

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

WO2008/114733

発行日 平成22年7月1日(2010.7.1)

(43) 国際公開日 平成20年9月25日(2008.9.25)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 4
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C O 8 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 O 1	4 H O 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 87 頁) 最終頁に続く

出願番号	特願2009-505202(P2009-505202)	(71) 出願人	000001029
(21) 国際出願番号	PCT/JP2008/054769		協和発酵キリン株式会社
(22) 国際出願日	平成20年3月14日(2008.3.14)		東京都千代田区大手町1丁目6番1号
(31) 優先権主張番号	特願2007-68064(P2007-68064)	(74) 代理人	100105647
(32) 優先日	平成19年3月16日(2007.3.16)		弁理士 小栗 昌平
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(74) 代理人	100105474
(31) 優先権主張番号	特願2007-223803(P2007-223803)		弁理士 本多 弘徳
(32) 優先日	平成19年8月30日(2007.8.30)	(74) 代理人	100108589
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		弁理士 市川 利光
		(74) 代理人	100129160
			弁理士 古館 久丹子
		(72) 発明者	太田 聡
			静岡県駿東郡長泉町下土狩1188 協和 発酵キリン株式会社 研究推進部内
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 抗Claudin-4抗体

(57) 【要約】

本発明の目的は、Claudin 4(以下、CLDN4と表記する)遺伝子によりコードされるポリペプチドおよび/または、Claudin 3(以下、CLDN3と表記する)遺伝子によりコードされるポリペプチドが関与する疾患に対する治療薬及び診断に有用なモノクローナル抗体またはその使用方法を提供することにある。

本発明は、CLDN4の細胞外領域の立体構造を特異的に認識し、かつ細胞外領域に結合するモノクローナル抗体または該抗体断片、CLDN4およびCLDN3の細胞外領域の立体構造を特異的に認識し、かつ該細胞外領域に結合するモノクローナル抗体または該抗体断片、該抗体を産生するハイブリドーマ、該抗体をコードするDNA、該DNAを含んでなるベクター、該ベクターを形質転換して得られる形質転換体、該ハイブリドーマまたは形質転換体を用いる抗体または抗体断片の製造方法、ならびに該抗体または抗体断片を用いるCLDN4および/またはCLDN3遺伝子によりコードされるポリペプチドが関与する疾患の診断薬または治療薬を提供する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

Claudin 4 (以下、CLDN4と表記する) 遺伝子によりコードされるポリペプチドの細胞外領域の立体構造を特異的に認識し、かつ該細胞外領域に結合するモノクローナル抗体または該抗体断片。

【請求項 2】

CLDN4遺伝子によりコードされるポリペプチドの細胞外領域(以下、CLDN4の細胞外領域と表記する)に特異的に結合し、CLDN4中和活性を有するモノクローナル抗体または該抗体断片。

【請求項 3】

CLDN4の細胞外領域の28~76番目、または141~159番目のアミノ酸配列からなる立体構造を認識し、かつ該細胞外領域に特異的に結合する請求項1または2いずれか1項記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

【請求項 4】

モノクローナル抗体が、CLDN4の細胞外領域への結合において、ハイブリドーマKM3900(FERM BP 10751)から生産されるモノクローナル抗体と競合するモノクローナル抗体である、請求項1~3いずれか1項に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

【請求項 5】

モノクローナル抗体が、ハイブリドーマKM3900(FERM BP 10751)から生産されるモノクローナル抗体が結合する、CLDN4の細胞外領域に存在するエピトープに結合するモノクローナル抗体である、請求項1~4のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

【請求項 6】

モノクローナル抗体が、ハイブリドーマKM3900(FERM BP 10751)から生産されるモノクローナル抗体である、請求項1~5のいずれか1項に記載の抗体または該抗体断片。

【請求項 7】

モノクローナル抗体が、遺伝子組換え抗体である、請求項1~6のいずれか1項に記載の抗体または該抗体断片。

【請求項 8】

遺伝子組換え抗体が、ヒト型キメラ抗体、ヒト化抗体およびヒト抗体から選ばれる遺伝子組換え抗体である、請求項7に記載の遺伝子組換え抗体または該抗体断片。

【請求項 9】

抗体のVHのCDR1、CDR2およびCDR3が、それぞれ配列番号19、20および21で示されるアミノ酸配列を含む、請求項8に記載の遺伝子組換え抗体または該抗体断片。

