

(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
2013 年 5 月 30 日(30.05.2013)



(10) 国際公開番号
WO 2013/077458 A1

- (51) 国際特許分類:
C07K 16/30 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *C12P 21/08* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *G01N 33/53* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2012/080800
- (22) 国際出願日: 2012 年 11 月 21 日(21.11.2012)
- (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:
61/562,672 2011 年 11 月 22 日(22.11.2011) US
- (71) 出願人: 株式会社リブテック(LIVTECH, INC.)
[JP/JP]; 〒2160001 神奈川県川崎市宮前区野川 9
0 7 帝京大学生物工学研究センター 1 F
Kanagawa (JP).
- (72) 発明者: 中村康司(NAKAMURA, Koji); 〒1830033
東京都府中市分梅町五丁目 3 5 番地の 1 4 エ
ルデ 1 0 3 Tokyo (JP). 岡村健太郎(OKAMURA,
Kentaro); 〒2160035 神奈川県川崎市宮前区馬絹 1
3 2 1 番地 4 カサド M 1 0 3 Kanagawa (JP). 田
村真紀(TAMURA, Maki); 〒2130015 神奈川県川崎
市高津区梶ヶ谷 2 丁目 1 番地 1 3 イルニード
7 0 1 Kanagawa (JP). 柳内浩之(YANAI, Hiroyuki);
〒2230062 神奈川県横浜市港北区日吉本町六丁
目 9 番 2 2 - 2 C 号 Kanagawa (JP). 菅家徹
(KANKE, Toru); 〒2160004 神奈川県川崎市宮前区
鷺沼 4 丁目 1 番地 2 鷺沼サン・エルサ 2 0 3
Kanagawa (JP). 鶴下直也(TSURUSHITA, Naoya);
94306 カリフォルニア州パロアルト市レッド
ウッドサークル 3 7 1 9 番地 California (US). ク
マールシャンカール(KUMAR, Shankar); 94588 カ
リフォルニア州プリーザントン市クラールブレ
イス 3 9 3 0 番地 California (US).
- (74) 代理人: 小林浩, 外(KOBAYASHI, Hiroshi et al.); 〒
1040028 東京都中央区八重洲二丁目 8 番 7 号福
岡ビル 9 階 阿部・井窪・片山法律事務所
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, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, 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, PA, PE, PG, PH,
PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
SM, ST, SV, SY, TH, 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, LR, LS, MW,
MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシ
ア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ
(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR,
GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT,
NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, 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 (条約第 21 条(3))
— 規則 13 の 2 に基づいて明細書とは別に提出され
た、寄託された生物材料に関する表示 (規則 13
の 2.4(d)(i) 及び 48.2(a)(viii))
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト
(規則 5.2(a))

(54) Title: ANTI-HUMAN TROP-2 ANTIBODY EXHIBITING ANTITUMOR ACTIVITY IN VIVO

(54) 発明の名称: in vivo で抗腫瘍活性を有する抗ヒト TROP-2 抗体

(57) Abstract: The present invention provides an antibody (particularly a humanized antibody) specifically reacting with hTROP-2 and exhibiting antitumor activity in vivo, a hybridoma producing said antibody, a composite of said antibody and a drug, a pharmaceutical composition for diagnosing or treating tumors, a tumor detection method, and a kit for detecting or diagnosing tumors.

(57) 要約: 本発明は、hTROP-2 と特異的に反応し in vivo で抗腫瘍活性を有する抗体 (特にヒト型化抗体)、当該抗体を産生するハイブリドーマ、当該抗体と薬剤との複合体、腫瘍の診断用又は治療用医薬組成物、腫瘍の検出方法、腫瘍の検出用又は診断用キットを提供する。



WO 2013/077458 A1

明 細 書

発明の名称

*in vivo*で抗腫瘍活性を有する抗ヒトTROP-2抗体

5

技術分野

本発明は、抗腫瘍活性を有する抗ヒトTROP-2抗体、特に*in vivo*で抗腫瘍活性を有する抗ヒトTROP-2抗体に関する。また本発明は、当該抗体を産生するハイブリドーマ、及び当該抗体の用途に関する。

10

背景技術

ヒトTROP-2 (Tacstd2, GA733-1, EGP-1) (以下、hTROP-2とも表記する。) は、種々の上皮細胞癌種において過剰発現していることが知られる、323アミノ酸残基 (配列番号2参照) からなる1回膜貫通型の1型細胞膜タンパク質である。

- 15 以前より、ヒト栄養膜細胞 (trophoblasts) と癌細胞に共通する免疫抵抗性に関する細胞膜タンパク質の存在 (非特許文献1) が示唆されていたが、ヒト絨毛癌細胞株BeWoの細胞膜タンパク質に対するマウスモノクローナル抗体 (162-25.3, 162-46.2) により認識される抗原分子が特定され、ヒト栄養膜細胞 (trophoblasts) に発現する分子の一つとしてTrop-2と命名された (非特許文献2)
- 20)。後に、同じ分子が、他の研究者によって発見され、胃癌細胞SW948を免疫して得られたマウスモノクローナル抗体GA733によって認識される腫瘍抗原GA733-1 (非特許文献3)、非小細胞肺癌細胞免疫によって得られたマウスモノクローナル抗体RS7-3G11により認識される上皮糖タンパク質 (epithelial/carcinoma antigen, EGP-1) (非特許文献4) と呼ばれたが、
- 25 1995年にTrop-2の遺伝子がクローニングされ、これらが同一の分子であることが確認された (非特許文献5)。また、癌細胞において細胞内カルシウムシグナルを増幅させる機能が明らかにされ (非特許文献6)、tumor-associated calcium signal transducer 2, TACSTD2とも呼ばれる。

hTROP-2遺伝子は、染色体1p32にマッピングされ、約50%の相同性を持つ

GA733-2 (TACSTD1、上皮糖タンパク質EGP-2、EpCAM及びTrop-1としても知られている)とともにTACSTD遺伝子ファミリーを構成している(非特許文献7)。hTROP-2タンパク質(323アミノ酸残基;配列番号2)は、およそ36
5 キロダルトンの分子量を有し、親水性のシグナルペプチド(第1~26番目のアミノ酸)、細胞外ドメイン(第27~274番目のアミノ酸)、細胞膜貫通ドメイン(第275~297番目のアミノ酸)ならびに細胞内ドメイン(第298~323番目のアミノ酸)からなる。細胞外ドメインには4つの不均質N結合グリコシル化部位があり、糖鎖付加により見かけ上の分子量は11~13キロダルトン増加する(非特許文献5)。TACSTD遺伝子ファミリーでは、細胞外ドメインに特徴的な
10 thyroglobulin(TY)配列を有し、癌細胞の増殖や浸潤、転移に関与すると考えられている。

これまでに、hTROP-2の生理学的リガンドは同定されておらず、分子機能は明らかにされていないが、腫瘍細胞においてカルシウムシグナルを伝達することが示され(非特許文献6)、また、Ca²⁺依存性のキナーゼであるプロテインキ
15 ナーゼC(PKC)により、細胞内セリン303残基がリン酸化されること(非特許文献4)や、細胞内ドメインにPIP2結合配列を有することから、腫瘍細胞におけるシグナル伝達機能が示唆されている(非特許文献8)。

免疫組織化学(IHC)及びフローサイトメトリーなどの解析により、胃癌、肺癌、大腸癌、卵巣癌、乳癌、前立腺癌、膵癌、肝癌、食道癌などの多くの上皮由来癌腫においてhTROP-2の過剰発現が報告されている。これに対し、正常組織
20 における発現は上皮領域の細胞に限定され、発現レベルも癌腫に比較して低いことが示され、TROP-2の腫瘍形成への関与が示唆されている(特許文献1~3及び9)。

また、臨床検体におけるバイオマーカーとしてのhTROP-2の発現は、大腸癌
25 (非特許文献10及び11)、膵臓癌(非特許文献12)や口腔癌(非特許文献13)の悪性度と相関し、hTROP-2が高発現している場合には癌の転移や再発が有意に高いことが示されている。また、cDNAマイクロアレイ技術を使用した大規模遺伝子発現分析において、正常な卵巣上皮と比較して卵巣の重篤な乳頭状腺癌に最も高度に過剰発現している遺伝子群のひとつとして同定された(非特許

文献 14)。

さらに、近年、腫瘍形成におけるhTROP-2の重要な役割が大腸癌細胞を用いたモデルにより証明された(非特許文献 15)。hTROP-2の発現が腫瘍細胞の足場非依存的細胞増殖を促進し、免疫不全マウスの皮下に移植した癌細胞の腫瘍形成及び増殖に必要であることから、機能的な腫瘍抗原として新たな治療標的となる可能性を示した。

これまでに、いくつかの抗hTROP-2抗体について抗腫瘍効果の検討が報告されている。RS7抗体(特許文献 1)について、放射性物質で標識した抗体を用いた*in vivo*モデルにおいて試験され、ヌードマウス異種移植モデルにおける抗腫瘍活性が示されているが、抗体単独(裸抗体)での抗腫瘍効果は報告されていない。

この他に、細胞毒素を結合させた抗hTROP-2モノクローナル抗体BR110(特許文献 2)による、ヒト癌細胞株H3619、H2987、MCF-7、H3396及びH2981に対する*in vitro*実験での細胞障害性が報告されているが、*in vivo*データでは裸抗体又はBR110の免疫複合体について開示されているものはなかった。

近年、ヒト卵巣癌組織をマウスに免疫することで得られたハイブリドーマ細胞株AR47A6.4.2あるいはAR52A301.5により産生される単離モノクローナル抗体が、hTROP-2と結合し、裸抗体として初めて、*in vitro*での細胞障害性に加え、ヌードマウス異種移植モデルにおける抗腫瘍活性を示すことが報告された(特許文献 3 及び 4)。しかしながら、これら文献中では、膵臓癌細胞株BxPC-3及びPL45、前立腺癌細胞PC-3、乳癌細胞MCF-7並びに大腸癌細胞Colo205を移植したマウス異種移植モデルにおいて抗体単独での抗腫瘍効果が示されているが、BxPC-3細胞移植において治療効果が示されている以外は、抗体の予防的投与により腫瘍形成及び増殖を部分的に(約40~60%)抑制することが示されているに留まり、また、必要とされる抗体量も、20mg/kg程度と非常に高用量であった。

以上の従来知見から、抗hTROP-2抗体の抗腫瘍抗体としての可能性が示唆されているが、同時に、抗hTROP-2抗体のすべてが裸抗体として抗体単独で*in vivo*において抗腫瘍効果を示すものではなく、抗体の結合部位や親和性、モノクローナル抗体の性質により、hTROP-2に対する作用が異なることを示している。

- 特許文献 1 : 米国特許第6653104号
- 特許文献 2 : 米国特許第5840854号
- 特許文献 3 : 米国特許第7420040号
- 5 特許文献 4 : 米国特許第7420041号
- 非特許文献 1 : Faulk WP, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 75(4), p. 1947-1951 (1978)
- 非特許文献 2 : Lipinski M, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 78(8), p. 5147-5150 (1981)
- 10 非特許文献 3 : Linnenbach AJ, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 86(1), p. 27-31 (1989)
- 非特許文献 4 : Basu A, et al., Int. J. Cancer, 62(4), p. 472-479 (1995)
- 非特許文献 5 : Fornaro M, et al., Int. J. Cancer, 62(5), p. 610-618 (1995)
- 非特許文献 6 : Ripani E, et al., Int. J. Cancer, 76(5), p. 671-676 (1998)
- 15 非特許文献 7 : Calabrese G, et al., Cell Genet., 92(1-2), p. 164-165 (2001)
- 非特許文献 8 : El Sewedy T et al., Int. J. Cancer, 75(2), p. 324-330 (1998)
- 非特許文献 9 : Cubas R, et al., Biochim. Biophys. Acta., 1796(2), p. 309-314 (2009)
- 非特許文献 10 : Ohmachi T et al., Clin. Cancer Res., 12(10), p. 3057-3063 (2006)
- 20 非特許文献 11 : Fang YJ, et al., Int. J. Colorectal Dis., 24(8), p. 875-884 (2009)
- 非特許文献 12 : Fong D, et al., Br. J. Cancer, 99(8), p. 1290-1295 (2008)
- 非特許文献 13 : Fong D, et al., Mod. Pathol., 21(2), p. 186-191 (2008)
- 25 非特許文献 14 : Santin AD, et al., Int. J. Cancer, 112(1), p. 14-25 (2004)
- 非特許文献 15 : Wang J, et al., Mol. Cancer Ther., 7(2), p. 280-285 (2008)

発明の概要

このような状況下において、*in vivo*において高い抗腫瘍活性を有する抗

hTROP-2抗体（抗hTROP-2モノクローナル抗体）、具体的には、裸抗体として抗体単独で*in vivo*における抗腫瘍効果を有し、しかも低用量で当該効果を有する抗hTROP-2抗体、特に当該抗体であってヒト型化抗体であるもの等の開発が望まれていた。

- 5 本発明は、上記状況を考慮してなされたもので、以下に示す、抗hTROP-2抗体（抗hTROP-2モノクローナル抗体）、当該抗体を産生するハイブリドーマ、当該抗体の断片、当該抗体等と薬剤との複合体（イムノコンジュゲート）、腫瘍の診断用又は治療用医薬組成物、腫瘍の検出方法、腫瘍の検出用又は診断用キット等を提供するものである。
- 10 （１）H鎖V領域のアミノ酸配列が配列番号９２又は９８で示されるアミノ酸配列からなり、L鎖V領域のアミノ酸配列が配列番号９３で示されるアミノ酸配列からなるヒトTROP-2に対する抗体。

- 上記(1)の抗体は、そのH鎖V領域のCDR1～3のアミノ酸配列が、それぞれ順に、配列番号３６～３８で示されるアミノ酸配列であり、及び／又は、抗体
- 15 のL鎖V領域のCDR1～3のアミノ酸配列が、それぞれ順に、配列番号４１～４３で示されるアミノ酸配列である。

 （２）H鎖V領域のアミノ酸配列が配列番号９４又は９５で示されるアミノ酸配列からなり、L鎖V領域のアミノ酸配列が配列番号９６で示されるアミノ酸配列からなる、ヒトTROP-2に対する抗体。

- 20 上記(2)の抗体は、そのH鎖V領域のCDR1～3のアミノ酸配列が、それぞれ順に、配列番号６６～６８で示されるアミノ酸配列であり、及び／又は、抗体のL鎖V領域のCDR1～3のアミノ酸配列が、それぞれ順に、配列番号７１～７３で示されるアミノ酸配列である。

 上記(1)及び(2)の抗体は、例えば、ヒト型化抗体であるものが挙げられる。

- 25 上記(1)及び(2)の抗体は、例えば、*in vivo*で抗腫瘍活性を有するものが挙げられる。

 上記(1)及び(2)の抗体は、例えば、５～２０mg/kg体重の投与量で５０％以上の腫瘍成長阻害活性を示すものが挙げられる。ここで、当該腫瘍成長阻害活性を示すための投与回数は、例えば、多くても１週間に１回である。

上記(1)及び(2)の抗体は、例えば、10mg/kg体重の単回投与で50%以上の腫瘍成長阻害活性を示すものが挙げられる。

上記(1)及び(2)の抗体は、例えば、2種以上のヒト腫瘍細胞株に対して抗腫瘍活性を有するものが挙げられる。

- 5 上記(1)及び(2)の抗体は、例えば、解離定数 (Kd値) が 1.0×10^{-10} M以下であるものが挙げられる。

上記(1)及び(2)の抗体は、例えば、モノクローナル抗体であるものが挙げられる。

- 10 ここで、上記腫瘍としては、例えば、ヒト膵癌、ヒト前立腺癌、ヒト大腸癌、ヒト乳癌、ヒト卵巣癌、ヒト肺癌及びヒト胆管癌からなる群より選ばれる少なくとも1種が挙げられ、なかでもヒト膵癌、ヒト大腸癌、ヒト乳癌、ヒト肺癌及びヒト卵巣癌からなる群より選ばれる少なくとも1種が好ましく挙げられる。

また、上記腫瘍としては、例えば、再発癌又は転移癌が挙げられる。

- 15 また、上記腫瘍細胞株としては、例えば、ヒト膵癌細胞株PK-59、ヒト膵癌細胞株BxPC-3、ヒト膵癌細胞株KP-3L、ヒト膵癌細胞株KP-2、ヒト膵癌細胞株PK-1、ヒト膵癌細胞株PK-45H、ヒト膵癌細胞株PK-45P、ヒト膵癌細胞株TCC-PAN2、ヒト膵癌細胞株SUIT-2、ヒト大腸癌細胞株CACO-2、ヒト大腸癌細胞株SW480、ヒト大腸癌細胞株DLD-1、ヒト大腸癌細胞株HCT 116、ヒト乳癌細胞株JIMT-1、ヒト乳癌細胞株HCC1143、ヒト乳癌細胞株MCF-7、ヒト乳癌細胞株MBA-MD-468、ヒト前立腺癌細胞株DU145及びヒト前立腺癌細胞株PC-3、ヒト肺癌細胞株Calu-3、ヒト卵巣癌細胞株SK-OV-3、及びヒト胆管癌細胞株TFK-1からなる群より選ばれる少なくとも2種が挙げられ、なかでも、ヒト膵癌細胞株PK-59、ヒト膵癌細胞株BxPC-3、ヒト大腸癌細胞株SW480、ヒト肺癌細胞株Calu-3、ヒト乳癌細胞株MBA-MD-468及びヒト卵巣癌細胞株SK-OV-3
20 からなる群より選ばれる少なくとも2種が好ましく挙げられる。

(3) 上記(1)及び(2)の抗体に由来する抗体断片。

上記(3)の抗体断片は、例えば、配列番号92または98で示されるアミノ酸配列、及び／又は、配列番号93で示されるアミノ酸配列を含むものや、あるいは、配列番号94又は95で示されるアミノ酸配列、及び／又は、配列番号96

で示されるアミノ酸配列を含むものが挙げられる。

(4) 上記(1)及び(2)の抗体と、抗腫瘍活性及び／又は殺細胞活性を有する物質とを含む、抗体－薬剤複合体。

(5) 上記(3)の抗体断片と、抗腫瘍活性及び／又は殺細胞活性を有する物質とを含む、抗体断片－薬剤複合体。

上記(4)及び(5)の複合体において、腫瘍としては、例えば、ヒト膀胱癌、ヒト前立腺癌、ヒト大腸癌、ヒト乳癌、ヒト卵巣癌、ヒト肺癌及びヒト胆管癌からなる群より選ばれる少なくとも1種が挙げられ、なかでもヒト膀胱癌、ヒト大腸癌、ヒト乳癌、ヒト肺癌及びヒト卵巣癌からなる群より選ばれる少なくとも1種が好ましく挙げられる。また、腫瘍としては、例えば、再発癌又は転移癌も挙げられる。

(6) 上記(1)及び(2)の抗体、上記(3)の抗体断片、及び上記(4)及び(5)の複合体からなる群より選ばれる少なくとも1種を含む、医薬組成物。

上記(6)の医薬組成物は、例えば、腫瘍の治療に用いるものや、体重減少の副作用を有しないものや、腫瘍の診断に用いるものが挙げられる。ここで、腫瘍としては、例えば、ヒト膀胱癌、ヒト前立腺癌、ヒト大腸癌、ヒト乳癌、ヒト卵巣癌、ヒト肺癌及びヒト胆管癌からなる群より選ばれる少なくとも1種が挙げられ、なかでもヒト膀胱癌、ヒト大腸癌、ヒト乳癌、ヒト肺癌及びヒト卵巣癌からなる群より選ばれる少なくとも1種が好ましく挙げられる。また、腫瘍としては、例えば、再発癌又は転移癌も挙げられる。

(7) 上記(1)及び(2)の抗体、上記(3)の抗体断片、及び上記(4)及び(5)の複合体からなる群より選ばれる少なくとも1種を含む、腫瘍治療剤。

上記(7)の腫瘍治療剤は、例えば、体重減少の副作用を有しないものが挙げられる。ここで、腫瘍としては、例えば、ヒト膀胱癌、ヒト前立腺癌、ヒト大腸癌、ヒト乳癌、ヒト卵巣癌、ヒト肺癌及びヒト胆管癌からなる群より選ばれる少なくとも1種が挙げられ、なかでもヒト膀胱癌、ヒト大腸癌、ヒト乳癌、ヒト肺癌及びヒト卵巣癌からなる群より選ばれる少なくとも1種が好ましく挙げられる。

(8) 上記(1)及び(2)の抗体、上記(3)の抗体断片、及び上記(4)及び(5)の複合体からなる群より選ばれる少なくとも1種を含む、腫瘍診断剤。

上記(8)の腫瘍診断剤において、腫瘍としては、例えば、ヒト膀胱癌、ヒト前立

腺癌、ヒト大腸癌、ヒト乳癌、ヒト卵巣癌、ヒト肺癌及びヒト胆管癌からなる群より選ばれる少なくとも1種が挙げられ、なかでもヒト膵癌、ヒト大腸癌、ヒト乳癌、ヒト肺癌及びヒト卵巣癌からなる群より選ばれる少なくとも1種が好ましく挙げられる。

- 5 (9) 上記(1)及び(2)の抗体、上記(3)の抗体断片、及び上記(4)及び(5)の複合体からなる群より選ばれる少なくとも1種と、生体から採取された試料とを反応させ、反応した抗体及び／又は抗体断片のシグナルを検出することを特徴とする、腫瘍の検出方法。

10 上記(9)の腫瘍の検出方法において、腫瘍としては、例えば、ヒト膵癌、ヒト前立腺癌、ヒト大腸癌、ヒト乳癌、ヒト卵巣癌、ヒト肺癌及びヒト胆管癌からなる群より選ばれる少なくとも1種が挙げられ、なかでもヒト膵癌、ヒト大腸癌、ヒト乳癌、ヒト肺癌及びヒト卵巣癌からなる群より選ばれる少なくとも1種が好ましく挙げられる。

- 15 (10) 上記(1)及び(2)の抗体、上記(3)の抗体断片、及び上記(4)及び(5)の複合体からなる群より選ばれる少なくとも1種を含む、腫瘍の治療用、診断用又は検出用キット。

20 上記(10)の腫瘍の治療用、診断用又は検出用キットにおいて、腫瘍としては、例えば、ヒト膵癌、ヒト前立腺癌、ヒト大腸癌、ヒト乳癌、ヒト卵巣癌、ヒト肺癌及びヒト胆管癌からなる群より選ばれる少なくとも1種が挙げられ、なかでもヒト膵癌、ヒト大腸癌、ヒト乳癌、ヒト肺癌及びヒト卵巣癌からなる群より選ばれる少なくとも1種が好ましく挙げられる。

(11) 上記(1)及び(2)の抗体をコードするポリヌクレオチド。

(12) 上記(3)の抗体断片をコードするポリヌクレオチド。

(13) 上記(11)又は(12)のポリヌクレオチドを含む組換えベクター。

- 25 (14) 上記(13)の組換えベクターを含む形質転換体。

図面の簡単な説明

図1は、抗hTROP-2モノクローナル抗体(K5-70)の、抗原親和性(K_d: 解離定数)測定を示す図である。 Abt: Antibody (total), Agf: Antigen (free)

図2は、抗 hTROP-2 モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ培養上清の、HuH-7 細胞 (hTROP-2 陰性) と HuH-7-hTROP-2 細胞との反応性を示す図である。黒塗りのヒストグラムは HuH-7 細胞を示し、黒のラインのヒストグラムは HuH-7-hTROP-2 細胞を示す。

- 5 図3は、抗 hTROP-2 モノクローナル抗体の、内在的に hTROP-2 を細胞表面に発現している、ヒト膵臓癌細胞株 (PK-59 細胞) との反応性を示す図である。黒塗りのヒストグラムは二次抗体 (PE 標識抗マウス IgG)のみ、黒ラインのヒストグラムは、各抗 hTROP-2 モノクローナル抗体と反応させたものを示す

- 10 図4は、抗 hTROP-2 モノクローナル抗体の、内在的に hTROP-2 を細胞表面に発現している、ヒト膵臓癌細胞株 (BxPC-3 細胞) との反応性を示す図である。黒塗りのヒストグラムは二次抗体 (PE 標識抗マウス IgG)のみ、黒ラインのヒストグラムは、各抗 hTROP-2 モノクローナル抗体と反応させたものを示す。

- 15 図5は、抗 hTROP-2 モノクローナル抗体 (K5-70)の、ヒト膵臓癌細胞株との反応性を示す図である。黒塗りのヒストグラムは二次抗体 (PE 標識抗マウス IgG)のみ、黒ラインのヒストグラムは、抗 hTROP-2 モノクローナル抗体と反応させたものを示す。

- 20 図6は、抗 hTROP-2 モノクローナル抗体 (K5-70)の、ヒト大腸癌細胞株 (Colo320, CACO2, SW480, DLD1, CW2, HCT 116), ヒト乳癌 (JIMT-1, HCC1143)および ヒト前立腺癌細胞株 (PC-3, DU145)との反応性を示す図である。黒塗りのヒストグラムは二次抗体 (PE 標識抗マウス IgG)のみ、黒ラインのヒストグラムは、抗 hTROP-2 モノクローナル抗体と反応させたものを示す。

- 25 図7は、抗 hTROP-2 モノクローナル抗体の、マウス TROP-2 との交差反応性を調べた図である。細胞は、CHO-K1 細胞に、マウス TROP-2 遺伝子を一過性発現させた細胞を用い、陽性対照抗体として、マウス TROP-2 と交差性を示す T2-102 抗体 (マウス IgG1)を用いた。黒塗りのヒストグラムは二次抗体 (PE 標識抗マウス IgG)のみ、黒ラインのヒストグラムは、各抗 hTROP-2 モノクローナル抗体と反応させたものを示す。

図8は、抗 hTROP-2 モノクローナル抗体の、ヒト EpCAM/TROP-1 との交差反応性を調べた図である。細胞は、CHO-K1 細胞にヒト EpCAM/TROP-1 遺伝

子を一過性発現させた細胞を用い、陽性対照抗体として、PE 標識抗ヒト EpCAM モノクローナル抗体（ベクトンディッキンソン）を用いた。黒塗りのヒストグラムは二次抗体（PE 標識抗マウス IgG）のみ、黒ラインのヒストグラムは、各抗 hTROP-2 モノクローナル抗体と反応させたものを示す。

5 図 9 は、抗 hTROP-2 抗体（T6-16, T5-86, K5-70, K5-107）のヒト膵臓癌細胞株（PK-59 細胞）の細胞増殖阻害活性を示す図である。mIgG はコントロール抗体（マウス IgG）、YY01:市販の抗 hTROP-2 抗体（Santa Cruz）を示す。白カラム：0 μ g/mL, 灰色カラム：0.1 μ g/mL, 黒カラム：1 μ g/mL。抗体添加をしていない（0 μ g/mL）時の値に対する ratio で表した。エラーバーは標準偏差を示す。

10 *P < 0.05, **P < 0.01 (by Student's t-test)

図 10 は、抗 hTROP-2 抗体（T6-16, K5-70）のヒト膵臓癌細胞株（PK-59 細胞）のスクラッチアッセイを示す図である。

A. PK-59 細胞のスクラッチ領域の写真の代表例を示す。Day 0: スクラッチ直後の代表例を示す。mIgG (Day 1): スクラッチ後、コントロール抗体（マウス IgG, 1 μ g/mL）を培地に添加し、1 日後（24 時間後）の写真。K5-70 (Day 1): スクラッチ後、K5-70 抗体（1 μ g/mL）を培地に添加し、1 日後（24 時間後）の写真。T6-16 (Day 1): スクラッチ後、T6-16 抗体（1 μ g/mL）を培地に添加し、1 日後（24 時間後）の写真。写真中に示した矢印は、スクラッチ領域の幅を示した。

20 B. 画像解析ソフト(Scion Image)でスクラッチ領域の面積を解析し、その値を基に、コントロール抗体(mIgG) 添加群の Day0 を基準値 1 として、各被検抗体における値を算出した。

*P < 0.05, **P < 0.01 (by Student's t-test)

25 図 11 は、ヒト膵臓癌細胞株、PK-59 細胞の幹細胞マーカーの発現を示す FACS の図である。A: PK-59 細胞における EpCAM の発現を示す FACS の図である。黒塗りのヒストグラムは二次抗体（PE 標識抗マウス IgG）のみ、黒ラインは、抗ヒト EpCAM 抗体（ベクトンディッキンソン）と反応させた場合のヒストグラムを示す。B, C: PK-59 細胞における P-glycoprotein/MCR1 (B), および ABCG2 (C)の発現を示す FACS の図である。青のヒストグラムは、二次抗体

のみ、赤のヒストグラムが抗ヒト P-glycoprotein/MDR1 抗体(BD フェーミンジェン) (B), 抗ヒト ABCG2 抗体 (BD フェーミンジェン) (C)と反応させた場合を示す。 D: PK-59 細胞を膵臓癌幹細胞マーカーである FITC 標識抗ヒト CD24 抗体 (BD フェーミンジェン) と PE 標識抗ヒト CD44 抗体 (BD フェーミンジェン) で二重染色した FACS の図である。 D の図中の数字は、それぞれの画分の細胞の存在比率を示す。

図 1 2 は、PK-59細胞を用いたxenograft treatmentモデルにおいて、新規な抗hTROP-2モノクローナル抗体クローンK5-70 (マウスIgG2a)の抗腫瘍活性を評価した図である。

10 A: コントロール群 (●: マウスIgG) とK5-70抗体(10mg/kg 体重)投与群(○)の腫瘍成長を経時的に表した (平均値±標準偏差)。矢印は、抗体投与期間を表す。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (by Student's t-test)

B: Aの試験において、21日目(Day21) (実験最終日) の時点での各マウスにおける腫瘍重量をプロットした図である。各プロット上に示す数値は、平均値±標準偏差。 ** $P < 0.01$ (by Student's t-test)

図 1 3 は、PK-59細胞を用いたxenograft treatmentモデルにおける、A. クローンK5-107, B. クローンT6-16, C. クローンK5-116-2-1の抗腫瘍活性を評価した図である。●はコントロール群 (マウスIgG)、○は抗hTROP-2抗体 (10mg/kg 体重)投与群を示す。グラフ中の矢印は抗体投与期間を表し、各プロット上に示す数値は、平均値±標準偏差。* $P < 0.05$ (by Student's t-test)

図 1 4 は、PK-59細胞を用いたxenograft preventionモデルにおける、クローンK5-70 (A)、クローンT6-16 (B) 及び、クローンK5-116-2-1 (C) の抗腫瘍活性を評価した図である。●はコントロール群 (マウスIgG)、○は抗hTROP-2抗体 (10mg/kg 体重)投与群を示す。グラフ中の矢印は抗体投与期間を表し、各プロット上に示す数値は、平均値±標準偏差。** $P < 0.01$ (by Student's t-test)

図 1 5 は、BxPC-3細胞を用いたxenograft prevention及びtreatmentモデルにおける、クローンK5-70の抗腫瘍活性を評価した図である。A: preventionモデルにおけるコントロール群 (●: マウスIgG) とK5-70抗体(10mg/kg 体重)投与群 (○) の腫瘍成長を経時的に表した (平均値±標準偏差)。矢印は、抗体投与

期間を表す。 ** $P < 0.01$ (by Student's t-test) B : treatmentモデルにおけるコントロール群 (● : マウスIgG) とK5-70抗体(10mg/kg 体重)投与群(○)の腫瘍成長を経時的に表した (平均値±標準偏差)。矢印は、抗体投与期間を表す。

* $P < 0.05$ (by Student's t-test)

5 図16は、PK-59細胞を用いた xenograft prevention モデルにおける、クローン K5-70 の用量依存的な抗腫瘍活性を示した図である。腫瘍体積は平均値±標準偏差で表した。

A : コントロール群 (● : マウス IgG) と各用量での K5-70 抗体投与群(□ : 1mg/kg 体重、△ : 5mg/kg 体重) の腫瘍成長を経時的に表す (平均値±標準偏差)。矢印は、抗体投与期間を表す。 * $P < 0.05$ (by Student's t-test) , ** $P < 0.01$ (by Student's t-test)

B : A の試験において、17日目(Day17) (実験最終日) の時点での各マウスにおける腫瘍重量をプロットした図である。各プロット上に示す数値は、平均値±標準偏差。 ** $P < 0.01$ (by Student's-t-test)

15 図17は、実験に使用したヒト/マウスキメラTROP-2タンパク質の模式図である。SP : シグナル配列、TY domain : サイログロブリンタイプ1領域、TM : 膜貫通領域、C : 細胞内領域 黒の塗りつぶしで表している領域はhTROP-2由来のポリペプチドである。白抜きで表している領域は、マウスTROP-2由来のポリペプチドである。キメラタンパク質の模式図の上段に示してある数字は、マウスTROP-2タンパク質の、下段はhTROP-2タンパク質のアミノ酸番号をそれぞれ示している。

図18は、ヒト/マウスキメラTROP-2を用いた抗hTROP-2モノクローナル抗体結合領域の同定の結果を示す図である。ヒト/マウスキメラTROP2-C (hmTROP2-C) 及びマウス/ヒトキメラTROP2-D (mhTROP2-D) タンパク質を恒常的に発現するHEK293細胞を用い、図中に示した抗hTROP-2モノクローナル抗体との反応性を検討した。陰性コントロールはmouse IgG2bを用いた。

図19は、抗hTROP-2モノクローナル抗体の抗体結合領域の同定の結果を示す図である。

hTROP-2遺伝子及び各ヒト/マウスキメラTROP-2遺伝子をHEK293細胞に導

入し、一過性に発現させた細胞を用いてFACS解析を行った。(A) K5-70、K5-107、T5-86およびK5-116-2-1抗体について、hTROP-2（上段）、hmTROP-2-A（中段）及びhmTROP-2-B（下段）との反応性を検討した。mouse IgG2bは陰性コントロールとして用いた。(B) T6-4およびT6-16抗体について、hTROP-2（上段）、mhTROP-2-E（中段）及びmhTROP-2-F（下段）との反応性を検討した。mouse IgG2bは陰性コントロールとして用いた。

図20は、ヒト正常組織におけるhTROP-2の発現を示す図である。抗hTROP-2モノクローナル抗体 クローンK5-63-17を用いてヒト正常組織アレイの免疫染色を行った。(A) 皮膚、(B) 食道、(C) 腎臓（皮質）、(D) 腎臓（髄質）、(E) 膵臓、(F) 前立腺、(G) 膀胱、(H) 扁桃腺、(I) 心臓、(J) 肝臓（倍率：×200）

図21は、癌組織でのhTROP-2の発現を示す図である。抗hTROP-2モノクローナル抗体 クローンK5-63-17を用いてヒト癌組織アレイの免疫染色を行った。(A) 乳癌、(B) 肺癌、(C) 食道癌、(D) 胃癌、(E) 膵臓癌、(F) 大腸癌、(G) 膀胱癌、(H) 前立腺癌、(I) 卵巣癌（倍率：×100）

図22は、PK-59細胞を用いたxenograft preventionモデルにおける、クローンK5-70の単回投与による抗腫瘍活性を示した図である。

A. コントロール群（●：マウスIgG）とK5-70抗体(10mg/kg 体重)投与群（○）の腫瘍形成を経時的に表す（平均値±標準偏差）。矢印は、抗体投与を表す。
* $P < 0.05$ (by Student's t-test), ** $P < 0.01$ (by Student's t-test).

B. Aの試験において、28日目(Day 28)（実験最終日）の時点での各マウスにおける腫瘍重量をプロットした図である。** $P < 0.01$ (by Student's t-test).

C. コントロール群（●：マウスIgG）とK5-70抗体(10mg/kg 体重)投与群（○）の、各個体の腫瘍形成を経時的に表す。矢印は抗体投与を示す。

図23は、ヒト大腸癌細胞SW480細胞を用いたxenograft treatmentモデルにおける、クローンK5-70の抗腫瘍活性を示す図である。

A: コントロール群（●：マウスIgG）とK5-70抗体(10mg/kg 体重)投与群（○）の腫瘍形成を経時的に表した（平均値±標準偏差）。矢印は、抗体投与期間を表す。** $P < 0.01$ (by Student's t-test)

B: Aの試験において、44日目(Day 44) (実験最終日) の時点での各マウスにおける腫瘍重量をプロットした図である。 ** $P < 0.01$ (by Student' s t-test)

図24は、SW480細胞を用いたxenograft treatmentモデルにおける、クローンK5-116-2-1の抗腫瘍活性を示す図である。

- 5 A: コントロール群 (●: マウスIgG) とK5-116-2-1抗体(10mg/kg 体重)投与群 (○) の腫瘍形成を経時的に表した (平均値±標準偏差)。矢印は、抗体投与期間を表す。 ** $P < 0.01$ (by Student' s t-test)

B: Aの試験において、42日目(Day 42) (実験最終日) の時点での各マウスにおける腫瘍重量をプロットした図である。 ** $P < 0.01$ (by Student' s t-test)

- 10 図25は、SW480細胞を用いたxenograft treatmentモデルにおける、クローンT6-16の抗腫瘍活性を示す図である。

A: コントロール群 (●: マウスIgG) とT6-16抗体(10mg/kg 体重)投与群 (○) の腫瘍形成を経時的に表した (平均値±標準偏差)。矢印は、抗体投与期間を表す。 * $P < 0.05$ (by Student' s t-test)

- 15 B: Aの試験において、42日目(Day 42) (実験最終日) の時点での各マウスにおける腫瘍重量をプロットした図である。 * $P < 0.05$ (by Student' s t-test)

図26は、SW480細胞を用いたxenograft treatmentモデルにおける、クローンK5-70の用量依存的な抗腫瘍活性を示す図である。

- 20 A: コントロール群 (●: マウスIgG) とK5-70抗体投与群 (○: 1mg/kg 体重, △: 5mg/kg 体重, □: 10mg/kg 体重) の腫瘍形成を経時的に表した (平均値±標準偏差)。矢印は、抗体投与期間を表す。 * $P < 0.05$ (by Student' s t-test)

B: Aの試験において、42日目(Day 42) (実験最終日) の時点での各マウスにおける腫瘍重量をプロットした図である。 * $P < 0.05$ (by Student' s t-test)

- 25 図27は、SW480細胞を用いたxenograft treatmentモデルにおける、クローンK5-70の抗腫瘍活性を示す図である。

A: 1週間に1回の投与間隔でのK5-70抗体の抗腫瘍活性を示す図である。コントロール群 (●: マウス IgG) とK5-70抗体(10mg/kg)投与群 (○)の腫瘍形成を経時的に表した (平均値±標準偏差)。矢頭 (Day 10, 17, 24, 31, 38)は、K5-

70抗体の投与を示す。 $*P < 0.05$ by Student' s t-test.

B: 10日に1回 (q10d)、または2週間に1回 (q14d)の投与間隔でのK5-70抗体の抗腫瘍活性を示す図である。コントロール群 (●: マウス IgG、10mg/kg) と K5-70抗体投与群 (○: q10d、10 mg/kg, △: q14d、10 mg/kg) の腫瘍形成を
5 経時的に表した (平均値±標準偏差)。黒塗りの矢頭 (▼; Day 9, 19, 29)と白塗りの矢頭 (▽; Day 9, 23, 37)は、K5-70抗体の投与を示す。 $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ by Student' s t-test.

図 2 8 は、SW480細胞を用いたxenograft treatmentモデルにおける、クローンT6-16の用量依存的な抗腫瘍活性を示す図である。

10 A: コントロール群 (●: マウス IgG) とT6-16抗体投与群 (○: 1mg/kg 体重, △: 5mg/kg 体重, □: 10mg/kg 体重) の腫瘍形成を経時的に表した (平均値±標準偏差)。矢印は、抗体投与期間を表す。 $**P < 0.01$ (by Student' s t-test)

B: Aの試験において、43日目(Day 43) (実験最終日) の時点での各マウスに
15 おける腫瘍重量をプロットした図である。 $**P < 0.01$ (by Student' s t-test)

図 2 9 は、SW480細胞を用いたxenograft treatmentモデルにおける、クローンT6-16の抗腫瘍活性を示す図である。コントロール群 (●: マウス IgG 10 mg/kg 体重)、T6-16抗体(10 mg/kg 体重) 投与群 (○: q7d,△: q10d)の腫瘍形成を経時的に表した (平均値±標準偏差)。矢頭 (Day 10, 17, 24, 31, 38)、
20 及び矢印 (Day 10, 20, 30, 40)は、T6-16抗体の投与を示す。コントロール群は3日に1回投与を行った。 $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ by Student' s t-test.

図 3 0 は、ヒト前立腺癌細胞DU-145細胞を用いたxenograft preventionモデルにおける、クローンK5-70の抗腫瘍活性を示す図である。

A: コントロール群 (●: マウス IgG) とK5-70抗体(10mg/kg 体重)投与群
25 (○) の腫瘍形成を経時的に表した (平均値±標準偏差)。矢印は、抗体投与期間を表す。 $*P < 0.05$ (by Student' s t-test)

B: Aの試験において、40日目(Day 40) (実験最終日) の時点での各マウスにおける腫瘍重量をプロットした図である。 $*P < 0.05$ (by Student' s t-test)

図 3 1 は、PK-59細胞の肝転移モデルを用いたクローンK5-70の転移抑制活性

を示す図である。

A: コントロール群 (●: マウス IgG) と B: K5-70 抗体(10mg/kg 体重)投与群の細胞移植6週間後の摘出肝臓像を示す。矢印は、肝転移巣を示す。

図 3 2 は、SW480細胞を用いたxenograftモデルにおける塩酸イリノテカン投与後の癌再発モデルにおけるK5-70の抗腫瘍活性を示す図である。無処置群 (◆)、と塩酸イリノテカン(40mg/kg 体重) 投与後K5-70抗体 (○: 10 mg/kg 体重)、あるいはマウスIgG投与群 (●: 10 mg/kg 体重)の腫瘍形成を経時的に表した図である (平均値±標準偏差)。矢頭 (Day 11, 14, 17)は、塩酸イリノテカンの投与を示す。K5-70抗体あるいはマウスIgGはDay 20より3日に1回投与を行った。矢印は抗体投与期間を示す。*P < 0.05, **P < 0.01 by Student' s t-test.

図 3 3 は、クローンK5-70 H鎖可変領域 (VH) のcDNA塩基配列 (配列番号 3 4) と推定アミノ酸配列 (配列番号 3 5) を示す図である。シグナルペプチドはイタリックで表している。二重下線を引いたグルタミン (Q) は、成熟ペプチドの N 末端 アミノ酸残基を示す。CDR 配列 (下線; *IYWIN, NIYPSDSYTNYNQKFKD, TSMADY*) は、Kabatら(Sequences of Proteins of Immunological Interests, Fifth edition, NIH Publication No. 91-3242, U.S. Department of Health and Human Services, 1991) の定義に従って決定した。クローンK5-70 VHのCDR1~3のアミノ酸配列は、それぞれ順に、配列番号 3 6 ~ 3 8 に示す。

図 3 4 は、クローンK5-70 L鎖可変領域 (VL) のcDNA塩基配列 (配列番号 3 9) と推定アミノ酸配列 (配列番号 4 0) を示す図である。シグナルペプチドはイタリックで表している。二重下線を引いたアスパラギン酸 (D) は、成熟ペプチドのN末端アミノ酸残基を示す。CDR配列 (下線; *RASQSIGTSH, YASESIS, QQSNSWPFT*) は、Kabatら(前掲; U.S. Department of Health and Human Services, 1991) の定義に従って決定した。クローンK5-70 VLのCDR1~3のアミノ酸配列は、それぞれ順に、配列番号 4 1 ~ 4 3 に示す。

図 3 5 は、クローンK5-107 H鎖可変領域 (VH) のcDNA塩基配列 (配列番号 4 4) と推定アミノ酸配列 (配列番号 4 5) を示す図である。シグナルペプチドはイタリックで表している。二重下線を引いたグルタミン (Q) は、成熟ペプチ

5 ドのN末端アミノ酸残基を示す。CDR配列（下線；*SYWMH*,
NIYPGGGYTNYDEKFKS, *SSVFDY*）は、Kabatら(前掲；U.S. Department of
Health and Human Services, 1991) の定義に従って決定した。クローンK5-
107 VHのCDR1～3のアミノ酸配列は、それぞれ順に、配列番号46～48に示
す。

10 図36は、クローンK5-107 L鎖可変領域（VL）のcDNA塩基配列（配列番号
49）と推定アミノ酸配列（配列番号50）を示す図である。シグナルペプチド
はイタリックで表している。二重下線を引いたアスパラギン酸（D）は、成熟ペ
プチドのN末端アミノ酸残基を示す。CDR配列（下線；*RASQNIGTSIH*,
10 *YASESIS*, *QQSNSWPFT*）は、Kabatら(前掲；U.S. Department of Health
and Human Services, 1991) の定義に従って決定した。クローンK5-107 VLの
CDR1～3のアミノ酸配列は、それぞれ順に、配列番号510～53に示す。

15 図37は、クローンK5-116-2-1 H鎖可変領域（VH）のcDNA塩基配列（配列
番号54）と推定アミノ酸配列（配列番号55）を示す図である。シグナルペプ
チドはイタリックで表している。二重下線を引いたグルタミン（Q）は、成熟ペ
プチドのN末端アミノ酸残基を示す。CDR配列（下線；*SYWIT*,
15 *NIYPSDSYTNYNQKFRD*, *LFDY*）は、Kabatら(前掲；U.S. Department of
Health and Human Services, 1991) の定義に従って決定した。クローンK5-
116-2-1 VHのCDR1～3のアミノ酸配列は、それぞれ順に、配列番号56～58
20 に示す。

25 図38は、クローンK5-116-2-1 L鎖可変領域（VL）のcDNA塩基配列（配列
番号59）と推定アミノ酸配列（配列番号60）を示す図である。シグナルペプ
チドはイタリックで表している。二重下線を引いたアスパラギン酸（D）は、成
熟ペプチドのN末端アミノ酸残基を示す。CDR配列（下線；*RASQSIGTSIH*,
25 *YASESIS*, *QQSNSWPFT*）は、Kabatら(前掲；U.S. Department of Health
and Human Services, 1991) の定義に従って決定した。クローンK5-116-2-1
VLのCDR1～3のアミノ酸配列は、それぞれ順に、配列番号61～63に示す。

 図39は、クローンT6-16 H鎖可変領域（VH）のcDNA塩基配列（配列番号
64）と推定アミノ酸配列（配列番号65）を示す図である。シグナルペプチド

はイタリックで表している。二重下線を引いたグルタミン酸 (E) は、成熟ペプチドの N 末端 アミノ酸残基を示す。CDR 配列 (下線; *DYNMH, YIYPYNGGTGYNQRFKS, EDYGSSPSYAMDY*) は、Kabatら(前掲; U.S. Department of Health and Human Services, 1991) の定義に従って決定した。

- 5 クローン T6-16 VH の CDR1~3 のアミノ酸配列は、それぞれ順に、配列番号 66 ~ 68 に示す。

図 40 は、クローン T6-16 L 鎖可変領域 (VL) の cDNA 塩基配列 (配列番号 69) と推定アミノ酸配列 (配列番号 70) を示す図である。シグナルペプチドはイタリックで表している。二重下線を引いたアスパラギン酸 (D) は、成熟ペプチドの N 末端アミノ酸残基を示す。CDR 配列 (下線; *RSSQSLVHGNGNTYLH, KVSNRFS, SQTTHVPT*) は、Kabatら(前掲; U.S. Department of Health and Human Services, 1991) の定義に従って決定した。クローン T6-16 VL の CDR1 ~ 3 のアミノ酸配列は、それぞれ順に、配列番号 71 ~ 73 に示す。

図 41 は、クローン K5-70 の H 鎖可変領域 (K5-70 VH) のアミノ酸配列 (配列番号 35)、ヒト型化 K5-70 の H 鎖可変領域 (HuK5-70 VH) のアミノ酸配列 (配列番号 75)、及びヒト型化抗体作製に用いたアクセプター (Genbank accession No. DA980102; 配列番号 84) の H 鎖可変領域 (DA980102 VH) のアミノ酸配列 (配列番号 85) についての、アライメントを示す図である (なお、図中のいずれのアミノ酸配列も、各々の H 鎖可変領域のアミノ酸配列の一部 (具体的には、シグナルペプチド部分を除いた成熟タンパク質部分のアミノ酸配列) である。)

K5-70 VH 中にアンダーラインで示したアミノ酸配列は Kabatら(前掲; U.S. Department of Health and Human Services, 1991) により定義された CDR 配列を表している。また、アミノ酸配列上部に記された番号は上記 Kabatらの定義に従ったアミノ酸の位置番号を示している。DA980102 VH 中の各 CDR 配列は、図中では --- と表記し、記載を省略している。HuK5-70 VH 中のアンダーラインで示したアミノ酸は、CDR の構造維持に重要であると予想されるため、K5-70 VH の配列を維持した。また、HuK5-70 VH 中の二重下線で示したアミノ酸は、対応する DA980102 VH のアミノ酸 (メチオニン (M)) がこの位置では稀にし

か認められないものであり、抗原性を低下させる目的で同様のサブグループに属する典型的なアミノ酸であるロイシン（L）に置換した。

図42は、クローン K5-70 の L 鎖可変領域（K5-70 VL）のアミノ酸配列（配列番号40）、ヒト型化 K5-70 の L 鎖可変領域（HuK5-70 VL）のアミノ酸配列（配列番号77）、及びヒト型化抗体作製に用いたアクセプター（Genbank accession No. L41174；配列番号86）の L 鎖可変領域（L41174 VL）のアミノ酸配列（配列番号87；Genbank accession No. AAA64877）についての、アライメントを示す図である（なお、図中のいずれのアミノ酸配列も、各々の L 鎖可変領域のアミノ酸配列の一部（具体的には、シグナルペプチド部分を除いた成熟タンパク質部分のアミノ酸配列）である。）。

K5-70 VL中にアンダーラインで示したアミノ酸配列はKabatら(前掲；U.S. Department of Health and Human Services, 1991)により定義されたCDR配列を表している。また、アミノ酸配列上部に記された番号は上記Kabatらの定義に従ったアミノ酸の位置番号を示している。L41174 VL中の各CDR配列は、図中では――と表記し、記載を省略している。HuK5-70 VL中のアンダーラインで示したアミノ酸は、CDRの構造維持に重要であると予想されるため、K5-70 VLの配列を維持した。

図43は、クローン T6-16 の H 鎖可変領域（T6-16 VH）のアミノ酸配列（配列番号65）、2種類のヒト型化 T6-16 の H 鎖可変領域（HuT6-16 VH1、HuT6-16 VH2）のアミノ酸配列（それぞれ順に、配列番号79、配列番号81）、及びヒト型化抗体作製に用いたアクセプター（Genbank accession No. DA935238；配列番号88）の H 鎖可変領域（DA935238 VH）のアミノ酸配列（配列番号89）についての、アライメントを示す図である（なお、図中のいずれのアミノ酸配列も、各々の H 鎖可変領域のアミノ酸配列の一部（具体的には、シグナルペプチド部分を除いた成熟タンパク質部分のアミノ酸配列）である。）。

HuT6-16 VH中にアンダーラインで示したアミノ酸配列はKabatら(前掲；U.S. Department of Health and Human Services, 1991)により定義されたCDR配列を表している。また、アミノ酸配列上部に記された番号は上記Kabatらの定義に従ったアミノ酸の位置番号を示している。DA935238 VH中の各CDR配列は、図

中では――と表記し、記載を省略している。HuT6-16 VH1およびHuT6-16 VH2中のアンダーラインで示したアミノ酸は、CDRの構造維持に重要であると予想されるため、T6-16 VHの配列を維持した。また、HuT6-16 VH1中の73番目の位置にあるリジン（K）は、HuT6-16 VH2ではアクセプター配列である

5 DA935238 VHに由来するスレオニン（T）に置換した。

図4 4は、クローン T6-16 の L 鎖可変領域（T6-16 VL）のアミノ酸配列（配列番号 7 0）、ヒト型化 T6-16 の L 鎖可変領域（HuT6-16 VL）のアミノ酸配列（配列番号 8 3）、及びヒト型化抗体作製に用いたアクセプター（Genbank accession No. M99608；配列番号 9 0）の L 鎖可変領域（M99608 VL）のアミノ酸配列（配列番号 9 1；Genbank accession No. AAA60341）についての、アライメントを示す図である（なお、図中のいずれのアミノ酸配列も、各々の L 鎖可変領域のアミノ酸配列の一部（具体的には、シグナルペプチド部分を除いた成熟タンパク質部分のアミノ酸配列）である。）。10

T6-16 VL中にアンダーラインで示したアミノ酸配列はKabatら(前掲；U.S. Department of Health and Human Services, 1991)により定義されたCDR配列を表している。また、アミノ酸配列上部に記された番号は上記Kabatらの定義に従ったアミノ酸の位置番号を示している。M99608 VL中の各CDR配列は、図中では――と表記し、記載を省略している。15

図4 5は、HuK5-70 VH の遺伝子配列（配列番号 7 4）及びアミノ酸配列（配列番号 7 5）を示す図である。20

各行の上段は遺伝子配列（cDNA配列）、下段はアミノ酸配列を示す。当該アミノ酸配列中、シグナルペプチド部分には破線の下線を、各CDR配列（CDR1～3）には実線の下線を引いている（当該シグナルペプチド部分を除いた成熟タンパク質部分のみのアミノ酸配列は、配列番号 9 2 に示す）。なお、HuK5-70 VH遺伝子の5'末端にはEcoRI部位（GAA TTC）およびKozak配列（ACC ACC）、3'末端にはNhe I部位（GCT AGC）を付加した。25

図4 6は、HuK5-70 VL の遺伝子配列（配列番号 7 6）及びアミノ酸配列（配列番号 7 7）を示す図である。

各行の上段は遺伝子配列（cDNA配列）、下段はアミノ酸配列を示す。当該ア

ミノ酸配列中、シグナルペプチド部分には破線の下線を、各CDR配列（CDR1～3）には実線の下線を引いている（当該シグナルペプチド部分を除いた成熟タンパク質部分のみのアミノ酸配列は、配列番号 9 3 に示す）。なお、HuK5-70 VL 遺伝子の5'末端にはAge I部位（ACC GGT）およびKozak配列（ACC ACC）、

5 3'末端にはBsiWI 部位（CGT ACG）を付加した。

図 4 7 は、HuT6-16 VH1 の遺伝子配列（配列番号 7 8）及びアミノ酸配列（配列番号 7 9）を示す図である。

各行の上段は遺伝子配列（cDNA配列）、下段はアミノ酸配列を示す。当該アミノ酸配列中、シグナルペプチド部分には破線の下線を、各CDR配列（CDR1～3）には実線の下線を引いている（当該シグナルペプチド部分を除いた成熟タンパク質部分のみのアミノ酸配列は、配列番号 9 4 に示す）。なお、HuT6-16 VH1遺伝子の5'末端にはEcoRI部位（GAA TTC）およびKozak配列（ACC ACC）、3'末端にはNhe I部位（GCT AGC）を付加した。

図 4 8 は、HuT6-16 VH2 の遺伝子配列（配列番号 8 0）及びアミノ酸配列（配列番号 8 1）を示す図である。

各行の上段は遺伝子配列（cDNA配列）、下段はアミノ酸配列を示す。当該アミノ酸配列中、シグナルペプチド部分には破線の下線を、各CDR配列（CDR1～3）には実線の下線を引いている（当該シグナルペプチド部分を除いた成熟タンパク質部分のみのアミノ酸配列は、配列番号 9 5 に示す）。なお、HuT6-16 VH2遺伝子の5'末端にはEcoRI部位（GAA TTC）およびKozak配列（ACC ACC）、3'末端にはNhe I部位（GCT AGC）を付加した。

図 4 9 は、HuT6-16 VL の遺伝子配列（配列番号 8 2）及びアミノ酸配列（配列番号 8 3）を示す図である。

各行の上段は遺伝子配列（cDNA配列）、下段はアミノ酸配列を示す。当該アミノ酸配列中、シグナルペプチド部分には破線の下線を、各CDR配列（CDR1～3）には実線の下線を引いている（当該シグナルペプチド部分を除いた成熟タンパク質部分のみのアミノ酸配列は、配列番号 9 6 に示す）。なお、HuT6-16 VL 遺伝子の5'末端にはAge I部位（ACC GGT）およびKozak配列（ACC ACC）、3'末端にはBsiWI 部位（CGT ACG）を付加した。

図50は、HuK5-70 抗体、HuT6-16-1 抗体および HuT6-16-2 抗体の発現を確認した結果を示す図である。

(A) 293F 細胞に発現ベクターpFUSE-CHlg-HuK5-70 および pFUSE2-CLlg-HuK5-70 を導入し、培養上清中の HuK5-70 抗体の発現をウエスタンブロット
5 により検討した。レーン 1 は遺伝子導入を行っていない 293F 細胞の培養上清（ネガティブコントロール）、レーン 2 は上記発現ベクターを導入した 293F 細胞の培養上清。HuK5-70 抗体の重鎖および軽鎖タンパク質はビオチン標識した抗ヒト IgG F(ab')₂ 抗体で検出した。

(B) 293F 細胞に発現ベクターpFUSE-CHlg-HuT6-16-1 および pFUSE2-
10 CLlg-HuT6-16 (レーン 3)、pFUSE-CHlg-HuT6-16-2 および pFUSE2-CLlg-HuT6-16 (レーン 4) の組み合わせでそれぞれ導入し、HuT6-16-1 抗体および HuT6-16-2 抗体の発現をウエスタンブロットにより検討した。HuT6-16-1 抗体および HuT6-16-2 抗体の重鎖タンパク質はビオチン標識した抗ヒト IgG Fc 抗体で、HuT6-16-1 抗体および HuT6-16-2 抗体の軽鎖タンパク質はビオチン標識
15 した抗ヒト IgG F(ab')₂ 抗体でそれぞれ検出した。

図51は、精製した HuK5-70 抗体、HuT6-16-1 抗体および HuT6-16-2 抗体のクマシー染色の結果を示す図である。

精製した HuK5-70 抗体 (レーン 1)、HuT6-16-1 抗体 (レーン 2) および HuT6-16-2 抗体 (レーン 3) それぞれ 1 μg を SDS-PAGE により展開し、クマ
20 シー染色を行った。

図52は、フローサイトメーターを用いた HuK5-70 抗体、HuT6-16-1 抗体および HuT6-16-2 抗体の抗原結合能の解析結果を示す図である。

図に示した各抗体を用いてHEK293-hTROP-2細胞 (A) およびPK-59細胞 (B) に対する反応性をFACS解析により検討した。ネガティブコントロールは二次
25 抗体のみとし（黒塗り）、各抗体の反応性をグレーラインで示した。

図53は、ELISA 法を用いた HuK5-70 抗体の抗原結合能の測定結果を示す図である。

抗原固相化ELISA法によりK5-70抗体およびHuK5-70抗体の抗原結合能について検討した。▲はK5-70抗体、●はHuK5-70抗体の測定結果を表す。

図5 4は、ELISA法を用いたHuT6-16-1抗体およびHuT6-16-2抗体の抗原結合能の測定結果を示す図である。

抗原固相化ELISA法によりT6-16抗体、HuT6-16-1抗体およびHuT6-16-2抗体の抗原結合能について検討した。▲はT6-16抗体、●はHuT6-16-1抗体、■は

5 HuT6-16-2抗体の測定結果を表す。

図5 5は、ヒト大腸癌細胞SW480細胞を用いたxenograft treatmentモデルにおける、ヒト型化抗hTROP-2抗体（HuK5-70抗体）の抗腫瘍活性を示す図である。

A：コントロール群（●：PBS）とHuK5-70抗体(10mg/kg 体重)投与群（
10 ○）の腫瘍形成を経時的に表した（平均値±標準偏差）。矢印は、抗体投与期間を表す。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (by Student's t-test)

B：Aの試験において、39日目(Day 39)（実験最終日）の時点での各マウスにおける腫瘍重量をプロットした図である。* $P < 0.05$ (by Student's t-test)

図5 6は、ヒト大腸癌細胞SW480細胞を用いたxenograft treatmentモデルに
15 おける、ヒト型化抗hTROP-2抗体（HuK5-70）の用量依存的な抗腫瘍活性を示す図である。

A：コントロール群（●：PBS）とHuK5-70抗体投与群（○；1mg/kg 体重,
△；5mg/kg 体重, □；10mg/kg 体重）の腫瘍形成を経時的に表した（平均値
±標準偏差）。矢印は、抗体投与期間を表す。 ** $P < 0.01$ (by Student's t-
20 test)

B：Aの試験において、癌細胞移植から48日目(Day 48)（実験最終日）の時点での各マウスにおける腫瘍重量をプロットした図である。* * $P < 0.01$ (by Student's t-test)

図5 7は、ヒト大腸癌細胞SW480細胞を用いたxxenograft treatmentモデル
25 における、ヒト型化抗hTROP-2抗体（HuT6-16-2）の用量依存的な抗腫瘍活性を示す図である。

A：コントロール群（●：PBS）とHuT6-16-2抗体投与群（○；1mg/kg 体重,
△；5mg/kg 体重, □；10mg/kg 体重）の腫瘍形成を経時的に表した（平均
値±標準偏差）。矢印は、抗体投与期間を表す。 ** $P < 0.01$ (by Student's t-

test)

B: Aの試験において、癌細胞移植から48日目(Day 48) (実験最終日) の時点での各マウスにおける腫瘍重量をプロットした図である。* $P < 0.05$ (by Student's t-test)

5 図58は、ヒト卵巣癌細胞SK-OV-3細胞を用いたxenograft treatmentモデルにおける、マウス抗hTROP-2抗体 (K5-70およびT6-16) の抗腫瘍活性を示す図である。

A: コントロール群 (●: PBS)、K5-70抗体 (10mg/kg 体重)投与群 (○)、およびT6-16抗体 (10mg/kg 体重)投与群 (△) の腫瘍形成を経時的に表した (平均値±標準偏差)。矢印は、抗体投与期間を表す。 ** $P < 0.01$ (by Student's t-test)

B: Aの試験において、癌細胞移植から56日目(Day 56) (実験最終日) の時点での各マウスにおける腫瘍重量をプロットした図である。* $P < 0.05$ (by Student's t-test)

15 図59は、ヒト乳癌細胞MDA-MB-468細胞を用いたxxenograft treatmentモデルにおける、マウス抗hTROP-2抗体 (K5-70およびT6-16) の抗腫瘍活性を示す図である。

