

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6006640号
(P6006640)

(45) 発行日 平成28年10月12日 (2016. 10. 12)

(24) 登録日 平成28年9月16日 (2016. 9. 16)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 K 16/28 (2006. 01)

C O 7 K 16/28 Z N A

C 1 2 N 5/16 (2006. 01)

C 1 2 N 5/16

C 1 2 N 15/02 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00 C

A 6 1 K 39/395 (2006. 01)

A 6 1 K 39/395 T

A 6 1 P 35/00 (2006. 01)

A 6 1 P 35/00

請求項の数 9 (全 35 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2012-540965 (P2012-540965)
 (86) (22) 出願日 平成23年10月28日 (2011. 10. 28)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2011/074958
 (87) 国際公開番号 W02012/057328
 (87) 国際公開日 平成24年5月3日 (2012. 5. 3)
 審査請求日 平成26年10月23日 (2014. 10. 23)
 (31) 優先権主張番号 特願2011-150812 (P2011-150812)
 (32) 優先日 平成23年7月7日 (2011. 7. 7)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)
 (31) 優先権主張番号 特願2010-243708 (P2010-243708)
 (32) 優先日 平成22年10月29日 (2010. 10. 29)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

微生物の受託番号 NPMD NITE BP-989

微生物の受託番号 NPMD NITE BP-1147

微生物の受託番号 NPMD NITE BP-1145

(73) 特許権者 503196776
 株式会社ベルセウスプロテオミクス
 東京都目黒区駒場四丁目7番6号 パーク
 ビル
 (74) 代理人 110000109
 特許業務法人特許事務所サイクス
 (72) 発明者 石井 敬介
 東京都目黒区駒場4丁目7番6号 パーク
 ビル2F 株式会社ベルセウスプロテオミ
 クス内
 (72) 発明者 勝見 恵子
 東京都目黒区駒場4丁目7番6号 パーク
 ビル2F 株式会社ベルセウスプロテオミ
 クス内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 高い内在化能力を有する抗CDH3抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

Pカドヘリンのカドヘリンドメイン1 (EC1) を認識し、かつ高い内在化能を示す抗Pカドヘリンモノクローナル抗体 (前記の高い内在化能とは、前記抗体とサポリン標識抗マウスIgG抗体を投与したPカドヘリン発現細胞の生存率が45%以下であることを意味する) とDM1とがリンカーにより結合してなる、細胞傷害剤であって、上記リンカーがスルフォスクシイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサノ-1-カルボキシレート (Sulfosuccinimidyl-4-(N-maleimidomethyl) cyclohexanecarboxylate) (SMCC)、N-スクシニイミジル-4-(マレイミドメチル)シクロヘキサノカルボキシレート (SMCC)、又はN-スクシニイミジル-4-(N-マレイミドメチル)-シクロヘキサノ-1-カルボキシル-(6-アミドカプロエート) (LC-SMCC) である、細胞傷害剤。

【請求項2】

前記モノクローナル抗体が、PカドヘリンまたはPカドヘリンを発現している細胞を免疫原として投与した免疫動物から取得した抗体産生細胞が産生する抗体である、請求項1に記載の細胞傷害剤。

【請求項3】

Pカドヘリンが全長、あるいは細胞外領域のみを発現させた可溶性Pカドヘリン、またはその断片である、請求項2に記載の細胞傷害剤。

【請求項4】

前記モノクローナル抗体が、キメラ化抗体、ヒト化抗体またはヒト抗体である、請求項1

に記載の細胞傷害剤。

【請求項5】

前記モノクローナル抗体が、受託番号N I T E B P - 9 8 8、N I T E B P - 1 1 4 5、N I T E B P - 1 1 4 7又はN I T E B P - 1 1 4 8を有する細胞が産生するモノクローナル抗体である、請求項1から4のいずれか1項に記載の細胞傷害剤。

【請求項6】

抗体1分子あたり1～10個のDM1がリンカーを介して結合している、請求項1から5のいずれか1項に記載の細胞傷害剤。

【請求項7】

請求項1から6のいずれか1項に記載の細胞傷害剤を有効成分として含有する医薬組成物。

10

【請求項8】

請求項1から6のいずれか1項に記載の細胞傷害剤を有効成分として含有するヒトPカドヘリン高発現疾患の治療薬。

【請求項9】

ヒトPカドヘリン高発現疾患が、乳がん、肝がん、大腸がん、又は膵がんである、請求項8に記載の治療薬。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

20

本発明は、カドヘリンの特定のドメインを認識し、かつ高い内在化能を有する抗カドヘリン抗体に関する。本発明はさらに、抗カドヘリン抗体の薬剤コンジュゲートに関する。本発明はさらに抗カドヘリン抗体の薬剤コンジュゲートの使用方法に関する。

【背景技術】

【0002】

癌は、死亡原因の上位を占める重要な疾患であるが、その治療ニーズはいまだ満たされていない。近年、従来の化学療法の正常細胞にもダメージを与えるという問題点を解決するために、癌細胞に特異的に発現する特定の分子を標的として薬剤を設計し治療を行う分子標的薬による癌治療が盛んに研究されている。

【0003】

30

癌における分子治療薬の標的となりうる分子として、カドヘリンが挙げられる。カドヘリンは、カルシウム依存的に同種親和性の細胞接着に関与する分子として発見された膜タンパク質である（非特許文献1）。相互にホモロジーが高い約110アミノ酸残基からなるカドヘリンリピート（ECs）を持つタンパク質はカドヘリンスーパーファミリーと呼ばれ、120種類以上のタンパク質が存在し、多細胞構造の維持に重要な役割を果たしている。

【0004】

癌細胞で発現が上昇する例が報告されており、正常組織と比較して癌組織でのカドヘリンの発現が高い癌細胞に対しては、カドヘリンを認識する抗体に抗癌剤を結合させた薬剤や、抗体依存性細胞傷害活性（ADCC）を有する抗体を癌の治療に用いることが検討されている（特許文献1、特許文献2）。

40

【0005】

カドヘリンスーパーファミリーに属するタンパク質は、その構造の特徴により1）古典的カドヘリン、2）デスモゾームカドヘリン、3）プロトカドヘリン、4）その他に大きく分類することができる。カドヘリンスーパーファミリーの主要なメンバーであるEカドヘリン（CDH1）、Nカドヘリン（CDH2）、Pカドヘリン（CDH3）といった古典的カドヘリンは相互にホモロジーが高い（図1）。すなわち、2量体を形成するとされている1回膜貫通型タンパク質で、細胞外領域にEC1-EC5の5つのカドヘリンドメインと細胞内ドメインを持つ。古典的カドヘリンを介する細胞接着は同種細胞間での接着という特徴があり、細胞種により特異的に発現の状態が異なる同種のカドヘリン分子を

50

細胞が相互に認識することによって行われる。CDH1はCDH1を認識して結合し、CDH3はCDH3を認識して結合するという機序で同種細胞相互が接着する（図2）。

【0006】

カドヘリン相互の同種／異種の認識は細胞外ドメインのN端に位置するカドヘリンドメイン1（EC1）によるとされる（非特許文献2）。Klingel等は、ヒトCDH3のアミノ酸配列の第1位～第213位（配列番号2）とヒトCDH1の対応する領域を入れ替えると、CDH1とは結合せず、CDH3と結合することを示している（非特許文献3）。このように、CDH1、CDH3をはじめとする古典的カドヘリンは同一の機序で相互に結合すると考えられる。

【0007】

近年、分子標的薬として多くの癌治療用の抗体医薬が実際に上市され、その多くはADCを作用機序としてあげている。しかしその薬効は必ずしも十分なものではなく、より強力な抗腫瘍効果を示す技術開発が進められている。

【0008】

抗体の抗腫瘍能を増強する有効な手段の一つとして抗体と強力な毒性を有する薬剤（毒素）との連結があげられる。毒素はそれ単独で患者に投与すると、正常組織にも障害を及ぼし、有効な治療手段とはなり得ない。しかしながら、腫瘍細胞特異的な抗原と結合する抗体と連結する事により、正常な組織に悪影響を及ぼさず、腫瘍細胞のみ殺傷しえる能力を持つに至る。こうした薬剤は抗体薬物コンジュゲート（ADC）と呼ばれる。即ち、毒素は抗体と結合している状態では何ら毒性を示さない。しかし、ある種の抗体は標的とする抗原に結合すると細胞内に取り込まれ、リソソームにて分解される。したがって、毒素を結合したその種の抗体が細胞内に取り込まれ、細胞内で分解される事で毒素が放出され、特定の細胞内部においてのみ毒性が発現し、その効果により細胞は殺傷される。

【0009】

ADCにおいては、抗体に結合している薬剤は血液中を循環し、標的とする腫瘍に集積し薬効をしめす。腫瘍部位以外での薬剤の放出（抗体からの離脱）は、副作用を生じる危険性があるため必ずしも好ましくはない。つまり、抗体に結合している薬剤は細胞内に取り込まれた後抗体から離脱する設計が好ましい。近年ジェネンテック社は、このような観点からトラスツズマブに毒素を結合した薬剤（T-DM1）を開発、臨床試験がすすめられ、非常に高い臨床効果を示している。つまりADCにおいては、抗体は、標的となる癌に集積するだけでなく、効率よく癌細胞内に取り込まれなければならない。この能力（抗体の内在化能）はADCの薬効と密接な関係をもつことになる。

【0010】

抗体の内在化能は、抗体の結合する膜表面蛋白質と抗体両方に由来するものであり、分子構造、抗体物性等から一義的に推測することはできない。そのため、各抗原に対して、高い内在化能を有する抗体を探索することはADCを開発する上での大きな課題となっている。本発明においては、CDH3抗原に対して当該課題を解決するための道筋を与えている。

【0011】

上記の通り、ADCにより癌を治療するというコンセプトは公知である。しかし、内在化能の高い抗カドヘリン抗体に薬物をコンジュゲートさせた免疫複合体の効能を示唆したものはない。また、ドメイン構造とカドヘリンの機能との関連については報告があるが、内在化能との関連を示唆するものはない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0012】

【特許文献1】WO2002/097395号公報

【特許文献2】WO2007/102525号公報

【非特許文献】

【0013】

10

20

30

40

50

【非特許文献1】Yoshida and Takeichi, Cell 28:217-224, 1982

【非特許文献2】Nose A. et al, Cell 61;147-155, 1990

【非特許文献3】Klingel H. et al., Journal of Cell Science 113:2829-36, 2000

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0014】

本発明は、高い内在化能を有する抗カドヘリン抗体を提供し、さらにこれを用いてカドヘリンを発現する癌細胞を効率的に殺傷する抗カドヘリン抗体薬剤コンジュゲートを提供することを解決すべき課題とした。

【課題を解決するための手段】

【0015】

本発明者は上記課題を解決するために鋭意検討し、抗ヒトCDH3抗体の内在化能を測定したところ、抗体によって内在化能が異なることを見出した。そこで、各抗体をその認識している領域により分類したところ、内在化能が強い抗体は、カドヘリンドメイン1（EC1）を高い確率で認識していることが判明した。

【0016】

抗体の内在化能を規定する要素としては、抗体の抗原に対する親和性、抗体が認識するエピトープなどが挙げられるが、詳細は不明である。そこで、本発明は特に抗体と認識エピトープとの関係に注目した検索を行なう事により完成したものである。

【0017】

即ち、本発明によれば、以下の発明が提供される。

（1） カドヘリンのカドヘリンドメイン1（EC1）を認識し、かつ高い内在化能を示す抗カドヘリン抗体。

（2） カドヘリンがPカドヘリンである、（1）に記載の抗体。

（3） PカドヘリンまたはPカドヘリンを発現している細胞を免疫原として投与した免疫動物から取得した抗体産生細胞が産生する抗体である、（1）又は（2）に記載の抗体。

（4） Pカドヘリンが全長、あるいは細胞外領域のみを発現させた可溶型Pカドヘリン、またはその断片である、（3）に記載の抗体。

（5） モノクローナル抗体である、（1）から（4）の何れかに記載の抗体。

（6） モノクローナル抗体が、キメラ化抗体、ヒト化抗体またはヒト抗体である、（5）に記載の抗体。

【0018】

（7） 受託番号NITE BP-988、NITE BP-1145、NITE BP-1147又はNITE BP-1148を有する細胞が産生するモノクローナル抗体。

（8） （7）に記載のモノクローナル抗体を改変して作られたキメラ化抗体又はヒト化抗体。

（9） （7）に記載のモノクローナル抗体のVH及び／またはVLドメインのアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるVH及び／またはVLドメインを有する抗体またはその断片。

（10） 抗体が、Fab、Fab'、F(ab')₂、一本鎖抗体（scFv）、二量体化V領域（Diabody）、ジスルフィド安定化V領域（dsFv）およびCDRを含むペプチドからなる群から選ばれる抗体断片である、（1）から（9）のいずれか1項に記載の抗体。

【0019】

（11） （5）から（10）の何れか1項に記載の抗体を産生する細胞株。

（12） 受託番号NITE BP-988、NITE BP-1145、NITE B

10

20

30

40

50

P-1147又はNITE BP-1148を有する細胞株。

(13) (1)から(10)の何れかに記載の抗体を含む、細胞傷害剤。

(14) 上記抗体に、細胞傷害性物質が結合している、(13)に記載の細胞傷害剤。

(15) 細胞傷害性物質が薬剤、トキシン、又は放射性物質である、(14)に記載の細胞傷害剤。

【0020】

(16) 細胞傷害性物質が、メイタンシノイド又はその誘導体あるいはアウリスタチン又はその誘導体から選択される薬剤である、(15)に記載の細胞傷害剤。

(17) 細胞傷害性物質が、DM1、DM3又はDM4から選択されるメイタンシノイド誘導体、またはMMAE又はMMAFから選択されるアウリスタチン誘導体である、(16)に記載の細胞傷害剤。

(18) 抗体と細胞傷害性物質とがリンカーにより連結している、(14)から(17)のいずれか1項に記載の細胞傷害剤。

(19) リンカーが、2価反応性架橋試薬である、(18)に記載の細胞傷害剤。

(20) リンカーが、スルフォスクシイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート (Sulfo-SMCC)、N-スクシンイミジル-4-(マレイミドメチル)シクロヘキサンカルボキシレート (SMCC)、N-スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)-シクロヘキサン-1-カルボキシ-(6-アミドカプロエート) (LC-SMCC)、 α -マレイミドウンデカン酸N-スクシンイミジレステル (KMUA)、 γ -マレイミド酪酸N-スクシンイミジレステル (GMB S)、 ϵ -マレイミドカプロン酸N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (EMCS)、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (MBS)、N-(α -マレイミドアセトキシ)-スクシンイミドエステル (AMAS)、スクシンイミジル-6-(β -マレイミドプロピオンアミド)ヘキサノエート (SMPH)、N-スクシンイミジル-4-(p-マレイミドフェニル)-ブチレート (SMPB)、およびN-(p-マレイミドフェニル)イソシアネート (PMPI)、6-マレイミドカプロイル (MC)、マレイミドプロパノイル (MP)、p-アミノベンジルオキシカルボンイル (PAB)、N-スクシンイミジル-4-(2-ピリジルチオ)ペンタノエート (SPP)及びN-スクシンイミジル-(4-イオド-アセチル)アミノ安息香酸エステル (SIAB)、バリニ-シトルリン (val-cit)、アラニン-フェニルアラニン (ala-phe) から成る群より選択される、(18)又は(19)に記載の細胞傷害剤。

