

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-508023

(P2019-508023A)

(43) 公表日 平成31年3月28日(2019.3.28)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13 Z N A	4 B 0 6 3
C O 7 K 16/28 (2006.01)	C O 7 K 16/28	4 B 0 6 4
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62 Z	4 C O 7 6
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63 Z	4 C O 8 4
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	4 C O 8 5
審査請求 有 予備審査請求 未請求		(全 78 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-533643 (P2018-533643)
 (86) (22) 出願日 平成28年12月23日 (2016.12.23)
 (85) 翻訳文提出日 平成30年8月27日 (2018.8.27)
 (86) 国際出願番号 PCT/CN2016/111699
 (87) 国際公開番号 WO2017/107973
 (87) 国際公開日 平成29年6月29日 (2017.6.29)
 (31) 優先権主張番号 201510990545.6
 (32) 優先日 平成27年12月24日 (2015.12.24)
 (33) 優先権主張国 中国 (CN)

(71) 出願人 517434334
 エックスディーシーエクスプローラー (シャanghai) カンパニー リミテッド
 中華人民共和国 201210 シャanghai
 イ チャイナ (シャanghai) パイロット
 フリー トレード ゾーン リビン ロード 576 ファラディ ロード 56
 ビルディング ナンバー4 ルーム 204
 (74) 代理人 110000578
 名古屋国際特許業務法人

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 TPBG抗体およびその調製方法、その共役体並び用途

(57) 【要約】

本発明は、TPBG抗体及びその調製方法、その共役体並びに用途を公開した。前述したTPBG抗体は、TPBG抗体の重鎖可変領域重鎖CDR1、重鎖CDR2及び重鎖CDR3の1又は複数の種類、及び/又は、TPBG抗体の軽鎖可変領域軽鎖CDR1、軽鎖CDR2及び軽鎖CDR3の1又は複数の種類を含み、そのアミノ酸配列がそれぞれ本発明に記載の通りである。前述したTPBG抗体は、ヒト化抗体であり、高い親和力を有し、低分子薬物毒素MMAFと共役することによって得られた共役体がTPBG陽性細胞に対して細胞毒性傷害作用を発揮できるため、腫瘍等を治療する薬物の調製に利用される。

【特許請求の範囲】

【請求項1】

TPBG抗体の重鎖CDR1、重鎖CDR2及び重鎖CDR3の1又は複数の種類、及び/又は、TPBG抗体の軽鎖CDR1、軽鎖CDR2及び軽鎖CDR3の1又は複数の種類を含む分離したタンパク質であって、

前記重鎖CDR1のアミノ酸配列が、配列表におけるSEQ ID No.2、SEQ ID No.10、SEQ ID No.18、SEQ ID No.26、SEQ ID No.34、SEQ ID No.42、SEQ ID No.50、SEQ ID No.58、SEQ ID No.66又はSEQ ID No.74に示され、前記重鎖CDR2のアミノ酸配列が、配列表におけるSEQ ID No.3、SEQ ID No.11、SEQ ID No.19、SEQ ID No.27、SEQ ID No.35、SEQ ID No.43、SEQ ID No.51、SEQ ID No.59、SEQ ID No.67又はSEQ ID No.75に示され、前記重鎖CDR3のアミノ酸配列が、配列表におけるSEQ ID No.4、SEQ ID No.12、SEQ ID No.20、SEQ ID No.28、SEQ ID No.36、SEQ ID No.44、SEQ ID No.52、SEQ ID No.60、SEQ ID No.68又はSEQ ID No.76に示され、

10

前記軽鎖CDR1のアミノ酸配列が、配列表におけるSEQ ID No.6、SEQ ID No.14、SEQ ID No.22、SEQ ID No.30、SEQ ID No.38、SEQ ID No.46、SEQ ID No.54、SEQ ID No.62、SEQ ID No.70又はSEQ ID No.78に示され、前記軽鎖CDR2のアミノ酸配列が、配列表におけるSEQ ID No.7、SEQ ID No.15、SEQ ID No.23、SEQ ID No.31、SEQ ID No.39、SEQ ID No.47、SEQ ID No.55、SEQ ID No.63、SEQ ID No.71又はSEQ ID No.79に示され、前記軽鎖CDR3のアミノ酸配列が、配列表におけるSEQ ID No.8、SEQ ID No.16、SEQ ID No.24、SEQ ID No.32、SEQ ID No.40、SEQ ID No.48、SEQ ID No.56、SEQ ID No.64、SEQ ID No.72又はSEQ ID No.80に示され、あるいは、

20

前記重鎖CDR1のアミノ酸配列が、配列表におけるSEQ ID No.2、SEQ ID No.10、SEQ ID No.18、SEQ ID No.26、SEQ ID No.34、SEQ ID No.42、SEQ ID No.50、SEQ ID No.58、SEQ ID No.66又はSEQ ID No.74に示されたアミノ酸配列と少なくとも80%の配列相同性を持つアミノ酸配列であり、前記重鎖CDR2のアミノ酸配列が、配列表におけるSEQ ID No.3、SEQ ID No.11、SEQ ID No.19、SEQ ID No.27、SEQ ID No.35、SEQ ID No.43、SEQ ID No.51、SEQ ID No.59、SEQ ID No.67又はSEQ ID No.75に示されたアミノ酸配列と少なくとも80%の配列相同性を持つアミノ酸配列であり、前記重鎖CDR3のアミノ酸配列が、配列表におけるSEQ ID No.4、SEQ ID No.12、SEQ ID No.20、SEQ ID No.28、SEQ ID No.36、SEQ ID No.44、SEQ ID No.52、SEQ ID No.60、SEQ ID No.68又はSEQ ID No.76に示されたアミノ酸配列と少なくとも80%の配列相同性を持つアミノ酸配列であり、

30

前記軽鎖CDR1のアミノ酸配列が、配列表におけるSEQ ID No.6、SEQ ID No.14、SEQ ID No.22、SEQ ID No.30、SEQ ID No.38、SEQ ID No.46、SEQ ID No.54、SEQ ID No.62、SEQ ID No.70又はSEQ ID No.78に示されたアミノ酸配列と少なくとも80%の配列相同性を持つアミノ酸配列であり、前記軽鎖CDR2のアミノ酸配列が、配列表におけるSEQ ID No.7、SEQ ID No.15、SEQ ID No.23、SEQ ID No.31、SEQ ID No.39、SEQ ID No.47、SEQ ID No.55、SEQ ID No.63、SEQ ID No.71又はSEQ ID No.79に示されたアミノ酸配列と少なくとも80%の配列相同性を持つアミノ酸配列であり、前記軽鎖CDR3のアミノ酸配列が、配列表におけるSEQ ID No.8、SEQ ID No.16、SEQ ID No.24、SEQ ID No.32、SEQ ID No.40、SEQ ID No.48、SEQ ID No.56、SEQ ID No.64、SEQ ID No.72又はSEQ ID No.80に示されたアミノ酸配列と少なくとも80%の配列相同性を持つアミノ酸配列であることを特徴とする、分離したタンパク質。

40

【請求項2】

前記重鎖CDR1のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.2に、前記重鎖CDR2のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.3に、且つ前記重鎖CDR3のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.4に示され、前記の重鎖CDR1のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.10に、前記重鎖CDR2のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.11に、且つ前記重鎖CDR3のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.12に示され、前記重鎖CDR1のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.18に、前記重鎖CDR2のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.19に、且つ前記重鎖CDR3のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.20に示され、前記重鎖CDR1のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.26に、前記重鎖CD

50

R2のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.27に、且つ前記重鎖CDR3のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.28に示され、前記重鎖CDR1のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.34に、前記重鎖CDR2のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.35に、且つ前記重鎖CDR3のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.36に示され、前記重鎖CDR1のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.42に、前記重鎖CDR2のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.43に、且つ前記重鎖CDR3のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.44に示され、前記重鎖CDR1のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.50に、前記重鎖CDR2のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.51に、且つ前記重鎖CDR3のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.52に示され、前記重鎖CDR1のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.58に、前記重鎖CDR2のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.59に、且つ前記重鎖CDR3のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.60に示され、前記重鎖CDR1のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.66に、前記重鎖CDR2のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.67に、且つ前記重鎖CDR3のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.68に示され、あるいは、前記重鎖CDR1のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.74に、前記重鎖CDR2のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.75に、且つ前記重鎖CDR3のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.76に示され、

10

前記軽鎖CDR1のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.6に、前記軽鎖CDR2のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.7に、且つ前記軽鎖CDR3のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.8に示され、前記軽鎖CDR1のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.14に、前記軽鎖CDR2のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.15に、且つ前記軽鎖CDR3のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.16に示され、あるいは、前記軽鎖CDR1のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.22に、前記軽鎖CDR2のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.23に、且つ前記軽鎖CDR3のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.24に示され、前記軽鎖CDR1のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.30に、前記軽鎖CDR2のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.31に、且つ前記軽鎖CDR3のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.32に示され、前記軽鎖CDR1のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.38に、前記軽鎖CDR2のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.39に、且つ前記軽鎖CDR3のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.40に示され、前記軽鎖CDR1のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.46に、前記軽鎖CDR2のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.47に、且つ前記軽鎖CDR3のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.48に示され、前記軽鎖CDR1のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.54に、前記軽鎖CDR2のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.55に、且つ前記軽鎖CDR3のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.56に示され、前記軽鎖CDR1のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.62に、前記軽鎖CDR2のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.63に、且つ前記軽鎖CDR3のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.64に示され、前記軽鎖CDR1のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.70に、前記軽鎖CDR2のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.71に、且つ前記軽鎖CDR3のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.72に示され、あるいは、前記軽鎖CDR1のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.78に、前記軽鎖CDR2のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.79に、且つ前記軽鎖CDR3のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.80に示されたことを特徴とする、請求項1に記載のタンパク質。

20

30

【請求項3】

TPBG抗体の重鎖可変領域及び/又はTPBG抗体の軽鎖可変領域を含み、前記重鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列表におけるSEQ ID No.1、SEQ ID No.9、SEQ ID No.17、SEQ ID No.25、SEQ ID No.33、SEQ ID No.41、SEQ ID No.49、SEQ ID No.57、SEQ ID No.65又はSEQ ID No.73に示され、前記軽鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列表におけるSEQ ID No.5、SEQ ID No.13、SEQ ID No.21、SEQ ID No.29、SEQ ID No.37、SEQ ID No.45、SEQ ID No.53、SEQ ID No.61、SEQ ID No.69又はSEQ ID No.77に示されたことを特徴とする、分離したタンパク質。

40

【請求項4】

前記重鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.1に、且つ前記軽鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.5に示され、前記重鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.9に、且つ前記軽鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.13に示され、前記重鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.17に、且つ前記軽鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.21に示され、前記重鎖可変領域のアミノ酸配列が

50

、配列表SEQ ID No.25に、且つ前記軽鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.29に示され、前記重鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.33に、且つ前記軽鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.37に示され、前記重鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.41に、且つ前記軽鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.45に示され、前記重鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.49に、且つ前記軽鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.53に示され、前記重鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.57に、且つ前記軽鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.61に示され、前記重鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.65に、且つ前記軽鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.69に示され、あるいは、前記重鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.73に、且つ前記軽鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.77に示されたことを特徴とする、請求項3に記載のタンパク質。

10

【請求項5】

前記タンパク質は、抗体重鎖定常領域及び/又は抗体軽鎖定常領域をさらに含むことを特徴とする、請求項1~4のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項6】

前記抗体重鎖定常領域は、ヒト又はマウス抗体重鎖定常領域であり、前記抗体軽鎖定常領域は、ヒト又はマウス抗体軽鎖定常領域であることを特徴とする、請求項5に記載のタンパク質。

【請求項7】

前記抗体重鎖定常領域は、ヒト抗体重鎖定常領域であり、前記抗体軽鎖定常領域は、ヒト抗体軽鎖定常領域であることを特徴とする、請求項6に記載のタンパク質。

20

【請求項8】

前記タンパク質は、TPBG抗体、モノクローナル抗体、抗体全長タンパク、抗原抗体結合領域タンパク質断片、二重特異性抗体、多重特異性抗体、一本鎖抗体、単ドメイン抗体又は単一領域抗体であることを特徴とする、請求項1又は3に記載のタンパク質。

【請求項9】

請求項1~7のいずれか一項に記載のタンパク質をコードすることを特徴とする、核酸。

【請求項10】

前記重鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.81、配列表SEQ ID No.83、配列表SEQ ID No.85、配列表SEQ ID No.87、配列表SEQ ID No.89、配列表SEQ ID No.91、配列表SEQ ID No.93、配列表SEQ ID No.95、配列表SEQ ID No.97又は配列表SEQ ID No.99に示され、及び/又は、前記軽鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.82、配列表SEQ ID No.84、配列表SEQ ID No.86、配列表SEQ ID No.88、配列表SEQ ID No.90、配列表SEQ ID No.92、配列表SEQ ID No.94、配列表SEQ ID No.96、配列表SEQ ID No.98又は配列表SEQ ID No.100に示されたことを特徴とする、請求項9に記載の核酸。

30

【請求項11】

前記重鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.81に、且つ前記軽鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.82に示され、前記重鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.83に、且つ前記軽鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.84に示され、前記重鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.85に、且つ前記軽鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.86に示され、前記重鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.87に、且つ前記軽鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.88に示され、前記重鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.89に、且つ前記軽鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.90に示され、前記重鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.91に、且つ前記軽鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.92に示され、前記重鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID

40

50

No.93に、且つ前記軽鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.94に示され、前記重鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.95に、且つ前記軽鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.96に示され、前記重鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.97に、且つ前記軽鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.98に示され、あるいは、前記重鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.99に、且つ前記軽鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.100に示されたことを特徴とする、請求項10に記載の核酸。

【請求項12】

請求項9～11のいずれか一項に記載の核酸を含む、組換え発現ベクター。

10

【請求項13】

請求項12に記載の組換え発現ベクターを含む、組換え発現形質転換体。

【請求項14】

請求項13に記載の組換え発現形質転換体を培養し、培養物からTPBG抗体を得る工程を含む、TPBG抗体の調製方法。

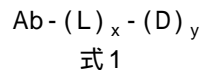
【請求項15】

細胞毒性薬に共有付着される請求項1～7のいずれか一項に記載のタンパク質を含むことを特徴とする、免疫共役体。

【請求項16】

1当量の請求項1～7のいずれか一項に記載のタンパク質が、x当量のアダプターによりy当量の細胞毒性薬と連結し、式1に示された構造を有することを特徴とする、請求項15に記載の免疫共役体。

20



ただし、Abは、請求項1～7のいずれか一項に記載のタンパク質であり、Lはアダプターであり、Dは細胞毒性薬であり、xは自然数であり、好ましくは1～20の整数であり、yは0又は自然数であり、好ましくは0～20の整数であり、x及びyは、各々独立に1～2、又は2～4、又は4～8、又は8～20の整数が好ましく、xとyとの比は、好ましくは、1：1である。

【請求項17】

前記アダプターLは、活性エステル、炭酸塩系、カルバメート系、イミノホスフェート、オキシム系、ヒドラゾン系、アセタール系、オルトエステル系、アミノ系、小ペプチド断片又はヌクレオチド断片であり、好ましくは、前記アダプターLは、マレイミドカプロイル(MC)、マレイミドカプロイル-L-バリン-L-シトルリンp-アミノベンジルアルコール(MC-VC-PAB)又はスクシンイミジル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(SMCC)であり、及び/又は、

30

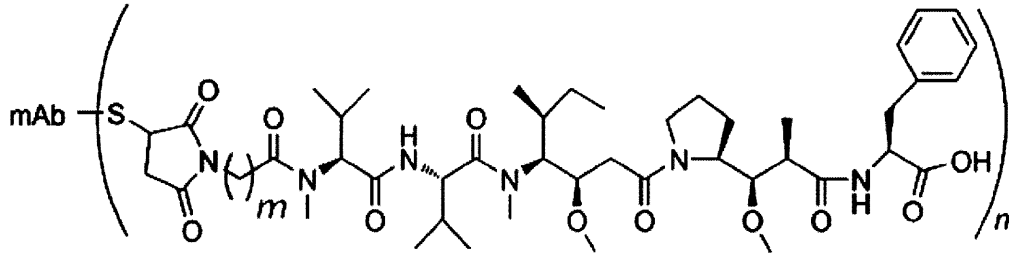
前記Dは、細胞毒素、化学療法剤、放射性同位元素、治療的核酸、免疫調節剤、血管新生阻害剤、抗増殖・プロアポトーシス剤又は溶菌酵素から選択され、好ましくは、メチルアウリスタチンE、メチルアウリスタチンF又はN²'-デアセチル-N²'-3-メルカプト-1オキソプロピル-メイタンシンから選択されることを特徴とする、請求項16に記載の免疫共役体。

40

【請求項18】

前記式1において、x=y=nであり、前記免疫共役体の構造は、式3、式4又は式5に示されることを特徴とする、請求項17に記載の免疫共役体。

【化1】

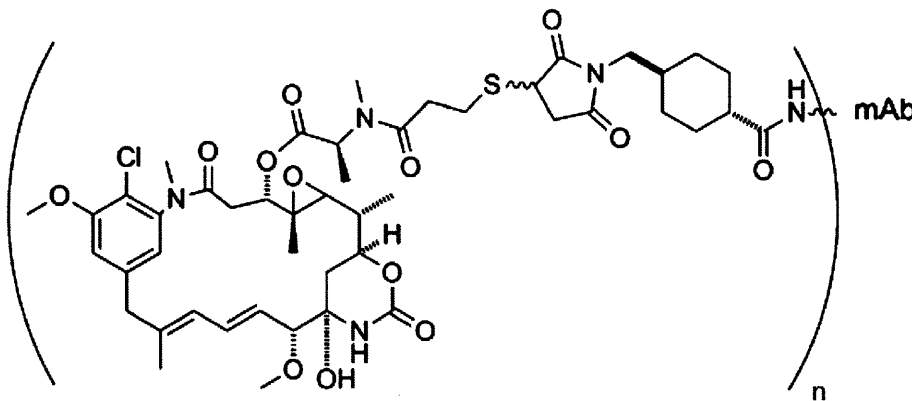


式3

10

式3中、mは1~10であり、好ましくは5（即ち、Lがマレイミドカプロイルである）であり、DはメチルアウリスタチンFであり、

【化2】



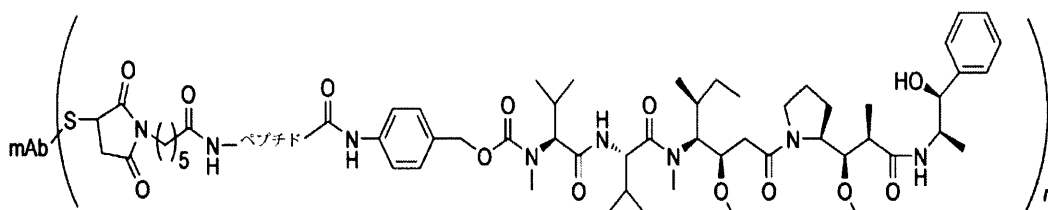
式4

20

式4中、Lはスクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレートであり、DはN2'-デアセチル-N2'-3-メルカプト-1オキソプロピル-メイトンシン（DM1）であり、

30

【化3】



式5

40

式5中、Lはマレイミドカプロイル-L-パリン-L-シトルリンp-アミノベンジルアルコールであり、DはメチルアウリスタチンE（MMAE）であり、

ただし、nは自然数であり、好ましくは1~20の整数であり、より好ましくは1~2、又は2~4、又は4~8、又は8~20の整数である。

【請求項19】

請求項15~18のいずれか一項に記載の免疫共役体と、薬学的に許容可能なベクターとを含むことを特徴とする、医薬組成物。

【請求項20】

前記医薬組成物は、請求項1~7のいずれか一項に記載のタンパク質0.01~99.99%と、薬用ベクター0.01~99.99%とを含み、前記百分率は、前記医薬組成物に占める質量百分率であることを特徴とする、請求項19に記載の医薬組成物。

50

【請求項 2 1】

請求項1~7のいずれか一項に記載のタンパク質の抗腫瘍薬の調製における用途。

【請求項 2 2】

請求項15~18のいずれか一項に記載の免疫共役体の抗腫瘍薬の調製における用途。

【請求項 2 3】

請求項19~20のいずれか一項に記載の医薬組成物の抗腫瘍薬の調製における用途。

【請求項 2 4】

請求項1~7のいずれか一項に記載のタンパク質を、検査試料とインビトロで接触させ、請求項1~7のいずれか一項に記載のタンパク質と前記検査試料の結合を検出すれば良い工程を含むことを特徴とする、TPBGタンパク質を過剰発現する細胞の検出方法。

10

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

本出願は、2015年12月24日の出願日の中国特許出願CN201510990545.6号の優先権を主張する。本出願は、上記した中国特許出願の全ての内容を援用する。

【技術分野】

本発明は、抗体分野に関し、具体的に、TPBG抗体およびその調製方法、その共役体並び用途に関する。

【背景技術】

胚性幹細胞栄養膜と癌細胞の比較を行っているうちに、栄養膜特異的糖タンパク質 (TPBG、5T4とも称する) が胚栄養膜より発現される特異的タンパク質である細胞表面分子が発見された。ヒトTPBGタンパク質は、分子量が約72kDaであり、420つのアミノ酸を含み、そのN末端におけるオリゴ糖構造が多様であり、タンパク質の加水分解を防止することができると共に、細胞膜におけるシグナル伝達中で他の分子と相互作用がある。TPBGタンパク質には、反復のロイシンドメイン (LRR) を合計7つ含み、タンパク質間の相互作用に与ることができる。

20

【0002】

栄養膜は、プラセンタと胎児の間に特別な1層胚性幹細胞であり、TPBGが胚発生段階における各種の栄養膜細胞によく発現されている。正常成人組織に関しては、TPBGがただ限られたいくつかの種類の上皮細胞に発現する。但し、TPBGは、多くの癌細胞に発現し、例えば、子宮頸癌、結腸癌、胃癌、卵巣癌、口腔癌、前列腺癌、肺癌あるいは腎臓癌の組織に共にTPBGの発現が検出され、結腸癌、胃癌や、卵巣癌に、TPBGの発現量が癌の低い治癒率に関連することを証拠だてる。また、非小細胞肺癌、腎臓癌或いは膵臓癌の組織において、TPBGの発現が95%以上と高い。

30

【0003】

多くの研究によると、当該TPBGの過剰発現は、細胞遷移を促すと共に、免疫監視から逃れることができる。マウスの線維芽細胞において、TPBGを過剰発現することによって、細胞を紡錘体形態へ誘導し、細胞接着を下げる。マウスの正常上皮細胞において、同様に、TPBGが上皮細胞カドヘリン (E-cadherin) を阻害し、細胞遷移を促すことができると分かった。また、TPBGの細胞における一部は、細胞骨格の形成を阻害する機能がある。同時に、TPBGは、上皮細胞間葉転換 (EMT) に関連し、胚性幹細胞発育の早期マーカーとして、細胞外マトリックスプロテアーゼの活性を増加させ、アクチン細胞骨格の配列を妨害し、E-cadherinの発現を減少する。さらに、研究によると、細胞膜におけるTPBGとCXCR4の共局在化によって、そのリガンドCXCL12ケモカインの結合を誘導し、炎症と腫瘍の拡散を促すことができることを発見した。TPBG陰性細胞において、CXCL12は、もう1つの受容体CXCR7と結合し、遊走反応を抑制することによって、細胞の成長および生存に役たつ。Wnt/b-cateninシグナル経路は、発育および細胞再生に重要な役割を果たしており、TPBGがLRP6とWnt受容体のエンドサイトーシスを阻害し、Wntシグナル経路を抑制することによって、細胞接着および細胞骨格の形成を阻害し、腫瘍の遷移および拡散を促す。また、TPBGは、乳癌や胃癌細胞中で非標準なWnt経路を関与するので、同様に、癌細胞の遷移および浸潤

40

50

を促す。

【0004】

抗体薬剤共役薬剤は、抗体と高性能低分子薬剤から連結体の共役で形成される抗体薬物共役体であり、高毒性低分子薬剤に癌細胞におけるターゲットタンパク質を特異的に認識させ、癌細胞を特異的に死滅することができる。過去百年間、抗体に基づく免疫療法と化学薬剤に基づく化学療法は、ずっと臨床癌治療に関して2つの治療対策になっている。抗体は、腫瘍細胞の過剰発現した抗原をターゲットとするものであり、多種類の治療的モノクローナル抗体は、既に临床上莫大な成功を遂げた。臨床実践において、治療的抗体は、良いターゲット指向性があるものの、傷害作用に限界性が存在する。低分子化学薬剤は、癌細胞への高性能傷害作用を有するが、非癌細胞にも同様に傷害する。従って、临床上、抗体薬剤および低分子薬剤がそれぞれ限界性を有するため、薬剤の研究開発が新たに求められている。新世代の抗体薬物共役体は、抗体のターゲット細胞への特異的結合能を利用し、細胞毒素の高い化学薬剤を搬送し、癌細胞へのターゲット指向の高性能傷害を達成する。新型化学連結技術の登場につれて、抗体薬剤共役薬は、80年代末から臨床研究に進み、現在2つのADC薬剤が既にFDAから許可をもらって発売されている。

10

【0005】

ADC薬剤の開発は、薬剤ターゲットの選別、組換え抗体の調製、連結体技術開発および高細胞毒性化合物の選別最適化などに関わる。TPBGは、癌細胞特異的発現のタンパク質として、ADC薬剤の候補ターゲットになっている。

20

[発明の概要]

本発明が解決しようとする課題は、現在TPBG抗体の不足を克服するために、ヒト、マウス或いはカニクイザルのTPBGタンパク質と高い親和力を持つ親和力が高く特異性が強いTPBG抗体およびその調製方法、並び用途を提供する。本発明はさらに、前記TPBG抗体、それと共役し抗腫瘍機能を持つ低分子化合物を含有し、細胞に侵入し、TPBG陽性細胞を細胞毒素で傷害し、腫瘍を治療するような薬剤の調製に用いられる薬剤活性成分の共役体を提供する。

【0006】

本発明は、ヒトTPBGタンパク質又は過剰発現ヒトTPBGタンパク質の組換え細胞株を免疫原とし、伝統的なハイブリドーマ調製技術(Kohler and Milstein, Nature, 1975, 256: 495)を採用し、一連の調整や改進により、TPBG抗体のリード抗体を得た。さらに、リード抗体の初期生産、精製及び検定により、ヒトTPBGタンパク質などの蛋白と高度な親和力を有するTPBG抗体を得た。当該TPBG抗体とMMAFのような低分子化合物とを共役させて共役体を得、前記共役体は細胞に入り込み、TPBG陽性細胞に対して優れた細胞毒性傷害作用を有する。そして、分子生物学方法でシーケンシングを行うことにより、得られたTPBG抗体の重鎖可変領域とTPBG抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列が分かる。

30

【0007】

本発明は、TPBG抗体の重鎖CDR1、重鎖CDR2及び重鎖CDR3の1又は複数の種類、及び/又は、TPBG抗体の軽鎖CDR1、軽鎖CDR2及び軽鎖CDR3の1又は複数の種類を含む分離したタンパク質を提供し、ここで、前記重鎖CDR1のアミノ酸配列が、配列表におけるSEQ ID No.2、SEQ ID No.10、SEQ ID No.18、SEQ ID No.26、SEQ ID No.34、SEQ ID No.42、SEQ ID No.50、SEQ ID No.58、SEQ ID No.66又はSEQ ID No.74に示され、前記重鎖CDR2のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.3、SEQ ID No.11、SEQ ID No.19、SEQ ID No.27、SEQ ID No.35、SEQ ID No.43、SEQ ID No.51、SEQ ID No.59、SEQ ID No.67又はSEQ ID No.75に示され、前記重鎖CDR3のアミノ酸配列が、配列表におけるSEQ ID No.4、SEQ ID No.12、SEQ ID No.20、SEQ ID No.28、SEQ ID No.36、SEQ ID No.44、SEQ ID No.52、SEQ ID No.60、SEQ ID No.68又はSEQ ID No.76に示され、前記軽鎖CDR1のアミノ酸配列が、配列表におけるSEQ ID No.6、SEQ ID No.14、SEQ ID No.22、SEQ ID No.30、SEQ ID No.38、SEQ ID No.46、SEQ ID No.54、SEQ ID No.62、SEQ ID No.70又はSEQ ID No.78に示され、前記軽鎖CDR2のアミノ酸配列が、配列表におけるSEQ ID No.7、SEQ ID No.15、SEQ ID No.23、SEQ ID No.31、SEQ ID No.39、SEQ ID No.47、SEQ ID No.55、SEQ ID No.63、SEQ ID No.71又はS