A: コントロール群 (●: PBS)、K5-70抗体 (10mg/kg 体重)投与群 (○)、およびT6-16抗体 (10mg/kg 体重)投与群 (△) の腫瘍形成を経時的に表した (平均値±標準偏差)。矢印は、抗体投与期間を表す。 ** $P < 0.01$ (by Student's t-test)

B: Aの試験において、癌細胞移植から54日目(Day 54) (実験最終日) の時点での各マウスにおける腫瘍重量をプロットした図である。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (by Student's t-test)

25 図60は、ヒト肺癌細胞Calu-3細胞を用いたxenograft treatmentモデルにおける、マウス抗hTROP-2抗体 (K5-70およびT6-16) の抗腫瘍活性を示す図である。

A: コントロール群 (●: PBS)、K5-70抗体 (10mg/kg 体重)投与群 (○)、およびT6-16抗体 (10mg/kg 体重)投与群 (△) の腫瘍形成を経時的に表し

た（平均値±標準偏差）。矢印は、抗体投与期間を表す。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (by Student's t-test)

B：Aの試験において、癌細胞移植から41日目(Day 41)（実験最終日）の時点での各マウスにおける腫瘍重量をプロットした図である。* $P < 0.05$, ** $P <$

5 0.01 (by Student's t-test)

図6 1は、ヒト胆管癌細胞TFK-1細胞を用いたxenograft preventionモデルにおける、マウス抗hTROP-2抗体K5-70の抗腫瘍活性を示す図である。

A：コントロール群（●：PBS）、およびK5-70抗体（10mg/kg 体重）投与群（○）の腫瘍形成を経時的に表した（平均値±標準偏差）。矢印は、抗体投与期間を表す。** $P < 0.01$ (by Student's t-test)

B：Aの試験において、癌細胞移植から31日目(Day 31)（実験最終日）の時点での各マウスにおける腫瘍重量をプロットした図である。** $P < 0.01$ (by Student's t-test)

図6 2は、HuK5-70およびHuT6-16-2抗体の結合活性を、低濃度抗原固相化ELISAを用いて検討した結果である。96穴プレートに0.1 $\mu\text{g/mL}$ のリコンビナントhTACSTD2-Fc-Hisタンパク質でコーティングし、20 $\mu\text{g/mL}$ から2倍ずつの希釈系列を調製した被検抗体（K5-70、HuK5-70、T6-16およびHuT6-16-2抗体）を反応させた。(A)はK5-70(▲)およびHuK5-70(●)抗体を、(B)はT6-16(▲)およびHuT6-16-2抗体(●)をそれぞれ被検抗体として使用した。

図6 3は、hTROP-2のK5-70およびHuK5-70抗体に対する結合活性を示すELISAの結果である。96穴プレートにanti-mouse IgG (γ chain specific)およびanti-human IgG1 (Fc γ specific)を介してK5-70およびHuK5-70抗体を固相化し、5 $\mu\text{g/mL}$ から2倍希釈系列を調製したhTROP-2-EC-Hisタンパク質を反応させた。hTROP-2-EC-Hisタンパク質の結合は、抗Hisタグ抗体を用いて検出した。(▲)K5-70抗体、(●)HuK5-70抗体

図6 4は、遺伝子合成により作製したK5-70 VH遺伝子の塩基配列（上段；配列番号99）とK5-70 VHのアミノ酸配列（下段；配列番号35）を示す図である。当該塩基配列においては、5' 末端にEcoRI部位(GAA TTC)およびKozak配列(ACC ACC)を付加し、3' 末端にNheI部位(GCT AGC)を付加している。当

該アミノ酸配列は、一文字表記で示しており、N末端側のシグナルペプチドはイタリック体で表している。二重下線を引いたグルタミン (Q) は、成熟ペプチドのN末端アミノ酸残基を示す。CDR配列 (下線; *IYWIN, NIYPSDSYTNYNQKFKD, TSMADY*) は、Kabatら(Sequences of Proteins of Immunological Interests, Fifth edition, NIH Publication No. 91-3242, U.S. Department of Health and Human Services, 1991) の定義に従って決定した。クローンK5-70 VHのCDR1~3のアミノ酸配列は、それぞれ順に、配列番号36~38に示す。

図65は、遺伝子合成により作製したK5-70 VL遺伝子の塩基配列 (上段; 配列番号100) とK5-70 VLのアミノ酸配列 (下段; 配列番号40) を示す図である。当該塩基配列においては、5'末端にAgeI部位(ACC GGT)およびKozak配列(ACC ACC)を付加し、3'末端にBsiWI部位(CGT ACG)を付加している。当該アミノ酸配列は、一文字表記で示しており、N末端のシグナルペプチドはイタリック体で表している。二重下線を引いたアスパラギン酸 (D) は、成熟ペプチドのN末端アミノ酸残基を示す。CDR配列 (下線; *RASQSIGTSH, YASESIS, QQSNSWPFT*) は、Kabatら(前掲; U.S. Department of Health and Human Services, 1991) の定義に従って決定した。クローンK5-70 VLのCDR1~3のアミノ酸配列は、それぞれ順に、配列番号41~43に示す。

図66は、ChK5-70、HuK5-70、HuVH/MuVL (HuK5-70抗体のVLをK5-70抗体のVLに置換したもの) およびMuVH/HuVL (HuK5-70抗体のVHをK5-70抗体のVHに置換したもの) 抗体のhTROP-2に対する結合活性を示した図である。96穴プレートに0.1 $\mu\text{g/mL}$ のリコンビナントhTACSTD2-Fc-Hisタンパク質でコーティングし、被検抗体 (ChK5-70、HuK5-70、HuVH/MuVLおよびMuVH/HuVL抗体) を一過性発現させた細胞の培養上清を1、0.1、0.01、0.001 $\mu\text{g/mL}$ の抗体濃度になるように希釈し反応させた。(▲)ChK5-70抗体、(△)MuVH/HuVL抗体、(○)HuVH/MuVL抗体、(●)HuK5-70抗体

図67は、HuK5-70 VHおよびそのアミノ酸置換変異体のアミノ酸配列を示した図である。アミノ酸は一文字表記で示した。各アミノ酸置換変異体では、HuK5-70 VHのアミノ酸と同じアミノ酸については “.” で示し、置換したア

ミノ酸についてのみ一文字表記で示した。配列上部の数字はアミノ酸番号を示す (Kabatら1991)。

図68は、ChK5-70、HuK5-70、HuK5-70 VH A40R (HuK5-70抗体のVHの40番目のアラニンをアルギニンに置換した変異体) およびHuK5-70 VH R44G抗体 (HuK5-70抗体のVHの44番目のアルギニンをグリシンに置換した変異体) のhTROP-2に対する結合活性を示した図である。96穴プレートに0.1 μ g/mLのリコンビナントhTACSTD2-Fc-Hisタンパク質でコーティングし、被検抗体 (ChK5-70、HuK5-70、HuK5-70 VH A40RおよびHuK5-70 VH R44G抗体) を一過性発現させた細胞の培養上清を0.5 μ g/mLから2倍希釈系列 (6点) を作製し反応させた。(▲)ChK5-70抗体、(△)HuK5-70 VH R44G抗体、(○) HuK5-70 VH A40R抗体、(●)HuK5-70抗体

図69は、遺伝子合成により作製したHuK5-70 VH R44G遺伝子の塩基配列 (上段) とアミノ酸配列 (下段) を示す。5' 末端にEcoRI部位(GAA TTC)およびKozak配列 (ACC ACC)、3' 末端にNheI部位(GCT AGC)を付加した。アミノ酸配列は一文字表記で示した。N末端のシグナルペプチドはイタリック体で示し、成熟VHのN末端側のアミノ酸 (Q: グルタミン) を二重下線で示し、CDR配列 (Kabatら、1991) を下線で示した。

図70は、精製HuK5-70-2抗体のSDS-PAGEの図である。HuK5-70-2抗体1 μ gを還元条件下で11%SDS-PAGEゲルで展開した。レーン1: 分子量マーカー (プレジジョンPlusデュアルスタンダード (BIO-RAD))、レーン2: HuK5-70-2抗体。図の左側の数値は分子量を示す。

図71は、K5-70、HuK5-70およびHuK5-70-2抗体のhTROP-2に対する結合活性を示した図である。96穴プレートを0.1 μ g/mLのリコンビナントhTACSTD2-Fc-Hisタンパク質でコーティングし、精製した被検抗体 (K5-70、HuK5-70およびHuK5-70-2抗体) を1 μ g/mLから2倍希釈系列 (10点) を作製し反応させた。(■)K5-70抗体、(△)HuK5-70-2抗体、(●)HuK5-70抗体

図72Aは、ヒト型化抗hTROP-2抗体 (白カラム: HuK5-70, 黒カラム: HuT6-16-2)を用いたADCC活性を示す図である。詳しくは、ヒト大腸癌細胞株SW480に、HuK5-70抗体及びHuT6-16-2抗体 (いずれも0, 0.1, 0.3, 1, 3, 10 μ

g/mL)と健常人末梢血単核球を加え、6時間培養し、培養上清中に放出されるLDHの活性を測定することによりADCC活性を測定した結果を示す(平均値±標準誤差(N=3), :エフェクター/ターゲット(E/T)=40)。抗体濃度0は抗体非添加を示す。 $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ (by Student's t-test)

5 図72Bは、ヒト型化抗hTROP-2抗体(白カラム: HuK5-70, 灰色カラム: HuK5-70-2, 黒カラム: HuT6-16-2)を用いたADCC活性を示す図である。詳しくは、ヒト膵臓癌細胞株(PK-59)に、HuK5-70抗体, HuK5-70-2抗体及びHuT6-16-2抗体(いずれも0, 0.3, 1, 3, 10, 30 μ g/mL)と健常人末梢血単核球を加え、6時間培養し、培養上清中に放出されるLDHの活性を測定することによりADCC
10 活性を測定した結果を示す(平均値±標準誤差(N=3), :エフェクター/ターゲット(E/T)=40)。抗体濃度0は抗体非添加であることを示す。 $**P < 0.01$ (by Student's t-test)

図72Cは、ヒト型化抗hTROP-2抗体(白カラム: HuK5-70, 灰色カラム: HuK5-70-2, 黒カラム: HuT6-16-2)を用いたADCC活性を示す図である。詳しくは、ヒト前立腺癌細胞株(PC-3)に、HuK5-70抗体, HuK5-70-2抗体及びHuT6-16-2抗体(いずれも0, 0.3, 1, 3, 10, 30 μ g/mL)と健常人末梢血単核球を加え、6時間培養し、培養上清中に放出されるLDHの活性を測定することによりADCC
15 活性を測定した結果を示す(平均値±標準誤差(N=3), :エフェクター/ターゲット(E/T)=40)。抗体濃度0は抗体非添加であることを示す。 $**P < 0.01$
20 (by Student's t-test)。

発明を実施するための形態

以下、本発明を詳細に説明する。本発明の範囲はこれらの説明に拘束されることはなく、以下の例示以外についても、本発明の趣旨を損なわない範囲で適宜変更し実施し得る。
25

なお、本明細書は、本願優先権主張の基礎となる米国仮出願61/562,672号明細書(2011年11月22日出願)の全体を包含する。また、本明細書において引用された全ての刊行物、例えば先行技術文献、及び公開公報、特許公報その他の特許文献は、参照として本明細書に組み込まれる。

1. 本発明の概要

ヒトTROP-2 (hTROP-2) は、前述したように、全長323アミノ酸残基からなる1回膜貫通型の1型膜タンパク質である。そして、hTROP-2遺伝子及びその

5 遺伝子産物は、種々の癌細胞において発現していることが知られている。

前述したように、*in vivo* において高い抗腫瘍活性を有する抗 hTROP-2 抗体 (抗 hTROP-2 モノクローナル抗体) などの開発が望まれていた状況の下、本発明者は、極めて多数のクローンからスクリーニングを行うことにより、*in vivo* で高い抗腫瘍活性を有するクローンを取得することに成功した。具体的には、本

10 発明は、*in vivo* において hTROP-2 の細胞外領域を特異的に認識するモノクローナル抗体、特にピコモルオーダー (pM) の高い親和性を示すモノクローナル抗体を提供するものである。本発明の抗体は、裸抗体の単独投与で、既存の抗 hTROP-2 抗体と比較して、より少ない用量 (例えば 1/20 投与量) で顕著な腫瘍成長阻害活性を有し、かつ複数のヒト癌細胞を用いた担癌マウス治療モデルに
15 において顕著な腫瘍成長阻害活性を示す、抗 hTROP-2 モノクローナル抗体 (特にヒト型化抗体) である点で、極めて有用なものである。

2. 抗hTROP-2抗体の作製

(1) 抗原の調製

20 hTROP-2のアミノ酸配列 (配列番号2) の情報は、例えばNCBI (GenBank) のウェブサイト (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) に「Accession number : NP 002344」として公表されている。なお、hTROP-2のアミノ酸配列をコードする塩基配列 (配列番号1) の情報は、同ウェブサイト「Accession number : NM 002353」として公表されている。

25 抗原としては、hTROP-2のアミノ酸配列の少なくとも一部 (全部又は一部) を含むポリペプチド又はペプチド (単にペプチドともいう) を使用することができ、好ましくは、hTROP-2の細胞外領域のアミノ酸配列の少なくとも一部 (全部又は一部) を含むペプチドを使用することができる。hTROP-2の細胞外領域 (シグナルペプチドを含む) は、配列番号2で示されるアミノ酸配列のうちの第

1番目～第274番目のアミノ酸を含む領域（シグナルペプチド：第1番目～第26番目のアミノ酸）のことを言う。ここで、抗原に用いるペプチドにつき、上記「アミノ酸配列の少なくとも一部」とは、長さが特に限定されるわけではないが、例えば、配列番号2で示されるアミノ酸配列のうちの第1番目～第145番目のアミノ酸を含む領域や、当該アミノ酸配列のうちの第146番目～第274番目のアミノ酸を含む領域などが好ましい。

抗原とするペプチドの作製方法は、化学合成でも、大腸菌などを用いる遺伝子工学的手法による合成でもよく、当業者に周知の方法を用いることができる。

ペプチドの化学合成を行う場合は、ペプチドの合成の周知方法によって合成することができる。また、その合成は、固相合成法及び液相合成法のいずれをも適用することができる。市販のペプチド合成装置（例えば、島津製作所製：PSSM-8など）を使用してもよい。

ペプチドを遺伝子工学的に合成する場合は、まず、当該ペプチドをコードするDNAを設計し合成する。当該設計及び合成は、例えば、全長hTROP-2遺伝子を含むベクター等を鋳型とし、所望のDNA領域を合成し得るように設計したプライマーを用いて、PCR法により行うことができる。そして、上記DNAを適当なベクターに連結することによってタンパク質発現用組換えベクターを得、この組換えベクターを目的遺伝子が発現し得るように宿主中に導入することによって形質転換体を得る（Sambrook J. et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001）。

ベクターには、宿主微生物で自律的に増殖し得るファージ又はプラスミドが使用される。さらに、動物ウイルス、昆虫ウイルスベクターを用いることもできる。組換えベクターの作製は、精製されたDNAを適当な制限酵素で切断し、適当なベクターDNAの制限酵素部位等に挿入してベクターに連結すればよい。形質転換に使用する宿主としては、目的の遺伝子を発現できるものであれば特に限定されるものではない。例えば、細菌（大腸菌、枯草菌等）、酵母、動物細胞（COS細胞、CHO細胞等）、昆虫細胞又は昆虫が挙げられる。ヤギ等の哺乳動物を宿主として使用することも可能である。宿主への組換えベクターの導入方法は公知である。

そして、前記形質転換体を培養し、その培養物から抗原として使用されるペプチドを採取する。「培養物」とは、(a)培養上清、(b)培養細胞若しくは培養菌体又はその破砕物のいずれをも意味するものである。

培養後、目的ペプチドが菌体内又は細胞内に生産される場合には、菌体又は細胞を破砕することによりペプチドを抽出する。また、目的ペプチドが菌体外又は細胞外に生産される場合には、培養液をそのまま使用するか、遠心分離等により菌体又は細胞を除去する。その後、ペプチドの単離精製に用いられる一般的な生化学的方法、例えば硫酸アンモニウム沈殿、ゲル濾過、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等を単独で又は適宜組み合わせて用いることにより、目的のペプチドを単離精製することができる。

本発明においては、無細胞合成系を用いた *in vitro* 翻訳により抗原となるペプチドを得ることもできる。この場合は、RNAを鋳型にする方法とDNAを鋳型にする方法（転写／翻訳）の2通りの方法を用いることができる。無細胞合成系としては、市販のシステム、例えばExpressway™システム（インビトロジェン社）、PURESYSTEM（登録商標；ポストゲノム研究所）、TNTシステム（登録商標；プロメガ社）等を用いることができる。

上記のごとく得られたペプチドは、適当なキャリアタンパク質、例えば牛血清アルブミン(BSA)、キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)、ヒトチログロブリン、ニワトリガンマグロブリン等に結合することも可能である。

また抗原は、hTROP-2のアミノ酸配列（配列番号2）又は前述したその部分配列において1又は複数のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなるペプチドであってもよい。例えば、hTROP-2のアミノ酸配列又はその部分配列のうち1又は複数個（好ましくは1個又は数個（例えば1個～10個、さらに好ましくは1個～5個））のアミノ酸が欠失しており、1又は複数個（好ましくは1個又は数個（例えば1個～10個、さらに好ましくは1個～5個））のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されており、あるいは、1又は複数個（好ましくは1個又は数個（例えば1個～10個、さらに好ましくは1個～5個））の他のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなるペプチドを使用することもできる。

本発明において、細胞等に導入するための遺伝子としては、hTROP-2タンパク質若しくはその部分断片又はこれらの変異型のタンパク質又は断片をコードする遺伝子が挙げられる。そのような遺伝子としては、例えば、配列番号1に示される塩基配列又はその部分配列を有するものを使用することができる。

- 5 また、細胞等に導入するための遺伝子としては、配列番号1に示される塩基配列に相補的な配列とストリンジントな条件下でハイブリダイズし且つhTROP-2活性を有するタンパク質をコードする塩基配列、又はその部分配列を使用することも可能である。

- 10 「ストリンジントな条件」とは、ハイブリダイズさせた後の洗浄時の条件であって、バッファの塩（ナトリウム）濃度が10～500mMであり、温度が42℃～72℃、好ましくは、上記塩濃度が50～300mMであり、温度が55～68℃での条件をいう。

- 15 遺伝子に変異を導入するには、Kunkel法やGapped duplex法等の公知手法により、例えば部位特異的突然変異誘発法を利用した変異導入用キット、例えば GeneTailor™ Site-Directed Mutagenesis System（インビトロジェン社製）、 TaKaRa Site-Directed Mutagenesis System（Mutan-K、Mutan-Super Express Km等：タカラバイオ社製）を用いて行うことができる。

(2) ポリクローナル抗体の作製

- 20 調製した抗原を、免疫のため哺乳動物に投与する。哺乳動物は特に限定はされず、例えばラット、マウス及びウサギなどを挙げることができ、なかでもマウスが好ましい。

- 25 抗原の動物一匹あたりの投与量は、アジュバントの有無により適宜設定することができる。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、足蹠、皮下、腹腔内等に注入することにより行うことができる。また、免疫の間隔については、特に限定されず、数日から数週間間隔、好ましくは1週間間隔で、1～10回、好ましくは2～3回免疫を行う。そして、最終の免疫日から3～7日後に、酵素免疫測定法（ELISA又はEIA）や放射性免疫測定法（RIA）等で抗体価を測定し、所望の抗体価を示した日に採血

して、抗血清を得ることができる。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等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。その後は、抗血清中のポリクローナル抗体の反応性をELISA法などで測定する。

(3) モノクローナル抗体の作製

(3-1) 抗体産生細胞の採取

本発明の抗hTROP-2抗体は、限定はされないが、モノクローナル抗体であることが好ましい。

- 10 調製した抗原を、免疫のため哺乳動物、例えばラット、マウス及びウサギなどに投与する。抗原の動物一匹あたりの投与量は、アジュバントの有無により適宜設定することができる。アジュバントとしては上記と同様である。免疫手法も前記と同様である。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、抗体産生細胞を採取する。抗体産生細胞としては、脾臓細胞、リンパ節細胞及び末梢血細胞などが挙げられるが、なかでもリンパ節細胞及び脾臓細胞が好ましい。

(3-2) 細胞融合

- 20 ハイブリドーマ（抗体産生細胞株）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用いることができる。用いる細胞株としては、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、アミノプテリン及びチミジンを含む）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。

- 25 ミエローマ細胞としては、例えば、P3-X63-Ag8.653、P3-X63-Ag8(X63)、P3-X63-Ag8.U1(P3U1)、P3/NS I/1-Ag4-1(NS1) 及びSp2/0-Ag14(Sp2/0)等のマウスミエローマ細胞株が挙げられる。ミエローマ細胞の選択は、抗体産生細胞との適合性を適宜考慮して行うことができる。

次いで、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及びRPMI-1640培地などの動物細胞用培地中で、 $1 \times 10^6 \sim$

1×10⁷個/mLの抗体産生細胞と2×10⁵～2×10⁶個/mLのミエローマ細胞とを混合する。抗体産生細胞とミエローマ細胞との細胞比（抗体産生細胞：ミエローマ細胞）は、限定はされないが、通常、1：1～10：1とすることが好ましく、より好ましくは3：1である。次に、細胞融合促進剤の存在下で融合反応を行う。

- 5 細胞融合促進剤として、例えば、平均分子量1,000～6,000ダルトン(D)のポリエチレングリコールなど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。

(3-3) ハイブリドーマの選別及びクローニング

- 10 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培地などに適当に希釈後、マイクロタイタープレート上に播き、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ーマとして得ることができる。
- 15 次に、増殖してきたハイブリドーマの培養上清中に、hTROP-2に反応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、特に限定はされない。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取し、ELISA、EIA及びRIAなどによってスクリーニングすることができる。
- 20 融合細胞のクローニングは、限界希釈法等により行うことができる。hTROP-2に強い反応性を示す抗体をフローサイトメトリー等により判定し、これを産生するハイブリドーマを選択し、クローンとして樹立する。

(3-4) モノクローナル抗体の採取

- 25 樹立したハイブリドーマを培養し、得られる培養物からモノクローナル抗体を採取する方法として、通常の細胞培養法、又は腹水形成法等を採用することができる。「培養」とは、ハイブリドーマを培養皿又は培養ボトル中で生育させること、あるいはハイブリドーマを下記のように動物の腹腔内で増殖させることを意味する。

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、通常の培養条件（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ことができる。

- 5 腹水形成法の場合は、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1x10⁷個投与し、ハイブリドーマを大量に増殖させる。そして、2～3週間後に腹水を採取することが好ましい。

- 10 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等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。

(3-5) 抗腫瘍活性を有するクローンの選別

本発明の抗hTROP-2抗体は、*in vivo*で抗腫瘍活性を有する抗体である。

- 15 ここで、「抗腫瘍活性」とは、腫瘍細胞（癌細胞）を死滅させる活性又は腫瘍成長を阻害する活性を意味する。抗腫瘍活性としては、例えば、癌細胞の増殖阻害活性や腫瘍血管新生阻害活性が好ましく挙げられる。また、本発明の抗体が抗腫瘍活性を発揮しうるヒト腫瘍（腫瘍細胞）の種類としては、hTROP-2の発現が確認されている公知の各種ヒト腫瘍が挙げられ、特に限定はされないが、例えば、ヒト膵癌、ヒト前立腺癌、ヒト大腸癌、ヒト乳癌、ヒト卵巣癌、ヒト肺癌及
20 びヒト胆管癌などの各種ヒト腫瘍のうちの1種又は2種以上が好ましく挙げられ、より好ましくはヒト膵癌、ヒト大腸癌、ヒト前立腺癌、ヒト大腸癌、ヒト乳癌、ヒト卵巣癌及びヒト肺癌のうちの1種又は2種以上であり、さらに好ましくはヒト膵癌及び／又はヒト大腸癌である。さらに、上記腫瘍の種類としては、再発癌や転移癌であってもよく、本発明の抗体はこれらに腫瘍に対しても優れた抗腫瘍
25 活性を発揮し得る。

*in vivo*での抗腫瘍活性の確認は、例えば、所望の腫瘍細胞をマウスの皮下に移植した担癌マウス（担癌動物治療モデル）を用い、このマウスに前記のとおり得られた抗体を投与することにより行うことができる。この場合、抗体の投与は、腫瘍細胞の移植直後から行ってもよいし（*prevention*モデル）、移植に腫瘍が所

定の体積になったのを確認してから行ってもよい（treatmentモデル）。投与方法は、限定はされないが、例えば、3日、1週間、10日又は2週間に1回あるいは単回（1回のみ）で、5～20mg/kg体重、腹腔内投与等とすることができる。

preventionモデルの場合は、腫瘍形成頻度と腫瘍体積により抗腫瘍活性の有無及びレベルを評価することができる。treatmentモデルの場合は、腫瘍体積により抗腫瘍活性の有無及びレベルを評価することができる。

本発明において、*in vivo*で抗腫瘍活性を有する抗hTROP-2抗体としては、例えば、H鎖V領域のCDR1～3のアミノ酸配列が、それぞれ順に、配列番号36～38で示されるアミノ酸配列であり、及び／又は、L鎖V領域のCDR1～3のアミノ酸配列が、それぞれ順に、配列番号41～43で示されるアミノ酸配列であるものが、好ましく挙げられる。当該H鎖V領域としては、例えば、配列番号35で示されるアミノ酸配列からなるものが好ましく、当該L鎖V領域としては、例えば、配列番号40で示されるアミノ酸配列からなるものが好ましい。

また本発明の抗hTROP-2抗体の他の態様としては、例えば、H鎖V領域のCDR1～3のアミノ酸配列が、それぞれ順に、配列番号46～48で示されるアミノ酸配列であり、及び／又は、L鎖V領域のCDR1～3のアミノ酸配列が、それぞれ順に、配列番号51～53で示されるアミノ酸配列であるものが、好ましく挙げられる。当該H鎖V領域としては、例えば、配列番号45で示されるアミノ酸配列からなるものが好ましく、当該L鎖V領域としては、例えば、配列番号50で示されるアミノ酸配列からなるものが好ましい。

同様に、本発明の抗hTROP-2抗体の他の態様としては、例えば、H鎖V領域のCDR1～3のアミノ酸配列が、それぞれ順に、配列番号56～58で示されるアミノ酸配列であり、及び／又は、L鎖V領域のCDR1～3のアミノ酸配列が、それぞれ順に、配列番号61～63で示されるアミノ酸配列であるものが、好ましく挙げられる。当該H鎖V領域としては、例えば、配列番号55で示されるアミノ酸配列からなるものが好ましく、当該L鎖V領域としては、例えば、配列番号60で示されるアミノ酸配列からなるものが好ましい。

同様に、本発明の抗hTROP-2抗体の他の態様としては、例えば、H鎖V領域のCDR1～3のアミノ酸配列が、それぞれ順に、配列番号66～68で示される

アミノ酸配列であり、及び／又は、L鎖V領域のCDR1～3のアミノ酸配列が、それぞれ順に、配列番号71～73で示されるアミノ酸配列であるものが、好ましく挙げられる。当該H鎖V領域としては、例えば、配列番号65で示されるアミノ酸配列からなるものが好ましく、当該L鎖V領域としては、例えば、配列番号70で示されるアミノ酸配列からなるものが好ましい。

本発明において、*in vivo*で抗腫瘍活性を有する抗hTROP-2抗体としては、より具体的には、例えば、受領番号がFERM BP-11251であるハイブリドーマにより産生される抗hTROP-2モノクローナル抗体（クローン名：K5-70）、受領番号がFERM BP-11252であるハイブリドーマにより産生される抗hTROP-2モノクローナル抗体（クローン名：K5-107）、受領番号がFERM BP-11253であるハイブリドーマにより産生される抗hTROP-2モノクローナル抗体（クローン名：K5-116-2-1）、受領番号がFERM BP-11346であるハイブリドーマにより産生される抗hTROP-2モノクローナル抗体（クローン名：T6-16）及び受領番号がFERM BP-11254であるハイブリドーマにより産生される抗hTROP-2モノクローナル抗体（クローン名：T5-86）などが好ましく挙げられる。

ここで、受領番号がFERM BP-11251であるハイブリドーマは、「Mouse-Mouse Hybridoma K5-70」と称し2010年5月12日付で、受領番号がFERM BP-11252であるハイブリドーマは、「Mouse-Mouse Hybridoma K5-107」と称し2010年5月12日付で、受領番号がFERM BP-11253であるハイブリドーマは、「Mouse-Mouse Hybridoma K5-116-2-1」と称し2010年5月12日付で、受領番号がFERM BP-11346であるハイブリドーマは、「Mouse-Mouse Hybridoma T6-16」と称し2011年3月1日付で、受領番号がFERM BP-11254であるハイブリドーマは、「Mouse-Mouse Hybridoma T5-86」と称し2010年5月12日付で、いずれも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（〒305-8566 茨城県つくば市東 1-1-1 中央第 6）に寄託されたものである。

さらに、本発明の抗hTROP-2抗体としては、例えば、受領番号がFERM BP-11251、FERM BP-11252、FERM BP-11253、FERM BP-11346又はFERM BP-11254であるハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体が結合（

認識)する部位(例えばエピトープ)に結合する抗hTROP-2抗体も好ましく挙げられる。エピトープとしては、下記(3-6)項において例示するものが好ましく挙げられる。

(3-6) 抗hTROP-2抗体のエピトープ

- 5 本発明の抗hTROP-2抗体のエピトープ(抗原決定基)は、抗原であるhTROP-2の少なくとも一部であればよく限定はされないが、例えば、配列番号2に示されるhTROP-2のアミノ酸配列中の、第252番目～第260番目のアミノ酸からなる領域を除いた領域の少なくとも一部であることが好ましく、より好ましくは、第1番目～第69番目のアミノ酸からなる領域の少なくとも一部又は第100
- 10 番目～第274番目のアミノ酸からなる領域(第252番目～第260番目のアミノ酸からなる領域を除く)の少なくとも一部であり、さらに好ましくは第27番目～第69番目のアミノ酸からなる領域の少なくとも一部又は第109番目～第206番目のアミノ酸からなる領域の少なくとも一部である。上記エピトープとして、特に好ましくは、配列番号2に示されるhTROP-2のアミノ酸配列中の、第43番目～第
- 15 65番目のアミノ酸からなる領域、第152番目～第165番目のアミノ酸からなる領域、第171番目～第183番目のアミノ酸からなる領域、第109番目～第120番目のアミノ酸からなる領域、第193番目～第206番目のアミノ酸からなる領域、及び第43番目～第56番目のアミノ酸からなる領域、並びにこれらを含む部分であり、中でも特に好ましいのは、第43番目～第65番目のアミノ酸からなる領域、第152
- 20 番目～第165番目のアミノ酸からなる領域、第171番目～第183番目のアミノ酸からなる領域、及び第109番目～第120番目のアミノ酸からなる領域、並びにこれらを含む部分である。当該領域を認識する(当該領域又はそれを含む部分と結合する)抗hTROP-2抗体は、例えば、腫瘍細胞内へのインターナリゼーション活性が高く、後述するイムノコンジュゲート等の用途に極めて有用なものである。

25 (3-7) 抗hTROP-2抗体の特性

本発明の抗hTROP-2抗体は、前述の通り、低用量で高い*in vivo*抗腫瘍活性を有する抗体である。具体的には、担癌動物モデルに対して、20mg/kg体重以下(好ましくは10mg/kg体重以下、より好ましくは5mg/kg体重以下、さらに好ましくは1mg/kg体重以下)の投与量(裸抗体)で50%以上(好ましくは80%以上、

より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、特に好ましくはほぼ100%（例えば98%以上又は99%以上）の腫瘍成長阻害活性を示すものであることが好ましい。

ここで、腫瘍成長阻害活性（%）は、例えば、下記式により算出することができる。

$$\text{腫瘍成長阻害活性（\%）} = 100 - \left[\left(\text{抗体投与群の腫瘍体積又は腫瘍重量} \right) \div \left(\text{対照群の腫瘍体積又は腫瘍重量} \right) \right] \times 100$$

- 10 また、本発明の抗hTROP-2抗体は、2種以上のヒト腫瘍細胞株に対して抗腫瘍活性を有するものであることが好ましい。ヒト腫瘍細胞株としては、限定はされないが、例えば、各種ヒト膀胱癌細胞株、ヒト前立腺癌細胞株、ヒト大腸癌細胞株、ヒト乳癌細胞株、ヒト卵巣癌細胞株、ヒト肺癌細胞株及びヒト胆管癌細胞株からなる群より選ばれる少なくとも2種が挙げられ、具体的には、ヒト膀胱癌細胞株
- 15 PK-59、ヒト膀胱癌細胞株BxPC-3、ヒト膀胱癌細胞株KP-3L、ヒト膀胱癌細胞株KP-2、ヒト膀胱癌細胞株PK-1、ヒト膀胱癌細胞株PK-45H、ヒト膀胱癌細胞株PK-45P、ヒト膀胱癌細胞株TCC-PAN2、ヒト膀胱癌細胞株SUIT-2、ヒト大腸癌細胞株CACO-2、ヒト大腸癌細胞株SW480、ヒト大腸癌細胞株DLD-1、ヒト大腸癌細胞株HCT 116、ヒト乳癌細胞株JIMT-1、ヒト乳癌細胞株HCC1143、ヒト乳癌細胞株
- 20 MCF-7、ヒト乳癌細胞株MDA-MB-468、ヒト前立腺癌細胞株DU145、ヒト前立腺癌細胞株PC-3、ヒト卵巣癌細胞株SK-OV-3、ヒト肺癌細胞株Calu-3、及びヒト胆管癌細胞株TFK-1からなる群より選ばれる少なくとも2種が好ましく挙げられる。中でも、前記2種以上のヒト腫瘍細胞株としては、ヒト膀胱癌細胞株PK-59、ヒト膀胱癌細胞株BxPC-3、ヒト大腸癌細胞株SW480、ヒト肺癌細胞株Calu-3、ヒト
- 25 乳癌細胞株MBA-MD-468、及びヒト卵巣癌細胞株SK-OV-3からなる群より選ばれる少なくとも2種がより好ましく挙げられる。

さらに、本発明の抗hTROP-2抗体は、解離定数（Kd値）が 1.0×10^{-10} M以下であることが好ましく、より好ましくは 1.0×10^{-11} M以下であり、さらに好ましくは 1.0×10^{-12} M以下である。ここで、抗体の結合能（親和性）は、例えば、スキ

ヤッチャード解析やBiacoreと呼ばれる表面プラズモン共鳴センサーにより、解離定数(Kd値)、解離速度定数(Kdiss [1/Sec])、結合速度定数(Kass [1/M.Sec])として測定することができる。Biacore装置としては、例えばBiacore 3000、Biacore 2000、Biacore X、Biacore J、Biacore Q (いずれもBiacore社)などが

5 挙げられる。抗体は、解離定数 (Kd値) が小さい値であるほど結合能 (親和性) が高いという点で好ましい。Kd値は、Kdiss及びKassの2つのパラメーターにより決定され、例えば、式： $Kd[M] = Kdiss/Kass$ により表すことができる。なお、Kd値の算出方法については、後述する実施例 (具体的には実施例10) に記載の方法も好ましく採用することができる。

10 (4) 遺伝子組換え抗体、及び抗体断片

(4-1) 遺伝子組換え抗体

本発明の抗hTROP-2抗体の好ましい態様の一つとして、遺伝子組換え抗体が挙げられる。遺伝子組換え抗体としては、限定はされないが、例えば、キメラ抗体、ヒト型化抗体 及びヒト抗体等が挙げられる。

15 キメラ抗体 (すなわちヒト型キメラ抗体) は、マウス由来抗体の可変領域をヒト由来の定常領域に連結 (接合) した抗体であり (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81, 6851-6855, (1984) 等を参照)、キメラを作製する場合は、そのように連結した抗体が得られるよう、遺伝子組換え技術によって容易に構築できる。

ヒト型化抗体を作製する場合は、マウス抗体の可変領域から相補性決定領域 (CDR) をヒト可変領域に移植して、フレームワーク領域 (FR) はヒト由来のものでCDRはマウス由来のものからなる、再構成した可変領域を作製する (いわゆるCDRグラフトイング (CDR移植))。次に、これらのヒト型化された再構成ヒト可変領域をヒト定常領域に連結する。このようなヒト型化抗体の作製法は、

20 当分野において周知である (Nature, 321, 522-525 (1986) ; J. Mol. Biol., 196, 901-917 (1987) ; Queen C et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 10029-10033 (1989) ; 特表平4-502408号公報 (特許第2828340号公報 ; クイーンら) 等を参照)。

ここで、本発明のヒト型化抗hTROP-2抗体に用いることができるマウス由来のCDR配列としては、限定はされないが、例えば、H鎖V領域(VH)のCDR1~3

として（それぞれ順に）配列番号 36～38 に示されるアミノ酸配列や配列番号 66～68 で示されるアミノ酸配列が、L鎖V領域(VL)のCDR1～3として（それぞれ順に）配列番号 41～43 に示されるアミノ酸配列や配列番号 71～73 で示されるアミノ酸配列が、好ましく挙げられる。

- 5 また、ヒト型化された再構成ヒト可変領域のうち、H鎖V領域のアミノ酸配列としては、例えば、配列番号 92 で示されるアミノ酸配列（配列番号 36～38 に示されるアミノ酸配列からなるCDR1～3を含む；さらにシグナルペプチドを含むアミノ酸配列は配列番号 75 で示される）、配列番号 98 で示されるアミノ酸配列（配列番号 36～38 に示されるアミノ酸配列からなるCDR1～3を含む
- 10 ；さらにシグナルペプチドを含むアミノ酸配列は配列番号 97 で示される）、配列番号 94 で示されるアミノ酸配列（配列番号 66～68 に示されるアミノ酸配列からなるCDR1～3を含む；さらにシグナルペプチドを含むアミノ酸配列は配列番号 79 で示される）、及び配列番号 95 で示されるアミノ酸配列（配列番号 66～68 に示されるアミノ酸配列からなるCDR1～3を含む；さらにシグナル
- 15 ペプチドを含むアミノ酸配列は配列番号 81 で示される）が好ましく挙げられる。ここで、上記配列番号 98 で示されるH鎖V領域のアミノ酸配列は、上記の配列番号 92 で示されるH鎖V領域のアミノ酸配列の第44番目のアルギニン(R)をグリシン(G)に置換した改変型のアミノ酸配列である。

- 同様に、ヒト型化された再構成ヒト可変領域のうち、L鎖V領域のアミノ酸配列としては、例えば、配列番号 93 で示されるアミノ酸配列（配列番号 41～43 に示されるアミノ酸配列からなるCDR1～3を含む；さらにシグナルペプチドを含むアミノ酸配列は配列番号 77 で示される）、及び配列番号 96 で示されるアミノ酸配列（配列番号 71～73 に示されるアミノ酸配列からなるCDR1～3を含む；さらにシグナルペプチドを含むアミノ酸配列は配列番号 83 で示される
- 20 ）が好ましく挙げられる。
- 25 ）が好ましく挙げられる。

ここで、本発明のヒト型化抗hTROP-2抗体の態様としては、例えば、(i) H鎖V領域のアミノ酸配列が配列番号 92 で示されるアミノ酸配列からなり、かつ、L鎖V領域のアミノ酸配列が配列番号 93 で示されるアミノ酸配列からなるものや、(ii) H鎖V領域のアミノ酸配列が配列番号 98 で示されるアミノ酸配列から

なり、かつ、L鎖V領域のアミノ酸配列が配列番号93で示されるアミノ酸配列からなるものが好ましい。なかでも、H鎖V領域のアミノ酸配列が配列番号98で示されるアミノ酸配列である上記(ii)のヒト型化抗hTROP-2抗体は、アビディティー (Avidity) (すなわち2つの抗原結合アームの運動能に関するフレキシビリティ) がより向上したものであり、抗原結合活性が高いものであるため、
5 特に好ましい。

同様に、本発明のヒト型化抗hTROP-2抗体の他の態様としては、例えば、(iii) H鎖V領域のアミノ酸配列が配列番号94で示されるアミノ酸配列からなり、かつ、L鎖V領域のアミノ酸配列が配列番号96で示されるアミノ酸配列からなるものや、(iv) H鎖V領域のアミノ酸配列が配列番号95で示されるアミノ酸配列からなり、かつ、L鎖V領域のアミノ酸配列が配列番号96で示されるアミノ酸配列からなるものが好ましい。
10

ヒト抗体(完全ヒト抗体)は、一般にV領域の抗原結合部位である超可変領域(Hyper Variable region)、V領域のその他の部分及び定常領域の構造が、ヒトの抗体と同じ構造を有するものである。但し、超可変部位は他の動物由来であってもよい。ヒト抗体を作製する技術も公知であり、ヒトに共通の遺伝子配列については遺伝子工学的手法によって作製する方法が確立されている。ヒト抗体は、例えば、ヒト抗体のH鎖及び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, (1977)16,
15 133-143; Kuroiwa, Y.et.al., Nuc. Acids Res., (1998)26, 3447-3448; Yoshida, H.et.al., Animal Cell Technology: Basic and Applied Aspects,(1999)10, 69-73 (Kitagawa, Y.,Matuda, T. and Iijima, S. eds.), Kluwer Academic Publishers; Tomizuka, K.et.al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (2000)97, 722-727 等を参照)や、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
20 取得する方法(Wormstone, I. M.et.al, Investigative Ophthalmology & Visual Science., (2002)43 (7), 2301-8; Carmen, S. et.al., Briefings in Functional Genomics and Proteomics,(2002)1 (2), 189-203; Siriwardena, D. et.al., Ophthalmology, (2002)109 (3), 427-431 等を参照)により取得することができる。

上記キメラ抗体、ヒト型抗体及びヒト抗体は、抗体Fc領域におけるN-グリコ

シド結合複合型糖鎖が該糖鎖の還元末端の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であるものが好ましく、詳しくは、該フコースの1位がN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位に α 結合していない糖鎖を抗体分子のFc領域に有する遺伝子組換え抗体分子からなる抗体が挙げられる。このような抗体であれば、ADCC活性を飛躍的に向上させることができる。なお、この点（抗体Fc領域におけるN-グリコシド結合複合型糖鎖の特徴）は、前述したポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体についても同様に好ましい。

(4-2) 抗体断片

10 本発明の抗hTROP-2抗体の断片（部分断片）も、本発明の抗体に含まれるものとする。ここで、本発明の抗体断片は、本発明の抗hTROP-2抗体と同様に、hTROP-2に対する結合活性を有するもの（すなわちhTROP-2に結合し得るもの）であって *in vivo*で抗腫瘍活性を有するものである。

当該抗体の断片としては、抗hTROP-2ポリクローナル抗体又は抗hTROP-2モノクローナル抗体の一部分の領域（すなわち、本発明の抗hTROP-2抗体に由来する抗体断片）を意味し、例えば、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv (variable fragment of antibody)、一本鎖抗体（H鎖、L鎖、H鎖V領域、及びL鎖V領域等）、scFv、diabody（scFv二量体）、dsFv（ジスルフィド安定化V領域）、並びに、相補性決定領域（complementarity determining region : CDR）を少なくとも一部に含むペプチド等が挙げられる。

Fabは、抗体分子をタンパク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N末端側約半分とL鎖全体と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。また、抗体のFabをコードするDNAを、原核生物用発現ベクター又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又は真核生物へ導入することにより発現させ、Fabを製造することもできる。

F(ab')₂は、抗体分子をタンパク質分解酵素ペプシンで処理して得られる断片のうち、Fab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。また、後述す

るFabをチオエーテル結合あるいはジスルフィド結合させて、作製することもできる。

Fab'は、上記F(ab')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。また、抗体のFab'断片をコードするDNAを、原核生物用発現ベクター又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又は真核生物へ導入することにより発現させ、Fab'を製造することもできる。

scFvは、1本のH鎖V領域（VH）と1本のL鎖V領域（VL）とを適当なペプチドリンカー（P）を用いて連結した、VH-P-VLないしはVL-P-VHポリペプチドで、抗原結合活性を有する抗体断片である。scFvは、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を構築して、該DNAを原核生物用発現ベクター又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又は真核生物へ導入することにより発現させて、製造することができる。

diabodyは、scFvが二量体化した抗体断片で、二価の抗原結合活性を有する抗体断片である。二価の抗原結合活性は、同一であることもできるし、一方を異なる抗原結合活性とすることもできる。diabodyは、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Pのアミノ酸配列の長さが8残基以下となるように構築して、該DNAを原核生物用発現ベクター又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又は真核生物へ導入することにより発現させて、製造することができる。

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, 697-704, 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。dsFvは、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を構築して、該DNAを原核生物用発現ベクター又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又は真核生物へ導入することにより発現させて、製造することができる。

CDRを含むペプチドは、VHのCDR（CDR1～3）及びVLのCDR（CDR1～3

）の中の少なくとも1領域以上を含んで構成され、VHのCDRをすべて含むもの、及びVLのCDRをすべて含むものがより好ましく、VH及びVLのCDR（計6領域）をすべて含むものが特に好ましい。CDRのアミノ酸配列としては、例えば、前述した配列番号36～38、41～43、46～48、51～53、56～58、61～63、66～68及び71～73に示されるアミノ酸配列が好ましく挙げられる。複数のCDRを含むペプチドは、直接又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。CDRを含むペプチドは、抗体のVHおよびVLの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又は真核生物用発現ベクターに挿入して、該発現ベクターを原核生物又は真核生物へ導入することにより発現させて、製造することができる。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）及びtBoc法（t-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。

本発明の抗体断片としては、そのままの形状でN-グリコシド結合複合型糖鎖が該糖鎖の還元末端の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である抗体Fc領域の一部または全部を含む抗体断片でもよく、また、上述した抗体断片とN-グリコシド結合複合型糖鎖が該糖鎖の還元末端の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である抗体Fc領域の一部または全部との融合タンパク質であってもよい。このような抗体断片であれば、ADCC活性を飛躍的に向上させることができるため、好ましい。

以下、本明細書中の説明においては、上述した抗体断片も、本発明の抗hTROP-2抗体に含まれるものとする。

3. ポリヌクレオチド、組換えベクター及び形質転換体

本発明においては、上述した本発明の抗hTROP-2抗体やその抗体断片をコードするポリヌクレオチド（遺伝子、DNA）も提供することができる。当該ポリヌクレオチドとしては、具体的には、上述した本発明の抗hTROP-2抗体や抗体断片の例示として示した各アミノ酸配列をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドであることが好ましい。また、本発明のポリヌクレオチドは、本発明の抗hTROP-2抗体や抗体断片をコードするポリヌクレオチドのみからなるものであ

ってもよいし、当該ポリヌクレオチドを一部に含み、その他に遺伝子発現に必要な公知の塩基配列（転写プロモーター、SD配列、Kozak配列、ターミネーター等）をも含むものであってもよく、限定はされない。

本発明の抗hTROP-2抗体や抗体断片をコードするポリヌクレオチドとしては、
5 翻訳後の個々のアミノ酸に対応するコドンは、特に限定はされず、転写後、ヒト等の哺乳類において一般的に用いられているコドン（好ましくは使用頻度の高いコドン）を示すヌクレオチドDNAを含むものであってもよいし、また、大腸菌や酵母等の微生物や、植物等において一般的に用いられているコドン（好ましくは使用頻度の高いコドン）を示すヌクレオチドDNAを含むものであってもよい。

10 本発明においては、上記本発明のポリヌクレオチドを含む組換えベクターや、当該組換えベクターを含む形質転換体を提供することもできる。

組換えベクターとして用いる発現ベクターに組込むポリヌクレオチド（遺伝子、DNA）には、必要に応じて、予め、上流に転写プロモーター、SD配列（宿主が原核細胞の場合）及びKozak配列（宿主が真核細胞の場合）を連結しておいても
15 よいし、下流にターミネーターを連結しておいてもよく、その他、エンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー等を連結しておくこともできる。なお、上記転写プロモーター等の遺伝子発現に必要な各要素は、初めから当該ポリヌクレオチドに含まれていてもよいし、もともと発現ベクターに含まれている場合はそれを利用してもよく、各要素の使用態様は特に限定され
20 ない。

発現ベクターに当該ポリヌクレオチドを組込む方法としては、例えば、制限酵素を用いる方法や、トポイソメラーゼを用いる方法など、公知の遺伝子組換え技術を利用した各種方法が採用できる。また、発現ベクターとしては、例えば、プラスミドDNA、バクテリオファージDNA、レトロトランスポゾンDNA、レトロ
25 ウイルスベクター、人工染色体DNAなど、本発明の抗hTROP-2抗体やその抗体断片をコードするポリヌクレオチド（遺伝子、DNA）を保持し得るものであれば、限定はされず、使用する宿主細胞に適したベクターを適宜選択して使用することができる。

次いで、構築した上記組換えベクターを宿主に導入して形質転換体を得、これを培養することにより、本発明の抗hTROP-2抗体やその抗体断片を発現させることができる。なお、本発明で言う「形質転換体」とは宿主に外来遺伝子が導入されたものを意味し、例えば、宿主にプラスミドDNA等を導入すること（形質転換）で外来遺伝子が導入されたもの、並びに、宿主に各種ウイルス及びファージを感染させること（形質導入）で外来遺伝子が導入されたものが含まれる。

宿主としては、上記組換えベクターが導入された後、本発明の抗hTROP-2抗体やその抗体断片を発現し得るものであれば、限定はされず、適宜選択することができるが、例えば、ヒトやマウス等の各種動物細胞、各種植物細胞、細菌、酵母、植物細胞等の公知の宿主が挙げられる。

動物細胞を宿主とする場合は、例えば、ヒト繊維芽細胞、ヒト胎児腎細胞、HEK293細胞、293F細胞、CHO細胞、サル細胞COS-7、Vero、マウスL細胞、ラットGH3、ヒトFL細胞等が用いられる。また、Sf9細胞、Sf21細胞等の昆虫細胞を用いることもできる。

細菌を宿主とする場合、例えば、大腸菌、枯草菌等が用いられる。

酵母を宿主とする場合は、例えば、サッカロミセス・セレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）、シゾサッカロミセス・ポンベ（*Schizosaccharomyces pombe*）等が用いられる。

植物細胞を宿主とする場合は、例えば、タバコBY-2細胞等が用いられる。

形質転換体を得る方法は、限定はされず、宿主と発現ベクターとの種類の組み合わせを考慮し、適宜選択することができるが、例えば、電気穿孔法、リポフェクション法、ヒートショック法、PEG法、リン酸カルシウム法、DEAEデキストラン法、並びに、DNAウイルスやRNAウイルス等の各種ウイルスを感染させる方法などが好ましく挙げられる。

得られる形質転換体においては、組換えベクターに含まれるポリヌクレオチドのコドン型は、用いた宿主のコドン型と一致していても異なってもよく、限定はされない。

4. 抗体－薬剤複合体の作製

上記本発明の抗hTROP-2抗体を用いたイムノコンジュゲート等として、当該抗体と、抗腫瘍活性及び／又は殺細胞活性を有する物質（化合物等）とを含む、抗体－薬剤複合体を提供することができる。なお、予め、当該抗体分子と、抗腫瘍活性及び／又は殺細胞活性を有する物質とを、それぞれ調製したのち、これらを複合化させて得られたものは、一般に、イムノコンジュゲートと称される。また、遺伝子組換え技術を用い、抗腫瘍活性及び／又は殺細胞活性を有する物質としてのタンパク質トキシンを、遺伝子上で抗体遺伝子と連結させて、1つのタンパク質（融合タンパク質）として発現させて得られたものは、一般に、イムノトキシンと称される。

- 10 抗腫瘍活性を有する物質としては、例えば、ドキソルビシン、カリケアマイシン、マイトマイシン C、Auristatin E、放射性同位体（RI）などが挙げられる。殺細胞活性を有する物質としては、例えば、サポリン、リシン、緑膿菌外毒素、ジフテリアトキシン、放射性同位体（RI）等が挙げられ、なかでもサポリン及び緑膿菌外毒素が好ましく用いられる。なお、抗腫瘍活性及び／又は殺細胞活性
- 15 を有する RI としては、限定はされないが、例えば、 ^{90}Y 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^3H 、 ^{35}S 、 ^{14}C 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{189}Re 、 ^{177}Lu 、 ^{67}Cu 、 ^{212}Bi 、 ^{213}Bi 、 ^{211}At 、 ^{198}Au 、 ^{224}Ac 、 ^{126}I 、 ^{133}I 、 ^{77}Br 、 $^{113\text{m}}\text{In}$ 、 ^{95}Ru 、 ^{97}Ru 、 ^{103}Ru 、 ^{105}Ru 、 ^{107}Hg 、 ^{203}Hg 、 $^{94\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{121\text{m}}\text{Te}$ 、 $^{122\text{m}}\text{Te}$ 、 $^{125\text{m}}\text{Te}$ 、 ^{165}Tm 、 ^{167}Tm 、 ^{168}Tm 、 ^{111}Ag 、 ^{197}Pt 、 ^{109}Pd 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{47}Sc 、 ^{153}Sm 、 ^{177}Lu 、 ^{105}Rh 、 ^{142}Pr 、 ^{143}Pr 、 ^{161}Tb 、 ^{166}Ho 、 ^{199}Au 、 ^{57}Co 、 ^{58}Co 、 ^{51}Cr 、 ^{59}Fe 、 ^{18}F 、 ^{75}Se 、 ^{201}Tl 、 ^{225}Ac 、 ^{76}Br 、 ^{86}Y 、 ^{169}Yb 、 ^{166}Dy 、 ^{212}Pb
- 20 及び ^{223}Ra 等が挙げられる。

抗体－薬剤複合体の作製方法としては、限定はされないが、例えば、ジスルフィド結合やヒドラゾン結合によって抗体と薬剤とをカップリングする方法などが挙げられる。

- 25 上記本発明の抗hTROP-2抗体は、hTROP-2を発現する標的腫瘍細胞内へのインターナリゼーション活性に優れたものである。そのため、予め、抗腫瘍活性及び／又は殺細胞活性を有する物質を複合化しておくことにより、これら物質を腫瘍細胞に直接かつ高選択的に作用させることができる。本発明の抗体－薬剤複合体は、標的腫瘍細胞への薬剤送達能に極めて優れたものである。

なお、細胞内へのインターナリゼーション活性は、抗体をローダミン等により蛍光標識し、細胞内への移行挙動及び抗体の局在性について蛍光顕微鏡等を用いて観察することにより評価することができる。

また本発明においては、抗体－薬剤複合体において、抗体の代わりに前述の抗体断片を用いた抗体断片－薬剤複合体を提供することもできる。抗体断片－薬剤複合体の詳細については、上述の抗体－薬剤複合体の説明を適宜適用することができる。

以下、本明細書中の説明においては、抗体断片－薬剤複合体も、本発明の抗体－薬剤複合体に含まれるものとする。

10

5. 医薬組成物

本発明の抗hTROP-2抗体及び抗体－薬剤複合体は、医薬組成物に含まれる有効成分として有用である。

当該医薬組成物は、腫瘍の治療用及び／又は診断用の医薬組成物として有用である。特に、本発明の抗hTROP-2抗体、及び該抗体を含む抗体－薬剤複合体は、抗腫瘍活性として優れた腫瘍成長阻害活性を有するものであるため、腫瘍の治療用に使用されることが好ましい。すなわち、本発明の抗hTROP-2抗体及び抗体－薬剤複合体は、腫瘍治療剤及び腫瘍診断剤に含まれる有効成分として有用なものである。なお、本発明において、上記腫瘍の治療には、腫瘍の成長阻害及び成長抑制の意味も含むものとし、具体的には、例えば腫瘍治療剤であれば、腫瘍の成長阻害剤及び成長抑制剤の形態も含むものとする。

本発明の医薬組成物は、本発明の抗hTROP-2抗体及び／又は抗体－薬剤複合体を有効成分として含み、さらに薬学的に許容される担体を含む医薬組成物の形態で提供することが好ましい。また、本発明の医薬組成物は、公知の抗腫瘍剤との併用もすることができる。併用によりさらに高い抗腫瘍効果が得られる。

本発明の医薬組成物の適用の対象となる疾患（腫瘍）としては、hTROP-2の発現が確認されている前述した公知の各種ヒト腫瘍が挙げられる。なかでも特に、ヒト膀胱癌、ヒト前立腺癌、ヒト大腸癌、ヒト乳癌、ヒト卵巣癌、ヒト肺癌及びヒト胆管癌などの各種ヒト腫瘍のうちの1種又は2種以上が好ましく挙げられる。

これらの疾患は単独であってもよく、2つ以上が併発してもよい。また、対象となる腫瘍は、再発癌や転移癌であってもよく、本発明の医薬組成物（ひいては、本発明の抗hTROP-2抗体及び／又は抗体－薬剤複合体）は、再発癌や転移癌の治療剤及び診断剤としても有効に用いることができる。

- 5 「薬学的に許容され得る担体」とは、賦形剤、希釈剤、増量剤、崩壊剤、安定剤、保存剤、緩衝剤、乳化剤、芳香剤、着色剤、甘味剤、粘稠剤、矯味剤、溶解補助剤あるいはその他の添加剤等が挙げられる。そのような担体の1種以上を用いることにより、注射剤、液剤、カプセル剤、懸濁剤、乳剤あるいはシロップ剤等の形態の医薬組成物を調製することができる。これらの医薬組成物は、経口あるいは非経口的に投与することができる。非経口投与のためのその他の形態としては、1つ以上の活性物質を含み、常法により処方される注射剤などが含まれる。注射剤の場合には、生理食塩水又は市販の注射用蒸留水等の薬学的に許容される担体中に溶解または懸濁することにより製造することができる。
- 10

- 特に、本発明の抗hTROP-2抗体由来の抗体断片（中でも低分子のもの）を生体内に投与する場合は、上記に加えて、コロイド分散系を用いることができる。コロイド分散系は化合物（抗体断片）の生体内の安定性を高める効果や、特定の臓器、組織又は細胞へ化合物を効率的に輸送する効果が期待される。コロイド分散系は、通常用いられるものであればよく限定はされないが、ポリエチレングリコール、高分子複合体、高分子凝集体、ナノカプセル、ミクロスフェア、ビーズ、及び水中油系の乳化剤、ミセル、混合ミセル及びリポソームを包含する脂質をベースとする分散系を挙げることができ、好ましくは、特定の臓器、組織又は細胞へ化合物を効率的に輸送する効果のある、複数のリポソーム、人工膜の小胞である（Mannino et al., *Biotechniques*, 1988, 6, 682; Blume and Cevc, *Biochem. et Biophys. Acta*, 1990, 1029, 91; Lappalainen et al., *Antiviral Res.*, 1994, 23, 119; Chonn and Cullis, *Current Op. Biotech.*, 1995, 6, 698）。
- 15
- 20
- 25

本発明の医薬組成物の投与量は、患者の年齢、性別、体重及び症状、治療効果、投与方法、処理時間、あるいは医薬組成物に含有される本発明の抗hTROP-2抗体及び抗体－薬剤複合体の種類などにより異なる。通常、成人一人あたり、一回

につき600 μ gから6000mgの範囲で投与することができるが、この範囲に限定されるものではない。

例えば注射剤により投与する場合は、ヒト患者に対し、1回の投与において1 kg体重あたり、100 μ g~100mgの量を、1日平均あたり1回~数回投与してもよく、好ましくは3日、1週間、10日又は2週間に1回投与したり、あるいは単回（合計投与回数が1回）投与する態様も採ることができる。投与の形態としては、静脈内注射、皮下注射、皮内注射、筋肉内注射あるいは腹腔内注射などが挙げられるが、好ましくは静脈内注射である。また、注射剤は、場合により、非水性の希釈剤（例えばポリエチレングリコール、オリーブ油等の植物油、エタノール等のアルコール類など）、懸濁剤あるいは乳濁剤として調製することもできる。そのような注射剤の無菌化は、フィルターによる濾過滅菌、殺菌剤の配合等により行うことができる。注射剤は、用時調製の形態として製造することができる。すなわち、凍結乾燥法などによって無菌の固体組成物とし、使用前に無菌の注射用蒸留水または他の溶媒に溶解して使用することができる。

なお、本発明は、腫瘍を治療及び／又は診断する医薬（薬剤）を製造するための、前記本発明の抗hTROP-2抗体及び／又は抗体-薬剤複合体の使用を提供するものでもある。また、本発明は、腫瘍を治療用及び／又は診断用の、前記本発明の抗hTROP-2抗体及び／又は抗体-薬剤複合体を提供するものでもある。

さらに、本発明は、前記本発明の抗hTROP-2抗体及び／又は抗体-薬剤複合体を用いる（すなわち患者に投与する）ことを特徴とする腫瘍の治療及び／又は診断方法を提供するものであり、また、腫瘍を治療及び／又は診断するための、前記本発明の抗hTROP-2抗体及び／又は抗体-薬剤複合体の使用を提供するものでもある。

6. 腫瘍の検出方法

本発明の腫瘍の検出方法は、前記本発明の抗hTROP-2抗体と、生体から採取された試料（以下、生体試料）とを反応させ、反応した抗体のシグナルを検出することを特徴とする方法である。

前述したように、hTROP-2は各種腫瘍細胞において特異的に発現することが

確認されているため、hTROP-2、特に遊離hTROP-2（hTROP-2の細胞外領域部分）は、各種腫瘍マーカーとして利用することが可能である。なかでも、ヒト膵癌、ヒト前立腺癌、ヒト大腸癌及びヒト乳癌のマーカーとして利用することが好ましい。

- 5 そこで、本発明の抗hTROP-2抗体を生体試料と反応させ、反応した抗体のシグナルを検出することにより、腫瘍を検出することができる。得られた抗体のシグナルは、生体試料中の抗原量（すなわちhTROP-2量又は遊離hTROP-2量）の指標となる。本発明の抗体を用いた腫瘍の検出は、まず、検体として被験者から採取した生体試料、例えば検査対象とする組織片又は血液等と、本発明の抗体と
- 10 を、抗原抗体反応によって結合させる。次いで、結合した抗体量の測定結果に基づいて、生体試料中の目的とする抗原量を測定することにより行う。当該測定は、公知の免疫学的測定法に従って行えばよく、例えば、免疫沈降法、免疫凝集法、標識免疫測定法、免疫比懸濁法、ウエスタンブロット法、フローサイトメトリー法などを用いることができる。標識免疫測定法では、抗体のシグナルは、標識抗体を用いて直接検出した標識量で表すほか、既知濃度あるいは既知抗体価の抗体を標準液として相対的に表してもよい。すなわち、標準液と検体を測定計により測定し、標準液の値を基準にして生体試料中の抗体シグナルを相対的に表すことができる。標識免疫測定法としては、例えばELISA法、EI法、RIA法、蛍光免疫測定(FIA)法、化学発光免疫測定法(Luminescence immunoassay)等が挙げら
- 15 れる。なかでも特に、ELISA法が、簡便かつ高感度という点で好ましい。
- 20

