(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
2025年4月10日(10.04.2025)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2025/075127 A1

(51) 国際特許分類:
G01N 33/574 (2006.01) *C12N 15/13* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *G01N 33/50* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2024/035559

(22) 国際出願日： 2024年10月4日(04.10.2024)

(25) 国際出願の言語： 日本語

(26) 国際公開の言語： 日本語

(30) 優先権データ：
特願 2023-172752 2023年10月4日(04.10.2023) JP

(71) 出願人: 公立大学法人福島県立医科大学 (FUKUSHIMA MEDICAL UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒9601295 福島県福島市光が丘一番地 (JP).

(72) 発明者: 千葉 英樹 (CHIBA Hideki); 〒9601295 福島県福島市光が丘一番地 公立大学法人福島県立医科大学内 (JP). 杉本 幸太郎 (SUGIMOTO Kotaro); 〒9601295 福島県福島市光が丘一番地 公立大学法人福島県立医科大学内 (JP). 小林 信 (KOBAYASHI Makoto); 〒9601295 福島県福島市光が丘一番地 公立大学法人福島県立医科大学内 (JP).

(74) 代理人: 弁理士法人平木国際特許事務所 (HIRAKI & ASSOCIATES); 〒1056232 東京都港区愛宕二丁目５－１ 愛宕グリーンヒルズＭＯＲＩタワー３２階 (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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(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, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, 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,

(54) **Title:** BIOMARKER AND ANTIBODY THERAPY FOR CANCER

(54) 発明の名称： がんのバイオマーカー及び抗体治療

(57) **Abstract:** The present invention addresses the problem of providing: a novel biomarker useful for the prediction of prognosis of a cancer patient or for the detection of cancer; a means capable of specifically recognizing the biomarker; and a novel cancer therapeutic agent. Provided is a biomarker for cancer, the biomarker comprising claudin 16 (CLDN16) protein or a peptide fragment thereof, or a transcript of CLDN16 gene or a nucleic acid fragment thereof. Also provided is an anti-CLDN16 antibody or a fragment thereof, which comprises: a heavy-chain variable region that includes CDR1 comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1, CDR2 comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 2, and CDR3 comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 3; and a light-chain variable region that includes CDR1 comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 4, CDR2 comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 5, and CDR3 comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 6.

(57) 要約：がん患者の予後予測やがんの検出に有用な新たなバイオマーカー及びそれを特異的に認識し得る手段、並びに新たながん治療剤を提供することを課題とする。 クローディン16（CLDN16）タンパク質若しくはそのペプチド断片、又はCLDN16遺伝子の転写産物若しくはその核酸断片からなる、がんのバイオマーカーを提供する。また、配列番号1で示すアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号2で示すアミノ酸配列からなるCDR2、及び配列番号3で示すアミノ酸配列からなるCDR3を含む重鎖可変領域と、配列番号4で示すアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号5で示すアミノ酸配列からなるCDR2、及び配列番号6で示すアミノ酸配列からなるCDR3を含む軽鎖可変領域を含む、抗CLDN16抗体又はその断片を提供する。

WO 2025/075127 A1

［続葉有］

DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

規則4.17に規定する申立て：

一　不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て（規則4.17(v)）

添付公開書類：

一　国際調査報告（条約第21条(3)）

一　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)）

明　細　書

発明の名称 ： がんのバイオマーカー及び抗体治療

技術分野

[0001]　本発明は、がんのバイオマーカー、抗クローディン16（CLDN16）抗体又はその断片、並びにがん治療剤等に関する。

背景技術

[0002]　わが国において、がんは死亡原因全体の中で最も多く、約3割を占めている。特に卵巣がんは、その年間罹患人数が日本国内及び世界においてそれぞれ1.1万人及び24万人に及び、婦人科がんの中で最も予後の悪いがんの１つである。

[0003]　卵巣がんは早期発見が困難であり、早期診断法が確立されていない。そのため、卵巣がんの70％強が進行がんとして発見され、5年生存率は約60％と低いのが現状である。卵巣がんの早期診断が困難である理由として、卵巣がんに特異的かつ感度の高いバイオマーカーや、それを特異的かつ高感度で認識し得る手段がこれまで見出されていないことが挙げられる。

[0004]　非特許文献１～３には、代表的な卵巣がんマーカーとして知られているCancer antigen 125（CA125）が開示されている。CA125は、卵巣がん以外に膵がんや肺がん等でも陽性となることが知られている。また、CA125は子宮内膜症や子宮筋腫等の良性疾患においても上昇し得る。それ故、CA125の卵巣がんに対する特異性は十分ではない。非特許文献４～５では、過去の大規模臨床治験においてCA125と経腟エコー検査による卵巣がん診断が生存期間延長に貢献しないことが開示されている。非特許文献６には、別の卵巣がんマーカーであるHuman epididymis protein 4（HE4）が開示されている。HE4は、CA125と比べて特異度は高いものの、検出感度が約50％に留まる。したがって、特異的かつ高感度な卵巣がんマーカーや、それを特異的かつ高感度で認識し得る手段の開発が必要とされている。

[0005]　卵巣がんはまた、婦人科がんの中で最も予後不良であることも知られてい

る。現在の卵巣がんに対する標準治療では外科手術と化学療法が併用されるが、治療を受けた患者の半数以上が再発する。再発例では5年生存率が約20%と非常に低いため、卵巣がん患者の予後を向上させることが大きな課題となっている。しかしながら、早期診断の場合と同様に、予後判定に利用できる良好なバイオマーカーは見出されていない。特に、卵巣がんでは保険収載された予後予測用バイオマーカーは存在しない。卵巣がん患者の予後を向上させるために、予後判定に資するバイオマーカー及びそれを特異的かつ高感度で認識し得る手段の開発が必要とされている。また、卵巣がん治療薬として最近開発された抗VEGFR（vascular endothelial growth factor受容体）抗体やPARP（poly ADP-ribose polymerase）阻害剤の適応や効果は限定的であり、卵巣がんに対する新たな治療剤の開発も嘱望されている。

[0006] したがって、卵巣がん等のがん患者の予後を向上させるために、がんの予後判定や早期診断に資する新たなバイオマーカー及びそれを特異的かつ高感度で認識し得る手段、並びに新たな治療剤が必要とされている。

先行技術文献

非特許文献

[0007] 非特許文献1：Bast R.C.Jr., et al., N Engl J Med, 1983, 309(15):883-887.

非特許文献2：Cwik G., et al., Arch Surg, 2006, 141(10):968-973.

非特許文献3：Fahrmann J.F., et al., JAMA Oncol, 2022, in press. (DOI: 10.1200/JCO.21.01460)

非特許文献4：Jacobs I.J., et al., Lancet, 2016, 387(10022):945-956.

非特許文献5：Menon U., et al., Lancet, 2021, 397(10290):2182-2193.

非特許文献6：Hellstroem I., et al., Cancer Res, 2003, 63(13):3695-3700.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 本発明の目的は、がん患者の予後予測やがんの検出に有用な新たなバイオマーカー及びそれを特異的に認識し得る手段、並びに新たながん治療剤を提供することである。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明者らは、上記課題を解決するために、がんの新たなバイオマーカーを探索した結果、クローディン16（CLDN16）タンパク質が卵巣がん組織で高発現していることを見出した。CLDN16の発現は、卵巣がん、子宮体がん、及び甲状腺がん等のがん組織に発現するが、卵巣組織を含む正常組織では殆ど検出されず、がんについて極めて特異性の高いバイオマーカーである。本発明者はさらに、CLDN16タンパク質を特異的に検出することができる抗体（抗CLDN16抗体）の開発を試みた。本発明者は、ELISAを用いた一次スクリーニングにより得られた66種類の抗体クローンから、ホルマリン固定及びパラフィン包埋標本を用いた免疫組織化学染色でCLDN16タンパク質を検出し得る1種類の抗体クローンを見出した。得られた抗体クローンは、CLDN16以外のクローディンファミリータンパク質と交差反応せず、CLDN16タンパク質を特異的かつ高感度で検出できることが明らかとなり、バイオマーカー検出において極めて有用な手段となり得ることを見出した。また本抗体を利用したがん治療剤が有効な治療手段となり得ることを明らかにした。本発明は、上記知見に基づくものであって以下を提供する。

[0010] （１）クローディン16（CLDN16）タンパク質若しくはそのペプチド断片、又はCLDN16遺伝子の転写産物若しくはその核酸断片からなる、がんのバイオマーカー。

（２）前記がんが、卵巣がん、子宮体がん、甲状腺がん、肺がん、食道がん、胃がん、大腸がん、膀胱がん、子宮頚がん、腎がん、肝がん、膵がん、又は頭頸部がんである、（１）に記載のバイオマーカー。

（３）前記がんのがん患者の予後を予測するための、又は前記がんを検出するための、（１）又は（２）に記載のバイオマーカー。

（４）抗CLDN16抗体又はその断片であって、

配列番号1で示すアミノ酸配列からなるCDR1、

配列番号2で示すアミノ酸配列からなるCDR2、及び

配列番号3で示すアミノ酸配列からなるCDR3

を含む重鎖可変領域と

配列番号4で示すアミノ酸配列からなるCDR1、

配列番号5で示すアミノ酸配列からなるCDR2、及び

配列番号6で示すアミノ酸配列からなるCDR3

を含む軽鎖可変領域を含む、前記抗CLDN16抗体又はその断片。

（５）前記抗CLDN16抗体又はその断片が、

配列番号7で示すアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び

配列番号8で示すアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域

を含む、（４）に記載の抗CLDN16抗体又はその断片。

（６）（４）又は（５）に記載の抗CLDN16抗体又はその断片を含む、がんの予後予測用、又はがんの検出用キット。

（７）前記がんが、卵巣がん、子宮体がん、甲状腺がん、肺がん、食道がん、胃がん、大腸がん、膀胱がん、子宮頚がん、腎がん、肝がん、膵がん、又は頭頸部がんである、（６）に記載のキット。

（８）がん患者の予後を予測するための方法であって、

前記がん患者に由来する試料において、（１）に記載のバイオマーカーを検出する検出工程

を含み、前記試料が前記バイオマーカーについて陽性である場合、前記がん患者の予後が悪いことを示す、前記方法。

（９）前記がんが、卵巣がん、子宮体がん、甲状腺がん、肺がん、食道がん、胃がん、大腸がん、膀胱がん、子宮頚がん、腎がん、肝がん、膵がん、又は頭頸部がんである、（８）に記載の方法。

（１０）前記バイオマーカーが（４）に記載の抗CLDN16抗体又はその断片を用いて検出される、（８）又は（９）に記載の方法。

（１１）抗CLDN16抗体又はその断片を有効成分として含む、がん治療剤。

（１２）前記がんが、卵巣がん、子宮体がん、甲状腺がん、肺がん、食道がん、胃がん、大腸がん、膀胱がん、子宮頚がん、腎がん、肝がん、膵がん、又は頭頸部がんである、（１１）に記載のがん治療剤。

（１３）前記抗CLDN16抗体又はその断片が、

配列番号1で示すアミノ酸配列からなるCDR1、

配列番号2で示すアミノ酸配列からなるCDR2、及び

配列番号3で示すアミノ酸配列からなるCDR3

を含む重鎖可変領域と

配列番号4で示すアミノ酸配列からなるCDR1、

配列番号5で示すアミノ酸配列からなるCDR2、及び

配列番号6で示すアミノ酸配列からなるCDR3

を含む軽鎖可変領域を含む、（１１）又は（１２）に記載のがん治療剤。

（１４）前記抗CLDN16抗体又はその断片が、

配列番号7で示すアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び

配列番号8で示すアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域

を含む、（１３）に記載のがん治療剤。

本明細書は本願の優先権の基礎となる日本国特許出願番号2023-172752号の開示内容を包含する。

発明の効果

[0011] 本発明によれば、がん患者の予後予測やがんの検出に有用な新たなバイオマーカー及びそれを特異的に認識し得る手段、並びに新たながん治療剤が提供される。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]様々なヒトがん組織におけるCLDN16遺伝子の発現量を示す図である。図1Aは、卵巣がん（OV）、子宮体がん（UCEC）、及び甲状腺がん（THCA）を含む様々ながん組織におけるCLDN16遺伝子の発現量を示す。図1Bは、卵巣がん（OV）及び甲状腺がん（THCA）、並びにそれ以外のがん組織（Others）におけるCLDN16遺伝子の発現量を示す。

[図2]正常組織及びがん組織におけるCLDN16遺伝子の発現量を示す図である。図2Aは、卵巣（Ovary）、子宮（Uterus）、及び甲状腺（Thyroid）を含む様々な正常組織におけるCLDN16遺伝子の発現量を示す。図2Bは、様々な組織を含む、がん組織（Cancer(TCGA)）及び正常組織（Normal(GTEx)）におけるCLDN16遺伝子の発現量を示す。

[図3]抗CLDN16抗体の作製に用いた抗原ペプチドの位置を示す図である。図3Aは、抗原ペプチドが第1細胞外領域（EC1）内に位置することを示す。図3Bは、ヒトクローディンファミリーのEC1のアミノ酸配列のアラインメントを示す。CLDN16タンパク質と同一のアミノ酸残基を太字で示す。

[図4]抗CLDN16抗体の抗原特異性を示す図である。CLDN16タンパク質発現用のベクターが導入されていないHEK293T細胞（「293T cell」）、並びに全長CLDN16タンパク質（「+CLDN16」）、N末端側にHAタグが融合したCLDN16タンパク質（「+HA-CLDN16」）、及びC末端側にHAタグが融合したCLDN16タンパク質（「+CLDN16-HA」）をそれぞれ発現するHEK293T細胞に対して、HAタグに結合する抗体（図中、「HA-tag Ab」として示す）及び本発明の抗CLDN16抗体（図中、「hCLDN16-EC1 Ab」として示す）を用いて免疫組織化学染色を行った結果を示す。

[図5]抗CLDN16抗体の交差反応性を検証した結果を示す図である。CLDN3、CLDN4、CLDN5、CLDN6、CLDN7、CLDN8、CLDN9、CLDN12、CLDN19、及びCLDN16をそれぞれ発現するHEK293T細胞に対して抗CLDN16抗体を用いて免疫組織化学染色を行った結果を示す。

[図6]抗CLDN16抗体の軽鎖可変領域及び重鎖可変領域のアミノ酸配列を示す図である。図6Aは、軽鎖可変領域のアミノ酸配列（配列番号8）を示す。図6Bは、重鎖可変領域のアミノ酸配列（配列番号7）を示す。

[図7]EGFP又はCLDN16を過剰発現させた卵巣癌細胞（AMOC2細胞）の増殖能を示す図である。図7Aは、CLDN16を過剰発現させた卵巣癌細胞（AMOC2細胞）において、CLDN16タンパク質が過剰発現していることを抗CLDN16抗体（生理学研究所の古瀬幹夫博士より供与）を用いたウエスタンブロット法により検証

した結果を示す。図7Bは、当該細胞の増殖能を評価した結果を示す。

[図8]EGFP又はCLDN16を過剰発現させた卵巣癌細胞（AMOC2細胞）の遊走能を示す図である。

[図9]EGFP又はCLDN16を過剰発現させた卵巣癌細胞（AMOC2細胞）の浸潤能を示す図である。

[図10]抗CLDN16抗体が生細胞表面のCLDN16タンパク質を認識できることをフローサイトメトリーで検証した結果を示す図である。図中、「293T」はHEK293T細胞、「293T:EGFP」はEGFPを発現するHEK293T細胞、「293T:CLDN16」はCLDN16を発現するHEK293T細胞を示す。「hCLDN16-EC1 Ab」は、本発明の抗CLDN16抗体を示す。

[図11]抗CLDN16抗体が、CLDN16発現卵巣癌細胞の細胞内に取り込まれることを検証した結果を示す図である。図中、矢頭は細胞表面のCLDN16シグナルを示し、矢印は細胞内のCLDN16シグナルを示す。「Rat anti-CLDN16-EC1 mAb」は、本発明の抗CLDN16抗体を示す。

[図12]抗CLDN16抗体に基づく細胞傷害効果を示す図である。図中、「AMOC:CLDN16」はCLDN16発現卵巣癌細胞、「ADC-rat IgG」は細胞傷害毒素MMAF（Monomethyl Auristatin F)を結合した抗ラットIgG抗体、「Rat anti-CLDN16-EC1 mAb」は本発明の抗CLDN16抗体を示す。図12Aは代表的な位相差像を示す。図12Bは細胞生存アッセイにおいて490 nmの吸光度を測定した結果を示す。

[図13]様々な正常組織におけるCLDN16の免疫組織化学染色の代表的な結果を示す図である。

[図14]卵巣がん組織（CLDN16陰性例、CLDN16弱陽性例、CLDN16中程度陽性例、及びCLDN16強陽性例）における免疫組織化学染色の代表的な結果を示す図である。図14Aは、陰性例を示す。図14Bは、弱陽性例を示す。図14Cは、中程度陽性例を示す。図14Dは、強陽性例を示す。

[図15]249例の卵巣がん症例について、染色強度（SI）、陽性比率（PP）、及び免疫反応スコア（IRS）を評価した結果を示す図である。図15Aは、染色強度（SI）を示す。図15Bは、陽性比率（PP）を示す。図15Cは、免疫反応スコ

ア（IRS）を示す。

[図16]卵巣がん患者における臨床病理学的因子とCLDN16発現（低CLDN16発現／高CLDN16発現）との関連性を示す図である。

[図17]図16の続きである。

[図18]低CLDN16群の卵巣がん患者（165症例）及び高CLDN16群（84症例）の卵巣がん患者における無再発生存率のカプランマイヤー曲線を示すグラフである。図18Aは、全生存率（Overall Survival、OS）を示す。図18Bは、無病生存率(Disease-free survival、DFS)を示す。図18Cは、無再発生存率(Relapse-free survival、RFS)を示す。

[図19]臨床病理学的解析による卵巣がん患者の予後（DFS）に関する単変量解析及び多変量解析の結果を示す図である。

[図20]抗OCLN抗体及び本発明の抗CLDN16抗体を用いてマウス腎臓凍結組織において免疫組織化学染色を行った結果を示す。

[図21]ヒト卵巣癌細胞株においてCLDN16タンパク質の発現を評価した結果を示す。図21Aは、抗CLDN16抗体（生理学研究所の古瀬幹夫博士より供与）を用いて、代表的なヒト卵巣癌細胞株であるAMOC2細胞、SKOV3細胞、OVCAR3細胞、及びOVSAHO細胞において、CLDN16タンパク質の発現を評価した結果を示す。図中、「N.C.」は陰性対照であるHEK293T細胞を示し、「P.C.」はCLDN16を発現するHEK293T細胞（陽性対照）を示す。図21Bは、CLDN16遺伝子が破壊されたSKOV3細胞及びOVSAHO細胞を対象として抗CLDN16抗体を用いてウエスタンブロット法を実施した結果を示す。

[図22]CLDN16抗体薬物複合体の細胞傷害作用を示す図である。図22Aは、CLDN16抗体薬物複合体を投与した細胞の生存率をMTSアッセイで評価する実験方法を示す。図22Bは、AMOC2:CLDN16細胞及びAMOC2:EGFP細胞の生存率を示す。図22Cは、OVSAHO:CLDN16^{KO}細胞及び対照OVSAHO細胞の生存率を示す。図22Dは、SKOV3:CLDN16^{KO}細胞及び対照SKOV3細胞の生存率を示す。図中、「Vehicle」は抗体や抗体薬物複合体を含まない陰性対照を示し、「IgG」はラットIgGを細胞に投与した結果を示す。「CLDN16-Ab-MMAE」は抗腫瘍剤MMAEを結合させた

抗CLDN16抗体を細胞に投与した結果を示し、「CLDN16-Ab」は抗腫瘍剤MMAEを結合させていない抗CLDN16抗体を細胞に投与した結果を示す。

[図23]CLDN16抗体薬物複合体が腎毒性を惹起しないことを示す図である。マウス尾静脈にMMAE、正常ラットIgG、CLDN16抗体（図中の「CLDN16-Ab」）、およびCLDN16抗体薬物複合体（図中の「CLDN16-Ab-MMAE」）を4回注射し、それらの腎組織をHE染色した結果を示す。

発明を実施するための形態

[0013] （がんのバイオマーカー）

一態様において、本発明は、がんのバイオマーカーを提供する。本発明のバイオマーカーは、クローディン16（CLDN16）タンパク質若しくはそのペプチド断片、又はCLDN16遺伝子の転写産物若しくはその核酸断片からなる。がんにおいて発現し得るクローディン16（CLDN16）タンパク質若しくはそのペプチド断片、又はCLDN16遺伝子の転写産物若しくはその核酸断片をバイオマーカーとして使用することで、がんの悪性度の判定や、がん患者の予後の予測を行うこと、さらにがんの早期診断等の検出が可能となる。

[0014] 本明細書において、「がん」の種類は限定しないが、例えば、腺がん、扁平上皮がん、小細胞がん及び大細胞がん等が挙げられる。具体的ながんの種類としては、例えば、悪性黒色腫、口腔がん、喉頭がん、咽頭がん、甲状腺がん、肺がん、乳がん、食道がん、胃がん、大腸がん（結腸がん及び直腸がんを含む）、小腸がん、膀胱がん、前立腺がん、精巣がん、子宮体がん、子宮頚がん、卵巣がん、腎がん、肝がん、膵がん、胆道がん（胆嚢がん及び胆管がんを含む）、脳腫瘍、頭頸部がん、中皮腫、骨肉腫、神経膠腫、神経芽腫を始めとする小児腫瘍、白血病、リンパ腫等が挙げられる。がんは、好ましくは卵巣がん、子宮体がん、甲状腺がん、肺がん、食道がん、胃がん、大腸がん（結腸がん及び直腸がんを含む）、膀胱がん、子宮頚がん、腎がん、肝がん、膵がん、又は頭頸部がんであり、例えば卵巣がん、子宮体がん、又は甲状腺がんである。なお、本明細書において大腸がんは結腸がん及び直腸がんを含むものとする。

[0015] 本明細書において、「卵巣がん」は、卵巣に発生するがんを指す。卵巣がんは様々な起源細胞に基づいて分類することができる。例えば表層上皮、卵巣間質、性索間質、又は胚細胞を起源とする卵巣がんが知られている。本明細書では、卵巣がんの起源細胞は特に限定しない。また、卵巣がんの病期（ステージ）は、I期（腫瘍が卵巣に限局している）、II期（腫瘍が片側又は両側の卵巣に存在し、骨盤内への広がりを示す）、III期（腫瘍が片側又は両側の卵巣に存在し、腹膜播種やリンパ節転移を示す）、及びIV期（腹膜播種を除き、遠隔転移を示す）に分類することができる。

[0016] 「子宮体がん」は、子宮がんのうち子宮体に発生するがんを指し、子宮内膜から発生することから子宮内膜がんとも呼ばれる。子宮体がんは、がん組織の状態により、類内膜がん、漿液性がん、及び明細胞癌等の組織型に分類される。また、子宮体がんの病期（ステージ）は、I期（がんが子宮体部に限局している）、II期（がんが頸部間質に浸潤するが、子宮を越えていない）、III期（がんが子宮外に広がるが、小骨盤腔を越えていない、又は所属リンパ節へ広がっている）、及びIV期（がんが小骨盤腔を越えているか、明らかに膀胱／腸粘膜を侵している、及び／又は遠隔転移がある）に分類することができる。

[0017] 本明細書において、「甲状腺がん」は、甲状腺に発生するがんを指す。甲状腺がんは、組織型により、乳頭がん、濾胞がん、低分化がん、髄様がん、未分化がん、悪性リンパ腫等に分類することができる。甲状腺がんの病期（ステージ）は、I期（がんが子宮体部に限局している）、II期（甲状腺に限局し最大径が2cmを超えるが4cm以下の腫瘍）、III期、及びIV期に分類することができる。

[0018] 本明細書において、「予後」は、任意のがん、例えば卵巣がん、子宮体がん、甲状腺がん、肺がん、食道がん、胃がん、大腸がん（結腸がん及び直腸がんを含む）、膀胱がん、子宮頚がん、腎がん、肝がん、膵がん、又は頭頸部がん（以下、本明細書では「卵巣がん、子宮体がん、又は甲状腺がん等」と表記する場合がある）を対象とするがん治療（例えば、手術、化学療法（

薬物療法）、又は放射線治療等）後の、腫瘍量の低減、腫瘍増殖の抑制、又は疾患の経過（例えば、再発の有無、転移の有無、治療後の生存期間の長さ、生死等）をいう。「予後の予測」は、再発リスク(例えば無再発生存率)、転移リスク、生存期間、手術から一定期間後(例えば、1年、2年、3年、4年、5年、10年、15年若しくは20年後又はそれ以降の時点)の生存率、無再発生存率(Relapse-free survival、RFS)、又は疾患特異的生存率(Disease-free survival、DFS)の予測であってもよい。一実施形態において、予後の予測は、再発リスク(例えば無再発生存率)の予測又は転移リスクの予測を含む。なお、本明細書において無再発生存率は、初発がんと関連付けられるがん等の再発がん発症のない患者の割合であり、疾患特異的生存率は、初発がんと関連する死亡のない患者の割合を意味する。予後の予測は、予後の判定、評価、診断、又はこれらの補助ということもできる。

[0019] 本明細書において「判定」とは、任意のがん、例えば卵巣がん、子宮体がん、又は甲状腺がん等のがんの悪性度を判定することをいう。特に、任意のがん、例えば卵巣がん、子宮体がん、又は甲状腺がん等のがんに罹患している被験体（がん患者）において、がんの悪性度を判定することをいう。

[0020] 本明細書において、「がん患者」は、例えば哺乳動物、好ましくは霊長類、より好ましくはヒトである。「卵巣がん患者」、「子宮体がん患者」、及び「甲状腺がん患者」等の「がん患者」もまた、例えば哺乳動物、好ましくは霊長類、より好ましくはヒトである。

[0021] 本明細書において「悪性度」とは、任意のがん、例えば卵巣がん、子宮体がん、又は甲状腺がん等のがんの周囲組織への浸潤、他臓器への転移、及び／又は再発能の程度等をいう。具体的には、がん細胞の増殖能及び／又は遊走能を意味する。卵巣がん、子宮体がん、又は甲状腺がん等のがんの悪性度を判定することによって、予後を予測し、浸潤、転移、及び再発能の高い予後不良例を選別することが可能となる。本明細書において、悪性度の判定には予後の予測も含まれる。

[0022] 本明細書において「がんのバイオマーカー」とは、がん患者の予後を予測

する、若しくはがん患者の予後を示すことができるバイオマーカー（がんの予後予測用バイオマーカー）、又はがんを検出することができるバイオマーカー（がんの検出用バイオマーカー）をいう。

[0023] 本発明では、原則として、クローディン16（CLDN16）タンパク質若しくはそのペプチド断片、又はCLDN16遺伝子の転写産物若しくはその核酸断片（本明細書において「CLDN16タンパク質等」という）がバイオマーカーとなり得る。例えば、前記患者がヒトであれば、ヒトCLDN16遺伝子に由来するヒトCLDN16タンパク質及びヒトCLDN16遺伝子の転写産物(mRNA)が本発明のバイオマーカーとなり得る。

[0024] 「クローディン」は、細胞間接着分子として機能する20種類以上からなるファミリー分子である。クローディンファミリーは、互いに相同性の高いアミノ酸配列を有するため、特定のクローディン分子を特異的に認識するモノクローナル抗体を開発することは一般に難しい。

[0025] 「クローディン16（CLDN16）」は、N末端が細胞内に、またC末端が細胞内に存在する膜貫通タンパク質である。CLDN16はタイトジャンクション（密着結合）を構成し、腎臓の正常組織では細胞間のポア又はイオン濃度センサーとしてマグネシウムイオンの再吸収を制御することが知られている。本明細書において、CLDN16の由来生物種は限定しないが、例えば、配列番号9で示されるアミノ酸配列からなるヒトCLDN16タンパク質が挙げられる。