【請求項 10】

抗体のVLのCDR1、CDR2およびCDR3が、それぞれ配列番号22、23および24で示されるアミノ酸配列を含む、請求項8に記載の遺伝子組換え抗体または該抗体断片。

【請求項 11】

抗体のVHのCDR1、CDR2およびCDR3が、それぞれ配列番号19、20および21で示されるアミノ酸配列を含み、かつ、抗体のVLのCDR1、CDR2およびCDR3が、それぞれ配列番号22、23および24で示されるアミノ酸配列を含む、請求項8に記載の遺伝子組換え抗体または該抗体断片。

【請求項 12】

請求項1~6のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体のVHおよびVLを含む、請求項8記載のヒト型キメラ抗体または該抗体断片。

【請求項 13】

抗体のVHが配列番号16で示されるアミノ酸配列の20~142番目のアミノ酸配列を含み、かつ、抗体VLが配列番号18で示されるアミノ酸配列の23~130番目のアミノ酸配列を含む、請求項8に記載のヒト型キメラ抗体または該抗体断片。

【請求項 14】

10

20

30

40

50

ヒト化抗体のVHが、配列番号74で表されるアミノ酸配列または、配列番号74で示されるアミノ酸配列の41番目のProをHisに、43番目のGlnをLysに、44番目のGlyをSerに、48番目のMetをIleに、67番目のArgをLysに、68番目のValをAlaに、70番目のIleをLeuに、および72番目のAlaをValに置換するアミノ酸改変のうち、少なくとも1つの改変が導入されたアミノ酸配列を含み、

かつ、ヒト化抗体のVLが配列番号76で表されるアミノ酸配列または、配列番号76で表されるアミノ酸配列の1番目のAspをGlnに、10番目のSerをIleに、21番目のIleをMetに、48番目のLeuをTrpに、71番目のAspをSerに、79番目のLeuをMetに、および81番目のProをAlaに置換するアミノ酸改変のうち、少なくとも1つの改変が導入されたアミノ酸配列を含む請求項8記載のヒト化抗体または該抗体断片。

10

【請求項15】

ヒト化抗体のVHが、配列番号74で示されるアミノ酸配列の41番目のProをHisに、43番目のGlnをLysに、44番目のGlyをSerに、48番目のMetをIleに、67番目のArgをLysに、68番目のValをAlaに、70番目のIleをLeuに、および72番目のAlaをValに置換するアミノ酸改変のうち、少なくとも1つの改変が導入されたアミノ酸配列を含み、

かつ、ヒト化抗体のVLが、配列番号76で表されるアミノ酸配列の1番目のAspをGlnに、10番目のSerをIleに、21番目のIleをMetに、48番目のLeuをTrpに、71番目のAspをSerに、79番目のLeuをMetに、および81番目のProをAlaに置換するアミノ酸改変のうち、少なくとも1つの改変が導入されたアミノ酸配列を含む請求項8記載のヒト化抗体または該抗体断片。

20

【請求項16】

Claudin 3 (以下、CLDN3と表記する) 遺伝子によりコードされるポリペプチドの細胞外領域の立体構造を特異的に認識し、かつ該細胞外領域に結合する請求項1~4のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

【請求項17】

モノクローナル抗体が、CLDN4の細胞外領域への結合において、ハイブリドーマKM3907 (FERM BP 10885) から生産されるモノクローナル抗体と競合するモノクローナル抗体である、請求項1~4および16のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

【請求項18】

モノクローナル抗体が、ハイブリドーマKM3907 (FERM BP 10885) から生産されるモノクローナル抗体が結合するCLDN4の細胞外領域に存在するエピトープに結合するモノクローナル抗体である、請求項17記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