本発明においては、上記検出方法により得られた検出結果を指標として腫瘍の状態を評価又は診断することができる。例えば、検出結果が所定の基準値を超えるものを腫瘍陽性、所定の基準値以下のものを腫瘍陰性とし、陽性の場合には、いずれかの腫瘍を発症している可能性があると判断し、腫瘍の状態を評価することができる。ここで、腫瘍の状態とは、腫瘍の罹患の有無又はその進行度を意味し、腫瘍の発症の有無、進行度、悪性度、転移の有無及び再発の有無等が挙げられる。

25

上記評価にあたり、腫瘍の状態としては1つを選択してもよいし、複数個を組み合わせて選択してもよい。腫瘍の有無の評価は、得られた検出結果に基づいて、

所定の基準値を境界として腫瘍に罹患しているか否かを判断することにより行うことができる。腫瘍の悪性度は、癌がどの程度進行しているのかを示す指標となるものであり、検出結果に基づいて、病期(Stage)を分類して評価したり、あるいは早期癌や進行癌を分類して評価したりすることも可能である。例えば、検出結果を指標として早期癌又は進行癌であると評価することもできる。腫瘍の転移は、検出結果を指標として、原発巣の位置から離れた部位に新生物が出現しているか否かにより評価することができる。再発は、間欠期又は寛解の後に検出結果が再び所定の基準値を超えたか否かにより評価することができる。

10 7. 腫瘍の検出用又は診断用キット

本発明の抗hTROP-2抗体は、腫瘍の検出用又は診断用キットの形態で提供することができる。本発明のキットは抗体を含むが、その他に、標識物質、あるいは抗体又はその標識物を固定した固相化試薬などを含めることができる。抗体の標識物質とは、酵素、放射性同位体、蛍光化合物及び化学発光化合物等によって標識されたものを意味する。本発明のキットは、上記の構成要素のほか、本発明の検出を実施するための他の試薬、例えば標識物が酵素標識物の場合は、酵素基質（発色性基質等）、酵素基質溶解液、酵素反応停止液、あるいは検体用希釈液等を含んでいてもよい。また、各種バッファー、滅菌水、各種細胞培養容器、各種反応容器（エッペンドルフチューブ等）、ブロッキング剤（Bovine Serum Albumin (BSA), Skim milk, Goat血清等の血清成分）、洗浄剤、界面活性剤、各種プレート、アジ化ナトリウム等の防腐剤、及び実験操作マニュアル（説明書）等を含んでいてもよい。

本発明のキットは、上記本発明の検出方法を行うために有効に用いることができ、極めて有用性が高いものである

以下に、実施例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

〔実施例1〕

[hTROP-2 遺伝子のクローニング]

hTROP-2 遺伝子全長の単離は、ヒト胎児肝臓（胎生 10 週）から RT-PCR 法により行った。まず hTROP-2 遺伝子（Genbank accession No. NM_002353）の配列をもとに以下に示す PCR プライマーを設計した。

5

フォワード側プライマー： 5'-ttcctccgccccaccatggc-3'（配列番号 3）

リバーズ側プライマー： 5'-ctcgagcaagctcggttcctttctc-3'（配列番号 4）

このとき、リバーズ側プライマーにはストップコドンを除き、Xho I による制限酵素消化配列を付加した。これらのプライマーとヒト胎児肝臓（胎生 10 週）より調製した全 RNA (TAKARA)から合成した cDNA を鋳型として PCR 反応を行った。その後、アガロースゲル電気泳動による展開、目的のバンドの抽出を行い、pCRII ベクター(Invitrogen)にクローニングした(pCRII-hTROP2)。クローニングした hTROP-2 の cDNA はシークエンスにより確認した。

15 発現ベクターの構築は、pCRII-hTROP2 から hTROP-2 遺伝子を含む *Eco*RI/*Xho* I 断片を切り出し、pcDNA4/*myc*-His[®] A ベクター（Invitrogen）の *Eco*RI/*Xho* I 部位に挿入して行った（pcDNA4-hTROP2-*myc*/His）。また pcDNA4-hTROP2-*myc*/His から hTROP-2 遺伝子を含む *Hind* III/*Pme* I 断片を切り出し（*Hind* III 切断部位は平滑末端化した）、pcDNA3.1(+) ベクター（
20 Invitrogen）の *Pme* I 部位へ挿入することでネオマイシン耐性遺伝子を持つ発現ベクターを構築した（pcDNA3.1-hTROP2-*myc*/His）。

〔実施例 2〕

[hTROP-2 遺伝子安定細胞株の構築]

25 上記の方法で作製した hTROP-2 の全長 cDNA をコードした発現ベクター（pcDNA3.1-hTROP2-*myc*/His）を、HEK293 細胞（RIKEN）、HuH-7 細胞（HSRRB）、7E2-C 細胞（WO 2005/052156 に記載）、CHO-K1 細胞（HSRRB）にリポフェクタミン 2000 試薬 (Invitrogen) を用いて遺伝子導入し、抗生物質 G418 (geneticin, GIBCO BRL) による選択を行った後、hTROP-2 を安定して

発現している細胞株を樹立することにより得た。

〔実施例 3〕

[hTROP-2 細胞外領域のリコンビナントタンパク質作製]

- 5 hTROP-2 細胞外領域の一部（具体的には、配列番号 2 で示されるアミノ酸配列のうちの第 1 番目～第 263 番目のアミノ酸からなる領域）をコードする遺伝子断片は PCR 法により増幅した。増幅に使用したプライマーは以下の通りである。
- 10 フォワード側プライマー：5'-ttcctcgcgccaccatggc-3'（配列番号 3）
リバーズ側プライマー：5'-ctcgagctcgtccaggtaatagatgagcg-3'（配列番号 5）

- このとき、リバーズ側プライマーに Xho I による制限酵素消化部位を付加した。PCR 法により増幅した DNA 断片はアガロースゲル電気泳動により展開し、
- 15 QIAquick（登録商標）Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いて精製した。精製した DNA 断片は pCR Blunt ベクター（Invitrogen）にサブクローニングし（pCRB-hTROP-2 EC）、遺伝子配列を確認した。次に pCRB-hTROP-2 EC から hTROP-2 の細胞外領域をコードする遺伝子断片を含む *Eco* RI/*Xho* I 断片を切り出し、pcDNA4/*myc*-His[®] A ベクター（Invitrogen）の *Eco* RI/*Xho* I 部位に
- 20 挿入した（pcDNA4mH-hTROP-2 EC）。さらに pcDNA4mH-hTROP-2 EC の *Bam* HI/*Eco* RI 部位に *Nru* I 制限酵素切断部位を作製するため、以下に示すオリゴヌクレオチドを会合させ挿入した。

- オリゴヌクレオチド 1：5'-gatccactagtcgcgagtggtgg-3'（配列番号 6）
- 25 オリゴヌクレオチド 2：5'-aattccaccactcgcgactagt-3'（配列番号 7）

同様に pcDNA4mH-hTROP-2 EC の *Pme* I 部位に pBgl II リンカー（TAKARA）を挿入した（pcDNA4mH-NB-hTROP-2 EC）。バキュロウイルスを用いたリコンビナントタンパク質作製のため、pcDNA4mH-NB-hTROP-2

EC から hTROP-2 の細胞外領域をコードする遺伝子断片を含む *Nru* I/*Bgl* II 断片を切り出し、pPSC8 ベクター（日本農産工業）の *Nru* I/*Bgl* II 部位に挿入した（pPSC8-hTROP2 EC）。バキュロウイルスを用いた hTROP-2 細胞外領域のリコンビナントタンパク質作製は日本農産工業に委託した。

- 5 hTROP-2細胞外領域のリコンビナントタンパク質の精製は以下のように行った。リコンビナントタンパク質を含む培養上清にNi Sepharose 6 Fast Flow（GE Healthcare）を加え、4℃、2時間結合させた。その後、エコノカラム（BIO RAD）を用いて20mMイミダゾールを含むリン酸緩衝液で洗浄、300mMイミダゾールを含むリン酸緩衝液で溶出を行い精製した。

10

〔実施例 4〕

[ヒト EpCAM cDNA の単離と発現ベクターの構築]

- ヒト EpCAM 遺伝子全長の単離は、ヒト胎児肝臓（胎生 10 週）から RT-PCR 法により行った。まずヒト EpCAM 遺伝子（Genbank accession No. NM
15 002354）の配列をもとに以下に示す PCR プライマーを設計した。

フォワード側プライマー： 5'-tcctcgtgtccactcccgg-3'（配列番号 8）

リバーズ側プライマー： 5'-ctcgagtgcattgagttccctatgc-3'（配列番号 9）

- 20 このとき、リバーズ側プライマーにはストップコドンを除き、*Xho* I による制限酵素消化配列を付加した。これらのプライマーとヒト胎児肝臓（胎生 10 週）由来の全 RNA（TAKARA）から合成した cDNA を鋳型として PCR 反応を行った。その後、アガロースゲル電気泳動による展開、目的のバンドの抽出を行い、pCRII ベクター（Invitrogen）にクローニングした（pCRII-hEpCAM）。クローニ
25 グしたヒト EpCAM の cDNA はシーケンスにより確認した。

発現ベクターの構築は、pCRII-hEpCAM からヒト EpCAM 遺伝子を含む *Eco* RI/*Xho* I 断片を切り出し、pcDNA4/*myc*-His[®] A ベクター（Invitrogen）の *Eco* RI/*Xho* I 部位に挿入して行った（pcDNA4-hEpCAM-*myc*/His）。また pcDNA4-hEpCAM-*myc*/His からヒト EpCAM 遺伝子を含む *Hind* III/*Pme* I 断片

を切り出し (*Hind* III切断部位は平滑末端化した)、pcDNA3.1(+)ベクター (Invitrogen) の *Pme* I部位へ挿入することでネオマイシン耐性遺伝子を持つ発現ベクターを構築した (pcDNA3.1-hEpCAM-*myd*His)。

5 〔実施例5〕

〔抗 hTROP-2 モノクローナル抗体の作製〕

免疫原としては、hTROP-2 発現安定細胞株 (HEK293-hTROP-2 細胞、CHO-K1-hTROP-2 細胞、7E2-C-hTROP-2 細胞)、内在的に hTROP-2 タンパク質を細胞表面に発現している、ヒト膵臓癌細胞株 (PK-59, RCB1901; RIKEN cell bank より購入)、または上記の方法で作製した、hTROP-2 の細胞外領域のリコンビナントタンパク質を用いた。

hTROP-2発現安定細胞株の場合は 1×10^7 細胞、リコンビナントhTROP-2タンパク質の場合は、 $20 \mu\text{g}$ のタンパク質を、それぞれ免疫補助剤TiterMax Gold (フナコシ株式会社)と、1 : 1で混合してエマルジョンを調製し、マウス (C57/BL6, Balb/c) の両足蹠、または腹腔内に注射した (初回免疫)。両足蹠への短期免疫の場合は、初回免疫から3日後及び10日後に追加免疫を行い、最終免疫の翌日に、両膝膏リンパ節を採取し、リンパ球を調製した。腹腔内への長期免疫の場合は、初回免疫から1週間に1回の割合で、追加免疫を行い (1~2ヵ月間実施)、常法に従い、脾臓よりB細胞を単離した。追加免疫は、細胞免疫では 5×10^6 細胞のPBSによる細胞懸濁液を用い、タンパク質抗原の場合は、 $5 \mu\text{g}$ のPBS溶液を用いた。

調製したリンパ球とマウスミエローマ細胞株 (P3-X63-Ag8.653) とを、3 : 1の割合で混合し、ポリエチレングリコール法で細胞融合を行い、HAT (ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン) を含むメチルセルロース培地 (商品名: ClonaCell-HY Cloning Medium D; Stem Cell) で7~28日間培養し、増殖してきたハイブリドーマの単一コロニーを、1つ1つを96穴平底プレートにピックアップして、HATを含む液体選択培地を用い、5% CO₂インキュベーターで培養した。増殖してきた単一コロニー由来のハイブリドーマの培養上清を、Cell ELISA (後述) による一次スクリーニング、HuH-7-hTROP-2細胞、PK-59を用

いたFACS解析で2次スクリーニングを行うことで、生細胞の細胞表面に発現しているhTROP-2タンパク質を認識する抗hTROP-2 モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを300種類樹立した。

5 〔実施例6〕

[Cell ELISA を用いた一次スクリーニング]

96 穴培養プレート (BD フェルコン) に、CHO-K1 細胞 (hTROP-2 陰性コントロール: ヒューマンサイエンス振興事業団より購入) と CHO-K1-hTROP-2 細胞 (または、HuH-7 細胞 (hTROP-2 陰性コントロール: ヒューマンサイエンス振興事業団より購入) と HuH-7-hTROP-2 細胞) を 3×10^4 細胞/ウェルで交互に播種し、5% CO₂、37℃で1～2日間培養した。デカンテーションで細胞培養液を除去し、次いで、氷冷 PBS で洗浄後、4%パラホルムアルデヒド-PBS で5分間処理することにより細胞を固定し、氷冷 PBS で洗浄後 ELISA プレートとした。以後、常法に従い、ELISA 法を行った。具体的には以下のとおりである。

まず、2%スキムミルク-PBS溶液によるブロッキングを室温で30分～1時間行った。次に、ハイブリドーマ培養上清を加え、室温で1時間反応させた後、0.1% Tween20-PBS溶液で3回洗浄した。二次抗体として、ブロッキング溶液で1000倍希釈した、Horseradish peroxidase (HRP)標識抗マウスIgG (GEヘルスケアバイオサイエンス)を加え、室温で1時間反応させた後、0.1% Tween20-PBS溶液で3回洗浄した。TMB(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine: SIGMA)基質溶液を添加して発色反応を行い、1 M硫酸を加えて反応を停止させた。Microplate reader Model 550 (バイオ・ラッド)を用いて、吸光度 (405nm) を測定した。陰性コントロールに対して、高い吸光度の値を示したハイブリドーマ培養上清に対応するハイブリドーマを24穴平底プレートに拡大培養を行い、FACS解析を用いた二次スクリーニング (後述) に移行した。

〔実施例7〕

[FACS 解析を用いた二次スクリーニング]

上記の Cell ELISA を用いた一次スクリーニングで陽性であったハイブリドーマについて、FACS 解析を用いた二次スクリーニングを行った。細胞は、hTROP-2 を発現していないヒト肝癌細胞株である HuH-7 細胞を陰性コントロールとして、hTROP-2 を発現させた安定細胞株である HuH-7-hTROP-2 細胞に対する反応性を指標に評価し、次に内在的に hTROP-2 タンパク質を細胞表面に発現しているヒト膵臓癌細胞株である PK-59 細胞 (RCB1901; RIKEN cell bank より購入) との反応性で評価した。

細胞はトリプシン処理によって培養皿から剥がし、細胞懸濁液 (細胞密度 2×10^6 cells/mL) を調製した。Cell ELISA を用いた一次スクリーニングで陽性反応を示したハイブリドーマ培養上清と細胞懸濁液 $100 \mu\text{L}$ とを、 4°C で 20 分間反応させた。PBS で洗浄後、PE 標識抗マウス IgG (BD フェーミンゲン) ($0.1 \mu\text{g}$) と反応 (4°C , 30 分) させた後、FACSCalibur (ベクトンディッキンソン) により解析した。

最終的に、生細胞の細胞表面に発現している hTROP-2 タンパク質を認識する抗 hTROP-2 モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを約 300 種類樹立した。

[実施例 8]

[アイソタイプの同定]

20 作製した抗 hTROP-2 モノクローナル抗体のアイソタイプは、MOUSE MONOCLONAL ANTIBODY ISOTYPING TEST KIT (Serotec 社) を用いて、キット添付の方法に従って行った。

[実施例 9]

25 [TROP-2 抗体の腹水化及び抗体精製]

上記方法で作製したハイブリドーマのクローンを、予め (7 日前) 2,6,10,14-テトラメチルペンタデカン (プリスタン) を投与された BALB/cヌードマウスの腹腔内に 3×10^6 個投与し、2 週間後の腹水を採取した。さらに、この腹水から、カプリル酸沈澱、プロテイン G カラム (HiTrap protein G; GEヘルスケアバイ

オサイエンス)、またはプロテインAカラム (HiTrap protein A ; GEヘルスケアバイオサイエンス) を用いてアフィニティー精製を行うことで、各ハイブリドーマクローンが産生する抗hTROP-2モノクローナル抗体を得た。

5 〔実施例10〕

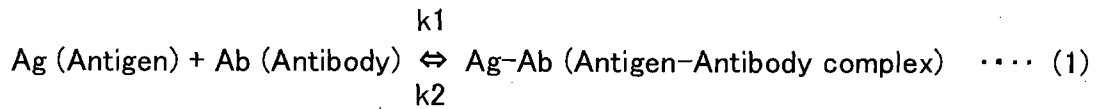
[抗原親和性の測定 (Kd 値の測定)]

作製した抗hTROP-2モノクローナル抗体の抗原親和性 (Kd値)は、ELISA を用いた方法で算出した (Djavadi-Ohanian L. et al (1996), In Antibody Engineering, Chapter 4, pp77-97. IRL Press, Oxford) 。

- 10 具体的には、96穴培養プレート(コーニング)に、精製したリコンビナント hTROP-2タンパク質 (0.1 μ g/mL) を添加して抗原を固相化した (室温, 1時間、または4℃, 一晚)。次に、PBSで3回洗浄し、2% スkimミルク (PBS溶液) を加えてブロッキングを行った (室温, 1時間)。PBSで2回洗浄後、予め抗原溶液 (精製hTROP-2タンパク質 ; 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 nM) と抗hTROP-
- 15 2モノクローナル抗体の各クローン (0.5nM) とを混合し平衡化させておいた抗原-抗体複合体を、上記ELISAプレートに添加して反応させた (室温, 1時間)。PBSで3回洗浄した後、ブロッキング液で希釈したHRP標識抗マウスIgG (最終濃度1 μ g/mL) (GEヘルスケアバイオサイエンス) と反応させた (室温, 1時間) 。次いで、0.1%Tween20-PBS溶液で3回洗浄した後に、TMB(3,3',5,5'-
- 20 tetramethylbenzidine: SIGMA)基質溶液を添加して発色反応を行い、1 M硫酸を加えて反応を停止させた。Microplate reader Model 550 (パイオ・ラッド)を用いて、吸光度を測定した。

解離定数(Kd)の計算式は以下の通りとした。

抗原抗体反応は質量作用の法則により、



$$5 \quad K_d = k_2/k_1 = \text{Agf} \times \text{Abf} / \text{Ag-Ab} = \text{Agf} \times \text{Abf} / x \cdots (2)$$

(2)式で、Agf は遊離抗原の濃度、Abf は遊離抗体の濃度、Ag-Ab は抗原-抗体複合体の濃度を表し、Ag-Ab = x とおくと、遊離抗体濃度は、

$$10 \quad \text{Abf} = \text{Abt} - x \cdots (3)$$

(2)式は、

$$K_d = \text{Agf} \times (\text{Abt} - x) / x \cdots (4)$$

15

(4)式の両項に $x / K_d \times \text{Abt}$ をかけると、

$$x / \text{Abt} = \text{Agf} \times (1 - x/\text{Abt}) \times 1/K_d$$

$$x/\text{Abt} \times 1/\text{Agf} = (1 - x/\text{Abt}) \times 1/K_d \cdots (5)$$

20

(5)式において、 $X = x/\text{Abt}$ 、 $Y = x/\text{Abt} \times \text{Agf}$ とおくと、

$$Y = (1 - X) \times 1/K_d \cdots (6)$$

25 (6)式から、 K_d 値を算出した。

上記の方法で、作製した抗 hTROP-2 モノクローナル抗体 300 クローンの K_d 値を測定した結果、 1×10^{-10} (M)以下の K_d 値を示すクローンが 133 クローン、 1×10^{-11} (M)以下の K_d 値を示すクローンが 59 クローン、 1×10^{-12} (M)以下の

Kd 値を示すクローンが 2 クローンであった。

*in vivo*で腫瘍成長阻害活性を示した、抗hTROP-2モノクローナル抗体のうち、K5-70 (マウスIgG2a)、T6-16 (マウスIgG2a)、K5-107 (マウスIgG1)、K5-116-2-1 (マウスIgG2a)、及びT5-86 (マウスIgG1)のKd値は、それぞれ順に、 6.8×10^{-12} (M)、 4.3×10^{-12} (M)、 4.7×10^{-12} (M)、 2.69×10^{-11} (M)、及び 8.49×10^{-11} (M)であった (図 1、表 1)。

表 1

抗hTROP-2モノクローナル抗体のKd値

Clone No.	K5-70	T6-16	K5-107	K5-116-2-1	T5-86
Kd ($\times 10^{-12}$ M)	6.8	4.3	4.7	26.9	84.9

〔実施例 1 1〕

15 [抗 hTROP-2 モノクローナル抗体のヒト癌細胞株との反応性]

ヒト癌細胞株 (ヒト腫瘍細胞株) は、ヒューマンサイエンス振興事業団 (HSRRB)、RIKEN cell bank (RIKEN)、ATCC (American Type Culture Collection)、ECACC (European Collection of Cell Cultures)、DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures)より入手したものを使用した。

20 具体的には、以下に列挙した通りである。

huH-1 (HSRRB), HUH-6 (HSRRB), HuH-7 (HSRRB), JHH-5 (HSRRB), JHH-6 (HSRRB), JHH-7(HSRRB), HLE (HSRRB), HLF (HSRRB), HepG2 (HSRRB), Alexander (HSRRB), KP-1N (HSRRB), KP-1NL (HSRRB), KP-2 (HSRRB), KP-3 (HSRRB), KP-3L (HSRRB), PK-1 (RIKEN), PANC-1 (RIKEN), MIA PaCa-2 (HSRRB), PK-59 (RIKEN), PK-45H (RIKEN), PK-45P (RIKEN), BxPC-3 (ATCC), SUIT-2 (HSRRB), TCC-PAN2 (HSRRB), SW480 (ATCC), DLD-1 (HSRRB), LoVo (HSRRB), COLO-320 (RIKEN), CACO-2 (RIKEN), CW-2 (RIKEN), HCT 116 (ATCC), HCC-56 (HSRRB), MCF-7 (HSRRB),

JIMT-1 (DSMZ), HCC1143 (ATCC), A549 (HSRRB), DU145 (RIKEN), PC-3 (HSRRB)

5 癌細胞はトリプシン処理によって培養皿から剥がし、細胞懸濁液（細胞密度 2×10^6 cells/mL）を調製した。細胞懸濁液 100 μ L に抗 hTROP-2 モノクローナル抗体を加え（0.1 μ g）、4℃で 20 分間反応させた。PBS で洗浄後、PE 標識抗マウス IgG (BD ファーミングエン)（0.1 μ g）と反応（4℃、30 分）させた後、FACSCalibur (ベクトンディッキンソン)により解析した。

10 作製した抗 hTROP-2 抗体は、いずれも内在的に hTROP-2 を発現していないヒト肝癌細胞株 HuH-7 とは結合せず、一方 hTROP-2 遺伝子を発現させた安定細胞株である HuH-7-hTROP-2 細胞には結合を示した（図 2）。次に、作製した抗 hTROP-2 モノクローナル抗体のヒト癌細胞株（内在的に細胞表面に発現している hTROP-2 タンパク質）との反応性を FACS 解析により検討した結果、作製した 300 種類の抗 hTROP-2 モノクローナル抗体は、全て、ヒト膵臓癌細胞株（PK-59、BxPC-3）との結合を示し、特に、*in vivo* で腫瘍成長阻害活性を示した、K5-70, T6-16, K5-107, K5-116-2-1, T5-86 抗体は、PE 標識抗マウス IgG (BD ファーミングエン)のみと反応させた場合と比較して、PK-59 細胞では、平均蛍光強度で K5-70 (44 倍)、T6-16 (59 倍)、K5-107 (89 倍)、K5-116-2-1 (122 倍)、T5-86 (15 倍)（図 3）、BxPC-3 細胞では、K5-70 (45 倍)、T6-16 (25 倍)、K5-107 (90 倍)、K5-116-2-1 (121 倍)、T5-86 (10 倍) と、いずれの抗体も高い結合を示した（図 4）。

PK-59とBxPC-3以外のヒト癌細胞株では、膵臓癌細胞株12種類のうち、KP-2, KP-3L, PK-1, PK-45H, SUIT-2, TCC-PAN2に結合し、KP-1N, KP-1NL, KP-3, PANC-1, MIA-PaCa2には結合しなかった（図 5）。ヒト大腸癌細胞株では、CACO-2, SW480, DLD-1, HCT 116に結合し、COLO-320, CW-2には結合しなかった（図 6）。その他、JIMT-1, HCC1143（いずれもヒト乳癌細胞株）、PC-3, DU145（いずれもヒト前立腺癌細胞株）と結合し、多くのヒト癌細胞株の細胞表面に内在的に発現しているhTROP-2タンパク質を認識した（図 6）。

〔実施例 1 2〕

[マウス TROP-2 タンパク質、ヒト TROP-1/EpCAM タンパク質との交差反応性]

作製した抗 hTROP-2 モノクローナル抗体の特異性を調べる目的で、hTROP-2 タンパク質とアミノ酸配列で 80%の相同性を示すマウス TROP-2 タンパク質、hTROP-2 タンパク質とアミノ酸配列で 50%の相同性を示すヒト TROP-1/EpCAM との反応性を FACS 解析にて行った。

具体的には、マウス TROP-2 遺伝子 (GenBank accession No. NM_020047、Y08830) の全長 cDNA を含む発現ベクター (マウス TROP-2-pcDNA3.1(+), 東京大学・分子細胞生物学研究所より供与)、およびヒト TROP-1/EpCAM 遺伝子 (GenBank accession No. NM_002354) の全長 cDNA を含む発現ベクター (pcDNA3.1-hEpCAM-myc/His) を、それぞれ Lipofectamine2000 試薬 (Invitrogen) を用いて、一過性に CHO-K1 細胞に遺伝子導入を行い、24~48 時間後に細胞をトリプシン処理で培養皿から剥がして細胞懸濁液を調整し、作製した抗 hTROP-2 モノクローナル抗体 (0.1 μ g)、PE 標識抗マウス IgG と順次反応させた後、FACSCalibur により解析した。

マウス TROP-2 遺伝子を一過性に発現させた CHO-K1 細胞において、陽性対照として用いたマウス TROP-2 と交差反応を示す T2-102 抗体 (マウス IgG1) は強い結合を示し、一方、K5-70, T6-16, K5-107, K5-116-2-1, T5-86 抗体はマウス TROP-2 との交差反応は示さなかった (図 7)。

同様に、ヒト EpCAM/TROP-1 遺伝子を一過性に発現させた CHO-K1 細胞において、陽性対照として用いた抗ヒト EpCAM モノクローナル抗体 (BD フェーミンジェン) は強い結合を示し、一方、K5-70, T6-16, K5-107, K5-116-2-1, T5-86 抗体はヒト EpCAM/TROP-1 との交差反応は示さなかった (図 8)。

以上の結果は、作製した抗hTROP-2モノクローナル抗体、特に*in vivo*で抗腫瘍活性を示したK5-70, T6-16, K5-107, K5-116-2-1, T5-86抗体は、hTROP-2に特異的に結合することが示された。

〔実施例 1 3〕

[細胞増殖阻害活性の測定]

抗 hTROP-2 モノクローナル抗体の hTROP-2 の機能阻害を調べる方法の 1 つとして、内在的に hTROP-2 を細胞表面に発現しているヒト癌細胞の細胞増殖に対する影響を、テトラカラーワン（生化学工業）を用いた生細胞数の測定に基づいて評価した。具体的には、PK-59 細胞を 0.5% のウシ胎児血清（BioWest 社製）を含む RPMI1640 培地に 2×10^5 細胞/mL の細胞濃度となるように細胞懸濁液を調製し、96 穴培養プレートに 100 μ L ずつ播種した。次いで、マウス IgG（陰性コントロール）、抗 hTROP-2 モノクローナル抗体（最終濃度 0.1, 1 μ g/mL）を添加し、37℃、5% CO₂ インキュベーターで 72 時間培養した。比較対照として、市販の抗 hTROP-2 モノクローナル抗体（クローン YY01, Santa Cruz）を使用した。細胞にテトラカラーワン（生化学工業）を添加し、5% CO₂ インキュベーターで 1~2 時間反応させた。反応後の 96 穴プレートを、そのままマイクロプレートリーダーを用いて波長 490nm（対照波長：655nm）の吸光度を測定した。各群 3 ウェルで実施し、Student's t 検定（Student's t-test）で有意差検定を行い、 $P < 0.05$ を統計的に有意と判定した。

これまでに自社で作製した抗 hTROP-2 モノクローナル抗体のうち、約 160 クローンについて、上記の方法で PK-59 細胞の細胞増殖に与える効果を調べたところ、*in vivo* で腫瘍成長阻害活性を示した、T6-16, T5-86, K5-70, K5-107 は、マウス IgG（陰性コントロール）と比較して、20%~40% の細胞増殖阻害活性が確認され、これら抗 hTROP-2 抗体は、ヒト癌細胞表面に発現する hTROP-2 タンパク質に結合し、hTROP-2 タンパク質の機能を中和し、癌細胞の増殖を阻害する活性を有することが明らかとなった（図 9）。

[実施例 14]

25 [スクラッチアッセイ]

抗 hTROP-2 モノクローナル抗体のヒト癌細胞の移動能をスクラッチアッセイで評価した。PK-59 細胞を 10% のウシ胎児血清を含む RPMI1640 培地に 3×10^5 cell/mL の細胞濃度となるように細胞懸濁液を調製し、96 穴培養プレートに 100 μ L ずつ播種した。細胞がコンフルエントに達した段階で、チップの先端

で縦に線を引くようにして単層培養した細胞の一部を剥離した。抗 hTROP-2 モ
ノクローナル抗体、および陰性コントロールとしてマウス IgG を最終濃度が 0.1、
および 1 μ g/mL となるように培地に添加し、24 時間培養を行い、抗体添加前
(Day 0)と 24 時間培養後 (Day 1) の剥離した領域の写真を撮影し、細胞間距離
5 を測定した。また、剥離領域の面積を Scion Image ソフトウェアで定量化した。
各群 8 ウェルで実施し、Student's t-test で有意差検定を行い、 $P < 0.05$ を統計
的に有意と判定した。

スクラッチ領域に浸潤する細胞の運動能に対する hTROP-2 抗体の効果を調べ
た。細胞増殖阻害アッセイと同様に薬効のあった抗体を評価した。評価方法とし
10 て、Day0(抗体添加時)およびDay1(24時間経過後)の細胞を撮影し、移動距離(μ
m)および、スクラッチ領域の面積を画像解析した。結果、図 10 に示すように、
細胞の運動能に明らかな違いが見られた。本試験に使用した T6-16 および K5-70
はコントロールと比較し、どちらも有意な増殖阻害が見られ、再現性試験におい
ても同様の傾向が確認できた。特に T6-16 については $P < 0.01$ (by Student's t-
15 test) であり、*in vivo* の試験との相関性が認められた。

〔実施例 15〕

〔担癌マウスでの抗 hTROP-2 モノクローナル抗体の薬効評価〕
prevention モデル

20 hTROP-2 を発現する膵癌細胞株 (PK-59, BxPC-3) をトリプシン処理で剥が
し、PBS で 1×10^8 cells/mL の細胞懸濁液を調製し、氷上にて等量のマトリゲル
(BD ファーミンゲン) と混合した。6 週齢の雌のヌードマウス (Balb/c, nu/nu
) の右脇腹の皮下に 26 G のシリンジを用いて 100 μ L (5×10^6 cell) 注射した。
癌細胞移植当日 (Day 1) に、マウスを群分し、抗体の投与 (1, 5, または 10
25 mg/kg 体重、腹腔内投与) を開始した。以降は、3 日に 1 回の間隔で同様の投与
を行った。抗腫瘍活性は、腫瘍形成頻度及び腫瘍体積により評価した。腫瘍体積
の計測は、以下の計算式を用いた。

$$\text{腫瘍体積}(\text{mm}^3) = (\text{短径})^2 \times (\text{長径}) \times \pi / 6$$

treatment モデル

hTROP-2を発現する膵癌細胞株 (PK-59, BxPC-3) をトリプシン処理で剥がし、PBSで 1×10^8 cells/mLの細胞懸濁液を調製し、氷上にて等量のマトリゲル (BDファーマーゲン) と混合した。6 週齢の雌のヌードマウス (Balb/c, nu/nu) の右脇腹の皮下に26 Gのシリンジを用いて $100 \mu\text{L}$ (5×10^6 cells) 注射した。癌細胞移植から5~6日後、腫瘍体積が $50 \sim 150 \text{ mm}^3$ (平均値で約 100 mm^3) に成長したマウスを群分し、群分した当日を1日目 (Day 1) として、抗体投与を開始した。抗体は3日に1回の間隔で腹腔内投与を行った (10 mg/kg 体重)。抗腫瘍活性は、腫瘍体積を計測することによって評価した。有意差検定は、Student's t-testで行い、 $P < 0.05$ を統計的に有意と判定した。

〔実施例 16〕

[ヒト膵癌細胞 xenograft モデルにおける抗 hTROP-2 モノクローナル抗体の *in vivo* における抗腫瘍活性の検討]

hTROP-2 を標的とした癌治療用抗体は、xenograft treatment モデルにおいて、hTROP-2 を発現する腫瘍組織を特異的に死滅させるか、腫瘍の成長を阻害する活性を示すことが必須である。

本発明において新たに作製した抗 hTROP-2 モノクローナル抗体(約 160 クローン)を、膵癌細胞株 PK-59 細胞の xenograft treatment モデルで評価した。PK-59 細胞は、膵臓癌幹細胞マーカーである EpCAM を発現し (図 11A) (Chenwei Li, et al. Cancer Res 2007; 67: (3). 1030-1037), 薬剤耐性に関わる ABC トランスポーターである P-glycoprotein/MDR1 (図 11B) , ABCG2/CDw338 (図 11C)を細胞表面に発現している (Chen,C.J. et al. Cell 47 (3), 381-389 (1986), Allikmets,R., et al. Hum. Mol. Genet. 5 (10), 1649-1655 (1996)。また、膵臓癌幹細胞の特徴である CD24 と CD44 共陽性の細胞画分 (8.93%) (図 11D)を含み、悪性度の高いヒト膵臓癌細胞株であると推測される(Chenwei Li, et al. Cancer Res 2007; 67: (3). 1030-1037, Jane E. Visvader and Geoffrey J. Lindeman.Nat Rev Cancer. Vol.8(10):755-68, 2008)。

新規に作製した約 160 クローンのうち、大部分のクローンは PK-59 細胞 xenograft treatment モデルでは薬効を示さなかったが、その中でも有意な腫瘍成長阻害活性を示す以下のクローン、すなわちクローン K5-70, T6-16, K5-107, T5-86 及び K5-116-2-1 が得られた。

- 5 クローン K5-70 (マウス IgG2a) 投与群では、腫瘍成長速度が統計的に有意に阻害され、投与開始後 21 日目(Day 21)において、コントロール群 (N=14) の腫瘍体積が $1200.8 \pm 377.3 \text{ mm}^3$ に対し、クローン K5-70 投与群では $748.7 \pm 175.0 \text{ mm}^3$ ($P < 0.01$ by Student's t-test) であった (図 12A)。抗体投与開始時点での腫瘍体積を 1.0 としたときの、21 日目(Day 21)における腫瘍体積は、
- 10 コントロール群が 12.5 であるのに対し、クローン K5-70 投与群では 7.8 であった (図 12A)。摘出した腫瘍重量も、コントロール群が $0.73 \pm 0.26 \text{ g}$ であったのに対し、クローン K5-70 投与群では $0.43 \pm 0.14 \text{ g}$ ($P < 0.01$ by Student's t-test) であり、約 60%の阻害を示した (図 12B)。

- 同様に、クローン K5-107(マウス IgG1) 投与群(N=8)、クローン T6-16 (マウス IgG2a) 投与群(N=8)、クローン T5-86(マウス IgG1) 及びクローン K5-116-2-1 (マウス IgG2a) 投与群(N=8)でも、腫瘍成長速度が統計的に有意に阻害された。
- 15 クローン K5-107 投与群 (N=8) 並びにクローン T6-16 投与群 (N=8) では、投与開始後 17 日目(Day 17)において、コントロール群 (N=8) の腫瘍体積が $1039.3 \pm 271.6 \text{ mm}^3$ に対し、それぞれ $698.2 \pm 175.9 \text{ mm}^3$ ($P < 0.05$ by Student's t-test)、 $707.2 \pm 254.5 \text{ mm}^3$ ($P < 0.05$ by Student's t-test) であった。
- 20 同様に、クローン K5-116-2-1 投与群 (N=8) では、投与開始後 16 日目(Day 16)において、コントロール群 (N=8) の腫瘍体積が $797.0 \pm 172.9 \text{ mm}^3$ に対し、 $508.5 \pm 225.2 \text{ mm}^3$ ($P < 0.05$ by Student's t-test) であった (図 13)。

- 一方、クローン T5-86 については、投与開始後 15 日目(Day 15)において、
- 25 コントロール群 (N=8) の腫瘍体積が $1033.2 \pm 319.4 \text{ mm}^3$ に対し、クローン T5-86 投与群 (N=8) では $744.1 \pm 289.1 \text{ mm}^3$ であり、腫瘍体積の比較では有意差はつかなかったものの、同日における腫瘍重量の比較では、コントロール群が $0.62 \pm 0.14 \text{ g}$ であったのに対し、クローン T5-86 投与群では $0.44 \pm 0.13 \text{ g}$ ($P < 0.05$ by Student's t-test) であり有意な阻害が示された。

また、下記表 2 に、各クローン抗体投与群の実験最終日におけるコントロール群との比率(T/C)を、腫瘍体積および腫瘍重量のそれぞれについて示した。表 2 に示した通り、各クローン抗体投与群において、それぞれ T/C=62~72%の有意な阻害が得られた。

5

表 2

群	N(個体数)	腫瘍体積 T/C (%)	腫瘍重量 T/C (%)
K5-70	14	62.3 **	58.8 **
K5-107	8	67.2 *	65.0 *
T6-16	8	68.0 *	64.7 *
T5-86	8	72.0	70.5 *
K5-116-2-1	8	63.8 *	60.5 *

* P < 0.05, ** P < 0.01 (by Student's t-test)

10

15

20

25

また、クローン K5-70、クローン T6-16、クローン K5-116-2-1 について、それぞれ腭癌細胞株 PK-59 細胞の xenograft prevention モデルでの抗腫瘍活性を検討した。それぞれのクローンにおいて、抗体投与後全ての個体で (N=8) 腫瘍成長が阻害され、クローン K5-70 投与群 (10 mg/kg 体重) では、投与開始後 18 日目 (Day 18) において、コントロール群 (N=8) の腫瘍体積が $880.8 \pm 206.4 \text{ mm}^3$ に対し、 $62.4 \pm 80.4 \text{ mm}^3$ ($P < 0.01$ by Student's t-test) と 92.9%の腫瘍成長阻害活性を示し、クローン T6-16 投与群 (10 mg/kg 体重) では、投与開始後 28 日目 (Day 28) において、コントロール群 (N=8) の腫瘍体積が $992.3 \pm 250.8 \text{ mm}^3$ に対し、 $152.14 \pm 122.3 \text{ mm}^3$ ($P < 0.01$ by Student's t-test) と 84.6%の腫瘍成長阻害活性、クローン K5-116-2-1 投与群 (10 mg/kg 体重) では、クローン K5-116-2-1 投与群 (10 mg/kg 体重) では、投与開始後 20 日目 (Day20) において、コントロール群 (N=8) の腫瘍体積が $1159.4 \pm 413.3 \text{ mm}^3$ に対し、 $207.7 \pm 319.2 \text{ mm}^3$ ($P < 0.01$ by Student's t-test) と 82.1%の腫瘍成長阻害活性を示した (図 14, 表 3)。また、すべての実験において、試験期間を

通じて、コントロール群と抗 hTROP-2 抗体投与群の間に、平均体重の変化に有意な差はなかった。

下記表 3 に、各クローン抗体投与群の、実験最終日におけるコントロール群との比率(T/C)を、腫瘍体積および腫瘍重量それぞれについて示した。表 3 に示したとおり、各クローン抗体投与群において、有意な腫瘍成長阻害が見られ、特にクローン K5-70 投与群では、T/C=10%以下の顕著な効果が確認された。

表 3

群	N(個体数)	腫瘍体積 T/C (%)	腫瘍重量 T/C (%)
K5-70	8	7.1 **	5.8 **
T6-16	8	15.3 **	10.5 **
K5-116-2-1	8	23.2 **	21.5 **

** P < 0.01 (by Student's t-test)

公知の抗 TROP-2 抗体 AR47A6.4.2 (米国特許第 7420041 号) は、様々なヒト癌細胞株を用いた 20 mg/kg の投与量で、xenograft prevention モデルで腫瘍成長阻害効果を示しているが、ヒト膵臓癌細胞株 PL45 細胞では、ほぼ 100%の腫瘍成長を阻害しているものの、膵臓癌細胞株 BxPC-3 では約 50%、前立腺癌細胞株 PC-3 では約 40%、乳癌細胞株である MCF-7 では約 60%、大腸癌細胞株 Colo205 で約 40%の腫瘍成長阻害効果であったことに対して、本願発明の抗 hTROP-2 抗体は、半分の投与量(10 mg/kg 体重)で、より強い腫瘍成長阻害効果を発揮した。

〔実施例 17〕

〔ヒト膵臓癌細胞株 BxPC-3 細胞の xenograft モデル (prevention モデルおよび treatment モデル) における抗腫瘍活性の検討〕

上記のヒト膵臓癌細胞株 PK-59 細胞の xenograft treatment モデルを用いた場合と同様に、ヒト膵臓癌細胞株 BxPC-3 細胞の xenograft prevention モデル及び xenograft treatment モデルでの抗腫瘍活性を、クローン K5-70 について検討し

た。

クローン K5-70 投与群(N=8)では、コントロール群 (N=8) と比較して、腫瘍成長が有意に阻害され、 52 日目(Day 52)において、コントロール群 (N=8) の腫瘍体積が $616.3 \pm 266.8 \text{ mm}^3$ であったのに対し、クローン K5-70 投与群 (N=8) では $236.0 \pm 136.4 \text{ mm}^3$ と 61.7%の腫瘍成長阻害効果を示した ($P < 0.01$ by Student's t-test) (図 15)。

以上の結果より、抗hTROP-2モノクローナル抗体は、少なくとも2つ以上の複数の癌細胞種に対して、*in vivo*での有意な腫瘍成長阻害活性を示すことが明らかとなった。

10

[実施例 18]

[抗 hTROP2 抗体 (クローン K5-70) の、hTROP2 発現膀胱癌細胞株 (PK-59 細胞) xenograft prevention モデルにおける用量依存的な抗腫瘍活性]

抗hTROP-2抗体の*in vivo*における腫瘍成長阻害活性を、より詳細に検討する目的で用量依存性試験を行った。図16に示したとおり、PK-59細胞の腫瘍の成長はK5-70抗体の投与によって用量依存的に阻害され、抗体投与後21日目(Day 21)において、コントロール群 (N=8)の腫瘍体積が $937.8 \pm 295.3 \text{ mm}^3$ であったのに対し、K5-70抗体 (1 mg/kg 体重) 投与群 (N=8) が $493.5 \pm 305.1 \text{ mm}^3$ と50%の阻害率を示し、K5-70抗体 (5mg/kg 体重) 投与群 (N= 8) が $124.7 \pm 89.0 \text{ mm}^3$ と90%の阻害効果を示し、公知の抗TROP-2抗体AR47A6.4.2 (米国特許第7420041号) と比較して、20分の1の投与量でほぼ同等の*in vivo*における腫瘍成長阻害効果を示し、4分の1の投与量では、より高い90%の阻害効果を示すことが明らかになった。

25 [実施例 19]

[エピトープアッセイ]

ヒト/マウスキメラ TROP-2 タンパク質の作製

ヒト/マウスキメラ TROP-2 遺伝子は PCR 法を用いて作製した。ヒト TROP-2 遺伝子配列およびマウス TROP-2 遺伝子配列 (Genbank accession No.

NM_020047) をもとに以下に示す PCR プライマーを設計した。

ヒト/マウス TROP-2-C プライマー

Y606 (フォワード側) : 5'-cctgagcctacgctgcgacgaagtggcg-3' (配列番号 10)

5 Y607 (リバーズ側) : 5'-cgcaccacttcgtgcagcgtaggctcagg-3' (配列番号 11)

ヒト/マウス TROP-2-A プライマー

Y612 (フォワード側) : 5'-gactgtccacgctgacttccaagtgcctg-3' (配列番号 12)

Y613 (リバーズ側) : 5'-caggcacttggaagtcagcgtggagcagtc-3' (配列番号 13)

10

ヒト/マウス TROP-2-B プライマー

Y614 (フォワード側) : 5'-ctcgtggacaacgatggcctctacgacccg-3' (配列番号 14)

Y615 (リバーズ側) : 5'-cgggtcgtagaggccatcgtgtccacgag-3' (配列番号 15)

15 マウス/ヒト TROP-2-D プライマー

Y608 (フォワード側) : 5'-ccaaagcctgcgctgcgatgagctggcg-3' (配列番号 16)

Y609 (リバーズ側) : 5'-gcgcaccagctcatgcagcgcaggttgg-3' (配列番号 17)

マウス/ヒト TROP-2-E プライマー

20 Y616 (フォワード側) : 5'-agcttcctatccgcggtgcactacgagcag-3' (配列番号 18)

Y617 (リバーズ側) : 5'-ctgctcgtagtgaccgcgcataggaagct-3' (配列番号 19)

マウス/ヒト TROP-2-F プライマー

Y618 (フォワード側) : 5'-gacattaaaggcgagtctctattccagggc-3' (配列番号 20)

25 Y619 (リバーズ側) : 5'-gccctggaatagagactgcctttaatgtc-3' (配列番号 21)

マウス TROP-2 プライマー

フォワード側 : 5'-ctactccacccaccctggcg-3' (配列番号 22)

リバーズ側 : 5'-ctcgagcaagctaggttcgttctc-3' (配列番号 23)

マウス TROP-2 リバース側プライマーにはストップコドンを除き、*Xho*I による制限酵素消化配列を付加した。作製したヒト/マウスキメラ TROP-2 タンパク質の模式図を図 17 に示す。

- 5 hmTROP-2-A キメラタンパク質は、hTROP-2 タンパク質の N 末端から 69 番目までのポリペプチドとマウス TROP-2 タンパク質の 64 番目から C 末端までのポリペプチドから成るキメラタンパク質である。hmTROP2-B キメラタンパク質は、hTROP-2 タンパク質の N 末端から 101 番目までのポリペプチドとマウス TROP-2 タンパク質の 96 番目から C 末端までのポリペプチドから成るキ
- 10 メラタンパク質である。hmTROP2-C キメラタンパク質は、hTROP-2 タンパク質の N 末端から 145 番目までのポリペプチドとマウス TROP-2 タンパク質の 140 番目から C 末端までのポリペプチドから成るキメラタンパク質である。
- 15 mhTROP-2-D キメラタンパク質は、マウス TROP-2 タンパク質の N 末端から 139 番目までのポリペプチドと hTROP-2 タンパク質の 146 番目から C 末端までのポリペプチドから成るキメラタンパク質である。mhTROP-2-E キメラタン
- 20 パク質は、マウス TROP-2 タンパク質の N 末端から 187 番目までのポリペプチドと hTROP-2 タンパク質の 194 番目から C 末端までのポリペプチドから成るキメラタンパク質である。mhTROP-2-F キメラタンパク質は、マウス TROP-2 タンパク質の N 末端から 227 番目までのポリペプチドと hTROP-2 タンパク質
- 25 の 234 番目から C 末端までのポリペプチドから成るキメラタンパク質である。

上記キメラタンパク質を作製するための発現ベクターは、具体的には以下の方法で構築した。hmTROP-2-A キメラ遺伝子を作製するため hTROP-2 遺伝子を鋳型にして、hTROP-2 フォワード側プライマー及びヒト/マウス TROP-2-A プライマー Y613 を用いて PCR を行った。同様にマウス TROP-2 遺伝子を鋳型に

25 して、ヒト/マウス TROP-2-A プライマー Y612 及びマウス TROP-2 リバース側プライマーを用いて PCR を行った。PCR により増幅した DNA 断片はアクリルアミドゲルを用いて展開、目的バンドの抽出により回収した。次に抽出した 2 種類の DNA 断片を混合して鋳型とし、hTROP-2 フォワード側プライマー及びマウス TROP-2 リバース側プライマーを用いて PCR を行った。PCR 産物はア

ガロースゲル電気泳動により展開し、目的の DNA 断片を抽出した。抽出した DNA 断片は pCR (登録商標) -Blunt ベクター (Invitrogen) にクローニングし (pCRB-hmTROP-2-A)、遺伝子配列を確認した。動物細胞用発現ベクターは、pcDNA3.1-hTROP-2-*myc*/His から Eco RI/Xho I 消化により hTROP-2 遺伝子を
 5 除き、pCRB-hmTROP-2-A から調製した hmTROP-2-A キメラ遺伝子を含む Eco RI/Xho I 断片を挿入することで作製した (pcDNA3.1-hmTROP-2-A-*myc*/His)。その他 hmTROP-2-B (ヒト TROP-2 フォワード側プライマー、ヒト/マウス TROP-2-B プライマー Y615、ヒト/マウス TROP-2-B プライマー Y614 及びマウス TROP-2 リバース側プライマーを使用)、hmTROP-2-C (ヒ
 10 ト TROP-2 フォワード側プライマー、ヒト/マウス TROP-2-C プライマー Y607 及びヒト/マウス TROP-2-C プライマー Y606、マウス TROP-2 リバース側プライマーを使用)、mhTROP-2-D (マウス TROP-2 フォワード側プライマー、マウス/ヒト TROP-2-D プライマー Y609 及びマウス/ヒト TROP-2-D プライマー Y608、ヒト TROP-2 リバース側プライマーを使用)、mhTROP-2-E (マウス
 15 TROP-2 フォワード側プライマー、マウス/ヒト TROP-2-E プライマー Y617 及びマウス/ヒト TROP-2-E プライマー Y616、ヒト TROP-2 リバース側プライマーを使用)、mhTROP-2-F (マウス TROP-2 フォワード側プライマー、マウス/ヒト TROP-2-F プライマー Y619 及びマウス/ヒト TROP-2-F プライマー Y618、ヒト TROP-2 リバース側プライマーを使用) についても同様の方法でキ
 20 メラ遺伝子を作製し、発現ベクターを構築した (pcDNA3.1-hmTROP-2-B-*myc*/His、pcDNA3.1-hmTROP-2-C-*myc*/His、pcDNA3.1-mhTROP-2-D-*myc*/His、pcDNA3.1-mhTROP-2-E-*myc*/His、pcDNA3.1-mhTROP-2-F-*myc*/His)。

25 hTROP-2、ヒト/マウスキメラ TROP-2-C、及びマウス/ヒトキメラ TROP-2-D タンパク質を恒常的に発現する HEK293 細胞株の樹立

HEK293 細胞株に上記発現ベクター pcDNA3.1-hTROP-2-*myc*/His、pcDNA3.1-hmTROP-2-C-*myc*/His 及び pcDNA3.1-mhTROP-2-D-*myc*/His をそれぞれ遺伝子導入した。抗生物質 G418 (Calbiochem) による選択を行い、

hTROP-2 タンパク質、hmTROP-2-C キメラタンパク質および mhTROP-2-D キメラタンパク質を恒常的に発現する HEK293 細胞株を樹立した。

5 膵臓癌細胞株 PK-59 を用いた xenograft treatment モデルにおいて、薬効を示した抗 hTROP-2 モノクローナル抗体 K5-70、T5-86、K5-107、T6-4、T6-16 および K5-116-2-1 について結合領域の同定を行った。まず hmTROP-2-C、mhTROP-2-D、それぞれのキメラタンパク質を恒常的に発現する HEK293 細胞を用いて、薬効を示した抗 hTROP-2 モノクローナル抗体の反応性を FACS 解析により検討した（図 18）。その結果、K5-70、K5-107、T5-86 および K5-116-2-1 抗体は hmTROP-2-C と反応したが mhTROP-2-D とは反応しなかった。一方、T6-4 および T6-16 抗体は mhTROP-2-D と反応したが hmTROP-2-C とは反応しなかった。これらのことから K5-70、K5-107、T5-84 および K5-116-2-1 抗体の結合領域は hTROP-2 の N 末端から 145 番目のアミノ酸までの領域、T6-4 および T6-16 抗体の結合領域は hTROP-2 の 146 番目のアミノ酸から C 末端までの領域に限定された（図 18）。

15 さらに詳細に結合領域の解析を行うため、hmTROP-2-A、hmTROP-2-B、mhTROP-2-E 及び mhTROP-2-F キメラタンパク質発現用ベクターを作製し、薬効を示す抗 hTROP-2 モノクローナル抗体との反応性を検討した（図 19）。新たに作製したキメラタンパク発現用ベクターを HEK293 細胞に遺伝子導入し、一過性に発現させた細胞を用いて FACS 解析を行った。K5-70、K5-107、T5-86 および K5-116-2-1 抗体は hmTROP-2-A とは反応したが mhTROP-2-B とは反応しなかった。調べた 6 種類のモノクローナル抗体はすべて hTROP-2 とは反応を示した。このことから K5-70、K5-107、T5-86 および K5-116-2-1 抗体の結合領域は hTROP-2 の N 末端から 69 番目のアミノ酸までの領域に存在することが明らかとなった。また T6-4 および T6-16 抗体は mhTROP-2-E、mhTROP-2-F 共に反応しなかったことから、hTROP-2 の 146 番目から 193 番目のアミノ酸までの領域を認識することが示唆された。

〔実施例 20〕

[免疫組織化学]

<材料・方法>

免疫組織染色に使用した正常および癌組織アレイは以下の通りである。

ヒト正常組織アレイ：

- 5 Human, Normal organs in duplicates (Catalog No.: AB1, Super Bio Chips)
Normal tissues more than single spots (Catalog No.: A103(VI), ISU ABXIS)

肺癌組織アレイ：

Human Lung cancer-metastasis-normal (Catalog No.: CCA3, Super Bio Chips)

- 10 Human lung carcinoma tissue with margin tissue, 2 location cores (Catalog No.: OD-CT-RsLug03-002, Shanghai Outdo Biotech)

膵臓癌組織アレイ：

Human Pancreas carcinoma tissue with mono-pathological type from 60 cases, 2 location cores (Catalog No.: OD-CT-DgPan03-001, Shanghai Outdo

- 15 Biotech)

肝臓癌組織アレイ：

Hepatocellular carcinoma, grade I~III with normal tissue controls, 63 cases tissue arrays (Catalog No.: CS03-01-002U, Cybrdi)

- 20 Human liver carcinoma tissue with mono-pathological type from 30 cases, 2 location cores (Catalog No.: OD-CT-DgLiv02-002, Shanghai Outdo Biotech)

大腸癌組織アレイ：

Human, Colorectal cancer (Catalog No.: CD3, Super Bio Chips)

Human colon carcinoma with margin tissue, 2 location cores (Catalog No.: OD-CT-DgCol03-002, Shanghai Outdo Biotech)

- 25 大腸癌リンパ節転移、肝転移組織アレイ：

Colorectal (colon and rectum) cancer with matched lymph node metastasis tissue array, 44 cases/99 cores, trial slide (Catalog No.: CO991t, Biomax us)

Colorectal (colon and rectum) cancer with matched lymph node metastasis and normal adjacent tissue array, 43 cases/99 cores (Catalog No.: CO992,

Biomax us)

Colon cancer tissues_liver metastasis (Catalog No.: A203(IV), ISU ABXIS)

乳癌組織アレイ :

5 Human, Breast cancer-metastasis-normal (Catalog No.: CBA3, Super Bio Chips)

Human breast carcinoma with margin tissue, 2 location cores (Catalog No.: OD-CT-RpBre03-002, Shanghai Outdo Biotech)

胃癌組織アレイ :

Human, Stomach cancer (Catalog No.: CQ1, Super Bio Chips)

10 Human gastric carcinoma with margin tissue, 2 location cores (Catalog No.: OD-CT-DgStm03-002, Shanghai Outdo Biotech)

食道癌組織アレイ :

Human, Esophagus cancer (Catalog No.: CR1, Super Bio Chips)

15 Human esophagus carcinoma with margin tissue, 2 location cores (Catalog No.: OD-CT-DgEso03-002, Shanghai Outdo Biotech)

卵巣癌組織アレイ :

Human, Ovary cancer (Catalog No.: CJ1, Super Bio Chips)

前立腺癌組織アレイ :

Human, Prostate cancer-normal (Catalog No.: CA3, Super Bio Chips)

20 膀胱癌組織アレイ :

Bladder carcinoma / transitional cell carcinoma, grade I~III with normal tissue arrays (Catalog No.: CC12-01-001U, Cybrdi)

25 上記組織アレイの患者情報および臨床情報は添付のデータシートおよび各社のホームページから入手した。

免疫組織染色法

ヒト正常組織および癌組織の組織アレイパラフィン切片は、脱パラフィン処理後、37℃で5分間ペプシンによるプロテアーゼ処理を行い、抗hTROP-2モノク

ローナル抗体を用いた免疫染色に使用した。DAB(3,3'-ジアミノベンチジン)を基質として発色反応を行った後、対比染色としてヘマトキシリンによる核染色を行った。

- これらの操作はより具体的には次のようにして行なった。パラフィン包埋された切片を脱パラフィン処理した後、37℃で 5 分間ペプシン (DAKO) によるプロテアーゼ処理を行った。抗原賦活化後、メタノールに終濃度 0.3%となるように過酸化水素水を加えた溶液により、室温で 20 分間処理し内因性のペルオキシダーゼ活性を除いた。PBS で室温 5 分間の洗浄を 2 回行った後、1.5%の正常ウマ血清 (DAKO) を含む PBS 溶液を用いて室温 30 分間のブロッキングを行い、
- 10 組織中の非特異的結合部位をふさぐ操作を行った。次に 1.5%の正常ウマ血清を含む PBS 溶液により希釈した抗 hTROP-2 モノクローナル抗体 clone K5-63-17 (終濃度 10 μ g/ml) を室温で 1 時間反応させた後、PBS で室温 5 分間の洗浄を 3 回行い、続いて 1.5%の正常ウマ血清を含む PBS 溶液により 200 倍に希釈したビオチン化抗マウス IgG 抗体 (Vector) を室温で 30 分間反応させた。PBS による室温 5 分間の洗浄を 3 回行った後、Vectastain ABC キット (Vector) の試薬を説明書通りに混合し ABC コンプレックスを作り、これを室温で 30 分間反応させた。PBS で室温 5 分間の洗浄を 3 回行った後、ヒストファインペルオキシダーゼ基質シンプルステイン DAB 溶液 (ニチレイバイオサイエンス) によって発色を行った。発色を確認した後、脱イオン水で 5 分間洗浄し、マイヤーヘマトキシリン溶液 (和光純薬) によって核を染色し、その後アルコールで脱水、
- 20 キシレンで透徹してエンテランニュー (メルク・ジャパン株式会社) で封入した。

<結果>

ヒト正常組織における hTROP-2 の発現

- 25 ヒト正常組織における hTROP-2 の発現パターンについて、抗 hTROP-2 モノクローナル抗体 クローン K5-63-17 を用いて解析した。ヒト正常組織組織アレイ (Catalog No.: AB1, Super Bio Chips) を脱パラフィン、親水化処理を行った後、タンパク質分解酵素ペプシンによる抗原の賦活化を行い、抗 hTROP-2 モノクローナル抗体 クローン K5-63-17 で免疫染色を行った (図 20)。その結果、

皮膚、食道、腎臓（皮質及び髄質）、膵臓、前立腺、膀胱、扁桃腺で染色が見られた。ほとんどの染色像は細胞膜への局在を示していたが（図 20 A, B, C, D, F, G, H）、一部細胞質にも発現が見られた（図 20. E, H）。一方、心臓、肝臓、胃、小腸、大腸、骨格筋、肺、脾臓、胸腺などでは染色されなかった（図 20. I, J）。

ヒト癌組織における hTROP-2 の発現

ヒト癌組織における hTROP-2 の発現（hTROP-2 の陽性率）を調べるため、抗 hTROP-2 モノクローナル抗体 クローン K5-63-17 を用いて、ヒトの各癌種の癌組織アレイの免疫染色を行った。癌細胞の 10%以上が染色される組織切片を hTROP-2 陽性とした。この染色結果を表 4 に示した。

表 4

癌組織	TROP2陽性数 /症例数	TROP2陽性率 (%)
乳癌	32/80	40
肺癌	53/81	65.4
食道癌	69/90	76.7
胃癌	25/90	27.8
大腸癌	29/178	16.3
膵臓癌	26/62	41.9
肝臓癌	7/92	7.61
膀胱癌	42/59	71.2
前立腺癌	35/38	92.1
卵巣癌	14/58	24.1

また、代表的な染色像を図 21 に示した。hTROP-2 の発現を検討した癌種では、前立腺癌で最も陽性率が高く（92.1%）、肺癌（65.4%）、食道癌（76.7%）、膀胱癌（71.2%）などで高い陽性率であった。最も陽性率の低かったのは肝臓癌で 7.61%であった。癌細胞でも正常細胞と同様に、hTROP-2 は細胞膜に強く局在している染色像が見られた（図 21. A~F, H, I）。また一部は細胞質にも発現していた（図 21. A, B, E, G）。

膵臓癌での hTROP-2 の陽性率は 41.9%であった。このときの hTROP-2 陽性

率と膵臓癌のグレード（分化度）との関係について検討した。その結果、グレードが高い、すなわち低分化膵臓癌で高頻度に発現していた（表 5）。

表 5

5

膵臓癌 hTROP2陽性スポット 26/62 (41.94%)			
Grade	-	+	陽性率
I	8	0	0%
I - II	5	0	0%
II	19	21	52.5%
II - III	4	5	55.6%
total	36	26	p<0.01

10

〔実施例 2 1〕

[K5-70 抗体の単回投与による、ヒト膵癌細胞株 PK-59 xenograft prevention モデルでの抗腫瘍効果]