40

50

EQ ID No.79に示され、前記軽鎖CDR3のアミノ酸配列が、配列表におけるSEQ ID No.8、SEQ ID No.16、SEQ ID No.24、SEQ ID No.32、SEQ ID No.40、SEQ ID No.48、SEQ ID No.56、SEQ ID No.64、SEQ ID No.72又はSEQ ID No.80に示され、又は、前記重鎖CDR1のアミノ酸配列が、配列表におけるSEQ ID No.2、SEQ ID No.10、SEQ ID No.18、SEQ ID No.26、SEQ ID No.34、SEQ ID No.42、SEQ ID No.50、SEQ ID No.58、SEQ ID No.66又はSEQ ID No.74に示されたアミノ酸配列と少なくとも80%の配列相同性を持つアミノ酸配列に示され、前記重鎖CDR2のアミノ酸配列が、配列表におけるSEQ ID No.3、SEQ ID No.11、SEQ ID No.19、SEQ ID No.27、SEQ ID No.35、SEQ ID No.43、SEQ ID No.51、SEQ ID No.59、SEQ ID No.67又はSEQ ID No.75に示されたアミノ酸配列と少なくとも80%の配列相同性を持つアミノ酸配列に示され、前記重鎖CDR3のアミノ酸配列が、配列表におけるSEQ ID No.4、SEQ ID No.12、SEQ ID No.20、SEQ ID No.28、SEQ ID No.36、SEQ ID No.44、SEQ ID No.52、SEQ ID No.60、SEQ ID No.68又はSEQ ID No.76に示されたアミノ酸配列と少なくとも80%の配列相同性を持つアミノ酸配列に示され、前記軽鎖CDR1のアミノ酸配列が、配列表におけるSEQ ID No.6、SEQ ID No.14、SEQ ID No.22、SEQ ID No.30、SEQ ID No.38、SEQ ID No.46、SEQ ID No.54、SEQ ID No.62、SEQ ID No.70又はSEQ ID No.78に示されたアミノ酸配列と少なくとも80%の配列相同性を持つアミノ酸配列に示され、前記軽鎖CDR2のアミノ酸配列が、配列表におけるSEQ ID No.7、SEQ ID No.15、SEQ ID No.23、SEQ ID No.31、SEQ ID No.39、SEQ ID No.47、SEQ ID No.55、SEQ ID No.63、SEQ ID No.71又はSEQ ID No.79に示されたアミノ酸配列と少なくとも80%の配列相同性を持つアミノ酸配列に示され、前記軽鎖CDR3のアミノ酸配列が、配列表におけるSEQ ID No.8、SEQ ID No.16、SEQ ID No.24、SEQ ID No.32、SEQ ID No.40、SEQ ID No.48、SEQ ID No.56、SEQ ID No.64、SEQ ID No.72又はSEQ ID No.80に示されたアミノ酸配列と少なくとも80%の配列相同性を持つアミノ酸配列に示された。

【 0 0 0 8 】

好ましくは、前記重鎖CDR1のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.2に示され、前記重鎖CDR2のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.3に示され、且つ前記重鎖CDR3のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.4に示され、前記重鎖CDR1のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.10に示され、前記重鎖CDR2のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.11に示され、且つ前記重鎖CDR3のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.12に示され、前記重鎖CDR1のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.18に示され、前記重鎖CDR2のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.19に示され、且つ前記重鎖CDR3のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.20に示され、前記重鎖CDR1のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.26に示され、前記重鎖CDR2のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.27に示され、且つ前記重鎖CDR3のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.28に示され、前記重鎖CDR1のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.34に示され、前記重鎖CDR2のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.35に示され、且つ前記重鎖CDR3のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.36に示され、前記重鎖CDR1のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.42に示され、前記重鎖CDR2のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.43に示され、且つ前記重鎖CDR3のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.44に示され、前記重鎖CDR1のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.50に示され、前記重鎖CDR2のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.51に示され、且つ前記重鎖CDR3のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.52に示され、前記重鎖CDR1のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.58に示され、前記重鎖CDR2のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.59に示され、且つ前記重鎖CDR3のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.60に示され、前記重鎖CDR1のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.66に示され、前記重鎖CDR2のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.67に示され、且つ前記重鎖CDR3のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.68に示され、前記重鎖CDR1のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.74に示され、前記重鎖CDR2のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.75に示され、且つ前記重鎖CDR3のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.76に示され、前記軽鎖CDR1のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.6に示され、前記軽鎖CDR2のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.7に示され、且つ前記軽鎖CDR3のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.8に示され、前記軽鎖CDR1のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.14に示され、前記軽鎖CDR2のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.15に示さ

れ、且つ前記軽鎖CDR3のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.16に示され、又は、前記軽鎖CDR1のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.22に示され、前記軽鎖CDR2のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.23に示され、且つ前記軽鎖CDR3のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.24に示され、前記軽鎖CDR1のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.30に示され、前記軽鎖CDR2のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.31に示され、且つ前記軽鎖CDR3のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.32に示され、前記軽鎖CDR1のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.38に示され、前記軽鎖CDR2のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.39に示され、且つ前記軽鎖CDR3のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.40に示され、前記軽鎖CDR1のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.46に示され、前記軽鎖CDR2のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.47に示され、且つ前記軽鎖CDR3のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.48に示され、前記軽鎖CDR1のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.54に示され、前記軽鎖CDR2のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.55に示され、且つ前記軽鎖CDR3のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.56に示され、前記軽鎖CDR1のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.62に示され、前記軽鎖CDR2のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.63に示され、且つ前記軽鎖CDR3のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.64に示され、前記軽鎖CDR1のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.70に示され、前記軽鎖CDR2のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.71に示され、且つ前記軽鎖CDR3のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.72に示され、又は、前記軽鎖CDR1のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.78に示され、前記軽鎖CDR2のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.79に示され、且つ前記軽鎖CDR3のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.80に示された。

10

【0009】

20

本発明はまた、TPBG抗体の重鎖可変領域及び/又はTPBG抗体の軽鎖可変領域を含む分離したタンパク質を提供し、前記重鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列表におけるSEQ ID No.1、SEQ ID No.9、SEQ ID No.17、SEQ ID No.25、SEQ ID No.33、SEQ ID No.41、SEQ ID No.49、SEQ ID No.57、SEQ ID No.65又はSEQ ID No.73に示され、前記軽鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列表におけるSEQ ID No.5、SEQ ID No.13、SEQ ID No.21、SEQ ID No.29、SEQ ID No.37、SEQ ID No.45、SEQ ID No.53、SEQ ID No.61、SEQ ID No.69又はSEQ ID No.77に示された。

【0010】

好ましくは、前記重鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.1に示され、且つ前記軽鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.5に示され、前記重鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.9に示され、且つ前記軽鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.13に示され、前記重鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.17に示され、且つ前記軽鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.21に示され、前記重鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.25に示され、且つ前記軽鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.29に示され、前記重鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.33に示され、且つ前記軽鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.37に示され、前記重鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.41に示され、且つ前記軽鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.45に示され、前記重鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.49に示され、且つ前記軽鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.53に示され、前記重鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.57に示され、且つ前記軽鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.61に示され、前記重鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.65に示され、且つ前記軽鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.69に示され、又は、前記重鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.73に示され、且つ前記軽鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.77に示された。

30

40

【0011】

以上をまとめると、前記アミノ酸配列の番号は表1に示された。

【0012】

【表1】

表1 TPBG 抗体蛋白配列番号

クローン番号	重鎖蛋白				軽鎖蛋白			
	可変領域	CDR1	CDR2	CDR3	可変領域	CDR1	CDR2	CDR3
12B12C7C3	1	2	3	4	5	6	7	8
5G4H10G5	9	10	11	12	13	14	15	16
37H9C5G2	17	18	19	20	21	22	23	24
39A11G5F2	25	26	27	28	29	30	31	32
52C9E9F6	33	34	35	36	37	38	39	40
28D4E6A9	41	42	43	44	45	46	47	48
36A10D8B12	49	50	51	52	53	54	55	56
99E12C7H1	57	58	59	60	61	62	63	64
103E2E9C2	65	66	67	68	69	70	71	72
106D5G3D10	73	74	75	76	77	78	79	80

10

ここで、表1中の数字は配列表における配列番号であり、例えば、12B12C7C3の重鎖蛋白可変領域のアミノ酸配列が、SEQ ID No.1であり、12B12C7C3の重鎖蛋白可変領域のCDR1のアミノ酸配列が、SEQ ID No.2である。

20

【0013】

好ましくは、前記のタンパク質はさらに、抗体重鎖定常領域及び/又は抗体軽鎖定常領域を含み、前記の抗体重鎖定常領域は、本分野において通常のことであり、好ましくはマウス抗体重鎖定常領域又はヒト抗体重鎖定常領域であり、より好ましくはヒト抗体重鎖定常領域である。前記抗体軽鎖定常領域は本分野において通常のことであり、好ましくはマウス軽鎖抗体定常領域又はヒト抗体軽鎖定常領域であり、より好ましくはヒト抗体軽鎖定常領域である。

30

【0014】

前記タンパク質は本分野における通常タンパク質であり、好ましくはTPBG抗体であり、より好ましくは抗体全長タンパク、抗原抗体結合領域タンパク質断片、二重特異性抗体、多重特異性抗体、一本鎖抗体 (single chain antibody fragment、scFv)、単ドメイン抗体 (single domain antibody、sdAb) 又は単一領域抗体 (Single-domain antibody) の1又は複数の種類、及び前記抗体から得られたモノクローナル抗体又はマルチクローナル抗体である。前記モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ、ファージディスプレイ、単一リンパ球遺伝子クローニングなどを含む、多種類の経路や技術により開発して作製されることができ、ハイブリドーマにより野生型又はトランスジェニックマウスからモノクローナル抗体を調製するのは主流となる。

40

【0015】

前記抗体全長タンパクは、本分野における通常抗体全長タンパクであり、重鎖可変領域、軽鎖可変領域、重鎖定常領域及び軽鎖定常領域を含む。前記タンパク質の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域と、ヒト重鎖定常領域及びヒト軽鎖定常領域とから、全ヒト抗体全長タンパクが構成される。好ましくは、前記抗体全長タンパクはIgG1、IgG2、IgG3又はIgG4である。

【0016】

前記一本鎖抗体は、本分野における通常一本鎖抗体であり、重鎖可変領域、軽鎖可変領域及び15~20個のアミノ酸の短ペプチドを含む。

前記抗原抗体結合領域タンパク質断片は、本分野における通常抗原抗体結合領域タンパク質断片であり、軽鎖可変領域、軽鎖定常領域及び重鎖定常領域のFd段を含む。好まし

50

くは、前記抗原抗体結合領域タンパク質断片はFab及びF(ab')₂である。

【0017】

前記単ドメイン抗体は、本分野における通常の単ドメイン抗体であり、重鎖可変領域及び重鎖定常領域を含む。

前記単一領域抗体は本分野における通常の単一領域抗体であり、重鎖可変領域のみを含む。

【0018】

ここで、前記タンパク質の調製方法は、本分野における通常の調製方法である。前記調製方法は、当該タンパク質を組換え発現する発現形質転換体から分離して得る、又はタンパク質配列を人工で合成して得ることが好ましい。前記当該タンパク質を組換え発現する発現形質転換体から分離して得ることは、前記タンパク質をコードする、やや突然変異した核酸分子を組換えベクターにクローンし、得られる組換えベクターを転換体に転換させ、組換え発現形質転換体を得、得られる組換え発現形質転換体を培養することにより、分離、精製して前記タンパク質を得ることが好ましい。

10

【0019】

本発明はさらに、前記タンパク質をコードする核酸を提供する。

好ましくは、前記重鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.81、配列表SEQ ID No.83、配列表SEQ ID No.85、配列表SEQ ID No.87、配列表SEQ ID No.89、配列表SEQ ID No.91、配列表SEQ ID No.93、配列表SEQ ID No.95、配列表SEQ ID No.97又は配列表SEQ ID No.99に示され、及び/又は、前記軽鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.82、配列表SEQ ID No.84、配列表SEQ ID No.86、配列表SEQ ID No.88、配列表SEQ ID No.90、配列表SEQ ID No.92、配列表SEQ ID No.94、配列表SEQ ID No.96、配列表SEQ ID No.98又は配列表SEQ ID No.100に示された。

20

【0020】

より好ましくは、前記重鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.81に示され、且つ前記軽鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.82に示され、前記重鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.83に示され、且つ前記軽鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.84に示され、前記重鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.85に示され、且つ前記軽鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.86に示され、前記重鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.87に示され、且つ前記軽鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.88に示され、前記重鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.89に示され、且つ前記軽鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.90に示され、前記重鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.91に示され、且つ前記軽鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.92に示され、前記重鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.93に示され、且つ前記軽鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.94に示され、前記重鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.95に示され、且つ前記軽鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.96に示され、前記重鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.97に示され、且つ前記軽鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.98に示され、又は、前記重鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.99に示され、且つ前記軽鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.100に示された。

30

40

【0021】

以上をまとめると、前記ヌクレオチド配列の番号は表2に示された：

【0022】

【表 2】

表 2 TPBG 抗体遺伝子配列番号

クローン番号	重鎖蛋白可変領域	軽鎖蛋白可変領域
12B12C7C3	81	82
5G4H10G5	83	84
37H9C5G2	85	86
39A11G5F2	87	88
52C9E9F6	89	90
28D4E6A9	91	92
36A10D8B12	93	94
99E12C7H1	95	96
103E2E9C2	97	98
106D5G3D10	99	100

10

ここで、表2中の数字は配列表における配列番号であり、例えば12B12C7C3の重鎖蛋白可変領域をコードするヌクレオチド配列が、SEQ ID No.81である。

【 0 0 2 3 】

ここで、12B12C7C3の重鎖蛋白可変領域におけるCDR1をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.81中の91位～105位であり、

12B12C7C3の重鎖蛋白可変領域におけるCDR2をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.81中の151位～198位であり、

12B12C7C3の重鎖蛋白可変領域におけるCDR3をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.81中の295位～327位であり、

12B12C7C3の軽鎖蛋白可変領域におけるCDR1をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.82中の70位～114位であり、

12B12C7C3の軽鎖蛋白可変領域におけるCDR2をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.82中の157位～180位であり、

12B12C7C3の軽鎖蛋白可変領域におけるCDR3をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.82中の277位～303位であり、

5G4H10G5の重鎖蛋白可変領域におけるCDR1をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.83中の91位～105位であり、

5G4H10G5の重鎖蛋白可変領域におけるCDR2をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.83中の148位～198位であり、

5G4H10G5の重鎖蛋白可変領域におけるCDR3をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.83中の295位～330位であり、

5G4H10G5の軽鎖蛋白可変領域におけるCDR1をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.84中の70位～102位であり、

5G4H10G5の軽鎖蛋白可変領域におけるCDR2をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.84中の148位～168位であり、

5G4H10G5の軽鎖蛋白可変領域におけるCDR3をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.84中の265位～288位であり、

37H9C5G2の重鎖蛋白可変領域におけるCDR1をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.85中の91位～105位であり、

37H9C5G2の重鎖蛋白可変領域におけるCDR2をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.85中の151位～198位であり、

37H9C5G2の重鎖蛋白可変領域におけるCDR3をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.85中の295位～327位であり、

37H9C5G2の軽鎖蛋白可変領域におけるCDR1をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.86中の70位～114位であり、

20

30

40

50

Q ID No.86中の70位～102位であり、
 37H9C5G2の軽鎖蛋白可変領域におけるCDR2をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.86中の148位～168位であり、
 37H9C5G2の軽鎖蛋白可変領域におけるCDR3をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.86中の265位～291位。

【 0 0 2 4 】

39A11G5F2の重鎖蛋白可変領域におけるCDR1をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.87中の91位～105位であり、
 39A11G5F2の重鎖蛋白可変領域におけるCDR2をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.87中の151位～198位であり、
 39A11G5F2の重鎖蛋白可変領域におけるCDR3をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.87中の295位～315位であり、
 39A11G5F2の軽鎖蛋白可変領域におけるCDR1をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.88中の70位～102位であり、
 39A11G5F2の軽鎖蛋白可変領域におけるCDR2をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.88中の148位～168位であり、
 39A11G5F2の軽鎖蛋白可変領域におけるCDR3をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.88中の265位～291位。

【 0 0 2 5 】

52C9E9F6の重鎖蛋白可変領域におけるCDR1をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.89中の91位～105位であり、
 52C9E9F6の重鎖蛋白可変領域におけるCDR2をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.89中の151位～198位であり、
 52C9E9F6の重鎖蛋白可変領域におけるCDR3をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.89中の295位～315位であり、
 52C9E9F6の軽鎖蛋白可変領域におけるCDR1をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.90中の70位～102位であり、
 52C9E9F6の軽鎖蛋白可変領域におけるCDR2をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.90中の148位～168位であり、
 52C9E9F6の軽鎖蛋白可変領域におけるCDR3をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.90中の268位～291位。

【 0 0 2 6 】

28D4E6A9の重鎖蛋白可変領域におけるCDR1をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.91中の91位～105位であり、
 28D4E6A9の重鎖蛋白可変領域におけるCDR2をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.91中の148位～198位であり、
 28D4E6A9の重鎖蛋白可変領域におけるCDR3をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.91中の295位～327位であり、
 28D4E6A9の軽鎖蛋白可変領域におけるCDR1をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.92中の70位～102位であり、
 28D4E6A9の軽鎖蛋白可変領域におけるCDR2をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.92中の148位～168位であり、
 28D4E6A9の軽鎖蛋白可変領域におけるCDR3をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.92中の265位～291位である。

【 0 0 2 7 】

36A10D8B12の重鎖蛋白可変領域におけるCDR1をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.93中の91位～108位であり、
 36A10D8B12の重鎖蛋白可変領域におけるCDR2をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.93中の154位～198位であり、
 36A10D8B12の重鎖蛋白可変領域におけるCDR3をコードするヌクレオチド配列が、配列表

10

20

30

40

50

SEQ ID No.93中の295位～324位であり、

36A10D8B12の軽鎖蛋白可変領域におけるCDR1をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.94中の70位～102位であり、

36A10D8B12の軽鎖蛋白可変領域におけるCDR2をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.94中の148位～168位であり、

36A10D8B12の軽鎖蛋白可変領域におけるCDR3をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.94中の265位～291位である。

【 0 0 2 8 】

99E12C7H1の重鎖蛋白可変領域におけるCDR1をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.95中の91位～105位であり、

99E12C7H1の重鎖蛋白可変領域におけるCDR2をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.95中の151位～198位であり、

99E12C7H1の重鎖蛋白可変領域におけるCDR3をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.95中の295位～318位であり、

99E12C7H1の軽鎖蛋白可変領域におけるCDR1をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.96中の70位～102位であり、

99E12C7H1の軽鎖蛋白可変領域におけるCDR2をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.96中の148位～168位であり、

99E12C7H1の軽鎖蛋白可変領域におけるCDR3をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.96中の265位～291位である。

【 0 0 2 9 】

103E2E9C2の重鎖蛋白可変領域におけるCDR1をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.97中の91位～105位であり、

103E2E9C2の重鎖蛋白可変領域におけるCDR2をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.97中の151位～198位であり、

103E2E9C2の重鎖蛋白可変領域におけるCDR3をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.97中の295位～324位であり、

103E2E9C2の軽鎖蛋白可変領域におけるCDR1をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.98中の70位～105位であり、

103E2E9C2の軽鎖蛋白可変領域におけるCDR2をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.98中の151位～171位であり、

103E2E9C2の軽鎖蛋白可変領域におけるCDR3をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.98中の268位～294位である。

【 0 0 3 0 】

106D5G3D10の重鎖蛋白可変領域におけるCDR1をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.99中の91位～105位であり、

106D5G3D10の重鎖蛋白可変領域におけるCDR2をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.99中の151位～198位であり、

106D5G3D10の重鎖蛋白可変領域におけるCDR3をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.99中の295位～318位であり、

106D5G3D10の軽鎖蛋白可変領域におけるCDR1をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.100中の70位～99位であり、

106D5G3D10の軽鎖蛋白可変領域におけるCDR2をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.100中の145位～165位であり、

106D5G3D10の軽鎖蛋白可変領域におけるCDR3をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.100中の262位～294位である。

【 0 0 3 1 】

前記核酸の調製方法は、本分野における通常の調製方法であり、遺伝子クローニングにより前記タンパク質をコードする核酸分子を得ること、又は人工全配列合成により前記タンパク質をコードする核酸分子を得ることを含む。

10

20

30

40

50

【0032】

当業者にとって、前記タンパク質をコードするアミノ酸配列の塩基配列は、適宜置換、欠失、変更、挿入又は増加によりポリヌクレオチドの同体を提供できることが分かる。本発明にかかるポリヌクレオチドの同体は、当該蛋白配列遺伝子をコードする1又は複数の塩基を、抗体活性が保持できる範囲で、置換、欠失又は増加により得られる。

【0033】

本発明はさらに、前記核酸を含む組換え発現ベクターを提供する。

ここで、前記組換え発現ベクターは、本分野における通常の方法により得られる。すなわち、本発明に記載の核酸分子を各種の発現ベクターに共役させて構築することができる。前記発現ベクターは、本分野における通常の各種のベクターであり、前記核酸分子を搭載できるものであれば良い。前記ベクターは、各種のプラスミド、コスミド、ファージ又はウイルスベクターなどを含むことが好ましい。

10

【0034】

本発明はさらに、前記組換え発現ベクターを含む組換え発現形質転換体を提供する。

ここで、前記組換え発現形質転換体の調製方法は、本分野における通常の調製方法であり、好ましくは、前記組換え発現ベクターを宿主細胞に転換させることに得られる。前記宿主細胞は、本分野における通常の各種の宿主細胞であり、前期組換え発現ベクターを安定して自己複製させ、且つそれが持つ前記核酸を効果的に発現させるものであれば良い。好ましくは、前記宿主細胞は、E.coli TG1又はBL21細胞（一本鎖抗体又はFab抗体を発現）、又はCHO-K1細胞（全長IgG抗体を発現）である。前記組換え発現プラスミドを宿主細胞に転換させることにより、本発明の好ましい組換え発現形質転換体得られる。ここで、前記転換方法は、本分野における通常の転換方法であり、好ましくは化学的転換法、熱激法又は電気転換法である。

20

【0035】

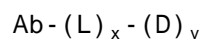
本発明はさらに、前記組換え発現形質転換体を培養し、培養物からTPBG抗体を得る工程を含む、TPBG抗体の調製方法を提供する。

本発明は、細胞毒性薬に共有付着される前記タンパク質を含む、免疫共役体を提供する。

【0036】

好ましくは、前記免疫共役体において、1当量の前記タンパク質は、x当量のアダプターによりy当量の細胞毒性薬と連結し、式1に示された構造を有する。

30



式 1

ここで、Abが上述したタンパク質であり；Lがアダプターであり；Dが細胞毒性薬であり；前記xが本分野における通常の架橋度であり、xが自然数であり、好ましくは1~20の整数であり；yが0又は自然数であり、好ましくは0~20の整数であり；x及びyがそれぞれ独立して、1~2、又は2~4、又は4~8、又は8~20の整数であることが好ましく；xとyの比が、1:1であることが好ましい。

【0037】

前記Lは、本分野における通常のアダプター（又は架橋剤やカップリング剤と称する）である。前記Lは、2個の官能基、すなわち、抗体と反応する基及び薬物と反応する基（例えば、アルデヒド又はケトン）を含む。

40

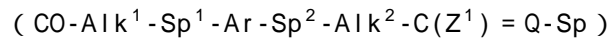
【0038】

薬物は、アダプター分子を介して上記タンパク質とカップリングする。前記Lは、細胞に入って放出され、それが、活性エステル、炭酸塩系、カルバメート系、イミノホスフェート、オキシム系、ヒドラゾン系、アセタール系、オルトエステル系、アミノ系、小ペプチド断片又はヌクレオチド断片を含むが、これらの官能基に限定されない。

【0039】

好ましくは、前記Lは、主として式2に示された構造を含有し、それは、L中の脱離基が脱離した残り部分である。

50



式 2

ここで、 AIk^1 及び AIk^2 は独立して、結合手又は分岐もしくは非分岐の(C_1-C_{10})アルキレン鎖であり； Sp^1 は、-S-、-O-、-CONH-、-NHCO-、-NR'-、-N(CH₂CH₂)₂N-、又は-X-Ar'-Y-(CH₂)_n-Zであり、ただしX、Y及びZが独立した結合手、-NR'-、-S-又は-O-であり、n=0である条件であれば、YとZとの少なくとも一方が結合手である必要があり、且つ、Ar'が(C_1-C_5)アルキル基、(C_1-C_4)アルコキシ基、(C_1-C_4)チオアルコキシ基、ハロゲン、ニトロ基、-COOR'、-CONHR'、-(CH₂)_nCOOR'、S(CH₂)_nCOOR'、-O(CH₂)_nCONHR'又は-S(CH₂)_nCONHR'から任意に選択された1、2又は3個の基で置換された1、2-、1,3-又は1,4-フェニレン基であり、nは0-5の整数であり、 AIk^1 が結合手である条件であれば、 Sp^1 が結合手であり；R'は、-OH、(C_1-C_4)アルコキシ基、(C_1-C_4)チオアルコキシ基、ハロゲン、ニトロ基、(C_1-C_3)ジアルキルアミノ基、又は(C_1-C_3)トリアルキルアンモニウム-Aから任意に選択された1又は2個の基で置換された分岐もしくは非分岐の(C_1-C_5)鎖であり、ただしAが塩を完成させる薬学的に許容可能なアニオンであり；Arが(C_1-C_6)アルキル基、(C_1-C_5)アルコキシ基、(C_1-C_4)チオアルコキシ基、ハロゲン、ニトロ基、-COOR'、-CONHR'、-O(CH₂)_nCOOR'、-S(CH₂)_nCOOR'、-O(CH₂)_nCONHR'又は-S(CH₂)_nCONHR'から任意に選択された1、2又は3個の基で置換された1,2-、1,3-又は1,4-フェニレン基であり、ただしn及びR'が上述した定義のとおりであり、又はArが1,2-、1,3-、1,4-、1,5-、1,6-、1,7-、1,8-、2,3-、2,6-又は2,7-ナフチリデン基であり、ただしナフチリデン基又はフェノチアジンがそれぞれ、(C_1-C_6)アルキル基、(C_1-C_5)アルコキシ基、(C_1-C_4)チオアルコキシ基、ハロゲン、ニトロ基、-COOR'、-CONHR'、-O(CH₂)_nCOOR'、-S(CH₂)_nCOOR'、又は-S(CH₂)_nCONHR'から任意に選択された1、2、3又は4個の基で置換され、ただしn及びR'が上述した定義のとおりであり、Arがフェノチアジンである条件であれば、 Sp^1 が窒素のみと結合する結合手であり； Sp^2 が結合手、-S-又は-O-であり、 AIk^2 が結合手である条件であれば、 Sp^2 が結合手であり；

Z^1 がH、(C_1-C_5)アルキル基、又は(C_1-C_5)アルキル基、(C_1-C_5)アルコキシ基、(C_1-C_4)チオアルコキシ基、ハロゲン、ニトロ基、-COOR'、-CONHR'、-O(CH₂)_nCOOR'、-S(CH₂)_nCOOR'、-O(CH₂)_nCONHR'或いは-S(CH₂)_nCONHR'から任意に選択された1、2、又は3個の基で置換されたフェニル基であり、ただしn及びR'が上述した定義のとおりであり；

Sp が直鎖もしくは分岐鎖の二価もしくは三価の(C_1-C_{18})基、二価もしくは三価のアリール基又はヘテロアリール基、二価もしくは三価の(C_3-C_{18})シクロアルキル基又はヘテロシクロアルキル基、二価もしくは三価のアリール基又はヘテロアリール-アリール(C_1-C_{18})基、二価もしくは三価のシクロアルキル基又はヘテロシクロアルキル-アルキル(C_1-C_{18})基、或いは、二価もしくは三価の(C_2-C_{18})不飽和アルキル基であり、ただしヘテロアリール基が好ましくはフラニル基、チエニル基、N-メチルピロリル基、ピリジル基、N-メチルイミダゾリル基、オキサゾリル基、ピリミジニル基、キノリル基、イソキノリル基、N-メチルカルバゾリル基、アミノクマリニル基、又はフェナジニル基であり、且つ Sp が三価の基であれば、 Sp がさらに低級(C_1-C_5)ジアルキルアミノ基、低級(C_1-C_5)アルコキシ基、水酸基、又は低級(C_1-C_5)アルキルチオ基で任意に置換されていてもよく；且つ、Qが=NHCO-、=NHNCS-、=NHNCONH-、=NHNCSNH-又は=NHO-である。

【0040】

好ましくは、 AIk^1 が分岐もしくは非分岐の(C_1-C_5)アルキレン鎖であり、 Sp^1 が結合手、-S-、-O-、-CONH-、-NHCO-又は-NR'であり、ただしR'が上述した定義のとおりであり、 AIk^1 が結合手である条件であれば、 Sp^1 が結合手であり；

Arが(C_1-C_6)アルキル基、(C_1-C_5)アルコキシ基、(C_1-C_4)チオアルコキシ基、ハロゲン、ニトロ基、-COOR'、-CONHR'、-O(CH₂)_nCOOR'、-S(CH₂)_nCOOR'、-O(CH₂)_nCONHR'又は-S(CH₂)_nCONHR'から任意に選択された1、2又は3個の基で置換された1,2-、1,3-又は1,4-フェニレン基であり、ただしn及びR'が上述した定義のとおりであり、

又はArがそれぞれ(C₁-C₆)アルキル基、(C₁-C₅)アルコキシ基、(C₁-C₄)チオアルコキシ基、ハロゲン、ニトロ基、-COOR'、-CONHR'、-O(CH₂)_nCOOR'、-S(CH₂)_nCOOR'、-O(CH₂)_nCONHR'又は-S(CH₂)_nCONHR'から任意に選択された1、2、3又は4個の基で置換された1,2-、1,3-、1,4-、1,5-、1,6-、1,7-、1,8-、2,3-、2,6-又は2,7-ナフチリデン基である。

【0041】

Z¹は、(C₁-C₅)アルキル基、又は(C₁-C₅)アルキル基、(C₁-C₄)アルコキシ基、(C₁-C₄)チオアルコキシ基、ハロゲン、ニトロ基、-COOR'、-CONHR'、-O(CH₂)_nCOOR'、-S(CH₂)_nCOOR'、-O(CH₂)_nCONHR'或いは-S(CH₂)_nCONHR'から任意に選択された1、2、又は3個の基で置換されたフェニル基であり；Alk²及びSp²がいずれも結合手であり；かつ、Sp及びQが前文のみで定義されたとおりである。また、上述した結合手とは、共有結合のことを意味する。

