

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

[図14]図14は、ヒト化hG019-薬物コンジュゲートH01L02-DXd又はNOV0712-DM4のin vivo抗腫瘍効果を示す。CDH6陽性ヒト卵巢腫瘍細胞株NIH:OVCAR-3を免疫不全マウスに移植した動物モデルを用いて評価した。横軸は日数、縦軸は腫瘍体積、誤差範囲はSE値を示す。

[図15]図15は、ヒト化hG019-薬物コンジュゲートH01L02-DXd又はNOV0712-DM4のin vivo抗腫瘍効果を示す。CDH6陽性ヒト腎細胞腫瘍細胞株786-Oを免疫不全マウスに移植した動物モデルを用いて評価した。横軸は日数、縦軸は腫瘍体積、誤差範囲はSE値を示す。

[図16]図16は、ヒト化hG019-薬物コンジュゲートH01L02-DXd又はNOV0712-DM4のin vivo抗腫瘍効果を示す。CDH6陰性ヒト卵巢腫瘍細胞株ES-2を免疫不全マウスに移植した動物モデルを用いて評価した。横軸は日数、縦軸は腫瘍体積、誤差範囲はSE値を示す。

発明を実施するための形態

[0025] 以下、本発明を実施するための好適な形態について図面を参照しながら説明する。なお、以下に説明する実施形態は、本発明の代表的な実施形態の一例を示したものであり、これにより本発明の範囲が狭く解釈されることはない。

[0026] 本明細書中、「がん」と「腫瘍」は同じ意味に用いられる。

[0027] 本明細書中、「遺伝子」という語には、DNAのみならずそのmRNA、cDNA及びそのcRNAも含まれる。

- [0028] 本明細書中、「ポリヌクレオチド」又は「ヌクレオチド」は、核酸と同じ意味で用いており、DNA、RNA、プローブ、オリゴヌクレオチド、及びプライマーも含まれる。本明細書中、「ポリヌクレオチド」と「ヌクレオチド」は、特に指定されない限り、交換可能に使用され得る。
- [0029] 本明細書中、「ポリペプチド」と「タンパク質」は交換可能に使用され得る。
- [0030] 本明細書中、「細胞」には、動物個体内の細胞、培養細胞も含む。
- [0031] 本明細書中、「CDH6」は、CDH6タンパク質と同じ意味で使用され得る。本明細書中、ヒトCDH6を「hCDH6」と記載する場合がある。
- [0032] 本明細書中、「細胞傷害活性」とは、何らかの形で、細胞に病理的な変化を引き起こすことをいい、直接的な外傷にとどまらず、DNAの切断や塩基の二量体の形成、染色体の切断、細胞分裂装置の損傷、各種酵素活性の低下などあらゆる細胞の構造や機能上の損傷を引き起こすことをいう。
- [0033] 本明細書中、「細胞内で毒性を発揮する」とは、何らかの形で、細胞内で毒性を示すことをいい、直接的な外傷にとどまらず、DNAの切断や塩基の二量体の形成、染色体の切断、細胞分裂装置の損傷、各種酵素活性の低下、細胞増殖因子の作用の抑制などあらゆる細胞の構造や機能、代謝に影響をもたらすことをいう。
- [0034] 本明細書中、「抗体の機能性断片」とは、「抗体の抗原結合断片」とも呼ばれ、抗原との結合活性を有する抗体の部分断片を意味しており、Fab、F(ab')₂、Fv、scFv、diabody、線状抗体及び抗体断片より形成された多特異性抗体等を含む。また、F(ab')₂を還元条件下で処理した抗体の可変領域の一価の断片であるFab'も抗体の抗原結合断片に含まれる。但し、抗原との結合能を有している限りこれらの分子に限定されない。また、これらの抗原結合断片には、抗体蛋白質の全長分子を適当な酵素で処理したもののみならず、遺伝子工学的に改変された抗体遺伝子を用いて適当な宿主細胞において産生された蛋白質も含まれる。
- [0035] 本明細書中、「エピトープ」とは、特定の抗CDH6抗体の結合するCD

H 6 の部分ペプチド又は部分立体構造を意味する。前記の C D H 6 の部分ペプチドであるエピトープは免疫アッセイ法等当業者にはよく知られている方法によって、決定することができる。まず、抗原の様々な部分構造を作製する。部分構造の作製にあたっては、公知のオリゴヌクレオチド合成技術を用いることができる。例えば、C D H 6 の C 末端又は N 末端から適当な長さで順次短くした一連のポリペプチドを当業者に周知の遺伝子組み換え技術を用いて作製した後、それらに対する抗体の反応性を検討し、大まかな認識部位を決定した後に、更に短いペプチドを合成してそれらのペプチドとの反応性を検討することによって、エピトープを決定することができる。また、複数の細胞外ドメインからなる膜タンパク質に結合する抗体が、複数のドメインからなる立体構造をエピトープとしている場合は、特定の細胞外ドメインのアミノ酸配列を改変することによって、立体構造を改変することによってどのドメインと結合するかを決定することができる。特定の抗体の結合する抗原の部分立体構造であるエピトープは、X線構造解析によって抗体と隣接する抗原のアミノ酸残基を特定することによっても決定することができる。

[0036] 本明細書中、「同一のエピトープに結合する」とは、共通のエピトープに結合する抗体を意味している。第一の抗体の結合する部分ペプチド又は部分立体構造に第二の抗体が結合すれば、第一の抗体と第二の抗体が同一のエピトープに結合すると判定することができる。あるいは、第一の抗体の抗原に対する結合に第二の抗体が競合する（即ち、第二の抗体が第一の抗体と抗原の結合を妨げる）ことを確認することによって、具体的なエピトープの配列又は構造が決定されていなくても、第一の抗体と第二の抗体の同一のエピトープに結合すると判定することができる。本明細書中、「同一のエピトープに結合する」とは、第一の抗体と第二の抗体が、当該判定方法のいずれか一方又は両方により、共通のエピトープに結合すると判定された場合をいう。第一の抗体と第二の抗体が同一のエピトープに結合し、かつ第一の抗体が抗腫瘍活性や内在化活性等の特殊な効果を有する場合、第二の抗体も同様の活性を有することが期待できる。

[0037] 本明細書中、「CDR」とは、相補性決定領域（CDR ; Complementarity Determining Region）を意味する。抗体分子の重鎖及び軽鎖にはそれぞれ3箇所のCDRがあることが知られている。CDRは、超可変領域（hypervariable region）とも呼ばれ、抗体の重鎖及び軽鎖の可変領域内にあって、一次構造の変異性が特に高い部位であり、重鎖及び軽鎖のポリペプチド鎖の一次構造上において、それぞれ3ヶ所に分離している。本明細書中においては、抗体のCDRについて、重鎖のCDRを重鎖アミノ酸配列のアミノ末端側からCDRH1、CDRH2、CDRH3と表記し、軽鎖のCDRを軽鎖アミノ酸配列のアミノ末端側からCDRL1、CDRL2、CDRL3と表記する。これらの部位は立体構造の上で相互に近接し、結合する抗原に対する特異性を決定している。

[0038] 本明細書中、「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする」とは、市販のハイブリダイゼーション溶液ExpressHyb Hybridization Solution（クロンテック社）中、68℃でハイブリダイズすること、又はDNAを固定したフィルターを用いて0.7～1.0MのNaCl存在下68℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1～2倍濃度のSSC溶液（1倍濃度SSCとは150mM NaCl、15mMクエン酸ナトリウムからなる）を用い、68℃で洗浄することによって同定することができる条件又はそれと同等の条件でハイブリダイズすることをいう。

[0039] 本明細書中、「1～数个」とは、1～10個、1～9個、1～8個、1～7個、1～6個、1～5個、1～4個、1～3個又は1～2個を意味する。

[0040] 1. CDH6

カドヘリンは、細胞膜表面に存在する糖タンパク質で、カルシウムイオン依存的にN末端側の細胞外ドメイン同士が結合することで、細胞間接着分子として、また細胞間相互作用を担うシグナル分子として機能する。カドヘリンスーパーファミリーの内、クラシックカドヘリンに分類される分子群は、

細胞外に5個の細胞外ドメイン（ECドメイン）と1個の膜貫通領域、及び細胞内ドメインから構成される1回膜貫通タンパク質である。

[0041] CDH6（Cadherin-6）は、タイプIIカドヘリンファミリーに分類される、790アミノ酸からなる1回膜貫通タンパク質であり、N末端側を細胞外、C末端側を細胞内に持つ。ヒトCDH6遺伝子は1995年に初めてクローニングされ（非特許文献1）、NM_004932、NP_004923（NCBI）等のアクセッション番号により参照可能である。

[0042] 本発明で用いるCDH6タンパク質は、ヒト、非ヒト哺乳動物（ラット、マウス、サル等）のCDH6発現細胞から直接精製して使用するか、あるいは当該細胞の細胞膜画分を調製して使用することができ、また、CDH6を*in vitro*にて合成する、あるいは遺伝子操作によって宿主細胞に産生させることによって得ることができる。遺伝子操作では、具体的には、CDH6 cDNAを発現可能なベクターに組み込んだ後、転写と翻訳に必要な酵素、基質及びエネルギー物質を含む溶液中で合成する、あるいは他の原核生物、又は真核生物の宿主細胞を形質転換させることによってCDH6を発現させることによって、該タンパク質を得ることが出来る。また、前記の遺伝子操作によるCDH6発現細胞、あるいはCDH6を発現している細胞株をCDH6タンパク質として使用することも可能である。また、CDH6のcDNAを組み込んだ発現ベクターを直接被免疫動物に投与し被免疫動物の体内でCDH6を発現させることもできる。

[0043] また、上記CDH6のアミノ酸配列において、1又は数個のアミノ酸が置換、欠失及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、当該タンパク質と同等の生物活性を有するタンパク質もCDH6に含まれる。

[0044] ヒトCDH6タンパク質は、配列番号1に記載のアミノ酸配列を有する。ヒトCDH6タンパク質の細胞外領域は、配列番号1に記載のアミノ酸配列の54～159番目のアミノ酸配列を有する細胞外ドメイン1（本明細書中、EC1とも称する）、配列番号1に記載のアミノ酸配列の160～268番目のアミノ酸配列を有する細胞外ドメイン2（本明細書中、EC2とも称

する。)、配列番号1に記載のアミノ酸配列の269～383番目のアミノ酸配列を有する細胞外ドメイン3(本明細書中、EC3とも称する。)、配列番号1に記載のアミノ酸配列の384～486番目のアミノ酸配列を有する細胞外ドメイン4(本明細書中、EC4とも称する。)、及び配列番号1に記載のアミノ酸配列の487～608番目のアミノ酸配列を有する細胞外ドメイン5(本明細書中、EC5とも称する。)から構成される。EC1～EC5のアミノ酸配列を、それぞれ、配列番号2～6とする(表1)。

[0045] 2. 抗CDH6抗体の製造

本発明の抗CDH6抗体の一例として、配列番号4に示すアミノ酸配列を含むアミノ酸配列を認識し、かつ内在化活性を有する抗CDH6抗体を挙げることができる。本発明の抗CDH6抗体の一例として、配列番号4に示すアミノ酸配列を含むアミノ酸配列を特異的に認識し、かつ内在化活性を有する抗CDH6抗体を挙げることができる。本発明の抗CDH6抗体の一例として、配列番号4に示すアミノ酸配列からなるアミノ酸配列を認識し、かつ内在化活性を有する抗CDH6抗体を挙げることができる。本発明の抗CDH6抗体の一例として、配列番号4に示すアミノ酸配列からなるアミノ酸配列を特異的に認識し、かつ内在化活性を有する抗CDH6抗体を挙げることができる。抗体が「配列番号4に示すアミノ酸配列を含むアミノ酸配列を特異的に認識」する又は「EC3ドメインを特異的に認識」するとは、抗体が、CDH6のEC3ドメインをCDH6の他の細胞外ドメインと比較して強く認識する又は強く結合することをいう。

[0046] 本発明の抗CDH6抗体は、いずれの種に由来してもよいが、好ましくは、ヒト、サル、ラット、マウス又はウサギを例示できる。ヒト以外の種に由来する場合は、周知の技術を用いて、キメラ化又はヒト化することが好ましい。本発明の抗体は、ポリクローナル抗体であっても、モノクローナル抗体であってもよいが、モノクローナル抗体が好ましい。

[0047] 本発明の抗CDH6抗体は腫瘍細胞を標的にできる抗体であり、すなわち腫瘍細胞を認識できる特性、腫瘍細胞に結合できる特性、及び／又は腫瘍細胞

胞内に取り込まれて内在化する特性等を備えている。したがって、本発明の抗CDH6抗体と抗腫瘍活性を有する化合物を、リンカーを介して結合させて抗体-薬物コンジュゲートとすることができる。

[0048] 抗体の腫瘍細胞への結合性は、フローサイトメトリーを用いて確認できる。腫瘍細胞内への抗体の取り込みは、(1) 治療抗体に結合する二次抗体（蛍光標識）を用いて細胞内に取り込まれた抗体を蛍光顕微鏡で可視化するアッセイ（Cell Death and Differentiation, 2008, 15, 751-761）、(2) 治療抗体に結合する二次抗体（蛍光標識）を用いて細胞内に取り込まれた蛍光量を測定するアッセイ（Molecular Biology of the Cell Vol. 15, 5268-5282, December 2004）又は(3) 治療抗体に結合するイムノトキシンを用いて、細胞内に取り込まれると毒素が放出されて細胞増殖が抑制されるというMab-ZAPアッセイ（Bio Techniques 28:162-165, January 2000）を用いて確認できる。イムノトキシンとしては、ジフテテリア毒素の触媒領域とプロテインGとのリコンビナント複合タンパク質タンパク質も使用可能である。

[0049] 本明細書で言う「高い内在化能」とは、当該抗体とサボリン標識抗ラットIgG抗体を投与したCDH6発現細胞の生存率（抗体未添加時の細胞生存率を100%とした相対率で表したもの）が、好ましくは70%以下、より好ましくは60%以下であることを意味する。

[0050] 抗体-薬物コンジュゲートは抗腫瘍効果を発揮する化合物を結合させてあるので、抗体自体が抗腫瘍効果を有することは、好ましいが、必須ではない。抗腫瘍性化合物の細胞傷害性を腫瘍細胞において特異的及び／又は選択的に発揮させる目的からは、抗体が内在化して腫瘍細胞内に移行する性質のあることが重要であり、好ましい。

[0051] 抗CDH6抗体は、この分野で通常実施される方法を用いて、抗原となるポリペプチドを動物に免疫し、生体内に産生される抗体を採取、精製するこ

とによって得ることができるが、好ましくは、立体構造を保持したCDH6を抗原として用いることが好ましい。そのような方法として、DNA免疫法を挙げることができる。

[0052] 抗原の由来はヒトに限定されず、マウス、ラット等のヒト以外の動物に由来する抗原を動物に免疫することもできる。この場合には、取得された異種抗原に結合する抗体とヒト抗原との交差性を試験することによって、ヒトの疾患に適用可能な抗体を選別できる。

[0053] また、公知の方法（例えば、Kohler and Milstein, Nature (1975) 256, 495-497、Kennet, R. ed., Monoclonal Antibodies, 365-367, Plenum Press, N. Y. (1980)）に従って、抗原に対する抗体を産生する抗体産生細胞とミエローマ細胞とを融合させることによってハイブリドーマを樹立し、モノクローナル抗体を得ることもできる。

[0054] 以下、具体的にCDH6に対する抗体の取得方法を説明する。

[0055] (1) 抗原の調製

抗原は抗原タンパク質をコードする遺伝子を遺伝子操作によって宿主細胞に産生させることによって得ることができる。具体的には、抗原遺伝子を発現可能なベクターを作製し、これを宿主細胞に導入して該遺伝子を発現させ、発現した抗原を精製すればよい。上記の遺伝子操作による抗原発現細胞、あるいは抗原を発現している細胞株を動物に免疫する方法を用いることによっても抗体を取得できる。

[0056] また、抗原タンパク質を用いずに、抗原タンパク質のcDNAを発現ベクターに組み込んで被免疫動物に投与し、被免疫動物の体内で抗原タンパク質を発現させ、抗原タンパク質に対する抗体を産生させることによっても抗体を取得することができる。

[0057] (2) 抗CDH6モノクローナル抗体の製造

本発明で使用する抗CDH6抗体は、特に制限はないが、例えば、本願の配列表で示されたアミノ酸配列で特定される抗体を好適に使用することが

できる。本発明において使用される抗CDH6抗体としては、以下の特性を有するものが望ましい。

(1) 以下の特性を有することを特徴とする抗体；

(a) CDH6に特異的に結合する

(b) CDH6と結合することによってCDH6発現細胞に内在化する活性を有する

(2) CDH6がヒトCDH6である上記(1)に記載の抗体又は当該抗体。

(3) ヒトCDH6のEC3を特異的に認識し、かつ内在化活性を有する

本発明のCDH6に対する抗体の取得方法は、抗CDH6抗体を取得できる限りにおいて、特に制限されないが、高次構造を保持したCDH6を抗原として用いることが好ましい。

[0058] 好ましい抗体の取得方法の一例としてDNA免疫法を挙げることができる。DNA免疫法とは、抗原発現プラスミドをマウスやラットなどの動物個体に遺伝子導入し、抗原を個体内で発現させることによって、抗原に対する免疫を誘導する手法である。遺伝子導入の手法には、直接プラスミドを筋肉に注射する方法や、リボソームやポリエチレンジアミンなどの導入試薬を静脈注射する方法、ウイルスベクターを用いる手法、プラスミドを付着させた金粒子をGene Gunにより打ち込む手法、急速に大量のプラスミド溶液を静脈注射するHydrodynamic法などが存在する。発現プラスミドの筋注による遺伝子導入法に関して、発現量を向上させる手法として、プラスミドを筋注後、同部位にエレクトロポレーションを加えるin vivo electroporationという技術が知られている(Aihara H, Miyazaki J. Nat Biotechnol. 1998 Sep; 16(9): 867-70又はMir LM, Bureau MF, Gehl J, Rangara R, Rouy D, Caillaud JM, Delaere P, Branellec D, Schwartz B, Scherman D. Proc Natl Acad Sci U

SA, 1999 Apr 13; 96 (8) : 4262-7.)。本手法はプラスミドの筋注前にヒアルロニダーゼで筋肉を処理することにより、さらに発現量が向上する (McMahon JM1, Signori E, Wells KE, Fazio VM, Wells DJ. Gene Ther. 2001 Aug; 8 (16) : 1264-70)。また、ハイブリドーマの作製は公知の方法によって行うことができ、例えば、Hybridoma Production System (Cytosol Sciences 社) を用いて行うこともできる。

[0059] 具体的なモノクローナル抗体取得の例としては、以下を挙げることができる。

(a) CDH6 の cDNA を発現ベクター (例えば、pcDNA3.1 : Thermo Fisher Scientific) に組み込み、エレクトロポレーションや遺伝子銃等の方法によって、そのベクターを直接被免疫動物 (例えば、ラットやマウス) に投与することによって、動物体内において CDH6 を発現させることによって、免疫反応を誘起させることができる。エレクトロポレーション等によるベクターの投与は抗体価を上げるために必要であれば、1 回でも複数回でもよく、好ましくは複数回である；

(b) 免疫反応を誘起された上述の動物より、抗体産生細胞を含む組織 (例えばリンパ節) を採取する；

(c) 骨髓腫細胞 (以下「ミエローマ」という) (例えば、マウスミエローマ SP2/O-ag14 細胞) の調製；

(d) 抗体産生細胞とミエローマとの細胞融合；

(e) 目的とする抗体を産生するハイブリドーマ群の選別；

(f) 単一細胞クローンへの分割 (クローニング) ；

(g) 場合によっては、モノクローナル抗体を大量に製造するためのハイブリドーマの培養、又はハイブリドーマを移植した動物の飼育；及び／又は

(h) このようにして製造されたモノクローナル抗体の生理活性 (内在化活性)、及びその結合特異性の検討、あるいは標識試薬としての特性の検定。

[0060] ここで用いられる抗体価の測定法としては、例えば、フローサイトメトリー又はC e l l - E L I S A法を挙げることができるがこれらの方法に制限されない。

[0061] このようにして樹立されたハイブリドーマ株の例としては、抗C D H 6抗体産生ハイブリドーマr G 0 1 9、r G 0 5 5、r G 0 5 6及びr G 0 6 1を挙げることができる。なお、本明細書中においては、抗C D H 6抗体産生ハイブリドーマr G 0 1 9が産生する抗体を、「r G 0 1 9抗体」又は単に「r G 0 1 9」と記載し、ハイブリドーマr G 0 5 5が産生する抗体を、「r G 0 5 5抗体」又は単に「r G 0 5 5」と記載し、ハイブリドーマr G 0 5 6が産生する抗体を、「r G 0 5 6抗体」又は単に「r G 0 5 6」と記載し、ハイブリドーマr G 0 6 1が産生する抗体を、「r G 0 6 1抗体」又は単に「r G 0 6 1」とする。

[0062] r G 0 1 9抗体の軽鎖可変領域は、配列番号10に示されるアミノ酸配列からなる。該r G 0 1 9抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号11に示されるヌクレオチド配列でコードされる。r G 0 1 9抗体の軽鎖可変領域は、配列番号12に示されるアミノ酸配列からなるC D R L 1、配列番号13に示されるアミノ酸配列からなるC D R L 2及び配列番号14に示されるアミノ酸配列からなるC D R L 3を有する。r G 0 1 9抗体の重鎖可変領域は、配列番号15に示されるアミノ酸配列からなる。該r G 0 1 9抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号16に示されるヌクレオチド配列でコードされる。r G 0 1 9抗体の重鎖可変領域は、配列番号17に示されるアミノ酸配列からなるC D R H 1、配列番号18に示されるアミノ酸配列からなるC D R H 2及び配列番号19に示されるアミノ酸配列からなるC D R H 3を有する。r G 0 1 9抗体の配列を表1に示す。

[0063] r G 0 5 5抗体の軽鎖可変領域は、配列番号20に示されるアミノ酸配列からなる。該r G 0 5 5抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号21に示されるヌクレオチド配列でコードされる。r G 0 5 5抗体の軽鎖可変領域は、配列番号22に示されるアミノ酸配列からなるC D R L 1、配列番

号 2 3 に示されるアミノ酸配列からなる C D R L 2 及び配列番号 2 4 に示されるアミノ酸配列からなる C D R L 3 を有する。 r G 0 5 5 抗体の重鎖可変領域は、配列番号 2 5 に示されるアミノ酸配列からなる。該 r G 0 5 5 抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号 2 6 に示されるヌクレオチド配列でコードされる。 r G 0 5 5 抗体の重鎖可変領域は、配列番号 2 7 に示されるアミノ酸配列からなる C D R H 1、配列番号 2 8 に示されるアミノ酸配列からなる C D R H 2 及び配列番号 2 9 に示されるアミノ酸配列からなる C D R H 3 を有する。 r G 0 5 5 抗体の配列を表 1 に示す。

[0064] r G 0 5 6 抗体の軽鎖可変領域は、配列番号 3 0 に示されるアミノ酸配列からなる。該 r G 0 5 6 抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号 3 1 に示されるヌクレオチド配列でコードされる。 r G 0 5 6 抗体の軽鎖可変領域は、配列番号 3 2 に示されるアミノ酸配列からなる C D R L 1、配列番号 3 3 に示されるアミノ酸配列からなる C D R L 2 及び配列番号 3 4 に示されるアミノ酸配列からなる C D R L 3 を有する。 r G 0 5 6 抗体の重鎖可変領域は、配列番号 3 5 に示されるアミノ酸配列からなる。該 r G 0 5 6 抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号 3 6 に示されるヌクレオチド配列でコードされる。 r G 0 5 6 抗体の重鎖可変領域は、配列番号 3 7 に示されるアミノ酸配列からなる C D R H 1、配列番号 3 8 に示されるアミノ酸配列からなる C D R H 2 及び配列番号 3 9 に示されるアミノ酸配列からなる C D R H 3 を有する。 r G 0 5 6 抗体の配列を表 1 に示す。

[0065] r G 0 6 1 抗体の軽鎖可変領域は、配列番号 4 0 に示されるアミノ酸配列からなる。該 r G 0 6 1 抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号 4 1 に示されるヌクレオチド配列でコードされる。 r G 0 6 1 抗体の軽鎖可変領域は、配列番号 4 2 に示されるアミノ酸配列からなる C D R L 1、配列番号 4 3 に示されるアミノ酸配列からなる C D R L 2 及び配列番号 4 4 に示されるアミノ酸配列からなる C D R L 3 を有する。 r G 0 6 1 抗体の重鎖可変領域は、配列番号 4 5 に示されるアミノ酸配列からなる。該 r G 0 6 1 抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号 4 6 に示されるヌクレオチド配

列でコードされる。r G O 6 1 抗体の重鎖可変領域は、配列番号 4 7 に示されるアミノ酸配列からなる C D R H 1、配列番号 4 8 に示されるアミノ酸配列からなる C D R H 2 及び配列番号 4 9 に示されるアミノ酸配列からなる C D R H 3 を有する。r G O 6 1 抗体の配列を表 1 に示す。

[0066] さらに、「2. 抗 C D H 6 抗体の製造」(a)乃至(h)の工程を再度実施して別途に独立してモノクローナル抗体を取得した場合や他の方法によって別途にモノクローナル抗体を取得した場合においても、r G O 1 9 抗体、r G O 5 5 抗体、r G O 5 6 抗体又は r G O 6 1 抗体と同等の内在化活性を有する抗体を取得することが可能である。このような抗体の一例として、r G O 1 9 抗体、r G O 5 5 抗体、r G O 5 6 抗体又は r G O 6 1 抗体と同一のエピトープに結合する抗体を挙げることができる。新たに作製されたモノクローナル抗体が、r G O 1 9 抗体、r G O 5 5 抗体、r G O 5 6 抗体又は r G O 6 1 抗体の結合する部分ペプチド又は部分立体構造に結合すれば、該モノクローナル抗体が r G O 1 9 抗体、r G O 5 5 抗体、r G O 5 6 抗体又は r G O 6 1 抗体と同一のエピトープに結合すると判定することができる。また、r G O 1 9 抗体、r G O 5 5 抗体、r G O 5 6 抗体又は r G O 6 1 抗体の C D H 6 に対する結合に対して該モノクローナル抗体が競合する（即ち、該モノクローナル抗体が、r G O 1 9 抗体、r G O 5 5 抗体、r G O 5 6 抗体又は r G O 6 1 抗体と C D H 6 の結合を妨げる）ことを確認することによって、具体的なエピトープの配列又は構造が決定されていなくても、該モノクローナル抗体が抗 C D H 6 抗体と同一のエピトープに結合すると判定することができる。エピトープが同一であることが確認された場合、該モノクローナル抗体が r G O 1 9 抗体、r G O 5 5 抗体、r G O 5 6 抗体又は r G O 6 1 抗体と同等の抗原結合能、生物活性及び／又は内在化活性を有していることが強く期待される。

[0067] (3) その他の抗体

本発明の抗体には、上記 C D H 6 に対するモノクローナル抗体に加え、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺

伝子組換え型抗体、例えば、キメラ（Chimeric）抗体、ヒト化（Humanized）抗体又はヒト抗体等も含まれる。これらの抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。

[0068] キメラ抗体としては、抗体の可変領域と定常領域が互いに異種である抗体、例えばマウス又はラット由来抗体の可変領域をヒト由来の定常領域に接合したキメラ抗体を挙げることができる（Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 81, 6851-6855, (1984) 参照）。

[0069] ラット抗ヒトCDH6抗体由来のキメラ抗体の例としては、例えば、本明細書に記載のラット抗ヒトCDH6抗体（例えば、rG019抗体、rG055抗体、rG056抗体又はrG061抗体）の各軽鎖可変領域とヒト由来の定常領域を含む軽鎖、及び、各重鎖可変領域とヒト由来の定常領域を含む重鎖からなる抗体が挙げられる。

[0070] ラット抗ヒトCDH6抗体由来のキメラ抗体の別の例としては、例えば、本明細書に記載のラット抗ヒトCDH6抗体（例えば、rG019抗体、rG055抗体、rG056抗体又はrG061抗体）の各軽鎖可変領域中の1～数残基、1～3残基、1～2残基、好ましくは1残基のアミノ酸を別のアミノ酸残基に置換した軽鎖可変領域を含む軽鎖、及び、各重鎖可変領域中の1～数残基、1～3残基、1～2残基、好ましくは1残基のアミノ酸を別のアミノ酸残基に置換した重鎖可変領域を含む重鎖からなる抗体が挙げられ、当該抗体は任意のヒト由来の定常領域を有してよい。

[0071] ラット抗ヒトCDH6抗体由来のキメラ抗体の別の例としては、例えば、本明細書に記載のラット抗ヒトCDH6抗体（例えば、rG019抗体、rG055抗体、rG056抗体又はrG061抗体）の各軽鎖可変領域中のいずれか1～3個のCDR中の1～2残基、好ましくは1残基のアミノ酸を別のアミノ酸残基に置換した軽鎖可変領域を含む軽鎖、及び、各重鎖可変領域中のいずれか1～3個のCDR中の1～2残基、好ましくは1残基のアミノ酸を別のアミノ酸残基に置換した重鎖可変領域を含む重鎖からなる抗体が挙げられ、当該抗体は任意のヒト由来の定常領域を有してよい。

[0072] r G O 1 9 抗体由来のキメラ抗体としては、例えば、配列番号 1 0 に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖、及び、配列番号 1 5 に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖からなる抗体が挙げられ、当該抗体は任意のヒト由来の定常領域を有してよい。

[0073] r G O 1 9 抗体由来のキメラ抗体の別の例としては、例えば、配列番号 1 0 に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域中の 1 ～数残基、1 ～3 残基、1 ～2 残基、好ましくは 1 残基のアミノ酸を別のアミノ酸残基に置換した軽鎖可変領域を含む軽鎖、及び、配列番号 1 5 に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域中の 1 ～数残基、1 ～3 残基、1 ～2 残基、好ましくは 1 残基のアミノ酸を別のアミノ酸残基に置換した重鎖可変領域を含む重鎖からなる抗体が挙げられ、当該抗体は任意のヒト由来の定常領域を有してよい。

[0074] r G O 1 9 抗体由来のキメラ抗体の別の例としては、例えば、配列番号 1 0 に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域中のいずれか 1 ～3 個の C D R 中の 1 又は 2 残基（好ましくは 1 残基）のアミノ酸を別のアミノ酸残基に置換した軽鎖可変領域を含む軽鎖、及び、配列番号 1 5 に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域中のいずれか 1 ～3 個の C D R 中の 1 又は 2 残基（好ましくは 1 残基）のアミノ酸を別のアミノ酸残基に置換した重鎖可変領域を含む重鎖からなる抗体が挙げられ、当該抗体は任意のヒト由来の定常領域を有してよい。

[0075] r G O 1 9 抗体由来のキメラ抗体の別の例としては、例えば、配列番号 1 0 に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖、及び、配列番号 5 8 に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖からなる抗体が挙げられ、当該抗体は任意のヒト由来の定常領域を有してよい。配列番号 5 8 に示されるアミノ酸配列は、配列番号 1 5 に示されるアミノ酸配列中の C D R H 2 中のシステイン残基をプロリン残基に置換した配列である。

[0076] r G O 1 9 抗体由来のキメラ抗体の具体例としては、配列番号 5 3 に示さ

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

[0077] chG019抗体の軽鎖可変領域アミノ酸配列は、rG019抗体の軽鎖可変領域アミノ酸配列と同一であり、配列番号10に示されるアミノ酸配列からなる。chG019抗体の軽鎖は、配列番号12に示されるアミノ酸配列からなるCDRL1、配列番号13に示されるアミノ酸配列からなるCDRL2及び配列番号14に示されるアミノ酸配列からなるCDRL3を有し、それぞれ、rG019の軽鎖のCDRL1、CDRL2及びCDRL3と同一である。chG019抗体の軽鎖可変領域アミノ酸は、配列番号55に示されるヌクレオチド配列でコードされる。

[0078] chG019抗体の重鎖可変領域アミノ酸配列は、配列番号58に示されるアミノ酸配列からなる。chG019抗体の重鎖は、配列番号17に示されるアミノ酸配列からなるCDRH1、配列番号60に示されるアミノ酸配列からなるCDRH2及び配列番号19に示されるアミノ酸配列からなるCDRH3を有する。配列番号58に示されるアミノ酸配列は、配列番号15に示されるアミノ酸配列中のCDRH2中のシステイン残基をプロリン残基に置換した配列である。配列番号60に示されるアミノ酸配列からなるCDRH2は、配列番号18に示されるrG019 CDRH2中のシステイン残基をプロリン残基に置換した配列である。chG019抗体の重鎖可変領域アミノ酸配列は、配列番号59に示されるヌクレオチド配列でコードされる。

[0079] chG019抗体の配列を表1に示す。

[0080] ラット抗ヒトCDH6抗体rG055抗体由来のキメラ抗体としては、例

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

[0081] ラット抗ヒトCDH6抗体 rG056 抗体由来のキメラ抗体としては、例えば、配列番号 30 に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖、及び、配列番号 35 に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖からなるキメラ抗体が挙げられ、当該抗体は任意のヒト由来の定常領域を有してよい。

[0082] ラット抗ヒトCDH6抗体 rG061 抗体由来のキメラ抗体としては、例えば、配列番号 40 に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖、及び、配列番号 45 に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖からなるキメラ抗体が挙げられ、当該抗体は任意のヒト由来の定常領域を有してよい。

[0083] ヒト化抗体としては、相補性決定領域 (CDR ; Complementarity Determining Region) のみをヒト由来の抗体に組み込んだ抗体 (Nature (1986) 321, p. 522-525 参照)、CDR 移植法によって、CDR の配列に加え一部のフレームワークのアミノ酸残基もヒト抗体に移植した抗体 (国際公開第 90/07861 号)、更に、抗原に対する結合能を維持しつつ、一部の CDR のアミノ酸配列を改変した抗体を挙げることができる。

[0084] 本明細書において、rG019 抗体、rG055 抗体、rG056 抗体、rG061 抗体又は chG019 抗体由来のヒト化抗体とは、rG019 抗体、rG055 抗体、rG056 抗体、rG061 抗体又は chG019 抗体のいずれかについて、各々に固有の 6 つの CDR 配列を全て保持し、かつ、内在化活性を有するヒト化抗体であればよく、特定のヒト化抗体に限定されない。当該ヒト化抗体は、内在化活性を有する限り、更に一部の CDR の一部のアミノ酸配列が改変されていてもよい。

[0085] c h G O 1 9 抗体のヒト化抗体の実例としては、（１）配列番号 6 3 又は 6 7 に記載のアミノ酸配列、（２）上記（１）のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 %以上の同一性を有するアミノ酸配列（好ましくは、各 C D R 配列以外のフレームワーク領域の配列に対して少なくとも 9 5 %以上の配列同一性を有するアミノ酸配列）、及び（３）上記（１）のアミノ酸配列において 1 又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなる群から選択されるいずれか 1 つに記載の軽鎖可変領域を含む軽鎖、並びに（４）配列番号 7 1、7 5 又は 7 9 に記載のアミノ酸配列、（５）上記（４）のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 %以上の同一性を有するアミノ酸配列（好ましくは、各 C D R 配列以外のフレームワーク領域の配列に対して少なくとも 9 5 %以上の配列同一性を有するアミノ酸配列）、及び（６）上記（４）のアミノ酸配列において 1 又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなる群から選択されるいずれか 1 つに記載の重鎖可変領域を含む重鎖の任意の組合せを挙げることができる。

[0086] また、重鎖又は軽鎖の一方をヒト化し、他方をラット抗体やキメラ抗体の軽鎖又は重鎖とした抗体も用いることができる。そのような抗体の例としては、（１）配列番号 6 3 又は 6 7 に記載のアミノ酸配列、（２）上記（１）のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 %以上の同一性を有するアミノ酸配列（好ましくは、各 C D R 配列以外のフレームワーク領域の配列に対して少なくとも 9 5 %以上の配列同一性を有するアミノ酸配列）、及び（３）上記（１）のアミノ酸配列において 1 又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなる群から選択されるいずれか 1 つに記載の軽鎖可変領域を含む軽鎖、並びに（４）配列番号 1 5、2 5、3 5、4 5 又は 5 8 に記載のアミノ酸配列、（５）上記（４）のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 %以上の同一性を有するアミノ酸配列（好ましくは、各 C D R 配列以外のフレームワーク領域の配列に対して少なくとも 9 5 %以上の配列同一性を有するアミノ酸配列）、及び（６）上記（４）のアミノ酸配列において 1 又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなる群か

ら選択されるいずれか1つに記載の重鎖可変領域を含む重鎖の任意の組合せを挙げることができる。他の例としては、(1) 配列番号10、20、30又は40に記載のアミノ酸配列、(2) 上記(1)のアミノ酸配列に対して少なくとも95%以上の同一性を有するアミノ酸配列（好ましくは、各CDR配列以外のフレームワーク領域の配列に対して少なくとも95%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列）、及び(3) 上記(1)のアミノ酸配列において1又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなる群から選択されるいずれか1つに記載の軽鎖可変領域を含む軽鎖、並びに(4) 配列番号71、75又は79に記載のアミノ酸配列、(5) 上記(4)のアミノ酸配列に対して少なくとも95%以上の同一性を有するアミノ酸配列（好ましくは、各CDR配列以外のフレームワーク領域の配列に対して少なくとも95%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列）、及び(6) 上記(4)のアミノ酸配列において1又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなる群から選択されるいずれか1つに記載の重鎖可変領域を含む重鎖の任意の組合せを挙げることができる。

[0087] また、本明細書中におけるアミノ酸の置換としては保存的アミノ酸置換が好ましい。保存的アミノ酸置換とは、アミノ酸側鎖に関連のあるアミノ酸グループ内で生じる置換である。好適なアミノ酸グループは、以下のとおりである：酸性グループ＝アスパギン酸、グルタミン酸；塩基性グループ＝リシン、アルギニン、ヒスチジン；非極性グループ＝アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン；及び非帯電極性ファミリー＝グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、スレオニン、チロシン。他の好適なアミノ酸グループは次のとおりである：脂肪族ヒドロキシグループ＝セリン及びスレオニン；アミド含有グループ＝アスパラギン及びグルタミン；脂肪族グループ＝アラニン、バリン、ロイシン及びイソロイシン；並びに芳香族グループ＝フェニルアラニン、トリプトファン及びチロシン。かかるアミノ酸置換は元のアミノ酸配列を有する物質の特性を低下させない範囲で行うのが好ましい。

[0088] 上記軽鎖及び重鎖の好適な組合せの抗体としては、配列番号 63 に示される軽鎖可変領域アミノ酸配列（本明細書中、h L O 2 軽鎖可変領域アミノ酸配列とも称する）を有する軽鎖又は配列番号 67 に示される軽鎖可変領域アミノ酸配列（本明細書中、h L O 3 軽鎖可変領域アミノ酸配列とも称する）を有する軽鎖、及び、配列番号 71 に示される重鎖可変領域アミノ酸配列（本明細書中、h H O 1 重鎖可変領域アミノ酸配列とも称する）を有する重鎖、配列番号 75 に示される重鎖可変領域アミノ酸配列（本明細書中、h H O 2 重鎖可変領域アミノ酸配列とも称する）を有する重鎖又は配列番号 79 に示される重鎖可変領域アミノ酸配列（本明細書中、h H O 4 重鎖可変領域アミノ酸配列とも称する）を有する重鎖からなる抗体が挙げられる。好ましい例としては、配列番号 63 に示される軽鎖可変領域アミノ酸配列を有する軽鎖及び配列番号 71 に示される重鎖可変領域アミノ酸配列を有する重鎖からなる抗体；配列番号 63 に示される軽鎖可変領域アミノ酸配列を有する軽鎖及び配列番号 75 に示される重鎖可変領域アミノ酸配列を有する重鎖からなる抗体；配列番号 63 に示される軽鎖可変領域アミノ酸配列を有する軽鎖及び配列番号 79 に示される重鎖可変領域アミノ酸配列を有する重鎖からなる抗体；配列番号 67 に示される軽鎖可変領域アミノ酸配列を有する軽鎖及び配列番号 71 に示される重鎖可変領域アミノ酸配列を有する重鎖からなる抗体；配列番号 67 に示される軽鎖可変領域アミノ酸配列を有する軽鎖及び配列番号 75 に示される重鎖可変領域アミノ酸配列を有する重鎖からなる抗体；又は、配列番号 67 に示される軽鎖可変領域アミノ酸配列を有する軽鎖及び配列番号 79 に示される重鎖可変領域アミノ酸配列を有する重鎖からなる抗体が挙げられる。より好ましい例としては、配列番号 63 に示される軽鎖可変領域アミノ酸配列を有する軽鎖及び配列番号 71 に示される重鎖可変領域アミノ酸配列を有する重鎖からなる抗体；配列番号 63 に示される軽鎖可変領域アミノ酸配列を有する軽鎖及び配列番号 75 に示される重鎖可変領域アミノ酸配列を有する重鎖からなる抗体；配列番号 63 に示される軽鎖可変領域アミノ酸配列を有する軽鎖及び配列番号 79 に示される重鎖可変領域ア

ミノ酸配列を有する重鎖からなる抗体；又は、配列番号 67 に示される軽鎖可変領域アミノ酸配列を有する軽鎖及び配列番号 75 に示される重鎖可変領域アミノ酸配列を有する重鎖からなる抗体が挙げられる。

[0089] 上記軽鎖及び重鎖の好適な組合せの抗体の別の例としては、配列番号 61 に示される軽鎖全長アミノ酸配列（本明細書中、hL02 軽鎖全長アミノ酸配列とも称する）の 21～233 番目のアミノ酸配列からなる軽鎖又は配列番号 65 に示される軽鎖全長アミノ酸配列（本明細書中、hL03 軽鎖全長アミノ酸配列とも称する）の 21～233 番目のアミノ酸配列からなる軽鎖、及び、配列番号 69 に示される重鎖全長アミノ酸配列（本明細書中、hH01 重鎖全長アミノ酸配列とも称する）の 20～471 番目のアミノ酸配列からなる重鎖、配列番号 73 に示される重鎖全長アミノ酸配列（本明細書中、hH02 重鎖全長アミノ酸配列とも称する）の 20～471 番目のアミノ酸配列からなる重鎖又は配列番号 77 に示される重鎖全長アミノ酸配列（本明細書中、hH04 重鎖全長アミノ酸配列とも称する）の 20～471 番目のアミノ酸配列からなる重鎖からなる抗体が挙げられる。好ましい例としては、配列番号 61 に示される軽鎖全長アミノ酸配列の 21～233 番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号 69 に示される重鎖全長アミノ酸配列の 20～471 番目のアミノ酸配列からなる重鎖からなる抗体；配列番号 61 に示される軽鎖全長アミノ酸配列の 21～233 番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号 73 に示される重鎖全長アミノ酸配列の 20～471 番目のアミノ酸配列からなる重鎖からなる抗体；配列番号 61 に示される軽鎖全長アミノ酸配列の 21～233 番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号 77 に示される重鎖全長アミノ酸配列の 20～471 番目のアミノ酸配列からなる重鎖からなる抗体；配列番号 65 に示される軽鎖全長アミノ酸配列の 21～233 番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号 69 に示される重鎖全長アミノ酸配列の 20～471 番目のアミノ酸配列からなる重鎖からなる抗体；配列番号 65 に示される軽鎖全長アミノ酸配列の 21～233 番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号 73 に示される重鎖全長

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

[0090] 上記の重鎖アミノ酸配列及び軽鎖アミノ酸配列と高い同一性を示す配列を組み合わせることによって、上記の各抗体と同等の生物活性を有する抗体を選択することが可能である。このような同一性は、一般的には 80%以上の同一性であり、好ましくは 90%以上の同一性であり、より好ましくは 95%以上の同一性であり、最も好ましくは 99%以上の同一性である。また、重鎖又は軽鎖のアミノ酸配列に 1 乃至数個のアミノ酸残基が置換、欠失又は

付加されたアミノ酸配列を組み合わせることによっても、上記の各抗体と同等の生物活性を有する抗体を選択することが可能である。

[0091] 二種類のアミノ酸配列間の同一性は、ClustalW version 2 (Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ and Higgins DG (2007), 「Clustal W and Clustal X version 2.0」, Bioinformatics. 23 (21) : 2947-2948) のデフォルトパラメーターを使用して配列を整列させることによって決定することができる。

[0092] なお、配列番号61に示されるhL02軽鎖全長アミノ酸配列中、1～20番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列はシグナル配列であり、21～128番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は可変領域であり、129～233番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は定常領域である。配列番号62に示されるhL02軽鎖全長ヌクレオチド配列中、1～60番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列はシグナル配列をコードし、61～384番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列は可変領域をコードし、385～699番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列は定常領域をコードしている。

[0093] 配列番号65に示されるhL03軽鎖全長アミノ酸配列中、1～20番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列はシグナル配列であり、21～128番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は可変領域であり、129～233番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は定常領域である。配列番号66に示されるhL03軽鎖全長ヌクレオチド配列中、1～60番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列はシグナル配列をコードし、61～384番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列は可変領域をコードし、38

５～６９９番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列は定常領域をコードしている。

[0094] 配列番号６９に示されるｈＨＯ１重鎖全長アミノ酸配列中、１～１９番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列はシグナル配列であり、２０～１４１番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は可変領域であり、１４２～４７１番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は定常領域である。配列番号７０に示されるｈＨＯ１重鎖全長ヌクレオチド配列中、１～５７番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列はシグナル配列をコードし、５８～４２３番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列は可変領域をコードし、４２４～１４１３番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列は定常領域をコードしている。

[0095] 配列番号７３に示されるｈＨＯ２重鎖全長アミノ酸配列中、１～１９番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列はシグナル配列であり、２０～１４１番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は可変領域であり、１４２～４７１番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は定常領域である。配列番号７４に示されるｈＨＯ２重鎖全長ヌクレオチド配列中、１～５７番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列はシグナル配列をコードし、５８～４２３番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列は可変領域をコードし、４２４～１４１３番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列は定常領域をコードしている。

[0096] 配列番号７７に示されるｈＨＯ４重鎖全長アミノ酸配列中、１～１９番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列はシグナル配列であり、２０～１４１番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は可変領域であり、１４２～４７１番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は定常領域である。配列番号７８に示されるｈＬＯ４重鎖全長ヌクレオチド配列で、１～５７番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列はシグナル配列であり、５８～４２３番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列は可変領域をコードしており、４２４～１４１３番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列は定常領域を

コードしている。

[0097] [表1-1]

配列 番号		配列
1	ヒトCDH6 ORFのアミノ酸 配列	MRTYRYFLLLFVWGQPYPTLSTPLSKRTSGFPAKKRALELSGNSKNELNRSKRSWMW NQFFLLEEYTGSDYQYVGKLHSDQDRGDGSLKYILSGDGAGDLFIINENTGDIQATK RLDREKPYIILRAQAINRRTRGRPVEPESEFIKIHINDNEPIFTKEVYTATVPEM SDVGTFFVQVTATDADPTYGNSAKVVYSILQGQPYFSVESETGIKKTALLNMDREN REQYQVVIQAKDMGGQMGGLSGTTTVNITLTDVNDNPPRFPQSTYQFKTPESSPPGT PIGRIKASDADVGENAEIEYSITDGEGLDMFDVITDQETOEGIITVKKLLDFEKKKV YTLKVEASNPHYPRFLYLGPFKDSATVRIVVEDVDEPPVFSKLAYILQIREDAQIN TTIGSVTAQDPDAARNPVKYSVDRHTMDRIFNIDSGNGSIFTSKLLDRETLWHNI TVIATEINNPKQSSRVPLYIKVLDVNDNAPEFAEFYETVCEKAKADQLIQTLHAVD KDDPYSGHQFSFSLAPEAASGSNFTIQDNKONTAGILTRKNGYNRHEMSTYLLPVVI SDNDYPVQSSTGTVTVRVCACDHHGNMQSCHAEALIHPTGLSTGALVAILLCIVILL VTVVLFAALRRQRKKEPLISKEDIRDNIVSYNDEGGGEEDTQAFDIGTLRNPEAIE DNKLRRDIVPEALFLPRRTPTARDNTDVRDFINQRLKENDTDPTAPPYDSLATYAYE GTGSVADSLSSLESVTTDADQDYDYLSDWGPFRKKLADMYGGVDSKDSDS
2	ヒトCDH6 EC1	SWMWNQFFLLEEYTGSDYQYVGKLHSDQDRGDGSLKYILSGDGAGDLFIINENTGDI QATKRLDREKPYIILRAQAINRRTRGRPVEPESEFIKIHINDNEPIF
3	ヒトCDH6 EC2	TKEVYTATVPEMSDVGTFFVQVTATDADPTYGNSAKVVYSILQGQPYFSVESETGI IKTALLNMDRENREQYQVVIQAKDMGGQMGGLSGTTTVNITLTDVNDNPPRF
4	ヒトCDH6 EC3	PQSTYQFKTPESSPPGTPIGRIKASDADVGENAEIEYSITDGEGLDMFDVITDQETO EGIITVKKLLDFEKKKVYTLKVEASNPHYPRFLYLGPFKDSATVRIVVEDVDEPPV F
5	ヒトCDH6 EC4	SKLAYILQIREDAQINTTIGSVTAQDPDAARNPVKYSVDRHTMDRIFNIDSGNGSI FTSKLLDRETLWHNITVIATEINNPKQSSRVPLYIKVLDVNDNAP
6	ヒトCDH6 EC5	EFAEFYETVCEKAKADQLIQTLHAVDKDDPYSGHQFSFSLAPEAASGSNFTIQDNK DNTAGILTRKNGYNRHEMSTYLLPVVISDNDYPVQSSTGTVTVRVCACDHHGNMQSC HAEALHP
7	マウスCDH6 ORFのアミノ酸 配列	MRTYRYFLLLFVWGQPYPTFSNPLSKRTSGFPAKRKALELSANSRNELSRKRSWMW NQFFLLEEYTGSDYQYVGKLHSDQDRGDGSLKYILSGDGAGDLFIINENTGDIQATK RLDREKPYIILRAQAVNRRTGRPVEPESEFIKIHINDNEPIFTKDVYTATVPEM ADVGTFFVQVTATDADPTYGNSAKVVYSILQGQPYFSVESETGIKKTALLNMDREN REQYQVVIQAKDMGGQMGGLSGTTTVNITLTDVNDNPPRFPQSTYQFKTPESSPPGT PIGRIKASDADVGENAEIEYSITDGEHEMFVDVITDQETOEGIITVKKLLDFEKKKV YTLKVEASNPHYPRFLYLGPFKDSATVRIVVDDVDEPPVFSKLAYILQIREDAQIN TTIGSVAAQDPDAARNPVKYSVDRHTMDRIFNIDSGNGSIFTSKLLDRETLWHNI TVIATEINNPKQSSRVPLYIKVLDVNDNAPEFAEFYETVCEKAKADQLIQTLRAVD KDDPYSGHQFSFSLAPEAASSNFTIQDNKONTAGILTRKNGYNRHEMSTYLLPVVI SDNDYPVQSSTGTVTVRVCACDHHGNMQSCHAEALIHPTGLSTGALVAILLCIVILL VTVVLFAALRRQRKKEPLISKEDIRDNIVSYNDEGGGEEDTQAFDIGTLRNPEAME DSKSRRDIVPEALFLPRRTPTARDNTDVRDFINQRLKENDTDPTAPPYDSLATYAYE GTGSVADSLSSLESVTTDGDQDYDYLSDWGPFRKKLADMYGGMDSDKDSDS

[0098]

[表1-2]

8	ラットCDH6 ORFのアミノ酸配列	MRTYRYFLLLFVWGQPYPTFSNPLSKRTSGFPAKRRAELSANSRNELSRSKRSMW NQFFLLEETGSDYQYVGKLHSDQDRGDGSLKYILSGDGAGDLFIINENTGDIQATK RLDREEKPVYILRAQAINRRTGRPVEPESEFIKIHNDNEPIFTKDYATVPEM ADVGTFFVQVATDADDDTYGNSAKVVYSILQGQPYFSVESETGIKTALLNMDREN REQYQVVIQAKDMGGQMGGLSGTTTNITLTDVNDNPPRFPQSTYQFKTPESPSPGT PIGRISKADADVGENAEIEYSITDGEHDMFDVITDQETQEGIIITVKLLDFEKKRV YTLKVEASNPHEPRFLYLGPFKDSATVRIIVDDVDEPPVFSKPAYILQIREDAQIN TTIGSVAAQDPDAARNPVKYSVDRHTMDRIFNIDSGNGSIFTSKLLDRETLWHNI TVIATEINNPKQSSRVPLYIKVLDVNDNAPEFAEFYETFVCEKAKADQLIQTLEHA VDKDDPYSGHQFSFSLAPEAASGSNFTIQDNKDNTAGILTRKNGYNRHEMSTYLLPVVI SDNDYPVQSSTGTVTVRVCACDHHGMMQSCHAELIHPTGLSTGALVAILLCIVILL VTVVLFAALRRQRKKEPLIISKEDIRDNIIVSYNDEGGGEEDTQAFDIGTLRNPKPWR QQSRDMVPEALFLPRRTPTARDNTDVRDFISQRLKMNTPPTAPPYDSLATYAYEG TGSVADSLSSLESVTTDGDQDYGYLSDWGPFRKKLADMYGGMDSKDS
9	カニクイザルCDH6 ORFのアミノ酸配列	MRTYRYFLLLFVWGQPYPTLSTPLSKRTSGFPAKRRAELSGNSKELNRSKRSMW NQFFLLEETGSDYQYVGKLHSDQDRGDGSLKYILSGDGAGDLFIINENTGDIQATK RLDREEKPVYILRAQAINRRTGRPVEPESEFIKIHNDNEPIFTKEVYATVPEM SDVGTFFVQVATDADDDTYGNSAKVVYSILQGQPYFSVESETGIKTALLNMDREN REQYQVVIQAKDMGGQMGGLSGTTTNITLTDVNDNPPRFPQSTYQFKTPESPSPGT PIGRISKADADVGENAEIEYSITDGEGLDMFDVITDQETQEGIIITVKLLDFEKKV YTLKVEASNPHEPRFLYLGPFKDSATVRIIVDDVDEPPVFSKLAYILQIREDAQIN TTIGSVTAQDPDAARNPVKYSVDRHTMDRIFNIDSGNGSIFTSKLLDRETLWHNI TVIATEINNPKQSSRVPLYIKVLDVNDNAPEFAEFYETFVCEKAKADQLIQTLEHA VDKDDPYSGHQFSFSLAPEAASGSNFTIQDNKDNTAGILTRKNGYNRHEMSTYLLPVVI SDNDYPVQSSTGTVTVRVCACDHHGMMQSCHAELIHPTGLSTGALVAILLCIVILL VTVVLFAALRRQRKKEPLIISKEDIRDNIIVSYNDEGGGEEDTQAFDIGTLRNPKE ATDNKLRRDIVPEALFLPRRTPTARDNTDVRDFINQRLKENDTPTAPPYDSLATYAYE GTGSVADSLSSLESVTTDGDQDYGYLSDWGPFRKKLADMYGGVDSKDS
10	rG019軽鎖可変領域アミノ酸配列	DIQMTQSPSLLSASVGDVTLNCKASQNIYKNLAWYQQKLGEGPKLLIYDANTLQTG IPSRFSGSGSGSDFTLTISSLQPEDVATYFCQQYYSGWAFGGVTNLELKRA
11	rG019軽鎖可変領域ヌクレオチド配列	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCACTCCTGTCTGCATCTGTGGGAGACAGAGTC ACTCTCAACTGCAAAGCAAGTCAGAATATTTATAAGAACTTAGCCTGGTATCAGCAA AAGCTTGGAGAAGGTCCCAAACTCCTGATTTATGATGCAAACACTTTGCAAACGGGC ATCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGTTCAGATTCACACTACCATCAGC AGCCTGCAGCCTGAAGATGTTGCCACATATTTCTGCCAGCAGTACTATAGCGGGTGG GCGTTCGGTGGAGTCACCAACCTGGAATTGAAACGGGCT
12	rG019 CDRL1	KASQNIYKNLA
13	rG019 CDRL2	DANTLQT
14	rG019 CDRL3	QQYYSGWA