クローン K5-70（マウス IgG2a）の *in vivo* における強い抗腫瘍活性は、ヒト膵癌細胞株 PK-59 を用いた xenograft prevention モデルにおいて、10 mg/kg 体重の投与量で 1 回投与した場合においても示された。コントロール群（マウス IgG 10mg/kg 体重, N=3）では、全ての個体において腫瘍形成が観察され、細胞移植後 28 日目（Day 28）における腫瘍体積は $781.7 \pm 74.5 \text{ mm}^3$ であったのに対して、癌細胞移植日（Day 1）に 1 回 K5-70 抗体を投与した群では（10 mg/kg 体重, N=3）、Day 28 における腫瘍体積は $144.4 \pm 176.9 \text{ mm}^3$ ($P < 0.05$ by Student's t-test) と 81.5% の腫瘍成長阻害活性を示した（図 22A）。腫瘍重量においては、Day 28 においてコントロール群が $0.59 \pm 0.06 \text{ g}$ であったのに対し、クローン K5-70 抗体投与群では $0.07 \pm 0.10 \text{ g}$ ($P < 0.01$ by Student's t-test) と 88% の阻害活性を示した（図 22B）。腫瘍体積、腫瘍重量のいずれにおいても、K5-70 抗体投与群では 3 個体中 2 個体では、1 回の 10 mg/kg 体重の投与で、完全に腫瘍形成が阻害された（図 22C）。

〔実施例 2 2〕

[ヒト大腸癌細胞株 SW480 細胞 xenograft treatment モデルにおける抗ヒ

hTROP-2 モノクローナル抗体の抗腫瘍活性]

抗 hTROP-2 モノクローナル抗体（クローン K5-70, K5-116-2-1 および T6-16）の抗腫瘍活性を、ヒト大腸癌細胞株 SW480 を用いた xenograft treatment モデルで検討した。5×10⁶ cells の SW480 細胞を 6 週齢雌の NOD-scid マウスの右脇腹皮下に移植（Day 1）し、平均の腫瘍体積が 100 mm³ に達した段階で群分けを行い（Day 7 又は Day 10）, Day 7 又は Day 10 から 3 日に 1 回の投与間隔で、抗体の腹腔内投与を開始した。クローン K5-70 抗体の抗腫瘍活性評価と、クローン K5-116-2-1 抗体およびクローン T6-16 抗体の抗腫瘍活性評価は、それぞれ独立した試験で評価した。K5-70 抗体の抗腫瘍活性評価試験において

5 の右脇腹皮下に移植（Day 1）し、平均の腫瘍体積が 100 mm³ に達した段階で群分けを行い（Day 7 又は Day 10）, Day 7 又は Day 10 から 3 日に 1 回の投与間隔で、抗体の腹腔内投与を開始した。クローン K5-70 抗体の抗腫瘍活性評価と、クローン K5-116-2-1 抗体およびクローン T6-16 抗体の抗腫瘍活性評価は、それぞれ独立した試験で評価した。K5-70 抗体の抗腫瘍活性評価試験において

10 は、癌細胞移植から 44 日目（Day 44）におけるコントロール群（マウス IgG（10 mg/kg 体重）, N=8）の腫瘍体積が 365.4±214.6 mm³であったのに対して、K5-70 抗体(10 mg/kg 体重)投与群では、27.4±29.4 mm³ (P < 0.01 by Student's t-test)と著しく腫瘍形成が阻害された（阻害率 92.5 %）（図 23A）。腫瘍重量においては、コントロール群が 0.11±0.07 g であったのに対して、

15 K5-70 抗体投与群では 0.005±0.007 (g) (P < 0.01 by Student's t-test)と 95.5 % の阻害率であった（図 23B）。特に、K5-70 抗体投与群では 8 個体中 2 個体では、完全に腫瘍形成が阻害され腫瘍の確認が出来なかった。

別に行った K5-116-2-1 抗体および T6-16 抗体の抗腫瘍活性評価試験においては、Day 42 におけるコントロール群の腫瘍体積が 713.8±354.5 mm³ (N=8)であったのに対して、K5-116-2-1 抗体 投与群 (10 mg/kg 体重)では、188.9±97.4 mm³ (N=8, P < 0.01 by Student's t-test) (図 24A), T6-16 抗体投与群(10 mg/kg 体重)では、292.8±199.7 mm³ (N=8, P < 0.05 by Student's t-test) (図 25A)と、それぞれ 73.5 %, 59.0%の阻害率であった。腫瘍重量についても同様に、コントロール群では 0.39±0.19 g であったのに対して、K5-116-2-1 抗体投与群、T6-

20 あったのに対して、K5-116-2-1 抗体 投与群 (10 mg/kg 体重)では、188.9±97.4 mm³ (N=8, P < 0.01 by Student's t-test) (図 24A), T6-16 抗体投与群(10 mg/kg 体重)では、292.8±199.7 mm³ (N=8, P < 0.05 by Student's t-test) (図 25A)と、それぞれ 73.5 %, 59.0%の阻害率であった。腫瘍重量についても同様に、コントロール群では 0.39±0.19 g であったのに対して、K5-116-2-1 抗体投与群、T6-

25 16 抗体投与群では、0.10±0.07 g (P < 0.01 by Student's t-test), 0.17±0.14 g (P < 0.05 by Student's t-test)と、それぞれ 72.2 %, 56.4 %の阻害率を示した（図 24B, 図 25B）。

〔実施例 2 3〕

[ヒト大腸癌細胞株 SW480 細胞 xenograft treatment モデルにおけるクローン K5-70 の用量依存的な抗腫瘍活性]

次に、K5-70 抗体の用量依存的な抗腫瘍活性を、ヒト大腸癌細胞株 SW480 を用いた xenograft treatment モデルにおいて検討した。5×10⁶ cells の SW480 細胞を 6 週齢雌の NOD-scid マウスの右脇腹皮下に移植し、移植から 10 日後 (Day 10) に平均の腫瘍体積が 100 mm³ に達した段階でコントロール群 (マウス IgG 10 mg/kg 体重投与群、N=8, 104.4±17.6 mm³) , 1 mg/kg 体重の K5-70 抗体投与群 (N=8, 104.3±16.1 mm³), 5mg/kg 体重の K5-70 抗体投与群 (N=8, 104.6±15.9 mm³) , 10 mg/kg 体重の K5-70 抗体投与群 (N=8, 104.8±14.9 mm³) に群分を行い、3 日に 1 回の腹腔内投与を行った。Day 42 におけるコントロール群の腫瘍体積が 713.8 ± 354.5 mm³ であったのに対して、K5-70 抗体投与群では用量依存的な腫瘍形成阻害活性が観察され、1 mg/kg 体重投与群では、485.0±207.3 mm³ (阻害率 32.1%), 5 mg/kg 体重投与群では、339.5 ± 253.2 mm³ (阻害率 52.4%), 10 mg/kg 体重投与群では、355.4±202.8 mm³ (阻害率 50.2 %, P < 0.05 by Student's t-test)であった (図 26A) 。同様に、Day 42 における腫瘍重量については、コントロール群が 0.39±0.19 g であったのに対して、K5-70 抗体の 1 mg/kg 体重 投与群では、0.24±0.11 g (阻害率 37.8%), 5 mg/kg 体重投与群では、0.17±0.14 g (阻害率 55.8%, P < 0.05 by Student's t-test), 10 mg/kg 体重投与群では、0.20±0.13 g (阻害率 47.1 %) となり、用量依存的な抗腫瘍活性が確認された (図 26B) 。

[実施例 2 4]

[ヒト大腸癌細胞株 SW480 細胞 xenograft treatment モデルにおける K5-70 抗体の投与間隔の検討]

さらに、K5-70 抗体の至適投与間隔を検討するために、週に 1 回 (7 日に 1 回) 投与を行った際の抗腫瘍活性を、ヒト大腸癌細胞株 SW480 を用いた xenograft treatment モデルにおいて検討した。5×10⁶ cells の SW480 細胞を 6 週齢雌の NOD-scid マウスの右脇腹皮下に移植し、移植から 10 日後 (Day 10) に平均の腫瘍体積が 100 mm³ に達した段階でコントロール群 (マウス IgG, 10

mg/kg 体重、N=8, $104.42 \pm 15.1 \text{ mm}^3$), K5-70 抗体投与群 (10 mg/kg 体重、N=8, $104.3 \pm 16.1 \text{ mm}^3$) に群分を行い、7 日に 1 回の腹腔内投与を行った。Day 42 におけるコントロール群の腫瘍体積が $713.8 \pm 354.5 \text{ mm}^3$ であったのに対して、K5-70 抗体投与群(週 1 回投与)では、 $332.3 \pm 239.9 \text{ mm}^3$ (阻害率 55%, $P < 0.05$ by Student's t-test) となった (図 27A)。更に、投与間隔を空け 10 日に 1 回および 2 週間に 1 回投与した場合、Day 39 におけるコントロール群の腫瘍体積が $956.9 \pm 367.8 \text{ mm}^3$ であったのに対して、10 日に 1 回の K5-70 抗体投与群では、 $525.4 \pm 180.6 \text{ mm}^3$ (阻害率 45.1%, $P < 0.01$ by Student's t-test) 2 週間に 1 回の K5-70 抗体投与群では $459.4 \pm 217.6 \text{ mm}^3$ (阻害率 52.0%, $P < 0.01$ by Student's t-test) となった (図 27B)。先行技術 (US 7420040, US 7420041) では、膵臓癌細胞株 (BxPC-3) を用いた xenograft treatment モデルにおいて、20 mg/kg 体重、週に 3 回の抗体投与 (投与間隔 2 日間) で、阻害率 50-60% の抗腫瘍活性を示しているのに対し、K5-70 抗体は 1 回の投与量が半分 (10 mg/kg 体重)、かつ 2 週間に 1 回の投与 (投与間隔 13 日間) で、先行技術に匹敵する抗腫瘍活性を示した。従って K5-70 抗体は少なくとも先行技術の 12 分の 1 の総投与量で顕著な抗腫瘍活性を示すことが明らかとなった。

[実施例 25]

[ヒト大腸癌細胞株 SW480 細胞 xenograft treatment モデルにおける T6-16 抗体の用量依存的な抗腫瘍活性]

次に、T6-16 抗体の用量依存的な抗腫瘍活性を、ヒト大腸癌細胞株 SW480 を用いた xenograft treatment モデルにおいて検討した。 5×10^6 cells の SW480 細胞を 6 週齢雌の NOD-scid マウスの右脇腹皮下に移植し、移植から 10 日後 (Day 10) に平均の腫瘍体積が 100 mm^3 に達した段階でコントロール群 (マウス IgG 10 mg/kg 体重、N=8, $105.8 \pm 9.9 \text{ mm}^3$)、1 mg/kg 体重の T6-16 抗体投与群 (N=8, $104.4 \pm 13.3 \text{ mm}^3$)、5mg/kg 体重の T6-16 抗体投与群 (N=8, $104.7 \pm 13.0 \text{ mm}^3$)、10 mg/kg 体重の T6-16 抗体投与群 (N=8, $104.8 \pm 12.4 \text{ mm}^3$) に群分を行い、3 日に 1 回の腹腔内投与を行った。Day 43 におけるコントロール群の腫瘍体積が $473.5 \pm 137.0 \text{ mm}^3$ であったのに対して、T6-16 抗体

投与群では用量依存的な腫瘍形成阻害活性が観察され、1 mg/kg 体重投与群では、 $397.9 \pm 97.5 \text{ mm}^3$ (阻害率 16.0 %), 5 mg/kg 体重投与群では、 $195.9 \pm 89.7 \text{ mm}^3$ (阻害率 58.7 %, $P < 0.01$ by Student's t-test), 10 mg/kg 体重投与群では、 $190.2 \pm 56.5 \text{ mm}^3$ (阻害率 59.8 %, $P < 0.01$ by Student's t-test)であった (図 28A)。

- 5 同様に、Day 43 における腫瘍重量は、コントロール群が $0.19 \pm 0.07 \text{ g}$ であったのに対して、1 mg/kg 体重の T6-16 抗体投与群では、 $0.20 \pm 0.08 \text{ g}$, 5 mg/kg 体重の投与群では、 $0.08 \pm 0.04 \text{ g}$ (阻害率 57.9 %, $P < 0.01$ by Student's t-test), 10 mg/kg 体重の投与群では、 $0.09 \pm 0.04 \text{ g}$ (阻害率 52.6 %, $P < 0.01$ by Student's t-test) となり、用量依存的な抗腫瘍活性が確認された (図 28B)。

10

[実施例 26]

[ヒト大腸癌細胞株 SW480 細胞 xenograft treatment モデルにおける T6-16 抗体の投与間隔の検討]

- さらに、T6-16 抗体の至適投与間隔を検討するために、週に 1 回 (7 日に 1 回) および 10 日に 1 回の投与間隔での抗腫瘍活性を、ヒト大腸癌細胞株 SW480 を用いた xenograft treatment モデルにおいて検討した。 5×10^6 cells の SW480 細胞を 6 週齢雌の NOD-scid マウスの右脇腹皮下に移植し、移植から 10 日後 (Day 10) に平均の腫瘍体積が 100 mm^3 に達した段階でコントロール群 (マウス IgG, 10 mg/kg 体重、 $N=8$, $105.8 \pm 9.9 \text{ mm}^3$), 週 1 回の T6-16 抗体投与群 (10 mg/kg 体重、 $N=8$, $105.0 \pm 11.6 \text{ mm}^3$), 10 日に 1 回の T6-16 抗体投与群 (10 mg/kg 体重、 $N=5$, $130.8 \pm 2.4 \text{ mm}^3$) に群分けを行い、投与を開始した。Day 43 におけるコントロール群の腫瘍体積が $473.5 \pm 137.0 \text{ mm}^3$ であったのに対して、週 1 回の T6-16 抗体投与群では、 $243.7 \pm 65.3 \text{ mm}^3$ (阻害率 48.5 %, $P < 0.01$ by Student's t-test), 10 日に 1 回の T6-16 抗体投与群では、 $297.8 \pm 54.4 \text{ mm}^3$ (阻害率 37.1%, $P < 0.05$ by Student's t-test) となった (図 29)。先行技術 (US 7420040, US 7420041) が膵臓癌細胞株 (BxPC-3) を用いた xenograft treatment モデルにおいて、20 mg/kg 体重の投与量で、週に 3 回投与 (投与間隔 2 日間) で、阻害率 50-60% の抗腫瘍活性を示しているのに対し、T6-16 抗体は、1 回の投与量が、先行技術の半分の用量かつ、10 日に 1 回の投与 (投与間

隔 9 日間) で、顕著な抗腫瘍活性を示した。従って、T6-16 抗体は少なくとも先行技術の 8 分の 1 の総投与量で顕著な抗腫瘍活性を示すことが明らかとなった。

〔実施例 27〕

- 5 [ヒト前立腺癌細胞株 DU-145 xenograft prevention モデルにおける抗腫瘍活性の検討]

クローン K5-70 のヒト前立腺癌に対する抗腫瘍活性を、DU-145 細胞 (RIKEN Cell Bank, RCB2143) を用いた xenograft prevention モデルで評価した。5×10⁶ 細胞の DU-145 細胞を 6 週齢の雌のヌードマウス (Balb/c, nu/nu) の皮下に移植し、移植当日を Day 1 とし、コントロール群 (マウス IgG) (N=8) と K5-70 抗体投与群 (N=8) に群分けを行い、Day 1 から 3 日に 1 回の頻度で 10 mg/kg 体重の投与量で腹腔内投与した。Day 40 において、コントロール群における腫瘍体積が 368.2±307.8 mm³ であったのに対し、K5-70 抗体投与群では 30.6±29.6 mm³ (P < 0.05 by Student's t-test) と約 90% の腫瘍形成阻害活性を示した (図 30A)。腫瘍重量においては、更に顕著な抗腫瘍活性が認められた。Day 40 におけるコントロール群の腫瘍重量が 0.18±0.18 g であったのに対して、K5-70 抗体投与群では 8 個体の全てにおいて腫瘍が消失しており、完全に腫瘍形成が阻害された (図 30B)。以上の結果から、抗ヒト TROP-2 モノクローナル抗体クローン K5-70 は、ヒト前立腺癌細胞に対しても 20 強い抗腫瘍活性を示すことが明らかとなった。

〔実施例 28〕

[ヒト膵癌細胞株 PK-59 細胞 の肝転移モデルを用いた K5-70 抗体の転移抑制活性]

- 25 消化器癌の治療において、癌の転移は临床上の予後を左右する重要な因子であり、転移をコントロールすることは治療上重要な意味を有する。TROP-2 を標的とした癌治療用抗体投与により、腫瘍形成の抑制のみならず、癌細胞の他臓器への転移を抑制することが可能であれば、高い临床上の有用性が期待されるため、癌治療抗体として望ましい特性である。

TROP-2 は多くの癌腫における発現が確認されているが、特に転移巣において高発現していることが示されている (Br. J. Cancer (2008); 99: 1290-1295, Clin. Cancer Res. (2006); 12: 3057-3063, Mod. Pathol. (2008); 21: 186-191) 。さらに、Trop-2 遺伝子を導入した癌細胞を経脾的あるいは経膵的にヌードマウスに移植した場合に、肝転移の発症率が増加すること (WO 2010/089782, Molecular Cancer (2010); 9: 253) が報告され、TROP-2 の癌転移過程における重要性が示唆されている。しかしながら、TROP-2 を標的とした抗体を用いて *in vivo* で転移抑制作用を具体的に示した報告はこれまでに認められない。

本発明により見出された抗hTROP-2 マウスモノクローナル抗体K5-70 は、ヒト膵臓癌細胞を皮下に移植したゼノグラフトモデルにおいて高い治療効果が示されているが、癌細胞の増殖抑制効果に加え、ヒト膵癌細胞株PK-59 の遊走能を抑制することが、*in vitro* のスクラッチアッセイで示されており、癌の転移を *in vivo* においても抑制する可能性が考えられた。そこで、PK-59 細胞をヌードマウスの脾臓から注入し、肝転移を発生させるモデルを用いて抗hTROP-2 マウスモノクローナル抗体の転移抑制効果を検証した。

癌細胞移植の前日に、マウスを群分し、抗hTROP-2 モノクローナル抗体K5-70 あるいは対照抗体 (精製マウスIgG) を 10 mg/kg 体重にて腹腔内投与した。翌日、hTROP-2 を内在的に発現するヒト膵癌細胞株 (PK-59) をトリプシン処理で剥がし、PBSで 2×10^7 cells/mL の細胞懸濁液を調製した。細胞懸濁液は移植時まで氷上に保管した。6～7 週齢の雌のヌードマウス (Balb/c, nu/nu) をペントバルビタールの腹腔内投与により麻酔し、麻酔下で左側腹部を 10～15mm 切開し、脾臓を腹腔外に引き出し、27 G のシリンジを用いて 50 μ L の細胞懸濁液 (1×10^6 cell) を脾臓内に注入した。細胞注入 4 分後に脾門部を 5-0 silk にて結紮し、脾臓を摘出した。切開した腹膜を 4-0 silk で閉創し、Wound Clips (AUTOCLIP 9mm, Becton Dickinson) を用いて閉腹した。癌細胞移植 7 日後に、さらに K5-70 抗体および対照抗体を 10mg/kg 体重で投与した。癌細胞移植から 4～6 週間後に頸椎脱臼によりマウスを安楽死させ、肝臓を摘出し、転移巣の有無を確認した。

コントロールとして用いたマウスIgGを投与した群においては、PK-59 細胞を

移植した 6 匹のマウス中、4 匹において、移植後 4 から 6 週間後に肝葉辺縁部への明らかな転移巣（2～7 個）が認められた（図 31A、転移発生率 67%、表 6）。これに対し、K5-70 抗体投与群では、PK-59 細胞を移植した 4 匹のマウスにおいて、いずれの個体でもまったく肝臓への転移巣が認められず、転移発生率は 5 0%であった（図 31B、表 6）。

表 6

PK-59 細胞をヌードマウスに経脾的に移植した肝転移モデルにおける
クローンK5-70 の転移抑制効果

投与群	移植後週	個体番号	転移巣数	転移判定
Control群	4W	C-1	0	-
	4W	C-2	5	++
	6W	C-3	7	++
	6W	C-4	7	++
	6W	C-5	2	+
	6W	C-6	0	-
	平均転移巣数		3.5	転移発生率 67%
K5-70投与群	4W	K-1	0	-
	6W	K-2	0	-
	6W	K-3	0	-
	6W	K-4	0	-
	平均転移巣数		0	転移発生率 0%

これらの結果から、抗hTROP-2 抗体K5-70 は、ヒト膵癌細胞株PK-59 の肝転移に対して極めて強い抑制作用を有することが明らかとなった。

15 〔実施例 2 9〕

[ヒト大腸癌細胞株 SW480 xenograft モデルにおける塩酸イリノテカン投与後の癌再発モデルにおける K5-70 抗体の抗腫瘍活性]

癌治療剤として近年、癌細胞の増殖を抑制する化学療法剤が多く開発され、一定の治療成績を上げているが、癌細胞以外の正常細胞に対する増殖抑制作用に伴う副作用と、治療中止後の癌の再発が大きな問題となっている。したがって、TROP-2 を標的とした癌治療用抗体投与により、化学療法剤による治療後の腫瘍再発を抑制することが可能であれば、高い臨床上的有用性が期待されるため、癌治療抗体として望ましい特性である。

大腸癌の治療剤としては、5-FU、白金製剤に加え、トポイソメラーゼ阻害効果を有する塩酸イリノテカン（トポテシン、第一三共株式会社）が近年臨床適応され、動物モデルにおいても、大腸癌をはじめとした種々のヒト腫瘍細胞を移植したマウスモデルにおける抗腫瘍効果が報告されている（Cancer Chemother Pharmacol. (1991); 28(3):192-8）。そこで、塩酸イリノテカン投与後の腫瘍再発に対する抗 hTROP-2 抗体クローン K5-70（マウス IgG2a）の再発予防効果について、ヒト大腸癌細胞株 SW480 を用いた xenograft モデルにおいて検討した。

5 5×10^6 cells の SW480 細胞を 8 週齢雌の NOD-scid マウスの右脇腹皮下に移植し、移植から 11 日後（Day 11）に平均の腫瘍体積が 100 mm^3 以上に達した段階で無処置群（生理食塩水投与群、 $N=8$, $130.7 \pm 16.2 \text{ mm}^3$ ），塩酸イリノテカン（CPT-11, トポテシン、第一三共株式会社）投与群（ $N=16$, $123.0 \pm 21.4 \text{ mm}^3$ ）に群分けを行い、塩酸イリノテカンを 40 mg/kg 体重で 3 日に 1 回、合計 3 回（Day 11, 14, 17）腹腔内投与した。塩酸イリノテカンの最終投与から 3 日目（Day 20）に、無処置群の腫瘍体積は $232.1 \pm 21.1 \text{ mm}^3$ に達したのに対し、塩酸イリノテカン投与群は $126.6 \pm 26.6 \text{ mm}^3$ （ $P < 0.01$ by Student's t-test）であり、

15 明らかな腫瘍抑制効果が認められた。この段階で腫瘍サイズに基づき塩酸イリノテカン投与群を 2 群に分け、一方は K5-70 抗体投与群（ 10 mg/kg 体重、 $N=8$, Day 20 の腫瘍体積 $126.0 \pm 28.0 \text{ mm}^3$ ）とし、もう一方はマウス IgG 投与群（ 10 mg/kg 体重、 $N=8$, Day 20 の腫瘍体積 $127.2 \pm 27.0 \text{ mm}^3$ ）とした。それぞれ 3 日に 1 回の抗体の腹腔内投与と腫瘍体積の測定を行い腫瘍の再発を評価した（図 32）。マウス IgG 投与群では、塩酸イリノテカンの最終投与から 18 日目（Day 35）より腫瘍体積が 300 mm^3 を超える明らかな再発腫瘍を有する個体が複数認められ、塩酸イリノテカンの最終投与から 30 日目（Day 47）においては、8 例中 5 例で 300 mm^3 を超える腫瘍が認められた（腫瘍平均体積 $401.7 \pm 172.7 \text{ mm}^3$ ）。これに対し、K5-70 抗体投与群では顕著に腫瘍再発が抑制され、腫瘍平均体積は、 $180.5 \pm 142.1 \text{ mm}^3$,（ $P < 0.05$ by Student's t-test）であった（図 32）。特に、K5-70 抗体投与群では、Day 47 における腫瘍体積が群分け時（ $126.0 \pm 28.0 \text{ mm}^3$ ）よりも退縮し、 100 mm^3 未満となった個体が 8 例中 4 例認められた。これらの結果から、抗 hTROP-2 抗体 K5-70 は、塩酸イリノテカ

ン投与後の腫瘍再発に対しても極めて強い抑制作用を有することが明らかとなった。

〔実施例 30〕

5 [CLIPS 技術を用いたエピトープマッピング]

＜材料と方法＞

ペプチド合成

本実験で使用した直鎖型 15-mer 及び 30-mer の TROP-2 細胞外領域に由来するペプチドは、Fmoc (9-Fluorenylmethoxycarbonyl)法による固相合成により取得した。また不連続エピトープ解析のため、両端にシステイン残基を付加した TROP-2 細胞外領域に由来する 17-mer のペプチドを合成し、CLIPS 技術 (Chemically Linked Peptides on Scaffolds technology) によりループ構造を一つまたは二つ有する立体構造を再構築した。付加したシステイン残基近傍に別のシステイン残基が存在する場合、アラニンに置換した。

15 エピトープスクリーニング ELISA

5034 種類の合成したペプチドを PEPSCAN カード (455 ペプチド/カード) へ共有結合させ、ELISA 法により合成ペプチドと抗体の結合を検証した。PEPSCAN カードはブロッキングバッファー (4%ウマ血清、5%卵白アルブミン、1% Tween を含むリン酸緩衝液) で 1 µg/mL に希釈した抗ヒト TROP-2 モノクローナル抗体 (K5-70、K5-107、K5-116-2-1、T5-86、T6-16) と反応させた。洗浄後、1000 倍希釈したペルオキシダーゼ二次抗体複合体と 25℃、1 時間反応させた。洗浄後、基質溶液 (2,2'-azino-di-3-ethylbenzthiazoline sulfonate (ABTS) と 2 µL の 3%過酸化水素水を含む溶液) を加え、1 時間発色反応を行った。抗体結合活性は CCD カメラで撮影し、画像解析を行い定量した。

25

＜結果＞

薬効を示した抗 hTROP-2 モノクローナル抗体 K5-70、K5-107、K5-116-2-1、T5-86、T6-16 について CLIPS (Chemically Linked Peptides on Scaffolds) 技術を利用しエピトープ解析を行った。なお、以下、本実施例において「アミノ酸

番号」とは、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列 (hTROP-2 タンパク質 (323 アミノ酸残基)) 中のアミノ酸番号を意味する。

- K5-70 抗体についての解析結果を下記表 7 に示す。その結果、33 ペプチドが K5-70 抗体と強い結合を示すことが明らかとなった。これら 33 ペプチドの中で、
- 5 VCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVD (アミノ酸番号 43-65) を含む配列 (表 7 中に記載のペプチド No. 1-7, 9)、HHILIDLRHRPTAG (アミノ酸番号 152-165) を含む配列 (表 7 中に記載のペプチド No. 14, 22-24, 28)、VHYEQPTIQIELRQ (アミノ酸番号 193-206) を含む配列 (表 7 中に記載のペプチド No. 8, 10, 12, 13, 18, 20, 21, 23, 26, 28, 30, 32)、DLDAELRRLFRER
- 10 (アミノ酸番号 171-183) を含む配列 (表 7 中に記載のペプチド No. 11, 16, 18, 19, 21, 22, 29, 31) は、繰り返し出現した。K5-70 抗体は、特に VCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVD を含む配列に強く結合した。これらの結果から、hTROP-2 タンパク質中、上記 4 種類のペプチド配列領域が K5-70 抗体のエピトープである可能性が示唆された。

表 7

ヒト TROP-2 細胞外領域に由来する CLIPS ペプチドに対する

K5-70 抗体の結合

number	peptide	binding of K5-70	SEQ ID No.
1	NKMTVCSPDGPGGRCQCRAVGSGMAVDCST	2742	101
2	TVCSPDGPGGRCQCRAVGSGMAVDCSTLTS	2604	102
3	TNKMTVCSPDGPGGRCQCRAVGSGMAVDCS	2562	103
4	MTVCSPDGPGGRCQCRAVGSGMAVDCSTLT	2402	104
5	KMTVCSPDGPGGRCQCRAVGSGMAVDCSTL	1770	105
6	PTNKMTVCSPDGPGGRCQCRAVGSGMAVDC	1391	106
7	VCSPDGPGGRCQCRAVGSGMAVDCSTLTSK	932	107
8	CAAVHYEQPTIQIELRCAAVHYEQPTIQIELRC	876	108
9	CPTNKMTVCSPDGPGGRCQCRAVGSGMAVD	839	109
10	CVHYEQPTIQIELRQNCVHYEQPTIQIELRQNC	825	110
11	HSDLDALRRLLFRERCHSDLDALRRLLFRERC	725	111
12	RLFRERYRLHPKFVAHVHYEQPTIQIELRQ	687	112
13	AVHYEQPTIQIELRQ	642	113
14	CAGAFNHSDLDALRRCHHILDLRHRPTAGAC	624	114
15	CPKFVAHVHYEQPTIQICGLDLVRGEPLQVERC	579	115
16	CHSDLDALRRLLFRERCGLDLRV	538	116
17	FQGRGGDLRLVRGEP	538	117
18	CVHYEQPTIQIELRQNCGLDLALRRLLFRERYRC	524	118
19	CHSDLDALRRLLFRERCGRGEPLQ	519	119
20	CTIQIELRQNTSQKAAVHYEQPTIQIELRQNC	513	120
21	CVHYEQPTIQIELRQNCCHSDLDALRRLLFRERC	511	121
22	CHHILDLRHRPTAGACHSDLDALRRLLFRERC	489	122
23	CHHILDLRHRPTAGACVHYEQPTIQIELRQNC	489	123
24	CHHILDLRHRPTAGACGLDLVRGEPLQVERC	488	124
25	CDAELRRLLFRERYRLHCDLVRTHHILDLRHC	483	125
26	CVHYEQPTIQIELRQNC	483	126
27	CAFNHSDLDALRRLLFCVHYEQPTIQIELRQNC	478	127
28	CVHYEQPTIQIELRQNCCHHILDLRHRPTAGAC	473	128
29	CDLDALRRLLFRERYRCDELVRTHHILDLRHC	472	129
30	VHYEQPTIQIELRQNCGLDLVRGEPLQVERC	470	130
31	CDELVRTHHILDLRHCGLDLALRRLLFRERYRC	469	131
32	AVHYEQPTIQIELRQCAVHYEQPTIQIELRQC	468	132
33	CHSDLDALRRLLFRERCDELVRTHHILDLRHC	466	133

5

K5-107 についての解析結果を下記表 8 に示す。その結果、VCSPDGPGGRCQCRAVGSGMAVD（アミノ酸番号 43-65）を含む配列が 20 ペプチド中 10 ペプチド（表 8 中に記載のペプチド No. 1-6, 8, 9, 14, 17）に含まれていた（表 8）。

従って、hTROP-2 タンパク質中、上記 VCSPDGPGGRCQCRAVGSGMAVD のペプチド配列領域が K5-107 抗体のエピトープであることが示唆された。

表 8

ヒト TROP-2 細胞外領域に由来する CLIPS ペプチドに対する
K5-107 抗体の結合

number	peptide	binding of K5-107	SEQ ID No.
1	TNKMTVCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVDCS	2763	134
2	NKMTVCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVDCST	2761	135
3	KMTVCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVDCSTL	2752	136
4	MTVCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVDCSTLT	2726	137
5	CPTNKMTVCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVD	2723	138
6	TVCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVDCSTLTS	2720	139
7	TCPTNKMTVCSPDGPGGRCQCRALGSGMAV	2716	140
8	PTNKMTVCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVDC	2689	141
9	VCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVDCSTLTSK	2655	142
10	CSPDGPGGRCQCRALGSGMAVDCSTLTSKC	2655	143
11	CTCPTNKMTVCSPDGPGGRCQCRALGSGMA	2207	144
12	NCTCPTNKMTVCSPDGPGGRCQCRALGSGM	1816	145
13	DNCTCPTNKMTVCSPDGPGGRCQCRALGSG	1525	146
14	CTVASPDGPGGRCQCRALGSGMAVDCSTLTSKC	1118	147
15	QDNCTCPTNKMTVCSPDGPGGRCQCRALGS	874	148
16	SPDGPGGRCQCRALGSGMAVDCSTLTSKCL	561	149
17	CTNKMTVCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVDASTC	380	150
18	TVCSPDGPGGRCQCR	312	151
19	CAPKNARTLVRPSEHACARTLVRPSEHALVDNC	284	152
20	HSDLDAELRRLFRERCHSDLDAELRRLFRERC	274	153

K5-116-2-1 抗体についての解析結果を下記表 9 に示す。当該解析では、VCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVD (アミノ酸番号 43-65) を含む配列 (表 9 中に記載のペプチド No. 1-7, 15, 25)、HHILIDLRHRPTAG (アミノ酸番号 152-165) を含む配列 (表 9 中のペプチド No. 8-11, 16, 17, 19, 20, 22-24, 27-29)、DLDAELRRLFRER (アミノ酸番号 171-183) を含む配列 (表 9 中に記載のペプチド No. 11-14, 17, 19, 21, 23, 29) の 3 種類のペプチド配列が複数回出現した (表 9)。従って、hTROP-2 タンパク質中、これら 3 種類のペプチド配列領域が K5-116-2-1 抗体のエピトープであることが示唆された。

表 9

ヒト TROP-2 細胞外領域に由来する CLIPS ペプチドに対する
K5-116-2-1 抗体の結合

number	peptide	binding of K5-116-2-1	SEQ ID No.
1	TVSPDGPGGRCQCRAIGSGMAVDCSTLTS	2672	154
2	NKMTVCSPDGPGGRCQCRAIGSGMAVDCST	2613	155
3	TNKMTVCSPDGPGGRCQCRAIGSGMAVDCS	2482	156
4	MTVCSPDGPGGRCQCRAIGSGMAVDCSTLT	2440	157
5	KMTVCSPDGPGGRCQCRAIGSGMAVDCSTL	2423	158
6	CPTNKMTVCSPDGPGGRCQCRAIGSGMAVD	2136	159
7	PTNKMTVCSPDGPGGRCQCRAIGSGMAVDC	1723	160
8	CAGAFNHSDLAELRRCHHILDLRHRPTAGAC	1643	161
9	CTHHILDLRHRPTAGC	1586	162
10	CVHYEQPTIQIELRQNCCHHILDLRHRPTAGAC	1504	163
11	CHHILDLRHRPTAGACHSDLAELRRFLRERC	1475	164
12	HSDLAELRRFLRERCHSDLAELRRFLRERC	1467	165
13	CDAELRRFLRERYRLHCHSDLAELRRFLRERC	1462	166
14	CDAELRRFLRERYRLHCPK	1442	167
15	VCSPDGPGGRCQCRAIGSGMAVDCSTLTSK	1432	168
16	DLSRCDELVRTHHILDLRHRPTAGAFNH	1421	169
17	CDELVRTHHILDLRHCDLAELRRFLRERYRC	1392	170
18	CFQGRGGDLRVRGEPC	1376	171
19	CDAELRRFLRERYRLHCDDELVRTHHILDLRHC	1366	172
20	CGLDLRVRGEPLQVERCHHILDLRHRPTAGAC	1342	173
21	CHSDLAELRRFLRERCHSDLAELRRFLRERC	1331	174
22	CDELVRTHHILDLRHCHHILDLRHRPTAGAC	1323	175
23	CDAELRRFLRERYRLHCDDELVRTHHILDLRHC	1266	176
24	CHHILDLRHRPTAGACRGEPLQVERTLIYLC	1229	177
25	CSPDGPGGRCQCRAI	1227	178
26	CTVASPDGPGGRAQARCVHYEQPTIQIELRQNC	1223	179
27	CHHILDLRHRPTAGACVHYEQPTIQIELRQNC	1222	180
28	LSLRCDELVRTHHILDLRHRPTAGAFNHS	1220	181
29	CDELVRTHHILDLRHCHSDLAELRRFLRERC	1205	182

5

T5-86 及び T6-16 抗体についての解析結果を下記表 10 及び表 11 に示す。当該解析では、DPEGFRFKARQCN (アミノ酸番号 109-120) の配列を含むペプチドと強く結合した。T5-86 抗体に対しては結合する 26 ペプチド中 22 ペプチド (表 10 中に記載のペプチド No. 1-4, 6-8, 10-13, 15-19, 21-26) に、T6-16 抗体に対しては結合する 26 ペプチド中 4 ペプチド (表 11 中に記載のペプチド No. 1, 2, 9, 13) に、上記ペプチド配列が含まれていた (表 10 及び表 11)。また T5-86 抗体についての解析では、DPEGFRFKARQCN (アミノ酸番号 109-120) を含む配列以外にも VCSPDGPGGRCQCRA (アミノ酸番号 43-57) を含む配列 (表 10 中に記載のペプチド No. 5, 14, 20) が複数回出現した。さらに、T6-16 抗体についての解析でも、他の配列として HHILDLRHRPTAG (アミノ酸番号 152-165) を含む配列 (表 11 中に記載のペプチド No. 4-8, 10-12, 19, 21,

10

15

23, 25, 26) が複数回確認された。従って、T5-86 抗体のエピトープとしては、hTROP-2 タンパク質中、DPEGRFKARQCN (アミノ酸番号 109-120)、VCSPDGPGGRCQCRA (アミノ酸番号 43-57) の 2 種類のペプチド配列領域が示唆され、T6-16 抗体のエピトープとしては、hTROP-2 タンパク質中、
5 DPEGRFKARQCN (アミノ酸番号 109-120)、HHILIDLRHRPTAG (アミノ酸番号 152-165) の 2 種類のペプチド配列領域が示唆された。

表 10

ヒト TROP-2 細胞外領域に由来する CLIPS ペプチドに対する
T5-86 抗体の結合

number	peptide	binding of T5-86	SEQ ID No.
1	CYDPDADPEGRFKARQCADPEGRFKARQANQTC	2306	183
2	PDCDPEGRFKARQCN	2292	184
3	CADPEGRFKARQANCPDADPEGRFKARQANC	2287	185
4	CPDADPEGRFKARQANCPDADPEGRFKARQANC	2263	186
5	VCSPDGPGGRCQCRA	2260	187
6	CYDPDADPEGRFKARQCPDADPEGRFKARQANC	2240	188
7	CADPEGRFKARQANQTCYDPDADPEGRFKARQC	2208	189
8	DCDPEGRFKARQCNQ	2150	190
9	CTVASPDGPGGRAQARCHSDLAELRRLFRERC	2086	191
10	CDADPEGRFKARQANQCDADPEGRFKARQANQC	2035	192
11	CGRFKARQANQTSVAWCARTLVRPSEHALVDNC	2019	193
12	CADPEGRFKARQANQTCPDADPEGRFKARQANC	1980	194
13	CPDADPEGRFKARQANCPDADPEGRFKARQANC	1950	195
14	CSPDGPGGRCQCRA	1946	196
15	CEGRFKARQANQTSVACEGRFKARQANQTSVAC	1895	197
16	CTVASPDGPGGRAQARCPDADPEGRFKARQANC	1890	198
17	CGLYDPDADPEGRFKACPDADPEGRFKARQANC	1857	199
18	DPDCDPEGRFKARQCNCQTSVCWCVNSVGVR	1850	200
19	CPEGRFKARQANQTSVCDELVRHHILIDLRHC	1841	201
20	CPDGPGGRAQARALGSCHSDLAELRRLFRERC	1830	202
21	CTLVRPSEHALVDNDGCGRFRKARQANQTSVAWC	1820	203
22	CPDADPEGRFKARQANCYDPDADPEGRFKARQC	1795	204
23	CGLYDPDADPEGRFKACPEGRFKARQANQTSVC	1793	205
24	YDPDCDPEGRFKARQ	1775	206
25	CPDADPEGRFKARQANCADPEGRFKARQANQTC	1773	207
26	CDPEGRFKARQCNQ	1772	208

表 1 1

ヒト TROP-2 細胞外領域に由来する CLIPS ペプチドに対する
T6-16 抗体の結合

number	peptide	binding of T6-16	SEQ ID No.
1	CVNSVGVRRTDKGDLSCYDPDADPEGRFKARQC	1072	209
2	CSVGVRRTDKGDLSCYDPDADPEGRFKARQC	786	210
3	HSDLD AELRR LFRERCHSDLD AELRR LFRERC	714	211
4	CDELVRTHHILIDLRHCDLDAELRR LFRERYRC	713	212
5	CVNSVGVRRTDKGDLSCYDPDADPEGRFKARQC	688	213
6	VRRTDKGDLSCYDPDADPEGRFKARQC	670	214
7	CVERTLIYYLDEIPPKCHHILIDLRHPTAGAC	626	215
8	CHHILIDLRHPTAGACHSDLD AELRR LFRERC	620	216
9	CVNSVGVRRTDKGDLSCYDPDADPEGRFKARQANC	611	217
10	CVHYEQPTIQIELRQNCCHHILIDLRHPTAGAC	602	218
11	VGVRRTDKGDLSCYDPDADPEGRFKARQANC	601	219
12	CAGAFNHSDDLAE LRRCHHILIDLRHPTAGAC	592	220
13	CSVGVRRTDKGDLSCYDPDADPEGRFKARQANC	585	221
14	CVRPSEHALVDNDGLYCSVGVRRTDKGDLSCYDPDADPEGRFKARQC	573	222
15	CD AELRR LFRERYRLHCHSDLD AELRR LFRERC	566	223
16	CSVGVRRTDKGDLSCYDPDADPEGRFKC	559	224
17	CVNSVGVRRTDKGDLSCYDPDADPEGRFKAC	553	225
18	CDLDAELRR LFRERYRCHSDLD AELRR LFRERC	534	226
19	CDELVRTHHILIDLRHCHHILIDLRHPTAGAC	534	227
20	CAGAFNHSDDLAE LRRCHHILIDLRHPTAGAC	529	228
21	CD AELRR LFRERYRLHCHSDLD AELRR LFRERC	527	229
22	CVHYEQPTIQIELRQNCCHHILIDLRHPTAGAC	526	230
23	CHHILIDLRHPTAGACHSDLD AELRR LFRERC	524	231
24	CGVRRTDKGDLSCYDPDADPEGRFKARQC	524	232
25	CGDLRVRGEP LQVERCHHILIDLRHPTAGAC	521	233
26	CDLDAELRR LFRERYRCHSDLD AELRR LFRERC	516	234

〔実施例 3 1〕

[マウス抗 hTROP-2 抗体（クローン K5-70, K5-107, K5-116-2-1 および T6-16）の抗体遺伝子の可変領域の配列決定]

3×10⁶ 個のマウス抗 TROP-2 モノクローナル抗体産生ハイブリドーマから、TRIzol 試薬 (Invitrogen) を用いて全 RNA を抽出した。クローン K5-70, クローン K5-107 およびクローン K5-116-2-1 については、SMARTer™ RACE cDNA Amplification kit (Clontech) を用いて、キット添付の方法に従い、マウス IgG の H 鎖特異的プライマー (5'-TCCA KAGTTCCA-3' (配列番号 2 4)) と、L 鎖特異的プライマー (5'-GCTGTCCTGATC-3' (配列番号 2 5)) を用いて cDNA を合成した。クローン T6-16 については、GeneRacer Kit (Invitrogen) を用いて、キット添付の方法に従い、オリゴ dT プライマーを用いて cDNA を合成した。

クローン K5-70 (マウス IgG2a), クローン K5-107 (マウス IgG1)、およびクローン K5-116-2-1 (マウス IgG2a) の H 鎖及び L 鎖の可変領域 (VH, VL) をコードする遺伝子は、上記合成後の cDNA を鋳型として、PCR 法を用いてクローニングした。この際、5'-プライマーは SMARTer™ RACE cDNA Amplification kit

5 に添付されている 10 × Universal Primer A Mix (UPM) を使用した。一方、3'-プライマーは、VH 増幅用 3'-プライマーとしてはマウス IgG H 鎖に特異的な配列を有するものを使用し、VL 増幅用 3'-プライマーとしてはマウス IgG L 鎖に特異的な配列を有するものを使用した。

10 5'-プライマー (10 × Universal Primer A Mix (UPM)) :

Long (0.4 μ M)

5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT -3'

(配列番号 2 6)

Short (2 μ M)

15 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3' (配列番号 2 7)

3'-プライマー (R プライマー) :

VH : 5'-GGGAARTARCCCTTGACCAGGCA-3' (配列番号 2 8)

5'-GGGAARTAGCCTTTGACAAGGCA-3' (配列番号 2 9)

20 VL : 5'-CACTGCCATCAATVCTCCACTTGACA-3' (配列番号 3 0)

上記各プライマーを用いた PCR は、以下の反応液組成及び反応条件で行った。また VH の cDNA 増幅の R プライマーは上記の 2 配列を等モル数ずつ混合して使用した。

<反応液組成>

	鋳型cDNA:	2.5 μ L
	5×PrimeSTAR バッファー(Mg ²⁺ plus):	10 μ L
	2.5mM dNTP:	4 μ L
5	PrimeSTAR HS DNA ポリメラーゼ(2.5U/ μ L):	0.5 μ L
	10 × Universal Primer A Mix (UPM):	5 μ L
	Rプライマー (10 μ M):	1 μ L
	滅菌水:	27 μ L
	合計:	50 μ L

10

<反応条件>

94℃ (10 sec) 反応させた後、「熱変性・解離: 98℃ (10 sec) → アニール
グ: 60℃ (5 sec) → 合成・伸長: 72℃ (60 sec)」を1サイクルとして計 30 サ
イクル反応させた後、最後に 72℃ (3 min) 反応させた。

15

合成した VH 及び VL の cDNA を、pMD20-T vector (タカラバイオ) にサブク
ローニングして、塩基配列を決定した。複数の VH クローン及び VL クローンの
塩基配列を解読し、マウス H 鎖及び L 鎖の可変領域に典型的な塩基配列を同定
した。図 33 及び図 34 に、K5-70 の VH 及び VL のコンセンサス cDNA 塩基配
列、ならびに推定アミノ酸配列を示した。図 35 及び図 36 に、K5-107 の VH 及
び VL のコンセンサス cDNA 塩基配列、ならびに推定アミノ酸配列を示した。
図 37 及び図 38 に、K5-116-2-1 の VH 及び VL のコンセンサス cDNA 塩基配列、
ならびに推定アミノ酸配列を示した。

25 クローン T6-16 の H 鎖及び L 鎖の可変領域 (VH, VL) をコードする遺伝子は、
上記合成後の cDNA を鋳型として、PCR 法を用いてクローニングした。この際、
この際、5'-プライマーは GeneRacer Kit に添付されているものを使用した。一
方、3'-プライマーは、VH 増幅用 3'-プライマーとしてはマウス IgG H 鎖に特異
的な配列を有するものを使用し、VL 増幅用 3'-プライマーとしてはマウス IgG L

鎖に特異的な配列を有するものを使用した。

5'-プライマー (F プライマー) :

5'-CGACTGGAGCACGAGGACACTGA-3' (配列番号 3 1)

5 3'-プライマー (R プライマー) :

VH: 5'-GCCAGTGGATAGACAGATGG -3' (配列番号 3 2)

VL: 5'-GATGGATACAGTTGGTGCAGC -3' (配列番号 3 3)

上記各プライマーを用いた PCR は、以下の反応液組成及び反応条件で行った。

10

<反応液組成>

	鋳型cDNA :	1.0 μ L
	5×PrimeSTAR バッファー(Mg ²⁺ plus) :	10 μ L
	2.5mM dNTP :	4 μ L
15	PrimeSTAR HS DNA ポリメラーゼ(2.5U/ μ L) :	0.5 μ L
	Fプライマー (10 μ M) :	3 μ L
	Rプライマー (10 μ M) :	1.0 μ L
	滅菌水 :	30.5 μ L
	合計 :	50 μ L

20

<反応条件>

「熱変性・解離 : 98°C (10 sec) → アニーリング : 57°C (10 sec) → 合成・伸長 : 72°C (60 sec) 」を 1 サイクルとして計 35 サイクル。

25 合成した VH 及び VL の cDNA を、pCR4Blunt-TOPO vector (Invitrogen) にサブクローニングして、塩基配列を決定した。複数の VH クローン及び VL クローンの塩基配列を解読し、マウス H 鎖及び L 鎖の可変領域に典型的な塩基配列を同定した。図 39 及び図 40 に、T6-16 の VH 及び VL のコンセンサス cDNA 塩基配列、ならびに推定アミノ酸配列を示した。

〔実施例 3 2〕

[ヒト型化 K5-70 抗体のデザイン]

先の実施例で作製した K5-70 抗体について、その可変領域 (VH, VL) のヒト
5 型化を、Queen らの方法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 10029-10033,
1989) に従って以下のように行った。まず、K5-70 抗体可変領域の立体構造の
分子モデリングをコンピュータで行い、次いで、ヒト抗体遺伝子の可変領域配列
とのホモロジー検索によって、K5-70 VH のヒト型化に必要なフレームワーク
(FR) 領域を提供するアクセプターとして GenBank accession number が
10 DA980102 の cDNA 配列 (DA980192 VH) を選択した (Genome Res. 16:55-65,
2006)。同様に、K5-70 VL のヒト型化に必要なフレームワーク (FR) 領域を提
供するアクセプターとして GenBank accession number が L41174 の cDNA 配
列 (L41174 VL) を選択した (J. Biol. Chem. 270:12457-12465, 1995)。

K5-70 VH のヒト型化では、K5-70 VH の CDR 配列をアクセプターである
15 DA980102 VH の対応する位置に置き換えて挿入した。コンピュータモデリング
による立体構造解析により、K5-70 VH の CDR に隣接し、その構造維持に重要
な役割を果たしていると考えられるアミノ酸残基 (48 番目のイソロイシン (I)、
66 番目のリジン (K)、67 番目のアラニン (A)、71 番目のバリン (V)、93 番目の
スレオニン (T)) については K5-70 VH のものを保持し、それ以外の FR 領域を
20 アクセプター配列に置き換えた。VH および VL 内のアミノ酸残基位置番号は
Kabat らの定義 (Sequences of Proteins of Immunological Interests, Fifth
edition, NIH Publication No. 91-3242, U.S. Department of Health and
Human Services, 1991) に準拠した。

また、アクセプター配列 DA980102 VH の 82 番目のアミノ酸残基であるメチ
25 オニン (M) は、somatic hypermutation による特殊なアミノ酸残基である可能
性が高いと考えられる。そこで潜在的抗原性を小さくするために、82 番目のア
ミノ酸残基として最も一般的なロイシン (L) に置き換えた。上述の通りデザイ
ンしたヒト型化 K5-70 VH (HuK5-70 VH)、K5-70 VH および DA980102 VH
のアミノ酸配列アライメントを図 41 に示した。

ヒト型化 K5-70 VL のデザインについても同様に CDR 配列の移植を行い、CDR の構造維持に重要なアミノ酸残基（49 番目のリジン(K)）は K5-70 VL のものを保持し、それ以外の FR 領域をアクセプター配列に置き換えた（HuK5-70 VL）。HuK5-70 VL、K5-70 VL および L41174 VL のアミノ酸配列アライメントを図

5 42 に示した。

〔実施例 3 3〕

[ヒト型化 T6-16 抗体のデザイン]

先の実施例で作製した T6-16 抗体について、その可変領域（VH, VL）のヒト型化を、Queen らの方法（Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 10029-10033, 1989）に従って以下のように行った。まず、T6-16 抗体可変領域の立体構造の分子モデリングをコンピュータで行い、次いで、ヒト抗体遺伝子の可変領域配列とのホモロジー検索によって、T6-16 VH のヒト型化に必要なフレームワーク（FR）領域を提供するアクセプターとして GenBank accession number が DA935238 の cDNA 配列（DA935238 VH）を選択した（Genome Res. 16:55-65, 2006）。同様に、T6-16 VL のヒト型化に必要なフレームワーク（FR）領域を提供するアクセプターとして GenBank accession number が M99608 の cDNA 配列（M99608 VL）を選択した（J. Immunol. 149:2518-2529, 1992）。

T6-16 VH のヒト型化では、T6-16 VH の CDR 配列をアクセプターである DA935238 VH の対応する位置に置き換えて挿入した。コンピュータモデリングによる立体構造解析により、T6-16 VH の CDR に隣接し、その構造維持に重要な役割を果たしていると考えられるアミノ酸残基（48 番目のイソロイシン（I）、67 番目のアラニン（A）、73 番目のリジン（K））については T6-16 VH のものを保持し、それ以外の FR 領域をアクセプター配列に置き換えた（HuT6-16 VH1）。また 73 番目のリジン残基（K）については、抗原結合部位の適切な形成に対する影響が少ない可能性があり、HuT6-16 VH1 のリジン残基をより寛容なアミノ酸残基であるスレオニン（T）に置き換えたアミノ酸配列を別途デザインした（HuT6-16 VH2）。デザインしたヒト型化 T6-16 VH（HuT6-16 VH1 および HuT6-16 VH2）、T6-16 VH および DA980102 VH のアミノ酸配列アライ

メントを図 43 に示した。

ヒト型化 T6-16 VL のデザインについても、同様に CDR 配列の移植を行った。

CDR の構造維持に重要なアミノ酸残基はアクセプター配列でも保持されており、

FR 配列はアクセプター配列と同じ配列を用いた (HuT6-16 VL) 。 HuT6-16

5 VL、T6-16 VL および L41174 VL のアミノ酸配列アライメントを図 44 に示した。

[実施例 3 4]

[ヒト型化 K5-70 VH および VL 遺伝子合成]

10 HuK5-70 VH および HuK5-70 VL をコードする遺伝子は以下のように作製した。上述のようにデザインした HuK5-70 VH および VL の N 末端側に、それぞれ K5-70 VH、VL 由来のシグナルペプチド配列を付加したアミノ酸配列をもとに遺伝子合成を行った (Operon 社) 。その際、それぞれ合成した HuK5-70 VH および HuK5-70 VL の遺伝子配列の 5'末端側に Kozak 配列 (ACC ACC) を付
15 加し、また HuK5-70 VH の 5'末端には、制限酵素部位として EcoRI の部位 (GAA TTC) を付加し、3'末端には NheI (GCT AGC) の部位を付加した。同様に、HuK5-70 VL の 5'末端には、制限酵素部位として Age I の部位 (ACC GGT) を付加し、3'末端には BsiWI の部位 (CGT ACG) を付加した。合成した HuK5-70 VH 遺伝子、および HuK5-70 VL 遺伝子は、pCR2.1 ベクター
20 (Invitrogen) に TA クローニングにより組み込んだ。遺伝子合成により作製した HuK5-70 VH および VL の遺伝子配列をそれぞれ図 45 及び 46 に示した。

[実施例 3 5]

[ヒト型化 T6-16 VH1、T6-16 VH2 および T6-16 VL 遺伝子合成]

25 HuT6-16 VH1、HuT6-16 VH2 および HuT6-16 VL をコードする遺伝子は以下のように作製した。デザインした HuT6-16 VH1、HuT6-16 VH2 の N 末端側に T6-16 VH 由来のシグナルペプチド配列を、HuT6-16 VL の N 末端側に T6-16 VL 由来のシグナルペプチド配列をそれぞれ付加したアミノ酸配列をもとに遺伝子合成を行った (Operon 社) 。その際、それぞれ合成した HuT6-16 VH1、

HuT6-16 VH2 および HuT6-16 VL の遺伝子配列の 5'末端側に Kozak 配列 (ACC ACC) を付加し、また HuT6-16 VH1 および HuT6-16 VH2 の 5'末端には、制限酵素部位として EcoRI の部位 (GAA TTC) を付加し、3'末端には NheI の部位 (GCT AGC) を付加した。同様に、ヒト型化 T6-16 VL の 5'末端
5 には、制限酵素部位として Age I の部位 (ACC GGT) を付加し、3'末端には BsiWI の部位 (CGT ACG) を付加した。合成した HuT6-16 VH1 遺伝子および HuT6-16 VH2 遺伝子ならびに HuT6-16 VL 遺伝子は、pCR2.1 ベクター (Invitrogen) に TA クローニングにより組み込んだ。

遺伝子合成により作製した HuT6-16 VH1、HuT6-16 VH2 および HuT6-16
10 VL の遺伝子配列をそれぞれ図 47~49 に示した。

〔実施例 3 6〕

[ヒト型化 K5-70 VH および VL 遺伝子発現ベクター構築]

pCR2.1 ベクター (Invitrogen) に組み込まれた HuK5-70 VH および VL 遺伝
15 子は、それぞれ制限酵素 EcoRI 及び Nhe I、Age I 及び BsiWI によって消化し、遺伝子断片の回収を行った。次に、切り出した HuK5-70 VH 遺伝子はヒト IgG1 フォームの発現用の動物細胞発現ベクターである、pFUSE-CHlg-hG1 ベクター (InvivoGen) の EcoRI/Nhe I 部位に挿入し (pFUSE-CHlg-HuK5-70)、HuK5-70 VL 遺伝子はヒト Ig κ フォーム発現用ベクターである pFUSE2-
20 CLlg-hk ベクター (InvivoGen) の Age I/BsiWI 部位に挿入して (pFUSE2-CLlg-HuK5-70)、それぞれ、コンストラクトを完成させた。

〔実施例 3 7〕

[ヒト型化 T6-16 VH1、T6-16 VH2 および T6-16 VL 遺伝子発現ベクター構築]

25 pCR2.1 ベクター (Invitrogen) に組み込まれた T6-16 VH1、T6-16 VH2 遺伝子は制限酵素 EcoRI 及び Nhe I で消化し、T6-16 VL 遺伝子は Age I 及び BsiWI で消化し、遺伝子断片の回収を行った。次に、切り出した T6-16 VH1 遺伝子は pFUSE-CHlg-hG1 ベクター (InvivoGen) の EcoRI/Nhe I 部位に挿入し (pFUSE-CHlg-HuT6-16-1)、T6-16 VH2 遺伝子も同様に pFUSE-CHlg-hG1

ベクター (InvivoGen) の EcoRI/Nhe I 部位に挿入し (pFUSE-CHlg-HuT6-16-2)、T6-16 VL 遺伝子は pFUSE2-CLlg-hk ベクター (InvivoGen) の Age I/BsiWI 部位に挿入して (pFUSE2-CLlg-HuT6-16)、それぞれ、コンストラクトを完成させた。

5

〔実施例 38〕

[HuK5-70 抗体、HuT6-16-1 抗体および HuT6-16-2 抗体を安定的に発現する 293F 細胞株の樹立]

293F 細胞 (Invitrogen) は、FreeStyle 293 Expression Medium (Invitrogen) で維持、培養した。293F 細胞への遺伝子導入は 293 fectin 試薬 (Invitrogen) を用い、添付のプロトコルに従い行った。pFUSE-CHlg-HuK5-70 および pFUSE2-CLlg-HuK5-70 を共に 293F 細胞へ導入し、Zeocin (InvivoGen) および Blasticidin (InvivoGen) による薬剤選択を行うことで HuK5-70 抗体を安定的に発現する細胞株を樹立した。同様に、pFUSE-CHlg-HuT6-16-1 および pFUSE2-CLlg-HuT6-16 を共に 293F 細胞へ導入し、上記の薬剤選択を行うことで HuT6-16-1 抗体を安定的に発現する細胞株を樹立した。また同様に、pFUSE-CHlg-HuT6-16-2 および pFUSE2-CLlg-HuT6-16 を共に 293F 細胞へ導入し、上記の薬剤選択を行うことで HuT6-16-2 抗体を安定的に発現する細胞株を樹立した。

20

〔実施例 39〕

[HuK5-70 抗体、HuT6-16-1 抗体および HuT6-16-2 抗体タンパク質の精製]

樹立した各抗体発現細胞株は $1 \sim 2.5 \times 10^5$ cells/ml で FreeStyle 293 Expression Medium (Invitrogen) に接種し、6~8 日間ローラーボトル培養を行った。培養上清を回収した後、rProtein A Sepharose Fast Flow (GE Healthcare) を用いて定法に従い各ヒト型化抗体の精製を行った。

25

図 50 に、HuK5-70 抗体、HuT6-16-1 抗体及び HuT6-16-2 抗体を発現させた 293F 細胞の培養上清中の、各ヒト型化抗体タンパク質の発現をウエスタンブロットで確認した図を示した。具体的には、SDS-PAGE を行った後、PVDF メン

ブレン (Immobilon-P, Millipore, IPVH00010)に転写した。メンブレンは5%スキムミルクを含む TBS (Tris-buffered saline)を用いて室温、30 分間ブロッキングを行った。0.1%TBST (0.1% Tween 20 含有 TBS)で 5 分間、3 回洗浄した後、1 次抗体との反応を行った。

- 5 レーン 1 は遺伝子導入を行っていない 293F 細胞の培養上清（ネガティブコントロール）、レーン 2 は pFUSE-CHlg-HuK5-70 および pFUSE2-CLlg-HuK5-70 を導入した 293F 細胞の培養上清を示す。HuK5-70 抗体の重鎖および軽鎖タンパク質の検出はビオチン標識した抗ヒト IgG F(ab')₂ 抗体（Rockland）を用いた。レーン 3 は 293F 細胞に pFUSE-CHlg-HuT6-16-1 および pFUSE2-CLlg-HuT6-16
10 HuT6-16 を導入した 293F 細胞の上清、レーン 4 は pFUSE-CHlg-HuT6-16-2 および pFUSE2-CLlg-HuT6-16 を導入した 293F 細胞の上清を示し、HuT6-16-1 抗体および HuT6-16-2 抗体の重鎖タンパク質はビオチン標識した抗ヒト IgG Fc 抗体（Rockland）で、HuT6-16-1 抗体および HuT6-16-2 抗体の軽鎖タンパク質はビオチン標識した抗ヒト IgG F(ab')₂ 抗体（Rockland）でそれぞれ検出した。
15 た。

その結果、HuK5-70 抗体、HuT6-16-1 抗体及び HuT6-16-2 抗体のいずれにおいても、重鎖および軽鎖タンパク質の培養上清中での発現が確認された。