30

【請求項19】

モノクローナル抗体が、ハイブリドーマKM3907 (FERM BP 10885) から生産されるモノクローナル抗体である請求項18に記載の抗体または該抗体断片。

【請求項20】

モノクローナル抗体が、遺伝子組換え抗体である、請求項16~18のいずれか1項に記載の抗体または該抗体断片。

【請求項21】

遺伝子組換え抗体が、ヒト型キメラ抗体、ヒト化抗体およびヒト抗体から選ばれる遺伝子組換え抗体である、請求項20に記載の遺伝子組換え抗体または該抗体断片。

40

【請求項22】

抗体のVHのCDR1、CDR2およびCDR3が、それぞれ配列番号59、60および61で示されるアミノ酸配列を含む、請求項21に記載の遺伝子組換え抗体または該抗体断片。

【請求項23】

抗体のVLのCDR1、CDR2およびCDR3が、それぞれ配列番号62、63および64で示されるアミノ酸配列を含む、請求項21に記載の遺伝子組換え抗体または該抗体断片。

【請求項24】

抗体のVHのCDR1、CDR2およびCDR3が、それぞれ配列番号59、60および61で示されるアミノ酸配列を含み、かつ、抗体のVLのCDR1、CDR2およびCDR3が、それぞれ配列番号62、63および

50

び64で示されるアミノ酸配列を含む、請求項21に記載の遺伝子組換え抗体または該抗体断片。

【請求項25】

請求項16～19のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体のVHおよびVLを含む、請求項21に記載のヒト型キメラ抗体または該抗体断片。

【請求項26】

抗体のVHが配列番号56で示されるアミノ酸配列の20～138番目のアミノ酸配列を含み、かつ抗体のVLが配列番号58で示されるアミノ酸配列の23～130番目のアミノ酸配列を含む、請求項21に記載のヒト型キメラ抗体および該抗体断片。

【請求項27】

抗体断片が、Fab、Fab'、F(ab')₂、一本鎖抗体(scFv)、二量体化V領域(Diabody)、ジスルフィド安定化V領域(dsFv)およびCDRを含むペプチドから選ばれる抗体断片である請求項1～26のいずれか1項に記載の抗体断片。

【請求項28】

請求項1～6および16～19のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ。

【請求項29】

ハイブリドーマが、ハイブリドーマKM3900(FERM BP 10751)である、請求項28に記載のハイブリドーマ。

【請求項30】

ハイブリドーマが、ハイブリドーマKM3907(FERM BP 10885)である、請求項28に記載のハイブリドーマ。

【請求項31】

請求項1～27のいずれか1項に記載の抗体または該抗体断片をコードするDNA。

【請求項32】

請求項31に記載のDNAを含有する組換え体ベクター。

【請求項33】

請求項32に記載の組換え体ベクターを宿主細胞に導入して得られる形質転換株。

【請求項34】

請求項28～30に記載のハイブリドーマまたは請求項33に記載の形質転換株を培地に培養し、培養物中に請求項1～27のいずれか1項に記載の抗体または該抗体断片を生成蓄積させ、該培養物から抗体または該抗体断片を採取することを特徴とする請求項1～27のいずれか1項に記載の抗体または該抗体断片の製造方法。

【請求項35】

請求項1～27のいずれか1項に記載の抗体または該抗体断片を用いるCLDN4遺伝子によりコードされるポリペプチドの免疫学的検出または測定方法。

【請求項36】

請求項1～27のいずれか1項に記載の抗体または該抗体断片を用いるCLDN4遺伝子によりコードされるポリペプチドの検出または測定用試薬。

【請求項37】

請求項1～27のいずれか1項に記載の抗体または該抗体断片を用いるCLDN4遺伝子によりコードされるポリペプチドが関与する疾患の診断薬。

【請求項38】

CLDN4遺伝子によりコードされるポリペプチドが関与する疾患が癌である、請求項37に記載の診断薬。

【請求項39】

請求項1～27のいずれか1項に記載の抗体または該抗体断片を有効成分として含有するCLDN4遺伝子によりコードされるポリペプチドが関与する疾患の治療薬。

【請求項40】

CLDN4遺伝子によりコードされるポリペプチドが関与する疾患が癌である、請求項39に記

10

20

30

40

50

載の治療薬。

【請求項 4 1】

請求項 1 ~ 27のいずれか 1 項に記載の抗体または該抗体断片を用いてCLDN4遺伝子によりコードされるポリペプチドが発現した細胞を検出または測定することを含む、CLDN4遺伝子によりコードされるポリペプチドが関与する疾患の診断方法。

