45 Ritchie, M., Tchistiakova, L. and Scott, N. (2013) Implications of receptor-mediated endocytosis and intracellular trafficking dynamics in the development of antibody drug conjugates. MAbs **5**, 13–21 CrossRef PubMed

46 Chari, R.V. (2008) Targeted cancer therapy: conferring specificity to cytotoxic drugs. Acc. Chem. Res. **41**, 98–107 CrossRef PubMed

47 Teicher, B.A. and Chari, R.V. (2011) Antibody conjugate therapeutics: challenges and potential. Clin. Cancer Res. **17**, 6389–6397 CrossRef PubMed

48 Jilani, I., Estey, E., Huh, Y., Joe, Y., Manshouri, T., Yared, M., Giles, F., Kantarjian, H., Cortes, J., Thomas, D. et al. (2002) Differences in CD33 intensity between various myeloid neoplasms. Am. J. Clin. Pathol. **118**, 560–566 CrossRef PubMed

49 Ricart, A.D. (2011) Antibody-drug conjugates of calicheamicin derivative: gemtuzumab ozogamicin and inotuzumab ozogamicin. Clin. Cancer Res. **17**, 6417–6427 CrossRef PubMed

50 Bernstein, I.D. (2000) Monoclonal antibodies to the myeloid stem cells: therapeutic implications of CMA-676, a humanized anti-CD33 antibody calicheamicin conjugate. Leukemia **14**, 474–475 CrossRef PubMed

51 Carter, P.J. and Senter, P.D. (2008) Antibody-drug conjugates for cancer therapy. Cancer J. **14**, 154–169 CrossRef PubMed

52 Xie, H. and Blattler, W.A. (2006) *In vivo* behaviour of antibody-drug conjugates for the targeted treatment of cancer. Expert Opin. Biol. Ther. **6**, 281–291 CrossRef PubMed

53 Kononen, J., Bubendorf, L., Kallioniemi, A., Barlund, M., Schraml, P., Leighton, S., Torhorst, J., Mihatsch, M.J., Sauter, G. and Kallioniemi, O.P. (1998) Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. Nat. Med. **4**, 844–847 CrossRef PubMed

54 Beck, A., Lambert, J., Sun, M. and Lin, K. (2012) Fourth World Antibody-Drug Conjugate Summit: February 29–March 1, 2012, Frankfurt, Germany. MAbs **4**, 637–647 CrossRef PubMed

55 Burris, 3rd, H.A., Rugo, H.S., Vukelja, S.J., Vogel, C.L., Borson, R.A., Limentani, S., Tan-Chiu, E., Krop, I.E., Michaelson, R.A., Girish, S. et al. (2011) Phase II study of the antibody drug conjugate trastuzumab-DM1 for the treatment of human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-positive breast cancer after prior HER2-directed therapy. J. Clin. Oncol. **29**, 398–405 CrossRef PubMed

56 Blanc, V., Bousseau, A., Caron, A., Carrez, C., Lutz, R.J. and Lambert, J.M. (2011) SAR3419: an anti-CD19-Maytansinoid Immunoconjugate for the treatment of B-cell malignancies. Clin. Cancer Res. **17**, 6448–6458 CrossRef PubMed

57 Lapusan, S., Vidriales, M.B., Thomas, X., de Botton, S., Vekhoff, A., Tang, R., Dumontet, C., Morariu-Zamfir, R., Lambert, J.M., Ozoux, M.L. et al. (2012) Phase I studies of AVE9633, an anti-CD33 antibody-maytansinoid conjugate, in adult patients with relapsed/refractory acute myeloid leukemia. Invest. New Drugs **30**, 1121–1131 CrossRef PubMed

58 Mathur, R. and Weiner, G.J. (2013) Picking the optimal target for antibody-drug conjugates. Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book, doi: 10.1200/EdBook_AM.2013.33.e103

59 Panchal, R.G. (1998) Novel therapeutic strategies to selectively kill cancer cells. Biochem. Pharmacol. **55**, 247–252 CrossRef PubMed

60 Bhaskar, V., Law, D.A., Ibsen, E., Breinberg, D., Cass, K.M., DuBridge, R.B., Evangelista, F., Henshall, S.M., Hevezi, P., Miller, J.C. et al. (2003) E-selectin up-regulation allows for targeted drug delivery in prostate cancer. Cancer Res. **63**, 6387–6394 PubMed

61 Walter, R.B., Raden, B.W., Kamikura, D.M., Cooper, J.A. and Bernstein, I.D. (2005) Influence of CD33 expression levels and ITIM-dependent internalization on gemtuzumab ozogamicin-induced cytotoxicity. Blood **105**, 1295–1302 CrossRef PubMed

62 Beeram, M., Burris, H.A., Modi, S., Birkner, M., Girish, S., Tibbits, J., Holden, S.N., Lutzker, S.G. and Krop, I.E. (2008) A phase I study of trastuzumab-DM1 (T-DM1), a first-in-class HER2 antibody-drug conjugate (ADC), in patients (pts) with advanced HER2 + breast cancer (BC). J. Clin. Oncol. **26**, 1028

63 Slamon, D.J., Clark, G.M., Wong, S.G., Levin, W.J., Ullrich, A. and McGuire, W.L. (1987) Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. Science **235**, 177–182 CrossRef PubMed

64 Rubin, I. and Yarden, Y. (2001) The basic biology of HER2. Ann. Oncol. **12** Suppl 1, S3–S8 CrossRef PubMed

65 Kennedy, S.G., Wagner, A.J., Conzen, S.D., Jordan, J., Bellacosa, A., Tsichlis, P.N. and Hay, N. (1997) The PI 3-kinase/Akt signaling pathway delivers an anti-apoptotic signal. Genes Dev. **11**, 701–713 CrossRef PubMed

66 Shapiro, P. (2002) Ras-MAP kinase signaling pathways and control of cell proliferation: relevance to cancer therapy. Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. **39**, 285–330 CrossRef PubMed

67 Vater, C.A. and Goldmacher, V.S. (2009) Antibody-cytotoxic compound conjugates for oncology. Macromolecular Anticancer Therapeutics (Reddy, L.H. and Couvreur, P., eds), pp. 331–369, Springer-Verlag New York Inc., New York

68 Teicher, B.A. (2009) Antibody-drug conjugate targets. Curr. Cancer Drug. Targets **9**, 982–1004 CrossRef PubMed

69 Boyiadzis, M. and Foon, K.A. (2008) Approved monoclonal antibodies for cancer therapy. Expert Opin. Biol. Ther. **8**, 1151–1158 CrossRef PubMed

70 Wu, Y., Cain-Hom, C., Choy, L., Hagenbeek, T.J., de Leon, G.P., Chen, Y., Finkle, D., Venook, R., Wu, X., Ridgway, J. et al. (2010) Therapeutic antibody targeting of individual Notch receptors. Nature **464**, 1052–1057 CrossRef PubMed

71 Mukherjee, S., Richardson, A.M., Rodriguez-Canales, J., Ylaya, K., Erickson, H.S., Player, A., Kawasaki, E.S., Pinto, P.A., Choyke, P.L., Merino, M.J. et al. (2009) Identification of EpCAM as a molecular target of prostate cancer stroma. Am. J. Pathol. **175**, 2277–2287 CrossRef PubMed

72 Hofmeister, V., Schrama, D. and Becker, J.C. (2008) Anti-cancer therapies targeting the tumor stroma. Cancer Immunol. Immunother. **57**, 1–17 CrossRef PubMed

73 Schliemann, C. and Neri, D. (2010) Antibody-based vascular tumor targeting. Recent Results Cancer Res. **180**, 201–216 PubMed

74 Kerbel, R.S. (1991) Inhibition of tumor angiogenesis as a strategy to circumvent acquired resistance to anti-cancer therapeutic agents. Bioessays **13**, 31–36 CrossRef PubMed

75 Minchinton, A.I. and Tannock, I.F. (2006) Drug penetration in solid tumours. Nat. Rev. Cancer. **6**, 583–592 CrossRef PubMed

76 Jain, R.K. (2005) Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. Science **307**, 58–62 CrossRef PubMed

77 Mahadevan, D. and Von Hoff, D.D. (2007) Tumor-stroma interactions in pancreatic ductal adenocarcinoma. Mol. Cancer Ther. **6**, 1186–1197 CrossRef PubMed

78 Shin, W.S., Kwon, J., Lee, H.W., Kang, M.C., Na, H.W., Lee, S.T. and Park, J.H. (2013) Oncogenic role of protein tyrosine kinase 7 in esophageal squamous cell carcinoma. Cancer Sci. **104**, 1120–1126 CrossRef PubMed

79 Wang, W., Wang, E.Q. and Balthasar, J.P. (2008) Monoclonal antibody pharmacokinetics and pharmacodynamics. Clin. Pharmacol. Ther. **84**, 548–558 CrossRef PubMed

80 Albanell, J., Codony, J., Rovira, A., Mellado, B. and Gascon, P. (2003) Mechanism of action of anti-HER2 monoclonal antibodies: scientific update on trastuzumab and 2C4. Adv. Exp. Med. Biol. **532**, 253–268 PubMed

81 Natsume, A., Niwa, R. and Satoh, M. (2009) Improving effector functions of antibodies for cancer treatment: enhancing ADCC and CDC. Drug Des. Devel. Ther. **3**, 7–16 PubMed

Downloaded from https://portlandpress.com/biosciencereports-pdf/35/4/e00225/477154/bsr035e225.pdf by guest on 19 November 2019

© 2015 Authors. This is an open access article published by Portland Press Limited and distributed under the Creative Commons Attribution License 3.0.

82 Senter, P.D. (2009) Potent antibody drug conjugates for cancer therapy. Curr. Opin. Chem. Biol. **13**, 235–244 CrossRef PubMed
83 Rudnick, S.I., Lou, J., Shaller, C.C., Tang, Y., Klein-Szanto, A.J., Weiner, L.M., Marks, J.D. and Adams, G.P. (2011) Influence of affinity and antigen internalization on the uptake and penetration of Anti-HER2 antibodies in solid tumors. Cancer Res. **71**, 2250–2259 CrossRef PubMed
84 Schroff, R.W., Foon, K.A., Beatty, S.M., Oldham, R.K. and Morgan, Jr, A.C. (1985) Human anti-murine immunoglobulin responses in patients receiving monoclonal antibody therapy. Cancer Res. **45**, 879–885 PubMed
85 Liu, A.Y., Robinson, R.R., Hellström, K.E., Murray, E.D., Chang, C.P. and Hellström, I. (1987) Chimeric mouse-human IgG1 antibody that can mediate lysis of cancer cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **84**, 3439–3443 CrossRef PubMed
86 Almagro, J.C. and Fransson, J. (2008) Humanization of antibodies. Front. Biosci. **13**, 1619–1633 PubMed
87 Katz, J., Janik, J.E. and Younes, A. (2011) Brentuximab Vedotin (SGN-35). Clin. Cancer Res. **17**, 6428–6436 CrossRef PubMed
88 Ikeda, H., Hideshima, T., Fulciniti, M., Lutz, R.J., Yasui, H., Okawa, Y., Kiziltepe, T., Vallet, S., Pozzi, S., Santo, L. et al. (2009) The monoclonal antibody nBT062 conjugated to cytotoxic Maytansinoids has selective cytotoxicity against CD138-positive multiple myeloma cells *in vitro* and *in vivo*. Clin. Cancer Res. **15**, 4028–4037 CrossRef PubMed
89 Peters, S.A. (2012) Physiologically-based pharmacokinetics of biotheraputics. Physiologically-Based Pharmacokinetic (PBPK) Modeling and Simulations: Principles, Methods And Applications In The Pharmaceutical Industry, pp. 209–259, John Wiley & Sons, New Jersey CrossRef
90 Drachman, J.G. and Senter, P.D. (2013) Antibody-drug conjugates: the chemistry behind empowering antibodies to fight cancer. Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program. **2013**, 306–310 CrossRef PubMed
91 Dudley, A.C. (2012) Tumor endothelial cells. Cold Spring Harb. Perspect. Med. **2**, a006536 CrossRef PubMed
92 Henderson, L.A., Baynes, J.W. and Thorpe, S.R. (1982) Identification of the sites of IgG catabolism in the rat. Arch. Biochem. Biophys. **215**, 1–11 CrossRef PubMed
93 Moldoveanu, Z., Epps, J.M., Thorpe, S.R. and Mestecky, J. (1988) The sites of catabolism of murine monomeric IgA. J. Immunol. **141**, 208–213 PubMed
94 Ferl, G.Z., Kenanova, V., Wu, A.M. and DiStefano, J. J., 3rd. (2006) A two-tiered physiologically based model for dually labeled single-chain Fv-Fc antibody fragments. Mol. Cancer Ther. **5**, 1550–1558 CrossRef PubMed
95 Lee, T.Y., Tjin Tham Sjin, R.M., Movahedi, S., Ahmed, B., Pravda, E.A., Lo, K.M., Gillies, S.D., Folkman, J. and Javaherian, K. (2008) Linking antibody Fc domain to endostatin significantly improves endostatin half-life and efficacy. Clin. Cancer Res. **14**, 1487–1493 CrossRef PubMed
96 Borvak, J., Richardson, J., Medesan, C., Antohe, F., Radu, C., Simionescu, M., Ghetie, V. and Ward, E.S. (1998) Functional expression of the MHC class I-related receptor, FcRn, in endothelial cells of mice. Int. Immunol. **10**, 1289–1298 CrossRef PubMed
97 Wang, Y., Tian, Z., Thirumalai, D. and Zhang, X. (2014) Neonatal Fc receptor (FcRn): a novel target for therapeutic antibodies and antibody engineering. J. Drug Target. **22**, 269–278 CrossRef PubMed
98 Vu, T. and Claret, F.X. (2012) Trastuzumab: updated mechanisms of action and resistance in breast cancer. Front. Oncol. **2**, 62 CrossRef PubMed
99 Weiner, G.J. (2010) Rituximab: mechanism of action. Semin. Hematol. **47**, 115–123 CrossRef PubMed
100 Sharkey, R.M. and Goldenberg, D.M. (2006) Targeted therapy of cancer: new prospects for antibodies and immunoconjugates. CA Cancer J. Clin. **56**, 226–243 CrossRef PubMed
101 Seidel, U.J.E., Schlegel, P. and Lang, P. (2013) Natural killer cell mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity in tumor immunotherapy with therapeutic antibodies. Front. Immunol. **4**, 76 CrossRef PubMed
102 Gelderman, K.A., Tomlinson, S., Ross, G.D. and Gorter, A. (2004) Complement function in mAb-mediated cancer immunotherapy. Trends Immunol. **25**, 158–164 CrossRef PubMed
103 Imai, K. and Takaoka, A. (2006) Comparing antibody and small-molecule therapies for cancer. Nat. Rev. Cancer. **6**, 714–727 CrossRef PubMed
104 Jefferis, R. (2007) Antibody therapeutics: isotype and glycoform selection. Expert Opin. Biol. Ther. **7**, 1401–1413 CrossRef PubMed
105 Salfeld, J.G. (2007) Isotype selection in antibody engineering. Nat. Biotechnol. **25**, 1369–1372 CrossRef PubMed
106 Strome, S.E., Sausville, E.A. and Mann, D. (2007) A mechanistic perspective of monoclonal antibodies in cancer therapy beyond target-related effects. Oncologist **12**, 1084–1095 CrossRef PubMed
107 van der Neut Kolfschoten, M., Schuurman, J., Losen, M., Bleeker, W.K., Martínez-Martínez, P., Vermeulen, E., den Bleker, T.H., Wiegman, L., Vink, T., Aarden, L.A. et al. (2007) Anti-inflammatory activity of human IgG4 antibodies by dynamic Fab arm exchange. Science **317**, 1554–1557 CrossRef PubMed
108 Yoo, E.M., Wims, L.A., Chan, L.A. and Morrison, S.L. (2003) Human IgG2 can form covalent dimers. J. Immunol. **170**, 3134–3138 CrossRef PubMed
109 Oflazoglu, E., Stone, I.J., Gordon, K.A., Grewal, I.S., van Rooijen, N., Law, C.L. and Gerber, H.P. (2007) Macrophages contribute to the antitumor activity of the anti-CD30 antibody SGN-30. Blood **110**, 4370–4372 CrossRef PubMed
110 Thakur, A. and Lum, L.G. (2010) Cancer therapy with bispecific antibodies: clinical experience. Curr. Opin. Mol. Ther. **12**, 340–349 PubMed
111 Garber, K. (2014) Bispecific antibodies rise again. Nat. Rev. Drug Discov. **13**, 799–801 CrossRef PubMed
112 Kim, S.J., Park, Y. and Hong, H.J. (2005) Antibody engineering for the development of therapeutic antibodies. Mol. Cells **20**, 17–29 PubMed
113 Ryan, M.C., Hering, M., Peckham, D., McDonagh, C.F., Brown, L., Kim, K.M., Meyer, D.L., Zabinski, R.F., Grewal, I.S. and Carter, P.J. (2007) Antibody targeting of B-cell maturation antigen on malignant plasma cells. Mol. Cancer Ther. **6**, 3009–3018 CrossRef PubMed
114 Polson, A.G., Williams, M., Gray, A.M., Fuji, R.N., Poon, K.A., McBride, J., Raab, H., Januario, T., Go, M., Lau, J. et al. (2010) Anti-CD22-MCC-DM1: an antibody-drug conjugate with a stable linker for the treatment of non-Hodgkin's lymphoma. Leukemia **24**, 1566–1573 CrossRef PubMed
115 Fujimori, K., Covell, D.G., Fletcher, J.E. and Weinstein, J.N. (1990) A modeling analysis of monoclonal antibody percolation through tumors: a binding-site barrier. J. Nucl. Med. **31**, 1191–1198 PubMed
116 Adams, G.P., Schier, R., McCall, A.M., Simmons, H.H., Horak, E.M., Alpaugh, R.K., Marks, J.D. and Weiner, L.M. (2001) High affinity restricts the localization and tumor penetration of single-chain fv antibody molecules. Cancer Res. **61**, 4750–4755 PubMed
117 Stasi, R. (2008) Gemtuzumab ozogamicin: an anti-CD33 immunoconjugate for the treatment of acute myeloid leukaemia. Expert Opin. Biol. Ther. **8**, 527–540 CrossRef PubMed
118 DiJoseph, J.F., Armellino, D.C., Boghaert, E.R., Khandke, K., Dougher, M.M., Sridharan, L., Kunz, A., Hamann, P.R., Gorovits, B., Udata, C. et al. (2004) Antibody-targeted chemotherapy with CMC-544: a CD22-targeted immunoconjugate of calicheamicin for the treatment of B-lymphoid malignancies. Blood **103**, 1807–1814 CrossRef PubMed

Downloaded from https://portlandpress.com/bioscirep/article-pdf/35/4/e00225/477154/bsr035e225.pdf by guest on 19 November 2019

© 2015 Authors. This is an open access article published by Portland Press Limited and distributed under the Creative Commons Attribution License 3.0.

119 Feld, J., Barta, S.K., Schinke, C., Braunschweig, I., Zhou, Y. and Verma, A.K. (2013) Linked-in: design and efficacy of antibody drug conjugates in oncology. Oncotarget **4**, 397–412 PubMed
120 Jaracz, S., Chen, J., Kuznetsova, L.V. and Ojima, I. (2005) Recent advances in tumor-targeting anticancer drug conjugates. Bioorg. Med. Chem. **13**, 5043–5054 CrossRef PubMed
121 Patil, R., Portilla-Arias, J., Ding, H., Konda, B., Rekechenetskiy, A., Inoue, S., Black, K.L., Holler, E. and Ljubimova, J.Y. (2012) Cellular delivery of doxorubicin via pH-controlled Hydrazone linkage using multifunctional nano vehicle based on poly(β-L-malic acid). Int. J. Mol. Sci. **13**, 11681–11693 CrossRef PubMed
122 Balendiran, G.K., Dabur, R. and Fraser, D. (2004) The role of glutathione in cancer. Cell Biochem. Funct. **22**, 343–352 CrossRef PubMed
123 Sanderson, R.J., Hering, M.A., James, S.F., Sun, M.M., Doronina, S.O., Siadak, A.W., Senter, P.D. and Wahl, A.F. (2005) *In vivo* drug-linker stability of an anti-CD30 dipeptide-linked auristatin immunoconjugate. Clin. Cancer Res. **11**, 843–852 PubMed
124 Koblinski, J.E., Ahram, M. and Sloane, B.F. (2000) Unraveling the role of proteases in cancer. Clin. Chim. Acta **291**, 113–135 CrossRef PubMed
125 Doronina, S.O., Bovee, T.D., Meyer, D.W., Miyamoto, J.B., Anderson, M.E., Morris-Tilden, C.A. and Senter, P.D. (2008) Novel peptide linkers for highly potent antibody-auristatin conjugate. Bioconjug. Chem. **19**, 1960–1963 CrossRef PubMed
126 Polson, A.G., Calemine-Fenaux, J., Chan, P., Chang, W., Christensen, E., Clark, S., de Sauvage, F.J., Eaton, D., Elkins, K., Elliott, J.M. et al. (2009) Antibody-drug conjugates for the treatment of non-Hodgkin's lymphoma: target and linker-drug selection. Cancer Res. **69**, 2358–2364 CrossRef PubMed
127 Erickson, H.K., Park, P.U., Widdison, W.C., Kovtun, Y.V., Garrett, L.M., Hoffman, K., Lutz, R.J., Goldmacher, V.S. and Blattler, W.A. (2006) Antibody-maytansinoid conjugates are activated in targeted cancer cells by lysosomal degradation and linker-dependent intracellular processing. Cancer Res. **66**, 4426–4433 CrossRef PubMed
128 Dosio, F., Brusa, P. and Cattel, L. (2011) Immunotoxins and anticancer drug conjugate assemblies: the role of the linkage between components. Toxins **3**, 848–883 CrossRef PubMed
129 Rosenberg, A.S. (2006) Effects of protein aggregates: an immunologic perspective. Aaps J. **8**, E501–E507 CrossRef PubMed
130 Hamblett, K.J., Senter, P.D., Chace, D.F., Sun, M.M., Lenox, J., Cerveny, C.G., Kissler, K.M., Bernhardt, S.X., Kopcha, A.K., Zabinski, R.F. et al. (2004) Effects of drug loading on the antitumor activity of a monoclonal antibody drug conjugate. Clin. Cancer Res. **10**, 7063–7070 CrossRef PubMed
131 Christiansen, J. and Rajasekaran, A.K. (2004) Biological impediments to monoclonal antibody-based cancer immunotherapy. Mol. Cancer Ther. **3**, 1493–1501 PubMed
132 Kovtun, Y.V. and Goldmacher, V.S. (2007) Cell killing by antibody-drug conjugates. Cancer Lett. **255**, 232–240 CrossRef PubMed
133 Kovtun, Y.V., Audette, C.A., Ye, Y., Xie, H., Ruberti, M.F., Phinney, S.J., Leece, B.A., Chittenden, T., Blattler, W.A. and Goldmacher, V.S. (2006) Antibody-drug conjugates designed to eradicate tumors with homogeneous and heterogeneous expression of the target antigen. Cancer Res. **66**, 3214–3221 CrossRef PubMed
134 Lyon, R.P., Meyer, D.L., Setter, J.R. and Senter, P.D. (2012) Conjugation of anticancer drugs through endogenous monoclonal antibody cysteine residues. Methods Enzymol. **502**, 123–138 PubMed
135 Lewis Phillips, G.D., Li, G., Dugger, D.L., Crocker, L.M., Parsons, K.L., Mai, E., Blattler, W.A., Lambert, J.M., Chari, R.V., Lutz, R.J. et al. (2008) Targeting HER2-positive breast cancer with trastuzumab-DM1, an antibody-cytotoxic drug conjugate. Cancer Res. **68**, 9280–9290 CrossRef PubMed
136 van de Donk, N.W. and Dhimolea, E. (2012) Brentuximab vedotin. MAbs **4**, 458–465 CrossRef PubMed
137 Boylan, N.J., Zhou, W., Proos, R.J., Tolbert, T.J., Wolfe, J.L. and Laurence, J.S. (2013) Conjugation site heterogeneity causes variable electrostatic properties in Fc conjugates. Bioconjug. Chem. **24**, 1008–1016 CrossRef PubMed
138 Bhat, A.S., Rabuka, D. and Bieck, G. (2014) The Next Step in Homogenous Bioconjugate Development: Optimizing Payload Placement and Conjugate Composition. ed.)^eds.). BioProcess International, http://www.bioprocessintl.com/manufacturing/antibody-non-antibody/next-step-homogenous-bioconjugate-development-optimizing-payload-placement-conjugate-composition/
139 Shen, B.Q., Xu, K., Liu, L., Raab, H., Bhakta, S., Kenrick, M., Parsons-Reponte, K.L., Tien, J., Yu, S.F., Mai, E. et al. (2012) Conjugation site modulates the *in vivo* stability and therapeutic activity of antibody-drug conjugates. Nat. Biotechnol. **30**, 184–189 CrossRef PubMed
140 Junutula, J.R., Raab, H., Clark, S., Bhakta, S., Leipold, D.D., Weir, S., Chen, Y., Simpson, M., Tsai, S.P., Dennis, M.S. et al. (2008) Site-specific conjugation of a cytotoxic drug to an antibody improves the therapeutic index. Nat. Biotechnol. **26**, 925–932 CrossRef PubMed
141 Junutula, J.R., Bhakta, S., Raab, H., Ervin, K.E., Eigenbrot, C., Vandlen, R., Scheller, R.H. and Lowman, H.B. (2008) Rapid identification of reactive cysteine residues for site-specific labeling of antibody-Fabs. J. Immunol. Methods **332**, 41–52 CrossRef PubMed
142 Chalker, J.M., Bernardes, G.J., Lin, Y.A. and Davis, B.G. (2009) Chemical modification of proteins at cysteine: opportunities in chemistry and biology. Chem. Asian J. **4**, 630–640 CrossRef PubMed
143 Junutula, J.R., Flagella, K.M., Graham, R.A., Parsons, K.L., Ha, E., Raab, H., Bhakta, S., Nguyen, T., Dugger, D.L., Li, G. et al. (2010) Engineered thio-trastuzumab-DM1 conjugate with an improved therapeutic index to target human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer. Clin. Cancer Res. **16**, 4769–4778 CrossRef PubMed
144 Chen, X.N., Nguyen, M., Jacobson, F. and Ouyang, J. (2009) Charge-based analysis of antibodies with engineered cysteines: from multiple peaks to a single main peak. MAbs **1**, 563–571 CrossRef PubMed
145 Woo, H.J., Lotz, M.M., Jung, J.U. and Mercurio, A.M. (1991) Carbohydrate-binding protein 35 (Mac-2), a laminin-binding lectin, forms functional dimers using cysteine 186. J. Biol. Chem. **266**, 18419–18422 PubMed
146 Dennler, P., Chiotellis, A., Fischer, E., Bregeon, D., Belmant, C., Gauthier, L., Lhospice, F., Romagne, F. and Schibli, R. (2014) Transglutaminase-based chemo-enzymatic conjugation approach yields homogeneous antibody-drug conjugates. Bioconjug. Chem. **25**, 569–578 CrossRef PubMed
147 Yokoyama, K., Nio, N. and Kikuchi, Y. (2004) Properties and applications of microbial transglutaminase. Appl. Microbiol. Biotechnol. **64**, 447–454 CrossRef PubMed
148 Jeger, S., Zimmermann, K., Blanc, A., Grunberg, J., Honer, M., Hunziker, P., Struthers, H. and Schibli, R. (2010) Site-specific and stoichiometric modification of antibodies by bacterial transglutaminase. Angew Chem. Int. Ed. Engl. **49**, 9995–9997 CrossRef PubMed
149 Strop, P., Liu, S.H., Dorywalska, M., Delaria, K., Dushin, R.G., Tran, T.T., Ho, W.H., Farias, S., Casas, M.G., Abdiche, Y. et al. (2013) Location matters: site of conjugation modulates stability and pharmacokinetics of antibody drug conjugates. Chem. Biol. **20**, 161–167 CrossRef PubMed

Downloaded from https://portlandpress.com/biosciencereports-pdf/35/4/e00225/477154/bsr035e225.pdf by guest on 19 November 2019

© 2015 Authors. This is an open access article published by Portland Press Limited and distributed under the Creative Commons Attribution License 3.0.

150 Sunbul, M. and Yin, J. (2009) Site specific protein labeling by enzymatic posttranslational modification. Org. Biomol. Chem. **7**, 3361–3371 CrossRef PubMed
151 Hofer, T., Skeffington, L.R., Chapman, C.M. and Rader, C. (2009) Molecularly defined antibody conjugation through a selenocysteine interface. Biochemistry **48**, 12047–12057 CrossRef PubMed
152 Liu, W., Brock, A., Chen, S. and Schultz, P.G. (2007) Genetic incorporation of unnatural amino acids into proteins in mammalian cells. Nat. Methods **4**, 239–244 CrossRef PubMed
153 Behrens, C.R. and Liu, B. (2014) Methods for site-specific drug conjugation to antibodies. MAbs **6**, 46–53 CrossRef PubMed
154 Wang, L. and Schultz, P.G. (2004) Expanding the genetic code. Angew Chem. Int. Ed. Engl. **44**, 34–66 CrossRef PubMed
155 Johansson, L., Gafvelin, G. and Arner, E.S. (2005) Selenocysteine in proteins-properties and biotechnological use. Biochim. Biophys. Acta **1726**, 1–13 CrossRef PubMed
156 Axup, J.Y., Bajjuri, K.M., Ritland, M., Hutchins, B.M., Kim, C.H., Kazane, S.A., Halder, R., Forsyth, J.S., Santidrian, A.F., Stafin, K. et al. (2012) Synthesis of site-specific antibody-drug conjugates using unnatural amino acids. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **109**, 16101–16106 CrossRef PubMed
157 Zimmerman, E.S., Heibeck, T.H., Gill, A., Li, X., Murray, C.J., Madlansacay, M.R., Tran, C., Uter, N.T., Yin, G., Rivers, P.J. et al. (2014) Production of site-specific antibody-drug conjugates using optimized non-natural amino acids in a cell-free expression system. Bioconjug. Chem. **25**, 351–361 CrossRef PubMed
158 Pietersz, G.A. and Krauer, K. (1994) Antibody-targeted drugs for the therapy of cancer. J. Drug Target. **2**, 183–215 CrossRef PubMed
159 Shih, L.B., Goldenberg, D.M., Xuan, H., Lu, H.W., Mattes, M.J. and Hall, T.C. (1994) Internalization of an intact doxorubicin immunoconjugate. Cancer Immunol. Immunother. **38**, 92–98 CrossRef PubMed
160 Smyth, M.J., Pietersz, G.A. and McKenzie, I.F. (1987) The mode of action of methotrexate-monoclonal antibody conjugates. Immunol. Cell Biol. **65** (Pt 2), 189–200 CrossRef PubMed
161 Lambert, J.M. (2005) Drug-conjugated monoclonal antibodies for the treatment of cancer. Curr. Opin. Pharmacol. **5**, 543–549 CrossRef PubMed
162 Searcey, M. (2002) Duocarmycins--natures prodrugs? Curr. Pharm. Des. **8**, 1375–1389 CrossRef PubMed
163 Dumontet, C. and Jordan, M.A. (2010) Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics. Nat. Rev. Drug Discov. **9**, 790–803 CrossRef PubMed
164 Hartley, J.A. (2011) The development of pyrrolobenzodiazepines as antitumour agents. Expert Opin. Investig. Drugs. **20**, 733–744 CrossRef PubMed
165 Smets, L.A. (1994) Programmed cell death (apoptosis) and response to anti-cancer drugs. Anticancer Drugs **5**, 3–9 CrossRef PubMed
166 Francisco, J.A., Cerveny, C.G., Meyer, D.L., Mixan, B.J., Klussman, K., Chace, D.F., Rejniak, S.X., Gordon, K.A., DeBlanc, R., Toki, B.E. et al. (2003) cAC10-vcMMAE, an anti-CD30-monomethyl auristatin E conjugate with potent and selective antitumor activity. Blood **102**, 1458–1465 CrossRef PubMed
167 Vaklavas, C. and Forero-Torres, A. (2012) Safety and efficacy of brentuximab vedotin in patients with Hodgkin lymphoma or systemic anaplastic large cell lymphoma. Ther. Adv. Hematol. **3**, 209–225 CrossRef PubMed
168 Gerber, H.P., Kung Sutherland, M., Stone, I., Morris-Tilden, C., Miyamoto, J., McCormick, R., Alley, S.C., Okeley, N., Hayes, B., Hernandez-Ilizaliturri, F.J. et al. (2009) Potent antitumor activity of the anti-CD19 auristatin antibody drug conjugate hBU12-vcMMAE against rituximab-sensitive and -resistant lymphomas. Blood **113**, 4352–4361 CrossRef PubMed
169 Okeley, N.M., Miyamoto, J.B., Zhang, X., Sanderson, R.J., Benjamin, D.R., Sievers, E.L., Senter, P.D. and Alley, S.C. (2010) Intracellular activation of SGN-35, a potent anti-CD30 antibody-drug conjugate. Clin. Cancer. Res. **16**, 888–897 CrossRef PubMed
170 Hamel, E. (1992) Natural products which interact with tubulin in the vinca domain: maytansine, rhizoxin, phomopsin A, dolastatins 10 and 15 and halichondrin B. Pharmacol. Ther. **55**, 31–51 CrossRef PubMed
171 Oroudjev, E., Lopus, M., Wilson, L., Audette, C., Provenzano, C., Erickson, H., Kovtun, Y., Chari, R. and Jordan, M.A. (2010) Maytansinoid-antibody conjugates induce mitotic arrest by suppressing microtubule dynamic instability. Mol. Cancer Ther. **9**, 2700–2713 CrossRef PubMed
172 Poon, K.A., Flagella, K., Beyer, J., Tibbitts, J., Kaur, S., Saad, O., Yi, J.H., Girish, S., Dybdal, N. and Reynolds, T. (2013) Preclinical safety profile of trastuzumab emtansine (T-DM1): mechanism of action of its cytotoxic component retained with improved tolerability. Toxicol. Appl. Pharmacol. **273**, 298–313 CrossRef PubMed
173 Conde, C. and Caceres, A. (2009) Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. Nat. Rev. Neurosci. **10**, 319–332 CrossRef PubMed
174 Ikemoto, N., Kumar, R.A., Ling, T.T., Ellestad, G.A., Danishefsky, S.J. and Patel, D.J. (1995) Calicheamicin-DNA complexes: warhead alignment and saccharide recognition of the minor groove. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **92**, 10506–10510 CrossRef PubMed
175 Boger, D.L. and Johnson, D.S. (1995) CC-1065 and the duocarmycins: unraveling the keys to a new class of naturally derived DNA alkylating agents. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **92**, 3642–3649 CrossRef PubMed
176 Jenkins, T.C., Hurley, L.H., Neidle, S. and Thurston, D.E. (1994) Structure of a covalent DNA minor groove adduct with a pyrrolobenzodiazepine dimer: evidence for sequence-specific interstrand cross-linking. J. Med. Chem. **37**, 4529–4537 CrossRef PubMed
177 Minasov, G., Tereshko, V. and Egli, M. (1999) Atomic-resolution crystal structures of B-DNA reveal specific influences of divalent metal ions on conformation and packing. J. Mol. Biol. **291**, 83–99 CrossRef PubMed
178 Lo Coco, F., Ammatuna, E. and Noguera, N. (2006) Treatment of acute promyelocytic leukemia with gemtuzumab ozogamicin. Clin. Adv. Hematol. Oncol. **4**, 57–62, 76–57 PubMed
179 Walker, S., Landovitz, R., Ding, W.D., Ellestad, G.A. and Kahne, D. (1992) Cleavage behavior of calicheamicin gamma 1 and calicheamicin T. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **89**, 4608–4612 CrossRef PubMed
180 Tercel, M., McManaway, S.P., Leung, E., Liyanage, H.D., Lu, G.L. and Pruijn, F.B. (2013) The cytotoxicity of duocarmycin analogues is mediated through alkylation of DNA, not aldehyde dehydrogenase 1: a comment. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. **52**, 5442–5446 CrossRef PubMed
181 Rahman, K.M., Thompson, A.S., James, C.H., Narayanaswamy, M. and Thurston, D.E. (2009) The pyrrolobenzodiazepine dimer SJG-136 forms sequence-dependent intrastrand DNA cross-links and monoalkylated adducts in addition to interstrand cross-links. J. Am. Chem. Soc. **131**, 13766–13766 CrossRef PubMed
182 Pfizer. (2013) Pfizer Discontinues Phase 3 Study of Inotuzumab Ozogamicin in Relapsed or Refractory Aggressive Non-Hodgkin Lymphoma (NHL) Due to Futility. ed.)`eds.), Pfizer, New York, http://press.pfizer.com/press-release/pfizer-discontinues-phase-3-study-inotuzumab-ozogamicin-relapsed-or-refractory-aggress

Downloaded from https://portlandpress.com/bioscirep/article-pdf/35/4/e00225/477154/bsr035e225.pdf by guest on 19 November 2019

© 2015 Authors. This is an open access article published by Portland Press Limited and distributed under the Creative Commons Attribution License 3.0.

183 Liberato, N.L., Marchetti, M. and Barosi, G. (2007) Cost effectiveness of adjuvant trastuzumab in human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer. J. Clin. Oncol. **25**, 625–633 CrossRef PubMed
184 Tran, M., Zhou, B., Pettersson, P.L., Gonzalez, M.J. and Mayfield, S.P. (2009) Synthesis and assembly of a full-length human monoclonal antibody in algal chloroplasts. Biotechnol. Bioeng. **104**, 663–673 PubMed
185 Perez, H.L., Cardarelli, P.M., Deshpande, S., Gangwar, S., Schroeder, G.M., Vite, G.D. and Borzilleri, R.M. (2014) Antibody-drug conjugates: current status and future directions. Drug. Discov. Today **19**, 869–881 CrossRef PubMed
186 Lackner, M.R., Wilson, T.R. and Settleman, J. (2012) Mechanisms of acquired resistance to targeted cancer therapies. Future Oncol. **8**, 999–1014 CrossRef PubMed
187 Cheever, M.A., Allison, J.P., Ferris, A.S., Finn, O.J., Hastings, B.M., Hecht, T.T., Mellman, I., Prindiville, S.A., Viner, J.L., Weiner, L.M. and Matrisian, L.M. (2009) The prioritization of cancer antigens: a national cancer institute pilot project for the acceleration of translational research. Clin. Cancer Res. **15**, 5323–5337 CrossRef PubMed
188 Ellis, L.M. and Hicklin, D.J. (2009) Resistance to targeted therapies: refining anticancer therapy in the era of molecular oncology. Clin. Cancer Res. **15**, 7471–7478 CrossRef PubMed
189 Reslan, L., Dalle, S. and Dumontet, C. (2009) Understanding and circumventing resistance to anticancer monoclonal antibodies. MAbs **1**, 222–229 CrossRef PubMed
190 Logue, J.S. and Morrison, D.K. (2012) Complexity in the signaling network: insights from the use of targeted inhibitors in cancer therapy. Genes Dev. **26**, 641–650 CrossRef PubMed
191 Wu, A.M. and Senter, P.D. (2005) Arming antibodies: prospects and challenges for immunoconjugates. Nat. Biotechnol. **23**, 1137–1146 CrossRef PubMed
192 Kim, K.M., McDonagh, C.F., Westendorf, L., Brown, L.L., Sussman, D., Feist, T., Lyon, R., Alley, S.C., Okeley, N.M., Zhang, X. et al. (2008) Anti-CD30 diabody-drug conjugates with potent antitumor activity. Mol. Cancer Ther. **7**, 2486–2497 CrossRef PubMed
193 Kamada, H., Taki, S., Nagano, K., Inoue, M., Ando, D., Mukai, Y., Higashisaka, K., Yoshioka, Y., Tsutsumi, Y. and Tsunoda, S. (2014) Generation and characterization of a bispecific diabody targeting both EPH receptor A10 and CD3. Biochem. Biophys. Res. Commun. **456**, 908–912 CrossRef PubMed
194 Shimomura, I., Konno, S., Ito, A., Masakari, Y., Orimo, R., Taki, S., Arai, K., Ogata, H., Okada, M., Furumoto, S. et al. (2014) Rearranging the domain order of a diabody-based IgG-like bispecific antibody enhances its antitumor activity and improves its degradation resistance and pharmacokinetics. MAbs **6**, 1243–1254 CrossRef PubMed
195 Asano, R., Kumagai, T., Nagai, K., Taki, S., Shimomura, I., Arai, K., Ogata, H., Okada, M., Hayasaka, F., Sanada, H. et al. (2013) Domain order of a bispecific diabody dramatically enhances its antitumor activity beyond structural format conversion: the case of the hEx3 diabody. Protein Eng. Des. Sel. **26**, 359–367 CrossRef PubMed
196 Smaglo, B.G., Aldeghaither, D. and Weiner, L.M. (2014) The development of immunoconjugates for targeted cancer therapy. Nat. Rev. Clin Oncol. **11**, 637–648 CrossRef PubMed
197 Beck, A. and Reichert, J.M. (2014) Antibody-drug conjugates: present and future. MAbs **6**, 15–17 CrossRef PubMed
198 Minich, S.S. (2012) Brentuximab vedotin: a new age in the treatment of Hodgkin lymphoma and anaplastic large cell lymphoma. Ann. Pharmacother **46**, 377–383 CrossRef PubMed
199 Advani, A., Coiffier, B., Czuczman, M.S., Dreyling, M., Foran, J., Gine, E., Gisselbrecht, C., Ketterer, N., Nasta, S., Rohatiner, A. et al. (2010) Safety, pharmacokinetics, and preliminary clinical activity of inotuzumab ozogamicin, a novel immunoconjugate for the treatment of B-cell non-Hodgkin's lymphoma: results of a phase I study. J. Clin. Oncol. **28**, 2085–2093 CrossRef PubMed
200 Younes, A., Kim, S., Romaguera, J., Copeland, A., Farial Sde, C., Kwak, L.W., Fayad, L., Hagemeister, F., Fanale, M., Neelapu, S. et al. (2012) Phase I multidose-escalation study of the anti-CD19 maytansinoid immunoconjugate SAR3419 administered by intravenous infusion every 3 weeks to patients with relapsed/refractory B-cell lymphoma. J. Clin. Oncol. **30**, 2776–2782 CrossRef PubMed
201 Gromek, S.M. and Balunas, M.J. (2014) Natural products as exquisitely potent cytotoxic payloads for antibody-drug conjugates. Curr. Top. Med. Chem. **14**, 2822–2834 CrossRef
202 Gottesman, M.M. (2002) Mechanisms of cancer drug resistance. Annu. Rev. Med. **53**, 615–627 CrossRef PubMed
203 Leslie, E.M., Deeley, R.G. and Cole, S.P. (2005) Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. Toxicol. Appl. Pharmacol. **204**, 216–237 CrossRef PubMed
204 Ferreira, R.J., Ferreira, M.U. and Santos, D. J. V. A. (2012) Reversing cancer multidrug resistance: insights into the efflux by ABC transports from *in silico* studies. J. Chem. Theory Comput. **8**, 1853–1864 CrossRef
205 Deeley, R.G. and Cole, S.P. (1997) Function, evolution and structure of multidrug resistance protein (MRP). Semin. Cancer Biol. **8**, 193–204 CrossRef PubMed
206 Thomas, H. and Coley, H.M. (2003) Overcoming multidrug resistance in cancer: an update on the clinical strategy of inhibiting p-glycoprotein. Cancer Control **10**, 159–165 PubMed
207 Zhou, S.F., Wang, L.L., Di, Y.M., Xue, C.C., Duan, W., Li, C.G. and Li, Y. (2008) Substrates and inhibitors of human multidrug resistance associated proteins and the implications in drug development. Curr. Med. Chem. **15**, 1981–2039 CrossRef PubMed
208 Kovtun, Y.V., Audette, C.A., Mayo, M.F., Jones, G.E., Doherty, H., Maloney, E.K., Erickson, H.K., Sun, X., Wilhelm, S., Ab, O. et al. (2010) Antibody-maytansinoid conjugates designed to bypass multidrug resistance. Cancer Res. **70**, 2528–2537 CrossRef PubMed
209 Luqmani, Y.A. (2005) Mechanisms of drug resistance in cancer chemotherapy. Med. Princ. Pract. **14** (Suppl 1), 35–48 CrossRef PubMed

Received 9 April 2015/18 May 2015; accepted 29 May 2015

Published as Immediate Publication 10 June 2015, doi 10.1042/BSR20150068

Downloaded from https://portlandpress.com/bioscirep/article-pdf/35/4/e00122547715/bsr035e225.pdf by guest on 09 November 2019

© 2015 Authors. This is an open access article published by Portland Press Limited and distributed under the Creative Commons Attribution License 3.0.

epigenetics

Taylor & Francis

Epigenetics

ISSN: 1559-2294 (Print) 1559-2308 (Online) Journal homepage: https://www.tandfonline.com/loi/kepi20

Cadherin-6 is a putative tumor suppressor and target of epigenetically dysregulated miR-429 in cholangiocarcinoma

Benjamin Goeppert, Christina Ernst, Constance Baer, Stephanie Roessler, Marcus Renner, Arianeb Mehrabi, Mohammadreza Hafezi, Anita Pathil, Arne Warth, Albrecht Stenzinger, Wilko Weichert, Marion Bähr, Rainer Will, Peter Schirmacher, Christoph Plass & Dieter Weichenhan

To cite this article: Benjamin Goeppert, Christina Ernst, Constance Baer, Stephanie Roessler, Marcus Renner, Arianeb Mehrabi, Mohammadreza Hafezi, Anita Pathil, Arne Warth, Albrecht Stenzinger, Wilko Weichert, Marion Bähr, Rainer Will, Peter Schirmacher, Christoph Plass & Dieter Weichenhan (2016) Cadherin-6 is a putative tumor suppressor and target of epigenetically dysregulated miR-429 in cholangiocarcinoma, Epigenetics, 11:11, 780-790, DOI: 10.1080/15592294.2016.1227899

To link to this article: https://doi.org/10.1080/15592294.2016.1227899

View supplementary material

Accepted author version posted online: 03 Sep 2016.
Published online: 01 Nov 2016.

Submit your article to this journal

Article views: 621

View related articles

View Crossmark data

Citing articles: 13 View citing articles

Full Terms & Conditions of access and use can be found at
https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=kepi20

EPIGENETICS
2016, VOL. 11, NO. 11, 780–790
http://dx.doi.org/10.1080/15592294.2016.1227899

Taylor & Francis
Taylor & Francis Group

RESEARCH PAPER

Cadherin-6 is a putative tumor suppressor and target of epigenetically dysregulated miR-429 in cholangiocarcinoma

Benjamin Goeppert[a,*], Christina Ernst[b,*], Constance Baer[b], Stephanie Roessler[a], Marcus Renner[a], Arianeb Mehrabi[c], Mohammadreza Hafezi[c], Anita Pathil[d], Arne Warth[a], Albrecht Stenzinger[a], Wilko Weichert[e], Marion Bähr[b], Rainer Will[f], Peter Schirmacher[a], Christoph Plass[b], and Dieter Weichenhan[b]

[a]Institute of Pathology, University Hospital Heidelberg, Germany; [b]Division of Epigenomics and Cancer Risk Factors, German Cancer Research Center (DKFZ), Heidelberg, Germany; [c]Department of General, Visceral, and Transplantation Surgery, University Hospital Heidelberg, Germany; [d]Department of Internal Medicine IV, Gastroenterology and Hepatology, University Hospital Heidelberg, Germany; [e]Technical University of Munich, University Hospital, Institute for General Pathology and Pathological Anatomy, Germany; [f]Genomics and Proteomics Core Facility, German Cancer Research Center (DKFZ), Heidelberg, Germany

ABSTRACT

Cholangiocarcinoma (CC) is a rare malignancy of the extrahepatic or intrahepatic biliary tract with an outstanding poor prognosis. Non-surgical therapeutic regimens result in minimally improved survival of CC patients. Global genomic analyses identified a few recurrently mutated genes, some of them in genes involved in epigenetic patterning. In a previous study, we demonstrated global DNA methylation changes in CC, indicating major contribution of epigenetic alterations to cholangiocarcinogenesis. Here, we aimed at the identification and characterization of CC-related, differentially methylated regions (DMRs) in potential microRNA promoters and of genes targeted by identified microRNAs. Twenty-seven hypermethylated and 13 hypomethylated potential promoter regions of microRNAs, known to be associated with cancer-related pathways like Wnt, ErbB, and PI3K-Akt signaling, were identified. Selected DMRs were confirmed in 2 independent patient cohorts. Inverse correlation between promoter methylation and expression suggested miR-129-2 and members of the miR-200 family (miR-200a, miR-200b, and miR-429) as novel tumor suppressors and oncomiRs, respectively, in CC. Tumor suppressor genes *deleted in liver cancer 1* (*DLC1*), *F-box/WD-repeat-containing protein 7* (*FBXW7*), and *cadherin-6* (*CDH6*) were identified as presumed targets in CC. Tissue microarrays of a representative and well-characterized cohort of biliary tract cancers (n=212) displayed stepwise downregulation of CDH6 and association with poor patient outcome. Ectopic expression of *CDH6* on the other hand, delayed growth in the CC cell lines EGI-1 and TFK-1, together suggesting a tumor suppressive function of *CDH6*. Our work represents a valuable repository for the study of epigenetically altered miRNAs in cholangiocarcinogenesis and novel putative, CC-related tumor suppressive miRNAs and oncomiRs.

ARTICLE HISTORY
Received 6 July 2016
Revised 14 August 2016
Accepted 18 August 2016

KEYWORDS
Biliary tract cancer; DNA methylation; epigenomics; microRNA; patient survival

Introduction

Cholangiocarcinomas (CCs) are heterogeneous hepatobiliary cancers with features of cholangiocyte differentiation.[1] From a clinical point of view, CC is an orphan cancer with poor patient outcome. Presently, therapeutic options for CC are limited, and surgical resection remains the only option with curative intent. Current clinical trials often employ mixed cohorts of biliary tract cancers (BTCs) including intrahepatic CC (ICC), extrahepatic CC (ECC), and gallbladder carcinoma (GBC) and, so far, promising chemotherapeutic treatment strategies have not been identified.[2] Recurrent mutations in CC have been found in *TP53*, *KRAS*, and *SMAD4*.[3] Profiling for additional mutations using exome sequencing identified mutations in genes associated with functions in epigenetic programming (e.g., *BAP1*, *MLL3*, *ARID1A*, *IDH1*, and *IDH2*) suggesting alterations in epigenetic patterns.[4,5]

Aberrant gene promoter methylation is an early and driving event in carcinogenesis, often manifested in an inverse correlation between the levels of promoter methylation and gene expression.[6] In a recent global DNA methylation screen in ECC and ICC patients, we identified many aberrantly methylated candidate genes related to cancer-relevant signaling pathways, thereby demonstrating the substantial contribution of DNA methylation changes in the pathogenesis of CC.[7]

Aberrant expression of oncogenic or tumor suppressive microRNAs (miRNAs) can also promote carcinogenesis and be attributed to epigenetic dysregulation, as exemplified by cancer-associated promoter hypermethylation of the tumor suppressive miRNAs miR-124a[8] and miR-34b/c.[9,10] When we screened for aberrant methylation of known or suspected miRNA promoters in patients with chronic lymphocytic leukemia, we also found

CONTACT Benjamin Goeppert benjamin.goeppert@med.uni-heidelberg.de Institute of Pathology, University of Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 224, D-69120 Heidelberg, Germany; Dieter Weichenhan d.weichenhan@dkfz.de Epigenomics and Cancer Risk Factors, DKFZ Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 280, D-69120 Heidelberg.

Supplemental data for this article can be accessed on the publisher's website.

*These authors contributed equally to this study.

© 2016 Taylor & Francis Group, LLC

correlations between promoter methylation alterations and miRNA dysregulation.[11] Dysregulation of miRNAs has been also described in CC,[12] but a systematic study of the relation between DNA methylation changes and miRNA expression in CC has not been presented so far.

Here, we correlated our data sets of known or suspected miRNA promoters and global DNA methylation to identify CC-related differentially methylated miRNA promoters. Our results represent a valuable repository enabling to study the role of epigenetically altered miRNAs in the onset and progression of CC. Novel putative oncomiRs and tumor suppressive miRNAs as well as their target genes were identified. For one of them, *CDH6*, encoding cadherin-6, we found a stepwise downregulation at the protein level in cholangiocarcinogenesis and association with patient survival, suggesting that *CDH6* is a putative tumor suppressor in CC.

Results

Aberrantly methylated miRNA promoters in cholangiocarcinoma

To identify aberrantly methylated miRNA promoters in CC, we searched for overlaps between previously published CC-related differentially methylated regions (DMRs)[7] and known or suspected miRNA promoters (for simplicity, henceforth designated miRNA promoters).[13] We considered 1099 hypermethylated and 565 hypomethylated regions, common to more than 50%, i.e., more than 9 of 18 CC cases examined in a previous study, and found overlaps with 27 and 13 miRNA promoters, respectively (Fig. 1; Supplementary Table S2 and S3). All overlapping DMRs were represented in both ECC and ICC. Screening miRCancer,[13] a literature-based database covering 454 cancer-related miRNAs (version December 2014), we found that 20 miRNAs or miRNA families with CC-related promoter DMR had been already described as dysregulated in cancer (Supplementary Table S4); yet, only one of them, miR-200b, in CC.[14]

To substantiate our previous array–based methylation results, we validated several of the miRNA-associated DMRs in CC cohort #1 (see CC cohort #1 in Table 1) using MassARRAY. From the miRNAs with suspected hypermethylated promoters, we selected miR-129-2, miR-9-3, miR-124-2, and miR-9-2, since they have been described as dysregulated in various cancer types (see Supplementary Table S4). The respective DMRs were shared by 12 CC (6 ECC and 6 ICC), 14 CC (8 ECC and 6 ICC), 16 CC (each 8 ECC and ICC), and 14 CC (6 ECC and 8 ICC) samples (Supplementary Fig. S1A-D). MassARRAY analyses revealed significantly higher average methylation levels of the CC samples compared to normal tissue in all 4 selected regions (Supplementary Fig. S2A-D and Supplementary Fig. S3A-D) and confirmed our CpG island array data.[7] Among the miRNAs with hypomethylated promoters, we selected the frequently dysregulated cluster comprising miR-200a, miR-200b, and miR-429 for validation. The three miRNAs share a common promoter that overlaps with a single DMR observed in all 18 previously examined CC samples (Supplementary Fig. S1E). The average methylation levels in the CC samples of cohort #1 were significantly reduced compared to normal samples, confirming our earlier data (Supplementary Fig. S2E-F and Supplementary Fig. S3E-F). In summary, independent validation by MASSARRAY analysis confirmed our previous microarray results for DMRs that were shared by the majority of the CC samples.

Aberrantly methylated miRNA promoters in cholangiocarcinoma target cancer related signaling pathways

We tested, *in silico*, whether signaling pathways might be targeted by miRNAs aberrantly methylated at their promoters in the majority of the CC cohort #1 cases. Using miRPath v.2.0,[15] we identified 100 and 69 signaling pathways targeted by the hypermethylated and

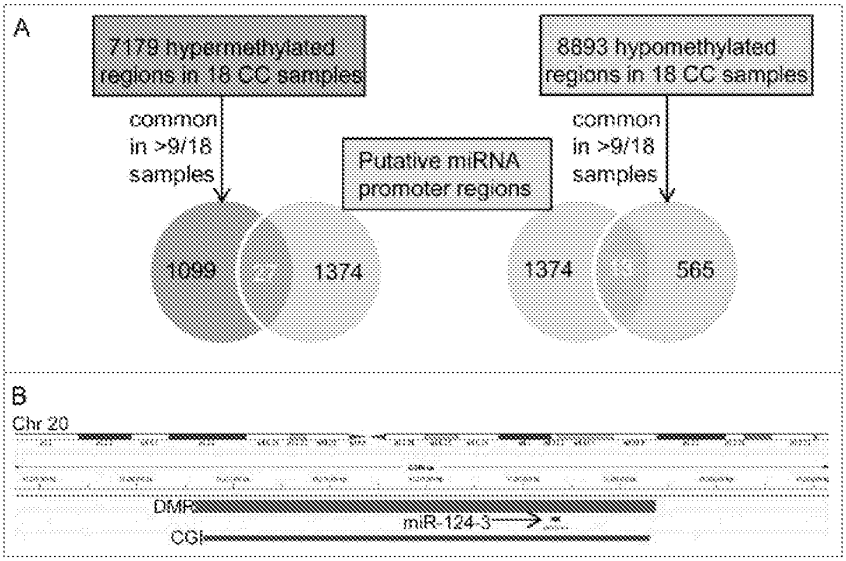


Figure 1. Hypermethylated and hypomethylated miRNA promoters in cholangiocarcinoma identified by overlapping genomic DMR and putative miRNA promoter coordinates. A) From 1374 putative miRNA promoter regions,[13] 27 and 13 overlapped with 1099 hypermethylated and 565 hypomethylated regions, respectively, common to >9/18 CC samples.[7] B) Integrated Genomics Viewer (IGV 2.3)[31] browser view on an example of a hypermethylated DMR common to 17 of 18 CC patients[7] and overlapping with the promoter of miR-124-3 (see Supplementary Table S2). CGI: CpG island.

hypomethylated miRNA promoters, respectively; 63 of the pathways overlapped (Supplementary Fig. S4A-B and Supplementary Table S6). Pathways ranking high in both lists were cancer related, such as the neurotrophin, Wnt, ErbB, PI3K, MAPK, and TGF-β signaling pathway. Notably, the Wnt, PI3K/AKT, MAPK, and TGF-β pathway proved also affected in our earlier study, which focused on the global aberrant methylation of protein coding genes in CC.[7] Thus, additional data presented here not only complements our previous work but also confirms that cancer related signaling pathways are targeted by global epigenetic alterations in CC.

Correlation of miRNA expression and promoter methylation in an independent cholangiocarcinoma validation cohort

We used DNA and RNA preparations from microdissected formalin-fixed paraffin embedded (FFPE) material from 20 CCs (9 ICC and 11 ECC; see CC cohort #2 in Table 1) and 10 control samples (normal bile duct) to correlate expression and promoter methylation of selected miRNAs. Promoter methylation of miR-129-2 was significantly higher in tumor samples compared to normal bile duct specimens (Fig. 2A and Supplementary Fig. S5A). Collectively, expression of miR-129 was lower in ECC and ICC sample groups as compared to the normal extra- and intra-hepatic bile duct samples, but the difference reached statistical significance only for the ECC group (Fig. 2B). Promoter methylation of miR-9-2 and miR-9-3 in CC cohort #2 was less pronounced than in cohort #1, but still reached statistical significance (Supplementary Fig. S6A-B). No miR-9 expression differences, however, could be observed between normal and tumor samples (Supplementary Fig. S6C). For promoter methylation analysis of the clustered miR-200a, miR-200b, and miR-429 and for miR-429 expression analysis, we included additional patients samples (55 ECC, 37 ICC) and controls (92), which were also used in the tissue microarray (TMA) analyses. Methylation was significantly lower in ICC and lower in ECC with borderline significance (Fig. 2C and Supplementary Fig. S5B and S7A). Correspondingly, expression of miR-200a and miR-200b was significantly higher in ICC, but not in ECC, than in the corresponding controls (Supplementary Fig. S7B-C). Expression of miR-429, however, was significantly higher in both ECC and ICC samples, whether considering the samples of cohort #2 alone (data not shown) or in combination with those from the TMA cohort (Fig. 2D). We also observed an inverse correlation between the promoter methylation and miR-429 expression, supporting the notion of promoter methylation-dependent regulation of this miRNA (Supplementary Fig. S8).

Tumor suppressor genes DLC1, FBXW7, and CDH6 are potential targets of miR-200a and miR-429

Upregulation by promoter demethylation of the clustered miR-200a, miR-200b, and miR-429 may contribute to CC by downregulation of target genes with tumor suppressive capability. We performed *in silico* prediction of genes potentially targeted by miR-200a and miR-429, the latter sharing the same seed sequence with miR-200b. Potential targets, 744 for miR-200a and 1057 for miR-429 (Supplementary Table S6), were screened for known downregulated genes in CC.[16,17] Targets with high scores and suspected tumor suppressive potential (Supplementary Table S7) were then tested in a luciferase reporter assay. We observed a reduction by about 40% in luciferase activity for the potential miR-200a target *DLC1* (Supplementary Fig. S9A) and a reduction of about 30 and 20% for potential miR-429 targets *FBXW7* and *CDH6*, respectively (Supplementary Fig. S9B), whereas the other targets remained unaffected (Supplementary Fig. S9A-B). The positive targets *DLC1*, *FBXW7*, and *CDH6* each harbor 2 3′ UTR sequence motifs that perfectly match the seed sequences of either miR-200a or miR-429 (Supplementary Fig. S10A-C).

Table 1. Clinicopathological characteristics of cholangiocarcinoma cohorts #1 and #2 used for methylome and miRNA analyses. Cases with pNx had no lymph nodes resected. 16 cases (ID 1-16) were used in our methylome screen.[7]

Sample ID	CC subtype	Gender	Age (years)	TNM
CC cohort #1				
1	ECC	m	68	pT2, pN0, M0, G2
2	ECC	m	66	pT2, pN0, M0, G2
3	ECC	f	43	pT2, pN0, M0, G2
4	ECC	m	71	pT2, pN0, M0, G2
5	ICC	m	73	pT2, pN0, M0, G2
6	ICC	f	43	pT2, pN0, M0, G2
7	ECC	m	64	pT2, pN0, M0, G2
8	ECC	f	57	pT2, pN0, M0, G2
9	ICC	m	42	pT2, pNx, M0, G2
10	ICC	f	55	pT2, pN1, M0, G2
11	ICC	m	77	pT2, pN0, M0, G2
12	ICC	f	64	pT2, pN0, M0, G2
13	ICC	f	45	pT2, pN1, M0, G3
14	ECC	m	60	pT2, pN0, M0, G3
15	ICC	m	76	pT1, pNx, M0, G1
16	ICC	m	54	pT2, pNx, M0, G2
17	ICC	m	77	pT2, pNx, M0, G3
18	ICC	m	70	pT2, pN0, M0, G2
19	ICC	m	51	pT4, pNx, M0, G2
20	ICC	f	75	pT3, pN1, M1, G2
21	ECC	f	78	pT4, pNx, M1, G3
22	ECC	f	81	pT3, pN1, M0, G3
CC cohort #2				
23	ICC	m	67	pT1, pN0, M0, G2
24	ICC	m	67	pT1, pN0, M0, G2
25	ICC	f	56	pT1, pN0, M0, G3
26	ICC	f	50	pT1, pN1, M0, G3
27	ICC	f	65	pT2, pN0, M0, G2
28	ICC	f	56	pT2, pN0, M0, G2
29	ICC	m	68	pT3, pNx, M0, G2
30	ICC	f	40	pT2, pN0, M0, G2
31	ICC	f	55	pT1, pN0, M0, G1
32	ECC	f	49	pT2, pN1, M0, G3
33	ECC	m	54	pT2, pN0, M0, G2
34	ECC	m	77	pT2, pN0, M0, G2
35	ECC	f	66	pT2, pN0, M0, G2
36	ECC	m	51	pT2, pN0, M0, G2
37	ECC	m	58	pT2, pN0, M0, G2
38	ECC	m	54	pT2, pN0, M0, G2
39	ECC	f	70	pT1, pN0, M0, G2
40	ECC	m	64	pT2, pN0, M0, G2
41	ECC	f	56	pT2, pN0, M0, G3
42	ECC	m	65	pT2, pN0, M0, G2

Protein expression of CDH6 is stepwise downregulated and associated with patient survival in biliary tract cancer

We studied the relevance of DLC1, FBXW7, and CDH6 expression in cholangiocarcinogenesis at the protein level by immunohistochemical analysis of conventional tissue slides and TMAs

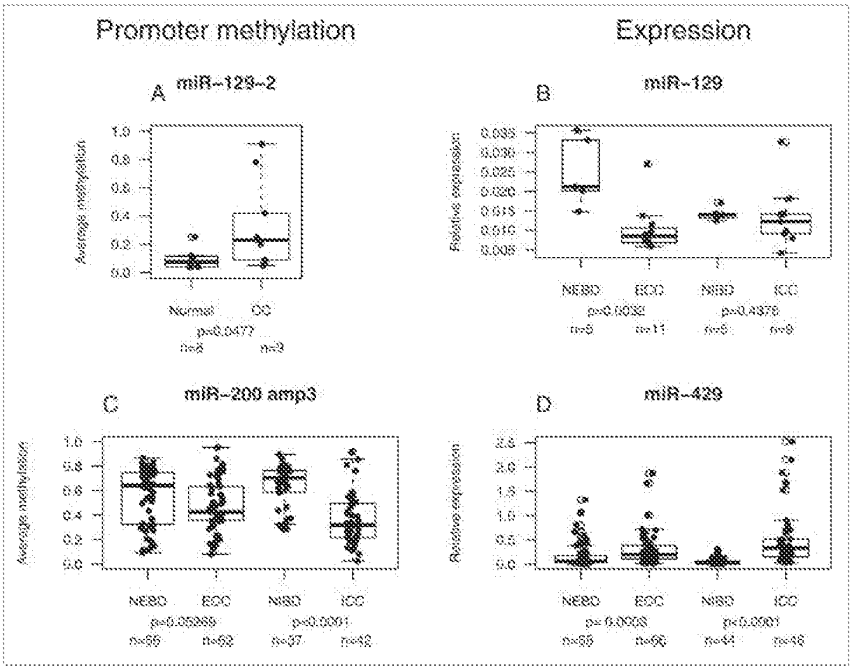


Figure 2. Correlation between miRNA promoter methylation and miRNA expression in CC. Methylation levels of the promoters of miR-129-2 (A) and the co-regulated miR-200a, miR-200b, and miR-429 (C) in cohort #2 and control samples. Corresponding relative expression is shown to the right (B and D). In C) and D), additional patient samples were included (see text). NEBD: normal extrahepatic bile duct; NIBD: normal intrahepatic bile duct.

from normal and biliary tract cancer (BTC) samples. While DLC1 did not show expression in either sample type, FBXW7 displayed strong signals in both normal and tumor samples; thus, appropriate discrimination between expression levels was not possible (data not shown). Potential miR-429 target CDH6, however, showed strong cytoplasmic and membranous staining in normal cholangiocytes of gallbladder and extra- and intrahepatic bile ducts (Fig. 3A), but significantly reduced immunoreactivity in the vast majority of neoplastic tissues (Fig. 3B, C). High CDH6 expression was visible also in some ICC cases (n=11; Fig. 3D, Table 2). Statistical analysis revealed a significantly higher immunoreactive score (IRS) of CDH6 in human normal biliary epithelium than in BTC (Fig. 4A). Significant downregulation of CDH6 could be already observed in BTC precursor lesion BilIN 3 followed by an even more pronounced CDH6 reduction in invasive BTC (Fig 4A). These findings were consistent in all BTC-subgroups (Fig 4B).

We correlated CDH6 expression with miR-429 promoter methylation and expression and compared the data of tumor with that of normal samples for which all 3 data sets were available. Generally, lower promoter methylation correlated with higher miR-429 expression, which, in turn, was inversely correlated with lower CDH6 expression (Supplementary Fig. S11A-D). Comparing ECC (n = 55) with normal EBD (n = 34), CDH6-IRS and miRNA promoter methylation were lower [$P < 0.0001$ and $P = 0.1859$ (not significant), respectively] and miR-429 expression was higher ($P = 0.0006$) in ECC (Supplementary Fig. S11A-B). Similarly, in ICC (n = 36), CDH6-IRS and miRNA promoter methylation were lower ($P = 0.0006$ and $P < 0.0001$, respectively), while miR-429 expression was higher ($P < 0.0001$) than in normal IBD (n = 31) (Supplementary Fig. S11C-D).

Relating CDH6 expression with clinical data, we found a significant positive correlation between expression and tumor-associated patient survival (Fig. 4C; $P = 0.007$). The vast majority of BTC cases showed absent to low (n = 178, IRS 0-4) CDH6 expression. A smaller proportion of tumors showed intermediate/high (n = 23, IRS 6-9) CDH6 expression. These two groups displayed very similar survival curves (data not shown). A minority of cases (n = 11) showed very high (IRS = 12) CDH 6 expression. This group consisted only of ICCs (Table 2; $P < 0.0001$) and was associated with prolonged overall survival both in the complete BTC and in the ICC subgroup (Fig. 4C and D; $P = 0.007$ and $P = 0.0027$, respectively). We also observed a significant positive correlation between very high CDH6 expression (IRS = 12) and lower pT-status of tumors (i.e., pT1 and pT2; Table 2; $P = 0.008$); none of the very high CDH6 expressing ICCs showed perineural tumor invasion (Table 2; $P = 0.008$). For other clinicopathological features, no significant correlation with CDH6 expression was observed (Table 2). Moreover, there was no significant correlation between overall survival and the promoter methylation status of the clustered miR-200a, miR-200b, and miR-429 (Supplementary Fig. S12).

CDH6 delays growth of CC cell lines

To corroborate the potential tumor suppressive function of CDH6, we stably transfected the 2 CC cell lines EGI-1 and TFK-1 with a lentiviral construct harboring *CDH6* under the control of the CMV promoter. While *CDH6*-transfected cells displayed expression of the CDH6 protein, untransfected and GFP transfected cells did not (Supplementary Fig. S13). We monitored growth of serial dilutions of *CDH6* transfectants

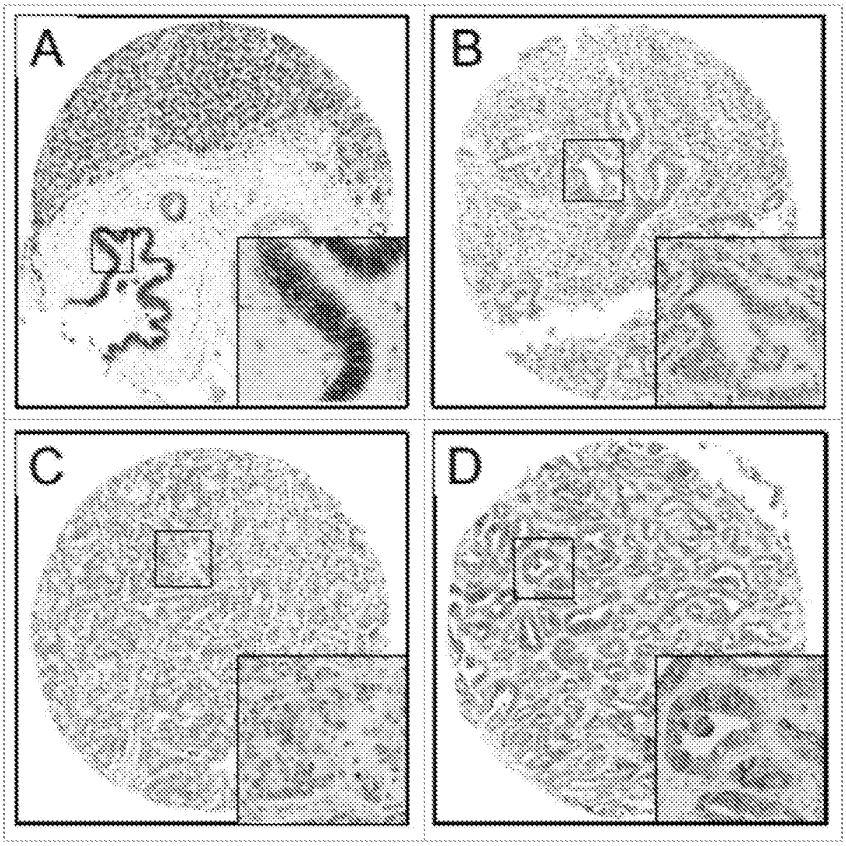


Figure 3. CDH6 expression in CC. High immunoreactivity for CDH6 in (A) normal biliary epithelium (large intrahepatic bile ducts) and (D) exemplary in one intrahepatic cholangiocarcinoma. Low immunoreactivity for CDH6 in (B) one extrahepatic cholangiocarcinoma and (C) one intrahepatic cholangiocarcinoma. Original magnification: 50x, 200x (inset).

and observed delayed growth of both cell lines as compared to the untransfected lines or the GFP transfectants (Fig. 5 and Supplementary Fig. S14). Growth delay by CDH6 was more pronounced for the faster growing TFK-1 than for EGI-1 and could be confirmed in TFK-1 by colony formation assay (Supplementary Fig. S15).

Discussion

Exome and whole-genome sequencing studies of CC patients revealed a number of recurrent somatic mutations, including *FGFR2*-associated translocations[18] and point mutations affecting epigenetically relevant genes, such as *ARID1*, *IDH1*, and *IDH2*.[5] Furthermore, expression profiling demonstrated recurrent dysregulation of miRNAs in CC (reviewed in[19]). In the present study, we aimed to globally identify and exemplarily characterize epigenetic alterations of miRNA promoters in ECC and ICC to advance the epigenetic characterization of CC. Overlapping the genomic coordinates of CC-related DMRs identified in our previous study[7] and of known or suspected miRNA promoters,[11] we identified 28 and 16 miRNAs associated with hypermethylated and hypomethylated promoters, respectively, in more than 50% of the analyzed CC cases. All DMRs were found in both ECC and ICC, and many of the identified miRNAs targeted signaling pathways that were already known to be affected in cholangiocarcinogenesis, such as Wnt, ErbB, PI3K, MAPK, and TGF-β, but had not been described in the context of altered miRNA promoter methylation in CC.

In cancer, downregulation of tumor suppressor genes is frequently caused by promoter hypermethylation. We observed hypermethylation of promoters from several miRNAs with suspected tumor suppressive ability in the initial CC patient cohort and confirmed promoter hypermethylation of miR-129-2, miR-9-2, and miR-9-3 in an independent cohort. miR-129 was also downregulated in ECC. MiR-129 was reported to be epigenetically downregulated in various cancers (e.g.,[20,21]) and to exert tumor suppressive functions by inhibiting cell proliferation and inducing cell death.[22,23] Thus, its downregulation in ECC might promote proliferation and survival of tumor cells. Promoter hypermethylation and downregulation of miR-9 have been described in several tumor types.[24,25] Though confirmed in CC cohort #2, promoter hypermethylation of miR-9-2 and miR-9-3 was less pronounced and was not associated with dysregulation of expression. The downregulation of these miRNAs might be compensated by concomitant upregulation of miR-9-1. Notably, the miR-9 family was reported to be both up- and down-regulated depending on the cancer type (see Supplementary Table S4).

The miRNA cluster encompassing miR-200a, miR-200b, and miR-429 did not only show promoter hypomethylation, but also all 3 miRNAs were found to be upregulated in CC. Both up- and down-regulation of the miR-200 family have been observed in

Table 2. Clinicopathological characteristics of the biliary tract cancer cohort used for TMA analysis. Cases with pNx had no lymph nodes resected; therefore, UICC status could not be assessed precisely in these cases. [§]Mann Whitney U-test; [¶]Fisher's exact test; [¶§]Chi-square test.

BTC-patients		CDH6 (IRS 0-9)	CDH6 (IRS 12)	*P*-value
		201 (100 %)	11 (100 %)	
Age	range	30.8-91.6 years	44.8-75.5 years	0.475[§]
	median	65.1 years	63.3 years	
	<65 years	100 (49.8%)	7 (63.6%)	0.538[¶§]
	>65 years	101 (50.2%)	4 (36.4%)	
Sex	male	112 (55.7%)	4 (36.4%)	0.230[¶§]
	female	89 (44.3%)	7 (63.6%)	
BTC subtype	ICC	48 (23.9%)	11 (100%)	<0.0001[¶§]
	ECC	88 (43.8%)	0 (0%)	
	GBAC	65 (32.3%)	0 (0%)	
UICC stage	1	10 (5.0%)	2 (18.2%)	0.068[¶§]
	2	56 (27.9%)	3 (27.3%)	
	3	48 (23.9%)	0 (0%)	
	4	39 (19.4%)	1 (9.1%)	
	NA	48 (23.9%)	5 (45.5%)	
pT	T1	17 (8.5%)	5 (45.5%)	0.008[¶§]
	T2	107 (53.3%)	6 (54.5%)	
	T3	59 (29.4%)	0 (0%)	
	T4	18 (9.0%)	0 (0%)	
pN	pN0	56 (27.9%)	5 (45.5%)	0.139[¶§]
	pN1	77 (38.3%)	1 (9.1%)	
	pNx	68 (33.8%)	5 (45.5%)	
M	M0	182 (90.5%)	11 (100%)	1.000[¶§]
	M1	19 (9.5%)	0 (0%)	
G	G1	11 (5.5%)	1 (9.1%)	1.000[¶§]
	G2	135 (67.2%)	8 (72.7%)	
	G3	55 (27.4%)	2 (18.2%)	
L	L0	106 (52.7%)	9 (81.8%)	0.069[¶§]
	L1	95 (47.3%)	2 (18.2%)	
V	V0	156 (77.6%)	8 (72.7%)	0.715[¶§]
	V1	45 (22.4%)	3 (27.3%)	
Pn	Pn0	126 (62.7%)	11 (100%)	0.009[¶§]
	Pn1	75 (37.7%)	0 (0%)	

cancer (see Supplementary Table S4), possibly depending on type and stage of the malignancy. Supporting our data, miR-200b was already reported as upregulated in CC.[26]

DLC1, *FBXW7*, and *CDH6* were found to be potential targets for downregulation by miR-200a and miR-429, respectively, and, thus, to be potential tumor suppressor genes in cholangiocarcinogenesis. Notably, the promoters of *DLC1*, *FBXW7*, and *CDH6* did not show CC-related hypermethylation in our previous study,[7] supporting the role of miRNA-mediated downregulation of these tumor suppressor genes in CC. Knockdown of *DLC1*, encoding an activator of Rho family GTPases and involved in the regulation of the cytoskeleton and cell motility,[27] contributes to carcinogenesis of HCC in an animal model;[28] *DLC1* downregulation might also contribute to ICC, since both malignancies share common molecular characteristics.[29] *FBXW7* was shown to be affected by loss-of-function mutations[30] and to suppress epithelial-mesenchymal transition, stemness, and metastasis in CC.[31] CDH6 is a cell adhesion molecule that contributes to the induction of apoptosis by dephosphorylation of ERK.[32] *CDH6* was already shown to be transcriptionally downregulated in CC (see Supplementary Table S7), and we also observed downregulation of the CDH6 protein in 2 CC cell lines, EGI-1 and TFK-1. On the other hand, *CDH6* was reported to be upregulated in other cancer types as well.[33,34] In line with its potential tumor suppressive function, we observed stepwise downregulation of CDH6 in a comprehensive and well characterized cohort, including normal tissue, precursor lesions, and invasive tumors of BTC patients. Additionally, we detected an ICC subgroup with very high CDH6 expression, better patient survival, and lower local tumor extent. When we expressed *CDH6* in the CC cell lines EGI-1 and TFK-1, both cell lines displayed delayed growth. Together, these features suggest that CDH6 is a potential tumor suppressor in cholangiocarcinogenesis. CDH6 could also serve as a biomarker due to its stepwise downregulation that can already be detected in pre-invasive BilIN 3 lesions.

In summary, our systematic approach revealed a considerable number of aberrantly methylated miRNA promoters in CC. We presented examples of inverse correlation between miRNA promoter methylation and miRNA expression, suggesting miR-129 as a novel tumor suppressor and members of the miR-200 family as novel oncomiRs in CC. CDH6 was identified as a potential tumor suppressor and biomarker in cholangiocarcinogenesis. The presented compilation of CC-related miRNAs constitutes a profound repository for future studies to dissect the role of epigenetically dysregulated miRNAs in the onset and progression of CC.

Material and methods

Clinicopathological characteristics of cholangiocarcinoma cohorts #1 and #2 used for methylome and miRNA analyses

Tissue samples from 42 CC patients (20 perihilar ECCs and 22 ICCs) who underwent bile duct and/or liver surgery in the University Hospital Heidelberg between 2004 and 2010 were included in these 2 cohorts (Table 1). Sixteen cases (ID 1-16) were already part of our previous methylome screen.[7] Patient cohort #1, initially used here for quantitative DNA methylation validation by mass spectrometry (MassARRAY) consisted of these 16 CC cases and additional 2 ECC and 4 ICC patients. As validation controls, fresh-frozen tissue specimens of 9 matched normal samples and one non-matched normal sample were used. Cohort #2, used for correlating miRNA expression with miRNA promoter methylation, consisted of 11 ECC and 9 ICC cases (FFPE samples). The normal controls used for comparison with cohort #2 consisted of extra- and intra-hepatic bile duct samples from non-neoplastic cases. Microdissection was performed as previously described.[35] Only patients with primary adenocarcinomas of the biliary tract and without other known malignancies at the time of diagnosis were included. Tumors were classified, graded, and staged according to the current World Health Organization (WHO) tumor classification system (4th ed., 2010) and the 7th TNM Classification of Malignant Tumors, respectively. Patients who received radiochemotherapy prior to surgery were excluded. The study was approved by the institutional ethics committee (206/05).

Clinicopathological characteristics of the biliary tract cancer cohort used for tissue microarray analysis

Tissue samples from 212 patients with a median age of 64.7 y who underwent bile duct and/or liver surgery in the University Hospital Heidelberg between 1995 and 2010 were included in this cohort (Table 2). Only patients with primary adenocarcinomas of the biliary tract and without other known malignancies at the time of diagnosis were included. Patients who received radiochemotherapy prior to surgery were excluded. BTCs of this study consisted of 88 ECCs, 59 ICCs, and 65 adenocarcinomas of the gallbladder

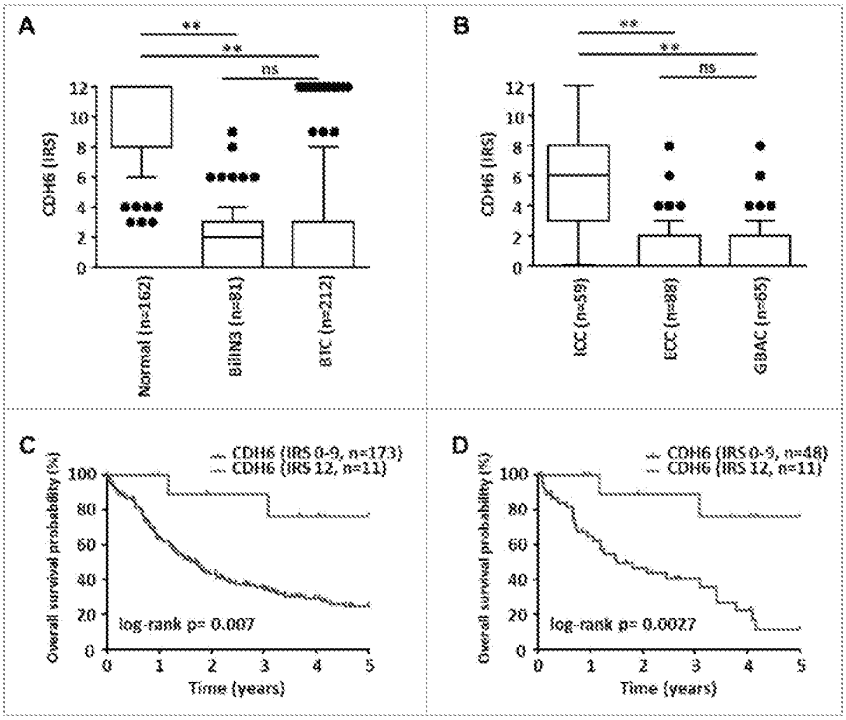


Figure 4. Statistical analyses of CDH6 expression in BTC and correlation with patient survival. (A) CDH6 immunoreactivity is already significantly reduced in pre-invasive BilIN 3 lesions and decreases even more in invasive BTC compared to normal biliary epithelium. (B) Subgroup analysis shows a significant stronger decrease of CDH6 expression for ECC and GBAC compared to ICC (Unpaired non-parametric Mann-Whitney-U test: ** $P < 0.005$; ns: not significant; Kruskal-Wallis test $P < 0.001$). (C) Kaplan-Meier curves show that BTC patients with very high CDH6 expression levels (IRS = 12, n = 11 ICCs; see also Table 2 and Fig. 6D) show significantly prolonged overall survival (red Kaplan-Meier curve) compared to patients with lower CDH6 IRS (blue Kaplan-Meier curve). (D) This also holds true in ICC subtype-specific survival analysis.

(GBACs). For 162 cases, corresponding histologically normal tissue, and for 81 cases corresponding biliary intraepithelial neoplasia grade 3 (BilIN 3) lesions could be included. For most patients, complete clinicopathological data, including sex, age, tumor grade, TNM/UICC status, lymph- and haemangiosis carcinomatosa, perineural tumor invasion, as well as overall survival data were available.

Cell lines, cloning, and transfection

Cell line HEK293T and the human CC cell lines EGI-1 and TFK-1 were obtained from the German Collection of Microorganims and Cell Cultures (DSMZ) and stored as low-passage aliquots in liquid nitrogen. For virus production and functional assays, freshly thawed aliquots are regularly authenticated and tested for absence of mycoplasmas using the Venor® GeM Classic kit (Minerva Biolabs, cat. no. 11-1025). HEK293T cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Life Technologies, cat. no. 41965-039) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS). EGI-1 and TFK-1 were grown in high glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; GE Healthcare Life Sciences, cat. no. SH30243.02) and RPMI 1640 (Life Technologies, cat. no. 21875-034), respectively, supplemented with 10% FCS. A human *CDH6* full ORF cDNA clone (Refseq no. BC000019)[36] was obtained from the DKFZ Genomics and Proteomics Core Facility. The *CDH6* ORF was re-cloned behind the CMV promoter into lentiviral vector rwpLX305 (R. W., unpublished), a puromycin resistance-conferring derivative of

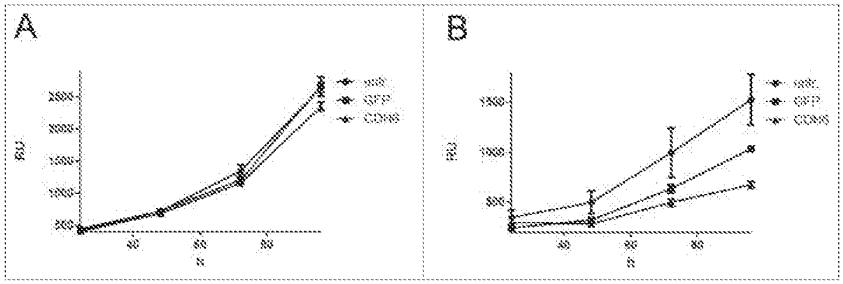


Figure 5. Growth curves of the CC cell lines EGI-1 (A) and TFK-1 (B) after lentiviral transfection with *CDH6* cDNA or GFP. Initial cell number of EGI-1 was 2,500, that of TFK-1 was 313. Relative fluorescence units (RU) were determined after 24, 48, 72, and 96 h. Values are means of 3 technical replicates; error bars indicate standard deviation. untr.: untransfected.

pLX304.[37] The GFP gene instead of *CDH6* was used in the same lentiviral vector setting as a control. Lentiviral particles were generated in HEK293T cells using a second-generation packaging system and transfected in diverse dilutions into both EGI-1 and TFK-1 cells under puromycin selection.

Cell proliferation and colony formation assay

Triplicates of 10,000 cells and twofold serial dilutions were seeded into 96-well plates. Cell proliferation was evaluated after 24, 48, 72 and 96 h with the Cell Titer-Blue Cell Viability Assay (Promega, cat. no. G8081), according to manufacturer's instructions using Spectramax M5e (Molecular Devices). To determine relative units, mean values of fluorescence units of medium only were subtracted from the fluorescence units obtained with cells. Growth curves were generated with GraphPad Prism 6 software. To monitor colony formation, 1,000 cells were seeded into 10 cm dishes, grown for 13 d washed with PBS, fixed with methanol, and stained with Giemsa (Sigma-Aldrich, cat. no. T862.1).

Immunoblotting

Proteins were isolated from roughly 2×10^6 cells using lysis buffer composed of 0.0625 M Tris/HCL pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 1 mM dithiothreitol, 1 mM NaVO4, 5 mM NaF and 1x protease inhibitors (Complete; Roche Diagnostics, cat.no. 11 697 498 001). Proteins (25 μg) were separated by 4-20% SDS-PAGE (Sigma Aldrich, PCG2012-10EA) and transferred to PVDF membrane (Immobilon, Milipore, cat. no. IPVH00010). Either anti-CDH6 monoclonal antibody (dilution 1:300; Thermo Fischer Scientific, cat.no. MA1-06305) or monoclonal anti-ACTB (dilution 1:5000; Santa Cruz, cat. no. sc47778) were used, followed by anti-mouse IgG horseradish peroxidase-linked antibody (dilution 1:5000; Cell Signaling, cat. no. 7076P2). For signal detection, we used Western Lightning Plus ECL (Perkin Elmer; cat. no. NEL 104001EA) and Amersham Hyperfilm ECL (GE Healthcare; cat. no. 28906836).

Tissue microarray preparation, immunohistochemistry, and analysis

Representative areas from vital tissue of invasive adenocarcinoma, BilIN 3, and normal tissue (NT) of biliary epithelium were marked by 2 pathologists experienced in BTC diagnostics (BG and WW). Tissue cores (1 mm diameter) from the selected representative areas were punched out of the sample tissue blocks and embedded into a new paraffin array block using a manual tissue microarrayer (Beecher Instruments, Woodland, CA, USA). Immunohistochemistry was performed according to standard protocols using the avidin-biotin complex-method and diaminobenzidine as chromogen. Immunohistochemistry was performed using an anti-CDH6 monoclonal antibody (dilution 1:100; Thermo Fischer Scientific, cat. no. MA1-06305), an anti-FBXW7 monoclonal antibody (dilutions 1:100 down to 1:2000; Abcam, cat. no. ab55036), and 2 anti-DLC1 antibodies (both polyclonal; dilution 1:50, each; Sigma Hamburg, cat. no. HPA017753 and Santa Cruz Biotechnology, cat. no. sc-271915). All sections were counterstained with hemalum. The specificity of the reaction was controlled by omitting the primary antibody. For semi-quantitative immunohistochemical assessment of cytoplasmic CDH6 expression, the product of the scores of staining intensity and percentage of immunoreactive cells was calculated based on the following scoring system: the intensity ranged from 0 = negative, 1 = low, 2 = medium to 3 = high; the quantity comprised 0 = no expression, 1 = positivity in less than 10 %, 2 = positivity in 10 % to 50 %, 3 = positivity in 51 % to 80 %, and 4 = positivity in more than 80 % of biliary cells. The final immunoreactive score (IRS) was obtained by multiplication of the intensity score and the quantity score according to IRS (ranging from 0 to 12). Only biliary cells were counted. Evaluations were performed independently by 2 experienced pathologists (BG and WW).

Statistical analyses of IRS in normal biliary tissue, BilIN3, and BTC samples were performed by unpaired non-parametric Mann-Whitney-U and Kruskal-Wallis test with GraphPad Prism 6. The same statistical test was also applied to the comparison of ICC, ECC, and GBAC groups. Kaplan-Meier survival analysis and determination of corresponding log-rank *P*-values were performed with GraphPad Prism 6 software. Survival data of 28 cases was not available. All *P*-values were 2-tailed and a *P*-value of less than 0.05 was considered significant.

Screening differentially methylated regions and miRNA promoters for overlaps of genomic coordinates

In a previous study, we identified 7179 hypermethylated and 8893 hypomethylated regions (collectively designated DMRs) in 10 ICC and 8 ECC samples using human CpG island tiling arrays (Agilent; genome assembly hg18).[7] In an independent analysis, we identified 1374 putative miRNA promoter regions by integration of H3K4me3-enriched genomic regions with sequences upstream of pre-miRNA (miRbase v15).[13] The genomic coordinates of DMRs and putative miRNA promoter regions (for simplicity, designated miRNA promoters) were harmonized to hg18 using the LiftOver tool from the UCSC genome browser.[38] We screened for overlaps between coordinates using a self-designed Perl script (kindly provided by Lei Gu, DKFZ Heidelberg) considering only DMRs represented by >9/18 (>50 %) CC samples.

Isolation of nucleic acids, cDNA synthesis, and expression analysis

DNA preparations from fresh-frozen tissue specimens from cohort #1 and its controls were performed as described previously.[7] FFPE samples from cohort #2 and corresponding control samples were used for simultaneous extraction of DNA and RNA using the AllPrepR DNA/RNA FFPE Kit as recommended (Qiagen, cat.no. 80234). Due to limited material, microdissected healthy bile duct samples were processed using the RNeasy FFPE Kit (Qiagen, cat. no. 73504) following the manufacturer's protocol to ensure high RNA yield. RNA isolation was done as recommended; the pellet from step 6 was used to follow the DNA isolation protocol of the AllPrepR DNA/RNA FFPE Kit starting at step 25 (Qiagen, version 2010a). In contrast to the miRNA quality, DNA quality proved appropriate for only a fraction of the CC cohort #2 and corresponding

control samples for MassARRAY analysis, most likely owing to the FFPE derivation of the DNAs and their harsh bisulfite treatment.

Isolation of miRNA was performed using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, cat. no. 74104) largely according to the manufacturer's instructions. The Qiagen protocol was modified at 2 steps: for precipitation of RNA, 1.5 volumes of 100% ethanol were used instead of 1 volume of 70% ethanol (step 4), and the RW1 wash buffer from the first wash step was replaced with RWT wash buffer (step 6). On-column DNase digestion was performed as indicated in the RNeasy Mini Handbook (D1-D4). For cDNA synthesis from 500 ng total RNA, the miScript PCR system (Qiagen, cat.no. 218073) was used as recommended (miScript II RT protocol).

For expression analysis, 2.1 μl of 1:20 diluted cDNA were used in a 7 μl PCR reaction with 3.5 μl 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix and 0.7 μl each of 10x miScript Universal Primer and respective 10x miScript Primer Assay (Supplementary Table S1C). Cycling conditions on the Lightcycler 480 (Roche, Mannheim, Germany) were used as described in the manufacturer's protocol.

For FFPE tissue-derived RNA, miR-574 was used as a reference gene, which was identified as the best-suited reference gene for this sample cohort using the web-based tool RefFinder (http://www.leonxie.com/referencegene.php).

Relative expression was calculated using the ΔC_t method.[39] Statistical evaluation of expression differences was performed by Mann-Whitney-U test, and accompanying boxplots were generated using the R statistical environment, version 3.0.1 (http://www.R-project.org). A P-value <0.05 was considered significant.

Quantitative determination of methylation levels by mass spectrometry

Quantitative methylation levels of CpGs or CpG units were determined by mass spectrometric analysis using the Epityper MassARRAY approach as described previously[7] and listed primers (Supplementary Table S1A). Use of FFPE samples for cohort #2 analyses partially required smaller amplicons than the analyses performed with cohort #1. Statistical evaluation of differences between average methylation values was performed by Mann-Whitney-U test, and accompanying boxplots and heat maps were generated using the R statistical and graphical environment, version 3.0.1. A P-value < 0.05 was considered significant. Kaplan-Meier survival analysis was done as described above.

Prediction of miRNA target genes and dual luciferase/renilla reporter assays

We used "TargetScanHuman" (release 6.2; http://www.targetscan.org/vert_61/) of the miRGator online tool for *in silico* prediction of miRNA target genes.[40] TargetScan predictions are ranked based on the predicted efficacy of targeting and calculated as "context scores" as described (http://www.targetscan.org/vert_61/docs/context_score.html). From the 3′ UTRs of selected target genes, amplicons containing the seed sequences were generated and cloned into the 3′ UTR of the firefly luciferase reporter gene of vector pMIR-REPORT (Ambion, cat. no. AM5795). Positive controls cloned into the reporter vector were short double-stranded sequence stretches formed by complementary phosphorylated oligonucleotides covering 4 times the seed sequence of the respective miRNA with a 6 bp spacer after the first and another 6 bp spacer after the third seed sequence. Reporter constructs were transfected into HEK293T cells together with synthetic microRNA Mimics (Qiagen, Supplementary Table S1D) or a non-target small RNA control (AllStar, Qiagen, cat. no. SI03650318) to test for physical interactions between the microRNA Mimics and the cloned 3′ UTR. HEK293T cells were transfected with 1 pmol of the miRNA mimic or AllStar non-target control using the DharmaFECT 1 transfection reagent (Thermo Scientific, cat. no. T-2001-01), according to the manufacturer's instructions. After overnight incubation, cells were transfected using the TransIT LT1 transfection reagent (Mirus, cat.no. MIR 2304) with 300 pg of the reporter construct or empty vector pMIR-Report together with 10 ng of the pRL-TK Renilla luciferase reporter vector (Promega, cat.no. E2241). The dual luciferase readout was performed with nearly confluent cells using the SpectraMax M5 (Berthold, Bad Wildbad, Germany); the luciferase signals were normalized to the renilla signals. Mean values were calculated from 6 or 8 parallel measurements per transfection, and 4 independent transfections were performed per construct. Barplots were generated with the mean values using the R statistical environment, version 3.0.1. Error bars indicate standard deviations. Statistical evaluation of differences between mean values of target 3′ UTRs and empty vector was performed by one-sample t-test.

Pathway enrichment analysis

Lists of 28 hypermethylated and 16 hypomethylated miRNAs present in >9/18 CC cases from patient cohort #1 (see Table 1) were loaded separately into the DIANA miRPath v.2.0 online tool to search with default settings for possibly affected signaling pathways.[15] In those cases, where the miRPath tool indicates ambiguity, for example miR-200a, both options, miR-200a-3p and miR-200a-5p, were loaded.

Oligonucleotides

The oligonucleotides used in this study are listed in Supplementary Table S1.

Disclosure of potential conflicts of interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgments

The excellent technical assistance of Veronika Geissler, John Moyers (Institute of Pathology, University of Heidelberg), Monika Helf and Oliver Mücke as well as helpful discussions with Daniel Lipka, Christopher Oakes, Yassen Assenov and Daniela Mancarella (Division of Epigenomics and Cancer Risk Factor, German Cancer Research Center) are gratefully acknowledged. We would also like to thank the Genomics and Proteomics Core Facility of the German Cancer Research Center for providing the *CDH6* ORFeome clone.

The work was supported by the Biobank of the National Center of Tumor Diseases (NCT) Heidelberg and, in part, by the Helmholtz Association.

Funding

This work was supported by a grant from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) to P. Schirmacher (SFB/TRR77) and by the German Cancer Consortium to C. Plass and P. Schirmacher.

References

1. Rizvi S, Gores GJ. Pathogenesis, diagnosis, and management of cholangiocarcinoma. Gastroenterology 2013; 145:1215-29; PMID:24140396; http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2013.10.013
2. Blechacz B, Komuta M, Roskams T, Gores GJ. Clinical diagnosis and staging of cholangiocarcinoma. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2011; 8:512-22; PMID:21808282; http://dx.doi.org/10.1038/nrgastro.2011.131
3. Ong CK, Subimerb C, Pairojkul C, Wongkham S, Cutcutache I, Yu W, McPherson JR, Allen GE, Ng CC, Wong BH, et al. Exome sequencing of liver fluke-associated cholangiocarcinoma. Nat Genet 2012; 44:690-3; PMID:22561520; http://dx.doi.org/10.1038/ng.2273
4. Chan-On W, Nairismagi ML, Ong CK, Lim WK, Dima S, Pairojkul C, Lim KH, McPherson JR, Cutcutache I, Heng HL, et al. Exome sequencing identifies distinct mutational patterns in liver fluke-related and non-infection-related bile duct cancers. Nat Genet 2013; 45:1474-8; PMID:24185513; http://dx.doi.org/10.1038/ng.2806
5. Jiao Y, Pawlik TM, Anders RA, Selaru FM, Streppel MM, Lucas DJ, Niknafs N, Guthrie VB, Maitra A, Argani P, et al. Exome sequencing identifies frequent inactivating mutations in BAP1, ARID1A and PBRM1 in intrahepatic cholangiocarcinomas. Nat Genet 2013; 45:1470-3; PMID:24185509; http://dx.doi.org/10.1038/ng.2813
6. Costello JF, Plass C. Methylation matters. J Med Genet 2001; 38:285-303; PMID:11333864; http://dx.doi.org/10.1136/jmg.38.5.285
7. Goeppert B, Konermann C, Schmidt CR, Bogatyrova O, Geiselhart L, Ernst C, Gu L, Becker N, Zucknick M, Mehrabi A, et al. Global alterations of DNA methylation in cholangiocarcinoma targets the Wnt signaling pathway. Hepatology 2014; 59:544-54; PMID:24002901; http://dx.doi.org/10.1002/hep.26721
8. Lujambio A, Ropero S, Ballestar E, Fraga MF, Cerrato C, Setien F, Casado S, Suarez-Gauthier A, Sanchez-Cespedes M, Gitt A, et al. Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells. Cancer Res 2007; 67:1424-9; PMID:17308079; http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-4218
9. Lujambio A, Calin GA, Villanueva A, Ropero S, Sanchez-Cespedes M, Blanco D, Montuenga LM, Rossi S, Nicoloso MS, Faller WJ, et al. A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis. Proc Natl Acad Sci USA 2008; 105:13556-61; PMID:18768788; http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0803055105
10. Toyota M, Suzuki H, Sasaki Y, Maruyama R, Imai K, Shinomura Y, Tokino T. Epigenetic silencing of microRNA-34b/c and B-cell translocation gene 4 is associated with CpG island methylation in colorectal cancer. Cancer Res 2008; 68:4123-32; PMID:18519671; http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-0325
11. Baer C, Claus R, Frenzel LP, Zucknick M, Park YJ, Gu L, Weichenhan D, Fischer M, Pallasch CP, Herpel E, et al. Extensive promoter DNA hypermethylation and hypomethylation is associated with aberrant microRNA expression in chronic lymphocytic leukemia. Cancer Res 2012; 72:3775-85; PMID:22710432; http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-0803
12. Karakatsanis A, Papaconstantinou I, Gazouli M, Lyberopoulou A, Polymeneas G, Voros D. Expression of microRNAs, miR-21, miR-31, miR-122, miR-145, miR-146a, miR-200c, miR-221, miR-222, and miR-223 in patients with hepatocellular carcinoma or intrahepatic cholangiocarcinoma and its prognostic significance. Mol Carcinogenesis 2013; 52:297-303; PMID:22213236; http://dx.doi.org/10.1002/mc.21864
13. Xie B, Ding Q, Han H, Wu D. miRCancer: a microRNA-cancer association database constructed by text mining on literature. Bioinformatics 2013; 29:638-44; PMID:23325619; http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btt014
14. Peng F, Jiang J, Yu Y, Tian R, Guo X, Li X, Shen M, Xu M, Zhu F, Shi C, et al. Direct targeting of SUZ12/ROCK2 by miR-200b/c inhibits cholangiocarcinoma tumourigenesis and metastasis. Br J Cancer 2013; 109:3092-104; PMID:24169343; http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2013.655
15. Vlachos IS, Kostoulas N, Vergoulis T, Georgakilas G, Reczko M, Maragkakis M, Paraskevopoulou MD, Prionidis K, Dalamagas T, Hatzigeorgiou AG. DIANA miRPath v.2.0: investigating the combinatorial effect of microRNAs in pathways. Nucleic Acids Res 2012; 40:W498-504; PMID:22649059; http://dx.doi.org/10.1093/nar/gks494
16. Jinawath N, Chamgramol Y, Furukawa Y, Obama K, Tsunoda T, Sripa B, Pairojkul C, Nakamura Y. Comparison of gene expression profiles between Opisthorchis viverrini and non-Opisthorchis viverrini associated human intrahepatic cholangiocarcinoma. Hepatology 2006; 44:1025-38; PMID:17006947; http://dx.doi.org/10.1002/hep.21330
17. Obama K, Ura K, Li M, Katagiri T, Tsunoda T, Nomura A, Satoh S, Nakamura Y, Furukawa Y. Genome-wide analysis of gene expression in human intrahepatic cholangiocarcinoma. Hepatology 2005; 41:1339-48; PMID:15880566; http://dx.doi.org/10.1002/hep.20718
18. Borad MJ, Champion MD, Egan JB, Liang WS, Fonseca R, Bryce AH, McCullough AE, Barrett MT, Hunt K, Patel MD, et al. Integrated genomic characterization reveals novel, therapeutically relevant drug targets in FGFR and EGFR pathways in sporadic intrahepatic cholangiocarcinoma. PLoS Genet 2014; 10:e1004135; PMID:24550739; http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1004135
19. Haga H, Yan I, Takahashi K, Wood J, Patel T. Emerging insights into the role of microRNAs in the pathogenesis of cholangiocarcinoma. Gene Expression 2014; 16:93-9; PMID:24801170; http://dx.doi.org/10.3727/105221614X13919976902174
20. Chen X, Zhang L, Zhang T, Hao M, Zhang X, Zhang J, Xie Q, Wang Y, Guo M, Zhuang H, et al. Methylation-mediated repression of microRNA 129-2 enhances oncogenic SOX4 expression in HCC. Liver Int: Official J Int Association For Study Liver 2013; 33:476-86; PMID:23402613; http://dx.doi.org/10.1111/liv.12097
21. Huang YW, Liu JC, Deatherage DE, Luo J, Mutch DG, Goodfellow PJ, Miller DS, Huang TH. Epigenetic repression of microRNA-129-2 leads to overexpression of SOX4 oncogene in endometrial cancer. Cancer Res 2009; 69:9038-46; PMID:19887623; http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1499
22. Brest P, Lassalle S, Hofman V, Bordone O, Gavric Tanga V, Bonnetaud C, Moreilhon C, Rios G, Santini J, Barbry P, et al. MiR-129-5p is required for histone deacetylase inhibitor-induced cell death in thyroid cancer cells. Endocrine-Related Cancer 2011; 18:711-9; PMID:21946411; http://dx.doi.org/10.1530/ERC-10-0257
23. Kang M, Li Y, Liu W, Wang R, Tang A, Hao H, Liu Z, Ou H. miR-129-2 suppresses proliferation and migration of esophageal carcinoma cells through downregulation of SOX4 expression. Internat J Mol Med 2013; 32:51-8; PMID:23677061; http://dx.doi.org/10.3892/ijmm.2013.1384
24. Lehmann U, Hasemeier B, Christgen M, Muller M, Romermann D, Langer F, Kreipe H. Epigenetic inactivation of microRNA gene hsa-mir-9-1 in human breast cancer. J Pathol 2008; 214:17-24; PMID:17948228; http://dx.doi.org/10.1002/path.2251
25. Tsai KW, Liao YL, Wu CW, Hu LY, Li SC, Chan WC, Ho MR, Lai CH, Kao HW, Fang WL, et al. Aberrant hypermethylation of miR-9 genes in gastric cancer. Epigenetics 2011; 6:1189-97; PMID:21931274; http://dx.doi.org/10.4161/epi.6.10.16535
26. Meng F, Wehbe-Janek H, Henson R, Smith H, Patel T. Epigenetic regulation of microRNA-370 by interleukin-6 in malignant human cholangiocytes. Oncogene 2008; 27:378-86; PMID:17621267; http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1210648
27. Kim TY, Vigil D, Der CJ, Juliano RL. Role of DLC-1, a tumor suppressor protein with RhoGAP activity, in regulation of the cytoskeleton and cell motility. Cancer Metastasis Rev 2009; 28:77-83; PMID:19221866; http://dx.doi.org/10.1007/s10555-008-9167-2
28. Zimonjic DB, Popescu NC. Role of DLC1 tumor suppressor gene and MYC oncogene in pathogenesis of human hepatocellular carcinoma: potential prospects for combined targeted therapeutics (review). Internat J Oncol 2012; 41:393-406; PMID:22580498; http://dx.doi.org/10.3892/ijo.2012.1474
29. Oishi N, Kumar MR, Roessler S, Ji J, Forgues M, Budhu A, Zhao X, Andersen JB, Ye QH, Jia HL, et al. Transcriptomic profiling reveals hepatic stem-like gene signatures and interplay of miR-200c and epithelial-mesenchymal transition in intrahepatic cholangiocarcinoma. Hepatology 2012; 56:1792-803; PMID:22707408; http://dx.doi.org/10.1002/hep.25890

30. Akhoondi S, Sun D, von der Lehr N, Apostolidou S, Klotz K, Maljukova A, Cepeda D, Fiegl H, Dafou D, Marth C, et al. FBXW7/hCDC4 is a general tumor suppressor in human cancer. Cancer Res 2007; 67:9006-12; PMID:17909001; http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-1320
31. Yang H, Lu X, Liu Z, Chen L, Xu Y, Wang Y, Wie G, Chen Y. FBXW7 suppresses epithelial-mesenchymal transition, stemness and metastatic potential of cholangiocarcinoma cells. Oncotarget 2015; 6:6310-25; PMID:25749036; http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.3355
32. Park MC, Kang T, Jin D, Han JM, Kim SB, Park YJ, Cho K, Park YW, Guo M, He W, et al. Secreted human glycyl-tRNA synthetase implicated in defense against ERK-activated tumorigenesis. Proc Natl Acad Sci USA 2012; 109:E640-7; PMID:22345558; http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1200194109
33. Paul R, Ewing CM, Robinson JC, Marshall FF, Johnson KR, Wheelock MJ, Isaacs WB. Cadherin-6, a cell adhesion molecule specifically expressed in the proximal renal tubule and renal cell carcinoma. Cancer Res 1997; 57:2741-8; PMID:9205085
34. Sancisi V, Gandolfi G, Ragazzi M, Nicoli D, Tamagnini I, Piana S, Ciarrocchi A. Cadherin 6 is a new RUNX2 target in TGF-β signalling pathway. PloS One 2013; 8:e75489; PMID:24069422; http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0075489
35. Goeppert B, Schmezer P, Dutruel C, Oakes C, Renner M, Breinig M, Warth A, Vogel MN, Mittelbronn M, Mehrabi A, et al. Downregulation of tumor suppressor A kinase anchor protein 12 in human hepatocarcinogenesis by epigenetic mechanisms. Hepatology 2010; 52:2023-33; PMID:20979053; http://dx.doi.org/10.1002/hep.23939
36. Collaboration OR. The ORFeome Collaboration: a genome-scale human ORF-clone resource. Nat Methods 2016; 13:191-2; PMID:26914201; http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.3776
37. Yang X, Boehm JS, Yang X, Salehi-Ashtiani K, Hao T, Shen Y, Lubonja R, Thomas, SR, Alkan O, Bhimdi T, et al. A public genome-scale lentiviral expression library of human ORFs. Nat Methods 2011; 8:659-61; PMID:21706014; http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.1638
38. Karolchik D, Barber GP, Casper J, Clawson H, Cline MS, Diekhans M, Dreszer TR, Fujita PA, Guruvadoo L, Haeussler M, et al. The UCSC Genome Browser database: 2014 update. Nucleic Acids Res 2014; 42:D764-70; PMID:24270787; http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkt1168
39. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods 2001; 25:402-8; PMID:11846609; http://dx.doi.org/10.1006/meth.2001.1262
40. Cho S, Jang I, Jun Y, Yoon S, Ko M, Kwon Y, Choi I, Chang H, Ryu D, Lee B, et al. MiRGator v3.0: a microRNA portal for deep sequencing, expression profiling and mRNA targeting. Nucleic Acids Res 2013; 41:D252-7; PMID:23193297; http://dx.doi.org/10.1093/nar/gks1168
41. Robinson JT, Thorvaldsdottir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G, Mesirov JP. Integrative genomics viewer. Nat Biotechnol 2011; 29:24-6; PMID:21221095; http://dx.doi.org/10.1038/nbt.1754

American Journal of Pathology, Vol. 161, No. 1, July 2002
Copyright © American Society for Investigative Pathology

A Novel Target Gene, *SKP2*, within the 5p13 Amplicon That Is Frequently Detected in Small Cell Lung Cancers

Sana Yokoi,*† Kohichiroh Yasui,* Fumiko Saito-Ohara,* Katsumi Koshikawa,‡ Toshihiko Iizasa,† Takehiko Fujisawa,† Takeo Terasaki,§ Akira Horii,¶ Takashi Takahashi,‡ Setsuo Hirohashi,§ and Johji Inazawa*

From the Department of Molecular Cytogenetics, Medical Research Institute, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo; the Department of Thoracic Surgery,† Chiba University Graduate School of Medicine, Chiba; the Divisions of Molecular Oncology and Immunology,‡ Aichi Cancer Center Research Institute, Nagoya; the Pathology Division,§ National Cancer Center Research Institute, Tokyo; and the Department of Molecular Pathology,¶ Tohoku University Graduate School of Medicine, Sendai, Japan*

We investigated DNA copy-number aberrations in 22 cell lines derived from small cell lung cancers (SCLCs) using comparative genomic hybridization. A minimal common region at 5p13, within the 5p11-p13 amplicon that was most frequently involved, harbored the *CDH6*, *PC4*, and *SKP2* genes. These three genes showed amplification and consequent overexpression in the SCLC cell lines. SKP2 positively regulates progression of cell cycle by targeting several regulators, such as the cell-cycle inhibitor $p27^{KIP1}$, for ubiquitin-mediated degradation. *SKP2* was amplified in 7 (44%) of 16 primary SCLC tumors, and consequently overexpressed in 10 (83%) of the 12 of those tumors we examined. Expression levels of SKP2 protein were cell cycle-dependent in SCLC cells as well as in normal cells, and were correlated with the DNA copy-number of the gene. There was an inverse correlation between the expression of SKP2 and $p27^{KIP1}$ proteins. Down-regulation of SKP2 using an anti-sense oligonucleotide remarkably suppressed the growth of SCLC cells. Our results indicate that *SKP2* is likely to be a target of the 5p13 amplification and to play an important role in the growth of SCLC cells. (*Am J Pathol 2002, 161:207–216*)

Small cell lung cancer (SCLC) is one of the most malignant tumors among human populations worldwide and accounts for ~15 to 25% of all lung cancers.[1–5] Although it initially shows good response to chemo- and radiation therapy, the prognosis is quite poor. An increased understanding of the genetics of SCLC may lead to development of better protocols for its clinical management.

Accumulated evidence suggests that multiple genetic alterations occurring sequentially in a cell lineage, at the nucleotide levels as well as at the chromosome levels, underlie the carcinogenetic process in solid tumors. Amplification of chromosomal DNA is one of the mechanisms capable of activating genes that are implicated in developing tumors. Oncogenes such as *MYC* (8q24), *MYCN* (2p24), and *MYCL1* (1p34) are known to be activated by amplification in SCLC,[6–8] and comparative genomic hybridization (CGH) studies have revealed additional regions of amplification.[9–15] Those amplified regions are likely to contain unidentified genes associated with the pathogenesis of SCLC. Indeed, our own CGH studies have revealed a number of novel regions of amplification in various types of tumors, including esophageal squamous cell carcinoma,[16,17] gastric cancer,[18,19] and malignant fibrous histiocytoma.[20] Furthermore, we have identified several novel target genes in these amplicons, including *GASC1* at 9p23-p24 in esophageal squamous cell carcinoma[19] and *MASL1* at 8p23.1 in malignant fibrous histiocytoma.[20] Our studies have also indicated possible involvement of *CD44* in an 11p13 amplicon detected in gastric cancers,[18] and recently we identified cIAP1, an apoptosis inhibitor, as a probable target of 11q22 amplification in esophageal squamous cell carcinomas.[21]

In the work reported here we examined 22 SCLC cell lines by CGH to explore genomic alterations that might affect initiation and progression of this type of tumor. Among losses and gains involving several chromosomal regions, we found the most frequent high-level gain (HLG), indicative of gene amplification, at 5p11-p13. HLG at 5p had been detected in 14% of SCLCs examined in previous CGH studies.[22] Gains in DNA copy-number within 5p have also been reported in 13.2% of

Supported by Grants-in-Aid for Cancer Research from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology, Japan; and from the Ministry of Health, Labour, and Welfare, Japan.

Accepted for publication April 15, 2002.

Address reprint requests to Dr. Johji Inazawa, Department of Molecular Cytogenetics, Medical Research Institute, Tokyo Medical and Dental University, 1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8519, Japan. E-mail: johinaz.cgen@mri.tmd.ac.jp.

