[表1]

in vitro における A549 肺癌細胞に対する細胞障害活性

実施例 No	細胞障害活性(ｎM)
実施例３	16.0
実施例５	7.6
実施例６	8.8
実施例１３	7.9
実施例１４	10.2
実施例１５	3.5
コルヒチン	32.8

[0509] [表2]

in vitro における HT-29 大腸癌細胞に対する細胞障害活性

実施例 No	細胞障害活性(ｎM)
実施例３	7.3
実施例５	1.2
実施例６	6.7
実施例１３	3.3
実施例１４	8.7
実施例１５	1.6
コルヒチン	16.2

[0510] 試験例２

（最大投与量試験）

（方法）

BALB/cヌードマウスの静脈内に被験物質を投与し、死亡例の認められない最大投与量（MD）を求めた。

[0511] （結果）

本試験において検討した実施例３（４－フルオロコルヒチン）、実施例１３（４－クロロ－Ｎ－プロピオニルデアセチルコルヒチン）及び実施例１５（４－クロロ－Ｎ－（クロロアセチル）デアセチルコルヒチン）の最大投与量はそれぞれ5 mg/kg、60 mg/kg及び60 mg/kgで、コルヒチンの1.5 mg/kgと比較してそれぞれ3.3、40、40倍の用量が投与可能となった（表３）。以上の結果から、本試験にて検討した本発明のコルヒチン誘導体の全てが、陽性対照薬であるコルヒチンよりも動物に対する毒性が軽減されていることが示された。

[0512] [表3]

最大投与量(MD)

実施例No.	最大投与量(mg/kg)
実施例3	5
実施例13	60
実施例15	60
コルヒチン	1.5

[0513] 試験例３

試験例１及び２と同様にして、試験した結果を表４～表６に示す。

[0514]

[表4]

実施例No.	IC_{50} (nM)		MD
	A549	HT-29	mg／kg
34	13.5	7.8	10
43	9.8	8.3	—
44	11.0	8.5	—
45	8.8	5.6	—
49	4.7	1.6	20
50	8.3	7.0	—
76	9.0	8.2	—
77	6.3	2.4	10
78	8.6	7.7	—
79	8.2	6.0	—
81	4.6	1.6	10
89	8.0	6.0	10
54	1.8	1.5	20
55	8.7	7.6	—
56	7.8	6.4	—
57	9.5	8.1	—
53	7.7	6.4	80
74	10.2	7.4	—
70	1.7	1.5	—
71	3.5	1.5	—
60	6.7	2.2	—
72	1.9	1.4	—
61	4.5	1.4	—
62	6.6	6.3	—
66	2.7	1.4	—
63	3.8	8.0	—
68	6.4	1.4	10
コルヒチン	32.8	16.1	1.5

[0515]

[表5]

実施例No.	IC_{50}		MD
	A549	HT-29	mg／kg
116	7.1	5.8	50
125	9.1	2.2	—
146	4.5	0.5	50
158	11.2	6.9	—
161	10.1	6.7	—
164	4.0	1.4	—
165	1.7	0.1	20
173	7.4	1.6	—
246	1.1	<0.2	—
151	8.8	1.4	40
157	8.1	5.7	80
118	10.1	6.1	—
120	9.6	6.1	—
122	8.7	3.6	—
181	8.5	7.8	—
183	4.5	1.5	—
184	7.1	7.5	—
186	1.2	1.4	—
187	8.6	6.4	—
188	7.7	6.7	—
191	7.2	6.3	—
200	2.2	1.2	—
201	6.4	1.4	—
202	5.0	1.3	—
203	6.7	1.3	—
215	3.7	1.0	—
217	7.8	6.4	—
178	8.1	1.5	—
199	7.5	6.6	—
234	9.8	6.1	—
コルヒチン	32.8	16.1	1.5

[0516]

[表6]

実施例No.	IC_{50}	
	A549	HT−29
252	10. 7	8. 8
270	1. 9	0. 9
277	6. 0	0. 4
279	6. 4	0. 3
280	1. 9	0. 3
284	10. 1	1. 1
286	10. 9	2. 8
287	9. 9	1. 6
288	7. 4	1. 0
290	9. 4	1. 7
296	7. 1	0. 2
297	10. 4	0. 3
298	8. 7	7. 2
299	9. 1	1. 9
303	7. 8	0. 8
308	2. 0	0. 3
309	12. 9	1. 6
310	9. 7	1. 0
321	1. 7	0. 2
323	0. 5	0. 2
324	1. 3	0. 1
327	2. 2	0. 2
330	8. 3	6. 0
331	8. 1	6. 6
332	4. 6	1. 1
358	7. 8	0. 3
359	5. 8	0. 7
360	7. 6	0. 4
376	1. 8	0. 2
379	9. 8	1. 1
380	4. 2	<0. 1
381	8. 1	<0. 1
388	8. 2	0. 5
コルヒチン	32. 8	16. 2

[0517] 試験例４

（In vivo抗腫瘍効果の検定法）

（動物）

動物は5週齢の雄ヌードマウス（BALB/c Slc-nu）を日本エスエルシー(株)より購入し、1群４～５匹として使用した。動物はポリカーボネート製ケージにて飼育し、水および飼料（放射線滅菌MF）は自由摂取とした。

[0518] （検定法）

2 × 10^6 cells/0.1mL/マウスのHCT116細胞をヌードマウスの左鼠径部皮下に注射筒および注射針を用いて移植した。1/2ab^2(aは腫瘍の長径、bは短径)より求めた推定腫瘍体積が平均300mm^3前後に達した時点に各群の推定腫瘍体積が均等になるよう群分け・割り付けを行った（Day 1）。その後、被験物質を静脈内（Days 1,5,9）に1日1回投与（1/4MD量または1/2MD量）した。対照群にはvehicle（Tween80/Propylene glycol/5% glucose（10/5/85））を同様のスケジュールで投与した。Day 22に腫瘍を摘出し重量を測定した後、次式により腫瘍増殖阻止率IR(%)を求めた。

腫瘍増殖阻止率IR(%) ＝（1－投与群の平均腫瘍重量／対照群の平均腫瘍重量）× 100

[0519] [表7]

（結果）

実施例 No.	腫瘍増殖阻止率 IR(%)		MD 値
	1/4MD	1/2MD	mg/kg
13	57.3	76.1	60
15	27.5	46.2	60
118	29.5	54.6	100
122	24.5	42.4	200
151	32.6	52.6	40
コルヒチン	-8.2	14.0	1.5

（結果）

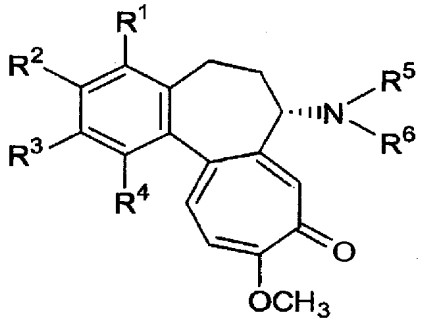
[0520] 本試験において検討した実施例１３、実施例１５、実施例１１８、実施例１２２及び実施例１５１の腫瘍増殖阻止率IR（%）は、コルヒチンを上回っていた。以上の結果から、本試験にて検討した本発明のコルヒチン誘導体が、陽性対照薬であるコルヒチンよりも動物に対する効果が優れていることが

示された。

請求の範囲

[請求項1] 次の一般式（１）

[化1]



（１）

（式中、R^1はハロゲン原子、ヒドロキシ基、ニトロ基、アミノ基又はモノー、ジー若しくはトリーフルオロメチル基を示し；
R^2、R^3及びR^4はそれぞれメトキシ基、又はヒドロキシ基を示すか、R^2とR^3又はR^3とR^4が一緒になってメチレンジオキシ基、又はエチレンジオキシ基を示し；
R^5及びR^6は同一又は異なって、水素原子、炭素数１～６のアルキル基、アリールアルキル基、炭素数２～６のアルケニル基、－ＣＯＲ^7、－ＣＯＯＲ^8、－SO_2R^9、－ＣＯＮＲ^{10}Ｒ^{11}、又は－ＣＳＮＲ^{12}Ｒ^{13}を示すか、R^5とR^6が結合する窒素原子と一緒になって３～７員の環状アミノ基を示し；
R^7は水素原子、炭素数６～１４のアリール基、ヘテロアリール基、環状アミノ基、炭素数３～７の環状アルキル基又は炭素数１～６のアルキル基を示し、当該アルキル基には環状アルキル基、ハロゲン原子、アミノ基、アルキルアミノ基、アリールアルキルアミノ基、ジアルキルアミノ基、環状アミノ基、アルコキシカルボニルアミノ基、アリールアミノ基、ヘテロアリールアミノ基、カルボキシル基、アルコキシカルボニル基、ヒドロキシ基、アシルオキシ基、ジアルキルアミノアシルオキシ基、アルキルオキシ基、アリール基、アリールオキシ基

、アリールアルキルオキシ基、ヘテロアリール基、ヘテロアリールオキシ基、チオール基、アシルチオ基、ジアルキルアミノアシルチオ基、アルキルチオ基、アルキルスルホニル基、アリールチオ基、ヘテロアリールチオ基、カルバモイルオキシ基及び環状アミノカルボニルオキシ基から選ばれる１～３個が置換していてもよく、当該アリール基にはハロゲン原子、アルコキシ基、ニトロ基、シアノ基、アミノ基、アルキルアミノ基、ジアルキルアミノ基、アリール基、アルキルアミノアルキル基及びヒドロキシアルキルオキシ基から選ばれる１～３個が置換していてもよく、当該環状アミノ基にはアルキル基及びアルコキシカルボニル基から選ばれる１～２個が置換していてもよい；

R^8は炭素数１～６のアルキル基、炭素数６～１４のアリール基、ヘテロアリール基、炭素数３～７の環状アルキル基又は環状アミノ基を示し、当該アルキル基にはアミノ基、アルキルアミノ基、ジアルキルアミノ基、環状アミノ基、カルボキシル基、アルコキシカルボニル基、アリール基及びヘテロアリール基から選ばれる１～３個が置換していてもよく、当該環状アミノ基にはアルキル基及びアルコキシカルボニル基から選ばれる１～２個が置換していてもよく、当該環状アルキル基にはカルボキシル基及びアルコキシカルボニル基から選ばれる１～３個が置換していてもよい；

R^9は炭素数１～６のアルキル基、炭素数３～７の環状アルキル基、炭素数６～１４のアリール基又はヘテロアリール基を示し、当該アルキル基には１～３個のハロゲン原子が置換していてもよく、当該アリール基には１～３個の炭素数１～６のアルキル基が置換していてもよい；

R^{10}とR^{11}は同一又は異なって、水素原子、炭素数１～６のアルキル基、炭素数６～１４のアリール基、ヘテロアリール基、炭素数３～７の環状アルキル基又は炭素数１～７のアシル基を示すか、R^{10}とR^{11}が結合する窒素原子と一緒になって３～７員環の環状アミノ基を示し

、当該アルキル基にはアリール基及びヘテロアリール基から選ばれる１～３個が置換していてもよく、炭素数１～７のアシル基には１～３個のハロゲン原子が置換していてもよく、当該環状アミノ基にはさらに酸素原子、窒素原子又は硫黄原子が含まれていてもよい；

R^{12}とR^{13}は同一又は異なって、水素原子、炭素数１～６のアルキル基、炭素数６～１４のアリール基、ヘテロアリール基又は炭素数３～７の環状アルキル基を示すか、R^{12}とR^{13}が結合する窒素原子と一緒になって３～７員環の環状アミノ基を示し、当該アルキル基にはアリール基、ヘテロアリール基、環状アミノ基、アミノ基、アルキルアミノ基、ジアルキルアミノ基、ヒドロキシ基及びアルキルオキシ基から選ばれる１～３個が置換していてもよく、当該環状アルキル基には１～３個のヒドロキシ基が置換していてもよく、当該アリール基にはジアルキルアミノアルキル基、アルキルオキシ基、アルキル基、シアノ基、ハロゲン原子、ヒドロキシアルキル基、ヒドロキシアルキルオキシ基、スルファモイル基及びヒドロキシ基から選ばれる１～３個が置換していてもよく、当該ヘテロアリール基にはアルキル基、シアノ基、アリール基及びヒドロキシアルキル基から選ばれる１～３個が置換していてもよく、当該環状アミノ基にはさらに酸素原子、窒素原子又は硫黄原子が含まれていてもよく、さらにアルキル基、ヒドロキシ基、ハロゲン原子、アミノ基、アシル基及びジアルキルアミノ基から選ばれる１～３個が置換していてもよい；

ただし、R^{1}が塩素原子、臭素原子又はヨウ素原子であり、R^{2}、R^{3}及びR^{4}がメトキシ基であり、R^{5}が水素原子であり、かつR^{6}がアセチル基である場合を除く。R^{1}がヒドロキシ基のとき、R^{2}、R^{3}及びR^{4}はメトキシ基である。）

で表されるコルヒチン誘導体、その塩又はそれらの溶媒和物。

[請求項2] R^{5}及びR^{6}が次の組み合せである請求項１記載のコルヒチン誘導体、その塩又はそれらの溶媒和物。

（１）R^5及びR^6が水素原子の場合、

（２）R^5が水素原子であり、R^6が－ＣＯＲ^7、－ＣＯＯＲ^8、－SO_2Ｒ^9、又は－ＣＳＮＲ^{12}Ｒ^{13}である場合、

（３）R^5が－ＣＯＲ^{7}で、R^6が－ＣＯＯＲ^{8}の場合、

（ここで、R^7は水素原子；炭素数２～６のアルキル基；炭素数３～７の環状アルキル基；C_{3-7}環状アルキル基、ハロゲン原子、アミノ基、C_{1-6}アルキルアミノ基、C_{6-14}アリールアルキルアミノ基、ジC_{1-6}アルキルアミノ基、環状アミノ基、C_{1-6}アルコキシカルボニルアミノ基、C_{6-14}アリールアミノ基、ヘテロアリールアミノ基、カルボキシル基、C_{1-6}アルコキシカルボニル基、ヒドロキシ基、アシルオキシ基、ジC_{1-6}アルキルアミノアシルオキシ基、C_{1-6}アルキルオキシ基、C_{6-14}アリール基、C_{6-14}アリールオキシ基、C_{6-14}アリールアルキルオキシ基、ヘテロアリール基、ヘテロアリールオキシ基、チオール基、アシルチオ基、ジC_{1-6}アルキルアミノアシルチオ基、C_{1-6}アルキルチオ基、C_{1-6}アルキルスルホニル基、C_{6-14}アリールチオ基及びヘテロアリールチオ基から選ばれる１～３個が置換した炭素数１～６のアルキル基；あるいはハロゲン原子、C_{1-6}アルコキシ基、ニトロ基、シアノ基、アミノ基、C_{1-6}アルキルアミノ基、ジC_{1-6}アルキルアミノ基、C_{1-6}アルキル基、C_{6-14}アリール基及びC_{1-6}アルキルアミノアルキル基から選ばれる１～３個が置換していてもよいC_{6-14}アリール基又はヘテロアリール基である。

R^8は炭素数１～６のアルキル基、炭素数６～１４のアリール基、ヘテロアリール基、炭素数３～７の環状アルキル基又は環状アミノ基が好ましく、当該アルキル基にはアミノ基、C_{1-6}アルキルアミノ基、ジC_{1-6}アルキルアミノ基、環状アミノ基、カルボキシル基、C_{1-6}アルコキシカルボニル基、C_{6-14}アリール基及びヘテロアリール基から選ばれる１～３個が置換していてもよく、当該環状アミノ基にはC_{1-6}アルキル基又はC_{1-6}アルコキシカルボニル基が置換していてもよく、当

該環状アルキル基にはカルボキシル基、アルコキシカルボニル基が置換していてもよい。

R^9はC_{6-14}アリール基又はヘテロアリール基である。

R^{12}とR^{13}は同一又は異なって、水素原子、炭素数１～４のアルキル基、炭素数５～６の環状アルキル基、アリール基、ヘテロアリール基又はR^{12}とR^{13}が窒素原子と一緒になって形成する４～６員環の環状アミノ基が好ましく、当該アルキル基にはアルキルオキシ基、ヒドロキシ基が置換していてもよく、当該アリール基にはジアルキルアミノアルキル基、アルキルオキシ基、アルキル基、シアノ基、ハロゲン原子、ヒドロキシアルキル基及びヒドロキシアルキルオキシ基から選ばれる１～３個が置換していてもよく、当該ヘテロアリール基にはアルキル基、シアノ基、アリール基、ヒドロキシアルキル基から選ばれる１～３個が置換していてもよく、当該環状アミノ基には酸素原子、硫黄原子が含まれていてもよく、さらにはアルキル基、ハロゲン原子から選ばれる１～３個が置換していてもよい。）

[請求項3] R^1がハロゲン原子、ニトロ基、アミノ基又はモノー、ジー若しくはトリーフルオロメチル基である請求項１又は２記載のコルヒチン誘導体、その塩又はそれらの溶媒和物。

[請求項4] 下記から選ばれるコルヒチン誘導体、その塩又はそれらの溶媒和物。

４－ニトロコルヒチン、

４－ヒドロキシコルヒチン、

４－フルオロコルヒチン、

４－アミノコルヒチン、

４－クロロデアセチルコルヒチン、

４－フルオロデアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－プロピオニルデアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－ホルミルデアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（クロロアセチル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（ｔ－ブトキシカルボニル）コルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（ｔ－ブトキシカルボニル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ，Ｎ－ジメチルデアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ，Ｎ－ジエチルデアセチルコルヒチン、

４－クロロ－７－（ピペラジン－１－イル）－７－デ（アセチルアミノ）コルヒチン、

Ｎ－（ｔｅｒｔ－ブチルオキシカルボニル）－４－クロロ－Ｎ－メチルデアセチルコルヒチン、

Ｎ－（ｔｅｒｔ－ブチルオキシカルボニル）－４－クロロ－Ｎ－エチルデアセチルコルヒチン、

Ｎ－アリル－４－クロロ－Ｎ－（ｔｅｒｔ－ブチルオキシカルボニル）デアセチルコルヒチン、

Ｎ－（ｔｅｒｔ－ブチルオキシカルボニル）－４－クロロ－Ｎ－（２－メチルアリル）デアセチルコルヒチン、

Ｎ－ベンジル－Ｎ－（ｔｅｒｔ－ブチルオキシカルボニル）－４－クロロデアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－メチルデアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－エチルデアセチルコルヒチン、

Ｎ－アリル－４－クロロデアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（２－メチルアリル）デアセチルコルヒチン、

Ｎ－ベンジル－４－クロロデアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－プロピルデアセチルコルヒチン、

Ｎ－イソブチル－４－クロロデアセチルコルヒチン、

Ｎ－（アセトキシアセチル）－４－クロロデアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（ヒドロキシアセチル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（１－メチルピペラジン－４－イルオキシカルボ

ニル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［１－（ベンジルオキシカルボニル）ピペリジン－４－イルオキシカルボニル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（ピペリジン－４－イルオキシカルボニル）デアセチルコルヒチン、

Ｎ－［ｔｒａｎｓ－１－（ベンジルオキシカルボニル）シクロヘキサン－４－イルオキシカルボニル］－４－クロロデアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（チオモルホリン－４－カルボニル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（１，１－ジオキソチオモルホリン－４－カルボニル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（１－メチルピペラジン－４－カルボニル）デアセチルコルヒチン、

Ｎ－ブチリル－４－クロロデアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－イソブチリルデアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（シクロプロパンカルボニル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－イソバレリルデアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－ヘプタノイルデアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（シクロヘキサンカルボニル）デアセチルコルヒチン、

Ｎ－ベンゾイル－４－クロロデアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（フェニルアセチル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（ピリジン－３－イルカルボニル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（ピリジン－４－イルカルボニル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（ピリジン－２－イルカルボニル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（トリフルオロアセチル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（メトキシアセチル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（フェノキシアセチル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（メチルチオ）アセチル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（４－ピリジルチオ）アセチル］デアセチルコルヒチン、

Ｎ－（４－ブロモブチリル）－４－クロロデアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（４－フルオロベンゾイル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（３，５－ジフルオロベンゾイル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（３，４，５－トリフルオロベンゾイル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（４－メトキシベンゾイル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（３，４，５－トリメトキシベンゾイル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（２－メトキシベンゾイル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（３－メトキシベンゾイル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（フェニルチオ）アセチル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［３－（ジメチルアミノ）ベンゾイル］デアセチ

ルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［４－（ジメチルアミノ）ベンゾイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（２－フルオロベンゾイル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（３－フルオロベンゾイル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（２，４－ジフルオロベンゾイル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（ピリジン－３－イルオキシアセチル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（ピリジン－２－イルアセチル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（ピリジン－３－イルアセチル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（メトキシカルボニル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（エトキシカルボニル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（イソプロピルオキシカルボニル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（イソブチルオキシカルボニル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（フェノキシカルボニル）デアセチルコルヒチン、

Ｎ－（ベンジルオキシカルボニル）－４－クロロデアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（メタンスルホニル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（エタンスルホニル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（イソプロパンスルホニル）デアセチルコルヒチ

ン、

４－クロロ－Ｎ－（シクロプロパンスルホニル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（イソブタンスルホニル）デアセチルコルヒチン、

Ｎ－（ベンゼンスルホニル）－４－クロロデアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（ｐ－トルエンスルホニル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（２－チオフェンスルホニル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（トリフルオロメタンスルホニル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（エチルカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（イソプロピルカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（ヘキシルカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（フェニルカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

Ｎ－（ベンジルカルバモイル）－４－クロロデアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（ジメチルカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（ジエチルカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（モルフォリン－４－カルボニル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（ピロリジン－１－カルボニル）デアセチルコル

ヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（ピペリジン－１－カルボニル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（トリクロロアセチルカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（ジメチルアミノアセチル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（ジエチルアミノアセチル）デアセチルコルヒチン、

Ｎ－（ｔ－ブチルオキシカルボニルアミノアセチル）－４－クロロデアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（アミノアセチル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（ピロリジン－１－イルアセチル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（ピペリジン－１－イルアセチル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（３－カルボキシプロピオニル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［３－（メトキシカルボニル）プロピオニル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（４－カルボキシブチリル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［４－（メトキシカルボニル）ブチリル］デアセチルコルヒチン、

Ｎ－（ｔｒａｎｓ－１－カルボキシシクロヘキサン－４－イルオキシカルボニル）－４－クロロデアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（ピリジン－３－イルオキシカルボニル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［１－（ジメチルアミノ）プロピル－３－イルオキシカルボニル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［３－（ピロリジン－１－イル）ベンゾイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［４－（４－モルホリニルメチル）ベンゾイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（ジエチルチオカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（ピロリジン－１－チオカルボニル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（ピペリジン－１－チオカルボニル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（モルホリン－４－チオカルボニル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（チオモルホリン－４－チオカルボニル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（１，１－ジオキソチオモルホリン－４－チオカルボニル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（１－メチルピペラジン－４－チオカルボニル）デアセチルコルヒチン、

（Ｓ）－４－クロロ－Ｎ－（２－アセトキシプロピオニル）デアセチルコルヒチン、

（Ｓ）－４－クロロ－Ｎ－（２－ヒドロキシプロピオニル）デアセチルコルヒチン、

（Ｒ）－４－クロロ－Ｎ－（２－アセトキシプロピオニル）デアセチルコルヒチン、

（Ｒ）－４－クロロ－Ｎ－（２－ヒドロキシプロピオニル）デアセチルコルヒチン、

OnCusp
Ex. 1038

４－クロロ－Ｎ－（２－ヒドロキシ－２－メチルプロピオニル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（３－ヒドロキシ－２，２－ジメチルプロピオニル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［２，２－ビス（ヒドロキシメチル）プロピオニル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（１－アセチルピペリジン－４－カルボニル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（１－ベンゾイルピペリジン－４－カルボニル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［１－（ｔｅｒｔ－ブチルオキシカルボニル）ピペリジン－４－カルボニル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（ピペリジン－４－カルボニル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［３－（ジメチルアミノメチル）ベンゾイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［３－（トリフェニルメチルオキシ）プロピオニル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（３－ヒドロキシプロピオニル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（メタンスルホニルアセチル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［３－（ジメチルアミノ）プロピオニル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［３－（ジエチルアミノ）プロピオニル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（３－ピペリジノプロピオニル）デアセチルコルヒチン、

Ｎ－［Ｎ’－（ｔ－ブチルオキシカルボニル）－Ｎ’－メチルアミノアセチル］－４－クロロデアセチルコルヒチン、

Ｎ－［Ｎ’－ベンジル－Ｎ’－（ｔ－ブチルオキシカルボニル）アミノアセチル］－４－クロロデアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（１－メチルピペリジン－４－イルカルボニル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［１－（ベンジルオキシカルボニル）ピペリジン－４－イルカルボニル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（Ｎ’－メチルアミノアセチル）デアセチルコルヒチン、

Ｎ－（Ｎ’－ベンジルアミノアセチル）－４－クロロデアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［４－（ジメチルアミノ）ブチリル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［２－（ジメチルアミノ）ベンゾイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（イソブチルチオカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

Ｎ－（ベンジルチオカルバモイル）－４－クロロデアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（シクロヘキシルチオカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（２－ピペリジノエチル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－｛［２－（４－モルフォリノ）エチル］チオカルバモイル｝デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（３－ピリジルチオカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［ｐ－（ジメチルアミノ）フェニルチオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（４－ニトロベンゾイル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（２－ナフトイル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（２－ニトロベンゾイル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（４－メチルベンゾイル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（４－フェニルベンゾイル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（３，５－ジニトロベンゾイル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（３，５－ジメチルベンゾイル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（３－ニトロベンゾイル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（３，５－ジメトキシベンゾイル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（２，４－ジメトキシベンゾイル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（２，４，６－トリメチルベンゾイル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（４－シアノベンゾイル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（３－ヒドロキシ－３－メチルブチリル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［４－（ベンジルオキシ）ブチリル］デアセチル

コルヒチン、
４－クロロ－Ｎ－（２－シアノベンゾイル）デアセチルコルヒチン、
４－クロロ－Ｎ－（３－シアノベンゾイル）デアセチルコルヒチン、
４－クロロ－Ｎ－（２－エチル－２－ヒドロキシブチリル）デアセチルコルヒチン、
４－クロロ－Ｎ－（１－ヒドロキシシクロプロパンカルボニル）デアセチルコルヒチン、
４－クロロ－Ｎ－（３－フェニルベンゾイル）デアセチルコルヒチン、
４－クロロ－Ｎ－（４－ヒドロキシブチリル）デアセチルコルヒチン、
４－ブロモ－Ｎ－（ｔ－ブチルオキシカルボニル）コルヒチン、
４－ブロモ－Ｎ－（ｔ－ブチルオキシカルボニル）デアセチルコルヒチン、
４－ブロモデアセチルコルヒチン、
４－ブロモ－Ｎ－プロピオニルデアセチルコルヒチン、
４－ブロモ－Ｎ－（シクロヘキサンカルボニル）デアセチルコルヒチン、
４－ブロモ－Ｎ－ベンゾイルデアセチルコルヒチン、
４－ブロモ－Ｎ－（フェニルアセチル）デアセチルコルヒチン、
Ｎ－アリル－４－ブロモ－Ｎ－（ｔ－ブチルオキシカルボニル）デアセチルコルヒチン、
４－ブロモ－Ｎ－（トリフルオロアセチル）デアセチルコルヒチン、
Ｎ－（アセトキシアセチル）－４－ブロモデアセチルコルヒチン、
４－ブロモ－Ｎ－（２－ピリジンカルボニル）デアセチルコルヒチ

ン、

Ｎ－アリル－４－ブロモデアセチルコルヒチン、

Ｎ－（ベンジルオキシカルボニル）－４－ブロモデアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－[（メチルチオ）アセチル]デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－［（Ｎ’，Ｎ’－ジメチルアミノ）アセチル］デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－プロピルデアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－（ヘキシルカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－（フェニルカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－（ヒドロキシアセチル）デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－（イソブタンスルホニル）デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－トシルデアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－（２－チオフェンスルホニル）デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－（２，４－ジフルオロベンゾイル）デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－［３－（Ｎ’，Ｎ’－ジメチルアミノ）ベンゾイル］デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－（２－フルオロベンゾイル）デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－（３－メトキシベンゾイル）デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－（エチルチオカルバモイル）デアセチルコルヒチ

ン、

４－ブロモ－Ｎ－（フェニルチオカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－（Ｎ’，Ｎ’－ジエチルカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－（ピペリジン-１-イルカルボニル）デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－（３－ヒドロキシ－２，２－ジメチルプロピオニル）デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－（２－ヒドロキシ－２－メチルプロピオニル）デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－（２－エチル－２－ヒドロキシブチリル）デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－（１－ヒドロキシシクロプロパンカルボニル）デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－［２，２－ビス（ヒドロキシメチル）プロピオニル］デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－（３－ヒドロキシ－３－メチルブチリル）デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－［４－（ベンジルオキシ）ブチリル］デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－（３－ニトロベンゾイル）デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－（４－シアノベンゾイル）デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－（３，５－ジメチルベンゾイル）デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－（４－メチルベンゾイル）デアセチルコルヒチン

、

４－ブロモ－Ｎ－［３－（ピロリジン－１－イル）ベンゾイル］デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－（イソブチルチオカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－（ベンジルチオカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－［４－（Ｎ’，Ｎ’－ジメチルアミノ）フェニルチオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－（ピリジン－３－イルチオカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－（Ｎ’，Ｎ’－ジエチルチオカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－（ピロリジン－１－イルチオカルボニル）デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－（ピペリジン－１－イルチオカルボニル）デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－（４－ヒドロキシブチリル）デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－（チオモルホリン－４－イルチオカルボニル）デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－（１，１－ジオキソチオモルホリン－４－イルチオカルボニル）デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－（４－メチルピペラジン－１－イルチオカルボニル）デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－（モルホリン－４－イルチオカルボニル）デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－（エタンスルホニル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－２，３－ジデメチルコルヒチン、

４－クロロ－２，３－（メチレンジオキシ）－２，３－ジデメトキシコルヒチン、

４－クロロ－２，３－（エチレンジオキシ）－２，３－ジデメトキシコルヒチン、

４－クロロ－１，２－（メチレンジオキシ）－１，２－ジデメトキシコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（エチルチオカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（フェニルチオカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（４－ピペリジノピペリジン－１－カルボキシアセチル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（１－メチルピペラジン－４－カルボキシアセチル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（ジメチルアミノアセトキシアセチル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［３－（ジメチルアミノ）プロピオニルオキシアセチル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［１－（ベンジルオキシカルボニル）ピペリジン－４－カルボキシアセチル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（チオアセトキシアセチル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（メルカプトアセチル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［１－（エトキシカルボニル）ピペリジン－４－イルカルボニル］デアセチルコルヒチン、

４－（フルオロメチル）コルヒチン、

４－（ジフルオロメチル）コルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（Ｎ’，Ｎ’－ジメチルチオカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（Ｎ’，Ｎ’－ジプロピルチオカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［Ｎ’－エチル－Ｎ’－プロピルチオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（４－ヒドロキシピペリジン－１－イル）チオカルボニル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（４－メチルピペリジン－１－イル）チオカルボニル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－｛Ｎ’－［２－（ジメチルアミノ）エチル］－Ｎ’－メチルチオカルバモイル｝デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－｛［４－（ジメチルアミノ）ピペリジン－１－イル］チオカルバモイル｝デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（Ｎ’－エチル－Ｎ’－メチルチオカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［１－アセチルピペラジン－４－イル）チオカルボニル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［Ｎ’－（２－ヒドロキシエチル）－Ｎ’－メチルチオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［Ｎ’－（３－ヒドロキシプロピル）－Ｎ’－メチルチオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［Ｎ’，Ｎ’－ビス（２－ヒドロキシエチル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（３－ヒドロキシプロピル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（４，４－ジフルオロピペリジン－１－イル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

Ｎ－［（アゼチジン－１－イル）チオカルバモイル］－４－クロロデアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（インダゾール－５－イル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（ｃｉｓ－２，６－ジメチルモルホリン－４－イル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（２－トリルチオカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（３－トリルチオカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［３－（ジメチルアミノ）フェニルチオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［４－（２－ヒドロキシエチル）フェニルチオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［３－（２－ヒドロキシエチル）フェニルチオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（４－シアノフェニル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［２，１，３－ベンゾチアジアゾール－４－イル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（２－メトキシフェニル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（３－メトキシフェニル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（３－シアノフェニル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（３，４－ジメトキシフェニル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（２－クロロフェニル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（３－クロロフェニル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（４－クロロフェニル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（２－シアノフェニル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（チアゾール－２－イル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（チオカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（メチルチオカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（ｎ－プロピルチオカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（ｎ－ブチルチオカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（ｔｅｒｔ－ブチルチオカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（シクロペンチルチオカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（イソプロピルチオカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（ｎ－ヘキシルチオカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（ｔｒａｎｓ－４－ヒドロキシシクロヘキシル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［２－（ジメチルアミノ）エチルチオカルバモイ

ル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（２－ヒドロキシエチル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（４－メトキシフェニル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（ｐ－トルイル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（シクロプロピルチオカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（アリルチオカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（１－メチルピペリジン－４－イル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（シクロヘプチルチオカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（２－メトキシエチル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（２，２，２－トリフルオロエチル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（インダン－２－イル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（４－スルファモイルフェニル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（３，５－ジメチルイソオキサゾール－４－イル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（４－ヒドロキシフェニル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（５－メチルピラゾール－３－イル）チオカル

バモイル］デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－（プロピルチオカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－（ブチルチオカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－［（２，２，２－トリフルオロエチル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－（シクロペンチルチオカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－（シクロヘキシルチオカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－［（４－メトキシフェニル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－｛［２－（４－モルホリノ）エチル］チオカルバモイル｝デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－（Ｎ’，Ｎ’－ジメチルチオカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－（Ｎ’－エチル－Ｎ’－メチルチオカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－［（４－メチルピペリジン－１－イル）チオカルボニル］デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－［（４，４－ジフルオロ－ピペリジン－１－イル）チオカルボニル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（５－メチルイソオキサゾール－３－イル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（５－メチル－１，２，４－トリアゾール－３－イル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（イソオキサゾール－３－イル）チオカルバモ

イル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（１，２，４－トリアゾール－３－イル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（３，４－ジメチルイソオキサゾール－５－イル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（４－シアノピラゾール－３－イル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（５－フェニルピラゾール－３－イル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

Ｎ－（ｔ－ブチルオキシカルボニル）－４－ヨードコルヒチン、

Ｎ－（ｔ－ブチルオキシカルボニル）－４－ヨードデアセチルコルヒチン、

４－ヨードデアセチルコルヒチン、

４－ヨード－Ｎ－プロピオニルデアセチルコルヒチン、

Ｎ－シクロプロピルカルボニル－４－ヨードデアセチルコルヒチン、

４－ヨード－Ｎ－（トリフルオロアセチル）デアセチルコルヒチン、

Ｎ－エチルスルホニル－４－ヨードデアセチルコルヒチン、

Ｎ－［３－（ジメチルアミノ）ベンゾイル］－４－ヨードデアセチルコルヒチン、

４－ヨード－Ｎ－（４－メトキシベンゾイル）デアセチルコルヒチン、

４－ヨード－Ｎ－（４－ニトロベンゾイル）デアセチルコルヒチン、

Ｎ－（３，５－ジフルオロベンゾイル）－４－ヨードデアセチルコルヒチン、

Ｎ－（３－シアノベンゾイル）－４－ヨードデアセチルコルヒチン

、

Ｎ－（アセトキシアセチル）－４－ヨードデアセチルコルヒチン、

４－ヨード－Ｎ－（フェニルアセチル）デアセチルコルヒチン、

４－ヨード－Ｎ－プロピルデアセチルコルヒチン、

Ｎ－（ヒドロキシアセチル）－４－ヨードデアセチルコルヒチン、

Ｎ－［１－（ベンジルオキシカルボニル）ピペリジン－４－イルカルボニル］－４－ヨードデアセチルコルヒチン、

４－ヨード－Ｎ－（ピリジン－４－イルカルボニル）デアセチルコルヒチン、

Ｎ－フェニルスルホニル－４－ヨードデアセチルコルヒチン、

Ｎ－（シクロヘキシルチオカルバモイル）－４－ヨードデアセチルコルヒチン、

Ｎ－［４－（ジメチルアミノ）フェニルチオカルバモイル］－４－ヨードデアセチルコルヒチン、

Ｎ－（ベンジルカルバモイル）－４－ヨードデアセチルコルヒチン

、

４－ヨード－Ｎ－［（ピペリジン－１－イル）カルボニル］デアセチルコルヒチン、

Ｎ－エチル－４－ヨードデアセチルコルヒチン、

４－ヨード－Ｎ－［（ピペリジン－１－イル）チオカルボニル］デアセチルコルヒチン、

４－ヨード－Ｎ－［（チオモルホリン－４－イル）チオカルボニル］デアセチルコルヒチン、

Ｎ－［（ベンゾイミダゾール－２－イル）チオカルバモイル］－４－クロロデアセチルコルヒチン、

Ｎ－［（ベンゾチアゾール－２－イル）チオカルバモイル］－４－クロロデアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（ピリミジン－２－イル）チオカルバモイル］

デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（ピリダジン－３－イル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（ピリジン－２－イル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（ピラゾ―ル－３－イル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（１－メチルピラゾ―ル－３－イル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（４－メチルチアゾ―ル－２－イル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（４，５－ジメチルチアゾ―ル－２－イル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（ピリジン－４－イル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［３－（２－ヒドロキシエトキシ）ベンゾイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［３－（２－ヒドロキシエトキシ）－４－メトキシベンゾイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（ピラジン－２－イル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（１，３，４－チアジアゾ―ル－２－イル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（ピリミジン－５－イル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［３－（２－ヒドロキシエトキシ）フェニルチオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［４－（２－ヒドロキシエトキシ）フェニルチオ

カルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（１，２－ジメチルイミダゾール－５－イル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－｛［１－（２－ヒドロキシエチル）－２－メチルイミダゾール－５－イル］チオカルバモイル｝デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－｛［１－（２－ヒドロキシエチル）ピラゾール－５－イル］チオカルバモイル｝デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－｛［１－（２－ヒドロキシエチル）ピラゾール－３－イル］チオカルバモイル｝デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－［（５－メチル－１，２，４－トリアゾール－３－イル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－［（１－メチル－１，２，４－トリアゾール－３－イル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－［（１，２，４－トリアゾール－３－イル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－［（４－シアノピラゾール－３－イル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－［（５－メチルピラゾール－３－イル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－［（１－メチルピラゾール－３－イル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－［（ピラゾール－３－イル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－［（３，４－ジメチルイソオキサゾール－５－イル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－［（５－メチルイソオキサゾール－３－イル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－［（４－メチルチアゾール－２－イル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－［（チアゾール－２－イル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－［３－（２－ヒドロキシエチル）フェニルチオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－［（ピリダジン－３－イル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

Ｎ－［（アゼチジン－１－イル）チオカルボニル］－４－ブロモデアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－（メチルチオカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－（チオカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－｛［１－（２－ヒドロキシエチル）－１，２，４－トリアゾール－３－イル］チオカルバモイル｝デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－｛［１－（２－ヒドロキシエチル）ピラゾール－３－イル］チオカルバモイル｝デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－［４－（２－ヒドロキシエトキシ）フェニルチオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－［３－（２－ヒドロキシエトキシ）フェニルチオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－［（４－シアノフェニル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－［（２－ヒドロキシエチル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－［Ｎ’－（２－ヒドロキシエチル）－Ｎ’－メチルチオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－［Ｎ’－（３－ヒドロキシプロピル）－Ｎ’－メチルチオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（１－メチル－１，２，４－トリアゾール－３－イル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（１－メチル－１，２，４－トリアゾール－５－イル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－｛［１－（２－ヒドロキシエチル）－１，２，４－トリアゾール－３－イル］チオカルバモイル｝デアセチルコルヒチン。

[請求項5] 請求項１～４のいずれか１項記載のコルヒチン誘導体、その塩又はそれらの溶媒和物を含有する医薬。

[請求項6] 請求項1～４のいずれか１項記載のコルヒチン誘導体、その塩又はそれらの溶媒和物、及び薬学的に許容される担体を含有する医薬組成物。

[請求項7] 請求項１～４のいずれか１項記載のコルヒチン誘導体、その塩又はそれらの溶媒和物を含有する抗癌剤。

[請求項8] 癌治療用の請求項１～４のいずれか１項記載のコルヒチン誘導体、その塩又はそれらの溶媒和物。

[請求項9] 請求項１～４のいずれか１項記載のコルヒチン誘導体、その塩又はそれらの溶媒和物の有効量を投与することを特徴とする癌の治療方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2010/005136

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C07C225/20(2006.01)i, *A61K31/135*(2006.01)i, *A61K31/165*(2006.01)i, *A61P35/00*(2006.01)i, *C07C233/32*(2006.01)i, *C07C233/41*(2006.01)i, *C07C271/24*(2006.01)i
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07C225/20, A61K31/135, A61K31/165, A61P35/00, C07C233/32, C07C233/41, C07C271/24

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2010
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2010 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2010

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	FR 1512320 A (ROUSSEL-UCLAF), 09 February 1968 (09.02.1968), page 1, left column, compounds; examples (Family: none)	1-3 4-8
A	Helvetica Chimica Acta, 1995, Vol.78, p.1247-1277	1-8
A	Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals, 2008, Vol.52, p.1-5	1-8

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

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

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
02 November, 2010 (02.11.10)	16 November, 2010 (16.11.10)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2010/005136

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

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

1. ☒ Claims Nos.: 9
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The invention set forth in claim 9 pertains to a method for treatment of the human body by therapy and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of PCT Rule 39.1(iv), to search.

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

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

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

OnCusp
Ex. 1038

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１０／００５１３６

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C07C225/20(2006.01)i, A61K31/135(2006.01)i, A61K31/165(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C07C233/32(2006.01)i, C07C233/41(2006.01)i, C07C271/24(2006.01)i

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C07C225/20, A61K31/135, A61K31/165, A61P35/00, C07C233/32, C07C233/41, C07C271/24

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０１０年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１０年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１０年

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

CAplus(STN),REGISTRY(STN)

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X A	FR 1512320 A (ROUSSEL-UCLAF) 1968.02.09, １頁左欄記載の化合物、実施例（ファミリーなし）	1-3 4-8
A	Helvetica Chimica Acta, 1995, Vol.７８, p.１２４７－１２７７	1-8
A	Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals, 2008, Vol.５２, p.１－５	1-8

☐　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☐　パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 ０２．１１．２０１０	国際調査報告の発送日 １６．１１．２０１０
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ） 郵便番号１００－８９１５ 東京都千代田区霞が関三丁目４番３号	特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｈ　３９６７ 野口　勝彦 電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４３

OnCusp
Ex. 1038

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１０／００５１３６

第Ⅱ欄　請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第１ページの２の続き）

法第8条第3項（ＰＣＴ17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

１．☑ 請求項　9　は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求項９に係る発明は、治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT規則39.1(iv)の規定により、国際調査をすることを要しない対象に係るものである。

２．☐ 請求項　　は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

３．☐ 請求項　　は、従属請求の範囲であってＰＣＴ規則6.4(a)の第２文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄　発明の単一性が欠如しているときの意見（第１ページの３の続き）

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

１．☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。

２．☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

３．☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。

４．☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

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

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。

☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
9 June 2011 (09.06.2011)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2011/068845 A1

(51) International Patent Classification:
A61K 51/00 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2010/058519

(22) International Filing Date:
1 December 2010 (01.12.2010)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

12/629,404	2 December 2009 (02.12.2009)	US
61/266,356	3 December 2009 (03.12.2009)	US
61/292,656	6 January 2010 (06.01.2010)	US
61/322,997	12 April 2010 (12.04.2010)	US
61/323,952	14 April 2010 (14.04.2010)	US

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: **IMMUNOMEDICS, INC.** [US/US]; 300 American Road, Morris Plains, New Jersey 07950 (US).

(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **GOVINDAN, Serengulam V.** [US/US]; 300 American Road, Morris Plains, New Jersey 07950 (US). **GOLDENBERG, David M.** [US/US]; 300 American Road, Morris Plains, New Jersey 07950 (US).

(74) Agent: **NAKASHIMA, Richard A.**; 300 American Road, Morris Plains, New Jersey 07950 (US).

(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, 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) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— *with international search report (Art. 21(3))*
— *with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))*

WO 2011/068845 A1

(54) **Title**: COMBINING RADIOIMMUNOTHERAPY AND ANTIBODY-DRUG CONJUGATES FOR IMPROVED CANCER THERAPY

(57) **Abstract**: Described herein are compositions and methods of use of radionuclide-antibody conjugates (for RAIT) and drug-antibody conjugates (ADC). The combination of RAIT and ADC was more efficacious than either RAIT alone, ADC alone, or the sum of effects of RAIT and ADC. The unexpected synergy resulted in decreased tumor growth rate and increased survival, with a high incidence of tumor-free survival in Capan-1 human pancreatic cancer xenografts in nude mice.

COMBINING RADIOIMMUNOTHERAPY AND ANTIBODY-DRUG CONJUGATES FOR IMPROVED CANCER THERAPY

RELATED APPLICATIONS

[001] This application claims priority to U.S. Patent Application Serial No. 12/629,404, filed December 2, 2009, and U.S. Provisional Patent Applications 61/266,356, filed December 3, 2009; 61/292,656, filed January 6, 2010; 61/322,997, filed April 12, 2010; and 61/323,952, filed April 14, 2010. The text of each priority application cited above is incorporated herein by reference in its entirety.

SEQUENCE LISTING

[002] The instant application contains a Sequence Listing which has been submitted in ASCII format via EFS-Web and is hereby incorporated by reference in its entirety. Said ASCII copy, created on November 29, 2010, is named IMM324WO.txt and is 21,127 bytes in size.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Field of the Invention

[003] This invention relates to combined therapy of cancer cells using radiolabeled antibodies (RAIT) and antibodies conjugated to drug moieties (ADC). In preferred embodiments, the combination of RAIT and ADC exhibits a synergistic effect and is more effective to induce cancer cell death than either RAIT or ADC alone, or the sum of the effects of RAIT and ADC administered individually. In more preferred embodiments, the combination RAIT and ADC is effective to treat pancreatic cancer. In most preferred embodiments, the labeled antibodies or antibody fragments may comprise a PAM4 (anti-pancreatic cancer mucin) antibody and an RS7 (anti-Trop-2) antibody. However, the skilled artisan will realize that other combinations of antibodies or fragments thereof may be utilized and other forms of cancer may be treated.

Related Art

[004] Pancreatic cancer is a malignant growth of the pancreas that mainly occurs in the cells of the pancreatic ducts. This disease is the ninth most common form of cancer, yet it is the fourth and fifth leading cause of cancer deaths in men and women, respectively.

Cancer of the pancreas is almost always fatal, with a five-year survival rate that is less than 3%.

[005] The most common symptoms of pancreatic cancer include jaundice, abdominal pain, and weight loss, which, together with other presenting factors, are nonspecific in nature. Thus, diagnosing pancreatic cancer at an early stage of tumor growth is often difficult and requires extensive diagnostic work-up, often times including exploratory surgery. Endoscopic ultrasonography and computed tomography are the best noninvasive means available today for diagnosis of pancreatic cancer. However, reliable detection of small tumors, as well as differentiation of pancreatic cancer from focal pancreatitis, is difficult. The vast majority of patients with pancreatic cancer are presently diagnosed at a late stage when the tumor has already extended outside of the capsule to invade surrounding organs and/or has metastasized extensively. Gold et al., Crit. Rev. Oncology/Hematology, 39:147-54 (2001). Late detection of the disease is common, and early pancreatic cancer diagnosis is rare in the clinical setting.

[006] Current treatment procedures available for pancreatic cancer have not led to a cure, or to a substantially improved survival time. Surgical resection has been the only modality that offers a chance at survival. However, due to a large tumor burden, only 10% to 25% of patients are candidates for "curative resection." For those patients undergoing a surgical treatment, the five-year survival rate is still poor, averaging only about 10%.

[007] Antibodies, in particular monoclonal antibodies (MAbs) and engineered antibodies or antibody fragments, have been widely tested and shown to be of value in detection and treatment of various human disorders, including cancers, autoimmune diseases, infectious diseases, inflammatory diseases, and cardiovascular diseases [Filpula and McGuire, Exp. Opin. Ther. Patents (1999) 9: 231-245]. The clinical utility of an antibody or an antibody-derived agent is primarily dependent on its ability to bind to a specific targeted antigen associated with a particular disorder. Selectivity is valuable for delivering a therapeutic agent, such as drugs, toxins, cytokines, hormones, hormone antagonists, enzymes, enzyme inhibitors, inhibitory oligonucleotides (e.g., RNAi, siRNA), immunomodulators, radionuclides, anti-angiogenic agents or pro-apoptotic agents, to a targeted tumor. Radiolabeled antibodies have been used with some success in numerous malignancies, including ovarian cancer, colon cancer, medullary thyroid cancer, and lymphomas.

[008] While various antibodies have been approved for human therapeutic use, including alemtuzumab, bevacizumab, cetuximab, gemtuzumab, ibritumomab, panitumumab,

rituximab, tositumomab and trastuzumab, a need exists in the field for more efficacious antibody-based therapies for difficult to treat cancers, such as pancreatic cancer.

SUMMARY

[009] In various embodiments, the present invention concerns combination therapy with radiolabeled antibodies and drug-conjugated antibodies. The combination therapy may be of use for treatment of cancers for which standard therapies are not effective, such as pancreatic cancer. In preferred embodiments the combination of radiolabeled and drug-conjugated antibodies is more efficacious than either radiolabeled antibody alone, drug-conjugated antibody alone, or the sum of the effects of radiolabeled and drug-conjugated antibody administered individually. In specific embodiments, the antibodies may bind respectively to human pancreatic cancer mucin and to EGP-1 (Trop-2). However, many antibodies against tumor-associated antigens (TAAs) are known and the skilled artisan will realize that various combinations of anti-TAA antibodies may be of use.

[010] Preferably the antibodies of use bind specifically to cancer cells, with little or no binding to normal or non-neoplastic cells. More preferably, the antibodies bind to the earliest stages of cancer, such as PanIN-1A and 1B and PanIN-2 in the case of pancreatic cancer. Most preferably, the antibodies bind to 80 to 90% or more of human invasive pancreatic adenocarcinoma, intraductal papillary mucinous neoplasia, PanIN-1A, PanIN-1B and PanIN-2 lesions, but not to normal human pancreatic tissue.

[011] In a specific embodiment, the radiolabeled antibody may be a humanized PAM4 antibody (see, e.g., U.S. Patent No. 7,282,567, incorporated herein by reference in its entirety), comprising the light complementarity determining region (CDR) sequences CDR1 (SASSSVSSSYLY, SEQ ID NO:1); CDR2 (STSNLAS, SEQ ID NO:2); and CDR3 (HQWNRYPYT, SEQ ID NO:3); and the heavy chain CDR sequences CDR1 (SYVLH, SEQ ID NO:4); CDR2 (YINPYNDGTQYNEKFKG, SEQ ID NO:5)and CDR3 (GFGGSYGFAY, SEQ ID NO:6). As discussed below, a number of therapeutic radionuclides of use for cancer treatment are known and any such known radionuclide may be conjugated to the antibody of interest. In a more preferred embodiment, the radiolabeled antibody is ^{90}Y-hPAM4 (clivatuzumab tetraxetan).

[012] In another specific embodiment, the drug-conjugated antibody may be a humanized RS7 antibody (see, e.g., U.S. Patent No. 7,238,785, incorporated herein by reference in its entirety), comprising the light chain CDR sequences CDR1

(KASQDVSIAVA, SEQ ID NO:7); CDR2 (SASYRYT, SEQ ID NO:8); and CDR3 (QQHYITPLT, SEQ ID NO:9) and the heavy chain CDR sequences CDR1 (NYGMN, SEQ ID NO:10); CDR2 (WINTYTGEPTYTDDFKG, SEQ ID NO:11) and CDR3 (GGFGSSYWYFDV, SEQ ID NO:12). As discussed below, a number of chemotherapeutic drugs of use for cancer treatment are known and any such known drug may be conjugated to the antibody of interest. In a more preferred embodiment, the drug-conjugated antibody is SN-38-hRS7.

[013] In alternative embodiments, the antibodies may be murine, chimeric, humanized or human antibodies that bind to the same antigenic determinant (epitope) as a PAM4 antibody comprising the light complementarity determining region (CDR) sequences CDR1 (SASSSVSSSYLY, SEQ ID NO:1); CDR2 (STSNLAS, SEQ ID NO:2); and CDR3 (HQWNRYPYT, SEQ ID NO:3); and the heavy chain CDR sequences CDR1 (SYVLH, SEQ ID NO:4); CDR2 (YINPYNDGTQYNEKFKG, SEQ ID NO:5)and CDR3 (GFGGSYGFAY, SEQ ID NO:6); or that bind to the same epitope as an RS7 antibody comprising the light chain CDR sequences CDR1 (KASQDVSIAVA, SEQ ID NO:7); CDR2 (SASYRYT, SEQ ID NO:8); and CDR3 (QQHYITPLT, SEQ ID NO:9) and the heavy chain CDR sequences CDR1 (NYGMN, SEQ ID NO:10); CDR2 (WINTYTGEPTYTDDFKG, SEQ ID NO:11) and CDR3 (GGFGSSYWYFDV, SEQ ID NO:12). Antibodies that bind to the same antigenic determinant may be identified by a variety of techniques known in the art, such as by competitive binding studies.

[014] In preferred embodiments, the radiolabeled antibody and drug-conjugated antibody are administered as separate antibody moieties, either sequentially or concurrently. However, in alternative embodiments, the radiolabeled antibody and drug-conjugated antibody, or fragments thereof, may be administered as a bispecific antibody. In preferred alternative embodiments, the bispecific antibody may be produced by the dock-and-lock (DNL) technique, as discussed in more detail below.

[015] Although in preferred embodiments, the antibodies or antibody fragments are conjugated respectively to a radionuclide and a chemotherapeutic drug, the skilled artisan will realize that other anticancer therapeutic agents are known in the art and may potentially be substituted for, or used in addition to, the subject radionuclide and/or drug. Other known therapeutic agents include toxins, immunomodulators (such as cytokines, lymphokines, chemokines, growth factors and tumor necrosis factors), hormones, hormone antagonists, enzymes, oligonucleotides (such as siRNA or RNAi), photoactive therapeutic

agents, anti-angiogenic agents and pro-apoptotic agents. The therapeutic agents may comprise one or more copies of the same therapeutic agent or else combinations of different therapeutic agents. The therapeutic agents may be conjugated to the subject antibodies or separately administered before, concurrently with or after the subject antibodies.

[016] In a preferred embodiment, the therapeutic agent is a cytotoxic agent, such as a drug or a toxin. Also preferred, the drug is selected from the group consisting of nitrogen mustards, ethylenimine derivatives, alkyl sulfonates, nitrosoureas, gemcitabine, triazenes, folic acid analogs, anthracyclines, taxanes, COX-2 inhibitors, pyrimidine analogs, purine analogs, antibiotics, enzyme inhibitors, epipodophyllotoxins, platinum coordination complexes, vinca alkaloids, substituted ureas, methyl hydrazine derivatives, adrenocortical suppressants, hormone antagonists, endostatin, taxols, camptothecins, SN-38, doxorubicins and their analogs, antimetabolites, alkylating agents, antimitotics, anti-angiogenic agents, tyrosine kinase inhibitors, mTOR inhibitors, heat shock protein (HSP90) inhibitors, proteosome inhibitors, HDAC inhibitors, pro-apoptotic agents, methotrexate, CPT-11, and a combination thereof.

[017] In another preferred embodiment, the therapeutic agent is a toxin selected from the group consisting of ricin, abrin, alpha toxin, saporin, ribonuclease (RNase), DNase I, Staphylococcal enterotoxin-A, pokeweed antiviral protein, gelonin, diphtheria toxin, Pseudomonas exotoxin, and Pseudomonas endotoxin and combinations thereof. Or an immunomodulator selected from the group consisting of a cytokine, a stem cell growth factor, a lymphotoxin, a hematopoietic factor, a colony stimulating factor (CSF), an interferon (IFN), erythropoietin, thrombopoietin and a combinations thereof.

[018] In other preferred embodiments, the therapeutic agent is a radionuclide selected from the group consisting of ^{111}In, ^{177}Lu, ^{212}Bi, ^{213}Bi, ^{211}At, ^{62}Cu, ^{67}Cu, ^{90}Y, ^{125}I, ^{131}I, ^{32}P, ^{33}P, ^{47}Sc, ^{111}Ag, ^{67}Ga, ^{142}Pr, ^{153}Sm, ^{161}Tb, ^{166}Dy, ^{166}Ho, ^{186}Re, ^{188}Re, ^{189}Re, ^{212}Pb, ^{223}Ra, ^{225}Ac, ^{59}Fe, ^{75}Se, ^{77}As, ^{89}Sr, ^{99}Mo, ^{105}Rh, ^{109}Pd, ^{143}Pr, ^{149}Pm, ^{169}Er, ^{194}Ir, ^{198}Au, ^{199}Au, and ^{211}Pb. Also preferred are radionuclides that substantially decay with Auger-emitting particles. For example, Co-58, Ga-67, Br-80m, Tc-99m, Rh-103m, Pt-109, In-111, Sb-119, 1-125, Ho-161, Os-189m and Ir-192. Decay energies of useful beta-particle-emitting nuclides are preferably <1,000 keV, more preferably <100 keV, and most preferably <70 keV. Also preferred are radionuclides that substantially decay with generation of alpha-particles. Such radionuclides include, but are not limited to: Dy-152,

At-211, Bi-212, Ra-223, Rn-219, Po-215, Bi-211, Ac-225, Fr-221, At-217, Bi-213 and Fm-255. Decay energies of useful alpha-particle-emitting radionuclides are preferably 2,000-10,000 keV, more preferably 3,000-8,000 keV, and most preferably 4,000-7,000 keV. Additional potential radioisotopes of use include ^{11}C, ^{13}N, ^{15}O, ^{75}Br, ^{198}Au, ^{224}Ac, ^{126}I, ^{133}I, ^{77}Br, ^{113m}In, ^{95}Ru, ^{97}Ru, ^{103}Ru, ^{105}Ru, ^{107}Hg, ^{203}Hg, ^{121m}Te, ^{122m}Te, ^{125m}Te, ^{165}Tm, ^{167}Tm, ^{168}Tm, ^{197}Pt, ^{109}Pd, ^{105}Rh, ^{142}Pr, ^{143}Pr, ^{161}Tb, ^{166}Ho, ^{199}Au, ^{57}Co, ^{58}Co, ^{51}Cr, ^{59}Fe, ^{75}Se, ^{201}Tl, ^{225}Ac, ^{76}Br, ^{169}Yb, and the like. In other embodiments the therapeutic agent is a photoactive therapeutic agent selected from the group consisting of chromogens and dyes.

[019] Alternatively, the therapeutic agent is an enzyme selected from the group consisting of malate dehydrogenase, staphylococcal nuclease, delta-V-steroid isomerase, yeast alcohol dehydrogenase, alpha-glycerophosphate dehydrogenase, triose phosphate isomerase, horseradish peroxidase, alkaline phosphatase, asparaginase, glucose oxidase, beta-galactosidase, ribonuclease, urease, catalase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, glucoamylase and acetylcholinesterase. Such enzymes may be used, for example, in combination with prodrugs that are administered in relatively non-toxic form and converted at the target site by the enzyme into a cytotoxic agent. In other alternatives, a drug may be converted into less toxic form by endogenous enzymes in the subject but may be reconverted into a cytotoxic form by the therapeutic enzyme.

[020] In other alternative embodiments, anti-TAA antibodies other than PAM4 and/or RS7 may be utilized. Preferably, the antibody or fragment thereof binds to a tumor-associated antigen selected from the group consisting of CA19.9, DUPAN2, SPAN1, Nd2, B72.3, CC49, CEA (CEACAM5), CEACAM6, Le^a, the Lewis antigen Le(y), CSAp, insulin-like growth factor (ILGF), epithelial glycoprotein-1 (EGP-1), epithelial glycoprotein-2 (EGP-2), CD80, placental growth factor (PlGF), carbonic anhydrase IX, tenascin, IL-6, HLA-DR, CD40, CD74 (e.g., milatuzumab), CD138 (syndecan-1), MUC-1, MUC-2, MUC-3, MUC-4, MUC-5ac, MUC-16, MUC-17, TAG-72, EGFR, platelet-derived growth factor (PDGF), angiogenesis factors (e.g., VEGF and PlGF), products of oncogenes (e.g., bcl-2, Kras, p53), cMET, HER2/neu, and antigens associated with gastric cancer and colorectal cancer.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[021] **FIG. 1**. PET/CT fusion images for a patient with inoperable metastatic pancreatic cancer treated with fractionated ^{90}Y-hPAM4 plus gemcitabine, before therapy (left side) and post-therapy (right side). The circle indicates the location of the primary lesion, which shows a significant decrease in PET/CT intensity following therapy.

[022] **FIG. 2**. 3D PET images for a patient with inoperable metastatic pancreatic cancer treated with fractionated ^{90}Y-hPAM4 plus gemcitabine, before therapy (left side) and post-therapy (right side). Arrows point to the locations of the primary lesion (on right) and metastases (on left), each of which shows a significant decrease in PET image intensity after therapy with radiolabeled hPAM4 plus gemcitabine.

[023] **FIG. 3**. Therapeutic activity of a single treatment of established (~0.4 cm^3) CaPan1 tumors with 0.15 mCi of ^{90}Y-hPAM4 IgG, or 0.25 or 0.50 mCi of TF10-pretargeted ^{90}Y-IMP-288.

[024] **FIG. 4.** Effect of gemcitabine potentiation of PT-RAIT therapy.

[025] **FIG. 5.** Effect of combination of cetuximab with gemcitabine and PT-RAIT.

[026] **FIG. 6.** Therapeutic efficacy of (Q)-hRS7 demonstrated in a Calu-3 human xenograft model to inhibit tumor growth **(A)** and increase MST **(B)**. Nude mice were inoculated subcutaneously with 1 x 10^7 Calu-3 cells. When tumors reached approximately 0.15 cm^3, mice were treated with either a single intravenous dose of 50 μg or two injections of 25 μg administered seven days apart. Control animals received saline.

[027] **FIG. 7** illustrates **(A)** the structure of bifunctional SN-38 (CL2A-SN-38); **(B)** a synthetic scheme for preparing CL2A-SN-38; and **(C)** a conjugation scheme for attaching CL2A-SN-38 to an antibody.

[028] **FIG. 8** compares the therapeutic efficacy of hRS7-SN-38 alone, ^{90}Y-hPAM4 alone, and the combination of hRS7-SN-38 and ^{90}Y-hPAM4, at either 75 μCi or 130 μCi.

[029] **FIG. 9** illustrates the toxicity, measured as % weight loss, of RAIT alone and ADC alone versus the combination of RAIT plus ADC.

[030] **FIG. 10** compares the effects of simultaneous RAIT and ADC with sequential administration of the two treatments.

[031] **FIG. 11** shows the effects of RAIT and ADC performed with the same (hPAM4) antibody.

[032] **FIG. 12** indicates the comparative efficacies of different antibody conjugates of SN-38.

DETAILED DESCRIPTION

Definitions

[033] Unless otherwise specified, "a" or "an" means one or more.

[034] As used herein, "about" means plus or minus 10%. For example, "about 100" would include any number between 90 and 110.

[035] An antibody, as described herein, refers to a full-length (i.e., naturally occurring or formed by normal immunoglobulin gene fragment recombinatorial processes) immunoglobulin molecule (e.g., an IgG antibody) or an immunologically active (i.e., specifically binding) portion of an immunoglobulin molecule, like an antibody fragment.

[036] An antibody fragment is a portion of an antibody such as $F(ab')_2$, Fab', Fab, Fv, sFv and the like. Regardless of structure, an antibody fragment binds with the same antigen that is recognized by the full-length antibody. The term "antibody fragment" also includes isolated fragments consisting of the variable regions of antibodies, such as the "Fv" fragments consisting of the variable regions of the heavy and light chains and recombinant single chain polypeptide molecules in which light and heavy variable regions are connected by a peptide linker ("scFv proteins").

[037] A chimeric antibody is a recombinant protein that contains the variable domains including the complementarity determining regions (CDRs) of an antibody derived from one species, preferably a rodent antibody, while the constant domains of the antibody molecule are derived from those of a human antibody. For veterinary applications, the constant domains of the chimeric antibody may be derived from that of other species, such as a cat or dog.

[038] A humanized antibody is a recombinant protein in which the CDRs from an antibody from one species; e.g., a rodent antibody, are transferred from the heavy and light variable chains of the rodent antibody into human heavy and light variable domains (e.g., framework region sequences). The constant domains of the antibody molecule are derived from those of a human antibody. In certain embodiments, a limited number of framework region amino acid residues from the parent (rodent) antibody may be substituted into the human antibody framework region sequences.

[039] A human antibody is, e.g., an antibody obtained from transgenic mice that have been "engineered" to produce specific human antibodies in response to antigenic challenge. In this technique, elements of the human heavy and light chain loci are introduced into strains of mice derived from embryonic stem cell lines that contain

targeted disruptions of the endogenous murine heavy chain and light chain loci. The transgenic mice can synthesize human antibodies specific for particular antigens, and the mice can be used to produce human antibody-secreting hybridomas. Methods for obtaining human antibodies from transgenic mice are described by Green et al., Nature Genet. 7:13 (1994), Lonberg et al., Nature 368:856 (1994), and Taylor et al., Int. Immun. 6:579 (1994). A fully human antibody also can be constructed by genetic or chromosomal transfection methods, as well as phage display technology, all of which are known in the art. See for example, McCafferty et al., Nature 348:552-553 (1990) for the production of human antibodies and fragments thereof *in vitro*, from immunoglobulin variable domain gene repertoires from unimmunized donors. In this technique, antibody variable domain genes are cloned in-frame into either a major or minor coat protein gene of a filamentous bacteriophage, and displayed as functional antibody fragments on the surface of the phage particle. Because the filamentous particle contains a single-stranded DNA copy of the phage genome, selections based on the functional properties of the antibody also result in selection of the gene encoding the antibody exhibiting those properties. In this way, the phage mimics some of the properties of the B cell. Phage display can be performed in a variety of formats, for review, see e.g. Johnson and Chiswell, Current Opinion in Structural Biology 3:5564-571 (1993). Human antibodies may also be generated by *in vitro* activated B cells. See U.S. Pat. Nos. 5,567,610 and 5,229,275, the Examples section of which are incorporated herein by reference.

[040] A therapeutic agent is a compound, molecule or atom which is administered separately, concurrently or sequentially with an antibody moiety or conjugated to an antibody moiety, i.e., antibody or antibody fragment, or a subfragment, and is useful in the treatment of a disease. Examples of therapeutic agents include antibodies, antibody fragments, drugs, toxins, nucleases, hormones, immunomodulators, pro-apoptotic agents, anti-angiogenic agents, boron compounds, photoactive agents or dyes and radioisotopes. Therapeutic agents of use are described in more detail below.

[041] An immunoconjugate is an antibody, antibody fragment or fusion protein conjugated to at least one therapeutic and/or diagnostic agent.

[042] A multispecific antibody is an antibody that can bind simultaneously to at least two targets that are of different structure, e.g., two different antigens, two different epitopes on the same antigen, or a hapten and/or an antigen or epitope. Multispecific, multivalent

antibodies are constructs that have more than one binding site, and the binding sites are of different specificity.

[043] A bispecific antibody is an antibody that can bind simultaneously to two different targets. Bispecific antibodies (bsAb) and bispecific antibody fragments (bsFab) may have at least one arm that specifically binds to, for example, a tumor-associated antigen and at least one other arm that specifically binds to a targetable conjugate that bears a therapeutic or diagnostic agent. A variety of bispecific fusion proteins can be produced using molecular engineering.

PAM4 Antibody

[044] Various embodiments of the invention concern antibodies that react with very high selectivity with pancreatic cancer as opposed to normal or benign pancreatic tissues. The anti-pancreatic cancer antibodies and fragments thereof are preferably raised against a crude mucin preparation from a tumor of the human pancreas, although partially purified or even purified mucins may be utilized. A non-limiting example of such antibodies is the PAM4 antibody.

[045] The murine PAM4 (mPAM4) antibody was developed by employing pancreatic cancer mucin derived from the xenografted RIP-1 human pancreatic carcinoma as immunogen. (Gold et al., Int. J. Cancer, 57:204-210, 1994.) Antibody cross-reactivity and immunohistochemical staining studies indicate that the PAM4 antibody recognizes a unique and novel epitope on a target pancreatic cancer antigen. Immunohistochemical staining studies, (see, e.g., U.S. Patent No. 7,282,567), have shown that the PAM4 MAb binds to an antigen expressed by breast, pancreas and other cancer cells, with limited binding to normal human tissue; however, the highest expression is usually by pancreatic cancer cells. Thus, the PAM4 antibodies are relatively specific to pancreatic cancer and preferentially bind pancreatic cancer cells. The PAM4 antibody is reactive with a target epitope which can be internalized. This epitope is expressed primarily by antigens associated with pancreatic cancer and not with focal pancreatitis or normal pancreatic tissue. Localization and therapy studies using a radiolabeled PAM4 MAb in animal models have demonstrated tumor targeting and therapeutic efficacy (*Id.*).

[046] The PAM4 antibody exhibits several properties which make it a good candidate for clinical diagnostic and therapeutic applications. The PAM4 antibody apparently recognizes an epitope of a pancreatic cancer antigen that is distinct from the epitopes recognized by non-PAM4 anti-pancreatic cancer antibodies (CA19.9, DUPAN2, SPAN1,

Nd2, CEACAM5, CEACAM6, B72.3, anti-Le^a, and other anti-Lewis antigens) (*Id.*). Antibodies suitable for use in combination or conjunction with PAM4 antibody include, for example, CA19.9, DUPAN2, SPAN1, Nd2, B72.3, CC49, anti-CEACAM5, anti-CEACAM6, anti-Le^a, anti-HLA-DR, anti-CD40, anti-CD74, anti-CD138, and antibodies defined by the Lewis antigen Le(y), or antibodies against colon-specific antigen-p (CSAp), MUC-1, MUC-2, MUC-3, MUC-4, MUC-5ac, MUC-16, MUC-17, EGP-1, EGP-2, HER2/neu, EGFR, angiogenesis factors (e.g., VEGF and PlGF), insulin-like growth factor (ILGF), tenascin, platelet-derived growth factor, and IL-6, as well as products of oncogenes (bcl-2, Kras, p53), cMET, and antibodies against tumor necrosis substances, such as described in patents by Epstein et al. (U.S. Pat. Nos. 6,071,491, 6.017,514, 5,019,368 and 5,882,626). Such antibodies would be useful for complementing PAM4 antibody reactivity with pancreatic cancer. These and other therapeutic agents could act synergistically with PAM4 antibody, when administered before, together with or after administration of PAM4 antibody.

[047] Preferred embodiments may involve the use of a humanized PAM4 antibody. Because non-human monoclonal antibodies can be recognized by the human host as a foreign protein, and repeated injections can lead to harmful hypersensitivity reactions, humanization of a murine antibody sequences can reduce the adverse immune response that patients may experience. For murine-based monoclonal antibodies, this is often referred to as a Human Anti-Mouse Antibody (HAMA) response. Preferably some human residues in the framework regions of the humanized PAM4 antibody or fragments thereof are replaced by their murine counterparts. It is also preferred that a combination of framework sequences from two different human antibodies is used for VH. The constant domains of the antibody molecule are derived from those of a human antibody.

RS7 Antibody

[048] The RS7 antibody is a murine IgG_1 raised against a crude membrane preparation of a human primary squamous cell lung carcinoma. (Stein et al., Cancer Res. 50: 1330, 1990) The RS7 antibody recognizes a 46-48 kDa glycoprotein, characterized as cluster 13. (Stein et al., Int. J. Cancer Supp. 8:98-102, 1994) The antigen was designated as EGP-1 (epithelial glycoprotein-1), but is also referred to as Trop-2.

[049] Trop-2 is a type-I transmembrane protein and has been cloned from both human (Fornaro et al., Int J Cancer 1995; 62:610-8) and mouse cells (Sewedy et al., Int J Cancer 1998; 75:324-30). In addition to its role as a tumor-associated calcium signal transducer

(Ripani et al., Int J Cancer 1998;76:671-6), the expression of human Trop-2 was shown to be necessary for tumorigenesis and invasiveness of colon cancer cells, which could be effectively reduced with a polyclonal antibody against the extracellular domain of Trop-2 (Wang et al., Mol Cancer Ther 2008;7:280-5).

[050] The growing interest in Trop-2 as a therapeutic target for solid cancers (Cubas et al., Biochim Biophys Acta 2009;1796:309-14) is attested by further reports that documented the clinical significance of overexpressed Trop-2 in breast (Huang et al., Clin Cancer Res 2005;11:4357-64), colorectal (Ohmachi et al., Clin Cancer Res 2006;12:3057-63; Fang et al., Int J Colorectal Dis 2009;24:875-84), and oral squamous cell (Fong et al., Modern Pathol 2008;21:186-91) carcinomas. The latest evidence that prostate basal cells expressing high levels of Trop-2 are enriched for in vitro and in vivo stem-like activity is particularly noteworthy (Goldstein et al., Proc Natl Acad Sci USA 2008;105:20882-7).

[051] Flow cytometry and immunohistochemical staining studies have shown that the RS7 MAb detects antigen on a variety of tumor types, with limited binding to normal human tissue. (Stein et al., 1990) EGP-1 is expressed primarily by carcinomas such as carcinomas of the lung, stomach, urinary bladder, breast, ovary, uterus, and prostate. Localization and therapy studies using radiolabeled murine RS7 MAb in animal models have demonstrated tumor targeting and therapeutic efficacy (Stein et al., 1990; Stein et al., 1991).

[052] Strong RS7 staining has been demonstrated in tumors from the lung, breast, bladder, ovary, uterus, stomach, and prostate. (Stein et al., Int. J. Cancer 55:938, 1993) The lung cancer cases comprised both squamous cell carcinomas and adenocarcinomas. (*Id.*) Both cell types stained strongly, indicating that the RS7 antibody does not distinguish between histologic classes of non-small-cell carcinoma of the lung.

[053] The RS7 MAb is rapidly internalized into target cells (Stein et al., 1993). The internalization rate constant for RS7 MAb is intermediate between the internalization rate constants of two other rapidly internalizing MAbs, which have been demonstrated to be useful for immunotoxin production. (*Id.*) It is well documented that internalization of immunotoxin conjugates is a requirement for anti-tumor activity. (Pastan et al., Cell 47:641, 1986) Internalization of drug immunoconjugates has been described as a major factor in anti-tumor efficacy. (Yang et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 85: 1189, 1988) Thus, the RS7 antibody exhibits several important properties for therapeutic applications.

Antibody Preparation

[054] MAbs can be isolated and purified from hybridoma cultures by a variety of well-established techniques. Such isolation techniques include affinity chromatography with Protein-A or Protein-G Sepharose, size-exclusion chromatography, and ion-exchange chromatography. See, for example, Coligan at pages 2.7.1-2.7.12 and pages 2.9.1-2.9.3. Also, see Baines *et al.*, "Purification of Immunoglobulin G (IgG)," in METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, VOL. 10, pages 79-104 (The Humana Press, Inc. 1992). After the initial raising of antibodies to the immunogen, the antibodies can be sequenced and subsequently prepared by recombinant techniques. Humanization and chimerization of murine antibodies and antibody fragments are well known to those skilled in the art, as discussed below.

Chimeric Antibodies

[055] A chimeric antibody is a recombinant protein in which the variable regions of a human antibody have been replaced by the variable regions of, for example, a mouse antibody, including the complementarity-determining regions (CDRs) of the mouse antibody. Chimeric antibodies exhibit decreased immunogenicity and increased stability when administered to a subject. General techniques for cloning murine immunoglobulin variable domains are disclosed, for example, in Orlandi *et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 6*: 3833 (1989). Techniques for constructing chimeric antibodies are well known to those of skill in the art. As an example, Leung *et al., Hybridoma 13:*469 (1994), produced an LL2 chimera by combining DNA sequences encoding the V_κ and V_H domains of murine LL2, an anti-CD22 monoclonal antibody, with respective human κ and IgG_1 constant region domains.

Humanized Antibodies

[056] Techniques for producing humanized MAbs are well known in the art (see, e.g., Jones *et al., Nature 321*: 522 (1986), Riechmann *et al., Nature 332*: 323 (1988), Verhoeyen *et al., Science 239*: 1534 (1988), Carter *et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 89*: 4285 (1992), Sandhu, *Crit. Rev. Biotech. 12*: 437 (1992), and Singer *et al., J. Immun. 150*: 2844 (1993)). A chimeric or murine monoclonal antibody may be humanized by transferring the mouse CDRs from the heavy and light variable chains of the mouse immunoglobulin into the corresponding variable domains of a human antibody. The mouse framework regions (FR) in the chimeric monoclonal antibody are also replaced with human FR sequences. As simply transferring mouse CDRs into human FRs often results in a reduction or even loss of antibody affinity, additional modification might be

required in order to restore the original affinity of the murine antibody. This can be accomplished by the replacement of one or more human residues in the FR regions with their murine counterparts to obtain an antibody that possesses good binding affinity to its epitope. See, for example, Tempest *et al.*, *Biotechnology* 9:266 (1991) and Verhoeyen *et al.*, *Science* 239: 1534 (1988). Preferred residues for substitution include FR residues that are located within 1, 2, or 3 Angstroms of a CDR residue side chain, that are located adjacent to a CDR sequence, or that are predicted to interact with a CDR residue.

Human Antibodies

[057] Methods for producing fully human antibodies using either combinatorial approaches or transgenic animals transformed with human immunoglobulin loci are known in the art (*e.g.,* Mancini et al., 2004, *New Microbiol.* 27:315-28; Conrad and Scheller, 2005, *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 8:117-26; Brekke and Loset, 2003, *Curr. Opin. Pharmacol.* 3:544-50). A fully human antibody also can be constructed by genetic or chromosomal transfection methods, as well as phage display technology, all of which are known in the art. See for example, McCafferty *et al., Nature* 348:552-553 (1990). Such fully human antibodies are expected to exhibit even fewer side effects than chimeric or humanized antibodies and to function *in vivo* as essentially endogenous human antibodies.

[058] In one alternative, the phage display technique may be used to generate human antibodies (*e.g.,* Dantas-Barbosa et al., 2005, *Genet. Mol. Res.* 4:126-40). Human antibodies may be generated from normal humans or from humans that exhibit a particular disease state, such as cancer (Dantas-Barbosa et al., 2005). The advantage to constructing human antibodies from a diseased individual is that the circulating antibody repertoire may be biased towards antibodies against disease-associated antigens.

[059] In one non-limiting example of this methodology, Dantas-Barbosa et al. (2005) constructed a phage display library of human Fab antibody fragments from osteosarcoma patients. Generally, total RNA was obtained from circulating blood lymphocytes (*Id.*). Recombinant Fab were cloned from the μ, γ and κ chain antibody repertoires and inserted into a phage display library (*Id.*). RNAs were converted to cDNAs and used to make Fab cDNA libraries using specific primers against the heavy and light chain immunoglobulin sequences (Marks et al., 1991, *J. Mol. Biol.* 222:581-97). Library construction was performed according to Andris-Widhopf et al. (2000, In: *Phage Display Laboratory Manual*, Barbas et al. (eds), 1st edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring

Harbor, NY pp. 9.1 to 9.22). The final Fab fragments were digested with restriction endonucleases and inserted into the bacteriophage genome to make the phage display library. Such libraries may be screened by standard phage display methods, as known in the art. Phage display can be performed in a variety of formats, for their review, see e.g. Johnson and Chiswell, *Current Opinion in Structural Biology* 3:5564-571 (1993).

[060] Human antibodies may also be generated by *in vitro* activated B-cells. See U.S. Patent Nos. 5,567,610 and 5,229,275, incorporated herein by reference in their entirety. The skilled artisan will realize that these techniques are exemplary and any known method for making and screening human antibodies or antibody fragments may be utilized.

[061] In another alternative, transgenic animals that have been genetically engineered to produce human antibodies may be used to generate antibodies against essentially any immunogenic target, using standard immunization protocols. Methods for obtaining human antibodies from transgenic mice are disclosed by Green *et al., Nature Genet. 7*:13 (1994), Lonberg *et al., Nature 368*:856 (1994), and Taylor *et al., Int. Immun. 6*:579 (1994). A non-limiting example of such a system is the XenoMouse® (*e.g.*, Green et al., 1999, *J. Immunol. Methods* 231:11-23, incorporated herein by reference) from Abgenix (Fremont, CA). In the XenoMouse® and similar animals, the mouse antibody genes have been inactivated and replaced by functional human antibody genes, while the remainder of the mouse immune system remains intact.

[062] The XenoMouse® was transformed with germline-configured YACs (yeast artificial chromosomes) that contained portions of the human IgH and Igkappa loci, including the majority of the variable region sequences, along with accessory genes and regulatory sequences. The human variable region repertoire may be used to generate antibody producing B-cells, which may be processed into hybridomas by known techniques. A XenoMouse® immunized with a target antigen will produce human antibodies by the normal immune response, which may be harvested and/or produced by standard techniques discussed above. A variety of strains of XenoMouse® are available, each of which is capable of producing a different class of antibody. Transgenically produced human antibodies have been shown to have therapeutic potential, while retaining the pharmacokinetic properties of normal human antibodies (Green et al., 1999). The skilled artisan will realize that the claimed compositions and methods are not limited to use of the XenoMouse® system but may utilize any transgenic animal that has been genetically engineered to produce human antibodies.

Known Antibodies and Target Antigens

[063] As discussed above, in preferred embodiments the immunoconjugate antibodies are of use for treatment of pancreatic cancer. However, the skilled artisan will realize that the invention is not so limited and may be applied to other types of cancer or even other disease states. Non-limiting examples include malignant disease, cardiovascular disease, infectious disease, inflammatory disease, autoimmune disease, immune dysfunction disease (e.g., graft versus host disease or organ transplant rejection) or neurological disease. Exemplary target antigens of use for treating such diseases may include carbonic anhydrase IX, CCCL19, CCCL21, CSAp, CD1, CD1a, CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD11A, CD14, CD15, CD16, CD18, CD19, IGF-1R, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD29, CD30, CD32b, CD33, CD37, CD38, CD40, CD40L, CD45, CD46, CD52, CD54, CD55, CD59, CD64, CD66a-e, CD67, CD70, CD74, CD79a, CD80, CD83, CD95, CD126, CD133, CD138, CD147, CD154, CXCR4, AFP, PSMA, CEACAM5, CEACAM6, B7, ED-B of fibronectin, Factor H, FHL-1, Flt-3, folate receptor, GROB, HMGB-1, hypoxia inducible factor (HIF), HM1.24, insulin-like growth factor-1 (ILGF-1), IFN-γ, IFN-α, IFN-β, IL-2, IL-4R, IL-6R, IL-13R, IL-15R, IL-17R, IL-18R, IL-6, IL-8, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-25, IP-10, MAGE, mCRP, MCP-1, MIP-1A, MIP-1B, MIF, MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5, NCA-95, NCA-90, Ia, HM1.24, EGP-1, EGP-2, HLA-DR, tenascin, Le(y), RANTES, T101, TAC, Tn antigen, Thomson-Friedenreich antigens, tumor necrosis antigens, TNF-α, TRAIL receptor (R1 and R2), VEGFR, EGFR, PlGF, complement factors C3, C3a, C3b, C5a, C5, and an oncogene product.

[064] In certain embodiments, such as treating tumors, antibodies of use may target tumor-associated antigens. These antigenic markers may be substances produced by a tumor or may be substances which accumulate at a tumor site, on tumor cell surfaces or within tumor cells. Among such tumor-associated markers are those disclosed by Herberman, "Immunodiagnosis of Cancer", in Fleisher ed., "The Clinical Biochemistry of Cancer", page 347 (American Association of Clinical Chemists, 1979) and in U.S. Pat. Nos. 4,150,149; 4,361,544; and 4,444,744, the Examples section of each of which is incorporated herein by reference. Reports on tumor associated antigens (TAAs) include Mizukami et al., (2005, *Nature Med.* 11:992-97); Hatfield et al., (2005, *Curr. Cancer Drug Targets* 5:229-48); Vallbohmer et al. (2005, *J. Clin. Oncol.* 23:3536-44); and Ren et al. (2005, *Ann. Surg.* 242:55-63), each incorporated herein by reference with respect to the TAAs identified.

[065] Tumor-associated markers have been categorized by Herberman, supra, in a number of categories including oncofetal antigens, placental antigens, oncogenic or tumor virus associated antigens, tissue associated antigens, organ associated antigens, ectopic hormones and normal antigens or variants thereof. Occasionally, a sub-unit of a tumor-associated marker is advantageously used to raise antibodies having higher tumor-specificity, e.g., the beta-subunit of human chorionic gonadotropin (HCG) or the gamma region of carcinoembryonic antigen (CEA), which stimulate the production of antibodies having a greatly reduced cross-reactivity to non-tumor substances as disclosed in U.S. Pat. Nos. 4,361,644 and 4,444,744.

[066] Another marker of interest is transmembrane activator and CAML-interactor (TACI). See Yu et al. Nat. Immunol. 1:252-256 (2000). Briefly, TACI is a marker for B-cell malignancies (e.g., lymphoma). TACI and B cell maturation antigen (BCMA) are bound by the tumor necrosis factor homolog - a proliferation-inducing ligand (APRIL). APRIL stimulates in vitro proliferation of primary B and T cells and increases spleen weight due to accumulation of B cells *in vivo*. APRIL also competes with TALL-I (also called BLyS or BAFF) for receptor binding. Soluble BCMA and TACI specifically prevent binding of APRIL and block APRIL-stimulated proliferation of primary B cells. BCMA-Fc also inhibits production of antibodies against keyhole limpet hemocyanin and Pneumovax in mice, indicating that APRIL and/or TALL-I signaling via BCMA and/or TACI are required for generation of humoral immunity. Thus, APRIL-TALL-I and BCMA-TACI form a two ligand-two receptor pathway involved in stimulation of B and T cell function.

[067] Where the disease involves a lymphoma, leukemia or autoimmune disorder, targeted antigens may be selected from the group consisting of CD4, CD5, CD8, CD14, CD15, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD33, CD37, CD38, CD40, CD40L, CD46, CD52, CD54, CD67, CD74, CD79a, CD80, CD126, CD138, CD154, B7, MUC1, Ia, Ii, HM1.24, HLA-DR, tenascin, VEGF, PlGF, ED-B fibronectin, an oncogene, an oncogene product, CD66a-d, necrosis antigens, IL-2, T101, TAG, IL-6, MIF, TRAIL-R1 (DR4) and TRAIL-R2 (DR5).

[068] The skilled artisan will realize that any antibody or fragment known in the art that has binding specificity for a target antigen associated with a disease state or condition may be utilized. Such known antibodies include, but are not limited to, hR1 (anti-IGF-1R, U.S. Patent Application Serial No. 12/772,645, filed 3/12/10) hPAM4 (anti-pancreatic cancer

mucin, U.S. Patent No. 7,282,567), hA20 (anti-CD20, U.S. Patent No. 7,251,164), hA19 (anti-CD19, U.S. Patent No. 7,109,304), hIMMU31 (anti-AFP, U.S. Patent No. 7,300,655), hLL1 (anti-CD74, U.S. Patent No. 7,312,318), hLL2 (anti-CD22, U.S. Patent No. 7,074,403), hMu-9 (anti-CSAp, U.S. Patent No. 7,387,773), hL243 (anti-HLA-DR, U.S. Patent No. 7,612,180), hMN-14 (anti-CEACAM5, U.S. Patent No. 6,676,924), hMN-15 (anti-CEACAM6, U.S. Patent No. 7,662,378, U.S. Patent Application Serial No. 12/846,062, filed 7/29/10), hRS7 (anti-EGP-1, U.S. Patent No. 7,238,785), hMN-3 (anti-CEACAM6, U.S. Patent No. 7,541,440), Ab124 and Ab125 (anti-CXCR4, U.S. Patent No. 7,138,496) the Examples section of each cited patent or application incorporated herein by reference.

[069] Various other antibodies of use are known in the art (e.g., U.S. Patent Nos. 5,686,072; 5,874,540; 6,107,090; 6,183,744; 6,306,393; 6,653,104; 6,730.300; 6,899,864; 6,926,893; 6,962,702; 7,074,403; 7,230,084; 7,238,785; 7,238,786; 7,256,004; 7,282,567; 7,300,655; 7,312,318; 7,585,491; 7,612,180; 7,642,239 and U.S. Patent Application Publ. No. 20060193865; each incorporated herein by reference.)

[070] Antibodies of use may be commercially obtained from a wide variety of known sources. For example, a variety of antibody secreting hybridoma lines are available from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). A large number of antibodies against various disease targets, including but not limited to tumor-associated antigens, have been deposited at the ATCC and/or have published variable region sequences and are available for use in the claimed methods and compositions. See, e.g., U.S. Patent Nos. 7,312,318; 7,282,567; 7,151,164; 7,074,403; 7,060,802; 7,056,509; 7,049,060; 7,045,132; 7,041,803; 7,041,802; 7,041,293; 7,038,018; 7,037,498; 7,012,133; 7,001,598; 6,998,468; 6,994,976; 6,994,852; 6,989,241; 6,974,863; 6,965,018; 6,964,854; 6,962,981; 6,962,813; 6,956,107; 6,951,924; 6,949,244; 6,946,129; 6,943,020; 6,939,547; 6,921,645; 6,921,645; 6,921,533; 6,919,433; 6,919,078; 6,916,475; 6,905,681; 6,899,879; 6,893,625; 6,887,468; 6,887,466; 6,884,594; 6,881,405; 6,878,812; 6,875,580; 6,872,568; 6,867,006; 6,864,062; 6,861,511; 6,861,227; 6,861,226; 6,838,282; 6,835,549; 6,835,370; 6,824,780; 6,824,778; 6,812,206; 6,793,924; 6,783,758; 6,770,450; 6,767,711; 6,764,688; 6,764,681; 6,764,679; 6,743,898; 6,733,981; 6,730,307; 6,720,15; 6,716,966; 6,709,653; 6,693,176; 6,692,908; 6,689,607; 6,689,362; 6,689,355; 6,682,737; 6,682,736; 6,682,734; 6,673,344; 6,653,104; 6,652,852; 6,635,482; 6,630,144; 6,610,833; 6,610,294; 6,605,441; 6,605,279; 6,596,852; 6,592,868; 6,576,745; 6,572;856; 6,566,076; 6,562,618; 6,545,130;

6,544,749; 6,534,058; 6,528,625; 6,528,269; 6,521,227; 6,518,404; 6,511,665; 6,491,915; 6,488,930; 6,482,598; 6,482,408; 6,479,247; 6,468,531; 6,468,529; 6,465,173; 6,461,823; 6,458,356; 6,455,044; 6,455,040, 6,451,310; 6,444,206' 6,441,143; 6,432,404; 6,432,402; 6,419,928; 6,413,726; 6,406,694; 6,403,770; 6,403,091; 6,395,276; 6,395,274; 6,387,350; 6,383,759; 6,383,484; 6,376,654; 6,372,215; 6,359,126; 6,355,481; 6,355,444; 6,355,245; 6,355,244; 6,346,246; 6,344,198; 6,340,571; 6,340,459; 6,331,175; 6,306,393; 6,254,868; 6,187,287; 6,183,744; 6,129,914; 6,120,767; 6,096,289; 6,077,499; 5,922,302; 5,874,540; 5,814,440; 5,798,229; 5,789,554; 5,776,456; 5,736,119; 5,716,595; 5,677,136; 5,587,459; 5,443,953, 5,525,338. These are exemplary only and a wide variety of other antibodies and their hybridomas are known in the art. The skilled artisan will realize that antibody sequences or antibody-secreting hybridomas against almost any disease-associated antigen may be obtained by a simple search of the ATCC, NCBI and/or USPTO databases for antibodies against a selected disease-associated target of interest. The antigen binding domains of the cloned antibodies may be amplified, excised, ligated into an expression vector, transfected into an adapted host cell and used for protein production, using standard techniques well known in the art.

Antibody Fragments

[071] Antibody fragments are antigen binding portions of an antibody, such as $F(ab')_2$, Fab', $F(ab)_2$, Fab, Fv, sFv, scFv and the like. Antibody fragments which recognize specific epitopes can be generated by known techniques. $F(ab')_2$ fragments, for example, can be produced by pepsin digestion of the antibody molecule. These and other methods are described, for example, by Goldenberg, U.S. Pat. Nos. 4,036,945 and 4,331,647 and references contained therein. Also, see Nisonoff et al., Arch Biochem. Biophys. 89: 230 (1960); Porter, Biochem. J. 73: 119 (1959), Edelman et al., in METHODS IN ENZYMOLOGY VOL. 1, page 422 (Academic Press 1967), and Coligan at pages 2.8.1-2.8.10 and 2.10.-2.10.4. Alternatively, Fab' expression libraries can be constructed (Huse et al., 1989, Science, 246:1274-1281) to allow rapid and easy identification of monoclonal Fab' fragments with the desired specificity.

[072] A single chain Fv molecule (scFv) comprises a VL domain and a VH domain. The VL and VH domains associate to form a target binding site. These two domains are further covalently linked by a peptide linker (L). A scFv molecule is denoted as either VL-L-VH if the VL domain is the N-terminal part of the scFv molecule, or as VH-L-VL if the VH domain is the N-terminal part of the scFv molecule. Methods for making scFv

molecules and designing suitable peptide linkers are described in U.S. Pat. No. 4,704,692, U.S. Pat. No. 4,946,778, R. Raag and M. Whitlow, "Single Chain Fvs." FASEB Vol 9:73-80 (1995) and R. E. Bird and B. W. Walker, Single Chain Antibody Variable Regions, TIBTECH, Vol 9: 132-137 (1991).

[073] Other antibody fragments, for example single domain antibody fragments, are known in the art and may be used in the claimed constructs. Single domain antibodies (VHH) may be obtained, for example, from camels, alpacas or llamas by standard immunization techniques. (See, e.g., Muyldermans et al., TIBS 26:230-235, 2001; Yau et al., J Immunol Methods 281:161-75, 2003; Maass et al., J Immunol Methods 324:13-25, 2007). The VHH may have potent antigen-binding capacity and can interact with novel epitopes that are inaccessible to conventional VH-VL pairs. (Muyldermans et al., 2001). Alpaca serum IgG contains about 50% camelid heavy chain only IgG antibodies (HCAbs) (Maass et al., 2007). Alpacas may be immunized with known antigens, such as TNF-α, and VHHs can be isolated that bind to and neutralize the target antigen (Maass et al., 2007). PCR primers that amplify virtually all alpaca VHH coding sequences have been identified and may be used to construct alpaca VHH phage display libraries, which can be used for antibody fragment isolation by standard biopanning techniques well known in the art (Maass et al., 2007).

[074] An antibody fragment can also be prepared by proteolytic hydrolysis of a full-length antibody or by expression in E. coli or another host of the DNA coding for the fragment. An antibody fragment can be obtained by pepsin or papain digestion of full-length antibodies by conventional methods. For example, an antibody fragment can be produced by enzymatic cleavage of antibodies with pepsin to provide an approximate 100 kD fragment denoted $F(ab')_2$. This fragment can be further cleaved using a thiol reducing agent, and optionally a blocking group for the sulfhydryl groups resulting from cleavage of disulfide linkages, to produce an approximate 50 Kd Fab' monovalent fragment. Alternatively, an enzymatic cleavage using papain produces two monovalent Fab fragments and an Fc fragment directly.

[075] Other methods of cleaving antibodies, such as separation of heavy chains to form monovalent light-heavy chain fragments, further cleavage of fragments, or other enzymatic, chemical or genetic techniques may also be used, so long as the fragments bind to the antigen that is recognized by the intact antibody.

General techniques for antibody cloning and production

[076] Various techniques, such as production of chimeric or humanized antibodies, may involve procedures of antibody cloning and construction. The antigen-binding Vκ (variable light chain) and V_H (variable heavy chain) sequences for an antibody of interest may be obtained by a variety of molecular cloning procedures, such as RT-PCR, 5'-RACE, and cDNA library screening. The V genes of a MAb from a cell that expresses a murine MAb can be cloned by PCR amplification and sequenced. To confirm their authenticity, the cloned V_L and V_H genes can be expressed in cell culture as a chimeric Ab as described by Orlandi *et al.*, (*Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA, 86: 3833 (1989)). Based on the V gene sequences, a humanized MAb can then be designed and constructed as described by Leung et al. (*Mol. Immunol.*, 32: 1413 (1995)).

[077] cDNA can be prepared from any known hybridoma line or transfected cell line producing a murine MAb by general molecular cloning techniques (Sambrook et al., Molecular Cloning, A laboratory manual, 2nd Ed (1989)). The Vκ sequence for the MAb may be amplified using the primers VK1BACK and VK1FOR (Orlandi *et al.*, 1989) or the extended primer set described by Leung et al. (*BioTechniques*, 15: 286 (1993)). The V_H sequences can be amplified using the primer pair VH1BACK/VH1FOR (Orlandi *et al.*, 1989) or the primers annealing to the constant region of murine IgG described by Leung et al. (Hybridoma, 13:469 (1994)). Humanized V genes can be constructed by a combination of long oligonucleotide template syntheses and PCR amplification as described by Leung et al. (*Mol. Immunol.*, 32: 1413 (1995)).

[078] PCR products for Vκ can be subcloned into a staging vector, such as a pBR327-based staging vector, VKpBR, that contains an Ig promoter, a signal peptide sequence and convenient restriction sites. PCR products for V_H can be subcloned into a similar staging vector, such as the pBluescript-based VHpBS. Expression cassettes containing the Vκ and V_H sequences together with the promoter and signal peptide sequences can be excised from VKpBR and VHpBS and ligated into appropriate expression vectors, such as pKh and pG1g, respectively (Leung et al., Hybridoma, 13:469 (1994)). The expression vectors can be co-transfected into an appropriate cell and supernatant fluids monitored for production of a chimeric, humanized or human MAb. Alternatively, the Vκ and V_H expression cassettes can be excised and subcloned into a single expression vector, such as pdHL2, as described by Gillies *et al.* (*J. Immunol. Methods* 125:191 (1989) and also shown in Losman et al., *Cancer*, 80:2660 (1997)).

[079] In an alternative embodiment, expression vectors may be transfected into host cells that have been pre-adapted for transfection, growth and expression in serum-free medium. Exemplary cell lines that may be used include the Sp/EEE, Sp/ESF and Sp/ESF-X cell lines (see, e.g., U.S. Patent Nos. 7,531,327; 7,537,930 and 7,608,425; the Examples section of each of which is incorporated herein by reference). These exemplary cell lines are based on the Sp2/0 myeloma cell line, transfected with a mutant Bcl-EEE gene, exposed to methotrexate to amplify transfected gene sequences and pre-adapted to serum-free cell line for protein expression.

Bispecific and Multispecific Antibodies

[080] As discussed in the Examples below, in preferred embodiments the radiolabeled antibody and the drug-conjugated antibody are administered as separate antibodies, either sequentially or concurrently. However, in alternative embodiments the two immunoconjugates may be administered as a single bispecific or multispecific antibody. Numerous methods to produce bispecific or multispecific antibodies are known, as disclosed, for example, in U.S. Patent No. 7,405,320, the Examples section of which is incorporated herein by reference. Bispecific antibodies can be produced by the quadroma method, which involves the fusion of two different hybridomas, each producing a monoclonal antibody recognizing a different antigenic site (Milstein and Cuello, Nature, 1983; 305:537-540).

[081] Another method for producing bispecific antibodies uses heterobifunctional cross-linkers to chemically tether two different monoclonal antibodies (Staerz, et al. Nature. 1985; 314:628-631; Perez, et al. Nature. 1985; 316:354-356). Bispecific antibodies can also be produced by reduction of each of two parental monoclonal antibodies to the respective half molecules, which are then mixed and allowed to reoxidize to obtain the hybrid structure (Staerz and Bevan. Proc Natl Acad Sci U S A. 1986; 83:1453-1457). Other methods include improving the efficiency of generating hybrid hybridomas by gene transfer of distinct selectable markers via retrovirus-derived shuttle vectors into respective parental hybridomas, which are fused subsequently (DeMonte, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990, 87:2941-2945); or transfection of a hybridoma cell line with expression plasmids containing the heavy and light chain genes of a different antibody.

[082] Cognate V_H and V_L domains can be joined with a peptide linker of appropriate composition and length (usually consisting of more than 12 amino acid residues) to form a

single-chain Fv (scFv), as discussed above. Reduction of the peptide linker length to less than 12 amino acid residues prevents pairing of V_H and V_L domains on the same chain and forces pairing of V_H and V_L domains with complementary domains on other chains, resulting in the formation of functional multimers. Polypeptide chains of V_H and V_L domains that are joined with linkers between 3 and 12 amino acid residues form predominantly dimers (termed diabodies). With linkers between 0 and 2 amino acid residues, trimers (termed triabody) and tetramers (termed tetrabody) are favored, but the exact patterns of oligomerization appear to depend on the composition as well as the orientation of V-domains (V_H-linker-V_L or V_L-linker-V_H), in addition to the linker length.

[083] These techniques for producing multispecific or bispecific antibodies exhibit various difficulties in terms of low yield, necessity for purification, low stability or the labor-intensiveness of the technique. More recently, a technique known as "dock and lock" (DNL), discussed in more detail below, has been utilized to produce combinations of virtually any desired antibodies, antibody fragments and other effector molecules. Any of the techniques known in the art for making bispecific or multispecific antibodies may be utilized in the practice of the presently claimed methods.

Dock-and-Lock (DNL)

[084] Bispecific or multispecific antibodies or other constructs may be produced using the dock-and-lock technology (see, e.g., U.S. Patent Nos. 7,550,143; 7,521,056; 7,534,866; 7,527,787 and 7,666,400, the Examples section of each incorporated herein by reference). The DNL method exploits specific protein/protein interactions that occur between the regulatory (R) subunits of cAMP-dependent protein kinase (PKA) and the anchoring domain (AD) of A-kinase anchoring proteins (AKAPs) (Baillie *et al.*, FEBS Letters. 2005; 579: 3264. Wong and Scott, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2004; 5: 959). PKA, which plays a central role in one of the best studied signal transduction pathways triggered by the binding of the second messenger cAMP to the R subunits, was first isolated from rabbit skeletal muscle in 1968 (Walsh *et al.*, J. Biol. Chem. 1968;243:3763). The structure of the holoenzyme consists of two catalytic subunits held in an inactive form by the R subunits (Taylor, J. Biol. Chem. 1989;264:8443). Isozymes of PKA are found with two types of R subunits (RI and RII), and each type has α and β isoforms (Scott, Pharmacol. Ther. 1991;50:123). The R subunits have been isolated only as stable dimers and the dimerization domain has been shown to consist of the first 44 amino-terminal residues

(Newlon *et al.*, Nat. Struct. Biol. 1999; 6:222). Binding of cAMP to the R subunits leads to the release of active catalytic subunits for a broad spectrum of serine/threonine kinase activities, which are oriented toward selected substrates through the compartmentalization of PKA via its docking with AKAPs (Scott *et al.*, J. Biol. Chem. 1990;265;21561)

[085] Since the first AKAP, microtubule-associated protein-2, was characterized in 1984 (Lohmann *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1984; 81:6723), more than 50 AKAPs that localize to various sub-cellular sites, including plasma membrane, actin cytoskeleton, nucleus, mitochondria, and endoplasmic reticulum, have been identified with diverse structures in species ranging from yeast to humans (Wong and Scott, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2004;5:959). The AD of AKAPs for PKA is an amphipathic helix of 14-18 residues (Carr *et al.*, J. Biol. Chem. 1991;266:14188). The amino acid sequences of the AD are quite varied among individual AKAPs, with the binding affinities reported for RII dimers ranging from 2 to 90 nM (Alto *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003;100:4445). AKAPs will only bind to dimeric R subunits. For human RIIα, the AD binds to a hydrophobic surface formed by the 23 amino-terminal residues (Colledge and Scott, Trends Cell Biol. 1999; 6:216). Thus, the dimerization domain and AKAP binding domain of human RIIα are both located within the same N-terminal 44 amino acid sequence (Newlon *et al.*, Nat. Struct. Biol. 1999;6:222; Newlon *et al.*, EMBO J. 2001;20:1651), which is termed the DDD herein.

[086] We have developed a platform technology to utilize the DDD of human RIIα and the AD of AKAP as an excellent pair of linker modules for docking any two entities, referred to hereafter as **A** and **B**, into a noncovalent complex, which could be further locked into a stably tethered structure through the introduction of cysteine residues into both the DDD and AD at strategic positions to facilitate the formation of disulfide bonds. The general methodology of the "dock-and-lock" approach is as follows. Entity **A** is constructed by linking a DDD sequence to a precursor of **A,** resulting in a first component hereafter referred to as **a**. Because the DDD sequence would effect the spontaneous formation of a dimer, **A** would thus be composed of $\mathbf{a}_2$. Entity **B** is constructed by linking an AD sequence to a precursor of **B,** resulting in a second component hereafter referred to as **b**. The dimeric motif of DDD contained in $\mathbf{a}_2$ will create a docking site for binding to the AD sequence contained in **b,** thus facilitating a ready association of $\mathbf{a}_2$ and **b** to form a binary, trimeric complex composed of $\mathbf{a}_2\mathbf{b}$. This binding event is made irreversible with a subsequent reaction to covalently secure the two entities via disulfide bridges, which

occurs very efficiently based on the principle of effective local concentration because the initial binding interactions should bring the reactive thiol groups placed onto both the DDD and AD into proximity (Chmura *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001;98:8480) to ligate site-specifically. Using various combinations of linkers, adaptor modules and precursors, a wide variety of DNL constructs of different stoichiometry may be produced and used, including but not limited to dimeric, trimeric, tetrameric, pentameric and hexameric DNL constructs (see, e.g., U.S. Nos. 7,550,143; 7,521,056; 7,534,866; 7,527,787 and 7,666,400.)

[087] By attaching the DDD and AD away from the functional groups of the two precursors, such site-specific ligations are also expected to preserve the original activities of the two precursors. This approach is modular in nature and potentially can be applied to link, site-specifically and covalently, a wide range of substances, including peptides, proteins, antibodies, antibody fragments, and other effector moieties with a wide range of activities. Utilizing the fusion protein method of constructing AD and DDD conjugated effectors described in the Examples below, virtually any protein or peptide may be incorporated into a DNL construct. However, the technique is not limiting and other methods of conjugation may be utilized.

[088] A variety of methods are known for making fusion proteins, including nucleic acid synthesis, hybridization and/or amplification to produce a synthetic double-stranded nucleic acid encoding a fusion protein of interest. Such double-stranded nucleic acids may be inserted into expression vectors for fusion protein production by standard molecular biology techniques (see, e.g. Sambrook et al., Molecular Cloning, A laboratory manual, 2nd Ed, 1989). In such preferred embodiments, the AD and/or DDD moiety may be attached to either the N-terminal or C-terminal end of an effector protein or peptide. However, the skilled artisan will realize that the site of attachment of an AD or DDD moiety to an effector moiety may vary, depending on the chemical nature of the effector moiety and the part(s) of the effector moiety involved in its physiological activity. Site-specific attachment of a variety of effector moieties may be performed using techniques known in the art, such as the use of bivalent cross-linking reagents and/or other chemical conjugation techniques.

Pre-Targeting

[089] In preferred embodiments, the radionuclide and drug are directly attached to the antibodies of interest and administered as immunoconjugates. However, in alternative

embodiments the radionuclide and/or drug may be conjugated to a targetable construct that comprises one or more haptens. The hapten is recognized by at least one arm of a bispecific or multispecific antibody that also binds to a tumor-associated antigen or other disease-associated antigen. In this case, the radionuclide and/or drug bind indirectly to the antibodies, via the binding of the targetable construct. This process is referred to as pretargeting.

[090] Pre-targeting is a multistep process originally developed to resolve the slow blood clearance of directly targeting antibodies, which contributes to undesirable toxicity to normal tissues such as bone marrow. With pre-targeting, a radionuclide or other diagnostic or therapeutic agent is attached to a small delivery molecule (targetable construct) that is cleared within minutes from the blood. A pre-targeting bispecific or multispecific antibody, which has binding sites for the targetable construct as well as a target antigen, is administered first, free antibody is allowed to clear from circulation and then the targetable construct is administered.

[091] Pre-targeting methods are disclosed, for example, in Goodwin et al., U.S. Pat. No. 4,863,713; Goodwin et al., J. Nucl. Med. 29:226, 1988; Hnatowich et al., J. Nucl. Med. 28:1294, 1987; Oehr et al., J. Nucl. Med. 29:728, 1988; Klibanov et al., J. Nucl. Med. 29:1951, 1988; Sinitsyn et al., J. Nucl. Med. 30:66, 1989; Kalofonos et al., J. Nucl. Med. 31:1791, 1990; Schechter et al., Int. J. Cancer 48:167, 1991; Paganelli et al., Cancer Res. 51:5960, 1991; Paganelli et al., Nucl. Med. Commun. 12:211, 1991; U.S. Pat. No. 5,256,395; Stickney et al., Cancer Res. 51:6650, 1991; Yuan et al., Cancer Res. 51:3119, 1991; U.S. Pat. Nos. 6,077,499; 7,011,812; 7,300,644; 7,074,405; 6,962,702; 7,387,772; 7,052,872; 7,138,103; 6,090,381; 6,472,511; 6,962,702; and 6,962,702, each incorporated herein by reference.

[092] A pre-targeting method of treating or diagnosing a disease or disorder in a subject may be provided by: (1) administering to the subject a bispecific antibody or antibody fragment; (2) optionally administering to the subject a clearing composition, and allowing the composition to clear the antibody from circulation; and (3) administering to the subject the targetable construct, containing one or more chelated or chemically bound therapeutic or diagnostic agents.

Immunoconjugates

[093] In preferred embodiments, the radionuclide and drug are attached directly to an antibody or antibody fragment to form an immunoconjugate. Immunoconjugates comprising radionuclides may be formed by direct covalent attachment of the radionuclide to a functional group on the antibody, as in the well known radioiodination of tyrosine residues. Alternatively, the radionuclide may be conjugated to a chelating moiety that is attached to the antibody or fragment thereof. Methods for covalent conjugation of chelating moieties, drugs and other therapeutic agents to antibodies and other proteins are known in the art and any such known method may be utilized.

[094] Therapeutic agents may be attached, for example to reduced SH groups and/or to carbohydrate side chains. A therapeutic agent can be attached at the hinge region of a reduced antibody component via disulfide bond formation. Alternatively, such agents can be attached using a heterobifunctional cross-linker, such as *N*-succinyl 3-(2-pyridyldithio)propionate (SPDP). Yu *et al., Int. J. Cancer 56*: 244 (1994). General techniques for such conjugation are well-known in the art. See, for example, Wong, CHEMISTRY OF PROTEIN CONJUGATION AND CROSS-LINKING (CRC Press 1991); Upeslacis *et al.*, "Modification of Antibodies by Chemical Methods," in MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND APPLICATIONS, Birch *et al.* (eds.), pages 187-230 (Wiley-Liss, Inc. 1995); Price, "Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies," in MONOCLONAL ANTIBODIES: PRODUCTION, ENGINEERING AND CLINICAL APPLICATION, Ritter *et al.* (eds.), pages 60-84 (Cambridge University Press 1995). Alternatively, the therapeutic agent can be conjugated via a carbohydrate moiety in the Fc region of the antibody. The carbohydrate group can be used to increase the loading of the same agent that is bound to a thiol group, or the carbohydrate moiety can be used to bind a different therapeutic or diagnostic agent.

[095] Methods for conjugating functional groups to antibodies via an antibody carbohydrate moiety are well-known to those of skill in the art. See, for example, Shih *et al., Int. J. Cancer 41*: 832 (1988); Shih *et al., Int. J. Cancer 46*: 1101 (1990); and Shih *et al.*, U.S. Patent No. 5,057,313, the Examples section of which is incorporated herein by reference. The general method involves reacting an antibody having an oxidized carbohydrate portion with a carrier polymer that has at least one free amine function. This

reaction results in an initial Schiff base (imine) linkage, which can be stabilized by reduction to a secondary amine to form the final conjugate.

[096] The Fc region may be absent if the antibody component of the immunoconjugate is an antibody fragment. However, it is possible to introduce a carbohydrate moiety into the light chain variable region of a full length antibody or antibody fragment. See, for example, Leung *et al., J. Immunol. 154*: 5919 (1995); U.S. Patent Nos. 5,443,953 and 6,254,868, the Examples section of which is incorporated herein by reference. The engineered carbohydrate moiety is used to attach the therapeutic or diagnostic agent.

[097] Methods of conjugation and use of chelating agents to attach radionuclides to proteins are well known in the art (see, e.g., U.S. Patent Application No. 7,563,433, the Examples section of which is incorporated herein by reference). Exemplary chelators include but are not limited to DTPA (such as Mx-DTPA), DOTA, TETA, NETA or NOTA. Chelates may be directly linked to antibodies or peptides, for example as disclosed in U.S. Patent 4,824,659, incorporated herein in its entirety by reference. Particularly useful chelating moieties include 2-benzyl-DTPA and its monomethyl and cyclohexyl analogs. Other ring-type chelates such as macrocyclic polyethers are of interest for stably binding radionuclides.

[098] In certain embodiments, radionuclides may be attached to proteins or peptides by reaction with a reagent having a long tail, to which may be attached a multiplicity of chelating groups for binding ions. Such a tail can be a polymer such as a polylysine, polysaccharide, or other derivatized or derivatizable chains having pendant groups to which can be bound chelating groups such as, *e.g.,* ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA), porphyrins, polyamines, crown ethers, bis-thiosemicarbazones, polyoximes, and like groups known to be useful for this purpose.

[099] An alternative method for attaching chelating moieties, drugs or other functional groups to a targeting molecule involves use of click chemistry reactions. The click chemistry approach was originally conceived as a method to rapidly generate complex substances by joining small subunits together in a modular fashion. (See, e.g., Kolb et al., 2004, Angew Chem Int Ed 40:3004-31; Evans, 2007, Aust J Chem 60:384-95.) Various forms of click chemistry reaction are known in the art, such as the Huisgen 1,3-dipolar cycloaddition copper catalyzed reaction (Tornoe et al., 2002, J Organic Chem 67:3057-64), which is often referred to as the "click reaction." Other alternatives include

cycloaddition reactions such as the Diels-Alder, nucleophilic substitution reactions (especially to small strained rings like epoxy and aziridine compounds), carbonyl chemistry formation of urea compounds and reactions involving carbon-carbon double bonds, such as alkynes in thiol-yne reactions.

[0100] The azide alkyne Huisgen cycloaddition reaction uses a copper catalyst in the presence of a reducing agent to catalyze the reaction of a terminal alkyne group attached to a first molecule. In the presence of a second molecule comprising an azide moiety, the azide reacts with the activated alkyne to form a 1,4-disubstituted 1,2,3-triazole. The copper catalyzed reaction occurs at room temperature and is sufficiently specific that purification of the reaction product is often not required. (Rostovstev et al., 2002, Angew Chem Int Ed 41:2596; Tornoe et al., 2002, J Org Chem 67:3057.) The azide and alkyne functional groups are largely inert towards biomolecules in aqueous medium, allowing the reaction to occur in complex solutions. The triazole formed is chemically stable and is not subject to enzymatic cleavage, making the click chemistry product highly stable in biological systems. Although the copper catalyst is toxic to living cells, the copper-based click chemistry reaction may be used *in vitro* for immunoconjugate formation.

[0101] A copper-free click reaction has been proposed for covalent modification of biomolecules. (See, e.g., Agard et al., 2004, J Am Chem Soc 126:15046-47.) The copper-free reaction uses ring strain in place of the copper catalyst to promote a [3 + 2] azide-alkyne cycloaddition reaction (*Id.*) For example, cyclooctyne is an 8-carbon ring structure comprising an internal alkyne bond. The closed ring structure induces a substantial bond angle deformation of the acetylene, which is highly reactive with azide groups to form a triazole. Thus, cyclooctyne derivatives may be used for copper-free click reactions (*Id.*)

[0102] Another type of copper-free click reaction was reported by Ning et al. (2010, Angew Chem Int Ed 49:3065-68), involving strain-promoted alkyne-nitrone cycloaddition. To address the slow rate of the original cyclooctyne reaction, electron-withdrawing groups are attached adjacent to the triple bond (*Id.*) Examples of such substituted cyclooctynes include difluorinated cyclooctynes, 4-dibenzocyclooctynol and azacyclooctyne (*Id.*) An alternative copper-free reaction involved strain-promoted akyne-nitrone cycloaddition to give N-alkylated isoxazolines (*Id.*) The reaction was reported to have exceptionally fast reaction kinetics and was used in a one-pot three-step protocol for site-specific modification of peptides and proteins (*Id.*) Nitrones were prepared by the

condensation of appropriate aldehydes with *N*-methylhydroxylamine and the cycloaddition reaction took place in a mixture of acetonitrile and water (*Id.*) These and other known click chemistry reactions may be used to attach chelating moieties or drugs to antibodies *in vitro.*

Methods of Therapeutic Treatment

[0103] Various embodiments concern methods of treating a cancer in a subject, comprising administering a therapeutically effective amount of an antibody, fragment or immunoconjugate. In preferred embodiments, the subject is administered a radionuclide-conjugated antibody or fragment and a drug-conjugated antibody or fragment.

[0104] The immunoconjugates can be supplemented with the administration, either concurrently or sequentially, of at least one other therapeutic agent. Multimodal therapies may include therapy with other antibodies, such as anti-CD22, anti-CD19, anti-CD20, anti-CD21, anti-CD74, anti-CD80, anti-CD23, anti-CD45, anti-CD46, anti-MIF, anti-EGP-1, anti-CEACAM5, anti-CEACAM6, anti-pancreatic cancer mucin, anti-IGF-1R or anti-HLA-DR (including the invariant chain) antibodies in the form of naked antibodies, fusion proteins, or as immunoconjugates. Various antibodies of use, such as anti-CD19, anti-CD20, and anti-CD22 antibodies, are known to those of skill in the art. See, for example, Ghetie *et al., Cancer Res. 48*:2610 (1988); Hekman *et al., Cancer Immunol. Immunother. 32*:364 (1991); Longo, *Curr. Opin. Oncol. 8*:353 (1996), U.S. Patent Nos. 5,798,554; 6,187,287; 6,306,393; 6,676,924; 7,109,304; 7,151,164; 7,230,084; 7,230,085; 7,238,785; 7,238,786; 7,282,567; 7,300,655; 7,312,318; 7,612,180; 7,501,498; the Examples section of each of which is incorporated herein by reference.

[0105] In one non-limiting embodiment, the present invention contemplates treatment with conjugated PAM4 and RS7 antibodies or fragments thereof before, in combination with, or after other pancreatic tumor associated antibodies such as CA19.9, DUPAN2, SPAN1, Nd2, B72.3, CC49, anti-Le^a antibodies, and antibodies to other Lewis antigens (e.g., Le(y)), as well as antibodies against carcinoembryonic antigen (CEA or CEACAM5), CEACAM6, colon-specific antigen-p (CSAp), MUC-1, MUC-2, MUC-3, MUC-4, MUC-5ac, MUC-16, MUC-17, HLA-DR, CD40, CD74, CD138, HER2/neu, EGFR, EGP-1, EGP-2, angiogenesis factors (e.g., VEGF, PlGF), insulin-like growth factor (ILGF), tenascin, platelet-derived growth factor, and IL-6, as well as products of oncogenes (e.g., bcl-2, Kras, p53), cMET, and antibodies against tumor necrosis

substances. These solid tumor antibodies may be naked or conjugated to, *inter alia*, drugs, toxins, isotopes, radionuclides or immunomodulators. Many different antibody combinations may be constructed and used in either naked or conjugated form. Alternatively, different antibody combinations may be employed for administration in combination with other therapeutic agents, such as a cytotoxic drug or with radiation, given consecutively, simultaneously, or sequentially.

[0106] In another form of multimodal therapy, subjects receive immunoconjugates in conjunction with standard cancer chemotherapy. For example, "CVB" (1.5 g/m^2 cyclophosphamide, 200-400 mg/m^2 etoposide, and 150-200 mg/m^2 carmustine) is a regimen used to treat non-Hodgkin's lymphoma. Patti *et al., Eur. J. Haematol. 51*: 18 (1993). Other suitable combination chemotherapeutic regimens are well-known to those of skill in the art. See, for example, Freedman *et al.*, "Non-Hodgkin's Lymphomas," in CANCER MEDICINE, VOLUME 2, 3rd Edition, Holland *et al.* (eds.), pages 2028-2068 (Lea & Febiger 1993). As an illustration, first generation chemotherapeutic regimens for treatment of intermediate-grade non-Hodgkin's lymphoma (NHL) include C-MOPP (cyclophosphamide, vincristine, procarbazine and prednisone) and CHOP (cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone). A useful second generation chemotherapeutic regimen is m-BACOD (methotrexate, bleomycin, doxorubicin, cyclophosphamide, vincristine, dexamethasone and leucovorin), while a suitable third generation regimen is MACOP-B (methotrexate, doxorubicin, cyclophosphamide, vincristine, prednisone, bleomycin and leucovorin). Additional useful drugs include phenyl butyrate, bendamustine, and bryostatin-1.

[0107] In a preferred multimodal therapy, both chemotherapeutic drugs and cytokines are co-administered with an antibody or immunoconjugate. The cytokines, chemotherapeutic drugs and antibody or immunoconjugate can be administered in any order, or together.

[0108] Immunoconjugates can be formulated according to known methods to prepare pharmaceutically useful compositions, whereby the immunoconjugate is combined in a mixture with a pharmaceutically suitable excipient. Sterile phosphate-buffered saline is one example of a pharmaceutically suitable excipient. Other suitable excipients are well-known to those in the art. See, for example, Ansel *et al.*, PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, 5th Edition (Lea & Febiger 1990), and Gennaro (ed.), REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18th Edition (Mack Publishing Company 1990), and revised editions thereof.

[0109] The immunoconjugate of the present invention can be formulated for intravenous administration via, for example, bolus injection or continuous infusion. Preferably, the antibody of the present invention is infused over a period of less than about 4 hours, and more preferably, over a period of less than about 3 hours. For example, the first 25-50 mg could be infused within 30 minutes, preferably even 15 min, and the remainder infused over the next 2-3 hrs. Formulations for injection can be presented in unit dosage form, e.g., in ampoules or in multi-dose containers, with an added preservative. The compositions can take such forms as suspensions, solutions or emulsions in oily or aqueous vehicles, and can contain formulatory agents such as suspending, stabilizing and/or dispersing agents. Alternatively, the active ingredient can be in powder form for constitution with a suitable vehicle, e.g., sterile pyrogen-free water, before use.

[0110] Additional pharmaceutical methods may be employed to control the duration of action of the therapeutic conjugate. Control release preparations can be prepared through the use of polymers to complex or adsorb the immunoconjugate. For example, biocompatible polymers include matrices of poly(ethylene-co-vinyl acetate) and matrices of a polyanhydride copolymer of a stearic acid dimer and sebacic acid. Sherwood *et al.*, *Bio/Technology* 10: 1446 (1992). The rate of release of an immunoconjugate or antibody from such a matrix depends upon the molecular weight of the immunoconjugate or antibody, the amount of immunoconjugate or antibody within the matrix, and the size of dispersed particles. Saltzman *et al.*, *Biophys. J.* 55: 163 (1989); Sherwood *et al.*, *supra.* Other solid dosage forms are described in Ansel *et al.*, PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, 5th Edition (Lea & Febiger 1990), and Gennaro (ed.), REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18th Edition (Mack Publishing Company 1990), and revised editions thereof.

[0111] The immunoconjugate may also be administered to a mammal subcutaneously or even by other parenteral routes. Moreover, the administration may be by continuous infusion or by single or multiple boluses. Preferably, the antibody is infused over a period of less than about 4 hours, and more preferably, over a period of less than about 3 hours.

[0112] More generally, the dosage of an administered immunoconjugate for humans will vary depending upon such factors as the patient's age, weight, height, sex, general medical condition and previous medical history. It may be desirable to provide the recipient with a dosage of immunoconjugate, antibody fusion protein that is in the range of from about 1 mg/kg to 25 mg/kg as a single intravenous infusion, although a lower or higher dosage

also may be administered as circumstances dictate. A dosage of 1-20 mg/kg for a 70 kg patient, for example, is 70-1,400 mg, or 41-824 mg/m^2 for a 1.7-m patient. The dosage may be repeated as needed, for example, once per week for 4-10 weeks, once per week for 8 weeks, or once per week for 4 weeks. It may also be given less frequently, such as every other week for several months, or monthly or quarterly for many months, as needed in a maintenance therapy.

[0113] Alternatively, an antibody may be administered as one dosage every 2 or 3 weeks, repeated for a total of at least 3 dosages. Or, the antibodies may be administered twice per week for 4-6 weeks. If the dosage is lowered to approximately 200-300 mg/m^2 (340 mg per dosage for a 1.7-m patient, or 4.9 mg/kg for a 70 kg patient), it may be administered once or even twice weekly for 4 to 10 weeks. Alternatively, the dosage schedule may be decreased, namely every 2 or 3 weeks for 2-3 months. It has been determined, however, that even higher doses, such as 20 mg/kg once weekly or once every 2-3 weeks can be administered by slow i.v. infusion, for repeated dosing cycles. The dosing schedule can optionally be repeated at other intervals and dosage may be given through various parenteral routes, with appropriate adjustment of the dose and schedule.

[0114] In preferred embodiments, the subject antibodies are of use for therapy of cancer. Examples of cancers include, but are not limited to, carcinoma, lymphoma, glioblastoma, melanoma, sarcoma, and leukemia, myeloma, or lymphoid malignancies. More particular examples of such cancers are noted below and include: squamous cell cancer (e.g., epithelial squamous cell cancer), Ewing sarcoma, Wilms tumor, astrocytomas, lung cancer including small-cell lung cancer, non-small cell lung cancer, adenocarcinoma of the lung and squamous carcinoma of the lung, cancer of the peritoneum, hepatocellular cancer, gastric or stomach cancer including gastrointestinal cancer, pancreatic cancer, glioblastoma multiforme, cervical cancer, ovarian cancer, liver cancer, bladder cancer, hepatoma, hepatocellular carcinoma, neuroendocrine tumors, medullary thyroid cancer, differentiated thyroid carcinoma, breast cancer, ovarian cancer, colon cancer, rectal cancer, endometrial cancer or uterine carcinoma, salivary gland carcinoma, kidney or renal cancer, prostate cancer, vulvar cancer, anal carcinoma, penile carcinoma, as well as head-and-neck cancer. The term "cancer" includes primary malignant cells or tumors (e.g., those whose cells have not migrated to sites in the subject's body other than the site of the original malignancy or tumor) and secondary malignant cells or tumors (e.g., those arising

from metastasis, the migration of malignant cells or tumor cells to secondary sites that are different from the site of the original tumor).

[0115] Other examples of cancers or malignancies include, but are not limited to: Acute Childhood Lymphoblastic Leukemia, Acute Lymphoblastic Leukemia, Acute Lymphocytic Leukemia, Acute Myeloid Leukemia, Adrenocortical Carcinoma, Adult (Primary) Hepatocellular Cancer, Adult (Primary) Liver Cancer, Adult Acute Lymphocytic Leukemia, Adult Acute Myeloid Leukemia, Adult Hodgkin's Lymphoma, Adult Lymphocytic Leukemia, Adult Non-Hodgkin's Lymphoma, Adult Primary Liver Cancer, Adult Soft Tissue Sarcoma, AIDS-Related Lymphoma, AIDS-Related Malignancies, Anal Cancer, Astrocytoma, Bile Duct Cancer, Bladder Cancer, Bone Cancer, Brain Stem Glioma, Brain Tumors, Breast Cancer, Cancer of the Renal Pelvis and Ureter, Central Nervous System (Primary) Lymphoma, Central Nervous System Lymphoma, Cerebellar Astrocytoma, Cerebral Astrocytoma, Cervical Cancer, Childhood (Primary) Hepatocellular Cancer, Childhood (Primary) Liver Cancer, Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia, Childhood Acute Myeloid Leukemia, Childhood Brain Stem Glioma, Childhood Cerebellar Astrocytoma, Childhood Cerebral Astrocytoma, Childhood Extracranial Germ Cell Tumors, Childhood Hodgkin's Disease, Childhood Hodgkin's Lymphoma, Childhood Hypothalamic and Visual Pathway Glioma, Childhood Lymphoblastic Leukemia, Childhood Medulloblastoma, Childhood Non-Hodgkin's Lymphoma, Childhood Pineal and Supratentorial Primitive Neuroectodermal Tumors, Childhood Primary Liver Cancer, Childhood Rhabdomyosarcoma, Childhood Soft Tissue Sarcoma, Childhood Visual Pathway and Hypothalamic Glioma, Chronic Lymphocytic Leukemia, Chronic Myelogenous Leukemia, Colon Cancer, Cutaneous T-Cell Lymphoma, Endocrine Pancreas Islet Cell Carcinoma, Endometrial Cancer, Ependymoma, Epithelial Cancer, Esophageal Cancer, Ewing's Sarcoma and Related Tumors, Exocrine Pancreatic Cancer, Extracranial Germ Cell Tumor, Extragonadal Germ Cell Tumor, Extrahepatic Bile Duct Cancer, Eye Cancer, Female Breast Cancer, Gaucher's Disease, Gallbladder Cancer, Gastric Cancer, Gastrointestinal Carcinoid Tumor, Gastrointestinal Tumors, Germ Cell Tumors, Gestational Trophoblastic Tumor, Hairy Cell Leukemia, Head and Neck Cancer, Hepatocellular Cancer, Hodgkin's Lymphoma, Hypergammaglobulinemia, Hypopharyngeal Cancer, Intestinal Cancers, Intraocular Melanoma, Islet Cell Carcinoma, Islet Cell Pancreatic Cancer, Kaposi's Sarcoma, Kidney Cancer, Laryngeal Cancer, Lip and Oral Cavity Cancer, Liver Cancer, Lung Cancer, Lymphoproliferative Disorders,

Macroglobulinemia, Male Breast Cancer, Malignant Mesothelioma, Malignant Thymoma, Medulloblastoma, Melanoma, Mesothelioma, Metastatic Occult Primary Squamous Neck Cancer, Metastatic Primary Squamous Neck Cancer, Metastatic Squamous Neck Cancer, Multiple Myeloma, Multiple Myeloma/Plasma Cell Neoplasm, Myelodysplastic Syndrome, Myelogenous Leukemia, Myeloid Leukemia, Myeloproliferative Disorders, Nasal Cavity and Paranasal Sinus Cancer, Nasopharyngeal Cancer, Neuroblastoma, Non-Hodgkin's Lymphoma, Nonmelanoma Skin Cancer, Non-Small Cell Lung Cancer, Occult Primary Metastatic Squamous Neck Cancer, Oropharyngeal Cancer, Osteo-/Malignant Fibrous Sarcoma, Osteosarcoma/Malignant Fibrous Histiocytoma, Osteosarcoma/Malignant Fibrous Histiocytoma of Bone, Ovarian Epithelial Cancer, Ovarian Germ Cell Tumor, Ovarian Low Malignant Potential Tumor, Pancreatic Cancer, Paraproteinemias, Polycythemia vera, Parathyroid Cancer, Penile Cancer, Pheochromocytoma, Pituitary Tumor, Primary Central Nervous System Lymphoma, Primary Liver Cancer, Prostate Cancer, Rectal Cancer, Renal Cell Cancer, Renal Pelvis and Ureter Cancer, Retinoblastoma, Rhabdomyosarcoma, Salivary Gland Cancer, Sarcoidosis Sarcomas, Sezary Syndrome, Skin Cancer, Small Cell Lung Cancer, Small Intestine Cancer, Soft Tissue Sarcoma, Squamous Neck Cancer, Stomach Cancer, Supratentorial Primitive Neuroectodermal and Pineal Tumors, T-Cell Lymphoma, Testicular Cancer, Thymoma, Thyroid Cancer, Transitional Cell Cancer of the Renal Pelvis and Ureter, Transitional Renal Pelvis and Ureter Cancer, Trophoblastic Tumors, Ureter and Renal Pelvis Cell Cancer, Urethral Cancer, Uterine Cancer, Uterine Sarcoma, Vaginal Cancer, Visual Pathway and Hypothalamic Glioma, Vulvar Cancer, Waldenstrom's Macroglobulinemia, Wilms' Tumor, and any other hyperproliferative disease, besides neoplasia, located in an organ system listed above.

[0116] The methods and compositions described and claimed herein may be used to treat malignant or premalignant conditions and to prevent progression to a neoplastic or malignant state, including but not limited to those disorders described above. Such uses are indicated in conditions known or suspected of preceding progression to neoplasia or cancer, in particular, where non-neoplastic cell growth consisting of hyperplasia, metaplasia, or most particularly, dysplasia has occurred (for review of such abnormal growth conditions, see Robbins and Angell, Basic Pathology, 2d Ed., W. B. Saunders Co., Philadelphia, pp. 68-79 (1976)).

[0117] Dysplasia is frequently a forerunner of cancer, and is found mainly in the epithelia. It is the most disorderly form of non-neoplastic cell growth, involving a loss in individual cell uniformity and in the architectural orientation of cells. Dysplasia characteristically occurs where there exists chronic irritation or inflammation. Dysplastic disorders which can be treated include, but are not limited to, anhidrotic ectodermal dysplasia, anterofacial dysplasia, asphyxiating thoracic dysplasia, atriodigital dysplasia, bronchopulmonary dysplasia, cerebral dysplasia, cervical dysplasia, chondroectodermal dysplasia, cleidocranial dysplasia, congenital ectodermal dysplasia, craniodiaphysial dysplasia, craniocarpotarsal dysplasia, craniometaphysial dysplasia, dentin dysplasia, diaphysial dysplasia, ectodermal dysplasia, enamel dysplasia, encephalo-ophthalmic dysplasia, dysplasia epiphysialis hemimelia, dysplasia epiphysialis multiplex, dysplasia epiphysialis punctata, epithelial dysplasia, faciodigitogenital dysplasia, familial fibrous dysplasia of jaws, familial white folded dysplasia, fibromuscular dysplasia, fibrous dysplasia of bone, florid osseous dysplasia, hereditary renal-retinal dysplasia, hidrotic ectodermal dysplasia, hypohidrotic ectodermal dysplasia, lymphopenic thymic dysplasia, mammary dysplasia, mandibulofacial dysplasia, metaphysial dysplasia, Mondini dysplasia, monostotic fibrous dysplasia, mucoepithelial dysplasia, multiple epiphysial dysplasia, oculoauriculovertebral dysplasia, oculodentodigital dysplasia, oculovertebral dysplasia, odontogenic dysplasia, opthalmomandibulomelic dysplasia, periapical cemental dysplasia, polyostotic fibrous dysplasia, pseudoachondroplastic spondyloepiphysial dysplasia, retinal dysplasia, septo-optic dysplasia, spondyloepiphysial dysplasia, and ventriculoradial dysplasia.

[0118] Additional pre-neoplastic disorders which can be treated include, but are not limited to, benign dysproliferative disorders (e.g., benign tumors, fibrocystic conditions, tissue hypertrophy, intestinal polyps or adenomas, and esophageal dysplasia), leukoplakia, keratoses, Bowen's disease, Farmer's Skin, solar cheilitis, and solar keratosis.

[0119] In preferred embodiments, the method of the invention is used to inhibit growth, progression, and/or metastasis of cancers, in particular those listed above.

[0120] Additional hyperproliferative diseases, disorders, and/or conditions include, but are not limited to, progression, and/or metastases of malignancies and related disorders such as leukemia (including acute leukemias (e.g., acute lymphocytic leukemia, acute myelocytic leukemia (including myeloblastic, promyelocytic, myelomonocytic, monocytic, and erythroleukemia)) and chronic leukemias (e.g., chronic myelocytic (granulocytic) leukemia and chronic lymphocytic leukemia)), polycythemia vera,

lymphomas (e.g., Hodgkin's disease and non-Hodgkin's disease), multiple myeloma, Waldenstrom's macroglobulinemia, heavy chain disease, and solid tumors including, but not limited to, sarcomas and carcinomas such as fibrosarcoma, myxosarcoma, liposarcoma, chondrosarcoma, osteogenic sarcoma, chordoma, angiosarcoma, endotheliosarcoma, lymphangiosarcoma, lymphangioendotheliosarcoma, synovioma, mesothelioma, Ewing's tumor, leiomyosarcoma, rhabdomyosarcoma, colon carcinoma, pancreatic cancer, breast cancer, ovarian cancer, prostate cancer, squamous cell carcinoma, basal cell carcinoma, adenocarcinoma, sweat gland carcinoma, sebaceous gland carcinoma, papillary carcinoma, papillary adenocarcinomas, cystadenocarcinoma, medullary carcinoma, bronchogenic carcinoma, renal cell carcinoma, hepatoma, bile duct carcinoma, choriocarcinoma, seminoma, embryonal carcinoma, Wilm's tumor, cervical cancer, testicular tumor, lung carcinoma, small cell lung carcinoma, bladder carcinoma, epithelial carcinoma, glioma, astrocytoma, medulloblastoma, craniopharyngioma, ependymoma, pinealoma, emangioblastoma, acoustic neuroma, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma, and retinoblastoma.

Other Therapeutic Agents

[0121] A wide variety of therapeutic reagents can be administered concurrently or sequentially, or advantageously conjugated to the antibodies of the invention, for example, drugs, toxins, oligonucleotides, immunomodulators, hormones, hormone antagonists, enzymes, enzyme inhibitors, radionuclides, angiogenesis inhibitors, etc. The therapeutic agents recited here are those agents that also are useful for administration separately with an antibody as described above. Therapeutic agents include, for example, chemotherapeutic drugs such as vinca alkaloids, anthracyclines, gemcitabine, epipodophyllotoxins, taxanes, antimetabolites, alkylating agents, antibiotics, SN-38, COX-2 inhibitors, antimitotics, anti-angiogenic and pro-apoptotic agents, particularly doxorubicin, methotrexate, taxol, CPT-11, camptothecans, proteosome inhibitors, mTOR inhibitors, HDAC inhibitors, tyrosine kinase inhibitors, and others. Other useful cancer chemotherapeutic drugs for administering concurrently or sequentially, or for the preparation of immunoconjugates and antibody fusion proteins include nitrogen mustards, alkyl sulfonates, nitrosoureas, triazenes, folic acid analogs, COX-2 inhibitors, antimetabolites, pyrimidine analogs, purine analogs, platinum coordination complexes, mTOR inhibitors, tyrosine kinase inhibitors, proteosome inhibitors, HDAC inhibitors, camptothecins, hormones, and the like. Suitable chemotherapeutic agents are described in

REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 19th Ed. (Mack Publishing Co. 1995), and in GOODMAN AND GILMAN'S THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS, 7th Ed. (MacMillan Publishing Co. 1985), as well as revised editions of these publications. Other suitable chemotherapeutic agents, such as experimental drugs, are known to those of skill in the art.