【0021】

(21) 抗体1分子あたり1~10個のDM1がリンカーを介して結合している、(19)又は(20)に記載の細胞傷害剤。

(22) (13)から(21)のいずれか1項に記載の細胞傷害剤を有効成分として含有する医薬組成物。

(23) (13)から(21)のいずれか1項に記載の細胞傷害剤を有効成分として含有するヒトCDH3高発現疾患の治療薬。

(24) ヒトCDH3高発現疾患が癌である、(23)に記載の治療薬。

【0022】

更に本発明によれば、上記した本発明の抗体又は細胞傷害剤を、カドヘリン高発現の患者に投与することを含む、上記患者におけるカドヘリン高発現細胞を傷害する方法が提供される。更に本発明によれば、上記した本発明の抗体又は細胞傷害剤を、カドヘリン高発現の患者に投与することを含む、カドヘリン高発現疾患の治療方法が提供される。

更に本発明によれば、細胞傷害剤の製造のための、上記した本発明の抗体の使用が提供される。更に本発明によれば、カドヘリン高発現疾患の治療薬の製造のための、上記した本発明の抗体の使用が提供される。

【発明の効果】

【0023】

本発明の抗カドヘリン抗体は、カドヘリンのカドヘリンドメイン1 (EC1) を認識し

10

20

30

40

50

、高い内在化能を有することを特徴とする。高い内在化能を発揮しうる抗体は、修飾抗体、改変抗体を作製するための材料として有用である。また、本発明の抗カドヘリン抗体に、例えば細胞内で毒性を発揮する薬剤を結合し、カドヘリンを発現する癌細胞を有する患者に投与することにより、高い抗癌作用の発揮が期待できる。即ち、本発明の抗カドヘリン抗体は、抗癌剤として有用である。本発明によれば、上記抗体と化学療法剤とリンカーにより連結して成る免疫複合体が提供される。本免疫複合体は化学療法剤を結合しない抗体と比較して、カドヘリンを発現する癌細胞株に、より強力な細胞傷害活性を示す。従って、上記の免疫複合体は、カドヘリンを発現する癌細胞を有する患者に投与することにより、高い抗癌作用の発揮が期待できる。即ち、本発明の免疫複合体は、抗癌剤として有用である。

10

【図面の簡単な説明】

【0024】

【図1】図1は、CDH1（Eカドヘリン）、CDH2（Nカドヘリン）、CDH3（Pカドヘリン）のシグナル及びプロペプチド配列を除いた成熟タンパク質の配列を示す。

【図2】図2は、古典的カドヘリンファミリーに属する分子の接着機序を示す。

【図3】図3は、各種腫瘍組織のヒトCDH3のmRNA発現結果を示す。A：正常組織、B：各種癌組織、C：膵臓癌分化度

【図4】図4は、各種腫瘍組織でのヒトCDH3の免疫染色結果を示す。

【図5】図5は、ヒトCDH3強制発現細胞株と市販抗ヒトCDH3抗体を反応させたフローサイトメトリの結果を示す。A：CHO細胞、B：ヒトCDH3強制発現CHO細胞。a：抗ヒトCDH3抗体0.01mg/ml、b：抗ヒトCDH3抗体0.1mg/ml、c：抗ヒトCDH3抗体1mg/ml

20

【図6】図6は、取得抗体3例と各細胞株との典型的なフローサイトメトリ結果を示す。A：ヒトCDH3強制発現CHO細胞、B：CHO細胞、C：肺がん由来細胞株NCI-H358。a：抗ヒトCDH3抗体0.01mg/mL、b：抗ヒトCDH3抗体0.1mg/mL、c：抗ヒトCDH3抗体1mg/mL

【図7】図7は、抗ヒトCDH3マウス抗体の内在化能を示す。各抗体とサポリン標識抗マウスIgG抗体を投与したヒトCDH3発現細胞の生存率（抗体未添加時の細胞生存率を100%とした相対率で表したもの）を示す。抗体を変えて複数回実施した（A、B）。

30

【図8】図8は、ヒトCDH3部分長タンパク質断片1から5のヒトCDH3細胞外領域との対応を示す。

【図9】図9は、ヒトCDH3部分長タンパク質の発現結果を示す。A：断片1、B：断片2、C：断片3、D：断片4、E：断片5

【図10】図10は、ヒトCDH3部分長タンパク質と各抗体のウェスタンブロット法による反応を示す。A：断片1、B：断片2、C：断片3、D：断片4、E：断片5

【図11】図11は、ペプチドアレイを用いたPPAT-055-13のエピトープ解析の結果を示す。X軸の数値はペプチドアレイの番号を示す。A；PPAT-055-13、B：1次抗体無し

【図12】図12は、DM1SMeの構造を示す。

40

【図13】図13は、抗ヒトCDH3キメラ化抗体薬剤コンジュゲートのインビトロでの細胞傷害性試験結果を示す。ADC：抗ヒトCDH3キメラ化抗体各クローンに薬剤コンジュゲートを施したもの、Naked：薬剤を結合していない抗ヒトCDH3キメラ化抗体。

【図14】図14は、HCC1954細胞株をマウスに移植して形成させた腫瘍塊におけるヒトCDH3発現の免疫組織染色結果を示す。

【図15】図15は、ヒトCDH3キメラ化抗体薬剤コンジュゲートのインビボでの細胞傷害性試験結果を示す。抗ヒトCDH3キメラ化抗体各クローンに薬剤コンジュゲートを施したもの、Naked：薬剤を結合していない抗ヒトCDH3キメラ化抗体。Vehicle：各抗体を溶解した溶液。

50

【発明を実施するための形態】

【0025】

以下、本発明について更に詳細に説明する。

本発明の抗体は、カドヘリンのカドヘリンドメイン1 (EC1) を認識し、かつ高い内在化能を有する抗カドヘリン抗体である。

【0026】

本明細書においてPカドヘリン (CDH3)、Eカドヘリン (CDH1) およびNカドヘリン (CDH2) のカドヘリンドメイン1 (EC1)、カドヘリンドメイン2 (EC2)、カドヘリンドメイン3 (EC3)、カドヘリンドメイン4 (EC4)、カドヘリンドメイン5 (EC5) は、それぞれ次の領域を示す。また、他のカドヘリンの対応する領域は、Genbank等より得られる公知のカドヘリントタンパク質の配列を比較することによって決定することができる。配列の比較は公知のプログラム、例えばClustalW2 (Thompson JD et al., Nucleic Acids Research 22 (22): 3673-3680, 1994) またはClustalX2 (Thompson JD et al., Nucleic Acids Research 25 (24): 4876-4882, 1997) などを用いて行うことが可能である。

【0027】

・Pカドヘリン (CDH3)

カドヘリンドメイン1 (EC1) : 配列番号2のアミノ酸配列の第108位～第236位
 カドヘリンドメイン2 (EC2) : 配列番号2のアミノ酸配列の第237位～第348位
 カドヘリンドメイン3 (EC3) : 配列番号2のアミノ酸配列の第349位～第461位
 カドヘリンドメイン4 (EC4) : 配列番号2のアミノ酸配列の第462位～第550位
 カドヘリンドメイン5 (EC5) : 配列番号2のアミノ酸配列の第551位～第654位

・Eカドヘリン (CDH1)

カドヘリンドメイン1 (EC1) : 配列番号4のアミノ酸配列の第155位～第283位
 カドヘリンドメイン2 (EC2) : 配列番号4のアミノ酸配列の第284位～第395位
 カドヘリンドメイン3 (EC3) : 配列番号4のアミノ酸配列の第396位～第507位
 カドヘリンドメイン4 (EC4) : 配列番号4のアミノ酸配列の第508位～第597位
 カドヘリンドメイン5 (EC5) : 配列番号4のアミノ酸配列の第598位～第704位

・Nカドヘリン (CDH2)

カドヘリンドメイン1 (EC1) : 配列番号6のアミノ酸配列の第160位～第288位
 カドヘリンドメイン2 (EC2) : 配列番号6のアミノ酸配列の第289位～第402位
 カドヘリンドメイン3 (EC3) : 配列番号6のアミノ酸配列の第403位～第518位
 カドヘリンドメイン4 (EC4) : 配列番号6のアミノ酸配列の第519位～第607位
 カドヘリンドメイン5 (EC5) : 配列番号6のアミノ酸配列の第608位～第719位

【0028】

抗体の内在化能は、公知の方法で測定することが可能である。例えば、抗体（または2次抗体）をRI、蛍光色素等で標識し、取込まれた量 (RI, 蛍光強度) を測定する方法や、サポリン等の毒素（例えば、サポリン標識抗マウスIgG抗体）を用い細胞死を測定する方法が知られているが、感度・簡便性でサポリン毒素を標識した抗体を用いる方法が優れている。本明細書の内在化能の数値は、実施例6あるいは15における測定と同様の条件で測定した場合を意味する。具体的には以下の通りである。

【0029】

(1) 内在化能の測定

ヒトCDH3発現細胞に抗ヒトCDH3抗体100ng、サポリン標識抗体 (Advanced Targeting Systems社) 100ngを加え、37℃、3日間、5%CO₂インキュベーターにて保温した。その後、生細胞数計測試薬であるCell Counting Kit-8 (同仁化学研究所社) を使用することで各抗体の細胞殺傷性を評価した。細胞殺傷性は抗体を加えなかった時の細胞生存率を100%とした相対活性

10

20

30

40

50

で表した。

【0030】

本明細書で言う「高い内在化能」とは、当該抗体とサポリン標識抗マウスIgG抗体を投与したCDH3発現細胞の生存率（抗体未添加時の細胞生存率を100%とした相対率で表したもの）が、好ましくは70%以下、より好ましくは60%以下、より好ましくは50%以下、より好ましくは45%以下、さらに好ましくは40%以下、特に好ましくは35%以下であることを意味する。

【0031】

本発明の抗体が認識するカドヘリンの種類は古典的カドヘリンが望ましい。例としてEカドヘリン、Nカドヘリン、Pカドヘリンを挙げる事ができるが、これに限定されるもの

10

【0032】

本発明の抗体を作成するための抗原としては、カドヘリン又はその部分ペプチドを用いることができる。一例としては、可溶型CDH3タンパク質などを用いることができるが、これに限定されるものではない。

【0033】

本発明の抗体は、ポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよい。本発明の抗体（ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体）は、種々の方法のいずれかによって製造することができる。このような抗体の製造法は当該分野で周知である〔例えばSambrook, J et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)を参照〕。この明細書では、“モノクローナル抗体”は、ハイブリドーマ法で作られた抗体に限定されない。“モノクローナル抗体”という用語は、単一のクローン（例えば真核生物、原核生物、ファージのクローン）に由来する抗体を意味し、どの方法で作ったかは問題とされない。本発明のモノクローナル抗体は、従来技術で知られている多彩な方法で調製することができる。方法としては、例えば、ハイブリドーマ法、組み換え法、ファージ提示法や、これらの組み合わせがある。その全体がこの明細書に組み込まれているものとする。

20

【0034】

（a）ポリクローナル抗体の作製

30

ポリクローナル抗体を作製するためには、カドヘリン、カドヘリン細胞外領域発現物又はその部分ペプチド（EC1が好ましい）を抗原として、これを哺乳動物、例えばラット、マウス、ウサギなどに投与する。抗原の動物1匹当たりの投与量は、アジュバントを用いないときは0.1～100mgであり、アジュバントを用いるときは1～100μgである。アジュバントとしては、フロイント完全アジュバント（FCA）、フロイント不完全アジュバント（FIA）、水酸化アルミニウムアジュバント等が挙げられる。免疫は、主として静脈内、皮下、腹腔内等に注入することにより行われる。また、免疫の間隔は特に限定されず、数日から数週間間隔、好ましくは2～5週間間隔で、1～10回、好ましくは2～5回免疫を行う。そして、最終の免疫日から6～60日後に、酵素免疫測定法（ELISA）、放射性免疫測定法（RIA）等で抗体価を測定し、最大の抗体価を示した日に採血し、抗血清を得る。抗血清から抗体の精製が必要とされる場合は、硫酸塩析法、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過、アフィニティークロマトグラフィーなどの公知の方法を適宜選択して、又はこれらを組み合わせることにより精製することができる。

40

【0035】

（b）モノクローナル抗体の作製

モノクローナル抗体を作製するためには、カドヘリン、カドヘリン細胞外領域発現物又はその部分ペプチド（EC1が好ましい）を抗原として、これを哺乳動物、例えばラット、マウス、ウサギなどに投与する。抗原の動物1匹当たりの投与量は、アジュバントを用いないときは0.1～100mgであり、アジュバントを用いるときは1～100μgである。アジュバントとしては、フロイント完全アジュバント（FCA）、フロイント不完

50

全アジュバント（F I A）、水酸化アルミニウムアジュバント等が挙げられる。免疫は、主として静脈内、皮下、腹腔内に注入することにより行われる。また、免疫の間隔は特に限定されず、数日から数週間間隔、好ましくは2～5週間間隔で、1～10回、好ましくは2～5回免疫を行う。そして、最終の免疫日から1～60日後、好ましくは1～14日後に抗体産生細胞を採集する。抗体産生細胞としては、脾臓細胞、リンパ節細胞、末梢血細胞等が挙げられるが、脾臓細胞又は局所リンパ節細胞が好ましい。

【0036】

細胞融合ハイブリドーマを得るため、抗体産生細胞とミエローマ細胞との細胞融合を行う。抗体産生細胞と融合させるミエローマ細胞として、マウスなどの動物の一般に入手可能な株化細胞を使用することができる。使用する細胞株としては、薬剤選択性を有し、未融合の状態ではHAT選択培地（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジンを含む）で生存できず、抗体産生細胞と融合した状態でのみ生存できる性質を有するものが好ましい。ミエローマ細胞としては、例えばP3×63-Ag. 8. U1（P3U1）、NS-1などのマウスミエローマ細胞株が挙げられる。

【0037】

次に、上記ミエローマ細胞と抗体産生細胞とを細胞融合させる。細胞融合は、血清を含まないDMEM、RPMI-1640培地などの動物細胞培養用培地中で、 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 個/mlの抗体産生細胞と $2 \times 10^5 \sim 2 \times 10^6$ 個/mlのミエローマ細胞とを混合し（抗体産生細胞とミエローマ細胞との細胞比5：1が好ましい）、細胞融合促進剤存在のもとで融合反応を行う。細胞融合促進剤として、平均分子量1000～6000ダルトンのポリエチレングリコール等を使用することができる。また、電気刺激（例えばエレクトロポレーション）を利用した市販の細胞融合装置を用いて抗体産生細胞とミエローマ細胞とを融合させることもできる。