Table 1. Summary of 22 SCLC Cell Lines

No.	Cell line	Amplification sites	Reference
1	S-1	3q27-q29	50
2	S-2	None	50
3	87-5	None	51
4	SBC-3	None	52
5	SBC-5	2p23-p25.3, 6q15-q16.2, 8q11.1-q12	53
6	PC-6	5p15.2-p15.3	54
7	ACC-LC-5*	5p11-p13.3, 13q33-q34, 18q12.1-q21.1	55
8	ACC-LC-80	20q13.1-q13.3	56
9	ACC-LC-170	8q21.3-q23	57
10	ACC-LC-172*	5p11-p13.3, 5q11.1-q11.2, 8q22.1-q23, 12p11.1-p13.3, 12q11-q13.1, 13q31-q34	55
11	ACC-LC-173	8p11.1-p12, 8q11.1-q24.3, 21q21-q22.3	58
12	Lu-24	3q22-q29	59
13	Lu-130	5p11-p15.3, 5q11.1-q11.2	59
14	Lu-134A†	5p11-p15.3, 5q11.1-q11.2	59
15	Lu-134B†	5p11-p15.3, 5q11.1-q11.2	59
16	Lu-135	None	59
17	Lu-136	19q11-q13.2, Xq21.1-q28	59
18	Lu-139	None	59
19	Lu-140	3q26.1-q29, Xq21.1-q28	59
20	Lu-141	19q11-q13.2	60
21	Lu-143	18q21.1-q21.2, 19q11-q13.2, Xp11.1-p22.3, Xq11.1-q13	61
22	Lu-165	4p15.2-p16	61

*Established from the same patient after an interval of 9 months of chemotherapy and radiotherapy.
†Established from the same patient using a different method.

solid tumors from 27 tissues, and in 40.7% of all types of lung cancer.[23] Taken together, these lines of evidence strongly suggested that the 5p11-p13 region harbors one or more target genes whose amplification renders them oncogenic in tumors of various types, and led us to carry out molecular definition of the 5p13 amplicon. Within this amplicon we identified a probable target gene, *SKP2*, whose product promotes the ubiquitin-mediated proteolysis of $p27^{KIP1}$;[24–26] this gene exerts its oncogenic effect by cooperating with other oncogenes.[27,28]

Materials and Methods

Cell Lines and Primary Samples

The 22 SCLC cell lines chosen for this study had been established and described previously (Table 1). All lines except Lu-165 were established from Japanese patients; Lu-165 was derived from the tumor of an Indonesian patient. ACC-LC-5, -80, -170, -172, and -173 were maintained in RPMI 1640 supplemented with 5% fetal calf serum and penicillin-streptomycin. SBC-3 and SBC-5 were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal calf serum and penicillin-streptomycin. All others were maintained in RPMI 1640 supplemented with 10% fetal calf serum and penicillin-streptomycin. We obtained primary samples from 16 patients with SCLC at the Aichi Cancer Center Hospital. Before initiation of the present study, informed consent was obtained in the formal style approved by the Ethics Committee.

Comparative Genomic Hybridization

CGH was performed using directly fluorochrome-conjugated DNA as described by Kallioniemi and colleagues,[29] with minor modification.[17,30] Briefly, tumor DNAs and normal DNAs were labeled respectively with Spectrum Green-dUTP and Spectrum Orange-dUTP (Vysis, Chicago, IL) by nick translation. Labeled tumor and normal DNAs (250 ng each), together with 10 μg of Cot-1 DNA (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD), were denatured and hybridized to normal male metaphase chromosome spreads. The slides were washed and counterstained with 4′,6′-diamidino-2-phenylindole. Shifts in CGH profiles were rated as gains and losses if they reached at least the 1.2 and 0.8 thresholds. Overrepresentations were considered to be HLGs when the fluorescence ratio exceeded 1.5, as described elsewhere.[16–20,29]

Fluorescence in Situ Hybridization (FISH)

We performed FISH experiments using as probes a total of 10 bacterial artificial chromosomes (BACs). We selected eight of them (RP11-313B16, 116O11, 16A6, 318D22, 36A10, 2A8, 309K8, and 313P15), containing respectively the *CDH12*, *CDH10*, *CDH6*, *PC4*, *SKP2*, *RAD1*, *ZNF131*, and *GHR* genes, on the basis of their locations according to the GeneMap'99 (*http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genemap99/*) and Map View (*http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/maps*) databases. The other two, RP11-5N11 and 85N3, were selected on the basis of the BAC map published by the University of Washington (*http://www.biotech.washington.edu/*). Briefly, each

probe was labeled by nick translation with biotin-16-dUTP or digoxigenin-11-dUTP (Boehringer Mannheim, Tokyo, Japan) and hybridized to metaphase chromosomes. Hybridization signals for multicolor FISH were detected as described elsewhere.[31,32]

Southern and Northern Blot Analyses

cDNA sequences of *PC4* (IMAGE clone ID, 265592) were purchased from Incyte Genomics (Palo Alto, CA) and used as probes for Southern and Northern blotting. For *SKP2* and *CHD6* we designed specific polymerase chain reaction (PCR) primers on the basis of their respective cDNA sequences[33,34] and used the PCR products as probes. The primer sequences were for *SKP2*: F, 5′-TGGAATCGTGCCAGATGGTA-3′ and R, 5′-GCTCCCT-AGTATACTTGCAG-3′; and for *CHD6*: F, 5′-TCAGCAT-GAGAACTTACCGC-3′ and R, 5′-ACTGATTCCACATCC-AGCTC-3′. Southern and Northern hybridization experiments were performed as described elsewhere.[35]

Semiquantitative Reverse-Transcriptase (RT)-PCR of CDH6

cDNAs were synthesized from 5 μg of total RNA by means of the SuperScript Preamplification System (Life Technologies, Inc.). The RT-PCR exponential phase was determined on 15 to 35 cycles to allow semiquantitative comparisons among cDNAs. Each PCR regime involved an initial denaturation step of 4 minutes at 94°C, followed by 30 cycles for *CDH6* and 25 cycles for *GAPDH* at 94°C for 30 seconds, 59°C for 30 seconds, and 72°C for 30 seconds on a thermocycler (GeneAmp PCR System 9700; Perkin Elmer, Branchburg, NJ). The primer sequences were mentioned above for *CDH6*, and previously described for *GAPDH*.[36]

Western Blotting

Western blots were prepared according to published methods.[36] Anti-SKP2 polyclonal antibody was obtained from Zymed Laboratories Inc. (San Francisco, CA); anti-KIP1/p27 (clone 57) monoclonal antibody was from Transduction Laboratories (Lexington, KY); and anti-cyclin E (M-20) polyclonal antibody was from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Anti-SKP2, anti-KIP1/p27, and anti-cyclin E served as primary antibodies at dilutions of 1:1000, 1:2500, and 1:2000, respectively. We used anti-rabbit or anti-mouse Ig (Amersham Pharmacia Biotech, Tokyo, Japan) diluted 1:2000 as secondary antibodies.

Cell-Cycle Analysis

Cells were blocked in G_1/S by incubation in medium containing 2.5 mmol/L of thymidine (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) for 24 hours.[37] Four hours after release from the thymidine block, cells were synchronized in G_2/M by incubation in medium containing 50 ng/ml of nocodazole (SIGMA) for 12 hours.[38] Then cells were shaken-off,[39] released from the mitotic block in fresh medium, and harvested at selected times. The synchronization and progression of the cell cycle were monitored by flow cytometry using a FACSCaliber scanner and Cell Quest software (Becton Dickinson Pharmingen, San Diego, CA). Suspensions of nuclei for determination of DNA content were prepared as previously described.[40]

Anti-Sense Experiments

Anti-sense experiments were performed as described previously with minor modifications.[26,41] Briefly, two oligonucleotides that contain a phosphorothioate backbone were synthesized (Espec Oligo Service Corp., Tsukuba, Japan) as follows: oligonucleotide 1; 5′-CCTGGGGGAT-GTTCTCA (the anti-sense direction of human SKP2 cDNA nucleotides 180 to 196); oligonucleotide 2, 5′-GGCTTC-CGGGCATTTAG (the scramble control for oligonucleotide 1). The oligonucleotides were delivered into ACC-LC-172 cells using Oligofectamine reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instruction. Briefly, cells were seeded in a 96-well plate at 1000 cells/well the day before transfection. Cells were transfected using 0.6 μl of Oligofectamine per well in 100 μl of Opti-MEM I Reduced Serum Medium (Invitrogen). Cells were treated with the oligonucleotides (anti-sense or scrambled) at a final concentration of 50, 200, and 1000 nmol/L, or Oligofectamine alone as a control. After incubation for 4 hours, 50 μl of growth medium containing three times the normal concentration of serum were added. Viable cells were counted by the MTT assay (see later) at 2, 4, and 6 days after transfection. For Western blot analysis, cells were plated in a 15-cm dish, transfected in the same way, and then harvested at 48 hours after transfection.

Measurement of Cell Viability

Cell growth was assessed using the MTT colorimetric assay (cell-counting kit-8; Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan), which measures the ability of viable cells to cleave a tetrazolium salt (WST-8) to a water-soluble formazan. WST-8 was added 4 hours before the end of culture, and absorbance was measured at 450 nm using a microplate reader (Benchmark; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Each determination was performed in quadruplicate.

Results

Genomic Changes in SCLC Cell Lines

An overview of the genetic changes we detected among 22 SCLC cell lines is shown in Figure 1. All of the lines (100%) showed copy-number aberrations, and gains predominated over losses in a ratio of 1.21:1. The average number of aberrations per cell line was 14.7 (range, 4 to 25); average numbers of gains and losses were 8.0 (range, 4 to 12) and 6.6 (range, 0 to 14), respectively.

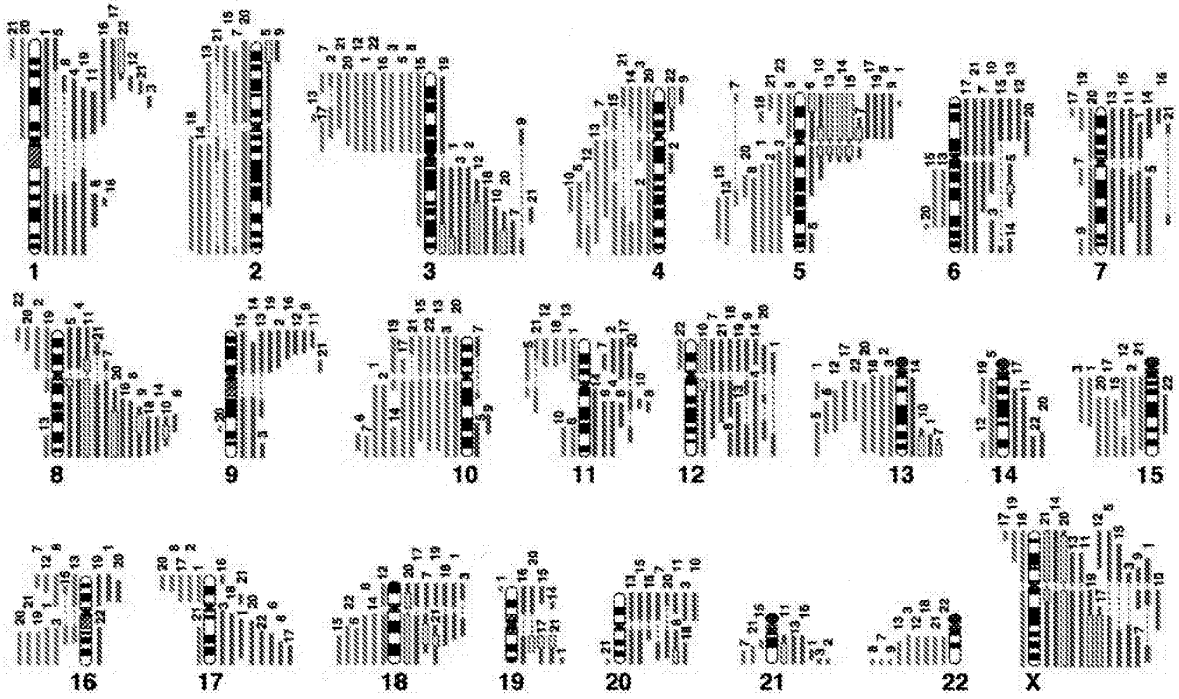


Figure 1. Summary of genetic imbalances detected by CGH in 22 SCLC cell lines. The 22 autosomes and X chromosome are represented by idiograms showing G-banding patterns. As judged by the computerized green-to-red profiles, **vertical lines** on the **left** (red) of each chromosome idiogram show losses of genomic material in cell lines, whereas those on the **right** (green) correspond to copy-number gains. HLGs are represented as **yellow rectangles**. The number at the **top** of each **vertical line** corresponds to the cell line in which each change was recorded (see Table 1).

Common Regions Involved in DNA Copy-Number Aberrations

Table 2 indicates that the minimal common regions of loss that occurred most frequently were at 3p and 10q (13 of 22 each, 59.1%); 22q (9 of 22, 40.3%); 4q31.2-q34, 5q21-q23.1, 13q14.1-q21, and 15q15-q22.1 (8 of 22 each, 36.4%); 16q12.2-q21 (7 of 22, 31.8%). The minimal regions involving copy-number gains were identified at 8q21.1-q24.3, and Xq21.1-q28 (12 of 22 each, 54.5%); 3q23-q29 and 5p11-p15.3 (11 of 22 each, 50.0%); 9p21-p24 and 12p11-p13.3 (9 of 22 each, 40.9%); 6p21.3-p22.2 and 17q23-q25 (8 of 22 each, 36.4%); 11q13-q14.2, 18q12.1-q12.3, and 20p12-p13 (7 of 22 each, 31.8%). The smallest regions of HLGs were seen at 5p11-p13 (five cases); 3q26-q29 and 8q22.2-q24.3 (four cases each); 18q12.1-q21.3, 19q12-q13.2, and Xq21.1-q28 (three cases each); 13q33-q34 and Xp22.3-q13 (two cases each).

Definition of the 5p13 Amplicon by FISH

We focused further examination on amplification at 5p11-p13, because this was the region most frequently involved. To delineate a map of the 5p11-p13 amplicon, we performed FISH on 11 SCLC cell lines that had exhibited copy-number gains in this region by CGH. We selected 10 BACs covering the amplified region as probes for the FISH experiments (Figure 2A). Four BACs (5N11, 16A6, 318D22, and 36A10) produced strong signals as homogeneous staining regions (HSRs) in ACC-LC-5 and ACC-LC-172, indicating that these BACs represented part of the amplicon. In contrast, the six other BACs did not show HSR patterns in the same cell lines, reflecting positions outside the 5p13 amplicon (Figure 2E). On the other hand, when we used BACs 5N11, 16A6, 318D22, or 36A10 as probes the numbers of FISH signals in the amplified region ranged from seven to nine in three cell lines (Lu-130, -134A, and -134B; Figure 2D), amounted to three or four in four lines (ACC-LC-80, -170, -173, and PC-6; Figure 2C) and two in two cell lines (SBC-3 and SBC-5; Figure 2B). In this way we defined the smallest commonly affected region in the 5p13 amplicon between BACs 5N11 and 36A10 (markers AFM238ZA9 and WI12996), a region harboring the *CDH6*, *PC4*, and *SKP2* genes.

Amplification and Overexpression of CDH6, PC4, and SKP2 in SCLC Cell Lines

To determine whether *CDH6*, *PC4*, and *SKP2* were individual targets of amplification, we examined amplification status and expression levels for each of these genes in all of the SCLC cell lines except Lu-141 and S-1, by Southern and Northern blotting and by semiquantitative RT-PCR. As Figure 3A represents, all three genes were amplified in comparison to normal genomic DNA in five (ACC-LC-5, ACC-LC-172, Lu-130, Lu-134A, and Lu-134B) of the 20 cell lines examined. In Northern blot

Table 2. Minimal Overlapping Regions of Common DNA Copy Number Changes in SCLC Cell Lines

DNA copy number	Chromosome regions	Frequency (%)
Gains	8q21.1-q24.3	54.5 (12/22)
	Xq21.1-q28	54.5 (12/22)
	3q23-q29	50.0 (11/22)
	5p11-p15.3	50.0 (11/22)
	9p21-p24	40.9 (9/22)
	12p11-p13.3	40.9 (9/22)
	6p21.3-p22.2	36.4 (8/22)
	17q23-q25	36.4 (8/22)
	1p31.3-p32.3	31.8 (7/22)
	11q13-q14.2	31.8 (7/22)
	12q23-q24.1	31.8 (7/22)
	18q12.1-q12.3	31.8 (7/22)
	20p12-p13	31.8 (7/22)
High level gains (amplifications)	5p11-p13	22.7 (5/22)
	3q26-q29	18.2 (4/22)
	8q22.2-q24.3	18.2 (4/22)
	18q12.1-q21.3	13.6 (3/22)
	19q12-q13.2	13.6 (3/22)
	Xq21.1-q26	13.6 (3/22)
	13q33-q34	9.1 (2/22)
	Xp11.1-p22.3, Xq11.1-q13	9.1 (2/22)
Losses	3p	59.1 (13/22)
	10q	59.1 (13/22)
	22q	40.9 (9/22)
	4q31.2-q34	36.4 (8/22)
	5q21-q23.1	36.4 (8/22)
	13q14.1-q21	36.4 (8/22)
	15q15-q22.1	36.4 (8/22)
	16q12.2-q21	31.8 (7/22)

analyses, *SKP2* and *PC4* showed overexpression in 15 (75%) and nine (45%) of the 20 cell lines, respectively (Figure 3B). Semiquantitative RT-PCR analysis demonstrated that expression levels of *CDH6* were elevated in 13 (65%) of the 20 cell lines (Figure 3C). Taken together, these findings indicated that *CDH6*, *PC4*, and *SKP2* were co-amplified and consequently overexpressed in all five cell lines that had exhibited HLG at 5p13. Among the three genes, we focused further investigation on *SKP2*, because the gene was most frequently overexpressed among the three.

Amplification and Overexpression of SKP2 in Primary SCLC Tumors

To ascertain whether *SKP2* was amplified and overexpressed in primary tumors, we examined 16 primary SCLCs by Southern blotting and 12 of those 16 by Northern blotting. As shown in Figure 3D, *SKP2* was amplified in 7 (43.8%) of the 16 tumors compared with their nontumorous counterparts. In Northern blots, 10 (83.3%) of 12 tumors showed high expression of this gene (Figure 3E). All of the tumors with amplification of *SKP2*, except for one whose RNA was not available, showed consequent overexpression.

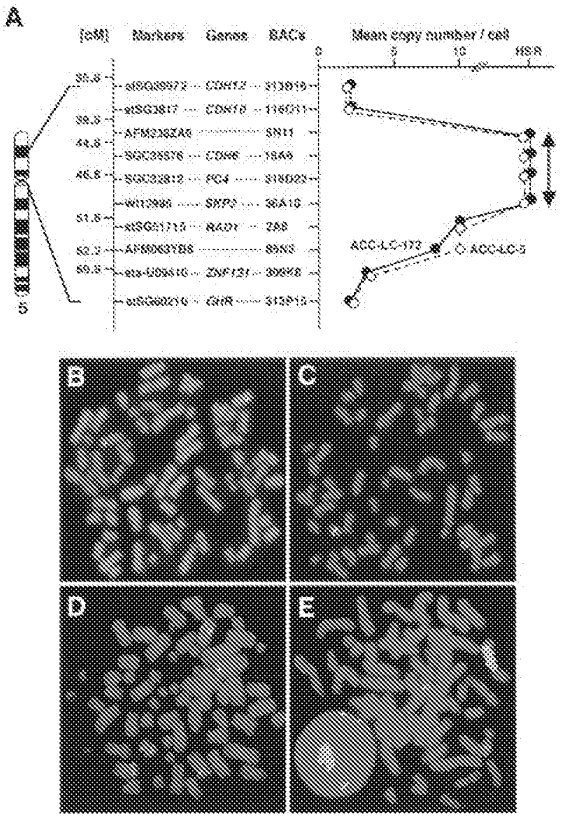


Figure 2. *Map of the amplicon at 5p13 and representative images of two-color FISH in SCLC cell lines.* **As** *Represented to the* **right** *of the chromosome 5 ideogram are STS markers selected according to the GeneMap 1999 database (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genemap99/), the positions of eight genes (CDH12, CDH10, CDH6, PC4, SKP2, RAD1, ZNF131, and GHR), and the 10 BACs used as probes for FISH experiments. The RP11-prefix is omitted here for all BACs. The graph at* **far right** *represents the copy number per cell and the extent of HSR determined by FISH on metaphase chromosomes from two SCLC cell lines, ACC-LC-5* **(open circles)** *and ACC-LC-172* **(filled circles). B–E:** *Two-color FISH using BAC RP11–36A10 (green) and RP11–309K8 (red) on metaphase chromosomes from cell lines SBC-5* **(B)**, *ACC-LC-173* **(C)**, *Lu-134A* **(D)**, *and ACC-LC-172* **(E)**. *BAC RP11–36A10 generated strong signals as a HSR on a marker chromosome in ACC-LC-172* **(E)**; *BAC RP11–309K8 generated three signals in the same cell line. In other lines both RP11–36A10 and RP11–309K8 generated two signals in SBC-5* **(B)**, *three in ACC-LC-173* **(C)**, *and eight in Lu-134A* **(D)**.

Expression of SKP2 During Cell-Cycle Progression

To confirm whether expression levels of SKP2 protein correlated with amplification levels of the gene, we conducted immunoblotting experiments. Because expression of SKP2 protein was cell cycle-dependent in both normal and transformed cells,[26,42] we determined its levels during cell-cycle progression in ACC-LC-172, a cell line showing amplification of *SKP2*. We examined the expression of $p27^{Kip1}$ and cyclin E proteins as well. Cells were synchronized in the M phase with nocodazole. We confirmed the synchrony and monitored the progression of the cell cycle after removal of nocodazole, by flow-cytometric analysis (Figure 4A). As shown in Figure 4B, immunoblots revealed that expression levels of SKP2 were high in the M phase (0 hours) and gradually de-

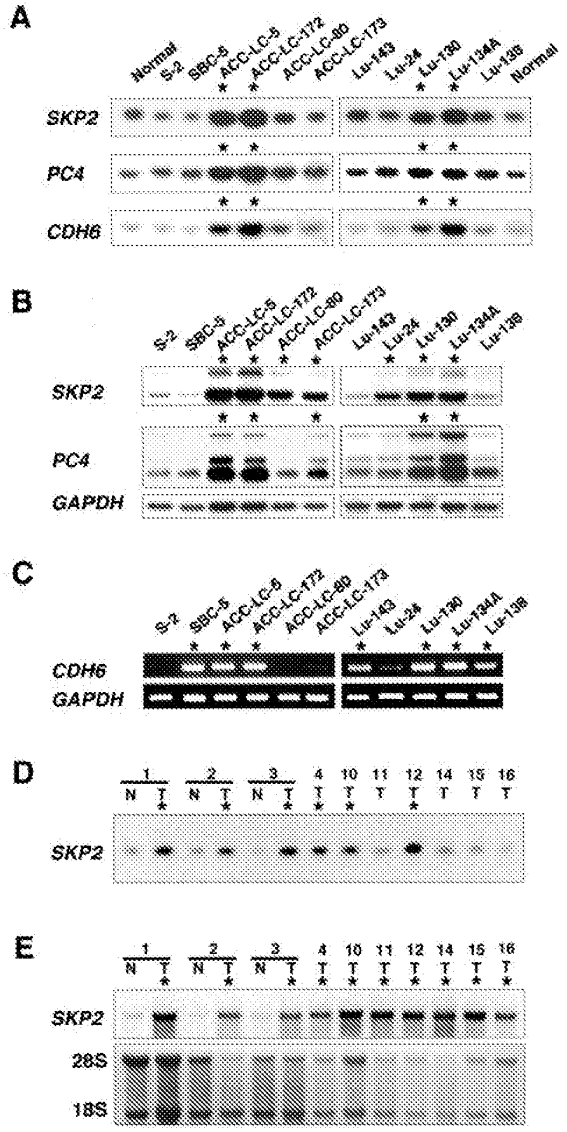


Figure 3. Amplification and overexpression of three genes (*SKP2, PC4,* and *CDH6*) lying within the 5p13 amplicon in SCLC cell lines and primary tumors. **Asterisks** indicate cell lines and primary tumors bearing amplification or overexpression of these genes. **A:** Representative Southern blots containing 5 μg of genomic DNA derived from cell lines and normal peripheral lymphocytes. **B:** Northern-blot analyses of *SKP2* and *PC4* using 10 μg of total RNA from the same SCLC cell lines. *GAPDH* served as a quantity-control probe. **C:** Semiquantitative RT-PCR analyses of *CDH6* in the same cell lines, using *GAPDH* as control. **D:** Representative Southern blots analysis of *SKP2* containing 5 μg of genomic DNA derived from 10 primary SCLC tumors (T) and nontumorous counterparts (N) of three of them. **E:** Northern-blot analysis of *SKP2* using 10 μg of total RNA from each of the same 10 primary SCLC tumors and three nontumorous counterparts. Two rRNA species served as controls.

creased during transition from the M to G_1 phases (6 hours). This decrease was inversely proportional to the increase in levels of $p27^{KIP1}$. As the cell cycle progressed, SKP2 levels increased again in S phase (24 hours). Expression levels of $p27^{KIP1}$ decreased during transition from the mid-G_1 phase (12 hours) to S phase.

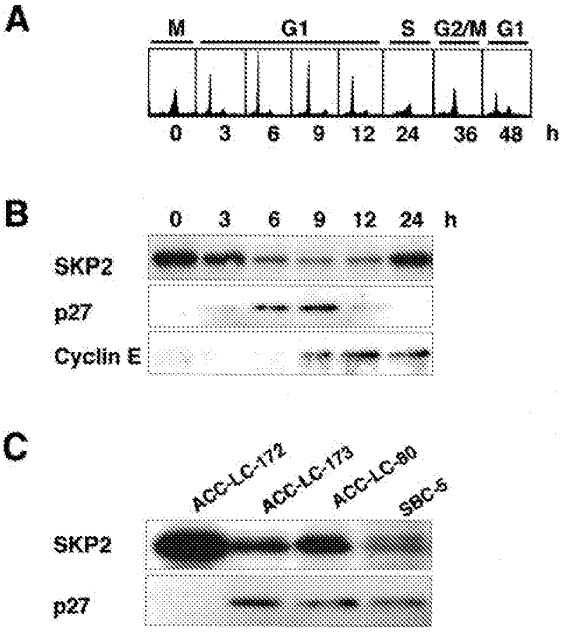


Figure 4. Expression of SKP2 protein during cell-cycle progression. **A:** Flow-cytometric analysis. ACC-LC-172 cells were synchronized to the M phase with nocodazole as described in Materials and Methods, and harvested at the indicated times after release from the nocodazole block. The *x* axis shows DNA content and the *y* axis shows the number of cells. **B:** Protein extracts of ACC-LC-172 cells analyzed by Western blotting with antibodies to SKP2, p27, and cyclin E during the M phase (0 hours) and the S phase (24 hours). **C:** Immunoblots of protein extracts from M phase showing expression of SKP2 and p27 in four SCLC cell lines that had shown different *SKP2* DNA copy-numbers in FISH. Experiments using the *SKP2*-specific BAC 36A10 (Figure 2) had shown the gene amplification as HSR in ACC-LC-172, three-copy signals in ACC-LC-173 and ACC-LC-80, and two-copy signals in SBC-5. The results of FISH analyses also agreed with those of Southern blotting (Figure 3A).

Cyclin E was expressed during the transition from G_1 to S. These results verified that expression of SKP2 was regulated by the cell cycle even in SCLC lines where the gene was amplified and inversely proportional to that of $p27^{KIP1}$.

We next compared expression levels of SKP2 protein in four SCLC cell lines (ACC-LC-172, ACC-LC-173, ACC-LC-80, and SBC-5) that had different status of *SKP2* DNA copy-number, by synchronizing these cells to the M phase when its levels were high. As shown in Figure 4C, we found the greatest amount of SKP2 in ACC-LC-172 and the least in SBC-5, a cell line not showing amplification of the gene. Expression levels of SKP2 protein were concordant with levels of the amplification of this gene. By contrast, $p27^{KIP1}$ was expressed at the lowest level in ACC-LC-172, an inverse correlation with SKP2.

SKP2 Anti-Sense Oligonucleotide Inhibits the Growth of SCLC Cells

To investigate the effect of *SKP2* overexpression on cell growth, SKP2 was down-regulated in ACC-LC-172 cells using an anti-sense oligonucleotide targeting the same site on *SKP2* mRNA as described previously.[25,41] The

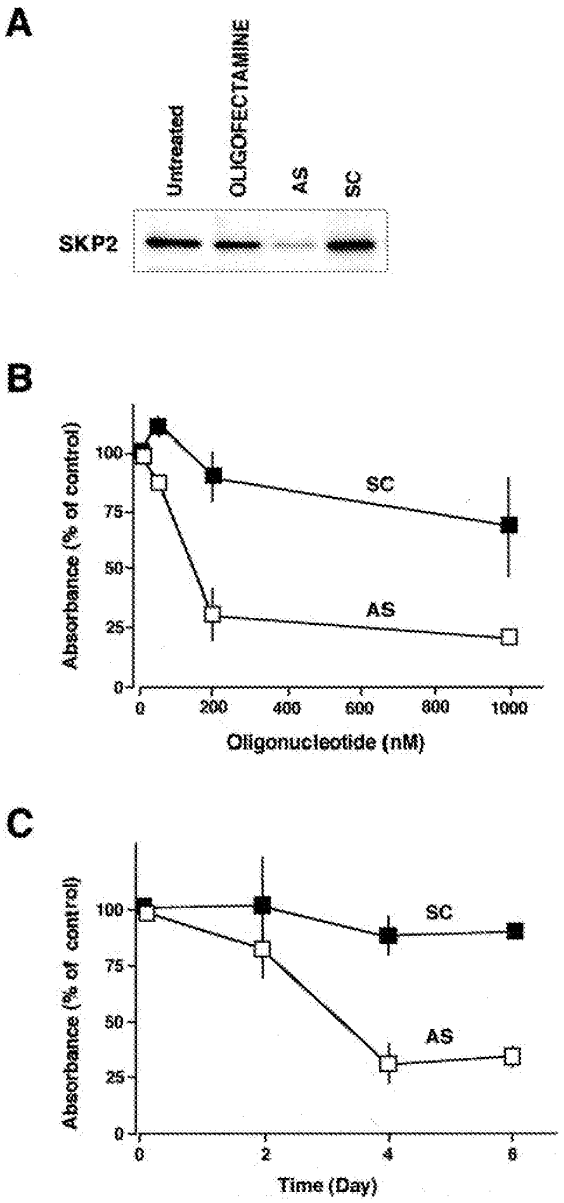


Figure 5. Growth inhibition by the anti-sense oligonucleotide targeting *SKP2* mRNA. ACC-LC-172 cells, exhibiting amplification and overexpression of *SKP2*, were treated with an anti-sense oligonucleotide targeting SKP2 (AS) or a scramble oligonucleotide (SC) by using Oligofectamine. **A:** Levels of SKP2 determined by Western blotting. Cells were treated with 200 nmol/L of oligonucleotides (anti-sense or scrambled) or Oligofectamine alone, and then harvested at 48 hours after transfection. Untreated cells were maintained under identical experimental conditions. Six μg of whole cell lysate were separated by polyacrylamide gel electrophoresis and analyzed by immunoblotting. **B** and **C:** The effects of anti-sense oligonucleotide on the viability of ACC-LC-172 cells. Cells were treated with the indicated concentrations of oligonucleotides (anti-sense or scrambled) and cell viability was determined by MTT assay at 4 days after transfection (**B**). Cells were treated with 200 nmol/L of oligonucleotides (anti-sense or scrambled) and cell viability was determined at the indicated times after transfection (**C**). The percentage was calculated against the absorbance of the control cells treated with Oligofectamine alone. The values were shown on the plot represent the means ± SD of four independent experiments.

anti-sense oligonucleotide, but not the control oligonucleotide or the transfecting agent alone, induced a decrease in SKP2 protein (Figure 5A). Down-regulation of *SKP2* resulted in remarkable growth inhibition in ACC-LC-172 cells (Figure 5, B and C). The most striking anti-sense effects were obtained when ACC-LC-172 cells were treated with 200 nmol/L of anti-sense oligonucleotides (Figure 5B) and cell viability was determined at 4 days after transfection (Figure 5C). These findings strongly suggested that *SKP2* overexpression led to promoting the growth of SCLC cells.

Discussion

Results from our CGH analysis of 22 SCLC cell lines, summarized in Table 2 and Figure 1, mostly were in accord with previous CGH data,[9–15] except that we more often found gains at 9p and 6p, and observed loss at 17p less frequently. HLG at 5p11-p13 was detected in five (22.7%) of the 22 cell lines. In two previous CGH studies involving primary SCLCs, amplification of 5p occurred in 15% in one (2 of 13)[15] and 14% in the other (3 of 22).[10] Amplification of 5p has been reported also in non-small cell lung cancer (NSCLC), squamous cell carcinoma of the head and neck, carcinoma of the uterine cervix, osteosarcoma, and malignant fibrous histiocytoma.[22] Although in some SCLCs examined the entire 5p arm was amplified, in others the commonly amplified regions were restricted to the region spanning 5p11-p13,[9–11] strongly suggesting the existence there of one or more genes whose amplification could contribute to tumorigenesis of SCLC. Thus we chose to perform molecular cytogenetic characterization of 5p13 amplification in this type of cancer cell.

First, by FISH analysis we successfully narrowed the region of overlap within the 5p13 amplification and observed that BACs containing *CDH6*, *PC4*, and *SKP2* were localized in this limited region (Figure 2). We focused further examination on *SKP2*. Our experiments clearly demonstrated that *SKP2* was amplified and consequently overexpressed not only in multiple SCLC cell lines, but also in primary tumors (Figure 3). Moreover, the gene was always overexpressed in both the cell lines and primary tumors where it was amplified, as well as in some lines and tumors not showing amplification. The findings supported the idea that it is a specific target within the 5p13 amplicon, because some mechanism other than amplification should be operating for a gene to be important for tumorigenesis.

SKP2 is an F-box substrate-recognition subunit of the SCF ubiquitin-protein ligase complex. It regulates the progression of the cell cycle by targeting regulators, such as the cell-cycle inhibitor $p27^{KIP1}$, for ubiquitin-mediated degradation.[23–26,33] This molecule is also required for ubiquitination of cyclin E, but only in the latter's free, non-CDK2 bound form.[43] Decreased levels of $p27^{KIP1}$ seem to be associated with high aggressiveness and poor prognosis in a variety of cancers.[44] Skp2-deficient mice grow more slowly and have smaller organs than littermate controls.[45] Moreover, cells in the mutant mice

contain markedly enlarged nuclei with polyploidy and multiple centrosomes, and show a reduced growth rate and increased apoptosis. Overexpression of SKP2 has been observed in transformed cells[33] and in human hepatocellular carcinomas,[45] colorectal carcinomas,[46] lymphomas,[28] and oral carcinomas.[27,47] In a direct evaluation of the potential of SKP2 to deregulate growth *in vivo*, Latres and colleagues[28] generated transgenic mice expressing the SKP2 gene targeted to the T-lymphoid lineage, and also generated double-transgenic mice coexpressing SKP2 and activated N-Ras. Their experiments demonstrated that the double-transgenic mice developed T cell lymphoma, suggesting that SKP2 had oncogenic potential.

In the present study, our results clearly showed that expression of SKP2 protein was cell cycle-dependent, even in SCLC cell lines with amplification of the gene, as it is in normal cells[26,33] (Figure 4, A and B). Moreover, we ascertained that expression levels of SKP2 protein were closely correlated with the DNA copy numbers of *SKP2* (Figure 4C). We also examined the relation between SKP2 and $p27^{KIP1}$ expression levels during cell-cycle progression. During the transition from M to G_1 phase (0 to 6 hours in Figure 4B), an inverse correlation appeared between expression of SKP2 and $p27^{KIP1}$; after that, however, $p27^{KIP1}$ was reduced in the mid-G_1 phase (9 to 12 hours) before SKP2 levels were elevated again in the S phase (24 hours; Figure 4B). These findings, together with evidence presented recently by Malek and colleagues,[48] suggested that down-regulation of $p27^{KIP1}$ in the G_1 phase might reflect an SKP2-independent mechanism. Yatabe and colleagues[49] previously observed that SCLC tumors, in contrast to NSCLC, showed increased expression of $p27^{KIP1}$, a fact seemingly inconsistent with our results that SKP2 was frequently overexpressed in SCLCs. However, an SKP2-independent pathway for controlling $p27^{KIP1}$ could account for this discrepancy. Indeed, recently Kudo and colleagues[47] reported high expression of SKP2 protein despite high $p27^{KIP1}$ expression in some primary oral cancers and one oral cancer cell line. Therefore we suggest that amplification and consequent overexpression of *SKP2* might play an important role in SCLC tumorigenesis because of not only mediated reduction of $p27^{KIP1}$, but also because of a dominantly acting function that has not yet been clarified. The involvement of SKP2 or $p27^{KIP1}$ in tumorigenesis at least should be discussed with a view to their joint dependency on the cell cycle.

To elucidate the functional role of *SKP2* in SCLC cells, we down-regulated the expression levels of SKP2 protein using the anti-sense oligonucleotide (Figure 5A). We demonstrated that down-regulation of SKP2 induced growth inhibition in SCLC cells (Figure 5, B and C). This result provided direct evidence for the role of SKP2 overexpression in the growth of tumor cells.

In summary, the CGH studies reported here revealed that amplification in SCLC cell lines was most frequent in the 5p11-p13 region. We found that *SKP2*, lying within the minimal common region of the amplicon at 5p13, often showed amplification and consequent overexpression in not only cell lines, but also primary SCLCs. Expression levels of SKP2 protein were correlated with amplification levels of the gene, in a cell cycle-dependent pattern. The anti-sense oligonucleotide targeting the SKP2 gene reduces the growth rate of SCLC cells. These findings indicate that *SKP2* is likely to be a target of the amplification mechanism, and to promote the growth of SCLC cells. Thus, *SKP2* may provide an excellent therapeutic target for SCLCs.

Acknowledgment

We thank Professor Yusuke Nakamura for his continuous encouragement.

References

1. Shimosato Y, Nakajima T, Hirohashi S, Morinaga S, Terasaki T, Yamaguchi K, Saijo N, Suemasu K: Biological, pathological and clinical features of small cell lung cancer. Cancer Lett 1986, 33:241–258
2. Vincent RG, Pickren JW, Lane WW, Bross I, Takita H, Houten L, Gutierrez AC, Rzepk T: The changing histopathology of lung cancer: a review of 1682 cases. Cancer 1977, 39:1647–1655
3. Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA: Cancer statistics, 1999. CA Cancer J Clin 1999, 49:8–31
4. Yoshimura K, Yamashita N: Clinical statistical observation of 4,931 cases with lung cancer by histological types, results of field study in Japan. Haigan 1982, 22:1–17
5. The Editorial Board of the Cancer Center Statistics in Japan: Cancer Statistics in Japan 1999. Tokyo, Foundation for Promotion of Cancer Research, 1999, pp 12–47
6. Little C, Nau MM, Carney DN, Gazdar AF, Minna JD: Amplification and expression of the c-myc oncogene in human lung cancer cell lines. Nature 1983, 306:194–196
7. Nau MM, Brooks Jr BJ, Carney DN, Gazdar AF, Battey JF, Sausville EA, Minna JD: Human small-cell lung cancers show amplification and expression of the N-myc gene. Proc Natl Acad Sci USA 1986, 83:1092–1096
8. Nau MM, Brooks BJ, Battey J, Sausville E, Gazdar AF, Kirsch IR, McBride OW, Bertness V, Hollis GF, Minna JD: L-myc, a new myc-related gene amplified and expressed in human small cell lung cancer. Nature 1985, 318:69–73
9. Levin NA, Brzoska PM, Warnock ML, Gray JW, Christman MF: Identification of novel regions of altered DNA copy number in small cell lung tumors. Genes Chromosom Cancer 1995, 13:175–185
10. Petersen I, Langreck H, Wolf G, Schwendel A, Psille R, Vogt P, Reichel MB, Ried T, Dietel M: Small-cell lung cancer is characterized by a high incidence of deletions on chromosomes 3p, 4q, 5q, 10q, 13q and 17p. Br J Cancer 1997, 75:79–86
11. Schwendel A, Langreck H, Reichel M, Schrock E, Ried T, Dietel M, Petersen I: Primary small-cell lung carcinomas and their metastases are characterized by a recurrent pattern of genetic alterations. Int J Cancer 1997, 74:86–93
12. Levin NA, Brzoska P, Gupta N, Minna JD, Gray JW, Christman MF: Identification of frequent novel genetic alterations in small cell lung carcinoma. Cancer Res 1994, 54:5086–5091
13. Lui WO, Tannenbaum DM, Larsson C: High level amplification of 1p32-33 and 2p22-24 in small cell lung carcinomas. Int J Oncol 2001, 19:451–457
14. Ried T, Petersen I, Holtgreve-Grez H, Speicher MR, Schrock E, du Manoir S, Cremer T: Mapping of multiple DNA gains and losses in primary small cell lung carcinomas by comparative genomic hybridization. Cancer Res 1994, 54:1801–1806
15. Walch AK, Zitzelsberger HF, Aubele MM, Mattis AE, Bauchinger M, Candidus S, Prauer HW, Werner M, Hofler H: Typical and atypical carcinoid tumors of the lung are characterized by 11q deletions as detected by comparative genomic hybridization. Am J Pathol 1996, 153:1089–1098
16. Pimkhaokham A, Shimada Y, Fukuda Y, Kurihara N, Imoto I, Yang ZQ, Imamura M, Nakamura Y, Amagasa T, Inazawa J: Nonrandom chro-

mosomal imbalances in esophageal squamous cell carcinoma cell lines: possible involvement of the ATP3 and CENPF genes in the 1q32 amplicon. Jpn J Cancer Res 2000, 91:1128–1133

17. Shinomiya T, Mori T, Ariyama Y, Sakabe T, Fukuda Y, Murakami Y, Nakamura Y, Inazawa J: Comparative genomic hybridization of squamous cell carcinoma of the esophagus: the possible involvement of the DP1 gene in the 13q34 amplicon. Genes Chromosom Cancer 1999, 24:337–344
18. Fukuda Y, Kurihara N, Imoto I, Yasui K, Yoshida M, Yanagihara K, Park JG, Nakamura Y, Inazawa J: CD44 is a potential target of amplification within the 11p13 amplicon detected in gastric cancer cell lines. Genes Chromosom Cancer 2000, 29:315–324
19. Yang ZQ, Imoto I, Fukuda Y, Pimkhaokham A, Shimada Y, Imamura M, Sugano S, Nakamura Y, Inazawa J: Identification of a novel gene, GASC1, within an amplicon at 9p23-24 frequently detected in esophageal cancer cell lines. Cancer Res 2000, 60:4735–4739
20. Sakabe T, Shinomiya T, Mori T, Ariyama Y, Fukuda Y, Fujiwara T, Nakamura Y, Inazawa J: Identification of a novel gene, MASL1, within an amplicon at 8p23.1 detected in malignant fibrous histiocytomas by comparative genomic hybridization. Cancer Res 1999, 59:511–515
21. Imoto I, Yang ZQ, Pimkhaokham A, Tsuda H, Shimada Y, Imamura M, Ohki M, Inazawa J: Identification of cIAP1 as a candidate target gene within an amplicon at 11q22 in esophageal squamous cell carcinomas. Cancer Res 2001, 61:6629–6634
22. Knuutila S, Björkqvist AM, Autio K, Tarkkanen M, Wolf M, Monni O, Szymanska J, Larramendy ML, Tapper J, Pere H, El-Rifai W, Hemmer S, Wasenius VM, Vidgren V, Zhu Y: DNA copy number amplifications in human neoplasms: review of comparative genomic hybridization studies. Am J Pathol 1998, 152:1107–1123
23. Rooney PH, Murray GI, Stevenson DA, Haites NE, Cassidy J, McLeod HL: Comparative genomic hybridization and chromosomal instability in solid tumours. Br J Cancer 1999, 80:862–873
24. Sutterluty H, Chatelain E, Marti A, Wirbelauer C, Senften M, Muller U, Krek W: p45(SKP2) promotes p27(Kip1) degradation and induces S phase in quiescent cells. Nat Cell Biol 1999, 1:207–214
25. Tsvetkov LM, Yeh KH, Lee SJ, Sun H, Zhang H: p27(Kip1) ubiquitination and degradation is regulated by the SCFSkp2 complex through phosphorylated Thr187 in p27. Curr Biol 1999, 9:661–664
26. Carrano AC, Eytan E, Hershko A, Pagano M: SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27. Nat Cell Biol 1999, 1:193–199
27. Gstaiger M, Jordan R, Lim M, Catzavelos C, Mestan J, Slingerland J, Krek W: Skp2 is oncogenic and overexpressed in human cancers. Proc Natl Acad Sci USA 2001, 98:5043–5048
28. Latres E, Chiarle R, Schulman BA, Pavletich NP, Pellicer A, Inghirami G, Pagano M: Role of the F-box protein Skp2 in lymphomagenesis. Proc Natl Acad Sci USA 2001, 98:2515–2520
29. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D: Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. Science 1992, 258:818–821
30. Ariyama Y, Sakabe T, Shinomiya T, Mori T, Fukuda Y, Inazawa J: Identification of amplified DNA sequences on double minute chromosomes in a leukemic cell line KY821 by means of spectral karyotyping and comparative genomic hybridization. J Hum Genet 1998, 43:187–190
31. Inazawa J, Ariyama T, Abe T: Physical ordering of three polymorphic DNA markers spanning the regions containing a tumor suppressor gene of renal cell carcinoma by three-color fluorescent in situ hybridization. Jpn J Cancer Res 1992, 83:1248–1252
32. Ariyama T, Inazawa J, Uemura Y, Kakazu N, Maekawa T, Urase F, Inmaji K, Horiuchi A, Nakamura Y, Abe T: Clonal origin of Philadelphia chromosome negative cells with trisomy 8 appearing during the course of alpha-interferon therapy for pH-positive chronic myelocytic leukemia. Cancer Genet Cytogenet 1995, 81:20–23
33. Zhang H, Kobayashi R, Galaktionov K, Beach D: p19Skp1 and p45Skp2 are essential elements of the cyclin A-CDK2 S phase kinase. Cell 1995, 82:915–925
34. Shimoyama Y, Gotoh M, Terasaki T, Kitajima M, Hirohashi S: Isolation and sequence analysis of human cadherin-6 complementary DNA for the full coding sequence and its expression in human carcinoma cells. Cancer Res 1995, 55:2208–2211
35. Yasui K, Imoto I, Fukuda Y, Pimkhaokham A, Yang ZQ, Naruto T, Shimada Y, Nakamura Y, Inazawa J: Identification of target genes within an amplicon at 14q12–q13 in esophageal squamous cell carcinoma. Genes Chromosom Cancer 2001, 32:112–118
36. Mahotka C, Wenzel M, Springer E, Gabbert HE, Gerharz CD: Survivin-deltaEx3 and survivin-2B: two novel splice variants of the apoptosis inhibitor survivin with different antiapoptotic properties. Cancer Res 1999, 59:6097–6102
37. Bootsma D, Budke L, Vos O: Studies on synchronous division of tissue culture cells initiated by excess thymidine. Exp Cell Res 1964, 33:301–309
38. Zieve GW, Turnbull D, Mullins JM, McIntosh JR: Production of large numbers of mitotic mammalian cells by use of the reversible microtubule inhibitor nocodazole. Nocodazole accumulated mitotic cells. Exp Cell Res 1980, 126:397–405
39. Terashima T, Tolmach LJ: Changes in X-ray sensitivity of HeLa cells during the division cycle. Nature 1961, 190:1210–1211
40. Stock AL, Bauer KD, Williams TJ, Seidenfeld J: Experimental parameters and a biological standard for acridine orange detection of drug-induced alterations in chromatin condensation. Cytometry 1987, 8:163–169
41. Yu ZK, Gervais JL, Zhang H: Human CUL-1 associates with the SKP1/SKP2 complex and regulates $p21^{CIP1/WAF1}$ and cyclin D proteins. Proc Natl Acad Sci USA 1998, 95:11324–11329
42. Lisztwan J, Marti A, Sutterluty H, Gstaiger M, Wirbelauer C, Krek W: Association of human CUL-1 and ubiquitin-conjugating enzyme CDC34 with the F-box protein $p45^{SKP2}$: evidence for evolutionary conservation in the subunit composition of the CDC34-SCF pathway. EMBO J 1998, 17:368–383
43. Nakayama K, Nagahama H, Minamishima YA, Matsumoto M, Nakamichi I, Kitagawa K, Shirane M, Tsunematsu R, Tsukiyama T, Ishida N, Kitagawa M, Nakayama K, Hatakeyama S: Targeted disruption of Skp2 results in accumulation of cyclin E and p27Kip1, polyploidy and centrosome overduplication. EMBO J 2000, 19:2069–2081
44. Tsihlias J, Kapusta LR, DeBoer G, Morava-Protzner I, Zbieranowski I, Bhattacharya N, Catzavelos GC, Klotz LH, Slingerland JM: Loss of cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 is a novel prognostic factor in localized human prostate adenocarcinoma. Cancer Res 1998, 58:542–548
45. Chao Y, Shih YL, Chiu JH, Chau GY, Lui WY, Yang WK, Lee SD, Huang TS: Overexpression of cyclin A but not Skp 2 correlates with the tumor relapse of human hepatocellular carcinoma. Cancer Res 1998, 58:985–990
46. Hershko D, Bornstein G, Ben-Izhak O, Carrano A, Pagano M, Krausz MM, Hershko A: Inverse relation between levels of $p27^{KIP1}$ and of its ubiquitin ligase subunit Skp2 in colorectal carcinomas. Cancer 2001, 91:1745–1751
47. Kudo Y, Kitajima S, Sato S, Miyauchi M, Ogawa I, Takata T: High expression of S-phase kinase-interacting protein 2, human F-box protein, correlates with poor prognosis in oral squamous cell carcinomas. Cancer Res 2001, 61:7044–7047
48. Malek NP, Sundberg H, McGrew S, Nakayama K, Kyriakidis TR, Roberts JM: A mouse knock-in model exposes sequential proteolytic pathways that regulate p27Kip1 in G1 and S phase. Nature 2001, 413:323–327
49. Yatabe Y, Masuda A, Nakamura S, Kuroishi T, Osada H, Takahashi T, Mitsudomi T: P27Kip1 in human lung cancers: differential changes in small cell and non-small cell carcinomas. Cancer Res 1998, 58:1042–1047
50. Kobayashi S, Okada S, Inaba H, Hashimoto K, Nakada T: Study on growth characteristics and morphological findings of human small cell carcinoma in vitro. Kokenshi 1986, 38:103–111
51. Kobayashi S, Okada S, Inaba H, Syoji W, Hasumi T, Sato N, Fujimura S: Culture and growth characteristics of human non-small cell lung cancer cells. Kokenshi 1990, 42:73–83
52. Kishimoto N, Ohmoshi T, Hiraki S, Miyake K, Ozawa S, Tamura T, Numata K, Kawahara N, Tamura R, Miyamoto H, Nishii K, Kimura I: Establishment and characterization of five cell lines from human small cell carcinoma. Haigan 1984, 24:644
53. Mitsuhashi Y, Inaba M, Sugiyama Y, Kobayashi T: In vitro measurement of chemosensitivity of human small cell lung and gastric cancer cell lines toward cell cycle phase-nonspecific agents under the clinically equivalent area under the curve. Cancer 1992, 70:2540–2546

54. Tsuji K, Hayata Y, Sato M, Shimosato Y, Fukushima Y: Neuronal differentiation of oat cell carcinoma in vitro by dibutyryl cyclic adenosine 3′, 5′-monophosphate. Cancer Lett 1978, 1:311–318
55. Takahashi T, Obata Y, Sekido Y, Hida T, Ueda R, Watanabe H, Ariyoshi Y, Sugiura T, Takahashi T: Expression and amplification of myc gene family in small cell lung cancer and its relation to biological characteristics. Cancer Res 1989, 49:2683–2688
56. Hibi K, Takahashi T, Sekido Y, Ueda R, Hida T, Ariyoshi Y, Takagi H, Takahashi T: Coexpression of the stem cell factor and the c-kit genes in small-cell lung cancer. Oncogene 1991, 6:2291–2296
57. Suyama M, Saito T, Hara K, Nakamura W, Tateno W, Hosoda S, Kito H, Ariyoshi H, Kato K: Successive transplantation of 2 small cell (oat-cell) carcinoma of the lung and the thymus containing neuron-specific enolase into nude mice. Igaku no Ayumi 1984, 131:161–162
58. Hida T, Ariyoshi Y, Kuwabara M, Sugiura T, Takahashi T, Takahashi T, Hosoda K, Niitsu Y, Ueda R: Glutathione S-transferase levels in a panel of lung cancer cell lines and its relation to chemo-radiosensitivity. Jpn J Clin Oncol 1993, 23:14–19
59. Terasaki T, Shimosato Y, Nakajima T, Tsumuraya M, Morinaga S, Hirohashi S, Yamaguchi K, Kato K, Ichinose H, Nagatsu T: Changes in cell characteristics due to culture conditions in cell lines from human small cell lung cancer. Jpn J Clin Oncol 1986, 16:203–212
60. Matsumoto T, Terasaki T, Mukai K, Wada M, Okamoto A, Yokota J, Yamaguchi K, Kato K, Nagatsu T, Shimosato Y: Relation between nucleolar size and growth characteristics in small cell lung cancer cell lines. Jpn J Cancer Res 1991, 82:820–828
61. Terasaki T, Matsuno Y, Shimosato Y, Yamaguchi K, Ichinose H, Nagatsu T, Kato K: Establishment of a human small cell lung cancer cell line producing a large amount of anti-diuretic hormone. Jpn J Cancer Res 1994, 85:718–722

DSPCT-FP1814

特許協力条約に基づく国際出願願書

紙面による写し (注意　電子データが原本となります)

0	受理官庁記入欄	
0-1	国際出願番号	PCT/JP2018/018572
0-2	国際出願日	2018年 05月 14日 (14.05.2018)
0-3	(受付印)	RO/JP

0-4	様式 PCT/RO/101 この特許協力条約に基づく国際出願願書は、	
0-4-1	右記によって作成された。	JPO-PAS i330
0-5	申立て 出願人は、この国際出願が特許協力条約に従って処理されることを請求する。	
0-6	出願人によって指定された受理官庁	日本国特許庁 (RO/JP)
0-7	出願人又は代理人の書類記号	DSPCT-FP1814
I	発明の名称	抗ＣＤＨ６抗体及び抗ＣＤＨ６抗体－薬物コンジュゲート
II	出願人	
II-1	この欄に記載した者は	出願人である (applicant only)
II-2	右の指定国についての出願人である。	すべての指定国 (all designated States)
II-4ja	名称	第一三共株式会社
II-4en	Name:	DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED
II-5ja	あて名	1038426 日本国 東京都中央区日本橋本町三丁目５番１号
II-5en	Address:	3-5-1, Nihonbashi Honcho, Chuo-ku, Tokyo 1038426 Japan
II-6	国籍(国名)	日本国 JP
II-7	住所(国名)	日本国 JP
II-10	電子メール	ipadmin@daiichisankyo.co.jp
II-10(a)	電子メール使用の承認 受理官庁、国際調査機関、国際事務局若しくは国際予備審査機関が、その官庁又は機関が希望する場合には、この電子メールアドレスを利用して、この国際出願に関する通知を送付することを承認する。	通知の写しを事前に送付するために利用することを承認する。
II-11	出願人登録番号	307010166

DSPCT-FP1814

特許協力条約に基づく国際出願願書

紙面による写し (注意　電子データが原本となります)

III-1	その他の出願人又は発明者	
III-1-1	この欄に記載した者は	発明者である (inventor only)
III-1-3	右の指定国についての発明者である。	
III-1-4ja	氏名(姓名)	齊藤　敦子
III-1-4en	Name (LAST, First):	SAITO Atsuko
III-1-5ja	あて名	1038426 日本国 東京都中央区日本橋本町三丁目５番１号　第一三共株式会社内
III-1-5en	Address:	c/o DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED, 3-5-1, Nihonbashi Honcho, Chuo-ku, Tokyo 1038426 Japan
III-2	その他の出願人又は発明者	
III-2-1	この欄に記載した者は	発明者である (inventor only)
III-2-3	右の指定国についての発明者である。	
III-2-4ja	氏名(姓名)	平田　剛之
III-2-4en	Name (LAST, First):	HIRATA Tsuyoshi
III-2-5ja	あて名	1348630 日本国 東京都江戸川区北葛西１丁目１６番１３号　第一三共ＲＤノバーレ株式会社内
III-2-5en	Address:	c/o RD NOVARE CO., LTD., 1-16-13, Kitakasai, Edogawa-ku, Tokyo 1348630 Japan
III-3	その他の出願人又は発明者	
III-3-1	この欄に記載した者は	発明者である (inventor only)
III-3-3	右の指定国についての発明者である。	
III-3-4ja	氏名(姓名)	中村　健介
III-3-4en	Name (LAST, First):	NAKAMURA Kensuke
III-3-5ja	あて名	1038426 日本国 東京都中央区日本橋本町三丁目５番１号　第一三共株式会社内
III-3-5en	Address:	c/o DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED, 3-5-1, Nihonbashi Honcho, Chuo-ku, Tokyo 1038426 Japan

DSPCT-FP1814

特許協力条約に基づく国際出願願書

紙面による写し (注意　電子データが原本となります)

IV-1	代理人又は共通の代表者、通知のあて名 下記の者は国際機関において右記のごとく出願人のために行動する。	代理人（agent）
IV-1-1ja	氏名(姓名)	石橋　公樹
IV-1-1en	Name (LAST, First):	ISHIBASHI Koki
IV-1-2ja	あて名	1400005 日本国 東京都品川区広町一丁目２番５８号　第一三共株式会社内
IV-1-2en	Address:	c/o DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED, 1-2-58, Hiromachi, Shinagawa-ku, Tokyo 1400005 Japan
IV-1-3	電話番号	03-5436-8550
IV-1-4	ファクシミリ番号	03-5740-3660
IV-1-5	電子メール	ipadmin@daiichisankyo.co.jp
IV-1-5(a)	電子メール使用の承認 受理官庁、国際調査機関、国際事務局若しくは国際予備審査機関が、その官庁又は機関が希望する場合には、この電子メールアドレスを利用して、この国際出願に関する通知を送付することを承認する。	通知の写しを事前に送付するために利用することを承認する。
IV-1-6	代理人登録番号	100146581
IV-2	その他の代理人	筆頭代理人と同じあて名を有する代理人 (additional agent(s) with the same address as first named agent)
IV-2-1ja	氏名	竹元　利泰(100161160)
IV-2-1en	Name(s)	TAKEMOTO Toshiyasu(100161160)
V	国の指定	
V-1	この願書を用いてされた国際出願は、規則4.9(a)に基づき、国際出願の時点で拘束される全てのPCT締約国を指定し、取得しうるあらゆる種類の保護を求め、及び該当する場合には広域と国内特許の両方を求める国際出願となる。	
VI-1	先の国内出願に基づく優先権主張	
VI-1-1	出願日	2017年 05月 15日 (15.05.2017)
VI-1-2	出願番号	2017-096749
VI-1-3	パリ条約同盟国名又はWTO加盟国名	日本国 JP
VI-2	優先権証明書送付の請求 国際事務局に対して、上記の先の出願のうち、右記のものについては、該当する場合には記載されたアクセスコードを利用し、優先権書類に記載されている事項に係る情報を電子図書館から、取得することを請求する。	VI-1 アクセスコード： 9E70

DSPCT-FP1814

特許協力条約に基づく国際出願願書

紙面による写し (注意　電子データが原本となります)

VI-3	引用による補充： 条約第11条(1)(iii)(d)若しくは(e)に規定する国際出願の要素の全部、又は規則20.5(a)に規定する明細書、請求の範囲若しくは図面の一部がこの国際出願には含まれていないが、受理官庁が条約第11条(1)(iii)に規定する要素の1つ以上を最初に受領した日において優先権を主張する先の出願にそれが完全に含まれている場合には、規則20.6に基づく確認の手続を条件として、その要素又は部分を規則20.6の規定によりこの国際出願に引用して補充することを請求する。		
VII-1	特定された国際調査機関(ISA)	日本国特許庁（ISA/JP）	
VIII	申立て	申立て数	
VIII-1	発明者の特定に関する申立て	–	
VIII-2	出願し及び特許を与えられる国際出願日における出願人の資格に関する申立て	–	
VIII-3	先の出願の優先権を主張する国際出願日における出願人の資格に関する申立て	–	
VIII-4	発明者である旨の申立て（米国を指定国とする場合）	–	
VIII-5	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	–	
IX	照合欄	用紙の枚数	添付された電子データ
IX-1	願書（申立てを含む）	5	✓
IX-2	明細書	138	✓
IX-3	請求の範囲	15	✓
IX-4	要約	1	✓
IX-5	図面	25	✓
IX-6a	明細書の配列表（国際調査のためにも利用される）	–	✓
IX-7	合計	184	
	添付書類	添付	添付された電子データ
IX-8	手数料計算用紙	–	✓
IX-20	要約とともに提示する図の番号		
IX-21	国際出願の使用言語名	日本語	
X-1	出願人、代理人又は代表者の記名押印	(PKCS7 デジタル署名)	
X-1-1	氏名(姓名)	石橋　公樹	
X-1-3	権限（署名者が法人の場合）		
X-2	出願人、代理人又は代表者の記名押印	/100161160/	
X-2-1	氏名(姓名)	竹元　利泰	
X-2-3	権限（署名者が法人の場合）		

DSPCT-FP1814

特許協力条約に基づく国際出願願書

紙面による写し (注意　電子データが原本となります)

受理官庁記入欄

10-1	国際出願として提出された書類の実際の受理の日	2018年 05月 14日 (14.05.2018)
10-2	図面	
10-2-1	受理された	
10-2-2	不足図面がある	
10-3	国際出願として提出された書類を補完する書類又は図面であってその後期間内に提出されたものの実際の受理の日(訂正日)	
10-4	特許協力条約第11条(2)に基づく必要な補完の期間内の受理の日	
10-5	出願人により特定された国際調査機関	ISA/JP
10-6	調査手数料未払いにつき、国際調査機関に調査用写しを送付していない	

国際事務局記入欄

11-1	記録原本の受理の日	

PATENT COOPERATION TREATY PCT/JP2018/018572

ADVANCE E-MAIL

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92*bis*.1 and Administrative Instructions, Section 422)

To:

ISHIBASHI Koki
c/o DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED, 1-2-58, Hiromachi, Shinagawa-ku, Tokyo
1400005
JAPON

Date of mailing *(day/month/year)*
21 May 2019 (21.05.2019)

Applicant's or agent's file reference
DSPCT-FP1814

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/JP2018/018572

International filing date *(day/month/year)*
14 May 2018 (14.05.2018)

1. The following indications appeared on record concerning:

☐ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address

HIRATA Tsuyoshi
c/o RD NOVARE CO., LTD., 1-16-13, Kitakasai, Edogawa-ku, Tokyo
1348630
Japan

State of Nationality | State of Residence

Telephone No.

Facsimile No.

E-mail address

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☐ the name ☒ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address

HIRATA Tsuyoshi
c/o DAIICHI SANKYO RD NOVARE CO., LTD., 1-16-13, Kitakasai, Edogawa-ku, Tokyo
1348630
Japan

State of Nationality | State of Residence

Telephone No.

Facsimile No.

E-mail address
☐ Notifications by e-mail authorized

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office
☐ the International Searching Authority
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search
☐ the International Preliminary Examining Authority
☒ the designated Offices concerned
☐ the elected Offices concerned
☐ other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Kuboki Masumi

e-mail pct.team8@wipo.int
Telephone No. +41 22 338 74 08

Form PCT/IB/306 (January 2009) 1/GNJ4R6NSX4MRW0

特 許 協 力 条 約

発信人　日本国特許庁（国際調査機関）

代理人
　石橋　公樹

様

あて名
〒140-0005
日本国東京都品川区広町一丁目２番５８号　第一三共株式会社内

ＰＣＴ
国際調査機関の見解書
（法施行規則第 40 条の 2）
［ＰＣＴ規則 43 の 2.1］

発送日 （日.月.年）	０７．０８．２０１８
出願人又は代理人 の書類記号　DSPCT-FP1814	今後の手続については、下記２を参照すること。

国際出願番号	国際出願日	優先日
ＰＣＴ／ＪＰ２０１８／０１８５７２	（日.月.年）　１４．０５．２０１８	（日.月.年）　１５．０５．２０１７

国際特許分類（ＩＰＣ）Int.Cl.　補充欄参照

出願人（氏名又は名称）
第一三共株式会社

１．この見解書は次の内容を含む。

- ☑ 第Ⅰ欄　見解の基礎
- ☐ 第Ⅱ欄　優先権
- ☐ 第Ⅲ欄　新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解の不作成
- ☐ 第Ⅳ欄　発明の単一性の欠如
- ☑ 第Ⅴ欄　ＰＣＴ規則 43 の 2.1(a)(i)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- ☐ 第Ⅵ欄　ある種の引用文献
- ☐ 第Ⅶ欄　国際出願の欠陥
- ☐ 第Ⅷ欄　国際出願についての意見

２．今後の手続
国際予備審査の請求がされた場合は、出願人がこの国際調査機関とは異なる国際予備審査機関を選択し、かつ、その国際予備審査機関がＰＣＴ規則 66.1 の 2(b)の規定に基づいて国際調査機関の見解書を国際予備審査機関の見解書とみなさない旨を国際事務局に通知していた場合を除いて、この見解書は国際予備審査機関の最初の見解書とみなされる。

この見解書が上記のように国際予備審査機関の見解書とみなされる場合、様式ＰＣＴ／ＩＳＡ／２２０を送付した日から３月又は優先日から２２月のうちいずれか遅く満了する期限が経過するまでに、出願人は国際予備審査機関に、適当な場合は補正書とともに、答弁書を提出することができる。

さらなる選択肢は、様式ＰＣＴ／ＩＳＡ／２２０を参照すること。

見解書を作成した日
３０．０７．２０１８

名称及びあて先	特許庁審査官（権限のある職員）	４Ｂ	６１１５
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ） 郵便番号１００－８９１５ 東京都千代田区霞が関三丁目４番３号	田ノ上　拓自 電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８		

様式ＰＣＴ／ＩＳＡ／２３７（表紙）（２０１５年１月）

国際調査機関の見解書

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１８／０１８５７２

第Ⅰ欄　見解の基礎

１．言語に関し、この見解書は以下のものに基づき作成した。

☑ 出願時の言語による国際出願

☐ 出願時の言語から国際調査のための言語である＿＿＿＿＿＿＿＿語に翻訳された、この国際出願の翻訳文
（ＰＣＴ規則12.3(a)及び23.1(b)）

２．☐ この見解書は、ＰＣＴ規則 91 の規定により国際調査機関が許可した又は国際調査機関に通知された明らかな誤りの訂正を考慮して作成した（ＰＣＴ規則 43 の 2.1(b)）。

３．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見解書を作成した。

ａ．☑ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
☑ 附属書C/ST.25テキストファイル形式
☐ 紙形式又はイメージファイル形式

ｂ．☐ 国際出願とともに、ＰＣＴ規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表

ｃ．☐ 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
☐ 附属書C/ST.25テキストファイル形式（ＰＣＴ規則13の3.1(a)）
☐ 紙形式又はイメージファイル形式（ＰＣＴ規則13の3.1(b)及びＰＣＴ実施細則第713号）

４．☐ さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。

５．補足意見：

国際調査機関の見解書

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１８／０１８５７２

第Ⅴ欄　新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についてのＰＣＴ規則43の2.1(a)(i)に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

１．　見解

新規性（N）	請求項	1-53	有
	請求項		無
進歩性（ＩＳ）	請求項	1-53	有
	請求項		無
産業上の利用可能性（ＩＡ）	請求項	1-53	有
	請求項		無

２．　文献及び説明

文献１：WO 2016/024195 A1 (NOVARTIS AG) 2016.02.18, 請求項 1-61, 実施例特に実施例 7, 図 4 等
& US 2016/0046711 A1, 請求項 1-61, 実施例特に実施例 7, 図 4 等

文献２：WO 2014/057687 A1 (第一三共株式会社) 2014.04.17, 請求項 1-49, 実施例等
& US 2015/0297748 A1, 請求項 1-49, 実施例等

請求項１－５３に係る発明は、国際調査報告にて引用された文献に対して新規性及び進歩性を有する。

文献１には、ＮＯＶＯ０７１２等のカドヘリン６に対する抗体が記載されており（請求項１－６１、実施例等参照）、ＮＯＶＯ０７１２はカドヘリン６のＥＣ５に結合することが記載されている（実施例７、図４等参照）。また、該抗体を卵巣癌等の治療に使用することも記載されている（請求項４０等参照）。

文献２は、いわゆるＧＧＦＧリンカーに関するものであり、本願の請求項３１－３６に記載されるリンカー化合物が記載されている（請求項１－４９、実施例等参照）。

しかしながら、文献１－２のいずれにも、本願の配列番号４、すなわちカドヘリン６のＥＣ３に特異的に結合する抗体は記載も示唆もされておらず、また、本願実施例にて示される、良好な内在化能についても記載も示唆もされていない。さらに、本願実施例では、カドヘリン６のＥＣ３に特異的に結合する抗体が、先行技術たる文献１のＮＯＶＯ０７１２と比較して、より高い内在活性及び細胞傷害活性を有することも示されている。

したがって、本願請求項１－５３に係る発明は、国際調査報告にて引用されたいずれの文献にも記載も示唆もされていないものであり、出願時の技術常識を考慮しても、当業者といえども容易には想到し得ないものである。

国際調査機関の見解書

国際出願番号 ＰＣＴ／ＪＰ２０１８／０１８５７２

補充欄

いずれかの欄の大きさが足りない場合

第　　欄の続き

C12N15/13(2006.01)i, A61K9/00(2006.01)i, A61K31/4745(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61K47/68(2017.01)i, A61P13/12(2006.01)i, A61P15/08(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C07K16/28(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)i

Digital Access Service
(DAS)

WIPO
WORLD
INTELLECTUAL PROPERTY
ORGANIZATION

CERTIFICATE OF AVAILABILITY OF A CERTIFIED PATENT DOCUMENT IN A DIGITAL LIBRARY

The International Bureau certifies that a copy of the patent application indicated below has been available to the WIPO Digital Access Service since the date of availability indicated, and that the patent application has been available to the indicated Office(s) as of the date specified following the relevant Office code:

Document details: Country/Office: JP
Filing date: 15 May 2017 (15.05.2017)
Application number: 2017-096749

Date of availability of document: 16 May 2017 (16.05.2017)

The following Offices can retrieve this document by using the access code:
JP, US, SE, NZ, KR, EA, IN, BR, GB, AU, EP, ES, IB, EE, CN, MA, FI

Date of issue of this certificate: 24 May 2018 (24.05.2018)

34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland
www.wipo.int

日　本　国　特　許　庁
JAPAN PATENT OFFICE

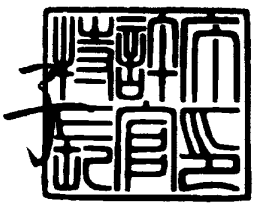
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 Date of Application:	２０１７年　５月１５日
出願番号 Application Number:	特願２０１７－０９６７４９
パリ条約による外国への出願に用いる優先権の主張の基礎となる出願の国コードと出願番号 The country code and number of your priority application, to be used for filing abroad under the Paris Convention, is	ＪＰ２０１７－０９６７４９
出願人 Applicant(s):	第一三共株式会社

２０１８年　５月２４日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office　宗像直



【書類名】　特許願
【整理番号】　DS2017002
【あて先】　特許庁長官殿
【国際特許分類】　C07K 16/28
【発明者】
　【住所又は居所】　東京都中央区日本橋本町三丁目５番１号　第一三共株式会社内
　【氏名】　齊藤　敦子
【発明者】
　【住所又は居所】　東京都江戸川区北葛西一丁目１６番１３号　第一三共ＲＤノバーレ株式会社内
　【氏名】　平田　剛之
【発明者】
　【住所又は居所】　東京都中央区日本橋本町三丁目５番１号　第一三共株式会社内
　【氏名】　中村　健介
【特許出願人】
　【識別番号】　307010166
　【氏名又は名称】　第一三共株式会社
【代理人】
　【識別番号】　100146581
　【弁理士】
　【氏名又は名称】　石橋　公樹
【選任した代理人】
　【識別番号】　100113583
　【弁理士】
　【氏名又は名称】　北野　範子
【選任した代理人】
　【識別番号】　100161160
　【弁理士】
　【氏名又は名称】　竹元　利泰
【選任した代理人】
　【識別番号】　100119622
　【弁理士】
　【氏名又は名称】　金原　玲子
【手数料の表示】
　【予納台帳番号】　353135
　【納付金額】　14,000円
【提出物件の目録】
　【物件名】　明細書　1
　【物件名】　特許請求の範囲　1
　【物件名】　要約書　1
　【物件名】　図面　1
　【包括委任状番号】　0704434
　【包括委任状番号】　0906688
　【包括委任状番号】　0909034
　【包括委任状番号】　0906690

【書類名】明細書
【発明の名称】抗ＣＤＨ６抗体及び抗ＣＤＨ６抗体―薬物コンジュゲート
【技術分野】
【０００１】
本発明は、ＣＤＨ６に結合し、内在化作用を有する抗ＣＤＨ６抗体、該抗ＣＤＨ６抗体の製造方法、ならびに該抗体を含む抗体―薬物コンジュゲート、該抗体―薬物コンジュゲートを含む抗腫瘍剤等に関する。
【背景技術】
【０００２】
カドヘリン（Ｃａｄｈｅｒｉｎ）は、細胞膜表面に存在する糖タンパク質で、カルシウムイオン依存的にＮ末端側の細胞外ドメイン同士が結合することで、細胞間接着分子として、また細胞間相互作用を担うシグナル分子として機能する。カドヘリンスーパーファミリーの内、クラシックカドヘリンに分類される分子群は、５個の細胞外ドメイン（ｅｘｔｒａｃｅｌｌｕｌａｒ　ｄｏｍａｉｎ、ＥＣドメイン）と１個の膜貫通領域、及び細胞内ドメインから構成される１回膜貫通タンパク質である。クラシックカドヘリンはアミノ酸配列の相同性から、Ｅ―カドヘリンやＮ―カドヘリンに代表されるタイプＩファミリーと、タイプＩＩファミリーに分類される。
【０００３】
カドヘリン６（Ｃａｄｈｅｒｉｎ―６、ＣＤＨ６）は、タイプＩＩカドヘリンファミリーに分類される、７９０アミノ酸からなる１回膜貫通タンパク質であり、Ｎ末端側を細胞外、Ｃ末端側を細胞内に持つ。ヒトＣＤＨ６遺伝子は１９９５年に初めてクローニングされ（非特許文献１）、ＮＭ＿００４９３２、ＮＰ＿００４９２３（ＮＣＢＩ）等のアクセッション番号により参照可能である。
【０００４】
ＣＤＨ６は発生期において脳や腎臓で特異的に発現しており、中枢神経系の回路形成（非特許文献２、非特許文献３）や腎臓のネフロン発生時（非特許文献４、非特許文献５）に重要な役割を担うことが報告されている。成人の正常組織では、ＣＤＨ６の発現は腎尿細管や胆管上皮細胞などに限局されている。
【０００５】
一方で、成人のいくつかの癌種において、腫瘍部で特異的にＣＤＨ６の発現が亢進することが知られており、ヒト腎細胞癌、特に腎淡明細胞癌では、ＣＤＨ６発現と予後不良との相関や、腫瘍マーカーとしての利用可能性が報告されている（非特許文献６、非特許文献７）。ヒト卵巣癌でもＣＤＨ６の高発現が報告されている（非特許文献８）、また、ヒト甲状腺癌の上皮間葉変換と転移にＣＤＨ６が関与するとの報告もある（非特許文献９）。
【０００６】
がんは死亡原因の上位を占め、その罹患数は人口の高齢化と共に増加することが予想されているが、未だ治療ニーズは充分に満たされていない。従来の化学療法剤は、その選択性の低さから腫瘍細胞だけでなく正常細胞に対しても傷害性を持つことによる副作用や、充分な薬剤量を投与できないことで薬剤の効果を充分に得ることが出来ないことが問題となっている。このため近年では、がん細胞に特徴的な変異や高発現を示す分子、細胞のがん化に関与する特定の分子を標的としたより選択性の高い分子標的薬や抗体医薬の開発が行われている。
【０００７】
抗体は血中安定性が高く、標的抗原に特異的に結合することから副作用の軽減が期待されており、がん細胞表面に高発現している分子に対する抗体医薬が多数開発されている。抗体の抗原特異的な結合能を利用した技術の一つとして、抗体―薬物コンジュゲート（Ａｎｔｉｂｏｄｙ―Ｄｒｕｇ　Ｃｏｎｊｕｇａｔｅ；ＡＤＣ）が挙げられる。ＡＤＣは、がん細胞表面に発現している抗原に結合し、その結合によって抗原を細胞内に内在化できる抗体に、細胞傷害活性を有する薬物を結合させたものである。ＡＤＣは、がん細胞に効率

的に薬物を送達できることによって、がん細胞内に薬物を蓄積させ、がん細胞を死滅させることが期待できる（非特許文献１０）。ＡＤＣとして例えば、抗ＣＤ３０モノクローナル抗体にモノメチルアウリスタチンＥを結合させたアドセトリス（商標）（ブレンツキシマブ　ベドチン）がホジキンリンパ腫と未分化大細胞リンパ腫の治療薬として認可されている。また、抗ＨＥＲ２モノクローナル抗体にエムタンシンを結合させたカドサイラ（商標）（トラスツズマブ　エムタンシン）がＨＥＲ２陽性の進行、再発乳癌の治療に用いられている。

【０００８】

抗腫瘍薬としてのＡＤＣに適した標的抗原の特徴としては、がん細胞表面で特異的に高発現し、正常細胞では低発現又は発現していないこと、細胞内に内在化できること、抗原が細胞表面から分泌されないことなどが挙げられる。また、ＡＤＣに適した抗体の重要な特徴としては、標的となる抗原に特異的に結合することに加えて、高い内在化能を有することが挙げられる。抗体の内在化能は標的抗原と抗体の両方の性質に依存するものであり、標的の分子構造から内在化に適した抗原結合部位を推定したり、抗体の結合強度や物性等から容易に内在化能の高い抗体を推測したりすることは困難である。このため、標的抗原に対して高い内在化能を有する抗体を取得することは、有効性の高いＡＤＣを開発する上で重要な課題となっている（非特許文献１１）。

【０００９】

ＣＤＨ６を標的としたＡＤＣとしては、ＣＤＨ６のＥＣドメイン５（ＥＣ５）に特異的に結合する抗ＣＤＨ６抗体にＤＭ４を結合させたＡＤＣが知られている（特許文献１）。

【先行技術文献】

【特許文献】

【００１０】

【特許文献１】ＷＯ２０１６／０２４１９５

【非特許文献】

【００１１】

【非特許文献１】Ｓｈｉｍｏｙａｍａ　Ｙ，ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ，２２０６―２２１１，５５，Ｍａｙ　１５，１９９５

【非特許文献２】Ｉｎｏｕｅ　Ｔ，ｅｔ　ａｌ．，Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔａｌ　Ｂｉｏｌｏｇｙ，１８３―１９４，１９９７

【非特許文献３】Ｏｓｔｅｒｈｏｕｔ　Ｊ　Ａ，ｅｔ　ａｌ．，Ｎｅｕｒｏｎ，６３２―６３９，７１，Ａｕｇ　２５，２０１１

【非特許文献４】Ｃｈｏ　Ｅ　Ａ，ｅｔ　ａｌ．，Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ，８０３―８１２，１２５，１９９８

【非特許文献５】Ｍａｈ　Ｓ　Ｐ，ｅｔ　ａｌ．，Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ　Ｂｉｏｌｏｇｙ，３８―５３，２２３，２０００

【非特許文献６】Ｐａｕｌ　Ｒ，ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ，２７４１―２７４８，Ｊｕｌｙ　１，５７，１９９７

【非特許文献７】Ｓｈｉｍａｚｕｉ　Ｔ，ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ，９６３―９６８，１０１（５），Ｓｅｐ．１，２００４

【非特許文献８】Ｋｏｅｂｅｌ　Ｍ，ｅｔ　ａｌ．，ＰＬｏＳ　Ｍｅｄｉｃｉｎｅ，１７４９―１７６０，５（１２），ｅ２３２，Ｄｅｃ．２００８

【非特許文献９】Ｇｕｇｎｏｎｉ　Ｍ，ｅｔ　ａｌ．，Ｏｎｃｏｇｅｎｅ，６６７―６７７，３６，２０１７

【非特許文献１０】Ｐｏｌａｋｉｓ　Ｐ．，Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｒｅｖｉｅｗｓ，３―１９，６８，２０１６

【非特許文献１１】Ｐｅｔｅｒｓ　Ｃ，ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ　Ｒｅｐｏｒｔｓ，１―２０，３５，２０１５

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

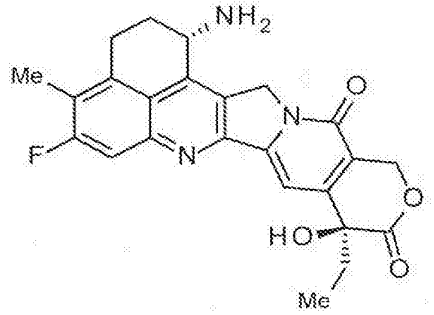
【００１２】
本発明の課題は、ＣＤＨ６に対して特異的に結合する高い内在化活性を有する抗体、該抗体を含む高い抗腫瘍活性を有する抗体―薬物コンジュゲート、該抗体―薬物コンジュゲートを用いた腫瘍に対する治療効果を有する医薬品、及び、当該抗体、抗体―薬物コンジュゲート又は医薬品を用いた腫瘍の治療方法等を提供することである。
【課題を解決するための手段】
【００１３】
本発明者らは、上記課題を達成するために鋭意検討したところ、驚くべきことにＣＤＨ６の細胞外ドメイン３（本明細書中、ＥＣ３とも称する）に特異的に結合する抗体が、ＣＤＨ６を発現する細胞において極めて高い内在化活性を有しＡＤＣ抗体として有用であることを見出した。更に、当該抗ＣＤＨ６抗体に、細胞内で毒性を発揮する薬剤を特定の構造のリンカーを介して結合させた抗ＣＤＨ６抗体―薬物コンジュゲートは、従来のＣＤＨ６薬物複合体よりも強い抗腫瘍活性を示すことを見出した。
【００１４】
本願発明は以下の発明を包含する；
［１］配列番号４に記載のアミノ酸配列に特異的に結合し、細胞内に取り込まれる内在化能を有する、抗体又は当該抗体の機能性断片；
［２］配列番号４に記載のアミノ酸配列への結合に対して、以下の（１）～（５）：
（１）配列番号５３の２１～２３３番目に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号５６の２０～４７１番目に記載のアミノ酸配列からなる重鎖を有する抗体、
（２）配列番号６１の２１～２３３番目に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号６９の２０～４７１番目に記載のアミノ酸配列からなる重鎖を有する抗体、
（３）配列番号６１の２１～２３３番目に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号７３の２０～４７１番目に記載のアミノ酸配列からなる重鎖を有する抗体、
（４）配列番号６５の２１～２３３番目に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号７３の２０～４７１番目に記載のアミノ酸配列からなる重鎖を有する抗体、及び
（５）配列番号６１の２１～２３３番目に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号７７の２０～４７１番目に記載のアミノ酸配列からなる重鎖を有する抗体、
からなる群から選択される抗体のうち少なくともいずれか１つと競合阻害活性を有する［１］に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片；
［３］以下の（１）～（４）：
（１）配列番号１２に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１、配列番号１３に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２及び配列番号１４に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ３、
（２）配列番号２２に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１、配列番号２３に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２及び配列番号２４に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ３、
（３）配列番号３２に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１、配列番号３３に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２及び配列番号３４に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ３、及び
（４）配列番号４２に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１、配列番号４３に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２及び配列番号４４に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ３、
からなる群から選択されるいずれか１つに記載のＣＤＲＬ１、ＣＤＲＬ２及びＣＤＲＬ３、並びに、
以下の（５）～（９）：
（５）配列番号１７に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１、配列番号１８に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２及び配列番号１９に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３、
（６）配列番号２７に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１、配列番号２８に記載のア

ミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２及び配列番号２９に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３、
（７）配列番号３７に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１、配列番号３８に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２及び配列番号３９に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３、
（８）配列番号４７に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１、配列番号４８に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２及び配列番号４９に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３、及び
（９）配列番号１７に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１、配列番号６０に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２及び配列番号１９に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３、
からなる群から選択されるいずれか１つに記載のＣＤＲＨ１、ＣＤＲＨ２及びＣＤＲＨ３を含む、
［１］又は［２］のいずれか１項に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片；
［４］以下の（１）～（５）：
（１）配列番号１２に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１、配列番号１３に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２及び配列番号１４に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ３、及び、配列番号１７に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１、配列番号１８に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２及び配列番号１９に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３、
（２）配列番号２２に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１、配列番号２３に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２及び配列番号２４に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ３、及び、配列番号２７に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１、配列番号２８に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２及び配列番号２９に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３、
（３）配列番号３２に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１、配列番号３３に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２及び配列番号３４に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ３、及び、配列番号３７に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１、配列番号３８に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２及び配列番号３９に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３、
（４）配列番号４２に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１、配列番号４３に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２及び配列番号４４に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ３、及び、配列番号４７に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１、配列番号４８に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２及び配列番号４９に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３、及び
（５）配列番号１２に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１、配列番号１３に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２及び配列番号１４に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ３、及び、配列番号１７に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１、配列番号６０に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２及び配列番号１９に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３、
からなる群から選択されるＣＤＲＬ１、ＣＤＲＬ２及びＣＤＲＬ３、並びに、ＣＤＲＨ１、ＣＤＲＨ２及びＣＤＲＨ３を含む、
［１］～［３］のいずれか１項に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片；
［５］ヒト化されている［１］～［４］のいずれか１項に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片；
［６］以下の（１）～（４）：
（１）配列番号６３に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、
（２）配列番号６７に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、
（３）（１）～（２）のアミノ酸配列において各ＣＤＲ配列以外のフレームワーク領域の配列に対して少なくとも９５％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列、及び

（４）（１）～（３）のアミノ酸配列において各ＣＤＲ配列以外のフレームワーク領域の配列において１又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列
からなる群から選択されるいずれか１つに記載の軽鎖可変領域、並びに、
以下の（５）～（９）：
（５）配列番号７１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、
（６）配列番号７５に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、
（７）配列番号７９に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、
（８）（５）～（７）のアミノ酸配列において各ＣＤＲ配列以外のフレームワーク領域の配列に対して少なくとも９５％以上の配列相同性を有するアミノ酸配列、及び
（９）（５）～（８）のアミノ酸配列において各ＣＤＲ配列以外のフレームワーク領域の配列において１又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列
からなる群から選択されるいずれか１つに記載の重鎖可変領域、
を有する［１］～［５］のいずれか１項に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片；
［７］以下の（１）～（４）：
（１）配列番号６３に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域及び配列番号７１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、
（２）配列番号６３に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域及び配列番号７５に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、
（３）配列番号６７に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域及び配列番号７５に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、又は
（４）配列番号６３に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域及び配列番号７９に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、
のいずれかの軽鎖可変領域及び重鎖可変領域、
を含む［１］～［６］のいずれか１項に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片；
［８］以下の（１）～（４）：
（１）配列番号６１の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号６９の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖、
（２）配列番号６１の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号７３の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖、
（３）配列番号６５の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号７３の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖、又は
（４）配列番号６１の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号７７の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖、
のいずれかを有する［１］～［７］のいずれか１項に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片；
［９］配列番号６１の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号６９の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖を有する［８］に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片；
［１０］配列番号６１の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号７３の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖を有する［８］に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片；
【００１５】
［１１］配列番号６５の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号７３の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖を有する［８］に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片；
［１２］配列番号６１の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号７７の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖を有する［８］に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片；
［１３］機能性断片がＦａｂ、Ｆ（ａｂ’）２、Ｆａｂ’及びＦｖからなる群から選択される［１］～［１２］のいずれか１項に記載の抗体の機能性断片；

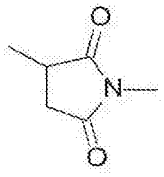
［１４］［１］～［１３］のいずれか１項に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片をコードするポリヌクレオチド；
［１５］以下の（１）～（５）：
（１）配列番号１２に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１、配列番号１３に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２及び配列番号１４に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ３を含む軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド、及び、配列番号１７に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１、配列番号１８に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２及び配列番号１９に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３を含む重鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド、
（２）配列番号２２に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１、配列番号２３に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２及び配列番号２４に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ３を含む軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド、及び、配列番号２７に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１、配列番号２８に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２及び配列番号２９に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３を含む重鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド、
（３）配列番号３２に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１、配列番号３３に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２及び配列番号３４に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ３を含む軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド、及び、配列番号３７に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１、配列番号３８に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２及び配列番号３９に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３を含む重鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド、
（４）配列番号４２に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１、配列番号４３に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２及び配列番号４４に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ３を含む軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド、及び、配列番号４７に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１、配列番号４８に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２及び配列番号４９に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３を含む重鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド、並びに
（５）配列番号１２に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１、配列番号１３に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２及び配列番号１４に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ３を含む軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド、及び、配列番号１７に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１、配列番号６０に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２及び配列番号１９に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３を含む重鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド、
からなる群から選択されるいずれか１つに記載のポリヌクレオチドを含む［１４］に記載のポリヌクレオチド；
［１６］配列番号６１の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖をコードするポリヌクレオチド及び配列番号６９の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖をコードするポリヌクレオチドを含む［１４］又は［１５］に記載のポリヌクレオチド；
［１７］配列番号６１の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖をコードするポリヌクレオチド及び配列番号７３の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖をコードするポリヌクレオチドを含む［１４］又は［１５］に記載のポリヌクレオチド；
［１８］配列番号６５の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖をコードするポリヌクレオチド及び配列番号７３の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖をコードするポリヌクレオチドを含む［１４］又は［１５］に記載のポリヌクレオチド；
［１９］配列番号６１の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖をコードするポリヌクレオチド及び配列番号７７の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖をコードするポリヌクレオチドを含む［１４］又は［１５］に記載のポリヌクレオチド；
［２０］［１４］～［１９］のいずれか１項に記載のポリヌクレオチドを含有する発現ベクター；
［２１］［２０］に記載の発現ベクターにより形質転換された宿主細胞；

［２２］宿主細胞が真核細胞である［２１］に記載の宿主細胞；
［２３］［２１］又は［２２］に記載の宿主細胞を培養する工程、及び当該工程で得られた培養物から目的の抗体又は当該抗体の機能性断片を採取する工程を含むことを特徴とする当該抗体又は当該抗体の機能性断片の製造方法；
［２４］重鎖又は軽鎖が、Ｎ―結合への糖鎖付加、Ｏ―結合への糖鎖付加、Ｎ末のプロセッシング、Ｃ末のプロセッシング、脱アミド化、アスパラギン酸の異性化、メチオニンの酸化、Ｎ末にメチオニン残基の付加、プロリン残基のアミド化、Ｎ末グルタミンもしくはＮ末グルタミン酸のピログルタミン酸化、及びカルボキシル末端における１つ又は２つのアミノ酸欠失からなる群より選択される１又は２以上の修飾をうけた、［１］～［１３］のいずれか１項に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片；
［２５］重鎖のカルボキシル末端において１つ又は２つのアミノ酸が欠失している［２４］に記載の抗体；
［２６］２本の重鎖の双方でカルボキシル末端において１つのアミノ酸が欠失している［２５］に記載の抗体；
［２７］重鎖のカルボキシル末端のプロリン残基が更にアミド化されている［２４］～［２６］のいずれか１項に記載の抗体；
［２８］抗体依存性細胞傷害活性を増強させるために糖鎖修飾が調節されている［１］～［１３］及び［２４］～［２７］からなる群から選択されるいずれか１項に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片；
［２９］［１］～［１３］及び［２４］～［２８］からなる群から選択されるいずれか１項に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片に薬物が結合している抗体―薬物コンジュゲート；
［３０］薬物が抗腫瘍性化合物である、［２９］に記載の抗体―薬物コンジュゲート；
［３１］抗腫瘍性化合物が次式：
【００１６】
【化１】



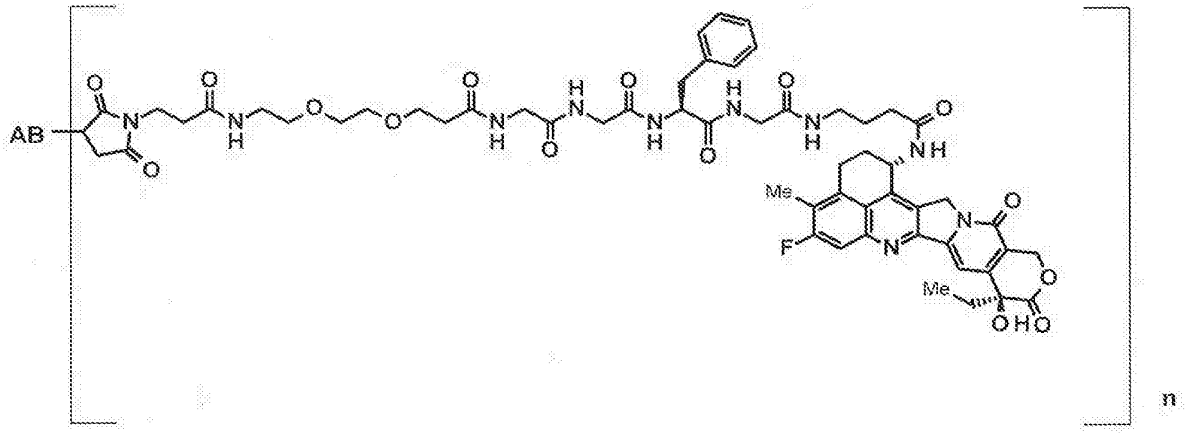
【００１７】
で示される抗腫瘍性化合物である［３０］に記載の抗体―薬物コンジュゲート；
［３２］抗体と薬物が、次式（ａ）～（ｆ）：
（ａ）―（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ―３―ｙｌ―Ｎ）―CH_2CH_2―Ｃ（＝Ｏ）―ＧＧＦＧ―ＮＨ―$CH_2CH_2CH_2$―Ｃ（＝Ｏ）―、
（ｂ）―（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ―３―ｙｌ―Ｎ）―$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$―Ｃ（＝Ｏ）―ＧＧＦＧ―ＮＨ―$CH_2CH_2CH_2$―Ｃ（＝Ｏ）―、
（ｃ）―（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ―３―ｙｌ―Ｎ）―$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$―Ｃ（＝Ｏ）―ＧＧＦＧ―ＮＨ―CH_2―Ｏ―CH_2―Ｃ（＝Ｏ）―、
（ｄ）―（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ―３―ｙｌ―Ｎ）―$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$―Ｃ（＝Ｏ）―ＧＧＦＧ―ＮＨ―CH_2CH_2―Ｏ―CH_2―Ｃ（＝Ｏ）―、
（ｅ）―（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ―３―ｙｌ―Ｎ）―CH_2CH_2―Ｃ（＝Ｏ）―ＮＨ―CH_2CH_2O―CH_2CH_2O―CH_2CH_2―Ｃ（＝Ｏ）―ＧＧＦＧ―ＮＨ―CH_2

ＣＨ２ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―、及び
（ｆ）―（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ―３―ｙｌ―Ｎ）―ＣＨ２ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―ＮＨ―ＣＨ２ＣＨ２Ｏ―ＣＨ２ＣＨ２Ｏ―ＣＨ２ＣＨ２Ｏ―ＣＨ２ＣＨ２Ｏ―ＣＨ２ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―ＧＧＦＧ―ＮＨ―ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―、
からなる群から選択されるいずれかの構造のリンカーを介して結合している、［２９］～［３１］のいずれか１項に記載の抗体―薬物コンジュゲート。
（ここで、抗体は、―（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ―３―ｙｌ―Ｎ）の末端において結合する。抗腫瘍性化合物は、１位のアミノ基の窒素原子を結合部位として、―（ＣＨ２）ｎ２―Ｃ（＝Ｏ）―部分のカルボニル基に結合する。上記式中ＧＧＦＧは、グリシン―グリシン―フェニルアラニン―グリシンからなるペプチド結合でつながっているアミノ酸配列を示す。
―（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ―３―ｙｌ―Ｎ）―は次式：
【００１８】
【化２】

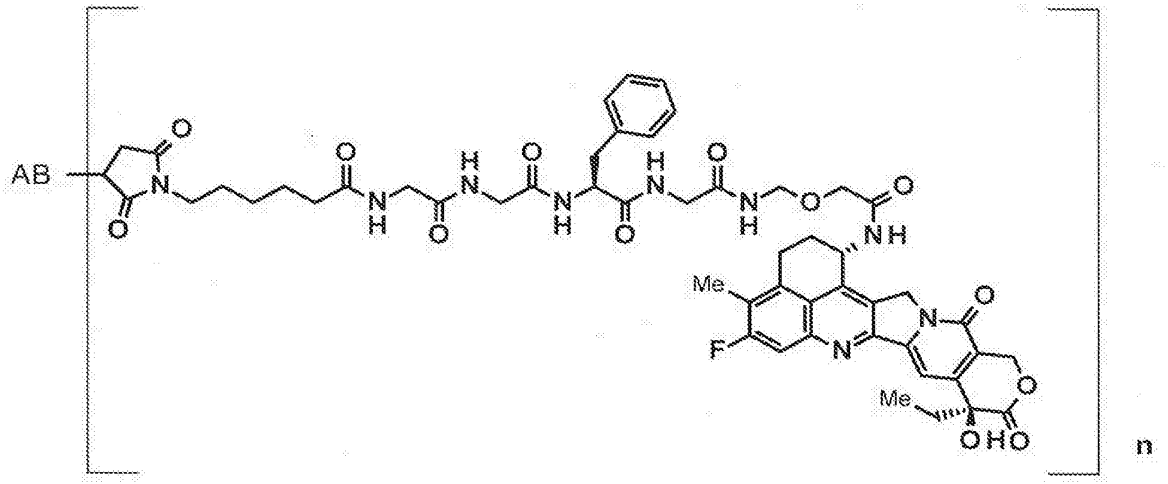


【００１９】
で示される構造であり、このものの３位で抗体と結合し、１位の窒素原子上でこれを含むリンカー構造内のメチレン基と結合する。）；
［３３］リンカーが以下の（ｃ）、（ｄ）及び（ｅ）からなる群から選択されるいずれかの式で示される［２９］～［３２］のいずれか１項に記載の抗体―薬物コンジュゲート：
（ｃ）―（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ―３―ｙｌ―Ｎ）―ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―ＧＧＦＧ―ＮＨ―ＣＨ２―Ｏ―ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―、
（ｄ）―（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ―３―ｙｌ―Ｎ）―ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―ＧＧＦＧ―ＮＨ―ＣＨ２ＣＨ２―Ｏ―ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―、
（ｅ）―（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ―３―ｙｌ―Ｎ）―ＣＨ２ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―ＮＨ―ＣＨ２ＣＨ２Ｏ―ＣＨ２ＣＨ２Ｏ―ＣＨ２ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―ＧＧＦＧ―ＮＨ―ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―；
［３４］リンカーが以下の（ｃ）又は（ｅ）の式で示される［２９］～［３３］のいずれか１項に記載の抗体―薬物コンジュゲート：
（ｃ）―（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ―３―ｙｌ―Ｎ）―ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―ＧＧＦＧ―ＮＨ―ＣＨ２―Ｏ―ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―、
（ｅ）―（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ―３―ｙｌ―Ｎ）―ＣＨ２ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―ＮＨ―ＣＨ２ＣＨ２Ｏ―ＣＨ２ＣＨ２Ｏ―ＣＨ２ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―ＧＧＦＧ―ＮＨ―ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―；
［３５］
以下の式：
【００２０】

【化３】



【００２１】
で示される構造を有する、［２９］～［３４］のいずれか１項に記載の抗体―薬物コンジュゲート：
ここで、ＡＢは抗体又は該抗体の機能性断片を示す。ｎは抗体と結合している薬物―リンカー構造の１抗体あたりの平均結合数を示す。抗体とリンカーは抗体由来のスルフヒドリル基を介して結合している；
［３６］以下の式：
【００２２】
【化４】



【００２３】
で示される構造を有する、［２９］～［３４］のいずれか１項に記載の抗体―薬物コンジュゲート：
ここで、ＡＢは抗体又は該抗体の機能性断片を示す。ｎは抗体と結合している薬物―リンカー構造の１抗体あたりの平均結合数を示す。抗体とリンカーは抗体由来のスルフヒドリル基を介して結合している；
［３７］抗体が以下の（１）～（４）：
（１）配列番号６１の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号６９の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖、
（２）配列番号６１の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号７３の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖、

（３）配列番号６５の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号７３の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖、又は
（４）配列番号６１の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号７７の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖、
からなる群から選択されるいずれか１つに記載の軽鎖及び重鎖を含む抗体又は当該抗体の機能性断片である、［２９］～［３６］のいずれか１項に記載の抗体―薬物コンジュゲート；
［３８］抗体が、配列番号６１の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号６９の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖を含む抗体又は当該抗体の機能性断片である、［３７］に記載の抗体―薬物コンジュゲート；
［３９］抗体が、配列番号６１の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号７７の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖を含む抗体又は当該抗体の機能性断片である、［３７］に記載の抗体―薬物コンジュゲート；
［４０］重鎖又は軽鎖が、Ｎ―結合への糖鎖付加、Ｏ―結合への糖鎖付加、Ｎ末のプロセッシング、Ｃ末のプロセッシング、脱アミド化、アスパラギン酸の異性化、メチオニンの酸化、Ｎ末にメチオニン残基の付加、プロリン残基のアミド化、Ｎ末グルタミンもしくはＮ末グルタミン酸のピログルタミン酸化及びカルボキシル末端における１つ又は２つのアミノ酸欠失からなる群から選択される１又は２以上の修飾をうけた、［２９］～［３９］のいずれか１項に記載の抗体―薬物コンジュゲート；
［４１］選択された１種の薬物―リンカー構造の１抗体あたりの平均結合数が１～１０個の範囲である［２９］～［４０］のいずれか１項に記載の抗体―薬物コンジュゲート；
［４２］選択された１種の薬物―リンカー構造の１抗体あたりの平均結合数が２～８個の範囲である［４１］に記載の抗体―薬物コンジュゲート；
［４３］選択された１種の薬物―リンカー構造の１抗体あたりの平均結合数が５～８個の範囲である［４２］に記載の抗体―薬物コンジュゲート；
［４４］選択された１種の薬物―リンカー構造の１抗体あたりの平均結合数が７～８である［４３］に記載の抗体―薬物コンジュゲート；
［４５］［２９］～［４４］のいずれか１項に記載の抗体―薬物コンジュゲート、その塩、又はそれらの水和物を含むことを特徴とする医薬組成物；
［４６］抗腫瘍薬であることを特徴とする、［４５］に記載の医薬組成物；
［４７］腫瘍がＣＤＨ６を発現する腫瘍であることを特徴とする、［４６］に記載の抗腫瘍薬；
［４８］腫瘍が腎細胞癌、腎淡明細胞癌、乳頭状腎細胞癌、卵巣癌、卵巣漿液性腺癌又は甲状腺癌であることを特徴とする、［４６］又は［４７］に記載の抗腫瘍薬；
［４９］［２９］～［４４］のいずれか１項に記載の抗体―薬物コンジュゲート、その塩、又はそれらの水和物から選択されるいずれかを個体に投与することを特徴とする腫瘍の治療方法；
［５０］腫瘍がＣＤＨ６が発現している腫瘍であることを特徴とする、［４９］に記載の治療方法；
［５１］腫瘍が、腎細胞癌、腎淡明細胞癌、乳頭状腎細胞癌、卵巣癌、卵巣漿液性腺癌又は甲状腺癌であることを特徴とする、［４９］又は［５０］に記載の治療方法；
［５２］［２９］～［４４］のいずれか１項に記載の抗体―薬物コンジュゲート、その塩、又はそれらの水和物から選択される少なくとも一つを含む医薬組成物及び少なくとも一つの抗腫瘍薬を、同時に、別々に又は連続して個体に投与することを特徴とする腫瘍の治療方法；
［５３］［２１］又は［２２］に記載の宿主細胞を培養する工程、当該工程で得られた培養物から目的の抗体又は当該抗体の機能性断片を採取する工程、及び当該工程で得られた抗体又は当該抗体の機能性断片と薬物―リンカー中間化合物を反応させる工程を含むことを特徴とする、抗体―薬物コンジュゲートの製造方法。
【発明の効果】

【００２４】
本発明の抗ＣＤＨ６抗体は、ＣＤＨ６のＥＣドメイン３（ＥＣ３）を特異的に認識し、高い内在化活性を有することを特徴とする。本発明の抗ＣＤＨ６抗体に、細胞内で毒性を発揮する薬剤を特定の構造のリンカーを介して結合させた抗ＣＤＨ６抗体―薬物コンジュゲートは、ＣＤＨ６を発現するがん細胞を有する患者に投与することによって、優れた抗腫瘍効果及び安全性を達成することが期待できる。即ち、本発明の抗ＣＤＨ６抗体―薬物コンジュゲートは、抗腫瘍剤として有用である。

【図面の簡単な説明】

【００２５】

【図１】図１は、ラット抗ＣＤＨ６モノクローナル抗体４種（クローン番号は、ｒＧ０１９、ｒＧ０５５、ｒＧ０５６及びｒＧ０６１）又はラットＩｇＧコントロールの、コントロール細胞又はｈＣＤＨ６導入２９３Ｔ細胞に対する結合を調べたフローサイトメトリーの結果を示す。横軸は抗体結合量を表すＦＩＴＣの蛍光強度、縦軸は細胞数を示す。

【図２－１】図２－１は、ラット抗ＣＤＨ６モノクローナル抗体４種（ｒＧ０１９、ｒＧ０５５、ｒＧ０５６及びｒＧ０６１）又は陰性コントロール抗体ＲａｔＩｇＧ２ｂの、コントロール細胞又は全長ｈＣＤＨ６導入２９３細胞に対する結合性を示す。横軸は抗体結合量を表すＦＩＴＣの蛍光強度、縦軸は細胞数を示す。

【図２－２】図２－２は、ラット抗ＣＤＨ６モノクローナル抗体４種（ｒＧ０１９、ｒＧ０５５、ｒＧ０５６及びｒＧ０６１）又はラットＩｇＧコントロールの、コントロール細胞又はＥＣ１欠失ｈＣＤＨ６導入２９３細胞に対する結合性を示す。横軸は抗体結合量を表すＦＩＴＣの蛍光強度、縦軸は細胞数を示す。

【図２－３】図２－３は、ラット抗ＣＤＨ６モノクローナル抗体４種（ｒＧ０１９、ｒＧ０５５、ｒＧ０５６及びｒＧ０６１）又はラットＩｇＧコントロールの、コントロール細胞又はＥＣ２欠失ｈＣＤＨ６導入２９３細胞に対する結合性を示す。横軸は抗体結合量を表すＦＩＴＣの蛍光強度、縦軸は細胞数を示す。

【図２－４】図２－４は、ラット抗ＣＤＨ６モノクローナル抗体４種（ｒＧ０１９、ｒＧ０５５、ｒＧ０５６及びｒＧ０６１）又はラットＩｇＧコントロールの、コントロール細胞又はＥＣ３欠失ｈＣＤＨ６導入２９３細胞に対する結合性を示す。横軸は抗体結合量を表すＦＩＴＣの蛍光強度、縦軸は細胞数を示す。

【図２－５】図２－５は、ラット抗ＣＤＨ６モノクローナル抗体４種（ｒＧ０１９、ｒＧ０５５、ｒＧ０５６及びｒＧ０６１）又はラットＩｇＧコントロールの、コントロール細胞又はＥＣ４欠失ｈＣＤＨ６導入２９３細胞に対する結合性を示す。横軸は抗体結合量を表すＦＩＴＣの蛍光強度、縦軸は細胞数を示す。

【図２－６】図２－６は、ラット抗ＣＤＨ６モノクローナル抗体４種（ｒＧ０１９、ｒＧ０５５、ｒＧ０５６及びｒＧ０６１）又はラットＩｇＧコントロールの、コントロール細胞又はＥＣ５欠失ｈＣＤＨ６導入２９３細胞に対する結合性を示す。横軸は抗体結合量を表すＦＩＴＣの蛍光強度、縦軸は細胞数を示す。

【図３】図３は、４種類のヒト腫瘍細胞株（ヒト卵巣腫瘍細胞株ＮＩＨ：ＯＶＣＡＲ―３，ＰＡ―１，ＥＳ―２及びヒト腎細胞腫瘍細胞株７８６―Ｏ）の細胞膜表面でのＣＤＨ６の発現を評価したフローサイトメトリーの結果を示す。横軸は抗体結合量を表すＦＩＴＣの蛍光強度、縦軸は細胞数を示す。

【図４】図４は、４種類のラット抗ＣＤＨ６抗体（ｒＧ０１９、ｒＧ０５５、ｒＧ０５６及びｒＧ０６１）又はラットＩｇＧコントロールの内在化活性を、タンパク質合成を阻害する毒素（サポリン）を結合させた抗ラットＩｇＧ試薬Ｒａｔ―ＺＡＰ又は陰性コントロールとして毒素を結合していないＧｏａｔ　Ａｎｔｉ―Ｒａｔ　ＩｇＧ，Ｆｃ（ｇａｍｍａ）　Ｆｒａｇｍｅｎｔ　Ｓｐｅｃｉｆｉｃを用いて、ＮＩＨ：ＯＶＣＡＲ―３細胞及び７８６―Ｏ細胞において評価したグラフを示す。グラフの縦軸は、ＡＴＰ活性（ＲＬＵ）を示す。各グラフの下に、Ｒａｔ―ＺＡＰの代わりに陰性コントロールを添加したウェルの生存細胞数を１００％とした相対生存率として算出

された細胞生存率（％）を示す。
【図５】図５は、ヒトキメラ抗ＣＤＨ６抗体ｃｈＧ０１９のヒトＣＤＨ６及びサルＣＤＨ６に対する結合を示す。横軸は抗体濃度を示し、縦軸は結合量をＭｅａｎＦｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ　Ｉｎｔｅｎｓｉｔｙ（平均蛍光強度）で示す。
【図６－１】図６－１及び図６－２は、ヒト化ｈＧ０１９抗体４種（Ｈ０１Ｌ０２、Ｈ０２Ｌ０２、Ｈ０２Ｌ０３及びＨ０４Ｌ０２）又は陰性コントロール抗体ヒトＩｇＧ１の、ヒトＣＤＨ６、サルＣＤＨ６、マウスＣＤＨ６、ラットＣＤＨ６に対する結合性を示す。横軸は抗体濃度を示し、縦軸は結合量をＭｅａｎＦｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ　Ｉｎｔｅｎｓｉｔｙ（平均蛍光強度）で示す。
【図６－２】図６－１及び図６－２は、ヒト化ｈＧ０１９抗体４種（Ｈ０１Ｌ０２、Ｈ０２Ｌ０２、Ｈ０２Ｌ０３及びＨ０４Ｌ０２）又は陰性コントロール抗体ヒトＩｇＧ１の、ヒトＣＤＨ６、サルＣＤＨ６、マウスＣＤＨ６、ラットＣＤＨ６に対する結合性を示す。横軸は抗体濃度を示し、縦軸は結合量をＭｅａｎＦｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ　Ｉｎｔｅｎｓｉｔｙ（平均蛍光強度）で示す。
【図７－１】図７－１は、ヒト化ｈＧ０１９抗体４種（Ｈ０１Ｌ０２、Ｈ０２Ｌ０２、Ｈ０２Ｌ０３及びＨ０４Ｌ０２）、抗ＣＤＨ６抗体ＮＯＶ０７１２又は陰性コントロール抗体ｈＩｇＧ１の、コントロール細胞又は全長ｈＣＤＨ６導入２９３α細胞に対する結合性を示す。横軸は抗体結合量を表すＡＰＣの蛍光強度、縦軸は細胞数を示す。
【図７－２】図７－２は、ヒト化ｈＧ０１９抗体４種（Ｈ０１Ｌ０２、Ｈ０２Ｌ０２、Ｈ０２Ｌ０３及びＨ０４Ｌ０２）、抗ＣＤＨ６抗体ＮＯＶ０７１２又は陰性コントロール抗体ｈＩｇＧ１の、コントロール細胞又はＥＣ１欠失ｈＣＤＨ６導入２９３α細胞に対する結合性を示す。横軸は抗体結合量を表すＡＰＣの蛍光強度、縦軸は細胞数を示す。
【図７－３】図７－３は、ヒト化ｈＧ０１９抗体４種（Ｈ０１Ｌ０２、Ｈ０２Ｌ０２、Ｈ０２Ｌ０３及びＨ０４Ｌ０２）、抗ＣＤＨ６抗体ＮＯＶ０７１２又は陰性コントロール抗体ｈＩｇＧ１の、コントロール細胞又はＥＣ２欠失ｈＣＤＨ６導入２９３α細胞に対する結合性を示す。横軸は抗体結合量を表すＡＰＣの蛍光強度、縦軸は細胞数を示す。
【図７－４】図７－４は、ヒト化ｈＧ０１９抗体４種（Ｈ０１Ｌ０２、Ｈ０２Ｌ０２、Ｈ０２Ｌ０３及びＨ０４Ｌ０２）、抗ＣＤＨ６抗体ＮＯＶ０７１２又は陰性コントロール抗体ｈＩｇＧ１の、コントロール細胞又はＥＣ３欠失ｈＣＤＨ６導入２９３α細胞に対する結合性を示す。横軸は抗体結合量を表すＡＰＣの蛍光強度、縦軸は細胞数を示す。
【図７－５】図７－５は、ヒト化ｈＧ０１９抗体４種（Ｈ０１Ｌ０２、Ｈ０２Ｌ０２、Ｈ０２Ｌ０３及びＨ０４Ｌ０２）、抗ＣＤＨ６抗体ＮＯＶ０７１２又は陰性コントロールのｈＩｇＧ１の、コントロール細胞又はＥＣ４欠失ｈＣＤＨ６導入２９３α細胞に対する結合性を示す。横軸は抗体結合量を表すＡＰＣの蛍光強度、縦軸は細胞数を示す。
【図７－６】図７－６は、ヒト化ｈＧ０１９抗体４種（Ｈ０１Ｌ０２、Ｈ０２Ｌ０２、Ｈ０２Ｌ０３及びＨ０４Ｌ０２）、抗ＣＤＨ６抗体ＮＯＶ０７１２又は陰性コントロールのｈＩｇＧ１の、コントロール細胞又はＥＣ５欠失ｈＣＤＨ６導入２９３α細胞に対する結合性を示す。横軸は抗体結合量を表すＡＰＣの蛍光強度、縦軸は細胞数を示す。
【図８】図８は、７８６－Ｏ／ｈＣＤＨ６安定発現細胞株及び親細胞株７８６－Ｏにおけるヒトの発現を調べたフローサイトメトリーの結果を示す。横軸は抗体結合量を表すＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　６４７の蛍光強度、縦軸は細胞数を示す。
【図９】図９は、（ａ）ラベル化ＮＯＶ０７１２又は（ｂ）ラベル化Ｈ０１Ｌ０２を用いた、ラベル化していないヒト化ｈＧ０１９抗体４種（Ｈ０１Ｌ０２、Ｈ０２Ｌ０２、Ｈ０２Ｌ０３及びＨ０４Ｌ０２）、抗ＣＤＨ６抗体ＮＯＶ０７１２又は陰性コン

トロールのｈＩｇＧ１との結合競合アッセイを示す。横軸はラベル化していない抗体の添加時の終濃度を示し、縦軸は結合量をＭｅａｎＦｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ　Ｉｎｔｅｎｓｉｔｙ（平均蛍光強度）で示す。

【図１０－１】図１０－１は、ヒト化ｈＧ０１９抗体４種（Ｈ０１Ｌ０２、Ｈ０２Ｌ０２、Ｈ０２Ｌ０３及びＨ０４Ｌ０２）、抗ＣＤＨ６抗体ＮＯＶ０７１２及び陰性コントロール抗体の内在化活性を、タンパク質合成を阻害する毒素（サポリン）を結合させた抗ヒトＩｇＧ試薬Ｈｕｍ―ＺＡＰ又は陰性コントロールとして毒素を結合していないＦ（ａｂ’）２　Ｆｒａｇｍｅｎｔ　Ｇｏａｔ　Ａｎｔｉ―ｈｕｍａｎ　ＩｇＧ，Ｆｃ（ｇａｍｍａ）　Ｆｒａｇｍｅｎｔ　Ｓｐｅｃｉｆｉｃを用いて、ＮＩＨ：ＯＶＣＡＲ―３細胞において評価したグラフを示す。グラフの縦軸は、ＡＴＰ活性（ＲＬＵ）を示す。各グラフの下に、Ｈｕｍ―ＺＡＰの代わりに陰性コントロールを添加したウェルの生存細胞数を１００％とした相対生存率として算出された細胞生存率（％）を示す。