[0122] In a preferred embodiment, conjugates of camptothecins and related compounds, such as SN-38, may be conjugated to hPAM4, hRS7 or other anti-pancreatic cancer antibodies, for example as disclosed in U.S. Patent Application Serial No. 12/026,811, filed February 6, 2008; and 11/388,032, filed March 23, 2006, the Examples section of each of which is incorporated herein by reference. In another preferred embodiment, gemcitabine is administered to the subject in conjunction with ^{90}Y-hPAM4 and/or SN-38-hRS7.

[0123] A toxin can be of animal, plant or microbial origin. A toxin, such as Pseudomonas exotoxin, may also be complexed to or form the therapeutic agent portion of an immunoconjugate of the antibodies. Other toxins suitably employed in the preparation of such conjugates or other fusion proteins, include ricin, abrin, ribonuclease (RNase), DNase I, Staphylococcal enterotoxin-A, pokeweed antiviral protein, onconase, gelonin, diphtheria toxin, Pseudomonas exotoxin, and Pseudomonas endotoxin. See, for example, Pastan et al., Cell 47:641 (1986), Goldenberg, CA--A Cancer Journal for Clinicians 44:43 (1994), Sharkey and Goldenberg, CA--A Cancer Journal for Clinicians 56:226 (2006). Additional toxins suitable for use are known to those of skill in the art and are disclosed in U.S. Pat. No. 6,077,499, the Examples section of which is incorporated herein by reference.

[0124] An immunomodulator, such as a cytokine, may also be conjugated to, or form the therapeutic agent portion of the immunoconjugate, or may be administered with, but unconjugated to, an antibody or antibody fragment. As used herein, the term "immunomodulator" includes a cytokine, a lymphokine, a monokine, a stem cell growth factor, a lymphotoxin, a hematopoietic factor, a colony stimulating factor (CSF), an interferon (IFN), parathyroid hormone, thyroxine, insulin, proinsulin, relaxin, prorelaxin, follicle stimulating hormone (FSH), thyroid stimulating hormone (TSH), luteinizing hormone (LH), hepatic growth factor, prostaglandin, fibroblast growth factor, prolactin, placental lactogen, OB protein, a transforming growth factor (TGF), TGF-α, TGF-β, insulin-like growth factor (ILGF), erythropoietin, thrombopoietin, tumor necrosis factor (TNF), TNF- α, TNF-β, a mullerian-inhibiting substance, mouse gonadotropin-associated

peptide, inhibin, activin, vascular endothelial growth factor, integrin, interleukin (IL), granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF), granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF), interferon- α, interferon- β, interferon-γ, S1 factor, IL-1, IL-1cc, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18 IL-21 and IL-25, LIF, kit-ligand, FLT-3, angiostatin, thrombospondin, endostatin and LT, and the like.

[0125] The immunoconjugate may comprise one or more radioactive isotopes useful for treating diseased tissue. Particularly useful therapeutic radionuclides include, but are not limited to ^{111}In, ^{177}Lu, ^{212}Bi, ^{213}Bi, ^{211}At, ^{62}Cu, ^{64}Cu, ^{67}Cu, ^{90}Y, ^{125}I, ^{131}I, ^{32}P, ^{33}P, ^{47}Sc, ^{111}Ag, ^{67}Ga, ^{142}Pr, ^{153}Sm, ^{161}Tb, ^{166}Dy, ^{166}Ho, ^{186}Re, ^{188}Re, ^{189}Re, ^{212}Pb, ^{223}Ra, ^{225}Ac, ^{59}Fe, ^{75}Se, ^{77}As, ^{89}Sr, ^{99}Mo, ^{105}Rh, ^{109}Pd, ^{143}Pr, ^{149}Pm, ^{169}Er, ^{194}Ir, ^{198}Au, ^{199}Au, and ^{211}Pb. The therapeutic radionuclide preferably has a decay energy in the range of 20 to 6,000 keV, preferably in the ranges 60 to 200 keV for an Auger emitter, 100-2,500 keV for a beta emitter, and 4,000-6,000 keV for an alpha emitter. Maximum decay energies of useful beta-particle-emitting nuclides are preferably 20-5,000 keV, more preferably 100-4,000 keV, and most preferably 500-2,500 keV. Also preferred are radionuclides that substantially decay with Auger-emitting particles. For example, Co-58, Ga-67, Br-80m, Tc-99m, Rh-103m, Pt-109, In-111, Sb-119, I-125, Ho-161, Os-189m and Ir-192. Decay energies of useful beta-particle-emitting nuclides are preferably <1,000 keV, more preferably <100 keV, and most preferably <70 keV. Also preferred are radionuclides that substantially decay with generation of alpha-particles. Such radionuclides include, but are not limited to: Dy-152, At-211, Bi-212, Ra-223, Rn-219, Po-215, Bi-211, Ac-225, Fr-221, At-217, Bi-213 and Fm-255. Decay energies of useful alpha-particle-emitting radionuclides are preferably 2,000-10,000 keV, more preferably 3,000-8,000 keV, and most preferably 4,000-7,000 keV.

[0126] For example, ^{67}Cu, considered one of the more promising radioisotopes for radioimmunotherapy due to its 61.5-hour half-life and abundant supply of beta particles and gamma rays, can be conjugated to an antibody using the chelating agent, p-bromoacetamido-benzyl-tetraethylaminetetraacetic acid (TETA). Chase, supra. Alternatively, ^{90}Y, which emits an energetic beta particle, can be coupled to an antibody, antibody fragment or fusion protein, using diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA), or more preferably using DOTA. Methods of conjugating ^{90}Y to antibodies or targetable constructs are known in the art and any such known methods may be used. (See, e.g., U.S.

Patent No. 7,259,249, the Examples section of which is incorporated herein by reference. See also Lindén et al., Clin Cancer Res. 11:5215-22, 2005; Sharkey et al., J Nucl Med. 46:620-33, 2005; Sharkey et al., J Nucl Med. 44:2000-18, 2003.)

[0127] Additional potential therapeutic radioisotopes include ^{11}C, ^{13}N, ^{15}O, ^{75}Br, ^{198}Au, ^{224}Ac, ^{126}I, ^{133}I, ^{77}Br, ^{113m}In, ^{95}Ru, ^{97}Ru, ^{103}Ru, ^{105}Ru, ^{107}Hg, ^{203}Hg, ^{121m}Te, ^{122m}Te, ^{125m}Te, ^{165}Tm, ^{167}Tm, ^{168}Tm, ^{197}Pt, ^{109}Pd, ^{105}Rh, ^{142}Pr, ^{143}Pr, ^{161}Tb, ^{166}Ho, ^{199}Au, ^{57}Co, ^{58}Co, ^{51}Cr, ^{59}Fe, ^{75}Se, ^{201}Tl, ^{225}Ac, ^{76}Br, ^{169}Yb, and the like.

[0128] In another embodiment, a radiosensitizer can be used in combination with a naked or conjugated antibody or antibody fragment. For example, the radiosensitizer can be used in combination with a radiolabeled antibody or antibody fragment. The addition of the radiosensitizer can result in enhanced efficacy when compared to treatment with the radiolabeled antibody or antibody fragment alone. Radiosensitizers are described in D. M. Goldenberg (ed.), CANCER THERAPY WITH RADIOLABELED ANTIBODIES, CRC Press (1995). Other typical radionsensitizers of interest for use with this technology include gemcitabine, 5-fluorouracil, and cisplatin, and have been used in combination with external irradiation in the therapy of diverse cancers, including pancreatic cancer. Therefore, we have studied the combination of gemcitabine at what is believed to be radiosensitizing doses (once weekly 200 mg/m^2 over 4 weeks) of gemcitabine combined with fractionated doses of ^{90}Y-hPAM4, and have observed objective evidence of pancreatic cancer reduction after a single cycle of this combination that proved to be well-tolerated (no grade 3-4 toxicities by NCI-CTC v. 3 standard).

[0129] Antibodies or fragments thereof that have a boron addend-loaded carrier for thermal neutron activation therapy will normally be affected in similar ways. However, it will be advantageous to wait until non-targeted immunoconjugate clears before neutron irradiation is performed. Clearance can be accelerated using an anti-idiotypic antibody that binds to the anti-pancreatic cancer antibody. See U.S. Pat. No. 4,624,846 for a description of this general principle. For example, boron addends such as carboranes, can be attached to antibodies. Carboranes can be prepared with carboxyl functions on pendant side chains, as is well-known in the art. Attachment of carboranes to a carrier, such as aminodextran, can be achieved by activation of the carboxyl groups of the carboranes and condensation with amines on the carrier. The intermediate conjugate is then conjugated to the antibody. After administration of the antibody conjugate, a boron addend is activated

by thermal neutron irradiation and converted to radioactive atoms which decay by alpha-emission to produce highly toxic, short-range effects.

Pharmaceutically Suitable Excipients

[0130] The antibodies, fragments thereof or immunoconjugates to be delivered to a subject can comprise one or more pharmaceutically suitable excipients, one or more additional ingredients, or some combination of these. The antibody can be formulated according to known methods to prepare pharmaceutically useful compositions, whereby the immunoconjugate is combined in a mixture with a pharmaceutically suitable excipient. Sterile phosphate-buffered saline is one example of a pharmaceutically suitable excipient. Other suitable excipients are well-known to those in the art. See, for example, Ansel et al., PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, 5th Edition (Lea & Febiger 1990), and Gennaro (ed.), REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18th Edition (Mack Publishing Company 1990), and revised editions thereof.

[0131] The immunoconjugate can be formulated for intravenous administration via, for example, bolus injection or continuous infusion. Formulations for injection can be presented in unit dosage form, e.g., in ampules or in multi-dose containers, with an added preservative. The compositions can take such forms as suspensions, solutions or emulsions in oily or aqueous vehicles, and can contain formulatory agents such as suspending, stabilizing and/or dispersing agents. Alternatively, the active ingredient can be in powder form for constitution with a suitable vehicle, e.g., sterile pyrogen-free water, before use.

Kits

[0132] Various embodiments may concern kits containing components suitable for treating or diagnosing diseased tissue in a patient. Exemplary kits may contain at least one antibody, antigen binding fragment or fusion protein as described herein. If the composition containing components for administration is not formulated for delivery via the alimentary canal, such as by oral delivery, a device capable of delivering the kit components through some other route may be included. One type of device, for applications such as parenteral delivery, is a syringe that is used to inject the composition into the body of a subject. Inhalation devices may also be used. In certain embodiments, an anti-pancreatic cancer antibody or antigen binding fragment thereof may be provided in

the form of a prefilled syringe or autoinjection pen containing a sterile, liquid formulation or lyophilized preparation of antibody (e.g., Kivitz et al., Clin. Ther. 2006, 28:1619-29).

[0133] The kit components may be packaged together or separated into two or more containers. In some embodiments, the containers may be vials that contain sterile, lyophilized formulations of a composition that are suitable for reconstitution. A kit may also contain one or more buffers suitable for reconstitution and/or dilution of other reagents. Other containers that may be used include, but are not limited to, a pouch, tray, box, tube, or the like. Kit components may be packaged and maintained sterilely within the containers. Another component that can be included is instructions for use of the kit.

EXAMPLES

The examples below are illustrative of embodiments of the current invention and are not limiting to the scope of the claims.

Example 1. Therapy of a Patient With Inoperable and Metastatic Pancreatic Carcinoma

[0232] The humanized PAM4 (hPAM4) antibody was made and radiolabeled as described in U.S. Patent No. 7,282,567 (incorporated herein by reference in its entirety). Patient 118-001, CWG, was a 63-year-old man with Stage-IV pancreatic adenocarcinoma with multiple liver metastases, diagnosed in November of 2007. He agreed to undertake combined radioimmunotherapy and gemcitabine chemotherapy as a first treatment strategy, and was then given a first therapy cycle of 6.5 mCi/m^2 of ^{90}Y-hPAM4, combined with 200 mg/m^2 gemcitabine, whereby the gemcitabine was given once weekly on weeks 1-4 and ^{90}Y-hPAM4 was given once-weekly on weeks 2-4 (3 doses). Two months later, the same therapy cycle was repeated, because no major toxicities were noted after the first cycle. Already 4 weeks after the first therapy cycle, CT evidence of a reduction in the diameters of the primary tumor and 2 of the 3 liver metastases surprisingly was noted, and this was consistent with significant decreases in the SUV values of FDG-PET scans, with 3 of the 4 tumors returning to normal background SUV levels at this time (**FIG. 1** and **FIG. 2**). The patient's pre-therapy CA-19.9 level of 1,297 dropped to a low level of 77, further supportive of the therapy being effective. **Table 1** shows the effects of combined radioimmunotherapy with ^{90}Y-hPAM4 and gemcitabine chemotherapy in this patient. It was surprising and unexpected that such low doses of the radionuclide conjugated to the

antibody combined with such low, nontoxic, doses of gemcitabine showed such antitumor activity even after only a single course of this therapy.

Table 1. Effects of Combined Radioimmunotherapy with ^{90}Y-hPAM4 and Gemcitabine Chemotherapy in Metastatic Pancreatic Carcinoma

Tumor Location	Baseline Longest Diameter (cm)	4 wk post-Tx Longest Diameter (cm)	Baseline PET (SUV)	4 wk post-Tx PET (SUV)
Pancreatic tail (primary)	4.5	4.3	9.2	4.2
L hepatic met	1.9	1.9	4.1	background
R post hepatic met	1.7	1.6	3.7	background
R central hepatic met	1.9	1.2	3.2	background

Example 2. Therapy of Pancreatic Cancer Xenografts with Gemcitabine and ^{90}Y-Labeled Peptide Pretargeted Using TF10

Summary

[0134] ^{90}Y-hPAM4 IgG is currently being examined in Phase I/II trials in combination with gemcitabine in patients with Stage III/IV pancreatic cancer. We disclose a new approach for pretargeting radionuclides that is able to deliver a similar amount of radioactivity to pancreatic cancer xenografts, but with less hematological toxicity, which would be more amenable for combination with gemcitabine. The TF10 bispecific antibody was made by the DNL technique as described below. Nude mice bearing ~0.4 cm^3 sc CaPan1 human pancreatic cancer were administered TF10, followed 1 day later with a ^{90}Y-labeled hapten-peptide (IMP-288). Various doses and schedules of gemcitabine were added to this treatment, and tumor progression monitored up to 28 weeks. 0.7 mCi PT-RAIT alone produced only a transient 60% loss in blood counts, and animals given 0.9 mCi of PT-RAIT alone and 0.7 mCi PT-RAIT + 6 mg gemcitabine (human equivalent ~1000 mg/m^2) had no histological evidence of renal toxicity after 9 months. A single dose of 0.25 or 0.5 mCi PT-RAIT alone can completely ablate 20% and 80% of the tumors, respectively. Monthly fractionated PT-RAIT (0.25 mCi/dose given at the start of each

gemcitabine cycle) added to a standard gemcitabine regimen (6 mg wkly x 3; 1 wk off; repeat 3 times) significantly increased the median time for tumors to reach 3.0 cm^3 over PT-RAIT alone. Other treatment plans examining non-cytotoxic radiosensitizing dose regimens of gemcitabine added to PT-RAIT also showed significant improvements in treatment response over PT-RAIT alone. The results show that PT-RAIT is a promising new approach for treating pancreatic cancer. These data indicate combining PT-RAIT with gemcitabine will enhance therapeutic responses.

Methods

[0135] TF10 bispecific antibody was prepared as described below. For pretargeting, TF10 was given to nude mice bearing the human pancreatic adenocarcinoma cell line, CaPan1. After allowing sufficient time for TF10 to clear from the blood (16h), the radiolabeled divalent HSG-peptide was administered. The small molecular weight HSG-peptide (~1.4 kD) clears within minutes from the blood, entering the extravascular space where it can bind to anti-HSG arm of the pretargeted TF10 bsMAb. Within a few hours, >80% of the radiolabeled HSG-peptide is excreted in the urine, leaving the tumor localized peptide and a trace amount in the normal tissues.

Results

[0136] FIG. 3 illustrates the therapeutic activity derived from a single treatment of established (~0.4 cm^3) CaPan1 tumors with 0.15 mCi of ^{90}Y-hPAM4 IgG, or 0.25 or 0.50 mCi of TF10-pretargeted ^{90}Y-IMP-288. Similar anti-tumor activity was observed for the 0.5-mCi pretargeted dose vs. 0.15-mCi dose of the directly radiolabeled IgG, but hematological toxicity was severe at this level of the direct conjugate (not shown), while the pretargeted dose was only moderately toxic (not shown). Indeed, the MTD for pretargeting using 90Y-IMP-288 is at least 0.9 mCi in nude mice.

[0137] FIG. 4 shows that the combination of gemcitabine and PT-RAIT has a synergistic effect on anti-tumor therapy. Human equivalent doses of 1000 mg/m^2 (6 mg) of gemcitabine (GEM) were given intraperitoneally to mice weekly for 3 weeks, then after resting for 1 week, this regimen was repeated 2 twice. PT-RAIT (0.25 mCi of TF10-pretargeted ^{90}Y-IMP-288) was given 1 day after the first GEM dose in each of the 3 cycles of treatment. GEM alone had no significant impact on tumor progression (survival based on time to progress to 3.0 cm^3). PT-RAIT alone improved survival compared to untreated animals, but the combined GEM with PT-RAIT regimen increased the median survival by nearly 10 weeks. Because hematological toxicity is not dose-limiting for PT-RAIT, but it

is one of the limitations for gemcitabine therapy, these studies suggest that PT-RAIT could be added to a standard GEM therapy with the potential for enhanced responses. The significant synergistic effect of gemcitabine plus PT-RAIT was surprising and unexpected.

[0138] A further study examined the effect of the timing of administration on the potentiation of anti-tumor effect of gemcitabine plus PT-RAIT. A single 6-mg dose of GEM was given one day before or 1 day after 0.25 mCi of TF10-pretargeted ^{90}Y-IMP-288 (not shown). This study confirmed what is already well known with GEM, i.e., radiosensitization is best given in advance of the radiation. Percent survival of treated mice showed little difference in survival time between PT-RAIT alone and PT-RAIT with gemcitabine given 22 hours after the radiolabeled peptide. However, administration of gemcitabine 19 hours prior to PT-RAIT resulted in a substantial increase in survival (not shown).

[0139] Single dose PT-RAIT (0.25 mCi) combined with cetuximab (1 mg weekly ip; 7 weeks) or with cetuximab + GEM (6 mg weekly x 3) in animals bearing CaPan1 showed the GEM + cetuximab combination with PT-RAIT providing a better initial response (**FIG. 5**), but the response associated with just cetuximab alone added to PT-RAIT was encouraging (**FIG. 5**), since it was as good or better than PT-RAIT + GEM. Because the overall survival in this study was excellent, with only 2 tumors in each group progressing to >2.0 cm3 after 24 weeks when the study was terminated, these results indicate a potential role for cetuximab when added to PT-RAIT.

Example 3. Effect of Fractionated Pretargeted Radioimmunotherapy (PT-RAIT) for Pancreatic Cancer Therapy

[0140] We evaluated fractionated therapy with ^{90}Y-DOTA-di-HSG peptide (IMP-288) and TF10. Studies using TF10 and radiolabeled IMP-288 were performed in nude mice bearing s.c. CaPan1 human pancreatic cancer xenografts, 0.32-0.54cm^3. For therapy, TF10-pretargeted ^{90}Y-IMP-288 was given [A] once (0.6mCi on wk 0) or [B] fractionated (0.3 mCi on wks 0 and 1), [C] (0.2 mCi on wks 0, 1 and 2) or [D] (0.2 mCi on wks 0, 1 and 4).

[0141] Tumor regression (>90%) was observed in the majority of mice, 9/10, 10/10, 9/10 and 8/10 in groups [A], [B], [C] and [D], respectively. In group [A], maximum tumor regression in 50 % of the mice was reached at 3.7 wks, compared to 6.1, 8.1 and 7.1 wks in [B], [C] and [D], respectively. Some tumors showed regrowth. At week 14, the best

therapeutic response was observed in the fractionated group (2x0.3 mCi), with 6/10 mice having no tumors (NT) compared to 3/10 in the 3x0.2 mCi groups and 1/10 in the 1x 0.6mCi group. No major body weight loss was observed. Fractionated PT-RAIT provides another alternative for treating pancreatic cancer with minimum toxicity.

Example 4. ^{90}Y-hPAM4 Radioimmunotherapy (RAIT) Plus Radiosensitizing Gemcitabine (GEM) Treatment in Advanced Pancreatic Cancer (PC)

[0142] ^{90}Y-hPAM4, a humanized antibody highly specific for PC, showed transient activity in patients with advanced disease, and GEM enhanced RAIT in preclinical studies. This study evaluated repeated treatment cycles of ^{90}Y-hPAM4 plus GEM in patients with untreated, unresectable PC. The ^{90}Y-dose was escalated by cohort, with patients repeating 4-wk cycles (once weekly 200 mg/m^2 GEM, ^{90}Y-hPAM4 once-weekly wks 2-4) until progression or unacceptable toxicity. Response assessments used CT, FDG-PET, and CA19.9 serum levels.

[0143] Of 8 patients (3F/5M, 56-72 y.o.) at the 1st 2 dose levels (6.5 and 9.0 mCi/m^2 ^{90}Y-hPAM4 x 3), hematologic toxicity has been transient Grade 1-2. Two patients responded to initial treatment with FDG SUV and CA19.9 decreases, and lesion regression by CT. Both patients continue in good performance status now after 9 and 11 mo. and after a total of 3 and 4 cycles, respectively, without additional toxicity. A 3rd patient with a stable response by PET and CT and decreases in CA19.9 levels after initial treatment is now undergoing a 2nd cycle. Four other patients had early disease progression and the remaining patient is still being evaluated. Dose escalation is continuing after fractionated RAIT with ^{90}Y-hPAM4 plus low-dose gemcitabine demonstrated therapeutic activity at the initial ^{90}Y-dose levels, with minimal hematologic toxicity, even after 4 therapy cycles.

Example 5. PAM4 Antibody Binds to the Earliest Stages of Pancreatic Cancer

[0144] Immunohistochemistry studies were performed with PAM4 antibody. Results obtained with stained tissue sections showed no reaction of PAM4 with normal pancreatic ducts, ductules and acinar tissues (not shown). In contrast, use of the MA5 antibody applied to the same tissue samples showed diffuse positive staining of normal pancreatic ducts and acinar tissue (not shown). In tissue sections with well differentiated or moderately differentiated pancreatic adenocarcinoma, PAM4 staining was positive, with mostly cytoplasmic staining but intensification of at the cell surface. Normal pancreatic tissue in the same tissue sections was unstained.

[0145] Table 2 shows the results of immunohistochemical analysis with PAM4 MAb in pancreatic adenocarcinoma samples of various stages of differentiation. Overall, there was an 87% detection rate for all pancreatic cancer samples, with 100% detection of well differentiated and almost 90% detection of moderately differentiated pancreatic cancers.

Table 2. PAM4 Binding to Different Stages of Pancreatic Cancer

Cancer	n	Focal	Diffuse	Total
Well Diff.	13	2	11	13 (100%)
Moderately Diff.	24	6	15	21 (88%)
Poorly Diff.	18	5	9	14 (78%)
Total	55	13	35	48 (87%)

[0146] Table 3 shows that PAM4 immunohistochemical staining also detected a very high percentage of precursor lesions of pancreatic cancer, including PanIn-1A to PanIN-3, IPMN (intraductal papillary mucinous neoplasms) and MCN (mucinous cystic neoplasms). Overall, PAM4 staining detected 89% of all pancreatic precursor lesions. These results demonstrate that PAM4 antibody-based immunodetection is capable of detecting almost 90% of pancreatic cancers and precursor lesions by *in vitro* analysis. PAM4 expression was observed in the earliest phases of PanIN development. Intense staining was observed in lPMN and MCN samples (not shown). The PAM4 epitope was present at high concentrations (intense diffuse stain) in the great majority of pancreatic adenocarcinomas. PAM4 showed diffuse, intense reactivity with the earliest stages of pancreatic carcinoma precursor lesions, including PanIN-1, IPMN and MCN, yet was non-reactive with normal pancreatic tissue. Taken together, these results show that the PAM4 antibody is binds with very high specificity to the earliest stages of pancreatic cancer development.

Table 3. PAM4 Banding to Precursor Lesions of Pancreatic Cancer

	n	Focal	Diffuse	Total
PanIn-1A	27	9	15	24 (89%)
PanIn-1B	20	4	16	20 (100%)
PanIn-2	11	6	4	10 (91%)

PanIn-3	5	2	0	2 (40%)
Total PanIn	63	21	35	56 (89%)
IPMN	36	6	25	31 (86%)
MCN	27	3	22	25 (92%)

Example 6. Preparation of Dock-and-Lock (DNL) Constructs

DDD and AD Fusion Proteins

[0147] The DNL technique can be used to make dimers, trimers, tetramers, hexamers, etc. comprising virtually any antibodies or fragments thereof or other effector moieties. For certain preferred embodiments, IgG antibodies or Fab antibody fragments may be produced as fusion proteins containing either a dimerization and docking domain (DDD) or anchoring domain (AD) sequence. Although in preferred embodiments the DDD and AD moieties are produced as fusion proteins, the skilled artisan will realize that other methods of conjugation, such as chemical cross-linking, may be utilized within the scope of the claimed methods and compositions.

[0148] Bispecific antibodies may be formed by combining a Fab-DDD fusion protein of a first antibody with a Fab-AD fusion protein of a second antibody. Alternatively, constructs may be made that combine IgG-AD fusion proteins with Fab-DDD fusion proteins. The technique is not limiting and any protein or peptide of use may be produced as an AD or DDD fusion protein for incorporation into a DNL construct. Where chemical cross-linking is utilized, the AD and DDD conjugates are not limited to proteins or peptides and may comprise any molecule that may be cross-linked to an AD or DDD sequence using any cross-linking technique known in the art. In certain exemplary embodiments, a polyethylene glycol (PEG) or other polymeric moiety may be incorporated into a DNL construct, as described in further detail below.

[0149] For pretargeting applications, an antibody or fragment containing a binding site for an antigen associated with a diseased tissue, such as a tumor-associated antigen (TAA), may be combined with a second antibody or fragment that binds a hapten on a targetable construct, to which a therapeutic and/or diagnostic agent is attached. The DNL-based bispecific antibody is administered to a subject, circulating antibody is allowed to clear from the blood and localize to target tissue, and the conjugated targetable construct is added and binds to the localized antibody for diagnosis or therapy.

[0150] Independent transgenic cell lines may be developed for each Fab or IgG fusion protein. Once produced, the modules can be purified if desired or maintained in the cell culture supernatant fluid. Following production, any DDD-fusion protein module can be combined with any AD-fusion protein module to generate a bispecific DNL construct. For different types of constructs, different AD or DDD sequences may be utilized. Exemplary DDD and AD sequences are provided below.

DDD1: SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:13)

DDD2: CGHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:14)

AD1: QIEYLAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO:15)

AD2: CGQIEYLAKQIVDNAIQQAGC (SEQ ID NO:16)

[0151] The skilled artisan will realize that DDD1 and DDD2 comprise the DDD sequence of the human RIIα form of protein kinase A. However, in alternative embodiments, the DDD and AD moieties may be based on the DDD sequence of the human RIα form of protein kinase A and a corresponding AKAP sequence, as exemplified in DDD3, DDD3C and AD3 below.

DDD3

SLRECELYVQKHNIQALLKDSIVQLCTARPERPMAFLREYFERLEKEEAK (SEQ ID NO:17)

DDD3C

MSCGGSLRECELYVQKHNIQALLKDSIVQLCTARPERPMAFLREYFERLEKEEAK (SEQ ID NO:18)

AD3

CGFEELAWKIAKMIWSDVFQQGC (SEQ ID NO:19)

Expression Vectors

[0152] The plasmid vector pdHL2 has been used to produce a number of antibodies and antibody-based constructs. See Gillies et al., J Immunol Methods (1989), 125:191-202; Losman et al., Cancer (Phila) (1997), 80:2660-6. The di-cistronic mammalian expression vector directs the synthesis of the heavy and light chains of IgG. The vector sequences are

mostly identical for many different IgG-pdHL2 constructs, with the only differences existing in the variable domain (VH and VL) sequences. Using molecular biology tools known to those skilled in the art, these IgG expression vectors can be converted into Fab-DDD or Fab-AD expression vectors. To generate Fab-DDD expression vectors, the coding sequences for the hinge, CH2 and CH3 domains of the heavy chain are replaced with a sequence encoding the first 4 residues of the hinge, a 14 residue Gly-Ser linker and the first 44 residues of human RIIα (referred to as DDD1). To generate Fab-AD expression vectors, the sequences for the hinge, CH2 and CH3 domains of IgG are replaced with a sequence encoding the first 4 residues of the hinge, a 15 residue Gly-Ser linker and a 17 residue synthetic AD called AKAP-*IS* (referred to as AD1), which was generated using bioinformatics and peptide array technology and shown to bind RIIα dimers with a very high affinity (0.4 nM). See Alto, et al. Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A (2003), 100:4445-50.

[0153] Two shuttle vectors were designed to facilitate the conversion of IgG-pdHL2 vectors to either Fab-DDD1 or Fab-AD1 expression vectors, as described below.

Preparation of CH1

[0154] The CH1 domain was amplified by PCR using the pdHL2 plasmid vector as a template. The left PCR primer consisted of the upstream (5') end of the CH1 domain and a SacII restriction endonuclease site, which is 5' of the CH1 coding sequence. The right primer consisted of the sequence coding for the first 4 residues of the hinge (PKSC) followed by four glycines and a serine, with the final two codons (GS) comprising a Bam HI restriction site. The 410 bp PCR amplimer was cloned into the PGEMT® PCR cloning vector (PROMEGA®, Inc.) and clones were screened for inserts in the T7 (5') orientation.

[0155] A duplex oligonucleotide was synthesized to code for the amino acid sequence of DDD1 preceded by 11 residues of the linker peptide, with the first two codons comprising a BamHI restriction site. A stop codon and an EagI restriction site are appended to the 3'end. The encoded polypeptide sequence is shown below.

GSGGGGSGGGGSHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:20)

[0156] Two oligonucleotides, designated RIIA1-44 top and RIIA1-44 bottom, which overlap by 30 base pairs on their 3' ends, were synthesized and combined to comprise the central 154 base pairs of the 174 bp DDD1 sequence. The oligonucleotides were annealed

and subjected to a primer extension reaction with Taq polymerase. Following primer extension, the duplex was amplified by PCR. The amplimer was cloned into PGEMT® and screened for inserts in the T7 (5') orientation.

[0157] A duplex oligonucleotide was synthesized to code for the amino acid sequence of AD1 preceded by 11 residues of the linker peptide with the first two codons comprising a BamHI restriction site. A stop codon and an EagI restriction site are appended to the 3'end. The encoded polypeptide sequence is shown below.

GSGGGGSGGGGSQIEYLAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO:21)

[0158] Two complimentary overlapping oligonucleotides encoding the above peptide sequence, designated AKAP-IS Top and AKAP-IS Bottom, were synthesized and annealed. The duplex was amplified by PCR. The amplimer was cloned into the PGEMT® vector and screened for inserts in the T7 (5') orientation.

Ligating DDD1 with CH1

[0159] A 190 bp fragment encoding the DDD1 sequence was excised from PGEMT® with BamHI and NotI restriction enzymes and then ligated into the same sites in CH1-PGEMT® to generate the shuttle vector CH1-DDD1-PGEMT®.

Ligating AD1 with CH1

[0160] A 110 bp fragment containing the AD1 sequence was excised from PGEMT® with BamHI and NotI and then ligated into the same sites in CH1-PGEMT® to generate the shuttle vector CH1-AD1-PGEMT®.

Cloning CH1-DDD1 or CH1-AD1 into pdHL2-based vectors

[0161] With this modular design either CH1-DDD1 or CH1-AD1 can be incorporated into any IgG construct in the pdHL2 vector. The entire heavy chain constant domain is replaced with one of the above constructs by removing the SacII/EagI restriction fragment (CH1-CH3) from pdHL2 and replacing it with the SacII/EagI fragment of CH1-DDD1 or CH1-AD1, which is excised from the respective pGemT shuttle vector.

Construction of h679-Fd-AD1-pdHL2

[0162] h679-Fd-AD1-pdHL2 is an expression vector for production of h679 Fab with AD1 coupled to the carboxyl terminal end of the CH1 domain of the Fd via a flexible Gly/Ser peptide spacer composed of 14 amino acid residues. A pdHL2-based vector containing the variable domains of h679 was converted to h679-Fd-AD1-pdHL2 by

replacement of the SacII/EagI fragment with the CH1-AD1 fragment, which was excised from the CH1-AD1-SV3 shuttle vector with SacII and EagI.

Construction of C-DDD1-Fd-hMN-14-pdHL2

[0163] C-DDD1-Fd-hMN-14-pdHL2 is an expression vector for production of a stable dimer that comprises two copies of a fusion protein C-DDD1-Fab-hMN-14, in which DDD1 is linked to hMN-14 Fab at the carboxyl terminus of CH1 via a flexible peptide spacer. The plasmid vector hMN-14(I)-pdHL2, which has been used to produce hMN-14 IgG, was converted to C-DDD1-Fd-hMN-14-pdHL2 by digestion with SacII and EagI restriction endonucleases to remove the CH1-CH3 domains and insertion of the CH1-DDD1 fragment, which was excised from the CH1-DDD1-SV3 shuttle vector with SacII and EagI.

[0164] The same technique has been utilized to produce plasmids for Fab expression of a wide variety of known antibodies, such as hLL1, hLL2, hPAM4, hR1, hRS7, hMN-14, hMN-15, hA19, hA20 and many others. Generally, the antibody variable region coding sequences were present in a pdHL2 expression vector and the expression vector was converted for production of an AD- or DDD-fusion protein as described above. The AD- and DDD-fusion proteins comprising a Fab fragment of any of such antibodies may be combined, in an approximate ratio of two DDD-fusion proteins per one AD-fusion protein, to generate a trimeric DNL construct comprising two Fab fragments of a first antibody and one Fab fragment of a second antibody.

C-DDD2-Fd-hMN-14-pdHL2

[0165] C-DDD2-Fd-hMN-14-pdHL2 is an expression vector for production of C-DDD2-Fab-hMN-14, which possesses a dimerization and docking domain sequence of DDD2 appended to the carboxyl terminus of the Fd of hMN-14 via a 14 amino acid residue Gly/Ser peptide linker. The fusion protein secreted is composed of two identical copies of hMN-14 Fab held together by non-covalent interaction of the DDD2 domains.

[0166] The expression vector was engineered as follows. Two overlapping, complimentary oligonucleotides, which comprise the coding sequence for part of the linker peptide and residues 1-13 of DDD2, were made synthetically. The oligonucleotides were annealed and phosphorylated with T4 PNK, resulting in overhangs on the 5' and 3' ends that are compatible for ligation with DNA digested with the restriction endonucleases BamHI and PstI, respectively.

[0167] The duplex DNA was ligated with the shuttle vector CH1-DDD1-PGEMT®, which was prepared by digestion with BamHI and PstI, to generate the shuttle vector CH1-DDD2-PGEMT®. A 507 bp fragment was excised from CH1-DDD2-PGEMT® with SacII and EagI and ligated with the IgG expression vector hMN-14(I)-pdHL2, which was prepared by digestion with SacII and EagI. The final expression construct was designated C-DDD2-Fd-hMN-14-pdHL2. Similar techniques have been utilized to generated DDD2-fusion proteins of the Fab fragments of a number of different humanized antibodies.

h679-Fd-AD2-pdHL2

[0168] h679-Fab-AD2, was designed to pair as **B** to C-DDD2-Fab-hMN-14 as **A**. h679-Fd-AD2-pdHL2 is an expression vector for the production of h679-Fab-AD2, which possesses an anchoring domain sequence of AD2 appended to the carboxyl terminal end of the CH1 domain via a 14 amino acid residue Gly/Ser peptide linker. AD2 has one cysteine residue preceding and another one following the anchor domain sequence of AD1.

[0169] The expression vector was engineered as follows. Two overlapping, complimentary oligonucleotides (AD2 Top and AD2 Bottom), which comprise the coding sequence for AD2 and part of the linker sequence, were made synthetically. The oligonucleotides were annealed and phosphorylated with T4 PNK, resulting in overhangs on the 5' and 3' ends that are compatible for ligation with DNA digested with the restriction endonucleases BamHI and SpeI, respectively.

[0170] The duplex DNA was ligated into the shuttle vector CH1-AD1-PGEMT®, which was prepared by digestion with BamHI and SpeI, to generate the shuttle vector CH1-AD2-PGEMT®. A 429 base pair fragment containing CH1 and AD2 coding sequences was excised from the shuttle vector with SacII and EagI restriction enzymes and ligated into h679-pdHL2 vector that prepared by digestion with those same enzymes. The final expression vector is h679-Fd-AD2-pdHL2.

Generation of TF2 DNL Construct

[0171] A trimeric DNL construct designated TF2 was obtained by reacting C-DDD2-Fab-hMN-14 with h679-Fab-AD2. A pilot batch of TF2 was generated with >90% yield as follows. Protein L-purified C-DDD2-Fab-hMN-14 (200 mg) was mixed with h679-Fab-AD2 (60 mg) at a 1.4:1 molar ratio. The total protein concentration was 1.5 mg/ml in PBS containing 1 mM EDTA. Subsequent steps involved TCEP reduction, HIC

chromatography, DMSO oxidation, and IMP 291 affinity chromatography. Before the addition of TCEP, SE-HPLC did not show any evidence of **a_2b** formation. Addition of 5 mM TCEP rapidly resulted in the formation of **a_2b** complex consistent with a 157 kDa protein expected for the binary structure. TF2 was purified to near homogeneity by IMP 291 affinity chromatography (not shown). IMP 291 is a synthetic peptide containing the HSG hapten to which the 679 Fab binds (Rossi et al., 2005, Clin Cancer Res 11:7122s-29s). SE-HPLC analysis of the IMP 291 unbound fraction demonstrated the removal of a_4, a_2 and free kappa chains from the product (not shown).

[0172] The functionality of TF2 was determined by BIACORE® assay. TF2, C-DDD1-hMN-14+h679-AD1 (used as a control sample of noncovalent **a_2b** complex), or C-DDD2-hMN-14+h679-AD2 (used as a control sample of unreduced a_2 and b components) were diluted to 1 μg/ml (total protein) and passed over a sensorchip immobilized with HSG. The response for TF2 was approximately two-fold that of the two control samples, indicating that only the h679-Fab-AD component in the control samples would bind to and remain on the sensorchip. Subsequent injections of WI2 IgG, an anti-idiotype antibody for hMN-14, demonstrated that only TF2 had a DDD-Fab-hMN-14 component that was tightly associated with h679-Fab-AD as indicated by an additional signal response. The additional increase of response units resulting from the binding of WI2 to TF2 immobilized on the sensorchip corresponded to two fully functional binding sites, each contributed by one subunit of C-DDD2-Fab-hMN-14. This was confirmed by the ability of TF2 to bind two Fab fragments of WI2 (not shown).

Production of TF10 Bispecific Antibody

[0173] A similar protocol was used to generate a trimeric TF10 DNL construct, comprising two copies of a C-DDD2-Fab-hPAM4 and one copy of C-AD2-Fab-679. The cancer-targeting antibody component in TF10 was derived from hPAM4, a humanized anti-pancreatic cancer mucin MAb that has been studied in detail as a radiolabeled MAb (*e.g.*, Gold et al., *Clin. Cancer Res.* 13: 7380-7387, 2007). The hapten-binding component was derived from h679, a humanized anti-histaminyl-succinyl-glycine (HSG) MAb. The TF10 bispecific ([hPAM4]$_2$ x h679) antibody was produced using the method disclosed for production of the (anti CEA)$_2$ x anti HSG bsAb TF2, as described above. The TF10 construct bears two humanized PAM4 Fabs and one humanized 679 Fab.

[0174] The two fusion proteins (hPAM4-DDD and h679-AD2) were expressed independently in stably transfected myeloma cells. The tissue culture supernatant fluids were combined, resulting in a two-fold molar excess of hPAM4-DDD. The reaction mixture was incubated at room temperature for 24 hours under mild reducing conditions using 1 mM reduced glutathione. Following reduction, the DNL reaction was completed by mild oxidation using 2 mM oxidized glutathione. TF10 was isolated by affinity chromatography using IMP 291-affigel resin, which binds with high specificity to the h679 Fab.

[0175] A full tissue histology and blood cell binding panel has been examined for hPAM4 IgG and for an anti-CEA x anti-HSG bsMAb that is entering clinical trials. hPAM4 binding was restricted to very weak binding to the urinary bladder and stomach in 1/3 specimens (no binding was seen *in vivo*), and no binding to normal tissues was attributed to the anti-CEA x anti-HSG bsMAb. Furthermore, *in vitro* studies against cell lines bearing the H1 and H2 histamine receptors showed no antagonistic or agonistic activity with the IMP 288 di-HSG peptide, and animal studies in 2 different species showed no pharmacologic activity of the peptide related to the histamine component at doses 20,000 times higher than that used for imaging. Thus, the HSG-histamine derivative does not have pharmacologic activity.

[0176] The skilled artisan will realize that the DNL techniques disclosed above may be used to produce complexes comprising any combination of antibodies or immunoconjugates - for example, a radiolabeled hPAM4 and an SN-38 conjugated hRS7 DNL complex.

Example 7. Sequence variants for DNL

[0177] In certain preferred embodiments, the AD and DDD sequences incorporated into the DNL complex comprise the amino acid sequences of AD1 or AD2 and DDD1 or DDD2, as discussed above. However, in alternative embodiments sequence variants of AD and/or DDD moieties may be utilized in construction of the DNL complexes. For example, there are only four variants of human PKA DDD sequences, corresponding to the DDD moieties of PKA RIα, RIIα, RIβ and RIIβ. The RIIα DDD sequence is the basis of DDD1 and DDD2 disclosed above. The four human PKA DDD sequences are shown below. The DDD sequence represents residues 1-44 of RIIα, 1-44 of RIIβ, 12-61 of RIα and 13-66 of RIβ. (Note that the sequence of DDD1 is modified slightly from the human PKA RIIα DDD moiety.)

PKA RIα

SLRECELYVQKHNIQALLKDVSIVQLCTARPERPMAFLREYFEKLEKEEAK (SEQ ID NO:22)

PKA RIβ

SLKGCELYVQLHGIQQVLKDCIVHLCISKPERPMKFLREHFEKLEKEENRQILA (SEQ ID NO:23)

PKA RIIα

SHIQIPPGLTELLQGYTVEVGQQPPDLVDFAVEYFTRLREARRQ (SEQ ID NO:24)

PKA RIIβ

SIEIPAGLTELLQGFTVEVLRHQPADLLEFALQHFTRLQQENER (SEQ ID NO:25)

[0178] The structure-function relationships of the AD and DDD domains have been the subject of investigation. (See, e.g., Burns-Hamuro et al., 2005, Protein Sci 14:2982-92; Carr et al., 2001, J Biol Chem 276:17332-38; Alto et al., 2003, Proc Natl Acad Sci USA 100:4445-50; Hundsrucker et al., 2006, Biochem J 396:297-306; Stokka et al., 2006, Biochem J 400:493-99; Gold et al., 2006, Mol Cell 24:383-95; Kinderman et al., 2006, Mol Cell 24:397-408, the entire text of each of which is incorporated herein by reference.)

[0179] For example, Kinderman et al. (2006) examined the crystal structure of the AD-DDD binding interaction and concluded that the human DDD sequence contained a number of conserved amino acid residues that were important in either dimer formation or AKAP binding, underlined in SEQ ID NO:13 below. (See Figure 1 of Kinderman et al., 2006, incorporated herein by reference.) The skilled artisan will realize that in designing

sequence variants of the DDD sequence, one would desirably avoid changing any of the underlined residues, while conservative amino acid substitutions might be made for residues that are less critical for dimerization and AKAP binding.

SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:13)

[0180] Alto et al. (2003) performed a bioinformatic analysis of the AD sequence of various AKAP proteins to design an RII selective AD sequence called AKAP-IS (SEQ ID NO:15), with a binding constant for DDD of 0.4 nM. The AKAP-IS sequence was designed as a peptide antagonist of AKAP binding to PKA. Residues in the AKAP-IS sequence where substitutions tended to decrease binding to DDD are underlined in SEQ ID NO:15. The skilled artisan will realize that in designing sequence variants of the AD sequence, one would desirably avoid changing any of the underlined residues, while conservative amino acid substitutions might be made for residues that are less critical for DDD binding.

AKAP-IS sequence

QIEYLAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO:15)

[0181] Gold (2006) utilized crystallography and peptide screening to develop a SuperAKAP-IS sequence (SEQ ID NO:26), exhibiting a five order of magnitude higher selectivity for the RII isoform of PKA compared with the RI isoform. Underlined residues indicate the positions of amino acid substitutions, relative to the AKAP-IS sequence, which increased binding to the DDD moiety of RIIα. In this sequence, the N-terminal Q residue is numbered as residue number 4 and the C-terminal A residue is residue number 20. Residues where substitutions could be made to affect the affinity for RIIα were residues 8, 11, 15, 16, 18, 19 and 20 (Gold et al., 2006). It is contemplated that in certain alternative embodiments, the SuperAKAP-IS sequence may be substituted for the AKAP-IS AD moiety sequence to prepare DNL constructs. Other alternative sequences that might be substituted for the AKAP-IS AD sequence are shown in SEQ ID NO:27-29. Substitutions relative to the AKAP-IS sequence are underlined. It is anticipated that, as with the AD2 sequence shown in SEQ ID NO:16, the AD moiety may also include the additional N-terminal residues cysteine and glycine and C-terminal residues glycine and cysteine.

SuperAKAP-IS

QIEYVAKQIVDYAIHQA (SEQ ID NO:26)

Alternative AKAP sequences

QIEYKAKQIVDHAIHQA (SEQ ID NO:27)

QIEYHAKQIVDHAIHQA (SEQ ID NO:28)

QIEYVAKQIVDHAIHQA (SEQ ID NO:29)

Figure 2 of Gold et al. disclosed additional DDD-binding sequences from a variety of AKAP proteins, shown below.

RII-Specific AKAPs

AKAP-KL

PLEYQAGLLVQNAIQQAI (SEQ ID NO:30)

AKAP79

LLIETASSLVKNAIQLSI (SEQ ID NO:31)

AKAP-Lbc

LIEEAASRIVDAVIEQVK (SEQ ID NO:32)

RI-Specific AKAPs

AKAPce

ALYQFADRFSELVISEAL (SEQ ID NO:33)

RIAD

LEQVANQLADQIIKEAT (SEQ ID NO:34)

PV38

FEELAWKIAKMIWSDVF (SEQ ID NO:35)

Dual-Specificity AKAPs

AKAP7

ELVRLSKRLVENAVLKAV (SEQ ID NO:36)

MAP2D

TAEEVSARIVQVVTAEAV (SEQ ID NO:37)

DAKAP1

QIKQAAFQLISQVILEAT (SEQ ID NO:38)

DAKAP2

LAWKIAKMIVSDVMQQ (SEQ ID NO:39)

[0182] Stokka et al. (2006) also developed peptide competitors of AKAP binding to PKA, shown in SEQ ID NO:40-42. The peptide antagonists were designated as Ht31 (SEQ ID NO:40), RIAD (SEQ ID NO:41) and PV-38 (SEQ ID NO:42). The Ht-31 peptide exhibited a greater affinity for the RII isoform of PKA, while the RIAD and PV-38 showed higher affinity for RI.

Ht31

DLIEEAASRIVDAVIEQVKAAGAY (SEQ ID NO:40)

RIAD

LEQYANQLADQIIKEATE (SEQ ID NO:41)

PV-38

FEELAWKIAKMIWSDVFQQC (SEQ ID NO:42)

[0183] Hundsrucker et al. (2006) developed still other peptide competitors for AKAP binding to PKA, with a binding constant as low as 0.4 nM to the DDD of the RII form of PKA. The sequences of various AKAP antagonistic peptides are provided in Table 1 of Hundsrucker et al., reproduced in **Table 4** below. AKAPIS represents a synthetic RII subunit-binding peptide. All other peptides are derived from the RII-binding domains of the indicated AKAPs.

Table 4. AKAP Peptide sequences

	Peptide Sequence
AKAPIS	QIEYLAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO:15)
AKAPIS-P	QIEYLAKQIPDNAIQQA (SEQ ID NO:43)
Ht31	KGADLIEEAASRIVDAVIEQVKAAG (SEQ ID NO:44)
Ht31-P	KGADLIEEAASRIPDAPIEQVKAAG (SEQ ID NO:45)
AKAP7δ-wt-pep	PEDAELVRLSKRLVENAVLKAVQQY (SEQ ID NO:46)
AKAP7δ-L304T-pep	PEDAELVRTSKRLVENAVLKAVQQY (SEQ ID NO:47)
AKAP7δ-L308D-pep	PEDAELVRLSKRDVENAVLKAVQQY (SEQ ID NO:48)
AKAP7δ-P-pep	PEDAELVRLSKRLPENAVLKAVQQY (SEQ ID NO:49)
AKAP7δ-PP-pep	PEDAELVRLSKRLPENAPLKAVQQY (SEQ ID NO:50)
AKAP7δ-L314E-pep	PEDAELVRLSKRLVENAVEKAVQQY (SEQ ID NO:51)
AKAP1-pep	EEGLDRNEEIKRAAFQIISQVISEA (SEQ ID NO:52)
AKAP2-pep	LVDDPLEYQAGLLVQNAIQQAIAEQ (SEQ ID NO:53)
AKAP5-pep	QYETLLIETASSLVKNAIQLSIEQL (SEQ ID NO:54)

AKAP9-pep	LEKQYQEQLEEEVAKVIVSMSIAFA (SEQ ID NO:55)
AKAP10-pep	NTDEAQEELAWKIAKMIVSDIMQQA (SEQ ID NO:56)
AKAP11-pep	VNLDKKAVLAEKIVAEAIEKAEREL (SEQ ID NO:57)
AKAP12-pep	NGILELETKSSKLVQNIIQTAVDQF (SEQ ID NO:58)
AKAP14-pep	TQDKNYEDELTQVALALVEDVINYA (SEQ ID NO:59)
Rab32-pep	ETSAKDNINIEEAARFLVEKILVNH (SEQ ID NO:60)

[0184] Residues that were highly conserved among the AD domains of different AKAP proteins are indicated below by underlining with reference to the AKAP IS sequence (SEQ ID NO:15). The residues are the same as observed by Alto et al. (2003), with the addition of the C-terminal alanine residue. (See FIG. 4 of Hundsrucker et al. (2006), incorporated herein by reference.) The sequences of peptide antagonists with particularly high affinities for the RII DDD sequence were those of AKAP-IS, AKAP7δ-wt-pep, AKAP7δ-L304T-pep and AKAP7δ-L308D-pep.

AKAP-IS

QIEYLAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO:15)

[0185] Carr et al. (2001) examined the degree of sequence homology between different AKAP-binding DDD sequences from human and non-human proteins and identified residues in the DDD sequences that appeared to be the most highly conserved among different DDD moieties. These are indicated below by underlining with reference to the human PKA RIIα DDD sequence of SEQ ID NO:13. Residues that were particularly conserved are further indicated by italics. The residues overlap with, but are not identical to those suggested by Kinderman et al. (2006) to be important for binding to AKAP proteins. The skilled artisan will realize that in designing sequence variants of DDD, it would be most preferred to avoid changing the most conserved residues (italicized), and it would be preferred to also avoid changing the conserved residues (underlined), while conservative amino acid substitutions may be considered for residues that are neither underlined nor italicized..

SHIQ*IP*P*GL*T*ELLQGYT*V*EVLR*Q*QP*P*D*L*VE*FA*VE*YF*TR*L*REA*R*A (SEQ ID NO:13)

[0186] The skilled artisan will realize that these and other amino acid substitutions in the antibody moiety or linker portions of the DNL constructs may be utilized to enhance the therapeutic and/or pharmacokinetic properties of the resulting DNL constructs.

Example 8. Cytotoxicity of RS7 Immunoconjugates to Cancer Cells

[0187] The RS7 antibody was conjugated to ranpirnase to produce an immunoconjugate with very high toxicity to a variety of epithelial cell lines. Ranpirnase (Rap) is a single-chain ribonuclease of 104 amino acids originally isolated from the oocytes of *Rana pipiens*. Rap exhibits cytostatic and cytotoxic effects on a variety of tumor cell lines *in vitro,* as well as antitumor activity *in vivo*. Rap enters cells via receptor-mediated endocytosis and once internalized into the cytosol, selectively degrades tRNA, resulting in inhibition of protein synthesis and induction of apoptosis. Rap can be administered repeatedly to patients without an untoward immune response, with reversible renal toxicity reported to be dose-limiting (Mikulski et al., J Clin Oncol 2002; 20:274-81; Int J Oncol 1993; 3:57-64).

[0188] In the studies below, an immunoconjugate comprising Rap attached to RS7 showed broad and potent anti-proliferative activity against diverse human epithelial cancer cell lines *in vitro*, as well as a human lung cancer xenograft *in vivo*. The IgG-based immunotoxin, designated 2L-Rap(Q)-hRS7, comprised Rap(Q) (a mutant form of Rap with the putative N-glycosylation site removed) conjugated to hRS7. 2L-Rap(Q)-hRS7 suppressed tumor growth in a prophylactic model of nude mice bearing Calu-3 human non-small cell lung cancer xenografts, with an increase in the median survival time (MST) from 55 to 96 days ($P<0.01$). The results demonstrated superior efficacy of 2L-Rap(Q)-hRS7 as a therapeutic for various Trop-2-expressing cancers, such as cervical, breast, colon, pancreatic, ovarian, and prostate cancers.

Methods

[0189] Cell proliferation assay Tumor cells were seeded in 96-well plates (1×10^4 cells per well) and incubated with test articles at 0.01 to 100 nM for 72 h. The number of living cells was then determined using the soluble tetrazolium salt, MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2- (4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium], following the manufacturer's protocol. The data from the dose-response curves were analyzed using GraphPad Prism software to obtain EC50 values (the concentration at which 50% inhibition occurs).

[0190] Colony-formation assay Tumor cells were trypsinized and plated in 60-mm dishes (1×10^3 cells). Cells were treated with each test article and allowed to form colonies. Fresh media containing the test article were added every 4 days, and after 2 weeks of

incubation, colonies were fixed in 4% formaldehyde and stained with Giemsa. Colonies > 50 cells were enumerated under a microscope.

[0191] *In vivo* toxicity Naïve BALB/c mice (female, 7 weeks old, Taconic Farms, Germantown, NY) were injected intravenously with various doses of (Q)-hRS7 ranging from 25 to 400 μg per mouse and were monitored daily for visible signs of toxicity and body weight change. The maximum tolerated dose (MTD) was defined as the highest dose at which no deaths occurred and the body weight loss was 20% or less of pretreatment animal weight (approximately 20 g). Animals that experienced toxic effects were euthanized.

[0192] Therapeutic efficacy in tumor-bearing mice Female NCr homozygous athymic nu/nu mice of approximately 20 g (5 weeks old when received from Taconic Farms) were inoculated s.c. with 1 x 10^7 Calu-3 human NSCLC cells and monitored for tumor growth by caliper measurements of length x width of the tumor. Tumor volume was calculated as (L x W2)/2. Once tumors reached approximately 0.15 cm^3 in size, the animals were divided into treatment groups of five per group. Therapy consisted of either a single i.v. injection of 50 μg of (Q)-hRS7 or two injections of 25 μg administered seven days apart. A control group received saline. Animals were monitored daily for signs of toxicity and were humanely euthanized and deemed to have succumbed to disease progression if tumors reached greater than 2.0 cm^3 in size or became ulcerated. Additionally, if mice lost more than 20% of initial body weight or otherwise became moribund, they were euthanized. Survival data were analyzed using Kaplan- Meier plots (log-rank analysis) with GraphPad Prism software. Differences were considered statistically significant at $P<0.05$.

Results

[0193] Binding analysis The reactivity of (Q)-hRS7 with Trop-2-expressing cell lines was initially assessed by ELISA and demonstrated for PC-3 and Calu-3 (data not shown), both yielding an apparent dissociation constant (K_D) about two-fold higher than that of hRS7 (0.28 nM vs. 0.14 nM). No binding was observed for the Trop-2-negative 22Rv1. Subsequent studies were performed by flow cytometry in a total of 10 Trop-2-expressing cell lines, and the results (not shown), indicate that there was virtually no difference in the binding property of (Q)-hRS7 from that of hRS7.

[0194] RNase activity The IVTT assay measures inhibition of protein synthesis due to mRNA degradation by RNase. (Q)-hRS7 and rRap exhibited comparable RNase activity

in this cell-free assay (not shown). Using yeast tRNA as substrate, we estimated the kcat/Km (10^9 M^{-1} s^{-1}) of rRap and (Q)-hRS7 to be 4.10 (± 0.42) and 1.98, respectively. Thus the catalytic efficiency of (Q)-hRS7 based on the concentration of Rap is about 50% of rRap

[0195] In vitro cytotoxicity Based on the results of an MTS assay, (Q)-hRS7 is most potent against ME-180, T-47D, MDA-MB-468, and Calu-3 (not shown), with EC50 values of 1.5, 2.0, 3.8, and 8.5 nM, respectively. For those cell lines showing less than <50% growth inhibition at 100 nM of (Q)-hRS7 with the MTS assay, we performed colony-formation assays to confirm that (Q)-hRS7 was cytotoxic at 10 or 100 nM to DU-145, PC-3, MCF7, SK-BR-3, BxPC-3, Capan-1, and SK-OV-3 (not shown). In both assays, hRS7, rRap, and the combination of hRS7 and rRap showed little, if any, toxicity at 100 nM in all the cell lines evaluated. The Trop-2- negative AsPC-1 was resistant to (Q)-hRS7 in both assays.

[0196] Internalization and subcellular location The internalization of (Q)-hRS7 into ME-180 cells was clearly observed (not shown). The distribution pattern of intracellular (Q)-hRS7 in ME-180, as detected directly by FITC conjugated GAH or indirectly by PE-conjugated GAM via mouse anti-Rap IgG, appeared to be nearly identical, suggesting that (Q)-hRS7 remains intact following entry into these cells (not shown).

[0197] Therapeutic efficacy in tumor-bearing mice As shown in **FIG. 6A**, either treatment (single dose, 50 μg or two doses of 25 μg given 5 days apart) with (Q)-hRS7 significantly inhibited the growth of Calu-3 xenografts compared to untreated controls (P< 0.019), with the median survival time increased from 55 days to 96 days (P <0.01; **FIG. 6B**).

Discussion

[0198] The clinical advancement of antibody-targeted RNases of animal origin is relatively moderate, with the majority developed for treating hematological malignancies and the targeting components conferred by some forms of scFv (Schirrmann et al., Exp Opin Biol Ther 2009;9:79-95). To date, antibody-targeted animal RNases have not been evaluated in patients with any cancer.

[0199] Two difficulties noted in the clinical development of plant or microbial immunotoxins are undesirable toxicity and immunogenicity. Normal tissue toxicity observed with these immunotoxins includes vascular leak syndrome (VLS), hemolytic uremic syndrome (HUS), and hepatotoxicity (Kreitman, BioDrugs 2009;23:1-13). The

structural motif (x)D(y) identified to be responsible for the binding of ricin A-chain or IL-2 to endothelial cells is absent in the native sequence of Rap(Q), and hRS7 is not crossreactive with human endothelial cells. We therefore consider the likelihood of (Q)-hRS7 causing VLS to be remote. The large size of (Q)-hRS7 (~ 180kDa), which poses a potential concern for less rapid penetration of tumors (Yokota et al., Cancer Res 1992;52:3402-8), should prevent its clearance via kidneys and mitigate the risk for HUS. As for hepatotoxicity, we note that BL22, a recombinant anti-CD22 immunotoxin composed of the disulfide-stabilized Fv of RFB4 fused to PE38, and similar immunotoxins such as LMB-2 (anti-Tac(Fv)-PE38), also had a very low MTD in mice due to nonspecific liver toxicity, yet BL22 has been reported to be safe and efficacious in clinical trials of patients with hairy-cell leukemia (Kreitman et al., N Engl J Med 2001;345:241-7). Thus, the dose-limiting hepatotoxicity commonly observed in mice may be rarely manifested in humans (Kreitman, BioDrugs 2009;23:1-13).

[0200] Most genetically-engineered immunotoxins that have been evaluated in cancer patients induced a strong humoral immune response, which shortens the serum half-life and prevents further administration. It is expected that (Q)-hRS7 will be less immunogenic, because it comprises the fusion of a humanized antibody to a toxin (Rap) that appears to induce little antibody response in patients (Mikulski et al., J Clin Oncol 2002;20:274-81).

[0201] Although the *in vitro* potency of (Q)-hRS7 was found to vary among Trop-2-expressing cell lines when measured by the 3-day MTS assay, the cytotoxicity of (Q)-hRS7 was unequivocally demonstrated at 10 nM for all cell lines using the 14-day colony-formation assay. In addition to its potent cytotoxicity against diverse cancer cell lines in vitro, (Q)- hRS7 was shown to be effective in inhibiting the growth of Calu-3 human lung cancer xenografts in nude mice, thus validating the antitumor activity and stability of (Q)-hRS7 in vivo and confirming the suitability of adding Trop-2 to the current list of antigens on solid cancers targeted by immunotoxins (Kreitman, AAPS J 2006;8:E532-51; Pastan et al., Nat Rev Cancer 2006; Pastan et al., Ann Rev Med 2007;58:221-37; Schirrmann et al., Exp Opin Biol Ther 2009;9:79-95).

[0202] In conclusion, we have demonstrated that an amphibian RNase recombinantly fused with a humanized anti-Trop-2 antibody shows selective and potent cytotoxicity against a variety of epithelial cancers, both in vitro and in vivo.

Example 9. High Potency of a Rap-anti-Trop-2 IgG DNL Construct Against Carcinomas

[0203] Using the DNL techniques described in the Examples above, an E1-Rap DNL construct, comprising hRS7-IgG-Ad2 (anti-Trop-2) linked to four copies of Rap-DDD2 was produced and showed potent *in vitro* growth inhibitory properties against a variety of carcinoma cell lines (not shown). In breast (MDA-MB-468), cervical (ME-180), and pancreatic (BxPC-3 and Capan-1) tumor lines, all of which express high levels of Trop-2, E1-Rap was very potent, showing EC_{50} in the subnanomolar range (5 to 890 pM), which was 1,000- to 100,00-fold higher than untargeted Rap or the combination of Rap and hRS7. In cell lines expressing moderate levels of Trop-2, such as the three prostate cancer lines (PC-3, DU 145, and LNCaP), E1-Rap was less potent, but still showed EC_{50} in the nanomolar range (1 to 890 nM). The cell binding data obtained for these solid cancer cell lines suggest that the sensitivity of a cell line to E1-Rap appears to correlate with its Trop-2 expression on the cell surface. No toxicity was observed for E1-Rap in the prostate cancer line, 22Rv1, which fails to bind hRS7. These results show the efficacy of E1-Rap as a new therapeutic for Trop-2-positive solid tumors, including breast, colon, stomach, lung, ovarian, endometrial, cervical, pancreatic, and prostatic carcinomas.

Example 10. Combining Antibody-Targeted Radiation (Radioimmunotherapy) and Antibody-SN-38 Conjugates (ADC) Improves Pancreatic Cancer Therapy

[0204] We previously reported effective anti-tumor activity in nude mice bearing human pancreatic tumors with ^{90}Y-humanized PAM4 IgG (hPAM4; ^{90}Y-clivatuzumab tetraxetan) that was enhanced when combined with gemcitabine (GEM) (Gold et al., Int J. Cancer 109:618-26, 2004; Clin Cancer Res 9:3929S-37S, 2003). These studies led to clinical testing of fractionated ^{90}Y-hPAM4 IgG combined with GEM that is showing encouraging objective responses. While GEM is known for its radiosensitizing ability, alone it is not a very effective therapeutic agent for pancreatic cancer and its dose is limited by hematologic toxicity, which is also limiting for ^{90}Y-hPAM4 IgG.

[0205] We have observed promising anti-tumor activity with an ADC composed of hRS7 IgG (humanized anti-epithelial glycoprotein-1; EGP-1) and SN-38, the active component of irinotecan. This ADC is very well tolerated in mice (*e.g.*, $\geq$ 60 mg), yet just 4.0 mg (0.5 mg, twice-weekly x 4) is significantly therapeutic. EGP-1 (Trop2) is also expressed in most pancreatic cancers.

[0206] The present study examined combinations of ^{90}Y-hPAM4 IgG with RS7-SN-38 in nude mice bearing 0.35 cm^3 subcutaneous xenografts of the human pancreatic cancer cell line, Capan-1. Mice (n=10) were treated with a single dose of ^{90}Y-hPAM4 IgG alone (130 μCi, *i.e.*, the maximum tolerated dose (MTD) or 75 μCi), with RS7-SN-38 alone (as above), or combinations of the 2 agents at the two ^{90}Y-hPAM4 dose levels, with the first ADC injection given the same day as the ^{90}Y-hPAM4. All treatments were tolerated, with ≤ 15% loss in body weight. Objective responses occurred in most animals, but they were more robust in both of the combination groups as compared to each agent given alone. All animals in the 0.13-mCi ^{90}Y-hPAM4 IgG + hRS7-SN-38 group achieved a tumor-free state within 4 weeks, while other animals continued to have evidence of persistent disease. These studies provide the first evidence that combined radioimmunotherapy and ADC enhances efficacy at safe doses.

[0207] In the ongoing PAM4 clinical trials, a four week clinical treatment cycle is performed. In week 1, subjects are administered a dose of ^{111}In-hPAM4, followed at least 2 days later by gemcitabine dose. In weeks 2, 3 and 4, subjects are administered a ^{90}Y-hPAM4 dose, followed at least 2 days later by gemcitabine (200 mg/m^2). Escalation started at 3 x 6.5 mCi/m^2. The maximum tolerated dose in front-line pancreatic cancer patients was 3 x 15 mCi/m^2 (hematologic toxicity is dose-limiting). Of 22 CT-assessable patients, the disease control rate (CR+PR+SD) was 68%, with 5 (23%) partial responses and 10 (45%) having stabilization as best response by RECIST criteria.

Preparation of Antibody-Drug Conjugate (ADC)

[0208] The SN-38 conjugated hRS7 antibody was prepared as shown in **FIG. 7** and according to previously described protocols (Moon et al. J Med Chem 2008, 51:6916-6926; Govindan et al., Clin Cancer Res 2009. 15:6052-6061). A reactive bifunctional derivative of SN-38 (CL2A-SN-38, **FIG. 7A**) was prepared as described in U.S. Patent Application Publ. No. 20200204589 (the Examples section of which is incorporated herein by reference). The formula of CL2A-SN-38 is (maleimido-[x]-Lys-PABOCO-20-*O*-SN-38, where PAB is *p*-aminobenzyl and 'x' contains a short PEG). The synthetic scheme for CL2A-SN-38 production is further illustrated in **FIG. 7B**. Following reduction of disulfide bonds in the antibody with TCEP, the CL2A-SN-38 is reacted with reduced antibody to generate the SN-38 conjugated RS7 (**FIG. 7C**).

[0209] ^{90}Y-hPAM4 is prepared as previously described (Gold et al., Clin Cancer Res 2003, 9:3929S-37S; Gold et al., Int J Cancer 2004, 109:618-26).

Combination RAIT + ADC

[0210] The hRS7 is present in most epithelial cancers (lung, breast, prostate, ovarian, colorectal, pancreatic) and hRS7-SN-38 conjugates are being examined in various human cancer-mouse xenograft models. Initial clinical trials with ^{90}Y-hPAM4 IgG plus radiosensitizing amounts of GEM are encouraging, with evidence of tumor shrinkage or stable disease. However, therapy of pancreatic cancer is very challenging. Therefore, a combination therapy was examined to determine whether it would response. Specifically, administration of hRS7-SN-38 at effective, yet non-toxic doses was combined with RAIT with ^{90}Y-hPAM4 IgG.

[0211] The results shown in **FIG. 8** demonstrate that the combination of hRS7-SN-38 with ^{90}Y-hPAM4 was more effective than either treatment alone, or the sum of the individual treatments. At a dosage of 75 μCi ^{90}Y-hPAM4, only 1 of 10 mice was tumor-free after 20 weeks of therapy, the same as observed with hRS7-SN-38 alone. However, the combination of hRS7-SN-38 with ^{90}Y-hPAM4 resulted in 4 of 10 mice that were tumor-free after 20 weeks, and the remaining subjects showed substantial decrease in tumor volume compared with either treatment alone. At 130 μCi ^{90}Y-hPAM4 the difference was even more striking, with 9 of 10 animals tumor-free in the combined therapy group compared to 5 of 10 in the RAIT alone group. These data demonstrate the synergistic effect of the combination of hRS7-SN-38 with ^{90}Y-hPAM4. RAIT + ADC significantly improved time to progression and increased the frequency of tumor-free treatment.

[0212] **FIG. 9** shows that the combination of ADC with hRS7-SN-38 added to the MTD of RAIT with ^{90}Y-hPAM4 had minimal additional toxicity, indicated by the % weight loss of the animal in response to treatment.

[0213] The effect of different sequential treatments on tumor survival is illustrated in **FIG. 10**. The results indicate that the optimal effect is obtained when RAIT is administered first, followed by ADC. In contrast, when ADC is administered first followed by RAIT, there is a decrease in the incidence of tumor-free animals. Neither unconjugated hPAM4 nor hRS7 antibodies had anti-tumor activity when given alone.

[0214] Experiments were performed in which both the radionuclide and the drug (SN-38) were conjugated to the same (PAM4) antibody. **FIG. 11** shows that a 0.5 mg dose of hPAM4-SN-38, given twice weekly for 8 weeks, was relatively effective at inhibiting tumor growth. However, addition of ^{90}Y-hPAM4 either on the same day or else prior to ADC improved the incidence of tumor-free animals at 12 weeks. These results show that RAIT and ADC treatments targeting the same antigen can be given together. Even though hPAM4 IgG does not internalize, hPAM4-SN-38 conjugate controlled tumor growth longer than hRS7-SN-38 in this model system (which expresses high levels of PAM4 antigen).

Example 11. Efficacy of SN-38 Conjugates of Different Antibodies

[0215] CL2A-SN-38 was conjugated to humanized antibodies, hRS7 (anti-EGP-1), hPAM4 (anti-mucin), hMN-14 (anti-CEACAM5), hLL2 (anti-CD22), and hA20 (anti-CD20). The conjugates, with a mean SN-38/MAb substitution (MSR) of ~ 6, were evaluated in the Capan-1 and BxPC-3 pancreatic human tumor xenografts and the Ramos human lymphoma xenograft grown s.c. in female athymic nude mice. When the starting tumor sizes in animals reached 0.2 to 0.3 cm^3, specific and non-targeting control conjugates were administered i.p. in a twice-weekly × 4 weeks schedule using 25 mg/kg, 12.5 mg/kg, or 5 mg/kg of protein dose.

[0216] All of the SN-38 antibody conjugates showed efficacy when examined in an appropriate target cancer cell line (data not shown). The hMN-14-SN-38 conjugate showed efficacy against LS174T human colon carcinoma xenograft in nude mice (not shown). The hA20-SN-38 and hLL2 conjugates showed efficacy in against Ramos human lymphoma xenografts in nude mice (not shown). The hRS7-SN-38 and hPAM4-SN-38 conjugates showed efficacy against Capan-1 human pancreatic cancer xenografts in nude mice (not shown).

[0217] A comparison was performed of the efficacy of SN-38 conjugates of hRS7, hPAM4, hMN14 and the control hA20 antibodies against Capan-1 human pancreatic cancer xenografts in nude mice. As shown in FIG. 12, the hRS7 and hPAM4 conjugates of SN-38 showed the greatest efficacy against a human pancreatic cancer cell line.

* * *

[0218] It will be apparent to those skilled in the art that various modifications and variations can be made to the products, compositions, methods and processes of this

invention. Thus, it is intended that the present invention cover such modifications and variations, provided they come within the scope of the appended claims and their equivalents.

What is claimed is:

1. A method of treating cancer comprising:
   a) administering to a subject with cancer an anti-Trop-2 antibody or antigen-binding fragment thereof conjugated to a first therapeutic agent; and
   b) administering to said subject an anti-pancreatic cancer mucin antibody or antigen-binding fragment thereof conjugated to a second therapeutic agent.
2. The method of claim 1, wherein the cancer is pancreatic cancer.
3. The method of claim 1, wherein the first therapeutic agent is a chemotherapeutic drug and the second therapeutic agent is a radionuclide.
4. The method of claim 1, wherein the first therapeutic agent is SN-38 and the second therapeutic agent is ^{90}Y.
5. The method of claim 3, wherein the chemotherapeutic drug is selected from the group consisting of nitrogen mustards, ethylenimine derivatives, alkyl sulfonates, nitrosoureas, gemcitabine, triazenes, folic acid analogs, anthracyclines, taxanes, COX-2 inhibitors, pyrimidine analogs, purine analogs, antibiotics, enzyme inhibitors, epipodophyllotoxins, platinum coordination complexes, vinca alkaloids, substituted ureas, methyl hydrazine derivatives, adrenocortical suppressants, hormone antagonists, endostatin, taxols, camptothecins, SN-38, doxorubicin, doxorubicin analogs, antimetabolites, alkylating agents, antimitotics, anti-angiogenic agents, tyrosine kinase inhibitors, mTOR inhibitors, heat shock protein (HSP90) inhibitors, proteosome inhibitors, HDAC inhibitors, pro-apoptotic agents, methotrexate and CPT-11.
6. The method of claim 3, wherein the radionuclide is selected from the group consisting of ^{11}C, ^{13}N, ^{15}O, ^{32}P, ^{33}P, ^{47}Sc, ^{51}Cr, ^{57}Co, ^{58}Co, ^{59}Fe, ^{62}Cu, ^{67}Cu, ^{67}Ga, ^{67}Ga, ^{75}Br, ^{75}Se, ^{75}Se, ^{76}Br, ^{77}As, ^{77}Br, ^{80m}Br, ^{89}Sr, ^{90}Y, ^{95}Ru, ^{97}Ru, ^{99}Mo, ^{99m}Tc, ^{103m}Rh, ^{103}Ru, ^{105}Rh, ^{105}Ru, ^{107}Hg, ^{109}Pd, ^{109}Pt, ^{111}Ag, ^{111}In, ^{113m}In, ^{119}Sb, ^{121m}Te, ^{122m}Te, ^{125}I, ^{125m}Te, ^{126}I, ^{131}I, ^{133}I, ^{142}Pr, ^{143}Pr, ^{149}Pm, ^{152}Dy, ^{153}Sm, ^{161}Ho, ^{161}Tb, ^{165}Tm, ^{166}Dy, ^{166}Ho, ^{167}Tm, ^{168}Tm, ^{169}Er, ^{169}Yb, ^{177}Lu, ^{186}Re, ^{188}Re, ^{189m}Os, ^{189}Re, ^{192}Ir, ^{194}Ir, ^{197}Pt, ^{198}Au, ^{199}Au, ^{199}Au, ^{201}Tl, ^{203}Hg, ^{211}At, ^{211}Bi, ^{211}Pb, ^{212}Bi, ^{212}Pb, ^{213}Bi, ^{215}Po, ^{217}At, ^{219}Rn, ^{221}Fr, ^{223}Ra, ^{224}Ac, ^{225}Ac and ^{255}Fm.
7. The method of claim 1, wherein the anti-pancreatic cancer mucin antibody or fragment thereof comprises the light complementarity determining region (CDR) sequences

CDR1 (SASSSVSSSYLY, SEQ ID NO:1); CDR2 (STSNLAS, SEQ ID NO:2); and CDR3 (HQWNRYPYT, SEQ ID NO:3); and the heavy chain CDR sequences CDR1 (SYVLH, SEQ ID NO:4); CDR2 (YINPYNDGTQYNEKFKG, SEQ ID NO:5)and CDR3 (GFGGSYGFAY, SEQ ID NO:6).

8. The method of claim 1, wherein the anti-pancreatic cancer mucin antibody or fragment thereof binds to the same epitope as an anti-pancreatic cancer mucin antibody comprising the light complementarity determining region (CDR) sequences CDR1 (SASSSVSSSYLY, SEQ ID NO:1); CDR2 (STSNLAS, SEQ ID NO:2); and CDR3 (HQWNRYPYT, SEQ ID NO:3); and the heavy chain CDR sequences CDR1 (SYVLH, SEQ ID NO:4); CDR2 (YINPYNDGTQYNEKFKG, SEQ ID NO:5)and CDR3 (GFGGSYGFAY, SEQ ID NO:6).

9. The method of claim 1, wherein the anti-Trop-2 antibody or fragment thereof comprises the light chain CDR sequences CDR1 (KASQDVSIAVA, SEQ ID NO:7); CDR2 (SASYRYT, SEQ ID NO:8); and CDR3 (QQHYITPLT, SEQ ID NO:9) and the heavy chain CDR sequences CDR1 (NYGMN, SEQ ID NO:10); CDR2 (WINTYTGEPTYTDDFKG, SEQ ID NO:11) and CDR3 (GGFGSSYWYFDV, SEQ ID NO:12).

10. The method of claim 1, wherein the anti-Trop-2 antibody or fragment thereof binds to the same epitope as an anti-Trop-2 antibody comprising the light chain CDR sequences CDR1 (KASQDVSIAVA, SEQ ID NO:7); CDR2 (SASYRYT, SEQ ID NO:8); and CDR3 (QQHYITPLT, SEQ ID NO:9) and the heavy chain CDR sequences CDR1 (NYGMN, SEQ ID NO:10); CDR2 (WINTYTGEPTYTDDFKG, SEQ ID NO:11) and CDR3 (GGFGSSYWYFDV, SEQ ID NO:12).

11. The method of claim 1, wherein the anti-Trop-2 antibody or fragment thereof and the anti-pancreatic cancer mucin antibody or fragment thereof are administered sequentially or concurrently.

12. The method of claim 1, wherein the anti-Trop-2 antibody or fragment thereof and the anti-pancreatic cancer mucin antibody or fragment thereof are conjugated together.

13. The method of claim 12, wherein the anti-Trop-2 antibody or fragment thereof and the anti-pancreatic cancer mucin antibody or fragment thereof are conjugated together by the dock-and-lock (DNL) technique.

14. The method of claim 1, wherein the anti-Trop-2 antibody or fragment thereof and the anti-pancreatic cancer mucin antibody or fragment thereof are chimeric, humanized or human antibodies or fragments thereof.

15. The method of claim 1, wherein the first and second therapeutic agents are selected from the group consisting of a radionuclide, a chemotherapeutic drug, a toxin, an immunomodulator, a hormone, a hormone antagonist, an enzyme, an siRNA, an RNAi, a photoactive therapeutic agent, an anti-angiogenic agent and a pro-apoptotic agent.

16. The method of claim 15, wherein the toxin is selected from the group consisting of ricin, abrin, alpha toxin, saporin, ribonuclease (RNase), DNase I, Staphylococcal enterotoxin-A, pokeweed antiviral protein, gelonin, diphtheria toxin, Pseudomonas exotoxin, and Pseudomonas endotoxin.

17. The method of claim 15, wherein the immunomodulator is selected from the group consisting of a cytokine, a stem cell growth factor, a lymphotoxin, a hematopoietic factor, a colony stimulating factor (CSF), an interferon (IFN), erythropoietin, thrombopoietin.

18. The method of claim 1, wherein the anti-pancreatic cancer mucin antibody binds to 80% or more of human invasive pancreatic adenocarcinoma, intraductal papillary mucinous neoplasia, PanIN-1A, PanIN-1B and PanIN-2 lesions, and does not bind to normal human pancreatic tissue

19. A method of treating pancreatic cancer comprising:
    a) administering to a subject with pancreatic cancer a first anti-pancreatic cancer antibody or antigen-binding fragment thereof conjugated to ^{90}Y; and
    b) administering to said subject a second anti-pancreatic cancer antibody or antigen-binding fragment thereof conjugated to SN-38.

20. The method of claim 19, wherein the first and second anti-pancreatic cancer antibodies bind to an antigen selected from the group consisting of pancreatic cancer mucin,

Trop-2, CA19.9, DUPAN2, SPAN1, Nd2 antigen, CEACAM5, CEACAM6, B72.3, Le^a, Lewis antigen, MUC-1, MUC-5ac and MUC-16.

21. The method of claim 19, wherein the first anti-pancreatic cancer antibody comprises the light complementarity determining region (CDR) sequences CDR1 (SASSSVSSSYLY, SEQ ID NO:1); CDR2 (STSNLAS, SEQ ID NO:2); and CDR3 (HQWNRYPYT, SEQ ID NO:3); and the heavy chain CDR sequences CDR1 (SYVLH, SEQ ID NO:4); CDR2 (YINPYNDGTQYNEKFKG, SEQ ID NO:5)and CDR3 (GFGGSYGFAY, SEQ ID NO:6).

22. The method of claim 19, wherein the second anti-pancreatic cancer antibody comprises the light chain CDR sequences CDR1 (KASQDVSIAVA, SEQ ID NO:7); CDR2 (SASYRYT, SEQ ID NO:8); and CDR3 (QQHYITPLT, SEQ ID NO:9) and the heavy chain CDR sequences CDR1 (NYGMN, SEQ ID NO:10); CDR2 (WINTYTGEPTYTDDFKG, SEQ ID NO:11) and CDR3 (GGFGSSYWYFDV, SEQ ID NO:12).

23. The method of claim 19, wherein the first and second anti-pancreatic cancer antibodies are selected from the group consisting of PAM4 and RS7.

24. A pharmaceutical composition comprising

    a) an anti-Trop-2 antibody or antigen-binding fragment thereof conjugated to a first therapeutic agent; and

    b) an anti-pancreatic cancer mucin antibody or antigen-binding fragment thereof conjugated to a second therapeutic agent.

25. The pharmaceutical composition of claim 24, wherein the first therapeutic agent is a chemotherapeutic drug and the second therapeutic agent is a radionuclide.

26. The pharmaceutical composition of claim 24, wherein the first therapeutic agent is SN-38 and the second therapeutic agent is ^{90}Y.

27. The pharmaceutical composition of claim 25, wherein the chemotherapeutic drug is selected from the group consisting of nitrogen mustards, ethylenimine derivatives, alkyl sulfonates, nitrosoureas, gemcitabine, triazenes, folic acid analogs, anthracyclines, taxanes, COX-2 inhibitors, pyrimidine analogs, purine analogs, antibiotics, enzyme inhibitors, epipodophyllotoxins, platinum coordination complexes, vinca alkaloids, substituted ureas, methyl hydrazine derivatives, adrenocortical

suppressants, hormone antagonists, endostatin, taxols, camptothecins, SN-38, doxorubicin, doxorubicin analogs, antimetabolites, alkylating agents, antimitotics, anti-angiogenic agents, tyrosine kinase inhibitors, mTOR inhibitors, heat shock protein (HSP90) inhibitors, proteosome inhibitors, HDAC inhibitors, pro-apoptotic agents, methotrexate and CPT-11.

28. The pharmaceutical composition of claim 25, wherein the radionuclide is selected from the group consisting of ^{11}C, ^{13}N, ^{15}O, ^{32}P, ^{33}P, ^{47}Sc, ^{51}Cr, ^{57}Co, ^{58}Co, ^{59}Fe, ^{62}Cu, ^{67}Cu, ^{67}Ga, ^{67}Ga, ^{75}Br, ^{75}Se, ^{75}Se, ^{76}Br, ^{77}As, ^{77}Br, ^{80m}Br, ^{89}Sr, ^{90}Y, ^{95}Ru, ^{97}Ru, ^{99}Mo, ^{99m}Tc, ^{103m}Rh, ^{103}Ru, ^{105}Rh, ^{105}Ru, ^{107}Hg, ^{109}Pd, ^{109}Pt, ^{111}Ag, ^{111}In, ^{113m}In, ^{119}Sb, ^{121m}Te, ^{122m}Te, ^{125}I, ^{125m}Te, ^{126}I, ^{131}I, ^{133}I, ^{142}Pr, ^{143}Pr, ^{149}Pm, ^{152}Dy, ^{153}Sm, ^{161}Ho, ^{161}Tb, ^{165}Tm, ^{166}Dy, ^{166}Ho, ^{167}Tm, ^{168}Tm, ^{169}Er, ^{169}Yb, ^{177}Lu, ^{186}Re, ^{188}Re, ^{189m}Os, ^{189}Re, ^{192}Ir, ^{194}Ir, ^{197}Pt, ^{198}Au, ^{199}Au, ^{199}Au, ^{201}Tl, ^{203}Hg, ^{211}At, ^{211}Bi, ^{211}Pb, ^{212}Bi, ^{212}Pb, ^{213}Bi, ^{215}Po, ^{217}At, ^{219}Rn, ^{221}Fr, ^{223}Ra, ^{224}Ac, ^{225}Ac and ^{255}Fm.

29. The pharmaceutical composition of claim 24, wherein the anti-pancreatic cancer mucin antibody or fragment thereof comprises the light complementarity determining region (CDR) sequences CDR1 (SASSSVSSSYLY, SEQ ID NO:1); CDR2 (STSNLAS, SEQ ID NO:2); and CDR3 (HQWNRYPYT, SEQ ID NO:3); and the heavy chain CDR sequences CDR1 (SYVLH, SEQ ID NO:4); CDR2 (YINPYNDGTQYNEKFKG, SEQ ID NO:5)and CDR3 (GFGGSYGFAY, SEQ ID NO:6).

30. The pharmaceutical composition of claim 24, wherein the anti-pancreatic cancer mucin antibody or fragment thereof competes for binding to human pancreatic cancer mucin with an anti-pancreatic cancer mucin antibody comprising the light complementarity determining region (CDR) sequences CDR1 (SASSSVSSSYLY, SEQ ID NO:I); CDR2 (STSNLAS, SEQ ID NO:2); and CDR3 (HQWNRYPYT, SEQ ID NO:3); and the heavy chain CDR sequences CDR1 (SYVLH, SEQ ID NO:4); CDR2 (YINPYNDGTQYNEKFKG, SEQ ID NO:5)and CDR3 (GFGGSYGFAY, SEQ ID NO:6).

31. The pharmaceutical composition of claim 24, wherein the anti-Trop-2 antibody or fragment thereof comprises the light chain CDR sequences CDR1 (KASQDVSIAVA, SEQ ID NO:7); CDR2 (SASYRYT, SEQ ID NO:8); and CDR3 (QQHYITPLT, SEQ

ID NO:9) and the heavy chain CDR sequences CDR1 (NYGMN, SEQ ID NO:10); CDR2 (WINTYTGEPTYTDDFKG, SEQ ID NO:11) and CDR3 (GGFGSSYWYFDV, SEQ ID NO:12).

32. The pharmaceutical composition of claim 24, wherein the anti-Trop-2 antibody or fragment thereof competes for binding to Trop-2 with an anti-Trop-2 antibody comprising the light chain CDR sequences CDR1 (KASQDVSIAVA, SEQ ID NO:7); CDR2 (SASYRYT, SEQ ID NO:8); and CDR3 (QQHYITPLT, SEQ ID NO:9) and the heavy chain CDR sequences CDR1 (NYGMN, SEQ ID NO:10); CDR2 (WINTYTGEPTYTDDFKG, SEQ ID NO:11) and CDR3 (GGFGSSYWYFDV, SEQ ID NO:12).

33. The pharmaceutical composition of claim 24, wherein the anti-Trop-2 antibody or fragment thereof and the anti-pancreatic cancer mucin antibody or fragment thereof are separate or are conjugated together.

34. The pharmaceutical composition of claim 33, wherein the anti-Trop-2 antibody or fragment thereof and the anti-pancreatic cancer mucin antibody or fragment thereof are conjugated together by the dock-and-lock (DNL) technique.

35. The pharmaceutical composition of claim 24, wherein the anti-Trop-2 antibody or fragment thereof and the anti-pancreatic cancer mucin antibody or fragment thereof are chimeric, humanized or human antibodies or fragments thereof.

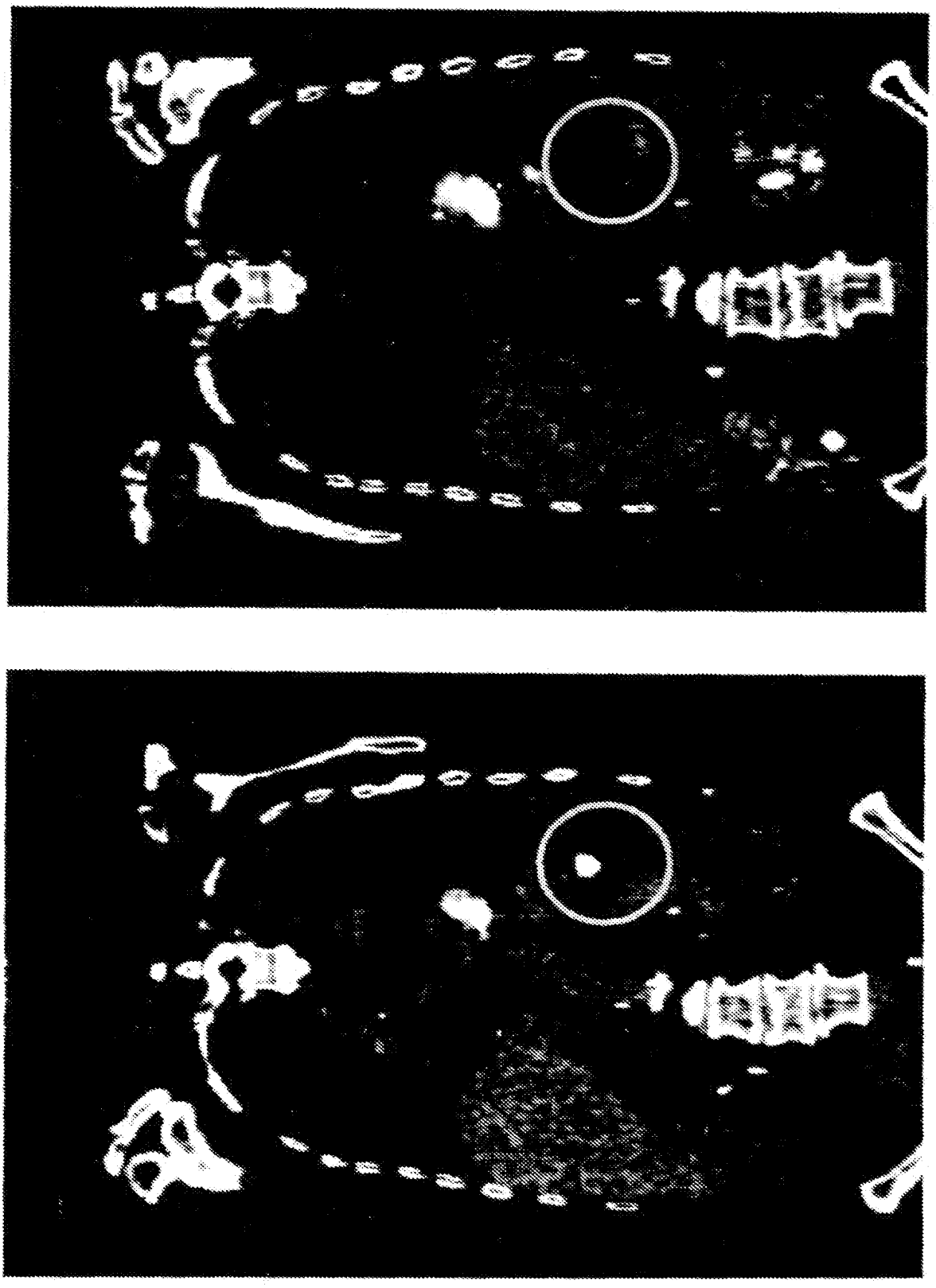


FIG. 1

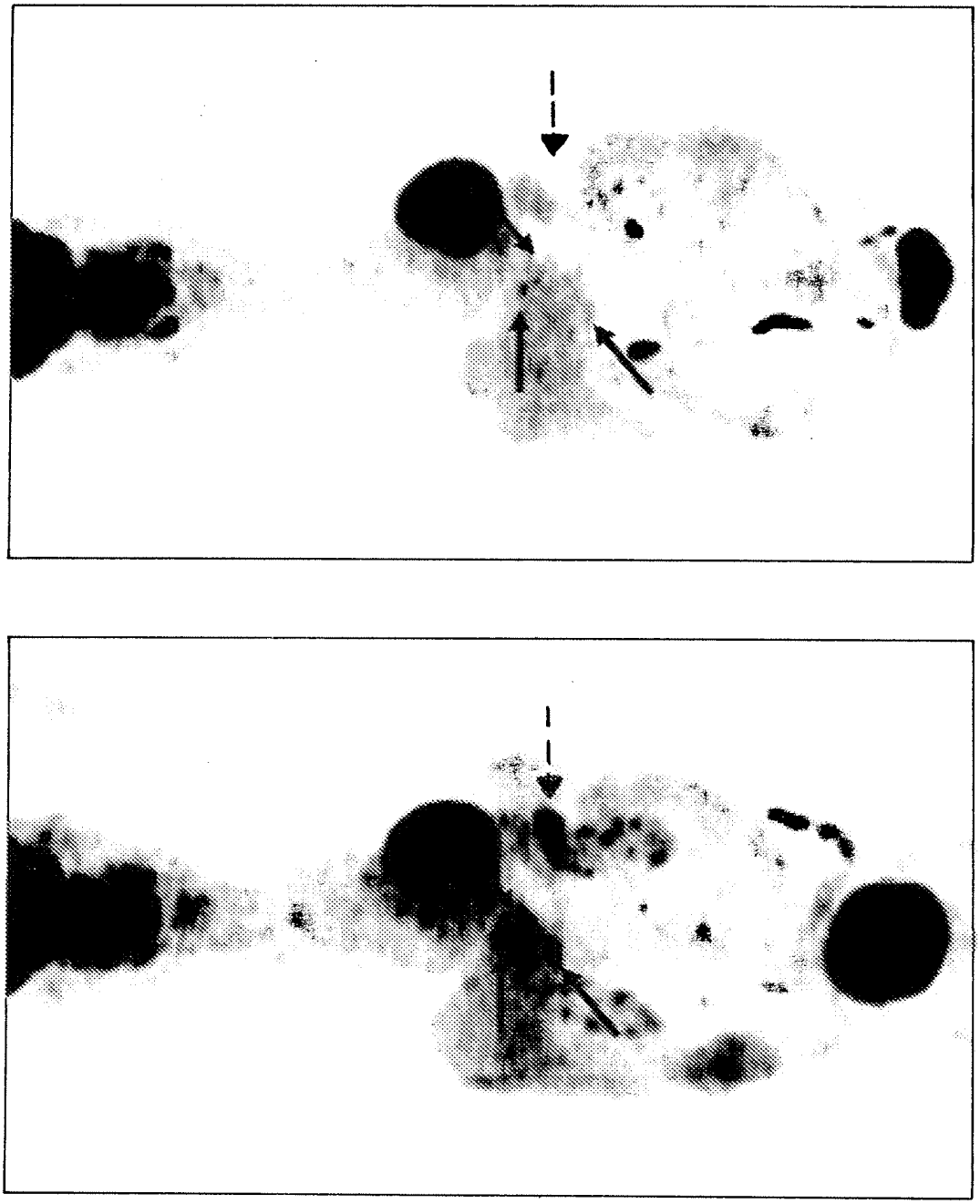


FIG. 2

OnCusp
Ex. 1038
PCT/US2010/058519

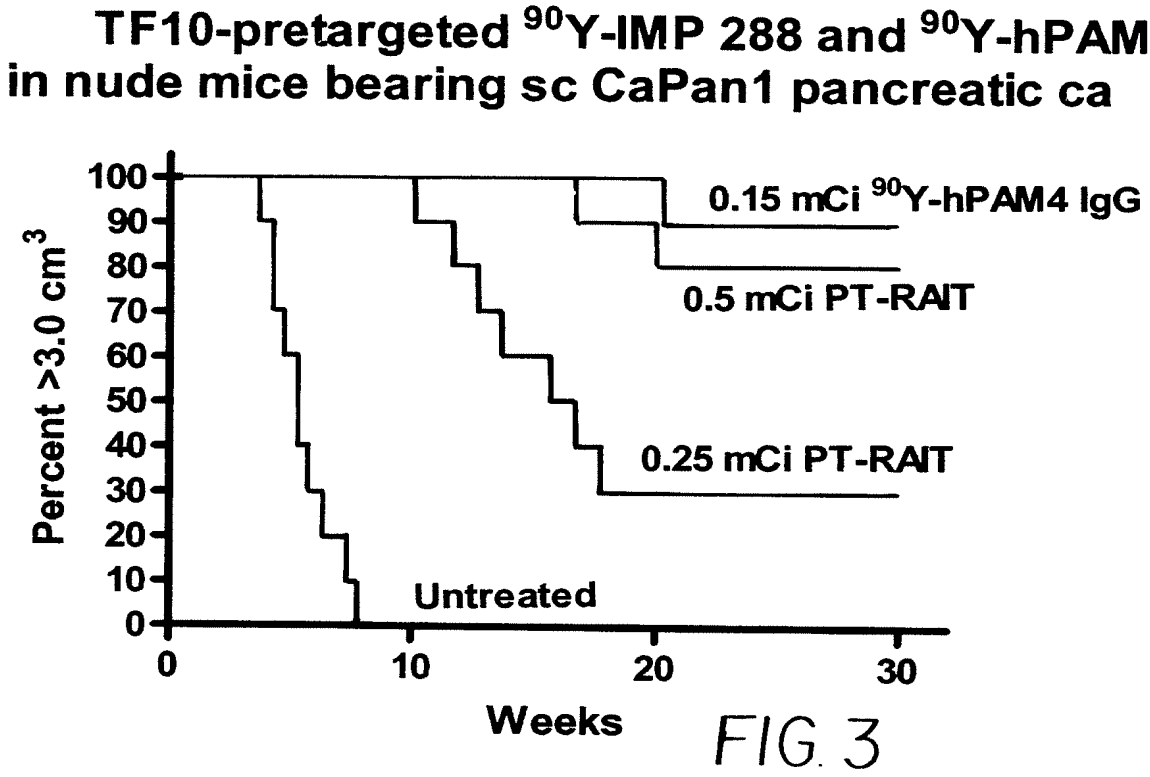


FIG. 3

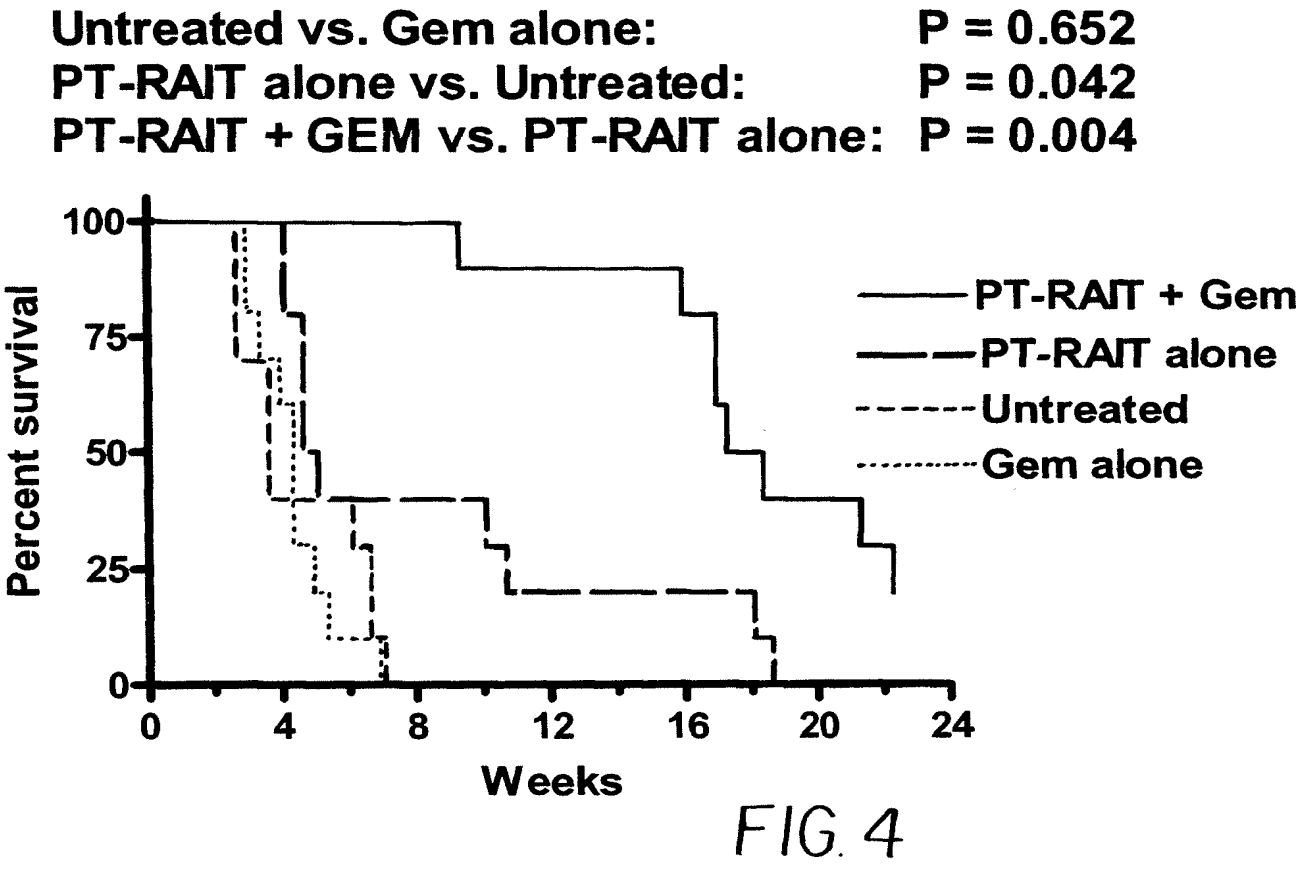

Untreated vs. Gem alone: P = 0.652
PT-RAIT alone vs. Untreated: P = 0.042
PT-RAIT + GEM vs. PT-RAIT alone: P = 0.004
Percent survival
100
75
50
25
0
0
4
8
12
16
20
24
Weeks
PT-RAIT + Gem
PT-RAIT alone
Untreated
Gem alone

FIG. 4

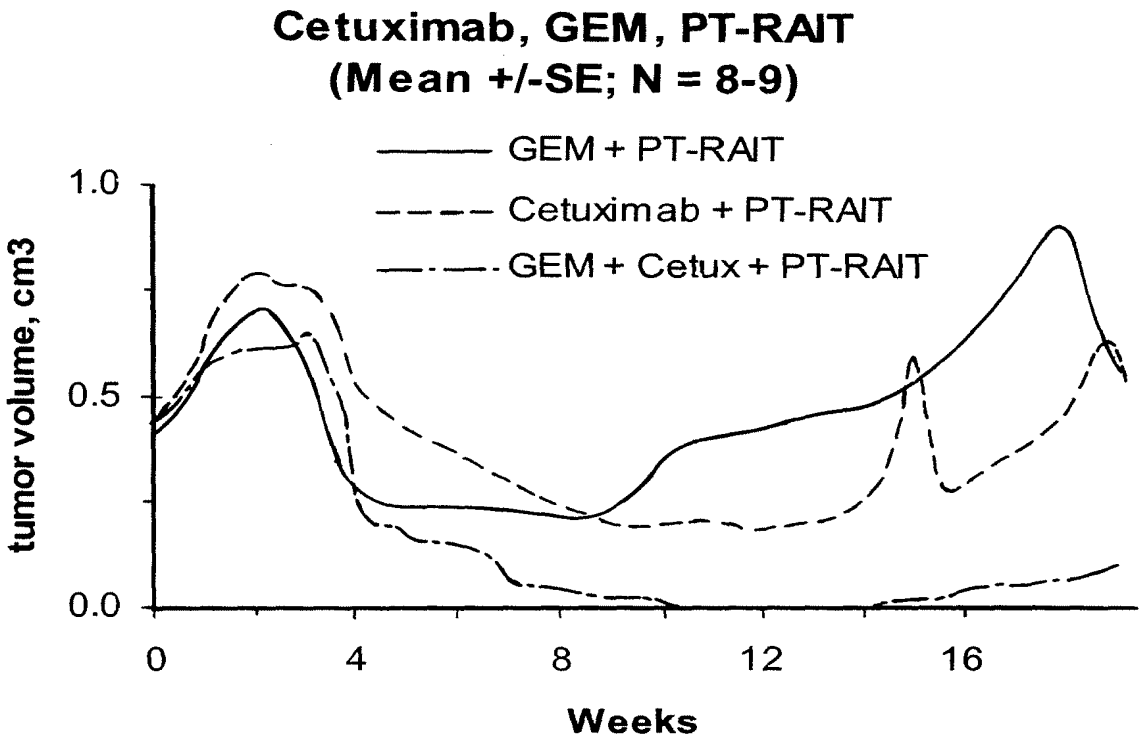

Cetuximab, GEM, PT-RAIT
(Mean +/-SE; N = 8-9)
GEM + PT-RAIT
Cetuximab + PT-RAIT
GEM + Cetux + PT-RAIT
tumor volume, cm3
1.0
0.5
0.0
0
4
8
12
16
Weeks

FIG. 5

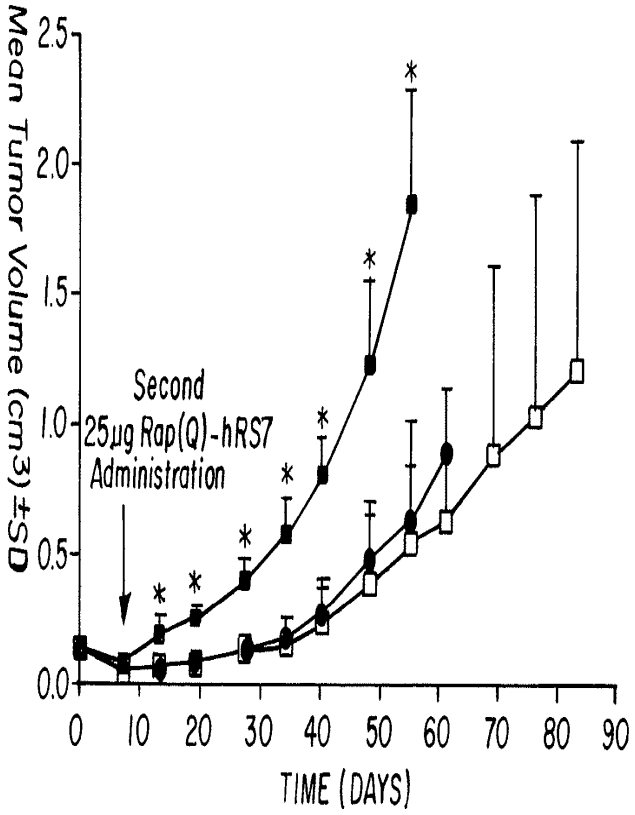
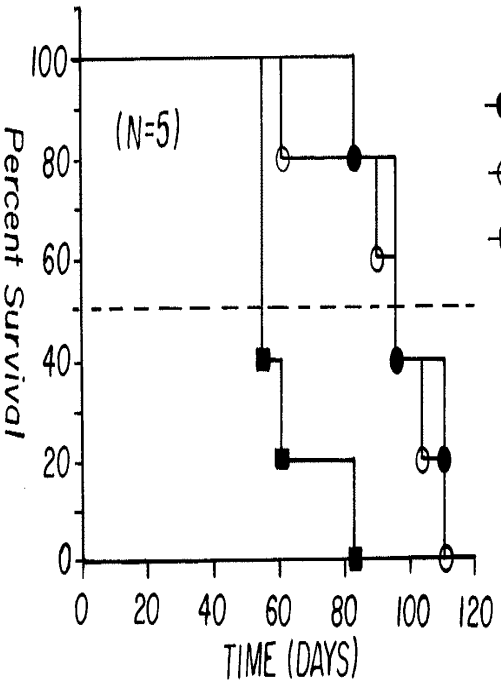


FIG. 6A



	* Median Survival	Survivors/ Total	P-value vs. Saline
Rap(Q)-hRS7 (2x25µg)	96days	1/5	0.0041
Rap(Q)-hRS7 (50µg)	96days	0/5	0.0088
Saline	55days	0/5	NA

FIG. 6B

* Time for tumor to reach ≥2.0 cm^3 or for severe ulceration.

Structures of SN-38, & bifunctional SN-38

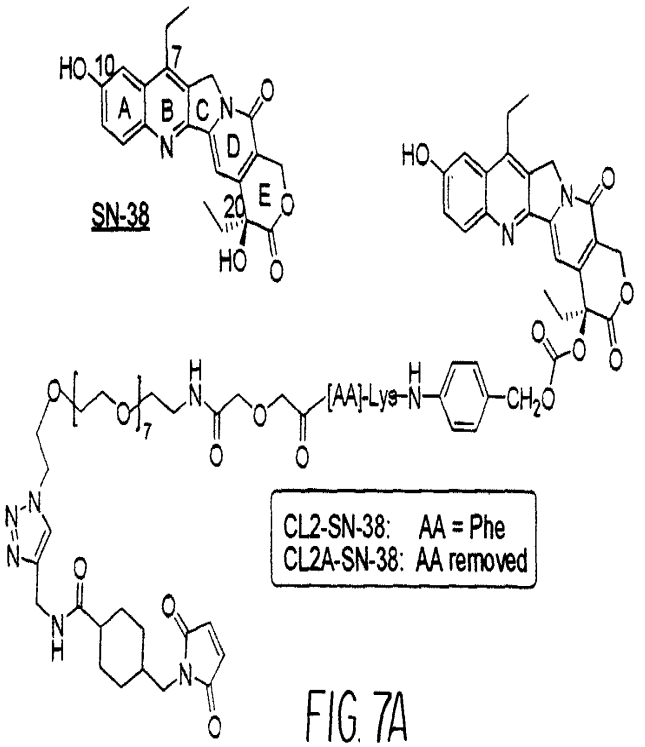


FIG. 7A

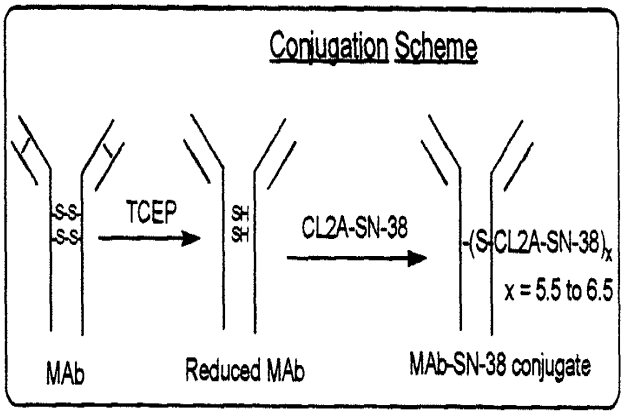


FIG. 7C

Preparation of bifunctional SN-38, CL2A-SN-38

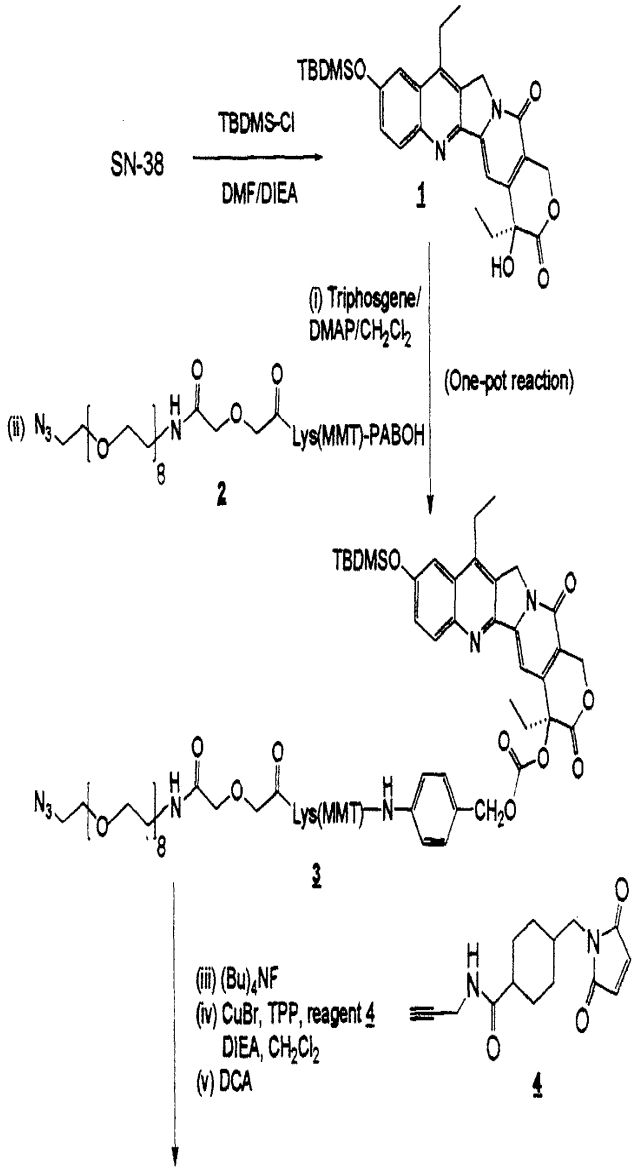


FIG. 7B

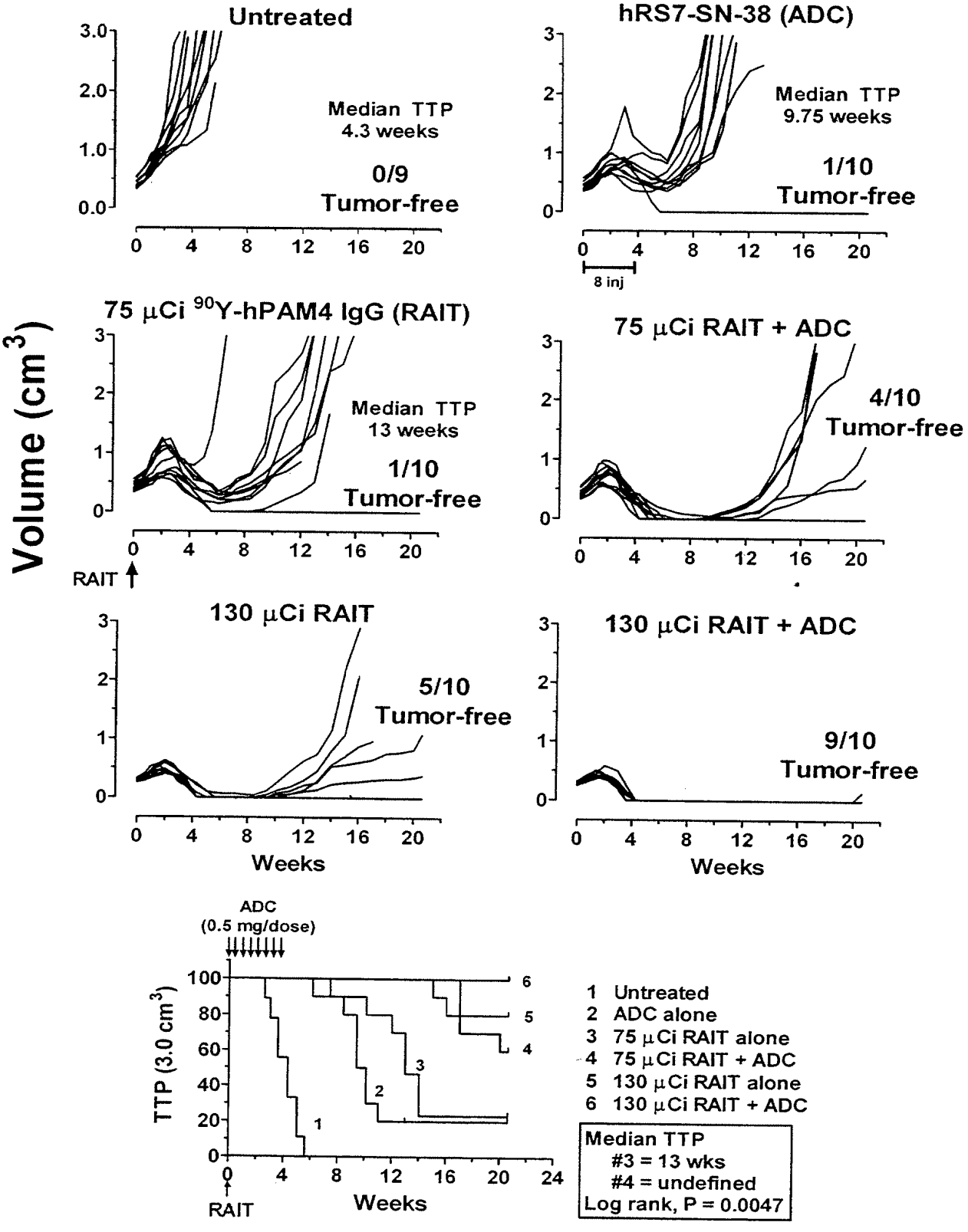

Untreated
Median TTP
4.3 weeks
0/9
Tumor-free
hRS7-SN-38 (ADC)
Median TTP
9.75 weeks
1/10
Tumor-free
8 inj
75 µCi 90Y-hPAM4 IgG (RAIT)
Median TTP
13 weeks
1/10
Tumor-free
RAIT
75 µCi RAIT + ADC
4/10
Tumor-free
130 µCi RAIT
5/10
Tumor-free
130 µCi RAIT + ADC
9/10
Tumor-free
Volume (cm3)
Weeks
ADC
(0.5 mg/dose)
TTP (3.0 cm3)
1 Untreated
2 ADC alone
3 75 µCi RAIT alone
4 75 µCi RAIT + ADC
5 130 µCi RAIT alone
6 130 µCi RAIT + ADC
Median TTP
#3 = 13 wks
#4 = undefined
Log rank, P = 0.0047

FIG. 8

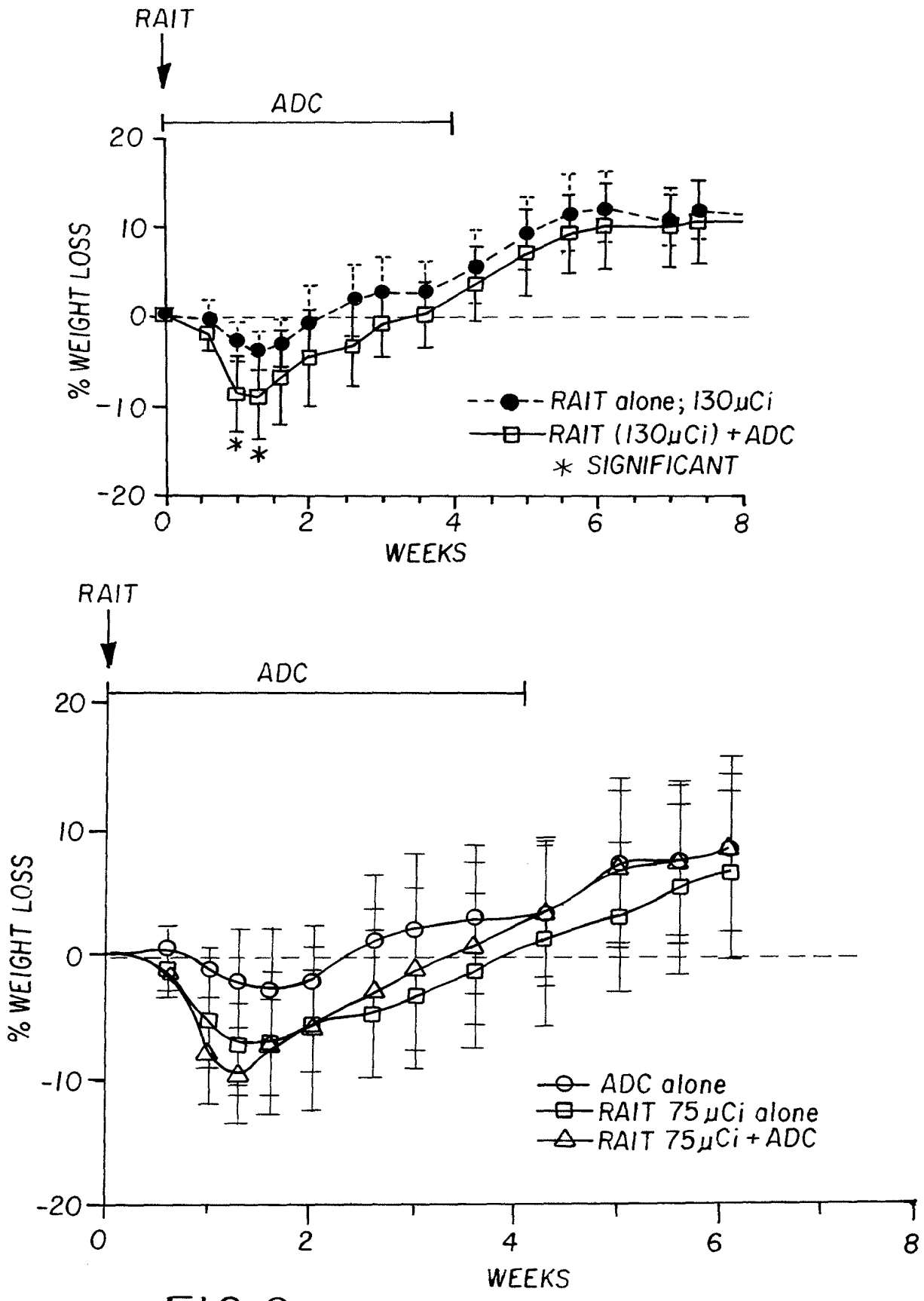
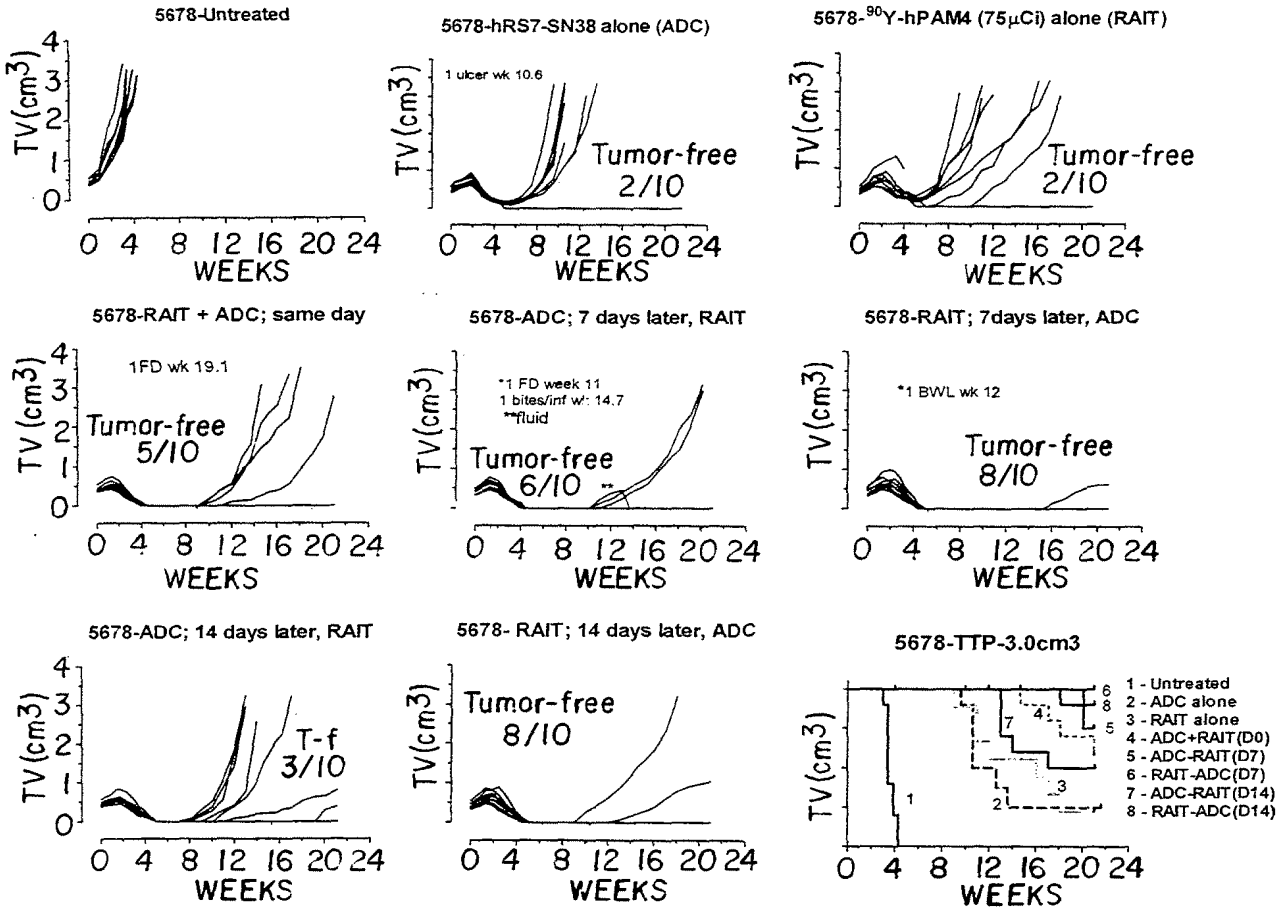

RAIT
ADC
20
10
0
-10
-20
% WEIGHT LOSS
0
2
4
6
8
WEEKS
RAIT alone; 130μCi
RAIT (130μCi) + ADC
* SIGNIFICANT
RAIT
ADC
20
10
0
-10
-20
% WEIGHT LOSS
0
2
4
6
8
WEEKS
ADC alone
RAIT 75 μCi alone
RAIT 75μCi + ADC

FIG. 9

RAIT = ^{90}Y-hPAM4 IgG (75 μCi, 50 μg); iv
ADC = hRS7-SN-38; 0.5 mg, twice weekly, 4 weeks; ip



Unconjugated antibodies
(0.5 mg, twice weekly x 4 wks)

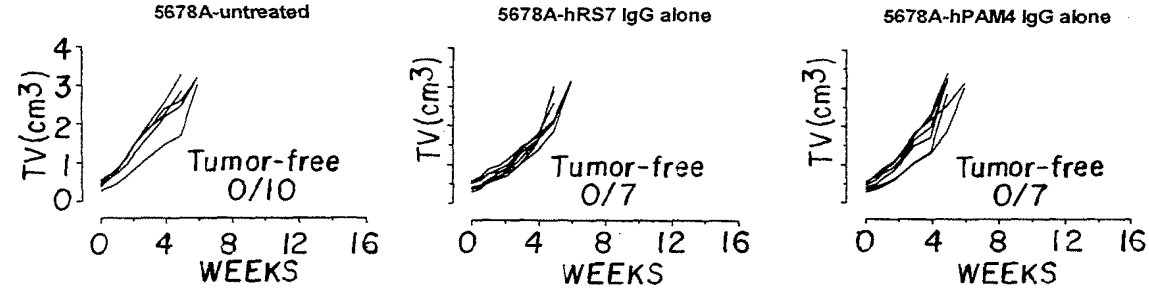


FIG. 10

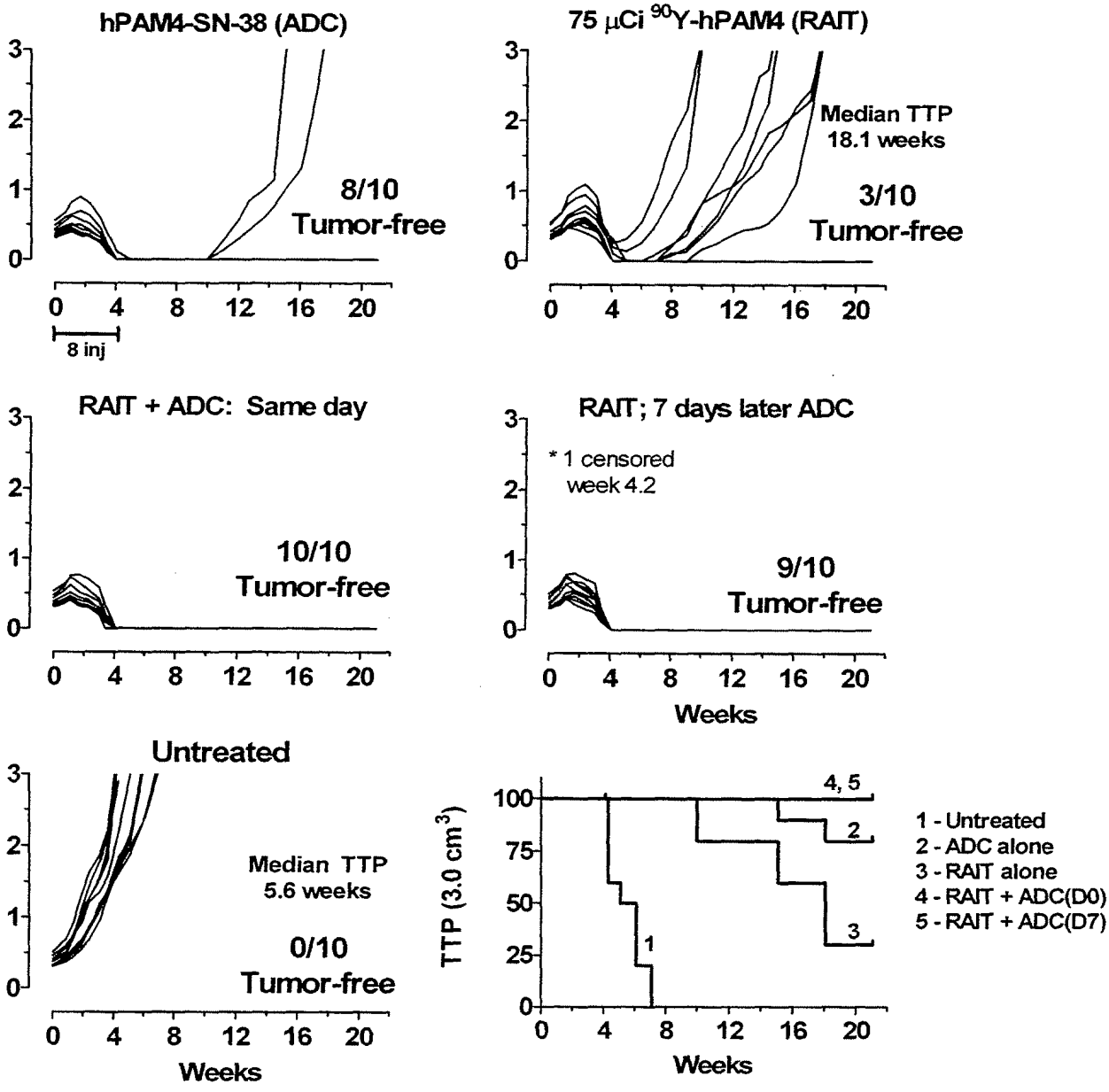

hPAM4-SN-38 (ADC)
8/10
Tumor-free
8 inj
75 μCi 90Y-hPAM4 (RAIT)
Median TTP
18.1 weeks
3/10
Tumor-free
RAIT + ADC: Same day
10/10
Tumor-free
RAIT; 7 days later ADC
* 1 censored
week 4.2
9/10
Tumor-free
Weeks
Untreated
Median TTP
5.6 weeks
0/10
Tumor-free
Weeks
TTP (3.0 cm3)
1
2
3
4, 5
1 - Untreated
2 - ADC alone
3 - RAIT alone
4 - RAIT + ADC(D0)
5 - RAIT + ADC(D7)
Weeks

FIG. 11

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

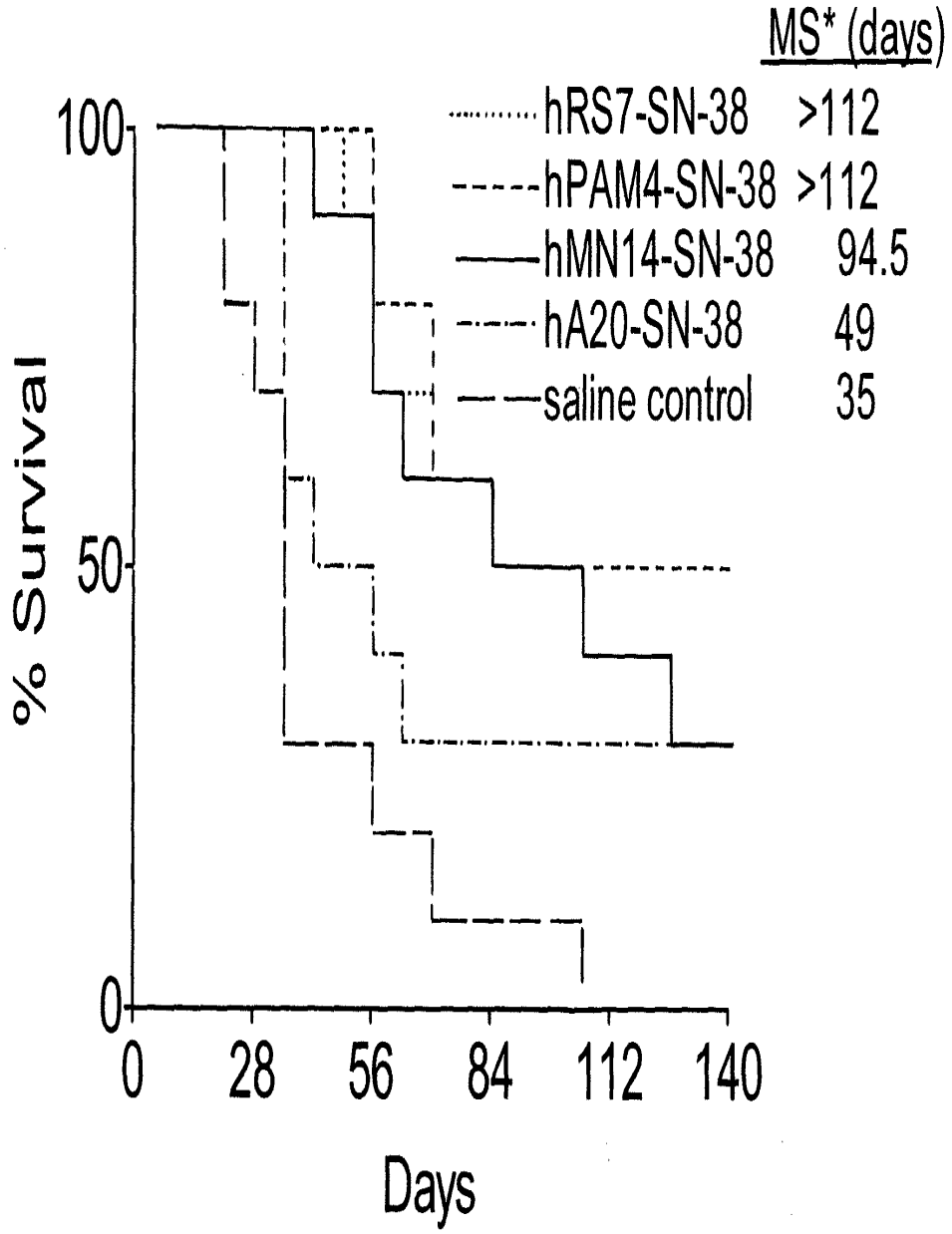


FIG. 12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 10/58519

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - A61K 51/00; A61K 39/00 (2011.01)
USPC - 424/1.49; 424/142.1
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
USPC- 424/1.49; 424/142.1

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
Electronic data bases: PubWEST (PGPB, UPST, EPAB, JPAB); Google Scholar: Cancer, pancreatic cancer, adenocarcinoma, MUC1 biomarker, antibody PAM4, epithelial glycoprotein 1 (synonyms: EGP-1, Trop-2, TROP2, TACSTD2), immunoconjugate, chemotherapeutic agent (e.g. SN-38), radionuclide (e.g. 90Y), monoclonal antibody (mAbs, mAb). GenCore 6.3: SEQ ID NO

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2004/0001825 A1 (GOVINDAN et al) 1 January 2004 (01.01.2004) para [0009], [0013]-[0015]	1-35
Y	WO 2003/106495 A2 (GOLDENBERG et al.) 24 December 2003 (24.12.2003) pg 5 para 1-3; pg 7 para 3; pg 8 para 2; pg 10 para 1; pg 12 para 1; pg 76 para 2	1-35
Y	US 2007/0086942 A1 (CHANG et al.) 19 April 2007 (19.04.2007) abstract, claim 17	13, 34
Y	GOLD et al. PAM4-Reactive MUC1 Is a Biomarker for Early Pancreatic Adenocarcinoma. Clin Can Res 2007, 13(24):7380-7387; abstract	18

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐

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

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
19 January 2100 (19.01.2011)	09 FEB 2011
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

OnCusp
Ex. 1038

(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
2011 年 11 月 24 日(24.11.2011)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2011/145744 A1

(51) 国際特許分類:
C07K 16/32 (2006.01) *C12N 5/10* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)
A61K 45/00 (2006.01) *G01N 33/574* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C12P 21/08* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2011/061709

(22) 国際出願日: 2011 年 5 月 17 日(17.05.2011)

(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 2010-113302 2010 年 5 月 17 日(17.05.2010) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社リブテック **(LIVTECH, INC.)** [JP/JP]; 〒2160001 神奈川県川崎市宮前区野川９０７ 帝京大学生物工学研究センター１Ｆ Kanagawa (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 中村康司 **(NAKAMURA, Koji)** [JP/JP]; 〒1830033 東京都府中市分梅町五丁目３５番地の１４ エルデ１０３ Tokyo (JP). 岡村健太郎 **(OKAMURA, Kentaro)** [JP/JP]; 〒2160035 神奈川県川崎市宮前区馬絹１３２１番地４ カサドＭ１０３ Kanagawa (JP). 田村真紀 **(TAMURA, Maki)** [JP/JP]; 〒2130015 神奈川県川崎市高津区梶ヶ谷２丁目１番地１３ イルニード７０１ Kanagawa (JP). 柳内浩之 **(YANAI, Hiroyuki)** [JP/JP]; 〒2230062 神奈川県横浜市港北区日吉本町六丁目９番２２－２Ｃ号 Kanagawa (JP). 菅家徹 **(KANKE, Toru)** [JP/JP]; 〒1800013 東京都武蔵野市西久保２丁目１５番３０－１５０２号 ルーバンハイツ武蔵野 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 小林浩, 外 **(KOBAYASHI, Hiroshi** et al.); 〒1040028 東京都中央区八重洲二丁目８番７号 福岡ビル９階 阿部・井窪・片山法律事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, 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, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告（条約第 21 条(3)）
— 規則 13 の 2 に基づいて明細書とは別に提出された、寄託された生物材料に関する表示（規則 13 の 2.4(d)(i)及び 48.2(a)(viii)）
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト（規則 5.2(a)）

WO 2011/145744 A1

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

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

(57) **Abstract**: Provided are: an antibody which reacts specifically with hTROP-2 and has an antitumor activity *in vivo*; a hybridoma producing said antibody; a complex of said antibody with a drug; a medicinal composition for the diagnosis or treatment of tumor; a method for detecting tumor; and a kit for the detection or diagnosis of tumor.