[0099]

[表1-3]

15	rG019重鎖可変領域アミノ酸配列	QVQLQQSGAELVKPGSSVKISCKASGYTFRNFMHWIKQQPGNGLEWIGW1YCGDGE TEYNQKFNGKATLTADRSSSTAYMELSRLTSEDSAVYFCARGVYGGFAGGYDFWGG GVMVTVSS
16	rG019重鎖可変領域ヌクレオチド配列	CAGGTACAGCTGCAGCAATCTGGGGCTGAACTGGTGAAGCCTGGGCCTCAGTGAAA ATTTCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTACCAGGAACCTTATGCACTGGATAAAA CAGCAGCCTGGAAATGGCCTTGAGTGGATTGGGTGGATTTATTGTGGAGATGGTGAG ACAGAGTACAATCAAAAGTTCAATGGGAAGGCAACACTCACTGCCGACAGATCCTCC AGCACAGCCTATATGGAGCTCAGCAGACTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTTT TGTGCAAGAGGGGTTACGGAGGGTTGCCGGGGGCTACTTTGATTTCTGGGGCCAA GGAGTCATGGTCACAGTCTCCTCA
17	rG019 CDRH1	GYTFRNFMH
18	rG019 CDRH2	WIYCGDGETE
19	rG019 CDRH3	GVYGGFAGGYDF
20	rG055軽鎖可変領域アミノ酸配列	DVQMTHTSPSYLAASPGESVSI SCKTSKNISNYLVWYQQKPG EAYKLLIYSGSTLQSG TPSRFSGSGSGTDFTLTIRSLPEPDFGLYFCQQYYEKPF TFGSGTKLEIKRA
21	rG055軽鎖可変領域ヌクレオチド配列	GATGTCCAGATGACCCACTCTCGTCTTATCTTGCTGCGTCTCCTGGAGAAAGTGTT TCCATCAGTTGCAAGACAAGTAAGAACATTAGTAATTATTTAGTCTGGTATCAACAG AAACCTGGGGAAGCATATAAGCTTCTTATCTATTCTGGGTCAACTTTGCAATCTGGA ACTCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGTACAGATTTCACTCTCACTATCAGA AGCCTGGAGCCTGAAGATTTTGGACTCTATTTCTGTCAACAGTATTATGAAAAACCA TTCACGTTCCGGCTCAGGGACGAAGTTGAAATAAAACGGGCT
22	rG055 CDRL1	KTSKNISNYLV
23	rG055 CDRL2	SGSTLQS
24	rG055 CDRL3	QQYYEKPFT
25	rG055重鎖可変領域アミノ酸配列	EVQLQESGPGLV RPSQSLSLSCSVTDYSITSNYGWIRRFPGNKMEWMGYITYSGYT SYNPSLQSRISITRDTSKNQFFLQLNSVTAEDTATYYCARSINHGGSYVVDAWPG ASVTVSS
26	rG055重鎖可変領域ヌクレオチド配列	GAGGTGCAACTTCAGGAGTCAGGACCTGGCCTTGTGAGACCCTCACAGTCACTCTCC CTCTCCTGTTCTGTCAGTGATTACTCCATCACTAGTAATTACTGGGGCTGGATCCGG AGGTTCCCAGGAAATAAAATGGAGTGGATGGGATACATAACCTATAGTGGTTACACT AGCTACAACCCATCTCTCCAAAGTCGAATCTCCATTACTAGAGACACATCGAAGAAT CAGTTCTTCCTGCAGTTGAACTCTGTAAGTCTGAGGACACAGCCACATATTACTGT GCAAGATCGATTAAACCACGGAGGATATAGTTATGTTGTGGATGCCTGGGGTCCGGGA GCTTCAGTCACTGTCTCCTCA
27	rG055 CDRH1	DYSITSNYWG
28	rG055 CDRH2	YITYSGYTS
29	rG055 CDRH3	SINHGGSYVVDA

[0100]

[表1-4]

30	rG056軽鎖可変領域アミノ酸配列	DVQMTQSPSSLAAPGESVSI SCRATKSI GIYLAWYQQKPGKTFKLLI YSGSTLQSGTPSRFSGSGSGTDFTLTIRSLEPEDFGLYFCQQFYENPFTFGSGTKLEIRRA
31	rG056軽鎖可変領域ヌクレオチド配列	GATGTCCAGATGACCCAGTCTCCGTCTTCTTGTGCGTCTCCTGGAGAAAGTGTTTCCATCAGTTGCAGGGCAACTAAGAGCATTGGTATTTATTTAGCCTGGTATCAACAGAAACCTGGGAAACATTTAAGCTTCTTATCTACTCTGGGTCAACTTTGCAATCTGGAACCTCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGTACAGATTTCACTCTCACCATCAGAGCCTGGAGCCTGAAGATTTTGGACTCTATTTCTGTCAACAGTTTATGAAAACCAATTCACGTTCCGCTCAGGGACGAAGTTGAAATAAGACGGGCT
32	rG056 CDRL1	RATKSI GIYLA
33	rG056 CDRL2	SGSTLQS
34	rG056 CDRL3	QQFYENPFT
35	rG056重鎖可変領域アミノ酸配列	EVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVTDYSITTYFWGWI RKFPGNKMEWMGYMSYRGGTSYNPSLKSRI S ITRDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCARCPNYGGHSLVFDYWGGVMVTVSS
36	rG056重鎖可変領域ヌクレオチド配列	GAGGTGCAGCTTCAGGAGTCAGGACCTGGCCTTGTGAAACCTCACAGTCACTCTCCCTCACCTGTTCTGTCACTGATTACTCCATCACTACTTATTTCTGGGGCTGGATCCGGAAGTTCACAGGAAATAAATGGAGTGGATGGGATACATGAGCTACCGTGGTGGCACTTCCTACAACCCATCTCTCAAGAGTCGAATCTCCATTACTAGAGACACATCGAAGAATCAGTTCTTCCTGCAGTTGAAGTCTGTAAGTACTGAGGACACAGCCACATATTACTGTGCAAGATGCCCTAACTACGGAGGGCATTCCCTGTTTTTGATTACTGGGGCCAAGGAGTCATGGTCACAGTGTCTCA
37	rG056 CDRH1	DYSITTYFWG
38	rG056 CDRH2	YMSYRGGTS
39	rG056 CDRH3	CPNYGGHSLVFDY
40	rG061軽鎖可変領域アミノ酸配列	DVQMTQSPSYLAAPGESVSI SCKATKSI SNYLAWYQQKPGEAYKVL I YSGSTLQSGTPSRFSGSGSGTDFTLTIRSLEPEDFGLYSCQQYYEKPLTFGSGTKLEIKRA
41	rG061軽鎖可変領域ヌクレオチド配列	GATGTCCAGATGACCCAGTCTCCGTCTTATCTTGTGCGTCTCCTGGAGAAAGTGTTTCCATCAGTTGCAAGGCAACTAAGAGCATTAGTAATTTATTTAGCCTGGTATCAACAGAAACCTGGGGAAGCATATAAGGTTCTTATCTATTCTGGGTCAACTTTGCAATCTGGAACCTCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGTACAGATTTCACTCTCACCATCAGAGCCTGGAGCCTGAAGATTTTGGACTCTATTCCTGTCAACAGTATTATGAAAAACCGCTCACGTTCCGTTCTGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGGGCT
42	rG061 CDRL1	KATKSI SNYLA
43	rG061 CDRL2	SGSTLQS
44	rG061 CDRL3	QQYYEKPLT

[0101]

[表1-5]

45	rG061重鎖可変領域アミノ酸配列	EVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVTGYSITTYWGWI RKFPGNKMEWMGYISYSGRT SYNPSLKSRMSITRDASKNQFFLQLNSVITDDTATYYCARSPINHGGYWYFDWGP TMVTVSS
46	rG061重鎖可変領域ヌクレオチド配列	GAGGTGCAGCTTCAGGAGTCAGGACCTGGCCTTGTAACCCCTCACAGTCACTCTCC CTCACCTGTTCTGTCACTGGTTACTCCATCACTACTTATTACTGGGGCTGGATCCGG AAGTTCCAGGAAATAAAATGGAGTGGATGGGTACATAAGCTACAGTGGTCGCACT AGTTATAACCCATCTCTCAAAGTCGAATGTCCATTACTAGAGACGCATCGAAGAAT CAGTTCTTCTACAGTTGAAGTCTGTAAGTACTGACGACACAGCCACATATTACTGT GCAAGATCCCCAATTAACACGGAGGGTACTGGTACTTTGACTTCTGGGGCCAGGA ACCATGGTCACCGTGTCTCA
47	rG061 CDRH1	GYSITTYWG
48	rG061 CDRH2	YISYSGRTS
49	rG061 CDRH3	SPINHGGYWYFDF
50	ヒト軽鎖シグナル配列及びヒト κ 鎖定常領域をコードするDNA配列を含むDNA断片	gcctccggactctagagccaccATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTTCATCTCCCTGCT GCTGTGGATCTCCGGCGGTACGGCGATATCGTGATGATTAAACGTACGGTGGCCGC CCCTCCGTGTTTCATCTTCCCCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCCTC CGTGGTGTGCTGCTGAATAACTTCTACCCAGAGAGGCCAAGGTGCAGTGAAGGT GGACAACGCCCTGCAGTCCGGAACTCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAA GGACAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGCAAAGCCGACTACGAGAA GCACAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACAGGGCCTGAGCTCCCCGTCACCAA GAGCTTCAACAGGGGGAGTGTtagggcccgtttaaacggggaggcta

[0102]

[表1-6]

51	ヒト重鎖シグナル配列及びヒトIgG1定常領域をコードするDNA配列を含むDNA断片	gcctccggactctagagccaccATGAAACACCTGTGGTTCTTCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCAGATGGGTGCTGAGCCAGGTGCAATTGTGCAGGCGGTTAGCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCAAGCGTCTTCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCCTGACCGTGAGCTGGAAGTCAAGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGCTGTCTGCAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCCCTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGACCTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGAGCTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATTAATGCCAAGACAAGCCCGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAAGCTCCTCACCGTCTGCACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGCCAGCCCCGGGAACACAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACAGGTGAGCTGAGCTGACCTGCGTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCAACCCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTCTCGCTGTCCCGCAAAAtgagatatcgggcccggtttaaacggggaggcta
52	ch6019軽鎖をコードするDNA配列を含むDNA断片	ccagcctccggactctagagccaccATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTTCATCAGCCTGCTGCTGTGGATCAGCGGCGCCTACGGCGACATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCCTGCTGAGCGCCAGCGTGGGCGATAGAGTGACCCCTGAAGTCAAGGCCAGCCAGAACATCTACAAGAACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAAGCTGGGCGAGGGCCCCAAGCTGCTGATCTACGACGCCAACACCCCTGCAGACCGGCATCCCCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCAGCGGCTCCGACTTCACCCCTGACAATCAGCAGCCTGCAGCCGAGGACGTGGCCACCTACTTTTGGCAGCAGTACTACAGCGGCTGGGCCTTCGGCGGCGTGACCAACCTGGAAGTGAAGAGAGCCGTGGCCGCTCCCTCCGTGTTTCATCTTCCACCTAGCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACAGCCTCTGTGCTGTGCCTGCTGAACAACCTTACCCCCGCGAGGCAAGGTGCAGTGGAAAGGTGGACAATGCCCTGCAGTCTGGCAACAGCCAGGAAAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCCTGACCCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAAGCAAGGTGTACGCTGCGAAGTGACCCACAGGGCCTGTCTAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGTTgagtttaaacggggaggtaact
53	ch6019軽鎖全長アミノ酸配列	MVLQTQVFI SLLWISGAYGDIQMTQSPSLLSASVGDVTLNCKASQNIYKNLAWYQ QKLGEQPKLLIYDANTLQTGIPSRFSGSGSGDFTLTISSLPEDVATYFCQQYYSG WAFGGVTNLELKRAVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC

[0103]

[表1-7]

54	chG019軽鎖全長ヌクレオチド配列	ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTTCATCAGCCTGCTGCTGTGGATCAGCGGCGCCTACGGCGACATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCCTGCTGAGCGCCAGCGTGGGCGATAGAGTGACCCCTGAACGCAAGGCCAGCCAGAACATCTACAAGAACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAAGCTGGGCGAGGGCCCCAAGCTGCTGATCTACGACGCCAACACCCCTGCAGACCGCATCCCCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCAGCGGCTCCGACTTCACCTGACAATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACGTGGCCACCTACTTTTGGCAGCAGTACTACAGCGGCGTGGGCTTCGGCGGCGTGACCAACCTGGAAGTGAAGAGAGCCGTGGCCGCTCCCTCGGTGTTTCATCTTCCACCTAGCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACAGCCTCTGTGCTGTGCTGCTGAACAACCTTACCCCGCGAGGCCAAGGTGAGTGAAGGTGGACAATGCCCTGCAGTCTGGCAACAGCCAGGAAAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCTGCGAAGTGACCCACCAGGGCCTGTCTAGCCCGTGACCAAGAGCTTAACCGGGCGAGTGT
10	chG019軽鎖可変領域アミノ酸配列	DIQMTQSPSLLSASVGDRTLNCKASONIYKNLAWYQQKLGEGPKLLIYDANTLQTGIPSRFSGSGSGSDFLTITSSLPEDVATYFCQQYYSGWAFGGVTNLELKRA
55	chG019軽鎖可変領域ヌクレオチド配列	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCCTGCTGAGCGCCAGCGTGGGCGATAGAGTGACCCCTGAACGCAAGGCCAGCCAGAACATCTACAAGAACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAAGCTGGGCGAGGGCCCCAAGCTGCTGATCTACGACGCCAACCCCTGCAGACCGGCATCCCCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCAGCGGCTCCGACTTCACCTGACAATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACGTGGCCACCTACTTTTGGCAGCAGTACTACAGCGGCTGGGCCTTCGGCGGCGTGACCAACCTGGAAGTGAAGAGAGCC
12	chG019 CDRL1	KASQNIYKNLA
13	chG019 CDRL2	DANTLQT
14	chG019 CDRL3	QQYYSGWA
56	chG019重鎖全長アミノ酸配列	MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLQQSGAELVKPGSSVKISCKASGYTFTRNFMHWIKQQPGNGLEWIGWIYPGDGETEYNGKFNGKATLTADRSSSTAYMELSRLTSEDSAVYFCARGVYGGFAGGYFDWFQGVMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0104]

[表1-8]

57	chG019重鎖全長ヌクレオチド配列	ATGAAACACCTGTGGTTCTTCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCAGATGGGTGCTGAGC CAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGCGCCGAGCTCGTGAAGCCTGGCAGCAGCGTGAAG ATCAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCCGGAACCTCATGCACTGGATCAAG CAGCAGCCCGGCAACGGCTGGAATGGATCGGCTGGATCTATCCCGGCGACGGCGAG ACAGAGTACAACCAAGTTCAACGGCAAGGCCACCCTGACCGCCGACAGAAGCAGC TCCACCGCTACATGGAAGTGAAGCGGCTGACCGAGGAGCAGCGCGGTACTTT TGCGCCAGAGGCGGTACGGCGGCTTCGCTGGCGGCTACTTCGATTTTGGGGCCAG GGCGTGATGGTCACCGTCAGCTCAGCTCCACCAAGGGCCCAAGCGTCTTCCCGCTG GCACCGTCTCCAAGAGCACCTCTGGCGGCACAGCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAG GACTACTTCCCGGAACCGTGACCGTGAGCTGGAAGTCAAGCGCCCTGACCGCGGC GTGCACACCTTCCCGCTGTCTGCAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTG GTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCAC AAGCCGAGCAACCAAGGTGGACAAGAGATTGAGCCCAATCTTGTGACAAAAT CACACATGCCACCCCTGCCAGCACCTGAACCTCTGGGGGACCCCTCAGTCTTCTC TTCCCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTACATGC GTGGTGGTGGAGTGAAGCAGGACCGTGAAGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGAG GGCGTGAGGTGCATAATGCCAAGACAAGCCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAGC TACCGGTGGTCAAGCTCCTACCGTCTGCACCGAGTGGCTGAATGGCAAGGAG TACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCC AAAGCCAAAGGCCAGCCCGGGAACACAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGAG GAGATGACCAAGAACAGGTGAGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGC GACATCGCGGTGGAGTGGGAGCAATGGCCAGCCGAGAACAACTACAAGACCAAC CCTCCCGTGTGGAGTCCGAGGCTCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCAGGTGGAG AAGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG CACAACCACTACACCCAGAAGAGCTCTCCCTGTCTCCCGGCAAA
58	chG019重鎖可変領域アミノ酸配列	QVQLQQSGAELVKPGSSVKISCKASGYTFRNFMHWIKQQPGNGLEWIGWIYPGDGE TEYNQKFNGKATLTADRSSSTAYMELSRLTSEDSAVYFCARGVYGGFAGGYDFWVGQ GVMVTVSS
59	chG019重鎖可変領域ヌクレオチド配列	CAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGCGCCGAGCTCGTGAAGCCTGGCAGCAGCGTGAAG ATCAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCCGGAACCTCATGCACTGGATCAAG CAGCAGCCCGGCAACGGCTGGAATGGATCGGCTGGATCTATCCCGGCGACGGCGAG ACAGAGTACAACCAAGTTCAACGGCAAGGCCACCCTGACCGCCGACAGAAGCAGC TCCACCGCTACATGGAAGTGAAGCGGCTGACCGAGGAGCAGCGCGGTACTTT TGCGCCAGAGGCGGTACGGCGGCTTCGCTGGCGGCTACTTCGATTTTGGGGCCAG GGCGTGATGGTCACCGTCAGCTCA
17	chG019 CDRH1	GYTFRNFMH
60	chG019 CDRH2	WIYPGDGETE
19	chG019 CDRH3	GVYGGFAGGYDF

[0105]

[表1-9]

61	hL02軽鎖全長 アミノ酸配列	MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNIYKNLAWYQ QKPGKAPKLLIYDANTLQTGVPSRFSGSGSGSDFLTISLQPEDFATYFCQQYYSG WAFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC
62	hL02軽鎖全長 ヌクレオチド 配列	ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTTCATCTCCCTGCTGCTGTGGATCTCCGGCGGTAC GGCGACATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGA GTGACCATCACATGCAAGGCCAGCCAGAACATCTACAAGAACCCTGGCCTGGTATCAG CAGAAGCCCGGCAAGGCCCAAGCTGCTGATCTACGACGCCAACCCCTGCAGACC GGCGTGCCCGAGCAGATTTCTGGCAGCGGAGCGGCTCCGACTTCACCCTGACAATC AGCAGCCTGCAGCCGAGGACTTCGCCACCTACTTTTGCAGCAGTACTACAGCGGC TGGGCTTCGGCCAGGGCACCAGGTGGAATCAAGCGTACGGTGGCCGCCCTCC GTGTTTCATCTTCCCCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCTCCGTGGTG TGCTCTGCTGAATAACTTCTACCCAGAGAGGCCAAGGTGCAGTGAAGGTGGACAAC GCCCTGCAGTCCGGGAACCTCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACAGC ACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAAGCCGACTACGAGAAGCACAAG GTGTACGCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCTGAGTCCCCCGTCACCAAGAGCTTC AACAGGGGGGAGTGT
63	hL02軽鎖可変 領域アミノ酸 配列	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNIYKNLAWYQKPGKAPKLLIYDANTLQTG VPSRFSGSGSGSDFLTISLQPEDFATYFCQQYYSGWAFGGGTKVEIKRT
64	hL02軽鎖可変 領域ヌクレオ チド配列	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTG ACCATCACATGCAAGGCCAGCCAGAACATCTACAAGAACCCTGGCCTGGTATCAGCAG AAGCCCGGCAAGGCCCAAGCTGCTGATCTACGACGCCAACCCCTGCAGACCGGC GTGCCCGAGCAGATTTCTGGCAGCGGAGCGGCTCCGACTTCACCCTGACAATCAGC AGCCTGCAGCCGAGGACTTCGCCACCTACTTTTGCAGCAGTACTACAGCGGCTGG GCCTTCGGCCAGGGCACCAGGTGGAATCAAGCGTAGC
65	hL03軽鎖全長 アミノ酸配列	MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNIYKNLAWYQ QKLGEQPKLLIYDANTLQTGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYFCQQYYSG WAFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC

[0106]

[表1-10]

66	hL03軽鎖全長 ヌクレオチド 配列	ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTTCATCTCCCTGCTGCTGTGGATCTCCGGCGCGTAC GGCGACATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGA GTGACCATCACATGCAAGGCCAGCCAGAACATCTACAAGAACCTGGCCTGGTATCAG CAGAAGCTGGGCGAGGGCCCCAAGCTGCTGATCTACGACGCCAACCCCTGCAGACC GGCGTGCCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGACAATC AGCAGCCTGCAGCCCAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACTACAGCGGC TGGGCCTTTGGCCAGGGCACCAAGGTGGAATCAAGCGTACGGTGGCCGCCCTCC GTGTTTCATCTCCCCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCTCCGTGGTG TGCCTGCTGAATAACTTCTACCCAGAGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAAC GCCCTGCAGTCCGGGAATCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACAGC ACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGCAAGCCGACTACGAGAAGCACAAAG GTGTACGCCTGCCAGGTGACCCACAGGGCTGAGCTCCCCGTACCAAGAGCTTC AACAGGGGGAGTGT
67	hL03軽鎖可変 領域アミノ酸 配列	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQNIYKNLAWYQQKLGEGPKLLIYDANTLTG VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYSGWAFGGTKVEIKRT
68	hL03軽鎖可変 領域ヌクレオ チド配列	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTG ACCATCACATGCAAGGCCAGCCAGAACATCTACAAGAACCTGGCCTGGTATCAGCAG AAGCTGGGCGAGGGCCCCAAGCTGCTGATCTACGACGCCAACCCCTGCAGACCGGC GTGCCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGACAATCAGC AGCCTGCAGCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACTACAGCGGCTGG GCCTTTGGCCAGGGCACCAAGGTGGAATCAAGCGTACG
69	hH01重鎖全長 アミノ酸配列	MKHLWFFLLVAAPRWVLSEVLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRNFMHWVR QAPGGGLEWMGW1YPGDGETEYAQKFQGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYY CARGVYGGFAGGYFDWGGTLVTYSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSYMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK

[0107]

[表1-11]

70	hH01重鎖全長 ヌクレオチド 配列	ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTGCTGAGC GAAGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCAGGCGCCAGCGTGAAG GTGTCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTTACCCGGAACCTCATGCACTGGGTGCGC CAGGCTCCAGGCCAGGACTGGAATGGATGGGCTGGATCTATCCCGCGACGGCGAG ACAGAGTACGCCAGAAAATCCAGGGCAGAGTGACCATCACCGCCGACACCAGCAC TCCACCGCTACATGGAAGTGAAGCAGCTGCGGAGCGAGGACACCGCGTGTACTAT TGTGCCAGAGGCGTGTACGGCGGCTTCGCTGGCGGCTACTTCGATTTTGGGGCCAG GGCACCTCGTGACCGTCAGCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCAAGCGTCTCCCGCTG GCACCCCTCTCCAAGAGCACCTCTGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAG GACTACTTCCCGGAACCGTGACCGTGAGCTGGAAGTCAAGCGCCCTGACCAGCGGC GTGCACACCTTCCCGCTGTCTGCAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTG GTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCAC AAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGATTGAGCCCAATCTTGTGACAAACT CACACATGCCACCGCTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGACCGCTCAGTCTTCCTC TTCCCCCAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCGCTGAGGTCACATGC GTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCGTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGAC GGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAG TACCGGGTGGTCAGCGTCTCACCCTGCTGCACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAG TACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCC AAAGCCAAAGGCCAGCCCGGGAACACAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGAG GAGATGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGC GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCCGAGAACAACACAAGACCA CCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGAC AAGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTCTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG CACAACCACTACACCCAGAAGCGCTCTCCCTGTCTCCCGCAAA
71	hH01重鎖可変 領域アミノ酸 配列	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTRNFMHWVRQAPGQGLEWMGWITYPDGE TEYAKFQGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGVYGGFAGGYFDWVGQ GTLVTVSS
72	hH01重鎖可変 領域ヌクレオ チド配列	GAAGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCAGGCGCCAGCGTGAAG GTGTCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTTACCCGGAACCTCATGCACTGGGTGCGC CAGGCTCCAGGCCAGGACTGGAATGGATGGGCTGGATCTATCCCGCGACGGCGAG ACAGAGTACGCCAGAAAATCCAGGGCAGAGTGACCATCACCGCCGACACCAGCAC TCCACCGCTACATGGAAGTGAAGCAGCTGCGGAGCGAGGACACCGCGTGTACTAT TGTGCCAGAGGCGTGTACGGCGGCTTCGCTGGCGGCTACTTCGATTTTGGGGCCAG GGCACCTCGTGACCGTCAGCTCA

[0108]

[表1-12]

73	hH02重鎖全長 アミノ酸配列	MKHLWFFLLLVAAPRWVLSEVLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTRNFMHWVR QAPGGGLEWMGW1YPGDGETEYNQKFQGRVTITADRSTSTAYMELSSLRSEDVAVYF CARGVYGGFAGGYDFWGGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIGNVNH KPSNTKVKDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFGSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
74	hH02重鎖全長 ヌクレオチド 配列	ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTGCTGAGC GAAGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCAGGCGCCAGCGTGAAG GTGCTCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTTACCCGGAACCTCATGCACTGGGTGCGC CAGGCTCCAGGCCAGGGAAGTGAATGGATGGGCTGGATCTATCCGCGCGACGGCGAG ACAGAGTACAACAGAAATCCAGGGCAGAGTGACCATCACCGCCGACAGAAAGCACC AGCACCGCTACATGGAAGTGAAGCAGCTGCGGAGCGAGGATACCGCGCTGACTTCT TGTGCCAGAGCGGTGACGGCGGCTTCGCTGGCGGCTACTTCGATTTTTGGGGCCAG GGCACCTCGTGACCGTCAAGCTCAGCTCCACCAAGGGCCCAAGCGTCTTCCCGCTG GCACCTCTCTCAAGAGCAGCTCTGGCGGCACAGCGCCCTGGGTGCCTGGTCAAG GACTACTTCCCGGAACCGGTGACCGTGAGCTGGAAGTCAAGCGCCCTGACCAAGCGG GTGCACACCTTCCCGCTGCTCTGCAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTG GTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCAC AAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCAAATCTTGTGACAAAACCT CACACATGCCACCTGCCAGACCTGAACTCCTGGGGGACCCCTCAGTCTTCTCTC TTCCCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGC GTGGTGGTGAGCGTGAGCCAGCAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGAG GGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACG TACCGGTGGTCAGCGTCTCACCCTGCTGCACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAG TACAAGTCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCC AAAGCCAAAGGCCAGCCCCGGGAACACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGGAG GAGATGACCAAGAACAGGTGACCTGACCTGCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGC GACATCGCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCCGAGAACTACAAGACCACC CCTCCCGTGTGGACTCCGAGCGGCTCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGAC AAGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG CACAACCACTACACCGAGAAGAGCCTGCTGCTGTCTCCCGGCAAA
75	hH02重鎖可変 領域アミノ酸 配列	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTRNFMHWVRQAPGGGLEWMGW1YPGDGE TEYNQKFQGRVTITADRSTSTAYMELSSLRSEDVAVYFCARGVYGGFAGGYDFWGG GTLTVSS

[0109]

[表1-13]

76	hH02重鎖可変領域ヌクレオチド配列	GAAGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCAGGCCAGCGTGAAGGTGTCTGCAAGGCCAGCGGTACACCTTTACCGGAACCTCATGCACTGGGTGCGCAGGGCTCCAGGCCAGGGACTGGAATGGATGGGCTGGATCTATCCCGCGCAGCGCGAGACAGAGTACAACCAGAAATTCAGGGCAGAGTGACCATACCGCCGACAGAAAGCACCAGCACCGCTACATGGAAGTGAAGCAGCTGCGGAGCGAGGATACCGCGGTGACTTCTGTGCCAGAGCGGTGTACGGCGGCTTCGCTGGCGGCTACTTCGATTTTGGGGCCAGGGCACCTCGTGACCGTCAGCTCA
77	hH04重鎖全長アミノ酸配列	MKHLWFFLLVAAPRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRNFMHWIRQAPGGGLEWMGIYPGDGETEYAKFGGRVTLTADRSTSTAYMELSSLRSEDATVYYCARGVYGGFAGGYDFWGGTLVTYSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVTVTPSSSLGTQTYICNVNKKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
78	hH04重鎖全長ヌクレオチド配列	ATGAAACACCTGTGGTTCTTCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTGCTGAGCCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCAGGCCAGCGTGAAGGTGTCTGCAAGGCCAGCGGTACACCTTTACCGGAACCTCATGCACTGGATCCGGCAGGCCCTGGACAGGGCTGGAATGGATGGGCTGGATCTATCCCGCGCAGCGCGAGACAGAGTACGCCAGAAATTCAGGGCAGAGTGACCTGACCGCCGACAGAAAGCACCAGCACCGCTACATGGAAGTGAAGCAGCTGCGGAGCGAGGACACCGCGGTGACTATGTGCCAGAGCGGTGTACGGCGGCTTCGCTGGCGGCTACTTCGATTTTGGGGCCAGGGCACCTCGTGACCGTCAGCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCAAGCGTCTTCCCCTGACACCTCTCCAAGAGCACCTCTGGCGGCACAGCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCCTGACCGTGAGCTGGAAGTCAAGCGCCCTGACCAAGCGGTGTCACACCTTCCCGCTGTCTGCAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGTCAGCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCCCTGCCAGCACCTGAAGTCTGGGGGACCCCTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAGCCCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGCCAGCCCCGGGAACCAAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACGCTGCTGCTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCGGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCAACCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCTTCTCTCTACAGCAAGCTACCGTGGACAAAGAGAGGTGGCAGAGGGCAACGTCTTCTATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCTCTCCCTGTCTCCCGGCAAA

[0110]

[表1-14]

79	hH04重鎖可変 領域アミノ酸 配列	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFRNFMHWIRQAPGGGLEWMGW1YPGDGE TEYAOKFQGRVLTADRSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGVYGGFAGGYDFWGG GTLVTVSS
80	hH04重鎖可変 領域ヌクレオ チド配列	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCAGGCGCCAGCGTGAAG GTGTCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTTACCGGAACCTCATGCACTGGATCCGG CAGGCCCTGGACAGGGCTGGAATGGATGGGCTGGATCTATCCGGCGACGGCGAG ACAGAGTACGCCAGAAATTCAGGGCAGAGTGACCTGACCGCCGACAGAAAGCACC AGCACCGCTACATGGAAGTGAAGCAGCTGCGGAGCGAGGACACCGCGTGTACTAT TGTGCCAGAGCGGTACGGCGGCTTCGCTGGCGGCTACTTCGATTTTGGGGCCAG GGCACCTCGTGACCGTCAGCTCA
81	NOV0712軽鎖全 長アミノ酸配 列	MVLQTQVFIISLLWISGAYGDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQ QKPGKAPKLLIYAVSTLQSGVPSRFSGSGSGDTFTLTISLQPEDFATYYCQQSGTF PPTTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC
82	NOV0712軽鎖全 長ヌクレオチ ド配列	ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTTCATCTCCCTGCTGCTGTGGATCTCCGGCGGTAC GGCGACATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGA GTGACCATCACCTGTAGAGCCAGCCAGAGCATCAGCAGTACCTGAAGTGGTATCAG CAGAAGCCCGGCAAGGCCCAAACTGCTGATCTAGCGCGTGTCCACACTGCAGAGC GGCGTGCCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTTCACCTGACAATC AGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGTGACAGTCCGGCACCTTC CCCCCACCACATTTGGCCAGGGCACCAAGGTGGAATCAAGCGTACGGTGGCGGCC CCCTCGTGTTTCATCTCCCCCTCCGACGAGCAGTGAAGTCCGGCACCGCTCC GTGGTGTGCTGCTGAATAACTTCTACCCAGAGAGGCCAAGGTGAGTGAAGGTG GACAACGCCCTGCAGTCCGGGAAGTCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAG GACAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCTGAGCAAGCCGACTACGAGAAG CACAAGGTGTACGCTGCGAGGTGACCCACAGGGCTGAGTCCCCCGTACCAAG AGCTTCAACAGGGGGAGTGT
83	NOV0712重鎖全 長アミノ酸配 列	MKHLWFFLLVAAPRWVLSQVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHGMHWVR QAPGKGLEWVSVISGSGSNTGYADSVKGRFTISRDNSKNTLYQMNSLRADTAVYY CARQWGSYAFDSWGGTLVTYSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAAGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSYMHEALHNHY TQKSLSLSPGK

[0111]

[表1-15]

84	NOV0712重鎖全長ヌクレオチド配列	ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCAGATGGGTGCTGAGC CAGGTGCAGCTGCTGGAATCTGGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCTCTCTGAGA CTGTCTTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCCACGGAATGCACTGGGTGCGC CAGGCCCTGGAAGGGACTGGAATGGGTGTCCGTGATCAGCGGCAGCGGCTCCAAT ACCGGCTACGCCGATAGCGTGAAGGGCCGGTTACCATCAGCCGGGACAACAGCAAG AACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGACACCGCGTGTACTAT TGTGCCAGACAGTGGGGCAGCTACGCCTTCGATTCTTGGGGCCAGGGCACCCTCGTG ACCGTCAGCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCAAGCGTCTCCCGCTGGCACCTCTCTCC AAGAGCACCTTGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCC GAACCCGTGACCGTGAGCTGGAAGTCAAGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTC CCCGTGTCTGCAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCC TCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAAGGTGAATCACAAGCCAGCAAC ACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAATCTTGTGACAAAACACACATGCCCA CCCTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGACCCCTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAA CCCAAGGACACCCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGAC GTGAGCCGGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG CATAATGCCAAGACAAAGCCCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGT AGCGTCTCACCCTCCTGCACCGAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAG GTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGC CAGCCCCGGGAACACAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGAGGAGATGACCAAG AACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTG GAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCGAGAACAACTACAAGACACCCCTCCCGTGTG GACTCCGACGGCTCCTTCTCTCTACAGCAAGCTCAGCGTGACAAGAGCAGGTGG CAGCAGGGCAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTAC ACCCAGAAGAGCCTCTCCTGTCTCCGGGAAA
----	---------------------	--

[0112] (本明細書中、表1-1～表1-15を表1と総称する場合がある。)

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

[0113] このようなヒト抗体産生マウスは、具体的には、内在性免疫グロブリン重鎖及び軽鎖の遺伝子座が破壊され、代わりに酵母人工染色体 (Yeast artificial chromosome, YAC) ベクター等を介してヒト免疫グロブリン重鎖及び軽鎖の遺伝子座が導入された遺伝子組み換え動物として、ノックアウト動物及びトランスジェニック動物の作製及びこれらの動物同士を掛け合わせることによって作り出すことができる。

[0114] また、遺伝子組換え技術によって、そのようなヒト抗体の重鎖及び軽鎖の各々をコードする cDNA、好ましくは該 cDNA を含むベクターによって真核細胞を形質転換し、遺伝子組換えヒトモノクローナル抗体を産生する形質転換細胞を培養することによって、この抗体を培養上清中から得ることもできる。

[0115] ここで、宿主としては例えば真核細胞、好ましくは CHO 細胞、リンパ球やミエローマ等の哺乳動物細胞を用いることができる。

[0116] また、ヒト抗体ライブラリーより選別したファージディスプレイ由来のヒト抗体を取得する方法 (Wormstone, I. M. et. al, Investigative Ophthalmology & Visual Science. (2002) 43 (7), p. 2301-2308; Carmen, S. et. al., Briefings in Functional Genomics and Proteomics (2002), 1 (2), p. 189-203; Siriwardena, D. et. al., Ophthalmology (2002) 109 (3), p. 427-431 等参照。) も知られている。

[0117] 例えば、ヒト抗体の可変領域を一本鎖抗体 (scFv) としてファージ表面に発現させて、抗原に結合するファージを選択するファージディスプレイ法 (Nature Biotechnology (2005), 23, (9), p. 1105-1116) を用いることができる。

[0118] 抗原に結合することで選択されたファージの遺伝子を解析することによって、抗原に結合するヒト抗体の可変領域をコードする DNA 配列を決定する

ことができる。

[0119] 抗原に結合する s c F v の DNA 配列が明らかになれば、当該配列を有する発現ベクターを作製し、適当な宿主に導入して発現させることによってヒト抗体を取得することができる（国際公開第 92/01047 号、同 92/20791 号、同 93/06213 号、同 93/11236 号、同 93/19172 号、同 95/01438 号、同 95/15388 号、Ann u. R e v. I m m u n o l (1994) 12, p. 433-455、Nature Biotechnology (2005) 23 (9), p. 1105-1116)。

[0120] 新たに作製されたヒト抗体が、本明細書に記載のラット抗ヒト CDH6 抗体、キメラ抗ヒト CDH6 抗体又はヒト化抗ヒト CDH6 抗体（例えば、r G O 1 9 抗体、r G O 5 5 抗体、r G O 5 6 抗体、r G O 6 1 抗体、c h G O 1 9 抗体、H O 1 L O 2 抗体、H O 2 L O 2 抗体、H O 2 L O 3 抗体又は H O 4 L O 2 抗体）のいずれか 1 つが結合する部分ペプチド又は部分立体構造に結合すれば、該ヒト抗体が当該ラット抗ヒト CDH6 抗体、キメラ抗ヒト CDH6 抗体又はヒト化抗ヒト CDH6 抗体と同一のエピトープに結合すると判定することができる。あるいは、本明細書に記載のラット抗ヒト CDH6 抗体、キメラ抗ヒト CDH6 抗体又はヒト化抗ヒト CDH6 抗体（例えば、r G O 1 9 抗体、r G O 5 5 抗体、r G O 5 6 抗体、r G O 6 1 抗体、c h G O 1 9 抗体、H O 1 L O 2 抗体、H O 2 L O 2 抗体、H O 2 L O 3 抗体又は H O 4 L O 2 抗体）の CDH6 に対する結合に対して該ヒト抗体が競合する（例えば、該ヒト抗体が、r G O 1 9 抗体、r G O 5 5 抗体、r G O 5 6 抗体、r G O 6 1 抗体、c h G O 1 9 抗体、H O 1 L O 2 抗体、H O 2 L O 2 抗体、H O 2 L O 3 抗体又は H O 4 L O 2 抗体と CDH6、好ましくは、CDH6 の EC3 への結合を妨げる）ことを確認することによって、具体的なエピトープの配列又は構造が決定されていなくても、該ヒト抗体が本明細書に記載のラット抗ヒト CDH6 抗体、キメラ抗ヒト CDH6 抗体又はヒト化抗ヒト CDH6 抗体と同一のエピトープに結合すると判定することが

できる。本明細書において、当該判定方法の少なくともいずれか一方の方法により「同一のエピトープに結合する」と判定された場合、新たに作製されたヒト抗体が、本明細書に記載のラット抗ヒトCDH6抗体、キメラ抗ヒトCDH6抗体又はヒト化抗ヒトCDH6抗体と「同一のエピトープに結合する」といえる。エピトープが同一であることが確認された場合、該ヒト抗体がラット抗ヒトCDH6抗体、キメラ抗ヒトCDH6抗体又はヒト化抗ヒトCDH6抗体（例えば、rG019抗体、rG055抗体、rG056抗体、rG061抗体、chG019抗体、H01L02抗体、H02L02抗体、H02L03抗体又はH04L02抗体）と同等の生物活性を有していることが期待される。

[0121] 以上の方法によって得られたキメラ抗体、ヒト化抗体、又はヒト抗体は、公知の方法等によって抗原に対する結合性を評価し、好適な抗体を選抜することができる。

[0122] 抗体の性質を比較する際の別の指標の一例としては、抗体の安定性を挙げることができる。示差走査カロリメトリー（DSC）は、蛋白の相対的構造安定性のよい指標となる熱変性中点（ T_m ）を素早く、また正確に測定することができる装置である。DSCを用いて T_m 値を測定し、その値を比較することによって、熱安定性の違いを比較することができる。抗体の保存安定性は、抗体の熱安定性とある程度の相関を示すことが知られており（Lor i Burton, et. al., Pharmaceutical Development and Technology (2007) 12, p. 265-273）、熱安定性を指標に、好適な抗体を選抜することができる。抗体を選抜するための他の指標としては、適切な宿主細胞における収量が高いこと、及び水溶液中での凝集性が低いことを挙げることができる。例えば収量の最も高い抗体が最も高い熱安定性を示すとは限らないので、以上に述べた指標に基づいて総合的に判断して、ヒトへの投与に最も適した抗体を選抜する必要がある。

[0123] 本発明の抗体には抗体の修飾体も含まれる。当該修飾体とは、本発明の抗

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

[0124] また、本発明の抗体に結合している糖鎖修飾を調節すること（グリコシル化、脱フコース化等）によって、抗体依存性細胞傷害活性を増強することが可能である。抗体の糖鎖修飾の調節技術としては、国際公開第1999/54342号、同2000/61739号、同2002/31140号等が知られているが、これらに限定されるものではない。本発明の抗体には当該糖鎖修飾を調節された抗体も含まれる。

[0125] 抗体遺伝子を一旦単離した後、適当な宿主に導入して抗体を作製する場合には、適当な宿主と発現ベクターの組み合わせを使用することができる。抗体遺伝子の具体例としては、本明細書に記載された抗体の重鎖配列をコードする遺伝子、及び軽鎖配列をコードする遺伝子を組み合わせたものを挙げるることができる。宿主細胞を形質転換する際には、重鎖配列遺伝子と軽鎖配列遺伝子は、同一の発現ベクターに挿入されていることが可能であり、又別々の発現ベクターに挿入されていることも可能である。

[0126] 真核細胞を宿主として使用する場合、動物細胞、植物細胞、真核微生物を用いることができる。特に動物細胞としては、哺乳類細胞、例えば、サルの細胞であるCOS細胞（Gluzman, Y. Cell (1981) 23,

p. 175-182、ATCC CRL-1650)、マウス線維芽細胞NIH3T3(ATCC No. CRL-1658)やチャイニーズ・ハムスター卵巣細胞(CHO細胞、ATCC CCL-61)のジヒドロ葉酸還元酵素欠損株(Urlaub, G. and Chasin, L. A. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (1980) 77, p. 4126-4220)、FreeStyle 293F細胞(Invitrogen社)を挙げることができる。

[0127] 原核細胞を使用する場合は、例えば、大腸菌、枯草菌を挙げることができる。

[0128] これらの細胞に目的とする抗体遺伝子を形質転換によって導入し、形質転換された細胞を*in vitro*で培養することによって抗体が得られる。当該培養においては抗体の配列によって収量が異なる場合があり、同等な結合活性を持つ抗体の中から収量を指標に医薬としての生産が容易なものを選別することが可能である。よって、本発明の抗体には、上記形質転換された宿主細胞を培養する工程、及び当該工程で得られた培養物から目的の抗体又は当該抗体の機能性断片を採取する工程を含むことを特徴とする当該抗体の製造方法によって得られる抗体も含まれる。

[0129] なお、哺乳類培養細胞で生産される抗体の重鎖のカルボキシル末端のリシン残基が欠失することが知られており(Journal of Chromatography A, 705:129-134(1995))、また、同じく重鎖カルボキシル末端のグリシン、リシンの2アミノ酸残基が欠失し、新たにカルボキシル末端に位置するプロリン残基がアミド化されることが知られている(Analytical Biochemistry, 360:75-83(2007))。しかし、これらの重鎖配列の欠失及び修飾は、抗体の抗原結合能及びエフェクター機能(補体の活性化や抗体依存性細胞傷害作用等)には影響を及ぼさない。従って、本発明に係る抗体には、当該修飾を受けた抗体及び当該抗体の機能性断片も含まれ、重鎖カルボキシル末端において1又は2つのアミノ酸が欠失した欠失体、及びアミド化された当

該欠失体（例えば、カルボキシル末端部位のプロリン残基がアミド化された重鎖）等も包含される。但し、抗原結合能及びエフェクター機能が保たれている限り、本発明に係る抗体の重鎖のカルボキシル末端の欠失体は上記の種類に限定されない。本発明に係る抗体を構成する2本の重鎖は、完全長及び上記の欠失体からなる群から選択される重鎖のいずれか一種であってもよいし、いずれか二種を組み合わせたものであってもよい。各欠失体の量比は本発明に係る抗体を産生する哺乳類培養細胞の種類及び培養条件に影響を受け得るが、本発明に係る抗体の主成分としては2本の重鎖の双方でカルボキシル末端の1つのアミノ酸残基が欠失している場合を挙げることができる。

[0130] 本発明の抗体のアイソタイプとしては、例えばIgG（IgG1、IgG2、IgG3、IgG4）等を挙げることができるが、好ましくはIgG1又はIgG4を挙げることができる。

[0131] 抗体の生物活性としては、一般的には抗原結合活性、抗原と結合することによって該抗原を発現する細胞に内在化する活性、抗原の活性を中和する活性、抗原の活性を増強する活性、抗体依存性細胞傷害（ADCC）活性、補体依存性細胞傷害（CDC）活性及び抗体依存性細胞媒介食作用（ADCP）を挙げることができるが、本発明に係る抗体が有する機能は、CDH6に対する結合活性であり、好ましくはCDH6と結合することによってCDH6発現細胞に内在化する活性である。さらに、本発明の抗体は、細胞内在化活性に加えて、ADCC活性、CDC活性及び／又はADCP活性を併せ持っても良い。

[0132] 得られた抗体は、均一にまで精製することができる。抗体の分離、精製は通常のタンパク質で使用されている分離、精製方法を使用すればよい。例えばカラムクロマトグラフィー、フィルター濾過、限外濾過、塩析、透析、調製用ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動等を適宜選択、組み合わせれば、抗体を分離、精製することができる（Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Ma

nual, Daniel R. Marshak et al. eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996); Antibodies: A Laboratory Manual, Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)) が、これらに限定されるものではない。

[0133] クロマトグラフィーとしては、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等を挙げることができる。

[0134] これらのクロマトグラフィーは、HPLCやFPLC等の液体クロマトグラフィーを用いて行うことができる。

[0135] アフィニティークロマトグラフィーに用いるカラムとしては、プロテインAカラム、プロテインGカラムを挙げることができる。例えばプロテインAカラムを用いたカラムとして、Hyper D, POROS, Sepharose F. F. (ファルマシア)等を挙げることができる。

[0136] また抗原を固定化した担体を用いて、抗原への結合性を利用して抗体を精製することも可能である。

[0137] 3. 抗CDH6抗体-薬物コンジュゲート

(1) 薬物

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

物質等を挙げることができる。

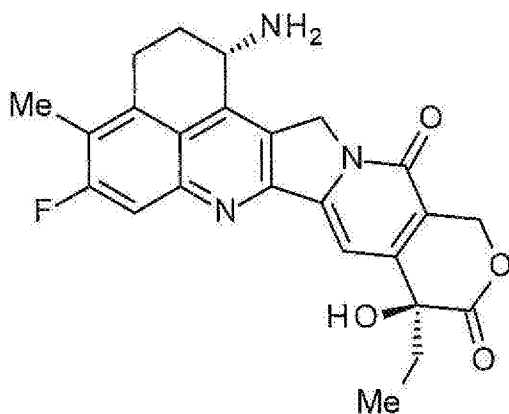
[0138] (1) - 1 抗腫瘍化合物

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

[0139] 上記「2. 抗CDH6抗体の製造」にて取得された抗CDH6抗体はリンカー構造部分を介して抗腫瘍性化合物を結合させることによって、抗CDH6抗体-薬物コンジュゲートとすることができる。

[0140] 本発明で使用される抗腫瘍性化合物の一つの例として、カンプトテシン誘導体であるエキサテカン（(1S, 9S) - 1 - アミノ - 9 - エチル - 5 - フルオロ - 2, 3 - ジヒドロ - 9 - ヒドロキシ - 4 - メチル - 1H, 12H - ベンゾ[d,e]ピラノ[3', 4' : 6, 7]インドリジノ[1, 2-b]キノリン - 10, 13(9H, 15H) - ジオン；次式：）

[0141] [化5]



[0142] を好適に使用することができる。同化合物は、例えば、米国特許公開公報U

S 2 0 1 6 / 0 2 9 7 8 9 0 号に記載の方法やその他の公知の方法で容易に取得でき、1 位のアミノ基をリンカー構造への結合部位として好適に使用することができる。また、エキサテカン[®]はリンカーの一部が結合した状態で腫瘍細胞内で遊離される場合もあるが、このような状態でも優れた抗腫瘍効果が発揮される化合物である。

[0143] エキサテカン[®]はカンプトテシン構造を有するので、酸性水性媒体中（例えば pH 3 程度）ではラクトン環が形成された構造（閉環体）に平衡が偏り、一方、塩基性水性媒体中（例えば pH 10 程度）ではラクトン環が開環した構造（開環体）に平衡が偏ることが知られている。このような閉環構造及び開環構造に対応するエキサテカン[®]残基を導入した薬物コンジュゲートであっても同等の抗腫瘍効果が期待され、いずれのものも本発明の範囲に包含されることはいうまでもない。

[0144] 他の抗腫瘍性化合物として例えば、文献（Pharmacological Reviews, 68, p3-19, 2016）記載の抗腫瘍化合物を挙げることができ、その一例として、ドキソルビシン（Doxorubicin）、カルケマイシン（Calicheamicin）、ドラスタチン（Dorastatin）10、モノメチルアウリスタチン E（MMAE）、モノメチルアウリスタチン F（MMAF）等のアウリスタチン類（Auristatins）、DM1、DM4 等のメイタンシノイド類（Maytansinoids）、ピロロベンゾジアゼピン（Pyrrolobenzodiazepine）二量体の SG2000（SJG-136）、カンプトテシンの誘導体である SN-38、CC-1065 等のデュオカルマイシン類（Duocarmycins）、アマニチン（Amanitin）、ダウノルビシン、マイトマイシン C、ブレオマイシン、シクロシチジン、ビンクリスチン、ビンブラスチン、メトトレキサート、白金系抗腫瘍剤（シスプラチン若しくはその誘導体）、タキソール若しくはその誘導体等を挙げることができる。

[0145] 抗体-薬物コンジュゲートにおいて、抗体 1 分子への薬物の結合数は、そ

の有効性、安全性に影響する重要因子である。抗体－薬物コンジュゲートの製造は、薬物の結合数が一定の数となるよう、反応させる原料・試薬の使用量等の反応条件を規定して実施されるが、低分子化合物の化学反応とは異なり、異なる数の薬物が結合した混合物として得られるのが通常である。抗体 1 分子への薬物の結合数は平均値、すなわち、平均薬物結合数として特定され、表記される。本発明でも原則として断りのない限り、すなわち、異なる薬物結合数をもつ抗体－薬物コンジュゲート混合物に含まれる特定の薬物結合数をもつ抗体－薬物コンジュゲートを示す場合を除き、薬物の結合数は平均値を意味する。抗体分子へのエキサテカンの結合数はコントロール可能であり、1 抗体あたりの薬物平均結合数として、1～10 個程度のエキサテカン結合させることができるが、好ましくは 2～8 個、3～8 個、4～8 個、5～8 個、6～8 個、7～8 個であり、より好ましくは 5～8 個であり、更に好ましくは 7～8 個であり、更により好ましくは 8 個である。なお、当業者であれば本願の実施例の記載から抗体に必要な数の薬物を結合させる反応を設計することができ、エキサテカンの結合数をコントロールした抗体－薬物コンジュゲートを取得することができる。

[0146] (2) リンカー構造

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

[0147] 本願の抗体－薬物コンジュゲートにおいて、抗 CDH6 抗体と薬物とを結合するリンカー構造は、抗体－薬物コンジュゲートとして用いることができる限りにおいて特に制限されず、使用目的に応じて適宜選択して用いることもできる。リンカー構造の一例としては、公知文献 (Pharmacol Rev 68:3-19, January 2016、Protein Cell DOI 10.1007/s13238-016-0323-0 等) に記載のリンカーを挙げることができ、更に具体的な例としては、VC (バリン－シトルリン: valine-citrulline)、MC (マレインアミドカプロイル: maleimidocaproyl)、SMCC (

スクシニミジル 4- (N-マレイミドメチル) シクロヘキサン-1-カルボキシレート: succinimidyl 4- (N-maleimido methyl) cyclohexane-1-carboxylate)、SPP (N-スクシニミジル 4- (2-ピリジルジチオ) ペンタン酸: N-succinimidyl 4- (2-pyridyldithio) pentanoate、SS (ジスルフィド: disulfide)、SPDB (N-スクシニミジル 4- (2-ピリジルジチオ) ブチレート) N-succinimidyl 4- (2-pyridyldithio) butyrate、SS/ヒドラゾン、ヒドラゾン、カルボネートを挙げることができる。

[0148] 他の一例としては、例えば、米国特許公開公報US2016/0297890に記載のリンカー構造（一例として、段落[0260]～[0289]に記載のもの）を挙げることができ、以下の構造のものを好適に使用することができる。なお以下に示す構造の左端が抗体との結合部位であり、右端が薬物との結合部位である。また、下記のリンカー構造中のGGFGは、グリシン-グリシン-フェニルアラニン-グリシン (GGFG) からなるペプチド結合でつながっているアミノ酸配列を示す。

— (Succinimid-3-yl-N) —CH₂CH₂—C(=O)—GGFG—NH—CH₂CH₂CH₂—C(=O)—、
— (Succinimid-3-yl-N) —CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂—C(=O)—GGFG—NH—CH₂CH₂CH₂—C(=O)—、
— (Succinimid-3-yl-N) —CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂—C(=O)—GGFG—NH—CH₂—O—CH₂—C(=O)—、
— (Succinimid-3-yl-N) —CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂—C(=O)—GGFG—NH—CH₂CH₂—O—CH₂—C(=O)—、
— (Succinimid-3-yl-N) —CH₂CH₂—C(=O)—NH—CH₂CH₂O—CH₂CH₂O—CH₂CH₂—C(=O)—GGFG—NH—CH₂CH₂CH₂—C(=O)—、

$-(\text{Succinimid-3-yl-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ 。

[0149] より好ましくは、次のものを挙げることができる。

$-(\text{Succinimid-3-yl-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ 、
 $-(\text{Succinimid-3-yl-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ 、
 $-(\text{Succinimid-3-yl-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ 。

さらにより好ましくは、

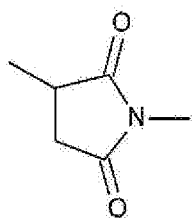
$-(\text{Succinimid-3-yl-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ 、
 $-(\text{Succinimid-3-yl-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ 。

を挙げることができる。

[0150] 抗体は $-(\text{Succinimid-3-yl-N})$ の末端、(例えば、『 $-(\text{Succinimid-3-yl-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ 』においては、 $(-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-)$ が結合するのとは反対側の末端(左末端))で結合し、抗腫瘍性化合物は $-(\text{Succinimid-3-yl-N})$ とは反対側の末端(上記例では右末端の、 $\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ のカルボニル基で結合する。『 $-(\text{Succinimid-3-yl-N})-$ 』は、次式：

[0151]

[化6]



[0152] で示される構造を有する。この部分構造における3位が抗CDH6抗体への結合部位である。この3位での該抗体との結合は、チオエーテルを形成して結合することが特徴である。この構造部分の1位の窒素原子は、この構造が含まれるリンカー内に存在するメチレンの炭素原子と結合する。

