899）を用いて溶血処理を行っ

た。得られた脾臓細胞をFetal Bovine Serum, Ultra－low IgG(Invitrogen社製)を10%含むフェノールレッド不含RPMI1640(Invitrogen社製)(以下「ADCC用培地」と略す。)に懸濁し、セルストレイナー(ポアサイズ40μm:BD Biosciences社製)を通した後、生細胞数をトリパンブルー色素排除試験にて計測した。脾臓細胞懸濁液を遠心後、培地を除去し、生細胞密度で1．5×10^7細胞／mlになるようADCC用培地で再懸濁しエフェクター細胞とした。

[0230] 3)－2－2 標的細胞の調製

MDA－MB－231、A549、PC－3細胞をトリプシン処理し、10% FBS含有RPMI1640で細胞を洗浄後、10% FBS含有RPMI1640に再懸濁し、各細胞4×10^6個を0．22μmフィルターで滅菌したChromium－51(5550kBq)と混合し、37℃、5% CO_2の条件下で1時間ラベルした。ラベルした細胞をADCC用培地で3回洗浄し、ADCC用培地で2×10^5細胞／mlになるよう再懸濁し標的細胞とした。

[0231] 3)－2－3 ^{51}Crリリースアッセイ

2×10^5細胞／mlの標的細胞を50μl／ウェルで96穴U底マイクロプレートに分注した。そこにエフェクター細胞添加後の終濃度で2．5μg／mlになるようADCC用培地で希釈したSH348－1、SH357－1、アイソタイプコントロール抗体(mIgG2a)を50μl添加し、4℃で1時間静置した。そこに1．5×10^7細胞／mlのエフェクター細胞を100μl添加し、37℃、5% CO_2の条件下で一晩培養した。翌日、上清をLumaPlate(PerkinElmer社製)に回収し、ガンマカウンターで放出されたガンマ線量を測定した。ADCC活性による細胞溶解率は次式で算出した。

[0232] 細胞溶解率(%)＝(A-B)／(C-B)×100

A:サンプルウェルのカウント

B:自然放出(抗体・エフェクター細胞非添加ウェル)カウントの平均値(n＝3)。抗体添加時とエフェクター細胞添加時にそれぞれADCC用培地を50μl、100μl添加した。それ以外はサンプルウェルと同様の操作を行った。

[0233] C:最大放出(標的細胞を界面活性剤で溶解させたウェル)カウントの平均値(n＝3)。抗体添加時にADCC用培地を50μl、エフェクター細胞添加時にTriton－X100を2%(v／v)含むADCC用培地を100μlを添加した。それ以外はサンプルウェル

と同様の操作を行った。

[0234] 図3は、3回の実験の平均値で、エラーバーは、標準偏差を示し、P値はStudent's t－testにより算出した。その結果、SH348－1は、MDA－MB－231細胞(図3A)、A549細胞(図3B)、PC－3細胞(図3C)に対しそれぞれ8．2%、9．1%、4．7%の細胞溶解活性を示し、SH357－1は、MDA－MB－231細胞(図3A)、A549細胞(図3B)、PC－3細胞(図3C)に対しそれぞれ8．8%、13．0%、9．0%の細胞溶解活性を示したことから、いずれの抗体もMDA－MB－231細胞、A549細胞、PC－3細胞に対しADCC活性を有することが示された。

[0235] 3)－3 CDC活性

10% FBS含有RPMI1640(抗生物質入り)に懸濁したMDA－MB－231、A549、PC－3細胞を96穴マイクロプレートに各5000細胞／ウェルで播種し、37℃、5% CO_2の条件下で一晩培養した。翌日、補体添加後の終濃度で25μg／mlになるように10% FBS含有RPMI1640(抗生物質入り)で希釈したSH348－1、SH357－1、アイソタイプコントロール抗体(mIgG2a)を添加し、4℃で1時間静置した。そこにRPMI1640で30%に希釈したウサギ補体(CEDARLANE社製 ＃CL3051)を終濃度で5%になるよう添加し37℃、5% CO_2の条件下で1時間インキュベートし、さらに室温で30分間静置した。細胞生存率を測定するため、培養液と等量のCell Titer－Glo Luminescent Cell Viability Assay(Promega社製)を添加し、室温で10分間攪拌した後、プレートリーダーで発光量を計測した。細胞生存率は次式で算出した。

[0236] 細胞生存率(%)＝(a－b)／(c－b)×100

a:サンプルウェルの発光量

b:バックグラウンド(細胞・抗体非添加ウェル)発光量の平均値(n＝8)。細胞播種時に細胞懸濁液の代わりに等量の10% FBS含有RPMI1640(抗生物質入り)を添加し、抗体添加時に抗体希釈液と等量の10% FBS含有RPMI1640(抗生物質入り)を添加した。それ以外はサンプルウェルと同様の操作を行った。

[0237] c:抗体非添加ウェルの発光量の平均値(n＝3)。抗体添加時に抗体希釈液と等量の10% FBS含有RPMI1640(抗生物質入り)を添加した。それ以外はサンプルウ

ェルと同様の操作を行った。

[0238] 図4は、3回の実験の平均値で、エラーバーは、標準偏差を示し、P値はStudent's t－testにより算出した。その結果、SH348－1は、補体存在下でMDA－MB－231細胞（図4A）、A549細胞（図4B）、PC－3細胞（図4C）に対しそれぞれ44％、31％、41％の細胞生存率の低下を誘導し、SH357－1も補体存在下でMDA－MB－231細胞（図4D）、A549細胞（図4E）、PC－3細胞（図4F）に対しそれぞれ65％、60％、65％の細胞生存率の低下を誘導したことから、いずれの抗体もMDA－MB－231細胞、A549細胞、PC－3細胞に対しCDC活性を有することが示された。

[0239] 3）－4 エピトープ決定

3）－4－1 EPHA2部分ポリペプチド（rFnIII－NC、rFnIII－N、rFnIII－C）の作製

1）－1－3で作製した発現プラスミドで大腸菌BL21および大腸菌Origami（DE3）（Novagen社製）を形質転換し、50μg／mlのアンピシリン（Sigma社製）を添加したLB培地で培養を行い、BL21はAutoinduction System（Novagen社製）、Origami（DE3）は0．5mM IPTG添加でEPHA2部分ポリペプチドの発現誘導を行った。6000rpm、20分間遠心して集菌し、破砕バッファー（50mM Tris HCl pH7．5、150mM NaCl、0．1％（v／v） Triton－X100、10％（v／v） Glycerol）に懸濁した後、氷上で超音波破砕を行った。14000rpm、15分間遠心して、上清を回収し、Ni－NTA（Invitrogen社製） 0．5mlに供与した。洗浄バッファー（50mM Tris－HCl pH7．5、150mM NaCl、50mM Imidazole、10％（v／v） Glycerol）で洗浄した後に、溶出バッファー（50mM Tris－HCl pH7．5、150mM NaCl、400mM Imidazole、10％（v／v） Glycerol）にて溶出した。溶出サンプルは、PBSを溶媒としたゲル濾過カラムクロマトグラフィー（Superdex 75 10／300：GE Healthcare Bio－Sciences社製）でさらに精製された。得られた組換え蛋白質の濃度はProtein Assay（Bio－Rad社製）で測定した。

[0240] 3）－4－2 EPHB2細胞外領域ポリペプチド（rEPHB2－ECD）の調製

EPHB2－ECDを発現させるため、FreeStyle 293－F細胞に293fectinを用い

てpcDNA3．1－EphA2－ECDをトランスフェクションし、37℃、8％ CO_2で72時間培養した。培養後、遠心分離により培養液を回収し、rEPHB2－EDC精製の原料とした。得られた培養上清を分子量分画15000の透析チューブを用いて20mM Tris－HCl pH7．5に対して透析し、フィルター濾過（0．45μm，PES）した後、20mM Tris－HCl pH7．5で平衡化されたHiPrep 16／10 Q XLに添加した。溶出はNaClの直線濃度勾配（20mM Tris－HCl pH7．5、0－1M NaCl）で行った。溶出画分の一部をSDS－PAGEで分離後、ゲルをCBB染色し、rEPHB2－ECDの含まれる画分を確認した。次にrEPHB2－ECDを含む画分を集め、PBSで平衡化されたHiLoad 26／60 Superdex 200pgに添加した。PBSで溶出し、溶出分画の一部をSDS－PAGEにより分離後、ゲルをCBB染色し、rEPHB2－ECDの含まれる画分を確認した。rEPHB2－ECDを含む画分を集め、エピトープ決定時の抗原として使用した。蛋白質濃度はBCA Protein Assay Reagentにより決定した。

[0241] 3）－4－3 ELISA法による抗原結合部位の決定

rEPHA2－ECD、rFnIII－NC、rFnIII－N、rFnIII－Cとコントロール蛋白質のrEPHB2－ECDをPBSで1μg／mlに希釈し、イムノプレート（Nunc社製 ＃442404）にそれぞれ100μl／ウェルで分注し、4℃で一晩静置することでプレートに蛋白質を吸着させた。翌日、ウェル中の液を除去し、ブロックエース溶液（ブロックエース粉末1袋を100mlの超純水で溶解）をPBSで4倍希釈した溶液を200μl／ウェルで分注し、室温で1時間静置した。ウェル中の液を除去後、SH348－1、SH357－1、アイソタイプコントロール抗体（mIgG2a）を希釈緩衝液（PBS、0．05％（v／v） Tween 20）で5μg／mlに希釈したものを50μl／ウェルで添加した。室温で1時間静置後、ウェル中の液を除去し、希釈緩衝液で2回ウェルを洗浄した。希釈緩衝液で3000倍に希釈したGoat anti－Mouse IgG，Peroxidase Conjugatedを50μl／ウェルで添加し、室温で1時間静置した。ウェル中の液を除去し、希釈緩衝液で2回ウェルを洗浄した後、OPD発色液を100μl／ウェルで添加し攪拌しながら発色反応を行った。発色後、1M HClを100μl／ウェルで添加して発色反応を止め、プレートリーダーで490nmの吸光度を測定した。

[0242] EPHA2のドメイン構造予測(NCBI CDD version 2.11、CBS TMHMM Server v. 2.0)およびEPHA2－ECD、FnIII－NC、FnIII－N、FnIII－CのEPHA2中での位置を図5Aに示す。Ligand－BDはリガンド結合ドメイン、FN3はフィブロネクチンタイプ3ドメイン、TMは膜貫通領域、Trk kinaseはチロシンキナーゼドメイン、SAMはSAMドメインを示す。

[0243] EPHA2細胞外領域(EPHA2－ECD)、2つのフィブロネクチンタイプ3ドメインを含む領域(FnIII－NC)、N末端側のフィブロネクチンタイプ3ドメインを含む領域(FnIII－N)、C末端側のフィブロネクチンタイプ3ドメインを含む領域(FnIII－C)の組換え蛋白質を作製し、SH348－1、SH357－1の結合性を検討したところ、SH348－1、SH357－1は、rEPHA2－ECD、rFnIII－NC、rFnIII－Cに結合性を示した(図5B)。したがってSH348－1、SH357－1はC末端側のフィブロネクチンタイプ3ドメインを含む426番目～534番目のアミノ酸(配列表の配列番号8のアミノ酸番号426乃至534に示されるアミノ酸配列)の領域に結合することが示された。

[0244] (実施例4)In vivo抗腫瘍効果

MDA－MB－231細胞をトリプシン処理して培養フラスコより剥がした後、10% FBS含有RPMI1640(抗生物質入り)に懸濁後遠心し、上清を除去した。細胞を同培地で2回洗浄したあと、BDマトリゲル基底膜マトリックス(BD Biosciences社製)に懸濁し、6週齢のBALB／cAJcl－nu／nu((日本クレア社)に5×10^{6}細胞／マウスで背部皮下に移植した。移植日を0日目として9、16、23、30日目にSH348－1、SH357－1を500μg／マウスで腹腔内投与した。コントロールには抗体と同体積(500μl)のPBSを腹腔内投与した。腫瘍体積を9、13、16、20、23、28、30、34、37日目に測定し、抗体投与による抗腫瘍効果を検討した。その結果、SH348－1、SH357－1投与群ではPBS投与群に比べ、有意に腫瘍増殖が抑制された(37日目時点の腫瘍体積についてPBS投与群との比較でSH348－1、SH357－1のP値は共にP＜0.001であった。P値はStudent's t－testにより算出)。また、37日目時点での腫瘍増殖阻害率(＝100-(抗体投与群の腫瘍体積の平均値)／(PBS投与群の腫瘍体積の平均値)×100)はSH348－1で89.5%、SH357－1で84.1%であり、In vivoで非常に強い抗腫瘍効果が観察された(図6A、B)。

[0245] MDA－MB－231細胞移植マウスで抗腫瘍効果を検討した14のモノクローナル抗EPHA2抗体の内、効果を示したのはFnIII－Cに結合するSH348－1、SH357－1のみであった(表1)。

[0246] [表1]

抗体	抗原への結合性				腫瘍増殖抑制効果 (in vivo)
	rEPHA2-ECD	rFnIII-NC	rFnIII-N	rFnIII-C	
SH348-1	+	+	-	+	+
SH357-1	+	+	-	+	+
Ab 57-1	+	+	+	-	-
Ab 65-1	+	-	-	-	-
Ab 96-1	+	-	-	-	-
Ab 100-1	+	-	-	-	-
Ab 105-1	+	-	-	-	-
Ab 106-13	+	-	-	-	-
Ab 136-1	+	-	-	-	-
Ab 148-1	+	-	-	-	-
Ab 151-4	+	-	-	-	-
Ab230-1	+	+	+	-	-
Ab 373-1	+	-	-	-	-
Ab 382-1	+	-	-	-	-

以上の結果より、SH348－1、SH357－1が従来報告のないエピトープ(配列表の配列番号8のアミノ酸番号426乃至534に示されるアミノ酸配列)を認識し抗腫瘍効果を示す抗体であることが明らかとなった。またSH348－1、SH357－1の結合領域がEPHA2を標的とした抗腫瘍モノクローナル抗体の有望な標的となることが示された。

[0247] (実施例5)SH348－1, SH357－1の抗体遺伝子の同定

マウス抗ヒトEPHA2抗体であるSH348－1、SH357－1の重鎖および軽鎖のN末端アミノ酸配列を決定するために、2)－8で精製したSH348－1、SH357－1を含む溶液の一部をSDS－PAGEで分離した。分離後のゲルからPVDF膜(ポアサイズ 0．45μm;Invitrogen社製)にゲル中の蛋白質を転写し、洗浄バッファー(25mM NaCl、10mM ホウ酸ナトリウムバッファー pH8．0)で洗浄した後、染色液(50

％ メタノール、20％ 酢酸、0．05％ クマシーブリリアントブルー）に5分間浸して染色してから、90％ メタノールで脱色した。PVDF膜上で可視化された重鎖（移動度が小さい方のバンド）および軽鎖（移動度が大きい方のバンド）に相当するバンド部分を切りとり、Procise（登録商標） cLC プロテインシーケンサー Model 492cLC （Applied Biosystems）を用いて、自動エドマン法（Edman, P., et al. (1967) Eur. J. Biochem. 1, 80参照）によりそれぞれのN末端アミノ酸配列の同定を試みた。SH－348－1の重鎖については、上述の方法ではアミノ酸配列が同定できなかったため、Pfu Pyroglutamate Aminopeptidase（TAKARA社製）を用いてN末端ピログルタミン酸を除去後に同様の操作を行いN末端から2番目以降のアミノ酸配列を同定した。

[0248] その結果、SH348－1の重鎖に相当するバンドのN末端から2番目以降のアミノ酸配列は、

I－Q－L－V－Q－S－G－P（配列表の配列番号26）であり、軽鎖に相当するバンドのN末端アミノ酸配列は、

D－V－L－M－T－Q－S－P－L－S－L（配列表の配列番号27）

であり、SH357－1の重鎖に相当するバンドのN末端アミノ酸配列は、

Q－I－Q－L－V－Q－S－G－P（配列表の配列番号28）

であり、軽鎖に相当するバンドのN末端アミノ酸配列は、

D－V－L－M－T－Q－T－P－L－S－L－P－V－S－L－G－D－Q－A（配列表の配列番号29）であった。これらのアミノ酸配列を、カバトらにより作成された抗体のアミノ酸配列データベース（Kabat, E. A. et al., (1991) in Sequences of Proteins of Immunological Interest Vol. I及びII, U. S. Department of Health and Human Services参照）と比較したところ、SH348－1の重鎖（γ2a鎖）のサブタイプはmiscellaneousであり、軽鎖のサブタイプはkappa light IIであった。また、SH357－1の重鎖（γ2a鎖）のサブタイプはmiscellaneousであり、軽鎖のサブタイプはkappa light IIであることが判明した。

[0249] そこでこれらのマウスサブタイプに属する抗体遺伝子翻訳領域の5’末端側と終止コドンを含む3’末端部分にそれぞれハイブリダイズする下記のオリゴヌクレオチドプラ

イマーを合成した(前出カバトらの文献、Matti Kartinen et al. (1988) 25, 859－865およびHeinrich, G. et al. (1984) J. Exp. Med. 159, p. 417－435参照):

5'－cagatccagttggtgcagtctggacct－3'(DB3F1:配列表の配列番号30)

5'－aagatatctcatttacccggagtccgggagaa－3'(MIG2AEVR1:配列表の配列番号31)

5'－aagaattcatgaagttgcctgttagg－3'(MK19EIF1:配列表の配列番号32)

5'－aagatatcttaacactcattcctgttgaagct－3'(KEVR1:配列表の配列番号33)

SH348－1, SH357－1の重鎖及び軽鎖をコードするcDNAをクローニングするため、SH348－1、SH357－1産生ハイブリドーマよりQuick Prep mRNA Purification Kit(GE Healthcare Bio－Sciences社製 ＃27－9254－01)を用いてmRNAを調製した。このようにして得られたそれぞれのmRNAからTaKaRa One Step RNA PCR Kit(AMV)(タカラバイオ社製 ＃RR024A)と重鎖用プライマーセット(DB3F1及びMIG2AEVR1の組み合わせ)または軽鎖用プライマーセット(MK19EIF1及びKEVR1の組み合わせ)を用いて各抗体の重鎖、軽鎖をコードするcDNAを増幅した。これらPCRで増幅されたcDNAをZero Blunt TOPO PCR Cloning Kit(Invitrogen社製)を用いてクローニングし、クローニングされた重鎖、軽鎖の各ヌクレオチド配列を遺伝子配列解析装置(「ABI PRISM 3700 DNA Analyzer;Applied Biosystems」あるいは「Applied Biosystems 3730xl Analyzer;Applied Biosystems」)を用いて決定した。シーケンスの反応は、GeneAmp 9700(Applied Biosystems)を用いた。

[0250] 決定されたSH348－1の重鎖をコードするcDNAのヌクレオチド配列を配列表の配列番号34に示し、アミノ酸配列を配列番号35に示した。SH348－1の軽鎖をコードするcDNAのヌクレオチド配列を配列表の配列番号36に示し、アミノ酸配列を配列表の配列番号37に示した。SH357－1の重鎖をコードするcDNAのヌクレオチド配列を配列表の配列番号38に示し、アミノ酸配列を配列番号39に示した。SH357－1の軽鎖をコードするcDNAのヌクレオチド配列を配列表の配列番号40に示し、アミノ酸配列を配列番号41に示した。配列番号34のヌクレオチド番号1～27及び1327