【0038】

細胞融合処理後の細胞から目的とするハイブリドーマを選別する。その方法として、細胞懸濁液を例えばウシ胎児血清含有RPMI-1640培地などで適当に希釈後、マイクロタイタープレート上に 3×10^5 個/well程度まき、各ウェルに選択培地を加え、以後適当に選択培地を交換して培養を行う。その結果、選択培地で培養開始後、14日前後から生育してくる細胞をハイブリドーマとして得ることができる。

【0039】

次に、増殖してきたハイブリドーマの培養上清中に、目的とする抗体が存在するか否かをスクリーニングする。ハイブリドーマのスクリーニングは、通常の方法に従えばよく、特に限定されるものではない。例えば、ハイブリドーマとして生育したウェルに含まれる培養上清の一部を採集し、酵素免疫測定法、放射性免疫測定法等によって、カドヘリンのカドヘリンドメイン1（EC1）と結合する抗体を産生するハイブリドーマをスクリーニングすることができる。融合細胞のクローニングは、限界希釈法等により行い、最終的にモノクローナル抗体産生細胞であるハイブリドーマを樹立することができる。

【0040】

樹立したハイブリドーマからモノクローナル抗体を採取する方法として、通常の方法培養法又は腹水採取法等を採用することができる。細胞培養法においては、ハイブリドーマを10%ウシ胎児血清含有RPMI-1640培地、MEM培地又は無血清培地等の動物細胞培養培地中で、通常の方法（例えば37℃、5%CO₂濃度）で7～14日間培養し、その培養上清から抗体を取得する。

【0041】

腹水採取法の場合は、ミエローマ細胞由来の哺乳動物と同種系動物の腹腔内にハイブリドーマを約 1×10^7 個投与し、ハイブリドーマを大量に増殖させる。そして、1～2週間後に腹水を採集する。上記抗体の採取方法において抗体の精製が必要とされる場合は、硫酸塩析法、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過、アフィニティークロマトグラフィーなどの公知の方法を適宜選択して、又はこれらを組み合わせることにより精製することができる。

【0042】

本発明の抗体の種類は特に制限されず、マウス抗体、ヒト抗体、ラット抗体、ウサギ抗体、ヒツジ抗体、ラクダ抗体、トリ抗体等や、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺伝子組換え型抗体、例えば、キメラ抗体、ヒト化抗体等の何れでもよい。遺伝子組換え型抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。キメラ抗体は、ヒト以外の哺乳動物、例えば、マウス抗体の重鎖、軽鎖の可変領域とヒト抗体の重鎖、軽鎖の定常領域からなる抗体であり、マウス抗体の可変領域をコードするDNAをヒト抗体の定常領域をコードするDNAと連結し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入し産生させることにより得ることができる。ヒト化抗体は、ヒト以外の哺乳動物、たとえばマウス抗体の相補性決定領域(CDR)をヒト抗体の相補性決定領域へ移植したものであり、その一般的な遺伝子組換え手法も知られている。具体的には、マウス抗体のCDRとヒト抗体のフレームワーク領域(Framework Region; FR)を連結するように設計したDNA配列を、末端部にオーバーラップする部分を有するように作製した数個のオリゴヌクレオチドからPCR法により合成する。得られたDNAをヒト抗体定常領域をコードするDNAと連結し、次いで発現ベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させることにより得られる(E P 2 3 9 4 0 0号公報、国際公開W O 9 6 / 0 2 5 7 6号公報など)。

10

【0043】

ヒト型キメラ化抗体のCHとしては、ヒトイムノグロブリン(以下、h I gと表記する)に属すればいかなるものでもよいが、h I g Gクラスのもの好適であり、更にh I g Gクラスに属するh I g G 1、h I g G 2、h I g G 3、h I g G 4といったサブクラスのいずれも用いることができる。また、ヒト型キメラ抗体のCLとしては、h I gに属すればいかなるものでもよく、κクラスあるいはλクラスのものを用いることができる。

20

【0044】

ヒト型CDR移植抗体は、ヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLのCDRのアミノ酸配列をヒト抗体のVHおよびVLの適切な位置に移植した抗体を意味する。

【0045】

ヒト型CDR移植抗体は、カドヘリンに特異的に反応するヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLのCDRのアミノ酸配列を任意のヒト抗体のVHおよびVLのFRに移植したV領域をコードするcDNAを構築し、ヒト抗体のCHおよびCLをコードするDNAを有する動物細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型CDR移植抗体発現ベクターを構築し、動物細胞へ導入することにより発現させ、製造することができる。

30

【0046】

タンパク質発現に使用する宿主細胞系は、抗体生産系では哺乳動物起源のものが多い。該生産者は発現したい遺伝子産物に最も適する特定の宿主細胞系を優先的に決定できる。一般的な宿主細胞系としては、CHO由来細胞株(チャイニーズハムスター卵巣細胞系)、CV1(サル腎臓系)、COS(SV40T抗原をするCV1の誘導体)、SP2/0(マウスミエローマ)、P3x63-Ag3.653(マウスミエローマ)、および293(ヒト腎臓)、293T(SV40T抗原をする293の誘導体)が挙げられるがそれらに限定されない。宿主細胞系は商業施設やthe American Tissue Culture Collection(ATCC)から、または発表された文献の発表機関から入手することができる。

40

【0047】

宿主細胞系として、好ましくはd g f r遺伝子の発現欠損であるCHO由来細胞株かSP2/0のいずれかである(Urland, G. et al, Effect of gamma rays at the dihydrofolate reductase locus: deletions and inversions, Somat. Cell. Mol. Genet. Vol. 12, 1986, p5555-566、および、Schulman, M. et al, A better cell line for making hybridomas secreting speci

50

f i c a n t i b o d i e s , N a t u r e V o l . 2 7 6 , 1 9 7 8 , p 2 6 9 - 2 7 0 をそれぞれ参照のこと)。最も好ましくは、宿主細胞系はD H F R 欠失 C H O である。

【0048】

宿主細胞中へのプラスミドのトランスフェクションは、任意の技術を使って達成できる。具体的な方法としては、トランスフェクション（リン酸カルシウム法、D E A E 法、リポフェクション、およびエレクトロポレーションを含む）、センダイウイルス等のエンベロープを利用してD N A を導入する方法、マイクロインジェクション、およびレトロウイルスウイルスやアデノウイルス等のウイルスベクターを用いた感染が挙げられるが、それらに限定されない（C u r r e n t P r o t o c o l s i n M o l e c u l a r B i o l o g y , C h a p t e r 9 I n t r o d u c t i o n o f D N A i n t o M a m m a l i a n C e l l s , J o h n W i l e y a n d S o n s , I n c . を参照のこと）。最も好ましいのは、エレクトロポレーションによる宿主中へのプラスミド導入である。

10

【0049】

また、別のヒト化、キメラ化抗体の作製の手法としては例えば、C D R と 枠組構造残基の相互作用をモデル化して抗原が結合する上で重要な枠組構造残基を同定し、配列を比較して特定の位置にある通常とは異なる枠組構造残基を同定するという方法がある。例えば Q u e e n 他、アメリカ合衆国特許第 5 , 5 3 0 , 1 0 1 号、第 5 , 5 8 5 , 0 8 9 号、第 5 , 6 9 3 , 7 6 1 号、第 5 , 6 9 3 , 7 6 2 号、第 6 , 1 8 0 , 3 7 0 号を参照のこと（それぞれの特許は、参考としてその全体がこの明細書に組み込まれているものとする）。抗体は従来技術で知られている多彩な方法でヒト化することができる。例えば C D R グラフティング（ヨーロッパ特許第 2 3 9 , 4 0 0 号；P C T 公開公報 W O 9 1 / 0 9 9 6 7 ；アメリカ合衆国特許第 5 , 2 2 5 , 5 3 9 号、第 5 , 5 3 0 , 1 0 1 号、第 5 , 5 8 5 , 0 8 9 号）、ベニアリングまたはリサーフェシング（ヨーロッパ特許第 5 9 2 , 1 0 6 号、第 5 1 9 , 5 9 6 号；P a d l a n , M o l . I m m u n o l . , 第 2 8 巻、4 8 9 ~ 4 9 8 ページ、1 9 9 1 年；S t u d n i c k a 他、P r o t . E n g . , 第 7 巻、8 0 5 ~ 8 1 4 ページ、1 9 9 4 年；R o g u s k a 他、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . , 第 9 1 巻、9 6 9 ~ 9 7 3 ページ、1 9 9 4 年）、鎖シャッフリング（アメリカ合衆国特許第 5 , 5 6 5 , 3 3 2 号）。また、キメラ化抗体の作製方法は M o l e c u l a r B i o t e c h n o l o g y 2 6 , 3 9 (2 0 0 4) , J o u r n a l o f I m m u n o l o g i c a l M e t h o d s 1 2 5 , 1 9 1 (1 9 8 9) に記載されている。なおこれら文献は、参考としてその全体がこの明細書に組み込まれているものとする。

20

30

【0050】

キメラ化、ヒト化抗体のアミノ酸配列は、寄託ハイブリドーマの発現する c D N A に由来する V H 又は V L 領域のアミノ酸配列と 1 0 0 % 同一であることも好ましいが、遺伝子工学的な改変により、9 0 % 以上同一である配列を有する抗体であることも好ましい。ヒト化、キメラ化の過程で抗原の結合を改善することを目的とした残基置換の調整は従来から行われている。このような、配列を一部改変した抗体は、基本的にはもとのハイブリドーマに由来する抗体と考えられるからである。

40

【0051】

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

【0052】

また、ヒト抗体の取得方法も知られている。例えば、ヒトリンパ球をインビトロで所望の抗原または所望の抗原を発現する細胞で感作し、感作リンパ球をヒトミエローマ細胞、例えば U 2 6 6 と融合させ、抗原への結合活性を有する所望のヒト抗体を得ることもできる（特公平 1 - 5 9 8 7 8 参照）。また、ヒト抗体遺伝子の全てのレパートリーを有する

50

トランスジェニック動物を所望の抗原で免疫することで所望のヒト抗体を取得することができる (WO 93/12227, WO 92/03918, WO 94/02602, WO 94/25585, WO 96/34096, WO 96/33735 参照)。さらに、ヒト抗体ライブラリーを用いて、パンニングによりヒト抗体を取得する技術も知られている。例えば、ヒト抗体の可変領域を一本鎖抗体 (s c F v) としてファージディスプレイ法によりファージの表面に発現させ、抗原に結合するファージを選択することができる。選択されたファージの遺伝子を解析すれば、抗原に結合するヒト抗体の可変領域をコードする DNA 配列を決定することができる。抗原に結合する s c F v の DNA 配列が明らかになれば、当該配列から適当な発現ベクターを作製し、ヒト抗体を取得することができる。これらの方法は既に周知であり、WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438, WO 95/15388 を参考にすることができる。

10

【0053】

また、これらの抗体は、カドヘリンのカドヘリンドメイン 1 (E C 1) を認識し、内在化能が高い抗体であるという特性を失わない限り、一価抗体、二価抗体、多価抗体のいずれでもよく、抗体断片 (フラグメント) 等の低分子化抗体や抗体の修飾物などであってもよい。抗体断片としては、F a b、F a b'、F (a b')₂、s c F v、d s F v、および C D R を含むペプチドなどがあげられる。また、抗体断片や低分子化抗体、例えば、F a b、F a b'、F (a b')₂、F v、S c F v (single chain F v)、D i a b o d y などに F c 部分を融合し A D C C 活性を付加したものでもよい。このような抗体を得るには、これら抗体をコードする遺伝子を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させればよい。

20

【0054】

F a b は、I g G を蛋白質分解酵素パパインで処理して得られる断片のうち (H 鎖の 24 番目のアミノ酸残基で切断される)、H 鎖の N 末端側約半分と L 鎖全体がジスルフィド結合で結合した分子量約 5 万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

【0055】

本発明の F a b は、カドヘリンに特異的に反応する抗体を蛋白質分解酵素パパインで処理して得ることができる。または、該抗体の F a b をコードする DNA を原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、F a b を製造することができる。

30

【0056】

F (a b')₂ は、I g G を蛋白質分解酵素ペプシンで処理して得られる断片のうち (H 鎖の 234 番目のアミノ酸残基で切断される)、F a b がヒンジ領域のジスルフィド結合を介して結合されたものよりやや大きい、分子量約 10 万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

【0057】

本発明の F (a b')₂ は、カドヘリンに特異的に反応する抗体を蛋白質分解酵素ペプシンで処理して得ることができる。または、下記の F a b' をチオエーテル結合あるいはジスルフィド結合させ、作製することができる。

40

【0058】

F a b' は、上記 F (a b')₂ のヒンジ領域のジスルフィド結合を切断した分子量約 5 万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

本発明の F a b' は、カドヘリンに特異的に反応する F (a b')₂ を還元剤ジチオスレイトール処理して得ることができる。または、該抗体の F a b' 断片をコードする DNA を原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより F a b' を発現させ、製造することができる。

【0059】

s c F v は、一本の V H と一本の V L とを適当なペプチドリンカー (以下、P と表記す

50

る)を用いて連結した、VH-P-VLないしはVL-P-VHポリペプチドを示す。本発明のscFvに含まれるVHおよびVLは、本発明のカドヘリンに特異的に反応する抗体、例えば、ヒト化抗体、ヒト抗体のいずれをも用いることができる。

【0060】

本発明のscFvは、カドヘリンに特異的に反応する抗体のVHおよびVLをコードするcDNAを取得し、scFvをコードするDNAを構築し、該DNAを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、scFvを製造することができる。

【0061】

dsFvは、VHおよびVL中のそれぞれ1アミノ酸残基をシステイン残基に置換したポリペプチドを該システイン残基間のジスルフィド結合を介して結合させたものをいう。システイン残基に置換するアミノ酸残基はReiterらにより示された方法(Protein Engineering, 7, 697 (1994))に従って、抗体の立体構造予測に基づいて選択することができる。本発明のdsFvに含まれるVHおよびVLは本発明のカドヘリンに特異的に反応する抗体、例えば、ヒト化抗体、ヒト抗体のいずれをも用いることができる。

【0062】

本発明のdsFvは、カドヘリンに特異的に反応する抗体のVHおよびVLをコードするcDNAを取得し、dsFvをコードするDNAを構築し、該DNAを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、dsFvを製造することができる。

【0063】

CDRを含むペプチドは、H鎖またはL鎖CDRの少なくとも1領域以上を含んで構成される。複数のCDRは、直接または適当なペプチドリンカーを介して結合させることができる。

本発明のCDRを含むペプチドは、カドヘリンに特異的に反応する抗体のVHおよびVLをコードするcDNAを取得した後、CDRをコードするDNAを構築し、該DNAを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、CDRを含むペプチドを製造することができる。

【0064】

また、CDRを含むペプチドは、Fmoc法(フルオレニルメチルオキシカルボニル法)、tBoc法(tert-ブチルオキシカルボニル法)等の化学合成法によって製造することもできる。

【0065】

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。特に薬剤結合抗体は有用である。このような抗体修飾物は、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。なお、抗体の修飾方法は当業者に公知である。