[0153] 薬物をエキサテカンとする本発明の抗体-薬物コンジュゲートにおいては、下記の構造の薬物-リンカー構造部分を抗体に結合させたものが好ましい。これらの薬物-リンカー構造部分は、1抗体あたりの平均結合数として、1から10を結合させればよいが、好ましくは2から8であり、より好ましくは5から8であり、更に好ましくは7から8であり、更により好ましくは8である。

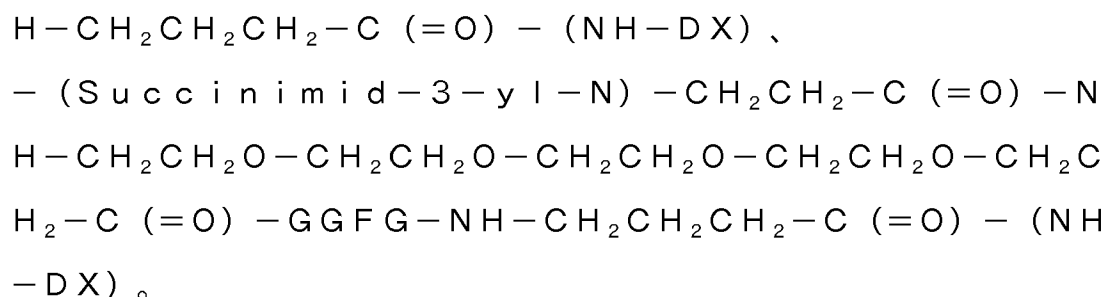
—(Succinimid-3-yl-N)—CH₂CH₂—C(=O)—GGFG—NH—CH₂CH₂CH₂—C(=O)—(NH—DX)、

—(Succinimid-3-yl-N)—CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂—C(=O)—GGFG—NH—CH₂CH₂CH₂—C(=O)—(NH—DX)、

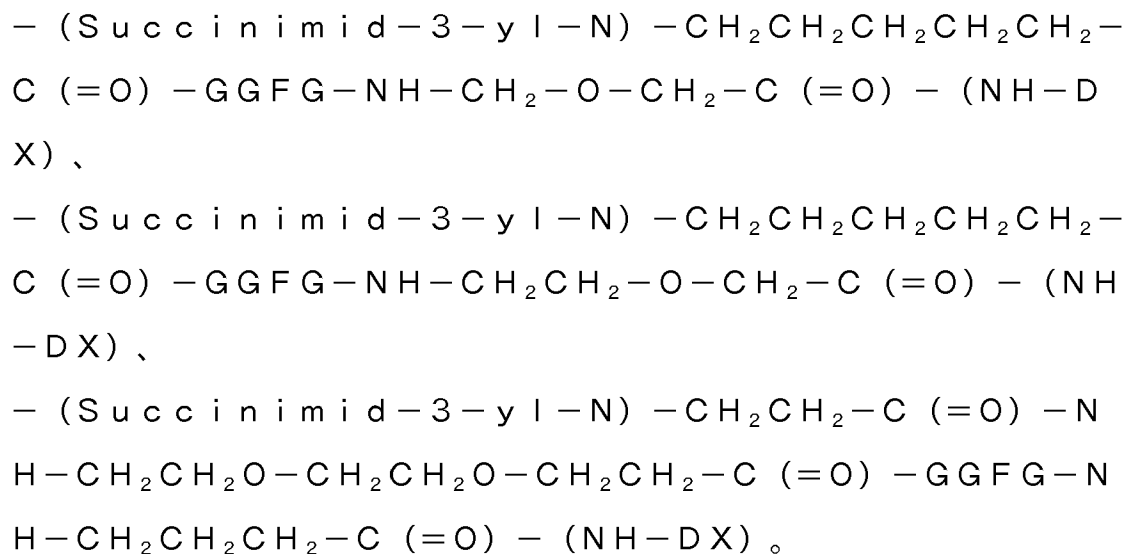
—(Succinimid-3-yl-N)—CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂—C(=O)—GGFG—NH—CH₂—O—CH₂—C(=O)—(NH—DX)、

—(Succinimid-3-yl-N)—CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂—C(=O)—GGFG—NH—CH₂CH₂—O—CH₂—C(=O)—(NH—DX)、

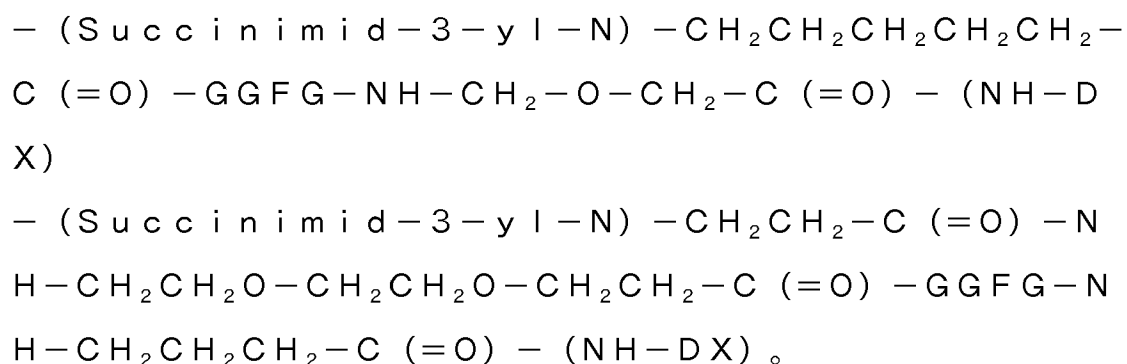
—(Succinimid-3-yl-N)—CH₂CH₂—C(=O)—NH—CH₂CH₂O—CH₂CH₂O—CH₂CH₂—C(=O)—GGFG—N



[0154] より、好ましくは、次のものである。



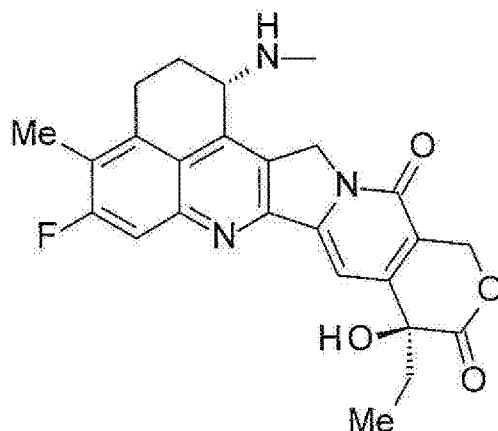
[0155] さらに、より好ましくは、次のものを挙げることができる。



[0156] また、 $-(\text{NH}-\text{DX})$ は次式：

[0157]

[化7]



[0158] で示される構造であり、エキサテカンの1位のアミノ基の水素原子1個が除かれて生成する基を示す。

[0159] (3) 抗体－薬物コンジュゲートの製造方法

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

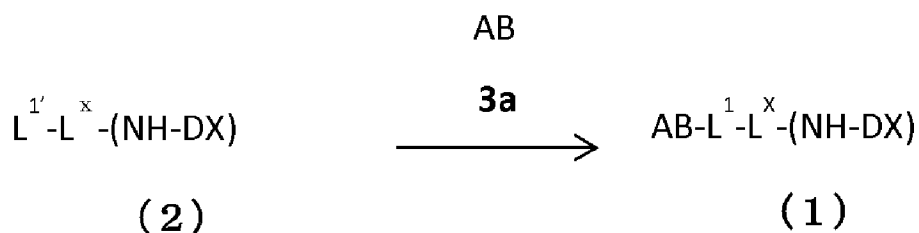
[0160] 次に、本発明の抗体－薬物コンジュゲートの代表的な製造方法について説明する。なお、以下において、化合物を示すために、各反応式中に示される化合物の番号を用いる。すなわち、『式(1)の化合物』、『化合物(1)』等と称する。また、これ以外の番号の化合物についても同様に記載する。

[0161] (3)－1 製造方法1

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

[0162]

[数1]



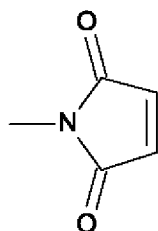
[0163] [式中、ABは、スルフヒドリル基を有する抗体を示す。

ここで、L¹は、

—(Succinimid-3-yl-N)—の構造で示される。

L^{1'}は次式で示される、マレイミジル基を示す。]

[0164] [化8]



[0165] —L¹—L^xは、以下の式で示されるいずれかの構造を有する。

—(Succinimid-3-yl-N)—CH₂CH₂—C(=O)—G

GGFG—NH—CH₂CH₂CH₂—C(=O)—、

—(Succinimid-3-yl-N)—CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂—

C(=O)—GGFG—NH—CH₂CH₂CH₂—C(=O)—、

—(Succinimid-3-yl-N)—CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂—

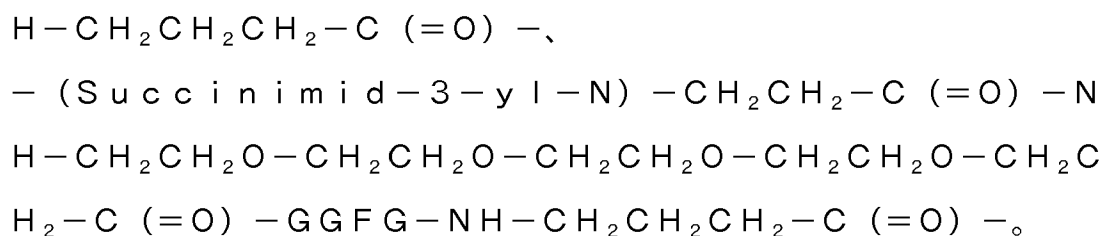
C(=O)—GGFG—NH—CH₂—O—CH₂—C(=O)—、

—(Succinimid-3-yl-N)—CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂—

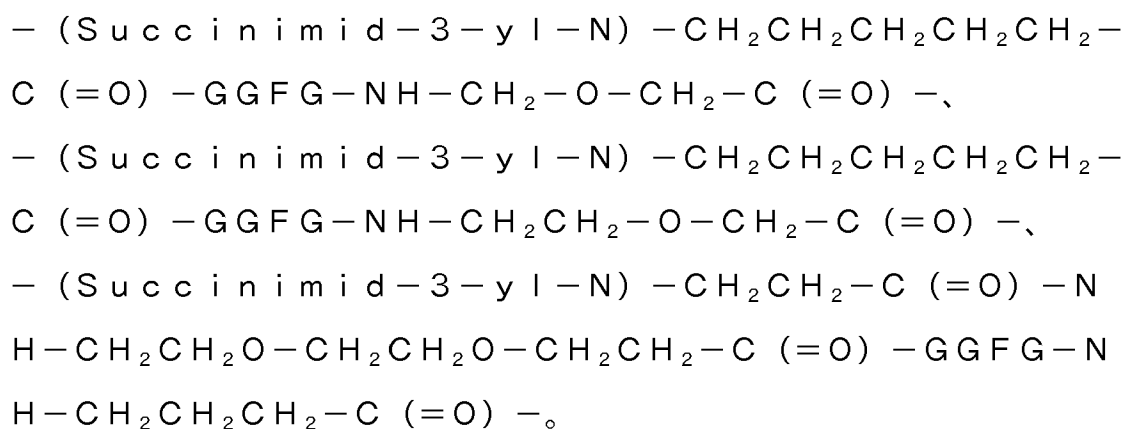
C(=O)—GGFG—NH—CH₂CH₂—O—CH₂—C(=O)—、

—(Succinimid-3-yl-N)—CH₂CH₂—C(=O)—N

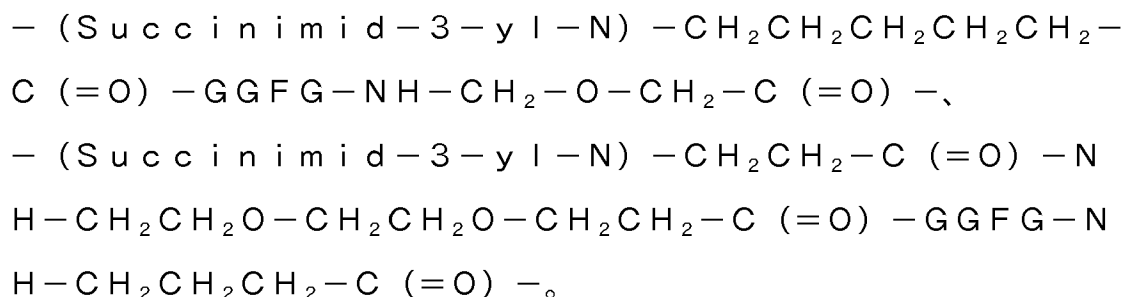
H—CH₂CH₂O—CH₂CH₂O—CH₂CH₂—C(=O)—GGFG—N



[0166] これらのうちでより好ましくは、次のものである。



[0167] さらに、好ましくは、次のものを挙げることができる。



[0168] また、上記の反応式において抗体-薬物コンジュゲート(1)では、薬物からリンカー末端までの構造部分1個が1個の抗体に対して結合した構造として記載されているが、これは説明のための便宜的な記載であって、実際には当該構造部分が1個の抗体分子に対して複数個が結合している場合が多い。この状況は以下の製造方法の説明においても同様である。

[0169] すなわち、既知の方法によって入手しうる化合物(2)(例えば、US 2016/297890号公開特許公報に記載の方法(例えば段落[0336]～[0374]に記載の方法)で入手可能)で入手可能)と、スルフヒドリル基を有する抗体(3a)を反応させることによって、抗体-薬物コンジュゲート(1)を製造することができる。

[0170] スルフヒドリル基を有する抗体（3 a）は、当業者周知の方法で得ることができる（Hermanson, G. T, Bioconjugate Techniques, pp. 56-136, pp. 456-493, Academic Press (1996)）。例えば、Traut's 試薬を抗体のアミノ基に作用させる；N-サクシンイミジルS-アセチルチオアルカノエート類を抗体のアミノ基に作用させた後、ヒドロキシルアミンを作用させる；N-サクシンイミジル3-（ピリジルジチオ）プロピオネートを作用させた後、還元剤を作用させる；ジチオトレイトール、2-メルカプトエタノール、トリス（2-カルボキシエチル）ホスフィン塩酸塩（TCEP）等の還元剤を抗体に作用させて抗体内鎖間部のジスルフィド結合を還元しスルフヒドリル基を生成させる；等の方法を挙げることができるがこれらに限定されることはない。

[0171] 具体的には、還元剤としてTCEPを、抗体内鎖間部ジスルフィド一個当たりに対して0.3乃至3モル当量用い、キレート剤を含む緩衝液中で、抗体と反応させることで、抗体内鎖間部ジスルフィドが部分的もしくは完全に還元された抗体を得ることができる。キレート剤としては、例えばエチレンジアミン四酢酸（EDTA）やジエチレントリアミン5酢酸（DTPA）等を挙げることができる。これ等を1 mM乃至20 mMの濃度で用いればよい。緩衝液としては、リン酸ナトリウムやホウ酸ナトリウム、酢酸ナトリウム溶液等を用いることができる。具体的な例において、抗体は4℃乃至37℃にて1乃至4時間TCEPと反応させることで部分的もしくは完全に還元されたスルフヒドリル基を有する抗体（3 a）を得ることが出来る。

[0172] なお、ここでスルフヒドリル基を薬物-リンカー部分に付加させる反応を実施させることでチオエーテル結合によって薬物-リンカー部分を結合させることができる。

[0173] 次に、スルフヒドリル基を有する抗体（3 a）一個あたり、2乃至20モル当量の化合物（2）を使用して、抗体1個あたり2個乃至8個の薬物が結合した抗体-薬物コンジュゲート（1）を製造することができる。具体的に

は、スルフヒドリル基を有する抗体（3 a）を含む緩衝液に、化合物（2）を溶解させた溶液を加えて反応させればよい。ここで、緩衝液としては、酢酸ナトリウム溶液、リン酸ナトリウムやホウ酸ナトリウム、等を用いればよい。反応時のpHは5乃至9であり、より好適にはpH 7付近で反応させればよい。化合物（2）を溶解させる溶媒としては、ジメチルスルホキシド（DMSO）、ジメチルホルムアミド（DMF）、ジメチルアセトアミド（DMA）、N-メチル-2-ピリドン（NMP）等の有機溶媒を用いることができる。化合物（2）を溶解させた有機溶媒溶液を、スルフヒドリル基を有する抗体（3 a）を含む緩衝液に1乃至20% v/vを加えて反応させればよい。反応温度は、0乃至37℃、より好適には10乃至25℃であり、反応時間は、0.5乃至2時間である。反応は、未反応の化合物（2）の反応性をチオール含有試薬によって失活させることによって終了できる。チオール含有試薬は例えば、システイン又はN-アセチル-L-システイン（NAC）である。より具体的には、NACを、用いた化合物（2）に対して、1乃至2モル当量加え、室温で10乃至30分インキュベートすることにより反応を終了できる。

[0174] （4）抗体-薬物コンジュゲートの同定

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

[0175] （4）-1 共通操作A：抗体もしくは抗体-薬物コンジュゲート水溶液の濃縮

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

溶液を濃縮した。

[0176] (4) - 2 共通操作B：抗体の濃度測定

UV測定器 (Nanodrop 1000, Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いて、メーカー規定の方法に従い、抗体濃度の測定を行った。その際に、抗体ごとに異なる280nm吸光係数 ($1.3 \text{ mL mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 乃至 $1.8 \text{ mL mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) を用いた。

[0177] (4) - 3 共通操作C：抗体のバッファー交換

Sephadex G-25担体を使用したNAP-25カラム (Cat. No. 17-0852-02, GE Healthcare Japan Corporation) を、メーカー規定の方法に従い、塩化ナトリウム (50mM) 及びEDTA (2mM) を含むリン酸緩衝液 (50mM, pH 6.0) (本明細書でPBS 6.0/EDTAと称する。) にて平衡化させた。このNAP-25カラム一本につき、抗体水溶液2.5mLをのせたのち、PBS 6.0/EDTA 3.5mLで溶出させた画分 (3.5mL) を分取した。この画分を共通操作Aによって濃縮し、共通操作Bを用いて抗体濃度の測定を行ったのちに、PBS 6.0/EDTAを用いて20mg/mLに抗体濃度を調整した。

[0178] (4) - 4 共通操作D：抗体-薬物コンジュゲートの精製

市販のSorbitol (5%) を含む酢酸緩衝液 (10mM, pH 5.5; 本明細書でABSと称する。) のいずれかの緩衝液でNAP-25カラムを平衡化させた。このNAP-25カラムに、抗体-薬物コンジュゲート反応水溶液 (約2.5mL) をのせ、メーカー規定の量の緩衝液で溶出させることで、抗体画分を分取した。この分取画分を再びNAP-25カラムにのせ緩衝液で溶出させるゲルろ過精製操作を計2乃至3回繰り返すことで、未結合の薬物リンカーや低分子化合物 (トリス (2-カルボキシエチル) ホスフィン塩酸塩 (TCEP), N-アセチル-L-システイン (NAC), ジメチルスルホキシド) を除いた抗体-薬物コンジュゲートを得た。

[0179] (4) - 5 共通操作E：抗体-薬物コンジュゲートにおける抗体濃度及

び抗体一分子あたりの薬物平均結合数の測定

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

[0180] ある波長における全吸光度は系内に存在する全ての吸収化学種の吸光度の和に等しい〔吸光度の加成性〕ことから、抗体と薬物のコンジュゲーション前後において、抗体及び薬物のモル吸光係数に変化がないと仮定すると、抗体－薬物コンジュゲートにおける抗体濃度及び薬物濃度は、下記の関係式で示される。

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

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

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

[0181] ここで、 $\varepsilon_{A, 280}$ 、 $\varepsilon_{A, 370}$ 、 $\varepsilon_{D, 280}$ 、 $\varepsilon_{D, 370}$ は、事前に用意した値（計算推定値もしくは化合物のUV測定から得られた実測値）が用いられる。例えば、 $\varepsilon_{A, 280}$ は、抗体のアミノ酸配列から、既知の計算方法（Protein Science, 1995, vol. 4, 2411–2423）によって推定することが出来る。 $\varepsilon_{A, 370}$ は、通常、ゼロである。 $\varepsilon_{D, 280}$ 及び $\varepsilon_{D, 370}$ は、用いるコンジュゲート前駆体をあるモル濃度に溶解させた溶液の吸

光度を測定することで、ランベルト・ベールの法則（吸光度＝モル濃度×モル吸光係数×セル光路長）によって、得ることができる。抗体－薬物コンジュゲート水溶液の A_{280} 及び A_{370} を測定し、これらの値を式（１）及び（２）に代入して連立方程式を解くことによって、 C_A 及び C_D を求めることができる。さらに C_D を C_A で除することで１抗体あたりの薬物平均結合数が求められることができる。

[0182] （４）－６ 共通操作F：抗体－薬物コンジュゲートにおける抗体一分子あたりの薬物平均結合数の測定（２）

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

[0183] F－１．HPLC分析用サンプルの調製（抗体－薬物コンジュゲートの還元）

抗体－薬物コンジュゲート溶液（約 1 mg/mL 、 $60\text{ }\mu\text{L}$ ）をジチオトレイトール（DTT）水溶液（ 100 mM 、 $15\text{ }\mu\text{L}$ ）と混合する。混合物を 37°C で 30 分インキュベートすることで、抗体－薬物コンジュゲートの軽鎖及び重鎖間のジスルフィド結合を切断したサンプルを、HPLC分析に用いる。

[0184] F－２．HPLC分析

HPLC分析を、下記の測定条件にて行う。

[0185] HPLCシステム：Agilent 1290 HPLCシステム（Agilent Technologies）

検出器：紫外吸光度計（測定波長： 280 nm ）

カラム：ACQUITY UPLC BEH Phenyl（ 2.1×5

0 mm、1.7 μ m、130 Å; Waters、P/N 186002884)

カラム温度：80℃

移動相A：0.10%トリフルオロ酢酸（TFA）、15%2-プロパノールを含む水溶液

移動相B：0.075%TFA、15%2-プロパノールを含むアセトニトリル溶液

グラジエントプログラム：14%–36%（0分–15分）、36%–80%（15分–17分）、80%–14%（17分–17.01分）、14%（17.01分–25分）

サンプル注入量：10 μ L

F-3. データ解析

F-3-1 薬物の結合していない抗体の軽鎖（L0）及び重鎖（H0）に対して、薬物の結合した軽鎖（薬物が*i*個結合した軽鎖：L_{*i*}）及び重鎖（薬物が*i*個結合した重鎖：H_{*i*}）は、結合した薬物の数に比例して疎水性が増し保持時間が大きくなることから、例えば、L0、L1、H0、H1、H2、H3の順に溶出される。L0及びH0との保持時間比較により検出ピークをL0、L1、H0、H1、H2、H3のいずれかに割り当てることができる。薬物結合数は、当業者によって定義され得るが、好ましくは、L0、L1、H0、H1、H2、H3である。

[0186] F-3-2 薬物リンカーにUV吸収があるため、薬物リンカーの結合数に応じて、軽鎖、重鎖及び薬物リンカーのモル吸光係数を用いて下式に従ってピーク面積値の補正を行う。

[0187] [数2]

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

[0188] [数3]

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

[0189] ここで、各抗体における軽鎖及び重鎖のモル吸光係数（280nm）は、既知の計算方法（Protein Science, 1995, vol. 4, 2411-2423）によって、各抗体の軽鎖及び重鎖のアミノ酸配列から推定される値を用いることができる。H01L02の場合、そのアミノ酸配列に従って、軽鎖のモル吸光係数として31710を、重鎖のモル吸光係数として79990を推定値として用いた。また、薬物リンカーのモル吸光係数（280nm）は、各薬物リンカーをメルカプトエタノール又はN-アセチルシステインで反応させ、マレイミド基をサクシニイミドチオエーテルに変換した化合物の実測のモル吸光係数（280nm）を用いた。吸光度を測定する波長は、当業者によって適宜設定され得るが、好ましくは、抗体のピークが測定され得る波長であり、より好ましくは280nmである。

[0190] F-3-3 ピーク面積補正值合計に対する各鎖ピーク面積比（%）を下式に従って計算する。

[0191] [数4]

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

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

$$A_{Li}, \quad A_{Hi} : L_i, \quad H_i \text{ 各々のピーク面積補正值}$$

[0192] F-3-4 抗体-薬物コンジュゲートにおける抗体一分子あたりの薬物平均結合数を、下式に従って計算する。

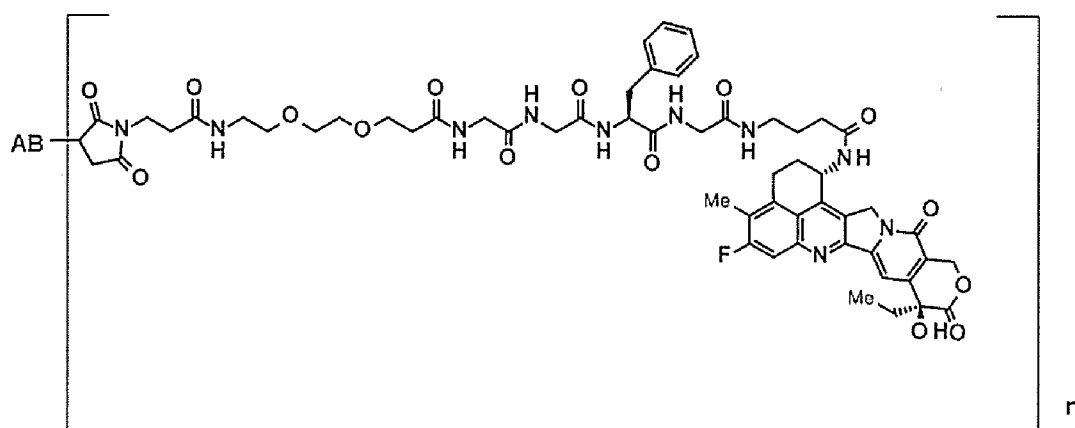
[0193] 薬物平均結合数 = (L₀ピーク面積比 × 0 + L₁ピーク面積比 × 1 + H₀ピーク面積比 × 0 + H₁ピーク面積比 × 1 + H₂ピーク面積比 × 2 + H₃ピーク面積比 × 3) / (L₀ピーク面積比 + L₁ピーク面積比 + H₀ピーク面積比 + H₁ピーク面積比 + H₂ピーク面積比 + H₃ピーク面積比)

ク面積比×0+H₁ピーク面積比×1+H₂ピーク面積比×2+H₃ピーク面積比×3)／100×2

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

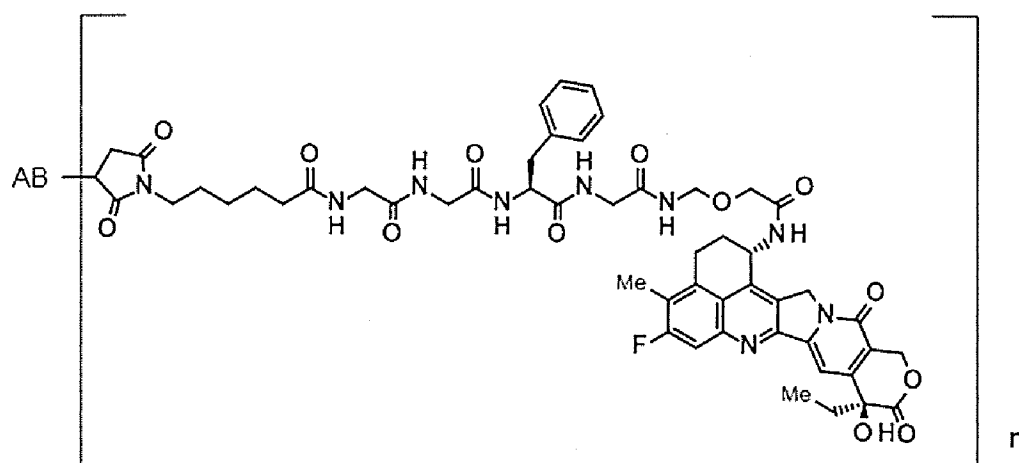
[0194] 本発明の抗体－薬物コンジュゲートの一つの実例としては次式：

[0195] [化9]



[0196] 又は次式：

[0197] [化10]



[0198] で示される構造を有するものを挙げることができる。

[0199] ここで、A Bは本明細書で開示される抗CDH6抗体を示し、抗体由来の

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

[0200] 本発明の抗体薬物-コンジュゲートの一例として、上記式[化9]又は[化10]に示される構造において、ABで示される抗体が、以下の(a)乃至(g)からなる群から選択されるいずれか1項に記載の重鎖及び軽鎖の抗体又はその機能性断片を含む、抗体-薬物コンジュゲート又はその薬理学上許容される塩を挙げることができる：

(a) 配列番号61に示される軽鎖全長アミノ酸配列の21～233番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号69に示される重鎖全長アミノ酸配列の20～471番目のアミノ酸配列からなる重鎖からなる抗体；

(b) 配列番号61に示される軽鎖全長アミノ酸配列の21～233番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号73に示される重鎖全長アミノ酸配列の20～471番目のアミノ酸配列からなる重鎖からなる抗体；

(c) 配列番号61に示される軽鎖全長アミノ酸配列の21～233番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号77に示される重鎖全長アミノ酸配列の20～471番目のアミノ酸配列からなる重鎖からなる抗体；

(d) 配列番号65に示される軽鎖全長アミノ酸配列の21～233番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号69に示される重鎖全長アミノ酸配列の20～471番目のアミノ酸配列からなる重鎖からなる抗体；

(e) 配列番号65に示される軽鎖全長アミノ酸配列の21～233番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号73に示される重鎖全長アミノ酸配列の20～471番目のアミノ酸配列からなる重鎖からなる抗体；

(f) 配列番号 65 に示される軽鎖全長アミノ酸配列の 21～233 番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号 77 に示される重鎖全長アミノ酸配列の 20～471 番目のアミノ酸配列からなる重鎖からなる抗体；又は

(g) 重鎖又は軽鎖が N-結合への糖鎖付加、O-結合への糖鎖付加、N 末のプロセッシング、C 末のプロセッシング、脱アミド化、アスパラギン酸の異性化、メチオニンの酸化、N 末にメチオニン残基の付加、プロリン残基のアミド化、N 末グルタミンや N 末グルタミン酸のピログルタミン酸化などに代表される翻訳後修飾、及びカルボキシル末端における 1 つ又は 2 つのアミノ酸欠失からなる群より選択される 1 又は 2 以上の修飾を含む、(a)～(f) からなる群から選択されるいずれか 1 つに記載の抗体。

[0201] 4. 医薬

上記、「2. 抗 CDH6 抗体の製造」の項及び実施例に記載された本発明の抗 CDH6 抗体及び当該抗体の機能性断片は、腫瘍細胞表面の CDH6 に結合し、内在化活性を有することから、単独であるいは他の薬剤と組み合わせて、医薬として、腎細胞腫瘍及び卵巣腫瘍等のがん、例えば、腎細胞癌、腎臓明細胞癌、乳頭状腎細胞癌、卵巣癌、卵巣漿液性腺癌、甲状腺癌、胆管癌、肺癌（例えば、小細胞肺癌又は非小細胞肺癌）、神経膠芽腫、中皮腫、子宮癌、膵臓癌、ウィルムス腫瘍又は神経芽腫の治療剤として用いることができる。

[0202] また、CDH6 を発現している細胞の検出に用いることができる。

[0203] 更に、本発明の抗 CDH6 抗体及び当該抗体の機能性断片は、内在化活性を有することから、抗体-薬物コンジュゲートに用いる抗体として供することができる。

[0204] 上記「3. 抗 CDH6 抗体-薬物コンジュゲート」の項及び実施例に記載の本発明の抗 CDH6 抗体-薬物コンジュゲートのうちで薬物として細胞傷害活性等の抗腫瘍活性を有する薬物が用いられているものは、内在化活性を有する抗 CDH6 抗体及び／又は当該抗体の機能性断片と細胞傷害活性等の抗腫瘍活性を有する薬物のコンジュゲートであり、CDH6 を発現している

がん細胞に対して抗腫瘍活性を示すことから、医薬として、特にがんに対する治療剤及び／又は予防剤として使用することができる。

[0205] 本発明の抗CDH6抗体-薬物コンジュゲートは、大気中に放置したり、又は再結晶や精製操作をしたりすることにより、水分を吸収し、あるいは吸着水が付着するなどして、水和物になる場合があり、そのような水を含む化合物又は薬理学的に許容され得る塩も本発明に包含される。

[0206] 本発明の抗CDH6抗体-薬物コンジュゲートが、アミノ基などの塩基性基を有する場合、所望により薬理学的に許容され得る酸付加塩を形成することができる。そのような酸付加塩としては、例えばフッ化水素酸塩、塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩などのハロゲン化水素酸塩；硝酸塩、過塩素酸塩、硫酸塩、燐酸塩などの無機酸塩；メタンスルホン酸塩、トリフルオロメタンスルホン酸塩、エタンスルホン酸塩などの低級アルカンスルホン酸塩；ベンゼンスルホン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩などのアリースルホン酸塩；蟻酸塩、酢酸塩、トリフルオロ酢酸塩、りんご酸塩、フマル酸塩、コハク酸塩、クエン酸塩、酒石酸塩、シュウ酸塩、マレイン酸塩などの有機酸塩；又はオルニチン酸塩、グルタミン酸塩、アスパラギン酸塩などのアミノ酸塩などを挙げることができる。

[0207] 本発明の抗CDH6抗体-薬物コンジュゲートが、カルボキシ基などの酸性基を有する場合、所望により薬理学的に許容され得る塩基付加塩を形成することができる。そのような塩基付加塩としては、例えばナトリウム塩、カリウム塩、リチウム塩などのアルカリ金属塩；カルシウム塩、マグネシウム塩などのアルカリ土類金属塩；アンモニウム塩などの無機塩；ジベンジルアミン塩、モルホリン塩、フェニルグリシンアルキルエステル塩、エチレンジアミン塩、N-メチルグルカミン塩、ジエチルアミン塩、トリエチルアミン塩、シクロヘキシルアミン塩、ジシクロヘキシルアミン塩、N, N'-ジベンジルエチレンジアミン塩、ジエタノールアミン塩、N-ベンジル-N-(2-フェニルエトキシ)アミン塩、ピペラジン塩、テトラメチルアンモニウム塩、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン塩などの有機アミン塩など

を挙げることができる。

[0208] 本発明はまた、抗体－薬物コンジュゲートを構成する原子の1以上が、その原子の同位体で置換された抗CDH6抗体－薬物コンジュゲートを包含し得る。同位体には放射性同位体及び安定同位体の2種類が存在し、同位体の例としては、例えば、水素の同位体（ 2H 及び 3H ）、炭素の同位体（ 11C 、 13C 及び 14C ）、窒素の同位体（ 13N 及び 15N ）、酸素の同位体（ 15O 、 17O 及び 18O ）、フッ素の同位体（ 18F ）などを挙げることができる。同位体で標識された抗体－薬物コンジュゲートを含む組成物は、例えば、治療剤、予防剤、研究試薬、アッセイ試薬、診断剤、インビボ画像診断剤などとして有用である。同位体で標識された抗体－薬物コンジュゲート、及び、同位体で標識された抗体－薬物コンジュゲートの任意の割合の混合物もすべて本発明に包含される。同位体で標識された抗体－薬物コンジュゲートは、当該分野で公知の方法により、例えば、後述する本発明の製造方法における原料の代わりに同位体で標識された原料を用いることにより、製造することができる。

[0209] *in vitro*での殺細胞活性は例えば、細胞の増殖抑制活性で測定することができる。例えば、CDH6を過剰発現している癌細胞株を培養し、培養系に種々の濃度で抗CDH6抗体－薬物コンジュゲートを添加し、フォーカス活性、コロニー形成及びスフェロイド増殖に対する抑制活性を測定することができる。ここで、例えば、腎細胞腫瘍及び卵巣腫瘍由来がん細胞株等を用いることで、腎細胞腫瘍及び卵巣腫瘍に対する細胞増殖抑制活性を調べることができる。

[0210] *in vivo*での実験動物を用いたがんに対する治療効果は、例えば、CDH6を高発現している腫瘍細胞株を移植したヌードマウスに抗CDH6抗体－薬物コンジュゲートを投与し、がん細胞の変化を測定することができる。ここで、例えば、腎細胞癌、腎臓明細胞癌、乳頭状腎細胞癌、卵巣癌、卵巣漿液性腺癌又は甲状腺癌由来の細胞を免疫不全マウスに移植した動物モデルを用いることで、腎細胞癌、腎臓明細胞癌、乳頭状腎細胞癌、卵巣癌、

卵巣漿液性腺癌又は甲状腺癌に対する治療効果を測定することができる。

[0211] 本発明の抗CDH6抗体-薬物コンジュゲートが適用されるがんの種類としては、治療対象となるがん細胞においてCDH6を発現しているがんであれば特に制限されないが、例えば、腎細胞癌（例えば、腎臓明細胞癌又は乳頭状腎細胞癌）、卵巣癌、卵巣漿液性腺癌、甲状腺癌、胆管癌、肺癌（例えば、小細胞肺癌又は非小細胞肺癌）、神経膠芽腫、中皮腫、子宮癌、膵臓癌、ウィルムス腫瘍又は神経芽腫を挙げることができるが、CDH6を発現している限りこれらに制限されない。より好ましいがんの例としては、腎細胞癌（例えば、腎臓明細胞癌、乳頭状腎細胞癌）又は卵巣癌を挙げることができる。

[0212] 本発明の抗CDH6抗体-薬物コンジュゲートは、哺乳動物に対して好適に投与することができるが、より好ましくはヒトである。

[0213] 本発明の抗CDH6抗体-薬物コンジュゲートが含まれる医薬組成物において使用される物質としては、投与量や投与濃度において、この分野において通常使用される製剤添加物その他から適宜選択して適用することができる。

[0214] 本発明の抗CDH6抗体-薬物コンジュゲートは、1種以上の薬学的に適合性の成分を含む薬学的組成物として投与され得る。例えば、上記薬学的組成物は、代表的には、1種以上の薬学的キャリア（例えば、滅菌した液体（例えば、水及び油（石油、動物、植物、又は合成起源の油（例えば、ラッカセイ油、大豆油、鉱油、ごま油など）を含む））を含む。水は、上記薬学的組成物が静脈内投与される場合に、より代表的なキャリアである。食塩水溶液、ならびにデキストロース水溶液及びグリセロール水溶液もまた、液体キャリアとして、特に、注射用溶液のために使用され得る。適切な薬学的賦形剤は、当該分野で公知である。上記組成物はまた、所望であれば、微量の湿潤剤もしくは乳化剤、又はpH緩衝化剤を含み得る。適切な薬学的キャリアの例は、E. W. Martinによる「Remington's Pharmaceutical Sciences」に記載される。その処方、投

与の態様に対応する。

[0215] 種々の送達システムが公知であり、本発明の抗CDH6抗体-薬物コンジュゲートを投与するために使用され得る。導入方法としては、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、及び皮下の経路が挙げられるが、これらに限定されない。投与は、例えば、注入又はボーラス注射によるものであり得る。特定の好ましい実施形態において、上記抗体-薬物コンジュゲートの投与は、注入によるものである。非経口的投与は、好ましい投与経路である。

[0216] 代表的実施形態において、上記薬学的組成物は、ヒトへの静脈内投与に適合した薬学的組成物として、常習的手順に従って処方される。代表的には、静脈内投与のための組成物は、滅菌の等張性の水性緩衝液中の溶液である。必要である場合、上記医薬はまた、可溶化剤及び注射部位での疼痛を和らげるための局所麻酔剤（例えば、リグノカイン）を含み得る。一般に、上記成分は、（例えば、活性剤の量を示すアンプル又はサシェなどに密封してシールされた容器中の乾燥凍結乾燥粉末又は無水の濃縮物として、別個に、又は単位剤形中で一緒に混合して、のいずれかで供給される。上記医薬が注入によって投与される予定である場合、それは、例えば、滅菌の製薬グレードの水又は食塩水を含む注入ボトルで投薬され得る。上記医薬が注射によって投与される場合、注射用滅菌水又は食塩水のアンプルは、例えば、上記成分が投与前に混合され得るように、提供され得る。

[0217] 本発明の医薬組成物には本願の抗CDH6抗体-薬物コンジュゲートのみを含む医薬組成物であってもよいし、抗CDH6抗体-薬物コンジュゲート及び少なくとも一つのこれ以外のがん治療剤を含む医薬組成物であってもよい。本発明の抗CDH6抗体-薬物コンジュゲートは、他のがん治療剤と共に投与することもでき、これによって抗がん効果を増強させることができる。このような目的で使用される他の抗がん剤は、抗体-薬物コンジュゲートと同時に、別々に、あるいは連続して個体に投与されてもよいし、それぞれの投与間隔を変えて投与してもよい。このようながん治療剤として、Imatinib、Sunitinib、Regorafenibなどを含むチロ

シンキナーゼ阻害剤、Palbociclibなどを含むCDK4／6阻害剤、TAS-116などを含むHSP90阻害剤、MEK162などを含むMEK阻害剤、ニボルマブ、ペンブロリズマブ、イピリムマブなどを含む免疫チェックポイント阻害剤等を挙げることができるが、抗腫瘍活性を有する薬剤であれば限定されることはない。

[0218] このような医薬組成物は、選択された組成と必要な純度を持つ製剤として、凍結乾燥製剤あるいは液状製剤として製剤化すればよい。凍結乾燥製剤として製剤化する際には、この分野において使用される適当な製剤添加物が含まれる製剤であってもよい。また液剤においても同様にして、この分野において使用される各種の製剤添加物を含む液状製剤として製剤化することができる。

[0219] 医薬組成物の組成及び濃度は投与方法によっても変化するが、本発明の医薬組成物に含まれる抗CDH6抗体-薬物コンジュゲートは、抗体-薬物コンジュゲートの抗原に対する親和性、すなわち、抗原に対する解離定数（ K_d 値）の点において、親和性が高い（ K_d 値が低い）ほど、少量の投与量であっても薬効を発揮させることができる。したがって、抗体-薬物コンジュゲートの投与量の決定に当たっては、抗体-薬物コンジュゲートと抗原との親和性の状況に基づいて投与量を設定することもできる。本発明の抗体-薬物コンジュゲートをヒトに対して投与する際には、例えば、約0.001～100mg/kgを1回あるいは1～180日間に1回の間隔で複数回投与すればよい。好適には、0.1～50mg/kgを、さらに好適には、1～50mg/kg、1～30mg/kg、1～20mg/kg、1～15mg/kg、2～50mg/kg、2～30mg/kg、2～20mg/kg又は2～15mg/kgを1～4週間に1回、好ましくは2～3週間に1回の間隔で複数回投与すればよい。

実施例

[0220] 以下に示す実施例によって本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。また、これらはいかなる意味においても限定的

に解釈されるものではない。なお、下記実施例において遺伝子操作に関する各操作は特に明示がない限り、「モレキュラークローニング (M o l e c u l a r C l o n i n g)」(S a m b r o o k, J., F r i t s c h, E. F. 及び M a n i a t i s, T. 著, C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y P r e s s より 1989 年発刊) に記載の方法及びその他の当業者が使用する実験書に記載の方法により行うか、又は、市販の試薬やキットを用いる場合には市販品の指示書に従って行った。また、本明細書において、特に記載のない試薬、溶媒及び出発材料は、市販の供給源から容易に入手可能である。

[0221] [実施例 1：内在化活性を有するラット抗ヒト CDH6 抗体の取得]

1) -1 ヒト、マウス、ラットおよびカニクイザル CDH6 発現ベクターの構築

ヒト CDH6 タンパク質 (NP__004923) をコードする cDNA 発現ベクター (OriGene 社、RC217889) を用いて、当業者に公知な方法に従い哺乳動物発現用ベクターに組み込むことによってヒト CDH6 発現ベクター p cDNA 3.1-hCDH6 が作製された。ヒト CDH6 ORF (Open Reading Frame) のアミノ酸配列を配列番号 1 に示す。

[0222] マウス CDH6 タンパク質 (NP__031692) をコードする cDNA 発現ベクター (OriGene 社、MC221619) を用いて、当業者に公知な方法に従い哺乳動物発現用ベクターに組み込むことによってマウス CDH6 発現ベクター p cDNA 3.1-mCDH6、及び p3xFLAG-CMV-9-mCDH6 が作製された。マウス CDH6 ORF のアミノ酸配列を配列番号 7 に示す。

[0223] ラット CDH6 タンパク質 (NP__037059) をコードする cDNA 発現ベクター (OriGene 社、RN211850) の各 cDNA 部分を用いて、当業者に公知な方法に従い哺乳動物発現用ベクターに組み込むことによってヒト CDH6 発現ベクター p cDNA 3.1-rCDH6、及び p

3 × FLAG-CMV-9-rCDH6 が作製された。ラットCDH6 ORF のアミノ酸配列を配列番号8に示す。

[0224] カニクイザルCDH6タンパク質をコードするcDNAは、カニクイザル腎臓のtotal RNAより合成したcDNAを鋳型にprimer 1 (5' -CACCATGAGAACTTACCGCTACTTCTTGC TGCTC-3') (配列番号85) 及びprimer 2 (5' -TTAGGAGTCTTTGTCACTGTCCACTCCTCC-3') (配列番号86) を用いてクローニングを行った。得られた配列が、カニクイザルCDH6 (NCBI, XP_005556691.1) の細胞外領域と一致することを確認した。また、EMBLで登録されたカニクイザルCDH6 (EHH54180.1) と全長配列が一致することを確認した。当業者に公知な方法に従い哺乳動物発現用ベクターに組み込むことによってカニクイザルCDH6発現ベクターpcDNA3.1-cynoCDH6が作製された。カニクイザルCDH6 ORF のアミノ酸配列を配列番号9に示す。

[0225] 作製したプラスミドDNAの大量調製は、EndoFree Plasmid Giga Kit (QIAGEN) を用いて行った。

[0226] 1) - 2 免疫

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

[0227] 1) - 3 ハイブリドーマ作製

リンパ節細胞あるいは脾臓細胞とマウスミエローマSP2/O-ag14細胞 (ATCC, No. CRL-1581) とをLF301 Cell

Fusion Unit (BEX社) を用いて電気細胞融合した後、ClonaCell-HY Selection Medium D (Stem Cell Technologies社) に懸濁し、希釈して37℃、5% CO₂の条件下で培養した。出現した各々のハイブリドーマコロニーは、モノクローンとして回収され、ClonaCell-HY Selection Medium E (Stem Cell Technologies社) に懸濁して37℃、5% CO₂の条件下で培養した。適度に細胞が増殖した後、各々のハイブリドーマ細胞の凍結ストックを作製すると共に、得られたハイブリドーマ培養上清を抗ヒトCDH6抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングに用いた。

[0228] 1) -4 Cell-ELISA法による抗体産生ハイブリドーマのスクリーニング

1) -4-1 Cell-ELISA用抗原遺伝子発現細胞の調製

293 α 細胞（インテグリン α v及びインテグリン β 3を発現するHEK 293由来の安定発現細胞株）を10% FBS含有DMEM培地中5 $\times$ 10⁵細胞/mLになるよう調製した。Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific社) を用いた形質移入手順に従って、この293 α 細胞に対して、pcDNA3.1-hCDH6もしくはpcDNA3.1-cynoCDH6または、陰性コントロールとしてpcDNA3.1のDNAを導入し、96-well plate (Corning社) に100 μ Lずつ分注後、10% FBS含有DMEM培地中で37℃、5% CO₂の条件下で24から27時間培養した。得られた形質移入細胞を接着状態のまま、Cell-ELISAに使用した。

[0229] 1) -4-2 Cell-ELISA

実施例1) -4-1で調製した発現ベクター導入293 α 細胞の培養上清を除去後、pcDNA3.1-hCDH6もしくはpcDNA3.1-cynoCDH6またはpcDNA3.1導入293 α 細胞の各々に対しハイブリドーマ培養上清を添加し、4℃で1時間静置した。well中の細胞を5

% FBS含有PBS (+) で1回洗浄後、5% FBS含有PBS (+) で500倍に希釈したAnti-Rat IgG-Peroxidase antibody produced in rabbit (SIGMA社) を加えて、4℃で1時間静置した。well中の細胞を5% FBS含有PBS (+) で3回洗浄した後、OPD発色液 (OPD溶解液 (0.05 M クエン酸3ナトリウム、0.1 M リン酸水素2ナトリウム・12水 pH 4.5) にo-フェニレンジアミン二塩酸塩 (和光純薬社)、H₂O₂をそれぞれ0.4 mg/mL、0.6% (v/v) になるように溶解) を100 μL/wellで添加した。時々攪拌しながら発色反応を行い、1 M HClを100 μL/wellで添加して発色反応を停止させた後、プレートリーダー (ENVISION: PerkinElmer社) で490 nmの吸光度を測定した。コントロールのpcDNA3.1導入293α細胞と比較し、pcDNA3.1-hCDH6ならびにpcDNA3.1-cynoCDH6発現ベクター導入293α細胞の方でより高い吸光度を示す培養上清を産生するハイブリドーマをヒト、かつ、カニクイサルCDH6に結合する抗体産生ハイブリドーマとして選択した。

[0230] 1) -5 フローサイトメトリーによるカニクイサルCDH6への選択的結合抗体のスクリーニング

1) -5-1 フローサイトメトリー解析用抗原遺伝子発現細胞の調製

293T細胞を5×10⁴細胞/cm²になるよう225 cm²フラスコ (住友ベークライト社) に播種し、10% FBS含有DMEM培地中で37℃、5% CO₂の条件下で一晩培養した。この293T細胞に、pcDNA3.1-cynoCDH6または、陰性コントロールとしてpcDNA3.1をLipofectamine 2000を用いて導入し、37℃、5% CO₂の条件下でさらに一晩培養した。各ベクターを導入した293T細胞をTrypLE Express (Thermo Fisher Scientific社) で処理し、10% FBS含有DMEMで細胞を洗浄した後、5% FBS含有PBSに懸濁した。得られた細胞懸濁液をフローサイ

トメトリー解析に使用した。

[0231] 1) - 5 - 2 フローサイトメトリー解析

実施例 1) - 4 の C e l l - E L I S A で選択されたヒト、かつ、カニクイサル C D H 6 に結合する抗体産生ハイブリドーマが産生する抗体のカニクイサル C D H 6 に対する結合特異性をフローサイトメトリー法によりさらに確認した。実施例 1) - 5 - 1 で調製した一過性発現 2 9 3 T 細胞の懸濁液を遠心し、上清を除去した後、各々に対しハイブリドーマ培養上清を加えて懸濁し、4℃で1時間静置した。5% F B S 含有 P B S で2回洗浄した後、5% F B S 含有 P B S で500倍に希釈した A n t i - R a t I g G F I T C c o n j u g a t e (S I G M A 社) を加えて懸濁し、4℃で1時間静置した。5% F B S 含有 P B S で2回洗浄した後、2 μ g / m L 7 - a m i n o a c t i n o m y c i n D (M o l e c u l a r P r o b e s 社) を含む5% F B S 含有 P B S に再懸濁し、フローサイトメーター (F C 5 0 0 : B e c k m a n C o u l t e r 社) で検出した。データ解析は F l o w J o (T r e e S t a r 社) で行った。7 - a m i n o a c t i n o m y c i n D 陽性の死細胞をゲートで除外した後、生細胞の F I T C 蛍光強度のヒストグラムを作成した。コントロールである p c D N A 3 . 1 導入 2 9 3 T 細胞の蛍光強度ヒストグラムに対し p c D N A 3 . 1 - c y n o C D H 6 導入 2 9 3 T 細胞のヒストグラムが強蛍光強度側にシフトしている抗体を産生するハイブリドーマを細胞膜表面上に発現するカニクイサル C D H 6 に特異的に結合する抗体産生ハイブリドーマとして選択した。

[0232] 1) - 6 ラットモノクローナル抗体のアイソタイプの決定

実施例 1) - 5 で選択したラット抗 C D H 6 抗体産生ハイブリドーマの中から、ヒトならびにサル C D H 6 に強く特異的に結合することが示唆されたクローン r G 0 1 9、r G 0 5 5、r G 0 5 6、r G 0 6 1 を選抜し、各抗体のアイソタイプを同定した。抗体の重鎖のサブクラス、軽鎖のタイプは、R A T M O N O C L O N A L A N T I B O D Y I S O T Y P I N G T E S T K I T (D S ファーマバイオメディカル社) により決定された

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

[0233] 1) - 7 ラット抗CDH6抗体の調製

1) - 7 - 1 培養上清作製

ラット抗ヒトCDH6モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ培養上清から精製した。まず、ラット抗CDH6モノクローナル抗体産生ハイブリドーマをClonaCell-HY Selection Medium E (StemCell Technologies社)で充分量まで増殖させた後、Ultra Low IgG FBS (Thermo Fisher Scientific社)を20%添加したHybridoma SFM (Thermo Fisher Scientific社)に培地交換し、4-5日間培養した。本培養上清を回収し、0.8 μ mのフィルターに通した後、さらに0.2 μ mのフィルターに通して不溶物を除去した。

[0234] 1) - 7 - 2 ラット抗CDH6抗体の精製

実施例1) - 7 - 1で作製したハイブリドーマの培養上清から抗体(ラット抗CDH6抗体(rG019, rG055, rG056, rG061))をProtein Gアフィニティークロマトグラフィーで精製した。Protein Gカラム(GE Healthcare Bioscience社)に抗体を吸着させ、PBSでカラムを洗浄後に0.1M グリシン/塩酸水溶液(pH2.7)で溶出した。溶出液に1M Tris-HCl (pH9.0)を加えてpH7.0~7.5に調整した後に、Centrifugal UF Filter Device VIVASPIN20 (分画分子量UF30K, Sartorius社)にてHBSor (25mM ヒスチジン/5% ソルビトール、pH6.0)へのバッファー置換を行うとともに抗体の濃縮を行い、抗体濃度を1mg/mLに調製した。最後にMinisart-Plus filter (Sartorius社)でろ過し、精製サンプルとした。

[0235]

[実施例2：ラット抗CDH6抗体の*in vitro*評価]

2) - 1 フローサイトメトリーによるラット抗CDH6抗体の結合能評価

実施例1) - 7で作製したラット抗CDH6抗体のヒトCDH6結合性をフローサイトメトリー法により評価した。実施例1) - 1で作製したp c D N A 3. 1 - h C D H 6を293T細胞(ATCC)にLipofectamine 2000(Thermo Fisher Scientific)を用いて一過性に導入し、37℃、5% CO₂の条件下で一晩培養した後、細胞懸濁液を調製した。遺伝子導入した293T細胞懸濁液を遠心し、上清を除去した後、実施例1) - 7で調製したラット抗CDH6モノクローナル抗体4種(クローン番号は、r G 0 1 9、r G 0 5 5、r G 0 5 6及びr G 0 6 1)又はラットIgGコントロール(R&D Systems)を終濃度10 ng/mL加えて懸濁し、4℃で1時間静置した。5% FBS含有PBSで2回洗浄した後、5% FBS含有PBSで50倍に希釈したAnti-Rat IgG(whole molecule)-FITC antibody produced in rabbit(SIGMA)を加えて懸濁し、4℃で1時間静置した。5% FBS含有PBSで2回洗浄した後、フローサイトメーター(FC500: Beckman Coulter)で検出を行った。データ解析はFlowJo(TreeStar)で行った。その結果を図1に示す。図1のヒストグラムにおいて、横軸は抗体結合量を表すFITCの蛍光強度、縦軸は細胞数を示す。網掛けで示すヒストグラムはhCDH6を導入していない陰性コントロール293T細胞を用いた場合を示し、白抜き実線で示すヒストグラムは、hCDH6導入293T細胞を用いた場合を示す。細胞表面のhCDH6に抗体が結合したことによって蛍光強度が増強したことを示す。ラットIgGコントロールはいずれの細胞にも結合しない。この結果、作製したラット抗CDH6モノクローナル抗体4種はp c D N A 3. 1 - h C D H 6導入293T細胞に結合することを確認した。