～1350の配列、配列番号36のヌクレオチド番号637～660の配列、配列番号38のヌクレオチド番号1～27及び1327～1350の配列、配列番号40のヌクレオチド番号637～660の配列はプライマー部分の配列である。

[0251] また、各重鎖および軽鎖のアミノ酸配列を、カバトらによる抗体のアミノ酸配列のデータベース(Kabat, E. A., et al. (1991) in "Sequence of Proteins of Immunological Interest Vol. I及びII":U. S. Department of Health and HumanServices参照)と比較検討した結果、SH348－1の重鎖については、配列表の配列番号35のアミノ酸番号1乃至119に示されるアミノ酸配列が可変領域であり、アミノ酸番号120乃至449に示されるアミノ酸配列が定常領域であることが明らかになった。またSH348－1の軽鎖については、配列表の配列番号37のアミノ酸番号1乃至112に示されるアミノ酸配列が可変領域であり、アミノ酸番号113乃至219に示されるアミノ酸配列が定常領域であることが明らかとなった。

[0252] SH357－1の重鎖については、配列表の配列番号39のアミノ酸番号1乃至119に示されるアミノ酸配列が可変領域であり、アミノ酸番号120乃至449に示されるアミノ酸配列が定常領域であることが明らかになった。またSH357－1の軽鎖については、配列表の配列番号41のアミノ酸番号1乃至112に示されるアミノ酸配列が可変領域であり、アミノ酸番号113乃至219に示されるアミノ酸配列が定常領域であることが明らかとなった。

[0253] SH348－1の重鎖可変領域のヌクレオチド配列を配列表の配列番号42に、アミノ酸配列を配列番号43に、重鎖定常領域のヌクレオチド配列を配列番号44に、アミノ酸配列を配列番号45に示した。SH348－1の軽鎖可変領域のヌクレオチド配列を配列表の配列番号46に、アミノ酸配列を配列番号47に、軽鎖定常領域のヌクレオチド配列を配列番号48に、アミノ酸配列を配列番号49に示した。配列番号42のヌクレオチド番号1～27の配列、配列番号44のヌクレオチド番号970～993の配列、配列番号48のヌクレオチド番号301～324の配列はプライマー部分の配列である。

[0254] またSH357－1の重鎖可変領域のヌクレオチド配列を配列表の配列番号50に、アミノ酸配列を配列番号51に、重鎖定常領域のヌクレオチド配列を配列番号52に、アミノ酸配列を配列番号53に示した。SH357－1の軽鎖可変領域のヌクレオチド配列

を配列番号54に、アミノ酸配列を配列番号55に、軽鎖定常領域のヌクレオチド配列を配列番号56に、アミノ酸配列を配列番号57に示した。配列番号50のヌクレオチド番号1～27の配列、配列番号52のヌクレオチド番号970～993の配列、配列番号56のヌクレオチド番号301～324の配列はプライマー部分の配列である。

[0255] さらに、重鎖および軽鎖の可変領域のアミノ酸配列における、それぞれのCDRの位置および配列は、カバトらの文献（前記Kabat, E. A., et al. (1991)参照。）による抗体のアミノ酸配列のデータベースとの相同性を比較検討することによって決定された。該文献によれば、異なる抗体間でもサブタイプが同じであれば可変領域中のフレームワーク領域の鎖長はほぼ一定であり、またそのアミノ酸配列には共通性が認められる。一方、CDRは、それらのフレームワーク領域にはさまれて存在する固有の配列である。そこで、重鎖および軽鎖のアミノ酸配列を同じサブタイプのものと比較検討した結果、SH348－1の重鎖のCDRは、配列表の配列番号35のアミノ酸番号26～35（$CDRH_1$）、同アミノ酸番号50～66（$CDRH_2$）および同アミノ酸番号99～108（$CDRH_3$）で示されるアミノ酸配列と決定された。SH348－1の軽鎖のCDRは、配列表の配列番号37のアミノ酸番号24～39（$CDRL_1$）、同アミノ酸番号55～61（$CDRL_2$）および同アミノ酸番号94～102（$CDRL_3$）で示されるアミノ酸配列と決定された。SH357－1重鎖のCDRは、配列表の配列番号39のアミノ酸番号26～35（$CDRH_1$）、同アミノ酸番号50～66（$CDRH_2$）および同アミノ酸番号99～108（$CDRH_3$）で示されるアミノ酸配列と決定された。SH357－1の軽鎖CDRは、配列表の配列番号41のアミノ酸番号24～39（$CDRL_1$）、同アミノ酸番号55～61（$CDRL_2$）および同アミノ酸番号94～102（$CDRL_3$）で示されるアミノ酸配列と決定された。

[0256] SH348－1の$CDRH_1$のヌクレオチド配列を配列表の配列番号58に、アミノ酸配列を配列番号59に、$CDRH_2$のヌクレオチド配列を配列番号60に、アミノ酸配列を配列番号61に、$CDRH_3$のヌクレオチド配列を配列番号62に、アミノ酸配列を配列番号63に、$CDRL_1$のヌクレオチド配列を配列番号64に、アミノ酸配列を配列番号65に、$CDRL_2$のヌクレオチド配列を配列番号66に、アミノ酸配列を配列番号67に、$CDRL_3$のヌクレオチド配列を配列番号68に、アミノ酸配列を配列番号69に示した。また、SH357－1の$CDRH_1$のヌクレオチド配列を配列番号70に、アミノ酸配列を配列

番号71に、$CDRH_2$のヌクレオチド配列を配列番号72に、アミノ酸配列を配列番号73に、$CDRH_3$のヌクレオチド配列を配列番号74に、アミノ酸配列を配列番号75に、$CDRL_1$のヌクレオチド配列を配列番号76に、アミノ酸配列を配列番号77に、$CDRL_2$のヌクレオチド配列を配列番号78に、アミノ酸配列を配列番号79に、$CDRL_3$のヌクレオチド配列を配列番号80に、アミノ酸配列を配列番号81に示した。

[0257] （実施例6）抗EPHA2抗体のEPHA2細胞外領域に対する結合性

EPHA2細胞外領域ポリペプチド（R&D Systems社製。＃3035－A2－100）又はコントロールとしてとしてBovine Serum Albmin（以下、本文及び図中で「BSA」と略す。）をPBSで1μg／mlに希釈した溶液を、イムノプレート（Nunc社製 ＃442404）に100μl／ウェルで分注し、4℃で一晩静置することでプレートに吸着させた。

[0258] 翌日、ウェル中の液を除去し、ブロックエース溶液（ブロックエース粉末（大日本住友製薬（雪印乳業）社製）1袋を100mlの超純水で溶解）をPBSで4倍希釈した溶液を200μl／ウェルで分注し、室温で1時間静置した。ウェルを希釈緩衝液（PBS、0.05％（v／v） Tween 20）で2回洗浄後、SH348－1、SH357－1、Ab96－1をそれぞれ1.25×10^{-4}μg／ml、1.25×10^{-3}μg／ml、1.25×10^{-2}μg／ml、1.25×10^{-1}μg／ml、1.25μg／ml、12.5μg／ml、125μg／mlの濃度になるようPBSで希釈した溶液（最終濃度で0.05％（v／v）のTween 20含有）を100μl／ウェルで添加した。

[0259] 室温で1時間静置後、ウェル中の液を除去し、希釈緩衝液で2回ウェルを洗浄した。希釈緩衝液で1000倍に希釈したGoat anti－Mouse IgG, Peroxidase Conjugated（Millipore（Chemicon）社製 ＃AP181P）を100μl／ウェルで添加し、室温で1時間静置した。ウェル中の液を除去し、希釈緩衝液で2回ウェルを洗浄した後、OPD発色液を100μl／ウェルで添加し攪拌しながら発色反応を行った。発色後、1M HClを100μl／ウェルで添加して発色反応を止め、プレートリーダーで490nmの吸光度を測定した（図7）。

[0260] 図7A）はSH348－1、図7B）はSH357－1、図7C）はAb96－1の結果を示す。各グラフ中の吸光度は平均値±標準偏差（n＝3）で示し、吸光度が強いほど、結合

活性が強いことを示している。グラフに示されるように、SH348－1、SH357－1、Ab96－1はいずれもBSAに対する結合性を示さずに、EPHA2細胞外領域に特異的に結合することが確認された。

[0261] （実施例7）抗EPHA2抗体のリガンド結合に対する影響

実施例6に記載の方法に準じてEPHA2細胞外領域ポリペプチド（R&D Systems社製：＃3035－A2－100）が固定されたイムノプレートを作製した。イムノプレートのウェルを希釈緩衝液で2回洗浄した後、SH348－1、SH357－1、Ab96－1、アイソタイプコントロール抗体としてMouse IgG_{2A} Isotype Control（以下及び図中で「mIgG2a」と略す；R&D Systems社製：＃MAB003）を希釈緩衝液で10μg／ml、50μg／mlに希釈したものをそれぞれ100μl／ウェルで添加した。室温で1時間静置後、終濃度で1μg／mlになるよう、可溶性リガンドであるRecombinant Mouse Ephrin－A1／Fc Chimera（以下及び図中で「Ephrin－A1／Fc」と略す；R&D Systems社製：＃602－A1－200。）又は可溶性リガンドに対する陰性コントロール蛋白質としてRecombinant Human IgG_1 Fc（以下及び図中で「hG_1Fc」と略す；R&D Systems社製：＃110－HG－100）を添加し室温で1時間静置した。

[0262] 次に実施例6に記載の方法に準じてウェル中の液を除去し、希釈緩衝液で洗浄し、Peroxidase AffiniPure Goat Anti－Human IgG Fcγ Fragment Specific（Jackson ImmunoResearch社製 ＃109－035－098）を添加し、OPD発色液による発色反応を行い、プレートリーダーで490nmの吸光度を測定した（図8）。

[0263] 図8中の吸光度は平均値±標準偏差（n＝3）で示した。Ab96－1は10μg／mlの濃度でもEPHA2のリガンドであるEphrin－A1のEPHA2に対する結合を強く阻害したのに対し、SH348－1及びSH357－1は、Ab96－1の5倍の濃度である50μg／mlで添加した場合でもEphrin－A1／FcのEPHA2に対する結合を阻害しなかった。以上の結果から、SH348－1及びSH357－1はEphrin－A1／FcのEPHA2に対する結合を阻害しないことが確認された。

[0264] （実施例8）抗EPHA2抗体のEphrin－A1依存的EPHA2チロシン残基リン酸化抑制活性の検証

8)－1 細胞溶解液の調製

10% FBS、50単位／mlペニシリン、50μg／mlストレプトマイシン含有RPMI1640(以下、「10% FBS含有RPMI1640(抗生物質入り)」と略す。)に懸濁したMDA－MB－231細胞を2.5×10^5細胞／ウェルになるよう12ウェルディッシュに播種し、37℃、5% CO_2の条件下で一晩培養した。次にウェル中の培地を捨て、新たにRPMI1640を添加し、37℃、5% CO_2の条件下でさらに一晩培養した。次にウェル中の培地を除去し、各ウェルにRPMI1640のみ、または10μg/ml又は50μg/mlの濃度の抗体(mIgG2a、SH348－1又はSH357－1)を含むRPMI1640を各ウェルに添加し、37℃、5% CO_2の条件下で1時間プレインキュベーションした。

[0265] プレインキュベーション後、RPMI1640のみを添加したウェルには50分の1容量のEphrin－A1／Fc、hG_1Fc(それぞれ最終濃度で1μg/ml)又はこれらと同体積のRPMI1640(図9で(－)と表記)を添加した。またmIgG2a、SH348－1又はSH357－1を添加したウェルには、50分の1容量のEphrin－A1／Fc(最終濃度で1μg/ml)を添加した。

[0266] ディッシュを37℃、5% CO_2の条件下でさらに15分間インキュベーションし、上清を除去した後、1mM PMSF(SIGMA社製)とプロテアーゼインヒビターカクテル(SIGMA社製 #P8340)を含有する1×Cell Lysis Buffer(Cell Signaling technology社製)(以下、PPCLBと略す)を加え細胞を溶解した。溶解液を15000rpmで5分間遠心し、得られた上清を免疫沈降のサンプルとした。サンプルの蛋白質濃度はBCA Protein Assay Reagent(PIERCE社製)により測定した。

[0267] 8)－2 免疫沈降によるEPHA2リン酸化状態の検出

1サンプル当たり、25μlのProtein G magnetic beads懸濁液(NEW ENGLAND Bio－Labs社製)及び4μgのanti－EphA2 Antibody(Santa Cruz Biotechnology社製 #sc－924)を加え、4℃で2時間転倒混和した。次に、終濃度で10%になるようFBSを加え、さらに4℃で30分間転倒混和した。次にビーズ(beads)をPPCLBで洗浄し、8)－1で調製した細胞溶解液上清を200μg加え、4℃で一晩転倒混和した。

[0268] 翌日、ビーズをPPCLBで3回洗浄した後、ビーズにSDS－sample buffer(56.

3mM Tris－HCl pH6．8、1．8％(w／v) SDS、9％ glycerol、0．72M 2-メルカプトエタノール、0．045mg／ml ブロモフェノールブルー)を加えて98℃で5分間過熱し、ビーズから解離した蛋白質をSDS－PAGEで分離した。

[0269] 分離後のゲルから蛋白質をPVDF膜(ポアサイズ 0．45μm:Millipore社製)に転写し、PVDF膜をアジ化ナトリウム不含ブロッキング液(ブロックエース粉末1袋を100mlの超純水に溶解後、Tween 20を最終濃度で0．1％(v／v)添加)中で振とうしてブロッキングした。

[0270] EPHA2チロシン残基のリン酸化状態を検出するため、Anti－Phosphotyrosine, recombinant 4G10 HRP－conjugate(Upstate社製 ＃16－184)をアジ化ナトリウム不含ブロッキング液で10000倍に希釈した溶液にPVDF膜を浸し、室温で1時間反応させた。PVDF膜をTBST(50mM Tris－HCl pH8．0、138mM NaCl、2．7mM KCl、0．1％(v／v) Tween 20)で10分間、3回洗浄後、さらにH_2Oで5分間、3回洗浄し、ECL Plus(GE Healthcare Bio－Sciences社製)を使用し化学発光用フィルム上にシグナルを検出した。

[0271] 次に、このPVDF膜上に存在する免疫沈降されたEPHA2を検出するため、EPHA2チロシン残基のリン酸化状態を検出した後のPVDF膜をStrip液(50mM Tris－HCl pH6．8、2％(w／v) SDS、100mM 2-メルカプトエタノール)に浸して55℃で30分間振とうした後、Quench液(1％(v／v) H_2O_2、0．1％(w／v) NaN_3含有TBST)に浸して室温で20分間振とうし、PVDF膜上の抗体を除去した。TBSTで10分間、3回洗浄し、ブロッキング液(ブロックエース粉末1袋を100mlの超純水に溶解後、Tween 20、アジ化ナトリウムをそれぞれ終濃度で0．1％(v／v)、0．02％(w／v)になるよう添加)中でブロッキングした後、anti－EphA2 Antibody(Santa Cruz Biotechnology社製 ＃sc－924)をブロッキング溶液で4000倍に希釈した溶液にPVDF膜を浸し、室温で1時間反応させた。PVDF膜をTBSTで10分間、3回洗浄した後、Anti－rabbit IgG, HRP－linked Antibody(Cell Signaling Technology社製 ＃7074)をTBSTで10000倍に希釈した溶液に浸して室温で30分間反応させた。その後このPVDF膜をTBSTで10分間、3回洗浄した後、ECL Plusを使用し化学発光用フィルム上にシグナルを検出した。

[0272] 可溶性リガンドであるEphrin－A1／Fcにより誘導されるEPHA2チロシン残基のリン酸化は、アイソタイプコントロール抗体であるmIgG2aでは阻害されないのに対し、SH348－1、SH357－1の添加により用量依存的に抑制されていた(図9)。

[0273] 以上の結果より、SH348－1、SH357－1は、リガンドであるEphrin－A1のEPHA2に対する結合を阻害するのではなく、リガンドにより誘導されるEPHA2チロシン残基のリン酸化を抑制することが示された。

[0274] (実施例9)抗EPHA2抗体のエピトープ同定

図10に示される領域からなるEPHA2の欠損変異体を作製し、SH348－1、SH357－1結合領域を決定した。

[0275] 9)－1 EPHA2欠損変異体の作製

EPHA2欠損変異体をN末端にGST－TagとHis－Tag、C末端にS－Tagを付加した形で蛋白質を発現させるため、下記のプライマーを合成し、以下の方法で増幅した遺伝子断片をpET－49b(＋)(Novagen社製)にクローニングした。

5'－attaggatccgagcttccgtactgccagtgtc－3'(プライマーN1:配列番号82)

5'－attaggatccgccccccaaggtgaggct－3'(プライマーN2:配列番号83)

5'－attaggatccggtcacttaccgcaagaagggaga－3'(プライマーN3:配列番号84)

5'－attaggatccggtccaggtgcaggcactgacg－3'(プライマーN4:配列番号85)

5'－aattaagcttgccgccaatcaccgccaagtt－3'(プライマーC1:配列番号86)

5'－aattaagcttgttgccagatccctccggggac－3'(プライマーC2:配列番号87)

5'－aattaagcttcaggtaggtggtgtctggg－3'(プライマーC3:配列番号88)

5'－aattaagcttctcgtacttccacactcggc－3'(プライマーC4:配列番号89)

配列表の配列番号8の、アミノ酸番号426乃至540に示されるアミノ酸配列からなる領域(以下、「m1」という。)をプライマーN1とC1を用いて、アミノ酸番号426乃至534に示されるアミノ酸配列からなる領域(以下、「m2」という。)をプライマーN1とC2を用いて、アミノ酸番号426乃至504に示されるアミノ酸配列からなる領域(以下、「m3」という。)をプライマーN1とC3を用いて、アミノ酸番号426乃至470に示されるアミノ酸配列からなる領域(以下、「m4」という。)をプライマーN1とC4を用いて、アミノ酸番号439乃至534に示されるアミノ酸配列からなる領域(以下、「m5」という。)をプライ

マーN2とC2を用いて、アミノ酸番号471乃至534に示されるアミノ酸配列からなる領域(以下、「m6」という。)をプライマーN3とC2を用いて、アミノ酸番号505乃至534に示されるアミノ酸配列からなる領域(以下、「m7」という。)をプライマーN4とC2を用いて、アミノ酸番号439乃至504に示されるアミノ酸配列からなる領域(以下、「m8」という。)をプライマーN2とC3を用いて、アミノ酸番号439乃至470に示されるアミノ酸配列からなる領域(以下、「m9」という。)をプライマーN2とC4を用いて、それぞれpcDNA－DEST40－EPHA2を鋳型にPCR反応で増幅した。得られたPCR産物をBamHI及びHindIIIで切断し、pET－49b(＋)のBamHI／HindIIIサイトにサブクローニングした。