【0066】

本発明の抗体は、高い内在化能を示すことから、毒素を結合し細胞傷害剤として使用することができる。本発明の細胞傷害剤は、例えばカドヘリンを発現している癌細胞と接触させることにより癌細胞を傷害することができる。

【0067】

本発明における抗体の好ましい態様としては抗体に薬剤等の細胞傷害性物質を結合した、いわゆるADCをあげることができる。

【0068】

本発明で用いられる薬剤の例としては例えばデュオカルマイシン、デュオカルマイシンのアナログ及び誘導剤、CC-1065、CBIを主成分とするデュオカルマイシンアナログ、MCBIを主成分とするデュオカルマイシンアナログ、CCBIを主成分とするデ

10

20

30

40

50

ユオカルマイシンアナログ、ドキシソルビシン、ドキシソルビシンコンジュゲート、モルフォリノードキシソルビシン、シアノモルフォリノードキシソルビシン、ドラスタチン、ドレスタチン-10、コンプレタスタチン、カリケアマイシン (calicheamicin)、メイタンシン、メイタンシンアナログ、DM1、DM2、DM3、DM4、DMI、アウリスタチンE、アウリスタチンEB (AEB)、アウリスタチンEFP (AEFP)、モノメチルアウリスタチンE (MMAE)、モノメチルアウリスタチンF (MMAF)、5-ベンゾイルバレリン酸AEエステル (AEVB)、チューブリシン、ジソラゾール、エポシロン、パクリタキセル、ドセタキセル、SN-38、トポテカン、リゾキシシン、エキノマイシン、コルヒチン、ビンブラスチン、ビンデシン、エストラムスチン、セマドチン、エリユーテロビン、メトトレキサート、メトプテリン、ジクロロメトトレキサート、5-フルオロウラシル、6-メルカプトプリン、シトシンアラビノシド、メルファラン、リユーロシン、リユーロシダイン、アクチノマイシン、ダウノルビシン、ダウノルビシンコンジュゲート、マイトマイシンC、マイトマイシンA、カルミノマイシン、アミノプテリン、タリソマイシン、ポドフィロトキシシン、ポドフィロトキシシン誘導体、エトポシド、エトポシドリン酸塩、ピンクリスチン、タキソール、タキソテールレチノイン酸、酪酸、N⁸-アセチルスペルミジン並びにカンプトセシン等をあげることができるが、これだけに限定されるわけではない。

10

【0069】

本発明におけるADCは、前記の薬剤と抗体と結合し、公知の方法により作製できる。抗体と薬剤は、それら自身が有する連結基などを介して直接結合されてもよいし、また、リンカーや他の物質を介して間接的に結合されてもよい。

20

【0070】

薬剤が直接結合される場合の連結基は、例えばSH基を用いたジスルフィド結合やマレイミドを介する結合が挙げられる。例えば、抗体のFc領域の分子内ジスルフィド結合と、薬剤のジスルフィド結合を還元して、両者をジスルフィド結合にて結合する。また、マレイミドを介する方法もある。また別の方法として、抗体内にシステインを遺伝子工学的に導入する方法もある。

【0071】

抗体と薬剤を、他の物質（リンカー）を介して間接的に結合することも可能である。リンカーには、抗体または薬剤または両方と反応する官能基を1または2種類以上有することが望ましい。官能基の例としてはアミノ基、カルボキシル基、メルカプト基、マレイミド基、ピリジニル基等をあげることができる。

30

【0072】

リンカーの例としては、スルフォスクシイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート (Sulfo-SMCC)、N-スクシイミジル-4-(マレイミドメチル)シクロヘキサンカルボキシレート (SMCC)、N-スクシイミジル-4-(N-マレイミドメチル)-シクロヘキサン-1-カルボキシー(6-アミドカプロエート) (LC-SMCC)、 κ -マレイミドウンデカン酸N-スクシイミジルエステル (KMUA)、 γ -マレイミド酪酸N-スクシイミジルエステル (GMB S)、 ϵ -マレイミドカプロン酸N-ヒドロキスクシイミドエステル (EMCS)、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキスクシイミドエステル (MBS)、N-(α -マレイミドアセトキシ)-スクシイミドエステル (AMAS)、スクシイミジル-6-(β -マレイミドプロピオンアミド)ヘキサノエート (SMPH)、N-スクシイミジル-4-(p-マレイミドフェニル)-ブチレート (SMPB)、およびN-(p-マレイミドフェニル)イソシアネート (PMP I)、6-マレイミドカプロイル (MC)、マレイミドプロパノイル (MP)、p-アミノベンジルオキシカルボンイル (PAB)、N-スクシイミジル-4-(2-ピリジルチオ)ペンタノエート (SPP) 及びN-スクシイミジル-(4-イオド-アセチル)アミノ安息香酸エステル (SIAB)等があげられるが、これらに限定されるものではない。また、このリンカーは例えば、バリニシトルリン (Val-Cit)、アラニン-フェニルアラニン (ala-phen) のよう

40

50

なペプチドリンカーであってもよいし、上記にあげたリンカーをそれぞれ適時組み合わせて使用しても良い。

【0073】

薬剤と抗体との結合方法に関しては、例えば、Cancer Research ; 68 (22) 9280 (2008)、Nature Biotechnology ; 26 (8) 925 (2008)、Bio Conjugate Chemistry ; 19、1673 (2008)、Cancer Research ; 68 (15) 6300 (2008)、又は特表2008-516896号公報などに記載の方法に準じて行うことができる。

【0074】

本発明の別の実施形態としては、抗体に毒素（トキシン）を化学的または遺伝子工学的に結合した、いわゆるイムノトキシンをあげることができる。

【0075】

本発明で用いられるトキシンとしては、例えば、ジフテリアトキシンA鎖、シュードモナスエンドトキシン、リシン鎖；無糖鎖リシンA鎖ゲロニン（Gel on in）サポリン（Saporin）等をあげることができる。

【0076】

本発明の抗体の別の実施態様としては、本発明の抗体と放射性物質とを結合したいわゆるRI標識抗体をあげることができる。

【0077】

放射性物質としては、癌治療薬として用いる場合には細胞傷害性放射性金属が好ましく、癌診断薬として用いる場合には細胞非傷害性放射性金属であるのが好ましい。また、ヨウ素123（¹²³I）、ヨウ素131（¹³¹I）を使用する方法もある。

【0078】

このような細胞傷害性放射性金属としては、例えばイットリウム90（⁹⁰Y）、レニウム186（¹⁸⁶Re）、レニウム188（¹⁸⁸Re）、銅67（⁶⁷Cu）、鉄59（⁵⁹Fe）、ストロンチウム89（⁸⁹Sr）、金198（¹⁹⁸Au）、水銀203（²⁰³Hg）、鉛212（²¹²Pb）、ジスプロシウム165（¹⁶⁵Dy）、ルテニウム103（¹⁰³Ru）、ビスマス212（²¹²Bi）、ビスマス213（²¹³Bi）、ホルミウム166（¹⁶⁶Ho）、サマリウム153（¹⁵³Sm）、ルテチウム177（¹⁷⁷Lu）などを挙げることができる。

【0079】

これらの放射性金属の中でも、⁹⁰Y、¹⁵³Sm、¹⁷⁷Luが、半減期、放射線エネルギー、容易な標識反応、標識率、錯体の安定性等の点から好ましい。

【0080】

一方、診断薬に用いる細胞非傷害性放射性金属としては、テクネシウム99m（^{99m}Tc）、インジウム111（¹¹¹In）、インジウム113m（^{113m}In）、ガリウム67（⁶⁷Ga）、ガリウム68（⁶⁸Ga）、タリウム201（²⁰¹Tl）、クロム51（⁵¹Cr）、コバルト57（⁵⁷Co）、コバルト58（⁵⁸Co）、コバルト60（⁶⁰Co）、ストロンチウム85（⁸⁵Sr）、水銀197（¹⁹⁷Hg）、銅64（⁶⁴Cu）が好適に用いられるが、これに限定されるものではない。

【0081】

これらの放射性金属元素を本発明の抗体に結合させるには、該抗体に金属キレート試薬を反応させ、これに放射性金属元素を反応させて錯体とするのが好ましい。このようにして得られた修飾抗体は、放射性金属元素が金属キレート試薬を介して本発明の抗体に結合している。

【0082】

このような錯体形成に用いられる金属キレート試薬の例としては、例えば（1）8-ヒドロキシキノリン、8-アセトキシキノリン、8-ヒドロキシキノリン、硫酸オキシキノリン、O-アセチルオキシ、O-ベンゾイルオキシ、O-p-ニトロベンゾイルオ

10

20

30

40

50

キシン、キノリン骨格を有するキノロン系化合物であるノルフロキサシン、オフロキサシン、エノキサシン、シプロフロキサシン、ロメフロキサシン、トスフロキサシン、フレロキサシン、スパルフロキサシン等のキノリン誘導体；(2) クロラニル酸、アルミノン、チオ尿素、ピロガロール、クペロン、ビスムチオール (I I)、ガロイル没食子酸、チオリド、2-メルカプトベンゾチアゾール、テトラフェニルアルソニウムクロライド等の化合物；(3) エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)、ジエチレントリアミン五酢酸 (DTPA) およびこれらに類似した骨格を有するジヒドロキシエチルグリシン、ジアミノプロパノール四酢酸、エチレンジアミン二酢酸、エチレンジアミンニプロピオン酸塩酸塩、ヒドロキシエチルエチレンジアミン三酢酸、エチレンジアミンテトラキス (メチレンホスホン酸)、グリコールエーテルジアミン四酢酸、ヘキサメチレンジアミン四酢酸、ヒドロキシエチルイミノ二酢酸、イミノ二酢酸、ジアミノプロパン四酢酸、ニトリロ三酢酸、ニトリロ三プロピオン酸、ニトリロトリス (メチレンスルホン酸) 三ナトリウム塩、トリエチレントトラミン六酢酸、メチルDTPA、シクロヘキシルDTPA、アミノベンジルEDTA、イソチオシアノベンジルEDTA、イソチオシアノベンジルDTPA、メチルイソチオシアノベンジルDTPA、シクロヘキシルイソチオシアノベンジルDTPA、マレイミドプロピルアミドベンジルEDTA、マレイミドペンチルアミドベンジルDTPA、マレイミドデシルアミドベンジルEDTA、マレイミドペンチルアミドベンジルDTPA、マレイミドデシルアミドベンジルEDTA、マレイミドデシルアミドベンジルDTPA；(4) 1, 4, 7, 10-テトラアザシクロデカン-1, 4, 7, 10-四酢酸 (DOTA)、1, 4, 7-トリアザシクロノナン-1, 4, 7-三酢酸 (NOTA)、1, 4, 8, 11-テトラアザシクロテトラデカン-1, 4, 8, 11-四酢酸 (TETA)、1, 4, 7, 10-テトラアザシクロデカン (Cyclen)、1, 4, 8, 11-テトラアザシクロテトラデカン (Cyclam)、イソチオシアノベンジルDOTA、イソチオシアノベンジルNOTA等が挙げられる。

【0083】

これらの金属キレート試薬のうち、イソチオシアノベンジルDOTA、メチルイソチオシアノベンジルDTPA、シクロヘキシルイソチオシアノベンジルDTPAが金属キレートの容易な抗体への導入反応、標識率、錯体の安定性等の点で好ましい。

【0084】

本発明の抗体への放射性金属元素の結合は、当業者であれば常法に従って行うことができる。例えば本発明の抗体に金属キレート試薬を反応させ、予め標識前駆体を調製しておき、次いで放射性金属元素を反応させることにより行うことができる。

【0085】

本発明の細胞傷害剤には、本発明の抗体 (所望により薬剤、トキシン、又は放射性物質を含む細胞障害性物質が結合していてもよい) の他に、必要に応じて薬学的に許容される担体、賦形剤、希釈剤などを適宜含有させることができる。本発明の細胞傷害剤としては、例えば注射剤として製剤することができる。本発明の細胞傷害剤の投与量は、患者の症状の程度、年齢及び体重、投与方法などに依存し、有効成分である抗体の重量としては通常、約10ng～約100mg/kg体重の範囲である。

【0086】

本発明の医薬組成物は、特に、カドヘリン (好ましくはCDH3) 高発現疾患の治療薬として有用である。カドヘリン (好ましくはCDH3) 高発現疾患の種類は特に限定されないが、好ましくは癌であり、例えば、大腸癌、乳癌、卵巣癌、子宮内膜癌、子宮頸癌、肺癌、移行上皮癌、膵臓癌、肝癌、腎癌、胆道癌、甲状腺癌、頭頸部癌、食道癌、皮膚扁平上皮癌、メラノーマ、胃癌、前立腺癌、骨肉腫又は軟組織肉腫などを挙げることができる。

【0087】

以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

【実施例】

【0088】

実施例1 正常組織および癌組織でのヒトCDH3 mRNAの発現

正常ヒト組織および各種癌組織より、レーザーマイクロディセクション法 (Laser Capture Microdissection) で回収したサンプルより ISOGEN (ニッポンジーン社) を用い定法に従って全RNAを調製した。RNA各10ngを GeneChip U-133B (Affymetrix社) を用い、Expression Analysis Technical Manual (Affymetrix社) に準じて遺伝子発現を解析した。全遺伝子の発現スコアの平均値を100とし、癌細胞において発現が亢進する遺伝子を探索したところ、ヒトCDH3は正常ヒト組織では発現が限られ、肺癌、大腸癌、膵臓癌で発現が高かった (図3A、B)。また、分化度の異なる膵臓癌組織におけるCDH3 mRNAの発現を検討したところ、分化度に関わらず発現が高い組織が認められた (図3C)。

10

【0089】

実施例2 免疫組織化学染色による癌組織でのヒトCDH3タンパク質の発現

癌臨床検体でのCDH3タンパク質の発現を確認するため、癌検体組織アレイで免疫染色を行った。

癌細胞組織アレイは、上海芯超生物科技有限公司社 (Shanghai Outdo Biotech Co., Ltd.) 製の、膵癌 (腺癌)、肺癌 (腺癌)、肺癌 (扁平上皮癌) および大腸癌 (腺癌) を使用した。

20

【0090】

各組織アレイスライドを脱パラフィン処理し、10mM Tris 1mM EDTA (pH9.0) で95℃40分賦活化を行った。ENVISION+Kit (Dako社) 付属のブロッキング試薬にて内在性ペルオキシダーゼの不活性化を行った後、抗CDH3抗体610227 (BD BIOSCIENCE社)、およびネガティブコントロールとして抗HBs抗体Hyb-3423と5μg/mLの濃度で4℃一晩反応させた。抗体溶液を洗い流した後に、ENVISION+Kit付属のポリマー二次抗体試薬と室温30分間反応させた。ENVISION+Kit付属の発色試薬にて発色を行い、ヘマトキシリンエオジン溶液にて核染色を行った。