【図１０－２】図１０－２は、ヒト化ｈＧ０１９抗体４種（Ｈ０１Ｌ０２、Ｈ０２Ｌ０２、Ｈ０２Ｌ０３及びＨ０４Ｌ０２）、抗ＣＤＨ６抗体ＮＯＶ０７１２及び陰性コントロール抗体の内在化活性を、タンパク質合成を阻害する毒素（サポリン）を結合させた抗ヒトＩｇＧ試薬Ｈｕｍ―ＺＡＰ又は陰性コントロールとして毒素を結合していないＦ（ａｂ’）２　Ｆｒａｇｍｅｎｔ　Ｇｏａｔ　Ａｎｔｉ―ｈｕｍａｎ　ＩｇＧ，Ｆｃ（ｇａｍｍａ）　Ｆｒａｇｍｅｎｔ　Ｓｐｅｃｉｆｉｃを用いて、７８６―Ｏ細胞において評価したグラフを示す。グラフの縦軸は、ＡＴＰ活性（ＲＬＵ）を示す。各グラフの下に、Ｈｕｍ―ＺＡＰの代わりに陰性コントロールを添加したウェルの生存細胞数を１００％とした相対生存率として算出された細胞生存率（％）を示す。

【図１０－３】図１０－３は、ヒト化ｈＧ０１９抗体４種（Ｈ０１Ｌ０２、Ｈ０２Ｌ０２、Ｈ０２Ｌ０３及びＨ０４Ｌ０２）、抗ＣＤＨ６抗体ＮＯＶ０７１２及び陰性コントロール抗体の内在化活性を、タンパク質合成を阻害する毒素（サポリン）を結合させた抗ヒトＩｇＧ試薬Ｈｕｍ―ＺＡＰ又は陰性コントロールとして毒素を結合していないＦ（ａｂ’）２　Ｆｒａｇｍｅｎｔ　Ｇｏａｔ　Ａｎｔｉ―ｈｕｍａｎ　ＩｇＧ，Ｆｃ（ｇａｍｍａ）　Ｆｒａｇｍｅｎｔ　Ｓｐｅｃｉｆｉｃを用いて、ＰＡ―１細胞において評価したグラフを示す。グラフの縦軸は、ＡＴＰ活性（ＲＬＵ）を示す。各グラフの下に、Ｈｕｍ―ＺＡＰの代わりに陰性コントロールを添加したウェルの生存細胞数を１００％とした相対生存率として算出された細胞生存率（％）を示す。

【図１１】図１１は、ヒト化ｈＧ０１９―薬物コンジュゲート４種（Ｈ０１Ｌ０２―ＤＸｄ、Ｈ０２Ｌ０２―ＤＸｄ、Ｈ０２Ｌ０３―ＤＸｄ及びＨ０４Ｌ０２―ＤＸｄ）、又はＮＯＶ０７１２―ＤＭ４のＰＡ―１細胞に対するｉｎ　ｖｉｔｒｏ細胞増殖抑制活性評価を示す。横軸は抗体―薬物コンジュゲートの濃度を示し、縦軸は細胞生存率（％）を示す。

【図１２】図１２は、ヒト化ｈＧ０１９―薬物コンジュゲート４種（Ｈ０１Ｌ０２―ＤＸｄ、Ｈ０２Ｌ０２―ＤＸｄ、Ｈ０２Ｌ０３―ＤＸｄ及びＨ０４Ｌ０２―ＤＸｄ）、又はＮＯＶ０７１２―ＤＭ４のｉｎ　ｖｉｖｏ抗腫瘍効果を示す。ＣＤＨ６陽性ヒト腎細胞腫瘍細胞株７８６―Ｏを免疫不全マウスに移植した動物モデルを用いて評価した。横軸は日数、縦軸は腫瘍体積、誤差範囲は標準誤差（ＳＥ）値を示す。

【図１３】図１３は、ヒト化ｈＧ０１９―薬物コンジュゲートＨ０１Ｌ０２―ＤＸｄ又はＮＯＶ０７１２―ＤＭ４又はＮＯＶ０７１２―ＤＸｄのｉｎ　ｖｉｖｏ抗腫瘍効果を示す。ＣＤＨ６陽性ヒト卵巣腫瘍細胞株ＰＡ―１を免疫不全マウスに移植した動物モデルを用いて評価した。横軸は日数、縦軸は腫瘍体積、誤差範囲はＳＥ値を示す。

【図１４】図１４は、ヒト化ｈＧ０１９―薬物コンジュゲートＨ０１Ｌ０２―ＤＸｄ又はＮＯＶ０７１２―ＤＭ４のｉｎ　ｖｉｖｏ抗腫瘍効果を示す。ＣＤＨ６陽性ヒト卵巣腫瘍細胞株ＮＩＨ：ＯＶＣＡＲ―３を免疫不全マウスに移植した動物モデルを用

いて評価した。横軸は日数、縦軸は腫瘍体積、誤差範囲はＳＥ値を示す。
【図１５】図１５は、ヒト化ｈＧ０１９―薬物コンジュゲートＨ０１Ｌ０２―ＤＸｄ又はＮＯＶ０７１２―ＤＭ４のｉｎ　ｖｉｖｏ抗腫瘍効果を示す。ＣＤＨ６陽性ヒト腎細胞腫瘍細胞株７８６―Ｏを免疫不全マウスに移植した動物モデルを用いて評価した。横軸は日数、縦軸は腫瘍体積、誤差範囲はＳＥ値を示す。
【図１６】図１６は、ヒト化ｈＧ０１９―薬物コンジュゲートＨ０１Ｌ０２―ＤＸｄ又はＮＯＶ０７１２―ＤＭ４のｉｎ　ｖｉｖｏ抗腫瘍効果を示す。ＣＤＨ６陰性ヒト卵巣腫瘍細胞株ＥＳ－２を免疫不全マウスに移植した動物モデルを用いて評価した。横軸は日数、縦軸は腫瘍体積、誤差範囲はＳＥ値を示す。
【発明を実施するための形態】
【００２６】
以下、本発明を実施するための好適な形態について図面を参照しながら説明する。なお、以下に説明する実施形態は、本発明の代表的な実施形態の一例を示したものであり、これにより本発明の範囲が狭く解釈されることはない。
【００２７】
本明細書中、「がん」と「腫瘍」は同じ意味に用いられる。
【００２８】
本明細書中、「遺伝子」という語には、ＤＮＡのみならずそのｍＲＮＡ、ｃＤＮＡ及びそのｃＲＮＡも含まれる。
【００２９】
本明細書中、「ポリヌクレオチド」又は「ヌクレオチド」は、核酸と同じ意味で用いており、ＤＮＡ、ＲＮＡ、プローブ、オリゴヌクレオチド、及びプライマーも含まれる。本明細書中、「ポリヌクレオチド」と「ヌクレオチド」は、特に指定されない限り、交換可能に使用され得る。
【００３０】
本明細書中、「ポリペプチド」と「タンパク質」は交換可能に使用され得る。
本明細書中、「細胞」には、動物個体内の細胞、培養細胞も含む。
【００３１】
本明細書中、「ＣＤＨ６」は、ＣＤＨ６タンパク質と同じ意味で使用され得る。本明細書中、ヒトＣＤＨ６を「ｈＣＤＨ６」と記載する場合がある。
【００３２】
本明細書中、「細胞傷害活性」とは、何らかの形で、細胞に病理的な変化を引き起こすことをいい、直接的な外傷にとどまらず、ＤＮＡの切断や塩基の二量体の形成、染色体の切断、細胞分裂装置の損傷、各種酵素活性の低下などあらゆる細胞の構造や機能上の損傷を引き起こすことをいう。
【００３３】
本明細書中、「細胞内で毒性を発揮する」とは、何らかの形で、細胞内で毒性を示すことをいい、直接的な外傷にとどまらず、ＤＮＡの切断や塩基の二量体の形成、染色体の切断、細胞分裂装置の損傷、各種酵素活性の低下、細胞増殖因子の作用の抑制などあらゆる細胞の構造や機能、代謝に影響をもたらすことをいう。
【００３４】
本明細書中、「抗体の機能性断片」とは、「抗体の抗原結合断片」とも呼ばれ、抗原との結合活性を有する抗体の部分断片を意味しており、Ｆａｂ、Ｆ（ａｂ’）２、Ｆｖ、ｓｃＦｖ、ｄｉａｂｏｄｙ、線状抗体及び抗体断片より形成された多特異性抗体等を含む。また、Ｆ（ａｂ’）２を還元条件下で処理した抗体の可変領域の一価の断片であるＦａｂ’も抗体の抗原結合断片に含まれる。但し、抗原との結合能を有している限りこれらの分子に限定されない。また、これらの抗原結合断片には、抗体蛋白質の全長分子を適当な酵素で処理したもののみならず、遺伝子工学的に改変された抗体遺伝子を用いて適当な宿主細胞において産生された蛋白質も含まれる。
【００３５】

本明細書中、「エピトープ」とは、特定の抗ＣＤＨ６抗体の結合するＣＤＨ６の部分ペプチド又は部分立体構造を意味する。前記のＣＤＨ６の部分ペプチドであるエピトープは免疫アッセイ法等当業者にはよく知られている方法によって、決定することができる。まず、抗原の様々な部分構造を作製する。部分構造の作製にあたっては、公知のオリゴヌクレオチド合成技術を用いることができる。例えば、ＣＤＨ６のＣ末端又はＮ末端から適当な長さで順次短くした一連のポリペプチドを当業者に周知の遺伝子組み換え技術を用いて作製した後、それらに対する抗体の反応性を検討し、大まかな認識部位を決定した後に、更に短いペプチドを合成してそれらのペプチドとの反応性を検討することによって、エピトープを決定することができる。また、複数の細胞外ドメインからなる膜タンパク質に結合する抗体が、複数のドメインからなる立体構造をエピトープとしている場合は、特定の細胞外ドメインのアミノ酸配列を改変することによって、立体構造を改変することによってどのドメインと結合するかを決定することができる。特定の抗体の結合する抗原の部分立体構造であるエピトープは、Ｘ線構造解析によって抗体と隣接する抗原のアミノ酸残基を特定することによっても決定することができる。

【００３６】

本明細書中、「同一のエピトープに結合する」とは、共通のエピトープに結合する抗体を意味している。第一の抗体の結合する部分ペプチド又は部分立体構造に第二の抗体が結合すれば、第一の抗体と第二の抗体が同一のエピトープに結合すると判定することができる。あるいは、第一の抗体の抗原に対する結合に第二の抗体が競合する（即ち、第二の抗体が第一の抗体と抗原の結合を妨げる）ことを確認することによって、具体的なエピトープの配列又は構造が決定されていなくても、第一の抗体と第二の抗体の同一のエピトープに結合すると判定することができる。本明細書中、「同一のエピトープに結合する」とは、第一の抗体と第二の抗体が、当該判定方法のいずれか一方又は両方により、共通のエピトープに結合すると判定された場合をいう。第一の抗体と第二の抗体が同一のエピトープに結合し、かつ第一の抗体が抗腫瘍活性や内在化活性等の特殊な効果を有する場合、第二の抗体も同様の活性を有することが期待できる。

【００３７】

本明細書中、「ＣＤＲ」とは、相補性決定領域（ＣＤＲ；Ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔａｒｉｔｙ　Ｄｅｔｅｒｍｉｎｉｎｇ　Ｒｅｇｉｏｎ）を意味する。抗体分子の重鎖及び軽鎖にはそれぞれ３箇所のＣＤＲがあることが知られている。ＣＤＲは、超可変領域（ｈｙｐｅｒｖａｒｉａｂｌｅ　ｒｅｇｉｏｎ）とも呼ばれ、抗体の重鎖及び軽鎖の可変領域内にあって、一次構造の変異性が特に高い部位であり、重鎖及び軽鎖のポリペプチド鎖の一次構造上において、それぞれ３ヶ所に分離している。本明細書中においては、抗体のＣＤＲについて、重鎖のＣＤＲを重鎖アミノ酸配列のアミノ末端側からＣＤＲＨ１、ＣＤＲＨ２、ＣＤＲＨ３と表記し、軽鎖のＣＤＲを軽鎖アミノ酸配列のアミノ末端側からＣＤＲＬ１、ＣＤＲＬ２、ＣＤＲＬ３と表記する。これらの部位は立体構造の上で相互に近接し、結合する抗原に対する特異性を決定している。

【００３８】

本明細書中、「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする」とは、市販のハイブリダイゼーション溶液ＥｘｐｒｅｓｓＨｙｂ　Ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ　Ｓｏｌｕｔｉｏｎ（クロンテック社）中、６８℃でハイブリダイズすること、又はＤＮＡを固定したフィルターを用いて０．７～１．０ＭのＮａＣｌ存在下６８℃でハイブリダイゼーションを行った後、０．１～２倍濃度のＳＳＣ溶液（１倍濃度ＳＳＣとは１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、１５ｍＭクエン酸ナトリウムからなる）を用い、６８℃で洗浄することによって同定することができる条件又はそれと同等の条件でハイブリダイズすることをいう。

【００３９】

本明細書中、「１～数個」とは、１～１０個、１～９個、１～８個、１～７個、１～６個、１～５個、１～４個、１～３個又は１～２個を意味する。

【００４０】

１．ＣＤＨ６

カドヘリンは、細胞膜表面に存在する糖タンパク質で、カルシウムイオン依存的にＮ末端側の細胞外ドメイン同士が結合することで、細胞間接着分子として、また細胞間相互作用を担うシグナル分子として機能する。カドヘリンスーパーファミリーの内、クラシックカドヘリンに分類される分子群は、細胞外に５個の細胞外ドメイン（ＥＣドメイン）と１個の膜貫通領域、及び細胞内ドメインから構成される１回膜貫通タンパク質である。

【００４１】

ＣＤＨ６（Ｃａｄｈｅｒｉｎ－６）　は、タイプIIカドヘリンファミリーに分類される、７９０アミノ酸からなる１回膜貫通タンパク質であり、Ｎ末端側を細胞外、Ｃ末端側を細胞内に持つ。ヒトＣＤＨ６遺伝子は１９９５年に初めてクローニングされ（非特許文献１）、ＮＭ＿００４９３２、ＮＰ＿００４９２３（ＮＣＢＩ）等のアクセッション番号により参照可能である。

【００４２】

本発明で用いるＣＤＨ６タンパク質は、ヒト、非ヒト哺乳動物（ラット、マウス、サル等）のＣＤＨ６発現細胞から直接精製して使用するか、あるいは当該細胞の細胞膜画分を調製して使用することができ、また、ＣＤＨ６をｉｎ　ｖｉｔｒｏにて合成する、あるいは遺伝子操作によって宿主細胞に産生させることによって得ることができる。遺伝子操作では、具体的には、ＣＤＨ６　ｃＤＮＡを発現可能なベクターに組み込んだ後、転写と翻訳に必要な酵素、基質及びエネルギー物質を含む溶液中で合成する、あるいは他の原核生物、又は真核生物の宿主細胞を形質転換させることによってＣＤＨ６を発現させることによって、該タンパク質を得ることが出来る。また、前記の遺伝子操作によるＣＤＨ６発現細胞、あるいはＣＤＨ６を発現している細胞株をＣＤＨ６タンパク質として使用することも可能である。また、ＣＤＨ６のｃＤＮＡを組み込んだ発現ベクターを直接被免疫動物に投与し被免疫動物の体内でＣＤＨ６を発現させることもできる。

【００４３】

また、上記ＣＤＨ６のアミノ酸配列において、１又は数個のアミノ酸が置換、欠失及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、当該タンパク質と同等の生物活性を有するタンパク質もＣＤＨ６に含まれる。

【００４４】

ヒトＣＤＨ６タンパク質は、配列番号１に記載のアミノ酸配列を有する。ヒトＣＤＨ６タンパク質の細胞外領域は、配列番号１に記載のアミノ酸配列の５４～１５９番目のアミノ酸配列を有する細胞外ドメイン１（本明細書中、ＥＣ１とも称する）、配列番号１に記載のアミノ酸配列の１６０～２６８番目のアミノ酸配列を有する細胞外ドメイン２（本明細書中、ＥＣ２とも称する。）、配列番号１に記載のアミノ酸配列の２６９～３８３番目のアミノ酸配列を有する細胞外ドメイン３（本明細書中、ＥＣ３とも称する。）、配列番号１に記載のアミノ酸配列の３８４～４８６番目のアミノ酸配列を有する細胞外ドメイン４（本明細書中、ＥＣ４とも称する。）、及び配列番号１に記載のアミノ酸配列の４８７～６０８番目のアミノ酸配列を有する細胞外ドメイン５（本明細書中、ＥＣ５とも称する。）から構成される。ＥＣ１～ＥＣ５のアミノ酸配列を、それぞれ、配列番号２～６とする（表１―１～表１―１５）。

【００４５】

２．抗ＣＤＨ６抗体の製造

本発明の抗ＣＤＨ６抗体の一例として、配列番号４に示すアミノ酸配列を含むアミノ酸配列を認識し、かつ内在化活性を有する抗ＣＤＨ６抗体を挙げることができる。本発明の抗ＣＤＨ６抗体の一例として、配列番号４に示すアミノ酸配列を含むアミノ酸配列を特異的に認識し、かつ内在化活性を有する抗ＣＤＨ６抗体を挙げることができる。本発明の抗ＣＤＨ６抗体の一例として、配列番号４に示すアミノ酸配列からなるアミノ酸配列を認識し、かつ内在化活性を有する抗ＣＤＨ６抗体を挙げることができる。本発明の抗ＣＤＨ６抗体の一例として、配列番号４に示すアミノ酸配列からなるアミノ酸配列を特異的に認識し、かつ内在化活性を有する抗ＣＤＨ６抗体を挙げることができる。

【００４６】

本発明の抗ＣＤＨ６抗体は、いずれの種に由来してもよいが、好ましくは、ヒト、サル、ラット、マウス又はウサギを例示できる。ヒト以外の種に由来する場合は、周知の技術を用いて、キメラ化又はヒト化することが好ましい。本発明の抗体は、ポリクローナル抗体であっても、モノクローナル抗体であってもよいが、モノクローナル抗体が好ましい。

【００４７】

本発明の抗ＣＤＨ６抗体は腫瘍細胞を標的にできる抗体であり、すなわち腫瘍細胞を認識できる特性、腫瘍細胞に結合できる特性、及び／又は腫瘍細胞内に取り込まれて内在化する特性等を備えている。したがって、本発明の抗ＣＤＨ６抗体と抗腫瘍活性を有する化合物を、リンカーを介して結合させて抗体―薬物コンジュゲートとすることができる。

【００４８】

抗体の腫瘍細胞への結合性は、フローサイトメトリーを用いて確認できる。腫瘍細胞内への抗体の取り込みは、（１）治療抗体に結合する二次抗体（蛍光標識）を用いて細胞内に取り込まれた抗体を蛍光顕微鏡で可視化するアッセイ（Ｃｅｌｌ Ｄｅａｔｈ ａｎｄ Ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｉｏｎ，２００８，１５，７５１―７６１）、（２）治療抗体に結合する二次抗体（蛍光標識）を用いて細胞内に取り込まれた蛍光量を測定するアッセイ（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ ｏｆ ｔｈｅ Ｃｅｌｌ Ｖｏｌ．１５，５２６８―５２８２，Ｄｅｃｅｍｂｅｒ ２００４）又は（３）治療抗体に結合するイムノトキシンを用いて、細胞内に取り込まれると毒素が放出されて細胞増殖が抑制されるというＭａｂ―ＺＡＰアッセイ（Ｂｉｏ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ２８：１６２―１６５，Ｊａｎｕａｒｙ ２０００）を用いて確認できる。イムノトキシンとしては、ジフテテリア毒素の触媒領域とプロテインＧとのリコンビナント複合タンパク質タンパク質も使用可能である。

【００４９】

本明細書で言う「高い内在化能」とは、当該抗体とサポリン標識抗ラットＩｇＧ抗体を投与したＣＤＨ６発現細胞の生存率（抗体未添加時の細胞生存率を１００％とした相対率で表したもの）が、好ましくは７０％以下、より好ましくは６０％以下であることを意味する。

【００５０】

抗体―薬物コンジュゲートは抗腫瘍効果を発揮する化合物を結合させてあるので、抗体自体が抗腫瘍効果を有することは、好ましいが、必須ではない。抗腫瘍性化合物の細胞傷害性を腫瘍細胞において特異的及び／又は選択的に発揮させる目的からは、抗体が内在化して腫瘍細胞内に移行する性質のあることが重要であり、好ましい。

【００５１】

抗ＣＤＨ６抗体は、この分野で通常実施される方法を用いて、抗原となるポリペプチドを動物に免疫し、生体内に産生される抗体を採取、精製することによって得ることができるが、好ましくは、立体構造を保持したＣＤＨ６を抗原として用いることが好ましい。そのような方法として、ＤＮＡ免疫法を挙げることができる。

【００５２】

抗原の由来はヒトに限定されず、マウス、ラット等のヒト以外の動物に由来する抗原を動物に免疫することもできる。この場合には、取得された異種抗原に結合する抗体とヒト抗原との交差性を試験することによって、ヒトの疾患に適用可能な抗体を選別できる。

【００５３】

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

【００５４】

以下、具体的にＣＤＨ６に対する抗体の取得方法を説明する。

【００５５】
（１）抗原の調製
抗原は抗原タンパク質をコードする遺伝子を遺伝子操作によって宿主細胞に産生させることによって得ることができる。具体的には、抗原遺伝子を発現可能なベクターを作製し、これを宿主細胞に導入して該遺伝子を発現させ、発現した抗原を精製すればよい。上記の遺伝子操作による抗原発現細胞、あるいは抗原を発現している細胞株を動物に免疫する方法を用いることによっても抗体を取得できる。
【００５６】
また、抗原タンパク質を用いずに、抗原タンパク質のｃＤＮＡを発現ベクターに組み込んで被免疫動物に投与し、被免疫動物の体内で抗原タンパク質を発現させ、抗原タンパク質に対する抗体を産生させることによっても抗体を取得することができる。
【００５７】
（２）抗ＣＤＨ６モノクローナル抗体の製造
本発明で使用される抗ＣＤＨ６抗体は、特に制限はないが、例えば、本願の配列表で示されたアミノ酸配列で特定される抗体を好適に使用することができる。本発明において使用される抗ＣＤＨ６抗体としては、以下の特性を有するものが望ましい。
（１）以下の特性を有することを特徴とする抗体；
（ａ）ＣＤＨ６に特異的に結合する
（ｂ）ＣＤＨ６と結合することによってＣＤＨ６発現細胞に内在化する活性を有する
（２）ＣＤＨ６がヒトＣＤＨ６である上記（１）に記載の抗体又は当該抗体。
（３）ヒトＣＤＨ６のＥＣ３を特異的に認識し、かつ内在化活性を有する
本発明のＣＤＨ６に対する抗体の取得方法は、抗ＣＤＨ６抗体を取得できる限りにおいて、特に制限されないが、高次構造を保持したＣＤＨ６を抗原として用いることが好ましい。
【００５８】
好ましい抗体の取得方法の一例としてＤＮＡ免疫法を挙げることができる。ＤＮＡ免疫法とは、抗原発現プラスミドをマウスやラットなどの動物個体に遺伝子導入し、抗原を個体内で発現させることによって、抗原に対する免疫を誘導する手法である。遺伝子導入の手法には、直接プラスミドを筋肉に注射する方法や、リポソームやポリエチレンイミンなどの導入試薬を静脈注射する方法、ウイルスベクターを用いる手法、プラスミドを付着させた金粒子をＧｅｎｅ　Ｇｕｎにより射ち込む手法、急速に大量のプラスミド溶液を静脈注射するＨｙｄｒｏｄｙｎａｍｉｃ法などが存在する。発現プラスミドの筋注による遺伝子導入法に関して、発現量を向上させる手法として、プラスミドを筋注後、同部位にエレクトロポレーションを加えるｉｎ　ｖｉｖｏ　ｅｌｅｃｔｒｏｐｏｒａｔｉｏｎという技術が知られている（Ａｉｈａｒａ　Ｈ，Ｍｉｙａｚａｋｉ　Ｊ．Ｎａｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１９９８　Ｓｅｐ；１６（９）：８６７―７０又はＭｉｒ　ＬＭ，Ｂｕｒｅａｕ　ＭＦ，Ｇｅｈｌ　Ｊ，Ｒａｎｇａｒａ　Ｒ，Ｒｏｕｙ　Ｄ，Ｃａｉｌｌａｕｄ　ＪＭ，Ｄｅｌａｅｒｅ　Ｐ，Ｂｒａｎｅｌｌｅｃ　Ｄ，Ｓｃｈｗａｒｔｚ　Ｂ，Ｓｃｈｅｒｍａｎ　Ｄ．Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　ＵＳＡ．１９９９　Ａｐｒ　１３；９６（８）：４２６２―７．）。本手法はプラスミドの筋注前にヒアルロニダーゼで筋肉を処理することにより、さらに発現量が向上する（ＭｃＭａｈｏｎ　ＪＭ１，　Ｓｉｇｎｏｒｉ　Ｅ，Ｗｅｌｌｓ　ＫＥ，Ｆａｚｉｏ　ＶＭ，Ｗｅｌｌｓ　ＤＪ．Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒ．２００１　Ａｕｇ；８（１６）：１２６４―７０）。また、ハイブリドーマの作製は公知の方法によって行うことができ、例えば、Ｈｙｂｒｉｍｕｎｅ　Ｈｙｂｒｉｄｏｍａ　Ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ　Ｓｙｓｔｅｍ（Ｃｙｔｏ　Ｐｕｌｓｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ社）を用いて行うこともできる。
【００５９】
具体的なモノクローナル抗体取得の例としては、以下を挙げることができる。
（ａ）ＣＤＨ６のｃＤＮＡを発現ベクター（例えば、ｐｃＤＮＡ３．１：ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）に組み込み、エレクトロポレーションや遺伝子銃

等の方法によって、そのベクターを直接被免疫動物（例えば、ラットやマウス）に投与することによって、動物体内においてＣＤＨ６を発現させることによって、免疫反応を誘起させることができる。エレクトロポレーション等によるベクターの投与は抗体価を上げるために必要であれば、１回でも複数回でもよく、好ましくは複数回である；
（ｂ）免疫反応を誘起された上述の動物より、抗体産生細胞を含む組織（例えばリンパ節）を採取する；
（ｃ）骨髄腫細胞（以下「ミエローマ」という）（例えば、マウスミエローマＳＰ２／０―ａｇ１４細胞）の調製；
（ｄ）抗体産生細胞とミエローマとの細胞融合；
（ｅ）目的とする抗体を産生するハイブリドーマ群の選別；
（ｆ）単一細胞クローンへの分割（クローニング）；
（ｇ）場合によっては、モノクローナル抗体を大量に製造するためのハイブリドーマの培養、又はハイブリドーマを移植した動物の飼育；及び／又は
（ｈ）このようにして製造されたモノクローナル抗体の生理活性（内在化活性）、及びその結合特異性の検討、あるいは標識試薬としての特性の検定。

【００６０】

ここで用いられる抗体価の測定法としては、例えば、フローサイトメトリー又はＣｅｌｌ―ＥＬＩＳＡ法を挙げることができるがこれらの方法に制限されない。

【００６１】

このようにして樹立されたハイブリドーマ株の例としては、抗ＣＤＨ６抗体産生ハイブリドーマｒＧ０１９、ｒＧ０５５、ｒＧ０５６及びｒＧ０６１を挙げることができる。なお、本明細書中においては、抗ＣＤＨ６抗体産生ハイブリドーマｒＧ０１９が産生する抗体を、「ｒＧ０１９抗体」又は単に「ｒＧ０１９」と記載し、ハイブリドーマｒＧ０５５が産生する抗体を、「ｒＧ０５５抗体」又は単に「ｒＧ０５５」と記載し、ハイブリドーマｒＧ０５６が産生する抗体を、「ｒＧ０５６抗体」又は単に「ｒＧ０５６」表１―１～表１―１５と記載し、ハイブリドーマｒＧ０６１が産生する抗体を、「ｒＧ０６１抗体」又は単に「ｒＧ０６１」とする。

【００６２】

ｒＧ０１９抗体の軽鎖可変領域は、配列番号１０に示されるアミノ酸配列からなる。該ｒＧ０１９抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号１１に示されるヌクレオチド配列でコードされる。ｒＧ０１９抗体の軽鎖可変領域は、配列番号１２に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１、配列番号１３に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２及び配列番号１４に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ３を有する。ｒＧ０１９抗体の重鎖可変領域は、配列番号１５に示されるアミノ酸配列からなる。該ｒＧ０１９抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号１６に示されるヌクレオチド配列でコードされる。ｒＧ０１９抗体の重鎖可変領域は、配列番号１７に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１、配列番号１８に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２及び配列番号１９に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３を有する。ｒＧ０１９抗体の配列を表１―１～表１―１５に示す。

【００６３】

ｒＧ０５５抗体の軽鎖可変領域は、配列番号２０に示されるアミノ酸配列からなる。該ｒＧ０５５抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号２１に示されるヌクレオチド配列でコードされる。ｒＧ０５５抗体の軽鎖可変領域は、配列番号２２に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１、配列番号２３に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２及び配列番号２４に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ３を有する。ｒＧ０５５抗体の重鎖可変領域は、配列番号２５に示されるアミノ酸配列からなる。該ｒＧ０５５抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号２６に示されるヌクレオチド配列でコードされる。ｒＧ０５５抗体の重鎖可変領域は、配列番号２７に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１、配列番号２８に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２及び配列番号２９に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３を有する。ｒＧ０５５抗体の配列を表１―１～表

１―１５に示す。

【００６４】

ｒＧ０５６抗体の軽鎖可変領域は、配列番号３０に示されるアミノ酸配列からなる。該ｒＧ０５６抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号３１に示されるヌクレオチド配列でコードされる。ｒＧ０５６抗体の軽鎖可変領域は、配列番号３２に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１、配列番号３３に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２及び配列番号３４に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ３を有する。ｒＧ０５６抗体の重鎖可変領域は、配列番号３５に示されるアミノ酸配列からなる。該ｒＧ０５６抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号３６に示されるヌクレオチド配列でコードされる。ｒＧ０５６抗体の重鎖可変領域は、配列番号３７に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１、配列番号３８に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２及び配列番号３９に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３を有する。ｒＧ０５６抗体の配列を表１―１～表１―１５に示す。

【００６５】

ｒＧ０６１抗体の軽鎖可変領域は、配列番号４０に示されるアミノ酸配列からなる。該ｒＧ０６１抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号４１に示されるヌクレオチド配列でコードされる。ｒＧ０６１抗体の軽鎖可変領域は、配列番号４２に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１、配列番号４３に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２及び配列番号４４に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ３を有する。ｒＧ０６１抗体の重鎖可変領域は、配列番号４５に示されるアミノ酸配列からなる。該ｒＧ０６１抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号４６に示されるヌクレオチド配列でコードされる。ｒＧ０６１抗体の重鎖可変領域は、配列番号４７に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１、配列番号４８に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２及び配列番号４９に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３を有する。ｒＧ０６１抗体の配列をに示す。

【００６６】

さらに、「２．抗ＣＤＨ６抗体の製造」（ａ）乃至（ｈ）の工程を再度実施して別途に独立してモノクローナル抗体を取得した場合や他の方法によって別途にモノクローナル抗体を取得した場合においても、ｒＧ０１９抗体、ｒＧ０５５抗体、ｒＧ０５６抗体又はｒＧ０６１抗体と同等の内在化活性を有する抗体を取得することが可能である。このような抗体の一例として、ｒＧ０１９抗体、ｒＧ０５５抗体、ｒＧ０５６抗体又はｒＧ０６１抗体と同一のエピトープに結合する抗体を挙げることができる。新たに作製されたモノクローナル抗体が、ｒＧ０１９抗体、ｒＧ０５５抗体、ｒＧ０５６抗体又はｒＧ０６１抗体の結合する部分ペプチド又は部分立体構造に結合すれば、該モノクローナル抗体がｒＧ０１９抗体、ｒＧ０５５抗体、ｒＧ０５６抗体又はｒＧ０６１抗体と同一のエピトープに結合すると判定することができる。また、ｒＧ０１９抗体、ｒＧ０５５抗体、ｒＧ０５６抗体又はｒＧ０６１抗体のＣＤＨ６に対する結合に対して該モノクローナル抗体が競合する（即ち、該モノクローナル抗体が、ｒＧ０１９抗体、ｒＧ０５５抗体、ｒＧ０５６抗体又はｒＧ０６１抗体とＣＤＨ６の結合を妨げる）ことを確認することによって、具体的なエピトープの配列又は構造が決定されていなくても、該モノクローナル抗体が抗ＣＤＨ６抗体と同一のエピトープに結合すると判定することができる。エピトープが同一であることが確認された場合、該モノクローナル抗体がｒＧ０１９抗体、ｒＧ０５５抗体、ｒＧ０５６抗体又はｒＧ０６１抗体と同等の抗原結合能、生物活性及び／又は内在化活性を有していることが強く期待される。

【００６７】

（３）その他の抗体

本発明の抗体には、上記ＣＤＨ６に対するモノクローナル抗体に加え、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺伝子組換え型抗体、例えば、キメラ（Ｃｈｉｍｅｒｉｃ）抗体、ヒト化（Ｈｕｍａｎｉｚｅｄ）抗体又はヒト抗体等も含まれる。これらの抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。

【００６８】

キメラ抗体としては、抗体の可変領域と定常領域が互いに異種である抗体、例えばマウス又はラット由来抗体の可変領域をヒト由来の定常領域に接合したキメラ抗体を挙げることができる（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．，８１，６８５１―６８５５，（１９８４）参照）。

【００６９】

ラット抗ヒトＣＤＨ６抗体由来のキメラ抗体の例としては、例えば、本明細書に記載のラット抗ヒトＣＤＨ６抗体（例えば、ｒＧ０１９抗体、ｒＧ０５５抗体、ｒＧ０５６抗体又はｒＧ０６１抗体）の各軽鎖可変領域とヒト由来の定常領域を含む軽鎖、及び、各重鎖可変領域とヒト由来の定常領域を含む重鎖からなる抗体が挙げられる。

【００７０】

ラット抗ヒトＣＤＨ６抗体由来のキメラ抗体の別の例としては、例えば、本明細書に記載のラット抗ヒトＣＤＨ６抗体（例えば、ｒＧ０１９抗体、ｒＧ０５５抗体、ｒＧ０５６抗体又はｒＧ０６１抗体）の各軽鎖可変領域中の１～数残基、１～３残基、１～２残基、好ましくは１残基のアミノ酸を別のアミノ酸残基に置換した軽鎖可変領域を含む軽鎖、及び、各重鎖可変領域中の１～数残基、１～３残基、１～２残基、好ましくは１残基のアミノ酸を別のアミノ酸残基に置換した重鎖可変領域を含む重鎖からなる抗体が挙げられ、当該抗体は任意のヒト由来の定常領域を有していてよい。

【００７１】

ラット抗ヒトＣＤＨ６抗体由来のキメラ抗体の別の例としては、例えば、本明細書に記載のラット抗ヒトＣＤＨ６抗体（例えば、ｒＧ０１９抗体、ｒＧ０５５抗体、ｒＧ０５６抗体又はｒＧ０６１抗体）の各軽鎖可変領域中のいずれか１～３のＣＤＲ中の１～２残基、好ましくは１残基のアミノ酸を別のアミノ酸残基に置換した軽鎖可変領域を含む軽鎖、及び、各重鎖可変領域中のいずれか１～３のＣＤＲ中の１～２残基、好ましくは１残基のアミノ酸を別のアミノ酸残基に置換した重鎖可変領域を含む重鎖からなる抗体が挙げられ、当該抗体は任意のヒト由来の定常領域を有していてよい。

【００７２】

ｒＧ０１９抗体由来のキメラ抗体としては、例えば、配列番号１０に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖、及び、配列番号１５に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖からなる抗体が挙げられ、当該抗体は任意のヒト由来の定常領域を有していてよい。

【００７３】

ｒＧ０１９抗体由来のキメラ抗体の別の例としては、例えば、配列番号１０に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域中の１～数残基、１～３残基、１～２残基、好ましくは１残基のアミノ酸を別のアミノ酸残基に置換した軽鎖可変領域を含む軽鎖、及び、配列番号１５に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域中の１～数残基、１～３残基、１～２残基、好ましくは１残基のアミノ酸を別のアミノ酸残基に置換した重鎖可変領域を含む重鎖からなる抗体が挙げられ、当該抗体は任意のヒト由来の定常領域を有していてよい。

【００７４】

ｒＧ０１９抗体由来のキメラ抗体の別の例としては、例えば、配列番号１０に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域中のいずれか１～３のＣＤＲ中の１又は２残基（好ましくは１残基）のアミノ酸を別のアミノ酸残基に置換した軽鎖可変領域を含む軽鎖、及び、配列番号１５に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域中のいずれか１～３のＣＤＲ中の１又は２残基（好ましくは１残基）のアミノ酸を別のアミノ酸残基に置換した重鎖可変領域を含む重鎖からなる抗体が挙げられ、当該抗体は任意のヒト由来の定常領域を有していてよい。

【００７５】

ｒＧ０１９抗体由来のキメラ抗体の別の例としては、例えば、配列番号１０に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖、及び、配列番号５８に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖からなる抗体が挙げられ、当該抗体は任意のヒト由

来の定常領域を有していてよい。配列番号５８に示されるアミノ酸配列は、配列番号１５に示されるアミノ酸配列中のＣＤＲＨ２中のシステイン残基をプロリン残基に置換した配列である。

【００７６】

ｒＧ０１９抗体由来のキメラ抗体の具体例としては、配列番号５３に示される軽鎖全長アミノ酸配列からなる軽鎖、及び、配列番号５６に示される重鎖全長アミノ酸配列からなる重鎖からなる抗体が挙げられ、当該キメラ抗ヒトＣＤＨ６抗体を本明細書中、「キメラＧ０１９抗体」、「ｃｈＧ０１９抗体」又は「ｃｈＧ０１９」と称する。ｃｈＧ０１９抗体の軽鎖全長アミノ酸配列は配列番号５４に示されるヌクレオチド配列でコードされ、ｃｈＧ０１９抗体の重鎖全長アミノ酸配列は配列番号５７に示されるヌクレオチド配列でコードされる。

【００７７】

ｃｈＧ０１９抗体の軽鎖可変領域アミノ酸配列は、ｒＧ０１９抗体の軽鎖可変領域アミノ酸配列と同一であり、配列番号１０に示されるアミノ酸配列からなる。ｃｈＧ０１９抗体の軽鎖は、配列番号１２に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１、配列番号１３に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２及び配列番号１４に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ３を有し、それぞれ、ｒＧ０１９の軽鎖のＣＤＲＬ１、ＣＤＲＬ２及びＣＤＲＬ３と同一である。ｃｈＧ０１９抗体の軽鎖可変領域アミノ酸は、配列番号５５に示されるヌクレオチド配列でコードされる。

【００７８】

ｃｈＧ０１９抗体の重鎖可変領域アミノ酸配列は、配列番号５８に示されるアミノ酸配列からなる。ｃｈＧ０１９抗体の重鎖は、配列番号１７に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１、配列番号６０に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２及び配列番号１９に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３を有する。配列番号５８に示されるアミノ酸配列は、配列番号１５に示されるアミノ酸配列中のＣＤＲＨ２中のシステイン残基をプロリン残基に置換した配列である。配列番号６０に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２は、配列番号１８に示されるｒＧ０１９　ＣＤＲＨ２中のシステイン残基をプロリン残基に置換した配列である。ｃｈＧ０１９抗体の重鎖可変領域アミノ酸配列は、配列番号５９に示されるヌクレオチド配列でコードされる。

【００７９】

ｃｈＧ０１９抗体の配列を表１―１～表１―１５に示す。

【００８０】

ラット抗ヒトＣＤＨ６抗体ｒＧ０５５抗体由来のキメラ抗体としては、例えば、配列番号２０に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖、及び、配列番号２５に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖からなるキメラ抗体が挙げられ、当該抗体は任意のヒト由来の定常領域を有していてよい。

【００８１】

ラット抗ヒトＣＤＨ６抗体ｒＧ０５６抗体由来のキメラ抗体としては、例えば、配列番号３０に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖、及び、配列番号３５に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖からなるキメラ抗体が挙げられ、当該抗体は任意のヒト由来の定常領域を有していてよい。

【００８２】

ラット抗ヒトＣＤＨ６抗体ｒＧ０６１抗体由来のキメラ抗体としては、例えば、配列番号４０に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖、及び、配列番号４５に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖からなるキメラ抗体が挙げられ、当該抗体は任意のヒト由来の定常領域を有していてよい。

【００８３】

ヒト化抗体としては、相補性決定領域（ＣＤＲ；Ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔａｒｉｔｙ　Ｄｅｔｅｒｍｉｎｉｎｇ　Ｒｅｇｉｏｎ）のみをヒト由来の抗体に組み込んだ抗体（Ｎａｔｕｒｅ（１９８６）３２１，ｐ．５２２―５２５参照）、ＣＤＲ移植法によって、ＣＤＲ

の配列に加え一部のフレームワークのアミノ酸残基もヒト抗体に移植した抗体（国際公開第９０／０７８６１号）、更に、抗原に対する結合能を維持しつつ、一部のＣＤＲのアミノ酸配列を改変した抗体を挙げることができる。

【００８４】

本明細書において、ｒＧ０１９抗体、ｒＧ０５５抗体、ｒＧ０５６抗体、ｒＧ０６１抗体又はｃｈＧ０１９抗体由来のヒト化抗体とは、ｒＧ０１９抗体、ｒＧ０５５抗体、ｒＧ０５６抗体、ｒＧ０６１抗体又はｃｈＧ０１９抗体のいずれかについて、各々に固有の６つのＣＤＲ配列を全て保持し、かつ、内在化活性を有するヒト化抗体であればよく、特定のヒト化抗体に限定されない。当該ヒト化抗体は、内在化活性を有する限り、更に一部のＣＤＲの一部のアミノ酸配列が改変されていてもよい。

【００８５】

ｃｈＧ０１９抗体のヒト化抗体の実例としては、（１）配列番号６３又は６７に記載のアミノ酸配列、（２）上記（１）のアミノ酸配列に対して少なくとも９５％以上の同一性を有するアミノ酸配列（好ましくは、各ＣＤＲ配列以外のフレームワーク領域の配列に対して少なくとも９５％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列）、及び（３）上記（１）のアミノ酸配列において１又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなる群から選択されるいずれか１つに記載の軽鎖可変領域を含む軽鎖、並びに（４）配列番号７１、７５又は７９に記載のアミノ酸配列、（５）上記（４）のアミノ酸配列に対して少なくとも９５％以上の同一性を有するアミノ酸配列（好ましくは、各ＣＤＲ配列以外のフレームワーク領域の配列に対して少なくとも９５％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列）、及び（６）上記（４）のアミノ酸配列において１又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなる群から選択されるいずれか１つに記載の重鎖可変領域を含む重鎖の任意の組合せを挙げることができる。

【００８６】

また、重鎖又は軽鎖の一方をヒト化し、他方をラット抗体やキメラ抗体の軽鎖又は重鎖とした抗体も用いることができる。そのような抗体の例としては、（１）配列番号６３又は６７に記載のアミノ酸配列、（２）上記（１）のアミノ酸配列に対して少なくとも９５％以上の同一性を有するアミノ酸配列（好ましくは、各ＣＤＲ配列以外のフレームワーク領域の配列に対して少なくとも９５％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列）、及び（３）上記（１）のアミノ酸配列において１又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなる群から選択されるいずれか１つに記載の軽鎖可変領域を含む軽鎖、並びに（４）配列番号１５、２５、３５、４５又は５８に記載のアミノ酸配列、（５）上記（４）のアミノ酸配列に対して少なくとも９５％以上の同一性を有するアミノ酸配列（好ましくは、各ＣＤＲ配列以外のフレームワーク領域の配列に対して少なくとも９５％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列）、及び（６）上記（４）のアミノ酸配列において１又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなる群から選択されるいずれか１つに記載の重鎖可変領域を含む重鎖の任意の組合せを挙げることができる。他の例としては、（１）配列番号１０、２０、３０又は４０に記載のアミノ酸配列、（２）上記（１）のアミノ酸配列に対して少なくとも９５％以上の同一性を有するアミノ酸配列（好ましくは、各ＣＤＲ配列以外のフレームワーク領域の配列に対して少なくとも９５％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列）、及び（３）上記（１）のアミノ酸配列において１又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなる群から選択されるいずれか１つに記載の軽鎖可変領域を含む軽鎖、並びに（４）配列番号７１、７５又は７９に記載のアミノ酸配列、（５）上記（４）のアミノ酸配列に対して少なくとも９５％以上の同一性を有するアミノ酸配列（好ましくは、各ＣＤＲ配列以外のフレームワーク領域の配列に対して少なくとも９５％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列）、及び（６）上記（４）のアミノ酸配列において１又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなる群から選択されるいずれか１つに記載の重鎖可変領域を含む重鎖の任意の組合せを挙げることができる。

【００８７】

また、本明細書中におけるアミノ酸の置換としては保存的アミノ酸置換が好ましい。保存的アミノ酸置換とは、アミノ酸側鎖に関連のあるアミノ酸グループ内で生じる置換である。好適なアミノ酸グループは、以下のとおりである：酸性グループ＝アスパギン酸、グルタミン酸；塩基性グループ＝リシン、アルギニン、ヒスチジン；非極性グループ＝アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン；及び非帯電極性ファミリー＝グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、スレオニン、チロシン。他の好適なアミノ酸グループは次のとおりである：脂肪族ヒドロキシグループ＝セリン及びスレオニン；アミド含有グループ＝アスパラギン及びグルタミン；脂肪族グループ＝アラニン、バリン、ロイシン及びイソロイシン；並びに芳香族グループ＝フェニルアラニン、トリプトファン及びチロシン。かかるアミノ酸置換は元のアミノ酸配列を有する物質の特性を低下させない範囲で行うのが好ましい。

【００８８】

上記軽鎖及び重鎖の好適な組合せの抗体としては、配列番号６３に示される軽鎖可変領域アミノ酸配列（本明細書中、ｈＬ０２軽鎖可変領域アミノ酸配列とも称する）を有する軽鎖又は配列番号６７に示される軽鎖可変領域アミノ酸配列（本明細書中、ｈＬ０３軽鎖可変領域アミノ酸配列とも称する）を有する軽鎖、及び、配列番号７１に示される重鎖可変領域アミノ酸配列（本明細書中、ｈＨ０１重鎖可変領域アミノ酸配列とも称する）を有する重鎖、配列番号７５に示される重鎖可変領域アミノ酸配列（本明細書中、ｈＨ０２重鎖可変領域アミノ酸配列とも称する）を有する重鎖又は配列番号７９に示される重鎖可変領域アミノ酸配列（本明細書中、ｈＨ０４重鎖可変領域アミノ酸配列とも称する）を有する重鎖からなる抗体が挙げられる。好ましい例としては、配列番号６３に示される軽鎖可変領域アミノ酸配列を有する軽鎖及び配列番号７１に示される重鎖可変領域アミノ酸配列を有する重鎖からなる抗体；配列番号６３に示される軽鎖可変領域アミノ酸配列を有する軽鎖及び配列番号７５に示される重鎖可変領域アミノ酸配列を有する重鎖からなる抗体；配列番号６３に示される軽鎖可変領域アミノ酸配列を有する軽鎖及び配列番号７９に示される重鎖可変領域アミノ酸配列を有する重鎖からなる抗体；配列番号６７に示される軽鎖可変領域アミノ酸配列を有する軽鎖及び配列番号７１に示される重鎖可変領域アミノ酸配列を有する重鎖からなる抗体；配列番号６７に示される軽鎖可変領域アミノ酸配列を有する軽鎖及び配列番号７５に示される重鎖可変領域アミノ酸配列を有する重鎖からなる抗体；又は、配列番号６７に示される軽鎖可変領域アミノ酸配列を有する軽鎖及び配列番号７９に示される重鎖可変領域アミノ酸配列を有する重鎖からなる抗体が挙げられる。より好ましい例としては、配列番号６３に示される軽鎖可変領域アミノ酸配列を有する軽鎖及び配列番号７１に示される重鎖可変領域アミノ酸配列を有する重鎖からなる抗体；配列番号６３に示される軽鎖可変領域アミノ酸配列を有する軽鎖及び配列番号７５に示される重鎖可変領域アミノ酸配列を有する重鎖からなる抗体；配列番号６３に示される軽鎖可変領域アミノ酸配列を有する軽鎖及び配列番号７９に示される重鎖可変領域アミノ酸配列を有する重鎖からなる抗体；又は、配列番号６７に示される軽鎖可変領域アミノ酸配列を有する軽鎖及び配列番号７５に示される重鎖可変領域アミノ酸配列を有する重鎖からなる抗体が挙げられる。

【００８９】

上記軽鎖及び重鎖の好適な組合せの抗体の別の例としては、配列番号６１に示される軽鎖全長アミノ酸配列（本明細書中、ｈＬ０２軽鎖全長アミノ酸配列とも称する）の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖又は配列番号６５に示される軽鎖全長アミノ酸配列（本明細書中、ｈＬ０３軽鎖全長アミノ酸配列とも称する）の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖、及び、配列番号６９に示される重鎖全長アミノ酸配列（本明細書中、ｈＨ０１重鎖全長アミノ酸配列とも称する）の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖、配列番号７３に示される重鎖全長アミノ酸配列（本明細書中、ｈＨ０２重鎖全長アミノ酸配列とも称する）の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖又は配列番号７７に示される重鎖全長アミノ酸配列（本明細書中、ｈＨ０４重鎖全長アミノ酸配列とも称する）の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖からなる抗体が挙げられる。

好ましい例としては、配列番号６１に示される軽鎖全長アミノ酸配列の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号６９に示される重鎖全長アミノ酸配列の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖からなる抗体；配列番号６１に示される軽鎖全長アミノ酸配列の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号７３に示される重鎖全長アミノ酸配列の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖からなる抗体；配列番号６１に示される軽鎖全長アミノ酸配列の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号７７に示される重鎖全長アミノ酸配列の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖からなる抗体；配列番号６５に示される軽鎖全長アミノ酸配列の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号６９に示される重鎖全長アミノ酸配列の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖からなる抗体；配列番号６５に示される軽鎖全長アミノ酸配列の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号７３に示される重鎖全長アミノ酸配列の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖からなる抗体；又は、配列番号６５に示される軽鎖全長アミノ酸配列の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号７７に示される重鎖全長アミノ酸配列の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖からなる抗体が挙げられる。より好ましい例としては、配列番号６１に示される軽鎖全長アミノ酸配列の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号６９に示される重鎖全長アミノ酸配列の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖からなる抗体（本明細書中、「Ｈ０１Ｌ０２抗体」又は「Ｈ０１Ｌ０２」とも称する）；配列番号６１に示される軽鎖全長アミノ酸配列の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号７３に示される重鎖全長アミノ酸配列の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖からなる抗体（本明細書中、「Ｈ０２Ｌ０２抗体」又は「Ｈ０２Ｌ０２」とも称する）；配列番号６１に示される軽鎖全長アミノ酸配列の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号７７に示される重鎖全長アミノ酸配列の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖からなる抗体（本明細書中、「Ｈ０４Ｌ０２抗体」又は「Ｈ０４Ｌ０２」とも称する）；又は、配列番号６５に示される軽鎖全長アミノ酸配列の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号７３に示される重鎖全長アミノ酸配列の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖からなる抗体（本明細書中、「Ｈ０２Ｌ０３抗体」又は「Ｈ０２Ｌ０３」とも称する）が挙げられる。Ｈ０１Ｌ０２抗体、Ｈ０２Ｌ０２抗体、Ｈ０２Ｌ０３抗体又はＨ０４Ｌ０２抗体の配列を表１―１～表１―１５に示す。

【００９０】

上記の重鎖アミノ酸配列及び軽鎖アミノ酸配列と高い同一性示す配列を組み合わせることによって、上記の各抗体と同等の生物活性を有する抗体を選択することが可能である。このような同一性は、一般的には８０％以上の同一性であり、好ましくは９０％以上の同一性であり、より好ましくは９５％以上の同一性であり、最も好ましくは９９％以上の同一性である。また、重鎖又は軽鎖のアミノ酸配列に１乃至数個のアミノ酸残基が置換、欠失又は付加されたアミノ酸配列を組み合わせることによっても、上記の各抗体と同等の生物活性を有する抗体を選択することが可能である。

【００９１】

二種類のアミノ酸配列間の同一性は、ＣｌｕｓｔａｌＷ ｖｅｒｓｉｏｎ２ （Ｌａｒｋｉｎ ＭＡ，Ｂｌａｃｋｓｈｉｅｌｄｓ Ｇ，Ｂｒｏｗｎ ＮＰ，Ｃｈｅｎｎａ Ｒ，ＭｃＧｅｔｔｉｇａｎ ＰＡ，ＭｃＷｉｌｌｉａｍ Ｈ，Ｖａｌｅｎｔｉｎ Ｆ，Ｗａｌｌａｃｅ ＩＭ，Ｗｉｌｍ Ａ，Ｌｏｐｅｚ Ｒ，Ｔｈｏｍｐｓｏｎ ＪＤ，Ｇｉｂｓｏｎ ＴＪ ａｎｄ Ｈｉｇｇｉｎｓ ＤＧ（２００７），「Ｃｌｕｓｔａｌ Ｗ ａｎｄ Ｃｌｕｓｔａｌ Ｘ ｖｅｒｓｉｏｎ ２．０」，Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ．２３（２１）：２９４７―２９４８）のデフォルトパラメーターを使用して配列を整列させることによって決定することができる。

【００９２】

なお、配列番号６１に示されるｈＬ０２軽鎖全長アミノ酸配列中、１～２０番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列はシグナル配列であり、２１～１２８番目のアミノ酸残基

からなるアミノ酸配列は可変領域であり、１２９～２３３番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は定常領域である。配列番号６２に示されるｈＬ０２軽鎖全長ヌクレオチド配列中、１～６０番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列はシグナル配列をコードし、６１～３８４番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列は可変領域をコードし、３８５～６９９番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列は定常領域をコードしている。

【００９３】

配列番号６５に示されるｈＬ０３軽鎖全長アミノ酸配列中、１～２０番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列はシグナル配列であり、２１～１２８番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は可変領域であり、１２９～２３３番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は定常領域である。配列番号６６に示されるｈＬ０３軽鎖全長ヌクレオチド配列中、１～６０番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列はシグナル配列をコードし、６１～３８４番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列は可変領域をコードし、３８５～６９９番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列は定常領域をコードしている。

【００９４】

配列番号６９に示されるｈＨ０１重鎖全長アミノ酸配列中、１～１９番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列はシグナル配列であり、２０～１４１番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は可変領域であり、１４２～４７１番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は定常領域である。配列番号７０に示されるｈＨ０１重鎖全長ヌクレオチド配列中、１～５７番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列はシグナル配列をコードし、５８～４２３番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列は可変領域をコードし、４２４～１４１３番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列は定常領域をコードしている。

【００９５】

配列番号７３に示されるｈＨ０２重鎖全長アミノ酸配列中、１～１９番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列はシグナル配列であり、２０～１４１番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は可変領域であり、１４２～４７１番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は定常領域である。配列番号７４に示されるｈＨ０２重鎖全長ヌクレオチド配列中、１～５７番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列はシグナル配列をコードし、５８～４２３番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列は可変領域をコードし、４２４～１４１３番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列は定常領域をコードしている。

【００９６】

配列番号７７に示されるｈＨ０４重鎖全長アミノ酸配列中、１～１９番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列はシグナル配列であり、２０～１４１番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は可変領域であり、１４２～４７１番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は定常領域である。配列番号７８に示されるｈＬ０４重鎖全長ヌクレオチド配列で、１～５７番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列はシグナル配列であり、５８～４２３番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列は可変領域をコードしており、４２４～１４１３番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列は定常領域をコードしている。

【００９７】

【表１－１】

配列番号		配列
1	ヒトCDH6 ORFのアミノ酸配列	MRTYRYFLLLFWVGQPYPTLSTPLSKRTSGFPAKKRALELSGNSKNELNRSKRSWMW NQFFLLEEYTGSDYQYVGKLHSDQDRGDGSLKYILSGDGAGDLFIINENTGDIQATK RLDREEKPVYILRAQAINRRTGRPVEPESEFIIKIHDINDNEPIFTKEVYTATVPEM SDVGTFVVQVTATDADDPTYGNSAKVVYSILQGQPYFSVESETGIIKTALLNMDREN REQYQVVIQAKDMGGQMGGLSGTTTVNITLTDVNDNPPRFPQSTYQFKTPESSPPGT PIGRIKASDADVGENAEIEYSITDGEGLDMFDVITDQETQEGIITVKKLLDFEKKKV YTLKVEASNPYVEPRFLYLGPFKDSATVRIVVEDVDEPPVFSKLAYILQIREDAQIN TTIGSVTAQDPDAARNPVKYSVDRHTDMDRIFNIDSGNGSIFTSKLLDRETLLWHNI TVIATEINNPKQSSRVPLYIKVLDVNDNAPEFAEFYETFVCEKAKADQLIQTLHAVD KDDPYSGHQFSFSLAPEAASGSNFTIQDNKDNTAGILTRKNGYNRHEMSTYLLPVVI SDNDYPVQSSTGTVTVRVCACDHHGNMQSCHAEALIHPTGLSTGALVAILLCIVILL VTVVLFAALRRQRKKEPLIISKEDIRDNIVSYNDEGGGEEDTQAFDIGTLRNPEAIE DNKLRRDIVPEALFLPRRTPTARDNTDVRDFINQRLKENDTDPTAPPYDSLATYAYE GTGSVADSLSSLESVTTDADQDYDYLSDWGPRFKKLADMYGGVDSDKDS
2	ヒトCDH6 EC1	SWMWNQFFLLEEYTGSDYQYVGKLHSDQDRGDGSLKYILSGDGAGDLFIINENTGDI QATKRLDREEKPVYILRAQAINRRTGRPVEPESEFIIKIHDINDNEPIF
3	ヒトCDH6 EC2	TKEVYTATVPEMSDVGTFVVQVTATDADDPTYGNSAKVVYSILQGQPYFSVESETGI IKTALLNMDRENREQYQVVIQAKDMGGQMGGLSGTTTVNITLTDVNDNPPRF
4	ヒトCDH6 EC3	PQSTYQFKTPESSPPGTPIGRIKASDADVGENAEIEYSITDGEGLDMFDVITDQETQ EGIITVKKLLDFEKKKVYTLKVEASNPYVEPRFLYLGPFKDSATVRIVVEDVDEPPV F
5	ヒトCDH6 EC4	SKLAYILQIREDAQINTTIGSVTAQDPDAARNPVKYSVDRHTDMDRIFNIDSGNGSI FTSKLLDRETLLWHNITVIATEINNPKQSSRVPLYIKVLDVNDNAP
6	ヒトCDH6 EC5	EFAEFYETFVCEKAKADQLIQTLHAVDKDDPYSGHQFSFSLAPEAASGSNFTIQDNK DNTAGILTRKNGYNRHEMSTYLLPVVISDNDYPVQSSTGTVTVRVCACDHHGNMQSC HAEALIHP
7	マウスCDH6 ORFのアミノ酸配列	MRTYRYFLLLFWVGQPYPTFSNPLSKRTSGFPAKRKALELSANSRNELSRSKRSWMW NQFFLLEEYTGSDYQYVGKLHSDQDRGDGSLKYILSGDGAGDLFIINENTGDIQATK RLDREEKPVYILRAQAVNRRTGRPVEPESEFIIKIHDINDNEPIFTKDVYTATVPEM ADVGTFVVQVTATDADDPTYGNSAKVVYSILQGQPYFSVESETGIIKTALLNMDREN REQYQVVIQAKDMGGQMGGLSGTTTVNITLTDVNDNPPRFPQSTYQFKTPESSPPGT PIGRIKASDADVGENAEIEYSITDGEGHEMFDVITDQETQEGIITVKKLLDFEKKKV YTLKVEASNPHVEPRFLYLGPFKDSATVRIVVDDVDEPPVFSKLAYILQIREDARIN TTIGSVAAQDPDAARNPVKYSVDRHTDMDRIFNIDSGNGSIFTSKLLDRETLLWHNI TVIATEINNPKQSSRVPLYIKVLDVNDNAPEFAEFYETFVCEKAKADQLIQTLRAVD KDDPYSGHQFSFSLAPEAASSSNFTIQDNKDNTAGILTRKNGYNRHEMSTYLLPVVI SDNDYPVQSSTGTVTVRVCACDHHGNMQSCHAEALIHPTGLSTGALVAILLCIVILL VTVVLFAALRRQRKKEPLIISKEDIRDNIVSYNDEGGGEEDTQAFDIGTLRNPEAME DSKSRRDIVPEALFLPRRTPTARDNTDVRDFINQRLKENDTDPTAPPYDSLATYAYE GTGSVADSLSSLESVTTDGDQDYDYLSDWGPRFKKLADMYGGMDSDKDS

【００９８】

【表１－２】

8	ラットCDH6 ORFのアミノ酸配列	MRTYRYFLLLFWVGQPYPTFSNPLSKRTSGFPAKRRALELSANSRNELSRSKRSWMW NQFFLLEEYTGSDYQYVGKLHSDQDRGDGSLKYILSGDGAGDLFIINENTGDIQATK RLDREEKPVYILRAQAINRRTGRPVEPESEFIIKIHDINDNEPIFTKDVYTATVPEM ADVGTFVVQVTATDADDPTYGNSAKVVYSILQGQPYFSVESETGIIKTALLNMDREN REQYQVVIQAKDMGGQMGGLSGTTTVNITLTDVNDNPPRFPQSTYQFKTPESSPPGT PIGRIKASDADVGENAEIEYSITDGEGHDMFDVITDQETQEGIITVKKLLDFEKKRV YTLKVEASNPHIEPRFLYLGPFKDSATVRIVVDDVDEPPVFSKPAYILQIREDAQIN TTIGSVAAQDPDAARNPVKYSVDRHTDMDRIFNIDSGNGSIFTSKLLDRETLLWHNI TVIATEINNPKQSSRVPLYIKVLDVNDNAPEFAEFYETFVCEKAKADQLIQTLHAVD KDDPYSGHQFSFSLAPEAASGSNFTIQDNKDNTAGILTRKNGYNRHEMSTYLLPVVI SDNDYPVQSSTGTVTVRVCACDHHGNMQSCHAEALIHPTGLSTGALVAILLCIVILL VTVVLFAALRRQRKKEPLIISKEDIRDNIVSYNDEGGGEEDTQAFDIGTLRNPKPWR QQSRRDMVPEALFLPRRTPTARDNTDVRDFISQRLRKMNTDPTAPPYDSLATYAYEG TGSVADSLSSLESVTTDGDQDYGYLSDWGPRFKKLADMYGGMDSDKDS
9	カニクイザルCDH6 ORFのアミノ酸配列	MRTYRYFLLLFWVGQPYPTLSTPLSKRTSGFPAKKRALELSGNSKNELNRSKRSWMW NQFFLLEEYTGSDYQYVGKLHSDQDRGDGSLKYILSGDGAGDLFIINENTGDIQATK RLDREEKPVYILRAQAINRRTGRPVEPESEFIIKIHDINDNEPIFTKEVYTATVPEM SDVGTFVVQVTATDADDPTYGNSAKVVYSILQGQPYFSVESETGIIKTALLNMDREN REQYQVVIQAKDMGGQMGGLSGTTTVNITLTDVNDNPPRFPQSTYQFKTPESSPPGT PIGRIKASDADVGENAEIEYSITDGEGLDMFDVITDQETQEGIITVKKLLDFEKKKV YTLKVEASNPHVEPRFLYLGPFKDSATVRIVVEDVDEPPVFSKLAYILQIREDAQIN TTIGSVTAQDPDAARNPVKYSVDRHTDMDRIFNIDSGNGSIFTSKLLDRETLLWHNI TVIATEINNPKQSSRVPLYIKVLDVNDNAPEFAEFYETFVCEKAKADQLIQTLRAVD KDDPYSGHQFSFSLAPEAASGSNFTIQDNKDNTAGILTRKNGYNRHEMSTYLLPVVI SDNDYPVQSSTGTVTVRVCACDHHGNMQSCHAEALIHPTGLSTGALVAILLCIVILL VTVVLFAALRRQRKKEPLIISKEDIRDNIVSYNDEGGGEEDTQAFDIGTLRNPEAIE DNKLRRDIVPEALFLPRRTPTARDNTDVRDFINQRLKENDTDPTAPPYDSLATYAYE GTGSVADSLSSLESVTTDGDQDYDYLSDWGPRFKKLADMYGGVDSDKDS
10	rGO19軽鎖可変領域アミノ酸配列	DIQMTQSPSLLSASVGDRVTLNCKASQNIYKNLAWYQQKLGEGPKLLIYDANTLQTG IPSRFSGSGSGSDFTLTISSLQPEDVATYFCQQYYSGWAFGGVTNLELKRA
11	rGO19軽鎖可変領域ヌクレオチド配列	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCACTCCTGTCTGCATCTGTGGGAGACAGAGTC ACTCTCAACTGCAAAGCAAGTCAGAATATTTATAAGAACTTAGCCTGGTATCAGCAA AAGCTTGGAGAAGGTCCCAAACTCCTGATTTATGATGCAAACACTTTGCAAACGGGC ATCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGTTCAGATTTCACACTCACCATCAGC AGCCTGCAGCCTGAAGATGTTGCCACATATTTCTGCCAGCAGTACTATAGCGGGTGG GCGTTCGGTGGAGTCACCAACCTGGAATTGAAACGGGCT
12	rGO19 CDRL1	KASQNIYKNLA
13	rGO19 CDRL2	DANTLQT
14	rGO19 CDRL3	QQYYSGWA

【００９９】

【表１－３】

15	rGO19重鎖可変領域アミノ酸配列	QVQLQQSGAELVKPGSSVKISCKASGYTFTRNFMHWIKQQPGNGLEWIGWIYCGDGETEYNQKFNGKATLTADRSSSTAYMELSRLTSEDSAVYFCARGVYGGFAGGYFDFWGQGVMVTVSS
16	rGO19重鎖可変領域ヌクレオチド配列	CAGGTACAGCTGCAGCAATCTGGGGCTGAACTGGTGAAGCCTGGGTCCTCAGTGAAAATTTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACCAGGAACTTTATGCACTGGATAAAACAGCAGCCTGGAAATGGCCTTGAGTGGATTGGGTGGATTTATTGTGGAGATGGTGAGACAGAGTACAATCAAAAGTTCAATGGGAAGGCAACACTCACTGCGGACAGATCCTCCAGCACAGCCTATATGGAGCTCAGCAGACTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTTCTGTGCAAGAGGGGTTTACGGAGGGTTTGCCGGGGGCTACTTTGATTTCTGGGGCCAAGGAGTCATGGTCACAGTCTCCTCA
17	rGO19 CDRH1	GYTFTRNFMH
18	rGO19 CDRH2	WIYCGDGETE
19	rGO19 CDRH3	GVYGGFAGGYFDF
20	rGO55軽鎖可変領域アミノ酸配列	DVQMTHSPSYLAASPGESVSISCKTSKNISNYLVWYQQKPGEAYKLLIYSGSTLQSGTPSRFSGSGSGTDFTLTIRSLEPEDFGLYFCQQYYEKPFTFGSGTKLEIKRA
21	rGO55軽鎖可変領域ヌクレオチド配列	GATGTCCAGATGACCCACTCTCCGTCTTATCTTGCTGCGTCTCCTGGAGAAAGTGTTTCCATCAGTTGCAAGACAAGTAAGAACATTAGTAATTATTTAGTCTGGTATCAACAGAAACCTGGGGAAGCATATAAGCTTCTTATCTATTCTGGGTCAACTTTGCAATCTGGAACTCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGTACAGATTTCACTCTCACTATCAGAAGCCTGGAGCCTGAAGATTTTGGACTCTATTTCTGTCAACAGTATTATGAAAAACCATTCACGTTCGGCTCAGGGACGAAGTTGGAAATAAAACGGGCT
22	rGO55 CDRL1	KTSKNISNYLV
23	rGO55 CDRL2	SGSTLQS
24	rGO55 CDRL3	QQYYEKPFT
25	rGO55重鎖可変領域アミノ酸配列	EVQLQESGPGLVRPSQSLSLSCSVTDYSITSNYWGWIRRFPGNKMEWMGYITYSGYTSYNPSLQSRISITRDTSKNQFFLQLNSVTAEDTATYYCARSINHGGYSYVVDAWGPGASVTVSS
26	rGO55重鎖可変領域ヌクレオチド配列	GAGGTGCAACTTCAGGAGTCAGGACCTGGCCTTGTGAGACCCTCACAGTCACTCTCCCTCTCCTGTTCTGTCACTGATTACTCCATCACTAGTAATTACTGGGGCTGGATCCGGAGGTTCCCAGGAAATAAAATGGAGTGGATGGGATACATAACCTATAGTGGTTACACTAGCTACAACCCATCTCTCCAAAGTCGAATCTCCATTACTAGAGACACATCGAAGAATCAGTTCTTCCTGCAGTTGAACTCTGTAACTGCTGAGGACACAGCCACATATTACTGTGCAAGATCGATTAACCACGGAGGATATAGTTATGTTGTGGATGCCTGGGGTCCGGGAGCTTCAGTCACTGTCTCCTCA
27	rGO55 CDRH1	DYSITSNYWG
28	rGO55 CDRH2	YITYSGYTS
29	rGO55 CDRH3	SINHGGYSYVVDA

【０１００】

【表１－４】

30	rGO56軽鎖可変領域アミノ酸配列	DVQMTQSPSSLAASPGESVSISCRATKSIGIYLAWYQQKPGKTFKLLIYSGSTLQSG TPSRFSGSGSGTDFTLTIRSLEPEDFGLYFCQQFYENPFTFGSGTKLEIRRA
31	rGO56軽鎖可変領域ヌクレオチド配列	GATGTCCAGATGACCCAGTCTCCGTCTTCTCTTGCTGCGTCTCCTGGAGAAAGTGTT TCCATCAGTTGCAGGGCAACTAAGAGCATTGGTATTTATTTAGCCTGGTATCAACAG AAACCTGGGAAAACATTTAAGCTTCTTATCTACTCTGGGTCAACTTTGCAATCTGGA ACTCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGTACAGATTTCACTCTCACCATCAGA AGCCTGGAGCCTGAAGATTTTGGACTCTATTTCTGTCAACAGTTTTATGAAAACCCA TTCACGTTCGGCTCAGGGACGAAGTTGGAAATAAGACGGGCT
32	rGO56 CDRL1	RATKSIGIYLA
33	rGO56 CDRL2	SGSTLQS
34	rGO56 CDRL3	QQFYENPFT
35	rGO56重鎖可変領域アミノ酸配列	EVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVTDYSITTYFWGWIRKFPGNKMEWMGYMSYRGGT SYNPSLKSRISITRDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCARCPNYGGHSLVFDYWGQG VMVTVSS
36	rGO56重鎖可変領域ヌクレオチド配列	GAGGTGCAGCTTCAGGAGTCAGGACCTGGCCTTGTGAAACCCTCACAGTCACTCTCC CTCACCTGTTCTGTCACTGATTACTCCATCACTACTTATTTCTGGGGCTGGATCCGG AAGTTCCCAGGAAATAAAATGGAGTGGATGGGATACATGAGCTACCGTGGTGGCACT TCCTACAACCCATCTCTCAAGAGTCGAATCTCCATTACTAGAGACACATCGAAGAAT CAGTTCTTCCTGCAGTTGAACTCTGTAACTACTGAGGACACAGCCACATATTACTGT GCAAGATGCCCTAACTACGGAGGGCATTCCCTTGTTTTTGATTACTGGGGCCAAGGA GTCATGGTCACAGTGTCCTCA
37	rGO56 CDRH1	DYSITTYFWG
38	rGO56 CDRH2	YMSYRGGTS
39	rGO56 CDRH3	CPNYGGHSLVFDY
40	rGO61軽鎖可変領域アミノ酸配列	DVQMTQSPSYLAASPGESVSISCKATKSISNYLAWYQQKPGEAYKVLIYSGSTLQSG TPSRFSGSGSGTDFTLTIRSLEPEDFGLYSCQQYYEKPLTFGSGTKLEIKRA
41	rGO61軽鎖可変領域ヌクレオチド配列	GATGTCCAGATGACCCAGTCTCCGTCTTATCTTGCTGCGTCTCCTGGAGAAAGTGTT TCCATCAGTTGCAAGGCAACTAAGAGCATTAGTAATTATTTAGCCTGGTATCAACAG AAACCTGGGGAAGCATATAAGGTTCTTATCTATTCTGGGTCAACTTTGCAATCTGGA ACTCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGTACAGATTTCACTCTCACCATCAGA AGCCTGGAGCCTGAAGATTTTGGACTCTATTCCTGTCAACAGTATTATGAAAAACCG CTCACGTTCGGTTCTGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGGGCT
42	rGO61 CDRL1	KATKSISNYLA
43	rGO61 CDRL2	SGSTLQS
44	rGO61 CDRL3	QQYYEKPLT

【０１０１】

【表１－５】

45	rGO61重鎖可変領域アミノ酸配列	EVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVTGYSITTYYWGWIRKFPGNKMEWMGYISYSGRTSYNPSLKSRMSITRDASKNQFFLQLNSVTTDDTATYYCARSPINHGGYWYFDFWGPGTMVTVSS
46	rGO61重鎖可変領域ヌクレオチド配列	GAGGTGCAGCTTCAGGAGTCAGGACCTGGCCTTGTGAAACCCTCACAGTCACTCTCCCTCACCTGTTCTGTCACTGGTTACTCCATCACTACTTATTACTGGGGCTGGATCCGGAAGTTCCCAGGAAATAAAATGGAGTGGATGGGGTACATAAGCTACAGTGGTCGCACTAGTTATAACCCATCTCTCAAAAGTCGAATGTCCATTACTAGAGACGCATCGAAGAATCAGTTCTTCCTACAGTTGAACTCTGTAACTACTGACGACACAGCCACATATTACTGTGCAAGATCCCCAATTAACCACGGAGGGTACTGGTACTTTGACTTCTGGGGCCCAGGAACCATGGTCACCGTGTCCTCA
47	rGO61 CDRH1	GYSITTYYWG
48	rGO61 CDRH2	YISYSGRTS
49	rGO61 CDRH3	SPINHGGYWYFDF
50	ヒト軽鎖シグナル配列及びヒトκ鎖定常領域をコードするDNA配列を含むDNA断片	gcctccggactctagagccaccATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTCATCTCCCTGCTGCTGTGGATCTCCGGCGCGTACGGCGATATCGTGATGATTAAACGTACGGTGGCCGCCCCCTCCGTGTTCATCTTCCCCCCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTACCCCAGAGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGGAACTCCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAAGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGAGCTCCCCCGTCACCAAGAGCTTCAACAGGGGGGAGTGTtaggggcccgtttaaacgggggaggcta

【０１０２】

【表１－６】

51	ヒト重鎖シグナル配列及びヒトIgG1定常領域をコードするDNA配列を含むDNA断片	gcctccggactctagagccaccATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGC AGCTCCCAGATGGGTGCTGAGCCAGGTGCAATTGTGCAGGCGGTTAGCTCAGCCTCC ACCAAGGGCCCAAGCGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGCGGC ACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCCGTGACCGTGAGC TGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCCGCTGTCCTGCAGTCC TCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACC CAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGA GTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCCTGCCCAGCACCTGAA CTCCTGGGGGGACCCTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATG ATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCT GAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAG CCCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTG CACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTC CCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGCCAGCCCCGGGAACCACAG GTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACC TGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGC CAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTC TTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTCTTC TCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTCTCC CTGTCTCCCGGCAAAtgagatatcgggccgtttaaacgggggaggcta
52	chG019軽鎖をコードするDNA配列を含むDNA断片	ccagcctccggactctagagccaccATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTCATCAGCCT GCTGCTGTGGATCAGCGGCGCCTACGGCGACATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCCT GCTGAGCGCCAGCGTGGGCGATAGAGTGACCCTGAACTGCAAGGCCAGCCAGAACAT CTACAAGAACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCTGGGCGAGGGCCCCAAGCTGCTGAT CTACGACGCCAACACCCTGCAGACCGGCATCCCCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCAG CGGCTCCGACTTCACCCTGACAATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACGTGGCCACCTA CTTTTGCCAGCAGTACTACAGCGGCTGGGCCTTCGGCGGCGTGACCAACCTGGAACT GAAGAGAGCCGTGGCCGCTCCCTCCGTGTTCATCTTCCCACCTAGCGACGAGCAGCT GAAGTCCGGCACAGCCTCTGTCGTGTGCCTGCTGAACAACTTCTACCCCCGCGAGGC CAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAATGCCCTGCAGTCTGGCAACAGCCAGGAAAGCGT GACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGAG CAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCACCAGGGCCT GTCTAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGTtgagtttaaacgggggga ggctaact
53	chG019軽鎖全長アミノ酸配列	MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIQMTQSPSLLSASVGDRVTLNCKASQNIYKNLAWYQ QKLGEGPKLLIYDANTLQTGIPSRFSGSGSGSDFTLTISSLQPEDVATYFCQQYYSG WAFGGVTNLELKRAVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC

【０１０３】

【表１－７】

54	chG019軽鎖全長ヌクレオチド配列	ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTCATCAGCCTGCTGCTGTGGATCAGCGGCGCCTAC GGCGACATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCCTGCTGAGCGCCAGCGTGGGCGATAGA GTGACCCTGAACTGCAAGGCCAGCCAGAACATCTACAAGAACCTGGCCTGGTATCAG CAGAAGCTGGGCGAGGGCCCCAAGCTGCTGATCTACGACGCCAACACCCTGCAGACC GGCATCCCCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCAGCGGCTCCGACTTCACCCTGACAATC AGCAGCCTGCAGCCCGAGGACGTGGCCACCTACTTTTGCCAGCAGTACTACAGCGGC TGGGCCTTCGGCGGCGTGACCAACCTGGAACTGAAGAGAGCCGTGGCCGCTCCCTCC GTGTTCATCTTCCCACCTAGCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACAGCCTCTGTCGTG TGCCTGCTGAACAACTTCTACCCCCGCGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAAT GCCCTGCAGTCTGGCAACAGCCAGGAAAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCC ACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAG GTGTACGCCTGCGAAGTGACCCACCAGGGCCTGTCTAGCCCCGTGACCAAGAGCTTC AACCGGGGCGAGTGT
10	chG019軽鎖可変領域アミノ酸配列	DIQMTQSPSLLSASVGDRVTLNCKASQNIYKNLAWYQQKLGEGPKLLIYDANTLQTG IPSRFSGSGSGSDFTLTISSLQPEDVATYFCQQYYSGWAFGGVTNLELKRA
55	chG019軽鎖可変領域ヌクレオチド配列	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCCTGCTGAGCGCCAGCGTGGGCGATAGAGTG ACCCTGAACTGCAAGGCCAGCCAGAACATCTACAAGAACCTGGCCTGGTATCAGCAG AAGCTGGGCGAGGGCCCCAAGCTGCTGATCTACGACGCCAACACCCTGCAGACCGGC ATCCCCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCAGCGGCTCCGACTTCACCCTGACAATCAGC AGCCTGCAGCCCGAGGACGTGGCCACCTACTTTTGCCAGCAGTACTACAGCGGCTGG GCCTTCGGCGGCGTGACCAACCTGGAACTGAAGAGAGCC
12	chG019 CDRL1	KASQNIYKNLA
13	chG019 CDRL2	DANTLQT
14	chG019 CDRL3	QQYYSGWA
56	chG019重鎖全長アミノ酸配列	MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLQQSGAELVKPGSSVKISCKASGYTFTRNFMHWIK QQPGNGLEWIGWIYPGDGETEYNQKFNGKATLTADRSSSTAYMELSRLTSEDSAVYF CARGVYGGFAGGYFDFWGQGVMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK

【０１０４】

【表１－８】

57	chG019重鎖全長ヌクレオチド配列	ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTGCTGAGC CAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGCGCCGAGCTCGTGAAGCCTGGCAGCAGCGTGAAG ATCAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCCGGAACTTCATGCACTGGATCAAG CAGCAGCCCGGCAACGGCCTGGAATGGATCGGCTGGATCTATCCCGGCGACGGCGAG ACAGAGTACAACCAGAAGTTCAACGGCAAGGCCACCCTGACCGCCGACAGAAGCAGC TCCACCGCCTACATGGAACTGAGCCGGCTGACCAGCGAGGACAGCGCCGTGTACTTT TGCGCCAGAGGCGTGTACGGCGGCTTCGCTGGCGGCTACTTCGATTTTTGGGGCCAG GGCGTGATGGTCACCGTCAGCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCAAGCGTCTTCCCCCTG GCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAG GACTACTTCCCCGAACCCGTGACCGTGAGCTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGC GTGCACACCTTCCCCGCTGTCCTGCAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTG GTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCAC AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACT CACACATGCCCACCCTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCCTCAGTCTTCCTC TTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGC GTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGAC GGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACG TACCGGGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAG TACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCC AAAGCCAAAGGCCAGCCCCGGGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAG GAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGC GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACC CCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGAC AAGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG CACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGCAAA
58	chG019重鎖可変領域アミノ酸配列	QVQLQQSGAELVKPGSSVKISCKASGYTFTRNFMHWIKQQPGNGLEWIGWIYPGDGE TEYNQKFNGKATLTADRSSSTAYMELSRLTSEDSAVYFCARGVYGGFAGGYFDFWGQ GVMVTVSS
59	chG019重鎖可変領域ヌクレオチド配列	CAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGCGCCGAGCTCGTGAAGCCTGGCAGCAGCGTGAAG ATCAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCCGGAACTTCATGCACTGGATCAAG CAGCAGCCCGGCAACGGCCTGGAATGGATCGGCTGGATCTATCCCGGCGACGGCGAG ACAGAGTACAACCAGAAGTTCAACGGCAAGGCCACCCTGACCGCCGACAGAAGCAGC TCCACCGCCTACATGGAACTGAGCCGGCTGACCAGCGAGGACAGCGCCGTGTACTTT TGCGCCAGAGGCGTGTACGGCGGCTTCGCTGGCGGCTACTTCGATTTTTGGGGCCAG GGCGTGATGGTCACCGTCAGCTCA
17	chG019 CDRH1	GYTFTRNFMH
60	chG019 CDRH2	WIYPGDGETE
19	chG019 CDRH3	GVYGGFAGGYFDF

【０１０５】

【表１－９】

61	hLO2軽鎖全長アミノ酸配列	MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNIYKNLAWYQQKPGKAPKLLIYDANTLQTGVPSRFSGSGSGSDFTLTISSLQPEDFATYFCQQYYSGWAFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
62	hLO2軽鎖全長ヌクレオチド配列	ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTCATCTCCCTGCTGCTGTGGATCTCCGGCGCGTACGGCGACATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACATGCAAGGCCAGCCAGAACATCTACAAGAACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACGACGCCAACACCCTGCAGACCGGCGTGCCCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCAGCGGCTCCGACTTCACCCTGACAATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTTTTGCCAGCAGTACTACAGCGGCTGGGCCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCCGCCCCCTCCGTGTTCATCTTCCCCCCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTACCCCAGAGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGGAACTCCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAAGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGAGCTCCCCCGTCACCAAGAGCTTCAACAGGGGGGAGTGT
63	hLO2軽鎖可変領域アミノ酸配列	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNIYKNLAWYQQKPGKAPKLLIYDANTLQTGVPSRFSGSGSGSDFTLTISSLQPEDFATYFCQQYYSGWAFGQGTKVEIKRT
64	hLO2軽鎖可変領域ヌクレオチド配列	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACATGCAAGGCCAGCCAGAACATCTACAAGAACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACGACGCCAACACCCTGCAGACCGGCGTGCCCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCAGCGGCTCCGACTTCACCCTGACAATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTTTTGCCAGCAGTACTACAGCGGCTGGGCCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAAGCGTACG
65	hLO3軽鎖全長アミノ酸配列	MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNIYKNLAWYQQKLGEGPKLLIYDANTLQTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYSGWAFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【０１０６】

【表１－１０】

66	hLO3軽鎖全長ヌクレオチド配列	ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTCATCTCCCTGCTGCTGTGGATCTCCGGCGCGTAC GGCGACATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGA GTGACCATCACATGCAAGGCCAGCCAGAACATCTACAAGAACCTGGCCTGGTATCAG CAGAAGCTGGGCGAGGGCCCCAAGCTGCTGATCTACGACGCCAACACCCTGCAGACC GGCGTGCCCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGACAATC AGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACTACAGCGGC TGGGCCTTTGGCCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCCGCCCCCTCC GTGTTCATCTTCCCCCCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTG TGCCTGCTGAATAACTTCTACCCCAGAGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAAC GCCCTGCAGTCCGGGAACTCCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACAGC ACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAAGCCGACTACGAGAAGCACAAG GTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGAGCTCCCCCGTCACCAAGAGCTTC AACAGGGGGGAGTGT
67	hLO3軽鎖可変領域アミノ酸配列	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNIYKNLAWYQQKLGEGPKLLIYDANTLQTG VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYSGWAFGQGTKVEIKRT
68	hLO3軽鎖可変領域ヌクレオチド配列	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTG ACCATCACATGCAAGGCCAGCCAGAACATCTACAAGAACCTGGCCTGGTATCAGCAG AAGCTGGGCGAGGGCCCCAAGCTGCTGATCTACGACGCCAACACCCTGCAGACCGGC GTGCCCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGACAATCAGC AGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACTACAGCGGCTGG GCCTTTGGCCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAAGCGTACG
69	hHO1重鎖全長アミノ酸配列	MKHLWFFLLLVAAPRWVLSEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRNFMHWVR QAPGQGLEWMGWIYPGDGETEYAQKFQGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYY CARGVYGGFAGGYFDFWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK

【表１－１１】

70	hH01重鎖全長ヌクレオチド配列	ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTGCTGAGC GAAGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCAGGCGCCAGCGTGAAG GTGTCCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTTACCCGGAACTTCATGCACTGGGTGCGC CAGGCTCCAGGCCAGGGACTGGAATGGATGGGCTGGATCTATCCCGGCGACGGCGAG ACAGAGTACGCCCAGAAATTCCAGGGCAGAGTGACCATCACCGCCGACACCAGCACC TCCACCGCCTACATGGAACTGAGCAGCCTGCGGAGCGAGGACACCGCCGTGTACTAT TGTGCCAGAGGCGTGTACGGCGGCTTCGCTGGCGGCTACTTCGATTTTTGGGGCCAG GGCACCCTCGTGACCGTCAGCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCAAGCGTCTTCCCCCTG GCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAG GACTACTTCCCCGAACCCGTGACCGTGAGCTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGC GTGCACACCTTCCCCGCTGTCCTGCAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTG GTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCAC AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACT CACACATGCCCACCCTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCCTCAGTCTTCCTC TTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGC GTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGAC GGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACG TACCGGGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAG TACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCC AAAGCCAAAGGCCAGCCCCGGGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAG GAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGC GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACC CCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGAC AAGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG CACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGCAAA
71	hH01重鎖可変領域アミノ酸配列	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRNFMHWVRQAPGQGLEWMGWIYPGDGE TEYAQKFQGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGVYGGFAGGYFDFWGQ GTLVTVSS
72	hH01重鎖可変領域ヌクレオチド配列	GAAGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCAGGCGCCAGCGTGAAG GTGTCCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTTACCCGGAACTTCATGCACTGGGTGCGC CAGGCTCCAGGCCAGGGACTGGAATGGATGGGCTGGATCTATCCCGGCGACGGCGAG ACAGAGTACGCCCAGAAATTCCAGGGCAGAGTGACCATCACCGCCGACACCAGCACC TCCACCGCCTACATGGAACTGAGCAGCCTGCGGAGCGAGGACACCGCCGTGTACTAT TGTGCCAGAGGCGTGTACGGCGGCTTCGCTGGCGGCTACTTCGATTTTTGGGGCCAG GGCACCCTCGTGACCGTCAGCTCA

【表１－１２】

73	hH02重鎖全長アミノ酸配列	MKHLWFFLLLVAAPRWVLSEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRNFMHWVR QAPGQGLEWMGWIYPGDGETEYNQKFQGRVTITADRSTSTAYMELSSLRSEDTAVYF CARGVYGGFAGGYFDFWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
74	hH02重鎖全長ヌクレオチド配列	ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTGCTGAGC GAAGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCAGGCGCCAGCGTGAAG GTGTCCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTTACCCGGAACTTCATGCACTGGGTGCGC CAGGCTCCAGGCCAGGGACTGGAATGGATGGGCTGGATCTATCCCGGCGACGGCGAG ACAGAGTACAACCAGAAATTCCAGGGCAGAGTGACCATCACCGCCGACAGAAGCACC AGCACCGCCTACATGGAACTGAGCAGCCTGCGGAGCGAGGATACCGCCGTGTACTTC TGTGCCAGAGGCGTGTACGGCGGCTTCGCTGGCGGCTACTTCGATTTTTGGGGCCAG GGCACCCTCGTGACCGTCAGCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCAAGCGTCTTCCCCCTG GCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAG GACTACTTCCCCGAACCCGTGACCGTGAGCTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGC GTGCACACCTTCCCCGCTGTCCTGCAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTG GTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCAC AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACT CACACATGCCCACCCTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCCTCAGTCTTCCTC TTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGC GTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGAC GGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACG TACCGGGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAG TACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCC AAAGCCAAAGGCCAGCCCCGGGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAG GAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGC GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACC CCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGAC AAGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG CACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGCAAA
75	hH02重鎖可変領域アミノ酸配列	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRNFMHWVRQAPGQGLEWMGWIYPGDGE TEYNQKFQGRVTITADRSTSTAYMELSSLRSEDTAVYFCARGVYGGFAGGYFDFWGQ GTLVTVSS

【表１－１３】

76	hH02重鎖可変領域ヌクレオチド配列	GAAGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCAGGCGCCAGCGTGAAG GTGTCCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTTACCCGGAACTTCATGCACTGGGTGCGC CAGGCTCCAGGCCAGGGACTGGAATGGATGGGCTGGATCTATCCCGGCGACGGCGAG ACAGAGTACAACCAGAAATTCCAGGGCAGAGTGACCATCACCGCCGACAGAAGCACC AGCACCGCCTACATGGAACTGAGCAGCCTGCGGAGCGAGGATACCGCCGTGTACTTC TGTGCCAGAGGCGTGTACGGCGGCTTCGCTGGCGGCTACTTCGATTTTTGGGGCCAG GGCACCCTCGTGACCGTCAGCTCA
77	hH04重鎖全長アミノ酸配列	MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRNFMHWIR QAPGQGLEWMGWIYPGDGETEYAQKFQGRVTLTADRSTSTAYMELSSLRSEDTAVYY CARGVYGGFAGGYFDFWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
78	hH04重鎖全長ヌクレオチド配列	ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTGCTGAGC CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCAGGCGCCAGCGTGAAG GTGTCCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTTACCCGGAACTTCATGCACTGGATCCGG CAGGCCCCTGGACAGGGCCTGGAATGGATGGGCTGGATCTATCCCGGCGACGGCGAG ACAGAGTACGCCCAGAAATTCCAGGGCAGAGTGACCCTGACCGCCGACAGAAGCACC AGCACCGCCTACATGGAACTGAGCAGCCTGCGGAGCGAGGACACCGCCGTGTACTAT TGTGCCAGAGGCGTGTACGGCGGCTTCGCTGGCGGCTACTTCGATTTTTGGGGCCAG GGCACCCTCGTGACCGTCAGCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCAAGCGTCTTCCCCCTG GCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAG GACTACTTCCCCGAACCCGTGACCGTGAGCTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGC GTGCACACCTTCCCCGCTGTCCTGCAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTG GTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCAC AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACT CACACATGCCCACCCTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCCTCAGTCTTCCTC TTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGC GTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGAC GGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACG TACCGGGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAG TACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCC AAAGCCAAAGGCCAGCCCCGGGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAG GAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGC GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACC CCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGAC AAGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG CACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGCAAA

【表１－１４】

79	hH04重鎖可変領域アミノ酸配列	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRNFMHWIRQAPGQGLEWMGWIYPGDGE TEYAQKFQGRVTLTADRSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGVYGGFAGGYFDFWGQ GTLVTVSS
80	hH04重鎖可変領域ヌクレオチド配列	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCAGGCGCCAGCGTGAAG GTGTCCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTTACCCGGAACTTCATGCACTGGATCCGG CAGGCCCCTGGACAGGGCCTGGAATGGATGGGCTGGATCTATCCCGGCGACGGCGAG ACAGAGTACGCCCAGAAATTCCAGGGCAGAGTGACCCTGACCGCCGACAGAAGCACC AGCACCGCCTACATGGAACTGAGCAGCCTGCGGAGCGAGGACACCGCCGTGTACTAT TGTGCCAGAGGCGTGTACGGCGGCTTCGCTGGCGGCTACTTCGATTTTTGGGGCCAG GGCACCCTCGTGACCGTCAGCTCA
81	NOV0712軽鎖全長アミノ酸配列	MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQ QKPGKAPKLLIYAVSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSGTF PPTTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC
82	NOV0712軽鎖全長ヌクレオチド配列	ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTCATCTCCCTGCTGCTGTGGATCTCCGGCGCGTAC GGCGACATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGA GTGACCATCACCTGTAGAGCCAGCCAGAGCATCAGCAGCTACCTGAACTGGTATCAG CAGAAGCCCGGCAAGGCCCCCAAACTGCTGATCTACGCCGTGTCCACACTGCAGAGC GGCGTGCCCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGACAATC AGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGTCAGCAGTCCGGCACCTTC CCCCCCACCACATTTGGCCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCCGCC CCCTCCGTGTTCATCTTCCCCCCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTCC GTGGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTACCCCAGAGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTG GACAACGCCCTGCAGTCCGGGAACTCCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAG GACAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAAGCCGACTACGAGAAG CACAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGAGCTCCCCCGTCACCAAG AGCTTCAACAGGGGGGAGTGT
83	NOV0712重鎖全長アミノ酸配列	MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHGMHWVR QAPGKGLEWVSVISGSGSNTGYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CARQWGSYAFDSWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK

【表１－１５】

84	NOV0712重鎖全長ヌクレオチド配列	ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTGCTGAGC CAGGTGCAGCTGCTGGAATCTGGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCTCTCTGAGA CTGTCTTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCCACGGAATGCACTGGGTGCGC CAGGCCCCTGGAAAGGGACTGGAATGGGTGTCCGTGATCAGCGGCAGCGGCTCCAAT ACCGGCTACGCCGATAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAG AACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTAT TGTGCCAGACAGTGGGGCAGCTACGCCTTCGATTCTTGGGGCCAGGGCACCCTCGTG ACCGTCAGCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCAAGCGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCC AAGAGCACCTCTGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCC GAACCCGTGACCGTGAGCTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTC CCCGCTGTCCTGCAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCC TCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAAC ACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCA CCCTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCCTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAA CCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGAC GTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG CATAATGCCAAGACAAAGCCCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTC AGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAG GTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGC CAGCCCCGGGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAG AACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTG GAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCTCCCGTGCTG GACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG CAGCAGGGCAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTAC ACCCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGCAAA

【０１０７】

本発明の抗体としては、さらに、ＣＤＨ６に結合する、ヒト抗体を挙げることができる。抗ＣＤＨ６ヒト抗体とは、ヒト染色体由来の抗体の遺伝子配列のみを有するヒト抗体を意味する。抗ＣＤＨ６ヒト抗体は、ヒト抗体の重鎖と軽鎖の遺伝子を含むヒト染色体断片を有するヒト抗体産生マウスを用いた方法（Ｔｏｍｉｚｕｋａ，Ｋ．ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　Ｇｅｎｅｔｉｃｓ（１９９７）１６，ｐ．１３３－１４３，；Ｋｕｒｏｉｗａ，Ｙ．ｅｔ．ａｌ．，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．（１９９８）２６，ｐ．３４４７－３４４８；Ｙｏｓｈｉｄａ，Ｈ．ｅｔ．ａｌ．，Ａｎｉｍａｌ　Ｃｅｌｌ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ：Ｂａｓｉｃ　ａｎｄ　Ａｐｐｌｉｅｄ　Ａｓｐｅｃｔｓ　ｖｏｌ．１０，ｐ．６９－７３（Ｋｉｔａｇａｗａ，Ｙ．，Ｍａｔｓｕｄａ，Ｔ．ａｎｄ　Ｉｉｊｉｍａ，Ｓ．ｅｄｓ．），Ｋｌｕｗｅｒ　Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ，１９９９．；Ｔｏｍｉｚｕｋａ，Ｋ．ｅｔ．ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ（２０００）９７，ｐ．７２２－７２７等を参照。）によって取得することができる。

【０１０８】

このようなヒト抗体産生マウスは、具体的には、内在性免疫グロブリン重鎖及び軽鎖の遺伝子座が破壊され、代わりに酵母人工染色体（Ｙｅａｓｔ　ａｒｔｉｆｉｃｉａｌ　ｃｈｒｏｍｏｓｏｍｅ，ＹＡＣ）ベクター等を介してヒト免疫グロブリン重鎖及び軽鎖の遺伝子座が導入された遺伝子組み換え動物として、ノックアウト動物及びトランスジェニック動物の作製及びこれらの動物同士を掛け合わせることによって作り出すことができる。

【０１０９】

また、遺伝子組換え技術によって、そのようなヒト抗体の重鎖及び軽鎖の各々をコードするｃＤＮＡ、好ましくは該ｃＤＮＡを含むベクターによって真核細胞を形質転換し、遺伝子組換えヒトモノクローナル抗体を産生する形質転換細胞を培養することによって、こ

の抗体を培養上清中から得ることもできる。

【０１１０】

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

【０１１１】

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

【０１１２】

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

【０１１３】

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

【０１１４】

抗原に結合するｓｃＦｖのＤＮＡ配列が明らかになれば、当該配列を有する発現ベクターを作製し、適当な宿主に導入して発現させることによってヒト抗体を取得することができる（国際公開第９２／０１０４７号、同９２／２０７９１号、同９３／０６２１３号、同９３／１１２３６号、同９３／１９１７２号、同９５／０１４３８号、同９５／１５３８８号、Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ（１９９４）１２，ｐ．４３３―４５５、Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（２００５）２３（９），ｐ．１１０５―１１１６）。

【０１１５】

新たに作製されたヒト抗体が、本明細書に記載のラット抗ヒトＣＤＨ６抗体、キメラ抗ヒトＣＤＨ６抗体又はヒト化抗ヒトＣＤＨ６抗体（例えば、ｒＧ０１９抗体、ｒＧ０５５抗体、ｒＧ０５６抗体、ｒＧ０６１抗体、ｃｈＧ０１９抗体、Ｈ０１Ｌ０２抗体、Ｈ０２Ｌ０２抗体、Ｈ０２Ｌ０３抗体又はＨ０４Ｌ０２抗体）のいずれか１つが結合する部分ペプチド又は部分立体構造に結合すれば、該ヒト抗体が当該ラット抗ヒトＣＤＨ６抗体、キメラ抗ヒトＣＤＨ６抗体又はヒト化抗ヒトＣＤＨ６抗体と同一のエピトープに結合すると判定することができる。あるいは、本明細書に記載のラット抗ヒトＣＤＨ６抗体、キメラ抗ヒトＣＤＨ６抗体又はヒト化抗ヒトＣＤＨ６抗体（例えば、ｒＧ０１９抗体、ｒＧ０５５抗体、ｒＧ０５６抗体、ｒＧ０６１抗体、ｃｈＧ０１９抗体、Ｈ０１Ｌ０２抗体、Ｈ０２Ｌ０２抗体、Ｈ０２Ｌ０３抗体又はＨ０４Ｌ０２抗体）のＣＤＨ６に対する結合に対して該ヒト抗体が競合する（例えば、該ヒト抗体が、ｒＧ０１９抗体、ｒＧ０５５抗体、ｒＧ０５６抗体、ｒＧ０６１抗体、ｃｈＧ０１９抗体、Ｈ０１Ｌ０２抗体、Ｈ０２Ｌ０２抗体、Ｈ０２Ｌ０３抗体又はＨ０４Ｌ０２抗体とＣＤＨ６、好ましくは、ＣＤＨ６のＥＣ３への結合を妨げる）ことを確認することによって、具体的なエピトープの配列又は構造が決定されていなくても、該ヒト抗体が本明細書に記載のラット抗ヒトＣＤＨ６抗体、キメラ抗ヒトＣＤＨ６抗体又はヒト化抗ヒトＣＤＨ６抗体と同一のエピトープに結合すると判定することができる。本明細書において、当該判定方法の少なくともいずれか一方の方法により「同一のエピトープに結合する」と判定された場合、新たに作製されたヒト抗体が、本明細書に記載のラット抗ヒトＣＤＨ６抗体、キメラ抗ヒトＣＤＨ６抗体又はヒト化抗ヒトＣＤＨ６抗体と「同一のエピトープに結合する」といえる。エピトープが同一である

ことが確認された場合、該ヒト抗体がラット抗ヒトＣＤＨ６抗体、キメラ抗ヒトＣＤＨ６抗体又はヒト化抗ヒトＣＤＨ６抗体（例えば、ｒＧ０１９抗体、ｒＧ０５５抗体、ｒＧ０５６抗体、ｒＧ０６１抗体、ｃｈＧ０１９抗体、Ｈ０１Ｌ０２抗体、Ｈ０２Ｌ０２抗体、Ｈ０２Ｌ０３抗体又はＨ０４Ｌ０２抗体）と同等の生物活性を有していることが期待される。

【０１１６】

以上の方法によって得られたキメラ抗体、ヒト化抗体、又はヒト抗体は、公知の方法等によって抗原に対する結合性を評価し、好適な抗体を選抜することができる。

【０１１７】

抗体の性質を比較する際の別の指標の一例としては、抗体の安定性を挙げることができる。示差走査カロリメトリー（ＤＳＣ）は、蛋白の相対的構造安定性のよい指標となる熱変性中点（Ｔｍ）を素早く、また正確に測定することができる装置である。ＤＳＣを用いてＴｍ値を測定し、その値を比較することによって、熱安定性の違いを比較することができる。抗体の保存安定性は、抗体の熱安定性とある程度の相関を示すことが知られており（Ｌｏｒｉ Ｂｕｒｔｏｎ，ｅｔ．ａｌ．，Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ ａｎｄ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（２００７）１２，ｐ．２６５―２７３）、熱安定性を指標に、好適な抗体を選抜することができる。抗体を選抜するための他の指標としては、適切な宿主細胞における収量が高いこと、及び水溶液中での凝集性が低いことを挙げることができる。例えば収量の最も高い抗体が最も高い熱安定性を示すとは限らないので、以上に述べた指標に基づいて総合的に判断して、ヒトへの投与に最も適した抗体を選抜する必要がある。

【０１１８】

本発明の抗体には抗体の修飾体も含まれる。当該修飾体とは、本発明の抗体に化学的又は生物学的な修飾が施されてなるものを意味する。化学的な修飾体には、アミノ酸骨格への化学部分の結合、Ｎ―結合又はＯ―結合炭水化物鎖の化学修飾体等が含まれる。生物学的な修飾体には、翻訳後修飾（例えば、Ｎ―結合又はＯ―結合への糖鎖付加、Ｎ末又はＣ末のプロセッシング、脱アミド化、アスパラギン酸の異性化、メチオニンの酸化、又はＮ末グルタミンもしくはＮ末グルタミン酸のピログルタミン酸化）されたもの、原核生物宿主細胞を用いて発現させることによってＮ末にメチオニン残基が付加したもの等が含まれる。また、本発明の抗体又は抗原の検出又は単離を可能にするために標識されたもの、例えば、酵素標識体、蛍光標識体、アフィニティ標識体もかかる修飾物の意味に含まれる。このような本発明の抗体の修飾物は、抗体の安定性及び血中滞留性の改善、抗原性の低減、抗体又は抗原の検出又は単離等に有用である。

【０１１９】

また、本発明の抗体に結合している糖鎖修飾を調節すること（グリコシル化、脱フコース化等）によって、抗体依存性細胞傷害活性を増強することが可能である。抗体の糖鎖修飾の調節技術としては、国際公開第１９９９／５４３４２号、同２０００／６１７３９号、同２００２／３１１４０号等が知られているが、これらに限定されるものではない。本発明の抗体には当該糖鎖修飾を調節された抗体も含まれる。

【０１２０】

抗体遺伝子を一旦単離した後、適当な宿主に導入して抗体を作製する場合には、適当な宿主と発現ベクターの組み合わせを使用することができる。抗体遺伝子の具体例としては、本明細書に記載された抗体の重鎖配列をコードする遺伝子、及び軽鎖配列をコードする遺伝子を組み合わせたものを挙げることができる。宿主細胞を形質転換する際には、重鎖配列遺伝子と軽鎖配列遺伝子は、同一の発現ベクターに挿入されていることが可能であり、又別々の発現ベクターに挿入されていることも可能である。

【０１２１】

真核細胞を宿主として使用する場合、動物細胞、植物細胞、真核微生物を用いることができる。特に動物細胞としては、哺乳類細胞、例えば、サルの細胞であるＣＯＳ細胞（Ｇｌｕｚｍａｎ，Ｙ．Ｃｅｌｌ（１９８１）２３，ｐ．１７５―１８２、ＡＴＣＣ ＣＲＬ

―１６５０）、マウス線維芽細胞ＮＩＨ３Ｔ３（ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ―１６５８）やチャイニーズ・ハムスター卵巣細胞（ＣＨＯ細胞、ＡＴＣＣ　ＣＣＬ―６１）のジヒドロ葉酸還元酵素欠損株（Ｕｒｌａｕｂ，Ｇ．ａｎｄ　Ｃｈａｓｉｎ，Ｌ．Ａ．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．（１９８０）７７，ｐ．４１２６―４２２０）、ＦｒｅｅＳｔｙｌｅ　２９３Ｆ細胞（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）を挙げることができる。

【０１２２】

原核細胞を使用する場合は、例えば、大腸菌、枯草菌を挙げることができる。

【０１２３】

これらの細胞に目的とする抗体遺伝子を形質転換によって導入し、形質転換された細胞をｉｎ　ｖｉｔｒｏで培養することによって抗体が得られる。当該培養においては抗体の配列によって収量が異なる場合があり、同等な結合活性を持つ抗体の中から収量を指標に医薬としての生産が容易なものを選別することが可能である。よって、本発明の抗体には、上記形質転換された宿主細胞を培養する工程、及び当該工程で得られた培養物から目的の抗体又は当該抗体の機能性断片を採取する工程を含むことを特徴とする当該抗体の製造方法によって得られる抗体も含まれる。

【０１２４】

なお、哺乳類培養細胞で生産される抗体の重鎖のカルボキシル末端のリシン残基が欠失することが知られており（Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒａｐｈｙ　Ａ，７０５：１２９―１３４（１９９５））、また、同じく重鎖カルボキシル末端のグリシン、リシンの２アミノ酸残基が欠失し、新たにカルボキシル末端に位置するプロリン残基がアミド化されることが知られている（Ａｎａｌｙｔｉｃａｌ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，３６０：７５―８３（２００７））。しかし、これらの重鎖配列の欠失及び修飾は、抗体の抗原結合能及びエフェクター機能（補体の活性化や抗体依存性細胞傷害作用等）には影響を及ぼさない。従って、本発明に係る抗体には、当該修飾を受けた抗体及び当該抗体の機能性断片も含まれ、重鎖カルボキシル末端において１又は２つのアミノ酸が欠失した欠失体、及びアミド化された当該欠失体（例えば、カルボキシル末端部位のプロリン残基がアミド化された重鎖）等も包含される。但し、抗原結合能及びエフェクター機能が保たれている限り、本発明に係る抗体の重鎖のカルボキシル末端の欠失体は上記の種類に限定されない。本発明に係る抗体を構成する２本の重鎖は、完全長及び上記の欠失体からなる群から選択される重鎖のいずれか一種であってもよいし、いずれか二種を組み合わせたものであってもよい。各欠失体の量比は本発明に係る抗体を産生する哺乳類培養細胞の種類及び培養条件に影響を受け得るが、本発明に係る抗体の主成分としては２本の重鎖の双方でカルボキシル末端の１つのアミノ酸残基が欠失している場合を挙げることができる。

【０１２５】

本発明の抗体のアイソタイプとしては、例えばＩｇＧ（ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４）等を挙げることができるが、好ましくはＩｇＧ１又はＩｇＧ４を挙げることができる。

【０１２６】

抗体の生物活性としては、一般的には抗原結合活性、抗原と結合することによって該抗原を発現する細胞に内在化する活性、抗原の活性を中和する活性、抗原の活性を増強する活性、抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）活性、補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）活性及び抗体依存性細胞媒介食作用（ＡＤＣＰ）を挙げることができるが、本発明に係る抗体が有する機能は、ＣＤＨ６に対する結合活性であり、好ましくはＣＤＨ６と結合することによってＣＤＨ６発現細胞に内在化する活性である。さらに、本発明の抗体は、細胞内在化活性に加えて、ＡＤＣＣ活性、ＣＤＣ活性及び／又はＡＤＣＰ活性を併せ持っていても良い。

【０１２７】

得られた抗体は、均一にまで精製することができる。抗体の分離、精製は通常のタンパク質で使用されている分離、精製方法を使用すればよい。例えばカラムクロマトグラフィー、フィルター濾過、限外濾過、塩析、透析、調製用ポリアクリルアミドゲル電気泳動、

等電点電気泳動等を適宜選択、組み合わせれば、抗体を分離、精製することができる（Ｓｔｒａｔｅｇｉｅｓ ｆｏｒ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ ａｎｄ Ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｚａｔｉｏｎ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｃｏｕｒｓｅ Ｍａｎｕａｌ，Ｄａｎｉｅｌ Ｒ．Ｍａｒｓｈａｋ ｅｔ ａｌ．ｅｄｓ．，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ（１９９６）；Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ．Ｅｄ Ｈａｒｌｏｗ ａｎｄ Ｄａｖｉｄ Ｌａｎｅ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ（１９８８））が、これらに限定されるものではない。

【０１２８】

クロマトグラフィーとしては、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等を挙げることができる。

【０１２９】

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

【０１３０】

アフィニティークロマトグラフィーに用いるカラムとしては、プロテインＡカラム、プロテインＧカラムを挙げることができる。例えばプロテインＡカラムを用いたカラムとして、Ｈｙｐｅｒ Ｄ，ＰＯＲＯＳ，Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ Ｆ．Ｆ．（ファルマシア）等を挙げることができる。

【０１３１】

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

【０１３２】

３．抗ＣＤＨ６抗体―薬物コンジュゲート

（１）薬物

上記「２．抗ＣＤＨ６抗体の製造」にて取得された抗ＣＤＨ６抗体はリンカー構造部分を介して薬物を結合させることによって、抗ＣＤＨ６抗体―薬物コンジュゲートとすることができる。薬物としては、リンカー構造に結合できる置換基、部分構造を有するものであれば特に制限はない。抗ＣＤＨ６抗体―薬物コンジュゲートは結合する薬物に応じて種々の用途に用いることができる。そのような薬物の例としては、抗腫瘍活性を有する物質、血液疾患に対する効果を有する物質、自己免疫疾患に対する効果を有する物質、抗炎症物質、抗菌物質、抗真菌物質、抗寄生虫物質、抗ウイルス物質、抗麻酔物質等を挙げることができる。

【０１３３】

（１）―１　抗腫瘍化合物

本発明の抗ＣＤＨ６抗体―薬物コンジュゲートに結合される化合物として抗腫瘍性化合物を用いる例について以下に述べる。抗腫瘍性化合物としては、抗腫瘍効果を有する化合物であって、リンカー構造に結合できる置換基、部分構造を有するものであれば特に制限はない。抗腫瘍性化合物は、リンカーの一部又は全部が腫瘍細胞内で切断されて抗腫瘍性化合物部分が遊離されて抗腫瘍効果が発現される。リンカーが薬物との結合部分で切断されれば抗腫瘍性化合物が本来の構造で遊離され、その本来の抗腫瘍効果が発揮される。

【０１３４】

上記「２．抗ＣＤＨ６抗体の製造」にて取得された抗ＣＤＨ６抗体はリンカー構造部分を介して抗腫瘍性化合物を結合させることによって、抗ＣＤＨ６抗体―薬物コンジュゲートとすることができる。

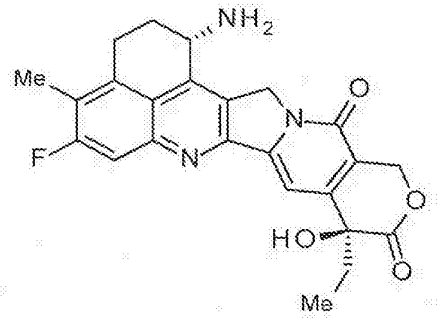
【０１３５】

本発明で使用される抗腫瘍性化合物の一つの例として、カンプトテシン誘導体であるエキサテカン（（１Ｓ，９Ｓ）－１－アミノ－９－エチル－５－フルオロ－２，３－ジヒドロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：

６，７］インドリジノ［１，２―ｂ］キノリン―１０，１３（９Ｈ，１５Ｈ）―ジオン；次式：）

【０１３６】

【化５】



【０１３７】

を好適に使用することができる。同化合物は、例えば、米国特許公開公報ＵＳ２０１６／０２９７８９０号に記載の方法やその他の公知の方法で容易に取得でき、１位のアミノ基をリンカー構造への結合部位として好適に使用することができる。また、エキサテカンはリンカーの一部が結合した状態で腫瘍細胞内で遊離される場合もあるが、この様な状態でも優れた抗腫瘍効果が発揮される化合物である。

【０１３８】

エキサテカンはカンプトテシン構造を有するので、酸性水性媒体中（例えばｐＨ３程度）ではラクトン環が形成された構造（閉環体）に平衡が偏り、一方、塩基性水性媒体中（例えばｐＨ１０程度）ではラクトン環が開環した構造（開環体）に平衡が偏ることが知られている。このような閉環構造及び開環構造に対応するエキサテカン残基を導入した薬物コンジュゲートであっても同等の抗腫瘍効果が期待され、いずれのものも本発明の範囲に包含されることはいうまでもない。

【０１３９】

他の抗腫瘍性化合物として例えば、文献（Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｒｅｖｉｅｗｓ，　６８，ｐ３―１９，２０１６）記載の抗腫瘍化合物を挙げることができ、その一例として、ドキソルビシン（Ｄｏｘｏｒｕｂｉｃｉｎ）、カルケマイシン（Ｃａｌｉｃｈｅａｍｉｃｉｎｅ）、ドラスタチン（Ｄｏｒａｓｔａｔｉｎ）１０、モノメチルアウリスタチンＥ（ＭＭＡＥ）、モノメチルアウリスタチンＦ（ＭＭＡＦ）等のアウリスタチン類（Ａｕｒｉｓｔａｔｉｎｓ）、ＤＭ１、ＤＭ４等のメイタンシノイド類（Ｍａｙｔａｎｓｉｎｏｉｄｓ）、ピロロベンゾジアゼピン（Ｐｙｒｒｏｌｏｂｅｎｚｏｄｉａｚｅｐｉｎｅ）二量体のＳＧ２０００（ＳＪＧ―１３６）、カンプトテシンの誘導体であるＳＮ―３８、ＣＣ―１０６５等のデュオカルマイシン類（Ｄｕｏｃａｒｍｙｃｉｎｓ）、アマニチン（Ａｍａｎｉｔｉｎ）、ダウノルビシン、マイトマイシンＣ、ブレオマイシン、シクロシチジン、ビンクリスチン、ビンブラスチン、メトトレキセート、白金系抗腫瘍剤（シスプラチン若しくはその誘導体）、タキソール若しくはその誘導体等を挙げることができる。

【０１４０】

抗体―薬物コンジュゲートにおいて、抗体１分子への薬物の結合数は、その有効性、安全性に影響する重要因子である。抗体―薬物コンジュゲートの製造は、薬物の結合数が一定の数となるよう、反応させる原料・試薬の使用量等の反応条件を規定して実施されるが、低分子化合物の化学反応とは異なり、異なる数の薬物が結合した混合物として得られるのが通常である。抗体１分子への薬物の結合数は平均値、すなわち、平均薬物結合数として特定され、表記される。本発明でも原則として断りのない限り、すなわち、異なる薬物結合数をもつ抗体―薬物コンジュゲート混合物に含まれる特定の薬物結合数をもつ抗体―薬物コンジュゲートを示す場合を除き、薬物の結合数は平均値を意味する。抗体分子への

エキサテカンの結合数はコントロール可能であり、１抗体あたりの薬物平均結合数として、１～１０個程度のエキサテカンを結合させることができるが、好ましくは２～８個、３～８個、４～８個、５～８個、６～８個、７～８個であり、より好ましくは５～８個であり、更に好ましくは７～８個であり、更により好ましくは８個である。なお、当業者であれば本願の実施例の記載から抗体に必要な数の薬物を結合させる反応を設計することができ、エキサテカンの結合数をコントロールした抗体―薬物コンジュゲートを取得することができる。