[0276] 9)－2 EPHA2欠損変異体の発現

上記9)－1で構築したプラスミドDNA及び陰性コントロールとしてpET－49b(＋)を用いて、大腸菌BL21(DE3)を形質転換した。得られた形質転換体を30μg／mlのカナマイシン(Invitrogen社製)を添加したLB培地で培養し、Autoinduction System(Novagen社製)によりEPHA2欠損変異体の発現誘導を行った。菌体を遠心により回収し、PBSで洗浄後、菌体を1mM PMSFとプロテアーゼインヒビターカクテル(SIGMA社製:＃P8340)を含有する2%SDS溶液で溶解した。遠心して上清を回収し、エピトープ同定に用いた。

[0277] pET－49b(＋)で形質転換した大腸菌の菌体溶解液中で発現したpET－49b(＋)由来のGST－Tag、His－Tag、S－Tagとそれらを繋ぐリンカー部分からなる蛋白質(以下及び図中で、「Vec」という。)の発現量は以下の方法で計算した。Vec発現菌体溶解液の希釈液系列と6x His Protein Ladder(QIAGEN社製)の希釈系列をSDS－sample bufferに溶解して98℃で5分間過熱した後、SDS－PAGEで分離し、ゲル中の蛋白質をPVDF膜に転写した。5% BSAを含むTBST中でブロッキングした後、5% BSAを含むTBSTでPenta－His HRP Conjugate(QIAGEN社製)を1000倍希釈した溶液にPVDF膜を浸し、室温で1時間反応させた。このPVDF膜をTBSTで10分間、3回洗浄した後、ECL Plusを使用しシグナルを検出した。Vec発現菌体溶解液の希釈液系列と6x His Protein Ladderの希釈系列のシグナル強度を比較することで6x His Protein Ladderに含まれる1バン

ド辺りの蛋白量からVec発現菌体溶解液に含まれるVecの蛋白質濃度を見積もった。S－Tag Monoclonal Antibody(Novagen)を用いたウエスタンブロットで20ngのVecと同程度の反応性を示す量のEPHA2欠損変異体を以下のエピトープ同定実験に用いた。

[0278] 9)－3) エピトープの同定

上記9)－2で調製したEPHA2欠損変異体を含む溶解液をSDS－sample bufferに溶解して98℃で5分間過熱したサンプルをSDS－PAGEで分離し、ゲル中の蛋白質をPVDF膜に転写した。転写後のPVDF膜を、ブロッキング液(ブロックエース粉末1袋を100mlの超純水に溶解後、Tween 20、アジ化ナトリウムをそれぞれ終濃度で0．1％(v／v)、0．02％(w／v)になるよう添加)中で振とうしブロッキングした後、このPVDF膜を2μg／mlのSH348－1又はSH357－1を含むブロッキング液中で4℃で一晩反応させた。このPVDF膜をTBSTで10分間、3回洗浄し、Anti－Mouse Ig, HRP－Linked Whole Ab SheepをTBSTで5000倍希釈した溶液中でさらに室温で30分間反応させた。続いてTBSTで10分間、3回洗浄した後、ECL Plusを使用し化学発光用フィルム上にシグナルを検出した。

[0279] 次に、PVDF膜をStrip液(50mM Tris－HCl pH6．8、2％(w／v) SDS、100mM 2-メルカプトエタノール)に浸して55℃で30分間振とうした後、TBSTで10分間、3回洗浄した。このPVDF膜をブロッキング液中でブロッキングした後、TBSTで10分間、3回洗浄し、S－Tag Monoclonal AntibodyをTBSTで10000倍に希釈した溶液に浸し室温で30分間反応させた。PVDF膜をTBSTで10分間、3回洗浄後、Anti－Mouse Ig, HRP－Linked Whole Ab SheepをTBSTで5000倍に希釈した溶液に浸し室温で30分間反応させた。次にTBSTで10分間、3回洗浄した後、ECL Plusを使用し化学発光用フィルム上にシグナルを検出した。

[0280] その結果、SH348－1(図11A)、SH357－1(図11C)は共にm1、m2、m5のみに結合性を示した。また、そのときのPVDF膜上に存在するEPHA2欠損変異体の量はほぼ一定であった(SH348－1:図11B、SH357－1:図11D)。以上の結果よりSH348－1、SH357－1はEPHA2のアミノ酸配列中で、配列表の配列番号8のアミノ酸番号439乃至534に示されるアミノ酸配列からなる領域に結合することが示さ

れた。

[0281] (実施例10)ヒト化抗体の設計

10)－1 SH348－1のヒト化抗体の設計

10)－1－1 SH348－1の可変領域の分子モデリング

SH348－1の可変領域の分子モデリングを相同性モデリング(Methods in Enzymology, 203, 121－153, (1991))によって行った。Protein Data Bank(Nuc. Acid Res. 35, D301－D303(2007))に登録されるヒト免疫グロブリンの可変領域の1次配列(X線結晶構造から誘導される三次元構造が入手可能である)を、実施例5で決定されたSH348－1の可変領域と比較した。結果として、2JELおよび1A4Jが、それぞれ、SH348－1の軽鎖および重鎖の可変領域に対して最も高い配列相同性を有する配列として選択された。フレームワーク領域の三次元構造は、SH348－1の軽鎖および重鎖に対応する2JELおよび1A4Jの座標を組み合わせて、「フレームワークモデル」を得ることによって作製した。SH348－1のCDRは、Thornton et al. (J. Mol. Biol., 263, 800－815, (1996))の分類に従って、$CDRL_1$、$CDRL_2$、$CDRL_3$、$CDRH_1$及び$CDRH_2$は、それぞれクラスター16A、7A、9A、10A、10Aに割り当てられた。$CDRH_3$は、H3ルール(FEBS letter 399, 1－8(1996))を使用して、e(9)Dに分類された。次いで、それぞれのCDRについての代表的なコンホメーションがフレームワークモデルに組み込んだ。

[0282] 最後に、エネルギーの点でSH348－1の可変領域の可能性のある分子モデルを得るために、不利な原子間接触を除くためのエネルギー計算を行った。上記手順を、市販の蛋白質立体構造予測プログラムPrimeおよび配座探索プログラムMacroModel(Schrodinger, LLC)を使用して行った。

[0283] 10)－1－2 ヒト化SH348－1に対するアミノ酸配列の設計

ヒト化SH348－1抗体の構築は、CDRグラフティング(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029－10033(1989))によって行った。アクセプター抗体は、フレームワーク領域内のアミノ酸相同性に基づいて選択された。SH348－1のフレームワーク領域の配列を、抗体のアミノ酸配列のKabatデータベース(Nuc. Acid Res. 29, 205－206(2001))の全てのヒトフレームワークと比較し、GSD2B5B10‘CL抗体

がフレームワーク領域についての72%の最も高い配列相同性に起因して、アクセプターとして選択された。GSD2B5B10‘CLについてのフレームワーク領域のアミノ酸残基を、SH348－1についてのアミノ酸残基と整列させ、異なるアミノ酸が使用される位置を同定した。これらの残基の位置は、上で構築されたSH348－1の三次元モデルを使用して分析され、そしてアクセプター上にグラフティングされるべきドナー残基が、Queen et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029－10033(1989))によって与えられる基準によって選択された。選択されたいくつかのドナー残基をアクセプター抗体GSD2B5B10‘CLに移入することによって、ヒト化SH348－1配列を決定した。その結果、以下に示すように、軽鎖について2タイプ、重鎖について2タイプのヒト化配列を取得した。以下、可変領域、定常領域、CDRについてはカバトらにより作成された抗体のアミノ酸配列データベースを元に分類された。

[0284] 10－1－3)SH348－1軽鎖のヒト化

10－1－3－1)hSH－348－T1Lタイプ軽鎖:

配列表の配列番号37に示されるSH348－1の軽鎖可変領域のアミノ酸番号2(バリン)、3(ロイシン)、14(セリン)、15(ロイシン)、17(アスパラギン酸)、18(グルタミン)、50(リジン)、79(アルギニン)、88(ロイシン)、105(グリシン)、109(ロイシン)、114(アラニン)をそれぞれイソロイシン、バリン、トレオニン、プロリン、グルタミン酸、プロリン、グルタミン、リジン、バリン、グルタミン、バリン、トレオニンに置き換えることを伴い設計されたヒト化SH348－1軽鎖を設計し、「hSH－348－T1Lタイプ軽鎖」と命名した。

[0285] hSH348－1－T1Lタイプ軽鎖のヌクレオチド配列を配列表の配列番号90に示し、アミノ酸配列を配列番号91に示した。配列番号90のヌクレオチド番号1乃至60に示されるヌクレオチド配列が分泌シグナル配列、ヌクレオチド番号61乃至402に示されるヌクレオチド配列が可変領域、ヌクレオチド番号403乃至717に示されるヌクレオチド配列が定常領域、ヌクレオチド番号130乃至177に示されるヌクレオチド配列が$CDRL_1$、ヌクレオチド番号223乃至243に示されるヌクレオチド配列が$CDRL_2$、ヌクレオチド番号340乃至363に示されるヌクレオチド配列が$CDRL_3$、の各ヌクレオチド配列である。

[0286] 配列表の配列番号91のアミノ酸番号1乃至20に示されるアミノ酸配列が分泌シグナル配列であり、アミノ酸番号21乃至134に示されるアミノ酸配列が可変領域、アミノ酸番号135乃至239に示されるアミノ酸配列が定常領域、アミノ酸番号44乃至59に示されるアミノ酸配列が$CDRL_1$、アミノ酸番号75乃至81に示されるアミノ酸配列が$CDRL_2$、アミノ酸番号114乃至121に示されるアミノ酸配列が$CDRL_3$、の各アミノ酸配列である。

[0287] また、hSH348－1－T1Lタイプ軽鎖の$CDRL_1$のヌクレオチド配列を配列表の配列番号92に、アミノ酸配列を配列番号93に、$CDRL_2$のヌクレオチド配列を配列表の配列番号94に、アミノ酸配列を配列番号95に、$CDRL_3$のヌクレオチド配列を配列表の配列番号96に、アミノ酸配列を配列番号97に示した。

[0288] 10－1－3－2)hSH348－T3Lタイプ軽鎖:

配列表の配列番号37に示されるSH348－1の軽鎖可変領域のアミノ酸番号14(セリン)、15(ロイシン)、17(アスパラギン酸)、18(グルタミン)、50(リジン)、79(アルギニン)、88(ロイシン)、105(グリシン)、109(ロイシン)、114(アラニン)、をそれぞれトレオニン、プロリン、グルタミン酸、プロリン、グルタミン、リジン、バリン、グルタミン、バリン、トレオニンにることを伴い設計されたヒト化SH348－1軽鎖を設計し、「hSH348－1－T3Lタイプ軽鎖」と命名した。

[0289] hSH348－1－T3Lタイプ軽鎖のヌクレオチド配列を配列表の配列番号98に示し、アミノ酸配列を配列番号99に示した。配列番号98のヌクレオチド番号1乃至60に示されるヌクレオチド配列が分泌シグナル配列、ヌクレオチド番号61乃至402に示されるヌクレオチド配列が可変領域、ヌクレオチド番号403乃至717に示されるヌクレオチド配列が定常領域、ヌクレオチド番号130乃至177に示されるヌクレオチド配列が$CDRL_1$、ヌクレオチド番号223乃至243に示されるヌクレオチド配列が$CDRL_2$、ヌクレオチド番号340乃至363に示されるヌクレオチド配列が$CDRL_3$、の各ヌクレオチド配列である。

[0290] 配列表の配列番号99のアミノ酸番号1乃至20に示されるアミノ酸配列が分泌シグナル配列であり、アミノ酸番号21乃至134に示されるアミノ酸配列が可変領域、アミノ酸番号135乃至239に示されるアミノ酸配列が定常領域、アミノ酸番号44乃至59に

示されるアミノ酸配列がCDRL$_1$、アミノ酸番号75乃至81に示されるアミノ酸配列がCDRL$_2$、アミノ酸番号114乃至121に示されるアミノ酸配列がCDRL$_3$、の各アミノ酸配列である。

[0291] また、hSH348－1－T3Lタイプ軽鎖のCDRL$_1$のヌクレオチド配列を配列表の配列番号100に、アミノ酸配列を配列番号101に、CDRL$_2$のヌクレオチド配列を配列表の配列番号102に、アミノ酸配列を配列番号103に、CDRL$_3$のヌクレオチド配列を配列表の配列番号104に、アミノ酸配列を配列番号105に示した。

[0292] 10－1－4）SH348－1重鎖のヒト化

10－1－4－1）hSH348－1－T1Hタイプ重鎖：

配列表の配列番号43に示されるSH348－1の重鎖可変領域のアミノ酸番号2（イソロイシン）、9（プロリン）、11（ロイシン）、16（グルタミン酸）、17（トレオニン）、20（イソロイシン）、38（リジン）、43（リジン）、46（リジン）、68（フェニルアラニン）、69（アラニン）、70（フェニルアラニン）、71（セリン）、72（ロイシン）、73（グルタミン酸）、76（アラニン）、80（フェニルアラニン）、82（グルタミン）、83（イソロイシン）、84（アスパラギン）、85（アスパラギン）、87（リジン）、88（アスパラギン）、93（トレオニン）、95（フェニルアラニン）、114（トレオニン）、115（ロイシン）、をそれぞれバリン、アラニン、バリン、セリンセリン、バリン、アルギニン、グルタミン、グルタミン酸、バリン、トレオニン、イソロイシン、トレオニン、アラニン、アスパラギン酸、トレオニン、チロシン、グルタミン酸、ロイシン、セリン、セリンアルギニン、セリン、バリン、チロシン、ロイシン、バリンに置き換えることを伴い設計されたヒト化SH348－1重鎖を設計し、「hSH348－1－T1Hタイプ重鎖」と命名した。

[0293] hSH348－1－T1Hタイプ重鎖のヌクレオチド配列を配列表の配列番号106に示し、アミノ酸配列を配列番号107に示した。配列番号106のヌクレオチド番号1乃至57に示されるヌクレオチド配列が分泌シグナル配列、ヌクレオチド番号58乃至414に示されるヌクレオチド配列が可変領域、ヌクレオチド番号415乃至1404に示されるヌクレオチド配列が定常領域、ヌクレオチド番号148乃至162に示されるヌクレオチド配列がCDRH$_1$、ヌクレオチド番号205乃至255に示されるヌクレオチド配列がCDRH$_2$、ヌクレオチド番号352乃至381に示されるヌクレオチド配列がCDRL$_3$、の各ヌク

レオチド配列である。

[0294] 配列表の配列番号107のアミノ酸番号1乃至19に示されるアミノ酸配列が分泌シグナル配列であり、アミノ酸番号20乃至138に示されるアミノ酸配列が可変領域、アミノ酸番号139乃至468に示されるアミノ酸配列が定常領域、アミノ酸番号50乃至54に示されるアミノ酸配列が$CDRH_1$、アミノ酸番号69乃至85に示されるアミノ酸配列が$CDRH_2$、アミノ酸番号118乃至127に示されるアミノ酸配列が$CDRH_3$、の各アミノ酸配列である。

[0295] また、hSH348－1－T1Hタイプ重鎖の$CDRH_1$のヌクレオチド配列を配列表の配列番号108に、アミノ酸配列を配列番号109に、$CDRH_2$のヌクレオチド配列を配列表の配列番号110に、アミノ酸配列を配列番号111に$CDRH_3$のヌクレオチド配列を配列表の配列番号112に、アミノ酸配列を配列番号113に示した。

[0296] 10－1－4－2)hSH348－1－T3Hタイプ重鎖:

配列表の配列番号43に示されるSH348－1の重鎖可変領域のアミノ酸番号9(プロリン)、11(ロイシン)、16(グルタミン酸)、17(トレオニン)、20(イソロイシン)、38(リジン)、43(リジン)、73(グルタミン酸)、76(アラニン)、80(フェニルアラニン)、82(グルタミン)、83(イソロイシン)、84(アスパラギン)、85(アスパラギン)、87(リジン)、88(アスパラギン)、93(トレオニン)、95(フェニルアラニン)、114(トレオニン)、115(ロイシン)をそれぞれアラニン、バリン、セリン、セリン、バリン、アルギニン、グルタミン、アスパラギン酸、トレオニン、チロシン、グルタミン酸、ロイシン、セリン、セリン、アルギニン、セリン、バリン、チロシン、ロイシン、バリン、に置き換えることを伴い設計されたヒト化SH348－1重鎖を設計し、「hSH348－1－T3Hタイプ重鎖」と命名した。

[0297] hSH348－1－T3Hタイプ重鎖のヌクレオチド配列を配列表の配列番号114に示し、アミノ酸配列を配列番号115(133)に示した。配列番号114のヌクレオチド番号1乃至57に示されるヌクレオチド配列が分泌シグナル配列、ヌクレオチド番号58乃至414に示されるヌクレオチド配列が可変領域、ヌクレオチド番号415乃至1404に示されるヌクレオチド配列が定常領域、ヌクレオチド番号148乃至162に示されるヌクレオチド配列が$CDRH_1$、ヌクレオチド番号205乃至255に示されるヌクレオチド配列が$CDRH_2$、ヌクレオチド番号352乃至381に示されるヌクレオチド配列が$CDRL_3$、の各

ヌクレオチド配列である。

[0298] 配列表の配列番号115のアミノ酸番号1乃至19に示されるアミノ酸配列が分泌シグナル配列であり、アミノ酸番号20乃至138に示されるアミノ酸配列が可変領域、アミノ酸番号139乃至468に示されるアミノ酸配列が定常領域、アミノ酸番号50乃至54に示されるアミノ酸配列が$CDRH_1$、アミノ酸番号69乃至85に示されるアミノ酸配列が$CDRH_2$、アミノ酸番号118乃至127に示されるアミノ酸配列が$CDRH_3$、の各アミノ酸配列である。

[0299] また、hSH348－1－T3Hタイプ重鎖の$CDRH_1$のヌクレオチド配列を配列表の配列番号116に、アミノ酸配列を配列番号117に、$CDRH_2$のヌクレオチド配列を配列表の配列番号118に、アミノ酸配列を配列番号119に、$CDRH_3$のヌクレオチド配列を配列表の配列番号120に、アミノ酸配列を配列番号121に示した。

[0300] 10)－2 SH357－1のヒト化抗体の設計

10)－2－1 SH357－1の可変領域の分子モデリング

上記10)－1－1と同様の方法で、2JELおよび1A4Jが、それぞれ、SH357－1の軽鎖および重鎖の可変領域に対して最も高い配列相同性を有する配列として選択され、$CDRL_1$、$CDRL_2$、$CDRL_3$、$CDRH_1$及び$CDRH_2$は、それぞれクラスター16A、7A、9A、10A、10Aに割り当てられた。$CDRH_3$は、e(9)Dに分類された。

[0301] 10)－2－2 ヒト化SH357－1に対するアミノ酸配列の設計

10)－1－2と同様の方法によって、GSD2B5B10‘CL抗体がアクセプターとして選択され、ヒト化SH357－1の配列を決定した。その結果、以下に示すように、軽鎖について2タイプ、重鎖について2タイプのヒト化配列を取得した。