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

明 細 書

*in vivo*で抗腫瘍活性を有する抗ヒトTROP-2抗体

技術分野

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

背景技術

ヒトTROP-2 (Tacstd2, GA733-1, EGP-1)（以下、hTROP-2とも表記する。）は、種々の上皮細胞癌種において過剰発現していることが知られる、323アミノ酸残基（配列番号２参照）からなる1回膜貫通型の1型細胞膜タンパク質である。以前より、ヒト栄養膜細胞（trophoblasts）と癌細胞に共通する免疫抵抗性に関与する細胞膜タンパクの存在（非特許文献１）が示唆されていたが、ヒト絨毛癌細胞株BeWoの細胞膜タンパクに対するマウスモノクローナル抗体（162-25.3, 162-46.2）により認識される抗原分子が特定され、ヒト栄養膜細胞（trophoblasts）に発現する分子の一つとしてTrop-2と命名された（非特許文献２）。後に、同じ分子が、他の研究者によって発見され、胃癌細胞SW948を免疫して得られたマウスモノクローナル抗体GA733によって認識される腫瘍抗原GA733-1（非特許文献３）、非小細胞肺癌細胞免疫によって得られたマウスモノクローナル抗体RS7-3G11により認識される上皮糖タンパク質（epithelial/carcinoma antigen, EGP-1）（非特許文献４）とも呼ばれたが、1995年にTrop-2の遺伝子がクローニングされ、これらが同一の分子であることが確認された（非特許文献５）。また、癌細胞において細胞内カルシウムシグナルを増幅させる機能が明らかにされ（非特許文献６）、tumor-associated calcium signal transducer 2, TACSTD2とも呼ばれる。

hTROP-2遺伝子は、染色体1p32にマッピングされ、約50％の相同性を持つGA733-2（TACSTD1、上皮糖タンパク質EGP-2、EpCAM及びTrop-1としても

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

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

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

また、臨床検体におけるバイオマーカーとしてのhTROP-2発現レベル解析において、大腸癌（非特許文献１０及び１１）、膵臓癌（非特許文献１２）や口腔癌（非特許文献１３）の悪性度と相関し、hTROP-2が高発現している場合には癌の転移や再発が有意に高いことが示されている。また、cDNAマイクロアレイ技術を使用した大規模遺伝子発現分析において、正常な卵巣上皮と比較して卵巣の重篤な乳頭状癌に最も高度に過剰発現している遺伝子群のひとつとして同定された（非特許文献１４）。

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

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

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

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

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

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

発明の概要

このような状況下において、*in vivo*において高い抗腫瘍活性を有する抗ヒトhTROP-2抗体（抗ヒトhTROP-2モノクローナル抗体）、特に、裸抗体として抗

体単独で*in vivo*における抗腫瘍効果を有し、しかも低用量で当該効果を有する抗ヒトhTROP-2抗体等の開発が望まれていた。

本発明は、上記状況を考慮してなされたもので、以下に示す、抗ヒトhTROP-2抗体（抗ヒトhTROP-2モノクローナル抗体）、当該抗体を産生するハイブリドーマ、当該抗体の断片、当該抗体等と薬剤との複合体（イムノコンジュゲート）、腫瘍の診断用又は治療用医薬組成物、腫瘍の検出方法、腫瘍の検出用又は診断用キット等を提供するものである。

（１）*in vivo*で抗腫瘍活性を有する、ヒトTROP-2に対する抗体。

上記(1)の抗体としては、例えば、5～20mg/kg体重の投与量で50％以上の腫瘍成長阻害活性を示すもの、前記腫瘍成長阻害活性を示すための投与回数が多くても１週間に１回であるもの、10mg/kg体重の単回投与で50％以上の腫瘍成長阻害活性を示すもの、2種以上のヒト腫瘍細胞株に対して抗腫瘍活性を有するもの、解離定数（Kd値）が1.0×10^{-10} M以下であるもの等が挙げられる。ここで、腫瘍としては、例えば、ヒト膵癌、ヒト前立腺癌、ヒト大腸癌及びヒト乳癌からなる群より選ばれる少なくとも１種、特にヒト膵癌が挙げられ、また腫瘍としては、再発癌及び転移癌も挙げられる。また、腫瘍細胞株としては、例えば、ヒト膵癌細胞株PK-59、ヒト膵癌細胞株BxPC-3、ヒト膵癌細胞株KP-3L、ヒト膵癌細胞株KP-2、ヒト膵癌細胞株PK-1、ヒト膵癌細胞株PK-45H、ヒト膵癌細胞株PK-45P、ヒト膵癌細胞株TCC-PAN2、ヒト膵癌細胞株SUIT-2、ヒト大腸癌細胞株CACO-2、ヒト大腸癌細胞株SW480、ヒト大腸癌細胞株DLD-1、ヒト大腸癌細胞株HCT 116、ヒト乳癌細胞株JIMT-1、ヒト乳癌細胞株HCC1143、ヒト乳癌細胞株MCF-7、ヒト前立腺癌細胞株DU145及びヒト前立腺癌細胞株PC-3からなる群より選ばれる少なくとも2種、特にヒト膵癌細胞株PK-59及びヒト膵癌細胞株BxPC-3が挙げられる。

上記(1)の抗体としては、例えば、抗体のＨ鎖Ｖ領域のＣＤＲ１～３のアミノ酸配列が、それぞれ順に、配列番号３６～３８で示されるアミノ酸配列であり、及び／又は、抗体のＬ鎖Ｖ領域のＣＤＲ１～３のアミノ酸配列が、それぞれ順に、配列番号４１～４３で示されるアミノ酸配列であるもの；

抗体のＨ鎖Ｖ領域のＣＤＲ１～３のアミノ酸配列が、それぞれ順に、配列番号

４６～４８で示されるアミノ酸配列であり、及び／又は、抗体のＬ鎖Ｖ領域のＣＤＲ１～３のアミノ酸配列が、それぞれ順に、配列番号５１～５３で示されるアミノ酸配列であるもの；

抗体のＨ鎖Ｖ領域のＣＤＲ１～３のアミノ酸配列が、それぞれ順に、配列番号５６～５８で示されるアミノ酸配列であり、及び／又は、抗体のＬ鎖Ｖ領域のＣＤＲ１～３のアミノ酸配列が、それぞれ順に、配列番号６１～６３で示されるアミノ酸配列であるもの；及び

抗体のＨ鎖Ｖ領域のＣＤＲ１～３のアミノ酸配列が、それぞれ順に、配列番号６６～６８で示されるアミノ酸配列であり、及び／又は、抗体のＬ鎖Ｖ領域のＣＤＲ１～３のアミノ酸配列が、それぞれ順に、配列番号７１～７３で示されるアミノ酸配列であるもの等が挙げられる。

上記(1)の抗体としては、例えば、モノクローナル抗体が挙げられる。

上記(1)の抗体としては、例えば、遺伝子組換え抗体が挙げられ、具体的には、キメラ抗体、ヒト型化抗体 又はヒト化抗体が挙げられる。

ここで、上記キメラ抗体としては、例えば、Ｈ鎖Ｖ領域のアミノ酸配列が配列番号３５で示されるアミノ酸配列からなり、及び／又は、Ｌ鎖Ｖ領域のアミノ酸配列が配列番号４０で示されるアミノ酸配列からなるもの；

Ｈ鎖Ｖ領域のアミノ酸配列が配列番号４５で示されるアミノ酸配列からなり、及び／又は、Ｌ鎖Ｖ領域のアミノ酸配列が配列番号５０で示されるアミノ酸配列からなるもの；

Ｈ鎖Ｖ領域のアミノ酸配列が配列番号５５で示されるアミノ酸配列からなり、及び／又は、Ｌ鎖Ｖ領域のアミノ酸配列が配列番号６０で示されるアミノ酸配列からなるもの；及び

Ｈ鎖Ｖ領域のアミノ酸配列が配列番号６５で示されるアミノ酸配列からなり、及び／又は、Ｌ鎖Ｖ領域のアミノ酸配列が配列番号７０で示されるアミノ酸配列からなるもの等が挙げられる。

（２）受領番号がFERM BP-11251、FERM BP-11252、FERM BP-11253、FERM BP-11346 又はFERM BP-11254であるハイブリドーマにより産生される、ヒトTROP-2に対するモノクローナル抗体。

上記(1)及び(2)の抗体としては、例えば、受領番号がFERM BP-11251、FERM BP-11252、FERM BP-11253、FERM BP-11346 又はFERM BP-11254であるハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体が結合する部位に結合するもの、及び配列番号２に示されるヒトTROP-2のアミノ酸配列中の、第４３番目～第６５番目のアミノ酸からなる領域、第１５２番目～第１６５番目のアミノ酸からなる領域、第１７１番目～第１８３番目のアミノ酸からなる領域、第１０９番目～第１２０番目のアミノ酸からなる領域、第４３番目～第５６番目のアミノ酸からなる領域、及び第１９３番目～第２０６番目のアミノ酸からなる領域からなる群より選択される少なくとも１種（例えばいずれか１種）の領域を含む部分と結合するものが挙げられる。

（３）上記(1)又は(2)の抗体に由来する抗体断片。

上記(3)の抗体断片としては、例えば、配列番号３６～３８で示されるアミノ酸配列、及び／又は、配列番号４１～４３で示されるアミノ酸配列を含むもの、例えば配列番号３５で示されるアミノ酸配列、及び／又は、配列番号４０で示されるアミノ酸配列を含むもの；

配列番号４６～４８で示されるアミノ酸配列、及び／又は、配列番号５１～５３で示されるアミノ酸配列を含むもの、例えば配列番号４５で示されるアミノ酸配列、及び／又は、配列番号５０で示されるアミノ酸配列を含むもの；

配列番号５６～５８で示されるアミノ酸配列、及び／又は、配列番号６１～６３で示されるアミノ酸配列を含むもの、例えば配列番号５５で示されるアミノ酸配列、及び／又は、配列番号６０で示されるアミノ酸配列を含むもの；及び

配列番号６６～６８で示されるアミノ酸配列、及び／又は、配列番号７１～７３で示されるアミノ酸配列を含むもの、例えば配列番号６５で示されるアミノ酸配列、及び／又は、配列番号７０で示されるアミノ酸配列を含むもの等が挙げられる。

（４）上記(1)又は(2)の抗体を産生するハイブリドーマ。

（５）受領番号がFERM BP-11251、FERM BP-11252、FERM BP-11253、FERM BP-11346 又はFERM BP-11254である、ヒトTROP-2に対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

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

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

上記(6)及び(7)の複合体において、腫瘍としては、例えば、ヒト膵癌、ヒト前立腺癌、ヒト大腸癌及びヒト乳癌からなる群より選ばれる少なくとも１種、特にヒト膵癌が挙げられ、また腫瘍としては、再発癌及び転移癌も挙げられる。

（８）上記(1)及び(2)の抗体、上記(3)の抗体断片、並びに上記(6)及び(7)の複合体からなる群より選ばれる少なくとも１種を含む、医薬組成物。

上記(8)の組成物としては、例えば、腫瘍の治療に用いるもの、特に体重減少の副作用を有しないものが挙げられ、また、腫瘍の診断に用いるものも挙げられる。ここで、腫瘍としては、例えば、ヒト膵癌、ヒト前立腺癌、ヒト大腸癌及びヒト乳癌からなる群より選ばれる少なくとも１種、特にヒト膵癌が挙げられ、また腫瘍としては、再発癌及び転移癌も挙げられる。

（９）上記(1)及び(2)の抗体、上記(3)の抗体断片、並びに上記(6)及び(7)の複合体からなる群より選ばれる少なくとも１種を含む、腫瘍治療剤。

上記(9)の治療剤としては、例えば、体重減少の副作用を有しないものが挙げられる。

（１０）上記(1)及び(2)の抗体、上記(3)の抗体断片、並びに上記(6)及び(7)の複合体からなる群より選ばれる少なくとも１種を含む、腫瘍診断剤。

上記(9)の治療剤及び上記(10)の診断剤において、腫瘍としては、例えば、ヒト膵癌、ヒト前立腺癌、ヒト大腸癌及びヒト乳癌からなる群より選ばれる少なくとも１種、特にヒト膵癌が挙げられ、また腫瘍としては、再発癌及び転移癌も挙げられる。

（１１）上記(1)及び(2)の抗体、上記(3)の抗体断片、並びに上記(6)及び(7)の複合体からなる群より選ばれる少なくとも１種と、生体から採取された試料とを反応させ、反応した抗体及び／又は抗体断片のシグナルを検出することを特徴とする、腫瘍の検出方法。

上記(11)の方法において、腫瘍としては、例えば、ヒト膵癌、ヒト前立腺癌、

ヒト大腸癌及びヒト乳癌からなる群より選ばれる少なくとも１種、特にヒト膵癌が挙げられ、また腫瘍としては、再発癌及び転移癌も挙げられる。

（１２）上記(1)及び(2)の抗体、上記(3)の抗体断片、並びに上記(6)及び(7)の複合体からなる群より選ばれる少なくとも１種を含む、腫瘍の治療用、診断用又は検出用キット。

上記(12)のキットにおいて、腫瘍としては、例えば、ヒト膵癌、ヒト前立腺癌、ヒト大腸癌及びヒト乳癌からなる群より選ばれる少なくとも１種、特にヒト膵癌が挙げられ、また腫瘍としては、再発癌及び転移癌も挙げられる。

図面の簡単な説明

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

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

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

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

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

図６は、抗 hTROP-2 モノクローナル抗体(K5-70)の、ヒト大腸癌細胞株

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

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

図８は、抗 hTROP-2 モノクローナル抗体の、ヒト EpCAM/TROP-1 との交差反応性を調べた図である。細胞は、CHO-K1 細胞にヒト EpCAM/TROP-1 遺伝子を一過性発現させた細胞を用い、陽性対照抗体として、PE 標識抗ヒト EpCAM モノクローナル抗体（ベクトンディッキンソン）を用いた。黒塗りのヒストグラムは二次抗体（PE 標識抗マウス IgG)のみ、黒ラインのヒストグラムは、各抗 hTROP-2 モノクローナル抗体と反応させたものを示す。

図９は、抗 hTROP-2 抗体（T6-16, T5-86, K5-70, K5-107)のヒト膵臓癌細胞株 (PK-59 細胞)の細胞増殖阻害活性を示す図である。mIgG はコントロール抗体(マウス IgG), YY01:市販の抗 hTROP-2 抗体(Santacruz)を示す。白カラム：0μg/mL, 灰色カラム：0.1μg/mL, 黒カラム：1μg/mL。抗体添加をしていない（0μg/mL)の値に対する Ratio で表した。エラーバーは標準偏差を示す。*P < 0.05, **P < 0.01（by Student's t-test）

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

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

1 日後（24 時間後）の写真。写真中に示した矢印は、スクラッチ領域の幅を示した。

B. 画像解析ソフト(Scion Image)でスクラッチ領域の面積を解析し、その値を基に、コントロール mIgG 添加群 Day0 を基準値 1 として、他サンプル各種の値を算出した。

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

図１１は、ヒト膵臓癌細胞株, PK-59 細胞の幹細胞マーカーの FACS の図である。 A: PK-59 細胞の EpCAM の発現を示す FACS の図である。黒塗りのヒストグラムは二次抗体（PE 標識抗マウス IgG)のみ、黒ラインは、抗ヒト EpCAM 抗体（ベクトンディッキンソン）と反応させた場合のヒストグラムを示す。B, C: PK-59 細胞の P-glycoprotein/MCR1 (B), または ABCG2 (C)の発現を示す FACS の図である。青のヒストグラムは、二次抗体のみ、赤のヒストグラムが抗ヒト P-glycoprotein/MDR1 抗体(BD ファーミンジェン)（B), 抗ヒト ABCG2 抗体（BD ファーミンジェン）（C)と反応させた場合を示す。 D: PK-59 細胞を膵臓癌幹細胞マーカーである FITC 標識抗ヒト CD24 抗体（BD ファーミンジェン）と PE 標識抗ヒト CD44 抗体（BD ファーミンジェン）で二重染色した FACS の図である。D の図中の数字は、それぞれの画分の細胞の存在比率を示す。

図１２は、PK-59細胞を用いたXenograft Treatmentモデルにおいて、新規な抗hTROP-2モノクローナル抗体クローンK5-70 (マウスIgG2a)の抗腫瘍活性を評価した図である。

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

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

図１３は、PK-59細胞を用いたXenograft Treatmentモデルにおける、A. クローンK5-107, B. クローンT6-16, C. クローンK5-116-2-1の抗腫瘍活性を評価

した図である。●はコントロール群（マウスIgG）、○は抗hTROP-2抗体投与群を示す。グラフ中の矢印は抗体投与期間を表し、各プロット上に示す数値は、平均値±標準偏差。* P < 0.05（by Student's t-test）

図１４は、PK-59細胞を用いたXenograft Preventionモデルにおける、A. クローンK5-70、 B. クローンT6-16及び, C.クローンK5-116-2-1の抗腫瘍活性を評価した図である。●はコントロール群（マウスIgG）、○は抗hTROP-2抗体投与群を示す。グラフ中の矢印は抗体投与期間を表し、各プロット上に示す数値は、平均値±標準偏差。** P < 0.01（by Student's t-test）

図１５は、BxPC-3細胞を用いたXenograft Prevention及びTreatmentモデルにおける、クローンK5-70の抗腫瘍活性を評価した図である。A： Preventionモデルにおけるコントロール群（マウスIgG）とK5-70投与群の腫瘍成長を経時的に表した（平均値±標準偏差）。矢印は、抗体投与期間を表す。** P < 0.01（by Student's t-test）B： Treatmentモデルにおけるコントロール群（マウスIgG）とK5-70投与群の腫瘍成長を経時的に表した（平均値±標準偏差）。矢印は、抗体投与期間を表す。 * P < 0.05（by Student's t-test）

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

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

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

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

TROP-2タンパク質の、下段はhTROP-2タンパク質のアミノ酸番号をそれぞれ示している。

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

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

hTROP-2遺伝子及び各ヒト／マウスキメラTROP-2遺伝子をHEK293細胞に導入し、一過性に発現させた細胞を用いてFACS解析を行った。(A) K5-70、K5-107、T5-86、K5-116-2-1抗体について、hTROP-2（上段）、hmTROP-2-A（中段）及びhmTROP-2-B（下段）との反応性を検討した。mouse IgG2bは陰性コントロールとして用いた。(B) T6-4、T6-16抗体について、hTROP-2（上段）、mhTROP-2-E（中段）及びmhTROP-2-F（下段）との反応性を検討した。mouse IgG2bは陰性コントロールとして用いた。

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

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

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

A. コントロール群（mouse IgG●）とK5-70投与群（○）の腫瘍形成を経時的に表す（平均値±標準偏差）。矢印は、抗体投与を表す。* $P < 0.05$（by

Student’s t-test）, ** P < 0.01（by Student’s t-test）.

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

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

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

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

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

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

A： コントロール群（●mouse IgG）とT6-16投与群（○）の腫瘍形成を経時的に表した（平均値±標準偏差）。矢印は、抗体投与期間を表す。** P < 0.01 (by Student’s t-test)

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

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

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

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

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

A： コントロール群（●mouse IgG）とK5-70投与群（○：1mg/kg, △：

5mg/kg, □：10mg/kg）の腫瘍形成を経時的に表した（平均値±標準偏差）。矢印は、抗体投与期間を表す。*P < 0.05 (by Student’s t-test)

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

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

A: 1週間に1回の投与間隔でのK5-70抗体の抗腫瘍活性を示す図である。コントロール群（●mouse IgG）とK5-70投与群（○：10 mg/kg)の腫瘍形成を経時的に表した（平均値±標準偏差）。矢頭（Day 10, 17, 24, 31, 38)は、K5-70抗体の投与を示す。*P < 0.05 by Student’s t-test.

B: 10日に1回 (■: q10d)、または2週間に1回 (●: q14d)の投与間隔でのK5-70抗体を投与した場合の腫瘍形成を経時的に表した図である。ひし形（◇）はコントロール群（Mouse IgG、10mg/kg)を示す（平均値±標準偏差）。黒塗りの矢頭（▼；Day 9, 19, 29)と白塗りの矢頭（▽； Day 9, 23, 37)は、K5-70抗体の投与を示す。*P < 0.05, **P < 0.01 by Student’s t-test.

図２８は、SW480細胞を用いたXenograft Treatmentモデルにおける、クローンT6-16の用量依存的な抗腫瘍活性を示す図である。

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

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

図２９は、SW480細胞を用いたXenograft Treatmentモデルにおける、クローンT6-16の抗腫瘍活性を示す図である。コントロール群（●：mouse IgG 10 mg/kg）、T6-16(10 mg/kg）投与群（○：q7d,△：q10d)の腫瘍形成を経時的に表した（平均値±標準偏差）。矢頭（Day 10, 17, 24, 31, 38)、及び矢印（Day 10, 20, 30, 40)は、T6-16抗体の投与を示す。コントロール群は3日に1回投与を行った。*P < 0.05, **P < 0.01 by Student’s t-test.

図３０は、ヒト前立腺癌細胞DU-145細胞を用いたXenograft Preventionモデ

ルにおける、クローンK5-70の抗腫瘍活性を示す図である。

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

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

図３１は、PK-59細胞の肝転移モデルを用いたクローンK5-70の転移抑制活性を示す図である。

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

図３２は、SW480細胞を用いたXenograftモデルにおける塩酸イリノテカン投与後の癌再発モデルにおけるK5-70の抗腫瘍活性を示す図である。無処置群（◆）、と塩酸イリノテカン(40mg/kg) 投与後K5-70（○：10 mg/kg)、あるいはマウスIgG投与群（●： 10 mg/kg)の腫瘍形成を経時的に表した図である（平均値±標準偏差）。矢頭（Day 11, 14, 17)は、塩酸イリノテカンの投与を示す。K5-70抗体あるいはマウスIgGはDay 20より3日に1回投与を行った。矢印は抗体投与期間を示す。*P < 0.05, **P < 0.01 by Student's t-test.

図３３は、クローンK5-70 H鎖可変領域（VH）のcDNA塩基配列（配列番号３４）と推定アミノ酸配列（配列番号３５）を示す図である。シグナルペプチドはイタリックで表している。二重下線を引いたグルタミン（Q）は、成熟ペプチドのN末端アミノ酸残基を示す。CDR配列（下線；*IYWIN, NIYPSDSYTNYNQKFKD, TSMADY*）は、Kabatら(Sequences of Proteins of Immunological Interests, Fifth edition, NIH Publication No. 91-3242, U.S. Department of Health and Human Services, 1991) の定義に従って決定した。クローンK5-70 VHのCDR1～3のアミノ酸配列は、それぞれ順に、配列番号３６～３８に示す。

図３４は、クローンK5-70 L鎖可変領域（VL）のcDNA塩基配列（配列番号３９）と推定アミノ酸配列（配列番号４０）を示す図である。シグナルペプチドはイタリックで表している。二重下線を引いたアスパラギン酸（D）は、成熟ペプ

チドのN末端アミノ酸残基を示す。CDR配列（下線; *RASQSIGTSIH, YASESIS, QQSNSWPFT*）は、Kabatら(Sequences of Proteins of Immunological Interests, Fifth edition, NIH Publication No. 91-3242, U.S. Department of Health and Human Services, 1991) の定義に従って決定した。クローンK5-70 VLのCDR1～3のアミノ酸配列は、それぞれ順に、配列番号４１～４３に示す。

図３５は、クローンK5-107 H鎖可変領域（VH）のcDNA塩基配列（配列番号４４）と推定アミノ酸配列（配列番号４５）を示す図である。シグナルペプチドはイタリックで表している。二重下線を引いたグルタミン（Q）は、成熟ペプチドのN末端アミノ酸残基を示す。CDR配列（下線; *SYWMH, NIYPGGGYTNYDEKFKS, SSVFDY*）は、Kabatら(Sequences of Proteins of Immunological Interests, Fifth edition, NIH Publication No. 91-3242, U.S. Department of Health and Human Services, 1991) の定義に従って決定した。クローンK5-107 VHのCDR1～3のアミノ酸配列は、それぞれ順に、配列番号４６～４８に示す。

図３６は、クローンK5-107 L鎖可変領域（VL）のcDNA塩基配列（配列番号４９）と推定アミノ酸配列（配列番号５０）を示す図である。シグナルペプチドはイタリックで表している。二重下線を引いたアスパラギン酸（D）は、成熟ペプチドのN末端アミノ酸残基を示す。CDR配列（下線;_*RASQNIGTSIH, YASESIS, QQSNSWPFT*）は、Kabatら(Sequences of Proteins of Immunological Interests, Fifth edition, NIH Publication No. 91-3242, U.S. Department of Health and Human Services, 1991) の定義に従って決定した。クローンK5-107 VLのCDR1～3のアミノ酸配列は、それぞれ順に、配列番５１０～５３に示す。

図３７は、クローンK5-116-2-1 H鎖可変領域（VH）のcDNA塩基配列（配列番号５４）と推定アミノ酸配列（配列番号５５）を示す図である。シグナルペプチドはイタリックで表している。二重下線を引いたグルタミン（Q）は、成熟ペプチドのN末端アミノ酸残基を示す。CDR配列（下線; *SYWIT, NIYPSDSYTNYNQKFRD, LFDY*）は、Kabatら(Sequences of Proteins of Immunological Interests, Fifth edition, NIH Publication No. 91-3242, U.S.

Department of Health and Human Services, 1991) の定義に従って決定した。クローンK5-116-2-1 VHのCDR1～3のアミノ酸配列は、それぞれ順に、配列番号５６～５８に示す。

図３８は、クローンK5-116-2-1 L鎖可変領域（VL）のcDNA塩基配列（配列番号５９）と推定アミノ酸配列（配列番号６０）を示す図である。シグナルペプチドはイタリックで表している。二重下線を引いたアスパラギン酸（D）は、成熟ペプチドのN末端アミノ酸残基を示す。CDR配列（下線;_*RASQSIGTSIH, YASESIS, QQSNSWPFT*）は、Kabatら(Sequences of Proteins of Immunological Interests, Fifth edition, NIH Publication No. 91-3242, U.S. Department of Health and Human Services, 1991) の定義に従って決定した。クローンK5-116-2-1 VLのCDR1～3のアミノ酸配列は、それぞれ順に、配列番号６１～６３に示す。

図３９は、クローンT6-16 H鎖可変領域（VH）のcDNA塩基配列（配列番号６４）と推定アミノ酸配列（配列番号６５）を示す図である。シグナルペプチドはイタリックで表している。二重下線を引いたグルタミン酸（E）は、成熟ペプチドのN末端アミノ酸残基を示す。CDR配列（下線；*DYNMH, YIYPYNGGTGYNQRFKS, EDYGSSPSYAMDY*）は、Kabatら(Sequences of Proteins of Immunological Interests, Fifth edition, NIH Publication No. 91-3242, U.S. Department of Health and Human Services, 1991) の定義に従って決定した。クローンT6-16 VHのCDR1～3のアミノ酸配列は、それぞれ順に、配列番号６６～６８に示す。

図４０は、クローンT6-16 L鎖可変領域（VL）のcDNA塩基配列（配列番号６９）と推定アミノ酸配列（配列番号７０）を示す図である。シグナルペプチドはイタリックで表している。二重下線を引いたアスパラギン酸（D）は、成熟ペプチドのN末端アミノ酸残基を示す。CDR配列（下線;_*RSSQSLVHGNGNTYLH, KVSNRFS, SQTTHVPT*）は、Kabatら(Sequences of Proteins of Immunological Interests, Fifth edition, NIH Publication No. 91-3242, U.S. Department of Health and Human Services, 1991) の定義に従って決定した。クローンT6-16 VLのCDR1～3のアミノ酸配列は、それぞれ順に、配列番号７１

～７３に示す。

発明を実施するための形態

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

なお、本明細書は、本願優先権主張の基礎となる特願2010-113302号明細書（2010年5月17日出願）の全体を包含する。また、本明細書において引用された全ての刊行物、例えば先行技術文献、及び公開公報、特許公報その他の特許文献は、参照として本明細書に組み込まれる。

１．本発明の概要

ヒトTROP-2（hTROP-2）は、前述したように、全長323アミノ酸残基からなる１回膜貫通型の１型膜タンパク質である。そして、hTROP-2遺伝子及びその遺伝子産物は、種々の癌細胞において発現していることが知られている。

前述したように、*in vivo* において高い抗腫瘍活性を有する抗ヒト hTROP-2 抗体（抗ヒト hTROP-2 モノクローナル抗体）などの開発が望まれていた状況の下、本発明者は、極めて多数のクローンからスクリーニングを行うことにより、*in vivo* で高い抗腫瘍活性を有するクローンを取得することに成功した。具体的には、本発明は、*in vivo* において hTROP-2 の細胞外領域を特異的に認識するモノクローナル抗体、特にピコモルオーダー（pM）の高い親和性を示すモノクローナル抗体を提供するものである。本発明の抗体は、裸抗体の単独投与で、既存の抗 hTROP-2 抗体と比較して、より少ない用量（例えば 1/20 投与量）で顕著な腫瘍成長阻害活性を有し、かつ複数のヒト癌細胞を用いた担癌マウス治療モデルにおいて顕著な腫瘍成長阻害活性を示す、抗 hTROP-2 モノクローナル抗体である点で、極めて有用なものである。

２．抗hTROP-2抗体の作製

（１）抗原の調製

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

抗原としては、hTROP-2のアミノ酸配列の少なくとも一部（全部又は一部）を含むポリペプチド又はペプチド（単にペプチドともいう）を使用することができ、好ましくは、hTROP-2の細胞外領域のアミノ酸配列の少なくとも一部（全部又は一部）を含むペプチドを使用することができる。hTROP-2の細胞外領域（シグナルペプチドを含む）は、配列番号２で示されるアミノ酸配列のうちの第1番目～第274番目のアミノ酸を含む領域（シグナルペプチド：第1番目～第26番目のアミノ酸）のことを言う。ここで、抗原に用いるペプチドにつき、上記「アミノ酸配列の少なくとも一部」とは、長さが特に限定されるわけではないが、例えば、配列番号２で示されるアミノ酸配列のうちの第1番目～第145番目のアミノ酸を含む領域や、当該アミノ酸配列のうちの第146番目～第274番目のアミノ酸を含む領域などが好ましい。

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

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

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

質転換体を得る（Sambrook J. et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001）。

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

（2）ポリクローナル抗体の作製

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

抗原の動物一匹あたりの投与量は、アジュバントの有無により適宜設定することができる。アジュバントとしては、フロイント完全アジュバント(FCA)、フロイント不完全アジュバント(FIA)、水酸化アルミニウムアジュバント等が挙げられる。免疫は、主として静脈内、足蹠、皮下、腹腔内等に注入することにより行うことができる。また、免疫の間隔については、特に限定されず、数日から数週間間隔、好ましくは１週間間隔で、１～10回、好ましくは２～３回免疫を行う。そして、最終の免疫日から３～７日後に、酵素免疫測定法（ELISA又はEIA）や放射性免疫測定法（RIA）等で抗体価を測定し、所望の抗体価を示した日に採血して、抗血清を得ることができる。上記抗体の採取方法において、抗体の精製が必要とされる場合は、硫安塩析法、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等の公知の方法を適宜選択して、又はこれらを組み合わせることにより、精製することができる。その後は、抗血清中のポリクローナル抗体の反応性をELISA法などで測定する。

（3）モノクローナル抗体の作製

(3-1) 抗体産生細胞の採取

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

調製した抗原を、免疫のため哺乳動物、例えばラット、マウス及びウサギなどに投与する。抗原の動物一匹あたりの投与量は、アジュバントの有無により適宜設定することができる。アジュバントとしては上記と同様である。免疫手法も前記と同様である。そして、最終の免疫日から１～60日後、好ましくは１～14日後に、抗体産生細胞を採取する。抗体産生細胞としては、脾臓細胞、リンパ節細胞及び末梢血細胞などが挙げられるが、なかでもリンパ節細胞及び脾臓細胞が好ましい。

(3-2) 細胞融合

ハイブリドーマ（抗体産生細胞株）を得るため、抗体産生細胞とミエローマ細胞との細胞融合を行う。抗体産生細胞と融合させるミエローマ細胞として、マウスなどの動物の一般に入手可能な株化細胞を用いることができる。用いる細胞株としては、薬剤選択性を有し、未融合の状態ではHAT選択培地（ヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジンを含む）で生存できず、抗体産生細胞と融合した状態でのみ生存できる性質を有するものが好ましい。

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

次いで、ミエローマ細胞と抗体産生細胞とを細胞融合させる。細胞融合は、血清を含まないDMEM及びRPMI-1640培地などの動物細胞用培地中で、1×10^6～1×10^7個／mLの抗体産生細胞と2×10^5～2×10^6個／mLのミエローマ細胞とを混合する。抗体産生細胞とミエローマ細胞との細胞比（抗体産生細胞：ミエローマ細胞）は、限定はされないが、通常、１：１～１０：１とすることが好ましく、より好ましくは３：１である。次に、細胞融合促進剤の存在下で融合反応を行う。細胞融合促進剤として、例えば、平均分子量1,000～6,000ダルトン(D)のポリエチレングリコールなどを使用することができる。また、電気刺激（例えばエレクトロポレーション）を利用した市販の細胞融合装置を用いて、抗体産生細胞とミエローマ細胞とを融合させることもできる。

(3-3) ハイブリドーマの選別及びクローニング

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

次に、増殖してきたハイブリドーマの培養上清中に、hTROP-2に反応する抗体が存在するか否かをスクリーニングする。ハイブリドーマのスクリーニングは、通常の方法に従えばよく、特に限定はされない。例えば、ハイブリドーマとして

生育したウェルに含まれる培養上清の一部を採取し、ELISA、EIA及びRIAなどによってスクリーニングすることができる。

融合細胞のクローニングは、限界希釈法等により行うことができる。hTROP-2に強い反応性を示す抗体をフローサイトメトリー等により判定し、これを産生するハイブリドーマを選択し、クローンとして樹立する。

(3-4) モノクローナル抗体の採取

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

細胞培養法においては、ハイブリドーマを10%ウシ胎児血清含有RPMI-1640培地、MEM培地又は無血清培地等の動物細胞培養培地中で、通常の培養条件（例えば37℃、５％CO_2濃度）で７～14日間培養し、その培養上清から抗体を取得することができる。

腹水形成法の場合は、ミエローマ細胞由来の哺乳動物と同種系動物の腹腔内にハイブリドーマを約１x10^7個投与し、ハイブリドーマを大量に増殖させる。そして、２～３週間後に腹水を採取することが好ましい。

上記抗体の採取方法において、抗体の精製が必要とされる場合は、硫安塩析法、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過、アフィニティークロマトグラフィー等の公知の方法を適宜選択して、又はこれらを組み合わせることにより精製することができる。

(3-5) 抗腫瘍活性を有するクローンの選別

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

ここで、「抗腫瘍活性」とは、腫瘍細胞（癌細胞）を死滅させる活性又は腫瘍成長を阻害する活性を意味する。抗腫瘍活性としては、例えば、癌細胞の増殖阻害活性や腫瘍血管新生阻害活性が好ましく挙げられる。また、本発明の抗体が抗腫瘍活性を発揮しうるヒト腫瘍（腫瘍細胞）の種類としては、hTROP-2の発現が確認されている公知の各種ヒト腫瘍が挙げられ、特に限定はされないが、例え

ば、ヒト膵癌、ヒト前立腺癌、ヒト大腸癌及びヒト乳癌のうちの１種又は２種以上が好ましく挙げられ、より好ましくはヒト膵癌である。さらに、上記腫瘍の種類としては、再発癌や転移癌であってもよく、本発明の抗体はこれらに腫瘍に対しても優れた抗腫瘍活性を発揮し得る。

*in vivo*での抗腫瘍活性の確認は、例えば、所望の腫瘍細胞をマウスの皮下に移植した担癌マウス（担癌動物治療モデル）を用い、このマウスに前記のとおり得られた抗体を投与することにより行うことができる。この場合、抗体の投与は、腫瘍細胞の移植直後から行ってもよいし（Preventionモデル）、移植に腫瘍が所定の体積になったのを確認してから行ってもよい（Treatmentモデル）。投与方法は、限定はされないが、例えば、3日、1週間,10日又は2週間に1回あるいは単回（1回のみ）で、5～20mg/kg体重、腹腔内投与等とすることができる。Preventionモデルの場合は、腫瘍形成頻度と腫瘍体積により抗腫瘍活性の有無及びレベルを評価することができる。Treatmentモデルの場合は、腫瘍体積により抗腫瘍活性の有無及びレベルを評価することができる。

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

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

同様に、本発明の抗hTROP-2抗体の他の態様としては、例えば、Ｈ鎖Ｖ領域

のCDR1～3のアミノ酸配列が、それぞれ順に、配列番号５６～５８で示されるアミノ酸配列であり、及び／又は、Ｌ鎖Ｖ領域のCDR1～3のアミノ酸配列が、それぞれ順に、配列番号６１～６３で示されるアミノ酸配列であるものが、好ましく挙げられる。当該Ｈ鎖Ｖ領域としては、例えば、配列番号５５で示されるアミノ酸配列からなるものが好ましく、当該Ｌ鎖Ｖ領域としては、例えば、配列番号６０で示されるアミノ酸配列からなるものが好ましい。

同様に、本発明の抗hTROP-2抗体の他の態様としては、例えば、Ｈ鎖Ｖ領域のCDR1～3のアミノ酸配列が、それぞれ順に、配列番号６６～６８で示されるアミノ酸配列であり、及び／又は、Ｌ鎖Ｖ領域のCDR1～3のアミノ酸配列が、それぞれ順に、配列番号７１～７３で示されるアミノ酸配列であるものが、好ましく挙げられる。当該Ｈ鎖Ｖ領域としては、例えば、配列番号６５で示されるアミノ酸配列からなるものが好ましく、当該Ｌ鎖Ｖ領域としては、例えば、配列番号７０で示されるアミノ酸配列からなるものが好ましい。

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

ここで、受領番号が FERM BP-11251 であるハイブリドーマは、「Mouse-Mouse Hybridoma K5-70」と称し 2010 年 5 月 12 日付で、受領番号が FERM BP-11252 であるハイブリドーマは、「Mouse-Mouse Hybridoma K5-107」と称し 2010 年 5 月 12 日付で、受領番号が FERM BP-11253 であるハイブリドーマは、「Mouse-Mouse Hybridoma K5-116-2-1」と称し 2010 年 5 月 12 日付で、受領番号が FERM BP-11346 であるハイブリドーマは、「Mouse-Mouse

Hybridoma T6-16」と称し 2011 年 3 月 1 日付で、受領番号が FERM BP-11254 であるハイブリドーマは、「Mouse-Mouse Hybridoma T5-86」と称し 2010 年 5 月 12 日付で、いずれも独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（〒305-8566 茨城県つくば市東 1-1-1 中央第 6）に寄託されたものである。

さらに、本発明の抗hTROP-2抗体としては、例えば、受領番号がFERM BP-11251、FERM BP-11252、FERM BP-11253、FERM BP-11346又はFERM BP-11254であるハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体が結合（認識）する部位（例えばエピトープ）に結合する抗hTROP-2抗体も好ましく挙げられる。エピトープとしては、下記(3-6)項において例示するものが好ましく挙げられる。

(3-6) 抗hTROP-2抗体のエピトープ

本発明の抗hTROP-2抗体のエピトープ（抗原決定基）は、抗原であるhTROP-2の少なくとも一部であればよく限定はされないが、例えば、配列番号２に示されるhTROP-2のアミノ酸配列中の、第252番目～第260番目のアミノ酸からなる領域とを除く領域の少なくとも一部であることが好ましく、より好ましくは、第1番目～第69番目のアミノ酸からなる領域の少なくとも一部又は第100番目～第274番目のアミノ酸からなる領域（第252番目～第260番目のアミノ酸からなる領域を除く）の少なくとも一部であり、さらに好ましくは第27番目～第69番目のアミノ酸からなる領域の少なくとも一部又は第109番目～第206番目のアミノ酸からなる領域の少なくとも一部である。上記エピトープとして、特に好ましくは、配列番号２に示されるhTROP-2のアミノ酸配列中の、第43番目～第65番目のアミノ酸からなる領域、第152番目～第165番目のアミノ酸からなる領域、第171番目～第183番目のアミノ酸からなる領域、第109番目～第120番目のアミノ酸からなる領域、第193番目～第206番目のアミノ酸からなる領域、及び第43番目～第56番目のアミノ酸からなる領域、並びにこれらを含む部分であり、中でも特に好ましいのは、第43番目～第65番目のアミノ酸からなる領域、第152番目～第165番目のアミノ酸からなる領域、第171番目～第183番目のアミノ酸からなる領域、及び第109番目～第120番目のアミノ酸からなる領域、並びにこれ

らを含む部分である。当該領域を認識する（当該領域又はそれを含む部分と結合する）抗hTROP-2抗体は、例えば、腫瘍細胞内へのインターナリゼーション活性が高く、後述するイムノコンジュゲート等の用途に極めて有用なものである。

(3-7) 抗hTROP-2抗体の特性

本発明の抗hTROP-2抗体は、前述の通り、低用量で高いin vivo抗腫瘍活性を有する抗体である。具体的には、担癌動物モデルに対して、20mg/kg体重以下（好ましくは10mg/kg体重以下、より好ましくは5mg/kg体重以下、さらに好ましくは1mg/kg体重以下）の投与量（裸抗体）で50％以上（好ましくは80％以上、より好ましくは90％以上、さらに好ましくは95％以上、特に好ましくはほぼ100％（例えば98％以上又は99％以上））の腫瘍成長阻害活性を示すものであることが好ましい。

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

腫瘍成長阻害活性（％）＝ 100－〔（抗体投与群の腫瘍体積又は腫瘍重量）÷（対照群の腫瘍体積又は腫瘍重量）〕×100

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

さらに、本発明の抗hTROP-2抗体は、解離定数（Kd値）が1.0×10^{-10} M以下で

あることが好ましく、より好ましくは1.0×10^{-11} M以下であり、さらに好ましくは1.0×10^{-12} M以下である。ここで、抗体の結合能（親和性）は、例えば、スキャッチャード解析やBiacoreと呼ばれる表面プラズモン共鳴センサーにより、解離定数(Kd値)、解離速度定数(Kdiss [1/Sec])、結合速度定数(Kass [1/M.Sec])として測定することができる。Biacore装置としては、例えばBiacore 3000、Biacore 2000、Biacore X、Biacore J、Biacore Q（いずれもBiacore社）などが挙げられる。抗体は、解離定数（Kd値）が小さい値であるほど結合能（親和性）が高いという点で好ましい。Kd値は、Kdiss及びKassの２つのパラメーターにより決定され、例えば、式：Kd[M]＝Kdiss/Kass により表すことができる。なお、Kd値の算出方法については、後述する実施例（具体的には実施例10）に記載の方法も好ましく採用することができる。

（4）遺伝子組換え抗体、及び抗体断片

(4-1) 遺伝子組換え抗体

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

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

ヒト型化抗体を作製する場合は、マウス抗体の可変領域から相補性決定領域（CDR）をヒト可変領域に移植して、フレームワーク領域（FR）はヒト由来のものでCDRはマウス由来のものからなる、再構成した可変領域を作製する（いわゆるCDRグラフティング（CDR移植））。次に、これらのヒト型化された再構成ヒト可変領域をヒト定常領域に連結する。このようなヒト型化抗体の作製法は、当分野において周知である（Nature, 321, 522-525 (1986)；J. Mol. Biol., 196, 901-917 (1987)；Queen C et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 10029-10033 (1989)；特表平4-502408号公報（特許第2828340号公報；クイーンら）等を参照）。

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

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

(4-2) 抗体断片

本発明の抗hTROP-2抗体の断片（部分断片）も、本発明の抗体に含まれるものとする。ここで、本発明の抗体断片は、本発明の抗hTROP-2抗体と同様に、

hTROP-2に対する結合活性を有するもの（すなわちhTROP-2に結合し得るもの）であって *in vivo*で抗腫瘍活性を有するものである。

当該抗体の断片としては、抗hTROP-2ポリクローナル抗体又は抗hTROP-2モノクローナル抗体の一部分の領域（すなわち、本発明の抗hTROP-2抗体に由来する抗体断片）を意味し、例えば、Fab、Fab'、$F(ab')_2$、Fv（variable fragment of antibody）、一本鎖抗体（H鎖、L鎖、H鎖V領域、及びL鎖V領域等）、scFv、diabody（scFv二量体）、dsFv（ジスルフィド安定化V領域）、並びに、相補性決定領域（complementarity determining region：CDR）を少なくとも一部に含むペプチド等が挙げられる。

Fabは、抗体分子をタンパク質分解酵素パパインで処理して得られる断片のうち、H鎖のN末端側約半分とL鎖全体とがジスルフィド結合で結合した、分子量約5万の抗原結合活性を有する抗体断片である。また、抗体のFabをコードするDNAを、原核生物用発現ベクター又は真核生物用発現ベクターに挿入し、該ベクターを原核生物又は真核生物へ導入することにより発現させ、Fabを製造することもできる。

$F(ab')_2$は、抗体分子をタンパク質分解酵素ペプシンで処理して得られる断片のうち、Fabがヒンジ領域のジスルフィド結合を介して結合されたものよりやや大きい、分子量約10万の抗原結合活性を有する抗体断片である。また、後述するFabをチオエーテル結合あるいはジスルフィド結合させて、作製することもできる。

Fab'は、上記$F(ab')_2$のヒンジ領域のジスルフィド結合を切断した、分子量約5万の抗原結合活性を有する抗体断片である。また、抗体のFab'断片をコードするDNAを、原核生物用発現ベクター又は真核生物用発現ベクターに挿入し、該ベクターを原核生物又は真核生物へ導入することにより発現させ、Fab'を製造することもできる。

scFvは、１本のH鎖V領域（VH）と１本のL鎖V領域（VL）とを適当なペプチドリンカー（P）を用いて連結した、VH-P-VLないしはVL-P-VHポリペプチドで、抗原結合活性を有する抗体断片である。scFvは、抗体のVHおよびVLをコードするcDNAを取得し、scFvをコードするDNAを構築して、該DNAを原核生

物用発現ベクター又は真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物又は真核生物へ導入することにより発現させて、製造することができる。

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

dsFvは、VHおよびVL中のそれぞれ１アミノ酸残基をシステイン残基に置換したポリペプチドを、該システイン残基間のジスルフィド結合を介して結合させたものをいう。システイン残基に置換するアミノ酸残基は、Reiterらにより示された方法（Protein Engineering, 7, 697-704, 1994）に従って、抗体の立体構造予測に基づいて選択することができる。dsFvは、抗体のVHおよびVLをコードするcDNAを取得し、dsFvをコードするDNAを構築して、該DNAを原核生物用発現ベクター又は真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物又は真核生物へ導入することにより発現させて、製造することができる。

CDRを含むペプチドは、VHのCDR（CDR1～3）及びVLのCDR（CDR1～3）の中の少なくとも１領域以上を含んで構成され、VHのCDRをすべて含むもの、及びVLのCDRをすべて含むものがより好ましく、VH及びVLのCDR（計6領域）をすべて含むものが特に好ましい。CDRのアミノ酸配列としては、例えば、前述した配列番号３６～３８、４１～４３、４６～４８、５１～５３、５６～５８、６１～６３、６６～６８及び７１～７３に示されるアミノ酸配列が好ましく挙げられる。複数のCDRを含むペプチドは、直接又は適当なペプチドリンカーを介して結合させることができる。CDRを含むペプチドは、抗体のVHおよびVLのCDRをコードするDNAを構築し、該DNAを原核生物用発現ベクター又は真核生物用発現ベクターに挿入して、該発現ベクターを原核生物又は真核生物へ導入することにより発現させて、製造することができる。また、CDRを含むペ

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

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

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

3．抗体－薬剤複合体の作製

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

抗腫瘍活性を有する物質としては、例えば、ドキソルビシン、カリケアマイシン、マイトマイシン C、Auristatin E、放射性同位体（RI）などが挙げられる。殺細胞活性を有する物質としては、例えば、サポリン、リシン、緑膿菌外毒素、ジフテリアトキシン、放射性同位体（RI）等が挙げられ、なかでもサポリン及び緑膿菌外毒素が好ましく用いられる。なお、抗腫瘍活性及び／又は殺細胞活性を有する RI としては、限定はされないが、例えば、^{90}Y、^{111}In、^{125}I、^{3}H、^{35}S、^{14}C、^{186}Re、^{188}Re、^{189}Re、^{177}Lu、^{67}Cu、^{212}Bi、^{213}Bi、^{211}At、^{198}Au、^{224}Ac、

^{126}I、^{133}I、^{77}Br、^{113m}In、^{95}Ru、^{97}Ru、^{103}Ru、^{105}Ru、^{107}Hg、^{203}Hg、^{94m}Tc、^{121m}Te、^{122m}Te、^{125m}Te、^{165}Tm、^{167}Tm、^{168}Tm、^{111}Ag、^{197}Pt、^{109}Pd、^{32}P、^{33}P、^{47}Sc、^{153}Sm、^{177}Lu、^{105}Rh、^{142}Pr、^{143}Pr、^{161}Tb、^{166}Ho、^{199}Au、^{57}Co、^{58}Co、^{51}Cr、^{59}Fe、^{18}F、^{75}Se、^{201}Tl、^{225}Ac、^{76}Br、^{86}Y、^{169}Yb、^{166}Dy、^{212}Pb及び^{223}Ra等が挙げられる。

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

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

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

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

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

４．医薬組成物

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

当該医薬組成物は、腫瘍の治療用及び／又は診断用の医薬組成物として有用である。特に、本発明の抗hTROP-2抗体、及び該抗体を含む抗体－薬剤複合体は、抗腫瘍活性として優れた腫瘍成長阻害活性を有するものであるため、腫瘍の治療

用に使用されることが好ましい。すなわち、本発明の抗hTROP-2抗体及び抗体－薬剤複合体は、腫瘍治療剤及び腫瘍診断剤に含まれる有効成分として有用なものである。なお、本発明において、上記腫瘍の治療には、腫瘍の成長阻害及び成長抑制の意味も含むものとし、具体的には、例えば腫瘍治療剤であれば、腫瘍の成長阻害剤及び成長抑制剤の形態も含むものとする。

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

本発明の医薬組成物の適用の対象となる疾患（腫瘍）としては、hTROP-2の発現が確認されている前述した公知の各種ヒト腫瘍が挙げられる。なかでも特に、ヒト膵癌、ヒト前立腺癌、ヒト大腸癌及びヒト乳癌のうちの１種又は２種以上が好ましく挙げられる。これらの疾患は単独であってもよく、２つ以上が併発してもよい。また、対象となる腫瘍は、再発癌や転移癌であってもよく、本発明の医薬組成物（ひいては、本発明の抗hTROP-2抗体及び／又は抗体－薬剤複合体）は、再発癌や転移癌の治療剤及び診断剤としても有効に用いることができる。

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

特に、本発明の抗hTROP-2抗体由来の抗体断片（中でも低分子のもの）を生体内に投与する場合は、上記に加えて、コロイド分散系を用いることができる。コロイド分散系は化合物（抗体断片）の生体内の安定性を高める効果や、特定の臓器、組織又は細胞へ化合物を効率的に輸送する効果が期待される。コロイド分

散系は、通常用いられるものであればよく限定はされないが、ポリエチレングリコール、高分子複合体、高分子凝集体、ナノカプセル、ミクロスフェア、ビーズ、及び水中油系の乳化剤、ミセル、混合ミセル及びリポソームを包含する脂質をベースとする分散系を挙げることができ、好ましくは、特定の臓器、組織又は細胞へ化合物を効率的に輸送する効果のある、複数のリポソーム、人工膜の小胞である（Mannino et al., Biotechniques, 1988, 6, 682; Blume and Cevc, Biochem.et Biophys. Acta, 1990, 1029, 91; Lappalainen et al., Antiviral Res., 1994, 23, 119; Chonn and Cullis, Current Op. Biotech., 1995, 6, 698）。

本発明の医薬組成物の投与量は、患者の年齢、性別、体重及び症状、治療効果、投与方法、処理時間、あるいは医薬組成物に含有される本発明の抗hTROP-2抗体及び抗体－薬剤複合体の種類などにより異なる。通常、成人一人あたり、一回につき600μgから6000mgの範囲で投与することができるが、この範囲に限定されるものではない。

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

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

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

５．腫瘍の検出方法

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

前述したように、hTROP-2は各種腫瘍細胞において特異的に発現することが確認されているため、hTROP-2、特に遊離hTROP-2（hTROP-2の細胞外領域部分）は、各種腫瘍マーカーとして利用することが可能である。なかでも、ヒト膵癌、ヒト前立腺癌、ヒト大腸癌及びヒト乳癌のマーカーとして利用することが好ましい。

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

疫測定(FIA)法、化学発光免疫測定法(Luminescence immunoassay)等が挙げられる。なかでも特に、ELISA法が、簡便かつ高感度という点で好ましい。

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

上記評価にあたり、腫瘍の状態としては１つを選択してもよいし、複数個を組み合わせて選択してもよい。腫瘍の有無の評価は、得られた検出結果に基づいて、所定の基準値を境界として腫瘍に罹患しているか否かを判断することにより行うことができる。腫瘍の悪性度は、癌がどの程度進行しているのかを示す指標となるものであり、検出結果に基づいて、病期(Stage)を分類して評価したり、あるいは早期癌や進行癌を分類して評価したりすることも可能である。例えば、検出結果を指標として早期癌又は進行癌であると評価することもできる。腫瘍の転移は、検出結果を指標として、原発巣の位置から離れた部位に新生物が出現しているか否かにより評価することができる。再発は、間欠期又は寛解の後に検出結果が再び所定の基準値を超えたか否かにより評価することができる。

６．腫瘍の検出用又は診断用キット

本発明の抗hTROP-2抗体は、腫瘍の検出用又は診断用キットの形態で提供することができる。本発明のキットは抗体を含むが、その他に、標識物質、あるいは抗体又はその標識物を固定した固相化試薬などを含めることができる。抗体の標識物質とは、酵素、放射性同位体、蛍光化合物及び化学発光化合物等によって標識されたものを意味する。本発明のキットは、上記の構成要素のほか、本発明の検出を実施するための他の試薬、例えば標識物が酵素標識物の場合は、酵素基質（発色性基質等）、酵素基質溶解液、酵素反応停止液、あるいは検体用希釈液等を含んでいてもよい。また、各種バッファー、滅菌水、各種細胞培養容器、各

種反応容器（エッペンドルフチューブ等）、ブロッキング剤（Bovine Serum Albumin (BSA), Skim milk, Goat血清等の血清成分）、洗浄剤、界面活性剤、各種プレート、アジ化ナトリウム等の防腐剤、及び実験操作マニュアル（説明書）等を含んでいてもよい。

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

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

〔実施例１〕

[hTROP-2 遺伝子のクローニング]

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

フォワード側プライマー：　5'-ttcctccgccccaccatggc-3'（配列番号３）
リバース側プライマー：　5'-ctcgagcaagctcggttcctttctc-3'（配列番号４）

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

発現ベクターの構築は、pCRII-hTROP2からhTROP-2遺伝子を含む*Eco* RI/*Xho* I断片を切り出し、pcDNA4/*myc*-His© Aベクター（Invitrogen）の*Eco*RI/*Xho* I部位に挿入して行った（pcDNA4-hTROP2-*myc*/His）。またpcDNA4-hTROP2-*myc*/HisからhTROP-2遺伝子を含む*Hind* III/*Pme* I断片を切り出し（*Hind* III切断部位は平滑末端化した）、pcDNA3.1(+)ベクター（

Invitrogen）の*Pme* I部位へ挿入することでネオマイシン耐性遺伝子を持つ発現ベクターを構築した（pcDNA3.1-hTROP2-*myc*/His）。

〔実施例２〕

[hTROP-2 遺伝子安定細胞株の構築]

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

〔実施例３〕

[hTROP-2 細胞外領域のリコンビナントタンパク質作製]

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

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

このとき、リバース側プライマーにXho Iによる制限酵素消化部位を付加した。PCR 法により増幅した DNA 断片はアガロースゲル電気泳動により展開し、QIAquick（登録商標） Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いて精製した。精製した DNA 断片は pCR Blunt ベクター（Invitrogen）にサブクローニングし（pCRB-hTROP-2 EC）、遺伝子配列を確認した。次にpCRB-hTROP-2 ECからhTROP-2の細胞外領域をコードする遺伝子断片を含む *Eco* RI/*Xho* I 断片を切り出し、pcDNA4/*myc*-His© A ベクター（Invitrogen）の *Eco* RI/*Xho* I 部位に

挿入した（pcDNA4mH-hTROP-2 EC）。さらにpcDNA4mH-hTROP-2 ECの*Bam* HI/*Eco* RI部位に*Nru* I制限酵素切断部位を作製するため、以下に示すオリゴヌクレオチドを会合させ挿入した。

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

同様にpcDNA4mH-hTROP-2 ECの*Pme* I部位にpBgl II リンカー（TAKARA）を挿入した（pcDNA4mH-NB-hTROP-2 EC）。バキュロウイルスを用いたリコンビナントタンパク質作製のため、pcDNA4mH-NB-hTROP-2 ECからhTROP-2の細胞外領域をコードする遺伝子断片を含む*Nru* I/*Bgl* II断片を切り出し、pPSC8ベクター（日本農産工業）の*Nru* I/*Bgl* II部位に挿入した（pPSC8-hTROP2 EC）。バキュロウイルスを用いたhTROP-2細胞外領域のリコンビナントタンパク質作製は日本農産工業に委託した。

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

〔実施例４〕

[ヒトEpCAM cDNAの単離と発現ベクターの構築]

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

フォワード側プライマー：　5'-tcctcgtgtcccactcccgg-3'（配列番号８）
リバース側プライマー：　5'-ctcgagtgcattgagttccctatgc-3'（配列番号９）

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

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

〔実施例５〕

[抗 hTROP-2 モノクローナル抗体の作製]

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

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

は5×10^6 細胞のPBSによる細胞懸濁液を用い、タンパク質抗原の場合は、5μgのPBS溶液を用いた。

調製したリンパ球とマウスミエローマ細胞株（P3-X63-Ag8.653）とを、３：１の割合で混合し、ポリエチレングリコール法で細胞融合を行い、HAT (ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を含むメチルセルロース培地（商品名：ClonaCell-HY Cloning Medium D; Stem Cell）で7～28日間培養し、増殖してきたハイブリドーマの単一コロニーを、１つ１つを96穴平底プレートにピックアップして、HATを含む液体選択培地を用い、5% CO_2インキュベーターで培養した。増殖してきた単一コロニー由来のハイブリドーマの培養上清を、Cell ELISA（後述）による一次スクリーニング、HuH-7-hTROP-2細胞, PK-59を用いたFACS解析で２次スクリーニングを行うことで、生細胞の細胞表面に発現しているhTROP-2タンパク質を認識する抗hTROP-2 モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを300種類樹立した。

〔実施例６〕

[Cell ELISA を用いた一次スクリーニング]

96 穴培養プレート（BD ファルコン）に、CHO-K1 細胞（hTROP-2 陰性コントロール：ヒューマンサイエンス振興事業団より購入）と CHO-K1-hTROP-2 細胞（または、HuH-7 細胞（hTROP-2 陰性コントロール：ヒューマンサイエンス振興事業団より購入）と HuH-7-hTROP-2 細胞）を 3×10^4 細胞/ウェルで交互に播種し、5% CO_2、37℃で１～２日間培養した。デカンテーションで細胞培養液を除去し、次いで、氷冷 PBS で洗浄後、4%パラホルムアルデヒド-PBS で５分間処理することにより細胞を固定し、氷冷 PBS で洗浄後 ELISA プレートとした。以後、常法に従い、ELISA 法を行った。具体的には以下のとおりである。

まず、2%スキムミルク-PBS溶液によるブロッキングを室温で30分～1時間行った。次に、ハイブリドーマ培養上清を加え、室温で１時間反応させた後、0.1% Tween20-PBS溶液で３回洗浄した。二次抗体として、ブロッキング溶液で1000倍希釈した、Horseradish peroxidase (HRP)標識抗マウスIgG (GEヘル

スケアバイオサイエンス)を加え、室温で1時間反応させた後、0.1% Tween20-PBS溶液で3回洗浄した。TMB(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine: SIGMA)基質溶液を添加して発色反応を行い、1M硫酸を加えて反応を停止させた。Microplate reader Model 550 (バイオ・ラッド)を用いて、吸光度（405nm）を測定した。陰性コントロールに対して、高い吸光度の値を示したハイブリドーマ培養上清に対応するハイブリドーマを24穴平底プレートに拡大培養を行い、FACS解析を用いた二次スクリーニング（後述）に移行した。

〔実施例7〕

[FACS 解析を用いた二次スクリーニング]

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

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

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

〔実施例8〕

[アイソタイプの同定]

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

〔実施例９〕

[TROP-2 抗体の腹水化及び抗体精製]

上記方法で作製したハイブリドーマのクローンを、予め（７日前）2,6,10,14-テトラメチルペンタデカン（プリスタン）を投与されたBALB/cヌードマウスの腹腔内に3×10^6個投与し、２週間後の腹水を採取した。さらに、この腹水から、カプリル酸沈澱、プロテインGカラム（HiTrap protein G；GEヘルスケアバイオサイエンス）、またはプロテインAカラム（HiTrap protein A；GEヘルスケアバイオサイエンス）を用いてアフィニティー精製を行うことで、各ハイブリドーマクローンが産生する抗hTROP-2モノクローナル抗体を得た。

〔実施例１０〕

[抗原親和性の測定(Kd 値の測定)]

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

具体的には、96穴培養プレート(コーニング)に、精製したリコンビナントhTROP-2タンパク質（0.1μg/mL）を添加して抗原を固相化した（室温，１時間、または4℃，一晩）。次に、PBSで３回洗浄し、2% スキムミルク（PBS溶液）を加えてブロッキングを行った（室温、１時間）。PBSで２回洗浄後、予め抗原溶液（精製hTROP-2タンパク質；50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 nM）と抗hTROP-2モノクローナル抗体の各クローン（0.5nM）とを混合し平衡化させておいた抗原－抗体複合体を、上記ELISAプレートに添加して反応させた（室温、1時間）。PBSで３回洗浄した後、ブロッキング液で希釈したHRP標識抗マウスIgG (最終濃度1μg/mL)（GEヘルスケアバイオサイエンス）と反応させた（室温、１時間）。次いで、0.1%Tween20-PBS溶液で３回洗浄した後に、TMB(3,3',5,5'-

tetramethylbenzidine: SIGMA)基質溶液を添加して発色反応を行い、１M硫酸を加えて反応を停止させた。Microplate reader Model 550 (バイオ・ラッド)を用いて、吸光度を測定した。

解離定数(Kd)の計算式は以下の通りとした。

抗原抗体反応は質量作用の法則により、

$$Ag\ (Antigen) + Ab\ (Antibody) \underset{k2}{\overset{k1}{\Leftrightarrow}} Ag\text{-}Ab\ (Antigen\text{-}Antibody\ complex) \quad \cdots\cdots (1)$$

$$Kd = k2/k1 = Agf \times Abf \,/\, Ag\text{-}Ab = Agf \times Abf \,/\, x \quad \cdots\cdots (2)$$

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

$$Abf = Abt - x \quad \cdots\cdots\cdots (3)$$

(2)式は、

$$Kd = Agf \times (Abt - x) \,/\, x \quad \cdots\cdots\cdots (4)$$

(4)式の両項に x / Kd × Abt をかけると、

$$x \,/\, Abt = Agf \times (1 - x/Abt) \times 1/Kd$$

$$x/Abt \times 1/Agf = (1 - x/Abt) \times 1/Kd \quad \cdots\cdots\cdots (5)$$

(5)式において、X＝x/Abt, Y＝x/Abt × Agf とおくと、

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

(6)式から、Kd 値を算出した。

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

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

表１

抗hTROP-2モノクローナル抗体のKd値

Clone No.	K5-70	T6-16	K5-107	K5-116-2-1	T5-86
Kd ($\times10^{-12}$ M)	6.8	4.3	4.7	26.9	84.9

〔実施例１１〕

[抗 hTROP-2 モノクローナル抗体のヒト癌細胞株との反応性]

ヒト癌細胞株（ヒト腫瘍細胞株）は、ヒューマンサイエンス振興事業団(HSRRB)、RIKEN cell bank (RIKEN), ATCC (American Type Culture Collection)、ECACC (European Collection of Cell Cultures)、DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures)より入手したものを使用した。具体的には、以下に列挙した通りである。

huH-1 (HSRRB), HUH-6 (HSRRB), HuH-7 (HSRRB), JHH-5 (HSRRB), JHH-6 (HSRRB), JHH-7(HSRRB), HLE (HSRRB), HLF (HSRRB), HepG2 (HSRRB), Alexander (HSRRB), KP-1N (HSRRB), KP-1NL (HSRRB), KP-2

(HSRRB), KP-3 (HSRRB), KP-3L (HSRRB), PK-1 (RIKEN), PANC-1 (RIKEN), MIA PaCa-2 (HSRRB), PK-59 (RIKEN), PK-45H (RIKEN), PK-45P (RIKEN), BxPC-3 (ATCC), SUIT-2 (HSRRB), TCC-PAN2 (HSRRB), SW480 (ATCC), DLD-1 (HSRRB), LoVo (HSRRB), COLO-320 (RIKEN), CACO-2 (RIKEN), CW-2 (RIKEN), HCT 116 (ATCC), HCC-56 (HSRRB), MCF-7 (HSRRB), JIMT-1 (DSMZ), HCC1143 (ATCC), A549 (HSRRB), DU145 (RIKEN), PC-3 (HSRRB)

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

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

PK-59とBxPC-3以外のヒト癌細胞株では、膵臓癌細胞株12種類のうち、KP-2, KP-3L, PK-1, PK-45H、SUIT-2、TCC-PAN2に結合し、KP-1N, KP-1NL, KP-3, PANC-1, MIA-PaCa2には結合しなかった（図５）。ヒト大腸癌細胞株では、

CACO-2, SW480, DLD-1, HCT 116に結合し、COLO-320, CW-2には結合しなかった（図６）。その他、JIMT-1, HCC1143（いずれもヒト乳癌細胞株）、PC-3, DU145 (いずれもヒト前立腺癌細胞株)と結合し、多くのヒト癌細胞株の細胞表面に内在的に発現しているhTROP-2タンパク質を認識した（図６）。

〔実施例１２〕

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

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

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

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

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

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

〔実施例１３〕

[細胞増殖阻害活性の測定]

抗 hTROP-2 モノクローナル抗体の hTROP-2 の機能阻害を調べる方法の１つとして、内在的に hTROP-2 を細胞表面に発現しているヒト癌細胞の細胞増殖に対する影響を、テトラカラーワン（生化学工業）を用いた生細胞数の測定に基づいて評価した。具体的には、PK-59 細胞を 0.5%のウシ胎児血清（BioWest 社製）を含む RPMI1640 培地に 2×10^5 細胞/mL の細胞濃度となるように細胞懸濁液を調製し、96 穴培養プレートに 100μL ずつ播種した。次いで、マウス IgG (陰性コントロール)、抗 hTROP-2 モノクローナル抗体(最終濃度 0.1, 1μg/mL)を添加し、37℃、5% CO_2 インキュベーターで 72 時間培養した。比較対照として、市販の抗 hTROP-2 モノクローナル抗体(クローン YY01, Santa Cruz)を使用した。細胞にテトラカラーワン（生化学工業）を添加し、5% CO_2 インキュベーターで 1～2 時間反応させた。反応後の 96 穴プレートを、そのままマイクロプレートリーダーを用いて波長 490nm（対照波長：655nm）の吸光度を測定した。各群 3 ウェルで実施し、Student's t 検定（Student's t-test）で有意差検定を行い、$P < 0.05$ を統計的に有意と判定した。

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

〔実施例１４〕

[スクラッチアッセイ]

抗 hTROP-2 モノクローナル抗体のヒト癌細胞の移動能をスクラッチアッセイで評価した。PK-59 細胞を 10%のウシ胎児血清を含む RPMI1640 培地に 3×10^5 cell/mL の細胞濃度となるように細胞懸濁液を調製し、96 穴培養プレートに 100μL ずつ播種した。細胞がコンフルエントに達した段階で、チップの先端で縦に線を引くようにして単層培養した細胞の一部を剥離した。抗 hTROP-2 モノクローナル抗体、および陰性コントロールとしてマウス IgG を最終濃度が 0.1、および 1μg/mL となるように培地に添加し、24 時間培養を行い、抗体添加前(Day 0)と 24 時間培養後（Day 1）の剥離した領域の写真を撮影し、細胞間距離を測定した。また、剥離領域の面積を Scion Image ソフトウェアで定量化した。各群 8 ウェルで実施し、Student's t-test で有意差検定を行い、$P < 0.05$ を統計的に有意と判定した。

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

〔実施例１５〕

[担癌マウスでの抗 hTROP-2 モノクローナル抗体の薬効評価]

Prevension モデル

hTROP-2を発現する膵癌細胞株（PK-59, BxPC-3）をトリプシン処理で剥がし、PBSで1×10^8 cells/mLの細胞懸濁液を調製し、氷上にて等量のマトリゲル（BDファーミンゲン）と混合した。６週齢の雌のヌードマウス（Balb/c, nu/nu）の右脇腹の皮下に26 Gのシリンジを用いて100μL（5×10^6 cell）注射した。癌細胞移植当日(Day 1)に、マウスを群分し、抗体の投与（1, 5, または10

mg/kg 体重、腹腔内投与）を開始した。以降は、3日に1回の間隔で同様の投与を行った。抗腫瘍活性は、腫瘍形成頻度及び腫瘍体積により評価した。腫瘍体積の計測は、以下の計算式を用いた。

腫瘍体積(mm^3) = (短径)^2 × (長径) × $\pi/6$

Treatment モデル

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

〔実施例１６〕

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

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

本発明において新たに作製した抗 hTROP-2 モノクローナル抗体(約 160 クローン)を、膵癌細胞株 PK-59 細胞の Xenograft Treatment モデルで評価した。PK-59 細胞は、膵臓癌幹細胞マーカーである EpCAM を発現し（図 11A）(Chenwei Li, et al. Cancer Res 2007; 67: (3). 1030-1037), 薬剤耐性に関わる ABC トランスポーターである P-glycoprotein/MDR1（図 11B）, ABCG2/CDw338（図 11C)を細胞表面に発現している（Chen,C.J. et al. Cell 47 (3), 381-389 (1986), Allikmets,R., et al. Hum. Mol. Genet. 5 (10), 1649-1655

(1996)。また、膵臓癌幹細胞の特徴である CD24 と CD44 共陽性の細胞画分（8.93%）（図 11D)を含み、悪性度の高いヒト膵臓癌細胞株であると推測される(Chenwei Li, et al. Cancer Res 2007; 67: (3). 1030-1037、Jane E. Visvader and Geoffrey J. Lindeman.Nat Rev Cancer. Vol.8(10):755-68, 2008)。

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

クローン K5-70 (マウス IgG2a) 投与群では、腫瘍成長速度が統計的に有意に阻害され、投与開始後 21 日目(Day 21)において、コントロール群（N=14）の腫瘍体積が 1200.8±377.3 mm^3 に対し、クローン K5-70 投与群では 748.7±162.9 mm^3（$P < 0.01$ by Student's t-test）であった（図 12A）。抗体投与開始時点での腫瘍体積を 1.0 としたときの、21 日目(Day 21)における腫瘍体積は、コントロール群が 12.5 であるのに対し、クローン K5-70 投与群では 7.8 であった（図 12A）。摘出した腫瘍重量も、コントロール群が 0.73±0.26 g であったのに対し、クローン K5-70 投与群では 0.43±0.14 g（$P < 0.01$ by Student's t-test）であり、約 60％の阻害を示した（図 12B）。

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

一方、クローン T5-86 については、投与開始後 15 日目(Day 15)において、コントロール群（N=8）の腫瘍体積が 1033.2±319.4 mm^3 に対し、クローン T5-

86 投与群（N=8）では 744.1±289.1 mm^3 であり、腫瘍体積の比較では有意差はつかなかったものの、同日における腫瘍重量の比較では、コントロール群が 0.62±0.14 g であったのに対し、クローン T5-86 投与群では 0.44±0.13 g（$P < 0.05$ by Student's t-test）であり有意な阻害が示された。

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

表２

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

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

また、クローン K5-70、クローン T6-16、クローン K5-116-2-1 について、それぞれ膵癌細胞株 PK-59 細胞の Xenograft Prevention モデルでの抗腫瘍活性を検討した。それぞれのクローンにおいて、抗体投与後全ての個体で（N=8）腫瘍成長が阻害され、クローン K5-70 投与群（10 mg/kg 体重）では、投与開始後 18 日目(Day 18)において、コントロール群（N=8）の腫瘍体積が 880.8±206.4 mm^3 に対し、62.4±80.4 mm^3（$P < 0.01$ by Student's t-test）と 92.9%の腫瘍成長阻害活性を示し、クローン T6-16 投与群（10 mg/kg 体重）では、投与開始後 28 日目(Day 28)において、コントロール群（N=8）の腫瘍体積が 992.3±250.8 mm^3 に対し、152.4±122.3 mm^3（$P < 0.01$ by Student's t-test）と 84.6%の腫瘍成長阻害活性、クローン K5-116-2-1 投与群（10 mg/kg 体重）で

は、クローン K5-116-2-1 投与群（10 mg/kg 体重）では、投与開始後 20 日目(Day20)において、コントロール群（N=8）の腫瘍体積が 1159.4±413.3 mm^3 に対し、207.7±319.2 mm^3（$P < 0.01$ by Student's t-test）と 82.1%の腫瘍成長阻害活性を示した（図 14, 表 3）。また、すべての実験において、試験期間を通じて、コントロール群と抗 hTROP-2 抗体投与群の間に、平均体重の変化に有意な差はなかった。

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

表 3

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

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

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

〔実施例１７〕

〔ヒト膵癌細胞株 BxPC-3 細胞の Xenograft モデル（Prevention モデルおよび

Treatmentモデル）における抗腫瘍活性の検討]

上記のヒト膵癌細胞株PK-59細胞のXenograft Treatmentモデルを用いた場合と同様に、ヒト膵癌細胞株BxPC-3細胞のXenograft PreventionモデルおよびXenograft Treatmentモデルでの抗腫瘍活性を、クローンK5-70について検討した。

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

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

〔実施例１８〕

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

抗hTROP-2抗体の*in vivo*における腫瘍成長阻害活性を、より詳細に検討する目的で用量依存性試験を行った。図16に示したとおり、PK-59細胞の腫瘍の成長はK5-70の投与によって用量依存的に阻害され、抗体投与後21日目(Day 21)において、コントロール群（N=7）の腫瘍体積が937.8±295.3 mm^3であったのに対し、K5-70（1 mg/kg）投与群（N=8）が493.5±305.1 mm^3と50%の阻害率を示し、K5-70（5mg/kg）投与群（N= 8）が124.7±89.0 mm^3と90%の阻害効果を示し、公知の抗TROP-2抗体AR47A6.4.2（米国特許第7420041号）と比較して、２０分の１の投与量でほぼ同等の*in vivo*における腫瘍成長阻害効果を示し、４分の１の投与量では、より高い90%の阻害効果を示すことが明らかになった。

〔実施例１９〕

[エピトープアッセイ]

ヒト／マウスキメラ TROP-2 タンパク質の作製

ヒト／マウスキメラ TROP-2 遺伝子は PCR 法を用いて作製した。ヒト TROP-2 遺伝子配列およびマウス TROP-2 遺伝子配列（Genbank accession No. NM_020047）をもとに以下に示す PCR プライマーを設計した。

ヒト／マウス TROP-2-C プライマー

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

Y607（リバース側）：5'-cgcaccacttcgtcgcagcgtaggctcagg-3'（配列番号１１）

ヒト／マウス TROP-2-A プライマー

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

Y613（リバース側）：5'-caggcacttggaagtcagcgtggagcagtc-3'（配列番号１３）

ヒト／マウス TROP-2-B プライマー

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

Y615（リバース側）：5'-cgggtcgtagaggccatcgttgtccacgag-3'（配列番号１５）

マウス／ヒト TROP-2-D プライマー

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

Y609（リバース側）：5'-gcgcaccagctcatcgcagcgcaggctttgg-3'（配列番号１７）

マウス／ヒト TROP-2-E プライマー

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

Y617（リバース側）：5'-ctgctcgtagtgcaccgcggataggaagct-3'（配列番号１９）

マウス／ヒト TROP-2-F プライマー

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

Y619（リバース側）：5'-gccctggaatagagactcgcctttaatgtc-3'（配列番号２１）

マウス TROP-2 プライマー

フォワード側： 5-ctactccaccccaccctggcg-3’ （配列番号２２）

リバース側： 5’-ctcgagcaagctaggttcgcttctc-3’ （配列番号２３）

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

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

上記キメラタンパク質を作製するための発現ベクターは、具体的には以下の方法で構築した。hmTROP-2-A キメラ遺伝子を作製するため hTROP-2 遺伝子を鋳型にして、hTROP-2 フォワード側プライマー及びヒト／マウス TROP-2-A プライマーY613 を用いて PCR を行った。同様にマウス TROP-2 遺伝子を鋳型にして、ヒト／マウス TROP-2-A プライマーY612 及びマウス TROP-2 リバース側プライマーを用いて PCR を行った。PCR により増幅した DNA 断片はアクリ

ルアミドゲルを用いて展開、目的バンドの抽出により回収した。次に抽出した 2 種類の DNA 断片を混合して鋳型とし、hTROP-2 フォワード側プライマー及びマウス TROP-2 リバース側プライマーを用いて PCR を行った。PCR 産物はアガロースゲル電気泳動により展開し、目的の DNA 断片を抽出した。抽出した DNA 断片は pCR（登録商標）-Blunt ベクター（Invitrogen）にクローニングし（pCRB-hmTROP-2-A）、遺伝子配列を確認した。動物細胞用発現ベクターは、pcDNA3.1-hTROP-2-*myc*/His から Eco RI/Xho I 消化により hTROP-2 遺伝子を除き、pCRB-hmTROP-2-A から調製した hmTROP-2-A キメラ遺伝子を含む *Eco* RI/*Xho* I 断片を挿入することで作製した（pcDNA3.1-hmTROP-2-A-*myc*/His）。その他 hmTROP-2-B（ヒト TROP-2 フォワード側プライマー、ヒト／マウス TROP-2-B プライマーY615、ヒト／マウス TROP-2-B プライマーY614 及びマウス TROP-2 リバース側プライマーを使用）、hmTROP-2-C（ヒト TROP-2 フォワード側プライマー、ヒト／マウス TROP-2-C プライマーY607 及びヒト／マウス TROP-2-C プライマーY606、マウス TROP-2 リバース側プライマーを使用）、mhTROP-2-D（マウス TROP-2 フォワード側プライマー、マウス／ヒト TROP-2-D プライマーY609 及びマウス／ヒト TROP-2-D プライマーY608、ヒト TROP-2 リバース側プライマーを使用）、mhTROP-2-E（マウス TROP-2 フォワード側プライマー、マウス／ヒト TROP-2-E プライマーY617 及びマウス／ヒト TROP-2-E プライマーY616、ヒト TROP-2 リバース側プライマーを使用）、mhTROP-2-F（マウス TROP-2 フォワード側プライマー、マウス／ヒト TROP-2-F プライマーY619 及びマウス／ヒト TROP-2-F プライマーY618、ヒト TROP-2 リバース側プライマーを使用）についても同様の方法でキメラ遺伝子を作製し、発現ベクターを構築した（pcDNA3.1-hmTROP-2-B-*myc*/His、pcDNA3.1-hmTROP-2-C-*myc*/His、pcDNA3.1-hmTROP-2-D-*myc*/His、pcDNA3.1-hmTROP-2-E-*myc*/His、pcDNA3.1-hmTROP-2-F-*myc*/His）。

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

HEK293 細胞株に上記発現ベクター pcDNA3.1-hTROP-2-*myc*/His、pcDNA3.1-hmTROP-2-C-*myc*/His 及び pcDNA3.1-mhTROP-2-D-*myc*/His をそれぞれ遺伝子導入した。抗生物質 G418（Calbiochem）による選択を行い、hTROP-2 タンパク質、hmTROP-2-C キメラタンパク質および mhTROP-2-D キメラタンパク質を恒常的に発現する HEK293 細胞株を樹立した。

膵臓癌細胞株 PK-59 を用いた Xenograft treatment モデルにおいて、薬効を示した抗 hTROP-2 モノクローナル抗体 K5-70、T5-86、K5-107、T6-4、T6-16、K5-116-2-1 について結合領域の同定を行った。まず hmTROP-2-C、mhTROP-2-D、それぞれのキメラタンパク質を恒常的に発現する HEK293 細胞を用いて、薬効を示した抗 hTROP-2 モノクローナル抗体の反応性を FACS 解析により検討した（図 18）。その結果、K5-70、K5-107、T5-86、K5-116-2-1 は hmTROP-2-C と反応したが mhTROP-2-D とは反応しなかった。一方、T6-4、T6-16 は mhTROP-2-D と反応したが hmTROP-2-C とは反応しなかった。これらのことから K5-70、K5-107、T5-84、K5-116-2-1 の結合領域は hTROP-2 の N 末端から 145 番目のアミノ酸までの領域、T6-4、T6-16 の結合領域は hTROP-2 の 146 番目のアミノ酸から 274 番目のアミノ酸までの領域に限定された（図 18）。

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

〔実施例２０〕

[免疫組織化学]

＜材料・方法＞

免疫組織染色に使用した正常および癌組織アレイは以下の通りである。

ヒト正常組織アレイ：

Human, Normal organs in duplicates (Catalog No.: AB1, Super Bio Chips)

Normal tissues more than single spots (Catalog No.: A103(VI), ISU ABXIS)

肺癌組織アレイ：

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

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

膵臓癌組織アレイ：

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

肝臓癌組織アレイ：

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

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

大腸癌組織アレイ：

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

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

大腸癌リンパ節転移、肝転移組織アレイ：

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

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

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

乳癌組織アレイ：

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

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

胃癌組織アレイ：

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

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

食道癌組織アレイ：

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

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

卵巣癌組織アレイ：

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

前立腺癌組織アレイ：

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

膀胱癌組織アレイ：

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

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

<u>免疫組織染色法</u>

ヒト正常組織および癌組織の組織アレイパラフィン切片は、脱パラフィン処理後、37℃で5分間ペプシンによるプロテアーゼ処理を行い、抗hTROP-2モノクローナル抗体を用いた免疫染色に使用した。DAB(3,3'-ジアミノベンチジン)を基質とて発色反応を行った後、対比染色としてヘマトキシリンによる核染色を行った。

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

＜結果＞

ヒト正常組織における hTROP-2 の発現

ヒト正常組織における hTROP-2 の発現パターンについて、抗 hTROP-2 モノクローナル抗体 クローン K5-63-17 を用いて解析した。ヒト正常組織組織アレイ（Catalog No.: AB1, Super Bio Chips）を脱パラフィン、親水化処理を行っ

た後、タンパク質分解酵素ペプシンによる抗原の賦活化を行い、抗 hTROP-2 モノクローナル抗体 クローン K5-63-17 で免疫染色を行った（図 20）。その結果、皮膚、食道、腎臓（皮質及び髄質）、膵臓、前立腺、膀胱、扁桃腺で染色が見られた。ほとんどの染色像は細胞膜への局在を示していたが（図 20 A, B, C, D, F, G. H）、一部細胞質にも発現が見られた（図 20. E, H）。一方、心臓、肝臓、胃、小腸、大腸、骨格筋、肺、脾臓、胸腺などでは染色されなかった（図 20. I, J）。

ヒト癌組織における hTROP-2 の発現

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

表４

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

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

膵臓癌での hTROP-2 の陽性率は 41.9%であった。このときの hTROP-2 陽性率と膵臓癌のグレード（分化度）との関係について検討した。その結果、グレードが高い、すなわち低分化膵臓癌で高頻度に発現していた（表５）。

表５

膵臓癌 hTROP2陽性スポット 26/62 (41.94%)

Grade	-	+	陽性率	
Ⅰ	8	0	0%	
Ⅰ-Ⅱ	5	0	0%	
Ⅱ	19	21	52.5%	
Ⅱ-Ⅲ	4	5	55.6%	p<0.01
total	36	26		

〔実施例２１〕

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

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

〔実施例２２〕

[ヒト大腸癌細胞株 SW480 細胞 Xenograft treatment モデルにおける抗ヒト TROP-2 モノクローナル抗体の抗腫瘍活性]

抗ヒト TROP-2 モノクローナル抗体（クローン K5-70, K5-116-2-1, T6-16）の抗腫瘍活性を、ヒト大腸癌細胞株 SW480 を用いた Xenograft treatment モデルで検討した。5×10^6 cells の SW480 細胞を 6 週齢雌の NOD-scid マウスの右脇腹皮下に移植（Day 1）し、平均の腫瘍体積が 100 mm^3 に達した段階で群分けを行い（Day 7 又は Day 10）, Day 7 又は Day 10 から 3 日に 1 回の投与間隔で、抗体の腹腔内投与を開始した。クローン K5-70 の抗腫瘍活性評価と、クローン K5-116-2-1 およびクローン T6-16 の抗腫瘍活性評価は、それぞれ独立した試験で評価した。K5-70 の抗腫瘍活性評価試験においては、癌細胞移植から 44 日目（Day 44）におけるコントロール群（マウス IgG（10 mg/kg 体重）, N=8）の腫瘍体積が 365.4±214.6 mm^3 であったのに対して、K5-70 (10 mg/kg 体重)投与群では、27.4±29.4 mm^3 (P < 0.01 by Student's t-test)と著しく腫瘍形成が阻害された（阻害率 92.5 %）（図 23A）。腫瘍重量においては、コントロール群が 0.11±0.07 g であったのに対して、K5-70 投与群では 0.005±0.007 (g) (P < 0.01 by Student's t-test)と 95.5 %の阻害率であった（図 23B）。特に、K5-70 投与群では 8 個体中 2 個体では、完全に腫瘍形成が阻害され腫瘍の確認が出来なかった。

別に行った K5-116-2-1 と T6-16 の抗腫瘍活性評価試験においては、Day 42 におけるコントロール群の腫瘍体積が 713.8±354.5 mm^3 (N=8)であったのに対して、K5-116-2-1 投与群 (10 mg/kg 体重)では、188.9±97.4 mm^3 (N=8, P < 0.01 by Student's t-test) (図 24A), T6-16 投与群(10 mg/kg 体重)では、292.8±199.7 mm^3 (N=8, P < 0.01 by Student's t-test) (図 25A)と、それぞれ 73.5 %, 59.0%の阻害率であった。腫瘍重量についても同様に、コントロール群では 0.39±0.19 g であったのに対して、K5-116-2-1 投与群、T6-16 投与群では、0.10±0.07 g (P < 0.01 by Student's t-test), 0.17±0.14 g (P < 0.05 by Student's t-test)と、それぞれ 72.2 %, 56.4 %の阻害率を示した（図 24B, 図 25B）。

〔実施例２３〕

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

次に、クローン K5-70（マウス IgG2a）の用量依存的な抗腫瘍活性を、ヒト大腸癌細胞株 SW480 を用いた Xenograft treatment モデルにおいて検討した。5×10^6 cells の SW480 細胞を 6 週齢雌の NOD-scid マウスの右脇腹皮下に移植し、移植から 10 日後（Day 10）に平均の腫瘍体積が 100 mm^3 に達した段階でコントロール群（マウス IgG 10 mg/kg 体重投与群、N=8, 104.4±17.6 mm^3），K5-70 （1 mg/kg 体重）投与群 (N=8, 104.3±16.1 mm^3), K5-70 (5mg/kg 体重)投与群（N=8, 104.6±15.9 mm^3），K5-70 (10 mg/kg 体重)投与群（N=8, 104.8±14.9 mm^3）に群分を行い、3 日に 1 回の腹腔内投与を行った。Day 42 におけるコントロール群の腫瘍体積が 713.8 ± 354.5 mm^3 であったのに対して、K5-70 投与群では用量依存的な腫瘍形成阻害活性が観察され、1 mg/kg 体重投与群では、485.0±207.3 mm^3 (阻害率 32.1%), 5 mg/kg 体重投与群では、339.5 ± 253.2 mm^3 (阻害率 52.4%), 10 mg/kg 体重投与群では、355.4±202.8 mm^3 (阻害率 50.2 %, $P < 0.05$ by Student's t-test)であった（図 26A）。同様に、Day 42 における腫瘍重量については、コントロール群が 0.39±0.19 g であったのに対して、K5-70 (1 mg/kg 体重)投与群では, 0.24±0.11 g (阻害率 37.8%), 5 mg/kg 体重投与群では、0.17±0.14 g (阻害率 55.8%, $P < 0.05$ by Student's t-test), 10 mg/kg 体重投与群では、0.20±0.13 g (阻害率 47.1 %) となり、用量依存的な抗腫瘍活性が確認された（図 26B）。

〔実施例２４〕

[ヒト大腸癌細胞株 SW480 細胞 Xenograft treatment モデルにおけるクローン K5-70 の投与間隔の検討]

さらに、クローン K5-70（マウス IgG2a）の至的投与間隔を検討するために、週に 1 回（7 日に 1 回）投与を行った際の抗腫瘍活性を、ヒト大腸癌細胞株 SW480 を用いた Xenograft treatment モデルにおいて検討した。5×10^6 cells の SW480 細胞を 6 週齢雌の NOD-scid マウスの右脇腹皮下に移植し、移植から 10 日後（Day 10）に平均の腫瘍体積が 100 mm^3 に達した段階でコントロール群

（マウス IgG 10 mg/kg 体重投与群、N=8, 104.4±17.6 mm^3），K5-70 （10 mg/kg 体重、週 1 回）投与群 (N=8, 104.3±16.1 mm^3)に群分を行い、7 日に 1 回の腹腔内投与を行った。Day 42 におけるコントロール群の腫瘍体積が 713.8 ±354.5 mm^3 であったのに対して、K5-70 週 1 回投与群では、323.3±239.9 mm^3 (阻害率 55%, $P < 0.05$ by Student's t-test) となり（図 27A）、更に、投与間隔を 10 日に 1 回、2 週間に 1 回と広げた場合においては、Day 39 におけるコントロール群の腫瘍体積が 956.9±367.8 mm^3 であったのに対して、K5-70 投与群 （10 日に 1 回投与）では、525.4±180.6 mm^3 (阻害率 45.1%, $P < 0.01$ by Student's t-test)となり、K5-70 投与群 （14 日に 1 回投与）では 459.4±217.6 mm^3 (阻害率 52.0%, $P < 0.01$ by Student's t-test)となり（図 27B）、先行技術（US 7420040, US 7420041）が膵臓癌細胞株（BxPC-3）を用いた Xenograft treatment モデルにおいて、20 mg/kg 体重の投与量で、週に 3 回投与（投与間隔 2 日間）で、阻害率 50-60%の抗腫瘍活性を示しているのに対し、K5-70 抗体は 1 回の投与量が半分の投与量（10 mg/kg 体重）、2 週間に 1 回の投与（投与間隔 12 日間）で、先行技術に匹敵する抗腫瘍活性を示し、1 回の投与量と投与間隔を考えると、少なくとも先行技術の 12 分の 1 の総投与量で顕著な抗腫瘍活性を示すことが明らかとなった。

〔実施例２５〕

[ヒト大腸癌細胞株 SW480 細胞 Xenograft treatment モデルにおけるクローン T6-16 の用量依存的な抗腫瘍活性]

次に、クローン T6-16（マウス IgG2a）の用量依存的な抗腫瘍活性を、ヒト大腸癌細胞株 SW480 を用いた Xenograft treatment モデルにおいて検討した。5×10^6 cells の SW480 細胞を 6 週齢雌の NOD-scid マウスの右脇腹皮下に移植し、移植から 10 日後（Day 10）に平均の腫瘍体積が 100 mm^3 に達した段階でコントロール群（マウス IgG 10 mg/kg 体重投与群、N=8, 105.8±9.9mm^3），T6-16 （1 mg/kg 体重）投与群 (N=8, 104.4±13.3 mm^3), T6-16 (5mg/kg 体重)投与群（N=8, 104.7±13.0 mm^3），T6-16 (10 mg/kg 体重)投与群（N=8, 104.8 ±12.4 mm^3）に群分を行い、3 日に 1 回の腹腔内投与を行った。Day 43 におけ

るコントロール群の腫瘍体積が 473.5 ± 137.0 mm^3 であったのに対して、T6-16 投与群では用量依存的な腫瘍形成阻害活性が観察され、1 mg/kg 体重投与群では、397.9±97.5 mm^3 (阻害率 16.0 %), 5 mg/kg 体重投与群では、195.9±89.7 mm^3 (阻害率 58.7 %, $P < 0.01$ by Student's t-test), 10 mg/kg 体重投与群では、190.2±56.5 mm^3 (阻害率 59.8 %, $P < 0.01$ by Student's t-test)であった（図 28A）。同様に、Day 43 における腫瘍重量については、コントロール群が 0.19±0.07 g であったのに対して、T6-16 (1 mg/kg 体重)投与群では, 0.20±0.08 g, 5 mg/kg 体重投与群では、0.08±0.04 g (阻害率 57.9 %, $P < 0.01$ by Student's t-test), 10 mg/kg 体重投与群では、0.09±0.04 g (阻害率 52.6 %, $P < 0.01$ by Student's t-test) となり、用量依存的な抗腫瘍活性が確認された（図 28B）。

〔実施例２６〕

[ヒト大腸癌細胞株 SW480 細胞 Xenograft treatment モデルにおけるクローン T6-16 の投与間隔の検討]

さらに、クローン T6-16（マウス IgG2a）の至的投与間隔を検討するために、週に 1 回（7 日に 1 回）および 10 日に 1 回の投与間隔での抗腫瘍活性を、ヒト大腸癌細胞株 SW480 を用いた Xenograft treatment モデルにおいて検討した。5×10^6 cells の SW480 細胞を 6 週齢雌の NOD-scid マウスの右脇腹皮下に移植し、移植から 10 日後（Day 10）に平均の腫瘍体積が 100 mm^3 に達した段階でコントロール群（マウス IgG 10 mg/kg 体重投与群、N=8, 105.8 ± 9.9mm^3）,T6-16 (10 mg/kg 体重、週 1 回)投与群(N=8, 105.0±11.6 mm^3), T6-16 (10 mg/kg 体重、10 日に 1 回)投与群（(N=5, 130.8±2.4 mm^3)に群分けを行い、投与を開始した。Day 43 におけるコントロール群の腫瘍体積が 473.5±137.0 mm^3 であったのに対して、T6-16（週 1 回）投与群では、243.7±65.3 mm^3 (阻害率 48.5 %, $P < 0.01$ by Student's t-test), T6-16 (10 日に 1 回)投与群では、297.8±54.4 mm^3 (阻害率 37.1%, $P < 0.05$ by Student's t-test)となり（図 29）、先行技術（US 7420040, US 7420041）が膵臓癌細胞株（BxPC-3）を用いた Xenograft treatment モデルにおいて、20 mg/kg 体重の投与量で、週に 3

回投与（投与間隔 2 日間）で、阻害率 50-60%の抗腫瘍活性を示しているのに対し、T6-16 抗体は、1 回の投与量が、先行技術の半分の用量で、10 日に 1 回の投与（投与間隔 8 日間）で、顕著な抗腫瘍活性を示すことが明らかとなり、1 回の投与量と投与間隔を考えると、少なくとも先行技術の 8 分の 1 の総投与量で顕著な抗腫瘍活性を示すことが明らかとなった。

〔実施例２７〕

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

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

〔実施例２８〕

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

消化器癌の治療において、癌の転移は臨床上の予後を左右する重要な因子であり、転移をコントロールすることは治療上重要な意味を有する。 TROP-2 を標

的とした癌治療用抗体投与により、腫瘍形成の抑制のみならず、癌細胞の他臓器への転移を抑制することが可能であれば、高い臨床上の有用性が期待されるため、癌治療抗体として望ましい特性である。

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

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

hTROP-2 を内在的に発現する膵癌細胞株（PK-59）をトリプシン処理で剥がし、PBSで 2×10^7 cells/mLの細胞懸濁液を調製した。細胞懸濁液は移植時まで氷上に保管した。6～7 週齢の雌のヌードマウス（Balb/c, nu/nu）をペントバルビタールの腹腔内投与により麻酔し、麻酔下で左側腹部を 10～15mm切開し、脾臓を腹腔外に引き出し、26 Gのシリンジを用いて 50μLの細胞懸濁液（1 x 10^6 cell）を脾臓内に注入した。細胞注入 4 分後に脾門部を 5-0silkにて結紮し、脾臓を摘出した。切開した腹膜を 5-0silkで閉創し、Wound Clips (AUTOCLIP 9mm, Becton Dickinson)を用いて閉腹した。癌細胞移植の前日に、マウスを群分し、抗hTROP-2 モノクローナル抗体(K5-70)あるいは対照抗体（精製マウスIgG）を 10 mg/kg 体重にて腹腔内投与した。また、癌細胞移植 7 日後に、同様に抗体の投与を行った。癌細胞移植から 4～6 週間後に頸椎脱臼によりマウスを

安楽死させ、肝臓を摘出し、転移巣の有無を確認した。

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

表 6

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

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

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

〔実施例２９〕

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

癌治療剤として近年、癌細胞の増殖を抑制する化学療法剤が多く開発され、一定の治療成績を上げているが、癌細胞以外の正常細胞に対する増殖抑制作用に伴う副作用と、治療中止後の癌の再発が大きな問題となっている。したがって、TROP-2 を標的とした癌治療用抗体投与により、化学療法剤による治療後の腫瘍

再発を抑制することが可能であれば、高い臨床上の有用性が期待されるため、癌治療抗体として望ましい特性である。

大腸癌の治療剤としては、5-FU, 白金製剤に加え、トポイソメラーゼ阻害効果を有する塩酸イリノテカン（トポテシン、第一三共株式会社）が近年臨床適応され、動物モデルにおいても、大腸癌をはじめとした種々のヒト腫瘍細胞を移植したマウスモデルにおける抗腫瘍効果が報告されている（Cancer Chemother Pharmacol. (1991); 28(3):192-8）。そこで、塩酸イリノテカン投与後の腫瘍再発に対する抗 hTROP-2 抗体クローン K5-70（マウス IgG2a）の再発予防効果について、ヒト大腸癌細胞株 SW480 を用いた Xenograft モデルにおいて検討した。5×10^6 cells の SW480 細胞を 8 週齢雌の NOD-scid マウスの右脇腹皮下に移植し、移植から 11 日後（Day 11）に平均の腫瘍体積が 100 mm^3 以上に達した段階で無処置群（生理食塩水投与群、N=8, 130.7±16.2 mm^3），塩酸イリノテカン（CPT-11, トポテシン、第一三共株式会社）投与群（N=16, 123.0±21.4 mm^3）に群分けを行い、塩酸イリノテカンを 40mg/kg 体重で 3 日に 1 回、合計 3 回（Day 11, 14, 17）腹腔内投与した。塩酸イリノテカンの最終投与から 3 日目(Day 20)に、無処置群の腫瘍体積は 232.1±21.1 mm^3 に達したのに対し、塩酸イリノテカン投与群は 126.6±26.6 mm^3 ($P < 0.01$ by Student's t-test)であり、明らかな腫瘍抑制効果が認められた。この段階で腫瘍サイズに基づき塩酸イリノテカン投与群を 2 群に分け、片方の群は K5-70 （10 mg/kg 体重）投与群 (N=8, Day 20 の腫瘍体積 126.0±28.0 mm^3)とし、もう片方の群はマウス IgG (10mg/kg 体重)投与群（N=8, Day 20 の腫瘍サイズ 127.2±27.0 mm^3）とし、それぞれ 3 日に 1 回の腹腔内投与と腫瘍体積の測定を行い腫瘍の再発を評価した（図 32）。マウス IgG 投与群では、塩酸イリノテカンの最終投与から 18 日目(Day 35)より腫瘍体積が 300 mm^3 を超える明らかな再発腫瘍を有する個体が複数認められ、塩酸イリノテカンの最終投与から 30 日目(Day 47)においては、8 例中 5 例で 300 mm^3 を超える腫瘍が認められた（腫瘍平均体積 401.7±172.7 mm^3）。これに対し、K5-70 投与群では顕著に腫瘍再発が抑制され、腫瘍平均体積は、180.5±142.1 mm^3, ($P < 0.05$ by Student's t-test)であった（図 32）。特に、K5-70 投与群では、Day 47 における腫瘍体積が群分け時（126.0±28.0

mm^3）よりも退縮し、100 mm^3未満となった個体が 8 例中 4 例認められた。これらの結果から、抗 hTROP-2 抗体 K5-70 は、塩酸イリノテカン投与後の腫瘍再発に対しても極めて強い抑制作用を有することが明らかとなった。

〔実施例３０〕

[CLIPS 技術を用いたエピトープマッピング]

＜材料と方法＞

ペプチド合成

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

エピトープスクリーニング ELISA

5034 種類の合成したペプチドを PEPSCAN カード（445 ペプチド/カード）へ共有結合させ、ELISA 法により合成ペプチドと抗体の結合を検証した。PEPSCAN カードはブロッキングバッファー（4%ウマ血清、5%卵白アルブミン、1% Tween を含むリン酸緩衝液）で 1 μg/mL に希釈した抗ヒト TROP-2 モノクローナル抗体（K5-70、K5-107、K5-116-2-1、T5-86、T6-16）と反応させた。洗浄後、1000 倍希釈したペルオキシダーゼ二次抗体複合体と 25℃、1 時間反応させた。洗浄後、基質溶液（2,2'-azino-di-3-ethylbenzthiazoline sulfonate(ABTS)と 2μL の 3%過酸化水素水を含む溶液）を加え、1 時間発色反応を行った。抗体結合活性は CCD カメラで撮影し、画像解析を行い定量した。

＜結果＞

薬効を示した抗ヒト TROP-2 モノクローナル抗体 K5-70、K5-107、K5-116-2-1、T5-86、T6-16 について CLIPS（Chemically Linked Peptides on

Scaffolds）技術を利用しエピトープ解析を行った。なお、以下、本実施例において「アミノ酸番号」とは、配列番号2に示されるアミノ酸配列（hTROP-2 タンパク質（323 アミノ酸残基））中のアミノ酸番号を意味する。

K5-70 抗体についての解析結果を下記表 7 に示す。その結果、33 ペプチドが K5-70 抗体と強い結合を示すことが明らかとなった。これら 33 ペプチドの中で、VCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVD（アミノ酸番号 43-65）を含む配列（表 7 中ペプチド No. 1-7, 9）、HHILIDLRHRPTAG（アミノ酸番号 152-165）を含む配列（表 7 中ペプチド No. 14, 22-25, 28, 29, 31,33）、VHYEQPTIQIELRQ（アミノ酸番号 193-206）を含む配列（表 7 中ペプチド No. 8, 10, 12, 13, 15, 18, 20, 21, 23, 26, 28, 30, 32）、DAELRRLFRER（アミノ酸番号 171-183）を含む配列（表 7 中ペプチド No. 11, 12, 14, 16, 18, 19, 21, 22, 25, 29, 31）は、繰り返し出現した。K5-70 抗体は、特に VCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVD を含む配列に強く結合した。これらの結果から、hTROP-2 タンパク質中、上記 4 種類のペプチド配列領域が K5-70 抗体のエピトープである可能性が示唆された。

表 7

ヒト TROP-2 細胞外領域に由来する CLIPS ペプチドに対する K5-70 抗体の結合

number	peptide	binding of K5-70
1	NKMTVCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVDCST	2742
2	TVCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVDCSTLTS	2604
3	TNKMTVCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVDCS	2562
4	MTVCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVDCSTLT	2402
5	KMTVCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVDCSTL	1770
6	PTNNKMTVCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVDC	1391
7	VCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVDCSTLTSK	932
8	CAAVHYEQPTIQIELRCAAVHYEQPTIQIELRC	876
9	CPTNKMTVCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVD	839
10	CVHYEQPTIQIELRQNCVHYEQPTIQIELRQNC	825
11	HSDLDAELRRLFRERCHSDLDAELRRLFRERC	725
12	RLFRERYRLHPKFVAAVHYEQPTIQIELRQ	687
13	AVHYEQPTIQIELRQ	642
14	CAGAFNHSDLDAELRRCHHILIDLRHRPTAGAC	624
15	CPKFVAAVHYEQPTIQCGLDLRVRGEPLQVERC	579
16	CHSDLDAELRRLFRERCGLDLRV	538
17	FQGRGGLDLRVRGEP	538
18	CVHYEQPTIQIELRQNCDLDAELRRLFRERYRC	524
19	CHSDLDAELRRLFRERCRGEPLQ	519
20	CTIQIELRQNTSQKAACVHYEQPTIQIELRQNC	513
21	CVHYEQPTIQIELRQNCHSDLDAELRRLFRERC	511
22	CHHILIDLRHRPTAGACHSDLDAELRRLFRERC	489
23	CHHILIDLRHRPTAGACVHYEQPTIQIELRQNC	489
24	CHHILIDLRHRPTAGACGLDLRVRGEPLQVERC	488
25	CDAELRRLFRERYRLHCDELVRTHHILIDLRHC	483
26	CVHYEQPTIQIELRQNC	483
27	CAFNHSDLDAELRRLFCVHYEQPTIQIELRQNC	478
28	CVHYEQPTIQIELRQNCHHILIDLRHRPTAGAC	473
29	CDAELRRLFRERYRLHCDELVRTHHILIDLRHC	472
30	VHYEQPTIQIELRQNCGLDLRVRGEPLQVERC	470
31	CDELVRTHHILIDLRHCDLDAELRRLFRERC	469
32	AVHYEQPTIQIELRQCAVHYEQPTIQIELRQC	468
33	CHSDLDAELRRLFRERCDELVRTHHILIDLRHC	466

K5-107 についての解析結果を下記表 8 に示す。その結果、VCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVD（アミノ酸番号 43-65）を含む配列が 20 ペプチド中 10 ペプチド（表 8 中ペプチド No. 1-6, 8, 13,14, 17）に含まれていた（表 8）。

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

表８

ヒト TROP-2 細胞外領域に由来する CLIPS ペプチドに対する

K5-107 抗体の結合

number	peptide	binding of K5-107
1	TNKMTVCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVDCS	2763
2	NKMTVCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVDCST	2761
3	KMTVCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVDCSTL	2752
4	MTVCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVDCSTLT	2726
5	CPTNKMTVCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVD	2723
6	TVCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVDCSTLTS	2720
7	TCPTNKMTVCSPDGPGGRCQCRALGSGMAV	2716
8	VCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVDCSTLTSK	2689
9	CSPDGPGGRCQCRALGSGMAVDCSTLTSKC	2655
10	CTCPTNKMTVCSPDGPGGRCQCRALGSGMA	2655
11	NCTCPTNKMTVCSPDGPGGRCQCRALGSGM	2207
12	DNCTCPTNKMTVCSPDGPGGRCQCRALGSG	1816
13	TNKMTVCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVDCS	1525
14	CTVCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVDASTLTSKC	1118
15	QDNCTCPTNKMTVCSPDGPGGRCQCRALGS	874
16	SPDGPGGRCQCRALGSGMAVDCSTLTSKCL	561
17	CTNKMTVCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVDASTC	380
18	TVCSPDGPGGRCQCR	312
19	CAPKNARTLVRPSEHACARTLVRPSEHALVDNC	284
20	HSDLDAELRRLFRERCHSDLDAELRRLFRERC	272

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

表 9

ヒト TROP-2 細胞外領域に由来する CLIPS ペプチドに対する

K5-116-2-1 抗体の結合

number	peptide	binding of KS-116-2-1
1	TVCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVDCSTLTS	2672
2	NKMTVCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVDCST	2613
3	TNKMTVCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVDCS	2482
4	MTVCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVDCSTLT	2440
5	KMTVCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVDCSTL	2423
6	CPTNKMTVCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVD	2136
7	PTNKMTVCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVDC	1723
8	CAGAFNHSDLDAELRRCHHILIDLRHRPTAGAC	1643
9	CTHHILIDLRHRPTAGC	1586
10	CVHYEQPTIQIELRQNCHHILIDLRHRPTAGAC	1504
11	CHHILIDLRHRPTAGCHSDLDAELRRLFRERC	1475
12	HSDLDAELRRLFRERCHSDLDAELRRLFRERC	1467
13	CDAELRRLFRERYRLHCHSDLDAELRRLFRERC	1462
14	CDAELRRLFRERYRLHCPK	1442
15	VCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVDCSTLTSK	1432
16	DLSLRCDELVRTHHILIDLRHRPTAGAFNH	1421
17	CDELVRTHHILIDLRHCDLDAELRRLFRERYRC	1392
18	CFQGRGGLDLRVRGEPC	1376
19	CDAELRRLFRERYRLHCDELVRTHHILIDLRHC	1366
20	CGLDLRVRGEPLQVERCHHILIDLRHRPTAGAC	1342
21	CHSDLDAELRRLFRERCHSDLDAELRRLFRERC	1331
22	CDELVRTHHILIDLRHCHHILIDLRHRPTAGAC	1323
23	CDAELRRLFRERYRLHCDELVRTHHILIDLRHC	1266
24	CHHILIDLRHRPTAGACRGEPLQVERTLIYYLC	1229
25	CSPDGPGGRCQCRAL	1227
26	CTVASPDGPGGRAQARACVHYEQPTIQIELRQNC	1223
27	CHHILIDLRHRPTAGACVHYEQPTIQIELRQNC	1222
28	LSLRCDELVRTHHILIDLRHRPTAGAFNHS	1220
29	CDELVRTHHILIDLRHCHSDLDAELRRLFRERC	1205

T5-86 及び T6-16 抗体についての解析結果を下記表 10 及び表 11 に示す。当該解析では、DPEGRFKARQCN（アミノ酸番号 109-120）の配列を含むペプチドと強く結合した。T5-86 抗体に対しては結合する 26 ペプチド中 22 ペプチド（表 10 中のペプチド No. 1-3, 5-8, 10-13, 15-19, 21-26）に、T6-16 抗体に対しては結合する 26 ペプチド中 4 ペプチド（表 11 中のペプチド No. 1, 2, 9, 13）に、上記ペプチド配列が含まれていた（表 10 及び表 11）。また T5-86 抗体についての解析では、DPEGRFKARQCN（アミノ酸番号 109-120）を含む配列以外にも VCSPDGPGGRCQCR（アミノ酸番号 43-56）を含む配列（表 10 中のペプチド No. 4, 14, 20）が複数回出現した。さらに、T6-16 抗体についての解析でも、他の配列として HHILIDLRHRPTAG（アミノ酸番号 152-165）を含む配列（表

11 中のペプチド No. 4-8, 10-12, 19, 21, 23, 25, 26）が複数回確認された。従って、T5-86 抗体のエピトープとしては、hTROP-2 タンパク質中、DPEGRFKARQCN（アミノ酸番号 109-120）、VCSPDGPGGRCQCR（アミノ酸番号 43-56）の 2 種類のペプチド配列領域が示唆され、T6-16 抗体のエピトープとしては、hTROP-2 タンパク質中、DPEGRFKARQCN（アミノ酸番号 109-120）、HHILIDLRHRPTAG（アミノ酸番号 152-165）の 2 種類のペプチド配列領域が示唆された。

表１０

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

number	peptide	binding of TS-86
1	CYDPDADPEGRFKARQCADPEGRFKARQANQTC	2306
2	PDCDPEGRFKARQCN	2292
3	CADPEGRFKARQANCPDADPEGRFKARQANC	2287
4	VCSPDGPGGRCQCRA	2263
5	CYDPDADPEGRFKARQCPDADPEGRFKARQANC	2260
6	CADPEGRFKARQANQTCTDPDADPEGRFKARQC	2240
7	CADPEGRFKARQANQTCYDPDADPEGRFKARQC	2208
8	DCDPEGRFKARQCNQ	2150
9	CTVASPDGPGGRAQARCHSDLDAELRRLFRERC	2086
10	CDADPEGRFKARQANQCDADPEGRFKARQANQC	2035
11	DGRFKARQANQTSVAWCARTLVRPSEHALVDNC	2019
12	DADPEGRFKARQANQTCPDADPEGRFKARQANC	1980
13	CPDADPEGRFKARQANCPDADPEGRFKARQANC	1950
14	CSPDGPGGRCQCRAL	1946
15	CEGRFKARQANQTSVACEGRFKARQANQTSVAC	1895
16	CTVASPDGPGGRAQARCPDADPEGRFKARQANC	1890
17	CGLYDPDADPEGRFKACPDADPEGRFKARQANC	1857
18	DPDCDPEGRFKARQCNCQTSVCWCVNSVGVR	1850
19	CPEGRFKARQANQTSVCDELVRHHILIDLRHC	1841
20	CPDGPGGRAQARALG5CH5DLDAELRRLFRERC	1830
21	CTLVRPSEHALVDNDGCGRFKARQANQTSVAWC	1820
22	CPDADPEGRFKARQANCYDPDADPEGRFKARQC	1795
23	CGLYDPDADPEGRFKACPEGRFKARQANQT5VC	1793
24	YDPDCDPEGRFKARQ	1775
25	CPDADPEGRFKARQANCADPEGRFKARQANQTC	1773
26	CDPEGRFKARQCNQT	1772

表１１

ヒト TROP-2 細胞外領域に由来する CLIPS ペプチドに対する

T6-16 抗体の結合

number	peptide	binding of T6-16
1	CVNSVGVRRTDKGDLSCPDCYDPDADPEGRFKARQC	1072
2	CSVGVRRTDKGDLSLRCYDPDADPEGRFKARQC	786
3	HSDLDAELRRLFRERCHSDLDAELRRLFRERC	714
4	CDELVRTHHILIDLRHCDLDAELRRLFRERYRC	713
5	CVNSVGVRRTDKGDL5LRCDELVRTHHILI	688
6	VRRTDKGDLSLRCDELVRTHHILIDLRHRP	670
7	CVERTLIYYLDEIPPKCHHILIDLRHRPTAGAC	626
8	CHHILIDLRHRPTAGACHSDLDAELRRLFRERC	620
9	CVNSVGVRRTDKGDLSCPDADPEGRFKARQANC	611
10	CVHYEQPTIQIELRQNCHHILIDLRHRPTAGAC	602
11	VGVRRTDKGDLSLRCDELVRTHHILIDLRH	601
12	CAGAFNHSDLDAELRRCHHILIDLRHRPTAGAC	592
13	CSVGVRRTDKGDLSLRCPDADPEGRFKARQANC	S85
14	CVRPSEHALVDNDGLYCSVGVRRTDKGDLSLRC	573
1S	CDAELRRLFRERYRLHCHSDLDAELRRLFRERC	S66
16	CSVGVRRTDKGDLSLRCNDGLYDPDADPEGRFC	SS9
17	CVNSVGVRRTDKGDLSCGLYDPDADPEGRFKAC	SS3
18	CDLDAELRRLFRERYRCH5DLDAELRRLFRERC	S34
19	CDELVRTHHILIDLRHCHHILIDLRHRPTAGAC	S34
20	CAGAFNH5DLDAELRRCDLDAELRRLFRERYRC	S29
21	CDAELRRLFRERYRLHCDELVRTHHILIDLRHC	527
22	CVHYEQPTIQIELRQNCDLDAELRRLFRERYRC	526
23	CHHILIDLRHRPTAGACVHYEQPTIQIELRQNC	524
24	CGVRRTDKGDLSLRADCGVRRTDKGDLSLRADC	524
25	CGLDLRVRGEPLQVERCHHILIDLRHRPTAGAC	S21
26	CDLDAELRRLFRERYRCDELVRTHHILIDLRHC	S16

〔実施例３１〕

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

3×10^6 個のマウス抗 TROP-2 モノクローナル抗体産生ハイブリドーマから、TRIzol 試薬（Invitrogen）を用いて全 RNA を抽出した。クローン K5-70, クローン K5-107, クローン K5-116-2-1 については、SMARTer™ RACE cDNA Amplification kit (Clontech)を用いて、キット添付の方法に従い、マウス IgG の H 鎖特異的プライマー (5'-TCCAKAGTT-3' (配列番号２４))と、L 鎖特異的プライマー（5'-GCTGTCCTGATC-3' (配列番号２５)）を用いて cDNA を合成した。

クローンT6-16については、GeneRacer Kit（Invitrogen）を用いて、キット添付の方法に従い、オリゴ dT プライマーを用いて cDNA を合成した。クローンK5-70 (マウス IgG2a), クローン K5-107 (マウス IgG1)、およびクローン K5-116-2-1 (マウス IgG2a)の H 鎖及び L 鎖の可変領域（VH, VL）をコードする遺伝子は、上記合成後の cDNA を鋳型として、PCR 法を用いてクローニングした。この際、5'-プライマーは SMARTer™ RACE cDNA Amplification kit に添付されている 10 × Universal Primer A Mix（UPM）を使用した。一方、3'-プライマーは、VH 増幅用 3'-プライマーとしてはマウス IgG H 鎖に特異的な配列を有するものを使用し、VL 増幅用 3'-プライマーとしてはマウス IgG L 鎖に特異的な配列を有するものを使用した。

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

Long (0.4 μM)

5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT -3'（配列番号２６）

Short (2 μM)

5'- CTAATACGACTCACTATAGGGC-3'（配列番号２７）

3'-プライマー（R プライマー）：

VH： 5'-GGGAARTARCCCTTGACCAGGCA-3'（配列番号２８）

5'-GGGAARTAGCCTTTGACAAGGCA-3'（配列番号２９）

VL： 5'-CACTGCCATCAATVTTCCACTTGACA-3'（配列番号３０）

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

＜反応液組成＞

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

＜反応条件＞

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

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

クローン T6-16 の H 鎖及び L 鎖の可変領域（VH, VL）をコードする遺伝子は、上記合成後の cDNA を鋳型として、PCR 法を用いてクローニングした。この際、この際、5'-プライマーは GeneRacer Kit に添付されているものを使用した。一方、3'-プライマーは、VH 増幅用 3'-プライマーとしてはマウス IgG H 鎖に特異的な配列を有するものを使用し、VL 増幅用 3'-プライマーとしてはマウス IgG L

鎖に特異的な配列を有するものを使用した。

5'-プライマー（F プライマー）：
5'-CGACTGGAGCACGAGGACACTGA-3'（配列番号３１）
3'-プライマー（R プライマー）：
VH: 5'- GCCAGTGGATAGACAGATGG -3'（配列番号３２）
VL: 5'- GATGGATACAGTTGGTGCAGC -3'（配列番号３３）

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

＜反応液組成＞

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

＜反応条件＞

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

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

産業上の利用可能性

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

配列表フリーテキスト

配列番号３：合成DNA

配列番号４：合成DNA

配列番号５：合成DNA

配列番号６：合成DNA

配列番号７：合成DNA

配列番号８：合成DNA

配列番号９：合成DNA

配列番号１０：合成DNA

配列番号１１：合成DNA

配列番号１２：合成DNA

配列番号１３：合成DNA

配列番号１４：合成DNA

配列番号１５：合成DNA

配列番号１６：合成DNA

配列番号１７：合成DNA

配列番号１８：合成DNA

配列番号１９：合成DNA

配列番号２０：合成DNA

配列番号２１：合成DNA

配列番号２２：合成DNA

配列番号２３：合成DNA

配列番号２４：合成DNA

配列番号２５：合成DNA

配列番号２６：合成DNA

配列番号２７：合成DNA

配列番号２８：合成DNA

配列番号２９：合成DNA

配列番号３０：合成DNA

配列番号３１：合成DNA

配列番号３２：合成DNA

配列番号３３：合成DNA

請 求 の 範 囲

1．*in vivo*で抗腫瘍活性を有する、ヒトTROP-2に対する抗体。

2．5～20mg/kg体重の投与量で50％以上の腫瘍成長阻害活性を示すものである、請求項１記載の抗体。

3．前記腫瘍成長阻害活性を示すための投与回数が多くても１週間に１回である、請求項２記載の抗体。

4．10mg/kg体重の単回投与で50％以上の腫瘍成長阻害活性を示すものである、請求項１記載の抗体。

5．2種以上のヒト腫瘍細胞株に対して抗腫瘍活性を有する、請求項１～４のいずれか１項に記載の抗体。

6．解離定数（Kd値）が1.0×10^{-10} M以下である、請求項１～５のいずれか１項に記載の抗体。

7．抗体がモノクローナル抗体である、請求項１～６のいずれか１項に記載の抗体。

8．腫瘍が、ヒト膵癌、ヒト前立腺癌、ヒト大腸癌及びヒト乳癌からなる群より選ばれる少なくとも１種である、請求項１～７のいずれか１項に記載の抗体。

9．腫瘍がヒト膵癌である、請求項１～７のいずれか１項に記載の抗体。

１０．腫瘍が再発癌又は転移癌である、請求項１～９のいずれか１項に記載の抗体。

１１．腫瘍細胞株が、ヒト膵癌細胞株PK-59、ヒト膵癌細胞株BxPC-3、ヒト膵癌細胞株KP-3L、ヒト膵癌細胞株KP-2、ヒト膵癌細胞株PK-1、ヒト膵癌細胞株PK-45H、ヒト膵癌細胞株PK-45P、ヒト膵癌細胞株TCC-PAN2、ヒト膵癌細胞株SUIT-2、ヒト大腸癌細胞株CACO-2、ヒト大腸癌細胞株SW480、ヒト大腸癌細胞株DLD-1、ヒト大腸癌細胞株HCT 116、ヒト乳癌細胞株JIMT-1、ヒト乳癌細胞株HCC1143、ヒト乳癌細胞株MCF-7、ヒト前立腺癌細胞株DU145及びヒト前立腺癌細胞株PC-3からなる群より選ばれる少なくとも2種である、請求項５～１０のいずれか１項に記載の抗体。

１２．腫瘍細胞株が、ヒト膵癌細胞株PK-59及びヒト膵癌細胞株BxPC-3である、請求項５～１０のいずれか１項に記載の抗体。

１３．抗体のＨ鎖Ｖ領域のＣＤＲ１～３のアミノ酸配列が、それぞれ順に、配列番号３６～３８で示されるアミノ酸配列であり、及び／又は、抗体のＬ鎖Ｖ領域のＣＤＲ１～３のアミノ酸配列が、それぞれ順に、配列番号４１～４３で示されるアミノ酸配列である、請求項１～１２のいずれか１項に記載の抗体。

１４．抗体のＨ鎖Ｖ領域のＣＤＲ１～３のアミノ酸配列が、それぞれ順に、配列番号４６～４８で示されるアミノ酸配列であり、及び／又は、抗体のＬ鎖Ｖ領域のＣＤＲ１～３のアミノ酸配列が、それぞれ順に、配列番号５１～５３で示されるアミノ酸配列である、請求項１～１２のいずれか１項に記載の抗体。

１５．抗体のＨ鎖Ｖ領域のＣＤＲ１～３のアミノ酸配列が、それぞれ順に、配列番号５６～５８で示されるアミノ酸配列であり、及び／又は、抗体のＬ鎖Ｖ領域のＣＤＲ１～３のアミノ酸配列が、それぞれ順に、配列番号６１～６３で示されるアミノ酸配列である、請求項１～１２のいずれか１項に記載の抗体。

１６．抗体のＨ鎖Ｖ領域のＣＤＲ１～３のアミノ酸配列が、それぞれ順に、配列番号６６～６８で示されるアミノ酸配列であり、及び／又は、抗体のＬ鎖Ｖ領域のＣＤＲ１～３のアミノ酸配列が、それぞれ順に、配列番号７１～７３で示されるアミノ酸配列である、請求項１～１２のいずれか１項に記載の抗体。

１７．抗体が遺伝子組換え抗体である、請求項１～１６のいずれか１項に記載の抗体。

１８．遺伝子組換え抗体が、キメラ抗体、ヒト型化抗体 又はヒト化抗体である、請求項１７記載の抗体。

１９．キメラ抗体は、Ｈ鎖Ｖ領域のアミノ酸配列が配列番号３５で示されるアミノ酸配列からなり、及び／又は、Ｌ鎖Ｖ領域のアミノ酸配列が配列番号４０で示されるアミノ酸配列からなるものである、請求項１８記載の抗体。

２０．キメラ抗体は、Ｈ鎖Ｖ領域のアミノ酸配列が配列番号４５で示されるアミノ酸配列からなり、及び／又は、Ｌ鎖Ｖ領域のアミノ酸配列が配列番号５０

で示されるアミノ酸配列からなるものである、請求項１８記載の抗体。

２１．キメラ抗体は、Ｈ鎖Ｖ領域のアミノ酸配列が配列番号５５で示されるアミノ酸配列からなり、及び／又は、Ｌ鎖Ｖ領域のアミノ酸配列が配列番号６０で示されるアミノ酸配列からなるものである、請求項１８記載の抗体。

２２．キメラ抗体は、Ｈ鎖Ｖ領域のアミノ酸配列が配列番号６５で示されるアミノ酸配列からなり、及び／又は、Ｌ鎖Ｖ領域のアミノ酸配列が配列番号７０で示されるアミノ酸配列からなるものである、請求項１８記載の抗体。

２３．受領番号がFERM BP-11251であるハイブリドーマにより産生される、ヒトTROP-2に対するモノクローナル抗体。

２４．受領番号がFERM BP-11252であるハイブリドーマにより産生される、ヒトTROP-2に対するモノクローナル抗体。

２５．受領番号がFERM BP-11253であるハイブリドーマにより産生される、ヒトTROP-2に対するモノクローナル抗体。

２６．受領番号がFERM BP-11346であるハイブリドーマにより産生される、ヒトTROP-2に対するモノクローナル抗体。

２７．受領番号がFERM BP-11254であるハイブリドーマにより産生される、ヒトTROP-2に対するモノクローナル抗体。

２８．受領番号がFERM BP-11251、FERM BP-11252、FERM BP-11253、FERM BP-11346又はFERM BP-11254であるハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体が結合する部位に結合する、請求項１～２２のいずれか１項に記載の抗体。

２９．配列番号２に示されるヒトTROP-2のアミノ酸配列中の、第４３番目～第６５番目のアミノ酸からなる領域、第１５２番目～第１６５番目のアミノ酸からなる領域、第１７１番目～第１８３番目のアミノ酸からなる領域、第１０９番目～第１２０番目のアミノ酸からなる領域、第４３番目～第５６番目のアミノ酸からなる領域、及び第１９３番目～第２０６番目のアミノ酸からなる領域からなる群より選択される少なくとも１種の領域を含む部分と結合するものである、請求項１～２２のいずれか１項に記載の抗体。

３０．配列番号２に示されるヒトTROP-2のアミノ酸配列中の、第４３番目～第

６５番目のアミノ酸からなる領域を含む部分と結合するものである、請求項１～２２のいずれか１項に記載の抗体。

３１．配列番号２に示されるヒトTROP-2のアミノ酸配列中の、第１５２番目～第１６５番目のアミノ酸からなる領域を含む部分と結合するものである、請求項１～２２のいずれか１項に記載の抗体。

３２．配列番号２に示されるヒトTROP-2のアミノ酸配列中の、第１７１番目～第１８３番目のアミノ酸からなる領域を含む部分と結合するものである、請求項１～２２のいずれか１項に記載の抗体。

３３．配列番号２に示されるヒトTROP-2のアミノ酸配列中の、第１０９番目～第１２０番目のアミノ酸からなる領域を含む部分と結合するものである、請求項１～２２のいずれか１項に記載の抗体。

３４．請求項１～３３のいずれか１項に記載の抗体に由来する抗体断片。

３５．配列番号３６～３８で示されるアミノ酸配列、及び／又は、配列番号４１～４３で示されるアミノ酸配列を含むものである、請求項３４記載の抗体断片。

３６．配列番号３５で示されるアミノ酸配列、及び／又は、配列番号４０で示されるアミノ酸配列を含むものである、請求項３５記載の抗体断片。

３７．配列番号４６～４８で示されるアミノ酸配列、及び／又は、配列番号５１～５３で示されるアミノ酸配列を含むものである、請求項３４記載の抗体断片。

３８．配列番号４５で示されるアミノ酸配列、及び／又は、配列番号５０で示されるアミノ酸配列を含むものである、請求項３７記載の抗体断片。

３９．配列番号５６～５８で示されるアミノ酸配列、及び／又は、配列番号６１～６３で示されるアミノ酸配列を含むものである、請求項３４記載の抗体断片。

４０．配列番号５５で示されるアミノ酸配列、及び／又は、配列番号６０で示されるアミノ酸配列を含むものである、請求項３８記載の抗体断片。

４１．配列番号６６～６８で示されるアミノ酸配列、及び／又は、配列番号７１～７３で示されるアミノ酸配列を含むものである、請求項３４記載の抗体断

片。

４２．配列番号６５で示されるアミノ酸配列、及び／又は、配列番号７０で示されるアミノ酸配列を含むものである、請求項４１記載の抗体断片。

４３．請求項１～２２及び２８～３３のいずれか１項に記載の抗体を産生するハイブリドーマ。

４４．受領番号がFERM BP-11251である、ヒトTROP-2に対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

４５．受領番号がFERM BP-11252である、ヒトTROP-2に対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

４６．受領番号がFERM BP-11253である、ヒトTROP-2に対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

４７．受領番号がFERM BP-11346である、ヒトTROP-2に対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

４８．受領番号がFERM BP-11254である、ヒトTROP-2に対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

４９．請求項１～３３のいずれか１項に記載の抗体と、抗腫瘍活性及び／又は殺細胞活性を有する物質とを含む、抗体－薬剤複合体。

５０．請求項３４～４２のいずれか１項に記載の抗体断片と、抗腫瘍活性及び／又は殺細胞活性を有する物質とを含む、抗体断片－薬剤複合体。

５１．腫瘍が、ヒト膵癌、ヒト前立腺癌、ヒト大腸癌及びヒト乳癌からなる群より選ばれる少なくとも１種である、請求項４９又は５０記載の複合体。

５２．腫瘍がヒト膵癌である、請求項４９又は５０記載の複合体。

５３．腫瘍が再発癌又は転移癌である、４９～５２のいずれか１項に記載の複合体。

５４．請求項１～３３のいずれか１項に記載の抗体、請求項３４～４２のいずれか１項に記載の抗体断片、及び請求項４９～５３のいずれか１項に記載の複合体からなる群より選ばれる少なくとも１種を含む、医薬組成物。

５５．腫瘍の治療に用いるものである、請求項５４記載の組成物。

５６．体重減少の副作用を有しないものである、請求項５５記載の組成物。

５７．腫瘍の診断に用いるものである、請求項５４記載の組成物。

５８．腫瘍が、ヒト膵癌、ヒト前立腺癌、ヒト大腸癌及びヒト乳癌からなる群より選ばれる少なくとも１種である、請求項５４～５７のいずれか１項に記載の組成物。

５９．腫瘍が再発癌又は転移癌である、請求項５５～５８のいずれか１項に記載の組成物。

６０．請求項１～３３のいずれか１項に記載の抗体、請求項３４～４２のいずれか１項に記載の抗体断片、及び請求項４９～５３のいずれか１項に記載の複合体からなる群より選ばれる少なくとも１種を含む、腫瘍治療剤。

６１．体重減少の副作用を有しないものである、請求項６０記載の治療剤。

６２．腫瘍が、ヒト膵癌、ヒト前立腺癌、ヒト大腸癌及びヒト乳癌からなる群より選ばれる少なくとも１種である、請求項６０又は６１記載の治療剤。

６３．請求項１～３３のいずれか１項に記載の抗体、請求項３４～４２のいずれか１項に記載の抗体断片、及び請求項４９～５３のいずれか１項に記載の複合体からなる群より選ばれる少なくとも１種を含む、腫瘍診断剤。

６４．腫瘍が、ヒト膵癌、ヒト前立腺癌、ヒト大腸癌及びヒト乳癌からなる群より選ばれる少なくとも１種である、請求項６３記載の診断剤。

６５．請求項１～３３のいずれか１項に記載の抗体、請求項３４～４２のいずれか１項に記載の抗体断片、及び請求項４９～５３のいずれか１項に記載の複合体からなる群より選ばれる少なくとも１種と、生体から採取された試料とを反応させ、反応した抗体及び／又は抗体断片のシグナルを検出することを特徴とする、腫瘍の検出方法。

６６．腫瘍が、ヒト膵癌、ヒト前立腺癌、ヒト大腸癌及びヒト乳癌からなる群より選ばれる少なくとも１種である、請求項６５記載の方法。

６７．請求項１～３３のいずれか１項に記載の抗体、請求項３４～４２のいずれか１項に記載の抗体断片、及び請求項４９～５３のいずれか１項に記載の複合体からなる群より選ばれる少なくとも１種を含む、腫瘍の治療用、診断用又は検出用キット。

６８．腫瘍が、ヒト膵癌、ヒト前立腺癌、ヒト大腸癌及びヒト乳癌からなる群よ

り選ばれる少なくとも１種である、請求項６７記載のキット。

図1

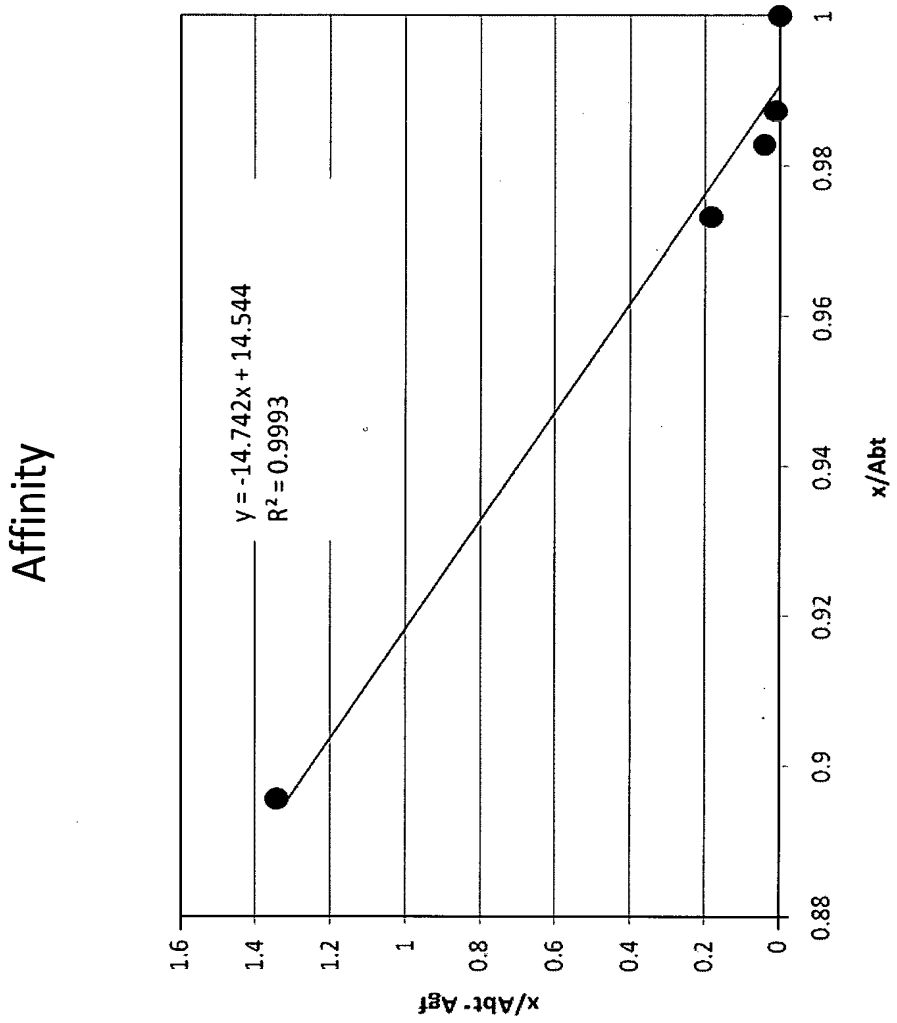

Affinity
y = -14.742x + 14.544
R² = 0.9993
x/Abt- Agf
x/Abt
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0.88
0.9
0.92
0.94
0.96
0.98
1