- また、図 51 に、精製した HuK5-70 抗体、HuT6-16-1 抗体及び HuT6-16-2 抗体を、SDS-PAGE で展開後、CBB 染色した図を示した。還元条件下で、い
20 らも約 50kD の重鎖と約 25kD の軽鎖が検出され、上述したウエスタンブロットで検出された各重鎖および軽鎖と同じ位置にバンドが確認された。以上の結果から、HuK5-70 抗体タンパク質、HuT6-16-1 抗体タンパク質及び HuT6-16-2 抗体タンパク質の産生が確認された。

25 [実施例 40]

[ヒト型化 K5-70 抗体（HuK5-70）及びヒト型化 T6-16 抗体（HuT6-16-1, HuT6-16-2）の抗原親和性]

精製した HuK5-70 抗体、HuT6-16-1 抗体及び HuT6-16-2 抗体の抗原親和性を FACS、及び ELISA を用いた方法で検討した。

FACS は、実施例 5 に記載した HEK293 細胞にヒト全長 TROP-2 遺伝子を安定的に発現させた HEK293-hTROP-2 細胞と内在的にヒト TROP-2 タンパク質を細胞表面に発現している膵臓癌細胞株 PK-59 を用いて行った。トリプシン処理によって培養皿から剥がした細胞 (HEK293-hTROP-2 細胞、又は PK-59 細胞) の懸濁液 (5×10^5 cells) に対し、1 次抗体として 10% FCS を含む培地で $1 \mu\text{g/ml}$ に希釈した抗体溶液 $100 \mu\text{l}$ 加え、 4°C で 20 分間 incubation した。その後、 1ml の 10% FCS を含む培地で洗浄し、フィコエリスリン (PE) 標識 anti-mouse IgG 抗体 (BD Pharmingen) およびビオチン標識 anti-human IgG Fc 抗体 (Rockland) をそれぞれ 200 倍、2000 倍希釈した 2 次抗体溶液 $100 \mu\text{l}$ を加えた。 4°C で 20 分間 incubation した後、再び 1ml の 10% FCS を含む培地で洗浄した。2 次抗体としてビオチン標識 anti-human IgG Fc 抗体を用いた場合は、蛍光標識試薬としてストレプトアビジン標識 PE (BD Pharmingen) を 400 倍希釈した標識溶液を $100 \mu\text{l}$ 加え、 4°C で 20 分間 incubation した後、 1ml の 10% FCS を含む培地で洗浄した。その後、標識細胞を含むサンプルは 1ml の 1% FCS、 2mM EDTA 入りの PBS に懸濁し、FACSCalibur (Becton Dickinson) を用いて解析した。その結果、HEK293-hTROP-2 細胞においても、PK-59 細胞においても、HuK5-70 抗体は、マウス K5-70 抗体と同等の反応性を示した。同様に HuT6-16-1 抗体および HuT6-16-2 抗体は T6-16 抗体と同等の反応性を示した (図 52)。

更に ELISA 法により抗原親和性について検証した。ELISA は、実施例 3 で示した hTROP-2 細胞外領域のリコンビナントタンパク質を固相化した ELISA プレートを使用して行った。具体的には、96 well plate (BD FALCON) を PBS で $0.5 \mu\text{g/ml}$ に希釈した hTROP-2 細胞外領域のリコンビナントタンパク質を $50 \mu\text{l/well}$ でコーティングした (4°C 、一晚)。洗浄バッファー (0.05% Tween 20 を含む PBS) で洗浄後、ブロッキングバッファー (2% スキムミルク、0.05% Tween 20 を含む PBS) を $200 \mu\text{l/well}$ で添加しブロッキングを行った (室温、1 時間)。洗浄バッファーで洗浄した後、HuK5-70 抗体、HuT6-16-1 抗体、HuT6-16-2 抗体、K5-70 抗体および T6-16 抗体を ELISA バッファー (1% スキムミルク、0.025% Tween 20 を含む PBS) で $3.05 \times 10^{-4} \sim 5 \mu\text{g/ml}$ の

範囲で 2 倍希釈系列サンプルを調製し、各 50 μ l/well で添加した（室温、2 時間）。洗浄バッファーで洗浄した後、検出用抗体として ELISA バッファーで 2000 倍希釈した HRP 標識 goat 抗ヒト κ 鎖抗体（SouthernBiotech）もしくは 2000 倍希釈した HRP 標識 sheep 抗マウス IgG 抗体（GE Healthcare）を 50 μ l/well で添加した（室温、1 時間）。洗浄バッファーで洗浄後、TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine、SIGMA) を基質溶液として 50 μ l/well で添加し、発色反応を行った。1M 硫酸を 25 μ l/well で加え反応を停止させた後、Microplate reader Model 550 (BioRad) を用いて、655nm の吸光度をリファレンスとして 450nm の吸光度を測定した。その結果、K5-70 および HuK5-70 の反応曲線はほぼ重なり、EC50 はそれぞれ 27ng/ml、22ng/ml であった（図 53）。同様に、T6-16、HuT6-16-1 及び HuT6-16-2 の反応曲線もほぼ重なり、EC50 はそれぞれ 30ng/ml、27ng/ml、27ng/ml であった（図 54）。これらの結果から HuK5-70 抗体、HuT6-16-1 抗体および HuT6-16-2 抗体は、それぞれ、ヒト型化する前の親抗体である K5-70 又は T6-16 抗体と同等の抗原親和性を示すことが明らかとなった。

〔実施例 4 1〕

〔ヒト型化抗 hTROP-2 抗体（HuK5-70）の *in vivo* における抗腫瘍活性〕

次に、HuK5-70 抗体の *in vivo* における抗腫瘍活性を、内在的にヒト TROP-2 を細胞表面に発現するヒト大腸癌細胞株 SW480 を用いた xenograft treatment モデルで検討した。5 $\times$ 10⁶ cells の SW480 細胞を 7 週齢雌の NOD-scid マウスの右脇腹皮下に移植（Day 1）し、平均の腫瘍体積が 100 mm³ に達した段階で群分けを行い（Day 9）、Day 9 から 3 日に 1 回の投与間隔で、抗体の腹腔内投与を開始した。癌細胞移植から 39 日目（Day 39）におけるコントロール群（PBS 投与、N=8）の腫瘍体積が 824.3 $\pm$ 188.8 mm³ であったのに対して、HuK5-70 抗体投与群（10 mg/kg 体重、N=8）では、455.5 $\pm$ 208.6 mm³ (P < 0.01 by Student's t-test) であり有意に腫瘍形成が阻害された（阻害率 44.7 %）（図 55A）。腫瘍重量においては、コントロール群が 0.509 $\pm$ 0.161 g であったのに対して、HuK5-70 抗体投与群では 0.272 $\pm$ 0.162 g (P < 0.05 by Student's t-test) であり 46.6 % の阻

害率であった（図55B）。

〔実施例 4 2〕

〔ヒト型化抗 hTROP-2 抗体（HuK5-70 及び HuT6-16-2）のヒト大腸癌細胞株

5 SW480 細胞 xenograft treatment モデルにおける用量依存的な抗腫瘍活性〕

HuK5-70 及び HuT6-16-2 抗体の用量依存的な抗腫瘍活性を、ヒト大腸癌細胞株 SW480 を用いた xenograft treatment モデルにおいて検討した。5 × 10⁶ cells の SW480 細胞を 7 週齢雌の NOD-scid マウスの右脇腹皮下に移植（Day 1）し、癌細胞移植から 9 日目（Day 9）に平均の腫瘍体積が 100 mm³ に達した段階でコントロール群（PBS 投与群、N=8, 101.65±8.35 mm³）, 1 mg/kg 体重の HuK5-70 抗体投与群（N=8, 103.18±9.86 mm³）, 5 mg/kg 体重の HuK5-70 抗体投与群（N=8, 101.34±8.94 mm³）, 10 mg/kg 体重の HuK5-70 抗体投与群（N=8, 101.53±8.98 mm³）, 1 mg/kg 体重の HuT6-16-2 抗体投与群（N=8, 103.18±9.86 mm³）, 5 mg/kg 体重の HuT6-16-2 抗体投与群（N=8, 101.34±8.94 mm³）, 10 mg/kg 体重の HuT6-16-2 抗体投与群（N=8, 101.53±8.98 mm³）に群分を行い、Day 9 より 3 日に 1 回の間隔で抗体の腹腔内投与を行った。癌細胞移植から 48 日目（Day 48）におけるコントロール群の腫瘍体積が 754.67±276.05 mm³ であったのに対して、HuK5-70 抗体投与群では、1 mg/kg 体重投与群では、521.81±183.45 mm³（阻害率 30.9%）, 5 mg/kg 体重投与群では、258.78±137.02 mm³（阻害率 65.7%, P < 0.01 by Student' s t-test）, 10 mg/kg 体重投与群では、314.60±152.89 mm³（阻害率 58.3 %, P < 0.01 by Student' s t-test）であった（図 56A）。HuT6-16-2 抗体投与群では、1 mg/kg 体重投与群では、600.41±319.84 mm³（阻害率 20.4%）, 5 mg/kg 体重投与群では、315.32±189.02 mm³（阻害率 58.2%, P < 0.01 by Student' s t-test）, 10 mg/kg 体重投与群では、270.79±266.71 mm³（阻害率 64.1 %, P < 0.01 by Student' s t-test）であった（図 57A）。Day 48 における腫瘍重量については、コントロール群が 0.422±0.201 g であったのに対して、HuK5-70 抗体投与群では、1 mg/kg 体重投与群で、0.301±0.160 g（阻害率 28.7%）, 5 mg/kg 体重投与群で、0.115±0.083 g（阻害率 72.7%, P < 0.01 by Student' s t-test）, 10 mg/kg 体重投与群で、

0.244±0.181 g (阻害率 42.2%) となった (図 56B)。HuT6-16-2 抗体投与群では、1 mg/kg 体重投与群で、0.422±0.255 g (阻害率 0%), 5 mg/kg 体重投与群で、0.247±0.151 g (阻害率 41.5%), 10 mg/kg 体重投与群で、0.190±0.190 g (阻害率 53.1%, $P < 0.01$ by Student's t-test) となった (図 57B)。これらの結果から、HuK5-70 及び HuT6-16-2 抗体の用量依存的な抗腫瘍活性が確認された。

〔実施例 4 3〕

〔抗 hTROP-2 マウスモノクローナル抗体 K5-70 及び T6-16 のヒト卵巣癌細胞株 SK-OV-3 細胞 xenograft treatment モデルにおける抗腫瘍活性〕

10 親抗体である K5-70 及び T6-16 抗体の *in vivo* における抗腫瘍活性を、内在的に hTROP-2 を細胞表面に発現するヒト卵巣癌細胞株 SK-OV-3 を用いた xenograft treatment モデルで検討した。5 × 10⁶ cells の SK-OV-3 細胞を 7 週齢雌のヌードマウスの右脇腹皮下に移植 (Day 1) し、癌細胞移植から 11 日目 (Day 11) に、明らかな腫瘍形成が確認された個体 (平均の腫瘍体積約 50 mm³) について群分けを行い、Day 11 から週に 2 回の投与間隔で、抗体の腹腔内投与を行った。癌細胞移植から 56 日目 (Day 56) におけるコントロール群 (PBS 投与, N=8) の腫瘍体積が 652.6±349.1 mm³ であったのに対して、K5-70 抗体投与群 (10 mg/kg 体重, N=8) では、253.7±137.3 mm³ ($P < 0.01$ by Student's t-test) と有意に腫瘍形成が阻害され (阻害率 61.1 %)、T6-16 抗体投与群 (10 mg/kg 体重, N=8) では、214.6±98.6 mm³ ($P < 0.01$ by Student's t-test) と有意に腫瘍形成が阻害された (阻害率 67.1 %) (図 58A)。腫瘍重量においては、コントロール群が 0.413±0.218 g であったのに対して、K5-70 抗体投与群では 0.194±0.112 (g) ($P < 0.05$ by Student's t-test) と 53.0 % の阻害率、T6-16 抗体投与群では 0.183±0.093 (g) ($P < 0.05$ by Student's t-test) と 55.7 % の阻害率であった (図 58B)。

〔実施例 4 4〕

〔抗 hTROP-2 マウスモノクローナル抗体 K5-70 及び T6-16 のヒト乳癌細胞株 MDA-MB-468 細胞 xenograft treatment モデルにおける抗腫瘍活性〕

同様に、K5-70 ならびに T6-16 抗体の *in vivo* における抗腫瘍活性を、内在的に hTROP-2 を細胞表面に発現するヒト乳癌細胞株 MDA-MB-468 を用いた xenograft treatment モデルで検討した。5 × 10⁶ cells の MDA-MB-468 細胞を 7 週齢雌のヌードマウスの右脇腹皮下に移植 (Day 1) し、癌細胞移植から 12 日目 (Day 12) に、明らかな腫瘍形成が確認された個体 (平均の腫瘍体積約 50 mm³) について群分けを行い、Day 12 から週に 2 回の投与間隔で、抗体の腹腔内投与を行った。癌細胞移植から 54 日目 (Day 54) におけるコントロール群 (PBS 投与, N=8) の腫瘍体積が 218.6 ± 75.5 mm³ であったのに対して、K5-70 抗体投与群 (10 mg/kg 体重, N=8) では、70.2 ± 37.4 mm³ (P < 0.01 by Student's t-test) と有意に腫瘍形成が阻害され (阻害率 67.9 %)、T6-16 抗体投与群 (10 mg/kg 体重, N=8) では、88.3 ± 42.9 mm³ (P < 0.01 by Student's t-test) と有意に腫瘍形成が阻害された (阻害率 59.6 %) (図 59A)。Day 54 における腫瘍重量においては、コントロール群が 0.142 ± 0.049 g であったのに対して、K5-70 抗体投与群では 0.050 ± 0.033 (g) (P < 0.01 by Student's t-test) と 64.8 % の阻害率、T6-16 抗体投与群では 0.077 ± 0.046 (g) (P < 0.05 by Student's t-test) と 45.8 % の阻害率であった (図 59B)。

〔実施例 45〕

〔抗 hTROP-2 マウスモノクローナル抗体 K5-70 及び T6-16 のヒト肺癌細胞株 Calu-3 細胞 xenograft treatment モデルにおける抗腫瘍活性〕

同様に、K5-70 抗体の *in vivo* における抗腫瘍活性を、内在的に hTROP-2 を細胞表面に発現するヒト肺癌細胞株 Calu-3 を用いた xenograft treatment モデルで検討した。5 × 10⁶ cells の Calu-3 細胞を 7 週齢雌のヌードマウスの右脇腹皮下に移植 (Day 1) し、癌細胞移植から 9 日目 (Day 9) に、明らかな腫瘍形成が確認された個体 (平均の腫瘍体積約 100 mm³) について群分けを行い、Day 9 から週に 2 回の投与間隔で、抗体の腹腔内投与を行った。癌細胞移植から 41 日目 (Day 41) におけるコントロール群 (PBS 投与, N=8) の腫瘍体積が 395.7 ± 221.2 mm³ であったのに対して、K5-70 抗体投与群 (10 mg/kg 体重, N=8) では、120.7 ± 125.6 mm³ (P < 0.01 by Student's t-test) と有意に腫瘍形成が阻害さ

れ（阻害率 69.5 %）、T6-16 抗体投与群投与群(10 mg/kg 体重, N=8)では、
146.3 ± 128.4 mm³ (P < 0.05 by Student's t-test) と有意に腫瘍形成が阻害され
た（阻害率 63.0%）（図 60A）。腫瘍重量においては、コントロール群が 0.301
± 0.189 g であったのに対して、K5-70 抗体投与群では 0.08 ± 0.085 (g) (P <
5 0.01 by Student's t-test)と 73.5 %の阻害率、T6-16 抗体投与群では 0.106 ±
0.096 (g) (P < 0.05 by Student's t-test)と 64.9 %の阻害率であった（図 60B）。

〔実施例 4 6〕

10 [抗 hTROP-2 マウスモノクローナル抗体 K5-70 のヒト胆管癌細胞株 TFK-1 細胞 xenograft prevention モデルにおける抗腫瘍活性]

同様に、K5-70 抗体の *in vivo* における抗腫瘍活性を、内在的に hTROP-2 を
細胞表面に発現するヒト胆管癌細胞株 TFK-1 を用いた xenograft prevention
モデルで検討した。5 × 10⁶ cells の TFK-1 細胞を 7 週齢雌のヌードマウスの右
脇腹皮下に移植（Day 1）し、同日より、週に 2 回の投与間隔で、抗体の腹腔内
15 投与を開始した。癌細胞移植から 31 日目（Day 31）におけるコントロール群
（PBS 投与, N=5）の腫瘍体積が 1000.4 ± 268.9 mm³ であったのに対して、K5-
70 抗体投与群(10 mg/kg 体重, N=5)では、197.2 ± 215.5 mm³ (P < 0.01 by
Student's t-test)と有意に腫瘍形成が阻害された（阻害率 80.3 %）（図 61A）。
腫瘍重量においては、コントロール群が 0.443 ± 0.070 g であったのに対して、
20 K5-70 抗体投与群では 0.063 ± 0.052 (g) (P < 0.01 by Student's t-test)と 85.8 %
の阻害率であった（図 61B）。

〔実施例 4 7〕

[HuK5-70 および HuT6-16-2 抗体の avidity 解析]

25 HuK5-70 および HuT6-16-2 抗体の抗原結合活性について、低密度の抗原を固
相化した 96 well plate を用いた ELISA 法（低密度抗原固相化 ELISA）により
検討した。96 穴プレートに 0.1M 酢酸バッファー(pH5.3)で 0.1 μg/mL に調製し
たりコンビナント hTACSTD2-Fc-His タンパク(Creative BioMart)を 50 μL/ウ
ェルで添加し、4℃で一晩コーティングした後、実施例 4 0 と同様の解析をおこ

なった。被験抗体は ELISA バッファー（1%スキムミルク、0.025% Tween 20 を含む PBS）で 20 μ g/mL から 2 倍希釈系列（15 点）を作製し使用した。その結果、HuT6-16-2 抗体は T6-16 抗体とほぼ同等の結合活性であるのに対し（EC50 値はそれぞれ 49ng/mL と 41ng/mL）、HuK5-70 抗体の EC50 値は

5 K5-70 抗体の約 20 倍となった（それぞれ 222ng/mL、12ng/mL、図 62）。

次に HuK5-70 および K5-70 抗体の抗原結合活性について、一価の抗原-抗体反応を解析する ELISA により検討した。96 穴プレートに 0.1M 酢酸バッファー(pH5.3)で 1 μ g/mL に希釈した Goat anti-human IgG (Fc γ specific) (Southern Biotech)および 3 μ g/mL に希釈した Goat anti-mouse IgG (γ chain specific) (Southern Biotech)を 50 μ L/ウェルで添加し、4℃で一晩コーティングした。洗浄バッファー（0.05% Tween 20 を含む PBS）で洗浄後、ブロッキングバッファー（2%スキムミルク、0.05% Tween 20 を含む PBS）を 200 μ L/ウェルで添加しブロッキングを行った（室温、1 時間）。洗浄バッファーで洗浄した後、ELISA バッファー（1%スキムミルク、0.025% Tween 20 を含む PBS）

15 で 1 μ g/mL 希釈した試験抗体を 50 μ L/ウェルで添加した。この際、Goat anti-human IgG (Fc γ specific)をコートしたウェルには HuK5-70 抗体を添加し、Goat anti-mouse IgG (γ chain specific)をコートしたウェルには K5-70 抗体を添加した。室温で 1 時間静置した後、洗浄バッファーで洗浄し、実施例 3 で示した hTROP-2 細胞外領域のリコンビナントタンパク質 (hTROP-2 EC)を ELISA

20 バッファーで 5 μ g/mL から 3 倍希釈系列（10 点）を作製し、各 50 μ L/ウェルで添加した。室温で 1 時間静置した後、洗浄バッファーで洗浄し、1 次抗体として ELISA バッファーで 2 μ g/mL に希釈した anti-His (G-18) (Santa Cruz) を 50 μ L/ウェルで添加した。室温で 1 時間静置した後、洗浄バッファーで洗浄し、2 次抗体として ELISA バッファーで 1000 倍希釈した HRP 標識 anti-rabbit

25 IgG (GE Healthcare) を 50 μ L/ウェルで添加した。室温で 1 時間静置した後、洗浄バッファーで洗浄し、TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, SIGMA) を基質溶液として 50 μ L/ウェルで添加し、発色反応を行った。1M 硫酸を 25 μ L/ウェルで加え反応を停止させた後、Microplate reader Model 550 (Bio Rad) を用いて、655nm の吸光度をリファレンスとして 450nm の吸光度を測定した。

その結果、hTROP-2EC タンパク質の K5-70 および HuK5-70 抗体との結合カーブから算出される EC50 はそれぞれ 7ng/mL、6ng/mL となった（図 63）。このことから一価の抗原-抗体反応においては HuK5-70 抗体と K5-70 抗体は同等の抗原親和性（アフィニティー）であることが示された。

- 5 実施例 40 で示したとおり、高密度の抗原(0.5 μ g/mL)を固相化した 96 well plate を用いた ELISA 法（抗原固相化 ELISA）では K5-70 抗体と HuK5-70 抗体の抗原親和性が同等であったことから（図 53）、低密度の抗原（0.1 μ g/mL）を固相化した ELISA 法で HuK5-70 抗体の抗原結合活性が K5-70 抗体と比べて相対的に低い原因として、HuK5-70 抗体では 2 つの抗原結合アームの運動能に関するフレキシビリティ、いわゆる“アビディティ（Avidity）”が、
10 K5-70 抗体と比べて相対的に低いことが考えられた。

〔実施例 48〕

〔ヒト型化 K5-70 抗体の変異体の作製とキャラクタリゼーション〕

- 15 HuK5-70 抗体の“アビディティ（Avidity）”を向上させることを目的として、以下の実験を行った。

前述のとおり HuK5-70 抗体の“アビディティ（Avidity）”が相対的に低いことが、VH と VL のどちらに起因するのかを以下の実験で検討した。まず、親抗体である K5-70 抗体の H 鎖可変領域 (K5-70 VH)、および L 鎖可変領域 (K5-70 VL) をコードする遺伝子を遺伝子合成により作製した（Operon 社）。その際、K5-70 VH および K5-70 VL の遺伝子配列の 5'末端側に Kozak 配列（ACC ACC）を付加した。さらに K5-70 VH の 5'末端には制限酵素部位として EcoRI の部位(GAA TTC)を、3'末端には NheI の部位(GCT AGC)を付加した。同様に、
20 K5-70 VL の 5'末端には制限酵素部位として Age I の部位(ACC GGT)を、3'末端には BsiWI の部位(CGT ACG)を付加した。合成した K5-70 VH 遺伝子、および K5-70 VL 遺伝子は、pCR2.1 ベクター（Invitrogen）に組み込んだ。遺伝子合成により作製した K5-70 VH および VL の遺伝子配列をそれぞれ図 64 と図 65 に示した。pCR2.1 ベクターに組み込まれた K5-70 VH および K5-70 VL 遺伝子は、それぞれ制限酵素 EcoRI および Nhe I、Age I および BsiWI によって消化

し、遺伝子断片の回収を行った。次に、切り出した K5-70 VH 遺伝子は、ヒト IgG1 フォーム発現用ベクターである、pFUSE-CHlg-hG1 ベクター (InvivoGen) の EcoRI/Nhe I 部位に、K5-70 VL 遺伝子はヒト Ig κ フォーム発現用ベクターである pFUSE2-CLlg-hk ベクター (InvivoGen) の Age I/BsiWI 部位にそれぞれ挿入し、マウス-ヒトキメラコンストラクトを完成させた (pFUSE-CHlg-MuK5-70、pFUSE2-CLlg-MuK5-70)。

上記で作製したコンストラクトと、実施例 36 で作製した HuK5-70 H 鎖発現ベクター (pFUSE-CHlg-HuK5-70) および HuK5-70 L 鎖発現ベクター (pFUSE2-CLlg-HuK5-70) を、下記表の 1~4 のとおりの組み合わせで 293F 細胞 (Invitrogen) に共発現させた。

	H 鎖	L 鎖	産生される抗体	備考
1	pFUSE-CHlg-HuK5-70	pFUSE2-CLlg-HuK5-70	HuK5-70 抗体	ヒト型化 K5-70 抗体
2	pFUSE-CHlg-HuK5-70	pFUSE2-CLlg-MuK5-70	HuVH/MuVL 抗体	ヒト型化 K5-70VH/ マウス K5-70VL
3	pFUSE-CHlg-MuK5-70	pFUSE2-CLlg-HuK5-70	MuVH/HuVL 抗体	マウス K5-70VH/ ヒト型化 K5-70VL
4	pFUSE-CHlg-MuK5-70	pFUSE2-CLlg-MuK5-70	ChK5-70 抗体	キメラ K5-70 抗体

293F 細胞 (Invitrogen) へのトランスフェクションは、NeoFection 試薬 (Astec) を用いて添付の方法に従った。トランスフェクション後、5 日間 FreeStyle 293 Expression Medium (Invitrogen) を用いて 37℃、CO₂ 濃度 8% の CO₂ インキュベーターで培養を行った後培養上清を回収した。培養上清中の

抗体濃度は、サンドイッチ ELISA 法で測定した。具体的には、96 穴プレートに PBS で $1\mu\text{g/mL}$ に希釈した Goat anti-human IgG (Fc γ specific) (Southern Biotech) を $50\mu\text{L}$ /ウェルで添加し、 4°C で一晩コーティングした。洗浄バッファ

5 (0.05% Tween20 を含む PBS) で洗浄した後、ブロッキングバッファ (2% スキムミルクと 0.05% Tween20 を含む PBS) を $200\mu\text{L}$ /ウェルで添加し、1 時間、室温にてブロッキングを行った。洗浄バッファで洗浄した後、ELISA

10 バッファ (1% スキムミルクと 0.025% Tween 20 を含む PBS) で適当な希釈倍率に希釈した培養上清を $50\mu\text{L}$ /ウェルで添加し、室温で 2 時間反応させた。標準品として HuK5-70 抗体を用いた。洗浄バッファで洗浄した後、検出用抗体

15 として ELISA バッファで 1,000 倍希釈した HRP 標識 Goat anti-human kappa (κ chain specific) (Southern Biotech) を $50\mu\text{L}$ /ウェルで添加し、室温で 1 時間反応させた。洗浄バッファで洗浄した後、TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, SIGMA) 基質溶液を $50\mu\text{L}$ /ウェルで添加し、発色反応

20 を行った。1M 硫酸を $25\mu\text{L}$ /ウェルで加え反応を停止させた後、iMark Microplate reader (Bio Rad) を用いて 655nm の吸光度をリファレンスとして 450nm の吸光度を測定した。4 種類の培養上清中の抗体と hTROP-2 との結合は、前述した低密度抗原固相化 ELISA で測定した。その結果、マウス K5-70 VH と HuK5-70 VL から構成される MuVH/HuVL 抗体の hTROP-2 に対する結合は ChK5-70 抗体と同等であったが、HuK5-70 VH とマウス K5-70 VL から構成される HuVH/MuVL 抗体の hTROP-2 に対する結合活性は、ChK5-70 と比べて相対的に低かった (図 66)。このことから、HuK5-70 VH が HuK5-70 の “アビディティー” に関与していることが示唆された。そこで、HuK5-70 抗体の “アビディティー” を向上させた改変抗体を作製するために、HuK5-70 VH のアミノ酸の置換を行った。図 41 に示した HuK5-70 VH と K5-70 VH のアミノ酸配列のアライメントから分かるとおり、アミノ酸番号が 5, 7, 11, 12, 13, 20, 25 38, 40, 44, 73, 75, 81, 82c, 83, 87, 108 および 109 番目の合計 17 個のアミノ酸が、HuK5-70 VH と K5-70 VH との間で異なっている (アミノ酸番号は Kabat らの定義(1991)に従った)。HuK5-70 VH のこれらのアミノ酸を対応する K5-70 VH のアミノ酸に 1 つずつ置換した変異体を遺伝子合成により作製し、発現

ベクター (pFUSE-CHlg-HuK5-70 変異体) を作製した。さらに、Landolfi らの報告(J. Immunol. 166:1748, 2001)によると、VH の 11 番目と 38 番目のアミノ酸がヒト型化抗体のアビディティーに関与しており、両者のアミノ酸を対応するマウス由来のアミノ酸に置換することにより、アビディティー、および生物活性が向上することが報告されている。そこで、11 番目と 38 番目のアミノ酸の 2 重変異体も併せて作製した。図 67 に作製した 18 種類の HuK5-70 VH 変異体の名称とアミノ酸配列を示した。

作製した 18 種類の HuK5-70 VH 変異体 (pFUSE-CHlg-HuK5-70 変異体の発現ベクター) を、それぞれ HuK5-70 L 鎖発現ベクター (pFUSE2-CLlg-HuK5-70) と組み合わせて、HEK293 細胞にトランスフェクションし、その培養上清を用いて各アミノ酸置換抗体と hTROP-2 との結合活性を低密度抗原固相化 ELISA で検討した。その結果、18 種類の HuK5-70 VH 変異体のうち、HuK5-70 VH の 44 番目の R(アルギニン)を G(グリシン)に置換した R44G 変異体 (HuK5-70 R44G ; 以下 HuK5-70-2) において、明らかな抗原結合活性の向上が認められた (図 68) 。HuK5-70 VH R44G (以下 HuK5-70 VH2)遺伝子の配列は図 69 に示した。

〔実施例 49〕

20 〔HuK5-70-2 抗体の精製およびキャラクタリゼーション〕

HuK5-70 R44G 変異型抗体である HuK5-70-2 抗体は、以下のように精製した。pFUSE-CHlg-HuK5-70 R44G と pFUSE2-CLlg-HuK5-70 を 293F 細胞にトランスフェクションし、5 日間培養を行った後、培養上清を回収した。回収した培養上清から rProtein A sepharose Fast Flow (GE Healthcare)を用いて、HuK5-70-2 抗体を精製した。精製した HuK5-70-2 抗体を還元条件下で SDS-PAGE により展開したところ、約 50kDa の H 鎖と約 25kDa の L 鎖が確認され、それぞれの抗体の純度は 95%以上であった (図 70) 。

精製した HuK5-70-2 および HuK5-70 抗体の hTROP-2 との結合活性を高密度抗原固相化 ELISA および低密度抗原固相化 ELISA で検討した。高密度抗原

固相化 ELISA で ($1\mu\text{g/mL}$ の hTROP-2 を固相化した 96 ウェルプレートを使用)、アフィニティーの検証を行った結果、HuK5-70 抗体と HuK5-70-2 抗体の結合曲線はほぼ重なり、両者のアフィニティーは同等であり、次に低密度抗原固相化 ELISA ($0.1\mu\text{g/mL}$ の hTROP-2 を固相化した 96 ウェルプレートを使用) によりアビディティーの検証を行った結果、培養上清を用いた場合の結果と同様、HuK5-70-2 抗体の抗原結合活性は HuK5-70 抗体より明らかに高かった (図 71)。具体的には、 EC_{50} 値は、K5-70 抗体が 11.4ng/mL 、HuK5-70 抗体が 33.4ng/mL 、HuK5-70-2 抗体が 11.4ng/mL であり、HuK5-70-2 抗体は、HuK5-70 抗体と比べて“アビディティー”が向上し、K5-70 抗体と同等の活性を有するものであることが示された。

〔実施例 50〕

〔ヒト型化抗 hTROP-2 抗体の抗体依存性細胞傷害(ADCC)活性の測定〕

(1) 標的細胞溶液の調整

標的細胞としては、内在的に hTROP-2 を発現するヒト大腸癌細胞株 SW480、ヒト膵臓癌細胞株 PK-59、ヒト前立腺癌細胞株 PC-3 を用いた。10 cm 細胞培養ディッシュで培養したターゲット細胞をトリプシン処理によってプレートから剥離し、アッセイ培地に懸濁した。ADCC アッセイ用の培地は、0.5% FBS を加えた Leivovitz L-15 培地 (SW480 細胞) または RPMI-1640 培地 (PK-59、PC-3 細胞) を用いた。遠心後 (1000 rpm, 3 分、室温)、ペレットを同じ培地で $2 \times 10^5 \text{ cell/mL}$ の細胞密度になるように調製し、標的細胞溶液とした。

(2) ヒト末梢血単核細胞の分離

健康人静脈血をヘパリン採血し、PBS で 2 倍に希釈後、Lymphoprep (第一化学薬品) 上に重層し遠心した (室温、750 rpm, 5 分、次に 2000 rpm, 20 分)。遠心後、中間層分画にある単核細胞 (健康人末梢血単核球) を回収し、PBS で 3 回洗浄後、アッセイ培地で細胞懸濁液を調製し、エフェクター細胞として使用した。

(3) ヒト型化抗 hTROP-2 抗体 (HuK5-70, HuK5-70-2 および HuT6-16-2 抗体) の ADCC 活性

96 穴平底プレート (FALCON 社製) に調製した標的細胞溶液の 100 μ L (2 $\times 10^4$ cell/ウェル) を分注した。次いで、ヒト末梢血単核細胞 (エフェクター細胞) を、エフェクター細胞 : ターゲット細胞比が 40:1 となるように添加した。更に、被験抗体として、ヒト型化抗 hTROP-2 抗体 (HuK5-70, HuK5-70-2 および HuT6-16-2 抗体) を最終濃度が 0.1~30 μ g/mL となるように加えて、全量を 200 μ L として CO₂ インキュベーター内 (37℃、5%CO₂) で 6 時間培養を行った。培養後、Cytotoxicity Detection Kit (LDH) (Roche, Cat. No. 11 644 793 001) を用い、Kit 添付のプロトコールに従って、エフェクター細胞により傷害を受けたターゲット細胞の細胞質から培養上清へ放出される乳酸脱水素酵素 (LDH) の活性を測定し、この測定結果を指標として ADCC 活性を評価した。

図 72A~72C に示したとおり、HuK5-70、および HuT6-16-2 抗体は hTROP-2 を細胞表面に発現するヒト大腸癌細胞株 SW480 (図 72A)、ヒト膀胱癌細胞株 PK-59 (図 72B)、ヒト前立腺癌細胞株 PC-3 (図 72C) に対して、用量依存的に ADCC 活性を発揮することが明らかとなった。また図 72B および図 72C に示したとおり、HuK5-70-2 抗体はヒト膀胱癌細胞株 PK-59 およびヒト前立腺癌細胞株 PC-3 細胞に対して、HuK5-70 抗体よりも強い ADCC 活性を発揮することが明らかとなった。HuK5-70-2 抗体は、前述のとおり、HuK5-70 VH の 44 番目の R(アルギニン)を G(グリシン)に置換することにより、hTROP-2 に対する結合能 (アビディティ) が向上した抗体であり、HuK5-70 抗体に比べて向上したアビディティが ADCC 活性に反映していることが示された。したがって、HuK5-70-2 抗体は、*in vivo* においても、HuK5-70 抗体と同様に優れた抗腫瘍活性を有する (好ましくは、HuK5-70 抗体より高い抗腫瘍活性を有し得る) ものと推認される。以上の結果から、HuK5-70、HuK5-70-2 及び HuT6-16-2 抗体は、hTROP-2 を細胞表面に発現する癌に対して有効な治療用抗体となることが示唆された。

産業上の利用可能性

- 本発明によれば、hTROP-2と特異的に反応し、*in vivo*において高い抗腫瘍活性を有する抗体、具体的には、低用量で*in vivo*での高い抗腫瘍活性を有するモノクローナル抗体、特に当該抗体のうちヒト型化抗体であるものを提供することができる。さらに本発明は、当該抗体を産生するハイブリドーマ、当該抗体の断片、当該抗体等と各種薬剤との複合体、腫瘍の診断用又は治療用医薬組成物、腫瘍の検出方法、腫瘍の検出用又は診断用キットを提供することができる。

配列表フリーテキスト

- 10 配列番号 3 : 合成DNA
配列番号 4 : 合成DNA
配列番号 5 : 合成DNA
配列番号 6 : 合成DNA
配列番号 7 : 合成DNA
15 配列番号 8 : 合成DNA
配列番号 9 : 合成DNA
配列番号 10 : 合成DNA
配列番号 11 : 合成DNA
配列番号 12 : 合成DNA
20 配列番号 13 : 合成DNA
配列番号 14 : 合成DNA
配列番号 15 : 合成DNA
配列番号 16 : 合成DNA
配列番号 17 : 合成DNA
25 配列番号 18 : 合成DNA
配列番号 19 : 合成DNA
配列番号 20 : 合成DNA
配列番号 21 : 合成DNA
配列番号 22 : 合成DNA

- 配列番号 2 3 : 合成DNA
配列番号 2 4 : 合成DNA
配列番号 2 5 : 合成DNA
配列番号 2 6 : 合成DNA
5 配列番号 2 7 : 合成DNA
配列番号 2 8 : 合成DNA
配列番号 2 9 : 合成DNA
配列番号 3 0 : 合成DNA
配列番号 3 1 : 合成DNA
10 配列番号 3 2 : 合成DNA
配列番号 3 3 : 合成DNA
配列番号 7 4 : 組換えDNA
配列番号 7 5 : 合成コンストラクト (組換えタンパク質)
配列番号 7 6 : 組換えDNA
15 配列番号 7 7 : 合成コンストラクト (組換えタンパク質)
配列番号 7 8 : 組換えDNA
配列番号 7 9 : 合成コンストラクト (組換えタンパク質)
配列番号 8 0 : 組換えDNA
配列番号 8 1 : 合成コンストラクト (組換えタンパク質)
20 配列番号 8 2 : 組換えDNA
配列番号 8 3 : 合成コンストラクト (組換えタンパク質)
配列番号 9 2 : 組換えタンパク質
配列番号 9 3 : 組換えタンパク質
配列番号 9 4 : 組換えタンパク質
25 配列番号 9 5 : 組換えタンパク質
配列番号 9 6 : 組換えタンパク質
配列番号 9 7 : 組換えタンパク質
配列番号 9 8 : 組換えタンパク質
配列番号 9 9 : 組換えDNA

配列番号 1 0 0 : 組換えDNA

請求の範囲

1. H鎖V領域のアミノ酸配列が配列番号92又は98で示されるアミノ酸配列
5 列からなり、L鎖V領域のアミノ酸配列が配列番号93で示されるアミノ酸配
列からなるヒトTROP-2に対する抗体。
2. 抗体のH鎖V領域のCDR1～3のアミノ酸配列が、それぞれ順に、配列番
号36～38で示されるアミノ酸配列であり、及び／又は、抗体のL鎖V領
域のCDR1～3のアミノ酸配列が、それぞれ順に、配列番号41～43で
示されるアミノ酸配列である、請求項1記載の抗体。
- 10 3. H鎖V領域のアミノ酸配列が配列番号94又は95で示されるアミノ酸配列
からなり、L鎖V領域のアミノ酸配列が配列番号96で示されるアミノ酸配
列からなる、ヒトTROP-2に対する抗体。
4. 抗体のH鎖V領域のCDR1～3のアミノ酸配列が、それぞれ順に、配列番
号66～68で示されるアミノ酸配列であり、及び／又は、抗体のL鎖V領
15 域のCDR1～3のアミノ酸配列が、それぞれ順に、配列番号71～73で
示されるアミノ酸配列である、請求項3記載の抗体。
5. 抗体がヒト型化抗体である、請求項1～4のいずれか1項に記載の抗体。
6. 抗体が*in vivo*で抗腫瘍活性を有するものである、請求項1～5のいずれか
1項に記載の抗体。
- 20 7. 5～20mg/kg体重の投与量で50%以上の腫瘍成長阻害活性を示すものである、
請求項1～6のいずれか1項に記載の抗体。
8. 前記腫瘍成長阻害活性を示すための投与回数が多くても1週間に1回である、
請求項7記載の抗体。
9. 10mg/kg体重の単回投与で50%以上の腫瘍成長阻害活性を示すものである、
25 請求項1～6のいずれか1項に記載の抗体。
10. 2種以上のヒト腫瘍細胞株に対して抗腫瘍活性を有する、請求項1～9の
いずれか1項に記載の抗体。
11. 解離定数(Kd値)が 1.0×10^{-10} M以下である、請求項1～10のいずれか
1項に記載の抗体。

- 1 2. 抗体がモノクローナル抗体である、請求項 1 ～ 1 1 のいずれか 1 項に記載の抗体。
- 1 3. 腫瘍が、ヒト膵癌、ヒト前立腺癌、ヒト大腸癌、ヒト乳癌、ヒト卵巣癌、ヒト肺癌及びヒト胆管癌からなる群より選ばれる少なくとも 1 種である、請求項 6 ～ 1 2 のいずれか 1 項に記載の抗体。
- 1 4. 腫瘍がヒト膵癌、ヒト大腸癌、ヒト肺癌、ヒト乳癌及びヒト卵巣癌からなる群より選ばれる少なくとも 1 種である、請求項 6 ～ 1 2 のいずれか 1 項に記載の抗体。
- 1 5. 腫瘍が再発癌又は転移癌である、請求項 6 ～ 1 4 のいずれか 1 項に記載の抗体。
- 1 6. 腫瘍細胞株が、ヒト膵癌細胞株PK-59、ヒト膵癌細胞株BxPC-3、ヒト膵癌細胞株KP-3L、ヒト膵癌細胞株KP-2、ヒト膵癌細胞株PK-1、ヒト膵癌細胞株PK-45H、ヒト膵癌細胞株PK-45P、ヒト膵癌細胞株TCC-PAN2、ヒト膵癌細胞株SUIT-2、ヒト大腸癌細胞株CACO-2、ヒト大腸癌細胞株SW480、ヒト大腸癌細胞株DLD-1、ヒト大腸癌細胞株HCT 116、ヒト乳癌細胞株JIMT-1、ヒト乳癌細胞株HCC1143、ヒト乳癌細胞株MCF-7、ヒト乳癌細胞株MDA-MB-468、ヒト前立腺癌細胞株DU145、ヒト前立腺癌細胞株PC-3、ヒト卵巣癌細胞株SK-OV-3、ヒト肺癌細胞株Calu-3、ヒト胆管癌細胞株TFK-1からなる群より選ばれる少なくとも 2 種である、請求項 1 0 ～ 1 5 のいずれか 1 項に記載の抗体。
- 1 7. 腫瘍細胞株が、ヒト膵癌細胞株PK-59、ヒト膵癌細胞株BxPC-3、ヒト大腸癌細胞株SW480、ヒト肺癌細胞株Calu-3、ヒト乳癌細胞株MBA-MD-468 及びヒト卵巣癌細胞株SK-OV-3からなる群より選ばれる少なくとも 2 種である、請求項 1 0 ～ 1 5 のいずれか 1 項に記載の抗体。
- 1 8. 請求項 1 ～ 1 7 のいずれか 1 項に記載の抗体に由来する抗体断片。
- 1 9. 配列番号 9 2 又は 9 8 で示されるアミノ酸配列、及び／又は、配列番号 9 3 で示されるアミノ酸配列を含むものである、請求項 1 8 記載の抗体断片。
- 2 0. 配列番号 9 4 又は 9 5 で示されるアミノ酸配列、及び／又は、配列番号 9 6 で示されるアミノ酸配列を含むものである、請求項 1 8 記載の抗体断片。

- 2 1. 請求項 1～17 のいずれか 1 項に記載の抗体と、抗腫瘍活性及び／又は殺細胞活性を有する物質とを含む、抗体－薬剤複合体。
- 2 2. 請求項 18～20 のいずれか 1 項に記載の抗体断片と、抗腫瘍活性及び／又は殺細胞活性を有する物質とを含む、抗体断片－薬剤複合体。
- 5 2 3. 腫瘍が、ヒト膀胱癌、ヒト前立腺癌、ヒト大腸癌、ヒト乳癌、ヒト卵巣癌、ヒト肺癌及びヒト胆管癌からなる群より選ばれる少なくとも 1 種である、請求項 2 1 又は 2 2 記載の複合体。
- 2 4. 腫瘍がヒト膀胱癌、ヒト大腸癌、ヒト肺癌、ヒト乳癌及びヒト卵巣癌からなる群より選ばれる少なくとも 1 種である、請求項 2 1 又は 2 2 記載の複合体。
- 10 2 5. 腫瘍が再発癌又は転移癌である、2 1～2 4 のいずれか 1 項に記載の複合体。
- 2 6. 請求項 1～17 のいずれか 1 項に記載の抗体、請求項 18～20 のいずれか 1 項に記載の抗体断片、及び請求項 2 1～2 5 のいずれか 1 項に記載の複合体からなる群より選ばれる少なくとも 1 種を含む、医薬組成物。
- 15 2 7. 腫瘍の治療に用いるものである、請求項 2 6 記載の組成物。
- 2 8. 体重減少の副作用を有しないものである、請求項 2 7 記載の組成物。
- 2 9. 腫瘍の診断に用いるものである、請求項 2 6 記載の組成物。
- 3 0. 腫瘍が、ヒト膀胱癌、ヒト前立腺癌、ヒト大腸癌、ヒト乳癌、ヒト卵巣癌、ヒト肺癌及びヒト胆管癌からなる群より選ばれる少なくとも 1 種である、請求項 2 6～2 9 のいずれか 1 項に記載の組成物。
- 20 3 1. 腫瘍が再発癌又は転移癌である、請求項 2 6～3 0 のいずれか 1 項に記載の組成物。
- 3 2. 請求項 1～17 のいずれか 1 項に記載の抗体、請求項 18～20 のいずれか 1 項に記載の抗体断片、及び請求項 2 1～2 5 のいずれか 1 項に記載の複合体からなる群より選ばれる少なくとも 1 種を含む、腫瘍治療剤。
- 25 3 3. 体重減少の副作用を有しないものである、請求項 3 2 記載の治療剤。
- 3 4. 腫瘍が、ヒト膀胱癌、ヒト前立腺癌、ヒト大腸癌、ヒト乳癌、ヒト卵巣癌、ヒト肺癌及びヒト胆管癌からなる群より選ばれる少なくとも 1 種である、請求項 3 2 又は 3 3 記載の治療剤。

35. 請求項1～17のいずれか1項に記載の抗体、請求項18～20のいずれか1項に記載の抗体断片、及び請求項21～25のいずれか1項に記載の複合体からなる群より選ばれる少なくとも1種を含む、腫瘍診断剤。
36. 腫瘍が、ヒト膀胱癌、ヒト前立腺癌、ヒト大腸癌、ヒト乳癌、ヒト卵巣癌、
5 ヒト肺癌及びヒト胆管癌からなる群より選ばれる少なくとも1種である、請求項35記載の診断剤。
37. 請求項1～17のいずれか1項に記載の抗体、請求項18～20のいずれか1項に記載の抗体断片、及び請求項21～25のいずれか1項に記載の複合体からなる群より選ばれる少なくとも1種と、生体から採取された試料と
10 を反応させ、反応した抗体及び／又は抗体断片のシグナルを検出することを特徴とする、腫瘍の検出方法。
38. 腫瘍が、ヒト膀胱癌、ヒト前立腺癌、ヒト大腸癌、ヒト乳癌、ヒト卵巣癌、ヒト肺癌及びヒト胆管癌からなる群より選ばれる少なくとも1種である、請求項37記載の方法。
- 15 39. 請求項1～17のいずれか1項に記載の抗体、請求項18～20のいずれか1項に記載の抗体断片、及び請求項21～25のいずれか1項に記載の複合体からなる群より選ばれる少なくとも1種を含む、腫瘍の治療用、診断用又は検出用キット。
40. 腫瘍が、ヒト膀胱癌、ヒト前立腺癌、ヒト大腸癌、ヒト乳癌、ヒト卵巣癌、
20 ヒト肺癌及びヒト胆管癌からなる群より選ばれる少なくとも1種である、請求項39記載のキット。
41. 請求項1～17のいずれか1項に記載の抗体をコードするポリヌクレオチド。
42. 請求項18～20のいずれか1項に記載の抗体断片をコードするポリヌクレオチド。
25
43. 請求項41又は42記載のポリヌクレオチドを含む組換えベクター。
44. 請求項43記載の組換えベクターを含む形質転換体。

図1

Affinity

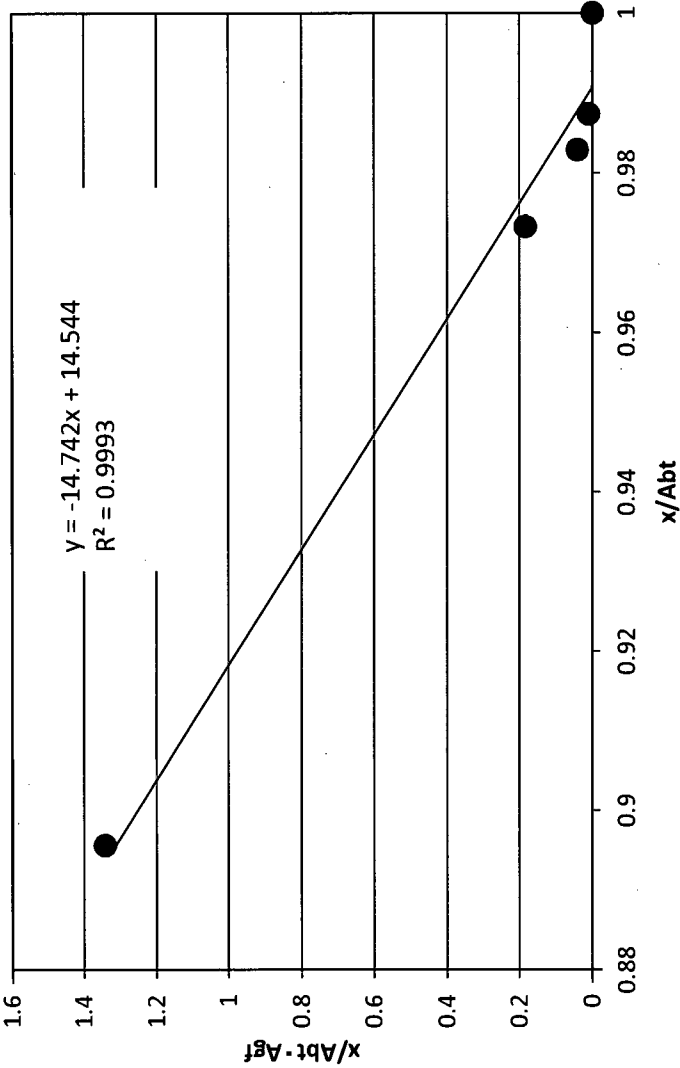


図2

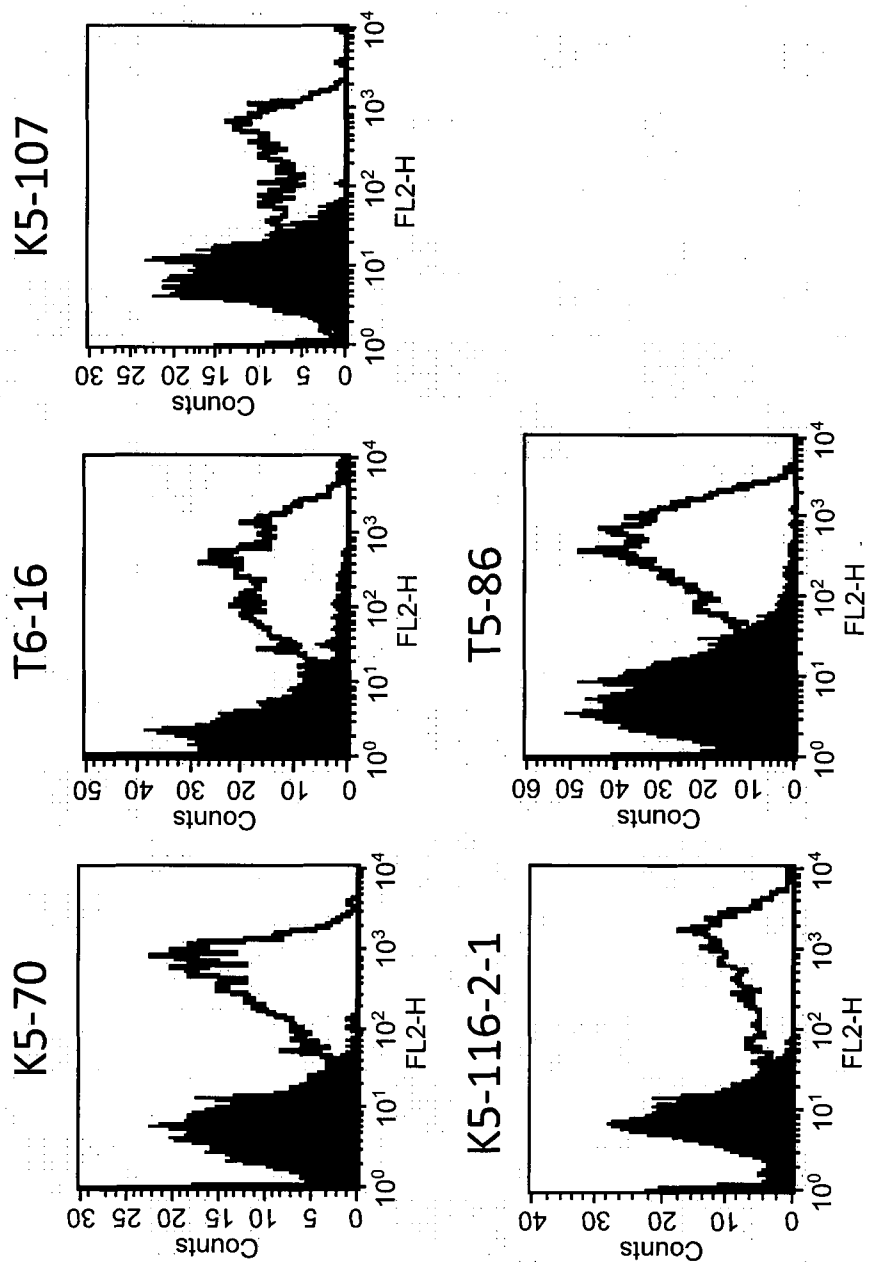
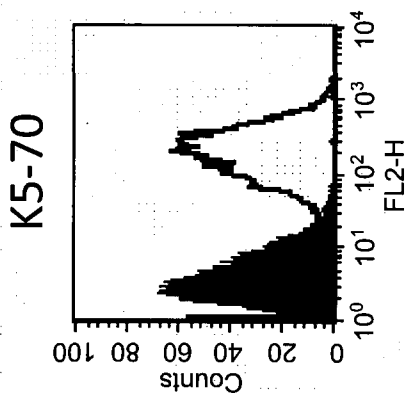
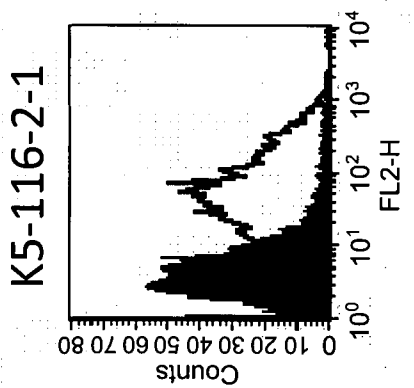
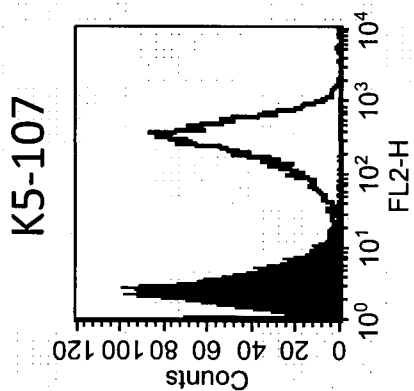
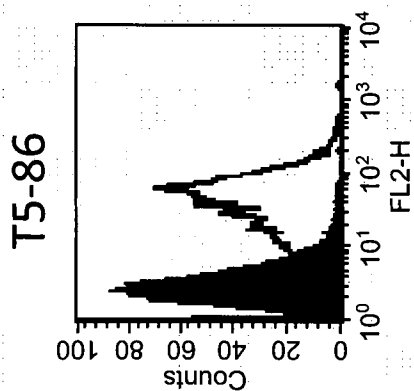


図3

PK-59



T6-16

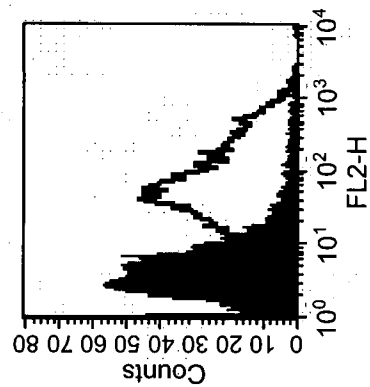


図4

BxPC-3

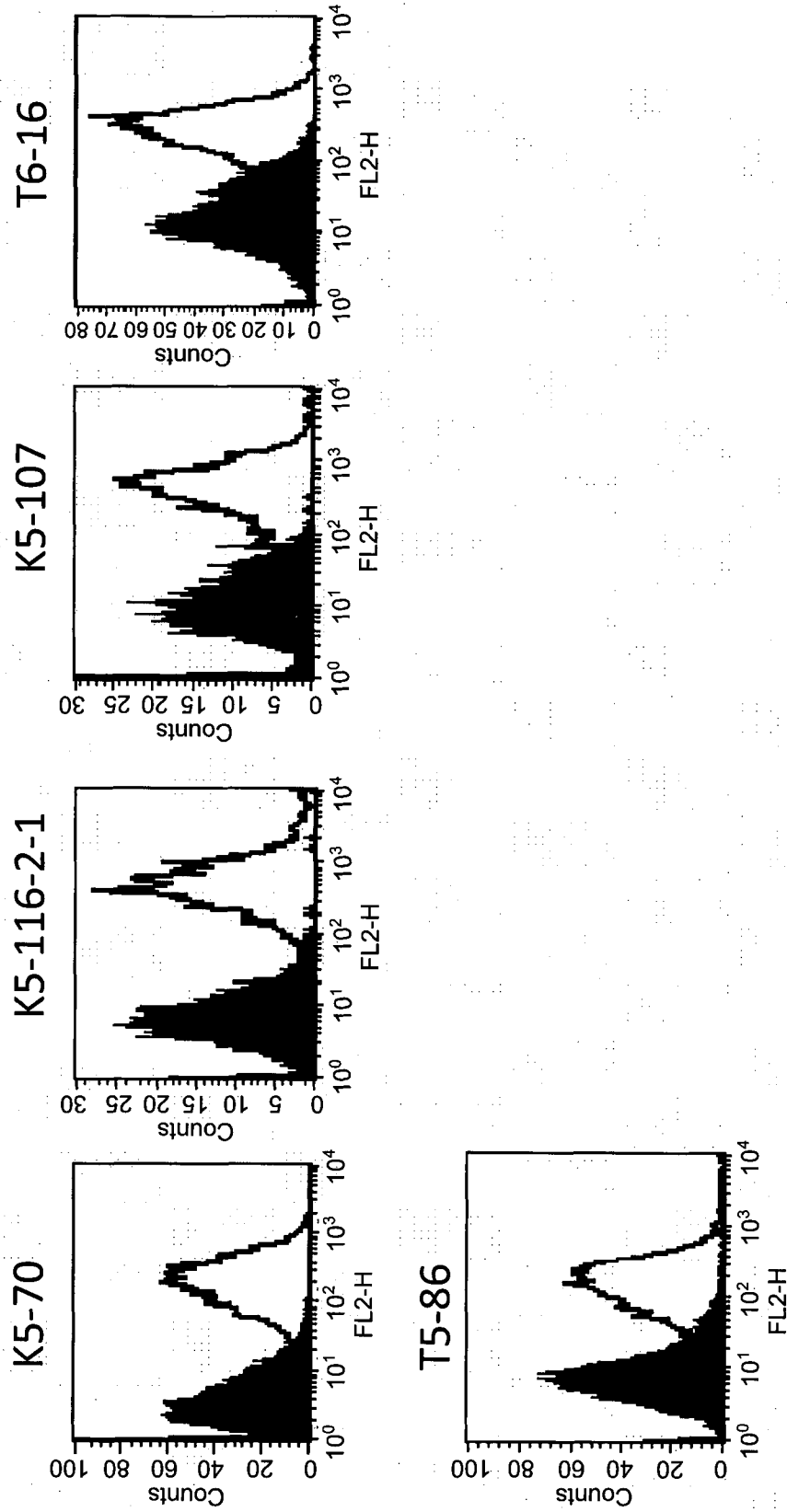


図5

Other cancer cell lines

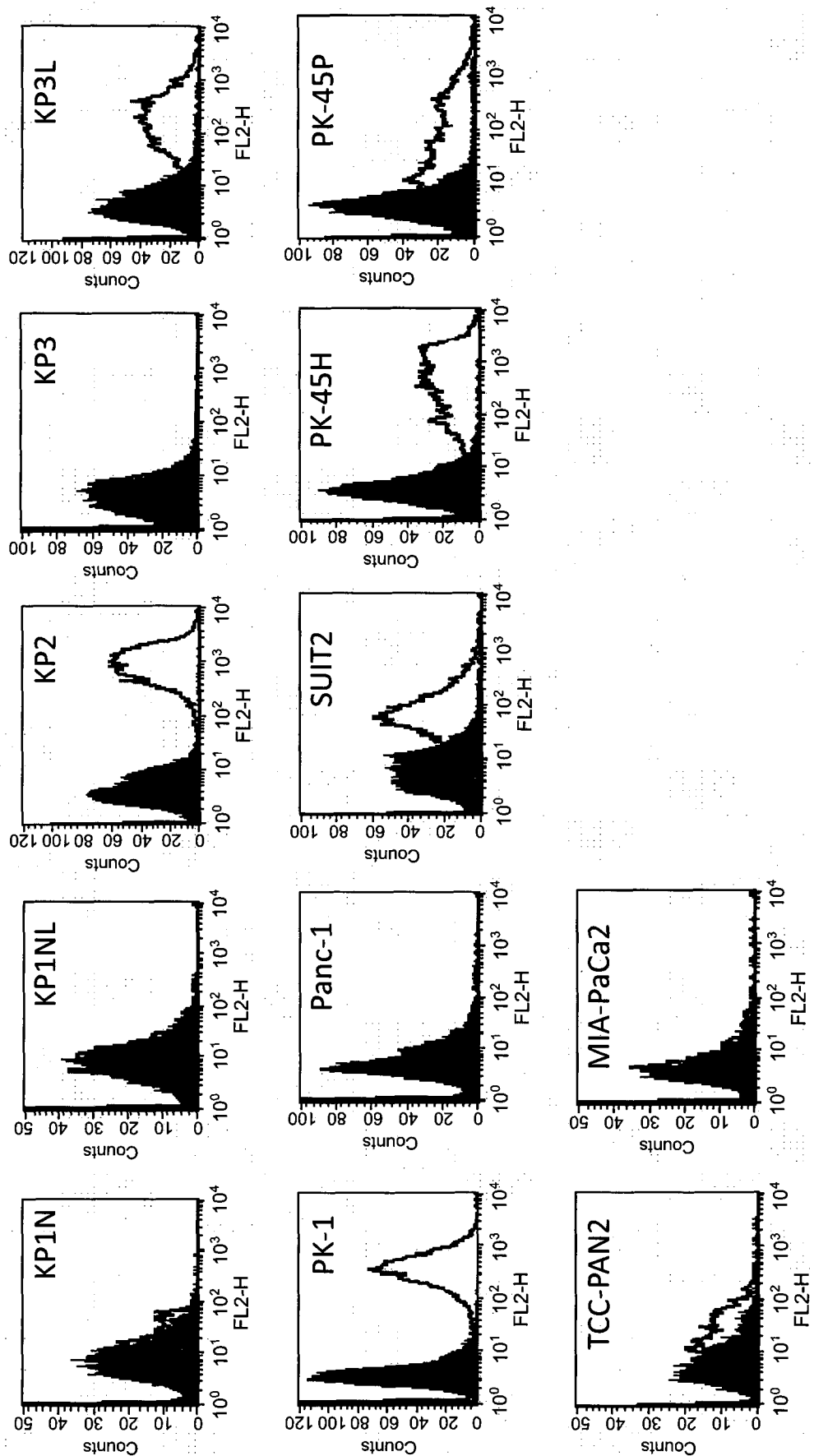
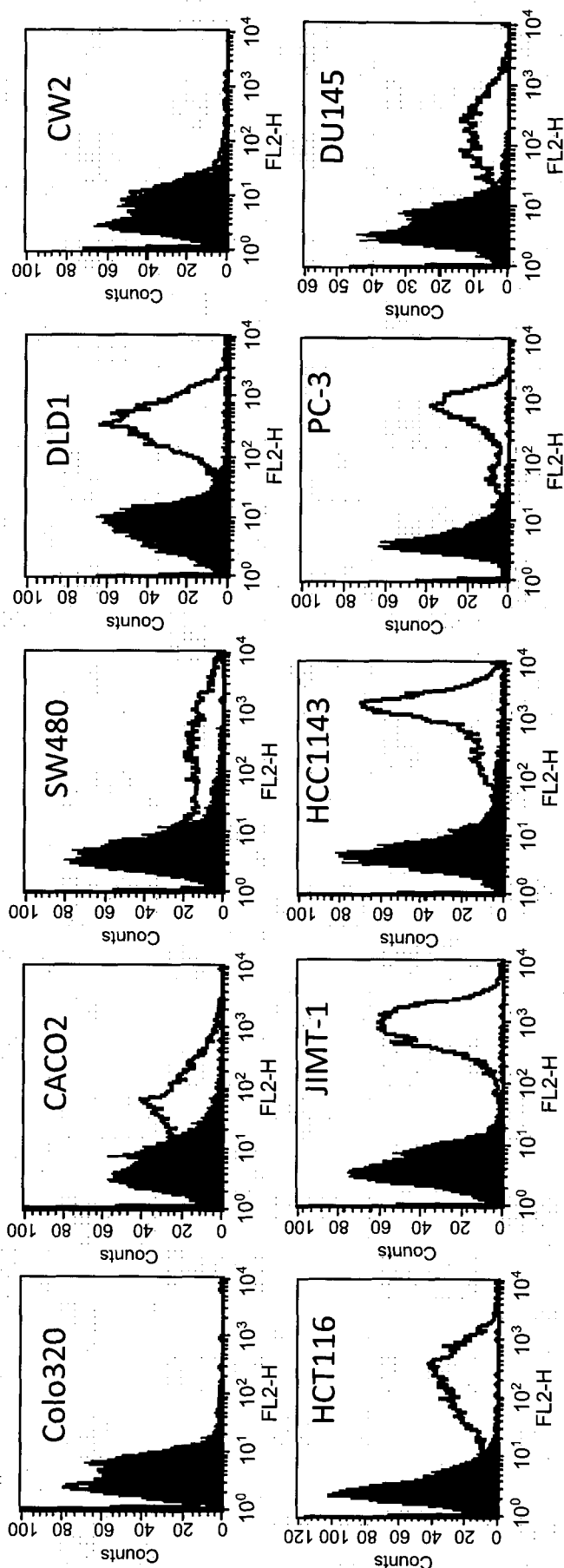