[0302] 10－2－3)SH357－1軽鎖のヒト化

10－2－3－1)hSH357－1－T1Lタイプ軽鎖:

配列表の配列番号41に示されるSH357－1の軽鎖のアミノ酸番号2(バリン)、3(ロイシン)、7(トレオニン)、14(セリン)、15(ロイシン)、17(アスパラギン酸)、18(グルタミン)、50(リジン)、88(ロイシン)、105(グリシン)、109(ロイシン)、114(アラニン)をそれぞれイソロイシン、バリン、セリン、トレオニン、プロリン、グルタミン酸、プロリン、グルタミン、バリン、グルタミン、バリン、トレオニンに置き換えることを伴い設計され

たヒト化SH357－1軽鎖を、「hSH357－1－T1Lタイプ軽鎖」と命名した。

[0303] hSH357－1－T1Lタイプ軽鎖のヌクレオチド配列を配列表の配列番号122に示し、アミノ酸配列を配列番号123に示した。配列番号122のヌクレオチド番号1乃至60に示されるヌクレオチド配列が分泌シグナル配列、ヌクレオチド番号61乃至402に示されるヌクレオチド配列が可変領域、ヌクレオチド番号403乃至717に示されるヌクレオチド配列が定常領域、ヌクレオチド番号130乃至177に示されるヌクレオチド配列が$CDRL_1$、ヌクレオチド番号223乃至243に示されるヌクレオチド配列が$CDRL_2$、ヌクレオチド番号340乃至363に示されるヌクレオチド配列が$CDRL_3$、の各ヌクレオチド配列である。

[0304] 配列表の配列番号123のアミノ酸番号1乃至20に示されるアミノ酸配列が分泌シグナル配列であり、アミノ酸番号21乃至134に示されるアミノ酸配列が可変領域、アミノ酸番号135乃至239に示されるアミノ酸配列が定常領域、アミノ酸番号44乃至59に示されるアミノ酸配列が$CDRL_1$、アミノ酸番号75乃至81に示されるアミノ酸配列が$CDRL_2$、アミノ酸番号114乃至121に示されるアミノ酸配列が$CDRL_3$である。

[0305] また、hSH357－1－T1Lタイプ軽鎖の$CDRL_1$のヌクレオチド配列を配列表の配列番号124（154）に、アミノ酸配列を配列番号125（155）に、$CDRL_2$のヌクレオチド配列を配列表の配列番号126（156）に、アミノ酸配列を配列番号127（157）に、$CDRL_3$のヌクレオチド配列を配列表の配列番号128（158）に、アミノ酸配列を配列番号129（159）に示した。

[0306] 10－2－3－2）hSH357－1－T3Lタイプ軽鎖：

配列番号41に示されるSH357－1軽鎖のアミノ酸番号7（トレオニン）、14（セリン）、15（ロイシン）、17（アスパラギン酸）、18（グルタミン）、50（リジン）、88（ロイシン）、105（グリシン）、109（ロイシン）、114（アラニン）をそれぞれセリン、トレオニン、プロリン、グルタミン酸、プロリン、グルタミン、バリン、グルタミン、バリン、トレオニンに置き換えることを伴い設計されたヒト化SH357－1軽鎖を、「hSH357－1－T3Lタイプ軽鎖」と命名した。

[0307] hSH357－1－T3Lタイプ軽鎖のヌクレオチド配列を配列表の配列番号130に示し、アミノ酸配列を配列番号131に示した。配列番号130のヌクレオチド番号1乃至6

0に示されるヌクレオチド配列が分泌シグナル配列、ヌクレオチド番号61乃至402に示されるヌクレオチド配列が可変領域、ヌクレオチド番号403乃至717に示されるヌクレオチド配列が定常領域、ヌクレオチド番号130乃至177に示されるヌクレオチド配列が$CDRL_1$、ヌクレオチド番号223乃至243に示されるヌクレオチド配列が$CDRL_2$、ヌクレオチド番号340乃至363に示されるヌクレオチド配列が$CDRL_3$、の各ヌクレオチド配列である。

[0308] 配列表の配列番号131のアミノ酸番号1乃至20に示されるアミノ酸配列が分泌シグナル配列であり、アミノ酸番号21乃至134に示されるアミノ酸配列が可変領域、アミノ酸番号135乃至239に示されるアミノ酸配列が定常領域、アミノ酸番号44乃至59に示されるアミノ酸配列が$CDRL_1$、アミノ酸番号75乃至81に示されるアミノ酸配列が$CDRL_2$、アミノ酸番号114乃至121に示されるアミノ酸配列が$CDRL_3$、の各アミノ酸配列である。

[0309] また、hSH357－1－T3Lタイプ軽鎖の$CDRL_1$のヌクレオチド配列を配列表の配列番号132に、アミノ酸配列を配列番号133(183)に、$CDRL_2$のヌクレオチド配列を配列表の配列番号134に、アミノ酸配列を配列番号135に、$CDRL_3$のヌクレオチド配列を配列表の配列番号136に、アミノ酸配列を配列番号137に示した。

[0310] 10－2－4)SH357－1重鎖のヒト化

10－2－4－1)hSH357－1－T1Hタイプ重鎖:

配列表の配列番号51に示されるSH357－1の重鎖可変領域のアミノ酸番号2(イソロイシン)、9(プロリン)、11(ロイシン)、16(グルタミン酸)、17(トレオニン)、20(イソロイシン)、38(リジン)、43(リジン)、46(リジン)、68(フェニルアラニン)、69(アラニン)、70(フェニルアラニン)、71(セリン)、72(ロイシン)、73(グルタミン酸)、76(アラニン)、82(グルタミン)、83(イソロイシン)、85(アスパラギン)、87(リジン)、88(アスパラギン)、93(セリン)、95(フェニルアラニン)、114(トレオニン)、115(ロイシン)をそれぞれバリン、アラニン、バリン、アラニン、セリン、バリン、アルギニン、グルタミン、グルタミン酸、バリン、トレオニン、イソロイシン、トレオニン、アラニン、アスパラギン酸、トレオニン、グルタミン酸、ロイシン、セリン、アルギニン、セリン、バリン、チロシン、ロイシン、バリンに置き換えることを伴い設計されたヒト化SH357－1重鎖を設計し、「

hSH357－1－T1Hタイプ重鎖」と命名した。

[0311] hSH357－1－T1Hタイプ重鎖のヌクレオチド配列を配列表の配列番号138に示し、アミノ酸配列を配列番号139に示した。配列番号138のヌクレオチド番号1乃至57に示されるヌクレオチド配列が分泌シグナル配列、ヌクレオチド番号58乃至414に示されるヌクレオチド配列が可変領域、ヌクレオチド番号415乃至1404に示されるヌクレオチド配列が定常領域、ヌクレオチド番号145乃至162に示されるヌクレオチド配列が$CDRH_1$、ヌクレオチド番号205乃至255に示されるヌクレオチド配列が$CDRH_2$、ヌクレオチド番号352乃至381に示されるヌクレオチド配列が$CDRL_3$、の各ヌクレオチド配列である。

[0312] 配列表の配列番号139のアミノ酸番号1乃至19に示されるアミノ酸配列が分泌シグナル配列であり、アミノ酸番号20乃至138に示されるアミノ酸配列が可変領域、アミノ酸番号139乃至468に示されるアミノ酸配列が定常領域、アミノ酸番号49乃至54に示されるアミノ酸配列が$CDRH_1$、アミノ酸番号69乃至85に示されるアミノ酸配列が$CDRH_2$、アミノ酸番号118乃至127に示されるアミノ酸配列が$CDRH_3$、の各アミノ酸配列である。

[0313] また、hSH357－1－T1Hタイプ重鎖の$CDRH_1$のヌクレオチド配列を配列表の配列番号140に、アミノ酸配列を配列番号141に、$CDRH_2$のヌクレオチド配列を配列表の配列番号142に、アミノ酸配列を配列番号143に、$CDRH_3$のヌクレオチド配列を配列表の配列番号144に、アミノ酸配列を配列番号145に示した。

[0314] 10－2－4－2)hSH357－1－T3Hタイプ重鎖:

配列番号51に示されるSH357－1の重鎖可変領域のアミノ酸番号9(プロリン)、11(ロイシン)、16(グルタミン酸)、17(トレオニン)、20(イソロイシン)、38(リジン)、43(リジン)、73(グルタミン酸)、76(アラニン)、82(グルタミン)、83(イソロイシン)、85(アスパラギン)、87(リジン)、88(アスパラギン)、93(セリン)、95(フェニルアラニン)、114(トレオニン)、115(ロイシン)をそれぞれアラニン、バリン、アラニン、セリン、バリン、アルギニン、グルタミン、アスパラギン酸、トレオニン、グルタミン酸、ロイシン、セリン、アルギニン、セリン、バリン、チロシン、ロイシン、バリンに置き換えることを伴い設計されたヒト化SH357－1重鎖を設計し、「hSH357－1－T3Hタイプ重鎖」と命

名した。

[0315] hSH357－1－T3Hタイプ重鎖のヌクレオチド配列を配列表の配列番号146に示し、アミノ酸配列を配列番号147に示した。配列番号146のヌクレオチド番号1乃至57に示されるヌクレオチド配列が分泌シグナル配列、ヌクレオチド番号58乃至414に示されるヌクレオチド配列が可変領域、ヌクレオチド番号415乃至1404に示されるヌクレオチド配列が定常領域、ヌクレオチド番号145乃至162に示されるヌクレオチド配列が$CDRH_1$、ヌクレオチド番号205乃至255に示されるヌクレオチド配列が$CDRH_2$、ヌクレオチド番号352乃至381に示されるヌクレオチド配列が$CDRL_3$、の各ヌクレオチド配列である。

[0316] 配列表の配列番号147のアミノ酸番号1乃至19に示されるアミノ酸配列が分泌シグナル配列であり、アミノ酸番号20乃至138に示されるアミノ酸配列が可変領域、アミノ酸番号139乃至468に示されるアミノ酸配列が定常領域、アミノ酸番号49乃至54に示されるアミノ酸配列が$CDRH_1$、アミノ酸番号69乃至85に示されるアミノ酸配列が$CDRH_2$、アミノ酸番号118乃至127に示されるアミノ酸配列が$CDRH_3$、の各アミノ酸配列である。

[0317] また、hSH357－1－T3Hタイプ重鎖の$CDRH_1$のヌクレオチド配列を配列表の配列番号148に、アミノ酸配列を配列番号149に、$CDRH_2$のヌクレオチド配列を配列表の配列番号150に、アミノ酸配列を配列番号151に、$CDRH_3$のヌクレオチド配列を配列表の配列番号152に、アミノ酸配列を配列番号153に示した。

[0318] （実施例11）ヒト化抗EPHA2抗体の作製

ヒト化SH348－1及びヒト化SH357－1の活性を測定するために、実施例10で取得されたヒト化抗EPHA2抗体の重鎖又は軽鎖を有するプラスミドを以下のように構築した。

[0319] 11）－1 ヒト化抗EPHA2抗体発現ベクターの構築

11）－1－1 ヒト化抗体軽鎖発現汎用ベクター（pEF6／KCL）の作製

配列表の配列番号154に記されるヒト抗体軽鎖シグナル配列およびヒトIg軽鎖（κ鎖）定常領域をコードする遺伝子を合成し（インビトロジェン社 人工遺伝子合成サービス）、制限酵素NheIおよびPmeIで切り出されるDNA断片を、ベクターpEF6／V

5－HisB（インビトロジェン社）のNheI／PmeIサイトに導入し、ヒト化抗体軽鎖発現汎用ベクター（pEF6／KCL）を構築した。

11）－1－2 ヒト化抗体重鎖発現汎用ベクター（pEF1／FCCU－1）の作製

配列表の配列番号155に記されるヒト抗体重鎖シグナル配列およびヒトIgG1定常領域をコードする遺伝子を合成し（インビトロジェン社 人工遺伝子合成サービス）、制限酵素NheIおよびPmeIで切り出されるDNA断片を、ベクターpEF1／myc－HisB（インビトロジェン社）のNheI／PmeIサイトに導入し、ヒト化抗体H鎖発現汎用ベクター（pEF1／FCCU－1）を構築した。

[0320] 11）－1－3 hSH348－1－T1L、hSH348－1－T3Lタイプ軽鎖発現ベクターの構築

配列表の配列番号156、157にそれぞれ示される、分泌シグナルと融合したhSH348－1－T1L又はhSH348－1－T3Lタイプ軽鎖可変領域をコードする遺伝子を含むDNAを合成し（インビトロジェン社 人工遺伝子合成サービス）、制限酵素NdeIおよびBsiWIで切り出されたDNA断片を、ヒト化抗体軽鎖発現汎用ベクター（pEF6／KCL）を制限酵素NdeIおよびBsiWIで切断した箇所に挿入することにより、hSH348－1－T1L、hSH348－1－T3Lタイプ軽鎖発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターをそれぞれ「pEF6／KCL／hSH348－1－T1L」、「pEF6／KCL／hSH348－1－T3L」と命名した。

[0321] 11）－1－4 hSH348－1－T1H、hSH348－1－T3H タイプ重鎖発現ベクターの構築

配列表の配列番号158、159にそれぞれ示される、hSH348－1－T1H又はhSH348－1－T3Hタイプ重鎖可変領域をコードするする遺伝子を含むDNAを合成し（インビトロジェン社 人工遺伝子合成サービス）、制限酵素BlpIで切り出されるDNA断片を、ヒト化抗体H鎖発現汎用ベクター（pEF1／FCCU－1）を制限酵素BlpIで切断した箇所に挿入することにより、hSH348－1－T1H、hSH348－1－T3Hタイプ重鎖発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターをそれぞれ「pEF1／FCCU／hSH348－1－T1H」、「pEF1／FCCU／hSH348－1－T3H」と命名した。

[0322] 11）－1－5 hSH357－1－T1L、hSH357－1－T3Lタイプ軽鎖発現ベクター

の構築

配列表の配列番号160、161にそれぞれ示される分泌シグナルと融合したhSH357－1－T1LまたはhSH357－1－T3Lタイプ軽鎖可変領域をコードする遺伝子を含むDNAを合成し（インビトロジェン社　人工遺伝子合成サービス）、制限酵素NdeIおよびBsiWIで切り出されたDNA断片を、ヒト化抗体L鎖発現汎用ベクター（pEF6／KCL）を制限酵素NdeIおよびBsiWIで切断した箇所に挿入することにより、hSH357－1－T1L、hSH357－1－T3Lタイプ軽鎖発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターをそれぞれ「pEF6／KCL／hSH357－1－T1L」、「pEF6／KCL／hSH357－1－T3L」と命名した。

[0323] 11）－1－6　hSH357－1－T1H、hSH357－1－T3　Hタイプ重鎖発現ベクターの構築

配列表の配列番号162、163にそれぞれ示される、hSH357－1－T1HまたはhSH357－1－T3Hタイプ重鎖可変領域をコードするする遺伝子を含むDNAを合成し（インビトロジェン社　人工遺伝子合成サービス）、制限酵素BlpIで切り出されたDNA断片を、ヒト化抗体H鎖発現汎用ベクター（pEF1／FCCU－1）を制限酵素BlpIで切断した箇所に挿入することにより、hSH357－1－T1H、hSH357－1－T3Hタイプ重鎖発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターをそれぞれ「pEF1／FCCU／hSH357－1－T1H」、「pEF1／FCCU／hSH357－1－T3H」と命名した。

[0324] 11）－2　ヒト化抗体の生産

対数増殖期の293FreeStyle細胞　1.2×10^{9}　を新鮮な1．2LのFreeStyle293 Expression Medium（Invitrogen社）に播種し、37℃、8％CO_2インキュベータで振とう培養した（125rpm）。Polyethyleneimine（Polyscience　＃24765）12mgをOpti－ProSFM培地（Invitrogen社製）40mLに溶解し、室温で5分間放置した。PureLink HiPure Plasmid キット（Invitrogen社）を用いて調製したH鎖発現プラスミド（0．6mg）およびL鎖発現プラスミド（1．8mg）を40mLのOpti－ProSFM培地（Invitrogen社）に懸濁した。室温で5分間放置したPolyethyleneimine／OptiProSFM混合液40mLに、発現プラスミド／OptiProSFM混合液40mLを加え、

さらに室温5分間放置した。次にPolyethyleneimine／発現プラスミド／OptiProSFM混合液80mLを293FreeStyle細胞懸濁液に添加し、振とう培養を続けた。37℃、8%CO2中で7日間培養したのち、培養上清を回収した。

[0325] 11)－3 ヒト化抗体の精製

上記11)－3で得られた培養上清をDisposable Capsu2le Filter (Advabtec #CCS－045－E1H)でろ過したのち、ProteinAアフィニティカラムクロマトグラフィーで精製した。PBSで平衡化したMabSelectSuReHiTrap 1mL (GE Healthcare Bio－science社製)に培養上清をアプライし、PBSで洗浄した。次に2Mアルギニン溶液(pH4．0)をアプライし、抗体の含まれる画分を集めた。pHを7に調整し、あらかじめPBSで平衡化したHiPrep Desalting カラム(26／10, 50mL)(GEヘルスケアバイオサイエンス株式会社)に供与し、PBSに置換したのち、0．2μmのフィルターを通して精製サンプルとした。

[0326] 抗体の濃度はPOROS G 20μm Column, PEEK, 4．6mm×100mm, 1．7ml(Applied Biosystems社製)に結合させた抗体を溶出し、溶出液の吸光度(O．D．280nm)を測定し、標準品(ヒトIgG1)のピーク面積と比較することにより求めた。

[0327] pEF6／KCL／hSH348－1－T1LとpEF1／FCCU／hSH348－1－T1Hとの組合せによって取得されたSH348－1のヒト化抗体をhSH348－1－T1、pEF6／KCL／hSH348－1－T3LとpEF1／FCCU／hSH348－1－T3Hとの組合せによって取得されたSH348－1のヒト化抗体を「hSH348－1－T3」と命名した。

[0328] また、pEF6／KCL／hSH357－1－T1LとpEF1／FCCU／hSH357－1－T1Hとの組合せによって取得されたSH357－1のヒト化抗体をhSH357－1－T1、pEF6／KCL／hSH357－1－T3LとpEF1／FCCU／hSH357－1－T3Hとの組合せによって取得されたSH357－1のヒト化抗体を「hSH357－1－T3」と命名した。

[0329] (実施例12)ヒト化抗EPHA2抗体の抗原結合性の確認

hSH348－1－T1、hSH348－1－T3、hSH357－1－T1及びhSH357－1－

T3の抗原結合能を2次抗体としてPeroxidase AffiniPure Goat Anti－Human IgG Fcγ Fragment Specific(Jackson ImmunoResearch社製 ＃109－035－098)を用いる点を除き、実施例6に記載の方法に準じて行った。