[0026] 本明細書において「アミノ酸同一性」とは、比較する2つのアミノ酸配列の全アミノ酸残基数における一致したアミノ酸残基数の割合（%）をいう。具体的には、2つのアミノ酸配列を整列（アラインメント）し、必要に応じ、一方又は双方に適宜ギャップを挿入する。このとき、1ギャップは、1アミノ酸残基として全アミノ酸残基数にカウントする。アミノ酸配列の整列化は、例えば、Blast、FASTA、ClustalW等の既知プログラムを用いて行うことができる（Karlin, S. et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 5873-5877；Altschul, S. F. et al., 1990, J. Mol. Biol., 215: 403-410；Pearson, W. R. et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 2444-2448）。比

較する２つのアミノ酸配列間で全アミノ酸残基数が異なる場合には、長い方を全アミノ酸残基数とする。アミノ酸同一性は、比較する２つのアミノ酸配列においてアミノ酸一致度が最も高くなるようにしたときの同一アミノ酸残基数を全アミノ酸残基数で除して算出される。

[0027] 本明細書において「複数個」とは、例えば、2～50個、2～40個、2～30個、2～20個、2～18個、2～16個、2～14個、2～12個、2～10個、2～8個、2～7個、2～6個、2～5個、2～4個又は2～3個をいう。

[0028] 「CLDN16遺伝子」は、前記CLDN16タンパク質をコードする遺伝子である。CLDN16遺伝子の具体例として、配列番号9で示されるアミノ酸配列からなるヒトCLDN16タンパク質をコードするヒトCLDN16遺伝子が挙げられる。より具体的には、CLDN16遺伝子は、配列番号10で示される塩基配列からなる遺伝子である。

[0029] また、CLDN16遺伝子には、配列番号10で示されるCLDN16遺伝子がコードするCLDN16タンパク質と機能的に同等の活性を有するCLDN16バリアントや他生物種のCLDN16オルソログをコードするCLDN16遺伝子も包含される。具体的には、配列番号10で示される塩基配列において1若しくは複数個の塩基が欠失、置換又は付加された塩基配列、或いは配列番号10で示される塩基配列に対して90％以上、95％以上、97％以上、98％以上又は99％以上の塩基同一性を有するCLDN16遺伝子が包含される。さらに、配列番号10で示される塩基配列に対して相補的な塩基配列の一部からなる核酸断片と高ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列からなり、かつCLDN16タンパク質と機能的に同等の活性を有するタンパク質をコードする遺伝子が包含される。

[0030] 本明細書において「塩基同一性」とは、2つの塩基配列を整列(アラインメント)し、必要に応じてギャップを導入して、両者の塩基一致度が最も高くなるようにしたときに、配列番号10で示される塩基配列からなるCLDN16遺伝子の全塩基に対する2つの塩基配列間での同一塩基の割合(％)をいう。

[0031] CLDN16遺伝子の塩基配列情報は、公共のデータベース(GenBank、EMBL、DDBJ)より検索可能である。例えば、配列番号10で示されるCLDN16遺伝子の既知

塩基配列情報に基づいて、塩基同一性の高い遺伝子をデータベースから検索し、入手することができる。

[0032] 「CLDN16遺伝子の転写産物」とは、CLDN16 mRNAを意味する。mRNAは、mRNA前駆体(pre-mRNA)及び成熟mRNA(mature mRNA)を問わない。通常、mRNA前駆体は、核内において直ちにスプライシングされて、成熟mRNA成熟体となることから、実質的に本発明のバイオマーカーとなるCLDN16遺伝子の転写産物は、CLDN16成熟mRNAである。

[0033] 本明細書において「ペプチド断片」とは、CLDN16タンパク質を構成するアミノ酸配列の一部からなるペプチド断片であって、その断片を構成するアミノ酸配列からCLDN16タンパク質の断片であることを同定することができるものをいう。通常は、CLDN16タンパク質の全長アミノ酸配列のうちの10個以上200個以下、20個以上150個以下、30個以上100個以下、又は40個以上80個以下の連続するアミノ酸残基からなるペプチドであればよい。例えば、後述する本発明の抗CLDN16抗体によって認識される抗原エピトープを含むペプチド断片、例えば配列番号11又は20で示されるアミノ酸配列を含む、又はそれに含まれるペプチド断片が好ましい。

[0034] 本明細書において「核酸断片」とは、CLDN16 mRNAを構成する塩基配列の一部からなる核酸断片であって、その断片を構成する塩基配列からCLDN16 mRNAの断片であることを同定することができるものをいう。通常は、CLDN16 mRNAの全長塩基配列のうちの15個以上600個以下、20個以上500個以下、25個以上400個以下、30個以上300個以下、35個以上200個以下、又は40個以上100個以下の連続する塩基からなる核酸であればよい。

[0035] 本明細書において「被験体」とは、試料を提供し、検査に供されるヒト個体をいう。原則として個体であるが、本明細書では、時としてヒト由来の組織や細胞も包含し得る。また、個体は、健常体のみならず、何らかの疾患（例えば悪性腫瘍）を有する患者、又は疾患（例えば悪性腫瘍）の罹患可能性のある個体のいずれであってもよい。

[0036] 本明細書において「健常体」とは、特定のがんに罹患していないヒト個体

、好ましくはいかなるがんにも罹患していないヒト個体、より好ましくはいずれの疾患にも罹患していない健常状態にあるヒト個体をいう。ただし、本明細書では健常ヒト細胞も広義の健常体に含むものとする。したがって、個体レベルのみならず、例えば、がん患者から採取した組織のうちの正常部分のように、細胞レベルで健常状態にあれば健常体と称することとする。

[0037] 本明細書において「(アミノ酸の）置換」とは、天然のタンパク質を構成する20種類のアミノ酸間において、電荷、側鎖、極性、芳香族性等の性質の類似する保存的アミノ酸群内での置換をいう。例えば、低極性側鎖を有する無電荷極性アミノ酸群（Gly, Asn, Gln, Ser, Thr, Cys, Tyr）、分枝鎖アミノ酸群（Leu, Val, Ile）、中性アミノ酸群（Gly, Ile, Val, Leu, Ala, Met, Pro）、親水性側鎖を有する中性アミノ酸群（Asn, Gln, Thr, Ser, Tyr, Cys）、酸性アミノ酸群（Asp, Glu）、塩基性アミノ酸群（Arg, Lys, His）、芳香族アミノ酸群（Phe, Tyr, Trp）内での置換が挙げられる。これらの群内でのアミノ酸置換であれば、ペプチドの性質に変化を生じにくいことが知られているため好ましい。

[0038] 本明細書において「高ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする」とは、低塩濃度及び/又は高温の条件下でハイブリダイゼーションと洗浄を行うことをいう。例えば、6×SSC、5×Denhardt試薬、0.5%SDS、100μg/mL変性断片化サケ精子DNA中で65℃～68℃にてプローブと共にインキュベートし、その後、2×SSC、0.1%SDSの洗浄液中で室温から開始して、洗浄液中の塩濃度を0.1×SSCまで下げ、かつ温度を68℃まで上げて、バックグラウンドシグナルが検出されなくなるまで洗浄することが例示される。高ストリンジェントなハイブリダイゼーションの条件については、Green, M.R. and Sambrook, J., 2012, Molecular Cloning： A Laboratory Manual Fourth Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New Yorkに記載されているので参考にすることができる。

[0039] 本発明のがん患者の予後予測用バイオマーカーによれば、任意のがん、例えば卵巣がん、子宮体がん、又は甲状腺がん等のがん患者の予後を高い精度

で予測することができる。例えば、がん患者の再発リスク、及び／又は転移リスクを判定することができる。このことによって、がんの中から浸潤、転移、及び／又は再発能の高い予後不良例を選別することが可能となる。

[0040] また、本発明のがんの予後予測用バイオマーカーによれば、CLDN16タンパク質若しくはそのペプチド断片、又はCLDN16遺伝子の転写産物若しくはその核酸断片の、がん患者の予後予測用バイオマーカーとしての使用が提供される。

[0041] 本発明のがんの検出用バイオマーカーによれば、任意のがん、例えば卵巣がん、子宮体がん、又は甲状腺がん等のがんを高い精度で検出することができる。例えば、卵巣がん、子宮体がん、又は甲状腺がん等の早期診断や早期発見が可能となる。また、本発明によれば、CLDN16タンパク質若しくはそのペプチド断片、又はCLDN16遺伝子の転写産物若しくはその核酸断片の、任意のがん、例えば卵巣がん、子宮体がん、又は甲状腺がん等を検出するためのバイオマーカーとしての使用も提供される。

[0042] （抗CLDN16抗体又はその断片）

一態様において、本発明によれば抗CLDN16抗体又はその断片が提供される。また、任意のがん、例えば卵巣がん、子宮体がん、又は甲状腺がん等のがん患者の予後を予測するための抗CLDN16抗体又はその断片、及び任意のがん、例えば卵巣がん、子宮体がん、又は甲状腺がん等を検出するための抗CLDN16抗体又はその断片も提供される。本発明の抗CLDN16抗体又はその断片は、悪性度の高いがん、例えば卵巣がん、子宮体がん、又は甲状腺がん等において発現し得るCLDN16タンパク質又はそのペプチド断片を検出することによって、被験体におけるがんの予後を予測することができる。また、本発明の抗CLDN16抗体又はその断片は、卵巣がん、子宮体がん、又は甲状腺がん等のがんにおいて発現し得るCLDN16タンパク質又はそのペプチド断片を検出することによって、がんを検出することができる。

[0043] （１）抗CLDN16抗体

「抗CLDN16抗体」とは、CLDN16タンパク質又はそのペプチド断片に対して

免疫応答性を示す抗体をいう。

[0044] 本発明の抗CLDN16抗体の由来生物種は、特に限定しない。好ましくは鳥類及び哺乳動物由来の抗体である。例えば、ニワトリ、ダチョウ、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ヤギ、ロバ、ヒツジ、ラクダ、ウマ、又はヒト等が挙げられる。

[0045] 本発明の抗CLDN16抗体は、CLDN16タンパク質又はそのペプチド断片を認識し、免疫応答性を示す抗体である限り、モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体のいずれであってもよい。好ましくは抗体価が安定しているモノクローナル抗体である。

[0046] 本明細書において「ポリクローナル抗体」とは、抗原に特異的に結合し、かつそれを認識することのできる異なる複数種の免疫グロブリン群をいう。

[0047] また、本明細書において「モノクローナル抗体」とは、フレームワーク領域（Framework region：以下、「FR」と表記する）及び相補性決定領域（Complementarity determining region：以下、「CDR」と表記する）を含み、抗原に特異的に結合し、かつそれを認識することのできる単一種の免疫グロブリン、又は免疫グロブリンに含まれる少なくとも1組の軽鎖可変領域（V_L領域）及び重鎖可変領域（V_H領域）を包含する組換え抗体又は合成抗体をいう。

[0048] 抗CLDN16抗体が免疫グロブリン分子で構成される場合、免疫グロブリンは任意のクラス（例えば、IgG、IgE、IgM、IgA、IgD、及びIgY）、又は任意のサブクラス（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、及びIgA2）とすることができる。

[0049] 本発明の抗CLDN16抗体が認識するCLDN16タンパク質又はそのペプチド断片のエピトープの位置は特に限定しない。本発明の抗CLDN16抗体が認識するエピトープの一例として、配列番号11又は20で示すアミノ酸配列に含まれるペプチド配列が挙げられる。

[0050] 上記エピトープを認識する抗CLDN16抗体の具体例として、後述する実施例２で得られたラット抗CLDN16モノクローナル抗体クローンが挙げられる。この抗体クローンは、重鎖可変領域が配列番号7で示すアミノ酸配列からなり、

また軽鎖可変領域が配列番号8で示すアミノ酸配列からなる。Kabatのルール（Kabat E.A., et al., 1991, Sequences of proteins of immunological interest, Vol.1, eds. 5, NIH publication）によれば、抗体クローンの重鎖可変領域において、CDR1は配列番号1で示すアミノ酸配列からなり、CDR2は配列番号2で示すアミノ酸配列からなり、CDR3は配列番号3で示すアミノ酸配列からなる。また、抗体クローンの軽鎖可変領域において、CDR1は配列番号4で示すアミノ酸配列からなり、CDR2は配列番号5で示すアミノ酸配列からなり、CDR3は配列番号6で示すアミノ酸配列からなる。配列番号1～8のアミノ酸配列を以下に示す。

[0051] 重鎖可変領域のアミノ酸配列：DRQMGLLLCLVTFPRCVLSQVQLEESGPGLVQPSQTLSLTCTVSGFSLTSNGVSWVRQPPGKGLEWIAAISSAGNTYYNSALKSRLSISRDTSKSQVFLKMNSLQTEDTAIYFCNTLYYGYNRGYFDYWGQGVMVTVSSAETTAPSVYP（配列番号7）

軽鎖可変領域のアミノ酸配列：MTQTPVSLSVSLGGQVSISCRSSQSLVHNNGNTYLSWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGISDRFSGSGSGTDFTLKISRVEPDDLGVYYCGQGTQYPLTFGSGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSMEHEMVSWTVLLIRTPKTARTA（配列番号8）

重鎖CDR1のアミノ酸配列：GFSLTSN（配列番号1）

重鎖CDR2のアミノ酸配列：SSAGN（配列番号2）

重鎖CDR3のアミノ酸配列：LYYGYNRGYFDY（配列番号3）

軽鎖CDR1のアミノ酸配列：RSSQSLVHNNGNTYLS（配列番号4）

軽鎖CDR2のアミノ酸配列：KVSNRFS（配列番号5）

軽鎖CDR3のアミノ酸配列：GQGTQYPLT（配列番号6）

[0052] なお、実施例２で得られた抗CLDN16抗体の重鎖可変領域に相当する配列番号7で示すアミノ酸配列をコードする核酸（ヌクレオチド）として、例えば、配列番号18で示す塩基配列からなる核酸が挙げられる。また、実施例２で得られた抗CLDN16抗体の軽鎖可変領域に相当する配列番号8で示すアミノ酸配列をコードする核酸として、例えば、配列番号19で示す塩基配列からなる核酸が挙げられる。さらに、上記抗体クローンにおける重鎖可変領域のCDR1、CDR2、及びCDR3をコードする塩基配列として、例えば、それぞれ配列番号12、13

、及び14で示す塩基配列からなる核酸が挙げられる。また、上記抗体クローンにおける軽鎖可変領域のCDR1、CDR2、及びCDR3をコードする塩基配列として、例えば、それぞれ配列番号15、16、及び17で示す塩基配列からなる核酸が挙げられる。

[0053] 「組換え抗体」とは、キメラ抗体、又はヒト化抗体をいう。「キメラ抗体」とは、異なる動物由来の抗体のアミノ酸配列を組み合わせて作製される抗体で、ある抗体の定常領域（C領域）を他の抗体のC領域で置換した抗体である。例えば、ラットモノクローナル抗体のC領域をヒト抗体のC領域と置き換えた抗体が該当する。具体的な例を挙げると、任意の抗原に対するヒト抗体の重鎖可変領域を前述の実施例２で得られた抗CLDN16抗体クローンにおける配列番号7で示すアミノ酸配列からなる重鎖可変領域と置換し、またヒト抗体の軽鎖可変領域を配列番号8で示すアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域と置換してなる抗体が挙げられる。これによりヒト体内における当該抗体に対する免疫反応を軽減し得る。「ヒト化抗体」とは、ヒト抗体におけるCDRをヒト以外の哺乳動物由来の抗体におけるCDRと置換したモザイク抗体である。免疫グロブリン分子の可変領域（V領域）は、4つのFR（FR1、FR2、FR3及びFR4）と3つのCDR（CDR1、CDR2及びCDR3）がN末端側からFR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4の順序で連結されて構成されている。このうちFRは可変領域の骨格を構成する相対的に保存された領域であり、CDRが抗体の抗原結合特異性に直接寄与する。ヒト化抗体は、例えば、ラット由来の抗体クローンの軽鎖又は重鎖における一組のCDR1、CDR2及びCDR3を任意の抗原に対するヒト抗体の軽鎖又は重鎖における一組のCDR1、CDR2、及びCDR3とそれぞれ置換することによって、ラット抗体クローンの抗原結合特異性を受け継いだヒト抗体として構築することができる。具体的な例を挙げると、前述の実施例２で得られたラット由来の抗CLDN16抗体クローンにおける重鎖由来の配列番号1で示すアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号2で示すアミノ酸配列からなるCDR2、及び配列番号3で示すアミノ酸配列からなるCDR3をヒト抗体の重鎖CDR1、CDR2、及びCDR3とそれぞれ置換し、また前述の抗体クローンにおける軽鎖由来の配列番号4で示

すアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号5で示すアミノ酸配列からなるCDR2、及び配列番号6で示すアミノ酸配列からなるCDR3をヒト抗体の軽鎖CDR1、CDR2、及びCDR3とそれぞれ置換してなる抗体が挙げられる。このようなヒト化抗体は、CDR以外はヒト抗体由来であることからヒト体内における当該抗体に対する免疫反応をキメラ抗体以上に軽減し得る。

[0054] 「合成抗体」とは、化学的に又は組換えDNA法を用いることによって合成した抗体をいう。例えば、組換えDNA法を用いて新たに合成された抗体が挙げられる。具体的には、例えば、scFv（single chain Fragment of variable region：単鎖抗体）、ダイアボディ（diabody）、トリアボディ（triabody）又はテトラボディ（tetrabody）等が挙げられる。免疫グロブリン分子において、機能的な抗原結合部位を形成する一組の可変領域（軽鎖可変領域V_L及び重鎖可変領域V_H）は、軽鎖と重鎖という別々のポリペプチド鎖上に位置する。scFvは、免疫グロブリン分子において、V_L及びV_Hを十分な長さの柔軟性リンカーによって連結し、1本のポリペプチド鎖に包含した構造を有する分子量約35 kDa以下の合成抗体である。scFv内において1組の可変領域は、互いに自己集合して1つの機能的な抗原結合部位を形成することができる。scFvは、それをコードする組換えDNAを、公知技術を用いてベクターに組み込み、発現させることで得ることができる。ダイアボディは、scFvの二量体構造を基礎とした構造を有する分子である(Holliger et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448)。例えば、上記リンカーの長さが約12アミノ酸残基よりも短い場合、scFv内の2つの可変領域は自己集合できないが、2つのscFvを相互作用させてダイアボディを形成させることにより、一方のscFvのV_Lが他方のscFvのV_Hと集合可能となり、2つの機能的な抗原結合部位を形成することができる。さらに、scFvのC末端にシステイン残基を付加させることにより、2本のscFv同士のジスルフィド結合が可能となり、安定的なダイアボディを形成させることもできる。このようにダイアボディは二価の抗体断片である。トリアボディ、及びテトラボディは、ダイアボディと同様にscFv構造を基本とした、その三量体、及び四量体構造を有する、それぞれ、三価、及び四価の抗体で

ある。ダイアボディ、トリアボディ、及びテトラボディは、多重特異性抗体であってもよい。「多重特異性抗体」とは、多価抗体、すなわち抗原結合部位を一分子内に複数有する抗体において、それぞれの抗原結合部位が異なるエピトープと結合する抗体をいう。例えば、ダイアボディにおいて、それぞれの抗原結合部位が異なるエピトープと結合する二重特異性抗体（Bispecific抗体）が挙げられる。具体的には、例えば、本発明の抗CLDN16抗体であれば、一方の抗原結合部位が配列番号11又は20で示すアミノ酸配列に含まれるエピトープと結合し、他方の抗原結合部位が上記エピトープ以外のエピトープと結合するダイアボディが該当する。

[0055] 本発明の抗CLDN16抗体は、修飾することもできる。ここでいう「修飾」とは、グリコシル化のような抗原特異的結合活性に必要な機能上の修飾や抗体検出に必要な標識上の修飾を含む。

[0056] 抗CLDN16抗体上のグリコシル化修飾は、標的であるCLDN16タンパク質又はそのペプチド断片に対する抗CLDN16抗体の親和性を調整するために行われる。具体的には、例えば、抗CLDN16抗体のFRにおいて、グリコシル化を構成するアミノ酸残基に置換を導入してグリコシル化部位を除去することで、その部位のグリコシル化を喪失させる改変等が挙げられる。

[0057] 抗CLDN16抗体の標識には、例えば、蛍光色素（FITC、ローダミン、テキサスレッド、Cy3、Cy5）、蛍光タンパク質（例えば、PE、APC、GFP）、酵素（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、グルコースオキシダーゼ）、放射性同位元素（例えば、^{3}H、^{14}C、^{35}S）又はビオチン若しくは（ストレプト）アビジンによる標識が挙げられる。

[0058] 本発明の抗CLDN16抗体は、CLDN16タンパク質との解離定数が、10^{-7} M以下であることが好ましく、例えば10^{-8}M以下の高い親和性を有することが好ましく、より好ましくは10^{-9} M以下、特に好ましくは10^{-10} M以下である。上記解離定数は、当該分野で公知の技術を用いて測定することができる。例えば、Biacoreシステム（GE Healthcare社）により速度評価キットソフトウェアを用いて測定してもよい。

[0059] （２）その断片

本明細書において「その断片」とは、抗CLDN16抗体の一部からなり、かつ抗CLDN16抗体と同様にCLDN16タンパク質又はその断片に対して免疫応答性を示す抗体断片をいう。例えば、Fab、$F(ab')_2$、Fab'等が該当する。

[0060] Fabは、IgG分子がパパインによってヒンジ部のジスルフィド結合よりもN末端側で切断されて生じる抗体断片であって、H鎖定常領域（重鎖定常領域：以下C_Hと表記する）を構成する3つのドメイン（C_H1、C_H2、C_H3）のうちV_Hに隣接するC_H1とV_H、及び完全長のL鎖から構成される。

[0061] $F(ab')_2$は、IgG分子がペプシンによってヒンジ部のジスルフィド結合よりもC末端側で切断されて生じるFab'の二量体である。Fab'は、Fabよりもヒンジ部を含む分だけH鎖が若干長いが実質的にはFabと同等の構造を有する。Fab'は、$F(ab')_2$をマイルドな条件下で還元し、ヒンジ領域のジスルフィド連結を切断することによって得ることができる。これらの抗体断片は、いずれも抗原結合部位を包含していることから、抗原エピトープと特異的に結合する能力を有している。

[0062] （３）抗CLDN16抗体の作製

本発明の抗CLDN16抗体は、当該分野の常法によって得ることができる。また、モノクローナル抗体のアミノ酸配列が明らかであれば、そのアミノ酸配列に基づいて、化学的合成法や組換えDNA技術を用いることによって調製することもできる。さらに、モノクローナル抗体は、その抗体を産生するハイブリドーマから得ることもできる。

[0063] 本発明の抗CLDN16抗体の免疫原として使用可能な抗原ペプチドは、CLDN16タンパク質の中の任意の一部（以下、「CLDN16抗原ペプチド」と表記する）である。例えば、本発明の抗CLDN16抗体の免疫原として使用可能な抗原ペプチドの一例として、配列番号11又は20で示すアミノ酸配列からなるペプチドが挙げられる。CLDN16抗原ペプチドは、例えば、化学合成法又はDNA組換え技術を用いて調製することができる。

[0064] （がんの予後予測用キット及びがんの検出用キット）

一態様において、本発明はがんの予後予測用キット、及びがんの検出用キットを提供する。本発明のがんの予後予測用キット、又はがんの検出用キットは、抗CLDN16抗体又はその免疫応答性を有する断片を必須の構成要素として含み、がん患者の予後を予測するためのバイオマーカーを検出することや、がんを検出するためのバイオマーカーを検出することができる。本発明のがんの予後予測用キット、又はがんの検出用キットは、CLDN16タンパク質又はそのペプチド断片以外のがんの予後予測用バイオマーカー（以下、「他の予後予測用バイオマーカー」と称する）に対する抗体（以下、「他の予後予測用抗体」と称する）又は免疫応答性を有するその断片を選択構成物として含む。

[0065] （１）必須構成物

本発明のがんの予後予測用キット、又はがんの検出用キットは、上述の抗CLDN16抗体又はその断片を必須の構成要素として含む。本発明のがんの予後予測用キット、又はがんの検出用キットに含まれる抗CLDN16抗体は単一種であってもよいし、複数種であってもよい。

[0066] （２）選択構成物

本発明のがんの予後予測用キット、又はがんの検出用キットは、選択構成物として、１種類又は複数種類の他の予後予測用抗体若しくは他の検出用抗体又は免疫応答性を有するその断片をさらに含んでもよい。ここで、他の予後予測用抗体若しくは他の検出用抗体は、上記の抗CLDN16抗体と組み合わせて用いた場合に卵巣がん、子宮体がん、又は甲状腺がん等のがん患者の予後予測や検出の精度を向上し得るものであれば任意の抗体でよく、がんの任意の予後予測用バイオマーカーに対する抗体又はがんの検出用バイオマーカーに対する抗体を使用することができる。このようなバイオマーカーは、公知のがんのバイオマーカーから選択することができる。例えば、公知の卵巣がんマーカーの例として、Cancer antigen 125 (CA125) 及びHuman epididymis protein 4 (HE4) が挙げられる。また、CA125に対する抗体の例として、CA125（ライカバイオシステムズ、PA0539）が挙げられる。HE4に対する抗体の例

としては、Recombinant Anti-HE4 antibody（アブカム、ab200828）が挙げられる。

[0067] 本発明のがんの予後予測用キット、又はがんの検出用キットは、上述の必須の構成要素の他に、がん患者の予後予測やがんの検出に必要な他の試薬、例えば、バッファーや二次抗体、検出及び結果の判定に用いる説明書を含んでいてもよい。

[0068]（がんの予後予測方法）

一態様において、本発明はがんの予後予測方法を提供する。本発明のがんの予後予測方法は、がん患者由来の試料中のCLDN16タンパク質若しくはそのペプチド断片、又はCLDN16遺伝子の転写産物若しくはその核酸断片からなるバイオマーカー（以下、「CLDN16タンパク質等のバイオマーカー」という）を検出する検出工程を含み、バイオマーカーの陽性／陰性の決定結果に基づいてがん患者の予後が示される。検出工程はインビトロで行うことができる。

[0069] 本態様において「検出工程」とは、がんに罹患している被験体に由来する試料において、がんの予後予測用バイオマーカーの量を測定し、その測定値に基づいて、当該バイオマーカーが陽性であるか又は陰性であるかを決定（以下、「陽性／陰性の決定」と表記する）する工程である。

[0070] 本明細書において、「検出」という用語には、測定、定性、定量、及び半定量のいずれもが包含される。

[0071] 本態様の予後予測方法において「試料」とは、被験体若しくは被験体群又は健常体若しくは健常体群から採取され、本態様のがん患者の予後予測方法に供されるものであって、例えば、組織又は細胞が該当する。本発明の予後予測方法に供される「組織」及び「細胞」は、例えば被験体の卵巣がん、子宮体がん、又は甲状腺がん等の任意のがんに罹患している組織及び細胞、並びに健常体における対応する組織及び細胞が該当する。本発明の予後予測方法に供される試料は、特に限定されないが、がんに罹患している被験体から生検により採取された、又は手術により切除された検体である。好ましくは

、生検により採取された、又は手術により切除されたがんの一部（例えば、組織又は細胞）、例えば浸潤先進部である。本発明の方法の対象となる患者が患うがんのステージは限定しない。