図4に結果を示す。癌細胞は抗ヒトCDH3抗体で染色され正常細胞は染色されなかった。

30

【0091】

実施例3 ヒトCDH3発現CHO細胞株の樹立

抗ヒトCDH3抗体スクリーニング用細胞株を得るため、全長CDH3を発現するCHO細胞の樹立を行った。

(1) CDH3遺伝子発現ベクターの作製

配列番号1に示す全長ヒトCDH3 DNAを哺乳類発現ベクターpEF4/myc-HisB (インビトロジェン社) へ挿入するため、2種類の制限酵素KpnI (タカラバイオ社) 及びXbaI (タカラバイオ社) で37℃、1時間処理した後、同じくKpnI及びXbaIで処理したpEF4/myc-HisBへT4 DNAリガーゼ (プロメガ社) により常法に従って挿入し、発現ベクターpEF4-CDH3-myc-Hisを得た。

40

【0092】

(2) CDH3安定発現株の取得

FuGENE (登録商標) 6トランスフェクション試薬 (ロシュ・ダイアグノスティックス社) のプロトコールに準じ、トランスフェクション前日に径10cmディッシュに8×10⁵細胞のCHO細胞を播種し一晩培養後、8μgの発現ベクターpEF4-CDH3-myc-Hisと16μLのFuGENE 6試薬を400μLの無血清RPMI 1640培地 (SIGMA ALDRICH社) に混合し15分間室温放置後、細胞培養液に加えトランスフェクションを行った。トランスフェクション翌々日に選択試薬 (Zeocin (登録商標)) を用いて限界希釈法にてクローニングを行った。

50

【0093】

CDH3全長発現CHOのクローン選抜は、抗c-Mycモノクローナル抗体（SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY社）を用いたウェスタンブロット法により行い、その結果発現量が高く、かつ増殖が良好なCDH3強制発現CHO細胞株（EXZ1501）を得た。この細胞株及び親株であるCHO細胞と市販抗CDH3抗体（R&D SYSTEMS社）のフローサイトメーターによる測定結果を図5に示す。

【0094】

実施例4 ヒトCDH3細胞外領域抗原の作製

抗ヒトCDH3抗体作製の免疫原とするため、C末端膜貫通領域以降を欠損させたヒトCDH3細胞外領域（sCDH3）タンパク質を作製した。

10

（1）sCDH3抗原発現ベクターの作製

ヒトCDH3全長cDNAをテンプレートとして、ヒトCDH3細胞外領域に相当する部分（配列番号2の1-654に相当、以下sCDH3cDNA）を増幅するように設計されたフォワードプライマー（配列番号7：CGCGGTACCATGGGGCTCCCTCGT）とリバースプライマー（配列番号8：CCGTCTAGATAACCTCCCTTCCAGGGTCC）を用いてPCR反応を行った。反応にはKOD-Plus（東洋紡社）を用い、94℃-15秒、55℃-30秒、68℃-90秒、30サイクルの反応条件で行った。

【0095】

その後、アガロースゲル電気泳動で目的サイズである約2.0kbpのバンドを含むゲル断片を切り出し、QIA（登録商標）クイックゲル抽出キット（キアゲン社）を用いて、目的のsCDH3cDNAを得た。

20

【0096】

このsCDH3cDNAを発現用ベクターpEF4/myc-HisBへ挿入するために、2種類の制限酵素KpnI及びXbaIで処理した後、同じくKpnI及びXbaIで処理したpEF4/myc-HisBにT4 DNAリガーゼを用いて常法に従い挿入し、発現ベクターpEF4-sCDH3-myc-Hisを得た。

【0097】

（2）可溶型CDH3タンパク質の発現

FuGENE6トランスフェクション試薬のプロトコールに準じ、トランスフェクション前日に径10cmディッシュに 8×10^5 個のCHO細胞を播種し一晩培養後、8μgの発現ベクターpEF4-sCDH3-myc-Hisと16μLのFuGENE6試薬を400μLの無血清RPMI1640培地に混合、15分間室温放置後、細胞培養液に加えトランスフェクションを行った。トランスフェクション翌々日に選択試薬（Zeocin）を用いて限界希釈法にてクローニングを行った。

30

【0098】

可溶型CDH3発現CHO細胞の選抜は、抗c-Mycモノクローナル抗体（SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY社）を用いたウェスタンブロット法で行った。培養上清中への分泌量が多く増殖が良好な細胞株を選択した結果、可溶型CDH3発現CHO細胞株（EXZ1702）が得られた。選択されたEXZ1702は、培養面積1,500cm²のローラーボトル3本を用い、ローラーボトル1本あたり無血清培地CHO-S-SFM-II（インビトロジェン社）333mLにて72時間培養を行い、培養上清を回収した。得られた培養上清からHisTrap（登録商標）HPカラム（GEヘルスケアバイオサイエンス社）によるアフィニティークロマトグラフィーとSuperdex（登録商標）200pgカラム（GEヘルスケアバイオサイエンス社）によるゲル濾過クロマトグラフィーにより可溶型CDH3細胞外領域タンパク質を得た。

40

【0099】

実施例5 抗ヒトCDH3モノクローナル抗体の作製

（1）可溶型CDH3タンパク質を免疫原としたモノクローナル抗体の作製

生理食塩水に溶解した50μgの可溶型CDH3タンパク質とTiter-MAX G

50

old（登録商標）（タイターマックス社）を等量混合し、MRL/lprマウス（日本エスエルシー株式会社）の腹腔内および皮下に注射する事により初回免疫を行った。2回目以降の免疫は同様に調製した25μgタンパク質量相当の可溶型CDH3タンパク質とTiter-MAX Goldを混合して腹腔内および皮下に注射することにより実施した。最終免疫から3日後にマウスから脾臓細胞を無菌的に調製し、常法に従って、ポリエチレングリコール法によりマウスミエローマ細胞SP2/O-Ag14あるいはP3-X63-Ag8.653との細胞融合を行った。

【0100】

（2）抗ヒトCDH3抗体産生ハイブリドーマの選抜

抗ヒトCDH3抗体の選抜は、EXZ1501を用いたフローサイトメトリで行った。

すなわち、EXZ1501を2mM EDTA-PBSで処理することで培養プレートから剥離後、 1×10^6 個/mLとなるようにFACS溶液に懸濁した。この細胞懸濁液を50μL/ウェルとなるように96ウェルプレートに播種し、ハイブリドーマ培養上清を加えて4℃で60分間反応させ、FACS溶液（200μL/ウェル）で2回洗浄した後、AlexaFluor488標識抗マウスIgG・ヤギF(ab')₂（インビトロジェン社）を加えて、4℃で30分間反応させた。その後FACS溶液で2回洗浄した後、フローサイトメトリを実施し、EXZ1501との反応が認められるハイブリドーマを選抜した。

【0101】

当該ハイブリドーマより得られた抗体と、EXZ1501、親株であるCHO細胞及びCDH3が高発現であると確認されているヒト細気管支肺胞上皮癌細胞株NCI-H358との典型的な反応結果を図6に示す。選抜したハイブリドーマ全てが、EXZ1501およびNCI-H358と反応し、CHO細胞とは反応しないことを確認した。

【0102】

実施例6 サポリン標識抗マウスIgG抗体（MabZAP）による抗ヒトCDH3マウス抗体の内在化能評価

内在化能の測定は、タンパク質合成を阻害する毒素（サポリン）を標識した抗マウスIgG抗体を使用して行なった。サポリンによる細胞殺傷は細胞内部移行が必須であるため、MabZAP（Advanced Targeting Systems社製）を2次抗体とした抗ヒトCDH3抗体のヒトCDH3発現細胞に対する殺傷程度を測定する事で抗ヒトCDH3抗体の内在化能を評価する事が可能である。

【0103】

ヒトCDH3発現細胞としてヒト乳がん由来細胞株HCC1954（1ウェルあたり5000個）を用い、そこに抗ヒトCDH3マウス抗体100ng、MabZAP100ngを加え、37℃、3日間、5%CO₂インキュベーターにて保温した。その後、生細胞数計測試薬であるCell Counting Kit-8（同仁化学研究所社製）を使用して各抗体の細胞殺傷性を評価した。細胞殺傷性は抗体を加えなかった時の細胞生存率を100%とした相対活性で表記した。抗体を変えて複数回実施した結果を表1及び図7A及びBに示す。

【0104】

10

20

30

40

【表 1】

抗体番号	サブタイプ	細胞生存率 (%、試験A)	細胞生存率 (%、試験B)
PPAT-055-01	IgG1	92	85
PPAT-055-02	IgG2a	31	42
PPAT-055-03	IgG1	34	50
PPAT-055-05	IgG1		69
PPAT-055-07	IgG2a		45
PPAT-055-08	IgG2a	43	40
PPAT-055-09	IgG1	26	57
PPAT-055-10	IgG1		61
PPAT-055-11	IgG1		59
PPAT-055-12	IgG2a	47	58
PPAT-055-13	IgG1	99	95
PPAT-055-14	IgG1		87
PPAT-055-15	IgG1	23	
PPAT-055-16	IgG1	88	89
PPAT-055-17	IgG1	93	87
PPAT-055-18	IgG1		65
PPAT-055-19	IgG2b	85	79
PPAT-055-20	IgG2a		78
PPAT-055-21	IgG2a		57
PPAT-055-24	IgG2a		44
PPAT-055-25	IgG1		54
NegativeAb1	IgG2a		97
NegativeAb2	IgG1	90	98

10

20

【0105】

NegativeAb1、NegativeAb2は、ヒト細胞株では発現しておらず、かつCDH3とは無関係な抗原を認識する抗体を示す。

【0106】

抗体PPAT-055-03を産生するハイブリドーマPPAT-055-03は、2010年10月15日に独立行政法人 製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター（郵便番号292-0818 日本国千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8）に受託番号NITE P-988として寄託され、2011年9月7日に、受託番号NITE BP-988としてブタベスト条約に基づく国際寄託に移管された。

30

【0107】

また、抗体PPAT-055-09、PPAT-055-24をそれぞれ産生するハイブリドーマPPAT-055-09、PPAT-055-24は、2010年10月15日に独立行政法人 製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センター（郵便番号292-0818 日本国千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8）に受託番号NITE P-989、NITE P-991として寄託され、2011年9月7日に、受託番号NITE BP-989、NITE BP-991としてブタベスト条約に基づく国際寄託に移管された。

40

【0108】

また、抗体PPAT-055-15を産生するハイブリドーマPPAT-055-15は、2011年9月27日に独立行政法人 製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センター（郵便番号292-0818 日本国千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8）に受託番号NITE BP-1145としてブタベスト条約に基づいて国際寄託されている。

【0109】

実施例7 抗CDH3モノクローナル抗体のエピトープ分類

得られた抗ヒトCDH3抗体のエピトープ分類は、ヒトCDH3部分配列発現物とのウェスタンブロット法により行った。ヒトCDH3部分配列発現物は各断片間で十分に配列が重複するように断片1から5を設計した（図8）。

50

【0110】

(1) ヒトCDH3部分配列発現物の発現ベクターの作製

実施例3の全長ヒトCDH3 cDNAをテンプレートとし、後述のプライマーセットを用いてPCR反応を行った。この反応にはiProofHighFidelityDNAポリメラーゼ（バイオラッド社）を用い、条件は98℃-10秒、60℃-10秒、72℃-30秒、35サイクルで行なった。アガロースゲル電気泳動により目的のサイズに近いバンドを含むゲルを切り出し、QIA（登録商標）クイックゲル抽出キットを用いて、目的のヒトCDH3 cDNA部分断片を得た。

【0111】

このヒトCDH3部分断片を大腸菌発現ベクターpCold（登録商標）TF（タカラバイオ社）へ挿入するために、2種類の制限酵素KpnI及びXbaIで処理した後、同じくKpnI及びXbaIで処理したpColdTFにT4DNAリガーゼを用いて常法に従い挿入し、各断片を発現するための発現ベクターを得た。以下のプライマーセットを用いてPCR反応を行い各断片を得た。

【0112】

断片1（配列番号2の108位-236位）

フォワードプライマー：TATGGAGCTCGGTACCGATTGGGTGGTTGCTCCAATACTG（配列番号：9）

リバープライマー：AGATTACCTATCTAGACTACTGCATCACAGAAGTACCTGGTAGG（配列番号：10）

【0113】

断片2（配列番号2の132位-348位）

フォワードプライマー：TATGGAGCTCGGTACCAAGTCTAATAAAGATAGAGACACCAAG（配列番号：11）

リバープライマー：AGATTACCTATCTAGACTACCTCTGCACCTCATGGCCCACTGCATTCTCA（配列番号：12）

【0114】

断片3（配列番号2の237位-461位）

フォワードプライマー：TATGGAGCTCGGTACCGTGACAGCCACGGATGAGGATGATG（配列番号：13）

リバープライマー：AGATTACCTATCTAGACTAGACACACACAGGCTCCCCAGTG（配列番号：14）

【0115】

断片4（配列番号2の349位-550位）

フォワードプライマー：TATGGAGCTCGGTACCCCTGACGGTCACTGATCTGGACG（配列番号：15）

リバープライマー：AGATTACCTATCTAGACTAGGGCTCAGGGA CTGGGCCATGGTCA TTG（配列番号：16）

【0116】

断片5（配列番号2の462位-654位）

フォワードプライマー：TATGGAGCTCGGTACCTACACTGCAGAAAGACCCCTGACAAAGG（配列番号：17）

リバープライマー：AGATTACCTATCTAGACTAACCTCCCTTCCAGGGTCCAGGGGCAGGTTTTCG（配列番号：18）

【0117】

(2) ヒトCDH3部分配列の発現

(1)のCDH3断片の発現ベクターを使用して、常法により大腸菌Rossetta（登録商標）2（メルク社）を形質転換し、LB培地中で培養。600nmの吸光値が0.4となった段階で、30分間氷冷し、イソプロピルβ-チオガラクトピラノシド（IPTG）濃度を0.5mMとし、20℃で18時間培養後、回収した。

10

20

30

40

50

【0118】

ヒトCDH3部分配列の発現は、大腸菌培養液を電気泳動後、抗PentamerHis抗体（キアゲン社）によるウェスタンブロット法を実施し、予想された位置にバンドが存在する事で確認した。

即ち、上述した大腸菌培養液量の1/10量に相当する泳動緩衝液を加え、還元条件下5-20%グラジエントゲル（バイオラッド社）にチャージして電気泳動後、イモビロン（登録商標）P（ミリポア社）に転写した。転写膜は、TBS-T（0.05%Tween（登録商標）20、TBS）で軽く洗った後、40%BSA入りTBSで1時間振とう後、10%ブロックエー・ース（登録商標）（雪印乳業社）入りTBS-Tで希釈した各抗CDH3抗体を加え1時間振とうした。TBS-Tで洗った後10%ブロックエー・ース入りTBS-Tで希釈したHRP-抗マウスIgG抗体（GEヘルスケアバイオサイエンス社）で1時間振とう後、TBS-Tで洗った。発色はメーカーの解説書に従い、ECL（登録商標）-Plus（GEヘルスケアバイオサイエンス社）を用いて、X線フィルムRX-u（富士フィルム社）にて検出した。得られた結果を図9に示す。