【請求項 4 2】

請求項 1 ~ 27のいずれか 1 項に記載の抗体または該抗体断片を用いてCLDN4遺伝子によりコードされるポリペプチドを検出または測定することを含む、CLDN4遺伝子によりコードされるポリペプチドが関与する疾患の診断方法。

【請求項 4 3】

CLDN4遺伝子によりコードされるポリペプチドが関与する疾患が癌である、請求項41または42に記載の診断方法。

10

【請求項 4 4】

CLDN4遺伝子によりコードされるポリペプチドが関与する疾患の診断薬を製造するための、請求項 1 ~ 27のいずれか 1 項に記載の抗体または該抗体断片の使用。

【請求項 4 5】

CLDN4遺伝子によりコードされるポリペプチドが関与する疾患の治療薬を製造するための、請求項 1 ~ 27のいずれか 1 項に記載の抗体または該抗体断片の使用。

【請求項 4 6】

CLDN4遺伝子によりコードされるポリペプチドが関与する疾患が癌である、請求項44または45に記載の抗体または該抗体断片の使用。

20

【請求項 4 7】

請求項16 ~ 27のいずれか 1 項に記載の抗体または該抗体断片を用いる、CLDN4遺伝子および/またはCLDN3遺伝子によりコードされるポリペプチドが関与する疾患の診断薬。

【請求項 4 8】

CLDN4遺伝子および/またはCLDN3遺伝子によりコードされるポリペプチドが関与する疾患が癌である、請求項47に記載の診断薬。

【請求項 4 9】

請求項16 ~ 27のいずれか 1 項に記載の抗体または抗体断片を有効成分として含有する、CLDN4遺伝子および/またはCLDN3遺伝子によりコードされるポリペプチドが関与する疾患の治療薬。

30

【請求項 5 0】

CLDN4遺伝子および/またはCLDN3遺伝子によりコードされるポリペプチドが関与する疾患が癌である、請求項49に記載の治療薬。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、Claudin 4 (以下、CLDN4と表記する) 遺伝子によりコードされるポリペプチドの細胞外領域の立体構造を特異的に認識し、かつ該細胞外領域に結合するモノクローナル抗体または該抗体断片、Claudin 3 (以下、CLDN3と表記する) 遺伝子によりコードされるポリペプチドおよびCLDN4遺伝子によりコードされるポリペプチドの細胞外領域の立体構造を特異的に認識し、かつ両方の細胞外領域に結合するモノクローナル抗体またはこれらの抗体断片、該抗体を産生するハイブリドーマ、該抗体をコードするDNA、該DNAを含んでなるベクター、該ベクターを形質転換して得られる形質転換体、該ハイブリドーマまたは形質転換体を用いる抗体または該抗体断片の製造方法、ならびに該抗体または抗体断片を用いる診断薬または治療薬に関する。

40

【背景技術】

【0 0 0 2】

Claudin分子 (以下、ClaudinをCLDNと略記する) は現在 2 4 種類のファミリー分子が報告されており、CLDN分子同士がホモフィリックもしくはヘテロフィリックに結合し、細胞

50

間接着に機能すると考えられている（非特許文献1）。CLDNによって形成されるtight junction（以下、TJと記載する）は、水溶性分子が上皮細胞間や血管内皮細胞間の間隙を自由に通り抜けるのを妨げるバリアーとして機能すると考えられている（非特許文献1、4）。また、TJは膜蛋白質や脂質分子を細胞膜の頂端部と側底部の仕切り、お互いの間での拡散を遮るフェンスとしても機能していると考えられている（非特許文献1）。

【0003】

CLDN4は1997年、Katahiraらによりウエルシュ菌エンテロトキシン[*Clostridium perfringens enterotoxin*(以下、CPEと表記する)]のレセプターとしてクローニングされた、全長209アミノ酸からなる4回膜貫通蛋白質であり、TJを構成する接着分子である（非特許文献2、3）。