[0330] 図12A－D)のグラフ中の吸光度は平均値±標準偏差(n＝3)で示している。その結果、ヒト化抗EPHA2抗体であるhSH348－1－T1、hSH348－1－T3、hSH357－1－T1、hSH357－1－T3はいずれもEPHA2細胞外領域に結合性を有することが確認された。

[0331] (実施例13)SH348－1またはSH357－1のEPHA2結合に対する競合阻害活性の測定

SH348－1のEPHA2への結合に対するhSH348－1－T1、hSH348－1－T3の競合阻害活性およびSH357－1のEPHA2への結合に対するhSH357－1－T1、hSH357－1－T3の競合阻害活性を以下の方法で測定した。

[0332] EZ－Link Sulfo－NHS－LC Biotinylation Kit(Thermo scientific社製 ＃21435)を使用し添付のプロトコールに従い、マウスモノクローナル抗体SH348－1、SH357－1をそれぞれビオチン化した(以下、ビオチン化SH348－1、SH357－1をそれぞれ、「bSH348－1」、「bSH357－1」と表記する。)。bSH348－1、bSH357－1及び競合阻害実験に使用する非標識抗体(SH348－1、SH357－1、hSH348－1－T1、hSH348－1－T3、hSH357－1－T1、hSH357－1－T3及びAb96－1)の濃度はBCA Protein Assay Reagent(PIERCE社製)により測定した。

[0333] EPHA2の細胞外領域ポリペプチド(R&D Systems社製:＃3035－A2－100)をPBSで0．5μg／mlに希釈してイムノプレート(Nunc社製 ＃442404)に100μl／ウェルで分注し、4℃で一晩静置することでプレートに蛋白質を吸着させた。翌日、ウェルを希釈緩衝液(PBS、0．05％(v／v) Tween 20)で1回洗浄した後、、ブロックエース溶液(ブロックエース粉末1袋を100mlの超純水で溶解)をPBSで4倍希釈した溶液を200μl／ウェルで分注し、室温で4時間静置した。ウェル中の液を除去後、5μg／mlのビオチン化抗体と各種濃度(0μg／ml、1μg／ml、5μg／ml、25μg／ml、50μg／ml、125μg／ml)の非標識抗体の混合溶液(溶媒はPBS。最

終濃度で0．05％（v／v）のTween 20含有）をそれぞれ100μl／ウェルで分注し、1時間室温で静置した。希釈緩衝液（PBS、0．05％（v／v） Tween 20）で2回ウェルを洗浄した後、希釈緩衝液で500倍に希釈したStreptavidin－horseradish Peroxidase Conjugate（GE Healthcare Bio－Sciences社製 #RPN1231V）を100μl／ウェルで添加し、室温で1時間静置した。ウェル中の液を除去し、希釈緩衝液で2回ウェルを洗浄した後、OPD発色液を100μl／ウェルで添加し攪拌しながら発色反応を行った。発色後、1M HClを100μl／ウェルで添加して発色反応を止め、プレートリーダーで490nmの吸光度を測定した。

[0334] その結果、bSH348－1、またはbSH357－1のみを添加したウェルの吸光度はそれぞれ0．780±0．016、0．978±0．007（平均値±標準偏差（n＝3））であった。

[0335] 図13A）、B）のグラフ中の吸光度はそれぞれ平均値±標準偏差（n＝3）で示している。エピトープの異なるAb96－1は、SH348－1またはSH357－1のEPHA2に対する結合を阻害しなかった。一方、SH348－1のEPHA2に対する結合は、SH348－1自身またはそのヒト化抗体であるhSH348－1－T1、hSH348－1－T3により阻害されることが示された（図13A）。同様にSH357－1のEPHA2に対する結合はSH357－1自身またはそのヒト化抗体であるhSH357－1－T1、hSH357－1－T3により阻害されることが示された（図13B）。

[0336] （実施例14）Ephrin－A1依存的EPHA2チロシン残基リン酸化のヒト化抗EPHA2抗体による抑制作用

実施例8に記載の方法に準じてヒト化抗EPHA2抗体のEphrin－A1依存的EPHA2チロシン残基リン酸化能を調べた。その結果、hSH348－1－T1、hSH348－1－T3、hSH357－1－T1、hSH357－1－T3のいずれもEphrin－A1／Fcにより誘導されるEPHA2チロシン残基リン酸化を抑制する活性を維持していることが示された（図14）。

産業上の利用可能性

[0337] 本発明の抗EPHA2抗体は抗腫瘍活性を有し、該抗EPHA2抗体を含む医薬組成物は抗癌剤となり得る。

請求の範囲

[1] ハイブリドーマSH348－1（FERM BP－10836）が産生する抗体によって認識されるエピトープを認識する抗体。

[2] 以下のa）乃至d）に示される性質を有する、請求項1に記載の抗体：

a）EPHA2チロシン残基のリン酸化能を有さない；

b）EPHA2発現細胞に対してADCC活性を有する；

c）EPHA2発現細胞に対してCDC活性を有する；

d）In vivoで抗腫瘍活性を有する。

[3] 以下のa）乃至e）に示される性質を有する、請求項1に記載の抗体：

a）EPHA2チロシン残基のリン酸化能を有さない；

b）EPHA2蛋白質量の減少作用を示す；

c）EPHA2発現細胞に対してADCC活性を有する；

d）EPHA2発現細胞に対してCDC活性を有する；

e）In vivoで抗腫瘍活性を有する。

[4] 配列表の配列番号8のアミノ酸番号426乃至534に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドに特異的に結合する抗体。

[5] 配列表の配列番号8のアミノ酸番号426乃至534に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドに特異的に結合し、以下のa）乃至d）に示される性質を有する抗体：

a）EPHA2チロシン残基のリン酸化能を有さない；

b）EPHA2発現細胞に対してADCC活性を有する；

c）EPHA2発現細胞に対してCDC活性を有する；

d）In vivoで抗腫瘍活性を有する。

[6] 配列表の配列番号8のアミノ酸番号426乃至534に示されるアミノ酸配列からなるペプチドに特異的に結合し、以下のa）乃至e）に示される性質を有する抗体：

a）EPHA2チロシン残基のリン酸化能を有さない；

b）EPHA2蛋白質量の減少作用を示す；

c）EPHA2発現細胞に対してADCC活性を有する；

d）EPHA2発現細胞に対してCDC活性を有する；

e）In vivoで抗腫瘍活性を有する。

[7] 配列表の配列番号8のアミノ酸番号439乃至534に示されるアミノ酸配列からなるペプチドに特異的に結合する、請求項1乃至6から選択されるいずれか一つに記載の抗体。

[8] EPHA2リガンドにより誘導されるEPHA2チロシン残基のリン酸化を抑制する、請求項1乃至7から選択されるいずれか一つに記載の抗体。

[9] EPHA2リガンドのEPHA2に対する結合を阻害するのではなく、リガンドにより誘導されるEPHA2チロシン残基のリン酸化を抑制する、請求項1乃至7から選択されるいずれか一つに記載の抗体。

[10] 重鎖可変領域の相補性決定領域として、配列表の配列番号59、61及び63に示されるアミノ酸配列又はこれらのアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、軽鎖可変領域の相補性決定領域として、配列表の配列番号65、67及び69に示されるアミノ酸配列又はこれらのアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有する、配列表の配列番号8に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドに特異的に結合する抗体。

[11] 以下の1）及び2）の特徴を有する、配列表の配列番号8に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドに特異的に結合する抗体：

1）一般式（I）で示されるアミノ酸配列を含む重鎖ペプチドを有する；

$-FRH_1-CDRH_1-FRH_2-CDRH_2-FRH_3-CDRH_3-FRH_4-$ (I)

（式中、FRH_1は18乃至30個のアミノ酸からなる任意のアミノ酸配列を示し、$CDRH_1$は配列表の配列番号59で示されるアミノ酸配列又は1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を示し、FRH_2は14個のアミノ酸からなる任意のアミノ酸配列を表し、$CDRH_2$は配列表の配列番号61で示されるアミノ酸配列又は1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を示し、FRH_3は32個のアミノ酸からなる任意のアミノ酸配列を表し、$CDRH_3$は配列表の配列番号63で示されるアミノ酸配列又は1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を示し、FRH_4は11個のアミノ酸からなる任意のアミノ酸配列を示し

、各アミノ酸はそれぞれペプチド結合で連結している。）；

2）一般式（II）で示されるアミノ酸配列を含むことからなる軽鎖ポリペプチドを有する；

$-FRL_1-CDRL_1-FRL_2-CDRL_2-FRL_3-CDRL_3-FRL_4-$（II）

（式中、FRL_1は23個のアミノ酸からなる任意のアミノ酸配列を示し、$CDRL_1$は配列表の配列番号65で示されるアミノ酸配列又は1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を示し、FRL_2は15個のアミノ酸からなる任意のアミノ酸配列を表し、$CDRL_2$は配列表の配列番号67で示されるアミノ酸配列を示し、FRL_3は32個のアミノ酸からなる任意のアミノ酸配列を表し、$CDRL_3$は配列表の配列番号69で示されるアミノ酸配列又は1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を示し、FRL_4は10個のアミノ酸からなる任意のアミノ酸配列を示し、各アミノ酸はそれぞれペプチド結合で連結している。）。

[12] ハイブリドーマSH357－1（FERM BP－10837）が産生する抗体によって認識されるエピトープを認識する抗体。

[13] 以下のa）乃至d）に示される性質を有する、請求項12に記載の抗体：

a）EPHA2チロシン残基のリン酸化能を有さない；

b）EPHA2発現細胞に対してADCC活性を有する；

c）EPHA2発現細胞に対してCDC活性を有する；

d）In vivoで抗腫瘍活性を有する。

[14] 配列表の配列番号8のアミノ酸番号426乃至534に示されるアミノ酸配列からなるペプチドに特異的に結合し、以下のa）乃至e）に示される性質を有する抗体：

a）EPHA2チロシン残基のリン酸化能を有さない；

b）EPHA2蛋白質量の減少作用を示さない；

c）EPHA2発現細胞に対してADCC活性を有する；

d）EPHA2発現細胞に対してCDC活性を有する；

e）In vivoで抗腫瘍活性を有する。

[15] 配列表の配列番号8のアミノ酸番号439乃至534に示されるアミノ酸配列からなるペプチドに特異的に結合する、請求項12乃至14から選択されるいずれか一つに記載の抗体。

[16] EPHA2リガンドにより誘導されるEPHA2チロシン残基のリン酸化を抑制する、請求項12乃至15から選択されるいずれか一つに記載の抗体。

[17] EPHA2リガンドのEPHA2に対する結合を阻害するのではなく、リガンドにより誘導されるEPHA2チロシン残基のリン酸化を抑制する、請求項12乃至15から選択されるいずれか一つに記載の抗体。

[18] 重鎖可変領域の相補性決定領域として、配列表の配列番号71、73及び75に示されるアミノ酸配列又はこれらのアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、軽鎖可変領域の相補性決定領域として、配列表の配列番号77、79及び81に示されるアミノ酸配列又はこれらのアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有する、配列表の配列番号8に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドに特異的に結合する抗体。

[19] 以下の1)及び2)に示される特徴を有する、配列表の配列番号8に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドに特異的に結合する抗体:

1)一般式(I)で示されるアミノ酸配列を含む重鎖ペプチドを有する;

$-FRH_1-CDRH_1-FRH_2-CDRH_2-FRH_3-CDRH_3-FRH_4-$ (I)

(式中、FRH1は18乃至30個のアミノ酸からなる任意のアミノ酸配列を示し、$CDRH_1$は配列表の配列番号71で示されるアミノ酸配列又は1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を示し、FRH_2は14個のアミノ酸からなる任意のアミノ酸配列を表し、$CDRH_2$は配列表の配列番号73で示されるアミノ酸配列又は1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を示し、FRH_3は32個のアミノ酸からなる任意のアミノ酸配列を表し、$CDRH_3$は配列表の配列番号75で示されるアミノ酸配列又は1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を示し、FRH_4は11個のアミノ酸からなる任意のアミノ酸配列を示し、各アミノ酸はそれぞれペプチド結合で連結している。);

2)一般式(II)で示されるアミノ酸配列を含むことからなる軽鎖ポリペプチドを有する;

$-FRL_1-CDRL_1-FRL_2-CDRL_2-FRL_3-CDRL_3-FRL_4-$ (II)

(式中、FRL_1は23個のアミノ酸からなる任意のアミノ酸配列を示し、$CDRL_1$は配列

表の配列番号77で示されるアミノ酸配列又は1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を示し、FRL_2は15個のアミノ酸からなる任意のアミノ酸配列を表し、$CDRL_2$は配列表の配列番号79で示されるアミノ酸配列又は1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を示し、FRL_3は32個のアミノ酸からなる任意のアミノ酸配列を表し、$CDRL_3$は配列表の配列番号81で示されるアミノ酸配列又は1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を示し、FRL_4は10個のアミノ酸からなる任意のアミノ酸配列を示し、各アミノ酸はそれぞれペプチド結合で連結している。)。

[20] ヒト化抗体であることを特徴とする、請求項1乃至19から選択されるいずれか1つに記載の抗体。

[21] ヒト抗体であることを特徴とする、請求項1乃至19から選択されるいずれか1つに記載の抗体。

[22] IgG抗体であることを特徴とする、請求項1乃至19から選択されるいずれか1つに記載の抗体。

[23] Fab、F(ab')2、Fv、scFV、ディアボディー、線状抗体及び多特異的抗体から選択されるいずれかであることを特徴とする、請求項1乃至9及び、12乃至17から選択されるいずれか1つに記載の抗体。

[24] ハイブリドーマSH348－1(FERM BP－10836)が産生する抗体。

[25] ハイブリドーマSH357－1(FERM BP－10837)が産生する抗体。

[26] 以下の1)及び2)からなる抗体:

1)配列表の配列番号35のアミノ酸番号1乃至119に示されるアミノ酸配列を含む重鎖ポリペプチド又は配列表の配列番号39のアミノ酸番号1乃至119に示されるアミノ酸配列を含む重鎖ポリペプチド;

2)配列表の配列番号37のアミノ酸番号1乃至112に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖ポリペプチド又は配列表の配列番号41のアミノ酸番号1乃至112に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖ポリペプチド。

[27] 以下の1)又は2)からなる抗体:

1)配列表の配列番号35のアミノ酸番号1乃至119に示されるアミノ酸配列を含む重

鎖ポリペプチド及び、配列表の配列番号37のアミノ酸番号1乃至112に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖ポリペプチド;

2)配列表の配列番号39のアミノ酸番号1乃至119に示されるアミノ酸配列を含む重鎖ポリペプチド及び、配列表の配列番号41のアミノ酸番号1乃至112に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖ポリペプチド。

[28] 以下の1)及び2)からなる抗体:

1)配列表の配列番号35に示されるアミノ酸配列を含む重鎖ポリペプチド又は配列表の配列番号39に示されるアミノ酸配列を含む重鎖ポリペプチド;

2)配列表の配列番号37に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖ポリペプチド又は配列表の配列番号41に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖ポリペプチド。

[29] 以下の1)又は2)からなる抗体:

1)配列表の配列番号35に示されるアミノ酸配列を含む重鎖ポリペプチド及び、配列表の配列番号37に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖ポリペプチド;

2)配列表の配列番号39に示されるアミノ酸配列を含む重鎖ポリペプチド及び、配列表の配列番号41に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖ポリペプチド。

[30] 請求項24乃至29から選択されるいずれか1つに記載の抗体をヒト化した抗体。

[31] 以下の1)及び2)からなる抗体:

1)配列表の配列番号107のアミノ酸番号20乃至468に示されるアミノ酸配列を含む重鎖ポリペプチド又は配列表の配列番号115のアミノ酸番号20乃至468に示されるアミノ酸配列を含む重鎖ポリペプチド;

2)配列表の配列番号91のアミノ酸番号21乃至239に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖ポリペプチド又は配列表の配列番号99のアミノ酸番号21乃至239に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖ポリペプチド。

[32] 以下の1)又は2)からなる抗体:

1)配列表の配列番号107のアミノ酸番号20乃至468に示されるアミノ酸配列を含む重鎖ポリペプチド及び、配列表の配列番号91のアミノ酸番号21乃至239に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖ポリペプチド;

2)配列表の配列番号115のアミノ酸番号20乃至468に示されるアミノ酸配列を含む

重鎖ポリペプチド及び、配列表の配列番号99のアミノ酸番号21乃至239に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖ポリペプチド。

[33] 以下の1)及び2)からなる抗体:

1)配列表の配列番号139のアミノ酸番号20乃至468に示されるアミノ酸配列を含む重鎖ポリペプチド又は配列表の配列番号147のアミノ酸番号20乃至468に示されるアミノ酸配列を含む重鎖ポリペプチド;

2)配列表の配列番号123のアミノ酸番号21乃至239に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖ポリペプチド又は配列表の配列番号131のアミノ酸番号21乃至239に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖ポリペプチド。

[34] 以下の1)又は2)からなる抗体:

1)配列表の配列番号139のアミノ酸番号20乃至468に示されるアミノ酸配列を含む重鎖ポリペプチド及び、配列表の配列番号123のアミノ酸番号21乃至239に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖ポリペプチド;

2)配列表の配列番号147のアミノ酸番号20乃至468に示されるアミノ酸配列を含む重鎖ポリペプチド及び、配列表の配列番号131のアミノ酸番号21乃至239に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖ポリペプチド。

[35] 請求項24乃至34から選択されるいずれかに記載の抗体の、Fab、F(ab')2、Fv、scFV、ディアボディー、線状抗体及び多特異的抗体から選択されるいずれか一つ。

[36] 以下の1)乃至20)からなる群から選択されるいずれか一つのポリペプチド:

1)配列表の配列番号35のアミノ酸番号1乃至119に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチド

2)配列表の配列番号39のアミノ酸番号1乃至119に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチド;

3)配列表の配列番号37のアミノ酸番号1乃至112に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチド;

4)配列表の配列番号41のアミノ酸番号1乃至112に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチド;

5)配列表の配列番号107のアミノ酸番号20乃至468に示されるアミノ酸配列を含む

ポリペプチド;

6)配列表の配列番号115のアミノ酸番号20乃至468に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチド;

7)配列表の配列番号107のアミノ酸番号20乃至138に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチド;

8)配列表の配列番号115のアミノ酸番号20乃至138に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチド;

9)配列表の配列番号91のアミノ酸番号21乃至239に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチド;

10)配列表の配列番号99のアミノ酸番号21乃至239に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチド;

11)配列表の配列表の配列番号91のアミノ酸番号21乃至134に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチド;

12)配列表の配列番号99のアミノ酸番号21乃至134に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチド;

13)配列表の配列番号139のアミノ酸番号20乃至468に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチド;

14)配列表の配列番号147のアミノ酸番号20乃至468に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチド;

15)配列表の配列番号139のアミノ酸番号20乃至138に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチド;

16)配列表の配列番号147のアミノ酸番号20乃至138に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチド;

17)配列表の配列番号123のアミノ酸番号21乃至239に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチド;

18)配列表の配列番号131のアミノ酸番号21乃至239に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチド。

19)配列表の配列番号123のアミノ酸番号21乃至134に示されるアミノ酸配列を含

むポリペプチド;