10

【0042】

前記Lは、マレイミドカプロイル(maleimidocaproyl、MC)、マレイミドカプロイル-L-バリン-L-シトルリン-p-アミノベンジルアルコール(MC-VC-PAB)又はスクシンイミジル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(SMCC)であることが好ましい。

【0043】

前記Dは、本分野における通常の細胞毒性薬であり、細胞毒素、化学療法剤、放射性同位元素、治療的核酸、免疫調節剤、血管新生阻害剤、抗増殖・プロアポトーシス剤又は溶菌酵素から好ましく選択される。

20

【0044】

ここで、前記細胞毒素は、本分野における通常の細胞毒素であり、一般的には、細胞の機能を抑制又は阻止する、及び/又は細胞を破壊する活性剤のことをいう。好ましくは、抗生物質、チューブリン重合阻害剤、アルキル化剤、タンパク合成阻害剤、プロテインキナーゼ阻害剤、ホスファターゼ阻害剤、トポイソメラーゼ阻害剤、プロテインキナーゼ、ホスファターゼ、トポイソメラーゼ又はサイクリンから選択される。より好ましくは、ドキシルピシン、ダウノルピシン、イダルピシン、アクラルピシン、ゾルピシン、ミトキサントロン、エピルピシン、カルピシン、ノガラマイシン、メノガリル、ピラルピシン、バルルピシン、シタラピン、ゲムシタピン、トリフルリジン、アンシタピン、エノシタピン、アザシチジン、ドキシフルリジン、ペントスタチン、プロクスウリジン、カペシタピン、クラドリピン、デシタピン、フロクスウリジン、フルダラピン、ゲーゲロチン、ピューロマイシン、テガフル、チアゾフリン、ドキシルピシン、シスプラチン、カルボプラチン、シクロホスファミド、ダカルバジン、ビンブラスチン、ピンクリスチン、プレオマイシン、ナイトロジェンマスタード、プレドニゾン、プロカルバジン、メトトレキサート、フルオロウラシル、エトポシド、タキソール、タキソール類似体、プラチン系(例えば、シスプラチン及びカルボプラチン)、マイトマイシン、チオテパ、タキサン、ダウノルピシン、アクチノマイシン、アントラマイシン、アザセリン、タモキシフェン、ドラスタチン、アウリスタチン及びその誘導体、ヘミアスタリン、エスペラミシン又はメイタンシン系化合物から選択され、最も好ましくは、メチルアウリスタチンE(MMAE)、メチルアウリスタチンF(MMAF)又はN2'-デアセチル-N2'-3-メルカプト-1オキソプロピル-メイタンシン(DM1)から選択される。

30

40

【0045】

ここで、前記化学療法剤は、本分野における通常の化学療法剤であり、好ましくはアルキル化剤、スルホン酸アルキル系化学療法剤、アジリジン系化学療法剤、ビニルアミド系やメチルメラミン系化学療法剤、ナイトロジェンマスタード、ニトロ尿素系化学療法剤、抗生物質、代謝拮抗物、葉酸系化学療法剤、プリン類似体、ピリミジン類似体、アンドロゲン、抗アドレナリン薬、葉酸補充剤、メイタンシノール、多糖複合体、タキサン、プラチン類似体又はレチノイド、又は、その薬学的に許容可能な塩、酸及び誘導体から選択される。

50

【 0 0 4 6 】

前記アルキル化剤は、本分野における通常のアルキル化剤であり、好ましくはチオテバヤ、シクロホスファミドから選択される。前記スルホン酸アルキル系化学療法剤は、本分野における通常のスルホン酸アルキル系化学療法剤であり、好ましくはブスルファン、インプロスルファンや、ピボスルファンから選択される。前記アジリジン系化学療法剤は、本分野における通常のアジリジン系化学療法剤であり、好ましくはアジリジン、カルボコン、メツレデバヤ、ウレデバから選択される。前記エチレンイミン系及びメチルメラミン系化学療法剤は、本分野における通常のエチレンイミン系及びメチルメラミン系化学療法剤であり、好ましくはアルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホルアミド、トリエチレンチオホスホルアミドや、トリメチローロメラミンから選択される。前記ナイトロジェンマスタードは、本分野における通常のナイトロジェンマスタードであり、好ましくはクロラムブシル、クロルナファジン、エストラムスチン (estramustine)、イホスファミド、ナイトロジェンマスタード、メクロレタミンオキシド塩酸塩、メルファラン、ノベンピシン、フェネステリン、プレドニマスチン、トロホスファミドや、ウラシルマスタードから選択される。前記ニトロ尿素系化学療法剤は、本分野における通常のニトロ尿素系化学療法剤であり、好ましくはカルムスチン、クロロゾトシン、フォテムスチン、ロムスチン、ニムスチンや、ラニムスチンから選択される。前記抗生物質は、本分野における通常の抗生物質であり、好ましくはアクラルピシン、アクチノマイシン、アントラマイシン、アザセリン、プレオマイシン、アクチノマイシンc、カリケアマイシン、カルピシン、カルミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、デトルピシン、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ドキシソルピシン、エピルピシン、エソルピシン、イダルピシン、マルセロマイシン、マイトマイシン、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポルフィロマイシン、ピューロマイシン、ケラマイシン、ロドルピシン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチンや、ゾルピシンから選択される。前記代謝拮抗物は、本分野における通常の代謝拮抗物であり、好ましくはメトトレキサートや、5-フルオロウラシル (5-FU) から選択される。前記葉酸系化学療法剤は、本分野における通常の葉酸系化学療法剤であり、好ましくはデノプテリン、プテロプテリンや、トリメトレキサートから選択される。前記プリン類似体は、本分野における通常のプリン類似体であり、好ましくはフルダラビン、6-メルカプトプリン、チアミプリンや、チオグアニンから選択される。前記ピリミジン類似体は、本分野における通常のピリミジン類似体であり、好ましくはアンシタピン、アザシチジン、6-アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタピン、フロクスウリジンや、5-EU から選択される。前記アンドロゲンは、本分野における通常のアンドロゲンであり、好ましくはカルステロン、プロピオン酸ドロスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタンや、テストラクトンから選択される。前記抗アドレナリン薬は、本分野における通常の抗アドレナリン薬であり、好ましくはアミノグルテチミド、ミトタンや、トリロスタンから選択される。前記葉酸補充剤は、本分野における通常の葉酸補充剤であり、好ましくはフロリン酸、アセグラトン、アルドホスファミドグリコシド、アミノレプリン酸、アムサクリン、アトリムスチン、ピサントレン、エダトレキサート、デホスファミド、デメコルチン、ジアジクオン、エルフォルニチン、酢酸エリブチニウム、エポチロン、エトグルシド、ガリウム硝酸ガリウム、ヒドロキシウレア、レンチナンや、ロニダミンから選択される。前記メイタンシノールは、本分野における通常のメイタンシノールであり、好ましくはメイタンシン、アンサマイトシン、ミトグアゾン、ミトキサントロン、モピダモール、ニトラクリン、ペントスタチン、フェナメット、ピラルピシン、ロソキサントロン、ポドフィリン酸、2-エチルヒドラジドや、プロカルバジンから選択される。前記多糖複合体は、本分野における通常の多糖複合体であり、好ましくはラゾキサン、リゾキシン、シゾフィラン、スピロゲルマニウム、テニユアゾン酸、トリアジコン、2,2',2''-トリクロロトリエチルアミン、トリコテセン、ウレタン、ピンデシン、ダカルバジン、マンノムスチン、ミトブロニトール、ミトラクトール、ピボプロマン、ガシトシン、シタラビン、シクロ

10

20

30

40

50

ホスファミド又はチオテパから選ばれる。より好ましくは、T-2トキシシン、ベラキュリンA、ロリジンA又はアングエイジンから選択される。前記タキサンは、本分野における通常のタキサンであり、好ましくはパクリタキセル、ABRAXANE（登録商標）（クレモホール不使用）、パクリタキセルのアルブミン加工ナノ粒子製剤（American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois）、ドキシタキセル、クロラムブシル、ゲムシタピン、6-チオグアニン、メルカプトプリンや、メトトレキサートから選択される。前記白金類似体は、本分野における通常の白金類似体であり、好ましくはシスプラチン、カルボプラチン、ピンラスチン、エトポシド、イホスファミド、ミトキサントロン、ピンクリスチン、ノバントロン、テニポシド、エダトレキサート、ダウノマイシン、アミノプテリン、カペシタピン、イバンドロネート、CPT-11、トポイソメラーゼ阻害剤RFS 2000や、ジフルオロメチルオルニチンから選択される。前記レチノイドは、本分野におけるレチノイドであり、好ましくはレチノイン酸である。

10

【0047】

ただし、前記放射性同位元素は、本分野における通常の放射性同位元素であり、好ましくは、前記タンパク質に直接的に結合し、もしくはキレート剤によって前記タンパク質に結合するものである。より好ましくは、前記タンパク質のシステイン残基に直接的に結合するものである。好ましくは、前記放射性同位元素は、放射線治療に適する -放射体、
-放射体、及びオージェ電子、並びに診断に適する陽電子放射体又は -放射体から選択される。より好ましくは、前記放射性同位元素は、フルオロ-18、銅64、銅65、ガリウム-67、ガリウム-68、プロモ-77、プロモ-80m、ルテニウム-95、ルテニウム-97、ルテニウム-103、ルテニウム-105、テクニチウム-99m、水銀107、水銀203、ヨウ素-123、ヨウ素-124、ヨウ素-125、ヨウ素-126、ヨウ素-131、ヨウ素-133、インジウム-111、インジウム-113、レニウム-99m、レニウム-105、レニウム-101、レニウム-186、レニウム-188、テルル-121m、テクニチウム-99、テルル-122m、テルル-125m、ツリウム-165、ツリウム-167、ツリウム-168、イットリウム-90、ビスマス-213、鉛213や、アクチニウム-225、又はそれらから誘導される窒化物や、酸化物から選択される。

20

【0048】

ここで、前記治療的核酸は、本分野における通常の核酸であり、好ましくは免疫調節剤、血管新生阻害剤、抗増殖剤又はプロアポトーシス剤をコードする遺伝子である。前記治療剤は、前記治療剤、その誘導體、及び、前記治療剤の薬学的に許容可能な塩、酸及び誘導體を含む。

30

【0049】

ここで、前記免疫調節剤は、本分野における通常の免疫調節剤であり、すなわち体液免疫応答（例えば、抗原特異的抗体の発生）及び細胞媒介免疫応答（例えばリンパ球の増殖）を含む免疫応答を誘発する試薬である。好ましくはサイトカイン、成長因子、ホルモン、抗ホルモン薬、免疫阻害剤又はコルチコステロイドから選択される。前記サイトカインは、本分野における通常のサイトカインであり、好ましくはキサンチン、インターロイキン又はインターフェロンから選択される。前記成長因子は、本分野における通常の成長因子であり、好ましくはTNF、CSF、GM-CSF又はG-CSFから選択される。前記ホルモンは、本分野における通常のホルモンであり、好ましくはエストロゲン、アンドロゲン又はプロゲステロンから選択される。前記エストロゲンはジエチルstilbestrol又はエストラジオールであることがより好ましい。前記アンドロゲンはテストステロン又はフルオキシメステロンであることがより好ましい。前記プロゲステロンは酢酸メゲストロール又は酢酸メドロキシプロゲステロンであることがより好ましい。前記コルチコステロイドは、本分野における通常のコルチコステロイドであり、好ましくはプレドニゾン、デキサメタゾン又はヒドロコルチゾンから選択される。前記抗ホルモン薬は、本分野における通常の抗ホルモン薬であり、ホルモンの腫瘍に対する作用を遮断し、サイトカインの発生を抑制し、自己抗原の発現を低下させ、またMHC抗原の免疫阻害剤をマスクすることができ、好ましくは抗エストロゲン薬、抗アンドロゲン薬又は抗アドレナリン薬から選択される。前記抗エストロゲン薬は、タモキシフェン、ラロキシフェン、アロマターゼ抑制性4（5

40

50

である。

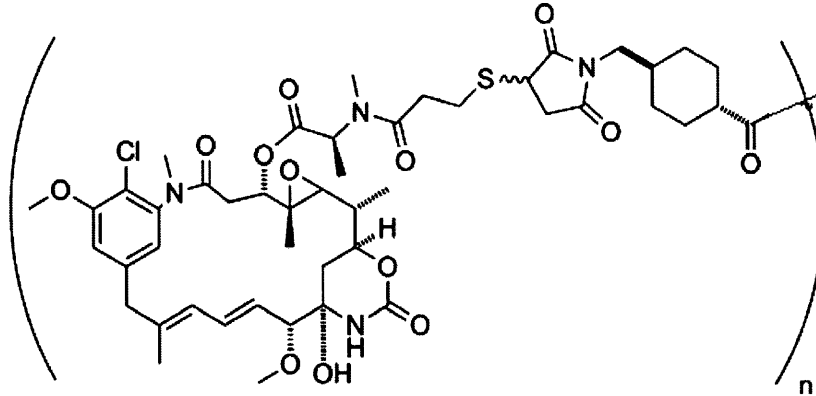
【0054】

ここで、 m は1~10であり、好ましくは5である。

好ましい実施例では、 $-(L)_x-(D)_y$ は、

【0055】

【化2】



10

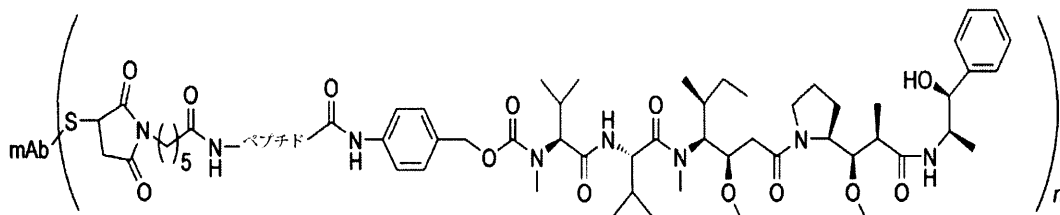
である。

【0056】

好ましい実施例では、 $-(L)_x-(D)_y$ は、

【0057】

【化3】

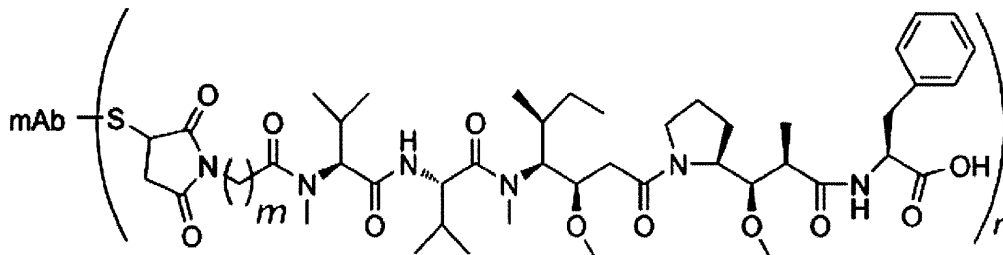


30

最も好ましくは、前記Dは、チューブリン合成酵素阻害剤 - メチルアウリスタチンF (MM AF) であり、前記つなぎLは、マレイミドカプロイル (maleimidocaproyl、MC) であり、前記免疫共役体の構造は、式3で示される。

【0058】

【化4】



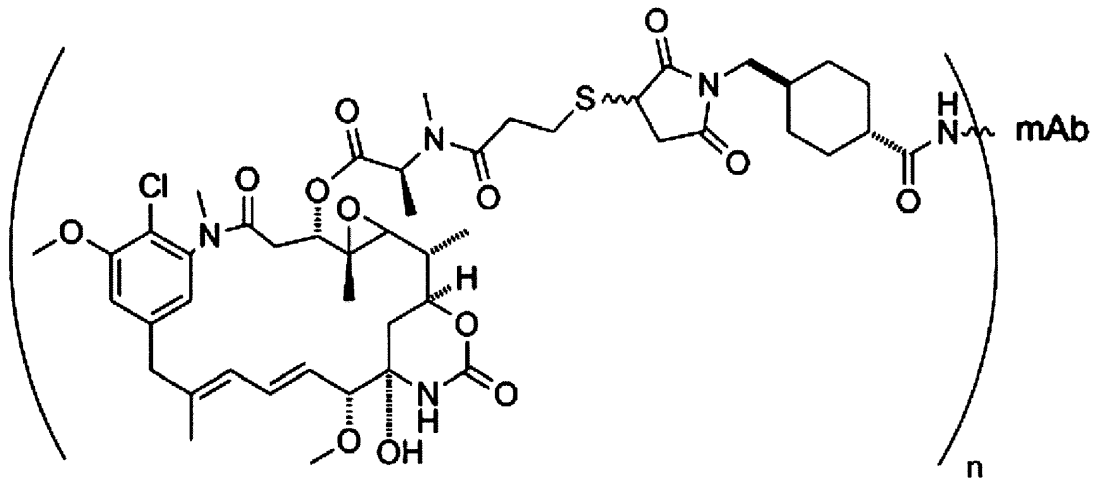
40

式3

又は、前記Lは、スクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレートであり、Dは、N2'-デアセチル-N2'-3-メルカプト-1オキソプロピル)-メイトンシン (DM1) であり、前記免疫共役体の構造は、式4で示される。

【0059】

【化5】



10

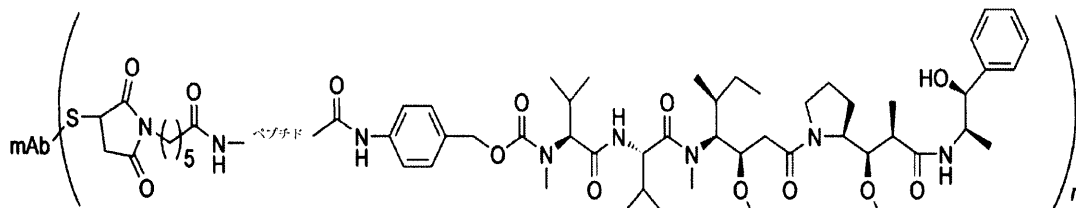
式4

又は、Lは、マレイミドカプロイル-L-バリン-L-シトルリンp-アミノベンジルアルコールであり、Dは、メチルアウリスタチンE (MMAE) であり、前記免疫共役体の構造は、式5で示される。

20

【0060】

【化6】



式5

30

ここで、nは自然数であり、好ましくは1~20の整数であり、より好ましくは1~2、又は2~4、又は4~8、又は8~20の整数である。

【0061】

前記免疫共役体の調製方法は本分野における通常の方法であり、好ましくは、Doronina, 2006, Bioconjugate Chem. 17, 114-124に記載の調製方法を採用する。好ましくは、前記調製方法は、最小限を有する低共役画分 (LCF) が10%よりも小さい免疫共役体を生成する。

【0062】

より好ましくは、前記調製方法は、前記タンパク質をpH6.5~8.5のホウ酸ナトリウム緩衝液で透析した後、トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン(TCEP)を加え(ただし、前記タンパク質に対するTCEPのモル比率が2~10)、室温で1~4時間還元して、反応液Aを得る、工程を含む。反応液Aに対して溶出を行い、不要の前記タンパク質を除去して反応液Bを得た。反応液Bに、MC-MMAFを加え(ただし、精製されたTPBG抗体に対するMC-MMAFのモル比率が5~20)、10~37 で4時間反応した。

40

【0063】

前記免疫共役体は、当該分野にて公知のいずれの物理的形態として存在してもよい。好ましくは、清澄液である。

本発明は、さらに、前記免疫共役体と薬学的に許容可能なベクターとを備える医薬組成物を提出する。

【0064】

前記薬学的に許容可能なベクターは、本分野における通常のベクターであり、前記ベク

50

ターは、いずれの適当な生理学的又は薬学的に許容可能な医薬助剤であってもよい。前記医薬助剤は、本分野における通常の医薬助剤であり、薬学的に許容可能な付形剤、充填剤や希釈剤などを含むことが好ましい。より好ましくは、前記医薬組成物は、前記タンパク質0.01~99.99%と、薬用ベクター0.01~99.99%とを含み、前記百分率は、前記医薬組成物に占める質量百分率である。

【0065】

好ましくは、前記医薬組成物は、抗腫瘍薬であり、より好ましくは、扁平上皮/腺肺癌（非小細胞肺癌）、浸潤性乳癌、結腸癌、直腸癌、胃癌、扁平上皮子宮頸癌、浸潤性子宮内膜腺癌、浸潤性膵臓癌、卵巣癌、扁平上皮膀胱癌、絨毛癌、気管支癌、乳癌、子宮頸癌、膵臓癌又は精嚢癌に対する医薬である。

10

【0066】

本発明に記載の医薬組成物の投与経路は、好ましくは、胃腸外投与、注射投与や経口投与である。前記注射投与は、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮内注射や皮下注射などの経路を含むことが好ましい。前記医薬組成物の剤形は、本分野における通常の各種の剤形であり、固体、半固体又は液体のいずれの形式であることが好ましく、即ち、水溶液、非水溶液又は懸濁液、より好ましくは、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、注射剤又は輸液剤などであってよい。より好ましくは、血管内、皮下、腹膜内又は肌内経路を介して投与する。好ましくは、前記医薬組成物は、さらに、エアゾール剤又は粗噴霧剤として、即ち、経鼻投与、または鞘内、髄内あるいは心室内経路を介して投与することが可能である。より好ましくは、前記医薬組成物は、さらに、透皮投与、経皮投与、局所投与、腸内投与、腔内投与、舌下投与又は経直腸投与が可能である。

20

【0067】

本発明に記載の医薬組成物の投与量のレベルは、所望の診断又は治療結果に達する組成物の量に応じて調整することができる。投与方案は、単回注射であっても複数回注射であってもよく、調整してもよい。選択された用量レベル及び方案は、前記医薬組成物の活性と安定性（即ち、半減期）、製剤、投与経路、他の医薬又は治療との組み合わせ、検査及び/又は治療する疾患又は病症、ならびに治療する被験者の健康状態と病歴などを含む、各種の要因に応じて適当に調整する。

【0068】

本発明による前記医薬組成物の治療に対する有効量は、最初に、細胞培養実験又は動物モデル、例えば、げっ歯類、ウサギ、イヌ、ブタ及び/又は霊長類を用いて予測することができる。動物モデルはまた、適当な投与濃度範囲と投与経路を測定するのに用いられてもよい。その後、ヒトにおける有効投与量と投与経路を確定するのに用いられてもよい。一般に、有効投与量又は用量の確定や調整、ならびに調整のタイミングと方法に関する評価は、当業者には知られている。

30

【0069】

併用療法については、前記タンパク質、前記免疫共役体及び/又は他の治療又は診断剤は、それぞれ単一薬剤として、所望の治療又は診断を実施するのに適合する任意の時間範囲内で使用することが可能であるため、これらの単一薬剤は、ほぼ同時に（即ち、単一薬剤として、または数分間又は数時間内に）、又は順次連続して投与することが可能である。例えば、これらの単一薬剤は、一年以内、又は10、8、6、4、2ヶ月以内、又は4、3、2、1週間以内、又は5、4、3、2、1日以内に投与することが可能である。

40

【0070】

製剤、用量、投与方案および計測できる治療結果に関する他の指導は、Berkowら（2000）The Merck Manual of Medical Information（Merck医学情報マニュアル）とMerck&Co. Inc., Whitehouse Station, New Jersey; Ebadi（1998）CRC Desk Reference of Clinical Pharmacology（臨床薬理学マニュアル）などの著作を参照のこと。

【0071】

本発明は、前記タンパク質の抗腫瘍薬の調製における用途を提供する。

本発明は、前記免疫共役体の抗腫瘍薬の調製における用途を提供する。

50

本発明は、前記医薬組成物の抗腫瘍薬の調製における用途を提供する。

【0072】

本発明は、前記タンパク質の腫瘍の治療における用途を提供する。

本発明は、前記免疫共役体の腫瘍の治療における用途を提供する。

本発明は、前記医薬組成物の腫瘍の治療における用途を提供する。

【0073】

本発明は、さらに、前記タンパク質を、検査試料とインビトロで接触させ、前記タンパク質と前記検査試料の結合を検出すれば良い工程、を含むTPBGタンパク質を過剰発現する細胞の検出方法を提出する。

【0074】

前記過剰発現とは、本分野における通常の意味であり、好ましくは、検査試料では、フローサイトメトリーを経た細胞における前記タンパク質の平均蛍光強度(MFI)値は、サブクラスIgGのMFI値の3倍以上である。

【0075】

前記結合の検出方式は、本分野における通常の方法であり、好ましくは、FACSによる検出である。

本発明に記載の「TPBG陽性」細胞は、即ち、TPBGタンパク質を過剰発現する細胞である。例えば、NCI-H1568細胞株がある。逆に、「TPBG陰性」細胞と称される。例えば、腫瘍細胞系のNCI-H1770がある。

【0076】

当該分野における常識に合わせれば、上述した各々の好ましい条件は、任意に組み合わせて本発明の各々の好ましい実施例を得ることが可能である。

本発明で使用する試薬と原料は、いずれも市販されているものを使用することが可能である。

【0077】

本発明の進歩性及び効果は、本発明に記載のTPBG抗体はキメラ抗体であり、TPBGタンパク質に高い親和性を有し、タンパク質レベルおよび細胞レベルで、TPBGタンパク質共役型受容体の細胞外領域に結合することができる。前記TPBG抗体とMC-MMAFのような低分子化合物とを共役した後、共役体を得られた。前記共役体は、TPBG陽性細胞に細胞傷害作用を効果的に発揮することができる。その他、TPBG抗体は、MMAFのような低分子化合物をエンドサイトーシスによって細胞に取り込まれて、細胞内において低分子化合物を分解し放出して、細胞傷害作用を発揮することができる。したがって、前記TPBG抗体で調製した抗体共役薬剤は、腫瘍細胞を効果的に傷害し、腫瘍を治療することができる。

【図面の簡単な説明】

【0078】

【図1】図1は、ヒトTPBGタンパク質でトランスフェクトされたHEK293細胞のFACS選別検出結果である。

【図2】図2は、ヒトTPBGタンパク質でトランスフェクトされたCHOK1細胞のFACS選別検出結果である。

【図3】図3は、カニクイザルTPBGタンパク質でトランスフェクトされたCHOK1細胞のFACS選別検出結果である。

【図4】図4は、マウスTPBGタンパク質でトランスフェクトされたCHOK1細胞のFACS選別検出結果である。

【図5】図5は、ELISAによるTPBG免疫後のマウス血清の抗体力価の検出である。

【図6A】図6Aは、ELISAによるTPBG抗体とヒトTPBG-hFcタンパク質との結合反応の検出である。

【図6B】図6Bは、ELISAによるTPBG抗体とヒトTPBG-hFcタンパク質との結合反応の検出である。

【図7A】図7Aは、FACSによるTPBG抗体とCHOK1-hTPBGとの結合反応の検出である。

【図7B】図7Bは、FACSによるTPBG抗体とCHOK1-hTPBGとの結合反応の検出である。

10

20

30

40

50

- 【図8A】図8Aは、FACSによるTPBG抗体とCHOK1-cTPBGとの結合反応の検出である。
- 【図8B】図8Bは、FACSによるTPBG抗体とCHOK1-cTPBGとの結合反応の検出である。
- 【図9A】図9Aは、FACSによるTPBG抗体とCHOK1-mTPBGとの結合反応の検出である。
- 【図9B】図9Bは、FACSによるTPBG抗体とCHOK1-mTPBGとの結合反応の検出である。
- 【図10A】図10Aは、FACSによるTPBG抗体とCHOK1との結合反応の検出である。
- 【図10B】図10Bは、FACSによるTPBG抗体とCHOK1との結合反応の検出である。
- 【図11A】図11Aは、TPBG発現陽性非小肺癌細胞株NCI-H1568に対するTPBG抗体-MMAF抗体架橋剤の細胞傷害作用である。
- 【図11B】図11Bは、TPBG発現陽性非小肺癌細胞株NCI-H1568に対するTPBG抗体-MMAF抗体架橋剤の細胞傷害作用である。
- 【図11C】図11Cは、TPBG発現陽性非小肺癌細胞株NCI-H1568に対するTPBG抗体の細胞傷害作用である。
- 【図12A】図12Aは、TPBG発現陰性非小肺癌細胞株NCI-H1770に対するTPBG抗体-MMAF抗体架橋剤の細胞傷害作用である。
- 【図12B】図12Bは、TPBG発現陰性非小肺癌細胞株NCI-H1770に対するTPBG抗体-MMAF抗体架橋剤の細胞傷害作用である。
- 【図13】図13は、TPBG陽性腫瘍細胞系NCI-H1299に対するTPBGキメラ抗体薬物共役体の細胞傷害作用である。
- 【図14A】図14Aは、TPBGキメラ抗体12B12の抗体薬物共役体及びその裸抗体による治療後の、腫瘍体積変化図である。
- 【図14B】図14Bは、TPBGキメラ抗体5G4の抗体薬物共役体及びその裸抗体による治療後の、腫瘍体積変化図である。
- 【図14C】図14Cは、TPBGキメラ抗体39A11の抗体薬物共役体及びその裸抗体による治療後の、腫瘍体積変化図である。
- 【図14D】図14Dは、TPBGキメラ抗体28D4の抗体薬物共役体及びその裸抗体による治療後の、腫瘍体積変化図である。
- 【図14E】図14Eは、TPBGキメラ抗体36A10の抗体薬物共役体及びその裸抗体による治療後の、腫瘍体積変化図である。
- 【図15A】図15Aは、TPBGキメラ抗体12B12の抗体薬物共役体及びその裸抗体による治療後の、マウス体重変化図である。
- 【図15B】図15Bは、TPBGキメラ抗体5G4の抗体薬物共役体及びその裸抗体による治療後の、マウス体重変化図である。
- 【図15C】図15Cは、TPBGキメラ抗体39A11の抗体薬物共役体及びその裸抗体による治療後の、マウス体重変化図である。
- 【図15D】図15Dは、TPBGキメラ抗体28D4の抗体薬物共役体及びその裸抗体による治療後の、マウス体重変化図である。
- 【図15E】図15Eは、TPBGキメラ抗体36A10の抗体薬物共役体及びその裸抗体による治療後の、マウス体重変化図である。
- 【図16A】図16Aは、TPBG陽性腫瘍細胞系NCI-H1299に対するTPBGキメラ抗体12B12及びその異なる低分子薬を共役した抗体薬物共役体の細胞傷害作用である。
- 【図16B】図16Bは、TPBG陽性腫瘍細胞系NCI-H1299に対するTPBGキメラ抗体12B12及びその異なる低分子薬を共役した抗体薬物共役体の細胞傷害作用である。
- 【図16C】図16Cは、TPBG陽性腫瘍細胞系NCI-H1568に対するTPBGキメラ抗体12B12及びその異なる低分子薬を共役した抗体薬物共役体の細胞傷害作用である。
- 【図16D】図16Dは、TPBG陽性腫瘍細胞系NCI-H1568に対するTPBGキメラ抗体12B12及びその異なる低分子薬を共役した抗体薬物共役体の細胞傷害作用である。
- 【図17A】図17Aは、TPBG陽性のTPBGを発現する293-hTPBG安定発現細胞株に対するTPBGキメラ抗体薬物共役体の細胞傷害作用である。
- 【図17B】図17Bは、TPBG陽性のTPBGを発現する293-hTPBG安定発現細胞株に対するTPBGキメラ抗体薬物共役体の細胞傷害作用である。