癌におけるCLDN4の発現に関しては、膵臓癌（非特許文献5、6、7）、卵巣癌（非特許文献8、9）、乳癌（非特許文献10）、子宮癌（非特許文献11）、大腸癌（非特許文献12）、胃癌（非特許文献13、14）、前立腺癌（非特許文献15）、食道癌（非特許文献16）、胆道癌（非特許文献17）等、種々の癌で高発現が報告されており、胃癌ではCLDN4高発現が予後不良因子の一つであることも報告されている（非特許文献13）。癌におけるCLDN4の機能については、CLDN4を発現させた癌細胞で腫瘍形成能や細胞運動能が亢進することや、CLDN4に対するsmall interfering RNAを用いて癌細胞でのCLDN4発現を抑制すると、癌細胞の浸潤能が低下することが報告されている（非特許文献18）。

【0004】

一方、Claudin 3（以下、CLDN3と表記する）は、CLDN4と同様に、1997年、KatahiraらによりCPEのレセプターとして、クローニングされた（非特許文献2、3）。同時にCLDN3はラット去勢後の前立腺萎縮において発現が上昇する遺伝子として報告されたRat ventral prostate.1 protein（RVP.1）にホモロジーが高い遺伝子として報告されている（非特許文献3）。CLDN3は全長220アミノ酸からなる4回膜貫通蛋白質であり、TJを構成するCLDNファミリーの1つである。

【0005】

癌におけるCLDN3の発現に関しては、卵巣癌（非特許文献19、20、21）、乳癌（非特許文献22）、子宮癌（非特許文献23）、前立腺癌（非特許文献24、25）、食道癌（非特許文献26）、胃癌（非特許文献27）、大腸癌（非特許文献28）等、種々の癌で高発現が報告されている。癌におけるCLDN3の機能については、CLDN3を発現させた癌細胞で腫瘍形成能や細胞運動能が亢進することや、CLDN3に対するsmall interfering RNAを用いて癌細胞でのCLDN3発現を抑制すると、癌細胞の浸潤能が低下すること等が報告されている（非特許文献18）。一方で、浸潤能の高い乳癌細胞株では、CLDN3の発現が低下しているという報告（非特許文献29）や、胃癌ではCLDN3陽性患者の予後が良好であるとの報告（非特許文献30）もあり、癌における機能に関しては未だ不明な点が多い。

【0006】

CLDN3およびCLDN4に結合する分子としては、食中毒の原因菌であるウエルシュ菌のエンテロトキシン（CPE）が存在する。CPEはCLDN3もしくはCLDN4に結合して複合体を形成し、細胞膜に孔をあけて細胞を破壊する膜孔形成毒素である。CPEはCLDN3またはCLDN4を発現する癌細胞に対して殺細胞活性を発揮し、担癌モデル動物に投与した場合、腫瘍増殖の抑制や延命効果を示すことが報告されている（非特許文献9、10）。また、CPEの殺細胞活性を欠損させたCPEのC末部分ペプチド（以下、C CPEと表記する）は、CLDNへの結合活性を保持しており、CLDN4発現細胞に添加した場合、CLDN4の発現を特異的に抑制し、TJのバリアー機能を阻害することが報告されている（非特許文献4）。C CPEに関しては、TJのバリアー機能を阻害することで、細胞間隙経路（Paracellular route）を介した吸収を促進する作用も報告されている（非特許文献33）。

【0007】

CLDN4の細胞外領域に結合する抗体としては配列番号2で表されるCLDN4のアミノ酸配列の141～158番目をニワトリに免疫して作製されたポリクローナル抗体、配列番号2で表されるCLDN4のアミノ酸配列の29～79番目をマウスに免疫して作製されたモノクローナル抗

10

20

30

40

50

体が知られている。上述のポリクローナル抗体は、CLDN4発現細胞に対して反応することが報告されている（非特許文献34）。また、上述のモノクローナル抗体としては、Abnova社より4A4（IgG3）が市販されている。しかしながら、現在までにCLDN4の細胞外領域の立体構造を特異的に認識し、かつ該細胞外領域に結合するモノクローナル抗体や、CLDN4の細胞外領域に結合しCLDN4の中和活性を有するモノクローナル抗体は知られていない。

【0008】

CLDN3に結合する抗体としては、マウスCLDN3に結合するウサギポリクローナル抗体（特許文献1）が報告されている。また、CLDN3の細胞外領域を認識し、結合する抗体としては、配列番号26で表されるCLDN3のアミノ酸配列の56～69番目および139～156番目をニワトリに免疫して作製されたポリクローナル抗体が、CLDN3陽性の癌細胞に対して反応することが報告されている（非特許文献34）。しかし、ポリクローナル抗体が反応性を示す癌細胞はCLDN4も発現しており、これらの抗体の特異性は確認されていない。従って、CLDN3の細胞外領域の立体構造を特異的に認識し、かつ結合するモノクローナル抗体は知られていない。