20)配列表の配列番号131のアミノ酸番号21乃至134に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチド。

[37] マウスハイブリドーマSH－348－1(FERM BP－10836)。

[38] マウスハイブリドーマSH－357－1(FERM BP－10837)。

[39] 請求項1乃至36から選択される抗体の少なくともいずれか1つを含有することを特徴とする、医薬組成物。

[40] 請求項1乃至36から選択される抗体の少なくともいずれか一つを含有することを特徴とする、癌の治療用医薬組成物。

[41] 請求項1乃至36、及び、請求項39、40からなる群から選択されるいずれかを投与することによる、哺乳動物の有する腫瘍の増殖の抑制方法。

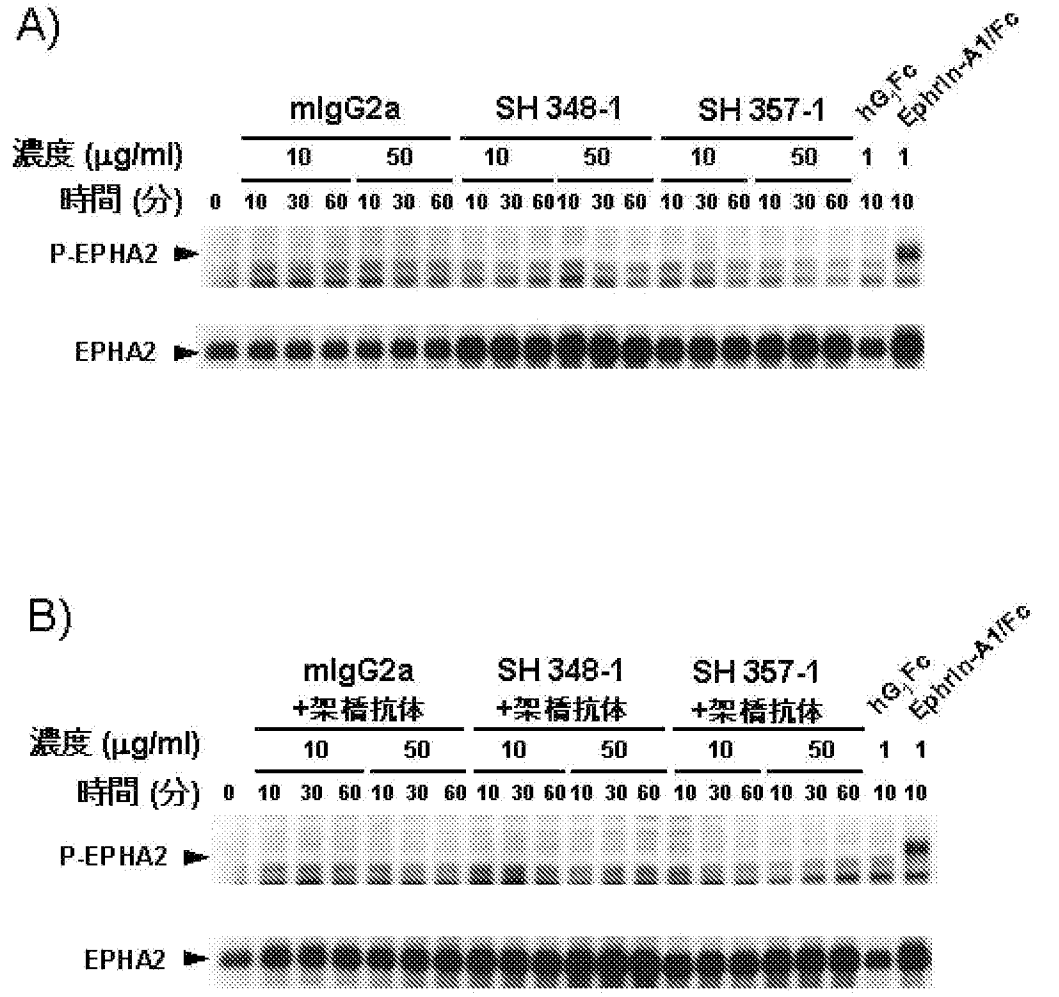
[42] 腫瘍が、EPHA2を発現している腫瘍であることを特徴とする、請求項41に記載の腫瘍の増殖の抑制方法。

[43] 請求項1乃至36から選択されるいずれか一つに記載の抗体をコードするポリヌクレオチド。

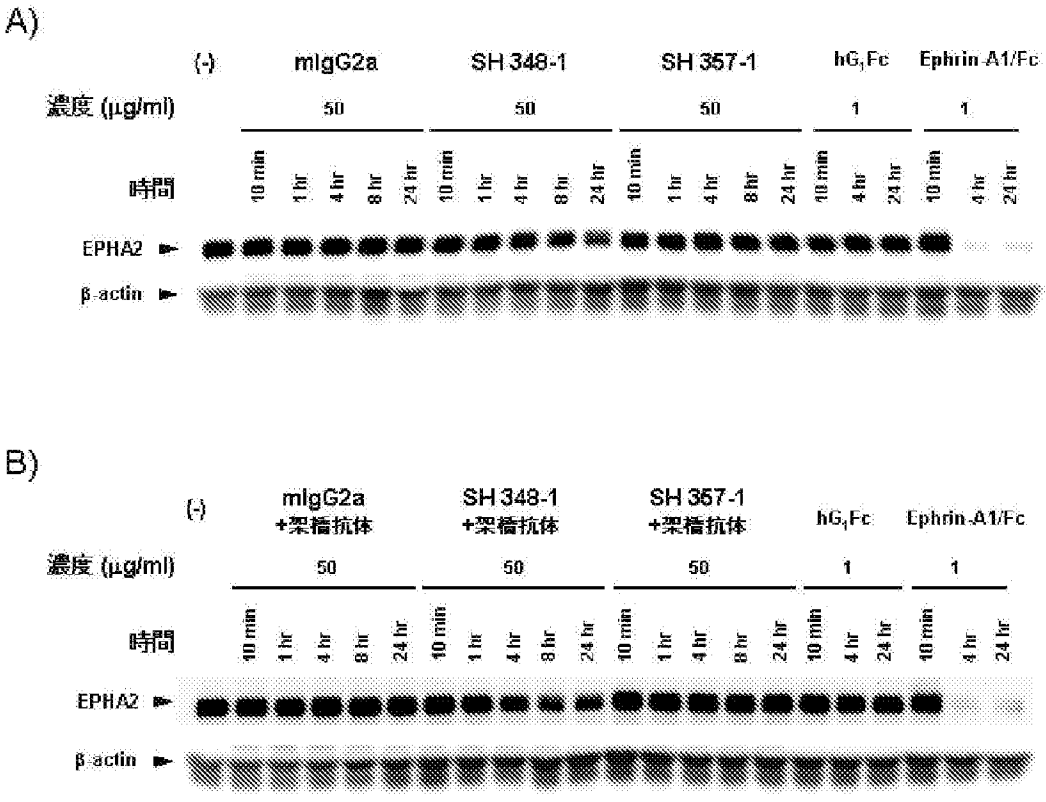
[44] 請求項43に記載のポリヌクレオチドによって形質転換された宿主細胞。

[45] 請求項44に記載の宿主細胞を用いた抗体の製造方法。

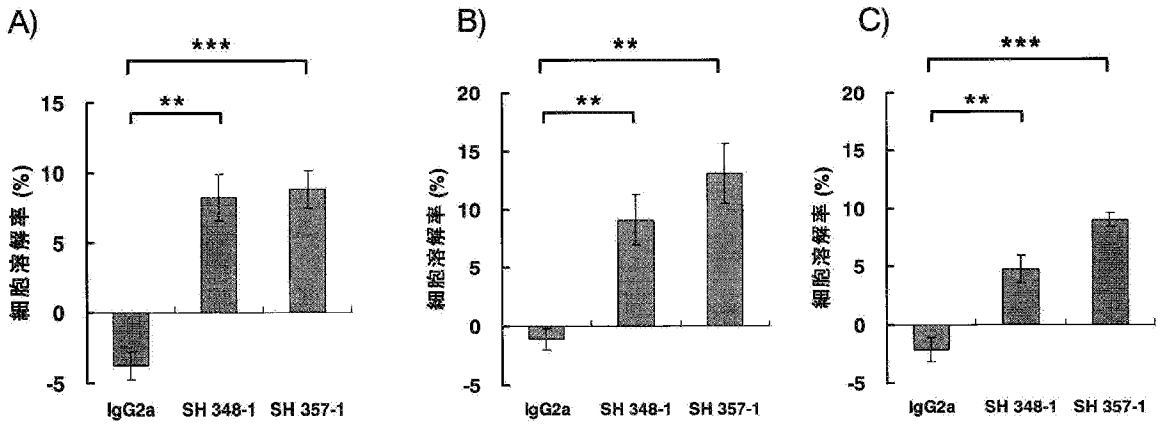
[図1]


A)
mIgG2a
SH 348-1
SH 357-1
hG1Fc
Ephrin-A1/Fc
濃度 (μg/ml)
10 50 10 50 10 50 1 1
時間 (分)
0 10 30 60 10 30 60 10 30 60 10 30 60 10 30 60 10 30 60 10 10
P-EPHA2
EPHA2
B)
mIgG2a +架橋抗体
SH 348-1 +架橋抗体
SH 357-1 +架橋抗体
hG1Fc
Ephrin-A1/Fc
濃度 (μg/ml)
10 50 10 50 10 50 1 1
時間 (分)
0 10 30 60 10 30 60 10 30 60 10 30 60 10 30 60 10 30 60 10 10
P-EPHA2
EPHA2

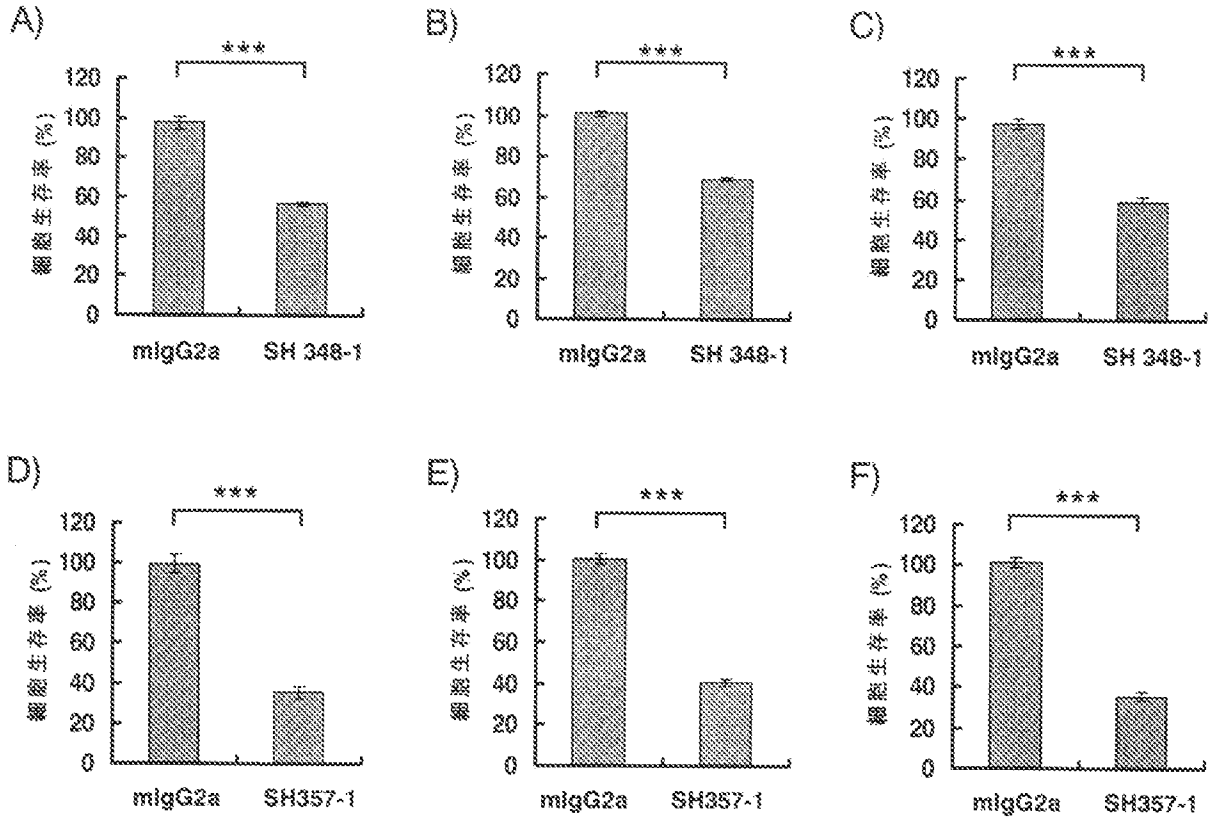
[図2]


A)
(-)
mIgG2a
SH 348-1
SH 357-1
hG1Fc
Ephrin-A1/Fc
濃度 (μg/ml)
50 50 50 1 1
時間
10 min 1 hr 4 hr 8 hr 24 hr 10 min 1 hr 4 hr 8 hr 24 hr 10 min 1 hr 4 hr 8 hr 24 hr 10 min 4 hr 24 hr 10 min 4 hr 24 hr
EPHA2
β-actin
B)
(-)
mIgG2a +架橋抗体
SH 348-1 +架橋抗体
SH 357-1 +架橋抗体
hG1Fc
Ephrin-A1/Fc
濃度 (μg/ml)
50 50 50 1 1
時間
10 min 1 hr 4 hr 8 hr 24 hr 10 min 1 hr 4 hr 8 hr 24 hr 10 min 1 hr 4 hr 8 hr 24 hr 10 min 4 hr 24 hr 10 min 4 hr 24 hr
EPHA2
β-actin

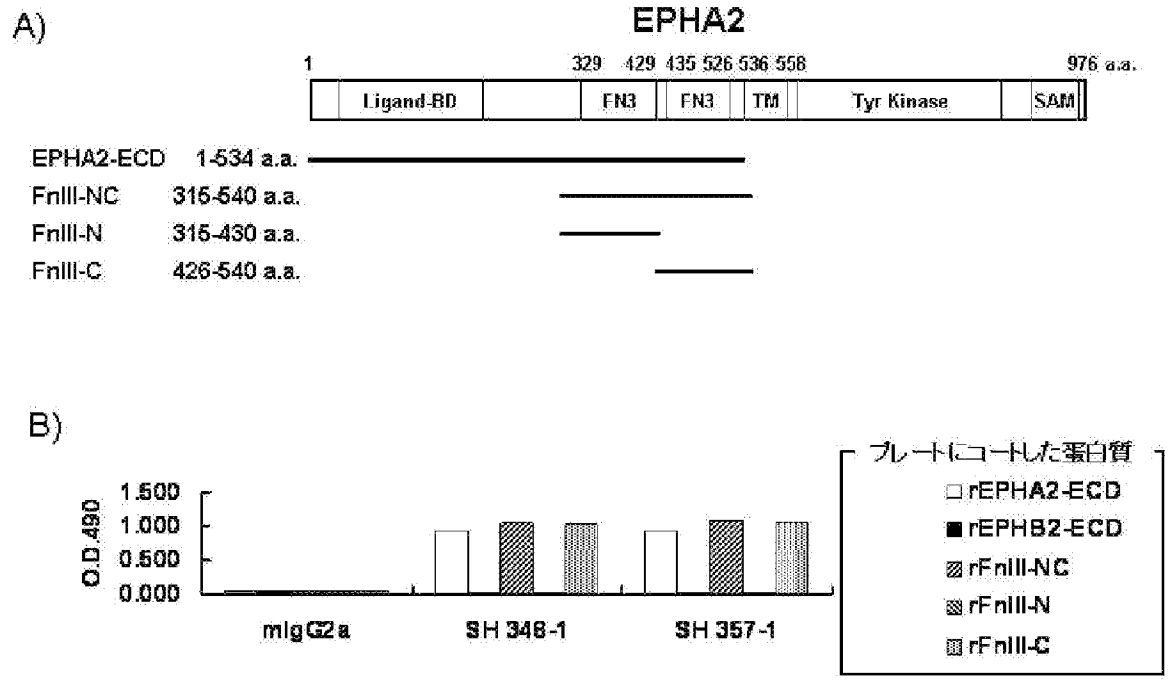
[図3]


A)
B)
C)
細胞溶解率 (%)
IgG2a
SH 348-1
SH 357-1
**
***

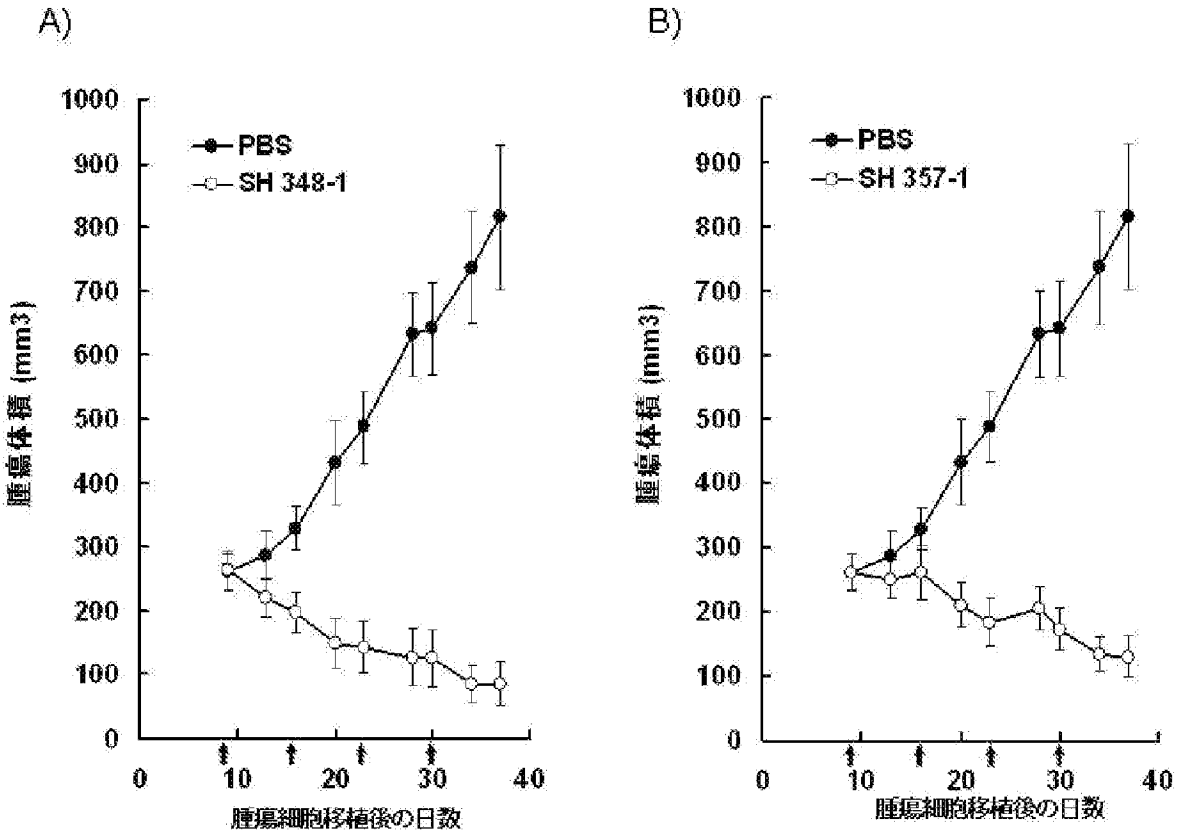
[図4]