10

20

30

40

50

【図17C】図17Cは、TPBGを発現しない293細胞株に対するTPBGキメラ抗体薬物共役体の細胞傷害作用である。

【図17D】図17Dは、TPBGを発現しない293細胞株に対するTPBGキメラ抗体薬物共役体の細胞傷害作用である。

【発明を実施するための形態】

【0079】

以下に、本発明を実施例によりさらに説明するが、本発明はこれらの実施例に制限するものではない。以下の実施例では、具体的な条件が注記されていない実験方法は、通常の方法や条件、または製品説明に応じて選択する。

【0080】

実施例に記載の室温は、本分野における通常の室温であり、一般に、10~30℃である。特に言及しない限り、実施例に記載のPBSは、pH7.2のPBSリン酸緩衝液である。

【0081】

実施例1 TPBG抗体の調製

ヒトTPBGタンパク質の細胞外領域のアミノ酸配列32-355 (Ser32-Ser355) (ただし、ヒトTPBGタンパク質をコードするヌクレオチド配列のGenebankにおける番号はGenebank ID: AAH37161.1) をコードするヌクレオチド配列を含む核酸をヒトIgG Fc断片 (hFc) を有するpCpCベクター (Invitrogenから購入、V044-50) にクローリングし、既知の標準分子生物学方法により、プラスミドを調製した。具体的な方法はSambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition (Plainview, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press) を参照のこと。HEK293細胞 (Invitrogenから購入) に対して、一過性トランスフェクト (Transient transfection) (ポリエーテルイミド、PEI、Polysciencesから購入) を行い、FreeStyle TM 293 (Invitrogenから購入) を使用して、37℃で拡大培養した。4日後、細胞培養液を回収し、遠心分離して細胞成分を除去して、TPBGタンパク質細胞外領域を含む培養上澄を得た。培養上澄をタンパク質Aアフィニティーカラム (Mabselect Sure、GE Healthcareから購入) に仕込みし、同時に紫外線 (UV) 検出計により紫外線吸収値 (A280nm) の変化を検出する。仕込み後、タンパク質Aアフィニティーカラムを、PBSリン酸塩緩衝液 (pH7.2) で、紫外線吸収値が基準線に戻るまで洗浄した。そして、0.1Mグリシン塩酸 (pH2.5) で溶出し、タンパク質AアフィニティーカラムからhFcタグ付きTPBGタンパク質 (即ち、ヒトTPBG-hFc) を溶出し回収した。PBSリン酸塩緩衝液 (pH7.2) により、4℃冷蔵庫で一晩透析した。透析した後のタンパク質を、0.22ミクロンで無菌濾過してから分注して-80℃に保存して、精製された免疫原Aを得た。

【0082】

免疫原Aは使用前に、そのタンパク質の濃度、純度、分子量、生物活性などの検出のような一連のQC検出が必要である。その結果、免疫原Aは、各指標が良好であり、抗原として次のTPBG抗体調製試験を行うことが可能である。

【0083】

(二)、免疫原Bの調製

ヒトTPBGの全長アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列 (ただし、ヒトTPBGタンパク質をコードするヌクレオチド配列のGenebankにおける番号は、Genebank ID: AAH37161.1) は、pIRESベクター (Clontechから購入) にクローリングされ、プラスミドは調製された。HEK293細胞系とCHOK1細胞系 (いずれもInvitrogenから購入) に対して、プラスミドトランスフェクション (PEI、Polysciencesから購入) をした後、10% (w/w) ウシ胎児血清を0.5 µg/ml含むDMEM培地において、選択的に2週間培養して、限界希釈法で96ウェル培養プレートでサブクローニングし、37℃、5% (v/v) CO₂で培養し、約2週間後、一部のモノクローナルウェルを選択して6ウェルプレートに増幅した。増幅後のクローンに対して、既知のTPBG抗体 (Sigmaから購入、カタログ番号#SAB1404485) で、フローサイトメトリーで選別した。成長が良好で、蛍光強度が高いモノクローナル細胞系を選択して、拡大培養を継続し、液体窒素により凍結して、免疫原Bを得た。具体的な選択結果は、表3と図1

10

20

30

40

50

に示される。対照IgGサブクラスは対照マウスIgGである。表3から、一連のTPBG発現陽性HEK293細胞系が作成されたことが明らかになる。図1では、横座標は細胞蛍光強度で、縦座標は細胞数である。図1の結果から分かるように、5E5E9はTPBGが高レベルで発現する細胞株である。ここで、抗TPBG抗体で標識された細胞は、平均細胞蛍光密度が216であり、移動度が98.5%である。

【 0 0 8 4 】

【 表 3 】

表3 ヒトTPBGタンパク質でトランスフェクトされたHEK293細胞のFACS選別
検出結果

	トランスフェクトされた細胞のクローン番号	細胞平均蛍光強度	
		対照IgGサブクラス	TPBG抗体
1	293F-hTPBG 4E1	5.2	145.0
2	293F-hTPBG 4A8	3.1	33.4
3	293F-hTPBG 4A9	6.3	203.9
5	293F-hTPBG 4B9	6.3	126.1
6	293F-hTPBG 4C3	3.2	27.2
7	293F-hTPBG 4C5	5.6	171.5
8	293F-hTPBG 4E1	4.8	91.8
9	293F-hTPBG 4F9	3.9	47.7
10	293F-hTPBG 4G1	4.0	131.2
11	293F-hTPBG 4G6	3.1	31.8
12	293F-hTPBG 4H12	4.0	9.5
13	293F-hTPBG 5E6	2.6	13.2
15	293F-hTPBG 5A11	4.6	166.5
16	293F-hTPBG 5A9	5.0	53.2
17	293F-hTPBG 5C12	3.7	75.4
18	293F-hTPBG 5D4	3.0	70.6
19	293F-hTPBG 5E5	5.6	280.5
20	293F-hTPBG 5G11	4.1	11.3
21	293F-hTPBG 5G8	6.0	167.8
22	293F-hTPBG 5H6	3.0	36.4

(三)、ハイブリドーマ細胞の調製及び抗体選別

A、免疫原Aによる免疫

6~8週齢のBALB/cAnNCrIマウス又はSJL/JorIIcoCrIマウス(いずれも上海SLAC会社から購入)を採用し、マウスをSPF条件で飼育した。初回の免疫に際しては、免疫原Aをフロイント完全アジュバントで乳化した後、0.25mL腹腔内注射し、すなわちマウス1匹毎に、免疫原Aタンパク50µgを注射した。強化免疫に際しては、免疫原Aをフロイント不完全アジ

ュバントで乳化した後、0.25mL腹腔内注射し、すなわちマウス1匹毎に、免疫原Aを50マイクログラム注射した。初回免疫と一回目の強化免疫との間は2週間を隔て、それから毎回の強化免疫を3週間を隔てて行った。毎回の強化免疫から1週間後に採血し、ELISA及びFACSにて血清における免疫原Aの抗体力価及び特異性を測定し、その結果を図5及び表4に示した。表4から明らかなように、免疫原Aで免疫されたマウスの免疫後血清はいずれも、免疫原Aに対して異なる程度で結合しており、抗原抗体反応を示し、そのうちの最高希釈度が百万程度であった。ここで、ブランク対照は1% (w/w) BSAであり、バッチとは二回目の強化免疫後から七日目のマウス血清のことを指し、表中のデータはOD_{450nm}値である。

【0085】

【表4】

表4 ELISA による TPBG タンパク免疫後の Balb/c マウス血清の抗体力価の測定

OD _{450nm}	血清希釈度							
	バッチ	1:100	1:10 ³	1:10 ⁴	1:10 ⁵	1:10 ⁶	1:10 ⁷	ブランク対照
731 (TB2)		2.8722	2.8084	2.8186	1.5772	0.3892	0.1201	0.0935
732 (TB2)		2.8715	2.8171	2.857	1.2767	0.2601	0.1353	0.0985
733 (TB2)		2.8411	2.8841	2.9258	1.7943	0.3336	0.1178	0.1418
734 (TB2)		2.8735	2.8503	2.861	1.3150	0.3052	0.1129	0.1365
735 (TB2)		2.9460	2.9859	2.9761	1.9749	0.4203	0.1463	0.1531

B、免疫原Bによる免疫

6~8週齢のBALB/cAnNCrIマウス又はSJL/JorllcoCrIマウス(いずれも上海SLAC会社から購入)を採用し、マウスをSPF条件で飼育した。ヒトTPBGの全長アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含有するpIRESプラスミド[実施例1の工程(二)を参照]でHEK293細胞系をトランスフェクトすることによって、ヒトTPBGを含有するHEK293安定細胞系を得た(トランスフェクトにはX-treme GENE HP DNA Transfection Reagentを使用し、Roche会社から購入し、品番号Cat #06 366 236 001、明細書に従って操作する)。T-75細胞培養ボトルで凝集度90%になるまで拡大培養を行い、培地をなくなるまで吸引して除去し、DMEM基礎培地(Invitrogenから購入)で2回洗浄し、その後、細胞がシャーレ壁から脱落可能になるまで、37℃で無酵素細胞解離液(Invitrogenから購入)を用いて処理し、細胞を回収した。DMEM基礎培地で2回洗浄し、細胞をカウントした後、リン酸塩緩衝液にて 2×10^7 cell/mLになるまで希釈した。免疫のたびに、マウス1匹毎に0.5mL細胞懸濁液を腹腔内注射した。一回目と二回目の免疫の間は2週間を隔て、それから毎回の免疫を3週間を隔てて行った。一回目の免疫以外、毎回の免疫から1週間後に採血し、FACSにて血清における抗体力価及び特異性を測定した。二回目の強化免疫の後、FACSによる血清の抗体力価が1:1000以上になった。

【0086】

工程A~Bを完成する前、最後の免疫のために、選ばれたマウス1匹毎に精製された免疫原A(免疫原Aに対して免疫反応を行うマウス)又はヒトTPBGを含有するHEK293安定細胞系(免疫原Bに対して免疫反応を行うマウス)を100マイクログラム腹腔内注射し、5日間後にマウスを殺死し、脾細胞を回収した。終濃度が1% (w/w) になるまでNH₄OHを加え、脾細胞にドープされた赤血球を分解し、脾細胞懸濁液を得た。DMEM基礎培地を用いて1000rpmで細胞を3回遠心洗浄し、その後活細胞数の比が5:1でマウス骨髄腫細胞SP2/0(ATCCから購入)と混合させ、高効率電気融合方法(METHODS IN ENZYMOLOGY, VOL. 220を参照)を用いて細胞融合を行った。融合後の細胞を20% (w/w) ウシ胎児血清、1×HATを含有するDMEM培地に希釈した。その後、 1×10^5 /200 μ L/wellで96ウェル細胞培養プレートに添加し、5% (v/v) CO₂、37℃のインキュベーターに入れて培養した。14日間後、ELISA及びAcumen

10

20

30

40

50

(マイクロウェルプレート細胞測定法)にて細胞融合プレートの上澄みを選別し、ELISAにおける $OD_{450nm} > 1.0$ の、及びAcumenにおけるMFI値 > 100 の陽性クローンを24ウェルプレートに増幅し、10% (w/w) HTウシ胎児血清を含有するDMEM (invitrogen) で、37、5% (v/v) CO_2 の条件で拡大培養した。3日間培養した後、24ウェルプレートで拡大培養した培養液を遠心し、上澄み液を回収し、上澄み液に対して抗体サブクラス分析を行い、ELISA、FACSを用いてTPBGタンパク及びTPBG陽性細胞に対する結合活性を確認し(結合活性の測定方法はそれぞれ実施例3Aと実施例3B中の関連内容を参照)、またマウスTPBG抗体-MMAFによる間接的細胞傷害実験を行った(間接的細胞傷害活性の測定方法は実施例4中の関連内容を参照)。

【0087】

24ウェルプレートの選別結果から、ELISA実験中の $OD_{450nm} > 1.0$ 、FACS実験中のMFI値 > 50 、及び間接的細胞傷害実験中のハイブリドーマ細胞を培養した上澄みのTPBG陽性細胞に対する傷害率50%になったハイブリドーマ細胞を選別して条件を満たす陽性クローンとし、条件を満たすハイブリドーマ細胞を選んで限界希釈法を利用して96ウェルプレートでサブクロニングを行い、10% (w/w) FBSを含有するDMEM培地 (invitrogenから購入) で37、5% (v/v) CO_2 の条件で培養した。サブクロニングから10日目にELISA及びAcumenで初期選別を行い、単一の陽性モノクローンを24ウェルプレートに増幅して培養を続けた。3日間後、FACSにより抗原結合陽性を確認し、マウスTPBG抗体-MMAFによる間接的細胞傷害実験により生体活性を評価し、評価基準は、ELISA実験において $OD_{450nm} > 1.0$ 、FACS実験においてMFI値 > 50 、並びに間接的細胞傷害実験においてハイブリドーマ細胞を培養した上澄みのTPBG陽性細胞に対する傷害率が50%及びそれ以上になることである。

【0088】

24ウェルプレートの試料測定結果から、最適なクローンを選別し、10% (w/w) FBSを含有するDMEM培地 (invitrogenから購入) で37、5% (v/v) CO_2 の条件で当該最適なクローンを拡大培養し、液体窒素で冷凍保管して本発明に係るハイブリドーマ細胞を得、次のリード抗体の獲得、抗体の生産及び精製に用いられる。

【0089】

実施例2 リード抗体の生産及び精製

ハイブリドーマ細胞による抗体濃度は、約1-10 $\mu g/mL$ と低く、濃度変化が大きく。また培地での細胞培養による多種類のタンパクや培地に含まれるウシ胎児血清は、多くの生体活性分析方法に対して異なる程度で障害するので、小規模(1-5mg)の抗体の生産精製を行う必要がある。

【0090】

実施例1で得られたハイブリドーマ細胞をT-75細胞培養ボトルに播種して生産培地 (Hybridoma serum free medium、Invitrogen会社から購入) で適応させて3代継代培養した。その成長状態が良好になったら、細胞培養ローラーボトルに播種した。2Lの培養ローラーボトル毎に生産培地200mLを添加し、播種細胞の密度が $1.0 \times 10^5/mL$ であった。蓋を固く締めて、ローラーボトルを37のインキュベーター中のセルローラーに置き、回転数を3rpmとした。14日間連続して回転培養した後、細胞培養液を回収し、細胞をろ過して除去し、0.45 μm のろ過膜で培養上澄み液が澄んだまでろ過し、澄んだハイブリドーマ細胞の培養上澄み液を得た。澄んだハイブリドーマ細胞の培養上澄み液は直ちに精製してもよく、或いは-30で冷凍保管してもよい。

【0091】

得られた培養上澄み液(200mL)におけるTPBG抗体を、2mLタンパクAカラム (GE Healthcareから購入) で精製した。タンパクGカラムを、まず平衡緩衝液 (PBSリン酸緩衝液、pH 7.4) で平衡化し、その後培養上澄み液をタンパクAカラムにロードし、流速を3mL/分に制御した。ロードが完了した後、平衡緩衝液によりタンパクGカラムを洗浄し、平衡緩衝液の体積がタンパクAカラムベッド体積の4倍であった。溶出液 (0.1Mクエン酸ナトリウム緩衝液、pH3.5) でタンパクAカラムに結合したTPBG抗体を溶出させ、紫外検出器を用いて溶出状況 (A_{280nm} 紫外吸収ピーク) をモニタリングした。溶出させた抗体を回収し、10% (v

10

20

30

40

50

/v) 1.0M Tris-HCl緩衝液を加えてpHを中和した直後、PBSリン酸緩衝液により一晚透析し、翌日液を1回換えて透析を3時間続いた。透析されたTPBG抗体を回収し、0.22 μmのフィルターで無菌ろ過し、無菌保管することにより、精製されたTPBG抗体を得た。

【0092】

精製されたTPBG抗体については、タンパク濃度 ($A_{280nm}/1.4$)、純度、エンドトキシン (Lonzaキット) などの検出分析を行い、結果を表5に示した。表5から明らかなように、抗体の最終製品におけるエンドトキシン濃度が1.0EU/mg以下であった。

【0093】

【表5】

表5 精製されたTPBG抗体の検出分析

クローン番号	抗体純度	タンパク濃度 (mg/mL)	エンドトキシン (EU/mg)
12B12C7C3	>90%	0.82	<0.12
5G4H10G5	>90%	0.68	<0.12
37H9C5G2	>90%	0.65	<0.12
39A11G5F2	>90%	0.85	<0.12
52C9E9F6	>90%	1.2	<0.12
28D4E6A9	>90%	1.02	<0.12
36A10D8B12	>90%	0.28	<0.12
99E12C7H1	>90%	1.12	<0.12
103E2E9C2	>90%	0.73	<0.12
106D5G3D10	>90%	0.54	<0.12

実施例3 リード抗体の検定

A、酵素結合免疫吸着実験 (ELISA) によるTPBG抗体とTPBGタンパクとの結合測定

実施例2で得られた精製されたTPBG抗体をヒトTPBG-hFcタンパク (免疫原A) と反応させた。

【0094】

実施例1で得られた精製された免疫原A (その調製方法は実施例1の工程 (一) を参照) をPBSで終濃度1.0 μg/mLになるまで希釈し、その後100 μL/wellで96ウェルELISAプレートに加えた。プラスチックフィルムにより密閉して4℃で一晩インキュベートし、翌日プレート洗浄液 [0.01% (v/v) Tween20を含有するPBS] で2回洗浄し、遮断液 [0.01% (v/v) Tween20及び1% (w/w) BSAを含有するPBS] を加えて室温で2時間遮断した。遮断液を流し、100 μL/wellで実施例2で得られた精製されたTPBG抗体を加えた。37℃で2時間インキュベートした後、プレート洗浄液 [0.01% (v/v) Tween20を含有するPBS] で3回洗浄した。HRP (ホースラディッシュパーオキシダーゼ) 標識二次抗体 (Sigmaから購入) を加え、37℃で2時間インキュベートした後、プレート洗浄液 [0.01% (v/v) Tween20を含有するPBS] で3回洗浄した。100 μL/wellでTMB基質を加え、室温で30分間インキュベートした後、100 μL/wellで停止液 (1.0N HCl) を加えた。ELISAプレートリーダー (SpectraMax 384plus、Molecular Deviceから購入) で A_{450nm} の数値を読み、結果を図6及び表6に示した。表6から明らかなように、精製されたTPBG抗体とTPBG組換えタンパクとはELISAレベルで結合した。表6におけるIgG対照は、対照マウスIgGであり、表中のデータは OD_{450nm} 値であり、BlankとはプレートでPBS緩衝液のみがあるときの OD_{450nm} 値である。

【0095】

【表 6】

表 6 ELISA による TPBG 抗体とヒト TPBG-hFc タンパクとの結合反応の測定

OD _{450nm}	抗体濃度 (nM)							
	200	20	2	0.2	0.02	0.002	0.0002	Blank
クローン番号								
12B12C7C3	2.82	2.83	2.84	1.67	0.29	0.13	0.10	0.11
5G4H10G5	2.72	2.80	2.68	1.76	0.34	0.10	0.08	0.07
37H9C5G2	2.61	2.63	2.52	1.55	0.35	0.11	0.09	0.09
39A11G5F2	2.55	2.50	2.43	1.36	0.30	0.11	0.09	0.09
52C9E9F6	2.65	2.69	2.68	1.39	0.27	0.12	0.09	0.08
28D4E6A9	2.60	2.59	2.64	1.97	0.46	0.14	0.10	0.09
36A10D8B12	2.51	3.07	3.06	2.15	0.51	0.18	0.16	0.19
99E12C7H1	2.93	2.88	2.93	2.62	0.78	0.21	0.11	0.08
103E2E9C2	2.60	2.62	2.64	1.89	0.48	0.14	0.10	0.13
106D5G3D10	2.88	2.82	2.81	2.36	0.56	0.16	0.11	0.10
IgG 対照	0.24	0.11	0.10	0.11	0.10	0.10	0.11	0.11

10

B、フローサイトメトリー実験 (FACS) による TPBG 抗体と TPBG 発現細胞との結合測定

実施例1の工程(二)で記載のヒトTPBGの全長アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含有するpIRESプラスミドでCHOK1細胞株をトランスフェクトしてヒトTPBGを含有するCHOK1安定細胞株(ここで、CHOK1-hPD1安定細胞株という)を得た。同様に、サルTPBG全長遺伝子を含有するpIRESプラスミド(その調製方法は、実施例1の工程(一)“免疫原Aの調製”におけるヒトIgG Fc断片(hFc)を含有するpCpCベクターの調製方法と同じである。蟹食猿TPBGの全長アミノ酸配列(Genebank ID: BAE00432.1))でCHOK1細胞株をトランスフェクトしてサルTPBGを含有するCHOK1安定細胞株(ここで、CHOK1-cTPBG安定細胞株という)を得た。マウスTPBG全長遺伝子を含有するpIRESプラスミド(その調製方法は、実施例1の工程(一)“免疫原Aの調製”におけるヒトIgG Fc断片(hFc)を含有するpCpCベクターの調製方法と同じである。マウスTPBG全長アミノ酸配列(Genebank ID: CAA09931.1))でCHOK1細胞株をトランスフェクトしてマウスTPBGを含有するCHOK1安定細胞株(ここで、CHOK1-mTPBG安定細胞株という)を得た。

20

30

【0096】

FACSにより血清におけるTPBG抗体の力価及び特異性を測定し、測定方法は実施例1の工程(二)“免疫原Bの調製”におけるHEK293-hTPBG安定細胞株の同定方法を参照した。測定結果を表7及び図2~4に示し、図2~4は横座標が細胞蛍光強度で、縦座標が細胞数である。ここで、CHOK1-hTPBG 3A2F1は選別のためのヒトTPBG発現細胞株であり、そのFACS選別測定結果を図2に示し、CHOK1-cTPBG 3F13G4は選別のための蟹食猿TPBG発現細胞株であり、そのFACS選別測定結果を図3に示し、CHOK1-mTPBG 3A3は選別のためのマウスTPBG発現細胞株であり、そのFACS選別測定結果を図4に示した。表7の結果から明らかなように、CHOK1-hTPBG安定細胞株、CHOK1-cTPBG安定細胞株及びCHOK1-mTPBG安定細胞株の細胞膜ではそれぞれヒト、サル又はマウスのTPBGタンパクを過剰発現し、TPBG抗体の選別に用いられる。

40

【0097】

【表 7】

表 7 ヒト/サル/マウス TPBG でトランスフェクトされた CHOK1 細胞の FACS 選別測定結果

トランスフェクト細胞のクローン番号	細胞平均蛍光強度	
	対照 IgG	抗 TPBG 抗体
CHOk1-hTPBG 3A2F1	3.24	798.37
CHOk1-cTPBG 3F13G4	2.66	198.35
CHOk1-mTPBG 3A3	2.38	135.25

10

CHOk1-hTPBG安定細胞株、CHOk1-cTPBG安定細胞株、CHOk1-mTPBG安定細胞株（すなわち表7に示されたCHOk1-hTPBG 3A2F1、CHOk1-cTPBG 3F13G4及びCHOk1-mTPBG 3A3）及びCHOK1細胞をそれぞれT-75細胞培養ボトルで凝集度90%になるまで拡大培養を行い、培地をなくなるまで吸引して除去し、HBSS緩衝液（Hanks Balanced Salt Solution）（Invitrogenから購入）で2回洗浄し、その後、無酵素細胞解離液（Versene solution：Life technology会社から購入）を用いて処理し、細胞を回収した。HBSS緩衝液で細胞を2回洗浄し、細胞をカウントした後、HBSS緩衝液で 2×10^6 cell/mLになるまで希釈し、10%ヤギ血清遮断液を加え（前記パーセントが質量パーセントである）、氷で30分間インキュベートした後、HBSS緩衝液で2回遠心洗浄した。回収された細胞をFACS緩衝液（HBSS+1%BSA、前記パーセントが質量パーセントである）で 2×10^6 cell/mLになるまで懸濁させ、100 μ L/wellで96ウェルFACS反応板に加え、100 μ L/wellで実施例2で得られた精製されたTPBG抗体検査試料を加え、氷で2時間インキュベートした。FACS緩衝液で2回遠心洗浄し、100 μ L/wellで蛍光（Alexa 488）標識二次抗体（Invitrogenから購入）を加え、氷で1時間インキュベートした。FACS緩衝液で3回遠心洗浄し、100 μ L/wellで固定液[4%（v/v）パラホルムアルデヒド]を加えて細胞を再懸濁させ、10分間後にFACS緩衝液で2回遠心洗浄した。100 μ LのFACS緩衝液により細胞を懸濁させ、FACS（FACS Calibur、BD会社から購入）を用いて結果を測定して分析した。ソフトウェア（CellQuest）でデータ解析を行い、細胞の平均蛍光強度（MFI）を得た。さらに、ソフトウェア（GraphPad Prism5）で解析、データフィッティングを行い、EC50値を算出した。分析結果を表8及び図7～10に示し、図7～10のデータが細胞の平均蛍光強度（MFI）である。表8におけるデータはMFIから算出したEC50値であった。表8から明らかのように、TPBG抗体は細胞表面のTPBGタンパクと結合できた。

20

30

【 0 0 9 8 】

【表 8】

表 8 FACS による TPBG 抗体とヒト/サル/マウス TPBG 発現細胞株との結合活性の分析

クローン番号	EC50 (nM)			
	CHOK1-hTPBG	CHOK1-cTPBG	CHOK1-mTPBG	CHOK1
12B12C7C3	0.65	0.59	陰性	陰性
5G4H10G5	1.75	0.84	9.07	陰性
37H9C5G2	0.94	0.62	11.05	陰性
39A11G5F2	2.34	1.35	1.88	陰性
52C9E9F6	3.27	1.54	陰性	陰性
28D4E6A9	0.63	0.25	陰性	陰性
36A10D8B12	0.94	0.60	陰性	陰性
99E12C7H1	3.54	2.29	陰性	陰性
103E2E9C2	0.85	0.83	陰性	陰性
106D5G3D10	1.72	1.26	陰性	陰性

10

20

実施例4 TPBG抗体薬物共役体の細胞傷害活性実験

実施例2で得られた精製されたTPBG抗体をpH6.5~8.5のホウ酸ナトリウム緩衝液で透析した後、トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン(TCEP)を加え(ただし、TCEPと精製されたTPBG抗体とのモル比率は2である)、室温で1時間還元して、反応液Aを得た。反応液AをG25カラム(GEから購入)にて脱塩し、不要なTCEPを除去して、反応液Bを得た。反応液BにMC-MMAF(南京聯寧から購入)を加え(ただし、MC-MMAFと精製されたTPBG抗体とのモル比率は5である)、室温で4時間反応した。更に、不要なMC-MMAFを中和するようにシステインを加え、G25カラム脱塩によって不要な低分子を除去して、精製されたTPBG抗体薬物共役体を得た(共役方法はDoronina、2006、BioconjugateChem.17,114~124を参照)。HICにより薬物の架橋率、純度などのパラメータを分析した後、細胞毒性活性分析を行った。抗体共役体の薬物架橋率(DAR)は、いずれも8である。ここで、DAR(drugAntibody ratio)とは、抗体共役後の一つの抗体分子が有する低分子薬の平均数をいう。