[0236] 2) - 2 フローサイトメトリーによるラット抗CDH6抗体のCDH6結合部位の解析

2) - 2 - 1 ヒトCDH6各ドメイン欠失体発現ベクターの構築

ヒトCDH6の細胞外全長には5つの細胞外ドメイン、EC1（配列番号2）、EC2（配列番号3）、EC3（配列番号4）、EC4（配列番号5）、EC5（配列番号6）が存在する。ヒトCDH6全長から、5つのECドメインを各一箇所ずつ欠失発現した遺伝子をGeneArt社で合成し、当業者に公知な方法に従い哺乳動物発現用ベクターp3xFLAG-CMV-9ベクター（SIGMA-ALDRICH社）へ組み込み、EC1からEC5をそれぞれ欠失した、各ドメイン欠失体発現ベクターを作製した。

[0237] 2) - 2 - 2 フローサイトメトリーによるドメイン欠失体を用いたラット抗CDH6抗体のエピトープ解析

各ECドメイン欠失ベクターを導入した293 α 細胞株を用いたフローサイトメトリー解析により、ラット抗ヒトCDH6抗体の結合エピトープを同定した。インテグリン α vおよびインテグリン β 3発現ベクターをHEK293細胞内に安定形質移入した細胞株293 α 細胞株に対して、実施例2) - 2 - 1で作成した各ドメイン欠失体発現ベクター、及び全長ヒトCDH6を発現するpcDNA3.1-hCDH6をLipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific)を用いて一過性に導入し、37℃、5% CO₂の条件下で一晩培養した後、細胞懸濁液を調製した。導入293 α 細胞懸濁液を遠心し、上清を除去した後、実施例1) - 7で調製したラット抗CDH6モノクローナル抗体4種（クローン番号は、rG019、rG055、rG056及びrG061）又はラットIgGコントロール（R&D Systems）を終濃度20nMで加えて懸濁し、4℃で1時間静置した。5% FBS含有PBSで2回洗浄した後、5% FBS含有PBSで50倍に希釈したAnti-Rat IgG (whole molecule) - FITC antibody produced in rabbit (SIGMA)を加えて懸濁し、4℃で1時

間静置した。5% FBS含有PBSで2回洗浄した後、フローサイトメーター（Canto II: BD Biosciences）で検出を行った。データ解析はFlowJo（TreeStar）で行った。その結果を図2-1～図2-6に示す。図2-1～図2-6のヒストグラムにおいて、横軸は抗体結合量を表すFITCの蛍光強度、縦軸は細胞数を示す。網掛けで示すヒストグラムは遺伝子を導入していない陰性コントロール293 α 細胞を用いた場合を示し、白抜き実線で示すヒストグラムは、全長hCDH6又は各ECドメイン欠失293細胞を用いた場合を示す。細胞表面の全長hCDH6又は各ECドメイン欠失体に抗体が結合した場合は、蛍光強度が増強する。ラットIgGコントロールはいずれの導入細胞にも結合しない。作製したラット抗CDH6モノクローナル抗体4種は、全長hCDH6、EC1欠失体、EC2欠失体、EC4欠失体、及びEC5欠失体には結合するが、EC3欠失体には結合しない。この結果から、ラット抗CDH6モノクローナル抗体4種はhCDH6のEC3をエピトープとして特異的に結合することが示された。

[0238] 2) - 3 ラット抗CDH6抗体の内在化活性

2) - 3 - 1 ヒト腫瘍細胞株におけるCDH6の発現確認

取得抗体の評価に用いるCDH6陽性ヒト腫瘍細胞株を選抜するため、公知データベースからCDH6発現情報を検索し、フローサイトメトリー法により細胞膜表面でのCDH6の発現を評価した。ヒト卵巣腫瘍細胞株NIH: OVCAR-3, PA-1, ES-2及びヒト腎細胞腫瘍細胞株786-O（全てATCCから入手）を37℃、5% CO₂の条件下で培養した後、細胞懸濁液を調製した。細胞を遠心し、上清を除去した後、市販抗ヒトCDH6抗体（MABU2715, R&D Systems）又は陰性コントロールとしてマウスIgG1（BD Pharmingen）を終濃度50 μ g/mL加えて懸濁し、4℃で1時間静置した。5% FBS含有PBSで2回洗浄した後、5% FBS含有PBSで50倍に希釈したF(ab')₂ Fragment of FITC-conjugated Goat

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

[0239] 2) -3-2 ラット抗CDH6抗体の内在化活性評価

ラット抗CDH6抗体の内在化活性は、タンパク質合成を阻害する毒素（サボリン）を結合させた抗ラットIgG試薬Rat-ZAP (ADVANCED TARGETING SYSTEMS) を用いて評価した。すなわち、ヒトCDH6陽性卵巣腫瘍細胞株NIH: OVCAR-3 (ATCC) を 4×10^3 cells/well で96wellプレートに播種して37℃、5% CO₂の条件下で一晩培養した。ヒトCDH6陽性腎細胞腫瘍細胞株786-O (ATCC) は 1×10^3 cells/well で96wellプレートに播種して一晩培養した。翌日、ラット抗CDH6抗体（終濃度：1 nM）又は、陰性コントロール抗体としてラットIgG2b抗体 (R&D Systems) を添加した。さらに、Rat-ZAP（終濃度：0.5 nM）または、陰性コントロールとして毒素を結合していないGoat Anti-Rat IgG, Fc (gamma) Fragment Specific (JACKSON IMMUNORESEARCH)（終濃度：0.5 nM）を添加し、3日間37℃、5%CO₂条件下で培養した。生

存細胞数は、Cell Titer-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay (Promega) によるATP 活性 (RLU) の定量で測定した。この評価では、ラット抗CDH6 抗体の 内在化活性に依存してRat-ZAP が細胞内に取り込まれ、タンパク合成 を阻害するサボリンが細胞内に放出されることで、細胞増殖が抑制される。 抗CDH6 抗体添加による細胞増殖抑制作用は、Rat-ZAP の代わりに 陰性コントロールを添加したウェルの生存細胞数を100%とした相対生存 率で表記した。図4 にグラフおよび細胞生存率の表を示す。この結果、ラッ ト抗CDH6 抗体はCDH6 に結合して内在化を引き起こすことが示された。

[0240]

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

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

3) -1-1 G019 からのtotal RNA の調製

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

[0241] 3) -1-2 5' -RACE PCR によるrG019 の重鎖可変領域 を含むcDNA の増幅とヌクレオチド配列の決定

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

ライマーを用いた。

[0242] 5' - R A C E PCRで増幅した重鎖の可変領域を含むcDNAをプラスミドにクローニングし、次に重鎖の可変領域のcDNAのヌクレオチド配列のシーケンス解析を実施した。

[0243] 決定されたrG019の重鎖の可変領域をコードするcDNAのヌクレオチド配列を配列番号16に示し、アミノ酸配列を配列番号15に示した。

[0244] 3) - 1 - 3 5' - R A C E PCRによるrG019の軽鎖可変領域を含むcDNAの増幅とヌクレオチド配列の決定

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

[0245] 決定されたrG019の軽鎖の可変領域をコードするcDNAのヌクレオチド配列を配列番号11に示し、アミノ酸配列を配列番号10に示した。

[0246] 3) - 2 rG055重鎖可変領域及び軽鎖可変領域の遺伝子断片の増幅および配列決定

実施例3) - 1と同様の方法で配列を決定した。

[0247] 決定されたrG055の重鎖の可変領域をコードするcDNAのヌクレオチド配列を配列番号26に示し、アミノ酸配列を配列番号25に示した。軽鎖の可変領域をコードするcDNAのヌクレオチド配列を配列番号21に示し、アミノ酸配列を配列番号20に示した。

[0248] 3) - 3 rG056重鎖可変領域及び軽鎖可変領域の遺伝子断片の増幅および配列決定

実施例3) - 1と同様の方法で配列を決定した。

[0249] 決定されたrG056の重鎖の可変領域をコードするcDNAのヌクレオチド配列を配列番号36に示し、アミノ酸配列を配列番号35に示した。軽鎖の可変領域をコードするcDNAのヌクレオチド配列を配列番号31に示

し、アミノ酸配列を配列番号 30 に示した。

[0250] 3) - 4 r G O 6 1 重鎖可変領域及び軽鎖可変領域の遺伝子断片の増幅
および配列決定

実施例 3) - 1 と同様の方法で配列を決定した。

[0251] 決定された r G O 6 1 の重鎖の可変領域をコードする c D N A のヌクレオ
チド配列を配列番号 46 に示し、アミノ酸配列を配列番号 45 に示した。軽
鎖の可変領域をコードする c D N A のヌクレオチド配列を配列番号 41 に示
し、アミノ酸配列を配列番号 40 に示した。

[0252]

[実施例 4 : ヒトキメラ化抗 C D H 6 抗体 c h G O 1 9 の作製]

4) - 1 ヒトキメラ化抗 C D H 6 抗体 c h G O 1 9 の発現ベクターの構
築

4) - 1 - 1 キメラ及びヒト化軽鎖発現ベクター p C M A - L K の構築
プラスミド p c D N A 3. 3 - T O P O / L a c Z (I n v i t r o g e
n 社) を制限酵素 X b a I 及び P m e I で消化して得られる約 5. 4 k b の
フラグメントと、配列番号 50 に示すヒト軽鎖シグナル配列及びヒト κ 鎖定
常領域をコードする D N A 配列を含む D N A 断片を I n - F u s i o n A
d v a n t a g e P C R クローニングキット (C l o n t e c h 社) を用
いて結合して、p c D N A 3. 3 / L K を作製した。

[0253] p c D N A 3. 3 / L K からネオマイシン発現ユニットを除去すること
により p C M A - L K を構築した。

[0254] 4) - 1 - 2 キメラ及びヒト化 I g G 1 タイプ重鎖発現ベクター p C M
A - G 1 の構築

p C M A - L K を X b a I 及び P m e I で消化して軽鎖シグナル配列及び
ヒト κ 鎖定常領域を取り除いた D N A 断片と、配列番号 51 で示されるヒト
重鎖シグナル配列及びヒト I g G 1 定常領域をコードする D N A 配列を含む
D N A 断片を I n - F u s i o n A d v a n t a g e P C R クローニン
グキット (C l o n t e c h 社) を用いて結合して、p C M A - G 1 を構築

した。

[0255] 4) - 1 - 3 chG019重鎖発現ベクターの構築

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

[0256] 4) - 1 - 4 chG019軽鎖発現ベクターの構築

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

[0257] 4) - 2 ヒトキメラ化抗CDH6抗体chG019の生産及び精製

4) - 2 - 1 chG019の生産

FreeStyle 293F細胞(Invitrogen社)はマニュアルに従い、継代、培養をおこなった。対数増殖期の 1.2×10^9 個のFreeStyle 293F細胞(Invitrogen社)を3L Fernbach Erlenmeyer Flask(CORNING社)に播種し、FreeStyle 293 expression medium(Invitrogen社)で希釈して 2.0×10^6 細胞/mlに調製した。40mlのOpti-Pro SFM培地(Invitrogen社)に0.24mgの重鎖発現ベクターと0.36mgの軽鎖発現ベクターと1.8mgのPolyethyleneimine(PolyScience #24765)を加えて穏やかに攪拌し、さらに5分間放置した後にFree

Style 293F細胞に添加した。37℃、8%CO₂インキュベーターで4時間、90rpmで振とう培養後に600mlのEX-CELL VP RO培地 (SAFC Biosciences社)、18mlのGluta MAX 1 (GIBCO社)、及び30mlのYeastolate Ultrafiltrate (GIBCO社)を添加し、37℃、8%CO₂インキュベーターで7日間、90rpmで振とう培養して得られた培養上清をDisposable Capsule Filter (Advantec #CCS-045-E1H)でろ過した。

[0258] 4) -2-2 chG019の精製

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

[0259] 4) -3 ヒトキメラ化抗CDH6抗体chG019の結合性評価

4) -2で精製したヒトキメラ化抗CDH6抗体chG019のCDH6結合性をフローサイトメトリー法により確認した。実施例1) -1で作製したpcDNA3.1-hCDH6、又はpcDNA3.1-cynoCDH6、又はpcDNA3.1をそれぞれ293α細胞にLipofectam

ine 2000を用いて一過性に導入し、37℃、5% CO₂の条件下で一晩培養した後、細胞懸濁液を調製した。これらの細胞懸濁液にchG019を加えて4℃で1時間静置した後、5% FBS含有PBSで2回洗浄し、5% FBS含有PBSで500倍に希釈したPE標識F(ab')₂ Fragment 抗ヒトIgG、Fcγ抗体(JACKSON IMMUNORESEARCH)を加えて懸濁し、4℃で1時間静置した。5% FBS含有PBSで2回洗浄した後、5% FBS含有PBSに再懸濁し、フローサイトメーター(CantoII: BD Biosciences)で検出を行った。データ解析はFlowJo(TreeStar)で行った。図5に示すとおり、chG019は陰性コントロールであるpcDNA3.1導入293T細胞には結合せず、pcDNA3.1-hCDH6及びpcDNA3.1-cynoCDH6導入293T細胞に抗体濃度依存的に結合した。図5において横軸は抗体濃度を示し、縦軸は結合量をMean Fluorescent Intensity(平均蛍光強度)で示す。この結果から、chG019が、ヒトおよびカニクイザルCDH6に対して特異的に結合し、結合活性はほぼ同等であることがわかる。

[0260]

[実施例5：ヒト化抗CDH6抗体の作製]

5) - 1 抗CDH6抗体のヒト化体デザイン

5) - 1 - 1 chG019の可変領域の分子モデリング

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

[0261] 5) - 1 - 2 ヒト化 hG019 に対するアミノ酸配列の設計

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

[0262] 5) - 2 chG019 重鎖のヒト化

設計された 3 種の重鎖を hH01、hH02 及び hH04 と命名した。hH01 の重鎖全長アミノ酸配列を、配列番号 69 に記載する。配列番号 69 のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を、配列番号 70 に記載する。hH02 の重鎖全長アミノ酸配列を、配列番号 73 に記載する。配列番号 73 のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を、配列番号 74 に記載する。hH04 の重鎖全長アミノ酸配列を、配列番号 77 に記載する。配列番号 77 のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を、配列番号 78 に記載する。

[0263] 5) - 3 chG019 軽鎖のヒト化

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

ミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列は、配列番号 66 に記載する。

[0264] 5) - 4 重鎖及び軽鎖の組み合わせによるヒト化 h G O 1 9 の設計

h H O 1 及び h L O 2 からなる抗体を「H O 1 L O 2 抗体」又は「H O 1 L O 2」と称する。h H O 2 及び h L O 2 からなる抗体を「H O 2 L O 2 抗体」又は「H O 2 L O 2」と称する。h H O 2 及び h L O 3 からなる抗体を「H O 2 L O 3 抗体」又は「H O 2 L O 3」と称する。h H O 4 及び h L O 2 からなる抗体を「H O 4 L O 2 抗体」又は「H O 4 L O 2」と称する。

[0265] 5) - 5 ヒト化抗 C D H 6 抗体の発現

5) - 5 - 1 ヒト化 h G O 1 9 の重鎖発現ベクターの構築

5) - 5 - 1 - 1 ヒト化 h G O 1 9 - H O 1 タイプ重鎖発現ベクターの構築

配列番号 70 に示すヒト化 h G O 1 9 - H O 1 タイプ重鎖のヌクレオチド配列のヌクレオチド番号 36 乃至 440 に示される DNA 断片を合成した (G E N E A R T 社)。実施例 4) - 1 - 3 と同様の方法でヒト化 h G O 1 9 - H O 1 タイプ重鎖発現ベクターを構築した。

[0266] 5) - 5 - 1 - 2 ヒト化 h G O 1 9 - H O 2 タイプ重鎖発現ベクターの構築

配列番号 74 に示すヒト化 h G O 1 9 - H O 2 タイプ重鎖のヌクレオチド配列のヌクレオチド番号 36 乃至 440 に示される DNA 断片を合成した (G E N E A R T 社)。実施例 4) - 1 - 3 と同様の方法でヒト化 h G O 1 9 - H O 2 タイプ重鎖発現ベクターを構築した。

[0267] 5) - 5 - 1 - 3 ヒト化 h G O 1 9 - H O 4 タイプ重鎖発現ベクターの構築

配列番号 78 に示すヒト化 h G O 1 9 - H O 4 タイプ重鎖のヌクレオチド配列のヌクレオチド番号 36 乃至 440 に示される DNA 断片を合成した (G E N E A R T 社)。実施例 4) - 1 - 3 と同様の方法でヒト化 h G O 1 9 - H O 4 タイプ重鎖発現ベクターを構築した。

[0268] 5) - 5 - 2 ヒト化 h G O 1 9 の軽鎖発現ベクターの構築

5) - 5 - 2 - 1 ヒト化 h G O 1 9 - L O 2 タイプ軽鎖発現ベクターの構築

配列番号 6 2 に示すヒト化 h G O 1 9 - L O 2 タイプ軽鎖のヌクレオチド配列のヌクレオチド番号 3 7 乃至 3 9 9 に示されるヒト化 h G O 1 9 - L O 2 タイプ軽鎖の可変領域をコードする DNA 配列を含む DNA 断片を合成した (G E N E A R T 社) 。 I n - F u s i o n H D P C R クローニングキット (C l o n t e c h 社) を用いて、 p C M A - L K を制限酵素 B s i W I で切断した箇所に合成した DNA 断片を挿入することによりヒト化 h G O 1 9 - L O 2 タイプ軽鎖発現ベクターを構築した。

[0269] 5) - 5 - 2 - 2 ヒト化 h G O 1 9 - L O 3 タイプ軽鎖発現ベクターの構築

配列番号 6 6 に示すヒト化 h G O 1 9 - L O 3 タイプ軽鎖のヌクレオチド配列のヌクレオチド番号 3 7 乃至 3 9 9 に示されるヒト化 h G O 1 9 - L O 3 タイプ軽鎖の可変領域をコードする DNA 配列を含む DNA 断片を合成した (G E N E A R T 社) 。実施例 5) - 5 - 2 - 1 と同様の方法でヒト化 h G O 1 9 - L O 3 タイプ軽鎖発現ベクターを構築した。

[0270] 5) - 5 - 3 ヒト化 h G O 1 9 の調製

5) - 5 - 3 - 1 H O 1 L O 2 、 H O 2 L O 2 、 H O 2 L O 3 、 H O 4 L O 2 の生産

実施例 4) - 2 - 1 と同様の方法で生産した。実施例 5) - 4 に示した重鎖と軽鎖の組み合わせにより、 H O 1 L O 2 、 H O 2 L O 2 、 H O 2 L O 3 、 H O 4 L O 2 を生産した。

[0271] 5) - 5 - 3 - 2 H O 1 L O 2 、 H O 2 L O 2 、 H O 2 L O 3 、 H O 4 L O 2 の 2 s t e p 精製

実施例 5) - 5 - 3 - 1 で得られた培養上清を r P r o t e i n A アフィニティークロマトグラフィーとセラミックハイドロキシアパタイトの 2 段階工程で精製した。培養上清を P B S で平衡化した M a b S e l e c t S u R e が充填されたカラム (G E H e a l t h c a r e B i o s c i e n

c e 社製) にアプライした後に、カラム容量の 2 倍以上の P B S でカラムを洗淨した。次に 2 M アルギニン塩酸塩溶液 (p H 4 . 0) で抗体を溶出した。抗体の含まれる画分を透析 (T h e r m o S c i e n t i f i c 社、S l i d e - A - L y z e r D i a l y s i s C a s s e t t e) により P B S へのバッファー置換を行い、5 m M リン酸ナトリウム / 5 0 m M M E S / p H 7 . 0 のバッファーで 5 倍希釈した後に、5 m M N a P i / 5 0 m M M E S / 3 0 m M N a C l / p H 7 . 0 のバッファーで平衡化したセラミックハイドロキシアパタイトカラム (日本バイオラッド、B i o - S c a l e C H T T y p e - 1 H y d r o x y a p a t i t e C o l u m n) にアプライした。塩化ナトリウムによる直線的濃度勾配溶出を実施し、抗体の含まれる画分を集めた。その画分を透析 (T h e r m o S c i e n t i f i c 社、S l i d e - A - L y z e r D i a l y s i s C a s s e t t e) により H B S o r (2 5 m M ヒスチジン / 5 % ソルビトール、p H 6 . 0) へのバッファー置換を行った。C e n t r i f u g a l U F F i l t e r D e v i c e V I V A S P I N 2 0 (分画分子量 U F 1 0 K, S a r t o r i u s 社) にて抗体を濃縮し、I g G 濃度を 2 0 m g / m l に調製した。最後に M i n i s a r t - P l u s f i l t e r (S a r t o r i u s 社) でろ過し、精製サンプルとした。

[0272]

[参考例 1 : 抗 C D H 6 抗体 N O V 0 7 1 2 の作製]

実施例で用いた抗 C D H 6 抗体 N O V 0 7 1 2 は、国際公開第 2 0 1 6 / 0 2 4 1 9 5 号に記載の N O V 0 7 1 2 の軽鎖全長、及び重鎖全長のアミノ酸配列 (それぞれ、国際公開第 2 0 1 6 / 0 2 4 1 9 5 の配列番号 2 3 5 及び配列番号 2 3 4) を参照して作製した。

[0273] 参考例 1) - 1 抗 C D H 6 抗体 N O V 0 7 1 2

参考例 1) - 1 - 1 抗 C D H 6 抗体 N O V 0 7 1 2 の重鎖発現ベクターの構築

配列番号 8 4 に示す N O V 0 7 1 2 の重鎖のヌクレオチド配列のヌクレオ

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

[0274] 参考例 1) - 1 - 2 抗 CDH6 抗体 NOV0712 の軽鎖発現ベクターの構築

配列番号 82 に示す NOV0712 の軽鎖のヌクレオチド配列のヌクレオチド番号 37 乃至 405 に示される NOV0712 の軽鎖の可変領域をコードする DNA 配列を含む DNA 断片を合成した (GENEART 社)。実施例 5) - 5 - 2 - 1 と同様の方法で NOV0712 の軽鎖発現ベクターを構築した。当該 NOV0712 の軽鎖発現ベクターにより発現する NOV0712 の軽鎖のアミノ酸配列を、配列番号 81 に示す。配列番号 81 に示されるアミノ酸配列中、1 ~ 20 番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列はシグナル配列である。

[0275] 参考例 1) - 2 抗 CDH6 抗体 NOV0712 の調製

参考例 1) - 2 - 1 抗 CDH6 抗体 NOV0712 の生産

実施例 4) - 2 - 1 と同様の方法で NOV0712 を生産した。

[0276] 参考例 1) - 2 - 2 抗 CDH6 抗体 NOV0712 の 1st step 精製

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

[0277]

[実施例 6 : ヒト化 hG019 および NOV0712 の *in vitro* 評価]

6) - 1 ヒト化 hG019 の結合性評価

6) - 1 - 1 ヒト化 hG019 のヒト CDH6 抗原結合能

抗体と抗原（Recombinant Human CDH6 Fc His chimera, R&D Systems）との解離定数測定は、Biacore T200（GEヘルスケアバイオサイエンス）を使用し、固定化した抗His抗体に抗原をリガンドとして捕捉（キャプチャー）し、抗体をアナライトとして測定するキャプチャー法にて行った。抗ヒスチジン抗体（His capture kit、GEヘルスケアバイオサイエンス）は、センサーチップCM5（GEヘルスケアバイオサイエンス）へ、アミンカップリング法にて約1000RU共有結合させた。リファレンスセルにも同様に固定化した。ランニングバッファーとして1mM CaCl_2 を添加したHBS-P+（10mM HEPES pH7.4、0.15M NaCl、0.05% Surfactant P20）を用いた。抗ヒスチジン抗体を固定化したチップ上に、抗原を60秒間添加した後、抗体の希釈系列溶液（0.391–100nM）を流速30 μl /分で300秒間添加し、引き続き600秒間の解離相をモニターした。再生溶液として、5M MgCl_2 を添加したGlycine溶液pH1.5を流速10 μl /分で30秒間、2回添加した。データの解析は、分析ソフトウェア（BIAevaluation software, version 4.1）のSteady State Affinityモデルを用いて、解離定数（KD）を算出した。結果を表2に示す。

[0278] [表2]

	抗体	KD (M)
1	H02L02	1.5E-09
2	H02L02	1.1E-09
3	H02L03	1.4E-09
4	H04L02	1.1E-09

[0279] 6) –1–2 ヒト、サル、マウス、ラットCDH6に対する結合性

実施例 1) - 1 で作製した p c D N A 3. 1 - h C D H 6、p c D N A 3. 1 - c y n o C D H 6、p 3 x F L A G - C M V - 9 - m C D H 6、p 3 x F L A G - C M V - 9 - r C D H 6 を、2 9 3 α 細胞に L i p o f e c t a m i n e 2 0 0 0 を用いて一過性に導入し、3 7 °C、5 % C O ₂ の条件下で一晩培養した後、細胞懸濁液を調製した。陰性コントロールとして、遺伝子導入していない 2 9 3 α 細胞を用いた。上記にて作製した 2 9 3 α 細胞懸濁液を遠心し、上清を除去した後、実施例 5) - 5 - 3 で調製したヒト化 h G O 1 9 抗体 4 種（クローン番号は、H 0 1 L 0 2、H 0 2 L 0 2、H 0 2 L 0 3 および H 0 4 L 0 2）、又は、ヒト I g G 1 コントロール（C a l b i o c h e m）を加えて懸濁し、4 °C で 1 時間静置した。5 % F B S 含有 P B S で 2 回洗浄した後、5 % F B S 含有 P B S で 5 0 0 倍に希釈した a n t i - h u m a n F c g P E g o a t F (a b ') （J a c k s o n l a b o r a t o r y）を加えて懸濁し、4 °C で 1 時間静置した。5 % F B S 含有 P B S で 2 回洗浄した後、フローサイトメーター（C a n t o I I : B D B i o s c i e n c e s）で検出を行った。データ解析は F l o w J o (T r e e S t a r) で行った。図 6 - 1 及び図 6 - 2 において横軸は抗体濃度を示し、縦軸は結合量を M e a n F l u o r e s c e n t I n t e n s i t y（平均蛍光強度）で示す。図 6 - 1 及び図 6 - 2 に示すとおり、陰性コントロールであるヒト I g G 1 コントロールは、いずれの C D H 6 遺伝子導入細胞に対しても結合しない。ヒト化 h G O 1 9 抗体 4 種（クローン番号は、H 0 1 L 0 2、H 0 2 L 0 2、H 0 2 L 0 3 および H 0 4 L 0 2）はヒト及びカニクイザル C D H 6 に結合するが、マウス及びラット C D H 6 には結合しない。いずれの抗体も、陰性コントロールである空ベクター p c D N A 3. 1 導入細胞には結合しない。一方、N O V 0 7 1 2 抗体はヒト、カニクイザル、マウス、及びラット C D H 6 全てに結合活性を示すことが国際公開第 2 0 1 6 / 0 2 4 1 9 5 号に示されている。この結果、本明細書で取得したヒト化 h G O 1 9 抗体 4 種は、N O V 0 7 1 2 抗体と異なる結合性質を示す抗 C D H 6 抗体であることが示された。

[0280] 6) - 2 ヒト化hG019およびNOV0712のCDH6結合部位の解析

6) - 2 - 1 ドメイン欠失体を用いたエピトープ解析

実施例2) - 2 - 1 で作成した各ドメイン欠失体発現ベクター、及び全長hCDH6を発現するpcDNA3.1-hCDH6をLipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific) を用いて一過性に導入し、37℃、5% CO₂の条件下で一晩培養した後、細胞懸濁液を調製した。遺伝子導入した293α細胞懸濁液を遠心し、上清を除去した後、実施例5) - 5 - 3で調製したヒト化hG019抗体4種（クローン番号は、H01L02、H02L02、H02L03およびH04L02）、又は、参考例1で調製した抗CDH6抗体NOV0712、又は、陰性コントロールとしてヒトIgG1 (Calbiochem) を加えて懸濁し、4℃で1時間静置した。5% FBS含有PBSで2回洗浄した後、5% FBS含有PBSで500倍に希釈したAPC-anti-human IgG goat F(ab')₂ (Jackson Laboratory) を加えて懸濁し、4℃で1時間静置した。5% FBS含有PBSで2回洗浄した後、フローサイトメーター (Canto II: BD Biosciences) で検出を行った。データ解析はFlowJo (TreeStar) で行った。その結果を図7-1～図7-6に示す。図7-1～図7-6のヒストグラムにおいて、横軸は抗体結合量を表すAPCの蛍光強度、縦軸は細胞数を示す。網掛けで示すヒストグラムは遺伝子を導入していない陰性コントロール293α細胞を用いた場合を示し、白抜き実線で示すヒストグラムは、全長hCDH6又は各ECドメイン欠失293α細胞を用いた場合を示す。細胞表面の全長hCDH6又は各ECドメイン欠失体に抗体が結合した場合は、蛍光強度が増強する。ヒトIgG1コントロールはいずれの導入細胞にも結合しない。ヒト化hG019抗体4種（クローン番号は、H01L02、H02L02、H02L03およびH04L02）は、全長hCDH6、EC1欠失体、EC2欠失体、EC4欠失体、及びEC5

欠失体には結合するが、EC 3 欠失体には結合しない。すなわち、ヒト化 h G O 1 9 抗体 4 種は h C D H 6 の E C 3 をエピトープとして特異的に結合することが示された。一方、抗 C D H 6 抗体 N O V 0 7 1 2 は、全長 h C D H 6、EC 1 欠失体、EC 2 欠失体、EC 3 欠失体、及び EC 4 欠失体には結合するが、EC 5 欠失体には結合しない。すなわち、抗 C D H 6 抗体 N O V 0 7 1 2 抗体は h C D H 6 の E C 5 をエピトープとして特異的に結合することが示され、国際公開第 2 0 1 6 / 0 2 4 1 9 5 号に記載されている N O V 0 7 1 2 のエピトープ情報と一致する。この結果から、N O V 0 7 1 2 と本明細書で取得したヒト化 h G O 1 9 抗体 4 種は、異なる性質を示す抗 C D H 6 抗体であることが示された。

[0281] 6) - 2 - 2 抗体の結合競合アッセイ

6) - 2 - 2 - 1 7 8 6 - O / h C D H 6 安定発現細胞株の作製

7 8 6 - O / h C D H 6 安定発現細胞株は、7 8 6 - O 細胞 (A T C C) にヒト C D H 6 全長発現用組換えレトロウイルスを感染させることにより作製した。ヒト C D H 6 発現レトロウイルスベクター (p Q C X I N - h C D H 6) は、ヒト C D H 6 タンパク質 (N P _ 0 0 4 9 2 3) をコードする c D N A 発現ベクター (O r i G e n e 社 R C 2 1 7 8 8 9) を用いて、当業者に公知な方法に従いレトロウイルスベクター p Q C X I N (C L O N T E C H) に組み込むことにより作製された。F u G e n e H D (P r o m e g a) を用いてレトロウイルスパッケージング細胞 R e t r o P a c k P T 6 7 (C L O N T E C H) に p Q C X I N - h C D H 6 を一過性に導入し、4 8 時間後に組換えレトロウイルスを含む培養上清を回収し、7 8 6 - O 細胞培養系に添加することで同細胞に感染させた。感染 3 日後から、G 4 1 8 (G i b c o) を終濃度 5 0 m g / m L で添加した培地で 3 7 ° C、5 % C O 2 の条件下で培養を行い感染細胞の薬剤選抜を行うことで、ヒト C D H 6 を安定的に発現する細胞株 7 8 6 - O / h C D H 6 を樹立した。実施例 2) - 3 - 1 と同様にフローサイトメトリーにて安定発現株でのヒト C D H 6 の高発現を確認した (図 8)。検出用抗体には 5 % F B S 含有 P B S で 5

00倍に希釈したGoat anti-Mouse IgG1 Secondary Antibody Alexa Fluor 647 (Thermo Fisher Scientific)を使用した。その結果を図8に示す。図8のヒストグラムにおいて、横軸は抗体結合量を表すAlexa Fluor 647の蛍光強度、縦軸は細胞数を示す。網掛けで示すヒストグラムは陰性コントロールmIgG1で染色した場合を示し、白抜き実線で示すヒストグラムは抗ヒトCDH6抗体で染色した場合を示す。細胞表面のhCDH6に抗体が結合したことによって蛍光強度が増強したことを示す。mIgG1コントロールはいずれの細胞にも結合しない。この結果、786-O/hCDH6安定発現細胞株では親株786-O細胞と比較して、ヒトCDH6を高発現することが示された。

[0282] 6) -2-2-2 ラベル化H01L02及びラベル化NOV0712を用いた結合競合アッセイ

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

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

[0283] 6) -3 ヒト化hG019およびNOV0712の内在化活性評価

ヒト化hG019およびNOV0712の内在化活性は、タンパク質合成を阻害する毒素（サポリン）を結合させた抗ヒトIgG試薬Hum-ZAP（ADVANCED TARGETING SYSTEMS）を用いて評価した。すなわち、ヒトCDH6陽性卵巣腫瘍細胞株NIH:OVCAR-3（ATCC）を 4×10^3 cells/wellで96wellプレートに播種して37℃、5% CO₂の条件下で一晩培養した。ヒトCDH6陽性腎細胞腫瘍細胞株786-O（ATCC）は 1×10^3 cells/wellで96wellプレートに播種して一晩培養した。ヒトCDH6陽性卵巣腫瘍細胞株PA-1（ATCC）を 1×10^3 cells/wellで96wellプレートに播種して37℃、5% CO₂の条件下で一晩培養した。翌日、抗CDH6抗体（終濃度：1 nM）、又は、陰性コントロール抗体としてヒトIgG1抗体（Calbiochem）を添加した。さらにHum-ZAP（終濃度：0.5 nM）または、陰性コントロールとして毒素を

結合していない F (a b ') 2 F r a g m e n t G o a t A n t i -
h u m a n I g G , F c (g a m m a) F r a g m e n t S p e c i
f i c (J A C K S O N I M M U N O R E S E A R C H) (終 濃 度 : 0 .
5 n M) を 添 加 し 、 3 日 間 3 7 ° C 、 5 % C O 2 条 件 下 で 培 養 し た 。 生 存 細 胞
数 は 、 C e l l T i t e r - G l o TM L u m i n e s c e n t C e l l
V i a b i l i t y A s s a y に よ る A T P 活 性 (R L U) の 定 量 で 測
定 し た 。 こ の 評 価 で は 、 ヒ ト 化 抗 C D H 6 抗 体 の 内 在 化 活 性 に 依 存 し て H u
m - Z A P が 細 胞 内 に 取 り 込 ま れ 、 タ ン パ ク 合 成 を 阻 害 す る サ ボ リ ン が 細 胞
内 に 放 出 さ れ る こ と で 、 細 胞 増 殖 が 抑 制 さ れ る 。 抗 C D H 6 抗 体 添 加 に よ る
細 胞 増 殖 抑 制 作 用 は 、 H u m - Z A P の 代 わ り に 陰 性 コ ン ト ロ ー ル を 添 加 し
た ウ ェ ル の 生 存 細 胞 数 を 1 0 0 % と し た 相 対 生 存 率 で 表 記 し た 。 図 1 0 - 1 ~
図 1 0 - 3 に グ ラ フ お よ び 細 胞 生 存 率 の 表 を 示 す 。 本 実 験 に お い て 内 在 化 活
性 が 強 い 抗 体 は 低 い 細 胞 生 存 率 を 示 す と 考 え ら れ る 。 こ の 結 果 、 N O V 0 7
1 2 は ヒ ト 化 h G 0 1 9 抗 体 4 種 は 3 種 の 細 胞 株 い ず れ に お い て も 細 胞 生 存
率 か ら 予 測 さ れ る 内 在 化 率 は 約 5 0 ~ 7 5 % で あ り 、 非 常 に 高 い 内 在 化 活 性
を 示 し 、 N O V 0 7 1 2 と 比 較 し て 、 さ ら に 高 い 内 在 活 性 を 示 す 。 A D C の
薬 効 メ カ ニ ズ ム か ら 、 高 い 内 在 化 活 性 を 有 す る 抗 体 は 、 A D C 化 抗 体 を し て
、 よ り 適 し て い る と 考 え ら れ る 。

[0284]

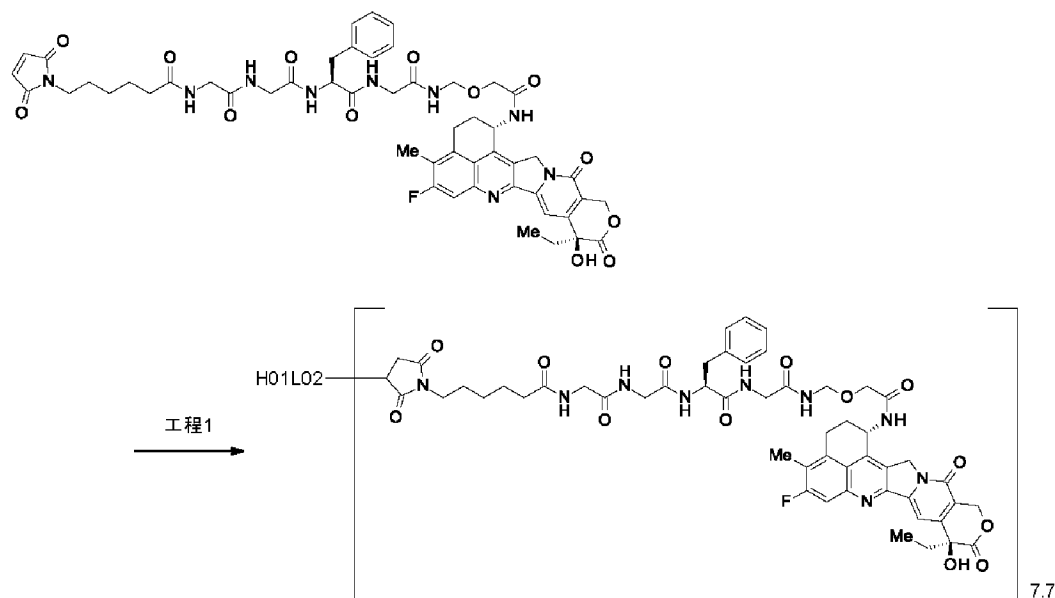
[実施例 7 : ヒト化 h G 0 1 9 - 薬物コンジュゲートの作製]

7) - 1 抗体-薬物コンジュゲートの作製 H O 1 L 0 2 - D X d

工程 1 : 抗体-薬物コンジュゲート (1)

[0285]

[化11]



[0286] 抗体の還元：実施例5にて作製したH01L02を、製造方法1に記載した共通操作B（280nm吸光係数として1.53mLmg⁻¹cm⁻¹を使用）及びCを用いて、PBS6.0/EDTAにて9.85mg/mLに調製した。本溶液（5.7mL）に10mM TCEP（東京化成工業株式会社）水溶液（0.231mL；抗体一分子に対して6.0当量）及び1Mリン酸水素二カリウム水溶液（Nacalai Tesque, Inc.；0.0855mL）を加えた。本溶液のpHが7.0±0.1内であることを確認した後に、37℃で2時間インキュベートすることによって、抗体内鎖間部のジスルフィド結合を還元した。

[0287] 抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：上記溶液を15℃で10分間インキュベートした。次いでN-[6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ヘキサノイル]グリシルグリシル-*L*-フェニルアラニル-N-[(2-{[(1S,9S)-9-エチル-5-フルオロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-10,13-ジオキソ-2,3,9,10,13,15-ヘキサヒドロ-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-1-イル]

アミノ}-2-オキソエトキシ)メチル]グリシンアミドの10mMジメチルスルホキシド溶液(0.386mL;抗体一分子に対して10当量)を加え、15℃で1時間インキュベートし、薬物リンカーを抗体へ結合させた。次に、100mM NAC(Sigma-Aldrich Co. LLC)水溶液(0.0347mL;抗体一分子に対して9当量)を加え、さらに室温にて20分間攪拌し、薬物リンカーの反応を停止させた。

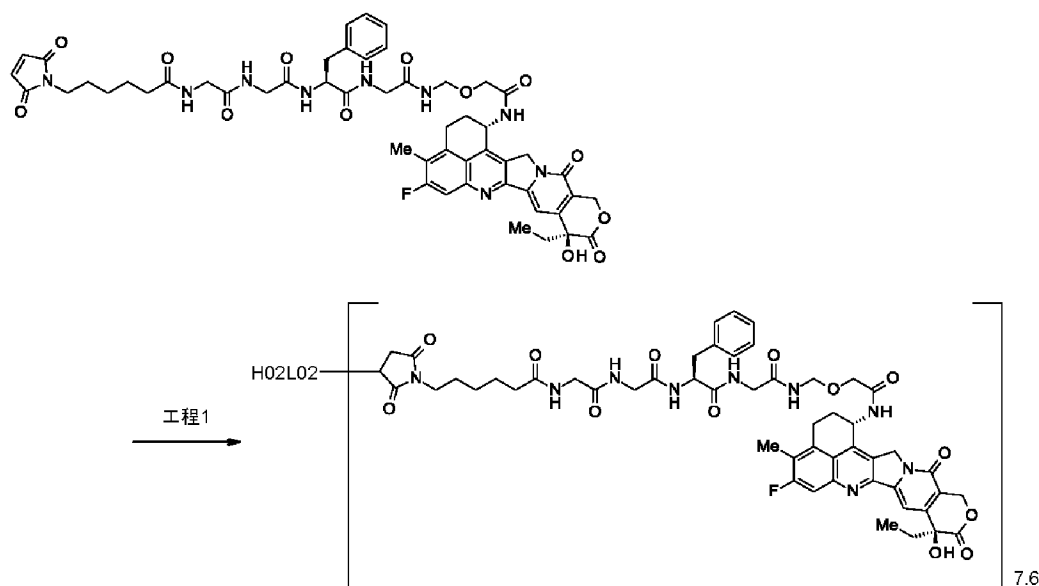
[0288] 精製：上記溶液を、製造方法1に記載した共通操作Dによる精製を行い、標記抗体-薬物コンジュゲート「H01L02-ADC」を含有する溶液を19mL得た。

[0289] 特性評価：製造方法1に記載した共通操作E($\epsilon_{D,280}=5440$ 、 $\epsilon_{D,370}=21240$ を使用)を使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度：2.26mg/mL, 抗体収量：42.9mg(76%), 共通操作Eにて測定された抗体一分子あたりの薬物平均結合数(n):5.9; 共通操作Fにて測定された抗体一分子あたりの薬物平均結合数(n):7.7。

[0290] 7)-2 抗体-薬物コンジュゲートの作製 H02L02-DXd
工程1：抗体-薬物コンジュゲート(2)

[0291] [化12]



[0292] 抗体の還元：実施例 5 にて作製した H O 2 L O 2 を、製造方法 1 に記載した共通操作 B（280 nm 吸光係数として $1.51 \text{ mL mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ を使用）及び C を用いて、PBS 6.0 / EDTA にて 9.95 mg / mL に調製した。本溶液（5.7 mL）に 10 mM TCEP（東京化成工業株式会社）水溶液（0.234 mL；抗体一分子に対して 6.0 当量）及び 1 M リン酸水素二カリウム水溶液（Nacalai Tesque, Inc.；0.0855 mL）を加えた。本溶液の pH が 7.0 ± 0.1 内であることを確認した後に、37℃で 2 時間インキュベートすることによって、抗体内鎖間部のジスルフィド結合を還元した。

[0293] 抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：上記溶液を 15℃で 10 分間インキュベートした。次いで N-〔6-（2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル）ヘキサノイル〕グリシルグリシル-ル-フェニルアラニル-N-〔（2-〔（1S,9S）-9-エチル-5-フルオロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-10,13-ジオキソ-2,3,9,10,13,15-ヘキサヒドロ-1H,12H-ベンゾ〔de〕ピラノ〔3',4':6,7〕インドリジノ〔1,2-b〕キノリン-1-イル〕アミノ〕-2-オキソエトキシ）メチル〕グリシンアミドの 10 mM ジメチルスルホキシド溶液（0.389 mL；抗体一分子に対して 10 当量）を加え、15℃で 1 時間インキュベートし、薬物リンカーを抗体へ結合させた。次に、100 mM NAC（Sigma-Aldrich Co. LLC）水溶液（0.0350 mL；抗体一分子に対して 9 当量）を加え、さらに室温にて 20 分間攪拌し、薬物リンカーの反応を停止させた。

[0294] 精製：上記溶液を、製造方法 1 に記載した共通操作 D による精製を行い、標記抗体-薬物コンジュゲート「H O 2 L O 2 -ADC」を含有する溶液を 19 mL 得た。

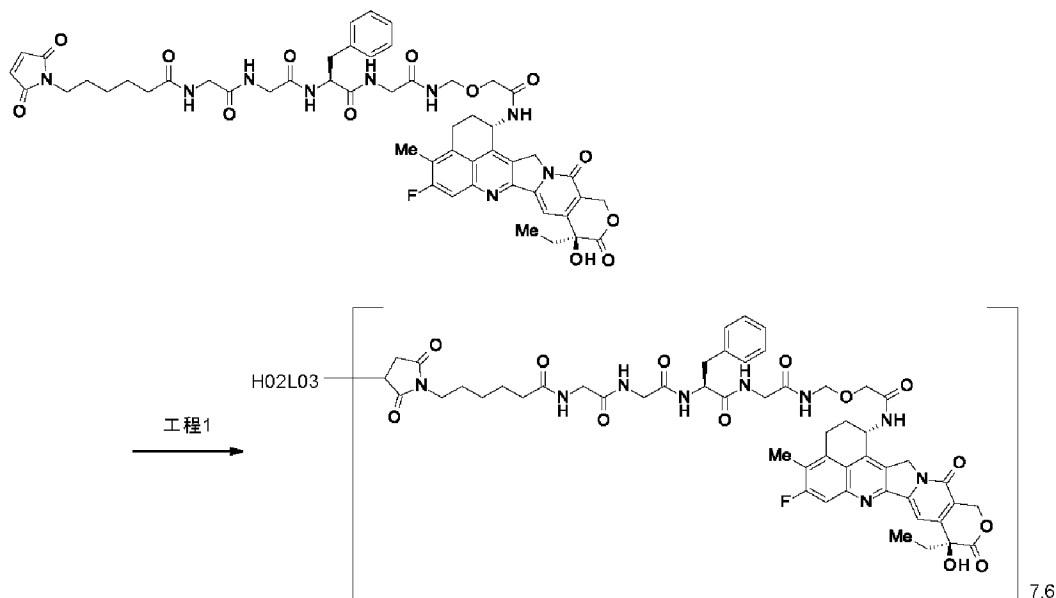
[0295] 特性評価：製造方法 1 に記載した共通操作 E（ $\epsilon_{D,280} = 5440$ 、 $\epsilon_{D,370} = 21240$ を使用）を使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度：2.61 mg/mL，抗体収量：49.6 mg（87%），共通操作Eにて測定された抗体一分子あたりの薬物平均結合数（n）：5.9；共通操作Fにて測定された抗体一分子あたりの薬物平均結合数（n）：7.6。

[0296] 7) - 3 抗体-薬物コンジュゲートの作製 H02L03-DXd

工程1：抗体-薬物コンジュゲート（3）

[0297] [化13]



[0298] 抗体の還元：実施例5にて作製したH02L03を、製造方法1に記載した共通操作B（280 nm吸光係数として1.53 mL mg⁻¹ cm⁻¹を使用）及びCを用いて、PBS 6.0/EDTAにて9.86 mg/mLに調製した。本溶液（5.7 mL）に10 mM TCEP（東京化成工業株式会社）水溶液（0.270 mL；抗体一分子に対して7.0当量）及び1 Mリン酸水素二カリウム水溶液（Nacalai Tesque, Inc.；0.0855 mL）を加えた。本溶液のpHが7.0±0.1内であることを確認した後に、37℃で2時間インキュベートすることによって、抗体内鎖間部のジスルフィド結合を還元した。

[0299] 抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：上記溶液を15℃で10分間

インキュベートした。次いでN-[6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ヘキサノイル]グリシルグリシル-L-フェニルアラニル-N-[(2-{[(1S,9S)-9-エチル-5-フルオロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-10,13-ジオキソ-2,3,9,10,13,15-ヘキサヒドロ-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-1-イル]アミノ}-2-オキソエトキシ)メチル]グリシンアミドの10mMジメチルスルホキシド溶液(0.386mL;抗体一分子に対して10当量)を加え、15℃で1時間インキュベートし、薬物リンカーを抗体へ結合させた。次に、100mM NAC (Sigma-Aldrich Co. LLC)水溶液(0.0347mL;抗体一分子に対して9当量)を加え、さらに室温にて20分間攪拌し、薬物リンカーの反応を停止させた。

[0300] 精製：上記溶液を、製造方法1に記載した共通操作Dによる精製を行い、標記抗体-薬物コンジュゲート「H01L02-ADC」を含有する溶液を19mL得た。

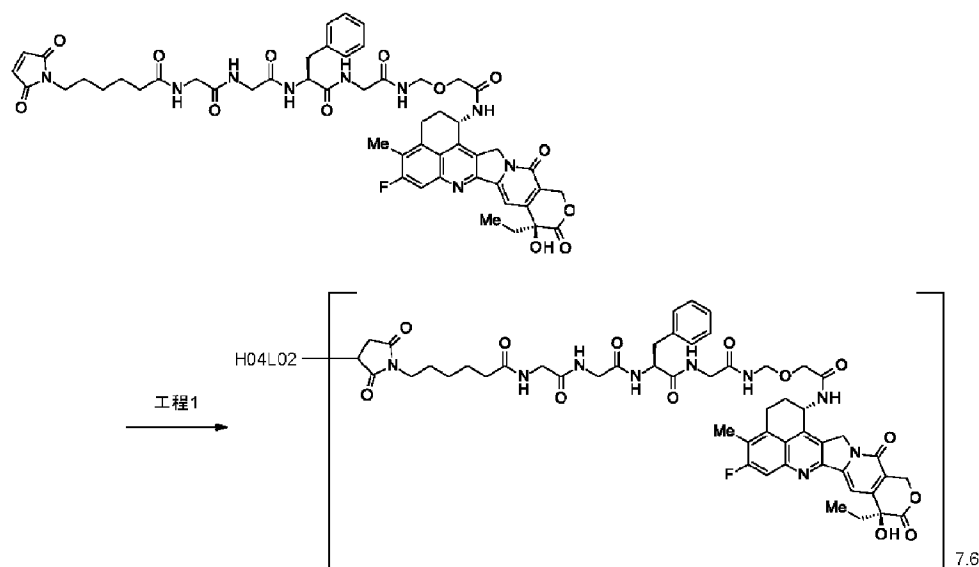
[0301] 特性評価：製造方法1に記載した共通操作E ($\epsilon_{D,280}=5440$ 、 $\epsilon_{D,370}=21240$ を使用)を使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度：2.71mg/mL, 抗体収量：51.4mg (91%) , 共通操作Eにて測定された抗体一分子あたりの薬物平均結合数(n)：5.7 ; 共通操作Fにて測定された抗体一分子あたりの薬物平均結合数(n)：7.6。

[0302] 7)-4 抗体-薬物コンジュゲートの作製 H04L02-DXd
工程1：抗体-薬物コンジュゲート(4)

[0303]

[化14]



[0304] 抗体の還元：実施例5にて作製したH04L02を、製造方法1に記載した共通操作B（280nm吸光係数として1.53mLmg⁻¹cm⁻¹を使用）及びCを用いて、PBS6.0/EDTAにて9.86mg/mLに調製した。本溶液（5.7mL）に10mM TCEP（東京化成工業株式会社）水溶液（0.232mL；抗体一分子に対して6.0当量）及び1Mリン酸水素二カリウム水溶液（Nacalai Tesque, Inc.；0.0855mL）を加えた。本溶液のpHが7.0±0.1内であることを確認した後に、37℃で2時間インキュベートすることによって、抗体内鎖間部のジスルフィド結合を還元した。

[0305] 抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：上記溶液を15℃で10分間インキュベートした。次いでN-[6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ヘキサノイル]グリシルグリシル-L-フェニルアラニル-N-[(2-{[(1S,9S)-9-エチル-5-フルオロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-10,13-ジオキソ-2,3,9,10,13,15-ヘキサヒドロ-1H,12H-ベンゾ[d,e]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-1-イル]

アミノ}-2-オキソエトキシ)メチル]グリシンアミドの10mMジメチルスルホキシド溶液(0.386mL;抗体一分子に対して10当量)を加え、15℃で1時間インキュベートし、薬物リンカーを抗体へ結合させた。次に、100mM NAC (Sigma-Aldrich Co. LLC)水溶液(0.0347mL;抗体一分子に対して9当量)を加え、さらに室温にて20分間攪拌し、薬物リンカーの反応を停止させた。

[0306] 精製：上記溶液を、製造方法1に記載した共通操作Dによる精製を行い、標記抗体-薬物コンジュゲート「H04L02-ADC」を含有する溶液を19mL得た。

[0307] 特性評価：製造方法1に記載した共通操作E ($\epsilon_{D, 280} = 5440$ 、 $\epsilon_{D, 370} = 21240$ を使用)を使用して、下記の特性値を得た。
抗体濃度：2.56mg/mL, 抗体収量：48.7mg (87%) , 共通操作Eにて測定された抗体一分子あたりの薬物平均結合数(n)：5.8 ; 共通操作Fにて測定された抗体一分子あたりの薬物平均結合数(n)：7.6。

[0308]

[参考例2：NOV0712-薬物コンジュゲートの作製]

参考例2)-1 抗体-薬物コンジュゲートの作製 NOV0712-D
M4

抗体-薬物コンジュゲート(5)

抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：参考例1にて作製したNOV0712を、製造方法1に記載した共通操作B (280nm吸光係数として1.51mLmg⁻¹cm⁻¹を使用)及びCを用いて、20mM HEPES 8.1 (LIFE TECHNOLOGIES社製 HEPES, 1M Buffer Solution (20mL)を1M水酸化ナトリウムでpH 8.1とした後、蒸留水にて1Lとした)にて9.7mg/mLに調製し、20℃で10分間インキュベートした。次いでWO2016/024195号公開特許公報に記載の10mM 1-(2,5-ジオキソピロリジン-1

ーイルオキシ)ー1ーオキソー4ー(ピリジンー2ーイルジスルファニル)
ブタンー2ースルホン酸のDMA溶液(0.366 mL; 抗体一分子に対
して5.2当量)、10 mM N2ーデアセチルーデアセチルーN2ー(4
ーメチルー4ーメルカプトー1ーオキソペンチル)ーメイタンシン(DM4
)のDMA溶液(0.366 mL; 抗体一分子に対して6.8当量)、及び
0.243 mLのDMAを加え、20℃で16時間インキュベートし、薬物
リンカーを抗体へ結合させた。次に、1 M 酢酸水溶液を加えpH 5.0と
し、さらに室温にて20分間攪拌し、薬物リンカーの反応を停止させた。

[0309] 精製：上記溶液を、製造方法1に記載した共通操作Dによる精製を行い、
標記抗体ー薬物コンジュゲート「NOV0712ーDM4」を含有する溶液
を28 mL得た。

[0310] 特性評価：製造方法1に記載した共通操作E ($\epsilon_{A, 280} = 200500$ 、 $\epsilon_{A, 252} = 76295$ 、 $\epsilon_{D, 280} = 43170$ 、及び $\epsilon_{D, 252} = 23224$ を使
用)を使用して、下記の特性値を得た。