A)
B)
C)
D)
E)
F)
細胞生存率 (%)
mIgG2a
SH 348-1
SH357-1
***

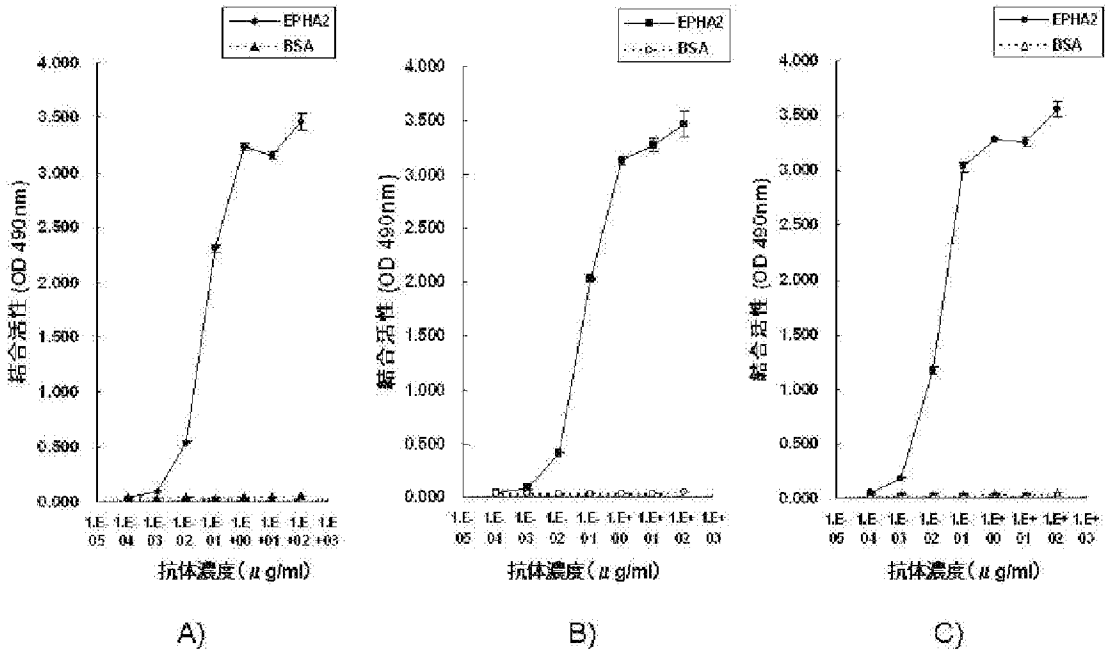
[図5]


A)
EPHA2
1
329
429
435
526
536
558
976 a.a.
Ligand-BD
FN3
FN3
TM
Tyr Kinase
SAM
EPHA2-ECD 1-534 a.a.
FnIII-NC 316-540 a.a.
FnIII-N 315-430 a.a.
FnIII-C 426-540 a.a.
B)
O.D.490
1.500
1.000
0.500
0.000
mIgG2a
SH 348-1
SH 357-1
プレートにコートした蛋白質
rEPHA2-ECD
rEPHB2-ECD
rFnIII-NC
rFnIII-N
rFnIII-C

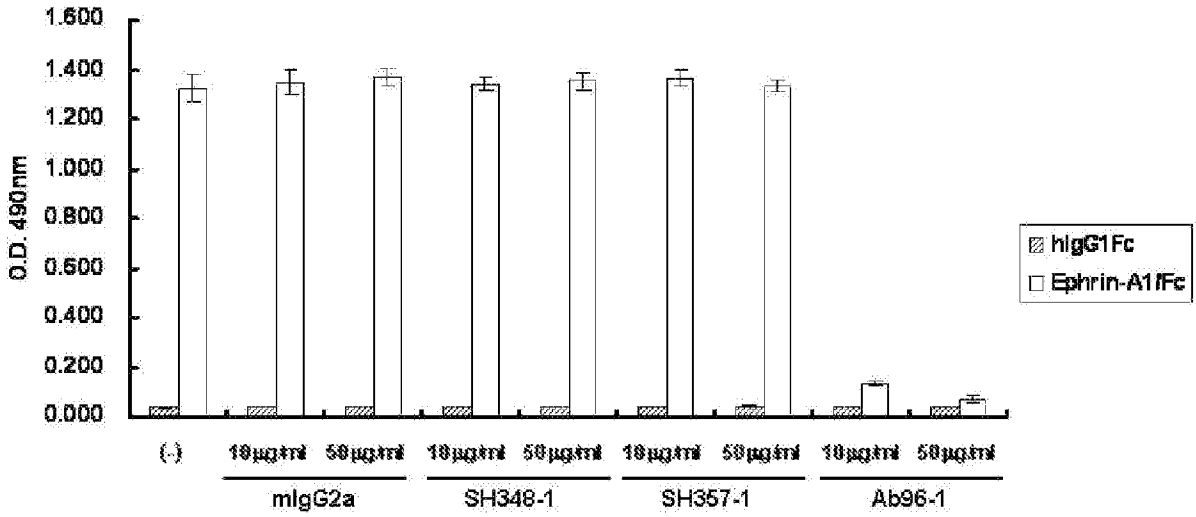
[図6]


A)
B)
PBS
SH 348-1
SH 357-1
腫瘍体積 (mm3)
腫瘍細胞移植後の日数
0
100
200
300
400
500
600
700
800
900
1000
10
20
30
40

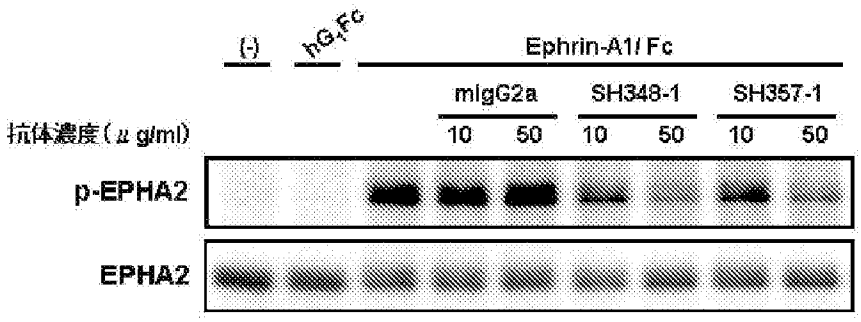
[図7]


EPHA2
BSA
結合活性 (OD 490nm)
抗体濃度（μg/ml）
A)
B)
C)

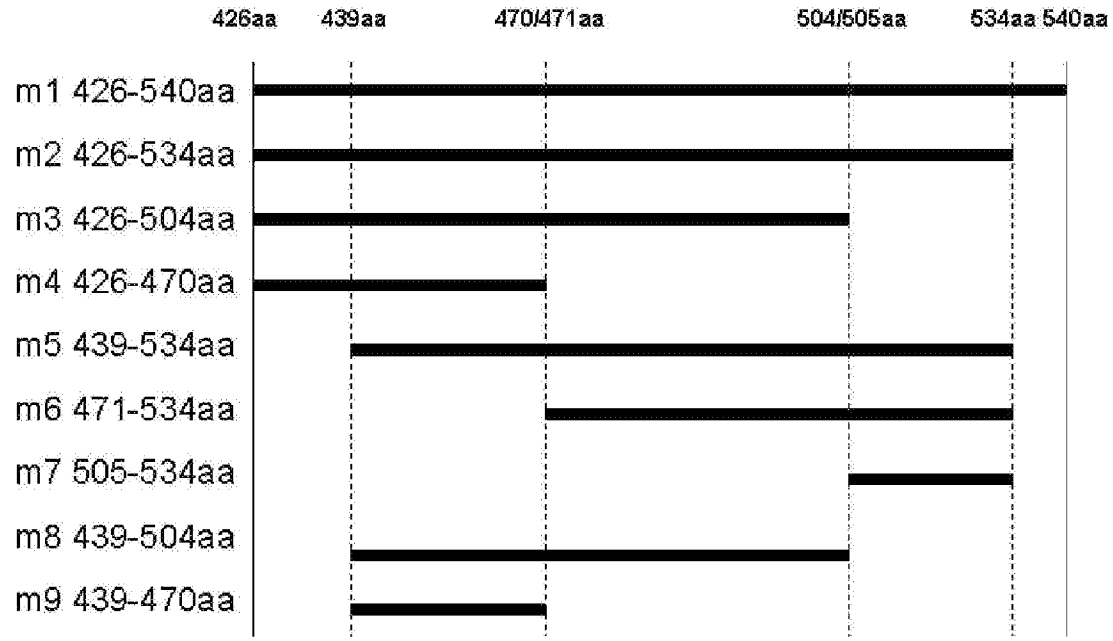
[図8]


O.D. 490nm
hIgG1Fc
Ephrin-A1/Fc
(-)
10μg/ml
50μg/ml
mIgG2a
SH348-1
SH357-1
Ab96-1

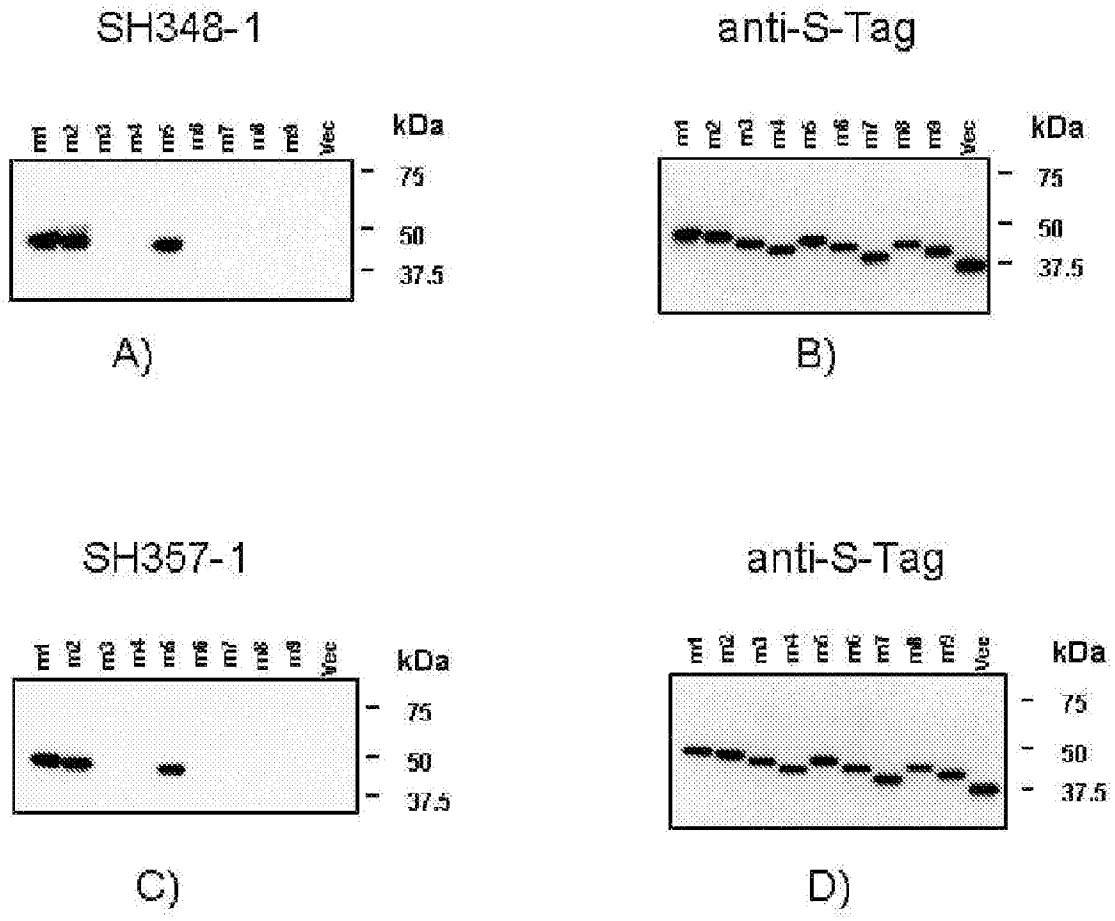
[図9]


(-)
hG1Fc
Ephrin-A1/Fc
mIgG2a
SH348-1
SH357-1
抗体濃度（μg/ml）
10
50
p-EPHA2
EPHA2

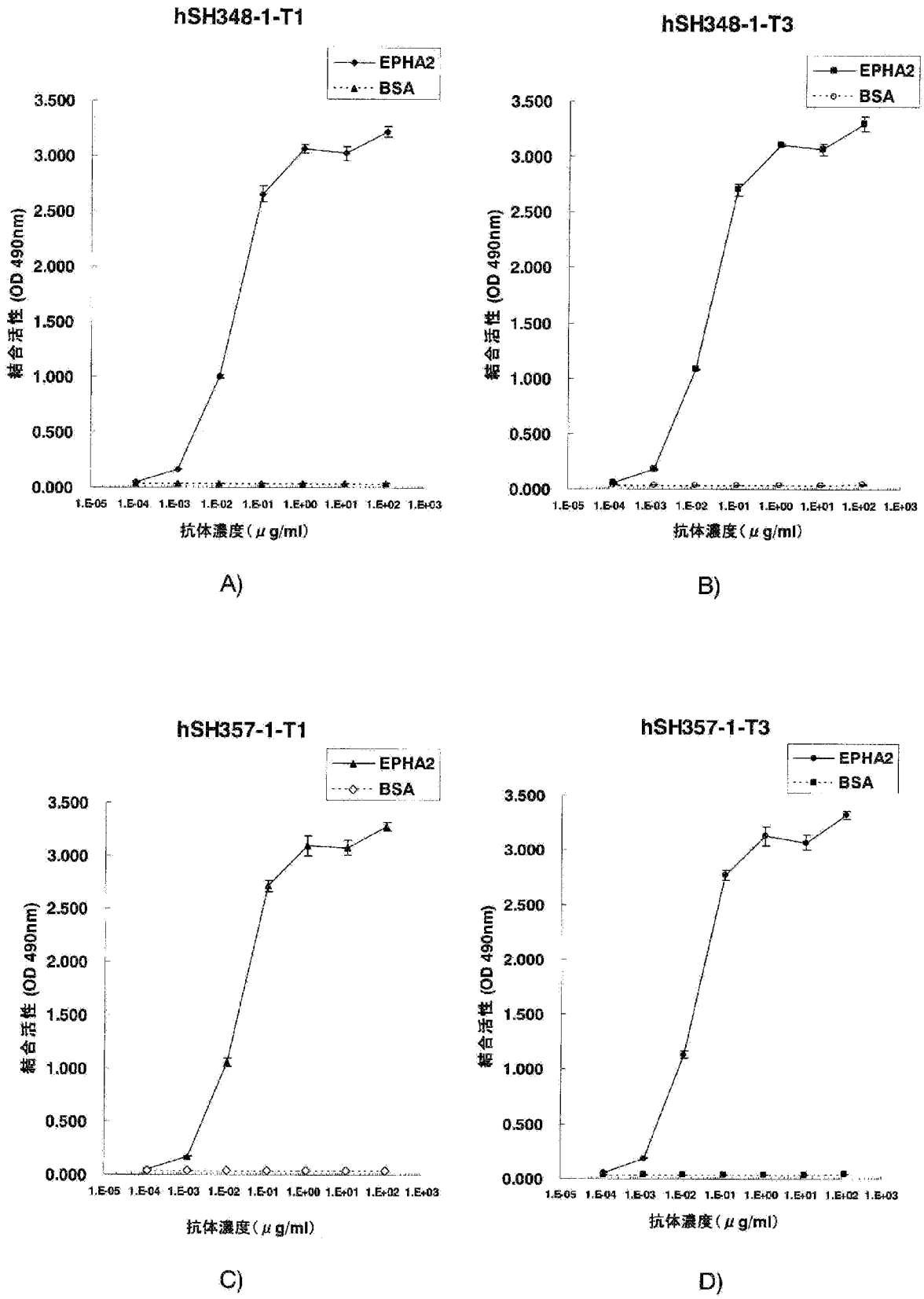
[図10]


426aa
439aa
470/471aa
504/505aa
534aa 540aa
m1 426-540aa
m2 426-534aa
m3 426-504aa
m4 426-470aa
m5 439-534aa
m6 471-534aa
m7 505-534aa
m8 439-504aa
m9 439-470aa

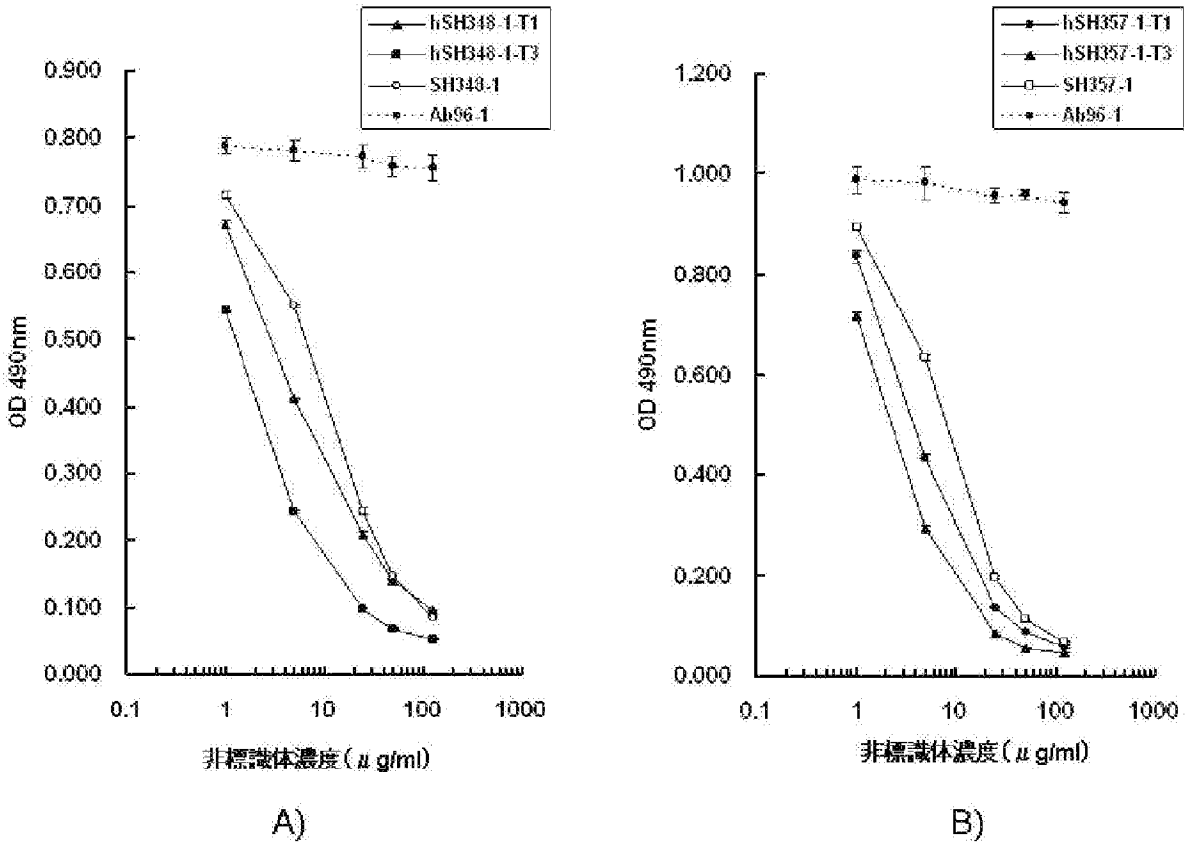
[図11]