[0072] 本発明の予後予測方法において必要となる試料の量は、特に限定するものではない。組織又は細胞であれば少なくとも10 μg、好ましくは少なくとも0.1 mgあれば望ましく、生検材料も同様とする。試料は、がん患者の予後予測用バイオマーカーを検出可能なように、必要に応じて調製、処理することができる。例えば、免疫組織化学染色法でバイオマーカーを検出する場合は、患者由来の試料からパラフィン包埋切片を調製してもよい。また、例えば、ウエスタンブロット法又はRT-PCR法によってバイオマーカーを検出する場合は、患者由来の試料からタンパク質抽出液又はmRNA抽出液を調製してもよい。このような調製は、ホモジナイズ処理や細胞溶解処理、遠心や濾過による夾雑物除去、プロテアーゼインヒビターの添加等を適宜含むことができる。これらの処理の詳細についてはGreen & Sambrook, Molecular Cloning, 2012, Fourth Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Pressに詳しく記載されており、参考にすればよい。

[0073] 本明細書において「がんの予後予測用バイオマーカーの測定値」とは、具体的には、試料中のCLDN16タンパク質等のバイオマーカーの量の測定値である。

[0074] 本明細書において「測定値」とは、バイオマーカーの測定によって得られた測定値である。測定値は、試料中のタンパク質量をng（ナノグラム）やμg（マイクログラム）等の単位で表した絶対値であってもよいし、又は対照値に対する吸光度や標識分子による蛍光強度等で表した相対値であってもよく、或いは、試料中におけるバイオマーカーの空間分布（例えば、染色パターン）から一定の計算式により算出されるスコア（点数）であってもよい。ここで対照値は、CLDN16タンパク質若しくはそのペプチド断片、又はCLDN16遺伝子の転写産物若しくはその核酸断片以外の任意のバイオマーカーの測定値、であってもよい。

[0075] 以下、本態様の検出工程を構成する、（１）CLDN16タンパク質等のバイオマーカーの測定、及び（２）CLDN16タンパク質等のバイオマーカーの陽性／陰性の決定について説明する。

[0076] （１）CLDN16タンパク質等のバイオマーカーの測定

本方法で測定すべきバイオマーカーは、CLDN16タンパク質若しくはそのペプチド断片、又はCLDN16遺伝子の転写産物若しくはその核酸断片のいずれであってもよい。量(発現量)の測定は、発現の有無、又は発現量若しくは発現濃度の大小等を測定することを包含する。本明細書において、「測定」という用語には、検出、定性、定量及び半定量のいずれもが包含される。

[0077] 測定すべきバイオマーカーがCLDN16タンパク質若しくはそのペプチド断片の場合、その測定方法は、公知のタンパク質定量方法であればよく、特に限定はしないが、例えば、免疫学的検出法、アプタマー解析法、及び質量分析法が挙げられる。

[0078] 「免疫学的検出法」とは、標的分子と特異的に結合する抗体又はその結合断片を用いて、その標的分子を定量する方法である。免疫学的検出法には、例えば、酵素免疫測定法（ELISA法、EIA法を含む）、蛍光免疫測定法、放射免疫測定法（RIA）、発光免疫測定法、表面プラズモン共鳴法（SPR法）、水晶振動子マイクロバランス（QCM）法、免疫比濁法、ラテックス凝集免疫測定法、ラテックス比濁法、赤血球凝集反応、粒子凝集反応法、金コロイド法、キャピラリー電気泳動法、ウエスタンブロット法又は免疫組織化学法（免疫染色法）等が知られているが、本方法ではいずれの検出法を用いてもよい。限定はしないが、免疫組織化学法が好適である。

[0079] 免疫組織化学法を用いる場合には、CLDN16タンパク質若しくはそのペプチド断片の定量方法は、限定しない。例えば、組織切片の染色パターンの観察に基づいて、一定の計算式を用いて算出されるスコアとして定量してもよい。

[0080] 本工程の免疫学的検出に使用する抗体は、モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体のいずれであってもよく、抗体を構成する免疫グロブリンは任

意のクラス又は任意のサブクラスであってもよく、哺乳動物及び鳥を含めたいずれの動物由来でもよく、人為的に作製した抗体、例えば、組換え抗体、合成抗体、又は抗体断片であってもよい。これらの抗体の形態については上述の通りであり、ここでの詳細な説明は省略する。一実施形態において、本工程の免疫学的検出に使用する抗体は、上述の抗CLDN16抗体又はその断片である。

[0081] 「アプタマー解析法」は、立体構造によって標的物質と強固、かつ特異的に結合するアプタマーを用いて、標的分子である予後予測用バイオマーカータンパク質を定量する方法である。アプタマーは、その分子の種類により、核酸アプタマーとペプチドアプタマーに大別することができるが、いずれのアプタマーであってもよい。

[0082] 「核酸アプタマー」とは、核酸で構成されるアプタマーをいう。核酸アプタマーを構成する核酸は、DNA、RNA又はそれらの組合せのいずれであってもよい。必要に応じて、PNA、LNA／BNA、メチルホスホネート型DNA、ホスホロチオエート型DNA、2'-O-メチル型RNA等の化学修飾核酸を含むこともできる。本発明であれば、抗CLDN16 RNAアプタマー又は抗CLDN16 DNAアプタマー等が挙げられる。

[0083] 核酸アプタマーは、CLDN16タンパク質又はその一部を標的分子として、当該分野で公知の方法、例えば、SELEX(systematic evolution of ligands by exponential enrichment)法を用いて作製することができる。SELEX法は、公知の方法であり、具体的な方法は、例えば、Panら (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1995, 92: 11509-11513) に準じて行えばよい。

[0084] ペプチドアプタマーとは、アミノ酸で構成されるアプタマーで、抗体と同様に、特定の標的分子の表面構造を認識して、特異的に結合する1～6 kDaのペプチド分子である。本発明であれば、抗CLDN16ペプチドアプタマー等が挙げられる。ペプチドアプタマーは、当該分野で公知製造の方法に基づいて作製すればよい。例えば、Whaley, S. R., et al., Nature, 2000, 405, 665-668を参照することができる。通常は、ファージディスプレイ法や細胞表層デ

ィスプレイ法を用いて作製することができる。

[0085] 上記抗体又はアプタマーは、必要に応じて標識されていてもよい。標識は、当該分野で公知の標識物質を利用すればよい。抗体及びペプチドアプタマーの場合、例えば、蛍光色素（フルオレセイン、FITC、ローダミン、テキサスレッド、Cy3、Cy5）、蛍光タンパク質（例えば、PE、APC、GFP）、酵素（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、グルコースオキシダーゼ）、放射性同位元素（例えば、^{3}H、^{14}C、^{35}S）又はビオチン若しくは（ストレプト）アビジンにより標識することができる。また、核酸アプタマーの場合、例えば、放射性同位元素（例えば、^{32}P、^{3}H、^{14}C）、DIG、ビオチン、蛍光色素（例えば、FITC、Texas、Cy3、Cy5、Cy7、FAM、HEX、VIC、JOE、Rox、TET、Bodipy493、NBD、TAMRA）、又は発光物質（例えば、アクリジニウムエスター）が挙げられる。標識物質で標識された抗体やアプタマーは、標的タンパク質と結合したアプタマーを検出する際に有用なツールとなり得る。

[0086] 「質量分析法」には、高速液体クロマトグラフ質量分析法（LC-MS）、高速液体クロマトグラフタンデム質量分析法（LC-MS/MS）、ガスクロマトグラフ質量分析法（GC-MS）、ガスクロマトグラフタンデム質量分析法（GC-MS/MS）、キャピラリー電気泳動質量分析法（CE-MS）及びICP質量分析法（ICP-MS）が挙げられる。

[0087] 上記免疫学的検出法、アプタマー解析法、及び質量分析法は、いずれも当該分野に公知の技術であって、それらの方法に準じて行えばよい。例えば、Green, M.R. and Sambrook, J., 2012, Molecular Cloning: A Laboratory Manual Fourth Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York；Christopher J., et al., 2005, Chemical Review,105:1103-1169；Iijima Y. et al., 2008,.The Plant Journal, 54,949-962；Hirai M. et al.,2004, Proc Natl Acad Sci USA, 101(27) 10205-10210；Sato S, et al., 2004,,The Plant Journal, 40(1)151-163； Shimizu M. et al., 2005, Proteomics, 5,3919-3931に記載の方法に準じて行うことができる。また

、各メーカーからペプチド定量キットが市販されており、それらを利用することもできる。

[0088] また、測定すべきバイオマーカーがCLDN16遺伝子転写産物若しくはその核酸断片の場合、その測定方法は、公知の核酸定量方法であればよく、特に限定はしないが、例えば、プライマーを用いる核酸増幅法又はプローブを用いるハイブリダイゼーション法が挙げられる。

[0089] 「核酸増幅法」は、フォワード/リバースプライマーセット用いて、標的核酸の特定の領域を核酸ポリメラーゼによって増幅させる方法をいう。核酸増幅法としては、例えば、RT-PCR(逆転写ポリメラーゼ連鎖反応)法等のPCR(ポリメラーゼ連鎖反応)法が挙げられる。

[0090] 「ハイブリダイゼーション法」は、検出すべき標的核酸の塩基配列の全部又は一部に相補的な塩基配列を有する核酸断片をプローブとして用い、その核酸と該プローブ間の塩基対合を利用して、標的核酸若しくはその断片を検出、定量する方法である。ハイブリダイゼーション法には、検出手段の異なるいくつかの方法が知られているが、例えば、ノザンハイブリダイゼーション法(ノザンブロットハイブリダイゼーション法)、in situハイブリダイゼーション法、又はマイクロアレイ法が挙げられる。

[0091] プライマー及びプローブ等の核酸鎖は、公知のバイオマーカー配列情報を基に当業者に公知の方法により適宜設計し、化学合成等の公知の作製方法により得ることができる。

[0092] 上述の各測定法は、いずれも当該分野に公知の技術である。したがって、具体的な測定方法については、公知の方法に準じて行えばよい。例えば、Green, M.R. and Sambrook, J., 2012(前述)に記載の方法を参考にすることができる。

[0093] （２）CLDN16タンパク質等のバイオマーカーの陽性／陰性の決定

次に、（１）で得られた測定値に基づいて、試料中におけるCLDN16タンパク質等のバイオマーカーの陽性／陰性を決定する。

[0094] 測定値に基づいた陽性／陰性の決定方法は、限定はしない。例えば、CLDN1

6タンパク質等のバイオマーカーの測定値に対するカットオフ値を定め、そのカットオフ値に基づいて陽性／陰性を決定する方法が挙げられる。すなわち、所定の値をカットオフ値と定め、測定値がその値以上であれば、CLDN16タンパク質等のバイオマーカーは陽性であり、逆にカットオフ値未満であれば陰性と決定することができる。

[0095] カットオフ値は、測定値を陽性、陰性に分類するための境界値をいう。カットオフ値は、通常、疾患の罹患率とROC曲線(receiver operating characteristic curve)より算出された感度及び特異度に基づき算出することができる。カットオフ値の設定法は特に限定しない。

[0096] 例えば、卵巣がん、子宮体がん、又は甲状腺がん等の任意のがんに罹患していない健常体に由来する試料の測定値、若しくは健常体群に由来する試料の測定値の平均値をカットオフ値として、被験体の測定値がカットオフ値よりも高いときに、陽性と決定することができる。

[0097] 或いは、卵巣がん、子宮体がん、又は甲状腺がん等の任意のがんに罹患していない健常体に由来する試料の測定値、又は健常体群に由来する試料の測定値の平均値の1.5倍以上、2.0倍以上、3.0倍以上、4倍以上、5倍以上、又は6倍以上をカットオフ値として、被験体の測定値がカットオフ値よりも高いときに、陽性と決定することもできる。

[0098] また、対照群から得られた測定値をパーセンタイルで分類し、その分類に用いたパーセンタイル値をカットオフ値とすることもできる。例えば、対照者から得られた測定値の95パーセンタイルをカットオフ値とし、その値以上を陽性、値未満を陰性とした場合、被験体の測定値が95パーセンタイル以上であれば、陽性と決定することができる。

[0099] なお、対照とする健常体の測定値は、被験体の測定値と異なり、必ずしもその都度測定する必要はない。例えば、測定に用いる試料の量、がんの予後予測用バイオマーカーの測定方法、測定条件を一定にしておけば、以前に測定した対照健常体の測定値を再利用することができる。

[0100] 免疫組織化学染色法を用いる場合、例えば、腫瘍細胞総数に対して染色さ

れた腫瘍細胞数が一定割合(例えば10%、15%又は20%)を超える場合、陽性と判定し、腫瘍細胞総数に対して染色された腫瘍細胞数が前記一定割合以下の場合、陰性と判定してもよい。

[0101] 本発明の予後予測方法では、上記検出工程で得られたCLDN16タンパク質等のバイオマーカーの検出結果に基づいて、がん患者の予後を予測する、又は予後が示される。具体的には、卵巣がん、子宮体がん、又は甲状腺がん等のがん患者に由来する試料がCLDN16タンパク質等のバイオマーカーについて陽性である場合、がん患者の予後が悪いこと、又はがん患者の予後が悪い可能性が高いことが示される。反対に、がん患者に由来する試料がCLDN16タンパク質等のバイオマーカーについて陰性である場合、がん患者の予後が良好であること、又はがん患者の予後が良好である可能性が高いことが示される。

[0102] 本明細書において、「予後が悪い」とは、(例えば外科的手術による切除後の)臨床転帰が不良である(例えば、がんの再発リスク又は再発率が高い、がんの転移リスク又は転移率が高い、無再発生存率が低い、疾患(がん)特異的生存率が低い、又は全生存率が低い)ことをいう。予後が悪い場合、5年後の無再発生存率又は疾患特異的生存率は95%以下、90%以下、85%以下、80%以下、75%以下、70%以下、65%以下、60%以下、55%以下、50%以下、又は45%以下であってよい。なお、本発明では、生存率は累積生存率を意味する。

[0103] 本明細書において、「予後が良い」とは、臨床転帰が良好であることをいう。予後が良い場合、がんの切除手術後の5年後の無再発生存率又は生存率は50%以上、55%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、95%以上、又は100%であってよい。

[0104] 一実施形態において、がん患者に由来する試料において、CLDN16タンパク質等のバイオマーカー以外の他のがん患者の予後予測用バイオマーカーを検出し、その検出結果とCLDN16タンパク質等のバイオマーカーの検出結果に基づいて、がん患者の予後を予測してもよい。ここでCLDN16タンパク質等のバイオマーカー以外の他のがん患者の予後予測用バイオマーカーや、それを検

出するための抗体の例は、上述の通りである。

[0105] また、本態様の予後予測方法では、がん患者に由来する試料において、細胞異型、構造異型、浸潤、及び転移のうちいずれか１つ以上を検出し、その検出結果とCLDN16タンパク質等のバイオマーカーの検出結果とに基づいて、がん患者の予後を予測してもよい。ここで、「細胞異型」とは、正常の細胞構造からの隔たりであり、具体的には核胞体比の増大、細胞や核の大小不同、核形の不整、核クロマチンの増量、核小体の増大や増加、核分裂像の増加、及び／又は異常核分裂像の出現を指す。また、「構造異型」とは、正常の組織構造からの隔たり、即ち組織構造の不規則化である。本態様において細胞異型又は構造異型の検出方法は限定しない。例えば、ヘマトキシリン・エオジン染色を用いて可視化することができる。「浸潤」とは、悪性腫瘍が周囲の正常組織や臓器を破壊しながら連続性に進展することであり、周囲組織との境界が不明瞭になることで判定できる。「転移」とは、悪性腫瘍が原発巣から離れた臓器に非連続性に進展することである。

[0106] 本発明の予後予測方法によれば、生検や手術により摘出した生体試料を調べることで、その検体を提供した被験体の予後を正確に予測することができる。正診率の高い本態様の予後予測方法によって、再発リスクや転移リスクを判定し、その結果に基づき、治療方針(例えば、抗がん剤の種類、投与量、投与間隔等)を決定し、又はがんの再発及び転移の検査の間隔を決定することができる。本発明により、がん患者の予後が悪いことが示された場合、がんの再発を防止し、予後を改善し、又は生存率を改善するために、患者に外科手術や抗がん剤療法(例として、パクリタキセルやカルボプラチン等の抗がん剤を投与することを含む治療方法が挙げられる)を行っても良い。したがって、本発明の方法により予後が悪いことが示されたがん患者に上記の少なくとも一つを行うことを含む、がんの再発を防止し、予後を改善し、又は生存率を改善する方法もまた提供される。また、がん患者の予後が悪いと予測された場合、がんの再発を早期発見するために、検査頻度を上げることもできる。

[0107] 本発明の予後予測方法によれば、がんの予後予測を補助する方法も提供される。また、被験体のがんの悪性度を判定する方法や、被験体のがんの悪性度判定を補助する方法もまた提供される。

[0108] 本発明の方法は、他の方法（例えば、レントゲン撮影；経膣超音波検査等の超音波（エコー）検査；内視鏡検査；マンモグラフィー；触診；内診；直腸診；CT検査；骨盤MRI検査等のMRI検査；PET-CT検査等の画像検査；血液検査；細胞診や組織診等の病理検査；腫瘍マーカー検査；及び／又は遺伝子診断）や他の因子（例えば、ステージによる分類、腫瘍径、リンパ節転移の有無、組織学的グレード等）と組み合わせて用いることができる。他の方法と組み合わせることで、本発明の予後予測方法の精度を高めることができる。

[0109] さらに、本発明の方法でがんの予後を予測する工程を含む、がんを治療する方法や、がん患者の予後を改善する方法も提供される。

[0110] （がんの検出方法）

一態様において、本発明はがんの検出方法を提供する。本発明のがんの検出方法は、被験者由来の体液等の試料中のCLDN16タンパク質若しくはそのペプチド断片、又はCLDN16遺伝子の転写産物若しくはその核酸断片からなるバイオマーカー（以下、「CLDN16タンパク質等のバイオマーカー」という）を検出する検出工程を含み、バイオマーカーの陽性／陰性の決定結果に基づいて被験者はがんに罹患している可能性が示される。検出工程はインビトロで行うことができる。本発明のがんの検出方法により、がんの早期診断が可能となる。

[0111] 本態様において「検出工程」とは、被験者に由来する試料において、がんの検出用バイオマーカーの量を測定し、その測定値に基づいて、当該バイオマーカーが陽性であるか又は陰性であるかを決定（以下、「陽性／陰性の決定」と表記する）する工程である。

[0112] 本発明のがんの検出方法において「試料」とは、被験体若しくは被験体群又は健常体若しくは健常体群から採取され、本態様のがんの検出方法に供されるものであって、例えば、体液が該当する。体液の例として、血液（血清

、血漿及び間質液を含む）、リンパ液、各組織若しくは細胞の抽出液、腹水、胸水、唾液、及び尿等が挙げられる。血液は血液から調製された血清又は血漿であってもよい。

[0113] 本明細書において「がんの検出用バイオマーカーの測定値」とは、具体的には、体液等の試料中のCLDN16タンパク質等のバイオマーカーの量の測定値である。

[0114] 以下、本態様の検出工程を構成する、（１）CLDN16タンパク質等のバイオマーカーの測定、及び（２）CLDN16タンパク質等のバイオマーカーの陽性／陰性の決定について説明する。

[0115] （１）CLDN16タンパク質等のバイオマーカーの測定

本方法で測定すべきバイオマーカーは、CLDN16タンパク質若しくはそのペプチド断片、又はCLDN16遺伝子の転写産物若しくはその核酸断片のいずれであってもよい。量(発現量)の測定は、発現の有無、又は発現量若しくは発現濃度の大小等を測定することを包含する。

[0116] 測定すべきバイオマーカーがCLDN16タンパク質若しくはそのペプチド断片の場合、その測定方法は、公知のタンパク質定量方法であればよく、特に限定はしないが、例えば、上述した、免疫学的検出法、アプタマー解析法、及び質量分析法が挙げられる。

[0117] また、測定すべきバイオマーカーがCLDN16遺伝子転写産物若しくはその核酸断片の場合、その測定方法は、公知の核酸定量方法であればよく、特に限定はしないが、例えば、上述した、プライマーを用いる核酸増幅法又はプローブを用いるハイブリダイゼーション法が挙げられる。

[0118] （２）CLDN16タンパク質等のバイオマーカーの陽性／陰性の決定

次に、（１）で得られた測定値に基づいて、試料中におけるCLDN16タンパク質等のバイオマーカーの陽性／陰性を決定する。本方法における陽性／陰性の決定は、上述の予後予測方法について述べた「（２）CLDN16タンパク質等のバイオマーカーの陽性／陰性の決定」に準じるものとし、ここでの説明は省略する。

[0119] 本発明のがんの検出方法では、上記検出工程で得られたCLDN16タンパク質等のバイオマーカーの検出結果に基づいて、試料が当該バイオマーカーについて陽性である場合、その被験者はがんに罹患している可能性が高いことが示される。反対に、被験者に由来する試料がCLDN16タンパク質等のバイオマーカーについて陰性である場合、その被験者はがんに罹患している可能性が低いことが示される。

[0120] 一実施形態において、被験者に由来する試料において、CLDN16タンパク質等のバイオマーカー以外の他のがんの検出用バイオマーカーを検出し、その検出結果とCLDN16タンパク質等のバイオマーカーの検出結果に基づいて、がんを検出してもよい。ここでCLDN16タンパク質等のバイオマーカー以外の他のがんの検出用バイオマーカーや、それを検出するための抗体の例は、上述の通りである。

[0121] 本発明のがんの検出方法によれば、被験者から単離された体液等（腹水や血清等）の試料を調べることで、その被験体のがんの罹患可能性の有無を決定することができる。本発明のがんの検出方法の結果に基づきがんの早期診断が可能となり、早いステージで治療を開始することが可能となる。本発明のがんの検出方法の結果に基づいてがんの罹患可能性が高いことが示された場合、がんを治療するために、患者に薬物療法及び／又は放射線療法を行っても良い。したがって、本発明の方法によりがんの罹患の可能性が高いことが示されたがん患者に薬物療法及び放射線療法の少なくとも一つを行うことを含む、がんを治療する方法もまた提供される。

[0122] 本発明のがんの検出方法によれば、がんの検出を補助する方法も提供される。

本発明のがんの検出方法は、他の方法（例えば、レントゲン撮影；経膣超音波検査等の超音波（エコー）検査；内視鏡検査；マンモグラフィー；触診；内診；直腸診；CT検査；骨盤MRI検査等のMRI検査、PET-CT検査等の画像検査；血液検査；細胞診や組織診等の病理検査；腫瘍マーカー検査；及び／又は遺伝子診断）や他の因子（例えば、ステージによる分類、腫瘍径、リンパ

節転移の有無、組織学的グレード等）と組み合わせて用いることができる。他の方法と組み合わせることで、本発明のがんの検出方法の精度を高めることができる。

[0123]（がん治療剤）

一態様において、本発明はがん治療剤を提供する。本発明のがん治療剤は、抗CLDN16抗体又はその断片を有効成分として含み、がん患者において卵巣がん、子宮体がん、又は甲状腺がん等のがんを治療することができる。本態様の抗CLDN16抗体又はその断片は上述の「（１）抗CLDN16抗体」及び「（２）その断片」の記載に準じるものとし、ここでの詳細な説明は省略する。

[0124] 本態様において、抗CLDN16抗体又はその断片は、好ましくは、細胞障害活性を有しており、これによって抗腫瘍効果を発揮することができる。

[0125] また、本態様において、抗CLDN16抗体又はその断片は、抗腫瘍剤とコンジュゲートすることができる。抗体と抗腫瘍剤との結合は、アミノ基、カルボキシル基、ヒドロキシ基、チオール基等と反応性の基（例えば、コハク酸イミジル基、ホルミル基、２－ピリジルジチオ基、マレイイミジル基、アルコキシカルボニル基、ヒドロキシ基等）をもつスペーサーを介して行うことができる。

[0126] 抗腫瘍剤は、公知の抗腫瘍剤、及びそれらの薬学的に許容可能な塩又は誘導体を包含する。公知の抗腫瘍剤の例として、パクリタキセル、ドキソルビシン、ダウノルビシン、シクロホスファミド、メトトレキサート、5-フルオロウラシル、チオテパ、ブスルファン、インプロスルファン、ピポスルファン、ベンゾドーパ（benzodopa）、カルボコン、メツレドーパ（meturedopa）、ウレドーパ（uredopa）、アルトレートアミン（altretamine）、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミド、トリエチレンチオホスホラミド（triethilenethiophosphoramide）、トリメチローロメラミン（trimethylolomelamine）、ブラタシン、ブラタシノン、カンプトセシン、ブリオスタチン、カリスタチン（callystatin）、クリプトフィシン1、クリプトフィシン8、ドラスタチン、ズオカルマイシン、エレウテロビン、パンクラチスタチン、

サルコジクチン（sarcodictyin）、スポンジスタチン、クロランブシル、クロロナファジン（chloRNAphazine）、コロホスファミド（cholophosphamide）、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシドヒドロクロリド、メルファラン、ノベンビチン（novembichin）、フェネステリン（phenesterine）、プレドニムスチン（prednimustine）、トロフォスファミド（trofosfamide）、ウラシルマスタード、カルムスチン、クロロゾトシン（chlorozotocin）、フォテムスチン（fotemustine）、ロムスチン、ニムスチン、ラニムスチン、カリケアマイシン（calicheamicin）、ダイネマイシン、クロドロネート、エスペラマイシン、アクラシノマイシン、アクチノマイシン、オースラマイシン（authramycin）、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン（cactinomycin）、カラビシン（carabicin）、カルミノマイシン、カルジノフィリン（carzinophilin）、クロモマイシン、ダクチノマイシン、デトルビシン（detorbicin）、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、アドリアマイシン（adriamycin）、エピルビシン、エソルビシン、イダルビシン、マーセロマイシン（marcellomycin）、マイトマイシンC、マイコフェノール酸（mycophenolic acid）、ノガラマイシン（nogalamycin）、オリボマイシン（olivomycins）、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン（potfiromycin）、ピューロマイシン、ケラマイシン（quelamycin）、ロドルビシン（rodorubicin）、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン（tubercidin）、ウベニメクス、ジノスタチン（zinostatin）、ゾルビシン（zorubicin）、デノプテリン（denopterin）、プテロプテリン（pteropterin）、トリメトレキセート（trimetrexate）、フルダラビン（fludarabine）、6-メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニン、アンシタビン、アザシチジン（azacitidine）、6-アザウリジン（azauridine）、カルモフール、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン（enocitabine）、フロキシウリジン（floxuridine）、アンドロゲン類、カルステロン（calusterone）、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトン（testolactone）、アミノグルテ

チミド、ミトタン、トリロスタン、フロリン酸（frolinic acid）、アセグラトン、アルドホスファミドグリコシド、アミノレブリン酸、エニルウラシル、アムサクリン（amsacrine）、ベストラブシル（bestrabucil）、ビサントレン（bisantrene）、エダトラキセート（edatraxate）、デフォファミン（defofamine）、デメコルシン（demecolcine）、ジアジコン（diaziquone）、エルフォルニチン（elfornithine）、酢酸エリプチニウム（elliptinium）、エポチロン（epothilone）、エトグルシド（etoglucid）、レンチナン、ロニダミン（lonidamine）、メイタンシン（maytansine）、アンサミトシン（ansamitocine）、ミトグアゾン（mitoguazone）、ミトキサントロン、モピダンモール（mopidanmol）、ニトラエリン（nitraerine）、ペントスタチン、フェナメット（phenamet）、ピラルビシン、ロソキサントロン（losoxantrone）、ポドフィリン酸（podophyllinic acid）、2-エチルヒドラジド、プロカルバジン、ラゾキサン（razoxane）、リゾキシン、シゾフィラン、スピロゲルマニウム（ｓｐｉｒｏｇｅｒｍａｎｉｕｍ）、テニュアゾン酸（tenuazonic acid）、トリアジコン（triaziquone)、ロリジン(roridine) A、アングイジン（anguidine）、ウレタン、ビンデシン、ダカーバジン、マンノムスチン（mannomustine）、ミトブロニトール、ミトラクトール（mitolactol）、ピポブロマン（pipobroman）、ガシトシン（gacytosine）、ドキセタキセル、クロランブシル、ゲムシタビン（gemcitabine）、6-チオグアニン、メルカプトプリン、シスプラチン、オキサリプラチン、カルボプラチン、ビンブラスチン、エトポシド、イホスファミド、マイトキサントロン、ビンクリスチン、ビノレルビン、ノバントロン（novantrone）、テニポシド、エダトレキセート（edatrexate）、ダウノマイシン、アミノプテリン、キセローダ（xeloda）、イバンドロナート（ibandronate）、イリノテカン、トポイソメラーゼインヒビター、ジフルオロメチロールニチン（DMFO）、レチノイン酸、及びカペシタビン（capecitabine）等を挙げることができる。