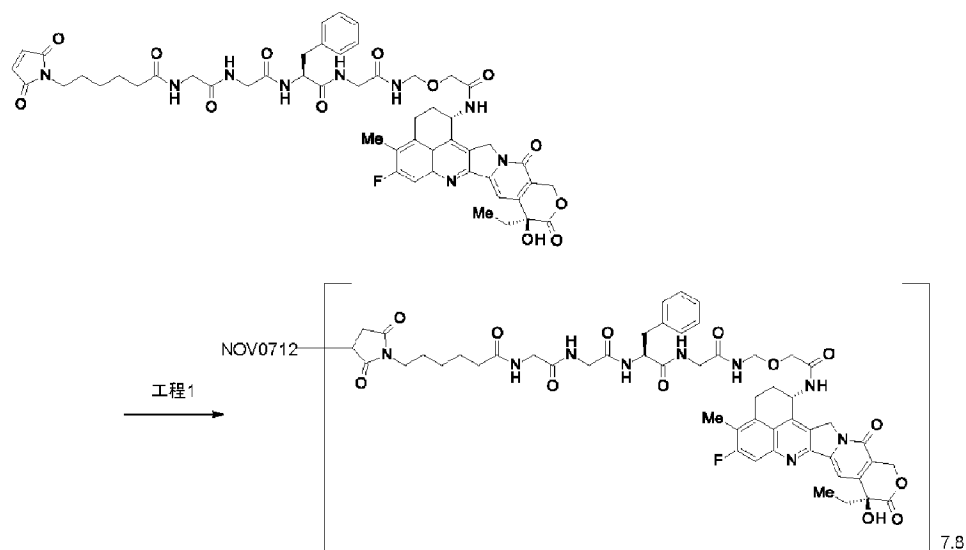
抗体濃度：2.58 mg/mL, 抗体収量：72.2 mg (93%)、共通
操作Eにて測定された抗体一分子あたりの薬物平均結合数(n)：3.0。

[0311] 参考例2)ー2 抗体ー薬物コンジュゲートの作製 NOV0712ーD
Xd

工程1：抗体ー薬物コンジュゲート(6)

[0312]

[化15]



[0313] 抗体の還元：参考例1にて作製したNOV0712を、製造方法1に記載した共通操作B（280nm吸光係数として1.51mLmg⁻¹cm⁻¹を使用）及びCを用いて、PBS6.0/EDTAにて9.26mg/mLに調製した。本溶液（6.6mL）に10mM TCEP（東京化成工業株式会社）水溶液（0.254mL；抗体一分子に対して6.0当量）及び1Mリン酸水素二カリウム水溶液（Nacalai Tesque, Inc.；0.0990mL）を加えた。本溶液のpHが7.0±0.1内であることを確認した後に、37℃で2時間インキュベートすることによって、抗体内鎖間部のジスルフィド結合を還元した。

[0314] 抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：上記溶液を15℃で10分間インキュベートした。次いでN-[6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ヘキサノイル]グリシルグリシル-L-フェニルアラニル-N-[(2-{[(1S,9S)-9-エチル-5-フルオロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-10,13-ジオキソ-2,3,9,10,13,15-ヘキサヒドロ-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-1-イル]アミノ}-2-オキソエトキシ)メチル]グリシンアミドの10mMジメ

チルスルホキンド溶液（0.381 mL；抗体一分子に対して9当量）を加え、15℃で1時間インキュベートし、薬物リンカーを抗体へ結合させた。次に、100 mM NAC（Sigma-Aldrich Co. LLC）水溶液（0.0381 mL；抗体一分子に対して9当量）を加え、さらに室温にて20分間攪拌し、薬物リンカーの反応を停止させた。

[0315] 精製：上記溶液を、製造方法1に記載した共通操作Dによる精製を行い、標記抗体－薬物コンジュゲート「NOV0712-ADC」を含有する溶液を23.5 mL得た。

[0316] 特性評価：製造方法1に記載した共通操作E（ $\epsilon_{D, 280} = 5440$ 、 $\epsilon_{D, 370} = 21240$ を使用）を使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度：2.26 mg/mL，抗体収量：56.4 mg（92%），共通操作Eにて測定された抗体一分子あたりの薬物平均結合数（n）：6.4；共通操作Fにて測定された抗体一分子あたりの薬物平均結合数（n）：7.8。

[0317]

[参考例3：H01L02-DM4の作製]

参考例3）－1 抗体－薬物コンジュゲートの作製 H01L02-DM4

抗体－薬物コンジュゲート（7）

抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：実施例5にて作製したH01L02を、製造方法1に記載した共通操作B（280 nm吸光係数として1.53 mL mg⁻¹ cm⁻¹を使用）及びCを用いて、20 mM HEPES 8.1（LIFE TECHNOLOGIES社製 HEPES，1 M Buffer Solution（20 mL）を1 M水酸化ナトリウムでpH 8.1とした後、蒸留水にて1 Lとした）にて9.8 mg/mLに調製し、20℃で10分間インキュベートした。次いでWO2016/024195号公開特許公報に記載の10 mM 1-（2，5-ジオキソピロリジン-1-イルオキシ）-1-オキソ-4-（ピリジン-2-イルジスルファニル）

ブタン-2-スルホン酸のDMA溶液（0.062 mL；抗体一分子に対して11.5当量）、10 mM N2-デアセチル-N2-（4-メチル-4-メルカプト-1-オキソペンチル）-メイタンシン（DM4）のDMA溶液（0.082 mL；抗体一分子に対して15.1当量）を加え、20℃で18時間インキュベートし、薬物リンカーを抗体へ結合させた。次に、1 M 酢酸水溶液を加えpH 5.0とし、さらに室温にて20分間攪拌し、薬物リンカーの反応を停止させた。

[0318] 精製：上記溶液を、製造方法1に記載した共通操作Dによる精製を行い、標記抗体-薬物コンジュゲート「H01L02-DM4」を含有する溶液を3.5 mL得た。

[0319] 特性評価：製造方法1に記載した共通操作E（ ϵ_A , 280 = 22340、 ϵ_A , 252 = 85646、 ϵ_D , 280 = 4317、及び ϵ_D , 252 = 23224を使用）を使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度：1.97 mg/mL、抗体収量：6.90 mg（88%）、共通操作Eにて測定された抗体一分子あたりの薬物平均結合数（n）：3.6。

[0320]

〔実施例8：抗体-薬物コンジュゲートの*in vitro*活性評価〕

8) -1 CDH6陽性ヒト腫瘍細胞株に対する抗体-薬物コンジュゲートの*in vitro*細胞増殖抑制活性評価

CDH6陽性ヒト卵巣腫瘍細胞株PA-1を10% FBS含有MEM培地中 2×10^3 細胞/100 μ L/wellになるよう96ウェルプレートに播種し、37℃、5% CO₂の条件下で一晩培養した。翌日、実施例7で作製したヒト化hG019-薬物コンジュゲート4種（クローン名は、H01L02-DXd、H02L02-DXd、H02L03-DXd及びH04L02-DXd）、又は参考例2で作製したNOV0712-薬物コンジュゲート（NOV0712-DM4）を終濃度0.0001（nM）から100（nM）となるように添加した。4日間培養後に生存細胞数をCellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viabili

t y A s s a y (P r o m e g a) による A T P の定量で測定した。図 1
1 に抗体－薬物コンジュゲートを各々添加した際の濃度依存的な細胞増殖抑
制活性を示す。この結果、ヒト化 h G O 1 9 －薬物コンジュゲート 4 種は、
N O V 0 7 1 2 －薬物コンジュゲートと比較して、より低い添加濃度から腫
瘍細胞の増殖抑制活性を示し、抗腫瘍活性が高いことが示される。

[0321]

[実施例 9：抗体－薬物コンジュゲートの i n v i v o 抗腫瘍効果]

抗体－薬物コンジュゲートの抗腫瘍効果は、C D H 6 陽性ヒト腫瘍細胞株
の細胞を免疫不全マウスに移植した動物モデルを用いて評価した。4－5 週
齢の B A L B / c ノードマウス (C A n N . C g - F o x n 1 [n u] /
C r l C r l j [F o x n 1 n u / F o x n 1 n u] 、日本チャールス・リ
バー) 及び、S C I D マウス (C B 1 7 / l c r - P r k d c [s c i d]
/ C r l C r l j 、日本チャールス・リバー) を実験使用前に S P F 条件化
で 3 日間以上馴化した。マウスには滅菌した固形飼料 (F R - 2 , F u n a
b a s h i F a r m s C o . , L t d) を給餌し、滅菌した水道水 (5
－ 1 5 p p m 次亜塩素酸ナトリウム溶液を添加して調製) を与えた。移植し
た腫瘍の長径及び短径を電子式デジタルノギス (C D - 1 5 C X , M i t u
t o y o C o r p .) で 1 週間に 2 回測定し、以下に示す計算式により腫
瘍体積を算出した。

腫瘍体積 (m m ³) = 1 / 2 × 長径 (m m) × [短径 (m m)] ²

抗体－薬物コンジュゲートは全て A B S 緩衝液 (1 0 m M - A c e t a t e
B u f f e r , 5 % S o r b i t o l , p H 5 . 5) (N A C A
L A I) で希釈し、各実施例に示す用量にて尾静脈内投与した。また、コン
トロール群 (V e h i c l e 群) として A B S 緩衝液を同様に投与した。1
群あたり 6 匹のマウスを実験に用いた。

[0322] 9) - 1 抗腫瘍効果 (1)

実施例 2) - 3 - 1 にて C D H 6 発現を確認した、C D H 6 陽性ヒト腎細
胞腫瘍細胞株 7 8 6 - O (A T C C) をマトリゲル (コーニング社) に懸濁

し、 5×10^6 cells を雄 SCID マウスの右側腹部に皮下移植し (Day 0)、Day 18 に無作為に群分けを実施した。群分け実施日に、実施例 7 で作製した抗体-薬物コンジュゲート 4 種 (クローン名は、H01L02-DXd、H02L02-DXd、H02L03-DXd 及び H04L02-DXd)、又は参考例 2 で作製した NOV0712-DM4 を 3 mg/kg の用量で尾静脈内投与した。結果を図 12 に示す。横軸は日数、縦軸は腫瘍体積、誤差範囲は SE 値を示す。

[0323] NOV0712-DM4 は本腫瘍モデルにおいて顕著な抗腫瘍効果を示さなかった。実施例 7 で作成した抗体-薬物コンジュゲート 4 種はいずれも投与後腫瘍体積が減少し、顕著な腫瘍の退縮が認められ、投与後 24 日の間、腫瘍退縮効果が持続した (図 12)。

[0324] 9) - 2 抗腫瘍効果 (2)

実施例 2) - 3 - 1 にて CDH6 発現を確認した、CDH6 陽性ヒト卵巣腫瘍細胞株 PA-1 (ATCC) をマトリゲル (コーニング社) に懸濁し、 8.5×10^6 cells を雌ヌードマウスの右側腹部に皮下移植し (Day 0)、Day 11 に無作為に群分けを実施した。群分け実施日に、実施例 7 で作製した抗体-薬物コンジュゲート H01L02-DXd 又は参考例 2 で作製した NOV0712-DM4 もしくは NOV0712-DXd を、1 及び 3 mg/kg の用量で尾静脈内投与した。結果を図 13 に示す。横軸は日数、縦軸は腫瘍体積、誤差範囲は SE 値を示す。

[0325] NOV0712-DM4 は本腫瘍モデルにおいて 1 及び 3 mg/kg いずれの用量でも抗腫瘍効果を示さなかった。一方、H01L02-DXd は 1 及び 3 mg/kg いずれの用量でも投与後腫瘍体積が著しく減少し、腫瘍を縮退させる効果を発揮した (図 13)。また、本明細書で取得した H01L02 抗体もしくは NOV0712 抗体に同じ薬物 DXd をコンジュゲートした検体の薬効を比較したところ、H01L02-DXd は、1 及び 3 mg/kg いずれの用量でも NOV0712-DXd に比べて強い抗腫瘍効果を発揮した。すなわち、本発明の H01L02 抗体は、NOV0712 抗体に比

べて、抗腫瘍剤としての抗体－薬物コンジュゲートの抗体としてより優れた抗体であることが示された（図 13）。

[0326] 9)－3 抗腫瘍効果（3）

実施例 2)－3－1 にて CDH6 発現を確認した、CDH6 陽性ヒト卵巣腫瘍細胞株 NIH: OVCAR-3 (ATCC) をマトリゲル（コーニング社）に懸濁し、 1×10^7 cells を雌ヌードマウスの右側腹部に皮下移植し（Day 0）、Day 22 に無作為に群分けを実施した。群分け実施日に、実施例 7 で作製した抗体－薬物コンジュゲート H01L02-DXd 又は参考例 2 で作製した NOV0712-DM4 を、1 及び 3 mg/kg の用量で尾静脈内投与した。結果を図 14 に示す。横軸は日数、縦軸は腫瘍体積、誤差範囲は SE 値を示す。

[0327] NOV0712-DM4 は、1 mg/kg では全く抗腫瘍効果を示さず、3 mg/kg では抗腫瘍効果を示すものの、投与 2 週間後から腫瘍の再増殖が認められた。一方、H01L02-DXd は 1 及び 3 mg/kg いずれの用量でも、投与後腫瘍体積の増加を著しく抑制し、特に 3 mg/kg では投与後 31 日間の長期にわたって腫瘍増殖抑制効果が持続した。（図 14）。

[0328] また、PA-1 細胞を用いて同様に、参考例 2 で作製した NOV0712-DM4 もしくは参考例 3 で作成した H01L02-DM4 の腫瘍増殖抑制効果を評価した。H01L02-DM4 は NOV0712-DM4 よりも腫瘍体積を縮退させ、本発明の H01L02 抗体は、NOV0712 抗体に比べて、抗腫瘍剤としての抗体－薬物コンジュゲートの抗体としてより優れた抗体であった。

[0329] 9)－4 抗腫瘍効果（4）

実施例 2)－3－1 にて CDH6 発現を確認した、CDH6 陽性ヒト腎細胞腫瘍細胞株 786-O (ATCC) をマトリゲル（コーニング社）に懸濁し、 5×10^6 cells を雄 SCID マウスの右側腹部に皮下移植し（Day 0）、Day 20 に無作為に群分けを実施した。群分け実施日に、実施例 7 で作製した抗体－薬物コンジュゲート H01L02-DXd 又は参考例 2

で作製したNOVO712-DM4を、1及び3mg/kgの用量で尾静脈内投与した。結果を図15に示す。横軸は日数、縦軸は腫瘍体積、誤差範囲はSE値を示す。

[0330] NOVO712-DM4は本腫瘍モデルにおいて1及び3mg/kgいずれの用量でも顕著な抗腫瘍効果を示さなかった。一方、HO1LO2-DXdは1及び3mg/kgいずれの用量でも投与後腫瘍体積が減少し、特に3mg/kgでは顕著な腫瘍の退縮が認められ、投与後20日の間、腫瘍退縮効果が持続した(図15)。

[0331] 9)-5 抗腫瘍効果(5)

実施例2)-3-1にてCDH6を発現しないことを確認した、CDH6陰性ヒト卵巣腫瘍細胞株ES-2(ATCC)を生理食塩水に懸濁し、 1×10^6 cellsを雌ヌードマウスの右側腹部に皮下移植し(Day 0)、Day 7に無作為に群分けを実施した。群分け実施日に、実施例7で作成した抗体-薬物コンジュゲートHO1LO2-DXd又は参考例2で作製したNOVO712-DM4を、1及び3mg/kgの用量で尾静脈内投与した。結果を図16に示す。横軸は日数、縦軸は腫瘍体積、誤差範囲はSE値を示す。

[0332] CDH6を発現しない本腫瘍モデルでは、HO1LO2-DXd及びNOVO712-DM4はいずれの用量でも抗腫瘍効果を全く示さなかった。この結果から、実施例9)-1、9)-2、9)-3、9)-4で示されたCDH6陽性腫瘍モデルでの抗体-薬物コンジュゲートの抗腫瘍効果は、腫瘍細胞のCDH6発現に依存して起こる効果であり、CDH6陽性の腫瘍に特異的に抗腫瘍効果を示し、CDH6陰性の正常組織には細胞障害を起こさない選択的で安全な抗腫瘍薬剤と考えられる(図16)。

産業上の利用可能性

[0333] 本発明により、内在化活性を有する抗CDH6抗体及び該抗体を含む抗体-薬物コンジュゲートが提供された。該抗体-薬物コンジュゲートは癌に対する治療薬等として用いることができる。

請求の範囲

- [請求項1] 配列番号4に記載のアミノ酸配列に特異的に結合し、細胞内に取り込まれる内在化能を有する、抗体又は当該抗体の機能性断片。
- [請求項2] 配列番号4に記載のアミノ酸配列への結合に対して、以下の(1)～(5)：
- (1) 配列番号53の21～233番目に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号56の20～471番目に記載のアミノ酸配列からなる重鎖を有する抗体、
 - (2) 配列番号61の21～233番目に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号69の20～471番目に記載のアミノ酸配列からなる重鎖を有する抗体、
 - (3) 配列番号61の21～233番目に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号73の20～471番目に記載のアミノ酸配列からなる重鎖を有する抗体、
 - (4) 配列番号65の21～233番目に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号73の20～471番目に記載のアミノ酸配列からなる重鎖を有する抗体、及び
 - (5) 配列番号61の21～233番目に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号77の20～471番目に記載のアミノ酸配列からなる重鎖を有する抗体、
- からなる群から選択される抗体のうち少なくともいずれか1つと競合阻害活性を有する請求項1に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片。
- [請求項3] 以下の(1)～(4)：
- (1) 配列番号12に記載のアミノ酸配列からなるCDRL1、配列番号13に記載のアミノ酸配列からなるCDRL2及び配列番号14に記載のアミノ酸配列からなるCDRL3、
 - (2) 配列番号22に記載のアミノ酸配列からなるCDRL1、配列番号23に記載のアミノ酸配列からなるCDRL2及び配列番号24

に記載のアミノ酸配列からなるCDRL3、

(3) 配列番号32に記載のアミノ酸配列からなるCDRL1、配列番号33に記載のアミノ酸配列からなるCDRL2及び配列番号34に記載のアミノ酸配列からなるCDRL3、及び

(4) 配列番号42に記載のアミノ酸配列からなるCDRL1、配列番号43に記載のアミノ酸配列からなるCDRL2及び配列番号44に記載のアミノ酸配列からなるCDRL3、

からなる群から選択されるいずれか1つに記載のCDRL1、CDRL2及びCDRL3、並びに、

以下の(5)～(9)：

(5) 配列番号17に記載のアミノ酸配列からなるCDRH1、配列番号18に記載のアミノ酸配列からなるCDRH2及び配列番号19に記載のアミノ酸配列からなるCDRH3、

(6) 配列番号27に記載のアミノ酸配列からなるCDRH1、配列番号28に記載のアミノ酸配列からなるCDRH2及び配列番号29に記載のアミノ酸配列からなるCDRH3、

(7) 配列番号37に記載のアミノ酸配列からなるCDRH1、配列番号38に記載のアミノ酸配列からなるCDRH2及び配列番号39に記載のアミノ酸配列からなるCDRH3、

(8) 配列番号47に記載のアミノ酸配列からなるCDRH1、配列番号48に記載のアミノ酸配列からなるCDRH2及び配列番号49に記載のアミノ酸配列からなるCDRH3、及び

(9) 配列番号17に記載のアミノ酸配列からなるCDRH1、配列番号60に記載のアミノ酸配列からなるCDRH2及び配列番号19に記載のアミノ酸配列からなるCDRH3、

からなる群から選択されるいずれか1つに記載のCDRH1、CDRH2及びCDRH3を含む、

請求項1又2のいずれか1項に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片

。

[請求項4] 以下の（１）～（５）：

（１）配列番号１２に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１、配列番号１３に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２及び配列番号１４に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ３、及び、配列番号１７に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１、配列番号１８に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２及び配列番号１９に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３、

（２）配列番号２２に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１、配列番号２３に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２及び配列番号２４に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ３、及び、配列番号２７に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１、配列番号２８に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２及び配列番号２９に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３、

（３）配列番号３２に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１、配列番号３３に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２及び配列番号３４に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ３、及び、配列番号３７に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１、配列番号３８に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２及び配列番号３９に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３、

（４）配列番号４２に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１、配列番号４３に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２及び配列番号４４に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ３、及び、配列番号４７に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１、配列番号４８に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２及び配列番号４９に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３、及び

（５）配列番号１２に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１、配列番号１３に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２及び配列番号１４

に記載のアミノ酸配列からなるCDRL3、及び、配列番号17に記載のアミノ酸配列からなるCDRH1、配列番号60に記載のアミノ酸配列からなるCDRH2及び配列番号19に記載のアミノ酸配列からなるCDRH3、
からなる群から選択されるCDRL1、CDRL2及びCDRL3、
並びに、CDRH1、CDRH2及びCDRH3を含む、
請求項1～3のいずれか1項に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片。
。

[請求項5] ヒト化されている請求項1～4のいずれか1項に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片。

[請求項6] 以下の(1)～(4)：

(1) 配列番号63に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、
(2) 配列番号67に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、
(3) (1)～(2)のアミノ酸配列において各CDR配列以外のフレームワーク領域の配列に対して少なくとも95%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列、及び
(4) (1)～(3)のアミノ酸配列において各CDR配列以外のフレームワーク領域の配列において1又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列
からなる群から選択されるいずれか1つに記載の軽鎖可変領域、並びに、

以下の(5)～(9)：

(5) 配列番号71に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、
(6) 配列番号75に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、
(7) 配列番号79に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、
(8) (5)～(7)のアミノ酸配列において各CDR配列以外のフレームワーク領域の配列に対して少なくとも95%以上の配列相同性を有するアミノ酸配列、及び

(9) (5) ~ (8) のアミノ酸配列において各 C D R 配列以外のフレームワーク領域の配列において 1 又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなる群から選択されるいずれか 1 つに記載の重鎖可変領域、を有する請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片。

[請求項7]

以下の (1) ~ (4) :

(1) 配列番号 63 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域及び配列番号 71 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、

(2) 配列番号 63 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域及び配列番号 75 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、

(3) 配列番号 67 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域及び配列番号 75 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、又は

(4) 配列番号 63 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域及び配列番号 79 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、

のいずれかの軽鎖可変領域及び重鎖可変領域、

を含む請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片。

[請求項8]

以下の (1) ~ (4) :

(1) 配列番号 61 の 21 ~ 233 番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号 69 の 20 ~ 471 番目のアミノ酸配列からなる重鎖、

(2) 配列番号 61 の 21 ~ 233 番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号 73 の 20 ~ 471 番目のアミノ酸配列からなる重鎖、

(3) 配列番号 65 の 21 ~ 233 番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号 73 の 20 ~ 471 番目のアミノ酸配列からなる重鎖、又は

(4) 配列番号 61 の 21 ~ 233 番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号 77 の 20 ~ 471 番目のアミノ酸配列からなる重鎖、

のいずれかを有する請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片。

[請求項9] 配列番号 6 1 の 2 1 ～ 2 3 3 番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号 6 9 の 2 0 ～ 4 7 1 番目のアミノ酸配列からなる重鎖を有する請求項 8 に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片。

[請求項10] 配列番号 6 1 の 2 1 ～ 2 3 3 番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号 7 3 の 2 0 ～ 4 7 1 番目のアミノ酸配列からなる重鎖を有する請求項 8 に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片。

[請求項11] 配列番号 6 5 の 2 1 ～ 2 3 3 番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号 7 3 の 2 0 ～ 4 7 1 番目のアミノ酸配列からなる重鎖を有する請求項 8 に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片。

[請求項12] 配列番号 6 1 の 2 1 ～ 2 3 3 番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号 7 7 の 2 0 ～ 4 7 1 番目のアミノ酸配列からなる重鎖を有する請求項 8 に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片。

[請求項13] 機能性断片が F a b、F (a b') 2、F a b' 及び F v からなる群から選択される請求項 1 ～ 1 2 のいずれか 1 項に記載の抗体の機能性断片。

[請求項14] 請求項 1 ～ 1 3 のいずれか 1 項に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片をコードするポリヌクレオチド。

[請求項15] 以下の (1) ～ (5) :

(1) 配列番号 1 2 に記載のアミノ酸配列からなる C D R L 1、配列番号 1 3 に記載のアミノ酸配列からなる C D R L 2 及び配列番号 1 4 に記載のアミノ酸配列からなる C D R L 3 を含む軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド、及び、配列番号 1 7 に記載のアミノ酸配列からなる C D R H 1、配列番号 1 8 に記載のアミノ酸配列からなる C D R H 2 及び配列番号 1 9 に記載のアミノ酸配列からなる C D R H 3 を含む重鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド、

(2) 配列番号 2 2 に記載のアミノ酸配列からなる C D R L 1、配列

番号 23 に記載のアミノ酸配列からなる C D R L 2 及び配列番号 24 に記載のアミノ酸配列からなる C D R L 3 を含む軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド、及び、配列番号 27 に記載のアミノ酸配列からなる C D R H 1、配列番号 28 に記載のアミノ酸配列からなる C D R H 2 及び配列番号 29 に記載のアミノ酸配列からなる C D R H 3 を含む重鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド、

(3) 配列番号 32 に記載のアミノ酸配列からなる C D R L 1、配列番号 33 に記載のアミノ酸配列からなる C D R L 2 及び配列番号 34 に記載のアミノ酸配列からなる C D R L 3 を含む軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド、及び、配列番号 37 に記載のアミノ酸配列からなる C D R H 1、配列番号 38 に記載のアミノ酸配列からなる C D R H 2 及び配列番号 39 に記載のアミノ酸配列からなる C D R H 3 を含む重鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド、

(4) 配列番号 42 に記載のアミノ酸配列からなる C D R L 1、配列番号 43 に記載のアミノ酸配列からなる C D R L 2 及び配列番号 44 に記載のアミノ酸配列からなる C D R L 3 を含む軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド、及び、配列番号 47 に記載のアミノ酸配列からなる C D R H 1、配列番号 48 に記載のアミノ酸配列からなる C D R H 2 及び配列番号 49 に記載のアミノ酸配列からなる C D R H 3 を含む重鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド、並びに

(5) 配列番号 12 に記載のアミノ酸配列からなる C D R L 1、配列番号 13 に記載のアミノ酸配列からなる C D R L 2 及び配列番号 14 に記載のアミノ酸配列からなる C D R L 3 を含む軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド、及び、配列番号 17 に記載のアミノ酸配列からなる C D R H 1、配列番号 60 に記載のアミノ酸配列からなる C D R H 2 及び配列番号 19 に記載のアミノ酸配列からなる C D R H 3 を含む重鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド、

からなる群から選択されるいずれか 1 つに記載のポリヌクレオチドを

含む請求項 14 に記載のポリヌクレオチド。

[請求項16] 配列番号 61 の 21 ～ 233 番目のアミノ酸配列からなる軽鎖をコードするポリヌクレオチド及び配列番号 69 の 20 ～ 471 番目のアミノ酸配列からなる重鎖をコードするポリヌクレオチドを含む請求項 14 又は 15 に記載のポリヌクレオチド。

[請求項17] 配列番号 61 の 21 ～ 233 番目のアミノ酸配列からなる軽鎖をコードするポリヌクレオチド及び配列番号 73 の 20 ～ 471 番目のアミノ酸配列からなる重鎖をコードするポリヌクレオチドを含む請求項 14 又は 15 に記載のポリヌクレオチド。

[請求項18] 配列番号 65 の 21 ～ 233 番目のアミノ酸配列からなる軽鎖をコードするポリヌクレオチド及び配列番号 73 の 20 ～ 471 番目のアミノ酸配列からなる重鎖をコードするポリヌクレオチドを含む請求項 14 又は 15 に記載のポリヌクレオチド。

[請求項19] 配列番号 61 の 21 ～ 233 番目のアミノ酸配列からなる軽鎖をコードするポリヌクレオチド及び配列番号 77 の 20 ～ 471 番目のアミノ酸配列からなる重鎖をコードするポリヌクレオチドを含む請求項 14 又は 15 に記載のポリヌクレオチド。

[請求項20] 請求項 14 ～ 19 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチドを含有する発現ベクター。

[請求項21] 請求項 20 に記載の発現ベクターにより形質転換された宿主細胞。

[請求項22] 宿主細胞が真核細胞である請求項 21 に記載の宿主細胞。

[請求項23] 請求項 21 又は 22 に記載の宿主細胞を培養する工程、及び当該工程で得られた培養物から目的の抗体又は当該抗体の機能性断片を採取する工程を含むことを特徴とする当該抗体又は当該抗体の機能性断片の製造方法。

[請求項24] 重鎖又は軽鎖が、N-結合への糖鎖付加、O-結合への糖鎖付加、N末のプロセッシング、C末のプロセッシング、脱アミド化、アスパラギン酸の異性化、メチオニンの酸化、N末にメチオニン残基の付加、

プロリン残基のアミド化、N末グルタミンもしくはN末グルタミン酸のピログルタミン酸化、及びカルボキシル末端における1つ又は2つのアミノ酸欠失からなる群より選択される1又は2以上の修飾をうけた、請求項1～13のいずれか1項に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片。

[請求項25] 重鎖のカルボキシル末端において1つ又は2つのアミノ酸が欠失している請求項24に記載の抗体。

[請求項26] 2本の重鎖の双方でカルボキシル末端において1つのアミノ酸が欠失している請求項25に記載の抗体。

[請求項27] 重鎖のカルボキシル末端のプロリン残基が更にアミド化されている請求項24～26のいずれか1項に記載の抗体。

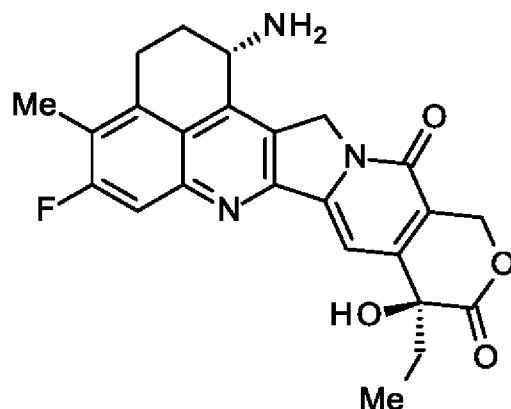
[請求項28] 抗体依存性細胞傷害活性を増強させるために糖鎖修飾が調節されている請求項1～13及び請求項24～27からなる群から選択されるいずれか1項に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片。

[請求項29] 請求項1～13及び請求項24～28からなる群から選択されるいずれか1項に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片に薬物が結合している抗体－薬物コンジュゲート。

[請求項30] 薬物が抗腫瘍性化合物である、請求項29に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[請求項31] 抗腫瘍性化合物が次式：

[化1]



で示される抗腫瘍性化合物である請求項30に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

[請求項32] 抗体と薬物が、次式(a)～(f)：

(a) - (Succinimid-3-yl-N) - CH₂CH₂ - C(=O) - GGFG - NH - CH₂CH₂CH₂ - C(=O) -、

(b) - (Succinimid-3-yl-N) - CH₂CH₂CH₂CH₂ - C(=O) - GGFG - NH - CH₂CH₂CH₂ - C(=O) -、

(c) - (Succinimid-3-yl-N) - CH₂CH₂CH₂CH₂ - C(=O) - GGFG - NH - CH₂ - O - CH₂ - C(=O) -、

(d) - (Succinimid-3-yl-N) - CH₂CH₂CH₂CH₂ - C(=O) - GGFG - NH - CH₂CH₂ - O - CH₂ - C(=O) -、

(e) - (Succinimid-3-yl-N) - CH₂CH₂ - C(=O) - NH - CH₂CH₂O - CH₂CH₂O - CH₂CH₂ - C(=O) - GGFG - NH - CH₂CH₂CH₂ - C(=O) -、及び

(f) - (Succinimid-3-yl-N) - CH₂CH₂ - C(=O) - NH - CH₂CH₂O - CH₂CH₂O - CH₂CH₂O - CH₂CH₂O - CH₂CH₂ - C(=O) - GGFG - NH - CH₂CH₂CH₂ - C(=O) -、

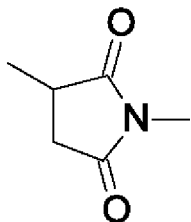
からなる群から選択されるいずれかの構造のリンカーを介して結合している、請求項29～31のいずれか1項に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

(ここで、抗体は、- (Succinimid-3-yl-N) の末端において結合する。抗腫瘍性化合物は、1位のアミノ基の窒素原子を結合部位として、(a)、(b)、(e)又は(f)の-CH₂CH₂CH₂CH₂ - C(=O) - 部分、(c)のCH₂ - O - CH₂ - C(=

O) 一部分又は (d) の $\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})$ 一部分のカルボニル基に結合する。上記式中GGFGは、グリシンーグリシンーフェニルアラニンーグリシンからなるペプチド結合でつながっているアミノ酸配列を示す。

— (Succinimid-3-yl-N) — は次式：

[化2]



で示される構造であり、このものの3位で抗体と結合し、1位の窒素原子上でこれを含むリンカー構造内のメチレン基と結合する。)

[請求項33] リンカーが以下の (c)、(d) 及び (e) からなる群から選択されるいずれかの式で示される請求項29～32のいずれか1項に記載の抗体ー薬物コンジュゲート：

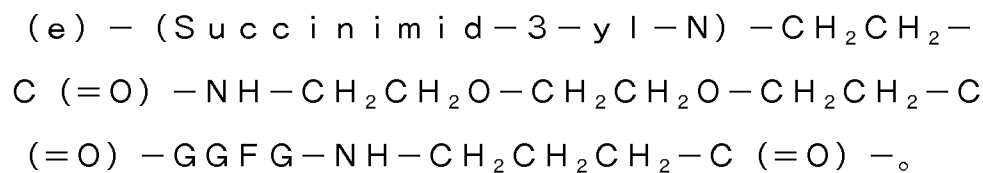
(c) — (Succinimid-3-yl-N) — $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ 、

(d) — (Succinimid-3-yl-N) — $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ 、

(e) — (Succinimid-3-yl-N) — $\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ 。

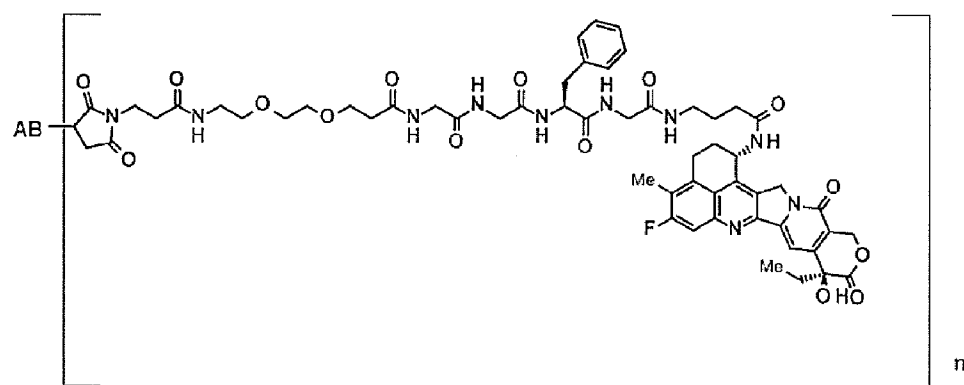
[請求項34] リンカーが以下の (c) 又は (e) の式で示される請求項29～33のいずれか1項に記載の抗体ー薬物コンジュゲート：

(c) — (Succinimid-3-yl-N) — $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ 、



[請求項35] 以下の式：

[化3]

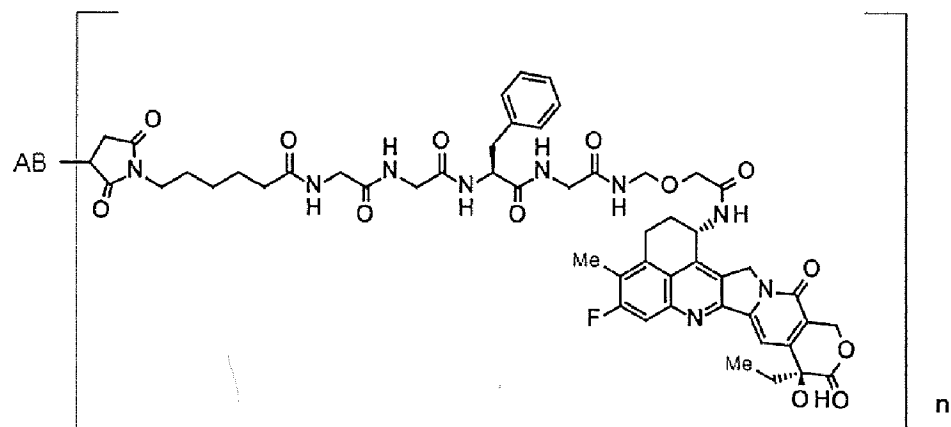


で示される構造を有する、請求項29～34のいずれか1項に記載の抗体-薬物コンジュゲート：

ここで、ABは抗体又は該抗体の機能性断片を示す。nは抗体と結合している薬物-リンカー構造の1抗体あたりの平均結合数を示す。抗体とリンカーは抗体由来のスルフヒドリル基を介して結合している。

[請求項36] 以下の式：

[化4]



で示される構造を有する、請求項 29～34 のいずれか 1 項に記載の抗体－薬物コンジュゲート：

ここで、A B は抗体又は該抗体の機能性断片を示す。n は抗体と結合している薬物－リンカー構造の 1 抗体あたりの平均結合数を示す。抗体とリンカーは抗体由来のスルフヒドリル基を介して結合している。

[請求項37] 抗体が以下の (1) ～ (4) ：

(1) 配列番号 61 の 21～233 番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号 69 の 20～471 番目のアミノ酸配列からなる重鎖、

(2) 配列番号 61 の 21～233 番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号 73 の 20～471 番目のアミノ酸配列からなる重鎖、

(3) 配列番号 65 の 21～233 番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号 73 の 20～471 番目のアミノ酸配列からなる重鎖、

又は

(4) 配列番号 61 の 21～233 番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号 77 の 20～471 番目のアミノ酸配列からなる重鎖、

からなる群から選択されるいずれか 1 つに記載の軽鎖及び重鎖を含む抗体又は当該抗体の機能性断片である、請求項 29～36 のいずれか 1 項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[請求項38] 抗体が、配列番号 61 の 21～233 番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号 69 の 20～471 番目のアミノ酸配列からなる重鎖を含む抗体又は当該抗体の機能性断片である、請求項 37 に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[請求項39] 抗体が、配列番号 61 の 21～233 番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号 77 の 20～471 番目のアミノ酸配列からなる重鎖を含む抗体又は当該抗体の機能性断片である、請求項 37 に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[請求項40] 重鎖又は軽鎖が、N－結合への糖鎖付加、O－結合への糖鎖付加、N 末のプロセッシング、C 末のプロセッシング、脱アミド化、アスパラ

ギン酸の異性化、メチオニンの酸化、N末にメチオニン残基の付加、プロリン残基のアミド化、N末グルタミンもしくはN末グルタミン酸のピログルタミン酸化及びカルボキシル末端における1つ又は2つのアミノ酸欠失からなる群から選択される1又は2以上の修飾をうけた、請求項29～39のいずれか1項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[請求項41] 選択された1種の薬物－リンカー構造の1抗体あたりの平均結合数が1～10個の範囲である請求項29～40のいずれか1項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[請求項42] 選択された1種の薬物－リンカー構造の1抗体あたりの平均結合数が2～8個の範囲である請求項41に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[請求項43] 選択された1種の薬物－リンカー構造の1抗体あたりの平均結合数が5～8個の範囲である請求項42に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[請求項44] 選択された1種の薬物－リンカー構造の1抗体あたりの平均結合数が7～8個である請求項43に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[請求項45] 請求項29～44のいずれか1項に記載の抗体－薬物コンジュゲート、その塩、又はそれらの水和物を含むことを特徴とする医薬組成物。

[請求項46] 抗腫瘍薬であることを特徴とする、請求項45に記載の医薬組成物。

[請求項47] 腫瘍がCDH6を発現する腫瘍であることを特徴とする、請求項46に記載の医薬組成物。

[請求項48] 腫瘍が、腎細胞癌、腎淡明細胞癌、乳頭状腎細胞癌、卵巣癌、卵巣漿液性腺癌、甲状腺癌、胆管癌、肺癌、小細胞肺癌、神経膠芽腫、中皮腫、子宮癌、膵臓癌、ウィルムス腫瘍又は神経芽腫であることを特徴とする、請求項46又は47に記載の医薬組成物。

[請求項49] 請求項29～44のいずれか1項に記載の抗体－薬物コンジュゲート、その塩、又はそれらの水和物から選択されるいずれかを個体に投与

することを特徴とする腫瘍の治療方法。

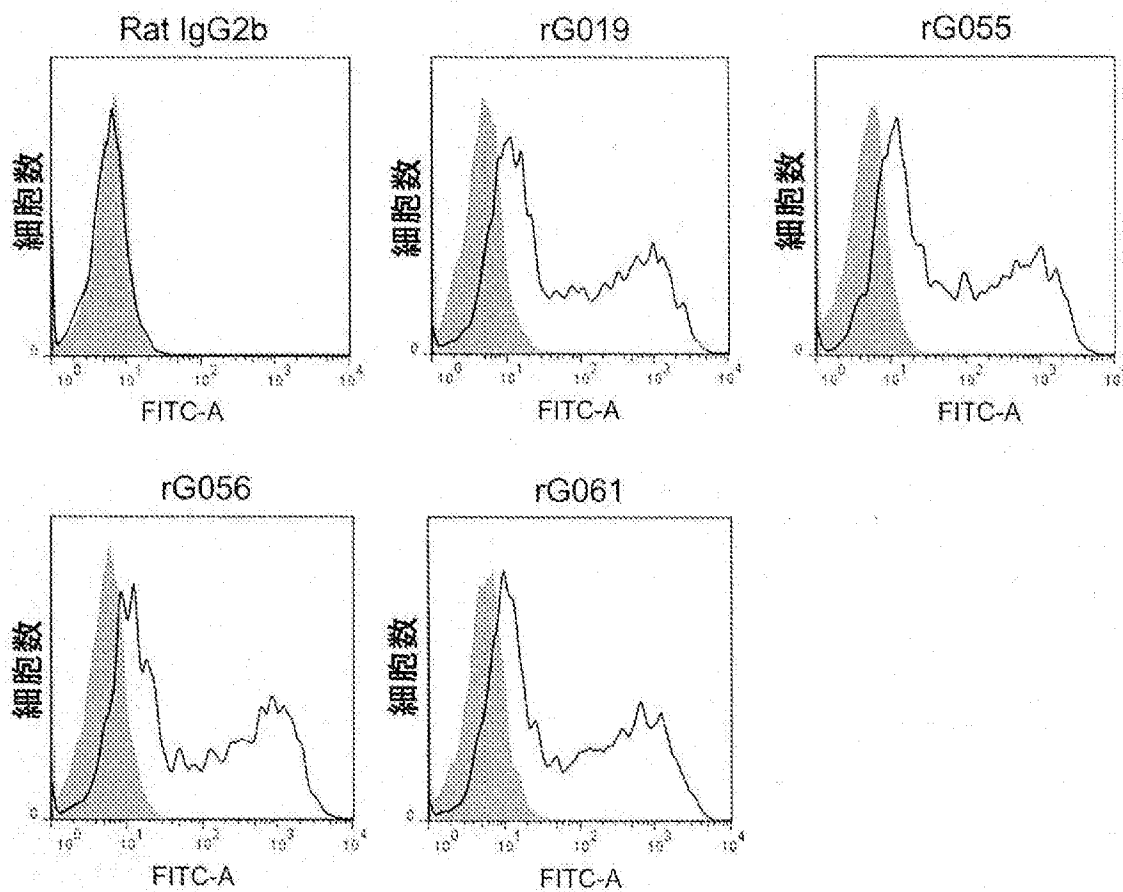
[請求項50] 腫瘍がCDH6が発現している腫瘍であることを特徴とする、請求項49に記載の治療方法。

[請求項51] 腫瘍が、腎細胞癌、腎臓明細胞癌、乳頭状腎細胞癌、卵巣癌、卵巣漿液性腺癌、甲状腺癌、胆管癌、肺癌、小細胞肺癌、神経膠芽腫、中皮腫、子宮癌、膵臓癌、ウィルムス腫瘍又は神経芽腫であることを特徴とする、請求項49又は50に記載の治療方法。

[請求項52] 請求項29～44のいずれか1項に記載の抗体－薬物コンジュゲート、その塩、又はそれらの水和物から選択される少なくとも一つを含む医薬組成物及び少なくとも一つの抗腫瘍薬を、同時に、別々に又は連続して個体に投与することを特徴とする腫瘍の治療方法。

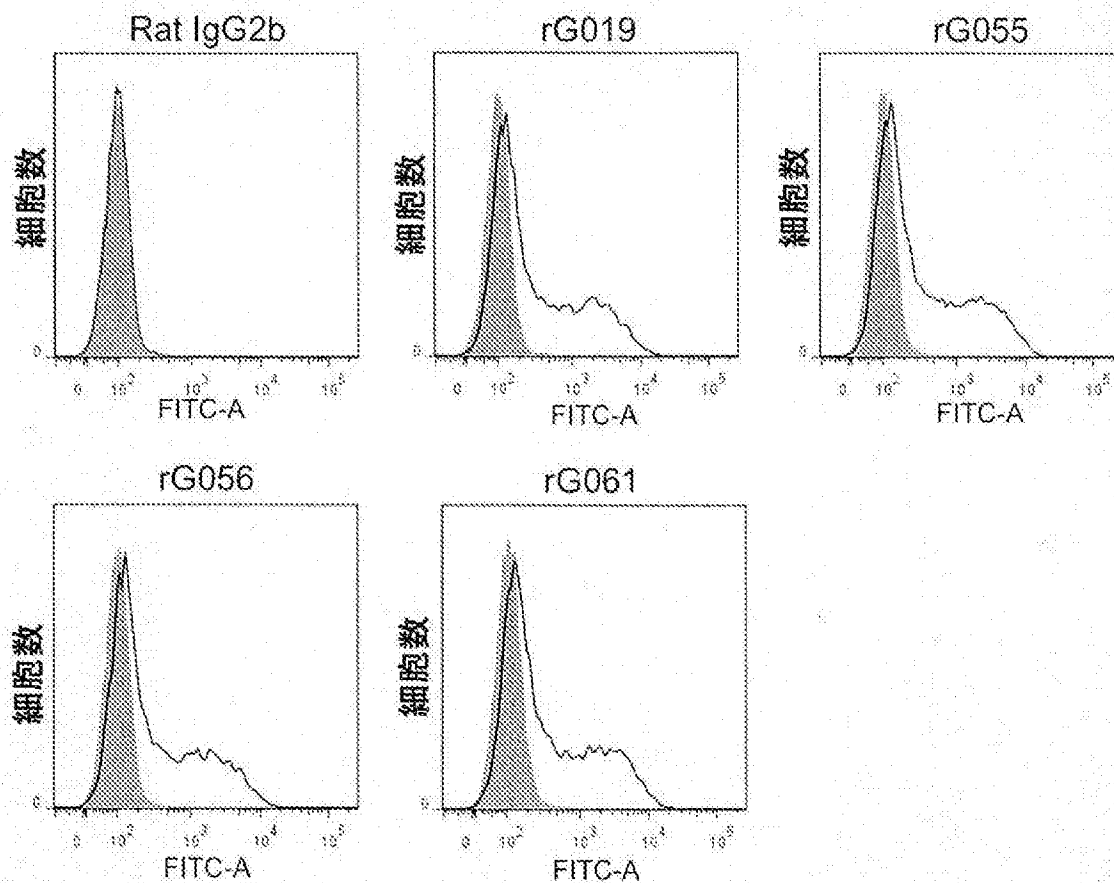
[請求項53] 請求項1～13及び請求項24～28からなる群から選択されるいずれか1項に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片或いは請求項23に記載の製造方法で得られる抗体又は当該抗体の機能性断片と、薬物－リンカー中間化合物を反応させる工程を含むことを特徴とする、抗体－薬物コンジュゲートの製造方法。

[図1]



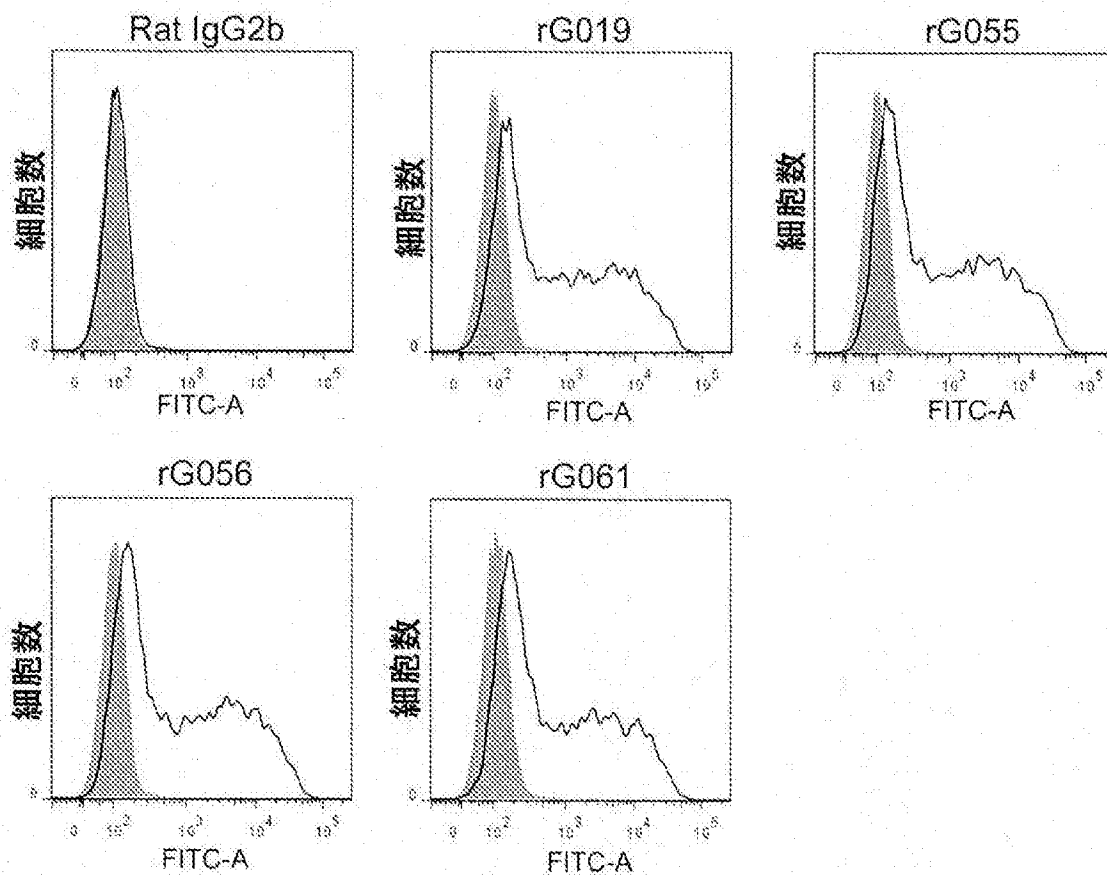
[図2-1]

(1) コントロール細胞又は全長hCDH6導入細胞



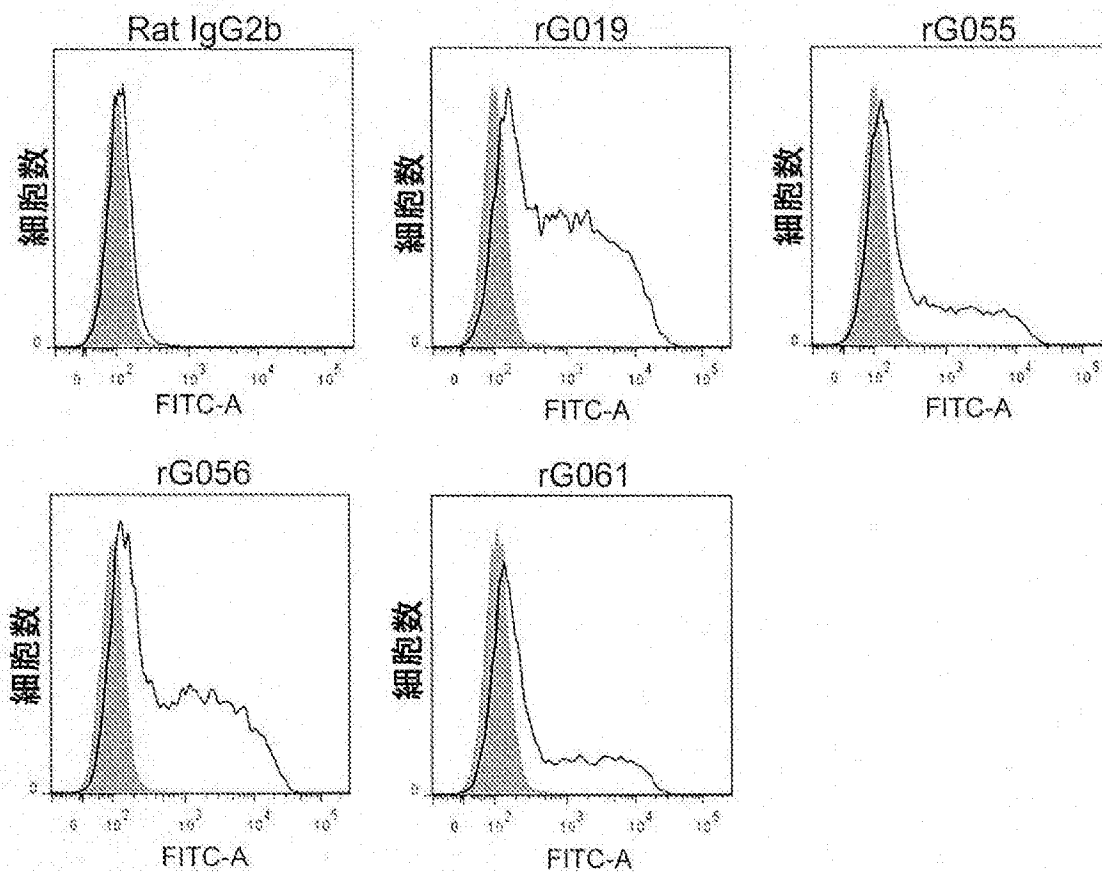
[図2-2]

(2) コントロール細胞又はEC1欠失hCDH6導入細胞



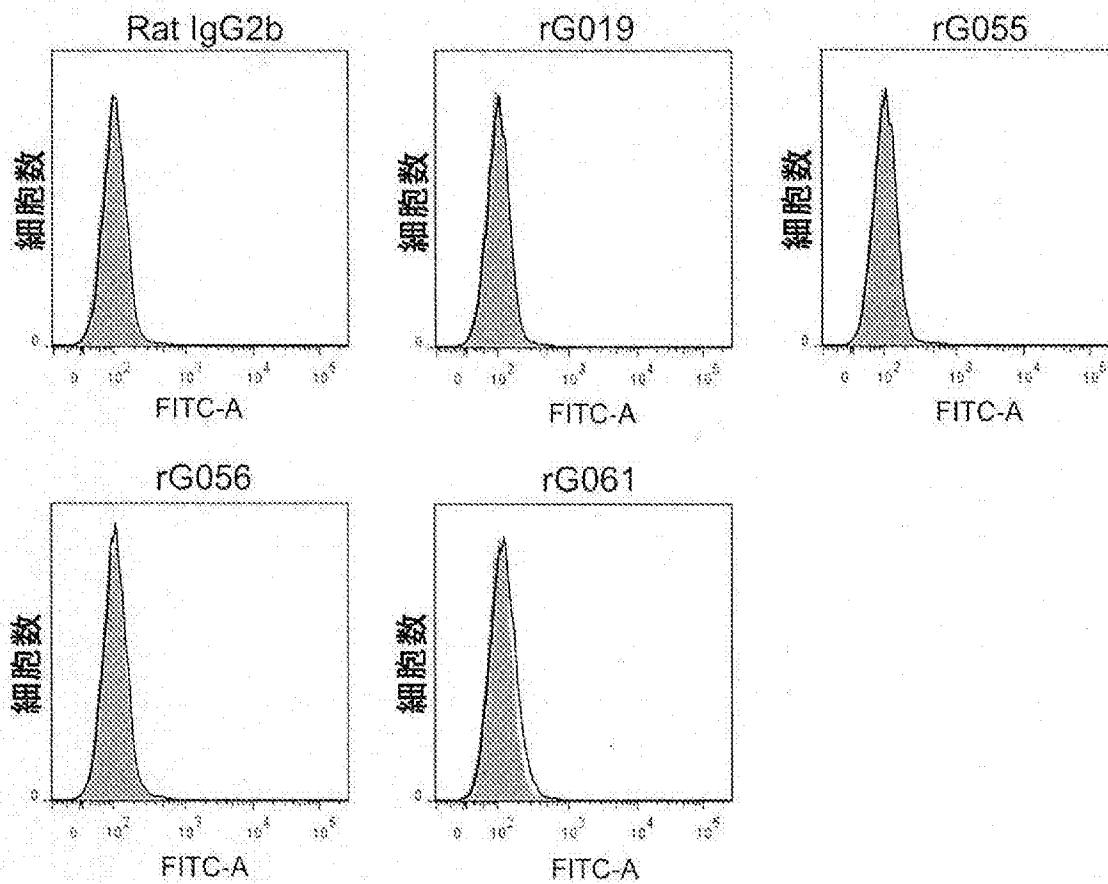
[図2-3]