SH348-1
anti-S-Tag
kDa
75
50
37.5
A)
B)
SH357-1
anti-S-Tag
kDa
75
50
37.5
C)
D)

[図12]

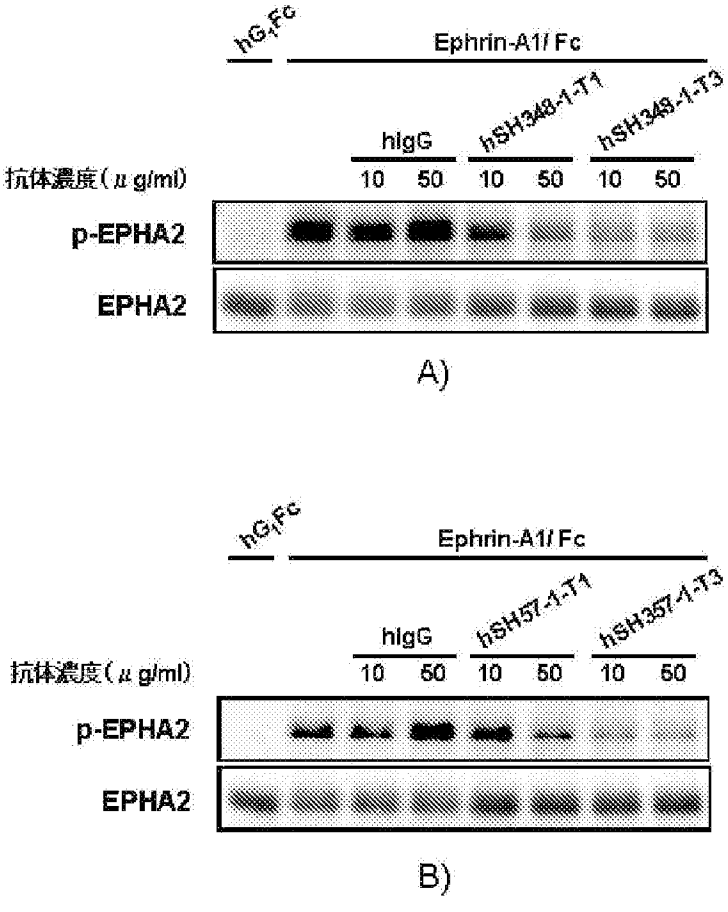

hSH348-1-T1
EPHA2
BSA
結合活性 (OD 490nm)
3.500
3.000
2.500
2.000
1.500
1.000
0.500
0.000
1.E-05 1.E-04 1.E-03 1.E-02 1.E-01 1.E+00 1.E+01 1.E+02 1.E+03
抗体濃度(μg/ml)
A)
hSH348-1-T3
EPHA2
BSA
結合活性 (OD 490nm)
抗体濃度(μg/ml)
B)
hSH357-1-T1
EPHA2
BSA
結合活性 (OD 490nm)
抗体濃度(μg/ml)
C)
hSH357-1-T3
EPHA2
BSA
結合活性 (OD 490nm)
抗体濃度(μg/ml)
D)

[図13]


hSH348-1-T1
hSH348-1-T3
SH348-1
Ab96-1
OD 490nm
0.900
0.800
0.700
0.600
0.500
0.400
0.300
0.200
0.100
0.000
0.1
1
10
100
1000
非標識体濃度（μg/ml）
hSH357-1-T1
hSH357-1-T3
SH357-1
Ab96-1
OD 490nm
1.200
1.000
0.800
0.600
0.400
0.200
0.000
0.1
1
10
100
1000
非標識体濃度（μg/ml）

A) B)

[図14]


hG1Fc
Ephrin-A1/Fc
hIgG
hSH348-1-T1
hSH348-1-T3
抗体濃度（μg/ml）
10 50 10 50 10 50
p-EPHA2
EPHA2
hG1Fc
Ephrin-A1/Fc
hIgG
hSH57-1-T1
hSH357-1-T3
抗体濃度（μg/ml）
10 50 10 50 10 50
p-EPHA2
EPHA2

A)

B)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2008/065486

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N15/02(2006.01)i, *A61K39/395*(2006.01)i, *A61P35/00*(2006.01)i, *C07K16/28*(2006.01)i, *C07K16/46*(2006.01)i, *C12P21/08*(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)
C12N15/02, A61K39/395, A61P35/00, C07K16/28, C07K16/46, C12P21/08

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)
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq, JSTPlus(JDreamII), JMEDPlus(JDreamII), JST7580(JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KIEWLICH D. ET AL, Anti-EphA2 antibodies decrease EphA2 protein levels in murine CT26 colorectal and human MDA-231 breast tumors but do not inhibit tumor growth., Neoplasia, 2006, Vol.8, No.1, p.18-30, full text	1-9,12-17, 20-25,27,29, 30,32,34,35, 37-40,43-45
A	CARLES-KINCH K. ET AL, Antibody targeting of the EphA2 tyrosine kinase inhibits malignant cell behavior., Cancer Res., 2002, Vol.62, No.10, p.2840-2847, full text	1-9,12-17, 20-25,27,29, 30,32,34,35, 37-40,43-45
A	COFFMAN KT, ET AL, Differential EphA2 epitope display on normal versus malignant cells., Cancer Res., 2003, Vol.63, No.22, p.7907-7912, full text	1-9,12-17, 20-25,27,29, 30,32,34,35, 37-40,43-45

☒ 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	Date of mailing of the international search report
14 November, 2008 (14.11.08)	25 November, 2008 (25.11.08)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2008/065486

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2007/030642 A2 (MEDIMMUNE INC. et al.), 15 March, 2007 (15.03.07), Full text & EP 1928912 A2 & CA 2621502 A1	1-9,12-17, 20-25,27,29, 30,32,34,35, 37-40,43-45
A	WO 2006/084226 A2 (RAVEN BIOTECHNOLOGIES, INC.), 10 August, 2006 (10.08.06), Full text & US 2006/174401 A1 & CA 2596798 A1	1-9,12-17, 20-25,27,29, 30,32,34,35, 37-40,43-45

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2008/065486

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. [X] Claims Nos.: 41, 42
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The invention of the above claims pertains to a method for treatment of a human body by therapy.

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:
See extra sheet.

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. [X] 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.:
1-9, 12-17, 20-25, 27, 29, 30, 32, 34, 35, 37-40, 43-45

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.

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

(1)

The common matter among the inventions of claims 1-9, 12-17, 20-25, 27, 29, 30, 32, 34, 35, 37-40 and 43-45 is "an antibody capable of specifically binding to a polypeptide comprising the amino acid sequence lying between amino acid-426 to amino acid-534 in SEQ ID NO:8 shown in the Sequence Listing". The common matter among the inventions of claims 10, 11, 18, 19, 26, 28, 31 and 33 is tentatively "an antibody capable of specifically binding to a polypeptide comprising the amino acid sequence lying between amino acid-426 to amino acid-534 in SEQ ID NO:8 shown in the Sequence Listing". In the antibodies according to the inventions of claims 10, 11,18 and 19, however, the amino acid sequences for the frameworks are not specified, or all of the combinations among three heavy-chain CDRs and three light-chain CDRs are not specified. Further, with regard to the whole scope of the inventions of claims 10, 11, 18 and 19, the antibodies claimed in these claims cannot be regarded as being capable of specifically binding to a polypeptide comprising the amino acid sequence lying between amino acid-426 to amino acid-534 in SEQ ID NO:8 shown in the Sequence Listing. Still further, in the antibody claimed in the inventions of claims 26, 28, 31 and 33, the combination of a specific heavy-chain immunoglobulin and a specific light-chain immunoglobulin is not specified. The specificity of an antibody can be defined only by the combination of a specific heavy-chain immunoglobulin and a specific light-chain immunoglobulin selected, and there is a low probability that an antibody having the specificity can be also produced by employing other combinations. Thus, with regard to the whole scope of the inventions of claims 26, 28, 31 and 33, the antibodies claimed in these claims cannot be regarded as being capable of specifically binding to a polypeptide comprising the amino acid sequence lying between amino acid-426 to amino acid-534 in SEQ ID NO:8 shown in the Sequence Listing. Therefore, the common matter among the inventions of claims 10, 11, 18, 19, 26, 28, 31 and 33 is "an antibody". However, an "antibody" is known at the time of the priority date of the present application, without the need of citing any relevant reference document. Therefore, there is no common "special technical feature" among the inventions of claims 1-9, 12-17, 20-25, 27, 29, 30, 32, 34, 35, 37-40, 43-45, 10, 11, 18, 19, 26, 28, 31 and 33.

The common matter between the inventions of claims 1-9, 12-17, 20-25, 27, 29, 30, 32, 34, 35, 37-40 and 43-45 and the invention of claim 36 is tentatively "an antibody capable of specifically binding to a polypeptide comprising the amino acid sequence lying between amino acid-426 to amino acid-534 in SEQ ID NO:8 shown in the Sequence Listing". Generally, however, in an antibody, a specific heavy-chain polypeptide and a specific light-chain polypeptide are polymerized, and three CDRs located on the framework of a heavy-chain polypeptide approach that of a light-chain polypeptide to form a pocket that acts as a antigen-recognizing/-binding site. Therefore, there is a low probability that the specificity of an antibody can be maintained only by a heavy-chain polypeptide alone or a light-chain immunological polypeptide alone. Further, it cannot be considered that all of the polypeptides recited in claim 36 can bind specifically to a polypeptide

(continued to next sheet)

comprising the amino acid sequence lying between amino acid-426 to amino acid-534 in SEQ ID NO:8 shown in the Sequence Listing. Therefore, the common matter among the inventions of claim 36 is "a polypeptide". However, a "polypeptide" is known at the time of the priority date of the present application, without the need of citing any relevant reference document. Therefore, there is no common "special technical feature" between the inventions of claims 1-9, 12-17, 20-25, 27, 29, 30, 32, 34, 35, 37-40 and 43-45 and the invention of claim 36.

(2)

As stated above, the common matter among 20 polypeptides recited in claim 36 is "a polypeptide". However, the 20 polypeptides have different amino acid sequences from one another, and therefore there is no common "special technical feature" among the 20 polypeptide.

Consequently, the claims include the following 29 groups of inventions.

1. Claims 1-9, 12-17, 20-25, 27, 29, 30, 32, 34, 35, 37-40 and 43-45;
2. Claims 10, 20-22, 39, 40 and 43-45;
3. Claims 11, 20-22, 39, 40 and 43-45;
4. Claims 18, 20-22, 39, 40 and 43-45;
5. Claims 19, 20-22, 39, 40 and 43-45;
6. Claims 26, 30, 35, 39, 40 and 43-45;
7. Claims 28, 30, 35, 39, 40 and 43-45;
8. Claims 31, 35, 39, 40 and 43-45;
9. Claims 33, 35, 39, 40 and 43-45; and
10-29. Claim 36 (parts referring to the polypeptides 1-20) and claims 39, 40 and 43-45.

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２００８／０６５４８６

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N15/02(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C07K16/28(2006.01)i, C07K16/46(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)i

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.　C12N15/02, A61K39/395, A61P35/00, C07K16/28, C07K16/46, C12P21/08

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

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(STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq, JSTPlus(JDreamII), JMEDPlus(JDreamII), JST7580(JDreamII)

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
A	KIEWLICH D. ET AL, Anti-EphA2 antibodies decrease EphA2 protein levels in murine CT26 colorectal and human MDA-231 breast tumors but do not inhibit tumor growth., Neoplasia, 2006, Vol.8, No.1, p.18-30, 全文	1-9,12-17,20-25,27,29,30,32,34,35,37-40,43-45
A	CARLES-KINCH K. ET AL, Antibody targeting of the EphA2 tyrosine kinase inhibits malignant cell behavior., Cancer Res., 2002, Vol.62, No.10, p.2840-2847, 全文	1-9,12-17,20-25,27,29,30,32,34,35,37-40,43-45

☑　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	国際調査報告の発送日
１４．１１．２００８	２５．１１．２００８

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）　４Ｂ　３５３４
柴原　直司
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８

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
A	COFFMAN KT, ET AL, Differential EphA2 epitope display on normal versus malignant cells., Cancer Res., 2003, Vol.63, No.22, p.7907-7912, 全文	1-9,12-17,20-25,27,29,30,32,34,35,37-40,43-45
A	WO 2007/030642 A2 (MEDIMMUNE INC., 外１名) 2007.03.15, 全文 & EP 1928912 A2 & CA 2621502 A1	1-9,12-17,20-25,27,29,30,32,34,35,37-40,43-45
A	WO 2006/084226 A2 (RAVEN BIOTECHNOLOGIES, INC.) 2006.08.10, 全文 & US 2006/174401 A1 & CA 2596798 A1	1-9,12-17,20-25,27,29,30,32,34,35,37-40,43-45

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２００８／０６５４８６

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（ＰＣＴ17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 41,42 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、
上記請求の範囲に記載された発明は、人を治療する方法に係るものである。

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。

特別ページ参照。

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った。

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ったので、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ったので、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。

請求の範囲 1-9, 12-17, 20-25, 27, 29, 30, 32, 34, 35, 37-40, 43-45

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った。

☐ 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ったが、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った。

☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

(1)

請求の範囲 1-9, 12-17, 20-25, 27, 29, 30, 32, 34, 35, 37-40, 43-45 に記載された発明に共通する事項は、「配列表の配列番号 8 のアミノ酸番号 426 乃至 534 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドに特異的に結合する抗体」に関するものであり、請求の範囲 10、請求の範囲 11、請求の範囲 18、請求の範囲 19、請求の範囲 26、請求の範囲 28、請求の範囲 31、及び、請求の範囲 33 に記載された発明に共通する事項は、一見すると、「配列表の配列番号 8 のアミノ酸番号 426 乃至 534 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドに特異的に結合する抗体」に関するものであるが、請求の範囲 10、請求の範囲 11、請求の範囲 18、及び、請求の範囲 19 に記載される発明の抗体は、フレームワークのアミノ酸配列を特定し、かつ、3 個の重鎖 CDR と 3 個の軽鎖 CDR の組み合わせをすべて特定したものではなく、請求の範囲 10、請求の範囲 11、請求の範囲 18、及び、請求の範囲 19 に記載される発明の全範囲について配列表の配列番号 8 のアミノ酸番号 426 乃至 534 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドに特異的に結合するとも認められず、また、請求の範囲 26、請求の範囲 28、請求の範囲 31、及び、請求の範囲 33 に記載される発明の抗体は、特定の重鎖免疫グロブリンと特定の軽鎖免疫グロブリンの組み合わせを特定したものではなく、抗体の特異性は特定の重鎖免疫グロブリンと特定の軽鎖免疫グロブリンの組み合わせを選択した場合に初めて得られるものであり、それ以外の組み合わせを用いた場合には特異性を有する抗体が得られる蓋然性は低く、請求の範囲 26、請求の範囲 28、請求の範囲 31、及び、請求の範囲 33 に記載される発明の全範囲について配列表の配列番号 8 のアミノ酸番号 426 乃至 534 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドに特異的に結合するとも認められないから、請求の範囲 10、請求の範囲 11、請求の範囲 18、請求の範囲 19、請求の範囲 26、請求の範囲 28、請求の範囲 31、及び、請求の範囲 33 に記載された発明に共通する事項は「抗体」に関するものとなり、「抗体」は文献を提示するまでもなく本願優先日前に公知であったから、請求の範囲 1-9, 12-17, 20-25, 27, 29, 30, 32, 34, 35, 37-40, 43-45、請求の範囲 10、請求の範囲 11、請求の範囲 18、請求の範囲 19、請求の範囲 26、請求の範囲 28、請求の範囲 31、及び、請求の範囲 33 に記載された発明の間で共通する「特別な技術的特徴」は存在しないといえる。

また、請求の範囲 1-9, 12-17, 20-25, 27, 29, 30, 32, 34, 35, 37-40, 43-45 に記載された発明と請求の範囲 36 に記載された発明に共通する事項は、一見すると、「配列表の配列番号 8 のアミノ酸番号 426 乃至 534 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドに特異的に結合する抗体」に関するものであるが、一般的に抗体は特定の重鎖ポリペプチドと特定の軽鎖ポリペプチドが重合することによって、重鎖ポリペプチドと軽鎖ポリペプチドのフレームワーク上の存在する 3 つの CDR 領域が互いに寄り合い、ポケットを形成し、該ポケットが抗原認識結合部位になるものであるから、重鎖ポリペプチド単独又は軽鎖免疫ポリペプチドでは、抗体としての特異性を維持する蓋然性は極めて低く、請求の範囲 36 に記載されるポリペプチド全てが配列表の配列番号 8 のアミノ酸番号 426 乃至 534 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドに特異的に結合するとも認められないから、請求の範囲 36 に記載された発明に共通する事項は「ポリペプチド」に関するものとなり、「ポリペプチド」は文献を提示するまでもなく本願優先日前に公知であったから、請求の範囲 1-9, 12-17, 20-25, 27, 29, 30, 32, 34, 35, 37-40, 43-45、及び、請求の範囲 36 に記載された発明の間で共通する「特別な技術的特徴」は存在しないといえる。

(2)
　上述したように、請求の範囲 36 に記載された 20 個のポリペプチドに共通する事項は「ポリペプチド」に関するものであり、また、20 個のポリペプチドのアミノ酸配列は互いに異なるものであるから、これら 20 個のポリペプチドに共通する「特別な技術的特徴」は存在しないといえる。

　したがって、請求の範囲には、
1. 請求の範囲 1-9, 12-17, 20-25, 27, 29, 30, 32, 34, 35, 37-40, 43-45、
2. 請求の範囲 10, 20-22, 39, 40, 43-45、
3. 請求の範囲 11, 20-22, 39, 40, 43-45、
4. 請求の範囲 18, 20-22, 39, 40, 43-45、
5. 請求の範囲 19, 20-22, 39, 40, 43-45、
6. 請求の範囲 26, 30, 35, 39, 40, 43-45、
7. 請求の範囲 28, 30, 35, 39, 40, 43-45、
8. 請求の範囲 31, 35, 39, 40, 43-45、9. 請求の範囲 33, 35, 39, 40, 43-45、
10-29. 請求の範囲 36(1-20 のポリペプチドをそれぞれ引用する部分), 39, 40, 43-45、
の 29 発明が包含されている。