[0127] 本発明により、上記のがん治療剤に加えて他のがん治療剤や薬学的に許容可能な担体を含む、がんの治療用組成物も提供される。

[0128] 「薬学的に許容可能な担体」とは、製剤技術分野において通常使用する添加剤をいう。例えば、溶媒、植物性油、基剤、乳化剤、懸濁化剤、界面活性剤、pH調整剤、安定化剤、賦形剤、ビヒクル、防腐剤、結合剤、希釈剤、等張化剤、鎮静剤、増量剤、崩壊剤、緩衝剤、コーティング剤、滑沢剤、着色剤、甘味剤、増粘剤、矯味剤、溶解助剤、及び他の添加剤が挙げられる。

[0129] 溶媒には、例えば、水若しくはそれ以外の薬学的に許容し得る水溶液、又は薬学的に許容される有機溶剤のいずれであってもよい。水溶液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助剤を含む等張液、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液が挙げられる。補助剤としては、例えば、D-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウム、その他にも低濃度の非イオン性界面活性剤、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル類等が挙げられる。

[0130] 上記担体は、有効成分である抗CLDN16抗体又はその断片の生体内での酵素等による分解を回避又は抑制する他、製剤化や投与方法を容易にし、剤形及び薬効を維持するために用いられるものであり、必要に応じて適宜使用すればよい。

[0131] 本発明のがん治療剤又はがん治療用組成物を投与する対象は、哺乳動物であり、例えば霊長類、ペット動物、家畜類、競技用動物等を含む哺乳動物であり、特にヒトが好ましい。

[0132] 本発明のがん治療剤又はがん治療用組成物の好ましい投与形態には特定の限定はない。例えば、経口投与又は非経口投与であればよい。非経口投与の具体例として、静脈内投与、動脈内投与、腹腔内投与、皮下投与、皮内投与、筋肉内投与、及び輸血による投与が挙げられる。投与形態は、患者の年齢、体重、性別、症状等により適宜選択することができる。

[0133] 抗体又はその断片の投与量としては、例えば、1回につき体重1kg当たり0.0001 mgから1000 mgの範囲、又は患者当たり0.001 mg/body～100000 mg/bodyの範囲で投与量を選ぶことができるが、これらの数値に必ずしも制限されるものではない。

[0134] 本発明のがん治療剤又はがん治療用組成物の投与は、単回投与でも、複数回投与であってもよい。複数回投与の場合、毎日若しくは適当な時間間隔で（例えば1日、2日、3日、1週間、2週間、1ヶ月の間隔で）、例えば2～20回等投与することもできる。上記のがん治療剤又はがん治療用組成物の1回の抗体又はその断片の投与量は、例えば、0.001mg/kg以上、0.005mg/kg以上、0.01mg/kg以上、0.25mg/kg以上、0.5mg/kg以上、1.0mg/kg以上、2.0mg/kg以上、3.0mg/kg以上、4.0mg/kg以上、5mg/kg以上、10mg/kg以上、20mg/kg以上、30mg/kg以上、40mg/kg以上、50mg/kg以上、75mg/kg以上、100mg/kg以上、150mg/kg以上、200mg/kg以上、300mg/kg以上、400mg/kg以上、若しくは500mg/kg以上とすることができ、例えば、0.001mg/kg～500mg/kgの範囲に含まれる任意の量（例えば、0.001mg/kg、0.01mg/kg、0.1mg/kg、1mg/kg、5mg/kg、10mg/kg、50mg/kg、100mg/kg、若しくは200mg/kg）を適宜選択することができる。

実施例

[0135] 以下に実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、この実施例は単なる一例示に過ぎず、本発明は実施例に記載の範囲に限定されるものではない。

[0136] ＜実施例１：卵巣がん細胞表面に特異的に発現している遺伝子の同定＞

（目的）

がんの新たなバイオマーカーを同定する。

[0137] （方法と結果）

様々ながん組織と正常組織におけるCLDN16遺伝子の発現データをThe Cancer Genome Atlasデータベース（TCGAデータベース）及びThe Genotype-Tissue Expressionデータベース（GTExデータベース）を用いて収集した。

[0138] 図1は、様々ながん組織におけるCLDN16遺伝子の発現量を示す。CLDN16遺伝子は、卵巣がん（OV, Ovarian serous cystadenocarcinoma）及び甲状腺がん（THCA, Thyroid carcinoma）において強い発現が検出された。また、子宮体がん（UCEC, Uterine Corpus Endometrial Carcinoma）においてもCLDN16遺伝子の中等度の発現が検出された。卵巣がん（OV）、子宮体がん（UCEC）、及び甲状腺がん（THCA）に加えて、肺がん（LUAD, Lung adenocarcinoma; LU

SC, Lung squamous cell carcinoma）、食道がん（ESCA, Esophageal carcinoma）、胃がん（STAD, Stomach adenocarcinoma）、大腸がん（結腸がん（COAD, Colon adenocarcinoma）及び直腸がん（READ, Rectum adenocarcinoma）を含む）、膀胱がん（BLCA, Bladder Urothelial Carcinoma）、子宮頚がん（CESC, Cervical squamous cell carcinoma and endocervical adenocarcinoma）、腎がん（KICH, Kidney Chromophobe; KIRC, Kidney renal clear cell carcinoma; KIRP, Kidney renal papillary cell carcinoma）、肝がん（LIHC, Liver hepatocellular carcinoma）、膵がん（PAAD, Pancreatic adenocarcinoma）、及び頭頸部がん（HNSC, Head and Neck squamous cell carcinoma）においても、CLDN16遺伝子の発現の上昇が検出された。

[0139] 図2は、成体の様々な正常組織及びがん組織におけるCLDN16遺伝子の発現量を示す。卵巣、子宮、及び甲状腺を含む様々な正常組織においては、CLDN16遺伝子の強い発現は検出されなかった。様々な正常組織（Normal(GTEx)）におけるCLDN16遺伝子の発現はがん組織（Cancer(TCGA)）に比べて極めて弱かった。

[0140] 以上の結果から、CLDN16遺伝子の発現が、卵巣がん、子宮体がん、甲状腺がん、肺がん、食道がん、胃がん、大腸がん（結腸がん及び直腸がんを含む）、膀胱がん、子宮頚がん、腎がん、肝がん、膵がん、及び頭頸部がん、特に卵巣がん、子宮体がん、及び甲状腺がんを特異的かつ高感度で検出し得るバイオマーカーとなり得ることが示された。

[0141] ＜実施例２：抗CLDN16モノクローナル抗体の作製＞

（目的）

CLDN16タンパク質を特異的かつ高感度で検出可能なモノクローナル抗体（抗CLDN16モノクローナル抗体；以下、単に「抗CLDN16抗体」と表記する場合もある）を開発する。

[0142] （方法と結果）

（１）抗原ペプチドの設計

抗原ペプチドとして、CLDN16の第１細胞外領域（EC1）においてクローディ

ンファミリーでの相同性が低い領域を選択した（図3）。具体的には、配列番号9で示すヒトCLDN16タンパク質の55～69位（開始メチオニンを1位とする）に相当するアミノ酸配列（FDGIRTCDEYDSILA、配列番号11）のN末端側にシステインを付加したアミノ酸配列（CFDGIRTCDEYDSILA、配列番号20）からなるペプチドを使用した。

[0143] （２）抗原ペプチドの調製

モノクローナル抗体の作製は、Kishiro Y, et al., 1995, Cell Struct Funct, 20(2):151-6に記載の方法に基づき、以下の手順で行った。

[0144] Imject(商標) Maleimide Activated mcKLH (Thermo Fisher Scientific) 2 mgを200 μLの超純水に溶解して10 mg/mLのKLH溶液を調製した。抗原ペプチドを超純水で溶解して、5 mg/mLの抗原ペプチド溶液とした。各々200 μLのKLH溶液と抗原ペプチド溶液を混合し、室温で2時間静置した。混合液からKLH溶液由来のEDTAを除去するため、煮沸した透析膜に移して、PBSを外液として透析を行った。得られた溶液を抗原溶液とした。2 mLルアーロック式ガラス注射器を用いて、500 μLの抗原溶液と1 mLのフロイント完全アジュバント（Sigma-Aldrich）を混和して乳化し、抗原エマルジョンを調製した。

[0145] （３）免疫

麻酔した8週齢の雌ラット（Wistar系）の両後肢に100 μLの抗原エマルジョンを注射し、免疫した。

[0146] （４）ポリエチレングリコール（PEG）溶液の調製

5 gのPEG（P2906, Sigma-Aldrich）を70℃に加温し溶解した。8 mLのダルベッコ改変イーグル培地（高グルコース; DMEM; D5796, Sigma-Aldrich）に0.4 mLのジメチルスルホキシド（D2650, Sigma-Aldrich）を加え、50℃に加温した。これを溶解したPEGに加え、素早く混和してPEG溶液を調製した。

[0147] （５）細胞融合と細胞培養

免疫14日後のラットより腸骨リンパ節を摘出し、1 mLのDMEMと共に滅菌シャーレに置いた。リンパ節を鋏で細断した後、100 μmのセルストレーナー（BD Falcon）で濾過した。前記シャーレに約10^7個のマウス多発性骨髄腫細胞株

SP2を加えて、ピペットでよく混和した後、1,200 rpm/minで5分間遠心分離し、上清を吸引除去した。37℃のPEG溶液を約1分間かけて緩徐に滴下した後、2分間放置し、その後、5分間かけて9 mLのDMEM培地を緩徐に滴下した。900 rpm/minで5分間遠心分離し、上清を吸引除去した。ハイブリドーマ培地（78% GIT培地[和光富士フイルム工業株式会社], 2% HAT Supplement [Thermo Fisher Scientific], 10% BM Condimmed H1 Hybridoma Cloning Supplement [Roche], 10%ウシ胎児血清）を40 mL加えて、100 μLずつ96穴培養皿4枚に播種した後、37℃のCO_2インキュベーターで培養した。

[0148] （６）スクリーニング

培養7日後に100 μLのハイブリドーマ培地で培地交換を行った。交換2日後の培養上清50 μLを用いてELISA法により陽性のクローンをスクリーニングした。スクリーニングは以下の手順で行った。

[0149] まず、前述の抗原ペプチド溶液を含むペプチド溶液を3 μg/mLに調整し、96穴ELISAプレートのウェルに50 μLずつ加えて、4℃で一晩静置した。その後、各ウェルから抗原ペプチド溶液を除去して、200 μLの0.1% Tween20加トリス塩酸緩衝液（TBS-T）で1回洗浄した後、ブロッキング液（1%ウシ血清アルブミン/TBS）200 μLを加えて37℃で1時間静置した。その後、各ウェルからブロッキング液を除去して、200 μLのTBS-Tで1回洗浄した後、50 μLの培養上清を加えて、37℃で1時間反応させた。各ウェルから培養上清を除去した後、200 μLのTBS-Tで3回洗浄した。続いて、各ウェルにブロッキング液で2,000倍希釈したECL（商標）Rat IgG, HRP-linked whole antibody (Cytiva)を二次抗体として50 μL加え、37℃で1時間反応をさせた。その後、各ウェルから二次抗体液を除去して、TBS-Tで3回洗浄した後、TMB Substrate Set (BioLegend）によりメーカーが推奨する方法で発色させて、その490 nmの波長における吸光度（OD_{490}）を測定した。

[0150] 陽性クローンは6穴培養皿で継代培養した後、コンフルエンシーが概ね50%に達した時点で10 cm培養皿に移して、さらに増殖させた。

[0151] 287クローンのうち、ELISAによるスクリーニングでは66種類の陽性クロー

ンが得られた。さらに、ホルマリン固定／パラフィン包埋標本を用いた免疫組織化学染色では、1種類のクローンのみで陽性シグナルが検出された（以下、「実施例２で得られた抗CLDN16モノクローナル抗体クローン」又は単に「抗CLDN16抗体クローン」は呼ぶ）。以上から、ELISAでの反応性が高く、かつ免疫染色においてCLDN16タンパク質を特異的かつ高感度で検出できる利点を同時に達成するクローンが得られた。

[0152] ＜実施例３：抗CLDN16モノクローナル抗体クローンの抗原特異性の検証＞

（目的）

実施例２で得られた抗CLDN16モノクローナル抗体クローンについて、免疫組織化学染色により抗原特異性を検証する。

[0153] （方法と結果）

配列番号9で示すアミノ酸配列からなるヒト野生型CLDN16タンパク質を発現するベクターをHEK293T細胞にポリエチレンイミン“MAX”（24765-1，コスモバイオ）で一過性導入し、2日後に擦過により細胞を回収した。10%中性ホルマリンで4℃、16時間固定し、1 mLのPBSで1回洗浄した。1%アルギン酸ナトリウム溶液1 mLを加え細胞塊を1 mL用チップの先端を切った先太チップでゆるやかに懸濁後、2,000 rpmで5分間遠心して細胞をペレット化した。その後、上清を除去し、1 Mの塩化カルシウム水溶液を1 mL加え、細胞のペレットをゲル化した。その後ゲル化したペレットのみをカセットに入れ、自動固定包埋装置（Tissue-Tek VIP（登録商標） 5 Jr，サクラファインテックジャパン）とパラフィン包埋ブロック作製装置（Tissue-Tek（登録商標） TEC（商標），サクラファインテックジャパン）を用いてホルマリン固定パラフィン包埋ブロックを作製した。ブロックは滑走型ミクロトームを用いて3 μmの厚さに薄切し、剥離防止コートスライドガラス（CRE-12，松波硝子工業株式会社）に乗せ、室温にて乾燥させた。

[0154] 標本はキシレン中で10分間脱パラフィンを行い、続いて100%エタノール中で脱キシレンを行った。0.3%過酸化水素/メタノールで10分間処理し、内因性ペルオキシダーゼを失活させた後、トリス塩酸緩衝液(TBS)で5分間洗浄し

た。10 mMトリス，1 mMエチレンジアミン四酢酸溶液pH9.0中にて、電子レンジを用いて10分間抗原賦活化を行った。標本は室温に戻したのちにTBSで5分間標本を洗浄し、内因性アビジン・ビオチンブロッキングキット(415041、ニチレイバイオサイエンス)とTBSで0.5%に希釈したカゼイン(C3400、EMD Millipore)溶液を用いて一次抗体の非特異的反応を防止した。反応時間は前者は10分間を2回、後者は10分間、全て室温で反応させた。その後、標本を実施例２で得られた抗CLDN16モノクローナル抗体を一次抗体として4℃で一昼夜反応させた。0.1% Tween20を添加した改変トリス塩酸緩衝液(TBS2T; 11.6 mM トリズマベース、38 mMトリズマ塩酸塩、及び300 mM塩化ナトリウム)で5分間3回洗浄し、チラミド増幅液（20%デキストラン硫酸ナトリウム5000、0.2 Mトリス塩酸pH8.8）にて100倍に希釈したビオチン標識チラミドを室温で15分間反応させた。TBS2Tで5分間3回洗浄した後、改変トリス塩酸緩衝(TBS2)で500倍に希釈した西洋わさびペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン(P0397,アジレントテクノロジー)と室温で15分間反応させた。TBS2Tで5分間3回洗浄した後、DAB基質キット(425011、ニチレイバイオサイエンス)中で適当な染色像が得られるまで反応させた。核染色はティシュー・テック（登録商標）ヘマトキシリン3G（サクラファインテックジャパン株式会社）溶液中で5秒間振り洗いを行い、流水で10分間洗浄した。次に0.5%塩酸/70%エタノール溶液中で5秒間振り洗いを行い、余分なヘマトキシリンを除いた。100%エタノールを用いて標本の脱水、キシレンにより透徹処理を行い、プレパラート自動封入機（白井松器械株式会社）を用いてプレパラートを作製した。

[0155] 同様の方法により、CLDN16タンパク質発現用のベクターを導入していないHEK293T細胞、ヒト野生型CLDN16タンパク質のN末端側又はC末端側にHAタグを融合させた融合タンパク質（以下、それぞれ「HA-CLDN16」及び「CLDN16-HA」と称する）を発現するベクターを導入したHEK293T細胞、並びにヒト野生型のCLDN3、CLDN4、CLDN5、CLDN6、CLDN7、CLDN8、CLDN9、CLDN12、又はCLDN19タンパク質を発現するベクターを導入したHEK293T細胞を作製し、各細胞について免疫染色を行った。

[0156] 抗CLDN16モノクローナル抗体による免疫染色の結果を図4及び図5に示す。CLDN16タンパク質発現用のベクターが導入されていないHEK293T細胞ではCLDN16陽性シグナルが全く認められない一方で、ヒト野生型CLDN16タンパク質、HA-CLDN16タンパク質又はCLDN16-HAタンパク質を発現させたHEK293T細胞ではCLDN16陽性シグナルが認められた（図4）。CLDN16以外のクローディンを発現させたHEK293T細胞ではCLDN16陽性シグナルが全く認められず、クローディンファミリーの中ではCLDN16タンパク質を発現させたHEK293T細胞のみがCLDN16陽性シグナルを示した（図5）。

[0157] 以上の結果から、実施例２で得られた抗CLDN16モノクローナル抗体は、CLDN16を免疫染色において特異的かつ高感度で検出することができる上、他のクローディンとは交差反応性を示さない、極めて有用な抗体であることが明らかになった。

[0158] ＜実施例４：抗CLDN16モノクローナル抗体のCDR配列決定＞

（目的）

実施例２で得られた抗CLDN16モノクローナル抗体クローンのCDR配列を決定する。

[0159] （方法と結果）

抗CLDN16モノクローナル抗体クローンの重鎖及び軽鎖の各可変領域及び各CDRの配列を決定した。具体的には、まずハイブリドーマに1 mLのTRIzol（登録商標）試薬（サーモフィッシャーサイエンティフィック）と200 μLのクロロホルムを混和し、4℃、15,000回転／分にて15分間遠心した。次にmRNAが含まれる水相と等量のイソプロパノールを混和し、4℃、15,000回転／分にて15分間遠心しmRNAを抽出した。最後に1 mLの70%エタノールを加えてmRNAの脱塩を行い50 μLの水に溶解し、NanoDrop（登録商標）2000によりmRNAの濃度を定量した。

[0160] CDRの決定には5'-Full RACE Core Set（タカラバイオ株式会社）を用いた。実験は全て取扱説明書及び添付の試薬を用いて行い、得られたDNA断片をpGEM（登録商標）-T Easy Vector（プロメガ）にクローニングした後に、DNAシ

ークエンスを行った。DNAシークエンスはマクロジェンジャパン株式会社で行い、CDRの同定はKabatの抗体ナンバリングシステムに従った。

[0161] 抗CLDN16モノクローナル抗体クローンの重鎖及び軽鎖の各可変領域及び各CDRの配列を決定した結果（図6）を以下に示す。

[0162] 重鎖可変領域のアミノ酸配列：DRQMGLLLCLVTFPRCVLSQVQLEESGPGLVQPSQTLSLTCTVSGFSLTSNGVSWVRQPPGKGLEWIAAISSAGNTYYNSALKSRLSISRDTSKSQVFLKMNSLQTEDTAIYFCNTLYYGYNRGYFDYWGQGVMVTVSSAETTAPSVYP（配列番号7）

軽鎖可変領域のアミノ酸配列：MTQTPVSLSVSLGGQVSISCRSSQSLVHNNGNTYLSWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGISDRFSGSGSGTDFTLKISRVEPDDLGVYYCGQGTQYPLTFGSGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSMEHEMVSWTVLLIRTPKTARTA（配列番号8）

重鎖CDR1のアミノ酸配列：GFSLTSN（配列番号1）

重鎖CDR2のアミノ酸配列：SSAGN（配列番号2）

重鎖CDR3のアミノ酸配列：LYYGYNRGYFDY（配列番号3）

軽鎖CDR1のアミノ酸配列：RSSQSLVHNNGNTYLS（配列番号4）

軽鎖CDR2のアミノ酸配列：KVSNRFS（配列番号5）

軽鎖CDR3のアミノ酸配列：GQGTQYPLT（配列番号6）

[0163] ＜実施例５：CLDN16タンパク質の機能解析＞

（目的）

CLDN16タンパク質を過剰発現する卵巣癌細胞株AMOC2を作製し、その増殖能、遊走能、及び浸潤能に対する影響を検討する。

[0164] （方法）

（１）CLDN16タンパク質を過剰発現する卵巣癌細胞株の作製

形質導入用の細胞株として卵巣癌細胞株AMOC2を使用した。AMOC2は、札幌医科大学の斎藤豪博士より分与されたものを使用した。AMOC2細胞の培養液には、10%ウシ胎児血清とペニシリン・ストレプトマイシン・アンフォテリシンBの混合液(富士フイルム和光純薬)1%を添加したダルベッコ改変イーグル培地(DMEM, 富士フイルム和光純薬)を使用した。以降この培地をDMEM(10%FBS+1%PS)培地と表記する。配列番号9で示すアミノ酸配列からなるヒト野生型

CLDN16タンパク質を発現するベクター、又は陰性対照としてEGFPを発現するベクターをレンチウイルスにパッケージし、最終濃度10 μg/mLのポリブレン溶液(12996-81、ナカライテスク)を用いて導入しCLDN16発現卵巣癌細胞株#1、CLDN16発現卵巣癌細胞株#2、及びEGFP発現卵巣癌細胞株の各細胞株を作製した。

[0165] 次に、CLDN16発現卵巣癌細胞株#1及びCLDN16発現卵巣癌細胞株#2において、CLDN16タンパク質が過剰発現していることをウエスタンブロット法により検証した。CelLytic (商標) MT Cell Lysis Reagent (Sigma-Aldrich)にタンパク質分解酵素阻害剤 Complete mini EDTA-free (Roche Diagnostics)を1タブレット/10mLの濃度で添加した可溶化液を用いてタンパク質を抽出した。標準プロトコルに従ってSDS-PAGE、転写、及び抗体反応を順に行い、EzWestLumi PlusECL (アトー)によって化学発光させて、CCDイメージャーImage Quant LAS4000 (GE Healthcare)を用いて撮像した。一次抗体は、500倍に希釈した抗CLDN16抗体（生理学研究所の古瀬幹夫博士より供与）を用いて4℃で一晩、二次抗体は、2,000倍に希釈したECL(TM) Rabbit IgG, HRP-linked whole antibody (Sigma-Aldrich)を用いて1時間反応させた。希釈液はCan Get Signal (登録商標) Immunoreaction Enhancer Solution (東洋紡)を用いた。ウエスタンブロットの結果を図7Aに示す。CLDN16発現卵巣癌細胞株#1及びCLDN16発現卵巣癌細胞株#2において、CLDN16タンパク質が過剰発現していることが確認された。

[0166] （２）増殖能の評価

細胞増殖能は、以下の方法により評価した。上記（１）に記載の方法で得られた各細胞株を10 cm皿で培養し、上記実施例３と同様の方法でホルマリン固定パラフィン包埋標本を作製した。標本はキシレン中で10分間脱パラフィンを行い、続いて100%エタノール中で脱キシレンを行った。0.3%過酸化水素/メタノールで10分間処理し、内因性ペルオキシダーゼを失活させた後、リン酸生理食塩水(PBS)で5分間洗浄した。10 mMクエン酸溶液pH6.0に入れ、電子レンジを用いて10分間抗原賦活化を行った。室温に戻したのちにPBSで5分

間標本を洗浄し、PBSで5%に希釈スキムミルク(森永乳業)溶液を用いて一次抗体の非特異的反応を防止した。その後、標本をKi-67抗体(M7240、アジレントテクノロジー)を一次抗体として4℃で一昼夜反応させた。PBSで5分間3回洗浄し、2次抗体としてヒストファイン シンプルステインラットMAX-PO(MULTI)(424151,ニチレイバイオサイエンス)と室温で60分間反応させた。PBSで5分間3回洗浄した後、DAB基質キット(425011、ニチレイバイオサイエンス)中で適当な染色像が得られるまで反応させた。核染色はティシュー・テック（登録商標）ヘマトキシリン3G（サクラファインテックジャパン株式会社）溶液中で5秒間振り洗いを行い、流水で10分間洗浄した。次に0.5%塩酸/70%エタノール溶液中で5秒間振り洗いを行い、余分なヘマトキシリンを除いた。100%エタノールを用いて標本の脱水、キシレンにより透徹処理を行い、プレパラート自動封入機（白井松器械株式会社）を用いてプレパラートを作製した。陽性細胞数をImageJを用いて算出し、統計解析を行った。

[0167] （３）遊走能の評価

細胞遊走能アッセイは、以下の方法によって行った。まず24ウェルプレートの各ウェルにDMEM(10%FBS+1%PS)培地を500 μL入れ、24ウェル用カルチャーインサート(#353-097, Corning)を入れた。さらに24ウェル用カルチャーインサートの内部に培養細胞を1×10^5個入れ、培養用インキュベーター(37℃、5%CO_2、95%Air)で24時間培養した。遊走細胞数の測定は、まず24ウェル用カルチャーインサートをPBSで洗浄し、4%パラホルムアルデヒド溶液で室温10分間固定を行った。再度PBSで洗浄した後に0.2%クリスタルバイオレット溶液を用いて室温10分間細胞を染色した。最後に24ウェル用カルチャーインサート内部の細胞を綿棒で除去、外部の細胞数をImageJで算出し、これを遊走細胞数とした。

[0168] （４）浸潤能の評価

浸潤能アッセイは、以下の方法により行った。まず24ウェルプレートの各ウェルにDMEM(10%FBS+1%PS)培地を500 μL入れ、BioCoat（登録商標）マトリゲルインベージョンチャンバー(#354480, Corning)を入れた。さらにBioCo

at（登録商標）マトリゲルインベージョンチャンバーの内部に培養細胞を1×10^5個入れ、培養用インキュベーター(37℃、5%CO2、95%Air)で24時間培養した。浸潤細胞数の測定は、まずBioCoat（登録商標）マトリゲルインベージョンチャンバーをリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で洗浄し、4%パラホルムアルデヒド溶液で室温10分間固定を行った。再度PBSで洗浄した後に0.2%クリスタルバイオレット溶液を用いて室温10分間細胞を染色した。最後にBioCoat（登録商標）マトリゲルインベージョンチャンバー内部の細胞を綿棒で除去、外部の細胞数をImageJで算出し、これを浸潤細胞数とした。

[0169] （結果）

CLDN16発現卵巣癌細胞株#1及び#2、並びにEGFP発現卵巣癌細胞株について増殖能、遊走能、及び浸潤能を評価した結果をそれぞれ図7B、図8、及び図9に示す。CLDN16発現卵巣癌細胞株#1及び#2は、いずれもEGFP発現卵巣癌細胞株と比較して増殖能、遊走能、及び浸潤能の顕著な亢進を示した。これらの結果から、CLDN16は卵巣癌細胞の悪性度を増強し得ることが明らかになった。