図6

Other cancer cell lines



6/74

差替え用紙(規則26)

図7

Reactivity with mouse TROP-2

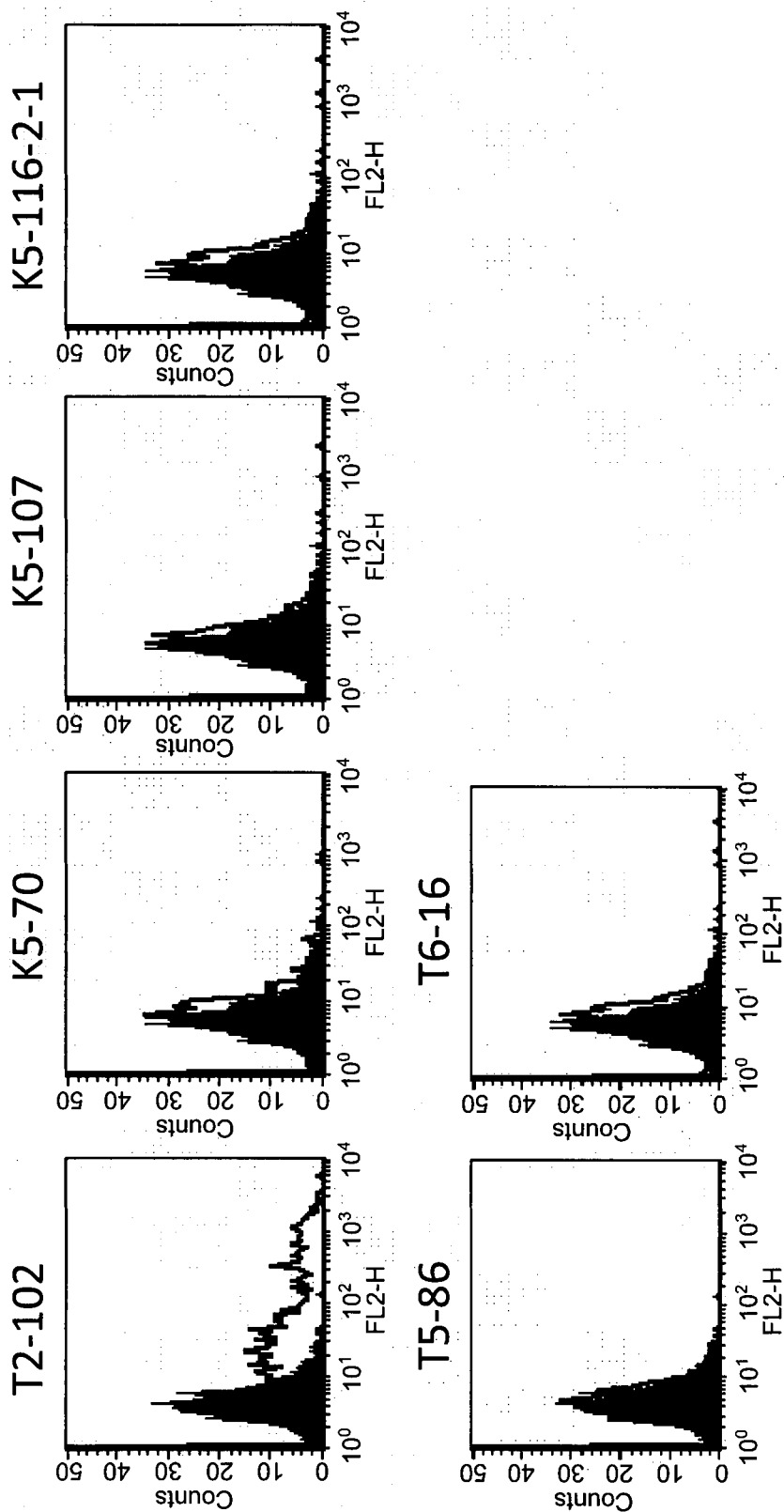
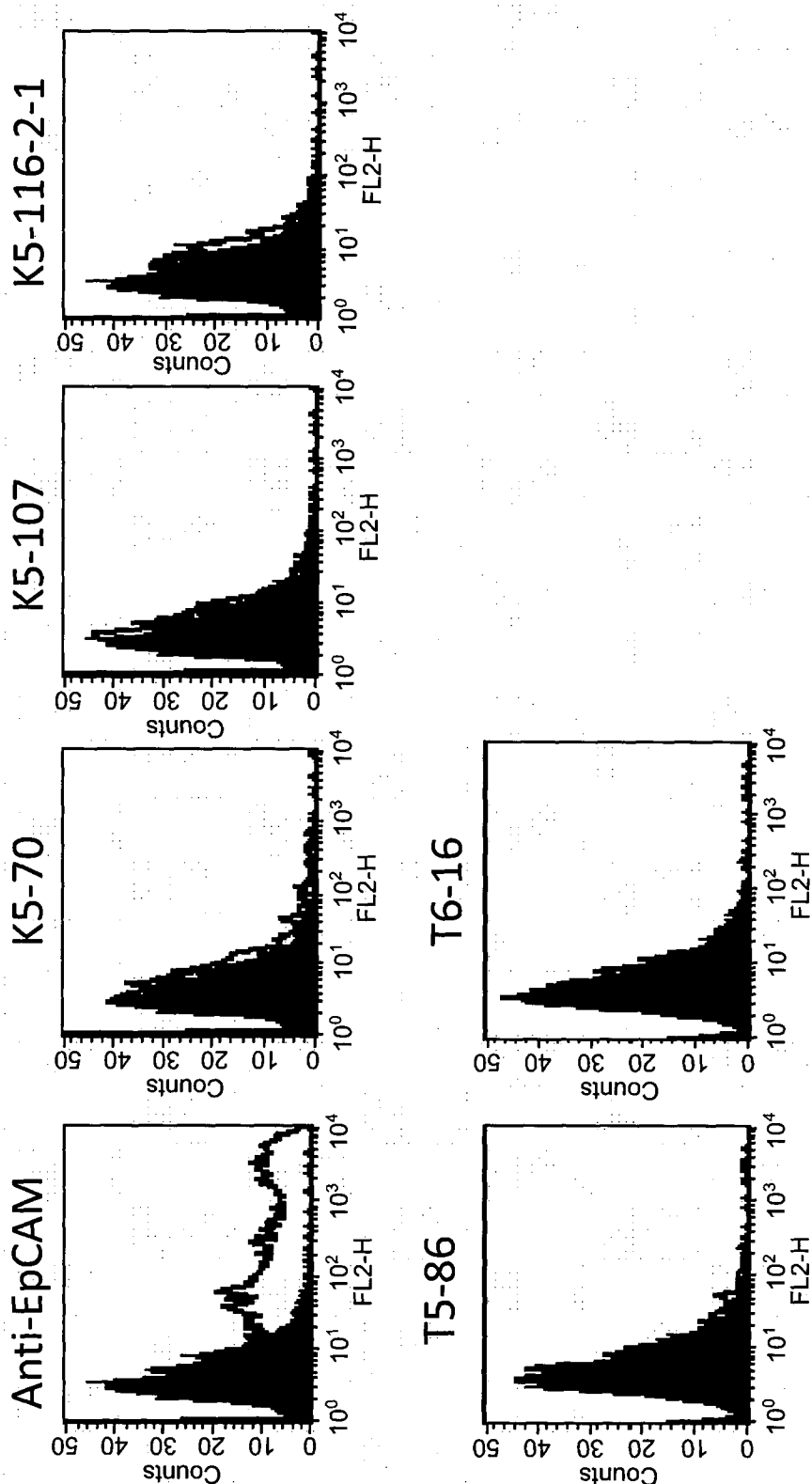


図8

Reactivity with EpCAM/hTROP-1



9

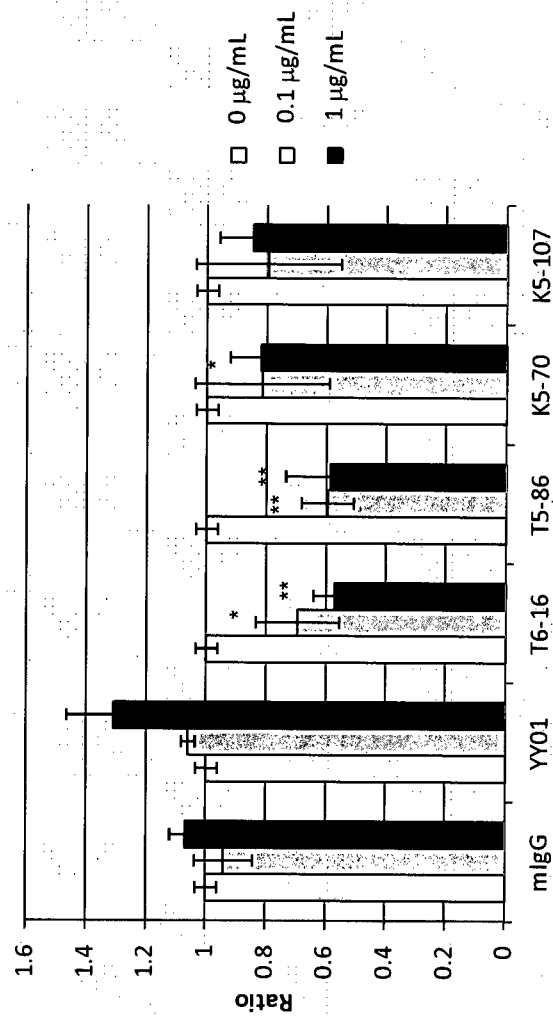


図10

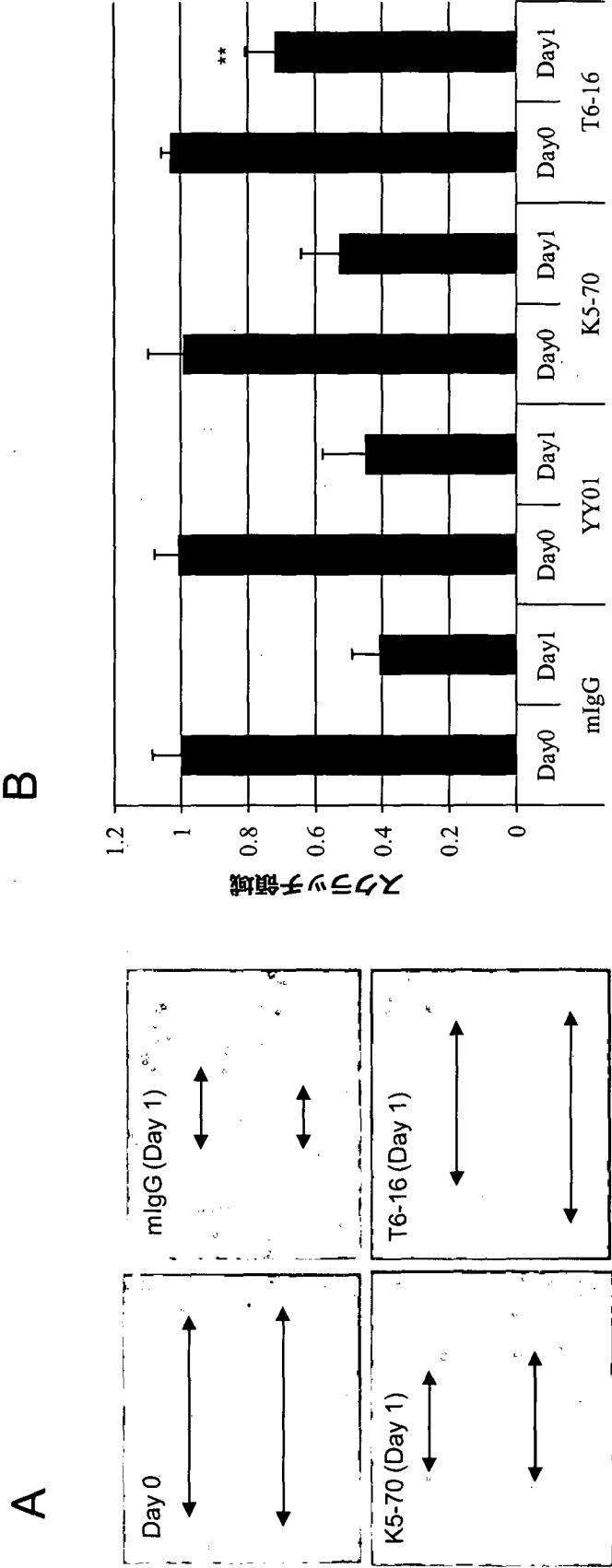


図11

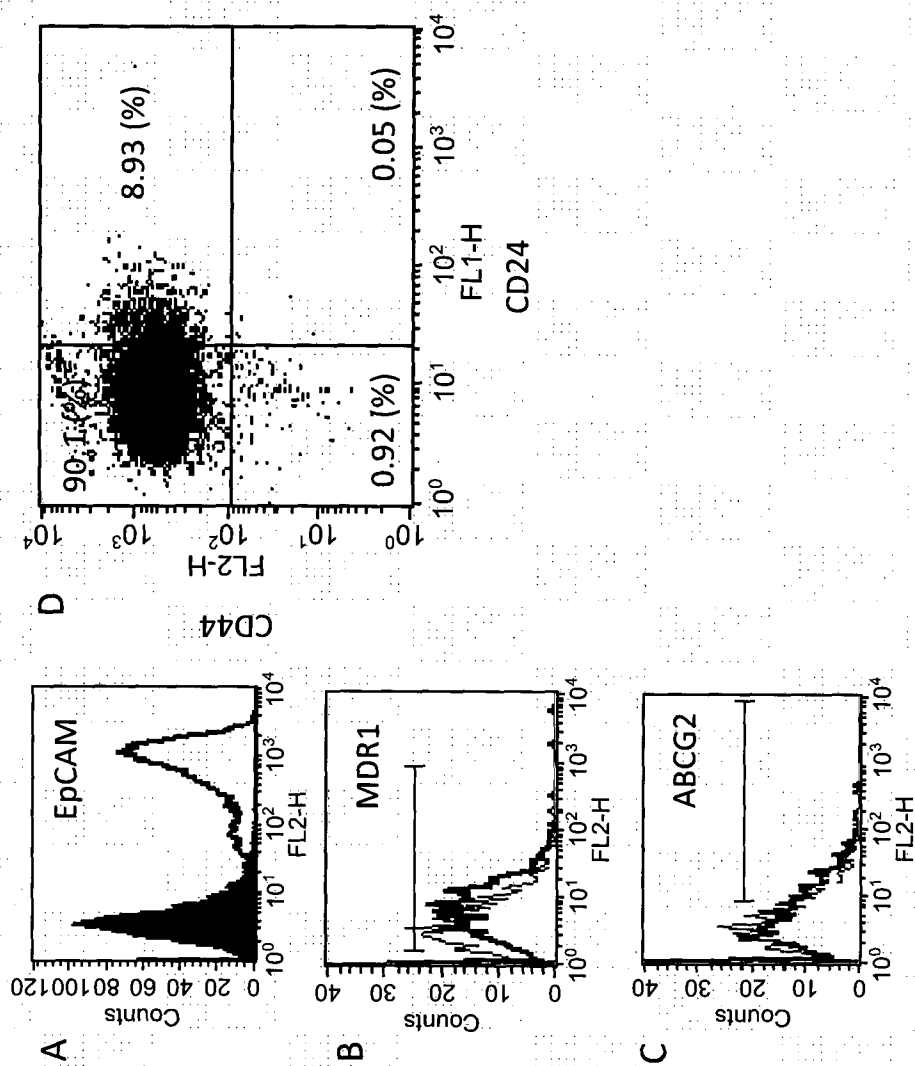


図12

K5-70 / Treatment

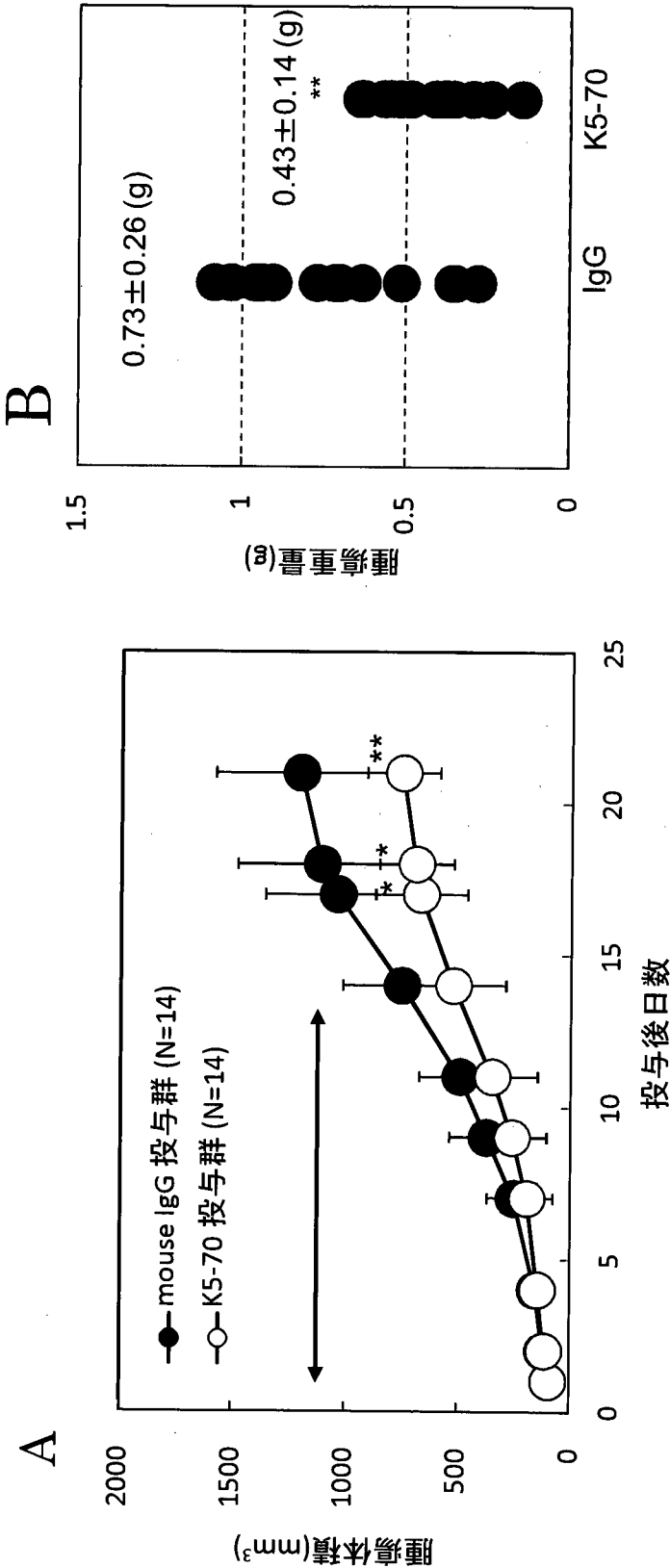


図13

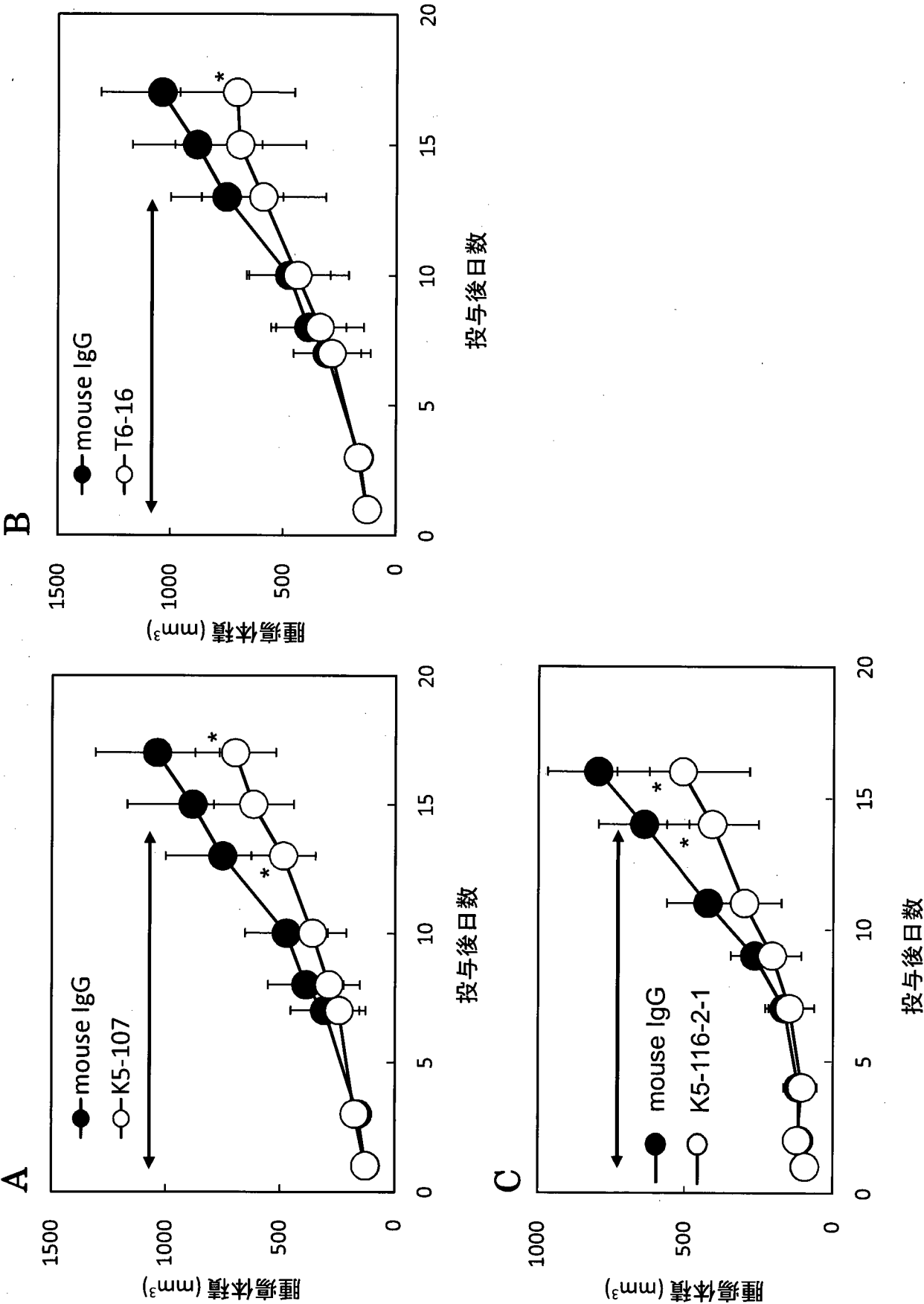
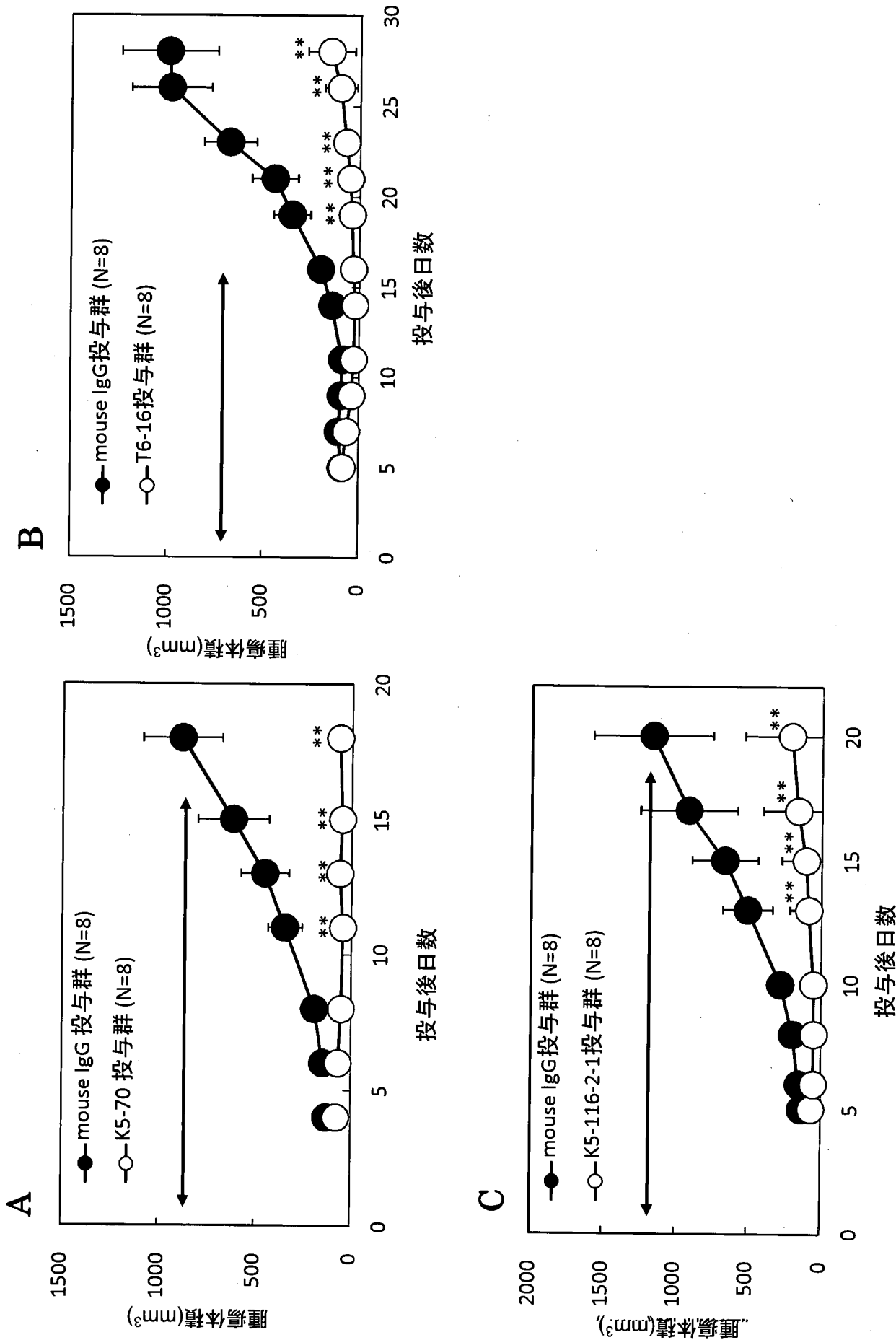
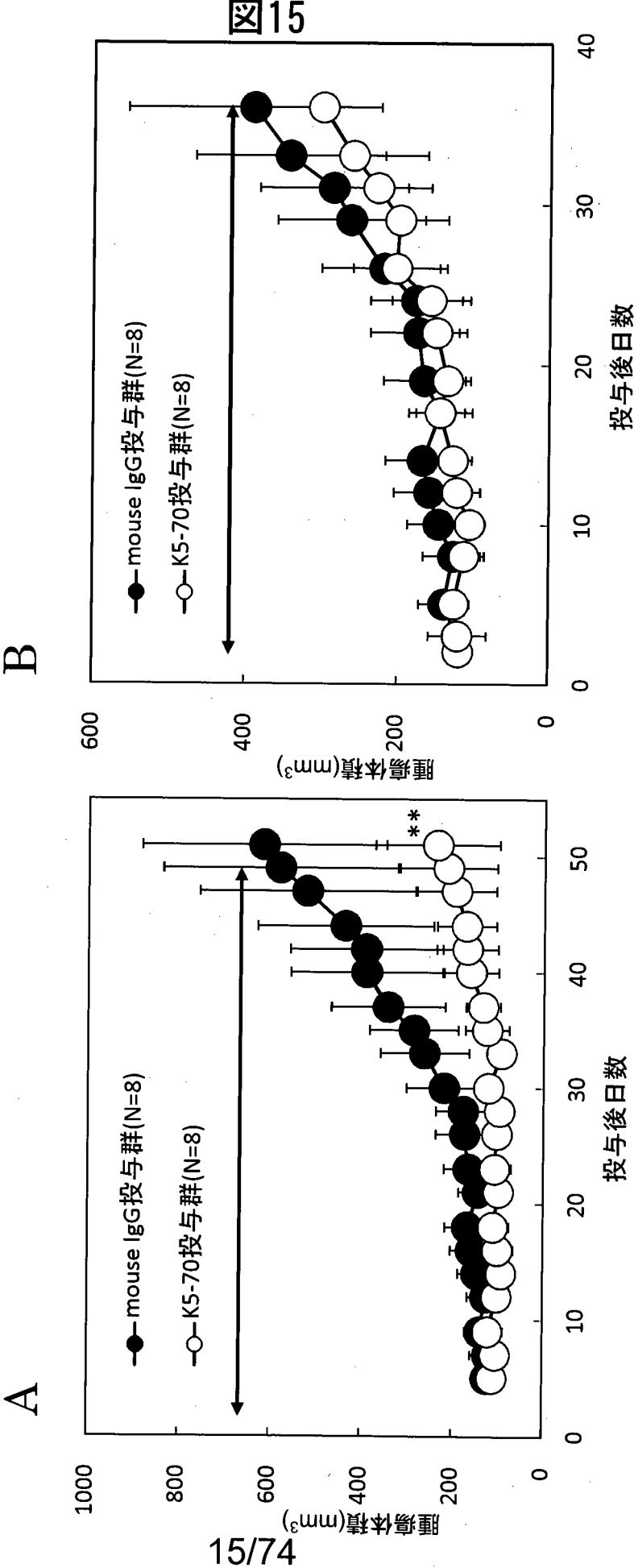


図14



K5-70 /BxPC-3



K5-70 / Prevention用量依存

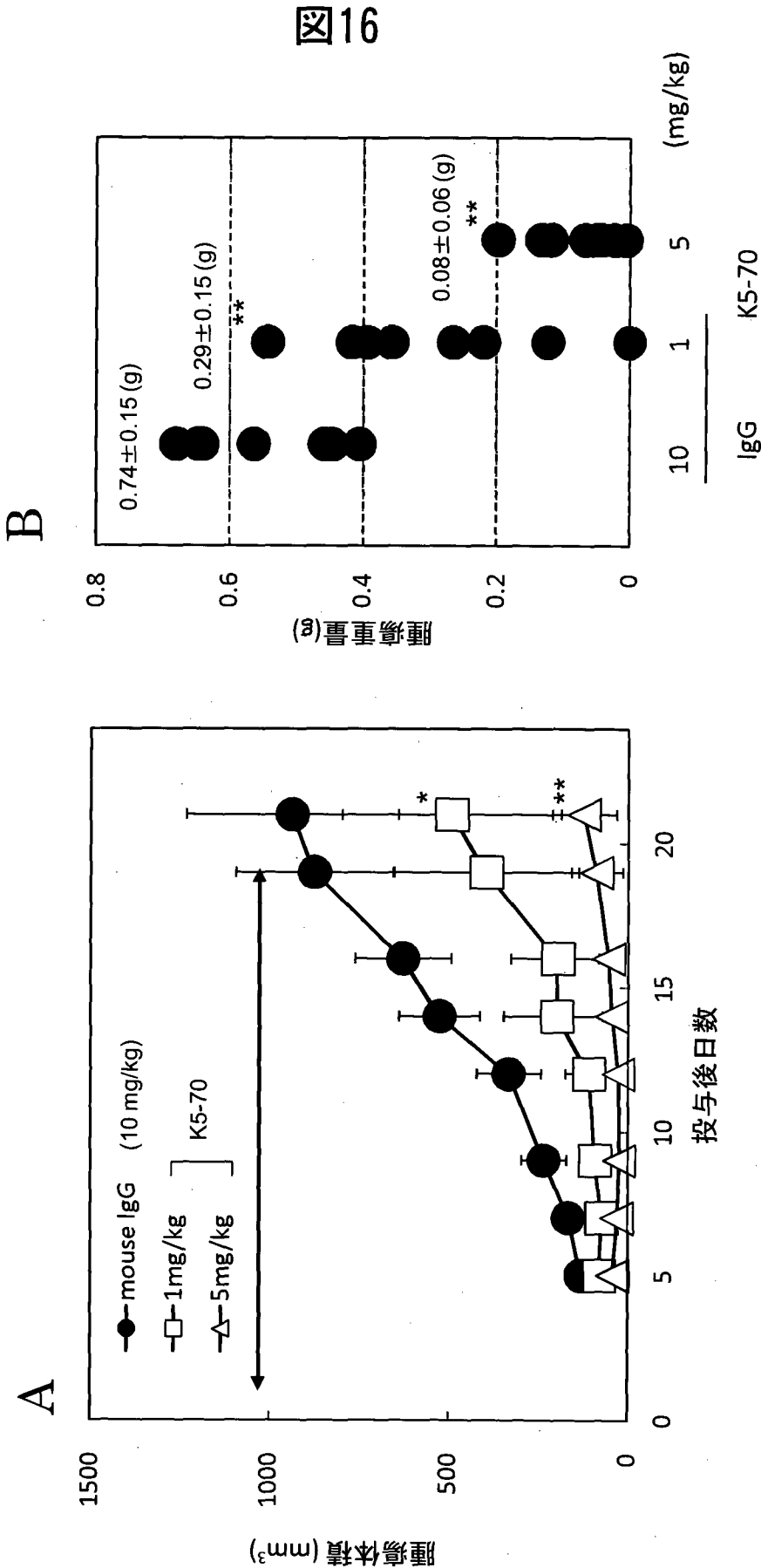


図 17

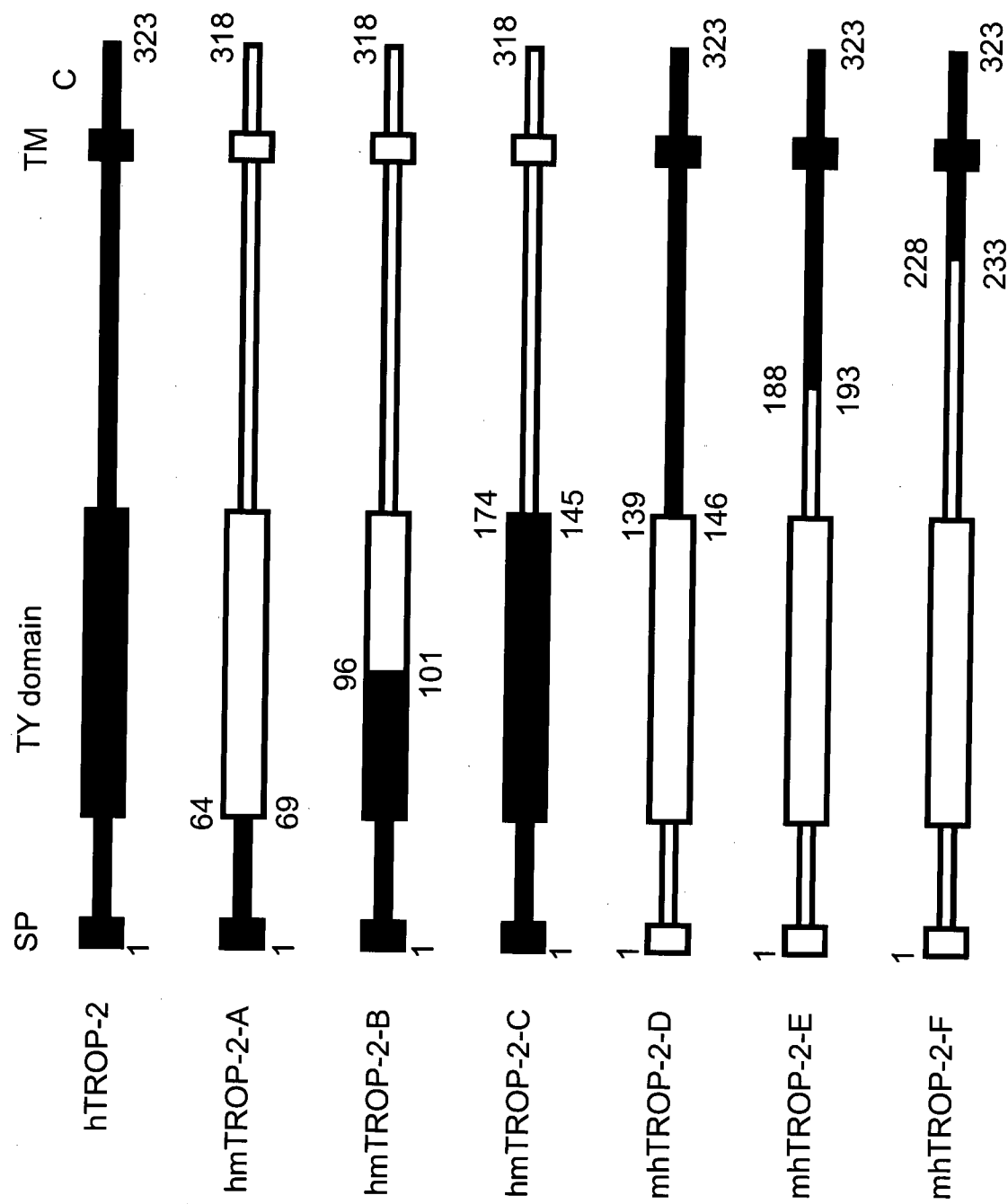


図18

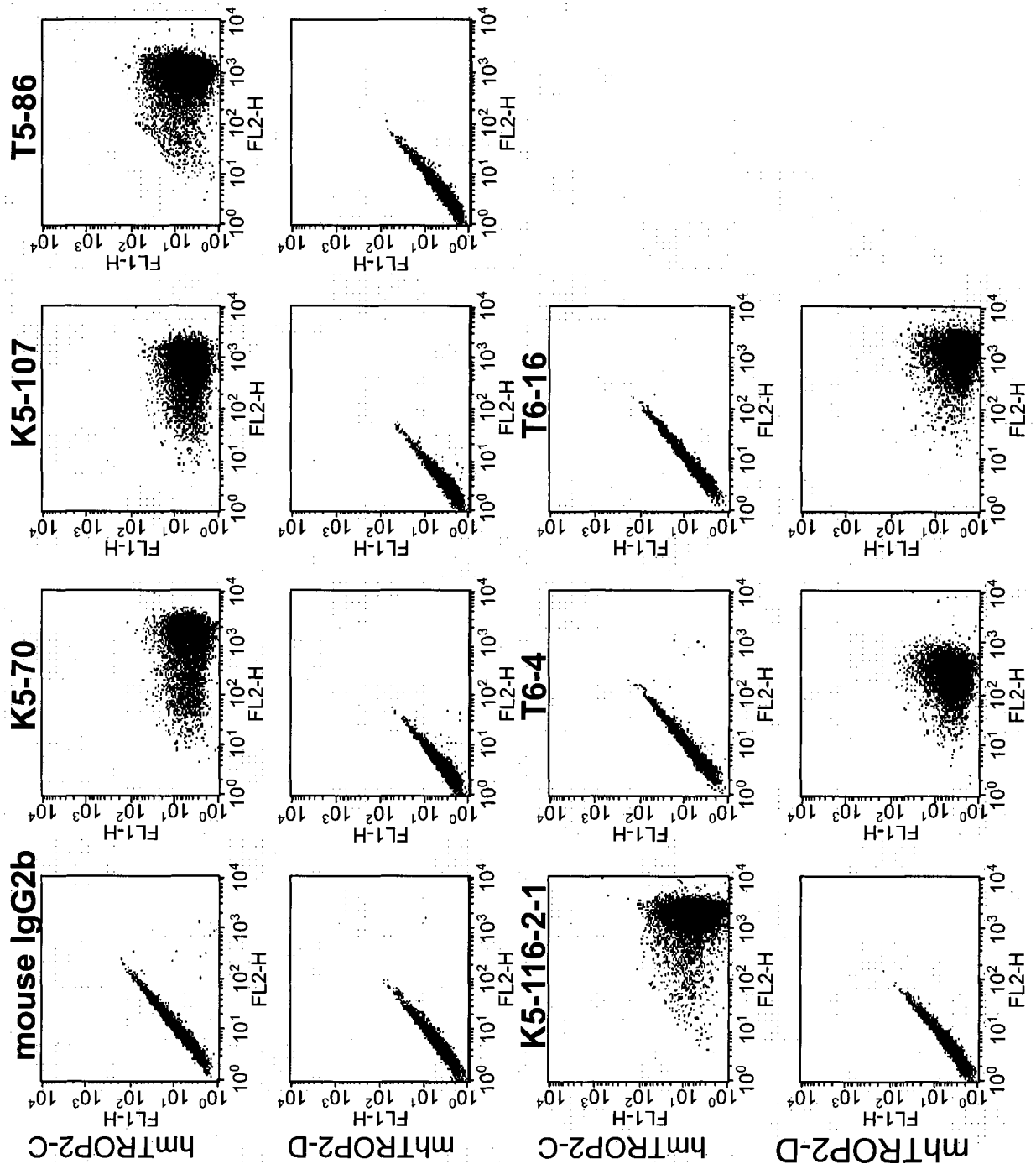


図19

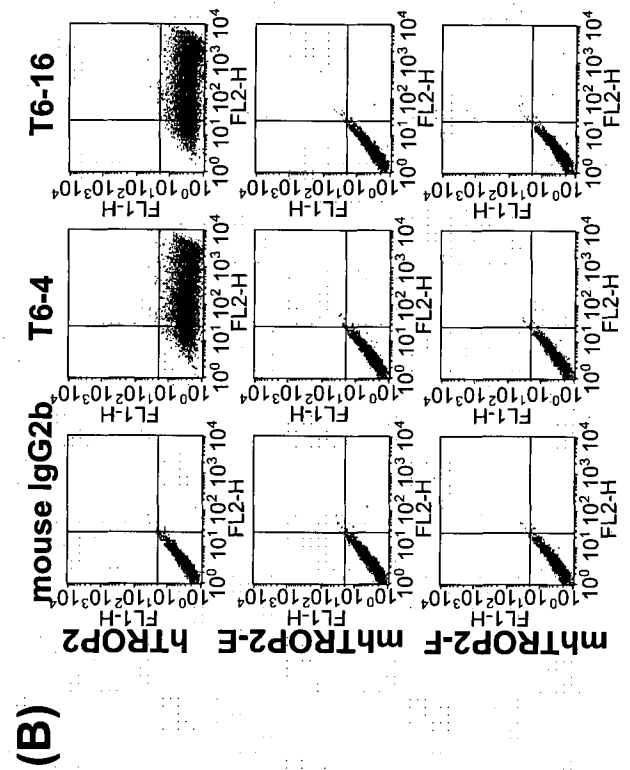
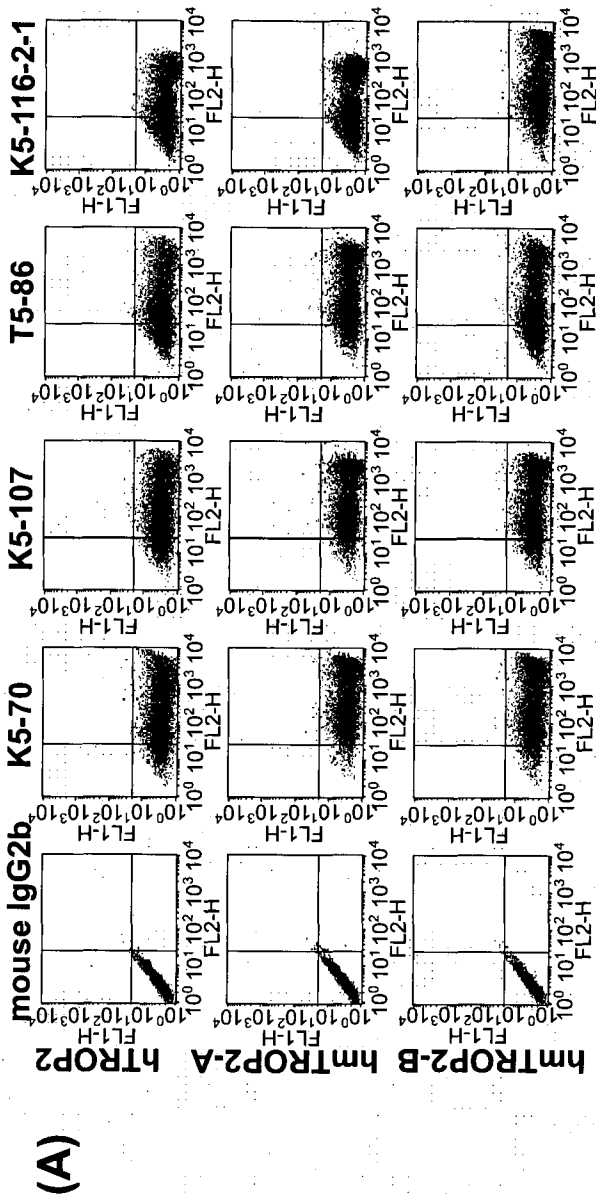


図20

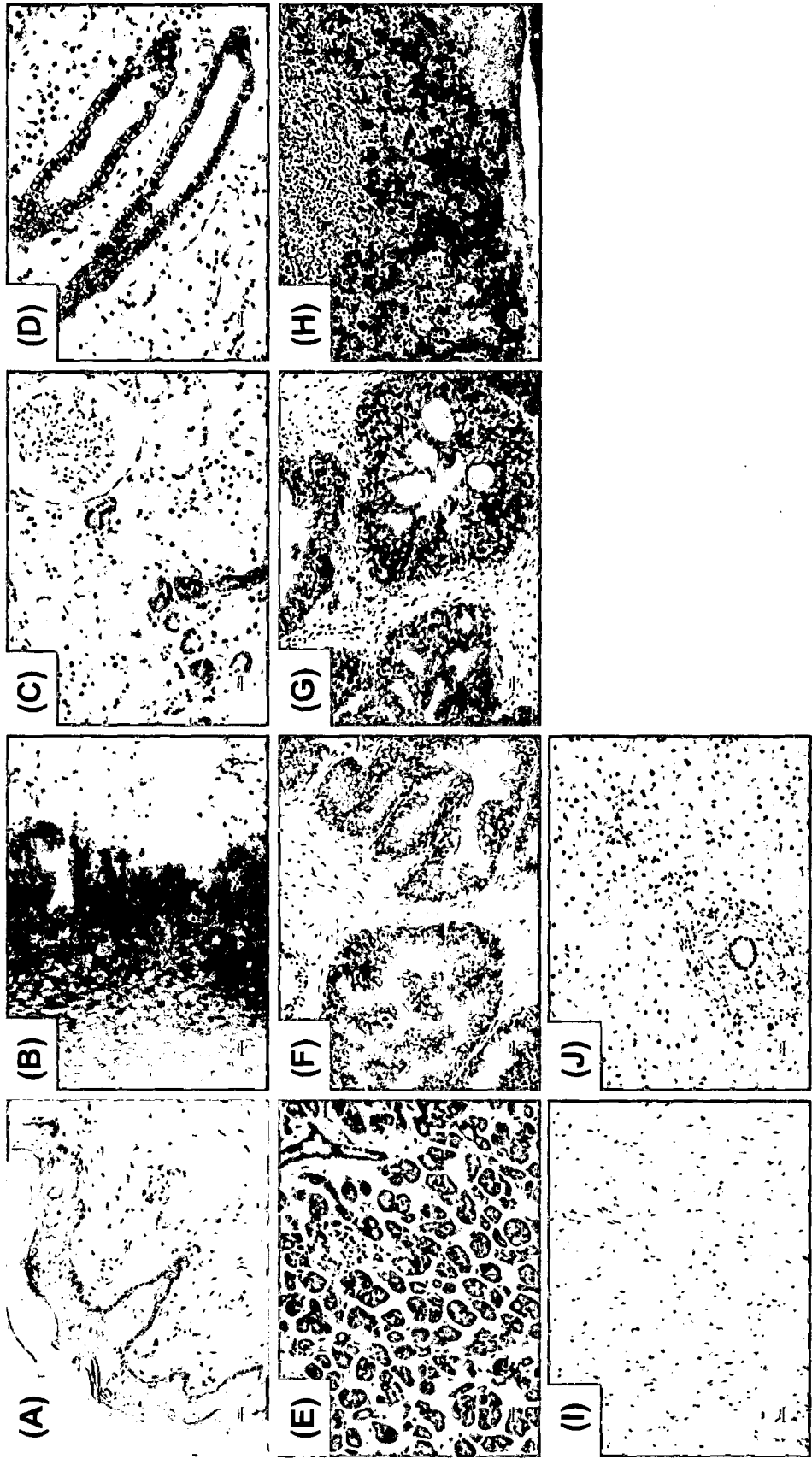
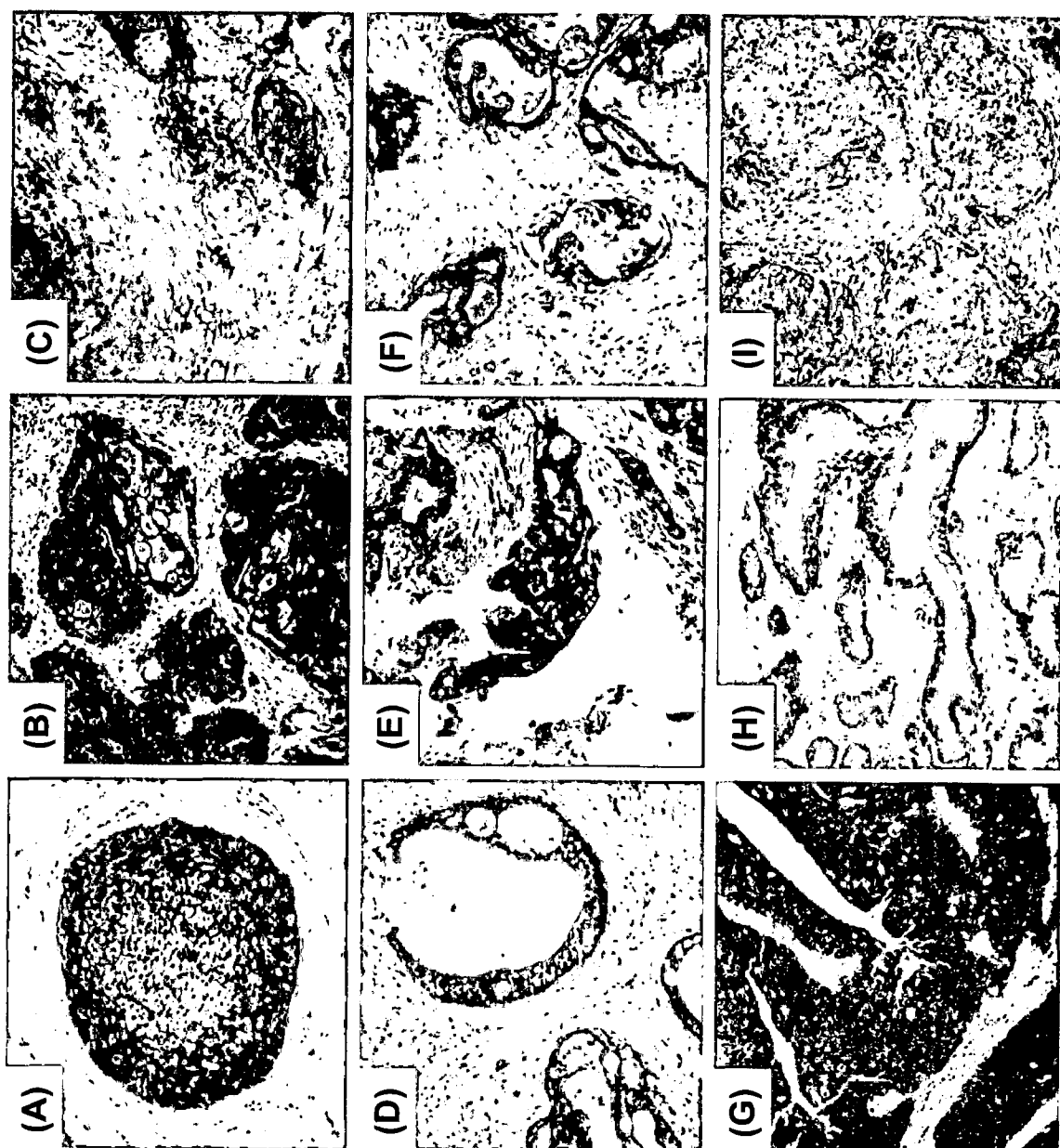