【０１４１】

（２）リンカー構造

本発明の抗ＣＤＨ６抗体―薬物コンジュゲートにおいて薬物を抗ＣＤＨ６抗体に結合させるリンカー構造について述べる。

【０１４２】

本願の抗体―薬物コンジュゲートにおいて、抗ＣＤＨ６抗体と薬物とを結合するリンカー構造は、抗体―薬物コンジュゲートとして用いることができる限りにおいて特に制限されず、使用目的に応じて適宜選択して用いることもできる。リンカー構造の一例としては、公知文献（Ｐｈａｒｍａｃｏｌ　Ｒｅｖ　６８：３-１９，　Ｊａｎｕａｒｙ　２０１６、Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｃｅｌｌ　ＤＯＩ　１０．１００７／ｓ１３２３８―０１６―０３２３―０等）に記載のリンカーを挙げることができ、更に具体的な例としては、ＶＣ（バリン―シトルリン：ｖａｌｉｎｅ―ｃｉｔｒｕｌｌｉｎｅ）、ＭＣ（マレインアミドカプロイル：ｍａｌｅｉｍｉｄｏｃａｐｒｏｙｌ）、ＳＭＣＣ（スクシニミジル　４―（Ｎ―マレイミドメチル）シクロヘキサン―１―カルボキシレート：ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄｙｌ　４―（Ｎ―ｍａｌｅｉｍｉｄｏｍｅｔｈｙｌ）　ｃｙｃｌｏｈｅｘａｎｅ―１―ｃａｒｂｏｘｙｌａｔｅ）、ＳＰＰ（Ｎ―スクシニミジル　４―（２―ピリジルジチオ）ペンタン酸：Ｎ―ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄｙｌ　４―（２―ｐｙｒｉｄｙｌｄｉｔｈｉｏ）ｐｅｎｔａｎｏａｔｅ、ＳＳ（ジスルフィド：ｄｉｓｕｌｆｉｄｅ）、ＳＰＤＢ（Ｎ―スクシミジル　４―（２―ピリジルジチオ）ブチラート）Ｎ―ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄｙｌ　４―（２―ｐｙｒｉｄｙｌｄｉｔｈｉｏ）ｂｕｔｙｒａｔｅ、ＳＳ／ヒドラゾン、ヒドラゾン、カルボネートを挙げることができる。

【０１４３】

他の一例としては、例えば、米国特許公開公報ＵＳ２０１６／０２９７８９０に記載のリンカー構造（一例として、段落［０２６０］～［０２８９］に記載のもの）を挙げることができ、以下の構造のものを好適に使用することができる。なお以下に示す構造の左端が抗体との結合部位であり、右端が薬物との結合部位である。また、下記のリンカー構造中のＧＧＦＧは、グリシン―グリシン―フェニルアラニン―グリシン（ＧＧＦＧ）からなるペプチド結合でつながっているアミノ酸配列を示す。

―（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ―３―ｙｌ―Ｎ）―CH_2CH_2―Ｃ（＝Ｏ）―ＧＧＦＧ―ＮＨ―$CH_2CH_2CH_2$―Ｃ（＝Ｏ）―、

―（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ―３―ｙｌ―Ｎ）―$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$―Ｃ（＝Ｏ）―ＧＧＦＧ―ＮＨ―$CH_2CH_2CH_2$―Ｃ（＝Ｏ）―、

―（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ―３―ｙｌ―Ｎ）―$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$―Ｃ（＝Ｏ）―ＧＧＦＧ―ＮＨ―CH_2―Ｏ―CH_2―Ｃ（＝Ｏ）―、

―（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ―３―ｙｌ―Ｎ）―$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$―Ｃ（＝Ｏ）―ＧＧＦＧ―ＮＨ―CH_2CH_2―Ｏ―CH_2―Ｃ（＝Ｏ）―、

―（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ―３―ｙｌ―Ｎ）―CH_2CH_2―Ｃ（＝Ｏ）―ＮＨ―CH_2CH_2O―CH_2CH_2O―CH_2CH_2―Ｃ（＝Ｏ）―ＧＧＦＧ―ＮＨ―$CH_2CH_2CH_2$―Ｃ（＝Ｏ）―、

―（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ―３―ｙｌ―Ｎ）―CH_2CH_2―Ｃ（＝Ｏ）―ＮＨ―CH_2CH_2O―CH_2CH_2O―CH_2CH_2O―CH_2CH_2O―CH_2CH_2―Ｃ（＝Ｏ）―ＧＧＦＧ―ＮＨ―$CH_2CH_2CH_2$―Ｃ（＝Ｏ）―。

【０１４４】

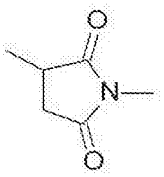
より好ましくは、次のものを挙げることができる。
―（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ―３―ｙｌ―Ｎ）―ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―ＧＧＦＧ―ＮＨ―ＣＨ２―Ｏ―ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―、
―（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ―３―ｙｌ―Ｎ）―ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―ＧＧＦＧ―ＮＨ―ＣＨ２ＣＨ２―Ｏ―ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―、
―（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ―３―ｙｌ―Ｎ）―ＣＨ２ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―ＮＨ―ＣＨ２ＣＨ２Ｏ―ＣＨ２ＣＨ２Ｏ―ＣＨ２ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―ＧＧＦＧ―ＮＨ―ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―。
さらにより好ましくは、
―（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ―３―ｙｌ―Ｎ）―ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―ＧＧＦＧ―ＮＨ―ＣＨ２―Ｏ―ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―、
―（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ―３―ｙｌ―Ｎ）―ＣＨ２ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―ＮＨ―ＣＨ２ＣＨ２Ｏ―ＣＨ２ＣＨ２Ｏ―ＣＨ２ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―ＧＧＦＧ―ＮＨ―ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―。
を挙げることができる。

【０１４５】

抗体は―（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ―３―ｙｌ―Ｎ）の末端、（例えば、『―（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ―３―ｙｌ―Ｎ）―ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―ＧＧＦＧ―ＮＨ―ＣＨ２―Ｏ―ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―』においては、（―ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２―）が結合するのとは反対側の末端（左末端））で結合し、抗腫瘍性化合物は―（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ―３―ｙｌ―Ｎ）とは反対側の末端（上記例では右末端の、ＣＨ２―Ｏ―ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―のカルボニル基で結合する。『―（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ―３―ｙｌ―Ｎ）―』は、次式：

【０１４６】

【化６】



【０１４７】

で示される構造を有する。この部分構造における３位が抗ＣＤＨ６抗体への結合部位である。この３位での該抗体との結合は、チオエーテルを形成して結合することが特徴である。この構造部分の１位の窒素原子は、この構造が含まれるリンカー内に存在するメチレンの炭素原子と結合する。

【０１４８】

薬物をエキサテカンとする本発明の抗体―薬物コンジュゲートにおいては、下記の構造の薬物―リンカー構造部分を抗体に結合させたものが好ましい。これらの薬物―リンカー構造部分は、１抗体あたりの平均結合数として、１から１０を結合させればよいが、好ましくは２から８であり、より好ましくは５から８であり、更に好ましくは７から８であり、更により好ましくは８である。
―（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ―３―ｙｌ―Ｎ）―ＣＨ２ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―ＧＧＦＧ―ＮＨ―ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―（ＮＨ―ＤＸ）、
―（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ―３―ｙｌ―Ｎ）―ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―ＧＧＦＧ―ＮＨ―ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―（ＮＨ―ＤＸ）、
―（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ―３―ｙｌ―Ｎ）―ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―ＧＧＦＧ―ＮＨ―ＣＨ２―Ｏ―ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―（ＮＨ―ＤＸ）、
―（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ―３―ｙｌ―Ｎ）―ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―ＧＧＦＧ―ＮＨ―ＣＨ２ＣＨ２―Ｏ―ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―（ＮＨ―ＤＸ）、

―（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ―３―ｙｌ―Ｎ）―ＣＨ２ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―ＮＨ―ＣＨ２ＣＨ２Ｏ―ＣＨ２ＣＨ２Ｏ―ＣＨ２ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―ＧＧＦＧ―ＮＨ―ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―（ＮＨ―ＤＸ）、
―（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ―３―ｙｌ―Ｎ）―ＣＨ２ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―ＮＨ―ＣＨ２ＣＨ２Ｏ―ＣＨ２ＣＨ２Ｏ―ＣＨ２ＣＨ２Ｏ―ＣＨ２ＣＨ２Ｏ―ＣＨ２ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―ＧＧＦＧ―ＮＨ―ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―（ＮＨ―ＤＸ）。

【０１４９】

より、好ましくは、次のものである。

―（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ―３―ｙｌ―Ｎ）―ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―ＧＧＦＧ―ＮＨ―ＣＨ２―Ｏ―ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―（ＮＨ―ＤＸ）、
―（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ―３―ｙｌ―Ｎ）―ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―ＧＧＦＧ―ＮＨ―ＣＨ２ＣＨ２―Ｏ―ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―（ＮＨ―ＤＸ）、
―（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ―３―ｙｌ―Ｎ）―ＣＨ２ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―ＮＨ―ＣＨ２ＣＨ２Ｏ―ＣＨ２ＣＨ２Ｏ―ＣＨ２ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―ＧＧＦＧ―ＮＨ―ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―（ＮＨ―ＤＸ）。

【０１５０】

さらに、より好ましくは、次のものを挙げることができる。

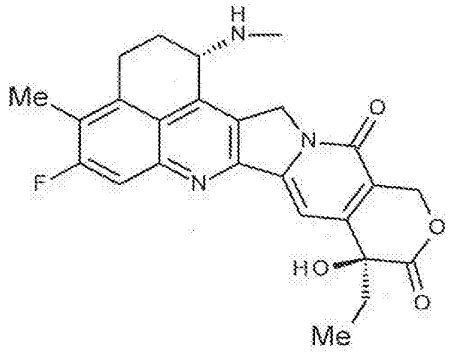
―（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ―３―ｙｌ―Ｎ）―ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―ＧＧＦＧ―ＮＨ―ＣＨ２―Ｏ―ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―（ＮＨ―ＤＸ）
―（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ―３―ｙｌ―Ｎ）―ＣＨ２ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―ＮＨ―ＣＨ２ＣＨ２Ｏ―ＣＨ２ＣＨ２Ｏ―ＣＨ２ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―ＧＧＦＧ―ＮＨ―ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―（ＮＨ―ＤＸ）。

【０１５１】

また、―（ＮＨ―ＤＸ）は次式：

【０１５２】

【化７】



【０１５３】

で示される構造であり、エキサテカンの１位のアミノ基の水素原子１個が除かれて生成する基を示す。

【０１５４】

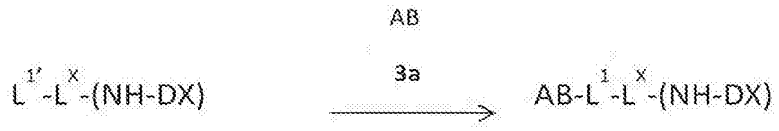
（３）抗体―薬物コンジュゲートの製造方法

本発明の抗体ー薬物コンジュゲートに用いることができる抗体は、上記「２．抗ＣＤＨ６抗体の製造」の項及び実施例に記載の内在化活性を有する抗ＣＤＨ６抗体及び該抗体の機能性断片であれば特に制限がない。

【０１５５】

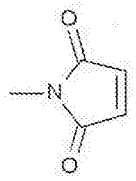
次に、本発明の抗体―薬物コンジュゲートの代表的な製造方法について説明する。なお、以下において、化合物を示すために、各反応式中に示される化合物の番号を用いる。すなわち、『式（１）の化合物』、『化合物（１）』等と称する。また、これ以外の番号の

化合物についても同様に記載する。
【０１５６】
（３）―１　製造方法１
下記式（１）で示される抗体―薬物コンジュゲートのうち、チオエーテルを介して抗ＣＤＨ６抗体とリンカー構造が結合しているものは抗ＣＤＨ６抗体を還元してジスルフィド結合をスルヒドリル基に変換した抗体に対して、既知の方法によって入手しうる化合物（２）（例えば、ＵＳ２０１６／２９７８９０号公開特許公報に記載の方法（例えば段落［０３３６］～［０３７４］に記載の方法）で入手可能）を反応させることによって製造することができる。例えば下記の方法によって製造することができる。
【０１５７】
【数１】



（２）　　（１）

【０１５８】
［式中、ＡＢは、スルフヒドリル基を有する抗体を示す。
ここで、Ｌ１は、
―（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ―３―ｙｌ―Ｎ）―の構造で示される。
Ｌ１’は次式で示される、マレイミジル基を示す。］
【０１５９】
【化８】



【０１６０】
―Ｌ１―ＬＸは、以下の式で示されるいずれかの構造を有する。
―（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ―３―ｙｌ―Ｎ）―ＣＨ２ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―ＧＧＦＧ―ＮＨ―ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―、
―（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ―３―ｙｌ―Ｎ）―ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―ＧＧＦＧ―ＮＨ―ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―、
―（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ―３―ｙｌ―Ｎ）―ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―ＧＧＦＧ―ＮＨ―ＣＨ２―Ｏ―ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―、
―（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ―３―ｙｌ―Ｎ）―ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―ＧＧＦＧ―ＮＨ―ＣＨ２ＣＨ２―Ｏ―ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―、
―（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ―３―ｙｌ―Ｎ）―ＣＨ２ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―ＮＨ―ＣＨ２ＣＨ２Ｏ―ＣＨ２ＣＨ２Ｏ―ＣＨ２ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―ＧＧＦＧ―ＮＨ―ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―、
―（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ―３―ｙｌ―Ｎ）―ＣＨ２ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―ＮＨ―ＣＨ２ＣＨ２Ｏ―ＣＨ２ＣＨ２Ｏ―ＣＨ２ＣＨ２Ｏ―ＣＨ２ＣＨ２Ｏ―ＣＨ２ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―ＧＧＦＧ―ＮＨ―ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―。
【０１６１】
これらのうちでより好ましくは、次のものである。
―（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ―３―ｙｌ―Ｎ）―ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―ＧＧＦＧ―ＮＨ―ＣＨ２―Ｏ―ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―、

―（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ―３―ｙｌ―Ｎ）―ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$―Ｃ（＝Ｏ）―ＧＧＦＧ―ＮＨ―ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$―Ｏ―ＣＨ$_2$―Ｃ（＝Ｏ）―、
―（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ―３―ｙｌ―Ｎ）―ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$―Ｃ（＝Ｏ）―ＮＨ―ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｏ―ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｏ―ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$―Ｃ（＝Ｏ）―ＧＧＦＧ―ＮＨ―ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$―Ｃ（＝Ｏ）―。

【０１６２】

さらに、好ましくは、次のものを挙げることができる。
―（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ―３―ｙｌ―Ｎ）―ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$―Ｃ（＝Ｏ）―ＧＧＦＧ―ＮＨ―ＣＨ$_2$―Ｏ―ＣＨ$_2$―Ｃ（＝Ｏ）―、
―（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ―３―ｙｌ―Ｎ）―ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$―Ｃ（＝Ｏ）―ＮＨ―ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｏ―ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｏ―ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$―Ｃ（＝Ｏ）―ＧＧＦＧ―ＮＨ―ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$―Ｃ（＝Ｏ）―。

【０１６３】

また、上記の反応式において抗体―薬物コンジュゲート（１）では、薬物からリンカー末端までの構造部分１個が１個の抗体に対して結合した構造として記載されているが、これは説明のための便宜的な記載であって、実際には当該構造部分が１個の抗体分子に対して複数個が結合している場合が多い。この状況は以下の製造方法の説明においても同様である。

【０１６４】

すなわち、既知の方法によって入手しうる化合物（２）（例えば、ＵＳ２０１６／２９７８９０号公開特許公報に記載の方法（例えば段落［０３３６］～［０３７４］に記載の方法）で入手可能）で入手可能）と、スルフヒドリル基を有する抗体（３ａ）を反応させることによって、抗体―薬物コンジュゲート（１）を製造することができる。

【０１６５】

スルフヒドリル基を有する抗体（３ａ）は、当業者周知の方法で得ることができる（Ｈｅｒｍａｎｓｏｎ，Ｇ．Ｔ、Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ　Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ、ｐｐ．５６―１３６、ｐｐ．４５６―４９３、Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ（１９９６））。例えば、Ｔｒａｕｔ’ｓ試薬を抗体のアミノ基に作用させる；Ｎ―サクシンイミジルＳ―アセチルチオアルカノエート類を抗体のアミノ基に作用させた後、ヒドロキシルアミンを作用させる；Ｎ―サクシンイミジル３―（ピリジルジチオ）プロピオネートを作用させた後、還元剤を作用させる；ジチオトレイトール、２―メルカプトエタノール、トリス（２―カルボキシエチル）ホスフィン塩酸塩（ＴＣＥＰ）等の還元剤を抗体に作用させて抗体内鎖間部のジスルフィド結合を還元しスルフヒドリル基を生成させる；等の方法を挙げることができるがこれらに限定されることはない。

【０１６６】

具体的には、還元剤としてＴＣＥＰを、抗体内鎖間部ジスルフィド一個当たりに対して０．３乃至３モル当量用い、キレート剤を含む緩衝液中で、抗体と反応させることで、抗体内鎖間部ジスルフィドが部分的もしくは完全に還元された抗体を得ることができる。キレート剤としては、例えばエチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）やジエチレントリアミン５酢酸（ＤＴＰＡ）等を挙げることができる。これ等を１ｍＭ乃至２０ｍＭの濃度で用いればよい。緩衝液としては、リン酸ナトリウムやホウ酸ナトリウム、酢酸ナトリウム溶液等を用いることができる。具体的な例において、抗体は４℃乃至３７℃にて１乃至４時間ＴＣＥＰと反応させることで部分的もしくは完全に還元されたスルフヒドリル基を有する抗体（３ａ）を得ることが出来る。

【０１６７】

なお、ここでスルフヒドリル基を薬物―リンカー部分に付加させる反応を実施させることでチオエーテル結合によって薬物―リンカー部分を結合させることができる。

【０１６８】

次に、スルフヒドリル基を有する抗体（３ａ）一個あたり、２乃至２０モル当量の化合物（２）を使用して、抗体１個当たり２個乃至８個の薬物が結合した抗体―薬物コンジュ

ゲート（１）を製造することができる。具体的には、スルフヒドリル基を有する抗体（３ａ）を含む緩衝液に、化合物（２）を溶解させた溶液を加えて反応させればよい。ここで、緩衝液としては、酢酸ナトリウム溶液、リン酸ナトリウムやホウ酸ナトリウム、等を用いればよい。反応時のｐＨは５乃至９であり、より好適にはｐＨ７付近で反応させればよい。化合物（２）を溶解させる溶媒としては、ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）、ジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）、ジメチルアセトアミド（ＤＭＡ）、Ｎ―メチル―２―ピリドン（ＮＭＰ）等の有機溶媒を用いることができる。化合物（２）を溶解させた有機溶媒溶液を、スルフヒドリル基を有する抗体（３ａ）を含む緩衝液に１乃至２０％ｖ／ｖを加えて反応させればよい。反応温度は、０乃至３７℃、より好適には１０乃至２５℃であり、反応時間は、０．５乃至２時間である。反応は、未反応の化合物（２）の反応性をチオール含有試薬によって失活させることによって終了できる。チオール含有試薬は例えば、システイン又はＮ―アセチル―Ｌ―システイン（ＮＡＣ）である。より具体的には、ＮＡＣを、用いた化合物（２）に対して、１乃至２モル当量加え、室温で１０乃至３０分インキュベートすることにより反応を終了できる。

【０１６９】

（４）抗体―薬物コンジュゲートの同定

製造した抗体―薬物コンジュゲート（１）は、以下の共通操作によって濃縮、バッファー交換、精製、抗体濃度及び抗体一分子あたりの薬物平均結合数の測定を行い、抗体―薬物コンジュゲート（１）の同定を行うことができる。

【０１７０】

（４）―１　共通操作Ａ：抗体もしくは抗体―薬物コンジュゲート水溶液の濃縮

Ａｍｉｃｏｎ　Ｕｌｔｒａ（５０，０００　ＭＷＣＯ，Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ）の容器内に抗体もしくは抗体―薬物コンジュゲート溶液を入れ、遠心機（Ａｌｌｅｇｒａ　Ｘ―１５Ｒ，Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ，Ｉｎｃ．）を用いた遠心操作（２０００Ｇ乃至３８００Ｇにて５乃至２０分間遠心）にて、抗体もしくは抗体―薬物コンジュゲート溶液を濃縮した。

【０１７１】

（４）―２　共通操作Ｂ：抗体の濃度測定

ＵＶ測定器（Ｎａｎｏｄｒｏｐ　１０００，Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ　Ｉｎｃ．）を用いて、メーカー規定の方法に従い、抗体濃度の測定を行った。その際に、抗体ごとに異なる２８０ｎｍ吸光係数（１．３ｍＬｍｇ－１ｃｍ－１乃至１．８ｍＬｍｇ－１ｃｍ－１）を用いた。

【０１７２】

（４）―３　共通操作Ｃ：抗体のバッファー交換

Ｓｅｐｈａｄｅｘ　Ｇ―２５担体を使用したＮＡＰ―２５カラム（Ｃａｔ．Ｎｏ．１７―０８５２―０２，ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　Ｊａｐａｎ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ）を、メーカー規定の方法に従い、塩化ナトリウム（５０ｍＭ）及びＥＤＴＡ（２ｍＭ）を含むリン酸緩衝液（５０ｍＭ，ｐＨ６．０）（本明細書でＰＢＳ６．０／ＥＤＴＡと称する。）にて平衡化させた。このＮＡＰ―２５カラム一本につき、抗体水溶液２．５ｍＬをのせたのち、ＰＢＳ６．０／ＥＤＴＡ３．５ｍＬで溶出させた画分（３．５ｍＬ）を分取した。この画分を共通操作Ａによって濃縮し、共通操作Ｂを用いて抗体濃度の測定を行ったのちに、ＰＢＳ６．０／ＥＤＴＡを用いて２０ｍｇ／ｍＬに抗体濃度を調整した。

【０１７３】

（４）―４　共通操作Ｄ：抗体―薬物コンジュゲートの精製

市販のＳｏｒｂｉｔｏｌ（５％）を含む酢酸緩衝液（１０ｍＭ，ｐＨ５．５；本明細書でＡＢＳと称する。）のいずれかの緩衝液でＮＡＰ―２５カラムを平衡化させた。このＮＡＰ―２５カラムに、抗体―薬物コンジュゲート反応水溶液（約２．５ｍＬ）をのせ、メーカー規定の量の緩衝液で溶出させることで、抗体画分を分取した。この分取画分を再びＮＡＰ―２５カラムにのせ緩衝液で溶出させるゲルろ過精製操作を計２乃至３回繰り返すことで、未結合の薬物リンカーや低分子化合物（トリス（２―カルボキシエチル）ホスフ

ィン塩酸塩（ＴＣＥＰ），Ｎ―アセチル―Ｌ―システイン（ＮＡＣ），ジメチルスルホキシド）を除いた抗体―薬物コンジュゲートを得た。

【０１７４】

（４）―５　共通操作Ｅ：抗体―薬物コンジュゲートにおける抗体濃度及び抗体一分子あたりの薬物平均結合数の測定

抗体―薬物コンジュゲートにおける結合薬物濃度は、抗体―薬物コンジュゲート水溶液の２８０ｎｍ及び３７０ｎｍの二波長におけるＵＶ吸光度を測定したのちに下記の計算を行うことで、算出することができる。

【０１７５】

ある波長における全吸光度は系内に存在する全ての吸収化学種の吸光度の和に等しい［吸光度の加成性］ことから、抗体と薬物のコンジュゲーション前後において、抗体及び薬物のモル吸光係数に変化がないと仮定すると、抗体―薬物コンジュゲートにおける抗体濃度及び薬物濃度は、下記の関係式で示される。

$A_{280}=A_{D,280}+A_{A,280}=\varepsilon_{D,280}C_D+\varepsilon_{A,280}C_A$　式（１）

$A_{370}=A_{D,370}+A_{A,370}=\varepsilon_{D,370}C_D+\varepsilon_{A,370}C_A$　式（２）

【０１７６】

ここで、A_{280}は２８０ｎｍにおける抗体―薬物コンジュゲート水溶液の吸光度を示し、A_{370}は３７０ｎｍにおける抗体―薬物コンジュゲート水溶液の吸光度を示し、$A_{A,280}$は２８０ｎｍにおける抗体の吸光度を示し、$A_{A,370}$は３７０ｎｍにおける抗体の吸光度を示し、$A_{D,280}$は２８０ｎｍにおけるコンジュゲート前駆体の吸光度を示し、$A_{D,370}$は３７０ｎｍにおけるコンジュゲート前駆体の吸光度を示し、$\varepsilon_{A,280}$は２８０ｎｍにおける抗体のモル吸光係数を示し、$\varepsilon_{A,370}$は３７０ｎｍにおける抗体のモル吸光係数を示し、$\varepsilon_{D,280}$は２８０ｎｍにおけるコンジュゲート前駆体のモル吸光係数を示し、$\varepsilon_{D,370}$は３７０ｎｍにおけるコンジュゲート前駆体のモル吸光係数を示し、C_Aは抗体―薬物コンジュゲートにおける抗体濃度を示し、C_Dは抗体―薬物コンジュゲートにおける薬物濃度を示す。

【０１７７】

ここで、$\varepsilon_{A,280}$、$\varepsilon_{A,370}$、$\varepsilon_{D,280}$、$\varepsilon_{D,370}$は、事前に用意した値（計算推定値もしくは化合物のＵＶ測定から得られた実測値）が用いられる。例えば、$\varepsilon_{A,280}$は、抗体のアミノ酸配列から、既知の計算方法（Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｓｃｉｅｎｃｅ，１９９５，ｖｏｌ．４，２４１１―２４２３）によって推定することが出来る。$\varepsilon_{A,370}$は、通常、ゼロである。$\varepsilon_{D,280}$及び$\varepsilon_{D,370}$は、用いるコンジュゲート前駆体をあるモル濃度に溶解させた溶液の吸光度を測定することで、ランベルト・ベールの法則（吸光度＝モル濃度×モル吸光係数×セル光路長）によって、得ることができる。抗体―薬物コンジュゲート水溶液のA_{280}及びA_{370}を測定し、これらの値を式（１）及び（２）に代入して連立方程式を解くことによって、C_A及びC_Dを求めることができる。さらにC_DをC_Aで除することで１抗体あたりの薬物平均結合数が求めることができる。

【０１７８】

（４）―６　共通操作Ｆ：抗体―薬物コンジュゲートにおける抗体一分子あたりの薬物平均結合数の測定（２）

抗体―薬物コンジュゲートにおける抗体一分子あたりの薬物平均結合数は、前述の「（４）―５　共通操作Ｅ」に加え、以下の方法を用いる高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）分析によっても求めることができる。以下に、抗体と薬物リンカーがジスルフィド結合している場合のＨＰＬＣによる薬物平均結合数の測定方法を記載する。当業者は、この方法を参照して、抗体と薬物リンカーとの結合様式に依存して適宜、ＨＰＬＣにより薬物平均結合数を測定し得る。

【０１７９】

Ｆ－１．ＨＰＬＣ分析用サンプルの調製（抗体―薬物コンジュゲートの還元）
抗体―薬物コンジュゲート溶液（約１ｍｇ／ｍＬ、６０μＬ）をジチオトレイトール（ＤＴＴ）水溶液（１００ｍＭ、１５μＬ）と混合する。混合物を３７℃で３０分インキュベートすることで、抗体―薬物コンジュゲートの軽鎖及び重鎖間のジスルフィド結合を切断したサンプルを、ＨＰＬＣ分析に用いる。
【０１８０】
Ｆ－２．ＨＰＬＣ分析
ＨＰＬＣ分析を、下記の測定条件にて行う。
ＨＰＬＣシステム：Ａｇｉｌｅｎｔ　１２９０　ＨＰＬＣシステム（Ａｇｉｌｅｎｔ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）
検出器：紫外吸光度計（測定波長：２８０ｎｍ）
カラム：ＡＣＱＵＩＴＹ　ＵＰＬＣ　ＢＥＨ　Ｐｈｅｎｙｌ（２．１×５０ｍｍ、１．７μｍ、１３０Å；Ｗａｔｅｒｓ、Ｐ／Ｎ　１８６００２８８４）
カラム温度：８０℃
移動相Ａ：０．１０％トリフルオロ酢酸（ＴＦＡ）、１５％２―プロパノールを含む水溶液
移動相Ｂ：０．０７５％ＴＦＡ、１５％２―プロパノールを含むアセトニトリル溶液
グラジエントプログラム：１４％―３６％（０分―１５分）、３６％―８０％（１５分―１７分）、８０％―１４％（１７分―１７．０１分）、１４％（１７．０１分―２５分）
サンプル注入量：１０μＬ
【０１８１】
Ｆ－３．データ解析
Ｆ－３－１　薬物の結合していない抗体の軽鎖（Ｌ０）及び重鎖（Ｈ０）に対して、薬物の結合した軽鎖（薬物がi個結合した軽鎖：$Ｌ_{i}$）及び重鎖（薬物がi個結合した重鎖：$Ｈ_{i}$）は、結合した薬物の数に比例して疎水性が増し保持時間が大きくなることから、例えば、Ｌ０、Ｌ１、Ｈ０、Ｈ１、Ｈ２、Ｈ３の順に溶出される。Ｌ０及びＨ０との保持時間比較により検出ピークをＬ０、Ｌ１、Ｈ０、Ｈ１、Ｈ２、Ｈ３のいずれかに割り当てることができる。薬物結合数は、当業者によって定義され得るが、好ましくは、Ｌ０、Ｌ１、Ｈ０、Ｈ１、Ｈ２、Ｈ３である。
【０１８２】
Ｆ－３－２　薬物リンカーにＵＶ吸収があるため、薬物リンカーの結合数に応じて、軽鎖、重鎖及び薬物リンカーのモル吸光係数を用いて下式に従ってピーク面積値の補正を行う。
【０１８３】
【数２】

$$\text{薬物がi個結合した軽鎖ピーク面積補正値}(A_{Li}) = \text{ピーク面積} \times \frac{\text{軽鎖のモル吸光係数}}{\text{軽鎖のモル吸光係数} + \text{結合薬物数（i）} \times \text{薬物リンカーのモル吸光係数}}$$

【０１８４】
【数３】

$$\text{薬物がi個結合した重鎖ピーク面積補正値}（A_{Hi}）= \text{ピーク面積} \times \frac{\text{重鎖のモル吸光係数}}{\text{重鎖のモル吸光係数} + \text{結合薬物数（i）} \times \text{薬物リンカーのモル吸光係数}}$$

【０１８５】
ここで、各抗体における軽鎖及び重鎖のモル吸光係数（２８０ｎｍ）は、既知の計算方

法（Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｓｃｉｅｎｃｅ，　１９９５，　ｖｏｌ．４，　２４１１－２４２３）によって、各抗体の軽鎖及び重鎖のアミノ酸配列から推定される値を用いることができる。Ｈ０１Ｌ０２の場合、そのアミノ酸配列に従って、軽鎖のモル吸光係数として３１７１０を、重鎖のモル吸光係数として７９９９０を推定値として用いた。また、薬物リンカーのモル吸光係数（２８０ｎｍ）は、各薬物リンカーをメルカプトエタノール又はＮ－アセチルシステインで反応させ、マレイミド基をサクシニイミドチオエーテルに変換した化合物の実測のモル吸光係数（２８０ｎｍ）を用いた。吸光度を測定する波長は、当業者によって適宜設定され得るが、好ましくは、抗体のピークが測定され得る波長であり、より好ましくは２８０ｎｍである。

【０１８６】

Ｆ－３－３　ピーク面積補正値合計に対する各鎖ピーク面積比（％）を下式に従って計算する。

【０１８７】

【数４】

$$\text{薬物がi個結合した軽鎖ピーク面積比} = \frac{A_{Li}}{A_{L0} + A_{L1}} \times 100$$

$$\text{薬物がi個結合した重鎖ピーク面積比} = \frac{A_{Hi}}{A_{H0} + A_{H1} + A_{H2} + A_{H3}} \times 100$$

A_{Li}，A_{Hi}：L_i，H_i各々のピーク面積補正値

【０１８８】

Ｆ－３－４　抗体―薬物コンジュゲートにおける抗体一分子あたりの薬物平均結合数を、下式に従って計算する。

【０１８９】

薬物平均結合数＝（L_0ピーク面積比ｘ０＋L_1ピーク面積比ｘ１＋H_0ピーク面積比ｘ０＋H_1ピーク面積比ｘ１＋H_2ピーク面積比ｘ２＋H_3ピーク面積比ｘ３）／１００ｘ２

【０１９０】

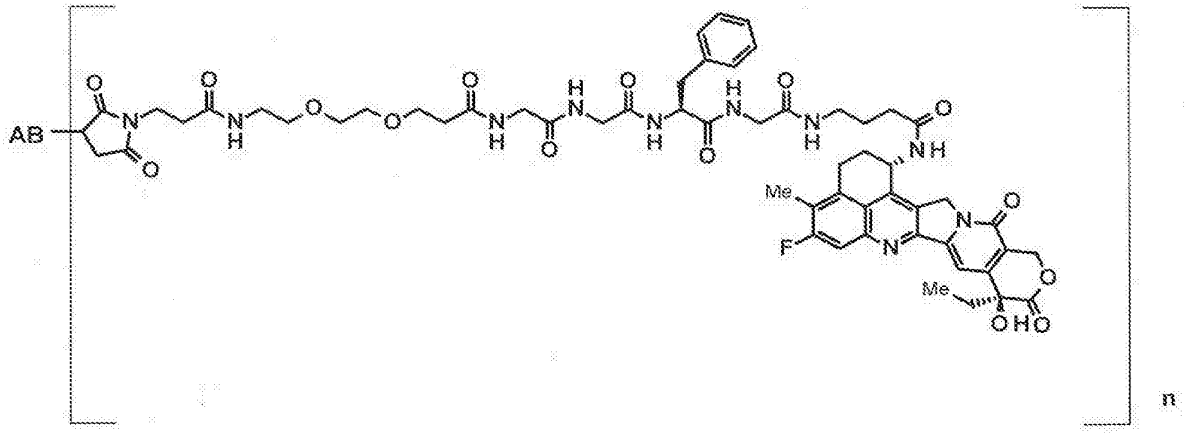
なお、抗体―薬物コンジュゲートの量を確保するために、同様な条件で作製して得られた平均薬物数が同程度の複数の抗体―薬物コンジュゲート（例えば±１程度）を混合して新たなロットにすることができる。その場合、平均薬物数は混合前の平均薬物数の間に収まる。

【０１９１】

本発明の抗体―薬物コンジュゲートの一つの具体例としては次式：

【０１９２】

【化９】

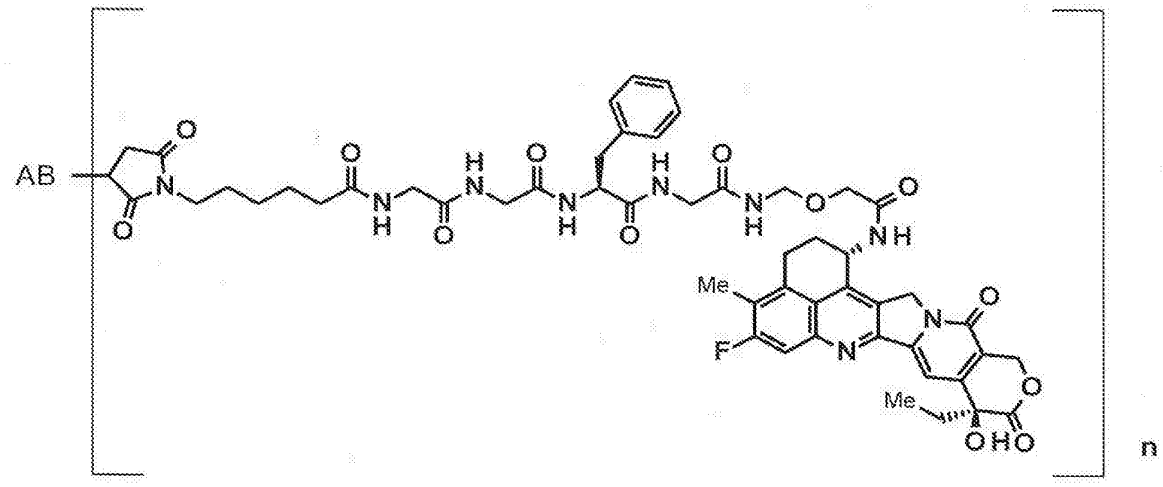


【０１９３】

又は次式：

【０１９４】

【化１０】



【０１９５】

で示される構造を有するものを挙げることができる。

【０１９６】

ここで、ＡＢは本明細書で開示される抗ＣＤＨ６抗体を示し、抗体由来のスルフヒドリル基を介して結合リンカーと結合している。ここで、ｎはいわゆるＤＡＲ（Ｄｒｕｇ―ｔｏ―Ａｎｔｉｂｏｄｙ　Ｒａｔｉｏ）と同義であり、１抗体あたりの薬物抗体比を示す。すなわち、抗体１分子への薬物の結合数を示すが、これは平均値、すなわち、平均薬物結合数として特定され、表記される数値である。本発明の[化９]及び[化１０]で示される抗体―薬物コンジュゲートの場合、共通操作Ｆによる測定で、ｎは、２から８であればよく、好ましくは５から８であり、更に好ましくは７から８であり、更により好ましく８である。

【０１９７】

本発明の抗体薬物―コンジュゲートの一例として、上記式［化９］又は［化１０］に示される構造において、ＡＢで示される抗体が、以下の（ａ）乃至（ｇ）からなる群から選択されるいずれか１項に記載の重鎖及び軽鎖の抗体又はその機能性断片を含む、抗体―薬物コンジュゲート又はその薬理学上許容される塩を挙げることができる：

（ａ）配列番号６１に示される軽鎖全長アミノ酸配列の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号６９に示される重鎖全長アミノ酸配列の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖からなる抗体；
（ｂ）配列番号６１に示される軽鎖全長アミノ酸配列の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号７３に示される重鎖全長アミノ酸配列の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖からなる抗体；
（ｃ）配列番号６１に示される軽鎖全長アミノ酸配列の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号７７に示される重鎖全長アミノ酸配列の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖からなる抗体；
（ｄ）配列番号６５に示される軽鎖全長アミノ酸配列の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号６９に示される重鎖全長アミノ酸配列の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖からなる抗体；
（ｅ）配列番号６５に示される軽鎖全長アミノ酸配列の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号７３に示される重鎖全長アミノ酸配列の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖からなる抗体；
（ｆ）配列番号６５に示される軽鎖全長アミノ酸配列の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号７７に示される重鎖全長アミノ酸配列の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖からなる抗体；又は
（ｇ）重鎖又は軽鎖がＮ―結合への糖鎖付加、Ｏ―結合への糖鎖付加、Ｎ末のプロセッシング、Ｃ末のプロセッシング、脱アミド化、アスパラギン酸の異性化、メチオニンの酸化、Ｎ末にメチオニン残基の付加、プロリン残基のアミド化、Ｎ末グルタミンやＮ末グルタミン酸のピログルタミン酸化などに代表される翻訳後修飾、及びカルボキシル末端における１つ又は２つのアミノ酸欠失からなる群より選択される１又は２以上の修飾を含む、（ａ）～（ｆ）からなる群から選択されるいずれか１つに記載の抗体。

【０１９８】

４．医薬

上記、「２．抗ＣＤＨ６抗体の製造」の項及び実施例に記載された本発明の抗ＣＤＨ６抗体及び当該抗体の機能性断片は、腫瘍細胞表面のＣＤＨ６に結合し、内在化活性を有することから、単独であるいは他の薬剤と組み合わせて、医薬として、特に腎細胞腫瘍及び卵巣腫瘍等のがんの治療剤として用いることができる。

【０１９９】

また、ＣＤＨ６を発現している細胞の検出に用いることができる。

【０２００】

更に、本発明の抗ＣＤＨ６抗体及び当該抗体の機能性断片は、内在化活性を有することから、抗体―薬物コンジュゲートに用いる抗体として供することができる。

【０２０１】

上記「３．抗ＣＤＨ６抗体―薬物コンジュゲート」の項及び実施例に記載の本発明の抗ＣＤＨ６抗体―薬物コンジュゲートのうちで薬物として細胞傷害活性等の抗腫瘍活性を有する薬物が用いられているものは、内在化活性を有する抗ＣＤＨ６抗体及び／又は当該抗体の機能性断片と細胞傷害活性等の抗腫瘍活性を有する薬物のコンジュゲートであり、ＣＤＨ６を発現しているがん細胞に対して抗腫瘍活性を示すことから、医薬として、特にがんに対する治療剤及び／又は予防剤として使用することができる。

【０２０２】

本発明の抗ＣＤＨ６抗体―薬物コンジュゲートは、大気中に放置したり、又は再結晶や精製操作をしたりすることにより、水分を吸収し、あるいは吸着水が付着するなどして、水和物になる場合があり、そのような水を含む化合物又は薬理学的に許容され得る塩も本発明に包含される。

【０２０３】

本発明の抗ＣＤＨ６抗体―薬物コンジュゲートが、アミノ基などの塩基性基を有する場合、所望により薬理学的に許容され得る酸付加塩を形成することができる。そのような酸

付加塩としては、例えばフッ化水素酸塩、塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩などのハロゲン化水素酸塩；硝酸塩、過塩素酸塩、硫酸塩、燐酸塩などの無機酸塩；メタンスルホン酸塩、トリフルオロメタンスルホン酸塩、エタンスルホン酸塩などの低級アルカンスルホン酸塩；ベンゼンスルホン酸塩、ｐ―トルエンスルホン酸塩などのアリ―ルスルホン酸塩；蟻酸塩、酢酸塩、トリフルオロ酢酸塩、りんご酸塩、フマル酸塩、コハク酸塩、クエン酸塩、酒石酸塩、シュウ酸塩、マレイン酸塩などの有機酸塩；又はオルニチン酸塩、グルタミン酸塩、アスパラギン酸塩などのアミノ酸塩などを挙げることができる。

【０２０４】

本発明の抗ＣＤＨ６抗体―薬物コンジュゲートが、カルボキシ基などの酸性基を有する場合、所望により薬理学的に許容され得る塩基付加塩を形成することができる。そのような塩基付加塩としては、例えばナトリウム塩、カリウム塩、リチウム塩などのアルカリ金属塩；カルシウム塩、マグネシウム塩などのアルカリ土類金属塩；アンモニウム塩などの無機塩；ジベンジルアミン塩、モルホリン塩、フェニルグリシンアルキルエステル塩、エチレンジアミン塩、Ｎ―メチルグルカミン塩、ジエチルアミン塩、トリエチルアミン塩、シクロヘキシルアミン塩、ジシクロヘキシルアミン塩、Ｎ，Ｎ’―ジベンジルエチレンジアミン塩、ジエタノールアミン塩、Ｎ―ベンジル―Ｎ―（２―フェニルエトキシ）アミン塩、ピペラジン塩、テトラメチルアンモニウム塩、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン塩などの有機アミン塩などを挙げることができる。

【０２０５】

本発明はまた、抗体―薬物コンジュゲートを構成する原子の１以上が、その原子の同位体で置換された抗ＣＤＨ６抗体―薬物コンジュゲートを包含し得る。同位体には放射性同位体及び安定同位体の２種類が存在し、同位体の例としては、例えば、水素の同位体（２Ｈ及び３Ｈ）、炭素の同位体（１１Ｃ、１３Ｃ及び１４Ｃ）、窒素の同位体（１３Ｎ及び１５Ｎ）、酸素の同位体（１５Ｏ、１７Ｏ及び１８Ｏ）、フッ素の同位体（１８Ｆ）などを挙げることができる。同位体で標識された抗体―薬物コンジュゲートを含む組成物は、例えば、治療剤、予防剤、研究試薬、アッセイ試薬、診断剤、インビボ画像診断剤などとして有用である。同位体で標識された抗体―薬物コンジュゲート、及び、同位体で標識された抗体―薬物コンジュゲートの任意の割合の混合物もすべて本発明に包含される。同位体で標識された抗体―薬物コンジュゲートは、当該分野で公知の方法により、例えば、後述する本発明の製造方法における原料の代わりに同位体で標識された原料を用いることにより、製造することができる。

【０２０６】

ｉｎ　ｖｉｔｒｏでの殺細胞活性は例えば、細胞の増殖抑制活性で測定することができる。例えば、ＣＤＨ６を過剰発現している癌細胞株を培養し、培養系に種々の濃度で抗ＣＤＨ６抗体―薬物コンジュゲートを添加し、フォーカス活性、コロニー形成及びスフェロイド増殖に対する抑制活性を測定することができる。ここで、腎細胞腫瘍及び卵巣腫瘍由来がん細胞株を用いることで、腎細胞腫瘍及び卵巣腫瘍に対する細胞増殖抑制活性を調べることができる。

【０２０７】

ｉｎ　ｖｉｖｏでの実験動物を用いたがんに対する治療効果は、例えば、ＣＤＨ６を高発現している腫瘍細胞株を移植したヌードマウスに抗ＣＤＨ６抗体―薬物コンジュゲートを投与し、がん細胞の変化を測定することができる。ここで、腎細胞癌、腎淡明細胞癌、乳頭状腎細胞癌、卵巣癌、卵巣漿液性腺癌又は甲状腺癌由来の細胞を免疫不全マウスに移植した動物モデルを用いることで、腎細胞癌、腎淡明細胞癌、乳頭状腎細胞癌、卵巣癌、卵巣漿液性腺癌又は甲状腺癌に対する治療効果を測定することができる。

【０２０８】

本発明の抗ＣＤＨ６抗体―薬物コンジュゲートが適用されるがんの種類としては、治療対象となるがん細胞においてＣＤＨ６を発現しているがんであれば特に制限されないが、例えば、腎細胞癌、腎淡明細胞癌、乳頭状腎細胞癌、卵巣癌、卵巣漿液性腺癌又は甲状腺癌を挙げることができるが、ＣＤＨ６を発現している限りこれらに制限されない。より好

ましいがんの例としては、腎細胞癌又は卵巣癌を挙げることができる。

【０２０９】

本発明の抗ＣＤＨ６抗体―薬物コンジュゲートは、哺乳動物に対して好適に投与することができるが、より好ましくはヒトである。

【０２１０】

本発明の抗ＣＤＨ６抗体―薬物コンジュゲートが含まれる医薬組成物において使用される物質としては、投与量や投与濃度において、この分野において通常使用される製剤添加物その他から適宜選択して適用することができる。

【０２１１】

本発明の抗ＣＤＨ６抗体―薬物コンジュゲートは、１種以上の薬学的に適合性の成分を含む薬学的組成物として投与され得る。例えば、上記薬学的組成物は、代表的には、１種以上の薬学的キャリア（例えば、滅菌した液体（例えば、水及び油（石油、動物、植物、又は合成起源の油（例えば、ラッカセイ油、大豆油、鉱油、ごま油など）を含む））を含む。水は、上記薬学的組成物が静脈内投与される場合に、より代表的なキャリアである。食塩水溶液、ならびにデキストロース水溶液及びグリセロール水溶液もまた、液体キャリアとして、特に、注射用溶液のために使用され得る。適切な薬学的賦形剤は、当該分野で公知である。上記組成物はまた、所望であれば、微量の湿潤剤もしくは乳化剤、又はｐＨ緩衝化剤を含み得る。適切な薬学的キャリアの例は、Ｅ．Ｗ．Ｍａｒｔｉｎによる「Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ」に記載される。その処方は、投与の態様に対応する。

【０２１２】

種々の送達システムが公知であり、本発明の抗ＣＤＨ６抗体―薬物コンジュゲートを投与するために使用され得る。導入方法としては、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、及び皮下の経路が挙げられるが、これらに限定されない。投与は、例えば、注入又はボーラス注射によるものであり得る。特定の好ましい実施形態において、上記抗体―薬物コンジュゲートの投与は、注入によるものである。非経口的投与は、好ましい投与経路である。

【０２１３】

代表的実施形態において、上記薬学的組成物は、ヒトへの静脈内投与に適合した薬学的組成物として、常習的手順に従って処方される。代表的には、静脈内投与のための組成物は、滅菌の等張性の水性緩衝液中の溶液である。必要である場合、上記医薬はまた、可溶化剤及び注射部位での疼痛を和らげるための局所麻酔剤（例えば、リグノカイン）を含み得る。一般に、上記成分は、（例えば、活性剤の量を示すアンプル又はサシェなどに密封してシールされた容器中の乾燥凍結乾燥粉末又は無水の濃縮物として、別個に、又は単位剤形中で一緒に混合して、のいずれかで供給される。上記医薬が注入によって投与される予定である場合、それは、例えば、滅菌の製薬グレードの水又は食塩水を含む注入ボトルで投薬され得る。上記医薬が注射によって投与される場合、注射用滅菌水又は食塩水のアンプルは、例えば、上記成分が投与前に混合され得るように、提供され得る。

【０２１４】

本発明の医薬組成物には本願の抗ＣＤＨ６抗体―薬物コンジュゲートのみを含む医薬組成物であってもよいし、抗ＣＤＨ６抗体―薬物コンジュゲート及び少なくとも一つのこれ以外のがん治療剤を含む医薬組成物であってもよい。本発明の抗ＣＤＨ６抗体―薬物コンジュゲートは、他のがん治療剤と共に投与することもでき、これによって抗がん効果を増強させることができる。このような目的で使用される他の抗がん剤は、抗体―薬物コンジュゲートと同時に、別々に、あるいは連続して個体に投与されてもよいし、それぞれの投与間隔を変えて投与してもよい。このようながん治療剤として、Ｉｍａｔｉｎｉｂ、Ｓｕｎｉｔｉｎｉｂ、Ｒｅｇｏｒａｆｅｎｉｂなどを含むチロシンキナーゼ阻害剤、Ｐａｌｂｏｃｉｃｌｉｂなどを含むＣＤＫ４／６阻害剤、ＴＡＳ―１１６などを含むＨＳＰ９０阻害剤、ＭＥＫ１６２などを含むＭＥＫ阻害剤、ニボルマブ、ペンブロリズマブ、イピリムマブなどを含む免疫チェックポイント阻害剤等を挙げることができるが、抗腫瘍活性を有する薬剤であれば限定されることはない。

【０２１５】
このような医薬組成物は、選択された組成と必要な純度を持つ製剤として、凍結乾燥製剤あるいは液状製剤として製剤化すればよい。凍結乾燥製剤として製剤化する際には、この分野において使用される適当な製剤添加物が含まれる製剤であってもよい。また液剤においても同様にして、この分野において使用される各種の製剤添加物を含む液状製剤として製剤化することができる。
【０２１６】
医薬組成物の組成及び濃度は投与方法によっても変化するが、本発明の医薬組成物に含まれる抗ＣＤＨ６抗体―薬物コンジュゲートは、抗体―薬物コンジュゲートの抗原に対する親和性、すなわち、抗原に対する解離定数（Ｋｄ値）の点において、親和性が高い（Ｋｄ値が低い）ほど、少量の投与量であっても薬効を発揮させることができる。したがって、抗体―薬物コンジュゲートの投与量の決定に当たっては、抗体―薬物コンジュゲートと抗原との親和性の状況に基づいて投与量を設定することもできる。本発明の抗体―薬物コンジュゲートをヒトに対して投与する際には、例えば、約０．００１～１００ｍｇ／ｋｇを１回あるいは１～１８０日間に１回の間隔で複数回投与すればよい。好適には、０．１～５０ｍｇ／ｋｇを、さらに好適には、１～１５ｍｇ／ｋｇを２～３週間に１回の間隔で複数回投与すればよい。
【実施例】
【０２１７】
以下に示す実施例によって本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。また、これらはいかなる意味においても限定的に解釈されるものではない。なお、下記実施例において遺伝子操作に関する各操作は特に明示がない限り、「モレキュラークローニング（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ）」（Ｓａｍｂｒｏｏｋ，Ｊ．，Ｆｒｉｔｓｃｈ，Ｅ．Ｆ．及びＭａｎｉａｔｉｓ，Ｔ．著，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｅｓｓより１９８９年発刊）に記載の方法及びその他の当業者が使用する実験書に記載の方法により行うか、又は、市販の試薬やキットを用いる場合には市販品の指示書に従って行った。また、本明細書において、特に記載のない試薬、溶媒及び出発材料は、市販の供給源から容易に入手可能である。
【０２１８】
［実施例１：内在化活性を有するラット抗ヒトＣＤＨ６抗体の取得］
１）―１　ヒト、マウス、ラットおよびカニクイザルＣＤＨ６発現ベクターの構築
ヒトＣＤＨ６タンパク質（ＮＰ＿００４９２３）をコードするｃＤＮＡ発現ベクター（ＯｒｉＧｅｎｅ社、ＲＣ２１７８８９）を用いて、当業者に公知な方法に従い哺乳動物発現用ベクターに組み込むことによってヒトＣＤＨ６発現ベクターｐｃＤＮＡ３．１―ｈＣＤＨ６が作製された。ヒトＣＤＨ６　ＯＲＦ（Ｏｐｅｎ　Ｒｅａｄｉｎｇ　Ｆｒａｍｅ）のアミノ酸配列を配列番号１に示す。
マウスＣＤＨ６タンパク質（ＮＰ＿０３１６９２）をコードするｃＤＮＡ発現ベクター（ＯｒｉＧｅｎｅ社、ＭＣ２２１６１９）を用いて、当業者に公知な方法に従い哺乳動物発現用ベクターに組み込むことによってマウスＣＤＨ６発現ベクターｐｃＤＮＡ３．１―ｍＣＤＨ６、及びｐ３ｘＦＬＡＧ―ＣＭＶ―９―ｍＣＤＨ６が作製された。マウスＣＤＨ６　ＯＲＦのアミノ酸配列を配列番号７に示す。
ラットＣＤＨ６タンパク質（ＮＰ＿０３７０５９）をコードするｃＤＮＡ発現ベクター（ＯｒｉＧｅｎｅ社、ＲＮ２１１８５０）の各ｃＤＮＡ部分を用いて、当業者に公知な方法に従い哺乳動物発現用ベクターに組み込むことによってヒトＣＤＨ６発現ベクターｐｃＤＮＡ３．１―ｒＣＤＨ６、及びｐ３ｘＦＬＡＧ―ＣＭＶ―９―ｒＣＤＨ６が作製された。ラットＣＤＨ６　ＯＲＦのアミノ酸配列を配列番号８に示す。
カニクイザルＣＤＨ６タンパク質をコードするｃＤＮＡは、カニクイザル腎臓のｔｏｔａｌ　ＲＮＡより合成したｃＤＮＡを鋳型にｐｒｉｍｅｒ　１　（５’―ＣＡＣＣＡＴＧＡＧＡＡＣＴＴＡＣＣＧＣＴＡＣＴＴＣＴＴＧＣＴＧＣＴＣ―３’）（配列番号８５）及びｐｒｉｍｅｒ　２　（５’―ＴＴＡＧＧＡＧＴＣＴＴＴＧＴＣＡＣＴＧＴＣＣＡＣＴＣ

ＣＴＣＣ－３’）（配列番号８６）を用いてクローニングを行った。得られた配列が、カニクイザルＣＤＨ６（ＮＣＢＩ，ＸＰ＿００５５５６６９１．１）の細胞外領域と一致することを確認した。また、ＥＭＢＬで登録されたカニクイザルＣＤＨ６（ＥＨＨ５４１８０．１）と全長配列が一致することを確認した。当業者に公知な方法に従い哺乳動物発現用ベクターに組み込むことによってカニクイザルＣＤＨ６発現ベクターｐｃＤＮＡ３．１－ｃｙｎｏＣＤＨ６が作製された。カニクイザルＣＤＨ６　ＯＲＦのアミノ酸配列を配列番号９に示す。

作製したプラスミドＤＮＡの大量調製は、ＥｎｄｏＦｒｅｅ　Ｐｌａｓｍｉｄ　Ｇｉｇａ　Ｋｉｔ（ＱＩＡＧＥＮ）を用いて行った。

【０２１９】

１）－２　免疫

免疫にはＷＫＹ／Ｉｚｍラットの雌（日本エスエルシー社）を使用した。まずラット両足下腿部をＨｙａｌｕｒｏｎｉｄａｓｅ（ＳＩＧＭＡ－ＡＬＤＲＩＣＨ社）にて前処理後、同部位に実施例１）－　１で作製したヒトＣＤＨ６発現ベクターｐｃＤＮＡ３．１－ｈＣＤＨ６を筋肉内注射した。続けて、ＥＣＭ８３０（ＢＴＸ社）を使用し、２ニードル電極を用いて、同部位にインビボエレクトロポレーションを実施した。約二週間に一度、同様のインビボエレクトロポーレーションを繰り返した後、ラットのリンパ節又は脾臓を採取しハイブリドーマ作製に用いた。

【０２２０】

１）－３　ハイブリドーマ作製

リンパ節細胞あるいは脾臓細胞とマウスミエローマＳＰ２／０－ａｇ１４細胞（ＡＴＣＣ，　Ｎｏ．ＣＲＬ－１　５８１）とをＬＦ３０１　Ｃｅｌｌ　Ｆｕｓｉｏｎ　Ｕｎｉｔ（ＢＥＸ社）を用いて電気細胞融合した後、ＣｌｏｎａＣｅｌｌ－ＨＹ　Ｓｅｌｅｃｔｉｏｎ　Ｍｅｄｉｕｍ　Ｄ（ＳｔｅｍＣｅｌｌ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社）に懸濁し、希釈して３７℃、５％　CO_2の条件下で培養した。出現した各々のハイブリドーマコロニーは、モノクローンとして回収され、ＣｌｏｎａＣｅｌｌ－ＨＹ　Ｓｅｌｅｃｔｉｏｎ　Ｍｅｄｉｕｍ　Ｅ（ＳｔｅｍＣｅｌｌ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社）に懸濁して３７℃、５％　CO_2の条件下で培養した。適度に細胞が増殖した後、各々のハイブリドーマ細胞の凍結ストックを作製すると共に、得られたハイブリドーマ培養上清を抗ヒトＣＤＨ６抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングに用いた。

【０２２１】

１）－４　Ｃｅｌｌ－ＥＬＩＳＡ法による抗体産生ハイブリドーマのスクリーニング

１）－４－１　Ｃｅｌｌ－ＥＬＩＳＡ用抗原遺伝子発現細胞の調製

２９３α細胞（インテグリンαｖ及びインテグリンβ３を発現するＨＥＫ２９３由来の安定発現細胞株）を１０％　ＦＢＳ含有ＤＭＥＭ培地中５ｘ１０^{5}細胞／ｍＬになるよう調製した。Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｆｔｉｆｉｃ社）を用いた形質移入手順に従って、この２９３α細胞に対して、ｐｃＤＮＡ３．１－ｈＣＤＨ６もしくはｐｃＤＮＡ３．１－ｃｙｎｏＣＤＨ６または、陰性コントロールとしてｐｃＤＮＡ３．１のＤＮＡを導入し、９６－ｗｅｌｌ　ｐｌａｔｅ（Ｃｏｒｎｉｎｇ社）に１００μＬずつ分注後、１０％　ＦＢＳ含有ＤＭＥＭ培地中で３７℃、５％　CO_2の条件下で２４から２７時間培養した。得られた形質移入細胞を接着状態のまま、Ｃｅｌｌ－ＥＬＩＳＡに使用した。

【０２２２】

１）－４－２　Ｃｅｌｌ－ＥＬＩＳＡ

実施例１）－４－１で調製した発現ベクター導入２９３α細胞の培養上清を除去後、ｐｃＤＮＡ３．１－ｈＣＤＨ６もしくはｐｃＤＮＡ３．１－ｃｙｎｏＣＤＨ６またはｐｃＤＮＡ３．１導入２９３α細胞の各々に対しハイブリドーマ培養上清を添加し、４℃で１時間静置した。ｗｅｌｌ中の細胞を５％　ＦＢＳ含有ＰＢＳ（＋）で１回洗浄後、５％　ＦＢＳ含有ＰＢＳ（＋）で５００倍に希釈したＡｎｔｉ－Ｒａｔ　ＩｇＧ－Ｐｅｒｏｘｉｄａｓｅ　ａｎｔｉｂｏｄｙ　ｐｒｏｄｕｃｅｄ　ｉｎ　ｒａｂｂｉｔ（ＳＩＧＭＡ社）を

加えて、４℃で１時間静置した。ｗｅｌｌ中の細胞を５％　ＦＢＳ含有ＰＢＳ（＋）で３回洗浄した後、ＯＰＤ発色液（ＯＰＤ溶解液（０．０５　Ｍ　クエン酸３ナトリウム、０．１Ｍ　リン酸水素２ナトリウム・１２水　ｐＨ４．５）にｏ－フェニレンジアミン二塩酸塩（和光純薬社）、H_2O_2をそれぞれ０．４ｍｇ／ｍＬ、０．６％（ｖ／ｖ）になるように溶解）を１００μＬ／ｗｅｌｌで添加した。時々攪拌しながら発色反応を行い、１Ｍ　ＨＣｌを１００μＬ／ｗｅｌｌで添加して発色反応を停止させた後、プレートリーダー（ＥＮＶＩＳＩＯＮ：ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ社）で４９０ｎｍの吸光度を測定した。コントロールのｐｃＤＮＡ３．１導入２９３α細胞と比較し、ｐｃＤＮＡ３．１－ｈＣＤＨ６ならびにｐｃＤＮＡ３．１－ｃｙｎｏＣＤＨ６発現ベクター導入２９３α細胞の方でより高い吸光度を示す培養上清を産生するハイブリドーマをヒト、かつ、カニクイサルＣＤＨ６に結合する抗体産生ハイブリドーマとして選択した。

【０２２３】

１）－５　フローサイトメトリーによるカニクイサルＣＤＨ６への選択的結合抗体のスクリーニング

１）－５－１　フローサイトメトリー解析用抗原遺伝子発現細胞の調製

２９３Ｔ細胞を５×１０^{4}細胞／ｃｍ^{2}になるよう２２５ｃｍ^{2}フラスコ（住友ベークライト社）に播種し、１０％　ＦＢＳ含有ＤＭＥＭ培地中で３７℃、５％　CO_2の条件下で一晩培養した。この２９３Ｔ細胞に、ｐｃＤＮＡ３．１－ｃｙｎｏＣＤＨ６または、陰性コントロールとしてｐｃＤＮＡ３．１をＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００を用いて導入し、３７℃、５％　CO_2の条件下でさらに一晩培養した。各ベクターを導入した２９３Ｔ細胞をＴｒｙｐＬＥ　Ｅｘｐｒｅｓｓ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｆｔｉｆｉｃ社）で処理し、１０％　ＦＢＳ含有ＤＭＥＭで細胞を洗浄した後、５％　ＦＢＳ含有ＰＢＳに懸濁した。得られた細胞懸濁液をフローサイトメトリー解析に使用した。

【０２２４】

１）－５－２　フローサイトメトリー解析

実施例１）－４のＣｅｌｌ－ＥＬＩＳＡで選択されたヒト、かつ、カニクイサルＣＤＨ６に結合する抗体産生ハイブリドーマが産生する抗体のカニクイサルＣＤＨ６に対する結合特異性をフローサイトメトリー法によりさらに確認した。実施例１）－５－１で調製した一過性発現２９３Ｔ細胞の懸濁液を遠心し、上清を除去した後、各々に対しハイブリドーマ培養上清を加えて懸濁し、４℃で１時間静置した。５％　ＦＢＳ含有ＰＢＳで２回洗浄した後、５％　ＦＢＳ含有ＰＢＳで５００倍に希釈したＡｎｔｉ－Ｒａｔ　ＩｇＧ　ＦＩＴＣ　ｃｏｎｊｕｇａｔｅ（ＳＩＧＭＡ社）を加えて懸濁し、４℃で１時間静置した。５％　ＦＢＳ含有ＰＢＳで２回洗浄した後、２μｇ／ｍＬ　７－ａｍｉｎｏａｃｔｉｎｏｍｙｃｉｎ　Ｄ（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ社）を含む５％　ＦＢＳ含有ＰＢＳに再懸濁し、フローサイトメーター（ＦＣ５００：ＢｅｃｋｍａｎＣｏｕｌｔｅｒ社）で検出した。データ解析はＦｌｏｗＪｏ（ＴｒｅｅＳｔａｒ社）で行った。７－ａｍｉｎｏａｃｔｉｎｏｍｙｃｉｎ　Ｄ陽性の死細胞をゲートで除外した後、生細胞のＦＩＴＣ蛍光強度のヒストグラムを作成した。コントロールであるｐｃＤＮＡ３．１導入２９３Ｔ細胞の蛍光強度ヒストグラムに対しｐｃＤＮＡ３．１－ｃｙｎｏＣＤＨ６導入２９３Ｔ細胞のヒストグラムが強蛍光強度側にシフトしている抗体を産生するハイブリドーマを細胞膜表面上に発現するカニクイサルＣＤＨ６に特異的に結合する抗体産生ハイブリドーマとして選択した。

【０２２５】

１）－６　ラットモノクローナル抗体のアイソタイプの決定

実施例１）－　５で選択したラット抗ＣＤＨ６抗体産生ハイブリドーマの中から、ヒトならびにサルＣＤＨ６に強く特異的に結合することが示唆されたクローンｒＧ０１９、ｒＧ０５５、ｒＧ０５６、ｒＧ０６１を選抜し、各抗体のアイソタイプを同定した。抗体の重鎖のサブクラス、軽鎖のタイプは、ＲＡＴ　ＭＯＮＯＣＬＯＮＡＬ　ＡＮＴＩＢＯＤＹ　ＩＳＯＴＹＰＩＮＧ　ＴＥＳＴ　ＫＩＴ（ＤＳファーマバイオメディカル社）により決

定された。その結果、ｒＧ０１９、ｒＧ０５５、ｒＧ０５６、ｒＧ０６１の４クローンともサブクラスは、ＩｇＧ２ｂ、タイプはκ鎖であることが確認された。

【０２２６】

１）―７　ラット抗ＣＤＨ６抗体の調製

１）―７―１　培養上清作製

ラット抗ヒトＣＤＨ６モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ培養上清から精製した。まず、ラット抗ＣＤＨ６モノクローナル抗体産生ハイブリドーマをＣｌｏｎａＣｅｌｌ―ＨＹ　Ｓｅｌｅｃｔｉｏｎ　Ｍｅｄｉｕｍ　Ｅ（ＳｔｅｍＣｅｌｌ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社）で充分量まで増殖させた後、Ｕｌｔｒａ　Ｌｏｗ　ＩｇＧ　ＦＢＳ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｆｔｉｆｉｃ社）を２０％添加したＨｙｂｒｉｄｏｍａ　ＳＦＭ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｆｔｉｆｉｃ社）に培地交換し、４―５日間培養した。本培養上清を回収し、０．８μｍのフィルターに通した後、さらに０．２μｍのフィルターに通して不溶物を除去した。

【０２２７】

１）―７―２　ラット抗ＣＤＨ６抗体の精製

実施例１）―７―１で作製したハイブリドーマの培養上清から抗体（ラット抗ＣＤＨ６抗体（ｒＧ０１９，ｒＧ０５５，ｒＧ０５６，ｒＧ０６１））をＰｒｏｔｅｉｎ　Ｇアフィニティークロマトグラフィーで精製した。Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｇカラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ社）に抗体を吸着させ、ＰＢＳでカラムを洗浄後に０．１Ｍ　グリシン／塩酸水溶液（ｐＨ２．７）で溶出した。溶出液に１Ｍ　Ｔｒｉｓ―ＨＣｌ（ｐＨ９．０）を加えてｐＨ７．０～７．５に調整した後に、Ｃｅｎｔｒｉｆｕｇａｌ　ＵＦ　Ｆｉｌｔｅｒ　Ｄｅｖｉｃｅ　ＶＩＶＡＳＰＩＮ２０（分画分子量ＵＦ３０Ｋ、Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ社）にてＨＢＳｏｒ（２５ｍＭ　ヒスチジン／５％　ソルビトール、ｐＨ６．０）へのバッファー置換を行うとともに抗体の濃縮を行い、抗体濃度を１ｍｇ／ｍＬに調製した。最後にＭｉｎｉｓａｒｔ―Ｐｌｕｓ　ｆｉｌｔｅｒ（Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ社）でろ過し、精製サンプルとした。

【０２２８】

［実施例２：ラット抗ＣＤＨ６抗体のｉｎ　ｖｉｔｒｏ評価］

２）―１　フローサイトメトリーによるラット抗ＣＤＨ６抗体の結合能評価

実施例１）―７で作製したラット抗ＣＤＨ６抗体のヒトＣＤＨ６結合性をフローサイトメトリー法により評価した。実施例１）―１で作製したｐｃＤＮＡ３．１―ｈＣＤＨ６を２９３Ｔ細胞（ＡＴＣＣ）にＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を用いて一過性に導入し、３７℃、５％　CO_2の条件下で一晩培養した後、細胞懸濁液を調製した。遺伝子導入した２９３Ｔ細胞懸濁液を遠心し、上清を除去した後、実施例１）―７で調製したラット抗ＣＤＨ６モノクローナル抗体４種（クローン番号は、ｒＧ０１９、ｒＧ０５５、ｒＧ０５６及びｒＧ０６１）又はラットＩｇＧコントロール（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）を終濃度１０ｎｇ／ｍＬ加えて懸濁し、４℃で１時間静置した。５％　ＦＢＳ含有ＰＢＳで２回洗浄した後、５％　ＦＢＳ含有ＰＢＳで５０倍に希釈したＡｎｔｉ―Ｒａｔ　ＩｇＧ（ｗｈｏｌｅ　ｍｏｌｅｃｕｌｅ）―ＦＩＴＣ　ａｎｔｉｂｏｄｙ　ｐｒｏｄｕｃｅｄ　ｉｎ　ｒａｂｂｉｔ（ＳＩＧＭＡ）を加えて懸濁し、４℃で１時間静置した。５％　ＦＢＳ含有ＰＢＳで２回洗浄した後、フローサイトメーター（ＦＣ５００：Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ）で検出を行った。データ解析はＦｌｏｗＪｏ（ＴｒｅｅＳｔａｒ）で行った。その結果を図１に示す。図１のヒストグラムにおいて、横軸は抗体結合量を表すＦＩＴＣの蛍光強度、縦軸は細胞数を示す。網掛けで示すヒストグラムはｈＣＤＨ６を導入していない陰性コントロール２９３Ｔ細胞を用いた場合を示し、白抜き実線で示すヒストグラムは、ｈＣＤＨ６導入２９３Ｔ細胞を用いた場合を示す。細胞表面のｈＣＤＨ６に抗体が結合したことによって蛍光強度が増強したことを示す。ラットＩｇＧコントロールはいずれの細胞にも結合しない。この結果、作製したラット抗ＣＤＨ６モノクローナル抗体４種はｐｃＤＮＡ３．１―ｈＣＤＨ６導入２９３Ｔ細胞に結合することを確認した。

【０２２９】
２）－２　フローサイトメトリーによるラット抗ＣＤＨ６抗体のＣＤＨ６結合部位の解析
２）－２－１　ヒトＣＤＨ６各ドメイン欠失体発現ベクターの構築
ヒトＣＤＨ６の細胞外全長には５つの細胞外ドメイン、ＥＣ１（配列番号２）、ＥＣ２（配列番号３）、ＥＣ３（配列番号４）、ＥＣ４（配列番号５）、ＥＣ５（配列番号６）が存在する。ヒトＣＤＨ６全長から、５つのＥＣドメインを各一箇所ずつ欠失発現した遺伝子をＧｅｎｅＡｒｔ社で合成し、当業者に公知な方法に従い哺乳動物発現用ベクターｐ３ｘＦＬＡＧ－ＣＭＶ－９ベクター（ＳＩＧＭＡ－ＡＬＤＲＩＣＨ社）へ組み込み、ＥＣ１からＥＣ５をそれぞれ欠失した、各ドメイン欠失体発現ベクターを作製した。
【０２３０】
２）－２－２　フローサイトメトリーによるドメイン欠失体を用いたラット抗ＣＤＨ６抗体のエピトープ解析
各ＥＣドメイン欠失ベクターを導入した２９３α細胞株を用いたフローサイトメトリー解析により、ラット抗ヒトＣＤＨ６抗体の結合エピトープを同定した。インテグリンαｖおよびインテグリンβ３発現ベクターをＨＥＫ２９３細胞内に安定形質移入した細胞株２９３α細胞株に対して、実施例２）－２－１で作成した各ドメイン欠失体発現ベクター、及び全長ヒトＣＤＨ６を発現するｐｃＤＮＡ３．１－ｈＣＤＨ６をＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を用いて一過性に導入し、３７℃、５％　CO_2の条件下で一晩培養した後、細胞懸濁液を調製した。導入２９３α細胞懸濁液を遠心し、上清を除去した後、実施例１）－７で調製したラット抗ＣＤＨ６モノクローナル抗体４種（クローン番号は、ｒＧ０１９、ｒＧ０５５、ｒＧ０５６及びｒＧ０６１）又はラットＩｇＧコントロール（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）を終濃度２０ｎＭで加えて懸濁し、４℃で１時間静置した。５％　ＦＢＳ含有ＰＢＳで２回洗浄した後、５％　ＦＢＳ含有ＰＢＳで５０倍に希釈したＡｎｔｉ－Ｒａｔ　ＩｇＧ（ｗｈｏｌｅ　ｍｏｌｅｃｕｌｅ）－ＦＩＴＣ　ａｎｔｉｂｏｄｙ　ｐｒｏｄｕｃｅｄ　ｉｎ　ｒａｂｂｉｔ（ＳＩＧＭＡ）を加えて懸濁し、４℃で１時間静置した。５％　ＦＢＳ含有ＰＢＳで２回洗浄した後、フローサイトメーター（ＣａｎｔｏII：ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）で検出を行った。データ解析はＦｌｏｗＪｏ（ＴｒｅｅＳｔａｒ）で行った。その結果を図２－１～図２－６に示す。図２－１～図２－６のヒストグラムにおいて、横軸は抗体結合量を表すＦＩＴＣの蛍光強度、縦軸は細胞数を示す。網掛けで示すヒストグラムは遺伝子を導入していない陰性コントロール２９３α細胞を用いた場合を示し、白抜き実線で示すヒストグラムは、全長ｈＣＤＨ６又は各ＥＣドメイン欠失２９３細胞を用いた場合を示す。細胞表面の全長ｈＣＤＨ６又は各ＥＣドメイン欠失体に抗体が結合した場合は、蛍光強度が増強する。ラットＩｇＧコントロールはいずれの導入細胞にも結合しない。作製したラット抗ＣＤＨ６モノクローナル抗体４種は、全長ｈＣＤＨ６、ＥＣ１欠失体、ＥＣ２欠失体、ＥＣ４欠失体、及びＥＣ５欠失体には結合するが、ＥＣ３欠失体には結合しない。この結果から、ラット抗ＣＤＨ６モノクローナル抗体４種はｈＣＤＨ６のＥＣ３をエピトープとして特異的に結合することが示された。
【０２３１】
２）－３　ラット抗ＣＤＨ６抗体の内在化活性
２）－３－１　ヒト腫瘍細胞株におけるＣＤＨ６の発現確認
取得抗体の評価に用いるＣＤＨ６陽性ヒト腫瘍細胞株を選抜するため、公知データベースからＣＤＨ６発現情報を検索し、フローサイトメトリー法により細胞膜表面でのＣＤＨ６の発現を評価した。ヒト卵巣腫瘍細胞株ＮＩＨ：ＯＶＣＡＲ－３，ＰＡ－１，ＥＳ－２及びヒト腎細胞腫瘍細胞株７８６－Ｏ（全てＡＴＣＣから入手）を３７℃、５％　CO_2の条件下で培養した後、細胞懸濁液を調製した。細胞を遠心し、上清を除去した後、市販抗ヒトＣＤＨ６抗体（ＭＡＢＵ２７１５，Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）又は陰性コントロールとしてマウスＩｇＧ１（ＢＤ　Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ）を終濃度５０ｕｇ／ｍＬ加えて懸濁し、４℃で１時間静置した。５％　ＦＢＳ含有ＰＢＳで２回洗浄した後、５％　ＦＢＳ含有ＰＢＳで５０倍に希釈したＦ（ａｂ’）２　Ｆｒａｇｍｅｎｔ　ｏｆ　ＦＩＴＣ－

ｃｏｎｊｕｇａｔｅｄ　Ｇｏａｔ　Ａｎｔｉ―ｍｏｕｓｅ　ｉｍｍｕｎｏｇｌｏｂｕｌｉｎｓ（Ｄａｋｏ）を加えて懸濁し、４℃で１時間静置した。５％　ＦＢＳ含有ＰＢＳで２回洗浄した後、フローサイトメーター（ＣａｎｔｏＩＩ：ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）で検出を行った。データ解析はＦｌｏｗＪｏ（ＴｒｅｅＳｔａｒ）で行った。その結果を図３に示す。図３のヒストグラムにおいて、横軸は抗体結合量を表すＦＩＴＣの蛍光強度、縦軸は細胞数を示す。網掛けで示すヒストグラムは陰性コントロールｍＩｇＧ１で染色した場合を示し、白抜き実線で示すヒストグラムは抗ヒトＣＤＨ６抗体で染色した場合を示す。細胞表面のｈＣＤＨ６に抗体が結合したことによって蛍光強度が増強したことを示す。ｍＩｇＧ１コントロールはいずれの細胞にも結合しない。この結果、ＮＩＨ：ＯＶＣＡＲ―３，ＰＡ―１及び７８６―Ｏ細胞株は、内在的にＣＤＨ６を細胞表面上に発現することが示された。一方、ＥＳ―２細胞株はＣＤＨ６を全く発現しないことが示された。

【０２３２】

２）―３―２　ラット抗ＣＤＨ６抗体の内在化活性評価

ラット抗ＣＤＨ６抗体の内在化活性は、タンパク質合成を阻害する毒素（サポリン）を結合させた抗ラットＩｇＧ試薬Ｒａｔ―ＺＡＰ（ＡＤＶＡＮＣＥＤ　ＴＡＲＧＥＴＩＮＧ　ＳＹＳＴＥＭＳ）を用いて評価した。すなわち、ヒトＣＤＨ６陽性卵巣腫瘍細胞株ＮＩＨ：ＯＶＣＡＲ―３（ＡＴＣＣ）を４ｘ１０^{3}　ｃｅｌｌｓ／ｗｅｌｌで９６ｗｅｌｌプレートに播種して３７℃、５％　ＣＯ２の条件下で一晩培養した。ヒトＣＤＨ６陽性腎細胞腫瘍細胞株７８６―Ｏ（ＡＴＣＣ）は１ｘ１０^{3}　ｃｅｌｌｓ／ｗｅｌｌで９６ｗｅｌｌプレートに播種して一晩培養した。翌日、ラット抗ＣＤＨ６抗体（終濃度：１ｎＭ）又は、陰性コントロール抗体としてラットＩｇＧ２ｂ抗体（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）を添加した。さらに、Ｒａｔ―ＺＡＰ（終濃度：０．５ｎＭ）または、陰性コントロールとして毒素を結合していないＧｏａｔ　Ａｎｔｉ―Ｒａｔ　ＩｇＧ，　Ｆｃ（ｇａｍｍａ）　Ｆｒａｇｍｅｎｔ　Ｓｐｅｃｉｆｉｃ（ＪＡＣＫＳＯＮ　ＩＭＭＵＮＯＲＥＳＥＡＲＣＨ）（終濃度：０．５ｎＭ）を添加し、３日間３７℃、５％ＣＯ２条件下で培養した。生存細胞数は、ＣｅｌｌＴｉｔｅｒ―ＧｌｏTM Ｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｔ　Ｃｅｌｌ　Ｖｉａｂｉｌｉｔｙ　Ａｓｓａｙ（Ｐｒｏｍｅｇａ）によるＡＴＰ活性（ＲＬＵ）の定量で測定した。この評価では、ラット抗ＣＤＨ６抗体の内在化活性に依存してＲａｔ―ＺＡＰが細胞内に取り込まれ、タンパク合成を阻害するサポリンが細胞内に放出されることで、細胞増殖が抑制される。抗ＣＤＨ６抗体添加による細胞増殖抑制作用は、Ｒａｔ―ＺＡＰの代わりに陰性コントロールを添加したウェルの生存細胞数を１００％とした相対生存率で表記した。図４にグラフおよび細胞生存率の表を示す。この結果、ラット抗ＣＤＨ６抗体はＣＤＨ６に結合して内在化を引き起こすことが示された。

【０２３３】

［実施例３：ラット抗ＣＤＨ６抗体の可変領域をコードするｃＤＮＡのヌクレオチド配列の決定］

３）―１　ｒＧ０１９重鎖可変領域及び軽鎖可変領域の遺伝子断片の増幅および配列決定

３）―１―１　Ｇ０１９からのｔｏｔａｌ　ＲＮＡの調製

ｒＧ０１９の可変領域を含むｃＤＮＡを増幅するためＧ０１９よりＴＲＩｚｏｌ　Ｒｅａｇｅｎｔ（Ａｍｂｉｏｎ社）を用いてｔｏｔａｌ　ＲＮＡを調製した。

【０２３４】

３）―１―２　５’―ＲＡＣＥ　ＰＣＲによるｒＧ０１９の重鎖可変領域を含むｃＤＮＡの増幅とヌクレオチド配列の決定

重鎖可変領域を含むｃＤＮＡの増幅は、実施例３）―１―１で調製したｔｏｔａｌ　ＲＮＡの約１μｇとＳＭＡＲＴｅｒ　ＲＡＣＥ　ｃＤＮＡ　Ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ　Ｋｉｔ（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ社）を用いて実施した。ｒＧ０１９の重鎖遺伝子の可変領域のｃＤＮＡをＰＣＲで増幅するためのプライマーとして、ＵＰＭ　（Ｕｎｉｖｅｒｓａｌ　Ｐｒｉｍｅｒ　Ａ　Ｍｉｘ：ＳＭＡＲＴｅｒ　ＲＡＣＥ　ｃＤＮＡ　Ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ　Ｋｉｔに付属）、及び公知のラット重鎖の定常領域の配列から設計したプライマーを用いた。

５’―ＲＡＣＥ　ＰＣＲで増幅した重鎖の可変領域を含むｃＤＮＡをプラスミドにクローニングし、次に重鎖の可変領域のｃＤＮＡのヌクレオチド配列のシークエンス解析を実施した。

決定されたｒＧ０１９の重鎖の可変領域をコードするｃＤＮＡのヌクレオチド配列を配列番号１６に示し、アミノ酸配列を配列番号１５に示した。

【０２３５】

３）―１―３　５’―ＲＡＣＥ　ＰＣＲによるｒＧ０１９の軽鎖可変領域を含むｃＤＮＡの増幅とヌクレオチド配列の決定

実施例３）―１―２と同様の方法で実施した。ただし、ｒＧ０１９の軽鎖遺伝子の可変領域のｃＤＮＡをＰＣＲで増幅するためのプライマーとして、ＵＰＭ（Ｕｎｉｖｅｒｓａｌ　Ｐｒｉｍｅｒ　Ａ　Ｍｉｘ：ＳＭＡＲＴｅｒ　ＲＡＣＥ　ｃＤＮＡ　Ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ　Ｋｉｔに付属）、及び公知のラット軽鎖の定常領域の配列から設計したプライマーを用いた。

決定されたｒＧ０１９の軽鎖の可変領域をコードするｃＤＮＡのヌクレオチド配列を配列番号１１に示し、アミノ酸配列を配列番号１０に示した。

【０２３６】

３）―２　ｒＧ０５５重鎖可変領域及び軽鎖可変領域の遺伝子断片の増幅および配列決定

実施例３）―１と同様の方法で配列を決定した。

決定されたｒＧ０５５の重鎖の可変領域をコードするｃＤＮＡのヌクレオチド配列を配列番号２６に示し、アミノ酸配列を配列番号２５に示した。軽鎖の可変領域をコードするｃＤＮＡのヌクレオチド配列を配列番号２１に示し、アミノ酸配列を配列番号２０に示した。

【０２３７】

３）―３　ｒＧ０５６重鎖可変領域及び軽鎖可変領域の遺伝子断片の増幅および配列決定

実施例３）―１と同様の方法で配列を決定した。

決定されたｒＧ０５６の重鎖の可変領域をコードするｃＤＮＡのヌクレオチド配列を配列番号３６に示し、アミノ酸配列を配列番号３５に示した。軽鎖の可変領域をコードするｃＤＮＡのヌクレオチド配列を配列番号３１に示し、アミノ酸配列を配列番号３０に示した。

【０２３８】

３）―４　ｒＧ０６１重鎖可変領域及び軽鎖可変領域の遺伝子断片の増幅および配列決定

実施例３）―１と同様の方法で配列を決定した。

決定されたｒＧ０６１の重鎖の可変領域をコードするｃＤＮＡのヌクレオチド配列を配列番号４６に示し、アミノ酸配列を配列番号４５に示した。軽鎖の可変領域をコードするｃＤＮＡのヌクレオチド配列を配列番号４１に示し、アミノ酸配列を配列番号４０に示した。

【０２３９】

［実施例４：ヒトキメラ化抗ＣＤＨ６抗体ｃｈＧ０１９の作製］

４）―１　ヒトキメラ化抗ＣＤＨ６抗体ｃｈＧ０１９の発現ベクターの構築

４）―１―１　キメラ及びヒト化軽鎖発現ベクターｐＣＭＡ―ＬＫの構築

プラスミドｐｃＤＮＡ３．３―ＴＯＰＯ／ＬａｃＺ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）を制限酵素ＸｂａＩ及びＰｍｅＩで消化して得られる約５．４ｋｂのフラグメントと、配列番号５０に示すヒト軽鎖シグナル配列及びヒトκ鎖定常領域をコードするＤＮＡ配列を含むＤＮＡ断片をＩｎ―Ｆｕｓｉｏｎ　Ａｄｖａｎｔａｇｅ　ＰＣＲクローニングキット（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ社）を用いて結合して、ｐｃＤＮＡ３．３／ＬＫを作製した。

ｐｃＤＮＡ３．３／ＬＫからネオマイシン発現ユニットを除去することによりｐＣＭＡ―ＬＫを構築した。

【０２４０】

４）―１―２　キメラ及びヒト化ＩｇＧ１タイプ重鎖発現ベクターｐＣＭＡ―Ｇ１の構築

ｐＣＭＡ―ＬＫをＸｂａＩ及びＰｍｅＩで消化して軽鎖シグナル配列及びヒトκ鎖定常

領域を取り除いたＤＮＡ断片と、配列番号５１で示されるヒト重鎖シグナル配列及びヒトＩｇＧ１定常領域をコードするＤＮＡ配列を含むＤＮＡ断片をＩｎ－Ｆｕｓｉｏｎ　Ａｄｖａｎｔａｇｅ　ＰＣＲクローニングキット（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ社）を用いて結合して、ｐＣＭＡ－Ｇ１を構築した。

【０２４１】

４）－１－３　ｃｈＧ０１９重鎖発現ベクターの構築

配列番号５７に示すｃｈＧ０１９重鎖のヌクレオチド配列のヌクレオチド番号３６乃至４４０に示されるＤＮＡ断片を合成した（ＧＥＮＥＡＲＴ社）。Ｉｎ－Ｆｕｓｉｏｎ　ＨＤ　ＰＣＲクローニングキット（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ社）を用いて、ｐＣＭＡ－Ｇ１を制限酵素ＢｌｐＩで切断した箇所に合成したＤＮＡ断片を挿入することによりｃｈＧ０１９重鎖発現ベクターを構築した。なお、ｃｈＧ０１９重鎖は予期せぬジスルフィド結合を防ぐため、ＣＤＲ中のシステインをプロリンに置換した配列を用いた。

【０２４２】

４）－１－４　ｃｈＧ０１９軽鎖発現ベクターの構築

配列番号５２に示すｃｈＧ０１９軽鎖をコードするＤＮＡ配列を含むＤＮＡ断片を合成した（ＧＥＮＥＡＲＴ社）。Ｉｎ－Ｆｕｓｉｏｎ　ＨＤ　ＰＣＲクローニングキット（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ社）を用いて、合成したＤＮＡ断片とｐＣＭＡ－ＬＫをＸｂａＩ及びＰｍｅＩで消化して軽鎖シグナル配列及びヒトκ鎖定常領域を取り除いたＤＮＡ断片を結合することにより、ｃｈＧ０１９軽鎖発現ベクターを構築した。

【０２４３】

４）－２　ヒトキメラ化抗ＣＤＨ６抗体ｃｈＧ０１９の生産及び精製

４）－２－１　ｃｈＧ０１９の生産

ＦｒｅｅＳｔｙｌｅ　２９３Ｆ細胞（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）はマニュアルに従い、継代、培養をおこなった。対数増殖期の１．２×10^9個のＦｒｅｅＳｔｙｌｅ　２９３Ｆ細胞（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）を３Ｌ　Ｆｅｒｎｂａｃｈ　Ｅｒｌｅｎｍｅｙｅｒ　Ｆｌａｓｋ（ＣＯＲＮＩＮＧ社）に播種し、ＦｒｅｅＳｔｙｌｅ２９３　ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　ｍｅｄｉｕｍ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）で希釈して２．０×10^6細胞／ｍｌに調製した。４０ｍｌのＯｐｔｉ－Ｐｒｏ　ＳＦＭ培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）に０．２４ｍｇの重鎖発現ベクターと０．３６ｍｇの軽鎖発現ベクターと１．８ｍｇのＰｏｌｙｅｔｈｙｌｅｎｅｉｍｉｎｅ（Ｐｏｌｙｓｃｉｅｎｃｅ　＃２４７６５）を加えて穏やかに攪拌し、さらに５分間放置した後にＦｒｅｅＳｔｙｌｅ　２９３Ｆ細胞に添加した。３７℃、８％CO_2インキュベーターで４時間、９０ｒｐｍで振とう培養後に６００ｍｌのＥＸ－ＣＥＬＬ　ＶＰＲＯ培地（ＳＡＦＣ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ社）、１８ｍｌのＧｌｕｔａＭＡＸ　Ｉ（ＧＩＢＣＯ社）、及び３０ｍｌのＹｅａｓｔｏｌａｔｅ　Ｕｌｔｒａｆｉｌｔｒａｔｅ（ＧＩＢＣＯ社）を添加し、３７℃、８％CO_2インキュベーターで７日間、９０ｒｐｍで振とう培養して得られた培養上清をＤｉｓｐｏｓａｂｌｅ　Ｃａｐｓｕｌｅ　Ｆｉｌｔｅｒ　（Ａｄｖａｎｔｅｃ　＃ＣＣＳ－０４５－Ｅ１Ｈ）でろ過した。

【０２４４】

４）－２－２　ｃｈＧ０１９の精製

実施例４）－２－１で得られた培養上清をｒＰｒｏｔｅｉｎ　Ａアフィニティークロマトグラフィーの１段階工程で精製した。培養上清をＰＢＳで平衡化したＭａｂＳｅｌｅｃｔＳｕＲｅが充填されたカラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ社製）にアプライしたのちに、カラム容量の２倍以上のＰＢＳでカラムを洗浄した。次に２Ｍアルギニン塩酸塩溶液（ｐＨ４．０）で溶出し、抗体の含まれる画分を集めた。その画分を透析（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社、Ｓｌｉｄｅ－Ａ－Ｌｙｚｅｒ　Ｄｉａｌｙｓｉｓ　Ｃａｓｓｅｔｔｅ）によりＨＢＳｏｒ（２５ｍＭ　ヒスチジン／５％　ソルビトール、ｐＨ６．０）へのバッファー置換を行った。Ｃｅｎｔｒｉｆｕｇａｌ　ＵＦ　Ｆｉｌｔｅｒ　Ｄｅｖｉｃｅ　ＶＩＶＡＳＰＩＮ２０（分画分子量ＵＦ１０Ｋ，Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ社）で抗体を濃縮し、ＩｇＧ濃度を５ｍｇ／ｍｌ以上に調製した。最後にＭ

ｉｎｉｓａｒｔ―Ｐｌｕｓ　ｆｉｌｔｅｒ（Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ社）でろ過し、精製サンプルとした。

【０２４５】

４）―３　ヒトキメラ化抗ＣＤＨ６抗体ｃｈＧ０１９の結合性評価

４）―２で精製したヒトキメラ化抗ＣＤＨ６抗体ｃｈＧ０１９のＣＤＨ６結合性をフローサイトメトリー法により確認した。実施例１）―１で作製したｐｃＤＮＡ３．１―ｈＣＤＨ６、又はｐｃＤＮＡ３．１―ｃｙｎｏＣＤＨ６、又はｐｃＤＮＡ３．１をそれぞれ２９３α細胞にＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００を用いて一過性に導入し、３７℃、５％　CO_2の条件下で一晩培養した後、細胞懸濁液を調製した。これらの細胞懸濁液にｃｈＧ０１９を加えて４℃で１時間静置した後、５％　ＦＢＳ含有ＰＢＳで２回洗浄し、５％　ＦＢＳ含有ＰＢＳで５００倍に希釈したＰＥ標識Ｆ（ａｂ’）２　Ｆｒａｇｍｅｎｔ抗ヒトＩｇＧ，Ｆｃγ抗体（ＪＡＣＫＳＯＮ　ＩＭＭＵＮＯＲＥＳＥＡＲＣＨ）を加えて懸濁し、４℃で１時間静置した。５％　ＦＢＳ含有ＰＢＳで２回洗浄した後、５％　ＦＢＳ含有ＰＢＳに再懸濁し、フローサイトメーター（ＣａｎｔｏＩＩ：ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）で検出を行った。データ解析はＦｌｏｗＪｏ（ＴｒｅｅＳｔａｒ）で行った。図５に示すとおり、ｃｈＧ０１９は陰性コントロールであるｐｃＤＮＡ３．１導入２９３Ｔ細胞には結合せず、ｐｃＤＮＡ３．１―ｈＣＤＨ６及びｐｃＤＮＡ３．１―ｃｙｎｏＣＤＨ６導入２９３Ｔ細胞に抗体濃度依存的に結合した。図５において横軸は抗体濃度を示し、縦軸は結合量をＭｅａｎＦｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ　Ｉｎｔｅｎｓｉｔｙ（平均蛍光強度）で示す。この結果から、ｃｈＧ０１９が、ヒトおよびカニクイザルＣＤＨ６に対して特異的結合し、結合活性はほぼ同等であることがわかる。

【０２４６】

［実施例５：ヒト化抗ＣＤＨ６抗体の作製］

５）―１　抗ＣＤＨ６抗体のヒト化体デザイン

５）―１―１　ｃｈＧ０１９の可変領域の分子モデリング

ｃｈＧ０１９の可変領域の分子モデリングは、ホモロジーモデリングとして公知の方法（Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ，２０３，１２１―１５３，（１９９１））を利用した。ｃｈＧ０１９の重鎖と軽鎖の可変領域に対して高い配列同一性を有するＰｒｏｔｅｉｎ　Ｄａｔａ　Ｂａｎｋ（Ｎｕｃ．Ａｃｉｄ　Ｒｅｓ．３５，Ｄ３０１―Ｄ３０３（２００７））に登録されている構造（ＰＤＢ　ＩＤ：２Ｉ９Ｌ）を鋳型に、市販のタンパク質立体構造解析プログラムＢｉｏＬｕｍｉｎａｔｅ（Ｓｃｈｒｏｄｉｎｇｅｒ社製）を用いて行った。

【０２４７】

５）―１―２　ヒト化ｈＧ０１９に対するアミノ酸配列の設計

ｃｈＧ０１９は、ＣＤＲグラフティング（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８６，１００２９―１００３３（１９８９））によりヒト化した。ＫＡＢＡＴ　ｅｔ　ａｌ．（Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ　ｏｆ　Ｐｒｏｔｅｉｎｓ　ｏｆ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，５ｔｈ　Ｅｄ．Ｐｕｂｌｉｃ　Ｈｅａｌｔｈ　Ｓｅｒｖｉｃｅ　Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ　ｏｆ　Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，ＭＤ．（１９９１））において既定されるヒトのｇａｍｍａ鎖サブグループ１およびｋａｐｐａ鎖サブグループ１のコンセンサス配列が、ｃｈＧ０１９のフレームワーク領域に対して高い同一性を有することから、それぞれ、重鎖と軽鎖のアクセプターとして選択された。アクセプター上に移入すべきドナー残基は、Ｑｕｅｅｎ　ｅｔ　ａｌ．（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８６，１００２９―１００３３（１９８９））によって与えられる基準などを参考に三次元モデルを分析することで選択された。

【０２４８】

５）―２　ｃｈＧ０１９重鎖のヒト化

設計された３種の重鎖をｈＨ０１、ｈＨ０２及びｈＨ０４と命名した。ｈＨ０１の重鎖全長アミノ酸配列を、配列番号６９に記載する。配列番号６９のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を、配列番号７０に記載する。ｈＨ０２の重鎖全長アミノ酸配列を、

配列番号７３に記載する。配列番号７３のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を、配列番号７４に記載する。ｈＨ０４の重鎖全長アミノ酸配列を、配列番号７７に記載する。配列番号７７のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を、配列番号７８に記載する。

【０２４９】

５）－３　ｃｈＧ０１９軽鎖のヒト化

設計された２種の軽鎖をｈＬ０２およびｈＬ０３と命名した。ｈＬ０２の軽鎖全長アミノ酸配列を、配列番号６１に記載する。配列番号６１のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を、配列番号６２に記載する。ｈＬ０３の軽鎖全長アミノ酸配列を、配列番号６５に記載する。配列番号６５のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列は、配列番号６６に記載する。

【０２５０】

５）－４　重鎖及び軽鎖の組み合わせによるヒト化ｈＧ０１９の設計

ｈＨ０１及びｈＬ０２からなる抗体を「Ｈ０１Ｌ０２抗体」又は「Ｈ０１Ｌ０２」と称する。ｈＨ０２及びｈＬ０２からなる抗体を「Ｈ０２Ｌ０２抗体」又は「Ｈ０２Ｌ０２」と称する。ｈＨ０２及びｈＬ０３からなる抗体を「Ｈ０２Ｌ０３抗体」又は「Ｈ０２Ｌ０３」と称する。ｈＨ０４及びｈＬ０２からなる抗体を「Ｈ０４Ｌ０２抗体」又は「Ｈ０４Ｌ０２」と称する。

【０２５１】

５）－５　ヒト化抗ＣＤＨ６抗体の発現

５）－５－１　ヒト化ｈＧ０１９の重鎖発現ベクターの構築

５）－５－１－１　ヒト化ｈＧ０１９－Ｈ０１タイプ重鎖発現ベクターの構築

配列番号７０に示すヒト化ｈＧ０１９－Ｈ０１タイプ重鎖のヌクレオチド配列のヌクレオチド番号３６乃至４４０に示されるＤＮＡ断片を合成した（ＧＥＮＥＡＲＴ社）。実施例４）－１－３と同様の方法でヒト化ｈＧ０１９－Ｈ０１タイプ重鎖発現ベクターを構築した。

【０２５２】

５）－５－１－２　ヒト化ｈＧ０１９－Ｈ０２タイプ重鎖発現ベクターの構築

配列番号７４に示すヒト化ｈＧ０１９－Ｈ０２タイプ重鎖のヌクレオチド配列のヌクレオチド番号３６乃至４４０に示されるＤＮＡ断片を合成した（ＧＥＮＥＡＲＴ社）。実施例４）－１－３と同様の方法でヒト化ｈＧ０１９－Ｈ０２タイプ重鎖発現ベクターを構築した。

【０２５３】

５）－５－１－３　ヒト化ｈＧ０１９－Ｈ０４タイプ重鎖発現ベクターの構築

配列番号７８に示すヒト化ｈＧ０１９－Ｈ０４タイプ重鎖のヌクレオチド配列のヌクレオチド番号３６乃至４４０に示されるＤＮＡ断片を合成した（ＧＥＮＥＡＲＴ社）。実施例４）－１－３と同様の方法でヒト化ｈＧ０１９－Ｈ０４タイプ重鎖発現ベクターを構築した。

【０２５４】

５）－５－２　ヒト化ｈＧ０１９の軽鎖発現ベクターの構築

５）－５－２－１　ヒト化ｈＧ０１９－Ｌ０２タイプ軽鎖発現ベクターの構築

配列番号６２に示すヒト化ｈＧ０１９－Ｌ０２タイプ軽鎖のヌクレオチド配列のヌクレオチド番号３７乃至３９９に示されるヒト化ｈＧ０１９－Ｌ０２タイプ軽鎖の可変領域をコードするＤＮＡ配列を含むＤＮＡ断片を合成した（ＧＥＮＥＡＲＴ社）。Ｉｎ－Ｆｕｓｉｏｎ　ＨＤ　ＰＣＲクローニングキット（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ社）を用いて、ｐＣＭＡ－ＬＫを制限酵素ＢｓｉＷＩで切断した箇所に合成したＤＮＡ断片を挿入することによりヒト化ｈＧ０１９－Ｌ０２タイプ軽鎖発現ベクターを構築した。

【０２５５】

５）－５－２－２　ヒト化ｈＧ０１９－Ｌ０３タイプ軽鎖発現ベクターの構築

配列番号６６に示すヒト化ｈＧ０１９－Ｌ０３タイプ軽鎖のヌクレオチド配列のヌクレ

オチド番号３７乃至３９９に示されるヒト化ｈＧ０１９―Ｌ０３タイプ軽鎖の可変領域をコードするＤＮＡ配列を含むＤＮＡ断片を合成した（ＧＥＮＥＡＲＴ社）。実施例５）―５―２―１と同様の方法でヒト化ｈＧ０１９―Ｌ０３タイプ軽鎖発現ベクターを構築した。

【０２５６】

５）―５―３　ヒト化ｈＧ０１９の調製

５）―５―３―１　Ｈ０１Ｌ０２、Ｈ０２Ｌ０２、Ｈ０２Ｌ０３、Ｈ０４Ｌ０２の生産

実施例４）―２―１と同様の方法で生産した。実施例５）―４に示した重鎖と軽鎖の組み合わせにより、Ｈ０１Ｌ０２、Ｈ０２Ｌ０２、Ｈ０２Ｌ０３、Ｈ０４Ｌ０２を生産した。

【０２５７】

５）―５―３―２　Ｈ０１Ｌ０２、Ｈ０２Ｌ０２、Ｈ０２Ｌ０３、Ｈ０４Ｌ０２の２ｓｔｅｐ精製

実施例５）―５―３―１で得られた培養上清をｒＰｒｏｔｅｉｎ　Ａアフィニティークロマトグラフィーとセラミックハイドロキシアパタイトの２段階工程で精製した。培養上清をＰＢＳで平衡化したＭａｂＳｅｌｅｃｔＳｕＲｅが充填されたカラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ社製）にアプライした後に、カラム容量の２倍以上のＰＢＳでカラムを洗浄した。次に２Ｍアルギニン塩酸塩溶液（ｐＨ４．０）で抗体を溶出した。抗体の含まれる画分を透析（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社、Ｓｌｉｄｅ―Ａ―Ｌｙｚｅｒ　Ｄｉａｌｙｓｉｓ　Ｃａｓｓｅｔｔｅ）によりＰＢＳへのバッファー置換を行い、５ｍＭリン酸ナトリウム／５０ｍＭ　ＭＥＳ／ｐＨ７．０のバッファーで５倍希釈した後に、５ｍＭ　ＮａＰｉ／５０ｍＭ　ＭＥＳ／３０ｍＭ　ＮａＣｌ／ｐＨ７．０のバッファーで平衡化したセラミックハイドロキシアパタイトカラム（日本バイオラッド、Ｂｉｏ―Ｓｃａｌｅ　ＣＨＴ　Ｔｙｐｅ―１　Ｈｙｄｒｏｘｙａｐａｔｉｔｅ　Ｃｏｌｕｍｎ）にアプライした。塩化ナトリウムによる直線的濃度勾配溶出を実施し、抗体の含まれる画分を集めた。その画分を透析（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社、Ｓｌｉｄｅ―Ａ―Ｌｙｚｅｒ　Ｄｉａｌｙｓｉｓ　Ｃａｓｓｅｔｔｅ）によりＨＢＳｏｒ（２５ｍＭ　ヒスチジン／５％　ソルビトール、ｐＨ６．０）へのバッファー置換を行った。Ｃｅｎｔｒｉｆｕｇａｌ　ＵＦ　Ｆｉｌｔｅｒ　Ｄｅｖｉｃｅ　ＶＩＶＡＳＰＩＮ２０（分画分子量ＵＦ１０Ｋ，Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ社）にて抗体を濃縮し、ＩｇＧ濃度を２０ｍｇ／ｍｌに調製した。最後にＭｉｎｉｓａｒｔ―Ｐｌｕｓ　ｆｉｌｔｅｒ（Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ社）でろ過し、精製サンプルとした。

【０２５８】

［参考例１：抗ＣＤＨ６抗体ＮＯＶ０７１２の作製］

実施例で用いた抗ＣＤＨ６抗体ＮＯＶ０７１２は、国際公開第２０１６／０２４１９５号に記載のＮＯＶ０７１２の軽鎖全長、及び重鎖全長のアミノ酸配列（それぞれ、国際公開第２０１６／０２４１９５の配列番号２３５及び配列番号２３４）を参照して作製した。

【０２５９】

参考例１）―１抗ＣＤＨ６抗体ＮＯＶ０７１２

参考例１）―１―１　抗ＣＤＨ６抗体ＮＯＶ０７１２の重鎖発現ベクターの構築

配列番号８４に示すＮＯＶ０７１２の重鎖のヌクレオチド配列のヌクレオチド番号３６乃至４２８に示されるＮＯＶ０７１２の重鎖の可変領域を含むＤＮＡ断片を合成した（ＧＥＮＥＡＲＴ社）。実施例４）―１―３と同様の方法でＮＯＶ０７１２の重鎖発現ベクターを構築した。当該ＮＯＶ０７１２の重鎖発現ベクターにより発現するＮＯＶ０７１２の重鎖のアミノ酸配列を、配列番号８３に示す。配列番号８３に示されるアミノ酸配列中、１～１９番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列はシグナル配列である。

【０２６０】

参考例１）―１―２　抗ＣＤＨ６抗体ＮＯＶ０７１２の軽鎖発現ベクターの構築

配列番号８２に示すＮＯＶ０７１２の軽鎖のヌクレオチド配列のヌクレオチド番号３７

乃至４０５に示されるＮＯＶ０７１２の軽鎖の可変領域をコードするＤＮＡ配列を含むＤＮＡ断片を合成した（ＧＥＮＥＡＲＴ社）。実施例５）―５―２―１と同様の方法でＮＯＶ０７１２の軽鎖発現ベクターを構築した。当該ＮＯＶ０７１２の軽鎖発現ベクターにより発現するＮＯＶ０７１２の軽鎖のアミノ酸配列を、配列番号８１に示す。配列番号８１に示されるアミノ酸配列中、１～２０番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列はシグナル配列である。

【０２６１】

参考例１）―２　抗ＣＤＨ６抗体ＮＯＶ０７１２の調製

参考例１）―２―１　抗ＣＤＨ６抗体ＮＯＶ０７１２の生産

実施例４）―２―１と同様の方法でＮＯＶ０７１２を生産した。

【０２６２】

参考例１）―２―２　抗ＣＤＨ６抗体ＮＯＶ０７１２のｌｓｔｅｐ精製

参考例１）―２―１で得られた培養上清から実施例４）―２―２と同様の方法で抗ＣＤＨ６抗体ＮＯＶ０７１２を精製した（抗体濃度ＨＢＳｏｒで５ｍｇ／ｌ）。

【０２６３】

［実施例６：ヒト化ｈＧ０１９およびＮＯＶ０７１２のｉｎ　ｖｉｔｒｏ評価］

６）―１　ヒト化ｈＧ０１９の結合性評価

６）―１―１　ヒト化ｈＧ０１９のヒトＣＤＨ６抗原結合能

抗体と抗原（Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ　Ｈｕｍａｎ　ＣＤＨ６　Ｆｃ　Ｈｉｓ　ｃｈｉｍｅｒａ，　Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）との解離定数測定は、Ｂｉａｃｏｒｅ　Ｔ２００（ＧＥヘルスケアバイオサイエンス）を使用し、固定化した抗Ｈｉｓ抗体に抗原をリガンドとして捕捉（キャプチャー）し、抗体をアナライトとして測定するキャプチャー法にて行った。抗ヒスチジン抗体（Ｈｉｓ　ｃａｐｔｕｒｅ　ｋｉｔ、ＧＥヘルスケアバイオサイエンス）は、センサーチップＣＭ５（ＧＥヘルスケアバイオサイエンス）へ、アミンカップリング法にて約１０００ＲＵ共有結合させた。リファレンスセルにも同様に固定化した。ランニングバッファーとして１ｍＭ　$CaCl_2$を添加したＨＢＳ―Ｐ＋（１０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ　ｐＨ７．４、０．１５Ｍ　ＮａＣｌ、０．０５％　Ｓｕｒｆａｃｔａｎｔ　Ｐ２０）を用いた。抗ヒスチジン抗体を固定化したチップ上に、抗原を６０秒間添加した後、抗体の希釈系列溶液（０．３９１―１００ｎＭ）を流速３０μｌ／分で３００秒間添加し、引き続き６００秒間の解離相をモニターした。再生溶液として、５Ｍ　ＭｇＣｌ２を添加したＧｌｙｃｉｎｅ溶液ｐＨｌ．５を流速１０μｌ／分で３０秒間、２回添加した。データの解析は、分析ソフトウェア（ＢＩＡｅｖａｌｕａｔｉｏｎ　ｓｏｆｔｗａｒｅ，　ｖｅｒｓｉｏｎ　４．１）のＳｔｅａｄｙ　Ｓｔａｔｅ　Ａｆｆｉｎｉｔｙモデルを用いて、解離定数（ＫＤ）を算出した。結果を表２に示す。

【０２６４】

【表２】

	抗体	ＫＤ（Ｍ）
1	Ｈ０２Ｌ０２	１．５Ｅ－０９
2	Ｈ０２Ｌ０２	１．１Ｅ－０９
3	Ｈ０２Ｌ０３	１．４Ｅ－０９
4	Ｈ０４Ｌ０２	１．１Ｅ－０９

【０２６５】

６）―１―２　ヒト、サル、マウス、ラットＣＤＨ６に対する結合性

実施例１）－１で作製したｐｃＤＮＡ３．１－ｈＣＤＨ６、ｐｃＤＮＡ３．１－ｃｙｎｏＣＤＨ６、ｐ３ｘＦＬＡＧ－ＣＭＶ－９－ｍＣＤＨ６、ｐ３ｘＦＬＡＧ－ＣＭＶ－９－ｒＣＤＨ６を、２９３α細胞にＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００を用いて一過性に導入し、３７℃、５％　CO_2の条件下で一晩培養した後、細胞懸濁液を調製した。陰性コントロールとして、遺伝子導入していない２９３α細胞を用いた。上記にて作製した２９３α細胞懸濁液を遠心し、上清を除去した後、実施例５）－５－３で調製したヒト化ｈＧ０１９抗体４種（クローン番号は、Ｈ０１Ｌ０２、Ｈ０２Ｌ０２、Ｈ０２Ｌ０３およびＨ０４Ｌ０２）、又は、ヒトＩｇＧ１コントロール（Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ）を加えて懸濁し、４℃で１時間静置した。５％　ＦＢＳ含有ＰＢＳで２回洗浄した後、５％　ＦＢＳ含有ＰＢＳで５００倍に希釈したａｎｔｉ－ｈｕｍａｎ　Ｆｃｇ　ＰＥ　ｇｏａｔ　Ｆ（ａｂ’）（Ｊａｃｋｓｏｎ　ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ）を加えて懸濁し、４℃で１時間静置した。５％　ＦＢＳ含有ＰＢＳで２回洗浄した後、フローサイトメーター（ＣａｎｔｏII：ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）で検出を行った。データ解析はＦｌｏｗＪｏ（ＴｒｅｅＳｔａｒ）で行った。図６－１及び図６－２において横軸は抗体濃度を示し、縦軸は結合量をＭｅａｎＦｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ　Ｉｎｔｅｎｓｉｔｙ（平均蛍光強度）で示す。図６－１及び図６－２に示すとおり、陰性コントロールであるヒトＩｇＧ１コントロールは、いずれのＣＤＨ６遺伝子導入細胞に対しても結合しない。ヒト化ｈＧ０１９抗体４種（クローン番号は、Ｈ０１Ｌ０２、Ｈ０２Ｌ０２、Ｈ０２Ｌ０３およびＨ０４Ｌ０２）はヒト及びカニクイザルＣＤＨ６に結合するが、マウス及びラットＣＤＨ６には結合しない。いずれの抗体も、陰性コントロールである空ベクターｐｃＤＮＡ３．１導入細胞には結合しない。一方、ＮＯＶ０７１２抗体はヒト、カニクイザル、マウス、及びラットＣＤＨ６全てに結合活性を示すことが国際公開第２０１６／０２４１９５号に示されている。この結果、本明細書で取得したヒト化ｈＧ０１９抗体４種は、ＮＯＶ０７１２抗体と異なる結合性質を示す抗ＣＤＨ６抗体であることが示された。

【０２６６】

６）－２　ヒト化ｈＧ０１９およびＮＯＶ０７１２のＣＤＨ６結合部位の解析

６）－２－１　ドメイン欠失体を用いたエピトープ解析

実施例２）－２－１で作成した各ドメイン欠失体発現ベクター、及び全長ｈＣＤＨ６を発現するｐｃＤＮＡ３．１－ｈＣＤＨ６をＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を用いて一過性に導入し、３７℃、５％　CO_2の条件下で一晩培養した後、細胞懸濁液を調製した。遺伝子導入した２９３α細胞懸濁液を遠心し、上清を除去した後、実施例５）－５－３で調製したヒト化ｈＧ０１９抗体４種（クローン番号は、Ｈ０１Ｌ０２、Ｈ０２Ｌ０２、Ｈ０２Ｌ０３およびＨ０４Ｌ０２）、又は、参考例１で調製した抗ＣＤＨ６抗体ＮＯＶ０７１２、又は、陰性コントロールとしてヒトＩｇＧ１（Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ）を加えて懸濁し、４℃で１時間静置した。５％　ＦＢＳ含有ＰＢＳで２回洗浄した後、５％　ＦＢＳ含有ＰＢＳで５００倍に希釈したＡＰＣ－ａｎｔｉ－ｈｕｍａｎ　ＩｇＧ　ｇｏａｔ　Ｆ（ａｂ’）２（Ｊａｃｋｓｏｎ　ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ）を加えて懸濁し、４℃で１時間静置した。５％　ＦＢＳ含有ＰＢＳで２回洗浄した後、フローサイトメーター（ＣａｎｔｏII：ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）で検出を行った。データ解析はＦｌｏｗＪｏ（ＴｒｅｅＳｔａｒ）で行った。その結果を図７－１～図７－６に示す。図７－１～図７－６のヒストグラムにおいて、横軸は抗体結合量を表すＡＰＣの蛍光強度、縦軸は細胞数を示す。網掛けで示すヒストグラムは遺伝子を導入していない陰性コントロール２９３α細胞を用いた場合を示し、白抜き実線で示すヒストグラムは、全長ｈＣＤＨ６又は各ＥＣドメイン欠失２９３α細胞を用いた場合を示す。細胞表面の全長ｈＣＤＨ６又は各ＥＣドメイン欠失体に抗体が結合した場合は、蛍光強度が増強する。ヒトＩｇＧ１コントロールはいずれの導入細胞にも結合しない。ヒト化ｈＧ０１９抗体４種（クローン番号は、Ｈ０１Ｌ０２、Ｈ０２Ｌ０２、Ｈ０２Ｌ０３およびＨ０４Ｌ０２）は、全長ｈＣＤＨ６、ＥＣ１欠失体、ＥＣ２欠失体、ＥＣ４欠失体、及びＥＣ５欠失体には結合するが、ＥＣ３欠失体には結合しない。すなわち、ヒト化ｈＧ０１９抗体４種はｈＣＤＨ６のＥＣ３をエピトープとして特異的に結合する

ことが示された。一方、抗ＣＤＨ６抗体ＮＯＶ０７１２は、全長ｈＣＤＨ６、ＥＣ１欠失体、ＥＣ２欠失体、ＥＣ３欠失体、及びＥＣ４欠失体には結合するが、ＥＣ５欠失体には結合しない。すなわち、抗ＣＤＨ６抗体ＮＯＶ０７１２抗体はｈＣＤＨ６のＥＣ５をエピトープとして特異的に結合することが示され、国際公開第２０１６／０２４１９５号に記載されているＮＯＶ０７１２のエピトープ情報と一致する。この結果から、ＮＯＶ０７１２と本明細書で取得したヒト化ｈＧ０１９抗体４種は、異なる性質を示す抗ＣＤＨ６抗体であることが示された。