10

【0119】

(3) CDH3部分配列発現物を用いた抗体エピトープ分類

上述の各CDH3部分配列を発現させた大腸菌溶解物を還元条件下、5-20%グラジエントゲル（バイオラッド社）にチャージして電気泳動後、プロット装置（バイオラッド社）を用いて、イモビロンP（ミリポア社）に転写した。転写膜は、TBS-T（0.05%Tween20、TBS）で軽く洗った後、40%BSA入りTBSで1時間振とう後、短冊状に等間隔で切断し、10%ブロックエー・ース入りTBS-Tで希釈した各抗CDH3抗体を加え1時間振とうした。TBS-Tで洗った後10%ブロックエー・ース入りTBS-Tで希釈したHRP-抗マウスIgG抗体（GEヘルスケアバイオサイエンス社）で1時間振とう後、TBS-Tで洗った。発色はメーカーの解説書に従い、ECL-Plus（GEヘルスケアバイオサイエンス社）を用いて、x線FilmRx-u（富士フィルム社）にて検出した。ここで得られた結果を図10に示す。各CDH3部分配列発現物との反応性により、各抗体が認識する領域を決定した。

20

【0120】

(4) ペプチドアレイを用いた抗CDH3モノクローナル抗体エピトープ決定

(3)のCDH3部分配列発現物によるエピトープ決定において、その境界領域に相当したと考えられる抗体PPAT-055-13を対象に、ペプチドアレイ（JPT Peptide Technologies社製Replite）を用いてより詳細にエピトープ決定を行った。具体的には、CDH3の細胞外領域に相当する領域（配列番号2の108位-563位に相当）を、N端から13残基ずつ、2アミノ酸残基ずつスライドして合成したペプチド（108位-120位、110位-122位…551位-563位）をガラススライドに固相化、SuperBlock（サーモフィッシャーサイエンティフィック社）にてブロッキングしたものを調製し、1次抗体としてエピトープ検索対象の抗体と反応させた。TBS-Tで3度洗浄後、DyLight649蛍光標識した抗マウス抗体（サーモフィッシャーサイエンティフィック社）で検出した。エピトープ検索対象の抗体を反応させないものを陰性コントロールとして測定した。測定結果を図11に示す。配列番号2に示されたCDH3のアミノ酸配列446位-472位、490位-504位に相当する領域に強いシグナルが観察され、当該抗体のエピトープと推定された。

30

40

【0121】

以上の実験から推定されたCDH3配列上の各抗体が認識する領域との対応関係を表1で示した内在性試験結果と共に表2に示す。

【0122】

【表 2】

抗体番号	サブタイプ	細胞生存率 (%、試験A)	細胞生存率 (%、試験B)	認識ドメイン
PPAT-055-01	IgG1	92	85	EC3
PPAT-055-02	IgG2a	31	42	EC1
PPAT-055-03	IgG1	34	50	EC1
PPAT-055-05	IgG1		69	EC1
PPAT-055-07	IgG2a		45	EC1
PPAT-055-08	IgG2a	43	40	EC1
PPAT-055-09	IgG1	26	57	EC1
PPAT-055-10	IgG1		61	EC1
PPAT-055-11	IgG1		59	EC1
PPAT-055-12	IgG2a	47	58	EC1
PPAT-055-13	IgG1	99	95	EC3
PPAT-055-14	IgG1		87	EC4
PPAT-055-15	IgG1	23		EC1
PPAT-055-16	IgG1	88	89	EC5
PPAT-055-17	IgG1	93	87	EC5
PPAT-055-18	IgG1		65	EC4
PPAT-055-19	IgG2b	85	79	EC4
PPAT-055-20	IgG2a		78	EC2
PPAT-055-21	IgG2a		57	EC1
PPAT-055-24	IgG2a		44	EC1
PPAT-055-25	IgG1		54	EC1

*但し、PPAT-055-13はEC3、EC4の境界領域を認識すると推定された。

【0123】

表中の認識ドメインと配列番号2で示されるアミノ酸位置との関係は以下に示される。

EC1: 108位-236位

EC2: 237位-348位

EC3: 349位-461位

EC4: 462位-550位

EC5: 551位-654位

【0124】

ここで決定された抗体の認識領域の結果と併せ、内在化能との関連を検討したところ、ヒトCDH3のEC1領域に高い内在化能を示す抗体が集中している事が示された。

【0125】

実施例8 ハイブリドーマからのRNAの精製

ハイブリドーマPPAT-055-09（受託番号NITE BP-989）、及びハイブリドーマPPAT-055-24（受託番号NITE BP-991）から、細胞質に存在するRNAをGough, Rapid and quantitative preparation of cytoplasmic RNA from small numbers of cells, Analytical Biochemistry, 173, p93-95 (1988)により記載されている方法（ただし、この論文に記されている溶解緩衝液のかわりに別のTNE緩衝液（25mM Tris-HCl、pH 7.5、1% NP-40、150mM NaCl、1mMEDTA、pH 8.0）を用いた）に従って単離した。具体的な操作方法としては、 5×10^6 個のハイブリドーマ細胞を0.2mLのTNE緩衝液に懸濁して細胞膜を溶解後、遠心により細胞核を除去した。得られた約0.2mL細胞質上清に0.2mLの抽出緩衝液（10mM Tris-HCl、pH 7.5、0.35M NaCl、1% (w/v) SDS、10mMEDTA、pH 8.0、7M尿素）を加えた。この混合物をフェノールおよびクロロホルムで抽出し、得られたRNA溶液にキャリアとしてグリコーゲン（ロッシュ社、Cat No. 901393）を加えてから、エタノールで沈澱させた。次にRNA沈殿物を、細胞質RNA濃度が0.5~2ug/uLになるように10~50uLの滅菌蒸留水を加えて溶解

した。

【0126】

実施例9 ハイブリドーマから調製したRNAからのcDNAライブラリーの作製

一本鎖cDNAを合成するため、前記のように調製した細胞質RNAの0.5~3ugを50mM Tris-HCl, pH 8.3 (室温)、75mMKCl、3mMMgCl₂、10mMDTT、100ngのランダムプライマー、0.5mMdNTP、200ユニットのSuperscript II (逆転写酵素、インビトロジェン社)を含む20マイクロリットル反応混合液を調製し、42℃で50分間インキュベートした。このように合成したcDNAライブラリーをポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法の鋳型として直接使用した。

10

【0127】

実施例10 抗ヒトCDH3抗体可変領域をコードする遺伝子のPCR法による増幅

実験に用いたプライマーはすべて北海道システムサイエンス株式会社で合成した。

A. マウス軽鎖の可変領域をコードする遺伝子をPCR法で増幅するために使用するプライマー

5'末端においてFR1部分と相同性を有するDNAプライマーと3'末端においてマウスL鎖内のJ鎖遺伝子と相同性を有する4セットプライマー(1)、あるいは、5'末端においてL鎖シグナル部分(7セットプライマー)と3'末端においてKC部分(KVLアンチセンスプライマー)と相同性を有するプライマーセット(2)の2種類のプライマーセットを用いてポリメラーゼ連鎖反応により、該cDNAからマウス免疫グロブリンL鎖可変域DNAを単離した。プライマー配列は次のとおりであった。

20

【0128】

(1) マウスL鎖可変域クローニング4セットセンスプライマー

「Phage Display -A Laboratory Manual, Barbas Burton Scott Silverman」PROTOCOL9.5を参考にSense Primer 17種、Reverse Primer 3種を北海道システムサイエンス社で合成した。

【0129】

VKセンス(FR1部分)下記17のプライマーの混合物をVKセンスプライマーとして使用した。なお、塩基配列において、WはA又はTを示し、RはA又はGを示し、MはA又はCを示し、KはT又はGを示し、YはT又はCを示し、SはG又はCを示し、HはA、C又はTを示し、BはG、C又はTを示し、VはA、G又はCを示し、DはA、G又はTを示し、NはA、G、C又はTを示す。

30

【0130】

配列番号19: 5'-GAYATCCAGCTGACTCAGCC-3' (縮重度2)

配列番号20: 5'-GAYATTGTTCTCWCCAGTC-3' (縮重度4)

配列番号21: 5'-GAYATTGTGMTMACTCAGTC-3' (縮重度8)

配列番号22: 5'-GAYATTGTGYTRACACAGTC-3' (縮重度8)

配列番号23: 5'-GAYATTGTRATGACMCAGTC-3' (縮重度8)

配列番号24: 5'-GAYATTMAGATRAMCCAGTC-3' (縮重度16)

40

配列番号25: 5'-GAYATTCAGATGAYDCAGTC-3' (縮重度12)

配列番号26: 5'-GAYATYCAGATGACACAGAC-3' (縮重度4)

配列番号27: 5'-GAYATTGTTCTCAWCCAGTC-3' (縮重度4)

配列番号28: 5'-GAYATTGWGCTSACCCAATC-3' (縮重度8)

配列番号29: 5'-GAYATTSTRATGACCCARTC-3' (縮重度16)

配列番号30: 5'-GAYRTTKTGATGACCCARAC-3' (縮重度16)

配列番号31: 5'-GAYATTGTGATGACBCAGKC-3' (縮重度12)

配列番号32: 5'-GAYATTGTGATAACYCAGGA-3' (縮重度4)

配列番号33: 5'-GAYATTGTGATGACCCAGWT-3' (縮重度4)

配列番号34: 5'-GAYATTGTGATGACACAACC-3' (縮重度2)

50

配列番号 35 : 5' -GAYATTTTGCTGACTCAGTC-3' (縮重度 2)

【0131】

J アンチセンス (4 セットプライマー)

J1 / J2 アンチセンスプライマー (1)

配列番号 36 : 5' -GGSACCAARCTGGAAATMAAA-3' (縮重度 : 8)

J4 アンチセンスプライマー (2)

配列番号 37 : 5' -GGGACAAAGTTGGAAATAAAA-3'

J5 アンチセンスプライマー (3)

配列番号 38 : 5' -GGGACCAAGCTGGAGCTGAAA-3'

J1 / J2, J4, J5 アンチセンスプライマー混合物 (4)

10

【0132】

(2) マウス L 鎖可変域クローニング 7 セットプライマー

VK センス (シグナルペプチド部分)

このプライマーはノバジェン社のマウス Ig-プライマーセット (Novagen ; Merck, Cat. No. 69831-3) を元に制限酵素部位を除去するように塩基配列を改変した。

【0133】

A セットセンスプライマー

配列番号 39 : 5' -ATGRAGWCACAKWCYCAGGTCTTT-3'

B セットセンスプライマー

20

配列番号 40 : 5' -ATGGAGACAGACACACTCCTGCTAT-3'

C セットセンスプライマー

配列番号 41 : 5' -ATGGAGWCAGACACACTSCTGYTATGGGT-3',

D セットセンスプライマー (下記 2 種類のプライマーの混合物を使用)

配列番号 42 : 5' -ATGAGGRCCCCCTGCTCAGWTTYTTGGIWTCTTT-3'

配列番号 43 : 5' -ATGGGCWTCAGATGRAGTCACAKWYYCWGG-3'

E セットセンスプライマー (下記 3 種類のプライマーの混合物を使用)

30

配列番号 44 : 5' -ATGAGTGTCYCACTCAGGTCTCTGGSGTT-3',

配列番号 45 : 5' -ATGTGGGGAYCGKTTYAMMCTTTTCAATTG-3'

配列番号 46 : 5' -ATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTTCC-3'

F セットセンスプライマー (下記 4 種類のプライマーの混合物を使用)

配列番号 47 : 5' -ATGAGIMMKTCIMTTCAITTCYTG GG-3'

配列番号 48 : 5' -ATGAKGTHCYCIGCTCAGYTYCTIRG-3'

配列番号 49 : 5' -ATGGTRTCCWCASCTCAGTTCCTTG-3'

配列番号 50 : 5' -ATGTATATATGTTTGTGTCTATTTCT-3'

40

G セットセンスプライマー (下記 4 種類のプライマーの混合物を使用)

配列番号 51 : 5' -ATGAAGTTGCCCTGTTAGGCTGTTGGTGCT-3',

配列番号 52 : 5' -ATGGATTTWCARGTGCAGATTWTCAGCTT-3',

配列番号 53 : 5' -ATGGTYCTYATVTCCTTGCTGTTCTGG-3'

配列番号 54 : 5' -ATGGTYCTYATVTRCTGCTGCTATGG-3'

KVL アンチセンスプライマー

配列番号 55 : 5' -ACTGGATGGTGGGAAGATGGA-3'

【0134】

50

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

5'末端においてマウスH鎖シグナル部分（4セットプライマー）と相同性を有するプライマーと3'末端においてKC部分と相同性を有するプライマー、あるいは5'末端においてFR1部分と相同性を有する1セットのプライマーと3'末端においてマウスH鎖の定常領域（IGHC）と相同性を有する2種類のプライマーセットを用いてポリメラーゼ連鎖反応により、該cDNAからマウス免疫グロブリンH鎖可変域DNAを単離した。プライマー配列は次のとおりであった。

【0135】

(3) マウスH鎖可変域クローニングプライマー

VHセンス（シグナル部分：4セットプライマー）

このプライマーはCurrent Protocols in Immunology (John Wiley and Sons, Inc.), Unit 2.12 Cloning, Expression, and Modification of Antibody V RegionsのTable 2.12.2を参考にした。

配列番号56：5'-ATGGRATGSAGCTGKGTMATSCCTCTT-3'（縮重度：32）

配列番号57：5'-ATGRACTTCGGGYTGAGCTKGGTTTTT-3'（縮重度：8）

配列番号58：5'-ATGGCTGTCTTGGGGCTGCTCTTCT-3'

配列番号59：5'-ATGGRCAGRCTTACWTYY-3'（縮重度：32）

【0136】

(4) マウスH鎖可変域クローニングプライマー

VHセンス（FR1部分）

このプライマーはTan等、“Superhumanized” Antibodies: Reduction of Immunogenic Potential by Complementarity-Determining Region Grafting with Human Germline Sequences: Application to an Anti-CD281, Journal of Immunology 169 (2002) p1119-1125のセンスプライマーの塩基配列を改変してデザインした。

配列番号60：5'-SAGGTSMARCTKSAGSAGTCWGG-3'（縮重度：256）

VHアンチセンス（3, 4に共通のアンチセンスプライマー）

マウスIgGすべてのアイソフォームとアニーリングできるように塩基配列を縮重してデザインした。

配列番号61：5'-CASC C C C A T C D G T C T A T C C -3'（縮重度：6）

【0137】

実施例11 キメラ抗ヒトCDH3免疫グロブリンの一過性発現ベクターの作製

発現プラスミドの作製：DNA Engine (Peltier Thermal Cycler, バイオラッド社)を用いたPCR法により抗CDH3マウスモノクローナル抗体L鎖、H鎖それぞれの可変領域を実施例10に示したプライマーを用いて増幅した。増幅したDNAフラグメントはサブクローニングベクターpGEM（プロメガ社）に組み込んで、このベクターのT7, SP6ユニバーサルプライマーで塩基配列を決定した。