(3) コントロール細胞又はEC2欠失hCDH6導入細胞



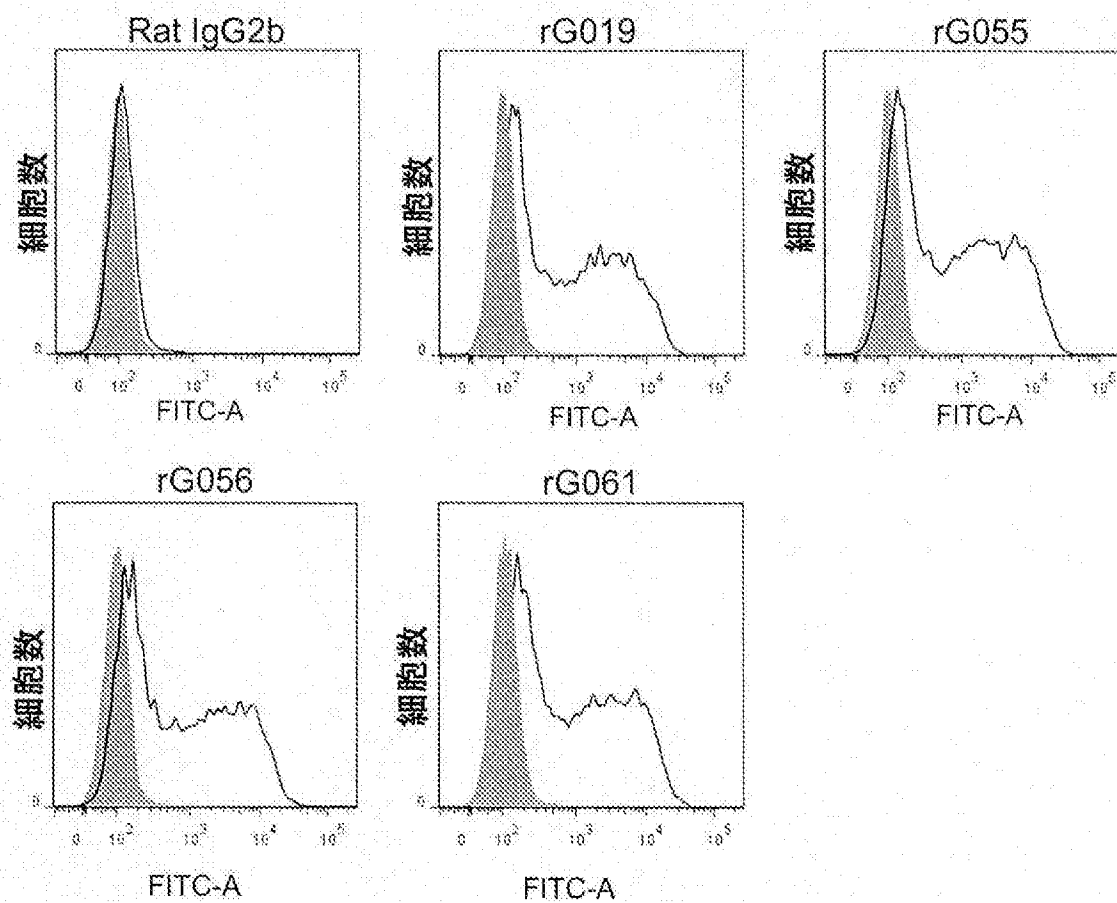
[図2-4]

(4) コントロール細胞又はEC3欠失hCDH6導入細胞



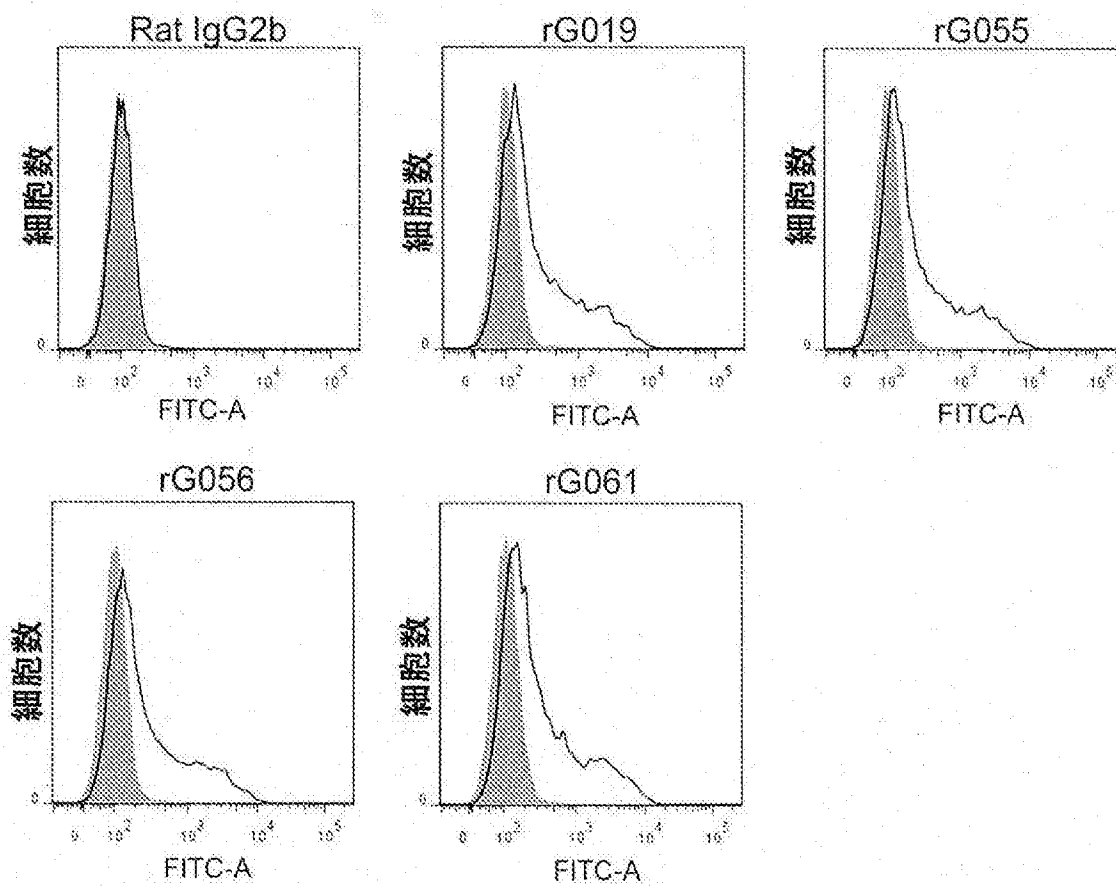
[図2-5]

(5) コントロール細胞又はEC4欠失hCDH6導入細胞

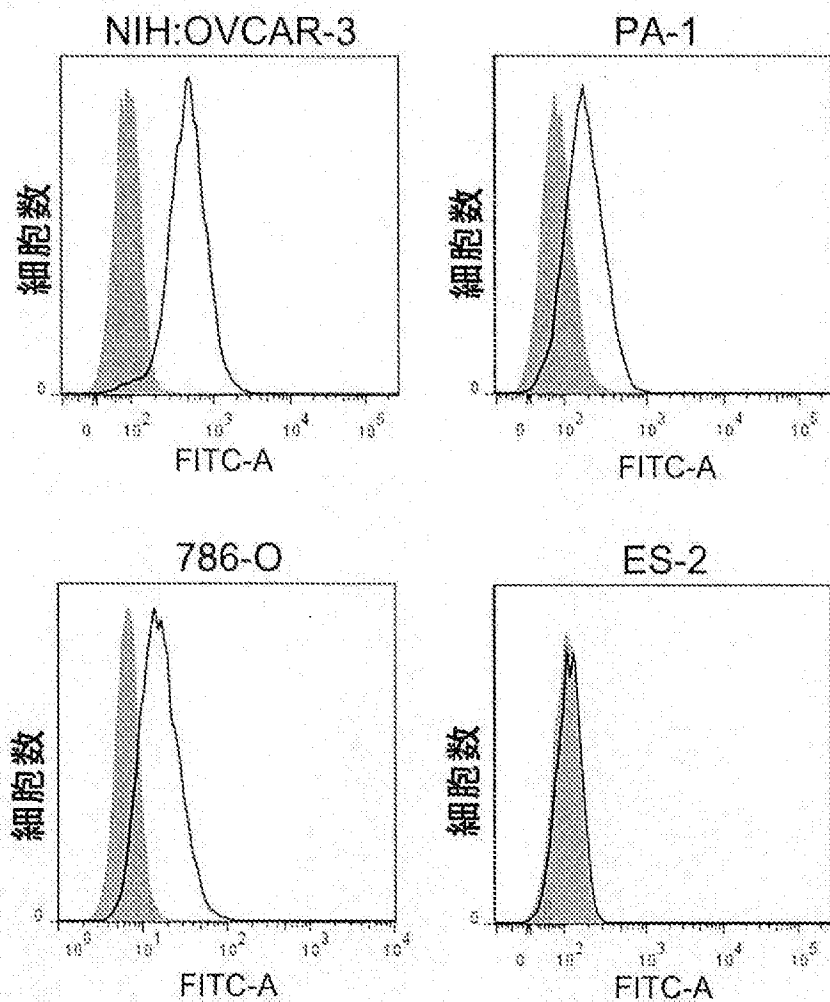


[図2-6]

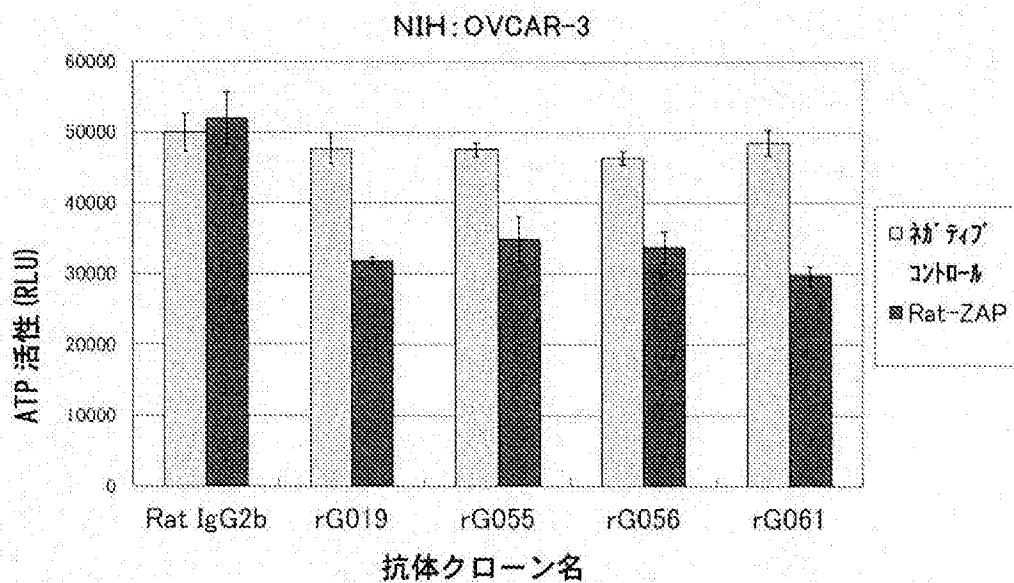
(6) コントロール細胞又はEC5欠失hCDH6導入細胞



[図3]

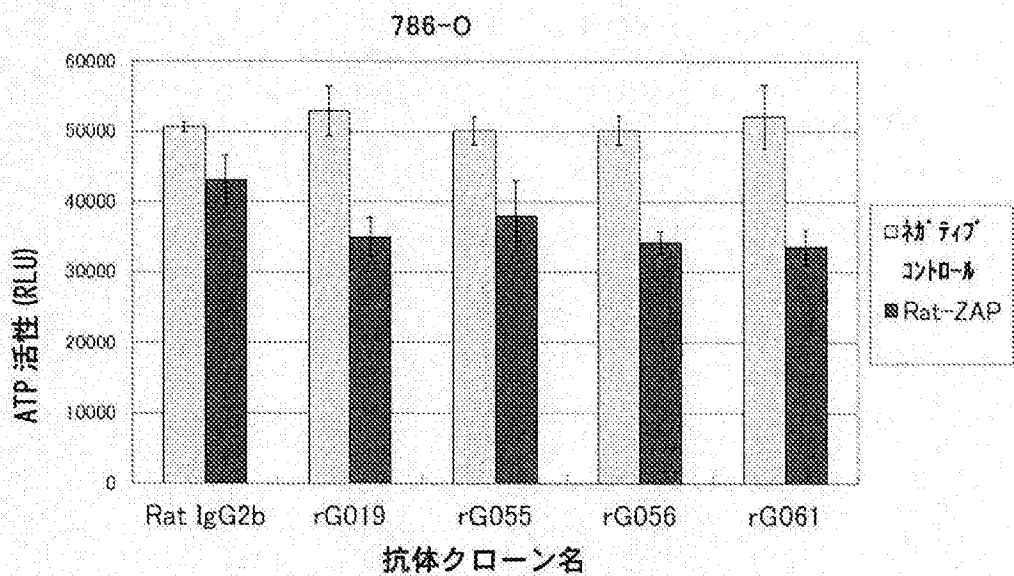


[図4]



Rat-ZAPを用いたNIH: OVCAR-3細胞生存率 (%)

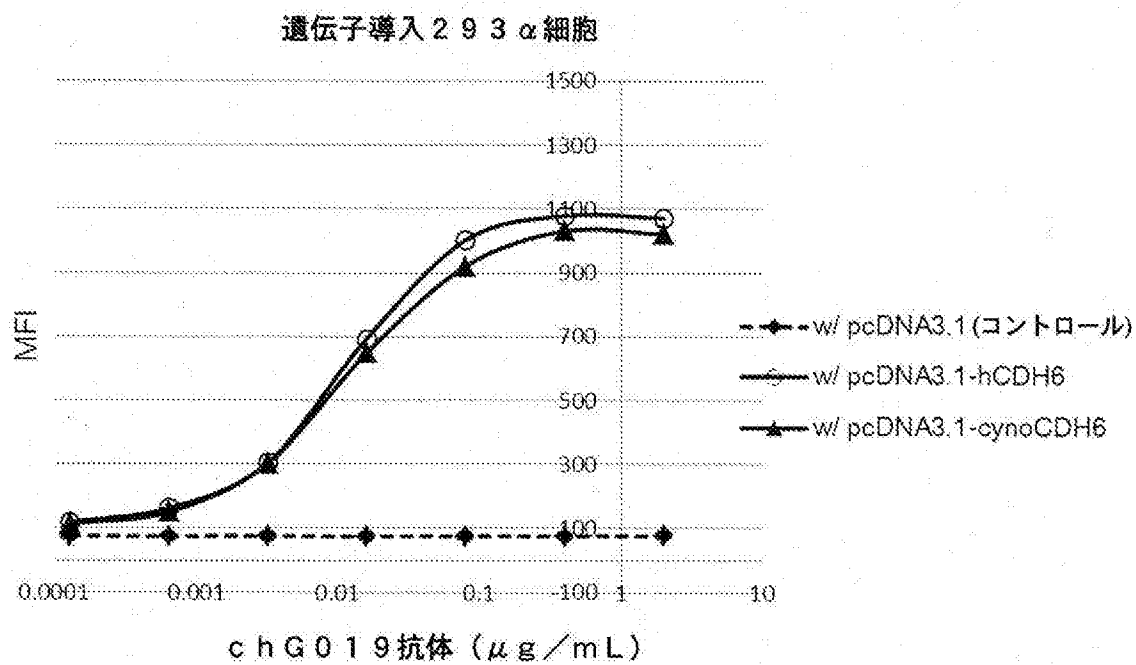
Rat IgG2b	rG019	rG055	rG056	rG061
104.1	66.8	73.3	72.8	61.2



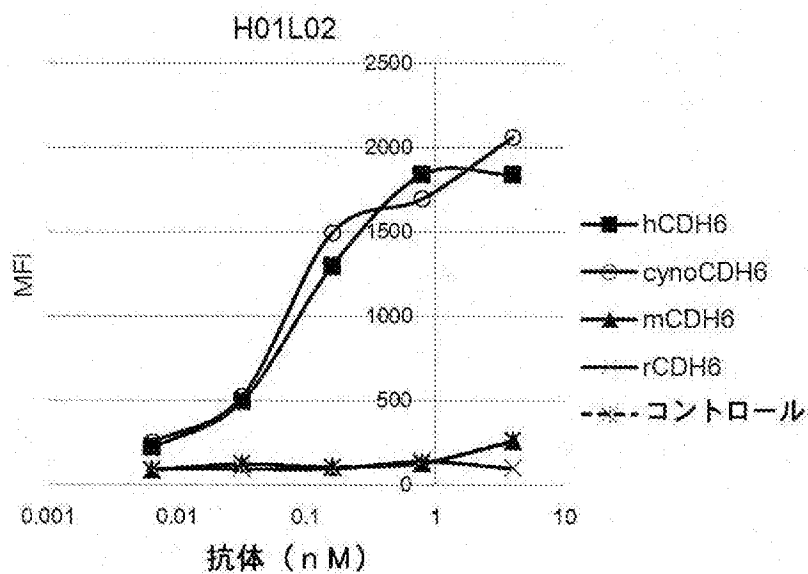
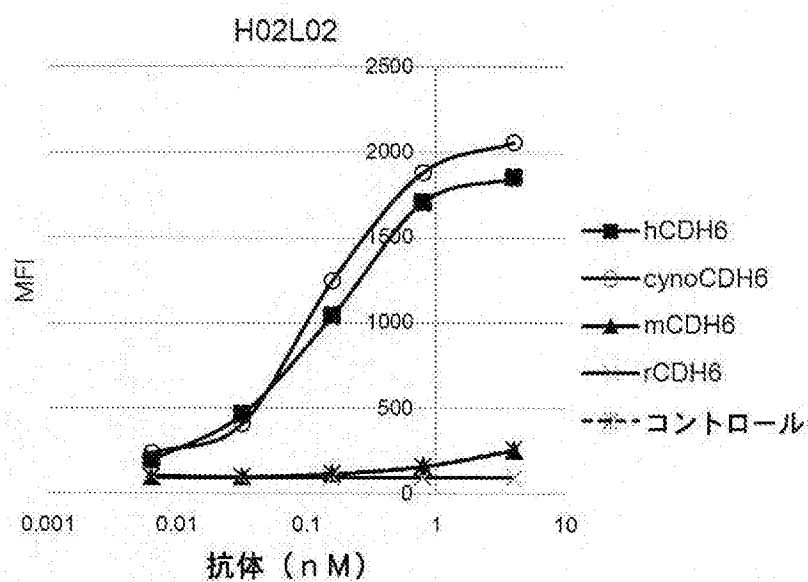
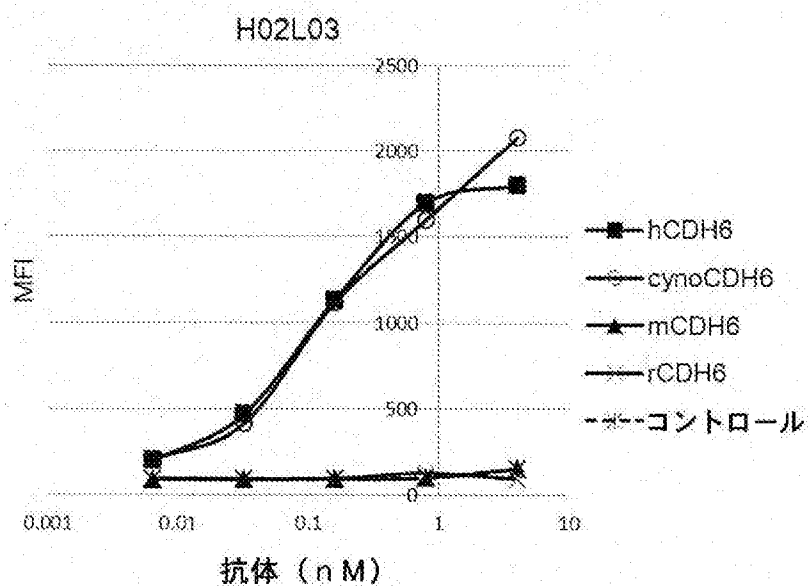
Rat-ZAPを用いた786-O細胞生存率 (%)

Rat IgG2b	rG019	rG055	rG056	rG061
85.2	66.1	75.7	68.1	64.2

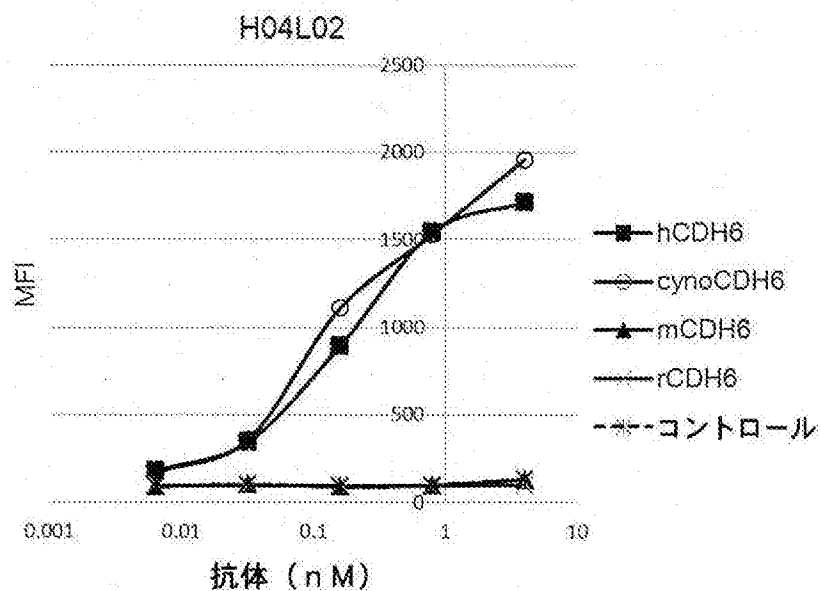
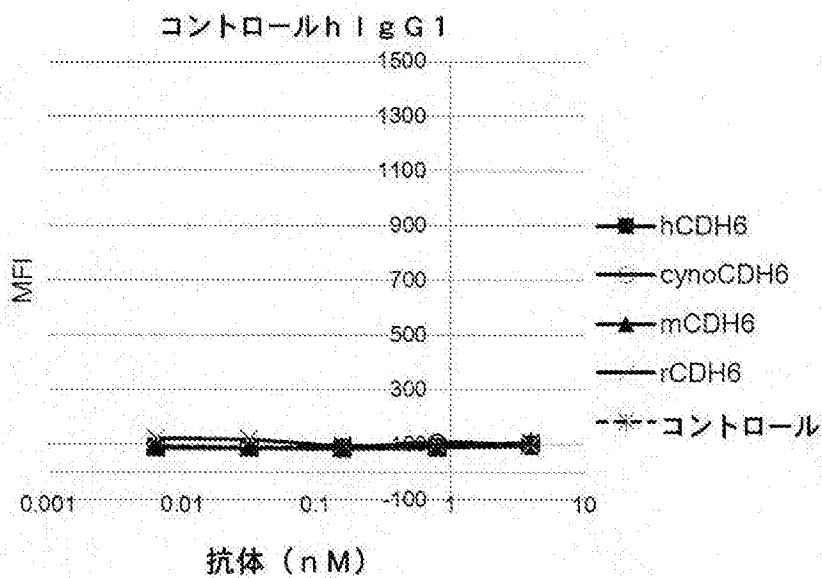
[図5]



[図6-1]

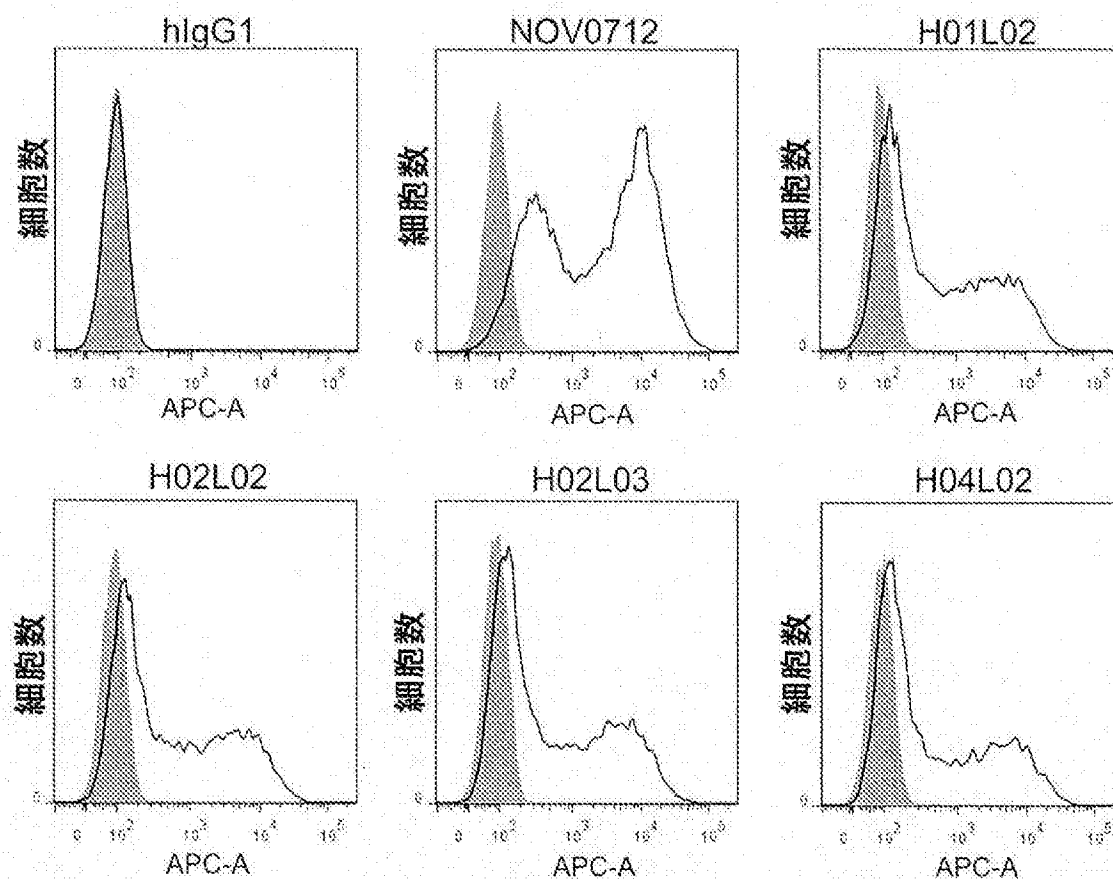


[図6-2]



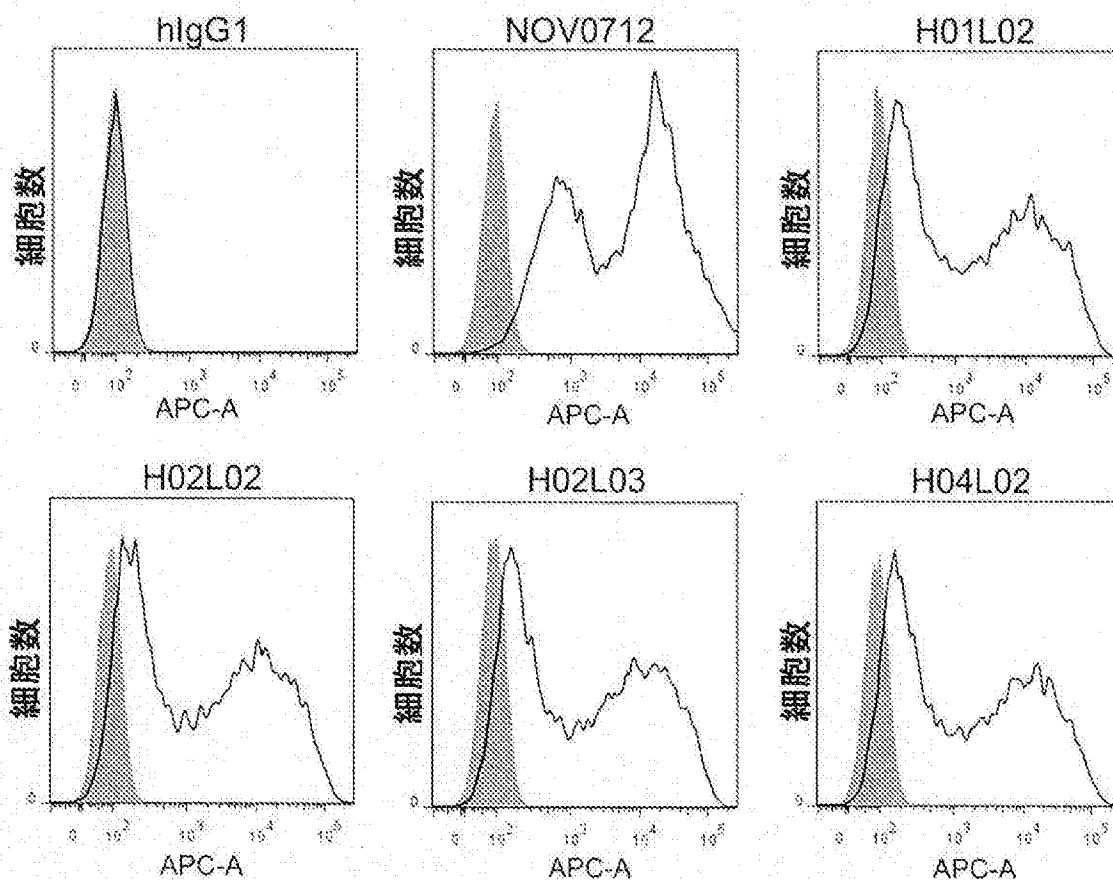
[図7-1]

(1) コントロール細胞又は全長hCDH6導入細胞



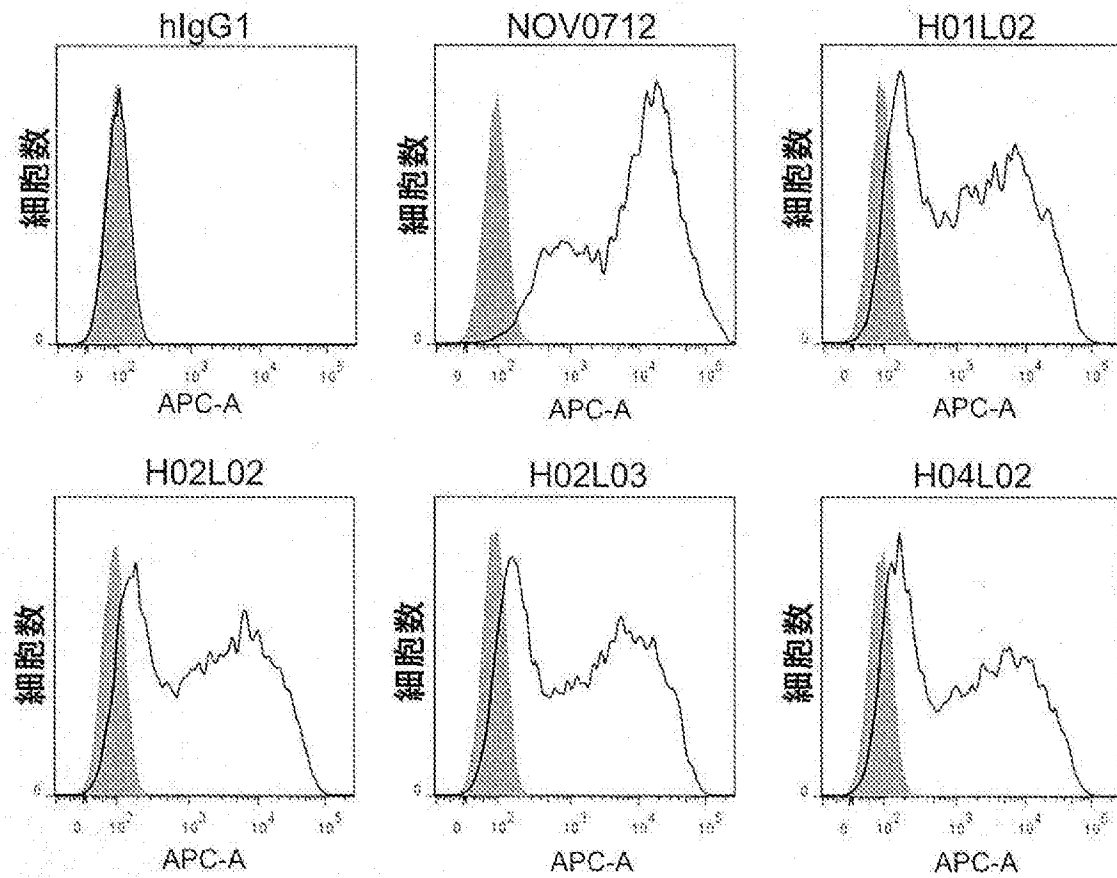
[図7-2]

(2) コントロール細胞又はEC1欠失hCDH6導入細胞



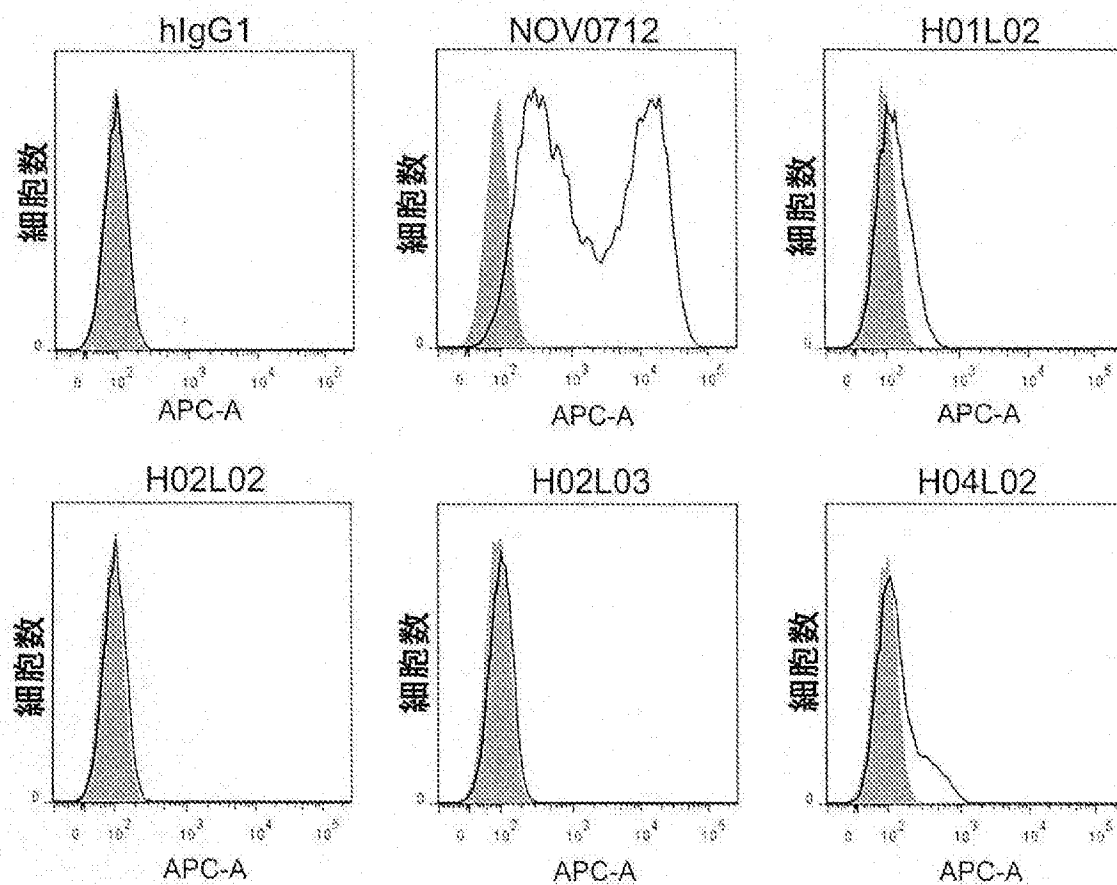
[図7-3]

(3) コントロール細胞又はEC2欠失hCDH6導入細胞



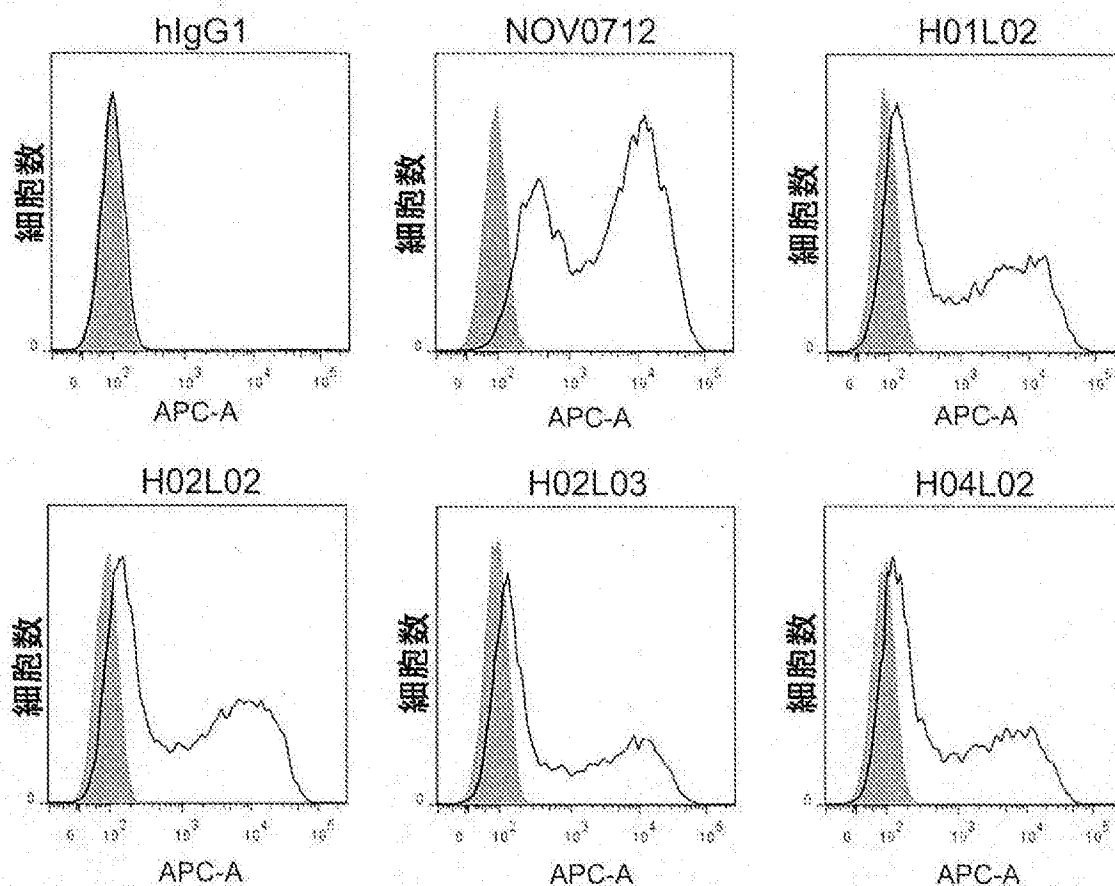
[図7-4]

(4) コントロール細胞又はEC3欠失hCDH6導入細胞



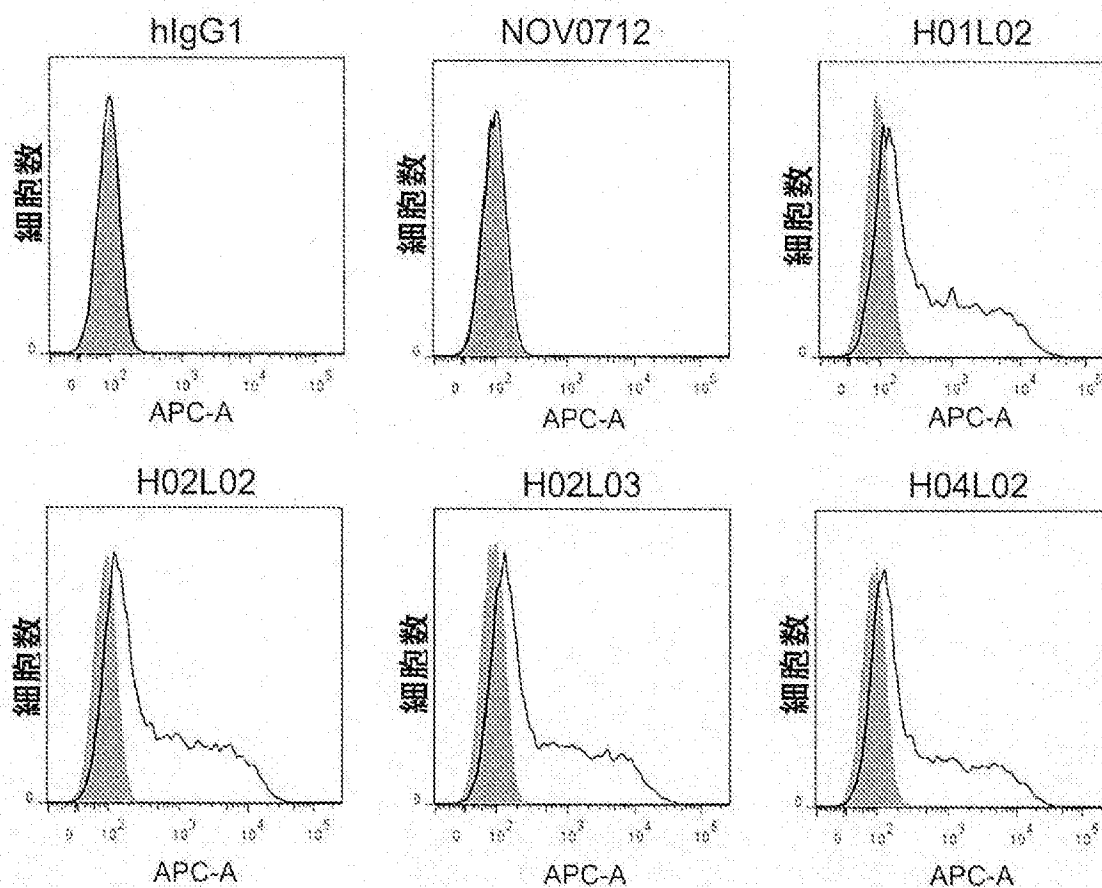
[図7-5]

(5) コントロール細胞又はEC4欠失hCDH6導入細胞



[図7-6]

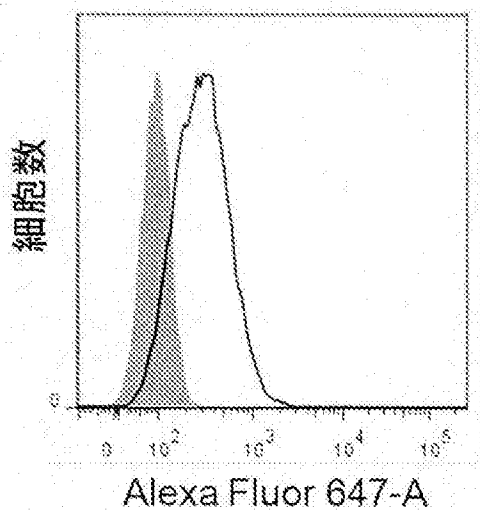
(6) コントロール細胞又はEC5欠失hCDH6導入細胞



[図8]

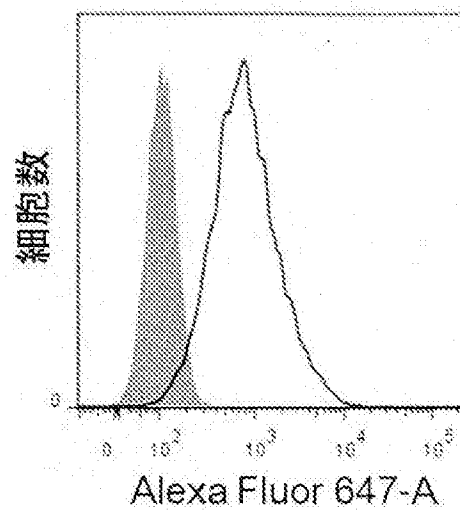
786-O

親細胞株

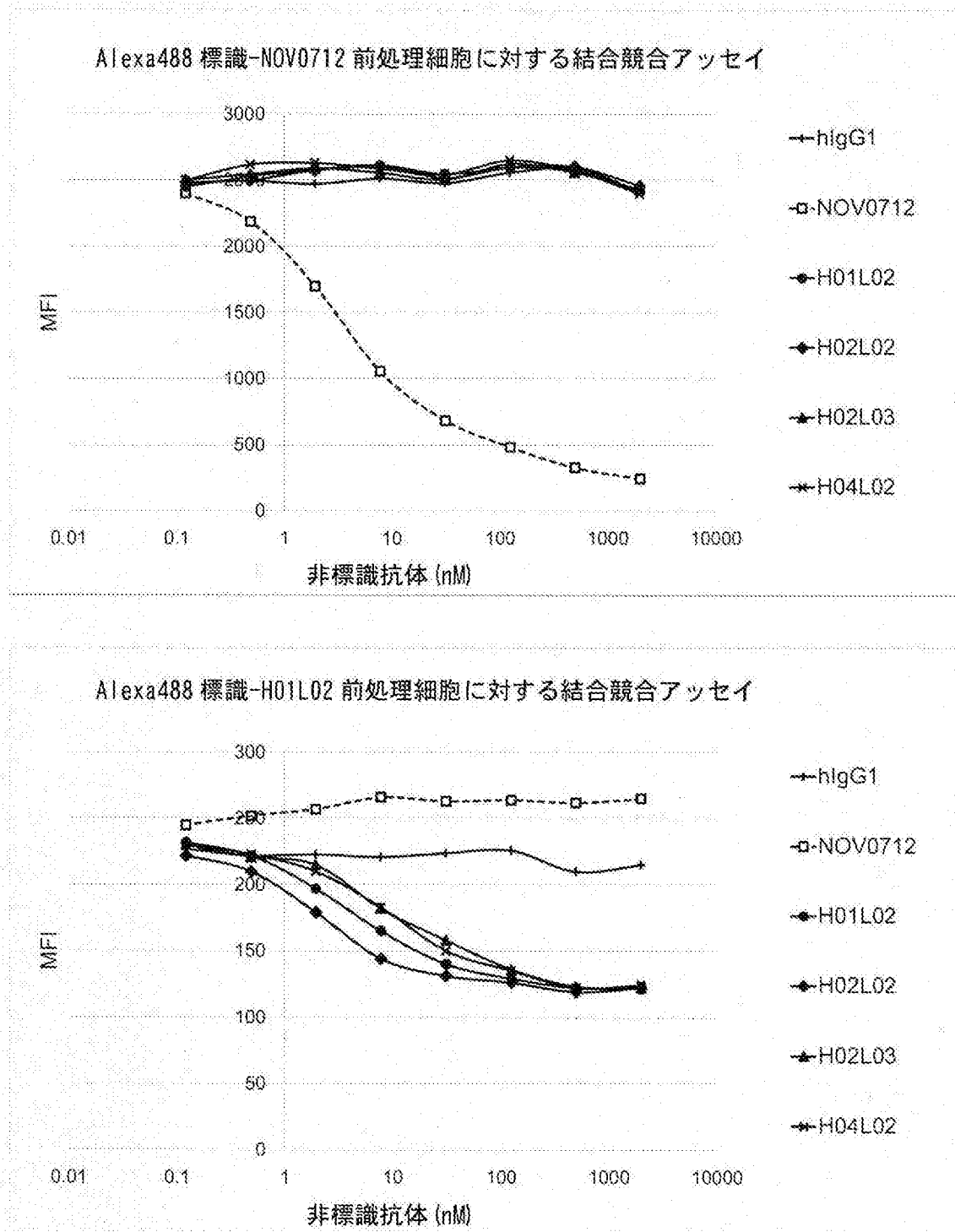


786-O / hCDH6

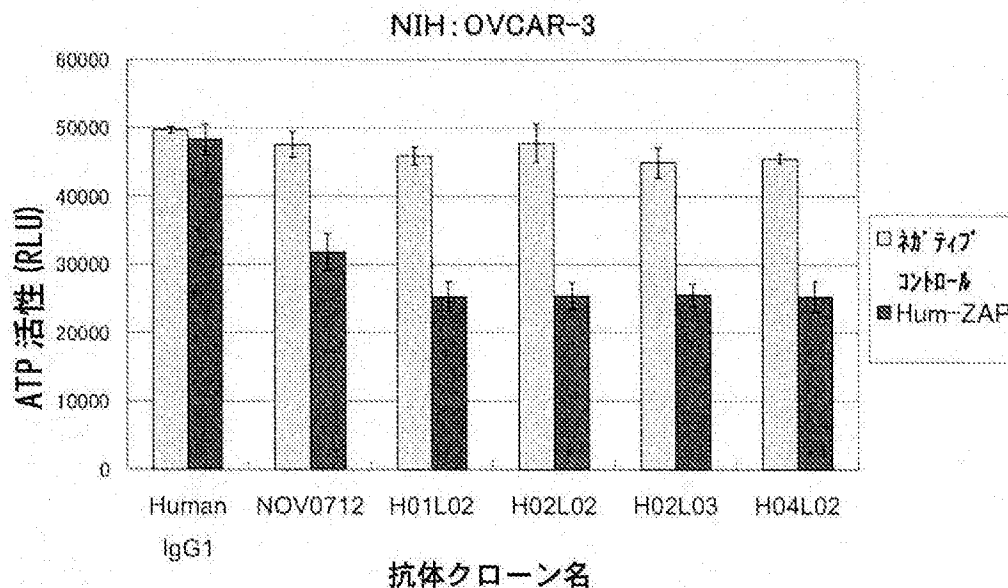
安定発現細胞株



[図9]



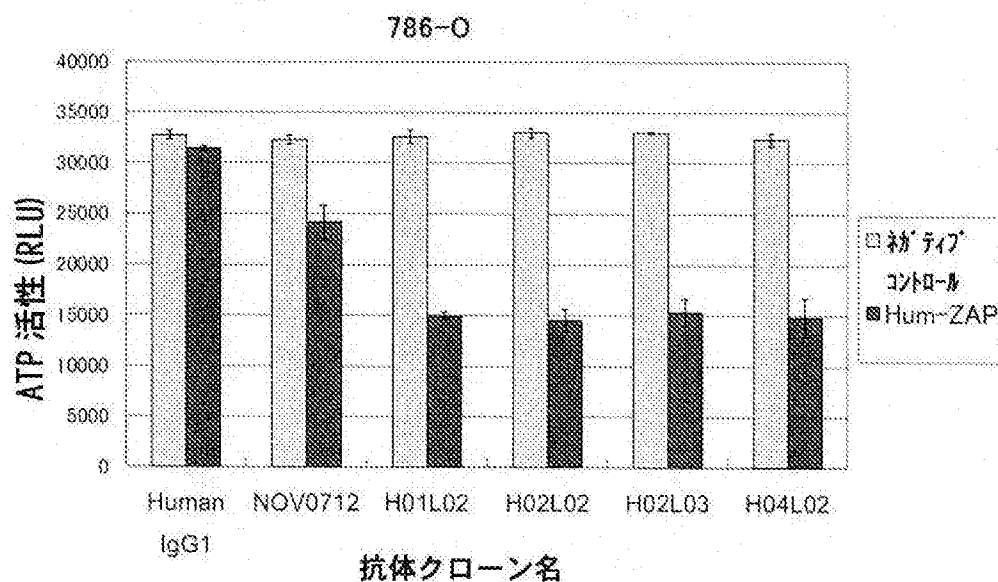
[図10-1]



Hum-ZAPを用いたNIH: OVCAR-3細胞生存率 (%)

Human IgG1	NOV0712	H01L02	H02L02	H02L03	H04L02
97.3	67.0	55.1	53.1	56.7	55.6

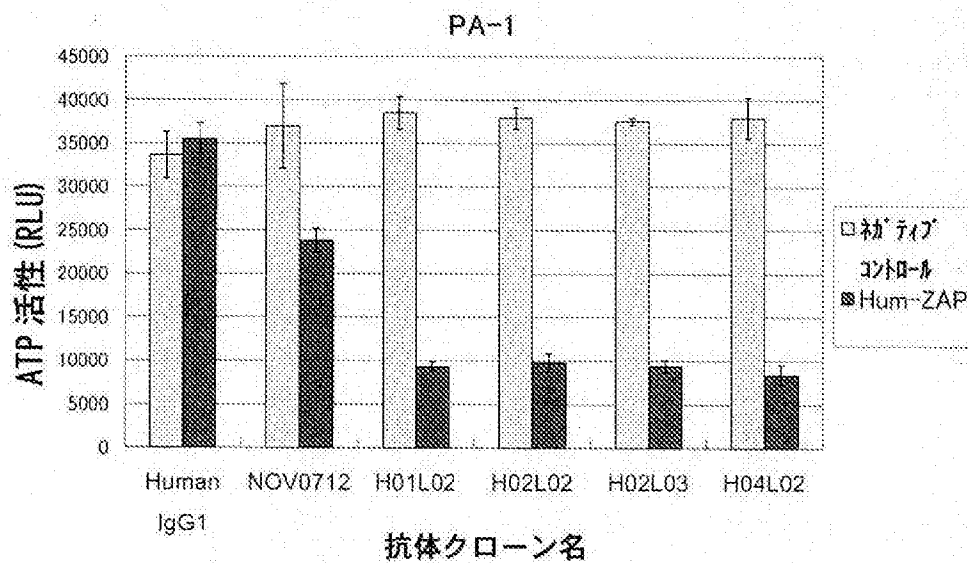
[図10-2]



Hum-ZAPを用いた786-O細胞生存率 (%)