図2

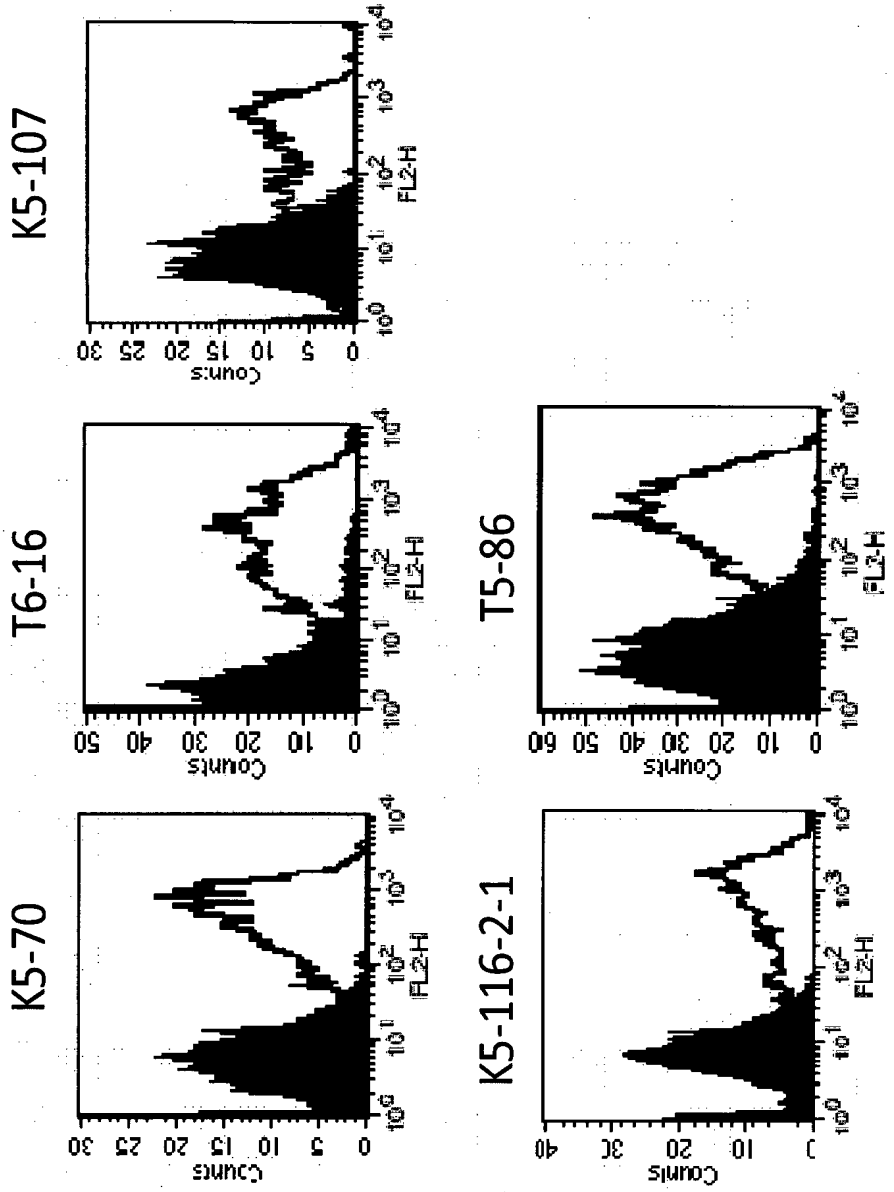


図3

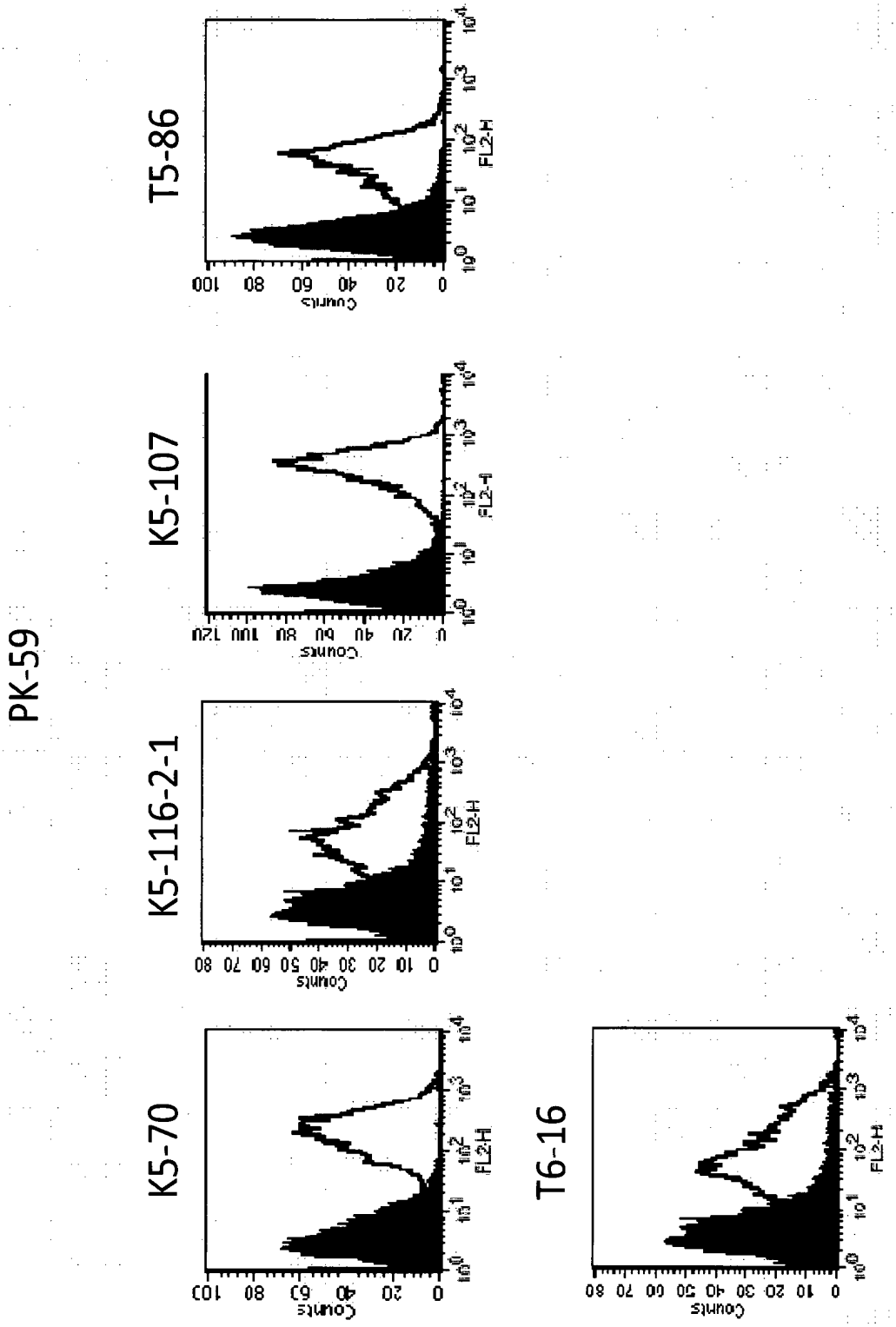


図4

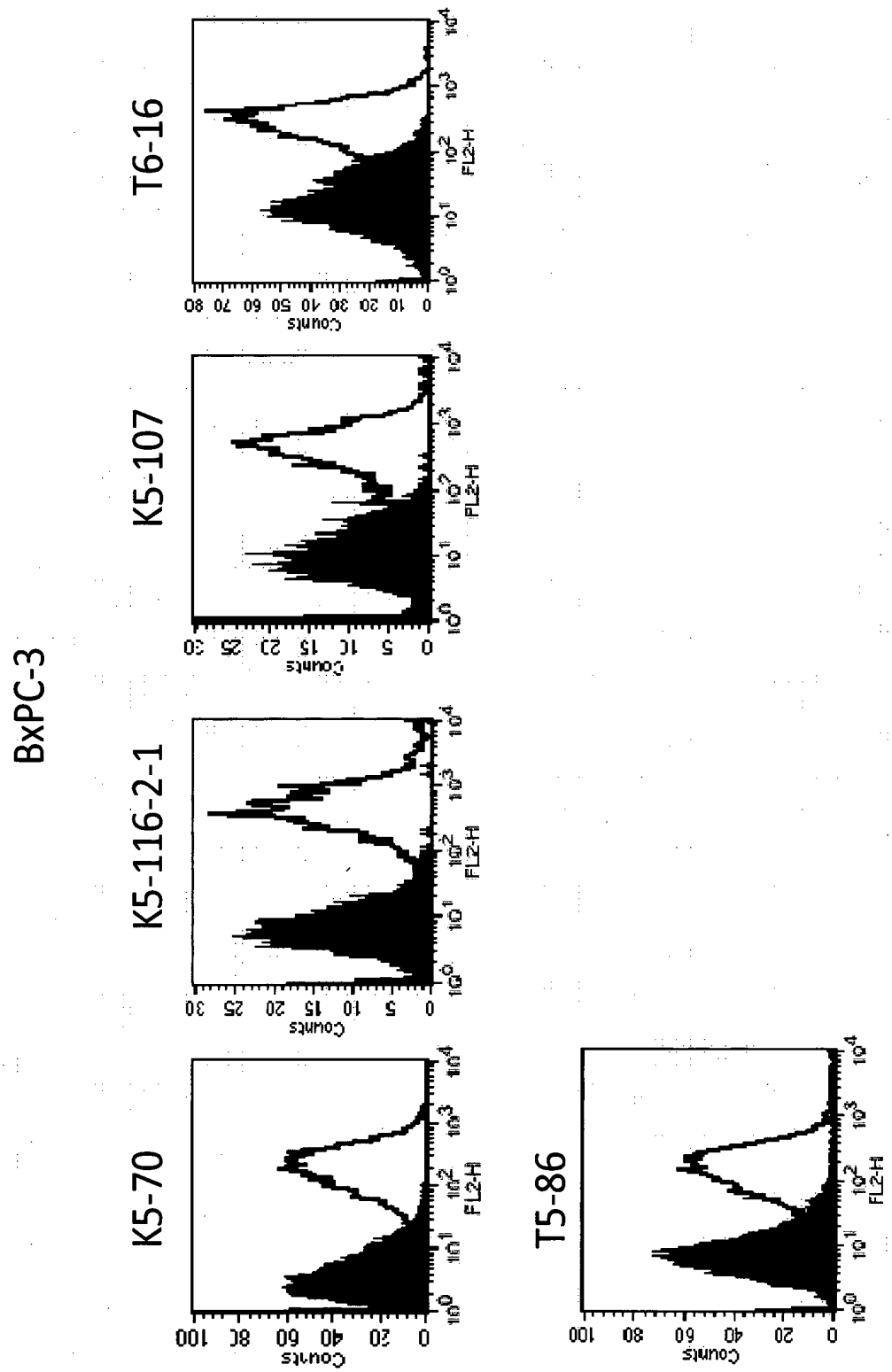
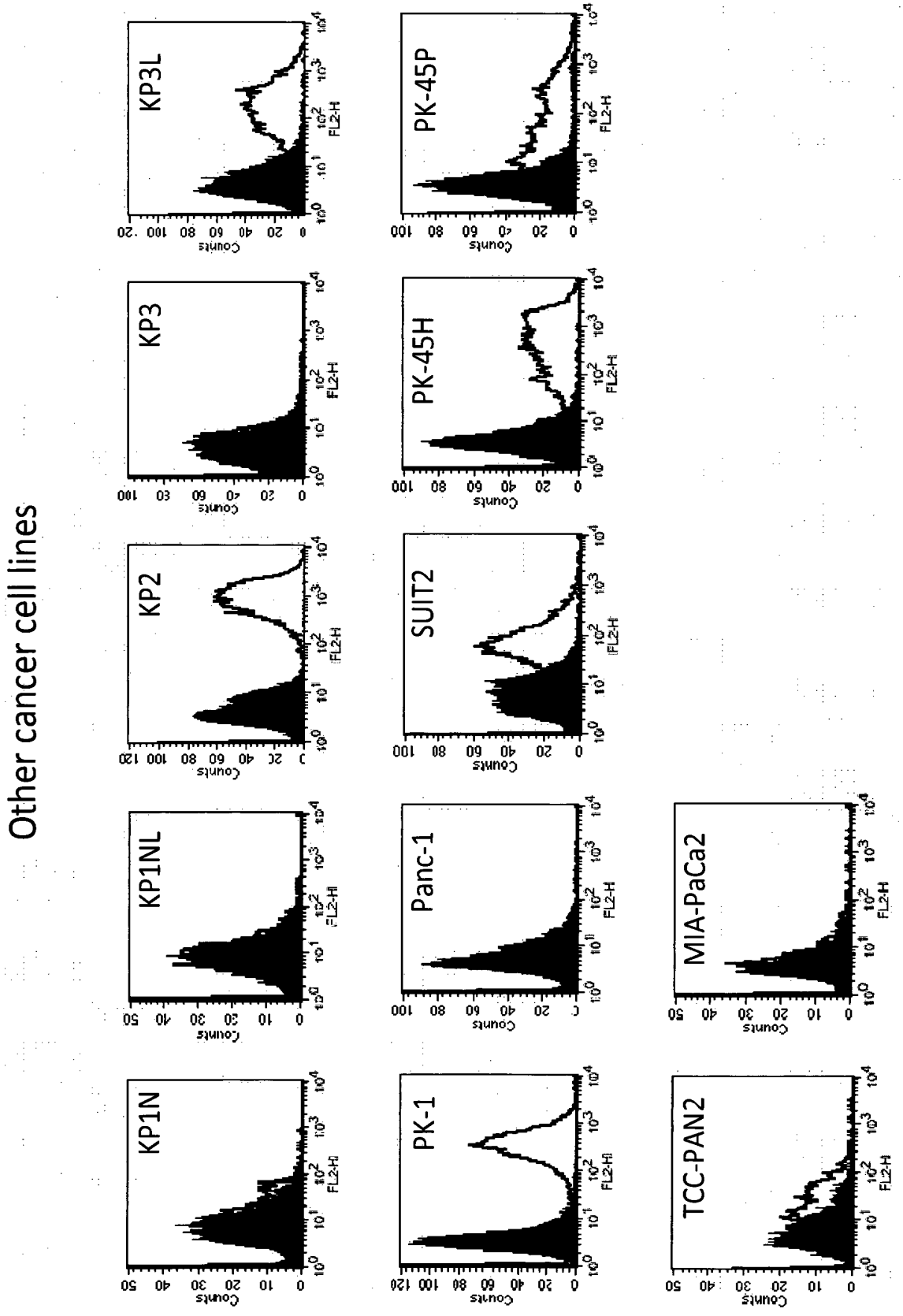


図5


Other cancer cell lines
KP3L
PK-45P
KP3
PK-45H
KP2
SUIT2
KP1NL
Panc-1
MIA-PaCa2
KP1N
PK-1
TCC-PAN2
Counts
FL2-H

Other cancer cell lines
Counts
FL2-H
Colo320
HCT116
CACO2
JIMT-1
SW480
HCC1143
DLD1
PC-3
CW2
DU145

図6

図7

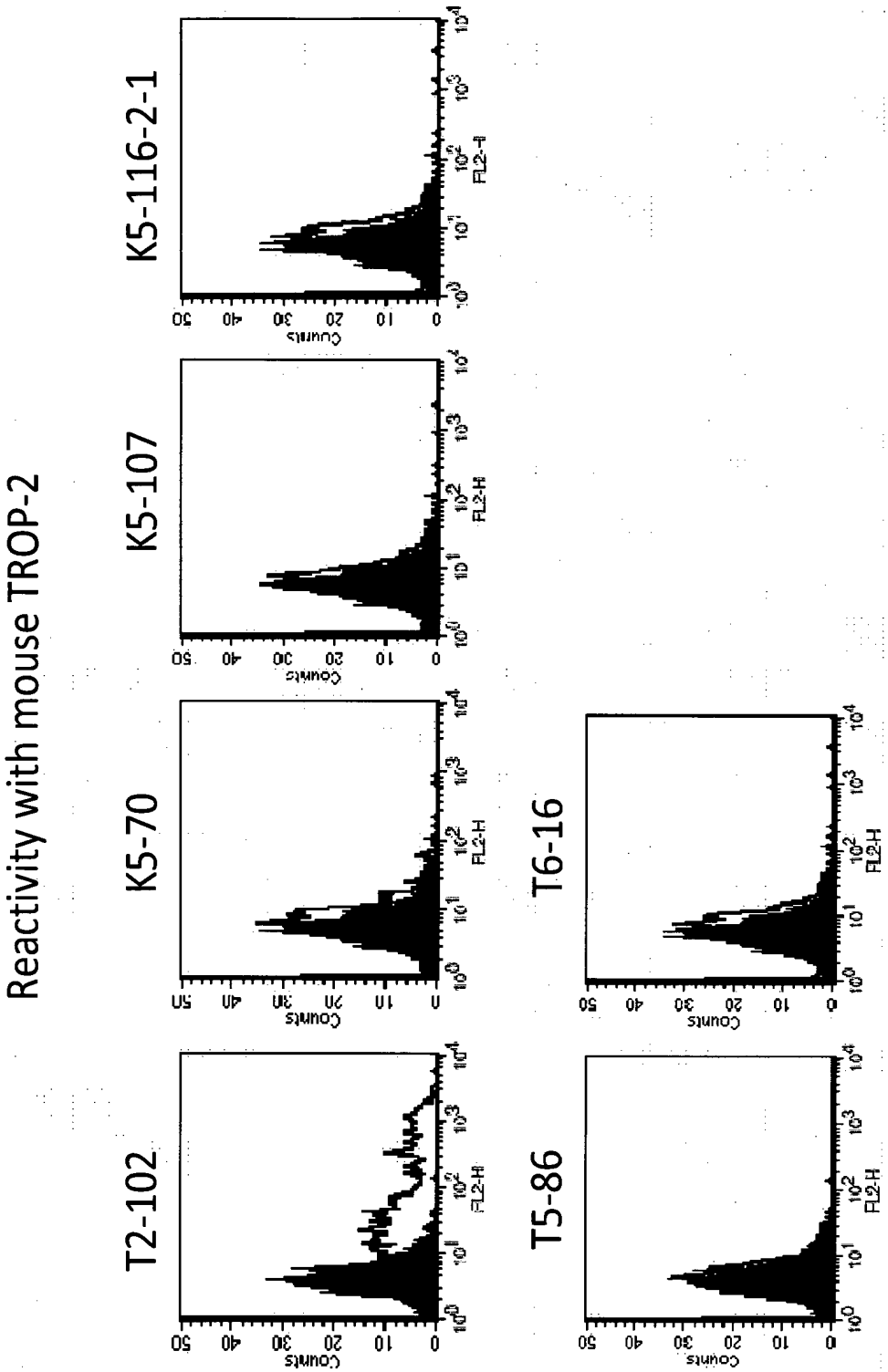

Reactivity with mouse TROP-2
K5-116-2-1
K5-107
K5-70
T6-16
T2-102
T5-86
Counts
FL2-H

図8

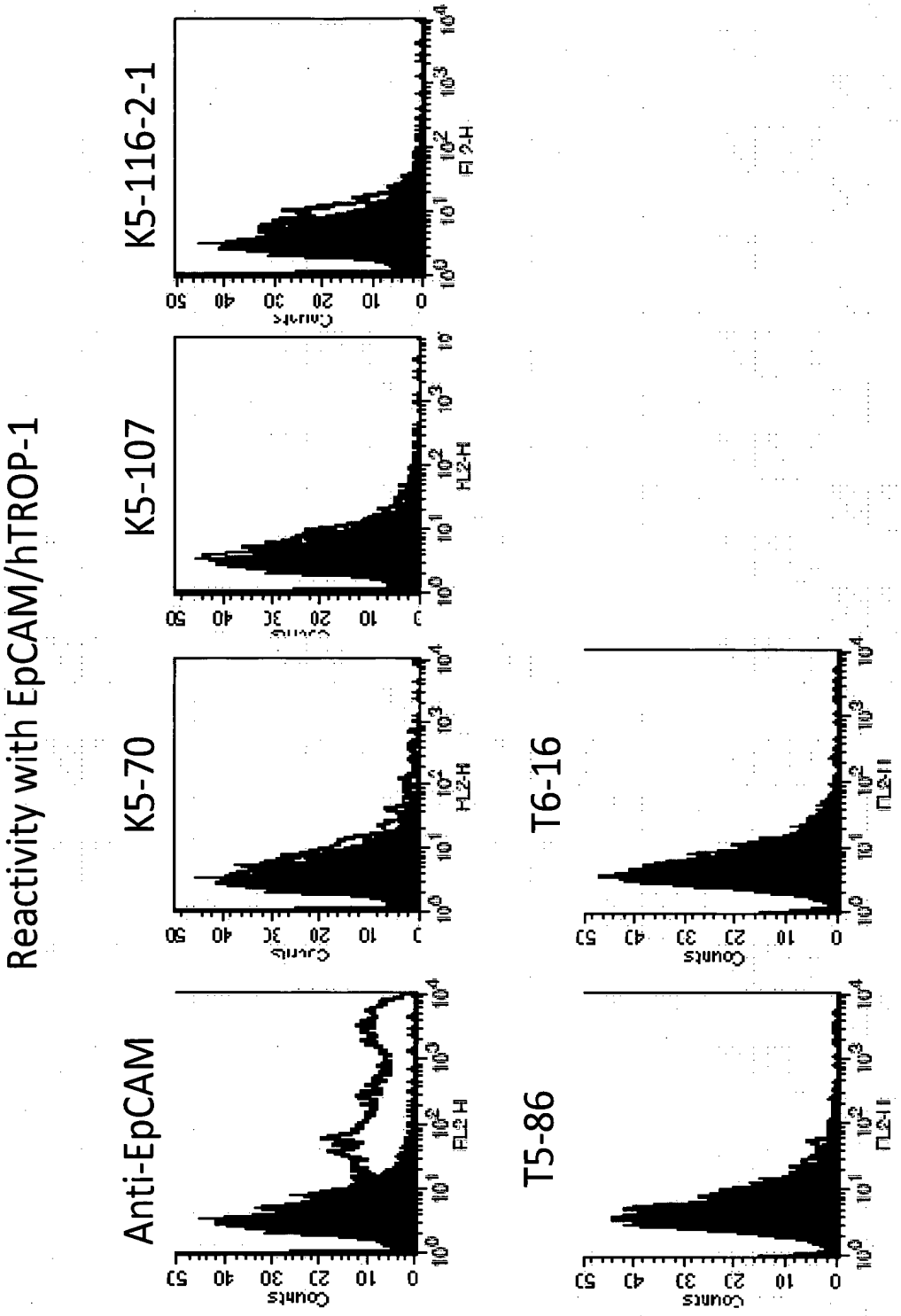

Reactivity with EpCAM/hTROP-1
Anti-EpCAM
K5-70
K5-107
K5-116-2-1
T5-86
T6-16
Counts
FL2-H

図9

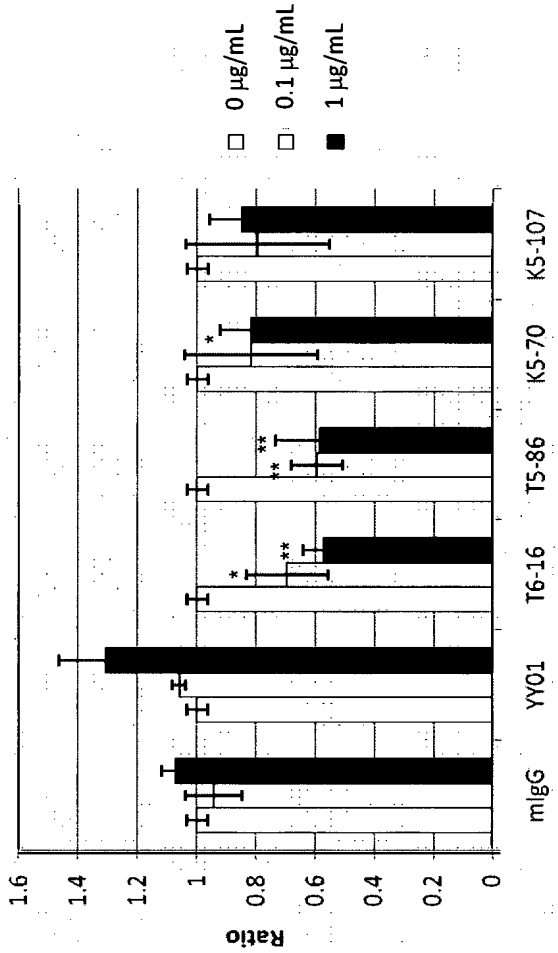
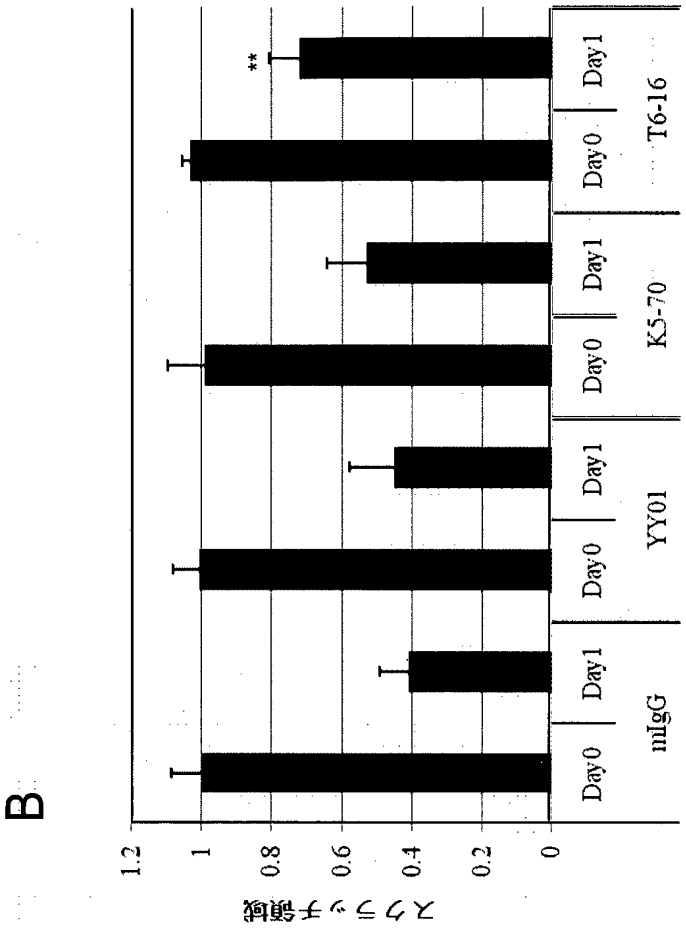

0 μg/mL
0.1 μg/mL
1 μg/mL
Ratio
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
mIgG
YY01
T6-16
T5-86
K5-70
K5-107
*
**
**
*
**

図10


B
アクシン子領域
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
**
Day 0
Day 1
mIgG
YY01
K5-70
T6-16

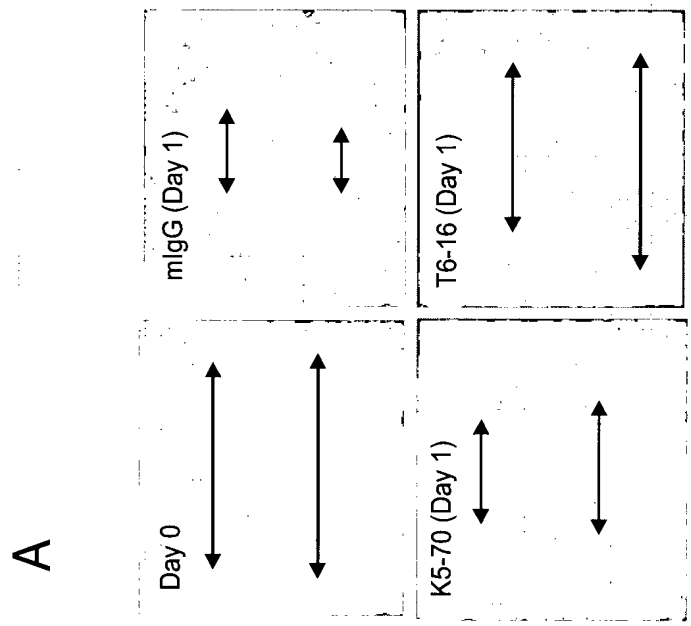
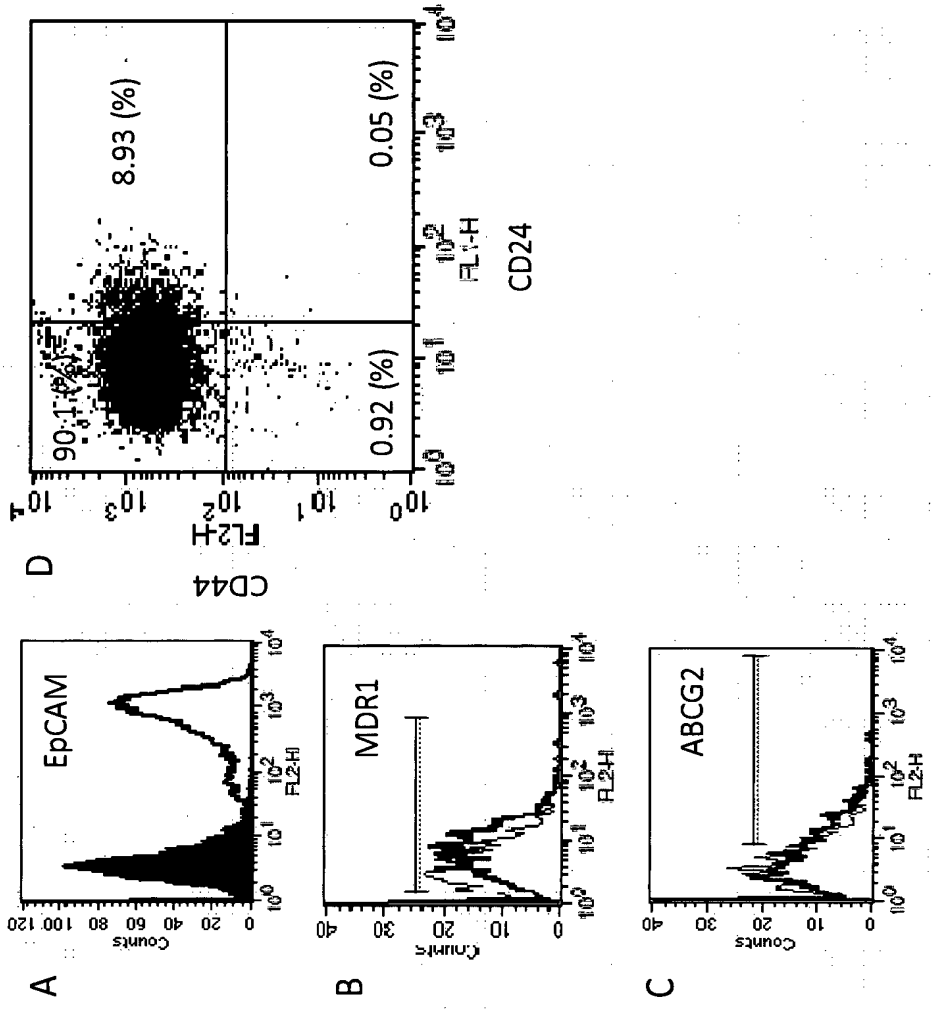
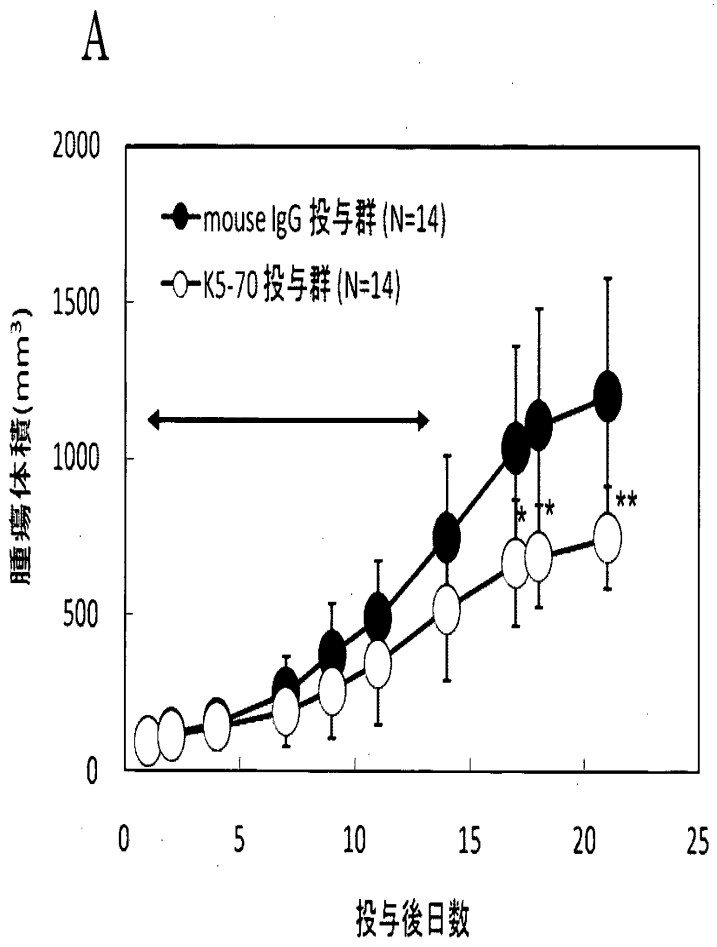

A
Day 0
mIgG (Day 1)
K5-70 (Day 1)
T6-16 (Day 1)

図11


A
EpCAM
Counts
FL2-H
B
MDR1
Counts
FL2-H
C
ABCG2
Counts
FL2-H
D
CD44
FL2-H
CD24
FL1-H
90.1 (%)
8.93 (%)
0.92 (%)
0.05 (%)

WO 2011/145744

K5-70 / Treatment



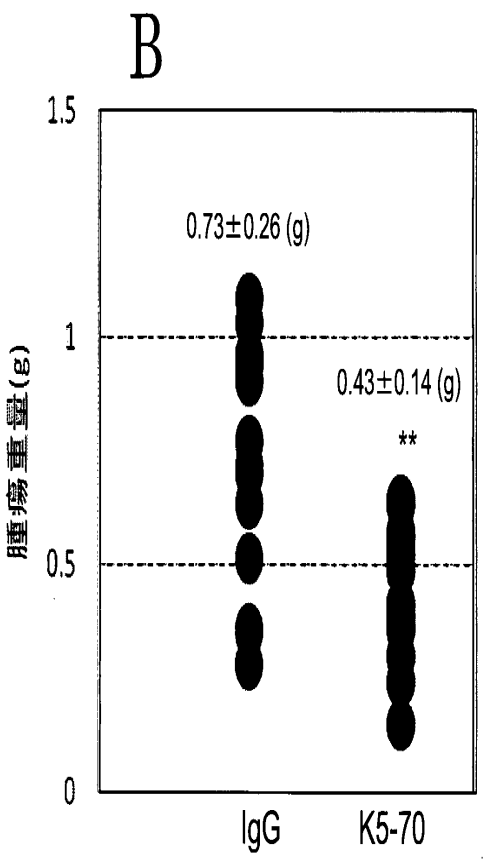


図12

PCT/JP2011/061709

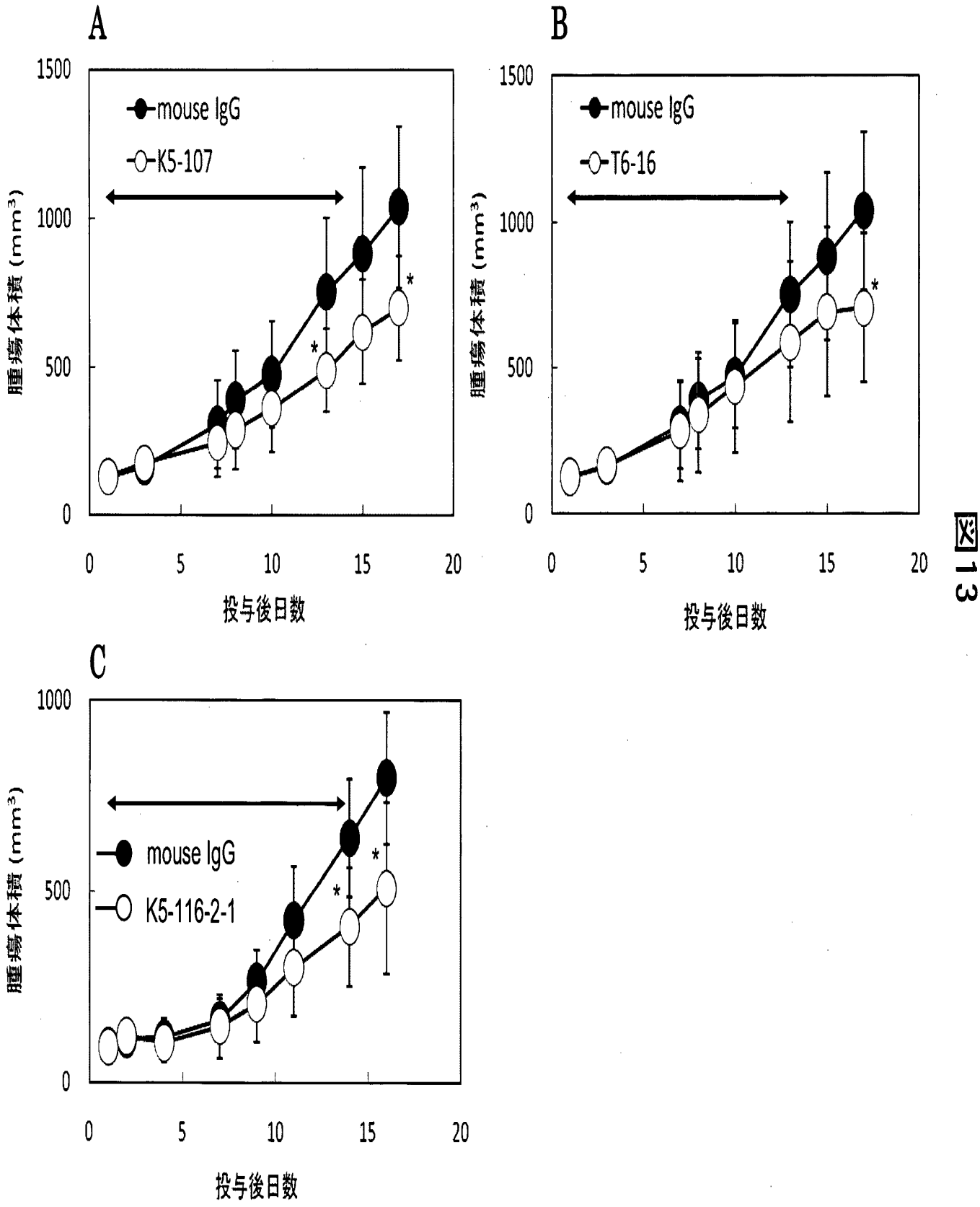

A
B
C
mouse IgG
K5-107
T6-16
K5-116-2-1
腫瘍体積 (mm³)
投与後日数
0
500
1000
1500
0
5
10
15
20
*

図13

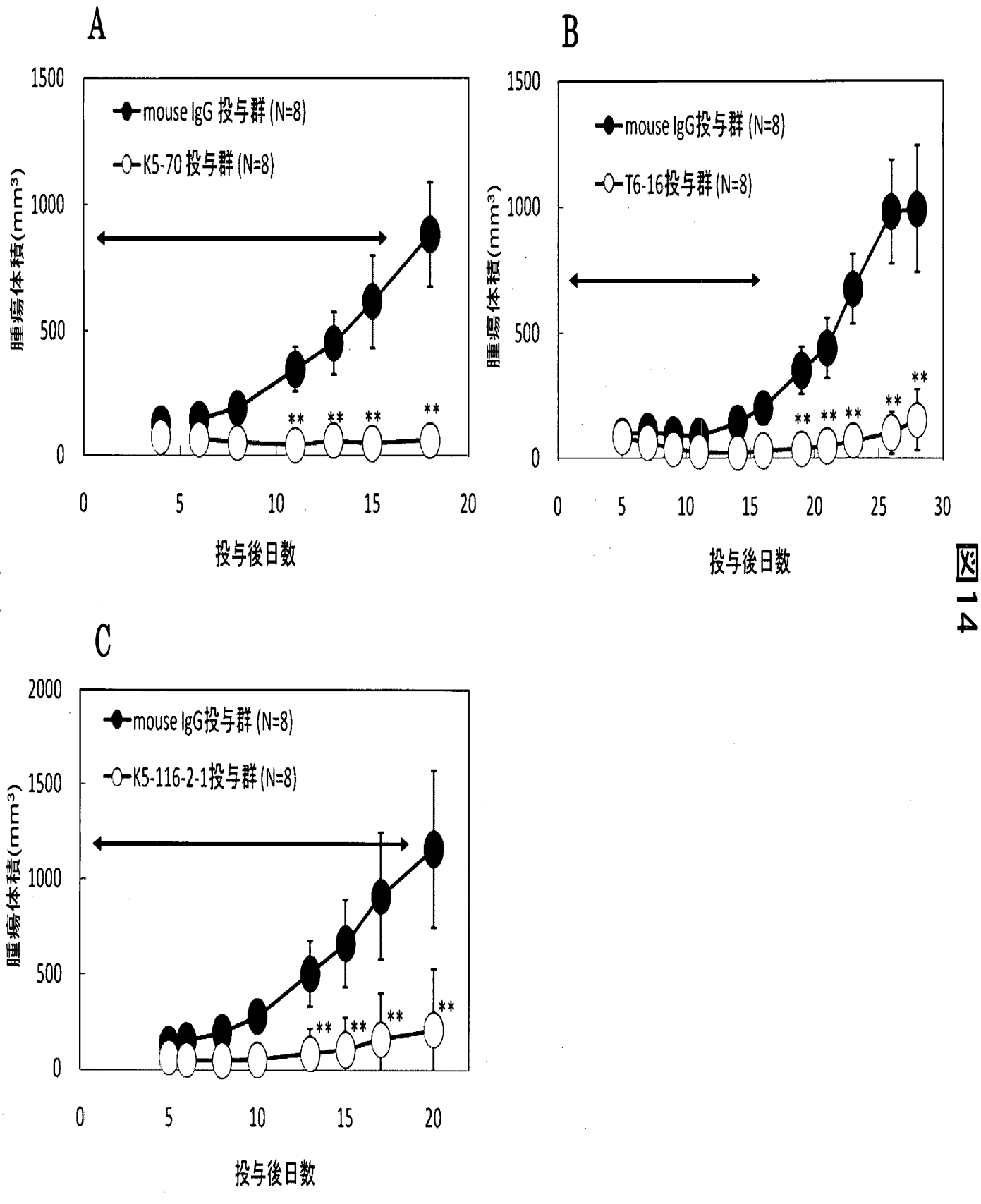
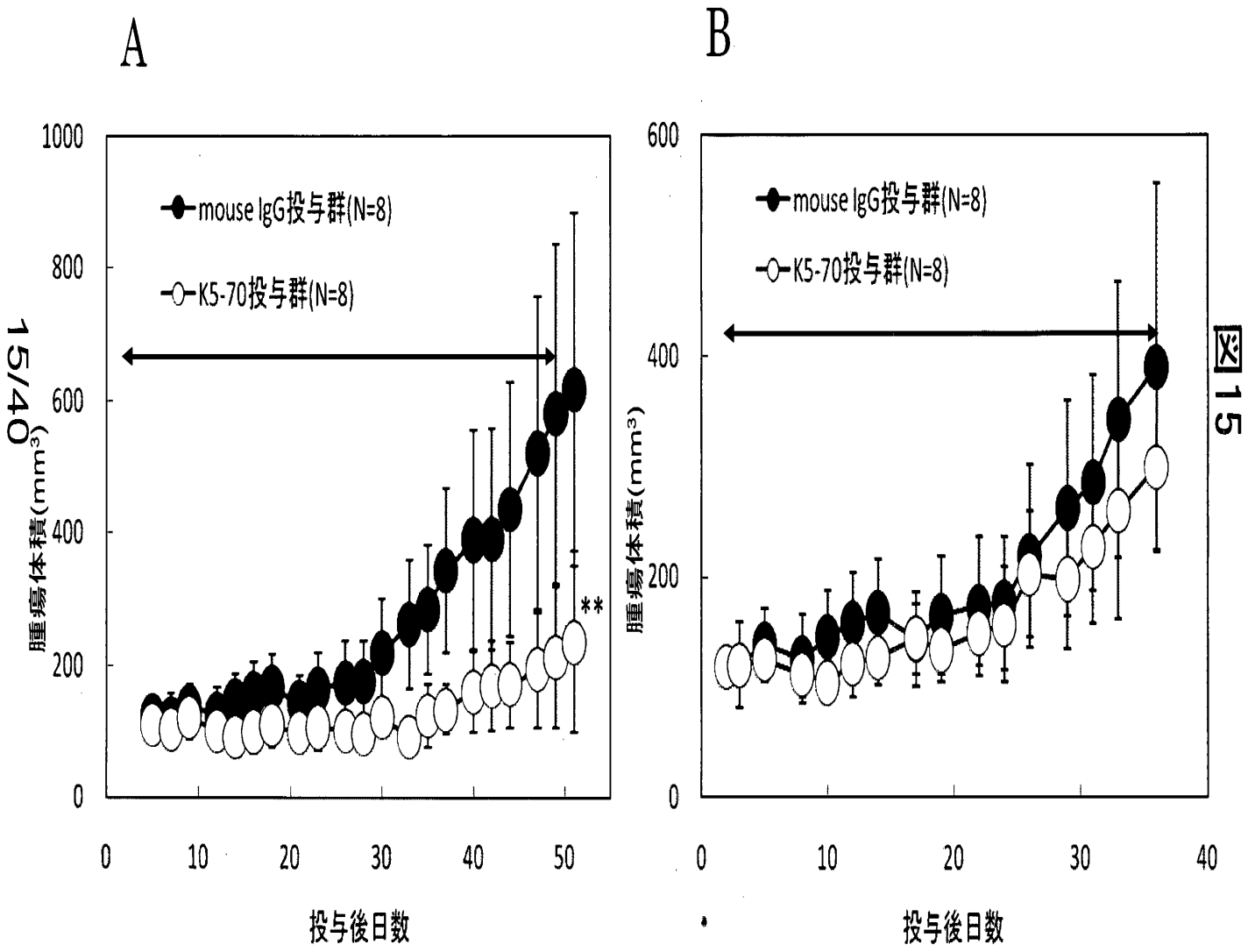

A
1500
1000
500
0
腫瘍体積(mm³)
mouse IgG 投与群 (N=8)
K5-70 投与群 (N=8)
**
0
5
10
15
20
投与後日数
B
1500
1000
500
0
腫瘍体積(mm³)
mouse IgG投与群 (N=8)
T6-16投与群 (N=8)
**
0
5
10
15
20
25
30
投与後日数
C
2000
1500
1000
500
0
腫瘍体積(mm³)
mouse IgG投与群 (N=8)
K5-116-2-1投与群 (N=8)
**
0
5
10
15
20
投与後日数

図14

図15

K5-70 /BxPC-3



K5-70 / Prevention用量依存

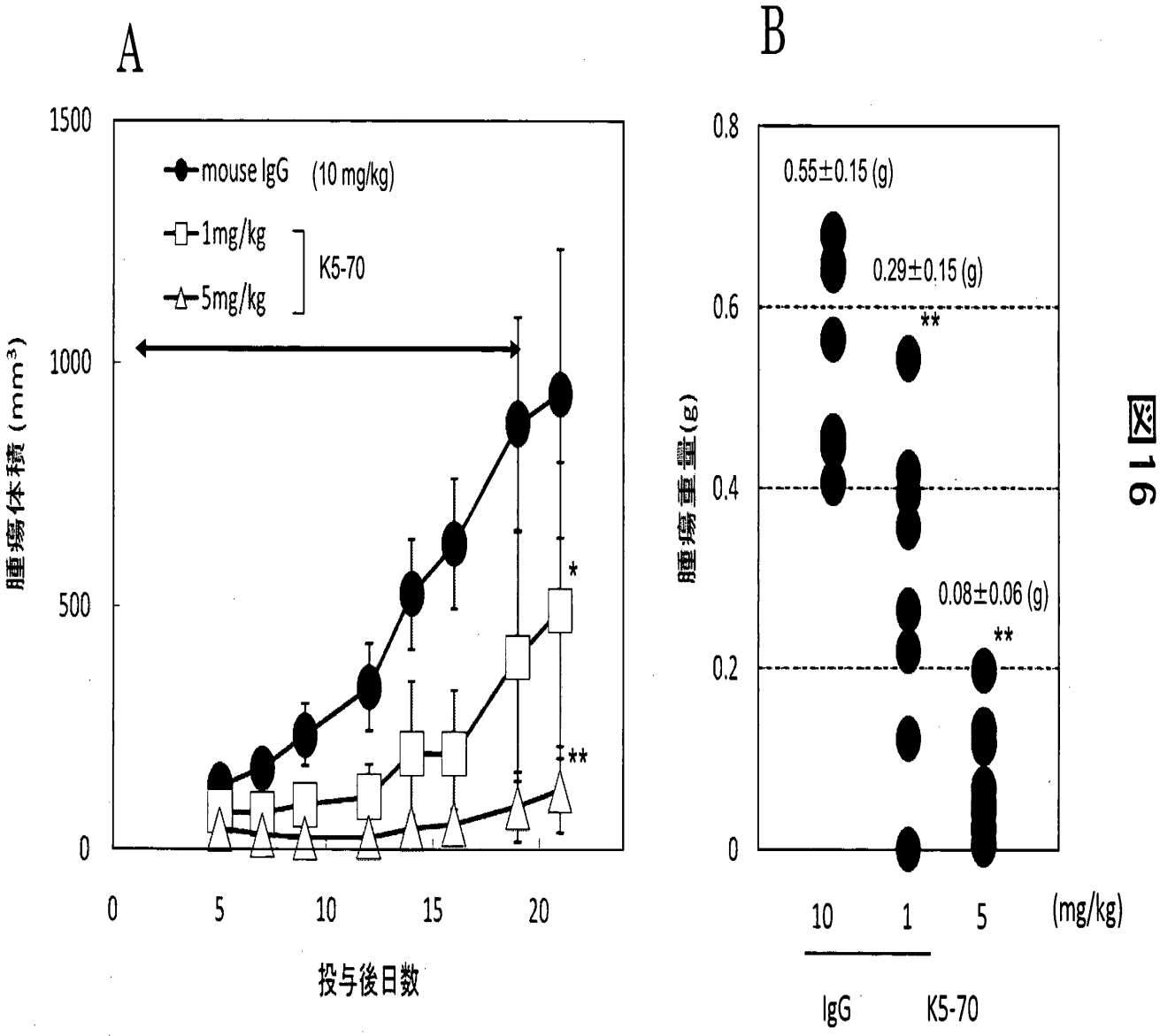


図16

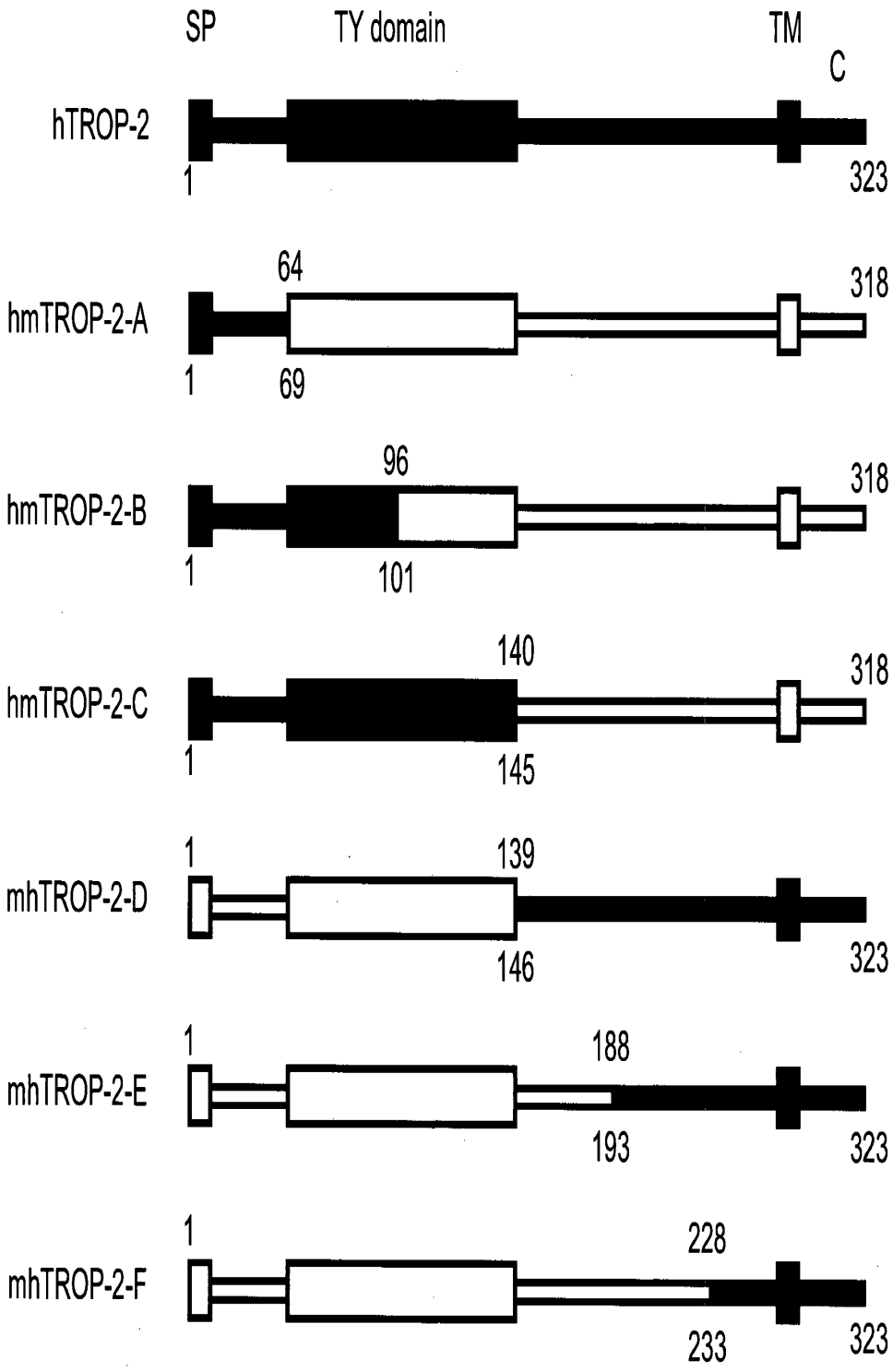

SP
TY domain
TM
C
hTROP-2
1
323
64
318
hmTROP-2-A
1
69
96
318
hmTROP-2-B
1
101
140
318
hmTROP-2-C
1
145
1
139
mhTROP-2-D
146
323
1
188
mhTROP-2-E
193
323
1
228
mhTROP-2-F
233
323

図17

図18

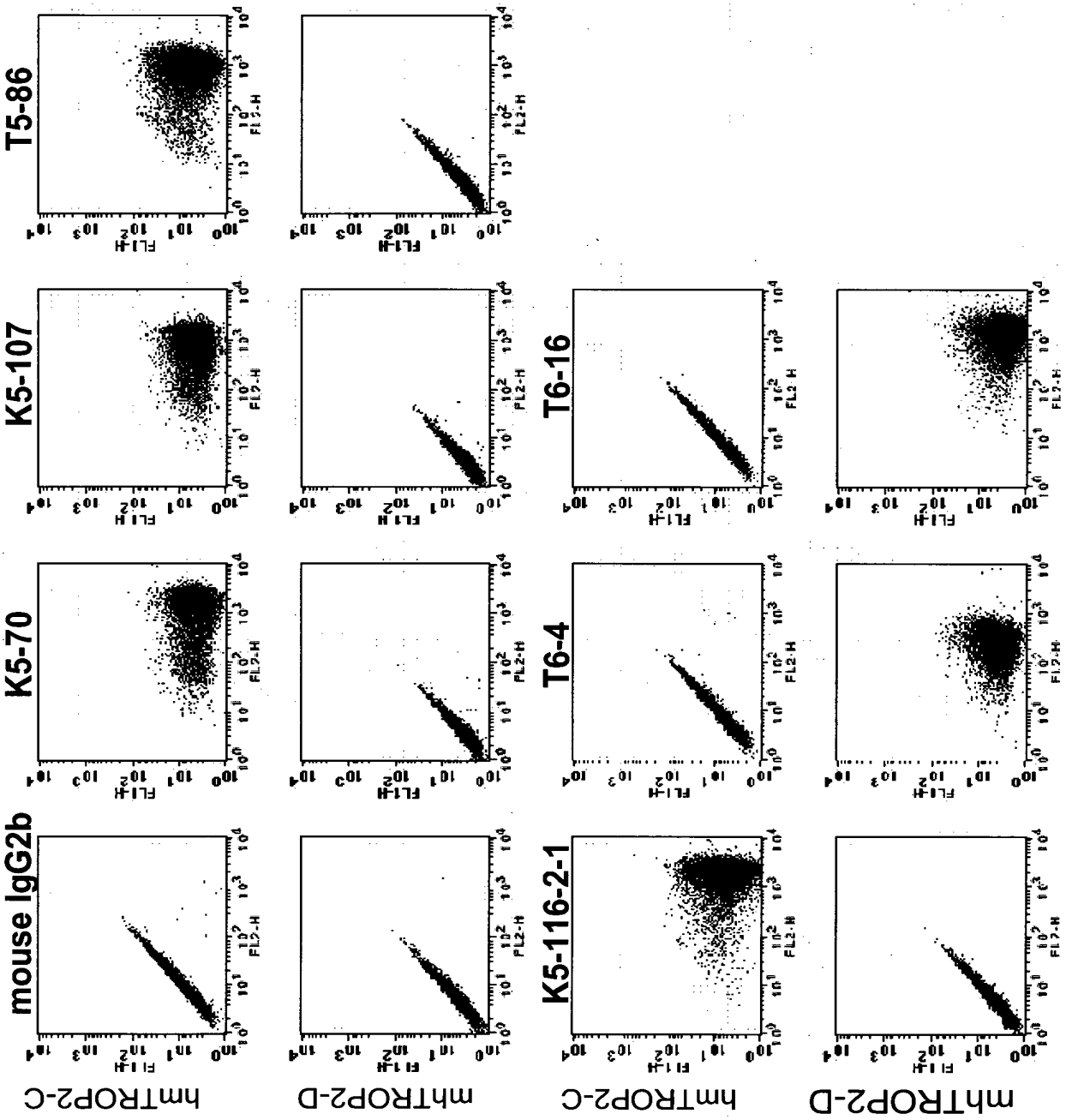

T5-86
K5-107
T6-16
K5-70
T6-4
mouse IgG2b
K5-116-2-1
hmTROP2-C
mhTROP2-D
hmTROP2-C
mhTROP2-D

図19

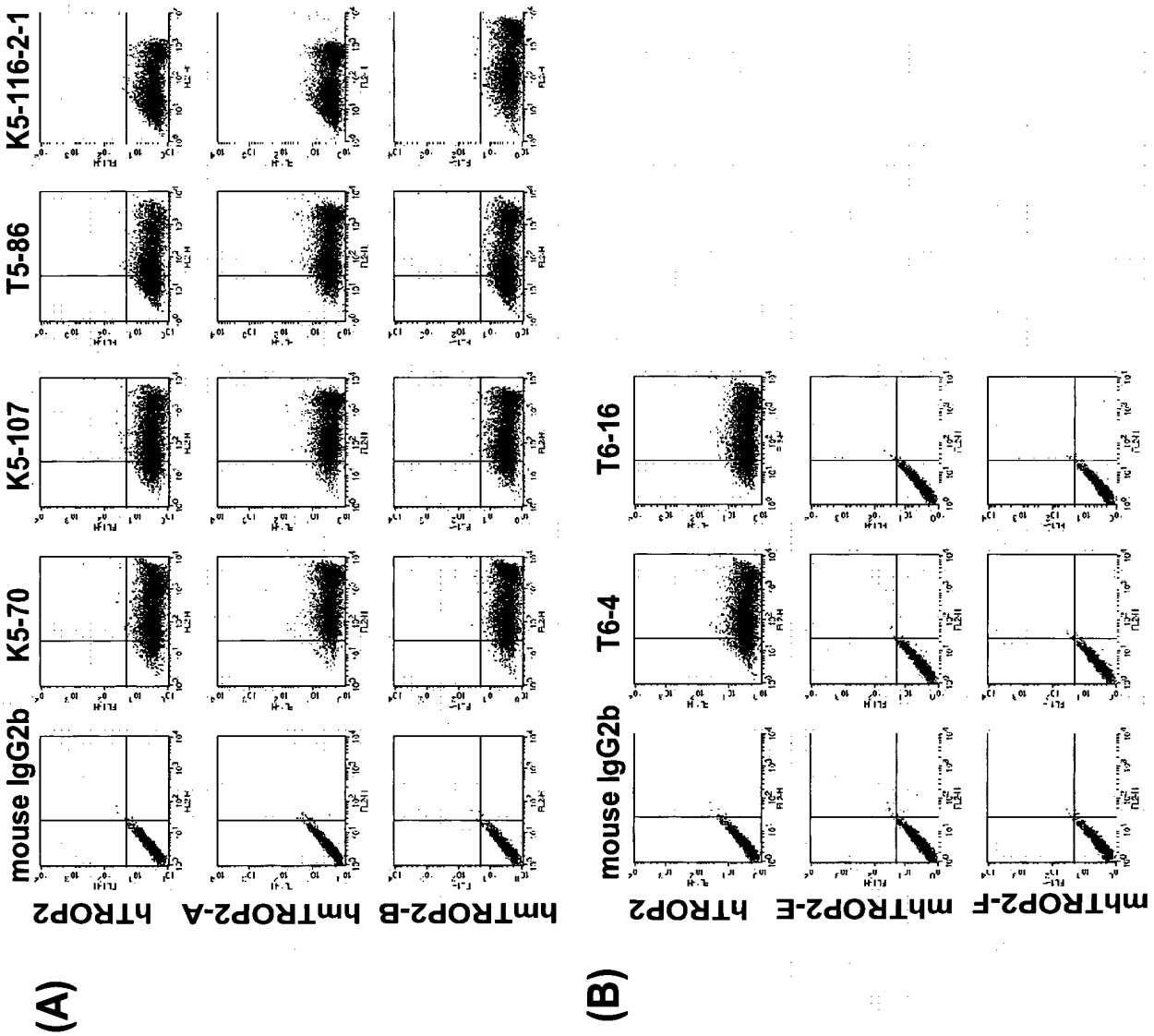

(A)
hTROP2
hmTROP2-A
hmTROP2-B
mouse IgG2b
K5-70
K5-107
T5-86
K5-116-2-1
(B)
hTROP2
mhTROP2-E
mhTROP2-F
mouse IgG2b
T6-4
T6-16

図20

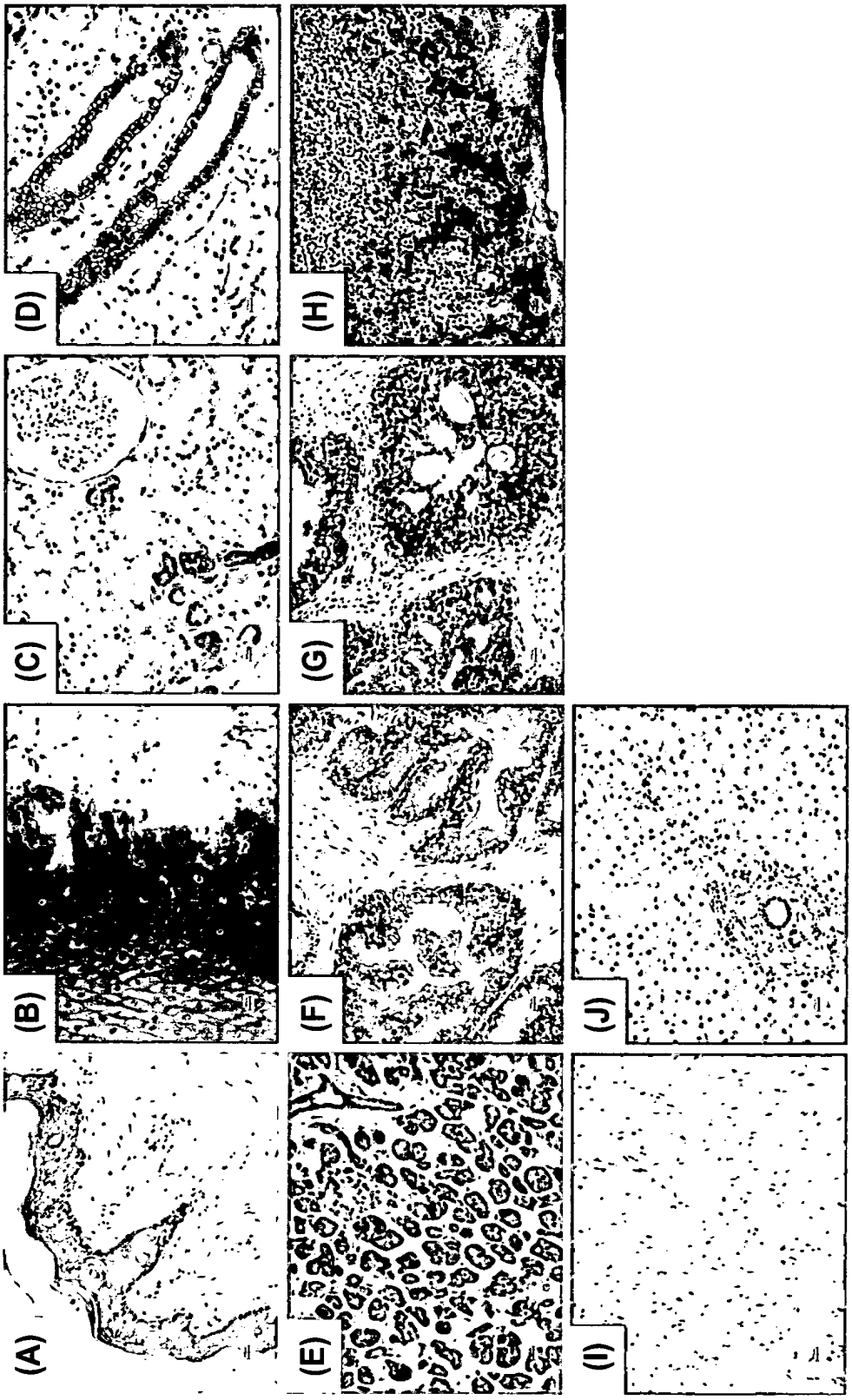
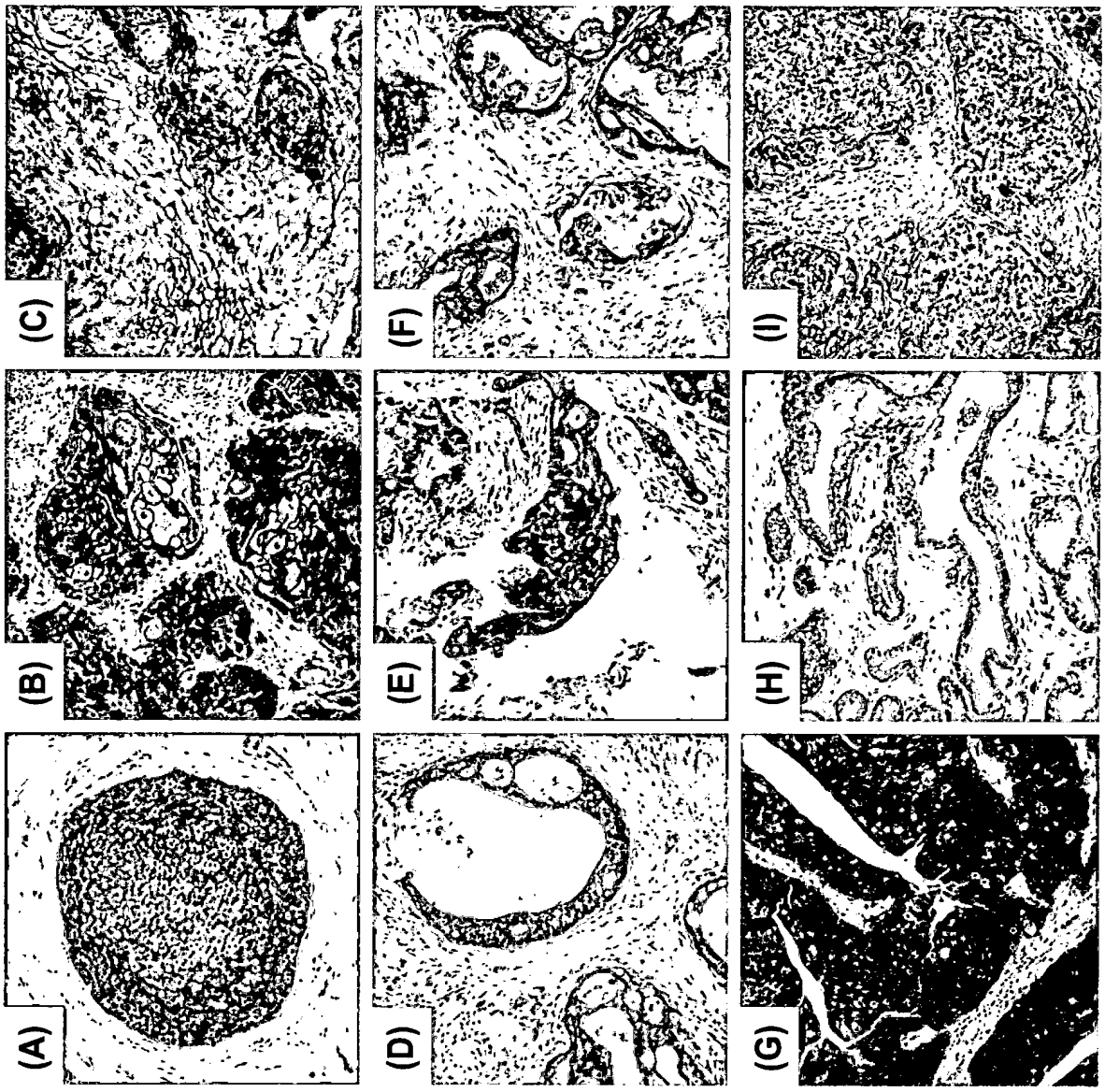


図21



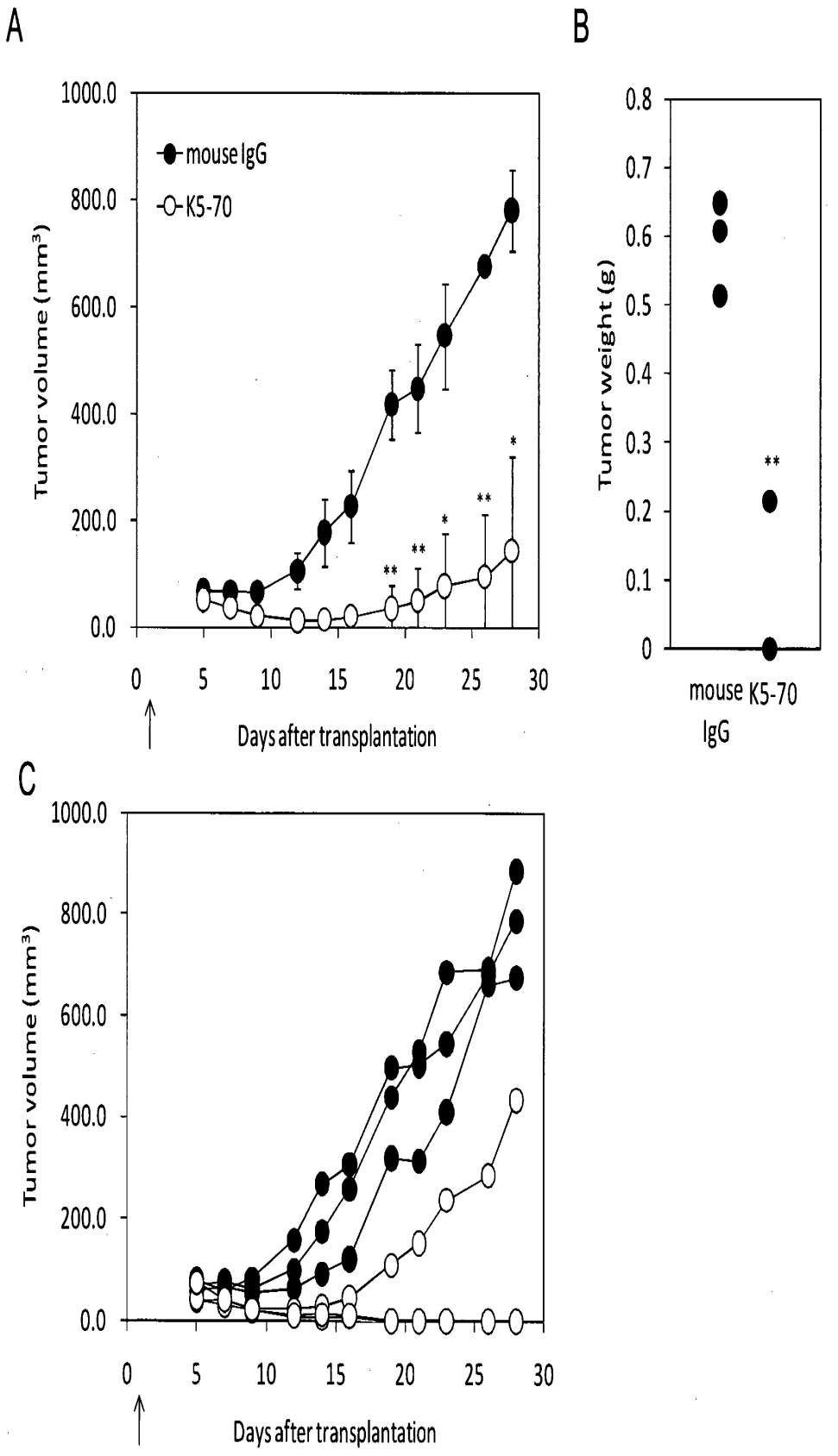
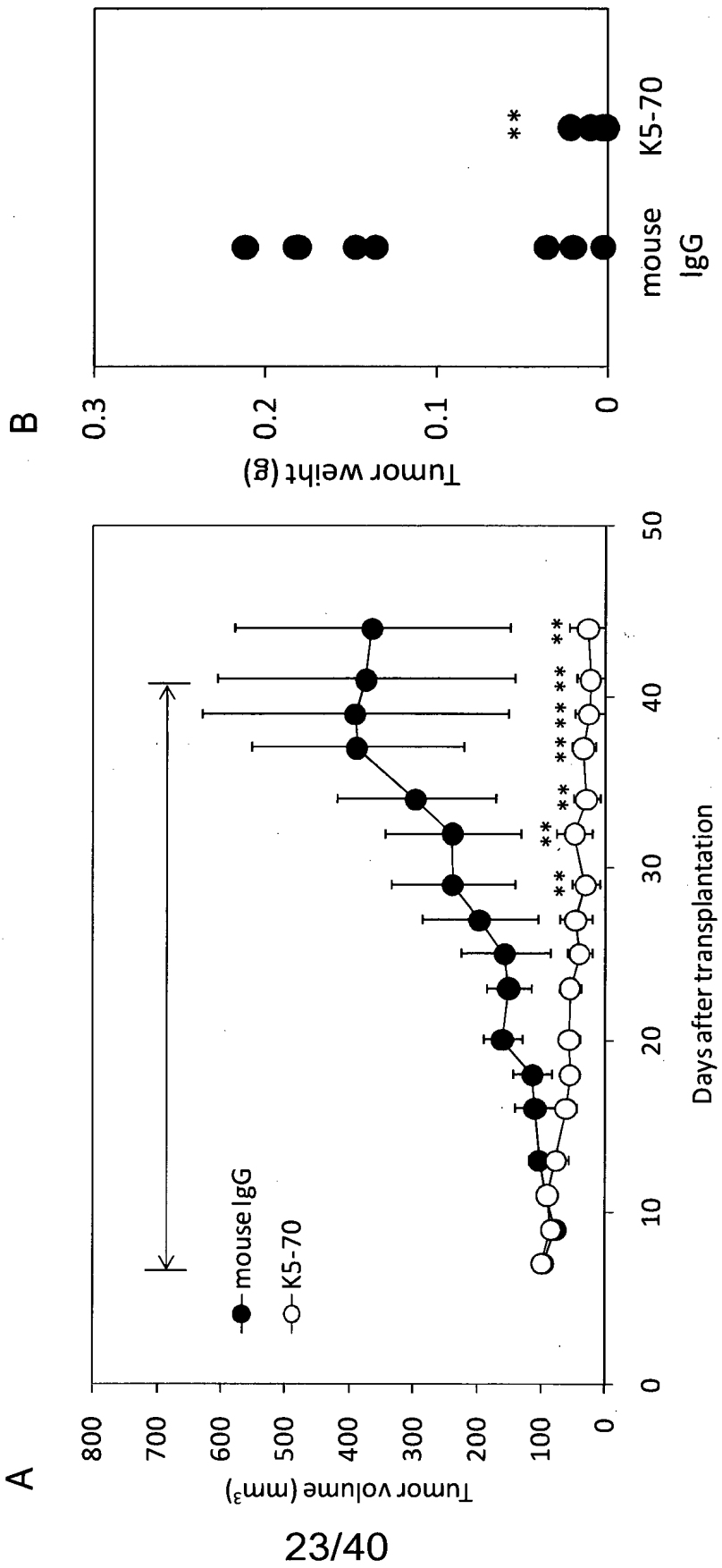

A
B
C
mouse IgG
K5-70
Tumor volume (mm³)
Days after transplantation
Tumor weight (g)
mouse IgG
K5-70
1000.0
800.0
600.0
400.0
200.0
0.0
0
5
10
15
20
25
30
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
*
**

図 22

図23


A
Tumor volume (mm³)
800
700
600
500
400
300
200
100
0
0
10
20
30
40
50
Days after transplantation
mouse IgG
K5-70
**
B
Tumor weight (g)
0.3
0.2
0.1
0
mouse IgG
K5-70
**

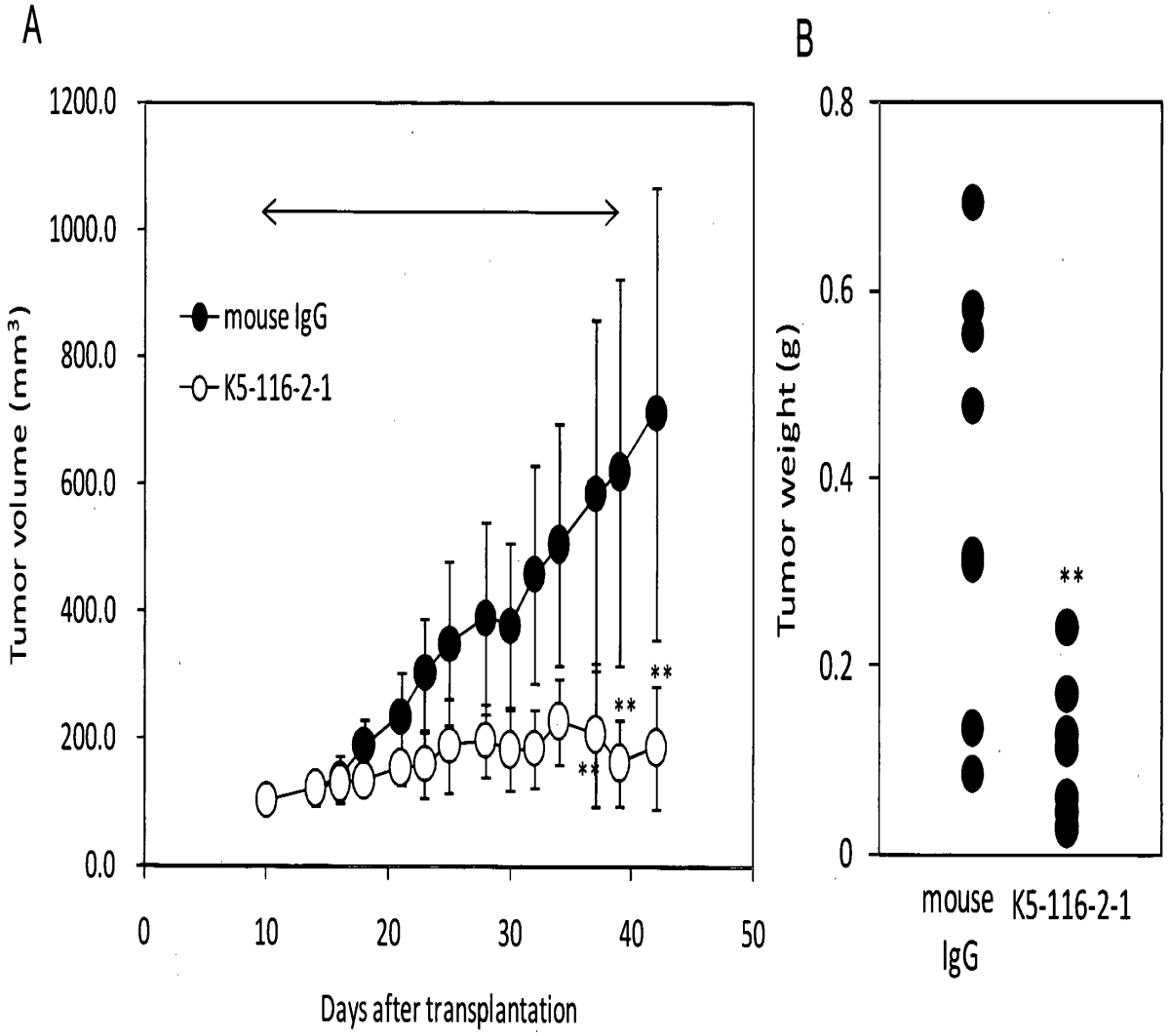

A
B
1200.0
1000.0
800.0
600.0
400.0
200.0
0.0
Tumor volume (mm³)
mouse IgG
K5-116-2-1
**
**
**
0
10
20
30
40
50
Days after transplantation
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Tumor weight (g)
**
mouse IgG
K5-116-2-1

図24

図25

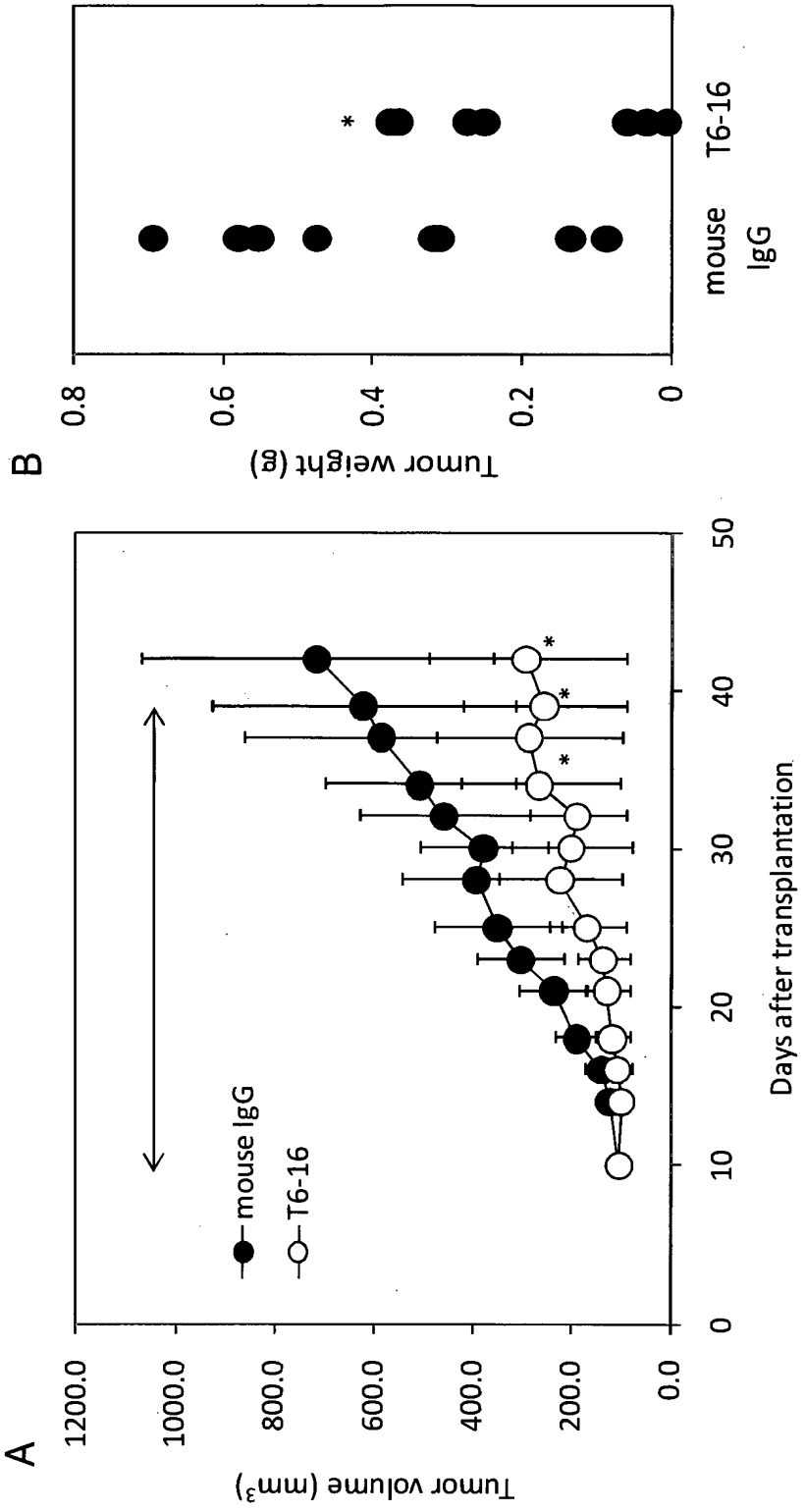
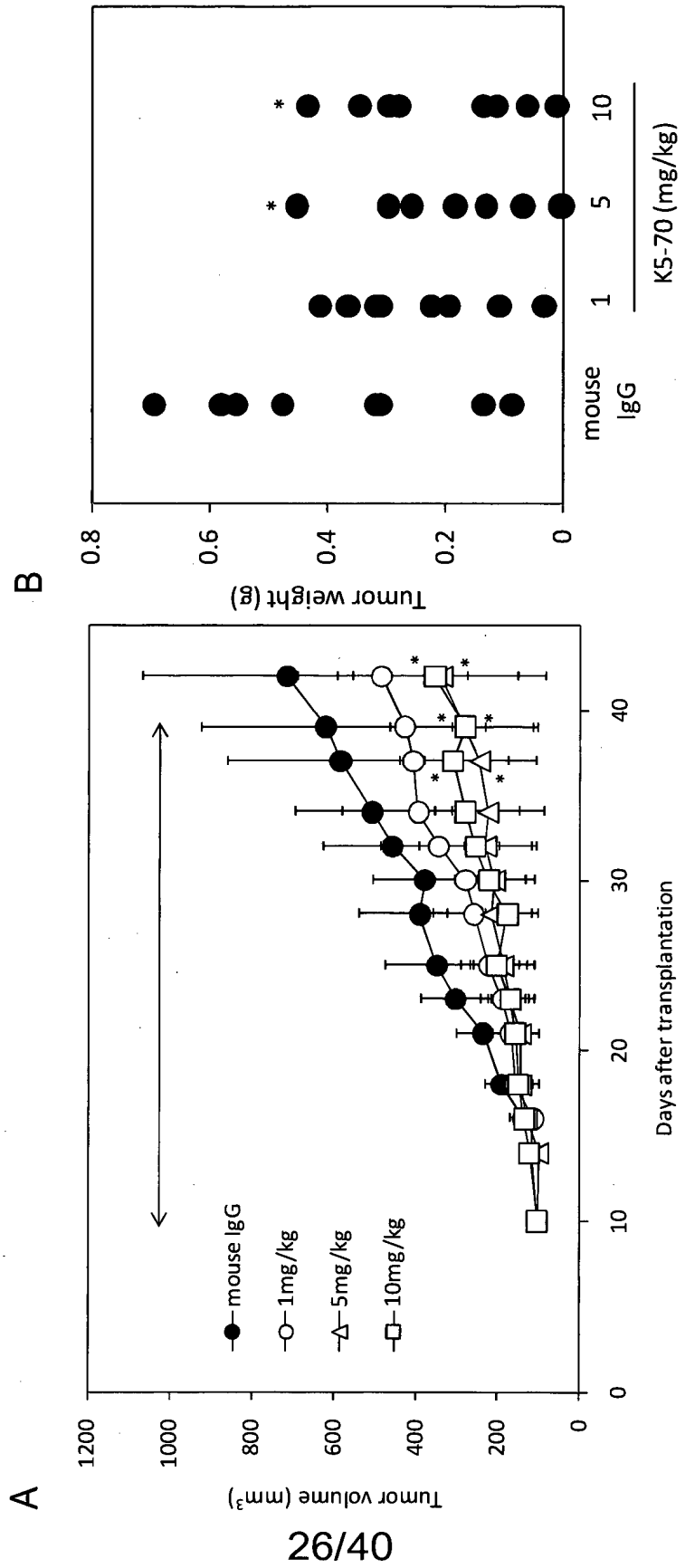

A
Tumor volume (mm3)
1200.0
1000.0
800.0
600.0
400.0
200.0
0.0
0
10
20
30
40
50
Days after transplantation
mouse IgG
T6-16
*
*
*
B
Tumor weight (g)
0.8
0.6
0.4
0.2
0
*
mouse IgG
T6-16

図26


A
Tumor volume (mm3)
1200
1000
800
600
400
200
0
0
10
20
30
40
Days after transplantation
mouse IgG
1mg/kg
5mg/kg
10mg/kg
B
Tumor weight (g)
0.8
0.6
0.4
0.2
0
mouse IgG
1
5
10
K5-70 (mg/kg)

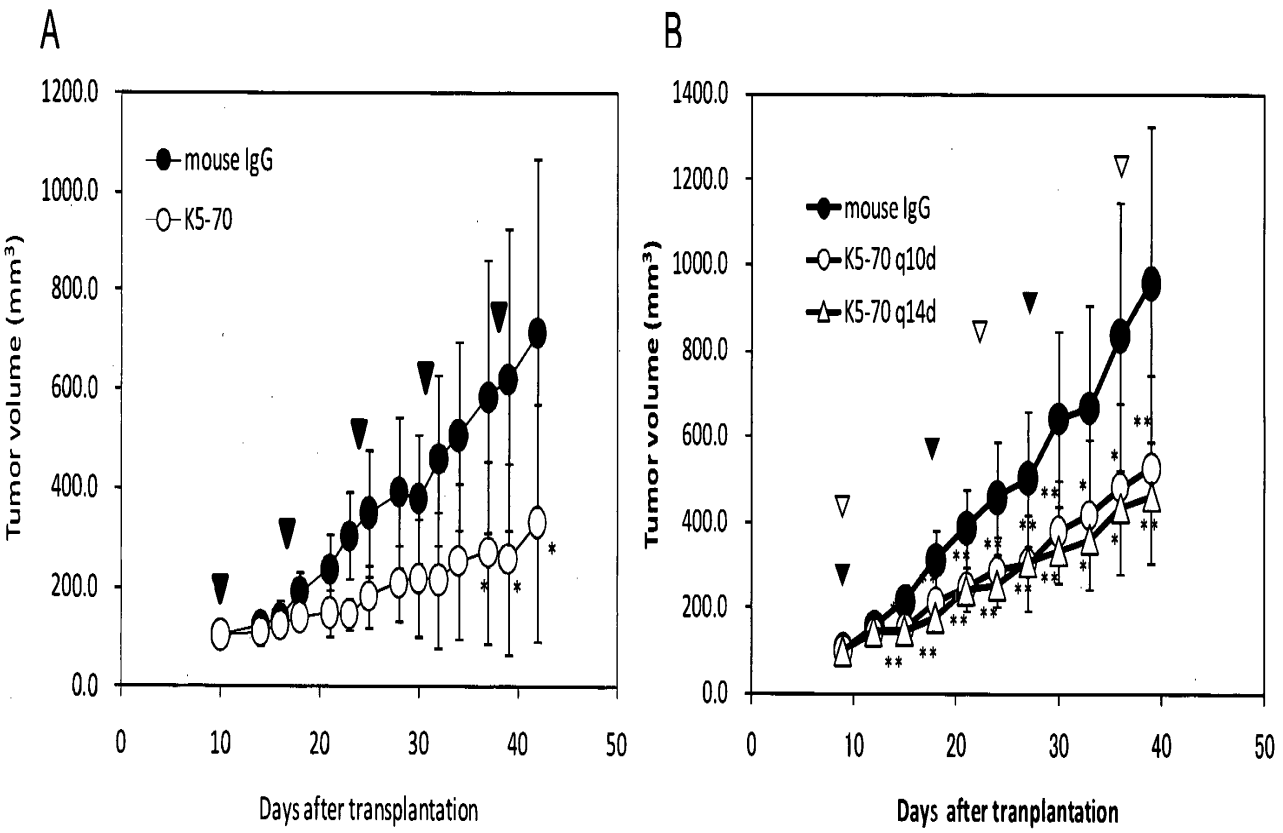

A
1200.0
1000.0
800.0
600.0
400.0
200.0
0.0
Tumor volume (mm³)
mouse IgG
K5-70
0
10
20
30
40
50
Days after transplantation
B
1400.0
1200.0
1000.0
800.0
600.0
400.0
200.0
0.0
Tumor volume (mm³)
mouse IgG
K5-70 q10d
K5-70 q14d
0
10
20
30
40
50
Days after tranplantation

図 27

図28

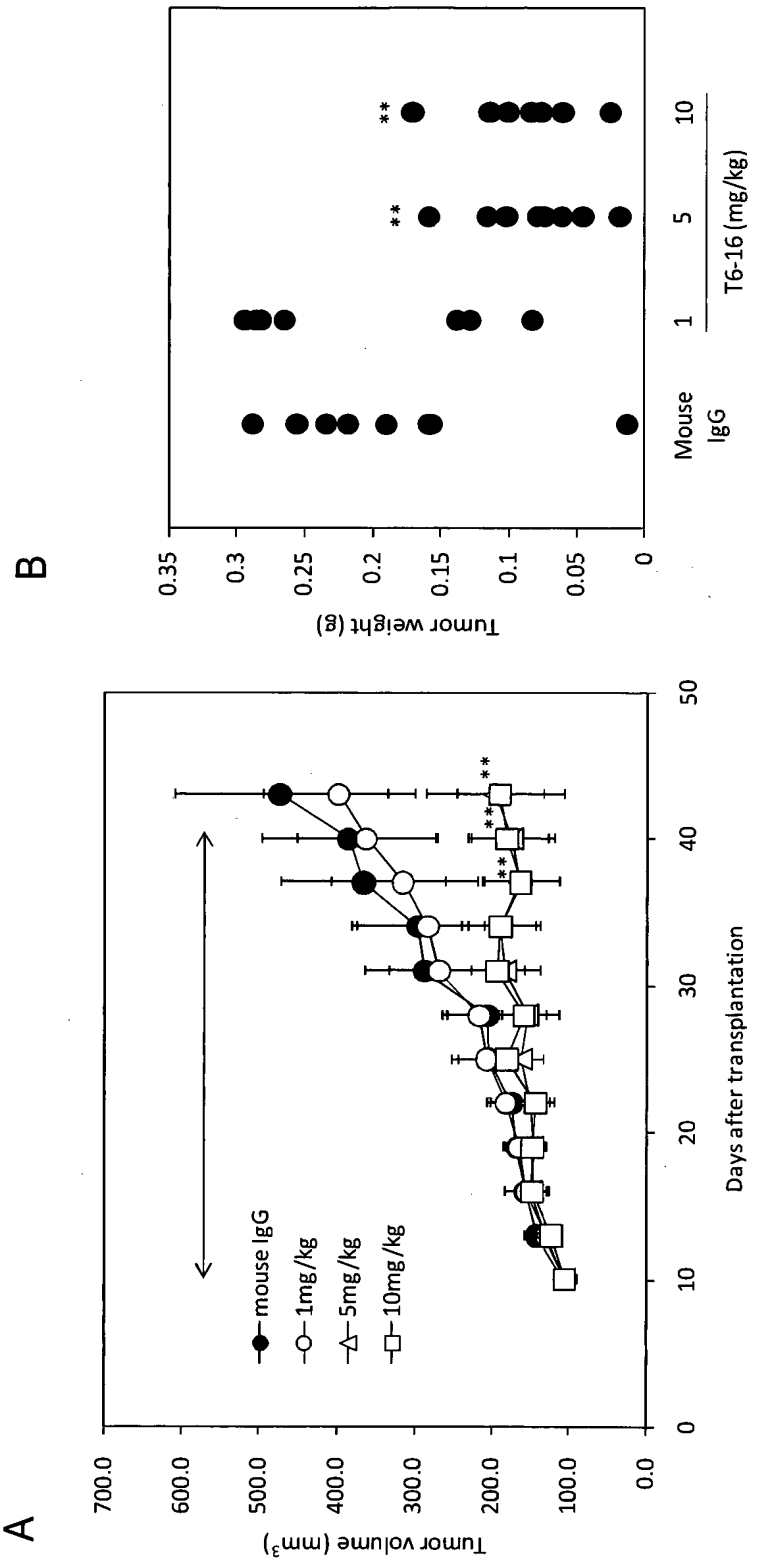
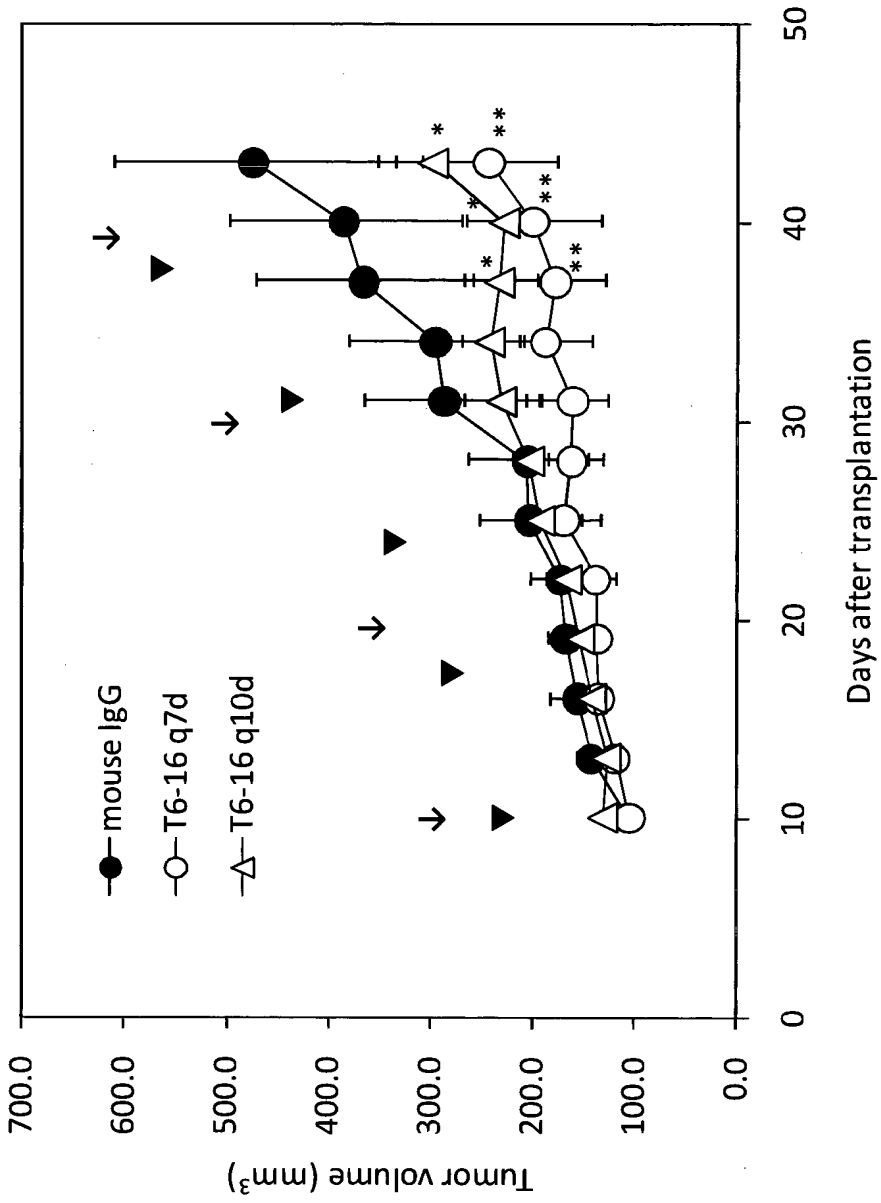
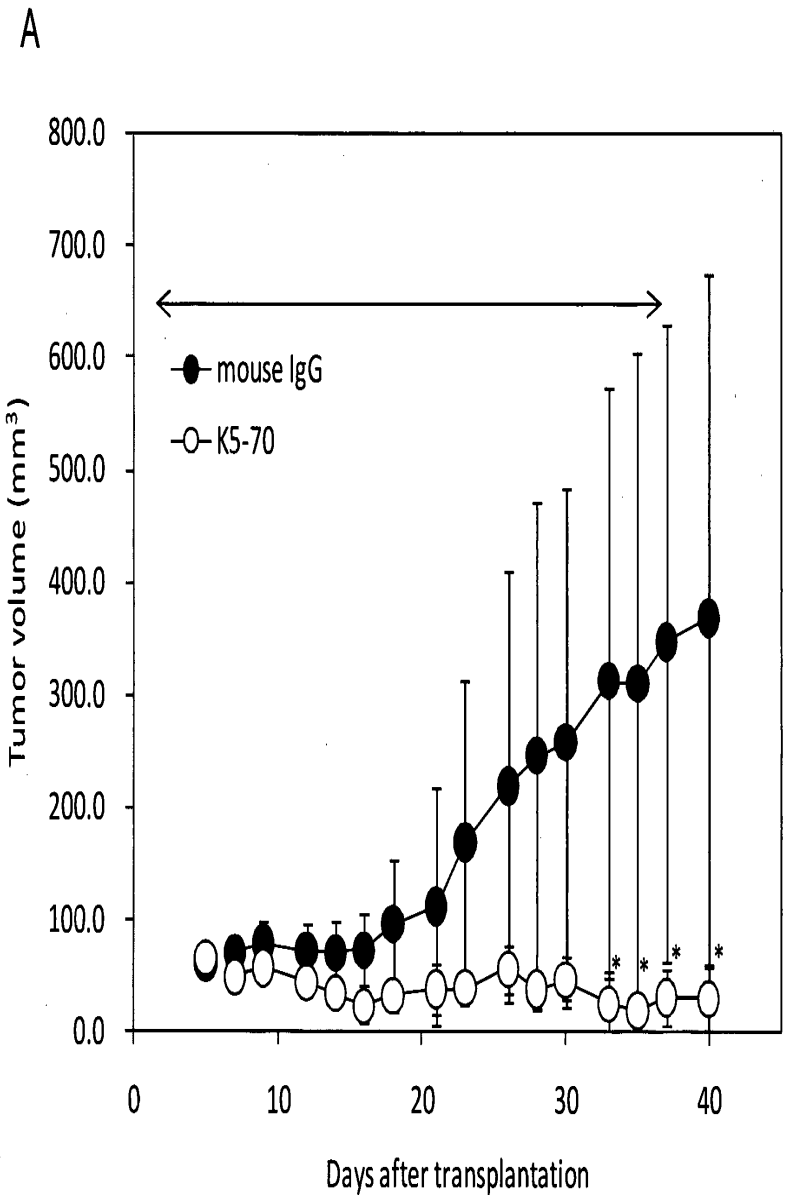

A
Tumor volume (mm3)
700.0
600.0
500.0
400.0
300.0
200.0
100.0
0.0
0
10
20
30
40
50
Days after transplantation
mouse IgG
1mg/kg
5mg/kg
10mg/kg
**
B
Tumor weight (g)
0.35
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
Mouse IgG
1
5
10
T6-16 (mg/kg)
**
**

図29


Tumor volume (mm3)
700.0
600.0
500.0
400.0
300.0
200.0
100.0
0.0
0
10
20
30
40
50
Days after transplantation
mouse IgG
T6-16 q7d
T6-16 q10d
*
**


A
800.0
700.0
600.0
500.0
400.0
300.0
200.0
100.0
0.0
Tumor volume (mm³)
mouse IgG
K5-70
0
10
20
30
40
Days after transplantation

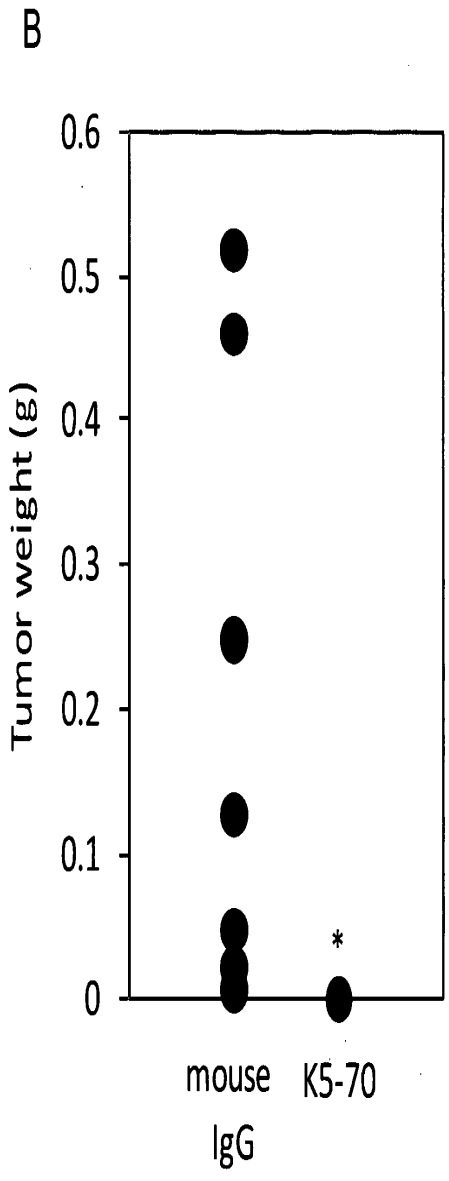

B
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
Tumor weight (g)
mouse IgG
K5-70

図30

図31

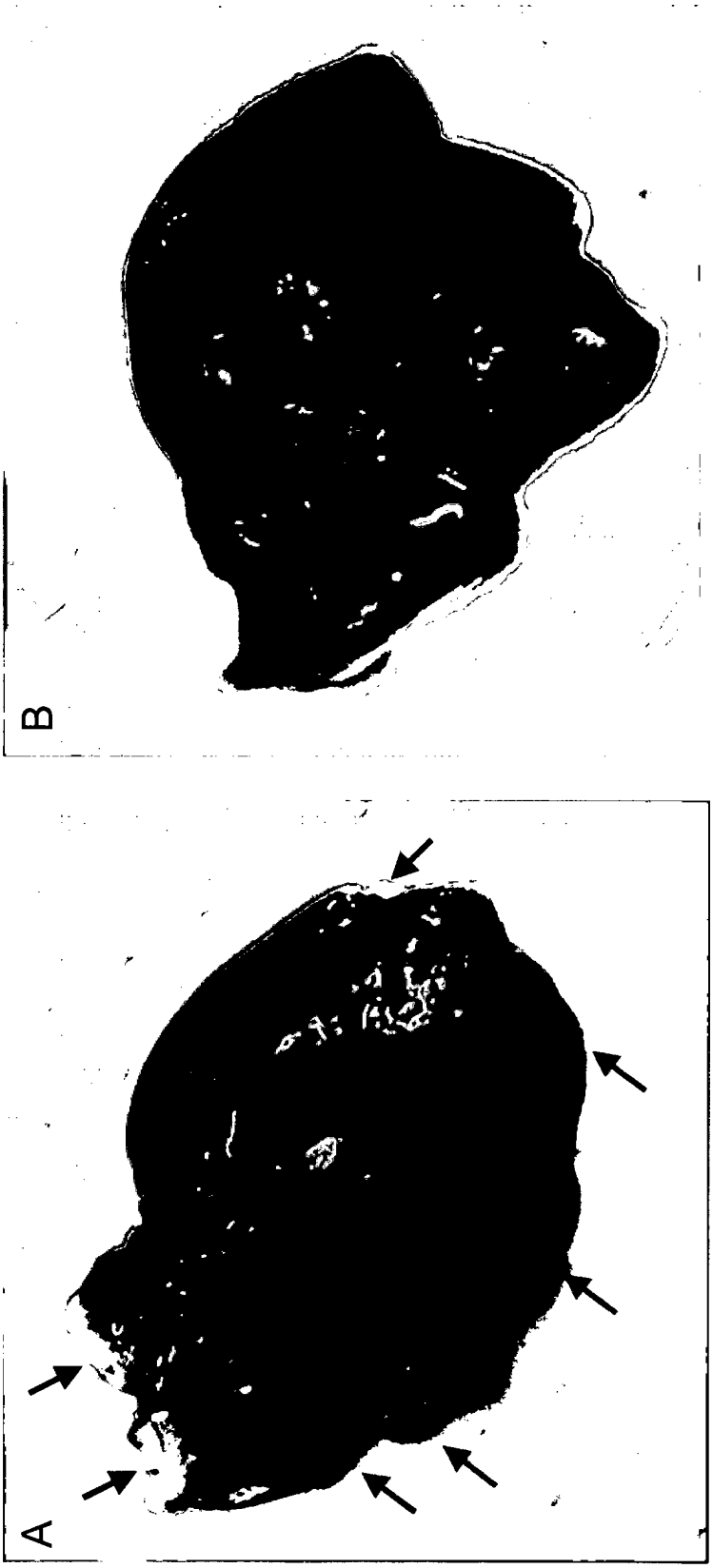
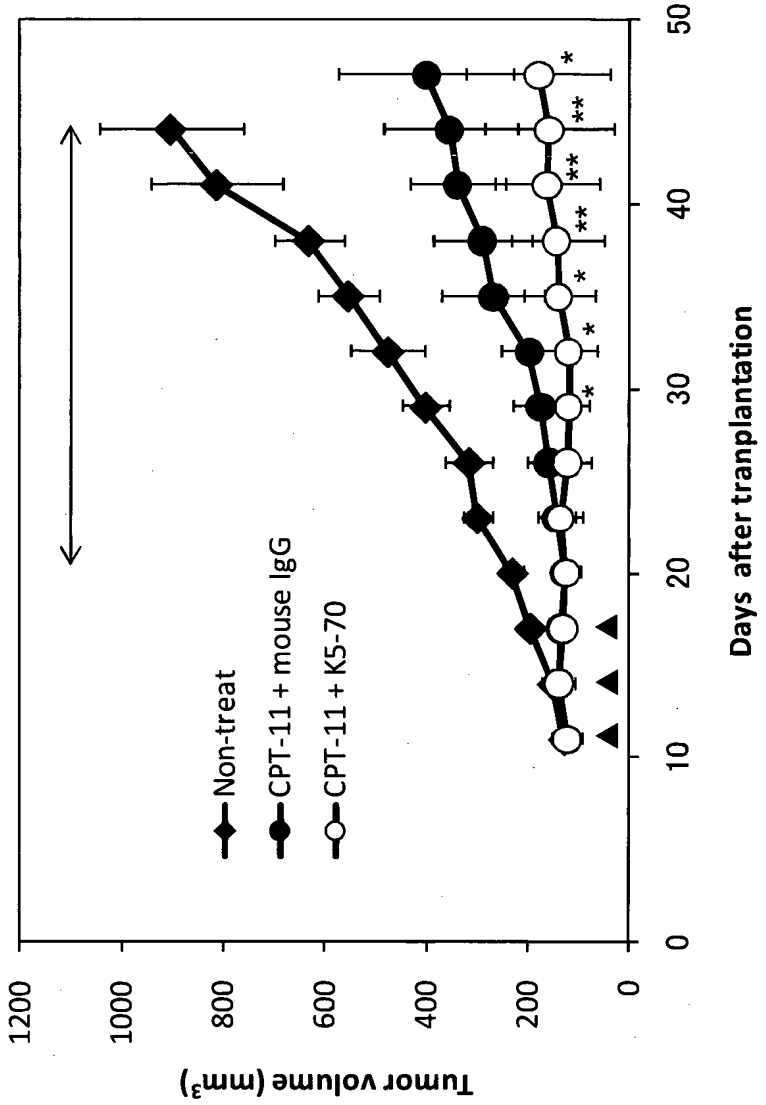


図32


Tumor volume (mm3)
1200
1000
800
600
400
200
0
0
10
20
30
40
50
Days after tranplantation
Non-treat
CPT-11 + mouse IgG
CPT-11 + K5-70
*
**
**
**
*
*
*

K5-70
VH

ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTCCACTCCCAG

M G W S C I I L F L V A T A T G V H S Q

GTCCAACTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGGCTTCAGTGAAGCTGTCC

V Q L Q Q P G A E L V R P G A S V K L S

TGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACCATCTACTGGATAAACTGGGTGAAACAGAGGCCT

C K A S G Y T F T I Y W I N W V K Q R P

GGACAAGGCCTTGAGTGGATCGGAAATATTTATCCTTCTGATAGTTATACTAACTACAAT

G Q G L E W I G N I Y P S D S Y T N Y N

CAAAAGTTCAAGGACAAGGCCACATTGACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATG

Q K F K D K A T L T V D K S S S T A Y M

CAGCTCAGCAGCCCGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTACAAGAACGTCTATG

Q L S S P T S E D S A V Y Y C T R T S M

GCGGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

A D Y W G Q G T T L T V S S

図 33

K5-70
VL

ATGGTATCCACACCTCAGTTCCTTGTATTTTTGCTTTTCTGGATTCCAGCCTCCAGAGGT
M V S T P Q F L V F L L F W I P A S R G
GACATCTTGCTGACTCAGTCTCCAGCCATCCTGTCTGTGAGTCCAGGAGAAAGAGTCAGT
D I L L T Q S P A I L S V S P G E R V S
TTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGCATTGGCACAAGCATACACTGGTATCAGCAAAGAACA
F S C R A S Q S I G T S I H W Y Q Q R T
AATGGTTCTCCAAGGCTTCTCATAAAGTATGCTTCTGAGTCTATCTCTGGGATCCCTTCC
N G S P R L L I K Y A S E S I S G I P S
AGGTTTAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTTACTCTTAGCATCAACAGTGTGGAGTCT
R F S G S G S G T D F T L S I N S V E S
GAAGATATTGCAGATTATTACTGTCAACAAAGTAATAGCTGGCCATTCACGTTCGGCTCG
E D I A D Y Y C Q Q S N S W P F T F G S
GGGACAAAGTTGGAAATAAAA
G T K L E I K

図34

K5-107
VH

ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTCCACTCCCAG

M G W S C I I L F L V A T A T G V H S Q

GTCCAACTGCAGCAACCTGGGTCTGAGCTGGTGAGGCCTGGAGCTTCAGTGAAGCTGTCC

V Q L Q Q P G S E L V R P G A S V K L S

TGCAAGGCTTCTGGCTACACATTCACCAGCTACTGGATGCACTGGGTGAAGCAGAGGCAT

C K A S G Y T F T S Y W M H W V K Q R H

GGACAAGGCCTTGAGTGGATTGGAAATATTTATCCTGGTGGTGGTTATACTAACTACGAT

G Q G L E W I G N I Y P G G G Y T N Y D

GAGAAGTTCAAGAGCAAGGGCACACTGACTGTAGACACATCCTCCAGCACAGCCTACATG

E K F K S K G T L T V D T S S S T A Y M

CACCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTACAAGATCATCCGTT

H L S S L T S E D S A V Y Y C T R S S V

TTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

F D Y W G Q G T T L T V S S

図35

K5-107
VL

ATGGTATCCACACCTCAGTTCCTTGTATTTTTGCTTTTCTGGATTCCAGCCTCCAGAGGT

M V S T P Q F L V F L L F W I P A S R G

GACATCTTGCTGACTCAGTCTCCAGCCATCCTGTCTGTGAGTCCAGGAGAAAGAGTCAGT

D I L L T Q S P A I L S V S P G E R V S

TTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAACATTGGCACAAGCATACACTGGTTTCAGCAAAGAACA

F S C R A S Q N I G T S I H W F Q Q R T

AATGGTTCTCCAAGGCTTCTCATAAAGTATGCTTCTGAGTCTATCTCTGGGATCCCTTCC

N G S P R L L I K Y A S E S I S G I P S

AGGTTTAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTTACTCTTAGCATCAACAGTGTGGAGTCT

R F S G S G S G T D F T L S I N S V E S

GAAGATATTGCAGATTATTACTGTCAACAAAGTAATAGCTGGCCATTCACGTTCGGCTCG

E D I A D Y Y C Q Q S N S W P F T F G S

GGGACAAAGTTGGAAATAAAA

G T K L E I K

K5-116-2-1
VH

ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTCCACTCCCAG
M G W S C I I L F L V A T A T G V H S Q
GTCCAACTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGGCTTCAGTGAAGCTGTCC
V Q L Q Q P G A E L V R P G A S V K L S
TGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACCAGCTACTGGATAACCTGGGTGAAGCAGAGGCCT
C K A S G Y T F T S Y W I T W V K Q R P
GGACAAGGCCTTGAGTGGATCGGAAATATTTATCCTTCTGATAGTTATACTAACTACAAT
G Q G L E W I G N I Y P S D S Y T N Y N
CAAAAGTTCAGGGACAAGGCCACATTGACTGTAGACAAATCCTCCAGTACAGCCTACATG
Q K F R D K A T L T V D K S S S T A Y M
CAGCTCAGCAGCCCGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTTCAGCCCTCTTTGAC
Q L S S P T S E D S A V Y Y C S A L F D
TACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA
Y W G Q G T T L T V S S

K5-116-2-1
VL

ATGGTATCCACACCTCAGTTCCTTGTATTTTTGCTTTTCTGGATTCCAGCCTCCAGAGGT
M V S T P Q F L V F L L F W I P A S R G
GACATCTTGCTGACTCAGTCTCCAGCCATCCTGTCTGTGAGTCCAGGAGAAAGAGTCAGT
D I L L T Q S P A I L S V S P G E R V S
TTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGCATTGGCACAAGCATACACTGGTATCAGCAAAGAACA
F S C R A S Q S I G T S I H W Y Q Q R T
AATGGTTCTCCAAGGCTTCTCATAAAGTATGCTTCTGAGTCTATCTCTGGGATCCCTTCC
N G S P R L L I K Y A S E S I S G I P S
AGGTTTAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTTATTCTTAGCATCAACAGTGTGGAGTCT
R F S G S G S G T D F I L S I N S V E S
GAAGATATTGCAGATTATTACTGTCAACAAAGTAATAGCTGGCCATTCACGTTCGGCTCG
E D I A D Y Y C Q Q S N S W P F T F G S
GGGACAAAGTTGGAAATAAAA
G T K L E I K

T6-16
VH

ATGGGATGGAGCTGGATCTTTCTCTTCCTCCTGTCAGGAACTGCAGGCGTCCACTCTGAG

M G W S W I F L F L L S G T A G V H S E

GTCCAGCTTCAGCAGTCAGGACCTGAGCTGGTGAAACCTGGGGCCTCAGTGAAGATTTCC

V Q L Q Q S G P E L V K P G A S V K I S

TGCAAGGCTTCTGGATACACATTCACTGACTACAATATGCACTGGGTGAAGCAGAGCCAT

C K A S G Y T F T D Y N M H W V K Q S H

GGAAAGAACCTTGAATGGATTGGATATATTTATCCTTACAATGGTGGTACTGGCTACAAC

G K N L E W I G Y I Y P Y N G G T G Y N

CAGAGGTTCAAGAGCAGGGCCACAATGACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATG

Q R F K S R A T M T V D K S S S T A Y M

GAGCTCCGCAGCCTGACATCTGATGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGAGAAGACTAC

E L R S L T S D D S A V Y Y C A R E D Y

GGTAGTAGCCCCTCTTATGCTATGGACTATTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCATCGTCTCC

G S S P S Y A M D Y W G Q G T S V I V S

TCA

S

図 39

T6-16
VL

ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGTTCTGGATTCCTGCTTCCAGCAGTGAT

M K L P V R L L V L M F W I P A S S S D

GTTGTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAGGCCTCCATC

V V M T Q T P L S L P V S L G D Q A S I

TCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTTGTACACGGTAATGGAAACACCTATTTACATTGGTAC

S C R S S Q S L V H G N G N T Y L H W Y

CTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCT

L Q K P G Q S P K L L I Y K V S N R F S

GGGGTCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACGGATTTCACACTCAAGATCAGC

G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S

AGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTTCTGCTCTCAAACTACACATGTTCCCACG

R V E A E D L G V Y F C S Q T T H V P T

TTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAAATAAAA

F G S G T K L E I K

図40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2011/061709

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C07K16/32(2006.01)i, *A61K39/395*(2006.01)i, *A61K45/00*(2006.01)i, *A61P35/00*(2006.01)i, *C12N5/10*(2006.01)i, *C12N15/09*(2006.01)i, *G01N33/574*(2006.01)i, *C12P21/08*(2006.01)n
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K16/32, A61K39/395, A61K45/00, A61P35/00, C12N5/10, C12N15/09, G01N33/574, C12P21/08

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPLUS/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), UniProt/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	JP 2009-528995 A (Arius Research, Inc.), 13 August 2009 (13.08.2009), & US 2007/0202113 A1 & EP 1996700 A1 & WO 2007/095748 A1	1-12,49-68/ 13-48
X/Y	JP 2009-527230 A (Arius Research, Inc.), 30 July 2009 (30.07.2009), & US 2007/0202043 A1 & EP 1996701 A1 & WO 2007/095749 A1	1-12,49-68/ 13-48
Y	JP 2006-502698 A (Immunomedics, Inc.), 26 January 2006 (26.01.2006), & US 2004/0001825 A1 & EP 1483295 A2 & WO 2003/074566 A2	1-68

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

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

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
13 June, 2011 (13.06.11)	21 June, 2011 (21.06.11)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

OnCusp
Ex. 1038

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2011/061709

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2001-501801 A (BRISTOL-MYERS SQUIBB CO.), 13 February 2001 (13.02.2001), & US 5840854 A & EP 856054 A1 & WO 1997/014796 A1	1-68

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１１／０６１７０９

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C07K16/32(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61K45/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, G01N33/574(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)n

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C07K16/32, A61K39/395, A61K45/00, A61P35/00, C12N5/10, C12N15/09, G01N33/574, C12P21/08

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

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

CAPLUS/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), UniProt/GeneSeq

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
Ｘ／Ｙ	JP 2009-528995 A (アリアス　リサーチ、インコーポレイテッド) 2009.08.13, & US 2007/0202113 A1 & EP 1996700 A1 & WO 2007/095748 A1	1-12, 49-68 /13-48
Ｘ／Ｙ	JP 2009-527230 A (アリアス　リサーチ、インコーポレイテッド) 2009.07.30, & US 2007/0202043 A1 & EP 1996701 A1 & WO 2007/095749 A1	1-12, 49-68 /13-48

☑　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☐　パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
１３．０６．２０１１	２１．０６．２０１１

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
郵便番号１００－８９１５
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｎ　４４３４
藤井　美穂
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４８８

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１１／０６１７０９

Ｃ（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
Y	JP 2006-502698 A (イミューノメディクス、インコーポレイテッド) 2006.01.26, & US 2004/0001825 A1 & EP 1483295 A2 & WO 2003/074566 A2	1-68
Y	JP 2001-501801 A (ブリストルーマイヤーズ　スクイップ　カンパニー) 2001.02.13, & US 5840854 A & EP 856054 A1 & WO 1997/014796 A1	1-68

OnCusp
Ex. 1038

(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
2011 年 12 月 15 日(15.12.2011)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2011/155579 A1

(51) 国際特許分類:
C07K 16/28 (2006.01) *C12N 5/10* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)
A61K 45/00 (2006.01) *C12P 21/08* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2011/063294

(22) 国際出願日: 2011 年 6 月 9 日(09.06.2011)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
61/353430 2010 年 6 月 10 日(10.06.2010) US

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 北海道公立大学法人札幌医科大学(SAPPORO MEDICAL UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒0600061 北海道札幌市中央区南１条西１７丁目２９１ Hokkaido (JP). 協和発酵キリン株式会社(Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd.) [JP/JP]; 〒1008185 東京都千代田区大手町１丁目６番１号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 山口 美樹(YAMAGUCHI Miki). 加藤 和則(KATO Kazunori). 濱田 洋文(HAMADA Hirofumi). 中村和靖(NAKAMURA Kazuyasu). 杉本 義幸(SUGIMOTO Yoshiyuki). 久保田 麗夫(KUBOTA Tsuguo). 池田 昌弘(IKEDA Masahiro).

(74) 代理人: 小栗 昌平, 外(OGURI Shohei et al.); 〒1050003 東京都港区西新橋一丁目７番１３号 虎ノ門イーストビルディング１０階 栄光特許事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, 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, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告（条約第 21 条(3)）
— 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)）

WO 2011/155579 A1

(54) **Title**: ANTI-Trop-2 ANTIBODY

(54) 発明の名称 : 抗Ｔｒｏｐ－２抗体

(57) **Abstract**: Disclosed is an anti-Trop-2 antibody related to: a monoclonal antibody or antibody fragment against human Trop-2 that specifically binds to the human Trop-2 extracellular domain, a hybridoma that produces said antibody, DNA that codes said antibody, a vector that contains said DNA, a transformant obtained by introducing said vector; and a method for producing an antibody or antibody fragment that uses said hybridoma or said transformant, or a therapeutic drug or diagnostic agent that uses said antibody fragment.