【０２６７】

６）－２－２　抗体の結合競合アッセイ

６）－２－２－１　７８６－Ｏ／ｈＣＤＨ６安定発現細胞株の作製

７８６－Ｏ／ｈＣＤＨ６安定発現細胞株は、７８６－Ｏ細胞（ＡＴＣＣ）にヒトＣＤＨ６全長発現用組換えレトロウイルスを感染させることにより作製した。ヒトＣＤＨ６発現レトロウイルスベクター（ｐＱＣＸＩＮ－ｈＣＤＨ６）は、ヒトＣＤＨ６タンパク質（ＮＰ＿００４９２３）をコードするｃＤＮＡ発現ベクター（ＯｒｉＧｅｎｅ社ＲＣ２１７８８９）を用いて、当業者に公知な方法に従いレトロウイルスベクターｐＱＣＸＩＮ（ＣＬＯＮＴＥＣＨ）に組み込むことにより作製された。ＦｕＧｅｎｅ　ＨＤ（Ｐｒｏｍｅｇａ）を用いてレトロウイルスパッケージング細胞ＲｅｔｒｏＰａｃｋ　ＰＴ６７（ＣＬＯＮＴＥＣＨ）にｐＱＣＸＩＮ－ｈＣＤＨ６を一過性に導入し、４８時間後に組換えレトロウイルスを含む培養上清を回収し、７８６－Ｏ細胞培養系に添加することで同細胞に感染させた。感染３日後から、Ｇ４１８（Ｇｉｂｃｏ）を終濃度５０ｍｇ／ｍＬで添加した培地で３７℃、５％　ＣＯ２の条件下で培養を行い感染細胞の薬剤選抜を行うことで、ヒトＣＤＨ６を安定的に発現する細胞株７８６－Ｏ／ｈＣＤＨ６を樹立した。実施例２）－３－１と同様にフローサイトメトリーにて安定発現株でのヒトＣＤＨ６の高発現を確認した（図８）。検出用抗体には５％　ＦＢＳ含有ＰＢＳで５００倍に希釈したＧｏａｔ　ａｎｔｉ－Ｍｏｕｓｅ　ＩｇＧ１　Ｓｅｃｏｎｄａｒｙ　Ａｎｔｉｂｏｄｙ　Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　６４７（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を使用した。その結果を図８に示す。図８のヒストグラムにおいて、横軸は抗体結合量を表すＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　６４７の蛍光強度、縦軸は細胞数を示す。網掛けで示すヒストグラムは陰性コントロールｍＩｇＧ１で染色した場合を示し、白抜き実線で示すヒストグラムは抗ヒトＣＤＨ６抗体で染色した場合を示す。細胞表面のｈＣＤＨ６に抗体が結合したことによって蛍光強度が増強したことを示す。ｍＩｇＧ１コントロールはいずれの細胞にも結合しない。この結果、７８６－Ｏ／ｈＣＤＨ６安定発現細胞株では親株７８６－Ｏ細胞と比較して、ヒトＣＤＨ６を高発現することが示された。

【０２６８】

６）－２－２－２　ラベル化Ｈ０１Ｌ０２及びラベル化ＮＯＶ０７１２を用いた結合競合アッセイ

Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　４８８　Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ　Ａｎｔｉｂｏｄｙ　Ｌａｂｅｌｉｎｇ　Ｋｉｔ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）を用いて、ラベル化Ｈ０１Ｌ０２及びラベル化ＮＯＶ０７１２を作製した。７）－２－２－１で作製した７８６－Ｏ／ｈＣＤＨ６安定発現細胞株の細胞懸濁液を遠心し、上清を除去した後、ラベル化ＮＯＶ０７１２又はラベル化Ｈ０１Ｌ０２を終濃度５ｎＭで添加し、さらに実施例５）－５－３で調製したヒト化ｈＧ０１９抗体４種（クローン番号は、Ｈ０１Ｌ０２、Ｈ０２Ｌ０２、Ｈ０２Ｌ０３およびＨ０４Ｌ０２）、又は、参考例１で調製した抗ＣＤＨ６抗体ＮＯＶ０７１２、又は、陰性コントロールとしてヒトＩｇＧ１（Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ）を図９の横軸で示す終濃度で添加して懸濁し、４℃で１時間静置した。５％　ＦＢＳ含有ＰＢＳで２回洗浄した後、フローサイトメーター（ＣａｎｔｏＩＩ：ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）で検出を行った。データ解析はＦｌｏｗＪｏ（ＴｒｅｅＳｔａｒ）で行った。その結果を図９に示す。横軸はラベル化していない抗体の添加時の終濃度を示し、縦軸は結合量をＭｅａｎＦｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ　Ｉｎｔｅｎｓｉｔｙ（平均蛍光強度）で示す。ラベル化ＮＯＶ０７１２を添加した細胞にラベル化していないＮＯＶ０７１２を添加した場合は、同じ

エピトープを持ち結合が競合するため、添加濃度依存的にラベル化していない抗体に置き換わりラベル化抗体の結合量が減少する。一方、ラベル化ＮＯＶ０７１２を添加した細胞にヒト化ｈＧ０１９抗体４種、又は陰性コントロールとしてヒトＩｇＧ１を添加しても、ラベル化抗体の結合量に変化は無いことから、これらの抗体はエピトープが異なり結合が競合しないことが示される。同様に、ラベル化Ｈ０１Ｌ０２を添加した細胞にラベル化していないヒト化ｈＧ０１９抗体４種を添加した場合は、同じエピトープを持ち結合が競合するため、添加濃度依存的にラベル化していない抗体に置き換わりラベル化抗体の結合量が減少する。一方、ラベル化Ｈ０１Ｌ０２を添加した細胞にＮＯＶ０７１２、又は陰性コントロールとしてヒトＩｇＧ１を添加しても、ラベル化抗体の結合量に変化は無いことから、これらの抗体はエピトープが異なり結合が競合しないことが示される。

【０２６９】

６）―３　ヒト化ｈＧ０１９およびＮＯＶ０７１２の内在化活性評価

ヒト化ｈＧ０１９およびＮＯＶ０７１２の内在化活性は、タンパク質合成を阻害する毒素（サポリン）を結合させた抗ヒトＩｇＧ試薬Ｈｕｍ―ＺＡＰ（ＡＤＶＡＮＣＥＤ　ＴＡＲＧＥＴＩＮＧ　ＳＹＳＴＥＭＳ）を用いて評価した。すなわち、ヒトＣＤＨ６陽性卵巣腫瘍細胞株ＮＩＨ：ＯＶＣＡＲ―３（ＡＴＣＣ）を４ｘ１０^{3}　ｃｅｌｌｓ／ｗｅｌｌで９６ｗｅｌｌプレートに播種して３７℃、５％　ＣＯ２の条件下で一晩培養した。ヒトＣＤＨ６陽性腎細胞腫瘍細胞株７８６―Ｏ（ＡＴＣＣ）は１ｘ１０^{3}　ｃｅｌｌｓ／ｗｅｌｌで９６ｗｅｌｌプレートに播種して一晩培養した。ヒトＣＤＨ６陽性卵巣腫瘍細胞株ＰＡ―１（ＡＴＣＣ）を１ｘ１０^{3}　ｃｅｌｌｓ／ｗｅｌｌで９６ｗｅｌｌプレートに播種して３７℃、５％　ＣＯ２の条件下で一晩培養した。翌日、抗ＣＤＨ６抗体（終濃度：１ｎＭ）、又は、陰性コントロール抗体としてヒトＩｇＧ１抗体（Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ）を添加した。さらにＨｕｍ―ＺＡＰ（終濃度：０．５ｎＭ）または、陰性コントロールとして毒素を結合していないＦ（ａｂ’）２　Ｆｒａｇｍｅｎｔ　Ｇｏａｔ　Ａｎｔｉ―ｈｕｍａｎ　ＩｇＧ，Ｆｃ（ｇａｍｍａ）　Ｆｒａｇｍｅｎｔ　Ｓｐｅｃｉｆｉｃ（ＪＡＣＫＳＯＮ　ＩＭＭＵＮＯＲＥＳＥＡＲＣＨ）（終濃度：０．５ｎＭ）を添加し、３日間３７℃、５％ＣＯ２条件下で培養した。生存細胞数は、ＣｅｌｌＴｉｔｅｒ―Ｇｌｏ™ Ｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｔ　Ｃｅｌｌ　Ｖｉａｂｉｌｉｔｙ　ＡｓｓａｙによるＡＴＰ活性（ＲＬＵ）の定量で測定した。この評価では、ヒト化抗ＣＤＨ６抗体の内在化活性に依存してＨｕｍ―ＺＡＰが細胞内に取り込まれ、タンパク合成を阻害するサポリンが細胞内に放出されることで、細胞増殖が抑制される。抗ＣＤＨ６抗体添加による細胞増殖抑制作用は、Ｈｕｍ―ＺＡＰの代わりに陰性コントロールを添加したウェルの生存細胞数を１００％とした相対生存率で表記した。図１０―l～図１０―３にグラフおよび細胞生存率の表を示す。本実験において内在化活性が強い抗体は低い細胞生存率を示すと考えられる。この結果、ＮＯＶ０７１２はヒト化ｈＧ０１９抗体４種は３種の細胞株いずれにおいても細胞生存率から予測される内在化率は約５０～７５％であり、非常に高い内在化活性を示し、ＮＯＶ０７１２と比較して、さらに高い内在活性を示す。ＡＤＣの薬効メカニズムから、高い内在化活性を有する抗体は、ＡＤＣ化抗体をして、より適していると考えられる。

【０２７０】

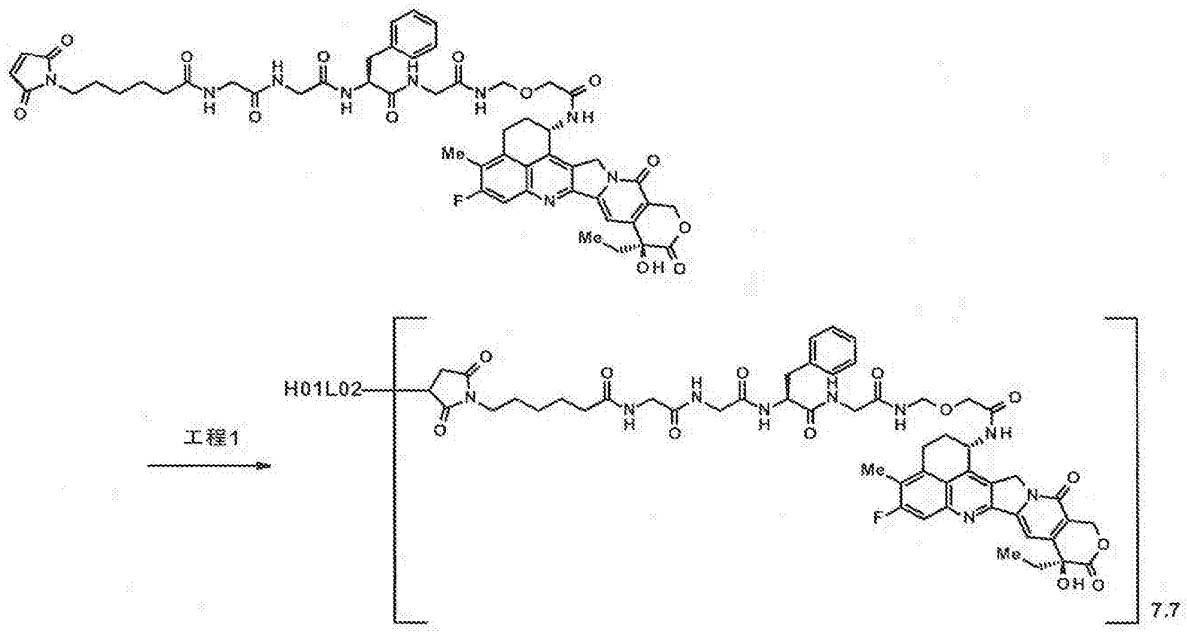
［実施例７：ヒト化ｈＧ０１９―薬物コンジュゲートの作製］

７）―１　抗体―薬物コンジュゲートの作製　Ｈ０１Ｌ０２―ＤＸｄ

工程１：抗体―薬物コンジュゲート（１）

【０２７１】

【化１１】



【０２７２】

抗体の還元：実施例５にて作製したＨ０１Ｌ０２を、製造方法１に記載した共通操作Ｂ（２８０ｎｍ吸光係数として１．５３ｍＬｍｇ－１ｃｍ－１を使用）及びＣを用いて、ＰＢＳ６．０／ＥＤＴＡにて９．８５ｍｇ／ｍＬに調製した。本溶液（５．７ｍＬ）に１０ｍＭ　ＴＣＥＰ（東京化成工業株式会社）水溶液（０．２３１ｍＬ；抗体一分子に対して６．０当量）及び１Ｍリン酸水素二カリウム水溶液（Ｎａｃａｌａｉ　Ｔｅｓｑｕｅ，Ｉｎｃ．；０．０８５５ｍＬ）を加えた。本溶液のｐＨが７．０±０．１内であることを確認した後に、３７℃で２時間インキュベートすることによって、抗体内鎖間部のジスルフィド結合を還元した。

【０２７３】

抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：上記溶液を１５℃で１０分間インキュベートした。次いでＮ―［６―（２，５―ジオキソ―２，５―ジヒドロ―１Ｈ―ピロール―１―イル）ヘキサノイル］グリシルグリシル―Ｌ―フェニルアラニル―Ｎ―［（２―｛［（１Ｓ，９Ｓ）―９―エチル―５―フルオロ―９―ヒドロキシ―４―メチル―１０，１３―ジオキソ―２，３，９，１０，１３，１５―ヘキサヒドロ―１Ｈ，１２Ｈ―ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２―ｂ］キノリン―１―イル］アミノ｝―２―オキソエトキシ）メチル］グリシンアミドの１０ｍＭ　ジメチルスルホキシド溶液（０．３８６ｍＬ；抗体一分子に対して１０当量）を加え、１５℃で１時間インキュベートし、薬物リンカーを抗体へ結合させた。次に、１００ｍＭ　ＮＡＣ（Ｓｉｇｍａ―Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｃｏ．ＬＬＣ）水溶液（０．０３４７ｍＬ；抗体一分子に対して９当量）を加え、さらに室温にて２０分間撹拌し、薬物リンカーの反応を停止させた。

【０２７４】

精製：上記溶液を、製造方法１に記載した共通操作Ｄによる精製を行い、標記抗体―薬物コンジュゲート「Ｈ０１Ｌ０２―ＡＤＣ」を含有する溶液を１９ｍＬ得た。

【０２７５】

特性評価：製造方法１に記載した共通操作Ｅ（$\varepsilon_{D,280}$＝５４４０、$\varepsilon_{D,370}$＝２１２４０を使用）を使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度：２．２６ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：４２．９ｍｇ（７６％），共通操作Ｅにて測定された抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：５．９；共通操作Ｆにて測定された

抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：７．７。

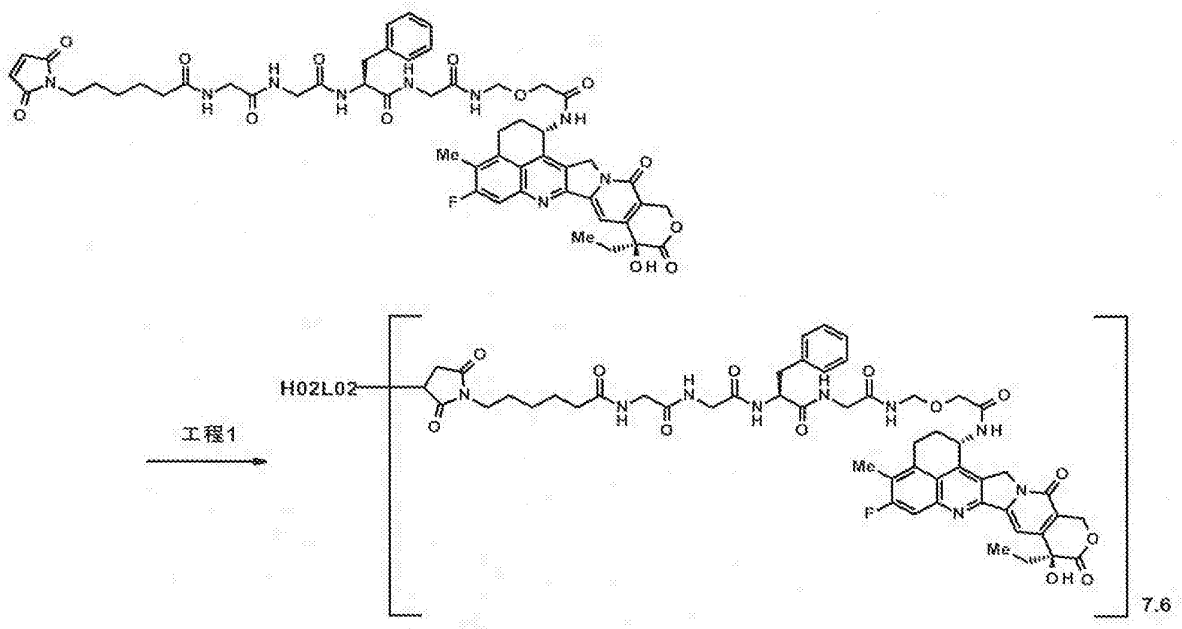
【０２７６】

７）―２　抗体―薬物コンジュゲートの作製　Ｈ０２Ｌ０２―ＤＸｄ

工程１：抗体―薬物コンジュゲート（２）

【０２７７】

【化１２】



【０２７８】

抗体の還元：実施例５にて作製したＨ０２Ｌ０２を、製造方法１に記載した共通操作Ｂ（２８０ｎｍ吸光係数として１．５１ｍＬｍｇ－１ｃｍ－１を使用）及びＣを用いて、ＰＢＳ６．０／ＥＤＴＡにて９．９５ｍｇ／ｍＬに調製した。本溶液（５．７ｍＬ）に１０ｍＭ　ＴＣＥＰ（東京化成工業株式会社）水溶液（０．２３４ｍＬ；抗体一分子に対して６．０当量）及び１Ｍリン酸水素二カリウム水溶液（Ｎａｃａｌａｉ　Ｔｅｓｑｕｅ，Ｉｎｃ．；０．０８５５ｍＬ）を加えた。本溶液のｐＨが７．０±０．１内であることを確認した後に、３７℃で２時間インキュベートすることによって、抗体内鎖間部のジスルフィド結合を還元した。

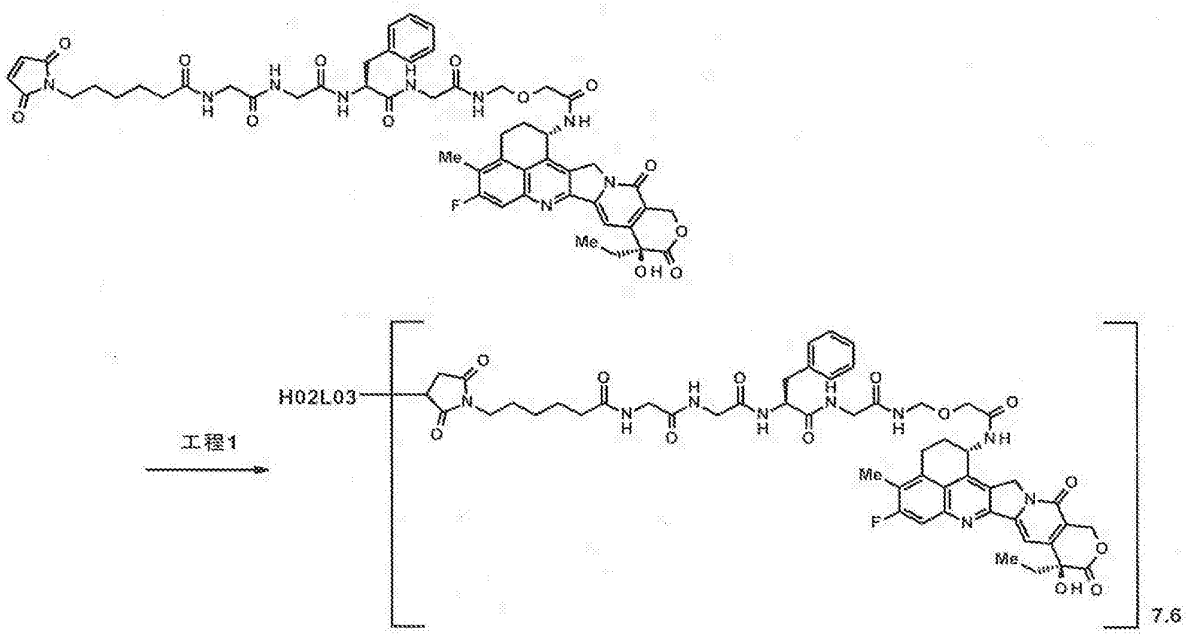
【０２７９】

抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：上記溶液を１５℃で１０分間インキュベートした。次いでＮ―［６―（２，５―ジオキソ―２，５―ジヒドロ―１Ｈ―ピロール―１―イル）ヘキサノイル］グリシルグリシル―Ｌ―フェニルアラニル―Ｎ―［（２―｛［（１Ｓ，９Ｓ）―９―エチル―５―フルオロ―９―ヒドロキシ―４―メチル―１０，１３―ジオキソ―２，３，９，１０，１３，１５―ヘキサヒドロ―１Ｈ，１２Ｈ―ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２―ｂ］キノリン―１―イル］アミノ｝―２―オキソエトキシ）メチル］グリシンアミドの１０ｍＭ　ジメチルスルホキシド溶液（０．３８９ｍＬ；抗体一分子に対して１０当量）を加え、１５℃で１時間インキュベートし、薬物リンカーを抗体へ結合させた。次に、１００ｍＭ　ＮＡＣ（Ｓｉｇｍａ―Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｃｏ．ＬＬＣ）水溶液（０．０３５０ｍＬ；抗体一分子に対して９当量）を加え、さらに室温にて２０分間撹拌し、薬物リンカーの反応を停止させた。

【０２８０】

精製：上記溶液を、製造方法１に記載した共通操作Ｄによる精製を行い、標記抗体―薬物コンジュゲート「Ｈ０２Ｌ０２―ＡＤＣ」を含有する溶液を１９ｍＬ得た。

【０２８１】
特性評価：製造方法１に記載した共通操作Ｅ（$\varepsilon_{D,280}$＝５４４０、$\varepsilon_{D,370}$＝２１２４０を使用）を使用して、下記の特性値を得た。
抗体濃度：２．６１ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：４９．６ｍｇ（８７％），共通操作Ｅにて測定された抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：５．９；共通操作Ｆにて測定された抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：７．６。
【０２８２】
７）―３　抗体―薬物コンジュゲートの作製　Ｈ０２Ｌ０３―ＤＸｄ
工程１：抗体―薬物コンジュゲート（３）
【０２８３】
【化１３】



【０２８４】
抗体の還元：実施例５にて作製したＨ０２Ｌ０３を、製造方法１に記載した共通操作Ｂ（２８０ｎｍ吸光係数として１．５３ｍＬｍｇ$^{-1}$ｃｍ$^{-1}$を使用）及びＣを用いて、ＰＢＳ６．０／ＥＤＴＡにて９．８６ｍｇ／ｍＬに調製した。本溶液（５．７ｍＬ）に１０ｍＭ　ＴＣＥＰ（東京化成工業株式会社）水溶液（０．２７０ｍＬ；抗体一分子に対して７．０当量）及び１Ｍリン酸水素二カリウム水溶液（Ｎａｃａｌａｉ　Ｔｅｓｑｕｅ，Ｉｎｃ．；０．０８５５ｍＬ）を加えた。本溶液のｐＨが７．０±０．１内であることを確認した後に、３７℃で２時間インキュベートすることによって、抗体内鎖間部のジスルフィド結合を還元した。
【０２８５】
抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：上記溶液を１５℃で１０分間インキュベートした。次いでＮ―［６―（２，５―ジオキソ―２，５―ジヒドロ―１Ｈ―ピロール―１―イル）ヘキサノイル］グリシルグリシル―Ｌ―フェニルアラニル―Ｎ―［（２―｛［（１Ｓ，９Ｓ）―９―エチル―５―フルオロ―９―ヒドロキシ―４―メチル―１０，１３―ジオキソ―２，３，９，１０，１３，１５―ヘキサヒドロ―１Ｈ，１２Ｈ―ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２―ｂ］キノリン―１―イル］アミノ｝―２―オキソエトキシ）メチル］グリシンアミドの１０ｍＭ　ジメチルスルホキシド溶液（０．３８６ｍＬ；抗体一分子に対して１０当量）を加え、１５℃で１時間インキュベートし、薬物リンカーを抗体へ結合させた。次に、１００ｍＭ　ＮＡＣ（Ｓｉｇｍａ―

Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｃｏ．ＬＬＣ）水溶液（０．０３４７ｍＬ；抗体一分子に対して９当量）を加え、さらに室温にて２０分間撹拌し、薬物リンカーの反応を停止させた。

【０２８６】

精製：上記溶液を、製造方法１に記載した共通操作Ｄによる精製を行い、標記抗体―薬物コンジュゲート「Ｈ０１Ｌ０２―ＡＤＣ」を含有する溶液を１９ｍＬ得た。

【０２８７】

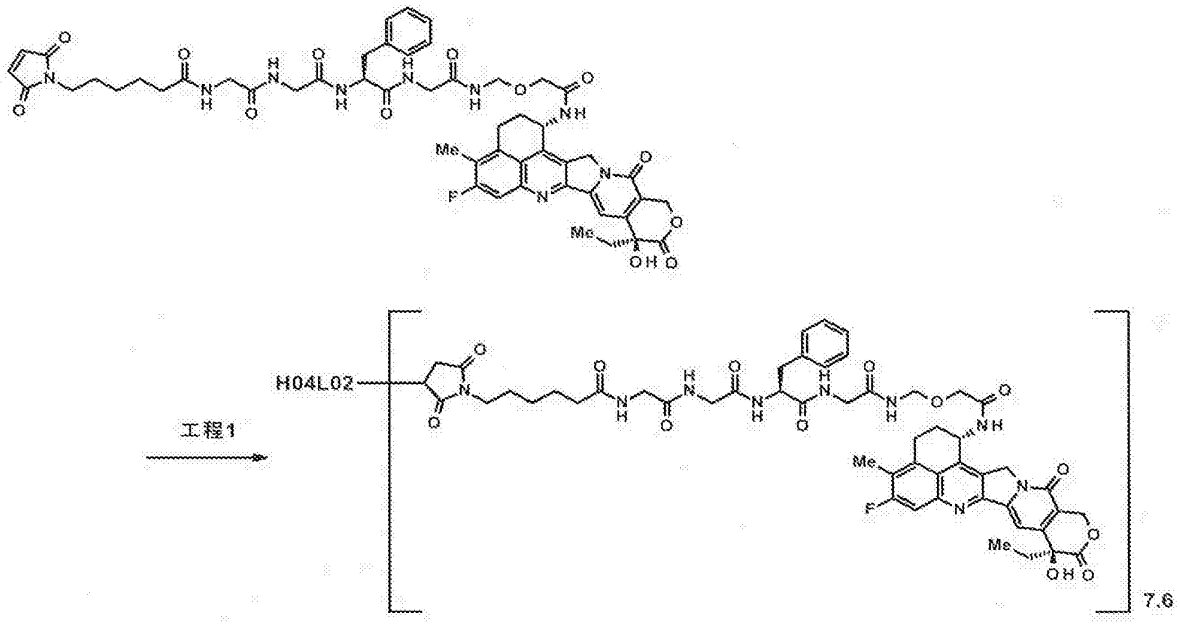
特性評価：製造方法１に記載した共通操作Ｅ（$\varepsilon_{D,280}$＝５４４０、$\varepsilon_{D,370}$＝２１２４０を使用）を使用して、下記の特性値を得た。
抗体濃度：２．７１ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：５１．４ｍｇ（９１％），共通操作Ｅにて測定された抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：５．７；共通操作Ｆにて測定された抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：７．６。

【０２８８】

７）―４　抗体―薬物コンジュゲートの作製　Ｈ０４Ｌ０２―ＤＸｄ
工程１：抗体―薬物コンジュゲート（４）

【０２８９】

【化１４】



【０２９０】

抗体の還元：実施例５にて作製したＨ０４Ｌ０２を、製造方法１に記載した共通操作Ｂ（２８０ｎｍ吸光係数として１．５３ｍＬｍｇ$^{-1}$ｃｍ$^{-1}$を使用）及びＣを用いて、ＰＢＳ６．０／ＥＤＴＡにて９．８６ｍｇ／ｍＬに調製した。本溶液（５．７ｍＬ）に１０ｍＭ　ＴＣＥＰ（東京化成工業株式会社）水溶液（０．２３２ｍＬ；抗体一分子に対して６．０当量）及び１Ｍリン酸水素二カリウム水溶液（Ｎａｃａｌａｉ　Ｔｅｓｑｕｅ，Ｉｎｃ．；０．０８５５ｍＬ）を加えた。本溶液のｐＨが７．０±０．１内であることを確認した後に、３７℃で２時間インキュベートすることによって、抗体内鎖間部のジスルフィド結合を還元した。

【０２９１】

抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：上記溶液を１５℃で１０分間インキュベートした。次いでＮ―［６―（２，５―ジオキソ―２，５―ジヒドロ―１Ｈ―ピロール―１―イル）ヘキサノイル］グリシルグリシル―Ｌ―フェニルアラニル―Ｎ―［（２―｛［（１Ｓ，９Ｓ）―９―エチル―５―フルオロ―９―ヒドロキシ―４―メチル―１０，１３―

ジオキソ―２，３，９，１０，１３，１５―ヘキサヒドロ―１Ｈ，１２Ｈ―ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２―ｂ］キノリン―１―イル］アミノ｝―２―オキソエトキシ）メチル］グリシンアミドの１０ｍＭ　ジメチルスルホキシド溶液（０．３８６ｍＬ；抗体一分子に対して１０当量）を加え、１５℃で１時間インキュベートし、薬物リンカーを抗体へ結合させた。次に、１００ｍＭ　ＮＡＣ（Ｓｉｇｍａ―Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｃｏ．ＬＬＣ）水溶液（０．０３４７ｍＬ；抗体一分子に対して９当量）を加え、さらに室温にて２０分間撹拌し、薬物リンカーの反応を停止させた。

【０２９２】

精製：上記溶液を、製造方法１に記載した共通操作Ｄによる精製を行い、標記抗体―薬物コンジュゲート「Ｈ０４Ｌ０２―ＡＤＣ」を含有する溶液を１９ｍＬ得た。

【０２９３】

特性評価：製造方法１に記載した共通操作Ｅ（$\varepsilon_{D,280}$＝５４４０、$\varepsilon_{D,370}$＝２１２４０を使用）を使用して、下記の特性値を得た。
抗体濃度：２．５６ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：４８．７ｍｇ（８７％），共通操作Ｅにて測定された抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：５．８；共通操作Ｆにて測定された抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：７．６。

【０２９４】

［参考例２：ＮＯＶ０７１２―薬物コンジュゲートの作製］
参考例２）―１　抗体―薬物コンジュゲートの作製　ＮＯＶ０７１２―ＤＭ４
抗体―薬物コンジュゲート（５）

抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：参考例1にて作製したＮＯＶ０７１２を、製造方法１に記載した共通操作Ｂ（２８０ｎｍ吸光係数として１．５１ｍＬｍｇ$^{-1}$ｃｍ$^{-1}$を使用）及びＣを用いて、２０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ８．１（ＬＩＦＥ　ＴＥＣＨＮＯＬＯＧＩＥＳ社製　ＨＥＰＥＳ，　１Ｍ　Ｂｕｆｆｅｒ　Ｓｏｌｕｔｉｏｎ（２０ｍＬ）を１Ｍ水酸化ナトリウムでｐＨ８．１とした後、蒸留水にて１Ｌとした）にて９．７ｍｇ／ｍＬに調製し、２０℃で１０分間インキュベートした。次いでＷＯ２０１６／０２４１９５号公開特許公報に記載の１０ｍＭ　１―（２，５―ジオキソピロリジン―１―イルオキシ）―１―オキソ―４―（ピリジン―２―イルジスルファニル）ブタン―２―スルフォン酸のＤＭＡ溶液（０．３６６ｍＬ；抗体一分子に対して５．２当量）、１０ｍＭ　Ｎ２―デアセチル―デアセチル―Ｎ２―（４―メチル―４―メルカプト―１―オキソペンチル）―メイタンシン（ＤＭ４）のＤＭＡ溶液（０．３６６ｍＬ；抗体一分子に対して６．８当量）、及び０．２４３ｍＬのＤＭＡを加え、２０℃で１６時間インキュベートし、薬物リンカーを抗体へ結合させた。次に、１Ｍ　酢酸水溶液を加えｐＨ５．０とし、さらに室温にて２０分間撹拌し、薬物リンカーの反応を停止させた。

精製：上記溶液を、製造方法１に記載した共通操作Ｄによる精製を行い、標記抗体―薬物コンジュゲート「ＮＯＶ０７１２―ＤＭ４」を含有する溶液を２８ｍＬ得た。

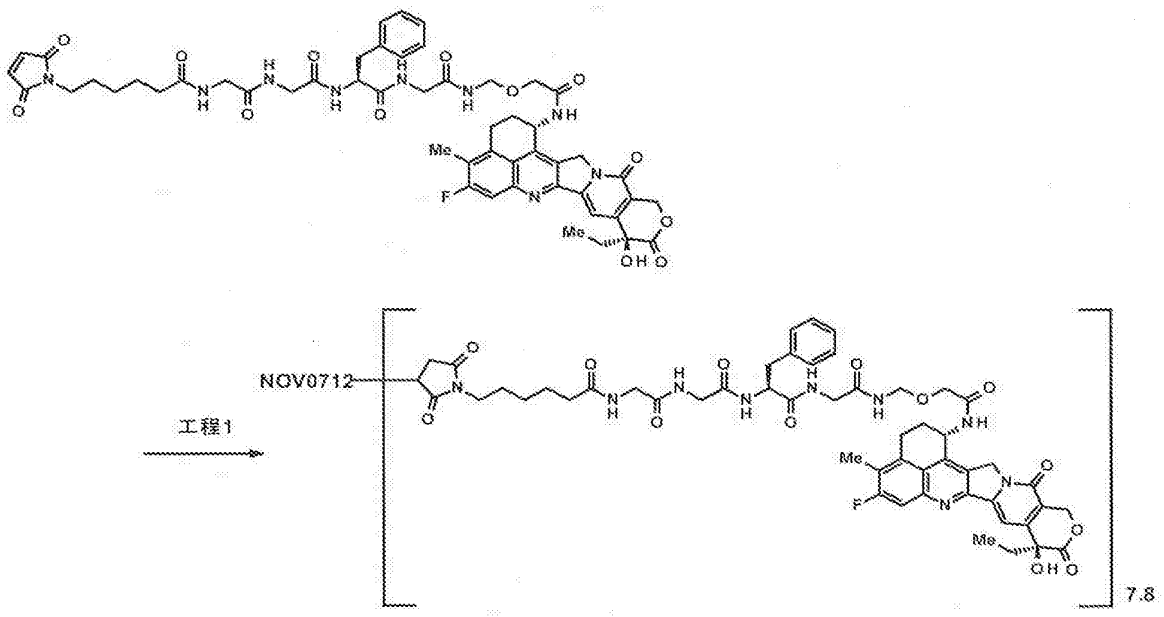
特性評価：製造方法１に記載した共通操作Ｅ（$\varepsilon_{A,280}$＝２００５００、$\varepsilon_{A,252}$＝７６２９５、$\varepsilon_{D,280}$＝４３１７０、及び$\varepsilon_{D,252}$＝２３２２４を使用）を使用して、下記の特性値を得た。
抗体濃度：２．５８ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：７２．２ｍｇ（９３％），共通操作Ｅにて測定された抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：３．０。

【０２９５】

参考例２）―２　抗体―薬物コンジュゲートの作製　ＮＯＶ０７１２―ＤＸｄ
工程１：抗体―薬物コンジュゲート（６）

【０２９６】

【化１５】



【０２９７】

抗体の還元：参考例１にて作製したＮＯＶ０７１２を、製造方法１に記載した共通操作Ｂ（２８０ｎｍ吸光係数として１．５１ｍＬｍｇ－１ｃｍ－１を使用）及びＣを用いて、ＰＢＳ６．０／ＥＤＴＡにて９．２６ｍｇ／ｍＬに調製した。本溶液（６．６ｍＬ）に１０ｍＭ　ＴＣＥＰ（東京化成工業株式会社）水溶液（０．２５４ｍＬ；抗体一分子に対して６．０当量）及び１Ｍリン酸水素二カリウム水溶液（Ｎａｃａｌａｉ　Ｔｅｓｑｕｅ，Ｉｎｃ．；０．０９９０ｍＬ）を加えた。本溶液のｐＨが７．０±０．１内であることを確認した後に、３７℃で２時間インキュベートすることによって、抗体内鎖間部のジスルフィド結合を還元した。

抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：上記溶液を１５℃で１０分間インキュベートした。次いでＮ―［６―（２，５―ジオキソ―２，５―ジヒドロ―１Ｈ―ピロール―１―イル）ヘキサノイル］グリシルグリシル―Ｌ―フェニルアラニル―Ｎ―［（２―｛［（１Ｓ，９Ｓ）―９―エチル―５―フルオロ―９―ヒドロキシ―４―メチル―１０，１３―ジオキソ―２，３，９，１０，１３，１５―ヘキサヒドロ―１Ｈ，１２Ｈ―ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２―ｂ］キノリン―１―イル］アミノ｝―２―オキソエトキシ）メチル］グリシンアミドの１０ｍＭ　ジメチルスルホキシド溶液（０．３８１ｍＬ；抗体一分子に対して９当量）を加え、１５℃で１時間インキュベートし、薬物リンカーを抗体へ結合させた。次に、１００ｍＭ　ＮＡＣ（Ｓｉｇｍａ―Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｃｏ．ＬＬＣ）水溶液（０．０３８１ｍＬ；抗体一分子に対して９当量）を加え、さらに室温にて２０分間撹拌し、薬物リンカーの反応を停止させた。

精製：上記溶液を、製造方法１に記載した共通操作Ｄによる精製を行い、標記抗体―薬物コンジュゲート「ＮＯＶ０７１２―ＡＤＣ」を含有する溶液を２３．５ｍＬ得た。

特性評価：製造方法１に記載した共通操作Ｅ（$\varepsilon_{D,280}$＝５４４０、$\varepsilon_{D,370}$＝２１２４０を使用）を使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度：２．２６ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：５６．４ｍｇ（９２％），共通操作Ｅにて測定された抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：６．４；共通操作Ｆにて測定された抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：７．８。

【０２９８】

［実施例８：抗体―薬物コンジュゲートのｉｎ　ｖｉｔｒｏ活性評価］

８）―１　ＣＤＨ６陽性ヒト腫瘍細胞株に対する抗体―薬物コンジュゲートのｉｎ　ｖｉ

ｔｒｏ細胞増殖抑制活性評価
ＣＤＨ６陽性ヒト卵巣腫瘍細胞株ＰＡ―１を１０％　ＦＢＳ含有ＭＥＭ培地中２ｘ１０^{3}細胞／１００μＬ／ｗｅｌｌになるよう９６ウェルプレートに播種し、３７℃、５％CO_2の条件下で一晩培養した。翌日、実施例７で作製したヒト化ｈＧ０１９―薬物コンジュゲート４種（クローン名は、Ｈ０１Ｌ０２―ＤＸｄ、Ｈ０２Ｌ０２―ＤＸｄ、Ｈ０２Ｌ０３―ＤＸｄ及びＨ０４Ｌ０２―ＤＸｄ）、又は参考例２で作製したＮＯＶ０７１２―薬物コンジュゲート（ＮＯＶ０７１２―ＤＭ４）を終濃度０．０００１（ｎＭ）から１００（ｎＭ）となるように添加した。４日間培養後に生存細胞数をＣｅｌｌＴｉｔｅｒ―Ｇｌｏ™ Ｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｔ Ｃｅｌｌ Ｖｉａｂｉｌｉｔｙ Ａｓｓａｙ（Ｐｒｏｍｅｇａ）によるＡＴＰの定量で測定した。図１１に抗体―薬物コンジュゲートを各々添加した際の濃度依存的な細胞増殖抑制活性を示す。この結果、ヒト化ｈＧ０１９―薬物コンジュゲート４種は、ＮＯＶ０７１２―薬物コンジュゲートと比較して、より低い添加濃度から腫瘍細胞の増殖抑制活性を示し、抗腫瘍活性が高いことが示される。

【０２９９】

［実施例９：抗体―薬物コンジュゲートのｉｎ　ｖｉｖｏ抗腫瘍効果］

抗体―薬物コンジュゲートの抗腫瘍効果は、ＣＤＨ６陽性ヒト腫瘍細胞株の細胞を免疫不全マウスに移植した動物モデルを用いて評価した。４―５週齢のＢＡＬＢ／ｃ　ヌードマウス（ＣＡｎＮ．Ｃｇ―Ｆｏｘｎ１［ｎｕ］／ＣｒｌＣｒｌｊ［Ｆｏｘｎ１ｎｕ／Ｆｏｘｎ１ｎｕ］、日本チャールス・リバー）及び、ＳＣＩＤマウス（ＣＢ１７／Ｉｃｒ―Ｐｒｋｄｃ［ｓｃｉｄ］／ＣｒｌＣｒｌｊ、日本チャールス・リバー）を実験使用前にＳＰＦ条件化で３日間以上馴化した。マウスには滅菌した固形飼料（ＦＲ―２，Ｆｕｎａｂａｓｈｉ　Ｆａｒｍｓ　Ｃｏ．，Ｌｔｄ）を給餌し、滅菌した水道水（５―１５ｐｐｍ次亜塩素酸ナトリウム溶液を添加して調製）を与えた。移植した腫瘍の長径及び短径を電子式デジタルノギス（ＣＤ―１５ＣＸ，Ｍｉｔｕｔｏｙｏ　Ｃｏｒｐ．）で１週間に２回測定し、以下に示す計算式により腫瘍体積を算出した。

腫瘍体積（ｍｍ^{3}）＝１／２×長径（ｍｍ）×［短径（ｍｍ）］^{2}

抗体―薬物コンジュゲートは全てＡＢＳ緩衝液（１０ｍＭ―Ａｃｅｔａｔｅ　Ｂｕｆｆｅｒ，　５％　Ｓｏｒｂｉｔｏｌ，　ｐＨ５．５）（ＮＡＣＡＬＡＩ）で希釈し、各実施例に示す用量にて尾静脈内投与した。また、コントロール群（Ｖｅｈｉｃｌｅ群）としてＡＢＳ緩衝液を同様に投与した。１群あたり６匹のマウスを実験に用いた。

【０３００】

９）―１　抗腫瘍効果（１）

実施例２）―３―１にてＣＤＨ６発現を確認した、ＣＤＨ６陽性ヒト腎細胞腫瘍細胞株７８６―Ｏ（ＡＴＣＣ）をマトリゲル（コーニング社）に懸濁し、５×１０^{6}ｃｅｌｌｓを雄ＳＣＩＤマウスの右側腹部に皮下移植し（Ｄａｙ０）、Ｄａｙ１８に無作為に群分けを実施した。群分け実施日に、実施例７で作製した抗体―薬物コンジュゲート４種（クローン名は、Ｈ０１Ｌ０２―ＤＸｄ、Ｈ０２Ｌ０２―ＤＸｄ、Ｈ０２Ｌ０３―ＤＸｄ及びＨ０４Ｌ０２―ＤＸｄ）、又は参考例２で作製したＮＯＶ０７１２―ＤＭ４を３ｍｇ／ｋｇの用量で尾静脈内投与した。結果を図１２に示す。横軸は日数、縦軸は腫瘍体積、誤差範囲はＳＥ値を示す。

ＮＯＶ０７１２―ＤＭ４は本腫瘍モデルにおいて顕著な抗腫瘍効果を示さなかった。実施例７で作成した抗体―薬物コンジュゲート４種はいずれも投与後腫瘍体積が減少し、顕著な腫瘍の退縮が認められ、投与後２４日の間、腫瘍退縮効果が持続した（図１２）。

【０３０１】

９）―２　抗腫瘍効果（２）

実施例２）―３―１にてＣＤＨ６発現を確認した、ＣＤＨ６陽性ヒト卵巣腫瘍細胞株ＰＡ―１（ＡＴＣＣ）をマトリゲル（コーニング社）に懸濁し、８．５×１０^{6}ｃｅｌｌｓを雌ヌードマウスの右側腹部に皮下移植し（Ｄａｙ０）、Ｄａｙ１１に無作為に群分けを実施した。群分け実施日に、実施例７で作製した抗体―薬物コンジュゲートＨ０１Ｌ０２―ＤＸｄ又は参考例２で作製したＮＯＶ０７１２―ＤＭ４もしくはＮＯＶ０７１２―ＤＸ

ｄを、１及び３ｍｇ／ｋｇの用量で尾静脈内投与した。結果を図１３に示す。横軸は日数、縦軸は腫瘍体積、誤差範囲はＳＥ値を示す。

ＮＯＶ０７１２―ＤＭ４は本腫瘍モデルにおいて１及び３ｍｇ／ｋｇいずれの用量でも抗腫瘍効果を示さなかった。一方、Ｈ０１Ｌ０２―ＤＸｄは１及び３ｍｇ／ｋｇいずれの用量でも投与後腫瘍体積が著しく減少し、腫瘍を縮退させる効果を発揮した（図１３）。また、本明細書で取得したＨ０１Ｌ０２抗体もしくはＮＯＶ０７１２抗体に同じ薬物ＤＸｄをコンジュゲートした検体の薬効を比較したところ、Ｈ０１Ｌ０２―ＤＸｄは、１及び３ｍｇ／ｋｇいずれの用量でもＮＯＶ０７１２―ＤＸｄに比べて強い抗腫瘍効果を発揮した。すなわち、本発明のＨ０１Ｌ０２抗体は、ＮＯＶ０７１２抗体に比べて、抗腫瘍剤としての抗体―薬物コンジュゲートの抗体としてより優れた抗体であることが示された（図１３）。

【０３０２】

９）―３　抗腫瘍効果（３）

実施例２）―３―１にてＣＤＨ６発現を確認した、ＣＤＨ６陽性ヒト卵巣腫瘍細胞株ＮＩＨ：ＯＶＣＡＲ―３（ＡＴＣＣ）をマトリゲル（コーニング社）に懸濁し、１×１０７ｃｅｌｌｓを雌ヌードマウスの右側腹部に皮下移植し（Ｄａｙ０）、Ｄａｙ２２に無作為に群分けを実施した。群分け実施日に、実施例７で作製した抗体―薬物コンジュゲートＨ０１Ｌ０２―ＤＸｄ又は参考例２で作製したＮＯＶ０７１２―ＤＭ４を、１及び３ｍｇ／ｋｇの用量で尾静脈内投与した。結果を図１４に示す。横軸は日数、縦軸は腫瘍体積、誤差範囲はＳＥ値を示す。

ＮＯＶ０７１２―ＤＭ４は、１ｍｇ／ｋｇでは全く抗腫瘍効果を示さず、３ｍｇ／ｋｇでは抗腫瘍効果を示すものの、投与２週間後から腫瘍の再増殖が認められた。一方、Ｈ０１Ｌ０２―ＤＸｄは１及び３ｍｇ／ｋｇいずれの用量でも、投与後腫瘍体積の増加を著しく抑制し、特に３ｍｇ／ｋｇでは投与後３１日間の長期にわたって腫瘍増殖抑制効果が持続した。（図１４）。

【０３０３】

９）―４　抗腫瘍効果（４）

実施例２）―３―１にてＣＤＨ６発現を確認した、ＣＤＨ６陽性ヒト腎細胞腫瘍細胞株７８６―Ｏ（ＡＴＣＣ）をマトリゲル（コーニング社）に懸濁し、５×１０６ｃｅｌｌｓを雄ＳＣＩＤマウスの右側腹部に皮下移植し（Ｄａｙ０）、Ｄａｙ２０に無作為に群分けを実施した。群分け実施日に、実施例７で作製した抗体―薬物コンジュゲートＨ０１Ｌ０２―ＤＸｄ又は参考例２で作製したＮＯＶ０７１２―ＤＭ４を、１及び３ｍｇ／ｋｇの用量で尾静脈内投与した。結果を図１５に示す。横軸は日数、縦軸は腫瘍体積、誤差範囲はＳＥ値を示す。

ＮＯＶ０７１２―ＤＭ４は本腫瘍モデルにおいて１及び３ｍｇ／ｋｇいずれの用量でも顕著な抗腫瘍効果を示さなかった。一方、Ｈ０１Ｌ０２―ＤＸｄは１及び３ｍｇ／ｋｇいずれの用量でも投与後腫瘍体積が減少し、特に３ｍｇ／ｋｇでは顕著な腫瘍の退縮が認められ、投与後２０日の間、腫瘍退縮効果が持続した（図１５）。

【０３０４】

９）―５　抗腫瘍効果（５）

実施例２）―３―１にてＣＤＨ６を発現しないことを確認した、ＣＤＨ６陰性ヒト卵巣腫瘍細胞株ＥＳ―２（ＡＴＣＣ）を生理食塩水に懸濁し、１×１０６ｃｅｌｌｓを雌ヌードマウスの右側腹部に皮下移植し（Ｄａｙ０）、Ｄａｙ７に無作為に群分けを実施した。群分け実施日に、実施例７で作成した抗体―薬物コンジュゲートＨ０１Ｌ０２―ＤＸｄ又は参考例２で作製したＮＯＶ０７１２―ＤＭ４を、１及び３ｍｇ／ｋｇの用量で尾静脈内投与した。結果を図１６に示す。横軸は日数、縦軸は腫瘍体積、誤差範囲はＳＥ値を示す。

ＣＤＨ６を発現しない本腫瘍モデルでは、Ｈ０１Ｌ０２―ＤＸｄ及びＮＯＶ０７１２―ＤＭ４はいずれの用量でも抗腫瘍効果を全く示さなかった。この結果から、実施例９）―１、９）―２、９）―３、９）―４で示されたＣＤＨ６陽性腫瘍モデルでの抗体―薬物コ

ンジュゲートの抗腫瘍効果は、腫瘍細胞のＣＤＨ６発現に依存して起こる効果であり、ＣＤＨ６陽性の腫瘍に特異的に抗腫瘍効果を示し、ＣＤＨ６陰性の正常組織には細胞障害を起こさない選択的で安全な抗腫瘍薬剤と考えられる（図１６）。

【産業上の利用可能性】

【０３０５】

本発明により、内在化活性を有する抗ＣＤＨ６抗体及び該抗体を含む抗体―薬物コンジュゲートが提供された。該抗体―薬物コンジュゲートは癌に対する治療薬等として用いることができる。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED

<120> Anti CDH6 antibodies and anti CDH6 antibody drug conjugates

<130> DS2017002

<160> 86

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 790
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

```
Met Arg Thr Tyr Arg Tyr Phe Leu Leu Leu Phe Trp Val Gly Gln Pro
1               5                  10                  15

Tyr Pro Thr Leu Ser Thr Pro Leu Ser Lys Arg Thr Ser Gly Phe Pro
            20                  25                  30

Ala Lys Lys Arg Ala Leu Glu Leu Ser Gly Asn Ser Lys Asn Glu Leu
        35                  40                  45

Asn Arg Ser Lys Arg Ser Trp Met Trp Asn Gln Phe Phe Leu Leu Glu
    50                  55                  60

Glu Tyr Thr Gly Ser Asp Tyr Gln Tyr Val Gly Lys Leu His Ser Asp
65                  70                  75                  80

Gln Asp Arg Gly Asp Gly Ser Leu Lys Tyr Ile Leu Ser Gly Asp Gly
                85                  90                  95

Ala Gly Asp Leu Phe Ile Ile Asn Glu Asn Thr Gly Asp Ile Gln Ala
            100                 105                 110

Thr Lys Arg Leu Asp Arg Glu Glu Lys Pro Val Tyr Ile Leu Arg Ala
        115                 120                 125
```

```
Gln Ala Ile Asn Arg Arg Thr Gly Arg Pro Val Glu Pro Glu Ser Glu
    130                 135                 140

Phe Ile Ile Lys Ile His Asp Ile Asn Asp Asn Glu Pro Ile Phe Thr
145                 150                 155                 160

Lys Glu Val Tyr Thr Ala Thr Val Pro Glu Met Ser Asp Val Gly Thr
                165                 170                 175

Phe Val Val Gln Val Thr Ala Thr Asp Ala Asp Asp Pro Thr Tyr Gly
            180                 185                 190

Asn Ser Ala Lys Val Val Tyr Ser Ile Leu Gln Gly Gln Pro Tyr Phe
        195                 200                 205

Ser Val Glu Ser Glu Thr Gly Ile Ile Lys Thr Ala Leu Leu Asn Met
    210                 215                 220

Asp Arg Glu Asn Arg Glu Gln Tyr Gln Val Val Ile Gln Ala Lys Asp
225                 230                 235                 240

Met Gly Gly Gln Met Gly Gly Leu Ser Gly Thr Thr Thr Val Asn Ile
                245                 250                 255

Thr Leu Thr Asp Val Asn Asp Asn Pro Pro Arg Phe Pro Gln Ser Thr
            260                 265                 270

Tyr Gln Phe Lys Thr Pro Glu Ser Ser Pro Pro Gly Thr Pro Ile Gly
        275                 280                 285

Arg Ile Lys Ala Ser Asp Ala Asp Val Gly Glu Asn Ala Glu Ile Glu
    290                 295                 300

Tyr Ser Ile Thr Asp Gly Glu Gly Leu Asp Met Phe Asp Val Ile Thr
305                 310                 315                 320
```

```
Asp Gln Glu Thr Gln Glu Gly Ile Ile Thr Val Lys Lys Leu Leu Asp
                325                 330                 335

Phe Glu Lys Lys Lys Val Tyr Thr Leu Lys Val Glu Ala Ser Asn Pro
            340                 345                 350

Tyr Val Glu Pro Arg Phe Leu Tyr Leu Gly Pro Phe Lys Asp Ser Ala
        355                 360                 365

Thr Val Arg Ile Val Val Glu Asp Val Asp Glu Pro Pro Val Phe Ser
    370                 375                 380

Lys Leu Ala Tyr Ile Leu Gln Ile Arg Glu Asp Ala Gln Ile Asn Thr
385                 390                 395                 400

Thr Ile Gly Ser Val Thr Ala Gln Asp Pro Asp Ala Ala Arg Asn Pro
                405                 410                 415

Val Lys Tyr Ser Val Asp Arg His Thr Asp Met Asp Arg Ile Phe Asn
            420                 425                 430

Ile Asp Ser Gly Asn Gly Ser Ile Phe Thr Ser Lys Leu Leu Asp Arg
        435                 440                 445

Glu Thr Leu Leu Trp His Asn Ile Thr Val Ile Ala Thr Glu Ile Asn
    450                 455                 460

Asn Pro Lys Gln Ser Ser Arg Val Pro Leu Tyr Ile Lys Val Leu Asp
465                 470                 475                 480

Val Asn Asp Asn Ala Pro Glu Phe Ala Glu Phe Tyr Glu Thr Phe Val
                485                 490                 495

Cys Glu Lys Ala Lys Ala Asp Gln Leu Ile Gln Thr Leu His Ala Val
            500                 505                 510

Asp Lys Asp Asp Pro Tyr Ser Gly His Gln Phe Ser Phe Ser Leu Ala
        515                 520                 525
```

```
Pro Glu Ala Ala Ser Gly Ser Asn Phe Thr Ile Gln Asp Asn Lys Asp
    530                 535                 540

Asn Thr Ala Gly Ile Leu Thr Arg Lys Asn Gly Tyr Asn Arg His Glu
545                 550                 555                 560

Met Ser Thr Tyr Leu Leu Pro Val Val Ile Ser Asp Asn Asp Tyr Pro
                565                 570                 575

Val Gln Ser Ser Thr Gly Thr Val Thr Val Arg Val Cys Ala Cys Asp
            580                 585                 590

His His Gly Asn Met Gln Ser Cys His Ala Glu Ala Leu Ile His Pro
        595                 600                 605

Thr Gly Leu Ser Thr Gly Ala Leu Val Ala Ile Leu Leu Cys Ile Val
    610                 615                 620

Ile Leu Leu Val Thr Val Val Leu Phe Ala Ala Leu Arg Arg Gln Arg
625                 630                 635                 640

Lys Lys Glu Pro Leu Ile Ile Ser Lys Glu Asp Ile Arg Asp Asn Ile
                645                 650                 655

Val Ser Tyr Asn Asp Glu Gly Gly Gly Glu Glu Asp Thr Gln Ala Phe
            660                 665                 670

Asp Ile Gly Thr Leu Arg Asn Pro Glu Ala Ile Glu Asp Asn Lys Leu
        675                 680                 685

Arg Arg Asp Ile Val Pro Glu Ala Leu Phe Leu Pro Arg Arg Thr Pro
    690                 695                 700

Thr Ala Arg Asp Asn Thr Asp Val Arg Asp Phe Ile Asn Gln Arg Leu
705                 710                 715                 720
```

```
Lys Glu Asn Asp Thr Asp Pro Thr Ala Pro Pro Tyr Asp Ser Leu Ala
                725                 730                 735

Thr Tyr Ala Tyr Glu Gly Thr Gly Ser Val Ala Asp Ser Leu Ser Ser
            740                 745                 750

Leu Glu Ser Val Thr Thr Asp Ala Asp Gln Asp Tyr Asp Tyr Leu Ser
        755                 760                 765

Asp Trp Gly Pro Arg Phe Lys Lys Leu Ala Asp Met Tyr Gly Gly Val
    770                 775                 780

Asp Ser Asp Lys Asp Ser
785                 790
```

<210> 2
<211> 106
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

```
Ser Trp Met Trp Asn Gln Phe Phe Leu Leu Glu Glu Tyr Thr Gly Ser
1               5                   10                  15

Asp Tyr Gln Tyr Val Gly Lys Leu His Ser Asp Gln Asp Arg Gly Asp
            20                  25                  30

Gly Ser Leu Lys Tyr Ile Leu Ser Gly Asp Gly Ala Gly Asp Leu Phe
        35                  40                  45

Ile Ile Asn Glu Asn Thr Gly Asp Ile Gln Ala Thr Lys Arg Leu Asp
    50                  55                  60

Arg Glu Glu Lys Pro Val Tyr Ile Leu Arg Ala Gln Ala Ile Asn Arg
65                  70                  75                  80

Arg Thr Gly Arg Pro Val Glu Pro Glu Ser Glu Phe Ile Ile Lys Ile
                85                  90                  95
```

```
His Asp Ile Asn Asp Asn Glu Pro Ile Phe
            100                 105


<210>  3
<211>  109
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens

<400>  3

Thr Lys Glu Val Tyr Thr Ala Thr Val Pro Glu Met Ser Asp Val Gly
1               5                   10                  15


Thr Phe Val Val Gln Val Thr Ala Thr Asp Ala Asp Asp Pro Thr Tyr
            20                  25                  30


Gly Asn Ser Ala Lys Val Val Tyr Ser Ile Leu Gln Gly Gln Pro Tyr
        35                  40                  45


Phe Ser Val Glu Ser Glu Thr Gly Ile Ile Lys Thr Ala Leu Leu Asn
    50                  55                  60


Met Asp Arg Glu Asn Arg Glu Gln Tyr Gln Val Val Ile Gln Ala Lys
65                  70                  75                  80


Asp Met Gly Gly Gln Met Gly Gly Leu Ser Gly Thr Thr Thr Val Asn
                85                  90                  95


Ile Thr Leu Thr Asp Val Asn Asp Asn Pro Pro Arg Phe
            100                 105


<210>  4
<211>  115
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens

<400>  4

Pro Gln Ser Thr Tyr Gln Phe Lys Thr Pro Glu Ser Ser Pro Pro Gly
1               5                   10                  15
```

```
Thr Pro Ile Gly Arg Ile Lys Ala Ser Asp Ala Asp Val Gly Glu Asn
            20                  25                  30

Ala Glu Ile Glu Tyr Ser Ile Thr Asp Gly Glu Gly Leu Asp Met Phe
        35                  40                  45

Asp Val Ile Thr Asp Gln Glu Thr Gln Glu Gly Ile Ile Thr Val Lys
    50                  55                  60

Lys Leu Leu Asp Phe Glu Lys Lys Lys Val Tyr Thr Leu Lys Val Glu
65                  70                  75                  80

Ala Ser Asn Pro Tyr Val Glu Pro Arg Phe Leu Tyr Leu Gly Pro Phe
                85                  90                  95

Lys Asp Ser Ala Thr Val Arg Ile Val Val Glu Asp Val Asp Glu Pro
            100                 105                 110

Pro Val Phe
        115


<210>  5
<211>  103
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens

<400>  5

Ser Lys Leu Ala Tyr Ile Leu Gln Ile Arg Glu Asp Ala Gln Ile Asn
1               5                   10                  15

Thr Thr Ile Gly Ser Val Thr Ala Gln Asp Pro Asp Ala Ala Arg Asn
            20                  25                  30

Pro Val Lys Tyr Ser Val Asp Arg His Thr Asp Met Asp Arg Ile Phe
        35                  40                  45

Asn Ile Asp Ser Gly Asn Gly Ser Ile Phe Thr Ser Lys Leu Leu Asp
    50                  55                  60
```

```
Arg Glu Thr Leu Leu Trp His Asn Ile Thr Val Ile Ala Thr Glu Ile
65                  70                  75                  80

Asn Asn Pro Lys Gln Ser Ser Arg Val Pro Leu Tyr Ile Lys Val Leu
                85                  90                  95

Asp Val Asn Asp Asn Ala Pro
            100


<210>  6
<211>  122
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens

<400>  6

Glu Phe Ala Glu Phe Tyr Glu Thr Phe Val Cys Glu Lys Ala Lys Ala
1               5                   10                  15

Asp Gln Leu Ile Gln Thr Leu His Ala Val Asp Lys Asp Asp Pro Tyr
            20                  25                  30

Ser Gly His Gln Phe Ser Phe Ser Leu Ala Pro Glu Ala Ala Ser Gly
        35                  40                  45

Ser Asn Phe Thr Ile Gln Asp Asn Lys Asp Asn Thr Ala Gly Ile Leu
    50                  55                  60

Thr Arg Lys Asn Gly Tyr Asn Arg His Glu Met Ser Thr Tyr Leu Leu
65                  70                  75                  80

Pro Val Val Ile Ser Asp Asn Asp Tyr Pro Val Gln Ser Ser Thr Gly
                85                  90                  95

Thr Val Thr Val Arg Val Cys Ala Cys Asp His His Gly Asn Met Gln
            100                 105                 110

Ser Cys His Ala Glu Ala Leu Ile His Pro
```

115 120

<210> 7
<211> 790
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 7

Met Arg Thr Tyr Arg Tyr Phe Leu Leu Leu Phe Trp Val Gly Gln Pro
1 5 10 15

Tyr Pro Thr Phe Ser Asn Pro Leu Ser Lys Arg Thr Ser Gly Phe Pro
20 25 30

Ala Lys Arg Lys Ala Leu Glu Leu Ser Ala Asn Ser Arg Asn Glu Leu
35 40 45

Ser Arg Ser Lys Arg Ser Trp Met Trp Asn Gln Phe Phe Leu Leu Glu
50 55 60

Glu Tyr Thr Gly Ser Asp Tyr Gln Tyr Val Gly Lys Leu His Ser Asp
65 70 75 80

Gln Asp Arg Gly Asp Gly Ser Leu Lys Tyr Ile Leu Ser Gly Asp Gly
85 90 95

Ala Gly Asp Leu Phe Ile Ile Asn Glu Asn Thr Gly Asp Ile Gln Ala
100 105 110

Thr Lys Arg Leu Asp Arg Glu Glu Lys Pro Val Tyr Ile Leu Arg Ala
115 120 125

Gln Ala Val Asn Arg Arg Thr Gly Arg Pro Val Glu Pro Glu Ser Glu
130 135 140

Phe Ile Ile Lys Ile His Asp Ile Asn Asp Asn Glu Pro Ile Phe Thr
145 150 155 160

```
Lys Asp Val Tyr Thr Ala Thr Val Pro Glu Met Ala Asp Val Gly Thr
                165                 170                 175

Phe Val Val Gln Val Thr Ala Thr Asp Ala Asp Asp Pro Thr Tyr Gly
            180                 185                 190

Asn Ser Ala Lys Val Val Tyr Ser Ile Leu Gln Gly Gln Pro Tyr Phe
        195                 200                 205

Ser Val Glu Ser Glu Thr Gly Ile Ile Lys Thr Ala Leu Leu Asn Met
    210                 215                 220

Asp Arg Glu Asn Arg Glu Gln Tyr Gln Val Val Ile Gln Ala Lys Asp
225                 230                 235                 240

Met Gly Gly Gln Met Gly Gly Leu Ser Gly Thr Thr Thr Val Asn Ile
                245                 250                 255

Thr Leu Thr Asp Val Asn Asp Asn Pro Pro Arg Phe Pro Gln Ser Thr
            260                 265                 270

Tyr Gln Phe Lys Thr Pro Glu Ser Ser Pro Pro Gly Thr Pro Ile Gly
        275                 280                 285

Arg Ile Lys Ala Ser Asp Ala Asp Val Gly Glu Asn Ala Glu Ile Glu
    290                 295                 300

Tyr Ser Ile Thr Asp Gly Glu Gly His Glu Met Phe Asp Val Ile Thr
305                 310                 315                 320

Asp Gln Glu Thr Gln Glu Gly Ile Ile Thr Val Lys Lys Leu Leu Asp
                325                 330                 335

Phe Glu Lys Lys Lys Val Tyr Thr Leu Lys Val Glu Ala Ser Asn Pro
            340                 345                 350

His Val Glu Pro Arg Phe Leu Tyr Leu Gly Pro Phe Lys Asp Ser Ala
        355                 360                 365
```

```
Thr Val Arg Ile Val Val Asp Asp Val Asp Glu Pro Pro Val Phe Ser
    370                 375                 380

Lys Leu Ala Tyr Ile Leu Gln Ile Arg Glu Asp Ala Arg Ile Asn Thr
385                 390                 395                 400

Thr Ile Gly Ser Val Ala Ala Gln Asp Pro Asp Ala Ala Arg Asn Pro
                405                 410                 415

Val Lys Tyr Ser Val Asp Arg His Thr Asp Met Asp Arg Ile Phe Asn
            420                 425                 430

Ile Asp Ser Gly Asn Gly Ser Ile Phe Thr Ser Lys Leu Leu Asp Arg
        435                 440                 445

Glu Thr Leu Leu Trp His Asn Ile Thr Val Ile Ala Thr Glu Ile Asn
    450                 455                 460

Asn Pro Lys Gln Ser Ser Arg Val Pro Leu Tyr Ile Lys Val Leu Asp
465                 470                 475                 480

Val Asn Asp Asn Ala Pro Glu Phe Ala Glu Phe Tyr Glu Thr Phe Val
                485                 490                 495

Cys Glu Lys Ala Lys Ala Asp Gln Leu Ile Gln Thr Leu Arg Ala Val
            500                 505                 510

Asp Lys Asp Asp Pro Tyr Ser Gly His Gln Phe Ser Phe Ser Leu Ala
        515                 520                 525

Pro Glu Ala Ala Ser Ser Ser Asn Phe Thr Ile Gln Asp Asn Lys Asp
    530                 535                 540

Asn Thr Ala Gly Ile Leu Thr Arg Lys Asn Gly Tyr Asn Arg His Glu
545                 550                 555                 560
```

```
Met Ser Thr Tyr Leu Leu Pro Val Val Ile Ser Asp Asn Asp Tyr Pro
                565                 570                 575

Val Gln Ser Ser Thr Gly Thr Val Thr Val Arg Val Cys Ala Cys Asp
            580                 585                 590

His His Gly Asn Met Gln Ser Cys His Ala Glu Ala Leu Ile His Pro
        595                 600                 605

Thr Gly Leu Ser Thr Gly Ala Leu Val Ala Ile Leu Leu Cys Ile Val
    610                 615                 620

Ile Leu Leu Val Thr Val Val Leu Phe Ala Ala Leu Arg Arg Gln Arg
625                 630                 635                 640

Lys Lys Glu Pro Leu Ile Ile Ser Lys Glu Asp Ile Arg Asp Asn Ile
                645                 650                 655

Val Ser Tyr Asn Asp Glu Gly Gly Gly Glu Glu Asp Thr Gln Ala Phe
            660                 665                 670

Asp Ile Gly Thr Leu Arg Asn Pro Glu Ala Met Glu Asp Ser Lys Ser
        675                 680                 685

Arg Arg Asp Ile Val Pro Glu Ala Leu Phe Leu Pro Arg Arg Thr Pro
    690                 695                 700

Thr Ala Arg Asp Asn Thr Asp Val Arg Asp Phe Ile Asn Gln Arg Leu
705                 710                 715                 720

Lys Glu Asn Asp Thr Asp Pro Thr Ala Pro Pro Tyr Asp Ser Leu Ala
                725                 730                 735

Thr Tyr Ala Tyr Glu Gly Thr Gly Ser Val Ala Asp Ser Leu Ser Ser
            740                 745                 750

Leu Glu Ser Val Thr Thr Asp Gly Asp Gln Asp Tyr Asp Tyr Leu Ser
        755                 760                 765
```

```
Asp Trp Gly Pro Arg Phe Lys Lys Leu Ala Asp Met Tyr Gly Gly Met
    770                 775                 780

Asp Ser Asp Lys Asp Ser
785                 790
```

<210> 8
<211> 789
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 8

```
Met Arg Thr Tyr Arg Tyr Phe Leu Leu Leu Phe Trp Val Gly Gln Pro
1               5                   10                  15

Tyr Pro Thr Phe Ser Asn Pro Leu Ser Lys Arg Thr Ser Gly Phe Pro
            20                  25                  30

Ala Lys Arg Arg Ala Leu Glu Leu Ser Ala Asn Ser Arg Asn Glu Leu
        35                  40                  45

Ser Arg Ser Lys Arg Ser Trp Met Trp Asn Gln Phe Phe Leu Leu Glu
    50                  55                  60

Glu Tyr Thr Gly Ser Asp Tyr Gln Tyr Val Gly Lys Leu His Ser Asp
65                  70                  75                  80

Gln Asp Arg Gly Asp Gly Ser Leu Lys Tyr Ile Leu Ser Gly Asp Gly
                85                  90                  95

Ala Gly Asp Leu Phe Ile Ile Asn Glu Asn Thr Gly Asp Ile Gln Ala
            100                 105                 110

Thr Lys Arg Leu Asp Arg Glu Glu Lys Pro Val Tyr Ile Leu Arg Ala
        115                 120                 125

Gln Ala Ile Asn Arg Arg Thr Gly Arg Pro Val Glu Pro Glu Ser Glu
```

```
    130                 135                 140

Phe Ile Ile Lys Ile His Asp Ile Asn Asp Asn Glu Pro Ile Phe Thr
145                 150                 155                 160

Lys Asp Val Tyr Thr Ala Thr Val Pro Glu Met Ala Asp Val Gly Thr
                165                 170                 175

Phe Val Val Gln Val Thr Ala Thr Asp Ala Asp Asp Pro Thr Tyr Gly
            180                 185                 190

Asn Ser Ala Lys Val Val Tyr Ser Ile Leu Gln Gly Gln Pro Tyr Phe
        195                 200                 205

Ser Val Glu Ser Glu Thr Gly Ile Ile Lys Thr Ala Leu Leu Asn Met
    210                 215                 220

Asp Arg Glu Asn Arg Glu Gln Tyr Gln Val Val Ile Gln Ala Lys Asp
225                 230                 235                 240

Met Gly Gly Gln Met Gly Gly Leu Ser Gly Thr Thr Thr Val Asn Ile
                245                 250                 255

Thr Leu Thr Asp Val Asn Asp Asn Pro Pro Arg Phe Pro Gln Ser Thr
            260                 265                 270

Tyr Gln Phe Lys Thr Pro Glu Ser Ser Pro Pro Gly Thr Pro Ile Gly
        275                 280                 285

Arg Ile Lys Ala Ser Asp Ala Asp Val Gly Glu Asn Ala Glu Ile Glu
    290                 295                 300

Tyr Ser Ile Thr Asp Gly Glu Gly His Asp Met Phe Asp Val Ile Thr
305                 310                 315                 320

Asp Gln Glu Thr Gln Glu Gly Ile Ile Thr Val Lys Lys Leu Leu Asp
                325                 330                 335
```

```
Phe Glu Lys Lys Arg Val Tyr Thr Leu Lys Val Glu Ala Ser Asn Pro
            340                 345                 350

His Ile Glu Pro Arg Phe Leu Tyr Leu Gly Pro Phe Lys Asp Ser Ala
        355                 360                 365

Thr Val Arg Ile Val Val Asp Asp Val Asp Glu Pro Pro Val Phe Ser
    370                 375                 380

Lys Pro Ala Tyr Ile Leu Gln Ile Arg Glu Asp Ala Gln Ile Asn Thr
385                 390                 395                 400

Thr Ile Gly Ser Val Ala Ala Gln Asp Pro Asp Ala Ala Arg Asn Pro
                405                 410                 415

Val Lys Tyr Ser Val Asp Arg His Thr Asp Met Asp Arg Ile Phe Asn
            420                 425                 430

Ile Asp Ser Gly Asn Gly Ser Ile Phe Thr Ser Lys Leu Leu Asp Arg
        435                 440                 445

Glu Thr Leu Leu Trp His Asn Ile Thr Val Ile Ala Thr Glu Ile Asn
    450                 455                 460

Asn Pro Lys Gln Ser Ser Arg Val Pro Leu Tyr Ile Lys Val Leu Asp
465                 470                 475                 480

Val Asn Asp Asn Ala Pro Glu Phe Ala Glu Phe Tyr Glu Thr Phe Val
                485                 490                 495

Cys Glu Lys Ala Lys Ala Asp Gln Leu Ile Gln Thr Leu His Ala Val
            500                 505                 510

Asp Lys Asp Asp Pro Tyr Ser Gly His Gln Phe Ser Phe Ser Leu Ala
        515                 520                 525

Pro Glu Ala Ala Ser Gly Ser Asn Phe Thr Ile Gln Asp Asn Lys Asp
```

530 535 540

Asn Thr Ala Gly Ile Leu Thr Arg Lys Asn Gly Tyr Asn Arg His Glu
545 550 555 560

Met Ser Thr Tyr Leu Leu Pro Val Val Ile Ser Asp Asn Asp Tyr Pro
565 570 575

Val Gln Ser Ser Thr Gly Thr Val Thr Val Arg Val Cys Ala Cys Asp
580 585 590

His His Gly Asn Met Gln Ser Cys His Ala Glu Ala Leu Ile His Pro
595 600 605

Thr Gly Leu Ser Thr Gly Ala Leu Val Ala Ile Leu Leu Cys Ile Val
610 615 620

Ile Leu Leu Val Thr Val Val Leu Phe Ala Ala Leu Arg Arg Gln Arg
625 630 635 640

Lys Lys Glu Pro Leu Ile Ile Ser Lys Glu Asp Ile Arg Asp Asn Ile
645 650 655

Val Ser Tyr Asn Asp Glu Gly Gly Gly Glu Glu Asp Thr Gln Ala Phe
660 665 670

Asp Ile Gly Thr Leu Arg Asn Pro Lys Pro Trp Arg Gln Gln Ser Arg
675 680 685

Arg Asp Met Val Pro Glu Ala Leu Phe Leu Pro Arg Arg Thr Pro Thr
690 695 700

Ala Arg Asp Asn Thr Asp Val Arg Asp Phe Ile Ser Gln Arg Leu Arg
705 710 715 720

Lys Met Asn Thr Asp Pro Thr Ala Pro Pro Tyr Asp Ser Leu Ala Thr
725 730 735

```
Tyr Ala Tyr Glu Gly Thr Gly Ser Val Ala Asp Ser Leu Ser Ser Leu
            740                 745                 750

Glu Ser Val Thr Thr Asp Gly Asp Gln Asp Tyr Gly Tyr Leu Ser Asp
        755                 760                 765

Trp Gly Pro Arg Phe Lys Lys Leu Ala Asp Met Tyr Gly Gly Met Asp
    770                 775                 780

Ser Asp Lys Asp Ser
785
```

<210> 9
<211> 790
<212> PRT
<213> Macaca fascicularis

<400> 9

```
Met Arg Thr Tyr Arg Tyr Phe Leu Leu Leu Phe Trp Val Gly Gln Pro
1               5                   10                  15

Tyr Pro Thr Leu Ser Thr Pro Leu Ser Lys Arg Thr Ser Gly Phe Pro
            20                  25                  30

Ala Lys Lys Arg Ala Leu Glu Leu Ser Gly Asn Ser Lys Asn Glu Leu
        35                  40                  45

Asn Arg Ser Lys Arg Ser Trp Met Trp Asn Gln Phe Phe Leu Leu Glu
    50                  55                  60

Glu Tyr Thr Gly Ser Asp Tyr Gln Tyr Val Gly Lys Leu His Ser Asp
65                  70                  75                  80

Gln Asp Arg Gly Asp Gly Ser Leu Lys Tyr Ile Leu Ser Gly Asp Gly
                85                  90                  95

Ala Gly Asp Leu Phe Ile Ile Asn Glu Asn Thr Gly Asp Ile Gln Ala
            100                 105                 110
```

```
Thr Lys Arg Leu Asp Arg Glu Glu Lys Pro Val Tyr Ile Leu Arg Ala
        115                 120                 125

Gln Ala Ile Asn Arg Arg Thr Gly Arg Pro Val Glu Pro Glu Ser Glu
    130                 135                 140

Phe Ile Ile Lys Ile His Asp Ile Asn Asp Asn Glu Pro Ile Phe Thr
145                 150                 155                 160

Lys Glu Val Tyr Thr Ala Thr Val Pro Glu Met Ser Asp Val Gly Thr
                165                 170                 175

Phe Val Val Gln Val Thr Ala Thr Asp Ala Asp Asp Pro Thr Tyr Gly
            180                 185                 190

Asn Ser Ala Lys Val Val Tyr Ser Ile Leu Gln Gly Gln Pro Tyr Phe
        195                 200                 205

Ser Val Glu Ser Glu Thr Gly Ile Ile Lys Thr Ala Leu Leu Asn Met
    210                 215                 220

Asp Arg Glu Asn Arg Glu Gln Tyr Gln Val Val Ile Gln Ala Lys Asp
225                 230                 235                 240

Met Gly Gly Gln Met Gly Gly Leu Ser Gly Thr Thr Thr Val Asn Ile
                245                 250                 255

Thr Leu Thr Asp Val Asn Asp Asn Pro Pro Arg Phe Pro Gln Ser Thr
            260                 265                 270

Tyr Gln Phe Lys Thr Pro Glu Ser Ser Pro Pro Gly Thr Pro Ile Gly
        275                 280                 285

Arg Ile Lys Ala Ser Asp Ala Asp Val Gly Glu Asn Ala Glu Ile Glu
    290                 295                 300
```

```
Tyr Ser Ile Thr Asp Gly Glu Gly Leu Asp Met Phe Asp Val Ile Thr
305                 310                 315                 320

Asp Gln Glu Thr Gln Glu Gly Ile Ile Thr Val Lys Lys Leu Leu Asp
                325                 330                 335

Phe Glu Lys Lys Lys Val Tyr Thr Leu Lys Val Glu Ala Ser Asn Pro
            340                 345                 350

His Val Glu Pro Arg Phe Leu Tyr Leu Gly Pro Phe Lys Asp Ser Ala
        355                 360                 365

Thr Val Arg Ile Val Val Glu Asp Val Asp Glu Pro Pro Val Phe Ser
    370                 375                 380

Lys Leu Ala Tyr Ile Leu Gln Ile Arg Glu Asp Ala Gln Ile Asn Thr
385                 390                 395                 400

Thr Ile Gly Ser Val Thr Ala Gln Asp Pro Asp Ala Ala Arg Asn Pro
                405                 410                 415

Val Lys Tyr Ser Val Asp Arg His Thr Asp Met Asp Arg Ile Phe Asn
            420                 425                 430

Ile Asp Ser Gly Asn Gly Ser Ile Phe Thr Ser Lys Leu Leu Asp Arg
        435                 440                 445

Glu Thr Leu Leu Trp His Asn Ile Thr Val Ile Ala Thr Glu Ile Asn
    450                 455                 460

Asn Pro Lys Gln Ser Ser Arg Val Pro Leu Tyr Ile Lys Val Leu Asp
465                 470                 475                 480

Val Asn Asp Asn Ala Pro Glu Phe Ala Glu Phe Tyr Glu Thr Phe Val
                485                 490                 495

Cys Glu Lys Ala Lys Ala Asp Gln Leu Ile Gln Thr Leu Arg Ala Val
            500                 505                 510
```

```
Asp Lys Asp Asp Pro Tyr Ser Gly His Gln Phe Ser Phe Ser Leu Ala
        515                 520                 525

Pro Glu Ala Ala Ser Gly Ser Asn Phe Thr Ile Gln Asp Asn Lys Asp
    530                 535                 540

Asn Thr Ala Gly Ile Leu Thr Arg Lys Asn Gly Tyr Asn Arg His Glu
545                 550                 555                 560

Met Ser Thr Tyr Leu Leu Pro Val Val Ile Ser Asp Asn Asp Tyr Pro
                565                 570                 575

Val Gln Ser Ser Thr Gly Thr Val Thr Val Arg Val Cys Ala Cys Asp
            580                 585                 590

His His Gly Asn Met Gln Ser Cys His Ala Glu Ala Leu Ile His Pro
        595                 600                 605

Thr Gly Leu Ser Thr Gly Ala Leu Val Ala Ile Leu Leu Cys Ile Val
    610                 615                 620

Ile Leu Leu Val Thr Val Val Leu Phe Ala Ala Leu Arg Arg Gln Arg
625                 630                 635                 640

Lys Lys Glu Pro Leu Ile Ile Ser Lys Glu Asp Ile Arg Asp Asn Ile
                645                 650                 655

Val Ser Tyr Asn Asp Glu Gly Gly Gly Glu Glu Asp Thr Gln Ala Phe
            660                 665                 670

Asp Ile Gly Thr Leu Arg Asn Pro Glu Ala Ile Glu Asp Asn Lys Leu
        675                 680                 685

Arg Arg Asp Ile Val Pro Glu Ala Leu Phe Leu Pro Arg Arg Thr Pro
    690                 695                 700
```

```
Thr Ala Arg Asp Asn Thr Asp Val Arg Asp Phe Ile Asn Gln Arg Leu
705                 710                 715                 720

Lys Glu Asn Asp Thr Asp Pro Thr Ala Pro Pro Tyr Asp Ser Leu Ala
                725                 730                 735

Thr Tyr Ala Tyr Glu Gly Thr Gly Ser Val Ala Asp Ser Leu Ser Ser
            740                 745                 750

Leu Glu Ser Val Thr Thr Asp Gly Asp Gln Asp Tyr Asp Tyr Leu Ser
        755                 760                 765

Asp Trp Gly Pro Arg Phe Lys Lys Leu Ala Asp Met Tyr Gly Gly Val
    770                 775                 780

Asp Ser Asp Lys Asp Ser
785                 790


<210>  10
<211>  108
<212>  PRT
<213>  Rattus norvegicus

<400>  10

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Leu Leu Ser Ala Ser Val Gly
1               5                   10                  15

Asp Arg Val Thr Leu Asn Cys Lys Ala Ser Gln Asn Ile Tyr Lys Asn
            20                  25                  30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Leu Gly Glu Gly Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Tyr Asp Ala Asn Thr Leu Gln Thr Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Ser Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80
```

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Gly Trp Ala
85 90 95

Phe Gly Gly Val Thr Asn Leu Glu Leu Lys Arg Ala
100 105

<210> 11
<211> 324
<212> DNA
<213> Rattus norvegicus

<400> 11
gacatccaga tgacccagtc tccttcactc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcact 60

ctcaactgca aagcaagtca gaatatttat aagaacttag cctggtatca gcaaaagctt 120

ggagaaggtc ccaaactcct gatttatgat gcaaacactt tgcaaacggg catcccatca 180

aggttcagtg gcagtggatc tggttcagat ttcacactca ccatcagcag cctgcagcct 240

gaagatgttg ccacatattt ctgccagcag tactatagcg ggtgggcgtt cggtggagtc 300

accaacctgg aattgaaacg ggct 324

<210> 12
<211> 11
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 12

Lys Ala Ser Gln Asn Ile Tyr Lys Asn Leu Ala
1 5 10

<210> 13
<211> 7
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 13

Asp Ala Asn Thr Leu Gln Thr
1 5

<210> 14
<211> 8
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 14

Gln Gln Tyr Tyr Ser Gly Trp Ala
1 5

<210> 15
<211> 122
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 15

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Asn
20 25 30

Phe Met His Trp Ile Lys Gln Gln Pro Gly Asn Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Trp Ile Tyr Cys Gly Asp Gly Glu Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Asn Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Arg Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Val Tyr Gly Gly Phe Ala Gly Gly Tyr Phe Asp Phe Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Val Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 16
<211> 366
<212> DNA
<213> Rattus norvegicus

<400> 16
caggtacagc tgcagcaatc tggggctgaa ctggtgaagc ctgggtcctc agtgaaaatt 60

tcctgcaagg cttctggcta caccttcacc aggaacttta tgcactggat aaaacagcag 120

cctggaaatg gccttgagtg gattgggtgg atttattgtg gagatggtga gacagagtac 180

aatcaaaagt tcaatgggaa ggcaacactc actgcggaca gatcctccag cacagcctat 240

atggagctca gcagactgac atctgaggac tctgcagtct atttctgtgc aagaggggtt 300

tacggagggt ttgccggggg ctactttgat ttctggggcc aaggagtcat ggtcacagtc 360

tcctca 366

<210> 17
<211> 10
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 17

Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Asn Phe Met His
1 5 10

<210> 18
<211> 10
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 18

Trp Ile Tyr Cys Gly Asp Gly Glu Thr Glu
1 5 10

<210> 19
<211> 13
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 19

```
Gly Val Tyr Gly Gly Phe Ala Gly Gly Tyr Phe Asp Phe
1               5                   10


<210>  20
<211>  109
<212>  PRT
<213>  Rattus norvegicus

<400>  20

Asp Val Gln Met Thr His Ser Pro Ser Tyr Leu Ala Ala Ser Pro Gly
1               5                   10                  15


Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Lys Thr Ser Lys Asn Ile Ser Asn Tyr
            20                  25                  30


Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Ala Tyr Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45


Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Thr Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60


Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Arg Ser Leu Glu Pro
65                  70                  75                  80


Glu Asp Phe Gly Leu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Tyr Glu Lys Pro Phe
                85                  90                  95


Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala
            100                 105


<210>  21
<211>  327
<212>  DNA
<213>  Rattus norvegicus

<400>  21
gatgtccaga tgacccactc tccgtcttat cttgctgcgt ctcctggaga aagtgtttcc       60

atcagttgca agacaagtaa gaacattagt aattatttag tctggtatca acagaaacct      120

ggggaagcat ataagcttct tatctattct gggtcaactt tgcaatctgg aactccatca      180
```

aggttcagtg gcagtggatc tggtacagat ttcactctca ctatcagaag cctggagcct 240

gaagattttg gactctattt ctgtcaacag tattatgaaa aaccattcac gttcggctca 300

gggacgaagt tggaaataaa acgggct 327

<210> 22
<211> 11
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 22

Lys Thr Ser Lys Asn Ile Ser Asn Tyr Leu Val
1 5 10

<210> 23
<211> 7
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 23

Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser
1 5

<210> 24
<211> 9
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 24

Gln Gln Tyr Tyr Glu Lys Pro Phe Thr
1 5

<210> 25
<211> 121
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 25

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln
1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ser Val Thr Asp Tyr Ser Ile Thr Ser Asn
20 25 30

Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Arg Phe Pro Gly Asn Lys Met Glu Trp Met
35 40 45

Gly Tyr Ile Thr Tyr Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Gln
50 55 60

Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe Leu
65 70 75 80

Gln Leu Asn Ser Val Thr Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Ser Ile Asn His Gly Gly Tyr Ser Tyr Val Val Asp Ala Trp Gly
100 105 110

Pro Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 26
<211> 363
<212> DNA
<213> Rattus norvegicus

<400> 26
gaggtgcaac ttcaggagtc aggacctggc cttgtgagac cctcacagtc actctccctc 60

tcctgttctg tcactgatta ctccatcact agtaattact ggggctggat ccggaggttc 120

ccaggaaata aaatggagtg gatgggatac ataacctata gtggttacac tagctacaac 180

ccatctctcc aaagtcgaat ctccattact agagacacat cgaagaatca gttcttcctg 240

cagttgaact ctgtaactgc tgaggacaca gccacatatt actgtgcaag atcgattaac 300

cacggaggat atagttatgt tgtggatgcc tggggtccgg gagcttcagt cactgtctcc 360

tca 363

<210> 27
<211> 10
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 27

Asp Tyr Ser Ile Thr Ser Asn Tyr Trp Gly
1 5 10

<210> 28
<211> 9
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 28

Tyr Ile Thr Tyr Ser Gly Tyr Thr Ser
1 5

<210> 29
<211> 13
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 29

Ser Ile Asn His Gly Gly Tyr Ser Tyr Val Val Asp Ala
1 5 10

<210> 30
<211> 109
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 30

Asp Val Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ala Thr Lys Ser Ile Gly Ile Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Thr Phe Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Thr Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Arg Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Leu Tyr Phe Cys Gln Gln Phe Tyr Glu Asn Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Arg Arg Ala
100 105

<210> 31
<211> 327
<212> DNA
<213> Rattus norvegicus

<400> 31
gatgtccaga tgacccagtc tccgtcttct cttgctgcgt ctcctggaga aagtgtttcc 60

atcagttgca gggcaactaa gagcattggt atttatttag cctggtatca acagaaacct 120

gggaaaacat ttaagcttct tatctactct gggtcaactt tgcaatctgg aactccatca 180

aggttcagtg gcagtgggtc tggtacagat ttcactctca ccatcagaag cctggagcct 240

gaagattttg gactctattt ctgtcaacag ttttatgaaa acccattcac gttcggctca 300

gggacgaagt tggaaataag acgggct 327

<210> 32
<211> 11
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 32

Arg Ala Thr Lys Ser Ile Gly Ile Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 33

<211> 7
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 33

Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser
1 5

<210> 34
<211> 9
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 34

Gln Gln Phe Tyr Glu Asn Pro Phe Thr
1 5

<210> 35
<211> 121
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 35

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Asp Tyr Ser Ile Thr Thr Tyr
20 25 30

Phe Trp Gly Trp Ile Arg Lys Phe Pro Gly Asn Lys Met Glu Trp Met
35 40 45

Gly Tyr Met Ser Tyr Arg Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe Leu
65 70 75 80

Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

```
Arg Cys Pro Asn Tyr Gly Gly His Ser Leu Val Phe Asp Tyr Trp Gly
            100                 105                 110


Gln Gly Val Met Val Thr Val Ser Ser
        115                 120


<210>  36
<211>  363
<212>  DNA
<213>  Rattus norvegicus

<400>  36
gaggtgcagc ttcaggagtc aggacctggc cttgtgaaac cctcacagtc actctccctc       60

acctgttctg tcactgatta ctccatcact acttatttct ggggctggat ccggaagttc      120

ccaggaaata aaatggagtg gatgggatac atgagctacc gtggtggcac ttcctacaac      180

ccatctctca agagtcgaat ctccattact agagacacat cgaagaatca gttcttcctg      240

cagttgaact ctgtaactac tgaggacaca gccacatatt actgtgcaag atgccctaac      300

tacggagggc attcccttgt ttttgattac tggggccaag gagtcatggt cacagtgtcc      360

tca                                                                    363


<210>  37
<211>  10
<212>  PRT
<213>  Rattus norvegicus

<400>  37

Asp Tyr Ser Ile Thr Thr Tyr Phe Trp Gly
1               5                   10


<210>  38
<211>  9
<212>  PRT
<213>  Rattus norvegicus

<400>  38

Tyr Met Ser Tyr Arg Gly Gly Thr Ser
```

1 5

<210> 39
<211> 13
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 39

Cys Pro Asn Tyr Gly Gly His Ser Leu Val Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 40
<211> 109
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 40

Asp Val Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Tyr Leu Ala Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Lys Ala Thr Lys Ser Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Ala Tyr Lys Val Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Thr Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Arg Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Leu Tyr Ser Cys Gln Gln Tyr Tyr Glu Lys Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala
100 105

<210> 41

<211> 327
<212> DNA
<213> Rattus norvegicus

<400> 41
gatgtccaga tgacccagtc tccgtcttat cttgctgcgt ctcctggaga aagtgtttcc 60

atcagttgca aggcaactaa gagcattagt aattatttag cctggtatca acagaaacct 120

ggggaagcat ataaggttct tatctattct gggtcaactt tgcaatctgg aactccatca 180

aggttcagtg gcagtggatc tggtacagat ttcactctca ccatcagaag cctggagcct 240

gaagattttg gactctattc ctgtcaacag tattatgaaa aaccgctcac gttcggttct 300

gggaccaagc tggagatcaa acgggct 327

<210> 42
<211> 11
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 42

Lys Ala Thr Lys Ser Ile Ser Asn Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 43
<211> 7
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 43

Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser
1 5

<210> 44
<211> 9
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 44

Gln Gln Tyr Tyr Glu Lys Pro Leu Thr
1 5

<210> 45
<211> 121
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 45

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Thr Tyr
20 25 30

Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Lys Phe Pro Gly Asn Lys Met Glu Trp Met
35 40 45

Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Arg Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Met Ser Ile Thr Arg Asp Ala Ser Lys Asn Gln Phe Phe Leu
65 70 75 80

Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Ser Pro Ile Asn His Gly Gly Tyr Trp Tyr Phe Asp Phe Trp Gly
100 105 110

Pro Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 46
<211> 363
<212> DNA
<213> Rattus norvegicus

<400> 46
gaggtgcagc ttcaggagtc aggacctggc cttgtgaaac cctcacagtc actctccctc 60

acctgttctg tcactggtta ctccatcact acttattact ggggctggat ccggaagttc 120

ccaggaaata aaatggagtg gatggggtac ataagctaca gtggtcgcac tagttataac 180

ccatctctca aaagtcgaat gtccattact agagacgcat cgaagaatca gttcttccta 240

cagttgaact ctgtaactac tgacgacaca gccacatatt actgtgcaag atccccaatt 300

aaccacggag ggtactggta ctttgacttc tggggcccag gaaccatggt caccgtgtcc 360

tca 363

<210> 47
<211> 10
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 47

Gly Tyr Ser Ile Thr Thr Tyr Tyr Trp Gly
1 5 10

<210> 48
<211> 9
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 48

Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Arg Thr Ser
1 5

<210> 49
<211> 13
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 49

Ser Pro Ile Asn His Gly Gly Tyr Trp Tyr Phe Asp Phe
1 5 10

<210> 50
<211> 449
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA comprising DNA sequence coding for human light chain signal sequence and kappa chain constant region

<400> 50
gcctccggac tctagagcca ccatggtgct gcagacccag gtgttcatct ccctgctgct 60

gtggatctcc ggcgcgtacg gcgatatcgt gatgattaaa cgtacggtgg ccgccccctc 120

cgtgttcatc ttcccccccct ccgacgagca gctgaagtcc ggcaccgcct ccgtggtgtg 180

cctgctgaat aacttctacc ccagagaggc caaggtgcag tggaaggtgg acaacgccct 240

gcagtccggg aactcccagg agagcgtgac cgagcaggac agcaaggaca gcacctacag 300

cctgagcagc accctgaccc tgagcaaagc cgactacgag aagcacaagg tgtacgcctg 360

cgaggtgacc caccagggcc tgagctcccc cgtcaccaag agcttcaaca gggggggagtg 420

ttaggggccc gtttaaacgg gggaggcta 449

<210> 51
<211> 1132
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> DNA comprising DNA sequence coding for human heavy chain signal sequence and IgG1 constant region

<400> 51
gcctccggac tctagagcca ccatgaaaca cctgtggttc ttcctcctgc tggtggcagc 60

tcccagatgg gtgctgagcc aggtgcaatt gtgcaggcgg ttagctcagc ctccaccaag 120

ggcccaagcg tcttcccccct ggcaccctcc tccaagagca cctctggcgg cacagccgcc 180

ctgggctgcc tggtcaagga ctacttcccc gaacccgtga ccgtgagctg gaactcaggc 240

gccctgacca gcggcgtgca caccttcccc gctgtcctgc agtcctcagg actctactcc 300

ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc agcttgggca cccagaccta catctgcaac 360

gtgaatcaca agcccagcaa caccaaggtg gacaagagag ttgagcccaa atcttgtgac 420

aaaactcaca catgcccacc ctgcccagca cctgaactcc tgggggggacc ctcagtcttc 480

ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggacccctga ggtcacatgc 540

gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc 600

gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccc cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgg 660

gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc 720

aaggtctcca acaaagccct cccagccccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggc 780

cagccccggg aaccacaggt gtacaccctg cccccatccc gggaggagat gaccaagaac 840

caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg 900

gagagcaatg gccagcccga gaacaactac aagaccaccc ctcccgtgct ggactccgac 960

ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcagggcaac 1020

gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacaccca gaagagcctc 1080

tccctgtctc ccggcaaatg agatatcggg cccgtttaaa cgggggaggc ta 1132

<210> 52
<211> 749
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> DNA comprising DNA sequence coding for chG019 light chain

<400> 52
ccagcctccg gactctagag ccaccatggt gctgcagacc caggtgttca tcagcctgct 60

gctgtggatc agcggcgcct acggcgacat ccagatgacc cagagcccta gcctgctgag 120

cgccagcgtg ggcgatagag tgaccctgaa ctgcaaggcc agccagaaca tctacaagaa 180

cctggcctgg tatcagcaga agctgggcga gggccccaag ctgctgatct acgacgccaa 240

caccctgcag accggcatcc ccagcagatt ttctggcagc ggcagcggct ccgacttcac 300

cctgacaatc agcagcctgc agcccgagga cgtggccacc tacttttgcc agcagtacta 360

cagcggctgg gccttcggcg gcgtgaccaa cctggaactg aagagagccg tggccgctcc 420

ctccgtgttc atcttcccac ctagcgacga gcagctgaag tccggcacag cctctgtcgt 480

gtgcctgctg aacaacttct accccgcga ggccaaggtg cagtggaagg tggacaatgc 540

cctgcagtct ggcaacagcc aggaaagcgt gaccgagcag gacagcaagg actccaccta 600

cagcctgagc agcaccctga ccctgagcaa ggccgactac gagaagcaca aggtgtacgc 660

ctgcgaagtg acccaccagg gcctgtctag ccccgtgacc aagagcttca accggggcga 720

gtgttgagtt taaacggggg aggctaact 749

<210> 53
<211> 233
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> amino acid sequesnce of chG019 light chain full-length

<400> 53

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Leu Leu Ser
20 25 30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Leu Asn Cys Lys Ala Ser Gln Asn
35 40 45

Ile Tyr Lys Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Leu Gly Glu Gly Pro
50 55 60

Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Asn Thr Leu Gln Thr Gly Ile Pro Ser
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Tyr
100 105 110

Ser Gly Trp Ala Phe Gly Gly Val Thr Asn Leu Glu Leu Lys Arg Ala
115 120 125

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
130 135 140

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
145 150 155 160

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
165 170 175

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
180 185 190

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
195 200 205

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
210 215 220

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 54
<211> 699
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> nucleotide sequesnce of chG019 light chain full-length

<400> 54
atggtgctgc agacccaggt gttcatcagc ctgctgctgt ggatcagcgg cgcctacggc 60

gacatccaga tgacccagag ccctagcctg ctgagcgcca gcgtgggcga tagagtgacc 120

ctgaactgca aggccagcca gaacatctac aagaacctgg cctggtatca gcagaagctg 180

ggcgagggcc ccaagctgct gatctacgac gccaacaccc tgcagaccgg catccccagc 240

agattttctg gcagcggcag cggctccgac ttcaccctga caatcagcag cctgcagccc 300

gaggacgtgg ccacctactt ttgccagcag tactacagcg gctgggcctt cggcggcgtg 360

accaacctgg aactgaagag agccgtggcc gctccctccg tgttcatctt cccacctagc 420

gacgagcagc tgaagtccgg cacagcctct gtcgtgtgcc tgctgaacaa cttctacccc 480

cgcgaggcca aggtgcagtg gaaggtggac aatgccctgc agtctggcaa cagccaggaa 540

agcgtgaccg agcaggacag caaggactcc acctacagcc tgagcagcac cctgaccctg 600

agcaaggccg actacgagaa gcacaaggtg tacgcctgcg aagtgaccca ccagggcctg 660

tctagccccg tgaccaagag cttcaaccgg ggcgagtgt 699

<210> 55
<211> 324
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> nucleotide sequesnce of chG019 light chain variable region

<400> 55
gacatccaga tgacccagag ccctagcctg ctgagcgcca gcgtgggcga tagagtgacc 60

ctgaactgca aggccagcca gaacatctac aagaacctgg cctggtatca gcagaagctg 120

ggcgagggcc ccaagctgct gatctacgac gccaacaccc tgcagaccgg catccccagc 180

agattttctg gcagcggcag cggctccgac ttcaccctga caatcagcag cctgcagccc 240

gaggacgtgg ccacctactt ttgccagcag tactacagcg gctgggcctt cggcggcgtg 300

accaacctgg aactgaagag agcc 324

<210> 56
<211> 471
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> amino acid sequesnce of chG019 heavy chain full-length

<400> 56

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys
20 25 30

```
Pro Gly Ser Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
        35                  40                  45

Thr Arg Asn Phe Met His Trp Ile Lys Gln Gln Pro Gly Asn Gly Leu
    50                  55                  60

Glu Trp Ile Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Glu Thr Glu Tyr Asn
65                  70                  75                  80

Gln Lys Phe Asn Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Arg Ser Ser Ser
                85                  90                  95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
            100                 105                 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Val Tyr Gly Gly Phe Ala Gly Gly Tyr Phe
        115                 120                 125

Asp Phe Trp Gly Gln Gly Val Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
    130                 135                 140

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
145                 150                 155                 160

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
                165                 170                 175

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
            180                 185                 190

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
        195                 200                 205

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
    210                 215                 220

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu
225                 230                 235                 240
```

```
Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
                245                 250                 255

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
            260                 265                 270

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
        275                 280                 285

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
    290                 295                 300

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
305                 310                 315                 320

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
                325                 330                 335

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
            340                 345                 350

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
        355                 360                 365

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
    370                 375                 380

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
385                 390                 395                 400

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
                405                 410                 415

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
            420                 425                 430
```

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
435 440 445

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
450 455 460

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470

<210> 57
<211> 1413
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> nucleotide sequesnce of chG019 heavy chain full-length

<400> 57
atgaaacacc tgtggttctt cctcctgctg gtggcagctc ccagatgggt gctgagccag 60

gtgcagctgc agcagtctgg cgccgagctc gtgaagcctg gcagcagcgt gaagatcagc 120

tgcaaggcca gcggctacac cttcacccgg aacttcatgc actggatcaa gcagcagccc 180

ggcaacggcc tggaatggat cggctggatc tatcccggcg acggcgagac agagtacaac 240

cagaagttca acggcaaggc caccctgacc gccgacagaa gcagctccac cgcctacatg 300

gaactgagcc ggctgaccag cgaggacagc gccgtgtact tttgcgccag aggcgtgtac 360

ggcggcttcg ctggcggcta cttcgatttt tggggccagg gcgtgatggt caccgtcagc 420

tcagcctcca ccaagggccc aagcgtcttc cccctggcac cctcctccaa gagcacctct 480

ggcggcacag ccgccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc cgtgaccgtg 540

agctggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tccccgctgt cctgcagtcc 600

tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcacccag 660

acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gagagttgag 720

cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccctgcc cagcacctga actcctgggg 780

ggaccctcag tcttcctctt ccccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 840

cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 900

tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccccggga ggagcagtac 960

aacagcacgt accgggtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 1020

aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag cccccatcga gaaaaccatc 1080

tccaaagcca aaggccagcc ccgggaacca caggtgtaca ccctgccccc atcccgggag 1140

gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta tcccagcgac 1200

atcgccgtgg agtgggagag caatggccag cccgagaaca actacaagac cacccctccc 1260

gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1320

tggcagcagg gcaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1380

acccagaaga gcctctccct gtctcccggc aaa 1413

<210> 58
<211> 122
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> amino acid sequesnce of chG019 heavy chain variable region

<400> 58

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Asn
20 25 30

Phe Met His Trp Ile Lys Gln Gln Pro Gly Asn Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Glu Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Asn Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Arg Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Val Tyr Gly Gly Phe Ala Gly Gly Tyr Phe Asp Phe Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Val Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 59
<211> 366
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> nucleotide sequesnce of chG019 heavy chain variable region

<400> 59
caggtgcagc tgcagcagtc tggcgccgag ctcgtgaagc ctggcagcag cgtgaagatc 60

agctgcaagg ccagcggcta caccttcacc cggaacttca tgcactggat caagcagcag 120

cccggcaacg gcctggaatg gatcggctgg atctatcccg gcgacggcga gacagagtac 180

aaccagaagt tcaacggcaa ggccaccctg accgccgaca gaagcagctc caccgcctac 240

atggaactga gccggctgac cagcgaggac agcgccgtgt actttgcgc cagaggcgtg 300

tacggcggct tcgctggcgg ctacttcgat ttttggggcc agggcgtgat ggtcaccgtc 360

agctca 366

<210> 60
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> amino acid sequesnce of chG019 CDRH2

<400> 60

Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Glu Thr Glu
1 5 10

<210> 61
<211> 233
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> amino acid sequesnce of hL02 light chain full-length

<400> 61

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
20 25 30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn
35 40 45

Ile Tyr Lys Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
50 55 60

Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Asn Thr Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Tyr
100 105 110

Ser Gly Trp Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
115 120 125

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
130 135 140

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
145 150 155 160

```
Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
                165                 170                 175

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
            180                 185                 190

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
        195                 200                 205

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
    210                 215                 220

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225                 230
```

<210> 62
<211> 699
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> nucleotide sequesnce of hL02 light chain full-length

<400> 62

```
atggtgctgc agacccaggt gttcatctcc ctgctgctgt ggatctccgg cgcgtacggc       60

gacatccaga tgacccagag ccctagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc      120

atcacatgca aggccagcca gaacatctac aagaacctgg cctggtatca gcagaagccc      180

ggcaaggccc ccaagctgct gatctacgac gccaacaccc tgcagaccgg cgtgcccagc      240

agattttctg gcagcggcag cggctccgac ttcaccctga caatcagcag cctgcagccc      300

gaggacttcg ccacctactt ttgccagcag tactacagcg gctgggcctt cggccagggc      360

accaaggtgg aaatcaagcg tacggtggcc gccccctccg tgttcatctt ccccccctcc      420

gacgagcagc tgaagtccgg caccgcctcc gtggtgtgcc tgctgaataa cttctacccc      480

agagaggcca aggtgcagtg gaaggtggac aacgccctgc agtccgggaa ctcccaggag      540

agcgtgaccg agcaggacag caaggacagc acctacagcc tgagcagcac cctgaccctg      600

agcaaagccg actacgagaa gcacaaggtg tacgcctgcg aggtgaccca ccagggcctg      660
```

agctcccccg tcaccaagag cttcaacagg ggggagtgt 699

<210> 63
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> amino acid sequesnce of hL02 light chain variable region

<400> 63

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Ile Tyr Lys Asn
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Asn Thr Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Gly Trp Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
100 105

<210> 64
<211> 324
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> nucleotide sequesnce of hL02 light chain variable region

<400> 64
gacatccaga tgacccagag ccctagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc 60

atcacatgca aggccagcca gaacatctac aagaacctgg cctggtatca gcagaagccc 120

ggcaaggccc ccaagctgct gatctacgac gccaacaccc tgcagaccgg cgtgcccagc 180

agattttctg gcagcggcag cggctccgac ttcaccctga caatcagcag cctgcagccc 240

gaggacttcg ccacctactt ttgccagcag tactacagcg gctgggcctt cggccagggc 300

accaaggtgg aaatcaagcg tacg 324

<210> 65
<211> 233
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> amino acid sequesnce of hL03 light chain full-length

<400> 65

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
20 25 30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn
35 40 45

Ile Tyr Lys Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Leu Gly Glu Gly Pro
50 55 60

Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Asn Thr Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr
100 105 110

Ser Gly Trp Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
115 120 125

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
130 135 140

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
145 150 155 160

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
165 170 175

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
180 185 190

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
195 200 205

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
210 215 220

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 66
<211> 699
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> nucleotide sequesnce of hL03 light chain full-length

<400> 66
atggtgctgc agacccaggt gttcatctcc ctgctgctgt ggatctccgg cgcgtacggc 60

gacatccaga tgacccagag ccctagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc 120

atcacatgca aggccagcca gaacatctac aagaacctgg cctggtatca gcagaagctg 180

ggcgagggcc ccaagctgct gatctacgac gccaacaccc tgcagaccgg cgtgcccagc 240

agattttctg gcagcggctc cggcaccgac ttcaccctga caatcagcag cctgcagccc 300

gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag tactacagcg gctgggcctt tggccagggc 360

accaaggtgg aaatcaagcg tacggtggcc gccccctccg tgttcatctt cccccccctcc 420

gacgagcagc tgaagtccgg caccgcctcc gtggtgtgcc tgctgaataa cttctacccc 480

agagaggcca aggtgcagtg gaaggtggac aacgccctgc agtccgggaa ctcccaggag 540

agcgtgaccg agcaggacag caaggacagc acctacagcc tgagcagcac cctgaccctg 600

agcaaagccg actacgagaa gcacaaggtg tacgcctgcg aggtgaccca ccagggcctg 660

agctcccccg tcaccaagag cttcaacagg ggggagtgt 699

<210> 67
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> amino acid sequesnce of hL03 light chain variable region

<400> 67

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Ile Tyr Lys Asn
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Leu Gly Glu Gly Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Asn Thr Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Gly Trp Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
100 105

<210> 68
<211> 324
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> nucleotide sequesnce of hL03 light chain variable region

<400> 68
gacatccaga tgacccagag ccctagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc 60

atcacatgca aggccagcca gaacatctac aagaacctgg cctggtatca gcagaagctg 120

ggcgagggcc ccaagctgct gatctacgac gccaacaccc tgcagaccgg cgtgcccagc 180

agattttctg gcagcggctc cggcaccgac ttcaccctga caatcagcag cctgcagccc 240

gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag tactacagcg gctgggcctt tggccagggc 300

accaaggtgg aaatcaagcg tacg 324

<210> 69
<211> 471
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> amino acid sequesnce of hH01 heavy chain full-length

<400> 69

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1 5 10 15

Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

```
Thr Arg Asn Phe Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
    50                  55                  60

Glu Trp Met Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Glu Thr Glu Tyr Ala
65                  70                  75                  80

Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser
                85                  90                  95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
            100                 105                 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Val Tyr Gly Gly Phe Ala Gly Gly Tyr Phe
        115                 120                 125

Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
    130                 135                 140

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
145                 150                 155                 160

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
                165                 170                 175

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
            180                 185                 190

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
        195                 200                 205

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
    210                 215                 220

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu
225                 230                 235                 240

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
                245                 250                 255
```

```
Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
            260                 265                 270

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
        275                 280                 285

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
    290                 295                 300

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
305                 310                 315                 320

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
                325                 330                 335

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
            340                 345                 350

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
        355                 360                 365

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
    370                 375                 380

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
385                 390                 395                 400

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
                405                 410                 415

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
            420                 425                 430

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
        435                 440                 445
```

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
450 455 460

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470

<210> 70
<211> 1413
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> nucleotide sequesnce of hH01 heavy chain full-length

<400> 70
atgaaacacc tgtggttctt cctcctgctg gtggcagctc ccagatgggt gctgagcgaa 60

gtgcagctgg tgcagtctgg cgccgaagtg aagaaaccag gcgccagcgt gaaggtgtcc 120

tgcaaggcca gcggctacac ctttacccgg aacttcatgc actgggtgcg ccaggctcca 180

ggccagggac tggaatggat gggctggatc tatcccggcg acggcgagac agagtacgcc 240

cagaaattcc agggcagagt gaccatcacc gccgacacca gcacctccac cgcctacatg 300

gaactgagca gcctgcggag cgaggacacc gccgtgtact attgtgccag aggcgtgtac 360

ggcggcttcg ctggcggcta cttcgatttt tggggccagg gcaccctcgt gaccgtcagc 420

tcagcctcca ccaagggccc aagcgtcttc cccctggcac cctcctccaa gagcacctct 480

ggcggcacag ccgccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc cgtgaccgtg 540

agctggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tccccgctgt cctgcagtcc 600

tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcacccag 660

acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gagagttgag 720

cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccctgcc cagcacctga actcctgggg 780

ggaccctcag tcttcctctt ccccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 840

cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 900

tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccccggga ggagcagtac 960

aacagcacgt accgggtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 1020

aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag cccccatcga gaaaaccatc 1080

tccaaagcca aaggccagcc ccgggaacca caggtgtaca ccctgccccc atcccgggag 1140

gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta tcccagcgac 1200

atcgccgtgg agtgggagag caatggccag cccgagaaca actacaagac cacccctccc 1260

gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1320

tggcagcagg gcaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1380

acccagaaga gcctctccct gtctcccggc aaa 1413

<210> 71
<211> 122
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> amino acid sequesnce of hH01 heavy chain variable region

<400> 71

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Asn
20 25 30

Phe Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Glu Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

```
Ala Arg Gly Val Tyr Gly Gly Phe Ala Gly Gly Tyr Phe Asp Phe Trp
            100                 105                 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 72
<211> 366
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> nucleotide sequesnce of hH01 heavy chain variable region

<400> 72

```
gaagtgcagc tggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac caggcgccag cgtgaaggtg       60

tcctgcaagg ccagcggcta cacctttacc cggaacttca tgcactgggt gcgccaggct      120

ccaggccagg gactggaatg gatgggctgg atctatcccg gcgacggcga gacagagtac      180

gcccagaaat tccagggcag agtgaccatc accgccgaca ccagcacctc caccgcctac      240

atggaactga gcagcctgcg gagcgaggac accgccgtgt actattgtgc cagaggcgtg      300

tacggcggct tcgctggcgg ctacttcgat ttttggggcc agggcaccct cgtgaccgtc      360

agctca                                                                 366
```

<210> 73
<211> 471
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> amino acid sequesnce of hH02 heavy chain full-length

<400> 73

```
Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1               5                   10                  15

Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
            20                  25                  30
```

```
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
        35                  40                  45

Thr Arg Asn Phe Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
    50                  55                  60

Glu Trp Met Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Glu Thr Glu Tyr Asn
65                  70                  75                  80

Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Arg Ser Thr Ser
                85                  90                  95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
            100                 105                 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Val Tyr Gly Gly Phe Ala Gly Gly Tyr Phe
        115                 120                 125

Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
    130                 135                 140

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
145                 150                 155                 160

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
                165                 170                 175

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
            180                 185                 190

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
        195                 200                 205

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
    210                 215                 220

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu
225                 230                 235                 240
```

```
Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
                245                 250                 255

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
            260                 265                 270

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
        275                 280                 285

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
    290                 295                 300

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
305                 310                 315                 320

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
                325                 330                 335

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
            340                 345                 350

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
        355                 360                 365

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
    370                 375                 380

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
385                 390                 395                 400

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
                405                 410                 415

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
            420                 425                 430
```

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
435 440 445

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
450 455 460

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470

<210> 74
<211> 1413
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> nucleotide sequesnce of hH02 heavy chain full-length

<400> 74
atgaaacacc tgtggttctt cctcctgctg gtggcagctc ccagatgggt gctgagcgaa 60

gtgcagctgg tgcagtctgg cgccgaagtg aagaaaccag gcgccagcgt gaaggtgtcc 120

tgcaaggcca gcggctacac ctttacccgg aacttcatgc actgggtgcg ccaggctcca 180

ggccagggac tggaatggat gggctggatc tatcccggcg acggcgagac agagtacaac 240

cagaaattcc agggcagagt gaccatcacc gccgacagaa gcaccagcac cgcctacatg 300

gaactgagca gcctgcggag cgaggatacc gccgtgtact tctgtgccag aggcgtgtac 360

ggcggcttcg ctggcggcta cttcgatttt tggggccagg gcaccctcgt gaccgtcagc 420

tcagcctcca ccaagggccc aagcgtcttc cccctggcac cctcctccaa gagcacctct 480

ggcggcacag ccgccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc cgtgaccgtg 540

agctggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tccccgctgt cctgcagtcc 600

tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcacccag 660

acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gagagttgag 720

cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccctgcc cagcacctga actcctgggg 780

ggaccctcag tcttcctctt ccccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 840

cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 900

tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccccggga ggagcagtac 960

aacagcacgt accgggtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 1020

aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag cccccatcga gaaaaccatc 1080

tccaaagcca aaggccagcc ccgggaacca caggtgtaca ccctgccccc atcccgggag 1140

gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta tcccagcgac 1200

atcgccgtgg agtgggagag caatggccag cccgagaaca actacaagac cacccctccc 1260

gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1320

tggcagcagg gcaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1380

acccagaaga gcctctccct gtctcccggc aaa 1413

<210> 75
<211> 122
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> amino acid sequesnce of hH02 heavy chain variable region

<400> 75

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Asn
20 25 30

Phe Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Glu Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Arg Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

```
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
                85                  90                  95

Ala Arg Gly Val Tyr Gly Gly Phe Ala Gly Gly Tyr Phe Asp Phe Trp
            100                 105                 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 76
<211> 366
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> nucleotide sequesnce of hH02 heavy chain variable region

<400> 76

```
gaagtgcagc tggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac caggcgccag cgtgaaggtg       60

tcctgcaagg ccagcggcta cacctttacc cggaacttca tgcactgggt gcgccaggct      120

ccaggccagg gactggaatg gatgggctgg atctatcccg gcgacggcga gacagagtac      180

aaccagaaat tccagggcag agtgaccatc accgccgaca gaagcaccag caccgcctac      240

atggaactga gcagcctgcg gagcgaggat accgccgtgt acttctgtgc cagaggcgtg      300

tacggcggct tcgctggcgg ctacttcgat ttttggggcc agggcaccct cgtgaccgtc      360

agctca                                                                366
```