図21



22

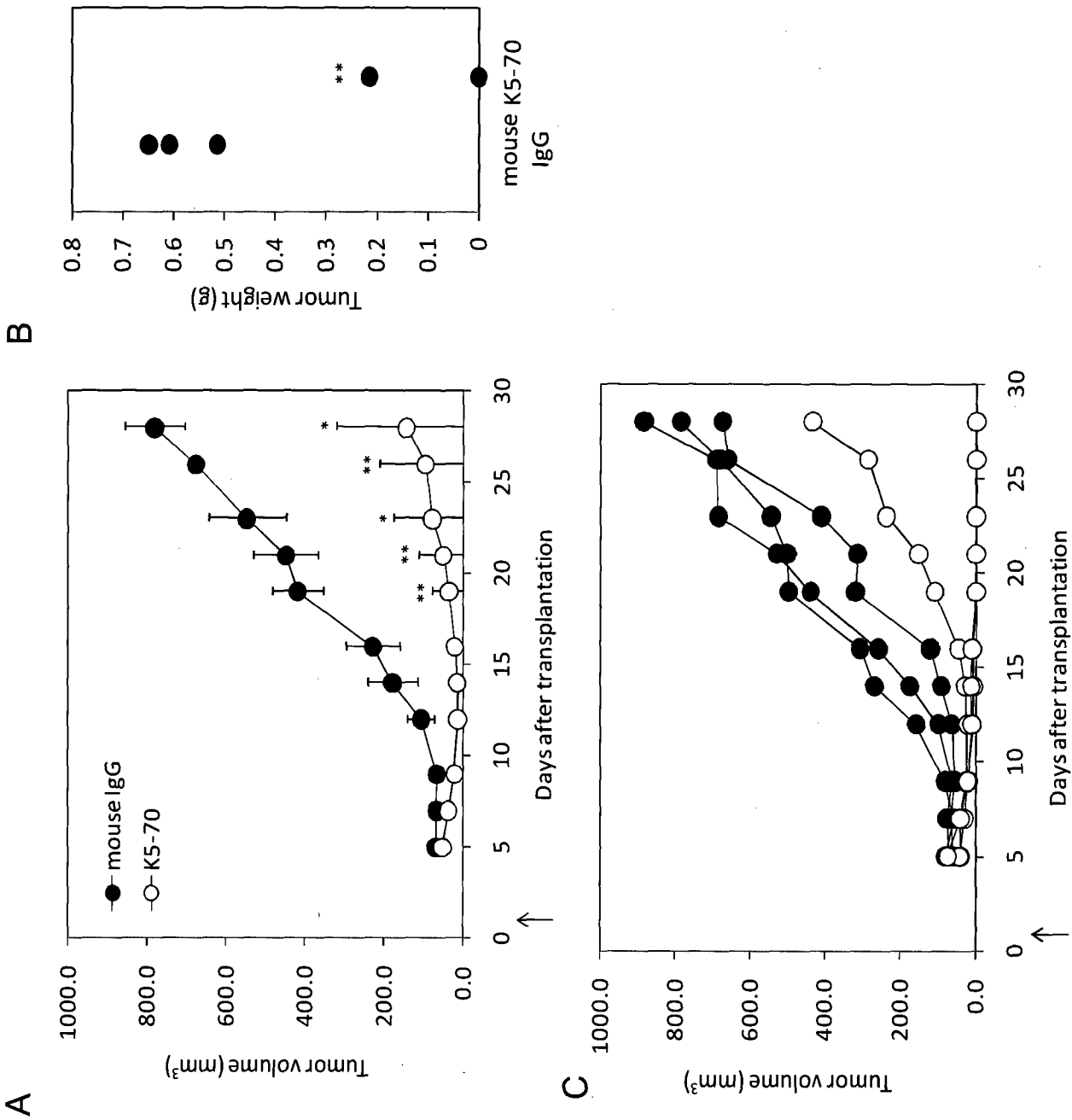


図23

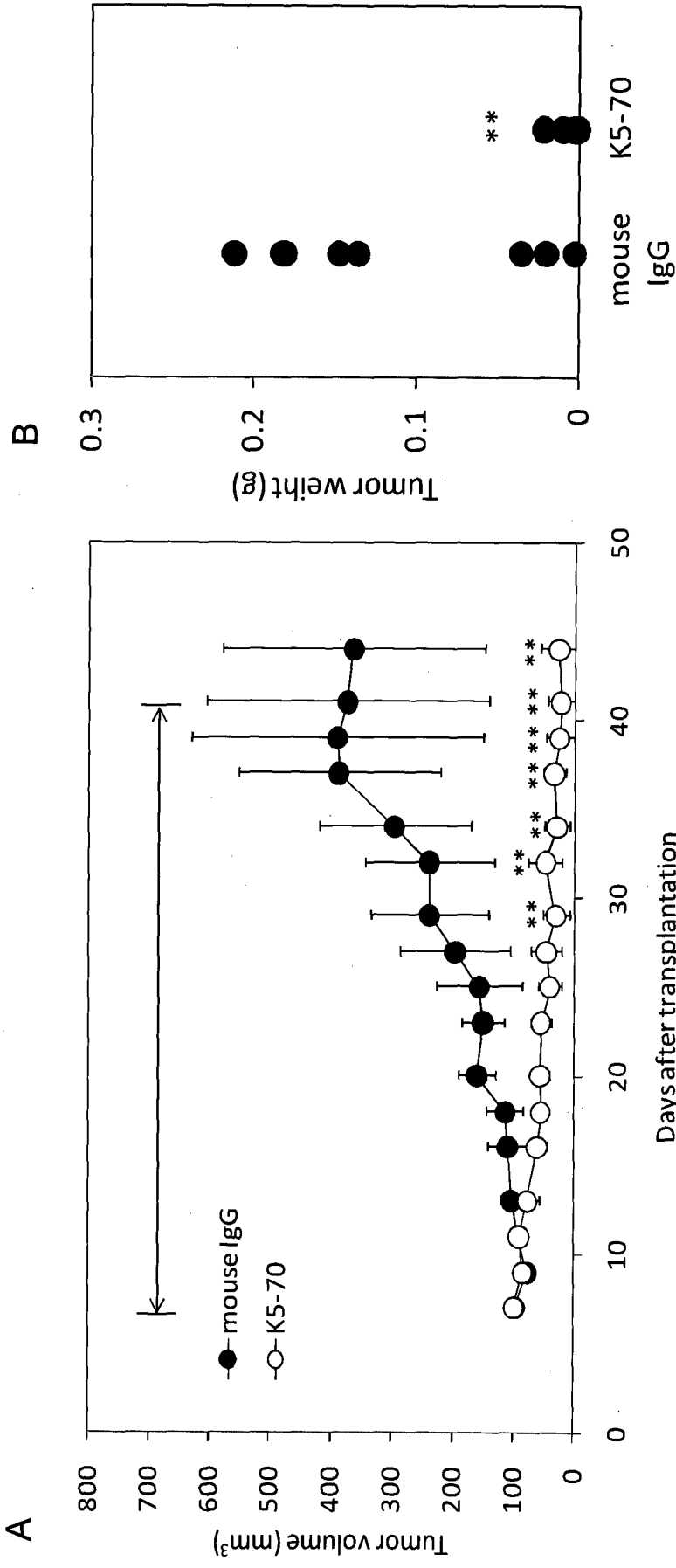


図24

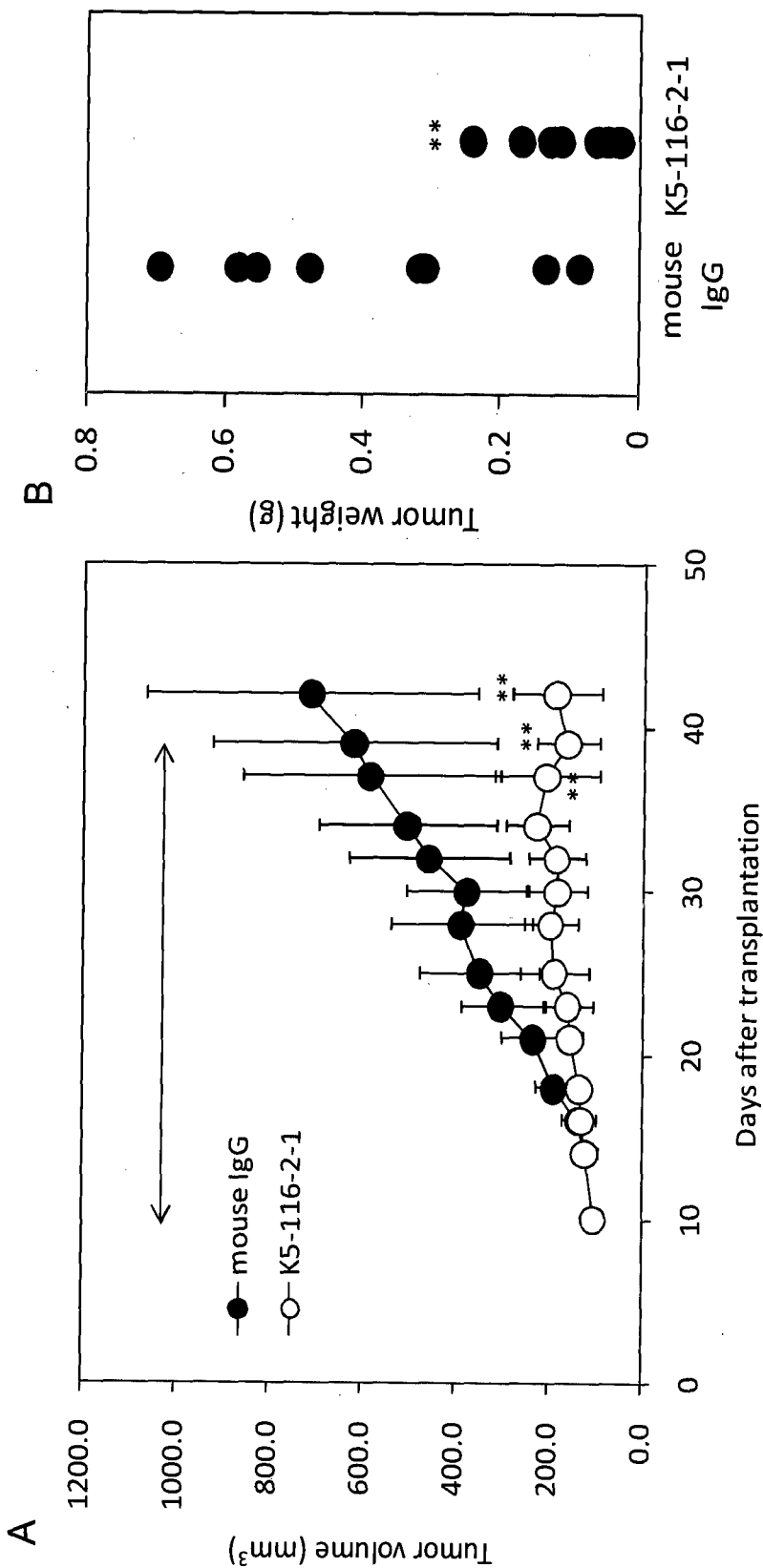


図25

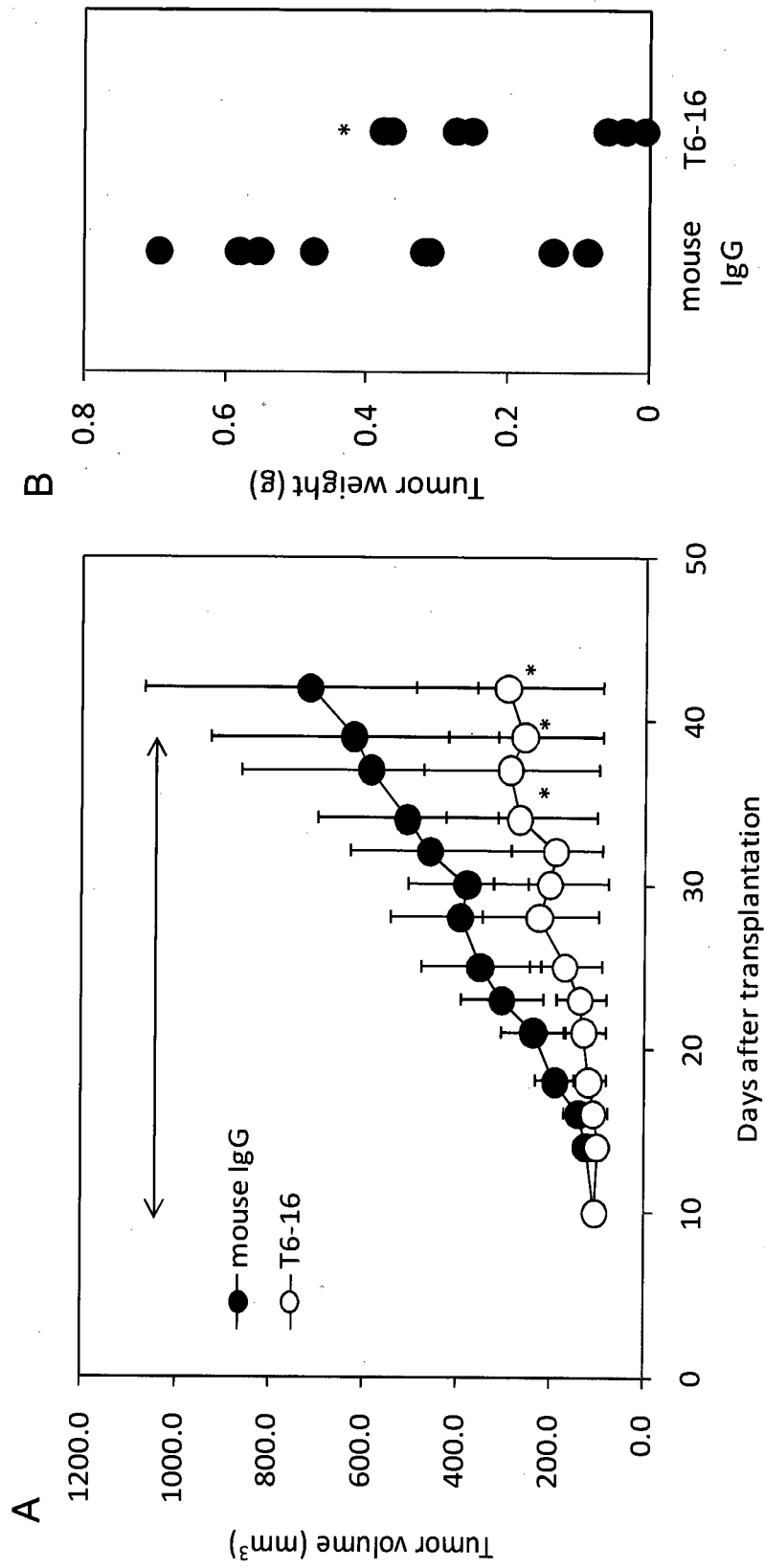


図26

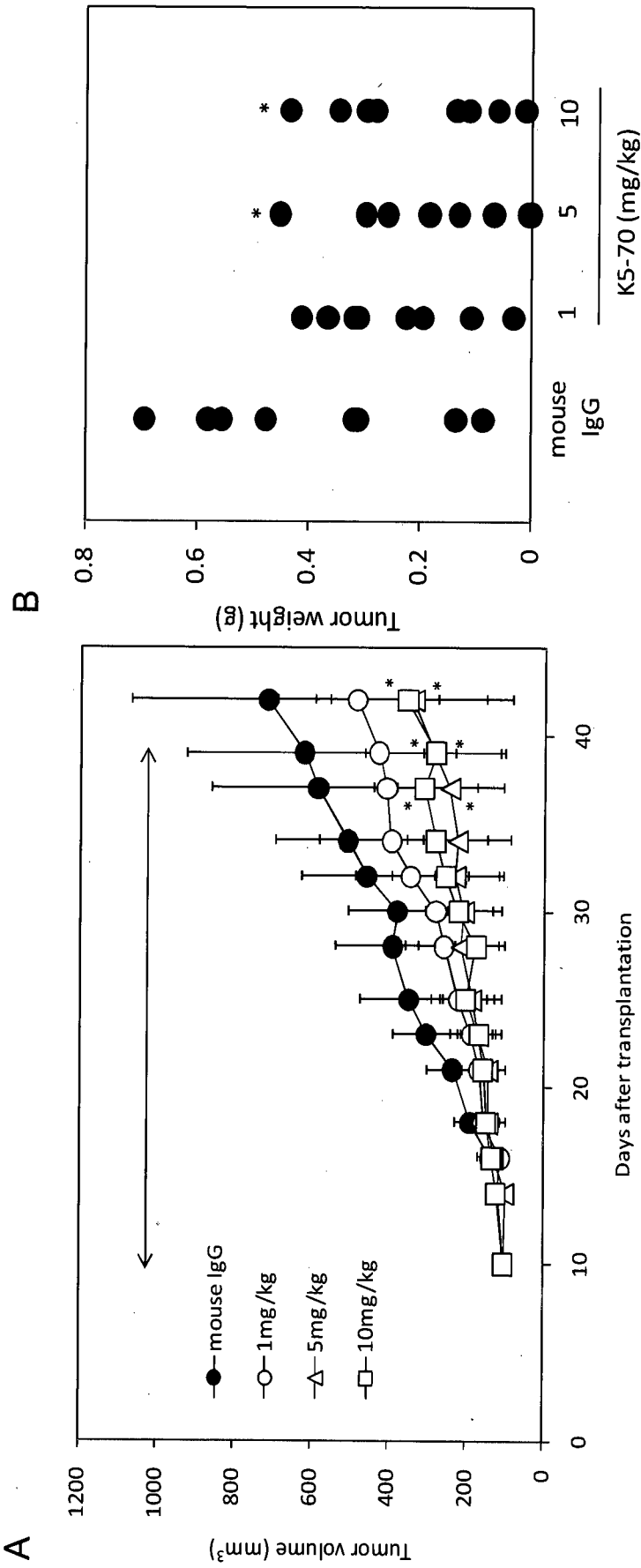


図27

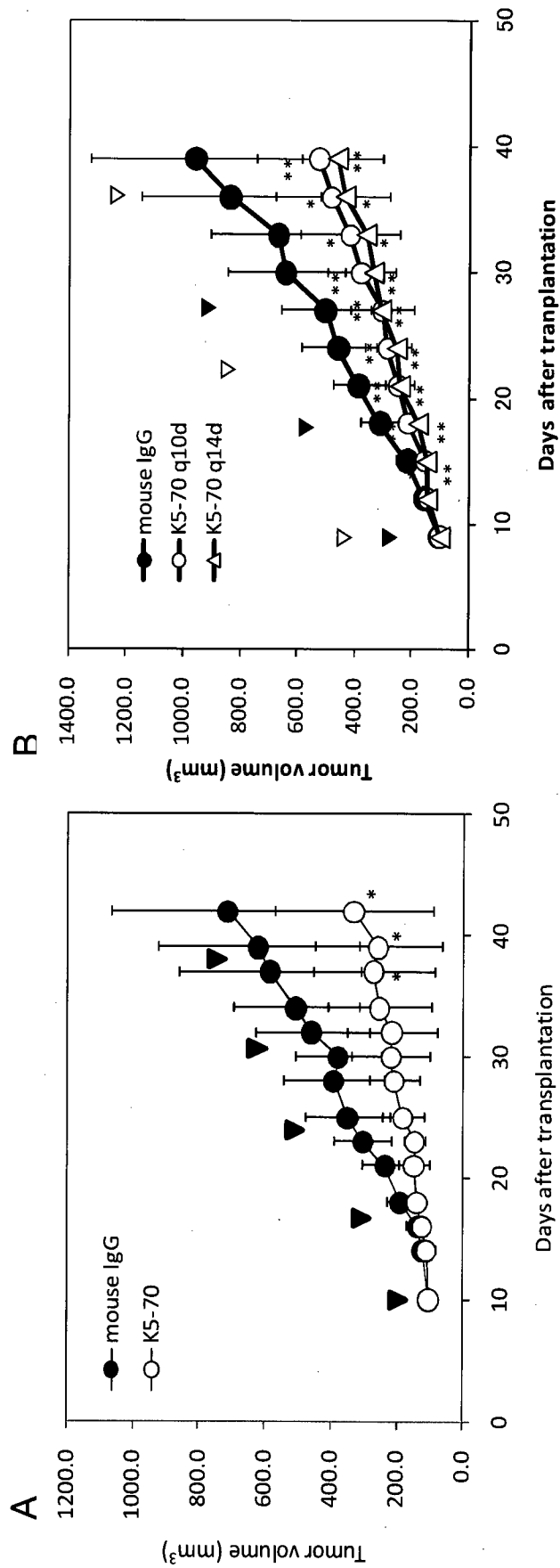


図28

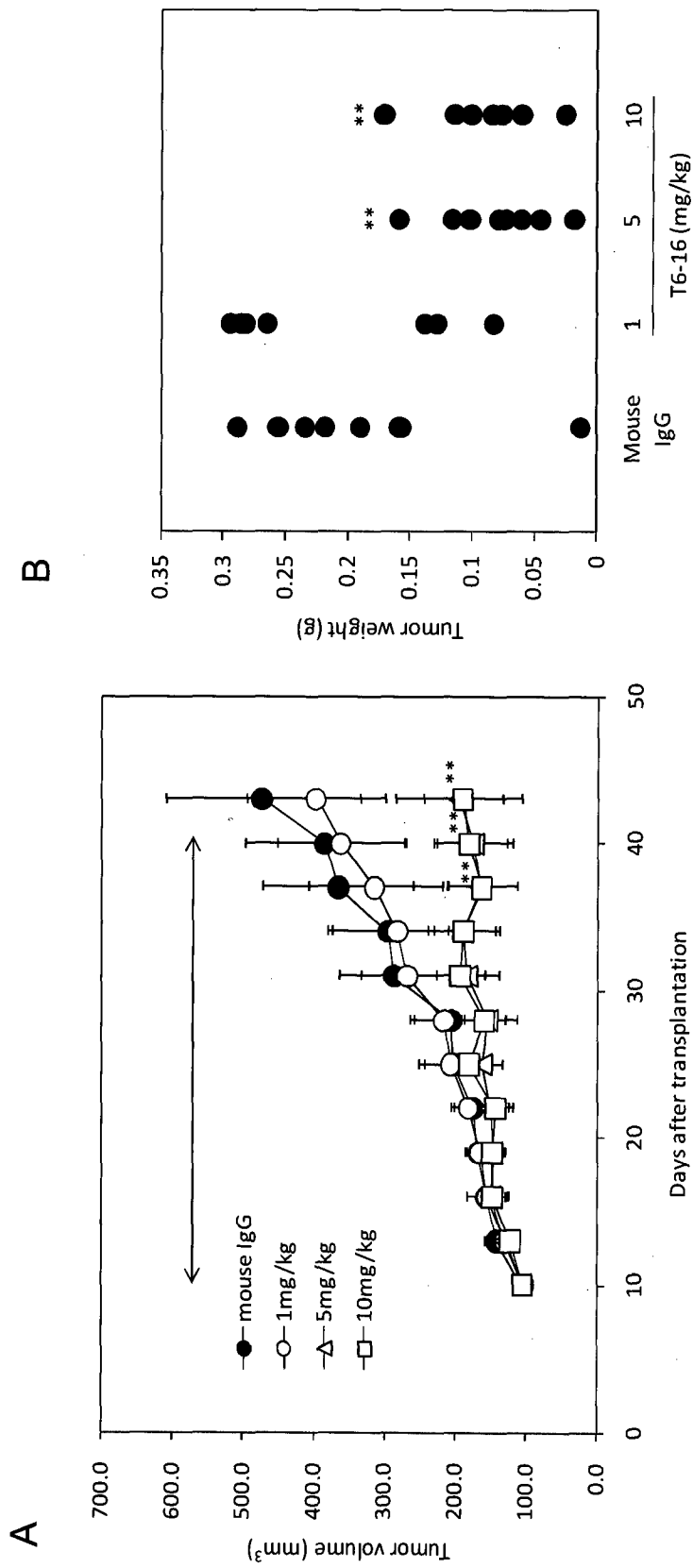


図29

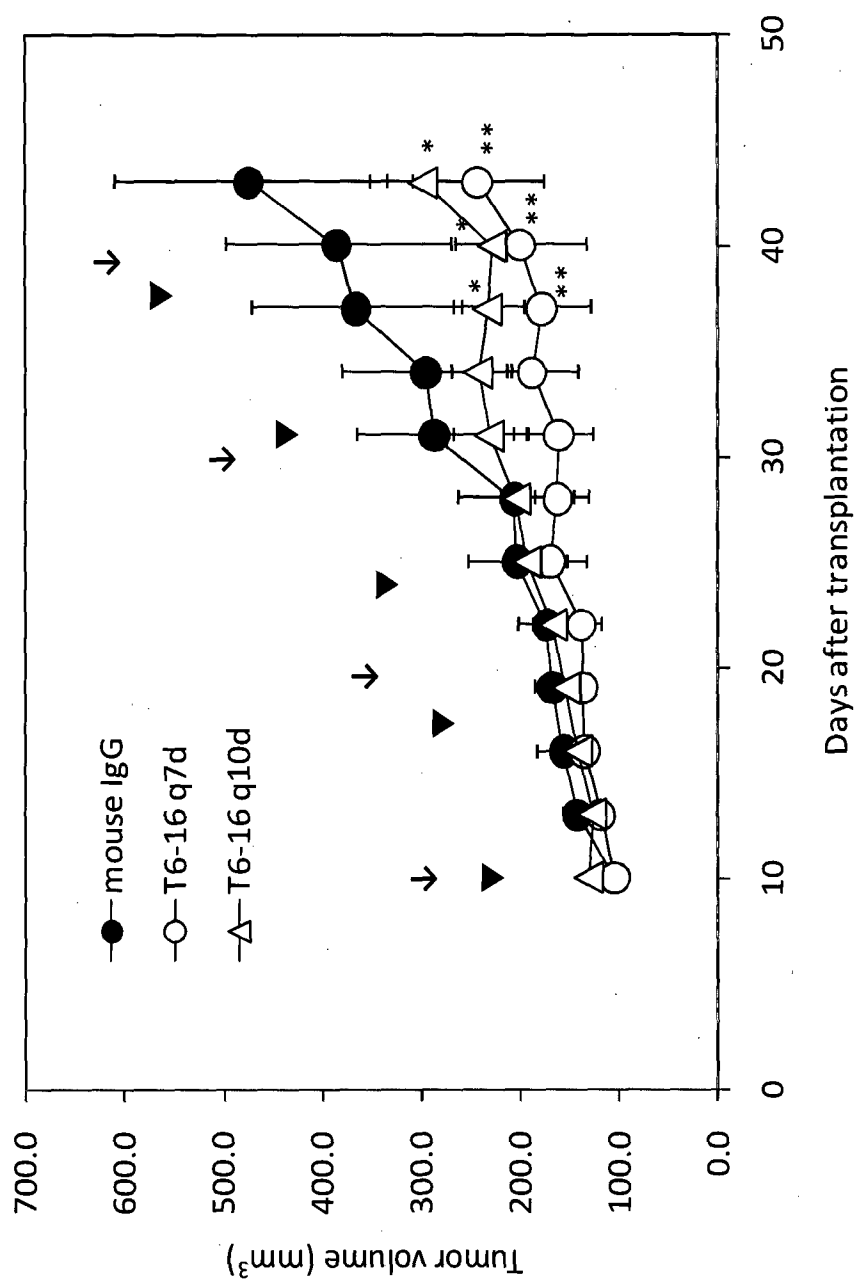


図30

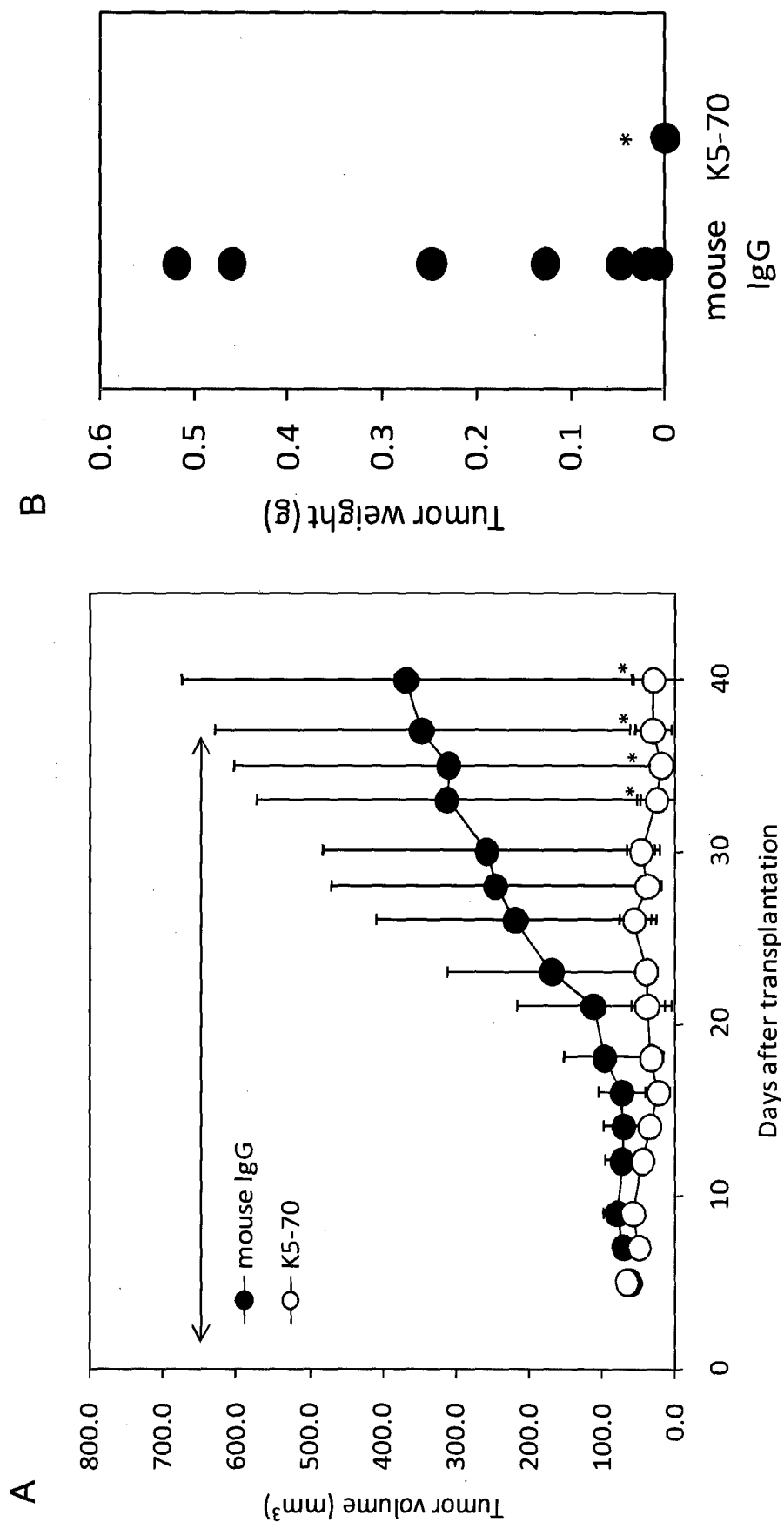


図31

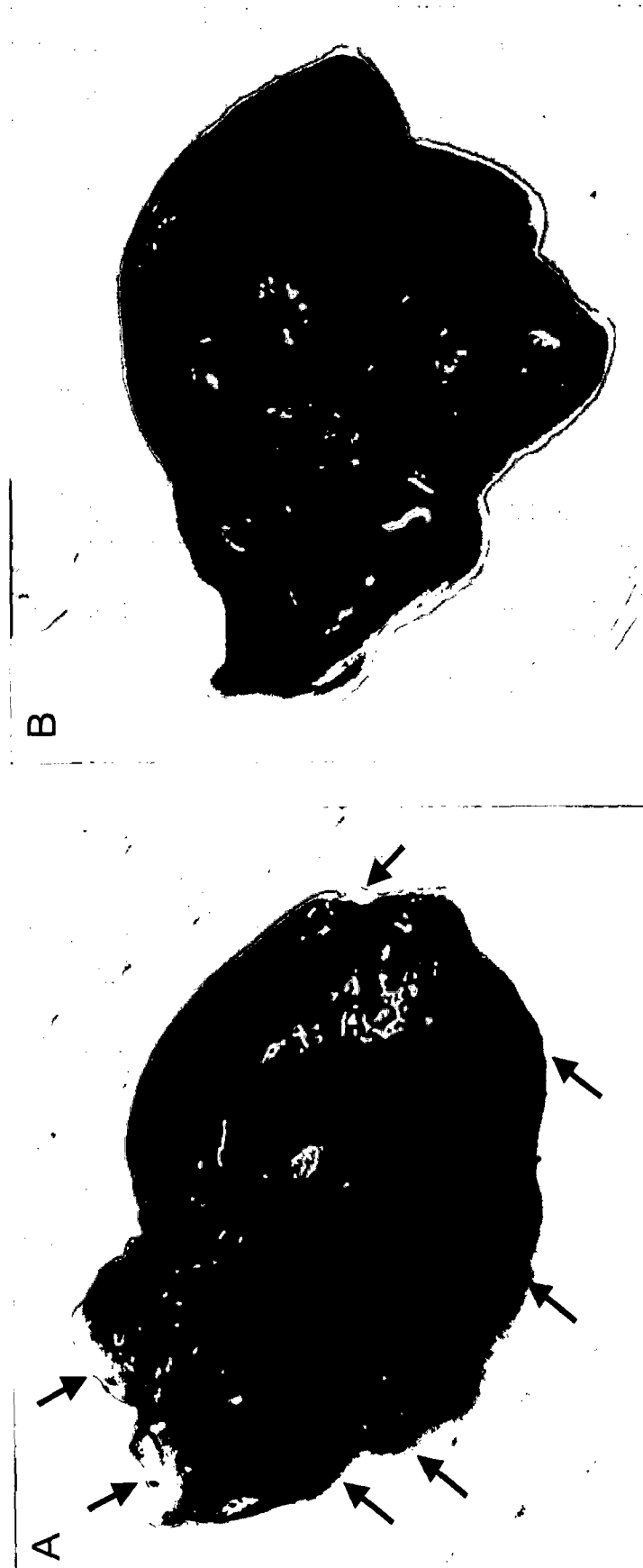
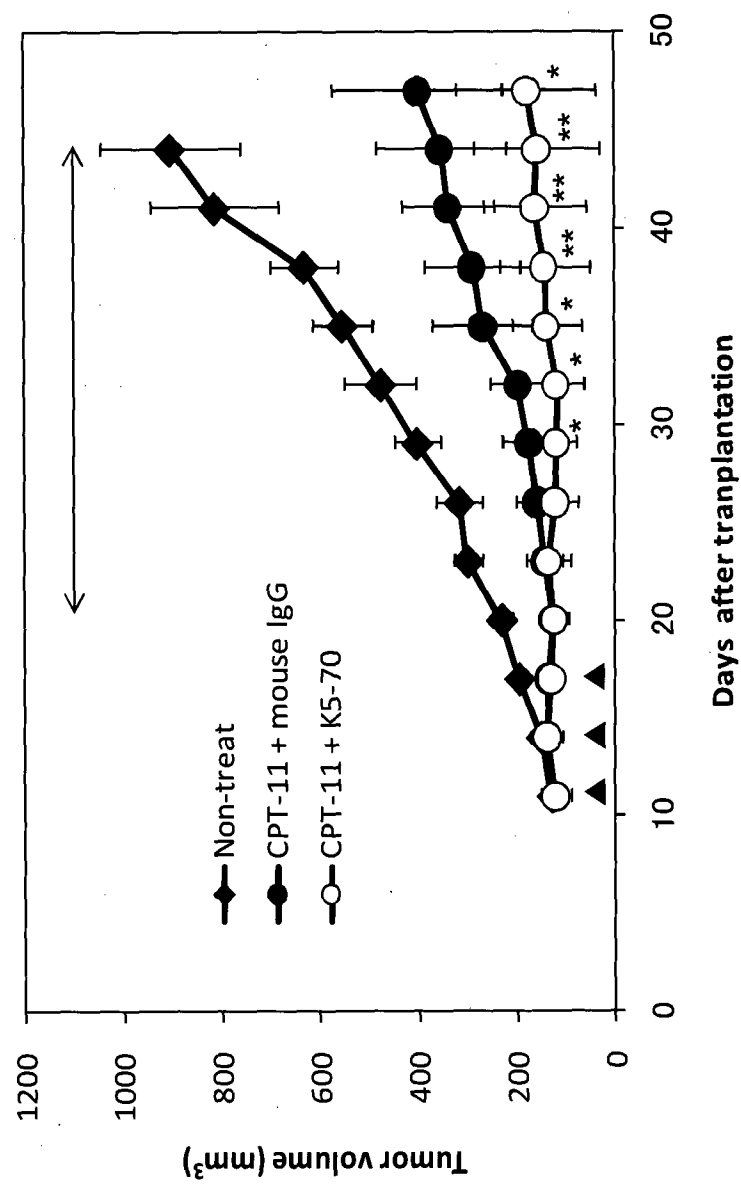


図32



33

K5-70

VH

ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTCCACTCCCAG
M G W S C I I L F L V A T A T G V H S Q
GTCCAACTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCCTGGGGCTTCAGTGAAGCTGTCC
V Q L Q Q P G A E L V R P G A S V K L S
TGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACCATCTACTGGATAAACTGGGTGAACACAGAGGCCT
C K A S G Y T F T I Y W I N W V K Q R P
GGACAAGGCCTTGAGTGGATCGGAAATATTATCCTTCTGTAGATTATACTAACTACAAT
G Q G L E W I G N I Y P S D S Y T N Y N
CAAAAGTTCAAGGACAAGGCCACATTGACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATG
Q K F K D K A T L T V D K S S T A Y M
CAGCTCAGCAGCCGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTACAAGAACGTCTATG
Q L S S P T S E D S A V Y Y C T R T S M
GCGGACTACTGGGGCCAAGGCACCACCTCTCACAGTCTCCTCA
A D Y W G G Q G T T L T V S S

34

K5-70

VL

ATGGTATCCACACCTCAGTTCCTTGTAATTTTGGCTTTTCTGGATTCCAGCCCTCCAGAGGT
M V S T P Q F L V F L L F W I P A S R G
GACATCTGTGACTCAGTCTCCAGCCATCCTGTCTGTGAGTCCAGGAGAAAGAGTCAGT
D I L L T Q S P A I L S V S P G E R V S
TTCTCCTGCAAGGCCAGTCAGAGCATTTGGCACAAAGCATACACTGGTATCAGCAAGAACA
F S C R A S Q S I G T S I H W Y Q Q R T
AATGGTTCTCCAAGGCTTCTCATAAAGTATGCTTCTGAGTCTATCTCTGGGATCCCTTCC
N G S P R L L I K Y A S E S I S G I P S
AGGTTAGTGGCAGTGGATCAGGACAGATTTTACTCTTAGCATCAACAGTGTGGAGTCT
R F S G S G S G T D F T L S I N S V E S
GAAGATATTGCAGATTATTACTGTCAACAAAGTAATAGCTGGCCATTACGTTCCGGCTCG
E D I A D Y Y C Q Q S N S W P F T F G S
GGGACAAAGTTGGAATAAAA
G T K L E I K

35

K5-107
VH

ATGGATGGAGCTGATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTCCTCCAG
M G W S C I I L F L V A T A T G V H S Q
GTCCAACTGCAGCAACCTGGGTCTGAGCTGGTGGAGCCCTGGAGCTTCAGTGAAGCTGTCC
V Q L Q Q P G S E L V R P G A S V K L S
TGCAAGGCTTCTGGCTACACATTCACCAGCTACTGGATGCACCTGGGTGAAGCAGAGGCAT
C K A S G Y T F T S Y W M H W V K Q R H
GGACAAGGCCTTGAGTGGATIGGAAATATTATCCTGGTGGTGTATATACTAATACGAT
G Q G L E W I G N I Y P G G Y T N Y D
GAGAAAGTTCAAGAGCAAGGCACACTGACTGTAGACACATCCTCCAGCACAGCCTACATG
E K F K S K G T L T V D T S S S T A Y M
CACCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTACAAGATCATCCGTT
H L S S L T S E D S A V Y Y C T R S S V
TTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA
F D Y W G Q G T T L T V S S

36

K5-107
VL

ATGGTATCCACACCTCAGTTCCTTGATATTTTGTCTTTTCTGGATTCCAGCCTCCAGAGGT
M V S T P Q F L V F L L F W I P A S R G
GACATCTTGCTGACTCAGTCTCCAGCCATCCTGTCTGTGAGTCCAGGAGAAAGAGTCAGT
D I L L T Q S P A I L S V S P G E R V S
TTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAACATTGGCACACAGCATAACACTGGTTTCAGCAAAGAACA
F S C R A S Q N I G T S I H W F Q Q R T
AATGGTTCTCCAAGGCTTCTCATAAAGTATGCTTCTGAGTCTATCTCTGGGATCCCTTCC
N G S P R L L I K Y A S E S I S G I P S
AGGTTAGTGGCAGTGGATCAGGACAGAGATTTTACTCTTAGCATCAACAGTGTGGAGTCT
R F S G S G S G T D F T L S I N S V E S
GAAGATATTGCAGATTATTACTGTCAACAAAGTAATAGCTGGCCATTACAGTTCGGCTCG
E D I A D Y Y C Q Q S N S W P F T F G S
GGGACAAAGTTGGAATAAAA
G T K L E I K

 37

K5-116-2-1

VH

ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTCCACTCCCAG
 M G W S C I I L F L V A T A T G V H S Q
 GTCCAACTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCCTGGGGCTTCAGTGAAGCTGTCC
 V Q L Q Q P G A E L V R P G A S V K L S
 TGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACCAGCTACTGGATAACCTGGGTGAAGCAGAGGCCCT
 C K A S G Y T F T S Y W I T W V K Q R P
 GGACAAGGCCTTGAGTGGATCGGAAATATTATCCTTCTGATAGTTATACTAACAAT
 G Q G L E W I G N I Y P S D S Y T N Y N
 CAAAAGTTCAGGACAAGGCCACATTGACTGTAGACAAATCCTCCAGTACAGCCTACATG
 Q K F R D K A T L T V D K S S T A Y M
 CAGCTCAGCAGCCGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTTCAGCCCTCTTTGAC
 Q L S S P T S E D S A V Y Y C S A L F D
 TACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA
 Y W G G Q G T T L T V S S

38

K5-116-2-1

VL

ATGGTATCCACACCTCAGTTCCTTGTAATTTTGGCTTTTCTGGATTCCAGCCTCCAGAGGT
M V S T P Q F L V F L L F W I P A S R G
GACATCTTGCTGACTCAGTCTCCAGCCATCCTGTCTGTGAGTCCAGGAGAAAGAGTCAGT
D I L L T Q S P A I L S V S P G E R V S
TTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGCATTGGCACAAAGCATACACTGGTATCAGCAAGAACA
F S C R A S Q S I G T S I H W Y Q Q R T
AATGGTCTCCAAGGCTTCTCATAAAGTATGCTTCTGTGAGTCTATCTCTGGGATCCCCTTCC
N G S P R L L I K Y A S E S I S G I P S
AGGTTTAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTTATTTCTTAGCATCAACAGTGTGGAGTCT
R F S G S G S G T D F I L S I N S V E S
GAAGATATTGCAGATTATTACTGTCAACAAAGTAATAGCTGGCCATTACAGTTCGGCTCG
E D I A D Y Y C Q Q S N S W P F T F G S
GGGACAAAGTTGGAAATAAAA
G T K L E I K

T6-16
VH

ATGGGATGGAGCTGGATCTTTCTCTTCCTCCTGTGTCAGGAACCTGCAGGCGTCCACTCTGAG
M G W S W I F L L F L L S G T A G V H S E
GTCCAGCTTCAGCAGTCAGGACCTGAGCTGGTGAAACCTGGGGCCTCAGTGAAGATTTC
V Q L Q Q S G P E L V K P G A S V K I S
TGCAAGGCTTCTGGATACACATTCACTGACTACAAATATGCACTGGGTGAAGCAGAGCCAT
C K A S G Y T F T D Y N M H W V K Q S H
GGAAAGAACCTTGAATGGATTGGATATATTATCCTTACAATGGTGCTACTGGCTACAAC
G K N L E W I G Y I Y P Y N G G T G Y N
CAGAGGTTCAAGAGCAGGGCCACAATGACTGTAGACAAAATCCTCCAGCACAGCCTACATG
Q R F K S R A T M T V D K S S S T A Y M
GAGTCCGCAGCCTGACATCTGATGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGAGAAGACTAC
E L R S L T S D D S A V Y Y C A R E D Y
GGTAGTAGCCCCCTTATGCTATGGACTATTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCATCGTCTCC
G S S P S Y A M D Y W G Q G T S V I V S
TCA
S

40

T6-16

VL

ATGAAGTTGCCCTGTAGGCTGTTGGTGTGATGTTCTGGATTCTGCTTCCAGCAGTGAT
M K L P V R L L V L M F W I P A S S D
GTTGTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCCTGTCTGAGATCAGGCCCTCCATC
V V M T Q T P L S L P V S L G D Q A S I
TCTTGAGATCTAGTCAGAGCCCTTGTACACGGTAATGGAACACCTATTACATTGGTAC
S C R S S Q S L V H G N G N T Y L H W Y
CTGCAGAAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTCTCT
L Q K P G Q S P K L L I Y K V S N R F S
GGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGACGGATTTCACACTCAAGATCAGC
G V P D R F S G S G T D F T L K I S
AGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTCTGCTCTCAAACTACACATGTTCCCACG
R V E A E D L G V Y F C S Q T T H V P T
TTCGGCTCGGGACAAAGTTGGAAATAAAA
F G S G T K L E I K

41

	1	2	3	4
	123456789	0123456789	0123456789	0123456789
K5-70 VH	QVQLQQPGA	ELVRPGASVK	LSCKASGYTF	TIYWINWVKQ
HuK5-70 VH	QVQLVQSGA	EVKKPGASVK	VSCKASGYTF	TIYWINWVRQ
DA980102 VH	QVQLVQSGA	EVKKPGASVK	VSCKASGYTF	T-----WVRQ
	5	6	7	8
	01223456789	0123456789	0123456789	0122223456789
	a		abc	
K5-70 VH	NIYPSDSYTN	NQFKDKATL	TVDKSSSTAY	MQLSSPTSEDSAV
HuK5-70 VH	NIYPSDSYTN	NQFKDKATL	TVDTASSTAY	MELSSLRSEDTAV
DA980102 VH	-----	-----RVTL	TSDTSASTAY	MEMSSLRSEDTAV
	9	0	1	1
	0123456789	0123456789	0123	
K5-70 VH	YYCTRTSMA-	-DYWGQGTTL	TVSS	
HuK5-70 VH	YYCTRTSMA-	-DYWGQGTTL	TVSS	
DA980102 VH	VHYYCAR----	-WGQGTTLV	TVSS	

42

1	2	3
123456789	0123456789	0123456789 0123456789
K5-70 VL	DILLTQSPA	ILSVSPGERV SFSCRASQSI <u>GTSIHWYQQR</u>
HuK5-70 VL	EIVLTQSPA	TLSLSPGERA TLSCRASQSI <u>GTSIHWYQQK</u>
L41174 VL	EIVLTQSPA	TLSLSPGERA TLSC-----WYQQK
4	5	6 7
0123456789	0123456789	0123456789 0123456789
K5-70 VL	TNGSPRLLIK	<u>YASEISGIP</u> SRFSGSGSGT DFTLSINSVE
HuK5-70 VL	PGQAPRLLIK	<u>YASEISGIP</u> ARFSGSGSGT DFTLTSSLE
L41174 VL	PGQAPRLLIY	-----GIP ARFSGSGSGT DFTLTSSLE
8	9	0
0123456789	0123456789	01234567
K5-70 VL	SEDIADYVCQ	<u>QNSWPF</u> TFG SGTKEIK
HuK5-70 VL	PEDFAVYVCQ	<u>QNSWPF</u> TFG QGTKEIK
L41174 VL	PEDFAVYVC-	-----FG QGTKEIK

43

	1	2	3	4
T6-16 VH	123456789	0123456789	0123456789	0123456789
HuT6-16 VH1	EVQLQQSGP	ELVKPGASVK	ISCKASGYTF	TDYNMHWVRQ
HuT6-16 VH2	QVQLVQSGA	EVKKPGASVK	VSCKASGYTF	TDYNMHWVRQ
DA935238 VH	QVQLVQSGA	EVKKPGASVK	VSCKASGYTF	T-----WVRQ
	5	6	7	8
	01223456789	0123456789	0123456789	012223456789
				abc
T6-16 VH	YIYPYNGGTGY	NQRFKSRA ^a TM	TVDKSSSTAY	MELRSLTSDDSAV
HuT6-16 VH1	YIYPYNGGTGY	NQRFKSRA ^a TM	TVDKSTSTAY	MELRSLRSDDTAV
HuT6-16 VH2	YIYPYNGGTGY	NQRFKSRA ^a TM	TVDTSTSTAY	MELRSLRSDDTAV
DA935238 VH	-----	-----RV ^a TM	TVDTSTSTAY	MELRSLRSDDTAV
	1		1	
	9	0	1	
	0123456789	000000123456789	0123	
		abcde		
T6-16 VH	YYCARE ^a DYGS	SPSYAMDYWGQTSV	IVSS	
HuT6-16 VH1	YYCARE ^a DYGS	SPSYAMDYWGQTMV	TVSS	
HuT6-16 VH2	YYCARE ^a DYGS	SPSYAMDYWGQTMV	TVSS	
DA935238 VH	YYCAR-----	-----WGQTMV	TVSS	

44

	1	2	3	
	123456789	0123456789	012345677777789	0123456789
			abcde	
T6-16 VL	DVVM	QTPL	SLPV	SLGDQA
				SISCRSSQSLVHGNG
				NTYLHWYLQK
HuT6-16 VL	DIVMT	QSPL	SLPVT	PGGEPA
				SISCRSSQSLVHGNG
				NTYLHWYLQK
M99608 VL	DIVMT	QSPL	SLPVT	PGGEPA
				SISC-----
				-----WYLQK
	4	5	6	7
	0123456789	0123456789	0123456789	0123456789
T6-16 VL	PGQSP	KLLIY	KVSN	RFS
				GVSGV
				DRFSGSGGT
				DFTLKISRVE
HuT6-16 VL	PGQSP	QLLIY	KVSN	RFS
				GVSGV
				DRFSGSGGT
				DFTLKISRVE
M99608 VL	PGQSP	QLLIY	-----	GVP
				DRFSGSGGT
				DFTLKISRVE
	8	9	0	1
	0123456789	0123456789	0123456789	01234567
T6-16 VL	AEDLG	VYFCS	QTHVP	-TFG
				SGTKLEIK
HuT6-16 VL	AEDVG	VYYCS	QTHVP	-TFG
				GGTKVEIK
M99608 VL	AEDVG	VYYC	-----	FG
				GGTKVEIK

 45

HuK5-70

VH

```

GAA TTC ACC ACC ATG GGG TGG AGC TGC ATT AIC CTG TTT GTT GCA ACT GCA ACA GGC
      M G W S C I I I L F L V A T A T G
      -----
GTT CAC TCA CAG GTT CAG CTA GTC CAG TCT GGA GCT GAG GTG AAG AAA CCA GGG GCA TCT
V H S Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S
-----
GTC AAA GTG AGC TGT AAG GCC TCT GGC TAT ACG TTC ACG ATA TAC TGG AIC AAT TGG GTG
V K V S C K A S G Y T F T I Y W I N W V
-----
AGG CAA GCT CCT GGA CAA CGG TTG GAA TGG ATT GGC AAC AIC TAT CCC TCA GAC TCC TAC
R Q A P G Q R L E W I G N I Y P S D S Y
-----
ACC AAC TAC AAT CAG AAG TTC AAG GAC AAA GCC ACT CTC ACC GTA GAT ACC AGT GCC TCC
I N Y N Q K K F K D K A T L T V D T S A S
-----
ACA GCC TAT ATG GAG CTG AGC AGT TTA CGC AGC GAA GAT ACA GCG GTG TAC TAC TGC ACC
T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C T
-----
AGA ACC TCC ATG GCT GAC TAT TGG GGT CAG GGT ACA CTG GTG ACT GTG AGC TCC GCT AGC
R T S M A D Y W G Q G T L V T V S S
-----

```

46

HuK5-70

VL

```

ACC GGT ACC ACC ATG GTA AGC ACA CCC CAG TTC CTC GTT TTC CTC CTG TTT TGG ATT CCC
M V S T P Q F L V F L L F W I P
-----
GCA AGT AGA GGG GAG ATC GTC TTG ACT CAG AGT CCT GGC ACA CTG TCT CTT TCA CCA GGA
A S R G E I V L T Q S P A T L S L S P G
-----
GAA AGG GGG ACA CTT AGC TGT CGA GCT TCT CAG AGC ATT GGC ACG TOC ATA CAC TGG TAT
E R A T L S C R A S Q S I G T S I H W Y
-----
CAG CAG AAA CCG GGA CAA GCT CCA CGG TTA CTG ATC AAG TAT GGC TOC GAA AGC ATC TCT
Q Q K P G Q A P R L L I K Y A S E S I S
-----
GGG ATT OCT GCA CGC TTT AGC GGA AGC GGT AGT GGT ACC GAC TTC ACT CTG ACC ATA TOC
G I P A R F S G S G S G T D F T L T I S
-----
TCA CTA GAA CCC GAG GAT TTT GCC GTG TAC TAC TGC CAG CAG TOC AAC TCA TGG CCT TTC
S L E P E D F A V Y Y C Q Q S N S W P F
-----
ACC TTT GGC CAA GGC ACC AAA GTG GAG ATC AAG CGT ACG
T F G Q G T K V E I K

```

47

HuT6-16

VH1

GAA TTC ACC ACC ATG GGA TGG TCT TGG ATC TTT CTC TTC CTG TCT GGC ACA GCT GGA
 M G W S W I F L L S G T A G

 GTG CAT TCC CAA GTT CAG CTG GTC CAG TCC GGA GCT GAA GTT AAA AAG CCC GGG GCC AGC
 V H S Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S

 GTC AAA GTC TCC TGC AAG GCA TCC GGG TAT ACT TTT ACC GAT TAT AAC ATG CAC TGG GTG
 V K V S C K A S G Y T F T D Y N M H W V

 CGC CAA GCA CCC GGC CAG GGC CTG GAG TGG ATT GGC TAT ATC TAT CCT TAT AAT GGA GGG
 R Q A P G Q G L E W I G Y I Y P Y N G G

 ACC GGC TAC AAC CAG AGA TTC AAG AGC AGA GCC ACC ATG ACA GTG GAT AAA TCT ACC AGC
 T G Y N Q R F K S R A T M T V D K S T S

 ACT GCC TAC ATG GAG CTG AGA AGC CTG CGG AGC GAC ACA GCC GTG TAC TAC TGT GCC
 T A Y M E L R S L R S D D T A V Y Y C A

 CGC GAG GAT TAC GGA AGC AGC CCA AGC TAC GCC ATG GAT TAC TGG GGC CAA GGC ACT ATG
 R E D Y G S S P S Y A M D Y W G Q G T M

 GTG ACC GTG AGC AGC GCT AGC
 V T V S S

 48

HuT6-16
VH2

```

GAA TTC ACC ACC ATG GGC TGG TCT TGG ATC TTC CTC TTC CTG CTG AGC GGG ACC GCT GGA
      M G W S W I F L F L L S G T A G
-----
GTC CAT TCT CAA GTC CAA CTG GTC CAG TCC GGG GCT GAA GTG AAA AAA CCA GGA GCA TCC
V H S Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S
-----
GTT AAG GTG TCC TGT AAG GCA AGC AGC GGA TAC ACC TTT ACC GAC TAT AAC ATG CAC TGG GTG
V K V S C K A S G Y T F T D Y N M H W V
-----
AGG CAG GCC CCC GGA CAG GGG CTG GAG TGG ATC GGC TAT ATT TAT CCT TAC AAC GGG GGC
R Q A P G Q G L E W I G Y I Y P Y N G G
-----
ACT GGC TAT AAT CAG AGA TTT AAG AGC CGC GCT ACC ATG ACC GTG GAC ACC TCC ACT TCT
T G Y N Q R F K S R A T M T V D T S S
-----
ACA GCC TAT ATG GAG CTG AGA AGC CTG CGG AGC GAT GAT ACA GCC GTG TAC TAC TGC GCC
T A Y M E L R S L R S D D I A V Y Y C A
-----
AGA GAA GAT TAC GGC AGC AGC CCC AGC TAC GCC ATG GAC TAC TGG GGC CAG GGC ACA ATG
R E D Y G S S P S Y A M D Y W G Q G T M
-----
GTT ACT GTG AGC AGC GCT AGC
V T V S S

```

HuT6-16
VL

```

ACC GGT ACC ACC ATG AAG CTC CCA GTG CGC CTC CTG GTC CTG ATG TTC TGG ATT CCC GCT
      M K L P V R L L V L M F W I P A
-----
TCC TCT AGC GAT ATC GTC ATG ACC CAA TCC CCA CTG TCT CTG CCT GTG ACA CCA GGC GAA
S S D I V M T Q S S P L S L P V T P G E
-----
CCT GCA TCT ATT AGC TGT AGA AGC AGC CAG TCC CTG GTG CAC GGA AAC GGA AAC ACC TAT
P A S I S C R S S Q S S L L V H G N G N T Y
-----
CTG CAC TGG TAC CTG CAA AAA CCT GGA CAG AGC CCC CAG CTG CTG ATC TAC AAA GTC AGC
L H W Y L Q K P G Q S S P Q L L I Y K V S
-----
AAT AGA TTT AGC GGG GTG CCC GAC AGG TTT AGC GGC AGC GGC AGC GGC ACA GAT TTC ACC
N R F S G V P D R F S S G S G S G T D F T
-----
CTG AAA ATC TCC CGG GTG GAA GCC GAG GAC GTT GGG GTT TAC TAT TGC AGC CAG ACA ACC
L K I S R V E A E D V G V Y Y C S Q T T
-----
CAT GTG CCC ACT TTC GGG GGC GGC ACT AAG GTG GAG ATC AAG CGT ACG
H V P T F G G G T K V E I K