(57) 要約: 本発明は、ヒトＴｒｏｐ－２細胞外領域に特異的に結合するヒトＴｒｏｐ－２に対するモノクローナル抗体または該抗体断片、該抗体を産生するハイブリドーマ、該抗体をコードするＤＮＡ、該ＤＮＡを含むベクター、該ベクターを導入して得られる形質転換体、該ハイブリドーマまたは該形質転換体を用いる抗体または抗体断片の製造方法または該抗体断片を用いる治療薬または診断薬に関する。

明　細　書

発明の名称 ： 抗Ｔｒｏｐ－２抗体

技術分野

[0001] 本発明は、高いアフィニティーでヒトＴｒｏｐ－２細胞外領域に結合し、かつ高い抗体依存的細胞傷害活性（ａｎｔｉｂｏｄｙ－ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ　ｃｅｌｌｕｌａｒ　ｃｙｔｏｔｏｘｉｃｉｔｙ、以下ＡＤＣＣ活性と記す）、高い抗腫瘍活性を発揮するモノクローナル抗体またはその抗体断片、該抗体を産生するハイブリドーマ、該抗体をコードするＤＮＡ、該ＤＮＡを含むベクター、該ベクターを導入して得られる形質転換体、該ハイブリドーマまたは該形質転換体を用いる抗体または該抗体断片の製造方法、抗体または該抗体断片を用いる治療薬および診断薬に関する。

背景技術

[0002] Ｔｒｏｐ－２は別名Ｔｕｍｏｒ　ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ　ｃａｌｃｉｕｍ　ｓｉｇｎａｌ　ｔｒａｎｓｄｕｃｅｒ　２（ＴＡＣＳＴＤ２）、ＧＡ７３－１、ｇｐ５０、Ｔ１６としても知られる、３２３アミノ酸から成るＩ型膜タンパク質である。Ｔｒｏｐ－２は、ヒト栄養芽細胞に反応するモノクローナル抗体１６２－２５．３、１６２－４６．２の認識タンパク質として見出された（非特許文献１）。

[0003] Ｔｒｏｐ－２の遺伝子は、１９８９年にクローニングされている（非特許文献２）。Ｔｒｏｐ－２のＤＮＡ配列、アミノ酸配列および立体構造は、公的データベース上に公開されており、例えば、ＮＰ＿００２３４４、ＮＭ＿００２３５３（ＮＣＢＩ）等のアクセッション番号から参照可能である。Ｔｒｏｐ－２のアミノ酸配列は、Ｎ末端２６アミノ酸から成るシグナル配列、２４８アミノ酸から成る細胞外ドメイン、２３アミノ酸から成る膜貫通ドメイン、２６アミノ酸から成る細胞内ドメインで構成されている。Ｔｒｏｐ－２の分子量の理論計算値は３５キロダルトンであるが、糖鎖付加を受け、１０キロダルトン前後増加することが知られている。

[0004] Ｔｒｏｐ－２は、ファミリー分子であるＥｐＣＡＭ（別名Ｔｒｏｐ－１）と、同一のシステイン残基の数および位置を有することから、構造が類似することが推定されている（非特許文献２）。ＥｐＣＡＭの細胞外領域は、システイン残基に富むＮ末端側の二つのドメインと、システイン残基の少ないＣ末端側のドメインの、３つのドメインから成る（非特許文献１５）。ＥｐＣＡＭにおいては、Ｎ末端側の第一のドメインは細胞間のＥｐＣＡＭ同士の接着に、第二のドメインは同一細胞膜上のＥｐＣＡＭ同士の相互作用に関与することが知られている（非特許文献１５）。

[0005] Ｔｒｏｐ－２は多くの癌で発現が認められており、発現と予後不良との相関も報告されている（非特許文献３－９）。また、大腸癌において、足場非依存性増殖への関与が報告されている（非特許文献１０）。正常組織におけるＴｒｏｐ－２の発現は、いくつかの組織の上皮細胞に限られていると報告されている。

[0006] １６２－２５．３、１６２－４６．２が報告されて以降、Ｔｒｏｐ－２に対するモノクローナル抗体は複数樹立されている（非特許文献１１－１３、特許文献１－３）。７７２２０など、試薬として市販されている抗Ｔｒｏｐ－２モノクローナル抗体もある。これら、樹立された抗Ｔｒｏｐ－２モノクローナル抗体のいくつかは癌治療への利用が検討されている。

[0007] 抗Ｔｒｏｐ－２モノクローナル抗体の一つであるＢＲ１１０（特許文献１）は細胞表面のＴｒｏｐ－２に結合後、細胞内にインターナリゼーションすることから、抗細胞薬剤とのコンジュゲートの検討例が報告されている。本コンジュゲートはＨ２９８７、Ｈ３３９６、Ｈ３６１９、ＭＣＦ－７といった癌細胞に対して細胞傷害活性を示すことが開示されている。

[0008] 抗Ｔｒｏｐ－２モノクローナル抗体の一つであるＲＳ７（特許文献２、非特許文献１１、１４、１６）は細胞表面のＴｒｏｐ－２に結合後、細胞内にインターナリゼーションすることから、抗細胞薬剤とのコンジュゲートの検討例が報告されている。該抗体のヒト化抗体ｈＲＳ７と放射性同位元素（^{131}Ｉ、^{131}Ｉ－ＩＭＲ－Ｒ４）とのコンジュゲートは、乳癌細胞株を用いたヒト

癌細胞異所移植モデルで抗腫瘍活性を示すことが開示されている。

[0009] 抗Ｔｒｏｐ－２モノクローナル抗体の一つであるＡＲ４７Ａ６．４．２（特許文献３）およびＡＲ５２Ａ３０１．５（特許文献４）は、標的細胞であるＴｒｏｐ－２発現癌細胞を特異的に傷害することにより薬効を発揮する抗体である。特許文献３および４には、これらの抗体が癌細胞を直接的に殺傷することが開示されている。

[0010] また、ＡＲ４７Ａ６．４．２のヒト化抗体ｈｕＡＲ４７Ａ６．４．２（特許文献５）は細胞内のＥｘｔｒａｃｅｌｌｕｌａｒ－ｓｉｇｎａｌ ｒｅｇｕｌａｔｅｄ ｋｉｎａｓｅ（ＥＲＫ）の活性化を抑制することが開示されている。さらに、特許文献５には、補体依存性細胞傷害活性（Ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔ－ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ Ｃｙｔｏｔｏｘｉｃｉｔｙ、以下ＣＤＣ活性と表記する）については、ｈｕＡＲ４７Ａ６．４．２は、補体価の高いウサギ血清を用いた場合に、Ｔｒｏｐ－２陽性のヒト細胞株に対してＣＤＣ活性を示すことが開示されている。

先行技術文献

特許文献

[0011] 特許文献1：国際公開第９７／１４７９６号
特許文献2：国際公開第２００３／０７４５６６号
特許文献3：国際公開第２００７／０９５７４８号
特許文献4：国際公開第２００７／０９５７４９号
特許文献5：国際公開第２００８／１４４８９１号

非特許文献

[0012] 非特許文献1：Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８，５１４７（１９８１）
非特許文献2：Ｉｎｔ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ，６２，６１０（１９９５）
非特許文献3：Ｍｏｄ．Ｐａｔｈｏｌ．，２１，１８６（２００８）
非特許文献4：Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．，１２，３０５７（２００６）

非特許文献5：Ｂｒ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ，９９，１２９０（２００８）
非特許文献6：Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｐａｔｈｏｌ．，６２，１５２（２００９）
非特許文献7：Ｅｕｒ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ，４６，９４４（２０１０）
非特許文献8：Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．，６２，５３２５（２００２）
非特許文献9：Ｌａｂ．Ｉｎｖｅｓｔ．８４，３２０（２００４）
非特許文献10：Ｍｏｌ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｔｈｅｒ．，７，２８０（２００８）
非特許文献11：Ｉｎｔ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ，３９，２９７（１９８７）
非特許文献12：Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．，５０，１３３０（１９９０）
非特許文献13：Ｈｙｂｒｉｄｏｍａ，１１，５３９（１９９２）
非特許文献14：Ｂｒｅａｓｔ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．Ｔｒｅａｔ．，８４，１７３，（２００４）
非特許文献15：Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．，２１，２５７０（２００１）
非特許文献16：Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．，１７，３１５７(２０１１)

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0013] しかしながら、特許文献１に記載のＢＲ１１０は、抗細胞薬剤を結合していない場合には細胞傷害活性を持たない。また、特許文献２、非特許文献１１、１４および１６に記載のＲＳ７は、抗細胞薬剤を結合していない場合には細胞傷害活性を示さない。また、特許文献５に記載のｈｕＡＲ４７Ａ６．４．２のＡＤＣＣ活性については報告がない。

[0014] さらに、ヒトＴｒｏｐ－２の細胞外領域に高いアフィニティーで結合する抗Ｔｒｏｐ－２モノクローナル抗体については報告がない。ヒトＴｒｏｐ－２の細胞外領域に高いアフィニティーで結合する抗Ｔｒｏｐ－２モノクローナル抗体は、ヒトＴｒｏｐ－２陽性のヒト細胞株に対して高いＡＤＣＣ活性および抗腫瘍活性を示すと考えられる。

[0015] したがって、本発明は、高いアフィニティーでヒトＴｒｏｐ－２細胞外領域に結合するヒトＴｒｏｐ－２に対するモノクローナル抗体または該抗体断片、該抗体を産生するハイブリドーマ、該抗体をコードするＤＮＡ、該ＤＮＡを含むベクター、該ベクターを導入して得られる形質転換体、該ハイブリドーマまたは該形質転換体を用いる抗体または抗体断片の製造方法または該抗体断片を用いる治療薬または診断薬を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0016] すなわち、本発明は以下の通りである。

１．ヒトＴｒｏｐ－２の細胞外領域のうち、少なくともドメインＩに結合するヒトＴｒｏｐ－２に対するモノクローナル抗体または該抗体断片。

２．配列番号１で表されるアミノ酸配列のうち、３４番目～７２番目の少なくとも１つのアミノ酸に結合する前項１に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

３．抗体の抗原に対する解離定数（K_D）が５×１０$^{-10}$M以下である前項１または２に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

４．高いＡＤＣＣ活性および抗腫瘍活性を有する前項１～３のいずれか１に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

５．相補鎖決定領域（ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔａｒｉｔｙ ｄｅｔｅｒｍｉｎｉｎｇ ｒｅｇｉｏｎ、以下ＣＤＲと記す）１～３がそれぞれ配列番号１３～１５で表されるアミノ酸配列を含む抗体の重鎖（以下、Ｈ鎖と記す）を含み、かつＣＤＲ１～３がそれぞれ配列番号１６～１８で表されるアミノ酸配列である抗体の軽鎖（以下、Ｌ鎖と記す）を含む、前項１～４のいずれか１に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

６．配列番号１０で表されるアミノ酸配列を含むＨ鎖可変領域（以下、ＶＨと記す）を含み、かつ配列番号１２で表されるアミノ酸配列を含むＬ鎖可変領域（以下、ＶＬと記す）を含む抗体が結合するＴｒｏｐ－２の細胞外領域に存在するエピトープと、同じエピトープに結合するモノクローナル抗体または該抗体断片。

７．前項５または６に記載の抗体と競合してＴｒｏｐ－２の細胞外領域に結合するモノクローナル抗体または該抗体断片。

８．遺伝子組換え抗体である、前項１～７のいずれか１に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

９．ヒト型キメラ抗体、ヒト化抗体およびヒト抗体から選ばれる遺伝子組換え抗体である、前項８に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

１０．ヒト化抗体であって、以下の（ａ）ＶＨおよび（ｂ）ＶＬを含む前項９に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

（ａ）配列番号２４で表されるアミノ酸配列、または配列番号２４で表されるアミノ酸配列の９番目のＡｌａをＰｒｏに、１２番目のＬｙｓをＶａｌに、２０番目のＶａｌをＩｌｅに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、７０番目のＩｌｅをＬｅｕに、９５番目のＴｙｒをＰｈｅに、および１１２番目のＶａｌをＬｅｕに置換するアミノ酸改変のうち、少なくとも１つの改変を行ったアミノ酸配列含むＶＨ。

（ｂ）配列番号２６で表されるアミノ酸配列、または配列番号２６で表されるアミノ酸配列の１５番目のＬｅｕをＡｌａに、１９番目のＡｌａをＶａｌに、２１番目のＩｌｅをＭｅｔに、および８４番目のＬｅｕをＶａｌに置換するアミノ酸改変のうち、少なくとも１つの改変を行ったアミノ酸配列を含むＶＬ。

１１．以下の（１）～（５）から選ばれる前項１０に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

（１）配列番号２８で表されるアミノ酸配列を含む抗体のＶＨおよび配列番号２６で表されるアミノ酸配列を含む抗体のＶＬの少なくとも一方を含むヒト化抗体

（２）配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含む抗体のＶＨおよび配列番号２６で表されるアミノ酸配列を含む抗体のＶＬの少なくとも一方を含むヒト化抗体

（３）配列番号３２で表されるアミノ酸配列を含む抗体のＶＨおよび配列番号２６で表されるアミノ酸配列を含む抗体のＶＬの少なくとも一方を含むヒト化抗体

（４）配列番号３４で表されるアミノ酸配列を含む抗体のＶＨおよび配列番号３６で表されるアミノ酸配列を含む抗体のＶＬの少なくとも一方を含むヒト化抗体

（５）配列番号３４で表されるアミノ酸配列を含む抗体のＶＨおよび配列番号３８で表されるアミノ酸配列を含む抗体のＶＬの少なくとも一方を含むヒト化抗体

１２．Ｆａｂ、Ｆａｂ’、（Ｆａｂ’）$_2$、一本鎖抗体（ｓｃＦｖ）、二量体化Ｖ領域（Ｄｉａｂｏｄｙ）、ジスルフィド安定化Ｖ領域（ｄｓＦｖ）およびＣＤＲを含むペプチドから選ばれる抗体断片である、前項１～１１のいずれか１に記載の抗体断片。

１３．前項１～１２のいずれか１に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片をコードするＤＮＡ。

１４．前項１３に記載のＤＮＡを含有する組換え体ベクター。

１５．前項１４に記載の組換え体ベクターを宿主細胞に導入して得られる形質転換株。

１６．前項１４に記載の形質転換株を培地に培養し、培養物中に前項１～１２のいずれか１に記載の抗体または該抗体断片を精製蓄積させ、培養物から該抗体または該抗体断片を採取することを特徴とする前項１～１２のいずれか１に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片の製造方法。

１７．前項１～１２のいずれか１に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片を含むヒトＴｒｏｐ－２の検出または測定用試薬。

１８．前項１～１２のいずれか１に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片を有効成分として含有するヒトＴｒｏｐ－２陽性細胞が関与する疾患の診断薬。

１９．ヒトＴｒｏｐ－２陽性細胞が関与する疾患が癌である、前項１８に記

載の診断薬。

２０．前項１～１２のいずれか１に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片を有効成分として含有するヒトＴｒｏｐ－２陽性細胞が関与する疾患の治療薬。

２１．ヒトＴｒｏｐ－２陽性細胞が関与する疾患が癌である、前項２０に記載の治療薬。

２２．前項１～１２のいずれか１に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片を用いてヒトＴｒｏｐ－２陽性細胞を検出または測定することを含む、ヒトＴｒｏｐ－２陽性細胞が関与する疾患の診断方法。

２３．前項１～１２のいずれか１に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片を用いてヒトＴｒｏｐ－２を検出または測定することを含む、ヒトＴｒｏｐ－２陽性細胞が関与する疾患の診断方法。

２４．ヒトＴｒｏｐ－２陽性細胞が関与する疾患が癌である、前項２２または２３に記載の診断方法。

２５．ヒトＴｒｏｐ－２陽性細胞が関与する疾患の診断薬を製造するための、前項１～１２のいずれか１に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片の使用。

２６．ヒトＴｒｏｐ－２陽性細胞が関与する疾患が癌である、前項２５に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片の使用。

２７．ヒトＴｒｏｐ－２陽性細胞が関与する疾患の治療薬を製造するための、前項１～１２のいずれか１に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片の使用。

２８．ヒトＴｒｏｐ－２陽性細胞が関与する疾患が癌である、前項２７に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片の使用。

発明の効果

[0017] 本発明のヒトＴｒｏｐ－２に対するモノクローナル抗体または該抗体断片は、ヒトＴｒｏｐ－２の細胞外領域のうち少なくともドメインＩを特異的に認識し、該細胞外領域に高いアフィニティーで結合することができる。これ

により、本発明のモノクローナル抗体または該抗体断片は、ヒトＴｒｏｐ－２陽性細胞に対し、高いＡＤＣＣ活性および抗腫瘍活性を有することができる。したがって、本発明のヒトＴｒｏｐ－２に対するモノクローナル抗体または該抗体断片は、ヒトＴｒｏｐ－２陽性細胞が関与する疾患の治療および診断等に非常に有用である。

[0018] また、本発明は、前記抗体を産生するハイブリドーマ、該抗体をコードするＤＮＡ、該ＤＮＡを含むベクター、該ベクターを導入して得られる形質転換体、該ハイブリドーマまたは形質転換体を用いる抗体または該抗体断片の製造方法、抗体または該抗体断片を用いる治療薬および診断薬を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0019] [図1]図１（ａ）は、ヒト膵臓癌細胞株ＢｘＰＣ－３に対するＫＭ４０９７の反応性をＦＣＭにより解析した結果を示す。図１（ｂ）は、ヒト卵巣癌細胞株ＣａＯＶ－３に対するＫＭ４０９７の反応性をＦＣＭにより解析した結果を示す。図１（ｃ）は、ヒト乳癌細胞株ＭＣＦ－７に対するＫＭ４０９７の反応性をＦＣＭにより解析した結果を示す。図１（ｄ）は、ヒト大腸癌細胞株Ｃｏｌｏ２０５に対するＫＭ４０９７の反応性をＦＣＭにより解析した結果を示す。図１（ａ）～（ｄ）において、黒部分はＫＭ４０９７を１０μｇ／ｍＬ添加した時のヒストグラムを、白部分は陰性対照抗体でのヒストグラムを示す。

[図2]図２は、ヒト膵臓癌細胞株ＢｘＰＣ－３へのｃＡＲ４７Ａ６．４．２の結合に対する、抗Ｔｒｏｐ－２マウスモノクローナル抗体の拮抗作用を、ＦＣＭにより解析した結果を示す。横軸には各抗体の濃度を、縦軸にはｃＡＲ４７Ａ６．４．２の結合を表すＭＦＩ値を示す。●はＫＭ４０９７を、□は７７２２０を共存させた場合のＭＦＩ値を示す。

[図3]図３は、ヒト膵臓癌細胞株ＢｘＰＣ－３への各抗Ｔｒｏｐ－２マウスモノクローナル抗体の結合に対する、ｃＡＲ４７Ａ６．４．２の拮抗作用を、ＦＣＭにより解析した結果を示す。横軸にはｃＡＲ４７Ａ６．４．２の濃度

を、縦軸には各競合抗体の結合を表すＭＦＩ値を示す。●はＫＭ４０９７を、□は７７２２０を共存させた場合のＭＦＩ値を示す。

[図4]図４は、組換えＴｒｏｐ－２へのＫＭ４０９７の結合に対する、抗Ｔｒｏｐ－２モノクローナル抗体の拮抗作用を、バインディングＥＬＩＳＡで解析した結果を示す。横軸には各抗体の濃度を、縦軸にはＫＭ４０９７の結合率（％）を示す。■はｃＡＲ４７Ａ６．４．２を、□は７７２２０を共存させた場合のＫＭ４０９７の結合率（％）を示す。

[図5]図５は、組換えＴｒｏｐ－２への７７２２０の結合に対する、抗Ｔｒｏｐ－２モノクローナル抗体の拮抗作用をバインディングＥＬＩＳＡで解析した結果を示す。横軸には各抗体の濃度を、縦軸には７７２２０の結合率（％）を示す。●はＫＭ４０９７を、■はｃＡＲ４７Ａ６．４．２を、△はＭＯｖ１６を共存させた場合の７７２２０の結合率（％）を示す。

[図6]図６（ａ）および（ｂ）は、ヒト乳癌細胞株ＭＣＦ－７細胞に対する抗Ｔｒｏｐ－２抗体の抗体依存性細胞傷害活性（ＡＤＣＣ活性）を示す。図６（ａ）はドナー１、図６（ｂ）はドナー２の結果である。横軸に各抗体の濃度を、縦軸に細胞傷害活性率（％）を示す。●はＫＭ４５９０を、◇はｃＡＲ４７Ａ６．４．２をそれぞれ表す。結果を３ウェルの平均値±標準誤差で表す。＊はＳｔｕｄｅｎｔ’ｓ　ｔ－ｔｅｓｔの結果、ｃＡＲ４７Ａ６．４．２と比較して有意に異なる（ｐ＜０．０５）ことを示す。

[図7]図７（ａ）および（ｂ）は、ヒト大腸癌細胞株Ｃｏｌｏ２０５細胞に対する抗Ｔｒｏｐ－２抗体の抗体依存性細胞傷害活性（ＡＤＣＣ活性）を示す。図７（ａ）はドナー１、図７（ｂ）はドナー２の結果である。横軸に各抗体の濃度を、縦軸に細胞傷害活性率（％）を示す。●はＫＭ４５９０を、◇はｃＡＲ４７Ａ６．４．２をそれぞれ表す。結果を３ウェルの平均値±標準誤差で表す。＊はＳｔｕｄｅｎｔ’ｓ　ｔ－ｔｅｓｔの結果、ｃＡＲ４７Ａ６．４．２と比較して有意に異なる（ｐ＜０．０５）ことを示す。

[図8]図８（ａ）および（ｂ）は、ヒト乳癌細胞株ＭＣＦ－７細胞に対する抗Ｔｒｏｐ－２抗体の抗体依存性細胞傷害活性（ＡＤＣＣ活性）を示す。図８

（ａ）はドナー１、図８（ｂ）はドナー２の結果である。横軸に抗体の濃度を、縦軸に細胞傷害活性率（％）を示す。●はＫＭ４５９０を、○はＫＭ４５９１をそれぞれ表す。結果を３ウェルの平均値±標準誤差で表す。

[図9]図９（ａ）および（ｂ）は、ヒト大腸癌細胞株Ｃｏｌｏ２０５細胞に対する抗体依存性細胞傷害活性（ＡＤＣＣ活性）を示す。図９（ａ）はドナー１、図９（ｂ）はドナー２の結果である。横軸に各抗体の濃度を、縦軸に細胞傷害活性率（％）を示す。●はＫＭ４５９０を、○はＫＭ４５９１をそれぞれ表す。結果を３ウェルの平均値±標準誤差で表す。

[図10]図１０は、ヒト膵臓癌細胞株ＢｘＰＣ－３異所移植マウスにおける抗Ｔｒｏｐ－２キメラ抗体の抗腫瘍結果を示す。縦軸が腫瘍体積、横軸が細胞株移植後の経過日数を示す。○はＰＢＳ投与群、■はｃＡＲ４７Ａ６．４．２－Ｐ投与群、●はＫＭ４５９１投与群を示す。結果を６個体の平均値±標準誤差で表す。＊はＳｔｕｄｅｎｔ’ｓ　ｔ－ｔｅｓｔの結果、ＫＭ４５９１投与群がＰＢＳ投与群と比較して有意に異なる（ｐ＜０．０５）ことを示す。＃はＳｔｕｄｅｎｔ’ｓ　ｔ－ｔｅｓｔの結果、ｃＡＲ４７Ａ６．４．２－Ｐ投与群がＰＢＳ投与群と比較して有意に異なる（ｐ＜０．０５）ことを示す。

[図11]図１１は、ヒト大腸癌細胞株Ｃｏｌｏ２０５異所移植マウスにおける抗Ｔｒｏｐ－２キメラ抗体の抗腫瘍結果を示す。縦軸が腫瘍体積、横軸が細胞株を移植後の経過日数を示す。○はＰＢＳ投与群、■はｃＡＲ４７Ａ６．４．２－Ｐ投与群、●はＫＭ４５９１投与群を示す。結果を５個体の平均値±標準誤差で表す。＊、＊＊、＊＊＊はＳｔｕｄｅｎｔ’ｓ　ｔ－ｔｅｓｔの結果、ＫＭ４５９１投与群がＰＢＳ投与群と比較して有意に異なる（それぞれ、ｐ＜０．０５、ｐ＜０．０１、ｐ＜０．００１）ことを示す。＃はＳｔｕｄｅｎｔ’ｓ　ｔ－ｔｅｓｔの結果、ｃＡＲ４７Ａ６．４．２－Ｐ投与群がＰＢＳ投与群と比較して有意に異なる（ｐ＜０．０５）ことを示す。

[図12]図１２は、設計したＫＭ４０９７ヒト化抗体のＨ鎖可変領域ＨＶ０、ＨＶ２、ＨＶ３ａ、ＨＶ３ｂ、ＨＶ４、ＨＶ５ａ、ＨＶ５ｂ、ＨＶ５ｃ、Ｈ

ＶＨ６、ＨＶ８、ＨＶ９、ＨＶ１０のアミノ酸配列を示す。

[図13]図１３は、設計したＫＭ４０９７ヒト化抗体のＬ鎖可変領域ＬＶ０、ＬＶ２、ＬＶ３ａ、ＬＶ３ｂ、ＬＶ４のアミノ酸配列を示す。

[図14]図１４（ａ）～（ｆ）は、各種抗Ｔｒｏｐ－２マウスモノクローナル抗体の組換えＴｒｏｐ－２への結合に対する、ＫＭ４５９０またはｃＡＲ４７Ａ６．４．２の拮抗作用をバインディングＥＬＩＳＡで解析した結果を示す。横軸には各キメラ抗体の濃度を、縦軸には各マウスモノクローナル抗体の結合率（％）を示す。●はｃＡＲ４７Ａ６．４．２を、○はＫＭ４５９０を共存させた場合のマウスモノクローナル抗体の結合率（％）を示す。

[図15]図１５はＴｒｏｐ－２／ＦＬＡＧ／Ｆｃ、Ｍｕｔａｎｔ　Ａ、Ｍｕｔａｎｔ　Ｂ、Ｍｕｔａｎｔ　Ｃの構造の模式図を示す。

[図16]図１６（ａ）～（ｃ）は、Ｔｒｏｐ－２細胞外領域蛋白質またはそのドメイン欠失体に対してウェスタンブロットでＫＭ４５９０［図１６（ａ）］、ｃＡＲ４７Ａ６．４．２［図１６（ｂ）］または抗ヒトＩｇＧ（Ａｎｔｉ－Ｆｃ）［図１６（ｃ）］を反応させた結果を示す。レーン１、２、３、４はそれぞれ、Ｔｒｏｐ－２／ＦＬＡＧ／Ｆｃ、Ｍｕｔａｎｔ　Ａ、Ｍｕｔａｎｔ　Ｂ、Ｍｕｔａｎｔ　Ｃを示す。

[図17]図１７（ａ）および（ｂ）は、ウェスタンブロットにおけるＫＭ４５９０またはｃＡＲ４７Ａ６．４．２のＴｒｏｐ－２／ＦＬＡＧ／Ｆｃに対する反応性を、還元処理の有無で比較した結果を示す。図１７（ａ）は、非還元状態および還元状態のＴｒｏｐ－２／ＦＬＡＧ／ＦｃへＫＭ４５９０またはｃＡＲ４７Ａ６．４．２を反応させた結果を示す。図１７（ｂ）は、図１７（ａ）の各ＰＤＶＦ膜より抗体を剥離し、抗ヒトＩｇＧ（Ａｎｔｉ－Ｆｃ）を反応させた結果を示す。いずれもレーン１、２はそれぞれ、非還元状態、還元状態のＴｒｏｐ－２／ＦＬＡＧ／Ｆｃを示す。

[図18]図１８は、各ＰＤＶＦ膜における３種類のバンド（非還元状態の上下のバンドおよび還元状態のバンド）のシグナルの強さを定量し、ＫＭ４５９０またはｃＡＲ４７Ａ６．４．２を反応させた場合とＡｎｔｉ－Ｆｃを反応

させた場合との比を算出した結果を示す。

[図19]図１９（ａ）および（ｂ）は、ヒトＴｒｏｐ－２発現ＣＨＯ細胞に対するＡＤＣＣ活性を示す。横軸に各抗体の濃度を、縦軸に細胞傷害活性率（％）を示す。図１９（ａ）はドナー１、図１９（ｂ）はドナー２の結果である。◇はＨＶ３ａＬＶ０を、●はＨＶ４ＬＶ０を、□はＫＭ４５９１をそれぞれ表す。結果を３ウェルの平均値±標準誤差で表す。

発明を実施するための形態

[0020] 本発明は、ヒトＴｒｏｐ－２の細胞外領域に特異的に結合する、ヒトＴｒｏｐ－２に対するモノクローナル抗体（以下、本発明のモノクローナル抗体と略記する。）または該抗体断片に関する。本発明のモノクローナル抗体は、ヒトＴｒｏｐ－２の細胞外領域に高いアフィニティーで結合することにより、高いＡＤＣＣ活性および抗腫瘍活性を有する。

[0021] 本発明におけるヒトＴｒｏｐ－２としては、配列番号１またはＮＣＢＩアクセッション番号ＮＰ＿００２３４４で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドまたは配列番号１またはＮＣＢＩアクセッション番号ＮＰ＿００２３４４で示されるアミノ酸配列において１つ以上のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列から成り、かつＴｒｏｐ－２の機能を有するポリペプチド、ならびに配列番号１またはＮＣＢＩアクセッション番号ＮＰ＿００２３４４で示されるアミノ酸配列と６０％以上、好ましくは８０％以上、さらに好ましくは９０％以上の相同性を有するポリペプチド、最も好ましくは９５％以上の相同性を有するアミノ酸配列から成り、かつＴｒｏｐ－２の機能を有するポリペプチドなどが挙げられる。

[0022] 配列番号１またはＮＣＢＩアクセッション番号ＮＰ＿００２３４４で示されるアミノ酸配列において１つ以上のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチドは、部位特異的変異導入法［Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ，Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｓｅｃｏｎｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ（１９８９）、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏ

ｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ（１９８７－１９９７）、Ｎｕｃｌｅｉｃ ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，１０，６４８７（１９８２）、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，７９，６４０９（１９８２）、Ｇｅｎｅ，３４，３１５（１９８５）、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，１３，４４３１（１９８５）、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８２，４８８（１９８５）］などを用いて、例えば配列番号１で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするＤＮＡに部位特異的変異を導入することにより得ることができる。

[0023] 欠失、置換または付加されるアミノ酸の数は特に限定されないが、好ましくは１個～数十個、例えば、１～２０個、より好ましくは１個～数個、例えば、１～５個のアミノ酸である。

[0024] ヒトＴｒｏｐ－２をコードする遺伝子としては、配列番号２またはＮＣＢＩアクセッション番号ＮＭ＿００２３５３で示される塩基配列が挙げられる。配列番号２またはＮＣＢＩアクセッション番号ＮＭ＿００２３５３で示される塩基配列において、１以上の塩基が欠失、置換または付加された塩基配列から成り、かつＴｒｏｐ－２の機能を有するポリペプチドをコードするＤＮＡを含む遺伝子、配列番号２またはＮＣＢＩアクセッション番号ＮＭ＿００２３５３で示される塩基配列と少なくとも６０％以上の相同性を有する塩基配列、好ましくは８０％以上の相同性を有する塩基配列、さらに好ましくは９５％以上の相同性を有する塩基配列から成り、かつＴｒｏｐ－２の機能を有するポリペプチドをコードするＤＮＡを含む遺伝子、ならびに配列番号２またはＮＣＢＩアクセッション番号ＮＭ＿００２３５３で示される塩基配列を有するＤＮＡとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするＤＮＡから成り、かつＴｒｏｐ－２の機能を有するポリペプチドをコードする遺伝子なども、本発明におけるＴｒｏｐ－２をコードする遺伝子に包含される。

[0025] ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするＤＮＡとしては、配列番号２またはＮＣＢＩアクセッション番号ＮＭ＿００２３５３で示される塩基

配列を有するＤＮＡをプローブに用いた、コロニー・ハイブリダイゼーション法、プラーク・ハイブリダイゼーション法、サザンブロット・ハイブリダイゼーション法、またはＤＮＡマイクロアレイ法などにより得られるハイブリダイズ可能なＤＮＡを意味する。

[0026] 具体的には、ハイブリダイズしたコロニー若しくはプラーク由来のＤＮＡ、または該配列を有するＰＣＲ産物若しくはオリゴＤＮＡを固定化したフィルターまたはスライドガラスを用いて、０．７～１．０ｍｏｌ／Ｌの塩化ナトリウム存在下、６５℃でハイブリダイゼーション［Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ，Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｓｅｃｏｎｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ（１９８９）、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ（１９８７－１９９７）、ＤＮＡ Ｃｌｏｎｉｎｇ １：Ｃｏｒｅ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ，Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ，Ｓｅｃｏｎｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ，（１９９５）］を行った後、０．１～２倍濃度のＳＳＣ溶液（１倍濃度のＳＳＣ溶液の組成は、１５０ｍｍｏｌ／Ｌ塩化ナトリウム、１５ｍｍｏｌ／Ｌクエン酸ナトリウムよりなる）を用い、６５℃条件下でフィルターまたはスライドグラスを洗浄することにより同定できるＤＮＡを挙げることができる。

[0027] 前記ハイブリダイズ可能なＤＮＡとしては、配列番号２またはＮＣＢＩアクセッション番号ＮＭ＿００２３５３で示される塩基配列と少なくとも６０％以上の相同性を有するＤＮＡ、好ましくは８０％以上の相同性を有するＤＮＡ、さらに好ましくは９５％以上の相同性を有するＤＮＡを挙げることができる。

[0028] 真核生物の蛋白質をコードする遺伝子の塩基配列には、しばしば遺伝子の多型が認められる。本発明において用いられる遺伝子に、このような多型によって塩基配列に小規模な変異を生じた遺伝子も、本発明におけるＴｒｏｐ－２をコードする遺伝子に包含される。

[0029] 本発明における相同性の数値は、特に明示した場合を除き、当業者に公知の相同性検索プログラムを用いて算出される数値であってよいが、塩基配列については、ＢＬＡＳＴ［Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２１５，４０３（１９９０）］においてデフォルトのパラメータを用いて算出される数値など、アミノ酸配列については、ＢＬＡＳＴ２［Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．，２５，３３８９（１９９７）、Ｇｅｎｏｍｅ Ｒｅｓ．，７，６４９（１９９７）、ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／Ｅｄｕｃａｔｉｏｎ／ＢＬＡＳＴｉｎｆｏ／ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ３．ｈｔｍｌ］においてデフォルトのパラメータを用いて算出される数値などが挙げられる。

[0030] デフォルトのパラメータとしては、Ｇ（Ｃｏｓｔ ｔｏ ｏｐｅｎ ｇａｐ）が塩基配列の場合は５、アミノ酸配列の場合は１１、－Ｅ（Ｃｏｓｔ ｔｏ ｅｘｔｅｎｄ ｇａｐ）が塩基配列の場合は２、アミノ酸配列の場合は１、－ｑ（Ｐｅｎａｌｔｙ ｆｏｒ ｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ ｍｉｓｍａｔｃｈ）が－３、－ｒ（ｒｅｗａｒｄ ｆｏｒ ｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ ｍａｔｃｈ）が１、－ｅ（ｅｘｐｅｃｔ ｖａｌｕｅ）が１０、－Ｗ（ｗｏｒｄｓｉｚｅ）が塩基配列の場合は１１残基、アミノ酸配列の場合は３残基、－ｙ［Ｄｒｏｐｏｆｆ（Ｘ）ｆｏｒ ｂｌａｓｔ ｅｘｔｅｎｓｉｏｎｓ ｉｎ ｂｉｔｓ］がｂｌａｓｔｎ の場合は２０、ｂｌａｓｔｎ以外のプログラムでは７、－Ｘ（Ｘ ｄｒｏｐｏｆｆ ｖａｌｕｅ ｆｏｒ ｇａｐｐｅｄ ａｌｉｇｎｍｅｎｔ ｉｎ ｂｉｔｓ）が１５および－Ｚ（ｆｉｎａｌ Ｘ ｄｒｏｐｏｆｆ ｖａｌｕｅ ｆｏｒ ｇａｐｐｅｄ ａｌｉｇｎｍｅｎｔ ｉｎ ｂｉｔｓ）がｂｌａｓｔｎ の場合は５０、ｂｌａｓｔｎ以外のプログラムでは２５である（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ｂｌａｓｔ／ｈｔｍｌ／ｂｌａｓｔｃｇｉｈｅｌｐ．ｈｔｍｌ）。

[0031] 配列番号１またはＮＣＢＩアクセッション番号ＮＰ＿００２３４４で示されるアミノ酸配列の部分配列から成るポリペプチドは、当業者に公知の方法

によって作成することができ、例えば、配列番号１で示されるアミノ酸配列をコードするＤＮＡの一部を欠失させ、これを含む発現ベクターを導入した形質転換体を培養することにより作製することができる。

[0032] また、上記の方法で作製されるポリペプチドまたはＤＮＡに基づいて、上記と同様の方法により、配列番号１またはＮＣＢＩアクセッション番号ＮＰ＿００２３４４で示されるアミノ酸配列において１以上のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチドを得ることができる。

[0033] さらに、配列番号１またはＮＣＢＩアクセッション番号ＮＰ＿００２３４４で示されるアミノ酸配列の部分配列から成るポリペプチド、または配列番号１またはＮＣＢＩアクセッション番号ＮＰ＿００２３４４で示されるアミノ酸配列の部分配列において１以上のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチドは、フルオレニルメチルオキシカルボニル（Ｆｍｏｃ）法、ｔ－ブチルオキシカルボニル（ｔＢｏｃ）法などの化学合成法によって製造することもできる。

[0034] 本発明におけるヒトＴｒｏｐ－２の細胞外領域としては、例えば配列番号１で示される該ポリペプチドのアミノ酸配列を公知の膜貫通領域予測プログラムＳＯＳＵＩ（ｈｔｔｐ：／／ｂｐ．ｎｕａｐ．ｎａｇｏｙａ－ｕ．ａｃ．ｊｐ／ＳＯＳＵＩ／ＳＯＳＵＩ＿ｓｕｂｍｉｔ．）、ＴＭＨＭＭ ｖｅｒ．２（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｃｂｓ．ｄｔｕ．ｄｋ／ｓｅｒｖｉｃｅｓ／ＴＭＨＭＭ－２．０／）またはＥｘＰＡＳｙ Ｐｒｏｔｅｏｍｉｃｓ Ｓｅｒｖｅｒ（ｈｔｔｐ：／／Ｃａ．ｅｘｐａｓｙ．ｏｒｇ／）などを用いて予測された領域などが挙げられる。具体的には、ＳＯＳＵＩにおいて予測される細胞外ドメインであるＮ末より２７４番目までが挙げられる。

[0035] 本発明におけるヒトＴｒｏｐ－２の細胞外領域としては、配列番号１またはＮＣＢＩアクセッション番号ＮＰ＿００２３４４で示されるアミノ酸配列を有するＴｒｏｐ－２の細胞外領域が天然状態でとりうる構造と同等の構造を有していればいずれの構造でもよい。Ｔｒｏｐ－２の細胞外領域が天然状

態でとりうる構造とは、細胞膜上に発現しているＴｒｏｐ－２の天然型の立体構造のことをいう。

[0036] 本発明において、ヒトＴｒｏｐ－２の細胞外領域は３つに分類され、Ｎ末側より順にドメインをＩ、ＩＩ、ＩＩＩと表される。すなわち、ヒトＴｒｏｐ－２の細胞外領域のうち、ＥｐＣＡＭの細胞外領域のシステイン残基に富んだ２つのドメインに相同なドメインを、Ｎ末側より順に各々ドメインＩ、ドメインＩＩと表し、システイン残基の少ないＣ末側のドメインを、ドメインＩＩＩと表す。具体的には、配列番号１で表されるヒトＴｒｏｐ－２のアミノ酸配列のうち、３４番目から７２番目をドメインＩ、７３番目から１４５番目をドメインＩＩ、１４６番目から２７４番目をドメインＩＩＩと表す。本発明のモノクローナル抗体または該抗体断片は、ヒトＴｒｏｐ－２の細胞外領域のうち、少なくともドメインＩに結合する。

[0037] 本発明のモノクローナル抗体または該抗体断片が、Ｔｒｏｐ－２の細胞外領域の天然型立体構造を特異的に認識し、かつ該細胞外領域に結合することは、固相サンドイッチ法などを用いたラジオイムノアッセイ、または酵素免疫測定法（ＥＬＩＳＡ）などを用いたＴｒｏｐ－２を発現した細胞に対する公知の免疫学的検出法、好ましくは蛍光細胞染色法などの特定の抗原を発現した細胞と特定抗原に対する抗体の結合性を調べることができる。

[0038] 例えば、ＦＭＡＴ８１００ＨＴＳシステム（アプライドバイオシステムズ社製）などを用いる蛍光抗体染色法［Ｃａｎｃｅｒ Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．，３６，３７３（１９９３）］、フローサイトメトリーを用いる蛍光細胞染色法、またはＢｉａｃｏｒｅシステム（ジーイーヘルスケア社製）などを用いた表面プラズモン共鳴などの方法が挙げられる。

[0039] また、公知の免疫学的検出法［Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ－Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ ｐｒａｃｔｉｃｅ，Ｔｈｉｒｄ ｅｄｉｔｉｏｎ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ（１９９６）、Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ－Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ（１９８８）、単クローン抗体

実験マニュアル，講談社サイエンティフィック（１９８７）］などを組み合わせて確認することもできる。

[0040] ヒトＴｒｏｐ－２を発現した細胞としては、該Ｔｒｏｐ－２を発現していればいずれの細胞でもよく、例えばヒト体内に天然に存在する細胞、ヒト体内に天然に存在する細胞から樹立された細胞株、または遺伝子組換え技術により得られた細胞などが挙げられる。

[0041] ヒト体内に天然に存在する細胞としては、癌患者体内において該ポリペプチドが発現している細胞が挙げられ、例えば、バイオプシーなどで得られた腫瘍細胞のうちで該Ｔｒｏｐ－２が発現している細胞などが挙げられる。

[0042] ヒト体内に天然に存在する細胞から樹立された細胞株としては、上記の癌患者から得られた該Ｔｒｏｐ－２が発現している細胞を株化して得られた細胞株のうち、該Ｔｒｏｐ－２を発現している細胞株が挙げられる。例えば、ヒトから樹立された細胞株であるヒト膵臓癌細胞株ＢｘＰＣ－３（ＡＴＣＣ番号：ＣＲＬ－１６８７）、ヒト乳癌細胞株ＭＣＦ－７（ＡＴＣＣ番号：ＨＴＢ－２２）などが挙げられる。

[0043] 遺伝子組換え技術により得られた細胞としては、具体的には、該Ｔｒｏｐ－２をコードするｃＤＮＡを含む発現ベクターを昆虫細胞または動物細胞などに導入することにより得られる、該Ｔｒｏｐ－２を発現した細胞などが挙げられる。

[0044] 本発明のモノクローナル抗体は、Ｔｒｏｐ－２に高いアフィニティーで結合する抗体であることが好ましい。Ｔｒｏｐ－２に高いアフィニティーで結合する抗体とは、治療用抗体として十分なアフィニティーを有する抗体であり、抗体のＴｒｏｐ－２に対する解離定数（以下、K_Dと記す）が1×10^{-9}M以下であることが好ましく、7×10^{-10}M以下であることがより好ましく、5×10^{-10}M以下であることが更に好ましく、1×10^{-10}M以下であることが特に好ましい。

[0045] K_Dを1×10^{-9}M以下とすることにより、治療用抗体として十分なアフィニティーでヒトＴｒｏｐ－２の細胞外領域に結合することができ、かつ高い

ＡＤＣＣ活性および抗腫瘍活性を有することができる。抗体のＴｒｏｐ－２に対する解離定数K_Dは、例えば、Ｂｉａｃｏｒｅ　Ｔ１００（ジーイーヘルスケア社製）などを用いて算出することができ、具体的には、実施例において後述する方法により測定することができる。本発明のモノクローナル抗体は、当該測定法を用いた場合に、抗Ｔｒｏｐ－２抗体ＡＲ４７Ａ６．４．２と比べて、より低い値を示す。

[0046] アフィニティーとは、反応速度論的な解析により測定されるものであり、例えばＢｉａｃｏｒｅ　Ｔ１００（ジーイーヘルスケア社製）などを用いて測定することができる。

[0047] 本発明において、解離が遅いとは、Ｂｉａｃｏｒｅ　Ｔ１００において算出される抗体の解離速度定数ｋｄの値が、より小さな値を示すことである。解離速度定数ｋｄは、例えばＢｉａｃｏｒｅ　Ｔ１００を用いて測定され、付属ソフトウェアＢｉａｃｏｒｅ　Ｔ１００　ｅｖａｌｕａｔｉｏｎ　ｓｏｆｔｗａｒｅ（ジーイーヘルスケア社製）により算出することができる。

[0048] また、本発明のモノクローナル抗体は、高いＡＤＣＣ活性および抗腫瘍活性を有することが好ましく、さらにＣＤＣ活性を有することがより好ましい。

[0049] 本発明において、「高いＡＤＣＣ活性を有する」とは、Ｔｒｏｐ－２発現細胞に対して、公知の測定方法［Ｃａｎｃｅｒ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．，３６，３７３（１９９３）］を用いて、同時に複数の抗体のＡＤＣＣ活性を測定した場合に、抗Ｔｒｏｐ－２抗体ＡＲ４７Ａ６．４．２と比べて、より高いＡＤＣＣ活性を示すことをいう。

[0050] 本発明において、「高い抗腫瘍活性を有する」とは、Ｔｒｏｐ－２を発現する癌細胞株の担癌動物モデルにおいて、同時に複数の抗体の抗腫瘍活性を測定した場合、抗Ｔｒｏｐ－２抗体ＡＲ４７Ａ６．４．２と比べて、より高い抗腫瘍活性を示すことをいう。抗腫瘍活性は、実施例において後述する方法により測定する。

[0051] 本発明においてモノクローナル抗体としては、ハイブリドーマにより産生

される抗体、または抗体遺伝子を含む発現ベクターで形質転換した形質転換体により生産される遺伝子組換え抗体を挙げることができる。

[0052] モノクローナル抗体とは、単一クローンの抗体産生細胞が分泌する抗体であり、ただ一つのエピトープ（抗原決定基ともいう）を認識し、モノクローナル抗体を構成するアミノ酸配列（１次配列）が均一である。

[0053] エピトープとは、モノクローナル抗体が認識し、結合する単一のアミノ酸配列、アミノ酸配列から成る立体構造、糖鎖が結合したアミノ酸配列および糖鎖が結合したアミノ酸配列から成る立体構造などが挙げられる。

[0054] 本発明のモノクローナル抗体が認識するエピトープは、Ｔｒｏｐ－２の一部のドメインを欠失または他のタンパク質由来のドメインと置換させた変異体を用いて抗体の結合実験を行うことにより決定することができる。

[0055] 本発明のモノクローナル抗体が認識するエピトープとは、抗Ｔｒｏｐ－２モノクローナル抗体ＡＲ４７Ａ６．４．２が認識するエピトープとは異なるアミノ酸配列または立体構造である。ＡＲ４７Ａ６．４．２は、１７９番目から１８７番目のアミノ酸配列および、２５２番目から２６０番目までの配列をエピトープとして認識し結合することが開示されている（国際公開第２００８／１４４８９１号）。

[0056] 本発明のモノクローナル抗体としては、ヒトＴｒｏｐ－２の細胞外領域のうち、抗Ｔｒｏｐ－２抗体ＡＲ４７Ａ６．４．２および７７２２０が結合するエピトープとは別の部位に結合するモノクローナル抗体および該抗体断片が挙げられる。

[0057] 本発明のモノクローナル抗体としては、具体的には、ＣＤＲ１～３がそれぞれ配列番号１３～１５で表されるアミノ酸配列を含む抗体の重鎖可変領域（以下、ＶＨと記す）を含み、かつＣＤＲ１～３がそれぞれ配列番号１６～１８で表されるアミノ酸配列を含む抗体の軽鎖可変領域（以下、ＶＬと記す）を含むモノクローナル抗体が挙げられる。

[0058] また、本発明のモノクローナル抗体として、より具体的には、配列番号１０で表されるアミノ酸配列を含む抗体のＶＨを含み、かつ配列番号１２で表

されるアミノ酸配列を含む抗体のＶＬを含むモノクローナル抗体が挙げられる。

[0059] 更に、本発明のモノクローナル抗体としては、前記モノクローナル抗体ならびに前記モノクローナル抗体と競合しＴｒｏｐ－２の細胞外領域に結合するモノクローナル抗体が結合する、Ｔｒｏｐ－２の細胞外領域上に存在するエピトープと、同じエピトープに結合するモノクローナル抗体を挙げることができる。具体的には、ヒトＴｒｏｐ－２の細胞外領域のうち、少なくともドメインＩを認識する抗体および該抗体断片が挙げられる。

[0060] ハイブリドーマは、例えば上記のＴｒｏｐ－２を発現した細胞などを抗原として調製し、該抗原を免疫した動物より抗原特異性を有する抗体生産細胞を誘導し、さらに、該抗体生産細胞と骨髄腫細胞とを融合させることにより、調製することができる。該ハイブリドーマを培養するか、または該ハイブリドーマを動物に投与して該動物を腹水癌化させ、該培養液または腹水を分離、精製することにより抗Ｔｒｏｐ－２モノクローナル抗体を取得することができる。

[0061] 抗原を免疫する動物としてはハイブリドーマを作製することが可能であれば、いかなるものも用いることができるが、例えば、好ましくはマウス、ラット、ハムスター、ニワトリまたはラビットが挙げられる。このような動物から抗体産生能を有する細胞を取得し、該細胞にｉｎ　ｖｉｔｒｏで免疫を施した後に、骨髄腫細胞と融合して作製したハイブリドーマが生産する抗体なども本発明のモノクローナル抗体に包含される。

[0062] 本発明において遺伝子組換え抗体としては、ヒト型キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体または抗体断片など、遺伝子組換えにより製造される抗体を包含する。遺伝子組換え抗体において、モノクローナル抗体の特徴を有し、抗原性が低く、血中半減期が延長されたものは、治療薬として好ましい。遺伝子組換え抗体は、例えば上記本発明のモノクローナル抗体を遺伝子組換え技術を用いて改変したものが挙げられる。

[0063] ヒト型キメラ抗体とは、非ヒト動物の抗体のＶＨおよびＶＬとヒト抗体の

重鎖定常領域（以下、ＣＨと記す）および軽鎖定常領域（以下、ＣＬと記す）とから成る抗体をいう。本発明のヒト型キメラ抗体は、Ｔｒｏｐ－２を特異的に認識し、かつ該細胞外領域に結合するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマより、ＶＨおよびＶＬをコードするｃＤＮＡを取得し、ヒト抗体のＣＨおよびＣＬをコードする遺伝子を有する動物細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築し、動物細胞へ導入することにより発現させ、製造することができる。

[0064] ヒト型キメラ抗体のＣＨとしては、ヒトイムノグロブリン（以下、ｈＩｇと表記する）に属すればいかなるものでもよいが、好ましくはｈＩｇＧクラスのものが用いられ、さらにｈＩｇＧ１、ｈＩｇＧ２、ｈＩｇＧ３またはｈＩｇＧ４といったサブクラスのいずれも用いることができる。また、ヒト型キメラ抗体のＣＬとしては、ｈＩｇに属すればいずれのものでもよく、κクラスまたはλクラスのものを用いることができる。

[0065] 本発明のキメラ抗体として具体的には、配列番号１０で表されるアミノ酸配列を含む抗体のＶＨを含み、かつ配列番号１２で表されるアミノ酸配列を含む抗体のＶＬを含むキメラ抗体が挙げられる。

[0066] 更に、本発明のキメラ抗体としては、前記キメラ抗体と競合して、Ｔｒｏｐ－２の細胞外領域に結合するキメラ抗体および前記キメラ抗体が結合するＴｒｏｐ－２の細胞外領域上に存在するエピトープと、同じエピトープに結合するキメラ抗体を挙げることができる。

[0067] ヒト化抗体とは、ヒト型相補鎖決定領域（Ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔａｒｉｔｙ Ｄｅｔｅｒｍｉｎｉｎｇ Ｒｅｇｉｏｎ、以下、ＣＤＲと表記する）移植抗体を包含する。

[0068] 本発明のヒト化抗体とは、非ヒト動物の抗体のＶＨおよびＶＬのＣＤＲのアミノ酸配列をヒト抗体のＶＨおよびＶＬの適切な位置に移植した抗体をいう。本発明のヒト化抗体は、非ヒト動物由来のハイブリドーマが産生しＴｒｏｐ－２に特異的に結合するモノクローナル抗体のＶＨおよびＶＬのＣＤＲのアミノ酸配列を、任意のヒト抗体のＶＨおよびＶＬのフレームワーク領域

（Ｆｒａｍｅｗｏｒｋ　Ｒｅｇｉｏｎ、以下、ＦＲと表記する）に各々移植して可変領域（以下、Ｖ領域と表記する）のアミノ酸配列を設計し、さらに、Ｖ領域のアミノ酸配列をコードするｃＤＮＡを構築し、ヒト抗体のＣＨおよびＣＬをコードする遺伝子を有する動物細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト化抗体発現ベクターを構築し、動物細胞へ導入することにより発現させ、製造することができる。

[0069] ヒト化抗体のＶＨおよびＶＬのＦＲのアミノ酸配列は、ヒト抗体由来のＶＨおよびＶＬのＦＲのアミノ酸配列であれば、いかなるものでも用いることができる。例えば、Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｄａｔａ　Ｂａｎｋなどのデータベースに登録されているヒト抗体のＶＨおよびＶＬのＦＲのアミノ酸配列、またはＳｅｑｕｅｎｃｅｓ　ｏｆ　Ｐｒｏｔｅｉｎｓ　ｏｆ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，ＵＳ　Ｄｅｐｔ．Ｈｅａｌｔｈ　ａｎｄ　Ｈｕｍａｎ　Ｓｅｒｖｉｃｅｓ（１９９１）などに記載の、ヒト抗体のＶＨおよびＶＬのＦＲの各サブグループの共通アミノ酸配列などが挙げられる。

[0070] 本発明のヒト化抗体としては、ＣＤＲ１～３がそれぞれ配列番号１３～１５のアミノ酸配列を含む抗体のＶＨを含み、かつＣＤＲ１～３がそれぞれ配列番号１６～１８のアミノ酸配列を含む抗体のＶＬを含むヒト化抗体が挙げられる。

[0071] 本発明のヒト化抗体として、具体的には、以下の（ａ）ＶＨおよび（ｂ）ＶＬの少なくとも一方を含むヒト化抗体などが挙げられるが、導入される改変の数に制限はない。

（ａ）配列番号２４のアミノ酸配列、または配列番号２４のアミノ酸配列の９番目のＡｌａ、１２番目のＬｙｓ、２０番目のＶａｌ、３８番目のＡｒｇ、４８番目のＭｅｔ、６７番目のＡｒｇ、６８番目のＶａｌ、７０番目のＩｌｅ、９５番目のＴｙｒ、および１１２番目のＶａｌから選ばれる少なくとも１つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む抗体のＶＨ

（ｂ）が配列番号２６のアミノ酸配列、または配列番号２６のアミノ酸配列

中の１５番目のＬｅｕ、１９番目のＡｌａ、２１番目のＩｌｅ、および８４番目のＬｅｕから選ばれる少なくとも１つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む抗体のＶＬ

[0072] 更に、本発明のヒト化抗体に含まれるＶＨとしては、以下の（１）～（１１）が好ましい。

（１）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａ、１２番目のＬｙｓ、２０番目のＶａｌ、３８番目のＡｒｇ、４８番目のＭｅｔ、６７番目のＡｒｇ、６８番目のＶａｌ、７０番目のＩｌｅ、９５番目のＴｙｒ、および１１２番目のＶａｌが、他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むＶＨ

（２）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａ、１２番目のＬｙｓ、２０番目のＶａｌ、３８番目のＡｒｇ、４８番目のＭｅｔ、６７番目のＡｒｇ、６８番目のＶａｌ、７０番目のＩｌｅ、および９５番目のＴｙｒが、他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むＶＨ

（３）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａ、２０番目のＶａｌ、３８番目のＡｒｇ、４８番目のＭｅｔ、６７番目のＡｒｇ、６８番目のＶａｌ、７０番目のＩｌｅ、および９５番目のＴｙｒが、他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むＶＨ

（４）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａ、３８番目のＡｒｇ、４８番目のＭｅｔ、６７番目のＡｒｇ、６８番目のＶａｌ、および９５番目のＴｙｒが、他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むＶＨ

（５）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａ、６７番目のＡｒｇ、６８番目のＶａｌ、７０番目のＩｌｅ、および９５番目のＴｙｒが、他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むＶＨ

（６）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａ、３８番目のＡｒｇ、４８番目のＭｅｔ、６７番目のＡｒｇ、および９５番目のＴｙｒが、他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むＶＨ

（７）配列番号２４のアミノ酸配列中の３８番目のＡｒｇ、４８番目のＭｅ

ｔ、６７番目のＡｒｇ、６８番目のＶａｌ、および９５番目のＴｙｒが、他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むＶＨ

（８）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａ、３８番目のＡｒｇ、４８番目のＭｅｔ、および９５番目のＴｙｒが、他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むＶＨ

（９）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａ、６７番目のＡｒｇ、および９５番目のＴｙｒが、他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むＶＨ

（１０）配列番号２４のアミノ酸配列中の３８番目のＡｒｇ、４８番目のＭｅｔ、および９５番目のＴｙｒが、他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むＶＨ

（１１）配列番号２４のアミノ酸配列中の３８番目のＡｒｇ、および４８番目のＭｅｔが、他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むＶＨ

[0073] 前記ＶＨのアミノ酸配列としては、例えば、配列番号２４のアミノ酸配列中の、９番目のＡｌａをＰｒｏに、１２番目のＬｙｓをＶａｌに、２０番目のＶａｌをＩｌｅに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、７０番目のＩｌｅをＬｅｕに、９５番目のＴｙｒをＰｈｅに、または１１２番目のＶａｌをＬｅｕに置換する改変から選ばれる少なくとも１つの改変が導入されたアミノ酸配列が挙げられる。

[0074] １０個の改変が導入されたＶＨのアミノ酸配列としては、具体的には、例えば、配列番号２４のアミノ酸配列中の、９番目のＡｌａをＰｒｏに、１２番目のＬｙｓをＶａｌに、２０番目のＶａｌをＩｌｅに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、７０番目のＩｌｅをＬｅｕに、９５番目のＴｙｒをＰｈｅに、および１１２番目のＶａｌをＬｅｕに置換したアミノ酸配列が挙げられる。

[0075] ９個の改変が導入されたＶＨのアミノ酸配列としては、具体的には、例え

1306 of 10951

ば、以下の（１）～（１０）のアミノ酸配列が挙げられる。

（１）配列番号２４のアミノ酸配列中の１２番目のＬｙｓをＶａｌに、２０番目のＶａｌをＩｌｅに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、７０番目のＩｌｅをＬｅｕに、９５番目のＴｙｒをＰｈｅに、および１１２番目のＶａｌをＬｅｕに置換したアミノ酸配列

（２）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、２０番目のＶａｌをＩｌｅに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、７０番目のＩｌｅをＬｅｕに、９５番目のＴｙｒをＰｈｅに、および１１２番目のＶａｌをＬｅｕに置換したアミノ酸配列

（３）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、１２番目のＬｙｓをＶａｌに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、７０番目のＩｌｅをＬｅｕに、９５番目のＴｙｒをＰｈｅに、および１１２番目のＶａｌをＬｅｕに置換したアミノ酸配列

（４）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、１２番目のＬｙｓをＶａｌに、２０番目のＶａｌをＩｌｅに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、７０番目のＩｌｅをＬｅｕに、９５番目のＴｙｒをＰｈｅに、および１１２番目のＶａｌをＬｅｕに置換したアミノ酸配列

（５）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、１２番目のＬｙｓをＶａｌに、２０番目のＶａｌをＩｌｅに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、７０番目のＩｌｅをＬｅｕに、９５番目のＴｙｒをＰｈｅに、および１１２番目のＶａｌをＬｅｕに置換したアミノ酸配列

（６）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、１２番目のＬｙｓをＶａｌに、２０番目のＶａｌをＩｌｅに、３８番目のＡｒｇを

OnCusp Ex. 1038

OnCusp
Ex. 1038

ＬｙｓにＭｅｔをＩｌｅに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、７０番目のＩｌｅをＬｅｕに、９５番目のＴｙｒをＰｈｅに、および１１２番目のＶａｌをＬｅｕに置換したアミノ酸配列

（７）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、１２番目のＬｙｓをＶａｌに、２０番目のＶａｌをＩｌｅに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、７０番目のＩｌｅをＬｅｕに、９５番目のＴｙｒをＰｈｅに、および１１２番目のＶａｌをＬｅｕに置換したアミノ酸配列

（８）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、１２番目のＬｙｓをＶａｌに、２０番目のＶａｌをＩｌｅに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、９５番目のＴｙｒをＰｈｅに、および１１２番目のＶａｌをＬｅｕに置換したアミノ酸配列

（９）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、１２番目のＬｙｓをＶａｌに、２０番目のＶａｌをＩｌｅに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、７０番目のＩｌｅをＬｅｕに、および１１２番目のＶａｌをＬｅｕに置換したアミノ酸配列

（１０）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、１２番目のＬｙｓをＶａｌに、２０番目のＶａｌをＩｌｅに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、７０番目のＩｌｅをＬｅｕに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

[0076] ８個の改変が導入されたＶＨのアミノ酸配列としては、具体的には、例えば、以下の（１）～（１７）のアミノ酸配列が挙げられる。

（１）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、１２番目のＬｙｓをＶａｌに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、７

1307 of 10951

０番目のＩｌｅをＬｅｕに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（２）配列番号２４のアミノ酸配列中の１２番目のＬｙｓをＶａｌに、２０番目のＶａｌをＩｌｅに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、７０番目のＩｌｅをＬｅｕに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（３）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、２０番目のＶａｌをＩｌｅに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、７０番目のＩｌｅをＬｅｕに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（４）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、１２番目のＬｙｓをＶａｌに、２０番目のＶａｌをＩｌｅに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、７０番目のＩｌｅをＬｅｕに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（５）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、１２番目のＬｙｓをＶａｌに、２０番目のＶａｌをＩｌｅに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、７０番目のＩｌｅをＬｅｕに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（６）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、１２番目のＬｙｓをＶａｌに、２０番目のＶａｌをＩｌｅに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、７０番目のＩｌｅをＬｅｕに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（７）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、１２番

目のＬｙｓをＶａｌに、２０番目のＶａｌをＩｌｅに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、７０番目のＩｌｅをＬｅｕに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（８）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、１２番目のＬｙｓをＶａｌに、２０番目のＶａｌをＩｌｅに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（９）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、１２番目のＬｙｓをＶａｌに、２０番目のＶａｌをＩｌｅに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、および７０番目のＩｌｅをＬｅｕに置換したアミノ酸配列

（１０）配列番号２４のアミノ酸配列中の１２番目のＬｙｓをＶａｌに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、７０番目のＩｌｅをＬｅｕに、９５番目のＴｙｒをＰｈｅに、および１１２番目のＶａｌをＬｅｕに置換したアミノ酸配列

（１１）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、７０番目のＩｌｅをＬｅｕに、９５番目のＴｙｒをＰｈｅに、および１１２番目のＶａｌをＬｅｕに置換したアミノ酸配列

（１２）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、１２番目のＬｙｓをＶａｌに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、７０番目のＩｌｅをＬｅｕに、９５番目のＴｙｒをＰｈｅに、および１１２番目のＶａｌをＬｅｕに置換し

たアミノ酸配列

（１３）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、１２番目のＬｙｓをＶａｌに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、７０番目のＩｌｅをＬｅｕに、９５番目のＴｙｒをＰｈｅに、および１１２番目のＶａｌをＬｅｕに置換したアミノ酸配列

（１４）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、１２番目のＬｙｓをＶａｌに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、７０番目のＩｌｅをＬｅｕに、９５番目のＴｙｒをＰｈｅに、および１１２番目のＶａｌをＬｅｕに置換したアミノ酸配列

（１５）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、１２番目のＬｙｓをＶａｌに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、７０番目のＩｌｅをＬｅｕに、９５番目のＴｙｒをＰｈｅに、および１１２番目のＶａｌをＬｅｕに置換したアミノ酸配列

（１６）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、１２番目のＬｙｓをＶａｌに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、９５番目のＴｙｒをＰｈｅに、および１１２番目のＶａｌをＬｅｕに置換したアミノ酸配列

（１７）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、１２番目のＬｙｓをＶａｌに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、７０番目のＩｌｅをＬｅｕに、および１１２番目のＶａｌをＬｅｕに置換したアミノ酸配列

[0077] ７個の改変が導入されたＶＨのアミノ酸配列としては、具体的には、例えば、以下の（１）～（８）のアミノ酸配列が挙げられる。

（１）配列番号２４のアミノ酸配列中の１２番目のＬｙｓをＶａｌに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、７０番目のＩｌｅをＬｅｕに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（２）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、７０番目のＩｌｅをＬｅｕに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（３）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、１２番目のＬｙｓをＶａｌに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、７０番目のＩｌｅをＬｅｕに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（４）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、１２番目のＬｙｓをＶａｌに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、７０番目のＩｌｅをＬｅｕに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（５）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、１２番目のＬｙｓをＶａｌに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、７０番目のＩｌｅをＬｅｕに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（６）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、１２番目のＬｙｓをＶａｌに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、７０番目のＩｌｅをＬｅｕに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（７）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、１２番目のＬｙｓをＶａｌに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

1311 of 10951
OnCusp Ex. 1038

（８）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、１２番目のＬｙｓをＶａｌに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、および７０番目のＩｌｅをＬｅｕに置換したアミノ酸配列

[0078] ６個の改変が導入されたＶＨのアミノ酸配列としては、具体的には、例えば、以下の（１）～（１３）のアミノ酸配列が挙げられる。

（１）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（２）配列番号２４のアミノ酸配列中の３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、７０番目のＩｌｅをＬｅｕに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（３）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、７０番目のＩｌｅをＬｅｕに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（４）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、７０番目のＩｌｅをＬｅｕに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（５）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、７０番目のＩｌｅをＬｅｕに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（６）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６７番目のＡｒｇを

1313 of 10951

ＬｙｓにＬｅｕに、および７０番目のＩｌｅをＬｅｕに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（７）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、および７０番目のＩｌｅをＬｅｕに置換したアミノ酸配列

（８）配列番号２４のアミノ酸配列中の２０番目のＶａｌをＩｌｅに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（９）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、２０番目のＶａｌをＩｌｅに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（１０）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、２０番目のＶａｌをＩｌｅに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（１１）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、２０番目のＶａｌをＩｌｅに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（１２）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、２０番目のＶａｌをＩｌｅに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（１３）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、２０番目のＶａｌをＩｌｅに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔ

OnCusp Ex. 1038

をＩｌｅに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、および６８番目のＶａｌをＡｌａに置換したアミノ酸配列

[0079] ５個の改変が導入されたＶＨのアミノ酸配列としては、具体的には、例えば、以下の（１）～（５）のアミノ酸配列が挙げられる。

（１）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、７０番目のＩｌｅをＬｅｕに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（２）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（３）配列番号２４のアミノ酸配列中の３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（４）配列番号２４のアミノ酸配列中の１２番目のＬｙｓをＶａｌに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（５）配列番号２４のアミノ酸配列中の３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、７０番目のＩｌｅをＬｅｕに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

[0080] ４個の改変が導入されたＶＨのアミノ酸配列としては、具体的には、例えば、以下の（１）～（５）のアミノ酸配列が挙げられる。

（１）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（２）配列番号２４のアミノ酸配列中の１２番目のＬｙｓをＶａｌに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（３）配列番号２４のアミノ酸配列中の３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８

番目のＭｅｔをＩｌｅに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（４）配列番号２４のアミノ酸配列中の３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（５）配列番号２４のアミノ酸配列中の３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、７０番目のＩｌｅをＬｅｕに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

[0081] ３個の改変が導入されたＶＨのアミノ酸配列としては、具体的には、例えば、以下の（１）～（１２）のアミノ酸配列が挙げられる。

（１）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（２）配列番号２４のアミノ酸配列中の３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（３）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、１２番目のＬｙｓをＶａｌに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（４）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（５）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（６）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（７）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、７０番目のＩｌｅをＬｅｕに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（８）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、および４８番目のＭｅｔをＩｌｅに置換したアミノ酸配列

（９）配列番号２４のアミノ酸配列中の１２番目のＬｙｓをＶａｌに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、および４８番目のＭｅｔをＩｌｅに置換したアミノ酸配列

（１０）配列番号２４のアミノ酸配列中の３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、および６７番目のＡｒｇをＬｙｓに置換したアミノ酸配列

（１１）配列番号２４のアミノ酸配列中の３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、および６８番目のＶａｌをＡｌａに置換したアミノ酸配列

（１２）配列番号２４のアミノ酸配列中の３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、および７０番目のＩｌｅをＬｅｕに置換したアミノ酸配列

[0082] ２個の改変が導入されたＶＨのアミノ酸配列としては、具体的には、例えば、以下の（１）～（１８）のアミノ酸配列が挙げられる。

（１）配列番号２４のアミノ酸配列中の３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、および４８番目のＭｅｔをＩｌｅに置換したアミノ酸配列

（２）配列番号２４のアミノ酸配列中の３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（３）配列番号２４のアミノ酸配列中の４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（４）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、および３８番目のＡｒｇをＬｙｓに置換したアミノ酸配列

（５）配列番号２４のアミノ酸配列中の１２番目のＬｙｓをＶａｌに、および３８番目のＡｒｇをＬｙｓに置換したアミノ酸配列

（６）配列番号２４のアミノ酸配列中の３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、および６７番目のＡｒｇをＬｙｓに置換したアミノ酸配列

（７）配列番号２４のアミノ酸配列中の３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、および６８番目のＶａｌをＡｌａに置換したアミノ酸配列

（８）配列番号２４のアミノ酸配列中の３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、および７０番目のＩｌｅをＬｅｕに置換したアミノ酸配列

（９）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、および４８番目のＭｅｔをＩｌｅに置換したアミノ酸配列

（１０）配列番号２４のアミノ酸配列中の１２番目のＬｙｓをＶａｌに、および４８番目のＭｅｔをＩｌｅに置換したアミノ酸配列

（１１）配列番号２４のアミノ酸配列中の４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、および６７番目のＡｒｇをＬｙｓに置換したアミノ酸配列

（１２）配列番号２４のアミノ酸配列中の４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、および６８番目のＶａｌをＡｌａに置換したアミノ酸配列

（１３）配列番号２４のアミノ酸配列中の４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、および７０番目のＩｌｅをＬｅｕに置換したアミノ酸配列

（１４）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（１５）配列番号２４のアミノ酸配列中の１２番目のＬｙｓをＶａｌに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（１６）配列番号２４のアミノ酸配列中の６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（１７）配列番号２４のアミノ酸配列中の６８番目のＶａｌをＡｌａに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（１８）配列番号２４のアミノ酸配列中の７０番目のＩｌｅをＬｅｕに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

[0083] １個の改変が導入されたＶＨのアミノ酸配列としては、具体的には、例えば、以下の（１）～（１０）のアミノ酸配列が挙げられる。

（１）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに置換したアミノ酸配列

（２）配列番号２４のアミノ酸配列中の１２番目のＬｙｓをＶａｌに置換したアミノ酸配列

（３）配列番号２４のアミノ酸配列中の２０番目のＶａｌをＩｌｅに置換したアミノ酸配列

（４）配列番号２４のアミノ酸配列中の３８番目のＡｒｇをＬｙｓに置換したアミノ酸配列

（５）配列番号２４のアミノ酸配列中の４８番目のＭｅｔをＩｌｅに置換したアミノ酸配列

（６）配列番号２４のアミノ酸配列中の６７番目のＡｒｇをＬｙｓに置換したアミノ酸配列

（７）配列番号２４のアミノ酸配列中の６８番目のＶａｌをＡｌａに置換したアミノ酸配列

（８）配列番号２４のアミノ酸配列中の７０番目のＩｌｅをＬｅｕに置換したアミノ酸配列

（９）配列番号２４のアミノ酸配列中の９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（１０）配列番号２４のアミノ酸配列中の１１２番目のＶａｌをＬｅｕに置換したアミノ酸配列

[0084] また、本発明のヒト化抗体に含まれるＶＬとしては、以下の（１）～（４）が好ましい。

（１）配列番号２６のアミノ酸配列中の１５番目のＬｅｕ、１９番目のＡｌａ、２１番目のＩｌｅ、および８４番目のＬｅｕが、他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むＶＬ

（２）配列番号２６のアミノ酸配列中の１５番目のＬｅｕ、１９番目のＡｌ

ａ、および８４番目のＬｅｕが、他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むＶＬ

（３）配列番号２６のアミノ酸配列中の１９番目のＡｌａ、２１番目のＩｌｅ、および８４番目のＬｅｕが、他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むＶＬ

（４）配列番号２６のアミノ酸配列中の１９番目のＡｌａ、および８４番目のＬｅｕが、他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むＶＬ

[0085] 前記ＶＬのアミノ酸配列としては、例えば、配列番号２６のアミノ酸配列中の１５番目のＬｅｕをＡｌａに、１９番目のＡｌａをＶａｌに、２１番目のＩｌｅをＭｅｔに、および８４番目のＬｅｕをＶａｌに置換する改変から選ばれる少なくとも１つの改変が導入されたアミノ酸配列が挙げられる。

[0086] ４個の改変が導入されたＶＬのアミノ酸配列としては、具体的には、例えば、配列番号２６のアミノ酸配列中の１５番目のＬｅｕをＡｌａに、１９番目のＡｌａをＶａｌに、２１番目のＩｌｅをＭｅｔに、および８４番目のＬｅｕをＶａｌに置換したアミノ酸配列が挙げられる。

[0087] ３個の改変が導入されたＶＬのアミノ酸配列としては、具体的には、例えば、以下の（１）～（４）のアミノ酸配列が挙げられる。

（１）配列番号２６のアミノ酸配列中の１９番目のＡｌａをＶａｌに、２１番目のＩｌｅをＭｅｔに、および８４番目のＬｅｕをＶａｌに置換したアミノ酸配列

（２）配列番号２６のアミノ酸配列中の１５番目のＬｅｕをＡｌａに、２１番目のＩｌｅをＭｅｔに、および８４番目のＬｅｕをＶａｌに置換したアミノ酸配列

（３）配列番号２６のアミノ酸配列中の１５番目のＬｅｕをＡｌａに、１９番目のＡｌａをＶａｌに、および８４番目のＬｅｕをＶａｌに置換したアミノ酸配列

（４）配列番号２６のアミノ酸配列中の１５番目のＬｅｕをＡｌａに、１９番目のＡｌａをＶａｌに、および２１番目のＩｌｅをＭｅｔに置換したアミ

ノ酸配列

[0088] ２個の改変が導入されたＶＬのアミノ酸配列としては、具体的には、例えば、以下の（１）～（６）のアミノ酸配列が挙げられる。

（１）配列番号２６のアミノ酸配列中の１５番目のＬｅｕをＡｌａに、および１９番目のＡｌａをＶａｌに置換したアミノ酸配列

（２）配列番号２６のアミノ酸配列中の１５番目のＬｅｕをＡｌａに、および２１番目のＩｌｅをＭｅｔに置換したアミノ酸配列

（３）配列番号２６のアミノ酸配列中の１５番目のＬｅｕをＡｌａに、および８４番目のＬｅｕをＶａｌに置換したアミノ酸配列

（４）配列番号２６のアミノ酸配列中の１９番目のＡｌａをＶａｌに、および２１番目のＩｌｅをＭｅｔに置換したアミノ酸配列

（５）配列番号２６のアミノ酸配列中の１９番目のＡｌａをＶａｌに、および８４番目のＬｅｕをＶａｌに置換したアミノ酸配列

（６）配列番号２６のアミノ酸配列中の２１番目のＩｌｅをＭｅｔに、および８４番目のＬｅｕをＶａｌに置換したアミノ酸配列

[0089] １個の改変が導入されたＶＬのアミノ酸配列としては、具体的には、例えば、以下の（１）～（４）のアミノ酸配列が挙げられる。

（１）配列番号２６のアミノ酸配列中の１５番目のＬｅｕをＡｌａに置換したアミノ酸配列

（２）配列番号２６のアミノ酸配列中の１９番目のＡｌａをＶａｌに置換したアミノ酸配列

（３）配列番号２６のアミノ酸配列中の２１番目のＩｌｅをＭｅｔに置換したアミノ酸配列

（４）配列番号２６のアミノ酸配列中の８４番目のＬｅｕをＶａｌに置換したアミノ酸配列

が挙げられる。

[0090] また、本発明のヒト化抗体の具体例としては、以下の（１）～（３）のヒト化抗体が挙げられる。

（１）配列番号２４で表されるアミノ酸配列を含む抗体のＶＨおよび配列番号２６で表されるアミノ酸配列を含む抗体のＶＬの少なくとも一方を含むヒト化抗体

（２）配列番号２４で表されるアミノ酸配列を含む抗体のＶＨおよび図１３で示されるいずれかのアミノ酸配列を含む抗体のＶＬの少なくとも一方を含むヒト化抗体

（３）図１２で示されるいずれかのアミノ酸配列を含む抗体のＶＨおよび配列番号２６のアミノ酸配列を含む抗体のＶＬの少なくとも一方を含むヒト化抗体

[0091] 更に、本発明のヒト化抗体としては、前記ヒト化抗体と競合してＴｒｏｐ－２に反応するヒト化抗体、および前記ヒト化抗体が反応するエピトープと同じエピトープに結合するヒト化抗体も包含される。

[0092] ヒト抗体は、元来、ヒト体内に天然に存在する抗体をいうが、最近の遺伝子工学的、細胞工学的、発生工学的な技術の進歩により作製されたヒト抗体ファージライブラリーおよびヒト抗体産生トランスジェニック動物から得られる抗体なども含まれる。

[0093] ヒト体内に天然に存在する抗体は、例えば、ヒト末梢血リンパ球にＥＢウイルスなどを感染させて不死化し、クローニングすることにより、該抗体を産生するリンパ球を培養し、該培養上清中より該抗体を精製することにより取得することができる。

[0094] ヒト抗体ファージライブラリーは、ヒトＢ細胞から調製した抗体遺伝子をファージ遺伝子に挿入することによりＦａｂ、ｓｃＦｖなどの抗体断片をファージ表面に発現させたライブラリーである。該ライブラリーより、抗原を固定化した基質に対する結合活性を指標として所望の抗原結合活性を有する抗体断片を表面に発現しているファージを回収することができる。該抗体断片は、さらに、遺伝子工学的手法により２本の完全なＨ鎖および２本の完全なＬ鎖からなるヒト抗体分子へも変換することができる。

[0095] ヒト抗体産生トランスジェニック動物は、ヒト抗体遺伝子が細胞内に組込

まれた動物を意味する。具体的には、例えば、マウスＥＳ細胞へヒト抗体遺伝子を導入し、該ＥＳ細胞をマウスの初期胚へ移植後、個体を発生させることにより、ヒト抗体産生トランスジェニックマウスを作製することができる。ヒト抗体産生トランスジェニック動物からのヒト抗体は、通常のヒト以外の動物で行われているハイブリドーマ作製方法を用い、ヒト抗体産生ハイブリドーマを取得し、培養することで培養上清中にヒト抗体を産生蓄積させることにより作製できる。

[0096] 上述の抗体または抗体断片を構成するアミノ酸配列において、１つ以上のアミノ酸が欠失、付加、置換または挿入され、かつ上述の抗体またはその抗体断片と同様な活性を有するモノクローナル抗体またはその抗体断片も、本発明のモノクローナル抗体またはその抗体断片に包含される。

[0097] 欠失、置換、挿入および／または付加されるアミノ酸の数は１個以上でありその数は特に限定されないが、部位特異的変異導入法［Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ ２ｎｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ（１９８９）、Ｃｕｒｒｅｎｔ ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ（１９８７－１９９７）、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，１０，６４８７（１９８２）、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．，ＵＳＡ，７９，６４０９（１９８２）、Ｇｅｎｅ，３４，３１５（１９８５）、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，１３，４４３１（１９８５）、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ ＵＳＡ，８２，４８８（１９８５）］などの周知の技術により、欠失、置換もしくは付加できる程度の数である。例えば、好ましくは１～数十個、より好ましくは１～２０個、さらに好ましくは１～１０個、特に好ましくは１～５個である。

[0098] 上記の抗体のアミノ酸配列において１つ以上のアミノ酸残基が欠失、置換、挿入または付加されたとは、次のことを示す。即ち、同一配列中の任意、かつ１もしくは複数のアミノ酸配列中において、１または複数のアミノ酸残

基の欠失、置換、挿入または付加があることを意味する。また、欠失、置換、挿入または付加が同時に生じる場合もあり、置換、挿入または付加されるアミノ酸残基は天然型と非天然型いずれの場合もある。

[0099] 天然型アミノ酸残基としては、例えば、Ｌ－アラニン、Ｌ－アスパラギン、Ｌ－アスパラギン酸、Ｌ－グルタミン、Ｌ－グルタミン酸、グリシン、Ｌ－ヒスチジン、Ｌ－イソロイシン、Ｌ－ロイシン、Ｌ－リジン、Ｌ－メチオニン、Ｌ－フェニルアラニン、Ｌ－プロリン、Ｌ－セリン、Ｌ－スレオニン、Ｌ－トリプトファン、Ｌ－チロシン、Ｌ－バリン、またはＬ－システインなどが挙げられる。

[0100] 以下に、相互に置換可能なアミノ酸残基の好ましい例を示す。同一群に含まれるアミノ酸残基は相互に置換可能である。

Ａ群：ロイシン、イソロイシン、ノルロイシン、バリン、ノルバリン、アラニン、２－アミノブタン酸、メチオニン、Ｏ－メチルセリン、ｔ－ブチルグリシン、ｔ－ブチルアラニン、シクロヘキシルアラニン

Ｂ群：アスパラギン酸、グルタミン酸、イソアスパラギン酸、イソグルタミン酸、２－アミノアジピン酸、２－アミノスベリン酸

Ｃ群：アスパラギン、グルタミン

Ｄ群：リジン、アルギニン、オルニチン、２，４－ジアミノブタン酸、２，３－ジアミノプロピオン酸

Ｅ群：プロリン、３－ヒドロキシプロリン、４－ヒドロキシプロリン

Ｆ群：セリン、スレオニン、ホモセリン

Ｇ群：フェニルアラニン、チロシン

[0101] 本発明において、抗体断片としては、Ｆａｂ、Ｆ（ａｂ’）$_2$、Ｆａｂ’、ｓｃＦｖ、ｄｉａｂｏｄｙ、ｄｓＦｖおよびＣＤＲを含むペプチドなどが挙げられる。

[0102] Ｆａｂは、ＩｇＧを蛋白質分解酵素であるパパインで処理して得られる断片のうち（Ｈ鎖の２２４番目のアミノ酸残基で切断される）、Ｈ鎖のＮ末端側約半分とＬ鎖全体がジスルフィド結合で結合した、分子量約５万の抗原結

合活性を有する抗体断片である。

[0103] 本発明のＦａｂは、本発明のモノクローナル抗体をパパインで処理して得ることができる。また、該抗体のＦａｂをコードするＤＮＡを原核生物用発現ベクターまたは真核生物用発現ベクターに挿入し、該ベクターを原核生物または真核生物へ導入することにより発現させ、Ｆａｂを製造することもできる。

[0104] Ｆ（ａｂ’）$_2$は、ＩｇＧのヒンジ領域の２個のジスルフィド結合の下部を蛋白質分解酵素であるペプシンで分解して得られる、２つのＦａｂ領域がヒンジ部分で結合して構成された、分子量約１０万の抗原結合活性を有する断片である。

[0105] 本発明のＦ（ａｂ’）$_2$は、本発明のモノクローナル抗体をペプシンで処理して得ることができる。また、下記のＦａｂ’をチオエーテル結合またはジスルフィド結合させ、作製することもできる。

[0106] Ｆａｂ’は、前記Ｆ（ａｂ’）$_2$のヒンジ領域のジスルフィド結合を切断して得られる、分子量約５万の抗原結合活性を有する抗体断片である。本発明のＦａｂ’は、本発明のＦ（ａｂ’）$_2$をジチオスレイトールなどの還元剤で処理して得ることができる。また、該抗体のＦａｂ’断片をコードするＤＮＡを原核生物用発現ベクターまたは真核生物用発現ベクターに挿入し、該ベクターを原核生物または真核生物へ導入することにより、Ｆａｂ’を発現させ製造することもできる。

[0107] ｓｃＦｖは、１本のＶＨと１本のＶＬとを適当なペプチドリンカー（以下、Ｐと表記する）を用いて連結した、ＶＨ－Ｐ－ＶＬまたはＶＬ－Ｐ－ＶＨポリペプチドであり、抗原結合活性を有する抗体断片である。

[0108] 本発明のｓｃＦｖは、本発明のモノクローナル抗体のＶＨおよびＶＬをコードするｃＤＮＡを取得し、ｓｃＦｖをコードするＤＮＡを構築し、該ＤＮＡを原核生物用発現ベクターまたは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物または真核生物へ導入することにより、発現させ、製造することができる。

[0109] ｄｉａｂｏｄｙは、ｓｃＦｖが二量体化した抗体断片であり、二価の抗原結合活性を有する抗体断片である。二価の抗原結合活性は、同一であることもできるし、一方を異なる抗原結合活性とすることもできる。本発明のｄｉａｂｏｄｙは、本発明のモノクローナル抗体のＶＨおよびＶＬをコードするｃＤＮＡを取得し、ｓｃＦｖをコードするＤＮＡをペプチドリンカーのアミノ酸配列の長さが８残基以下となるように構築し、該ＤＮＡを原核生物用発現ベクターまたは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物または真核生物へ導入することにより、発現させ、製造することができる。

[0110] ｄｓＦｖは、ＶＨおよびＶＬ中のそれぞれ１アミノ酸残基をシステイン残基に置換したポリペプチドを該システイン残基間のジスルフィド結合を介して結合させたものをいう。ｄｓＦｖは、システイン残基に置換するアミノ酸残基は既知の方法［Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ，７，６９７（１９９４）］に従って、抗体の立体構造予測に基づいて選択することができる。

[0111] 本発明のｄｓＦｖは、本発明のモノクローナル抗体のＶＨおよびＶＬをコードするｃＤＮＡを取得し、ｄｓＦｖをコードするＤＮＡを構築し、該ＤＮＡを原核生物用発現ベクターまたは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物または真核生物へ導入することにより、発現させ、製造することができる。

[0112] ＣＤＲを含むペプチドは、ＶＨまたはＶＬのＣＤＲの少なくとも１領域以上を含んで構成される。複数のＣＤＲを含むペプチドは、直接または適当なペプチドリンカーを介して結合させることができる。

[0113] 本発明のＣＤＲを含むペプチドは、本発明のモノクローナル抗体のＶＨおよびＶＬのＣＤＲをコードするＤＮＡを構築し、該ＤＮＡを原核生物用発現ベクターまたは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物または真核生物へ導入することにより、発現させ、製造することができる。また、ＣＤＲを含むペプチドは、Ｆｍｏｃ法、またはｔＢｏｃ法などの化

学合成法によって製造することもできる。

[0114] 本発明は、本発明のモノクローナル抗体またはその抗体断片に、放射性同位元素、低分子の薬剤、高分子の薬剤、蛋白質、または抗体医薬などを化学的または遺伝子工学的に結合させた抗体の誘導体を包含する。

[0115] 本発明における抗体の誘導体は、本発明のモノクローナル抗体またはその抗体断片のＨ鎖またはＬ鎖のＮ末端側またはＣ末端側、抗体またはその抗体断片中の適当な置換基または側鎖、さらにはモノクローナル抗体またはその抗体断片中の糖鎖などに、放射性同位元素、低分子の薬剤、高分子の薬剤、免疫賦活剤、蛋白質または抗体医薬などを化学的手法［抗体工学入門，地人書館（１９９４）］により結合させることにより製造することができる。

[0116] また、本発明における抗体の誘導体は、本発明のモノクローナル抗体または抗体断片をコードするＤＮＡと、結合させたい蛋白質または抗体医薬をコードするＤＮＡを連結させて発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを適当な宿主細胞へ導入し、発現させる遺伝子工学的手法より製造することができる。

[0117] 放射性同位元素としては、例えば、^{131}Ｉ、^{125}Ｉ、^{90}Ｙ、^{64}Ｃｕ、^{99}Ｔｃ、^{77}Ｌｕ、または^{211}Ａｔなどが挙げられる。放射性同位元素は、クロラミンＴ法などによって抗体に直接結合させることができる。また、放射性同位元素をキレートする物質を抗体に結合させてもよい。キレート剤としては、例えば、１－イソチオシアネートベンジル－３－メチルジエチレントリアミンペンタ酢酸（ＭＸ－ＤＴＰＡ）などが挙げられる。

[0118] 低分子の薬剤としては、例えば、アルキル化剤、ニトロソウレア剤、代謝拮抗剤、抗生物質、植物アルカロイド、トポイソメラーゼ阻害剤、ホルモン療法剤、ホルモン拮抗剤、アロマターゼ阻害剤、Ｐ糖蛋白阻害剤、白金錯体誘導体、Ｍ期阻害剤、またはキナーゼ阻害剤などの抗癌剤［臨床腫瘍学，癌と化学療法社（１９９６）］、またはハイドロコーチゾン、プレドニゾンなどのステロイド剤、アスピリン、インドメタシンなどの非ステロイド剤、金チオマレート、ペニシラミンなどの免疫調節剤、サイクロフォスファミド、

アザチオプリンなどの免疫抑制剤、マレイン酸クロルフェニラミン、またはクレマシチンのような抗ヒスタミン剤などの抗炎症剤［炎症と抗炎症療法，医歯薬出版株式会社（１９８２）］などが挙げられる。

［0119］　抗癌剤としては、例えば、アミフォスチン（エチオール）、シスプラチン、ダカルバジン（ＤＴＩＣ）、ダクチノマイシン、メクロレタミン（ナイトロジェンマスタード）、ストレプトゾシン、シクロフォスファミド、イホスファミド、カルムスチン（ＢＣＮＵ）、ロムスチン（ＣＣＮＵ）、ドキソルビシン（アドリアマイシン）、エピルビシン、ゲムシタビン（ゲムザール）、ダウノルビシン、プロカルバジン、マイトマイシン、シタラビン、エトポシド、メトトレキセート、５－フルオロウラシル、フルオロウラシル、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ブレオマイシン、ダウノマイシン、ペプロマイシン、エストラムスチン、パクリタキセル（タキソール）、ドセタキセル（タキソテア）、アルデスロイキン、アスパラギナーゼ、ブスルファン、カルボプラチン、オキサリプラチン、ネダプラチン、クラドリビン、カンプトテシン、１０－ヒドロキシ－７－エチル－カンプトテシン（ＳＮ３８）、フロクスウリジン、フルダラビン、ヒドロキシウレア、イホスファミド、イダルビシン、メスナ、イリノテカン（ＣＰＴ－１１）、ノギテカン、ミトキサントロン、トポテカン、ロイプロリド、メゲストロール、メルファラン、メルカプトプリン、ヒドロキシカルバミド、プリカマイシン、ミトタン、ペガスパラガーゼ、ペントスタチン、ピポブロマン、ストレプトゾシン、タモキシフェン、ゴセレリン、リュープロレニン、フルタミド、テニポシド、テストラクトン、チオグアニン、チオテパ、ウラシルマスタード、ビノレルビン、クロラムブシル、ハイドロコーチゾン、プレドニゾロン、メチルプレドニゾロン、ビンデシン、ニムスチン、セムスチン、カペシタビン、トムデックス、アザシチジン、ＵＦＴ、オキザロプラチン、ゲフィチニブ（イレッサ）、イマチニブ（ＳＴＩ５７１）、エルロチニブ、ＦＭＳ－ｌｉｋｅ ｔｙｒｏｓｉｎｅ ｋｉｎａｓｅ ３（Ｆｌｔ３）阻害剤、ｖａｓｃｕｌａｒ ｅｎｄｏｔｈｅｌｉａｌ ｇｒｏｗｔｈ ｆａｃｏｔｒ ｒｅｃｅｐｔｏｒ（

ＶＥＧＦＲ）阻害剤、ｆｉｂｒｏｂｌａｓｔ ｇｒｏｗｔｈ ｆａｃｔｏｒ ｒｅｃｅｐｔｏｒ（ＦＧＦＲ）阻害剤、イレッサ、タルセバなどのｅｐｉｄｅｒｍａｌ ｇｒｏｗｔｈ ｆａｃｔｏｒ ｒｅｃｅｐｔｏｒ（ＥＧＦＲ）阻害剤、ラディシコール、１７－アリルアミノ－１７－デメトキシゲルダナマイシン、ラパマイシン、アムサクリン、オールートランスレチノイン酸、サリドマイド、アナストロゾール、ファドロゾール、レトロゾール、エキセメスタン、金チオマレート、Ｄ－ペニシラミン、ブシラミン、アザチオプリン、ミゾリビン、シクロスポリン、ラパマイシン、ヒドロコルチゾン、ベキサロテン（ターグレチン）、タモキシフェン、デキサメタゾン、プロゲスチン類、エストロゲン類、アナストロゾール（アリミデックス）、ロイプリン、アスピリン、インドメタシン、セレコキシブ、アザチオプリン、ペニシラミン、金チオマレート、マレイン酸クロルフェニラミン、クロロフェニラミン、クレマシチン、トレチノイン、ベキサロテン、砒素、ボルテゾミブ、アロプリノール、カリケアマイシン、イブリツモマブチウキセタン、タルグレチン、オゾガミン、クラリスロマシン、ロイコボリン、イファスファミド、ケトコナゾール、アミノグルテチミド、スラミン、メトトレキセート、マイタンシノイド、またはその誘導体、などが挙げられる。

[0120] 低分子の薬剤と抗体とを結合させる方法としては、例えば、グルタールアルデヒドを介して薬剤と抗体のアミノ基間を結合させる方法、または水溶性カルボジイミドを介して薬剤のアミノ基と抗体のカルボキシル基を結合させる方法などが挙げられる。

[0121] 高分子の薬剤としては、例えば、ポリエチレングリコール（以下、ＰＥＧと表記する）、アルブミン、デキストラン、ポリオキシエチレン、スチレンマレイン酸コポリマー、ポリビニルピロリドン、ピランコポリマー、またはヒドロキシプロピルメタクリルアミドなどが挙げられる。

[0122] これらの高分子化合物を抗体または抗体断片に結合させることにより、（１）化学的、物理的または生物的な種々の因子に対する安定性の向上、（２）血中半減期の顕著な延長、（３）免疫原性の消失または抗体産生の抑制、

などの効果が期待される［バイオコンジュゲート医薬品，廣川書店（１９９３）］。

[0123] ＰＥＧと抗体を結合させる方法としては、例えば、ＰＥＧ化修飾試薬と反応させる方法などが挙げられる［バイオコンジュゲート医薬品，廣川書店（１９９３）］。ＰＥＧ化修飾試薬としては、リジンのε－アミノ基への修飾剤（日本国特開昭６１－１７８９２６号公報）、アスパラギン酸およびグルタミン酸のカルボキシル基への修飾剤（日本国特開昭５６－２３５８７号公報）、またはアルギニンのグアニジノ基への修飾剤（日本国特開平２－１１７９２０号公報）などが挙げられる。

[0124] 免疫賦活剤としては、イムノアジュバントとして知られている天然物でもよく、具体例としては、免疫を亢進する薬剤が、β（１→３）グルカン（レンチナン、シゾフィラン）、またはαガラクトシルセラミドなどが挙げられる。

[0125] 蛋白質としては、ＮＫ細胞、マクロファージ、または好中球などの免疫担当細胞を活性化するサイトカイン若しくは増殖因子、または毒素蛋白質などが挙げられる。

[0126] サイトカインまたは増殖因子としては、例えば、インターフェロン（以下、ＩＮＦと記す）－α、ＩＮＦ－β、ＩＮＦ－γ、インターロイキン（以下、ＩＬと記す）－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、ＩＬ－２３、顆粒球コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）、顆粒球／マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）、またはマクロファージコロニー刺激因子（Ｍ－ＣＳＦ）などが挙げられる。

[0127] 毒素蛋白質としては、例えば、リシン、ジフテリアトキシン、またはＯＮＴＡＫなどが挙げられ、毒性を調節するためにタンパク質に変異を導入したタンパク毒素も含まれる。

[0128] 抗体医薬としては、例えば、抗体の結合によりアポトーシスが誘導される抗原、腫瘍の病態形成に関わる抗原または免疫機能を調節する抗原、病変部位の血管新生に関与する抗原に対する抗体が挙げられる。

[0129] 抗体の結合によりアポトーシスが誘導される抗原としては、例えば、Ｃｌｕｓｔｅｒ ｏｆ ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｉｏｎ（以下、ＣＤと記載する）１９、ＣＤ２０、ＣＤ２１、ＣＤ２２、ＣＤ２３、ＣＤ２４、ＣＤ３７、ＣＤ５３、ＣＤ７２、ＣＤ７３、ＣＤ７４、ＣＤｗ７５、ＣＤｗ７６、ＣＤ７７、ＣＤｗ７８、ＣＤ７９ａ、ＣＤ７９ｂ、ＣＤ８０（Ｂ７．１）、ＣＤ８１、ＣＤ８２、ＣＤ８３、ＣＤｗ８４、ＣＤ８５、ＣＤ８６（Ｂ７．２）、ｈｕｍａｎ ｌｅｕｋｏｃｙｔｅ ａｎｔｉｇｅｎ（ＨＬＡ）－Ｃｌａｓｓ ＩＩ、またはＥｐｉｄｅｒｍａｌ Ｇｒｏｗｔｈ Ｆａｃｔｏｒ Ｒｅｃｅｐｔｏｒ（ＥＧＦＲ）などが挙げられる。

[0130] 腫瘍の病態形成に関わる抗原または免疫機能を調節する抗体の抗原としては、例えば、ＣＤ４０、ＣＤ４０リガンド、Ｂ７ファミリー分子（ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＤ２７４、Ｂ７－ＤＣ、Ｂ７－Ｈ２、Ｂ７－Ｈ３、またはＢ７－Ｈ４）、Ｂ７ファミリー分子のリガンド（ＣＤ２８、ＣＴＬＡ－４、ＩＣＯＳ、ＰＤ－１、またはＢＴＬＡ）、ＯＸ－４０、ＯＸ－４０リガンド、ＣＤ１３７、ｔｕｍｏｒ ｎｅｃｒｏｓｉｓ ｆａｃｔｏｒ（ＴＮＦ）受容体ファミリー分子（ＤＲ４、ＤＲ５、ＴＮＦＲ１、またはＴＮＦＲ２）、ＴＮＦ－ｒｅｌａｔｅｄ ａｐｏｐｔｏｓｉｓ－ｉｎｄｕｃｉｎｇ ｌｉｇａｎｄ ｒｅｃｅｐｔｏｒ（ＴＲＡＩＬ）ファミリー分子、ＴＲＡＩＬファミリー分子の受容体ファミリー（ＴＲＡＩＬ－Ｒ１、ＴＲＡＩＬ－Ｒ２、ＴＲＡＩＬ－Ｒ３、またはＴＲＡＩＬ－Ｒ４）、ｒｅｃｅｐｔｏｒ ａｃｔｉｖａｔｏｒ ｏｆ ｎｕｃｌｅａｒ ｆａｃｔｏｒ ｋａｐｐａ Ｂ ｌｉｇａｎｄ（ＲＡＮＫ）、ＲＡＮＫリガンド、ＣＤ２５、葉酸受容体４、サイトカイン［ＩＬ－１α、ＩＬ－１β、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－６、ＩＬ－１０、ＩＬ－１３、ｔｒａｎｓｆｏｒｍｉｎｇ ｇｒｏｗｔｈ ｆａｃｔｏｒ（ＴＧＦ）β、またはＴＮＦαなど］、これらのサイトカインの受容体、ケモカイン（ＳＬＣ、ＥＬＣ、Ｉ－３０９、ＴＡＲＣ、ＭＤＣ、またはＣＴＡＣＫなど）、またはこれらのケモカインの受容体が挙げられる。

[0131] 病変部位の血管新生を阻害する抗体の抗原としては、例えば、ｖａｓｃｕ

ｌａｒ ｅｎｄｏｔｈｅｌｉａｌ ｇｒｏｗｔｈ ｆａｃｔｏｒ（ＶＥＧＦ）、Ａｎｇｉｏｐｏｉｅｔｉｎ、ｆｉｂｒｏｂｌａｓｔ ｇｒｏｗｔｈ ｆａｃｔｏｒ（ＦＧＦ）、ＥＧＦ、ｐｌａｔｅｌｅｔ－ｄｅｒｉｖｅｄ ｇｒｏｗｔｈ ｆａｃｔｏｒ（ＰＤＧＦ）、ｉｎｓｕｌｉｎ－ｌｉｋｅ ｇｒｏｗｔｈ ｆａｃｔｏｒ（ＩＧＦ）、ｅｒｙｔｈｒｏｐｏｉｅｔｉｎ（ＥＰＯ）、ＴＧＦβ、ＩＬ－８、Ｅｐｈｉｌｉｎ、ＳＤＦ－１、またはこれらの受容体などが挙げられる。

[0132] 蛋白質または抗体医薬との融合抗体は、モノクローナル抗体または抗体断片をコードするｃＤＮＡに蛋白質をコードするｃＤＮＡを連結させることにより、融合抗体をコードするＤＮＡを構築し、該ＤＮＡを原核生物または真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物または真核生物へ導入することにより、融合抗体を発現させ製造することができる。

[0133] 検出方法、定量方法、検出用試薬、定量用試薬または診断薬として上記抗体の誘導体を使用する場合に、本発明のモノクローナル抗体またはその抗体断片に結合させる薬剤としては、通常の免疫学的検出または測定法で用いられる標識体が挙げられる。

[0134] 標識体としては、例えば、アルカリフォスファターゼ、ペルオキシダーゼおよびルシフェラーゼなどの酵素、アクリジニウムエステルおよびロフィンなどの発光物質、並びにフルオレセインイソチオシアネート（ＦＩＴＣ）およびテトラメチルローダミンイソチオシアネート（ＲＩＴＣ）などの蛍光物質などが挙げられる。

[0135] また、本発明は、本発明のモノクローナル抗体またはその抗体断片を有効成分として含有するＴｒｏｐ－２陽性細胞が関与する疾患の治療薬に関する。

[0136] Ｔｒｏｐ－２陽性細胞が関与する疾患としては、例えば、Ｔｒｏｐ－２が発現している細胞が関与する疾患であればいかなるものでもよく、例えば癌が挙げられる。

[0137] 癌としては、例えば、血液癌、乳癌、子宮癌、大腸癌、食道癌、胃癌、卵

巣癌、肺癌、腎臓癌、直腸癌、甲状腺癌、子宮頸癌、小腸癌、前立腺癌または膵臓癌などが挙げられ、好ましくは血液癌、食道癌、胃癌、大腸癌、肝癌または前立腺癌が挙げられる。

[0138] 本発明のモノクローナル抗体または該抗体断片、またはこれらの誘導体を含有する治療剤は、有効成分としての該抗体もしくは該抗体断片、またはこれらの誘導体のみを含むものであってもよいが、通常は薬理学的に許容される１以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野において公知の任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが望ましい。

[0139] 投与経路は、治療に際して最も効果的なものを使用するのが好ましく、例えば、経口投与、または口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内または静脈内などの非経口投与が挙げられる。中でも、静脈内投与が好ましい。

[0140] 投与形態としては、例えば、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、軟膏、またはテープ剤などが挙げられる。

[0141] 投与量または投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢、および体重などにより異なるが、通常成人１日当たり１０μｇ／ｋｇ～１０ｍｇ／ｋｇである。

[0142] さらに、本発明は、本発明のモノクローナル抗体またはその抗体断片を有効成分として含有する、Ｔｒｏｐ－２の免疫学的検出または測定方法、Ｔｒｏｐ－２の免疫学的検出用または測定用試薬、Ｔｒｏｐ－２が発現する細胞の免疫学的検出または測定方法、およびＴｒｏｐ－２陽性細胞が関与する疾患の診断薬に関する。

[0143] 本発明においてＴｒｏｐ－２の量を検出または測定する方法としては、任意の公知の方法が挙げられる。例えば、免疫学的検出または測定方法などが挙げられる。

[0144] 免疫学的検出または測定方法とは、標識を施した抗原または抗体を用いて、抗体量または抗原量を検出または測定する方法である。免疫学的検出または測定方法としては、例えば、放射免疫測定法（ＲＩＡ）、酵素免疫測定法

（ＥＩＡまたはＥＬＩＳＡ）、蛍光免疫測定法（ＦＩＡ）、発光免疫測定法（ｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｔ　ｉｍｍｕｎｏａｓｓａｙ）、ウェスタンブロット法または物理化学的手法などが挙げられる。

[0145] 本発明のモノクローナル抗体または該抗体断片を用いてＴｒｏｐ－２が発現した細胞を検出または測定することにより、Ｔｒｏｐ－２が関連する疾患を診断することができる。

[0146] 該ポリペプチドが発現している細胞の検出には、公知の免疫学的検出法を用いることができるが、例えば、免疫沈降法、免疫細胞染色法、免疫組織染色法、または蛍光抗体染色法などが、好ましく挙げられる。また、ＦＭＡＴ８１００ＨＴＳシステム（アプライドバイオシステム社製）などの蛍光抗体染色法なども挙げられる。

[0147] 本発明においてＴｒｏｐ－２を検出または測定する対象となる生体試料としては、組織細胞、血液、血漿、血清、膵液、尿、糞便、組織液、または培養液など、Ｔｒｏｐ－２が発現した細胞を含む可能性のあるものであれば特に限定されない。

[0148] 本発明のモノクローナル抗体またはその抗体断片、またはこれらの誘導体を含有する診断薬は、目的の診断法に応じて、抗原抗体反応を行なうための試薬、該反応の検出用試薬を含んでもよい。抗原抗体反応を行なうための試薬としては、例えば、緩衝剤、塩などが挙げられる。

[0149] 検出用試薬としては、例えば、該モノクローナル抗体若しくはその抗体断片、またはこれらの誘導体を認識する標識された二次抗体、または標識に対応した基質などの通常の免疫学的検出または測定法に用いられる試薬が挙げられる。

[0150] 以下に、本発明のモノクローナル抗体の製造方法、疾患の治療方法、および疾患の診断方法について、具体的に説明する。

[0151] １．モノクローナル抗体の製造方法

（１）抗原の調製

抗原となるＴｒｏｐ－２またはＴｒｏｐ－２を発現させた細胞は、Ｔｒｏ

ｐ－２全長またはその部分長をコードするｃＤＮＡを含む発現ベクターを、大腸菌、酵母、昆虫細胞、または動物細胞などに導入することにより、得ることができる。また、Ｔｒｏｐ－２を多量に発現している各種ヒト腫瘍培養細胞、ヒト組織などからＴｒｏｐ－２を精製し、得ることができる。また、該腫瘍培養細胞、または該組織などをそのまま抗原として用いることもできる。さらに、Ｆｍｏｃ法、またはｔＢｏｃ法などの化学合成法によりＴｒｏｐ－２の部分配列を有する合成ペプチドを調製し、抗原に用いることもできる。

[0152] 本発明で用いられるＴｒｏｐ－２は、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ，Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｓｅｃｏｎｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ（１９８９）やＣｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ Ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ（１９８７－１９９７）などに記載された方法などを用い、例えば以下の方法により、該Ｔｒｏｐ－２をコードするＤＮＡを宿主細胞中で発現させて、製造することができる。

[0153] まず、Ｔｒｏｐ－２をコードする部分を含む完全長ｃＤＮＡを適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換えベクターを作製する。上記完全長ｃＤＮＡの代わりに、完全長ｃＤＮＡをもとにして調製された、ポリペプチドをコードする部分を含む適当な長さのＤＮＡ断片を用いてもよい。次に、得られた該組換えベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより、ポリペプチドを生産する形質転換体を得ることができる。

[0154] 発現ベクターとしては、使用する宿主細胞における自律複製または染色体上への組込みが可能であり、ポリペプチドをコードするＤＮＡを転写できる位置に適当なプロモーターを含有しているものであれば、いずれも用いることができる。

[0155] 宿主細胞としては、大腸菌などのエシェリヒア属などに属する微生物、酵

母、昆虫細胞、または動物細胞など、目的とする遺伝子を発現できるものであればいずれも用いることができる。

[0156] 大腸菌などの原核生物を宿主細胞として用いる場合、組換えベクターは、原核生物中で自律複製が可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、Ｔｒｏｐ－２をコードする部分を含むＤＮＡ、および転写終結配列を含むベクターであることが好ましい。また、該組換えベクターには、転写終結配列は必ずしも必要ではないが、構造遺伝子の直下に転写終結配列を配置することが好ましい。さらに、該組換えベクターには、プロモーターを制御する遺伝子を含んでいてもよい。

[0157] 該組換えベクターとしては、リボソーム結合配列であるシャイン・ダルガルノ配列（ＳＤ配列ともいう）と開始コドンとの間を適当な距離（例えば６～１８塩基）に調節したプラスミドを用いることが好ましい。

[0158] また、該Ｔｒｏｐ－２をコードするＤＮＡの塩基配列としては、宿主内での発現に最適なコドンとなるように塩基を置換することができ、これにより目的とするＴｒｏｐ－２の生産率を向上させることができる。

[0159] 発現ベクターとしては、使用する宿主細胞中で機能を発揮できるものであればいずれも用いることができる。例えば、ｐＢＴｒｐ２、ｐＢＴａｃ１、ｐＢＴａｃ２（以上、ロシュ・ダイアグノスティックス社製）、ｐＫＫ２３３－２（ファルマシア社製）、ｐＳＥ２８０（インビトロジェン社製）、ｐＧＥＭＥＸ－１（プロメガ社製）、ｐＱＥ－８（キアゲン社製）、ｐＫＹＰ１０（日本国特開昭５８－１１０６００号公報）、ｐＫＹＰ２００［Ａｇｒｉｃｕｌｔｕｒａｌ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，４８，６６９（１９８４）］、ｐＬＳＡ１［Ａｇｒｉｃ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，５３，２７７（１９８９）］、ｐＧＥＬ１［Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８２，４３０６（１９８５）］、ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ ＩＩ ＳＫ（－）（ストラタジーン社製）、ｐＴｒｓ３０［大腸菌ＪＭ１０９／ｐＴｒＳ３０（ＦＥＲＭ ＢＰ－５４０７）より調製］、ｐＴｒｓ３２［大腸菌ＪＭ１０９／ｐＴｒＳ３２（ＦＥＲＭ ＢＰ－５４０８）より

調製］、ｐＧＨＡ２［大腸菌ＩＧＨＡ２（ＦＥＲＭ　ＢＰ－４００）より調製、日本国特開昭６０－２２１０９１号公報］、ｐＧＫＡ２［大腸菌ＩＧＫＡ２（ＦＥＲＭ　ＢＰ－６７９８）より調製、日本国特開昭６０－２２１０９１号公報］、ｐＴｅｒｍ２（米国特許第４６８６１９１号明細書、米国特許第４９３９０９４号明細書、米国特許第５１６０７３５号明細書）、ｐＳｕｐｅｘ、ｐＵＢ１１０、ｐＴＰ５、ｐＣ１９４、ｐＥＧ４００［Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．，１７２，２３９２（１９９０）］、ｐＧＥＸ（ファルマシア社製）、ｐＥＴシステム（ノバジェン社製）、またはｐＭＥ１８ＳＦＬ３などが挙げられる。

[0160] プロモーターとしては、使用する宿主細胞中で機能を発揮できるものであればいかなるものでもよい。例えば、ｔｒｐプロモーター（Ｐｔｒｐ）、ｌａｃプロモーター、ＰＬプロモーター、ＰＲプロモーター、またはＴ７プロモーターなどの、大腸菌やファージなどに由来するプロモーターを挙げることができる。また、Ｐｔｒｐを２つ直列させたタンデムプロモーター、ｔａｃプロモーター、ｌａｃＴ７プロモーター、またはｌｅｔ　Ｉプロモーターなどの人為的に設計改変されたプロモーターなども用いることができる。

[0161] 宿主細胞としては、例えば、大腸菌ＸＬ１－Ｂｌｕｅ、大腸菌ＸＬ２－Ｂｌｕｅ、大腸菌ＤＨ１、大腸菌ＭＣ１０００、大腸菌ＫＹ３２７６、大腸菌Ｗ１４８５、大腸菌ＪＭ１０９、大腸菌ＨＢ１０１、大腸菌Ｎｏ．４９、大腸菌Ｗ３１１０、大腸菌ＮＹ４９、または大腸菌ＤＨ５αなどが挙げられる。

[0162] 宿主細胞への組換えベクターの導入方法としては、使用する宿主細胞へＤＮＡを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、カルシウムイオンを用いる方法［Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，６９，２１１０（１９７２）、Ｇｅｎｅ，１７，１０７（１９８２）、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ＆Ｇｅｎｅｒａｌ　Ｇｅｎｅｔｉｃｓ，１６８，１１１（１９７９）］が挙げられる。

[0163] 動物細胞を宿主として用いる場合、発現ベクターとしては、動物細胞中で

機能を発揮できるものであればいずれも用いることができ、例えば、ｐｃＤＮＡＩ、ｐｃＤＭ８（フナコシ社製）、ｐＡＧＥ１０７　［日本国特開平３－２２９７９号公報；Ｃｙｔｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，３，１３３（１９９０）］、ｐＡＳ３－３（日本国特開平２－２２７０７５号公報）、ｐＣＤＭ８［Ｎａｔｕｒｅ，３２９，８４０（１９８７）］、ｐｃＤＮＡＩ／Ａｍｐ（インビトロジェン社製）、ｐｃＤＮＡ３．１（インビトロジェン社製）、ｐＲＥＰ４（インビトロジェン社製）、ｐＡＧＥ１０３［Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，１０１，１３０７（１９８７）］、ｐＡＧＥ２１０、ｐＭＥ１８ＳＦＬ３、またはｐＫＡＮＴＥＸ９３（国際公開第９７／１０３５４号）などが挙げられる。

[0164] プロモーターとしては、動物細胞中で機能を発揮できるものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）のｉｍｍｅｄｉａｔｅ　ｅａｒｌｙ（ＩＥ）遺伝子のプロモーター、ＳＶ４０の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、ＳＲαプロモーター、またはモロニーマウス白血病ウイルスのプロモーター若しくはエンハンサーが挙げられる。また、ヒトＣＭＶのＩＥ遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

[0165] 宿主細胞としては、例えば、ヒトバーキットリンパ腫細胞Ｎａｍａｌｗａ、サル腎臓細胞ＣＯＳ、チャイニーズ・ハムスター卵巣細胞ＣＨＯ（Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ　Ｍｅｄｉｃｉｎｅ，１０８，９４５（１９５８）；Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，６０，１２７５（１９６８）；Ｇｅｎｅｔｉｃｓ，５５，５１３（１９６８）；Ｃｈｒｏｍｏｓｏｍａ，４１，１２９（１９７３）；Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｃｅｌｌ　Ｓｃｉｅｎｃｅ，１８，１１５（１９９６）；Ｒａｄｉａｔｉｏｎ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ，１４８，２６０（１９９７）；Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，７７，４２１６（１９８０）；Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．，６０，１２７５（１９

６８）；Ｃｅｌｌ，６，１２１（１９７５）；Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｅｌｌ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ，Ａｐｐｅｎｄｉｘ Ｉ，ＩＩ（ｐｐ．８８３－９００）；）、ＣＨＯ／ＤＧ４４、ＣＨＯ－Ｋ１（ＡＴＣＣ ＣＣＬ－６１）、ＤＵＫＸＢ１１（ＡＴＣＣ ＣＣＬ－９０９６）、Ｐｒｏ－５（ＡＴＣＣ ＣＣＬ－１７８１）、ＣＨＯ－Ｓ（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｃａｔ ＃ １１６１９）、Ｐｒｏ－３、ラットミエローマ細胞ＹＢ２／３ＨＬ．Ｐ２．Ｇ１１．１６Ａｇ．２０（またはＹＢ２／０ともいう）、マウスミエローマ細胞ＮＳＯ、マウスミエローマ細胞ＳＰ２／０－Ａｇ１４、シリアンハムスター細胞ＢＨＫまたはヒト白血病細胞ＨＢＴ５６３７（日本国特開昭６３－０００２９９号公報）、などが挙げられる。

[0166] 宿主細胞への組換えベクターの導入方法としては、動物細胞にＤＮＡを導入する方法であればいずれも用いることができる。例えば、エレクトロポレーション法［Ｃｙｔｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，３，１３３（１９９０）］、リン酸カルシウム法（日本国特開平２－２２７０７５号公報）、またはリポフェクション法［Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８４，７４１３（１９８７）］などが挙げられる。

[0167] 以上のようにして得られるＴｒｏｐ－２をコードするＤＮＡを組み込んだ組換えベクターを保有する、微生物または動物細胞などの由来の形質転換体を培地に培養し、培養物中に該Ｔｒｏｐ－２を生成蓄積させ、該培養物から採取することにより、Ｔｒｏｐ－２を製造することができる。該形質転換体を培地に培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。

[0168] 真核生物由来の細胞で発現させた場合には、糖または糖鎖が付加されたＴｒｏｐ－２を得ることができる。

[0169] 誘導性のプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、ｌａｃプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養する場合にはイソプロピル－β－Ｄ－チオガラクトピラノシドなどを、

ｔｒｐプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養する場合にはインドールアクリル酸などを、培地に添加してもよい。

[0170] 動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているＲＰＭＩ１６４０培地［Ｔｈｅ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ ｔｈｅ Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｍｅｄｉｃａｌ Ａｓｓｏｃｉａｔｉｏｎ，１９９，５１９（１９６７）］、ＥａｇｌｅのＭＥＭ培地［Ｓｃｉｅｎｃｅ，１２２，５０１（１９５２）］、ダルベッコ改変ＭＥＭ培地［Ｖｉｒｏｌｏｇｙ，８，３９６（１９５９）］、１９９培地［Ｐｒｏｃ．Ｓｏｃ．Ｅｘｐ．Ｂｉｏｌ．Ｍｅｄ．，７３，１（１９５０）］、Ｉｓｃｏｖｅ’ｓ Ｍｏｄｉｆｉｅｄ Ｄｕｌｂｅｃｃｏ’ｓ Ｍｅｄｉｕｍ（ＩＭＤＭ）培地、またはこれらの培地に牛胎児血清（ＦＢＳ）などを添加した培地などが挙げられる。培養は、通常ｐＨ６～８、３０～４０℃、５％CO_2存在下などの条件下で１～７日間行う。また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ペニシリンなどの抗生物質を培地に添加してもよい。

[0171] Ｔｒｏｐ－２をコードする遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、分泌生産または融合蛋白質発現などの方法［Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ，Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｓｅｃｏｎｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ（１９８９）］を用いることができる。

[0172] Ｔｒｏｐ－２の生産方法としては、宿主細胞内に生産させる方法、宿主細胞外に分泌させる方法、または宿主細胞外膜上に生産させる方法があり、使用する宿主細胞や、生産させるＴｒｏｐ－２の構造を変えることにより、適切な方法を選択することができる。

[0173] Ｔｒｏｐ－２が宿主細胞内又は宿主細胞外膜上に生産される場合、ポールソンらの方法［Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２６４，１７６１９（１９８９）］、ロウらの方法［Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．，ＵＳＡ，８６，８２２７（１９８９）、Ｇｅｎｅｓ Ｄｅｖｅｌｏｐ．，４，１２８８（１９９０）］、日本国特開平０５－３３６９６３号公報、または国際公

開第９４／２３０２１号などに記載の方法を用いることにより、Ｔｒｏｐ－２を宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。

[0174] また、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子などを用いた遺伝子増幅系（日本国特開平２－２２７０７５号公報）を利用してＴｒｏｐ－２の生産量を上昇させることもできる。

[0175] 得られたＴｒｏｐ－２は、例えば、以下のようにして単離、精製することができる。

[0176] Ｔｒｏｐ－２が細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後に細胞を遠心分離により回収し、水系緩衝液に懸濁後、超音波破砕機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、またはダイノミルなどを用いて細胞を破砕し、無細胞抽出液を得る。

[0177] 前記無細胞抽出液を遠心分離することにより得られる上清から、通常の蛋白質の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫安などによる塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル（ＤＥＡＥ）－セファロース、ＤＩＡＩＯＮ　ＨＰＡ－７５（三菱化学社製）などのレジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、Ｓ－Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ　ＦＦ（ファルマシア社製）などのレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロースなどのレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、または等電点電気泳動などの電気泳動法などの手法を単独または組み合わせて用い、精製標品を得ることができる。

[0178] Ｔｒｏｐ－２が細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、上記と同様に細胞を回収後破砕し、遠心分離を行うことにより、沈殿画分として該Ｔｒｏｐ－２の不溶体を回収する。回収した該Ｔｒｏｐ－２の不溶体を蛋白質変性剤で可溶化する。該可溶化液を希釈または透析することにより、該Ｔｒｏｐ－２を正常な立体構造に戻した後、上記と同様の単離精製法によりポリペプチドの精製標品を得ることができる。

[0179] Ｔｒｏｐ－２またはその糖修飾体などの誘導体が細胞外に分泌された場合には、培養上清において該Ｔｒｏｐ－２またはその糖修飾体などの誘導体を回収することができる。該培養物を上記と同様に遠心分離などの手法により処理することにより可溶性画分を取得し、該可溶性画分から、上記と同様の単離精製法を用いることにより、精製標品を得ることができる。

[0180] また、本発明において用いられるＴｒｏｐ－２は、Ｆｍｏｃ法、またはｔＢｏｃ法などの化学合成法によっても製造することができる。また、アドバンストケムテック社製、パーキン・エルマー社製、ファルマシア社製、プロテインテクノロジインストルメント社製、シンセセルーベガ社製、パーセプチブ社製、または島津製作所社製などのペプチド合成機を利用して化学合成することもできる。

[0181] （２）動物の免疫と融合用抗体産生細胞の調製

３～２０週令のマウス、ラットまたはハムスターなどの動物に、（１）で得られる抗原を免疫して、その動物の脾臓、リンパ節、末梢血中の抗体産生細胞を採取する。また、免疫原性が低く上記の動物で充分な抗体価の上昇が認められない場合には、Ｔｒｏｐ－２ノックアウトマウスを被免疫動物として用いることもできる。

[0182] 免疫は、動物の皮下、静脈内または腹腔内に、例えば、フロインドの完全アジュバント、または水酸化アルミニウムゲルと百日咳菌ワクチンなどの適当なアジュバントとともに抗原を投与することにより行う。抗原が部分ペプチドである場合には、ＢＳＡ（ウシ血清アルブミン）、またはＫＬＨ（Ｋｅｙｈｏｌｅ Ｌｉｍｐｅｔ ｈｅｍｏｃｙａｎｉｎ）などのキャリア蛋白質とコンジュゲートを作製し、これを免疫原として用いる。

[0183] 抗原の投与は、１回目の投与の後、１～２週間おきに５～１０回行う。各投与後３～７日目に眼底静脈叢より採血し、その血清の抗体価を酵素免疫測定法［Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ－Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ（１９８８）］などを用いて測定する。免疫に用いた抗原に対し、その血清が十分な抗

体価を示した動物を融合用抗体産生細胞の供給源とする。

[0184] 抗原の最終投与後３～７日目に、免疫した動物より脾臓などの抗体産生細胞を含む組織を摘出し、抗体産生細胞を採取する。脾臓細胞を用いる場合には、脾臓を細断、ほぐした後、遠心分離し、さらに赤血球を除去して融合用抗体産生細胞を取得する。

[0185] （３）骨髄腫細胞の調製

骨髄腫細胞としては、マウスから得られた株化細胞を用い、例えば、８－アザグアニン耐性マウス（ＢＡＬＢ／ｃ由来）骨髄腫細胞株Ｐ３－Ｘ６３Ａｇ８－Ｕ１（Ｐ３－Ｕ１）［Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｔｏｐｉｃｓ ｉｎ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，１８，１（１９７８）］、Ｐ３－ＮＳ１／１－Ａｇ４１（ＮＳ－１）［Ｅｕｒｏｐｅａｎ Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，６，５１１（１９７６）］、ＳＰ２／０－Ａｇ１４（ＳＰ－２）［Ｎａｔｕｒｅ，２７６，２６９（１９７８）］、Ｐ３－Ｘ６３－Ａｇ８６５３（６５３）［Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，１２３，１５４８（１９７９）］、またはＰ３－Ｘ６３－Ａｇ８（Ｘ６３）［Ｎａｔｕｒｅ，２５６，４９５（１９７５）］などが挙げられる。

[0186] 該骨髄腫細胞は、正常培地［グルタミン、２－メルカプトエタノール、ジェンタマイシン、ＦＢＳ、および８－アザグアニンを加えたＲＰＭＩ１６４０培地］で継代し、細胞融合の３～４日前に正常培地に継代し、融合当日２×１０^{7}個以上の細胞数を確保する。

[0187] （４）細胞融合とモノクローナル抗体産生ハイブリドーマの調製

（２）で得られる融合用抗体産生細胞と（３）で得られる骨髄腫細胞をＭｉｎｉｍｕｍ Ｅｓｓｅｎｔｉａｌ Ｍｅｄｉｕｍ（ＭＥＭ）培地またはＰＢＳ（リン酸二ナトリウム１．８３ｇ、リン酸一カリウム０．２１ｇ、食塩７．６５ｇ、蒸留水１リットル、ｐＨ７．２）でよく洗浄し、細胞数が、融合用抗体産生細胞：骨髄腫細胞＝５～１０：１になるよう混合し、遠心分離した後、上清を除く。

[0188] 沈澱した細胞群をよくほぐした後、ポリエチレングリコール－１０００（

ＰＥＧ－１０００）、ＭＥＭ培地およびジメチルスルホキシドの混液を３７℃で、攪拌しながら加える。さらに１～２分間毎にＭＥＭ培地１～２ｍＬを数回加えた後、ＭＥＭ培地を加えて全量が５０ｍＬになるようにする。遠心分離後、上清を除く。沈澱した細胞群をゆるやかにほぐした後、融合用抗体産生細胞にＨＡＴ培地［ヒポキサンチン、チミジン、およびアミノプテリンを加えた正常培地］中にゆるやかに細胞を懸濁する。この懸濁液を５％CO_2インキュベーター中、３７℃で７～１４日間培養する。

[0189] 培養後、培養上清の一部を抜き取り、後述のバインディングアッセイなどのハイブリドーマの選択方法により、Ｔｒｏｐ－２を含む抗原に反応し、Ｔｒｏｐ－２を含まない抗原に反応しない細胞群を選択する。次に、限界希釈法によりクローニングを２回繰り返し［１回目はＨＴ培地（ＨＡＴ培地からアミノプテリンを除いた培地）、２回目は正常培地を使用する］、安定して強い抗体価の認められたものをモノクローナル抗体産生ハイブリドーマとして選択する。

[0190] （５）精製モノクローナル抗体の調製

プリスタン処理［２，６，１０，１４－テトラメチルペンタデカン（Ｐｒｉｓｔａｎｅ）０．５ｍｌを腹腔内投与し、２週間飼育する］した８～１０週令のマウスまたはヌードマウスに、（４）で得られるモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを腹腔内に注射する。１０～２１日でハイブリドーマは腹水癌化する。このマウスから腹水を採取し、遠心分離して固形分を除去後、４０～５０％硫酸アンモニウムで塩析し、カプリル酸沈殿法、ＤＥＡＥ－セファロースカラム、プロテインＡ－カラムまたはゲル濾過カラムによる精製を行い、ＩｇＧまたはＩｇＭ画分を集め、精製モノクローナル抗体とする。

[0191] また、（４）で得られるモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを、１０％濃度のＦＢＳを添加したＲＰＭＩ１６４０培地などで培養した後、遠心分離により上清を除き、Ｈｙｂｒｉｄｏｍａ　ＳＦＭ培地に懸濁し、３～７日間培養する。得られた細胞懸濁液を遠心分離し、得られた上清よりプロテイ

ンＡ－カラムまたはプロテインＧ－カラムによる精製を行ない、ＩｇＧ画分を集め、精製モノクローナル抗体を得ることもできる。なお、Ｈｙｂｒｉｄｏｍａ　ＳＦＭ培地には５％濃度のダイゴＧＦ２１を添加することもできる。

[0192] 抗体のサブクラスの決定は、サブクラスタイピングキットを用いて酵素免疫測定法により行う。蛋白量の定量は、ローリー法または２８０ｎｍでの吸光度より算出する。

[0193] （６）モノクローナル抗体の選択

モノクローナル抗体の選択は以下に示す酵素免疫測定法によるバインディングアッセイ、およびＢｉａｃｏｒｅによるｋｉｎｅｔｉｃｓ解析により行う。これらの方法以外に、公知の方法（Ｔｈｅ　Ｐｒｏｓｔａｔｅ，６７，１１６３（２００７））により、抗体の標的抗原を同定することで選択することもできる。

[0194] （６－ａ）バインディングアッセイ

抗原としては、（１）で得られるＴｒｏｐ－２をコードするｃＤＮＡを含む発現ベクターを大腸菌、酵母、昆虫細胞、または動物細胞などに導入して得られた遺伝子導入細胞、リコンビナント蛋白質、またはヒト組織から得た精製ポリペプチドまたは部分ペプチドなどを用いる。抗原が部分ペプチドである場合には、ＢＳＡまたはＫＬＨなどのキャリア蛋白質とコンジュゲートを作製して、これを用いる。

[0195] 抗原を９６ウェルプレートなどのプレートに分注し、固相化した後、一次抗体として血清、ハイブリドーマの培養上清または精製モノクローナル抗体などの被験物質を分注し、反応させる。ＰＢＳまたはＰＢＳ－Ｔｗｅｅｎなどで、よく洗浄した後、二次抗体としてビオチン、酵素、化学発光物質または放射線化合物などで標識した抗イムノグロブリン抗体を分注して反応させる。ＰＢＳ－Ｔｗｅｅｎでよく洗浄した後、二次抗体の標識物質に応じた反応を行い、免疫原に対し特異的に反応するモノクローナル抗体を選択する。

[0196] また、本発明のモノクローナル抗体と競合してＴｒｏｐ－２に結合するモ

ノクローナル抗体は、上述のバインディングアッセイ系に、被検抗体を添加して反応させることで取得できる。すなわち、被検抗体を加えた時にモノクローナル抗体の結合が阻害される抗体をスクリーニングすることにより、Ｔｒｏｐ－２の細胞外領域への結合において、取得したモノクローナル抗体と競合するモノクローナル抗体を取得することができる。

[0197] 更に、本発明のモノクローナル抗体が認識するエピトープと、同じエピトープに結合する抗体は、上述のバインディングアッセイ系で取得された抗体のエピトープを同定し、同定したエピトープの、部分的な合成ペプチド、またはエピトープの立体構造に擬態させた合成ペプチド等を作製し、免疫することで、取得することができる。

[0198] （６－ｂ）Ｂｉａｃｏｒｅによるカイネティクス解析

Ｂｉａｃｏｒｅ　Ｔ１００を用い、抗原と被験物の間の結合におけるカイネティクスを測定し、その結果を機器付属の解析ソフトウエアで解析をする。抗マウスＩｇＧ抗体をセンサーチップＣＭ５にアミンカップリング法により固定した後、ハイブリドーマ培養上清または精製モノクローナル抗体などの被験物質を流し、適当量結合させ、更に濃度既知の複数濃度の抗原を流し、結合および解離を測定する。

[0199] 得られたデータを元に、機器付属のソフトウエアを用いて、１：１バインディングモデルによりカイネティクス解析を行い、各種パラメータを取得する。または、ヒトＴｒｏｐ－２をセンサーチップ上に、例えばアミンカップリング法により固定した後、濃度既知の複数濃度の精製モノクローナル抗体を流し、結合および解離を測定する。得られたデータを機器付属のソフトウエアを用い、バイバレントバインディングモデルによるカイネティクス解析を行い、各種パラメータを取得する。

[0200] ２．遺伝子組換え抗体の作製

遺伝子組換え抗体の作製例として、以下にヒト型キメラ抗体およびヒト型ＣＤＲ移植抗体の作製方法を示す。

（１）遺伝子組換え抗体発現用ベクターの構築

遺伝子組換え抗体発現用ベクターは、ヒト抗体のＣＨおよびＣＬをコードするＤＮＡが組み込まれた動物細胞用発現ベクターであり、動物細胞用発現ベクターにヒト抗体のＣＨおよびＣＬをコードするＤＮＡをそれぞれクローニングすることにより構築することができる。

[0201] ヒト抗体のＣ領域は任意のヒト抗体のＣＨおよびＣＬを用いることができる。例えば、ヒト抗体のγ１サブクラスのＣＨおよびκクラスのＣＬなどを用いる。ヒト抗体のＣＨおよびＣＬをコードするＤＮＡには、ｃＤＮＡを用いるが、エキソンとイントロンからなる染色体ＤＮＡを用いることもできる。

[0202] 動物細胞用発現ベクターには、ヒト抗体のＣ領域をコードする遺伝子を組込み発現できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、ｐＡＧＥ１０７［Ｃｙｔｏｔｅｃｈｎｏｌ．，３，１３３（１９９０）］、ｐＡＧＥ１０３［Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．，１０１，１３０７（１９８７）］、ｐＨＳＧ２７４［Ｇｅｎｅ，２７，２２３（１９８４）］、ｐＫＣＲ［Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，７８，１５２７（１９８１）］、ｐＳＧ１ｂｄ２－４［Ｃｙｔｏｔｅｃｈｎｏｌ．，４，１７３（１９９０）］、またはｐＳＥ１ＵＫ１Ｓｅｄ１－３［Ｃｙｔｏｔｅｃｈｎｏｌ．，１３，７９（１９９３）］などを用いる。

[0203] 動物細胞用発現ベクターのうちプロモーターとエンハンサーには、例えば、ＳＶ４０の初期プロモーター［Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．，１０１，１３０７（１９８７）］、モロニーマウス白血病ウイルスＬＴＲ［Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍｕｎ．，１４９，９６０（１９８７）］、または免疫グロブリンＨ鎖のプロモーター［Ｃｅｌｌ，４１，４７９（１９８５）］とエンハンサー［Ｃｅｌｌ，３３，７１７（１９８３）］などを用いる。

[0204] 遺伝子組換え抗体発現用ベクターには、遺伝子組換え抗体発現ベクターの構築の容易さ、動物細胞への導入の容易さ、動物細胞内での抗体Ｈ鎖およびＬ鎖の発現量のバランスが均衡するなどの点から、抗体Ｈ鎖およびＬ鎖が同

一のベクター上に存在するタイプ（タンデム型）の遺伝子組換え抗体発現用ベクター［Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ，１６７，２７１（１９９４）］を用いるが、抗体Ｈ鎖およびＬ鎖が別々のベクター上に存在するタイプを用いることもできる。タンデム型の遺伝子組換え抗体発現用ベクターには、例えば、ｐＫＡＮＴＥＸ９３（国際公開第９７／１０３５４号公報）、ｐＥＥ１８［Ｈｙｂｒｉｄｏｍａ，１７，５５９（１９９８）］などを用いる。

[0205] （２）ヒト以外の動物由来の抗体のＶ領域をコードするｃＤＮＡの取得およびアミノ酸配列の解析

非ヒト抗体のＶＨ及びＶＬをコードするｃＤＮＡの取得およびアミノ酸配列の解析は以下のようにして行うことができる。非ヒト抗体を産生するハイブリドーマ細胞よりｍＲＮＡを抽出し、ｃＤＮＡを合成する。合成したｃＤＮＡをファージまたはプラスミドなどのベクターにクローニングしてｃＤＮＡライブラリーを作製する。

[0206] 前記ライブラリーより、マウス抗体のＣ領域部分またはＶ領域部分をコードするＤＮＡをプローブとして用い、ＶＨまたはＶＬをコードするｃＤＮＡを有する組換えファージまたは組換えプラスミドをそれぞれ単離する。組換えファージまたは組換えプラスミド上の目的とするマウス抗体のＶＨまたはＶＬの全塩基配列をそれぞれ決定し、塩基配列よりＶＨまたはＶＬの全アミノ酸配列をそれぞれ推定する。

[0207] 非ヒト抗体を産生するハイブリドーマ細胞を作製するヒト以外の動物には、マウス、ラット、ハムスター、またはラビットなどを用いるが、ハイブリドーマ細胞を作製することが可能であれば、いかなる動物も用いることができる。

[0208] ハイブリドーマ細胞からの全ＲＮＡの調製には、チオシアン酸グアニジン－トリフルオロ酢酸セシウム法［Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｅｎｚｙｍｏｌ．，１５４，３（１９８７）］、またはＲＮＡ　ｅａｓｙ　ｋｉｔ（キアゲン社製）などのキットなどを用いる。

OnCusp
Ex. 1038

[0209] 全ＲＮＡからのｍＲＮＡの調製には、オリゴ（ｄＴ）固定化セルロースカラム法［Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ，Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｓｅｃｏｎｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ（１９８９）］、またはＯｌｉｇｏ－ｄＴ３０＜Ｓｕｐｅｒ＞ ｍＲＮＡ Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ Ｋｉｔ（タカラバイオ社製）などのキットなどを用いる。

[0210] また、Ｆａｓｔ Ｔｒａｃｋ ｍＲＮＡ Ｉｓｏｌａｔｉｏｎ Ｋｉｔ（インビトロジェン社製）、またはＱｕｉｃｋＰｒｅｐ ｍＲＮＡ Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ Ｋｉｔ（ファルマシア社製）などのキットを用いてハイブリドーマ細胞からｍＲＮＡを調製することもできる。

[0211] ｃＤＮＡの合成およびｃＤＮＡライブラリーの作製には、公知の方法［Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ，Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｓｅｃｏｎｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ（１９８９）、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔ １，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ（１９８７－１９９７）］、またはＳｕｐｅｒＳｃｒｉｐｔ Ｐｌａｓｍｉｄ Ｓｙｓｔｅｍ ｆｏｒ ｃＤＮＡ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ ａｎｄ Ｐｌａｓｍｉｄ Ｃｌｏｎｉｎｇ（インビトロジェン社製）、またはＺＡＰ－ｃＤＮＡ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ Ｋｉｔ（ストラタジーン社製）などのキットなどを用いる。

[0212] ｃＤＮＡライブラリーの作製の際、ハイブリドーマ細胞から抽出したｍＲＮＡを鋳型として合成したｃＤＮＡを組み込むベクターには、該ｃＤＮＡを組み込めるベクターであればいかなるものでも用いることができる。例えば、ＺＡＰ Ｅｘｐｒｅｓｓ［Ｓｔｒａｔｅｇｉｅｓ，５，５８（１９９２）］、ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ ＩＩ ＳＫ（＋）［Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，１７，９４９４（１９８９）］、λＺＡＰＩＩ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ社製）、λｇｔ１０、λｇｔ１１［ＤＮＡ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ，Ｉ，４９（１９８５

OnCusp
Ex. 1038

）］、Ｌａｍｂｄａ　ＢｌｕｅＭｉｄ（クローンテック社製）、λＥｘＣｅｌｌ、ｐＴ７Ｔ３－１８Ｕ（ファルマシア社製）、ｐｃＤ２［Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．，３，２８０（１９８３）］、またはｐＵＣ１８［Ｇｅｎｅ，３３，１０３（１９８５）］などを用いる。

[0213] ファージまたはプラスミドベクターにより構築されるｃＤＮＡライブラリーを導入する大腸菌には、該ｃＤＮＡライブラリーを導入、発現および維持できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、ＸＬ１－Ｂｌｕｅ　ＭＲＦ’［Ｓｔｒａｔｅｇｉｅｓ，５，８１（１９９２）］、Ｃ６００［Ｇｅｎｅｔｉｃｓ，３９，４４０（１９５４）］、Ｙ１０８８、Ｙ１０９０［Ｓｃｉｅｎｃｅ，２２２，７７８（１９８３）］、ＮＭ５２２［Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，１６６，１（１９８３）］、Ｋ８０２［Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，１６，１１８（１９６６）］、またはＪＭ１０５［Ｇｅｎｅ，３８，２７５（１９８５）］などを用いる。

[0214] ｃＤＮＡライブラリーからの非ヒト抗体のＶＨまたはＶＬをコードするｃＤＮＡクローンの選択には、アイソトープまたは蛍光標識したプローブを用いたコロニー・ハイブリダイゼーション法、またはプラーク・ハイブリダイゼーション法［Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ，Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ，Ｓｅｃｏｎｄ　Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｅｓｓ（１９８９）］などを用いる。

[0215] また、プライマーを調製し、ｍＲＮＡから合成したｃＤＮＡまたはｃＤＮＡライブラリーを鋳型として、Ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ　Ｃｈａｉｎ　Ｒｅａｃｔｉｏｎ法［以下、ＰＣＲ法と表記する、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ，Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ，Ｓｅｃｏｎｄ　Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｅｓｓ（１９８９）、Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔ　１，Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ（１９８７－１９９７）］を行うことよりＶＨ

またはＶＬをコードするｃＤＮＡを調製することもできる。

[0216] 選択されたｃＤＮＡを、適当な制限酵素などで切断後、ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ ＳＫ（－）（ストラタジーン社製）などのプラスミドにクローニングし、通常用いられる塩基配列解析方法などにより該ｃＤＮＡの塩基配列を決定する。塩基配列解析方法には、例えば、ジデオキシ法［Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，７４，５４６３（１９７７）］などの反応を行った後、ＡＢＩ ＰＲＩＳＭ３７００（ＰＥバイオシステムズ社製）またはＡ．Ｌ．Ｆ．ＤＮＡシークエンサー（ファルマシア社製）などの塩基配列自動分析装置などを用いる。

[0217] 決定した塩基配列からＶＨおよびＶＬの全アミノ酸配列をそれぞれ推定し、既知の抗体のＶＨおよびＶＬの全アミノ酸配列［Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，ＵＳ Ｄｅｐｔ．Ｈｅａｌｔｈ ａｎｄ Ｈｕｍａｎ Ｓｅｒｖｉｃｅｓ（１９９１）］と比較することにより、取得したｃＤＮＡが分泌シグナル配列を含む抗体のＶＨおよびＶＬの完全なアミノ酸配列をコードしているかをそれぞれ確認する。

[0218] 分泌シグナル配列を含む抗体のＶＨおよびＶＬの完全なアミノ酸配列に関しては、既知の抗体のＶＨおよびＶＬの全アミノ酸配列［Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，ＵＳ Ｄｅｐｔ．Ｈｅａｌｔｈ ａｎｄ Ｈｕｍａｎ Ｓｅｒｖｉｃｅｓ（１９９１）］と比較することにより、分泌シグナル配列の長さおよびＮ末端アミノ酸配列を推定でき、更にはそれらが属するサブグループを知ることができる。また、ＶＨおよびＶＬの各ＣＤＲのアミノ酸配列についても、既知の抗体のＶＨおよびＶＬのアミノ酸配列［Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，ＵＳ Ｄｅｐｔ．Ｈｅａｌｔｈ ａｎｄ Ｈｕｍａｎ Ｓｅｒｖｉｃｅｓ（１９９１）］と比較することによって見出すことができる。

[0219] また、得られたＶＨおよびＶＬの完全なアミノ酸配列を用いて、例えば、

ＳＷＩＳＳ－ＰＲＯＴまたはＰＩＲ－Ｐｒｏｔｅｉｎなどの任意のデータベースに対してＢＬＡＳＴ法［Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２１５，４０３（１９９０）］などの相同性検索を行い、ＶＨおよびＶＬの完全なアミノ酸配列が新規なものかを確認できる。

[0220] （３）ヒト型キメラ抗体発現ベクターの構築

（１）で得られる遺伝子組換え抗体発現用ベクターのヒト抗体のＣＨまたはＣＬをコードするそれぞれの遺伝子の上流に、それぞれ非ヒト抗体のＶＨまたはＶＬをコードするｃＤＮＡをそれぞれクローニングすることで、ヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築することができる。

[0221] 非ヒト抗体のＶＨまたはＶＬをコードするｃＤＮＡの３’末端側と、ヒト抗体のＣＨまたはＣＬの５’末端側とを連結するために、連結部分の塩基配列が適切なアミノ酸をコードし、かつ適当な制限酵素認識配列になるように設計したＶＨおよびＶＬのｃＤＮＡを作製する。

[0222] 作製されたＶＨおよびＶＬのｃＤＮＡを、（１）で得られるヒト型ＣＤＲ移植抗体発現用ベクターのヒト抗体のＣＨまたはＣＬをコードするそれぞれの遺伝子の上流にそれらが適切な形で発現する様にそれぞれクローニングし、ヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築する。

[0223] また、非ヒト抗体ＶＨまたはＶＬをコードするｃＤＮＡを、適当な制限酵素の認識配列を両端に有する合成ＤＮＡを用いてＰＣＲ法によりそれぞれ増幅し、（１）で得られる遺伝子組換え抗体発現用ベクターにクローニングすることもできる。

[0224] （４）ヒト型ＣＤＲ移植抗体のＶ領域をコードするｃＤＮＡの構築

ヒト型ＣＤＲ移植抗体のＶＨまたはＶＬをコードするｃＤＮＡは、以下のようにして構築することができる。

[0225] 非ヒト抗体のＶＨまたはＶＬのＣＤＲのアミノ酸配列を移植するための、ヒト抗体のＶＨまたはＶＬのＦＲのアミノ酸配列をそれぞれ選択する。選択するＦＲのアミノ酸配列には、ヒト抗体由来のものであれば、いずれのものでも用いることができる。

[0226] 例えば、Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｄａｔａ Ｂａｎｋなどのデータベースに登録されているヒト抗体のＦＲのアミノ酸配列、またはヒト抗体のＦＲの各サブグループの共通アミノ酸配列［Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，ＵＳ Ｄｅｐｔ．Ｈｅａｌｔｈ ａｎｄ Ｈｕｍａｎ Ｓｅｒｖｉｃｅｓ（１９９１）］などを用いる。

[0227] 抗体の結合活性の低下を抑えるため、元の抗体のＶＨまたはＶＬのＦＲのアミノ酸配列とできるだけ高い相同性（少なくとも６０％以上）のＦＲのアミノ酸配列を選択する。

[0228] 次に、選択したヒト抗体のＶＨまたはＶＬのＦＲのアミノ酸配列に、もとの抗体のＣＤＲのアミノ酸配列をそれぞれ移植し、ヒト型ＣＤＲ移植抗体のＶＨまたはＶＬのアミノ酸配列をそれぞれ設計する。設計したアミノ酸配列を抗体の遺伝子の塩基配列に見られるコドンの使用頻度［Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，ＵＳ Ｄｅｐｔ．Ｈｅａｌｔｈ ａｎｄ Ｈｕｍａｎ Ｓｅｒｖｉｃｅｓ（１９９１）］を考慮してＤＮＡ配列に変換し、ヒト型ＣＤＲ移植抗体のＶＨまたはＶＬのアミノ酸配列をコードするＤＮＡ配列をそれぞれ設計する。

[0229] 設計したＤＮＡ配列に基づき、１００塩基前後の長さからなる数本の合成ＤＮＡを合成し、それらを用いてＰＣＲ反応を行う。この場合、ＰＣＲ反応での反応効率及び合成可能なＤＮＡの長さから、好ましくはＶＨ、ＶＬ各々について各６本の合成ＤＮＡを設計する。さらに、両端に位置する合成ＤＮＡの各５’末端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、ヒト型ＣＤＲ移植抗体のＶＨまたはＶＬをコードするｃＤＮＡを、（１）で得られるヒト型ＣＤＲ移植抗体発現用ベクターへ容易にクローニングすることができる。

[0230] ＰＣＲ反応後、増幅産物をｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ ＳＫ（－）（ストラタジーン社製）などのプラスミドにそれぞれクローニングし、（２）に記載

の方法と同様の方法により、塩基配列を決定し、所望のヒト型ＣＤＲ移植抗体のＶＨまたはＶＬのアミノ酸配列をコードするＤＮＡ配列を有するプラスミドを取得する。

[0231] または、設計したＤＮＡ配列に基づき、ＶＨ全長およびＶＬ全長を各々１本の長鎖ＤＮＡとして合成したものを、上記ＰＣＲ増幅産物に代えて用いることもできる。さらに、合成長鎖ＤＮＡの両端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、ヒト型ＣＤＲ移植抗体のＶＨまたはＶＬをコードするｃＤＮＡを、（１）で得られるヒト型ＣＤＲ移植抗体発現用ベクターへ容易にクローニングすることができる。

[0232] （５）ヒト型ＣＤＲ移植抗体のＶ領域のアミノ酸配列の改変

ヒト型ＣＤＲ移植抗体は、非ヒト抗体のＶＨおよびＶＬのＣＤＲのみをヒト抗体のＶＨおよびＶＬのＦＲに移植しただけでは、その抗原結合活性は元の非ヒト抗体に比べて低下する［ＢＩＯ／ＴＥＣＨＮＯＬＯＧＹ，９，２６６（１９９１）］。

[0233] ヒト型ＣＤＲ移植抗体では、ヒト抗体のＶＨおよびＶＬのＦＲのアミノ酸配列の中で、直接抗原との結合に関与しているアミノ酸残基、ＣＤＲのアミノ酸残基と相互作用するアミノ酸残基、および抗体の立体構造を維持し、間接的に抗原との結合に関与しているアミノ酸残基を同定し、それらのアミノ酸残基を元の非ヒト抗体のアミノ酸残基に置換することにより、低下した抗原結合活性を上昇させることができる。

[0234] 抗原結合活性に関わるＦＲのアミノ酸残基を同定するために、Ｘ線結晶解析［Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，１１２，５３５（１９７７）］またはコンピューターモデリング［Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ，７，１５０１（１９９４）］などを用いることにより、抗体の立体構造の構築および解析を行うことができる。

[0235] また、それぞれの抗体について数種の改変体を作製し、それぞれの抗原結合活性との相関を検討することを繰り返し、試行錯誤することで必要な抗原結合活性を有する改変ヒト型ＣＤＲ移植抗体を取得できる。

[0236] ヒト抗体のＶＨ及びＶＬのＦＲのアミノ酸残基は、改変用合成ＤＮＡを用いて（４）に記載のＰＣＲ反応を行うことにより、改変させることができる。ＰＣＲ反応後の増幅産物について（２）に記載の方法により、塩基配列を決定し、目的の改変が施されたことを確認する。

[0237] （６）ヒト型ＣＤＲ移植抗体発現ベクターの構築

（１）で得られる遺伝子組換え抗体発現用ベクターのヒト抗体のＣＨまたはＣＬをコードするそれぞれの遺伝子の上流に、構築した遺伝子組換え抗体のＶＨまたはＶＬをコードするｃＤＮＡをそれぞれクローニングし、ヒト型ＣＤＲ移植抗体発現ベクターを構築することができる。

[0238] 例えば、（４）および（５）で得られるヒト型ＣＤＲ移植抗体のＶＨまたはＶＬを構築する際に用いる合成ＤＮＡのうち、両端に位置する合成ＤＮＡの５’末端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、（１）で得られるヒト型ＣＤＲ移植抗体発現用ベクターのヒト抗体のＣＨまたはＣＬをコードするそれぞれの遺伝子の上流にそれらが適切な形で発現するようにそれぞれクローニングする。

[0239] （７）遺伝子組換え抗体の一過性発現

（３）および（６）で得られる遺伝子組換え抗体発現ベクター、またはそれらを改変した発現ベクターを用いて遺伝子組換え抗体の一過性発現を行い、作製した多種類のヒト型ＣＤＲ移植抗体の抗原結合活性を効率的に評価することができる。

[0240] 発現ベクターを導入する宿主細胞には、遺伝子組換え抗体を発現できる宿主細胞であれば、いかなる細胞でも用いることができるが、例えばＣＯＳ－７細胞［Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（ＡＴＣＣ）番号：ＣＲＬ１６５１］を用いる［Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．，ＣＲＣ ｐｒｅｓｓ，２８３（１９９１）］。

[0241] ＣＯＳ－７細胞への発現ベクターの導入には、ＤＥＡＥ－デキストラン法［Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．，ＣＲＣ

ｐｒｅｓｓ（１９９１）］、またはリポフェクション法［Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８４，７４１３（１９８７）］などを用いる。

[0242] 発現ベクターの導入後、培養上清中の遺伝子組換え抗体の発現量および抗原結合活性は酵素免疫抗体法［Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ－Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ ｐｒａｃｔｉｃｅ，Ｔｈｉｒｄ ｅｄｉｔｉｏｎ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ（１９９６）、Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ － Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ（１９８８）、単クローン抗体実験マニュアル，講談社サイエンティフィック（１９８７）］などを用いて測定する。

[0243] （８）遺伝子組換え抗体を安定に発現する形質転換株の取得と遺伝子組換え抗体の調製

（３）および（６）で得られた遺伝子組換え抗体発現ベクターを適当な宿主細胞に導入することにより、遺伝子組換え抗体を安定に発現する形質転換株を得ることができる。

[0244] 宿主細胞への発現ベクターの導入には、エレクトロポレーション法［日本国特開平２－２５７８９１号公報、Ｃｙｔｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，３，１３３（１９９０）］などを用いる。

[0245] 遺伝子組換え抗体発現ベクターを導入する宿主細胞には、遺伝子組換え抗体を発現させることができる宿主細胞であれば、いかなる細胞でも用いることができる。例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞ＣＨＯ－Ｋ１（ＡＴＣＣ ＣＣＬ－６１）、ＤＵＫＸＢ１１（ＡＴＣＣ ＣＣＬ－９０９６）、Ｐｒｏ－５（ＡＴＣＣ ＣＣＬ－１７８１）、ＣＨＯ－Ｓ（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｃａｔ ＃ １１６１９）、ラットミエローマ細胞ＹＢ２／３ＨＬ．Ｐ２．Ｇ１１．１６Ａｇ．２０（ＡＴＣＣ番号：ＣＲＬ１６６２、またはＹＢ２／０ともいう）、マウスミエローマ細胞ＮＳ０、マウスミエローマ細胞ＳＰ２／０－Ａｇ１４（ＡＴＣＣ番号：ＣＲＬ１５８１）

、マウスミエローマ細胞Ｐ３Ｘ６３－Ａｇ８．６５３（ＡＴＣＣ番号：ＣＲＬ１５８０）、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子（Ｄｉｈｙｄｒｏｆｏｒａｔｅ Ｒｅｄｕｃｔａｓｅ、以下、ｄｈｆｒと表記する）が欠損したＣＨＯ細胞［Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，７７，４２１６（１９８０）］などを用いる。

[0246] また、細胞内糖ヌクレオチドＧＤＰ－フコースの合成に関与する酵素などの蛋白質またはＮ－グリコシド結合複合型糖鎖の還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素などの蛋白質、または細胞内糖ヌクレオチドＧＤＰ－フコースのゴルジ体への輸送に関与する蛋白質などの活性が低下または欠失した宿主細胞、例えばα１，６－フコース転移酵素遺伝子が欠損したＣＨＯ細胞（国際公開第２００５／０３５５８６号、国際公開第０２／３１１４０号）、レクチン耐性を獲得したＬｅｃ１３［Ｓｏｍａｔｉｃ Ｃｅｌｌ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ｇｅｎｅｔｉｃｓ，１２，５５（１９８６）］などを用いることもできる。

[0247] 発現ベクターの導入後、遺伝子組換え抗体を安定に発現する形質転換株は、Ｇ４１８硫酸塩（以下、Ｇ４１８と表記する）などの薬剤を含む動物細胞培養用培地で培養することにより選択する（日本国特開平２－２５７８９１号公報）。

[0248] 動物細胞培養用培地には、ＲＰＭＩ１６４０培地（インビトロジェン社製）、ＧＩＴ培地（日本製薬社製）、ＥＸ－ＣＥＬＬ３０１培地（ジェイアールエイチ社製）、ＩＭＤＭ培地（インビトロジェン社製）、Ｈｙｂｒｉｄｏｍａ－ＳＦＭ培地（インビトロジェン社製）、またはこれら培地にＦＢＳなどの各種添加物を添加した培地などを用いる。

[0249] 得られた形質転換株を培地中で培養することで培養上清中に遺伝子組換え抗体を発現蓄積させる。培養上清中の遺伝子組換え抗体の発現量および抗原結合活性はＥＬＩＳＡ法などにより測定できる。また、ｄｈｆｒ遺伝子増幅系（日本国特開平２－２５７８９１号公報）などを利用して、形質転換株の