Human IgG1	NOV0712	H01L02	H02L02	H02L03	H04L02
95.9	74.8	46.0	44.1	46.5	45.9

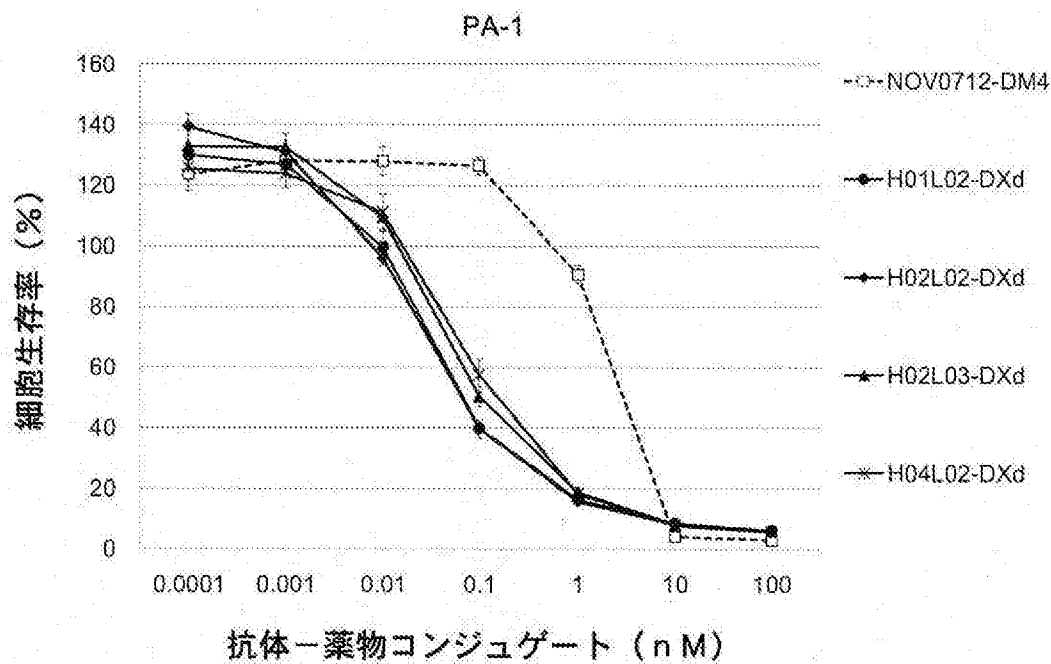
[図10-3]



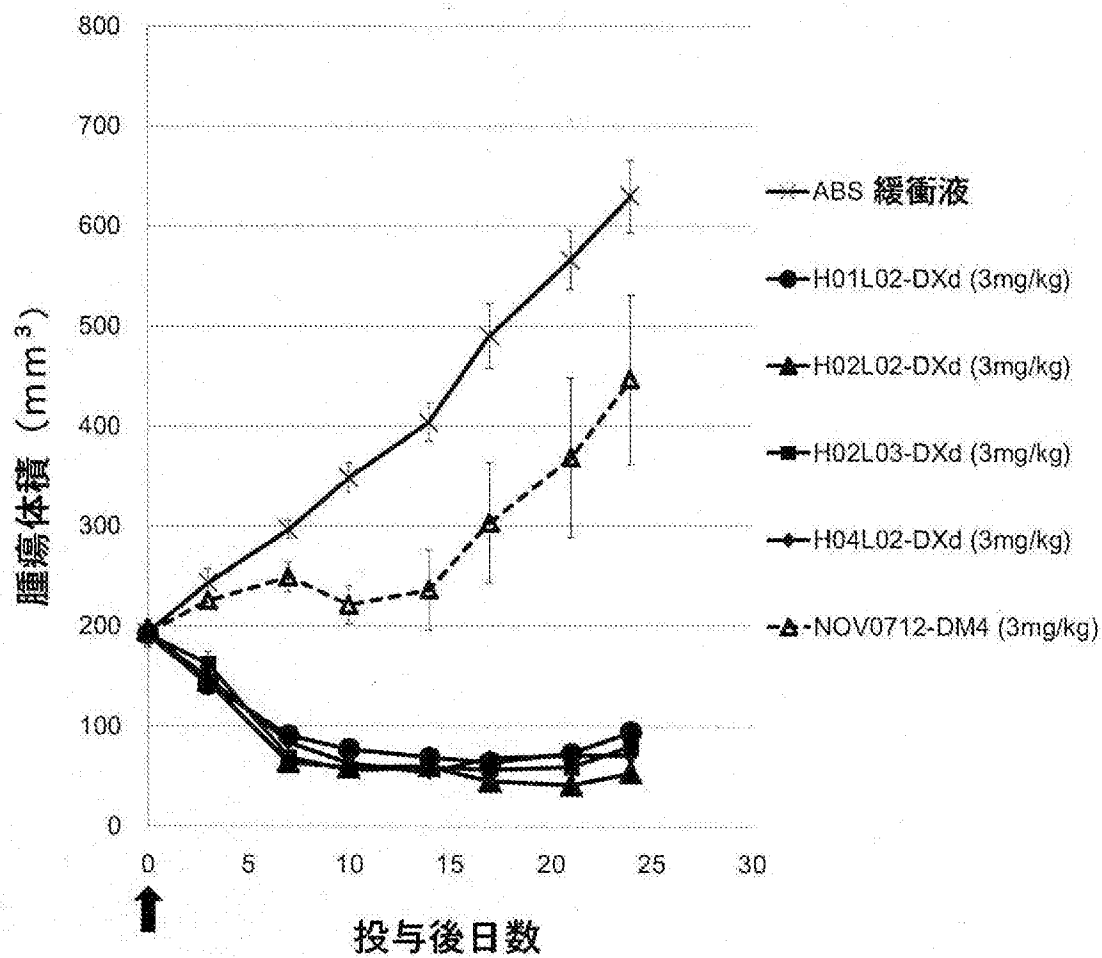
Hum-ZAPを用いたPA-1細胞生存率 (%)

Human IgG1	NOV0712	H01L02	H02L02	H02L03	H04L02
105.6	64.5	24.3	25.8	25.1	22.2

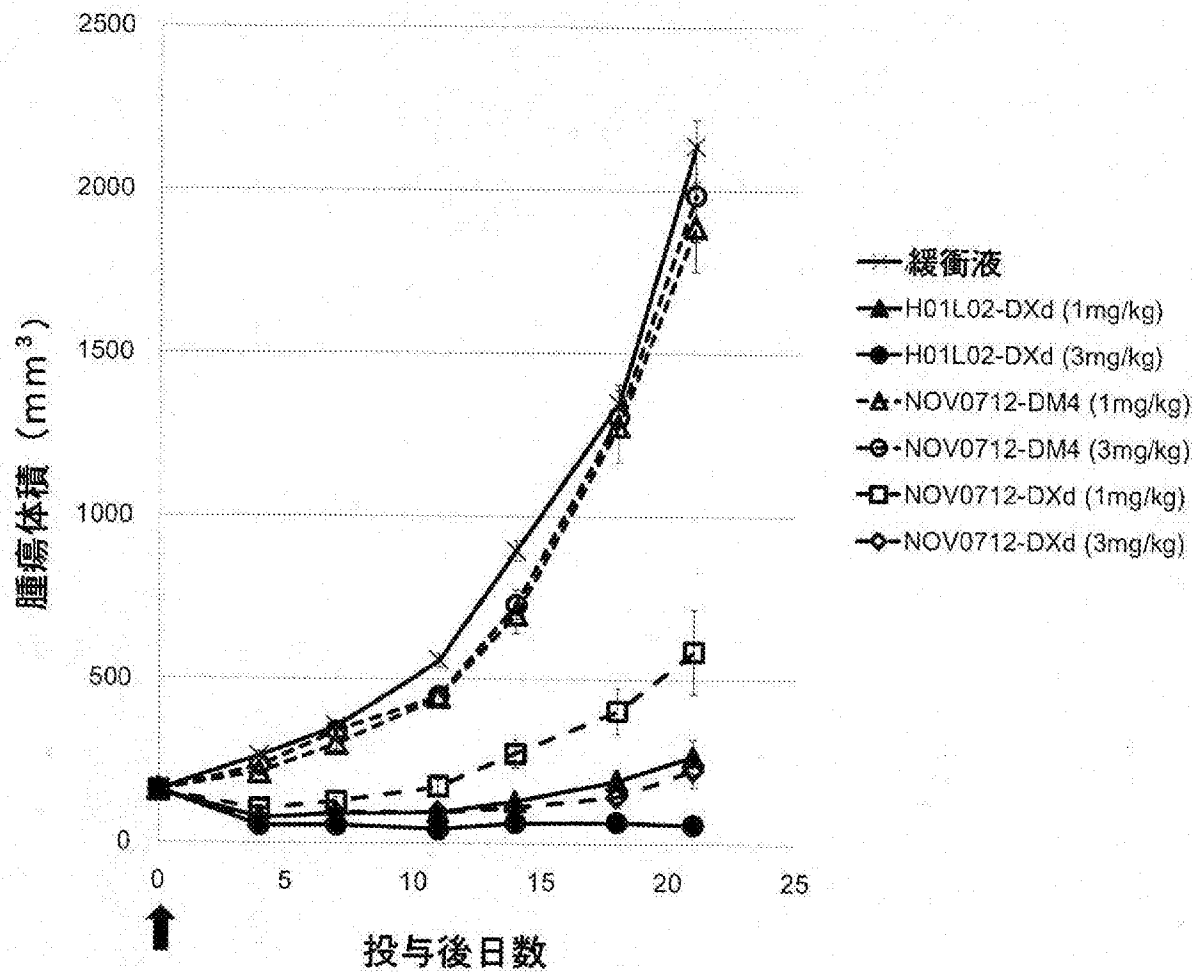
[図11]



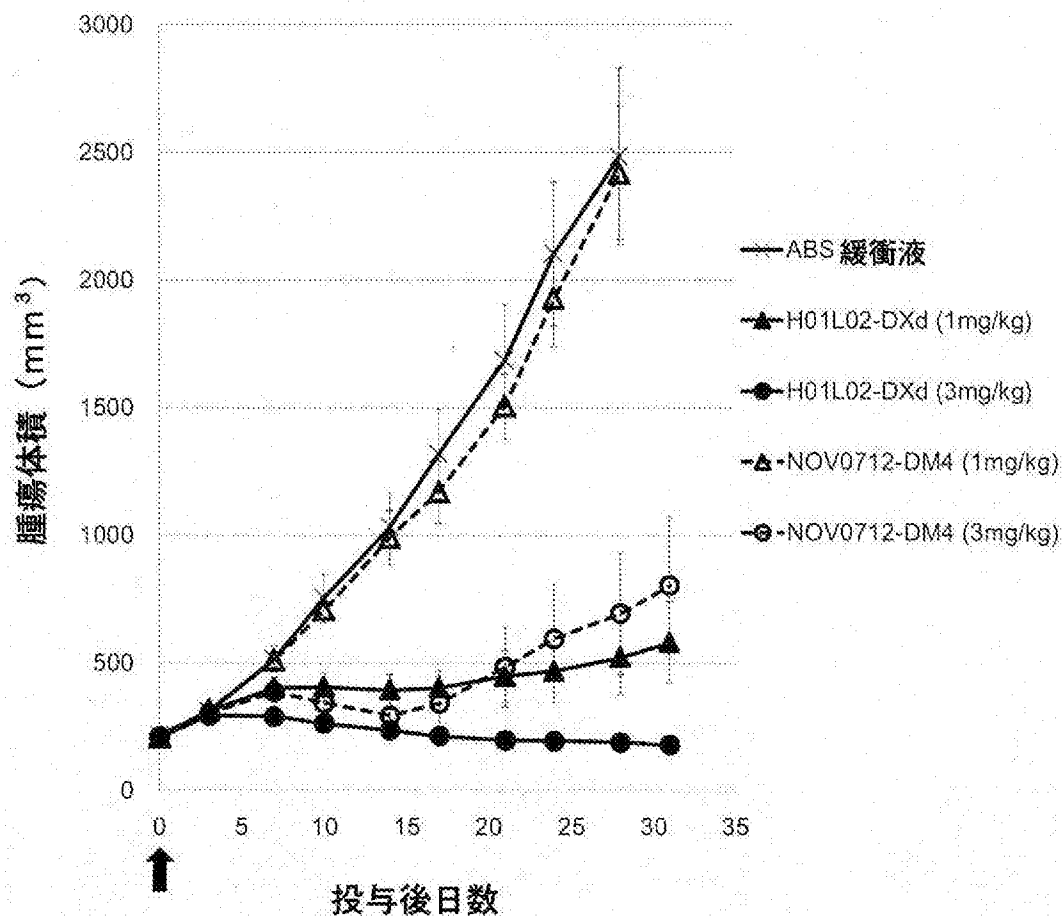
[図12]



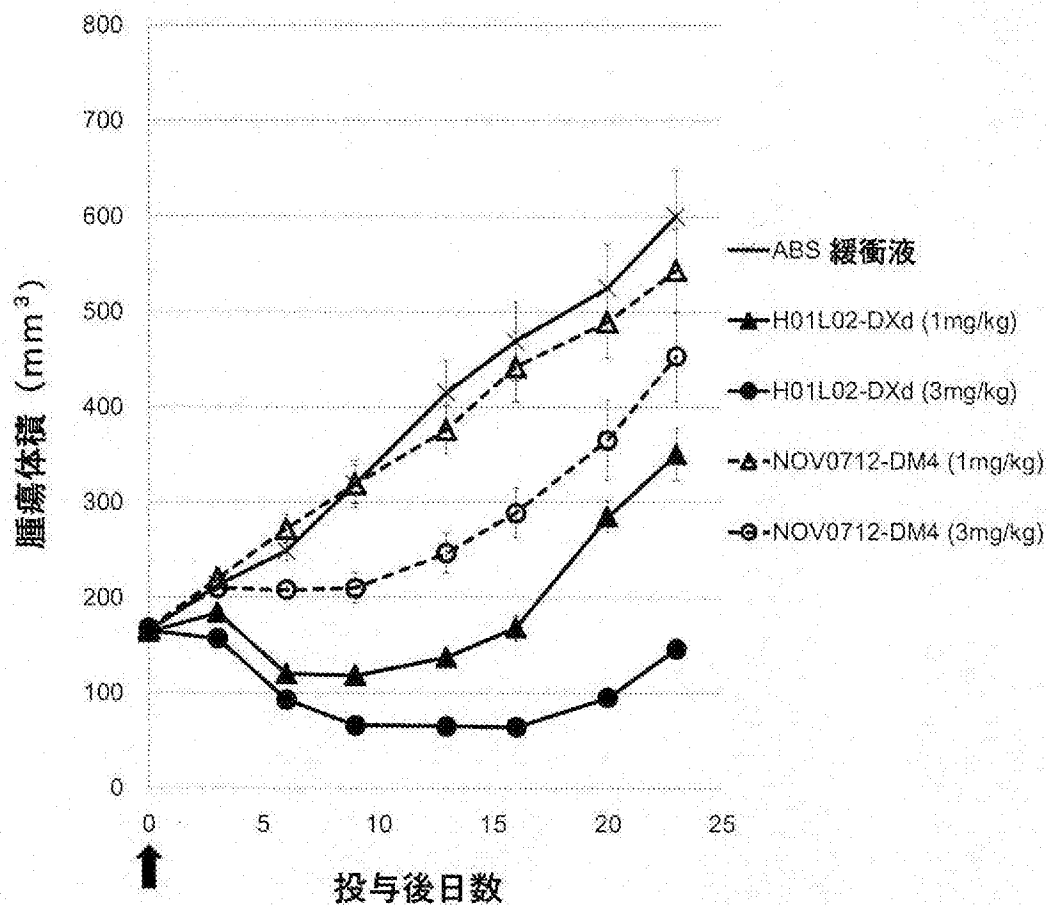
[図13]



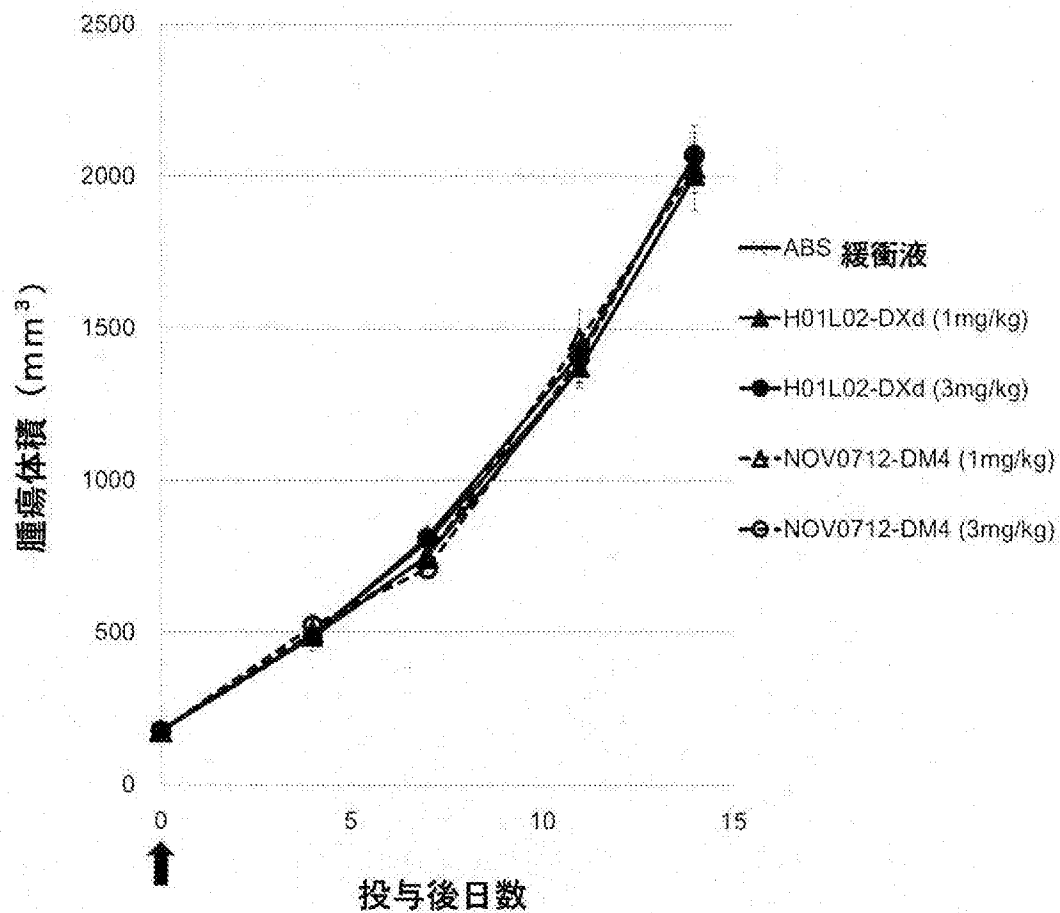
[図14]



[図15]



[図16]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/018572

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl. See extra sheet 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) Int.Cl. C12N15/13, A61K9/00, A61K31/4745, A61K39/395, A61K47/68, A61P13/12, A61P15/08, A61P35/00, A61P43/00, C07K16/28, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12P21/08 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2018 Registered utility model specifications of Japan 1996-2018 Published registered utility model applications of Japan 1994-2018 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), WPIDS/WPIX (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2016/024195 A1 (NOVARTIS AG) 18 February 2016, claims 1-61, examples, in particular, example 7, fig. 4, etc. & US 2016/0046711 A1, claims 1-61, examples, in particular, example 7, fig. 4, etc.	1-53
A	WO 2014/057687 A1 (DAIICHI SANKYO CO., LTD.) 17 April 2014, claims 1-49, examples, etc. & US 2015/0297748 A1, claims 1-49, examples, etc.	1-53
☐ 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 30 July 2018 (30.07.2018)		Date of mailing of the international search report 07 August 2018 (07.08.2018)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/018572

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

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

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. 特別ページ参照

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C12N15/13, A61K9/00, A61K31/4745, A61K39/395, A61K47/68, A61P13/12, A61P15/08, A61P35/00, A61P43/00, C07K16/28, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, 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	1 9 2 2－1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1－2 0 1 8 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6－2 0 1 8 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4－2 0 1 8 年

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAlplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), WPIDS/WPIX (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
A	WO 2016/024195 A1 (NOVARTIS AG) 2016.02.18, 請求項 1-61, 実施例特に実施例 7, 図 4 等 & US 2016/0046711 A1, 請求項 1-61, 実施例特に実施例 7, 図 4 等	1-53
A	WO 2014/057687 A1 (第一三共株式会社) 2014.04.17, 請求項 1-49, 実施例等 & US 2015/0297748 A1, 請求項 1-49, 実施例等	1-53

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

3 0 . 0 7 . 2 0 1 8

国際調査報告の発送日

0 7 . 0 8 . 2 0 1 8

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）

郵便番号 1 0 0－8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官（権限のある職員）

田ノ上 拓自

電話番号 0 3－3 5 8 1－1 1 0 1 内線 3 4 4 8

4 B

6 1 1 5

発明の属する分野の分類

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

Electronic Patent Application Fee Transmittal

Application Number:	17010162			
Filing Date:	02-Sep-2020			
Title of Invention:	ANTI-CDH6 ANTIBODY AND ANTI-CDH6 ANTIBODY-DRUG CONJUGATE			
First Named Inventor/Applicant Name:	Atsuko SAITO			
Filer:	Michael D. Kaminski/Tuan Tran			
Attorney Docket Number:	098065-0278			
Filed as Large Entity				
Filing Fees for Utility under 35 USC 111(a)				
Description	Fee Code	Quantity	Amount	Sub-Total in USD(\$)
Basic Filing:				
Pages:				
Claims:				
Miscellaneous-Filing:				
Petition:				
Patent-Appeals-and-Interference:				
Post-Allowance-and-Post-Issuance:				
Extension-of-Time:				

10899 of 10951

Description		Fee Code	Quantity	Amount	OnCusp Ex. Sub Total in USD(\$)
Miscellaneous:					
SUBMISSION- INFORMATION DISCLOSURE STMT		1806	1	260	260
Total in USD (\$)					260

EFS ID:	41937200
Application Number:	17010162
International Application Number:	
Confirmation Number:	6661
Title of Invention:	ANTI-CDH6 ANTIBODY AND ANTI-CDH6 ANTIBODY-DRUG CONJUGATE
First Named Inventor/Applicant Name:	Atsuko SAITO
Customer Number:	22428
Filer:	Michael D. Kaminski/Tuan Tran
Filer Authorized By:	Michael D. Kaminski
Attorney Docket Number:	098065-0278
Receipt Date:	16-FEB-2021
Filing Date:	02-SEP-2020
Time Stamp:	17:56:11
Application Type:	Utility under 35 USC 111(a)

Payment information:

Submitted with Payment	yes
Payment Type	CARD
Payment was successfully received in RAM	\$260
RAM confirmation Number	E20212FH58070876
Deposit Account	190741
Authorized User	Tuan Tran

The Director of the USPTO is hereby authorized to charge indicated fees and credit any overpayment as follows:
37 CFR 1.21 (Miscellaneous fees and charges)

File Listing:

Document Number	Document Description	File Name	File Size(Bytes)/ Message Digest	Multi Part /.zip	Pages (if appl.)
1	Transmittal Letter	098065-0278-IDS_C_Transmittal.pdf	370253	no	2
			1f66c4a00502d22a8a4724a12aca96490f138eee		

Warnings:**Information:**

2	Information Disclosure Statement (IDS) Form (SB08)	098065-0278-IDS_C_SB08.pdf	391764	no	1
			ca435e3e3e3da784b0c2def28bdf9974f4c2d208		

Warnings:**Information:**

This is not an USPTO supplied IDS fillable form

3	Foreign Reference	C1--WO_2018_185618A1.pdf	10395469	no	197
			d81282694299e07dd8bba6a9b5b49766b2f6b1b8		

Warnings:**Information:**

4	Foreign Reference	C2--WO_2018_212136A1.pdf	17433170	no	465
			fcdb1b627edf544ef4dbd666e1e597c8bf00d217		

Warnings:**Information:**

5	Non Patent Literature	C3-- CARL_U__BIALUCHA_ET_AL__ _Discovery_and_O.pdf	2836754	no	17
			957568999d2a046a2124e5898fa85f0d951dd99a		

Warnings:**Information:**

6	Non Patent Literature	C4-- CORADA_M_ET_AL__Monocl onal_antibodies_d.pdf	718730	no	6
			f464bfc1b0b48d955d49d80d383d3e48c21669b7		

Warnings:

<div> <div>Information:</div> <div>10902 of 10951</div> </div>				<div> <div>OnCusp</div> <div>Ex. 1038</div> </div>	
7	Non Patent Literature	C5-- Extended_European_Search_Report_dated_Ja.pdf	501670 ca4da30304b8abc339ff2786ba293d6e53aff4869	no	13
Warnings:					
Information:					
8	Non Patent Literature	C6-- Office_Action_issued_on_October_7__2020_.pdf	1101744 2d1fb32491419ae7f272cf2f2094a683e420b9f	no	26
Warnings:					
Information:					
9	Fee Worksheet (SB06)	fee-info.pdf	30576 5fc4fc4e02b47826eecca4dc8d0a4b76dd69d959	no	2
Warnings:					
Information:					
Total Files Size (in bytes):			33780130		
<p>This Acknowledgement Receipt evidences receipt on the noted date by the USPTO of the indicated documents, characterized by the applicant, and including page counts, where applicable. It serves as evidence of receipt similar to a Post Card, as described in MPEP 503.</p> <p><u>New Applications Under 35 U.S.C. 111</u> If a new application is being filed and the application includes the necessary components for a filing date (see 37 CFR 1.53(b)-(d) and MPEP 506), a Filing Receipt (37 CFR 1.54) will be issued in due course and the date shown on this Acknowledgement Receipt will establish the filing date of the application.</p> <p><u>National Stage of an International Application under 35 U.S.C. 371</u> If a timely submission to enter the national stage of an international application is compliant with the conditions of 35 U.S.C. 371 and other applicable requirements a Form PCT/DO/EO/903 indicating acceptance of the application as a national stage submission under 35 U.S.C. 371 will be issued in addition to the Filing Receipt, in due course.</p> <p><u>New International Application Filed with the USPTO as a Receiving Office</u> If a new international application is being filed and the international application includes the necessary components for an international filing date (see PCT Article 11 and MPEP 1810), a Notification of the International Application Number and of the International Filing Date (Form PCT/RO/105) will be issued in due course, subject to prescriptions concerning national security, and the date shown on this Acknowledgement Receipt will establish the international filing date of the application.</p>					

Atty. Dkt. No. 098065-0278

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

First Inventor Name: Atsuko SAITO

Title: ANTI-CDH6 ANTIBODY AND ANTI-CDH6 ANTIBODY-DRUG
 CONJUGATE

Application No.: 17/010,162

Filing Date: 9/2/2020

Examiner: LI, RUIXIANG

Art Unit: 1646

Confirmation No.: 6661

INFORMATION DISCLOSURE STATEMENT
UNDER 37 CFR §1.56

Commissioner:

Applicant submits herewith documents for the Examiner's consideration in accordance with 37 CFR §§1.56, 1.97 and 1.98.

Applicant respectfully requests that each listed document be considered by the Examiner and be made of record in the present application and that an initialed copy of Form PTO/SB/08 be returned in accordance with MPEP §609.

Applicant requests that, in accordance with 37 CFR §1.98(d), the Examiner review all applications relied on for an earlier effective filing date under 35 U.S.C. 120, including Application No. 16/613,203, filed 5/14/2018, for copies of references of record therein that are not being provided here; although Applicant would be pleased to provide copies of any such documents at the Examiner's request.

The submission of any document herewith is not an admission that such document constitutes prior art against the claims of the present application or that such document is considered material to patentability as defined in 37 CFR §1.56(b). Applicant does not waive

Atty. Dkt. No. 098065-0278

any rights to take any action which would be appropriate to antedate or otherwise remove as a competent reference any document submitted herewith.

CONCISE EXPLANATION OF RELEVANCE

Reference C1, C3, and C4 were cited in an Extended European Search Report (“EESR”) dated January 19, 2021 for corresponding European Patent Application No. 18802536.5. The EESR is submitted as Reference C5.

Reference C6 is the Office Action, along with English translations, issued on October 7, 2020 for corresponding Japanese Patent Application No. 2019-518773.

TIMING OF THE DISCLOSURE

The listed documents are being submitted in compliance with 37 CFR §1.97(c), before the mailing date of any of a final action under 37 CFR §1.113, a notice of allowance under 37 CFR §1.311, or an action that otherwise closes prosecution in the application.

FEE

Fees in the amount of \$260.00 to cover the fee associated with an information disclosure statement are being paid by credit card via EFS-Web.

The Commissioner is hereby authorized to charge any additional fees which may be required for this application to Deposit Account Number 19-0741.

Respectfully submitted,

Date 2021-02-16

By /Michael D. Kaminski/

FOLEY & LARDNER LLP
Customer Number: 22428
Telephone: (202) 672-5490
Facsimile: (202) 672-5399

Michael D. Kaminski
Attorney for Applicant
Registration No. 32,904

Atty. Dkt. No. 098065-0278

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

First Inventor Name: Atsuko SAITO

Title: ANTI-CDH6 ANTIBODY AND ANTI-CDH6 ANTIBODY-
DRUG CONJUGATE

Appl. No.: 17/010,162

Filing Date: 9/2/2020

Examiner: LI, RUIXIANG

Art Unit: 1646

Confirmation Number: 6661

AMENDMENT AND REPLY UNDER 37 CFR 1.111

Mail Stop AMENDMENT
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Commissioner:

This communication is responsive to the Office Action mailed December 24, 2020, concerning the above-referenced patent application. The Office Action set a standard shortened statutory period for response of 3 months. Accordingly, this response is timely filed.

Amendments to the Specification are shown on page 2.

Amendments to the Claims are set forth in the listing of claims that begins on page 3.

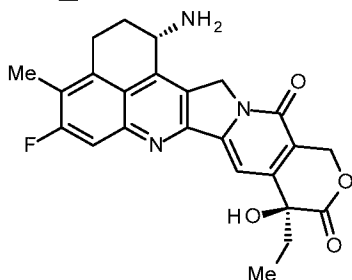
Remarks begin on page 12 of this document.

Please amend the application as follows:

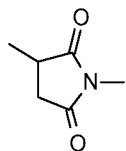
Atty. Dkt. No. 098065-0278

Amendments to the Specification:

Please amend the description at the top of page 105 of the as-filed specification as shown below:

[Formula 15]

Please amend the description at the top of page 110 of the as-filed specification as shown below:

[Formula 26]

Amendments to the Claims:

This listing of claims will replace all prior versions and listings of claims in the application:

Listing of Claims:

1. (Currently Amended) An antibody-drug conjugate comprising (i) an antibody or a functional fragment thereof that specifically binds binding to the amino acid sequence of shown in SEQ ID NO: 4 and possesses having internalization ability that permits cellular uptake, or a functional fragment of the antibody, and (ii) conjugated to a drug conjugated to the antibody or functional fragment thereof via a linker;

wherein the antibody or functional fragment thereof comprises a light chain comprising a CDRL1, a CDRL2, and a CDRL3 and a heavy chain comprising a CDRH1, a CDRH2, and a CDRH3 selected from the group consisting of:

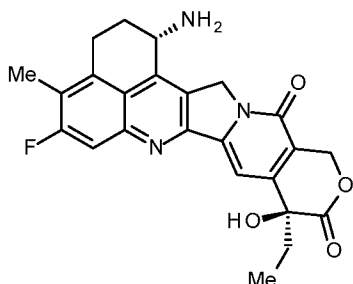
- (a) CDRL1 comprising SEQ ID NO: 12, CDRL2 comprising SEQ ID NO: 13, and CDRL3 comprising SEQ ID NO: 14, and CDRH1 comprising SEQ ID NO: 17, CDRH2 comprising SEQ ID NO: 18, and CDRH3 comprising SEQ ID NO: 19;
- (b) CDRL1 comprising SEQ ID NO: 22, CDRL2 comprising SEQ ID NO: 23, and CDRL3 comprising SEQ ID NO: 24, and CDRH1 comprising SEQ ID NO: 27, CDRH2 comprising SEQ ID NO: 28, and CDRH3 comprising SEQ ID NO: 29;
- (c) CDRL1 comprising SEQ ID NO: 32, CDRL2 comprising SEQ ID NO: 33, and CDRL3 comprising SEQ ID NO: 34, and CDRH1 comprising SEQ ID NO: 37, CDRH2 comprising SEQ ID NO: 38, and CDRH3 comprising SEQ ID NO: 39;
- (d) CDRL1 comprising SEQ ID NO: 42, CDRL2 comprising SEQ ID NO: 43, and CDRL3 comprising SEQ ID NO: 44, and CDRH1 comprising SEQ ID NO: 47, CDRH2 comprising SEQ ID NO: 48, and CDRH3 comprising SEQ ID NO: 49; and
- (e) CDRL1 comprising SEQ ID NO: 12, CDRL2 comprising SEQ ID NO: 13, and CDRL3 comprising SEQ ID NO: 14, and CDRH1 comprising SEQ ID NO: 17, CDRH2 comprising SEQ ID NO: 60, and CDRH3 comprising SEQ ID NO: 19.

2. (Original) The antibody-drug conjugate according to claim 1, wherein the drug is an antitumor compound.

Atty. Dkt. No. 098065-0278

3. (Original) The antibody-drug conjugate according to claim 2, wherein the antitumor compound is an antitumor compound represented by the following formula:

[Formula 1]



4. (Currently Amended) The antibody-drug conjugate according to claim 1, wherein the ~~antibody is conjugated to the drug via a linker~~ has a having any structure selected from the group consisting of the following formulas (a) to (f):

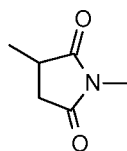
- (a) -(Succinimid-3-yl-N)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-,
- (b) -(Succinimid-3-yl-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-,
- (c) -(Succinimid-3-yl-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-,
- (d) -(Succinimid-3-yl-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-,
- (e) -(Succinimid-3-yl-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-, and
- (f) -(Succinimid-3-yl-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-,

wherein the antibody is connected to the terminus of -(Succinimid-3-yl-N), the antitumor compound is connected to the carbonyl group of the -CH₂CH₂CH₂-C(=O)- moiety of (a), (b), (e) or (f), the CH₂-O-CH₂-C(=O)- moiety of (c) or the CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)- moiety of (d) with the nitrogen atom of the amino group at position 1 as a connecting position, GGFG represents an amino acid sequence consisting of glycine-glycine-phenylalanine-glycine linked through peptide bonds, and

-(Succinimid-3-yl-N)- has a structure represented by the following formula:

[Formula 2]

Atty. Dkt. No. 098065-0278



which is connected to the antibody at position 3 thereof and is connected to a methylene group in the linker structure containing this structure on the nitrogen atom at position 1.

5. (Original) The antibody-drug conjugate according to claim 1, wherein the linker is represented by any formula selected from the group consisting of the following formulas (c), (d) and (e):

(c) -(Succinimid-3-yl-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-,

(d) -(Succinimid-3-yl-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-, and

(e) -(Succinimid-3-yl-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-.

6. (Original) The antibody-drug conjugate according to claim 1, wherein the linker is represented by the following formula (c) or (e):

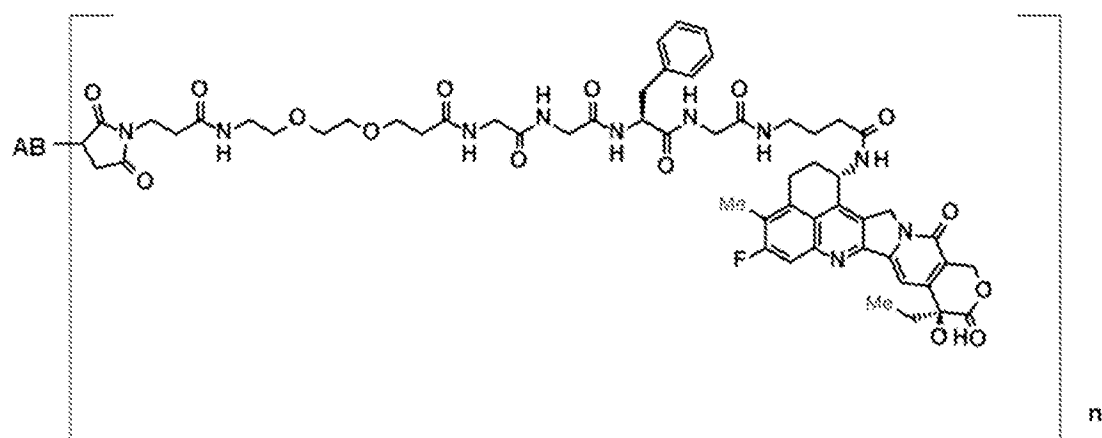
(c) -(Succinimid-3-yl-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-, and

(e) -(Succinimid-3-yl-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-.

7. (Withdrawn) The antibody-drug conjugate according to claim 1, which has a structure represented by the following formula:

[Formula 3]

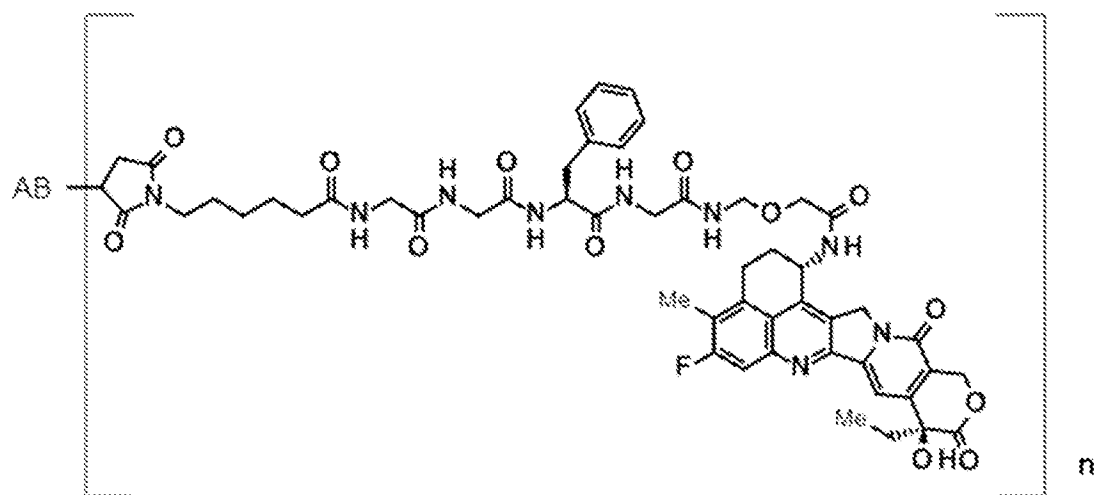
Atty. Dkt. No. 098065-0278



wherein AB represents the antibody or the functional fragment of the antibody, n represents the average number of units of the drug-linker structure conjugated to the antibody per antibody, and the antibody is connected to the linker via a sulfhydryl group derived from the antibody.

8. (Original) The antibody-drug conjugate according to claim 1, which has a structure represented by the following formula:

[Formula 4]



wherein AB represents the antibody or the functional fragment of the antibody, n represents the average number of units of the drug-linker structure conjugated to the antibody per antibody, and the antibody is connected to the linker via a sulfhydryl group derived from the antibody.

Atty. Dkt. No. 098065-0278

9. (Original) The antibody-drug conjugate according to claim 1, wherein the antibody is an antibody comprising a light chain and a heavy chain in any one combination selected from the group consisting of the following combinations (1) to (4), or a functional fragment of the antibody:

- (1) a light chain consisting of the amino acid sequence at positions 21 to 233 in SEQ ID NO: 61 and a heavy chain consisting of the amino acid sequence at positions 20 to 471 in SEQ ID NO: 69,
- (2) a light chain consisting of the amino acid sequence at positions 21 to 233 in SEQ ID NO: 61 and a heavy chain consisting of the amino acid sequence at positions 20 to 471 in SEQ ID NO: 73,
- (3) a light chain consisting of the amino acid sequence at positions 21 to 233 in SEQ ID NO: 65 and a heavy chain consisting of the amino acid sequence at positions 20 to 471 in SEQ ID NO: 73, and
- (4) a light chain consisting of the amino acid sequence at positions 21 to 233 in SEQ ID NO: 61 and a heavy chain consisting of the amino acid sequence at positions 20 to 471 in SEQ ID NO: 77.

10. (Original) The antibody-drug conjugate according to claim 9, wherein the antibody is an antibody comprising a light chain consisting of the amino acid sequence at positions 21 to 233 in SEQ ID NO: 61 and a heavy chain consisting of the amino acid sequence at positions 20 to 471 in SEQ ID NO: 69, or a functional fragment of the antibody.

11. (Withdrawn) The antibody-drug conjugate according to claim 9, wherein the antibody is an antibody comprising a light chain consisting of the amino acid sequence at positions 21 to 233 in SEQ ID NO: 61 and a heavy chain consisting of the amino acid sequence at positions 20 to 471 in SEQ ID NO: 77, or a functional fragment of the antibody.

12. (Original) The antibody-drug conjugate according to claim 1, wherein the heavy chain or the light chain has undergone one or two or more modifications selected from the group consisting of N-linked glycosylation, O-linked glycosylation, N-terminal processing, C-terminal

processing, deamidation, isomerization of aspartic acid, oxidation of methionine, addition of a methionine residue to the N-terminus, amidation of a proline residue, conversion of N-terminal glutamine or N-terminal glutamic acid to pyroglutamic acid, and a deletion of one or two amino acids from the carboxyl terminus.

13. (Original) The antibody-drug conjugate according to claim 1, wherein the average number of units of the selected drug-linker structure conjugated per antibody is in the range of from 1 to 10.

14. (Original) The antibody-drug conjugate according to claim 13, wherein the average number of units of the selected drug-linker structure conjugated per antibody is in the range of from 2 to 8.

15. (Original) The antibody-drug conjugate according to claim 14, wherein the average number of units of the selected drug-linker structure conjugated per antibody is in the range of from 5 to 8.

16. (Original) The antibody-drug conjugate according to claim 15, wherein the average number of units of the selected drug-linker structure conjugated per antibody is in the range of from 7 to 8.

17. (Original) A pharmaceutical composition comprising the antibody-drug conjugate according to claim 1, a salt thereof, or a hydrate of the conjugate or the salt.

18. (Original) The pharmaceutical composition according to claim 17, which is an antitumor drug.

19. (Original) The pharmaceutical composition according to claim 18, wherein the tumor is a tumor expressing CDH6.

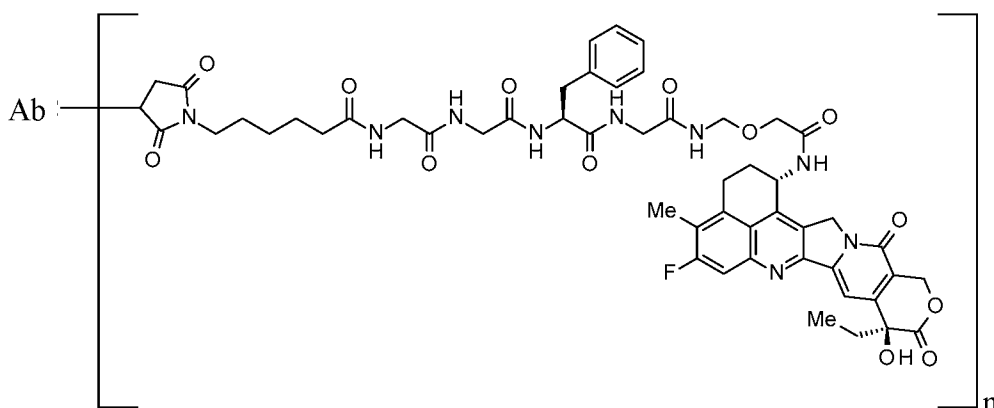
20. (Original) The pharmaceutical composition according to claim 18, wherein the tumor is renal cell carcinoma, renal clear cell carcinoma, papillary renal cell carcinoma, ovarian

Atty. Dkt. No. 098065-0278

cancer, ovarian serous adenocarcinoma, thyroid cancer, bile duct cancer, lung cancer, small-cell lung cancer, glioblastoma, mesothelioma, uterine cancer, pancreatic cancer, Wilms' tumor or neuroblastoma.

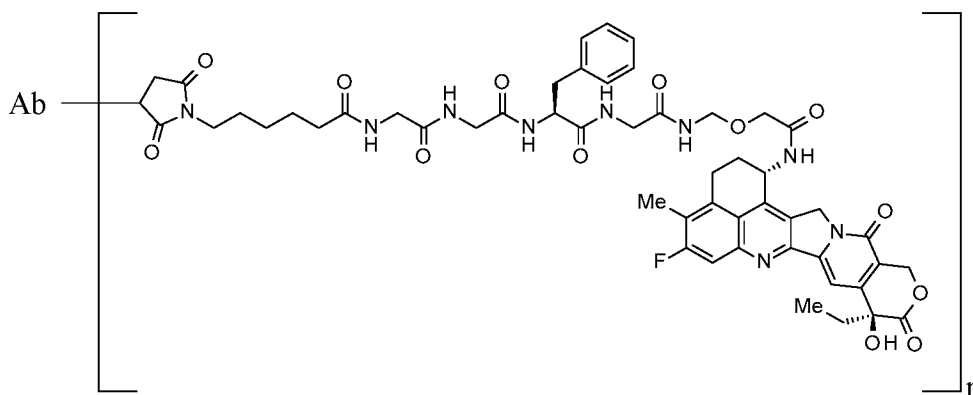
21-24. (Canceled)

25. (New) An antibody-drug conjugate, comprising the formula:



wherein Ab is an antibody comprising a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO: 71 and a light chain variable region comprising SEQ ID NO: 63, and n represents the average number of units of the drug-linker structure conjugated to the antibody per antibody, wherein the average number of units of the selected drug-linker structure conjugated per antibody is in the range of from 1 to 10.

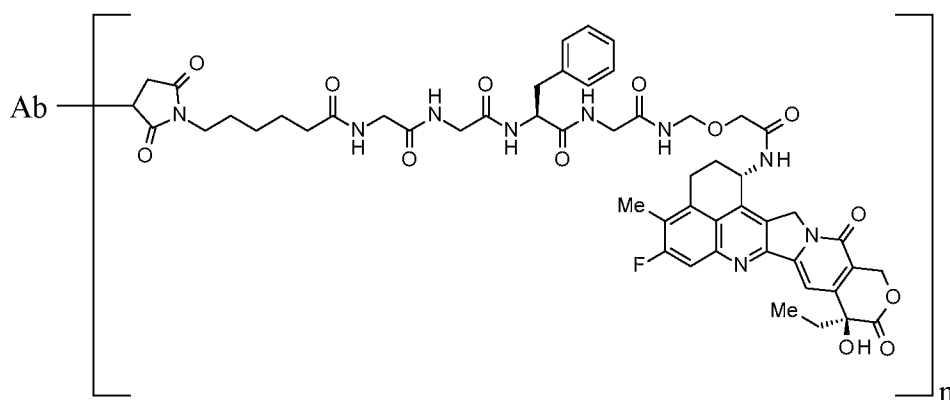
26. (New) An antibody-drug conjugate, comprising the formula:



Atty. Dkt. No. 098065-0278

wherein Ab is an antibody comprising a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO: 75 and a light chain variable region comprising SEQ ID NO: 63, and n represents the average number of units of the drug-linker structure conjugated to the antibody per antibody, wherein the average number of units of the selected drug-linker structure conjugated per antibody is in the range of from 1 to 10.

27. (New) An antibody-drug conjugate, comprising the formula:



wherein Ab is an antibody comprising a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO: 79 and a light chain variable region comprising SEQ ID NO: 63, and n represents the average number of units of the drug-linker structure conjugated to the antibody per antibody, wherein the average number of units of the selected drug-linker structure conjugated per antibody is in the range of from 1 to 10.

28. (New) The antibody-drug conjugate according to claim 9, wherein the antibody comprises a light chain consisting of amino acids 21 to 233 of SEQ ID NO: 61 and a heavy chain consisting of amino acids 20 to 471 of SEQ ID NO: 73.

29. (New) The antibody-drug conjugate according to claim 7, wherein the average number of units of the selected drug-linker structure conjugated per antibody is in the range of from 1 to 10.

Atty. Dkt. No. 098065-0278

30. (New) The antibody-drug conjugate according to claim 7, wherein the average number of units of the selected drug-linker structure conjugated per antibody is in the range of from 2 to 8.

31. (New) The antibody-drug conjugate according to claim 7, wherein the average number of units of the selected drug-linker structure conjugated per antibody is in the range of from 5 to 8.

32. (New) The antibody-drug conjugate according to claim 8, wherein the average number of units of the selected drug-linker structure conjugated per antibody is in the range of from 1 to 10.

33. (New) The antibody-drug conjugate according to claim 8, wherein the average number of units of the selected drug-linker structure conjugated per antibody is in the range of from 2 to 8.

34. (New) The antibody-drug conjugate according to claim 8, wherein the average number of units of the selected drug-linker structure conjugated per antibody is in the range of from 5 to 8.

REMARKS

Applicant respectfully requests that the foregoing claims are reconsidered in view of the foregoing amendments and the arguments that follow.

Status of the Claims

Claims 1 and 4 are currently amended. The amendments do not add new matter and support can be found throughout the as-filed application, for example, at least in the originally filed claims. Claims 21-24 are canceled. The amendments and cancelations are made without prejudice or disclaimer. Claims 25-34 are new. This addition does not add new matter and support can be found at least in the original claim set. Upon entry of this response claims 1-20 and 25-34 will be pending with claims 7 and 11 withdrawn.

Specification

The Specification was objected to because alleged informalities relating to the labeling of the chemical formulas on pages 105 and 110 of the as-filed specification. Applicant has amended the specification herein per the recommendations provided in the Office Action. Office Action at p. 3. Accordingly, Applicant respectfully requests that these objections are withdrawn.

Double Patenting Rejections

Claims 1-6, 8, and 12-20 were rejected on the ground of nonstatutory double patenting as allegedly unpatentable over claims 1-47 of US 9,872,924, claims 1-14 of US 9,850,312, claims 1-18 of US 9,808,537, claims 1-35 of US 10,195,288, and claims 1-8 of US 10,155,821 in view of WO 2016/024195. Applicant respectfully traverses these rejections.

A. **The Rejections Over US 9,850,312 and US 10,155,821 Should Be Withdrawn In View of the Amendments to the Claims**

US 9,850,312 claims an ADC comprising an anti-TROP2 antibody and US 10,155,821 claims an ADC comprising an anti-HER2 antibody. In contrast, the present claims are directed to ADCs that comprise specific anti-CDH6 antibodies. Accordingly, the present claims and the

Atty. Dkt. No. 098065-0278

reference claims are directed to clearly different inventions and there is no overlap between the claim sets as a result of the plainly distinct antibodies. The claims of the present application would not “unjustly extend” the patent rights granted by US 9,850,312 or US 10,155,821, nor would the present claims present the potential to harass accused infringers of US 9,850,312 or US 10,155,821. Accordingly, the legal basis for double patenting is simply absent here, and these rejections should be withdrawn.

B. The Rejections Over US 9,872,924; US 9,808,537; and US 10,195, 288 Should Also Be Withdrawn In View of the Amendments to the Claims

The claims of the cited reference patents US 9,872,924; US 9,808,537; and US 10,195,288 do not specifically relate to, teach, nor suggest an ADC comprising anti-CDH6 antibody, let alone any of the anti-CDH6 antibodies that are now specifically recited by the present claims. In fact, none of these patents mentions CDH6 anywhere in the specification at all, and, therefore the Office Action attempts to compensate for the deficiency by citing WO 2016/024195. However, as currently amended, the claims are directed to ADCs comprising an anti-CDH6 antibody with explicitly recited CDR sequences not taught or suggested in WO 2016/024195. Thus, none of the reference claims, nor WO 2016/024195, teach or suggest all of the elements of the present claims, and, therefore, cannot render the claims obvious.

Accordingly, these rejections for obviousness-type double patenting cannot be sustained and Applicant respectfully requests that they be withdrawn.

Rejection under 35 U.S.C. § 112(a) – Written Description

Claims 1-6, 8-10, and 12-20 were rejected under 35 U.S.C. § 112(a) as allegedly failing to satisfy the written description requirement. Applicant respectfully traverses this rejection in view of the amendments to the claims.

Without acquiescing to the propriety of the rejection and solely to facilitate prosecution, Applicant has amended claim 1 to recite specific combinations of CDR sequences that are expressly disclosed and described in the present specification. Accordingly, it would be clear to those skilled in the art that Applicant was in possession of the claimed ADC at the time of filing

Atty. Dkt. No. 098065-0278

this application, and nothing further is needed to satisfy the written description requirement of Section 112(a). Accordingly, Applicant respectfully requests that this rejection is reconsidered and withdrawn in view of the amendments to the claims.

Rejection under 35 U.S.C. § 103

Claims 1-6, 8, and 12-20 were rejected under 35 U.S.C. § 103 as allegedly unpatentable over Nakada et al. (*Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 26(6): 1542-45, 2016) or U.S. 2015/0352224, in view of WO 2016/024195. Applicant respectfully traverses this rejection in view of the amendments to the claims.

Without acquiescing to the propriety of the rejection and solely to facilitate prosecution, Applicant has amended claim 1 to recite specific combinations of CDR sequences that are expressly disclosed and described in the present specification. All of the cited references fail to teach or suggest the recited CDR sequences, and therefore the present claims cannot be rendered obvious by the cited combination of references. Accordingly, Applicant respectfully requests that this rejection is reconsidered and withdrawn in view of the amendments to the claims.

Atty. Dkt. No. 098065-0278

CONCLUSION

Applicants believe that the application is in condition for allowance. Favorable reconsideration is respectfully requested. The Examiner is invited to contact the undersigned by telephone if it is felt that a telephone interview would advance prosecution.

The Commissioner is hereby authorized to charge any additional fees which may be required regarding this application under 37 C.F.R. §§ 1.16-1.17, or credit any overpayment, to Deposit Account No. 19-0741. Should no proper payment be enclosed herewith, as by the credit card payment instructions in EFS-Web being incorrect or absent, resulting in a rejected or incorrect credit card transaction, the Commissioner is authorized to charge the unpaid amount to Deposit Account No. 19-0741. If any extensions of time are needed for timely acceptance of papers submitted herewith, Applicant hereby petitions for such extension under 37 C.F.R. §1.136 and authorizes payment of any such extension fees to Deposit Account No. 19-0741.

Respectfully submitted,

Date: March 1, 2021

By: /Benjamin Berkowitz/

FOLEY & LARDNER LLP
Customer Number: 22428
Telephone: (202) 672-5574
Facsimile: (202) 672-5399

Benjamin A. Berkowitz
Attorney for Applicants
Registration No. 59,349

Electronic Patent Application Fee Transmittal

Application Number:	17010162			
Filing Date:	02-Sep-2020			
Title of Invention:	ANTI-CDH6 ANTIBODY AND ANTI-CDH6 ANTIBODY-DRUG CONJUGATE			
First Named Inventor/Applicant Name:	Atsuko SAITO			
Filer:	Benjamin A. Berkowitz/Ralph Osmann			
Attorney Docket Number:	098065-0278			
Filed as Large Entity				
Filing Fees for Utility under 35 USC 111(a)				
Description	Fee Code	Quantity	Amount	Sub-Total in USD(\$)
Basic Filing:				
Pages:				
Claims:				
CLAIMS IN EXCESS OF 20	1202	6	100	600
Miscellaneous-Filing:				
Petition:				
Patent-Appeals-and-Interference:				
Post-Allowance-and-Post-Issuance:				

10921 of 10951	OnCusp Ex. Sub			1038
Description	Fee Code	Quantity	Amount	Total in USD(\$)
Extension-of-Time:				
Miscellaneous:				
Total in USD (\$)				600

Electronic Acknowledgement Receipt

EFS ID:	42116407
Application Number:	17010162
International Application Number:	
Confirmation Number:	6661
Title of Invention:	ANTI-CDH6 ANTIBODY AND ANTI-CDH6 ANTIBODY-DRUG CONJUGATE
First Named Inventor/Applicant Name:	Atsuko SAITO
Customer Number:	22428
Filer:	Benjamin A. Berkowitz/Ralph Osmann
Filer Authorized By:	Benjamin A. Berkowitz
Attorney Docket Number:	098065-0278
Receipt Date:	08-MAR-2021
Filing Date:	02-SEP-2020
Time Stamp:	15:13:46
Application Type:	Utility under 35 USC 111(a)

Payment information:

Submitted with Payment	yes
Payment Type	CARD
Payment was successfully received in RAM	\$ 600
RAM confirmation Number	E202138F15133925
Deposit Account	
Authorized User	

The Director of the USPTO is hereby authorized to charge indicated fees and credit any overpayment as follows:

File Listing:

Document Number	Document Description	File Name	File Size(Bytes)/ Message Digest	Multi Part /.zip	Pages (if appl.)
1		098065-0278_Response-to-NFOA-dtd-12-24-2020.pdf	426785	yes	15
			690a5c575ff4d44266dbf5a971b1fdcaf8639e06		
	Multipart Description/PDF files in .zip description				
	Document Description		Start	End	
	Amendment/Req. Reconsideration-After Non-Final Reject		1	1	
	Specification		2	2	
	Claims		3	11	
	Applicant Arguments/Remarks Made in an Amendment		12	15	
Warnings:					
Information:					
2	Fee Worksheet (SB06)	fee-info.pdf	30705	no	2
			04bf20f53d081d8d54da53079f9368211fdc5bb7		
Warnings:					
Information:					
Total Files Size (in bytes):			457490		

This Acknowledgement Receipt evidences receipt on the noted date by the USPTO of the indicated documents, characterized by the applicant, and including page counts, where applicable. It serves as evidence of receipt similar to a Post Card, as described in MPEP 503.