30

40

【0099】

得られた精製されたTPBG抗体薬物共役体をそれぞれFull培地を使用して段階希釈し、96ウェル細胞培養プレートに、2000cells/wellでTPBG陽性NCI-H1568細胞株の(ATCCから購入、カタログ番号#CRL5876)細胞懸濁液100 μ lを加え、一晚培養した後、ウェルごとに、濃度の異なる精製されたTPBG抗体薬物共役体の希釈液10 μ lを加え、続いて5日間培養した後、CellTiter-Gloキット(Promegaから購入、使用方法は製品説明を参照)を使用して、細胞活力を検出した。同時に、TPBG陰性腫瘍細胞系NCI-H1770(ATCCから購入、カタログ番号#CRL5893)を選択して、上述したように、細胞傷害活性を検出した。結果は表9及び図11~12に示される。ここで、表9におけるEC50とは、医薬が作用した後、細胞の活性が抑えられた半数効果用量であり、細胞の活性を検出することで細胞傷害活性を反映することができる。ここで、図11Aと11Bは、TPBG陽性腫瘍細胞系NCI-H1568に対する精製されたTPBG抗体薬物共役体の細胞傷害活性の検出であり、図12Aと12Bは、TPBG陰性腫瘍細胞系NCI-H1770に対する精製されたTPBG抗体薬物共役体の細胞傷害活性の検出である。その結果から、精製されたTPBG抗体薬物共役体は、TPBG陽性細胞に対する傷害作用を有することが明らかになる。

50

【 0 1 0 0 】

その他、実施例4におけるTPBG抗体薬物共役体の細胞傷害活性の検出方法と同じ方法で、実施例2で得られた精製されたTPBG抗体を単独で使用した場合の細胞に対する傷害作用を検出した。結果は、表9及び図11Cに示される。その結果から、単独で使用した精製されたTPBG抗体はTPBG陽性細胞に対して著しい傷害作用を有していないことが明らかになる。

【 0 1 0 1 】

【表9】

表9 細胞傷害実験によるTPBG陽性細胞に対する精製されたTPBG抗体薬物共役体の特異性傷害作用の検出

クローン番号	架橋率	EC50 (nM)	
		NCI-1568 (+)	NCI-1770 (-)
12B12C7C3-MMAF	8	0.042	陰性
5G4H10G5-MMAF	8	0.626	陰性
37H9C5G2-MMAF	8	0.120	陰性
39A11G5F2-MMAF	8	0.285	陰性
52C9E9F6-MMAF	8	1.485	陰性
28D4E6A9-MMAF	8	0.038	陰性
36A10D8B12-MMAF	8	0.066	陰性
99E12C7H1-MMAF	8	0.844	陰性
103E2E9C2-MMAF	8	0.135	陰性
106D5G3D10-MMAF	8	0.208	陰性
12B12C7C3	0	陰性	陰性
5G4H10G5	0	陰性	陰性
39A11G5F2	0	陰性	陰性
28D4E6A9	0	陰性	陰性
36A10D8B12	0	陰性	陰性

10

20

実施例5 競合ELISAによるTPBG抗体と抗原のエピトーププロファイルの検出分析

30

抗原に対する抗体の結合部位を検証するために、ELISA競合法でTPBG抗体をグルーピングした。

【 0 1 0 2 】

精製された検出抗体を、PBSで1 µg/mLに希釈し、50 µL/wellで96ウェル酵素高吸着酵素標記プレートを被覆し、4 で一晩被覆した後、250 µLブロッキング液[0.01% (v/v) Tween20と1% (w/w) BSAを含むPBS]で、室温で一時間ブロッキングし、ウェルごとに、0.05 µg/mLのビオチンで標記された組換えTPBGタンパク質を加えた。同時に、5 µg/mLの競合抗体を加え、実施例2で得られた精製されたTPBG抗体を得た。そのクローン番号は、それぞれ12B12C7C3、5G4H10G5、37H9C5G2、39A11G5F2、52C9E9F6、28D4E6A9、36A10D8B12、99E12C7H1、103E2E9C2、106D5G3D10である。そして、25~37 で1~2時間インキュベートした。プレート洗浄液[0.01% (v/v) Tween20を含むPBS]でプレートを3回洗浄し、HRP (ホースラディッシュペルオキシダーゼ)で標記されたストレプトアビジン (Sigmaから購入)を加えた。37 で0.5時間インキュベートした後、プレート洗浄液[0.01% (v/v) Tween20を含むPBS]でプレートを3回洗浄した。TMB基質を100 µL/well加え、室温で30分間インキュベートした後、停止液 (1.0N HCl) を100 µL/well加えた。ELISAプレートリーダー (SpectraMax 384plus、Molecular Deviceから購入) でA_{450nm}値を読み取り、結果を図6に示す。A_{450nm}値から、互いの、抗体同士の競合率を算出し、結果を表10に示す。競合率の値が高いほど、二つの抗体同士の抗原表面が近いことを表している。

40

【 0 1 0 3 】

【表 10】

表 10 TPBG 抗体同士の競合率

A \ B	12B12 C7C3	106D5 G3D10	5G4H1 OG5	99E12 C7H1	37H9C 5G2	36A10 D8B12	39A11 G5F2	52C9E 9F6	28D4E 6A9	103E2 E9C2
12B12 C7C3	97%	96%	47%	25%	1%	3%	0%	4%	74%	0%
106D5 G3D10	95%	94%	40%	11%	3%	1%	1%	0%	1%	0%
5G4H1 OG5	9%	3%	97%	95%	5%	1%	10%	19%	-1%	2%
99E12 C7H1	11%	12%	95%	94%	5%	8%	1%	0%	38%	1%
37H9C 5G2	6%	4%	12%	7%	96%	94%	3%	5%	58%	38%
36A10 D8B12	21%	14%	17%	25%	96%	85%	4%	23%	86%	40%
39A11 G5F2	9%	4%	19%	16%	0%	0%	96%	95%	0%	0%
52C9E 9F6	27%	7%	32%	18%	4%	19%	97%	97%	17%	0%
28D4E 6A9	24%	5%	11%	11%	0%	75%	0%	0%	96%	88%
103E2 E9C2	0%	0%	7%	3%	23%	31%	0%	0%	95%	88%

10

20

ここで、Aとは、各行が被覆抗体であり、濃度が1 μ g/mLであることをいう。Bとは、各行が競合抗体であり、濃度が5 μ g/mLであることをいう。

30

【0104】

結果から、12B12C7C3と106D5G3D10とは互いに競合できる類似するエピトープであり、5G4H1OG5と99E12C7H1とは互いに競合できる類似するエピトープであり、37H9C5G2と36A10D8B12とは互いに競合できる類似するエピトープであり、39A11G5F2と52C9E9F6とは互いに競合できる類似するエピトープであり、28D4E6A9と103E2E9C2とは互いに競合できる類似するエピトープであることが明らかになる。

【0105】

実施例6 軽鎖重鎖可変領域のアミノ酸配列の測定

total RNA分離：遠心遠心分離によって実施例1で得られたハイブリドーマを 5×10^7 個回収し、1mL Trizolを加え、均一に混合して1.5mL遠心チューブに移し、室温で5分間静置した。クロロホルム0.2mLを加え、15秒振とうして、10分間静置してから4、12000gで5分間遠心した。上清を取り、新しい1.5mL遠心チューブに移した。イソプロパノールを0.5mL加え、チューブ内の液を軽く均一に混合して、室温で10分間静置した後、4、12000gで15分間遠心し、上澄を廃棄した。75% (v/v) エタノールを1mL加え、軽く沈殿物をリンスし、4、12000gで5分間遠心してから上澄を廃棄した。沈殿物を乾してからDEPCで処理したH₂Oを加え、溶解（10分間の55℃水浴で溶解を促進）して、total RNAを得た。

40

【0106】

逆転写とPCR：total RNAを1 μ g取り、20 μ Lシステムを配置し、逆転写酵素を加え、42℃で60分間反応し、70℃で10分間反応して反応を停止した。1 μ L LCDNA、各種のプライマー25pmol、1 μ L DNAポリメラーゼ及び対応する緩衝システム、250 μ mol dNTPsを含む50 μ L P

50

CRシステムを配置し、PCRプログラムを設置し、95 で3分間予変性して、95 で30秒変性し、55 で30秒アニーリングし、72 で35秒伸ばし、35個のサイクルをした後、72 でさらに5分間伸ばして、PCR生成物を得た。ここで、逆転写に使用するキットはPrimeScript RT Master Mix (Takaraから購入、カタログ番号はRR036) である。PCRに使用するキットは、Q5ハイパフォーマンス酵素 (NEBから購入、カタログ番号M0492) を含んでいる。

【0107】

クローンとシーケンシング：PCR生成物を5 μ L取り、アガロースゲル電気泳動を行った。検出した陽性試料をカラム回収キットを使用して精製した。ここで、回収キットはNucleoSpin (登録商標) Gel & PCR Clean-up (MACHEREY-NAGELから購入、カタログ番号740609) である。架橋反応 (試料50ng、Tベクター50ng、架橋酵素0.5 μ L、緩衝液1 μ L、反応システム10 μ L) を行い、16 で半時間反応して、架橋生成物を得た。ここで、架橋キットは、T4 DNA架橋酵素 (NEBから購入、カタログ番号M0402) である。架橋生成物を5 μ L取り、100 μ Lのコンピテント細胞 (Ecos 101competentCells、Yeasternから購入、カタログ番号FYE607) に加え、5分間氷浴してから、42 で1分間水浴熱激し、再び氷上に置いて、1分間後、抗生物質のないSOC培地を650 μ L加え、37 でシェーカー上に200RPMのスピードで30分間蘇生した。200 μ Lを取り出し、抗生物質を含むLB固体培地に塗布してから37 でインキュベータで一晩培養した。翌日、Tベクター上プライマーM13FとM13Rを使用して、30 μ LPCRシステムを配置し、コロニーPCRをして、ピペットのヘッドにより、コロニーをディップしてPCR反応システムにおいて吹出吸込し、0.5 μ Lを吸込してもう一つの100nMアンピシリンを含むLB固体培養皿に点在して、菌株を保存した。PCR反応終了した後、5 μ Lを取り出し、アガロースゲル電気泳動を行い、陽性試料に対してシーケンシングと分析 [Kab at、"Sequences of Proteins of Immunological Interest、" National Institutes of Health、Bethesda、Md. (1991) を参照] を行った。シーケンシング結果は、表11~12に示される。

【0108】

【表11】

表11 TPBG 抗体タンパク質配列番号

クローン番号	重鎖タンパク質				軽鎖タンパク質			
	可変領域	CDR1	CDR2	CDR3	可変領域	CDR1	CDR2	CDR3
12B12C7C3	1	2	3	4	5	6	7	8
5G4H10G5	9	10	11	12	13	14	15	16
37H9C5G2	17	18	19	20	21	22	23	24
39A11G5F2	25	26	27	28	29	30	31	32
52C9E9F6	33	34	35	36	37	38	39	40
28D4E6A9	41	42	43	44	45	46	47	48
36A10D8B12	49	50	51	52	53	54	55	56
99E12C7H1	57	58	59	60	61	62	63	64
103E2E9C2	65	66	67	68	69	70	71	72
106D5G3D10	73	74	75	76	77	78	79	80

ここで、表11における数は、配列表における配列番号である。例えば、12B12C7C3の重鎖タンパク質可変領域のアミノ酸配列はSEQ ID No.1であり、12B12C7C3の重鎖タンパク質可変領域におけるCDR1のアミノ酸配列はSEQ ID No.2である。

【0109】

【表 1 2】

表 12 TPBG 抗体遺伝子配列番号

クローン番号	重鎖タンパク質可 変領域	軽鎖タンパク質可 変領域
12B12C7C3	81	82
5G4H10G5	83	84
37H9C5G2	85	86
39A11G5F2	87	88
52C9E9F6	89	90
28D4E6A9	91	92
36A10D8B12	93	94
99E12C7H1	95	96
103E2E9C2	97	98
106D5G3D10	99	100

10

ここで、表12における数は、配列表における配列番号である。例えば、12B12C7C3の重鎖タンパク質可変領域をコードするヌクレオチド配列はSEQ ID No.81である。

【 0 1 1 0】

20

ここで、12B12C7C3の重鎖タンパク質可変領域におけるCDR1をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.81における91位から105位までであり；

12B12C7C3の重鎖タンパク質可変領域におけるCDR2をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.81における151位から198位までであり；

12B12C7C3の重鎖タンパク質可変領域におけるCDR3をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.81における295位から327位までであり；

12B12C7C3の軽鎖タンパク質可変領域におけるCDR1をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.82における70位から114位までであり；

12B12C7C3の軽鎖タンパク質可変領域におけるCDR2をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.82における157位から180位までであり；

30

12B12C7C3の軽鎖タンパク質可変領域におけるCDR3をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.82における277位から303位までであり；

5G4H10G5の重鎖タンパク質可変領域におけるCDR1をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.83における91位から105位までであり；

5G4H10G5の重鎖タンパク質可変領域におけるCDR2をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.83における148位から198位までであり；

5G4H10G5の重鎖タンパク質可変領域におけるCDR3をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.83における295位から330位までであり；

5G4H10G5の軽鎖タンパク質可変領域におけるCDR1をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.84における70位から102位までであり；

40

5G4H10G5の軽鎖タンパク質可変領域におけるCDR2をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.84における148位から168位までであり；

5G4H10G5の軽鎖タンパク質可変領域におけるCDR3をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.84における265位から288位までであり；

37H9C5G2の重鎖タンパク質可変領域におけるCDR1をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.85における91位から105位までであり；

37H9C5G2の重鎖タンパク質可変領域におけるCDR2をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.85における151位から198位までであり；

37H9C5G2の重鎖タンパク質可変領域におけるCDR3をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.85における295位から327位までであり；

50

37H9C5G2の軽鎖タンパク質可変領域におけるCDR1をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.86における70位から102位までであり；

37H9C5G2の軽鎖タンパク質可変領域におけるCDR2をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.86における148位から168位までであり；

37H9C5G2の軽鎖タンパク質可変領域におけるCDR3をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.86における265位から291位までである。

【 0 1 1 1 】

39A11G5F2の重鎖タンパク質可変領域におけるCDR1をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.87における91位から105位までであり；

39A11G5F2の重鎖タンパク質可変領域におけるCDR2をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.87における151位から198位までであり；

39A11G5F2の重鎖タンパク質可変領域におけるCDR3をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.87における295位から315位までであり；

39A11G5F2の軽鎖タンパク質可変領域におけるCDR1をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.88における70位から102位までであり；

39A11G5F2の軽鎖タンパク質可変領域におけるCDR2をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.88における148位から168位までであり；

39A11G5F2の軽鎖タンパク質可変領域におけるCDR3をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.88における265位から291位までである。

【 0 1 1 2 】

52C9E9F6の重鎖タンパク質可変領域におけるCDR1をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.89における91位から105位までであり；

52C9E9F6の重鎖タンパク質可変領域におけるCDR2をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.89における151位から198位までであり；

52C9E9F6の重鎖タンパク質可変領域におけるCDR3をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.89における295位から315位までであり；

52C9E9F6の軽鎖タンパク質可変領域におけるCDR1をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.90における70位から102位までであり；

52C9E9F6の軽鎖タンパク質可変領域におけるCDR2をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.90における148位から168位までであり；

52C9E9F6の軽鎖タンパク質可変領域におけるCDR3をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.90における268位から291位までである。

【 0 1 1 3 】

28D4E6A9の重鎖タンパク質可変領域におけるCDR1をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.91における91位から105位までであり；

28D4E6A9の重鎖タンパク質可変領域におけるCDR2をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.91における148位から198位までであり；

28D4E6A9の重鎖タンパク質可変領域におけるCDR3をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.91における295位から327位までであり；

28D4E6A9の軽鎖タンパク質可変領域におけるCDR1をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.92における70位から102位までであり；

28D4E6A9の軽鎖タンパク質可変領域におけるCDR2をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.92における148位から168位までであり；

28D4E6A9の軽鎖タンパク質可変領域におけるCDR3をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.92における265位から291位までである。

【 0 1 1 4 】

36A10D8B12の重鎖タンパク質可変領域におけるCDR1をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.93における91位から108位までであり；

36A10D8B12の重鎖タンパク質可変領域におけるCDR2をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.93における154位から198位までであり；

10

20

30

40

50

36A10D8B12の重鎖タンパク質可変領域におけるCDR3をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.93における295位から324位までであり；

36A10D8B12の軽鎖タンパク質可変領域におけるCDR1をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.94における70位から102位までであり；

36A10D8B12の軽鎖タンパク質可変領域におけるCDR2をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.94における148位から168位までであり；

36A10D8B12の軽鎖タンパク質可変領域におけるCDR3をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.94における265位から291位までである。

【 0 1 1 5 】

99E12C7H1の重鎖タンパク質可変領域におけるCDR1をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.95における91位から105位までであり；

99E12C7H1の重鎖タンパク質可変領域におけるCDR2をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.95における151位から198位までであり；

99E12C7H1の重鎖タンパク質可変領域におけるCDR3をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.95における295位から318位までであり；

99E12C7H1の軽鎖タンパク質可変領域におけるCDR1をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.96における70位から102位までであり；

99E12C7H1の軽鎖タンパク質可変領域におけるCDR2をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.96における148位から168位までであり；

99E12C7H1の軽鎖タンパク質可変領域におけるCDR3をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.96における265位から291位までである。

【 0 1 1 6 】

103E2E9C2の重鎖タンパク質可変領域におけるCDR1をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.97における91位から105位までであり；

103E2E9C2の重鎖タンパク質可変領域におけるCDR2をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.97における151位から198位までであり；

103E2E9C2の重鎖タンパク質可変領域におけるCDR3をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.97における295位から324位までであり；

103E2E9C2の軽鎖タンパク質可変領域におけるCDR1をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.98における70位から105位までであり；

103E2E9C2の軽鎖タンパク質可変領域におけるCDR2をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.98における151位から171位までであり；

103E2E9C2の軽鎖タンパク質可変領域におけるCDR3をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.98における268位から294位までである。

【 0 1 1 7 】

106D5G3D10の重鎖タンパク質可変領域におけるCDR1をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.99における91位から105位までであり；

106D5G3D10の重鎖タンパク質可変領域におけるCDR2をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.99における151位から198位までであり；

106D5G3D10の重鎖タンパク質可変領域におけるCDR3をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.99における295位から318位までであり；

106D5G3D10の軽鎖タンパク質可変領域におけるCDR1をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.100における70位から99位までであり；

106D5G3D10の軽鎖タンパク質可変領域におけるCDR2をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.100における145位から165位までであり；

106D5G3D10の軽鎖タンパク質可変領域におけるCDR3をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.100における262位から294位までである。

【 0 1 1 8 】

実施例7 マウス-ヒトキメラ抗体の構築、並びに抗体の生産及び精製

1. プラスミドの構築と準備

10

20

30

40

50

実施例6にかかるシーケンシングの結果に応じて、TPBG抗体の重鎖可変領域と軽鎖可変領域の配列を明らかにした。実施例2と実施例3で得られたリード抗体の重鎖可変領域の配列を、信号ペプチド及びヒト抗体重鎖IgG1定常領域を含む発現ベクターに組み換え（ただし、発現ベクターが、Invitrogenから購入され、組換え工程も、上海睿智化学会社によってなされる）、TPBG抗体の軽鎖可変領域の配列を、信号ペプチド及びヒト抗体軽鎖kappaの定常領域を含む発現ベクターに組み換え、組換えプラスミドを取得し、シーケンシングによって検証した（シーケンシング方法は、実施例6におけるシーケンシング方法と同じである）。アルカリ溶菌法によって、キット（MACHERY-NAGELから購入）から、純度が向上した組換えプラスミドを質量500 µg以上量り取り、0.22 µmのろ過膜（Milloporeから購入）によって濾過し、トランスフェクションに供する。

10

【0119】

2. 細胞のトランスフェクション

培地Freestyle 293 expression medium（Invitrogenから購入）に、293E細胞（Invitrogenから購入）を培養する。シェーカーは、37 °C、130RPM、及び8%CO₂（v/v）とされる。Freestyle 293 expression mediumは、トランスフェクション時に、10%（v/v）F68（Invitrogenから購入）が、F68終濃度が0.1%（v/v）になるまで加えられることによって、0.1%（v/v）F68を含むFreestyle 293発現培地、即ち、培地Aを得た。培地A 5mLとPEI（Sigmaから購入）200 µg/mLとを均一に混合することで、培地Bを得た。培地A 5mLと、工程（1）で得られた組換えプラスミド100 µg/mLとを均一に混合することで、培地Cを得た。5分間後、培地Bと培地Cとを合わせて均一に混合し、15分間静置し、混合液Dを得た。10mLの混合液Dを、293Eの細胞密度が1.5 × 10⁶個/mLになるまで、100mLの293E細胞を含む培地Freestyle 293 expression mediumに徐々に加えるながら、振動することで、PEIが集中しすぎること回避し、そして、シェーカーに入れて培養を行った。翌日、ペプトンを、終濃度が0.5%（w/v）になるまで加えた。5～7日目、培養液抗体力価を測定した。6～7日目、上澄を遠心（3500RPM、30分間）収集し、0.22 µmろ過膜によって濾過することで、濾過した細胞上澄液を取得し、精製に供する。

20

【0120】

3. 抗体精製

連続して生産した内毒素のないカラム及びProtein Aフィルターに対して、0.1MのNaOHで30分間処理し、もしくは5つのカラム容量が0.5MのNaOHで洗い流した。また、長期間に亘り使用していないカラム材とカラムに対して、少なくとも1MのNaOHで1時間含浸し、内毒素のない水で中性になるまで洗い流し、10倍カラム容量の1%Triton X100でカラム材を洗浄した。5つのカラム容量のPBSで平衡し、濾過した細胞上澄をカラムにロードし、必要に応じてフロースルーを収集した。カラムロードが完成した後、5倍カラム容量のPBSで洗浄した。5倍カラム容量の0.1MのpH3.0のGlycine-HClによって溶離して、溶離液を収集し、1/10容量のpH8.5の1M Tris-HCl（1.5M NaCl）によって中和した。抗体を取得した後、1 × PBSに一晩透析し、内毒素汚染を回避した。透析が終了した後、分光光度又はキットで濃度を測定し、HPLC-SECで抗体純度を測定し、内毒素検出キット（Lonzaから購入）によって抗インビボ毒素含有量を検出した。

30

【0121】

下記の実施例において、キメラ抗体の名付けでは、前段の文字は、対応するリード抗体のクローン番号の頭3～5桁の文字を使用し、例えば、キメラ抗体12B12-MMAFが対応するリード抗体のクローン番号は、12B12C7C3であり、キメラ抗体5G4-MMAFが対応するリード抗体のクローン番号は、5G4H10G5である。

40

【0122】

実施例8 キメラ抗体のインビトロ薬効実験

実施例7で得られた精製されたTPBGキメラ抗体とMC-MMAFとを共役し、方法は実施例4と同じであり、pH6.5～8.5のホウ酸ナトリウムバッファーで透析した後、トリス（2-カルボキシエチル）ホスフィン（TCEP）を加え（ただし、TCEPと精製されたTPBG抗体とのモル比率は2である）、室温で1時間還元して、反応液Aを得た。反応液AをG25カラム（GEから購

50

入)にて脱塩し、不要なTCEPを除去して、反応液Bを得た。反応液Bに、MC-MMAF(ただし、MC-MMAFと精製されたTPBG抗体とのモル比率は5である)を加え、室温で4時間反応した。さらに、不要なMC-MMAFを中和するように、システインを加え、G25カラム脱塩によって不要な低分子を除去した。精製されたTPBG抗体薬物共役体を得た(共役方法は、Doronina, 2006, Bioconjugate Chem. 17, 114-124を参照)。HICにより薬物架橋率を分析し、SECにより抗体薬物共役体の純度等のパラメータを分析した後、細胞毒性活性の分析を行った。抗体共役体の全ての薬物架橋率(DAR)は3.0~5.0である。ここで、DAR(drug antibody ratio)とは、抗体共役後の一つの抗体分子が有する低分子薬の平均数をいう。

【0123】

得られた精製されたTPBG抗体薬物共役体を、それぞれ完全培地で段階希釈し、96ウェル細胞培養用プレートに、2000細胞/ウェルでTPBG陽性NCI-H1299細胞株(ATCCから購入、カタログ番号#CRL5803)細胞懸濁液100 μ lを加え、一晚培養した後、ウェルごとに、濃度の異なる精製されたTPBGキメラ抗体薬物共役体の希釈液10 μ lを加え、続いて5日間培養した後、CellTiter-Gloキット(Promegaから購入、使用方法は製品説明を参照)を使用して、細胞活力を検出した。結果は表13及び図13に示される。ここで、表13におけるIC50とは、薬物が作用した後、細胞の活性が抑えられた半数効果用量であり、細胞の活性を検出することで細胞傷害活性を反映することができる。図13は、TPBG陽性腫瘍細胞系NCI-H1299に対する精製されたTPBGキメラ抗体薬物共役体の細胞傷害活性の検出である。その結果から、精製されたTPBG抗体薬物共役体は、TPBG陽性細胞に対する傷害作用を有することが明らかになる。

【0124】

【表13】

表13 細胞傷害実験によるTPBG陽性NCI-H1299細胞に対する精製されたTPBGキメラ抗体薬物共役体の特異性傷害作用の検出

試料名	架橋率	IC50 (nM)
		NCI-H1299 (+)
キメラ抗体 12B12-MMAF		0.13
キメラ抗体 5G4-MMAF		87.27
キメラ抗体 39A11-MMAF		4.30
キメラ抗体 28D4-MMAF		0.21
キメラ抗体 36A10-MMAF		0.70
対照 hIgG-MMAF		>100

実施例9 キメラ抗体のインビボ薬効実験

NCI-H1299(非小細胞肺癌細胞株、ATCC、CRL-5803)(5×10^6 個)200 μ lをBalb/c nudeマウスの右脇の皮下に接種し、7~10日を経過し腫瘍が200mm³まで成長した後、体重、腫瘍における多すぎるもの、及び小さすぎるものを除き、腫瘍体積に応じて、マウスをランダムにいくつかのグループに分け、グループごとに7匹がある。D0から抗体を尾静脈注射し、4日あたりに1回、計4回で薬物を投与し、1周あたりに腫瘍体積を2回計測し、マウスの体重を量り、データを記録した。腫瘍体積(V)の算出式は、 $V = 1/2 \times a \times b^2$ であり、ただし、a、bは、それぞれ長さ、幅を表す。表14のようにグループ分けを行う。

【0125】

【表 14】

表 14 TPBG キメラ抗体及びその抗体薬物共役体のインビボ薬効実験

グループ	動物の数 (匹)	処理グループ	ドーズ (mg/kg)	注射体積 (μ l/g)	薬物投与 のルート	薬物投与 の手配
1	7	溶媒対照	—	10	尾静脈注射 i. v.	4日あたりに1回の薬物投与×4回
2	7	キメラ抗体 12B12-MMAF	1	10	尾静脈注射 i. v.	4日あたりに1回の薬物投与×4回
3	7	キメラ抗体 12B12-MMAF	10	10	尾静脈注射 i. v.	4日あたりに1回の薬物投与×4回
4	7	キメラ抗体 5G4-MMAF	1	10	尾静脈注射 i. v.	4日あたりに1回の薬物投与×4回
5	7	キメラ抗体 5G4-MMAF	10	10	尾静脈注射 i. v.	4日あたりに1回の薬物投与×4回
6	7	キメラ抗体 39A11-MMAF	1	10	尾静脈注射 i. v.	4日あたりに1回の薬物投与×4回
7	7	キメラ抗体 39A11-MMAF	10	10	尾静脈注射 i. v.	4日あたりに1回の薬物投与×4回
8	7	キメラ抗体 28D4-MMAF	1	10	尾静脈注射 i. v.	4日あたりに1回の薬物投与×4回
9	7	キメラ抗体 28D4-MMAF	10	10	尾静脈注射 i. v.	4日あたりに1回の薬物投与×4回

10

20

30

40

						回
10	7	キメラ抗体 36A10-MMAF	1	10	尾静脈注 射 i. v.	4日あたり に1回の薬 物投与×4 回
11	7	キメラ抗体 36A10-MMAF	10	10	尾静脈注 射 i. v.	4日あたり に1回の薬 物投与×4 回
12	7	キメラ抗体 12B12	10	10	尾静脈注 射 i. v.	4日あたり に1回の薬 物投与×4 回
13	7	キメラ抗体 5G4	10	10	尾静脈注 射 i. v.	4日あたり に1回の薬 物投与×4 回
14	7	キメラ抗体 39A11	10	10	尾静脈注 射 i. v.	4日あたり に1回の薬 物投与×4 回
15	7	キメラ抗体 28D4	10	10	尾静脈注 射 i. v.	4日あたり に1回の薬 物投与×4 回
16	7	キメラ抗体 36A10	10	10	尾静脈注 射 i. v.	4日あたり に1回の薬 物投与×4 回
17	7	対照 hIgG-MMAF	10	10	尾静脈注 射 i. v.	4日あたり に1回の薬 物投与×4 回

10

20

30

40

50

結果は、治療後の腫瘍の体積変化図である図14、及び治療後のマウス体重変化図である図15に示される。そのうち、図14A~Eは、それぞれキメラ抗体12B12、キメラ抗体5G4、キメラ抗体39A11、キメラ抗体28D4、キメラ抗体36A10の抗体薬物共役体及びその裸抗体による治療後の、腫瘍体積変化図である。図15A~Eは、それぞれキメラ抗体12B12、キメラ抗体5G4、キメラ抗体39A11、キメラ抗体28D4、キメラ抗体36A10の抗体薬物共役体及びその裸抗体による治療後の、マウス体重変化図である。その結果から、このいくつかの種類のADCは、腫瘍NCI-H1299の成長を好ましく抑制することができるとともに、マウスの体重に顕著な影響を与えないことが明らかになる。