産生する遺伝子組換え抗体の発現量を向上させることができる。

[0250] 遺伝子組換え抗体は、形質転換株の培養上清よりプロテインＡ－カラムを用いて精製する［Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ － Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ ｐｒａｃｔｉｃｅ，Ｔｈｉｒｄ ｅｄｉｔｉｏｎ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ（１９９６）、Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ － Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ（１９８８）］。また、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィーおよび限外濾過などの蛋白質の精製で用いられる方法を組み合わせることもできる。

[0251] 精製した遺伝子組換え抗体のＨ鎖、Ｌ鎖或いは抗体分子全体の分子量は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法［Ｎａｔｕｒｅ，２２７，６８０（１９７０）］、またはウェスタンブロッティング法［Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ － Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ ｐｒａｃｔｉｃｅ，Ｔｈｉｒｄ ｅｄｉｔｉｏｎ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ（１９９６）、Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ － Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ（１９８８）］など用いて測定することができる。

[0252] ３．精製モノクローナル抗体またはその抗体断片の活性評価

精製した本発明のモノクローナル抗体またはその抗体断片の活性評価は、以下のように行うことができる。Ｔｒｏｐ－２発現細胞株に対する結合活性は、前述の１－（６ａ）記載のバインディングアッセイおよび（６ｂ）記載のＢｉａｃｏｒｅシステムなどを用いた表面プラズモン共鳴法を用いて測定する。

[0253] また、該結合活性は、蛍光抗体法［Ｃａｎｃｅｒ Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．，３６，３７３（１９９３）］などを用いて測定できる。抗原陽性培養細胞株に対するＣＤＣ活性、またはＡＤＣＣ活性は公知の測定方法［Ｃａｎｃｅｒ Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．，３６，３７３（１９９３）］により測定することができる。

[0254] ４．抗体のエフェクター活性を制御する方法

本発明のモノクローナル抗体のエフェクター活性を制御する方法としては、抗体の定常領域（Ｆｒａｇｍｅｎｔ，ｃｒｙｓｔａｌｌｉｚａｂｌｅ、以下、Ｆｃ領域と表記する）の２９７番目のアスパラギン（Ａｓｎ）に結合するＮ結合複合型糖鎖の還元末端に存在するＮ－アセチルグルコサミン（ＧｌｃＮＡｃ）にα－１，６結合するフコース（コアフコースともいう）の量を制御する方法（国際公開第２００５／０３５５８６号、国際公開第２００２／３１１４０号、国際公開第００／６１７３９号）や、抗体のＦｃ領域のアミノ酸残基を改変することで制御する方法などが知られている。本発明のモノクローナル抗体にはいずれの方法を用いても、エフェクター活性を制御することができる。

[0255] エフェクター活性とは、抗体のＦｃ領域を介して引き起こされる抗体依存性の活性をいい、抗体依存性細胞傷害活性（ＡＤＣＣ活性）、補体依存性傷害活性（ＣＤＣ活性）や、マクロファージや樹状細胞などの食細胞による抗体依存性ファゴサイトーシス（Ａｎｔｉｂｏｄｙ－ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ ｐｈａｇｏｃｙｔｏｓｉｓ，ＡＤＰ活性）などが知られている。

[0256] Ｆｃ領域上のＮ－結合型複合型糖鎖の還元末端のＮ－アセチルグルコサミンに付加するフコースの含量を制御することで、抗体のエフェクター活性を増加または低下させることができる。抗体のＦｃ領域に結合しているＮ結合複合型糖鎖に付加するフコースの含量を低下させる方法としては、α１，６－フコース転移酵素遺伝子が欠損したＣＨＯ細胞を用いて抗体を発現することで、フコースが結合していない抗体を取得することができる。フコースが結合していない抗体は高いＡＤＣＣ活性を有する。

[0257] 一方、抗体のＦｃ領域に結合しているＮ－結合複合型糖鎖に付加するフコースの含量を増加させる方法としては、α１，６－フコース転移酵素遺伝子を導入した宿主細胞を用いて抗体を発現させることで、フコースが結合している抗体を取得できる。フコースが結合している抗体は、フコースが結合していない抗体よりも低いＡＤＣＣ活性を有する。

[0258] また、抗体のＦｃ領域のアミノ酸残基を改変することでＡＤＣＣ活性やＣＤＣ活性を増加または低下させることができる。例えば、米国特許出願公開第２００７／０１４８１６５号明細書に記載のＦｃ領域のアミノ酸配列を用いることで、抗体のＣＤＣ活性を増加させることができる。また、米国特許第６，７３７，０５６号明細書、米国特許第７，２９７，７７５号明細書または米国特許第７，３１７，０９１号明細書に記載のアミノ酸改変を行うことで、ＡＤＣＣ活性またはＣＤＣ活性を、増加させることも低下させることもできる。

[0259] 更に、上述の方法を組み合わせて、一つの抗体に使用することにより、抗体のエフェクター活性が制御された抗体を取得することができる。

[0260] ５．本発明のモノクローナル抗体またはその抗体断片を用いた疾患の治療方法

本発明のモノクローナル抗体またはその抗体断片は、Ｔｒｏｐ－２陽性細胞が関与する疾患の治療に用いることができる。

[0261] 本発明のモノクローナル抗体またはその抗体断片、またはこれらの誘導体を含有する治療剤は、有効成分としての該抗体もしくは該抗体断片、またはこれらの誘導体のみを含むものであってもよいが、通常は薬理学的に許容される１以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野において公知の方法により製造した医薬製剤として提供される。

[0262] 投与経路としては、例えば、経口投与、並びに口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内および静脈内などの非経口投与が挙げられる。投与形態としては、例えば、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、軟膏およびテープ剤などが挙げられる。

[0263] 経口投与に適当な製剤としては、例えば、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤、または顆粒剤などが挙げられる。

[0264] 乳剤またはシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトールまたは果糖などの糖類、ポリエチレングリコールまたはプロピレングリコールなどのグリコール類、ごま油、オリーブ油または大豆油などの油類、ｐ－

ヒドロキシ安息香酸エステル類などの防腐剤、またはストロベリーフレーバーまたはペパーミントなどのフレーバー類などを添加剤として用いて製造する。

[0265] カプセル剤、錠剤、散剤または顆粒剤などは、乳糖、ブドウ糖、ショ糖またはマンニトールなどの賦形剤、デンプンまたはアルギン酸ナトリウムなどの崩壊剤、ステアリン酸マグネシウムまたはタルクなどの滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロースまたはゼラチンなどの結合剤、脂肪酸エステルなどの界面活性剤またはグリセリンなどの可塑剤などを添加剤として用いて製造する。

[0266] 非経口投与に適当な製剤としては、例えば、注射剤、座剤または噴霧剤などが挙げられる。

[0267] 注射剤は、塩溶液、ブドウ糖溶液、またはその両者の混合物からなる担体などを用いて製造する。

[0268] 座剤はカカオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸などの担体を用いて製造する。

[0269] 噴霧剤は受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ本発明のモノクローナル抗体またはその抗体断片を微細な粒子として分散させ、吸収を容易にさせる担体などを用いて製造する。担体としては、例えば乳糖またはグリセリンなどを用いる。また、エアロゾルまたはドライパウダーとして製造することもできる。

[0270] さらに、上記非経口剤においても、経口投与に適当な製剤で添加剤として例示した成分を添加することもできる。

[0271] ６．本発明のモノクローナル抗体またはその抗体断片を用いた疾患の診断方法

本発明のモノクローナル抗体または該抗体断片を用いて、Ｔｒｏｐ－２またはＴｒｏｐ－２が発現した細胞を検出または測定することにより、Ｔｒｏｐ－２が関連する疾患を診断することができる。

[0272] Ｔｒｏｐ－２が関連する疾患の一つである癌の診断は、例えば、以下のよ

うにＴｒｏｐ－２の検出または測定して行うことができる。患者体内の癌細胞に発現しているＴｒｏｐ－２をフローサイトメトリーなどの免疫学的手法を用いて検出することにより診断を行うことができる。

[0273] 免疫学的手法とは、標識を施した抗原または抗体を用いて、抗体量または抗原量を検出または測定する方法である。例えば、放射免疫測定法、酵素免疫測定法、蛍光免疫測定法、発光免疫測定法、ウェスタンブロット法または物理化学的手法などを用いる。

[0274] 放射免疫測定法は、例えば、抗原または抗原を発現した細胞などに、本発明のモノクローナル抗体または該抗体断片を反応させ、さらに放射線標識を施した抗イムノグロブリン抗体または結合断片を反応させた後、シンチレーションカウンターなどで測定する。

[0275] 酵素免疫測定法は、例えば、抗原または抗原を発現した細胞などに、本発明のモノクローナル抗体または該抗体断片を反応させ、さらに標識を施した抗イムノグロブリン抗体または結合断片を反応させた後、発色色素を吸光光度計で測定する。例えばサンドイッチＥＬＩＳＡ法などを用いる。酵素免疫測定法で用いる標識体としては、公知［酵素免疫測定法，医学書院（１９８７）］の酵素標識を用いることができる。例えば、アルカリフォスファターゼ標識、ペルオキシダーゼ標識、ルシフェラーゼ標識、またはビオチン標識などを用いる。

[0276] サンドイッチＥＬＩＳＡ法は、固相に抗体を結合させた後、検出または測定対象である抗原をトラップさせ、トラップされた抗原に第２の抗体を反応させる方法である。該ＥＬＩＳＡ法では、検出または測定したい抗原を認識する抗体または抗体断片であって、抗原認識部位の異なる２種類の抗体を準備し、そのうち、第１の抗体または抗体断片を予めプレート（例えば、９６ウェルプレート）に吸着させ、次に第２の抗体または抗体断片をＦＩＴＣなどの蛍光物質、ペルオキシダーゼなどの酵素、またはビオチンなどで標識しておく。

[0277] 上記の抗体が吸着したプレートに、生体内から分離された、細胞またはそ

の破砕液、組織またはその破砕液、細胞培養上清、血清、胸水、腹水、または眼液などを反応させた後、標識したモノクローナル抗体または抗体断片を反応させ、標識物質に応じた検出反応を行う。濃度既知の抗原を段階的に希釈して作製した検量線より、被験サンプル中の抗原濃度を算出する。

[0278] サンドイッチＥＬＩＳＡ法に用いる抗体としては、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体のいずれを用いてもよく、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、またはＦ（ａｂ）$_2$などの抗体フラグメントを用いてもよい。サンドイッチＥＬＩＳＡ法で用いる２種類の抗体の組み合わせとしては、異なるエピトープを認識するモノクローナル抗体または抗体断片の組み合わせでもよいし、ポリクローナル抗体とモノクローナル抗体または抗体断片との組み合わせでもよい。

[0279] 蛍光免疫測定法は、文献［Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ－Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ ｐｒａｃｔｉｃｅ，Ｔｈｉｒｄ ｅｄｉｔｉｏｎ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ（１９９６）、単クローン抗体実験マニュアル，講談社サイエンティフィック（１９８７）］などに記載された方法で測定する。蛍光免疫測定法で用いる標識体としては、公知［蛍光抗体法，ソフトサイエンス社（１９８３）］の蛍光標識を用いることができる。例えば、ＦＩＴＣ、またはＲＩＴＣなどを用いる。

[0280] 発光免疫測定法は文献［生物発光と化学発光　臨床検査４２，廣川書店（１９９８）］などに記載された方法で測定する。発光免疫測定法で用いる標識体としては、公知の発光体標識が挙げられ、アクリジニウムエステル、ロフィンなどを用いる。

[0281] ウェスタンブロット法は、抗原または抗原を発現した細胞などをＳＤＳ（ドデシル硫酸ナトリウム）－ＰＡＧＥ（ポリアクリルアミドゲル）［Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ－Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ（１９８８）］で分画した後、該ゲルをポリフッ化ビニリデン（ＰＶＤＦ）膜またはニトロセルロース膜にブロッティングし、該膜に抗原を認識する抗体または抗体断片を反応

させ、さらにＦＩＴＣなどの蛍光物質、ペルオキシダーゼなどの酵素標識、またはビオチン標識などを施した抗マウスＩｇＧ抗体または結合断片を反応させた後、該標識を可視化することによって測定する。一例を以下に示す。

[0282] 配列番号１で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現している細胞や組織を溶解し、還元条件下でレーンあたりのタンパク量として０．１～３０μｇをＳＤＳ－ＰＡＧＥ法により泳動する。泳動されたタンパク質をＰＶＤＦ膜にトランスファーし１～１０％ＢＳＡを含むＰＢＳ（以下、ＢＳＡ－ＰＢＳと表記する）に室温で３０分間反応させブロッキング操作を行う。

[0283] ここで本発明のモノクローナル抗体を反応させ、０．０５～０．１％のＴｗｅｅｎ－２０を含むＰＢＳ（以下、Ｔｗｅｅｎ－ＰＢＳと表記する）で洗浄し、ペルオキシダーゼ標識したヤギ抗マウスＩｇＧを室温で２時間反応させる。Ｔｗｅｅｎ－ＰＢＳで洗浄し、ＥＣＬ Ｗｅｓｔｅｒｎ Ｂｌｏｔｔｉｎｇ Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ Ｒｅａｇｅｎｔｓ（アマシャム社製）などを用いてモノクローナル抗体が結合したバンドを検出することにより、配列番号１で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを検出する。ウェスタンブロッティングでの検出に用いられる抗体としては、天然型の立体構造を保持していないポリペプチドに結合できる抗体が用いられる。

[0284] 物理化学的手法は、例えば、抗原であるＴｒｏｐ－２と本発明のモノクローナル抗体またはその抗体断片とを結合させることにより凝集体を形成させて、この凝集体を検出することにより行う。この他に物理化学的手法として、毛細管法、一次元免疫拡散法、免疫比濁法またはラテックス免疫比濁法［臨床検査法提要，金原出版（１９９８）］などを用いることもできる。

[0285] ラテックス免疫比濁法は、抗体または抗原を感作させた粒径０．１～１μｍ程度のポリスチレンラテックスなどの担体を用い、対応する抗原または抗体により抗原抗体反応を起こさせると、反応液中の散乱光は増加し、透過光は減少する。この変化を吸光度または積分球濁度として検出することにより被験サンプル中の抗原濃度などを測定する。

[0286] 一方、Ｔｒｏｐ－２が発現している細胞の検出または測定は、公知の免疫学的検出法を用いることができるが、好ましくは免疫沈降法、免疫細胞染色法、免疫組織染色法または蛍光抗体染色法などを用いる。

[0287] 免疫沈降法は、Ｔｒｏｐ－２を発現した細胞などを本発明のモノクローナル抗体またはその抗体断片と反応させた後、プロテインＧ－セファロースなどのイムノグロブリンに特異的な結合能を有する担体を加えて抗原抗体複合体を沈降させる。または以下のような方法によっても行なうことができる。ＥＬＩＳＡ用９６ウェルプレートに上述した本発明のモノクローナル抗体またはその抗体断片を固相化した後、ＢＳＡ－ＰＢＳによりブロッキングする。

[0288] 抗体が、例えばハイブリドーマ培養上清などの精製されていない状態である場合には、抗マウスイムノグロブリン、抗ラットイムノグロブリン、プロテイン－Ａまたはプロテイン－Ｇなどをあらかじめ ＥＬＩＳＡ用９６ウェルプレートに固相化し、ＢＳＡ－ＰＢＳでブロッキングした後、ハイブリドーマ培養上清を分注して結合させる。次に、ＢＳＡ－ＰＢＳを捨てＰＢＳでよく洗浄した後、Ｔｒｏｐ－２を発現している細胞や組織の溶解液を反応させる。よく洗浄した後のプレートより免疫沈降物をＳＤＳ－ＰＡＧＥ用サンプルバッファーで抽出し、上記のウェスタンブロッティングにより検出する。

[0289] 免疫細胞染色法または免疫組織染色法は、抗原を発現した細胞または組織などを、場合によっては抗体の通過性を良くするため界面活性剤やメタノールなどで処理した後、本発明のモノクローナル抗体と反応させ、さらにＦＩＴＣなどの蛍光標識、ペルオキシダーゼなどの酵素標識またはビオチン標識などを施した抗イムノグロブリン抗体またはその結合断片と反応させた後、該標識を可視化し、顕微鏡にて顕鏡する方法である。

[0290] また、蛍光標識の抗体と細胞を反応させ、フローサイトメーターにて解析する蛍光抗体染色法［Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ －Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ ｐｒａｃｔｉｃｅ，Ｔｈｉｒｄ ｅｄｉｔｉｏｎ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ（１９９６）、単クローン抗体実験

マニュアル，講談社サイエンティフィック（１９８７）］により検出を行うことができる。特に、Ｔｒｏｐ－２の細胞外領域に結合する、本発明のモノクローナル抗体またはその抗体断片は、蛍光抗体染色法により天然型の立体構造を保持して発現している細胞の検出ができる。

[0291] また、蛍光抗体染色法のうち、ＦＭＡＴ８１００ＨＴＳシステム（アプライドバイオシステム社製）などを用いた場合には、形成された抗体－抗原複合体と、抗体－抗原複合体の形成に関与していない遊離の抗体または抗原とを分離することなく、抗原量または抗体量を測定できる。

実施例

[0292] 以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

[0293] ［実施例１］

抗Ｔｒｏｐ－２マウスモノクローナル抗体の取得

（１）免疫原の調製

ヒト前立腺癌より癌細胞株Ｐｃ１を樹立し、免疫原として用いた。

[0294] （２）動物の免疫と抗体産生細胞の調製

１×１０^{6}個のＰｃ１細胞をＢａｌｂ／ｃマウスに２週間間隔で５回投与し、最終投与の３日後に脾臓を摘出した。脾臓をＲＰＭＩ１６４０（以下、ＲＰＭＩ培地と表記する）中で裁断し、すりつぶして遠心分離（１２００ｒｐｍ、５分間）した。得られた沈殿画分にトリス－塩化アンモニウム緩衝液（ｐＨ７．６）を添加し、３７℃で１分間処理することにより赤血球を除去した。さらに、沈殿画分（細胞画分）をＲＰＭＩ培地で３回洗浄し、細胞融合に用いた。

[0295] （３）マウス骨髄腫細胞の調製

８－アザグアニン耐性マウス骨髄腫細胞株Ｐ３Ｘ６３Ａｇ８Ｕ．１（Ｐ３－Ｕ１）を１０％ウシ胎児血清添加ＲＰＭＩ１６４０（インビトロジェン社）にて培養し、細胞融合の親株として用いた。

[0296] （４）アデノウィルスベクターの調製

ＩｇＧへの結合性を有するｐｒｏｔｅｉｎ　ＡのＺ３３モチーフをＨＩループ中に持つ、改変型のタイプ５アデノウィルスに、βーガラクトシダーゼ遺伝子を導入したＡｘ３ＣＡＺ３－ＦＺ３３［Ｃｌｉｎ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ，１２，３８０３（２００６）］を、ハイブリドーマへの導入に用いた。

[0297] （５）ハイブリドーマの作製

実施例１（２）で得られたマウス脾細胞と実施例１（３）で得られた骨髄腫細胞を５：１になるよう混合し、遠心分離（１２００ｒｐｍ、５分間）した。得られた沈殿画分の細胞群をよくほぐした後、攪拌しながら、ポリエチレングリコール－４０００（ＰＥＧ－４０００）１ｍＬを約１分かけて徐々に加え、その後該細胞液に１分毎にＲＰＭＩ培地１ｍＬを数回加えた後、ＲＰＭＩ培地を加えて全量を５０ｍＬとした。該細胞懸濁液を遠心分離（９００ｒｐｍ、５分間）し、得られた沈殿画分の細胞をゆるやかにほぐした後、ＨＡＴ培地［１０％ウシ胎児血清およびＨＡＴ　Ｍｅｄｉａ　Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔを加えたＭＩ１６４０培地］１００ｍＬ中にゆるやかに懸濁した。該懸濁液を９６ウェル培養用プレートに２００μＬ／ウェルずつ分注し、３７℃、５％CO_2のインキュベーター中で、５０％コンフルエントとなるまで培養した。

[0298] 一方で９６ウェルプレートにて培養したＰｃ１細胞より培養液を除去し、上記のハイブリドーマの培養上清を添加した。４℃で１時間インキュベートした後、培養上清を除いて細胞をＰＢＳで２回洗浄し、実施例１（４）にて作製したＡｘ３ＣＡＺ３－ＦＺ３３を多重感染度（ＭＯＩ）１０００となるよう添加した。さらに４℃で１時間インキュベートした後、ウィルス液を除いて細胞をＰＢＳで２回洗浄した。

[0299] βーＧａｌ　Ｒｅｐｏｒｔｅｒ　Ｇｅｎｅ　Ａｓｓａｙ，ｃｈｅｍｉｌｉｍｉｎｅｓｃｅｎｔキット（Ｒｏｃｈｅ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ社）を用いてβーガラクトシダーゼレポーターアッセイを行い、βーガラクトシダーゼ活性の高いウェルを選択した。選択したウェルの細胞について限界希釈法

によるクローニングを２回繰り返すことにより、Ｐｃ１細胞に反応する抗体を産生するハイブリドーマを単離した［Ｔｈｅ　Ｐｒｏｓｔａｔｅ，６７，１１６３（２００７）］。

[0300] （６）抗体の標的抗原の決定

実施例１（５）にて確立したハイブリドーマの標的抗原を公知の方法［Ｔｈｅ　Ｐｒｏｓｔａｔｅ，６７，１１６３（２００７）］にて決定し、ハイブリドーマからＴｒｏｐ－２を認識する抗体ＫＭ４０９７を見出した。Ｉｓｏ　Ｓｔｒｉｐマウスモノクローナル抗体アイソタイピングキット（ロシュ・アプライドサイエンス社）により、本抗体のアイソタイプはＩｇＧ１およびκと決定された。

[0301] ［実施例２］

抗Ｔｒｏｐ－２マウス抗体ＡＲ４７Ａ６．４．２のＩｇＧ１型キメラ抗体およびデフコース型抗体の作製

（１）ＡＲ４７Ａ６．４．２由来ヒト型キメラ抗体発現ベクターの構築

本発明の抗Ｔｒｏｐ－２モノクローナル抗体の活性と比較するために、既存の抗Ｔｒｏｐ－２マウスモノクローナル抗体ＡＲ４７Ａ６．４．２の可変領域と、ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域とのキメラ抗体（以下、ｃＡＲ４７Ａ６．４．２と略記する）を作製した。

[0302] 米国特許第７４２００４０号明細書に開示されている配列情報に基づき、ＡＲ４７Ａ６．４．２のＶＨおよびＶＬをコードする遺伝子として、配列番号３のＤＮＡおよび配列番号４のＤＮＡをおのおのｐＺＥｒＯ－２ベクターに組み込んだプラスミドをカスタム合成した（ＩＤＴ社）。

[0303] ＡＲ４７Ａ６．４．２のＶＨが組み込まれたプラスミドに対し、ＡｐａＩ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ社）およびＮｏｔＩ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ社）を用いて制限酵素処理を行い、ＶＨを含むＮｏｔＩ－ＡｐａＩ断片を取得した。また、ＡＲ４７Ａ６．４．２のＶＬが組み込まれたプラスミドに対し、ＢｓｉＷＩ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ社）およびＥｃｏＲＩ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏ

ｌａｂｓ社）を用いて制限酵素処理を行い、ＶＬを含むＥｃｏＲＩ－ＢｓｉＷＩ断片を取得した。

[0304] 一方、抗体発現ベクターｐＫＡＮＴＥＸ９３に対し、ＮｏｔＩおよびＡｐａＩ、またはＥｃｏＲＩおよびＢｓｉＷＩの２通りの組み合わせで制限酵素処理を行った。ＶＨを含むＮｏｔＩ－ＡｐａＩ断片およびｐＫＡＮＴＥＸ９３由来のＮｏｔＩ－ＡｐａＩ断片、ならびに、ＶＬを含むＥｃｏＲＩ－ＢｓｉＷＩ断片およびｐＫＡＮＴＥＸ９３由来のＥｃｏＲＩ－ＢｓｉＷＩ断片の２種類の組み合わせを、Ｌｉｇａｔｉｏｎ ｈｉｇｈ（ＴＯＹＯＢＯ社）を用いて連結した。

[0305] 得られた該連結反応液を用いて、大腸菌ＤＨ５α株（ＴＯＹＯＢＯ社）の形質転換を行った。形質転換クローンよりプラスミドＤＮＡを調製し、ＡＲ４７Ａ６．４．２のＶＨまたはＶＬをコードするｃＤＮＡが各々クローニングされたｐＫＡＮＴＥＸ９３ベクターを取得した。

[0306] ＡＲ４７Ａ６．４．２のＶＨまたはＶＬが組み込まれた各々のｐＫＡＮＴＥＸ９３ベクターに対し、ＥｃｏＲＩおよびＮｏｔＩを用いて制限酵素処理を行い、ＶＬの組み込まれたＥｃｏＲＩ－ＮｏｔＩ断片、およびＶＨの組み込まれたＮｏｔＩ－ＥｃｏＲＩ断片を取得した。得られた２種類の断片を、Ｌｉｇａｔｉｏｎ ｈｉｇｈ（ＴＯＹＯＢＯ社）を用いて連結した。

[0307] 得られた該連結反応液を用いて、大腸菌ＤＨ５α株（ＴＯＹＯＢＯ社）の形質転換を行った。形質転換クローンよりプラスミドＤＮＡを調製し、ＡＲ４７Ａ６．４．２のＶＨおよびＶＬをコードするｃＤＮＡを有する、抗Ｔｒｏｐ－２ヒト型キメラ抗体発現ベクターを取得した。

[0308] （２）動物細胞を用いたＡＲ４７Ａ６．４．２由来ヒト型キメラ抗体の発現

実施例２（１）で得た抗体発現ベクターを、常法［Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ，Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ｇｕｉｄｅ，Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ ａｎｄ Ｃｏｍｐａｎｙ（１９９２）］により動物細胞株へ導入し、抗Ｔｒｏｐ－２ヒト型キメラ抗体を産生する形質転換株を取得した。宿主動物細胞株としては、ＣＨＯ／ＤＧ４４細胞株、およびα１，６－フ

コース転移酵素（ＦＵＴ８）遺伝子をノックアウトしたＣＨＯ／ＤＧ４４細胞株（以下、ＦＵＴ８ノックアウトＣＨＯ／ＤＧ４４細胞株と表記する）を用いた。

[0309] （３）ＡＲ４７Ａ６．４．２精製キメラ抗体の取得

実施例（２）で得られた各形質転換株の細胞懸濁液に対し、３０００ｒｐｍ、４℃の条件で２０分間の遠心分離を行うことにより、培養上清を回収し、さらに０．２２μｍ孔径ＭｉｌｌｅｘＧＶフィルター（ミリポア社）により濾過滅菌した。得られた培養上清より、Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ａ　Ｈｉｇｈ－ｃａｐａｃｉｔｙレジン（ミリポア社）カラムを用いて、各抗Ｔｒｏｐ－２ヒト型キメラ抗体を精製した。ＣＨＯ／ＤＧ４４細胞株およびＦＵＴ８ノックアウトＣＨＯ／ＤＧ４４細胞株由来の各形質転換株より得た抗体を、それぞれｃＡＲ４７Ａ６．４．２およびｃＡＲ４７Ａ６．４．２－Ｐと称す。

[0310] （４）ＡＲ４７Ａ６．４．２キメラ抗体のフコース含量測定

国際公開第２００２／３１１４０号に記載の方法に従い、ｃＡＲ４７Ａ６．４．２およびｃＡＲ４７Ａ６．４．２－Ｐに存在するＮ結合複合型糖鎖のうち、フコースが結合していない糖鎖の割合を調べた。その結果を表１に示す。

[0311] [表1]

抗Ｔｒｏｐ－２抗体のフコース含量	
ｃＡＲ４７Ａ６．４．２	１００％
ｃＡＲ４７Ａ６．４．２－Ｐ	０％

[0312] 表１に示す結果から、ｃＡＲ４７Ａ６．４．２－Ｐにはフコースが付加していないことが確認された。

[0313] [実施例３]

抗Ｔｒｏｐ－２マウスモノクローナル抗体ＫＭ４０９７の抗原結合活性評価

（１）フローサイトメトリー（以下、ＦＣＭと表記する）を用いたヒトＴｒｏｐ－２陽性細胞株に対するＫＭ４０９７の反応性

１～２×１０^{5}個のヒト膵臓癌細胞株ＢｘＰＣ－３、ヒト乳癌細胞株ＭＣＦ－７、卵巣癌細胞株ＣａＯＶ－３および大腸癌細胞株Ｃｏｌｏ２０５を、ＢＳＡ（インビトロジェン社）を１％加えたＰＢＳ（以下、ＢＳＡ－ＰＢＳと表記する）中に懸濁して細胞をブロッキングした。

[0314] その後、抗Ｔｒｏｐ－２モノクローナル抗体ＫＭ４０９７をＢＳＡ－ＰＢＳで適宜希釈して添加し、全量を１００μＬとした。これらの細胞懸濁液を氷上で６０分間反応させた後、ＢＳＡ－ＰＢＳを用いて細胞を洗浄した。該細胞に、ＢＳＡ－ＰＢＳで希釈調製したＦＩＴＣ標識抗マウスＩｇＧヤギ抗体（ダコ・ジャパン社）を１００μＬ添加し、氷上で３０分間反応させた。ＢＳＡ－ＰＢＳで細胞を洗浄した後、ＰＢＳに懸濁して、フローサイトメーター（ベックマン・コールター社）を用いて、蛍光強度を測定した。

[0315] 図１（ａ）～（ｄ）および表２に、ＫＭ４０９７を１０μｇ／ｍＬで反応させた場合のヒストグラムおよび平均蛍光強度（ＭＦＩ値）を示す。

[0316] [表2]

抗Ｔｒｏｐ－２モノクローナル抗体ＫＭ４０９７のＭＦＩ値	
ＢｘＰＣ－３	１２４
ＣａＯＶ－３	１４６
ＭＣＦ－７	９２．８
Ｃｏｌｏ２０５	５４．８

[0317] 図１（ａ）～（ｄ）および表２に示す結果から、ＫＭ４０９７はいずれも抗体濃度依存的にＴｒｏｐ－２陽性細胞株へ結合することが確認された。

[0318] （２）Ｂｉａｃｏｒｅを用いた組換えヒトＴｒｏｐ－２に対するＫＭ４０９７の結合活性

組換えヒトＴｒｏｐ－２に対する各抗Ｔｒｏｐ－２マウスモノクローナル抗体の結合活性を反応速度論的に解析するため、表面プラズモン共鳴法（ＳＰＲ法）を用いて結合活性測定を行った。尚、既存の抗Ｔｒｏｐ－２モノクローナル抗体である７７２２０（Ｒ＆Ｄ社）およびＭＯｖ１６（Ａｌｅｘｉｓ Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌ社）についても解析を行い、比較対照とした。

[0319] 以下の操作は全てＢｉａｃｏｒｅ　Ｔ１００（ＧＥヘルスケアバイオサイエンス社）を用いて行った。Ａｍｉｎｅ　Ｃｏｕｐｌｉｎｇ　Ｋｉｔ（ＧＥヘルスケアバイオサイエンス社）を用いて、Ｔｅｔｒａ－Ｈｉｓ抗体（ＱＩＡＧＥＮ社）を１２０００ＲＵ（レゾナンス　ユニット）になるように、ＣＭ５センサーチップ（ＧＥヘルスケアバイオサイエンス社）上に固相化した。センサーチップに組換えＴｒｏｐ－２／Ｆｃ／Ｈｉｓ融合タンパク質（Ｒ＆Ｄ社）を捕捉させた後、５０００ｎｇ／ｍＬから５段階に希釈した抗Ｔｒｏｐ－２抗体を３０μＬ／ｍｉｎの速度で流し、各濃度におけるセンサーグラムを取得した。

[0320] 装置添付の解析ソフトにより、Ｂｉｖａｌｅｎｔ　Ａｎａｌｙｔｅモデルを用いて解析し、各抗体の組換えヒトＴｒｏｐ－２／Ｆｃ／Ｈｉｓ融合タンパク質に対する結合速度定数および解離速度定数を算出した。

[0321] 各抗体の結合速度定数（以下、ｋａと記す）、解離速度定数（以下、ｋｄと記す）および解離定数K_D（ｋｄ／ｋａ）を表３に示す（２回の実験の平均値）。

[0322] [表3]

	ｋｄ（１／Ｍｓ）	ｋａ（１／ｓ）	K_D（ｎＭ）
ＫＭ４０９７	３．８９×１０^{5}	１．０１×１０$^{-4}$	０．２６１
７７２２０	５．５５×１０^{5}	６．１０×１０$^{-4}$	１．１０
ＭＯｖ１６	１．８３×１０^{5}	１．８４×１０$^{-4}$	０．９２９

[0323] 表３に示すように、ＫＭ４０９７は既存抗体よりも高いアフィニティーを示した。

[0324] （３）ＦＣＭを用いた抗Ｔｒｏｐ－２モノクローナル抗体間の競合活性評価

１～２×１０^{5}個のヒト膵臓癌細胞株ＢｘＰＣ－３を、ＢＳＡ－ＰＢＳ中に懸濁して細胞をブロッキングした。一方、ＢＳＡ－ＰＢＳを用いて、ｃＡＲ４７Ａ６．４．２を０．３μｇ／ｍＬの濃度とすると共に、ＫＭ４０９７または７７２２０を段階的に希釈した。調製した各抗体溶液を細胞懸濁液へ添加して全量を１００μＬとした。

[0325] これらの細胞懸濁液を氷上で６０分間反応させた後、ＢＳＡ－ＰＢＳを用いて細胞を洗浄した。該細胞に、ＢＳＡ－ＰＢＳで希釈調製したＦＩＴＣ標識抗ヒトＩｇＧヤギ抗体（Ｊａｃｋｓｏｎ Ｉｍｍｕｎｏ ｒｅｓｅｒｃｈ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ社）を１００μＬ添加し、氷上で３０分間反応させた。ＢＳＡ－ＰＢＳで細胞を洗浄した後、ＰＢＳに懸濁して、フローサイトメーター（ベックマン・コールター社）用いて、蛍光強度を測定した。

[0326] 図２に、ＫＭ４０９７または７７２２０の濃度を変化させた場合の、ｃＡＲ４７Ａ６．４．２のＢｘＰＣ－３細胞への結合を表す平均蛍光強度（ＭＦＩ値）を示す。７７２２０は濃度依存的にｃＡＲ４７Ａ６．４．２の細胞への結合を阻害する一方で、ＫＭ４０９７はｃＡＲ４７Ａ６．４．２の細胞への結合を阻害しないことが確認された。

[0327] 次に、上記と同様にして、ＢｘＰＣ－３細胞をＢＳＡ－ＰＢＳでブロッキングした。一方、ＢＳＡ－ＰＢＳを用いて、ＫＭ４０９７または７７２２０を１μｇ／ｍＬの濃度とすると共に、ｃＡＲ４７Ａ６．４．２を段階的に希釈した。調製した抗体溶液を細胞懸濁液へ添加し、全量を１００μＬとした。

[0328] これらの細胞懸濁液を氷上で６０分間反応させた後、ＢＳＡ－ＰＢＳを用いて細胞を洗浄した。該細胞に、ＢＳＡ－ＰＢＳで希釈調製したＦＩＴＣ標識抗マウスＩｇＧヤギ抗体（ダコ・ジャパン社）を１００μＬ添加し、氷上で３０分間反応させた。ＢＳＡ－ＰＢＳで細胞を洗浄した後、ＰＢＳに懸濁して、フローサイトメーター（ベックマン・コールター社）を用いて、蛍光強度を測定した。

[0329] 図３に、ｃＡＲ４７Ａ６．４．２の濃度を変化させた場合の、ＫＭ４０９７および７７２２０のＢｘＰＣ－３細胞への結合を表す平均蛍光強度（ＭＦＩ値）を示す。図３に示すように、ｃＡＲ４７Ａ６．４．２はＫＭ４０９７のＢｘＰＣ－３細胞への結合を阻害しないことが確認された。

[0330] 以上の結果から、ＫＭ４０９７はｃＡＲ４７Ａ６．４．２とは異なるエピトープを認識することが示された。

[0331] （４）Ｔｒｏｐ－２バインディングＥＬＩＳＡを用いた抗Ｔｒｏｐ－２モノクローナル抗体間の競合活性評価

２μｇ／ｍＬ組換えヒトＴｒｏｐ－２／Ｆｃ／Ｈｉｓ融合タンパク質（Ｒ＆Ｄ社）を９６ウェルＥＬＩＳＡ用プレート（グライナー社）へ５０μＬ／ウェルずつ分注し、４℃で一晩静置して固相化した。該プレートをＰＢＳで洗浄後、ＢＳＡ－ＰＢＳを１００μＬ／ウェルずつ加え、室温で１時間静置することによりブロッキングを行った。

[0332] 該プレートよりＢＳＡ－ＰＢＳを除去した後、一次抗体として、０．３μｇ／ｍＬ濃度のＫＭ４０９７（サブクラスはマウスＩｇＧ１）のＢＳＡ－ＰＢＳ希釈溶液、および競合抗体（マウスＩｇＧ１以外のサブクラスの抗体）のＢＳＡ－ＰＢＳ段階希釈溶液を、総量５０μＬ／ウェルとなるように分注し、２時間静置した。

[0333] 該プレートを０．０５％ポリオキシエチレン（２０）ソルビタンモノラウレート［（ＩＣＩ社商標Ｔｗｅｅｎ　２０相当品：和光純薬工業社）］／ＰＢＳ（以下Ｔｗｅｅｎ－ＰＢＳと表記）で洗浄した後、２次抗体としてペルオキシダーゼ標識ウサギ抗マウスＩｇＧ１抗体（ＺＹＭＥＤ社）を５０μＬ／ウェルずつ加えて１時間室温で静置した。

[0334] 該プレートをＴｗｅｅｎ－ＰＢＳで洗浄した後、ＡＢＴＳ〔２．２－アジノビス（３－エチルベンゾチアゾール－６－スルホン酸）アンモニウム〕基質液〔１ｍｍｏＬ／Ｌ　ＡＢＴＳ、０．１ｍｏＬ／Ｌ　クエン酸バッファー（ｐＨ４．２）、０．１％H_2O_2〕を５０μＬ／ウェルずつ添加して発色し、さらに５％ＳＤＳ（Ｓｏｄｉｕｍ　Ｌａｕｒｙｌ　Ｓｕｌｆａｔｅ）溶液を５０μＬ／ウェルずつ添加して発色反応を停止した。ＯＤ４１５ｎｍの吸光度をプレートリーダーＥｍａｘ（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ社）を用いて測定した。

[0335] 図４に、７７２２０の濃度を変化させた場合の、ＫＭ４０９７のＴｒｏｐ－２／Ｆｃ／Ｈｉｓ融合タンパク質への結合を示す。図４に示すように、７７２２０はＫＭ４０９７のＴｒｏｐ－２／Ｆｃ／Ｈｉｓ融合タンパク質への

結合を阻害しないことが確認された。

[0336] 次に、上記の実験と同様に、９６ウェルのＥＬＩＳＡ用プレートに組換えヒトＴｒｏｐ－２／Ｆｃ／Ｈｉｓ融合タンパク質を固相化し、ＰＢＳで洗浄後、ＢＳＡ－ＰＢＳでブロッキングした。該プレートに、一次抗体として、０．３μｇ／ｍＬ濃度の７７２２０（サブクラスはマウスＩｇＧ２ａ）のＢＳＡ－ＰＢＳ希釈溶液、および競合抗体（マウスＩｇＧ２ａ以外のサブクラスの抗体）のＢＳＡ－ＰＢＳ段階希釈溶液を、総量５０μＬ／ウェルとなるように分注して、２時間静置した。

[0337] 該プレートをＴｗｅｅｎ－ＰＢＳで洗浄後、２次抗体としてペルオキシダーゼ標識ウサギ抗マウスＩｇＧ２ａ抗体（ＺＹＭＥＤ社）を５０μＬ／ウェルずつ加えて１時間室温で静置した。該プレートをＴｗｅｅｎ－ＰＢＳで洗浄し、ＡＢＴＳ基質液を５０μＬ／ウェル添加して発色し、さらに５％ＳＤＳ溶液を５０μＬ／ウェルずつ添加して発色反応を停止した。ＯＤ４１５ｎｍの吸光度をプレートリーダーＥｍａｘ（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｄｅｖｉｃｅｓ社）を用いて測定した。

[0338] 図５に、ＫＭ４０９７、ＭＯｖ１６の濃度を変化させた場合の７７２２０のＴｒｏｐ－２／Ｆｃ／Ｈｉｓキメラタンパク質への結合を示す。図５に示すように、ＭＯｖ１６は７７２２０のＴｒｏｐ－２／Ｆｃ／Ｈｉｓキメラタンパク質への結合を阻害する一方で、ＫＭ４０９７は７７２２０のＴｒｏｐ－２／Ｆｃ／Ｈｉｓキメラタンパク質への結合を阻害しないことが確認された。

[0339] 以上の結果から、ＫＭ４０９７は７７２２０およびＭＯｖ１６と異なるエピトープに結合することが明らかとなった。

[0340] ［実施例４］

抗Ｔｒｏｐ－２マウスモノクローナル抗体ＫＭ４０９７の可変領域をコードするｃＤＮＡの単離

（１）ＫＭ４０９７産生ハイブリドーマ細胞からのｍＲＮＡの調製

実施例１で取得したハイブリドーマ細胞５×１０^{7}～１×１０^{8}個より、Ｒ

Ｎｅａｓｙ Ｍｉｎｉ ｋｉｔ（ＱＩＡＧＥＮ社）およびＯｌｉｇｏｔｅｘ ＴＭ－ｄＴ３０＜Ｓｕｐｅｒ＞ｍＲＮＡ Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ Ｋｉｔ（ＴａＫａＲａ社）を用いて、ＫＭ４０９７のｍＲＮＡを調製した。

[0341] （２）ＫＭ４０９７のＨ鎖可変領域遺伝子およびＬ鎖可変領域遺伝子のクローニング

実施例４（１）で取得したＫＭ４０９７のｍＲＮＡから、ＳＭＡＲＴ ＲＡＣＥ ｃＤＮＡ Ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ Ｋｉｔ（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ社）を用いて、ｃＤＮＡを取得した。取得したｃＤＮＡを鋳型として、ユニバーサルプライマーＡｍｉｘ（上記キットに添付）と、マウスＩｇＧ１に特異的なプライマー（配列番号５、６）を用いて、それぞれＰＣＲを行い、各抗体のＶＨのｃＤＮＡ断片を増幅した。また、抗体の各サブクラス特異的プライマーの代わりにマウスＩｇ（κ）特異的プライマー（配列番号７、８）を用いてＰＣＲを行い、各抗体のＶＬのｃＤＮＡ断片を増幅した。いずれのＰＣＲとも、ＰＴＣ－２００ ＤＮＡ Ｅｎｇｉｎｅ（ＢｉｏＲａｄ社）を用いて、９４℃で２分間加熱後、９４℃で１５秒間、６８℃で１分間から成る反応サイクルを３０回行った。

[0342] 取得したＰＣＲ産物をアガロースゲル電気泳動にて展開し、ＶＨを含むＤＮＡ断片およびＶＬを含むＤＮＡ断片を取得した。次に、ＴＡｒｇｅｔ Ｃｌｏｎｅ Ｐｌｕｓ（ＴＯＹＯＢＯ社）を用いて、得られた各ＤＮＡ断片の両端にデオキシアデニンを付加した後、ｐＴＡ２ベクターへ各々組み込んだ。こうして得られたベクターを用いて大腸菌ＤＨ５α株（ＴＯＹＯＢＯ社）の形質転換を行い、得られた形質転換クローンよりプラスミドを抽出した。クローニングした各ＰＣＲ産物の塩基配列の解析は、ＢｉｇＤｙｅ Ｔｅｒｍｉｎａｔｏｒ Ｃｙｃｌｅ Ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ ＦＳ Ｒｅａｄｙ Ｒｅａｃｔｉｏｎ Ｋｉｔ（ＰＥバイオシステムズ社）および同社のシーケンサーＡＢＩ ＰＲＩＳＭ３７００を用いて実施した。その結果、ｃＤＮＡの５’末端に開始コドンと推定されるＡＴＧ配列が存在する、ＶＨの完全長ｃＤＮＡを含むプラスミドおよびＶＬの完全長ｃＤＮＡを含むプラスミドを

各々取得したことが確認された。

[0343] （３）ＫＭ４０９７可変領域の遺伝子配列の解析

実施例４（２）で得られたプラスミドが有する、ＫＭ４０９７のＶＨの全塩基配列を配列番号９に、該配列から推定されるシグナル配列を含んだＶＨの全アミノ酸配列を配列番号１０に、また、ＶＬの全塩基配列を配列番号１１に、該配列から推定されるシグナル配列を含んだＶＬの全アミノ酸配列を配列番号１２にそれぞれ示した。

[0344] 既知のマウス抗体の配列データ［ＳＥＱＵＥＮＣＥＳ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ、ＵＳ Ｄｅｐｔ．Ｈｅａｌｔｈ ａｎｄ Ｈｕｍａｎ Ｓｅｒｖｉｃｅｓ（１９９１）］との比較から、単離した各ｃＤＮＡは、ＫＭ４０９７の分泌シグナル配列を含む可変領域（以下、Ｖ領域と表記する）をコードする完全長ｃＤＮＡであり、さらに、ＫＭ４０９７のＨ鎖については配列番号１０に記載のアミノ酸配列の１から１９番目が、ＫＭ４０９７のＬ鎖については配列番号１２に記載のアミノ酸配列の１から２０番目が分泌シグナル配列であることが明らかとなった。

[0345] 次に、ＫＭ４０９７のＶＨおよびＶＬのアミノ酸配列の新規性について解析した。配列解析システムとしてＧＣＧ Ｐａｃｋａｇｅ（ｖｅｒｓｉｏｎ ９．１、Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ｇｒｏｕｐ社）を用い、既存のタンパク質のアミノ酸配列データベースをＢＬＡＳＴＰ法［Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．，２５，３３８９（１９９７）］により検索した。その結果、ＶＨ、ＶＬともに完全に一致するアミノ酸配列がデータベース内に認められなかったことから、ＫＭ４０９７のＶＨおよびＶＬは新規のアミノ酸配列を有していることが確認された。

[0346] また、ＫＭ４０９７のＶＨおよびＶＬのＣＤＲを、既知の抗体のアミノ酸配列と比較することにより同定した。ＫＭ４０９７のＶＨのＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３のアミノ酸配列を配列番号１３、１４および１５に、ＶＬのＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３のアミノ酸配列を配列番号１６、１

７および１８にそれぞれ示した。

[0347] ［実施例５］

ＫＭ４０９７ヒト型キメラ抗体の作製

（１）ＫＭ４０９７ヒト型キメラ抗体発現ベクターの構築

本発明で作製するキメラ抗体は、実施例４（２）で得られたＫＭ４０９７の重鎖および軽鎖の各可変領域に、ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域の重鎖定常領域およびヒトκ型軽鎖定常領域をそれぞれ連結したキメラ抗体である。方法としては、抗体発現ベクターｐＫＡＮＴＥＸ９３と、実施例４（２）で得られたＶＨまたはＶＬを有する各ｐＴＡ２ベクターとを用いて、以下のようにしてＫＭ４０９７ヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築した。

[0348] ＫＭ４０９７のＶＨまたはＶＬを有するｐＴＡ２ベクターを鋳型として１００ｎｇ使用し、１０×ＥｘＴａｑ緩衝液を１．５μＬ、２．５ｍｍｏｌ／Ｌ ｄＮＴＰを１．２μＬ、ＥｘＴａｑ ＤＮＡ ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ（ＴａＫａＲａ社）を１μＬ、１０μｍｏｌ／Ｌ濃度のＶＨまたはＶＬに特異的なプライマーを０．７５μＬ各々含む、全量１５μＬから成る溶液を用いて、ＰＣＲを行った。ＫＭ４０９７のＶＨのプライマーを配列番号１９および２０に、ＶＬのプライマーを配列番号２１および２２に示す。ＰＣＲは、９４℃で２分間加熱後、９４℃で１５秒間、５５℃で３０秒間、７２℃で１分間の反応から成る反応サイクルを３０回行った後、７２℃で１０分間反応させることで行った。

[0349] 各ＰＣＲ反応産物をアガロースゲル電気泳動にて展開し、ＶＨを含むＤＮＡ断片およびＶＬを含むＤＮＡ断片を取得した。次に、ＴＯＰＯ ＴＡ ｃｌｏｎｉｎｇ ｋｉｔ ｆｏｒ ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ（インビトロジェン社）用いて、各ＤＮＡ断片をｐＣＲ４－ＴＯＰＯベクターへ組み込んだ。

[0350] ＫＭ４０９７のＶＨが組み込まれたプラスミドに対し、ＡｐａＩ（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ社）およびＮｏｔＩ（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ社）を用いて制限酵素処理を行い、ＶＨを含むＮｏｔＩ－ＡｐａＩ断片を取得した。また、ＫＭ４０９７のＶＬが組み込まれた

プラスミドに対し、ＢｓｉＷＩ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ社）およびＥｃｏＲＩ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ社）を用いて制限酵素処理を行い、ＶＬを含むＥｃｏＲＩ－ＢｓｉＷＩ断片を取得した。

[0351] 一方、抗体発現ベクターｐＫＡＮＴＥＸ９３に対し、ＮｏｔＩおよびＡｐａＩ、またはＥｃｏＲＩおよびＢｓｉＷＩの２通りの組み合わせで制限酵素処理を行った。ＶＨを含むＮｏｔＩ－ＡｐａＩ断片およびｐＫＡＮＴＥＸ９３由来のＮｏｔＩ－ＡｐａＩ断片、ならびに、ＶＬを含むＥｃｏＲＩ－ＢｓｉＷＩ断片およびｐＫＡＮＴＥＸ９３由来のＥｃｏＲＩ－ＢｓｉＷＩ断片の２種類の組み合わせを、Ｌｉｇａｔｉｏｎ　ｈｉｇｈ（ＴＯＹＯＢＯ社）を用いて連結した。

[0352] 得られた該連結反応液を用いて、大腸菌ＤＨ５α株（ＴＯＹＯＢＯ社）の形質転換を行った。形質転換クローンよりプラスミドＤＮＡを調製し、ＫＭ４０９７のＶＨまたはＶＬをコードするｃＤＮＡが各々クローニングされたｐＫＡＮＴＥＸ９３ベクターを取得した。

[0353] 次に、ＫＭ４０９７のＶＨまたはＶＬが組み込まれた各々のｐＫＡＮＴＥＸ９３ベクターに対し、ＥｃｏＲＩおよびＮｏｔＩを用いて制限酵素処理を行い、ＶＬの組み込まれたＥｃｏＲＩ－ＮｏｔＩ断片、およびＶＨの組み込まれたＮｏｔＩ－ＥｃｏＲＩ断片を取得した。得られた２種類の断片を、Ｌｉｇａｔｉｏｎ　ｈｉｇｈ（ＴＯＹＯＢＯ社）を用いて連結した。得られた該連結反応液を用いて、大腸菌ＤＨ５α株（ＴＯＹＯＢＯ社）の形質転換を行った。形質転換クローンよりプラスミドＤＮＡを調製し、ＫＭ４０９７のＶＨおよびＶＬをコードするｃＤＮＡを有する、抗Ｔｒｏｐ－２ヒト型キメラ抗体発現ベクターを取得した。

[0354] （２）動物細胞を用いたＫＭ４０９７ヒト型キメラ抗体の取得

実施例２と同様にして、実施例５（１）で得た抗Ｔｒｏｐ－２キメラ抗体発現ベクターをＣＨＯ／ＤＧ４４細胞株およびＦＵＴ８ノックアウトＣＨＯ／ＤＧ４４細胞株に導入し、得られた各形質転換株より、ヒト型キメラ抗体

ＫＭ４５９０およびＫＭ４５９１を各々取得した。

[0355] （３）ＫＭ４０９７キメラ抗体のフコース含量測定

国際公開第２００２／３１１４０号に記載の方法に従い、ＫＭ４５９０およびＫＭ４５９１に存在するＮ－結合複合型糖鎖のうち、フコースが結合していない糖鎖の割合を調べた。その結果を表４に示す。

[0356] [表4]

抗Ｔｒｏｐ－２抗体のフコース含量	
ＫＭ４５９０	１００％
ＫＭ４５９１	０％

[0357] 表４に示す結果から、実施例５（２）で作製したヒト型キメラ抗体ＫＭ４５９１にはフコースが付加していないことが確認された。

[0358] ［実施例６］

抗Ｔｒｏｐ－２ヒト型キメラ抗体ＫＭ４５９０およびＫＭ４５９１の活性評価

実施例５で得たＫＭ４５９０およびＫＭ４５９１、ならびに、実施例２で得たｃＡＲ４７Ａ６．４．２およびｃＡＲ４７Ａ６．４．２－Ｐの活性評価を行った。

（１）ビアコアによる抗Ｔｒｏｐ－２ヒト型キメラ抗体の組換えヒトＴｒｏｐ－２への結合活性評価

実施例３と同様にして、ＫＭ４５９１、ｃＡＲ４７Ａ６．４．２－ＰのヒトＴｒｏｐ－２／Ｆｃ／Ｈｉｓ融合タンパク質（Ｒ＆Ｄ社）に対する親和性を評価した。各抗体のｋａ、ｋｄおよびK_D（ｋｄ／ｋａ）を表５に示す（２回の実験の平均値）。

[0359] [表5]

	ｋｄ（１／Ｍｓ）	ｋａ（１／ｓ）	K_D（ｎＭ）
ＫＭ４５９１	4.16×10^{5}	5.80×10^{-5}	０．１４３
ｃＡＲ４７Ａ６．４．２－Ｐ	2.21×10^{5}	2.18×10^{-4}	１．０１

[0360] 表５に示すように、ＫＭ４５９１はｃＡＲ４７Ａ６．４．２－Ｐよりも高

いアフィニティーを示した。

[0361] （２）抗Ｔｒｏｐ－２ヒト型キメラ抗体のヒト癌細胞株に対するＡＤＣＣ活性の評価

ヒト癌細胞株に対するＫＭ４５９０、およびｃＡＲ４７Ａ６．４．２－１のＡＤＣＣ活性を、以下に示す方法に従って測定した。

[0362] （２）－１　標的細胞懸濁液の調製

ヒト癌細胞株ＭＣＦ－７、Ｃｏｌｏ２０５をＰＢＳで洗浄後、５％ウシ胎児血清（ＦＢＳ）（インビトロジェン社）を含むフェノールレッド不含有ＲＰＭＩ１６４０培地（インビトロジェン社）（以下、ＡＤＣＣ用培地と表記する）で洗浄し、同培地で至適の細胞密度に調製して標的細胞懸濁液とした。

[0363] （２）－２　エフェクター細胞懸濁液の調製

以下に示した方法により、健常人末梢血より末梢血単核球（Ｐｅｒｉｐｈｅｒａｌ　ｂｌｏｏｄ　ｍｏｎｏｎｕｃｌｅａｒ　ｃｅｌｌ：ＰＢＭＣ）を分離した。ヘパリンナトリウム注（味の素社）を０．５ｍＬ加えたシリンジを用いて、健常人から健常人末梢血５０ｍＬを採血した。採取した末梢血に同量の生理食塩水（大塚製薬）を加えて希釈し、良く攪拌した。

[0364] １５ｍＬチューブ（Ｇｒｅｉｎｅｒ社）に４．５ｍＬずつ分注したＬｙｍｐｈｏｐｒｅｐ（Ａｘｉｓ－Ｓｈｉｅｌｄ社）の上に、１０ｍＬの希釈末梢血を静かに重層し、２０００ｒｐｍ、ブレーキオフ、室温の条件で２０分間遠心分離して、単核球層を分離した。こうして得られた単核球画分を、ＡＤＣＣ用培地を用いて２回洗浄し、同培地により至適の細胞密度に調製して、エフェクター細胞懸濁液とした。

[0365] （２）－３　ＡＤＣＣ活性の測定

９６ウェルＵ底プレート（ＦＡＬＣＯＮ社）の各ウェルに、各抗体を３μｇ／ｍＬから段階的に１０倍希釈した抗体溶液を５０μＬずつ分注した後、次に（２）－１で調製した標的細胞懸濁液を1×10^{4}個／５０μＬ／ウェルずつ分注し、最後に（２）－２で調製したエフェクター細胞懸濁液を２．５

×１０^{5}個／５０μＬ／ウェルずつ分注し、全量を１５０μＬとして、３７℃で４時間反応させた。本系でのエフェクター細胞（Ｅ）と標的細胞（Ｔ）の比は２５：１とした。反応後、ＬＤＨ　Ｃｙｔｏｔｏｘｉｃ　Ｔｅｓｔ（和光純薬社）を用いて各培養上清の発色を測定した。

[0366]　ＡＤＣＣ活性は次式により求めた。その結果を図６（ａ）および（ｂ）、図７（ａ）および（ｂ）、図８（ａ）および（ｂ）並びに図９（ａ）および（ｂ）に示す。

[0367]（式）

ＡＤＣＣ活性（％）＝｛（［検体の吸光度］－［標的細胞自然遊離の吸光度］－［エフェクター細胞自然遊離の吸光度］）／（［標的細胞全遊離の吸光度］－［標的細胞自然遊離の吸光度］）｝×１００

[0368]　図６（ａ）および（ｂ）並びに図７（ａ）および（ｂ）に示すように、ＫＭ４５９０は、ヒト癌細胞株ＭＣＦ－７、Ｃｏｌｏ２０５に対してＡＤＣＣ活性を示し、その活性は既存の抗Ｔｒｏｐ－２ヒト型キメラ抗体ｃＡＲ４７Ａ６．４．２よりも高かった。さらに、図８（ａ）および（ｂ）並びに図９（ａ）および（ｂ）に示すように、ＫＭ４５９１は、ヒト癌細胞株ＭＣＦ－７、Ｃｏｌｏ２０５に対してＫＭ４５９０よりも高いＡＤＣＣ活性を有していた。

[0369]（３）ＢｘＰＣ－３細胞株異所移植マウスにおける抗Ｔｒｏｐ－２ヒト型キメラ抗体の抗腫瘍活性の評価

ＢｘＰＣ－３細胞をＰＢＳにて５×１０^{7}個／ｍＬの密度に調製し、６週齢雄性ＳＣＩＤマウス（日本クレア）の右腋下に１００μＬ注入した。６日後に腫瘍径を測定し、各群の平均腫瘍体積［長径×（短径）^{2}×０．５として計算］が１００ｍｍ^{3}となるよう群分けした（各群６匹）。ＰＢＳまたは抗Ｔｒｏｐ－２キメラ抗体（ＫＭ４５９１またはｃＡＲ４７Ａ６．４．２－Ｐ）を週２回、４週間投与して抗腫瘍活性を評価した。

[0370]　その結果を図１０に示す。図１０に示すように、評価の結果、ＫＭ４５９１は有意な抗腫瘍活性を示し、その活性はｃＡＲ４７Ａ６．４．２－Ｐより

も高かった。

[0371] （４）Ｃｏｌｏ２０５細胞株異所移植マウスにおける抗Ｔｒｏｐ－２キメラ抗体の抗腫瘍活性の評価

Ｃｏｌｏ２０５細胞をＰＢＳにて５×１０^{7}個／ｍＬの密度に調製し、５週齢雄性ＳＣＩＤマウス（日本クレア）の右腋下に１００μＬ注入した。５日後に腫瘍径を測定し、各群の平均腫瘍体積［長径×（短径）^{2}×０．５として計算］が１００ｍｍ^{3}となるよう群分けした（各群５匹）。ＰＢＳまたは抗Ｔｒｏｐ－２キメラ抗体（ＫＭ４５９１またはｃＡＲ４７Ａ６．４．２－Ｐ）を週２回、４週間投与して抗腫瘍活性を評価した。

[0372] その結果を図１１に示す。図１１に示すように、評価の結果、ＫＭ４５９１は有意な抗腫瘍活性を示し、その活性はｃＡＲ４７Ａ６．４．２－Ｐよりも高かった。

[0373] ［実施例７］

抗Ｔｒｏｐ－２ヒト型キメラ抗体ＫＭ４５９０のエピトープ解析

（１）Ｔｒｏｐ－２バインディングＥＬＩＳＡによる各種抗Ｔｒｏｐ－２モノクローナル抗体に対する競合活性評価

９６ウェルＥＬＩＳＡ用プレート（グライナー社）へ、２μｇ／ｍＬの組換えヒトＴｒｏｐ－２／Ｆｃ／Ｈｉｓキメラタンパク質（Ｒ＆Ｄ社製）をプレートに５０μＬ／ウェル分注し、４℃で一晩静置して吸着させた。該プレートをＰＢＳで洗浄後、ＢＳＡ－ＰＢＳを１００μＬ／ウェルずつ加え、室温で１時間静置することにより活性基のブロッキングを行った。

[0374] その後、該プレートよりＢＳＡ－ＰＢＳを除去し、一次抗体として、０．３μｇ／ｍＬ濃度の各種マウス抗Ｔｒｏｐ－２抗体〔７７７２０（Ｒ＆Ｄ社）、ＭＯｖ１６（ＡＬＥＸＩＳ　ＢＩＯＣＨＥＭＩＣＡＬＳ社）、ＭＭ０５８８－４９Ｄ６（Ａｎｇｉｏ－Ｐｒｏｔｅｏｍｉｅ社）、ＹＹ－０１（Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ社）または１６２－４６（ＢＤ　Ｐｈａｒｍｉｇｅｎ社）〕のＢＳＡ－ＰＢＳ希釈溶液、および競合キメラ抗体（ＫＭ４５９０またはｃＡＲ４７Ａ６．４．２）の段階希釈溶液を５０μＬ／ウェル分注し、２時

間静置した。

[0375] 該プレートをＴｗｅｅｎ－ＰＢＳで洗浄後、２次抗体として、ペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ヒトＩｇＧ抗体（Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｑｕａｌｅｘ社）を５０μＬ／ウェルずつ加えて１時間室温で静置した。該プレートをＴｗｅｅｎ－ＰＢＳで洗浄し、ＡＢＴＳ〔２．２－アジノビス（３－エチルベンゾチアゾール－６－スルホン酸）アンモニウム〕基質液〔１　ｍｍｏＬ／ＬＡＢＴＳ、０．１ｍｏＬ／Ｌ　クエン酸バッファー（ｐＨ４．２）、０．１％H_2O_2〕を５０μＬ／ウェル添加して発色し、５％ＳＤＳ（Ｓｏｄｉｕｍ　Ｌａｕｒｙｌ　Ｓｕｌｆａｔｅ）溶液を５０μＬ／ウェル添加して発色反応を停止した。プレートリーダーＥｍａｘ（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ社）を用いて該プレートのＯＤ４１５ｎｍの吸光度を測定した。

[0376] 図１４（ａ）～（ｆ）に、ＫＭ４５９０およびｃＡＲ４７Ａ６．４．２の濃度を変化させた場合の、各種抗Ｔｒｏｐ－２マウスモノクローナル抗体のＴｒｏｐ－２／Ｆｃ／Ｈｉｓキメラタンパク質への結合を示す。

[0377] 図１４（ａ）～（ｆ）に示すように、ＫＭ４０９７以外の抗Ｔｒｏｐ－２マウスモノクローナル抗体のＴｒｏｐ－２／Ｆｃ／Ｈｉｓキメラタンパク質への結合は、ＫＭ４５９０により阻害されないことが確認された。一方、ＫＭ４０９７以外の抗Ｔｒｏｐ－２マウスモノクローナル抗体のＴｒｏｐ－２／Ｆｃ／Ｈｉｓキメラタンパク質への結合は、ｃＡＲ４７Ａ６．４．２により阻害されることが確認された。

[0378] これらの結果から、ＫＭ４０９７およびそのキメラ抗体であるＫＭ４５９０は他の抗Ｔｒｏｐ－２抗体とは異なるエピトープを認識することが示された。

[0379] （２）Ｔｒｏｐ－２細胞外領域蛋白質およびそのドメイン欠損体蛋白質の作製

本発明の抗Ｔｒｏｐ－２モノクローナル抗体のエピトープを同定するため、Ｔｒｏｐ－２蛋白質の細胞外領域およびそのドメイン欠損体を作製した［図１５（ａ）～（ｄ）］］。まず、ＩＮＰＥＰ４ベクター（Ｂｉｏｇｅｎ－

ＩＤＥＣ社）に、ＦＬＡＧタグおよびＦｃ領域をコードするＤＮＡを５’末端側から３’末端側へ順次配置したＤＮＡ（配列番号３９）を挿入したベクターを作製した（ＩＮＰＥＰ４－ＦＬＡＧ－Ｆｃ）。

[0380] 次に、Ｔｒｏｐ－２の細胞外領域に分泌シグナル配列を付加した蛋白質をコードするＤＮＡ（配列番号４０）を、ＩＮＰＥＰ４－ＦＬＡＧ－Ｆｃベクターの ＦＬＡＧタグ配列の５’末端側に挿入することにより、Ｔｒｏｐ－２細胞外領域とＦＬＡＧタグおよびＦｃとの融合蛋白質（Ｔｒｏｐ－２／ＦＬＡＧ／Ｆｃとする）の発現ベクターを構築した。

[0381] 同様にして、Ｔｒｏｐ－２細胞外領域側のドメインＩのみ、ドメインＩおよびドメインＩＩ、ドメインＩおよびＩＩの全長ならびにドメインＩＩＩの一部を各々欠損した３種類の蛋白質（それぞれＭｕｔａｎｔ Ａ、Ｍｕｔａｎｔ Ｂ、Ｍｕｔａｎｔ Ｃとする）をコードするＤＮＡ（配列番号４１、４２、４３）についても、ＦＬＡＧタグおよびＦｃ領域との融合蛋白質の発現ベクターを構築した。Ｔｒｏｐ－２／ＦＬＡＧ／Ｆｃ、Ｍｕｔａｎｔ Ａ、Ｍｕｔａｎｔ ＢおよびＭｕｔａｎｔ Ｃのアミノ酸配列を配列番号４４－４７に示す。

[0382] ＨＥＫ２９３Ｆを宿主細胞とし、ＦｒｅｅＳｔｙｌｅ™ ２９３ 遺伝子導入システム（ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）を用いて、遺伝子導入および蛋白質の発現を行った。まず、発現ベクタープラスミド ３０μｇを、ＯＰＴＩ－ＭＥＭ Ｉ（ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）と混合して計９００μＬとした。次に、２９３ｆｅｃｔｉｎ™（ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）３０μＬをＯＰＴＩ－ＭＥＭ Ｉと混合して計９００μＬとし、室温で５分間静置した。

[0383] 該２９３ｆｅｃｔｉｎ™溶液を上記発現ベクタープラスミド溶液と混合し、室温で２０～３０分間静置した。ＦｒｅｅＳｔｙｌｅ™ ２９３ ＳＦＭ（ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）にて、１．１×10^6 ｃｅｌｌｓ／ｍＬの密度で培養したＨＥＫ２９３Ｆ細胞３０ｍＬに対し、上記プラスミド混合液の全量を加えた後、３７℃、５％CO_2、１２５ｒｐｍの設定条件下で、４日間の浮遊旋回培養を行った。

[0384] 培養後、細胞懸濁液を３０００ ｒｐｍ、４℃の条件で２０分間の遠心分離に供して培養上清を回収し、０．２２μｍ孔径Ｍｉｌｌｅｘ ＧＶフィルターを通して濾過滅菌した。

[0385] エコノパックカラム（ＢＩＯ－ＲＡＤ社）にＭａｂＳｅｌｅｃｔ（ＧＥＨｅａｌｔｈｃａｒｅ社）１ ｍＬを充填し、上記の操作で回収した培養上清をカラムに通塔した後、ＰＢＳ １０ ｍＬで洗浄した。洗浄後、０．１ｍｏｌ／Ｌクエン酸緩衝液（ｐＨ ３．４）を用いて担体に吸着した抗体の溶出を行った。

[0386] 溶出画分を１ ｍｏｌ／Ｌ Ｔｒｉｓ緩衝液（ｐＨ８．５）により中和した。次に、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ解析により目的蛋白質の溶出が確認された画分を合一し、該画分をＡｍｉｃｏｎ Ｕｌｔｒａ－１０Ｋ（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ社）で濃縮した後、０．２２μｍ孔径Ｍｉｌｌｅｘ ＧＶ（ＭＩＬＬＩＰＯＲＥ社）を用いて滅菌濾過した。上記濃縮溶液の２８０ｎｍの吸光度（ＯＤ２８０ ｎｍ）を吸光光度計（ＴｈｅｒｍｏＳｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社製Ｎａｎｏｄｒｏｐ ２０００）を用いて測定し、各精製蛋白質の濃度を算出した。

[0387] （３）ウェスタンブロットによるエピトープ解析

本実施例（２）で作製したＴｒｏｐ－２／ＦＬＡＧ／Ｆｃ、Ｍｕｔａｎｔ Ａ、Ｍｕｔａｎｔ ＢおよびＭｕｔａｎｔ Ｃの各蛋白質を還元状態（サンプルを１０ ｍｍｏｌ／Ｌ ＤＴＴ存在下で９５℃、５分間処理）または非還元状態（ＤＴＴ非存在下で室温にて１０分間処理）でＳＤＳ－ＰＡＧＥにて展開した後、セミドライ法を用いて、２００ｍＡの電流を１時間流すことによりゲル内のタンパク質をポリフッ化ビニリデン（ＰＶＤＦ）膜上に転写した。

[0388] ５％ＢＳＡを含むＰＢＳにて該ＰＶＤＦ膜を室温で１時間ブロッキングした後、０．１％ＢＳＡを含むＴＢＳＴ［ナカライテスク社製トリス緩衝生理食塩水（１０倍濃縮）（ｐＨ ７．４）を１０倍に希釈し、さらに０．１％濃度の０．０５％ポリオキシエチレン（２０）ソルビタンモノラウレート（

ＩＣＩ社商標Ｔｗｅｅｎ　２０相当品：和光純薬工業社）を加えた水溶液］で調製した一次抗液に浸漬し、室温で１時間または４℃で一晩反応させた。

[0389] 該ＰＶＤＦ膜をＴＢＳＴで３～４回洗浄した後、０．１％ＢＳＡを含むＴＢＳＴで調製したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウスＩｇＧ抗体（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ社）もしくはペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒトκ鎖抗体（Ｓｏｕｔｈｅｒｎ　Ｂｉｏｔｅｃｈ社）を二次抗体として、室温で１時間反応させた。該ＰＶＤＦ膜をＴＢＳＴで３～４回洗浄した後、ＳｕｐｅｒＳｉｇｎａｌ　Ｗｅｓｔ　Ｐｉｃｏ　Ｃｈｅｍｉｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｔ　Ｓｕｂｓｔｒａｔｅ（ＴｈｅｒｍｏＳｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社）を添加し、化学発光反応を行った。

[0390] 発光像を、イメージングシステムＬＡＳ４０００ｍｉｎｉ（富士フイルム社）を用いて取得した。一方、ＰＶＤＦ膜上の各ＦＬＡＧ／Ｆｃ融合タンパク質の量を評価する目的で、一次抗体反応を行わずに、ヒトＦｃを認識するペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ヒトＩｇＧ抗体（Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｑｕａｌｅｘ社）を室温で１時間反応させた後、化学発光反応を行う実験も実施した。

[0391] 図１６（ａ）に、ウェスタンブロットにおいて、一次抗体としてＫＭ４５９０を反応させた実験結果を示す。また、図１６（ｂ）に、ウェスタンブロットにおいて、一次抗体としてｃＡＲ４７Ａ６．４．２を反応させた実験結果を示す。

[0392] 図１６（ａ）に示すように、非還元状態および還元状態のいずれにおいても、ＫＭ４５９０は、Ｔｒｏｐ－２のドメインＩを欠損させたＭｕｔａｎｔ　ＡおよびＭｕｔａｎｔ　Ｂに対する反応性が低下した。一方、図１６（ｂ）に示すように、ｃＡＲ４７Ａ６．４．２は、ドメインＩＩＩの一部まで欠損させたＭｕｔａｎｔ　Ｃに対してのみ反応性が低下した。

[0393] 以上の結果から、キメラ抗体ＫＭ４５９０およびそのマウスモノクローナル抗体ＫＭ４０９７のエピトープはドメインＩに、ｃＡＲ４７Ａ６．４．２のエピトープはドメインＩＩＩにあることが示された。

[0394] 次に、Ｔｒｏｐ－２／ＦＬＡＧ／Ｆｃタンパク質の非還元状態と還元状態に対するＫＭ４５９０およびｃＡＲ４７Ａ６．４．２の反応性を比較した。図１７（ａ）および（ｂ）並びに図１８に実験の結果を示す。

[0395] ウェスタンブロットにてＫＭ４５９０およびｃＡＲ４７Ａ６．４．２を各々反応させたＰＶＤＦ膜［図１７（ａ）］より、Ｒｅｓｔｏｒｅ™ ＰＬＵＳ Ｗｅｓｔｅｒｎ Ｂｌｏｔ Ｓｔｒｉｐｐｉｎｇ Ｂｕｆｆｅｒ（ＴｈｅｒｍｏＳｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社）を用いて抗体を剥離し、前述のブロッキングを行った後にペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ヒトＩｇＧ抗体を反応させることにより、ＰＶＤＦ膜上のＴｒｏｐ－２／ＦＬＡＧ／Ｆｃ蛋白質の量を評価した。

[0396] その結果、図１７（ｂ）に示すように、二つのＰＶＤＦ膜の間で、含まれるＴｒｏｐ－２／ＦＬＡＧ／Ｆｃ蛋白質の量に大きな差は認められなかった。また、ＫＭ４５９０は還元状態のＴｒｏｐ－２／ＦＬＡＧ／Ｆｃタンパク質への反応性は非常に弱いのに対し、ｃＡＲ４７Ａ６．４．２は還元状態への反応性が強いことが示された。

[0397] 図１８に、画像解析ソフトＭｕｌｔｉ Ｇａｕｇｅ Ｖｅｒ３．０（富士フイルム社）を用いてバンドのシグナル強度を解析し数値化した結果を示す。以上より、ＫＭ４５９０はＴｒｏｐ－２タンパク質のドメインＩ内の、ジスルフィド結合を含む構造を認識していることが示された。

[0398] 以上の結果から、ＫＭ４５９０およびそのマウス抗体ＫＭ４０９７は、Ｔｒｏｐ－２の細胞外領域のうち、既存抗体とは異なるエピトープであるドメインＩを認識する抗体であることが明らかとなった。

[0399] ［実施例８］

抗Ｔｒｏｐ－２ヒト化抗体の作製

（１）ＫＭ４０９７ヒト化抗体のＶＨおよびＶＬのアミノ酸配列の設計

ＫＭ４０９７ヒト化抗体のＶＨのアミノ酸配列を以下のようにして設計した。ＫＭ４０９７ＶＨのＣＤＲ１～３のアミノ酸配列（配列番号１３～１５）の移植に適したヒト抗体のＶＨのＦＲのアミノ酸配列を以下のようにして

選択した。

[0400] カバットらは、既知の様々なヒト抗体のＶＨをそのアミノ酸配列の相同性からサブグループ（ＨＳＧ Ｉ～ＩＩＩ）に分類し、それらのサブグループ毎に共通配列を報告している［Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，ＵＳ Ｄｅｐｔ．Ｈｅａｌｔｈ ａｎｄ Ｈｕｍａｎ Ｓｅｒｖｉｃｅｓ（１９９１）］。そこで、ヒト抗体のＶＨのサブグループＩ～ＩＩＩの共通配列のＦＲのアミノ酸配列とＫＭ４０９７ＶＨのＦＲのアミノ酸配列との相同性検索を実施した。

[0401] 相同性を検索した結果、ＨＳＧＩ、ＨＳＧＩＩ、およびＨＳＧＩＩＩの相同性はそれぞれ７４．７％、５５．２％、５９．８％であった。従って、ＫＭ４０９７ＶＨのＦＲのアミノ酸配列はサブグループＩと最も高い相同性を有していた。

[0402] 以上の結果から、ヒト抗体のＶＨのサブグループＩの共通配列のＦＲのアミノ酸配列の適切な位置に、ＫＭ４０９７ＶＨのＣＤＲのアミノ酸配列（配列番号１３～１５）を移植した。このようにして、配列番号２４で表される抗Ｔｒｏｐ－２ＫＭ４０９７ヒト化抗体のＶＨのアミノ酸配列ＫＭ４０９７ＨＶ０を設計した。

[0403] 次に、ＫＭ４０９７ヒト化抗体のＶＬのアミノ酸配列を以下のようにして設計した。ＫＭ４０９７ＶＬのＣＤＲ１～３のアミノ酸配列（配列番号１６～１８）を移植に適したヒト抗体のＶＬのＦＲのアミノ酸配列を、以下のようにして選択した。

[0404] カバットらは、既知の様々なヒト抗体のＶＬをそのアミノ酸配列の相同性からサブグループ（ＨＳＧ Ｉ～ＩＶ）に分類し、それらのサブグループ毎に共通配列を報告している［Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，ＵＳ Ｄｅｐｔ．Ｈｅａｌｔｈ ａｎｄ Ｈｕｍａｎ Ｓｅｒｖｉｃｅｓ（１９９１）］。そこで、ヒト抗体のＶＬのサブグループＩ～ＩＶの共通配列のＦＲのアミノ

酸配列とＫＭ４０９７ＶＬのＦＲのアミノ酸配列との相同性検索を実施した。

[0405] 相同性を検索した結果、ＨＳＧＩ、ＨＳＧＩＩ、ＨＳＧＩＩＩ、およびＨＳＧＩＶの相同性はそれぞれ７８．８％、７３．８％、７２．５％、８３．８％であった。従って、ＫＭ４０９７ＶＬのＦＲのアミノ酸配列はサブグループＩＶと最も高い相同性を有していた。

[0406] 以上の結果から、ヒト抗体のＶＬのサブグループＩＶの共通配列のＦＲのアミノ酸配列の適切な位置に、ＫＭ４０９７ＶＬのＣＤＲのアミノ酸配列（配列番号１６～１８）を移植した。しかし、ＫＭ４０９７ＶＬのアミノ酸配列（配列番号１２）中の１１０番目のＬｅｕは、カバットらが挙げるヒト抗体ＦＲのアミノ酸配列の相当する部位において、最も使用される頻度が高いアミノ酸残基ではないが、比較的高い頻度で使用されるアミノ酸残基であるため、上記のＫＭ４０９７ＶＬのアミノ酸配列で認められるアミノ酸残基を用いることとした。

[0407] このようにして、抗Ｔｒｏｐ－２ＫＭ４０９７ヒト化抗体のＶＬのアミノ酸配列ＫＭ４０９７ＬＶ０（配列番号２６）を設計した。

[0408] 上記で設計したＫＭ４０９７ヒト化抗体のＶＨのアミノ酸配列ＫＭ４０９７ＨＶ０、およびＶＬのアミノ酸配列ＫＭ４０９７ＬＶ０は、選択したヒト抗体のＦＲのアミノ酸配列に、マウスモノクローナル抗体であるＫＭ４０９７のＣＤＲのアミノ酸配列のみを移植した配列である。

[0409] しかし、一般に、ヒト化抗体を作製する場合には、単にヒト抗体のＦＲへマウス抗体のＣＤＲのアミノ酸配列を移植するのみでは、結合活性が低下してしまうことが多い。このような結合活性の低下を回避するため、ＣＤＲのアミノ酸配列の移植とともに、ヒト抗体とマウス抗体で異なっているＦＲのアミノ酸残基のうち、結合活性に影響を与えると考えられるアミノ酸残基を改変することが行われている。

[0410] そこで、本実施例においても、結合活性に影響を与えると考えられるＦＲのアミノ酸残基を以下のようにして同定し、改変することとした。

[0411] まず、上記で設計したＫＭ４０９７ヒト化抗体のＶＨのアミノ酸配列ＫＭ４０９７ＨＶ０、およびＶＬのアミノ酸配列ＫＭ４０９７ＬＶ０より成る抗体Ｖ領域（以下、ＨＶ０ＬＶ０と表す）の三次元構造をコンピューターモデリングの手法を用いて構築した。三次元構造座標作製および三次元構造の表示には、Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ　Ｓｔｕｄｉｏ（アクセルリス社）を用いた。また、ＫＭ４０９７のＶ領域の三次元構造のコンピューターモデルも同様にして構築した。

[0412] 更に、ＨＶ０ＬＶ０のＶＨおよびＶＬのＦＲのアミノ酸配列の中で、ＫＭ４０９７と異なっているアミノ酸残基を選択し、ＫＭ４０９７のアミノ酸残基へ改変したアミノ酸配列を作製し、同様に三次元構造モデルを構築した。これら作製したＫＭ４０９７、ＨＶ０ＬＶ０および改変体の各Ｖ領域の三次元構造を比較し、抗体の結合活性に影響を与えると予測されるアミノ酸残基を同定した。

[0413] その結果、ＨＶ０ＬＶ０のＦＲのアミノ酸残基の中で抗原結合部位の三次元構造を変化させ、抗体の結合活性に影響を与えると考えられるアミノ酸残基として、

ＫＭ４０９７ＨＶ０では、９番目のＡｌａ、１２番目のＬｙｓ、２０番目のＶａｌ、３８番目のＡｒｇ、４８番目のＭｅｔ、６７番目のＡｒｇ、６８番目のＶａｌ、７０番目のＩｌｅ、９５番目のＴｙｒ、および１１２番目のＶａｌを、ＫＭ４０９７ＬＶ０では、１５番目のＬｅｕ、１９番目のＡｌａ、２１番目のＩｌｅ、および８４番目のＬｅｕを、それぞれ選択した。

[0414] これらの選択したアミノ酸残基のうち、少なくとも１つ以上のアミノ酸配列をＫＭ４０９７の同じ部位に存在するアミノ酸残基へ改変し、様々な改変を有するヒト化抗体のＶＨおよびＶＬを設計した。

[0415] 具体的には、ＶＨについては、配列番号２４のアミノ酸配列の９番目のＡｌａをＰｒｏに、１２番目のＬｙｓをＶａｌに、２０番目のＶａｌをＩｌｅに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、７０番目の

ＩｌｅをＬｅｕに、９５番目のＴｙｒをＰｈｅに、および１１２番目のＶａｌをＬｅｕに置換するアミノ酸改変のうち、少なくとも１つの改変を導入した。

[0416] また、ＶＬについては、配列番号２６のアミノ酸配列の１５番目のＬｅｕをＡｌａに、１９番目のＡｌａをＶａｌに、２１番目のＩｌｅをＭｅｔに、および８４番目のＬｅｕをＶａｌに置換するアミノ酸改変のうち、少なくとも１つの改変を導入した。

[0417] ＨＶ０ＬＶ０のＦＲに存在する、少なくとも１つのアミノ酸残基を改変したＫＭ４０９７ヒト化抗体の抗体Ｖ領域として、ＨＶ０ＬＶ０、ＨＶ０ＬＶ２、ＨＶ０ＬＶ３ａ、ＨＶ０ＬＶ３ｂ、ＨＶ０ＬＶ４、ＨＶ２ＬＶ０、ＨＶ２ＬＶ２、ＨＶ２ＬＶ３ａ、ＨＶ２ＬＶ３ｂ、ＨＶ２ＬＶ４、ＨＶ３ａＬＶ０、ＨＶ３ａＬＶ２、ＨＶ３ａＬＶ３ａ、ＨＶ３ａＬＶ３ｂ、ＨＶ３ａＬＶ４、ＨＶ３ｂＬＶ０、ＨＶ３ｂＬＶ２、ＨＶ３ｂＬＶ３ａ、ＨＶ３ｂＬＶ３ｂ、ＨＶ３ｂＬＶ４、ＨＶ４ＬＶ０、ＨＶ４ＬＶ２、ＨＶ４ＬＶ３ａ、ＨＶ４ＬＶ３ｂ、ＨＶ４ＬＶ４、ＨＶ５ａＬＶ０、ＨＶ５ａＬＶ２、ＨＶ５ａＬＶ３ａ、ＨＶ５ａＬＶ３ｂ、ＨＶ５ａＬＶ４、ＨＶ５ｂＬＶ０、ＨＶ５ｂＬＶ２、ＨＶ５ｂＬＶ３ａ、ＨＶ５ｂＬＶ３ｂ、ＨＶ５ｂＬＶ４、ＨＶ５ｃＬＶ０、ＨＶ５ｃＬＶ２、ＨＶ５ｃＬＶ３ａ、ＨＶ５ｃＬＶ３ｂ、ＨＶ５ｃＬＶ４、ＨＶ６ＬＶ０、ＨＶ６ＬＶ２、ＨＶ６ＬＶ３ａ、ＨＶ６ＬＶ３ｂ、ＨＶ６ＬＶ４、ＨＶ８ＬＶ０、ＨＶ８ＬＶ２、ＨＶ８ＬＶ３ａ、ＨＶ８ＬＶ３ｂ、ＨＶ８ＬＶ４、ＨＶ９ＬＶ０、ＨＶ９ＬＶ２、ＨＶ９ＬＶ３ａ、ＨＶ９ＬＶ３ｂ、ＨＶ９ＬＶ４、ＨＶ１０ＬＶ０、ＨＶ１０ＬＶ２、ＨＶ１０ＬＶ３ａ、ＨＶ１０ＬＶ３ｂ、およびＨＶ１０ＬＶ４をそれぞれ設計した。

[0418] Ｈ鎖可変領域ＨＶ２、ＨＶ３ａ，ＨＶ３ｂ，ＨＶ４、ＨＶ５ａ、ＨＶ５ｂ，ＨＶ５ｃ、ＨＶ６、ＨＶ８、ＨＶ９、ＨＶ１０およびＬ鎖可変領域ＬＶ２、ＬＶ３ａ、ＬＶ３ｂ、ＬＶ４のアミノ酸配列をそれぞれ図１２および図１３に示す。

OnCusp
Ex. 1038

[0419] （２）ＫＭ４０９７ヒト化抗体のＶＨおよびＶＬのｃＤＮＡ配列の設計

ＫＭ４０９７ヒト化抗体の可変領域のアミノ酸配列をコードするＤＮＡは、ＫＭ４０９７ＶＨおよびＫＭ４０９７ＶＬのアミノ酸配列をコードするＤＮＡ（配列番号２３、２５）で用いられているコドンを利用して設計し、アミノ酸改変を行う場合には、哺乳動物細胞で高頻度で使用されるコドンを用いて設計し、各々作製した。これらＤＮＡ配列を用いて、抗体発現ベクターの構築およびヒト化抗体の発現を行った。

[0420] （３）ＫＭ４０９７ヒト化抗体のＶＨをコードするｃＤＮＡの構築

本実施例（１）で設計したＫＭ４０９７ヒト化抗体のＶＨのアミノ酸配列ＫＭ４０９７ＨＶ０（配列番号２４）、および本実施例（１）の方法により設計した図１２に示されるＨＶ３ａ（配列番号２８）、ＨＶ４（配列番号３０）、ＨＶ５（配列番号３２）、ＨＶ１０（配列番号３４）をコードする、各ｃＤＮＡ（配列番号２３、２７、２９、３１、３３）を全合成にて作成した。

[0421] （４）ＫＭ４０９７ヒト化抗体のＶＬをコードするｃＤＮＡの構築

本実施例（１）で設計したＫＭ４０９７ヒト化抗体のＶＬのアミノ酸配列ＬＶ０（配列番号２６）、および本実施例（１）の方法により設計した図１３に示されるＬＶ２（配列番号３６）、ＬＶ４（配列番号３８）をコードする、各ｃＤＮＡ（配列番号２５、３５、３７）を全合成にて作成した。

[0422] （５）ＫＭ４０９７ヒト化抗体発現ベクターの構築

国際公開第９７／１０３５４号に記載のヒト化抗体発現用ベクターｐＫＡＮＴＥＸ９３の適当な位置に、本実施例（３）および（４）で得られたＨＶ０、ＨＶ３ａ、ＨＶ４、ＨＶ５、ＨＶ１０のいずれかをコードするｃＤＮＡ、およびＬＶ０、ＬＶ２、ＬＶ４のいずれかをコードするｃＤＮＡを挿入し、各種ＫＭ４０９７ヒト化抗体発現ベクターを構築した。

[0423] （６）動物細胞を用いたＫＭ４０９７ヒト化抗体の発現

本実施例（５）にて構築した動物細胞用の抗体発現ベクターの遺伝子導入には、ＣＨＯ－Ｋ１細胞（理化学研究所セルバンク寄託番号ＲＣＢ０４０３

）のα１，６－フコシルトランスフェラーゼ（ＦＵＴ８）遺伝子を破壊した株（以下、ＦＵＴ８ノックアウトＣＨＯ細胞）を使用した。

[0424] ＦＵＴ８ノックアウトＣＨＯ細胞を宿主細胞とし、ＦｒｅｅＳｔｙｌｅ™ ＭＡＸ ＣＨＯ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ Ｓｙｓｔｅｍ（ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）の説明書に基づいて、遺伝子導入から抗体の発現を行った。３１２．５μｇの発現ベクタープラスミドを、ＯｐｔｉＰｒｏ™ ＳＦＭ（ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）と混合して計５ｍＬとした。

[0425] ３１２．５μＬのＦｒｅｅＳｔｙｌｅ™ ＭＡＸ Ｔｒａｎｓｆｅｃｔｉｏｎ Ｒｅａｇｅｎｔ（ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）を、ＯｐｔｉＰｒｏ™ ＳＦＭと混合して計５ｍＬとした。発現ベクタープラスミド溶液と上記ＦｒｅｅＳｔｙｌｅ™ ＭＡＸ Ｔｒａｎｓｆｅｃｔｉｏｎ Ｒｅａｇｅｎｔ溶液を混合し、室温で１０分間静置した。ＦｒｅｅＳｔｙｌｅ™ ＣＨＯ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ Ｍｅｄｉｕｍ（ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）にて１．０×10^6 ｃｅｌｌｓ／ｍＬの密度で培養したＦＵＴ８ノックアウトＣＨＯ細胞 ２５０ｍＬに対し、上記ベクター溶液の全量を加えた後、３７℃、８％CO_2、１３５ｒｐｍの条件下で、５日～７日間浮遊旋回培養した。

[0426] 培養後、細胞懸濁液を３０００ ｒｐｍ、４℃の条件で２０分間の遠心分離に供して培養上清を回収し、０．２２μｍ孔径Ｍｉｌｌｅｘ ＧＶフィルターを通して濾過滅菌した。

[0427] （７）ＫＭ４０９７ヒト化抗体の精製

０．８ｃｍ径のカラムにＭａｂＳｅｌｅｃｔ ＳｕＲｅ（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ社製）０．５ｍＬを充填し、精製水 ３．０ｍＬ、０．１Ｍクエン酸緩衝液（ｐＨ ３．５）２．０ｍＬ、および１５０ｍＭ ＮａＣｌ，０．２Ｍホウ酸ナトリウム酸緩衝液（ｐＨ ７．５）１．５ｍＬを順次通塔し、担体の平衡化を行った。次に、本実施例（６）で回収した培養上清をカラムに通塔した後、１５０ｍＭ ＮａＣｌ，０．２Ｍホウ酸ナトリウム酸緩衝液（ｐＨ ７．５）５．０ｍＬで洗浄した。洗浄後、０．１Ｍクエン酸緩衝液（ｐＨ ３．５）２．０ｍＬを用いて担体に吸着した抗体の溶出を行っ

た。

[0428] 溶出は５００μＬずつ、４画分に分けて取得した。次に、得られた精製画分のＳＤＳ－ＰＡＧＥ解析を行い、抗体の溶出が確認された画分をまとめ、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ，１０ｍＭ　クエン酸Ｎａ溶液（ｐＨ６．０）を用いて、４℃で一昼夜透析を行った。透析後、抗Ｔｒｏｐ－２ＫＭ４０９７ヒト化抗体溶液を回収し、０．２２μｍ孔径Ｍｉｌｌｅｘ　ＧＶ（ＭＩＬＬＩＰＯＲＥ社）を用いて滅菌濾過した後に、２８０ｎｍの吸光度（ＯＤ２８０ｎｍ）を吸光光度計（ＳＨＩＭＡＤＺＵ　ＵＶ－１７００）を用いて測定し、各精製ＫＭ４０９７ヒト化抗体の濃度を算出した。

[0429] 以上より、抗体のＶＨがＨＶ０、ＶＬがＬＶ０から成るＨＶ０ＬＶ０、抗体のＶＨがＨＶ３ａ、ＶＬがＬＶ０から成るＨＶ３ａＬＶ０、抗体のＶＨがＨＶ４、ＶＬがＬＶ０から成るＨＶ４ＬＶ０、抗体のＶＨがＨＶ５、ＶＬがＬＶ０から成るＨＶ５ＬＶ０、抗体のＶＨがＨＶ１０、ＶＬがＬＶ２からなるＨＶ１０ＬＶ２、および抗体のＶＨがＨＶ１０、ＶＬがＬＶ４から成るＨＶ１０ＬＶ４、の６種類のＫＭ４０９７ヒト化抗体を作製した。

[0430] （８）ＫＭ４０９７ヒト化抗体のフコース含量測定

国際公開第２００２／３１１４０号に記載の方法に従い、本実施例（７）で作製した６種類のＫＭ４０９７ヒト化抗体に存在するＮ－結合複合型糖鎖のうち、フコースが結合していない糖鎖の割合を調べた。その結果、本実施例（７）で作製した６種類のＫＭ４０９７ヒト化抗体にはフコースが付加していないことが確認された。

[0431] ［実施例９］

ＫＭ４０９７ヒト化抗体の活性評価

実施例５で得たＫＭ４５９１ならびに、実施例８で得た６種類のＫＭ４０９７ヒト化抗体（ＨＶ０ＬＶ０、ＨＶ３ａＬＶ０、ＨＶ４ＬＶ０、ＨＶ５ＬＶ０、ＨＶ１０ＬＶ２、およびＨＶ１０ＬＶ４）の活性評価を行った。

[0432] （１）ビアコアによる組換えヒトＴｒｏｐ－２に対するＫＭ４０９７ヒト化抗体の結合活性評価

実施例３（２）と同様にして、ＫＭ４５９１ならびに、実施例８で得た６種類のＫＭ４０９７ヒト化抗体（ＨＶ０ＬＶ０、ＨＶ３ａＬＶ０、ＨＶ４ＬＶ０、ＨＶ５ＬＶ０、ＨＶ１０ＬＶ２、およびＨＶ１０ＬＶ４）の、ヒトＴｒｏｐ－２／Ｆｃ／Ｈｉｓ融合タンパク質（Ｒ＆Ｄ社）に対する親和性を評価した。

[0433] 各抗体のｋａ、ｋｄおよびK_D（ｋｄ／ｋａ）を表６に示す（２回の実験の平均値）。

[0434] [表6]

	ｋｄ（１／Ｍｓ）	ｋａ（１／ｓ）	K_D（ｎＭ）
ＫＭ４５９１	３．２３×１０^{5}	１．１３×１０$^{-4}$	０．３６
ＨＶ０ＬＶ０	３．３０×１０^{5}	１．６０×１０$^{-4}$	０．５３
ＨＶ３ａＬＶ０	５．０６×１０^{5}	１．６０×１０$^{-4}$	０．３０
ＨＶ４ＬＶ０	３．３５×１０^{5}	１．２６×１０$^{-4}$	０．４２
ＨＶ５ＬＶ０	３．８３×１０^{5}	１．９０×１０$^{-4}$	０．４９
ＨＶ１０ＬＶ２	３．７５×１０^{5}	１．４８×１０$^{-4}$	０．４０
ＨＶ１０ＬＶ４	３．４２×１０^{5}	１．１６×１０$^{-4}$	０．３７

[0435] 表６に示すように、全ての抗Ｔｒｏｐ－２ＫＭ４０９７ヒト化抗体（ＨＶ０ＬＶ０、ＨＶ３ａＬＶ０、ＨＶ４ＬＶ０、ＨＶ５ＬＶ０、ＨＶ１０ＬＶ２、およびＨＶ１０ＬＶ４）は、１×１０$^{-9}$Ｍ以下の高いアフィニティー（K_D）値を示した。うち５種類のＫＭ４０９７ヒト化抗体（ＨＶ３ａＬＶ０、ＨＶ４ＬＶ０、ＨＶ５ＬＶ０、ＨＶ１０ＬＶ２、およびＨＶ１０ＬＶ４）は、５×１０$^{-10}$Ｍ以下の高いK_D値を示した。

[0436] （２）ヒトＴｒｏｐ－２発現細胞株に対する抗Ｔｒｏｐ－２ヒト化抗体のＡＤＣＣ活性の評価

（２）－１　標的細胞懸濁液の調製

ヒトＴｒｏｐ－２のＣ末端側にｍｙｃタグおよびＨｉｓタグを付加した配列（配列番号４８）をコードするＤＮＡ（配列番号４９）をｐＫＡＮＴＥＸ９３の適当な部位に挿入することにより、タグ付加ヒトＴｒｏｐ－２発現ベクターを構築した。該発現ベクターをＣＨＯ／ＤＧ４４細胞に導入して得た形質転換株を本評価の標的細胞として用いた。標的細胞をＰＢＳで洗浄後、５％ウシ胎児血清（ＦＢＳ）（インビトロジェン社）を含むフェノールレッ

ド不含ＲＰＭＩ１６４０培地（インビトロジェン社）（以下、ＡＤＣＣ用培地と表記する）で洗浄し、同培地で至適の細胞密度に調製して標的細胞懸濁液とした。

[0437] （２）－２　エフェクター細胞懸濁液の調製

凍結状態より融解した末梢血単核球〔Ｐｅｒｉｐｈｅｒａｌ　ｂｌｏｏｄ　ｍｏｎｏｎｕｃｌｅａｒ　ｃｅｌｌ（ＰＢＭＣ）：ＡｌｌＣｅｌｌｓ社〕を、ＤＮａｓｅ　Ｉ（ロシュアプライドサイエンス社製）および１０％　ＦＢＳを含むＲＰＭＩ１６４０培地中に懸濁し、１５００ｒｐｍで１０分間遠心分離した。上清を除いた後、細胞をＤＮａｓｅ　Ｉおよび１０％　ＦＢＳを含むＲＰＭＩ１６４０培地中に懸濁し、３７℃で２０分間インキュベートした。該懸濁液を１５００ｒｐｍで１０分間遠心した後、上清を除き、さらに、ＡＤＣＣ用培地を用いて２回洗浄した。ＡＤＣＣ用培地により細胞を至適の密度に調製し、エフェクター細胞懸濁液とした。

[0438] （２）－３　ＡＤＣＣ活性の測定

９６ウェルＵ底プレート（ＦＡＬＣＯＮ社）の各ウェルに、３μｇ／ｍＬから段階的に１０倍希釈した各抗体溶液を５０μＬ／ウェル分注した。次に、（２）－１で調製した標的細胞懸濁液を1×10^{4}個／５０μＬ／ウェル分注し、さらに（２）－２で調製したエフェクター細胞懸濁液を2.5×10^{5}個／５０μＬ／ウェル分注して全量を１５０μＬ／ウェルとした後、３７℃で２４時間反応させた。本系でのエフェクター細胞（Ｅ）と標的細胞（Ｔ）の比は２５：１とした。反応後、ＬＤＨ　Ｃｙｔｏｔｏｘｉｃ　Ｔｅｓｔ（和光純薬社）を用いて各培養上清の発色を測定した。

[0439] ＡＤＣＣ活性は次式により算出した。その結果を図１９に示す。

[0440] （式）

ＡＤＣＣ活性（％）＝｛（［検体の吸光度］－［標的細胞自然遊離の吸光度］－［エフェクター細胞自然遊離の吸光度］）／（［標的細胞全遊離の吸光度］－［標的細胞自然遊離の吸光度］）｝×１００

[0441] 図１９に示すように、作製したヒト化抗体ＨＶ３ａＬＶ０、ＨＶ４ＬＶ０

はＫＭ４５９１と同程度のＡＤＣＣ活性を示した。

[0442] 本発明を特定の態様を用いて詳細に説明したが、本発明の意図と範囲を離れることなく様々な変更および変形が可能であることは、当業者にとって明らかである。なお本出願は、２０１０年６月１０日付で出願された米国仮出願（６１／３５３４３０）に基づいており、その全体が引用により援用される。

産業上の利用可能性

[0443] 本発明によれば、高いアフィニティーでヒトＴｒｏｐ－２の細胞外領域に結合し、かつ高い抗体依存的細胞傷害活性（ａｎｔｉｂｏｄｙ－ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ　ｃｅｌｌｕｌａｒ　ｃｙｔｏｔｏｘｉｃｉｔｙ、以下ＡＤＣＣ活性と記す）、高い抗腫瘍活性を発揮するモノクローナル抗体またはその抗体断片、該抗体を産生するハイブリドーマ、該抗体をコードするＤＮＡ、該ＤＮＡを含むベクター、該ベクターを導入して得られる形質転換体、該ハイブリドーマまたは該形質転換体を用いる抗体または該抗体断片の製造方法、抗体または該抗体断片を用いる治療薬および診断薬を提供することができる。

配列表フリーテキスト

[0444] 配列番号１：ヒトＴｒｏｐ－２アミノ酸配列

配列番号２：ヒトＴｒｏｐ－２塩基配列

配列番号３：ＡＲ４７Ａ６．４．２ＶＨ塩基配列

配列番号４：ＡＲ４７Ａ６．４．２ＶＬ塩基配列

配列番号５：マウスＩｇＧ１プライマーｍＧ１ａ１塩基配列

配列番号６：マウスＩｇＧ１プライマーｍＧ１ａ２塩基配列

配列番号７：マウスκ鎖プライマーＫａ１塩基配列

配列番号８：マウスκ鎖プライマーＫａ２塩基配列

配列番号９：ＫＭ４０９７ＶＨ塩基配列

配列番号１０：ＫＭ４０９７ＶＨアミノ酸配列

配列番号１１：ＫＭ４０９７ＶＬ塩基配列

配列番号１２：ＫＭ４０９７ＶＬアミノ酸配列

配列番号１３：ＫＭ４０９７ＶＨＣＤＲ１アミノ酸配列

配列番号１４：ＫＭ４０９７ＶＨＣＤＲ２アミノ酸配列

配列番号１５：ＫＭ４０９７ＶＨＣＤＲ３アミノ酸配列

配列番号１６：ＫＭ４０９７ＶＬＣＤＲ１アミノ酸配列

配列番号１７：ＫＭ４０９７ＶＬＣＤＲ２アミノ酸配列

配列番号１８：ＫＭ４０９７ＶＬＣＤＲ３アミノ酸配列

配列番号１９：ＫＭ４０９７キメラ抗体作製用ＶＨ鎖増幅フォワードプライマー塩基配列

配列番号２０：ＫＭ４０９７キメラ抗体作製用ＶＨ鎖増幅リバースプライマー塩基配列

配列番号２１：ＫＭ４０９７キメラ抗体作製用ＶＬ鎖増幅フォワードプライマー塩基配列

配列番号２２：ＫＭ４０９７キメラ抗体作製用ＶＬ鎖増幅リバースプライマー塩基配列

配列番号２３：ＫＭ４０９７　ＨＶ０可変領域塩基配列

配列番号２４：ＫＭ４０９７　ＨＶ０可変領域アミノ酸配列

配列番号２５：ＫＭ４０９７　ＬＶ０可変領域塩基配列

配列番号２６：ＫＭ４０９７　ＬＶ０可変領域アミノ酸配列

配列番号２７：ＫＭ４０９７　ＨＶ３ａ可変領域塩基配列

配列番号２８：ＫＭ４０９７　ＨＶ３ａ可変領域アミノ酸配列

配列番号２９：ＫＭ４０９７　ＨＶ４可変領域塩基配列

配列番号３０：ＫＭ４０９７　ＨＶ４可変領域アミノ酸配列

配列番号３１：ＫＭ４０９７　ＨＶ５可変領域塩基配列

配列番号３２：ＫＭ４０９７　ＨＶ５可変領域アミノ酸配列

配列番号３３：ＫＭ４０９７　ＨＶ１０可変領域塩基配列

配列番号３４：ＫＭ４０９７　ＨＶ１０可変領域アミノ酸配列

配列番号３５：ＫＭ４０９７　ＬＶ２可変領域塩基配列

配列番号３６：ＫＭ４０９７　ＬＶ２可変領域アミノ酸配列

配列番号３７：ＫＭ４０９７　ＬＶ４可変領域塩基配列

配列番号３８：ＫＭ４０９７　ＬＶ４可変領域アミノ酸配列

配列番号３９：ＦＬＡＧタグおよびＦｃの塩基配列

配列番号４０：Ｔｒｏｐ－２細胞外領域にシグナル配列を付加した塩基配列

配列番号４１：Ｍｕｔａｎｔ　ＡよりＦＬＡＧタグおよびＦｃ領域を除いた塩基配列

配列番号４２：Ｍｕｔａｎｔ　ＢよりＦＬＡＧタグおよびＦｃ領域を除いた塩基配列

配列番号４３：Ｍｕｔａｎｔ　ＣよりＦＬＡＧタグおよびＦｃ領域を除いた塩基配列

配列番号４４：Ｔｒｏｐ－２／ＦＬＡＧ／Ｆｃアミノ酸配列

配列番号４５：Ｍｕｔａｎｔ　Ａアミノ酸配列

配列番号４６：Ｍｕｔａｎｔ　Ｂアミノ酸配列

配列番号４７：Ｍｕｔａｎｔ　Ｃアミノ酸配列

配列番号４８：Ｃ末端タグ付加ヒトＴｒｏｐ－２アミノ酸配列

配列番号４９：Ｃ末端タグ付加ヒトＴｒｏｐ－２塩基配列

OnCusp
Ex. 1038

請求の範囲

[請求項1] ヒトＴｒｏｐ－２の細胞外領域のうち、少なくともドメインＩに結合するヒトＴｒｏｐ－２に対するモノクローナル抗体または該抗体断片。

[請求項2] 配列番号１で表されるアミノ酸配列のうち、３４番目～７２番目の少なくとも１つのアミノ酸に結合する請求項１に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

[請求項3] 抗体の抗原に対する解離定数（K_D）が５×１０$^{-10}$Ｍ以下である請求項１または２に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

[請求項4] 高いＡＤＣＣ活性および抗腫瘍活性を有する請求項１～３のいずれか１項に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

[請求項5] ＣＤＲ１～３がそれぞれ配列番号１３～１５で表されるアミノ酸配列を含む抗体のＨ鎖を含み、かつＣＤＲ１～３がそれぞれ配列番号１６～１８で表されるアミノ酸配列である抗体のＬ鎖を含む、請求項１～４のいずれか１項に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

[請求項6] 配列番号１０で表されるアミノ酸配列を含むＶＨを含み、かつ配列番号１２で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む抗体が結合するＴｒｏｐ－２の細胞外領域に存在するエピトープと、同じエピトープに結合するモノクローナル抗体または該抗体断片。

[請求項7] 請求項５または６に記載の抗体と競合してＴｒｏｐ－２の細胞外領域に結合するモノクローナル抗体または該抗体断片。

[請求項8] 遺伝子組換え抗体である、請求項１～７のいずれか１項に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

[請求項9] ヒト型キメラ抗体、ヒト化抗体およびヒト抗体から選ばれる遺伝子組換え抗体である、請求項８に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

[請求項10] ヒト化抗体であって、以下の（ａ）ＶＨおよび（ｂ）ＶＬの少なくとも一方を含む請求項９に記載のモノクローナル抗体または該抗体断

片。

（ａ）配列番号２４で表されるアミノ酸配列、または配列番号２４で表されるアミノ酸配列の９番目のＡｌａをＰｒｏに、１２番目のＬｙｓをＶａｌに、２０番目のＶａｌをＩｌｅに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、７０番目のＩｌｅをＬｅｕに、９５番目のＴｙｒをＰｈｅに、および１１２番目のＶａｌをＬｅｕに置換するアミノ酸改変のうち、少なくとも１つの改変を行ったアミノ酸配列含むＶＨ。

（ｂ）配列番号２６で表されるアミノ酸配列、または配列番号２６で表されるアミノ酸配列の１５番目のＬｅｕをＡｌａに、１９番目のＡｌａをＶａｌに、２１番目のＩｌｅをＭｅｔに、および８４番目のＬｅｕをＶａｌに置換するアミノ酸改変のうち、少なくとも１つの改変を行ったアミノ酸配列を含むＶＬ。

［請求項11］　以下の（１）～（５）から選ばれる請求項１０に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

（１）配列番号２８で表されるアミノ酸配列を含む抗体のＶＨおよび配列番号２６で表されるアミノ酸配列を含む抗体のＶＬの少なくとも一方を含むヒト化抗体

（２）配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含む抗体のＶＨおよび配列番号２６で表されるアミノ酸配列を含む抗体のＶＬの少なくとも一方を含むヒト化抗体

（３）配列番号３２で表されるアミノ酸配列を含む抗体のＶＨおよび配列番号２６で表されるアミノ酸配列を含む抗体のＶＬの少なくとも一方を含むヒト化抗体

（４）配列番号３４で表されるアミノ酸配列を含む抗体のＶＨおよび配列番号３６で表されるアミノ酸配列を含む抗体のＶＬの少なくとも一方を含むヒト化抗体

（５）配列番号３４で表されるアミノ酸配列を含む抗体のＶＨおよび配列番号３８で表されるアミノ酸配列を含む抗体のＶＬの少なくとも一方を含むヒト化抗体

[請求項12] Ｆａｂ、Ｆａｂ’、（Ｆａｂ’）$_2$、一本鎖抗体（ｓｃＦｖ）、二量体化Ｖ領域（Ｄｉａｂｏｄｙ）、ジスルフィド安定化Ｖ領域（ｄｓＦｖ）およびＣＤＲを含むペプチドから選ばれる抗体断片である、請求項１～１１のいずれか１項に記載の抗体断片。

[請求項13] 請求項１～１２のいずれか１項に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片をコードするＤＮＡ。

[請求項14] 請求項１３に記載のＤＮＡを含有する組換え体ベクター。

[請求項15] 請求項１４に記載の組換え体ベクターを宿主細胞に導入して得られる形質転換株。

[請求項16] 請求項１４に記載の形質転換株を培地に培養し、培養物中に請求項１～１２のいずれか１項に記載の抗体または該抗体断片を精製蓄積させ、培養物から該抗体または該抗体断片を採取することを特徴とする請求項１～１２のいずれか１項に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片の製造方法。

[請求項17] 請求項１～１２のいずれか１項に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片を含むヒトＴｒｏｐ－２の検出または測定用試薬。

[請求項18] 請求項１～１２のいずれか１項に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片を有効成分として含有するヒトＴｒｏｐ－２陽性細胞が関与する疾患の診断薬。

[請求項19] ヒトＴｒｏｐ－２陽性細胞が関与する疾患が癌である、請求項１８に記載の診断薬。

[請求項20] 請求項１～１２のいずれか１項に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片を有効成分として含有するヒトＴｒｏｐ－２陽性細胞が関与する疾患の治療薬。

[請求項21] ヒトＴｒｏｐ－２陽性細胞が関与する疾患が癌である、請求項２０

に記載の治療薬。

［請求項22］　請求項１～１２のいずれか１項に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片を用いてヒトＴｒｏｐ－２陽性細胞を検出または測定することを含む、ヒトＴｒｏｐ－２陽性細胞が関与する疾患の診断方法。

［請求項23］　請求項１～１２のいずれか１項に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片を用いてヒトＴｒｏｐ－２を検出または測定することを含む、ヒトＴｒｏｐ－２陽性細胞が関与する疾患の診断方法。

［請求項24］　ヒトＴｒｏｐ－２陽性細胞が関与する疾患が癌である、請求項２２または２３に記載の診断方法。

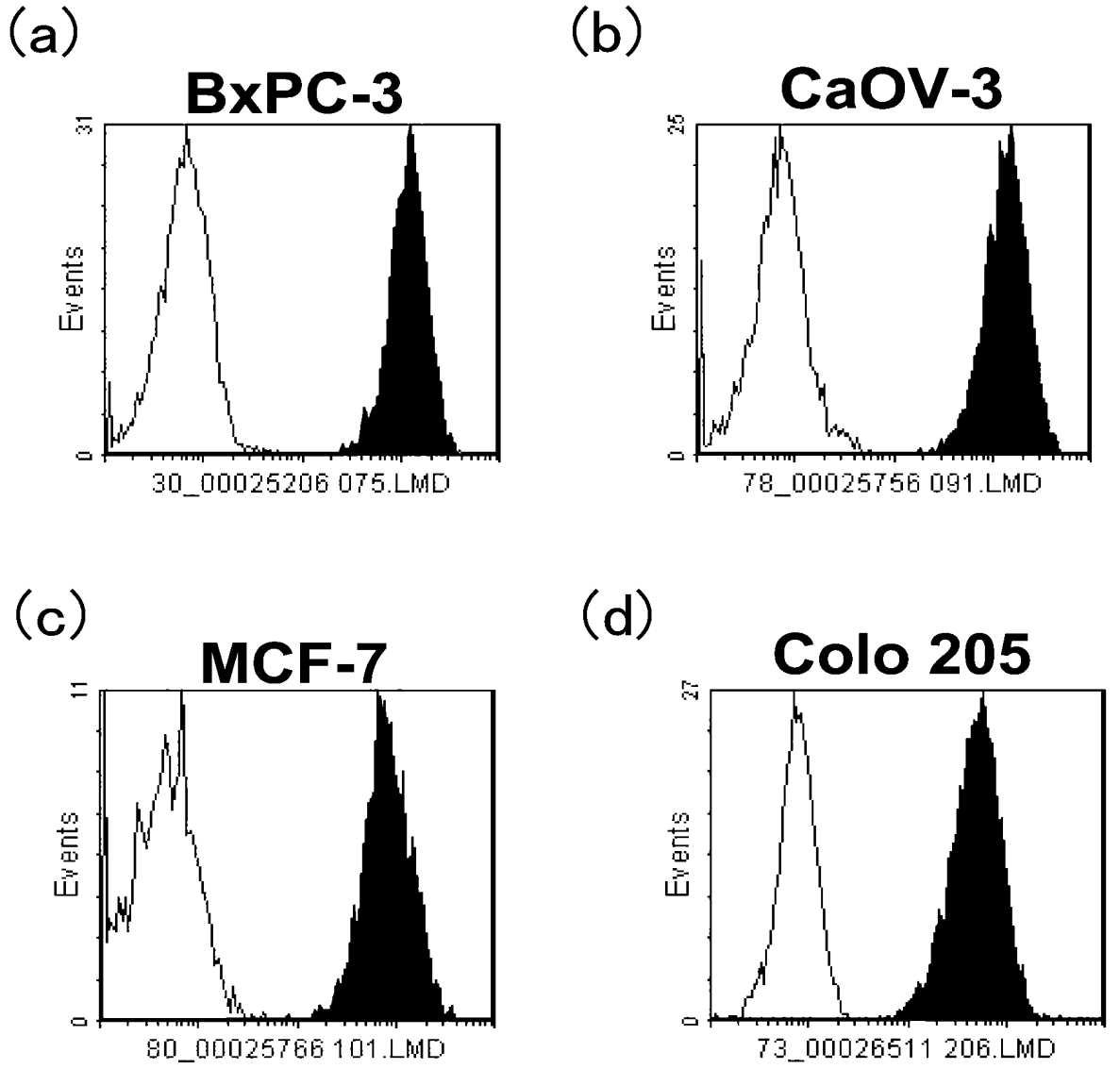
［請求項25］　ヒトＴｒｏｐ－２陽性細胞が関与する疾患の診断薬を製造するための、請求項１～１２のいずれか１項に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片の使用。

［請求項26］　ヒトＴｒｏｐ－２陽性細胞が関与する疾患が癌である、請求項２５に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片の使用。

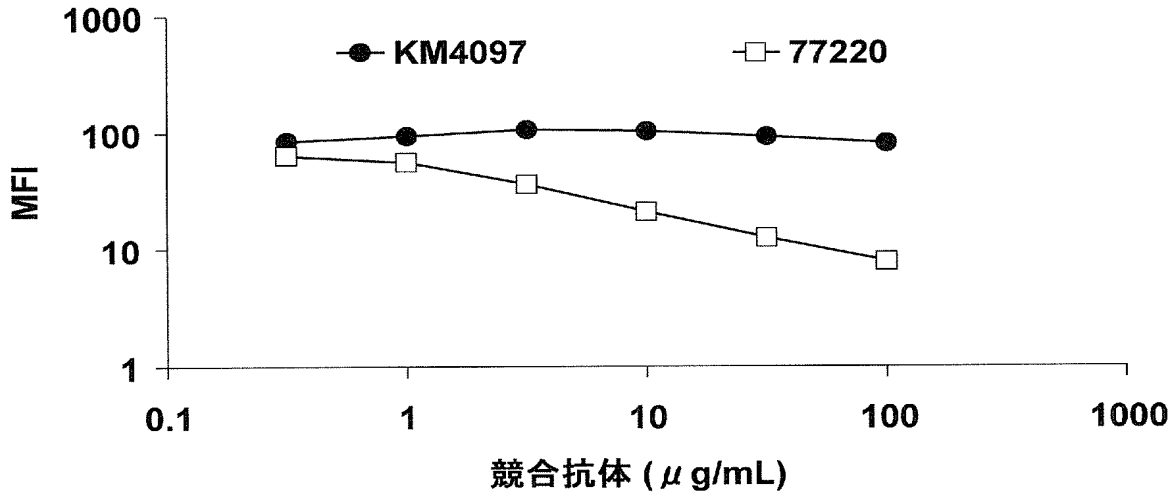
［請求項27］　ヒトＴｒｏｐ－２陽性細胞が関与する疾患の治療薬を製造するための、請求項１～１２のいずれか１項に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片の使用。

［請求項28］　ヒトＴｒｏｐ－２陽性細胞が関与する疾患が癌である、請求項２７に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片の使用。

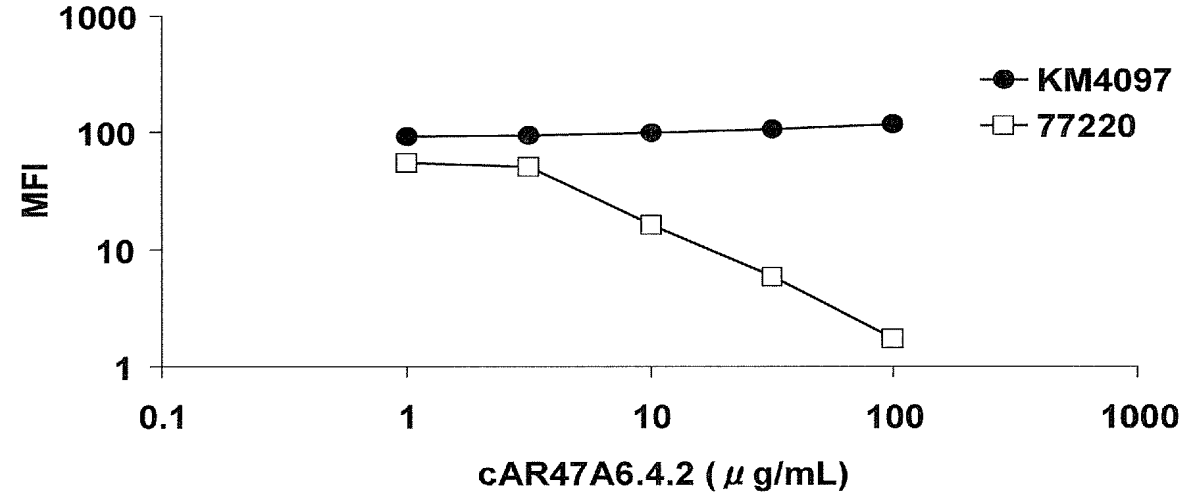
[図1]


(a)
BxPC-3
Events
31
0
30_00025206 075.LMD
(b)
CaOV-3
Events
25
0
78_00025756 091.LMD
(c)
MCF-7
Events
11
0
80_00025786 101.LMD
(d)
Colo 205
Events
27
0
73_00026511 206.LMD

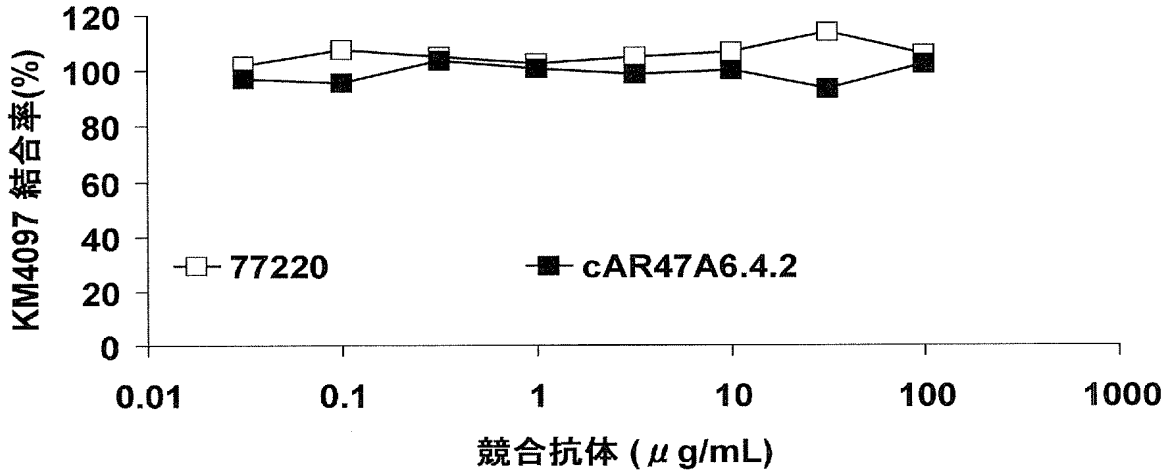
[図2]


1000
100
10
1
MFI
KM4097
77220
0.1
1
10
100
1000
競合抗体 (μg/mL)

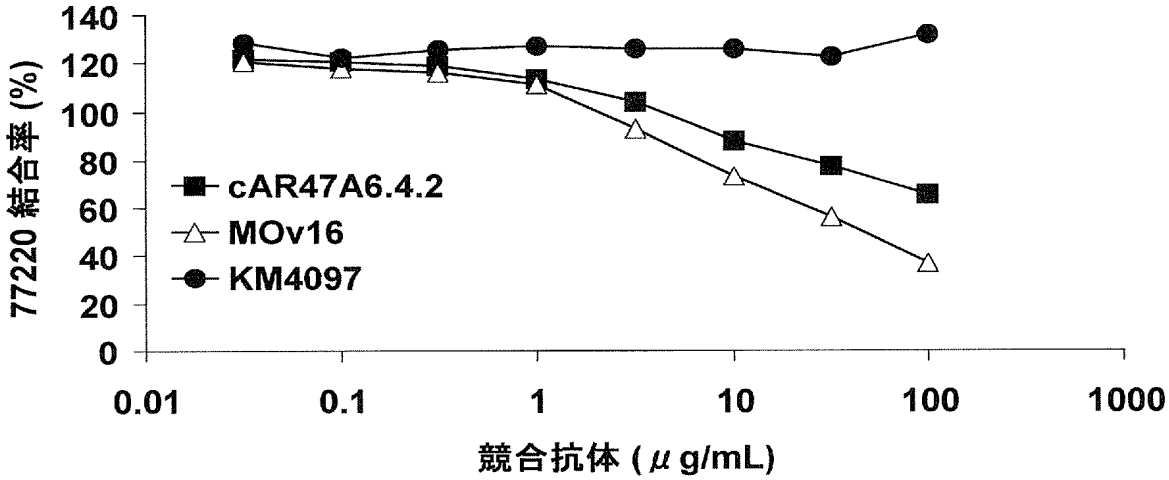
[図3]


1000
100
10
1
MFI
KM4097
77220
0.1
1
10
100
1000
cAR47A6.4.2 (μg/mL)

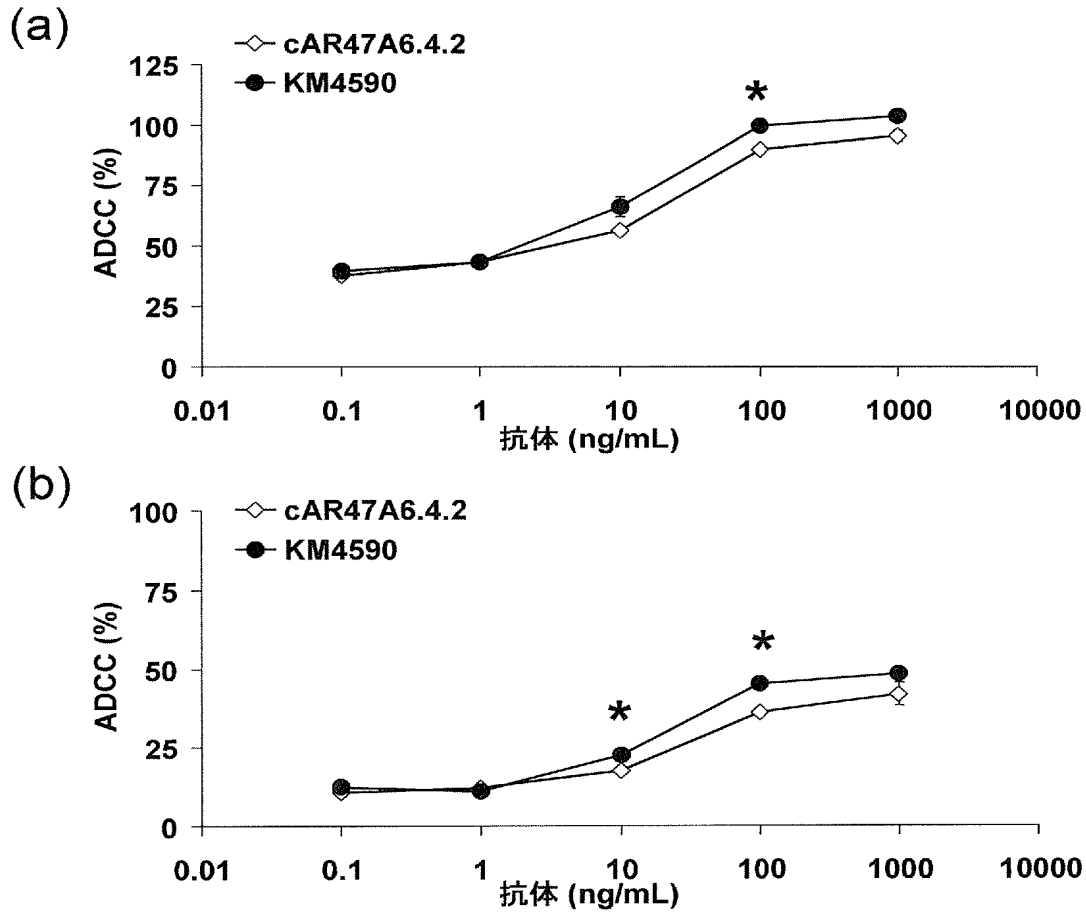
[図4]


120
100
80
60
40
20
0
KM4097 結合率(%)
77220
cAR47A6.4.2
0.01
0.1
1
10
100
1000
競合抗体 (μg/mL)

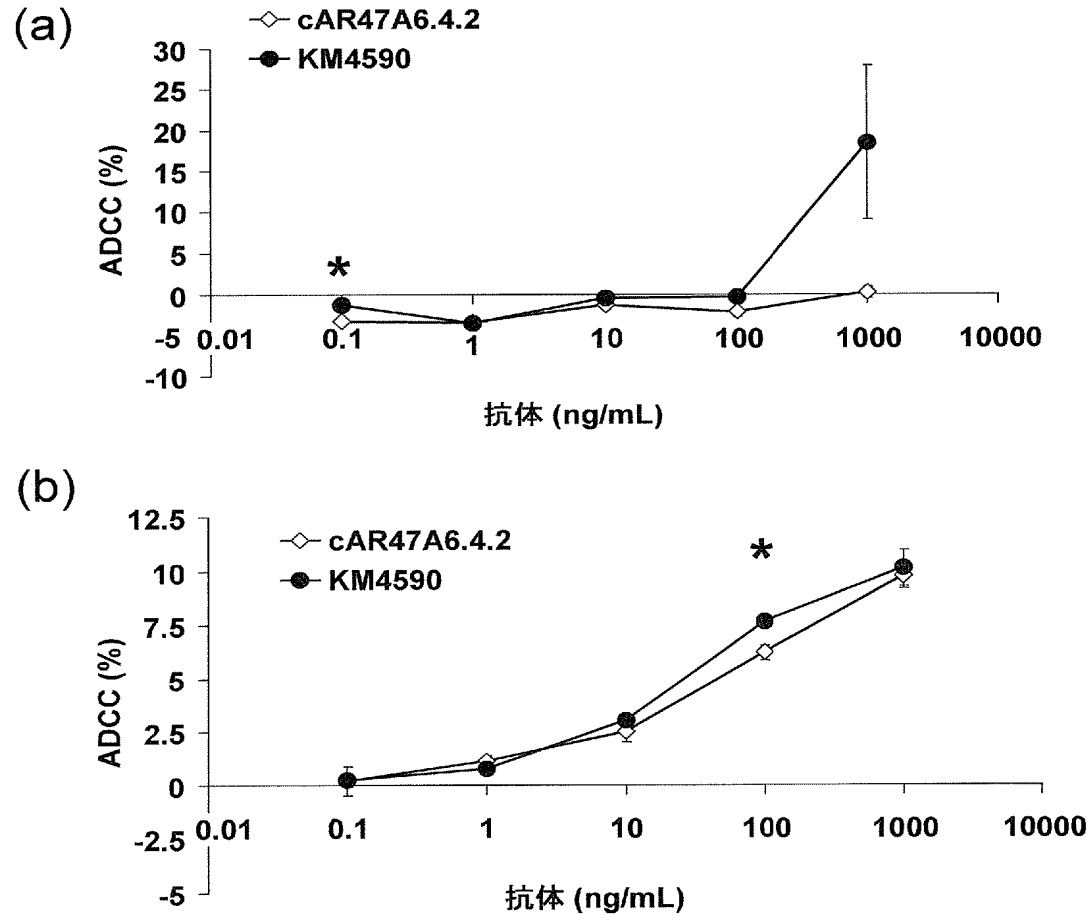
[図5]


140
120
100
80
60
40
20
0
77220 結合率 (%)
cAR47A6.4.2
MOv16
KM4097
0.01
0.1
1
10
100
1000
競合抗体 (μg/mL)

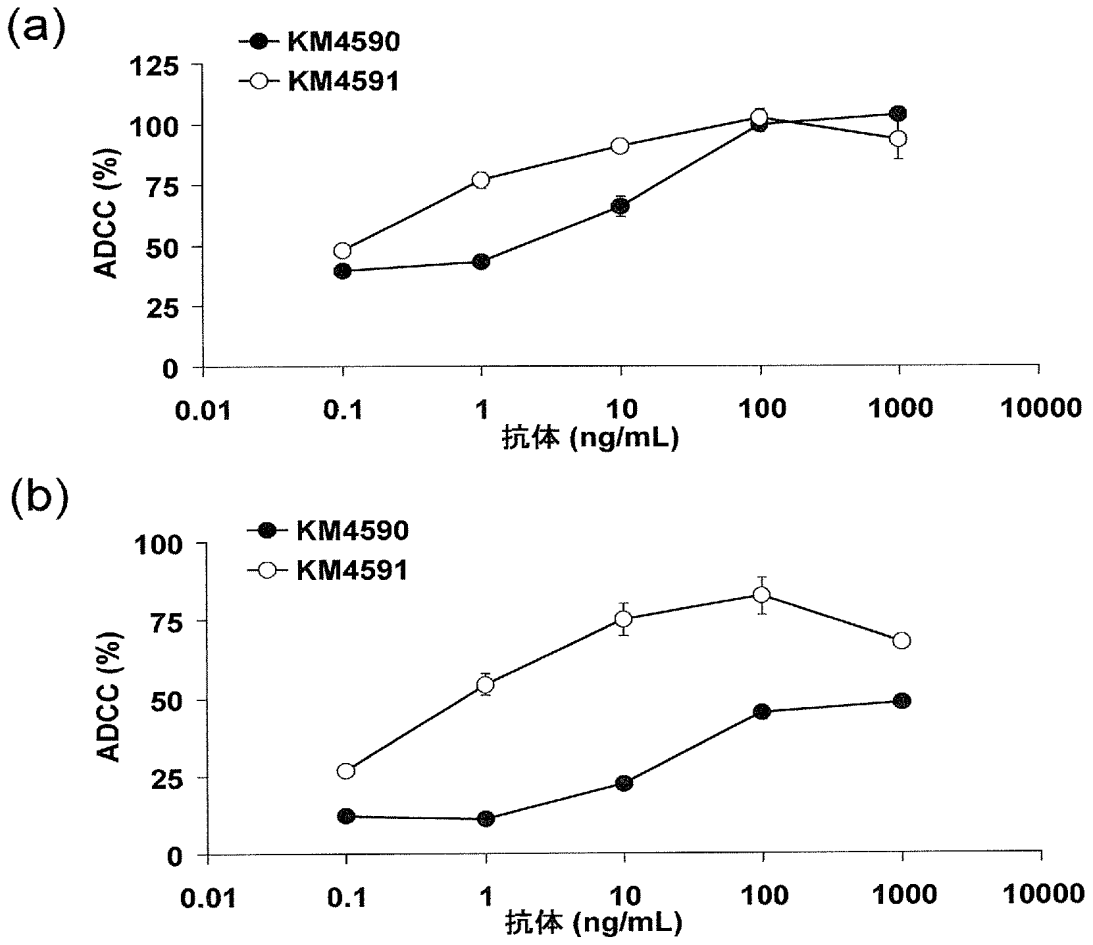
[図6]


(a)
cAR47A6.4.2
KM4590
ADCC (%)
125
100
75
50
25
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
抗体 (ng/mL)
*
(b)
cAR47A6.4.2
KM4590
ADCC (%)
100
75
50
25
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
抗体 (ng/mL)
*
*

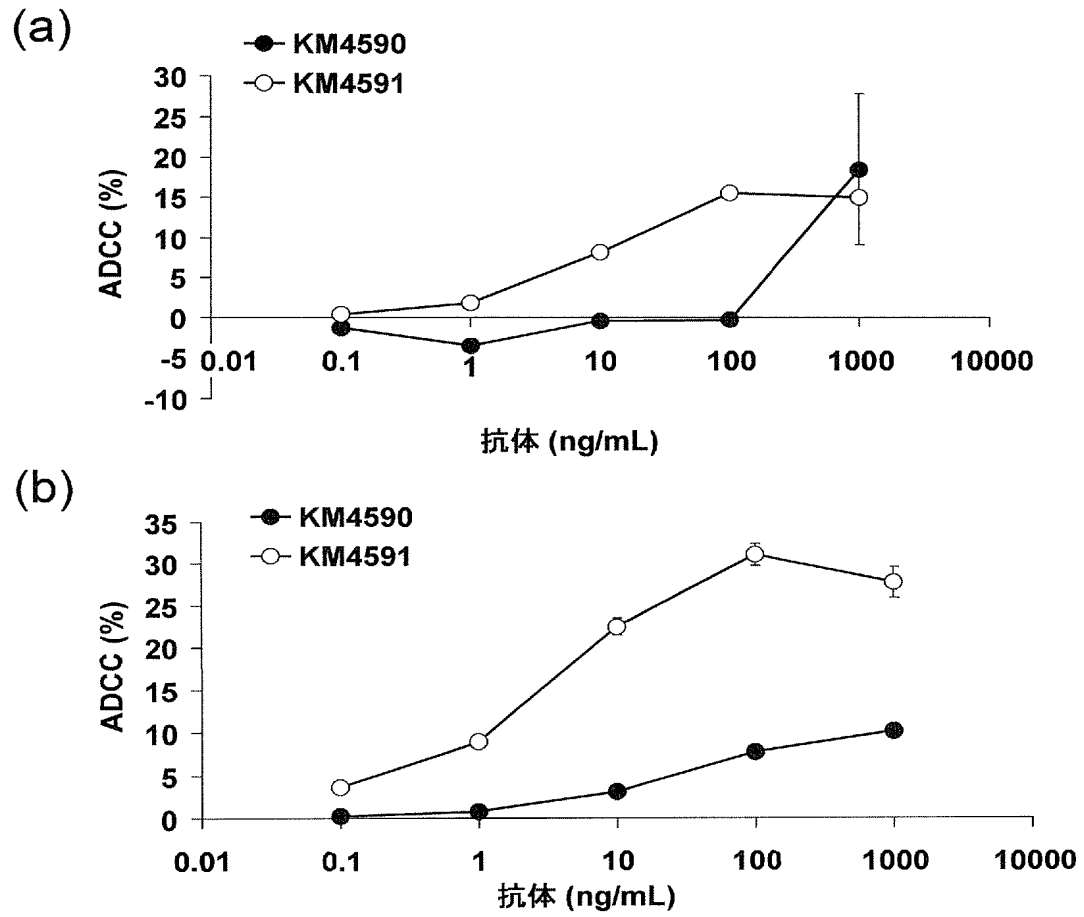
[図7]


(a)
cAR47A6.4.2
KM4590
ADCC (%)
30
25
20
15
10
5
0
-5
-10
*
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
抗体 (ng/mL)
(b)
cAR47A6.4.2
KM4590
ADCC (%)
12.5
10
7.5
5
2.5
0
-2.5
-5
*
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
抗体 (ng/mL)

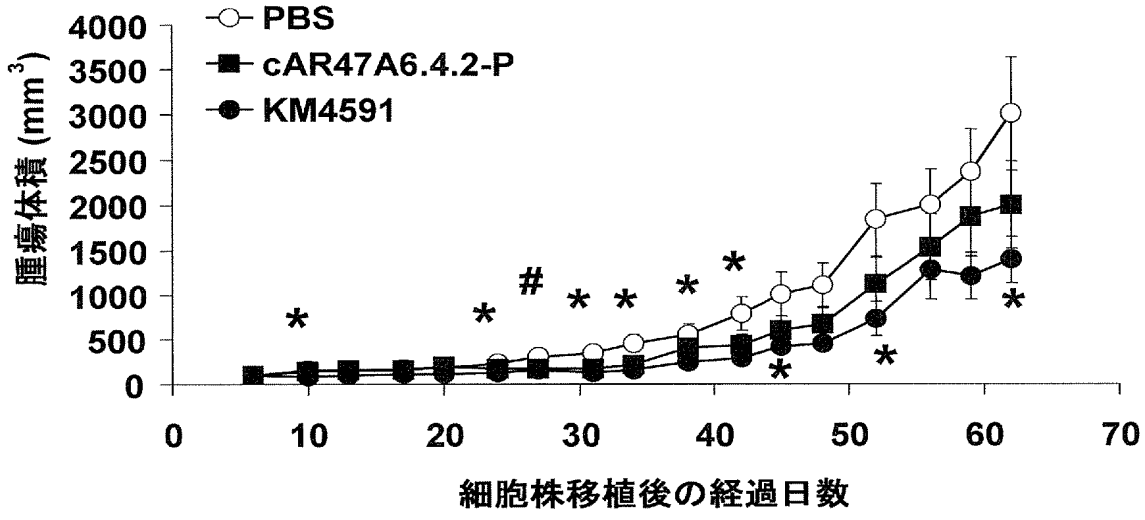
[図8]


(a)
KM4590
KM4591
ADCC (%)
125
100
75
50
25
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
抗体 (ng/mL)
(b)
KM4590
KM4591
ADCC (%)
100
75
50
25
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
抗体 (ng/mL)