【0138】

キメラ抗ヒトCDH3抗体のL鎖、および、H鎖の可変域塩基配列はIMGT/V-QUEST Search page (http://imgt.cines.fr/IMGT_vquest/vquest?livret=0&Option=mouseIg)で検索して、確かに抗体遺伝子がクローニングできていることを確認した。

【0139】

10

20

30

40

50

次に、クローン化された抗ヒトCDH3抗体のL鎖及びH鎖のV領域をコードする遺伝子は、キメラL鎖発現ベクターにはヒトCk領域をコードする遺伝子を、キメラH鎖発現ベクターにはヒトCg1領域をコードする遺伝子をそれぞれ接続した遺伝子をデザインして、これらL鎖、H鎖キメラ抗体遺伝子をGenScript社によって全長人工合成した。その際、CHO生産細胞での遺伝子発現が有利なようにコドン使用頻度の最適化(Kimら、Codon optimization for high-level expression of human erythropoietin (EPO) in mammalian cells, Gene, 199, 1997, p293-301の方法に従った)をおこなった。具体的には、L鎖の場合、効率的な翻訳のために必須のDNA配列(Kozak, M., J., At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. J. Mol. Biol. 196, p947-950, 1987)、マウスIGKV(k鎖可変領域)遺伝子のシグナルペプチド、抗ヒトCDH3抗体のL鎖のV領域、ヒトKC(k鎖定常域)の順に遺伝子を並列し、その両端には制限酵素部位(5'側にNheI, 3'側にEcoRI)を付加した。キメラH鎖も同様に作製した。これら人工合成遺伝子をNheIとEcoRIで切断し、発現ベクターpCAGGSのNheIとEcoRI部位に組み込み、抗ヒトCDH3キメラ抗体L鎖発現ベクターpCAGGS-IGK, H鎖発現ベクターpCAGGS-IGHを得た。

10

【0140】

20

実施例12 抗ヒトCDH3キメラ化抗体の安定発現ベクターの作製

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

【0141】

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

30

【0142】

実施例13 抗ヒトCDH3キメラ化抗体生産CHO細胞株の樹立

40

CHO dhfr(-)細胞(G. Urlaubら、Isolation of Chinese hamster cell mutants deficient in dihydrofolate reductase activity, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, p4216-4220, 1980)を用いて、2種類のプラスミド(アンピシリン耐性遺伝子内のPvuIでプラスミドを切断して環状プラスミドから線状プラスミドにした)すなわち、キメラ抗CDH3L鎖を発現するためのpCAGGS-IGK-CMV-dhfr-Aベクター、および、キメラ抗CDH3H鎖を発現するためのpCAGGS-IGH-CMV-dhfr-Aベクターにより同時形質転換した。エレクトロポレーションはロンザ社製のAmaxaでおこなった。DNA(L鎖、H鎖各プラスミドにつき0.002mg/試料)を 3×10^3

50

細胞の0.1 mLのAmaxaエレクトロポレーションCHO用緩衝液に加えてパルスを与えた。

【0143】

エレクトロポレーション処理された細胞を、10%の透析済みFBSを含有し、HT（H，ヒポキサンチン：T，チミジン）を含まないIscove's Modified Dulbecco培地（IMDM）に加えた。遺伝子導入から3日後、10%透析FBS、2 mM L-グルタミン、HTを含まないIMDMに培地を交換して1 mg/mLのG418でneo⁺形質転換細胞の選択をおこない、キメラ抗体産生陽性細胞株クローンを得た。次に、G418で選択されたクローンをを用いて遺伝子増幅をおこなった。0.25 mM、1 mMの2ラウンドのメソトレキセート（MTX）中での増幅の後、1リットルあたり約50～100 mgのキメラ抗ヒトCDH3抗体を生産する細胞株を樹立できた。

10

【0144】

実施例14 酵素免疫測定法（ELISA）によるキメラ化抗体の定量

遺伝子導入したCHO細胞の培養上清をELISAにより測定して、キメラ化抗体が生産されていることを確認した。キメラ抗体を検出するため、プレートをヤギ抗ヒトIgG（H+L）（マウス、ウサギ、ウシ、マウスIgGに対して吸収済み）（コスモバイオ：AQI，Cat. A-110UD）でコートした。ブロックした後、抗CDH3キメラ抗体産生CHO細胞からの培養上清を段階希釈し、各ウェルに加えた。プレートをインキュベーション、および洗浄後、ヤギ抗ヒトIgG（H+L）（マウス、ウサギ、ウシ、マウスIgGに対して吸収済み）-HRP（コスモバイオ：AQI，Cat. A-110PD）を加えた。インキュベーション及び洗浄の後、基質緩衝液を加えた。さらにインキュベーションした後、反応を停止しそして450 nmにおける吸光度を測定した。標準として精製ヒトIgGを用いた。

20

【0145】

実施例15 キメラ化抗体の内在化能の評価

作製したキメラ化抗体の内在化能は、実施例6で示したものと同様の方法で行なった。但し、サポリン標識抗体はキメラ化抗体に対応するため、HumZAP（Advanced Targeting Systems社）を使用した。その結果、親抗体で示されていた内在化能はキメラ化後もそのまま保持していた。表1で示した親抗体の結果を併せ、キメラ化後の内在性試験結果を表3に示す。

30

【0146】

【表 3】

親抗体番号	サブタイプ	親抗体 細胞生存率 (%、試験A)	親抗体 細胞生存率 (%、試験B)	認識ドメイン	キメラ化抗体番号	キメラ抗体 細胞生存率 (%)	
PPAT-055-15	IgG1	23		EC1			
PPAT-055-08	IgG2a	43	40	EC1			
PPAT-055-02	IgG2a	31	42	EC1			
PPAT-055-24	IgG2a		44	EC1	PPAT-055-24C	41	
PPAT-055-07	IgG2a		45	EC1			
PPAT-055-03	IgG1	34	50	EC1			
PPAT-055-25	IgG1		54	EC1			
PPAT-055-09	IgG1	26	57	EC1	PPAT-055-09C	44	10
PPAT-055-21	IgG2a		57	EC1			
PPAT-055-12	IgG2a	47	58	EC1			
PPAT-055-11	IgG1		59	EC1			
PPAT-055-10	IgG1		61	EC1			
PPAT-055-18	IgG1		65	EC4			
PPAT-055-05	IgG1		69	EC1			
PPAT-055-20	IgG2a		78	EC2			
PPAT-055-19	IgG2b	85	79	EC4			
PPAT-055-01	IgG1	92	85	EC3			
PPAT-055-14	IgG1		87	EC4			
PPAT-055-17	IgG1	93	87	EC5	PPAT-055-17C	91	
PPAT-055-16	IgG1	88	89	EC5			
PPAT-055-13	IgG1	99	95	EC3			
NegativeAb1	IgG2a		97				20
NegativeAb2	IgG1	90	98				

*但し、PPAT-055-13はEC3、EC4の境界領域を認識すると推定された。

【0147】

キメラ抗体PPAT-055-9C及びPPAT-055-24Cを産生する細胞株PPAT-055-9C及びPPAT-055-24Cは、2011年9月27日に独立行政法人 製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センター（郵便番号292-0818 日本国千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8）に受託番号NITE BP-1147及びNITE BP-1148としてブタベスト条約に基づいて国際寄託されている。

【0148】

実施例16 薬剤の合成

DM1SMeは、米国特許第5,208,020号および6,333,410B1号に以前に記載されたように調製した（図12）。

【0149】

実施例17 薬剤結合抗体の調製

(1) 結合薬剤の還元処理

エタノール300μLで溶解した0.78mgのDM1SMeと50mMリン酸カリウム緩衝液（pH7.5）180μL，TCEPsolution（Bond Breaker，サーモフィッシャーサイエンティフィック社）20μLを混合し、窒素雰囲気下、室温で30分以上、攪拌しながら反応させ、薬剤を還元した。

還元薬剤はHPLCを使用して精製した後に溶媒留去後、10mg/mLになるようにジメチルアセトアミドに溶解した。

【0150】

(2) マレイミド化抗体の調製

1mg/mL抗ヒトCDH3キメラ化抗体にモル比30倍過剰となる量のsulfo-SMCC（サーモフィッシャーサイエンティフィック社）を加え、30℃、1時間反応させた。

過剰な架橋剤を除くため、50mMリン酸カリウム、50mM NaCl、2mM EDTA（pH6.5）で平衡化した脱塩カラムで脱塩処理（ZebaSpinColumn，サーモフィッシャーサイエンティフィック社）した。

【0151】

(3) 薬剤による抗体の修飾

1 mg/mL のマレイミド化した抗CDH3キメラ抗体と、結合したマレイミド基数の1.7倍に相当する還元薬剤とを50 mMリン酸カリウム、50 mM NaCl、2 mM EDTA (pH 6.5) 中で、室温にて一晩反応させた。過剰な薬剤を除くため、HPLCを使用してゲルろ過を実施した。

【0152】

実施例18 抗体薬剤結合量の定量

抗体当たりの薬剤結合数は、252 nm及び280 nmの吸光度を測定する事で決定した。決定方法は非特許文献(Widdison, W. C., Wilhelm, S. D., Cavanagh, E. E., et al. (2006) Semisynthetic maytansine analogues for the targeted treatment of cancer. J. Med. Chem., 49, 4392-4408)に記載の吸光係数 $\epsilon_{Ab_{280}} = 223,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $\epsilon_{Ab_{252}} = 82,510 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $\epsilon_{DM_{280}} = 5,180 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $\epsilon_{DM_{252}} = 26,160 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ を利用した。その結果、各抗体1分子辺り3~4個程度の薬剤が導入されていると見積もられた。測定結果を表4に示す。

【0153】

【表4】

キメラ抗体番号	A280	A252	抗体1分子当たりの薬剤結合数
PPAT-055-09C	1.36	1.00	3.63
PPAT-055-24C	1.31	0.91	3.20

【0154】

実施例19 インビトロ試験

薬剤結合抗体の細胞毒性と特異性はWST-8を発色基質とした細胞増殖測定試薬(同仁化学研究所社, Cell counting assay kit-8)を使用して評価した。

即ち、ヒトCDH3が高発現であると確認されているヒト乳がん細胞株HCC1954(ATCC CRL-2338)と薬剤結合抗体(ADC)あるいは薬剤を結合していない抗体(Naked)を任意の量共存させ、37度で3日間、5% CO₂環境下でインキュベートした。その後、細胞増殖測定試薬を添加放置後A450/620の吸光度を測定し、癌細胞株のみで抗体を加えないウェルより得られた吸光度の値を100%としたときの相対的な値を細胞生存率として表記した(図13)。

【0155】

実施例20 インビボ試験

薬剤結合抗体のインビボでの腫瘍縮小効果を、乳がん細胞株HCC1954を移植したゼノグラフトモデルにて確認した。投与は、抗アシアログM1抗体(WAKO 014-09801)を、大塚蒸留水1 mLで溶解後、大塚生理食塩水4 mLを加えて全量5 mLとした後、この溶液を、マウス1匹あたり100 uL腹腔内投与。HCC1954は10% FBS含有RPMI 1640培地を用いて培養し、SCIDマウス(メス、日本クレア)の右腹側部皮下に5 x 10⁶個/マウスになるように移植した。

【0156】

試験に先立ち、移植HCC1954腫瘍塊のCDH3発現を056実施例5と同様の手順で免疫組織化学(IHC)により確認した。その結果を図14に示す。

インビボ試験は各群5匹とし、15 mg/kgを尾静脈より投与した。投与は平均腫瘍径が100-150 mm³となった時点で開始し、1週間後に更に同量、計2回行なった。

腫瘍サイズの推移を図15に示す。

【図 1】

E-cadherin_CDH1_ DNVIPPISCPENEKGFPPKLVQIKSNKQKEGVYSITGGADTPPVGVFI IERETGWL 60
P-cadherin_CDH3_ DNVVAPISVPEKNGKGFPPORLNKSNKQKOTKIFYSITGPADSPPEGFAVEKETGWL 60
N-cadherin_CDH2_ DNVIPPIPLPENSNGKGFPPQELVRIISDRDKNLSLRYSVITGPADQPTGIFINPISGQL 60

E-cadherin_CDH1_ KVTPLDRERATYTLFSHAYSSNGNAVEDPMEILITVTDQNDKPFETGEVFKGSVMEG 120
P-cadherin_CDH3_ LLNKLPLDREEIAKVELFGHAYSENGASVEDPNNISITVTDQNDKPFETQDFRGSVMLEG 120
N-cadherin_CDH2_ SVTANLPLDREELARFHLRAHAYDINGQVENPIDIVINWIDMNDNRPFLHGVNGTVPPEG 120

E-cadherin_CDH1_ ALPGTSVMETVATDADDQVNTYAAIAYTILSDPELPDKNMFITNRTGWSVYTTGLD 180
P-cadherin_CDH3_ VLPGTVMGATATDEDAIYTYNGVAYYSIHSGEPKDPHLMFTIHRSTGTISVSSGLD 180
N-cadherin_CDH2_ SKPGTYVMVTATDADDQVNTYAAIAYTILSDPELPDKNMFITNRTGWSVYTTGLD 180

E-cadherin_CDH1_ RESFPTYLTVGADLQGE---GLSTTATAVITVTDNDNPFIFNPTTYKGVPEANEAV 237
P-cadherin_CDH3_ REKVPETLTIQATMDQGD---GSTTATAVAVEILDANDNAPMFDPQYEAHVPENAVGH 237
N-cadherin_CDH2_ REKVGQTLTIQATMDQGNPTVGLSNTATVITVTDNDAPPEFTAMTFYGVPENRVDI 239

E-cadherin_CDH1_ VITLLKVTADAPNTNPAWEAVYITILN-DDGGGFVITNPNVNDGLKATGLDFEAKQGY 298
P-cadherin_CDH3_ EVGLRLVTLDLAFNSPWARATYILMGGDDQHFITITHPESNGSLITRKQLDFEAKNQH 297
N-cadherin_CDH2_ IVANLVTLDKQCFHTPAWNAVYRISGGDPTGFAIGTDQNSNGGLVTVVAPIDFETNRMF 299

E-cadherin_CDH1_ ILHVAVTNVPFEVSLT---STATVTVVLDWNEAPIFVPEKRVESDEFGMGGEITS 353
P-cadherin_CDH3_ TLKVEYVNEAPVYLKPT---STATVTVVYEDVNEAPVFPVPSKVVVEGEGITPGEVVCY 354
N-cadherin_CDH2_ VLTVAENGLPLAKGIQHPQGSTATVTVIDVNEPNFYAPNPKIIRGEEGLHAGTMLT 359

E-cadherin_CDH1_ YTAQEPDTFMEQKITRYIRWDNAVILEINPDTGAISTRALDREDFEHVNSYTYALLIA 413
P-cadherin_CDH3_ YTAEDPK-ENQKISYRILRDPAWILAMPDSGGMTAVGTLDRDEQFVRNNIYEVWYLA 413
N-cadherin_CDH2_ FTAQDPDRYMOQIRYTKLSDPANWLIDPVNGGIITIAVLDRSS-PWYKNNIYNATFLA 418