<210> 77
<211> 471
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> amino acid sequesnce of hH04 heavy chain full-length

<400> 77

```
Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1               5                   10                  15
```

```
Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
            20                  25                  30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
        35                  40                  45

Thr Arg Asn Phe Met His Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
    50                  55                  60

Glu Trp Met Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Glu Thr Glu Tyr Ala
65                  70                  75                  80

Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Arg Ser Thr Ser
                85                  90                  95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
            100                 105                 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Val Tyr Gly Gly Phe Ala Gly Gly Tyr Phe
        115                 120                 125

Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
    130                 135                 140

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
145                 150                 155                 160

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
                165                 170                 175

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
            180                 185                 190

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
        195                 200                 205

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
    210                 215                 220
```

```
Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu
225                 230                 235                 240

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
                245                 250                 255

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
            260                 265                 270

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
        275                 280                 285

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
    290                 295                 300

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
305                 310                 315                 320

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
                325                 330                 335

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
            340                 345                 350

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
        355                 360                 365

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
    370                 375                 380

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
385                 390                 395                 400

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
                405                 410                 415
```

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
420 425 430

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
435 440 445

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
450 455 460

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470

<210> 78
<211> 1413
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> nucleotide sequesnce of hH04 heavy chain full-length

<400> 78
atgaaacacc tgtggttctt cctcctgctg gtggcagctc ccagatgggt gctgagccag 60

gtgcagctgg tgcagtctgg cgccgaagtg aagaaaccag gcgccagcgt gaaggtgtcc 120

tgcaaggcca gcggctacac ctttacccgg aacttcatgc actggatccg gcaggccccc 180

ggacagggcc tggaatggat gggctggatc tatcccggcg acggcgagac agagtacgcc 240

cagaaattcc agggcagagt gaccctgacc gccgacagaa gcaccagcac cgcctacatg 300

gaactgagca gcctgcggag cgaggacacc gccgtgtact attgtgccag aggcgtgtac 360

ggcggcttcg ctggcggcta cttcgatttt tggggccagg gcaccctcgt gaccgtcagc 420

tcagcctcca ccaagggccc aagcgtcttc cccctggcac cctcctccaa gagcacctct 480

ggcggcacag ccgccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc cgtgaccgtg 540

agctggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tccccgctgt cctgcagtcc 600

tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcacccag 660

acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gagagttgag 720

cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccctgcc cagcacctga actcctgggg 780

ggaccctcag tcttcctctt ccccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 840

cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 900

tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccccggga ggagcagtac 960

aacagcacgt accgggtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 1020

aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag cccccatcga gaaaaccatc 1080

tccaaagcca aaggccagcc ccgggaacca caggtgtaca ccctgccccc atcccgggag 1140

gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta tcccagcgac 1200

atcgccgtgg agtgggagag caatggccag cccgagaaca actacaagac cacccctccc 1260

gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1320

tggcagcagg gcaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1380

acccagaaga gcctctccct gtctcccggc aaa 1413

<210> 79
<211> 122
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> amino acid sequesnce of hH04 heavy chain variable region

<400> 79

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Asn
20 25 30

Phe Met His Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Glu Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Arg Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Val Tyr Gly Gly Phe Ala Gly Gly Tyr Phe Asp Phe Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 80
<211> 366
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> nucleotide sequesnce of hH04 heavy chain variable region

<400> 80
caggtgcagc tggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac caggcgccag cgtgaaggtg 60

tcctgcaagg ccagcggcta cacctttacc cggaacttca tgcactggat ccggcaggcc 120

cctggacagg gcctggaatg gatgggctgg atctatcccg gcgacggcga gacagagtac 180

gcccagaaat tccagggcag agtgaccctg accgccgaca gaagcaccag caccgcctac 240

atggaactga gcagcctgcg gagcgaggac accgccgtgt actattgtgc cagaggcgtg 300

tacggcggct tcgctggcgg ctacttcgat ttttggggcc agggcaccct cgtgaccgtc 360

agctca 366

<210> 81
<211> 235
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> amino acid sequesnce of NOV0712 light chain full-length

<400> 81

```
Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1               5                  10                  15

Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
            20                  25                  30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser
        35                  40                  45

Ile Ser Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
    50                  55                  60

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Val Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser
65                  70                  75                  80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
                85                  90                  95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Gly
            100                 105                 110

Thr Phe Pro Pro Thr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
        115                 120                 125

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
    130                 135                 140

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
145                 150                 155                 160

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
                165                 170                 175

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
            180                 185                 190

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
        195                 200                 205
```

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
210 215 220

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

<210> 82
<211> 705
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> nucleotide sequesnce coding for amino acid sequence of sequence number 81

<400> 82
atggtgctgc agacccaggt gttcatctcc ctgctgctgt ggatctccgg cgcgtacggc 60

gacatccaga tgacccagag ccctagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc 120

atcacctgta gagccagcca gagcatcagc agctacctga actggtatca gcagaagccc 180

ggcaaggccc ccaaactgct gatctacgcc gtgtccacac tgcagagcgg cgtgcccagc 240

agattttctg gcagcggctc cggcaccgac ttcaccctga caatcagcag cctgcagccc 300

gaggacttcg ccacctacta ctgtcagcag tccggcacct tccccccccac cacatttggc 360

cagggcacca aggtggaaat caagcgtacg gtggccgccc cctccgtgtt catcttcccc 420

ccctccgacg agcagctgaa gtccggcacc gcctccgtgg tgtgcctgct gaataacttc 480

taccccagag aggccaaggt gcagtggaag gtggacaacg ccctgcagtc cgggaactcc 540

caggagagcg tgaccgagca ggacagcaag gacagcacct acagcctgag cagcaccctg 600

accctgagca aagccgacta cgagaagcac aaggtgtacg cctgcgaggt gacccaccag 660

ggcctgagct cccccgtcac caagagcttc aacaggggggg agtgt 705

<210> 83
<211> 467
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> amino acid sequesnce of NOV0712 heavy chain full-length

<400> 83

```
Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1               5                  10                  15

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
            20                  25                  30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
        35                  40                  45

Ser Ser His Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
    50                  55                  60

Glu Trp Val Ser Val Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asn Thr Gly Tyr Ala
65                  70                  75                  80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
                85                  90                  95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
            100                 105                 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gln Trp Gly Ser Tyr Ala Phe Asp Ser Trp Gly
        115                 120                 125

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
    130                 135                 140

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
145                 150                 155                 160

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
                165                 170                 175

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
```

```
            180                 185                 190

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
        195                 200                 205

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
    210                 215                 220

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys
225                 230                 235                 240

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
                245                 250                 255

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
            260                 265                 270

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
        275                 280                 285

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
    290                 295                 300

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
305                 310                 315                 320

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
                325                 330                 335

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
            340                 345                 350

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
        355                 360                 365

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
    370                 375                 380
```

```
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
385                 390                 395                 400

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
                405                 410                 415

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
            420                 425                 430

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
        435                 440                 445

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
    450                 455                 460

Pro Gly Lys
465
```

<210> 84
<211> 1401
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> nucleotide sequesnce coding for amino acid sequence of sequence number 83

<400> 84

```
atgaaacacc tgtggttctt cctcctgctg gtggcagctc ccagatgggt gctgagccag       60

gtgcagctgc tggaatctgg cggaggactg gtgcagcctg gcggctctct gagactgtct      120

tgtgccgcca gcggcttcac cttcagcagc cacggaatgc actgggtgcg ccaggccct       180

ggaaagggac tggaatgggt gtccgtgatc agcggcagcg gctccaatac cggctacgcc      240

gatagcgtga agggccggtt caccatcagc cgggacaaca gcaagaacac cctgtacctg      300

cagatgaaca gcctgcgggc cgaggacacc gccgtgtact attgtgccag acagtggggc      360

agctacgcct tcgattcttg gggccagggc accctcgtga ccgtcagctc agcctccacc      420

aagggcccaa gcgtcttccc cctggcaccc tcctccaaga gcacctctgg cggcacagcc      480
```

gccctgggct gcctggtcaa ggactacttc cccgaacccg tgaccgtgag ctggaactca 540

ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc cccgctgtcc tgcagtcctc aggactctac 600

tccctcagca gcgtggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcacccagac ctacatctgc 660

aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga gagttgagcc caaatcttgt 720

gacaaaactc acacatgccc accctgccca gcacctgaac tcctgggggg accctcagtc 780

ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 840

tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 900

ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccccgggagg agcagtacaa cagcacgtac 960

cgggtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 1020

tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 1080

ggccagcccc gggaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggagga gatgaccaag 1140

aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 1200

tgggagagca atggccagcc cgagaacaac tacaagacca cccctcccgt gctggactcc 1260

gacggctcct tcttcctcta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggc 1320

aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac ccagaagagc 1380

ctctccctgt ctcccggcaa a 1401

<210> 85
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 85
caccatgaga acttaccgct acttcttgct gctc 34

<210> 86
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 86
ttaggagtct ttgtcactgt ccactcctcc 30

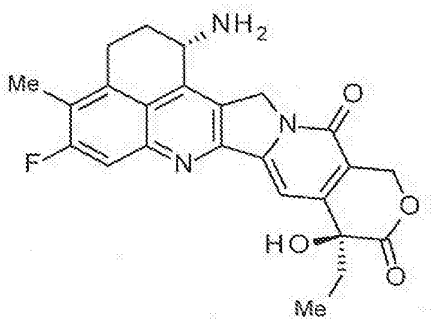
【書類名】特許請求の範囲
【請求項１】
配列番号４に記載のアミノ酸配列に特異的に結合し、細胞内に取り込まれる内在化能を有する、抗体又は当該抗体の機能性断片。
【請求項２】
配列番号４に記載のアミノ酸配列への結合に対して、以下の（１）～（５）：
（１）配列番号５３の２１～２３３番目に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号５６の２０～４７１番目に記載のアミノ酸配列からなる重鎖を有する抗体、
（２）配列番号６１の２１～２３３番目に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号６９の２０～４７１番目に記載のアミノ酸配列からなる重鎖を有する抗体、
（３）配列番号６１の２１～２３３番目に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号７３の２０～４７１番目に記載のアミノ酸配列からなる重鎖を有する抗体、
（４）配列番号６５の２１～２３３番目に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号７３の２０～４７１番目に記載のアミノ酸配列からなる重鎖を有する抗体、及び
（５）配列番号６１の２１～２３３番目に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号７７の２０～４７１番目に記載のアミノ酸配列からなる重鎖を有する抗体、
からなる群から選択される抗体のうち少なくともいずれか１つと競合阻害活性を有する請求項１に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片。
【請求項３】
以下の（１）～（４）：
（１）配列番号１２に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１、配列番号１３に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２及び配列番号１４に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ３、
（２）配列番号２２に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１、配列番号２３に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２及び配列番号２４に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ３、
（３）配列番号３２に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１、配列番号３３に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２及び配列番号３４に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ３、及び
（４）配列番号４２に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１、配列番号４３に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２及び配列番号４４に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ３、
からなる群から選択されるいずれか１つに記載のＣＤＲＬ１、ＣＤＲＬ２及びＣＤＲＬ３、並びに、
以下の（５）～（９）：
（５）配列番号１７に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１、配列番号１８に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２及び配列番号１９に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３、
（６）配列番号２７に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１、配列番号２８に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２及び配列番号２９に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３、
（７）配列番号３７に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１、配列番号３８に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２及び配列番号３９に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３、
（８）配列番号４７に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１、配列番号４８に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２及び配列番号４９に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３、及び
（９）配列番号１７に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１、配列番号６０に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２及び配列番号１９に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３、

からなる群から選択されるいずれか１つに記載のＣＤＲＨ１、ＣＤＲＨ２及びＣＤＲＨ３を含む、
請求項１又２のいずれか１項に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片。
【請求項４】
以下の（１）～（５）：
（１）配列番号１２に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１、配列番号１３に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２及び配列番号１４に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ３、及び、配列番号１７に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１、配列番号１８に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２及び配列番号１９に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３、
（２）配列番号２２に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１、配列番号２３に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２及び配列番号２４に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ３、及び、配列番号２７に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１、配列番号２８に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２及び配列番号２９に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３、
（３）配列番号３２に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１、配列番号３３に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２及び配列番号３４に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ３、及び、配列番号３７に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１、配列番号３８に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２及び配列番号３９に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３、
（４）配列番号４２に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１、配列番号４３に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２及び配列番号４４に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ３、及び、配列番号４７に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１、配列番号４８に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２及び配列番号４９に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３、及び
（５）配列番号１２に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１、配列番号１３に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２及び配列番号１４に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ３、及び、配列番号１７に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１、配列番号６０に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２及び配列番号１９に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３、
からなる群から選択されるＣＤＲＬ１、ＣＤＲＬ２及びＣＤＲＬ３、並びに、ＣＤＲＨ１、ＣＤＲＨ２及びＣＤＲＨ３を含む、
請求項１～３のいずれか１項に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片。
【請求項５】
ヒト化されている請求項１～４のいずれか１項に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片。
【請求項６】
以下の（１）～（４）：
（１）配列番号６３に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、
（２）配列番号６７に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、
（３）（１）～（２）のアミノ酸配列において各ＣＤＲ配列以外のフレームワーク領域の配列に対して少なくとも９５％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列、及び
（４）（１）～（３）のアミノ酸配列において各ＣＤＲ配列以外のフレームワーク領域の配列において１又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列
からなる群から選択されるいずれか１つに記載の軽鎖可変領域、並びに、
以下の（５）～（９）：
（５）配列番号７１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、
（６）配列番号７５に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、
（７）配列番号７９に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、
（８）（５）～（７）のアミノ酸配列において各ＣＤＲ配列以外のフレームワーク領域の

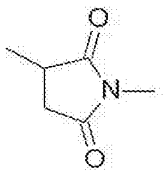
配列に対して少なくとも９５％以上の配列相同性を有するアミノ酸配列、及び
（９）（５）～（８）のアミノ酸配列において各ＣＤＲ配列以外のフレームワーク領域の配列において１又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列
からなる群から選択されるいずれか１つに記載の重鎖可変領域、
を有する請求項１～５のいずれか１項に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片。
【請求項７】
以下の（１）～（４）：
（１）配列番号６３に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域及び配列番号７１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、
（２）配列番号６３に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域及び配列番号７５に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、
（３）配列番号６７に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域及び配列番号７５に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、又は
（４）配列番号６３に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域及び配列番号７９に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、
のいずれかの軽鎖可変領域及び重鎖可変領域、
を含む請求項１～６のいずれか１項に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片。
【請求項８】
以下の（１）～（４）：
（１）配列番号６１の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号６９の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖、
（２）配列番号６１の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号７３の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖、
（３）配列番号６５の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号７３の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖、又は
（４）配列番号６１の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号７７の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖、
のいずれかを有する請求項１～７のいずれか１項に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片。
【請求項９】
配列番号６１の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号６９の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖を有する請求項８に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片。
【請求項１０】
配列番号６１の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号７３の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖を有する請求項８に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片。
【請求項１１】
配列番号６５の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号７３の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖を有する請求項８に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片。
【請求項１２】
配列番号６１の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号７７の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖を有する請求項８に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片。
【請求項１３】
機能性断片がＦａｂ、Ｆ（ａｂ’）２、Ｆａｂ’及びＦｖからなる群から選択される請求項１～１２のいずれか１項に記載の抗体の機能性断片。
【請求項１４】
請求項１～１３のいずれか１項に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片をコードするポ

リヌクレオチド。
【請求項１５】
以下の（１）～（５）：
（１）配列番号１２に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１、配列番号１３に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２及び配列番号１４に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ３を含む軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド、及び、配列番号１７に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１、配列番号１８に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２及び配列番号１９に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３を含む重鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド、
（２）配列番号２２に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１、配列番号２３に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２及び配列番号２４に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ３を含む軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド、及び、配列番号２７に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１、配列番号２８に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２及び配列番号２９に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３を含む重鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド、
（３）配列番号３２に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１、配列番号３３に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２及び配列番号３４に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ３を含む軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド、及び、配列番号３７に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１、配列番号３８に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２及び配列番号３９に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３を含む重鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド、
（４）配列番号４２に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１、配列番号４３に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２及び配列番号４４に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ３を含む軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド、及び、配列番号４７に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１、配列番号４８に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２及び配列番号４９に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３を含む重鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド、並びに
（５）配列番号１２に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１、配列番号１３に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２及び配列番号１４に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ３を含む軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド、及び、配列番号１７に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１、配列番号６０に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２及び配列番号１９に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３を含む重鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド、
からなる群から選択されるいずれか１つに記載のポリヌクレオチドを含む請求項１４に記載のポリヌクレオチド。
【請求項１６】
配列番号６１の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖をコードするポリヌクレオチド及び配列番号６９の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖をコードするポリヌクレオチドを含む請求項１４又は１５に記載のポリヌクレオチド。
【請求項１７】
配列番号６１の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖をコードするポリヌクレオチド及び配列番号７３の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖をコードするポリヌクレオチドを含む請求項１４又は１５に記載のポリヌクレオチド。
【請求項１８】
配列番号６５の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖をコードするポリヌクレオチド及び配列番号７３の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖をコードするポリヌクレオチドを含む請求項１４又は１５に記載のポリヌクレオチド。
【請求項１９】
配列番号６１の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖をコードするポリヌクレオチド及び配列番号７７の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖をコードするポ

リヌクレオチドを含む請求項１４又は１５に記載のポリヌクレオチド。
【請求項２０】
請求項１４～１９のいずれか１項に記載のポリヌクレオチドを含有する発現ベクター。
【請求項２１】
請求項２０に記載の発現ベクターにより形質転換された宿主細胞。
【請求項２２】
宿主細胞が真核細胞である請求項２１に記載の宿主細胞。
【請求項２３】
請求項２１又は２２に記載の宿主細胞を培養する工程、及び当該工程で得られた培養物から目的の抗体又は当該抗体の機能性断片を採取する工程を含むことを特徴とする当該抗体又は当該抗体の機能性断片の製造方法。
【請求項２４】
重鎖又は軽鎖が、Ｎ―結合への糖鎖付加、Ｏ―結合への糖鎖付加、Ｎ末のプロセッシング、Ｃ末のプロセッシング、脱アミド化、アスパラギン酸の異性化、メチオニンの酸化、Ｎ末にメチオニン残基の付加、プロリン残基のアミド化、Ｎ末グルタミンもしくはＮ末グルタミン酸のピログルタミン酸化、及びカルボキシル末端における１つ又は２つのアミノ酸欠失からなる群より選択される１又は２以上の修飾をうけた、請求項１～１３のいずれか１項に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片。
【請求項２５】
重鎖のカルボキシル末端において１つ又は２つのアミノ酸が欠失している請求項２４に記載の抗体。
【請求項２６】
２本の重鎖の双方でカルボキシル末端において１つのアミノ酸が欠失している請求項２５に記載の抗体。
【請求項２７】
重鎖のカルボキシル末端のプロリン残基が更にアミド化されている請求項２４～２６のいずれか１項に記載の抗体。
【請求項２８】
抗体依存性細胞傷害活性を増強させるために糖鎖修飾が調節されている請求項１～１３及び請求項２４～２７からなる群から選択されるいずれか１項に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片。
【請求項２９】
請求項１～１３及び請求項２４～２８からなる群から選択されるいずれか１項に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片に薬物が結合している抗体―薬物コンジュゲート。
【請求項３０】
薬物が抗腫瘍性化合物である、請求項２９に記載の抗体―薬物コンジュゲート。
【請求項３１】
抗腫瘍性化合物が次式：
【化１】



で示される抗腫瘍性化合物である請求項３０に記載の抗体―薬物コンジュゲート。
【請求項３２】
抗体と薬物が、次式（ａ）～（ｆ）：
（ａ）―（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ―３―ｙｌ―Ｎ）―ＣＨ２ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―ＧＧＦＧ―ＮＨ―ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―、
（ｂ）―（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ―３―ｙｌ―Ｎ）―ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―ＧＧＦＧ―ＮＨ―ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―、
（ｃ）―（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ―３―ｙｌ―Ｎ）―ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―ＧＧＦＧ―ＮＨ―ＣＨ２―Ｏ―ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―、
（ｄ）―（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ―３―ｙｌ―Ｎ）―ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―ＧＧＦＧ―ＮＨ―ＣＨ２ＣＨ２―Ｏ―ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―、
（ｅ）―（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ―３―ｙｌ―Ｎ）―ＣＨ２ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―ＮＨ―ＣＨ２ＣＨ２Ｏ―ＣＨ２ＣＨ２Ｏ―ＣＨ２ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―ＧＧＦＧ―ＮＨ―ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―、及び
（ｆ）―（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ―３―ｙｌ―Ｎ）―ＣＨ２ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―ＮＨ―ＣＨ２ＣＨ２Ｏ―ＣＨ２ＣＨ２Ｏ―ＣＨ２ＣＨ２Ｏ―ＣＨ２ＣＨ２Ｏ―ＣＨ２ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―ＧＧＦＧ―ＮＨ―ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―、
からなる群から選択されるいずれかの構造のリンカーを介して結合している、請求項２９～３１のいずれか１項に記載の抗体―薬物コンジュゲート。
（ここで、抗体は、―（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ―３―ｙｌ―Ｎ）の末端において結合する。抗腫瘍性化合物は、１位のアミノ基の窒素原子を結合部位として、―（ＣＨ２）ｎ２―Ｃ（＝Ｏ）―部分のカルボニル基に結合する。上記式中ＧＧＦＧは、グリシン―グリシン―フェニルアラニン―グリシンからなるペプチド結合でつながっているアミノ酸配列を示す。
―（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ―３―ｙｌ―Ｎ）―は次式：
【化２】



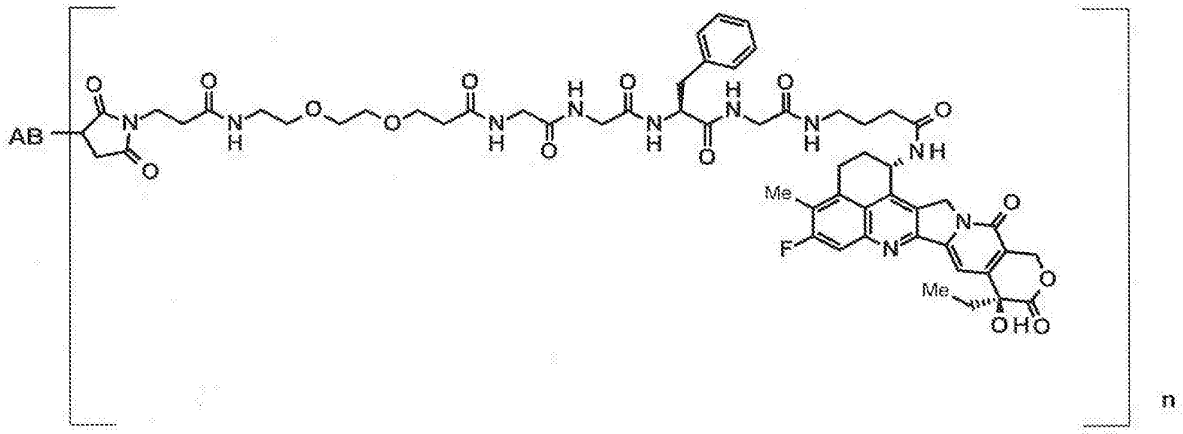
で示される構造であり、このものの３位で抗体と結合し、１位の窒素原子上でこれを含むリンカー構造内のメチレン基と結合する。）。
【請求項３３】
リンカーが以下の（ｃ）、（ｄ）及び（ｅ）からなる群から選択されるいずれかの式で示される請求項２９～３２のいずれか１項に記載の抗体―薬物コンジュゲート：
（ｃ）―（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ―３―ｙｌ―Ｎ）―ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―ＧＧＦＧ―ＮＨ―ＣＨ２―Ｏ―ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―、
（ｄ）―（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ―３―ｙｌ―Ｎ）―ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―ＧＧＦＧ―ＮＨ―ＣＨ２ＣＨ２―Ｏ―ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―、
（ｅ）―（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ―３―ｙｌ―Ｎ）―ＣＨ２ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―ＮＨ―ＣＨ２ＣＨ２Ｏ―ＣＨ２ＣＨ２Ｏ―ＣＨ２ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―ＧＧＦＧ―ＮＨ―ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―。
【請求項３４】
リンカーが以下の（ｃ）又は（ｅ）の式で示される請求項２９～３３のいずれか１項に記載の抗体―薬物コンジュゲート：
（ｃ）―（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ―３―ｙｌ―Ｎ）―ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―ＧＧＦＧ―ＮＨ―ＣＨ２―Ｏ―ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―、
（ｅ）―（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ―３―ｙｌ―Ｎ）―ＣＨ２ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―ＮＨ―

ＣＨ２ＣＨ２Ｏ―ＣＨ２ＣＨ２Ｏ―ＣＨ２ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―ＧＧＦＧ―ＮＨ―ＣＨ２ＣＨ２―Ｃ（＝Ｏ）―。

【請求項３５】

以下の式：

【化３】



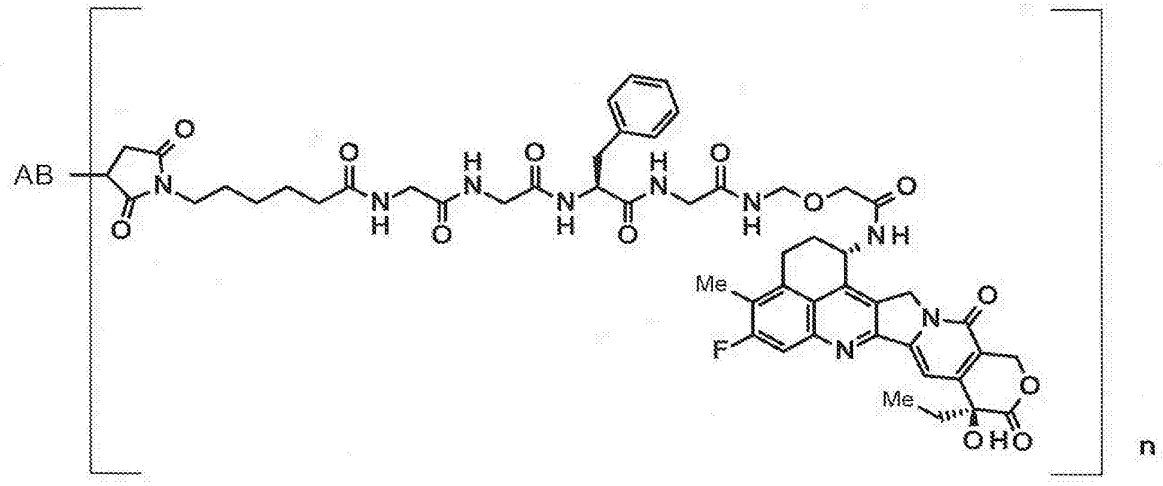
で示される構造を有する、請求項２９～３４のいずれか１項に記載の抗体―薬物コンジュゲート：

ここで、ＡＢは抗体又は該抗体の機能性断片を示す。ｎは抗体と結合している薬物―リンカー構造の１抗体あたりの平均結合数を示す。抗体とリンカーは抗体由来のスルフヒドリル基を介して結合している。

【請求項３６】

以下の式：

【化４】



で示される構造を有する、請求項２９～３４のいずれか１項に記載の抗体―薬物コンジュゲート：

ここで、ＡＢは抗体又は該抗体の機能性断片を示す。ｎは抗体と結合している薬物―リンカー構造の１抗体あたりの平均結合数を示す。抗体とリンカーは抗体由来のスルフヒドリル基を介して結合している。

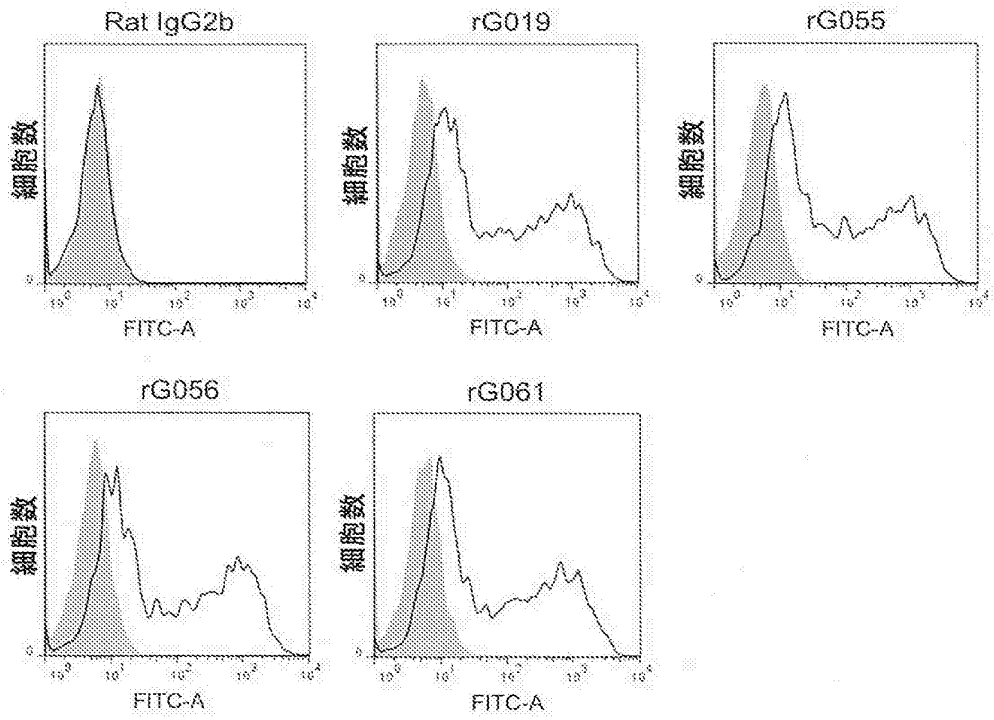
【請求項３７】

抗体が以下の（１）～（４）：
（１）配列番号６１の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号６９の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖、
（２）配列番号６１の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号７３の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖、
（３）配列番号６５の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号７３の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖、又は
（４）配列番号６１の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号７７の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖、
からなる群から選択されるいずれか１つに記載の軽鎖及び重鎖を含む抗体又は当該抗体の機能性断片である、請求項２９～３６のいずれか１項に記載の抗体―薬物コンジュゲート。
【請求項３８】
抗体が、配列番号６１の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号６９の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖を含む抗体又は当該抗体の機能性断片である、請求項３７に記載の抗体―薬物コンジュゲート。
【請求項３９】
抗体が、配列番号６１の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号７７の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖を含む抗体又は当該抗体の機能性断片である、請求項３７に記載の抗体―薬物コンジュゲート。
【請求項４０】
重鎖又は軽鎖が、Ｎ―結合への糖鎖付加、Ｏ―結合への糖鎖付加、Ｎ末のプロセッシング、Ｃ末のプロセッシング、脱アミド化、アスパラギン酸の異性化、メチオニンの酸化、Ｎ末にメチオニン残基の付加、プロリン残基のアミド化、Ｎ末グルタミンもしくはＮ末グルタミン酸のピログルタミン酸化及びカルボキシル末端における１つ又は２つのアミノ酸欠失からなる群から選択される１又は２以上の修飾をうけた、請求項２９～３９のいずれか１項に記載の抗体―薬物コンジュゲート。
【請求項４１】
選択された１種の薬物―リンカー構造の１抗体あたりの平均結合数が１～１０個の範囲である請求項２９～４０のいずれか１項に記載の抗体―薬物コンジュゲート。
【請求項４２】
選択された１種の薬物―リンカー構造の１抗体あたりの平均結合数が２～８個の範囲である請求項４１に記載の抗体―薬物コンジュゲート。
【請求項４３】
選択された１種の薬物―リンカー構造の１抗体あたりの平均結合数が５～８個の範囲である請求項４２に記載の抗体―薬物コンジュゲート。
【請求項４４】
選択された１種の薬物―リンカー構造の１抗体あたりの平均結合数が７～８である請求項４３に記載の抗体―薬物コンジュゲート。
【請求項４５】
請求項２９～４４のいずれか１項に記載の抗体―薬物コンジュゲート、その塩、又はそれらの水和物を含むことを特徴とする医薬組成物。
【請求項４６】
抗腫瘍薬であることを特徴とする、請求項４５に記載の医薬組成物。
【請求項４７】
腫瘍がＣＤＨ６を発現する腫瘍であることを特徴とする、請求項４６に記載の抗腫瘍薬。
【請求項４８】
腫瘍が腎細胞癌、腎淡明細胞癌、乳頭状腎細胞癌、卵巣癌、卵巣漿液性腺癌又は甲状腺癌であることを特徴とする、請求項４６又は４７に記載の抗腫瘍薬。

【請求項４９】
請求項２９～４４のいずれか１項に記載の抗体―薬物コンジュゲート、その塩、又はそれらの水和物から選択されるいずれかを個体に投与することを特徴とする腫瘍の治療方法。
【請求項５０】
腫瘍がＣＤＨ６が発現している腫瘍であることを特徴とする、請求項４９に記載の治療方法。
【請求項５１】
腫瘍が、腎細胞癌、腎淡明細胞癌、乳頭状腎細胞癌、卵巣癌、卵巣漿液性腺癌又は甲状腺癌であることを特徴とする、請求項４９又は５０に記載の治療方法。
【請求項５２】
請求項２９～４４のいずれか１項に記載の抗体―薬物コンジュゲート、その塩、又はそれらの水和物から選択される少なくとも一つを含む医薬組成物及び少なくとも一つの抗腫瘍薬を、同時に、別々に又は連続して個体に投与することを特徴とする腫瘍の治療方法。
【請求項５３】
請求項２１又は２２に記載の宿主細胞を培養する工程、当該工程で得られた培養物から目的の抗体又は当該抗体の機能性断片を採取する工程、及び当該工程で得られた抗体又は当該抗体の機能性断片と薬物―リンカー中間化合物を反応させる工程を含むことを特徴とする、抗体―薬物コンジュゲートの製造方法。

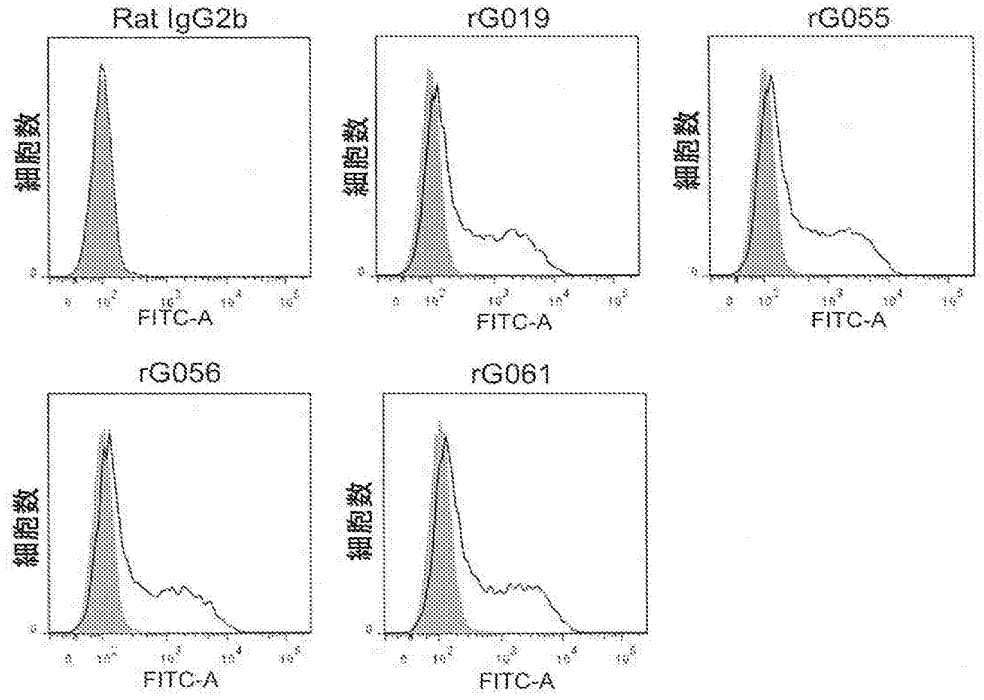
【書類名】要約書
【要約】
【課題】
本発明の課題は、ＣＤＨ６に結合する内在化活性を有する抗体、該抗体と抗腫瘍活性を有する薬物との抗体―薬物コンジュゲート、該抗体―薬物コンジュゲートを用いた腫瘍に対する治療効果を有する医薬品、及び、該抗体、該抗体―薬物コンジュゲート又は該医薬品を用いた腫瘍の治療方法等を提供することである。
【解決手段】
内在化活性を有する抗ＣＤＨ６抗体、及び、該抗体と抗腫瘍活性を有する薬物との抗体―薬物コンジュゲートにより上記課題の解決が図れる。
【選択図】なし

【書類名】図面
【図１】



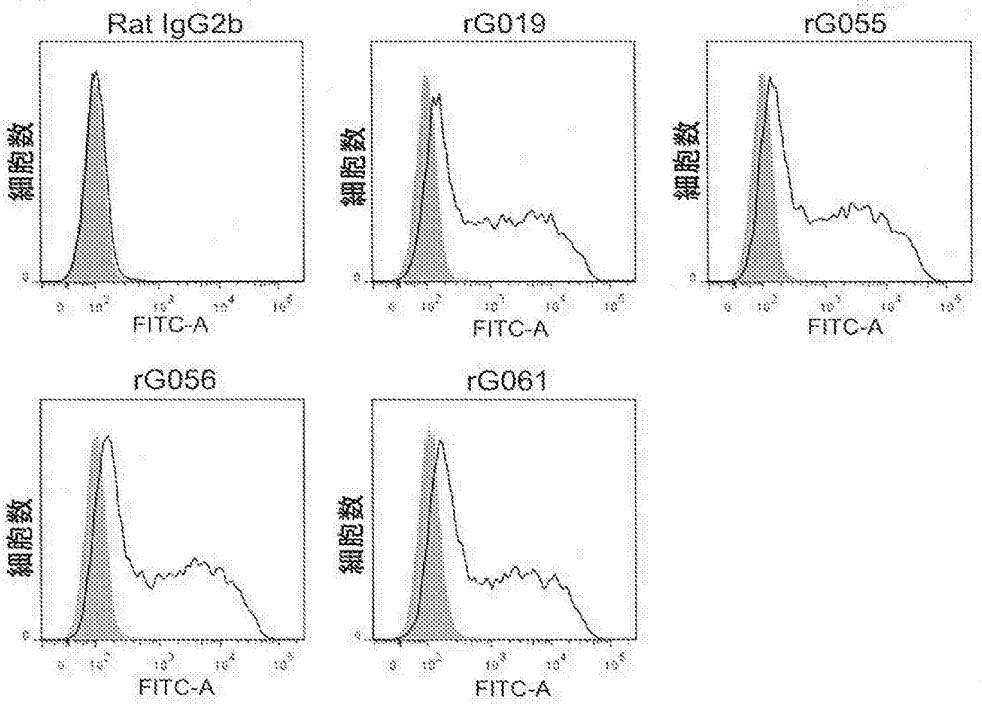
【図２－１】

(1) コントロール細胞又は全長ｈＣＤＨ６導入細胞



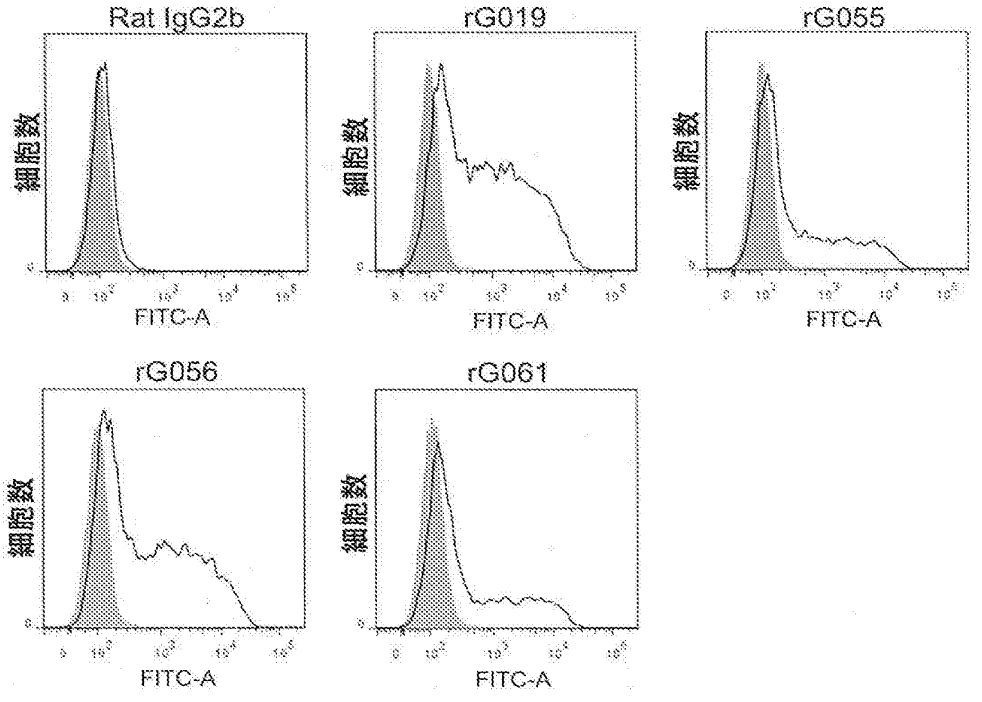
【図２－２】

(2) コントロール細胞又はＥＣ１欠失ｈＣＤＨ６導入細胞



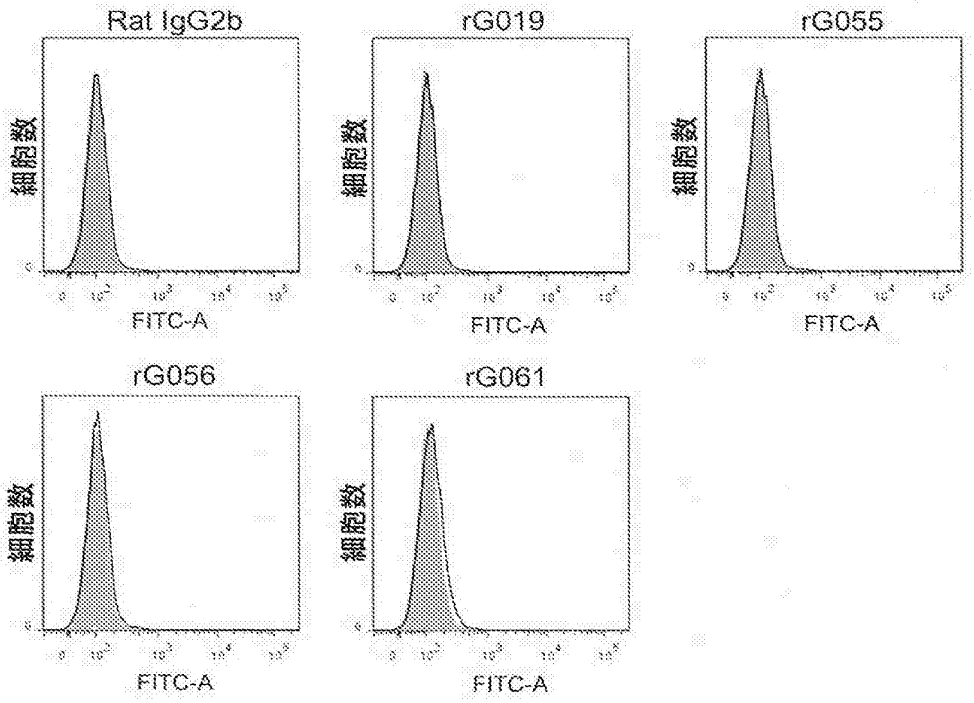
【図２－３】

(3) コントロール細胞又はＥＣ２欠失ｈＣＤＨ６導入細胞



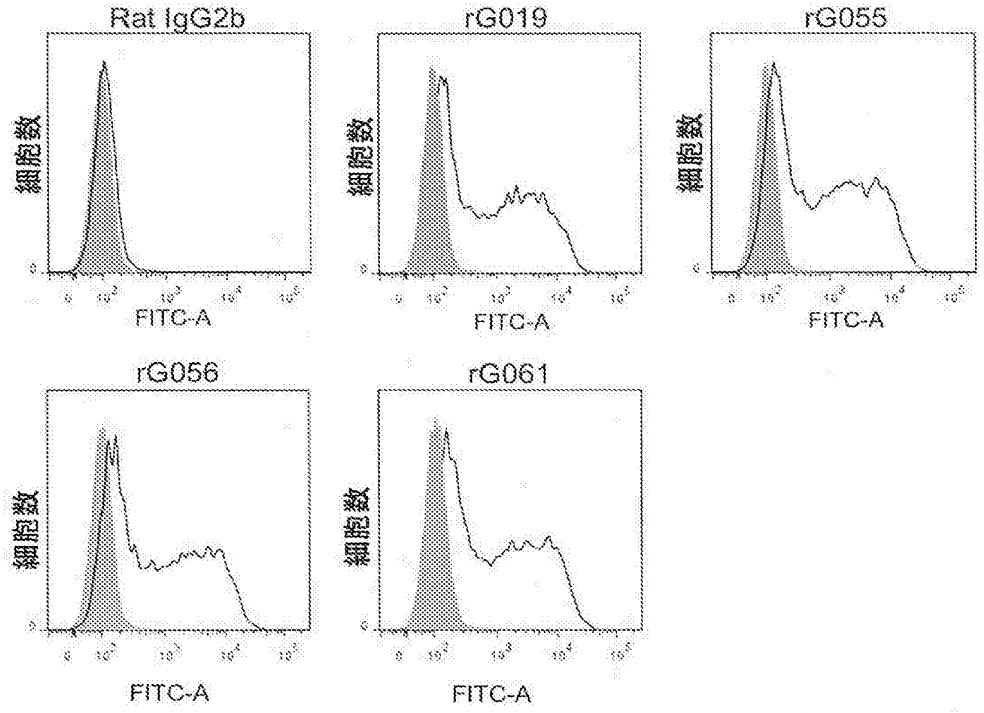
【図２－４】

(4) コントロール細胞又はＥＣ３欠失ｈＣＤＨ６導入細胞



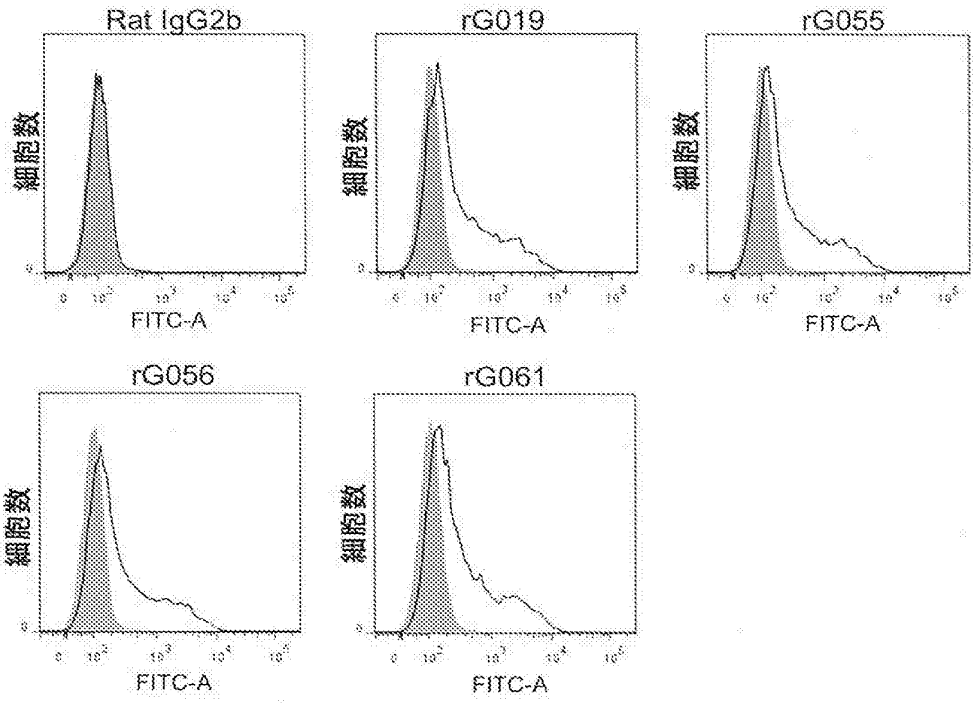
【図２－５】

(5) コントロール細胞又はＥＣ４欠失ｈＣＤＨ６導入細胞

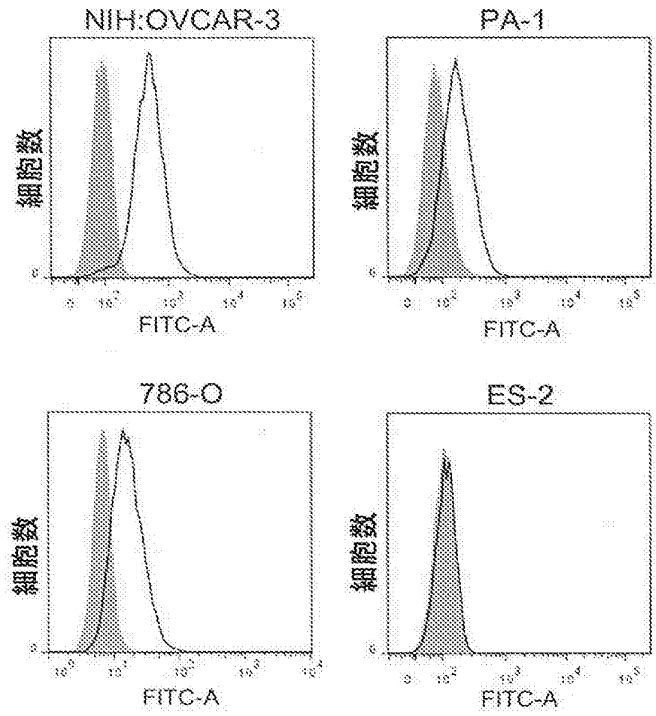


【図２－６】

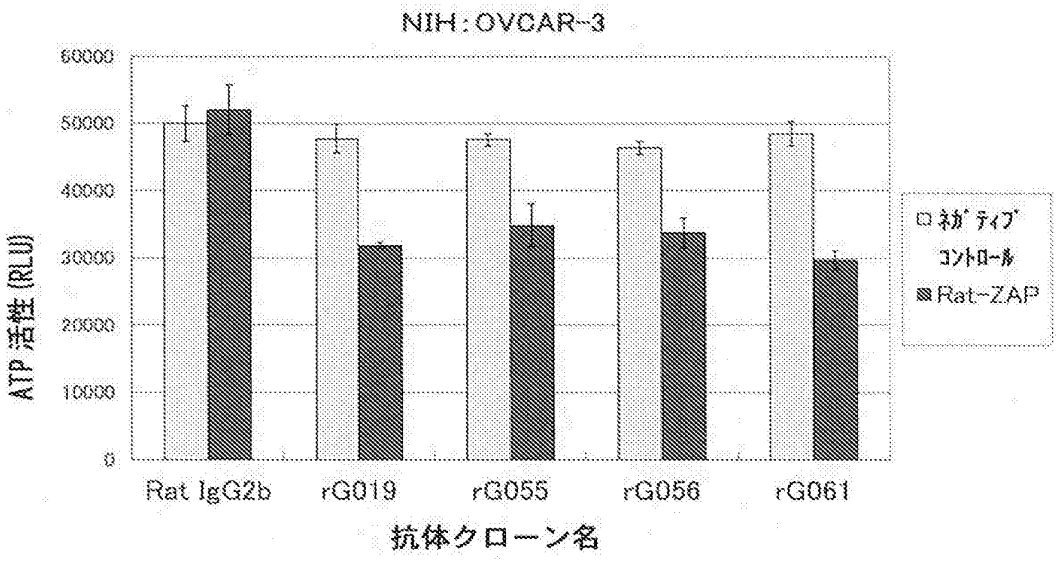
(6) コントロール細胞又はＥＣ５欠失ｈＣＤＨ６導入細胞



【図３】

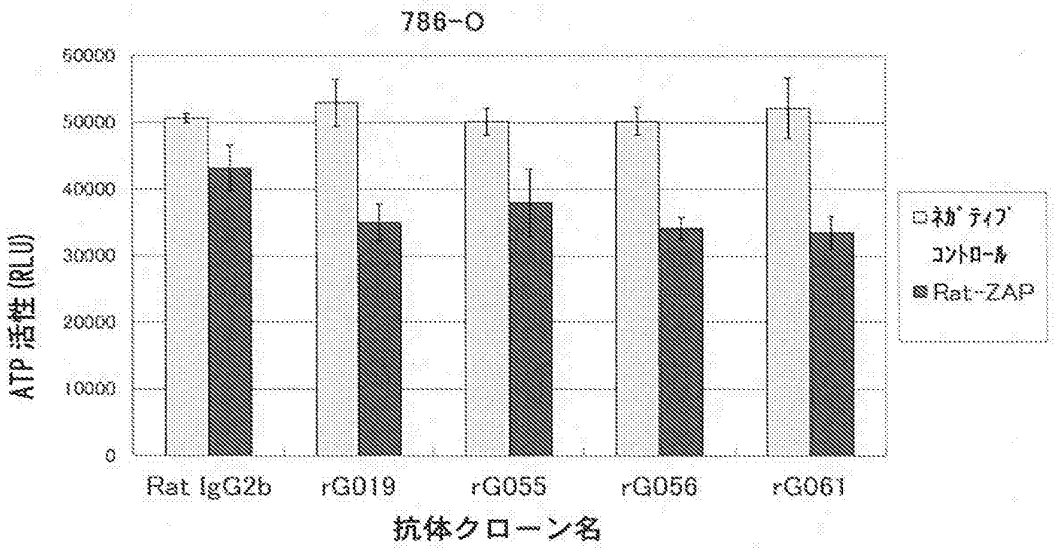


【図４】



Ｒａｔ－ＺＡＰを用いたＮＩＨ：ＯＶＣＡＲ-3細胞生存率（％）

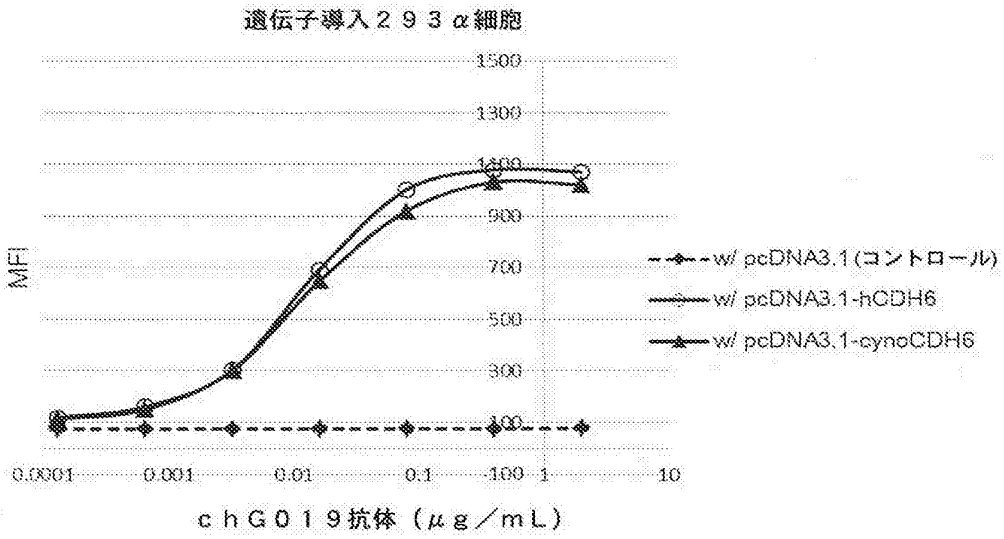
Rat IgG2b	rG019	rG055	rG056	rG061
104.1	66.8	73.3	72.8	61.2



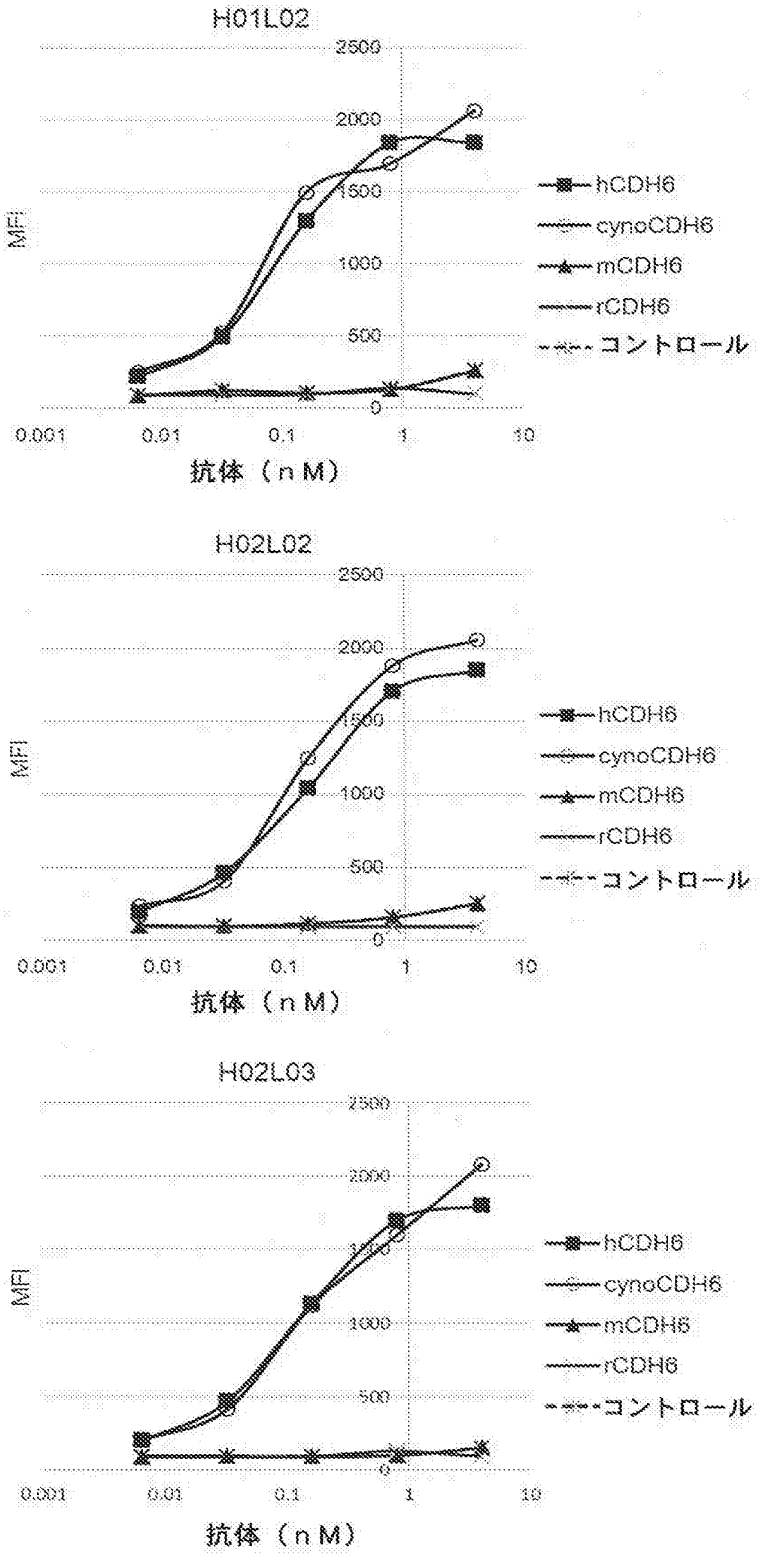
Ｒａｔ－ＺＡＰを用いた７８６－Ｏ細胞生存率（％）

Rat IgG2b	rG019	rG055	rG056	rG061
85.2	66.1	75.7	68.1	64.2

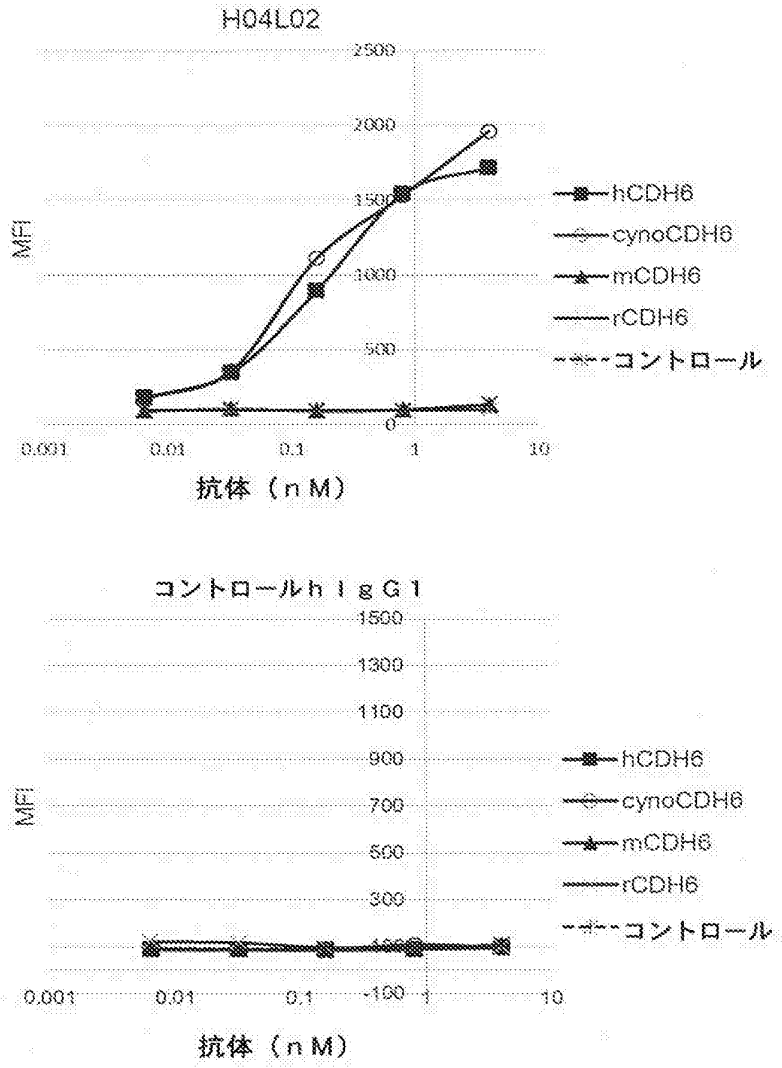
【図５】


遺伝子導入２９３α細胞
MFI
1500
1300
900
700
500
300
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
w/ pcDNA3.1(コントロール)
w/ pcDNA3.1-hCDH6
w/ pcDNA3.1-cynoCDH6
ｃｈＧ０１９抗体（μｇ／ｍＬ）

【図６－１】

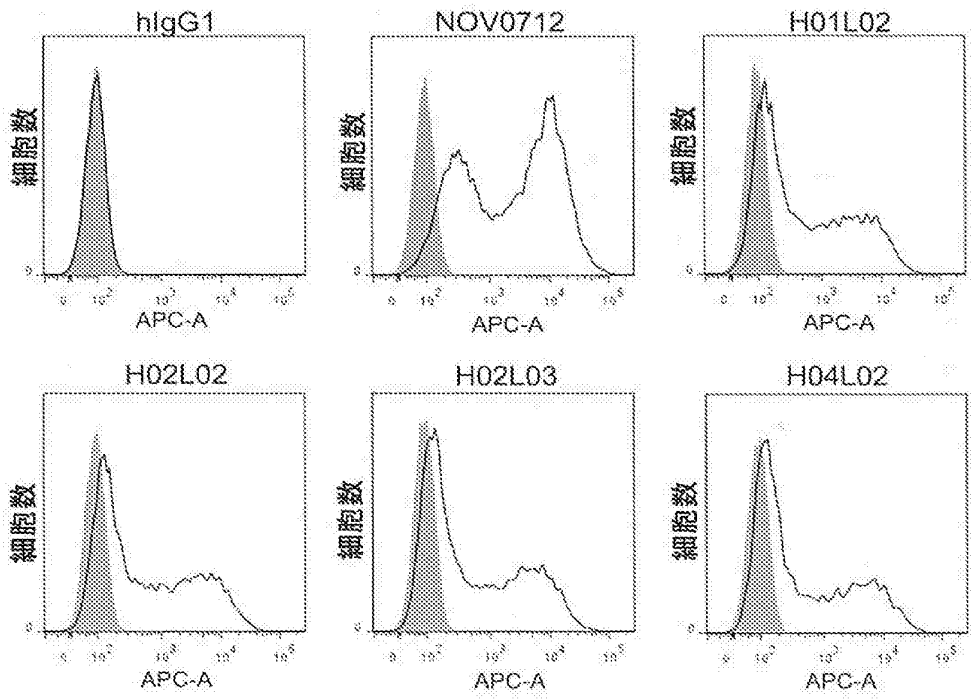

H01L02
2500
2000
1500
1000
500
0
MFI
0.001
0.01
0.1
1
10
抗体（ｎＭ）
hCDH6
cynoCDH6
mCDH6
rCDH6
コントロール
H02L02
2500
2000
1500
1000
500
0
MFI
0.001
0.01
0.1
1
10
抗体（ｎＭ）
hCDH6
cynoCDH6
mCDH6
rCDH6
コントロール
H02L03
2500
2000
1500
1000
500
0
MFI
0.001
0.01
0.1
1
10
抗体（ｎＭ）
hCDH6
cynoCDH6
mCDH6
rCDH6
コントロール

【図６－２】


H04L02
2500
2000
1500
1000
500
0
MFI
0.001
0.01
0.1
1
10
抗体（ｎＭ）
hCDH6
cynoCDH6
mCDH6
rCDH6
コントロール
コントロールｈＩｇＧ１
1500
1300
1100
900
700
500
300
100
-100
MFI
0.001
0.01
0.1
1
10
抗体（ｎＭ）
hCDH6
cynoCDH6
mCDH6
rCDH6
コントロール

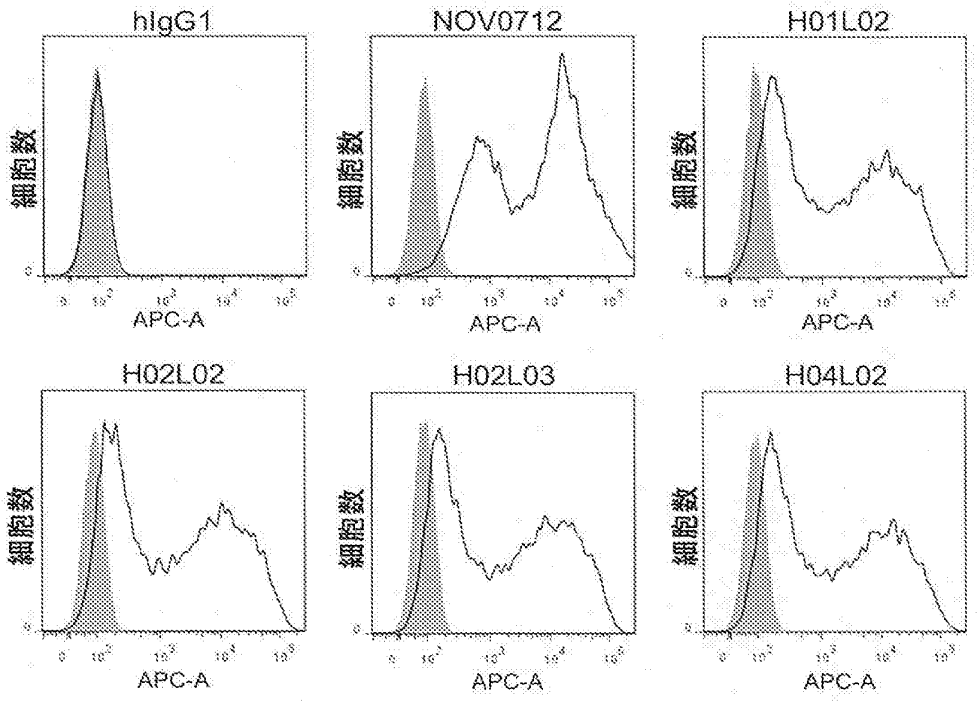
【図７－１】

(1) コントロール細胞又は全長ｈＣＤＨ６導入細胞



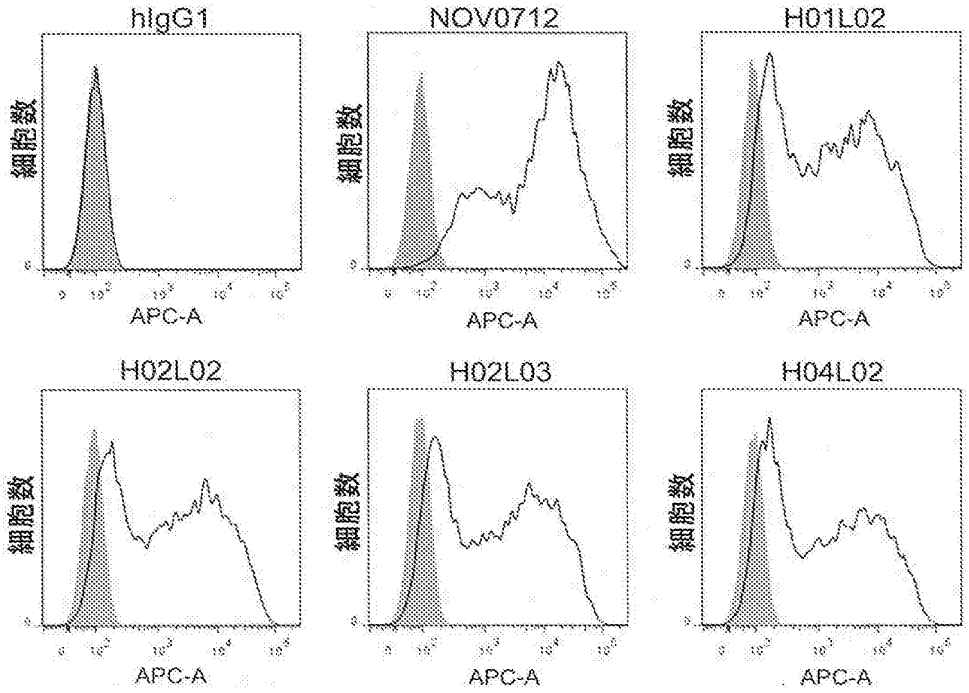
【図７－２】

(2) コントロール細胞又はＥＣ１欠失ｈＣＤＨ６導入細胞



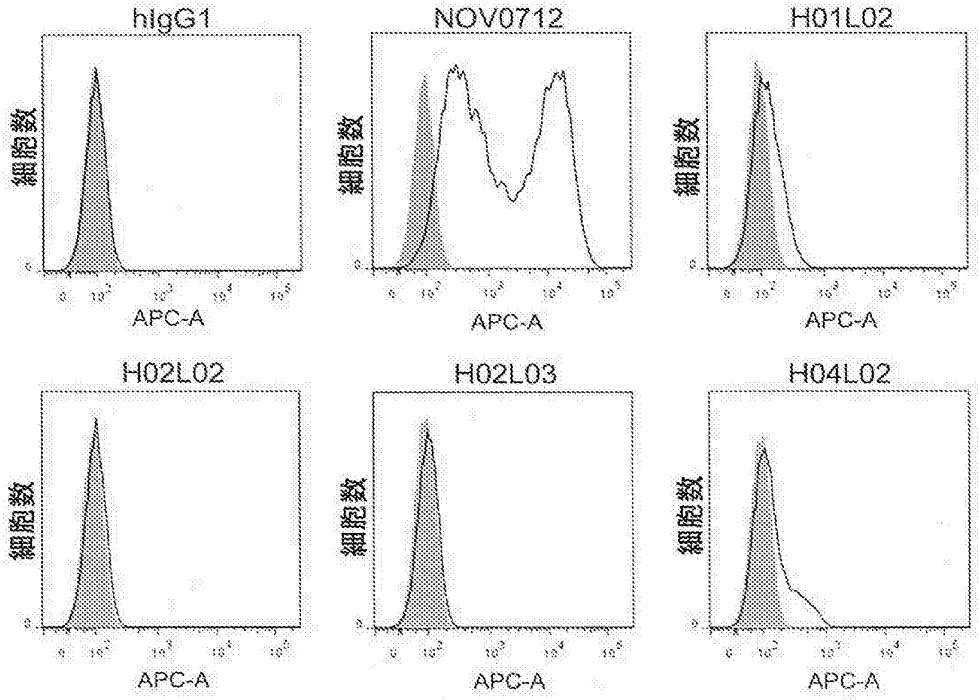
【図７－３】

(3) コントロール細胞又はＥＣ２欠失ｈＣＤＨ６導入細胞



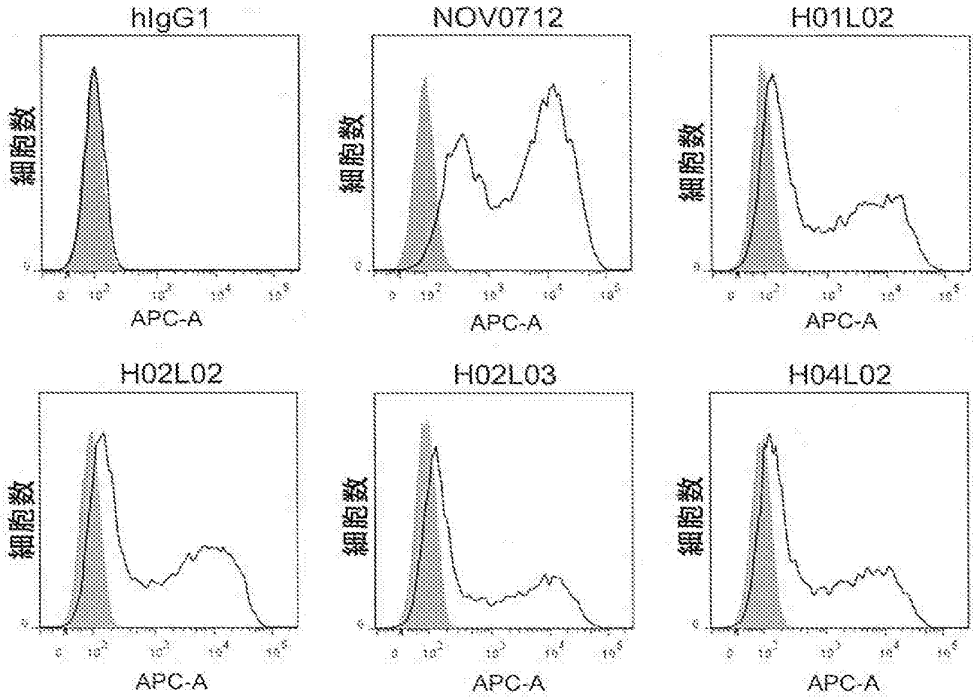
【図７－４】

(4) コントロール細胞又はＥＣ３欠失ｈＣＤＨ６導入細胞



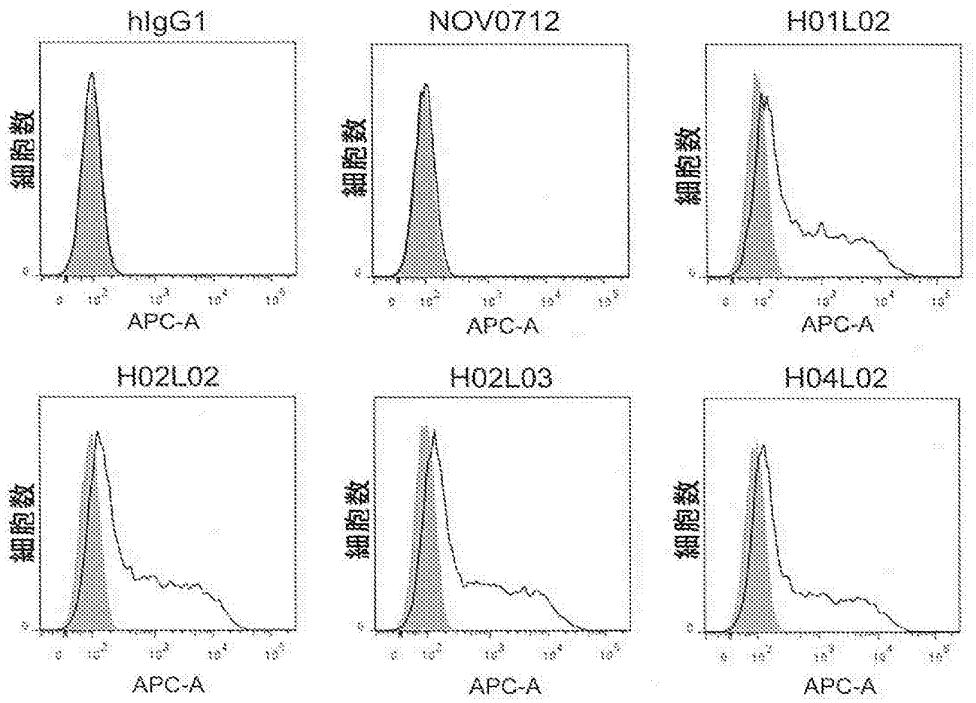
【図７－５】

(5)コントロール細胞又はＥＣ４欠失ｈＣＤＨ６導入細胞

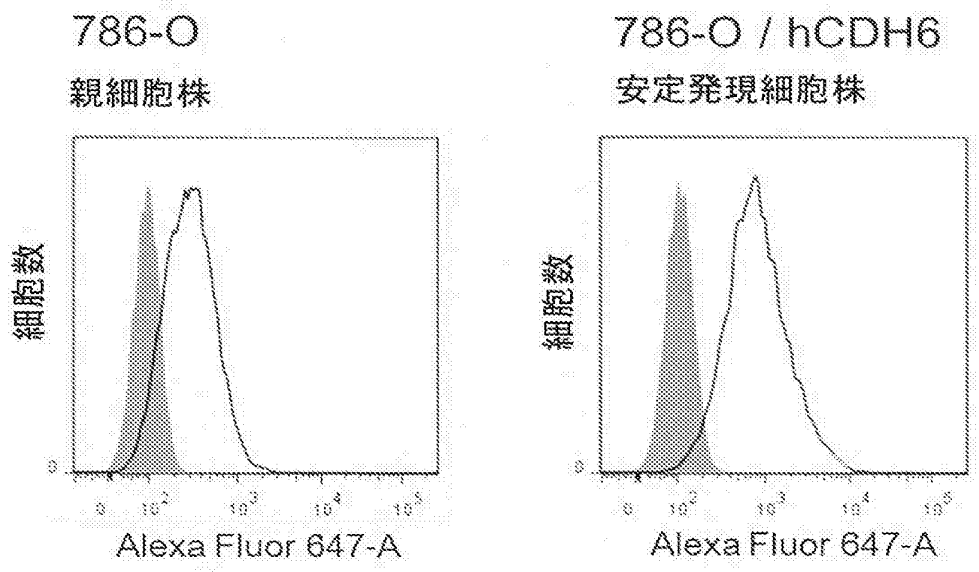


【図７－６】

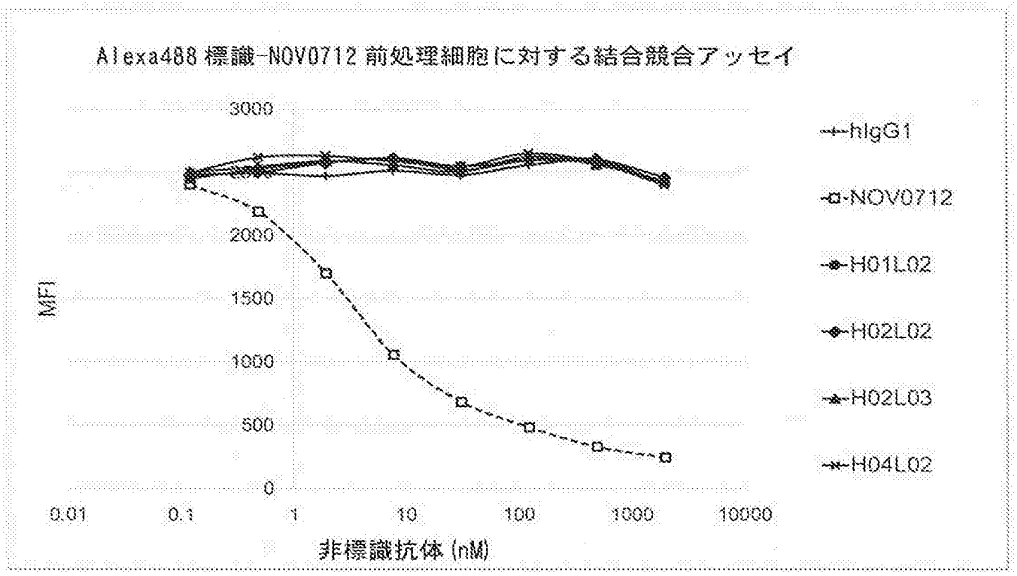
(6) コントロール細胞又はＥＣ５欠失ｈＣＤＨ６導入細胞

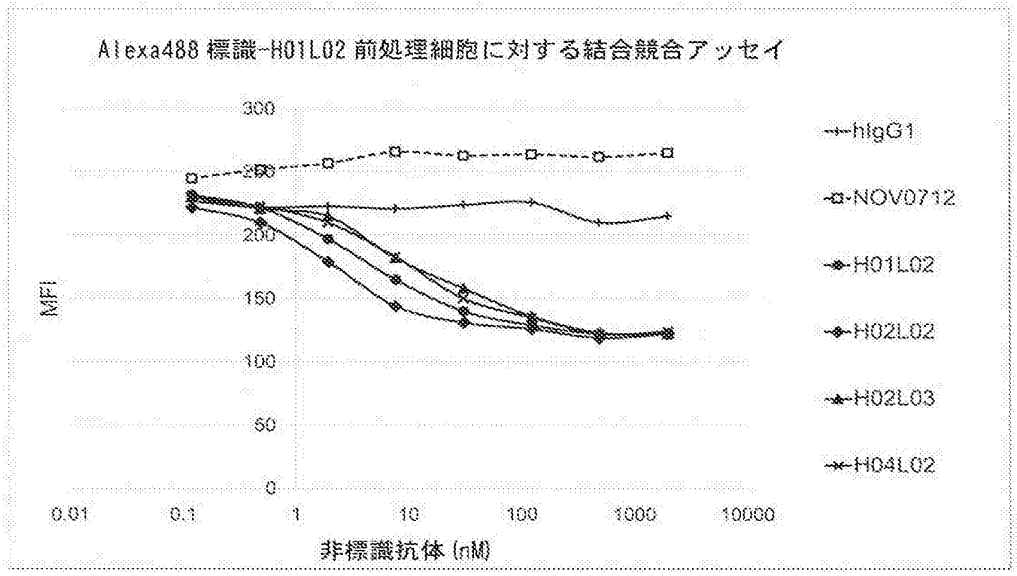


【図８】

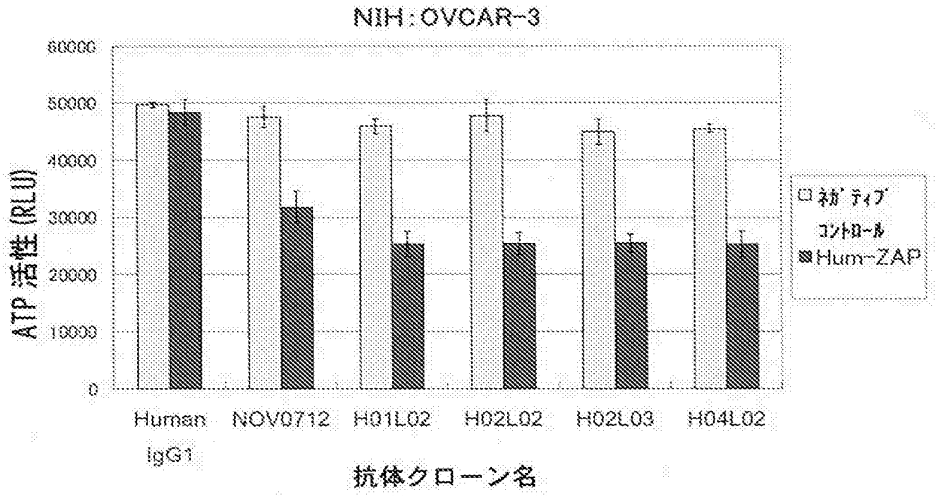

786-O
親細胞株
細胞数
0
Alexa Fluor 647-A
786-O / hCDH6
安定発現細胞株
細胞数
0
Alexa Fluor 647-A

【図９】


Alexa488 標識-NOV0712 前処理細胞に対する結合競合アッセイ
MFI
3000
2000
1500
1000
500
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
非標識抗体 (nM)
hIgG1
NOV0712
H01L02
H02L02
H02L03
H04L02


Alexa488 標識-H01L02 前処理細胞に対する結合競合アッセイ
MFI
300
250
200
150
100
50
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
非標識抗体 (nM)
hIgG1
NOV0712
H01L02
H02L02
H02L03
H04L02

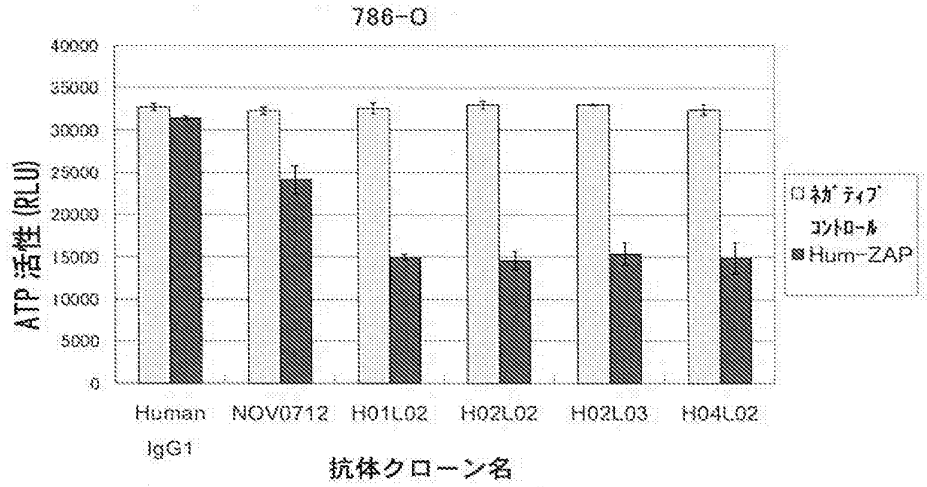
【図１０－１】



Ｈｕｍ－ＺＡＰを用いたＮＩＨ：ＯＶＣＡＲ－３細胞生存率（％）

Human IgG1	NOV0712	H01L02	H02L02	H02L03	H04L02
97.3	67.0	55.1	53.1	56.7	55.6

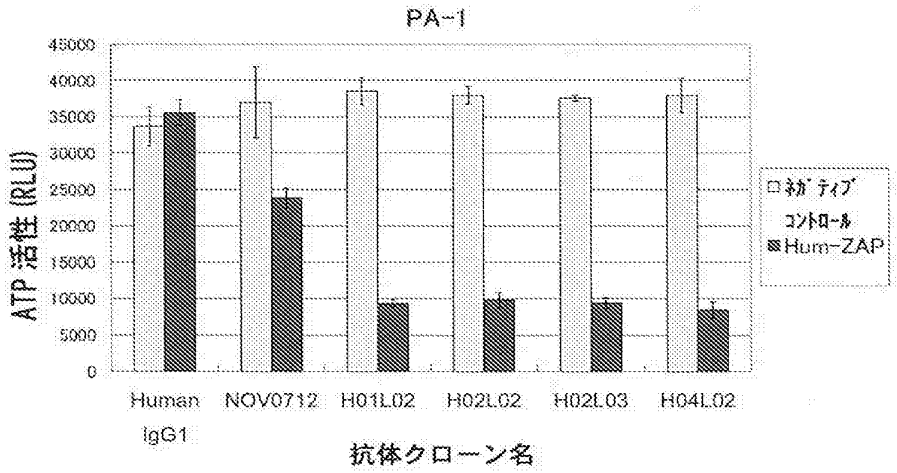
【図１０－２】



Ｈｕｍ－ＺＡＰを用いた７８６－Ｏ細胞生存率（％）

Human IgG1	NOV0712	H01L02	H02L02	H02L03	H04L02
95.9	74.8	46.0	44.1	46.5	45.9

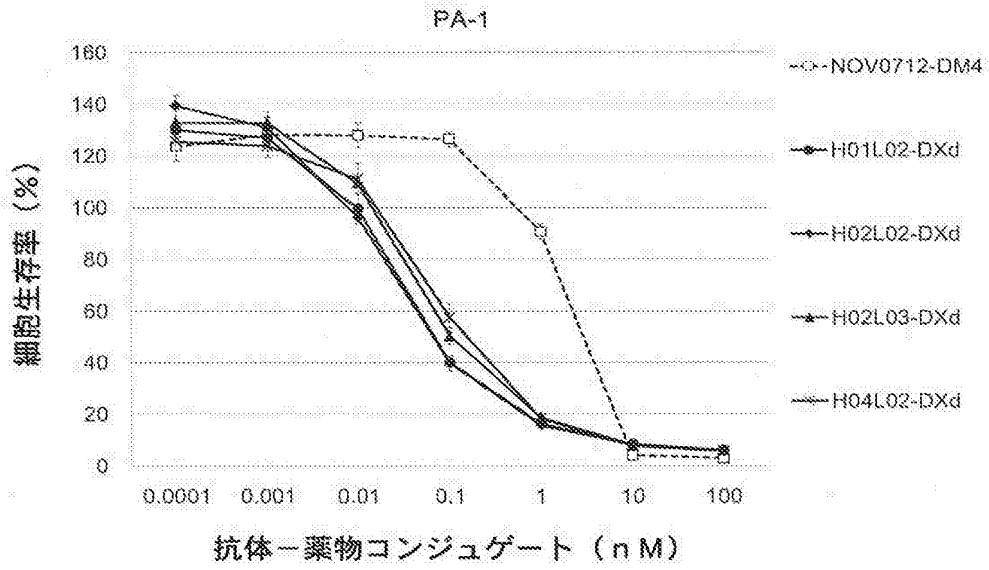
【図１０－３】



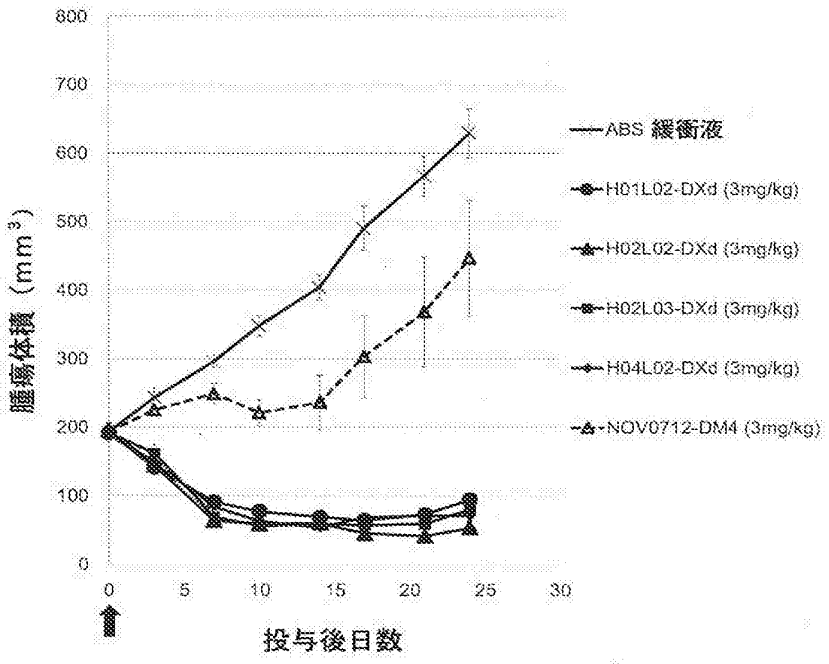
Ｈｕｍ－ＺＡＰを用いたＰＡ－１細胞生存率（％）

Human IgG1	NOV0712	H01L02	H02L02	H02L03	H04L02
105.6	64.5	24.3	25.8	25.1	22.2

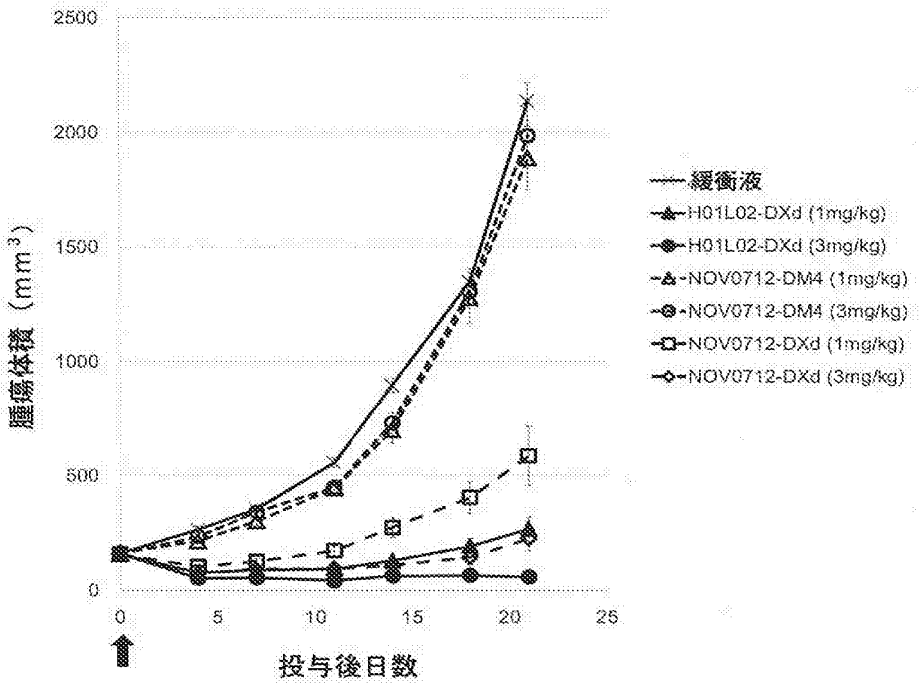
【図１１】



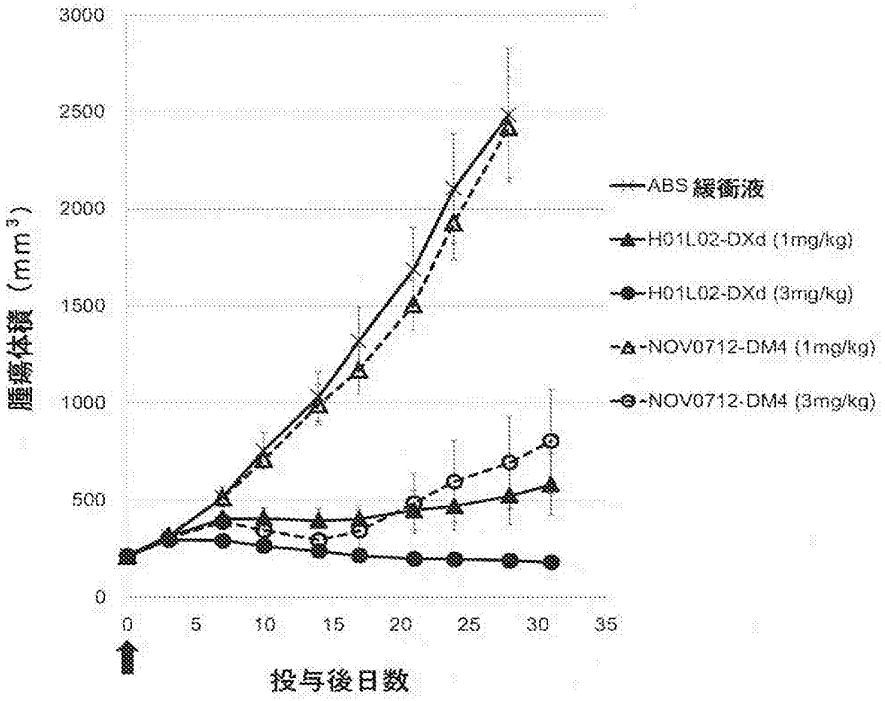
【図１２】


800
700
600
500
400
300
200
100
0
腫瘍体積（mm3）
0
5
10
15
20
25
30
投与後日数
ABS 緩衝液
H01L02-DXd (3mg/kg)
H02L02-DXd (3mg/kg)
H02L03-DXd (3mg/kg)
H04L02-DXd (3mg/kg)
NOV0712-DM4 (3mg/kg)

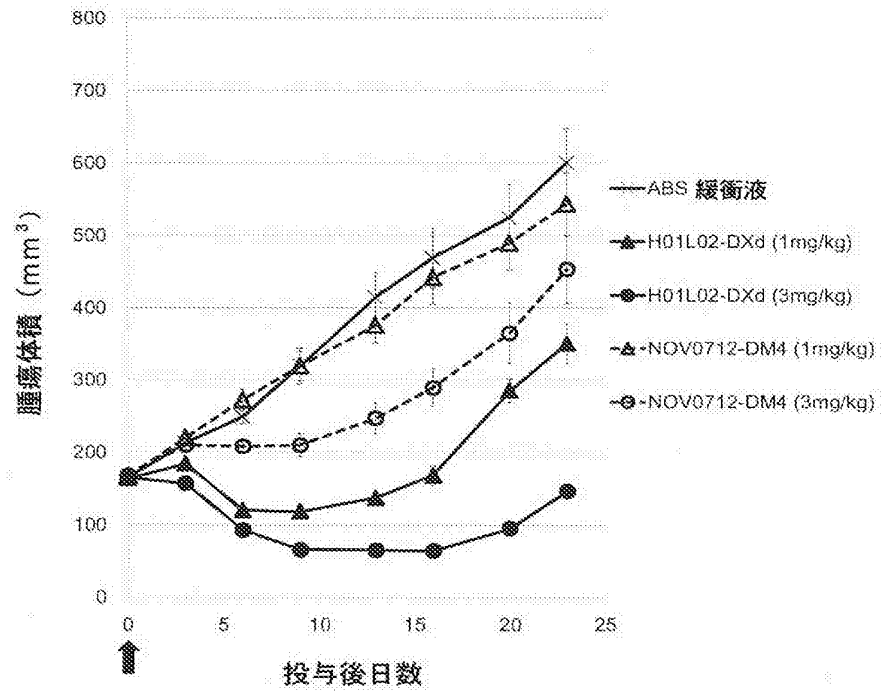
【図１３】


2500
2000
1500
1000
500
0
腫瘍体積（mm3）
0
5
10
15
20
25
投与後日数
緩衝液
H01L02-DXd (1mg/kg)
H01L02-DXd (3mg/kg)
NOV0712-DM4 (1mg/kg)
NOV0712-DM4 (3mg/kg)
NOV0712-DXd (1mg/kg)
NOV0712-DXd (3mg/kg)

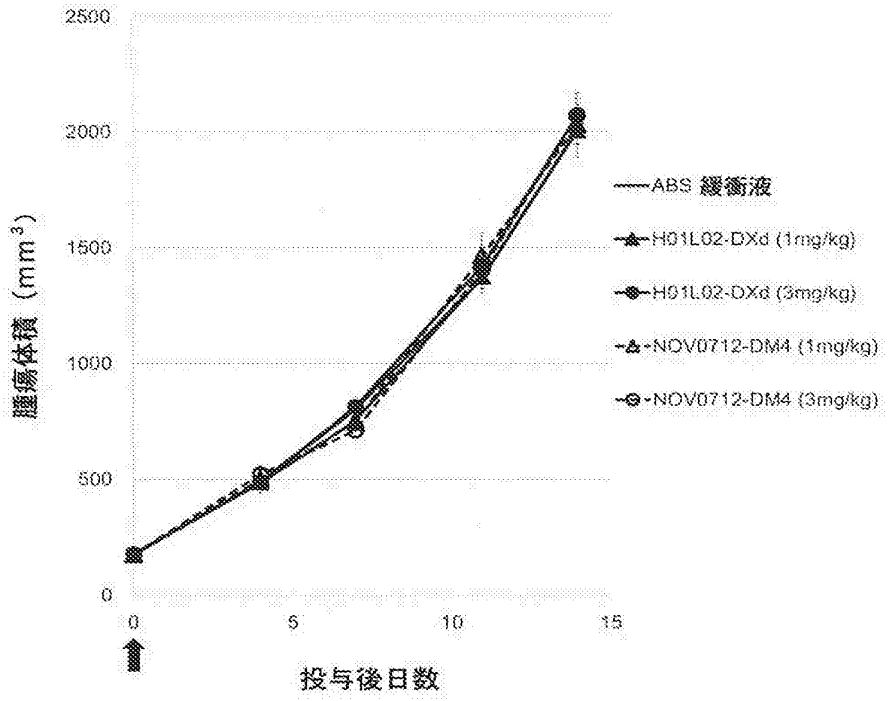
【図１４】


3000
2500
2000
1500
1000
500
0
腫瘍体積（mm³）
0
5
10
15
20
25
30
35
投与後日数
ABS 緩衝液
H01L02-DXd (1mg/kg)
H01L02-DXd (3mg/kg)
NOV0712-DM4 (1mg/kg)
NOV0712-DM4 (3mg/kg)

【図１５】


800
700
600
500
400
300
200
100
0
腫瘍体積（mm³）
0
5
10
15
20
25
投与後日数
ABS 緩衝液
H01L02-DXd (1mg/kg)
H01L02-DXd (3mg/kg)
NOV0712-DM4 (1mg/kg)
NOV0712-DM4 (3mg/kg)

【図１６】


2500
2000
1500
1000
500
0
腫瘍体積（mm3）
0
5
10
15
投与後日数
ABS 緩衝液
H01L02-DXd (1mg/kg)
H01L02-DXd (3mg/kg)
NOV0712-DM4 (1mg/kg)
NOV0712-DM4 (3mg/kg)

出願人履歴

３０７０１０１６６

20070308

新規登録

東京都中央区日本橋本町三丁目５番１号

第一三共株式会社

WIPO
WORLD
INTELLECTUAL PROPERTY
ORGANIZATION

DOCUMENT MADE AVAILABLE UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

International application number:		**PCT/JP2018/018572**
International filing date:		**14 May 2018 (14.05.2018)**
Document type:		**Certified copy of priority document**
Document details:	Country/Office:	**JP**
	Number:	**2017-096749**
	Filing date:	**15 May 2017 (15.05.2017)**
Date of receipt at the International Bureau:		**24 May 2018 (24.05.2018)**

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a),(b) or (b-*bis*)

34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland
www.wipo.int

PTO/AIA/80 (07-12)
Approved for use through 11/30/2014. OMB 0651-0035
U.S. Patent and Trademark Office; U.S DEPARTMENT OF COMMERCE
Under the Paperwork Reduction Act of 1995, no persons are required to respond to a collection of information unless it displays a valid OMB control number.

POWER OF ATTORNEY TO PROSECUTE APPLICATIONS BEFORE THE USPTO

I hereby revoke all previous powers of attorney given in the application identified in the attached statement under 37 CFR 3.73(c).

I hereby appoint:

☑ Practitioners associated with Customer Number: 22428

OR

☐ Practitioner(s) named below (if more than ten patent practitioners are to be named, then a customer number must be used):

Name	Registration Number	Name	Registration Number

As attorney(s) or agent(s) to represent the undersigned before the United States Patent and Trademark Office (USPTO) in connection with any and all patent applications assigned only to the undersigned according to the USPTO assignment records or assignments documents attached to this form in accordance with 37 CFR 3.73(c).

Please change the correspondence address for the application identified in the attached statement under 37 CFR 3.73(c) to:

☑ The address associated with Customer Number: 22428

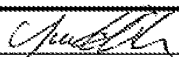
OR

☐	Firm or Individual Name		
	Address		
	City		
	Country		
	Telephone		Email

Assignee Name and Address: Daiichi Sankyo Company, Limited
3-5-1, Nihonbashi Honcho
Chuo-ku, Tokyo, Japan 103-8426

A copy of this form, together with a statement under 37 CFR 3.73(c) (Form PTO/SB/96 or equivalent) is required to be Filed in each application in which this form is used. The statement under 37 CFR 3.73(c) may be completed by one of The practitioners appointed in this form, and must identify the application in which this Power of Attorney is to be filed.

SIGNATURE of Assignee of Record
The individual whose signature and title is supplied below is authorized to act on behalf of the assignee

Signature		Date	September 4, 2013
Name	Yuichi Kubo	Telephone	
Title	Vice President, Intellectual Property, Daiichi Sankyo Company, Limited		

This collection of information is required by 37 CFR 1.31, 1.32 and 1.33. The information is required to obtain or retain a benefit by the public which is to file (and by the USPTO to process) an application. Confidentiality is governed by 35 U.S.C. 122 and 37 CFR 1.11 and 1.14. This collection is estimated to take 3 minutes to complete, including gathering, preparing, and submitting the completed application form to the USPTO. Time will vary depending upon the individual case. Any comments on the amount of time you require to complete this form and/or suggestions for reducing this burden, should be sent to the Chief Information Officer, U.S. Patent and Trademark Office, U.S. Department of Commerce, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450. DO NOT SEND FEES OR COMPLETED FORMS TO THIS ADDRESS. **SEND TO: Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450.**

If you need assistance in completing the form, call 1-800-PTO-9199 and select option 2.

PTO/AIA/96 (08-12)
Approved for use through 01/31/2013. OMB 0651-0031
U.S. Patent and Trademark Office; U.S. DEPARTMENT OF COMMERCE
Under the Paperwork Reduction Act of 1995, no persons are required to respond to a collection of information unless it displays a valid OMB control number.

STATEMENT UNDER 37 CFR 3.73(c)

Applicant/Patent Owner: DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED

Application No./Patent No.: 16/613,203 Filed/Issue Date: November 13, 2019

Titled: ANTI-CDH6 ANTIBODY AND ANTI-CDH6 ANTIBODY-DRUG CONJUGATE

DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED, a Corporation

(Name of Assignee) (Type of Assignee, e.g., corporation, partnership, university, government agency, etc.)

states that, for the patent application/patent identified above, it is (choose **one** of options 1, 2, 3 or 4 below):

1. ☑ The assignee of the entire right, title, and interest.

2. ☐ An assignee of less than the entire right, title, and interest (check applicable box):

   ☐ The extent (by percentage) of its ownership interest is _____%. Additional Statement(s) by the owners holding the balance of the interest must be submitted to account for 100% of the ownership interest.

   ☐ There are unspecified percentages of ownership. The other parties, including inventors, who together own the entire right, title and interest are:

   Additional Statement(s) by the owner(s) holding the balance of the interest must be submitted to account for the entire right, title, and interest.

3. ☐ The assignee of an undivided interest in the entirety (a complete assignment from one of the joint inventors was made). The other parties, including inventors, who together own the entire right, title, and interest are:

   Additional Statement(s) by the owner(s) holding the balance of the interest must be submitted to account for the entire right, title, and interest.

4. ☐ The recipient, via a court proceeding or the like (*e.g.*, bankruptcy, probate), of an undivided interest in the entirety (a complete transfer of ownership interest was made). The certified document(s) showing the transfer is attached.

The interest identified in option 1, 2 or 3 above (not option 4) is evidenced by either (choose **one** of options A or B below):

A. ☑ An assignment from the inventor(s) of the patent application/patent identified above. The assignment was recorded in the United States Patent and Trademark Office at Reel _____, Frame _____, or for which a copy thereof is attached.

B. ☐ A chain of title from the inventor(s), of the patent application/patent identified above, to the current assignee as follows:

1. From: _____ To: _____

   The document was recorded in the United States Patent and Trademark Office at

   Reel _____, Frame _____, or for which a copy thereof is attached.

2. From: _____ To: _____

   The document was recorded in the United States Patent and Trademark Office at

   Reel _____, Frame _____, or for which a copy thereof is attached.

This collection of information is required by 37 CFR 3.73(b). The information is required to obtain or retain a benefit by the public which is to file (and by the USPTO to process) an application. Confidentiality is governed by 35 U.S.C. 122 and 37 CFR 1.11 and 1.14. This collection is estimated to take 12 minutes to complete, including gathering, preparing, and submitting the completed application form to the USPTO. Time will vary depending upon the individual case. Any comments on the amount of time you require to complete this form and/or suggestions for reducing this burden, should be sent to the Chief Information Officer, U.S. Patent and Trademark Office, U.S. Department of Commerce, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450. DO NOT SEND FEES OR COMPLETED FORMS TO THIS ADDRESS. **SEND TO: Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450.**

If you need assistance in completing the form, call 1-800-PTO-9199 and select option 2.

PTO/AIA/96 (08-12)
Approved for use through 01/31/2013. OMB 0651-0031
U.S. Patent and Trademark Office; U.S. DEPARTMENT OF COMMERCE
Under the Paperwork Reduction Act of 1995, no persons are required to respond to a collection of information unless it displays a valid OMB control number.

STATEMENT UNDER 37 CFR 3.73(c)

3. From: _____ To: _____

The document was recorded in the United States Patent and Trademark Office at

Reel _____, Frame _____, or for which a copy thereof is attached.

4. From: _____ To: _____

The document was recorded in the United States Patent and Trademark Office at

Reel _____, Frame _____, or for which a copy thereof is attached.

5. From: _____ To: _____

The document was recorded in the United States Patent and Trademark Office at

Reel _____, Frame _____, or for which a copy thereof is attached.

6. From: _____ To: _____

The document was recorded in the United States Patent and Trademark Office at

Reel _____, Frame _____, or for which a copy thereof is attached.

☐ Additional documents in the chain of title are listed on a supplemental sheet(s).

☑ As required by 37 CFR 3.73(c)(1)(i), the documentary evidence of the chain of title from the original owner to the assignee was, or concurrently is being, submitted for recordation pursuant to 37 CFR 3.11.

[NOTE: A separate copy (i.e., a true copy of the original assignment document(s)) must be submitted to Assignment Division in accordance with 37 CFR Part 3, to record the assignment in the records of the USPTO. See MPEP 302.08]

The undersigned (whose title is supplied below) is authorized to act on behalf of the assignee.

/Michael D. Kaminski/	November 14, 2019
Signature	Date
Michael D. Kaminski	32,904
Printed or Typed Name	Title or Registration Number

Privacy Act Statement

The **Privacy Act of 1974 (P.L. 93-579)** requires that you be given certain information in connection with your submission of the attached form related to a patent application or patent. Accordingly, pursuant to the requirements of the Act, please be advised that: (1) the general authority for the collection of this information is 35 U.S.C. 2(b)(2); (2) furnishing of the information solicited is voluntary; and (3) the principal purpose for which the information is used by the U.S. Patent and Trademark Office is to process and/or examine your submission related to a patent application or patent. If you do not furnish the requested information, the U.S. Patent and Trademark Office may not be able to process and/or examine your submission, which may result in termination of proceedings or abandonment of the application or expiration of the patent.

The information provided by you in this form will be subject to the following routine uses:

1. The information on this form will be treated confidentially to the extent allowed under the Freedom of Information Act (5 U.S.C. 552) and the Privacy Act (5 U.S.C 552a). Records from this system of records may be disclosed to the Department of Justice to determine whether disclosure of these records is required by the Freedom of Information Act.
2. A record from this system of records may be disclosed, as a routine use, in the course of presenting evidence to a court, magistrate, or administrative tribunal, including disclosures to opposing counsel in the course of settlement negotiations.
3. A record in this system of records may be disclosed, as a routine use, to a Member of Congress submitting a request involving an individual, to whom the record pertains, when the individual has requested assistance from the Member with respect to the subject matter of the record.
4. A record in this system of records may be disclosed, as a routine use, to a contractor of the Agency having need for the information in order to perform a contract. Recipients of information shall be required to comply with the requirements of the Privacy Act of 1974, as amended, pursuant to 5 U.S.C. 552a(m).
5. A record related to an International Application filed under the Patent Cooperation Treaty in this system of records may be disclosed, as a routine use, to the International Bureau of the World Intellectual Property Organization, pursuant to the Patent Cooperation Treaty.
6. A record in this system of records may be disclosed, as a routine use, to another federal agency for purposes of National Security review (35 U.S.C. 181) and for review pursuant to the Atomic Energy Act (42 U.S.C. 218(c)).
7. A record from this system of records may be disclosed, as a routine use, to the Administrator, General Services, or his/her designee, during an inspection of records conducted by GSA as part of that agency's responsibility to recommend improvements in records management practices and programs, under authority of 44 U.S.C. 2904 and 2906. Such disclosure shall be made in accordance with the GSA regulations governing inspection of records for this purpose, and any other relevant (*i.e.*, GSA or Commerce) directive. Such disclosure shall not be used to make determinations about individuals.
8. A record from this system of records may be disclosed, as a routine use, to the public after either publication of the application pursuant to 35 U.S.C. 122(b) or issuance of a patent pursuant to 35 U.S.C. 151. Further, a record may be disclosed, subject to the limitations of 37 CFR 1.14, as a routine use, to the public if the record was filed in an application which became abandoned or in which the proceedings were terminated and which application is referenced by either a published application, an application open to public inspection or an issued patent.
9. A record from this system of records may be disclosed, as a routine use, to a Federal, State, or local law enforcement agency, if the USPTO becomes aware of a violation or potential violation of law or regulation.

Electronic Acknowledgement Receipt

EFS ID:	37749715
Application Number:	16613203
International Application Number:	
Confirmation Number:	6337
Title of Invention:	ANTI-CDH6 ANTIBODY AND ANTI-CDH6 ANTIBODY-DRUG CONJUGATE
First Named Inventor/Applicant Name:	Atsuko SAITO
Customer Number:	22428
Filer:	Michael D. Kaminski/Audrey Titus
Filer Authorized By:	Michael D. Kaminski
Attorney Docket Number:	098065-0249
Receipt Date:	14-NOV-2019
Filing Date:	
Time Stamp:	12:47:33
Application Type:	U.S. National Stage under 35 USC 371

Payment information:

Submitted with Payment	no

File Listing:

Document Number	Document Description	File Name	File Size(Bytes)/ Message Digest	Multi Part /.zip	Pages (if appl.)
1	Power of Attorney	098065-0249_POA_DAIICHI_SANKYO.pdf	163419 bce0b396e834a3ac88b2622e8646652020a12d76	no	1

Warnings:

Information:					
2	Assignee showing of ownership per 37 CFR 3.73	098065-0249_3_73cStatement_2019-11-14.pdf	129762 f2117dcb32e8b11250ac4f0cba64ba028eef706a	no	3
Warnings:					
Information:					
			Total Files Size (in bytes):	293181	

This Acknowledgement Receipt evidences receipt on the noted date by the USPTO of the indicated documents, characterized by the applicant, and including page counts, where applicable. It serves as evidence of receipt similar to a Post Card, as described in MPEP 503.

New Applications Under 35 U.S.C. 111

If a new application is being filed and the application includes the necessary components for a filing date (see 37 CFR 1.53(b)-(d) and MPEP 506), a Filing Receipt (37 CFR 1.54) will be issued in due course and the date shown on this Acknowledgement Receipt will establish the filing date of the application.

National Stage of an International Application under 35 U.S.C. 371

If a timely submission to enter the national stage of an international application is compliant with the conditions of 35 U.S.C. 371 and other applicable requirements a Form PCT/DO/EO/903 indicating acceptance of the application as a national stage submission under 35 U.S.C. 371 will be issued in addition to the Filing Receipt, in due course.

New International Application Filed with the USPTO as a Receiving Office

If a new international application is being filed and the international application includes the necessary components for an international filing date (see PCT Article 11 and MPEP 1810), a Notification of the International Application Number and of the International Filing Date (Form PCT/RO/105) will be issued in due course, subject to prescriptions concerning national security, and the date shown on this Acknowledgement Receipt will establish the international filing date of the application.