【0009】

一般に非ヒト抗体、例えばマウス抗体などをヒトに投与すると、異物として認識されることにより、ヒト体内にマウス抗体に対するヒト抗体（Human Anti Mouse Antibody:HAMA）が誘導されることが知られている。HAMAは投与されたマウス抗体と反応し、副作用を引き起こしたり（非特許文献25、26、27、28）、マウス抗体の体内からの消失を速め（非特許文献26、29、30）、マウス抗体の治療効果を低下させてしまうことが知られている（非特許文献41、42）。

【0010】

これらの問題点を解決するため、遺伝子組換え技術を利用して非ヒト抗体からヒト型キメラ抗体やヒト化抗体の作製が試みられている。

ヒト化抗体は、マウス抗体などの非ヒト抗体と比較して、ヒトへの投与を行う上で、様々な利点を有している。例えば、サルを用いた実験でマウス抗体に比べ免疫原性が低下し、血中半減期が延長したことが報告されている（非特許文献43、44）。すなわち、ヒト化抗体は、非ヒト抗体に比べ、ヒトにおいて副作用が少なく、その治療効果が長期間持続することが期待される。

【0011】

また、ヒト化抗体は、遺伝子組換え技術を利用して作製するため、様々な形態の分子として作製することができる。例えば、ヒト抗体の重鎖（以下、H鎖と表記する）定常領域（以下、C領域と表記する）（H鎖C領域を、CHと表記する）として 1サブクラスを使用すれば、抗体依存性細胞傷害活性（以下、ADCC活性と表記する）などのエフェクター機能の高いヒト化抗体を作製することができ（非特許文献43）、かつ、マウス抗体に比べ血中半減期の延長が期待される（非特許文献44）。特にCLDN4陽性細胞の増殖を抑制する治療においては、抗体を介してエフェクター細胞を腫瘍組織に集積させ、標的細胞を特異的に傷害するために、抗体のFc領域（抗体重鎖のヒンジ領域以降の領域）を介した補体依存性細胞傷害活性（以下、CDC活性と表記する）やADCC活性等の細胞傷害活性が重要である。ヒトの治療においては、細胞傷害活性を発揮させるために、ヒト型キメラ抗体、ヒト化抗体またはヒト化抗体を用いることが望ましい（非特許文献45、46）。

【0012】

さらに、ヒト化抗体は、最近の蛋白質工学、遺伝子工学の進歩により、Fab、Fab'、F(ab')₂、一本鎖抗体（以下、scFvと表記する）（非特許文献47）、2量体化V領域断片（以下、Diabodyと表記する）（非特許文献48）、ジスルフィド安定化V領域断片（以下、dsFvと表記する）（非特許文献49）、相補性決定領域（complementarity determining region、以下CDRと記す）を含むペプチド（非特許文献50）などの、分子量の小さい抗体断片としても作製でき、これらの抗体断片は、完全な抗体分子に比べ、標的組織への移行性に優れている（非特許文献51）。