[0170] ＜実施例６：生細胞表面のCLDN16タンパク質に対する抗体結合能の検証＞

（目的）

実施例２で得られた抗CLDN16モノクローナル抗体について、生細胞表面のCLDN16タンパク質に対する結合特異性をフローサイトメトリーにより検証する。

[0171] （方法と結果）

実施例３と同様の方法により、ベクターを導入していないHEK293T細胞、ヒト野生型CLDN16タンパク質を発現するベクターを導入したHEK293T細胞、及びEGFPタンパク質を発現するベクターを導入したHEK293T細胞を用意した。

[0172] フローサイトメトリーは、以下の方法で行った。細胞懸濁液に対して、最終濃度100 μg/mLとなるように一次抗体として抗CLDN16抗体又は正常ラットIgG抗体（147-09521、富士フイルム和光純薬）を加えた。その後、Alexa647標識抗ラットIgG抗体（563-78551、富士フイルム和光純薬）により抗体結合細

胞を染色し、フローサイトメトリー(On-chip Flow、On-chipバイオテクノロジーズ)により蛍光を解析した。

[0173] 結果を図10に示す。ベクターを導入していないHEK293T細胞、及びEGFPタンパク質を発現するベクターを導入したHEK293T細胞では抗体結合が検出されなかったのに対して、ヒト野生型CLDN16タンパク質を発現するベクターを導入したHEK293T細胞では抗CLDN16モノクローナル抗体の結合が検出された。以上の結果から、抗CLDN16モノクローナル抗体が生細胞表面上のCLDN16タンパク質を特異的に認識し得ることが示された。

[0174] ＜実施例７：抗CLDN16抗体のがん細胞内への取り込みの検証＞

（目的）

実施例２で得られた抗CLDN16モノクローナル抗体ががん細胞の細胞内に取り込まれ得ることを検証する。

[0175] （方法と結果）

実施例５の（１）と同様の方法により、野生型CLDN16タンパク質を過剰発現するCLDN16発現卵巣癌細胞株及びEGFP発現卵巣癌細胞株を作製した。

[0176] 細胞培養液に対して、最終濃度10 μg/mLとなるように抗CLDN16モノクローナル抗体又はラットIgG抗体（17316、株式会社免疫生物研究所）を加えた。培養用インキュベーター(37℃、5%CO_2、95%Air)で3時間培養し、PBSで3回洗浄した後に4%パラホルムアルデヒド溶液を用いて10分間固定した。PBSで3回洗浄後、0.1%TritonX-100/PBS溶液を加えて10分間細胞膜の透過処理を行い、5%スキムミルクを用いて30分間ブロッキングを行った。続いてCy3標識抗ラットIgG抗体(564-71901、富士フイルム和光純薬)を加えて抗体結合細胞を染色することにより、がん細胞内に取り込まれた抗体を検出した。

[0177] 結果を図11に示す。EGFP発現卵巣癌細胞株では抗CLDN16抗体の取り込みが検出されなかったのに対して、CLDN16発現卵巣癌細胞株では抗CLDN16抗体の細胞内取り込みが検出された（図11、矢印）。矢頭は細胞表面におけるCLDN16シグナルを示す。一方、ラットIgG抗体についてはCLDN16発現卵巣癌細胞株に取り込まれなかった。以上の結果から、抗CLDN16モノクローナル抗体は、C

LDN16タンパク質に基づいて卵巣癌細胞の細胞内に取り込まれ得ることが示された。この結果は、本発明の抗CLDN16抗体が卵巣癌細胞への抗腫瘍剤等の薬物送達を可能とし、癌細胞を特異的に死滅させ得ることを示している。

[0178] ＜実施例８：抗CLDN16抗体によるがん細胞傷害効果の検証＞

（目的）

実施例２で得られた抗CLDN16モノクローナル抗体ががん細胞に対して細胞傷害効果を示すことを検証する。

[0179] （方法と結果）

実施例５の（１）と同様の方法により、野生型CLDN16タンパク質を過剰発現する卵巣癌細胞株を作製した（以下、「CLDN16発現卵巣癌細胞」という）。

[0180] CLDN16発現卵巣癌細胞を96ウェルプレートに播種し、DMEM(10%FBS+1%PS)培地を用いて培養した。細胞傷害毒素MMAF（Monomethyl Auristatin F）を結合した抗ラットIgG抗体（AR101-AF, Moradec；以下、「ADC-rat IgG」と称する）1.5 μg及びラット抗CLDN16モノクローナル抗体3 μgを培地に添加した。24時間の培養後、MTS試薬（CellTiter96 Aqueous One Solution, G3580, Promega）を各ウェルに添加して細胞生存アッセイを行った。MTS試薬は、生細胞によって還元されると有色のホルマザン産物に変換されるため、490nmの吸光度を測定することによって培地中の生細胞数を評価することができる。

[0181] 細胞生存アッセイの結果を図12に示す。いずれの抗体も細胞に与えなかった無処置群、及びADC-rat IgGのみを細胞に与えた対照群では、細胞傷害効果は認められなかった。一方、抗CLDN16モノクローナル抗体とADC-rat IgGとを組み合わせてCLDN16発現卵巣癌細胞株に処置した群では、顕著な細胞傷害効果が惹起された。この結果は、本発明の抗CLDN16抗体が、CLDN16発現卵巣癌細胞を特異的に死滅させ得ることを示している。

[0182] ＜実験例９：正常組織における免疫組織化学＞

（目的）

実施例２で得られた抗CLDN16抗体を用いて、ヒト正常組織におけるCLDN16

タンパク質の発現を評価した。

[0183] （方法と結果）

（１）組織標本の収集

福島県立医科大学附属病院にて2013年から2014年の間に病理解剖が実施された患者15人を対象として組織標本を収集しCLDN16発現を評価した。組織材料の収集にあたっては、福島県立医科大学倫理委員会の承認（承認番号2019-0311）を受け、臨床研究に関わる倫理指針を遵守して実施した。

[0184] （２）免疫組織化学染色及びCLDN16発現量の評価

採取されたヒト正常組織は全て10％ホルマリン固定後にパラフィン包埋し、ヘマトリシリン・エオシン（Hematoxylin eosin：HE）染色と免疫組織化学染色を行った。免疫組織化学染色は実施例３と同様に実施した。

[0185] ヒト正常組織におけるCLDN16染色結果の一例を図13に示す。CLDN16は、腎の一部の正常組織で発現しているが、他の正常組織（脳、心臓、肝臓、肺、卵巣、甲状腺）には発現していないことが明らかになった。

[0186] ＜実施例１０：卵巣がん組織における免疫組織化学、及びそれに基づく無病生存率解析及び臨床病理学的解析＞

（目的）

実施例２で得られた抗CLDN16抗体を用いて、卵巣がん組織におけるCLDN16タンパク質を検出し、CLDN16の発現と予後との関係を明らかにする。

[0187] （方法と結果）

（１）組織標本の収集

福島県立医科大学附属病院にて2003年から2015年までの間に卵巣がんの診断で手術を受けた患者173人、いわき市医療センターにて2010年から2015年までに卵巣がんの診断で手術を受けた患者76人を対象として組織標本を収集し、合計249例についてCLDN16発現を評価した。対象症例は診断から3～5年間の生存情報が判明している患者に限り、原疾患に依らない死亡症例については対象から除外した。組織材料の収集にあたっては、福島県立医科大学倫理委員会の承認（承認番号2019-0311）を受け、臨床研究に関わる倫理指針を遵守

して実施した。

[0188] （２）免疫組織化学染色及びCLDN16発現量の評価

採取された卵巣がん組織は全て10%ホルマリン固定後にパラフィン包埋し、ヘマトリシリン・エオシン（Hematoxylin eosin：HE）染色と免疫組織化学染色を行った。免疫組織化学染色は実施例３と同様に実施した。

[0189] 転帰等の患者背景をマスキングした上で、2名の病理医がImmunoreactive score（IRS；Remmele et al., 1986, Virchows Arch, 409: 127-147)を一部改変した方法を用いて染色性を半定量評価した。具体的には、陽性細胞の割合（%）に基づいて、Positive Proportion (PP)=0（1%未満）、PP=1（1%～10%）、PP=2（11%～30%）、PP=3（31%～50%）、及びPP=4（51%以上）に分類した。次に、染色強度に基づいて、Signal Intensity (SI)=0（なし）、SI=1（弱）、SI=2（中程度）、及びSI=3（強）に分類した。PP及びSIを乗じた値をIRSスコアとした。さらに大部分の症例においてPP=3又はPP=4であったことから、SIスコアに基づいて、SIスコア0/1/2を低CLDN16群、SIスコア3を高CLDN16群として評価した。

[0190] 卵巣がん組織（陰性、弱陽性、中程度陽性、及び強陽性）におけるCLDN16染色結果の一例を図14に示し、SI、PP、及びIRSの解析結果を図15に示す。CLDN16は、卵巣がん症例の大部分で発現していることが明らかになり、卵巣がん症例の8割強で中等度以上の発現を示すことが明らかになった。

[0191] （３）臨床病理学的解析

249症例の卵巣がん患者について、臨床病理学的解析を実施した。CLDN16は、上記（２）と同様にSIスコアに基づき評価を行い、解析にはStatFlex Ver. 7.0.11(アーテック、大阪)を用いた。

[0192] まず、各臨床病理学的因子とCLDN16発現（低CLDN16発現又は高CLDN16発現）との関連性を解析した結果を図16及び図17に示す。図16及び図17では、高CLDN16発現は、ステージ（FIGO Stage）、組織型（Histological type）、pT（T classification(pT)）、及び腹膜播種（Peritoneal dissemination）と有意な相関を示した一方で、従来の代表的な卵巣がんマーカーとして知られ

るCancer antigen 125（CA-125）とは有意な相関を示さなかった。

[0193]（４）無再発生存率の解析

次に、低CLDN16群（84症例）及び高CLDN16群（165症例）の各々についてカプラン-マイヤー(Kaplan-Meier)法により術後経過年数に対する全生存率（Overall survival、OS）、無病生存率(Disease-free survival、DFS)、及び無再発生存率(Relapse-free survival、RFS)を計算した。さらに2群間の生存率をログランク検定により比較した。全ての統計分析は両側(two-sided)であり、Graphpad Prism及びSPSS Statisticsを用いて行った。全てのP値は両側であり、0.05未満のP値を統計学的に有意であるとした。

[0194] 無再発生存率を解析した結果を図18に示す。この結果から、低CLDN16群の卵巣がん患者は、卵巣がん切除手術後の予後が良いのに対し、高CLDN16群の卵巣がん患者は、卵巣がん切除手術後の予後が悪い傾向があることが示された。

[0195] 次に、無病生存率（DFS）に関する単変量解析及び多変量解析をロジスティック回帰モデルを用いて行った。結果を図19に示す。CLDN16の高発現が無病生存に関係する可能性が示された。

[0196]＜実施例１１：抗CLDN16抗体のマウスCLDN16との反応性の検証＞

（目的）

実施例２で得られた抗CLDN16抗体は、ヒトCLDN16タンパク質由来のペプチド断片を抗原として作製された抗体であるが、本実施例ではこの抗CLDN16抗体がマウスCLDN16に対しても反応することを検証する。マウス腎臓においては、オクルディン（OCLN）タンパク質がタイトジャンクションに発現することが知られている。そこでマウス腎臓組織に対して本発明の抗CLDN16抗体と抗OCLN抗体を用いて二重染色を行うことで、本発明の抗CLDN16抗体がマウスCLDN16に対しても反応することを立証する。

[0197]（方法と結果）

マウス腎臓から凍結切片を作製し、抗OCLN抗体（Thermo Fisher Scientific, Cat#71-1500）及び実施例２で得られた抗CLDN16抗体を用いて、蛍光免疫

染色を実施した。まず標本を4% パラホルムアルデヒド溶液で室温10分間固定した後にPBSで洗浄した。続いて0.1% TritonX-100/PBS溶液を用いて室温10分間インキュベートし、細胞膜の透過処理を行った。PBSで洗浄し、0.5% Casein/PBS溶液で10分間インキュベートし、一次抗体との非特異的な反応を防止した。実施例２で得られた抗CLDN16抗体及び抗OCLN抗体を4℃で一昼夜反応させ、PBSで5分間3回洗浄した後に200倍に希釈したAlexa488標識抗ラットIgG抗体、Cy3標識抗ウサギIgG抗体を室温で1時間反応させた。PBSで5分間3回洗浄した後にFluoro-Gel II (Electron microscopy science) を用いて封入し、蛍光顕微鏡により観察を行った。

[0198] 染色結果を図20に示す。抗OCLN抗体による染色では、マウス腎臓上皮のタイト結合領域にOCLNタンパク質が検出された。抗CLDN16抗体による染色パターンは、抗OCLN抗体の染色パターンと一致した。この結果から、本発明の抗CLDN16抗体が固定した腎組織のマウスCLDN16に対しても反応することが裏付けられた。

[0199] ＜実施例１２：ヒト卵巣癌細胞株におけるCLDN16タンパク質の発現評価＞

（目的）

抗CLDN16抗体（生理学研究所の古瀬幹夫博士より供与を用いて、代表的なヒト卵巣癌細胞株におけるCLDN16タンパク質の発現の有無を評価する。

[0200] （方法と結果）

卵巣癌細胞株として、AMOC2（上述のように札幌医科大学の斎藤豪博士より分与されたもの）、SKOV3（福島県立医科大学の藤森敬也教授より分与されたもの）、OVCAR3（理研BRC, RCB2135）、及びOVSAHO（JCRB細胞バンク, JCRB1046）を用いた。これらの卵巣癌細胞株を対象として、実施例５の（１）に記載の方法と同様の方法によりウエスタンブロット法を実施した。なお、ウエスタンブロット法では、陽性対照（P.C.）として、CLDN16を発現するHEK293T細胞を用いた。

[0201] ウエスタンブロット法の結果を図21Aに示す。CLDN16の発現はOVCAR3細胞において強く、OVSAHO細胞において中等度認められた。一方、SKOV3細胞におけ

るCLDN16の発現は極めて弱く、AMOC2細胞ではCLDN16発現が殆ど検出されなかった。

[0202] ＜実施例１３：CLDN16遺伝子をノックアウトしたヒト卵巣癌細胞株の作製＞

（目的）

上述のヒト卵巣癌細胞株においてCLDN16遺伝子をノックアウトする。

[0203] （方法と結果）

上述のSKOV3細胞及びOVSAHO細胞においてCLDN16遺伝子をノックアウトするために2種類のDNAオリゴgRNA1（配列番号21及び22）、gRNA2（配列番号23及び24）をそれぞれ98℃で10分間インキュベートした後に30分間室温に静置しアニーリングさせた。PX459プラスミド（Add gene, pSpCas9(BB)-2A-Puro（PX459）V2.0）にクローニングし、Lipofectamine3000試薬（Thermo Fisher）を用いてプラスミドを細胞に遺伝子導入した。Puromycinを用いてプラスミドの導入されていない細胞を除去し、CLDN16遺伝子がノックアウトされた細胞を樹立した。得られた細胞株を対象として、実施例５の（１）に記載の方法と同様の方法により抗CLDN16抗体を用いてウエスタンブロット法を実施した。

[0204] 図21Bは、CLDN16遺伝子がノックアウトされたSKOV3細胞及びOVSAHO細胞においてCLDN16の発現が検出されなかったことを示す。

[0205] ＜実施例１４：卵巣癌細胞株に対するCLDN16抗体薬物複合体の細胞傷害作用の検証＞

（目的）

実施例２で得られた抗CLDN16抗体と抗腫瘍剤とを結合させることにより、CLDN16抗体薬物複合体を作製する。この抗体薬物複合体を卵巣癌細胞株に投与することによって細胞傷害作用を評価する。

[0206] （方法と結果）

（１）CLDN16抗体薬物複合体の作製

抗腫瘍剤であるmonomethyl auristatin F（MMAE）を実施例２で得られた抗CLDN16抗体に結合させるため、抗体の溶媒を、透析カセットSlide-A-LyzerTM

Dialysis Cassettes, 10K MWCO (ThermoFisher, 66830)を用いた透析法でダルベッコりん酸緩衝生理食塩水(富士フイルム和光純薬, 048-29805)に置換した。次にジチオトレイトール(DTT)を終濃度1 mMで添加し、室温下で毎分150回転で30分振盪した。その後、Slide-A-LyzerTM Dialysis Cassettesで再透析してDTTを除去した。次に0.4 mg/mLのジチオビス(2-ニトロ安息香酸)と抗体を1:4で混和し、室温で10分静置した。波長421 nmの吸光度を測定し、抗体1分子あたりのチオール基を計算した。結果は5.18であった。続いてSH基のモル濃度の4倍となるように、リンカー・ペイロード MC-Val-Cit-PAB-MMAE (MedChemiExpress社, HY-15575)を最終濃度68.4 μMで添加し、室温下で毎分150回転で60分振盪した。その後、Slide-A-LyzerTM Dialysis Cassettesで再透析して未反応のリンカー・ペイロードを除去した。

[0207] （２）細胞傷害作用の検証

実施例５で作製されたCLDN16タンパク質を過剰発現させた卵巣がん細胞株AMOC2（以下、「AMOC2:CLDN16細胞」という）、EGFP遺伝子を導入した卵巣がん細胞株AMOC2（以下、「AMOC2:EGFP細胞」という）は1000細胞/100 μLとなるように調整し、1ウェルあたり5,000細胞で96穴細胞培養プレートに播種した。実施例１３で作製されたCLDN16遺伝子が破壊された卵巣がん細胞株OVSAHO（以下、「OVSAHO:CLDN16^{KO}細胞」という）とSKOV3（以下、「SKOV3:CLDN16^{KO}細胞」という）、及びCLDN16遺伝子が破壊されていないOVSAHO細胞とSKOV3（以下、「対照OVSAHO細胞」と「対照OVSAHO細胞」という）は5000細胞/100 μLとなるように調整し、同様に播種した。24時間後、正常ラットIgG（富士フイルム和光純薬, 147-09521)とCLDN16抗体を200 nM、CLDN16-ADCを25 nM、50 nM、100 nMで添加した。その48時間後、抗体薬物複合体などを含まない培地を交換した。さらにその24時間後、CellTiter 96（登録商標） AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS; Promega, G3581)を用いて波長490 nmの吸光度を測定し、相対的な生存細胞数を計測した。

[0208] AMOC2細胞に対するMTSアッセイの結果を図22Bに示す。図22Bは、抗体薬物複合体の用量依存的にAMOC2:CLDN16細胞の生存率が低下した一方で、AMOC2:E

GFP細胞の生存率は影響されなかったことを示す。この結果から、抗体薬物複合体を投与したAMOC2細胞ではCLDN16の発現に依存して細胞傷害作用が得られることが示された。

[0209] OVSAHO細胞に対するMTSアッセイの結果を図22Cに示す。図22Cは、抗体薬物複合体の用量依存的に対照OVSAHO細胞の生存率が低下した一方で、OVSAHO:CLDN16^{KO}細胞の生存率は影響されなかったことを示す。この結果から、抗体薬物複合体を投与したOVSAHO細胞では内因性のCLDN16の発現に依存して細胞傷害作用が得られることが示された。

[0210] 内因性のCLDN16をごく僅かに発現するSKOV3細胞に対するMTSアッセイの結果を図22Cに示す。図22Cは、抗体薬物複合体の用量依存的に対照SKOV3細胞の生存率が低下した一方で、SKOV3:CLDN16^{KO}細胞の生存率は影響されなかったことを示す。この結果から、抗体薬物複合体を投与したSKOV3細胞では内因性のCLDN16の発現に依存して細胞傷害作用が得られることが示された。

[0211] ＜実施例１５：生体内におけるCLDN16抗体薬物複合体の腎毒性の検証＞

（目的）

CLDN16は正常腎のヘンレ係蹄上行脚に強く発現することが知られている。そこで、実施例１４で作製したCLDN16抗体薬物複合体をマウスに投与することによって、生体内における腎毒性の有無を検証する。

[0212] （方法と結果）

ヒト重症複合型免疫不全症モデルマウスC.B-17/Icr-scid/scidJcl (SCID;日本クレア)の尾静脈に、1週間に1回の頻度で、MMAE、正常ラットIgG、CLDN16抗体、および実施例１４で作製したCLDN16抗体薬物複合体（以下、「CLDN16-ADC」と表記する）を4回注射した。抗体の投与量は5 mg/kgに相当する0.1 mg/匹とし、1回あたり投与容量100 μLとなるように調整した。MMAEはCLDN16-ADCとモル量が等しくなるように1回あたり1.87 μgを投与した。4週間後に安楽死させ、腎臓を摘出した。腎臓は10%中性ホルマリンで固定した後、HE標本を作製して組織学的に検討した。結果を図23に示す。CLDN16-ADCを投与したマウスではMMAE、正常ラットIgG、CLDN16抗体の投与群と同様に、腎組織の

HE像に著変は認められなかった。このことから、CLDN16-ADCは腎毒性を惹起しないことが示された。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願はそのまま引用により本明細書に組み入れられるものとする。

請求の範囲

[請求項1] クローディン16（CLDN16）タンパク質若しくはそのペプチド断片、又はCLDN16遺伝子の転写産物若しくはその核酸断片からなる、がんのバイオマーカー。

[請求項2] 前記がんが、卵巣がん、子宮体がん、甲状腺がん、肺がん、食道がん、胃がん、大腸がん、膀胱がん、子宮頚がん、腎がん、肝がん、膵がん、又は頭頸部がんである、請求項１に記載のバイオマーカー。

[請求項3] 前記がんのがん患者の予後を予測するための、又は前記がんを検出するための、請求項１又は２に記載のバイオマーカー。

[請求項4] 抗CLDN16抗体又はその断片であって、

配列番号1で示すアミノ酸配列からなるCDR1、

配列番号2で示すアミノ酸配列からなるCDR2、及び

配列番号3で示すアミノ酸配列からなるCDR3

を含む重鎖可変領域と

配列番号4で示すアミノ酸配列からなるCDR1、

配列番号5で示すアミノ酸配列からなるCDR2、及び

配列番号6で示すアミノ酸配列からなるCDR3

を含む軽鎖可変領域を含む、前記抗CLDN16抗体又はその断片。

[請求項5] 前記抗CLDN16抗体又はその断片が、

配列番号7で示すアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び

配列番号8で示すアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域

を含む、請求項４に記載の抗CLDN16抗体又はその断片。

[請求項6] 請求項４又は５に記載の抗CLDN16抗体又はその断片を含む、がんの予後予測用、又はがんの検出用キット。

[請求項7] 前記がんが、卵巣がん、子宮体がん、甲状腺がん、肺がん、食道がん、胃がん、大腸がん、膀胱がん、子宮頚がん、腎がん、肝がん、膵がん、又は頭頸部がんである、請求項６に記載のキット。

[請求項8] がん患者の予後を予測するための方法であって、

前記がん患者に由来する試料において、請求項１に記載のバイオマーカーを検出する検出工程

を含み、前記試料が前記バイオマーカーについて陽性である場合、前記がん患者の予後が悪いことを示す、前記方法。

[請求項9] 前記がんが、卵巣がん、子宮体がん、甲状腺がん、肺がん、食道がん、胃がん、大腸がん、膀胱がん、子宮頚がん、腎がん、肝がん、膵がん、又は頭頸部がんである、請求項８に記載の方法。

[請求項10] 前記バイオマーカーが請求項４に記載の抗CLDN16抗体又はその断片を用いて検出される、請求項８又は９に記載の方法。

[請求項11] 抗CLDN16抗体又はその断片を有効成分として含む、がん治療剤。

[請求項12] 前記がんが、卵巣がん、子宮体がん、甲状腺がん、肺がん、食道がん、胃がん、大腸がん、膀胱がん、子宮頚がん、腎がん、肝がん、膵がん、又は頭頸部がんである、請求項１１に記載のがん治療剤。

[請求項13] 前記抗CLDN16抗体又はその断片が、

配列番号1で示すアミノ酸配列からなるCDR1、

配列番号2で示すアミノ酸配列からなるCDR2、及び

配列番号3で示すアミノ酸配列からなるCDR3

を含む重鎖可変領域と

配列番号4で示すアミノ酸配列からなるCDR1、

配列番号5で示すアミノ酸配列からなるCDR2、及び

配列番号6で示すアミノ酸配列からなるCDR3

を含む軽鎖可変領域を含む、請求項１１又は１２に記載のがん治療剤。

[請求項14] 前記抗CLDN16抗体又はその断片が、

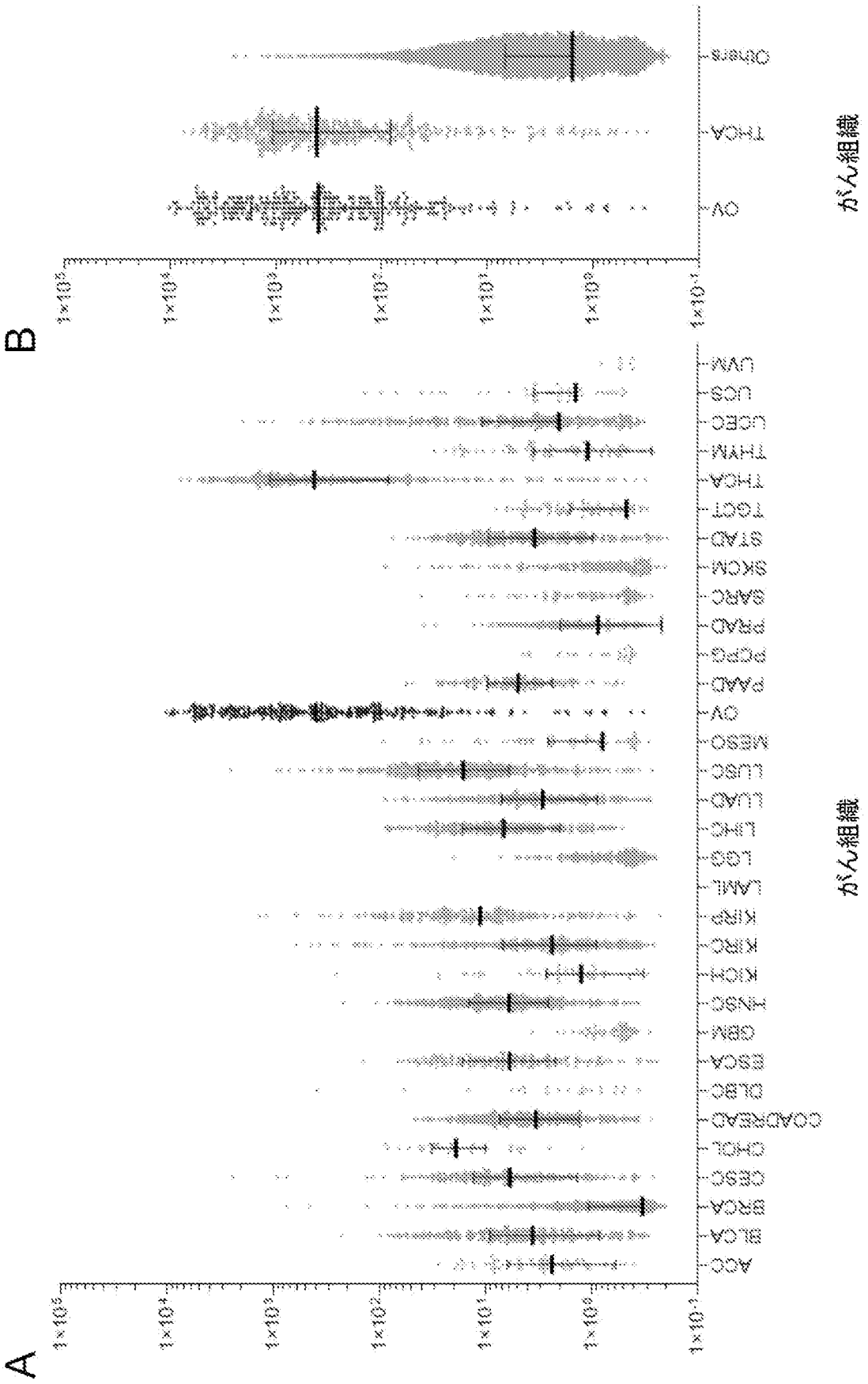
配列番号7で示すアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び