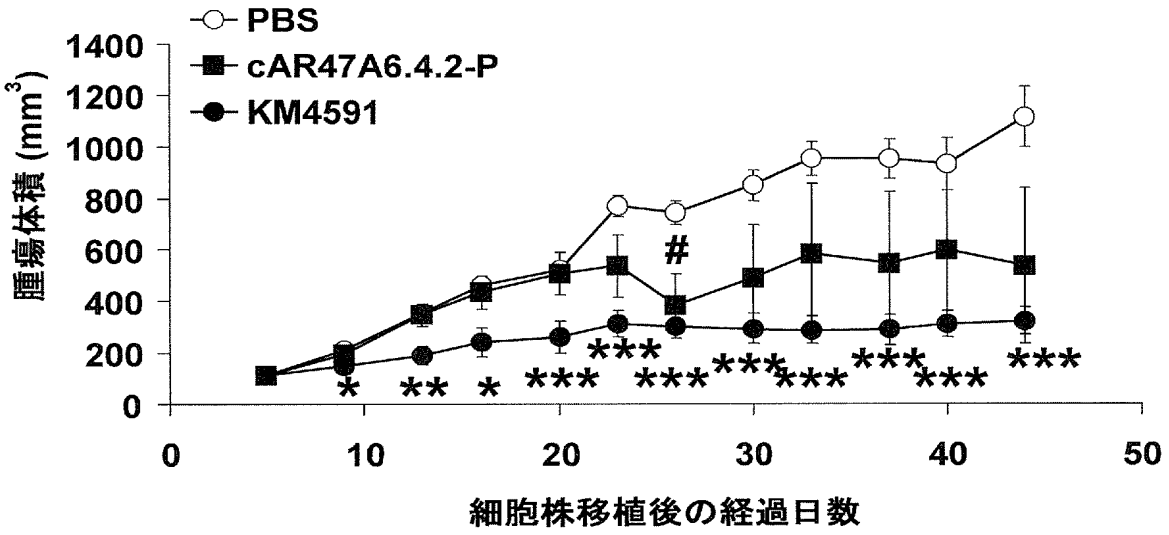
[図9]


(a)
KM4590
KM4591
ADCC (%)
30
25
20
15
10
5
0
-5
-10
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
抗体 (ng/mL)
(b)
KM4590
KM4591
ADCC (%)
35
30
25
20
15
10
5
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
抗体 (ng/mL)

[図10]


PBS
cAR47A6.4.2-P
KM4591
腫瘍体積 (mm3)
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
40
50
60
70
細胞株移植後の経過日数

[図11]



[図12]

	1	2	3	4	5	6
	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890
KM4097HV0	QVQLVQSGAE	VKKPGASVKV	SCKASGYTFT	IYWLGWVRQA	PGQGLEWMGN	IFPGSAYINY
KM4097HV2				K	I	
KM4097HV3a	P					
KM4097HV3b				K	I	
KM4097HV4	P			K	I	
KM4097HV5a	P					
KM4097HV5b	P			K	I	
KM4097HV5c				K	I	
KM4097HV6	P			K	I	
KM4097HV8	P	I		K	I	
KM4097HV9	P V	I		K	I	
KM4097HV10	P V	I		K	I	

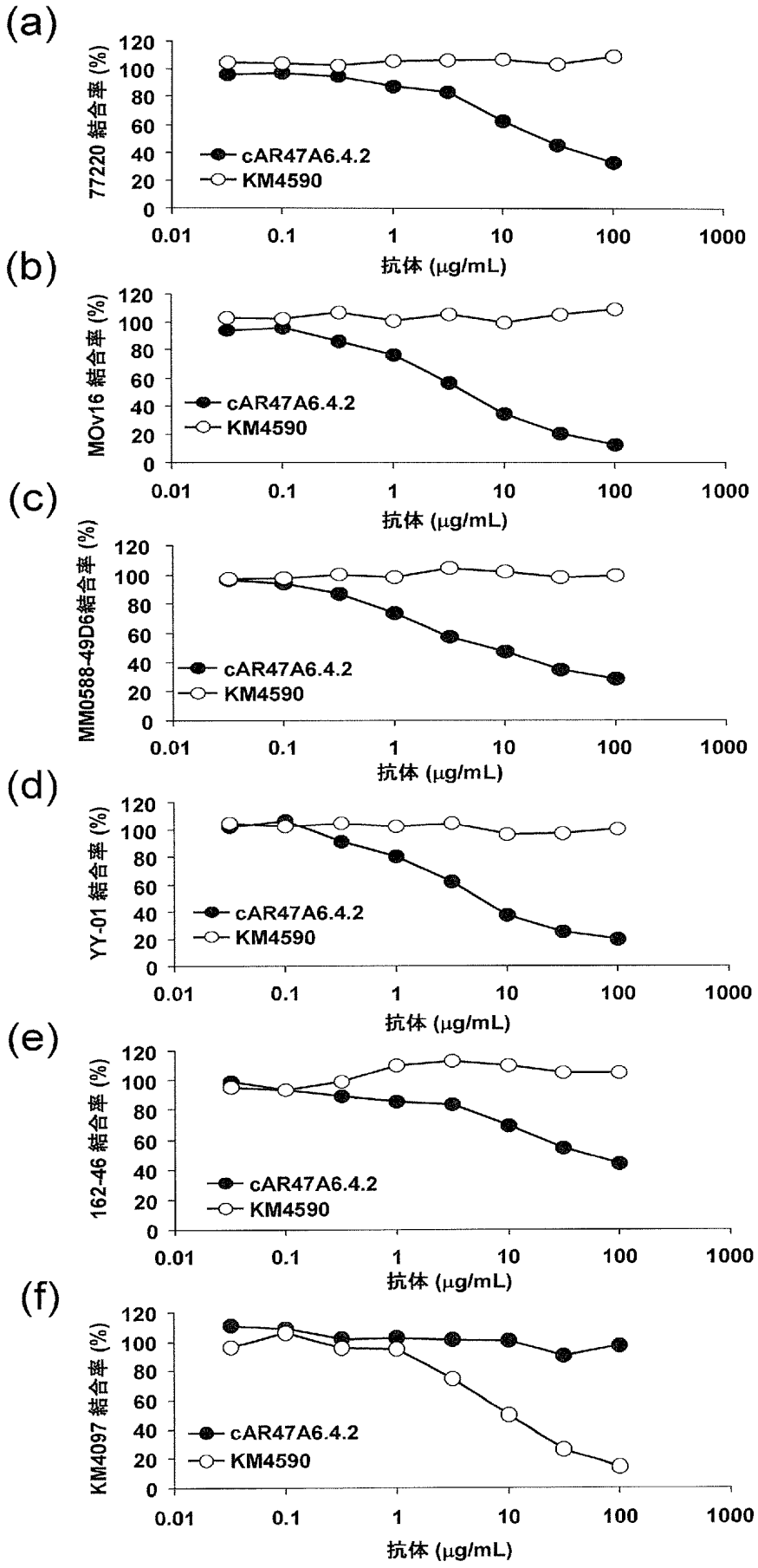
	7	8	9	10	11	
	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	123456
KM4097HV0	NEKFKGRVTI	TADTSTSTAY	MELSSLRSED	TAVYYCAREG	SNSGYWGQGT	LVTVSS
KM4097HV2						
KM4097HV3a	K			F		
KM4097HV3b				F		
KM4097HV4				F		
KM4097HV5a	KA L			F		
KM4097HV5b	K			F		
KM4097HV5c	KA			F		
KM4097HV6	KA			F		
KM4097HV8	KA L			F		
KM4097HV9	KA L			F		
KM4097HV10	KA L			F		L

[図13]

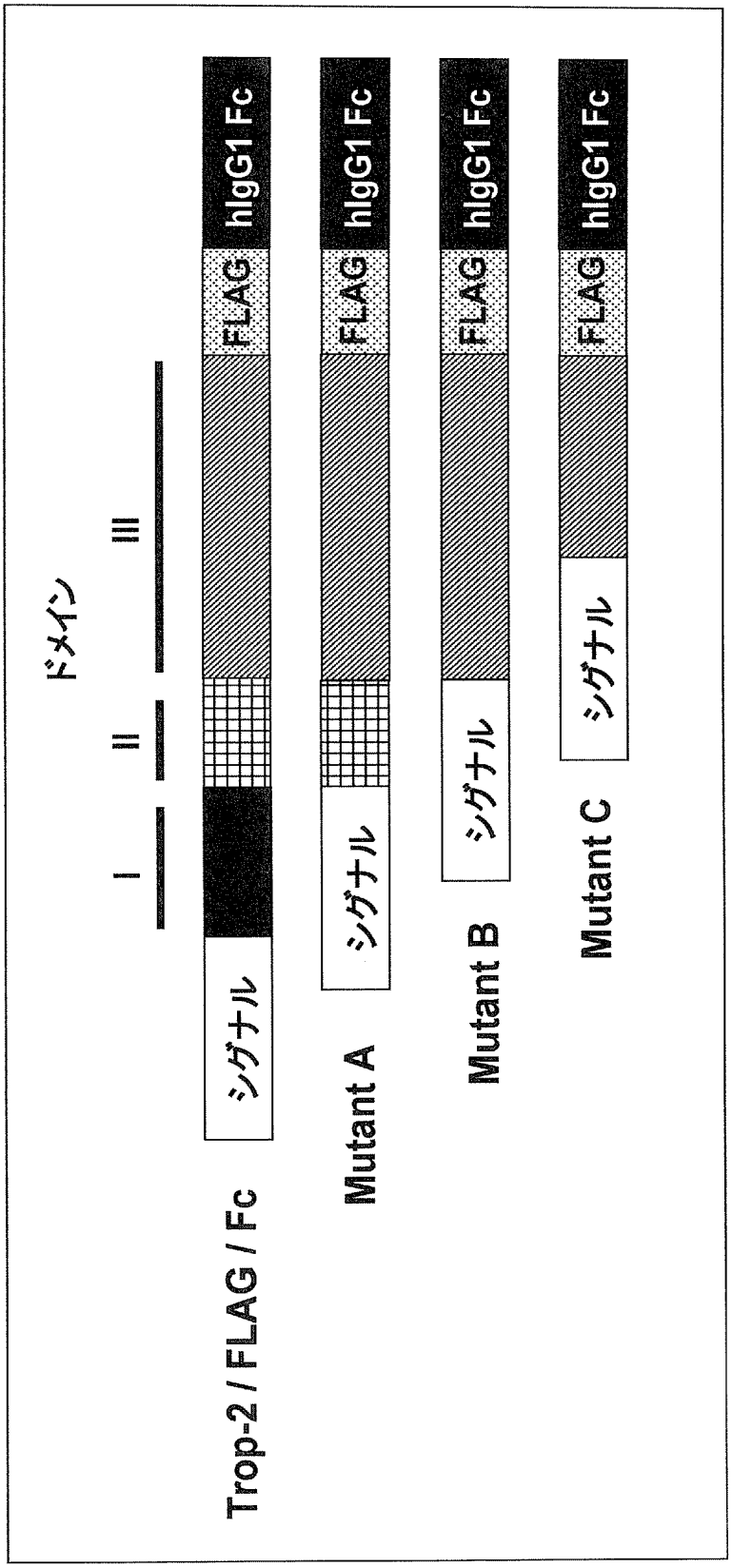
	1	2	3	4	5	6
	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890
KM4097LV0	DIVMTQSPDS	LAVSLGERAT	INCKSSQSLL	NSGNQQNYLA	WYQQKPGQPP	KLLIYGASTR
KM4097LV2		V				
KM4097LV3a		A V				
KM4097LV3b		V	M			
KM4097LV4		A V	M			

	7	8	9	10	11	
	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	123
KM4097LV0	ESGVPDRFSG	SGSGTDFTLT	ISSLQAEDVA	VYYCQSDHIY	PYTFGQGTKL	EIK
KM4097LV2			V			
KM4097LV3a			V			
KM4097LV3b			V			
KM4097LV4			V			

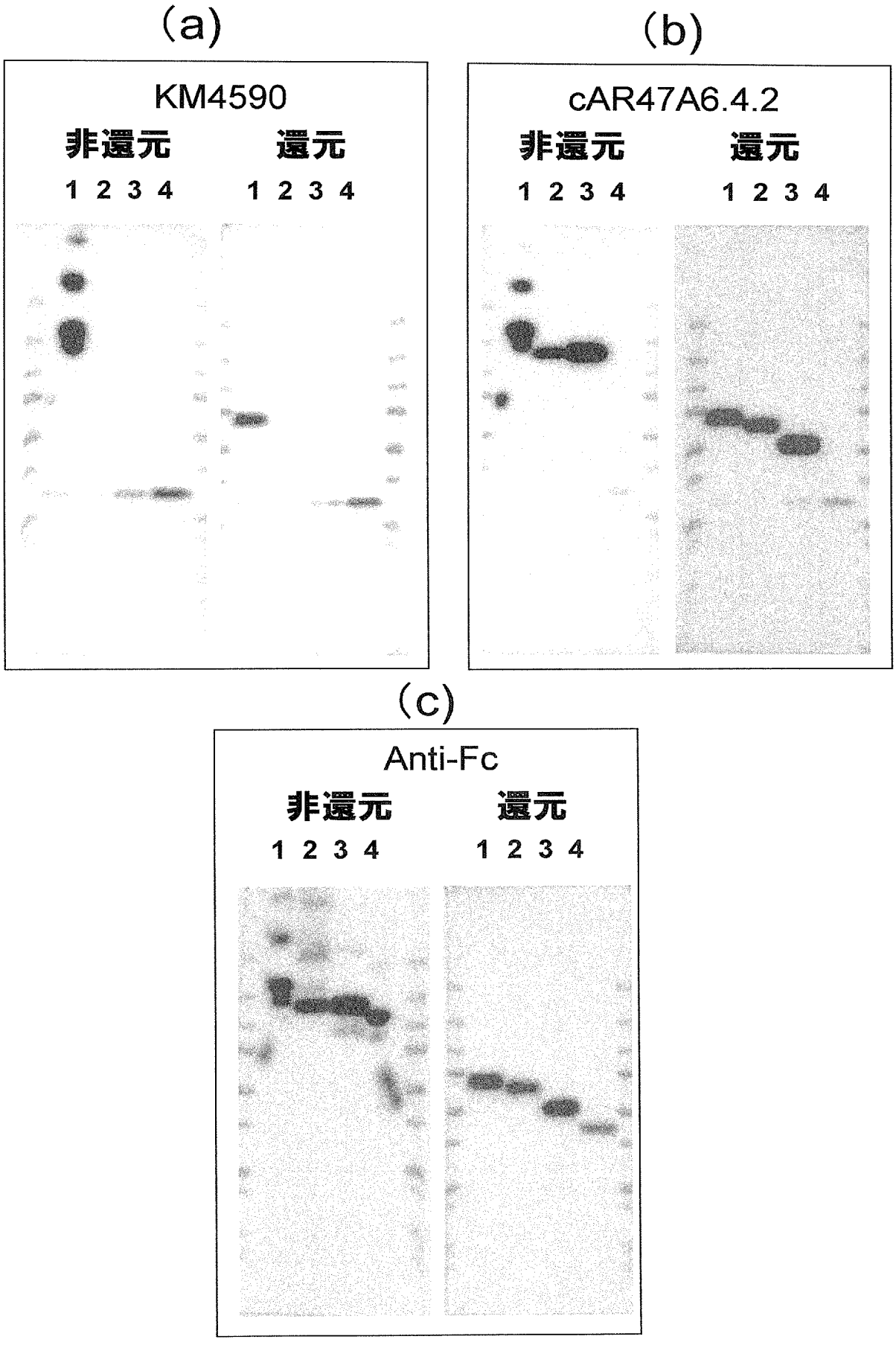
[図14]


(a)
77220 結合率 (%)
cAR47A6.4.2
KM4590
抗体 (μg/mL)
(b)
MOv16 結合率 (%)
cAR47A6.4.2
KM4590
抗体 (μg/mL)
(c)
MM0588-49D6結合率 (%)
cAR47A6.4.2
KM4590
抗体 (μg/mL)
(d)
YY-01 結合率 (%)
cAR47A6.4.2
KM4590
抗体 (μg/mL)
(e)
162-46 結合率 (%)
cAR47A6.4.2
KM4590
抗体 (μg/mL)
(f)
KM4097 結合率 (%)
cAR47A6.4.2
KM4590
抗体 (μg/mL)
0
20
40
60
80
100
120
0.01
0.1
1
10
100
1000

[図15]

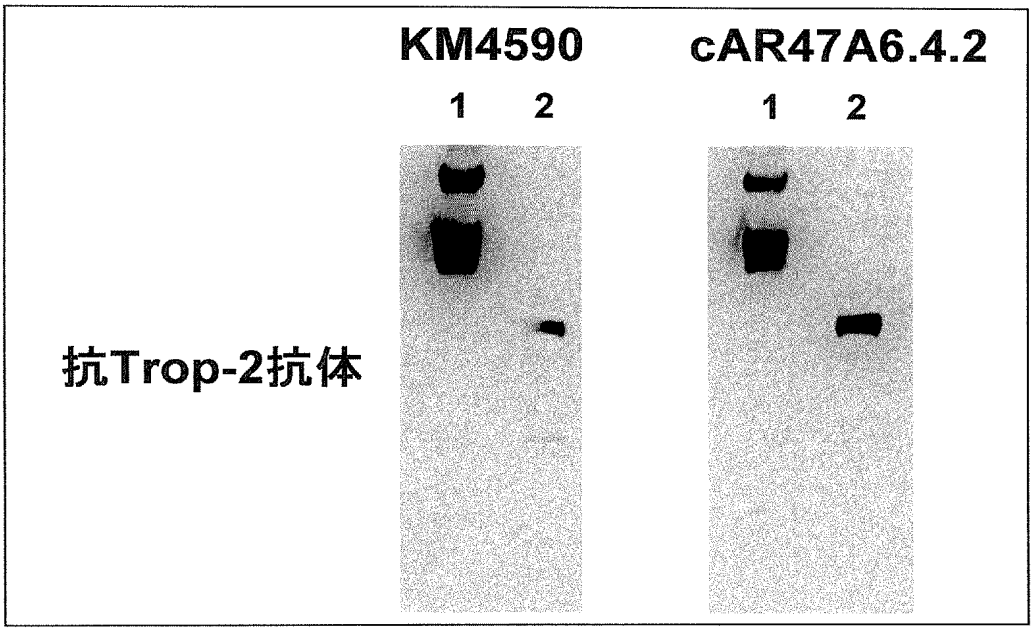

ドメイン
I
II
III
Trop-2 / FLAG / Fc
シグナル
FLAG
hIgG1 Fc
Mutant A
シグナル
FLAG
hIgG1 Fc
Mutant B
シグナル
FLAG
hIgG1 Fc
Mutant C
シグナル
FLAG
hIgG1 Fc

[図16]

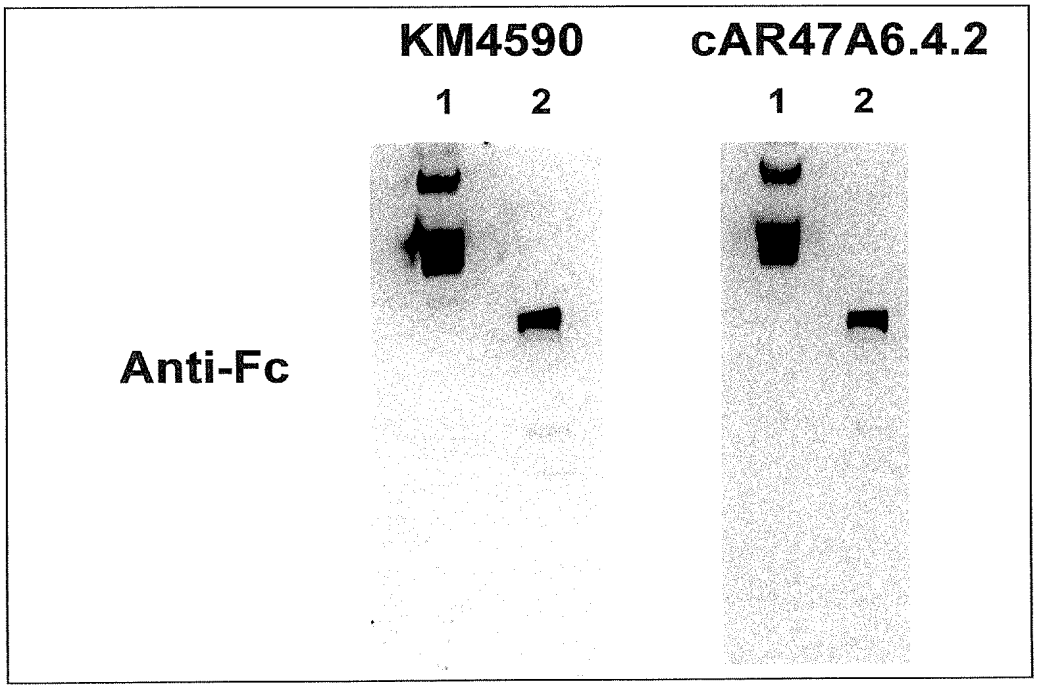

(a)
KM4590
非還元
還元
1 2 3 4
1 2 3 4
(b)
cAR47A6.4.2
非還元
還元
1 2 3 4
1 2 3 4
(c)
Anti-Fc
非還元
還元
1 2 3 4
1 2 3 4

[図17]

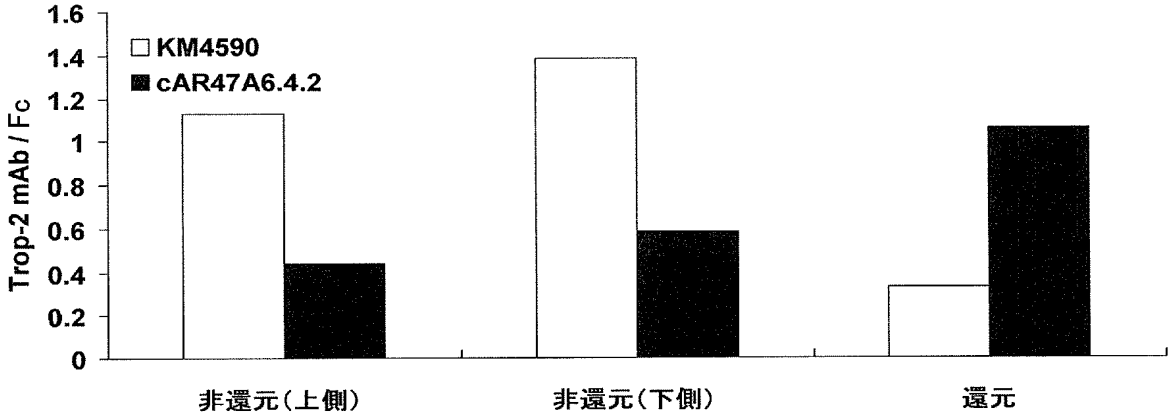
(a)


KM4590
cAR47A6.4.2
1
2
1
2
抗Trop-2抗体

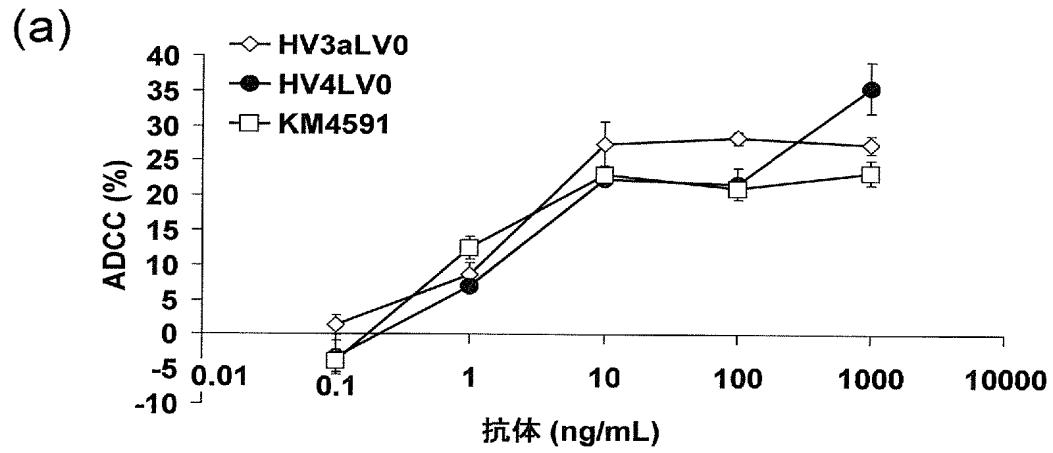
(b)

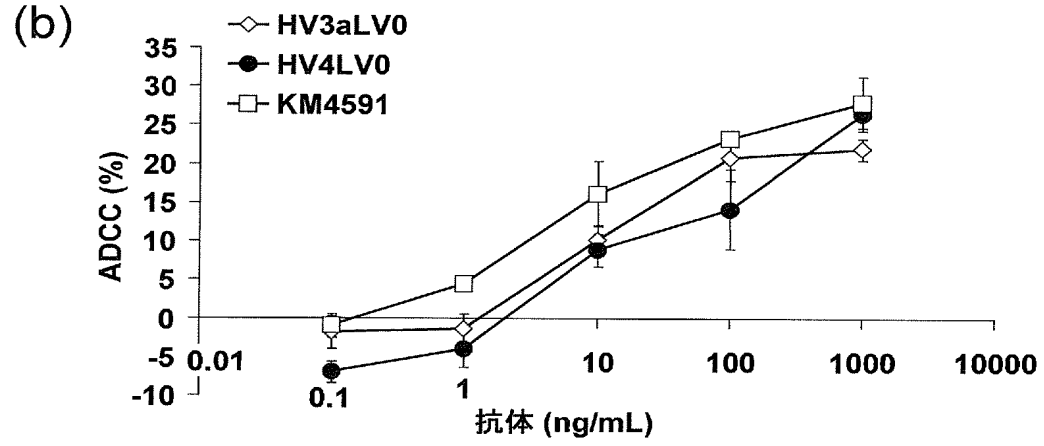

KM4590
cAR47A6.4.2
1
2
1
2
Anti-Fc

[図18]


KM4590
cAR47A6.4.2
Trop-2 mAb / Fc
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
非還元（上側）
非還元（下側）
還元

[図19]


(a)
HV3aLV0
HV4LV0
KM4591
ADCC (%)
40
35
30
25
20
15
10
5
0
-5
-10
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
抗体 (ng/mL)


(b)
HV3aLV0
HV4LV0
KM4591
ADCC (%)
35
30
25
20
15
10
5
0
-5
-10
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
抗体 (ng/mL)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2011/063294

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C07K16/28(2006.01)i, *A61K39/395*(2006.01)i, *A61K45/00*(2006.01)i, *C12N5/10*(2006.01)i, *C12N15/09*(2006.01)i, *C12P21/08*(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K16/28, A61K39/395, A61K45/00, C12N5/10, C12N15/09, C12P21/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2011
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2011 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2011

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y/A	FORNARO, M. et al, Cloning of the gene encoding TROP-2, a cell-surface glycoprotein expressed by human carcinomas., International Journal of Cancer, 1995, Vol. 62, No. 5, p. 610-618	1-4,6-9, 12-21,25-28/ 5,10,11
Y/A	WO 97/14796 A1 (BRISTOL-MYERS SQIBB CO.), 24 April 1997 (24.04.1997), a whole article & JP 2001-501801 A & US 5840854 A & EP 856054 A	1-4,6-9, 12-21,25-28/ 5,10,11

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

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

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
30 August, 2011 (30.08.11)	06 September, 2011 (06.09.11)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2011/063294

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y/A	WO 2003/74566 A2 (IMMUNOMEDICS, INC.), 12 September 2003 (12.09.2003), a whole article & US 2004/0001825 A1 & US 2007/0212350 A1 & US 2010/0221177 A1 & US 2008/0131363 A1 & US 2011/0070156 A & EP 1483295 A & EP 2287201 A2 & WO 2003/074566 A2	1-4,6-9, 12-21,25-28/ 5,10,11
Y/A	WO 2007/95748 A1 (ARIUS RESEARCH, INC.), 30 August 2007 (30.08.2007), a whole article & JP 2009-528995 A & US 2007/0202043 A1 & EP 1996700 A	1-4,6-9, 12-21,25-28/ 5,10,11
Y/A	WO 2007/95749 A1 (ARIUS RESEARCH, INC.), 30 August 2007 (30.08.2007), a whole article & JP 2009-527230 A & US 2007/0202043 A1 & EP 1996701 A	1-4,6-9, 12-21,25-28/ 5,10,11
Y/A	WO 2008/144891 A1 (ARIUS RESEARCH, INC.), 04 December 2008 (04.12.2008), a whole article & JP 2010-528056 A & US 2008/0131428 A1 & EP 2155791 A	1-4,6-9, 12-21,25-28/ 5,10,11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2011/063294

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

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

1. [X] Claims Nos.: 22-24
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The inventions set forth in claims 22 to 24 pertain to diagnostic methods to be practiced on the human body and thus relate to a subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out a search.

2. [ ] Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. [ ] Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. [ ] As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. [ ] As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. [ ] As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

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

Remark on Protest

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

[ ] No protest accompanied the payment of additional search fees.

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１１／０６３２９４

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C07K16/28(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61K45/00(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)i

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C07K16/28, A61K39/395, A61K45/00, C12N5/10, C12N15/09, C12P21/08

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０１１年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１１年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１１年

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

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

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
Y/A	FORNARO, M. et al, Cloning of the gene encoding TROP-2, a cell-surface glycoprotein expressed by human carcinomas., International Journal of Cancer, 1995, Vol. 62, No. 5, p. 610-618	1-4, 6-9, 12-21, 25-28/ 5, 10, 11
Y/A	WO 97/14796 A1 (BRISTOL-MYERS SQIBB COMPANY) 1997.04.24, 全体 & JP 2001-501801 A & US 5840854 A & EP 856054 A	1-4, 6-9, 12-21, 25-28/ 5, 10, 11

☑　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☐　パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 ３０．０８．２０１１	国際調査報告の発送日 ０６．０９．２０１１
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ） 郵便番号１００－８９１５ 東京都千代田区霞が関三丁目４番３号	特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｂ　３７６３ 濱田　光浩 電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１１／０６３２９４

Ｃ（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
Y/A	WO 2003/74566 A2 (IMMUNOMEDICS, INC) 2003.09.12, 全体 & US 2004/0001825 A1 & US 2007/0212350 A1 & US 2010/0221177 A1 & US 2008/0131363 A1 & US 2011/0070156 A & EP 1483295 A & EP 2287201 A2 & WO 2003/074566 A2	1-4, 6-9, 12-21, 25-28/5, 10, 11
Y/A	WO 2007/95748 A1 (ARIUS RESEARCH, INC.) 2007.08.30, 全体 & JP 2009-528995 A & US 2007/0202043 A1 & EP 1996700 A	1-4, 6-9, 12-21, 25-28/5, 10, 11
Y/A	WO 2007/95749 A1 (ARIUS RESEARCH, INC.) 2007.08.30, 全体 & JP 2009-527230 A & US 2007/0202043 A1 & EP 1996701 A	1-4, 6-9, 12-21, 25-28/5, 10, 11
Y/A	WO 2008/144891 A1 (ARIUS RESEARCH, INC.) 2008.12.04, 全体 & JP 2010-528056 A & US 2008/0131428 A1 & EP 2155791 A	1-4, 6-9, 12-21, 25-28/5, 10, 11

OnCusp
Ex. 1038

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１１／０６３２９４

第Ⅱ欄　請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第１ページの２の続き）

法第8条第3項（ＰＣＴ17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

１．☑ 請求項　２２－２４　は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求項２２－２４は、人の身体の診断方法に係る発明であるので、国際調査をすることを要しない事項である。

２．☐ 請求項　　は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

３．☐ 請求項　　は、従属請求の範囲であってＰＣＴ規則6.4(a)の第２文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄　発明の単一性が欠如しているときの意見（第１ページの３の続き）

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

１．☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。

２．☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

３．☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。

４．☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

OnCusp
Ex. 1038

(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
2011 年 12 月 15 日(15.12.2011)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2011/155579 A1

(51) 国際特許分類:
C07K 16/28 (2006.01) *C12N 5/10* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)
A61K 45/00 (2006.01) *C12P 21/08* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2011/063294

(22) 国際出願日: 2011 年 6 月 9 日(09.06.2011)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
61/353430 2010 年 6 月 10 日(10.06.2010) US

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 北海道公立大学法人札幌医科大学(SAPPORO MEDICAL UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒0600061 北海道札幌市中央区南１条西１７丁目２９１ Hokkaido (JP). 協和発酵キリン株式会社(Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd.) [JP/JP]; 〒1008185 東京都千代田区大手町１丁目６番１号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 山口 美樹(YAMAGUCHI Miki). 加藤 和則(KATO Kazunori). 濱田 洋文(HAMADA Hirofumi). 中村和靖(NAKAMURA Kazuyasu). 杉本 義幸(SUGIMOTO Yoshiyuki). 久保田 麗夫(KUBOTA Tsuguo). 池田 昌弘(IKEDA Masahiro).

(74) 代理人: 小栗 昌平, 外(OGURI Shohei et al.); 〒1050003 東京都港区西新橋一丁目７番１３号 虎ノ門イーストビルディング１０階 栄光特許事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, 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, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告（条約第 21 条(3)）
— 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)）

WO 2011/155579 A1

(54) **Title**: ANTI-Trop-2 ANTIBODY

(54) 発明の名称 : 抗Ｔｒｏｐ－２抗体

(57) **Abstract**: Disclosed is an anti-Trop-2 antibody related to: a monoclonal antibody or antibody fragment against human Trop-2 that specifically binds to the human Trop-2 extracellular domain, a hybridoma that produces said antibody, DNA that codes said antibody, a vector that contains said DNA, a transformant obtained by introducing said vector; and a method for producing an antibody or antibody fragment that uses said hybridoma or said transformant, or a therapeutic drug or diagnostic agent that uses said antibody fragment.

(57) 要約: 本発明は、ヒトＴｒｏｐ－２細胞外領域に特異的に結合するヒトＴｒｏｐ－２に対するモノクローナル抗体または該抗体断片、該抗体を産生するハイブリドーマ、該抗体をコードするＤＮＡ、該ＤＮＡを含むベクター、該ベクターを導入して得られる形質転換体、該ハイブリドーマまたは該形質転換体を用いる抗体または抗体断片の製造方法または該抗体断片を用いる治療薬または診断薬に関する。

明　細　書

発明の名称 ： 抗Ｔｒｏｐ－２抗体

技術分野

[0001] 本発明は、高いアフィニティーでヒトＴｒｏｐ－２細胞外領域に結合し、かつ高い抗体依存的細胞傷害活性（ａｎｔｉｂｏｄｙ－ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ　ｃｅｌｌｕｌａｒ　ｃｙｔｏｔｏｘｉｃｉｔｙ、以下ＡＤＣＣ活性と記す）、高い抗腫瘍活性を発揮するモノクローナル抗体またはその抗体断片、該抗体を産生するハイブリドーマ、該抗体をコードするＤＮＡ、該ＤＮＡを含むベクター、該ベクターを導入して得られる形質転換体、該ハイブリドーマまたは該形質転換体を用いる抗体または該抗体断片の製造方法、抗体または該抗体断片を用いる治療薬および診断薬に関する。

背景技術

[0002] Ｔｒｏｐ－２は別名Ｔｕｍｏｒ　ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ　ｃａｌｃｉｕｍ　ｓｉｇｎａｌ　ｔｒａｎｓｄｕｃｅｒ　２（ＴＡＣＳＴＤ２）、ＧＡ７３－１、ｇｐ５０、Ｔ１６としても知られる、３２３アミノ酸から成るＩ型膜タンパク質である。Ｔｒｏｐ－２は、ヒト栄養芽細胞に反応するモノクローナル抗体１６２－２５．３、１６２－４６．２の認識タンパク質として見出された（非特許文献１）。

[0003] Ｔｒｏｐ－２の遺伝子は、１９８９年にクローニングされている（非特許文献２）。Ｔｒｏｐ－２のＤＮＡ配列、アミノ酸配列および立体構造は、公的データベース上に公開されており、例えば、ＮＰ＿００２３４４、ＮＭ＿００２３５３（ＮＣＢＩ）等のアクセッション番号から参照可能である。Ｔｒｏｐ－２のアミノ酸配列は、Ｎ末端２６アミノ酸から成るシグナル配列、２４８アミノ酸から成る細胞外ドメイン、２３アミノ酸から成る膜貫通ドメイン、２６アミノ酸から成る細胞内ドメインで構成されている。Ｔｒｏｐ－２の分子量の理論計算値は３５キロダルトンであるが、糖鎖付加を受け、１０キロダルトン前後増加することが知られている。

[0004] Ｔｒｏｐ－２は、ファミリー分子であるＥｐＣＡＭ（別名Ｔｒｏｐ－１）と、同一のシステイン残基の数および位置を有することから、構造が類似することが推定されている（非特許文献２）。ＥｐＣＡＭの細胞外領域は、システイン残基に富むＮ末端側の二つのドメインと、システイン残基の少ないＣ末端側のドメインの、３つのドメインから成る（非特許文献１５）。ＥｐＣＡＭにおいては、Ｎ末端側の第一のドメインは細胞間のＥｐＣＡＭ同士の接着に、第二のドメインは同一細胞膜上のＥｐＣＡＭ同士の相互作用に関与することが知られている（非特許文献１５）。

[0005] Ｔｒｏｐ－２は多くの癌で発現が認められており、発現と予後不良との相関も報告されている（非特許文献３－９）。また、大腸癌において、足場非依存性増殖への関与が報告されている（非特許文献１０）。正常組織におけるＴｒｏｐ－２の発現は、いくつかの組織の上皮細胞に限られていると報告されている。

[0006] １６２－２５．３、１６２－４６．２が報告されて以降、Ｔｒｏｐ－２に対するモノクローナル抗体は複数樹立されている（非特許文献１１－１３、特許文献１－３）。７７２２０など、試薬として市販されている抗Ｔｒｏｐ－２モノクローナル抗体もある。これら、樹立された抗Ｔｒｏｐ－２モノクローナル抗体のいくつかは癌治療への利用が検討されている。

[0007] 抗Ｔｒｏｐ－２モノクローナル抗体の一つであるＢＲ１１０（特許文献１）は細胞表面のＴｒｏｐ－２に結合後、細胞内にインターナリゼーションすることから、抗細胞薬剤とのコンジュゲートの検討例が報告されている。本コンジュゲートはＨ２９８７、Ｈ３３９６、Ｈ３６１９、ＭＣＦ－７といった癌細胞に対して細胞傷害活性を示すことが開示されている。

[0008] 抗Ｔｒｏｐ－２モノクローナル抗体の一つであるＲＳ７（特許文献２、非特許文献１１、１４、１６）は細胞表面のＴｒｏｐ－２に結合後、細胞内にインターナリゼーションすることから、抗細胞薬剤とのコンジュゲートの検討例が報告されている。該抗体のヒト化抗体ｈＲＳ７と放射性同位元素（^{131}Ｉ、^{131}Ｉ－ＩＭＲ－Ｒ４）とのコンジュゲートは、乳癌細胞株を用いたヒト

癌細胞異所移植モデルで抗腫瘍活性を示すことが開示されている。

[0009] 抗Ｔｒｏｐ－２モノクローナル抗体の一つであるＡＲ４７Ａ６．４．２（特許文献３）およびＡＲ５２Ａ３０１．５（特許文献４）は、標的細胞であるＴｒｏｐ－２発現癌細胞を特異的に傷害することにより薬効を発揮する抗体である。特許文献３および４には、これらの抗体が癌細胞を直接的に殺傷することが開示されている。

[0010] また、ＡＲ４７Ａ６．４．２のヒト化抗体ｈｕＡＲ４７Ａ６．４．２（特許文献５）は細胞内のＥｘｔｒａｃｅｌｌｕｌａｒ－ｓｉｇｎａｌ ｒｅｇｕｌａｔｅｄ ｋｉｎａｓｅ（ＥＲＫ）の活性化を抑制することが開示されている。さらに、特許文献５には、補体依存性細胞傷害活性（Ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔ－ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ Ｃｙｔｏｔｏｘｉｃｉｔｙ、以下ＣＤＣ活性と表記する）については、ｈｕＡＲ４７Ａ６．４．２は、補体価の高いウサギ血清を用いた場合に、Ｔｒｏｐ－２陽性のヒト細胞株に対してＣＤＣ活性を示すことが開示されている。

先行技術文献

特許文献

[0011] 特許文献1：国際公開第９７／１４７９６号
特許文献2：国際公開第２００３／０７４５６６号
特許文献3：国際公開第２００７／０９５７４８号
特許文献4：国際公開第２００７／０９５７４９号
特許文献5：国際公開第２００８／１４４８９１号

非特許文献

[0012] 非特許文献1：Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８，５１４７（１９８１）
非特許文献2：Ｉｎｔ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ，６２，６１０（１９９５）
非特許文献3：Ｍｏｄ．Ｐａｔｈｏｌ．，２１，１８６（２００８）
非特許文献4：Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．，１２，３０５７（２００６）

非特許文献5：Ｂｒ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ，９９，１２９０（２００８）
非特許文献6：Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｐａｔｈｏｌ．，６２，１５２（２００９）
非特許文献7：Ｅｕｒ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ，４６，９４４（２０１０）
非特許文献8：Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．，６２，５３２５（２００２）
非特許文献9：Ｌａｂ．Ｉｎｖｅｓｔ．８４，３２０（２００４）
非特許文献10：Ｍｏｌ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｔｈｅｒ．，７，２８０（２００８）
非特許文献11：Ｉｎｔ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ，３９，２９７（１９８７）
非特許文献12：Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．，５０，１３３０（１９９０）
非特許文献13：Ｈｙｂｒｉｄｏｍａ，１１，５３９（１９９２）
非特許文献14：Ｂｒｅａｓｔ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．Ｔｒｅａｔ．，８４，１７３，（２００４）
非特許文献15：Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．，２１，２５７０（２００１）
非特許文献16：Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．，１７，３１５７(２０１１)

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0013] しかしながら、特許文献１に記載のＢＲ１１０は、抗細胞薬剤を結合していない場合には細胞傷害活性を持たない。また、特許文献２、非特許文献１１、１４および１６に記載のＲＳ７は、抗細胞薬剤を結合していない場合には細胞傷害活性を示さない。また、特許文献５に記載のｈｕＡＲ４７Ａ６．４．２のＡＤＣＣ活性については報告がない。

[0014] さらに、ヒトＴｒｏｐ－２の細胞外領域に高いアフィニティーで結合する抗Ｔｒｏｐ－２モノクローナル抗体については報告がない。ヒトＴｒｏｐ－２の細胞外領域に高いアフィニティーで結合する抗Ｔｒｏｐ－２モノクローナル抗体は、ヒトＴｒｏｐ－２陽性のヒト細胞株に対して高いＡＤＣＣ活性および抗腫瘍活性を示すと考えられる。

[0015] したがって、本発明は、高いアフィニティーでヒトＴｒｏｐ－２細胞外領域に結合するヒトＴｒｏｐ－２に対するモノクローナル抗体または該抗体断片、該抗体を産生するハイブリドーマ、該抗体をコードするＤＮＡ、該ＤＮＡを含むベクター、該ベクターを導入して得られる形質転換体、該ハイブリドーマまたは該形質転換体を用いる抗体または抗体断片の製造方法または該抗体断片を用いる治療薬または診断薬を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0016] すなわち、本発明は以下の通りである。

１．ヒトＴｒｏｐ－２の細胞外領域のうち、少なくともドメインＩに結合するヒトＴｒｏｐ－２に対するモノクローナル抗体または該抗体断片。

２．配列番号１で表されるアミノ酸配列のうち、３４番目～７２番目の少なくとも１つのアミノ酸に結合する前項１に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

３．抗体の抗原に対する解離定数（K_D）が５×１０$^{-10}$M以下である前項１または２に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

４．高いＡＤＣＣ活性および抗腫瘍活性を有する前項１～３のいずれか１に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

５．相補鎖決定領域（ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔａｒｉｔｙ ｄｅｔｅｒｍｉｎｉｎｇ ｒｅｇｉｏｎ、以下ＣＤＲと記す）１～３がそれぞれ配列番号１３～１５で表されるアミノ酸配列を含む抗体の重鎖（以下、Ｈ鎖と記す）を含み、かつＣＤＲ１～３がそれぞれ配列番号１６～１８で表されるアミノ酸配列である抗体の軽鎖（以下、Ｌ鎖と記す）を含む、前項１～４のいずれか１に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

６．配列番号１０で表されるアミノ酸配列を含むＨ鎖可変領域（以下、ＶＨと記す）を含み、かつ配列番号１２で表されるアミノ酸配列を含むＬ鎖可変領域（以下、ＶＬと記す）を含む抗体が結合するＴｒｏｐ－２の細胞外領域に存在するエピトープと、同じエピトープに結合するモノクローナル抗体または該抗体断片。

７．前項５または６に記載の抗体と競合してＴｒｏｐ－２の細胞外領域に結合するモノクローナル抗体または該抗体断片。

８．遺伝子組換え抗体である、前項１～７のいずれか１に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

９．ヒト型キメラ抗体、ヒト化抗体およびヒト抗体から選ばれる遺伝子組換え抗体である、前項８に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

１０．ヒト化抗体であって、以下の（ａ）ＶＨおよび（ｂ）ＶＬを含む前項９に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

（ａ）配列番号２４で表されるアミノ酸配列、または配列番号２４で表されるアミノ酸配列の９番目のＡｌａをＰｒｏに、１２番目のＬｙｓをＶａｌに、２０番目のＶａｌをＩｌｅに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、７０番目のＩｌｅをＬｅｕに、９５番目のＴｙｒをＰｈｅに、および１１２番目のＶａｌをＬｅｕに置換するアミノ酸改変のうち、少なくとも１つの改変を行ったアミノ酸配列含むＶＨ。

（ｂ）配列番号２６で表されるアミノ酸配列、または配列番号２６で表されるアミノ酸配列の１５番目のＬｅｕをＡｌａに、１９番目のＡｌａをＶａｌに、２１番目のＩｌｅをＭｅｔに、および８４番目のＬｅｕをＶａｌに置換するアミノ酸改変のうち、少なくとも１つの改変を行ったアミノ酸配列を含むＶＬ。

１１．以下の（１）～（５）から選ばれる前項１０に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

（１）配列番号２８で表されるアミノ酸配列を含む抗体のＶＨおよび配列番号２６で表されるアミノ酸配列を含む抗体のＶＬの少なくとも一方を含むヒト化抗体

（２）配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含む抗体のＶＨおよび配列番号２６で表されるアミノ酸配列を含む抗体のＶＬの少なくとも一方を含むヒト化抗体

（３）配列番号３２で表されるアミノ酸配列を含む抗体のＶＨおよび配列番号２６で表されるアミノ酸配列を含む抗体のＶＬの少なくとも一方を含むヒト化抗体

（４）配列番号３４で表されるアミノ酸配列を含む抗体のＶＨおよび配列番号３６で表されるアミノ酸配列を含む抗体のＶＬの少なくとも一方を含むヒト化抗体

（５）配列番号３４で表されるアミノ酸配列を含む抗体のＶＨおよび配列番号３８で表されるアミノ酸配列を含む抗体のＶＬの少なくとも一方を含むヒト化抗体

１２．Ｆａｂ、Ｆａｂ’、（Ｆａｂ’）$_2$、一本鎖抗体（ｓｃＦｖ）、二量体化Ｖ領域（Ｄｉａｂｏｄｙ）、ジスルフィド安定化Ｖ領域（ｄｓＦｖ）およびＣＤＲを含むペプチドから選ばれる抗体断片である、前項１～１１のいずれか１に記載の抗体断片。

１３．前項１～１２のいずれか１に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片をコードするＤＮＡ。

１４．前項１３に記載のＤＮＡを含有する組換え体ベクター。

１５．前項１４に記載の組換え体ベクターを宿主細胞に導入して得られる形質転換株。

１６．前項１４に記載の形質転換株を培地に培養し、培養物中に前項１～１２のいずれか１に記載の抗体または該抗体断片を精製蓄積させ、培養物から該抗体または該抗体断片を採取することを特徴とする前項１～１２のいずれか１に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片の製造方法。

１７．前項１～１２のいずれか１に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片を含むヒトＴｒｏｐ－２の検出または測定用試薬。

１８．前項１～１２のいずれか１に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片を有効成分として含有するヒトＴｒｏｐ－２陽性細胞が関与する疾患の診断薬。

１９．ヒトＴｒｏｐ－２陽性細胞が関与する疾患が癌である、前項１８に記

載の診断薬。

２０．前項１～１２のいずれか１に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片を有効成分として含有するヒトＴｒｏｐ－２陽性細胞が関与する疾患の治療薬。

２１．ヒトＴｒｏｐ－２陽性細胞が関与する疾患が癌である、前項２０に記載の治療薬。

２２．前項１～１２のいずれか１に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片を用いてヒトＴｒｏｐ－２陽性細胞を検出または測定することを含む、ヒトＴｒｏｐ－２陽性細胞が関与する疾患の診断方法。

２３．前項１～１２のいずれか１に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片を用いてヒトＴｒｏｐ－２を検出または測定することを含む、ヒトＴｒｏｐ－２陽性細胞が関与する疾患の診断方法。

２４．ヒトＴｒｏｐ－２陽性細胞が関与する疾患が癌である、前項２２または２３に記載の診断方法。

２５．ヒトＴｒｏｐ－２陽性細胞が関与する疾患の診断薬を製造するための、前項１～１２のいずれか１に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片の使用。

２６．ヒトＴｒｏｐ－２陽性細胞が関与する疾患が癌である、前項２５に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片の使用。

２７．ヒトＴｒｏｐ－２陽性細胞が関与する疾患の治療薬を製造するための、前項１～１２のいずれか１に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片の使用。

２８．ヒトＴｒｏｐ－２陽性細胞が関与する疾患が癌である、前項２７に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片の使用。

発明の効果

[0017] 本発明のヒトＴｒｏｐ－２に対するモノクローナル抗体または該抗体断片は、ヒトＴｒｏｐ－２の細胞外領域のうち少なくともドメインＩを特異的に認識し、該細胞外領域に高いアフィニティーで結合することができる。これ

により、本発明のモノクローナル抗体または該抗体断片は、ヒトＴｒｏｐ－２陽性細胞に対し、高いＡＤＣＣ活性および抗腫瘍活性を有することができる。したがって、本発明のヒトＴｒｏｐ－２に対するモノクローナル抗体または該抗体断片は、ヒトＴｒｏｐ－２陽性細胞が関与する疾患の治療および診断等に非常に有用である。

[0018] また、本発明は、前記抗体を産生するハイブリドーマ、該抗体をコードするＤＮＡ、該ＤＮＡを含むベクター、該ベクターを導入して得られる形質転換体、該ハイブリドーマまたは形質転換体を用いる抗体または該抗体断片の製造方法、抗体または該抗体断片を用いる治療薬および診断薬を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0019] [図1]図１（ａ）は、ヒト膵臓癌細胞株ＢｘＰＣ－３に対するＫＭ４０９７の反応性をＦＣＭにより解析した結果を示す。図１（ｂ）は、ヒト卵巣癌細胞株ＣａＯＶ－３に対するＫＭ４０９７の反応性をＦＣＭにより解析した結果を示す。図１（ｃ）は、ヒト乳癌細胞株ＭＣＦ－７に対するＫＭ４０９７の反応性をＦＣＭにより解析した結果を示す。図１（ｄ）は、ヒト大腸癌細胞株Ｃｏｌｏ２０５に対するＫＭ４０９７の反応性をＦＣＭにより解析した結果を示す。図１（ａ）～（ｄ）において、黒部分はＫＭ４０９７を１０μｇ／ｍＬ添加した時のヒストグラムを、白部分は陰性対照抗体でのヒストグラムを示す。

[図2]図２は、ヒト膵臓癌細胞株ＢｘＰＣ－３へのｃＡＲ４７Ａ６．４．２の結合に対する、抗Ｔｒｏｐ－２マウスモノクローナル抗体の拮抗作用を、ＦＣＭにより解析した結果を示す。横軸には各抗体の濃度を、縦軸にはｃＡＲ４７Ａ６．４．２の結合を表すＭＦＩ値を示す。●はＫＭ４０９７を、□は７７２２０を共存させた場合のＭＦＩ値を示す。

[図3]図３は、ヒト膵臓癌細胞株ＢｘＰＣ－３への各抗Ｔｒｏｐ－２マウスモノクローナル抗体の結合に対する、ｃＡＲ４７Ａ６．４．２の拮抗作用を、ＦＣＭにより解析した結果を示す。横軸にはｃＡＲ４７Ａ６．４．２の濃度

を、縦軸には各競合抗体の結合を表すＭＦＩ値を示す。●はＫＭ４０９７を、□は７７２２０を共存させた場合のＭＦＩ値を示す。

[図4]図４は、組換えＴｒｏｐ－２へのＫＭ４０９７の結合に対する、抗Ｔｒｏｐ－２モノクローナル抗体の拮抗作用を、バインディングＥＬＩＳＡで解析した結果を示す。横軸には各抗体の濃度を、縦軸にはＫＭ４０９７の結合率（％）を示す。■はｃＡＲ４７Ａ６．４．２を、□は７７２２０を共存させた場合のＫＭ４０９７の結合率（％）を示す。

[図5]図５は、組換えＴｒｏｐ－２への７７２２０の結合に対する、抗Ｔｒｏｐ－２モノクローナル抗体の拮抗作用をバインディングＥＬＩＳＡで解析した結果を示す。横軸には各抗体の濃度を、縦軸には７７２２０の結合率（％）を示す。●はＫＭ４０９７を、■はｃＡＲ４７Ａ６．４．２を、△はＭＯｖ１６を共存させた場合の７７２２０の結合率（％）を示す。

[図6]図６（ａ）および（ｂ）は、ヒト乳癌細胞株ＭＣＦ－７細胞に対する抗Ｔｒｏｐ－２抗体の抗体依存性細胞傷害活性（ＡＤＣＣ活性）を示す。図６（ａ）はドナー１、図６（ｂ）はドナー２の結果である。横軸に各抗体の濃度を、縦軸に細胞傷害活性率（％）を示す。●はＫＭ４５９０を、◇はｃＡＲ４７Ａ６．４．２をそれぞれ表す。結果を３ウェルの平均値±標準誤差で表す。＊はＳｔｕｄｅｎｔ’ｓ　ｔ－ｔｅｓｔの結果、ｃＡＲ４７Ａ６．４．２と比較して有意に異なる（ｐ＜０．０５）ことを示す。

[図7]図７（ａ）および（ｂ）は、ヒト大腸癌細胞株Ｃｏｌｏ２０５細胞に対する抗Ｔｒｏｐ－２抗体の抗体依存性細胞傷害活性（ＡＤＣＣ活性）を示す。図７（ａ）はドナー１、図７（ｂ）はドナー２の結果である。横軸に各抗体の濃度を、縦軸に細胞傷害活性率（％）を示す。●はＫＭ４５９０を、◇はｃＡＲ４７Ａ６．４．２をそれぞれ表す。結果を３ウェルの平均値±標準誤差で表す。＊はＳｔｕｄｅｎｔ’ｓ　ｔ－ｔｅｓｔの結果、ｃＡＲ４７Ａ６．４．２と比較して有意に異なる（ｐ＜０．０５）ことを示す。

[図8]図８（ａ）および（ｂ）は、ヒト乳癌細胞株ＭＣＦ－７細胞に対する抗Ｔｒｏｐ－２抗体の抗体依存性細胞傷害活性（ＡＤＣＣ活性）を示す。図８

（ａ）はドナー１、図８（ｂ）はドナー２の結果である。横軸に抗体の濃度を、縦軸に細胞傷害活性率（％）を示す。●はＫＭ４５９０を、○はＫＭ４５９１をそれぞれ表す。結果を３ウェルの平均値±標準誤差で表す。

[図9]図９（ａ）および（ｂ）は、ヒト大腸癌細胞株Ｃｏｌｏ２０５細胞に対する抗体依存性細胞傷害活性（ＡＤＣＣ活性）を示す。図９（ａ）はドナー１、図９（ｂ）はドナー２の結果である。横軸に各抗体の濃度を、縦軸に細胞傷害活性率（％）を示す。●はＫＭ４５９０を、○はＫＭ４５９１をそれぞれ表す。結果を３ウェルの平均値±標準誤差で表す。

[図10]図１０は、ヒト膵臓癌細胞株ＢｘＰＣ－３異所移植マウスにおける抗Ｔｒｏｐ－２キメラ抗体の抗腫瘍結果を示す。縦軸が腫瘍体積、横軸が細胞株移植後の経過日数を示す。○はＰＢＳ投与群、■はｃＡＲ４７Ａ６．４．２－Ｐ投与群、●はＫＭ４５９１投与群を示す。結果を６個体の平均値±標準誤差で表す。＊はＳｔｕｄｅｎｔ’ｓ　ｔ－ｔｅｓｔの結果、ＫＭ４５９１投与群がＰＢＳ投与群と比較して有意に異なる（ｐ＜０．０５）ことを示す。＃はＳｔｕｄｅｎｔ’ｓ　ｔ－ｔｅｓｔの結果、ｃＡＲ４７Ａ６．４．２－Ｐ投与群がＰＢＳ投与群と比較して有意に異なる（ｐ＜０．０５）ことを示す。

[図11]図１１は、ヒト大腸癌細胞株Ｃｏｌｏ２０５異所移植マウスにおける抗Ｔｒｏｐ－２キメラ抗体の抗腫瘍結果を示す。縦軸が腫瘍体積、横軸が細胞株を移植後の経過日数を示す。○はＰＢＳ投与群、■はｃＡＲ４７Ａ６．４．２－Ｐ投与群、●はＫＭ４５９１投与群を示す。結果を５個体の平均値±標準誤差で表す。＊、＊＊、＊＊＊はＳｔｕｄｅｎｔ’ｓ　ｔ－ｔｅｓｔの結果、ＫＭ４５９１投与群がＰＢＳ投与群と比較して有意に異なる（それぞれ、ｐ＜０．０５、ｐ＜０．０１、ｐ＜０．００１）ことを示す。＃はＳｔｕｄｅｎｔ’ｓ　ｔ－ｔｅｓｔの結果、ｃＡＲ４７Ａ６．４．２－Ｐ投与群がＰＢＳ投与群と比較して有意に異なる（ｐ＜０．０５）ことを示す。

[図12]図１２は、設計したＫＭ４０９７ヒト化抗体のＨ鎖可変領域ＨＶ０、ＨＶ２、ＨＶ３ａ、ＨＶ３ｂ、ＨＶ４、ＨＶ５ａ、ＨＶ５ｂ、ＨＶ５ｃ、Ｈ

ＶＨ６、ＨＶ８、ＨＶ９、ＨＶ１０のアミノ酸配列を示す。

[図13]図１３は、設計したＫＭ４０９７ヒト化抗体のＬ鎖可変領域ＬＶ０、ＬＶ２、ＬＶ３ａ、ＬＶ３ｂ、ＬＶ４のアミノ酸配列を示す。

[図14]図１４（ａ）～（ｆ）は、各種抗Ｔｒｏｐ－２マウスモノクローナル抗体の組換えＴｒｏｐ－２への結合に対する、ＫＭ４５９０またはｃＡＲ４７Ａ６．４．２の拮抗作用をバインディングＥＬＩＳＡで解析した結果を示す。横軸には各キメラ抗体の濃度を、縦軸には各マウスモノクローナル抗体の結合率（％）を示す。●はｃＡＲ４７Ａ６．４．２を、○はＫＭ４５９０を共存させた場合のマウスモノクローナル抗体の結合率（％）を示す。

[図15]図１５はＴｒｏｐ－２／ＦＬＡＧ／Ｆｃ、Ｍｕｔａｎｔ　Ａ、Ｍｕｔａｎｔ　Ｂ、Ｍｕｔａｎｔ　Ｃの構造の模式図を示す。

[図16]図１６（ａ）～（ｃ）は、Ｔｒｏｐ－２細胞外領域蛋白質またはそのドメイン欠失体に対してウェスタンブロットでＫＭ４５９０［図１６（ａ）］、ｃＡＲ４７Ａ６．４．２［図１６（ｂ）］または抗ヒトＩｇＧ（Ａｎｔｉ－Ｆｃ）［図１６（ｃ）］を反応させた結果を示す。レーン１、２、３、４はそれぞれ、Ｔｒｏｐ－２／ＦＬＡＧ／Ｆｃ、Ｍｕｔａｎｔ　Ａ、Ｍｕｔａｎｔ　Ｂ、Ｍｕｔａｎｔ　Ｃを示す。

[図17]図１７（ａ）および（ｂ）は、ウェスタンブロットにおけるＫＭ４５９０またはｃＡＲ４７Ａ６．４．２のＴｒｏｐ－２／ＦＬＡＧ／Ｆｃに対する反応性を、還元処理の有無で比較した結果を示す。図１７（ａ）は、非還元状態および還元状態のＴｒｏｐ－２／ＦＬＡＧ／ＦｃへＫＭ４５９０またはｃＡＲ４７Ａ６．４．２を反応させた結果を示す。図１７（ｂ）は、図１７（ａ）の各ＰＤＶＦ膜より抗体を剥離し、抗ヒトＩｇＧ（Ａｎｔｉ－Ｆｃ）を反応させた結果を示す。いずれもレーン１、２はそれぞれ、非還元状態、還元状態のＴｒｏｐ－２／ＦＬＡＧ／Ｆｃを示す。

[図18]図１８は、各ＰＤＶＦ膜における３種類のバンド（非還元状態の上下のバンドおよび還元状態のバンド）のシグナルの強さを定量し、ＫＭ４５９０またはｃＡＲ４７Ａ６．４．２を反応させた場合とＡｎｔｉ－Ｆｃを反応

させた場合との比を算出した結果を示す。

[図19]図１９（ａ）および（ｂ）は、ヒトＴｒｏｐ－２発現ＣＨＯ細胞に対するＡＤＣＣ活性を示す。横軸に各抗体の濃度を、縦軸に細胞傷害活性率（％）を示す。図１９（ａ）はドナー１、図１９（ｂ）はドナー２の結果である。◇はＨＶ３ａＬＶ０を、●はＨＶ４ＬＶ０を、□はＫＭ４５９１をそれぞれ表す。結果を３ウェルの平均値±標準誤差で表す。

発明を実施するための形態

[0020] 本発明は、ヒトＴｒｏｐ－２の細胞外領域に特異的に結合する、ヒトＴｒｏｐ－２に対するモノクローナル抗体（以下、本発明のモノクローナル抗体と略記する。）または該抗体断片に関する。本発明のモノクローナル抗体は、ヒトＴｒｏｐ－２の細胞外領域に高いアフィニティーで結合することにより、高いＡＤＣＣ活性および抗腫瘍活性を有する。

[0021] 本発明におけるヒトＴｒｏｐ－２としては、配列番号１またはＮＣＢＩアクセッション番号ＮＰ＿００２３４４で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドまたは配列番号１またはＮＣＢＩアクセッション番号ＮＰ＿００２３４４で示されるアミノ酸配列において１つ以上のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列から成り、かつＴｒｏｐ－２の機能を有するポリペプチド、ならびに配列番号１またはＮＣＢＩアクセッション番号ＮＰ＿００２３４４で示されるアミノ酸配列と６０％以上、好ましくは８０％以上、さらに好ましくは９０％以上の相同性を有するポリペプチド、最も好ましくは９５％以上の相同性を有するアミノ酸配列から成り、かつＴｒｏｐ－２の機能を有するポリペプチドなどが挙げられる。

[0022] 配列番号１またはＮＣＢＩアクセッション番号ＮＰ＿００２３４４で示されるアミノ酸配列において１つ以上のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチドは、部位特異的変異導入法［Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ，Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｓｅｃｏｎｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ（１９８９）、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏ

ｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ（１９８７－１９９７）、Ｎｕｃｌｅｉｃ ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，１０，６４８７（１９８２）、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，７９，６４０９（１９８２）、Ｇｅｎｅ，３４，３１５（１９８５）、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，１３，４４３１（１９８５）、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８２，４８８（１９８５）］などを用いて、例えば配列番号１で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするＤＮＡに部位特異的変異を導入することにより得ることができる。

[0023] 欠失、置換または付加されるアミノ酸の数は特に限定されないが、好ましくは１個～数十個、例えば、１～２０個、より好ましくは１個～数個、例えば、１～５個のアミノ酸である。

[0024] ヒトＴｒｏｐ－２をコードする遺伝子としては、配列番号２またはＮＣＢＩアクセッション番号ＮＭ＿００２３５３で示される塩基配列が挙げられる。配列番号２またはＮＣＢＩアクセッション番号ＮＭ＿００２３５３で示される塩基配列において、１以上の塩基が欠失、置換または付加された塩基配列から成り、かつＴｒｏｐ－２の機能を有するポリペプチドをコードするＤＮＡを含む遺伝子、配列番号２またはＮＣＢＩアクセッション番号ＮＭ＿００２３５３で示される塩基配列と少なくとも６０％以上の相同性を有する塩基配列、好ましくは８０％以上の相同性を有する塩基配列、さらに好ましくは９５％以上の相同性を有する塩基配列から成り、かつＴｒｏｐ－２の機能を有するポリペプチドをコードするＤＮＡを含む遺伝子、ならびに配列番号２またはＮＣＢＩアクセッション番号ＮＭ＿００２３５３で示される塩基配列を有するＤＮＡとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするＤＮＡから成り、かつＴｒｏｐ－２の機能を有するポリペプチドをコードする遺伝子なども、本発明におけるＴｒｏｐ－２をコードする遺伝子に包含される。

[0025] ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするＤＮＡとしては、配列番号２またはＮＣＢＩアクセッション番号ＮＭ＿００２３５３で示される塩基

配列を有するＤＮＡをプローブに用いた、コロニー・ハイブリダイゼーション法、プラーク・ハイブリダイゼーション法、サザンブロット・ハイブリダイゼーション法、またはＤＮＡマイクロアレイ法などにより得られるハイブリダイズ可能なＤＮＡを意味する。

[0026] 具体的には、ハイブリダイズしたコロニー若しくはプラーク由来のＤＮＡ、または該配列を有するＰＣＲ産物若しくはオリゴＤＮＡを固定化したフィルターまたはスライドガラスを用いて、０．７～１．０ｍｏｌ／Ｌの塩化ナトリウム存在下、６５℃でハイブリダイゼーション［Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ，Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｓｅｃｏｎｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ（１９８９）、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ（１９８７－１９９７）、ＤＮＡ Ｃｌｏｎｉｎｇ １：Ｃｏｒｅ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ，Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ，Ｓｅｃｏｎｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ，（１９９５）］を行った後、０．１～２倍濃度のＳＳＣ溶液（１倍濃度のＳＳＣ溶液の組成は、１５０ｍｍｏｌ／Ｌ塩化ナトリウム、１５ｍｍｏｌ／Ｌクエン酸ナトリウムよりなる）を用い、６５℃条件下でフィルターまたはスライドグラスを洗浄することにより同定できるＤＮＡを挙げることができる。

[0027] 前記ハイブリダイズ可能なＤＮＡとしては、配列番号２またはＮＣＢＩアクセッション番号ＮＭ＿００２３５３で示される塩基配列と少なくとも６０％以上の相同性を有するＤＮＡ、好ましくは８０％以上の相同性を有するＤＮＡ、さらに好ましくは９５％以上の相同性を有するＤＮＡを挙げることができる。

[0028] 真核生物の蛋白質をコードする遺伝子の塩基配列には、しばしば遺伝子の多型が認められる。本発明において用いられる遺伝子に、このような多型によって塩基配列に小規模な変異を生じた遺伝子も、本発明におけるＴｒｏｐ－２をコードする遺伝子に包含される。

[0029] 本発明における相同性の数値は、特に明示した場合を除き、当業者に公知の相同性検索プログラムを用いて算出される数値であってよいが、塩基配列については、ＢＬＡＳＴ［Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２１５，４０３（１９９０）］においてデフォルトのパラメータを用いて算出される数値など、アミノ酸配列については、ＢＬＡＳＴ２［Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．，２５，３３８９（１９９７）、Ｇｅｎｏｍｅ Ｒｅｓ．，７，６４９（１９９７）、ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／Ｅｄｕｃａｔｉｏｎ／ＢＬＡＳＴｉｎｆｏ／ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ３．ｈｔｍｌ］においてデフォルトのパラメータを用いて算出される数値などが挙げられる。

[0030] デフォルトのパラメータとしては、Ｇ（Ｃｏｓｔ ｔｏ ｏｐｅｎ ｇａｐ）が塩基配列の場合は５、アミノ酸配列の場合は１１、－Ｅ（Ｃｏｓｔ ｔｏ ｅｘｔｅｎｄ ｇａｐ）が塩基配列の場合は２、アミノ酸配列の場合は１、－ｑ（Ｐｅｎａｌｔｙ ｆｏｒ ｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ ｍｉｓｍａｔｃｈ）が－３、－ｒ（ｒｅｗａｒｄ ｆｏｒ ｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ ｍａｔｃｈ）が１、－ｅ（ｅｘｐｅｃｔ ｖａｌｕｅ）が１０、－Ｗ（ｗｏｒｄｓｉｚｅ）が塩基配列の場合は１１残基、アミノ酸配列の場合は３残基、－ｙ［Ｄｒｏｐｏｆｆ（Ｘ）ｆｏｒ ｂｌａｓｔ ｅｘｔｅｎｓｉｏｎｓ ｉｎ ｂｉｔｓ］がｂｌａｓｔｎ の場合は２０、ｂｌａｓｔｎ以外のプログラムでは７、－Ｘ（Ｘ ｄｒｏｐｏｆｆ ｖａｌｕｅ ｆｏｒ ｇａｐｐｅｄ ａｌｉｇｎｍｅｎｔ ｉｎ ｂｉｔｓ）が１５および－Ｚ（ｆｉｎａｌ Ｘ ｄｒｏｐｏｆｆ ｖａｌｕｅ ｆｏｒ ｇａｐｐｅｄ ａｌｉｇｎｍｅｎｔ ｉｎ ｂｉｔｓ）がｂｌａｓｔｎ の場合は５０、ｂｌａｓｔｎ以外のプログラムでは２５である（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ｂｌａｓｔ／ｈｔｍｌ／ｂｌａｓｔｃｇｉｈｅｌｐ．ｈｔｍｌ）。

[0031] 配列番号１またはＮＣＢＩアクセッション番号ＮＰ＿００２３４４で示されるアミノ酸配列の部分配列から成るポリペプチドは、当業者に公知の方法

によって作成することができ、例えば、配列番号１で示されるアミノ酸配列をコードするＤＮＡの一部を欠失させ、これを含む発現ベクターを導入した形質転換体を培養することにより作製することができる。

[0032] また、上記の方法で作製されるポリペプチドまたはＤＮＡに基づいて、上記と同様の方法により、配列番号１またはＮＣＢＩアクセッション番号ＮＰ＿００２３４４で示されるアミノ酸配列において１以上のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチドを得ることができる。

[0033] さらに、配列番号１またはＮＣＢＩアクセッション番号ＮＰ＿００２３４４で示されるアミノ酸配列の部分配列から成るポリペプチド、または配列番号１またはＮＣＢＩアクセッション番号ＮＰ＿００２３４４で示されるアミノ酸配列の部分配列において１以上のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチドは、フルオレニルメチルオキシカルボニル（Ｆｍｏｃ）法、ｔ－ブチルオキシカルボニル（ｔＢｏｃ）法などの化学合成法によって製造することもできる。

[0034] 本発明におけるヒトＴｒｏｐ－２の細胞外領域としては、例えば配列番号１で示される該ポリペプチドのアミノ酸配列を公知の膜貫通領域予測プログラムＳＯＳＵＩ（ｈｔｔｐ：／／ｂｐ．ｎｕａｐ．ｎａｇｏｙａ－ｕ．ａｃ．ｊｐ／ＳＯＳＵＩ／ＳＯＳＵＩ＿ｓｕｂｍｉｔ．）、ＴＭＨＭＭ ｖｅｒ．２（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｃｂｓ．ｄｔｕ．ｄｋ／ｓｅｒｖｉｃｅｓ／ＴＭＨＭＭ－２．０／）またはＥｘＰＡＳｙ Ｐｒｏｔｅｏｍｉｃｓ Ｓｅｒｖｅｒ（ｈｔｔｐ：／／Ｃａ．ｅｘｐａｓｙ．ｏｒｇ／）などを用いて予測された領域などが挙げられる。具体的には、ＳＯＳＵＩにおいて予測される細胞外ドメインであるＮ末より２７４番目までが挙げられる。

[0035] 本発明におけるヒトＴｒｏｐ－２の細胞外領域としては、配列番号１またはＮＣＢＩアクセッション番号ＮＰ＿００２３４４で示されるアミノ酸配列を有するＴｒｏｐ－２の細胞外領域が天然状態でとりうる構造と同等の構造を有していればいずれの構造でもよい。Ｔｒｏｐ－２の細胞外領域が天然状

態でとりうる構造とは、細胞膜上に発現しているＴｒｏｐ－２の天然型の立体構造のことをいう。

[0036] 本発明において、ヒトＴｒｏｐ－２の細胞外領域は３つに分類され、Ｎ末側より順にドメインをＩ、ＩＩ、ＩＩＩと表される。すなわち、ヒトＴｒｏｐ－２の細胞外領域のうち、ＥｐＣＡＭの細胞外領域のシステイン残基に富んだ２つのドメインに相同なドメインを、Ｎ末側より順に各々ドメインＩ、ドメインＩＩと表し、システイン残基の少ないＣ末側のドメインを、ドメインＩＩＩと表す。具体的には、配列番号１で表されるヒトＴｒｏｐ－２のアミノ酸配列のうち、３４番目から７２番目をドメインＩ、７３番目から１４５番目をドメインＩＩ、１４６番目から２７４番目をドメインＩＩＩと表す。本発明のモノクローナル抗体または該抗体断片は、ヒトＴｒｏｐ－２の細胞外領域のうち、少なくともドメインＩに結合する。

[0037] 本発明のモノクローナル抗体または該抗体断片が、Ｔｒｏｐ－２の細胞外領域の天然型立体構造を特異的に認識し、かつ該細胞外領域に結合することは、固相サンドイッチ法などを用いたラジオイムノアッセイ、または酵素免疫測定法（ＥＬＩＳＡ）などを用いたＴｒｏｐ－２を発現した細胞に対する公知の免疫学的検出法、好ましくは蛍光細胞染色法などの特定の抗原を発現した細胞と特定抗原に対する抗体の結合性を調べることができる。

[0038] 例えば、ＦＭＡＴ８１００ＨＴＳシステム（アプライドバイオシステムズ社製）などを用いる蛍光抗体染色法［Ｃａｎｃｅｒ Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．，３６，３７３（１９９３）］、フローサイトメトリーを用いる蛍光細胞染色法、またはＢｉａｃｏｒｅシステム（ジーイーヘルスケア社製）などを用いた表面プラズモン共鳴などの方法が挙げられる。

[0039] また、公知の免疫学的検出法［Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ－Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ ｐｒａｃｔｉｃｅ，Ｔｈｉｒｄ ｅｄｉｔｉｏｎ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ（１９９６）、Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ－Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ（１９８８）、単クローン抗体

実験マニュアル，講談社サイエンティフィック（１９８７）］などを組み合わせて確認することもできる。

[0040] ヒトＴｒｏｐ－２を発現した細胞としては、該Ｔｒｏｐ－２を発現していればいずれの細胞でもよく、例えばヒト体内に天然に存在する細胞、ヒト体内に天然に存在する細胞から樹立された細胞株、または遺伝子組換え技術により得られた細胞などが挙げられる。

[0041] ヒト体内に天然に存在する細胞としては、癌患者体内において該ポリペプチドが発現している細胞が挙げられ、例えば、バイオプシーなどで得られた腫瘍細胞のうちで該Ｔｒｏｐ－２が発現している細胞などが挙げられる。

[0042] ヒト体内に天然に存在する細胞から樹立された細胞株としては、上記の癌患者から得られた該Ｔｒｏｐ－２が発現している細胞を株化して得られた細胞株のうち、該Ｔｒｏｐ－２を発現している細胞株が挙げられる。例えば、ヒトから樹立された細胞株であるヒト膵臓癌細胞株ＢｘＰＣ－３（ＡＴＣＣ番号：ＣＲＬ－１６８７）、ヒト乳癌細胞株ＭＣＦ－７（ＡＴＣＣ番号：ＨＴＢ－２２）などが挙げられる。

[0043] 遺伝子組換え技術により得られた細胞としては、具体的には、該Ｔｒｏｐ－２をコードするｃＤＮＡを含む発現ベクターを昆虫細胞または動物細胞などに導入することにより得られる、該Ｔｒｏｐ－２を発現した細胞などが挙げられる。

[0044] 本発明のモノクローナル抗体は、Ｔｒｏｐ－２に高いアフィニティーで結合する抗体であることが好ましい。Ｔｒｏｐ－２に高いアフィニティーで結合する抗体とは、治療用抗体として十分なアフィニティーを有する抗体であり、抗体のＴｒｏｐ－２に対する解離定数（以下、K_Dと記す）が1×10^{-9}Ｍ以下であることが好ましく、7×10^{-10}Ｍ以下であることがより好ましく、5×10^{-10}Ｍ以下であることが更に好ましく、1×10^{-10}Ｍ以下であることが特に好ましい。

[0045] K_Dを1×10^{-9}Ｍ以下とすることにより、治療用抗体として十分なアフィニティーでヒトＴｒｏｐ－２の細胞外領域に結合することができ、かつ高い

ＡＤＣＣ活性および抗腫瘍活性を有することができる。抗体のＴｒｏｐ－２に対する解離定数K_Dは、例えば、Ｂｉａｃｏｒｅ　Ｔ１００（ジーイーヘルスケア社製）などを用いて算出することができ、具体的には、実施例において後述する方法により測定することができる。本発明のモノクローナル抗体は、当該測定法を用いた場合に、抗Ｔｒｏｐ－２抗体ＡＲ４７Ａ６．４．２と比べて、より低い値を示す。

[0046] アフィニティーとは、反応速度論的な解析により測定されるものであり、例えばＢｉａｃｏｒｅ　Ｔ１００（ジーイーヘルスケア社製）などを用いて測定することができる。

[0047] 本発明において、解離が遅いとは、Ｂｉａｃｏｒｅ　Ｔ１００において算出される抗体の解離速度定数ｋｄの値が、より小さな値を示すことである。解離速度定数ｋｄは、例えばＢｉａｃｏｒｅ　Ｔ１００を用いて測定され、付属ソフトウェアＢｉａｃｏｒｅ　Ｔ１００　ｅｖａｌｕａｔｉｏｎ　ｓｏｆｔｗａｒｅ（ジーイーヘルスケア社製）により算出することができる。

[0048] また、本発明のモノクローナル抗体は、高いＡＤＣＣ活性および抗腫瘍活性を有することが好ましく、さらにＣＤＣ活性を有することがより好ましい。

[0049] 本発明において、「高いＡＤＣＣ活性を有する」とは、Ｔｒｏｐ－２発現細胞に対して、公知の測定方法［Ｃａｎｃｅｒ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．，３６，３７３（１９９３）］を用いて、同時に複数の抗体のＡＤＣＣ活性を測定した場合に、抗Ｔｒｏｐ－２抗体ＡＲ４７Ａ６．４．２と比べて、より高いＡＤＣＣ活性を示すことをいう。

[0050] 本発明において、「高い抗腫瘍活性を有する」とは、Ｔｒｏｐ－２を発現する癌細胞株の担癌動物モデルにおいて、同時に複数の抗体の抗腫瘍活性を測定した場合、抗Ｔｒｏｐ－２抗体ＡＲ４７Ａ６．４．２と比べて、より高い抗腫瘍活性を示すことをいう。抗腫瘍活性は、実施例において後述する方法により測定する。

[0051] 本発明においてモノクローナル抗体としては、ハイブリドーマにより産生

される抗体、または抗体遺伝子を含む発現ベクターで形質転換した形質転換体により生産される遺伝子組換え抗体を挙げることができる。

[0052] モノクローナル抗体とは、単一クローンの抗体産生細胞が分泌する抗体であり、ただ一つのエピトープ（抗原決定基ともいう）を認識し、モノクローナル抗体を構成するアミノ酸配列（１次配列）が均一である。

[0053] エピトープとは、モノクローナル抗体が認識し、結合する単一のアミノ酸配列、アミノ酸配列から成る立体構造、糖鎖が結合したアミノ酸配列および糖鎖が結合したアミノ酸配列から成る立体構造などが挙げられる。

[0054] 本発明のモノクローナル抗体が認識するエピトープは、Ｔｒｏｐ－２の一部のドメインを欠失または他のタンパク質由来のドメインと置換させた変異体を用いて抗体の結合実験を行うことにより決定することができる。

[0055] 本発明のモノクローナル抗体が認識するエピトープとは、抗Ｔｒｏｐ－２モノクローナル抗体ＡＲ４７Ａ６．４．２が認識するエピトープとは異なるアミノ酸配列または立体構造である。ＡＲ４７Ａ６．４．２は、１７９番目から１８７番目のアミノ酸配列および、２５２番目から２６０番目までの配列をエピトープとして認識し結合することが開示されている（国際公開第２００８／１４４８９１号）。

[0056] 本発明のモノクローナル抗体としては、ヒトＴｒｏｐ－２の細胞外領域のうち、抗Ｔｒｏｐ－２抗体ＡＲ４７Ａ６．４．２および７７２２０が結合するエピトープとは別の部位に結合するモノクローナル抗体および該抗体断片が挙げられる。

[0057] 本発明のモノクローナル抗体としては、具体的には、ＣＤＲ１～３がそれぞれ配列番号１３～１５で表されるアミノ酸配列を含む抗体の重鎖可変領域（以下、ＶＨと記す）を含み、かつＣＤＲ１～３がそれぞれ配列番号１６～１８で表されるアミノ酸配列を含む抗体の軽鎖可変領域（以下、ＶＬと記す）を含むモノクローナル抗体が挙げられる。

[0058] また、本発明のモノクローナル抗体として、より具体的には、配列番号１０で表されるアミノ酸配列を含む抗体のＶＨを含み、かつ配列番号１２で表

されるアミノ酸配列を含む抗体のＶＬを含むモノクローナル抗体が挙げられる。

[0059] 更に、本発明のモノクローナル抗体としては、前記モノクローナル抗体ならびに前記モノクローナル抗体と競合しＴｒｏｐ－２の細胞外領域に結合するモノクローナル抗体が結合する、Ｔｒｏｐ－２の細胞外領域上に存在するエピトープと、同じエピトープに結合するモノクローナル抗体を挙げることができる。具体的には、ヒトＴｒｏｐ－２の細胞外領域のうち、少なくともドメインＩを認識する抗体および該抗体断片が挙げられる。

[0060] ハイブリドーマは、例えば上記のＴｒｏｐ－２を発現した細胞などを抗原として調製し、該抗原を免疫した動物より抗原特異性を有する抗体生産細胞を誘導し、さらに、該抗体生産細胞と骨髄腫細胞とを融合させることにより、調製することができる。該ハイブリドーマを培養するか、または該ハイブリドーマを動物に投与して該動物を腹水癌化させ、該培養液または腹水を分離、精製することにより抗Ｔｒｏｐ－２モノクローナル抗体を取得することができる。

[0061] 抗原を免疫する動物としてはハイブリドーマを作製することが可能であれば、いかなるものも用いることができるが、例えば、好ましくはマウス、ラット、ハムスター、ニワトリまたはラビットが挙げられる。このような動物から抗体産生能を有する細胞を取得し、該細胞にｉｎ　ｖｉｔｒｏで免疫を施した後に、骨髄腫細胞と融合して作製したハイブリドーマが生産する抗体なども本発明のモノクローナル抗体に包含される。

[0062] 本発明において遺伝子組換え抗体としては、ヒト型キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体または抗体断片など、遺伝子組換えにより製造される抗体を包含する。遺伝子組換え抗体において、モノクローナル抗体の特徴を有し、抗原性が低く、血中半減期が延長されたものは、治療薬として好ましい。遺伝子組換え抗体は、例えば上記本発明のモノクローナル抗体を遺伝子組換え技術を用いて改変したものが挙げられる。

[0063] ヒト型キメラ抗体とは、非ヒト動物の抗体のＶＨおよびＶＬとヒト抗体の

重鎖定常領域（以下、ＣＨと記す）および軽鎖定常領域（以下、ＣＬと記す）とから成る抗体をいう。本発明のヒト型キメラ抗体は、Ｔｒｏｐ－２を特異的に認識し、かつ該細胞外領域に結合するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマより、ＶＨおよびＶＬをコードするｃＤＮＡを取得し、ヒト抗体のＣＨおよびＣＬをコードする遺伝子を有する動物細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築し、動物細胞へ導入することにより発現させ、製造することができる。

[0064] ヒト型キメラ抗体のＣＨとしては、ヒトイムノグロブリン（以下、ｈＩｇと表記する）に属すればいかなるものでもよいが、好ましくはｈＩｇＧクラスのものが用いられ、さらにｈＩｇＧ１、ｈＩｇＧ２、ｈＩｇＧ３またはｈＩｇＧ４といったサブクラスのいずれも用いることができる。また、ヒト型キメラ抗体のＣＬとしては、ｈＩｇに属すればいずれのものでもよく、κクラスまたはλクラスのものを用いることができる。

[0065] 本発明のキメラ抗体として具体的には、配列番号１０で表されるアミノ酸配列を含む抗体のＶＨを含み、かつ配列番号１２で表されるアミノ酸配列を含む抗体のＶＬを含むキメラ抗体が挙げられる。

[0066] 更に、本発明のキメラ抗体としては、前記キメラ抗体と競合して、Ｔｒｏｐ－２の細胞外領域に結合するキメラ抗体および前記キメラ抗体が結合するＴｒｏｐ－２の細胞外領域上に存在するエピトープと、同じエピトープに結合するキメラ抗体を挙げることができる。

[0067] ヒト化抗体とは、ヒト型相補鎖決定領域（Ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔａｒｉｔｙ Ｄｅｔｅｒｍｉｎｉｎｇ Ｒｅｇｉｏｎ、以下、ＣＤＲと表記する）移植抗体を包含する。

[0068] 本発明のヒト化抗体とは、非ヒト動物の抗体のＶＨおよびＶＬのＣＤＲのアミノ酸配列をヒト抗体のＶＨおよびＶＬの適切な位置に移植した抗体をいう。本発明のヒト化抗体は、非ヒト動物由来のハイブリドーマが産生しＴｒｏｐ－２に特異的に結合するモノクローナル抗体のＶＨおよびＶＬのＣＤＲのアミノ酸配列を、任意のヒト抗体のＶＨおよびＶＬのフレームワーク領域

（Ｆｒａｍｅｗｏｒｋ　Ｒｅｇｉｏｎ、以下、ＦＲと表記する）に各々移植して可変領域（以下、Ｖ領域と表記する）のアミノ酸配列を設計し、さらに、Ｖ領域のアミノ酸配列をコードするｃＤＮＡを構築し、ヒト抗体のＣＨおよびＣＬをコードする遺伝子を有する動物細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト化抗体発現ベクターを構築し、動物細胞へ導入することにより発現させ、製造することができる。

[0069] ヒト化抗体のＶＨおよびＶＬのＦＲのアミノ酸配列は、ヒト抗体由来のＶＨおよびＶＬのＦＲのアミノ酸配列であれば、いかなるものでも用いることができる。例えば、Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｄａｔａ　Ｂａｎｋなどのデータベースに登録されているヒト抗体のＶＨおよびＶＬのＦＲのアミノ酸配列、またはＳｅｑｕｅｎｃｅｓ　ｏｆ　Ｐｒｏｔｅｉｎｓ　ｏｆ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，ＵＳ　Ｄｅｐｔ．Ｈｅａｌｔｈ　ａｎｄ　Ｈｕｍａｎ　Ｓｅｒｖｉｃｅｓ（１９９１）などに記載の、ヒト抗体のＶＨおよびＶＬのＦＲの各サブグループの共通アミノ酸配列などが挙げられる。

[0070] 本発明のヒト化抗体としては、ＣＤＲ１～３がそれぞれ配列番号１３～１５のアミノ酸配列を含む抗体のＶＨを含み、かつＣＤＲ１～３がそれぞれ配列番号１６～１８のアミノ酸配列を含む抗体のＶＬを含むヒト化抗体が挙げられる。

[0071] 本発明のヒト化抗体として、具体的には、以下の（ａ）ＶＨおよび（ｂ）ＶＬの少なくとも一方を含むヒト化抗体などが挙げられるが、導入される改変の数に制限はない。

（ａ）配列番号２４のアミノ酸配列、または配列番号２４のアミノ酸配列の９番目のＡｌａ、１２番目のＬｙｓ、２０番目のＶａｌ、３８番目のＡｒｇ、４８番目のＭｅｔ、６７番目のＡｒｇ、６８番目のＶａｌ、７０番目のＩｌｅ、９５番目のＴｙｒ、および１１２番目のＶａｌから選ばれる少なくとも１つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む抗体のＶＨ

（ｂ）が配列番号２６のアミノ酸配列、または配列番号２６のアミノ酸配列

中の１５番目のＬｅｕ、１９番目のＡｌａ、２１番目のＩｌｅ、および８４番目のＬｅｕから選ばれる少なくとも１つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む抗体のＶＬ

[0072] 更に、本発明のヒト化抗体に含まれるＶＨとしては、以下の（１）～（１１）が好ましい。

（１）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａ、１２番目のＬｙｓ、２０番目のＶａｌ、３８番目のＡｒｇ、４８番目のＭｅｔ、６７番目のＡｒｇ、６８番目のＶａｌ、７０番目のＩｌｅ、９５番目のＴｙｒ、および１１２番目のＶａｌが、他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むＶＨ

（２）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａ、１２番目のＬｙｓ、２０番目のＶａｌ、３８番目のＡｒｇ、４８番目のＭｅｔ、６７番目のＡｒｇ、６８番目のＶａｌ、７０番目のＩｌｅ、および９５番目のＴｙｒが、他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むＶＨ

（３）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａ、２０番目のＶａｌ、３８番目のＡｒｇ、４８番目のＭｅｔ、６７番目のＡｒｇ、６８番目のＶａｌ、７０番目のＩｌｅ、および９５番目のＴｙｒが、他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むＶＨ

（４）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａ、３８番目のＡｒｇ、４８番目のＭｅｔ、６７番目のＡｒｇ、６８番目のＶａｌ、および９５番目のＴｙｒが、他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むＶＨ

（５）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａ、６７番目のＡｒｇ、６８番目のＶａｌ、７０番目のＩｌｅ、および９５番目のＴｙｒが、他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むＶＨ

（６）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａ、３８番目のＡｒｇ、４８番目のＭｅｔ、６７番目のＡｒｇ、および９５番目のＴｙｒが、他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むＶＨ

（７）配列番号２４のアミノ酸配列中の３８番目のＡｒｇ、４８番目のＭｅ

ｔ、６７番目のＡｒｇ、６８番目のＶａｌ、および９５番目のＴｙｒが、他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むＶＨ

（８）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａ、３８番目のＡｒｇ、４８番目のＭｅｔ、および９５番目のＴｙｒが、他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むＶＨ

（９）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａ、６７番目のＡｒｇ、および９５番目のＴｙｒが、他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むＶＨ

（１０）配列番号２４のアミノ酸配列中の３８番目のＡｒｇ、４８番目のＭｅｔ、および９５番目のＴｙｒが、他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むＶＨ

（１１）配列番号２４のアミノ酸配列中の３８番目のＡｒｇ、および４８番目のＭｅｔが、他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むＶＨ

[0073] 前記ＶＨのアミノ酸配列としては、例えば、配列番号２４のアミノ酸配列中の、９番目のＡｌａをＰｒｏに、１２番目のＬｙｓをＶａｌに、２０番目のＶａｌをＩｌｅに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、７０番目のＩｌｅをＬｅｕに、９５番目のＴｙｒをＰｈｅに、または１１２番目のＶａｌをＬｅｕに置換する改変から選ばれる少なくとも１つの改変が導入されたアミノ酸配列が挙げられる。

[0074] １０個の改変が導入されたＶＨのアミノ酸配列としては、具体的には、例えば、配列番号２４のアミノ酸配列中の、９番目のＡｌａをＰｒｏに、１２番目のＬｙｓをＶａｌに、２０番目のＶａｌをＩｌｅに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、７０番目のＩｌｅをＬｅｕに、９５番目のＴｙｒをＰｈｅに、および１１２番目のＶａｌをＬｅｕに置換したアミノ酸配列が挙げられる。

[0075] ９個の改変が導入されたＶＨのアミノ酸配列としては、具体的には、例え

ば、以下の（１）～（１０）のアミノ酸配列が挙げられる。
（１）配列番号２４のアミノ酸配列中の１２番目のＬｙｓをＶａｌに、２０番目のＶａｌをＩｌｅに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、７０番目のＩｌｅをＬｅｕに、９５番目のＴｙｒをＰｈｅに、および１１２番目のＶａｌをＬｅｕに置換したアミノ酸配列
（２）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、２０番目のＶａｌをＩｌｅに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、７０番目のＩｌｅをＬｅｕに、９５番目のＴｙｒをＰｈｅに、および１１２番目のＶａｌをＬｅｕに置換したアミノ酸配列
（３）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、１２番目のＬｙｓをＶａｌに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、７０番目のＩｌｅをＬｅｕに、９５番目のＴｙｒをＰｈｅに、および１１２番目のＶａｌをＬｅｕに置換したアミノ酸配列
（４）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、１２番目のＬｙｓをＶａｌに、２０番目のＶａｌをＩｌｅに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、７０番目のＩｌｅをＬｅｕに、９５番目のＴｙｒをＰｈｅに、および１１２番目のＶａｌをＬｅｕに置換したアミノ酸配列
（５）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、１２番目のＬｙｓをＶａｌに、２０番目のＶａｌをＩｌｅに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、７０番目のＩｌｅをＬｅｕに、９５番目のＴｙｒをＰｈｅに、および１１２番目のＶａｌをＬｅｕに置換したアミノ酸配列
（６）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、１２番目のＬｙｓをＶａｌに、２０番目のＶａｌをＩｌｅに、３８番目のＡｒｇを

1450 of 10951
OnCusp Ex. 1038

OnCusp
Ex. 1038

ＬｙｓにＭｅｔをＩｌｅに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、７０番目のＩｌｅをＬｅｕに、９５番目のＴｙｒをＰｈｅに、および１１２番目のＶａｌをＬｅｕに置換したアミノ酸配列

（７）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、１２番目のＬｙｓをＶａｌに、２０番目のＶａｌをＩｌｅに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、７０番目のＩｌｅをＬｅｕに、９５番目のＴｙｒをＰｈｅに、および１１２番目のＶａｌをＬｅｕに置換したアミノ酸配列

（８）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、１２番目のＬｙｓをＶａｌに、２０番目のＶａｌをＩｌｅに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、９５番目のＴｙｒをＰｈｅに、および１１２番目のＶａｌをＬｅｕに置換したアミノ酸配列

（９）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、１２番目のＬｙｓをＶａｌに、２０番目のＶａｌをＩｌｅに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、７０番目のＩｌｅをＬｅｕに、および１１２番目のＶａｌをＬｅｕに置換したアミノ酸配列

（１０）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、１２番目のＬｙｓをＶａｌに、２０番目のＶａｌをＩｌｅに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、７０番目のＩｌｅをＬｅｕに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

[0076] ８個の改変が導入されたＶＨのアミノ酸配列としては、具体的には、例えば、以下の（１）～（１７）のアミノ酸配列が挙げられる。

（１）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、１２番目のＬｙｓをＶａｌに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、７

1451 of 10951

０番目のＩｌｅをＬｅｕに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（２）配列番号２４のアミノ酸配列中の１２番目のＬｙｓをＶａｌに、２０番目のＶａｌをＩｌｅに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、７０番目のＩｌｅをＬｅｕに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（３）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、２０番目のＶａｌをＩｌｅに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、７０番目のＩｌｅをＬｅｕに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（４）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、１２番目のＬｙｓをＶａｌに、２０番目のＶａｌをＩｌｅに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、７０番目のＩｌｅをＬｅｕに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（５）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、１２番目のＬｙｓをＶａｌに、２０番目のＶａｌをＩｌｅに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、７０番目のＩｌｅをＬｅｕに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（６）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、１２番目のＬｙｓをＶａｌに、２０番目のＶａｌをＩｌｅに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、７０番目のＩｌｅをＬｅｕに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（７）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、１２番

目のＬｙｓをＶａｌに、２０番目のＶａｌをＩｌｅに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、７０番目のＩｌｅをＬｅｕに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（８）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、１２番目のＬｙｓをＶａｌに、２０番目のＶａｌをＩｌｅに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（９）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、１２番目のＬｙｓをＶａｌに、２０番目のＶａｌをＩｌｅに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、および７０番目のＩｌｅをＬｅｕに置換したアミノ酸配列

（１０）配列番号２４のアミノ酸配列中の１２番目のＬｙｓをＶａｌに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、７０番目のＩｌｅをＬｅｕに、９５番目のＴｙｒをＰｈｅに、および１１２番目のＶａｌをＬｅｕに置換したアミノ酸配列

（１１）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、７０番目のＩｌｅをＬｅｕに、９５番目のＴｙｒをＰｈｅに、および１１２番目のＶａｌをＬｅｕに置換したアミノ酸配列

（１２）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、１２番目のＬｙｓをＶａｌに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、７０番目のＩｌｅをＬｅｕに、９５番目のＴｙｒをＰｈｅに、および１１２番目のＶａｌをＬｅｕに置換し

たアミノ酸配列

（１３）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、１２番目のＬｙｓをＶａｌに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、７０番目のＩｌｅをＬｅｕに、９５番目のＴｙｒをＰｈｅに、および１１２番目のＶａｌをＬｅｕに置換したアミノ酸配列

（１４）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、１２番目のＬｙｓをＶａｌに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、７０番目のＩｌｅをＬｅｕに、９５番目のＴｙｒをＰｈｅに、および１１２番目のＶａｌをＬｅｕに置換したアミノ酸配列

（１５）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、１２番目のＬｙｓをＶａｌに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、７０番目のＩｌｅをＬｅｕに、９５番目のＴｙｒをＰｈｅに、および１１２番目のＶａｌをＬｅｕに置換したアミノ酸配列

（１６）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、１２番目のＬｙｓをＶａｌに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、９５番目のＴｙｒをＰｈｅに、および１１２番目のＶａｌをＬｅｕに置換したアミノ酸配列

（１７）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、１２番目のＬｙｓをＶａｌに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、７０番目のＩｌｅをＬｅｕに、および１１２番目のＶａｌをＬｅｕに置換したアミノ酸配列

[0077] ７個の改変が導入されたＶＨのアミノ酸配列としては、具体的には、例えば、以下の（１）～（８）のアミノ酸配列が挙げられる。

（１）配列番号２４のアミノ酸配列中の１２番目のＬｙｓをＶａｌに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、７０番目のＩｌｅをＬｅｕに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（２）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、７０番目のＩｌｅをＬｅｕに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（３）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、１２番目のＬｙｓをＶａｌに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、７０番目のＩｌｅをＬｅｕに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（４）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、１２番目のＬｙｓをＶａｌに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、７０番目のＩｌｅをＬｅｕに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（５）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、１２番目のＬｙｓをＶａｌに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、７０番目のＩｌｅをＬｅｕに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（６）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、１２番目のＬｙｓをＶａｌに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、７０番目のＩｌｅをＬｅｕに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（７）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、１２番目のＬｙｓをＶａｌに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

1455 of 10951
OnCusp Ex. 1038

（８）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、１２番目のＬｙｓをＶａｌに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、および７０番目のＩｌｅをＬｅｕに置換したアミノ酸配列

[0078] ６個の改変が導入されたＶＨのアミノ酸配列としては、具体的には、例えば、以下の（１）～（１３）のアミノ酸配列が挙げられる。

（１）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（２）配列番号２４のアミノ酸配列中の３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、７０番目のＩｌｅをＬｅｕに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（３）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、７０番目のＩｌｅをＬｅｕに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（４）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、７０番目のＩｌｅをＬｅｕに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（５）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、７０番目のＩｌｅをＬｅｕに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（６）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６７番目のＡｒｇを

1457 of 10951

ＬｙｓにＬｅｕに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（７）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、および７０番目のＩｌｅをＬｅｕに置換したアミノ酸配列

（８）配列番号２４のアミノ酸配列中の２０番目のＶａｌをＩｌｅに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（９）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、２０番目のＶａｌをＩｌｅに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（１０）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、２０番目のＶａｌをＩｌｅに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（１１）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、２０番目のＶａｌをＩｌｅに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（１２）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、２０番目のＶａｌをＩｌｅに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（１３）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、２０番目のＶａｌをＩｌｅに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔ

OnCusp Ex. 1038

をＩｌｅに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、および６８番目のＶａｌをＡｌａに置換したアミノ酸配列

[0079] ５個の改変が導入されたＶＨのアミノ酸配列としては、具体的には、例えば、以下の（１）～（５）のアミノ酸配列が挙げられる。

（１）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、７０番目のＩｌｅをＬｅｕに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（２）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（３）配列番号２４のアミノ酸配列中の３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（４）配列番号２４のアミノ酸配列中の１２番目のＬｙｓをＶａｌに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（５）配列番号２４のアミノ酸配列中の３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、７０番目のＩｌｅをＬｅｕに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

[0080] ４個の改変が導入されたＶＨのアミノ酸配列としては、具体的には、例えば、以下の（１）～（５）のアミノ酸配列が挙げられる。

（１）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（２）配列番号２４のアミノ酸配列中の１２番目のＬｙｓをＶａｌに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（３）配列番号２４のアミノ酸配列中の３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８

番目のＭｅｔをＩｌｅに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（４）配列番号２４のアミノ酸配列中の３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（５）配列番号２４のアミノ酸配列中の３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、７０番目のＩｌｅをＬｅｕに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

[0081] ３個の改変が導入されたＶＨのアミノ酸配列としては、具体的には、例えば、以下の（１）～（１２）のアミノ酸配列が挙げられる。

（１）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（２）配列番号２４のアミノ酸配列中の３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（３）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、１２番目のＬｙｓをＶａｌに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（４）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（５）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（６）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（７）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、７０番目のＩｌｅをＬｅｕに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（８）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、および４８番目のＭｅｔをＩｌｅに置換したアミノ酸配列

（９）配列番号２４のアミノ酸配列中の１２番目のＬｙｓをＶａｌに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、および４８番目のＭｅｔをＩｌｅに置換したアミノ酸配列

（１０）配列番号２４のアミノ酸配列中の３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、および６７番目のＡｒｇをＬｙｓに置換したアミノ酸配列

（１１）配列番号２４のアミノ酸配列中の３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、および６８番目のＶａｌをＡｌａに置換したアミノ酸配列

（１２）配列番号２４のアミノ酸配列中の３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、および７０番目のＩｌｅをＬｅｕに置換したアミノ酸配列

[0082] ２個の改変が導入されたＶＨのアミノ酸配列としては、具体的には、例えば、以下の（１）～（１８）のアミノ酸配列が挙げられる。

（１）配列番号２４のアミノ酸配列中の３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、および４８番目のＭｅｔをＩｌｅに置換したアミノ酸配列

（２）配列番号２４のアミノ酸配列中の３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（３）配列番号２４のアミノ酸配列中の４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（４）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、および３８番目のＡｒｇをＬｙｓに置換したアミノ酸配列

（５）配列番号２４のアミノ酸配列中の１２番目のＬｙｓをＶａｌに、および３８番目のＡｒｇをＬｙｓに置換したアミノ酸配列

（６）配列番号２４のアミノ酸配列中の３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、および６７番目のＡｒｇをＬｙｓに置換したアミノ酸配列

（７）配列番号２４のアミノ酸配列中の３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、および６８番目のＶａｌをＡｌａに置換したアミノ酸配列

（８）配列番号２４のアミノ酸配列中の３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、および７０番目のＩｌｅをＬｅｕに置換したアミノ酸配列

（９）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、および４８番目のＭｅｔをＩｌｅに置換したアミノ酸配列

（１０）配列番号２４のアミノ酸配列中の１２番目のＬｙｓをＶａｌに、および４８番目のＭｅｔをＩｌｅに置換したアミノ酸配列

（１１）配列番号２４のアミノ酸配列中の４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、および６７番目のＡｒｇをＬｙｓに置換したアミノ酸配列

（１２）配列番号２４のアミノ酸配列中の４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、および６８番目のＶａｌをＡｌａに置換したアミノ酸配列

（１３）配列番号２４のアミノ酸配列中の４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、および７０番目のＩｌｅをＬｅｕに置換したアミノ酸配列

（１４）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（１５）配列番号２４のアミノ酸配列中の１２番目のＬｙｓをＶａｌに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（１６）配列番号２４のアミノ酸配列中の６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（１７）配列番号２４のアミノ酸配列中の６８番目のＶａｌをＡｌａに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（１８）配列番号２４のアミノ酸配列中の７０番目のＩｌｅをＬｅｕに、および９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

[0083] １個の改変が導入されたＶＨのアミノ酸配列としては、具体的には、例えば、以下の（１）～（１０）のアミノ酸配列が挙げられる。

（１）配列番号２４のアミノ酸配列中の９番目のＡｌａをＰｒｏに置換したアミノ酸配列

（２）配列番号２４のアミノ酸配列中の１２番目のＬｙｓをＶａｌに置換したアミノ酸配列

（３）配列番号２４のアミノ酸配列中の２０番目のＶａｌをＩｌｅに置換したアミノ酸配列

（４）配列番号２４のアミノ酸配列中の３８番目のＡｒｇをＬｙｓに置換したアミノ酸配列

（５）配列番号２４のアミノ酸配列中の４８番目のＭｅｔをＩｌｅに置換したアミノ酸配列

（６）配列番号２４のアミノ酸配列中の６７番目のＡｒｇをＬｙｓに置換したアミノ酸配列

（７）配列番号２４のアミノ酸配列中の６８番目のＶａｌをＡｌａに置換したアミノ酸配列

（８）配列番号２４のアミノ酸配列中の７０番目のＩｌｅをＬｅｕに置換したアミノ酸配列

（９）配列番号２４のアミノ酸配列中の９５番目のＴｙｒをＰｈｅに置換したアミノ酸配列

（１０）配列番号２４のアミノ酸配列中の１１２番目のＶａｌをＬｅｕに置換したアミノ酸配列

[0084] また、本発明のヒト化抗体に含まれるＶＬとしては、以下の（１）～（４）が好ましい。

（１）配列番号２６のアミノ酸配列中の１５番目のＬｅｕ、１９番目のＡｌａ、２１番目のＩｌｅ、および８４番目のＬｅｕが、他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むＶＬ

（２）配列番号２６のアミノ酸配列中の１５番目のＬｅｕ、１９番目のＡｌ

ａ、および８４番目のＬｅｕが、他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むＶＬ

（３）配列番号２６のアミノ酸配列中の１９番目のＡｌａ、２１番目のＩｌｅ、および８４番目のＬｅｕが、他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むＶＬ

（４）配列番号２６のアミノ酸配列中の１９番目のＡｌａ、および８４番目のＬｅｕが、他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むＶＬ

[0085] 前記ＶＬのアミノ酸配列としては、例えば、配列番号２６のアミノ酸配列中の１５番目のＬｅｕをＡｌａに、１９番目のＡｌａをＶａｌに、２１番目のＩｌｅをＭｅｔに、および８４番目のＬｅｕをＶａｌに置換する改変から選ばれる少なくとも１つの改変が導入されたアミノ酸配列が挙げられる。

[0086] ４個の改変が導入されたＶＬのアミノ酸配列としては、具体的には、例えば、配列番号２６のアミノ酸配列中の１５番目のＬｅｕをＡｌａに、１９番目のＡｌａをＶａｌに、２１番目のＩｌｅをＭｅｔに、および８４番目のＬｅｕをＶａｌに置換したアミノ酸配列が挙げられる。

[0087] ３個の改変が導入されたＶＬのアミノ酸配列としては、具体的には、例えば、以下の（１）～（４）のアミノ酸配列が挙げられる。

（１）配列番号２６のアミノ酸配列中の１９番目のＡｌａをＶａｌに、２１番目のＩｌｅをＭｅｔに、および８４番目のＬｅｕをＶａｌに置換したアミノ酸配列

（２）配列番号２６のアミノ酸配列中の１５番目のＬｅｕをＡｌａに、２１番目のＩｌｅをＭｅｔに、および８４番目のＬｅｕをＶａｌに置換したアミノ酸配列

（３）配列番号２６のアミノ酸配列中の１５番目のＬｅｕをＡｌａに、１９番目のＡｌａをＶａｌに、および８４番目のＬｅｕをＶａｌに置換したアミノ酸配列

（４）配列番号２６のアミノ酸配列中の１５番目のＬｅｕをＡｌａに、１９番目のＡｌａをＶａｌに、および２１番目のＩｌｅをＭｅｔに置換したアミ

ノ酸配列

[0088] ２個の改変が導入されたＶＬのアミノ酸配列としては、具体的には、例えば、以下の（１）～（６）のアミノ酸配列が挙げられる。

（１）配列番号２６のアミノ酸配列中の１５番目のＬｅｕをＡｌａに、および１９番目のＡｌａをＶａｌに置換したアミノ酸配列

（２）配列番号２６のアミノ酸配列中の１５番目のＬｅｕをＡｌａに、および２１番目のＩｌｅをＭｅｔに置換したアミノ酸配列

（３）配列番号２６のアミノ酸配列中の１５番目のＬｅｕをＡｌａに、および８４番目のＬｅｕをＶａｌに置換したアミノ酸配列

（４）配列番号２６のアミノ酸配列中の１９番目のＡｌａをＶａｌに、および２１番目のＩｌｅをＭｅｔに置換したアミノ酸配列

（５）配列番号２６のアミノ酸配列中の１９番目のＡｌａをＶａｌに、および８４番目のＬｅｕをＶａｌに置換したアミノ酸配列

（６）配列番号２６のアミノ酸配列中の２１番目のＩｌｅをＭｅｔに、および８４番目のＬｅｕをＶａｌに置換したアミノ酸配列

[0089] １個の改変が導入されたＶＬのアミノ酸配列としては、具体的には、例えば、以下の（１）～（４）のアミノ酸配列が挙げられる。

（１）配列番号２６のアミノ酸配列中の１５番目のＬｅｕをＡｌａに置換したアミノ酸配列

（２）配列番号２６のアミノ酸配列中の１９番目のＡｌａをＶａｌに置換したアミノ酸配列

（３）配列番号２６のアミノ酸配列中の２１番目のＩｌｅをＭｅｔに置換したアミノ酸配列

（４）配列番号２６のアミノ酸配列中の８４番目のＬｅｕをＶａｌに置換したアミノ酸配列

が挙げられる。

[0090] また、本発明のヒト化抗体の具体例としては、以下の（１）～（３）のヒト化抗体が挙げられる。

（１）配列番号２４で表されるアミノ酸配列を含む抗体のＶＨおよび配列番号２６で表されるアミノ酸配列を含む抗体のＶＬの少なくとも一方を含むヒト化抗体

（２）配列番号２４で表されるアミノ酸配列を含む抗体のＶＨおよび図１３で示されるいずれかのアミノ酸配列を含む抗体のＶＬの少なくとも一方を含むヒト化抗体

（３）図１２で示されるいずれかのアミノ酸配列を含む抗体のＶＨおよび配列番号２６のアミノ酸配列を含む抗体のＶＬの少なくとも一方を含むヒト化抗体

[0091] 更に、本発明のヒト化抗体としては、前記ヒト化抗体と競合してＴｒｏｐ－２に反応するヒト化抗体、および前記ヒト化抗体が反応するエピトープと同じエピトープに結合するヒト化抗体も包含される。

[0092] ヒト抗体は、元来、ヒト体内に天然に存在する抗体をいうが、最近の遺伝子工学的、細胞工学的、発生工学的な技術の進歩により作製されたヒト抗体ファージライブラリーおよびヒト抗体産生トランスジェニック動物から得られる抗体なども含まれる。

[0093] ヒト体内に天然に存在する抗体は、例えば、ヒト末梢血リンパ球にＥＢウイルスなどを感染させて不死化し、クローニングすることにより、該抗体を産生するリンパ球を培養し、該培養上清中より該抗体を精製することにより取得することができる。

[0094] ヒト抗体ファージライブラリーは、ヒトＢ細胞から調製した抗体遺伝子をファージ遺伝子に挿入することによりＦａｂ、ｓｃＦｖなどの抗体断片をファージ表面に発現させたライブラリーである。該ライブラリーより、抗原を固定化した基質に対する結合活性を指標として所望の抗原結合活性を有する抗体断片を表面に発現しているファージを回収することができる。該抗体断片は、さらに、遺伝子工学的手法により２本の完全なＨ鎖および２本の完全なＬ鎖からなるヒト抗体分子へも変換することができる。

[0095] ヒト抗体産生トランスジェニック動物は、ヒト抗体遺伝子が細胞内に組込

まれた動物を意味する。具体的には、例えば、マウスＥＳ細胞へヒト抗体遺伝子を導入し、該ＥＳ細胞をマウスの初期胚へ移植後、個体を発生させることにより、ヒト抗体産生トランスジェニックマウスを作製することができる。ヒト抗体産生トランスジェニック動物からのヒト抗体は、通常のヒト以外の動物で行われているハイブリドーマ作製方法を用い、ヒト抗体産生ハイブリドーマを取得し、培養することで培養上清中にヒト抗体を産生蓄積させることにより作製できる。

[0096] 上述の抗体または抗体断片を構成するアミノ酸配列において、１つ以上のアミノ酸が欠失、付加、置換または挿入され、かつ上述の抗体またはその抗体断片と同様な活性を有するモノクローナル抗体またはその抗体断片も、本発明のモノクローナル抗体またはその抗体断片に包含される。

[0097] 欠失、置換、挿入および／または付加されるアミノ酸の数は１個以上でありその数は特に限定されないが、部位特異的変異導入法［Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ ２ｎｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ（１９８９）、Ｃｕｒｒｅｎｔ ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ（１９８７－１９９７）、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，１０，６４８７（１９８２）、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．，ＵＳＡ，７９，６４０９（１９８２）、Ｇｅｎｅ，３４，３１５（１９８５）、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，１３，４４３１（１９８５）、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ ＵＳＡ，８２，４８８（１９８５）］などの周知の技術により、欠失、置換もしくは付加できる程度の数である。例えば、好ましくは１～数十個、より好ましくは１～２０個、さらに好ましくは１～１０個、特に好ましくは１～５個である。

[0098] 上記の抗体のアミノ酸配列において１つ以上のアミノ酸残基が欠失、置換、挿入または付加されたとは、次のことを示す。即ち、同一配列中の任意、かつ１もしくは複数のアミノ酸配列中において、１または複数のアミノ酸残

基の欠失、置換、挿入または付加があることを意味する。また、欠失、置換、挿入または付加が同時に生じる場合もあり、置換、挿入または付加されるアミノ酸残基は天然型と非天然型いずれの場合もある。

[0099] 天然型アミノ酸残基としては、例えば、Ｌ－アラニン、Ｌ－アスパラギン、Ｌ－アスパラギン酸、Ｌ－グルタミン、Ｌ－グルタミン酸、グリシン、Ｌ－ヒスチジン、Ｌ－イソロイシン、Ｌ－ロイシン、Ｌ－リジン、Ｌ－メチオニン、Ｌ－フェニルアラニン、Ｌ－プロリン、Ｌ－セリン、Ｌ－スレオニン、Ｌ－トリプトファン、Ｌ－チロシン、Ｌ－バリン、またはＬ－システインなどが挙げられる。

[0100] 以下に、相互に置換可能なアミノ酸残基の好ましい例を示す。同一群に含まれるアミノ酸残基は相互に置換可能である。

Ａ群：ロイシン、イソロイシン、ノルロイシン、バリン、ノルバリン、アラニン、２－アミノブタン酸、メチオニン、Ｏ－メチルセリン、ｔ－ブチルグリシン、ｔ－ブチルアラニン、シクロヘキシルアラニン

Ｂ群：アスパラギン酸、グルタミン酸、イソアスパラギン酸、イソグルタミン酸、２－アミノアジピン酸、２－アミノスベリン酸

Ｃ群：アスパラギン、グルタミン

Ｄ群：リジン、アルギニン、オルニチン、２，４－ジアミノブタン酸、２，３－ジアミノプロピオン酸

Ｅ群：プロリン、３－ヒドロキシプロリン、４－ヒドロキシプロリン

Ｆ群：セリン、スレオニン、ホモセリン

Ｇ群：フェニルアラニン、チロシン

[0101] 本発明において、抗体断片としては、Ｆａｂ、Ｆ（ａｂ’）$_2$、Ｆａｂ’、ｓｃＦｖ、ｄｉａｂｏｄｙ、ｄｓＦｖおよびＣＤＲを含むペプチドなどが挙げられる。

[0102] Ｆａｂは、ＩｇＧを蛋白質分解酵素であるパパインで処理して得られる断片のうち（Ｈ鎖の２２４番目のアミノ酸残基で切断される）、Ｈ鎖のＮ末端側約半分とＬ鎖全体がジスルフィド結合で結合した、分子量約５万の抗原結

合活性を有する抗体断片である。

[0103] 本発明のＦａｂは、本発明のモノクローナル抗体をパパインで処理して得ることができる。また、該抗体のＦａｂをコードするＤＮＡを原核生物用発現ベクターまたは真核生物用発現ベクターに挿入し、該ベクターを原核生物または真核生物へ導入することにより発現させ、Ｆａｂを製造することもできる。

[0104] Ｆ（ａｂ’）$_2$は、ＩｇＧのヒンジ領域の２個のジスルフィド結合の下部を蛋白質分解酵素であるペプシンで分解して得られる、２つのＦａｂ領域がヒンジ部分で結合して構成された、分子量約１０万の抗原結合活性を有する断片である。

[0105] 本発明のＦ（ａｂ’）$_2$は、本発明のモノクローナル抗体をペプシンで処理して得ることができる。また、下記のＦａｂ’をチオエーテル結合またはジスルフィド結合させ、作製することもできる。

[0106] Ｆａｂ’は、前記Ｆ（ａｂ’）$_2$のヒンジ領域のジスルフィド結合を切断して得られる、分子量約５万の抗原結合活性を有する抗体断片である。本発明のＦａｂ’は、本発明のＦ（ａｂ’）$_2$をジチオスレイトールなどの還元剤で処理して得ることができる。また、該抗体のＦａｂ’断片をコードするＤＮＡを原核生物用発現ベクターまたは真核生物用発現ベクターに挿入し、該ベクターを原核生物または真核生物へ導入することにより、Ｆａｂ’を発現させ製造することもできる。

[0107] ｓｃＦｖは、１本のＶＨと１本のＶＬとを適当なペプチドリンカー（以下、Ｐと表記する）を用いて連結した、ＶＨ－Ｐ－ＶＬまたはＶＬ－Ｐ－ＶＨポリペプチドであり、抗原結合活性を有する抗体断片である。

[0108] 本発明のｓｃＦｖは、本発明のモノクローナル抗体のＶＨおよびＶＬをコードするｃＤＮＡを取得し、ｓｃＦｖをコードするＤＮＡを構築し、該ＤＮＡを原核生物用発現ベクターまたは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物または真核生物へ導入することにより、発現させ、製造することができる。

[0109] ｄｉａｂｏｄｙは、ｓｃＦｖが二量体化した抗体断片であり、二価の抗原結合活性を有する抗体断片である。二価の抗原結合活性は、同一であることもできるし、一方を異なる抗原結合活性とすることもできる。本発明のｄｉａｂｏｄｙは、本発明のモノクローナル抗体のＶＨおよびＶＬをコードするｃＤＮＡを取得し、ｓｃＦｖをコードするＤＮＡをペプチドリンカーのアミノ酸配列の長さが８残基以下となるように構築し、該ＤＮＡを原核生物用発現ベクターまたは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物または真核生物へ導入することにより、発現させ、製造することができる。

[0110] ｄｓＦｖは、ＶＨおよびＶＬ中のそれぞれ１アミノ酸残基をシステイン残基に置換したポリペプチドを該システイン残基間のジスルフィド結合を介して結合させたものをいう。ｄｓＦｖは、システイン残基に置換するアミノ酸残基は既知の方法［Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ，７，６９７（１９９４）］に従って、抗体の立体構造予測に基づいて選択することができる。

[0111] 本発明のｄｓＦｖは、本発明のモノクローナル抗体のＶＨおよびＶＬをコードするｃＤＮＡを取得し、ｄｓＦｖをコードするＤＮＡを構築し、該ＤＮＡを原核生物用発現ベクターまたは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物または真核生物へ導入することにより、発現させ、製造することができる。

[0112] ＣＤＲを含むペプチドは、ＶＨまたはＶＬのＣＤＲの少なくとも１領域以上を含んで構成される。複数のＣＤＲを含むペプチドは、直接または適当なペプチドリンカーを介して結合させることができる。

[0113] 本発明のＣＤＲを含むペプチドは、本発明のモノクローナル抗体のＶＨおよびＶＬのＣＤＲをコードするＤＮＡを構築し、該ＤＮＡを原核生物用発現ベクターまたは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物または真核生物へ導入することにより、発現させ、製造することができる。また、ＣＤＲを含むペプチドは、Ｆｍｏｃ法、またはｔＢｏｃ法などの化

学合成法によって製造することもできる。

[0114] 本発明は、本発明のモノクローナル抗体またはその抗体断片に、放射性同位元素、低分子の薬剤、高分子の薬剤、蛋白質、または抗体医薬などを化学的または遺伝子工学的に結合させた抗体の誘導体を包含する。

[0115] 本発明における抗体の誘導体は、本発明のモノクローナル抗体またはその抗体断片のＨ鎖またはＬ鎖のＮ末端側またはＣ末端側、抗体またはその抗体断片中の適当な置換基または側鎖、さらにはモノクローナル抗体またはその抗体断片中の糖鎖などに、放射性同位元素、低分子の薬剤、高分子の薬剤、免疫賦活剤、蛋白質または抗体医薬などを化学的手法［抗体工学入門，地人書館（１９９４）］により結合させることにより製造することができる。

[0116] また、本発明における抗体の誘導体は、本発明のモノクローナル抗体または抗体断片をコードするＤＮＡと、結合させたい蛋白質または抗体医薬をコードするＤＮＡを連結させて発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを適当な宿主細胞へ導入し、発現させる遺伝子工学的手法より製造することができる。

[0117] 放射性同位元素としては、例えば、^{131}Ｉ、^{125}Ｉ、^{90}Ｙ、^{64}Ｃｕ、^{99}Ｔｃ、^{77}Ｌｕ、または^{211}Ａｔなどが挙げられる。放射性同位元素は、クロラミンＴ法などによって抗体に直接結合させることができる。また、放射性同位元素をキレートする物質を抗体に結合させてもよい。キレート剤としては、例えば、１－イソチオシアネートベンジル－３－メチルジエチレントリアミンペンタ酢酸（ＭＸ－ＤＴＰＡ）などが挙げられる。

[0118] 低分子の薬剤としては、例えば、アルキル化剤、ニトロソウレア剤、代謝拮抗剤、抗生物質、植物アルカロイド、トポイソメラーゼ阻害剤、ホルモン療法剤、ホルモン拮抗剤、アロマターゼ阻害剤、Ｐ糖蛋白阻害剤、白金錯体誘導体、Ｍ期阻害剤、またはキナーゼ阻害剤などの抗癌剤［臨床腫瘍学，癌と化学療法社（１９９６）］、またはハイドロコーチゾン、プレドニゾンなどのステロイド剤、アスピリン、インドメタシンなどの非ステロイド剤、金チオマレート、ペニシラミンなどの免疫調節剤、サイクロフォスファミド、

アザチオプリンなどの免疫抑制剤、マレイン酸クロルフェニラミン、またはクレマシチンのような抗ヒスタミン剤などの抗炎症剤［炎症と抗炎症療法，医歯薬出版株式会社（１９８２）］などが挙げられる。

[0119] 抗癌剤としては、例えば、アミフォスチン（エチオール）、シスプラチン、ダカルバジン（ＤＴＩＣ）、ダクチノマイシン、メクロレタミン（ナイトロジェンマスタード）、ストレプトゾシン、シクロフォスファミド、イホスファミド、カルムスチン（ＢＣＮＵ）、ロムスチン（ＣＣＮＵ）、ドキソルビシン（アドリアマイシン）、エピルビシン、ゲムシタビン（ゲムザール）、ダウノルビシン、プロカルバジン、マイトマイシン、シタラビン、エトポシド、メトトレキセート、５－フルオロウラシル、フルオロウラシル、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ブレオマイシン、ダウノマイシン、ペプロマイシン、エストラムスチン、パクリタキセル（タキソール）、ドセタキセル（タキソテア）、アルデスロイキン、アスパラギナーゼ、ブスルファン、カルボプラチン、オキサリプラチン、ネダプラチン、クラドリビン、カンプトテシン、１０－ヒドロキシ－７－エチル－カンプトテシン（ＳＮ３８）、フロクスウリジン、フルダラビン、ヒドロキシウレア、イホスファミド、イダルビシン、メスナ、イリノテカン（ＣＰＴ－１１）、ノギテカン、ミトキサントロン、トポテカン、ロイプロリド、メゲストロール、メルファラン、メルカプトプリン、ヒドロキシカルバミド、プリカマイシン、ミトタン、ペガスパラガーゼ、ペントスタチン、ピポブロマン、ストレプトゾシン、タモキシフェン、ゴセレリン、リュープロレニン、フルタミド、テニポシド、テストラクトン、チオグアニン、チオテパ、ウラシルマスタード、ビノレルビン、クロラムブシル、ハイドロコーチゾン、プレドニゾロン、メチルプレドニゾロン、ビンデシン、ニムスチン、セムスチン、カペシタビン、トムデックス、アザシチジン、ＵＦＴ、オキザロプラチン、ゲフィチニブ（イレッサ）、イマチニブ（ＳＴＩ５７１）、エルロチニブ、ＦＭＳ－ｌｉｋｅ ｔｙｒｏｓｉｎｅ ｋｉｎａｓｅ ３（Ｆｌｔ３）阻害剤、ｖａｓｃｕｌａｒ ｅｎｄｏｔｈｅｌｉａｌ ｇｒｏｗｔｈ ｆａｃｏｔｒ ｒｅｃｅｐｔｏｒ（

ＶＥＧＦＲ）阻害剤、ｆｉｂｒｏｂｌａｓｔ ｇｒｏｗｔｈ ｆａｃｔｏｒ ｒｅｃｅｐｔｏｒ（ＦＧＦＲ）阻害剤、イレッサ、タルセバなどのｅｐｉｄｅｒｍａｌ ｇｒｏｗｔｈ ｆａｃｔｏｒ ｒｅｃｅｐｔｏｒ（ＥＧＦＲ）阻害剤、ラディシコール、１７－アリルアミノ－１７－デメトキシゲルダナマイシン、ラパマイシン、アムサクリン、オールートランスレチノイン酸、サリドマイド、アナストロゾール、ファドロゾール、レトロゾール、エキセメスタン、金チオマレート、Ｄ－ペニシラミン、ブシラミン、アザチオプリン、ミゾリビン、シクロスポリン、ラパマイシン、ヒドロコルチゾン、ベキサロテン（ターグレチン）、タモキシフェン、デキサメタゾン、プロゲスチン類、エストロゲン類、アナストロゾール（アリミデックス）、ロイプリン、アスピリン、インドメタシン、セレコキシブ、アザチオプリン、ペニシラミン、金チオマレート、マレイン酸クロルフェニラミン、クロロフェニラミン、クレマシチン、トレチノイン、ベキサロテン、砒素、ボルテゾミブ、アロプリノール、カリケアマイシン、イブリツモマブチウキセタン、タルグレチン、オゾガミン、クラリスロマシン、ロイコボリン、イファスファミド、ケトコナゾール、アミノグルテチミド、スラミン、メトトレキセート、マイタンシノイド、またはその誘導体、などが挙げられる。

[0120] 低分子の薬剤と抗体とを結合させる方法としては、例えば、グルタールアルデヒドを介して薬剤と抗体のアミノ基間を結合させる方法、または水溶性カルボジイミドを介して薬剤のアミノ基と抗体のカルボキシル基を結合させる方法などが挙げられる。

[0121] 高分子の薬剤としては、例えば、ポリエチレングリコール（以下、ＰＥＧと表記する）、アルブミン、デキストラン、ポリオキシエチレン、スチレンマレイン酸コポリマー、ポリビニルピロリドン、ピランコポリマー、またはヒドロキシプロピルメタクリルアミドなどが挙げられる。

[0122] これらの高分子化合物を抗体または抗体断片に結合させることにより、（１）化学的、物理的または生物的な種々の因子に対する安定性の向上、（２）血中半減期の顕著な延長、（３）免疫原性の消失または抗体産生の抑制、

などの効果が期待される［バイオコンジュゲート医薬品，廣川書店（１９９３）］。

[0123] ＰＥＧと抗体を結合させる方法としては、例えば、ＰＥＧ化修飾試薬と反応させる方法などが挙げられる［バイオコンジュゲート医薬品，廣川書店（１９９３）］。ＰＥＧ化修飾試薬としては、リジンのε－アミノ基への修飾剤（日本国特開昭６１－１７８９２６号公報）、アスパラギン酸およびグルタミン酸のカルボキシル基への修飾剤（日本国特開昭５６－２３５８７号公報）、またはアルギニンのグアニジノ基への修飾剤（日本国特開平２－１１７９２０号公報）などが挙げられる。

[0124] 免疫賦活剤としては、イムノアジュバントとして知られている天然物でもよく、具体例としては、免疫を亢進する薬剤が、β（１→３）グルカン（レンチナン、シゾフィラン）、またはαガラクトシルセラミドなどが挙げられる。

[0125] 蛋白質としては、ＮＫ細胞、マクロファージ、または好中球などの免疫担当細胞を活性化するサイトカイン若しくは増殖因子、または毒素蛋白質などが挙げられる。

[0126] サイトカインまたは増殖因子としては、例えば、インターフェロン（以下、ＩＮＦと記す）－α、ＩＮＦ－β、ＩＮＦ－γ、インターロイキン（以下、ＩＬと記す）－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、ＩＬ－２３、顆粒球コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）、顆粒球／マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）、またはマクロファージコロニー刺激因子（Ｍ－ＣＳＦ）などが挙げられる。

[0127] 毒素蛋白質としては、例えば、リシン、ジフテリアトキシン、またはＯＮＴＡＫなどが挙げられ、毒性を調節するためにタンパク質に変異を導入したタンパク毒素も含まれる。

[0128] 抗体医薬としては、例えば、抗体の結合によりアポトーシスが誘導される抗原、腫瘍の病態形成に関わる抗原または免疫機能を調節する抗原、病変部位の血管新生に関与する抗原に対する抗体が挙げられる。

[0129] 抗体の結合によりアポトーシスが誘導される抗原としては、例えば、Ｃｌｕｓｔｅｒ ｏｆ ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｉｏｎ（以下、ＣＤと記載する）１９、ＣＤ２０、ＣＤ２１、ＣＤ２２、ＣＤ２３、ＣＤ２４、ＣＤ３７、ＣＤ５３、ＣＤ７２、ＣＤ７３、ＣＤ７４、ＣＤｗ７５、ＣＤｗ７６、ＣＤ７７、ＣＤｗ７８、ＣＤ７９ａ、ＣＤ７９ｂ、ＣＤ８０（Ｂ７．１）、ＣＤ８１、ＣＤ８２、ＣＤ８３、ＣＤｗ８４、ＣＤ８５、ＣＤ８６（Ｂ７．２）、ｈｕｍａｎ ｌｅｕｋｏｃｙｔｅ ａｎｔｉｇｅｎ（ＨＬＡ）－Ｃｌａｓｓ ＩＩ、またはＥｐｉｄｅｒｍａｌ Ｇｒｏｗｔｈ Ｆａｃｔｏｒ Ｒｅｃｅｐｔｏｒ（ＥＧＦＲ）などが挙げられる。

[0130] 腫瘍の病態形成に関わる抗原または免疫機能を調節する抗体の抗原としては、例えば、ＣＤ４０、ＣＤ４０リガンド、Ｂ７ファミリー分子（ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＤ２７４、Ｂ７－ＤＣ、Ｂ７－Ｈ２、Ｂ７－Ｈ３、またはＢ７－Ｈ４）、Ｂ７ファミリー分子のリガンド（ＣＤ２８、ＣＴＬＡ－４、ＩＣＯＳ、ＰＤ－１、またはＢＴＬＡ）、ＯＸ－４０、ＯＸ－４０リガンド、ＣＤ１３７、ｔｕｍｏｒ ｎｅｃｒｏｓｉｓ ｆａｃｔｏｒ（ＴＮＦ）受容体ファミリー分子（ＤＲ４、ＤＲ５、ＴＮＦＲ１、またはＴＮＦＲ２）、ＴＮＦ－ｒｅｌａｔｅｄ ａｐｏｐｔｏｓｉｓ－ｉｎｄｕｃｉｎｇ ｌｉｇａｎｄ ｒｅｃｅｐｔｏｒ（ＴＲＡＩＬ）ファミリー分子、ＴＲＡＩＬファミリー分子の受容体ファミリー（ＴＲＡＩＬ－Ｒ１、ＴＲＡＩＬ－Ｒ２、ＴＲＡＩＬ－Ｒ３、またはＴＲＡＩＬ－Ｒ４）、ｒｅｃｅｐｔｏｒ ａｃｔｉｖａｔｏｒ ｏｆ ｎｕｃｌｅａｒ ｆａｃｔｏｒ ｋａｐｐａ Ｂ ｌｉｇａｎｄ（ＲＡＮＫ）、ＲＡＮＫリガンド、ＣＤ２５、葉酸受容体４、サイトカイン［ＩＬ－１α、ＩＬ－１β、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－６、ＩＬ－１０、ＩＬ－１３、ｔｒａｎｓｆｏｒｍｉｎｇ ｇｒｏｗｔｈ ｆａｃｔｏｒ（ＴＧＦ）β、またはＴＮＦαなど］、これらのサイトカインの受容体、ケモカイン（ＳＬＣ、ＥＬＣ、Ｉ－３０９、ＴＡＲＣ、ＭＤＣ、またはＣＴＡＣＫなど）、またはこれらのケモカインの受容体が挙げられる。

[0131] 病変部位の血管新生を阻害する抗体の抗原としては、例えば、ｖａｓｃｕ

ｌａｒ ｅｎｄｏｔｈｅｌｉａｌ ｇｒｏｗｔｈ ｆａｃｔｏｒ（ＶＥＧＦ）、Ａｎｇｉｏｐｏｉｅｔｉｎ、ｆｉｂｒｏｂｌａｓｔ ｇｒｏｗｔｈ ｆａｃｔｏｒ（ＦＧＦ）、ＥＧＦ、ｐｌａｔｅｌｅｔ－ｄｅｒｉｖｅｄ ｇｒｏｗｔｈ ｆａｃｔｏｒ（ＰＤＧＦ）、ｉｎｓｕｌｉｎ－ｌｉｋｅ ｇｒｏｗｔｈ ｆａｃｔｏｒ（ＩＧＦ）、ｅｒｙｔｈｒｏｐｏｉｅｔｉｎ（ＥＰＯ）、ＴＧＦβ、ＩＬ－８、Ｅｐｈｉｌｉｎ、ＳＤＦ－１、またはこれらの受容体などが挙げられる。

[0132] 蛋白質または抗体医薬との融合抗体は、モノクローナル抗体または抗体断片をコードするｃＤＮＡに蛋白質をコードするｃＤＮＡを連結させることにより、融合抗体をコードするＤＮＡを構築し、該ＤＮＡを原核生物または真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物または真核生物へ導入することにより、融合抗体を発現させ製造することができる。

[0133] 検出方法、定量方法、検出用試薬、定量用試薬または診断薬として上記抗体の誘導体を使用する場合に、本発明のモノクローナル抗体またはその抗体断片に結合させる薬剤としては、通常の免疫学的検出または測定法で用いられる標識体が挙げられる。

[0134] 標識体としては、例えば、アルカリフォスファターゼ、ペルオキシダーゼおよびルシフェラーゼなどの酵素、アクリジニウムエステルおよびロフィンなどの発光物質、並びにフルオレセインイソチオシアネート（ＦＩＴＣ）およびテトラメチルローダミンイソチオシアネート（ＲＩＴＣ）などの蛍光物質などが挙げられる。

[0135] また、本発明は、本発明のモノクローナル抗体またはその抗体断片を有効成分として含有するＴｒｏｐ－２陽性細胞が関与する疾患の治療薬に関する。

[0136] Ｔｒｏｐ－２陽性細胞が関与する疾患としては、例えば、Ｔｒｏｐ－２が発現している細胞が関与する疾患であればいかなるものでもよく、例えば癌が挙げられる。

[0137] 癌としては、例えば、血液癌、乳癌、子宮癌、大腸癌、食道癌、胃癌、卵

巣癌、肺癌、腎臓癌、直腸癌、甲状腺癌、子宮頸癌、小腸癌、前立腺癌または膵臓癌などが挙げられ、好ましくは血液癌、食道癌、胃癌、大腸癌、肝癌または前立腺癌が挙げられる。

[0138] 本発明のモノクローナル抗体または該抗体断片、またはこれらの誘導体を含有する治療剤は、有効成分としての該抗体もしくは該抗体断片、またはこれらの誘導体のみを含むものであってもよいが、通常は薬理学的に許容される１以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野において公知の任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが望ましい。

[0139] 投与経路は、治療に際して最も効果的なものを使用するのが好ましく、例えば、経口投与、または口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内または静脈内などの非経口投与が挙げられる。中でも、静脈内投与が好ましい。

[0140] 投与形態としては、例えば、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、軟膏、またはテープ剤などが挙げられる。

[0141] 投与量または投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢、および体重などにより異なるが、通常成人１日当たり１０μｇ／ｋｇ～１０ｍｇ／ｋｇである。

[0142] さらに、本発明は、本発明のモノクローナル抗体またはその抗体断片を有効成分として含有する、Ｔｒｏｐ－２の免疫学的検出または測定方法、Ｔｒｏｐ－２の免疫学的検出用または測定用試薬、Ｔｒｏｐ－２が発現する細胞の免疫学的検出または測定方法、およびＴｒｏｐ－２陽性細胞が関与する疾患の診断薬に関する。

[0143] 本発明においてＴｒｏｐ－２の量を検出または測定する方法としては、任意の公知の方法が挙げられる。例えば、免疫学的検出または測定方法などが挙げられる。

[0144] 免疫学的検出または測定方法とは、標識を施した抗原または抗体を用いて、抗体量または抗原量を検出または測定する方法である。免疫学的検出または測定方法としては、例えば、放射免疫測定法（ＲＩＡ）、酵素免疫測定法

（ＥＩＡまたはＥＬＩＳＡ）、蛍光免疫測定法（ＦＩＡ）、発光免疫測定法（ｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｔ　ｉｍｍｕｎｏａｓｓａｙ）、ウェスタンブロット法または物理化学的手法などが挙げられる。

[0145] 本発明のモノクローナル抗体または該抗体断片を用いてＴｒｏｐ－２が発現した細胞を検出または測定することにより、Ｔｒｏｐ－２が関連する疾患を診断することができる。

[0146] 該ポリペプチドが発現している細胞の検出には、公知の免疫学的検出法を用いることができるが、例えば、免疫沈降法、免疫細胞染色法、免疫組織染色法、または蛍光抗体染色法などが、好ましく挙げられる。また、ＦＭＡＴ８１００ＨＴＳシステム（アプライドバイオシステム社製）などの蛍光抗体染色法なども挙げられる。