==========
Sequence Listing was accepted.
If you need help call the Patent Electronic Business Center at (866) 217-9197 (toll free).
Reviewer: Anjum, Durreshwar
Timestamp: [year=2019; month=11; day=14; hr=8; min=47; sec=59; ms=901;]
==========

Validated By CRFValidator v 1.0.5

Application No: 16613203 Version No: 1.0

Input Set:

Output Set:

Started: 2019-11-13 12:46:28.722
Finished: 2019-11-13 12:46:31.761
Elapsed: 0 hr(s) 0 min(s) 3 sec(s) 39 ms
Total Warnings: 37
Total Errors: 0
No. of SeqIDs Defined: 86
Actual SeqID Count: 86

Error code		Error Description
W	213	Artificial or Unknown found in <213> in SEQ ID (50)
W	213	Artificial or Unknown found in <213> in SEQ ID (51)
W	213	Artificial or Unknown found in <213> in SEQ ID (52)
W	213	Artificial or Unknown found in <213> in SEQ ID (53)
W	213	Artificial or Unknown found in <213> in SEQ ID (54)
W	213	Artificial or Unknown found in <213> in SEQ ID (55)
W	213	Artificial or Unknown found in <213> in SEQ ID (56)
W	213	Artificial or Unknown found in <213> in SEQ ID (57)
W	213	Artificial or Unknown found in <213> in SEQ ID (58)
W	213	Artificial or Unknown found in <213> in SEQ ID (59)
W	213	Artificial or Unknown found in <213> in SEQ ID (60)
W	213	Artificial or Unknown found in <213> in SEQ ID (61)
W	213	Artificial or Unknown found in <213> in SEQ ID (62)
W	213	Artificial or Unknown found in <213> in SEQ ID (63)
W	213	Artificial or Unknown found in <213> in SEQ ID (64)
W	213	Artificial or Unknown found in <213> in SEQ ID (65)
W	213	Artificial or Unknown found in <213> in SEQ ID (66)
W	213	Artificial or Unknown found in <213> in SEQ ID (67)
W	213	Artificial or Unknown found in <213> in SEQ ID (68)
W	213	Artificial or Unknown found in <213> in SEQ ID (69)

Input Set:

Output Set:

Started: 2019-11-13 12:46:28.722
Finished: 2019-11-13 12:46:31.761
Elapsed: 0 hr(s) 0 min(s) 3 sec(s) 39 ms
Total Warnings: 37
Total Errors: 0
No. of SeqIDs Defined: 86
Actual SeqID Count: 86

Error code	Error Description
	This error has occured more than 20 times, will not be displayed

OnCusp
Ex. 1002

SEQUENCE LISTING

<110> DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED

<120> Anti CDH6 antibodies and anti CDH6 antibody drug conjugates

<130> DSPCT-FP1814

<140> US 16/613,203
<141> 2019-11-13

<150> JP2017-096749
<151> 2017-05-15

<160> 86

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 790
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Arg Thr Tyr Arg Tyr Phe Leu Leu Leu Phe Trp Val Gly Gln Pro
1 5 10 15

Tyr Pro Thr Leu Ser Thr Pro Leu Ser Lys Arg Thr Ser Gly Phe Pro
20 25 30

Ala Lys Lys Arg Ala Leu Glu Leu Ser Gly Asn Ser Lys Asn Glu Leu
35 40 45

Asn Arg Ser Lys Arg Ser Trp Met Trp Asn Gln Phe Phe Leu Leu Glu
50 55 60

Glu Tyr Thr Gly Ser Asp Tyr Gln Tyr Val Gly Lys Leu His Ser Asp
65 70 75 80

Gln Asp Arg Gly Asp Gly Ser Leu Lys Tyr Ile Leu Ser Gly Asp Gly
85 90 95

Ala Gly Asp Leu Phe Ile Ile Asn Glu Asn Thr Gly Asp Ile Gln Ala
100 105 110

Thr Lys Arg Leu Asp Arg Glu Glu Lys Pro Val Tyr Ile Leu Arg Ala
115 120 125

```
Gln Ala Ile Asn Arg Arg Thr Gly Arg Pro Val Glu Pro Glu Ser Glu
    130                 135                 140

Phe Ile Ile Lys Ile His Asp Ile Asn Asp Asn Glu Pro Ile Phe Thr
145                 150                 155                 160

Lys Glu Val Tyr Thr Ala Thr Val Pro Glu Met Ser Asp Val Gly Thr
                165                 170                 175

Phe Val Val Gln Val Thr Ala Thr Asp Ala Asp Asp Pro Thr Tyr Gly
            180                 185                 190

Asn Ser Ala Lys Val Val Tyr Ser Ile Leu Gln Gly Gln Pro Tyr Phe
        195                 200                 205

Ser Val Glu Ser Glu Thr Gly Ile Ile Lys Thr Ala Leu Leu Asn Met
    210                 215                 220

Asp Arg Glu Asn Arg Glu Gln Tyr Gln Val Val Ile Gln Ala Lys Asp
225                 230                 235                 240

Met Gly Gly Gln Met Gly Gly Leu Ser Gly Thr Thr Thr Val Asn Ile
                245                 250                 255

Thr Leu Thr Asp Val Asn Asp Asn Pro Pro Arg Phe Pro Gln Ser Thr
            260                 265                 270

Tyr Gln Phe Lys Thr Pro Glu Ser Ser Pro Pro Gly Thr Pro Ile Gly
        275                 280                 285

Arg Ile Lys Ala Ser Asp Ala Asp Val Gly Glu Asn Ala Glu Ile Glu
    290                 295                 300

Tyr Ser Ile Thr Asp Gly Glu Gly Leu Asp Met Phe Asp Val Ile Thr
305                 310                 315                 320

Asp Gln Glu Thr Gln Glu Gly Ile Ile Thr Val Lys Lys Leu Leu Asp
                325                 330                 335

Phe Glu Lys Lys Lys Val Tyr Thr Leu Lys Val Glu Ala Ser Asn Pro
            340                 345                 350

Tyr Val Glu Pro Arg Phe Leu Tyr Leu Gly Pro Phe Lys Asp Ser Ala
```

```
        355                 360                 365

Thr Val Arg Ile Val Val Glu Asp Val Asp Glu Pro Pro Val Phe Ser
    370                 375                 380

Lys Leu Ala Tyr Ile Leu Gln Ile Arg Glu Asp Ala Gln Ile Asn Thr
385                 390                 395                 400

Thr Ile Gly Ser Val Thr Ala Gln Asp Pro Asp Ala Ala Arg Asn Pro
                405                 410                 415

Val Lys Tyr Ser Val Asp Arg His Thr Asp Met Asp Arg Ile Phe Asn
            420                 425                 430

Ile Asp Ser Gly Asn Gly Ser Ile Phe Thr Ser Lys Leu Leu Asp Arg
        435                 440                 445

Glu Thr Leu Leu Trp His Asn Ile Thr Val Ile Ala Thr Glu Ile Asn
    450                 455                 460

Asn Pro Lys Gln Ser Ser Arg Val Pro Leu Tyr Ile Lys Val Leu Asp
465                 470                 475                 480

Val Asn Asp Asn Ala Pro Glu Phe Ala Glu Phe Tyr Glu Thr Phe Val
                485                 490                 495

Cys Glu Lys Ala Lys Ala Asp Gln Leu Ile Gln Thr Leu His Ala Val
            500                 505                 510

Asp Lys Asp Asp Pro Tyr Ser Gly His Gln Phe Ser Phe Ser Leu Ala
        515                 520                 525

Pro Glu Ala Ala Ser Gly Ser Asn Phe Thr Ile Gln Asp Asn Lys Asp
    530                 535                 540

Asn Thr Ala Gly Ile Leu Thr Arg Lys Asn Gly Tyr Asn Arg His Glu
545                 550                 555                 560

Met Ser Thr Tyr Leu Leu Pro Val Val Ile Ser Asp Asn Asp Tyr Pro
                565                 570                 575

Val Gln Ser Ser Thr Gly Thr Val Thr Val Arg Val Cys Ala Cys Asp
            580                 585                 590
```

```
His His Gly Asn Met Gln Ser Cys His Ala Glu Ala Leu Ile His Pro
        595                 600                 605

Thr Gly Leu Ser Thr Gly Ala Leu Val Ala Ile Leu Leu Cys Ile Val
    610                 615                 620

Ile Leu Leu Val Thr Val Val Leu Phe Ala Ala Leu Arg Arg Gln Arg
625                 630                 635                 640

Lys Lys Glu Pro Leu Ile Ile Ser Lys Glu Asp Ile Arg Asp Asn Ile
                645                 650                 655

Val Ser Tyr Asn Asp Glu Gly Gly Gly Glu Glu Asp Thr Gln Ala Phe
            660                 665                 670

Asp Ile Gly Thr Leu Arg Asn Pro Glu Ala Ile Glu Asp Asn Lys Leu
        675                 680                 685

Arg Arg Asp Ile Val Pro Glu Ala Leu Phe Leu Pro Arg Arg Thr Pro
    690                 695                 700

Thr Ala Arg Asp Asn Thr Asp Val Arg Asp Phe Ile Asn Gln Arg Leu
705                 710                 715                 720

Lys Glu Asn Asp Thr Asp Pro Thr Ala Pro Pro Tyr Asp Ser Leu Ala
                725                 730                 735

Thr Tyr Ala Tyr Glu Gly Thr Gly Ser Val Ala Asp Ser Leu Ser Ser
            740                 745                 750

Leu Glu Ser Val Thr Thr Asp Ala Asp Gln Asp Tyr Asp Tyr Leu Ser
        755                 760                 765

Asp Trp Gly Pro Arg Phe Lys Lys Leu Ala Asp Met Tyr Gly Gly Val
    770                 775                 780

Asp Ser Asp Lys Asp Ser
785                 790
```

<210> 2
<211> 106
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

```
Ser Trp Met Trp Asn Gln Phe Phe Leu Leu Glu Glu Tyr Thr Gly Ser
1               5                   10                  15


Asp Tyr Gln Tyr Val Gly Lys Leu His Ser Asp Gln Asp Arg Gly Asp
            20                  25                  30


Gly Ser Leu Lys Tyr Ile Leu Ser Gly Asp Gly Ala Gly Asp Leu Phe
        35                  40                  45


Ile Ile Asn Glu Asn Thr Gly Asp Ile Gln Ala Thr Lys Arg Leu Asp
    50                  55                  60


Arg Glu Glu Lys Pro Val Tyr Ile Leu Arg Ala Gln Ala Ile Asn Arg
65                  70                  75                  80


Arg Thr Gly Arg Pro Val Glu Pro Glu Ser Glu Phe Ile Ile Lys Ile
                85                  90                  95


His Asp Ile Asn Asp Asn Glu Pro Ile Phe
            100                 105
```

<210> 3
<211> 109
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

```
Thr Lys Glu Val Tyr Thr Ala Thr Val Pro Glu Met Ser Asp Val Gly
1               5                   10                  15


Thr Phe Val Val Gln Val Thr Ala Thr Asp Ala Asp Asp Pro Thr Tyr
            20                  25                  30


Gly Asn Ser Ala Lys Val Val Tyr Ser Ile Leu Gln Gly Gln Pro Tyr
        35                  40                  45


Phe Ser Val Glu Ser Glu Thr Gly Ile Ile Lys Thr Ala Leu Leu Asn
    50                  55                  60


Met Asp Arg Glu Asn Arg Glu Gln Tyr Gln Val Val Ile Gln Ala Lys
65                  70                  75                  80
```

```
Asp Met Gly Gly Gln Met Gly Gly Leu Ser Gly Thr Thr Thr Val Asn
                85                  90                  95

Ile Thr Leu Thr Asp Val Asn Asp Asn Pro Pro Arg Phe
            100                 105
```

<210> 4
<211> 115
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

```
Pro Gln Ser Thr Tyr Gln Phe Lys Thr Pro Glu Ser Ser Pro Pro Gly
1               5                   10                  15

Thr Pro Ile Gly Arg Ile Lys Ala Ser Asp Ala Asp Val Gly Glu Asn
            20                  25                  30

Ala Glu Ile Glu Tyr Ser Ile Thr Asp Gly Glu Gly Leu Asp Met Phe
        35                  40                  45

Asp Val Ile Thr Asp Gln Glu Thr Gln Glu Gly Ile Ile Thr Val Lys
    50                  55                  60

Lys Leu Leu Asp Phe Glu Lys Lys Lys Val Tyr Thr Leu Lys Val Glu
65                  70                  75                  80

Ala Ser Asn Pro Tyr Val Glu Pro Arg Phe Leu Tyr Leu Gly Pro Phe
                85                  90                  95

Lys Asp Ser Ala Thr Val Arg Ile Val Val Glu Asp Val Asp Glu Pro
            100                 105                 110

Pro Val Phe
        115
```

<210> 5
<211> 103
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5

```
Ser Lys Leu Ala Tyr Ile Leu Gln Ile Arg Glu Asp Ala Gln Ile Asn
```

```
1               5                   10                  15

Thr Thr Ile Gly Ser Val Thr Ala Gln Asp Pro Asp Ala Ala Arg Asn
            20                  25                  30

Pro Val Lys Tyr Ser Val Asp Arg His Thr Asp Met Asp Arg Ile Phe
        35                  40                  45

Asn Ile Asp Ser Gly Asn Gly Ser Ile Phe Thr Ser Lys Leu Leu Asp
    50                  55                  60

Arg Glu Thr Leu Leu Trp His Asn Ile Thr Val Ile Ala Thr Glu Ile
65                  70                  75                  80

Asn Asn Pro Lys Gln Ser Ser Arg Val Pro Leu Tyr Ile Lys Val Leu
                85                  90                  95

Asp Val Asn Asp Asn Ala Pro
            100
```

<210> 6
<211> 122
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

```
Glu Phe Ala Glu Phe Tyr Glu Thr Phe Val Cys Glu Lys Ala Lys Ala
1               5                   10                  15

Asp Gln Leu Ile Gln Thr Leu His Ala Val Asp Lys Asp Asp Pro Tyr
            20                  25                  30

Ser Gly His Gln Phe Ser Phe Ser Leu Ala Pro Glu Ala Ala Ser Gly
        35                  40                  45

Ser Asn Phe Thr Ile Gln Asp Asn Lys Asp Asn Thr Ala Gly Ile Leu
    50                  55                  60

Thr Arg Lys Asn Gly Tyr Asn Arg His Glu Met Ser Thr Tyr Leu Leu
65                  70                  75                  80

Pro Val Val Ile Ser Asp Asn Asp Tyr Pro Val Gln Ser Ser Thr Gly
                85                  90                  95
```

```
Thr Val Thr Val Arg Val Cys Ala Cys Asp His His Gly Asn Met Gln
            100                 105                 110

Ser Cys His Ala Glu Ala Leu Ile His Pro
        115                 120

<210>  7
<211>  790
<212>  PRT
<213>  Mus musculus

<400>  7

Met Arg Thr Tyr Arg Tyr Phe Leu Leu Leu Phe Trp Val Gly Gln Pro
1               5                   10                  15

Tyr Pro Thr Phe Ser Asn Pro Leu Ser Lys Arg Thr Ser Gly Phe Pro
            20                  25                  30

Ala Lys Arg Lys Ala Leu Glu Leu Ser Ala Asn Ser Arg Asn Glu Leu
        35                  40                  45

Ser Arg Ser Lys Arg Ser Trp Met Trp Asn Gln Phe Phe Leu Leu Glu
    50                  55                  60

Glu Tyr Thr Gly Ser Asp Tyr Gln Tyr Val Gly Lys Leu His Ser Asp
65                  70                  75                  80

Gln Asp Arg Gly Asp Gly Ser Leu Lys Tyr Ile Leu Ser Gly Asp Gly
                85                  90                  95

Ala Gly Asp Leu Phe Ile Ile Asn Glu Asn Thr Gly Asp Ile Gln Ala
            100                 105                 110

Thr Lys Arg Leu Asp Arg Glu Glu Lys Pro Val Tyr Ile Leu Arg Ala
        115                 120                 125

Gln Ala Val Asn Arg Arg Thr Gly Arg Pro Val Glu Pro Glu Ser Glu
    130                 135                 140

Phe Ile Ile Lys Ile His Asp Ile Asn Asp Asn Glu Pro Ile Phe Thr
145                 150                 155                 160

Lys Asp Val Tyr Thr Ala Thr Val Pro Glu Met Ala Asp Val Gly Thr
```

```
                165                 170                 175

Phe Val Val Gln Val Thr Ala Thr Asp Ala Asp Asp Pro Thr Tyr Gly
            180                 185                 190

Asn Ser Ala Lys Val Val Tyr Ser Ile Leu Gln Gly Gln Pro Tyr Phe
        195                 200                 205

Ser Val Glu Ser Glu Thr Gly Ile Ile Lys Thr Ala Leu Leu Asn Met
    210                 215                 220

Asp Arg Glu Asn Arg Glu Gln Tyr Gln Val Val Ile Gln Ala Lys Asp
225                 230                 235                 240

Met Gly Gly Gln Met Gly Gly Leu Ser Gly Thr Thr Thr Val Asn Ile
                245                 250                 255

Thr Leu Thr Asp Val Asn Asp Asn Pro Pro Arg Phe Pro Gln Ser Thr
            260                 265                 270

Tyr Gln Phe Lys Thr Pro Glu Ser Ser Pro Pro Gly Thr Pro Ile Gly
        275                 280                 285

Arg Ile Lys Ala Ser Asp Ala Asp Val Gly Glu Asn Ala Glu Ile Glu
    290                 295                 300

Tyr Ser Ile Thr Asp Gly Glu Gly His Glu Met Phe Asp Val Ile Thr
305                 310                 315                 320

Asp Gln Glu Thr Gln Glu Gly Ile Ile Thr Val Lys Lys Leu Leu Asp
                325                 330                 335

Phe Glu Lys Lys Lys Val Tyr Thr Leu Lys Val Glu Ala Ser Asn Pro
            340                 345                 350

His Val Glu Pro Arg Phe Leu Tyr Leu Gly Pro Phe Lys Asp Ser Ala
        355                 360                 365

Thr Val Arg Ile Val Val Asp Asp Val Asp Glu Pro Pro Val Phe Ser
    370                 375                 380

Lys Leu Ala Tyr Ile Leu Gln Ile Arg Glu Asp Ala Arg Ile Asn Thr
385                 390                 395                 400
```

```
Thr Ile Gly Ser Val Ala Ala Gln Asp Pro Asp Ala Ala Arg Asn Pro
                405                 410                 415

Val Lys Tyr Ser Val Asp Arg His Thr Asp Met Asp Arg Ile Phe Asn
            420                 425                 430

Ile Asp Ser Gly Asn Gly Ser Ile Phe Thr Ser Lys Leu Leu Asp Arg
        435                 440                 445

Glu Thr Leu Leu Trp His Asn Ile Thr Val Ile Ala Thr Glu Ile Asn
    450                 455                 460

Asn Pro Lys Gln Ser Ser Arg Val Pro Leu Tyr Ile Lys Val Leu Asp
465                 470                 475                 480

Val Asn Asp Asn Ala Pro Glu Phe Ala Glu Phe Tyr Glu Thr Phe Val
                485                 490                 495

Cys Glu Lys Ala Lys Ala Asp Gln Leu Ile Gln Thr Leu Arg Ala Val
            500                 505                 510

Asp Lys Asp Asp Pro Tyr Ser Gly His Gln Phe Ser Phe Ser Leu Ala
        515                 520                 525

Pro Glu Ala Ala Ser Ser Ser Asn Phe Thr Ile Gln Asp Asn Lys Asp
    530                 535                 540

Asn Thr Ala Gly Ile Leu Thr Arg Lys Asn Gly Tyr Asn Arg His Glu
545                 550                 555                 560

Met Ser Thr Tyr Leu Leu Pro Val Val Ile Ser Asp Asn Asp Tyr Pro
                565                 570                 575

Val Gln Ser Ser Thr Gly Thr Val Thr Val Arg Val Cys Ala Cys Asp
            580                 585                 590

His His Gly Asn Met Gln Ser Cys His Ala Glu Ala Leu Ile His Pro
        595                 600                 605

Thr Gly Leu Ser Thr Gly Ala Leu Val Ala Ile Leu Leu Cys Ile Val
    610                 615                 620
```

```
Ile Leu Leu Val Thr Val Val Leu Phe Ala Ala Leu Arg Arg Gln Arg
625                 630                 635                 640

Lys Lys Glu Pro Leu Ile Ile S
```

505772897 11/14/2019

PATENT ASSIGNMENT COVER SHEET

Electronic Version v1.1
Stylesheet Version v1.2

EPAS ID: PAT5819714

SUBMISSION TYPE:	NEW ASSIGNMENT
NATURE OF CONVEYANCE:	ASSIGNMENT

CONVEYING PARTY DATA

Name	Execution Date
ATSUKO SAITO	11/08/2019
TSUYOSHI HIRATA	11/13/2019
KENSUKE NAKAMURA	11/11/2019

RECEIVING PARTY DATA

Name:	DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED
Street Address:	3-5-1, NIHONBASHI HONCHO, CHUO-KU
City:	TOKYO
State/Country:	JAPAN
Postal Code:	103-8426

PROPERTY NUMBERS Total: 1

Property Type	Number
Application Number:	16613203

CORRESPONDENCE DATA

Fax Number: (202)672-5399

Correspondence will be sent to the e-mail address first; if that is unsuccessful, it will be sent using a fax number, if provided; if that is unsuccessful, it will be sent via US Mail.

Phone: 202-672-5300
Email: ipdocketing@foley.com,mdoyle@foley.com,yelagha@foley.com,atitus@foley.com
Correspondent Name: MICHAEL D. KAMINSKI
Address Line 1: FOLEY & LARDNER LLP
Address Line 2: 3000 K STREET, N.W., SUITE 600
Address Line 4: WASHINGTON, D.C. 20007

ATTORNEY DOCKET NUMBER:	098065-0249
NAME OF SUBMITTER:	AUDREY TITUS
SIGNATURE:	/Audrey Titus/
DATE SIGNED:	11/14/2019
	This document serves as an Oath/Declaration (37 CFR 1.63).

Total Attachments: 3
source=098065-0249_ExecutedDeclarationAssignment#page1.tif
source=098065-0249_ExecutedDeclarationAssignment#page2.tif

source=098065-0249_ExecutedDeclarationAssignment#page3.tif

Atty. Dkt. No. 098065-0249

DECLARATION (37 CFR 1.63) AND ASSIGNMENT FOR UTILITY OR DESIGN APPLICATION USING AN APPLICATION DATA SHEET (37 CFR 1.76)

INVENTOR DECLARATION FOR U.S. PATENT APPLICATION

As a below named inventor, I HEREBY DECLARE:

THAT this declaration is directed to:

check one	[ ]	the attached application
	[X]	U.S. application or PCT international application number PCT/JP2018/018572 filed May 14, 2018

Entitled: ANTI-CDH6 ANTIBODY AND ANTI-CDH6 ANTIBODY-DRUG CONJUGATE

THAT the above-identified application was made or authorized to be made by me.

THAT I believe that I am the original inventor or an original joint inventor of a claimed invention in the application.

I hereby acknowledge that any willful false statement made in this declaration is punishable under 18 U.S.C. § 1001 by fine or imprisonment of not more than five (5) years, or both.

ASSIGNMENT - WORLDWIDE

For good and valuable consideration, the receipt and sufficiency of which are hereby acknowledged, each undersigned inventor (hereinafter referred to singly and collectively as "ASSIGNOR") has sold, assigned, and transferred, and by these presents hereby sells, assigns, and transfers, unto

DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED
3-5-1, Nihonbashi Honcho, Chuo-ku
Tokyo, 103-8426 Japan

(hereinafter referred to as "ASSIGNEE") its successors and assigns, his or her full and exclusive right, title and interest for the United States, its territories and possessions, and for all other countries and jurisdictions throughout the world, in and to the invention relating to said application as well as in and to (a) all improvements and modifications of the above-identified invention or inventions, (b) the above-identified application(s), all applications claiming priority to the above-identified application(s), and all applications to which the above-identified

application(s) claim priority, and all other applications for Letters Patent of the United States and of all other countries and jurisdictions throughout the world for the above-identified invention or inventions and all improvements and modifications thereof, (c) all Letters Patent which may issue from said applications in the United States and other countries and jurisdictions throughout the world (d) all divisions, continuations, reissues, and extensions of said applications and Letters Patent, and (e) the right to claim for any of said applications the full benefits and priority rights under the Patent Cooperation Treaty, the Paris Convention for the Protection of Industrial Property and any other international agreement associated with said applications, all applications claiming priority to said application(s), and all applications to which said application(s) claim priority; such right, title, and interest to be held and enjoyed by ASSIGNEE, its successors and assigns, to the full end of the term or terms for which any and all such Letters Patent may be granted as fully and entirely as would have been held and enjoyed by ASSIGNOR had this Assignment not been made.

ASSIGNOR HEREBY further sells and assigns to ASSIGNEE any and all claims for damages by way of past, present and future infringement of any of the rights stemming from the aforementioned patent application(s) and patent(s),as well as but not limited to the right to collect damages and royalties for infringement occurring from the date of publication of any said application(s), with the right, but not the obligation, to sue tor and collect such damages for said infringement

ASSIGNOR HEREBY AUTHORIZES ASSIGNEE to file patent applications in any or all countries and other jurisdictions throughout the world on the above-identified invention in the name of the ASSIGNOR or in the name of ASSIGNEE or otherwise as ASSIGNEE may deem advisable.

ASSIGNOR HEREBY AUTHORIZES AND REQUESTS the Commissioner of Patents and Trademarks for the United States to issue each said U.S. Letters Patent to ASSIGNEE as assignee of the entire interest, for the sole use and benefit of ASSIGNEE, its successors and assigns.

ASSIGNOR HEREBY AGREES (a) to communicate to ASSIGNEE, its successors and assigns, or their representative or agents, all facts and information known or available to ASSIGNOR respecting said invention or inventions, improvements, and modifications including evidence for interference, reexamination, reissue, opposition, review, revocation, extension, or infringement purposes or other legal, judicial, or administrative proceedings, whenever requested by ASSIGNEE; (b) to testify in person or by affidavit as required by ASSIGNEE, its successors and assigns, in any such proceeding in the United States and all other countries and jurisdictions throughout the world,; (c) to execute and deliver, upon request by ASSIGNEE, all lawful papers including, but not limited to, original, divisional, continuation, and reissue applications, renewals, assignments, powers of attorney, oaths, affidavits, declarations, and depositions; and (d) to provide all reasonable assistance to ASSIGNEE, its successors and assigns, in obtaining and enforcing proper title in and protection for said invention or inventions, improvements, and

modifications under the intellectual property laws of the United States and all other countries and jurisdictions throughout the world.

ASSIGNOR HEREBY REPRESENTS AND WARRANTS that ASSIGNOR has the full and unencumbered right to sell, assign, and transfer the interests sold, assigned, and transferred herein, and that ASSIGNOR has not executed and will not execute any document or instrument in conflict herewith.

ASSIGNOR HEREBY GRANTS to the law firm of **Foley & Lardner LLP** the power and authority to insert in this Assignment any further identification which may be necessary or desirable to comply with the rules of the U.S. Patent and Trademark Office for recordation of this Assignment, or to comply with any other governing rule, regulation or law of any other country or jurisdiction throughout the world for recordation and legal effect of this Assignment.

ASSIGNOR UNDERSTANDS AND AGREES that the attorneys and agents of the law firm of **Foley & Lardner LLP** do not represent ASSIGNOR OR ASSIGNOR's legal interests, but instead represent the interests of ASSIGNEE; since said attorneys and agents cannot provide legal advice to ASSIGNOR with respect to this Assignment, ASSIGNOR acknowledges its right to seek its own independent legal counsel.

Executed this 8 day of November, 2019.

Atsuko Saito

ATSUKO SAITO

Executed this 13 day of November, 2019.

Tsuyoshi Hirata

TSUYOSHI HIRATA

Executed this 11 day of November, 2019.

Kensuke Nakamura

KENSUKE NAKAMURA

CD Submission Review Results

Internal Worksheet Only - Do Not Scan

Application Number	16613203	Receipt Date	Nov 13, 2019

X	New Application		Response To Notice	Date Of Response

	Jumbo – Large tables are included on the CD
X	**There are no problems with the CDs in the submission.**

Items checked below are to be selected in the PALM Pre-Exam CD problem list.

Omitted Items

	Files on compact disc are unreadable:
	Disc(s) of either set not readable:
	Disc(s) do not contain file names listed:
	Amended CD missing unamended files
	Missing compact discs

Missing Parts

	Disc(s) do not contain file names listed
	Discs contains files that are non-ASCII files:
	Only one copy of the CD, no duplicate:
	Wrong media type, e.g., CD-RW:
	The transmittal letter and specification do not list information:
	Both disc(s) contain unreadable files:
	One disc(s) contain unreadable files:
	Compact disc(s) contain viruses, but are still readable:
	EFS/Paper Submission:
	Table does not maintain data in proper alignment:
	Not proper subject matter for CD's:

Informality

	No statement in transmittal letter that CD's are the same:
	No incorporation by reference statement for the CD's:
	CD's not labeled "Copy 1" and "Copy 2":
	Deficient CD packaging:
	Deficient Labeling on CD's:
	The transmittal letter does not list information:
	The specification does not list information:
	Table less than 51 pages submitted on CD:

File Directory Attachment

	Copy of file directory listing is attached and should be mailed to applicant
	Copy of file directory listing is not attached
	Copy of file directory listing is not attached because it is over one page long

Additional Comments

C:\Users\sleng\Desktop\ScoreModule\20191122\16613203\098065-0249_EnglishDrawings.pdf

DocCode – SCORE

SCORE Placeholder Sheet for IFW Content

Application Number: 16613203

Document Date: 11/13/2019

The presence of this form in the IFW record indicates that the following document type was received in electronic format on the date identified above. This content is stored in the SCORE database.

Since this was an electronic submission, there is no physical artifact folder, no artifact folder is recorded in PALM, and no paper documents or physical media exist. The TIFF images in the IFW record were created from the original documents that are stored in SCORE.

- Drawing

At the time of document entry (noted above):

- USPTO employees may access SCORE content via DAV or via the SCORE web page.
- External customers may access SCORE content via PAIR using the Supplemental Content tab.

Form Revision Date: March 1, 2019

(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
2018年11月22日(22.11.2018)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2018/212136 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 15/13 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 31/4745 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01)
A61P 13/12 (2006.01)
A61P 15/08 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2018/018572

(22) 国際出願日： 2018年5月14日(14.05.2018)

(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 2017-096749 2017年5月15日(15.05.2017) JP

(71) 出願人: 第一三共株式会社(**DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED**) [JP/JP]; 〒1038426 東京都中央区日本橋本町三丁目５番１号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 齊藤 敦子(**SAITO Atsuko**); 〒1038426 東京都中央区日本橋本町三丁目５番１号 第一三共株式会社内 Tokyo (JP). 平田 剛之(**HIRATA Tsuyoshi**); 〒1348630 東京都江戸川区北葛西１丁目１６番１３号 第一三共ＲＤノバーレ株式会社内 Tokyo (JP). 中村 健介(**NAKAMURA Kensuke**); 〒1038426 東京都中央区日本橋本町三丁目５番１号 第一三共株式会社内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 石橋 公樹，外(**ISHIBASHI Koki** et al.); 〒1400005 東京都品川区広町一丁目２番５８号 第一三共株式会社内 Tokyo (JP).

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

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, 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, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：
— 国際調査報告（条約第21条(3)）
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト（規則5.2(a)）

(54) **Title:** ANTI-CDH6 ANTIBODY AND ANTI-CDH6 ANTIBODY-DRUG CONJUGATE

(54) 発明の名称： 抗ＣＤＨ６抗体及び抗ＣＤＨ６抗体－薬物コンジュゲート

(57) **Abstract:** The present invention addresses the problem of providing: an antibody having an internalization activity of binding to CDH6; an antibody-drug conjugate consisting of the aforesaid antibody and a drug having an antitumor activity; a medicine using the antibody-drug conjugate, said medicine having a therapeutic effect on tumors; a method for treating tumors using the antibody, the antibody-drug conjugate or the medicine; etc. Provided are: an anti-CDH6 antibody having an internalization activity; an antibody-drug conjugate consisting of the aforesaid antibody and a drug having an antitumor activity; and a medicine and a method for treating tumors using the same.

(57) 要約：本発明の課題は、ＣＤＨ６に結合する内在化活性を有する抗体、該抗体と抗腫瘍活性を有する薬物との抗体－薬物コンジュゲート、該抗体－薬物コンジュゲートを用いた腫瘍に対する治療効果を有する医薬品、及び、該抗体、該抗体－薬物コンジュゲート又は該医薬品を用いた腫瘍の治療方法等を提供することである。 本発明により、内在化活性を有する抗ＣＤＨ６抗体、該抗体と抗腫瘍活性を有する薬物との抗体－薬物コンジュゲート、これらを用いる医薬品および腫瘍の治療方法が提供される。

WO 2018/212136 A1

明　細　書

発明の名称 ：

抗ＣＤＨ６抗体及び抗ＣＤＨ６抗体－薬物コンジュゲート

技術分野

[0001] 本発明は、ＣＤＨ６に結合し、内在化作用を有する抗ＣＤＨ６抗体、該抗ＣＤＨ６抗体の製造方法、ならびに該抗体を含む抗体－薬物コンジュゲート、該抗体－薬物コンジュゲートを含む抗腫瘍剤等に関する。

背景技術

[0002] カドヘリン（Ｃａｄｈｅｒｉｎ）は、細胞膜表面に存在する糖タンパク質で、カルシウムイオン依存的にＮ末端側の細胞外ドメイン同士が結合することで、細胞間接着分子として、また細胞間相互作用を担うシグナル分子として機能する。カドヘリンスーパーファミリーの内、クラシックカドヘリンに分類される分子群は、５個の細胞外ドメイン（ｅｘｔｒａｃｅｌｌｕｌａｒ ｄｏｍａｉｎ、ＥＣドメイン）と１個の膜貫通領域、及び細胞内ドメインから構成される１回膜貫通タンパク質である。クラシックカドヘリンはアミノ酸配列の相同性から、Ｅ－カドヘリンや Ｎ－カドヘリンに代表されるタイプＩファミリーと、タイプＩＩファミリーに分類される。

[0003] カドヘリン６（Ｃａｄｈｅｒｉｎ－６、ＣＤＨ６）は、タイプＩＩカドヘリンファミリーに分類される、７９０アミノ酸からなる１回膜貫通タンパク質であり、Ｎ末端側を細胞外、Ｃ末端側を細胞内に持つ。ヒトＣＤＨ６遺伝子は１９９５年に初めてクローニングされ（非特許文献１）、ＮＭ＿００４９３２、ＮＰ＿００４９２３（ＮＣＢＩ）等のアクセッション番号により参照可能である。

[0004] ＣＤＨ６は発生期において脳や腎臓で特異的に発現しており、中枢神経系の回路形成（非特許文献２、非特許文献３）や腎臓のネフロン発生時（非特許文献４、非特許文献５）に重要な役割を担うことが報告されている。成人の正常組織では、ＣＤＨ６の発現は腎尿細管や胆管上皮細胞などに限局され

ている。

[0005] 一方で、成人のいくつかの癌種において、腫瘍部で特異的にＣＤＨ６の発現が亢進することが知られており、ヒト腎細胞癌、特に腎淡明細胞癌では、ＣＤＨ６発現と予後不良との相関や、腫瘍マーカーとしての利用可能性が報告されている（非特許文献６、非特許文献７）。ヒト卵巣癌でもＣＤＨ６の高発現が報告されている（非特許文献８）、ヒト甲状腺癌の上皮間葉変換と転移にＣＤＨ６が関与するとの報告もある（非特許文献９）。また、ＣＤＨ６は、ヒト胆管癌およびヒト小細胞肺癌でも発現していることが報告されている（非特許文献１２、１３）。

[0006] がんは死亡原因の上位を占め、その罹患数は人口の高齢化と共に増加することが予想されているが、未だ治療ニーズは充分に満たされていない。従来の化学療法剤は、その選択性の低さから腫瘍細胞だけでなく正常細胞に対しても傷害性を持つことによる副作用や、充分な薬剤量を投与できないことで薬剤の効果を充分に得ることが出来ないことが問題となっている。このため近年では、がん細胞に特徴的な変異や高発現を示す分子、細胞のがん化に関与する特定の分子を標的としたより選択性の高い分子標的薬や抗体医薬の開発が行われている。

[0007] 抗体は血中安定性が高く、標的抗原に特異的に結合することから副作用の軽減が期待されており、がん細胞表面に高発現している分子に対する抗体医薬が多数開発されている。抗体の抗原特異的な結合能を利用した技術の一つとして、抗体－薬物コンジュゲート（Ａｎｔｉｂｏｄｙ－Ｄｒｕｇ　Ｃｏｎｊｕｇａｔｅ；ＡＤＣ）が挙げられる。ＡＤＣは、がん細胞表面に発現している抗原に結合し、その結合によって抗原を細胞内に内在化できる抗体に、細胞傷害活性を有する薬物を結合させたものである。ＡＤＣは、がん細胞に効率的に薬物を送達できることによって、がん細胞内に薬物を蓄積させ、がん細胞を死滅させることが期待できる（非特許文献１０、特許文献１及び２）。ＡＤＣとして例えば、抗ＣＤ３０モノクローナル抗体にモノメチルアウリスタチンＥを結合させたアドセトリス（商標）（ブレンツキシマブ　ベド

チン）がホジキンリンパ腫と未分化大細胞リンパ腫の治療薬として認可されている。また、抗ＨＥＲ２モノクローナル抗体にエムタンシンを結合させたカドサイラ（商標）（トラスツズマブ　エムタンシン）がＨＥＲ２陽性の進行、再発乳癌の治療に用いられている。

[0008] 抗腫瘍薬としてのＡＤＣに適した標的抗原の特徴としては、がん細胞表面で特異的に高発現し、正常細胞では低発現又は発現していないこと、細胞内に内在化できること、抗原が細胞表面から分泌されないことなどが挙げられる。また、ＡＤＣに適した抗体の重要な特徴としては、標的となる抗原に特異的に結合することに加えて、高い内在化能を有することが挙げられる。抗体の内在化能は標的抗原と抗体の両方の性質に依存するものであり、標的の分子構造から内在化に適した抗原結合部位を推定したり、抗体の結合強度や物性等から容易に内在化能の高い抗体を推測したりすることは困難である。このため、標的抗原に対して高い内在化能を有する抗体を取得することは、有効性の高いＡＤＣを開発する上で重要な課題となっている（非特許文献１１）。

[0009] ＣＤＨ６を標的としたＡＤＣとしては、ＣＤＨ６のＥＣドメイン５（ＥＣ５）に特異的に結合する抗ＣＤＨ６抗体にＤＭ４を結合させたＡＤＣが知られている（特許文献３）。

先行技術文献

特許文献

[0010] 特許文献1：ＷＯ２０１４／０５７６８７

特許文献2：ＵＳ２０１６／０２９７８９０

特許文献3：ＷＯ２０１６／０２４１９５

非特許文献

[0011] 非特許文献1：Ｓｈｉｍｏｙａｍａ　Ｙ，ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ，２２０６－２２１１，５５，Ｍａｙ　１５，１９９５

非特許文献2：Ｉｎｏｕｅ　Ｔ，ｅｔ　ａｌ．，Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔａｌ　Ｂｉｏｌｏｇｙ，１８３－１９４，１９９７

非特許文献3：Ｏｓｔｅｒｈｏｕｔ Ｊ Ａ，ｅｔ ａｌ．，Ｎｅｕｒｏｎ，６３２－６３９，７１，Ａｕｇ ２５，２０１１
非特許文献4：Ｃｈｏ Ｅ Ａ，ｅｔ ａｌ．，Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ，８０３－８１２，１２５，１９９８
非特許文献5：Ｍａｈ Ｓ Ｐ，ｅｔ ａｌ．，Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔａｌ Ｂｉｏｌｏｇｙ，３８－５３，２２３，２０００
非特許文献6：Ｐａｕｌ Ｒ，ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，２７４１－２７４８，Ｊｕｌｙ １，５７，１９９７
非特許文献7：Ｓｈｉｍａｚｕｉ Ｔ，ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ，９６３－９６８，１０１（５），Ｓｅｐ．１，２００４
非特許文献8：Ｋｏｅｂｅｌ Ｍ，ｅｔ ａｌ．，ＰＬｏＳ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ，１７４９－１７６０，５（１２），ｅ２３２，Ｄｅｃ．２００８
非特許文献9：Ｇｕｇｎｏｎｉ Ｍ，ｅｔ ａｌ．，Ｏｎｃｏｇｅｎｅ，６６７－６７７，３６，２０１７
非特許文献10：Ｐｏｌａｋｉｓ Ｐ．，Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｉｃａｌ Ｒｅｖｉｅｗｓ，３－１９，６８，２０１６
非特許文献11：Ｐｅｔｅｒｓ Ｃ，ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ Ｒｅｐｏｒｔｓ，１－２０，３５，２０１５
非特許文献12：Ｇｏｅｐｐｅｒｔ Ｂ，ｅｔ ａｌ．，Ｅｐｉｇｅｎｅｔｉｃｓ，７８０－７９０，１１（１１），２０１６
非特許文献13：Ｙｏｋｏｉ Ｓ，ｅｔ ａｌ．，Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｐａｔｈｏｌｏｇｙ，２０７－２１６，１６１，１，２００２

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0012] 本発明の課題は、ＣＤＨ６に対して特異的に結合する高い内在化活性を有する抗体、該抗体を含む高い抗腫瘍活性を有する抗体－薬物コンジュゲート、該抗体－薬物コンジュゲートを用いた腫瘍に対する治療効果を有する医薬

品、及び、当該抗体、抗体－薬物コンジュゲート又は医薬品を用いた腫瘍の治療方法等を提供することである。

課題を解決するための手段

[0013] 本発明者らは、上記課題を達成するために鋭意検討したところ、驚くべきことにＣＤＨ６の細胞外ドメイン３（本明細書中、ＥＣ３とも称する）に特異的に結合する抗体が、ＣＤＨ６を発現する細胞において極めて高い内在化活性を有しＡＤＣ抗体として有用であることを見出した。更に、当該抗ＣＤＨ６抗体に、細胞内で毒性を発揮する薬剤を特定の構造のリンカーを介して結合させた抗ＣＤＨ６抗体－薬物コンジュゲートは、従来のＣＤＨ６薬物複合体よりも強い抗腫瘍活性を示すことを見出した。

[0014] 本願発明は以下の発明を包含する；

［１］配列番号４に記載のアミノ酸配列に特異的に結合し、細胞内に取り込まれる内在化能を有する、抗体又は当該抗体の機能性断片；

［２］配列番号４に記載のアミノ酸配列への結合に対して、以下の（１）～（５）：

（１）配列番号５３の２１～２３３番目に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号５６の２０～４７１番目に記載のアミノ酸配列からなる重鎖を有する抗体、

（２）配列番号６１の２１～２３３番目に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号６９の２０～４７１番目に記載のアミノ酸配列からなる重鎖を有する抗体、

（３）配列番号６１の２１～２３３番目に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号７３の２０～４７１番目に記載のアミノ酸配列からなる重鎖を有する抗体、

（４）配列番号６５の２１～２３３番目に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号７３の２０～４７１番目に記載のアミノ酸配列からなる重鎖を有する抗体、及び

（５）配列番号６１の２１～２３３番目に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖

及び配列番号７７の２０～４７１番目に記載のアミノ酸配列からなる重鎖を有する抗体、
からなる群から選択される抗体のうち少なくともいずれか１つと競合阻害活性を有する［１］に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片；
［３］以下の（１）～（４）：
（１）配列番号１２に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１、配列番号１３に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２及び配列番号１４に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ３、
（２）配列番号２２に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１、配列番号２３に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２及び配列番号２４に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ３、
（３）配列番号３２に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１、配列番号３３に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２及び配列番号３４に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ３、及び
（４）配列番号４２に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１、配列番号４３に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２及び配列番号４４に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ３、
からなる群から選択されるいずれか１つに記載のＣＤＲＬ１、ＣＤＲＬ２及びＣＤＲＬ３、並びに、
以下の（５）～（９）：
（５）配列番号１７に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１、配列番号１８に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２及び配列番号１９に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３、
（６）配列番号２７に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１、配列番号２８に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２及び配列番号２９に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３、
（７）配列番号３７に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１、配列番号３８に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２及び配列番号３９に記載のアミ

ノ酸配列からなるＣＤＲＨ３、
（８）配列番号４７に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１、配列番号４８に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２及び配列番号４９に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３、及び
（９）配列番号１７に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１、配列番号６０に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２及び配列番号１９に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３、
からなる群から選択されるいずれか１つに記載のＣＤＲＨ１、ＣＤＲＨ２及びＣＤＲＨ３を含む、
［１］又は［２］のいずれか１項に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片；
［４］以下の（１）～（５）：
（１）配列番号１２に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１、配列番号１３に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２及び配列番号１４に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ３、及び、配列番号１７に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１、配列番号１８に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２及び配列番号１９に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３、
（２）配列番号２２に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１、配列番号２３に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２及び配列番号２４に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ３、及び、配列番号２７に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１、配列番号２８に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２及び配列番号２９に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３、
（３）配列番号３２に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１、配列番号３３に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２及び配列番号３４に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ３、及び、配列番号３７に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１、配列番号３８に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２及び配列番号３９に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３、
（４）配列番号４２に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１、配列番号４３に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２及び配列番号４４に記載のアミ

ノ酸配列からなるＣＤＲＬ３、及び、配列番号４７に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１、配列番号４８に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２及び配列番号４９に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３、及び

（５）配列番号１２に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１、配列番号１３に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２及び配列番号１４に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ３、及び、配列番号１７に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１、配列番号６０に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２及び配列番号１９に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３、

からなる群から選択されるＣＤＲＬ１、ＣＤＲＬ２及びＣＤＲＬ３、並びに、ＣＤＲＨ１、ＣＤＲＨ２及びＣＤＲＨ３を含む、

［１］～［３］のいずれか１項に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片；

［５］ヒト化されている［１］～［４］のいずれか１項に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片；

［６］以下の（１）～（４）：

（１）配列番号６３に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、

（２）配列番号６７に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、

（３）（１）～（２）のアミノ酸配列において各ＣＤＲ配列以外のフレームワーク領域の配列に対して少なくとも９５％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列、及び

（４）（１）～（３）のアミノ酸配列において各ＣＤＲ配列以外のフレームワーク領域の配列において１又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列

からなる群から選択されるいずれか１つに記載の軽鎖可変領域、並びに、

以下の（５）～（９）：

（５）配列番号７１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、

（６）配列番号７５に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、

（７）配列番号７９に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、

（８）（５）～（７）のアミノ酸配列において各ＣＤＲ配列以外のフレーム

ワーク領域の配列に対して少なくとも９５％以上の配列相同性を有するアミノ酸配列、及び

（９）（５）～（８）のアミノ酸配列において各ＣＤＲ配列以外のフレームワーク領域の配列において１又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列

からなる群から選択されるいずれか１つに記載の重鎖可変領域、

を有する［１］～［５］のいずれか１項に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片；

［７］以下の（１）～（４）：

（１）配列番号６３に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域及び配列番号７１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、

（２）配列番号６３に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域及び配列番号７５に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、

（３）配列番号６７に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域及び配列番号７５に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、又は

（４）配列番号６３に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域及び配列番号７９に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、

のいずれかの軽鎖可変領域及び重鎖可変領域、

を含む［１］～［６］のいずれか１項に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片；

［８］以下の（１）～（４）：

（１）配列番号６１の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号６９の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖、

（２）配列番号６１の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号７３の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖、

（３）配列番号６５の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号７３の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖、又は

（４）配列番号６１の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配

列番号７７の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖、
のいずれかを有する［１］～［７］のいずれか１項に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片；
［９］配列番号６１の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号６９の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖を有する［８］に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片；
［１０］配列番号６１の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号７３の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖を有する［８］に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片；
［１１］配列番号６５の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号７３の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖を有する［８］に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片；
［１２］配列番号６１の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号７７の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖を有する［８］に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片；
［１３］機能性断片がＦａｂ、Ｆ（ａｂ’）２、Ｆａｂ’及びＦｖからなる群から選択される［１］～［１２］のいずれか１項に記載の抗体の機能性断片；
［１４］［１］～［１３］のいずれか１項に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片をコードするポリヌクレオチド；
［１５］以下の（１）～（５）：
（１）配列番号１２に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１、配列番号１３に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２及び配列番号１４に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ３を含む軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド、及び、配列番号１７に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１、配列番号１８に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２及び配列番号１９に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３を含む重鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド、

（２）配列番号２２に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１、配列番号２３に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２及び配列番号２４に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ３を含む軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド、及び、配列番号２７に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１、配列番号２８に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２及び配列番号２９に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３を含む重鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド、

（３）配列番号３２に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１、配列番号３３に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２及び配列番号３４に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ３を含む軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド、及び、配列番号３７に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１、配列番号３８に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２及び配列番号３９に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３を含む重鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド、

（４）配列番号４２に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１、配列番号４３に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２及び配列番号４４に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ３を含む軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド、及び、配列番号４７に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１、配列番号４８に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２及び配列番号４９に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３を含む重鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド、並びに

（５）配列番号１２に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１、配列番号１３に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２及び配列番号１４に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ３を含む軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド、及び、配列番号１７に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１、配列番号６０に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２及び配列番号１９に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３を含む重鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド、

からなる群から選択されるいずれか１つに記載のポリヌクレオチドを含む［１４］に記載のポリヌクレオチド；

［１６］配列番号６１の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖をコードするポリヌクレオチド及び配列番号６９の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖をコードするポリヌクレオチドを含む［１４］又は［１５］に記載のポリヌクレオチド；

［１７］配列番号６１の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖をコードするポリヌクレオチド及び配列番号７３の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖をコードするポリヌクレオチドを含む［１４］又は［１５］に記載のポリヌクレオチド；

［１８］配列番号６５の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖をコードするポリヌクレオチド及び配列番号７３の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖をコードするポリヌクレオチドを含む［１４］又は［１５］に記載のポリヌクレオチド；

［１９］配列番号６１の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖をコードするポリヌクレオチド及び配列番号７７の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖をコードするポリヌクレオチドを含む［１４］又は［１５］に記載のポリヌクレオチド；

［２０］［１４］～［１９］のいずれか１項に記載のポリヌクレオチドを含有する発現ベクター；

［２１］［２０］に記載の発現ベクターにより形質転換された宿主細胞；

［２２］宿主細胞が真核細胞である［２１］に記載の宿主細胞；

［２３］［２１］又は［２２］に記載の宿主細胞を培養する工程、及び当該工程で得られた培養物から目的の抗体又は当該抗体の機能性断片を採取する工程を含むことを特徴とする当該抗体又は当該抗体の機能性断片の製造方法；

［２４］重鎖又は軽鎖が、Ｎ－結合への糖鎖付加、Ｏ－結合への糖鎖付加、Ｎ末のプロセッシング、Ｃ末のプロセッシング、脱アミド化、アスパラギン

酸の異性化、メチオニンの酸化、Ｎ末にメチオニン残基の付加、プロリン残基のアミド化、Ｎ末グルタミンもしくはＮ末グルタミン酸のピログルタミン酸化、及びカルボキシル末端における１つ又は２つのアミノ酸欠失からなる群より選択される１又は２以上の修飾をうけた、［１］～［１３］のいずれか１項に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片；

［２５］重鎖のカルボキシル末端において１つ又は２つのアミノ酸が欠失している［２４］に記載の抗体；

［２６］２本の重鎖の双方でカルボキシル末端において１つのアミノ酸が欠失している［２５］に記載の抗体；

［２７］重鎖のカルボキシル末端のプロリン残基が更にアミド化されている［２４］～［２６］のいずれか１項に記載の抗体；

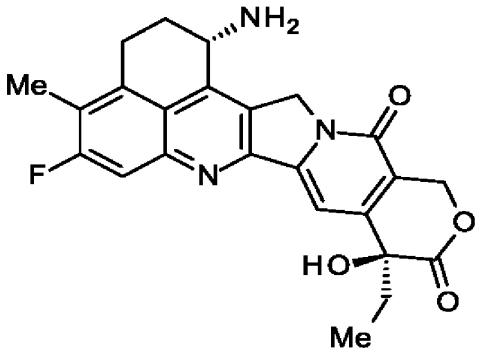
［２８］抗体依存性細胞傷害活性を増強させるために糖鎖修飾が調節されている［１］～［１３］及び［２４］～［２７］からなる群から選択されるいずれか１項に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片；

［２９］［１］～［１３］及び［２４］～［２８］からなる群から選択されるいずれか１項に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片に薬物が結合している抗体－薬物コンジュゲート；

［３０］薬物が抗腫瘍性化合物である、［２９］に記載の抗体－薬物コンジュゲート；

［３１］抗腫瘍性化合物が次式：

[0015] [化1]



[0016] で示される抗腫瘍性化合物である［３０］に記載の抗体－薬物コンジュゲート；

［３２］抗体と薬物が、次式（ａ）～（ｆ）：

（ａ）－（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ－３－ｙｌ－Ｎ）－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－Ｃ（＝Ｏ）－ＧＧＦＧ－ＮＨ－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－Ｃ（＝Ｏ）－、

（ｂ）－（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ－３－ｙｌ－Ｎ）－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－Ｃ（＝Ｏ）－ＧＧＦＧ－ＮＨ－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－Ｃ（＝Ｏ）－、

（ｃ）－（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ－３－ｙｌ－Ｎ）－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－Ｃ（＝Ｏ）－ＧＧＦＧ－ＮＨ－ＣＨ$_2$－Ｏ－ＣＨ$_2$－Ｃ（＝Ｏ）－、

（ｄ）－（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ－３－ｙｌ－Ｎ）－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－Ｃ（＝Ｏ）－ＧＧＦＧ－ＮＨ－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－Ｏ－ＣＨ$_2$－Ｃ（＝Ｏ）－、

（ｅ）－（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ－３－ｙｌ－Ｎ）－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｏ－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｏ－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－Ｃ（＝Ｏ）－ＧＧＦＧ－ＮＨ－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－Ｃ（＝Ｏ）－、及び

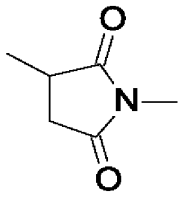
（ｆ）－（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ－３－ｙｌ－Ｎ）－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｏ－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｏ－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｏ－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｏ－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－Ｃ（＝Ｏ）－ＧＧＦＧ－ＮＨ－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－Ｃ（＝Ｏ）－、

からなる群から選択されるいずれかの構造のリンカーを介して結合している、［２９］～［３１］のいずれか１項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

（ここで、抗体は、－（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ－３－ｙｌ－Ｎ）の末端において結合する。抗腫瘍性化合物は、１位のアミノ基の窒素原子を結合部位として、（ａ）、（ｂ）、（ｅ）又は（ｆ）の－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－Ｃ（＝Ｏ）－部分、（ｃ）のＣＨ$_2$－Ｏ－ＣＨ$_2$－Ｃ（＝Ｏ）－部分又は（ｄ）のＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－Ｏ－ＣＨ$_2$－Ｃ（＝Ｏ）－部分のカルボニル基に結合する。上記式中ＧＧＦＧは、グリシン－グリシン－フェニルアラニン－グリシンからなるペプチド結合でつながっているアミノ酸配列を示す。

－（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ－３－ｙｌ－Ｎ）－は次式：

[0017] [化2]



[0018] で示される構造であり、このものの３位で抗体と結合し、１位の窒素原子上でこれを含むリンカー構造内のメチレン基と結合する。）；

［３３］リンカーが以下の（ｃ）、（ｄ）及び（ｅ）からなる群から選択されるいずれかの式で示される［２９］～［３２］のいずれか１項に記載の抗体－薬物コンジュゲート：

（ｃ）－（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ－３－ｙｌ－Ｎ）－$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$－Ｃ（＝Ｏ）－ＧＧＦＧ－ＮＨ－CH_2－Ｏ－CH_2－Ｃ（＝Ｏ）－、

（ｄ）－（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ－３－ｙｌ－Ｎ）－$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$－Ｃ（＝Ｏ）－ＧＧＦＧ－ＮＨ－CH_2CH_2－Ｏ－CH_2－Ｃ（＝Ｏ）－、

（ｅ）－（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ－３－ｙｌ－Ｎ）－CH_2CH_2－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－CH_2CH_2Ｏ－CH_2CH_2Ｏ－CH_2CH_2－Ｃ（＝Ｏ）－ＧＧＦＧ－ＮＨ－$CH_2CH_2CH_2$－Ｃ（＝Ｏ）－；

［３４］リンカーが以下の（ｃ）又は（ｅ）の式で示される［２９］～［３３］のいずれか１項に記載の抗体－薬物コンジュゲート：

（ｃ）－（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ－３－ｙｌ－Ｎ）－$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$－Ｃ（＝Ｏ）－ＧＧＦＧ－ＮＨ－CH_2－Ｏ－CH_2－Ｃ（＝Ｏ）－、

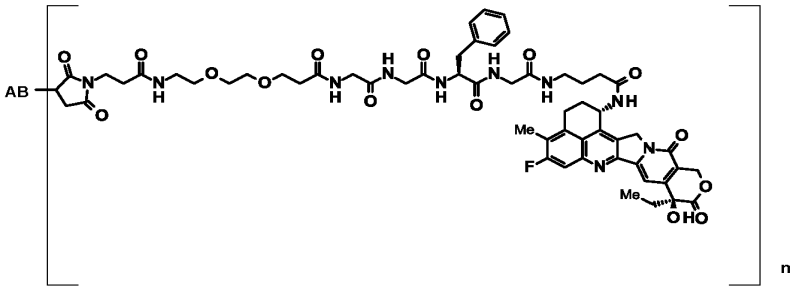
（ｅ）－（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ－３－ｙｌ－Ｎ）－CH_2CH_2－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－CH_2CH_2Ｏ－CH_2CH_2Ｏ－CH_2CH_2－Ｃ（＝Ｏ）－ＧＧＦＧ－ＮＨ－$CH_2CH_2CH_2$－Ｃ（＝Ｏ）－；

［３５］

以下の式：

[0019]

[化3]

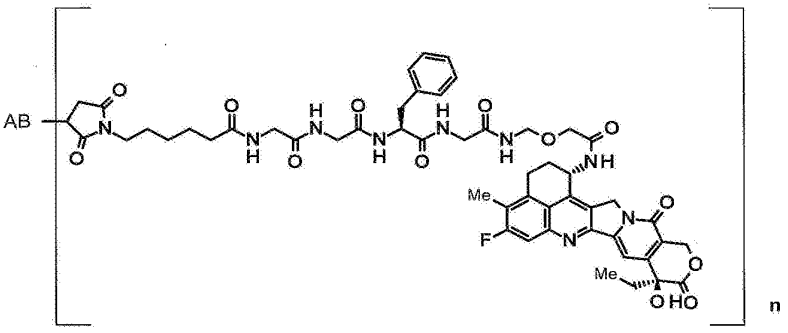


[0020] で示される構造を有する、［２９］～［３４］のいずれか１項に記載の抗体－薬物コンジュゲート：

ここで、ＡＢは抗体又は該抗体の機能性断片を示す。ｎは抗体と結合している薬物－リンカー構造の１抗体あたりの平均結合数を示す。抗体とリンカーは抗体由来のスルフヒドリル基を介して結合している；

［３６］以下の式：

[0021] [化4]



[0022] で示される構造を有する、［２９］～［３４］のいずれか１項に記載の抗体－薬物コンジュゲート：

ここで、ＡＢは抗体又は該抗体の機能性断片を示す。ｎは抗体と結合している薬物－リンカー構造の１抗体あたりの平均結合数を示す。抗体とリンカーは抗体由来のスルフヒドリル基を介して結合している；

［３７］抗体が以下の（１）～（４）：

（１）配列番号６１の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号６９の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖、
（２）配列番号６１の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号７３の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖、
（３）配列番号６５の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号７３の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖、又は
（４）配列番号６１の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号７７の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖、
からなる群から選択されるいずれか１つに記載の軽鎖及び重鎖を含む抗体又は当該抗体の機能性断片である、［２９］～［３６］のいずれか１項に記載の抗体－薬物コンジュゲート；
［３８］抗体が、配列番号６１の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号６９の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖を含む抗体又は当該抗体の機能性断片である、［３７］に記載の抗体－薬物コンジュゲート；
［３９］抗体が、配列番号６１の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号７７の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖を含む抗体又は当該抗体の機能性断片である、［３７］に記載の抗体－薬物コンジュゲート；
［４０］重鎖又は軽鎖が、Ｎ－結合への糖鎖付加、Ｏ－結合への糖鎖付加、Ｎ末のプロセッシング、Ｃ末のプロセッシング、脱アミド化、アスパラギン酸の異性化、メチオニンの酸化、Ｎ末にメチオニン残基の付加、プロリン残基のアミド化、Ｎ末グルタミンもしくはＮ末グルタミン酸のピログルタミン酸化及びカルボキシル末端における１つ又は２つのアミノ酸欠失からなる群から選択される１又は２以上の修飾をうけた、［２９］～［３９］のいずれか１項に記載の抗体－薬物コンジュゲート；
［４１］選択された１種の薬物－リンカー構造の１抗体あたりの平均結合数が１～１０個の範囲である［２９］～［４０］のいずれか１項に記載の抗体

－薬物コンジュゲート；

［４２］選択された１種の薬物－リンカー構造の１抗体あたりの平均結合数が２～８個の範囲である［４１］に記載の抗体－薬物コンジュゲート；

［４３］選択された１種の薬物－リンカー構造の１抗体あたりの平均結合数が５～８個の範囲である［４２］に記載の抗体－薬物コンジュゲート；

［４４］選択された１種の薬物－リンカー構造の１抗体あたりの平均結合数が７～８個である［４３］に記載の抗体－薬物コンジュゲート；

［４５］［２９］～［４４］のいずれか１項に記載の抗体－薬物コンジュゲート、その塩、又はそれらの水和物を含むことを特徴とする医薬組成物；

［４６］抗腫瘍薬であることを特徴とする、［４５］に記載の医薬組成物；

［４７］腫瘍がＣＤＨ６を発現する腫瘍であることを特徴とする、［４６］に記載の医薬組成物；

［４８］腫瘍が、腎細胞癌、腎淡明細胞癌、乳頭状腎細胞癌、卵巣癌、卵巣漿液性腺癌、甲状腺癌、胆管癌、肺癌、小細胞肺癌、神経膠芽腫、中皮腫、子宮癌、膵臓癌、ウィルムス腫瘍又は神経芽腫であることを特徴とする、［４６］又は［４７］に記載の医薬組成物；

［４９］［２９］～［４４］のいずれか１項に記載の抗体－薬物コンジュゲート、その塩、又はそれらの水和物から選択されるいずれかを個体に投与することを特徴とする腫瘍の治療方法；

［５０］腫瘍がＣＤＨ６が発現している腫瘍であることを特徴とする、［４９］に記載の治療方法；

［５１］腫瘍が、腎細胞癌、腎淡明細胞癌、乳頭状腎細胞癌、卵巣癌、卵巣漿液性腺癌、甲状腺癌、胆管癌、肺癌、小細胞肺癌、神経膠芽腫、中皮腫、子宮癌、膵臓癌、ウィルムス腫瘍又は神経芽腫であることを特徴とする、［４９］又は［５０］に記載の治療方法；

［５２］［２９］～［４４］のいずれか１項に記載の抗体－薬物コンジュゲート、その塩、又はそれらの水和物から選択される少なくとも一つを含む医薬組成物及び少なくとも一つの抗腫瘍薬を、同時に、別々に又は連続して個

体に投与することを特徴とする腫瘍の治療方法；

［５３］［１］～［１３］及び［２４］～［２８］からなる群から選択されるいずれか１項に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片或いは［２３］に記載の製造方法で得られる抗体又は当該抗体の機能性断片と、薬物－リンカー中間化合物を反応させる工程を含むことを特徴とする、抗体－薬物コンジュゲートの製造方法；又は

［５４］［２１］又は［２２］に記載の宿主細胞を培養する工程、当該工程で得られた培養物から目的の抗体又は当該抗体の機能性断片を採取する工程、及び当該工程で得られた抗体又は当該抗体の機能性断片と薬物－リンカー中間化合物を反応させる工程を含むことを特徴とする、抗体－薬物コンジュゲートの製造方法。

発明の効果

[0023] 本発明の抗ＣＤＨ６抗体は、ＣＤＨ６のＥＣドメイン３（ＥＣ３）を特異的に認識し、高い内在化活性を有することを特徴とする。本発明の抗ＣＤＨ６抗体に、細胞内で毒性を発揮する薬剤を特定の構造のリンカーを介して結合させた抗ＣＤＨ６抗体－薬物コンジュゲートは、ＣＤＨ６を発現するがん細胞を有する患者に投与することによって、優れた抗腫瘍効果及び安全性を達成することが期待できる。即ち、本発明の抗ＣＤＨ６抗体－薬物コンジュゲートは、抗腫瘍剤として有用である。

図面の簡単な説明

[0024] [図1]図１は、ラット抗ＣＤＨ６モノクローナル抗体４種（クローン番号は、ｒＧ０１９、ｒＧ０５５、ｒＧ０５６及びｒＧ０６１）又はラットＩｇＧコントロールの、コントロール細胞又はｈＣＤＨ６導入２９３Ｔ細胞に対する結合を調べたフローサイトメトリーの結果を示す。横軸は抗体結合量を表すＦＩＴＣの蛍光強度、縦軸は細胞数を示す。

[図2-1]図２－１は、ラット抗ＣＤＨ６モノクローナル抗体４種（ｒＧ０１９、ｒＧ０５５、ｒＧ０５６及びｒＧ０６１）又は陰性コントロール抗体ＲａｔＩｇＧ２ｂの、コントロール細胞又は全長ｈＣＤＨ６導入２９３細胞に対

する結合性を示す。横軸は抗体結合量を表すＦＩＴＣの蛍光強度、縦軸は細胞数を示す。

[図2-2]図２－２は、ラット抗ＣＤＨ６モノクローナル抗体４種（ｒＧ０１９、ｒＧ０５５、ｒＧ０５６及びｒＧ０６１）又はラットＩｇＧコントロールの、コントロール細胞又はＥＣ１欠失ｈＣＤＨ６導入２９３細胞に対する結合性を示す。横軸は抗体結合量を表すＦＩＴＣの蛍光強度、縦軸は細胞数を示す。

[図2-3]図２－３は、ラット抗ＣＤＨ６モノクローナル抗体４種（ｒＧ０１９、ｒＧ０５５、ｒＧ０５６及びｒＧ０６１）又はラットＩｇＧコントロールの、コントロール細胞又はＥＣ２欠失ｈＣＤＨ６導入２９３細胞に対する結合性を示す。横軸は抗体結合量を表すＦＩＴＣの蛍光強度、縦軸は細胞数を示す。

[図2-4]図２－４は、ラット抗ＣＤＨ６モノクローナル抗体４種（ｒＧ０１９、ｒＧ０５５、ｒＧ０５６及びｒＧ０６１）又はラットＩｇＧコントロールの、コントロール細胞又はＥＣ３欠失ｈＣＤＨ６導入２９３細胞に対する結合性を示す。横軸は抗体結合量を表すＦＩＴＣの蛍光強度、縦軸は細胞数を示す。

[図2-5]図２－５は、ラット抗ＣＤＨ６モノクローナル抗体４種（ｒＧ０１９、ｒＧ０５５、ｒＧ０５６及びｒＧ０６１）又はラットＩｇＧコントロールの、コントロール細胞又はＥＣ４欠失ｈＣＤＨ６導入２９３細胞に対する結合性を示す。横軸は抗体結合量を表すＦＩＴＣの蛍光強度、縦軸は細胞数を示す。

[図2-6]図２－６は、ラット抗ＣＤＨ６モノクローナル抗体４種（ｒＧ０１９、ｒＧ０５５、ｒＧ０５６及びｒＧ０６１）又はラットＩｇＧコントロールの、コントロール細胞又はＥＣ５欠失ｈＣＤＨ６導入２９３細胞に対する結合性を示す。横軸は抗体結合量を表すＦＩＴＣの蛍光強度、縦軸は細胞数を示す。

[図3]図３は、４種類のヒト腫瘍細胞株（ヒト卵巣腫瘍細胞株ＮＩＨ：ＯＶＣ

ＡＲ－３，ＰＡ－１，ＥＳ－２及びヒト腎細胞腫瘍細胞株７８６－Ｏ）の細胞膜表面でのＣＤＨ６の発現を評価したフローサイトメトリーの結果を示す。横軸は抗体結合量を表すＦＩＴＣの蛍光強度、縦軸は細胞数を示す。

[図4]図４は、４種類のラット抗ＣＤＨ６抗体（ｒＧ０１９、ｒＧ０５５、ｒＧ０５６及びｒＧ０６１）又はラットＩｇＧコントロールの内在化活性を、タンパク質合成を阻害する毒素（サポリン）を結合させた抗ラットＩｇＧ試薬Ｒａｔ－ＺＡＰ又は陰性コントロールとして毒素を結合していないＧｏａｔ　Ａｎｔｉ－Ｒａｔ　ＩｇＧ，Ｆｃ（ｇａｍｍａ）　Ｆｒａｇｍｅｎｔ　Ｓｐｅｃｉｆｉｃを用いて、ＮＩＨ：ＯＶＣＡＲ－３細胞及び７８６－Ｏ細胞において評価したグラフを示す。グラフの縦軸は、ＡＴＰ活性（ＲＬＵ）を示す。各グラフの下に、Ｒａｔ－ＺＡＰの代わりに陰性コントロールを添加したウェルの生存細胞数を１００％とした相対生存率として算出された細胞生存率（％）を示す。

[図5]図５は、ヒトキメラ抗ＣＤＨ６抗体ｃｈＧ０１９のヒトＣＤＨ６及びサルＣＤＨ６に対する結合を示す。横軸は抗体濃度を示し、縦軸は結合量をＭｅａｎＦｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ　Ｉｎｔｅｎｓｉｔｙ（平均蛍光強度）で示す。

[図6-1]図６－１及び図６－２は、ヒト化ｈＧ０１９抗体４種（Ｈ０１Ｌ０２、Ｈ０２Ｌ０２、Ｈ０２Ｌ０３及びＨ０４Ｌ０２）又は陰性コントロール抗体ヒトＩｇＧ１の、ヒトＣＤＨ６、サルＣＤＨ６、マウスＣＤＨ６、ラットＣＤＨ６に対する結合性を示す。横軸は抗体濃度を示し、縦軸は結合量をＭｅａｎＦｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ　Ｉｎｔｅｎｓｉｔｙ（平均蛍光強度）で示す。

[図6-2]図６－１及び図６－２は、ヒト化ｈＧ０１９抗体４種（Ｈ０１Ｌ０２、Ｈ０２Ｌ０２、Ｈ０２Ｌ０３及びＨ０４Ｌ０２）又は陰性コントロール抗体ヒトＩｇＧ１の、ヒトＣＤＨ６、サルＣＤＨ６、マウスＣＤＨ６、ラットＣＤＨ６に対する結合性を示す。横軸は抗体濃度を示し、縦軸は結合量をＭｅａｎＦｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ　Ｉｎｔｅｎｓｉｔｙ（平均蛍光強度）で示

す。

[図7-1]図７－１は、ヒト化ｈＧ０１９抗体４種（Ｈ０１Ｌ０２、Ｈ０２Ｌ０２、Ｈ０２Ｌ０３及びＨ０４Ｌ０２）、抗ＣＤＨ６抗体ＮＯＶ０７１２又は陰性コントロール抗体ｈＩｇＧ１の、コントロール細胞又は全長ｈＣＤＨ６導入２９３α細胞に対する結合性を示す。横軸は抗体結合量を表すＡＰＣの蛍光強度、縦軸は細胞数を示す。

[図7-2]図７－２は、ヒト化ｈＧ０１９抗体４種（Ｈ０１Ｌ０２、Ｈ０２Ｌ０２、Ｈ０２Ｌ０３及びＨ０４Ｌ０２）、抗ＣＤＨ６抗体ＮＯＶ０７１２又は陰性コントロール抗体ｈＩｇＧ１の、コントロール細胞又はＥＣ１欠失ｈＣＤＨ６導入２９３α細胞に対する結合性を示す。横軸は抗体結合量を表すＡＰＣの蛍光強度、縦軸は細胞数を示す。

[図7-3]図７－３は、ヒト化ｈＧ０１９抗体４種（Ｈ０１Ｌ０２、Ｈ０２Ｌ０２、Ｈ０２Ｌ０３及びＨ０４Ｌ０２）、抗ＣＤＨ６抗体ＮＯＶ０７１２又は陰性コントロール抗体ｈＩｇＧ１の、コントロール細胞又はＥＣ２欠失ｈＣＤＨ６導入２９３α細胞に対する結合性を示す。横軸は抗体結合量を表すＡＰＣの蛍光強度、縦軸は細胞数を示す。

[図7-4]図７－４は、ヒト化ｈＧ０１９抗体４種（Ｈ０１Ｌ０２、Ｈ０２Ｌ０２、Ｈ０２Ｌ０３及びＨ０４Ｌ０２）、抗ＣＤＨ６抗体ＮＯＶ０７１２又は陰性コントロール抗体ｈＩｇＧ１の、コントロール細胞又はＥＣ３欠失ｈＣＤＨ６導入２９３α細胞に対する結合性を示す。横軸は抗体結合量を表すＡＰＣの蛍光強度、縦軸は細胞数を示す。

[図7-5]図７－５は、ヒト化ｈＧ０１９抗体４種（Ｈ０１Ｌ０２、Ｈ０２Ｌ０２、Ｈ０２Ｌ０３及びＨ０４Ｌ０２）、抗ＣＤＨ６抗体ＮＯＶ０７１２又は陰性コントロールのｈＩｇＧ１の、コントロール細胞又はＥＣ４欠失ｈＣＤＨ６導入２９３α細胞に対する結合性を示す。横軸は抗体結合量を表すＡＰＣの蛍光強度、縦軸は細胞数を示す。

[図7-6]図７－６は、ヒト化ｈＧ０１９抗体４種（Ｈ０１Ｌ０２、Ｈ０２Ｌ０２、Ｈ０２Ｌ０３及びＨ０４Ｌ０２）、抗ＣＤＨ６抗体ＮＯＶ０７１２又は

陰性コントロールのｈＩｇＧ１の、コントロール細胞又はＥＣ５欠失ｈＣＤＨ６導入２９３α細胞に対する結合性を示す。横軸は抗体結合量を表すＡＰＣの蛍光強度、縦軸は細胞数を示す。

[図8]図８は、７８６－Ｏ／ｈＣＤＨ６安定発現細胞株及び親細胞株７８６－ＯにおけるヒトＣＤＨ６の発現を調べたフローサイトメトリーの結果を示す。横軸は抗体結合量を表すＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　６４７の蛍光強度、縦軸は細胞数を示す。

[図9]図９は、（ａ）ラベル化ＮＯＶ０７１２又は（ｂ）ラベル化Ｈ０１Ｌ０２を用いた、ラベル化していないヒト化ｈＧ０１９抗体４種（Ｈ０１Ｌ０２、Ｈ０２Ｌ０２、Ｈ０２Ｌ０３及びＨ０４Ｌ０２）、抗ＣＤＨ６抗体ＮＯＶ０７１２又は陰性コントロールのＩｇＧ１との結合競合アッセイを示す。横軸はラベル化していない抗体の添加時の終濃度を示し、縦軸は結合量をＭｅａｎＦｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ　Ｉｎｔｅｎｓｉｔｙ（平均蛍光強度）で示す。

[図10-1]図１０－１は、ヒト化ｈＧ０１９抗体４種（Ｈ０１Ｌ０２、Ｈ０２Ｌ０２、Ｈ０２Ｌ０３及びＨ０４Ｌ０２）、抗ＣＤＨ６抗体ＮＯＶ０７１２及び陰性コントロール抗体の内在化活性を、タンパク質合成を阻害する毒素（サポリン）を結合させた抗ヒトＩｇＧ試薬Ｈｕｍ－ＺＡＰ又は陰性コントロールとして毒素を結合していないＦ（ａｂ’）２　Ｆｒａｇｍｅｎｔ　Ｇｏａｔ　Ａｎｔｉ－ｈｕｍａｎ　ＩｇＧ，Ｆｃ（ｇａｍｍａ）　Ｆｒａｇｍｅｎｔ　Ｓｐｅｃｉｆｉｃを用いて、ＮＩＨ：ＯＶＣＡＲ－３細胞において評価したグラフを示す。グラフの縦軸は、ＡＴＰ活性（ＲＬＵ）を示す。各グラフの下に、Ｈｕｍ－ＺＡＰの代わりに陰性コントロールを添加したウェルの生存細胞数を１００％とした相対生存率として算出された細胞生存率（％）を示す。

[図10-2]図１０－２は、ヒト化ｈＧ０１９抗体４種（Ｈ０１Ｌ０２、Ｈ０２Ｌ０２、Ｈ０２Ｌ０３及びＨ０４Ｌ０２）、抗ＣＤＨ６抗体ＮＯＶ０７１２及び陰性コントロール抗体の内在化活性を、タンパク質合成を阻害する毒素

（サポリン）を結合させた抗ヒトＩｇＧ試薬Ｈｕｍ－ＺＡＰ又は陰性コントロールとして毒素を結合していないＦ（ａｂ’）２　Ｆｒａｇｍｅｎｔ　Ｇｏａｔ　Ａｎｔｉ－ｈｕｍａｎ　ＩｇＧ，Ｆｃ（ｇａｍｍａ）　Ｆｒａｇｍｅｎｔ　Ｓｐｅｃｉｆｉｃを用いて、７８６－Ｏ細胞において評価したグラフを示す。グラフの縦軸は、ＡＴＰ活性（ＲＬＵ）を示す。各グラフの下に、Ｈｕｍ－ＺＡＰの代わりに陰性コントロールを添加したウェルの生存細胞数を１００％とした相対生存率として算出された細胞生存率（％）を示す。

[図10-3]図１０－３は、ヒト化ｈＧ０１９抗体４種（Ｈ０１Ｌ０２、Ｈ０２Ｌ０２、Ｈ０２Ｌ０３及びＨ０４Ｌ０２）、抗ＣＤＨ６抗体ＮＯＶ０７１２及び陰性コントロール抗体の内在化活性を、タンパク質合成を阻害する毒素（サポリン）を結合させた抗ヒトＩｇＧ試薬Ｈｕｍ－ＺＡＰ又は陰性コントロールとして毒素を結合していないＦ（ａｂ’）２　Ｆｒａｇｍｅｎｔ　Ｇｏａｔ　Ａｎｔｉ－ｈｕｍａｎ　ＩｇＧ，Ｆｃ（ｇａｍｍａ）　Ｆｒａｇｍｅｎｔ　Ｓｐｅｃｉｆｉｃを用いて、ＰＡ－１細胞において評価したグラフを示す。グラフの縦軸は、ＡＴＰ活性（ＲＬＵ）を示す。各グラフの下に、Ｈｕｍ－ＺＡＰの代わりに陰性コントロールを添加したウェルの生存細胞数を１００％とした相対生存率として算出された細胞生存率（％）を示す。

[図11]図１１は、ヒト化ｈＧ０１９－薬物コンジュゲート４種（Ｈ０１Ｌ０２－ＤＸｄ、Ｈ０２Ｌ０２－ＤＸｄ、Ｈ０２Ｌ０３－ＤＸｄ及びＨ０４Ｌ０２－ＤＸｄ）、又はＮＯＶ０７１２－ＤＭ４のＰＡ－１細胞に対するｉｎｖｉｔｒｏ細胞増殖抑制活性評価を示す。横軸は抗体－薬物コンジュゲートの濃度を示し、縦軸は細胞生存率（％）を示す。

[図12]図１２は、ヒト化ｈＧ０１９－薬物コンジュゲート４種（Ｈ０１Ｌ０２－ＤＸｄ、Ｈ０２Ｌ０２－ＤＸｄ、Ｈ０２Ｌ０３－ＤＸｄ及びＨ０４Ｌ０２－ＤＸｄ）、又はＮＯＶ０７１２－ＤＭ４のｉｎ　ｖｉｖｏ抗腫瘍効果を示す。ＣＤＨ６陽性ヒト腎細胞腫瘍細胞株７８６－Ｏを免疫不全マウスに移植した動物モデルを用いて評価した。横軸は日数、縦軸は腫瘍体積、誤差範囲は標準誤差（ＳＥ）値を示す。

[図13]図１３は、ヒト化ｈＧ０１９－薬物コンジュゲートＨ０１Ｌ０２－ＤＸｄ又はＮＯＶ０７１２－ＤＭ４又はＮＯＶ０７１２－ＤＸｄのｉｎ　ｖｉｖｏ抗腫瘍効果を示す。ＣＤＨ６陽性ヒト卵巣腫瘍細胞株ＰＡ－１を免疫不全マウスに移植した動物モデルを用いて評価した。横軸は日数、縦軸は腫瘍体積、誤差範囲はＳＥ値を示す。

[図14]図１４は、ヒト化ｈＧ０１９－薬物コンジュゲートＨ０１Ｌ０２－ＤＸｄ又はＮＯＶ０７１２－ＤＭ４のｉｎ　ｖｉｖｏ抗腫瘍効果を示す。ＣＤＨ６陽性ヒト卵巣腫瘍細胞株ＮＩＨ：ＯＶＣＡＲ－３を免疫不全マウスに移植した動物モデルを用いて評価した。横軸は日数、縦軸は腫瘍体積、誤差範囲はＳＥ値を示す。

[図15]図１５は、ヒト化ｈＧ０１９－薬物コンジュゲートＨ０１Ｌ０２－ＤＸｄ又はＮＯＶ０７１２－ＤＭ４のｉｎ　ｖｉｖｏ抗腫瘍効果を示す。ＣＤＨ６陽性ヒト腎細胞腫瘍細胞株７８６－Ｏを免疫不全マウスに移植した動物モデルを用いて評価した。横軸は日数、縦軸は腫瘍体積、誤差範囲はＳＥ値を示す。

[図16]図１６は、ヒト化ｈＧ０１９－薬物コンジュゲートＨ０１Ｌ０２－ＤＸｄ又はＮＯＶ０７１２－ＤＭ４のｉｎ　ｖｉｖｏ抗腫瘍効果を示す。ＣＤＨ６陰性ヒト卵巣腫瘍細胞株ＥＳ－２を免疫不全マウスに移植した動物モデルを用いて評価した。横軸は日数、縦軸は腫瘍体積、誤差範囲はＳＥ値を示す。

発明を実施するための形態

[0025] 以下、本発明を実施するための好適な形態について図面を参照しながら説明する。なお、以下に説明する実施形態は、本発明の代表的な実施形態の一例を示したものであり、これにより本発明の範囲が狭く解釈されることはない。

[0026] 本明細書中、「がん」と「腫瘍」は同じ意味に用いられる。

[0027] 本明細書中、「遺伝子」という語には、ＤＮＡのみならずそのｍＲＮＡ、ｃＤＮＡ及びそのｃＲＮＡも含まれる。

[0028] 本明細書中、「ポリヌクレオチド」又は「ヌクレオチド」は、核酸と同じ意味で用いており、ＤＮＡ、ＲＮＡ、プローブ、オリゴヌクレオチド、及びプライマーも含まれる。本明細書中、「ポリヌクレオチド」と「ヌクレオチド」は、特に指定されない限り、交換可能に使用され得る。

[0029] 本明細書中、「ポリペプチド」と「タンパク質」は交換可能に使用され得る。

[0030] 本明細書中、「細胞」には、動物個体内の細胞、培養細胞も含む。

[0031] 本明細書中、「ＣＤＨ６」は、ＣＤＨ６タンパク質と同じ意味で使用され得る。本明細書中、ヒトＣＤＨ６を「ｈＣＤＨ６」と記載する場合がある。

[0032] 本明細書中、「細胞傷害活性」とは、何らかの形で、細胞に病理的な変化を引き起こすことをいい、直接的な外傷にとどまらず、ＤＮＡの切断や塩基の二量体の形成、染色体の切断、細胞分裂装置の損傷、各種酵素活性の低下などあらゆる細胞の構造や機能上の損傷を引き起こすことをいう。

[0033] 本明細書中、「細胞内で毒性を発揮する」とは、何らかの形で、細胞内で毒性を示すことをいい、直接的な外傷にとどまらず、ＤＮＡの切断や塩基の二量体の形成、染色体の切断、細胞分裂装置の損傷、各種酵素活性の低下、細胞増殖因子の作用の抑制などあらゆる細胞の構造や機能、代謝に影響をもたらすことをいう。

[0034] 本明細書中、「抗体の機能性断片」とは、「抗体の抗原結合断片」とも呼ばれ、抗原との結合活性を有する抗体の部分断片を意味しており、Ｆａｂ、Ｆ（ａｂ’）２、Ｆｖ、ｓｃＦｖ、ｄｉａｂｏｄｙ、線状抗体及び抗体断片より形成された多特異性抗体等を含む。また、Ｆ（ａｂ’）２を還元条件下で処理した抗体の可変領域の一価の断片であるＦａｂ’も抗体の抗原結合断片に含まれる。但し、抗原との結合能を有している限りこれらの分子に限定されない。また、これらの抗原結合断片には、抗体蛋白質の全長分子を適当な酵素で処理したもののみならず、遺伝子工学的に改変された抗体遺伝子を用いて適当な宿主細胞において産生された蛋白質も含まれる。

[0035] 本明細書中、「エピトープ」とは、特定の抗ＣＤＨ６抗体の結合するＣＤ

Ｈ６の部分ペプチド又は部分立体構造を意味する。前記のＣＤＨ６の部分ペプチドであるエピトープは免疫アッセイ法等当業者にはよく知られている方法によって、決定することができる。まず、抗原の様々な部分構造を作製する。部分構造の作製にあたっては、公知のオリゴヌクレオチド合成技術を用いることができる。例えば、ＣＤＨ６のＣ末端又はＮ末端から適当な長さで順次短くした一連のポリペプチドを当業者に周知の遺伝子組み換え技術を用いて作製した後、それらに対する抗体の反応性を検討し、大まかな認識部位を決定した後に、更に短いペプチドを合成してそれらのペプチドとの反応性を検討することによって、エピトープを決定することができる。また、複数の細胞外ドメインからなる膜タンパク質に結合する抗体が、複数のドメインからなる立体構造をエピトープとしている場合は、特定の細胞外ドメインのアミノ酸配列を改変することによって、立体構造を改変することによってどのドメインと結合するかを決定することができる。特定の抗体の結合する抗原の部分立体構造であるエピトープは、Ｘ線構造解析によって抗体と隣接する抗原のアミノ酸残基を特定することによっても決定することができる。

[0036] 本明細書中、「同一のエピトープに結合する」とは、共通のエピトープに結合する抗体を意味している。第一の抗体の結合する部分ペプチド又は部分立体構造に第二の抗体が結合すれば、第一の抗体と第二の抗体が同一のエピトープに結合すると判定することができる。あるいは、第一の抗体の抗原に対する結合に第二の抗体が競合する（即ち、第二の抗体が第一の抗体と抗原の結合を妨げる）ことを確認することによって、具体的なエピトープの配列又は構造が決定されていなくても、第一の抗体と第二の抗体の同一のエピトープに結合すると判定することができる。本明細書中、「同一のエピトープに結合する」とは、第一の抗体と第二の抗体が、当該判定方法のいずれか一方又は両方により、共通のエピトープに結合すると判定された場合をいう。第一の抗体と第二の抗体が同一のエピトープに結合し、かつ第一の抗体が抗腫瘍活性や内在化活性等の特殊な効果を有する場合、第二の抗体も同様の活性を有することが期待できる。

[0037] 本明細書中、「ＣＤＲ」とは、相補性決定領域（ＣＤＲ；Ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔａｒｉｔｙ Ｄｅｔｅｒｍｉｎｉｎｇ Ｒｅｇｉｏｎ）を意味する。抗体分子の重鎖及び軽鎖にはそれぞれ３箇所のＣＤＲがあることが知られている。ＣＤＲは、超可変領域（ｈｙｐｅｒｖａｒｉａｂｌｅ ｒｅｇｉｏｎ）とも呼ばれ、抗体の重鎖及び軽鎖の可変領域内にあって、一次構造の変異性が特に高い部位であり、重鎖及び軽鎖のポリペプチド鎖の一次構造上において、それぞれ３ヶ所に分離している。本明細書中においては、抗体のＣＤＲについて、重鎖のＣＤＲを重鎖アミノ酸配列のアミノ末端側からＣＤＲＨ１、ＣＤＲＨ２、ＣＤＲＨ３と表記し、軽鎖のＣＤＲを軽鎖アミノ酸配列のアミノ末端側からＣＤＲＬ１、ＣＤＲＬ２、ＣＤＲＬ３と表記する。これらの部位は立体構造の上で相互に近接し、結合する抗原に対する特異性を決定している。

[0038] 本明細書中、「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする」とは、市販のハイブリダイゼーション溶液ＥｘｐｒｅｓｓＨｙｂ Ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ Ｓｏｌｕｔｉｏｎ（クロンテック社）中、６８℃でハイブリダイズすること、又はＤＮＡを固定したフィルターを用いて０．７～１．０ＭのＮａＣｌ存在下６８℃でハイブリダイゼーションを行った後、０．１～２倍濃度のＳＳＣ溶液（１倍濃度ＳＳＣとは１５０ｍＭ ＮａＣｌ、１５ｍＭクエン酸ナトリウムからなる）を用い、６８℃で洗浄することによって同定することができる条件又はそれと同等の条件でハイブリダイズすることをいう。

[0039] 本明細書中、「１～数個」とは、１～１０個、１～９個、１～８個、１～７個、１～６個、１～５個、１～４個、１～３個又は１～２個を意味する。

[0040] １．ＣＤＨ６

カドヘリンは、細胞膜表面に存在する糖タンパク質で、カルシウムイオン依存的にＮ末端側の細胞外ドメイン同士が結合することで、細胞間接着分子として、また細胞間相互作用を担うシグナル分子として機能する。カドヘリンスーパーファミリーの内、クラシックカドヘリンに分類される分子群は、

細胞外に５個の細胞外ドメイン（ＥＣドメイン）と１個の膜貫通領域、及び細胞内ドメインから構成される１回膜貫通タンパク質である。

[0041] ＣＤＨ６（Ｃａｄｈｅｒｉｎ－６） は、タイプIIカドヘリンファミリーに分類される、７９０アミノ酸からなる１回膜貫通タンパク質であり、Ｎ末端側を細胞外、Ｃ末端側を細胞内に持つ。ヒトＣＤＨ６遺伝子は１９９５年に初めてクローニングされ（非特許文献１）、ＮＭ＿００４９３２、ＮＰ＿００４９２３（ＮＣＢＩ）等のアクセッション番号により参照可能である。

[0042] 本発明で用いるＣＤＨ６タンパク質は、ヒト、非ヒト哺乳動物（ラット、マウス、サル等）のＣＤＨ６発現細胞から直接精製して使用するか、あるいは当該細胞の細胞膜画分を調製して使用することができ、また、ＣＤＨ６をｉｎ ｖｉｔｒｏにて合成する、あるいは遺伝子操作によって宿主細胞に産生させることによって得ることができる。遺伝子操作では、具体的には、ＣＤＨ６ ｃＤＮＡを発現可能なベクターに組み込んだ後、転写と翻訳に必要な酵素、基質及びエネルギー物質を含む溶液中で合成する、あるいは他の原核生物、又は真核生物の宿主細胞を形質転換させることによってＣＤＨ６を発現させることによって、該タンパク質を得ることが出来る。また、前記の遺伝子操作によるＣＤＨ６発現細胞、あるいはＣＤＨ６を発現している細胞株をＣＤＨ６タンパク質として使用することも可能である。また、ＣＤＨ６のｃＤＮＡを組み込んだ発現ベクターを直接被免疫動物に投与し被免疫動物の体内でＣＤＨ６を発現させることもできる。

[0043] また、上記ＣＤＨ６のアミノ酸配列において、１又は数個のアミノ酸が置換、欠失及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、当該タンパク質と同等の生物活性を有するタンパク質もＣＤＨ６に含まれる。

[0044] ヒトＣＤＨ６タンパク質は、配列番号１に記載のアミノ酸配列を有する。ヒトＣＤＨ６タンパク質の細胞外領域は、配列番号１に記載のアミノ酸配列の５４～１５９番目のアミノ酸配列を有する細胞外ドメイン１（本明細書中、ＥＣ１とも称する）、配列番号１に記載のアミノ酸配列の１６０～２６８番目のアミノ酸配列を有する細胞外ドメイン２（本明細書中、ＥＣ２とも称

する。）、配列番号１に記載のアミノ酸配列の２６９～３８３番目のアミノ酸配列を有する細胞外ドメイン３（本明細書中、ＥＣ３とも称する。）、配列番号１に記載のアミノ酸配列の３８４～４８６番目のアミノ酸配列を有する細胞外ドメイン４（本明細書中、ＥＣ４とも称する。）、及び配列番号１に記載のアミノ酸配列の４８７～６０８番目のアミノ酸配列を有する細胞外ドメイン５（本明細書中、ＥＣ５とも称する。）から構成される。ＥＣ１～ＥＣ５のアミノ酸配列を、それぞれ、配列番号２～６とする（表１）。

[0045] ２．抗ＣＤＨ６抗体の製造

本発明の抗ＣＤＨ６抗体の一例として、配列番号４に示すアミノ酸配列を含むアミノ酸配列を認識し、かつ内在化活性を有する抗ＣＤＨ６抗体を挙げることができる。本発明の抗ＣＤＨ６抗体の一例として、配列番号４に示すアミノ酸配列を含むアミノ酸配列を特異的に認識し、かつ内在化活性を有する抗ＣＤＨ６抗体を挙げることができる。本発明の抗ＣＤＨ６抗体の一例として、配列番号４に示すアミノ酸配列からなるアミノ酸配列を認識し、かつ内在化活性を有する抗ＣＤＨ６抗体を挙げることができる。本発明の抗ＣＤＨ６抗体の一例として、配列番号４に示すアミノ酸配列からなるアミノ酸配列を特異的に認識し、かつ内在化活性を有する抗ＣＤＨ６抗体を挙げることができる。抗体が「配列番号４に示すアミノ酸配列を含むアミノ酸配列を特異的に認識」する又は「ＥＣ３ドメインを特異的に認識」するとは、抗体が、ＣＤＨ６のＥＣ３ドメインをＣＤＨ６の他の細胞外ドメインと比較して強く認識する又は強く結合することをいう。

[0046] 本発明の抗ＣＤＨ６抗体は、いずれの種に由来してもよいが、好ましくは、ヒト、サル、ラット、マウス又はウサギを例示できる。ヒト以外の種に由来する場合は、周知の技術を用いて、キメラ化又はヒト化することが好ましい。本発明の抗体は、ポリクローナル抗体であっても、モノクローナル抗体であってもよいが、モノクローナル抗体が好ましい。

[0047] 本発明の抗ＣＤＨ６抗体は腫瘍細胞を標的にできる抗体であり、すなわち腫瘍細胞を認識できる特性、腫瘍細胞に結合できる特性、及び／又は腫瘍細

胞内に取り込まれて内在化する特性等を備えている。したがって、本発明の抗ＣＤＨ６抗体と抗腫瘍活性を有する化合物を、リンカーを介して結合させて抗体－薬物コンジュゲートとすることができる。

[0048] 抗体の腫瘍細胞への結合性は、フローサイトメトリーを用いて確認できる。腫瘍細胞内への抗体の取り込みは、（１）治療抗体に結合する二次抗体（蛍光標識）を用いて細胞内に取り込まれた抗体を蛍光顕微鏡で可視化するアッセイ（Ｃｅｌｌ Ｄｅａｔｈ ａｎｄ Ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｉｏｎ，２００８，１５，７５１－７６１）、（２）治療抗体に結合する二次抗体（蛍光標識）を用いて細胞内に取り込まれた蛍光量を測定するアッセイ（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ ｏｆ ｔｈｅ Ｃｅｌｌ Ｖｏｌ．１５，５２６８－５２８２，Ｄｅｃｅｍｂｅｒ ２００４）又は（３）治療抗体に結合するイムノトキシンを用いて、細胞内に取り込まれると毒素が放出されて細胞増殖が抑制されるというＭａｂ－ＺＡＰアッセイ（Ｂｉｏ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ２８：１６２－１６５，Ｊａｎｕａｒｙ ２０００）を用いて確認できる。イムノトキシンとしては、ジフテテリア毒素の触媒領域とプロテインＧとのリコンビナント複合タンパク質タンパク質も使用可能である。

[0049] 本明細書で言う「高い内在化能」とは、当該抗体とサポリン標識抗ラットＩｇＧ抗体を投与したＣＤＨ６発現細胞の生存率（抗体未添加時の細胞生存率を１００％とした相対率で表したもの）が、好ましくは７０％以下、より好ましくは６０％以下であることを意味する。

[0050] 抗体－薬物コンジュゲートは抗腫瘍効果を発揮する化合物を結合させてあるので、抗体自体が抗腫瘍効果を有することは、好ましいが、必須ではない。抗腫瘍性化合物の細胞傷害性を腫瘍細胞において特異的及び／又は選択的に発揮させる目的からは、抗体が内在化して腫瘍細胞内に移行する性質のあることが重要であり、好ましい。

[0051] 抗ＣＤＨ６抗体は、この分野で通常実施される方法を用いて、抗原となるポリペプチドを動物に免疫し、生体内に産生される抗体を採取、精製するこ

とによって得ることができるが、好ましくは、立体構造を保持したＣＤＨ６を抗原として用いることが好ましい。そのような方法として、ＤＮＡ免疫法を挙げることができる。

[0052] 抗原の由来はヒトに限定されず、マウス、ラット等のヒト以外の動物に由来する抗原を動物に免疫することもできる。この場合には、取得された異種抗原に結合する抗体とヒト抗原との交差性を試験することによって、ヒトの疾患に適用可能な抗体を選別できる。

[0053] また、公知の方法（例えば、Ｋｏｈｌｅｒ ａｎｄ Ｍｉｌｓｔｅｉｎ，Ｎａｔｕｒｅ（１９７５）２５６，４９５－４９７、Ｋｅｎｎｅｔ，Ｒ．ｅｄ．，Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，３６５－３６７，Ｐｌｅｎｕｍ Ｐｒｅｓｓ，Ｎ．Ｙ．（１９８０））に従って、抗原に対する抗体を産生する抗体産生細胞とミエローマ細胞とを融合させることによってハイブリドーマを樹立し、モノクローナル抗体を得ることもできる。

[0054] 以下、具体的にＣＤＨ６に対する抗体の取得方法を説明する。

[0055] （１）抗原の調製

抗原は抗原タンパク質をコードする遺伝子を遺伝子操作によって宿主細胞に産生させることによって得ることができる。具体的には、抗原遺伝子を発現可能なベクターを作製し、これを宿主細胞に導入して該遺伝子を発現させ、発現した抗原を精製すればよい。上記の遺伝子操作による抗原発現細胞、あるいは抗原を発現している細胞株を動物に免疫する方法を用いることによっても抗体を取得できる。

[0056] また、抗原タンパク質を用いずに、抗原タンパク質のｃＤＮＡを発現ベクターに組み込んで被免疫動物に投与し、被免疫動物の体内で抗原タンパク質を発現させ、抗原タンパク質に対する抗体を産生させることによっても抗体を取得することができる。

[0057] （２）抗ＣＤＨ６モノクローナル抗体の製造

本発明で使用される抗ＣＤＨ６抗体は、特に制限はないが、例えば、本願の配列表で示されたアミノ酸配列で特定される抗体を好適に使用することが

できる。本発明において使用される抗ＣＤＨ６抗体としては、以下の特性を有するものが望ましい。

（１）以下の特性を有することを特徴とする抗体；

（ａ）ＣＤＨ６に特異的に結合する

（ｂ）ＣＤＨ６と結合することによってＣＤＨ６発現細胞に内在化する活性を有する

（２）ＣＤＨ６がヒトＣＤＨ６である上記（１）に記載の抗体又は当該抗体。

（３）ヒトＣＤＨ６のＥＣ３を特異的に認識し、かつ内在化活性を有する

本発明のＣＤＨ６に対する抗体の取得方法は、抗ＣＤＨ６抗体を取得できる限りにおいて、特に制限されないが、高次構造を保持したＣＤＨ６を抗原として用いることが好ましい。

[0058] 好ましい抗体の取得方法の一例としてＤＮＡ免疫法を挙げることができる。ＤＮＡ免疫法とは、抗原発現プラスミドをマウスやラットなどの動物個体に遺伝子導入し、抗原を個体内で発現させることによって、抗原に対する免疫を誘導する手法である。遺伝子導入の手法には、直接プラスミドを筋肉に注射する方法や、リポソームやポリエチレンイミンなどの導入試薬を静脈注射する方法、ウイルスベクターを用いる手法、プラスミドを付着させた金粒子をＧｅｎｅ　Ｇｕｎにより射ち込む手法、急速に大量のプラスミド溶液を静脈注射するＨｙｄｒｏｄｙｎａｍｉｃ法などが存在する。発現プラスミドの筋注による遺伝子導入法に関して、発現量を向上させる手法として、プラスミドを筋注後、同部位にエレクトロポレーションを加えるｉｎ　ｖｉｖｏ　ｅｌｅｃｔｒｏｐｏｒａｔｉｏｎという技術が知られている（Ａｉｈａｒａ Ｈ，Ｍｉｙａｚａｋｉ Ｊ．Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１９９８ Ｓｅｐ；１６（９）：８６７－７０又はＭｉｒ ＬＭ，Ｂｕｒｅａｕ ＭＦ，Ｇｅｈｌ Ｊ，Ｒａｎｇａｒａ Ｒ，Ｒｏｕｙ Ｄ，Ｃａｉｌｌａｕｄ ＪＭ，Ｄｅｌａｅｒｅ Ｐ，Ｂｒａｎｅｌｌｅｃ Ｄ，Ｓｃｈｗａｒｔｚ Ｂ，Ｓｃｈｅｒｍａｎ Ｄ．Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ

ＳＡ．１９９９　Ａｐｒ　１３；９６（８）：４２６２－７．）。本手法はプラスミドの筋注前にヒアルロニダーゼで筋肉を処理することにより、さらに発現量が向上する（ＭｃＭａｈｏｎ　ＪＭ1，　Ｓｉｇｎｏｒｉ　Ｅ，Ｗｅｌｌｓ　ＫＥ，Ｆａｚｉｏ　ＶＭ，Ｗｅｌｌｓ　ＤＪ．Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒ．２００１　Ａｕｇ；８（１６）：１２６４－７０）。また、ハイブリドーマの作製は公知の方法によって行うことができ、例えば、Ｈｙｂｒｉｍｕｎｅ　Ｈｙｂｒｉｄｏｍａ　Ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ　Ｓｙｓｔｅｍ（Ｃｙｔｏ　Ｐｕｌｓｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ社）を用いて行うこともできる。

[0059]　具体的なモノクローナル抗体取得の例としては、以下を挙げることができる。

（ａ）ＣＤＨ６のｃＤＮＡを発現ベクター（例えば、ｐｃＤＮＡ３．１：Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）に組み込み、エレクトロポレーションや遺伝子銃等の方法によって、そのベクターを直接被免疫動物（例えば、ラットやマウス）に投与することによって、動物体内においてＣＤＨ６を発現させることによって、免疫反応を誘起させることができる。エレクトロポレーション等によるベクターの投与は抗体価を上げるために必要であれば、１回でも複数回でもよく、好ましくは複数回である；

（ｂ）免疫反応を誘起された上述の動物より、抗体産生細胞を含む組織（例えばリンパ節）を採取する；

（ｃ）骨髄腫細胞（以下「ミエローマ」という）（例えば、マウスミエローマＳＰ２／０－ａｇ１４細胞）の調製；

（ｄ）抗体産生細胞とミエローマとの細胞融合；

（ｅ）目的とする抗体を産生するハイブリドーマ群の選別；

（ｆ）単一細胞クローンへの分割（クローニング）；

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

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

[0060] ここで用いられる抗体価の測定法としては、例えば、フローサイトメトリー又はＣｅｌｌ－ＥＬＩＳＡ法を挙げることができるがこれらの方法に制限されない。

[0061] このようにして樹立されたハイブリドーマ株の例としては、抗ＣＤＨ６抗体産生ハイブリドーマｒＧ０１９、ｒＧ０５５、ｒＧ０５６及びｒＧ０６１を挙げることができる。なお、本明細書中においては、抗ＣＤＨ６抗体産生ハイブリドーマｒＧ０１９が産生する抗体を、「ｒＧ０１９抗体」又は単に「ｒＧ０１９」と記載し、ハイブリドーマｒＧ０５５が産生する抗体を、「ｒＧ０５５抗体」又は単に「ｒＧ０５５」と記載し、ハイブリドーマｒＧ０５６が産生する抗体を、「ｒＧ０５６抗体」又は単に「ｒＧ０５６」と記載し、ハイブリドーマｒＧ０６１が産生する抗体を、「ｒＧ０６１抗体」又は単に「ｒＧ０６１」とする。

[0062] ｒＧ０１９抗体の軽鎖可変領域は、配列番号１０に示されるアミノ酸配列からなる。該ｒＧ０１９抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号１１に示されるヌクレオチド配列でコードされる。ｒＧ０１９抗体の軽鎖可変領域は、配列番号１２に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１、配列番号１３に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２及び配列番号１４に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ３を有する。ｒＧ０１９抗体の重鎖可変領域は、配列番号１５に示されるアミノ酸配列からなる。該ｒＧ０１９抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号１６に示されるヌクレオチド配列でコードされる。ｒＧ０１９抗体の重鎖可変領域は、配列番号１７に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１、配列番号１８に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２及び配列番号１９に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３を有する。ｒＧ０１９抗体の配列を表１に示す。

[0063] ｒＧ０５５抗体の軽鎖可変領域は、配列番号２０に示されるアミノ酸配列からなる。該ｒＧ０５５抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号２１に示されるヌクレオチド配列でコードされる。ｒＧ０５５抗体の軽鎖可変領域は、配列番号２２に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１、配列番

号２３に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２及び配列番号２４に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ３を有する。ｒＧ０５５抗体の重鎖可変領域は、配列番号２５に示されるアミノ酸配列からなる。該ｒＧ０５５抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号２６に示されるヌクレオチド配列でコードされる。ｒＧ０５５抗体の重鎖可変領域は、配列番号２７に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１、配列番号２８に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２及び配列番号２９に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３を有する。ｒＧ０５５抗体の配列を表１に示す。

[0064] ｒＧ０５６抗体の軽鎖可変領域は、配列番号３０に示されるアミノ酸配列からなる。該ｒＧ０５６抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号３１に示されるヌクレオチド配列でコードされる。ｒＧ０５６抗体の軽鎖可変領域は、配列番号３２に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１、配列番号３３に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２及び配列番号３４に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ３を有する。ｒＧ０５６抗体の重鎖可変領域は、配列番号３５に示されるアミノ酸配列からなる。該ｒＧ０５６抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号３６に示されるヌクレオチド配列でコードされる。ｒＧ０５６抗体の重鎖可変領域は、配列番号３７に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１、配列番号３８に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２及び配列番号３９に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３を有する。ｒＧ０５６抗体の配列を表１に示す。

[0065] ｒＧ０６１抗体の軽鎖可変領域は、配列番号４０に示されるアミノ酸配列からなる。該ｒＧ０６１抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号４１に示されるヌクレオチド配列でコードされる。ｒＧ０６１抗体の軽鎖可変領域は、配列番号４２に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１、配列番号４３に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２及び配列番号４４に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ３を有する。ｒＧ０６１抗体の重鎖可変領域は、配列番号４５に示されるアミノ酸配列からなる。該ｒＧ０６１抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号４６に示されるヌクレオチド配

列でコードされる。ｒＧ０６１抗体の重鎖可変領域は、配列番号４７に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１、配列番号４８に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２及び配列番号４９に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３を有する。ｒＧ０６１抗体の配列を表１に示す。

[0066] さらに、「２．抗ＣＤＨ６抗体の製造」（ａ）乃至（ｈ）の工程を再度実施して別途に独立してモノクローナル抗体を取得した場合や他の方法によって別途にモノクローナル抗体を取得した場合においても、ｒＧ０１９抗体、ｒＧ０５５抗体、ｒＧ０５６抗体又はｒＧ０６１抗体と同等の内在化活性を有する抗体を取得することが可能である。このような抗体の一例として、ｒＧ０１９抗体、ｒＧ０５５抗体、ｒＧ０５６抗体又はｒＧ０６１抗体と同一のエピトープに結合する抗体を挙げることができる。新たに作製されたモノクローナル抗体が、ｒＧ０１９抗体、ｒＧ０５５抗体、ｒＧ０５６抗体又はｒＧ０６１抗体の結合する部分ペプチド又は部分立体構造に結合すれば、該モノクローナル抗体がｒＧ０１９抗体、ｒＧ０５５抗体、ｒＧ０５６抗体又はｒＧ０６１抗体と同一のエピトープに結合すると判定することができる。また、ｒＧ０１９抗体、ｒＧ０５５抗体、ｒＧ０５６抗体又はｒＧ０６１抗体のＣＤＨ６に対する結合に対して該モノクローナル抗体が競合する（即ち、該モノクローナル抗体が、ｒＧ０１９抗体、ｒＧ０５５抗体、ｒＧ０５６抗体又はｒＧ０６１抗体とＣＤＨ６の結合を妨げる）ことを確認することによって、具体的なエピトープの配列又は構造が決定されていなくても、該モノクローナル抗体が抗ＣＤＨ６抗体と同一のエピトープに結合すると判定することができる。エピトープが同一であることが確認された場合、該モノクローナル抗体がｒＧ０１９抗体、ｒＧ０５５抗体、ｒＧ０５６抗体又はｒＧ０６１抗体と同等の抗原結合能、生物活性及び／又は内在化活性を有していることが強く期待される。

[0067] （３）その他の抗体

本発明の抗体には、上記ＣＤＨ６に対するモノクローナル抗体に加え、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺

伝子組換え型抗体、例えば、キメラ（Ｃｈｉｍｅｒｉｃ）抗体、ヒト化（Ｈｕｍａｎｉｚｅｄ）抗体又はヒト抗体等も含まれる。これらの抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。

[0068] キメラ抗体としては、抗体の可変領域と定常領域が互いに異種である抗体、例えばマウス又はラット由来抗体の可変領域をヒト由来の定常領域に接合したキメラ抗体を挙げることができる（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．，８１，６８５１－６８５５，（１９８４）参照）。

[0069] ラット抗ヒトＣＤＨ６抗体由来のキメラ抗体の例としては、例えば、本明細書に記載のラット抗ヒトＣＤＨ６抗体（例えば、ｒＧ０１９抗体、ｒＧ０５５抗体、ｒＧ０５６抗体又はｒＧ０６１抗体）の各軽鎖可変領域とヒト由来の定常領域を含む軽鎖、及び、各重鎖可変領域とヒト由来の定常領域を含む重鎖からなる抗体が挙げられる。

[0070] ラット抗ヒトＣＤＨ６抗体由来のキメラ抗体の別の例としては、例えば、本明細書に記載のラット抗ヒトＣＤＨ６抗体（例えば、ｒＧ０１９抗体、ｒＧ０５５抗体、ｒＧ０５６抗体又はｒＧ０６１抗体）の各軽鎖可変領域中の１～数残基、１～３残基、１～２残基、好ましくは１残基のアミノ酸を別のアミノ酸残基に置換した軽鎖可変領域を含む軽鎖、及び、各重鎖可変領域中の１～数残基、１～３残基、１～２残基、好ましくは１残基のアミノ酸を別のアミノ酸残基に置換した重鎖可変領域を含む重鎖からなる抗体が挙げられ、当該抗体は任意のヒト由来の定常領域を有していてよい。

[0071] ラット抗ヒトＣＤＨ６抗体由来のキメラ抗体の別の例としては、例えば、本明細書に記載のラット抗ヒトＣＤＨ６抗体（例えば、ｒＧ０１９抗体、ｒＧ０５５抗体、ｒＧ０５６抗体又はｒＧ０６１抗体）の各軽鎖可変領域中のいずれか１～３個のＣＤＲ中の１～２残基、好ましくは１残基のアミノ酸を別のアミノ酸残基に置換した軽鎖可変領域を含む軽鎖、及び、各重鎖可変領域中のいずれか１～３個のＣＤＲ中の１～２残基、好ましくは１残基のアミノ酸を別のアミノ酸残基に置換した重鎖可変領域を含む重鎖からなる抗体が挙げられ、当該抗体は任意のヒト由来の定常領域を有していてよい。

[0072] ｒＧＯ１９抗体由来のキメラ抗体としては、例えば、配列番号１０に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖、及び、配列番号１５に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖からなる抗体が挙げられ、当該抗体は任意のヒト由来の定常領域を有していてよい。

[0073] ｒＧＯ１９抗体由来のキメラ抗体の別の例としては、例えば、配列番号１０に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域中の１～数残基、１～３残基、１～２残基、好ましくは１残基のアミノ酸を別のアミノ酸残基に置換した軽鎖可変領域を含む軽鎖、及び、配列番号１５に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域中の１～数残基、１～３残基、１～２残基、好ましくは１残基のアミノ酸を別のアミノ酸残基に置換した重鎖可変領域を含む重鎖からなる抗体が挙げられ、当該抗体は任意のヒト由来の定常領域を有していてよい。

[0074] ｒＧＯ１９抗体由来のキメラ抗体の別の例としては、例えば、配列番号１０に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域中のいずれか１～３個のＣＤＲ中の１又は２残基（好ましくは１残基）のアミノ酸を別のアミノ酸残基に置換した軽鎖可変領域を含む軽鎖、及び、配列番号１５に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域中のいずれか１～３個のＣＤＲ中の１又は２残基（好ましくは１残基）のアミノ酸を別のアミノ酸残基に置換した重鎖可変領域を含む重鎖からなる抗体が挙げられ、当該抗体は任意のヒト由来の定常領域を有していてよい。

[0075] ｒＧＯ１９抗体由来のキメラ抗体の別の例としては、例えば、配列番号１０に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖、及び、配列番号５８に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖からなる抗体が挙げられ、当該抗体は任意のヒト由来の定常領域を有していてよい。配列番号５８に示されるアミノ酸配列は、配列番号１５に示されるアミノ酸配列中のＣＤＲＨ２中のシステイン残基をプロリン残基に置換した配列である。

[0076] ｒＧＯ１９抗体由来のキメラ抗体の具体例としては、配列番号５３に示さ

れる軽鎖全長アミノ酸配列からなる軽鎖、及び、配列番号５６に示される重鎖全長アミノ酸配列からなる重鎖からなる抗体が挙げられ、当該キメラ抗ヒトＣＤＨ６抗体を本明細書中、「キメラＧ０１９抗体」、「ｃｈＧ０１９抗体」又は「ｃｈＧ０１９」と称する。ｃｈＧ０１９抗体の軽鎖全長アミノ酸配列は配列番号５４に示されるヌクレオチド配列でコードされ、ｃｈＧ０１９抗体の重鎖全長アミノ酸配列は配列番号５７に示されるヌクレオチド配列でコードされる。

[0077] ｃｈＧ０１９抗体の軽鎖可変領域アミノ酸配列は、ｒＧ０１９抗体の軽鎖可変領域アミノ酸配列と同一であり、配列番号１０に示されるアミノ酸配列からなる。ｃｈＧ０１９抗体の軽鎖は、配列番号１２に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１、配列番号１３に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２及び配列番号１４に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ３を有し、それぞれ、ｒＧ０１９の軽鎖のＣＤＲＬ１、ＣＤＲＬ２及びＣＤＲＬ３と同一である。ｃｈＧ０１９抗体の軽鎖可変領域アミノ酸は、配列番号５５に示されるヌクレオチド配列でコードされる。

[0078] ｃｈＧ０１９抗体の重鎖可変領域アミノ酸配列は、配列番号５８に示されるアミノ酸配列からなる。ｃｈＧ０１９抗体の重鎖は、配列番号１７に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１、配列番号６０に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２及び配列番号１９に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３を有する。配列番号５８に示されるアミノ酸配列は、配列番号１５に示されるアミノ酸配列中のＣＤＲＨ２中のシステイン残基をプロリン残基に置換した配列である。配列番号６０に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２は、配列番号１８に示されるｒＧ０１９　ＣＤＲＨ２中のシステイン残基をプロリン残基に置換した配列である。ｃｈＧ０１９抗体の重鎖可変領域アミノ酸配列は、配列番号５９に示されるヌクレオチド配列でコードされる。

[0079] ｃｈＧ０１９抗体の配列を表１に示す。

[0080] ラット抗ヒトＣＤＨ６抗体ｒＧ０５５抗体由来のキメラ抗体としては、例

えば、配列番号２０に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖、及び、配列番号２５に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖からなるキメラ抗体が挙げられ、当該抗体は任意のヒト由来の定常領域を有していてよい。

[0081] ラット抗ヒトＣＤＨ６抗体ｒＧ０５６抗体由来のキメラ抗体としては、例えば、配列番号３０に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖、及び、配列番号３５に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖からなるキメラ抗体が挙げられ、当該抗体は任意のヒト由来の定常領域を有していてよい。

[0082] ラット抗ヒトＣＤＨ６抗体ｒＧ０６１抗体由来のキメラ抗体としては、例えば、配列番号４０に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖、及び、配列番号４５に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖からなるキメラ抗体が挙げられ、当該抗体は任意のヒト由来の定常領域を有していてよい。

[0083] ヒト化抗体としては、相補性決定領域（ＣＤＲ；Ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔａｒｉｔｙ Ｄｅｔｅｒｍｉｎｉｎｇ Ｒｅｇｉｏｎ）のみをヒト由来の抗体に組み込んだ抗体（Ｎａｔｕｒｅ（１９８６）３２１，ｐ．５２２－５２５参照）、ＣＤＲ移植法によって、ＣＤＲの配列に加え一部のフレームワークのアミノ酸残基もヒト抗体に移植した抗体（国際公開第９０／０７８６１号）、更に、抗原に対する結合能を維持しつつ、一部のＣＤＲのアミノ酸配列を改変した抗体を挙げることができる。

[0084] 本明細書において、ｒＧ０１９抗体、ｒＧ０５５抗体、ｒＧ０５６抗体、ｒＧ０６１抗体又はｃｈＧ０１９抗体由来のヒト化抗体とは、ｒＧ０１９抗体、ｒＧ０５５抗体、ｒＧ０５６抗体、ｒＧ０６１抗体又はｃｈＧ０１９抗体のいずれかについて、各々に固有の６つのＣＤＲ配列を全て保持し、かつ、内在化活性を有するヒト化抗体であればよく、特定のヒト化抗体に限定されない。当該ヒト化抗体は、内在化活性を有する限り、更に一部のＣＤＲの一部のアミノ酸配列が改変されていてもよい。