【0126】

実施例10 異なるリンカー・毒素を共役した抗体共役体のインビトロ薬効実験

実施例7で得られた精製されたTPBGキメラ抗体12B12及び28D4を、それぞれMC-MMAF及びMC-VC-PAB-MMAEと共役し、方法は、実施例8と同じであり、pH6.5~8.5のホウ酸ナトリウム緩衝液で透析した後、トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン(TCEP)を加え(ただし、

TCEPと精製されたTPBG抗体とのモル比率は2である)、室温で1時間還元して、反応液Aを得た。反応液Aを、G25カラム(GEから購入)にて脱塩し、不要なTCEPを除去して、反応液Bを得た。反応液BにMC-MMAF又はMC-VC-PAB-MMAE(南京聯寧から購入)を加え(ただし、MC-MMAF又はMC-VC-PAB-MMAEと精製されたTPBG抗体とのモル比率は5である)、室温で4時間反応した。さらに、不要なMC-MMAF又はMC-VC-PAB-MMAEを中和するように、システインを加え、G25カラム脱塩によって不要な低分子を除去して、精製されたTPBGキメラ抗体薬物共役体、即ち、表に記載されたキメラ抗体12B12-MMAF、12B12-MMAE、28D4-MMAF、28D4-MMAEを得た(共役方法は、Doronina,2006,Bioconjugate Chem.17,114-124を参照)。HICにより薬物の架橋率を分析し、SECにより抗体薬物共役体の純度等のパラメータを分析した後、細胞毒性活性の分析を行った。

10

【0127】

実施例7で得られた精製されたTPBGキメラ抗体12B12及び28D4をそれぞれSMCCと共役した。実施例7で得られた精製されたTPBGキメラ抗体12B12及び28D4を、pH6.5~7.4のリン酸塩緩衝液で透析した後、体積比が30%のDMA(ジメチルアセトアミド)の存在下でスクシンイミジル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(SMCC)を加え(ただし、SMCCと精製されたTPBGキメラ抗体とのモル比率は8である)、室温で1時間反応して、反応液Aを得た。反応液AをG25カラム(GEから購入)にて脱塩し、不要な低分子を除去して、反応液Bを得た。反応液Bに終体積が10%のDMAを加え、そして、DM1(化学名は、N²'-デアセチル-N²'-3-メルカプト-1オキソプロピル-メイトンシンである)を加え(ただし、DM1と精製されたTPBG抗体とのモル比率は9である)、室温で3.5時間反応し、反応液Cを得た。反応液CをG25カラム(GEから購入)にて脱塩し、不要な低分子を除去し、精製されたTPBGキメラ抗体薬物共役体、即ち、表に記載されたキメラ抗体12B12-DM1、28D4-DM1を得た(共役方法は、US5208020を参照)。LC-MSにより薬物の架橋率を分析し、SECにより抗体薬物共役体の純度等のパラメータを分析した後、細胞毒性活性の分析を行い、キメラ抗体共役体の全ての薬物架橋率(DAR)は3.0~5.0である。ここで、DAR(drug antibody ratio)とは、抗体共役後の一つの抗体分子が有する低分子薬の平均数をいう。

20

【0128】

得られた精製されたTPBGキメラ抗体薬物共役体を、それぞれ完全培地で段階希釈し、96ウェル細胞培養用プレートに、2000細胞/ウェルでTPBG陽性NCI-H1299細胞株(ATCCから購入、カタログ番号#CRL5803)、又はNCI-H1568細胞株(ATCCから購入、カタログ番号#CRL-5876)細胞懸濁液100 μ lを加え、一晚培養した後、ウェルごとに、濃度の異なる精製されたTPBGキメラ抗体薬物共役体の希釈液10 μ lを加え、続いて5日間培養した後、CellTiter-Gloキット(Promegaから購入、使用方法は製品説明を参照)を使用して、細胞活力を検出した。結果は表15及び図16に示される。ここで、表15におけるIC₅₀とは、薬物が作用した後、細胞の活性が抑えられた半数効果用量であり、細胞の活性を検出することで細胞傷害活性を反映することができる。そのうち、図16Aと16Bは、それぞれTPBG陽性腫瘍細胞系NCI-H1299に対する精製されたTPBGキメラ抗体12B12及びその異なる低分子薬を共役した抗体薬物共役体の細胞傷害活性の検出である。図16Cと16Dは、それぞれTPBG陽性腫瘍細胞系NCI-H1568に対する精製されたTPBGキメラ抗体12B12及びその異なる低分子薬を共役した抗体薬物共役体の細胞傷害活性の検出である。その結果から、異なる低分子毒素を共役した精製されたTPBGキメラ抗体薬物共役体は、いずれもTPBG陽性細胞に対して異なる程度の傷害作用を有するとともに、MC-MMAFを共役したTPBGキメラ抗体薬物共役体は、低いIC₅₀を有し、その細胞傷害能力が最も強いことが明らかになる。

30

40

【0129】

【表 15】

表 15 細胞傷害実験による TPBG 陽性 NCI-H1299、NCI-H1568 細胞に対する精製された TPBG キメラ抗体薬物共役体の特異性傷害作用の検出

試料名	IC ₅₀ (nM)	
	NCI-H1299	NCI-H1568
キメラ抗体 12B12	なし	なし
キメラ抗体 12B12-MMAF	0.04	0.025
キメラ抗体 12B12-MMAE	>100	>100
キメラ抗体 12B12-DM1	10.42	1.271
キメラ抗体 28D4	なし	なし
キメラ抗体 28D4-MMAF	0.132	0.066
キメラ抗体 28D4-MMAE	368.6	>100
キメラ抗体 28D4-DM1	6.084	2.507

得られた精製されたTPBGキメラ抗体薬物共役体を、それぞれ完全培地で段階希釈し、96ウェル細胞培養用プレートに、2000細胞/ウェルでTPBGを発現する293-hTPBG安定発現細胞株（構築方法は、実施例1：免疫原Bの調製を参照）、及びTPBGを発現しない293細胞株（ATCCから購入、カタログ番号#CRL-1573）細胞懸濁液を100μl加え、一晚培養した後、ウェルごとに、濃度の異なる精製されたTPBGキメラ抗体薬物共役体の希釈液10μlを加え、続いて5日間培養した後、CellTiter-Gloキット（Promegaから購入、使用方法は製品説明を参照）を使用して、細胞活力を検出した。結果は表16及び図17に示される。ここで、表16におけるIC50とは、薬物が作用した後、細胞の活性が抑えられた半数効果用量であり、細胞の活性を検出することで細胞傷害活性を反映することができる。図17Aと17Bは、TPBG陽性のTPBGを発現する293-hTPBG安定発現細胞株に対する精製されたTPBGキメラ抗体薬物共役体の細胞傷害活性の検出である。図17Cと17Dは、TPBGを発現しない293細胞株に対する精製されたTPBGキメラ抗体薬物共役体の細胞傷害活性の検出である。その結果から、異なる低分子毒素を共役した精製されたTPBGキメラ抗体薬物共役体は、TPBG陽性細胞に対して異なる程度の傷害作用を有し、TPBG陰性の293細胞に対して細胞傷害作用を有していないことが認められ、TPBG陽性細胞に対する精製されたTPBGキメラ抗体薬物共役体の傷害が特異的であるとともに、MC-MMAFを共役したTPBGキメラ抗体薬物共役体は、低いIC50を有し、その細胞傷害能力が最も強いことが明らかになる。

【0130】

10

20

30

【表 16】

表 16 細胞傷害実験による TPBG 陽性の 293-hTPBG 及び TPBG 陰性の 293 細胞に対する精製された TPBG キメラ抗体薬物共役体の特異性傷害作用の検出

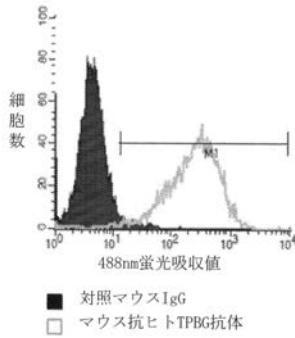
試料名	IC50 (nM)	
	293-TPBG	293
キメラ抗体 12B12	13.58	なし
キメラ抗体 12B12-MMAF	0.001	>100
キメラ抗体 12B12-MMAE	0.033	>100
キメラ抗体 12B12-DM1	0.154	8.885
キメラ抗体 28D4	1.137	なし
キメラ抗体 28D4-MMAF	0.024	>100
キメラ抗体 28D4-MMAE	0.08	>100
キメラ抗体 28D4-DM1	0.406	7.658

10

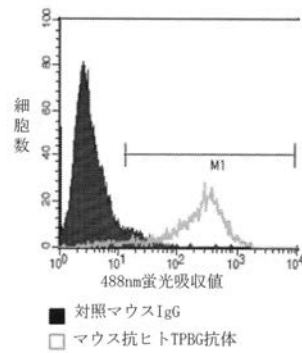
本発明の前述した内容を読んだ後、当業者は、本発明に対して、種々の変形、又は補正を行うことができ、これらの等価な形式も、同様に本願の特許請求の範囲に限定された範囲に含まれることを理解すべきである。

20

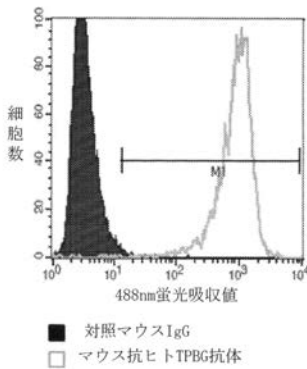
【図 1】



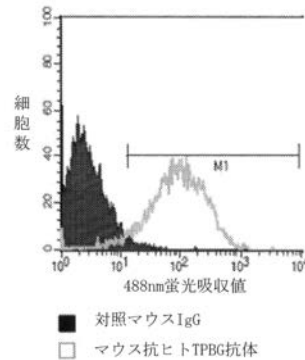
【図 3】



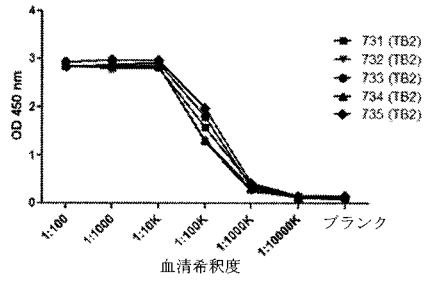
【図 2】



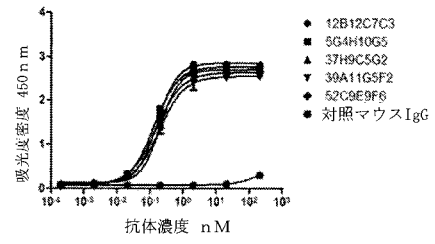
【図 4】



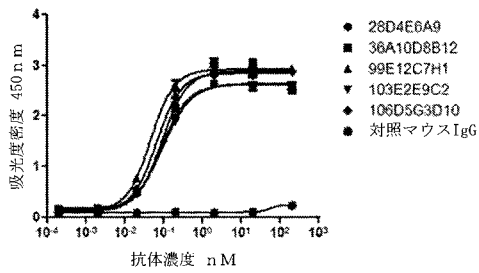
【 図 5 】



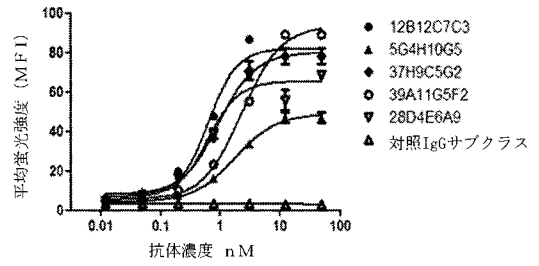
【 図 6 B 】



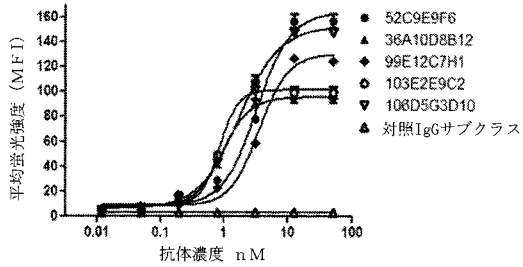
【 図 6 A 】



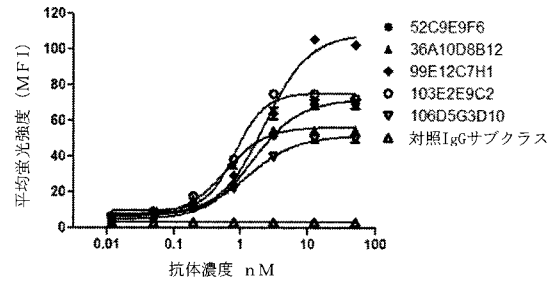
【 図 7 A 】



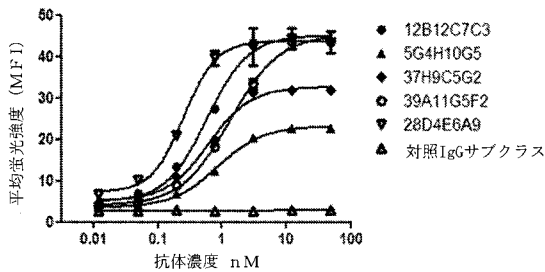
【 図 7 B 】



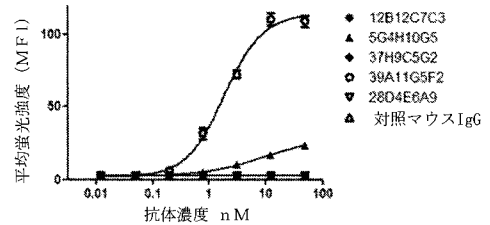
【 図 8 B 】



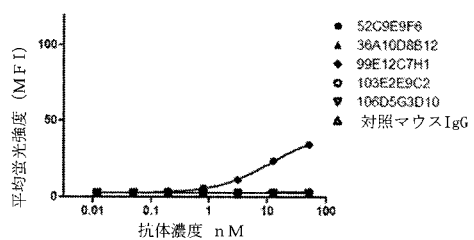
【 図 8 A 】



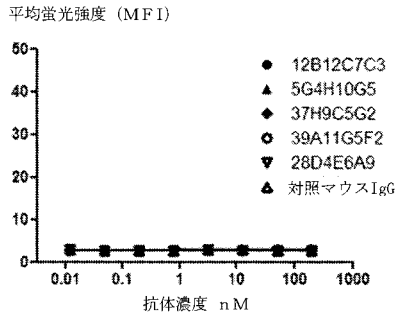
【 図 9 A 】



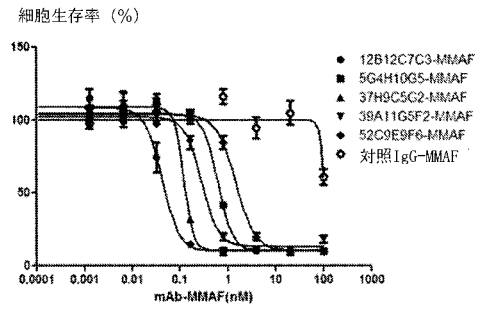
【 図 9 B 】



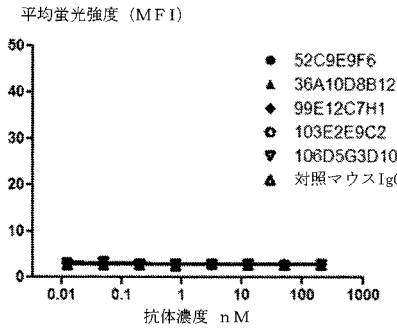
【図 1 0 A】



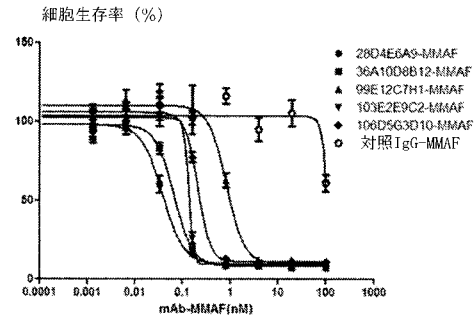
【図 1 1 A】



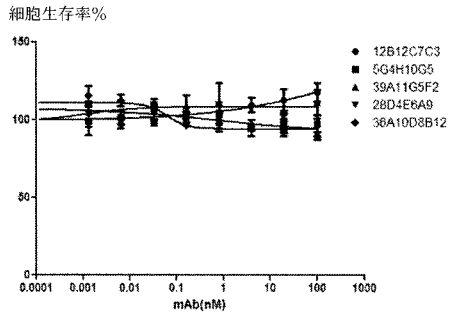
【図 1 0 B】



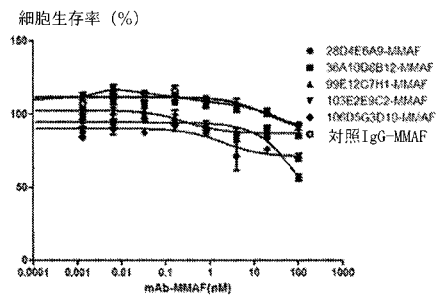
【図 1 1 B】



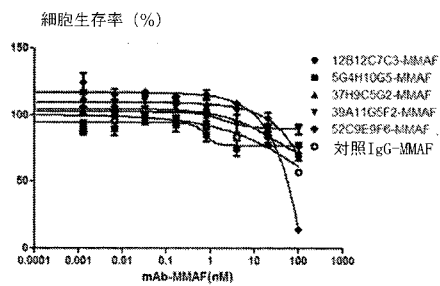
【図 1 1 C】



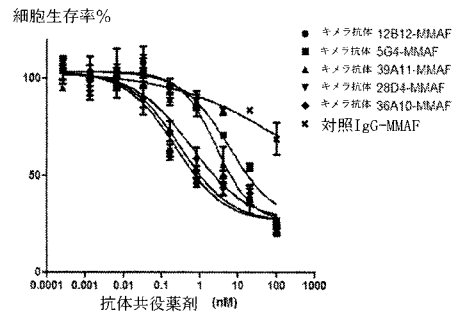
【図 1 2 B】



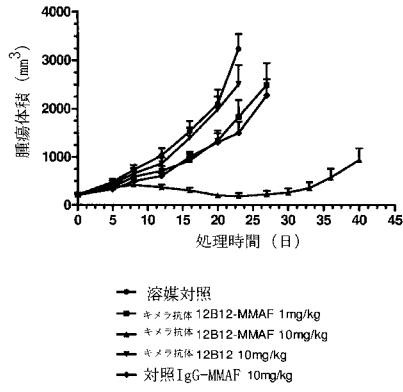
【図 1 2 A】



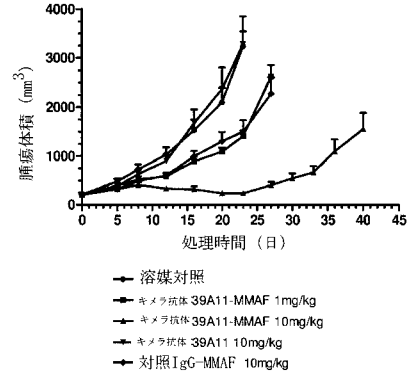
【図 1 3】



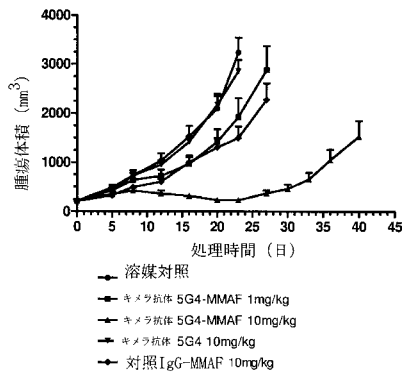
【図14A】



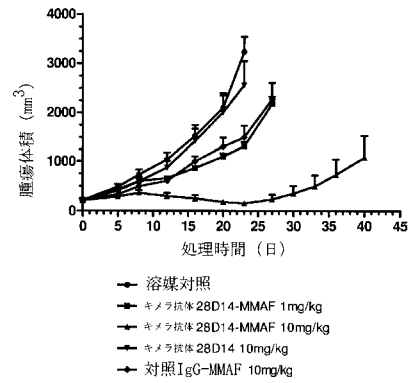
【図14C】



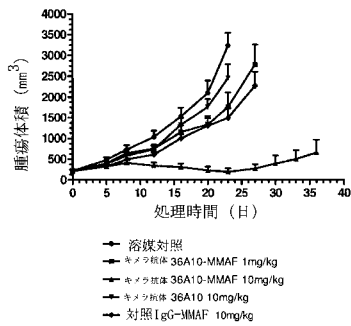
【図14B】



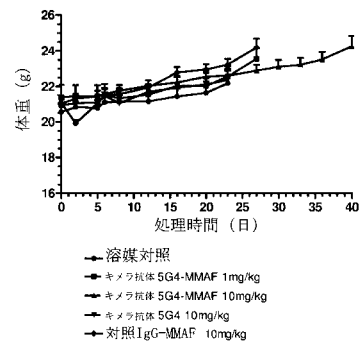
【図14D】



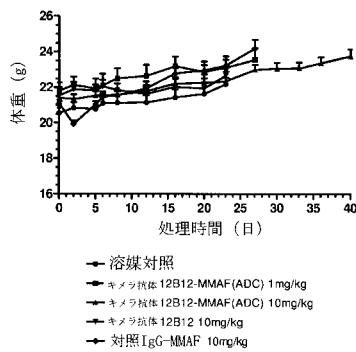
【図14E】



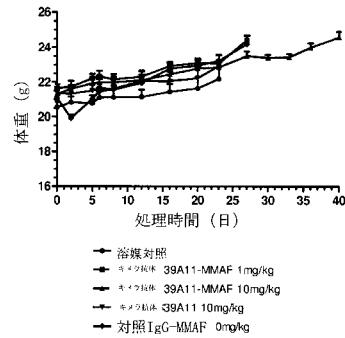
【図15B】



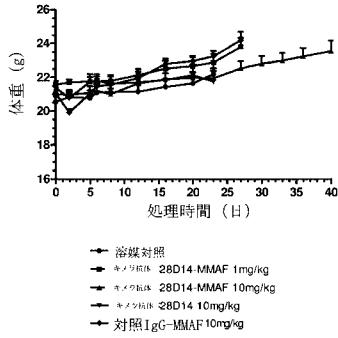
【図15A】



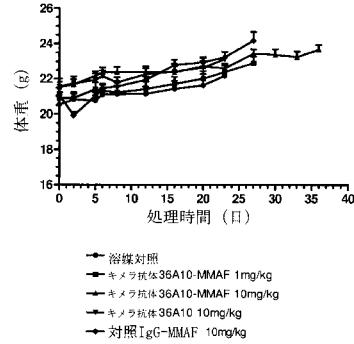
【図15C】



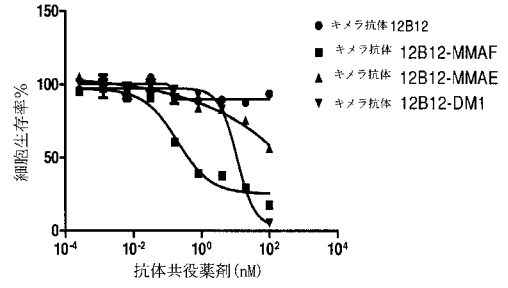
【図 1 5 D】



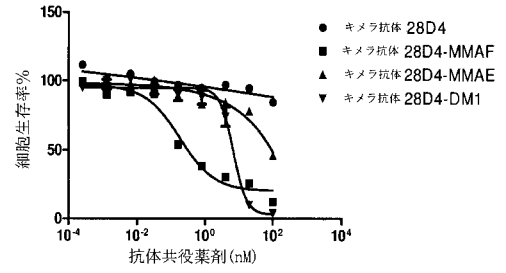
【図 1 5 E】



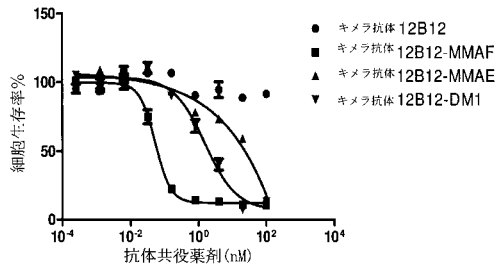
【図 1 6 A】



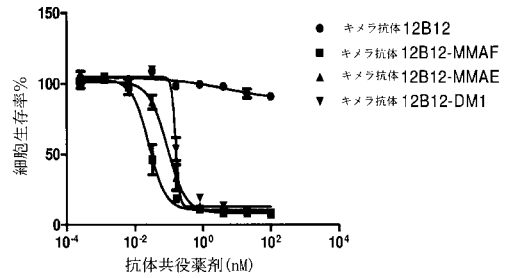
【図 1 6 B】



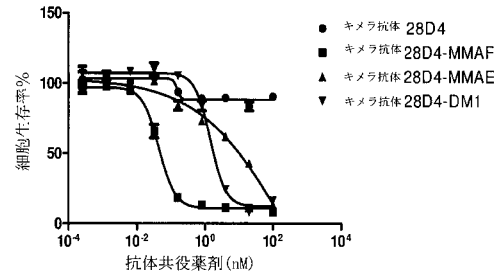
【図 1 6 C】



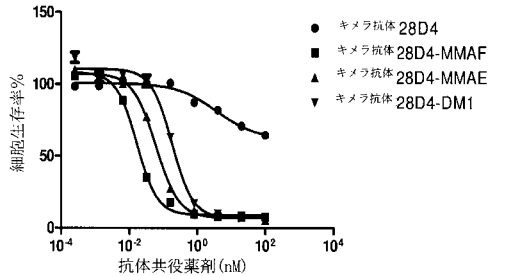
【図 1 7 A】



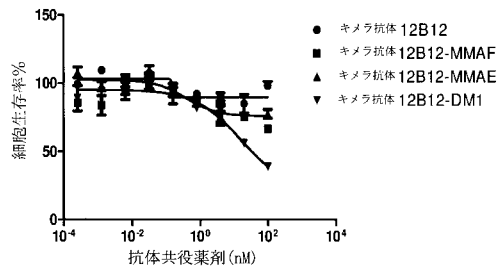
【図 1 6 D】



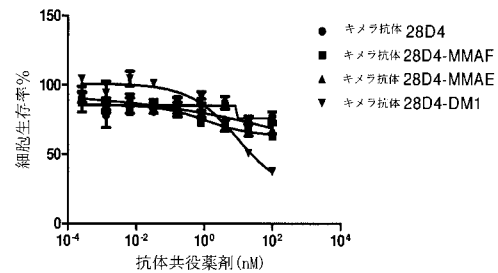
【図 1 7 B】



【 図 1 7 C 】



【 図 1 7 D 】



【 配列表 】

2019508023000001.app

【 手続補正書 】

【 提出日 】 平成30年8月27日 (2018.8.27)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】 特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】 全文

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

【 請求項 1 】

TPBG抗体の重鎖CDR1、重鎖CDR2及び重鎖CDR3の1又は複数の種類、及び/又は、TPBG抗体の軽鎖CDR1、軽鎖CDR2及び軽鎖CDR3の1又は複数の種類を含む分離したタンパク質であって、

前記重鎖CDR1のアミノ酸配列が、配列表におけるSEQ ID No.2、SEQ ID No.10、SEQ ID No.18、SEQ ID No.26、SEQ ID No.34、SEQ ID No.42、SEQ ID No.50、SEQ ID No.58、SEQ ID No.66又はSEQ ID No.74に示され、前記重鎖CDR2のアミノ酸配列が、配列表におけるSEQ ID No.3、SEQ ID No.11、SEQ ID No.19、SEQ ID No.27、SEQ ID No.35、SEQ ID No.43、SEQ ID No.51、SEQ ID No.59、SEQ ID No.67又はSEQ ID No.75に示され、前記重鎖CDR3のアミノ酸配列が、配列表におけるSEQ ID No.4、SEQ ID No.12、SEQ ID No.20、SEQ ID No.28、SEQ ID No.36、SEQ ID No.44、SEQ ID No.52、SEQ ID No.60、SEQ ID No.68又はSEQ ID No.76に示され、

前記軽鎖CDR1のアミノ酸配列が、配列表におけるSEQ ID No.6、SEQ ID No.14、SEQ ID No.22、SEQ ID No.30、SEQ ID No.38、SEQ ID No.46、SEQ ID No.54、SEQ ID No.62、SEQ ID No.70又はSEQ ID No.78に示され、前記軽鎖CDR2のアミノ酸配列が、配列表におけるS

EQ ID No.7、SEQ ID No.15、SEQ ID No.23、SEQ ID No.31、SEQ ID No.39、SEQ ID No.47、SEQ ID No.55、SEQ ID No.63、SEQ ID No.71又はSEQ ID No.79に示され、前記軽鎖CDR3のアミノ酸配列が、配列表におけるSEQ ID No.8、SEQ ID No.16、SEQ ID No.24、SEQ ID No.32、SEQ ID No.40、SEQ ID No.48、SEQ ID No.56、SEQ ID No.64、SEQ ID No.72又はSEQ ID No.80に示され、あるいは、

前記重鎖CDR1のアミノ酸配列が、配列表におけるSEQ ID No.2、SEQ ID No.10、SEQ ID No.18、SEQ ID No.26、SEQ ID No.34、SEQ ID No.42、SEQ ID No.50、SEQ ID No.58、SEQ ID No.66又はSEQ ID No.74に示されたアミノ酸配列と少なくとも80%の配列相同性を持つアミノ酸配列であり、前記重鎖CDR2のアミノ酸配列が、配列表におけるSEQ ID No.3、SEQ ID No.11、SEQ ID No.19、SEQ ID No.27、SEQ ID No.35、SEQ ID No.43、SEQ ID No.51、SEQ ID No.59、SEQ ID No.67又はSEQ ID No.75に示されたアミノ酸配列と少なくとも80%の配列相同性を持つアミノ酸配列であり、前記重鎖CDR3のアミノ酸配列が、配列表におけるSEQ ID No.4、SEQ ID No.12、SEQ ID No.20、SEQ ID No.28、SEQ ID No.36、SEQ ID No.44、SEQ ID No.52、SEQ ID No.60、SEQ ID No.68又はSEQ ID No.76に示されたアミノ酸配列と少なくとも80%の配列相同性を持つアミノ酸配列であり、