10

20

30

40

50

- 【非特許文献 1】 Nat.Rev.Mol.Cell Biol.,2,285(2001)
- 【非特許文献 2】 J.Cell Biol.,136,1239(1997)
- 【非特許文献 3】 J.Biol.Chem.,272,26652(1997)
- 【非特許文献 4】 J.Cell Biol.,147,195(1999)
- 【非特許文献 5】 Am.J.Clin.Pathol.,121,226(2004)
- 【非特許文献 6】 Am.J.Pathol.,164,903(2004)
- 【非特許文献 7】 Gastroenterology,121,678(2001)
- 【非特許文献 8】 Clin.Cancer Res.,9,2567(2003)
- 【非特許文献 9】 Cancer Res.,65,4334(2005)
- 【非特許文献 1 0】 Am.J.Pathol.,164,1627(2004) 10
- 【非特許文献 1 1】 Br.J.Cancer,92,1561(2005)
- 【非特許文献 1 2】 FEBS Lett.,579,6179(2005)
- 【非特許文献 1 3】 Hum.Pathol.,36,886(2005)
- 【非特許文献 1 4】 Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.,15,281(2006)
- 【非特許文献 1 5】 Cancer Res.,61,7878(2001)
- 【非特許文献 1 6】 Appl.Immunohistochem.Mol.Morpho.,14,24(2006)
- 【非特許文献 1 7】 Mod.Pathol.,19,460(2006)
- 【非特許文献 1 8】 Cancer Res.,65,7378(2005)
- 【非特許文献 1 9】 Clin.Cancer Res.,9,2567(2003)
- 【非特許文献 2 0】 Clin.Cancer Res.,10,4427(2004) 20
- 【非特許文献 2 1】 Clin.Cancer Res.,10,3291(2004)
- 【非特許文献 2 2】 Am.J.Pathol.,164,1627(2004)
- 【非特許文献 2 3】 Br.J.Cancer,92,1561(2005)
- 【非特許文献 2 4】 Cancer Res.,61,7878(2001)
- 【非特許文献 2 5】 Hum.Pathol.,38,564(2007)
- 【非特許文献 2 6】 Hum.Pathol.,36,886(2005)
- 【非特許文献 2 7】 FEBS Lett.,579,6179(2005)
- 【非特許文献 2 8】 Cancer Res.,65,7378(2005)
- 【非特許文献 2 9】 Oncogene,13,2328(2006)
- 【非特許文献 3 0】 Virchows Arch.,448,52(2006) 30
- 【非特許文献 3 1】 Cancer Res.,63,6265(2003)
- 【非特許文献 3 2】 Cancer Res.,65,1868(2005)
- 【非特許文献 3 3】 YAKUGAKU ZASSHI,126,711(2006)
- 【非特許文献 3 4】 Cancer Immunol. Immunother.,54,431(2005)
- 【非特許文献 3 5】 J.Clin.Oncol.,2,881(1984)
- 【非特許文献 3 6】 Blood,65,1349(1985)
- 【非特許文献 3 7】 J.Natl.Cancer Inst.,80,932(1988)
- 【非特許文献 3 8】 Proc.Natl.Acad.Sci.USA,82,1242(1985)
- 【非特許文献 3 9】 J.Nucl.Med.,26,1011(1985)
- 【非特許文献 4 0】 J.Natl.Cancer Inst.,80,937(1988) 40
- 【非特許文献 4 1】 J.Immunol.,135,1530(1985)
- 【非特許文献 4 2】 Cancer Res.,46,6489(1986)
- 【非特許文献 4 3】 Cancer Res.,56,1118(1996)
- 【非特許文献 4 4】 Immunol.,85,668(1995)
- 【非特許文献 4 5】 J.Immunol.,144,1382(1990)
- 【非特許文献 4 6】 Nature,322,323(1988)
- 【非特許文献 4 7】 Science,242,423(1988)
- 【非特許文献 4 8】 Nature Biotechnol.,15,629(1997)
- 【非特許文献 4 9】 Molecular Immunol.,32,249(1995)
- 【非特許文献 5 0】 J.Biol.Chem.,271,2966(1996) 50

【非特許文献 5 1】Cancer Res.,52,3402(1992)

【特許文献 1】日本特許第3428441号

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

本発明の目的は、Claudin 4 (以下、CLDN4と表記する) 遺伝子によりコードされるポリペプチドまたは、Claudin 3 (以下、CLDN3と表記する) 遺伝子によりコードされるポリペプチドが関与する疾患に対する治療薬及び診断に有用なモノクローナル抗体またはその使用方法を提供することある。

【課題を解決するための手段】

【0014】

(1) Claudin 4 (以下、CLDN4と表記する) 遺伝子によりコードされるポリペプチドの細胞外領域の立体構造を特異的に認識し、かつ該細胞外領域に結合するモノクローナル抗体または該抗体断片。

(2) CLDN4遺伝子によりコードされるポリペプチドの細胞外領域 (以下、CLDN4の細胞外領域と表記する) に特異的に結合し、CLDN4中和活性を有するモノクローナル抗体または該抗体断片。