New Applications Under 35 U.S.C. 111

If a new application is being filed and the application includes the necessary components for a filing date (see 37 CFR 1.53(b)-(d) and MPEP 506), a Filing Receipt (37 CFR 1.54) will be issued in due course and the date shown on this Acknowledgement Receipt will establish the filing date of the application.

National Stage of an International Application under 35 U.S.C. 371

If a timely submission to enter the national stage of an international application is compliant with the conditions of 35 U.S.C. 371 and other applicable requirements a Form PCT/DO/EO/903 indicating acceptance of the application as a national stage submission under 35 U.S.C. 371 will be issued in addition to the Filing Receipt, in due course.

New International Application Filed with the USPTO as a Receiving Office

If a new international application is being filed and the international application includes the necessary components for an international filing date (see PCT Article 11 and MPEP 1810), a Notification of the International Application Number and of the International Filing Date (Form PCT/RO/105) will be issued in due course, subject to prescriptions concerning national security, and the date shown on this Acknowledgement Receipt will establish the international filing date of the application.

PATENT APPLICATION FEE DETERMINATION RECORD Substitute for Form PTO-875				Application or Docket Number 17/010,162		Filing Date 09/02/2020		☐ To be Mailed			
ENTITY: ☒ LARGE ☐ SMALL ☐ MICRO											
APPLICATION AS FILED - PART I											
		(Column 1)		(Column 2)							
FOR		NUMBER FILED		NUMBER EXTRA		RATE (\$)		FEE (\$)			
☐ BASIC FEE (37 CFR 1.16(a), (b), or (c))		N/A		N/A		N/A					
☐ SEARCH FEE (37 CFR 1.16(k), (i), or (m))		N/A		N/A		N/A					
☐ EXAMINATION FEE (37 CFR 1.16(o), (p), or (q))		N/A		N/A		N/A					
TOTAL CLAIMS (37 CFR 1.16(i))		minus 20 = *				x \$100 =					
INDEPENDENT CLAIMS (37 CFR 1.16(h))		minus 3 = *				x \$460 =					
☐ APPLICATION SIZE FEE (37 CFR 1.16(s))		If the specification and drawings exceed 100 sheets of paper, the application size fee due is \$310 (\$155 for small entity) for each additional 50 sheets or fraction thereof. See 35 U.S.C. 41(a)(1)(G) and 37 CFR 1.16(s).									
☐ MULTIPLE DEPENDENT CLAIM PRESENT (37 CFR 1.16(j))											
* If the difference in column 1 is less than zero, enter "0" in column 2.						TOTAL					
APPLICATION AS AMENDED - PART II											
		(Column 1)		(Column 2)		(Column 3)					
AMENDMENT	03/08/2021	CLAIMS REMAINING AFTER AMENDMENT		HIGHEST NUMBER PREVIOUSLY PAID FOR		PRESENT EXTRA		RATE (\$)		ADDITIONAL FEE (\$)	
	Total (37 CFR 1.16(i))	* 30	Minus	** 24	= 6			x \$100 =		600	
	Independent (37 CFR 1.16(h))	* 4	Minus	*** 3	= 1			x \$480 =		480	
	☐ Application Size Fee (37 CFR 1.16(s))										
	☐ FIRST PRESENTATION OF MULTIPLE DEPENDENT CLAIM (37 CFR 1.16(j))										
								TOTAL ADD'L FEE		1080	
		(Column 1)		(Column 2)		(Column 3)					
AMENDMENT		CLAIMS REMAINING AFTER AMENDMENT		HIGHEST NUMBER PREVIOUSLY PAID FOR		PRESENT EXTRA		RATE (\$)		ADDITIONAL FEE (\$)	
	Total (37 CFR 1.16(i))	*	Minus	**	=			x \$0 =			
	Independent (37 CFR 1.16(h))	*	Minus	***	=			x \$0 =			
	☐ Application Size Fee (37 CFR 1.16(s))										
	☐ FIRST PRESENTATION OF MULTIPLE DEPENDENT CLAIM (37 CFR 1.16(j))										
								TOTAL ADD'L FEE			
* If the entry in column 1 is less than the entry in column 2, write "0" in column 3.								LIE			
** If the "Highest Number Previously Paid For" IN THIS SPACE is less than 20, enter "20".								/MARCUS M WASHINGTON/			
*** If the "Highest Number Previously Paid For" IN THIS SPACE is less than 3, enter "3".											
The "Highest Number Previously Paid For" (Total or Independent) is the highest number found in the appropriate box in column 1.											

This collection of information is required by 37 CFR 1.16. The information is required to obtain or retain a benefit by the public which is to file (and by the USPTO to process) an application. Confidentiality is governed by 35 U.S.C. 122 and 37 CFR 1.14. This collection is estimated to take 12 minutes to complete, including gathering, preparing, and submitting the completed application form to the USPTO. Time will vary depending upon the individual case. Any comments on the amount of time you require to complete this form and/or suggestions for reducing this burden, should be sent to the Chief Information Officer, U.S. Patent and Trademark Office, U.S. Department of Commerce, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450. DO NOT SEND FEES OR COMPLETED FORMS TO THIS ADDRESS. **SEND TO: Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450.**

If you need assistance in completing the form, call 1-800-PTO-9199 and select option 2.

109260710351



OnCusp
Ex. 1038

United States Patent and Trademark Office

Office of the Chief Financial Officer

Document Code:WFEE

User :92481

Sale Accounting Date:03/10/2021

Sale Item Reference Number

17010162

Effective Date

03/08/2021

Document Number

I202130C53401741

Fee Code

1201

Fee Code Description

INDEPENDENT CLAIMS IN
EXCESS OF 3

Amount Paid

\$480.00

Payment Method

Deposit Account



UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE
United States Patent and Trademark Office
Address: COMMISSIONER FOR PATENTS
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450
www.uspto.gov

NOTICE OF ALLOWANCE AND FEE(S) DUE

22428 7590 03/25/2021
FOLEY & LARDNER LLP
3000 K STREET N.W.
SUITE 600
WASHINGTON, DC 20007-5109

EXAMINER

LI, RUIXIANG

ART UNIT

PAPER NUMBER

1646

DATE MAILED: 03/25/2021

APPLICATION NO.	FILING DATE	FIRST NAMED INVENTOR	ATTORNEY DOCKET NO.	CONFIRMATION NO.
17/010,162	09/02/2020	Atsuko SAITO	098065-0278	6661

TITLE OF INVENTION: ANTI-CDH6 ANTIBODY AND ANTI-CDH6 ANTIBODY-DRUG CONJUGATE

APPLN. TYPE	ENTITY STATUS	ISSUE FEE DUE	PUBLICATION FEE DUE	PREV. PAID ISSUE FEE	TOTAL FEE(S) DUE	DATE DUE
nonprovisional	UNDISCOUNTED	\$1200	\$0.00	\$0.00	\$1200	06/25/2021

THE APPLICATION IDENTIFIED ABOVE HAS BEEN EXAMINED AND IS ALLOWED FOR ISSUANCE AS A PATENT. PROSECUTION ON THE MERITS IS CLOSED. THIS NOTICE OF ALLOWANCE IS NOT A GRANT OF PATENT RIGHTS. THIS APPLICATION IS SUBJECT TO WITHDRAWAL FROM ISSUE AT THE INITIATIVE OF THE OFFICE OR UPON PETITION BY THE APPLICANT. SEE 37 CFR 1.313 AND MPEP 1308.

THE ISSUE FEE AND PUBLICATION FEE (IF REQUIRED) MUST BE PAID WITHIN THREE MONTHS FROM THE MAILING DATE OF THIS NOTICE OR THIS APPLICATION SHALL BE REGARDED AS ABANDONED. THIS STATUTORY PERIOD CANNOT BE EXTENDED. SEE 35 U.S.C. 151. THE ISSUE FEE DUE INDICATED ABOVE DOES NOT REFLECT A CREDIT FOR ANY PREVIOUSLY PAID ISSUE FEE IN THIS APPLICATION. IF AN ISSUE FEE HAS PREVIOUSLY BEEN PAID IN THIS APPLICATION (AS SHOWN ABOVE), THE RETURN OF PART B OF THIS FORM WILL BE CONSIDERED A REQUEST TO REAPPLY THE PREVIOUSLY PAID ISSUE FEE TOWARD THE ISSUE FEE NOW DUE.

HOW TO REPLY TO THIS NOTICE:

I. Review the ENTITY STATUS shown above. If the ENTITY STATUS is shown as SMALL or MICRO, verify whether entitlement to that entity status still applies.

If the ENTITY STATUS is the same as shown above, pay the TOTAL FEE(S) DUE shown above.

If the ENTITY STATUS is changed from that shown above, on PART B - FEE(S) TRANSMITTAL, complete section number 5 titled "Change in Entity Status (from status indicated above)".

For purposes of this notice, small entity fees are 1/2 the amount of undiscounted fees, and micro entity fees are 1/2 the amount of small entity fees.

II. PART B - FEE(S) TRANSMITTAL, or its equivalent, must be completed and returned to the United States Patent and Trademark Office (USPTO) with your ISSUE FEE and PUBLICATION FEE (if required). If you are charging the fee(s) to your deposit account, section "4b" of Part B - Fee(s) Transmittal should be completed and an extra copy of the form should be submitted. If an equivalent of Part B is filed, a request to reapply a previously paid issue fee must be clearly made, and delays in processing may occur due to the difficulty in recognizing the paper as an equivalent of Part B.

III. All communications regarding this application must give the application number. Please direct all communications prior to issuance to Mail Stop ISSUE FEE unless advised to the contrary.

IMPORTANT REMINDER: Maintenance fees are due in utility patents issuing on applications filed on or after Dec. 12, 1980. It is patentee's responsibility to ensure timely payment of maintenance fees when due. More information is available at www.uspto.gov/PatentMaintenanceFees.

PART B - FEE(S) TRANSMITTAL

OnCusp
Ex. 1038

10928 of 10951

Complete and send this form, together with applicable fee(s), by mail or fax, or via EFS-Web.

By mail, send to: Mail Stop ISSUE FEE
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450

By fax, send to: (571)-273-2885

INSTRUCTIONS: This form should be used for transmitting the ISSUE FEE and PUBLICATION FEE (if required). Blocks 1 through 5 should be completed where appropriate. All further correspondence including the Patent, advance orders and notification of maintenance fees will be mailed to the current correspondence address as indicated unless corrected below or directed otherwise in Block 1, by (a) specifying a new correspondence address; and/or (b) indicating a separate "FEE ADDRESS" for maintenance fee notifications.

CURRENT CORRESPONDENCE ADDRESS (Note: Use Block 1 for any change of address)

Note: A certificate of mailing can only be used for domestic mailings of the Fee(s) Transmittal. This certificate cannot be used for any other accompanying papers. Each additional paper, such as an assignment or formal drawing, must have its own certificate of mailing or transmission.

Certificate of Mailing or Transmission

I hereby certify that this Fee(s) Transmittal is being deposited with the United States Postal Service with sufficient postage for first class mail in an envelope addressed to the Mail Stop ISSUE FEE address above, or being transmitted to the USPTO via EFS-Web or by facsimile to (571) 273-2885, on the date below.

(Typed or printed name)
(Signature)
(Date)

22428 7590 03/25/2021

FOLEY & LARDNER LLP
3000 K STREET N.W.
SUITE 600
WASHINGTON, DC 20007-5109

APPLICATION NO.	FILING DATE	FIRST NAMED INVENTOR	ATTORNEY DOCKET NO.	CONFIRMATION NO.
17/010,162	09/02/2020	Atsuko SAITO	098065-0278	6661

TITLE OF INVENTION: ANTI-CDH6 ANTIBODY AND ANTI-CDH6 ANTIBODY-DRUG CONJUGATE

APPLN. TYPE	ENTITY STATUS	ISSUE FEE DUE	PUBLICATION FEE DUE	PREV. PAID ISSUE FEE	TOTAL FEE(S) DUE	DATE DUE
nonprovisional	UNDISCOUNTED	\$1200	\$0.00	\$0.00	\$1200	06/25/2021

EXAMINER	ART UNIT	CLASS-SUBCLASS
LI, RUIXIANG	1646	424-181100

1. Change of correspondence address or indication of "Fee Address" (37 CFR 1.363).

☐ Change of correspondence address (or Change of Correspondence Address form PTO/SB/122) attached.

☐ "Fee Address" indication (or "Fee Address" Indication form PTO/SB/47; Rev 03-09 or more recent) attached. **Use of a Customer Number is required.**

2. For printing on the patent front page, list

(1) The names of up to 3 registered patent attorneys or agents OR, alternatively,

1 _____

(2) The name of a single firm (having as a member a registered attorney or agent) and the names of up to 2 registered patent attorneys or agents. If no name is listed, no name will be printed.

2 _____

3 _____

3. ASSIGNEE NAME AND RESIDENCE DATA TO BE PRINTED ON THE PATENT (print or type)

PLEASE NOTE: Unless an assignee is identified below, no assignee data will appear on the patent. If an assignee is identified below, the document must have been previously recorded, or filed for recordation, as set forth in 37 CFR 3.11 and 37 CFR 3.81(a). Completion of this form is NOT a substitute for filing an assignment.

(A) NAME OF ASSIGNEE

(B) RESIDENCE: (CITY and STATE OR COUNTRY)

Please check the appropriate assignee category or categories (will not be printed on the patent): ☐ Individual ☐ Corporation or other private group entity ☐ Government4a. Fees submitted: ☐ Issue Fee ☐ Publication Fee (if required) ☐ Advance Order - # of Copies _____

4b. Method of Payment: (Please first reapply any previously paid fee shown above)

☐ Electronic Payment via EFS-Web ☐ Enclosed check ☐ Non-electronic payment by credit card (Attach form PTO-2038)

☐ The Director is hereby authorized to charge the required fee(s), any deficiency, or credit any overpayment to Deposit Account No. _____

5. Change in Entity Status (from status indicated above)

☐ Applicant certifying micro entity status. See 37 CFR 1.29

☐ Applicant asserting small entity status. See 37 CFR 1.27

☐ Applicant changing to regular undiscounted fee status.

NOTE: Absent a valid certification of Micro Entity Status (see forms PTO/SB/15A and 15B), issue fee payment in the micro entity amount will not be accepted at the risk of application abandonment.

NOTE: If the application was previously under micro entity status, checking this box will be taken to be a notification of loss of entitlement to micro entity status.

NOTE: Checking this box will be taken to be a notification of loss of entitlement to small or micro entity status, as applicable.

NOTE: This form must be signed in accordance with 37 CFR 1.31 and 1.33. See 37 CFR 1.4 for signature requirements and certifications.

Authorized Signature _____

Date _____

Typed or printed name _____

Registration No. _____



UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE
United States Patent and Trademark Office
Address: COMMISSIONER FOR PATENTS
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450
www.uspto.gov

APPLICATION NO.	FILING DATE	FIRST NAMED INVENTOR	ATTORNEY DOCKET NO.	CONFIRMATION NO.
17/010,162	09/02/2020	Atsuko SAITO	098065-0278	6661
22428	7590	03/25/2021	EXAMINER	
FOLEY & LARDNER LLP 3000 K STREET N.W. SUITE 600 WASHINGTON, DC 20007-5109			LI, RUIXIANG	
			ART UNIT	PAPER NUMBER
			1646	
DATE MAILED: 03/25/2021				

Determination of Patent Term Adjustment under 35 U.S.C. 154 (b)
(Applications filed on or after May 29, 2000)

The Office has discontinued providing a Patent Term Adjustment (PTA) calculation with the Notice of Allowance.

Section 1(h)(2) of the AIA Technical Corrections Act amended 35 U.S.C. 154(b)(3)(B)(i) to eliminate the requirement that the Office provide a patent term adjustment determination with the notice of allowance. See Revisions to Patent Term Adjustment, 78 Fed. Reg. 19416, 19417 (Apr. 1, 2013). Therefore, the Office is no longer providing an initial patent term adjustment determination with the notice of allowance. The Office will continue to provide a patent term adjustment determination with the Issue Notification Letter that is mailed to applicant approximately three weeks prior to the issue date of the patent, and will include the patent term adjustment on the patent. Any request for reconsideration of the patent term adjustment determination (or reinstatement of patent term adjustment) should follow the process outlined in 37 CFR 1.705.

Any questions regarding the Patent Term Extension or Adjustment determination should be directed to the Office of Patent Legal Administration at (571)-272-7702. Questions relating to issue and publication fee payments should be directed to the Customer Service Center of the Office of Patent Publication at 1-(888)-786-0101 or (571)-272-4200.

OMB Clearance and PRA Burden Statement for PTOL-85 Part B

The Paperwork Reduction Act (PRA) of 1995 requires Federal agencies to obtain Office of Management and Budget approval before requesting most types of information from the public. When OMB approves an agency request to collect information from the public, OMB (i) provides a valid OMB Control Number and expiration date for the agency to display on the instrument that will be used to collect the information and (ii) requires the agency to inform the public about the OMB Control Number's legal significance in accordance with 5 CFR 1320.5(b).

The information collected by PTOL-85 Part B is required by 37 CFR 1.311. The information is required to obtain or retain a benefit by the public which is to file (and by the USPTO to process) an application. Confidentiality is governed by 35 U.S.C. 122 and 37 CFR 1.14. This collection is estimated to take 30 minutes to complete, including gathering, preparing, and submitting the completed application form to the USPTO. Time will vary depending upon the individual case. Any comments on the amount of time you require to complete this form and/or suggestions for reducing this burden, should be sent to the Chief Information Officer, U.S. Patent and Trademark Office, U.S. Department of Commerce, P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450. DO NOT SEND FEES OR COMPLETED FORMS TO THIS ADDRESS. SEND TO: Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450. Under the Paperwork Reduction Act of 1995, no persons are required to respond to a collection of information unless it displays a valid OMB control number.

Privacy Act Statement

The Privacy Act of 1974 (P.L. 93-579) requires that you be given certain information in connection with your submission of the attached form related to a patent application or patent. Accordingly, pursuant to the requirements of the Act, please be advised that: (1) the general authority for the collection of this information is 35 U.S.C. 2(b)(2); (2) furnishing of the information solicited is voluntary; and (3) the principal purpose for which the information is used by the U.S. Patent and Trademark Office is to process and/or examine your submission related to a patent application or patent. If you do not furnish the requested information, the U.S. Patent and Trademark Office may not be able to process and/or examine your submission, which may result in termination of proceedings or abandonment of the application or expiration of the patent.

The information provided by you in this form will be subject to the following routine uses:

1. The information on this form will be treated confidentially to the extent allowed under the Freedom of Information Act (5 U.S.C. 552) and the Privacy Act (5 U.S.C. 552a). Records from this system of records may be disclosed to the Department of Justice to determine whether disclosure of these records is required by the Freedom of Information Act.
2. A record from this system of records may be disclosed, as a routine use, in the course of presenting evidence to a court, magistrate, or administrative tribunal, including disclosures to opposing counsel in the course of settlement negotiations.
3. A record in this system of records may be disclosed, as a routine use, to a Member of Congress submitting a request involving an individual, to whom the record pertains, when the individual has requested assistance from the Member with respect to the subject matter of the record.
4. A record in this system of records may be disclosed, as a routine use, to a contractor of the Agency having need for the information in order to perform a contract. Recipients of information shall be required to comply with the requirements of the Privacy Act of 1974, as amended, pursuant to 5 U.S.C. 552a(m).
5. A record related to an International Application filed under the Patent Cooperation Treaty in this system of records may be disclosed, as a routine use, to the International Bureau of the World Intellectual Property Organization, pursuant to the Patent Cooperation Treaty.
6. A record in this system of records may be disclosed, as a routine use, to another federal agency for purposes of National Security review (35 U.S.C. 181) and for review pursuant to the Atomic Energy Act (42 U.S.C. 218(c)).
7. A record from this system of records may be disclosed, as a routine use, to the Administrator, General Services, or his/her designee, during an inspection of records conducted by GSA as part of that agency's responsibility to recommend improvements in records management practices and programs, under authority of 44 U.S.C. 2904 and 2906. Such disclosure shall be made in accordance with the GSA regulations governing inspection of records for this purpose, and any other relevant (i.e., GSA or Commerce) directive. Such disclosure shall not be used to make determinations about individuals.
8. A record from this system of records may be disclosed, as a routine use, to the public after either publication of the application pursuant to 35 U.S.C. 122(b) or issuance of a patent pursuant to 35 U.S.C. 151. Further, a record may be disclosed, subject to the limitations of 37 CFR 1.14, as a routine use, to the public if the record was filed in an application which became abandoned or in which the proceedings were terminated and which application is referenced by either a published application, an application open to public inspection or an issued patent.
9. A record from this system of records may be disclosed, as a routine use, to a Federal, State, or local law enforcement agency, if the USPTO becomes aware of a violation or potential violation of law or regulation.

Notice of Allowability	Application No. 17/010,162	Applicant(s) SAITO et al.	
	Examiner RUIXIANG LI	Art Unit 1646	AIA (FITF) Status Yes

-- The MAILING DATE of this communication appears on the cover sheet with the correspondence address--

All claims being allowable, PROSECUTION ON THE MERITS IS (OR REMAINS) CLOSED in this application. If not included herewith (or previously mailed), a Notice of Allowance (PTOL-85) or other appropriate communication will be mailed in due course. **THIS NOTICE OF ALLOWABILITY IS NOT A GRANT OF PATENT RIGHTS.** This application is subject to withdrawal from issue at the initiative of the Office or upon petition by the applicant. See 37 CFR 1.313 and MPEP 1308.

1. ☒ This communication is responsive to Applicant's amendment filed on 03/08/2021.
☐ A declaration(s)/affidavit(s) under **37 CFR 1.130(b)** was/were filed on ____.
2. ☐ An election was made by the applicant in response to a restriction requirement set forth during the interview on ____; the restriction requirement and election have been incorporated into this action.
3. ☒ The allowed claim(s) is/are 1-20 and 25-34. As a result of the allowed claim(s), you may be eligible to benefit from the **Patent Prosecution Highway** program at a participating intellectual property office for the corresponding application. For more information, please see http://www.uspto.gov/patents/init_events/pph/index.jsp or send an inquiry to PPHfeedback@uspto.gov.
4. ☒ Acknowledgment is made of a claim for foreign priority under 35 U.S.C. § 119(a)-(d) or (f).
Certified copies:
a) ☒ All b) ☐ Some *c) ☐ None of the:
1. ☒ Certified copies of the priority documents have been received.
2. ☐ Certified copies of the priority documents have been received in Application No. _____.
3. ☐ Copies of the certified copies of the priority documents have been received in this national stage application from the International Bureau (PCT Rule 17.2(a)).
* Certified copies not received: ____.

Applicant has THREE MONTHS FROM THE "MAILING DATE" of this communication to file a reply complying with the requirements noted below. Failure to timely comply will result in ABANDONMENT of this application.
THIS THREE-MONTH PERIOD IS NOT EXTENDABLE.

5. ☐ CORRECTED DRAWINGS (as "replacement sheets") must be submitted.
☐ including changes required by the attached Examiner's Amendment / Comment or in the Office action of Paper No./Mail Date ____.

Identifying indicia such as the application number (see 37 CFR 1.84(c)) should be written on the drawings in the front (not the back) of each sheet. Replacement sheet(s) should be labeled as such in the header according to 37 CFR 1.121(d).

6. ☐ DEPOSIT OF and/or INFORMATION about the deposit of BIOLOGICAL MATERIAL must be submitted. Note the attached Examiner's comment regarding REQUIREMENT FOR THE DEPOSIT OF BIOLOGICAL MATERIAL.

Attachment(s)

1. ☐ Notice of References Cited (PTO-892) 2. ☒ Information Disclosure Statements (PTO/SB/08), Paper No./Mail Date <u>02/16/2021</u> . 3. ☐ Examiner's Comment Regarding Requirement for Deposit of Biological Material _____. 4. ☐ Interview Summary (PTO-413), Paper No./Mail Date. _____.	5. ☒ Examiner's Amendment/Comment 6. ☐ Examiner's Statement of Reasons for Allowance 7. ☐ Other _____.
--	--

/RUIXIANG LI/
Primary Examiner, Art Unit 1646

Notice of Pre-AIA or AIA Status

The present application, filed on or after March 16, 2013, is being examined under the first inventor to file provisions of the AIA.

EXAMINER'S COMMENT

Examiner's Comment

Claims 7 and 11, previously withdrawn from consideration due to species election requirement, have been rejoined and considered.

Information Disclosure Statement

The information disclosure statement filed on 02/16/2021 has been considered by the Examiner and an initialed copy of the form PTO-1449 is attached to this communication.

Conclusion

Claims 1-20 and 25-34 are allowed.

Advisory Information

Any inquiry concerning this communication or earlier communications from the examiner should be directed to Ruixiang Li whose telephone number is (571) 272-0875. The examiner can normally be reached on Monday through Friday from 8:30 am to 5:00 pm. If attempts to reach the examiner by telephone are unsuccessful, the examiner's supervisor, Vanessa Ford, can be reached on (571) 272-0857. The fax number for the organization where this application or proceeding is assigned is (571) 273-8300.

Information regarding the status of an application may be obtained from the Patent Application Information Retrieval (PAIR) system. Status information for published applications may be obtained from either Private PAIR or Public PAIR. Status information for unpublished applications is available through Private PAIR only. For more information about the PAIR system, see <http://pair-direct.uspto.gov>. Should you have questions on access to the Private PAIR system, please contact the Electronic Business Center (EBC) at the toll-free phone number 866-217-9197.

/RUIXIANG LI/
Primary Examiner, Art Unit 1646
March 19, 2021

Issue Classification 	Application/Control No. 17/010,162	Applicant(s)/Patent Under Reexamination SAITO et al.	
	Examiner RUIXIANG LI	Art Unit 1646	

CPC						
Symbol					Type	Version
A61K	/	47	/	6803	F	2017-08-01
A61K	/	47	/	6849	I	2017-08-01
A61P	/	35	/	00	I	2018-01-01
A61K	/	31	/	4745	I	2013-01-01
C07K	/	16	/	28	I	2013-01-01
C07K	/	2317	/	24	A	2013-01-01
C07K	/	2317	/	40	A	2013-01-01
C07K	/	2317	/	41	A	2013-01-01
C07K	/	2317	/	565	A	2013-01-01
C07K	/	2317	/	732	A	2013-01-01
C07K	/	2317	/	76	A	2013-01-01
C07K	/	2317	/	77	A	2013-01-01

CPC Combination Sets							
Symbol				Type	Set	Ranking	Version
	/		/				

NONE		Total Claims Allowed:	
(Assistant Examiner)	(Date)	30	
/RUIXIANG LI/ Primary Examiner, Art Unit 1646	19 March 2021	O.G. Print Claim(s)	O.G. Print Figure
(Primary Examiner)	(Date)	1	None

10935 of 10951

Issue Classification 	Application/Control No. 17/010,162	Applicant(s)/Patent Under Reexamination SAITO et al.	
	Examiner RUIXIANG LI	Art Unit 1646	

INTERNATIONAL CLASSIFICATION			
CLAIMED			
A61K47/68	/	47	/ 68
A61P35/00	/	35	/ 00
A61K31/4745	/	31	/ 4745
C07K16/28	/	16	/ 28
NON-CLAIMED			
	/		/

US ORIGINAL CLASSIFICATION	
CLASS	SUBCLASS

CROSS REFERENCES(S)						
CLASS	SUBCLASS (ONE SUBCLASS PER BLOCK)					

NONE		Total Claims Allowed:	
(Assistant Examiner)	(Date)	30	
/RUIXIANG LI/ Primary Examiner, Art Unit 1646	19 March 2021	O.G. Print Claim(s)	O.G. Print Figure
(Primary Examiner)	(Date)	1	None

10936 of 10951

Issue Classification 	Application/Control No. 17/010,162	Applicant(s)/Patent Under Reexamination SAITO et al.
	Examiner RUIXIANG LI	Art Unit 1646

☐ Claims renumbered in the same order as presented by applicant
 ☐ CPA
 ☐ T.D.
 ☐ R.1.47

CLAIMS

Final	Original	Final	Original	Final	Original	Final	Original	Final	Original	Final	Original	Final	Original	Final	Original
1	1	16	10	26	19	12	32								
2	2	17	11	27	20	13	33								
3	3	19	12	28	25	14	34								
4	4	20	13	29	26										
5	5	21	14	30	27										
6	6	22	15	18	28										
7	7	23	16	8	29										
11	8	24	17	9	30										
15	9	25	18	10	31										

NONE		Total Claims Allowed:	
(Assistant Examiner)	(Date)	30	
/RUIXIANG LI/ Primary Examiner, Art Unit 1646	19 March 2021	O.G. Print Claim(s)	O.G. Print Figure
(Primary Examiner)	(Date)	1	None

<i>Search Notes</i> 	Application/Control No. 17/010,162	Applicant(s)/Patent Under Reexamination SAITO et al.
	Examiner RUIXIANG LI	Art Unit 1646

CPC - Searched*		
Symbol	Date	Examiner
A61K47/6803, A61K31/4745, A61K47/6849	12/20/2020	rl
C07K2317/24, C07K16/28	12/20/2020	rl

CPC Combination Sets - Searched*		
Symbol	Date	Examiner

US Classification - Searched*			
Class	Subclass	Date	Examiner

* See search history printout included with this form or the SEARCH NOTES box below to determine the scope of the search.

/RUIXIANG LI/ Primary Examiner, Art Unit 1646	
--	--

<i>Search Notes</i> 	Application/Control No. 17/010,162	Applicant(s)/Patent Under Reexamination SAITO et al.
	Examiner RUIXIANG LI	Art Unit 1646

Search Notes		
Search Notes	Date	Examiner
STIC Sequence Search: SEQ ID NOS: 61, 65, 69, 73, and 77 (see SCORES).	12/16/2020	STIC
STIC Structure Search (see SCORES).	12/17/2020	STIC
EAST, text and inventor's name search (see search history printout).	12/20/2020	rl
Google Search (see Search History Print).	12/19/2020	rl
Parent and related applications checked.	12/20/2020	rl
STIC Sequence Search: SEQ ID NOS: 12, 19, 22, 29, 32, 39, 42, and 49(see SCORES).	03/12/2021	STIC
STIC Sequence Search: SEQ ID NOS: 61, 63, 71, 73, 75, 79, (see SCORES).	03/13/2021	STIC
EAST, (i) prior art search and (ii) interference search by text & inventor's name (see search history printout).	03/18/2021	rl

Interference Search			
US Class/CPC Symbol	US Subclass/CPC Group	Date	Examiner
A61K	47/6803, 47/6849, 31/4745	03/14/2021	rl
C07K	16/28, 2317/24, 2317/565, 2317/732, 2317/76, 2317/76	03/14/2021	rl
A61P	35/00	03/14/2021	rl

/RUIXIANG LI/ Primary Examiner, Art Unit 1646	
--	--

Li, Ruixiang

From: Li, Ruixiang
Sent: Friday, March 12, 2021 7:36 PM
To: STIC-EIC1600/2900
Subject: Sequence search of Application No. 17/010,162

Please do a standard search on:

- (i). SEQ ID NOS: 63, 71, 75, and 79 against all amino acid databases, including interference amino acid databases;
- (ii). amino acid 21-233 of SEQ ID NO: 61 against interference amino acid databases;
- (iii). amino acid 20-471 of SEQ ID NO: 73 against interference amino acid databases.

Thank you very much!

Ruixiang Li

GAU 1646

(571) 272-0875

Li, Ruixiang

From: Li, Ruixiang
Sent: Thursday, March 11, 2021 10:03 AM
To: STIC-EIC1600/2900
Subject: Sequence search of Application No. 17/010,162

Please do a standard search on:

SEQ ID NOS: 12, 19, 22, 29, 32, 39, 42, and 49 against amino acid databases.

Thank you very much!

Ruixiang Li

GAU 1646

(571) 272-0875



UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE
United States Patent and Trademark Office
 Address: COMMISSIONER FOR PATENTS
 P.O. Box 1450
 Alexandria, Virginia 22313-1450
 www.uspto.gov

BIB DATA SHEET

CONFIRMATION NO. 6661

SERIAL NUMBER	FILING or 371(c) DATE	CLASS	GROUP ART UNIT	ATTORNEY DOCKET NO.		
17/010,162	09/02/2020	424	1646	098065-0278		
APPLICANTS DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED, Tokyo, JAPAN; INVENTORS Atsuko SAITO, Tokyo, JAPAN; Tsuyoshi HIRATA, Tokyo, JAPAN; Kensuke NAKAMURA, Tokyo, JAPAN; ** CONTINUING DATA ***** This application is a CON of 16/613,203 11/13/2019 which is a 371 of PCT/JP2018/018572 05/14/2018 ** FOREIGN APPLICATIONS ***** JAPAN 2017-096749 05/15/2017 ** IF REQUIRED, FOREIGN FILING LICENSE GRANTED ** 09/10/2020						
Foreign Priority claimed ☒ Yes ☐ No 35 USC 119(a-d) conditions met ☒ Yes ☐ No Verified and Acknowledged <u>/RUIXIANG LI/</u> Examiner's Signature		☐ Met after Allowance Initials	STATE OR COUNTRY JAPAN	SHEETS DRAWINGS 29	TOTAL CLAIMS 30 24	INDEPENDENT CLAIMS 4 4
ADDRESS FOLEY & LARDNER LLP 3000 K STREET N.W. SUITE 600 WASHINGTON, DC 20007-5109 UNITED STATES						
TITLE ANTI-CDH6 ANTIBODY AND ANTI-CDH6 ANTIBODY-DRUG CONJUGATE						
FILING FEE RECEIVED 4000	FEES: Authority has been given in Paper No. _____ to charge/credit DEPOSIT ACCOUNT No. _____ for following:			☐ All Fees ☐ 1.16 Fees (Filing) ☐ 1.17 Fees (Processing Ext. of time) ☐ 1.18 Fees (Issue) ☐ Other _____ ☐ Credit		

Substitute for form 1449/PTO INFORMATION DISCLOSURE STATEMENT BY APPLICANT Date Submitted: February 16, 2021 <i>(use as many sheets as necessary)</i>		Complete if Known	
		Application Number	17/010,162
		Filing Date	9/2/2020
		First Named Inventor	Atsuko SAITO
		Art Unit	1646
Examiner Name	LI, RUIXIANG		
Attorney Docket Number	098065-0278		
Sheet	1	of	1

U.S. PATENT DOCUMENTS					
Examiner Initials*	Cite No. ¹	Document Number Number-Kind Code ² (if known)	Publication Date MM-DD-YYYY	Name of Patentee or Applicant of Cited Document	Pages, Columns, Lines, Where Relevant Passages or Relevant Figures Appear

UNPUBLISHED U.S. PATENT APPLICATION DOCUMENTS					
Examiner Initials*	Cite No. ¹	U.S. Patent Application Document Serial Number-Kind Code ² (if known)	Filing Date of Cited Document MM-DD-YYYY	Name of Patentee or Applicant of Cited Document	Pages, Columns, Lines, Where Relevant Passages or Relevant Figures Appear

FOREIGN PATENT DOCUMENTS						
Examiner Initials*	Cite No. ¹	Foreign Patent Document Country Code ³ -Number ⁴ -Kind Code ⁵ (if known)	Publication Date MM-DD-YYYY	Name of Patentee or Applicant of Cited Documents	Pages, Columns, Lines, Where Relevant Passages or Relevant Figures Appear	T ⁶
	C1	WO-2018/185618-A1	10-11-2018	NOVARTIS AG		
	C2	WO-2018/212136-A1	11-22-2018	DAIICHI SANKYO CO LTD	Full English translations of priority JP App. 2017-096749A included.	✓+abs

NON PATENT LITERATURE DOCUMENTS			
Examiner Initials*	Cite No. ¹	Include name of the author (in CAPITAL LETTERS), title of the article (when appropriate), title of the item (book, magazine, journal, serial, symposium, catalog, etc.) date, page(s), volume-issue number(s), publisher, city and/or country where published.	T ⁶
	C3	CARL U. BIALUCHA ET AL: "Discovery and Optimization of HKT288, a Cadherin-6-Targeting ADC for the Treatment of Ovarian and Renal Cancers", CANCER DISCOVERY, vol. 7, no. 9, 1 September 2017 (2017-09-01), pages 1030-1045, XP055484340	
	C4	CORADA M ET AL: "Monoclonal antibodies directed to different regions of vascular endothelial cadherin extracellular domain affect adhesion and clustering of the protein and modulate endothelial permeability", BLOOD, THE AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY, US, vol. 97, no. 6, 15 March 2001 (2001-03-15), pages 1679-1684, XP002187985	
	C5	Extended European Search Report dated January 19, 2021 for corresponding European Patent Application No. 18802536.5	
	C6	Office Action issued on October 7, 2020 for corresponding Japanese Patent Application No. 2019-518773	✓

ALL REFERENCES CONSIDERED EXCEPT WHERE LINED THROUGH. /R.L./

Examiner Signature	/RUIXIANG LI/	Date Considered	03/13/2021
--------------------	---------------	-----------------	------------

EAST Search History**EAST Search History (Prior Art)**

Ref #	Hits	Search Query	DBs	Default Operator	Plurals	Time Stamp
L1	396	Atsuko near SAITO.in. or Tsuyoshi near HIRATA.in. or Kensuke near NAKAMURA.in.	US-PGPUB; USPAT; EPO; JPO; DERWENT	OR	ON	2021/03/14 10:05
L2	18	anti-CDH6	US-PGPUB; USPAT; EPO; JPO; DERWENT	OR	ON	2021/03/14 10:05
L3	64	CDH6 same antibody	US-PGPUB; USPAT; EPO; JPO; DERWENT	OR	ON	2021/03/14 10:06
L4	7	anti-CDH6 near antibody near drug near conjugate	US-PGPUB; USPAT; EPO; JPO; DERWENT	OR	ON	2021/03/14 10:10
L5	12,690	antibody near drug near conjugate	US-PGPUB; USPAT; EPO; JPO; DERWENT	OR	ON	2021/03/14 10:13
L6	96	CDH6 and L5	US-PGPUB; USPAT; EPO; JPO; DERWENT	OR	ON	2021/03/14 10:14
L7	10	L1 and L5	US-PGPUB; USPAT; EPO; JPO; DERWENT	OR	ON	2021/03/14 10:15
L8	40	L5 and Succinimid-3-yl-N	US-PGPUB; USPAT; EPO; JPO; DERWENT	OR	ON	2021/03/14 10:33
L10	34	L5 and Succinimid-3-yl-N and GGFG	US-PGPUB; USPAT; EPO; JPO; DERWENT	OR	ON	2021/03/14 10:34
L11	10,040	L5 AND ((A61K47/6803 OR A61K31/4745 OR A61K47/6849 OR C07K2317/24 OR C07K16/28 OR C07K2317/565 OR C07K2317/732 OR C07K2317/76 OR C07K2317/76 OR A61P35/00).CPC.)	US-PGPUB; USPAT; EPO; JPO; DERWENT	OR	ON	2021/03/14 10:38

L12	3,202	L5 AND ((A61K47/6803).CPC.)	US-PGPUB; USPAT; EPO; JPO; DERWENT	OR	ON	2021/03/14 10:39
L14	27	L5 AND ((A61K47/6803).CPC.) and CDH6	US-PGPUB; USPAT; EPO; JPO; DERWENT	OR	ON	2021/03/14 10:40
L15	84	L11 and CDH6	US-PGPUB; USPAT; EPO; JPO; DERWENT	OR	ON	2021/03/14 10:41

3/14/2021 10:41:59 AM

C:\Users\rli\Documents\EAST\Workspaces\RLi1.wsp

PART B - FEE(S) TRANSMITTAL

OnCusp
Ex. 1038

10945 of 10951

Complete and send this form, together with applicable fee(s), by mail or fax, or via EFS-Web.

By mail, send to: Mail Stop ISSUE FEE
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450

By fax, send to: (571)-273-2885

INSTRUCTIONS: This form should be used for transmitting the ISSUE FEE and PUBLICATION FEE (if required). Blocks 1 through 5 should be completed where appropriate. All further correspondence including the Patent, advance orders and notification of maintenance fees will be mailed to the current correspondence address as indicated unless corrected below or directed otherwise in Block 1, by (a) specifying a new correspondence address; and/or (b) indicating a separate "FEE ADDRESS" for maintenance fee notifications.

CURRENT CORRESPONDENCE ADDRESS (Note: Use Block 1 for any change of address)

Note: A certificate of mailing can only be used for domestic mailings of the Fee(s) Transmittal. This certificate cannot be used for any other accompanying papers. Each additional paper, such as an assignment or formal drawing, must have its own certificate of mailing or transmission.

22428 7590 03/25/2021
FOLEY & LARDNER LLP
3000 K STREET N.W.
SUITE 600
WASHINGTON, DC 20007-5109

Certificate of Mailing or Transmission

I hereby certify that this Fee(s) Transmittal is being deposited with the United States Postal Service with sufficient postage for first class mail in an envelope addressed to the Mail Stop ISSUE FEE address above, or being transmitted to the USPTO via EFS-Web or by facsimile to (571) 273-2885, on the date below.

(Typed or printed name)
(Signature)
(Date)

APPLICATION NO.	FILING DATE	FIRST NAMED INVENTOR	ATTORNEY DOCKET NO.	CONFIRMATION NO.
17/010,162	09/02/2020	Atsuko SAITO	098065-0278	6661

TITLE OF INVENTION: ANTI-CDH6 ANTIBODY AND ANTI-CDH6 ANTIBODY-DRUG CONJUGATE

APPLN. TYPE	ENTITY STATUS	ISSUE FEE DUE	PUBLICATION FEE DUE	PREV. PAID ISSUE FEE	TOTAL FEE(S) DUE	DATE DUE
nonprovisional	UNDISCOUNTED	\$1200	\$0.00	\$0.00	\$1200	06/25/2021

EXAMINER	ART UNIT	CLASS-SUBCLASS
LI, RUIXIANG	1646	424-181100

1. Change of correspondence address or indication of "Fee Address" (37 CFR 1.363).

☐ Change of correspondence address (or Change of Correspondence Address form PTO/SB/122) attached.☐ "Fee Address" indication (or "Fee Address" Indication form PTO/SB/47; Rev 03-09 or more recent) attached. **Use of a Customer Number is required.**

2. For printing on the patent front page, list

(1) The names of up to 3 registered patent attorneys or agents OR, alternatively,

(2) The name of a single firm (having as a member a registered attorney or agent) and the names of up to 2 registered patent attorneys or agents. If no name is listed, no name will be printed.

1 Foley & Lardner LLP

2 _____

3 _____

3. ASSIGNEE NAME AND RESIDENCE DATA TO BE PRINTED ON THE PATENT (print or type)

PLEASE NOTE: Unless an assignee is identified below, no assignee data will appear on the patent. If an assignee is identified below, the document must have been previously recorded, or filed for recordation, as set forth in 37 CFR 3.11 and 37 CFR 3.81(a). Completion of this form is NOT a substitute for filing an assignment.

(A) NAME OF ASSIGNEE

(B) RESIDENCE: (CITY and STATE OR COUNTRY)

DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED

TOKYO, JAPAN

Please check the appropriate assignee category or categories (will not be printed on the patent): ☐ Individual ☒ Corporation or other private group entity ☐ Government4a. Fees submitted: ☒ Issue Fee ☐ Publication Fee (if required) ☐ Advance Order - # of Copies _____

4b. Method of Payment: (Please first reapply any previously paid fee shown above)

☒ Electronic Payment via EFS-Web ☐ Enclosed check ☐ Non-electronic payment by credit card (Attach form PTO-2038)☒ The Director is hereby authorized to charge the required fee(s), any deficiency, or credit any overpayment to Deposit Account No. 19-0741

5. Change in Entity Status (from status indicated above)

☐ Applicant certifying micro entity status. See 37 CFR 1.29☐ Applicant asserting small entity status. See 37 CFR 1.27☐ Applicant changing to regular undiscounted fee status.

NOTE: Absent a valid certification of Micro Entity Status (see forms PTO/SB/15A and 15B), issue fee payment in the micro entity amount will not be accepted at the risk of application abandonment.

NOTE: If the application was previously under micro entity status, checking this box will be taken to be a notification of loss of entitlement to micro entity status.

NOTE: Checking this box will be taken to be a notification of loss of entitlement to small or micro entity status, as applicable.

NOTE: This form must be signed in accordance with 37 CFR 1.31 and 1.33. See 37 CFR 1.4 for signature requirements and certifications.

Authorized Signature /Michael D. Kaminski/Date 2021-06-24Typed or printed name Michael D. KaminskiRegistration No. 32,904

Electronic Patent Application Fee Transmittal

Application Number:	17010162			
Filing Date:	02-Sep-2020			
Title of Invention:	ANTI-CDH6 ANTIBODY AND ANTI-CDH6 ANTIBODY-DRUG CONJUGATE			
First Named Inventor/Applicant Name:	Atsuko SAITO			
Filer:	Michael D. Kaminski/Audrey Titus			
Attorney Docket Number:	098065-0278			
Filed as Large Entity				
Filing Fees for Utility under 35 USC 111(a)				
Description	Fee Code	Quantity	Amount	Sub-Total in USD(\$)
Basic Filing:				
Pages:				
Claims:				
Miscellaneous-Filing:				
Petition:				
Patent-Appeals-and-Interference:				
Post-Allowance-and-Post-Issuance:				
UTILITY APPL ISSUE FEE	1501	1	1200	1200

10947 of 10951	Description	Fee Code	Quantity	Amount	Ex. Sub Total in USD(\$)
Extension-of-Time:					
Miscellaneous:					
Total in USD (\$)					1200

Electronic Acknowledgement Receipt

EFS ID:	43079901
Application Number:	17010162
International Application Number:	
Confirmation Number:	6661
Title of Invention:	ANTI-CDH6 ANTIBODY AND ANTI-CDH6 ANTIBODY-DRUG CONJUGATE
First Named Inventor/Applicant Name:	Atsuko SAITO
Customer Number:	22428
Filer:	Michael D. Kaminski/Audrey Titus
Filer Authorized By:	Michael D. Kaminski
Attorney Docket Number:	098065-0278
Receipt Date:	24-JUN-2021
Filing Date:	02-SEP-2020
Time Stamp:	21:36:07
Application Type:	Utility under 35 USC 111(a)

Payment information:

Submitted with Payment	yes
Payment Type	CARD
Payment was successfully received in RAM	\$ 1200
RAM confirmation Number	E20216NL37164423
Deposit Account	
Authorized User	

The Director of the USPTO is hereby authorized to charge indicated fees and credit any overpayment as follows:

File Listing:

Document Number	Document Description	File Name	File Size(Bytes)/ Message Digest	Multi Part /.zip	Pages (if appl.)
1	Issue Fee Payment (PTO-85B)	098065-0278_IssueFee_2021-06-24.pdf	146331	no	1
			7aaa002849a25e30e07341271418a29011a53478		

Warnings:**Information:**

2	Fee Worksheet (SB06)	fee-info.pdf	30530	no	2
			48da2b8f377a2d459f8105803ffb9cf02bfdaafb		

Warnings:**Information:**

Total Files Size (in bytes):	176861
-------------------------------------	--------

This Acknowledgement Receipt evidences receipt on the noted date by the USPTO of the indicated documents, characterized by the applicant, and including page counts, where applicable. It serves as evidence of receipt similar to a Post Card, as described in MPEP 503.

New Applications Under 35 U.S.C. 111

If a new application is being filed and the application includes the necessary components for a filing date (see 37 CFR 1.53(b)-(d) and MPEP 506), a Filing Receipt (37 CFR 1.54) will be issued in due course and the date shown on this Acknowledgement Receipt will establish the filing date of the application.

National Stage of an International Application under 35 U.S.C. 371

If a timely submission to enter the national stage of an international application is compliant with the conditions of 35 U.S.C. 371 and other applicable requirements a Form PCT/DO/EO/903 indicating acceptance of the application as a national stage submission under 35 U.S.C. 371 will be issued in addition to the Filing Receipt, in due course.

New International Application Filed with the USPTO as a Receiving Office

If a new international application is being filed and the international application includes the necessary components for an international filing date (see PCT Article 11 and MPEP 1810), a Notification of the International Application Number and of the International Filing Date (Form PCT/RO/105) will be issued in due course, subject to prescriptions concerning national security, and the date shown on this Acknowledgement Receipt will establish the international filing date of the application.

Substitute for form 1449/PTO INFORMATION DISCLOSURE STATEMENT BY APPLICANT Date Submitted: September 30, 2020 <i>(use as many sheets as necessary)</i>				Complete if Known	
				Application Number	17/010162
				Filing Date	9/2/2020
				First Named Inventor	Atsuko SAITO
				Art Unit	1600
				Examiner Name	LUCAS, ZACHARIAH
Sheet	2	of	12	Attorney Docket Number	098065-0278

U.S. PATENT DOCUMENTS

Examiner Initials*	Cite No. ¹	Document Number	Publication Date MM-DD-YYYY	Name of Patentee or Applicant of Cited Document	Pages, Columns, Lines, Where Relevant Passages or Relevant Figures Appear
		Number-Kind Code ² (if known)			
	B50	2011/0045587-A1	02-24-2011	SULLIVAN ET AL.	
	B51	2011/0059076-A1	03-10-2011	MCDONAGH ET AL.	=B95
	B52	2011/0070248-A1	03-24-2011	ICHIKAWA ET AL.	
	B53	2011/0229406-A1	09-22-2011	HETTMANN ET AL.	
	B54	2011/0293513-A1	12-01-2011	GOVINDAN ET AL.	
	B55	2012/0121615-A1	05-17-2012	FLYGARE ET AL.	
	B56	2012/0171201-A1	07-05-2012	SAPRA, PUJA	=B74 =B96
	B57	2012/0201809-A1	08-09-2012	BHAT ET AL.	=B97
	B58	2012/0328634-A1	12-27-2012	GOVINDAN, SERENGULAM	
	B59	2013/0089872-A1	04-11-2013	NAKAMURA ET AL.	
	B60	2013/0123178-A1	05-16-2013	DIMARCHI ET AL.	=B98
	B61	2013/0216561-A1	08-22-2013	GOVINDAN	
	B62	2014/0004078-A1	01-02-2014	GOVINDAN, SERENGULAM	
	B63	2015/0297748-A1	10-22-2015	MASUDA ET AL.	
	B64	2015/0352224-A1	12-10-2015	NAITO ET AL.	
	B65	2016/0279259-A1	09-29-2016	MASUDA ET AL.	
	B66	2016/0287722-A1	10-06-2016	IMMUNOMEDICS, INC.	Govindan
	B67	2017/0021031-A1	01-26-2017	HETTMANN ET AL.	
	B68	2019/0151328-A1	05-23-2019	HETTMANN ET AL.	

UNPUBLISHED U.S. PATENT APPLICATION DOCUMENTS

Examiner Initials*	Cite No. ¹	U.S. Patent Application Document	Filing Date of Cited Document MM-DD-YYYY	Name of Patentee or Applicant of Cited Document	Pages, Columns, Lines, Where Relevant Passages or Relevant Figures Appear
		Serial Number-Kind Code ² (if known)			

FOREIGN PATENT DOCUMENTS

Examiner Initials*	Cite No. ¹	Foreign Patent Document	Publication Date MM-DD-YYYY	Name of Patentee or Applicant of Cited Documents	Pages, Columns, Lines, Where Relevant Passages or Relevant Figures Appear	T ⁶
		Country Code ³ Number ⁴ Kind Code ⁵ (if known)				
	B69	CA-2815154-A1	02-09-2012	U3 PHARMA GMBH DE		
	B70	CA-2859255-A1	06-20-2013	SEATTLE GENETICS, INC.		
	B71	CA-2927832-A1	11-24-2011	CERULEAN PHARMA. INC.		
	B72	CN-101023100-A	08-22-2007	GENENTECH INC	=B38	
	B73	CN-101490087-A	07-22-2009	GENENTECH INC		abs
	B74	CN-102481364-A	05-30-2012	ENZON PHARMACEUTICALS INC	=B74	
	B75	CN-1227499-A	09-01-1999	DAIICHI SEIYAKU CO		abs
	B76	CN-1764478-A	04-26-2006	IMMUNOMEDICS INC		abs
	B77	EP-1 155 702-A1	11-21-2001	DAIICHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.		
	B78	EP-2 594 589-A1	05-22-2013	SAPPORO MEDICAL UNIVERSITY ET AL.		
	B79	EP-2 799 452-A1	11-05-2014	LIVTECH INC		
	B80	EP-2 907 824-A1	08-19-2015	DAIICHI SANKYO CO LTD		

Examiner Signature		Date Considered	
--------------------	--	-----------------	--



UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE
United States Patent and Trademark Office
Address: COMMISSIONER FOR PATENTS
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450
www.uspto.gov

APPLICATION NO.	ISSUE DATE	PATENT NO.	ATTORNEY DOCKET NO.	CONFIRMATION NO.
17/010,162	08/03/2021	11077202	098065-0278	6661

22428 7590 07/14/2021

FOLEY & LARDNER LLP
3000 K STREET N.W.
SUITE 600
WASHINGTON, DC 20007-5109

ISSUE NOTIFICATION

The projected patent number and issue date are specified above.

Determination of Patent Term Adjustment under 35 U.S.C. 154 (b) (application filed on or after May 29, 2000)

The Patent Term Adjustment is 0 day(s). Any patent to issue from the above-identified application will include an indication of the adjustment on the front page.

If a Continued Prosecution Application (CPA) was filed in the above-identified application, the filing date that determines Patent Term Adjustment is the filing date of the most recent CPA.

Applicant will be able to obtain more detailed information by accessing the Patent Application Information Retrieval (PAIR) WEB site (<http://pair.uspto.gov>).

Any questions regarding the Patent Term Extension or Adjustment determination should be directed to the Office of Patent Legal Administration at (571)-272-7702. Questions relating to issue and publication fee payments should be directed to the Application Assistance Unit (AAU) of the Office of Data Management (ODM) at (571)-272-4200.

APPLICANT(s) (Please see PAIR WEB site <http://pair.uspto.gov> for additional applicants):

DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED, Tokyo, JAPAN;
Atsuko SAITO, Tokyo, JAPAN;
Tsuyoshi HIRATA, Tokyo, JAPAN;
Kensuke NAKAMURA, Tokyo, JAPAN;

The United States represents the largest, most dynamic marketplace in the world and is an unparalleled location for business investment, innovation, and commercialization of new technologies. The USA offers tremendous resources and advantages for those who invest and manufacture goods here. Through SelectUSA, our nation works to encourage and facilitate business investment. To learn more about why the USA is the best country in the world to develop technology, manufacture products, and grow your business, visit SelectUSA.gov.