[0147] 本発明においてＴｒｏｐ－２を検出または測定する対象となる生体試料としては、組織細胞、血液、血漿、血清、膵液、尿、糞便、組織液、または培養液など、Ｔｒｏｐ－２が発現した細胞を含む可能性のあるものであれば特に限定されない。

[0148] 本発明のモノクローナル抗体またはその抗体断片、またはこれらの誘導体を含有する診断薬は、目的の診断法に応じて、抗原抗体反応を行なうための試薬、該反応の検出用試薬を含んでもよい。抗原抗体反応を行なうための試薬としては、例えば、緩衝剤、塩などが挙げられる。

[0149] 検出用試薬としては、例えば、該モノクローナル抗体若しくはその抗体断片、またはこれらの誘導体を認識する標識された二次抗体、または標識に対応した基質などの通常の免疫学的検出または測定法に用いられる試薬が挙げられる。

[0150] 以下に、本発明のモノクローナル抗体の製造方法、疾患の治療方法、および疾患の診断方法について、具体的に説明する。

[0151] １．モノクローナル抗体の製造方法

（１）抗原の調製

抗原となるＴｒｏｐ－２またはＴｒｏｐ－２を発現させた細胞は、Ｔｒｏ

ｐ－２全長またはその部分長をコードするｃＤＮＡを含む発現ベクターを、大腸菌、酵母、昆虫細胞、または動物細胞などに導入することにより、得ることができる。また、Ｔｒｏｐ－２を多量に発現している各種ヒト腫瘍培養細胞、ヒト組織などからＴｒｏｐ－２を精製し、得ることができる。また、該腫瘍培養細胞、または該組織などをそのまま抗原として用いることもできる。さらに、Ｆｍｏｃ法、またはｔＢｏｃ法などの化学合成法によりＴｒｏｐ－２の部分配列を有する合成ペプチドを調製し、抗原に用いることもできる。

[0152] 本発明で用いられるＴｒｏｐ－２は、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ，Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｓｅｃｏｎｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ（１９８９）やＣｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ Ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ（１９８７－１９９７）などに記載された方法などを用い、例えば以下の方法により、該Ｔｒｏｐ－２をコードするＤＮＡを宿主細胞中で発現させて、製造することができる。

[0153] まず、Ｔｒｏｐ－２をコードする部分を含む完全長ｃＤＮＡを適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換えベクターを作製する。上記完全長ｃＤＮＡの代わりに、完全長ｃＤＮＡをもとにして調製された、ポリペプチドをコードする部分を含む適当な長さのＤＮＡ断片を用いてもよい。次に、得られた該組換えベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより、ポリペプチドを生産する形質転換体を得ることができる。

[0154] 発現ベクターとしては、使用する宿主細胞における自律複製または染色体上への組込みが可能であり、ポリペプチドをコードするＤＮＡを転写できる位置に適当なプロモーターを含有しているものであれば、いずれも用いることができる。

[0155] 宿主細胞としては、大腸菌などのエシェリヒア属などに属する微生物、酵

母、昆虫細胞、または動物細胞など、目的とする遺伝子を発現できるものであればいずれも用いることができる。

[0156] 大腸菌などの原核生物を宿主細胞として用いる場合、組換えベクターは、原核生物中で自律複製が可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、Ｔｒｏｐ－２をコードする部分を含むＤＮＡ、および転写終結配列を含むベクターであることが好ましい。また、該組換えベクターには、転写終結配列は必ずしも必要ではないが、構造遺伝子の直下に転写終結配列を配置することが好ましい。さらに、該組換えベクターには、プロモーターを制御する遺伝子を含んでいてもよい。

[0157] 該組換えベクターとしては、リボソーム結合配列であるシャイン・ダルガルノ配列（ＳＤ配列ともいう）と開始コドンとの間を適当な距離（例えば６～１８塩基）に調節したプラスミドを用いることが好ましい。

[0158] また、該Ｔｒｏｐ－２をコードするＤＮＡの塩基配列としては、宿主内での発現に最適なコドンとなるように塩基を置換することができ、これにより目的とするＴｒｏｐ－２の生産率を向上させることができる。

[0159] 発現ベクターとしては、使用する宿主細胞中で機能を発揮できるものであればいずれも用いることができる。例えば、ｐＢＴｒｐ２、ｐＢＴａｃ１、ｐＢＴａｃ２（以上、ロシュ・ダイアグノスティックス社製）、ｐＫＫ２３３－２（ファルマシア社製）、ｐＳＥ２８０（インビトロジェン社製）、ｐＧＥＭＥＸ－１（プロメガ社製）、ｐＱＥ－８（キアゲン社製）、ｐＫＹＰ１０（日本国特開昭５８－１１０６００号公報）、ｐＫＹＰ２００［Ａｇｒｉｃｕｌｔｕｒａｌ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，４８，６６９（１９８４）］、ｐＬＳＡ１［Ａｇｒｉｃ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，５３，２７７（１９８９）］、ｐＧＥＬ１［Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８２，４３０６（１９８５）］、ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ ＩＩ ＳＫ（－）（ストラタジーン社製）、ｐＴｒｓ３０［大腸菌ＪＭ１０９／ｐＴｒＳ３０（ＦＥＲＭ ＢＰ－５４０７）より調製］、ｐＴｒｓ３２［大腸菌ＪＭ１０９／ｐＴｒＳ３２（ＦＥＲＭ ＢＰ－５４０８）より

調製］、ｐＧＨＡ２［大腸菌ＩＧＨＡ２（ＦＥＲＭ　ＢＰ－４００）より調製、日本国特開昭６０－２２１０９１号公報］、ｐＧＫＡ２［大腸菌ＩＧＫＡ２（ＦＥＲＭ　ＢＰ－６７９８）より調製、日本国特開昭６０－２２１０９１号公報］、ｐＴｅｒｍ２（米国特許第４６８６１９１号明細書、米国特許第４９３９０９４号明細書、米国特許第５１６０７３５号明細書）、ｐＳｕｐｅｘ、ｐＵＢ１１０、ｐＴＰ５、ｐＣ１９４、ｐＥＧ４００［Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．，１７２，２３９２（１９９０）］、ｐＧＥＸ（ファルマシア社製）、ｐＥＴシステム（ノバジェン社製）、またはｐＭＥ１８ＳＦＬ３などが挙げられる。

[0160] プロモーターとしては、使用する宿主細胞中で機能を発揮できるものであればいかなるものでもよい。例えば、ｔｒｐプロモーター（Ｐｔｒｐ）、ｌａｃプロモーター、ＰＬプロモーター、ＰＲプロモーター、またはＴ７プロモーターなどの、大腸菌やファージなどに由来するプロモーターを挙げることができる。また、Ｐｔｒｐを２つ直列させたタンデムプロモーター、ｔａｃプロモーター、ｌａｃＴ７プロモーター、またはｌｅｔ　Ｉプロモーターなどの人為的に設計改変されたプロモーターなども用いることができる。

[0161] 宿主細胞としては、例えば、大腸菌ＸＬ１－Ｂｌｕｅ、大腸菌ＸＬ２－Ｂｌｕｅ、大腸菌ＤＨ１、大腸菌ＭＣ１０００、大腸菌ＫＹ３２７６、大腸菌Ｗ１４８５、大腸菌ＪＭ１０９、大腸菌ＨＢ１０１、大腸菌Ｎｏ．４９、大腸菌Ｗ３１１０、大腸菌ＮＹ４９、または大腸菌ＤＨ５αなどが挙げられる。

[0162] 宿主細胞への組換えベクターの導入方法としては、使用する宿主細胞へＤＮＡを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、カルシウムイオンを用いる方法［Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，６９，２１１０（１９７２）、Ｇｅｎｅ，１７，１０７（１９８２）、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ＆Ｇｅｎｅｒａｌ　Ｇｅｎｅｔｉｃｓ，１６８，１１１（１９７９）］が挙げられる。

[0163] 動物細胞を宿主として用いる場合、発現ベクターとしては、動物細胞中で

機能を発揮できるものであればいずれも用いることができ、例えば、ｐｃＤＮＡＩ、ｐｃＤＭ８（フナコシ社製）、ｐＡＧＥ１０７　［日本国特開平３－２２９７９号公報；Ｃｙｔｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，３，１３３（１９９０）］、ｐＡＳ３－３（日本国特開平２－２２７０７５号公報）、ｐＣＤＭ８［Ｎａｔｕｒｅ，３２９，８４０（１９８７）］、ｐｃＤＮＡＩ／Ａｍｐ（インビトロジェン社製）、ｐｃＤＮＡ３．１（インビトロジェン社製）、ｐＲＥＰ４（インビトロジェン社製）、ｐＡＧＥ１０３［Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，１０１，１３０７（１９８７）］、ｐＡＧＥ２１０、ｐＭＥ１８ＳＦＬ３、またはｐＫＡＮＴＥＸ９３（国際公開第９７／１０３５４号）などが挙げられる。

[0164] プロモーターとしては、動物細胞中で機能を発揮できるものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）のｉｍｍｅｄｉａｔｅ　ｅａｒｌｙ（ＩＥ）遺伝子のプロモーター、ＳＶ４０の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、ＳＲαプロモーター、またはモロニーマウス白血病ウイルスのプロモーター若しくはエンハンサーが挙げられる。また、ヒトＣＭＶのＩＥ遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

[0165] 宿主細胞としては、例えば、ヒトバーキットリンパ腫細胞Ｎａｍａｌｗａ、サル腎臓細胞ＣＯＳ、チャイニーズ・ハムスター卵巣細胞ＣＨＯ（Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ　Ｍｅｄｉｃｉｎｅ，１０８，９４５（１９５８）；Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，６０，１２７５（１９６８）；Ｇｅｎｅｔｉｃｓ，５５，５１３（１９６８）；Ｃｈｒｏｍｏｓｏｍａ，４１，１２９（１９７３）；Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｃｅｌｌ　Ｓｃｉｅｎｃｅ，１８，１１５（１９９６）；Ｒａｄｉａｔｉｏｎ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ，１４８，２６０（１９９７）；Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，７７，４２１６（１９８０）；Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．，６０，１２７５（１９

６８）；Ｃｅｌｌ，６，１２１（１９７５）；Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｅｌｌ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ，Ａｐｐｅｎｄｉｘ Ｉ，ＩＩ（ｐｐ．８８３－９００）；）、ＣＨＯ／ＤＧ４４、ＣＨＯ－Ｋ１（ＡＴＣＣ ＣＣＬ－６１）、ＤＵＫＸＢ１１（ＡＴＣＣ ＣＣＬ－９０９６）、Ｐｒｏ－５（ＡＴＣＣ ＣＣＬ－１７８１）、ＣＨＯ－Ｓ（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｃａｔ ＃ １１６１９）、Ｐｒｏ－３、ラットミエローマ細胞ＹＢ２／３ＨＬ．Ｐ２．Ｇ１１．１６Ａｇ．２０（またはＹＢ２／０ともいう）、マウスミエローマ細胞ＮＳＯ、マウスミエローマ細胞ＳＰ２／０－Ａｇ１４、シリアンハムスター細胞ＢＨＫまたはヒト白血病細胞ＨＢＴ５６３７（日本国特開昭６３－０００２９９号公報）、などが挙げられる。

[0166] 宿主細胞への組換えベクターの導入方法としては、動物細胞にＤＮＡを導入する方法であればいずれも用いることができる。例えば、エレクトロポレーション法［Ｃｙｔｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，３，１３３（１９９０）］、リン酸カルシウム法（日本国特開平２－２２７０７５号公報）、またはリポフェクション法［Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８４，７４１３（１９８７）］などが挙げられる。

[0167] 以上のようにして得られるＴｒｏｐ－２をコードするＤＮＡを組み込んだ組換えベクターを保有する、微生物または動物細胞などの由来の形質転換体を培地に培養し、培養物中に該Ｔｒｏｐ－２を生成蓄積させ、該培養物から採取することにより、Ｔｒｏｐ－２を製造することができる。該形質転換体を培地に培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。

[0168] 真核生物由来の細胞で発現させた場合には、糖または糖鎖が付加されたＴｒｏｐ－２を得ることができる。

[0169] 誘導性のプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、ｌａｃプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養する場合にはイソプロピル－β－Ｄ－チオガラクトピラノシドなどを、

ｔｒｐプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養する場合にはインドールアクリル酸などを、培地に添加してもよい。

[0170] 動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているＲＰＭＩ１６４０培地［Ｔｈｅ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ ｔｈｅ Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｍｅｄｉｃａｌ Ａｓｓｏｃｉａｔｉｏｎ，１９９，５１９（１９６７）］、ＥａｇｌｅのＭＥＭ培地［Ｓｃｉｅｎｃｅ，１２２，５０１（１９５２）］、ダルベッコ改変ＭＥＭ培地［Ｖｉｒｏｌｏｇｙ，８，３９６（１９５９）］、１９９培地［Ｐｒｏｃ．Ｓｏｃ．Ｅｘｐ．Ｂｉｏｌ．Ｍｅｄ．，７３，１（１９５０）］、Ｉｓｃｏｖｅ’ｓ Ｍｏｄｉｆｉｅｄ Ｄｕｌｂｅｃｃｏ’ｓ Ｍｅｄｉｕｍ（ＩＭＤＭ）培地、またはこれらの培地に牛胎児血清（ＦＢＳ）などを添加した培地などが挙げられる。培養は、通常ｐＨ６～８、３０～４０℃、５％CO_2存在下などの条件下で１～７日間行う。また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ペニシリンなどの抗生物質を培地に添加してもよい。

[0171] Ｔｒｏｐ－２をコードする遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、分泌生産または融合蛋白質発現などの方法［Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ，Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｓｅｃｏｎｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ（１９８９）］を用いることができる。

[0172] Ｔｒｏｐ－２の生産方法としては、宿主細胞内に生産させる方法、宿主細胞外に分泌させる方法、または宿主細胞外膜上に生産させる方法があり、使用する宿主細胞や、生産させるＴｒｏｐ－２の構造を変えることにより、適切な方法を選択することができる。

[0173] Ｔｒｏｐ－２が宿主細胞内又は宿主細胞外膜上に生産される場合、ポールソンらの方法［Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２６４，１７６１９（１９８９）］、ロウらの方法［Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．，ＵＳＡ，８６，８２２７（１９８９）、Ｇｅｎｅｓ Ｄｅｖｅｌｏｐ．，４，１２８８（１９９０）］、日本国特開平０５－３３６９６３号公報、または国際公

開第９４／２３０２１号などに記載の方法を用いることにより、Ｔｒｏｐ－２を宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。

[0174] また、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子などを用いた遺伝子増幅系（日本国特開平２－２２７０７５号公報）を利用してＴｒｏｐ－２の生産量を上昇させることもできる。

[0175] 得られたＴｒｏｐ－２は、例えば、以下のようにして単離、精製することができる。

[0176] Ｔｒｏｐ－２が細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後に細胞を遠心分離により回収し、水系緩衝液に懸濁後、超音波破砕機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、またはダイノミルなどを用いて細胞を破砕し、無細胞抽出液を得る。

[0177] 前記無細胞抽出液を遠心分離することにより得られる上清から、通常の蛋白質の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫安などによる塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル（ＤＥＡＥ）－セファロース、ＤＩＡＩＯＮ ＨＰＡ－７５（三菱化学社製）などのレジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、Ｓ－Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ ＦＦ（ファルマシア社製）などのレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロースなどのレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、または等電点電気泳動などの電気泳動法などの手法を単独または組み合わせて用い、精製標品を得ることができる。

[0178] Ｔｒｏｐ－２が細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、上記と同様に細胞を回収後破砕し、遠心分離を行うことにより、沈殿画分として該Ｔｒｏｐ－２の不溶体を回収する。回収した該Ｔｒｏｐ－２の不溶体を蛋白質変性剤で可溶化する。該可溶化液を希釈または透析することにより、該Ｔｒｏｐ－２を正常な立体構造に戻した後、上記と同様の単離精製法によりポリペプチドの精製標品を得ることができる。

[0179] Ｔｒｏｐ－２またはその糖修飾体などの誘導体が細胞外に分泌された場合には、培養上清において該Ｔｒｏｐ－２またはその糖修飾体などの誘導体を回収することができる。該培養物を上記と同様に遠心分離などの手法により処理することにより可溶性画分を取得し、該可溶性画分から、上記と同様の単離精製法を用いることにより、精製標品を得ることができる。

[0180] また、本発明において用いられるＴｒｏｐ－２は、Ｆｍｏｃ法、またはｔＢｏｃ法などの化学合成法によっても製造することができる。また、アドバンストケムテック社製、パーキン・エルマー社製、ファルマシア社製、プロテインテクノロジインストルメント社製、シンセセルーベガ社製、パーセプチブ社製、または島津製作所社製などのペプチド合成機を利用して化学合成することもできる。

[0181] （２）動物の免疫と融合用抗体産生細胞の調製

３～２０週令のマウス、ラットまたはハムスターなどの動物に、（１）で得られる抗原を免疫して、その動物の脾臓、リンパ節、末梢血中の抗体産生細胞を採取する。また、免疫原性が低く上記の動物で充分な抗体価の上昇が認められない場合には、Ｔｒｏｐ－２ノックアウトマウスを被免疫動物として用いることもできる。

[0182] 免疫は、動物の皮下、静脈内または腹腔内に、例えば、フロインドの完全アジュバント、または水酸化アルミニウムゲルと百日咳菌ワクチンなどの適当なアジュバントとともに抗原を投与することにより行う。抗原が部分ペプチドである場合には、ＢＳＡ（ウシ血清アルブミン）、またはＫＬＨ（Ｋｅｙｈｏｌｅ Ｌｉｍｐｅｔ ｈｅｍｏｃｙａｎｉｎ）などのキャリア蛋白質とコンジュゲートを作製し、これを免疫原として用いる。

[0183] 抗原の投与は、１回目の投与の後、１～２週間おきに５～１０回行う。各投与後３～７日目に眼底静脈叢より採血し、その血清の抗体価を酵素免疫測定法［Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ－Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ（１９８８）］などを用いて測定する。免疫に用いた抗原に対し、その血清が十分な抗

体価を示した動物を融合用抗体産生細胞の供給源とする。

[0184] 抗原の最終投与後３～７日目に、免疫した動物より脾臓などの抗体産生細胞を含む組織を摘出し、抗体産生細胞を採取する。脾臓細胞を用いる場合には、脾臓を細断、ほぐした後、遠心分離し、さらに赤血球を除去して融合用抗体産生細胞を取得する。

[0185] （３）骨髄腫細胞の調製

骨髄腫細胞としては、マウスから得られた株化細胞を用い、例えば、８－アザグアニン耐性マウス（ＢＡＬＢ／ｃ由来）骨髄腫細胞株Ｐ３－Ｘ６３Ａｇ８－Ｕ１（Ｐ３－Ｕ１）［Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｔｏｐｉｃｓ ｉｎ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，１８，１（１９７８）］、Ｐ３－ＮＳ１／１－Ａｇ４１（ＮＳ－１）［Ｅｕｒｏｐｅａｎ Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，６，５１１（１９７６）］、ＳＰ２／０－Ａｇ１４（ＳＰ－２）［Ｎａｔｕｒｅ，２７６，２６９（１９７８）］、Ｐ３－Ｘ６３－Ａｇ８６５３（６５３）［Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，１２３，１５４８（１９７９）］、またはＰ３－Ｘ６３－Ａｇ８（Ｘ６３）［Ｎａｔｕｒｅ，２５６，４９５（１９７５）］などが挙げられる。

[0186] 該骨髄腫細胞は、正常培地［グルタミン、２－メルカプトエタノール、ジェンタマイシン、ＦＢＳ、および８－アザグアニンを加えたＲＰＭＩ１６４０培地］で継代し、細胞融合の３～４日前に正常培地に継代し、融合当日２×１０^{7}個以上の細胞数を確保する。

[0187] （４）細胞融合とモノクローナル抗体産生ハイブリドーマの調製

（２）で得られる融合用抗体産生細胞と（３）で得られる骨髄腫細胞をＭｉｎｉｍｕｍ Ｅｓｓｅｎｔｉａｌ Ｍｅｄｉｕｍ（ＭＥＭ）培地またはＰＢＳ（リン酸二ナトリウム１．８３ｇ、リン酸一カリウム０．２１ｇ、食塩７．６５ｇ、蒸留水１リットル、ｐＨ７．２）でよく洗浄し、細胞数が、融合用抗体産生細胞：骨髄腫細胞＝５～１０：１になるよう混合し、遠心分離した後、上清を除く。

[0188] 沈澱した細胞群をよくほぐした後、ポリエチレングリコール－１０００（

ＰＥＧ－１０００）、ＭＥＭ培地およびジメチルスルホキシドの混液を３７℃で、攪拌しながら加える。さらに１～２分間毎にＭＥＭ培地１～２ｍＬを数回加えた後、ＭＥＭ培地を加えて全量が５０ｍＬになるようにする。遠心分離後、上清を除く。沈澱した細胞群をゆるやかにほぐした後、融合用抗体産生細胞にＨＡＴ培地［ヒポキサンチン、チミジン、およびアミノプテリンを加えた正常培地］中にゆるやかに細胞を懸濁する。この懸濁液を５％CO_2インキュベーター中、３７℃で７～１４日間培養する。

[0189] 培養後、培養上清の一部を抜き取り、後述のバインディングアッセイなどのハイブリドーマの選択方法により、Ｔｒｏｐ－２を含む抗原に反応し、Ｔｒｏｐ－２を含まない抗原に反応しない細胞群を選択する。次に、限界希釈法によりクローニングを２回繰り返し［１回目はＨＴ培地（ＨＡＴ培地からアミノプテリンを除いた培地）、２回目は正常培地を使用する］、安定して強い抗体価の認められたものをモノクローナル抗体産生ハイブリドーマとして選択する。

[0190] （５）精製モノクローナル抗体の調製

プリスタン処理［２，６，１０，１４－テトラメチルペンタデカン（Ｐｒｉｓｔａｎｅ）０．５ｍｌを腹腔内投与し、２週間飼育する］した８～１０週令のマウスまたはヌードマウスに、（４）で得られるモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを腹腔内に注射する。１０～２１日でハイブリドーマは腹水癌化する。このマウスから腹水を採取し、遠心分離して固形分を除去後、４０～５０％硫酸アンモニウムで塩析し、カプリル酸沈殿法、ＤＥＡＥ－セファロースカラム、プロテインＡ－カラムまたはゲル濾過カラムによる精製を行い、ＩｇＧまたはＩｇＭ画分を集め、精製モノクローナル抗体とする。

[0191] また、（４）で得られるモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを、１０％濃度のＦＢＳを添加したＲＰＭＩ１６４０培地などで培養した後、遠心分離により上清を除き、Ｈｙｂｒｉｄｏｍａ　ＳＦＭ培地に懸濁し、３～７日間培養する。得られた細胞懸濁液を遠心分離し、得られた上清よりプロテイ

OnCusp
Ex. 1038

ンＡ－カラムまたはプロテインＧ－カラムによる精製を行ない、ＩｇＧ画分を集め、精製モノクローナル抗体を得ることもできる。なお、Ｈｙｂｒｉｄｏｍａ　ＳＦＭ培地には５％濃度のダイゴＧＦ２１を添加することもできる。

[0192] 抗体のサブクラスの決定は、サブクラスタイピングキットを用いて酵素免疫測定法により行う。蛋白量の定量は、ローリー法または２８０ｎｍでの吸光度より算出する。

[0193] （６）モノクローナル抗体の選択

モノクローナル抗体の選択は以下に示す酵素免疫測定法によるバインディングアッセイ、およびＢｉａｃｏｒｅによるｋｉｎｅｔｉｃｓ解析により行う。これらの方法以外に、公知の方法（Ｔｈｅ　Ｐｒｏｓｔａｔｅ，６７，１１６３（２００７））により、抗体の標的抗原を同定することで選択することもできる。

[0194] （６－ａ）バインディングアッセイ

抗原としては、（１）で得られるＴｒｏｐ－２をコードするｃＤＮＡを含む発現ベクターを大腸菌、酵母、昆虫細胞、または動物細胞などに導入して得られた遺伝子導入細胞、リコンビナント蛋白質、またはヒト組織から得た精製ポリペプチドまたは部分ペプチドなどを用いる。抗原が部分ペプチドである場合には、ＢＳＡまたはＫＬＨなどのキャリア蛋白質とコンジュゲートを作製して、これを用いる。

[0195] 抗原を９６ウェルプレートなどのプレートに分注し、固相化した後、一次抗体として血清、ハイブリドーマの培養上清または精製モノクローナル抗体などの被験物質を分注し、反応させる。ＰＢＳまたはＰＢＳ－Ｔｗｅｅｎなどで、よく洗浄した後、二次抗体としてビオチン、酵素、化学発光物質または放射線化合物などで標識した抗イムノグロブリン抗体を分注して反応させる。ＰＢＳ－Ｔｗｅｅｎでよく洗浄した後、二次抗体の標識物質に応じた反応を行い、免疫原に対し特異的に反応するモノクローナル抗体を選択する。

[0196] また、本発明のモノクローナル抗体と競合してＴｒｏｐ－２に結合するモ

ノクローナル抗体は、上述のバインディングアッセイ系に、被検抗体を添加して反応させることで取得できる。すなわち、被検抗体を加えた時にモノクローナル抗体の結合が阻害される抗体をスクリーニングすることにより、Ｔｒｏｐ－２の細胞外領域への結合において、取得したモノクローナル抗体と競合するモノクローナル抗体を取得することができる。

[0197] 更に、本発明のモノクローナル抗体が認識するエピトープと、同じエピトープに結合する抗体は、上述のバインディングアッセイ系で取得された抗体のエピトープを同定し、同定したエピトープの、部分的な合成ペプチド、またはエピトープの立体構造に擬態させた合成ペプチド等を作製し、免疫することで、取得することができる。

[0198] （６－ｂ）Ｂｉａｃｏｒｅによるカイネティクス解析

Ｂｉａｃｏｒｅ　Ｔ１００を用い、抗原と被験物の間の結合におけるカイネティクスを測定し、その結果を機器付属の解析ソフトウエアで解析をする。抗マウスＩｇＧ抗体をセンサーチップＣＭ５にアミンカップリング法により固定した後、ハイブリドーマ培養上清または精製モノクローナル抗体などの被験物質を流し、適当量結合させ、更に濃度既知の複数濃度の抗原を流し、結合および解離を測定する。

[0199] 得られたデータを元に、機器付属のソフトウエアを用いて、１：１バインディングモデルによりカイネティクス解析を行い、各種パラメータを取得する。または、ヒトＴｒｏｐ－２をセンサーチップ上に、例えばアミンカップリング法により固定した後、濃度既知の複数濃度の精製モノクローナル抗体を流し、結合および解離を測定する。得られたデータを機器付属のソフトウエアを用い、バイバレントバインディングモデルによるカイネティクス解析を行い、各種パラメータを取得する。

[0200] ２．遺伝子組換え抗体の作製

遺伝子組換え抗体の作製例として、以下にヒト型キメラ抗体およびヒト型ＣＤＲ移植抗体の作製方法を示す。

（１）遺伝子組換え抗体発現用ベクターの構築

遺伝子組換え抗体発現用ベクターは、ヒト抗体のＣＨおよびＣＬをコードするＤＮＡが組み込まれた動物細胞用発現ベクターであり、動物細胞用発現ベクターにヒト抗体のＣＨおよびＣＬをコードするＤＮＡをそれぞれクローニングすることにより構築することができる。

[0201] ヒト抗体のＣ領域は任意のヒト抗体のＣＨおよびＣＬを用いることができる。例えば、ヒト抗体のγ１サブクラスのＣＨおよびκクラスのＣＬなどを用いる。ヒト抗体のＣＨおよびＣＬをコードするＤＮＡには、ｃＤＮＡを用いるが、エキソンとイントロンからなる染色体ＤＮＡを用いることもできる。

[0202] 動物細胞用発現ベクターには、ヒト抗体のＣ領域をコードする遺伝子を組込み発現できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、ｐＡＧＥ１０７［Ｃｙｔｏｔｅｃｈｎｏｌ．，３，１３３（１９９０）］、ｐＡＧＥ１０３［Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．，１０１，１３０７（１９８７）］、ｐＨＳＧ２７４［Ｇｅｎｅ，２７，２２３（１９８４）］、ｐＫＣＲ［Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，７８，１５２７（１９８１）］、ｐＳＧ１ｂｄ２－４［Ｃｙｔｏｔｅｃｈｎｏｌ．，４，１７３（１９９０）］、またはｐＳＥ１ＵＫ１Ｓｅｄ１－３［Ｃｙｔｏｔｅｃｈｎｏｌ．，１３，７９（１９９３）］などを用いる。

[0203] 動物細胞用発現ベクターのうちプロモーターとエンハンサーには、例えば、ＳＶ４０の初期プロモーター［Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．，１０１，１３０７（１９８７）］、モロニーマウス白血病ウイルスＬＴＲ［Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍｕｎ．，１４９，９６０（１９８７）］、または免疫グロブリンＨ鎖のプロモーター［Ｃｅｌｌ，４１，４７９（１９８５）］とエンハンサー［Ｃｅｌｌ，３３，７１７（１９８３）］などを用いる。

[0204] 遺伝子組換え抗体発現用ベクターには、遺伝子組換え抗体発現ベクターの構築の容易さ、動物細胞への導入の容易さ、動物細胞内での抗体Ｈ鎖およびＬ鎖の発現量のバランスが均衡するなどの点から、抗体Ｈ鎖およびＬ鎖が同

一のベクター上に存在するタイプ（タンデム型）の遺伝子組換え抗体発現用ベクター［Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ，１６７，２７１（１９９４）］を用いるが、抗体Ｈ鎖およびＬ鎖が別々のベクター上に存在するタイプを用いることもできる。タンデム型の遺伝子組換え抗体発現用ベクターには、例えば、ｐＫＡＮＴＥＸ９３（国際公開第９７／１０３５４号公報）、ｐＥＥ１８［Ｈｙｂｒｉｄｏｍａ，１７，５５９（１９９８）］などを用いる。

[0205] （２）ヒト以外の動物由来の抗体のＶ領域をコードするｃＤＮＡの取得およびアミノ酸配列の解析

非ヒト抗体のＶＨ及びＶＬをコードするｃＤＮＡの取得およびアミノ酸配列の解析は以下のようにして行うことができる。非ヒト抗体を産生するハイブリドーマ細胞よりｍＲＮＡを抽出し、ｃＤＮＡを合成する。合成したｃＤＮＡをファージまたはプラスミドなどのベクターにクローニングしてｃＤＮＡライブラリーを作製する。

[0206] 前記ライブラリーより、マウス抗体のＣ領域部分またはＶ領域部分をコードするＤＮＡをプローブとして用い、ＶＨまたはＶＬをコードするｃＤＮＡを有する組換えファージまたは組換えプラスミドをそれぞれ単離する。組換えファージまたは組換えプラスミド上の目的とするマウス抗体のＶＨまたはＶＬの全塩基配列をそれぞれ決定し、塩基配列よりＶＨまたはＶＬの全アミノ酸配列をそれぞれ推定する。

[0207] 非ヒト抗体を産生するハイブリドーマ細胞を作製するヒト以外の動物には、マウス、ラット、ハムスター、またはラビットなどを用いるが、ハイブリドーマ細胞を作製することが可能であれば、いかなる動物も用いることができる。

[0208] ハイブリドーマ細胞からの全ＲＮＡの調製には、チオシアン酸グアニジン－トリフルオロ酢酸セシウム法［Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｅｎｚｙｍｏｌ．，１５４，３（１９８７）］、またはＲＮＡ　ｅａｓｙ　ｋｉｔ（キアゲン社製）などのキットなどを用いる。

OnCusp
Ex. 1038

[0209] 全ＲＮＡからのｍＲＮＡの調製には、オリゴ（ｄＴ）固定化セルロースカラム法［Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ，Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｓｅｃｏｎｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ（１９８９）］、またはＯｌｉｇｏ－ｄＴ３０＜Ｓｕｐｅｒ＞ ｍＲＮＡ Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ Ｋｉｔ（タカラバイオ社製）などのキットなどを用いる。

[0210] また、Ｆａｓｔ Ｔｒａｃｋ ｍＲＮＡ Ｉｓｏｌａｔｉｏｎ Ｋｉｔ（インビトロジェン社製）、またはＱｕｉｃｋＰｒｅｐ ｍＲＮＡ Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ Ｋｉｔ（ファルマシア社製）などのキットを用いてハイブリドーマ細胞からｍＲＮＡを調製することもできる。

[0211] ｃＤＮＡの合成およびｃＤＮＡライブラリーの作製には、公知の方法［Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ，Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｓｅｃｏｎｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ（１９８９）、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔ １，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ（１９８７－１９９７）］、またはＳｕｐｅｒＳｃｒｉｐｔ Ｐｌａｓｍｉｄ Ｓｙｓｔｅｍ ｆｏｒ ｃＤＮＡ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ ａｎｄ Ｐｌａｓｍｉｄ Ｃｌｏｎｉｎｇ（インビトロジェン社製）、またはＺＡＰ－ｃＤＮＡ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ Ｋｉｔ（ストラタジーン社製）などのキットなどを用いる。

[0212] ｃＤＮＡライブラリーの作製の際、ハイブリドーマ細胞から抽出したｍＲＮＡを鋳型として合成したｃＤＮＡを組み込むベクターには、該ｃＤＮＡを組み込めるベクターであればいかなるものでも用いることができる。例えば、ＺＡＰ Ｅｘｐｒｅｓｓ［Ｓｔｒａｔｅｇｉｅｓ，５，５８（１９９２）］、ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ ＩＩ ＳＫ（＋）［Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，１７，９４９４（１９８９）］、λＺＡＰＩＩ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ社製）、λｇｔ１０、λｇｔ１１［ＤＮＡ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ，Ｉ，４９（１９８５

）］、Ｌａｍｂｄａ　ＢｌｕｅＭｉｄ（クローンテック社製）、λＥｘＣｅｌｌ、ｐＴ７Ｔ３－１８Ｕ（ファルマシア社製）、ｐｃＤ２［Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．，３，２８０（１９８３）］、またはｐＵＣ１８［Ｇｅｎｅ，３３，１０３（１９８５）］などを用いる。

[0213] ファージまたはプラスミドベクターにより構築されるｃＤＮＡライブラリーを導入する大腸菌には、該ｃＤＮＡライブラリーを導入、発現および維持できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、ＸＬ１－Ｂｌｕｅ　ＭＲＦ’［Ｓｔｒａｔｅｇｉｅｓ，５，８１（１９９２）］、Ｃ６００［Ｇｅｎｅｔｉｃｓ，３９，４４０（１９５４）］、Ｙ１０８８、Ｙ１０９０［Ｓｃｉｅｎｃｅ，２２２，７７８（１９８３）］、ＮＭ５２２［Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，１６６，１（１９８３）］、Ｋ８０２［Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，１６，１１８（１９６６）］、またはＪＭ１０５［Ｇｅｎｅ，３８，２７５（１９８５）］などを用いる。

[0214] ｃＤＮＡライブラリーからの非ヒト抗体のＶＨまたはＶＬをコードするｃＤＮＡクローンの選択には、アイソトープまたは蛍光標識したプローブを用いたコロニー・ハイブリダイゼーション法、またはプラーク・ハイブリダイゼーション法［Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ，Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ，Ｓｅｃｏｎｄ　Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｅｓｓ（１９８９）］などを用いる。

[0215] また、プライマーを調製し、ｍＲＮＡから合成したｃＤＮＡまたはｃＤＮＡライブラリーを鋳型として、Ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ　Ｃｈａｉｎ　Ｒｅａｃｔｉｏｎ法［以下、ＰＣＲ法と表記する、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ，Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ，Ｓｅｃｏｎｄ　Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｅｓｓ（１９８９）、Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔ　１，Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ（１９８７－１９９７）］を行うことよりＶＨ

またはＶＬをコードするｃＤＮＡを調製することもできる。

[0216] 選択されたｃＤＮＡを、適当な制限酵素などで切断後、ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ ＳＫ（－）（ストラタジーン社製）などのプラスミドにクローニングし、通常用いられる塩基配列解析方法などにより該ｃＤＮＡの塩基配列を決定する。塩基配列解析方法には、例えば、ジデオキシ法［Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，７４，５４６３（１９７７）］などの反応を行った後、ＡＢＩ ＰＲＩＳＭ３７００（ＰＥバイオシステムズ社製）またはＡ．Ｌ．Ｆ．ＤＮＡシークエンサー（ファルマシア社製）などの塩基配列自動分析装置などを用いる。

[0217] 決定した塩基配列からＶＨおよびＶＬの全アミノ酸配列をそれぞれ推定し、既知の抗体のＶＨおよびＶＬの全アミノ酸配列［Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，ＵＳ Ｄｅｐｔ．Ｈｅａｌｔｈ ａｎｄ Ｈｕｍａｎ Ｓｅｒｖｉｃｅｓ（１９９１）］と比較することにより、取得したｃＤＮＡが分泌シグナル配列を含む抗体のＶＨおよびＶＬの完全なアミノ酸配列をコードしているかをそれぞれ確認する。

[0218] 分泌シグナル配列を含む抗体のＶＨおよびＶＬの完全なアミノ酸配列に関しては、既知の抗体のＶＨおよびＶＬの全アミノ酸配列［Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，ＵＳ Ｄｅｐｔ．Ｈｅａｌｔｈ ａｎｄ Ｈｕｍａｎ Ｓｅｒｖｉｃｅｓ（１９９１）］と比較することにより、分泌シグナル配列の長さおよびＮ末端アミノ酸配列を推定でき、更にはそれらが属するサブグループを知ることができる。また、ＶＨおよびＶＬの各ＣＤＲのアミノ酸配列についても、既知の抗体のＶＨおよびＶＬのアミノ酸配列［Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，ＵＳ Ｄｅｐｔ．Ｈｅａｌｔｈ ａｎｄ Ｈｕｍａｎ Ｓｅｒｖｉｃｅｓ（１９９１）］と比較することによって見出すことができる。

[0219] また、得られたＶＨおよびＶＬの完全なアミノ酸配列を用いて、例えば、

ＳＷＩＳＳ－ＰＲＯＴまたはＰＩＲ－Ｐｒｏｔｅｉｎなどの任意のデータベースに対してＢＬＡＳＴ法［Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２１５，４０３（１９９０）］などの相同性検索を行い、ＶＨおよびＶＬの完全なアミノ酸配列が新規なものかを確認できる。

[0220] （３）ヒト型キメラ抗体発現ベクターの構築

（１）で得られる遺伝子組換え抗体発現用ベクターのヒト抗体のＣＨまたはＣＬをコードするそれぞれの遺伝子の上流に、それぞれ非ヒト抗体のＶＨまたはＶＬをコードするｃＤＮＡをそれぞれクローニングすることで、ヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築することができる。

[0221] 非ヒト抗体のＶＨまたはＶＬをコードするｃＤＮＡの３’末端側と、ヒト抗体のＣＨまたはＣＬの５’末端側とを連結するために、連結部分の塩基配列が適切なアミノ酸をコードし、かつ適当な制限酵素認識配列になるように設計したＶＨおよびＶＬのｃＤＮＡを作製する。

[0222] 作製されたＶＨおよびＶＬのｃＤＮＡを、（１）で得られるヒト型ＣＤＲ移植抗体発現用ベクターのヒト抗体のＣＨまたはＣＬをコードするそれぞれの遺伝子の上流にそれらが適切な形で発現する様にそれぞれクローニングし、ヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築する。

[0223] また、非ヒト抗体ＶＨまたはＶＬをコードするｃＤＮＡを、適当な制限酵素の認識配列を両端に有する合成ＤＮＡを用いてＰＣＲ法によりそれぞれ増幅し、（１）で得られる遺伝子組換え抗体発現用ベクターにクローニングすることもできる。

[0224] （４）ヒト型ＣＤＲ移植抗体のＶ領域をコードするｃＤＮＡの構築

ヒト型ＣＤＲ移植抗体のＶＨまたはＶＬをコードするｃＤＮＡは、以下のようにして構築することができる。

[0225] 非ヒト抗体のＶＨまたはＶＬのＣＤＲのアミノ酸配列を移植するための、ヒト抗体のＶＨまたはＶＬのＦＲのアミノ酸配列をそれぞれ選択する。選択するＦＲのアミノ酸配列には、ヒト抗体由来のものであれば、いずれのものでも用いることができる。

[0226] 例えば、Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｄａｔａ Ｂａｎｋなどのデータベースに登録されているヒト抗体のＦＲのアミノ酸配列、またはヒト抗体のＦＲの各サブグループの共通アミノ酸配列［Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，ＵＳ Ｄｅｐｔ．Ｈｅａｌｔｈ ａｎｄ Ｈｕｍａｎ Ｓｅｒｖｉｃｅｓ（１９９１）］などを用いる。

[0227] 抗体の結合活性の低下を抑えるため、元の抗体のＶＨまたはＶＬのＦＲのアミノ酸配列とできるだけ高い相同性（少なくとも６０％以上）のＦＲのアミノ酸配列を選択する。

[0228] 次に、選択したヒト抗体のＶＨまたはＶＬのＦＲのアミノ酸配列に、もとの抗体のＣＤＲのアミノ酸配列をそれぞれ移植し、ヒト型ＣＤＲ移植抗体のＶＨまたはＶＬのアミノ酸配列をそれぞれ設計する。設計したアミノ酸配列を抗体の遺伝子の塩基配列に見られるコドンの使用頻度［Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，ＵＳ Ｄｅｐｔ．Ｈｅａｌｔｈ ａｎｄ Ｈｕｍａｎ Ｓｅｒｖｉｃｅｓ（１９９１）］を考慮してＤＮＡ配列に変換し、ヒト型ＣＤＲ移植抗体のＶＨまたはＶＬのアミノ酸配列をコードするＤＮＡ配列をそれぞれ設計する。

[0229] 設計したＤＮＡ配列に基づき、１００塩基前後の長さからなる数本の合成ＤＮＡを合成し、それらを用いてＰＣＲ反応を行う。この場合、ＰＣＲ反応での反応効率及び合成可能なＤＮＡの長さから、好ましくはＶＨ、ＶＬ各々について各６本の合成ＤＮＡを設計する。さらに、両端に位置する合成ＤＮＡの各５’末端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、ヒト型ＣＤＲ移植抗体のＶＨまたはＶＬをコードするｃＤＮＡを、（１）で得られるヒト型ＣＤＲ移植抗体発現用ベクターへ容易にクローニングすることができる。

[0230] ＰＣＲ反応後、増幅産物をｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ ＳＫ（－）（ストラタジーン社製）などのプラスミドにそれぞれクローニングし、（２）に記載

の方法と同様の方法により、塩基配列を決定し、所望のヒト型ＣＤＲ移植抗体のＶＨまたはＶＬのアミノ酸配列をコードするＤＮＡ配列を有するプラスミドを取得する。

[0231] または、設計したＤＮＡ配列に基づき、ＶＨ全長およびＶＬ全長を各々１本の長鎖ＤＮＡとして合成したものを、上記ＰＣＲ増幅産物に代えて用いることもできる。さらに、合成長鎖ＤＮＡの両端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、ヒト型ＣＤＲ移植抗体のＶＨまたはＶＬをコードするｃＤＮＡを、（１）で得られるヒト型ＣＤＲ移植抗体発現用ベクターへ容易にクローニングすることができる。

[0232] （５）ヒト型ＣＤＲ移植抗体のＶ領域のアミノ酸配列の改変

ヒト型ＣＤＲ移植抗体は、非ヒト抗体のＶＨおよびＶＬのＣＤＲのみをヒト抗体のＶＨおよびＶＬのＦＲに移植しただけでは、その抗原結合活性は元の非ヒト抗体に比べて低下する［ＢＩＯ／ＴＥＣＨＮＯＬＯＧＹ，９，２６６（１９９１）］。

[0233] ヒト型ＣＤＲ移植抗体では、ヒト抗体のＶＨおよびＶＬのＦＲのアミノ酸配列の中で、直接抗原との結合に関与しているアミノ酸残基、ＣＤＲのアミノ酸残基と相互作用するアミノ酸残基、および抗体の立体構造を維持し、間接的に抗原との結合に関与しているアミノ酸残基を同定し、それらのアミノ酸残基を元の非ヒト抗体のアミノ酸残基に置換することにより、低下した抗原結合活性を上昇させることができる。

[0234] 抗原結合活性に関わるＦＲのアミノ酸残基を同定するために、Ｘ線結晶解析［Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，１１２，５３５（１９７７）］またはコンピューターモデリング［Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ，７，１５０１（１９９４）］などを用いることにより、抗体の立体構造の構築および解析を行うことができる。

[0235] また、それぞれの抗体について数種の改変体を作製し、それぞれの抗原結合活性との相関を検討することを繰り返し、試行錯誤することで必要な抗原結合活性を有する改変ヒト型ＣＤＲ移植抗体を取得できる。

[0236] ヒト抗体のＶＨ及びＶＬのＦＲのアミノ酸残基は、改変用合成ＤＮＡを用いて（４）に記載のＰＣＲ反応を行うことにより、改変させることができる。ＰＣＲ反応後の増幅産物について（２）に記載の方法により、塩基配列を決定し、目的の改変が施されたことを確認する。

[0237] （６）ヒト型ＣＤＲ移植抗体発現ベクターの構築

（１）で得られる遺伝子組換え抗体発現用ベクターのヒト抗体のＣＨまたはＣＬをコードするそれぞれの遺伝子の上流に、構築した遺伝子組換え抗体のＶＨまたはＶＬをコードするｃＤＮＡをそれぞれクローニングし、ヒト型ＣＤＲ移植抗体発現ベクターを構築することができる。

[0238] 例えば、（４）および（５）で得られるヒト型ＣＤＲ移植抗体のＶＨまたはＶＬを構築する際に用いる合成ＤＮＡのうち、両端に位置する合成ＤＮＡの５’末端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、（１）で得られるヒト型ＣＤＲ移植抗体発現用ベクターのヒト抗体のＣＨまたはＣＬをコードするそれぞれの遺伝子の上流にそれらが適切な形で発現するようにそれぞれクローニングする。

[0239] （７）遺伝子組換え抗体の一過性発現

（３）および（６）で得られる遺伝子組換え抗体発現ベクター、またはそれらを改変した発現ベクターを用いて遺伝子組換え抗体の一過性発現を行い、作製した多種類のヒト型ＣＤＲ移植抗体の抗原結合活性を効率的に評価することができる。

[0240] 発現ベクターを導入する宿主細胞には、遺伝子組換え抗体を発現できる宿主細胞であれば、いかなる細胞でも用いることができるが、例えばＣＯＳ－７細胞［Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（ＡＴＣＣ）番号：ＣＲＬ１６５１］を用いる［Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．，ＣＲＣ ｐｒｅｓｓ，２８３（１９９１）］。

[0241] ＣＯＳ－７細胞への発現ベクターの導入には、ＤＥＡＥ－デキストラン法［Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．，ＣＲＣ

OnCusp
Ex. 1038

ｐｒｅｓｓ（１９９１）］、またはリポフェクション法［Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８４，７４１３（１９８７）］などを用いる。

[0242] 発現ベクターの導入後、培養上清中の遺伝子組換え抗体の発現量および抗原結合活性は酵素免疫抗体法［Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ－Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ ｐｒａｃｔｉｃｅ，Ｔｈｉｒｄ ｅｄｉｔｉｏｎ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ（１９９６）、Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ － Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ（１９８８）、単クローン抗体実験マニュアル，講談社サイエンティフィック（１９８７）］などを用いて測定する。

[0243] （８）遺伝子組換え抗体を安定に発現する形質転換株の取得と遺伝子組換え抗体の調製

（３）および（６）で得られた遺伝子組換え抗体発現ベクターを適当な宿主細胞に導入することにより、遺伝子組換え抗体を安定に発現する形質転換株を得ることができる。

[0244] 宿主細胞への発現ベクターの導入には、エレクトロポレーション法［日本国特開平２－２５７８９１号公報、Ｃｙｔｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，３，１３３（１９９０）］などを用いる。

[0245] 遺伝子組換え抗体発現ベクターを導入する宿主細胞には、遺伝子組換え抗体を発現させることができる宿主細胞であれば、いかなる細胞でも用いることができる。例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞ＣＨＯ－Ｋ１（ＡＴＣＣ ＣＣＬ－６１）、ＤＵＫＸＢ１１（ＡＴＣＣ ＣＣＬ－９０９６）、Ｐｒｏ－５（ＡＴＣＣ ＣＣＬ－１７８１）、ＣＨＯ－Ｓ（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｃａｔ ＃ １１６１９）、ラットミエローマ細胞ＹＢ２／３ＨＬ．Ｐ２．Ｇ１１．１６Ａｇ．２０（ＡＴＣＣ番号：ＣＲＬ１６６２、またはＹＢ２／０ともいう）、マウスミエローマ細胞ＮＳ０、マウスミエローマ細胞ＳＰ２／０－Ａｇ１４（ＡＴＣＣ番号：ＣＲＬ１５８１）

、マウスミエローマ細胞Ｐ３Ｘ６３－Ａｇ８．６５３（ＡＴＣＣ番号：ＣＲＬ１５８０）、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子（Ｄｉｈｙｄｒｏｆｏｒａｔｅ Ｒｅｄｕｃｔａｓｅ、以下、ｄｈｆｒと表記する）が欠損したＣＨＯ細胞［Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，７７，４２１６（１９８０）］などを用いる。

[0246] また、細胞内糖ヌクレオチドＧＤＰ－フコースの合成に関与する酵素などの蛋白質またはＮ－グリコシド結合複合型糖鎖の還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素などの蛋白質、または細胞内糖ヌクレオチドＧＤＰ－フコースのゴルジ体への輸送に関与する蛋白質などの活性が低下または欠失した宿主細胞、例えばα１，６－フコース転移酵素遺伝子が欠損したＣＨＯ細胞（国際公開第２００５／０３５５８６号、国際公開第０２／３１１４０号）、レクチン耐性を獲得したＬｅｃ１３［Ｓｏｍａｔｉｃ Ｃｅｌｌ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ｇｅｎｅｔｉｃｓ，１２，５５（１９８６）］などを用いることもできる。

[0247] 発現ベクターの導入後、遺伝子組換え抗体を安定に発現する形質転換株は、Ｇ４１８硫酸塩（以下、Ｇ４１８と表記する）などの薬剤を含む動物細胞培養用培地で培養することにより選択する（日本国特開平２－２５７８９１号公報）。

[0248] 動物細胞培養用培地には、ＲＰＭＩ１６４０培地（インビトロジェン社製）、ＧＩＴ培地（日本製薬社製）、ＥＸ－ＣＥＬＬ３０１培地（ジェイアールエイチ社製）、ＩＭＤＭ培地（インビトロジェン社製）、Ｈｙｂｒｉｄｏｍａ－ＳＦＭ培地（インビトロジェン社製）、またはこれら培地にＦＢＳなどの各種添加物を添加した培地などを用いる。

[0249] 得られた形質転換株を培地中で培養することで培養上清中に遺伝子組換え抗体を発現蓄積させる。培養上清中の遺伝子組換え抗体の発現量および抗原結合活性はＥＬＩＳＡ法などにより測定できる。また、ｄｈｆｒ遺伝子増幅系（日本国特開平２－２５７８９１号公報）などを利用して、形質転換株の

産生する遺伝子組換え抗体の発現量を向上させることができる。

[0250] 遺伝子組換え抗体は、形質転換株の培養上清よりプロテインＡ－カラムを用いて精製する［Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ － Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ ｐｒａｃｔｉｃｅ，Ｔｈｉｒｄ ｅｄｉｔｉｏｎ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ（１９９６）、Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ － Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ（１９８８）］。また、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィーおよび限外濾過などの蛋白質の精製で用いられる方法を組み合わせることもできる。

[0251] 精製した遺伝子組換え抗体のＨ鎖、Ｌ鎖或いは抗体分子全体の分子量は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法［Ｎａｔｕｒｅ，２２７，６８０（１９７０）］、またはウェスタンブロッティング法［Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ － Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ ｐｒａｃｔｉｃｅ，Ｔｈｉｒｄ ｅｄｉｔｉｏｎ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ（１９９６）、Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ － Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ（１９８８）］など用いて測定することができる。

[0252] ３．精製モノクローナル抗体またはその抗体断片の活性評価

精製した本発明のモノクローナル抗体またはその抗体断片の活性評価は、以下のように行うことができる。Ｔｒｏｐ－２発現細胞株に対する結合活性は、前述の１－（６ａ）記載のバインディングアッセイおよび（６ｂ）記載のＢｉａｃｏｒｅシステムなどを用いた表面プラズモン共鳴法を用いて測定する。

[0253] また、該結合活性は、蛍光抗体法［Ｃａｎｃｅｒ Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．，３６，３７３（１９９３）］などを用いて測定できる。抗原陽性培養細胞株に対するＣＤＣ活性、またはＡＤＣＣ活性は公知の測定方法［Ｃａｎｃｅｒ Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．，３６，３７３（１９９３）］により測定することができる。

[0254] ４．抗体のエフェクター活性を制御する方法

本発明のモノクローナル抗体のエフェクター活性を制御する方法としては、抗体の定常領域（Ｆｒａｇｍｅｎｔ，ｃｒｙｓｔａｌｌｉｚａｂｌｅ、以下、Ｆｃ領域と表記する）の２９７番目のアスパラギン（Ａｓｎ）に結合するＮ結合複合型糖鎖の還元末端に存在するＮ－アセチルグルコサミン（ＧｌｃＮＡｃ）にα－１，６結合するフコース（コアフコースともいう）の量を制御する方法（国際公開第２００５／０３５５８６号、国際公開第２００２／３１１４０号、国際公開第００／６１７３９号）や、抗体のＦｃ領域のアミノ酸残基を改変することで制御する方法などが知られている。本発明のモノクローナル抗体にはいずれの方法を用いても、エフェクター活性を制御することができる。

[0255] エフェクター活性とは、抗体のＦｃ領域を介して引き起こされる抗体依存性の活性をいい、抗体依存性細胞傷害活性（ＡＤＣＣ活性）、補体依存性傷害活性（ＣＤＣ活性）や、マクロファージや樹状細胞などの食細胞による抗体依存性ファゴサイトーシス（Ａｎｔｉｂｏｄｙ－ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ ｐｈａｇｏｃｙｔｏｓｉｓ，ＡＤＰ活性）などが知られている。

[0256] Ｆｃ領域上のＮ－結合型複合型糖鎖の還元末端のＮ－アセチルグルコサミンに付加するフコースの含量を制御することで、抗体のエフェクター活性を増加または低下させることができる。抗体のＦｃ領域に結合しているＮ結合複合型糖鎖に付加するフコースの含量を低下させる方法としては、α１，６－フコース転移酵素遺伝子が欠損したＣＨＯ細胞を用いて抗体を発現することで、フコースが結合していない抗体を取得することができる。フコースが結合していない抗体は高いＡＤＣＣ活性を有する。

[0257] 一方、抗体のＦｃ領域に結合しているＮ－結合複合型糖鎖に付加するフコースの含量を増加させる方法としては、α１，６－フコース転移酵素遺伝子を導入した宿主細胞を用いて抗体を発現させることで、フコースが結合している抗体を取得できる。フコースが結合している抗体は、フコースが結合していない抗体よりも低いＡＤＣＣ活性を有する。

[0258] また、抗体のＦｃ領域のアミノ酸残基を改変することでＡＤＣＣ活性やＣＤＣ活性を増加または低下させることができる。例えば、米国特許出願公開第２００７／０１４８１６５号明細書に記載のＦｃ領域のアミノ酸配列を用いることで、抗体のＣＤＣ活性を増加させることができる。また、米国特許第６，７３７，０５６号明細書、米国特許第７，２９７，７７５号明細書または米国特許第７，３１７，０９１号明細書に記載のアミノ酸改変を行うことで、ＡＤＣＣ活性またはＣＤＣ活性を、増加させることも低下させることもできる。

[0259] 更に、上述の方法を組み合わせて、一つの抗体に使用することにより、抗体のエフェクター活性が制御された抗体を取得することができる。

[0260] ５．本発明のモノクローナル抗体またはその抗体断片を用いた疾患の治療方法

本発明のモノクローナル抗体またはその抗体断片は、Ｔｒｏｐ－２陽性細胞が関与する疾患の治療に用いることができる。

[0261] 本発明のモノクローナル抗体またはその抗体断片、またはこれらの誘導体を含有する治療剤は、有効成分としての該抗体もしくは該抗体断片、またはこれらの誘導体のみを含むものであってもよいが、通常は薬理学的に許容される１以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野において公知の方法により製造した医薬製剤として提供される。

[0262] 投与経路としては、例えば、経口投与、並びに口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内および静脈内などの非経口投与が挙げられる。投与形態としては、例えば、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、軟膏およびテープ剤などが挙げられる。

[0263] 経口投与に適当な製剤としては、例えば、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤、または顆粒剤などが挙げられる。

[0264] 乳剤またはシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトールまたは果糖などの糖類、ポリエチレングリコールまたはプロピレングリコールなどのグリコール類、ごま油、オリーブ油または大豆油などの油類、ｐ－

ヒドロキシ安息香酸エステル類などの防腐剤、またはストロベリーフレーバーまたはペパーミントなどのフレーバー類などを添加剤として用いて製造する。

[0265] カプセル剤、錠剤、散剤または顆粒剤などは、乳糖、ブドウ糖、ショ糖またはマンニトールなどの賦形剤、デンプンまたはアルギン酸ナトリウムなどの崩壊剤、ステアリン酸マグネシウムまたはタルクなどの滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロースまたはゼラチンなどの結合剤、脂肪酸エステルなどの界面活性剤またはグリセリンなどの可塑剤などを添加剤として用いて製造する。

[0266] 非経口投与に適当な製剤としては、例えば、注射剤、座剤または噴霧剤などが挙げられる。

[0267] 注射剤は、塩溶液、ブドウ糖溶液、またはその両者の混合物からなる担体などを用いて製造する。

[0268] 座剤はカカオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸などの担体を用いて製造する。

[0269] 噴霧剤は受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ本発明のモノクローナル抗体またはその抗体断片を微細な粒子として分散させ、吸収を容易にさせる担体などを用いて製造する。担体としては、例えば乳糖またはグリセリンなどを用いる。また、エアロゾルまたはドライパウダーとして製造することもできる。

[0270] さらに、上記非経口剤においても、経口投与に適当な製剤で添加剤として例示した成分を添加することもできる。

[0271] ６．本発明のモノクローナル抗体またはその抗体断片を用いた疾患の診断方法

本発明のモノクローナル抗体または該抗体断片を用いて、Ｔｒｏｐ－２またはＴｒｏｐ－２が発現した細胞を検出または測定することにより、Ｔｒｏｐ－２が関連する疾患を診断することができる。

[0272] Ｔｒｏｐ－２が関連する疾患の一つである癌の診断は、例えば、以下のよ

うにＴｒｏｐ－２の検出または測定して行うことができる。患者体内の癌細胞に発現しているＴｒｏｐ－２をフローサイトメトリーなどの免疫学的手法を用いて検出することにより診断を行うことができる。

[0273] 免疫学的手法とは、標識を施した抗原または抗体を用いて、抗体量または抗原量を検出または測定する方法である。例えば、放射免疫測定法、酵素免疫測定法、蛍光免疫測定法、発光免疫測定法、ウェスタンブロット法または物理化学的手法などを用いる。

[0274] 放射免疫測定法は、例えば、抗原または抗原を発現した細胞などに、本発明のモノクローナル抗体または該抗体断片を反応させ、さらに放射線標識を施した抗イムノグロブリン抗体または結合断片を反応させた後、シンチレーションカウンターなどで測定する。

[0275] 酵素免疫測定法は、例えば、抗原または抗原を発現した細胞などに、本発明のモノクローナル抗体または該抗体断片を反応させ、さらに標識を施した抗イムノグロブリン抗体または結合断片を反応させた後、発色色素を吸光光度計で測定する。例えばサンドイッチＥＬＩＳＡ法などを用いる。酵素免疫測定法で用いる標識体としては、公知［酵素免疫測定法，医学書院（１９８７）］の酵素標識を用いることができる。例えば、アルカリフォスファターゼ標識、ペルオキシダーゼ標識、ルシフェラーゼ標識、またはビオチン標識などを用いる。

[0276] サンドイッチＥＬＩＳＡ法は、固相に抗体を結合させた後、検出または測定対象である抗原をトラップさせ、トラップされた抗原に第２の抗体を反応させる方法である。該ＥＬＩＳＡ法では、検出または測定したい抗原を認識する抗体または抗体断片であって、抗原認識部位の異なる２種類の抗体を準備し、そのうち、第１の抗体または抗体断片を予めプレート（例えば、９６ウェルプレート）に吸着させ、次に第２の抗体または抗体断片をＦＩＴＣなどの蛍光物質、ペルオキシダーゼなどの酵素、またはビオチンなどで標識しておく。

[0277] 上記の抗体が吸着したプレートに、生体内から分離された、細胞またはそ

の破砕液、組織またはその破砕液、細胞培養上清、血清、胸水、腹水、または眼液などを反応させた後、標識したモノクローナル抗体または抗体断片を反応させ、標識物質に応じた検出反応を行う。濃度既知の抗原を段階的に希釈して作製した検量線より、被験サンプル中の抗原濃度を算出する。

[0278] サンドイッチＥＬＩＳＡ法に用いる抗体としては、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体のいずれを用いてもよく、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、またはＦ（ａｂ）$_2$などの抗体フラグメントを用いてもよい。サンドイッチＥＬＩＳＡ法で用いる２種類の抗体の組み合わせとしては、異なるエピトープを認識するモノクローナル抗体または抗体断片の組み合わせでもよいし、ポリクローナル抗体とモノクローナル抗体または抗体断片との組み合わせでもよい。

[0279] 蛍光免疫測定法は、文献［Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ－Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ ｐｒａｃｔｉｃｅ，Ｔｈｉｒｄ ｅｄｉｔｉｏｎ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ（１９９６）、単クローン抗体実験マニュアル，講談社サイエンティフィック（１９８７）］などに記載された方法で測定する。蛍光免疫測定法で用いる標識体としては、公知［蛍光抗体法，ソフトサイエンス社（１９８３）］の蛍光標識を用いることができる。例えば、ＦＩＴＣ、またはＲＩＴＣなどを用いる。

[0280] 発光免疫測定法は文献［生物発光と化学発光　臨床検査４２，廣川書店（１９９８）］などに記載された方法で測定する。発光免疫測定法で用いる標識体としては、公知の発光体標識が挙げられ、アクリジニウムエステル、ロフィンなどを用いる。

[0281] ウェスタンブロット法は、抗原または抗原を発現した細胞などをＳＤＳ（ドデシル硫酸ナトリウム）－ＰＡＧＥ（ポリアクリルアミドゲル）［Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ－Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ（１９８８）］で分画した後、該ゲルをポリフッ化ビニリデン（ＰＶＤＦ）膜またはニトロセルロース膜にブロッティングし、該膜に抗原を認識する抗体または抗体断片を反応

させ、さらにＦＩＴＣなどの蛍光物質、ペルオキシダーゼなどの酵素標識、またはビオチン標識などを施した抗マウスＩｇＧ抗体または結合断片を反応させた後、該標識を可視化することによって測定する。一例を以下に示す。

[0282] 配列番号１で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現している細胞や組織を溶解し、還元条件下でレーンあたりのタンパク量として０．１～３０μｇをＳＤＳ－ＰＡＧＥ法により泳動する。泳動されたタンパク質をＰＶＤＦ膜にトランスファーし１～１０％ＢＳＡを含むＰＢＳ（以下、ＢＳＡ－ＰＢＳと表記する）に室温で３０分間反応させブロッキング操作を行う。

[0283] ここで本発明のモノクローナル抗体を反応させ、０．０５～０．１％のＴｗｅｅｎ－２０を含むＰＢＳ（以下、Ｔｗｅｅｎ－ＰＢＳと表記する）で洗浄し、ペルオキシダーゼ標識したヤギ抗マウスＩｇＧを室温で２時間反応させる。Ｔｗｅｅｎ－ＰＢＳで洗浄し、ＥＣＬ Ｗｅｓｔｅｒｎ Ｂｌｏｔｔｉｎｇ Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ Ｒｅａｇｅｎｔｓ（アマシャム社製）などを用いてモノクローナル抗体が結合したバンドを検出することにより、配列番号１で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを検出する。ウェスタンブロッティングでの検出に用いられる抗体としては、天然型の立体構造を保持していないポリペプチドに結合できる抗体が用いられる。

[0284] 物理化学的手法は、例えば、抗原であるＴｒｏｐ－２と本発明のモノクローナル抗体またはその抗体断片とを結合させることにより凝集体を形成させて、この凝集体を検出することにより行う。この他に物理化学的手法として、毛細管法、一次元免疫拡散法、免疫比濁法またはラテックス免疫比濁法［臨床検査法提要，金原出版（１９９８）］などを用いることもできる。

[0285] ラテックス免疫比濁法は、抗体または抗原を感作させた粒径０．１～１μｍ程度のポリスチレンラテックスなどの担体を用い、対応する抗原または抗体により抗原抗体反応を起こさせると、反応液中の散乱光は増加し、透過光は減少する。この変化を吸光度または積分球濁度として検出することにより被験サンプル中の抗原濃度などを測定する。

[0286] 一方、Ｔｒｏｐ－２が発現している細胞の検出または測定は、公知の免疫学的検出法を用いることができるが、好ましくは免疫沈降法、免疫細胞染色法、免疫組織染色法または蛍光抗体染色法などを用いる。

[0287] 免疫沈降法は、Ｔｒｏｐ－２を発現した細胞などを本発明のモノクローナル抗体またはその抗体断片と反応させた後、プロテインＧ－セファロースなどのイムノグロブリンに特異的な結合能を有する担体を加えて抗原抗体複合体を沈降させる。または以下のような方法によっても行なうことができる。ＥＬＩＳＡ用９６ウェルプレートに上述した本発明のモノクローナル抗体またはその抗体断片を固相化した後、ＢＳＡ－ＰＢＳによりブロッキングする。

[0288] 抗体が、例えばハイブリドーマ培養上清などの精製されていない状態である場合には、抗マウスイムノグロブリン、抗ラットイムノグロブリン、プロテイン－Ａまたはプロテイン－Ｇなどをあらかじめ ＥＬＩＳＡ用９６ウェルプレートに固相化し、ＢＳＡ－ＰＢＳでブロッキングした後、ハイブリドーマ培養上清を分注して結合させる。次に、ＢＳＡ－ＰＢＳを捨てＰＢＳでよく洗浄した後、Ｔｒｏｐ－２を発現している細胞や組織の溶解液を反応させる。よく洗浄した後のプレートより免疫沈降物をＳＤＳ－ＰＡＧＥ用サンプルバッファーで抽出し、上記のウェスタンブロッティングにより検出する。

[0289] 免疫細胞染色法または免疫組織染色法は、抗原を発現した細胞または組織などを、場合によっては抗体の通過性を良くするため界面活性剤やメタノールなどで処理した後、本発明のモノクローナル抗体と反応させ、さらにＦＩＴＣなどの蛍光標識、ペルオキシダーゼなどの酵素標識またはビオチン標識などを施した抗イムノグロブリン抗体またはその結合断片と反応させた後、該標識を可視化し、顕微鏡にて顕鏡する方法である。

[0290] また、蛍光標識の抗体と細胞を反応させ、フローサイトメーターにて解析する蛍光抗体染色法［Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ －Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ ｐｒａｃｔｉｃｅ，Ｔｈｉｒｄ ｅｄｉｔｉｏｎ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ（１９９６）、単クローン抗体実験

マニュアル，講談社サイエンティフィック（１９８７）］により検出を行うことができる。特に、Ｔｒｏｐ－２の細胞外領域に結合する、本発明のモノクローナル抗体またはその抗体断片は、蛍光抗体染色法により天然型の立体構造を保持して発現している細胞の検出ができる。

[0291] また、蛍光抗体染色法のうち、ＦＭＡＴ８１００ＨＴＳシステム（アプライドバイオシステム社製）などを用いた場合には、形成された抗体－抗原複合体と、抗体－抗原複合体の形成に関与していない遊離の抗体または抗原とを分離することなく、抗原量または抗体量を測定できる。

実施例

[0292] 以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

[0293] ［実施例１］

抗Ｔｒｏｐ－２マウスモノクローナル抗体の取得

（１）免疫原の調製

ヒト前立腺癌より癌細胞株Ｐｃ１を樹立し、免疫原として用いた。

[0294] （２）動物の免疫と抗体産生細胞の調製

１×１０^{6}個のＰｃ１細胞をＢａｌｂ／ｃマウスに２週間間隔で５回投与し、最終投与の３日後に脾臓を摘出した。脾臓をＲＰＭＩ１６４０（以下、ＲＰＭＩ培地と表記する）中で裁断し、すりつぶして遠心分離（１２００ｒｐｍ、５分間）した。得られた沈殿画分にトリス－塩化アンモニウム緩衝液（ｐＨ７．６）を添加し、３７℃で１分間処理することにより赤血球を除去した。さらに、沈殿画分（細胞画分）をＲＰＭＩ培地で３回洗浄し、細胞融合に用いた。

[0295] （３）マウス骨髄腫細胞の調製

８－アザグアニン耐性マウス骨髄腫細胞株Ｐ３Ｘ６３Ａｇ８Ｕ．１（Ｐ３－Ｕ１）を１０％ウシ胎児血清添加ＲＰＭＩ１６４０（インビトロジェン社）にて培養し、細胞融合の親株として用いた。

[0296] （４）アデノウィルスベクターの調製

ＩｇＧへの結合性を有するｐｒｏｔｅｉｎ　ＡのＺ３３モチーフをＨＩループ中に持つ、改変型のタイプ５アデノウィルスに、βーガラクトシダーゼ遺伝子を導入したＡｘ３ＣＡＺ３－ＦＺ３３［Ｃｌｉｎ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ，１２，３８０３（２００６）］を、ハイブリドーマへの導入に用いた。

[0297] （５）ハイブリドーマの作製

実施例１（２）で得られたマウス脾細胞と実施例１（３）で得られた骨髄腫細胞を５：１になるよう混合し、遠心分離（１２００ｒｐｍ、５分間）した。得られた沈殿画分の細胞群をよくほぐした後、攪拌しながら、ポリエチレングリコールー４０００（ＰＥＧ－４０００）１ｍＬを約１分かけて徐々に加え、その後該細胞液に１分毎にＲＰＭＩ培地１ｍＬを数回加えた後、ＲＰＭＩ培地を加えて全量を５０ｍＬとした。該細胞懸濁液を遠心分離（９００ｒｐｍ、５分間）し、得られた沈殿画分の細胞をゆるやかにほぐした後、ＨＡＴ培地［１０％ウシ胎児血清およびＨＡＴ　Ｍｅｄｉａ　Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔを加えたＭＩ１６４０培地］１００ｍＬ中にゆるやかに懸濁した。該懸濁液を９６ウェル培養用プレートに２００μＬ／ウェルずつ分注し、３７℃、５％CO_2のインキュベーター中で、５０％コンフルエントとなるまで培養した。

[0298] 一方で９６ウェルプレートにて培養したＰｃ１細胞より培養液を除去し、上記のハイブリドーマの培養上清を添加した。４℃で１時間インキュベートした後、培養上清を除いて細胞をＰＢＳで２回洗浄し、実施例１（４）にて作製したＡｘ３ＣＡＺ３－ＦＺ３３を多重感染度（ＭＯＩ）１０００となるよう添加した。さらに４℃で１時間インキュベートした後、ウィルス液を除いて細胞をＰＢＳで２回洗浄した。

[0299] βーＧａｌ　Ｒｅｐｏｒｔｅｒ　Ｇｅｎｅ　Ａｓｓａｙ，ｃｈｅｍｉｌｉｍｉｎｅｓｃｅｎｔキット（Ｒｏｃｈｅ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ社）を用いてβーガラクトシダーゼレポーターアッセイを行い、βーガラクトシダーゼ活性の高いウェルを選択した。選択したウェルの細胞について限界希釈法

によるクローニングを２回繰り返すことにより、Ｐｃ１細胞に反応する抗体を産生するハイブリドーマを単離した［Ｔｈｅ　Ｐｒｏｓｔａｔｅ，６７，１１６３（２００７）］。

[0300] （６）抗体の標的抗原の決定

実施例１（５）にて確立したハイブリドーマの標的抗原を公知の方法［Ｔｈｅ　Ｐｒｏｓｔａｔｅ，６７，１１６３（２００７）］にて決定し、ハイブリドーマからＴｒｏｐ－２を認識する抗体ＫＭ４０９７を見出した。Ｉｓｏ　Ｓｔｒｉｐマウスモノクローナル抗体アイソタイピングキット（ロシュ・アプライドサイエンス社）により、本抗体のアイソタイプはＩｇＧ１およびκと決定された。

[0301] ［実施例２］

抗Ｔｒｏｐ－２マウス抗体ＡＲ４７Ａ６．４．２のＩｇＧ１型キメラ抗体およびデフコース型抗体の作製

（１）ＡＲ４７Ａ６．４．２由来ヒト型キメラ抗体発現ベクターの構築

本発明の抗Ｔｒｏｐ－２モノクローナル抗体の活性と比較するために、既存の抗Ｔｒｏｐ－２マウスモノクローナル抗体ＡＲ４７Ａ６．４．２の可変領域と、ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域とのキメラ抗体（以下、ｃＡＲ４７Ａ６．４．２と略記する）を作製した。

[0302] 米国特許第７４２００４０号明細書に開示されている配列情報に基づき、ＡＲ４７Ａ６．４．２のＶＨおよびＶＬをコードする遺伝子として、配列番号３のＤＮＡおよび配列番号４のＤＮＡをおのおのｐＺＥｒＯ－２ベクターに組み込んだプラスミドをカスタム合成した（ＩＤＴ社）。

[0303] ＡＲ４７Ａ６．４．２のＶＨが組み込まれたプラスミドに対し、ＡｐａＩ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ社）およびＮｏｔＩ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ社）を用いて制限酵素処理を行い、ＶＨを含むＮｏｔＩ－ＡｐａＩ断片を取得した。また、ＡＲ４７Ａ６．４．２のＶＬが組み込まれたプラスミドに対し、ＢｓｉＷＩ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ社）およびＥｃｏＲＩ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏ

OnCusp
Ex. 1038

ｌａｂｓ社）を用いて制限酵素処理を行い、ＶＬを含むＥｃｏＲＩ－ＢｓｉＷＩ断片を取得した。

[0304] 一方、抗体発現ベクターｐＫＡＮＴＥＸ９３に対し、ＮｏｔＩおよびＡｐａＩ、またはＥｃｏＲＩおよびＢｓｉＷＩの２通りの組み合わせで制限酵素処理を行った。ＶＨを含むＮｏｔＩ－ＡｐａＩ断片およびｐＫＡＮＴＥＸ９３由来のＮｏｔＩ－ＡｐａＩ断片、ならびに、ＶＬを含むＥｃｏＲＩ－ＢｓｉＷＩ断片およびｐＫＡＮＴＥＸ９３由来のＥｃｏＲＩ－ＢｓｉＷＩ断片の２種類の組み合わせを、Ｌｉｇａｔｉｏｎ ｈｉｇｈ（ＴＯＹＯＢＯ社）を用いて連結した。

[0305] 得られた該連結反応液を用いて、大腸菌ＤＨ５α株（ＴＯＹＯＢＯ社）の形質転換を行った。形質転換クローンよりプラスミドＤＮＡを調製し、ＡＲ４７Ａ６．４．２のＶＨまたはＶＬをコードするｃＤＮＡが各々クローニングされたｐＫＡＮＴＥＸ９３ベクターを取得した。

[0306] ＡＲ４７Ａ６．４．２のＶＨまたはＶＬが組み込まれた各々のｐＫＡＮＴＥＸ９３ベクターに対し、ＥｃｏＲＩおよびＮｏｔＩを用いて制限酵素処理を行い、ＶＬの組み込まれたＥｃｏＲＩ－ＮｏｔＩ断片、およびＶＨの組み込まれたＮｏｔＩ－ＥｃｏＲＩ断片を取得した。得られた２種類の断片を、Ｌｉｇａｔｉｏｎ ｈｉｇｈ（ＴＯＹＯＢＯ社）を用いて連結した。

[0307] 得られた該連結反応液を用いて、大腸菌ＤＨ５α株（ＴＯＹＯＢＯ社）の形質転換を行った。形質転換クローンよりプラスミドＤＮＡを調製し、ＡＲ４７Ａ６．４．２のＶＨおよびＶＬをコードするｃＤＮＡを有する、抗Ｔｒｏｐ－２ヒト型キメラ抗体発現ベクターを取得した。

[0308] （２）動物細胞を用いたＡＲ４７Ａ６．４．２由来ヒト型キメラ抗体の発現

実施例２（１）で得た抗体発現ベクターを、常法［Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ，Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ｇｕｉｄｅ，Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ ａｎｄ Ｃｏｍｐａｎｙ（１９９２）］により動物細胞株へ導入し、抗Ｔｒｏｐ－２ヒト型キメラ抗体を産生する形質転換株を取得した。宿主動物細胞株としては、ＣＨＯ／ＤＧ４４細胞株、およびα１，６－フ

コース転移酵素（ＦＵＴ８）遺伝子をノックアウトしたＣＨＯ／ＤＧ４４細胞株（以下、ＦＵＴ８ノックアウトＣＨＯ／ＤＧ４４細胞株と表記する）を用いた。

[0309] （３）ＡＲ４７Ａ６．４．２精製キメラ抗体の取得

実施例（２）で得られた各形質転換株の細胞懸濁液に対し、３０００ｒｐｍ、４℃の条件で２０分間の遠心分離を行うことにより、培養上清を回収し、さらに０．２２μｍ孔径ＭｉｌｌｅｘＧＶフィルター（ミリポア社）により濾過滅菌した。得られた培養上清より、Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ａ　Ｈｉｇｈ－ｃａｐａｃｉｔｙレジン（ミリポア社）カラムを用いて、各抗Ｔｒｏｐ－２ヒト型キメラ抗体を精製した。ＣＨＯ／ＤＧ４４細胞株およびＦＵＴ８ノックアウトＣＨＯ／ＤＧ４４細胞株由来の各形質転換株より得た抗体を、それぞれｃＡＲ４７Ａ６．４．２およびｃＡＲ４７Ａ６．４．２－Ｐと称す。

[0310] （４）ＡＲ４７Ａ６．４．２キメラ抗体のフコース含量測定

国際公開第２００２／３１１４０号に記載の方法に従い、ｃＡＲ４７Ａ６．４．２およびｃＡＲ４７Ａ６．４．２－Ｐに存在するＮ結合複合型糖鎖のうち、フコースが結合していない糖鎖の割合を調べた。その結果を表１に示す。

[0311] [表1]

抗Ｔｒｏｐ－２抗体のフコース含量	
ｃＡＲ４７Ａ６．４．２	１００％
ｃＡＲ４７Ａ６．４．２－Ｐ	０％

[0312] 表１に示す結果から、ｃＡＲ４７Ａ６．４．２－Ｐにはフコースが付加していないことが確認された。

[0313] [実施例３]

抗Ｔｒｏｐ－２マウスモノクローナル抗体ＫＭ４０９７の抗原結合活性評価

（１）フローサイトメトリー（以下、ＦＣＭと表記する）を用いたヒトＴｒｏｐ－２陽性細胞株に対するＫＭ４０９７の反応性

１～２×１０^{5}個のヒト膵臓癌細胞株ＢｘＰＣ－３、ヒト乳癌細胞株ＭＣＦ－７、卵巣癌細胞株ＣａＯＶ－３および大腸癌細胞株Ｃｏｌｏ２０５を、ＢＳＡ（インビトロジェン社）を１％加えたＰＢＳ（以下、ＢＳＡ－ＰＢＳと表記する）中に懸濁して細胞をブロッキングした。

[0314] その後、抗Ｔｒｏｐ－２モノクローナル抗体ＫＭ４０９７をＢＳＡ－ＰＢＳで適宜希釈して添加し、全量を１００μＬとした。これらの細胞懸濁液を氷上で６０分間反応させた後、ＢＳＡ－ＰＢＳを用いて細胞を洗浄した。該細胞に、ＢＳＡ－ＰＢＳで希釈調製したＦＩＴＣ標識抗マウスＩｇＧヤギ抗体（ダコ・ジャパン社）を１００μＬ添加し、氷上で３０分間反応させた。ＢＳＡ－ＰＢＳで細胞を洗浄した後、ＰＢＳに懸濁して、フローサイトメーター（ベックマン・コールター社）を用いて、蛍光強度を測定した。

[0315] 図１（ａ）～（ｄ）および表２に、ＫＭ４０９７を１０μｇ／ｍＬで反応させた場合のヒストグラムおよび平均蛍光強度（ＭＦＩ値）を示す。

[0316] [表2]

抗Ｔｒｏｐ－２モノクローナル抗体ＫＭ４０９７のＭＦＩ値	
ＢｘＰＣ－３	１２４
ＣａＯＶ－３	１４６
ＭＣＦ－７	９２．８
Ｃｏｌｏ２０５	５４．８

[0317] 図１（ａ）～（ｄ）および表２に示す結果から、ＫＭ４０９７はいずれも抗体濃度依存的にＴｒｏｐ－２陽性細胞株へ結合することが確認された。

[0318] （２）Ｂｉａｃｏｒｅを用いた組換えヒトＴｒｏｐ－２に対するＫＭ４０９７の結合活性

組換えヒトＴｒｏｐ－２に対する各抗Ｔｒｏｐ－２マウスモノクローナル抗体の結合活性を反応速度論的に解析するため、表面プラズモン共鳴法（ＳＰＲ法）を用いて結合活性測定を行った。尚、既存の抗Ｔｒｏｐ－２モノクローナル抗体である７７２２０（Ｒ＆Ｄ社）およびＭＯｖ１６（Ａｌｅｘｉｓ Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌ社）についても解析を行い、比較対照とした。

[0319] 以下の操作は全てＢｉａｃｏｒｅ　Ｔ１００（ＧＥヘルスケアバイオサイエンス社）を用いて行った。Ａｍｉｎｅ　Ｃｏｕｐｌｉｎｇ　Ｋｉｔ（ＧＥヘルスケアバイオサイエンス社）を用いて、Ｔｅｔｒａ－Ｈｉｓ抗体（ＱＩＡＧＥＮ社）を１２０００ＲＵ（レゾナンス　ユニット）になるように、ＣＭ５センサーチップ（ＧＥヘルスケアバイオサイエンス社）上に固相化した。センサーチップに組換えＴｒｏｐ－２／Ｆｃ／Ｈｉｓ融合タンパク質（Ｒ＆Ｄ社）を捕捉させた後、５０００ｎｇ／ｍＬから５段階に希釈した抗Ｔｒｏｐ－２抗体を３０μＬ／ｍｉｎの速度で流し、各濃度におけるセンサーグラムを取得した。

[0320] 装置添付の解析ソフトにより、Ｂｉｖａｌｅｎｔ　Ａｎａｌｙｔｅモデルを用いて解析し、各抗体の組換えヒトＴｒｏｐ－２／Ｆｃ／Ｈｉｓ融合タンパク質に対する結合速度定数および解離速度定数を算出した。

[0321] 各抗体の結合速度定数（以下、ｋａと記す）、解離速度定数（以下、ｋｄと記す）および解離定数K_D（ｋｄ／ｋａ）を表３に示す（２回の実験の平均値）。

[0322] [表3]

	ｋｄ（１／Ｍｓ）	ｋａ（１／ｓ）	K_D（ｎＭ）
ＫＭ４０９７	３．８９×１０^{5}	１．０１×１０$^{-4}$	０．２６１
７７２２０	５．５５×１０^{5}	６．１０×１０$^{-4}$	１．１０
ＭＯｖ１６	１．８３×１０^{5}	１．８４×１０$^{-4}$	０．９２９

[0323] 表３に示すように、ＫＭ４０９７は既存抗体よりも高いアフィニティーを示した。

[0324] （３）ＦＣＭを用いた抗Ｔｒｏｐ－２モノクローナル抗体間の競合活性評価

１～２×１０^{5}個のヒト膵臓癌細胞株ＢｘＰＣ－３を、ＢＳＡ－ＰＢＳ中に懸濁して細胞をブロッキングした。一方、ＢＳＡ－ＰＢＳを用いて、ｃＡＲ４７Ａ６．４．２を０．３μｇ／ｍＬの濃度とすると共に、ＫＭ４０９７または７７２２０を段階的に希釈した。調製した各抗体溶液を細胞懸濁液へ添加して全量を１００μＬとした。

[0325] これらの細胞懸濁液を氷上で６０分間反応させた後、ＢＳＡ－ＰＢＳを用いて細胞を洗浄した。該細胞に、ＢＳＡ－ＰＢＳで希釈調製したＦＩＴＣ標識抗ヒトＩｇＧヤギ抗体（Ｊａｃｋｓｏｎ Ｉｍｍｕｎｏ ｒｅｓｅｒｃｈ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ社）を１００μＬ添加し、氷上で３０分間反応させた。ＢＳＡ－ＰＢＳで細胞を洗浄した後、ＰＢＳに懸濁して、フローサイトメーター（ベックマン・コールター社）用いて、蛍光強度を測定した。

[0326] 図２に、ＫＭ４０９７または７７２２０の濃度を変化させた場合の、ｃＡＲ４７Ａ６．４．２のＢｘＰＣ－３細胞への結合を表す平均蛍光強度（ＭＦＩ値）を示す。７７２２０は濃度依存的にｃＡＲ４７Ａ６．４．２の細胞への結合を阻害する一方で、ＫＭ４０９７はｃＡＲ４７Ａ６．４．２の細胞への結合を阻害しないことが確認された。

[0327] 次に、上記と同様にして、ＢｘＰＣ－３細胞をＢＳＡ－ＰＢＳでブロッキングした。一方、ＢＳＡ－ＰＢＳを用いて、ＫＭ４０９７または７７２２０を１μｇ／ｍＬの濃度とすると共に、ｃＡＲ４７Ａ６．４．２を段階的に希釈した。調製した抗体溶液を細胞懸濁液へ添加し、全量を１００μＬとした。

[0328] これらの細胞懸濁液を氷上で６０分間反応させた後、ＢＳＡ－ＰＢＳを用いて細胞を洗浄した。該細胞に、ＢＳＡ－ＰＢＳで希釈調製したＦＩＴＣ標識抗マウスＩｇＧヤギ抗体（ダコ・ジャパン社）を１００μＬ添加し、氷上で３０分間反応させた。ＢＳＡ－ＰＢＳで細胞を洗浄した後、ＰＢＳに懸濁して、フローサイトメーター（ベックマン・コールター社）を用いて、蛍光強度を測定した。

[0329] 図３に、ｃＡＲ４７Ａ６．４．２の濃度を変化させた場合の、ＫＭ４０９７および７７２２０のＢｘＰＣ－３細胞への結合を表す平均蛍光強度（ＭＦＩ値）を示す。図３に示すように、ｃＡＲ４７Ａ６．４．２はＫＭ４０９７のＢｘＰＣ－３細胞への結合を阻害しないことが確認された。

[0330] 以上の結果から、ＫＭ４０９７はｃＡＲ４７Ａ６．４．２とは異なるエピトープを認識することが示された。

[0331] （４）Ｔｒｏｐ－２バインディングＥＬＩＳＡを用いた抗Ｔｒｏｐ－２モノクローナル抗体間の競合活性評価

２μｇ／ｍＬ組換えヒトＴｒｏｐ－２／Ｆｃ／Ｈｉｓ融合タンパク質（Ｒ＆Ｄ社）を９６ウェルＥＬＩＳＡ用プレート（グライナー社）へ５０μＬ／ウェルずつ分注し、４℃で一晩静置して固相化した。該プレートをＰＢＳで洗浄後、ＢＳＡ－ＰＢＳを１００μＬ／ウェルずつ加え、室温で１時間静置することによりブロッキングを行った。

[0332] 該プレートよりＢＳＡ－ＰＢＳを除去した後、一次抗体として、０．３μｇ／ｍＬ濃度のＫＭ４０９７（サブクラスはマウスＩｇＧ１）のＢＳＡ－ＰＢＳ希釈溶液、および競合抗体（マウスＩｇＧ１以外のサブクラスの抗体）のＢＳＡ－ＰＢＳ段階希釈溶液を、総量５０μＬ／ウェルとなるように分注し、２時間静置した。

[0333] 該プレートを０．０５％ポリオキシエチレン（２０）ソルビタンモノラウレート［（ＩＣＩ社商標Ｔｗｅｅｎ　２０相当品：和光純薬工業社）］／ＰＢＳ（以下Ｔｗｅｅｎ－ＰＢＳと表記）で洗浄した後、２次抗体としてペルオキシダーゼ標識ウサギ抗マウスＩｇＧ１抗体（ＺＹＭＥＤ社）を５０μＬ／ウェルずつ加えて１時間室温で静置した。

[0334] 該プレートをＴｗｅｅｎ－ＰＢＳで洗浄した後、ＡＢＴＳ〔２．２－アジノビス（３－エチルベンゾチアゾール－６－スルホン酸）アンモニウム〕基質液〔１ｍｍｏＬ／Ｌ　ＡＢＴＳ、０．１ｍｏＬ／Ｌ　クエン酸バッファー（ｐＨ４．２）、０．１％H_2O_2〕を５０μＬ／ウェルずつ添加して発色し、さらに５％ＳＤＳ（Ｓｏｄｉｕｍ　Ｌａｕｒｙｌ　Ｓｕｌｆａｔｅ）溶液を５０μＬ／ウェルずつ添加して発色反応を停止した。ＯＤ４１５ｎｍの吸光度をプレートリーダーＥｍａｘ（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ社）を用いて測定した。

[0335] 図４に、７７２２０の濃度を変化させた場合の、ＫＭ４０９７のＴｒｏｐ－２／Ｆｃ／Ｈｉｓ融合タンパク質への結合を示す。図４に示すように、７７２２０はＫＭ４０９７のＴｒｏｐ－２／Ｆｃ／Ｈｉｓ融合タンパク質への

結合を阻害しないことが確認された。

[0336] 次に、上記の実験と同様に、９６ウェルのＥＬＩＳＡ用プレートに組換えヒトＴｒｏｐ－２／Ｆｃ／Ｈｉｓ融合タンパク質を固相化し、ＰＢＳで洗浄後、ＢＳＡ－ＰＢＳでブロッキングした。該プレートに、一次抗体として、０．３μｇ／ｍＬ濃度の７７２２０（サブクラスはマウスＩｇＧ２ａ）のＢＳＡ－ＰＢＳ希釈溶液、および競合抗体（マウスＩｇＧ２ａ以外のサブクラスの抗体）のＢＳＡ－ＰＢＳ段階希釈溶液を、総量５０μＬ／ウェルとなるように分注して、２時間静置した。

[0337] 該プレートをＴｗｅｅｎ－ＰＢＳで洗浄後、２次抗体としてペルオキシダーゼ標識ウサギ抗マウスＩｇＧ２ａ抗体（ＺＹＭＥＤ社）を５０μＬ／ウェルずつ加えて１時間室温で静置した。該プレートをＴｗｅｅｎ－ＰＢＳで洗浄し、ＡＢＴＳ基質液を５０μＬ／ウェル添加して発色し、さらに５％ＳＤＳ溶液を５０μＬ／ウェルずつ添加して発色反応を停止した。ＯＤ４１５ｎｍの吸光度をプレートリーダーＥｍａｘ（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｄｅｖｉｃｅｓ社）を用いて測定した。

[0338] 図５に、ＫＭ４０９７、ＭＯｖ１６の濃度を変化させた場合の７７２２０のＴｒｏｐ－２／Ｆｃ／Ｈｉｓキメラタンパク質への結合を示す。図５に示すように、ＭＯｖ１６は７７２２０のＴｒｏｐ－２／Ｆｃ／Ｈｉｓキメラタンパク質への結合を阻害する一方で、ＫＭ４０９７は７７２２０のＴｒｏｐ－２／Ｆｃ／Ｈｉｓキメラタンパク質への結合を阻害しないことが確認された。

[0339] 以上の結果から、ＫＭ４０９７は７７２２０およびＭＯｖ１６と異なるエピトープに結合することが明らかとなった。

[0340] ［実施例４］

抗Ｔｒｏｐ－２マウスモノクローナル抗体ＫＭ４０９７の可変領域をコードするｃＤＮＡの単離

（１）ＫＭ４０９７産生ハイブリドーマ細胞からのｍＲＮＡの調製

実施例１で取得したハイブリドーマ細胞５×１０^{7}～１×１０^{8}個より、Ｒ

Ｎｅａｓｙ Ｍｉｎｉ ｋｉｔ（ＱＩＡＧＥＮ社）およびＯｌｉｇｏｔｅｘ ＴＭ－ｄＴ３０＜Ｓｕｐｅｒ＞ｍＲＮＡ Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ Ｋｉｔ（ＴａＫａＲａ社）を用いて、ＫＭ４０９７のｍＲＮＡを調製した。

[0341] （２）ＫＭ４０９７のＨ鎖可変領域遺伝子およびＬ鎖可変領域遺伝子のクローニング

実施例４（１）で取得したＫＭ４０９７のｍＲＮＡから、ＳＭＡＲＴ ＲＡＣＥ ｃＤＮＡ Ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ Ｋｉｔ（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ社）を用いて、ｃＤＮＡを取得した。取得したｃＤＮＡを鋳型として、ユニバーサルプライマーＡｍｉｘ（上記キットに添付）と、マウスＩｇＧ１に特異的なプライマー（配列番号５、６）を用いて、それぞれＰＣＲを行い、各抗体のＶＨのｃＤＮＡ断片を増幅した。また、抗体の各サブクラス特異的プライマーの代わりにマウスＩｇ（κ）特異的プライマー（配列番号７、８）を用いてＰＣＲを行い、各抗体のＶＬのｃＤＮＡ断片を増幅した。いずれのＰＣＲとも、ＰＴＣ－２００ ＤＮＡ Ｅｎｇｉｎｅ（ＢｉｏＲａｄ社）を用いて、９４℃で２分間加熱後、９４℃で１５秒間、６８℃で１分間から成る反応サイクルを３０回行った。

[0342] 取得したＰＣＲ産物をアガロースゲル電気泳動にて展開し、ＶＨを含むＤＮＡ断片およびＶＬを含むＤＮＡ断片を取得した。次に、ＴＡｒｇｅｔ Ｃｌｏｎｅ Ｐｌｕｓ（ＴＯＹＯＢＯ社）を用いて、得られた各ＤＮＡ断片の両端にデオキシアデニンを付加した後、ｐＴＡ２ベクターへ各々組み込んだ。こうして得られたベクターを用いて大腸菌ＤＨ５α株（ＴＯＹＯＢＯ社）の形質転換を行い、得られた形質転換クローンよりプラスミドを抽出した。クローニングした各ＰＣＲ産物の塩基配列の解析は、ＢｉｇＤｙｅ Ｔｅｒｍｉｎａｔｏｒ Ｃｙｃｌｅ Ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ ＦＳ Ｒｅａｄｙ Ｒｅａｃｔｉｏｎ Ｋｉｔ（ＰＥバイオシステムズ社）および同社のシーケンサーＡＢＩ ＰＲＩＳＭ３７００を用いて実施した。その結果、ｃＤＮＡの５’末端に開始コドンと推定されるＡＴＧ配列が存在する、ＶＨの完全長ｃＤＮＡを含むプラスミドおよびＶＬの完全長ｃＤＮＡを含むプラスミドを

各々取得したことが確認された。

[0343] （３）ＫＭ４０９７可変領域の遺伝子配列の解析

実施例４（２）で得られたプラスミドが有する、ＫＭ４０９７のＶＨの全塩基配列を配列番号９に、該配列から推定されるシグナル配列を含んだＶＨの全アミノ酸配列を配列番号１０に、また、ＶＬの全塩基配列を配列番号１１に、該配列から推定されるシグナル配列を含んだＶＬの全アミノ酸配列を配列番号１２にそれぞれ示した。

[0344] 既知のマウス抗体の配列データ［ＳＥＱＵＥＮＣＥＳ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ、ＵＳ Ｄｅｐｔ．Ｈｅａｌｔｈ ａｎｄ Ｈｕｍａｎ Ｓｅｒｖｉｃｅｓ（１９９１）］との比較から、単離した各ｃＤＮＡは、ＫＭ４０９７の分泌シグナル配列を含む可変領域（以下、Ｖ領域と表記する）をコードする完全長ｃＤＮＡであり、さらに、ＫＭ４０９７のＨ鎖については配列番号１０に記載のアミノ酸配列の１から１９番目が、ＫＭ４０９７のＬ鎖については配列番号１２に記載のアミノ酸配列の１から２０番目が分泌シグナル配列であることが明らかとなった。

[0345] 次に、ＫＭ４０９７のＶＨおよびＶＬのアミノ酸配列の新規性について解析した。配列解析システムとしてＧＣＧ Ｐａｃｋａｇｅ（ｖｅｒｓｉｏｎ ９．１、Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ｇｒｏｕｐ社）を用い、既存のタンパク質のアミノ酸配列データベースをＢＬＡＳＴＰ法［Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．，２５，３３８９（１９９７）］により検索した。その結果、ＶＨ、ＶＬともに完全に一致するアミノ酸配列がデータベース内に認められなかったことから、ＫＭ４０９７のＶＨおよびＶＬは新規のアミノ酸配列を有していることが確認された。

[0346] また、ＫＭ４０９７のＶＨおよびＶＬのＣＤＲを、既知の抗体のアミノ酸配列と比較することにより同定した。ＫＭ４０９７のＶＨのＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３のアミノ酸配列を配列番号１３、１４および１５に、ＶＬのＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３のアミノ酸配列を配列番号１６、１

７および１８にそれぞれ示した。

[0347] ［実施例５］

ＫＭ４０９７ヒト型キメラ抗体の作製

（１）ＫＭ４０９７ヒト型キメラ抗体発現ベクターの構築

本発明で作製するキメラ抗体は、実施例４（２）で得られたＫＭ４０９７の重鎖および軽鎖の各可変領域に、ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域の重鎖定常領域およびヒトκ型軽鎖定常領域をそれぞれ連結したキメラ抗体である。方法としては、抗体発現ベクターｐＫＡＮＴＥＸ９３と、実施例４（２）で得られたＶＨまたはＶＬを有する各ｐＴＡ２ベクターとを用いて、以下のようにしてＫＭ４０９７ヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築した。

[0348] ＫＭ４０９７のＶＨまたはＶＬを有するｐＴＡ２ベクターを鋳型として１００ｎｇ使用し、１０×ＥｘＴａｑ緩衝液を１．５μＬ、２．５ｍｍｏｌ／Ｌ ｄＮＴＰを１．２μＬ、ＥｘＴａｑ ＤＮＡ ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ（ＴａＫａＲａ社）を１μＬ、１０μｍｏｌ／Ｌ濃度のＶＨまたはＶＬに特異的なプライマーを０．７５μＬ各々含む、全量１５μＬから成る溶液を用いて、ＰＣＲを行った。ＫＭ４０９７のＶＨのプライマーを配列番号１９および２０に、ＶＬのプライマーを配列番号２１および２２に示す。ＰＣＲは、９４℃で２分間加熱後、９４℃で１５秒間、５５℃で３０秒間、７２℃で１分間の反応から成る反応サイクルを３０回行った後、７２℃で１０分間反応させることで行った。

[0349] 各ＰＣＲ反応産物をアガロースゲル電気泳動にて展開し、ＶＨを含むＤＮＡ断片およびＶＬを含むＤＮＡ断片を取得した。次に、ＴＯＰＯ ＴＡ ｃｌｏｎｉｎｇ ｋｉｔ ｆｏｒ ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ（インビトロジェン社）用いて、各ＤＮＡ断片をｐＣＲ４－ＴＯＰＯベクターへ組み込んだ。

[0350] ＫＭ４０９７のＶＨが組み込まれたプラスミドに対し、ＡｐａＩ（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ社）およびＮｏｔＩ（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ社）を用いて制限酵素処理を行い、ＶＨを含むＮｏｔＩ－ＡｐａＩ断片を取得した。また、ＫＭ４０９７のＶＬが組み込まれた

プラスミドに対し、ＢｓｉＷＩ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ社）およびＥｃｏＲＩ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ社）を用いて制限酵素処理を行い、ＶＬを含むＥｃｏＲＩ－ＢｓｉＷＩ断片を取得した。

[0351] 一方、抗体発現ベクターｐＫＡＮＴＥＸ９３に対し、ＮｏｔＩおよびＡｐａＩ、またはＥｃｏＲＩおよびＢｓｉＷＩの２通りの組み合わせで制限酵素処理を行った。ＶＨを含むＮｏｔＩ－ＡｐａＩ断片およびｐＫＡＮＴＥＸ９３由来のＮｏｔＩ－ＡｐａＩ断片、ならびに、ＶＬを含むＥｃｏＲＩ－ＢｓｉＷＩ断片およびｐＫＡＮＴＥＸ９３由来のＥｃｏＲＩ－ＢｓｉＷＩ断片の２種類の組み合わせを、Ｌｉｇａｔｉｏｎ　ｈｉｇｈ（ＴＯＹＯＢＯ社）を用いて連結した。

[0352] 得られた該連結反応液を用いて、大腸菌ＤＨ５α株（ＴＯＹＯＢＯ社）の形質転換を行った。形質転換クローンよりプラスミドＤＮＡを調製し、ＫＭ４０９７のＶＨまたはＶＬをコードするｃＤＮＡが各々クローニングされたｐＫＡＮＴＥＸ９３ベクターを取得した。

[0353] 次に、ＫＭ４０９７のＶＨまたはＶＬが組み込まれた各々のｐＫＡＮＴＥＸ９３ベクターに対し、ＥｃｏＲＩおよびＮｏｔＩを用いて制限酵素処理を行い、ＶＬの組み込まれたＥｃｏＲＩ－ＮｏｔＩ断片、およびＶＨの組み込まれたＮｏｔＩ－ＥｃｏＲＩ断片を取得した。得られた２種類の断片を、Ｌｉｇａｔｉｏｎ　ｈｉｇｈ（ＴＯＹＯＢＯ社）を用いて連結した。得られた該連結反応液を用いて、大腸菌ＤＨ５α株（ＴＯＹＯＢＯ社）の形質転換を行った。形質転換クローンよりプラスミドＤＮＡを調製し、ＫＭ４０９７のＶＨおよびＶＬをコードするｃＤＮＡを有する、抗Ｔｒｏｐ－２ヒト型キメラ抗体発現ベクターを取得した。

[0354] （２）動物細胞を用いたＫＭ４０９７ヒト型キメラ抗体の取得

実施例２と同様にして、実施例５（１）で得た抗Ｔｒｏｐ－２キメラ抗体発現ベクターをＣＨＯ／ＤＧ４４細胞株およびＦＵＴ８ノックアウトＣＨＯ／ＤＧ４４細胞株に導入し、得られた各形質転換株より、ヒト型キメラ抗体

ＫＭ４５９０およびＫＭ４５９１を各々取得した。

[0355] （３）ＫＭ４０９７キメラ抗体のフコース含量測定

国際公開第２００２／３１１４０号に記載の方法に従い、ＫＭ４５９０およびＫＭ４５９１に存在するＮ－結合複合型糖鎖のうち、フコースが結合していない糖鎖の割合を調べた。その結果を表４に示す。

[0356] [表4]

抗Ｔｒｏｐ－２抗体のフコース含量	
ＫＭ４５９０	１００％
ＫＭ４５９１	０％

[0357] 表４に示す結果から、実施例５（２）で作製したヒト型キメラ抗体ＫＭ４５９１にはフコースが付加していないことが確認された。

[0358] ［実施例６］

抗Ｔｒｏｐ－２ヒト型キメラ抗体ＫＭ４５９０およびＫＭ４５９１の活性評価

実施例５で得たＫＭ４５９０およびＫＭ４５９１、ならびに、実施例２で得たｃＡＲ４７Ａ６．４．２およびｃＡＲ４７Ａ６．４．２－Ｐの活性評価を行った。

（１）ビアコアによる抗Ｔｒｏｐ－２ヒト型キメラ抗体の組換えヒトＴｒｏｐ－２への結合活性評価

実施例３と同様にして、ＫＭ４５９１、ｃＡＲ４７Ａ６．４．２－ＰのヒトＴｒｏｐ－２／Ｆｃ／Ｈｉｓ融合タンパク質（Ｒ＆Ｄ社）に対する親和性を評価した。各抗体のｋａ、ｋｄおよびK_D（ｋｄ／ｋａ）を表５に示す（２回の実験の平均値）。

[0359] [表5]

	ｋｄ（１／Ｍｓ）	ｋａ（１／ｓ）	K_D（ｎＭ）
ＫＭ４５９１	4.16×10^{5}	5.80×10^{-5}	０．１４３
ｃＡＲ４７Ａ６．４．２－Ｐ	2.21×10^{5}	2.18×10^{-4}	１．０１

[0360] 表５に示すように、ＫＭ４５９１はｃＡＲ４７Ａ６．４．２－Ｐよりも高

いアフィニティーを示した。

[0361] （２）抗Ｔｒｏｐ－２ヒト型キメラ抗体のヒト癌細胞株に対するＡＤＣＣ活性の評価

ヒト癌細胞株に対するＫＭ４５９０、およびｃＡＲ４７Ａ６．４．２－１のＡＤＣＣ活性を、以下に示す方法に従って測定した。

[0362] （２）－１　標的細胞懸濁液の調製

ヒト癌細胞株ＭＣＦ－７、Ｃｏｌｏ２０５をＰＢＳで洗浄後、５％ウシ胎児血清（ＦＢＳ）（インビトロジェン社）を含むフェノールレッド不含有ＲＰＭＩ１６４０培地（インビトロジェン社）（以下、ＡＤＣＣ用培地と表記する）で洗浄し、同培地で至適の細胞密度に調製して標的細胞懸濁液とした。

[0363] （２）－２　エフェクター細胞懸濁液の調製

以下に示した方法により、健常人末梢血より末梢血単核球（Ｐｅｒｉｐｈｅｒａｌ　ｂｌｏｏｄ　ｍｏｎｏｎｕｃｌｅａｒ　ｃｅｌｌ：ＰＢＭＣ）を分離した。ヘパリンナトリウム注（味の素社）を０．５ｍＬ加えたシリンジを用いて、健常人から健常人末梢血５０ｍＬを採血した。採取した末梢血に同量の生理食塩水（大塚製薬）を加えて希釈し、良く攪拌した。

[0364] １５ｍＬチューブ（Ｇｒｅｉｎｅｒ社）に４．５ｍＬずつ分注したＬｙｍｐｈｏｐｒｅｐ（Ａｘｉｓ－Ｓｈｉｅｌｄ社）の上に、１０ｍＬの希釈末梢血を静かに重層し、２０００ｒｐｍ、ブレーキオフ、室温の条件で２０分間遠心分離して、単核球層を分離した。こうして得られた単核球画分を、ＡＤＣＣ用培地を用いて２回洗浄し、同培地により至適の細胞密度に調製して、エフェクター細胞懸濁液とした。

[0365] （２）－３　ＡＤＣＣ活性の測定

９６ウェルＵ底プレート（ＦＡＬＣＯＮ社）の各ウェルに、各抗体を３μｇ／ｍＬから段階的に１０倍希釈した抗体溶液を５０μＬずつ分注した後、次に（２）－１で調製した標的細胞懸濁液を1×10^{4}個／５０μＬ／ウェルずつ分注し、最後に（２）－２で調製したエフェクター細胞懸濁液を２．５

×１０^{5}個／５０μＬ／ウェルずつ分注し、全量を１５０μＬとして、３７℃で４時間反応させた。本系でのエフェクター細胞（Ｅ）と標的細胞（Ｔ）の比は２５：１とした。反応後、ＬＤＨ　Ｃｙｔｏｔｏｘｉｃ　Ｔｅｓｔ（和光純薬社）を用いて各培養上清の発色を測定した。

[0366]　ＡＤＣＣ活性は次式により求めた。その結果を図６（ａ）および（ｂ）、図７（ａ）および（ｂ）、図８（ａ）および（ｂ）並びに図９（ａ）および（ｂ）に示す。

[0367]（式）

ＡＤＣＣ活性（％）＝｛（［検体の吸光度］－［標的細胞自然遊離の吸光度］－［エフェクター細胞自然遊離の吸光度］）／（［標的細胞全遊離の吸光度］－［標的細胞自然遊離の吸光度］）｝×１００

[0368]　図６（ａ）および（ｂ）並びに図７（ａ）および（ｂ）に示すように、ＫＭ４５９０は、ヒト癌細胞株ＭＣＦ－７、Ｃｏｌｏ２０５に対してＡＤＣＣ活性を示し、その活性は既存の抗Ｔｒｏｐ－２ヒト型キメラ抗体ｃＡＲ４７Ａ６．４．２よりも高かった。さらに、図８（ａ）および（ｂ）並びに図９（ａ）および（ｂ）に示すように、ＫＭ４５９１は、ヒト癌細胞株ＭＣＦ－７、Ｃｏｌｏ２０５に対してＫＭ４５９０よりも高いＡＤＣＣ活性を有していた。

[0369]（３）ＢｘＰＣ－３細胞株異所移植マウスにおける抗Ｔｒｏｐ－２ヒト型キメラ抗体の抗腫瘍活性の評価

ＢｘＰＣ－３細胞をＰＢＳにて５×１０^{7}個／ｍＬの密度に調製し、６週齢雄性ＳＣＩＤマウス（日本クレア）の右腋下に１００μＬ注入した。６日後に腫瘍径を測定し、各群の平均腫瘍体積［長径×（短径）^{2}×０．５として計算］が１００ｍｍ^{3}となるよう群分けした（各群６匹）。ＰＢＳまたは抗Ｔｒｏｐ－２キメラ抗体（ＫＭ４５９１またはｃＡＲ４７Ａ６．４．２－Ｐ）を週２回、４週間投与して抗腫瘍活性を評価した。

[0370]　その結果を図１０に示す。図１０に示すように、評価の結果、ＫＭ４５９１は有意な抗腫瘍活性を示し、その活性はｃＡＲ４７Ａ６．４．２－Ｐより

も高かった。

[0371] （４）Ｃｏｌｏ２０５細胞株異所移植マウスにおける抗Ｔｒｏｐ－２キメラ抗体の抗腫瘍活性の評価

Ｃｏｌｏ２０５細胞をＰＢＳにて５×１０^{7}個／ｍＬの密度に調製し、５週齢雄性ＳＣＩＤマウス（日本クレア）の右腋下に１００μＬ注入した。５日後に腫瘍径を測定し、各群の平均腫瘍体積［長径×（短径）^{2}×０．５として計算］が１００ｍｍ^{3}となるよう群分けした（各群５匹）。ＰＢＳまたは抗Ｔｒｏｐ－２キメラ抗体（ＫＭ４５９１またはｃＡＲ４７Ａ６．４．２－Ｐ）を週２回、４週間投与して抗腫瘍活性を評価した。

[0372] その結果を図１１に示す。図１１に示すように、評価の結果、ＫＭ４５９１は有意な抗腫瘍活性を示し、その活性はｃＡＲ４７Ａ６．４．２－Ｐよりも高かった。

[0373] ［実施例７］

抗Ｔｒｏｐ－２ヒト型キメラ抗体ＫＭ４５９０のエピトープ解析

（１）Ｔｒｏｐ－２バインディングＥＬＩＳＡによる各種抗Ｔｒｏｐ－２モノクローナル抗体に対する競合活性評価

９６ウェルＥＬＩＳＡ用プレート（グライナー社）へ、２μｇ／ｍＬの組換えヒトＴｒｏｐ－２／Ｆｃ／Ｈｉｓキメラタンパク質（Ｒ＆Ｄ社製）をプレートに５０μＬ／ウェル分注し、４℃で一晩静置して吸着させた。該プレートをＰＢＳで洗浄後、ＢＳＡ－ＰＢＳを１００μＬ／ウェルずつ加え、室温で１時間静置することにより活性基のブロッキングを行った。

[0374] その後、該プレートよりＢＳＡ－ＰＢＳを除去し、一次抗体として、０．３μｇ／ｍＬ濃度の各種マウス抗Ｔｒｏｐ－２抗体〔７７７２０（Ｒ＆Ｄ社）、ＭＯｖ１６（ＡＬＥＸＩＳ　ＢＩＯＣＨＥＭＩＣＡＬＳ社）、ＭＭ０５８８－４９Ｄ６（Ａｎｇｉｏ－Ｐｒｏｔｅｏｍｉｅ社）、ＹＹ－０１（Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ社）または１６２－４６（ＢＤ　Ｐｈａｒｍｉｇｅｎ社）〕のＢＳＡ－ＰＢＳ希釈溶液、および競合キメラ抗体（ＫＭ４５９０またはｃＡＲ４７Ａ６．４．２）の段階希釈溶液を５０μＬ／ウェル分注し、２時

間静置した。

[0375] 該プレートをＴｗｅｅｎ－ＰＢＳで洗浄後、２次抗体として、ペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ヒトＩｇＧ抗体（Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｑｕａｌｅｘ社）を５０μＬ／ウェルずつ加えて１時間室温で静置した。該プレートをＴｗｅｅｎ－ＰＢＳで洗浄し、ＡＢＴＳ〔２．２－アジノビス（３－エチルベンゾチアゾール－６－スルホン酸）アンモニウム〕基質液〔１　ｍｍｏＬ／ＬＡＢＴＳ、０．１ｍｏＬ／Ｌ　クエン酸バッファー（ｐＨ４．２）、０．１％H_2O_2〕を５０μＬ／ウェル添加して発色し、５％ＳＤＳ（Ｓｏｄｉｕｍ　Ｌａｕｒｙｌ　Ｓｕｌｆａｔｅ）溶液を５０μＬ／ウェル添加して発色反応を停止した。プレートリーダーＥｍａｘ（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ社）を用いて該プレートのＯＤ４１５ｎｍの吸光度を測定した。

[0376] 図１４（ａ）～（ｆ）に、ＫＭ４５９０およびｃＡＲ４７Ａ６．４．２の濃度を変化させた場合の、各種抗Ｔｒｏｐ－２マウスモノクローナル抗体のＴｒｏｐ－２／Ｆｃ／Ｈｉｓキメラタンパク質への結合を示す。

[0377] 図１４（ａ）～（ｆ）に示すように、ＫＭ４０９７以外の抗Ｔｒｏｐ－２マウスモノクローナル抗体のＴｒｏｐ－２／Ｆｃ／Ｈｉｓキメラタンパク質への結合は、ＫＭ４５９０により阻害されないことが確認された。一方、ＫＭ４０９７以外の抗Ｔｒｏｐ－２マウスモノクローナル抗体のＴｒｏｐ－２／Ｆｃ／Ｈｉｓキメラタンパク質への結合は、ｃＡＲ４７Ａ６．４．２により阻害されることが確認された。

[0378] これらの結果から、ＫＭ４０９７およびそのキメラ抗体であるＫＭ４５９０は他の抗Ｔｒｏｐ－２抗体とは異なるエピトープを認識することが示された。

[0379] （２）Ｔｒｏｐ－２細胞外領域蛋白質およびそのドメイン欠損体蛋白質の作製

本発明の抗Ｔｒｏｐ－２モノクローナル抗体のエピトープを同定するため、Ｔｒｏｐ－２蛋白質の細胞外領域およびそのドメイン欠損体を作製した［図１５（ａ）～（ｄ）］］。まず、ＩＮＰＥＰ４ベクター（Ｂｉｏｇｅｎ－

ＩＤＥＣ社）に、ＦＬＡＧタグおよびＦｃ領域をコードするＤＮＡを５’末端側から３’末端側へ順次配置したＤＮＡ（配列番号３９）を挿入したベクターを作製した（ＩＮＰＥＰ４－ＦＬＡＧ－Ｆｃ）。

[0380] 次に、Ｔｒｏｐ－２の細胞外領域に分泌シグナル配列を付加した蛋白質をコードするＤＮＡ（配列番号４０）を、ＩＮＰＥＰ４－ＦＬＡＧ－Ｆｃベクターの ＦＬＡＧタグ配列の５’末端側に挿入することにより、Ｔｒｏｐ－２細胞外領域とＦＬＡＧタグおよびＦｃとの融合蛋白質（Ｔｒｏｐ－２／ＦＬＡＧ／Ｆｃとする）の発現ベクターを構築した。

[0381] 同様にして、Ｔｒｏｐ－２細胞外領域側のドメインＩのみ、ドメインＩおよびドメインＩＩ、ドメインＩおよびＩＩの全長ならびにドメインＩＩＩの一部を各々欠損した３種類の蛋白質（それぞれＭｕｔａｎｔ Ａ、Ｍｕｔａｎｔ Ｂ、Ｍｕｔａｎｔ Ｃとする）をコードするＤＮＡ（配列番号４１、４２、４３）についても、ＦＬＡＧタグおよびＦｃ領域との融合蛋白質の発現ベクターを構築した。Ｔｒｏｐ－２／ＦＬＡＧ／Ｆｃ、Ｍｕｔａｎｔ Ａ、Ｍｕｔａｎｔ ＢおよびＭｕｔａｎｔ Ｃのアミノ酸配列を配列番号４４－４７に示す。

[0382] ＨＥＫ２９３Ｆを宿主細胞とし、ＦｒｅｅＳｔｙｌｅ™ ２９３ 遺伝子導入システム（ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）を用いて、遺伝子導入および蛋白質の発現を行った。まず、発現ベクタープラスミド ３０μｇを、ＯＰＴＩ－ＭＥＭ Ｉ（ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）と混合して計９００μＬとした。次に、２９３ｆｅｃｔｉｎ™（ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）３０μＬをＯＰＴＩ－ＭＥＭ Ｉと混合して計９００μＬとし、室温で５分間静置した。

[0383] 該２９３ｆｅｃｔｉｎ™溶液を上記発現ベクタープラスミド溶液と混合し、室温で２０～３０分間静置した。ＦｒｅｅＳｔｙｌｅ™ ２９３ ＳＦＭ（ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）にて、１．１×10^6 ｃｅｌｌｓ／ｍＬの密度で培養したＨＥＫ２９３Ｆ細胞３０ｍＬに対し、上記プラスミド混合液の全量を加えた後、３７℃、５％CO_2、１２５ｒｐｍの設定条件下で、４日間の浮遊旋回培養を行った。

[0384] 培養後、細胞懸濁液を３０００ ｒｐｍ、４℃の条件で２０分間の遠心分離に供して培養上清を回収し、０．２２μｍ孔径Ｍｉｌｌｅｘ ＧＶフィルターを通して濾過滅菌した。

[0385] エコノパックカラム（ＢＩＯ－ＲＡＤ社）にＭａｂＳｅｌｅｃｔ（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ社）１ ｍＬを充填し、上記の操作で回収した培養上清をカラムに通塔した後、ＰＢＳ １０ ｍＬで洗浄した。洗浄後、０．１ ｍｏｌ／Ｌクエン酸緩衝液（ｐＨ ３．４）を用いて担体に吸着した抗体の溶出を行った。

[0386] 溶出画分を１ ｍｏｌ／Ｌ Ｔｒｉｓ緩衝液（ｐＨ８．５）により中和した。次に、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ解析により目的蛋白質の溶出が確認された画分を合一し、該画分をＡｍｉｃｏｎ Ｕｌｔｒａ－１０Ｋ（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ社）で濃縮した後、０．２２μｍ孔径Ｍｉｌｌｅｘ ＧＶ（ＭＩＬＬＩＰＯＲＥ社）を用いて滅菌濾過した。上記濃縮溶液の２８０ｎｍの吸光度（ＯＤ２８０ ｎｍ）を吸光光度計（ＴｈｅｒｍｏＳｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社製Ｎａｎｏｄｒｏｐ ２０００）を用いて測定し、各精製蛋白質の濃度を算出した。

[0387] （３）ウェスタンブロットによるエピトープ解析

本実施例（２）で作製したＴｒｏｐ－２／ＦＬＡＧ／Ｆｃ、Ｍｕｔａｎｔ Ａ、Ｍｕｔａｎｔ ＢおよびＭｕｔａｎｔ Ｃの各蛋白質を還元状態（サンプルを１０ ｍｍｏｌ／Ｌ ＤＴＴ存在下で９５℃、５分間処理）または非還元状態（ＤＴＴ非存在下で室温にて１０分間処理）でＳＤＳ－ＰＡＧＥにて展開した後、セミドライ法を用いて、２００ｍＡの電流を１時間流すことによりゲル内のタンパク質をポリフッ化ビニリデン（ＰＶＤＦ）膜上に転写した。

[0388] ５％ＢＳＡを含むＰＢＳにて該ＰＶＤＦ膜を室温で１時間ブロッキングした後、０．１％ＢＳＡを含むＴＢＳＴ［ナカライテスク社製トリス緩衝生理食塩水（１０倍濃縮）（ｐＨ ７．４）を１０倍に希釈し、さらに０．１％濃度の０．０５％ポリオキシエチレン（２０）ソルビタンモノラウレート（

ＩＣＩ社商標Ｔｗｅｅｎ　２０相当品：和光純薬工業社）を加えた水溶液］で調製した一次抗液に浸漬し、室温で１時間または４℃で一晩反応させた。

[0389] 該ＰＶＤＦ膜をＴＢＳＴで３～４回洗浄した後、０．１％ＢＳＡを含むＴＢＳＴで調製したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウスＩｇＧ抗体（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ社）もしくはペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒトκ鎖抗体（Ｓｏｕｔｈｅｒｎ　Ｂｉｏｔｅｃｈ社）を二次抗体として、室温で１時間反応させた。該ＰＶＤＦ膜をＴＢＳＴで３～４回洗浄した後、ＳｕｐｅｒＳｉｇｎａｌ　Ｗｅｓｔ　Ｐｉｃｏ　Ｃｈｅｍｉｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｔ　Ｓｕｂｓｔｒａｔｅ（ＴｈｅｒｍｏＳｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社）を添加し、化学発光反応を行った。

[0390] 発光像を、イメージングシステムＬＡＳ４０００ｍｉｎｉ（富士フイルム社）を用いて取得した。一方、ＰＶＤＦ膜上の各ＦＬＡＧ／Ｆｃ融合タンパク質の量を評価する目的で、一次抗体反応を行わずに、ヒトＦｃを認識するペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ヒトＩｇＧ抗体（Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｑｕａｌｅｘ社）を室温で１時間反応させた後、化学発光反応を行う実験も実施した。

[0391] 図１６（ａ）に、ウェスタンブロットにおいて、一次抗体としてＫＭ４５９０を反応させた実験結果を示す。また、図１６（ｂ）に、ウェスタンブロットにおいて、一次抗体としてｃＡＲ４７Ａ６．４．２を反応させた実験結果を示す。

[0392] 図１６（ａ）に示すように、非還元状態および還元状態のいずれにおいても、ＫＭ４５９０は、Ｔｒｏｐ－２のドメインＩを欠損させたＭｕｔａｎｔ　ＡおよびＭｕｔａｎｔ　Ｂに対する反応性が低下した。一方、図１６（ｂ）に示すように、ｃＡＲ４７Ａ６．４．２は、ドメインＩＩＩの一部まで欠損させたＭｕｔａｎｔ　Ｃに対してのみ反応性が低下した。

[0393] 以上の結果から、キメラ抗体ＫＭ４５９０およびそのマウスモノクローナル抗体ＫＭ４０９７のエピトープはドメインＩに、ｃＡＲ４７Ａ６．４．２のエピトープはドメインＩＩＩにあることが示された。

[0394] 次に、Ｔｒｏｐ－２／ＦＬＡＧ／Ｆｃタンパク質の非還元状態と還元状態に対するＫＭ４５９０およびｃＡＲ４７Ａ６．４．２の反応性を比較した。図１７（ａ）および（ｂ）並びに図１８に実験の結果を示す。

[0395] ウェスタンブロットにてＫＭ４５９０およびｃＡＲ４７Ａ６．４．２を各々反応させたＰＶＤＦ膜［図１７（ａ）］より、Ｒｅｓｔｏｒｅ™ ＰＬＵＳ Ｗｅｓｔｅｒｎ Ｂｌｏｔ Ｓｔｒｉｐｐｉｎｇ Ｂｕｆｆｅｒ（ＴｈｅｒｍｏＳｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社）を用いて抗体を剥離し、前述のブロッキングを行った後にペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ヒトＩｇＧ抗体を反応させることにより、ＰＶＤＦ膜上のＴｒｏｐ－２／ＦＬＡＧ／Ｆｃ蛋白質の量を評価した。

[0396] その結果、図１７（ｂ）に示すように、二つのＰＶＤＦ膜の間で、含まれるＴｒｏｐ－２／ＦＬＡＧ／Ｆｃ蛋白質の量に大きな差は認められなかった。また、ＫＭ４５９０は還元状態のＴｒｏｐ－２／ＦＬＡＧ／Ｆｃタンパク質への反応性は非常に弱いのに対し、ｃＡＲ４７Ａ６．４．２は還元状態への反応性が強いことが示された。

[0397] 図１８に、画像解析ソフトＭｕｌｔｉ Ｇａｕｇｅ Ｖｅｒ３．０（富士フイルム社）を用いてバンドのシグナル強度を解析し数値化した結果を示す。以上より、ＫＭ４５９０はＴｒｏｐ－２タンパク質のドメインＩ内の、ジスルフィド結合を含む構造を認識していることが示された。

[0398] 以上の結果から、ＫＭ４５９０およびそのマウス抗体ＫＭ４０９７は、Ｔｒｏｐ－２の細胞外領域のうち、既存抗体とは異なるエピトープであるドメインＩを認識する抗体であることが明らかとなった。

[0399] ［実施例８］

抗Ｔｒｏｐ－２ヒト化抗体の作製

（１）ＫＭ４０９７ヒト化抗体のＶＨおよびＶＬのアミノ酸配列の設計

ＫＭ４０９７ヒト化抗体のＶＨのアミノ酸配列を以下のようにして設計した。ＫＭ４０９７ＶＨのＣＤＲ１～３のアミノ酸配列（配列番号１３～１５）の移植に適したヒト抗体のＶＨのＦＲのアミノ酸配列を以下のようにして

選択した。

[0400] カバットらは、既知の様々なヒト抗体のＶＨをそのアミノ酸配列の相同性からサブグループ（ＨＳＧ Ｉ～ＩＩＩ）に分類し、それらのサブグループ毎に共通配列を報告している［Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，ＵＳ Ｄｅｐｔ．Ｈｅａｌｔｈ ａｎｄ Ｈｕｍａｎ Ｓｅｒｖｉｃｅｓ（１９９１）］。そこで、ヒト抗体のＶＨのサブグループＩ～ＩＩＩの共通配列のＦＲのアミノ酸配列とＫＭ４０９７ＶＨのＦＲのアミノ酸配列との相同性検索を実施した。

[0401] 相同性を検索した結果、ＨＳＧＩ、ＨＳＧＩＩ、およびＨＳＧＩＩＩの相同性はそれぞれ７４．７％、５５．２％、５９．８％であった。従って、ＫＭ４０９７ＶＨのＦＲのアミノ酸配列はサブグループＩと最も高い相同性を有していた。

[0402] 以上の結果から、ヒト抗体のＶＨのサブグループＩの共通配列のＦＲのアミノ酸配列の適切な位置に、ＫＭ４０９７ＶＨのＣＤＲのアミノ酸配列（配列番号１３～１５）を移植した。このようにして、配列番号２４で表される抗Ｔｒｏｐ－２ＫＭ４０９７ヒト化抗体のＶＨのアミノ酸配列ＫＭ４０９７ＨＶ０を設計した。

[0403] 次に、ＫＭ４０９７ヒト化抗体のＶＬのアミノ酸配列を以下のようにして設計した。ＫＭ４０９７ＶＬのＣＤＲ１～３のアミノ酸配列（配列番号１６～１８）を移植に適したヒト抗体のＶＬのＦＲのアミノ酸配列を、以下のようにして選択した。

[0404] カバットらは、既知の様々なヒト抗体のＶＬをそのアミノ酸配列の相同性からサブグループ（ＨＳＧ Ｉ～ＩＶ）に分類し、それらのサブグループ毎に共通配列を報告している［Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，ＵＳ Ｄｅｐｔ．Ｈｅａｌｔｈ ａｎｄ Ｈｕｍａｎ Ｓｅｒｖｉｃｅｓ（１９９１）］。そこで、ヒト抗体のＶＬのサブグループＩ～ＩＶの共通配列のＦＲのアミノ

酸配列とＫＭ４０９７ＶＬのＦＲのアミノ酸配列との相同性検索を実施した。

[0405] 相同性を検索した結果、ＨＳＧＩ、ＨＳＧＩＩ、ＨＳＧＩＩＩ、およびＨＳＧＩＶの相同性はそれぞれ７８．８％、７３．８％、７２．５％、８３．８％であった。従って、ＫＭ４０９７ＶＬのＦＲのアミノ酸配列はサブグループＩＶと最も高い相同性を有していた。

[0406] 以上の結果から、ヒト抗体のＶＬのサブグループＩＶの共通配列のＦＲのアミノ酸配列の適切な位置に、ＫＭ４０９７ＶＬのＣＤＲのアミノ酸配列（配列番号１６～１８）を移植した。しかし、ＫＭ４０９７ＶＬのアミノ酸配列（配列番号１２）中の１１０番目のＬｅｕは、カバットらが挙げるヒト抗体ＦＲのアミノ酸配列の相当する部位において、最も使用される頻度が高いアミノ酸残基ではないが、比較的高い頻度で使用されるアミノ酸残基であるため、上記のＫＭ４０９７ＶＬのアミノ酸配列で認められるアミノ酸残基を用いることとした。

[0407] このようにして、抗Ｔｒｏｐ－２ＫＭ４０９７ヒト化抗体のＶＬのアミノ酸配列ＫＭ４０９７ＬＶ０（配列番号２６）を設計した。

[0408] 上記で設計したＫＭ４０９７ヒト化抗体のＶＨのアミノ酸配列ＫＭ４０９７ＨＶ０、およびＶＬのアミノ酸配列ＫＭ４０９７ＬＶ０は、選択したヒト抗体のＦＲのアミノ酸配列に、マウスモノクローナル抗体であるＫＭ４０９７のＣＤＲのアミノ酸配列のみを移植した配列である。

[0409] しかし、一般に、ヒト化抗体を作製する場合には、単にヒト抗体のＦＲへマウス抗体のＣＤＲのアミノ酸配列を移植するのみでは、結合活性が低下してしまうことが多い。このような結合活性の低下を回避するため、ＣＤＲのアミノ酸配列の移植とともに、ヒト抗体とマウス抗体で異なっているＦＲのアミノ酸残基のうち、結合活性に影響を与えると考えられるアミノ酸残基を改変することが行われている。

[0410] そこで、本実施例においても、結合活性に影響を与えると考えられるＦＲのアミノ酸残基を以下のようにして同定し、改変することとした。

[0411] まず、上記で設計したＫＭ４０９７ヒト化抗体のＶＨのアミノ酸配列ＫＭ４０９７ＨＶ０、およびＶＬのアミノ酸配列ＫＭ４０９７ＬＶ０より成る抗体Ｖ領域（以下、ＨＶ０ＬＶ０と表す）の三次元構造をコンピューターモデリングの手法を用いて構築した。三次元構造座標作製および三次元構造の表示には、Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ　Ｓｔｕｄｉｏ（アクセルリス社）を用いた。また、ＫＭ４０９７のＶ領域の三次元構造のコンピューターモデルも同様にして構築した。

[0412] 更に、ＨＶ０ＬＶ０のＶＨおよびＶＬのＦＲのアミノ酸配列の中で、ＫＭ４０９７と異なっているアミノ酸残基を選択し、ＫＭ４０９７のアミノ酸残基へ改変したアミノ酸配列を作製し、同様に三次元構造モデルを構築した。これら作製したＫＭ４０９７、ＨＶ０ＬＶ０および改変体の各Ｖ領域の三次元構造を比較し、抗体の結合活性に影響を与えると予測されるアミノ酸残基を同定した。

[0413] その結果、ＨＶ０ＬＶ０のＦＲのアミノ酸残基の中で抗原結合部位の三次元構造を変化させ、抗体の結合活性に影響を与えると考えられるアミノ酸残基として、

ＫＭ４０９７ＨＶ０では、９番目のＡｌａ、１２番目のＬｙｓ、２０番目のＶａｌ、３８番目のＡｒｇ、４８番目のＭｅｔ、６７番目のＡｒｇ、６８番目のＶａｌ、７０番目のＩｌｅ、９５番目のＴｙｒ、および１１２番目のＶａｌを、ＫＭ４０９７ＬＶ０では、１５番目のＬｅｕ、１９番目のＡｌａ、２１番目のＩｌｅ、および８４番目のＬｅｕを、それぞれ選択した。

[0414] これらの選択したアミノ酸残基のうち、少なくとも１つ以上のアミノ酸配列をＫＭ４０９７の同じ部位に存在するアミノ酸残基へ改変し、様々な改変を有するヒト化抗体のＶＨおよびＶＬを設計した。

[0415] 具体的には、ＶＨについては、配列番号２４のアミノ酸配列の９番目のＡｌａをＰｒｏに、１２番目のＬｙｓをＶａｌに、２０番目のＶａｌをＩｌｅに、３８番目のＡｒｇをＬｙｓに、４８番目のＭｅｔをＩｌｅに、６７番目のＡｒｇをＬｙｓに、６８番目のＶａｌをＡｌａに、７０番目の

ＩｌｅをＬｅｕに、９５番目のＴｙｒをＰｈｅに、および１１２番目のＶａｌをＬｅｕに置換するアミノ酸改変のうち、少なくとも１つの改変を導入した。

[0416] また、ＶＬについては、配列番号２６のアミノ酸配列の１５番目のＬｅｕをＡｌａに、１９番目のＡｌａをＶａｌに、２１番目のＩｌｅをＭｅｔに、および８４番目のＬｅｕをＶａｌに置換するアミノ酸改変のうち、少なくとも１つの改変を導入した。

[0417] ＨＶ０ＬＶ０のＦＲに存在する、少なくとも１つのアミノ酸残基を改変したＫＭ４０９７ヒト化抗体の抗体Ｖ領域として、ＨＶ０ＬＶ０、ＨＶ０ＬＶ２、ＨＶ０ＬＶ３ａ、ＨＶ０ＬＶ３ｂ、ＨＶ０ＬＶ４、ＨＶ２ＬＶ０、ＨＶ２ＬＶ２、ＨＶ２ＬＶ３ａ、ＨＶ２ＬＶ３ｂ、ＨＶ２ＬＶ４、ＨＶ３ａＬＶ０、ＨＶ３ａＬＶ２、ＨＶ３ａＬＶ３ａ、ＨＶ３ａＬＶ３ｂ、ＨＶ３ａＬＶ４、ＨＶ３ｂＬＶ０、ＨＶ３ｂＬＶ２、ＨＶ３ｂＬＶ３ａ、ＨＶ３ｂＬＶ３ｂ、ＨＶ３ｂＬＶ４、ＨＶ４ＬＶ０、ＨＶ４ＬＶ２、ＨＶ４ＬＶ３ａ、ＨＶ４ＬＶ３ｂ、ＨＶ４ＬＶ４、ＨＶ５ａＬＶ０、ＨＶ５ａＬＶ２、ＨＶ５ａＬＶ３ａ、ＨＶ５ａＬＶ３ｂ、ＨＶ５ａＬＶ４、ＨＶ５ｂＬＶ０、ＨＶ５ｂＬＶ２、ＨＶ５ｂＬＶ３ａ、ＨＶ５ｂＬＶ３ｂ、ＨＶ５ｂＬＶ４、ＨＶ５ｃＬＶ０、ＨＶ５ｃＬＶ２、ＨＶ５ｃＬＶ３ａ、ＨＶ５ｃＬＶ３ｂ、ＨＶ５ｃＬＶ４、ＨＶ６ＬＶ０、ＨＶ６ＬＶ２、ＨＶ６ＬＶ３ａ、ＨＶ６ＬＶ３ｂ、ＨＶ６ＬＶ４、ＨＶ８ＬＶ０、ＨＶ８ＬＶ２、ＨＶ８ＬＶ３ａ、ＨＶ８ＬＶ３ｂ、ＨＶ８ＬＶ４、ＨＶ９ＬＶ０、ＨＶ９ＬＶ２、ＨＶ９ＬＶ３ａ、ＨＶ９ＬＶ３ｂ、ＨＶ９ＬＶ４、ＨＶ１０ＬＶ０、ＨＶ１０ＬＶ２、ＨＶ１０ＬＶ３ａ、ＨＶ１０ＬＶ３ｂ、およびＨＶ１０ＬＶ４をそれぞれ設計した。

[0418] Ｈ鎖可変領域ＨＶ２、ＨＶ３ａ，ＨＶ３ｂ，ＨＶ４、ＨＶ５ａ、ＨＶ５ｂ，ＨＶ５ｃ、ＨＶ６、ＨＶ８、ＨＶ９、ＨＶ１０およびＬ鎖可変領域ＬＶ２、ＬＶ３ａ、ＬＶ３ｂ、ＬＶ４のアミノ酸配列をそれぞれ図１２および図１３に示す。

[0419] （２）ＫＭ４０９７ヒト化抗体のＶＨおよびＶＬのｃＤＮＡ配列の設計

ＫＭ４０９７ヒト化抗体の可変領域のアミノ酸配列をコードするＤＮＡは、ＫＭ４０９７ＶＨおよびＫＭ４０９７ＶＬのアミノ酸配列をコードするＤＮＡ（配列番号２３、２５）で用いられているコドンを利用して設計し、アミノ酸改変を行う場合には、哺乳動物細胞で高頻度で使用されるコドンを用いて設計し、各々作製した。これらＤＮＡ配列を用いて、抗体発現ベクターの構築およびヒト化抗体の発現を行った。

[0420] （３）ＫＭ４０９７ヒト化抗体のＶＨをコードするｃＤＮＡの構築

本実施例（１）で設計したＫＭ４０９７ヒト化抗体のＶＨのアミノ酸配列ＫＭ４０９７ＨＶ０（配列番号２４）、および本実施例（１）の方法により設計した図１２に示されるＨＶ３ａ（配列番号２８）、ＨＶ４（配列番号３０）、ＨＶ５（配列番号３２）、ＨＶ１０（配列番号３４）をコードする、各ｃＤＮＡ（配列番号２３、２７、２９、３１、３３）を全合成にて作成した。

[0421] （４）ＫＭ４０９７ヒト化抗体のＶＬをコードするｃＤＮＡの構築

本実施例（１）で設計したＫＭ４０９７ヒト化抗体のＶＬのアミノ酸配列ＬＶ０（配列番号２６）、および本実施例（１）の方法により設計した図１３に示されるＬＶ２（配列番号３６）、ＬＶ４（配列番号３８）をコードする、各ｃＤＮＡ（配列番号２５、３５、３７）を全合成にて作成した。

[0422] （５）ＫＭ４０９７ヒト化抗体発現ベクターの構築

国際公開第９７／１０３５４号に記載のヒト化抗体発現用ベクターｐＫＡＮＴＥＸ９３の適当な位置に、本実施例（３）および（４）で得られたＨＶ０、ＨＶ３ａ、ＨＶ４、ＨＶ５、ＨＶ１０のいずれかをコードするｃＤＮＡ、およびＬＶ０、ＬＶ２、ＬＶ４のいずれかをコードするｃＤＮＡを挿入し、各種ＫＭ４０９７ヒト化抗体発現ベクターを構築した。

[0423] （６）動物細胞を用いたＫＭ４０９７ヒト化抗体の発現

本実施例（５）にて構築した動物細胞用の抗体発現ベクターの遺伝子導入には、ＣＨＯ－Ｋ１細胞（理化学研究所セルバンク寄託番号ＲＣＢ０４０３