配列番号8で示すアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域

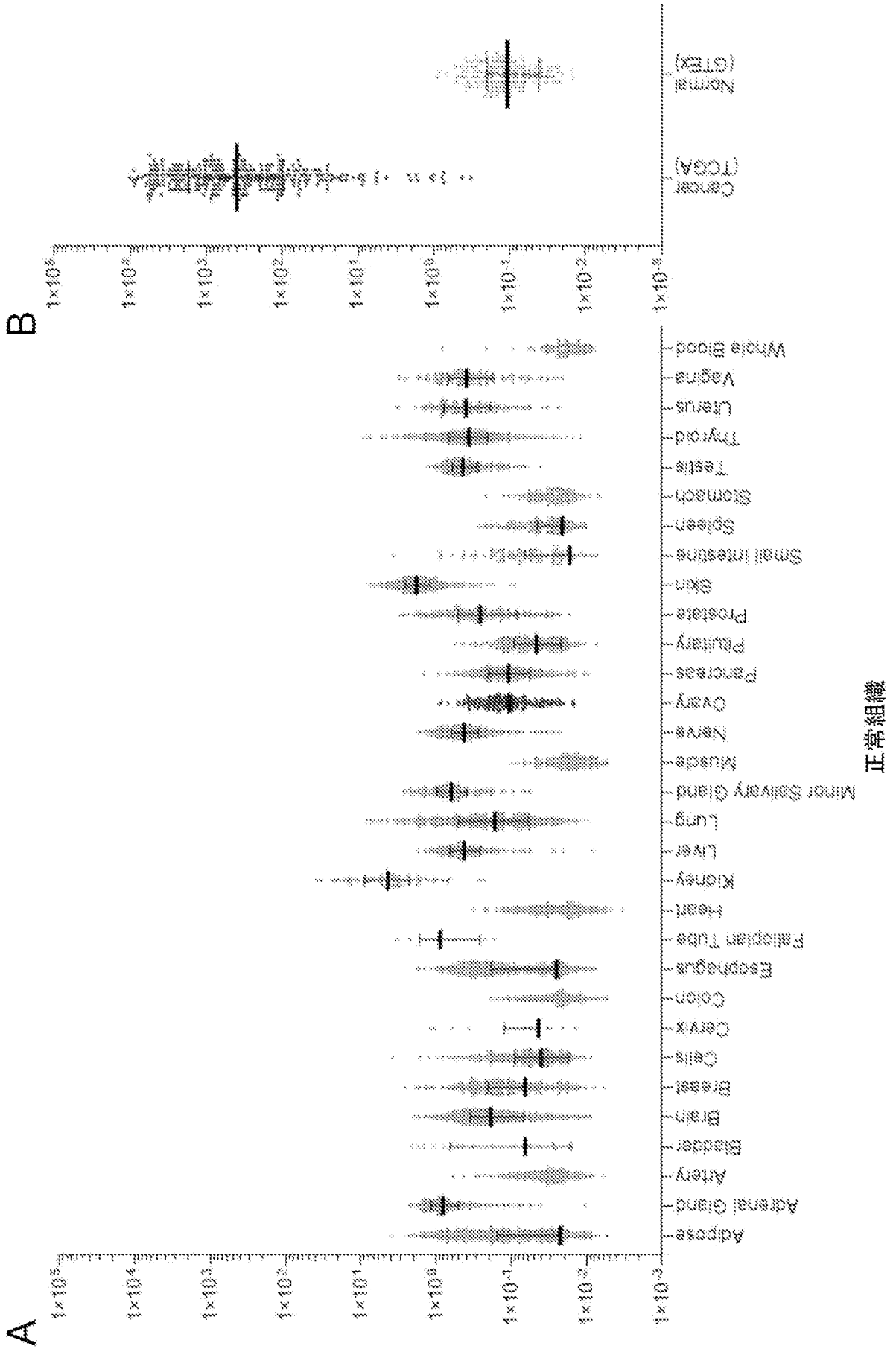
を含む、請求項１３に記載のがん治療剤。

WO 2025/075127 PCT/JP2024/035559

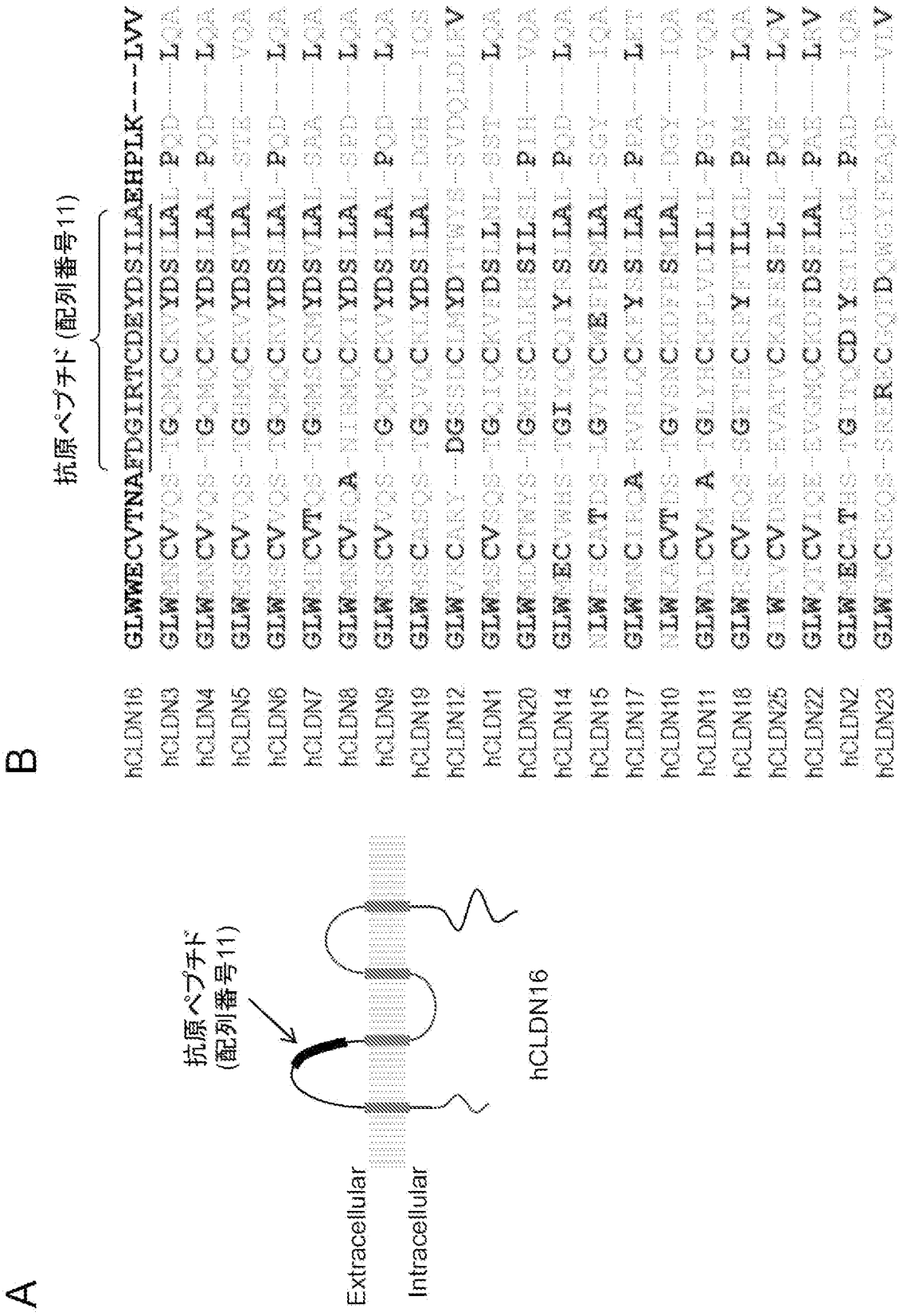
[図1]



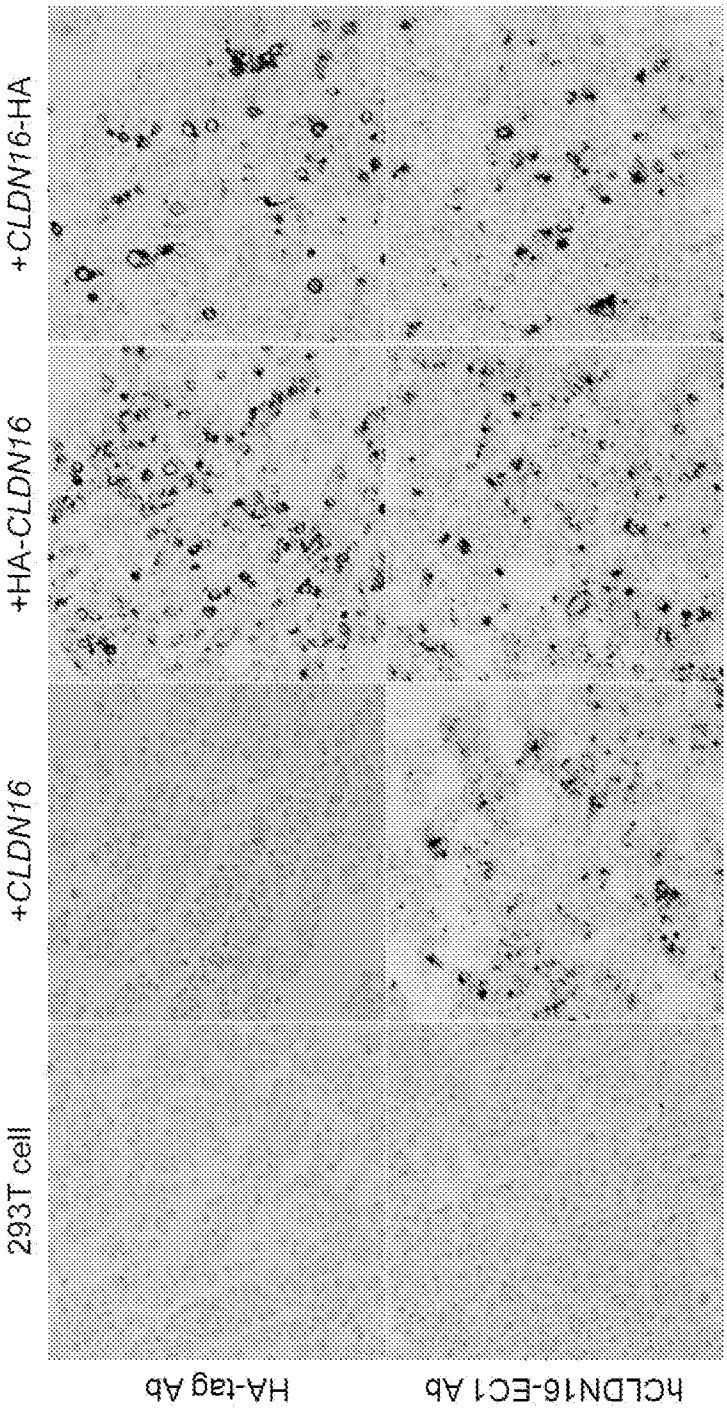
[図2]


A
B
1×10⁵
1×10⁴
1×10³
1×10²
1×10¹
1×10⁰
1×10⁻¹
1×10⁻²
1×10⁻³
Adipose
Adrenal Gland
Artery
Bladder
Brain
Breast
Cells
Cervix
Colon
Esophagus
Fallopian Tube
Heart
Kidney
Liver
Lung
Minor Salivary Gland
Muscle
Nerve
Ovary
Pancreas
Pituitary
Prostate
Skin
Small Intestine
Spleen
Stomach
Testis
Thyroid
Uterus
Vagina
Whole Blood
正常組織
Cancer (TCGA)
Normal (GTEx)

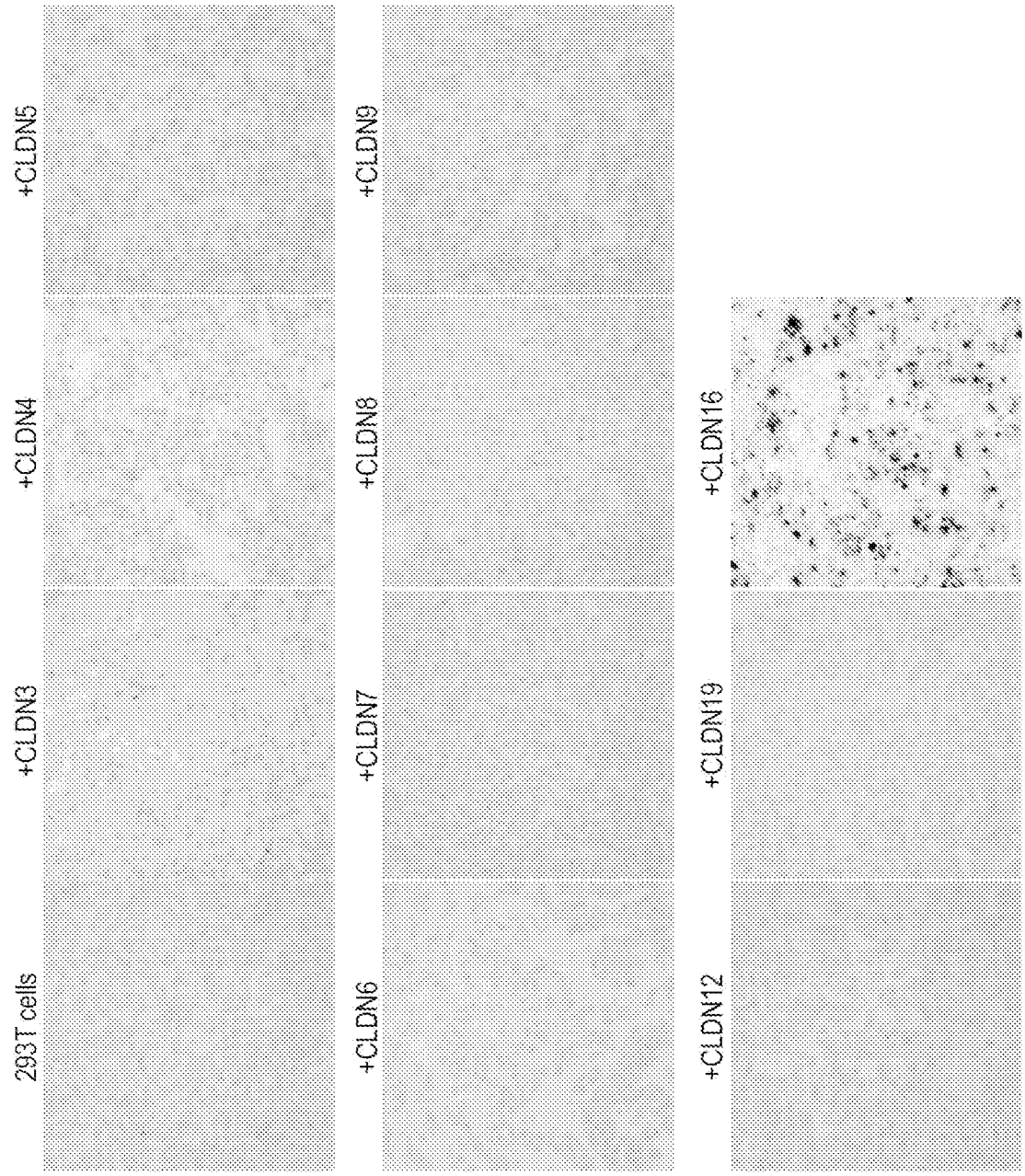
[図3]


A
抗原ペプチド
(配列番号11)
Extracellular
Intracellular
hCLDN16
B
抗原ペプチド (配列番号11)
hCLDN16
hCLDN3
hCLDN4
hCLDN5
hCLDN6
hCLDN7
hCLDN8
hCLDN9
hCLDN19
hCLDN12
hCLDN1
hCLDN20
hCLDN14
hCLDN15
hCLDN17
hCLDN10
hCLDN11
hCLDN18
hCLDN24
hCLDN22
hCLDN2
hCLDN23

[図4]



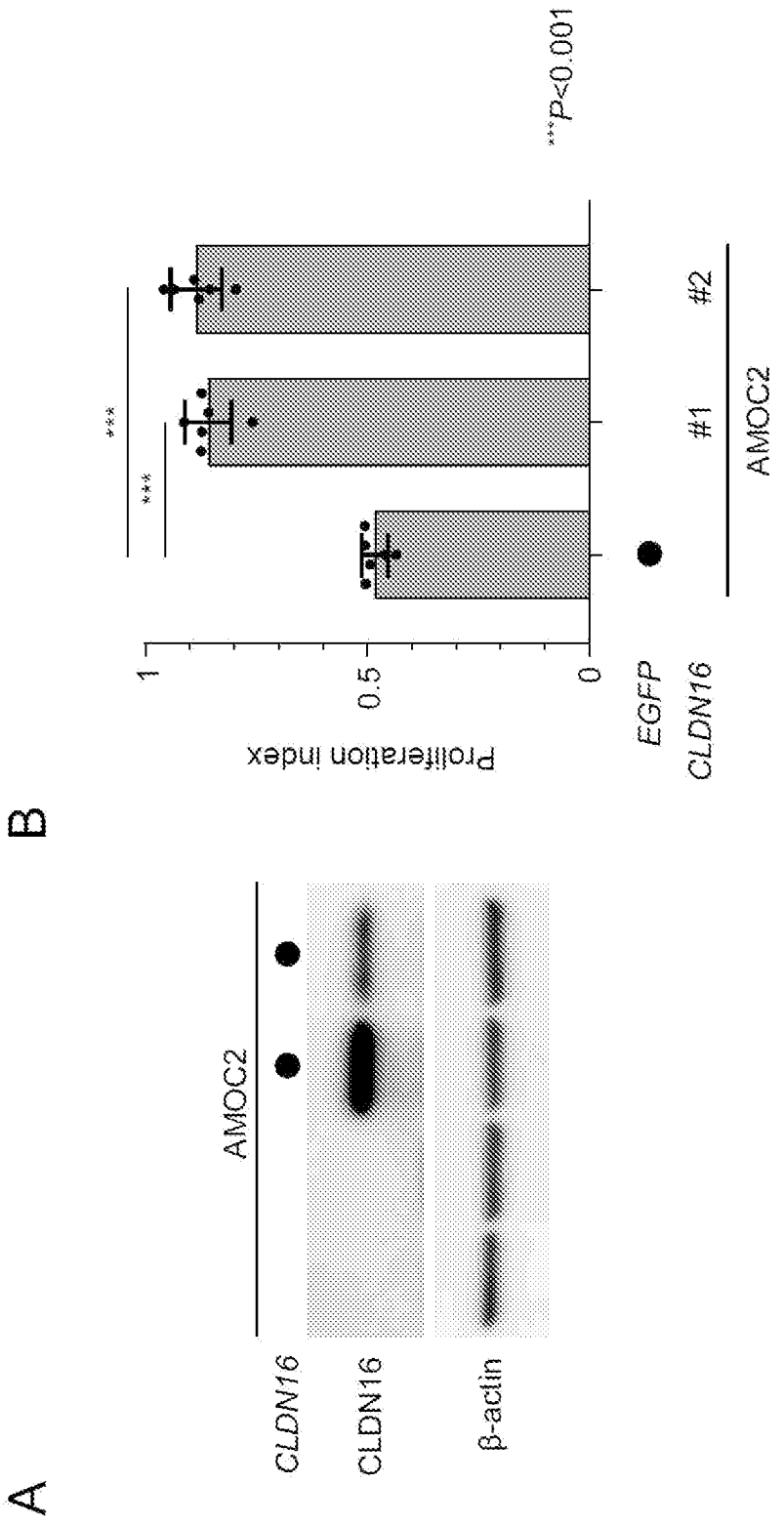
[図5]


293T cells
+CLDN3
+CLDN4
+CLDN5
+CLDN6
+CLDN7
+CLDN8
+CLDN9
+CLDN12
+CLDN19
+CLDN16

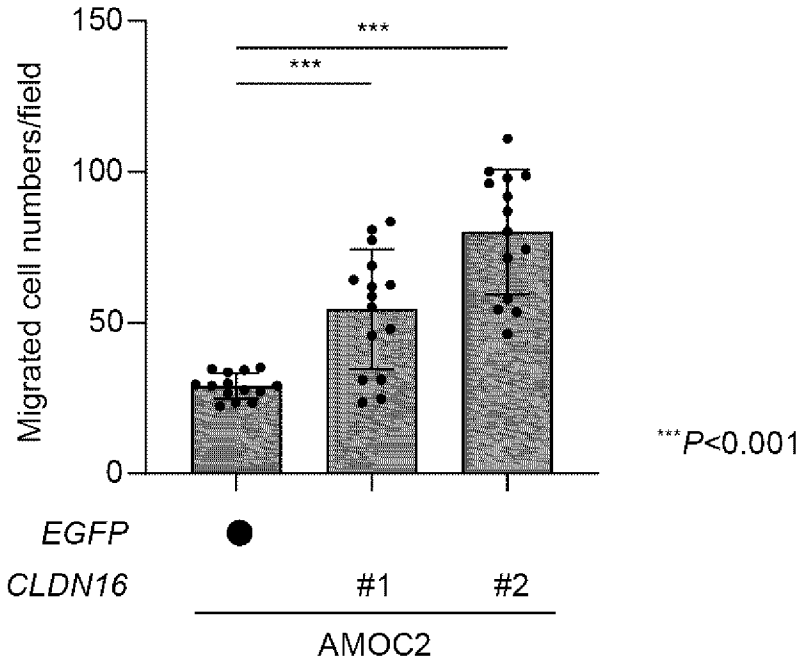
[図6]


A
軽鎖可変領域アミノ酸配列
FR1
CDR1
FR2
CDR2
MTQTPVSLSVSLGGQVSISCRSSQSLVHNNGNTYLSWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGISDRFSGSGSG
FR3
CDR3
FR4
TDFTLKISRVEPDDLGVYYCGQGTQYPLTFGSGTKLEIKPADAAPTVSIFPPSMEHEMVSWTVLLLRTPK
TARTA （配列番号8）
B
重鎖可変領域アミノ酸配列
FR1
CDR1
FR2
DRQMGLLLCLVTFPRCVLSQVQLEESGPGLVQPSQTLSLTCTVSGFSLTSNGVSWVRQPPGKGLEWIAAI
CDR2
FR3
CDR3
FR4
SSAGNTYYNSALKSRLSISRDTSKSQVFLKMNSLQTEDTAIYFCNTLYYGYNRGYFDYWGQGVMVTVSSA
ETTAPSVYP （配列番号7）

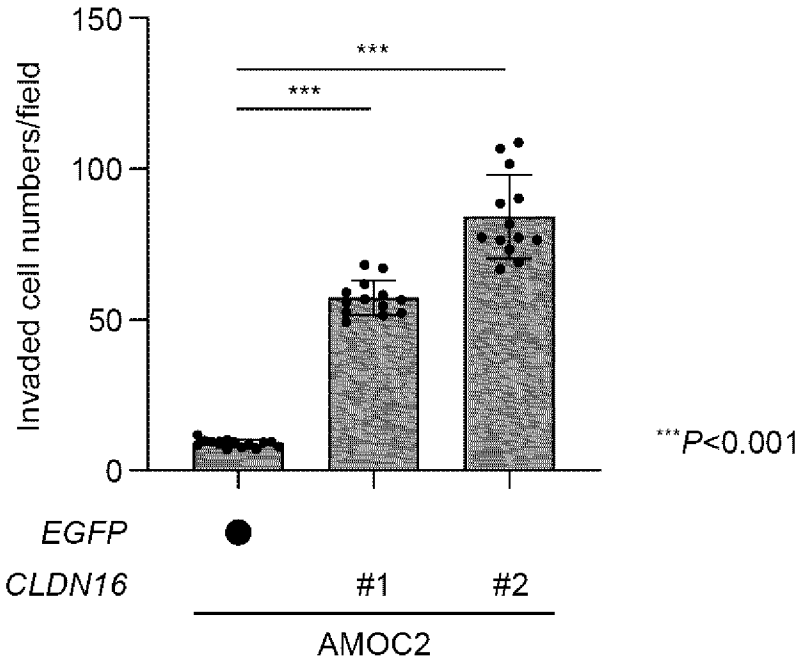
[図7]


A
AMOC2
CLDN16
CLDN16
β-actin
B
***P<0.001
***
***
Proliferation index
1
0.5
0
EGFP
CLDN16
#1
#2
AMOC2

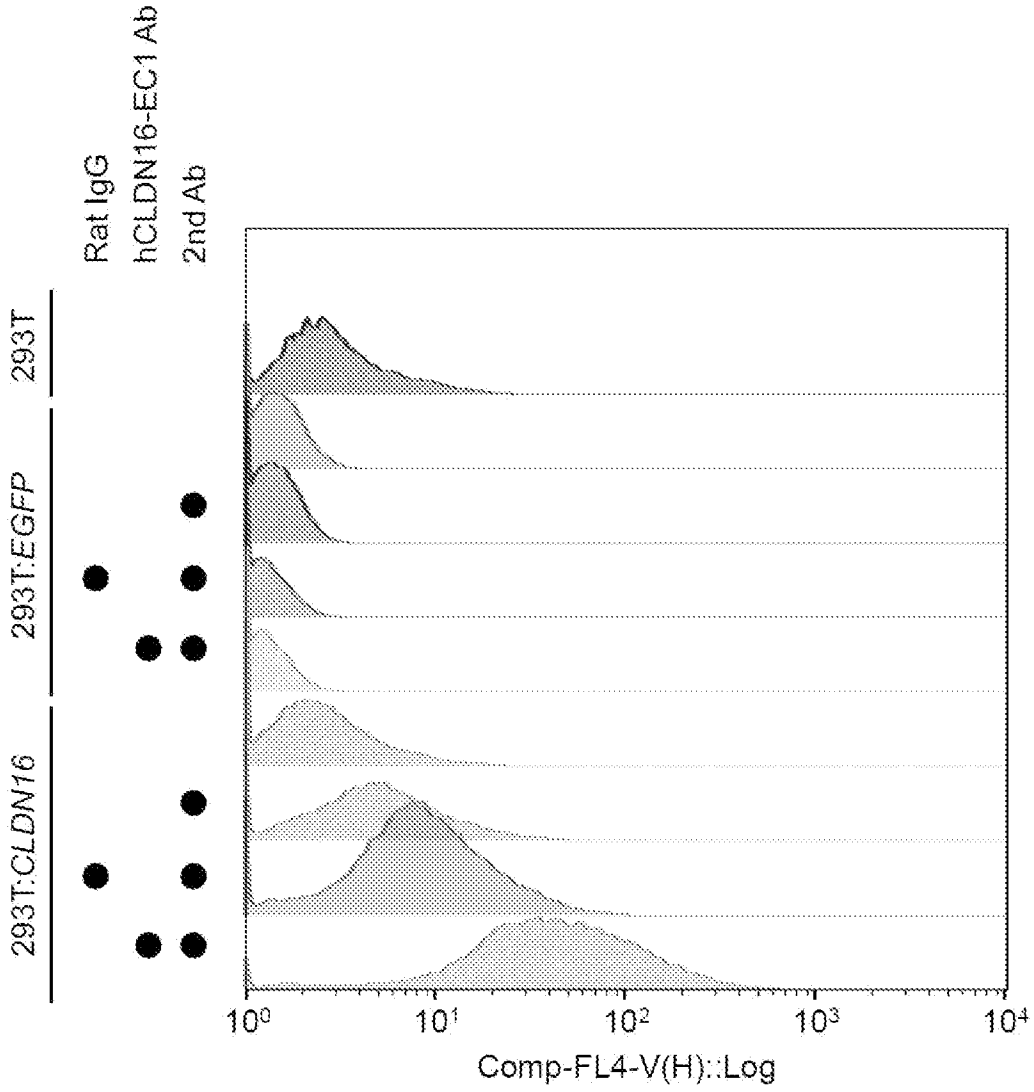
[図8]