E-cadherin_CDH1_ TDNGSPVATGTGTLILLSDVNDNAPIPEPTIFFCER-NPKPQVINIIDADLPNTSPSF 472
P-cadherin_CDH3_ MDNGSPPTTGTGTLILLDYNHGFVPEPRQITIQNG-SPVRGVLNITDKDLSPTSPSF 472
N-cadherin_CDH2_ SDNGIPPMSTGTGLQLYLLIDNDNAPQWLPQEAETQETPDPNSINITALDYDIDPNAQPF 478

E-cadherin_CDH1_ TAELTHG-ASANNITQYNDPTQESIILKPK-MALEVGQYKILKLMNDON---KQGVITLLE 528
P-cadherin_CDH3_ QAQLTDD-SDIYWTAEVNE-EGDTVLSLK-KFLKQDTYDVHLSLSDHGN---KEQLTVIR 527
N-cadherin_CDH2_ AFDLPLSPVTITKRNWITITRLNGDFAGLNKIKVLEAGIYEVPIITIDSGNPPKSNISILR 538

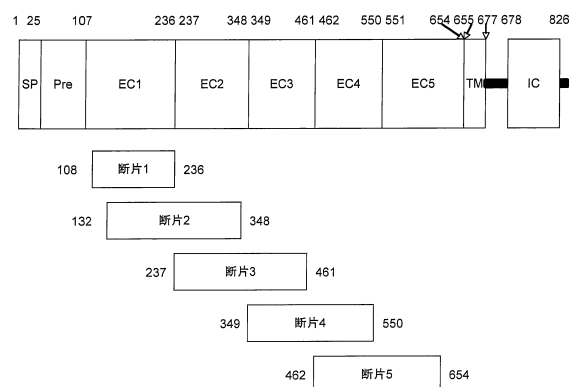
E-cadherin_CDH1_ VSVQDQGAAGYORKAQPEVAGLQIPAILGILGGILALLITLLLLFLRR---AVYVE 585
P-cadherin_CDH3_ ATVQDQGHVETC---PQPIVKGFTLP---VLGAVLALLFLLLVLLVRRK---RKIVE 578
N-cadherin_CDH2_ VKVQDQSGDQSDQDVRIVGAGLGTGATITALLCIITLLILVLMFVVMKRRDKERQAKQ 598

E-cadherin_CDH1_ PLLLPEDTDTRNMYYYDEEGGEEQDQDLSQLHRG---LDARPEVT-RNDVAPTLMSV 640
P-cadherin_CDH3_ PLLLPEDTDTRNMYYYGEEGGEEQDQYDITQLHRG---LEARPEVYLNDVAPTLIPT 634
N-cadherin_CDH2_ LITDPEDDRWNLKLYDEEGGEEQDQDLSQLQDPTVEPDAIKPVGIRWDERPIHAE 658

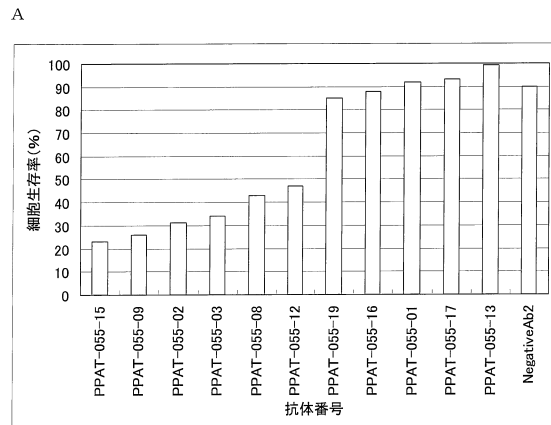
E-cadherin_CDH1_ PRVLPFPANPD---EIGNFIDENLKAADTOPAPPYDLSLLVFDYEGSGEASLSSLSNSE 688
P-cadherin_CDH3_ PMYRFPANPD---EIGNFIDENLKAANTOPAPPYDLSLLVFDYEGSGEASLSSLSNSA 682
N-cadherin_CDH2_ PQYVPSAAPHGDIQDFTNEGLKAADNPTAPPYDLSLLVFDYEGSGSTAGLSSLSNSSS 718

E-cadherin_CDH1_ SDKQGDYDYLNEWGNRFKRLADMYGGGEDD 728
P-cadherin_CDH3_ SDQDGDYDYLNEWGSRFRKRLADMYGGGEDD 722
N-cadherin_CDH2_ SGGEQDYDYLNDWGFRRFKRLADMYGGGEDD- 747

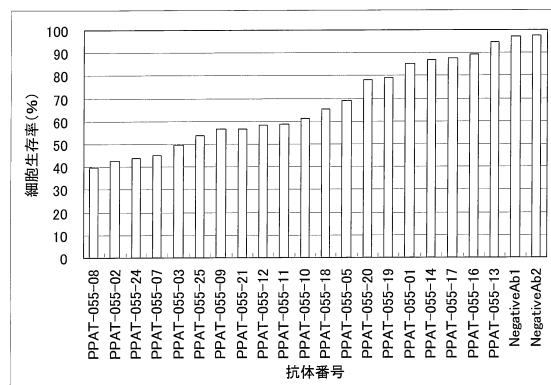
【図 8】



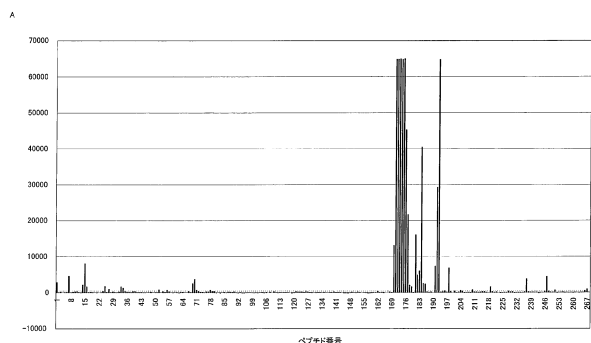
【図 7】



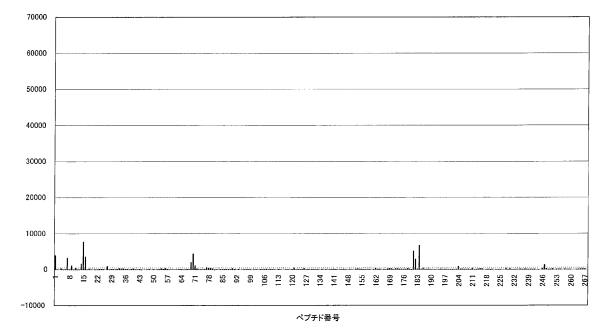
B



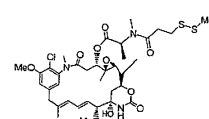
【図 11】



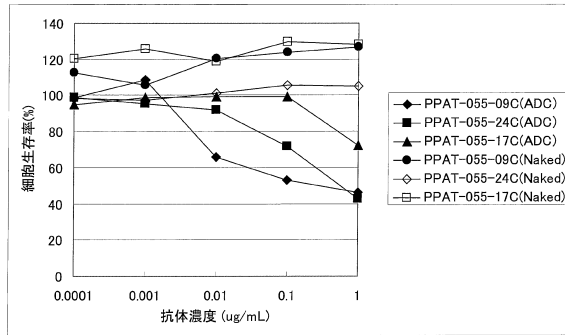
B



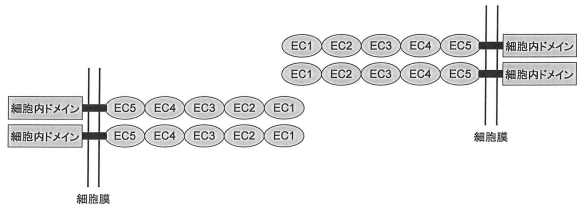
【図 12】



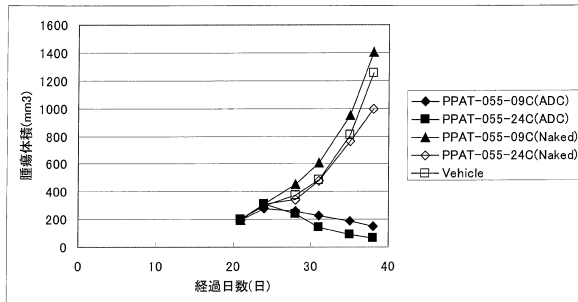
【図 13】



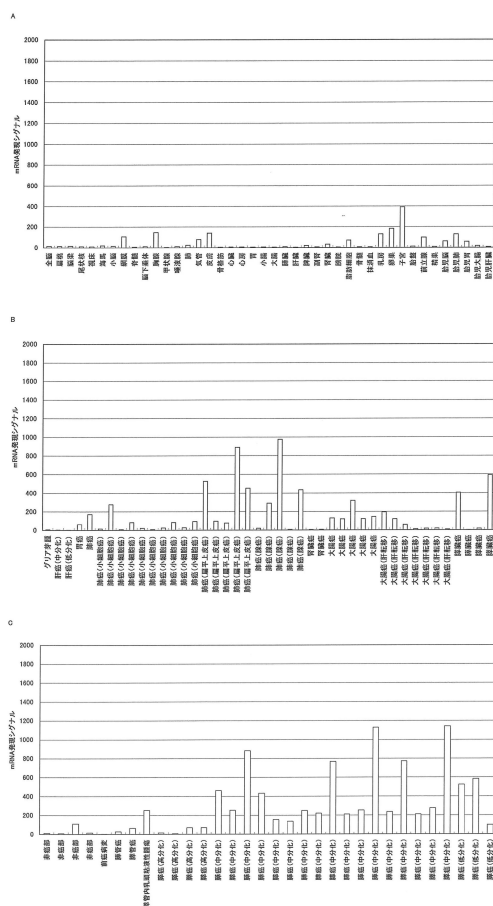
【図 2】



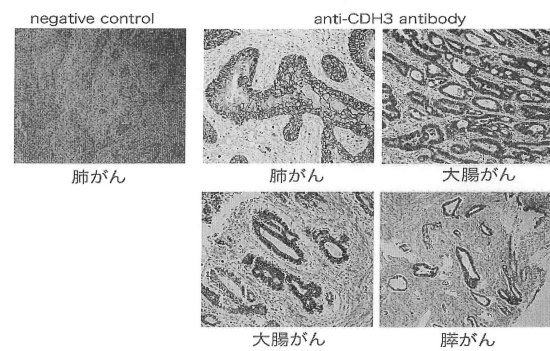
【図 15】



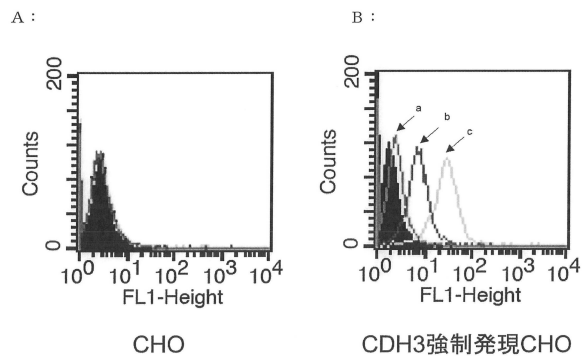
【図 3】



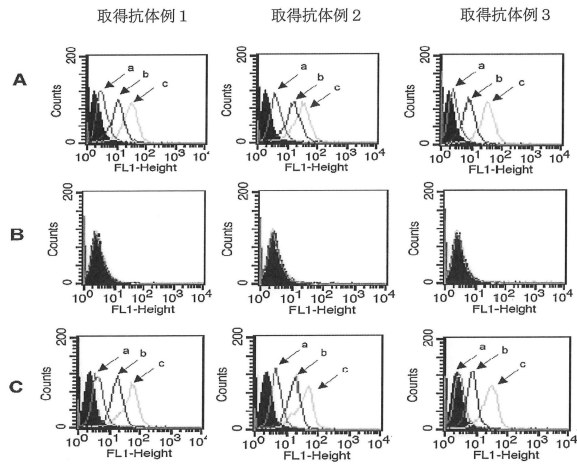
【図 4】



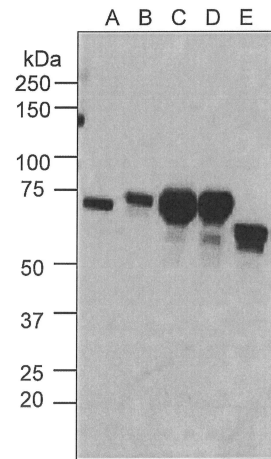
【図 5】



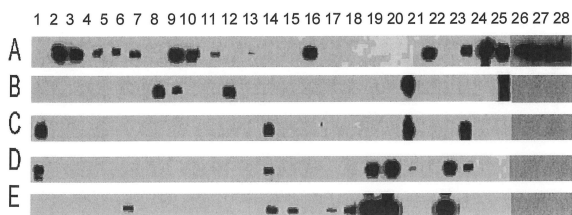
【図 6】



【図 9】

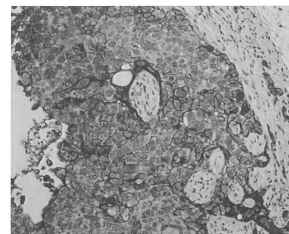


【図 10】



レーン	抗体番号
1	PPAT-055-01
2	PPAT-055-02
3	PPAT-055-03
5	PPAT-055-05
7	PPAT-055-07
8	PPAT-055-08
9	PPAT-055-09
10	PPAT-055-10
11	PPAT-055-11
12	PPAT-055-12
13	PPAT-055-13
14	PPAT-055-14
15	PPAT-055-15
16	PPAT-055-16
17	PPAT-055-17
18	PPAT-055-18
19	PPAT-055-19
20	PPAT-055-20
21	PPAT-055-21
27	PPAT-055-25
28	PPAT-055-24

【図 14】



【配列表】

0006006640000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 P 21/08 (2006.01) A 6 1 K 39/395 L
C 1 2 P 21/08

微生物の受託番号 NPMD NITE BP-991
微生物の受託番号 NPMD NITE BP-1148
微生物の受託番号 NPMD NITE BP-988

前置審査

(72)発明者 松浦 正
東京都目黒区駒場4丁目7番6号 パークビル2F 株式会社ベルセウスプロテオミクス内
(72)発明者 須藤 幸夫
東京都目黒区駒場4丁目7番6号 パークビル2F 株式会社ベルセウスプロテオミクス内
(72)発明者 見供 克之
東京都目黒区駒場4丁目7番6号 パークビル2F 株式会社ベルセウスプロテオミクス内
(72)発明者 甲田 克志
東京都目黒区駒場4丁目7番6号 パークビル2F 株式会社ベルセウスプロテオミクス内

審査官 伊達 利奈

(56)参考文献 国際公開第2002/097395 (WO, A1)
国際公開第2006/022344 (WO, A1)
国際公開第2008/146854 (WO, A1)
国際公開第2006/114704 (WO, A1)
国際公開第2003/000928 (WO, A1)
Clinical Cancer Research, 2010.09.09, Vol.16, No.21, pp.5177-5188
Oncogene, 2002, Vol.21, pp.7067-7076

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C 1 2 N 15/00-15/90
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)
P u b M e d