前記軽鎖CDR1のアミノ酸配列が、配列表におけるSEQ ID No.6、SEQ ID No.14、SEQ ID No.22、SEQ ID No.30、SEQ ID No.38、SEQ ID No.46、SEQ ID No.54、SEQ ID No.62、SEQ ID No.70又はSEQ ID No.78に示されたアミノ酸配列と少なくとも80%の配列相同性を持つアミノ酸配列であり、前記軽鎖CDR2のアミノ酸配列が、配列表におけるSEQ ID No.7、SEQ ID No.15、SEQ ID No.23、SEQ ID No.31、SEQ ID No.39、SEQ ID No.47、SEQ ID No.55、SEQ ID No.63、SEQ ID No.71又はSEQ ID No.79に示されたアミノ酸配列と少なくとも80%の配列相同性を持つアミノ酸配列であり、前記軽鎖CDR3のアミノ酸配列が、配列表におけるSEQ ID No.8、SEQ ID No.16、SEQ ID No.24、SEQ ID No.32、SEQ ID No.40、SEQ ID No.48、SEQ ID No.56、SEQ ID No.64、SEQ ID No.72又はSEQ ID No.80に示されたアミノ酸配列と少なくとも80%の配列相同性を持つアミノ酸配列であることを特徴とする、分離したタンパク質。

【請求項2】

前記重鎖CDR1のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.2に、前記重鎖CDR2のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.3に、且つ前記重鎖CDR3のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.4に示され、前記重鎖CDR1のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.10に、前記重鎖CDR2のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.11に、且つ前記重鎖CDR3のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.12に示され、前記重鎖CDR1のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.18に、前記重鎖CDR2のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.19に、且つ前記重鎖CDR3のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.20に示され、前記重鎖CDR1のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.26に、前記重鎖CDR2のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.27に、且つ前記重鎖CDR3のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.28に示され、前記重鎖CDR1のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.34に、前記重鎖CDR2のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.35に、且つ前記重鎖CDR3のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.36に示され、前記重鎖CDR1のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.42に、前記重鎖CDR2のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.43に、且つ前記重鎖CDR3のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.44に示され、前記重鎖CDR1のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.50に、前記重鎖CDR2のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.51に、且つ前記重鎖CDR3のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.52に示され、前記重鎖CDR1のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.58に、前記重鎖CDR2のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.59に、且つ前記重鎖CDR3のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.60に示され、前記重鎖CDR1のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.66に、前記重鎖CDR2のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.67に、且つ前記重鎖CDR3のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.68に示され、あるいは、前記重鎖CDR1のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.74に、前記重鎖CDR2のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.75に、且つ前記重鎖CDR3のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.76に示され、

前記軽鎖CDR1のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.6に、前記軽鎖CDR2のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.7に、且つ前記軽鎖CDR3のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.8に示

され、前記軽鎖CDR1のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.14に、前記軽鎖CDR2のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.15に、且つ前記軽鎖CDR3のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.16に示され、あるいは、前記軽鎖CDR1のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.22に、前記軽鎖CDR2のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.23に、且つ前記軽鎖CDR3のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.24に示され、前記軽鎖CDR1のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.30に、前記軽鎖CDR2のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.31に、且つ前記軽鎖CDR3のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.32に示され、前記軽鎖CDR1のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.38に、前記軽鎖CDR2のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.39に、且つ前記軽鎖CDR3のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.40に示され、前記軽鎖CDR1のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.46に、前記軽鎖CDR2のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.47に、且つ前記軽鎖CDR3のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.48に示され、前記軽鎖CDR1のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.54に、前記軽鎖CDR2のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.55に、且つ前記軽鎖CDR3のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.56に示され、前記軽鎖CDR1のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.62に、前記軽鎖CDR2のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.63に、且つ前記軽鎖CDR3のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.64に示され、前記軽鎖CDR1のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.70に、前記軽鎖CDR2のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.71に、且つ前記軽鎖CDR3のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.72に示され、あるいは、前記軽鎖CDR1のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.78に、前記軽鎖CDR2のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.79に、且つ前記軽鎖CDR3のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.80に示されたことを特徴とする、請求項1に記載の分離したタンパク質。

【請求項3】

TPBG抗体の重鎖可変領域及び/又はTPBG抗体の軽鎖可変領域を含み、前記重鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列表におけるSEQ ID No.1、SEQ ID No.9、SEQ ID No.17、SEQ ID No.25、SEQ ID No.33、SEQ ID No.41、SEQ ID No.49、SEQ ID No.57、SEQ ID No.65又はSEQ ID No.73に示され、前記軽鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列表におけるSEQ ID No.5、SEQ ID No.13、SEQ ID No.21、SEQ ID No.29、SEQ ID No.37、SEQ ID No.45、SEQ ID No.53、SEQ ID No.61、SEQ ID No.69又はSEQ ID No.77に示されたことを特徴とする、分離したタンパク質。

【請求項4】

前記重鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.1に、且つ前記軽鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.5に示され、前記重鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.9に、且つ前記軽鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.13に示され、前記重鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.17に、且つ前記軽鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.21に示され、前記重鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.25に、且つ前記軽鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.29に示され、前記重鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.33に、且つ前記軽鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.37に示され、前記重鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.41に、且つ前記軽鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.45に示され、前記重鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.49に、且つ前記軽鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.53に示され、前記重鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.57に、且つ前記軽鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.61に示され、前記重鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.65に、且つ前記軽鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.69に示され、あるいは、前記重鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.73に、且つ前記軽鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列表SEQ ID No.77に示されたことを特徴とする、請求項3に記載の分離したタンパク質。

【請求項5】

前記タンパク質は、抗体重鎖定常領域及び/又は抗体軽鎖定常領域をさらに含むことを特徴とする、請求項1～4のいずれか一項に記載の分離したタンパク質。

【請求項6】

前記抗体重鎖定常領域は、ヒト又はマウス抗体重鎖定常領域であり、前記抗体軽鎖定常領域は、ヒト又はマウス抗体軽鎖定常領域であることを特徴とする、請求項5に記載の分離したタンパク質。

【請求項7】

前記抗体重鎖定常領域は、ヒト抗体重鎖定常領域であり、前記抗体軽鎖定常領域は、ヒト抗体軽鎖定常領域であることを特徴とする、請求項6に記載の分離したタンパク質。

【請求項8】

前記タンパク質は、TPBG抗体、モノクローナル抗体、抗体全長タンパク、抗原抗体結合領域タンパク質断片、二重特異性抗体、多重特異性抗体、一本鎖抗体、単ドメイン抗体又は単一領域抗体であることを特徴とする、請求項1又は3に記載の分離したタンパク質。

【請求項9】

請求項1~7のいずれか一項に記載の分離したタンパク質をコードすることを特徴とする、核酸。

【請求項10】

前記重鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.81、配列表SEQ ID No.83、配列表SEQ ID No.85、配列表SEQ ID No.87、配列表SEQ ID No.89、配列表SEQ ID No.91、配列表SEQ ID No.93、配列表SEQ ID No.95、配列表SEQ ID No.97又は配列表SEQ ID No.99に示され、及び/又は、前記軽鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.82、配列表SEQ ID No.84、配列表SEQ ID No.86、配列表SEQ ID No.88、配列表SEQ ID No.90、配列表SEQ ID No.92、配列表SEQ ID No.94、配列表SEQ ID No.96、配列表SEQ ID No.98又は配列表SEQ ID No.100に示されたことを特徴とする、請求項9に記載の核酸。

【請求項11】

前記重鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.81に、且つ前記軽鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.82に示され、前記重鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.83に、且つ前記軽鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.84に示され、前記重鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.85に、且つ前記軽鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.86に示され、前記重鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.87に、且つ前記軽鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.88に示され、前記重鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.89に、且つ前記軽鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.90に示され、前記重鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.91に、且つ前記軽鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.92に示され、前記重鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.93に、且つ前記軽鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.94に示され、前記重鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.95に、且つ前記軽鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.96に示され、前記重鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.97に、且つ前記軽鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.98に示され、あるいは、前記重鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.99に、且つ前記軽鎖可変領域をコードする核酸のヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.100に示されたことを特徴とする、請求項10に記載の核酸。

【請求項12】

請求項9~11のいずれか一項に記載の核酸を含む、組換え発現ベクター。

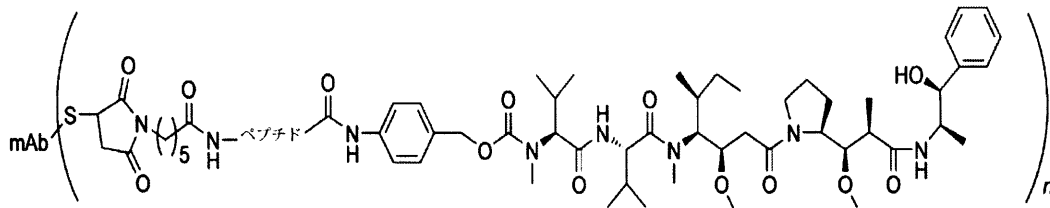
【請求項13】

請求項12に記載の組換え発現ベクターを含む、組換え発現形質転換体。

【請求項14】

請求項13に記載の組換え発現形質転換体を培養し、培養物からTPBG抗体を得る工程を含

) であり、
【化 3】



式 5

式5中、Lはマレイミドカプロイル-L-パリン-L-シトルリンp-アミノベンジルアルコールであり、DはメチルアウリスタチンE (MMAE) であり、
ただし、nは自然数である。

【請求項 19】

請求項15～18のいずれか一項に記載の免疫共役体と、薬学的に許容可能なベクターとを含むことを特徴とする、医薬組成物。

【請求項 20】

前記医薬組成物は、請求項1～7のいずれか一項に記載の分離したタンパク質0.01～99.99%と、薬用ベクター0.01～99.99%とを含み、前記%は、前記医薬組成物に占める質量百分率であることを特徴とする、請求項19に記載の医薬組成物。

【請求項 21】

腫瘍の予防及び治療に用いられる請求項1～7のいずれか一項に記載の分離したタンパク質。

【請求項 22】

請求項15～18のいずれか一項に記載の免疫共役体であって、前記免疫共役体に含まれる分離したタンパク質が腫瘍の予防及び治療に用いられる免疫共役体。

【請求項 23】

請求項19又は20に記載の医薬組成物であって、前記医薬組成物に含まれる分離したタンパク質が腫瘍の予防及び治療に用いられる免疫共役体。

【請求項 24】

請求項1～7のいずれか一項に記載の分離したタンパク質を、検査試料とインビトロで接触させ、請求項1～7のいずれか一項に記載の分離したタンパク質と前記検査試料の結合を検出すれば良い工程を含むことを特徴とする、TPBGタンパク質を過剰発現する細胞の検出方法。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0023

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0023】

ここで、12B12C7C3の重鎖蛋白可変領域におけるCDR1をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.81中の91位～105位であり、

12B12C7C3の重鎖蛋白可変領域におけるCDR2をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.81中の148位～198位であり、

12B12C7C3の重鎖蛋白可変領域におけるCDR3をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.81中の295位～327位であり、

12B12C7C3の軽鎖蛋白可変領域におけるCDR1をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.82中の70位～114位であり、

12B12C7C3の軽鎖蛋白可変領域におけるCDR2をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.82中の160位～180位であり、

12B12C7C3の軽鎖蛋白可変領域におけるCDR3をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.82中の277位～303位であり、

5G4H10G5の重鎖蛋白可変領域におけるCDR1をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.83中の91位～105位であり、

5G4H10G5の重鎖蛋白可変領域におけるCDR2をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.83中の148位～198位であり、

5G4H10G5の重鎖蛋白可変領域におけるCDR3をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.83中の295位～330位であり、

5G4H10G5の軽鎖蛋白可変領域におけるCDR1をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.84中の70位～102位であり、

5G4H10G53の軽鎖蛋白可変領域におけるCDR2をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.84中の148位～168位であり、

5G4H10G5の軽鎖蛋白可変領域におけるCDR3をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.84中の265位～288位であり、

37H9C5G2の重鎖蛋白可変領域におけるCDR1をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.85中の91位～105位であり、

37H9C5G2の重鎖蛋白可変領域におけるCDR2をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.85中の148位～198位であり、

37H9C5G2の重鎖蛋白可変領域におけるCDR3をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.85中の295位～327位であり、

37H9C5G2の軽鎖蛋白可変領域におけるCDR1をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.86中の70位～102位であり、

37H9C5G2の軽鎖蛋白可変領域におけるCDR2をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.86中の148位～168位であり、

37H9C5G2の軽鎖蛋白可変領域におけるCDR3をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.86中の265位～291位。

【**手続補正3**】

【**補正対象書類名**】明細書

【**補正対象項目名**】0024

【**補正方法**】変更

【**補正の内容**】

【0024】

39A11G5F2の重鎖蛋白可変領域におけるCDR1をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.87中の91位～105位であり、

39A11G5F2の重鎖蛋白可変領域におけるCDR2をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.87中の148位～198位であり、

39A11G5F2の重鎖蛋白可変領域におけるCDR3をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.87中の295位～315位であり、

39A11G5F2の軽鎖蛋白可変領域におけるCDR1をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.88中の70位～102位であり、

39A11G5F2の軽鎖蛋白可変領域におけるCDR2をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.88中の148位～168位であり、

39A11G5F2の軽鎖蛋白可変領域におけるCDR3をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.88中の265位～291位。

【**手続補正4**】

【**補正対象書類名**】明細書

【**補正対象項目名**】0025

【**補正方法**】変更

【**補正の内容**】

【0025】

52C9E9F6の重鎖蛋白可変領域におけるCDR1をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.89中の91位～105位であり、

52C9E9F6の重鎖蛋白可変領域におけるCDR2をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.89中の148位～198位であり、

52C9E9F6の重鎖蛋白可変領域におけるCDR3をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.89中の295位～315位であり、

52C9E9F6の軽鎖蛋白可変領域におけるCDR1をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.90中の70位～102位であり、

52C9E9F6の軽鎖蛋白可変領域におけるCDR2をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.90中の148位～168位であり、

52C9E9F6の軽鎖蛋白可変領域におけるCDR3をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.90中の265位～291位。

【**手続補正5**】

【**補正対象書類名**】明細書

【**補正対象項目名**】0027

【**補正方法**】変更

【**補正の内容**】

【0027】

36A10D8B12の重鎖蛋白可変領域におけるCDR1をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.93中の91位～108位であり、

36A10D8B12の重鎖蛋白可変領域におけるCDR2をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.93中の151位～198位であり、

36A10D8B12の重鎖蛋白可変領域におけるCDR3をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.93中の295位～324位であり、

36A10D8B12の軽鎖蛋白可変領域におけるCDR1をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.94中の70位～102位であり、

36A10D8B12の軽鎖蛋白可変領域におけるCDR2をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.94中の148位～168位であり、

36A10D8B12の軽鎖蛋白可変領域におけるCDR3をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.94中の265位～291位である。

【**手続補正6**】

【**補正対象書類名**】明細書

【**補正対象項目名**】0028

【**補正方法**】変更

【**補正の内容**】

【0028】

99E12C7H1の重鎖蛋白可変領域におけるCDR1をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.95中の91位～105位であり、

99E12C7H1の重鎖蛋白可変領域におけるCDR2をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.95中の148位～198位であり、

99E12C7H1の重鎖蛋白可変領域におけるCDR3をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.95中の295位～318位であり、

99E12C7H1の軽鎖蛋白可変領域におけるCDR1をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.96中の70位～102位であり、

99E12C7H1の軽鎖蛋白可変領域におけるCDR2をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.96中の148位～168位であり、

99E12C7H1の軽鎖蛋白可変領域におけるCDR3をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.96中の265位～291位である。

【**手続補正7**】

【**補正対象書類名**】明細書

【補正対象項目名】 0 0 2 9

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【 0 0 2 9 】

103E2E9C2の重鎖蛋白可変領域におけるCDR1をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.97中の91位～105位であり、

103E2E9C2の重鎖蛋白可変領域におけるCDR2をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.97中の148位～198位であり、

103E2E9C2の重鎖蛋白可変領域におけるCDR3をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.97中の295位～324位であり、

103E2E9C2の軽鎖蛋白可変領域におけるCDR1をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.98中の70位～105位であり、

103E2E9C2の軽鎖蛋白可変領域におけるCDR2をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.98中の151位～171位であり、

103E2E9C2の軽鎖蛋白可変領域におけるCDR3をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.98中の268位～294位である。

【手続補正 8】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0 0 3 0

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【 0 0 3 0 】

106D5G3D10の重鎖蛋白可変領域におけるCDR1をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.99中の91位～105位であり、

106D5G3D10の重鎖蛋白可変領域におけるCDR2をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.99中の148位～198位であり、

106D5G3D10の重鎖蛋白可変領域におけるCDR3をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.99中の295位～318位であり、

106D5G3D10の軽鎖蛋白可変領域におけるCDR1をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.100中の70位～99位であり、

106D5G3D10の軽鎖蛋白可変領域におけるCDR2をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.100中の145位～165位であり、

106D5G3D10の軽鎖蛋白可変領域におけるCDR3をコードするヌクレオチド配列が、配列表SEQ ID No.100中の262位～294位である。

【手続補正 9】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0 0 8 1

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【 0 0 8 1 】

実施例1 TPBG抗体の調製

(一)、免疫原Aの調製

ヒトTPBGタンパク質の細胞外領域のアミノ酸配列32-355 (Ser32-Ser355) (ただし、ヒトTPBGタンパク質をコードするヌクレオチド配列のGenebankにおける番号はGenebank ID: AAH37161.1) をコードするヌクレオチド配列を含む核酸をヒトIgG Fc断片 (hFc) を有するpCpCベクター (Invitrogenから購入、V044-50) にクローリングし、既知の標準分子生物学方法により、プラスミドを調製した。具体的な方法はSambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition (Plainview, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press) を参照のこと。HEK293細胞 (Invitrogenから購入) に対して、一過性トランスフェクト (Transient transfecti

on) (ポリエーテルイミド、PEI、Polysciencesから購入)を行い、FreeStyle TM 293 (Invitrogenから購入)を使用して、37℃で拡大培養した。4日後、細胞培養液を回収し、遠心分離して細胞成分を除去して、TPBGタンパク質細胞外領域を含む培養上澄を得た。培養上澄をタンパク質Aアフィニティーカラム (Mabselect Sure、GE Healthcareから購入) に仕込みし、同時に紫外線 (UV) 検出計により紫外線吸収値 (A280nm) の変化を検出する。仕込み後、タンパク質Aアフィニティーカラムを、PBSリン酸塩緩衝液 (pH7.2) で、紫外線吸収値が基準線に戻るまで洗浄した。そして、0.1Mグリシン塩酸 (pH2.5) で溶出し、タンパク質AアフィニティーカラムからhFcタグ付きTPBGタンパク質 (即ち、ヒトTPBG-hFc) を溶出し回収した。PBSリン酸塩緩衝液 (pH7.2) により、4℃冷蔵庫で一晩透析した。透析した後のタンパク質を、0.22ミクロンで無菌濾過してから分注して-80℃に保存して、精製された免疫原Aを得た。

【手続補正10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0083

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0083】

(二)、免疫原Bの調製

ヒトTPBGの全長アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列 (ただし、ヒトTPBGタンパク質をコードするヌクレオチド配列のGenebankにおける番号は、Genebank ID:AAH37161.1) は、pIRESベクター (Clontechから購入) にクローニングされ、プラスミドは調製された。HEK293細胞系 (Invitrogenから購入) に対して、プラスミドトランスフェクション (PEI、Polysciencesから購入) をした後、10% (w/w) ウシ胎児血清を0.5 µg/ml含むDMEM培地において、選択的に2週間培養して、限界希釈法で96ウェル培養プレートでサブクローニングし、37℃、5% (v/v) CO₂で培養し、約2週間後、一部のモノクローナルウェルを選択して6ウェルプレートに増幅した。増幅後のクローンに対して、既知のTPBG抗体 (Sigmaから購入、カタログ番号#SAB1404485) で、フローサイトメトリーで選別した。成長が良好で、蛍光強度が高いモノクローナル細胞系を選択して、拡大培養を継続し、液体窒素により凍結して、免疫原Bを得た。具体的な選択結果は、表3と図1に示される。対照IgGサブクラスは対照マウスIgGである。表3から、一連のTPBG発現陽性HEK293細胞系が作成されたことが明らかになる。図1では、横座標は細胞蛍光強度で、縦座標は細胞数である。図1の結果から分かるように、5E5E9はTPBGが高レベルで発現する細胞株である。ここで、抗TPBG抗体で標識された細胞は、平均細胞蛍光密度が216であり、移動度が98.5%である。

【手続補正11】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0095

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0095】

【表 1】

表 6 ELISA による TPBG 抗体とヒト TPBG-hFc タンパクとの結合反応の測定

OD _{450nm}	抗体濃度 (nM)							
	クローン番号	200	20	2	0.2	0.02	0.002	0.0002
12B12C7C3	2.82	2.83	2.84	1.67	0.29	0.13	0.10	0.11
5G4H10G5	2.72	2.80	2.68	1.76	0.34	0.10	0.08	0.07
37H9C5G2	2.61	2.63	2.52	1.55	0.35	0.11	0.09	0.09
39A11G5F2	2.55	2.50	2.43	1.36	0.30	0.11	0.09	0.09
52C9E9F6	2.65	2.69	2.68	1.39	0.27	0.12	0.09	0.08
28D4E6A9	2.60	2.59	2.64	1.97	0.46	0.14	0.10	0.09
36A10D8B12	2.51	3.07	3.06	2.15	0.51	0.18	0.16	0.19
99E12C7H1	2.93	2.88	2.93	2.62	0.78	0.21	0.11	0.08
103E2E9C2	2.60	2.62	2.64	1.89	0.48	0.14	0.10	0.13
106D5G3D10	2.88	2.82	2.81	2.36	0.56	0.16	0.11	0.10
IgG 対照	0.24	0.11	0.10	0.11	0.10	0.10	0.11	0.11

B、フローサイトメトリー実験 (FACS) による TPBG 抗体と TPBG 発現細胞との結合測定

実施例1の工程(二)で記載のヒトTPBGの全長アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含有するpIRESプラスミドでCHO_K1細胞株をトランスフェクトしてヒトTPBGを含有するCHO_K1安定細胞株(ここで、CHO_k1-hPD1安定細胞株という)を得た。同様に、サルTPBG全長遺伝子を含有するpIRESプラスミド(その調製方法は、実施例1の工程(一)“免疫原Aの調製”におけるヒトIgG Fc断片(hFc)を含有するpCpCベクターの調製方法と同じである。蟹食猿TPBGの全長アミノ酸配列(Genebank ID: BAE00432.1))でCHO_K1細胞株をトランスフェクトしてサルTPBGを含有するCHO_K1安定細胞株(ここで、CHO_k1-cTPBG安定細胞株という)を得た。マウスTPBG全長遺伝子を含有するpIRESプラスミド(その調製方法は、実施例1の工程(一)“免疫原Aの調製”におけるヒトIgG Fc断片(hFc)を含有するpCpCベクターの調製方法と同じである。マウスTPBG全長アミノ酸配列(Genebank ID: CAA09931.1))でCHO_K1細胞株をトランスフェクトしてマウスTPBGを含有するCHO_K1安定細胞株(ここで、CHO_k1-mTPBG安定細胞株という)を得た。

【手続補正12】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0096

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0096】

FACSにより血清におけるTPBG抗体の力価及び特異性を測定し、測定方法は実施例1の工程(二)“免疫原Bの調製”におけるHEK293-hTPBG安定細胞株の同定方法を参照した。測定結果を表7及び図2~4に示し、図2~4は横座標が細胞蛍光強度で、縦座標が細胞数である。ここで、CHO_K1-hTPBG 3A2F1は選別のためのヒトTPBG発現細胞株であり、そのFACS選別測定結果を図2に示し、CHO_K1-cTPBG 3F13G4は選別のための蟹食猿TPBG発現細胞株であり、そのFACS選別測定結果を図3に示し、CHO_K1-mTPBG 3A3は選別のためのマウスTPBG発現細胞株であり、そのFACS選別測定結果を図4に示した。表7の結果から明らかなように、CHO_k1-hTPBG安定細胞株、CHO_k1-cTPBG安定細胞株及びCHO_k1-mTPBG安定細胞株の細胞膜ではそれぞれヒト、サル又はマウスのTPBGタンパクを過剰発現し、TPBG抗体の選別に用いられる。

【手続補正13】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0097

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0097】

【表2】

表7 ヒト/サル/マウス TPBG でトランスフェクトされた CHO₁ 細胞の FACS 選別測定結果

トランスフェクト細胞のクローン番号	細胞平均蛍光強度	
	対照 IgG	抗 TPBG 抗体
CHO-k1-hTPBG 3A2F1	3.24	798.37
CHO-k1-cTPBG 3F13G4	2.66	198.35
CHO-k1-mTPBG 3A3	2.38	135.25

CHO₁-k1-hTPBG安定細胞株、CHO₁-k1-cTPBG安定細胞株、CHO₁-k1-mTPBG安定細胞株（すなわち表7に示されたCHO₁-k1-hTPBG 3A2F1、CHO₁-k1-cTPBG 3F13G4及びCHO₁-k1-mTPBG 3A3）及びCHO₁細胞をそれぞれT-75細胞培養ボトルで凝集度90%になるまで拡大培養を行い、培地をなくなるまで吸引して除去し、HBSS緩衝液（Hanks Balanced Salt Solution）（Invitrogenから購入）で2回洗浄し、その後、無酵素細胞解離液（Versene solution：Life technology会社から購入）を用いて処理し、細胞を回収した。HBSS緩衝液で細胞を2回洗浄し、細胞をカウントした後、HBSS緩衝液で 2×10^6 cell/mLになるまで希釈し、10%ヤギ血清遮断液を加え（前記パーセントが質量パーセントである）、氷で30分間インキュベートした後、HBSS緩衝液で2回遠心洗浄した。回収された細胞をFACS緩衝液（HBSS+1%BSA、前記パーセントが質量パーセントである）で 2×10^6 cell/mLになるまで懸濁させ、100 μ L/wellで96ウェルFACS反応板に加え、100 μ L/wellで実施例2で得られた精製されたTPBG抗体検査試料を加え、氷で2時間インキュベートした。FACS緩衝液で2回遠心洗浄し、100 μ L/wellで蛍光（Alexa 488）標識二次抗体（Invitrogenから購入）を加え、氷で1時間インキュベートした。FACS緩衝液で3回遠心洗浄し、100 μ L/wellで固定液[4%（v/v）パラホルムアルデヒド]を加えて細胞を再懸濁させ、10分間後にFACS緩衝液で2回遠心洗浄した。100 μ LのFACS緩衝液により細胞を懸濁させ、FACS（FACS Calibur、BD会社から購入）を用いて結果を測定して分析した。ソフトウェア（CellQuest）でデータ解析を行い、細胞の平均蛍光強度（MFI）を得た。さらに、ソフトウェア（GraphPad Prism5）で解析、データフィッティングを行い、EC50値を算出した。分析結果を表8及び図7～10に示し、図7～10のデータが細胞の平均蛍光強度（MFI）である。表8におけるデータはMFIから算出したEC50値であった。表8から明らかのように、TPBG抗体は細胞表面のTPBGタンパクと結合できた。

【手続補正14】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0098

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0098】

【表 3】

表 8 FACS による TPBG 抗体とヒト/サル/マウス TPBG 発現細胞株との結合活性の分析

クローン番号	EC50 (nM)			
	CHO-K1-hTPBG	CHO-K1-cTPBG	CHO-K1-mTPBG	CHO-K1
12B12C7C3	0.65	0.59	陰性	陰性
5G4H10G5	1.75	0.84	9.07	陰性
37H9C5G2	0.94	0.62	11.05	陰性
39A11G5F2	2.34	1.35	1.88	陰性
52C9E9F6	3.27	1.54	陰性	陰性
28D4E6A9	0.63	0.25	陰性	陰性
36A10D8B12	0.94	0.60	陰性	陰性
99E12C7H1	3.54	2.29	陰性	陰性
103E2E9C2	0.85	0.83	陰性	陰性
106D5G3D10	1.72	1.26	陰性	陰性

実施例4 TPBG抗体薬物共役体の細胞傷害活性実験

実施例2で得られた精製されたTPBG抗体をpH6.5~8.5のホウ酸ナトリウム緩衝液で透析した後、トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン(TCEP)を加え(ただし、TCEPと精製されたTPBG抗体とのモル比率は2である)、室温で1時間還元して、反応液Aを得た。反応液AをG25カラム(GEから購入)にて脱塩し、不要なTCEPを除去して、反応液Bを得た。反応液BにMC-MMAF(南京聯寧から購入)を加え(ただし、MC-MMAFと精製されたTPBG抗体とのモル比率は5である)、室温で4時間反応した。更に、不要なMC-MMAFを中和するようにシステインを加え、G25カラム脱塩によって不要な低分子を除去して、精製されたTPBG抗体薬物共役体を得た(共役方法はDoronina、2006、BioconjugateChem.17,114~124を参照)。HICにより薬物の架橋率、純度などのパラメータを分析した後、細胞毒性活性分析を行った。抗体共役体の薬物架橋率(DAR)は、いずれも8である。ここで、DAR(drugAntibody ratio)とは、抗体共役後の一つの抗体分子が有する低分子薬の平均数をいう。