150
100
50
0
Migrated cell numbers/field
***
***
***P<0.001
EGFP
CLDN16
#1
#2
AMOC2

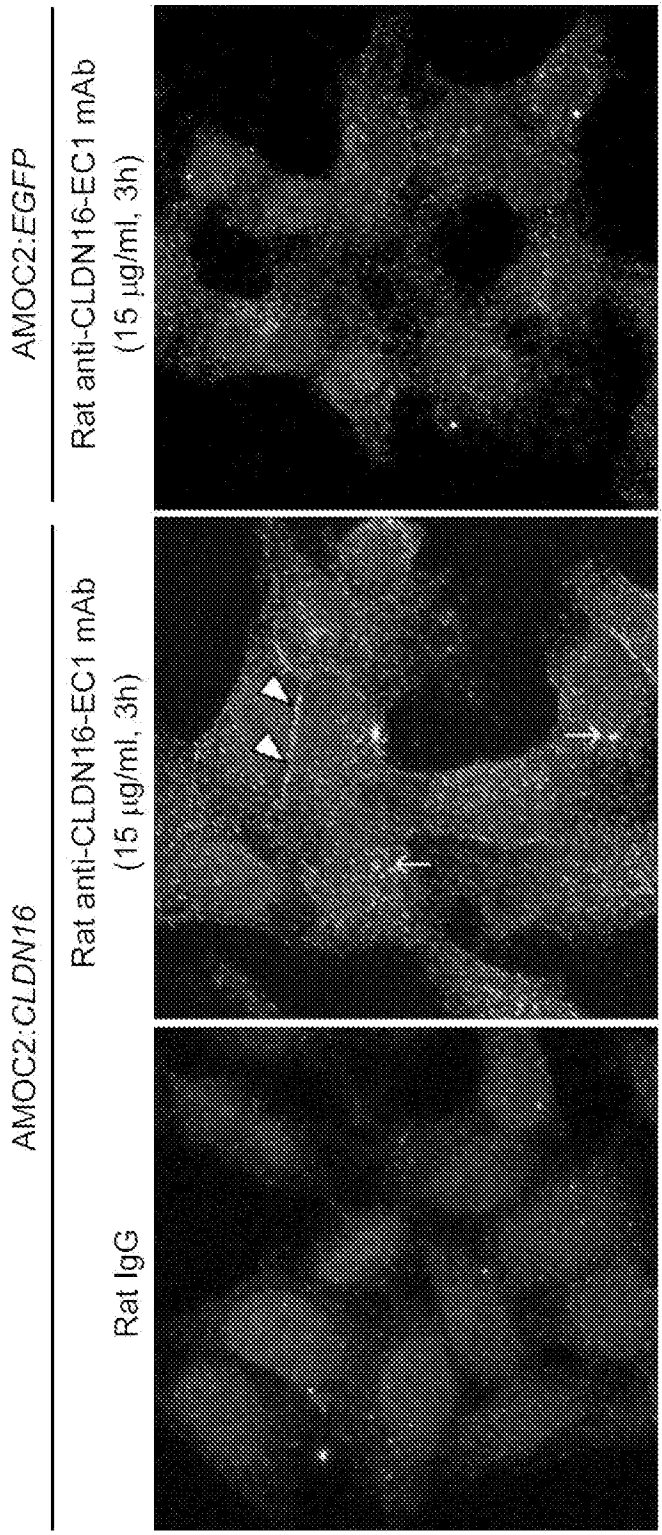
[図9]


150
100
50
0
Invaded cell numbers/field
***
***
***P<0.001
EGFP
CLDN16
#1
#2
AMOC2

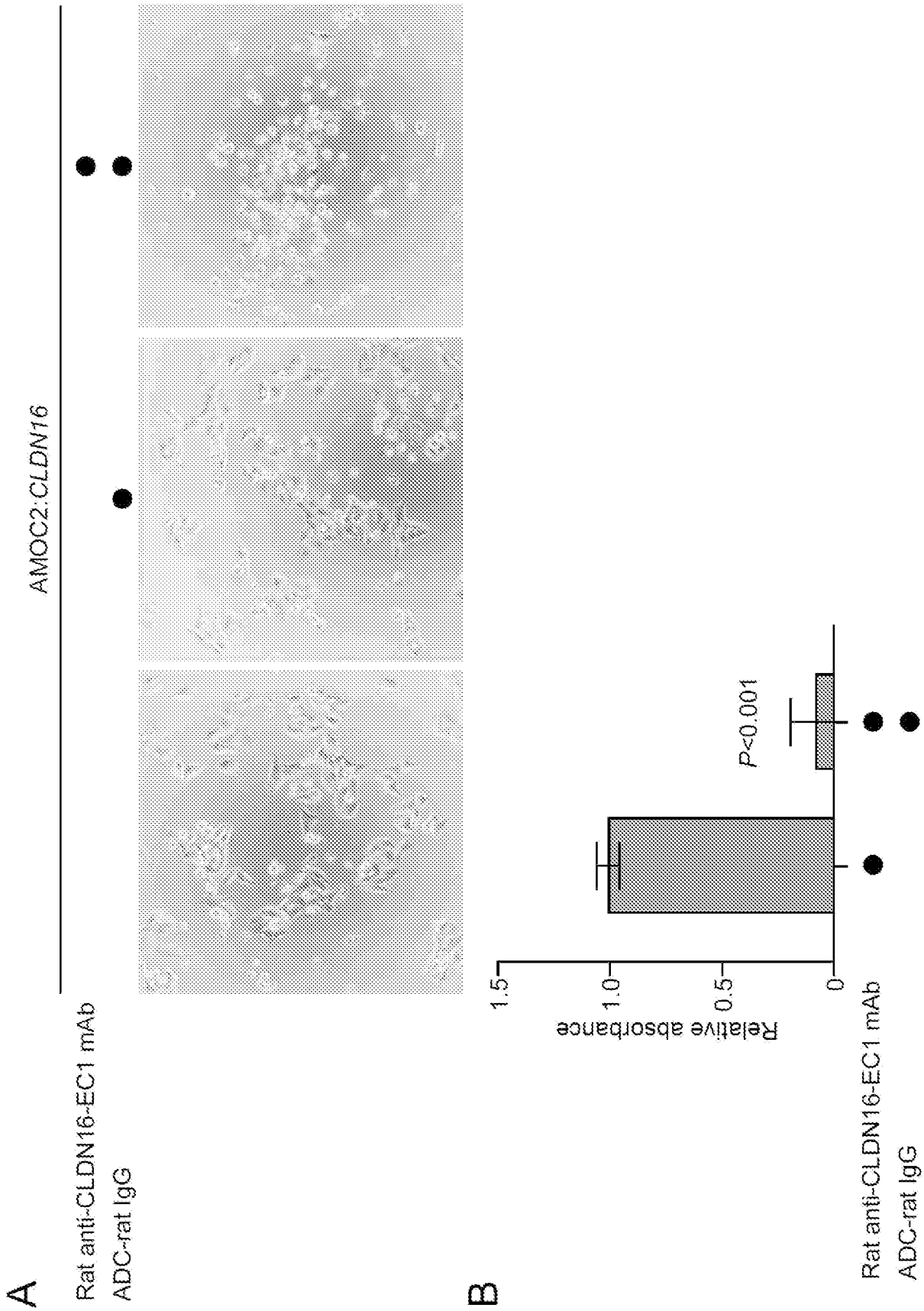
[図10]


293T
293T:EGFP
293T:CLDN16
Rat IgG
hCLDN16-EC1 Ab
2nd Ab
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
Comp-FL4-V(H)::Log

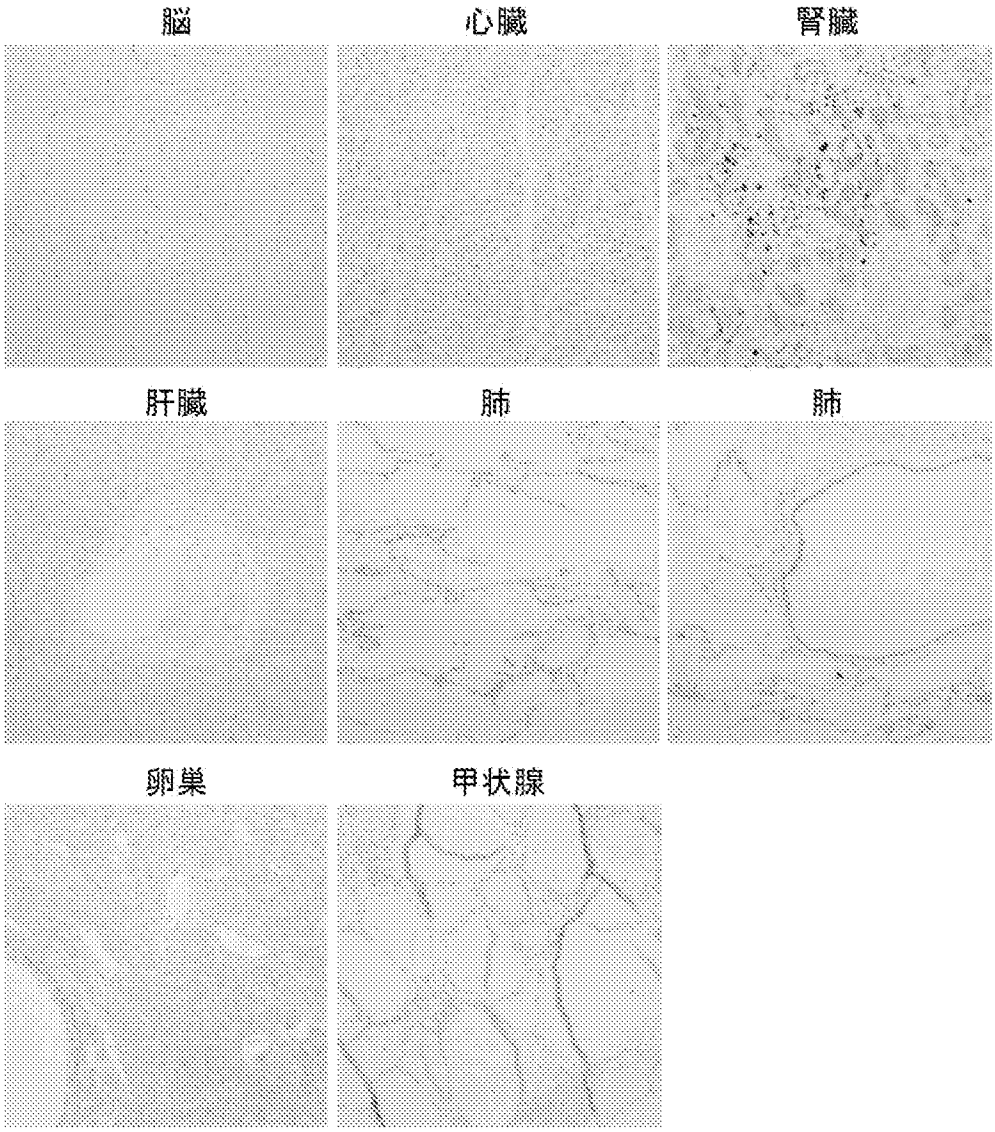
[図11]


AMOC2:EGFP
Rat anti-CLDN16-EC1 mAb
(15 μg/ml, 3h)
AMOC2:CLDN16
Rat anti-CLDN16-EC1 mAb
(15 μg/ml, 3h)
Rat IgG

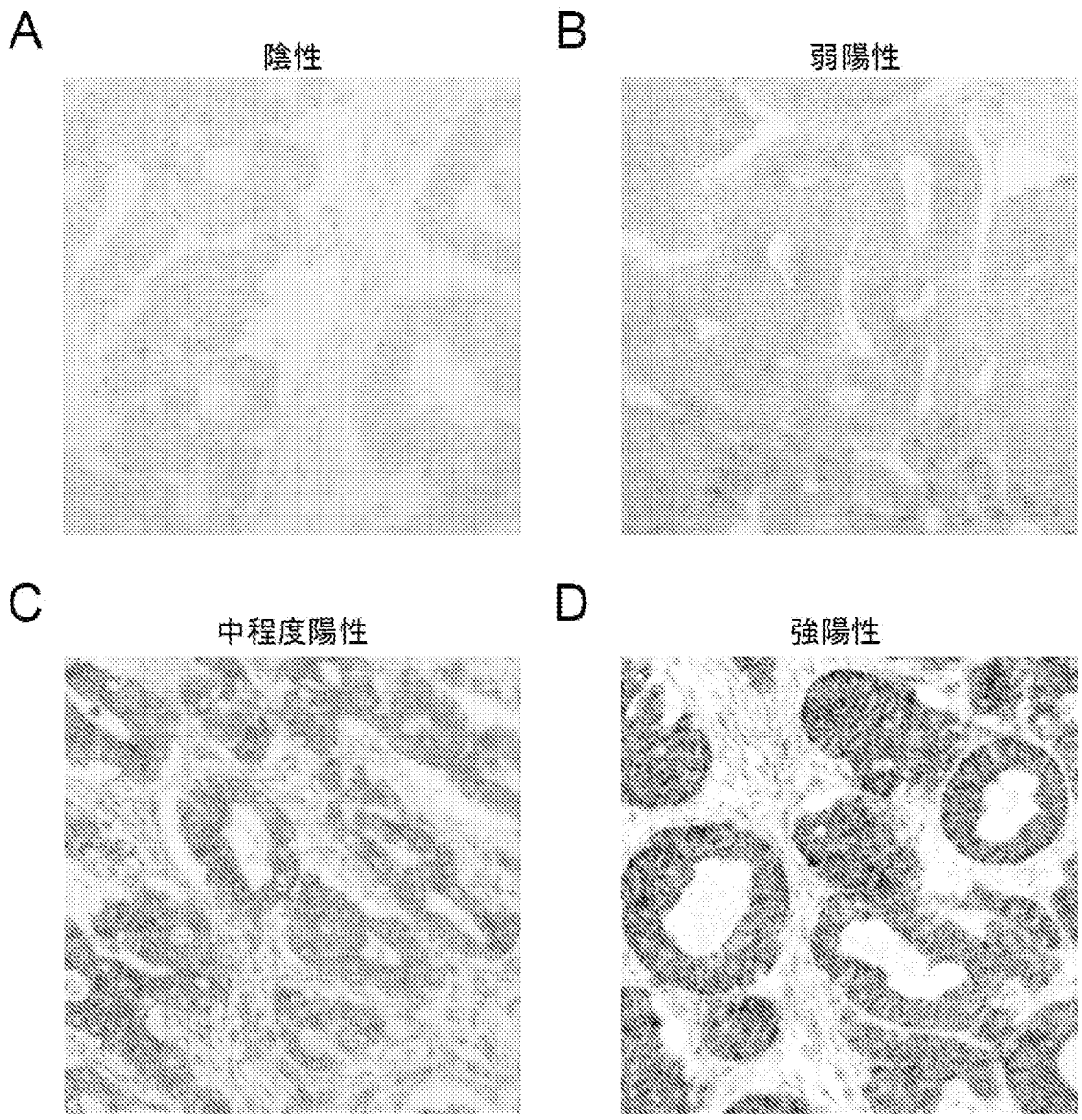
[図12]


A
AMOC2:CLDN16
Rat anti-CLDN16-EC1 mAb
ADC-rat IgG
B
Relative absorbance
1.5
1.0
0.5
0
P<0.001
Rat anti-CLDN16-EC1 mAb
ADC-rat IgG

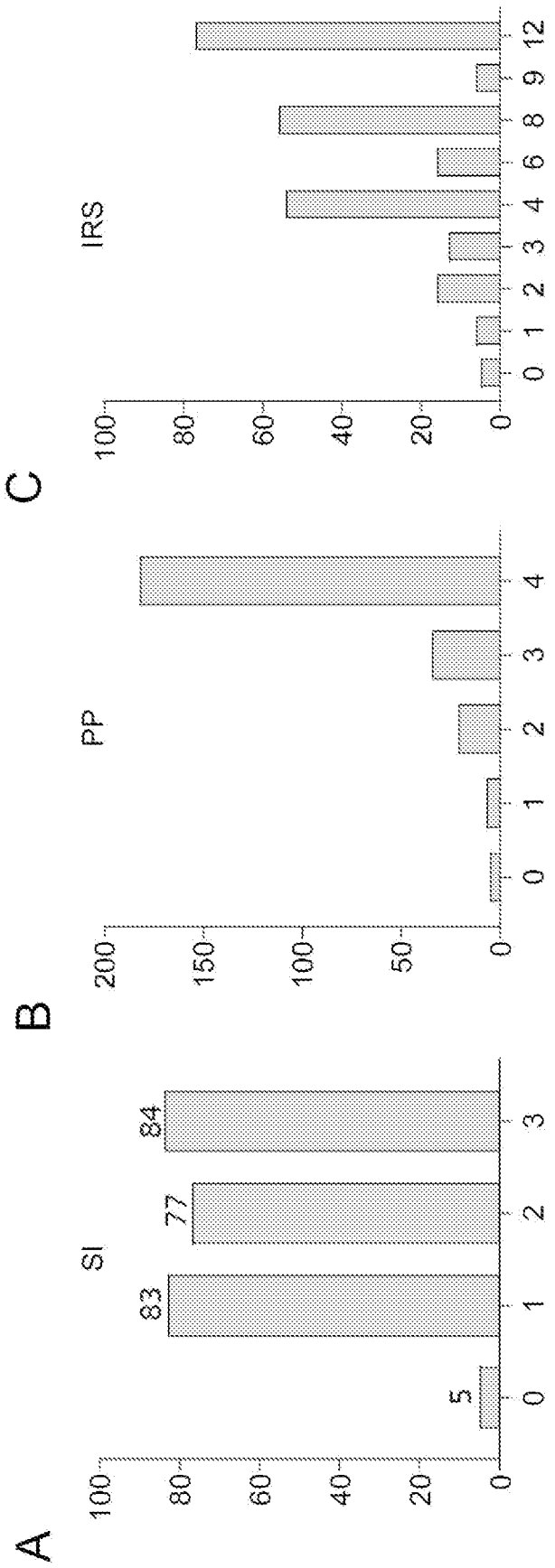
[図13]



[図14]



[図15]


A
SI
100
80
60
40
20
0
5
83
77
84
0
1
2
3
B
PP
200
150
100
50
0
0
1
2
3
4
C
IRS
100
80
60
40
20
0
0
1
2
3
4
6
8
9
12

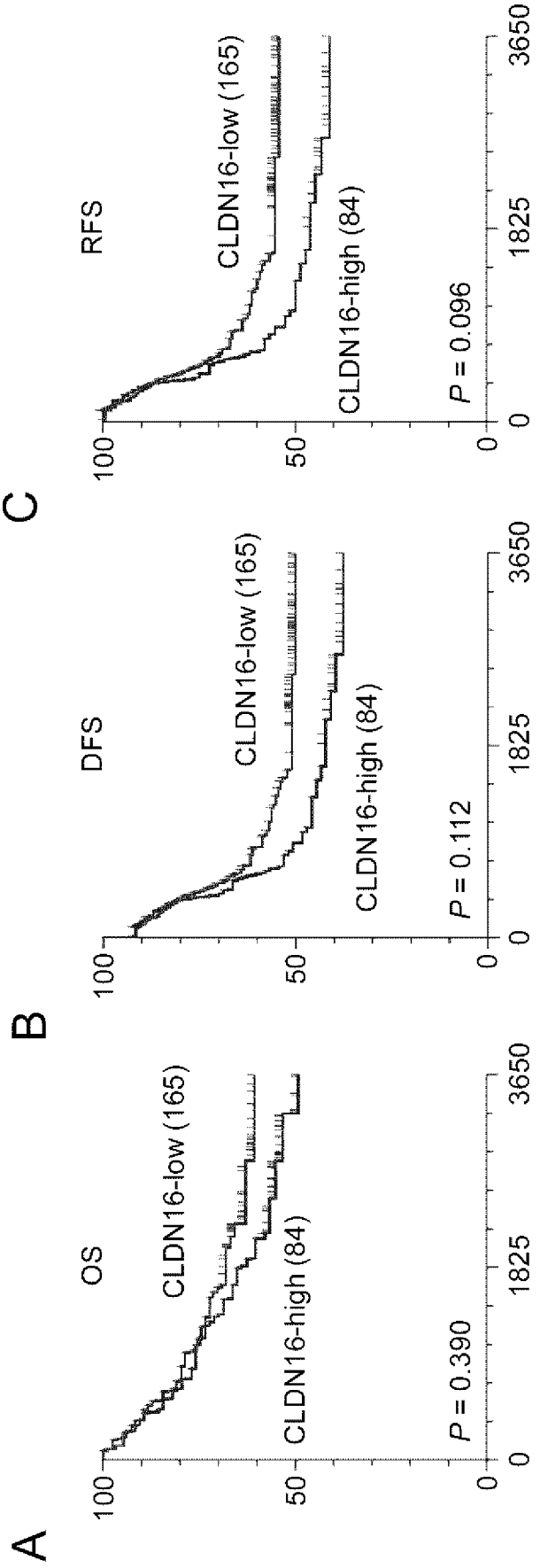
[図16]

Parameter	Total	Low CLDN16 (N = 165)	High CLDN16 (N = 84)	*P*-value
Age				0.8903
< 60	156(62.7)	104(63)	52(61.9)	
≥ 60	93(37.3)	61(37)	32(38.1)	
FIGO Stage				
I	92(36.9)	70(42.4)	22(26.2)	**0.0214**
II	24(9.6)	18(10.9)	6(7.1)	
III	108(43.4)	63(38.2)	45(53.6)	
IV	25(10)	14(8.5)	11(13.1)	
Histological type				
High-grade serous	86(34.5)	45(27.3)	41(48.8)	**0.0011**
Non-high-grade serous	163(65.5)	120(72.7)	43(51.2)	
Low-grade serous	13(5.2)	6(3.6)	7(8.3)	
Mucinous/Endometrioid	82(32.9)	61(37)	21(25)	
Clear cell	56(22.5)	43(26.1)	13(15.5)	
Others/unknown	12(4.8)	10(6.1)	2(2.4)	
T classification (pT)				
1	98(39.4)	74(44.8)	24(28.6)	**0.0018**
2/3	151(60.6)	91(55.2)	60(71.4)	
Lymph node metastasis				
(–)	128(51.4)	93(56.4)	35(41.7)	0.2384
(+)	40(16.1)	25(15.2)	15(17.9)	
Unknown	81(32.5)	47(28.5)	34(40.5)	
Distant metastasis				
(–)	223(89.6)	149(90.3)	74(88.1)	0.6622
(+)	26(10.4)	16(9.7)	10(11.9)	
Peritoneal dissemination				
(–)	126(50.6)	97(58.8)	29(34.5)	**0.0005**
(+)	123(49.4)	68(41.2)	55(65.5)	

[図17]

Parameter	Total	Low CLDN16 (N = 165)	High CLDN16 (N = 84)	*P*-value
Ascites cytology				
(–)	75(30.1)	49(29.7)	26(31)	0.23
(+)	86(34.5)	64(38.8)	22(26.2)	
Unknown	88(35.3)	52(31.5)	36(42.9)	
Type of surgery				
Complete	52(45)	80(48.5)	32(38.1)	0.1463
Optimal	8(3.2)	4(2.4)	4(4.8)	
Suboptimal	61(24.5)	38(23)	23(27.4)	
Unknown	68(27.3)	43(26.1)	25(29.8)	
CA-125 (U/mL)				
< 35	38(15.3)	29(17.6)	9(10.7)	0.1929
≥ 35	209(83.9)	135(81.8)	74(88.1)	
Unknown	2(0.8)	1(0.6)	1(1.2)	
Platinum sensitivity				
Sensitive	166(66.7)	112(67.9)	54(64.3)	0.8737
Resistance	61(24.5)	40(24.2)	21(25)	
No chemotherapy	22(8.8)	13(7.9)	9(10.7)	
Neoadjuvant chemotherapy				
(–)	229(92)	150(90.9)	79(94)	0.4669
(+)	20(8)	15(9.1)	5(6)	
Recurrence				
(–)	136(54.6)	96(58.2)	40(47.6)	0.1386
(+)	113(45.4)	69(41.8)	44(52.4)	

[図18]


A
OS
CLDN16-low (165)
CLDN16-high (84)
P = 0.390
100
50
0
0
1825
3650
B
DFS
CLDN16-low (165)
CLDN16-high (84)
P = 0.112
C
RFS
CLDN16-low (165)
CLDN16-high (84)
P = 0.096

[図19]

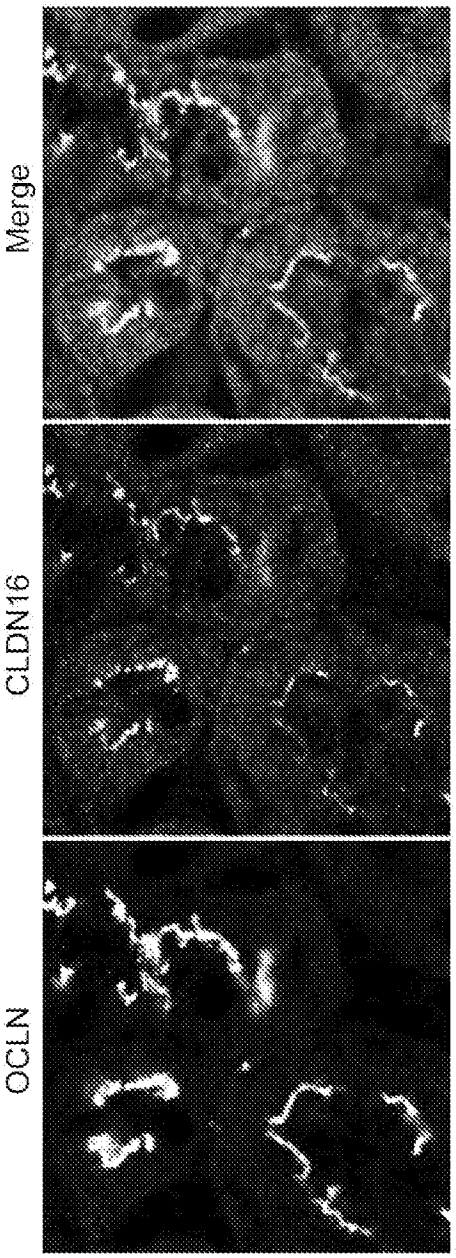
Univariate analysis

Variable (DFS)		HR	95% CI	*P*-value
Age	≥ 60	1.303	0.895-1.898	0.167
FIGO Stage	II/III/IV	6.894	4.266-11.143	<0.001
Histological type	HGSC	2.832	1.949-4.115	<0.001
T classification (pT)	2/3	6.582	4.189-10.343	<0.001
Lymph node metastasis	(+)	2.911	1.695-5.000	<0.001
Distant metastasis	(+)	3.483	2.146-5.653	<0.001
Peritoneal dissemination	(+)	6.777	4.308-10.659	<0.001
Ascites cytoloy	(+)	3.271	1.93-5.542	<0.001
Type of surgery	Suboptimal	12.552	7.326-21.507	<0.001
CA-125 (U/mL)	≥ 35	2.995	1.458-6.15	0.003
Platinum sensitivity	Resistance	4.608	3.041-6.983	<0.001
Neoadjuvant chemotherapy	(+)	2.881	1.71-4.854	<0.001
CLDN16	High	1.361	0.932-1.987	0.110