[0085] ｃｈＧ０１９抗体のヒト化抗体の実例としては、（１）配列番号６３又は６７に記載のアミノ酸配列、（２）上記（１）のアミノ酸配列に対して少なくとも９５％以上の同一性を有するアミノ酸配列（好ましくは、各ＣＤＲ配列以外のフレームワーク領域の配列に対して少なくとも９５％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列）、及び（３）上記（１）のアミノ酸配列において１又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなる群から選択されるいずれか１つに記載の軽鎖可変領域を含む軽鎖、並びに（４）配列番号７１、７５又は７９に記載のアミノ酸配列、（５）上記（４）のアミノ酸配列に対して少なくとも９５％以上の同一性を有するアミノ酸配列（好ましくは、各ＣＤＲ配列以外のフレームワーク領域の配列に対して少なくとも９５％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列）、及び（６）上記（４）のアミノ酸配列において１又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなる群から選択されるいずれか１つに記載の重鎖可変領域を含む重鎖の任意の組合せを挙げることができる。

[0086] また、重鎖又は軽鎖の一方をヒト化し、他方をラット抗体やキメラ抗体の軽鎖又は重鎖とした抗体も用いることができる。そのような抗体の例としては、（１）配列番号６３又は６７に記載のアミノ酸配列、（２）上記（１）のアミノ酸配列に対して少なくとも９５％以上の同一性を有するアミノ酸配列（好ましくは、各ＣＤＲ配列以外のフレームワーク領域の配列に対して少なくとも９５％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列）、及び（３）上記（１）のアミノ酸配列において１又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなる群から選択されるいずれか１つに記載の軽鎖可変領域を含む軽鎖、並びに（４）配列番号１５、２５、３５、４５又は５８に記載のアミノ酸配列、（５）上記（４）のアミノ酸配列に対して少なくとも９５％以上の同一性を有するアミノ酸配列（好ましくは、各ＣＤＲ配列以外のフレームワーク領域の配列に対して少なくとも９５％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列）、及び（６）上記（４）のアミノ酸配列において１又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなる群か

ら選択されるいずれか１つに記載の重鎖可変領域を含む重鎖の任意の組合せを挙げることができる。他の例としては、（１）配列番号１０、２０、３０又は４０に記載のアミノ酸配列、（２）上記（１）のアミノ酸配列に対して少なくとも９５％以上の同一性を有するアミノ酸配列（好ましくは、各ＣＤＲ配列以外のフレームワーク領域の配列に対して少なくとも９５％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列）、及び（３）上記（１）のアミノ酸配列において１又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなる群から選択されるいずれか１つに記載の軽鎖可変領域を含む軽鎖、並びに（４）配列番号７１、７５又は７９に記載のアミノ酸配列、（５）上記（４）のアミノ酸配列に対して少なくとも９５％以上の同一性を有するアミノ酸配列（好ましくは、各ＣＤＲ配列以外のフレームワーク領域の配列に対して少なくとも９５％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列）、及び（６）上記（４）のアミノ酸配列において１又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなる群から選択されるいずれか１つに記載の重鎖可変領域を含む重鎖の任意の組合せを挙げることができる。

[0087] また、本明細書中におけるアミノ酸の置換としては保存的アミノ酸置換が好ましい。保存的アミノ酸置換とは、アミノ酸側鎖に関連のあるアミノ酸グループ内で生じる置換である。好適なアミノ酸グループは、以下のとおりである：酸性グループ＝アスパギン酸、グルタミン酸；塩基性グループ＝リシン、アルギニン、ヒスチジン；非極性グループ＝アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン；及び非帯電極性ファミリー＝グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、スレオニン、チロシン。他の好適なアミノ酸グループは次のとおりである：脂肪族ヒドロキシグループ＝セリン及びスレオニン；アミド含有グループ＝アスパラギン及びグルタミン；脂肪族グループ＝アラニン、バリン、ロイシン及びイソロイシン；並びに芳香族グループ＝フェニルアラニン、トリプトファン及びチロシン。かかるアミノ酸置換は元のアミノ酸配列を有する物質の特性を低下させない範囲で行うのが好ましい。

[0088] 上記軽鎖及び重鎖の好適な組合せの抗体としては、配列番号６３に示される軽鎖可変領域アミノ酸配列（本明細書中、ｈＬ０２軽鎖可変領域アミノ酸配列とも称する）を有する軽鎖又は配列番号６７に示される軽鎖可変領域アミノ酸配列（本明細書中、ｈＬ０３軽鎖可変領域アミノ酸配列とも称する）を有する軽鎖、及び、配列番号７１に示される重鎖可変領域アミノ酸配列（本明細書中、ｈＨ０１重鎖可変領域アミノ酸配列とも称する）を有する重鎖、配列番号７５に示される重鎖可変領域アミノ酸配列（本明細書中、ｈＨ０２重鎖可変領域アミノ酸配列とも称する）を有する重鎖又は配列番号７９に示される重鎖可変領域アミノ酸配列（本明細書中、ｈＨ０４重鎖可変領域アミノ酸配列とも称する）を有する重鎖からなる抗体が挙げられる。好ましい例としては、配列番号６３に示される軽鎖可変領域アミノ酸配列を有する軽鎖及び配列番号７１に示される重鎖可変領域アミノ酸配列を有する重鎖からなる抗体；配列番号６３に示される軽鎖可変領域アミノ酸配列を有する軽鎖及び配列番号７５に示される重鎖可変領域アミノ酸配列を有する重鎖からなる抗体；配列番号６３に示される軽鎖可変領域アミノ酸配列を有する軽鎖及び配列番号７９に示される重鎖可変領域アミノ酸配列を有する重鎖からなる抗体；配列番号６７に示される軽鎖可変領域アミノ酸配列を有する軽鎖及び配列番号７１に示される重鎖可変領域アミノ酸配列を有する重鎖からなる抗体；配列番号６７に示される軽鎖可変領域アミノ酸配列を有する軽鎖及び配列番号７５に示される重鎖可変領域アミノ酸配列を有する重鎖からなる抗体；又は、配列番号６７に示される軽鎖可変領域アミノ酸配列を有する軽鎖及び配列番号７９に示される重鎖可変領域アミノ酸配列を有する重鎖からなる抗体が挙げられる。より好ましい例としては、配列番号６３に示される軽鎖可変領域アミノ酸配列を有する軽鎖及び配列番号７１に示される重鎖可変領域アミノ酸配列を有する重鎖からなる抗体；配列番号６３に示される軽鎖可変領域アミノ酸配列を有する軽鎖及び配列番号７５に示される重鎖可変領域アミノ酸配列を有する重鎖からなる抗体；配列番号６３に示される軽鎖可変領域アミノ酸配列を有する軽鎖及び配列番号７９に示される重鎖可変領域ア

ミノ酸配列を有する重鎖からなる抗体；又は、配列番号６７に示される軽鎖可変領域アミノ酸配列を有する軽鎖及び配列番号７５に示される重鎖可変領域アミノ酸配列を有する重鎖からなる抗体が挙げられる。

[0089] 上記軽鎖及び重鎖の好適な組合せの抗体の別の例としては、配列番号６１に示される軽鎖全長アミノ酸配列（本明細書中、ｈＬ０２軽鎖全長アミノ酸配列とも称する）の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖又は配列番号６５に示される軽鎖全長アミノ酸配列（本明細書中、ｈＬ０３軽鎖全長アミノ酸配列とも称する）の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖、及び、配列番号６９に示される重鎖全長アミノ酸配列（本明細書中、ｈＨ０１重鎖全長アミノ酸配列とも称する）の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖、配列番号７３に示される重鎖全長アミノ酸配列（本明細書中、ｈＨ０２重鎖全長アミノ酸配列とも称する）の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖又は配列番号７７に示される重鎖全長アミノ酸配列（本明細書中、ｈＨ０４重鎖全長アミノ酸配列とも称する）の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖からなる抗体が挙げられる。好ましい例としては、配列番号６１に示される軽鎖全長アミノ酸配列の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号６９に示される重鎖全長アミノ酸配列の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖からなる抗体；配列番号６１に示される軽鎖全長アミノ酸配列の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号７３に示される重鎖全長アミノ酸配列の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖からなる抗体；配列番号６１に示される軽鎖全長アミノ酸配列の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号７７に示される重鎖全長アミノ酸配列の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖からなる抗体；配列番号６５に示される軽鎖全長アミノ酸配列の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号６９に示される重鎖全長アミノ酸配列の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖からなる抗体；配列番号６５に示される軽鎖全長アミノ酸配列の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号７３に示される重鎖全長

アミノ酸配列の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖からなる抗体；又は、配列番号６５に示される軽鎖全長アミノ酸配列の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号７７に示される重鎖全長アミノ酸配列の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖からなる抗体が挙げられる。より好ましい例としては、配列番号６１に示される軽鎖全長アミノ酸配列の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号６９に示される重鎖全長アミノ酸配列の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖からなる抗体（本明細書中、「Ｈ０１Ｌ０２抗体」又は「Ｈ０１Ｌ０２」とも称する）；配列番号６１に示される軽鎖全長アミノ酸配列の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号７３に示される重鎖全長アミノ酸配列の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖からなる抗体（本明細書中、「Ｈ０２Ｌ０２抗体」又は「Ｈ０２Ｌ０２」とも称する）；配列番号６１に示される軽鎖全長アミノ酸配列の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号７７に示される重鎖全長アミノ酸配列の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖からなる抗体（本明細書中、「Ｈ０４Ｌ０２抗体」又は「Ｈ０４Ｌ０２」とも称する）；又は、配列番号６５に示される軽鎖全長アミノ酸配列の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号７３に示される重鎖全長アミノ酸配列の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖からなる抗体（本明細書中、「Ｈ０２Ｌ０３抗体」又は「Ｈ０２Ｌ０３」とも称する）が挙げられる。Ｈ０１Ｌ０２抗体、Ｈ０２Ｌ０２抗体、Ｈ０２Ｌ０３抗体又はＨ０４Ｌ０２抗体の配列を表１に示す。

[0090] 上記の重鎖アミノ酸配列及び軽鎖アミノ酸配列と高い同一性を示す配列を組み合わせることによって、上記の各抗体と同等の生物活性を有する抗体を選択することが可能である。このような同一性は、一般的には８０％以上の同一性であり、好ましくは９０％以上の同一性であり、より好ましくは９５％以上の同一性であり、最も好ましくは９９％以上の同一性である。また、重鎖又は軽鎖のアミノ酸配列に１乃至数個のアミノ酸残基が置換、欠失又は

付加されたアミノ酸配列を組み合わせることによっても、上記の各抗体と同等の生物活性を有する抗体を選択することが可能である。

[0091] 二種類のアミノ酸配列間の同一性は、ＣｌｕｓｔａｌＷ ｖｅｒｓｉｏｎ ２ （Ｌａｒｋｉｎ ＭＡ, Ｂｌａｃｋｓｈｉｅｌｄｓ Ｇ, Ｂｒｏｗｎ ＮＰ, Ｃｈｅｎｎａ Ｒ, ＭｃＧｅｔｔｉｇａｎ ＰＡ, ＭｃＷｉｌｌｉａｍ Ｈ, Ｖａｌｅｎｔｉｎ Ｆ, Ｗａｌｌａｃｅ ＩＭ, Ｗｉｌｍ Ａ, Ｌｏｐｅｚ Ｒ, Ｔｈｏｍｐｓｏｎ ＪＤ, Ｇｉｂｓｏｎ ＴＪ ａｎｄ Ｈｉｇｇｉｎｓ ＤＧ（２００７），「ＣｌｕｓｔａｌＷ ａｎｄ ＣｌｕｓｔａｌＸ ｖｅｒｓｉｏｎ ２．０」, Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ．２３（２１）：２９４７－２９４８）のデフォルトパラメーターを使用して配列を整列させることによって決定することができる。

[0092] なお、配列番号６１に示されるｈＬ０２軽鎖全長アミノ酸配列中、１～２０番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列はシグナル配列であり、２１～１２８番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は可変領域であり、１２９～２３３番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は定常領域である。配列番号６２に示されるｈＬ０２軽鎖全長ヌクレオチド配列中、１～６０番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列はシグナル配列をコードし、６１～３８４番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列は可変領域をコードし、３８５～６９９番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列は定常領域をコードしている。

[0093] 配列番号６５に示されるｈＬ０３軽鎖全長アミノ酸配列中、１～２０番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列はシグナル配列であり、２１～１２８番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は可変領域であり、１２９～２３３番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は定常領域である。配列番号６６に示されるｈＬ０３軽鎖全長ヌクレオチド配列中、１～６０番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列はシグナル配列をコードし、６１～３８４番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列は可変領域をコードし、３８

５～６９９番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列は定常領域をコードしている。

[0094] 配列番号６９に示されるｈＨ０１重鎖全長アミノ酸配列中、１～１９番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列はシグナル配列であり、２０～１４１番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は可変領域であり、１４２～４７１番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は定常領域である。配列番号７０に示されるｈＨ０１重鎖全長ヌクレオチド配列中、１～５７番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列はシグナル配列をコードし、５８～４２３番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列は可変領域をコードし、４２４～１４１３番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列は定常領域をコードしている。

[0095] 配列番号７３に示されるｈＨ０２重鎖全長アミノ酸配列中、１～１９番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列はシグナル配列であり、２０～１４１番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は可変領域であり、１４２～４７１番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は定常領域である。配列番号７４に示されるｈＨ０２重鎖全長ヌクレオチド配列中、１～５７番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列はシグナル配列をコードし、５８～４２３番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列は可変領域をコードし、４２４～１４１３番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列は定常領域をコードしている。

[0096] 配列番号７７に示されるｈＨ０４重鎖全長アミノ酸配列中、１～１９番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列はシグナル配列であり、２０～１４１番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は可変領域であり、１４２～４７１番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は定常領域である。配列番号７８に示されるｈＬ０４重鎖全長ヌクレオチド配列で、１～５７番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列はシグナル配列であり、５８～４２３番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列は可変領域をコードしており、４２４～１４１３番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列は定常領域を

コードしている。

[0097] [表1-1]

配列番号		配列
1	ヒトCDH6 ORFのアミノ酸配列	MRTYRYFLLLFWVGQPYPTLSTPLSKRTSGFPAKKRALELSGNSKNELNRSKRSWMW NQFFLLEEYTGSDYQYVGKLHSDQDRGDGSLKYILSGDGAGDLFIINENTGDIQATK RLDREEKPVYILRAQAINRRTGRPVEPESEFIIKIHDINDNEPIFTKEVYTATVPEM SDVGTFVVQVTATDADDPTYGNSAKVVYSILQGQPYFSVESETGIIKTALLNMDREN REQYQVVIQAKDMGGQMGGLSGTTTVNITLTDVNDNPPRFPQSTYQFKTPESSPPGT PIGRIKASDADVGENAEIEYSITDGEGLDMFDVITDQETQEGIITVKKLLDFEKKKV YTLKVEASNPYVEPRFLYLGPFKDSATVRIVVEDVDEPPVFSKLAYILQIREDAQIN TTIGSVTAQDPDAARNPVKYSVDRHTDMDRIFNIDSGNGSIFTSKLLDRETLLWHNI TVIATEINNPKQSSRVPLYIKVLDVNDNAPEFAEFYETFVCEKAKADQLIQTLHAVD KDDPYSGHQFSFSLAPEAASGSNFTIQDNKDNTAGILTRKNGYNRHEMSTYLLPVVI SDNDYPVQSSTGTVTVRVCACDHHGNMQSCHAEALIHPTGLSTGALVAILLCIVILL VTVVLFAALRRQRKKEPLIISKEDIRDNIVSYNDEGGGEEDTQAFDIGTLRNPEAIE DNKLRRDIVPEALFLPRRTPTARDNTDVRDFINQRLKENDTDPTAPPYDSLATYAYE GTGSVADSLSSLESVTTDADQDYDYLSDWGPRFKKLADMYGGVDSDKDS
2	ヒトCDH6 EC1	SWMWNQFFLLEEYTGSDYQYVGKLHSDQDRGDGSLKYILSGDGAGDLFIINENTGDI QATKRLDREEKPVYILRAQAINRRTGRPVEPESEFIIKIHDINDNEPIF
3	ヒトCDH6 EC2	TKEVYTATVPEMSDVGTFVVQVTATDADDPTYGNSAKVVYSILQGQPYFSVESETGI IKTALLNMDRENREQYQVVIQAKDMGGQMGGLSGTTTVNITLTDVNDNPPRF
4	ヒトCDH6 EC3	PQSTYQFKTPESSPPGTPIGRIKASDADVGENAEIEYSITDGEGLDMFDVITDQETQ EGIITVKKLLDFEKKKVYTLKVEASNPYVEPRFLYLGPFKDSATVRIVVEDVDEPPV F
5	ヒトCDH6 EC4	SKLAYILQIREDAQINTTIGSVTAQDPDAARNPVKYSVDRHTDMDRIFNIDSGNGSI FTSKLLDRETLLWHNITVIATEINNPKQSSRVPLYIKVLDVNDNAP
6	ヒトCDH6 EC5	EFAEFYETFVCEKAKADQLIQTLHAVDKDDPYSGHQFSFSLAPEAASGSNFTIQDNK DNTAGILTRKNGYNRHEMSTYLLPVVISDNDYPVQSSTGTVTVRVCACDHHGNMQSC HAEALIHP
7	マウスCDH6 ORFのアミノ酸配列	MRTYRYFLLLFWVGQPYPTFSNPLSKRTSGFPAKRKALELSANSRNELSRSKRSWMW NQFFLLEEYTGSDYQYVGKLHSDQDRGDGSLKYILSGDGAGDLFIINENTGDIQATK RLDREEKPVYILRAQAVNRRTGRPVEPESEFIIKIHDINDNEPIFTKDVYTATVPEM ADVGTFVVQVTATDADDPTYGNSAKVVYSILQGQPYFSVESETGIIKTALLNMDREN REQYQVVIQAKDMGGQMGGLSGTTTVNITLTDVNDNPPRFPQSTYQFKTPESSPPGT PIGRIKASDADVGENAEIEYSITDGEGHEMFDVITDQETQEGIITVKKLLDFEKKKV YTLKVEASNPHVEPRFLYLGPFKDSATVRIVVDDVDEPPVFSKLAYILQIREDARIN TTIGSVAAQDPDAARNPVKYSVDRHTDMDRIFNIDSGNGSIFTSKLLDRETLLWHNI TVIATEINNPKQSSRVPLYIKVLDVNDNAPEFAEFYETFVCEKAKADQLIQTLRAVD KDDPYSGHQFSFSLAPEAASSSNFTIQDNKDNTAGILTRKNGYNRHEMSTYLLPVVI SDNDYPVQSSTGTVTVRVCACDHHGNMQSCHAEALIHPTGLSTGALVAILLCIVILL VTVVLFAALRRQRKKEPLIISKEDIRDNIVSYNDEGGGEEDTQAFDIGTLRNPEAME DSKSRRDIVPEALFLPRRTPTARDNTDVRDFINQRLKENDTDPTAPPYDSLATYAYE GTGSVADSLSSLESVTTDGDQDYDYLSDWGPRFKKLADMYGGMDSDKDS

[0098]

[表1-2]

8	ラットCDH6 ORFのアミノ酸配列	MRTYRYFLLLFWVGQPYPTFSNPLSKRTSGFPAKRRALELSANSRNELSRSKRSWMW NQFFLLEEYTGSDYQYVGKLHSDQDRGDGSLKYILSGDGAGDLFIINENTGDIQATK RLDREEKPVYILRAQAINRRTGRPVEPESEFIIKIHDINDNEPIFTKDVYTATVPEM ADVGTFVVQVTATDADDPTYGNSAKVVYSILQGQPYFSVESETGIIKTALLNMDREN REQYQVVIQAKDMGGQMGGLSGTTTVNITLTDVNDNPPRFPQSTYQFKTPESSPPGT PIGRIKASDADVGENAEIEYSITDGEGHDMFDVITDQETQEGIITVKKLLDFEKKRV YTLKVEASNPHIEPRFLYLGPFKDSATVRIVVDDVDEPPVFSKPAYILQIREDAQIN TTIGSVAAQDPDAARNPVKYSVDRHTDMDRIFNIDSGNGSIFTSKLLDRETLLWHNI TVIATEINNPKQSSRVPLYIKVLDVNDNAPEFAEFYETFVCEKAKADQLIQTLHAVD KDDPYSGHQFSFSLAPEAASGSNFTIQDNKDNTAGILTRKNGYNRHEMSTYLLPVVI SDNDYPVQSSTGTVTVRVCACDHHGNMQSCHAEALIHPTGLSTGALVAILLCIVILL VTVVLFAALRRQRKKEPLIISKEDIRDNIVSYNDEGGGEEDTQAFDIGTLRNPKPWR QQSRRDMVPEALFLPRRTPTARDNTDVRDFISQRLRKMNTDPTAPPYDSLATYAYEG TGSVADSLSSLESVTTDGDQDYGYLSDWGPRFKKLADMYGGMDSDKDS
9	カニクイザルCDH6 ORFのアミノ酸配列	MRTYRYFLLLFWVGQPYPTLSTPLSKRTSGFPAKKRALELSGNSKNELNRSKRSWMW NQFFLLEEYTGSDYQYVGKLHSDQDRGDGSLKYILSGDGAGDLFIINENTGDIQATK RLDREEKPVYILRAQAINRRTGRPVEPESEFIIKIHDINDNEPIFTKEVYTATVPEM SDVGTFVVQVTATDADDPTYGNSAKVVYSILQGQPYFSVESETGIIKTALLNMDREN REQYQVVIQAKDMGGQMGGLSGTTTVNITLTDVNDNPPRFPQSTYQFKTPESSPPGT PIGRIKASDADVGENAEIEYSITDGEGLDMFDVITDQETQEGIITVKKLLDFEKKKV YTLKVEASNPHVEPRFLYLGPFKDSATVRIVVEDVDEPPVFSKLAYILQIREDAQIN TTIGSVTAQDPDAARNPVKYSVDRHTDMDRIFNIDSGNGSIFTSKLLDRETLLWHNI TVIATEINNPKQSSRVPLYIKVLDVNDNAPEFAEFYETFVCEKAKADQLIQTLRAVD KDDPYSGHQFSFSLAPEAASGSNFTIQDNKDNTAGILTRKNGYNRHEMSTYLLPVVI SDNDYPVQSSTGTVTVRVCACDHHGNMQSCHAEALIHPTGLSTGALVAILLCIVILL VTVVLFAALRRQRKKEPLIISKEDIRDNIVSYNDEGGGEEDTQAFDIGTLRNPEAIE DNKLRRDIVPEALFLPRRTPTARDNTDVRDFINQRLKENDTDPTAPPYDSLATYAYE GTGSVADSLSSLESVTTDGDQDYDYLSDWGPRFKKLADMYGGVDSDKDS
10	rGO19軽鎖可変領域アミノ酸配列	DIQMTQSPSLLSASVGDRVTLNCKASQNIYKNLAWYQQKLGEGPKLLIYDANTLQTG IPSRFSGSGSGSDFTLTISSLQPEDVATYFCQQYYSGWAFGGVTNLELKRA
11	rGO19軽鎖可変領域ヌクレオチド配列	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCACTCCTGTCTGCATCTGTGGGAGACAGAGTC ACTCTCAACTGCAAAGCAAGTCAGAATATTTATAAGAACTTAGCCTGGTATCAGCAA AAGCTTGGAGAAGGTCCCAAACTCCTGATTTATGATGCAAACACTTTGCAAACGGGC ATCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGTTCAGATTTCACACTCACCATCAGC AGCCTGCAGCCTGAAGATGTTGCCACATATTTCTGCCAGCAGTACTATAGCGGGTGG GCGTTCGGTGGAGTCACCAACCTGGAATTGAAACGGGCT
12	rGO19 CDRL1	KASQNIYKNLA
13	rGO19 CDRL2	DANTLQT
14	rGO19 CDRL3	QQYYSGWA

[0099]

[表1-3]

15	rGO19重鎖可変領域アミノ酸配列	QVQLQQSGAELVKPGSSVKISCKASGYTFTRNFMHWIKQQPGNGLEWIGWIYCGDGETEYNQKFNGKATLTADRSSSTAYMELSRLTSEDSAVYFCARGVYGGFAGGYFDFWGQGVMVTVSS
16	rGO19重鎖可変領域ヌクレオチド配列	CAGGTACAGCTGCAGCAATCTGGGGCTGAACTGGTGAAGCCTGGGTCCTCAGTGAAAATTTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACCAGGAACTTTATGCACTGGATAAAACAGCAGCCTGGAAATGGCCTTGAGTGGATTGGGTGGATTTATTGTGGAGATGGTGAGACAGAGTACAATCAAAAGTTCAATGGGAAGGCAACACTCACTGCGGACAGATCCTCCAGCACAGCCTATATGGAGCTCAGCAGACTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTTCTGTGCAAGAGGGGTTTACGGAGGGTTTGCCGGGGGCTACTTTGATTTCTGGGGCCAAGGAGTCATGGTCACAGTCTCCTCA
17	rGO19 CDRH1	GYTFTRNFMH
18	rGO19 CDRH2	WIYCGDGETE
19	rGO19 CDRH3	GVYGGFAGGYFDF
20	rGO55軽鎖可変領域アミノ酸配列	DVQMTHSPSYLAASPGESVSISCKTSKNISNYLVWYQQKPGEAYKLLIYSGSTLQSGTPSRFSGSGSGTDFTLTIRSLEPEDFGLYFCQQYYEKPFTFGSGTKLEIKRA
21	rGO55軽鎖可変領域ヌクレオチド配列	GATGTCCAGATGACCCACTCTCCGTCTTATCTTGCTGCGTCTCCTGGAGAAAGTGTTTCCATCAGTTGCAAGACAAGTAAGAACATTAGTAATTATTTAGTCTGGTATCAACAGAAACCTGGGGAAGCATATAAGCTTCTTATCTATTCTGGGTCAACTTTGCAATCTGGAACTCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGTACAGATTTCACTCTCACTATCAGAAGCCTGGAGCCTGAAGATTTTGGACTCTATTTCTGTCAACAGTATTATGAAAAACCATTCACGTTCGGCTCAGGGACGAAGTTGGAAATAAAACGGGCT
22	rGO55 CDRL1	KTSKNISNYLV
23	rGO55 CDRL2	SGSTLQS
24	rGO55 CDRL3	QQYYEKPFT
25	rGO55重鎖可変領域アミノ酸配列	EVQLQESGPGLVRPSQSLSLSCSVTDYSITSNYWGWIRRFPGNKMEWMGYITYSGYTSYNPSLQSRISITRDTSKNQFFLQLNSVTAEDTATYYCARSINHGGYSYVVDAWGPGASVTVSS
26	rGO55重鎖可変領域ヌクレオチド配列	GAGGTGCAACTTCAGGAGTCAGGACCTGGCCTTGTGAGACCCTCACAGTCACTCTCCCTCTCCTGTTCTGTCACTGATTACTCCATCACTAGTAATTACTGGGGCTGGATCCGGAGGTTCCCAGGAAATAAAATGGAGTGGATGGGATACATAACCTATAGTGGTTACACTAGCTACAACCCATCTCTCCAAAGTCGAATCTCCATTACTAGAGACACATCGAAGAATCAGTTCTTCCTGCAGTTGAACTCTGTAACTGCTGAGGACACAGCCACATATTACTGTGCAAGATCGATTAACCACGGAGGATATAGTTATGTTGTGGATGCCTGGGGTCCGGGAGCTTCAGTCACTGTCTCCTCA
27	rGO55 CDRH1	DYSITSNYWG
28	rGO55 CDRH2	YITYSGYTS
29	rGO55 CDRH3	SINHGGYSYVVDA

[0100]

[表1-4]

30	rGO56軽鎖可変領域アミノ酸配列	DVQMTQSPSSLAASPGESVSISCRATKSIGIYLAWYQQKPGKTFKLLIYSGSTLQSG TPSRFSGSGSGTDFTLTIRSLEPEDFGLYFCQQFYENPFTFGSGTKLEIRRA
31	rGO56軽鎖可変領域ヌクレオチド配列	GATGTCCAGATGACCCAGTCTCCGTCTTCTCTTGCTGCGTCTCCTGGAGAAAGTGTT TCCATCAGTTGCAGGGCAACTAAGAGCATTGGTATTTATTTAGCCTGGTATCAACAG AAACCTGGGAAAACATTTAAGCTTCTTATCTACTCTGGGTCAACTTTGCAATCTGGA ACTCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGTACAGATTTCACTCTCACCATCAGA AGCCTGGAGCCTGAAGATTTTGGACTCTATTTCTGTCAACAGTTTTATGAAAACCCA TTCACGTTCGGCTCAGGGACGAAGTTGGAAATAAGACGGGCT
32	rGO56 CDRL1	RATKSIGIYLA
33	rGO56 CDRL2	SGSTLQS
34	rGO56 CDRL3	QQFYENPFT
35	rGO56重鎖可変領域アミノ酸配列	EVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVTDYSITTYFWGWIRKFPGNKMEWMGYMSYRGGT SYNPSLKSRISITRDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCARCPNYGGHSLVFDYWGQG VMVTVSS
36	rGO56重鎖可変領域ヌクレオチド配列	GAGGTGCAGCTTCAGGAGTCAGGACCTGGCCTTGTGAAACCCTCACAGTCACTCTCC CTCACCTGTTCTGTCACTGATTACTCCATCACTACTTATTTCTGGGGCTGGATCCGG AAGTTCCCAGGAAATAAAATGGAGTGGATGGGATACATGAGCTACCGTGGTGGCACT TCCTACAACCCATCTCTCAAGAGTCGAATCTCCATTACTAGAGACACATCGAAGAAT CAGTTCTTCCTGCAGTTGAACTCTGTAACTACTGAGGACACAGCCACATATTACTGT GCAAGATGCCCTAACTACGGAGGGCATTCCCTTGTTTTTGATTACTGGGGCCAAGGA GTCATGGTCACAGTGTCCTCA
37	rGO56 CDRH1	DYSITTYFWG
38	rGO56 CDRH2	YMSYRGGTS
39	rGO56 CDRH3	CPNYGGHSLVFDY
40	rGO61軽鎖可変領域アミノ酸配列	DVQMTQSPSYLAASPGESVSISCKATKSISNYLAWYQQKPGEAYKVLIYSGSTLQSG TPSRFSGSGSGTDFTLTIRSLEPEDFGLYSCQQYYEKPLTFGSGTKLEIKRA
41	rGO61軽鎖可変領域ヌクレオチド配列	GATGTCCAGATGACCCAGTCTCCGTCTTATCTTGCTGCGTCTCCTGGAGAAAGTGTT TCCATCAGTTGCAAGGCAACTAAGAGCATTAGTAATTATTTAGCCTGGTATCAACAG AAACCTGGGGAAGCATATAAGGTTCTTATCTATTCTGGGTCAACTTTGCAATCTGGA ACTCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGTACAGATTTCACTCTCACCATCAGA AGCCTGGAGCCTGAAGATTTTGGACTCTATTCCTGTCAACAGTATTATGAAAAACCG CTCACGTTCGGTTCTGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGGGCT
42	rGO61 CDRL1	KATKSISNYLA
43	rGO61 CDRL2	SGSTLQS
44	rGO61 CDRL3	QQYYEKPLT

[0101]

[表1-5]

45	rGO61重鎖可変領域アミノ酸配列	EVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVTGYSITTYYWGWIRKFPGNKMEWMGYISYSGRTSYNPSLKSRMSITRDASKNQFFLQLNSVTTDDTATYYCARSPINHGGYWYFDFWGPGTMVTVSS
46	rGO61重鎖可変領域ヌクレオチド配列	GAGGTGCAGCTTCAGGAGTCAGGACCTGGCCTTGTGAAACCCTCACAGTCACTCTCCCTCACCTGTTCTGTCACTGGTTACTCCATCACTACTTATTACTGGGGCTGGATCCGGAAGTTCCCAGGAAATAAAATGGAGTGGATGGGGTACATAAGCTACAGTGGTCGCACTAGTTATAACCCATCTCTCAAAAGTCGAATGTCCATTACTAGAGACGCATCGAAGAATCAGTTCTTCCTACAGTTGAACTCTGTAACTACTGACGACACAGCCACATATTACTGTGCAAGATCCCCAATTAACCACGGAGGGTACTGGTACTTTGACTTCTGGGGCCCAGGAACCATGGTCACCGTGTCCTCA
47	rGO61 CDRH1	GYSITTYYWG
48	rGO61 CDRH2	YISYSGRTS
49	rGO61 CDRH3	SPINHGGYWYFDF
50	ヒト軽鎖シグナル配列及びヒトκ鎖定常領域をコードするDNA配列を含むDNA断片	gcctccggactctagagccaccATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTCATCTCCCTGCTGCTGTGGATCTCCGGCGCGTACGGCGATATCGTGATGATTAAACGTACGGTGGCCGCCCCCTCCGTGTTCATCTTCCCCCCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTACCCCAGAGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGGAACTCCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAAGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGAGCTCCCCCGTCACCAAGAGCTTCAACAGGGGGGAGTGTtaggggcccgtttaaacgggggaggcta

[0102]

[表1-6]

51	ヒト重鎖シグナル配列及びヒトIgG1定常領域をコードするDNA配列を含むDNA断片	gcctccggactctagagccaccATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGC AGCTCCCAGATGGGTGCTGAGCCAGGTGCAATTGTGCAGGCGGTTAGCTCAGCCTCC ACCAAGGGCCCAAGCGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGCGGC ACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCCGTGACCGTGAGC TGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCCGCTGTCCTGCAGTCC TCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACC CAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGA GTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCCTGCCCAGCACCTGAA CTCCTGGGGGGACCCTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATG ATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCT GAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAG CCCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTG CACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTC CCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGCCAGCCCCGGGAACCACAG GTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACC TGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGC CAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTC TTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTCTTC TCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTCTCC CTGTCTCCCGGCAAAtgagatatcgggcccgtttaaacgggggaggcta
52	chGO19軽鎖をコードするDNA配列を含むDNA断片	ccagcctccggactctagagccaccATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTCATCAGCCT GCTGCTGTGGATCAGCGGCGCCTACGGCGACATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCCT GCTGAGCGCCAGCGTGGGCGATAGAGTGACCCTGAACTGCAAGGCCAGCCAGAACAT CTACAAGAACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCTGGGCGAGGGCCCCAAGCTGCTGAT CTACGACGCCAACACCCTGCAGACCGGCATCCCCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCAG CGGCTCCGACTTCACCCTGACAATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACGTGGCCACCTA CTTTTGCCAGCAGTACTACAGCGGCTGGGCCTTCGGCGGCGTGACCAACCTGGAACT GAAGAGAGCCGTGGCCGCTCCCTCCGTGTTCATCTTCCCACCTAGCGACGAGCAGCT GAAGTCCGGCACAGCCTCTGTCGTGTGCCTGCTGAACAACTTCTACCCCCGCGAGGC CAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAATGCCCTGCAGTCTGGCAACAGCCAGGAAAGCGT GACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGAG CAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCACCAGGGCCT GTCTAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGTtgagtttaaacggggga ggctaact
53	chGO19軽鎖全長アミノ酸配列	MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIQMTQSPSLLSASVGDRVTLNCKASQNIYKNLAWYQ QKLGEGPKLLIYDANTLQTGIPSRFSGSGSGSDFTLTISSLQPEDVATYFCQQYYSG WAFGGVTNLELKRAVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC

[0103]

[表1-7]

54	chGO19軽鎖全長ヌクレオチド配列	ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTCATCAGCCTGCTGCTGTGGATCAGCGGCGCCTAC GGCGACATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCCTGCTGAGCGCCAGCGTGGGCGATAGA GTGACCCTGAACTGCAAGGCCAGCCAGAACATCTACAAGAACCTGGCCTGGTATCAG CAGAAGCTGGGCGAGGGCCCCAAGCTGCTGATCTACGACGCCAACACCCTGCAGACC GGCATCCCCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCAGCGGCTCCGACTTCACCCTGACAATC AGCAGCCTGCAGCCCGAGGACGTGGCCACCTACTTTTGCCAGCAGTACTACAGCGGC TGGGCCTTCGGCGGCGTGACCAACCTGGAACTGAAGAGAGCCGTGGCCGCTCCCTCC GTGTTCATCTTCCCACCTAGCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACAGCCTCTGTCGTG TGCCTGCTGAACAACTTCTACCCCCGCGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAAT GCCCTGCAGTCTGGCAACAGCCAGGAAAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCC ACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAG GTGTACGCCTGCGAAGTGACCCACCAGGGCCTGTCTAGCCCCGTGACCAAGAGCTTC AACCGGGGCGAGTGT
10	chGO19軽鎖可変領域アミノ酸配列	DIQMTQSPSLLSASVGDRVTLNCKASQNIYKNLAWYQQKLGEGPKLLIYDANTLQTG IPSRFSGSGSGSDFTLTISSLQPEDVATYFCQQYYSGWAFGGVTNLELKRA
55	chGO19軽鎖可変領域ヌクレオチド配列	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCCTGCTGAGCGCCAGCGTGGGCGATAGAGTG ACCCTGAACTGCAAGGCCAGCCAGAACATCTACAAGAACCTGGCCTGGTATCAGCAG AAGCTGGGCGAGGGCCCCAAGCTGCTGATCTACGACGCCAACACCCTGCAGACCGGC ATCCCCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCAGCGGCTCCGACTTCACCCTGACAATCAGC AGCCTGCAGCCCGAGGACGTGGCCACCTACTTTTGCCAGCAGTACTACAGCGGCTGG GCCTTCGGCGGCGTGACCAACCTGGAACTGAAGAGAGCC
12	chGO19 CDRL1	KASQNIYKNLA
13	chGO19 CDRL2	DANTLQT
14	chGO19 CDRL3	QQYYSGWA
56	chGO19重鎖全長アミノ酸配列	MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLQQSGAELVKPGSSVKISCKASGYTFTRNFMHWIK QQPGNGLEWIGWIYPGDGETEYNQKFNGKATLTADRSSSTAYMELSRLTSEDSAVYF CARGVYGGFAGGYFDFWGQGVMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK

[0104]

[表1-8]

57	chGO19重鎖全長ヌクレオチド配列	ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTGCTGAGC CAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGCGCCGAGCTCGTGAAGCCTGGCAGCAGCGTGAAG ATCAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCCGGAACTTCATGCACTGGATCAAG CAGCAGCCCGGCAACGGCCTGGAATGGATCGGCTGGATCTATCCCGGCGACGGCGAG ACAGAGTACAACCAGAAGTTCAACGGCAAGGCCACCCTGACCGCCGACAGAAGCAGC TCCACCGCCTACATGGAACTGAGCCGGCTGACCAGCGAGGACAGCGCCGTGTACTTT TGCGCCAGAGGCGTGTACGGCGGCTTCGCTGGCGGCTACTTCGATTTTTGGGGCCAG GGCGTGATGGTCACCGTCAGCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCAAGCGTCTTCCCCCTG GCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAG GACTACTTCCCCGAACCCGTGACCGTGAGCTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGC GTGCACACCTTCCCCGCTGTCCTGCAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTG GTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCAC AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACT CACACATGCCCACCCTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCCTCAGTCTTCCTC TTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGC GTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGAC GGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACG TACCGGGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAG TACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCC AAAGCCAAAGGCCAGCCCCGGGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAG GAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGC GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACC CCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGAC AAGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG CACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGCAAA
58	chGO19重鎖可変領域アミノ酸配列	QVQLQQSGAELVKPGSSVKISCKASGYTFTRNFMHWIKQQPGNGLEWIGWIYPGDGE TEYNQKFNGKATLTADRSSSTAYMELSRLTSEDSAVYFCARGVYGGFAGGYFDFWGQ GVMVTVSS
59	chGO19重鎖可変領域ヌクレオチド配列	CAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGCGCCGAGCTCGTGAAGCCTGGCAGCAGCGTGAAG ATCAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCCGGAACTTCATGCACTGGATCAAG CAGCAGCCCGGCAACGGCCTGGAATGGATCGGCTGGATCTATCCCGGCGACGGCGAG ACAGAGTACAACCAGAAGTTCAACGGCAAGGCCACCCTGACCGCCGACAGAAGCAGC TCCACCGCCTACATGGAACTGAGCCGGCTGACCAGCGAGGACAGCGCCGTGTACTTT TGCGCCAGAGGCGTGTACGGCGGCTTCGCTGGCGGCTACTTCGATTTTTGGGGCCAG GGCGTGATGGTCACCGTCAGCTCA
17	chGO19 CDRH1	GYTFTRNFMH
60	chGO19 CDRH2	WIYPGDGETE
19	chGO19 CDRH3	GVYGGFAGGYFDF

[0105]

[表1-9]

61	hLO2軽鎖全長アミノ酸配列	MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNIYKNLAWYQQKPGKAPKLLIYDANTLQTGVPSRFSGSGSGSDFTLTISSLQPEDFATYFCQQYYSGWAFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
62	hLO2軽鎖全長ヌクレオチド配列	ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTCATCTCCCTGCTGCTGTGGATCTCCGGCGCGTACGGCGACATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACATGCAAGGCCAGCCAGAACATCTACAAGAACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACGACGCCAACACCCTGCAGACCGGCGTGCCCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCAGCGGCTCCGACTTCACCCTGACAATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTTTTGCCAGCAGTACTACAGCGGCTGGGCCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCCGCCCCCTCCGTGTTCATCTTCCCCCCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTACCCCAGAGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGGAACTCCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAAGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGAGCTCCCCCGTCACCAAGAGCTTCAACAGGGGGGAGTGT
63	hLO2軽鎖可変領域アミノ酸配列	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNIYKNLAWYQQKPGKAPKLLIYDANTLQTGVPSRFSGSGSGSDFTLTISSLQPEDFATYFCQQYYSGWAFGQGTKVEIKRT
64	hLO2軽鎖可変領域ヌクレオチド配列	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACATGCAAGGCCAGCCAGAACATCTACAAGAACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACGACGCCAACACCCTGCAGACCGGCGTGCCCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCAGCGGCTCCGACTTCACCCTGACAATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTTTTGCCAGCAGTACTACAGCGGCTGGGCCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAAGCGTACG
65	hLO3軽鎖全長アミノ酸配列	MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNIYKNLAWYQQKLGEGPKLLIYDANTLQTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYSGWAFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0106]

[表1-10]

66	hLO3軽鎖全長ヌクレオチド配列	ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTCATCTCCCTGCTGCTGTGGATCTCCGGCGCGTAC GGCGACATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGA GTGACCATCACATGCAAGGCCAGCCAGAACATCTACAAGAACCTGGCCTGGTATCAG CAGAAGCTGGGCGAGGGCCCCAAGCTGCTGATCTACGACGCCAACACCCTGCAGACC GGCGTGCCCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGACAATC AGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACTACAGCGGC TGGGCCTTTGGCCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCCGCCCCCTCC GTGTTCATCTTCCCCCCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTG TGCCTGCTGAATAACTTCTACCCCAGAGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAAC GCCCTGCAGTCCGGGAACTCCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACAGC ACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAAGCCGACTACGAGAAGCACAAG GTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGAGCTCCCCCGTCACCAAGAGCTTC AACAGGGGGGAGTGT
67	hLO3軽鎖可変領域アミノ酸配列	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNIYKNLAWYQQKLGEGPKLLIYDANTLQTG VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYSGWAFGQGTKVEIKRT
68	hLO3軽鎖可変領域ヌクレオチド配列	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTG ACCATCACATGCAAGGCCAGCCAGAACATCTACAAGAACCTGGCCTGGTATCAGCAG AAGCTGGGCGAGGGCCCCAAGCTGCTGATCTACGACGCCAACACCCTGCAGACCGGC GTGCCCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGACAATCAGC AGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACTACAGCGGCTGG GCCTTTGGCCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAAGCGTACG
69	hHO1重鎖全長アミノ酸配列	MKHLWFFLLLVAAPRWVLSEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRNFMHWVR QAPGQGLEWMGWIYPGDGETEYAQKFQGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYY CARGVYGGFAGGYFDFWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK

[0107]

[表1-11]

70	hHO1重鎖全長ヌクレオチド配列	ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTGCTGAGC GAAGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCAGGCGCCAGCGTGAAG GTGTCCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTTACCCGGAACTTCATGCACTGGGTGCGC CAGGCTCCAGGCCAGGGACTGGAATGGATGGGCTGGATCTATCCCGGCGACGGCGAG ACAGAGTACGCCCAGAAATTCCAGGGCAGAGTGACCATCACCGCCGACACCAGCACC TCCACCGCCTACATGGAACTGAGCAGCCTGCGGAGCGAGGACACCGCCGTGTACTAT TGTGCCAGAGGCGTGTACGGCGGCTTCGCTGGCGGCTACTTCGATTTTTGGGGCCAG GGCACCCTCGTGACCGTCAGCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCAAGCGTCTTCCCCCTG GCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAG GACTACTTCCCCGAACCCGTGACCGTGAGCTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGC GTGCACACCTTCCCCGCTGTCCTGCAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTG GTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCAC AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACT CACACATGCCCACCCTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCCTCAGTCTTCCTC TTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGC GTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGAC GGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACG TACCGGGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAG TACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCC AAAGCCAAAGGCCAGCCCCGGGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAG GAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGC GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACC CCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGAC AAGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG CACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGCAAA
71	hHO1重鎖可変領域アミノ酸配列	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRNFMHWVRQAPGQGLEWMGWIYPGDGE TEYAQKFQGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGVYGGFAGGYFDFWGQ GTLVTVSS
72	hHO1重鎖可変領域ヌクレオチド配列	GAAGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCAGGCGCCAGCGTGAAG GTGTCCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTTACCCGGAACTTCATGCACTGGGTGCGC CAGGCTCCAGGCCAGGGACTGGAATGGATGGGCTGGATCTATCCCGGCGACGGCGAG ACAGAGTACGCCCAGAAATTCCAGGGCAGAGTGACCATCACCGCCGACACCAGCACC TCCACCGCCTACATGGAACTGAGCAGCCTGCGGAGCGAGGACACCGCCGTGTACTAT TGTGCCAGAGGCGTGTACGGCGGCTTCGCTGGCGGCTACTTCGATTTTTGGGGCCAG GGCACCCTCGTGACCGTCAGCTCA

[0108]

[表1-12]

73	hHO2重鎖全長アミノ酸配列	MKHLWFFLLLVAAPRWVLSEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRNFMHWVR QAPGQGLEWMGWIYPGDGETEYNQKFQGRVTITADRSTSTAYMELSSLRSEDTAVYF CARGVYGGFAGGYFDFWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
74	hHO2重鎖全長ヌクレオチド配列	ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTGCTGAGC GAAGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCAGGCGCCAGCGTGAAG GTGTCCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTTACCCGGAACTTCATGCACTGGGTGCGC CAGGCTCCAGGCCAGGGACTGGAATGGATGGGCTGGATCTATCCCGGCGACGGCGAG ACAGAGTACAACCAGAAATTCCAGGGCAGAGTGACCATCACCGCCGACAGAAGCACC AGCACCGCCTACATGGAACTGAGCAGCCTGCGGAGCGAGGATACCGCCGTGTACTTC TGTGCCAGAGGCGTGTACGGCGGCTTCGCTGGCGGCTACTTCGATTTTTGGGGCCAG GGCACCCTCGTGACCGTCAGCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCAAGCGTCTTCCCCCTG GCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAG GACTACTTCCCCGAACCCGTGACCGTGAGCTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGC GTGCACACCTTCCCCGCTGTCCTGCAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTG GTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCAC AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACT CACACATGCCCACCCTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCCTCAGTCTTCCTC TTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGC GTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGAC GGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACG TACCGGGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAG TACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCC AAAGCCAAAGGCCAGCCCCGGGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAG GAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGC GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACC CCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGAC AAGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG CACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGCAAA
75	hHO2重鎖可変領域アミノ酸配列	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRNFMHWVRQAPGQGLEWMGWIYPGDGE TEYNQKFQGRVTITADRSTSTAYMELSSLRSEDTAVYFCARGVYGGFAGGYFDFWGQ GTLVTVSS

[0109]

[表1-13]

76	hH02重鎖可変領域ヌクレオチド配列	GAAGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCAGGCGCCAGCGTGAAG GTGTCCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTTACCCGGAACTTCATGCACTGGGTGCGC CAGGCTCCAGGCCAGGGACTGGAATGGATGGGCTGGATCTATCCCGGCGACGGCGAG ACAGAGTACAACCAGAAATTCCAGGGCAGAGTGACCATCACCGCCGACAGAAGCACC AGCACCGCCTACATGGAACTGAGCAGCCTGCGGAGCGAGGATACCGCCGTGTACTTC TGTGCCAGAGGCGTGTACGGCGGCTTCGCTGGCGGCTACTTCGATTTTTGGGGCCAG GGCACCCTCGTGACCGTCAGCTCA
77	hH04重鎖全長アミノ酸配列	MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRNFMHWIR QAPGQGLEWMGWIYPGDGETEYAQKFQGRVTLTADRSTSTAYMELSSLRSEDTAVYY CARGVYGGFAGGYFDFWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
78	hH04重鎖全長ヌクレオチド配列	ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTGCTGAGC CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCAGGCGCCAGCGTGAAG GTGTCCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTTACCCGGAACTTCATGCACTGGATCCGG CAGGCCCCTGGACAGGGCCTGGAATGGATGGGCTGGATCTATCCCGGCGACGGCGAG ACAGAGTACGCCCAGAAATTCCAGGGCAGAGTGACCCTGACCGCCGACAGAAGCACC AGCACCGCCTACATGGAACTGAGCAGCCTGCGGAGCGAGGACACCGCCGTGTACTAT TGTGCCAGAGGCGTGTACGGCGGCTTCGCTGGCGGCTACTTCGATTTTTGGGGCCAG GGCACCCTCGTGACCGTCAGCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCAAGCGTCTTCCCCCTG GCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAG GACTACTTCCCCGAACCCGTGACCGTGAGCTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGC GTGCACACCTTCCCCGCTGTCCTGCAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTG GTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCAC AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACT CACACATGCCCACCCTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCCTCAGTCTTCCTC TTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGC GTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGAC GGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACG TACCGGGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAG TACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCC AAAGCCAAAGGCCAGCCCCGGGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAG GAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGC GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACC CCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGAC AAGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG CACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGCAAA

[0110]

[表1-14]

79	hH04重鎖可変領域アミノ酸配列	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRNFMHWIRQAPGQGLEWMGWIYPGDGETEYAQKFQGRVTLTADRSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGVYGGFAGGYFDFWGQGTLVTVSS
80	hH04重鎖可変領域ヌクレオチド配列	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCAGGCGCCAGCGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTTACCCGGAACTTCATGCACTGGATCCGGCAGGCCCCTGGACAGGGCCTGGAATGGATGGGCTGGATCTATCCCGGCGACGGCGAGACAGAGTACGCCCAGAAATTCCAGGGCAGAGTGACCCTGACCGCCGACAGAAGCACCAGCACCGCCTACATGGAACTGAGCAGCCTGCGGAGCGAGGACACCGCCGTGTACTATTGTGCCAGAGGCGTGTACGGCGGCTTCGCTGGCGGCTACTTCGATTTTTGGGGCCAGGGCACCCTCGTGACCGTCAGCTCA
81	NOV0712軽鎖全長アミノ酸配列	MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAVSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSGTFPPTTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
82	NOV0712軽鎖全長ヌクレオチド配列	ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTCATCTCCCTGCTGCTGTGGATCTCCGGCGCGTACGGCGACATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTAGAGCCAGCCAGAGCATCAGCAGCTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCCAAACTGCTGATCTACGCCGTGTCCACACTGCAGAGCGGCGTGCCCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGACAATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGTCAGCAGTCCGGCACCTTCCCCCCCACCACATTTGGCCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCCGCCCCCTCCGTGTTCATCTTCCCCCCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTACCCCAGAGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGGAACTCCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAAGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGAGCTCCCCCGTCACCAAGAGCTTCAACAGGGGGGAGTGT
83	NOV0712重鎖全長アミノ酸配列	MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHGMHWVRQAPGKGLEWVSVISGSGSNTGYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQWGSYAFDSWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0111]

[表1-15]

84	NOV0712重鎖全長ヌクレオチド配列	ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTGCTGAGC CAGGTGCAGCTGCTGGAATCTGGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCTCTCTGAGA CTGTCTTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCCACGGAATGCACTGGGTGCGC CAGGCCCCTGGAAAGGGACTGGAATGGGTGTCCGTGATCAGCGGCAGCGGCTCCAAT ACCGGCTACGCCGATAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAG AACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTAT TGTGCCAGACAGTGGGGCAGCTACGCCTTCGATTCTTGGGGCCAGGGCACCCTCGTG ACCGTCAGCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCAAGCGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCC AAGAGCACCTCTGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCC GAACCCGTGACCGTGAGCTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTC CCCGCTGTCCTGCAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCC TCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAAC ACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCA CCCTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCCTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAA CCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGAC GTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG CATAATGCCAAGACAAAGCCCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTC AGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAG GTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGC CAGCCCCGGGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAG AACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTG GAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCTCCCGTGCTG GACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG CAGCAGGGCAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTAC ACCCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGCAAA

[0112] （本明細書中、表１－１～表１－１５を表１と総称する場合がある。）

本発明の抗体としては、さらに、ＣＤＨ６に結合する、ヒト抗体を挙げることができる。抗ＣＤＨ６ヒト抗体とは、ヒト染色体由来の抗体の遺伝子配列のみを有するヒト抗体を意味する。抗ＣＤＨ６ヒト抗体は、ヒト抗体の重鎖と軽鎖の遺伝子を含むヒト染色体断片を有するヒト抗体産生マウスを用いた方法（Ｔｏｍｉｚｕｋａ，Ｋ．ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　Ｇｅｎｅｔｉｃｓ（１９９７）１６，ｐ．１３３－１４３，；Ｋｕｒｏｉｗａ，Ｙ．ｅｔ．ａｌ．，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．（１９９８）２６，ｐ．３４４７－３４４８；Ｙｏｓｈｉｄａ，Ｈ．ｅｔ．ａｌ．，Ａｎｉｍａｌ　Ｃｅｌｌ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ：Ｂａｓｉｃ　ａｎｄ　Ａｐｐｌｉｅｄ　Ａｓｐｅｃｔｓ　ｖｏｌ．１０，ｐ．６９－７３（Ｋｉｔａｇａｗａ，Ｙ．，Ｍａｔｓｕｄａ，Ｔ．ａｎｄ　Ｉｉｊｉｍａ，Ｓ．ｅｄｓ．），Ｋｌｕｗｅｒ　Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ，１９９９．；Ｔｏｍｉｚｕｋａ，Ｋ．ｅｔ．ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ（２０００）９７，ｐ．７２２－７２７等を参照。）によって取得することができる。

[0113] このようなヒト抗体産生マウスは、具体的には、内在性免疫グロブリン重鎖及び軽鎖の遺伝子座が破壊され、代わりに酵母人工染色体（Ｙｅａｓｔ ａｒｔｉｆｉｃｉａｌ ｃｈｒｏｍｏｓｏｍｅ，ＹＡＣ）ベクター等を介してヒト免疫グロブリン重鎖及び軽鎖の遺伝子座が導入された遺伝子組み換え動物として、ノックアウト動物及びトランスジェニック動物の作製及びこれらの動物同士を掛け合わせることによって作り出すことができる。

[0114] また、遺伝子組換え技術によって、そのようなヒト抗体の重鎖及び軽鎖の各々をコードするｃＤＮＡ、好ましくは該ｃＤＮＡを含むベクターによって真核細胞を形質転換し、遺伝子組換えヒトモノクローナル抗体を産生する形質転換細胞を培養することによって、この抗体を培養上清中から得ることもできる。

[0115] ここで、宿主としては例えば真核細胞、好ましくはＣＨＯ細胞、リンパ球やミエローマ等の哺乳動物細胞を用いることができる。

[0116] また、ヒト抗体ライブラリーより選別したファージディスプレイ由来のヒト抗体を取得する方法（Ｗｏｒｍｓｔｏｎｅ，Ｉ．Ｍ．ｅｔ．ａｌ，Ｉｎｖｅｓｔｉｇａｔｉｖｅ Ｏｐｈｔｈａｌｍｏｌｏｇｙ ＆ Ｖｉｓｕａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅ．（２００２）４３（７），ｐ．２３０１－２３０８；Ｃａｒｍｅｎ，Ｓ．ｅｔ．ａｌ．，Ｂｒｉｅｆｉｎｇｓ ｉｎ Ｆｕｎｃｔｉｏｎａｌ Ｇｅｎｏｍｉｃｓ ａｎｄ Ｐｒｏｔｅｏｍｉｃｓ（２００２），１（２），ｐ．１８９－２０３；Ｓｉｒｉｗａｒｄｅｎａ，Ｄ．ｅｔ．ａｌ．，Ｏｐｈｔｈａｌｍｏｌｏｇｙ（２００２）１０９（３），ｐ．４２７－４３１等参照。）も知られている。

[0117] 例えば、ヒト抗体の可変領域を一本鎖抗体（ｓｃＦｖ）としてファージ表面に発現させて、抗原に結合するファージを選択するファージディスプレイ法（Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（２００５），２３，（９），ｐ．１１０５－１１１６）を用いることができる。

[0118] 抗原に結合することで選択されたファージの遺伝子を解析することによって、抗原に結合するヒト抗体の可変領域をコードするＤＮＡ配列を決定する

ことができる。

[0119] 抗原に結合するｓｃＦｖのＤＮＡ配列が明らかになれば、当該配列を有する発現ベクターを作製し、適当な宿主に導入して発現させることによってヒト抗体を取得することができる（国際公開第９２／０１０４７号、同９２／２０７９１号、同９３／０６２１３号、同９３／１１２３６号、同９３／１９１７２号、同９５／０１４３８号、同９５／１５３８８号、Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ（１９９４）１２，ｐ．４３３－４５５、Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（２００５）２３（９），ｐ．１１０５－１１１６）。

[0120] 新たに作製されたヒト抗体が、本明細書に記載のラット抗ヒトＣＤＨ６抗体、キメラ抗ヒトＣＤＨ６抗体又はヒト化抗ヒトＣＤＨ６抗体（例えば、ｒＧ０１９抗体、ｒＧ０５５抗体、ｒＧ０５６抗体、ｒＧ０６１抗体、ｃｈＧ０１９抗体、Ｈ０１Ｌ０２抗体、Ｈ０２Ｌ０２抗体、Ｈ０２Ｌ０３抗体又はＨ０４Ｌ０２抗体）のいずれか１つが結合する部分ペプチド又は部分立体構造に結合すれば、該ヒト抗体が当該ラット抗ヒトＣＤＨ６抗体、キメラ抗ヒトＣＤＨ６抗体又はヒト化抗ヒトＣＤＨ６抗体と同一のエピトープに結合すると判定することができる。あるいは、本明細書に記載のラット抗ヒトＣＤＨ６抗体、キメラ抗ヒトＣＤＨ６抗体又はヒト化抗ヒトＣＤＨ６抗体（例えば、ｒＧ０１９抗体、ｒＧ０５５抗体、ｒＧ０５６抗体、ｒＧ０６１抗体、ｃｈＧ０１９抗体、Ｈ０１Ｌ０２抗体、Ｈ０２Ｌ０２抗体、Ｈ０２Ｌ０３抗体又はＨ０４Ｌ０２抗体）のＣＤＨ６に対する結合に対して該ヒト抗体が競合する（例えば、該ヒト抗体が、ｒＧ０１９抗体、ｒＧ０５５抗体、ｒＧ０５６抗体、ｒＧ０６１抗体、ｃｈＧ０１９抗体、Ｈ０１Ｌ０２抗体、Ｈ０２Ｌ０２抗体、Ｈ０２Ｌ０３抗体又はＨ０４Ｌ０２抗体とＣＤＨ６、好ましくは、ＣＤＨ６のＥＣ３への結合を妨げる）ことを確認することによって、具体的なエピトープの配列又は構造が決定されていなくても、該ヒト抗体が本明細書に記載のラット抗ヒトＣＤＨ６抗体、キメラ抗ヒトＣＤＨ６抗体又はヒト化抗ヒトＣＤＨ６抗体と同一のエピトープに結合すると判定することが

できる。本明細書において、当該判定方法の少なくともいずれか一方の方法により「同一のエピトープに結合する」と判定された場合、新たに作製されたヒト抗体が、本明細書に記載のラット抗ヒトＣＤＨ６抗体、キメラ抗ヒトＣＤＨ６抗体又はヒト化抗ヒトＣＤＨ６抗体と「同一のエピトープに結合する」といえる。エピトープが同一であることが確認された場合、該ヒト抗体がラット抗ヒトＣＤＨ６抗体、キメラ抗ヒトＣＤＨ６抗体又はヒト化抗ヒトＣＤＨ６抗体（例えば、ｒＧ０１９抗体、ｒＧ０５５抗体、ｒＧ０５６抗体、ｒＧ０６１抗体、ｃｈＧ０１９抗体、Ｈ０１Ｌ０２抗体、Ｈ０２Ｌ０２抗体、Ｈ０２Ｌ０３抗体又はＨ０４Ｌ０２抗体）と同等の生物活性を有していることが期待される。

[0121] 以上の方法によって得られたキメラ抗体、ヒト化抗体、又はヒト抗体は、公知の方法等によって抗原に対する結合性を評価し、好適な抗体を選抜することができる。

[0122] 抗体の性質を比較する際の別の指標の一例としては、抗体の安定性を挙げることができる。示差走査カロリメトリー（ＤＳＣ）は、蛋白の相対的構造安定性のよい指標となる熱変性中点（Ｔｍ）を素早く、また正確に測定することができる装置である。ＤＳＣを用いてＴｍ値を測定し、その値を比較することによって、熱安定性の違いを比較することができる。抗体の保存安定性は、抗体の熱安定性とある程度の相関を示すことが知られており（Ｌｏｒｉ Ｂｕｒｔｏｎ，ｅｔ．ａｌ．，Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ ａｎｄ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（２００７）１２，ｐ．２６５－２７３）、熱安定性を指標に、好適な抗体を選抜することができる。抗体を選抜するための他の指標としては、適切な宿主細胞における収量が高いこと、及び水溶液中での凝集性が低いことを挙げることができる。例えば収量の最も高い抗体が最も高い熱安定性を示すとは限らないので、以上に述べた指標に基づいて総合的に判断して、ヒトへの投与に最も適した抗体を選抜する必要がある。

[0123] 本発明の抗体には抗体の修飾体も含まれる。当該修飾体とは、本発明の抗

体に化学的又は生物学的な修飾が施されてなるものを意味する。化学的な修飾体には、アミノ酸骨格への化学部分の結合、Ｎ－結合又はＯ－結合炭水化物鎖の化学修飾体等が含まれる。生物学的な修飾体には、翻訳後修飾（例えば、Ｎ－結合又はＯ－結合への糖鎖付加、Ｎ末又はＣ末のプロセッシング、脱アミド化、アスパラギン酸の異性化、メチオニンの酸化、又はＮ末グルタミンもしくはＮ末グルタミン酸のピログルタミン酸化）されたもの、原核生物宿主細胞を用いて発現させることによってＮ末にメチオニン残基が付加したもの等が含まれる。また、本発明の抗体又は抗原の検出又は単離を可能にするために標識されたもの、例えば、酵素標識体、蛍光標識体、アフィニティ標識体もかかる修飾物の意味に含まれる。このような本発明の抗体の修飾物は、抗体の安定性及び血中滞留性の改善、抗原性の低減、抗体又は抗原の検出又は単離等に有用である。

[0124] また、本発明の抗体に結合している糖鎖修飾を調節すること（グリコシル化、脱フコース化等）によって、抗体依存性細胞傷害活性を増強することが可能である。抗体の糖鎖修飾の調節技術としては、国際公開第１９９９／５４３４２号、同２０００／６１７３９号、同２００２／３１１４０号等が知られているが、これらに限定されるものではない。本発明の抗体には当該糖鎖修飾を調節された抗体も含まれる。

[0125] 抗体遺伝子を一旦単離した後、適当な宿主に導入して抗体を作製する場合には、適当な宿主と発現ベクターの組み合わせを使用することができる。抗体遺伝子の具体例としては、本明細書に記載された抗体の重鎖配列をコードする遺伝子、及び軽鎖配列をコードする遺伝子を組み合わせたものを挙げることができる。宿主細胞を形質転換する際には、重鎖配列遺伝子と軽鎖配列遺伝子は、同一の発現ベクターに挿入されていることが可能であり、又別々の発現ベクターに挿入されていることも可能である。

[0126] 真核細胞を宿主として使用する場合、動物細胞、植物細胞、真核微生物を用いることができる。特に動物細胞としては、哺乳類細胞、例えば、サルの細胞であるＣＯＳ細胞（Ｇｌｕｚｍａｎ，Ｙ．Ｃｅｌｌ（１９８１）２３，

ｐ．１７５－１８２、ＡＴＣＣ　ＣＲＬ－１６５０）、マウス線維芽細胞ＮＩＨ３Ｔ３（ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－１６５８）やチャイニーズ・ハムスター卵巣細胞（ＣＨＯ細胞、ＡＴＣＣ　ＣＣＬ－６１）のジヒドロ葉酸還元酵素欠損株（Ｕｒｌａｕｂ，Ｇ．ａｎｄ　Ｃｈａｓｉｎ，Ｌ．Ａ．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．（１９８０）７７，ｐ．４１２６－４２２０）、ＦｒｅｅＳｔｙｌｅ　２９３Ｆ細胞（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）を挙げることができる。

[0127] 原核細胞を使用する場合は、例えば、大腸菌、枯草菌を挙げることができる。

[0128] これらの細胞に目的とする抗体遺伝子を形質転換によって導入し、形質転換された細胞をｉｎ　ｖｉｔｒｏで培養することによって抗体が得られる。当該培養においては抗体の配列によって収量が異なる場合があり、同等な結合活性を持つ抗体の中から収量を指標に医薬としての生産が容易なものを選別することが可能である。よって、本発明の抗体には、上記形質転換された宿主細胞を培養する工程、及び当該工程で得られた培養物から目的の抗体又は当該抗体の機能性断片を採取する工程を含むことを特徴とする当該抗体の製造方法によって得られる抗体も含まれる。

[0129] なお、哺乳類培養細胞で生産される抗体の重鎖のカルボキシル末端のリシン残基が欠失することが知られており（Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒａｐｈｙ　Ａ，７０５：１２９－１３４（１９９５））、また、同じく重鎖カルボキシル末端のグリシン、リシンの２アミノ酸残基が欠失し、新たにカルボキシル末端に位置するプロリン残基がアミド化されることが知られている（Ａｎａｌｙｔｉｃａｌ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，３６０：７５－８３（２００７））。しかし、これらの重鎖配列の欠失及び修飾は、抗体の抗原結合能及びエフェクター機能（補体の活性化や抗体依存性細胞傷害作用等）には影響を及ぼさない。従って、本発明に係る抗体には、当該修飾を受けた抗体及び当該抗体の機能性断片も含まれ、重鎖カルボキシル末端において１又は２つのアミノ酸が欠失した欠失体、及びアミド化された当

該欠失体（例えば、カルボキシル末端部位のプロリン残基がアミド化された重鎖）等も包含される。但し、抗原結合能及びエフェクター機能が保たれている限り、本発明に係る抗体の重鎖のカルボキシル末端の欠失体は上記の種類に限定されない。本発明に係る抗体を構成する２本の重鎖は、完全長及び上記の欠失体からなる群から選択される重鎖のいずれか一種であってもよいし、いずれか二種を組み合わせたものであってもよい。各欠失体の量比は本発明に係る抗体を産生する哺乳類培養細胞の種類及び培養条件に影響を受け得るが、本発明に係る抗体の主成分としては２本の重鎖の双方でカルボキシル末端の１つのアミノ酸残基が欠失している場合を挙げることができる。

[0130] 本発明の抗体のアイソタイプとしては、例えばＩｇＧ（ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４）等を挙げることができるが、好ましくはＩｇＧ１又はＩｇＧ４を挙げることができる。

[0131] 抗体の生物活性としては、一般的には抗原結合活性、抗原と結合することによって該抗原を発現する細胞に内在化する活性、抗原の活性を中和する活性、抗原の活性を増強する活性、抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）活性、補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）活性及び抗体依存性細胞媒介食作用（ＡＤＣＰ）を挙げることができるが、本発明に係る抗体が有する機能は、ＣＤＨ６に対する結合活性であり、好ましくはＣＤＨ６と結合することによってＣＤＨ６発現細胞に内在化する活性である。さらに、本発明の抗体は、細胞内在化活性に加えて、ＡＤＣＣ活性、ＣＤＣ活性及び／又はＡＤＣＰ活性を併せ持っていても良い。

[0132] 得られた抗体は、均一にまで精製することができる。抗体の分離、精製は通常のタンパク質で使用されている分離、精製方法を使用すればよい。例えばカラムクロマトグラフィー、フィルター濾過、限外濾過、塩析、透析、調製用ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動等を適宜選択、組み合わせれば、抗体を分離、精製することができる（Ｓｔｒａｔｅｇｉｅｓ ｆｏｒ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ ａｎｄ Ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｚａｔｉｏｎ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｃｏｕｒｓｅ Ｍａ

ｎｕａｌ，Ｄａｎｉｅｌ Ｒ．Ｍａｒｓｈａｋ ｅｔ ａｌ．ｅｄｓ．，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ（１９９６）；Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ．Ｅｄ Ｈａｒｌｏｗ ａｎｄ Ｄａｖｉｄ Ｌａｎｅ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ（１９８８））が、これらに限定されるものではない。

[0133] クロマトグラフィーとしては、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等を挙げることができる。

[0134] これらのクロマトグラフィーは、ＨＰＬＣやＦＰＬＣ等の液体クロマトグラフィーを用いて行うことができる。

[0135] アフィニティークロマトグラフィーに用いるカラムとしては、プロテインＡカラム、プロテインＧカラムを挙げることができる。例えばプロテインＡカラムを用いたカラムとして、Ｈｙｐｅｒ Ｄ，ＰＯＲＯＳ，Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ Ｆ．Ｆ．（ファルマシア）等を挙げることができる。

[0136] また抗原を固定化した担体を用いて、抗原への結合性を利用して抗体を精製することも可能である。

[0137] ３．抗ＣＤＨ６抗体－薬物コンジュゲート

（１）薬物

上記「２．抗ＣＤＨ６抗体の製造」にて取得された抗ＣＤＨ６抗体はリンカー構造部分を介して薬物を結合させることによって、抗ＣＤＨ６抗体－薬物コンジュゲートとすることができる。薬物としては、リンカー構造に結合できる置換基、部分構造を有するものであれば特に制限はない。抗ＣＤＨ６抗体－薬物コンジュゲートは結合する薬物に応じて種々の用途に用いることができる。そのような薬物の例としては、抗腫瘍活性を有する物質、血液疾患に対する効果を有する物質、自己免疫疾患に対する効果を有する物質、抗炎症物質、抗菌物質、抗真菌物質、抗寄生虫物質、抗ウイルス物質、抗麻酔

物質等を挙げることができる。

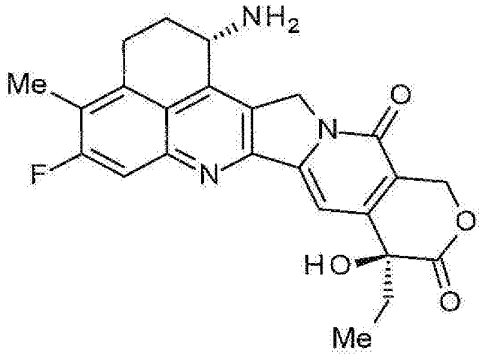
[0138] （１）－１　抗腫瘍化合物

本発明の抗ＣＤＨ６抗体－薬物コンジュゲートに結合される化合物として抗腫瘍性化合物を用いる例について以下に述べる。抗腫瘍性化合物としては、抗腫瘍効果を有する化合物であって、リンカー構造に結合できる置換基、部分構造を有するものであれば特に制限はない。抗腫瘍性化合物は、リンカーの一部又は全部が腫瘍細胞内で切断されて抗腫瘍性化合物部分が遊離されて抗腫瘍効果が発現される。リンカーが薬物との結合部分で切断されれば抗腫瘍性化合物が本来の構造で遊離され、その本来の抗腫瘍効果が発揮される。

[0139] 上記「２．抗ＣＤＨ６抗体の製造」にて取得された抗ＣＤＨ６抗体はリンカー構造部分を介して抗腫瘍性化合物を結合させることによって、抗ＣＤＨ６抗体－薬物コンジュゲートとすることができる。

[0140] 本発明で使用される抗腫瘍性化合物の一つの例として、カンプトテシン誘導体であるエキサテカン（（１Ｓ，９Ｓ）－１－アミノ－９－エチル－５－フルオロ－２，３－ジヒドロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１０，１３（９Ｈ，１５Ｈ）－ジオン；次式：）

[0141] [化5]



[0142] を好適に使用することができる。同化合物は、例えば、米国特許公開公報Ｕ

Ｓ２０１６／０２９７８９０号に記載の方法やその他の公知の方法で容易に取得でき、１位のアミノ基をリンカー構造への結合部位として好適に使用することができる。また、エキサテカンはリンカーの一部が結合した状態で腫瘍細胞内で遊離される場合もあるが、この様な状態でも優れた抗腫瘍効果が発揮される化合物である。

[0143] エキサテカンはカンプトテシン構造を有するので、酸性水性媒体中（例えばｐＨ３程度）ではラクトン環が形成された構造（閉環体）に平衡が偏り、一方、塩基性水性媒体中（例えばｐＨ１０程度）ではラクトン環が開環した構造（開環体）に平衡が偏ることが知られている。このような閉環構造及び開環構造に対応するエキサテカン残基を導入した薬物コンジュゲートであっても同等の抗腫瘍効果が期待され、いずれのものも本発明の範囲に包含されることはいうまでもない。

[0144] 他の抗腫瘍性化合物として例えば、文献（Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｉｃａｌ Ｒｅｖｉｅｗｓ， ６８，ｐ３－１９，２０１６）記載の抗腫瘍化合物を挙げることができ、その一例として、ドキソルビシン（Ｄｏｘｏｒｕｂｉｃｉｎ）、カルケマイシン（Ｃａｌｉｃｈｅａｍｉｃｉｎｅ）、ドラスタチン（Ｄｏｒａｓｔａｔｉｎ）１０、モノメチルアウリスタチンＥ（ＭＭＡＥ）、モノメチルアウリスタチンＦ（ＭＭＡＦ）等のアウリスタチン類（Ａｕｒｉｓｔａｔｉｎｓ）、ＤＭ１、ＤＭ４等のメイタンシノイド類（Ｍａｙｔａｎｓｉｎｏｉｄｓ）、ピロロベンゾジアゼピン（Ｐｙｒｒｏｌｏｂｅｎｚｏｄｉａｚｅｐｉｎｅ）二量体のＳＧ２０００（ＳＪＧ－１３６）、カンプトテシンの誘導体であるＳＮ－３８、ＣＣ－１０６５等のデュオカルマイシン類（Ｄｕｏｃａｒｍｙｃｉｎｓ）、アマニチン（Ａｍａｎｉｔｉｎ）、ダウノルビシン、マイトマイシンＣ、ブレオマイシン、シクロシチジン、ビンクリスチン、ビンブラスチン、メトトレキセート、白金系抗腫瘍剤（シスプラチン若しくはその誘導体）、タキソール若しくはその誘導体等を挙げることができる。

[0145] 抗体－薬物コンジュゲートにおいて、抗体１分子への薬物の結合数は、そ

の有効性、安全性に影響する重要因子である。抗体－薬物コンジュゲートの製造は、薬物の結合数が一定の数となるよう、反応させる原料・試薬の使用量等の反応条件を規定して実施されるが、低分子化合物の化学反応とは異なり、異なる数の薬物が結合した混合物として得られるのが通常である。抗体１分子への薬物の結合数は平均値、すなわち、平均薬物結合数として特定され、表記される。本発明でも原則として断りのない限り、すなわち、異なる薬物結合数をもつ抗体－薬物コンジュゲート混合物に含まれる特定の薬物結合数をもつ抗体－薬物コンジュゲートを示す場合を除き、薬物の結合数は平均値を意味する。抗体分子へのエキサテカンの結合数はコントロール可能であり、１抗体あたりの薬物平均結合数として、１～１０個程度のエキサテカンを結合させることができるが、好ましくは２～８個、３～８個、４～８個、５～８個、６～８個、７～８個であり、より好ましくは５～８個であり、更に好ましくは７～８個であり、更により好ましくは８個である。なお、当業者であれば本願の実施例の記載から抗体に必要な数の薬物を結合させる反応を設計することができ、エキサテカンの結合数をコントロールした抗体－薬物コンジュゲートを取得することができる。

[0146] （２）リンカー構造

本発明の抗ＣＤＨ６抗体－薬物コンジュゲートにおいて薬物を抗ＣＤＨ６抗体に結合させるリンカー構造について述べる。

[0147] 本願の抗体－薬物コンジュゲートにおいて、抗ＣＤＨ６抗体と薬物とを結合するリンカー構造は、抗体－薬物コンジュゲートとして用いることができる限りにおいて特に制限されず、使用目的に応じて適宜選択して用いることもできる。リンカー構造の一例としては、公知文献（Ｐｈａｒｍａｃｏｌ Ｒｅｖ ６８：３－１９，Ｊａｎｕａｒｙ ２０１６、Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｃｅｌｌ ＤＯＩ １０．１００７／ｓ１３２３８－０１６－０３２３－０等）に記載のリンカーを挙げることができ、更に具体的な例としては、ＶＣ（バリン－シトルリン：ｖａｌｉｎｅ－ｃｉｔｒｕｌｌｉｎｅ）、ＭＣ（マレインアミドカプロイル：ｍａｌｅｉｍｉｄｏｃａｐｒｏｙｌ）、ＳＭＣＣ（

スクシニミジル　４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－１－カルボキシレート：ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄｙｌ　４－（Ｎ－ｍａｌｅｉｍｉｄｏｍｅｔｈｙｌ）　ｃｙｃｌｏｈｅｘａｎｅ－１－ｃａｒｂｏｘｙｌａｔｅ）、ＳＰＰ（Ｎ－スクシニミジル　４－（２－ピリジルジチオ）ペンタン酸：Ｎ－ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄｙｌ　４－（２－ｐｙｒｉｄｙｌｄｉｔｈｉｏ）ｐｅｎｔａｎｏａｔｅ、ＳＳ（ジスルフィド：ｄｉｓｕｌｆｉｄｅ）、ＳＰＤＢ（Ｎ－スクシミジル　４－（２－ピリジルジチオ）ブチラート）Ｎ－ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄｙｌ　４－（２－ｐｙｒｉｄｙｌｄｉｔｈｉｏ）ｂｕｔｙｒａｔｅ、ＳＳ／ヒドラゾン、ヒドラゾン、カルボネートを挙げることができる。

[0148] 他の一例としては、例えば、米国特許公開公報ＵＳ２０１６／０２９７８９０に記載のリンカー構造（一例として、段落［０２６０］～［０２８９］に記載のもの）を挙げることができ、以下の構造のものを好適に使用することができる。なお以下に示す構造の左端が抗体との結合部位であり、右端が薬物との結合部位である。また、下記のリンカー構造中のＧＧＦＧは、グリシン－グリシン－フェニルアラニン－グリシン（ＧＧＦＧ）からなるペプチド結合でつながっているアミノ酸配列を示す。

－（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ－３－ｙｌ－Ｎ）－CH_2CH_2－Ｃ（＝Ｏ）－ＧＧＦＧ－ＮＨ－$CH_2CH_2CH_2$－Ｃ（＝Ｏ）－、

－（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ－３－ｙｌ－Ｎ）－$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$－Ｃ（＝Ｏ）－ＧＧＦＧ－ＮＨ－$CH_2CH_2CH_2$－Ｃ（＝Ｏ）－、

－（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ－３－ｙｌ－Ｎ）－$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$－Ｃ（＝Ｏ）－ＧＧＦＧ－ＮＨ－CH_2－Ｏ－CH_2－Ｃ（＝Ｏ）－、

－（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ－３－ｙｌ－Ｎ）－$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$－Ｃ（＝Ｏ）－ＧＧＦＧ－ＮＨ－CH_2CH_2－Ｏ－CH_2－Ｃ（＝Ｏ）－、

－（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ－３－ｙｌ－Ｎ）－CH_2CH_2－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－CH_2CH_2O－CH_2CH_2O－CH_2CH_2－Ｃ（＝Ｏ）－ＧＧＦＧ－ＮＨ－$CH_2CH_2CH_2$－Ｃ（＝Ｏ）－、

－（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ－３－ｙｌ－Ｎ）－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｏ－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｏ－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｏ－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｏ－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－Ｃ（＝Ｏ）－ＧＧＦＧ－ＮＨ－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－Ｃ（＝Ｏ）－。

[0149] より好ましくは、次のものを挙げることができる。

－（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ－３－ｙｌ－Ｎ）－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－Ｃ（＝Ｏ）－ＧＧＦＧ－ＮＨ－ＣＨ$_2$－Ｏ－ＣＨ$_2$－Ｃ（＝Ｏ）－、

－（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ－３－ｙｌ－Ｎ）－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－Ｃ（＝Ｏ）－ＧＧＦＧ－ＮＨ－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－Ｏ－ＣＨ$_2$－Ｃ（＝Ｏ）－、

－（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ－３－ｙｌ－Ｎ）－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｏ－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｏ－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－Ｃ（＝Ｏ）－ＧＧＦＧ－ＮＨ－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－Ｃ（＝Ｏ）－。

さらにより好ましくは、

－（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ－３－ｙｌ－Ｎ）－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－Ｃ（＝Ｏ）－ＧＧＦＧ－ＮＨ－ＣＨ$_2$－Ｏ－ＣＨ$_2$－Ｃ（＝Ｏ）－、

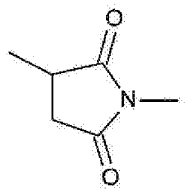
－（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ－３－ｙｌ－Ｎ）－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｏ－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｏ－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－Ｃ（＝Ｏ）－ＧＧＦＧ－ＮＨ－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－Ｃ（＝Ｏ）－。

を挙げることができる。

[0150] 抗体は－（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ－３－ｙｌ－Ｎ）の末端、（例えば、『－（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ－３－ｙｌ－Ｎ）－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－Ｃ（＝Ｏ）－ＧＧＦＧ－ＮＨ－ＣＨ$_2$－Ｏ－ＣＨ$_2$－Ｃ（＝Ｏ）－』においては、（－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－）が結合するのとは反対側の末端（左末端））で結合し、抗腫瘍性化合物は－（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ－３－ｙｌ－Ｎ）とは反対側の末端（上記例では右末端の、ＣＨ$_2$－Ｏ－ＣＨ$_2$－Ｃ（＝Ｏ）－のカルボニル基で結合する。『－（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ－３－ｙｌ－Ｎ）－』は、次式：

[0151]

[化6]



[0152] で示される構造を有する。この部分構造における３位が抗ＣＤＨ６抗体への結合部位である。この３位での該抗体との結合は、チオエーテルを形成して結合することが特徴である。この構造部分の１位の窒素原子は、この構造が含まれるリンカー内に存在するメチレンの炭素原子と結合する。

[0153] 薬物をエキサテカンとする本発明の抗体－薬物コンジュゲートにおいては、下記の構造の薬物－リンカー構造部分を抗体に結合させたものが好ましい。これらの薬物－リンカー構造部分は、１抗体あたりの平均結合数として、１から１０を結合させればよいが、好ましくは２から８であり、より好ましくは５から８であり、更に好ましくは７から８であり、更により好ましくは８である。

－（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ－３－ｙｌ－Ｎ）－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－Ｃ（＝Ｏ）－ＧＧＦＧ－ＮＨ－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－Ｃ（＝Ｏ）－（ＮＨ－ＤＸ）、

－（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ－３－ｙｌ－Ｎ）－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－Ｃ（＝Ｏ）－ＧＧＦＧ－ＮＨ－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－Ｃ（＝Ｏ）－（ＮＨ－ＤＸ）、

－（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ－３－ｙｌ－Ｎ）－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－Ｃ（＝Ｏ）－ＧＧＦＧ－ＮＨ－ＣＨ$_2$－Ｏ－ＣＨ$_2$－Ｃ（＝Ｏ）－（ＮＨ－ＤＸ）、

－（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ－３－ｙｌ－Ｎ）－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－Ｃ（＝Ｏ）－ＧＧＦＧ－ＮＨ－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－Ｏ－ＣＨ$_2$－Ｃ（＝Ｏ）－（ＮＨ－ＤＸ）、

－（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ－３－ｙｌ－Ｎ）－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｏ－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｏ－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－Ｃ（＝Ｏ）－ＧＧＦＧ－Ｎ

Ｈ－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－Ｃ（＝Ｏ）－（ＮＨ－ＤＸ）、
－（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ－３－ｙｌ－Ｎ）－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｏ－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｏ－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｏ－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｏ－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－Ｃ（＝Ｏ）－ＧＧＦＧ－ＮＨ－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－Ｃ（＝Ｏ）－（ＮＨ－ＤＸ）。

[0154] より、好ましくは、次のものである。

－（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ－３－ｙｌ－Ｎ）－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－Ｃ（＝Ｏ）－ＧＧＦＧ－ＮＨ－ＣＨ$_2$－Ｏ－ＣＨ$_2$－Ｃ（＝Ｏ）－（ＮＨ－ＤＸ）、
－（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ－３－ｙｌ－Ｎ）－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－Ｃ（＝Ｏ）－ＧＧＦＧ－ＮＨ－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－Ｏ－ＣＨ$_2$－Ｃ（＝Ｏ）－（ＮＨ－ＤＸ）、
－（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ－３－ｙｌ－Ｎ）－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｏ－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｏ－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－Ｃ（＝Ｏ）－ＧＧＦＧ－ＮＨ－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－Ｃ（＝Ｏ）－（ＮＨ－ＤＸ）。

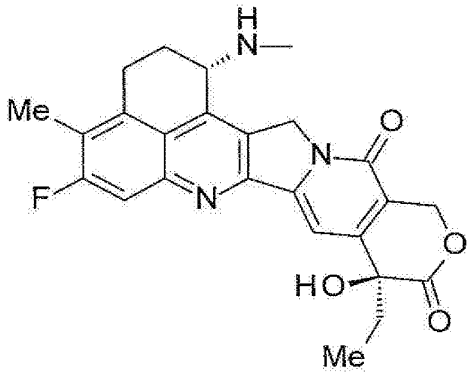
[0155] さらに、より好ましくは、次のものを挙げることができる。

－（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ－３－ｙｌ－Ｎ）－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－Ｃ（＝Ｏ）－ＧＧＦＧ－ＮＨ－ＣＨ$_2$－Ｏ－ＣＨ$_2$－Ｃ（＝Ｏ）－（ＮＨ－ＤＸ）
－（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ－３－ｙｌ－Ｎ）－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｏ－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｏ－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－Ｃ（＝Ｏ）－ＧＧＦＧ－ＮＨ－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－Ｃ（＝Ｏ）－（ＮＨ－ＤＸ）。

[0156] また、－（ＮＨ－ＤＸ）は次式：

[0157]

[化7]



[0158] で示される構造であり、エキサテカンの１位のアミノ基の水素原子１個が除かれて生成する基を示す。

[0159] （３）抗体－薬物コンジュゲートの製造方法

本発明の抗体ー薬物コンジュゲートに用いることができる抗体は、上記「２．抗ＣＤＨ６抗体の製造」の項及び実施例に記載の内在化活性を有する抗ＣＤＨ６抗体及び該抗体の機能性断片であれば特に制限がない。

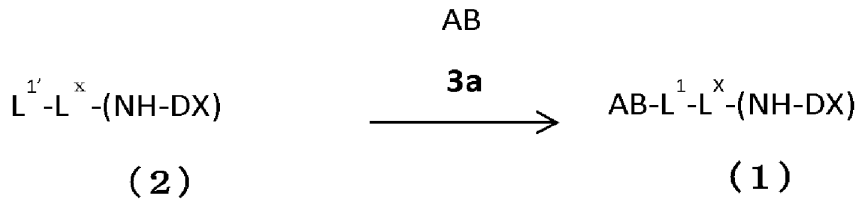
[0160] 次に、本発明の抗体－薬物コンジュゲートの代表的な製造方法について説明する。なお、以下において、化合物を示すために、各反応式中に示される化合物の番号を用いる。すなわち、『式（１）の化合物』、『化合物（１）』等と称する。また、これ以外の番号の化合物についても同様に記載する。

[0161] （３）－１　製造方法１

下記式（１）で示される抗体－薬物コンジュゲートのうち、チオエーテルを介して抗ＣＤＨ６抗体とリンカー構造が結合しているものは抗ＣＤＨ６抗体を還元してジスルフィド結合をスルヒドリル基に変換した抗体に対して、既知の方法によって入手しうる化合物（２）（例えば、ＵＳ２０１６／２９７８９０号公開特許公報に記載の方法（例えば段落［０３３６］～［０３７４］に記載の方法）で入手可能）を反応させることによって製造することができる。例えば下記の方法によって製造することができる。

[0162]

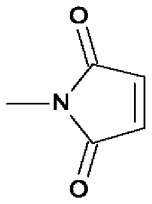
[数1]



（２） （１）

[0163] ［式中、ＡＢは、スルフヒドリル基を有する抗体を示す。
ここで、Ｌ１は、
－（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ－３－ｙｌ－Ｎ）－の構造で示される。
Ｌ１’は次式で示される、マレイミジル基を示す。］

[0164] [化8]



[0165] －Ｌ１－Ｌｘは、以下の式で示されるいずれかの構造を有する。
－（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ－３－ｙｌ－Ｎ）－ＣＨ２ＣＨ２－Ｃ（＝Ｏ）－ＧＧＦＧ－ＮＨ－ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２－Ｃ（＝Ｏ）－、
－（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ－３－ｙｌ－Ｎ）－ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２－Ｃ（＝Ｏ）－ＧＧＦＧ－ＮＨ－ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２－Ｃ（＝Ｏ）－、
－（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ－３－ｙｌ－Ｎ）－ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２－Ｃ（＝Ｏ）－ＧＧＦＧ－ＮＨ－ＣＨ２－Ｏ－ＣＨ２－Ｃ（＝Ｏ）－、
－（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ－３－ｙｌ－Ｎ）－ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２ＣＨ２－Ｃ（＝Ｏ）－ＧＧＦＧ－ＮＨ－ＣＨ２ＣＨ２－Ｏ－ＣＨ２－Ｃ（＝Ｏ）－、
－（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ－３－ｙｌ－Ｎ）－ＣＨ２ＣＨ２－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－ＣＨ２ＣＨ２Ｏ－ＣＨ２ＣＨ２Ｏ－ＣＨ２ＣＨ２－Ｃ（＝Ｏ）－ＧＧＦＧ－Ｎ

Ｈ－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－Ｃ（＝Ｏ）－、

－（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ－３－ｙｌ－Ｎ）－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｏ－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｏ－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｏ－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｏ－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－Ｃ（＝Ｏ）－ＧＧＦＧ－ＮＨ－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－Ｃ（＝Ｏ）－。

[0166] これらのうちでより好ましくは、次のものである。

－（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ－３－ｙｌ－Ｎ）－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－Ｃ（＝Ｏ）－ＧＧＦＧ－ＮＨ－ＣＨ$_2$－Ｏ－ＣＨ$_2$－Ｃ（＝Ｏ）－、

－（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ－３－ｙｌ－Ｎ）－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－Ｃ（＝Ｏ）－ＧＧＦＧ－ＮＨ－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－Ｏ－ＣＨ$_2$－Ｃ（＝Ｏ）－、

－（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ－３－ｙｌ－Ｎ）－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｏ－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｏ－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－Ｃ（＝Ｏ）－ＧＧＦＧ－ＮＨ－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－Ｃ（＝Ｏ）－。

[0167] さらに、好ましくは、次のものを挙げることができる。

－（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ－３－ｙｌ－Ｎ）－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－Ｃ（＝Ｏ）－ＧＧＦＧ－ＮＨ－ＣＨ$_2$－Ｏ－ＣＨ$_2$－Ｃ（＝Ｏ）－、

－（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄ－３－ｙｌ－Ｎ）－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｏ－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｏ－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－Ｃ（＝Ｏ）－ＧＧＦＧ－ＮＨ－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－Ｃ（＝Ｏ）－。

[0168] また、上記の反応式において抗体－薬物コンジュゲート（１）では、薬物からリンカー末端までの構造部分１個が１個の抗体に対して結合した構造として記載されているが、これは説明のための便宜的な記載であって、実際には当該構造部分が１個の抗体分子に対して複数個が結合している場合が多い。この状況は以下の製造方法の説明においても同様である。

[0169] すなわち、既知の方法によって入手しうる化合物（２）（例えば、ＵＳ２０１６／２９７８９０号公開特許公報に記載の方法（例えば段落［０３３６］～［０３７４］に記載の方法）で入手可能）で入手可能）と、スルフヒドリル基を有する抗体（３ａ）を反応させることによって、抗体－薬物コンジュゲート（１）を製造することができる。

[0170] スルフヒドリル基を有する抗体（３ａ）は、当業者周知の方法で得ることができる（Ｈｅｒｍａｎｓｏｎ，Ｇ．Ｔ、Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ、ｐｐ．５６－１３６、ｐｐ．４５６－４９３、Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ（１９９６））。例えば、Ｔｒａｕｔ’ｓ試薬を抗体のアミノ基に作用させる；Ｎ－サクシンイミジルＳ－アセチルチオアルカノエート類を抗体のアミノ基に作用させた後、ヒドロキシルアミンを作用させる；Ｎ－サクシンイミジル３－（ピリジルジチオ）プロピオネートを作用させた後、還元剤を作用させる；ジチオトレイトール、２－メルカプトエタノール、トリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン塩酸塩（ＴＣＥＰ）等の還元剤を抗体に作用させて抗体内鎖間部のジスルフィド結合を還元しスルフヒドリル基を生成させる；等の方法を挙げることができるがこれらに限定されることはない。

[0171] 具体的には、還元剤としてＴＣＥＰを、抗体内鎖間部ジスルフィド一個当たりに対して０．３乃至３モル当量用い、キレート剤を含む緩衝液中で、抗体と反応させることで、抗体内鎖間部ジスルフィドが部分的もしくは完全に還元された抗体を得ることができる。キレート剤としては、例えばエチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）やジエチレントリアミン５酢酸（ＤＴＰＡ）等を挙げることができる。これ等を１ｍＭ乃至２０ｍＭの濃度で用いればよい。緩衝液としては、リン酸ナトリウムやホウ酸ナトリウム、酢酸ナトリウム溶液等を用いることができる。具体的な例において、抗体は４℃乃至３７℃にて１乃至４時間ＴＣＥＰと反応させることで部分的もしくは完全に還元されたスルフヒドリル基を有する抗体（３ａ）を得ることが出来る。

[0172] なお、ここでスルフヒドリル基を薬物－リンカー部分に付加させる反応を実施させることでチオエーテル結合によって薬物－リンカー部分を結合させることができる。

[0173] 次に、スルフヒドリル基を有する抗体（３ａ）一個あたり、２乃至２０モル当量の化合物（２）を使用して、抗体１個当たり２個乃至８個の薬物が結合した抗体一薬物コンジュゲート（１）を製造することができる。具体的に

は、スルフヒドリル基を有する抗体（３ａ）を含む緩衝液に、化合物（２）を溶解させた溶液を加えて反応させればよい。ここで、緩衝液としては、酢酸ナトリウム溶液、リン酸ナトリウムやホウ酸ナトリウム、等を用いればよい。反応時のｐＨは５乃至９であり、より好適にはｐＨ７付近で反応させればよい。化合物（２）を溶解させる溶媒としては、ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）、ジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）、ジメチルアセトアミド（ＤＭＡ）、Ｎ－メチル－２－ピリドン（ＮＭＰ）等の有機溶媒を用いることができる。化合物（２）を溶解させた有機溶媒溶液を、スルフヒドリル基を有する抗体（３ａ）を含む緩衝液に１乃至２０％ｖ／ｖを加えて反応させればよい。反応温度は、０乃至３７℃、より好適には１０乃至２５℃であり、反応時間は、０．５乃至２時間である。反応は、未反応の化合物（２）の反応性をチオール含有試薬によって失活させることによって終了できる。チオール含有試薬は例えば、システイン又はＮ－アセチル－Ｌ－システイン（ＮＡＣ）である。より具体的には、ＮＡＣを、用いた化合物（２）に対して、１乃至２モル当量加え、室温で１０乃至３０分インキュベートすることにより反応を終了できる。

[0174] （４）抗体―薬物コンジュゲートの同定

製造した抗体－薬物コンジュゲート（１）は、以下の共通操作によって濃縮、バッファー交換、精製、抗体濃度及び抗体一分子あたりの薬物平均結合数の測定を行い、抗体－薬物コンジュゲート（１）の同定を行うことができる。

[0175] （４）－１　共通操作Ａ：抗体もしくは抗体－薬物コンジュゲート水溶液の濃縮

Ａｍｉｃｏｎ　Ｕｌｔｒａ（５０，０００　ＭＷＣＯ，Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ）の容器内に抗体もしくは抗体－薬物コンジュゲート溶液を入れ、遠心機（Ａｌｌｅｇｒａ　Ｘ－１５Ｒ，Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ，Ｉｎｃ．）を用いた遠心操作（２０００Ｇ乃至３８００Ｇにて５乃至２０分間遠心）にて、抗体もしくは抗体－薬物コンジュゲート

溶液を濃縮した。

[0176] （４）－２　共通操作Ｂ：抗体の濃度測定

ＵＶ測定器（Ｎａｎｏｄｒｏｐ　１０００，Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ　Ｉｎｃ．）を用いて、メーカー規定の方法に従い、抗体濃度の測定を行った。その際に、抗体ごとに異なる２８０ｎｍ吸光係数（１．３ｍＬｍｇ$^{-1}$ｃｍ$^{-1}$乃至１．８ｍＬｍｇ$^{-1}$ｃｍ$^{-1}$）を用いた。

[0177] （４）－３　共通操作Ｃ：抗体のバッファー交換

Ｓｅｐｈａｄｅｘ　Ｇ－２５担体を使用したＮＡＰ－２５カラム（Ｃａｔ．Ｎｏ．１７－０８５２－０２，ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　Ｊａｐａｎ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ）を、メーカー規定の方法に従い、塩化ナトリウム（５０ｍＭ）及びＥＤＴＡ（２ｍＭ）を含むリン酸緩衝液（５０ｍＭ，ｐＨ６．０）（本明細書でＰＢＳ６．０／ＥＤＴＡと称する。）にて平衡化させた。このＮＡＰ－２５カラム一本につき、抗体水溶液２．５ｍＬをのせたのち、ＰＢＳ６．０／ＥＤＴＡ３．５ｍＬで溶出させた画分（３．５ｍＬ）を分取した。この画分を共通操作Ａによって濃縮し、共通操作Ｂを用いて抗体濃度の測定を行ったのちに、ＰＢＳ６．０／ＥＤＴＡを用いて２０ｍｇ／ｍＬに抗体濃度を調整した。

[0178] （４）－４　共通操作Ｄ：抗体－薬物コンジュゲートの精製

市販のＳｏｒｂｉｔｏｌ（５％）を含む酢酸緩衝液（１０ｍＭ，ｐＨ５．５；本明細書でＡＢＳと称する。）のいずれかの緩衝液でＮＡＰ－２５カラムを平衡化させた。このＮＡＰ－２５カラムに、抗体－薬物コンジュゲート反応水溶液（約２．５ｍＬ）をのせ、メーカー規定の量の緩衝液で溶出させることで、抗体画分を分取した。この分取画分を再びＮＡＰ－２５カラムにのせ緩衝液で溶出させるゲルろ過精製操作を計２乃至３回繰り返すことで、未結合の薬物リンカーや低分子化合物（トリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン塩酸塩（ＴＣＥＰ），Ｎ－アセチル－Ｌ－システイン（ＮＡＣ），ジメチルスルホキシド）を除いた抗体－薬物コンジュゲートを得た。

[0179] （４）－５　共通操作Ｅ：抗体－薬物コンジュゲートにおける抗体濃度及

び抗体一分子あたりの薬物平均結合数の測定

抗体－薬物コンジュゲートにおける結合薬物濃度は、抗体－薬物コンジュゲート水溶液の２８０ｎｍ及び３７０ｎｍの二波長におけるＵＶ吸光度を測定したのちに下記の計算を行うことで、算出することができる。

[0180] ある波長における全吸光度は系内に存在する全ての吸収化学種の吸光度の和に等しい［吸光度の加成性］ことから、抗体と薬物のコンジュゲーション前後において、抗体及び薬物のモル吸光係数に変化がないと仮定すると、抗体－薬物コンジュゲートにおける抗体濃度及び薬物濃度は、下記の関係式で示される。

$$A_{280}=A_{D,280}+A_{A,280}=\varepsilon_{D,280}C_D+\varepsilon_{A,280}C_A \quad \text{式（１）}$$

$$A_{370}=A_{D,370}+A_{A,370}=\varepsilon_{D,370}C_D+\varepsilon_{A,370}C_A \quad \text{式（２）}$$

ここで、A_{280}は２８０ｎｍにおける抗体－薬物コンジュゲート水溶液の吸光度を示し、A_{370}は３７０ｎｍにおける抗体－薬物コンジュゲート水溶液の吸光度を示し、$A_{A,280}$は２８０ｎｍにおける抗体の吸光度を示し、$A_{A,370}$は３７０ｎｍにおける抗体の吸光度を示し、$A_{D,280}$は２８０ｎｍにおけるコンジュゲート前駆体の吸光度を示し、$A_{D,370}$は３７０ｎｍにおけるコンジュゲート前駆体の吸光度を示し、$\varepsilon_{A,280}$は２８０ｎｍにおける抗体のモル吸光係数を示し、$\varepsilon_{A,370}$は３７０ｎｍにおける抗体のモル吸光係数を示し、$\varepsilon_{D,280}$は２８０ｎｍにおけるコンジュゲート前駆体のモル吸光係数を示し、$\varepsilon_{D,370}$は３７０ｎｍにおけるコンジュゲート前駆体のモル吸光係数を示し、C_Aは抗体－薬物コンジュゲートにおける抗体濃度を示し、C_Dは抗体－薬物コンジュゲートにおける薬物濃度を示す。

[0181] ここで、$\varepsilon_{A,280}$、$\varepsilon_{A,370}$、$\varepsilon_{D,280}$、$\varepsilon_{D,370}$は、事前に用意した値（計算推定値もしくは化合物のＵＶ測定から得られた実測値）が用いられる。例えば、$\varepsilon_{A,280}$は、抗体のアミノ酸配列から、既知の計算方法（Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｃｉｅｎｃｅ，１９９５，ｖｏｌ．４，２４１１－２４２３）によって推定することが出来る。$\varepsilon_{A,370}$は、通常、ゼロである。$\varepsilon_{D,280}$及び$\varepsilon_{D,370}$は、用いるコンジュゲート前駆体をあるモル濃度に溶解させた溶液の吸

光度を測定することで、ランベルト・ベールの法則（吸光度＝モル濃度×モル吸光係数×セル光路長）によって、得ることができる。抗体－薬物コンジュゲート水溶液のA_{280}及びA_{370}を測定し、これらの値を式（１）及び（２）に代入して連立方程式を解くことによって、C_A及びC_Dを求めることができる。さらにC_DをC_Aで除することで１抗体あたりの薬物平均結合数が求めることができる。

[0182] （４）－６　共通操作Ｆ：抗体－薬物コンジュゲートにおける抗体一分子あたりの薬物平均結合数の測定（２）

抗体－薬物コンジュゲートにおける抗体一分子あたりの薬物平均結合数は、前述の「（４）－５　共通操作Ｅ」に加え、以下の方法を用いる高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）分析によっても求めることができる。以下に、抗体と薬物リンカーがジスルフィド結合している場合のＨＰＬＣによる薬物平均結合数の測定方法を記載する。当業者は、この方法を参照して、抗体と薬物リンカーとの結合様式に依存して適宜、ＨＰＬＣにより薬物平均結合数を測定し得る。

[0183] Ｆ－１．ＨＰＬＣ分析用サンプルの調製（抗体－薬物コンジュゲートの還元）

抗体－薬物コンジュゲート溶液（約１ｍｇ／ｍＬ、６０μＬ）をジチオトレイトール（ＤＴＴ）水溶液（１００ｍＭ、１５μＬ）と混合する。混合物を３７℃で３０分インキュベートすることで、抗体－薬物コンジュゲートの軽鎖及び重鎖間のジスルフィド結合を切断したサンプルを、ＨＰＬＣ分析に用いる。

[0184] Ｆ－２．ＨＰＬＣ分析

ＨＰＬＣ分析を、下記の測定条件にて行う。

[0185] ＨＰＬＣシステム：Ａｇｉｌｅｎｔ　１２９０　ＨＰＬＣシステム（Ａｇｉｌｅｎｔ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）

検出器：紫外吸光度計（測定波長：２８０ｎｍ）

カラム：ＡＣＱＵＩＴＹ　ＵＰＬＣ　ＢＥＨ　Ｐｈｅｎｙｌ（２．１×５

０ｍｍ、１．７μｍ、１３０Å；Ｗａｔｅｒｓ、Ｐ／Ｎ　１８６００２８８４）

カラム温度：８０℃

移動相Ａ：０．１０％トリフルオロ酢酸（ＴＦＡ）、１５％２－プロパノールを含む水溶液

移動相Ｂ：０．０７５％ＴＦＡ、１５％２－プロパノールを含むアセトニトリル溶液

グラジエントプログラム：１４％－３６％（０分－１５分）、３６％－８０％（１５分－１７分）、８０％－１４％（１７分―１７．０１分）、１４％（１７．０１分―２５分）

サンプル注入量：１０μＬ

Ｆ－３．データ解析

Ｆ－３－１　薬物の結合していない抗体の軽鎖（Ｌ０）及び重鎖（Ｈ０）に対して、薬物の結合した軽鎖（薬物がi個結合した軽鎖：L_i）及び重鎖（薬物がi個結合した重鎖：H_i）は、結合した薬物の数に比例して疎水性が増し保持時間が大きくなることから、例えば、Ｌ０、Ｌ１、Ｈ０、Ｈ１、Ｈ２、Ｈ３の順に溶出される。Ｌ０及びＨ０との保持時間比較により検出ピークをＬ０、Ｌ１、Ｈ０、Ｈ１、Ｈ２、Ｈ３のいずれかに割り当てることができる。薬物結合数は、当業者によって定義され得るが、好ましくは、Ｌ０、Ｌ１、Ｈ０、Ｈ１、Ｈ２、Ｈ３である。

[0186] Ｆ－３－２　薬物リンカーにＵＶ吸収があるため、薬物リンカーの結合数に応じて、軽鎖、重鎖及び薬物リンカーのモル吸光係数を用いて下式に従ってピーク面積値の補正を行う。

[0187] [数2]

$$\text{薬物がi個結合した軽鎖ピーク面積補正値}(A_{Li}) = \text{ピーク面積} \times \frac{\text{軽鎖のモル吸光係数}}{\text{軽鎖のモル吸光係数} + \text{結合薬物数（i）} \times \text{薬物リンカーのモル吸光係数}}$$

[0188] [数3]

$$\text{薬物がｉ個結合した重鎖ピーク面積補正値（}A_{Hi}\text{）＝ピーク面積}\times\frac{\text{重鎖のモル吸光係数}}{\text{重鎖のモル吸光係数＋結合薬物数（i）}\times\text{薬物リンカーのモル吸光係数}}$$

[0189] ここで、各抗体における軽鎖及び重鎖のモル吸光係数（２８０ｎｍ）は、既知の計算方法（Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｃｉｅｎｃｅ，１９９５，ｖｏｌ．４，２４１１－２４２３）によって、各抗体の軽鎖及び重鎖のアミノ酸配列から推定される値を用いることができる。Ｈ０１Ｌ０２の場合、そのアミノ酸配列に従って、軽鎖のモル吸光係数として３１７１０を、重鎖のモル吸光係数として７９９９０を推定値として用いた。また、薬物リンカーのモル吸光係数（２８０ｎｍ）は、各薬物リンカーをメルカプトエタノール又はＮ－アセチルシステインで反応させ、マレイミド基をサクシニイミドチオエーテルに変換した化合物の実測のモル吸光係数（２８０ｎｍ）を用いた。吸光度を測定する波長は、当業者によって適宜設定され得るが、好ましくは、抗体のピークが測定され得る波長であり、より好ましくは２８０ｎｍである。

[0190] Ｆ－３－３ ピーク面積補正値合計に対する各鎖ピーク面積比（％）を下式に従って計算する。

[0191] [数4]

$$\text{薬物がｉ個結合した軽鎖ピーク面積比}=\frac{A_{Li}}{A_{L0}+A_{L1}}\times 100$$

$$\text{薬物がｉ個結合した重鎖ピーク面積比}=\frac{A_{Hi}}{A_{H0}+A_{H1}+A_{H2}+A_{H3}}\times 100$$

A_{Li}，A_{Hi}：Ｌｉ，Ｈｉ各々のピーク面積補正値

[0192] Ｆ－３－４ 抗体－薬物コンジュゲートにおける抗体一分子あたりの薬物平均結合数を、下式に従って計算する。

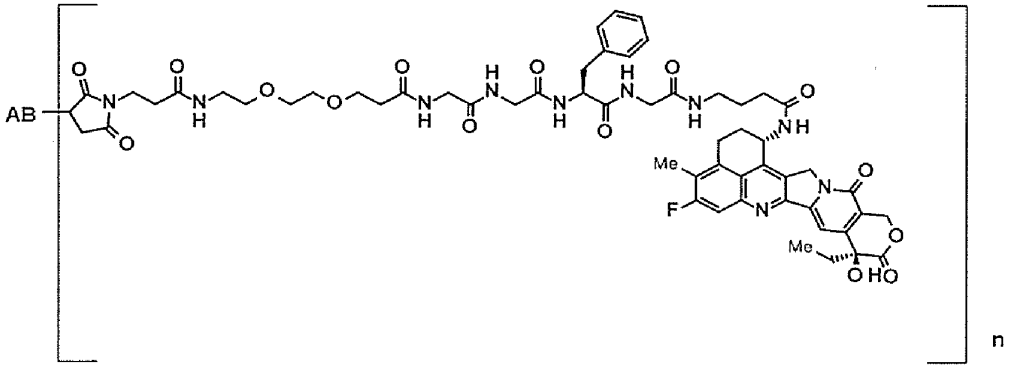
[0193] 薬物平均結合数＝（L_0ピーク面積比×０＋L_1ピーク面積比×１＋H_0ピー

ク面積比×０＋Ｈ$_1$ピーク面積比×１＋Ｈ$_2$ピーク面積比×２＋Ｈ$_3$ピーク面積比×３）／１００×２

なお、抗体－薬物コンジュゲートの量を確保するために、同様な条件で作製して得られた平均薬物数が同程度の複数の抗体－薬物コンジュゲート（例えば±１程度）を混合して新たなロットにすることができる。その場合、平均薬物数は混合前の平均薬物数の間に収まる。

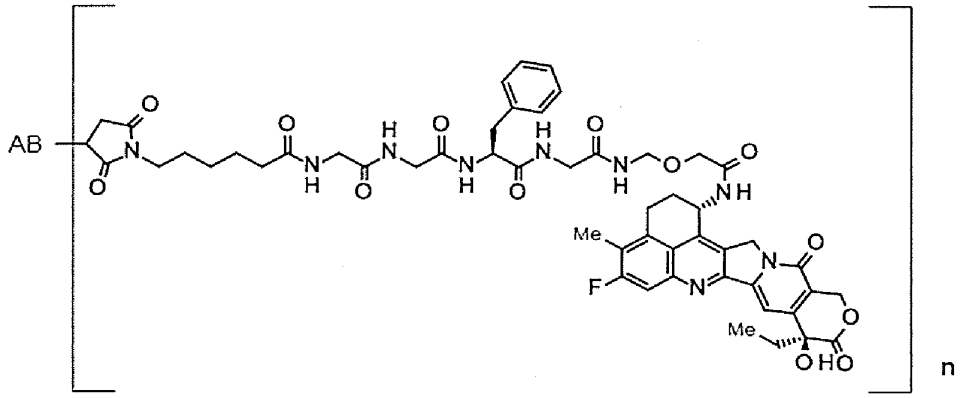
[0194] 本発明の抗体－薬物コンジュゲートの一つの具体例としては次式：

[0195] [化9]



[0196] 又は次式：

[0197] [化10]



[0198] で示される構造を有するものを挙げることができる。

[0199] ここで、ＡＢは本明細書で開示される抗ＣＤＨ６抗体を示し、抗体由来の

スルフヒドリル基を介して結合リンカーと結合している。ここで、ｎはいわゆるＤＡＲ（Ｄｒｕｇ－ｔｏ－Ａｎｔｉｂｏｄｙ　Ｒａｔｉｏ）と同義であり、１抗体あたりの薬物抗体比を示す。すなわち、抗体１分子への薬物の結合数を示すが、これは平均値、すなわち、平均薬物結合数として特定され、表記される数値である。本発明の[化９]及び[化１０]で示される抗体－薬物コンジュゲートの場合、共通操作Ｆによる測定で、ｎは、２から８であればよく、好ましくは５から８であり、更に好ましくは７から８であり、更により好ましく８である。

[0200] 本発明の抗体薬物－コンジュゲートの一例として、上記式［化９］又は［化１０］に示される構造において、ＡＢで示される抗体が、以下の（ａ）乃至（ｇ）からなる群から選択されるいずれか１項に記載の重鎖及び軽鎖の抗体又はその機能性断片を含む、抗体－薬物コンジュゲート又はその薬理学上許容される塩を挙げることができる：

（ａ）配列番号６１に示される軽鎖全長アミノ酸配列の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号６９に示される重鎖全長アミノ酸配列の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖からなる抗体；

（ｂ）配列番号６１に示される軽鎖全長アミノ酸配列の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号７３に示される重鎖全長アミノ酸配列の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖からなる抗体；

（ｃ）配列番号６１に示される軽鎖全長アミノ酸配列の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号７７に示される重鎖全長アミノ酸配列の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖からなる抗体；

（ｄ）配列番号６５に示される軽鎖全長アミノ酸配列の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号６９に示される重鎖全長アミノ酸配列の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖からなる抗体；

（ｅ）配列番号６５に示される軽鎖全長アミノ酸配列の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号７３に示される重鎖全長アミノ酸配列の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖からなる抗体；

（ｆ）配列番号６５に示される軽鎖全長アミノ酸配列の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号７７に示される重鎖全長アミノ酸配列の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖からなる抗体；又は

（ｇ）重鎖又は軽鎖がＮ－結合への糖鎖付加、Ｏ－結合への糖鎖付加、Ｎ末のプロセッシング、Ｃ末のプロセッシング、脱アミド化、アスパラギン酸の異性化、メチオニンの酸化、Ｎ末にメチオニン残基の付加、プロリン残基のアミド化、Ｎ末グルタミンやＮ末グルタミン酸のピログルタミン酸化などに代表される翻訳後修飾、及びカルボキシル末端における１つ又は２つのアミノ酸欠失からなる群より選択される１又は２以上の修飾を含む、（ａ）～（ｆ）からなる群から選択されるいずれか１つに記載の抗体。

[0201] ４．医薬

上記、「２．抗ＣＤＨ６抗体の製造」の項及び実施例に記載された本発明の抗ＣＤＨ６抗体及び当該抗体の機能性断片は、腫瘍細胞表面のＣＤＨ６に結合し、内在化活性を有することから、単独であるいは他の薬剤と組み合わせて、医薬として、腎細胞腫瘍及び卵巣腫瘍等のがん、例えば、腎細胞癌、腎淡明細胞癌、乳頭状腎細胞癌、卵巣癌、卵巣漿液性腺癌、甲状腺癌、胆管癌、肺癌（例えば、小細胞肺癌又は非小細胞肺癌）、神経膠芽腫、中皮腫、子宮癌、膵臓癌、ウィルムス腫瘍又は神経芽腫の治療剤として用いることができる。

[0202] また、ＣＤＨ６を発現している細胞の検出に用いることができる。

[0203] 更に、本発明の抗ＣＤＨ６抗体及び当該抗体の機能性断片は、内在化活性を有することから、抗体－薬物コンジュゲートに用いる抗体として供することができる。

[0204] 上記「３．抗ＣＤＨ６抗体－薬物コンジュゲート」の項及び実施例に記載の本発明の抗ＣＤＨ６抗体－薬物コンジュゲートのうちで薬物として細胞傷害活性等の抗腫瘍活性を有する薬物が用いられているものは、内在化活性を有する抗ＣＤＨ６抗体及び／又は当該抗体の機能性断片と細胞傷害活性等の抗腫瘍活性を有する薬物のコンジュゲートであり、ＣＤＨ６を発現している