【手続補正15】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0110

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0110】

ここで、12B12C7C3の重鎖タンパク質可変領域におけるCDR1をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.81における91位から105位までであり；

12B12C7C3の重鎖タンパク質可変領域におけるCDR2をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.81における148位から198位までであり；

12B12C7C3の重鎖タンパク質可変領域におけるCDR3をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.81における295位から327位までであり；

12B12C7C3の軽鎖タンパク質可変領域におけるCDR1をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.82における70位から114位までであり；

12B12C7C3の軽鎖タンパク質可変領域におけるCDR2をコードするヌクレオチド配列は配

列表SEQ ID No.82における160位から180位までであり；

12B12C7C3の軽鎖タンパク質可変領域におけるCDR3をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.82における277位から303位までであり；

5G4H10G5の重鎖タンパク質可変領域におけるCDR1をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.83における91位から105位までであり；

5G4H10G5の重鎖タンパク質可変領域におけるCDR2をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.83における148位から198位までであり；

5G4H10G5の重鎖タンパク質可変領域におけるCDR3をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.83における295位から330位までであり；

5G4H10G5の軽鎖タンパク質可変領域におけるCDR1をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.84における70位から102位までであり；

5G4H10G5の軽鎖タンパク質可変領域におけるCDR2をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.84における148位から168位までであり；

5G4H10G5の軽鎖タンパク質可変領域におけるCDR3をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.84における265位から288位までであり；

37H9C5G2の重鎖タンパク質可変領域におけるCDR1をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.85における91位から105位までであり；

37H9C5G2の重鎖タンパク質可変領域におけるCDR2をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.85における148位から198位までであり；

37H9C5G2の重鎖タンパク質可変領域におけるCDR3をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.85における295位から327位までであり；

37H9C5G2の軽鎖タンパク質可変領域におけるCDR1をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.86における70位から102位までであり；

37H9C5G2の軽鎖タンパク質可変領域におけるCDR2をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.86における148位から168位までであり；

37H9C5G2の軽鎖タンパク質可変領域におけるCDR3をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.86における265位から291位までである。

【**手続補正16**】

【**補正対象書類名**】明細書

【**補正対象項目名**】0111

【**補正方法**】変更

【**補正の内容**】

【0111】

39A11G5F2の重鎖タンパク質可変領域におけるCDR1をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.87における91位から105位までであり；

39A11G5F2の重鎖タンパク質可変領域におけるCDR2をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.87における148位から198位までであり；

39A11G5F2の重鎖タンパク質可変領域におけるCDR3をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.87における295位から315位までであり；

39A11G5F2の軽鎖タンパク質可変領域におけるCDR1をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.88における70位から102位までであり；

39A11G5F2の軽鎖タンパク質可変領域におけるCDR2をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.88における148位から168位までであり；

39A11G5F2の軽鎖タンパク質可変領域におけるCDR3をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.88における265位から291位までである。

【**手続補正17**】

【**補正対象書類名**】明細書

【**補正対象項目名**】0112

【**補正方法**】変更

【**補正の内容**】

【 0 1 1 2 】

52C9E9F6の重鎖タンパク質可変領域におけるCDR1をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.89における91位から105位までであり；

52C9E9F6の重鎖タンパク質可変領域におけるCDR2をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.89における148位から198位までであり；

52C9E9F6の重鎖タンパク質可変領域におけるCDR3をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.89における295位から315位までであり；

52C9E9F6の軽鎖タンパク質可変領域におけるCDR1をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.90における70位から102位までであり；

52C9E9F6の軽鎖タンパク質可変領域におけるCDR2をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.90における148位から168位までであり；

52C9E9F6の軽鎖タンパク質可変領域におけるCDR3をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.90における265位から291位までである。

【 手 続 補 正 1 8 】

【 補 正 対 象 書 類 名 】 明 細 書

【 補 正 対 象 項 目 名 】 0 1 1 4

【 補 正 方 法 】 変 更

【 補 正 の 内 容 】

【 0 1 1 4 】

36A10D8B12の重鎖タンパク質可変領域におけるCDR1をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.93における91位から108位までであり；

36A10D8B12の重鎖タンパク質可変領域におけるCDR2をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.93における151位から198位までであり；

36A10D8B12の重鎖タンパク質可変領域におけるCDR3をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.93における295位から324位までであり；

36A10D8B12の軽鎖タンパク質可変領域におけるCDR1をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.94における70位から102位までであり；

36A10D8B12の軽鎖タンパク質可変領域におけるCDR2をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.94における148位から168位までであり；

36A10D8B12の軽鎖タンパク質可変領域におけるCDR3をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.94における265位から291位までである。

【 手 続 補 正 1 9 】

【 補 正 対 象 書 類 名 】 明 細 書

【 補 正 対 象 項 目 名 】 0 1 1 5

【 補 正 方 法 】 変 更

【 補 正 の 内 容 】

【 0 1 1 5 】

99E12C7H1の重鎖タンパク質可変領域におけるCDR1をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.95における91位から105位までであり；

99E12C7H1の重鎖タンパク質可変領域におけるCDR2をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.95における148位から198位までであり；

99E12C7H1の重鎖タンパク質可変領域におけるCDR3をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.95における295位から318位までであり；

99E12C7H1の軽鎖タンパク質可変領域におけるCDR1をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.96における70位から102位までであり；

99E12C7H1の軽鎖タンパク質可変領域におけるCDR2をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.96における148位から168位までであり；

99E12C7H1の軽鎖タンパク質可変領域におけるCDR3をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.96における265位から291位までである。

【 手 続 補 正 2 0 】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 1 6

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 1 6】

103E2E9C2の重鎖タンパク質可変領域におけるCDR1をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.97における91位から105位までであり；

103E2E9C2の重鎖タンパク質可変領域におけるCDR2をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.97における148位から198位までであり；

103E2E9C2の重鎖タンパク質可変領域におけるCDR3をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.97における295位から324位までであり；

103E2E9C2の軽鎖タンパク質可変領域におけるCDR1をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.98における70位から105位までであり；

103E2E9C2の軽鎖タンパク質可変領域におけるCDR2をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.98における151位から171位までであり；

103E2E9C2の軽鎖タンパク質可変領域におけるCDR3をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.98における268位から294位までである。

【手続補正 2 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 1 7

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 1 7】

106D5G3D10の重鎖タンパク質可変領域におけるCDR1をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.99における91位から105位までであり；

106D5G3D10の重鎖タンパク質可変領域におけるCDR2をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.99における148位から198位までであり；

106D5G3D10の重鎖タンパク質可変領域におけるCDR3をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.99における295位から318位までであり；

106D5G3D10の軽鎖タンパク質可変領域におけるCDR1をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.100における70位から99位までであり；

106D5G3D10の軽鎖タンパク質可変領域におけるCDR2をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.100における145位から165位までであり；

106D5G3D10の軽鎖タンパク質可変領域におけるCDR3をコードするヌクレオチド配列は配列表SEQ ID No.100における262位から294位までである。

【手続補正 2 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 3 0

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 3 0】

【表 4】

表 16 細胞傷害実験による TPBG 陽性の 293-hTPBG 及び TPBG 陰性の 293 細胞に対する精製された TPBG キメラ抗体薬物共役体の特異性傷害作用の検出

試料名	IC50 (nM)	
	293-hTPBG	293
キメラ抗体 12B12	13.58	なし
キメラ抗体 12B12-MMAF	0.001	>100
キメラ抗体 12B12-MMAE	0.033	>100
キメラ抗体 12B12-DM1	0.154	8.885
キメラ抗体 28D4	1.137	なし
キメラ抗体 28D4-MMAF	0.024	>100
キメラ抗体 28D4-MMAE	0.08	>100
キメラ抗体 28D4-DM1	0.406	7.658

本発明の前述した内容を読んだ後、当業者は、本発明に対して、種々の変形、又は補正を行うことができ、これらの等価な形式も、同様に本願の特許請求の範囲に限定された範囲に含まれることを理解すべきである。

【手続補正 23】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】変更

【補正の内容】

【配列表】

2019508023000001.app

【 国际调查报告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2016/111699
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C07K 16/30 (2006.01) i; C12N 15/13 (2006.01) i; C12N 15/63 (2006.01) i; A61K 39/395 (2006.01) i; A61K 45/00 (2006.01) i; A61K 31/4025 (2006.01) i; A61P 35/00 (2006.01) i; G01N 33/574 (2006.01) i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K; C12N; A61K; A61P; G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CPRSABS; CNABS; CNKI; CNTXT; VEN; MEDLINE; EPTXT; USTXT; WOTXT and Key Words: trophoblast glycoprotein; SUN, Xiaolan; TPBG, 5T4, antibod+, humaniz+, etc. NATIONAL BIO-SEQUENCE DATABASE OF CHINESE PATENT; Genbank; EMBL; STN and searched sequences: SEQ ID NOS: 81-100, etc.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 101437850 A (WYETH LLC.), 20 May 2009 (20.05.2009), see embodiments 1-7, and claims 1-41	1-24
X	CN 103517719 A (WYETH), 15 January 2014 (15.01.2014), see embodiments 1-8, and claims 1-12	1-24
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“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)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&” document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 22 March 2017 (22.03.2017)		Date of mailing of the international search report 07 April 2017 (07.04.2017)
Name and mailing address of the ISA/CN: State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No.: (86-10) 62019451		Authorized officer WANG, Jinfeng Telephone No.: (86-10) 62412282

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2016/111699

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

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

- [1] invention 1: claims 1-24 (partial) relate to a protein containing a TPBG antibody, of which amino acid sequences of a heavy chain variable region and a light chain variable region are as shown in SEQ ID NOs: 1 and 5, a nucleic acid encoding the protein, a vector and transformant containing the nucleic acid, a method for preparing said protein, a conjugate, a pharmaceutical composition and the use; and
- [2] inventions 2-10 are respectively a protein containing a TPBG antibody, of which amino acid sequences of a heavy chain variable region and a light chain variable region are as shown in SEQ ID NOs: 9 and 13, SEQ ID NOs: 17 and 21, SEQ ID NOs: 25 and 29, SEQ ID NOs: 33 and 37, SEQ ID NOs: 41 and 45, SEQ ID NOs: 49 and 53, SEQ ID NOs: 57 and 61, SEQ ID NOs: 65 and 69 and SEQ ID NOs: 73 and 77, a nucleic acid encoding said protein, a vector and transformant containing the nucleic acid, a method for preparing said protein, a conjugate, a pharmaceutical composition and the use involved in claims 1-24 (partial).
- [3] Inventions 1-10 respectively relate to proteins containing a TPBG antibody, of which heavy chain and light chain variable regions are respectively defined by different sequence numbers. Amino acid compositions of sequences defined by these different sequence numbers are different from one another. The same or the corresponding technical feature of these inventions lies in that said proteins all contain a TPBG antibody. However, the same or the corresponding feature has been disclosed in the prior art (for example, CN 101437850 A and CN 103517719 A). Therefore, inventions 1-10 do not have the same or corresponding special technical feature, and lack unity of invention.

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2016/111699

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 101437850 A	20 May 2009	AU 2007226696 C1	04 February 2016
		RU 2008137074 A	20 April 2010
		PT 1994055 E	15 September 2014
		TW 200804424 A	16 January 2008
		CN 101437850 B	09 October 2013
		TW 201335189 A	01 September 2013
		IL 240245 D0	24 September 2015
		WO 2007106744 A8	02 October 2008
		US 8759495 B2	24 June 2014
		KR 20080106345 A	04 December 2008
		US 2012064600 A1	15 March 2012
		ES 2498517 T3	24 September 2014
		GT 200800181 A	25 May 2010
		IL 193986 A	31 August 2015
		AU 2007226696 A1	20 September 2007
		SG 170091 A1	29 April 2011
		JP 5523824 B2	18 June 2014
		KR 101443752 B1	26 September 2014
		MX 2008011492 A	22 September 2008
		TW I409277 B	21 September 2013
		IL 240245 A	24 September 2015
		PA 8718601 A1	15 May 2009
		US 8044178 B2	25 October 2011
		ZA 200808075 B	28 March 2012
		EC SP088733 A	31 October 2008
		WO 2007106744 A3	29 November 2007
		NZ 596295 A	25 January 2013
		EP 1994055 B1	02 July 2014
		EP 2368914 A1	28 September 2011
		US 2007231333 A1	04 October 2007
		HK 1121473 A1	24 July 2015
		AU 2007226696 B2	29 August 2013
		WO 2007106744 A2	20 September 2007
		DK 1994055 T3	25 August 2014
		TW I421257 B	01 January 2014
		SI 1994055 T1	29 August 2014
		PE 01192008 A1	04 March 2008
		US 2016185859 A1	30 June 2016
		CR 10273 A	26 November 2008
		CA 2645097 A1	20 September 2007
		IL 193986 D0	01 August 2011
		NO 20083891 A	03 December 2008
		BR PI0708771 A2	14 June 2011
		MY 148763 A	31 May 2013
		AR 059809 A1	30 April 2008
		NZ 571208 A	22 December 2011
		KR 20130018980 A	25 February 2013
		JP 2009529578 A	20 August 2009
		US 2014308302 A1	16 October 2014
CN 103517719 A	15 January 2014	CA 2830338 C	15 November 2016

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2016/111699

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
		KR 20130125833 A	19 November 2013
		CA 2830338 A1	04 October 2012
		EP 3130356 A1	15 February 2017
		TW I471334 B	01 February 2015
		SG 193324 A1	30 October 2013
		TW I549968 B	21 September 2016
		AU 2012235817 B2	10 March 2016
		TW 201302795 A	16 January 2013
		AU 2016203839 A1	23 June 2016
		NZ 615308 A	30 October 2015
		RU 2013142004 A	10 May 2015
		DK 2694111 T3	10 October 2016
		EP 2694111 B1	10 August 2016
		AR 085747 A1	23 October 2013
		SI 2694111 T1	28 October 2016
		ES 2596194 T3	05 January 2017
		MX 2013011353 A	16 December 2013
		CO 6771458 A2	15 October 2013
		US 2012251558 A1	04 October 2012
		SG 10201605401W A	30 August 2016
		US 8586049 B2	19 November 2013
		TW 201534624 A	16 September 2015
		KR 101529810 B1	26 June 2015
		KR 20150018903 A	24 February 2015
		IL 228404 D0	31 December 2013
		US 8309094 B2	13 November 2012
		JP 2016172747 A	29 September 2016
		WO 2012131527 A1	04 October 2012
		CN 105288644 A	03 February 2016
		JP 5925875 B2	25 May 2016
		CN 103517719 B	12 October 2016
		EP 2694111 A1	12 February 2014
		JP 2014516508 A	17 July 2014
		US 2014081005 A1	20 March 2014
		US 2013011418 A1	10 January 2013
		AU 2012235817 A1	10 October 2013
		PE 05732014 A1	14 May 2014

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2016/111699

A. 主题的分类		
C07K 16/30(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61K 46/00(2006.01)i; A61K 31/4025(2006.01)i; A61P 36/00(2006.01)i; G01N 33/574(2006.01)i		
按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
B. 检索领域		
检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)		
C07K; C12N; A61K; A61P; G01N		
包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献		
在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))		
CPRSABS; CNABS; CNKI; CNTXT; YEN; MEDLINE; EPTXT; USTXT; WOTXT和关键词: 孙晓岚, 滋养层特异性糖蛋白, 抗体, 人源化, Sun xiaolan, TPBG, 5T4, antibod+, humaniz+, 等 中国专利生物序列检索系统: Genbank; EMBL; STN和检索的序列: SEQ ID NO:81-100等		
C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	CN 101437850 A (惠氏公司) 2009年 5月 20日 (2009-05-20) 参见实施例1-7、权利要求1-41	1-24
X	CN 103517719 A (惠氏有限责任公司) 2014年 1月 15日 (2014-01-15) 参见实施例1-8、权利要求1-12	1-24
<input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期		国际检索报告邮寄日期
2017年 3月 22日		2017年 4月 7日
ISA/CN的名称和邮寄地址		受权官员
中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088		王金凤
传真号 (86-10)62019451		电话号码 (86-10)62412282

表 PCT/ISA/210 (第2页) (2009年7月)

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2016/111699

第III栏 缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明，即：

- [1] 发明1：权利要求1-24（部分），涉及包含TPBG抗体的重链可变区和轻链可变区的氨基酸序列分别如SEQ ID NO: 1和5所示的蛋白质，编码所述蛋白质的核酸、含有该核酸的载体和转化体，所述蛋白质的制备方法、偶联物、药物组合物以及用途；
- [2] 发明2-发明10分别是涉及权利要求1-24（部分）的包含TPBG抗体的重链可变区和轻链可变区的氨基酸序列分别如SEQ ID NO: 9和13、SEQ ID NO: 17和21、SEQ ID NO: 25和29、SEQ ID NO: 33和37、SEQ ID NO: 41和45、SEQ ID NO: 49和53、SEQ ID NO: 57和61、SEQ ID NO: 65和69、SEQ ID NO: 73和77所示的蛋白质，编码所述蛋白质的核酸、含有该核酸的载体和转化体，所述蛋白质的制备方法、偶联物、药物组合物以及用途。
- [3] 发明1-10分别涉及包含重链的和轻链的可变区分别由不同序列号限定的TPBG抗体的蛋白质，这些不同序列号所限定的序列的氨基酸组成各不相同，这些发明之间相同或相应的技术特征在于所述蛋白质均包含TPBG抗体，但该相同或相应的特征已经被现有技术（如CN101437850A、CN103517719A）所公开，因此发明1-10之间不具有相同或相应的特定技术特征，不具备单一性。

1. 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费，本国际检索报告涉及全部可作检索的权利要求。
2. 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索，本单位未通知缴纳任何加费。
3. 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费，本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求，具体地说，是权利要求：
4. 申请人未按时缴纳被要求缴纳的附加检索费。因此，本国际检索报告仅涉及权利要求书中首先提及的发明；包含该发明的权利要求是：

对异议的意见

- 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，适用时，缴纳了异议费。
- 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，但未在通知书规定的时间期限内缴纳异议费。
- 缴纳附加检索费时未提交异议书。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2016/111699

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	101437850	A	2009年 5月 20日	AU	2007226696	C1	2016年 2月 4日
				RU	2008137074	A	2010年 4月 20日
				PT	1994055	E	2014年 9月 16日
				TW	200804424	A	2008年 1月 16日
				CN	101437850	B	2013年 10月 9日
				TW	201335189	A	2013年 9月 1日
				IL	240245	D0	2015年 9月 24日
				WO	2007106744	A8	2008年 10月 2日
				US	8759495	B2	2014年 6月 24日
				KR	20080106345	A	2008年 12月 4日
				US	2012064600	A1	2012年 3月 15日
				ES	2498517	T3	2014年 9月 24日
				GT	200800181	A	2010年 5月 25日
				IL	193986	A	2015年 8月 31日
				AU	2007226696	A1	2007年 9月 20日
				SG	170091	A1	2011年 4月 29日
				JP	5523824	B2	2014年 6月 18日
				KR	101443752	B1	2014年 9月 26日
				MX	2008011492	A	2008年 9月 22日
				TW	I409277	B	2013年 9月 21日
				IL	240245	A	2015年 9月 24日
				PA	8718601	A1	2009年 5月 15日
				US	8044178	B2	2011年 10月 25日
				ZA	200808075	B	2012年 3月 28日
				EC	SP088733	A	2008年 10月 31日
				WO	2007106744	A3	2007年 11月 29日
				NZ	596295	A	2013年 1月 25日
				EP	1994055	B1	2014年 7月 2日
				EP	2368914	A1	2011年 9月 28日
				US	2007231333	A1	2007年 10月 4日
				HK	1121473	A1	2015年 7月 24日
				AU	2007226696	B2	2013年 8月 29日
				WO	2007106744	A2	2007年 9月 20日
				DK	1994055	T3	2014年 8月 25日
				TW	I421257	B	2014年 1月 1日
				SI	1994055	T1	2014年 8月 29日
				PE	01192008	A1	2008年 3月 4日
				US	2016185859	A1	2016年 6月 30日
				CR	10273	A	2008年 11月 26日
				CA	2645097	A1	2007年 9月 20日
				IL	193986	D0	2011年 8月 1日
				NO	20083891	A	2008年 12月 3日
				BR	PI0708771	A2	2011年 6月 14日
				MY	148763	A	2013年 5月 31日
				AR	059809	A1	2008年 4月 30日
				NZ	571208	A	2011年 12月 22日
				KR	20130018980	A	2013年 2月 25日
				JP	2009529578	A	2009年 8月 20日
				US	2014308302	A1	2014年 10月 16日
CN	103517719	A	2014年 1月 15日	CA	2830338	C	2016年 11月 15日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2016/111699

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
		KR 20130125833 A	2013年 11月 19日
		CA 2830338 A1	2012年 10月 4日
		EP 3130356 A1	2017年 2月 15日
		TW 1471334 B	2015年 2月 1日
		SG 193324 A1	2013年 10月 30日
		TW 1549068 B	2016年 9月 21日
		AU 2012235817 E2	2016年 3月 10日
		TW 201302795 A	2013年 1月 16日
		AU 2016203839 A1	2016年 6月 23日
		NZ 615308 A	2016年 10月 30日
		RU 2013142004 A	2015年 5月 10日
		DK 2694111 T3	2016年 10月 10日
		EP 2694111 B1	2016年 8月 10日
		AR 085747 A1	2013年 10月 23日
		SI 2694111 T1	2016年 10月 28日
		ES 2596194 T3	2017年 1月 5日
		MX 2013011353 A	2013年 12月 16日
		CO 6771458 A2	2013年 10月 15日
		US 2012251558 A1	2012年 10月 4日
		SG 10201605401W A	2016年 8月 30日
		US 8586049 E2	2013年 11月 19日
		TW 201534624 A	2015年 9月 16日
		KR 101629810 B1	2015年 6月 26日
		KR 20150018903 A	2015年 2月 24日
		IL 228404 D0	2013年 12月 31日
		US 8309094 E2	2012年 11月 13日
		JP 2016172747 A	2016年 9月 29日
		WO 2012131527 A1	2012年 10月 4日
		CN 105288644 A	2016年 2月 3日
		JP 5925875 E2	2016年 5月 25日
		CN 103517719 B	2016年 10月 12日
		EP 2694111 A1	2014年 2月 12日
		JP 2014516508 A	2014年 7月 17日
		US 2014081005 A1	2014年 3月 20日
		US 2013011418 A1	2013年 1月 10日
		AU 2012235817 A1	2013年 10月 10日
		PE 05732014 A1	2014年 5月 14日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I		テーマコード(参考)
C 1 2 Q 1/04 (2006.01)	C 1 2 Q	1/04	4 C 0 8 6
C 0 7 K 7/06 (2006.01)	C 0 7 K	7/06	4 H 0 4 5
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 K 47/68 (2017.01)	A 6 1 K	47/68	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	E
A 6 1 K 38/05 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	T
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K	38/05	
A 6 1 K 31/537 (2006.01)	A 6 1 K	45/00	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 K	31/537	
C 1 2 N 15/06 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	Y
	C 1 2 N	15/06	1 0 0

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . T W E E N

- (72)発明者 スン シャオラン
中華人民共和国 201210 シャンハイ チャイナ (シャンハイ) パイロット フリー
トレード ゾーン リビン ロード 576 ファラディ ロード 56 ビルディング ナンバ
ー4 ルーム 204
- (72)発明者 チャン イン
中華人民共和国 201210 シャンハイ チャイナ (シャンハイ) パイロット フリー
トレード ゾーン リビン ロード 576 ファラディ ロード 56 ビルディング ナンバ
ー4 ルーム 204
- (72)発明者 チャン ユー
中華人民共和国 201210 シャンハイ チャイナ (シャンハイ) パイロット フリー
トレード ゾーン リビン ロード 576 ファラディ ロード 56 ビルディング ナンバ
ー4 ルーム 204
- (72)発明者 フー フェイフェイ
中華人民共和国 201210 シャンハイ チャイナ (シャンハイ) パイロット フリー
トレード ゾーン リビン ロード 576 ファラディ ロード 56 ビルディング ナンバ
ー4 ルーム 204
- (72)発明者 ゴン シヨン
中華人民共和国 201210 シャンハイ チャイナ (シャンハイ) パイロット フリー
トレード ゾーン リビン ロード 576 ファラディ ロード 56 ビルディング ナンバ
ー4 ルーム 204
- (72)発明者 リウ ラー
中華人民共和国 201210 シャンハイ チャイナ (シャンハイ) パイロット フリー
トレード ゾーン リビン ロード 576 ファラディ ロード 56 ビルディング ナンバ
ー4 ルーム 204

Fターム(参考) 4B063 QA18 QA19 QQ02 QQ08 QQ79 QR48 QR72 QR77 QS07 QS33
QX01
4B064 AG27 CA20 CC24 DA05 DA14
4C076 AA95 CC27 CC41 EE41 EE59 FF68
4C084 AA01 AA02 AA17 BA01 BA10 BA14 BA23 BA41 CA59 DA27
NA13 ZB261 ZB262
4C085 AA13 AA14 AA16 AA23 AA25 AA26 AA27 CC02 CC05 CC08
CC21 CC23 DD23 DD62 DD88 EE01
4C086 AA01 AA02 CB22 MA01 MA04 NA13 ZB26
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA14 BA41 BA72 CA11 CA40 DA76
DA83 EA28 EA51 FA72

专利名称(译)	TPBG抗体，其制备方法，其缀合物及其用途		
公开(公告)号	JP2019508023A	公开(公告)日	2019-03-28
申请号	JP2018533643	申请日	2016-12-23
[标]发明人	スンシャオラン チャンイン チャンユー		
发明人	スン シャオラン チャン イン チャン ユー フー フェイフェイ ゴン シヨン リウ ラー		
IPC分类号	C12N15/13 C07K16/28 C12N15/62 C12N15/63 C12P21/08 C12Q1/04 C07K7/06 A61P35/00 A61K47/68 A61K39/395 A61K38/05 A61K45/00 A61K31/537 G01N33/53 C12N15/06		
CPC分类号	A61K31/4025 A61K45/00 C07K16/00 G01N33/57423 G01N2500/10 G01N2510/00 A61K47/6803 A61K47/6851 A61K47/6877 A61K2039/505 A61P35/00 C07K16/30 C07K2317/24 C07K2317/33 C07K2317/92		
FI分类号	C12N15/13.ZNA C07K16/28 C12N15/62.Z C12N15/63.Z C12P21/08 C12Q1/04 C07K7/06 A61P35/00 A61K47/68 A61K39/395.E A61K39/395.T A61K38/05 A61K45/00 A61K31/537 G01N33/53.Y C12N15/06.100		
F-TERM分类号	4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS07 4B063/QS33 4B063/QX01 4B064/AG27 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA05 4B064/DA14 4C076/AA95 4C076/CC27 4C076/CC41 4C076/EE41 4C076/EE59 4C076/FF68 4C084/AA01 4C084/AA02 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA10 4C084/BA14 4C084/BA23 4C084/BA41 4C084/CA59 4C084/DA27 4C084/NA13 4C084/ZB261 4C084/ZB262 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/AA23 4C085/AA25 4C085/AA26 4C085/AA27 4C085/CC02 4C085/CC05 4C085/CC08 4C085/CC21 4C085/CC23 4C085/DD23 4C085/DD62 4C085/DD88 4C085/EE01 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/CB22 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA13 4C086/ZB26 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA14 4H045/BA41 4H045/BA72 4H045/CA11 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/DA83 4H045/EA28 4H045/EA51 4H045/FA72		
优先权	201510990545.6 2015-12-24 CN		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明公开了TPBG抗体及其制备方法，它们的缀合物和用途。上述TPBG抗体包含TPBG抗体的重链可变区CDR1，重链CDR2和重链CDR3，和/或TPBG抗体的轻链可变区CDR1和轻链CDR2中的一种或多种。氨基酸序列如本发明所述，包括一种或多种类型的轻链CDR3。上述TPBG抗体是人源化抗体，具有高亲和力，通过与小分子药物毒素MMAF缀合获得的缀合物可以对TPBG阳性细胞发挥细胞毒性和破坏作用，使得肿瘤可以是肿瘤。它用于制备治疗药物等。

(5) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13 Z N A	4 B 0 6 3
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	4 B 0 6 4
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62 Z	4 C 0 7 6
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63 Z	4 C 0 8 4
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	4 C 0 8 5
	審査請求 有 予備審査請求 未請求	(全 78 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2018-533643 (P2018-533643)	(71) 出願人	517434334
(86) (22) 出願日	平成28年12月23日 (2016.12.23)		エクスディーシーエクスプローラー (
(85) 翻訳文提出日	平成30年8月27日 (2018.8.27)		シャンハイ) カンパニー リミテッド
(86) 国際出願番号	PCT/CN2016/111699		中華人民共和国 2 0 1 2 1 0 シャンハ
(87) 国際公開番号	W02017/107973		イ チャイナ (シャンハイ) パイロット
(87) 国際公開日	平成28年6月29日 (2017.6.29)		フリー トレード ゾーン リビソ ロー
(31) 優先権主張番号	201510990545.6		ド 5 7 6 ファラディ ロード 5 6
(32) 優先日	平成27年12月24日 (2015.12.24)		ビルディング ナンバー4 ルーム 2 0
(33) 優先権主張国	中国 (CN)		4
		(74) 代理人	110000578
			名古屋国際特許業務法人
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 T P B G抗体およびその調製方法、その共役体並び用途