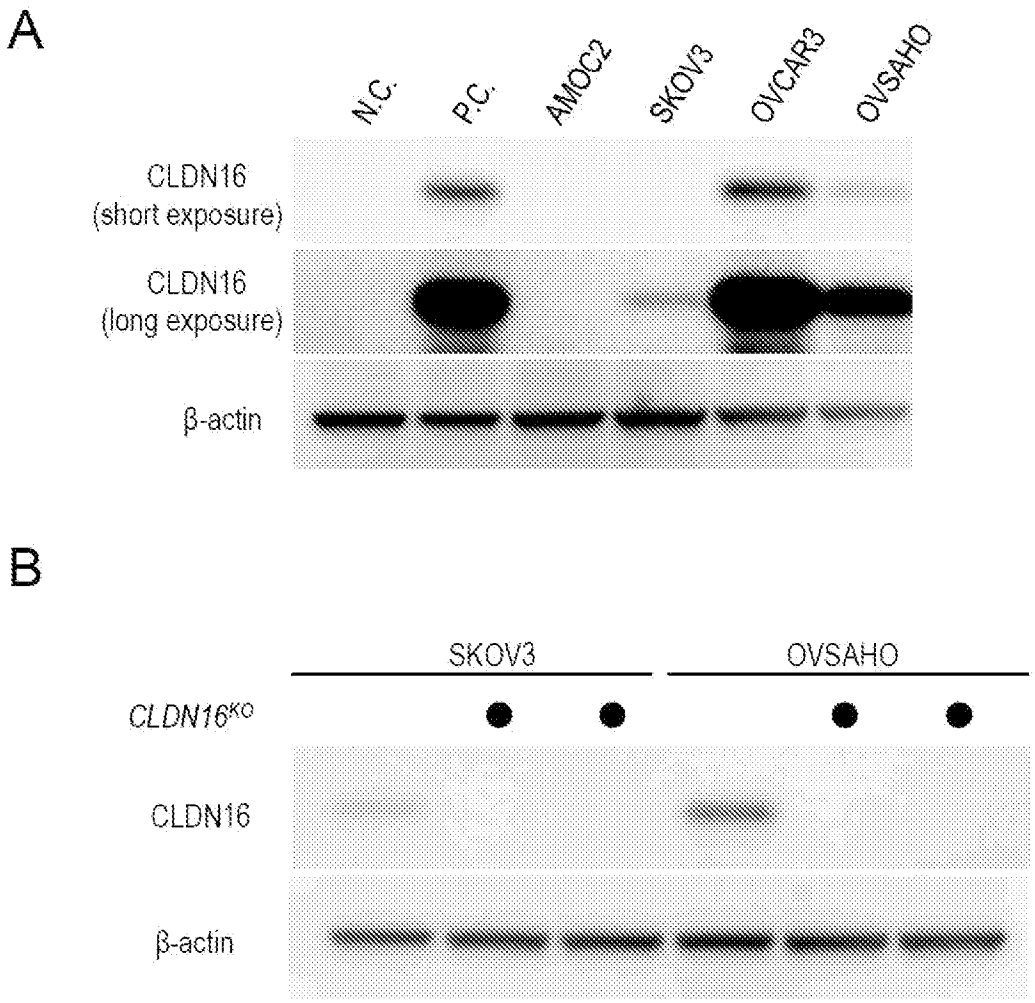
Multivariate analysis

Variable (DFS)		HR	95% CI	*P*-value
FIGO Stage	II/III/IV	6.894	4.266-11.143	<0.001

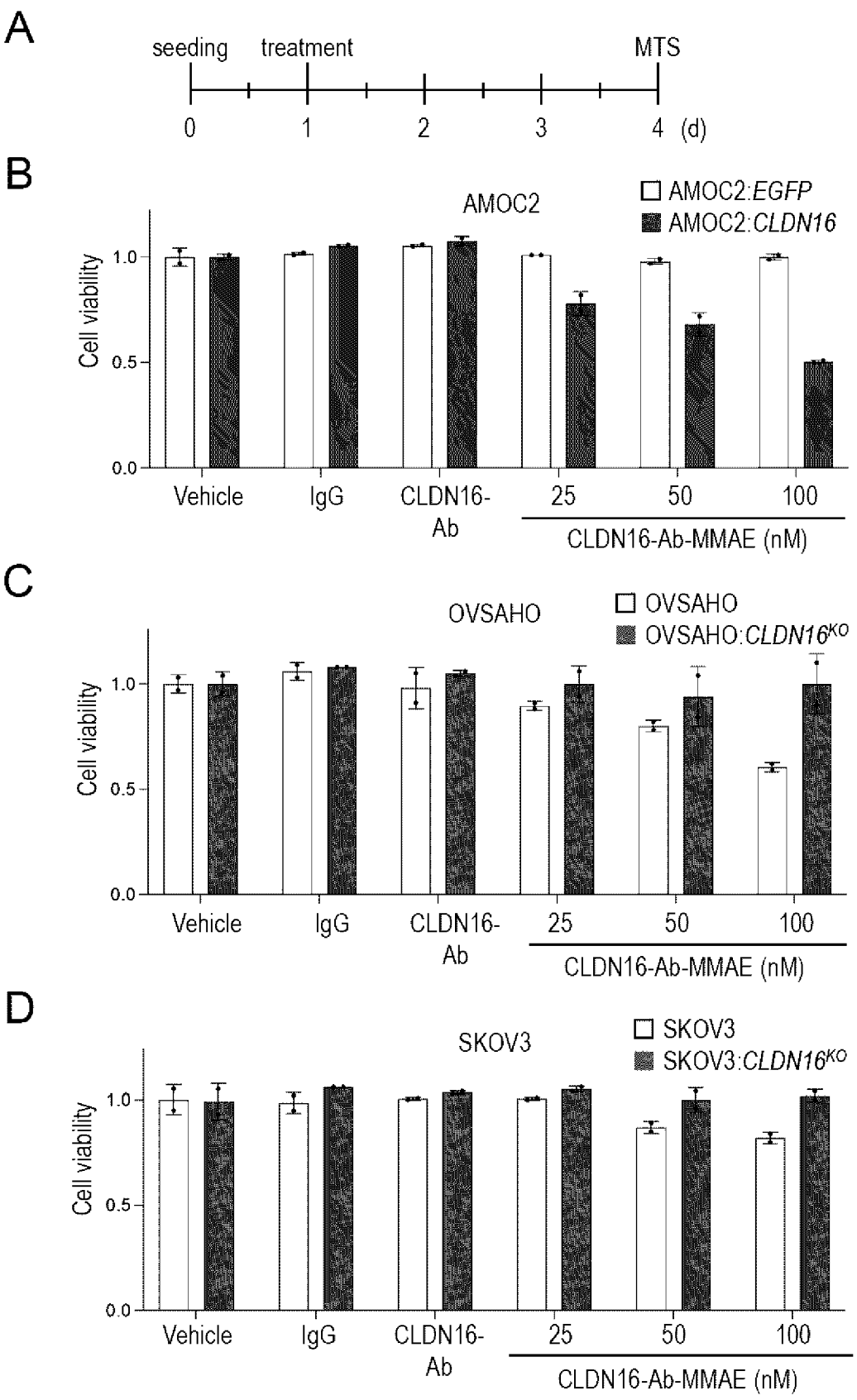
[図20]



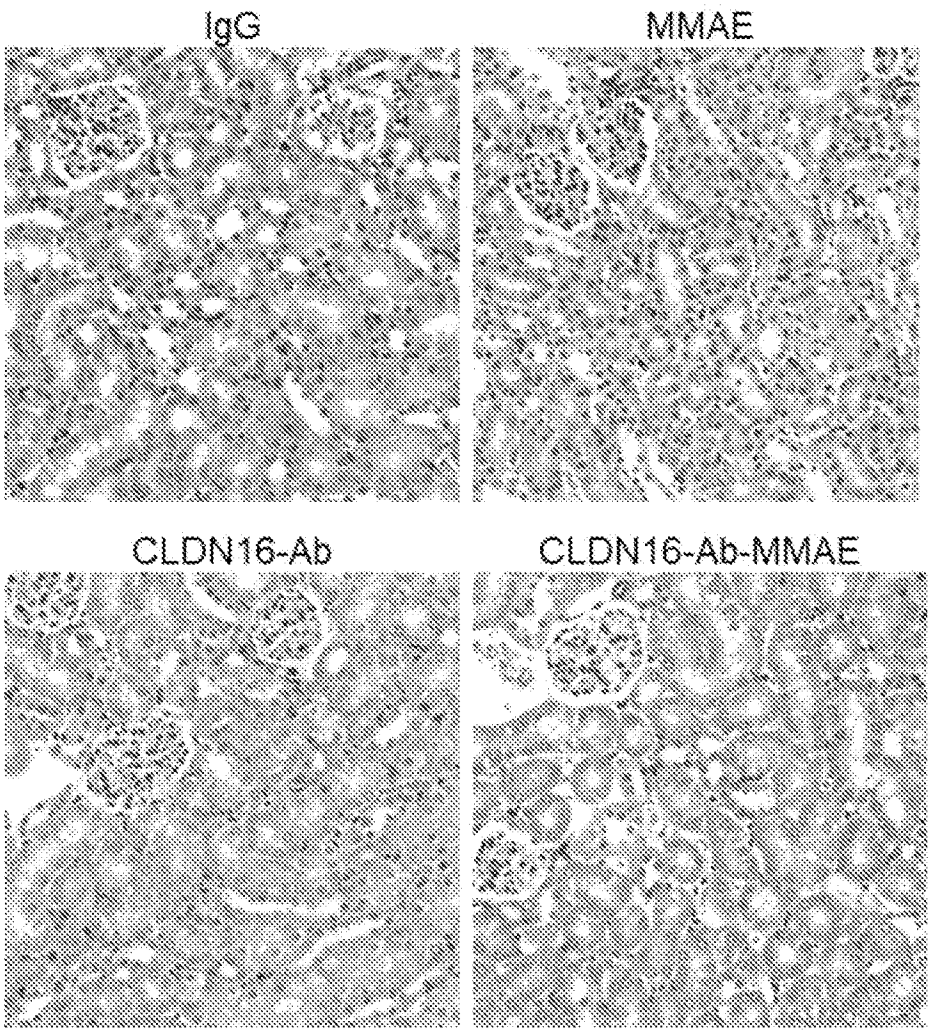
[図21]


A
N.C.
P.C.
AMOC2
SKOV3
OVCAR3
OVSAHO
CLDN16
(short exposure)
CLDN16
(long exposure)
β-actin
B
SKOV3
OVSAHO
CLDN16KO
CLDN16
β-actin

[図22]


A
seeding
treatment
MTS
0
1
2
3
4 (d)
B
AMOC2
AMOC2:EGFP
AMOC2:CLDN16
Cell viability
1.0
0.5
0.0
Vehicle
IgG
CLDN16-Ab
25
50
100
CLDN16-Ab-MMAE (nM)
C
OVSAHO
OVSAHO
OVSAHO:CLDN16KO
Cell viability
1.0
0.5
0.0
Vehicle
IgG
CLDN16-Ab
25
50
100
CLDN16-Ab-MMAE (nM)
D
SKOV3
SKOV3
SKOV3:CLDN16KO
Cell viability
1.0
0.5
0.0
Vehicle
IgG
CLDN16-Ab
25
50
100
CLDN16-Ab-MMAE (nM)

[図23]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2024/035559

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 33/574(2006.01)i; ***A61K 39/395***(2006.01)i; ***A61P 35/00***(2006.01)i; ***C07K 16/30***(2006.01)i; ***C12N 15/13***(2006.01)i; ***G01N 33/50***(2006.01)i; ***G01N 33/68***(2006.01)i
FI: G01N33/574 A ZNA; A61K39/395 N; A61P35/00; C07K16/30; C12N15/13; G01N33/50 P; G01N33/68

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)

G01N33/574; A61K39/395; A61P35/00; C07K16/30; C12N15/13; G01N33/50; G01N33/68

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

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2024
Registered utility model specifications of Japan 1996-2024
Published registered utility model applications of Japan 1994-2024

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GAO, Peipei et al., Association of CLDN6 and CLDN10 With Immune Microenvironment in Ovarian Cancer: A Study of the Claudin Family, Frontiers in Genetic, 2021, vol. 12, article 595436, doi: 10.3389/fgene.2021.595436 Abstract, p. 3, right column to p. 5, right column, fig. 2, 3	1-3, 8-9
X	YANG, Linqi et al., Evaluation of the Prognostic Relevance of Differential Claudin Gene Expression Highlights Claudin-4 as Being Suppressed by TGFβ1 Inhibitor in Colorectal Cancer, Frontiers in Genetics, 2022, vol. 13, article 783016, doi: 10.3389/fgene.2022.783016 Abstract, Results	1-3, 8-9
X	RIBEIRO, Ilda et al., A seven-gene signature to predict the prognosis of oral squamous cell carcinoma, Oncogene, 2021, vol. 40, no. 22, pp. 3859-3869, doi: 10.1038/s41388-021-01806-5 Abstract	1-3, 8-9
X	CN 115851611 A (SUZHOU RENDUAN BIOMEDICAL TECHNOLOGY CO., LTD.) 28 March 2023 (2023-03-28) claims, paragraphs [0002]-[0003]	1-3

☑ 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
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
05 December 2024	**17 December 2024**
Name and mailing address of the ISA/JP **Japan Patent Office (ISA/JP)** **3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915** **Japan**	Authorized officer Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 115820744 A (SUZHOU RENDUAN BIOMEDICAL TECHNOLOGY CO., LTD.) 21 March 2023 (2023-03-21) claims, paragraph [0001]	1-3
X	US 2014/0357518 A1 (ONCOCYTE CORPORATION) 04 December 2014 (2014-12-04) claims, paragraphs [0023], [0271], example 7, fig. 7	1-3
A	JP 2020-536507 A (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 17 December 2020 (2020-12-17) claims	1-3, 8-9
X	茂村 碧 ほか, 細胞接着分子クローディン16は卵巣癌の新規バイオマーカーである, 電気泳動, 18 May 2023, vol. 67, Suppl., p. s59, (Electrophoresis Letters), non-official translation (SHIGEMURA, Ao et al., The cell adhesion molecule Claudin-16 is a novel biomarker for ovarian cancer) entire text, all drawings	1-3, 8-9
X	茂村 碧 ほか, 細胞間接着分子クローディン-16の新規卵巣癌診断マーカーとしての可能性, 日本病理学会会誌, 07 October 2022, vol. 111, no. 2, p. 109, (SHIGEMURA, Ao et al., Claudin-16, a novel biomarker for ovarian cancer, Proceedings of the Japanese Society of Pathology) entire text	1-3, 8-9
P, X	杉本 幸太郎 ほか, 細胞間接着分子クローディン16に対する卵巣癌の抗体療法, 日本病理学会会誌, 29 February 2024, vol. 113, no. 1, p. 429, (SUGIMOTO, Kotaro et al., Claudin-16 is a novel therapeutic target for ovarian cancer, Proceedings of the Japanese Society of Pathology) entire text	1-3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2024/035559

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed.
   b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)),
      ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2024/035559

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:

(Invention 1) Claims 1-3 and 8-9

Claims 1-3 and claims 8-9 lack novelty in the light of documents 1-6 and documents 1-3, respectively, and therefore do not have a special technical feature. However, claims 1-3 and 8-9, which are dependent from claim 1, are classified as invention 1.

Document 1 (fig. 3A) indicates, with regard to the correlation between the expression of claudin family members and the prognosis of ovarian cancer, that overexpression of CLDN16 is significantly correlated with poor OS (overall survival).

Document 2 (fig. 4) describes evaluating the association between the expression of claudin family members and the prognosis of colorectal cancer, and indicates that CLDN16 is significantly associated with lymph node metastasis.

Document 3 (Abstract) describes CLDN16 as a biomarker for predicting the prognosis of oral squamous cell carcinoma (a type of head and neck cancer).

Document 4 indicates that it has been shown that Claudin-16 is expressed at a high level in most ovarian cancer tissues, and that Claudin-16 can be used as a specific marker for ovarian cancer (paragraph [0003]), and describes creating an anti-Claudin16 monoclonal antibody for ovarian cancer detection (claims).

Document 5 (claims) indicates that Claudin-16 is highly expressed in ovarian cancer cells and that Claudin-16 is a target for ovarian cancer treatment, and describes a cancer treatment agent containing fragments of anti-Claudin-16 antibody.

Document 6 (claims, example 7, and fig. 7) indicates, in relation to the diagnosis and treatment of thyroid cancer, that an elevated level of CLDN16 expression in a subject sample indicates that the subject has thyroid cancer. Document 6 (paragraphs [0023] and [0271]) also describes antigens associated with thyroid cancer as targets for therapeutic antibodies, and describes CLDN16 as these antigens.

(Invention 2) Claims 4-7 and 10

As described above in (Invention 1), CLDN16 and antibodies thereof lack novelty, and therefore claim 4 cannot be said to share any same or corresponding technical features with claims 1-3 and 8-9, classified as invention 1.

Claims 4-7 and 10 have the technical feature of an anti-CLDN16 antibody with identified heavy-chain and light-chain variable region sequences, and are therefore classified as invention 2.

(Invention 3) Claims 11-14

The invention in claim 1 is a biomarker of cancer, which is used to predict the prognosis of a cancer patient or to detect cancer, whereas the invention in claim 11 is a cancer treatment agent, and therefore these inventions cannot be said to share any same or corresponding technical features.

Accordingly, claims 11-14 are classified as invention 3.

Document 1: GAO, Peipei et al., Association of CLDN6 and CLDN10 With Immune Microenvironment in Ovarian Cancer: A Study of the Claudin Family, Frontiers in Genetic, vol. 12, article 595436, doi: 10.3389/fgene.2021.595436

Document 2: YANG, Linqi et al., Evaluation of the Prognostic Relevance of Differential Claudin Gene Expression Highlights Claudin-4 as Being Suppressed by TGFβ1 Inhibitor in Colorectal Cancer, Frontiers in Genetics, vol. 13, article 783016, doi: 10.3389/fgene.2022.783016

Document 3: RIBEIRO, Ribeiro Ilda et al., A seven-gene signature to predict the prognosis of oral squamous cell carcinoma, Oncogene, 2021, vol. 40, no. 22, pp. 3859-3869, doi: 10.1038/s41388-021-01806-5

Document 4: CN 115851611 A (SUZHOU RENDUAN BIOMEDICAL TECHNOLOGY CO., LTD.) 28 March 2023 (2023-03-28), claims, paragraphs [0002]-[0003] (Family: none)

Document 5: CN 115820744 A (SUZHOU RENDUAN BIOMEDICAL TECHNOLOGY CO., LTD.) 21 March 2023 (2023-03-21), claims, paragraph [0001] (Family: none)

Document 6: US 2014/0357518 A1 (ONCOCYTE CORPORATION) 04 December 2014 (2014-12-04), claims, paragraphs [0023], [0271], example 7, fig. 7 & WO 2013/106747 A2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2024/035559

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first 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.: **Claims 1-3, 8-9**

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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2024/035559

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN 115851611 A	28 March 2023	(Family: none)	
CN 115820744 A	21 March 2023	(Family: none)	
US 2014/0357518 A1	04 December 2014	WO 2013/106747 A2	
JP 2020-536507 A	17 December 2020	US 2020/0291111 A1 claims WO 2019/056023 A2 KR 10-2020-0070238 A CN 111565744 A	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2024/035559

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

G01N 33/574(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; C07K 16/30(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; G01N 33/50(2006.01)i; G01N 33/68(2006.01)i
FI: G01N33/574 A ZNA; A61K39/395 N; A61P35/00; C07K16/30; C12N15/13; G01N33/50 P; G01N33/68

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

G01N33/574; A61K39/395; A61P35/00; C07K16/30; C12N15/13; G01N33/50; G01N33/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０２４年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２４年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２４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 (JDreamIII)

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	GAO, Peipei et al., Association of CLDN6 and CLDN10 With Immune Microenvironment in Ovarian Cancer: A Study of the Claudin Family, Frontiers in Genetic, 2021, Vol.12, Article 595436, doi：10.3389/fgene.2021.595436 Abstract, 3頁右欄-5頁右欄, 図2, 図3	1-3,8-9
X	YANG, Linqi et al., Evaluation of the Prognostic Relevance of Differential Claudin Gene Expression Highlights Claudin-4 as Being Suppressed by TGFβ1 Inhibitor in Colorectal Cancer, Frontiers in Genetics, 2022, Vol.13, Article 783016, doi：10.3389/fgene.2022.783016 Abstract, Results	1-3,8-9
X	RIBEIRO, Ilda et al., A seven-gene signature to predict the prognosis of oral squamous cell carcinoma, Oncogene, 2021, Vol.40, No.22, Pages.3859-3869, doi：10.1038/s41388-021-01806-5 Abstract	1-3,8-9

☑ 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
"D" 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献
"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抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
"X" 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
"Y" 特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
"&" 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
05.12.2024	17.12.2024

名称及びあて先
日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

権限のある職員（特許庁審査官）
大瀧　真理 2J 9812

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

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	CN 115851611 A (SUZHOU RENDUAN BIOMEDICAL TECHNOLOGY CO., LTD.) 28.03.2023 (2023-03-28) [特許請求の範囲],[0002]-[0003]	1-3
X	CN 115820744 A (SUZHOU RENDUAN BIOMEDICAL TECHNOLOGY CO., LTD.) 21.03.2023 (2023-03-21) [特許請求の範囲]、[0001]	1-3
X	US 2014/0357518 A1 (ONCOCYTE CORPORATION) 04.12.2014 (2014-12-04) [特許請求の範囲]、[0023]、[0271]、[実施例７]、[図7]	1-3
A	JP 2020-536507 A (ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ オブ カリフォルニア) 17.12.2020 (2020-12-17) [特許請求の範囲]	1-3,8-9
X	茂村 碧 ほか, 細胞接着分子クローディン16は卵巣癌の新規バイオマーカーである, 電気泳動, 2023.05.18, Vol.67, Suppl., Page.s59 全文,全図	1-3,8-9
X	茂村 碧 ほか, 細胞間接着分子クローディン-16の新規卵巣癌診断マーカーとしての可能性, 日本病理学会会誌 , 2022.10.07, Vol.111, No.2, Page.109 全文	1-3,8-9
P, X	杉本 幸太郎 ほか, 細胞間接着分子クローディン16に対する卵巣癌の抗体療法, 日本病理学会会誌, 2024.02.29, Vol.113, No.1, Page.429 全文	1-3

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2024/035559

第Ⅰ欄　　ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第１ページの１．ｃの続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

a. ☑ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
b. ☐ 国際出願日後に、国際調査のために提出された配列表（ＰＣＴ規則13の3.1(a)）
☐ 配列表が出願時の国際出願の開示の範囲を超えるものではない旨の陳述書が添付されていた。

2. ☐ この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、この国際調査報告は、WIPO標準ST.26に準拠する配列表なしで有意義な国際調査をすることができる限度において作成された。

3. 補足意見:

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2024/035559

第Ⅲ欄　発明の単一性が欠如しているときの意見（第１ページの３の続き）

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

（発明１）請求項１－３、８－９
請求項１－３は文献１－６により、請求項８－９は文献１－３により、新規性が欠如しているため、特別な技術的特徴を有しない。しかしながら、請求項１の従属請求項である請求項１－３、８－９を発明１に区分する。

文献１には、クローディンファミリーの発現と卵巣がんの予後との相関について、CLDN16の過剰発現は、OS（全生存率）不良と有意に相関したことが記載されている（図3A）。
文献２には、クローディンファミリーの発現と大腸がんの予後との関連を評価したことが記載されており、CLDN16がリンパ節転移との間に有意な関連があることが記載されている（図４）。
文献３には、口腔扁平上皮がん（頭頸部がんの一種）の予後を予測するバイオマーカーとして、CLDN16が記載されている（Abstract）。
文献４には、Claudin 16が大部分の卵巣がん組織において高レベルの発現を有し、Claudin16が卵巣がん特異的マーカーとして使用できることが既に示されていることが記載されており（［0003］）、卵巣がん検出用の、抗Claudin16モノクローナル抗体を作成したこと（[特許請求の範囲]）が記載されている。
文献５には、Claudin 16が卵巣がん細胞に高発現すること及びClaudin 16が卵巣がん治療の標的であることが記載されており、抗Claudin 16抗体の断片を含む、がん治療剤が記載されている（[特許]請求の範囲]）。
文献６には、甲状腺がんの診断及び治療に関し、被験体試料における、CLDN16の発現のより高いレベルは、被験体が甲状腺がんを有することを示すことが記載されている（[特許請求の範囲]、[実施例7]、[図７]）。また文献６には、治療用抗体の標的として、甲状腺がんと関連する抗原が記載されており、該抗原としてCLDN16が記載されている（[0023]、[0271]）。

（発明２）請求項４－７、１０
CLODN16及びその抗体は、（発明１）に記載したように新規性が欠如しているため、請求項４は、発明１に区分された請求項１－３、８－９と、同一の又は対応する技術的特徴を有しているとはいえない。
そして、請求項４－７、１０は、重鎖可変領域と軽鎖可変領域の配列が特定された、抗CLDN16抗体という技術的特徴を有しているので、発明２に区分する。

（発明３）請求項１１－１４
請求項１に係る発明は、がんのバイオマーカーであって、癌患者の予後を予測するための、又はがんを検出するためのマーカーであるのに対し、請求項１１に係る発明は、がん治療剤であるから、同一の又は対応する技術的特徴を有しているとはいえない。
よって、請求項１１－１４は、発明３に区分する。

文献1: PEIPEI, Gao et al., Association of CLDN6 and CLDN10 With Immune Microenvironment in Ovarian Cancer: A Study of the Claudin Family, Frontiers in Genetic, Vol.12, Article 595436, doi：10.3389/fgene.2021.595436
文献2: YANG, Linqi et al., Evaluation of the Prognostic Relevance of Differential Claudin Gene Expression Highlights Claudin-4 as Being Suppressed by TGFβ1 Inhibitor in Colorectal Cancer, Frontiers in Genetics, Vol.13, Article 783016, doi：10.3389/fgene.2022.783016
文献3: RIBEIRO, Ribeiro Ilda et al., A seven-gene signature to predict the prognosis of oral squamous cell carcinoma, Oncogene, 2021, Vol.40, No.22, Pages.3859-3869, doi：10.1038/s41388-021-01806-5
文献4: CN 115851611 A (SUZHOU RENDUAN BIOMEDICAL TECHNOLOGY CO., LTD.) 28.03.2023(2023-03-28)　[特許請求の範囲],[0002]-[0003]（ファミリーなし）
文献5: CN 115820744 A (SUZHOU RENDUAN BIOMEDICAL TECHNOLOGY CO., LTD.) 21.03.2023(2023-03-21)　[特許請求の範囲]、[0001]（ファミリーなし）
文献6: US 2014/0357518 A1 (ONCOCYTE CORPORATION) 04.12.2014(2014-12-04)　[特許請求の範囲]、[0023]、[0271]、[実施例７]、[図7] & WO 2013/106747 A2

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2024/035559

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）

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ので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求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ので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。 請求項１－３、８－９

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。

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2024/035559

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
CN 115851611 A	28.03.2023	（ファミリーなし）	
CN 115820744 A	21.03.2023	（ファミリーなし）	
US 2014/0357518 A1	04.12.2014	WO 2013/106747 A2	
JP 2020-536507 A	17.12.2020	US 2020/0291111 A1 [特許請求の範囲] WO 2019/056023 A2 KR 10-2020-0070238 A CN 111565744 A	