```

図50

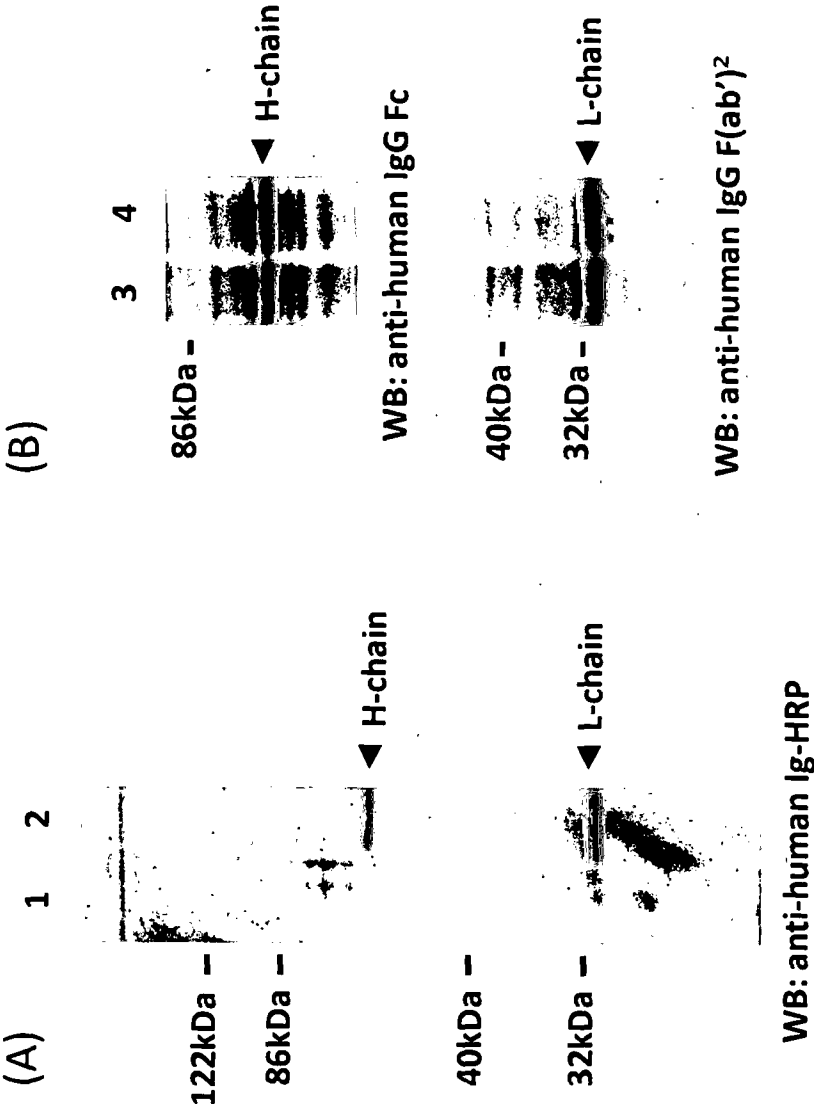


図51

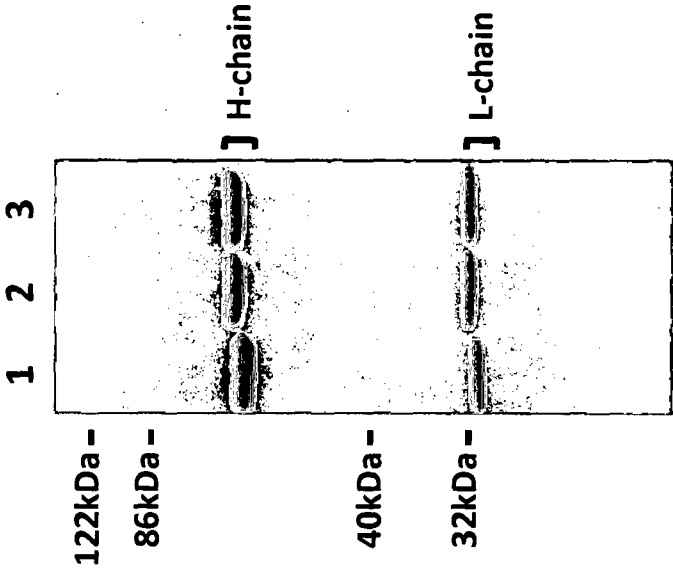


図52

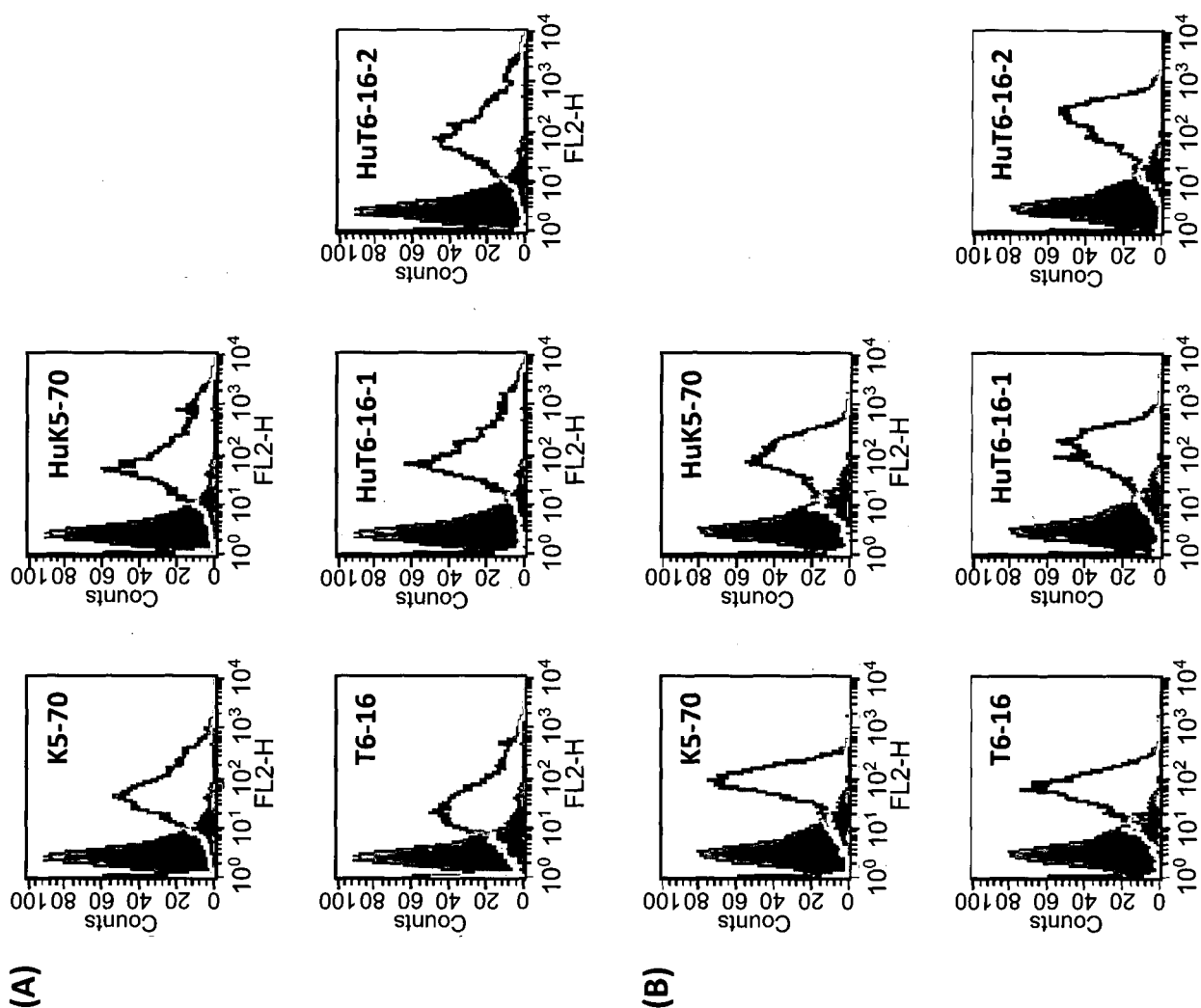


図53

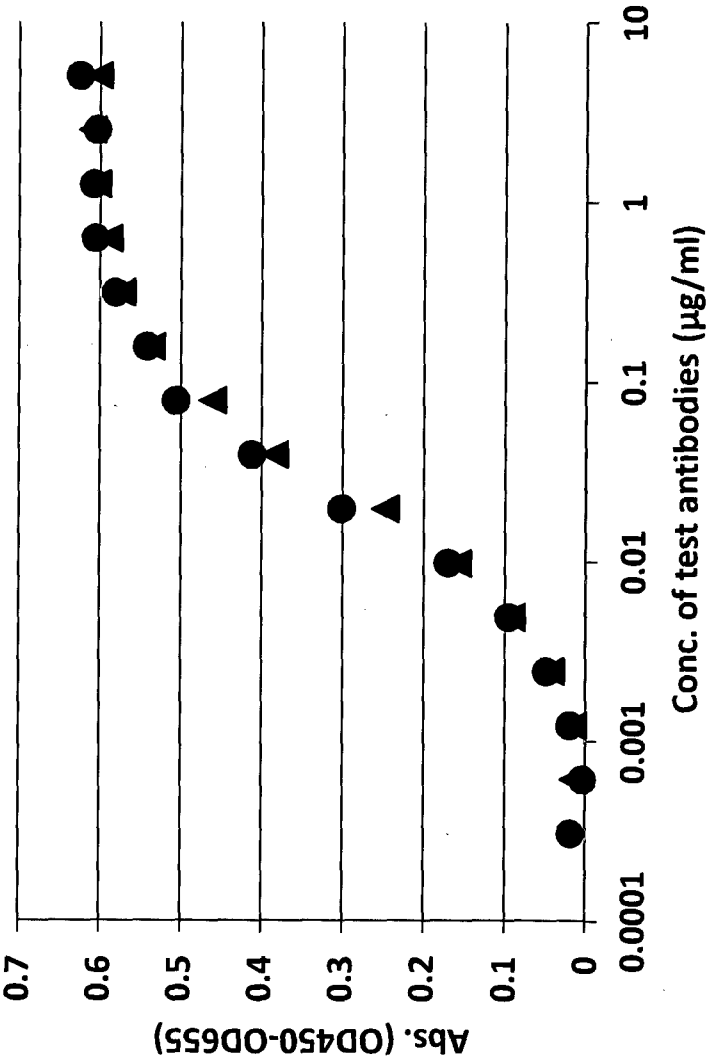


図54

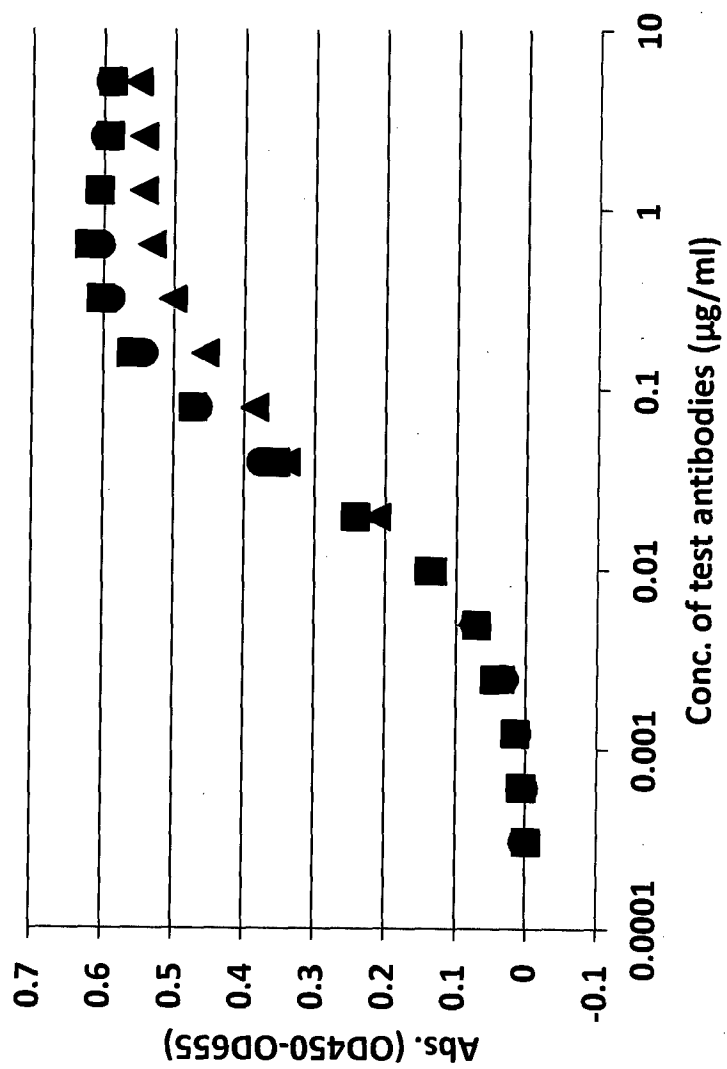


図55

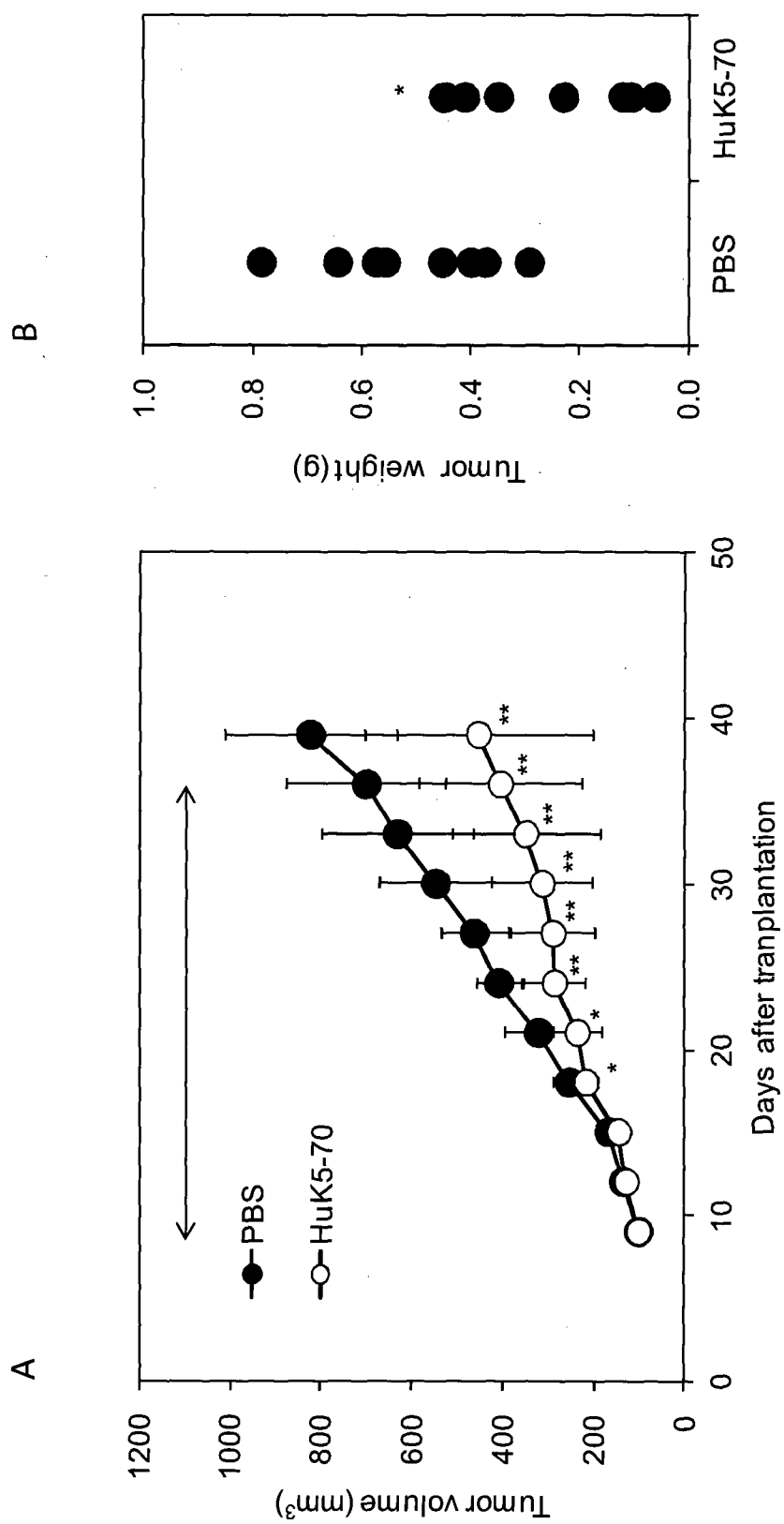


図56

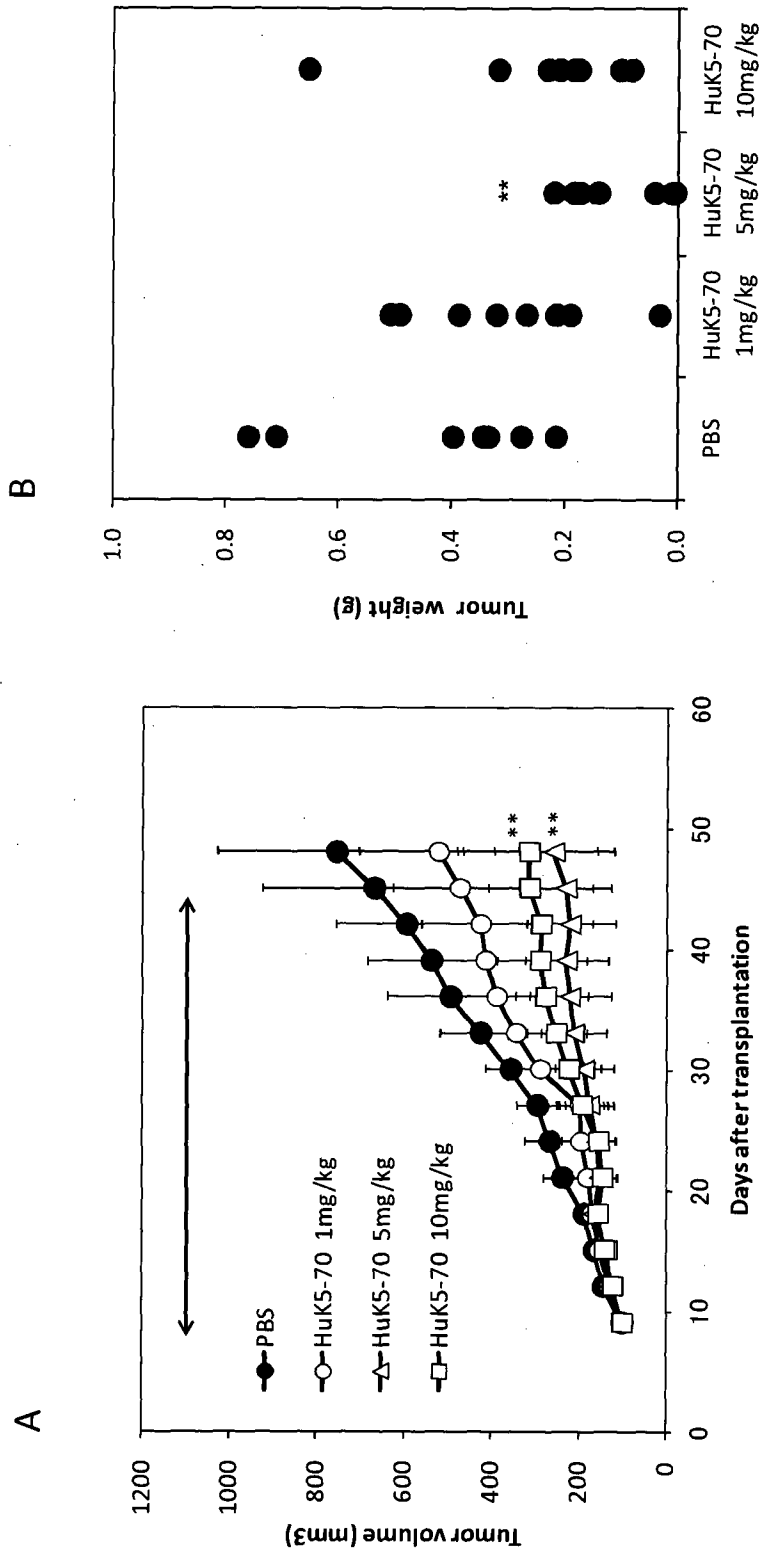
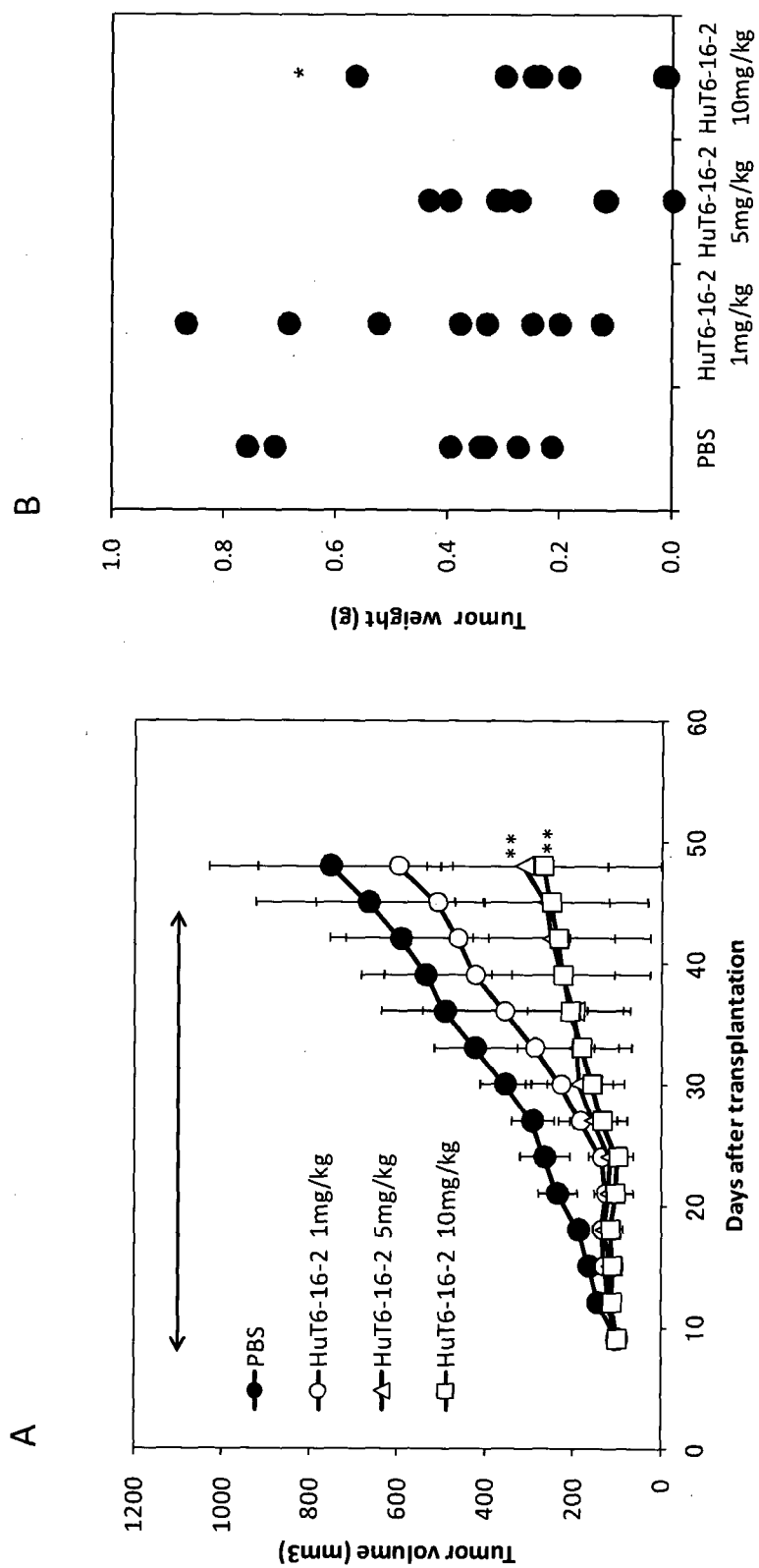


図57



58

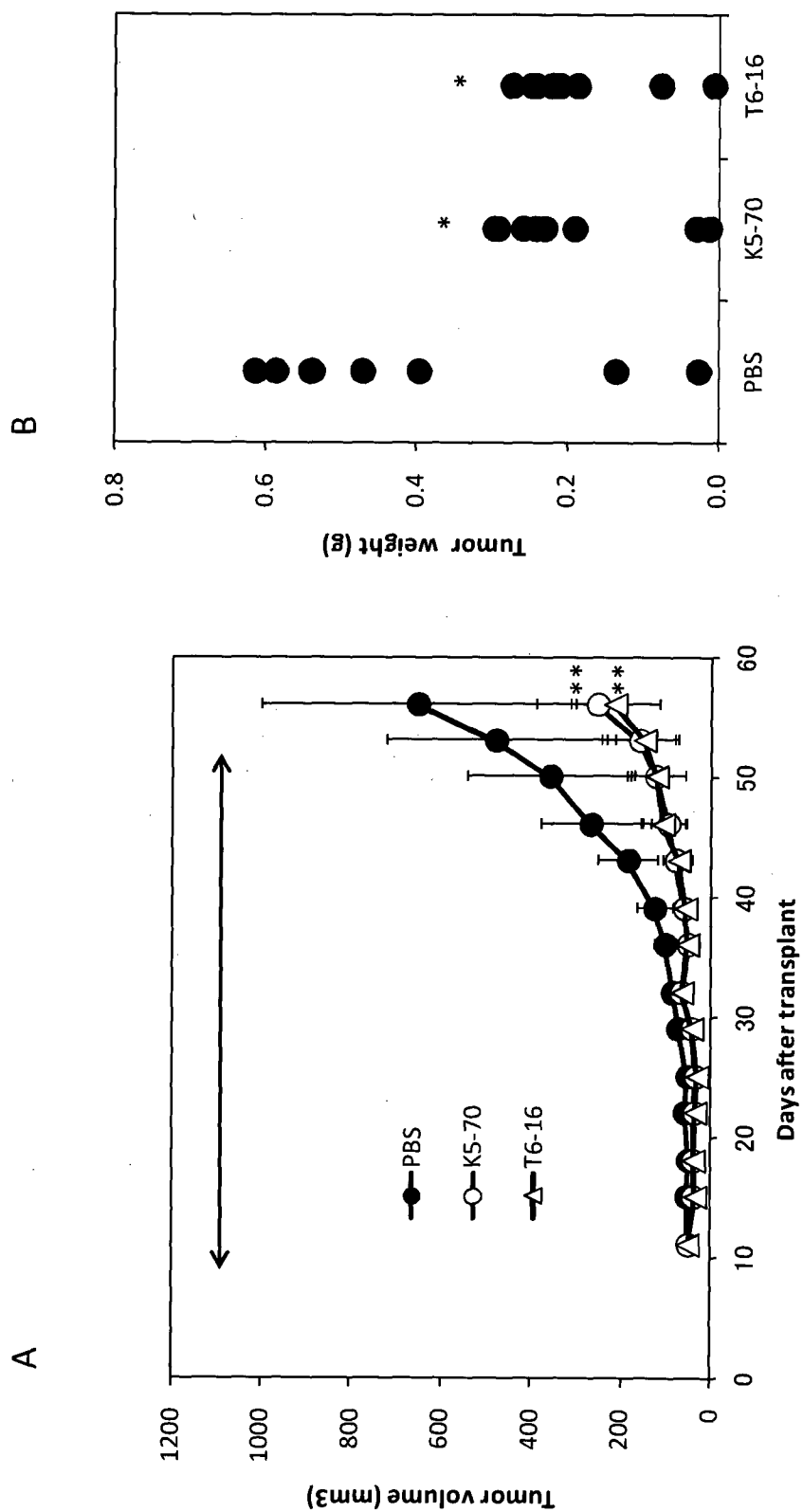


図59

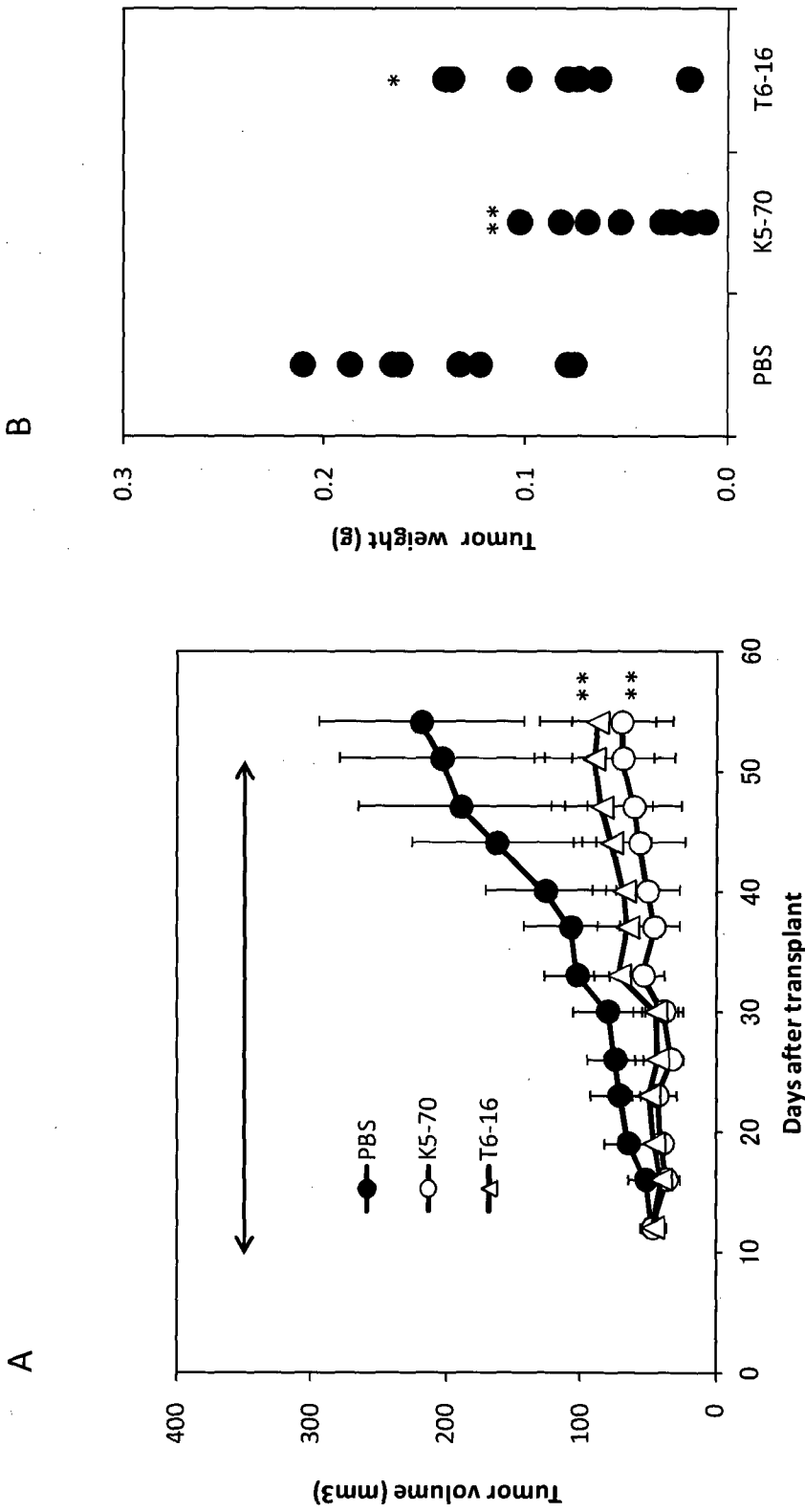


図60

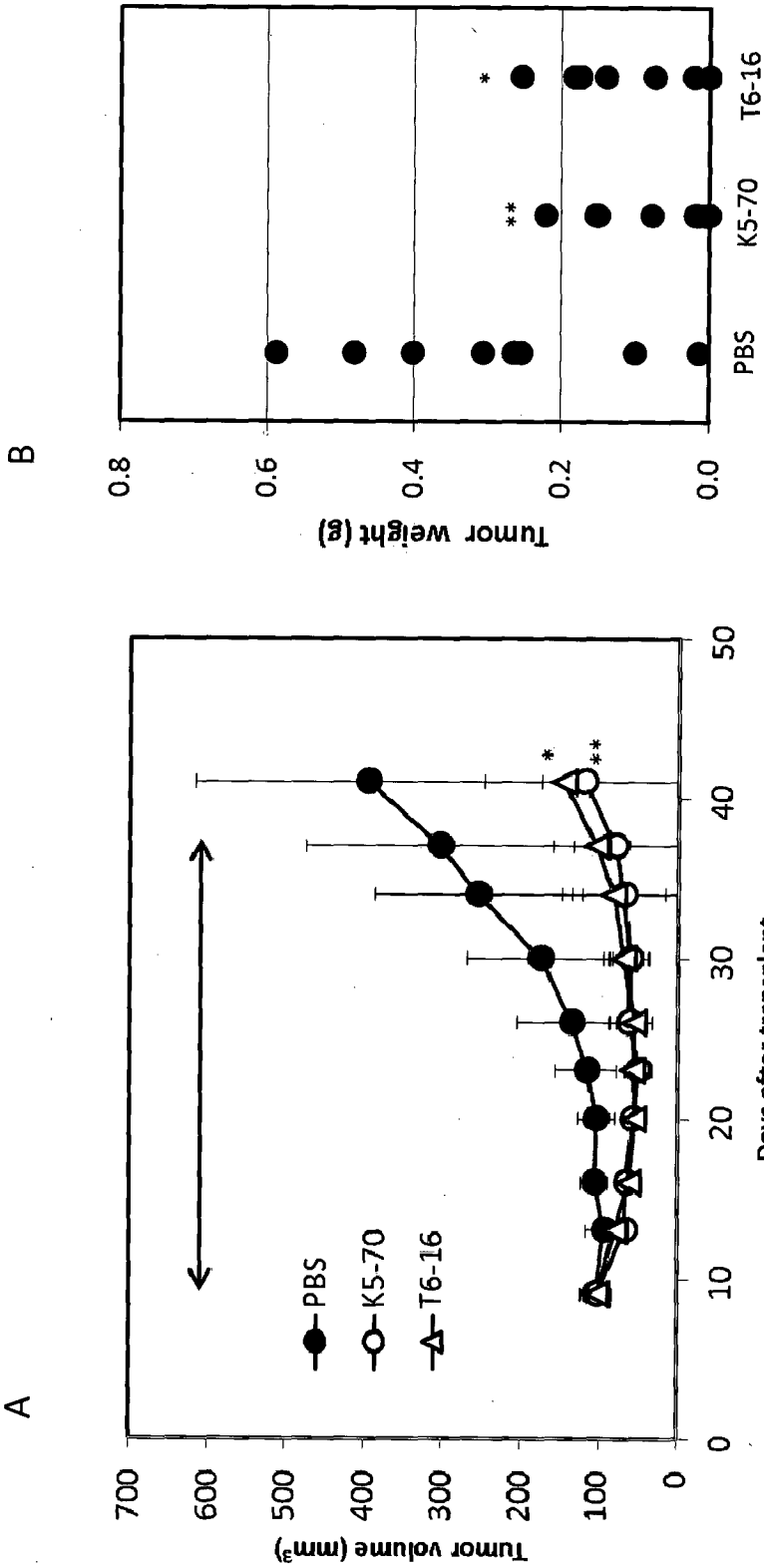
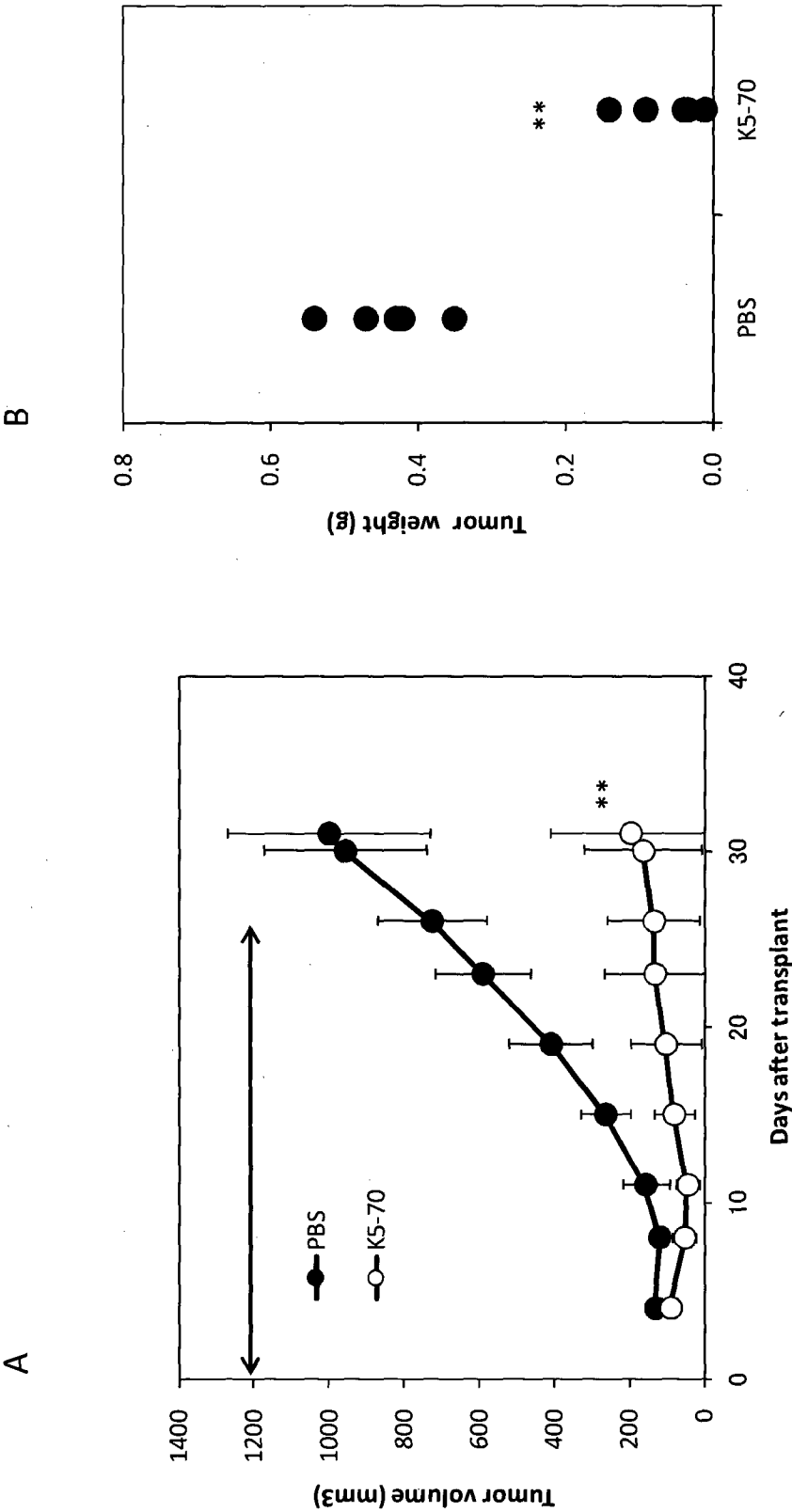


図61



62

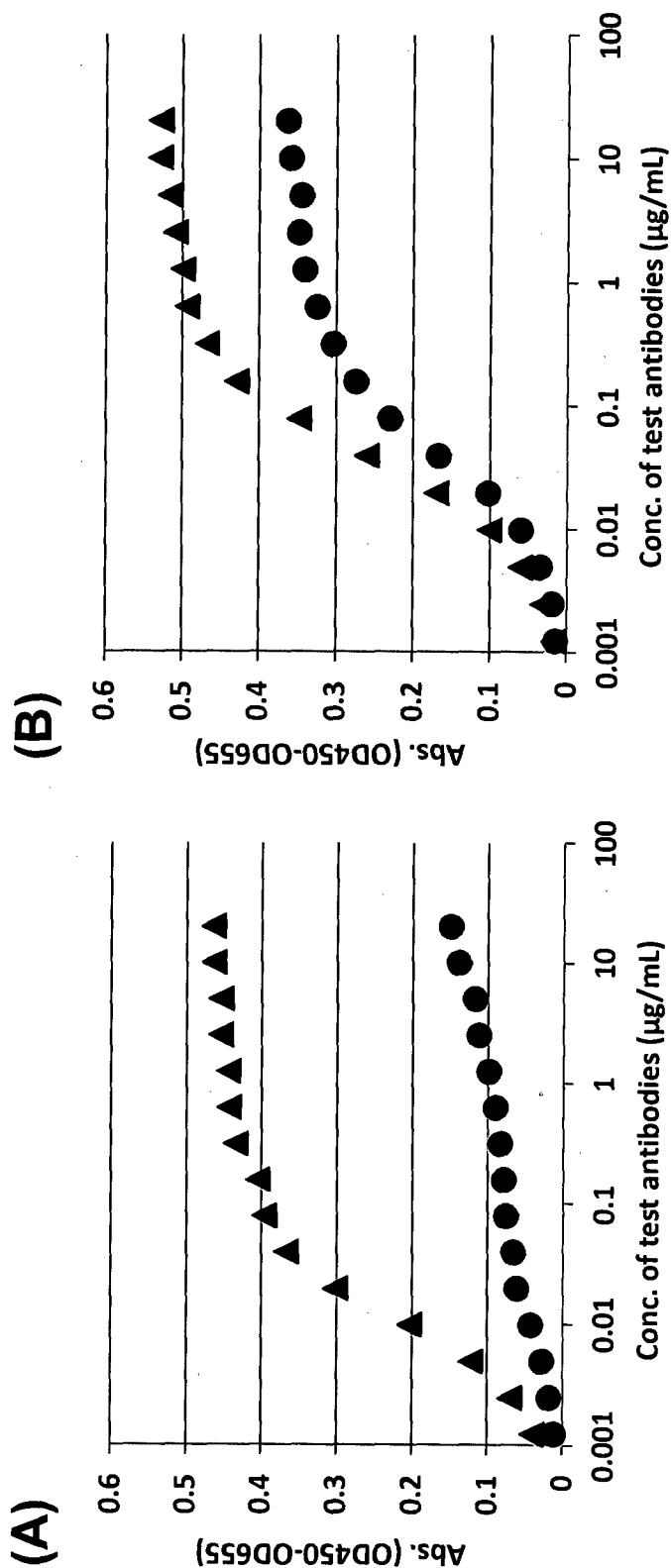
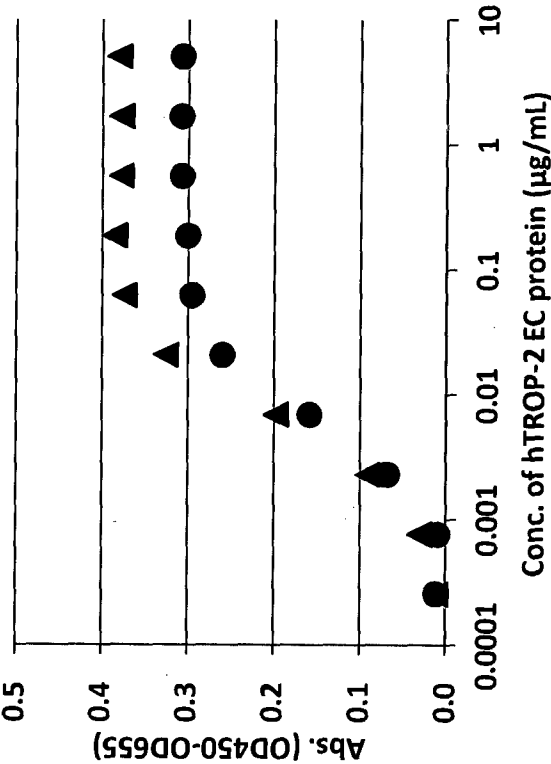


図63



64

EcoRI Kozak
GAA TTC ACC ACC ATG GGA TGG TCC TGC ATT ATT CTC TTT CTC GTC GCC ACC GCC ACA GGC
M G W S C I I L F L V A T A T G

GTG CAC AGC CAG GTT CAA CTG CAG CAA CCT GGG GCA GAG CTG GTT CGG CCA GGG GCC TCC
V H S Q V Q L Q Q P G A E L V R P G A S

GTC AAA CTG TCC TGC AAA GCT TCT GGC TAC ACT TTC ACC ATC TAC TGG ATC AAC TGG GTG
V K L S C K A S G Y T F T I Y W I N W V

AAG CAG AGG CCC GGC CAG GGC CTG GAA TGG ATC GGA AAT ATC TAT CCT AGC GAT TCT TAC
K Q R P G Q G L E W I G N I Y P S D S Y

ACA AAT TAC AAC CAG AAG TTC AAG GAC AAG GCT ACC CTG ACC GTG GAC AAA TCT AGC TCC
T N Y N Q K F K D A T L T V D K S S

ACA GCC TAC ATG CAG CTG AGC AGC CCC ACT AGC GAG GAT AGC GCA GTG TAT TAT TGT ACC
T A Y M Q L S S P T S E D S A V Y C T

AGA ACC AGC ATG GCC GAC TAT TGG GGA CAG GGC ACA ACT CTG ACC GTG AGC AGC ^{NheI} GCT AGC
R T S M A D Y W G Q T T L T V S S

65

AgeI Kozak
ACC GGT ACC ACC ATG GTT AGC ACA CCT CAA TTT CTG GTC TTC CTG CTC TTC TGG ATT CCT
M V S T P Q F L V F L L F W I P

GCC AGC AGA GGA GAT ATC CTC CTG ACA CAA AGC CCC GCA ATC CTG AGC GTG TCC CCC GGA
A S R G D I L L T Q S P A I L S V S P G

GAG CGC GTG AGC TTT AGC TGC CGG GCC AGC CAG AGC ATT GGA ACC AGC ATC CAC TGG TAT
E R V S F S C R A S Q S I G T S I H W Y

CAG CAG AGA ACC AAC GGG TCT CCC AGG CTG CTG ATT AAA TAC GCT TCT GAG TCT ATT TCC
Q Q R T N G S P R L L I K Y A S E S I S

GGG ATC CCA AGC AGA TTC TCC GGC TCT GGC AGC GGC ACT GAT TTT ACT CTG TCT ATC AAC
G I P S R F S G S G S G T D F T L S I N

AGC GTG GAG TCC GAA GAC ATC GCC GAC TAC TAT TGT CAG CAG AGC AAT TCC TGG CCA TTC
S V E S E D I A D Y Y C Q Q S N S W P F

ACC TTT GGC AGC GGC ACC AAG CTG GAA ATC AAG CGT ACG
T F G S G T K L E I K

BsiWI

図66

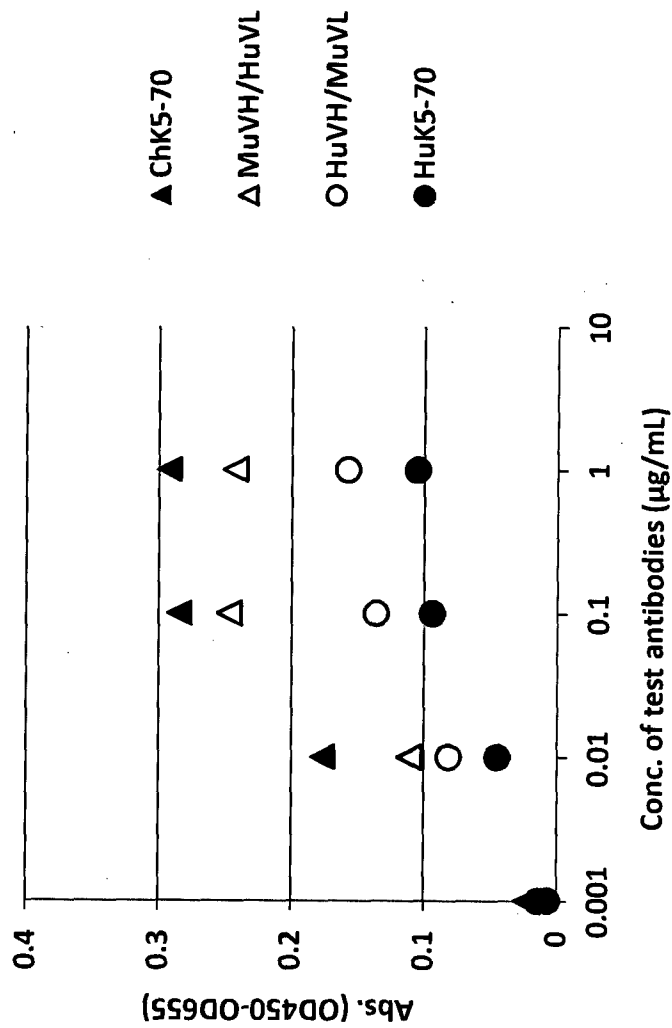
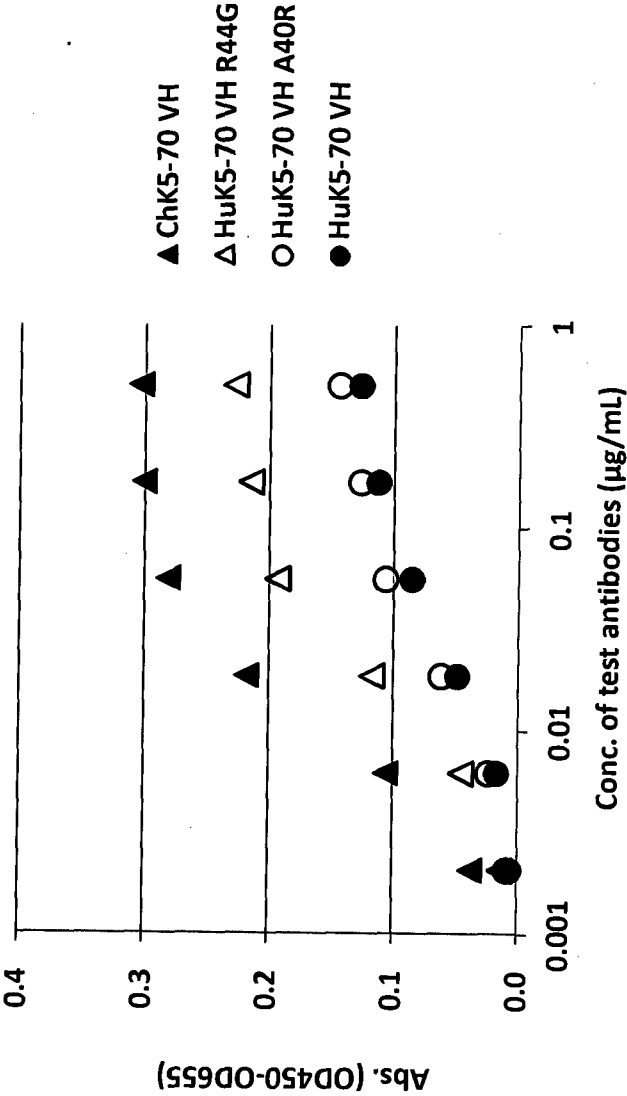


図67

	1	2	3	4	5	
	123456789	0123456789	0123456789	0123456789	01223456789	
					a	
HuK5-70 VH	QVQLVQSGA	EVKKPGASVK	VSCKASGYTF	TIYWINWVRQ	APGQRLEWIG	NIYPSDSYTNV
V5Q	---Q---	-----	-----	-----	-----	-----
S7P	-----P--	-----	-----	-----	-----	-----
V11L	-----	-L-----	-----	-----	-----	-----
K12V	-----	--V-----	-----	-----	-----	-----
K13R	-----	---R-----	-----	-----	-----	-----
V20L	-----	-----	L-----	-----	-----	-----
R38K	-----	-----	-----	-----K-	-----	-----
A40R	-----	-----	-----	-----	R-----	-----
R44G	-----	-----	-----	-----	---G---	-----
T73K	-----	-----	-----	-----	-----	-----
A75S	-----	-----	-----	-----	-----	-----
E81Q	-----	-----	-----	-----	-----	-----
L82cP	-----	-----	-----	-----	-----	-----
R83T	-----	-----	-----	-----	-----	-----
T87S	-----	-----	-----	-----	-----	-----
L108T	-----	-----	-----	-----	-----	-----
V109L	-----	-----	-----	-----	-----	-----
V11L/R38K	-----	-L-----	-----	-----K-	-----	-----

	6	7	8	9	1	1
	0123456789	0123456789	0122223456789	0123456789	0123456789	0123
		abc				
HuK5-70 VH	NQKF K D K ATL	TVDT S ASTAY	MEL S SLRSED T AV	YYCT R TSMA-	-DYWGQGT L V	TVSS
V5Q	-----	-----	-----	-----	-----	-----
S7P	-----	-----	-----	-----	-----	-----
V11L	-----	-----	-----	-----	-----	-----
K12V	-----	-----	-----	-----	-----	-----
K13R	-----	-----	-----	-----	-----	-----
V20L	-----	-----	-----	-----	-----	-----
R38K	-----	-----	-----	-----	-----	-----
A40R	-----	-----	-----	-----	-----	-----
R44G	-----	-----	-----	-----	-----	-----
T73K	-----	---K-----	-----	-----	-----	-----
A75S	-----	-----S	-----	-----	-----	-----
E81Q	-----	-----	-Q-----	-----	-----	-----
L82cP	-----	-----	---P-----	-----	-----	-----
R83T	-----	-----	---T-----	-----	-----	-----
T87S	-----	-----	-----S-	-----	-----	-----
L108T	-----	-----	-----	-----	-----T-	-----
V109L	-----	-----	-----	-----	-----L	-----
V11L/R38K	-----	-----	-----	-----	-----	-----

図 68



69

EcoRI Kozak
GAA TTC ACC ACC ATG GGC TGG AGC TGT ATT ATT CTC TTC CTC GTC GCC ACT GCA ACC GGG
M G W S C I I L F L V A T A T G

GTC CAC TCC CAG GTC CAG CTG GTG CAG AGC GGA GCT GAG GTG AAG AAG CCC GGC GCC AGC
V H S Q = V Q L V Q S G A E V K K P G A S

GTT AAG GTT TCT TGC AAA GCC TCT GGC TAT ACA TTC ACA ATC TAT TGG ATC AAT TGG GTG
V K V S C K A S G Y T F T I Y W I N W V

CGG CAG GCT CCA GGA CAA GGC CTG GAA TGG ATC GGC AAT ATC TAT CCT TCC GAC TCC TAC
R Q A P G G Q G L E W I G N I Y P S D S Y

ACC AAC TAT AAC CAG AAA TTT AAG GAC AAA GCA ACA CTG ACC GTG GAC ACC TCT GCC AGC
T N Y N Q K F K D K A T L T V D T S A S

ACT GCT TAC ATG GAG CTG AGC AGC CTG AGA AGC GAA GAT ACT GCC GTG TAC TAC TGC ACC
T A Y M E L S S L R S E D T A V Y C T

AGG ACA AGC ATG GCC GAT TAC TGG GGA CAA GGC ACC CTG GTG ACC GTG AGC AGC ^{NheI} GCT AGC
R T S M A D Y W G Q G T L V T V S S

図70

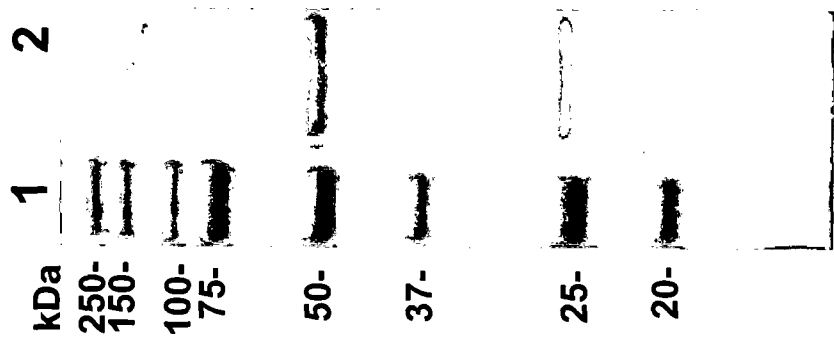


図71

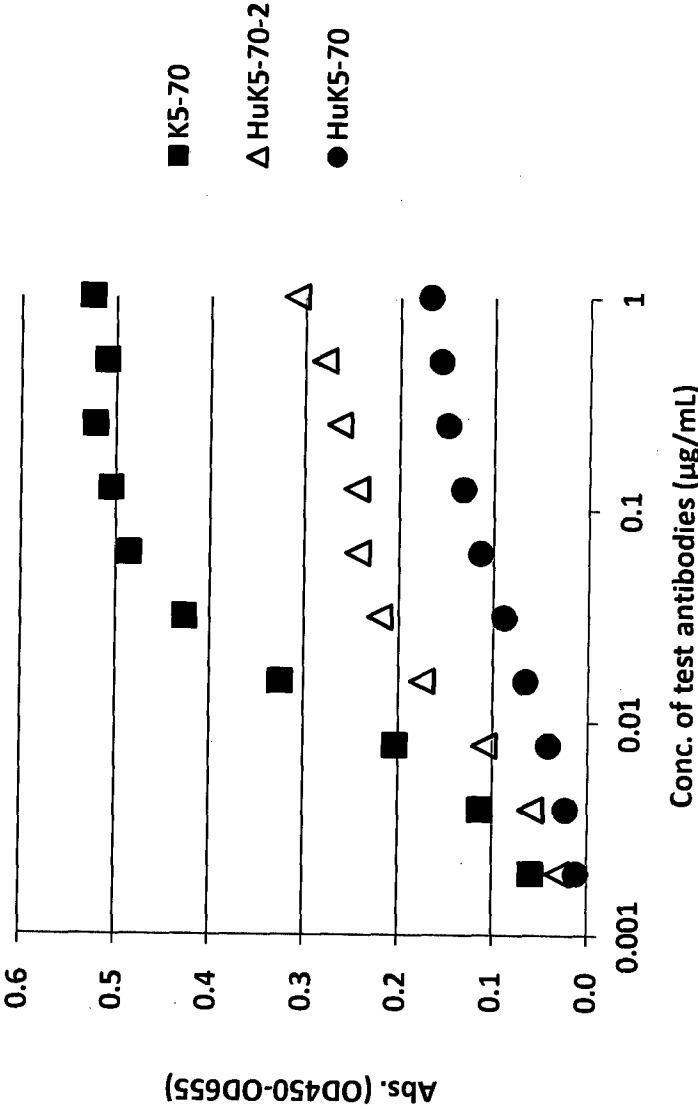


図72A

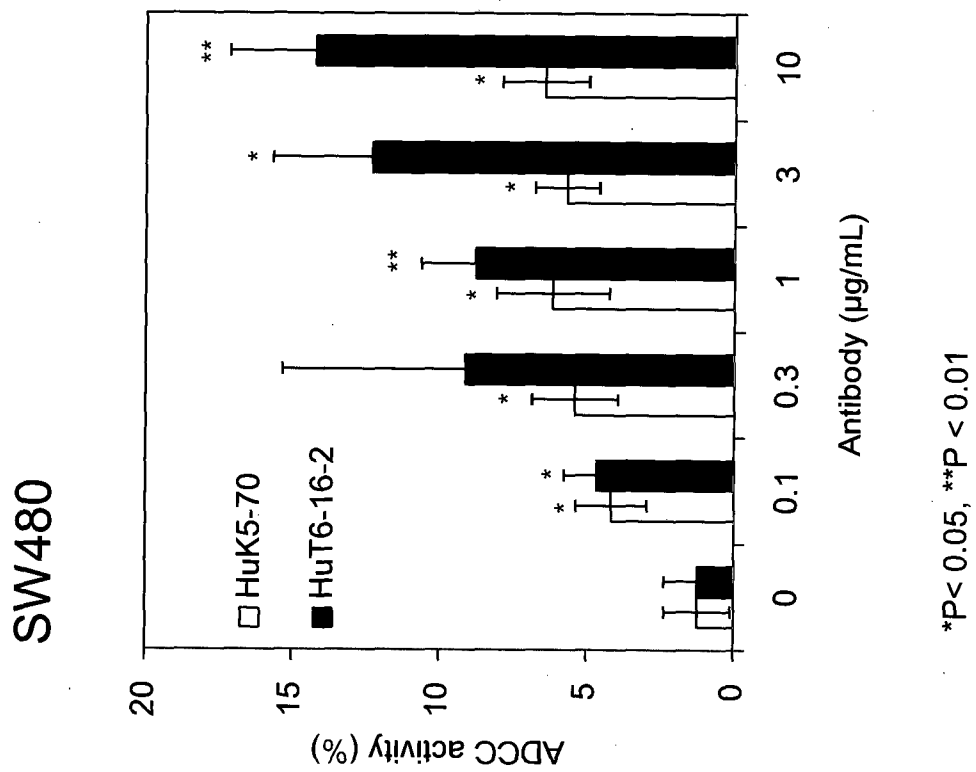


図72B

PK-59

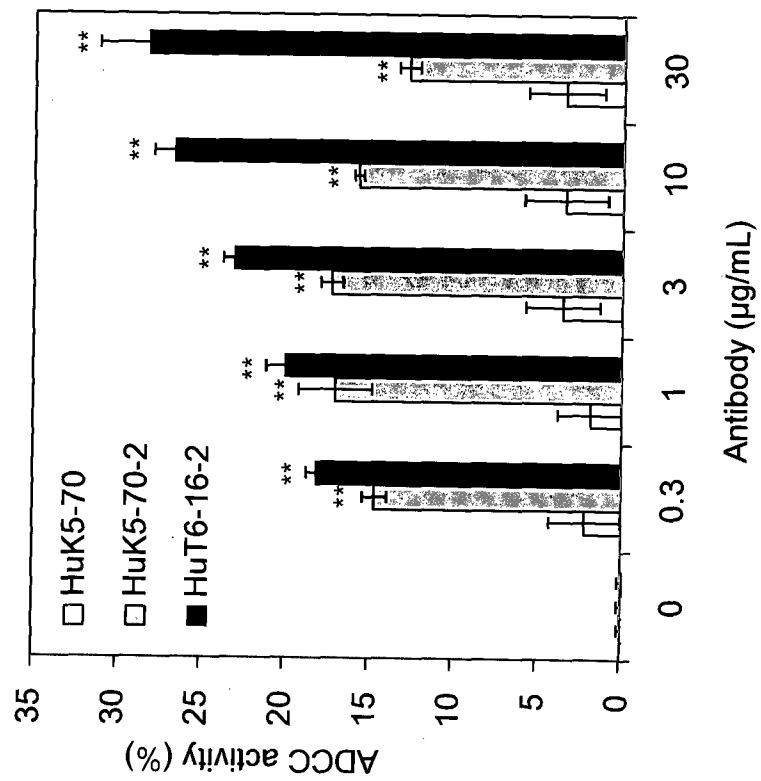
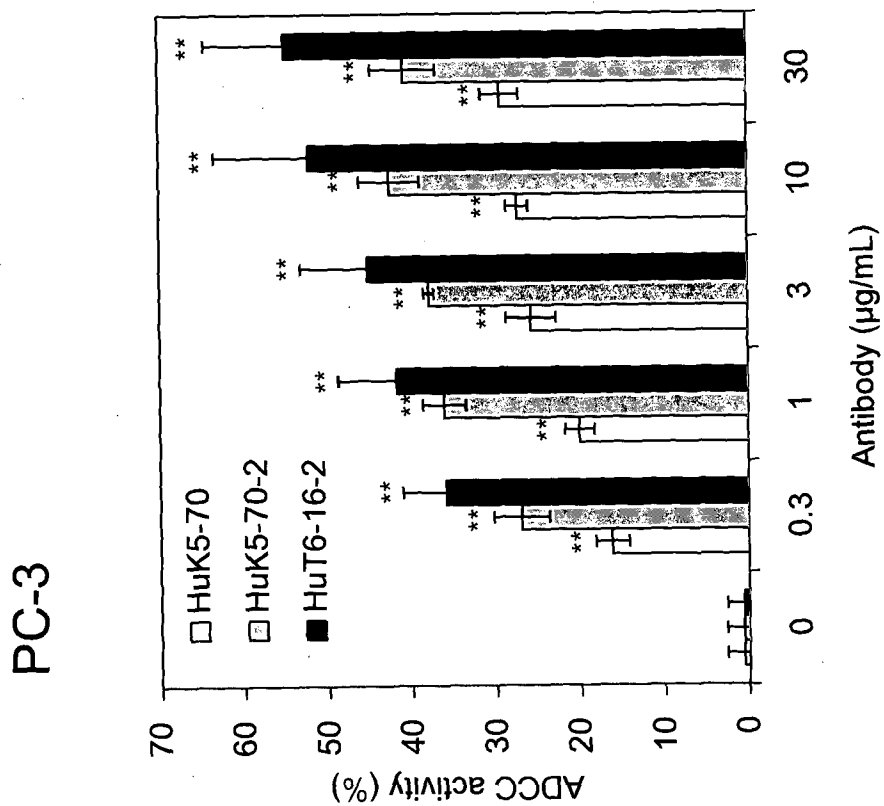


図72C



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/080800

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K16/30(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)i, G01N33/53(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)

C07K16/30, A61K39/395, A61P35/00, C12N15/09, C12P21/08, G01N33/53

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2013
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2013	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2013

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	US 2007/0202113 A1 (Arius Research, Inc.), 30 August 2007 (30.08.2007), & JP 2009-527230 A & EP 1996700 A & WO 2007/095748 A1	18-20, 22-40, 42-44/1-17, 21, 41
X/A	JP 2009-528995 A (Arius Research, Inc.), 13 August 2009 (13.08.2009), & US 2007/0202113 A1 & EP 1996700 A & WO 2007/095748 A1	18-20, 22-40, 42-44/1-17, 21, 41
X/A	JP 2009-527230 A (Arius Research, Inc.), 30 July 2009 (30.07.2009), & US 2007/0202043 A1 & EP 1996701 A & WO 2007/095749 A1	18-20, 22-40, 42-44/1-17, 21, 41

☒ 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
26 February, 2013 (26.02.13)

Date of mailing of the international search report
12 March, 2013 (12.03.13)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/080800

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	JP 2006-502698 A (Immunomedics, Inc.), 26 January 2006 (26.01.2006), & US 2004/0001825 A1 & EP 1483295 A & WO 2003/074566 A2	18-20, 22-40, 42-44/1-17, 21, 41
X/A	JP 2010-528056 A (F. Hoffmann-La Roche AG.), 19 August 2010 (19.08.2010), & US 2008/0131428 A1 & EP 2155791 A & WO 2008/144891 A1	18-20, 22-40, 42-44/1-17, 21, 41
X/A	WO 2010/089782 A1 (Alberti Saverio), 12 August 2010 (12.08.2010), & JP 2012-516887 A & EP 2393512 A	18-20, 22-40, 42-44/1-17, 21, 41
P, X	WO 2011/145744 A1 (Livtech, Inc.), 24 November 2011 (24.11.2011), (Family: none)	1-44

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/080800

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

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. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

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

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

Each of the antibodies described in claims 1 and 3 is specified by an amino acid sequence for an H-chain V-region thereof and an amino acid sequence for an L-chain V-region thereof. Although these amino acid sequences have a certain degree of homology with each other in their framework regions, the sequences for these regions are derived from known sequences, as described in the description of the present application (see the statements in examples 32-33). Therefore, both of the antibodies have no significant homology with each other when compared with those in the prior art techniques, and do not share any common structure, i.e., any common essential structural factor.

Both of the antibodies are common in a matter that the antibodies are anti-human TROP-2 antibodies each having an anti-tumor activity *in vivo* and having a human-originated framework region. However, a mouse anti-human TROP-2 antibody having an anti-tumor activity *in vivo* is disclosed in a document known before the priority date of the present application (US 2007/0202113 A1) and the humanization by a CDR graft method or the like on the basis of an antibody of a mouse or the like is a technique known to persons skilled in the art, as described in the description of the present application (see page 42). When these matters are taken in to consideration, a matter that a humanized antibody having a human-originated framework region can be produced on the basis of a mouse anti-human TROP-2 antibody having an anti-tumor activity *in vivo* can be conceived easily by persons skilled in the art. Therefore, the common matter cannot be regarded as a special technical feature in the meaning within PCT Rule 13.2, second sentence.

Consequently, it is not considered that the inventions of claims 1-44 are relevant to a group of inventions which are so linked as to form a single general inventive concept.

Accordingly, two inventions, which comprise (A) the inventions of claims 1-2, and the parts of the inventions of claims 5-44 which are concerned with claims 1-2 and (B) the inventions of claims 3-4, and the parts of the inventions of claims 5-44 which are concerned with claims 3-4, are set forth in claims 1-44.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C07K16/30 (2006.01)i, A61K39/395 (2006.01)i, A61P35/00 (2006.01)i, C12N15/09 (2006.01)i, C12P21/08 (2006.01)i, G01N33/53 (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 (I P C))

Int.Cl. C07K16/30, A61K39/395, A61P35/00, C12N15/09, C12P21/08, G01N33/53

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 3 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 3 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 3 年

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq, WPI, BIOSIS (STN), CAplus (STN), MEDLINE (STN)

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 請求項の番号
X/ A	US 2007/0202113 A1 (Arius Research, Inc.) 2007.08.30, & JP 2009-527230 A & EP 1996700 A & WO 2007/095748 A1	18-20, 22-40, 42-44/ 1-17, 21, 41
X/ A	JP 2009-528995 A (アリアス リサーチ、インコーポレイテッド) 2009.08.13, & US 2007/0202113 A1 & EP 1996700 A & WO 2007/095748 A1	18-20, 22-40, 42-44/ 1-17, 21, 41

☒ 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

2 6 . 0 2 . 2 0 1 3

国際調査報告の発送日

1 2 . 0 3 . 2 0 1 3

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)
郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5
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)

伊藤 佑一

4 N

3 8 4 6

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 8 8

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 請求項の番号
X/ A	JP 2009-527230 A (アリアス リサーチ、インコーポレイテッド) 2009. 07. 30, & US 2007/0202043 A1 & EP 1996701 A & WO 2007/095749 A1	18-20, 22-40, 42-44/ 1-17, 21, 41
X/ A	JP 2006-502698 A (イミューノメディクス、インコーポレイテッド) 2006. 01. 26, & US 2004/0001825 A1 & EP 1483295 A & WO 2003/074566 A2	18-20, 22-40, 42-44/ 1-17, 21, 41
X/ A	JP 2010-528056 A (エフ. ホフマン・ラ ロシュ アーゲー) 2010. 08. 19, & US 2008/0131428 A1 & EP 2155791 A & WO 2008/144891 A1	18-20, 22-40, 42-44/ 1-17, 21, 41
X/ A	WO 2010/089782 A1 (Alberti Saverio) 2010. 08. 12, & JP 2012-516887 A & EP 2393512 A	18-20, 22-40, 42-44/ 1-17, 21, 41
P, X	WO 2011/145744 A1 (株式会社リブテック) 2011. 11. 24, (ファミリーなし)	1-44

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

1. ☐ 請求項 _____ 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、
2. ☐ 請求項 _____ 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. ☐ 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってP C T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ろ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項について作成した。
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項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ため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項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ため、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項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 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。

請求項 1 及び 3 に記載の抗体は、それぞれの H 鎖 V 領域及び L 鎖 V 領域のアミノ酸配列により特定されたものであるが、これらアミノ酸配列はフレームワーク領域において一定の相同性を有しているものの、本願明細書に記載されるように（実施例 32-33 の記載箇所参照）、当該領域の配列は公知配列に由来するものであるから、両抗体は先行技術との比較において互いに顕著な相同性がなく、共通の構造、すなわち、重要な構造要素を共有していない。

また、両抗体は *in vivo* において抗腫瘍活性を有し、ヒト由来のフレームワーク領域を有する抗ヒト TROP-2 抗体であるという点で共通するものの、本願優先日前に公知の文献（US 2007/0202113 A1）において、*in vivo* において抗腫瘍活性を有するマウス抗ヒト TROP-2 抗体が記載されており、また、本願明細書にも記載されるように（第 42 頁参照）、マウス等の抗体を基に CDR グラフト法などを用いてヒト化することは当業者の周知技術であったことを参酌すると、*in vivo* において抗腫瘍活性を有するマウス抗ヒト TROP-2 抗体を基にヒト由来のフレームワーク領域を有するヒト化抗体を作製することは当業者が容易に想到し得ることであるから、PCT 規則 13.2 の第 2 文の意味において、この共通事項は特別な技術的特徴であると認められない。

よって、請求項 1-44 に係る発明は、単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であるとは言えない。

したがって、請求項 1-44 に係る発明は、

- A. 請求項 1-2 に係る発明、及び、請求項 5-44 に係る発明のうち請求項 1-2 に係る部分
- B. 請求項 3-4 に係る発明、及び、請求項 5-44 に係る発明のうち請求項 3-4 に係る部分

の 2 発明が記載されている。