(3) CLDN4の細胞外領域の28~76番目、または141~159番目のアミノ酸配列からなる立体構造を認識し、かつ該細胞外領域に特異的に結合する(1)または(2)いずれか1項記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

(4) モノクローナル抗体が、CLDN4の細胞外領域への結合において、ハイブリドーマKM3900 (FERM BP 10751) から生産されるモノクローナル抗体と競合するモノクローナル抗体である、(1)~(3)いずれか1項に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

(5) モノクローナル抗体が、ハイブリドーマKM3900 (FERM BP 10751) から生産されるモノクローナル抗体が結合する、CLDN4の細胞外領域に存在するエピトープに結合するモノクローナル抗体である、(1)~(4)のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

(6) モノクローナル抗体が、ハイブリドーマKM3900 (FERM BP 10751) から生産されるモノクローナル抗体である、(1)~(5)のいずれか1項に記載の抗体または該抗体断片。

(7) モノクローナル抗体が、遺伝子組換え抗体である、(1)~(6)のいずれか1項に記載の抗体または該抗体断片。

(8) 遺伝子組換え抗体が、ヒト型キメラ抗体、ヒト化抗体およびヒト抗体から選ばれる遺伝子組換え抗体である、(7)に記載の遺伝子組換え抗体または該抗体断片。

(9) 抗体のVHのCDR1、CDR2およびCDR3が、それぞれ配列番号19、20および21で示されるアミノ酸配列を含む、(8)に記載の遺伝子組換え抗体または該抗体断片。

(10) 抗体のVLのCDR1、CDR2およびCDR3が、それぞれ配列番号22、23および24で示されるアミノ酸配列を含む、(8)に記載の遺伝子組換え抗体または該抗体断片。

(11) 抗体のVHのCDR1、CDR2およびCDR3が、それぞれ配列番号19、20および21で示されるアミノ酸配列を含み、かつ、抗体のVLのCDR1、CDR2およびCDR3が、それぞれ配列番号22、23および24で示されるアミノ酸配列を含む、(8)に記載の遺伝子組換え抗体または該抗体断片。

(12) (1)~(6)のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体のVHおよびVLを含む、(8)に記載のヒト型キメラ抗体または該抗体断片。

(13) 抗体のVHが配列番号16で示されるアミノ酸配列の20~142番目のアミノ酸配列を含み、かつ、抗体VLが配列番号18で示されるアミノ酸配列の23~130番目のアミノ酸配列を含む、(8)に記載のヒト型キメラ抗体または該抗体断片。

(14) ヒト化抗体のVHが、配列番号74で表されるアミノ酸配列または、配列番号74で示されるアミノ酸配列の41番目のProをHisに、43番目のGlnをLysに、44番目のGlyをSerに、48番目のMetをIleに、67番目のArgをLysに、68番目のValをAlaに、70番目のIleをLeuに、お

10

20

30

40

50

よび72番目のAlaをValに置換するアミノ酸改変のうち、少なくとも1つの改変が導入されたアミノ酸配列を含み、

かつ、ヒト化抗体のVLが配列番号76で表されるアミノ酸配列または、配列番号76で表されるアミノ酸配列の1番目のAspをGlnに、10番目のSerをIleに、21番目のIleをMetに、48番目のLeuをTrpに、71番目のAspをSerに、79番目のLeuをMetに、および81番目のProをAlaに置換するアミノ酸改変のうち、少なくとも1つの改変が導入されたアミノ酸配列を含む(8)記載のヒト化抗体または該抗体断片。

(15) ヒト化抗体のVHが、配列番号74で示されるアミノ酸配列の41番目のProをHisに、43番目のGlnをLysに、44番目のGlyをSerに、48番目のMetをIleに、67番目のArgをLysに、68番目のValをAlaに、70番目のIleをLeuに、および72番目のAlaをValに置換するアミノ酸改変のうち、少なくとも1つの改変が導入されたアミノ酸配列を含み、

かつ、ヒト化抗体のVLが、配列番号76で表されるアミノ酸配列の1番目のAspをGlnに、10番目のSerをIleに、21番目のIleをMetに、48番目のLeuをTrpに、71番目のAspをSerに、79番目のLeuをMetに、および81番目のProをAlaに置換するアミノ酸改変のうち、少なくとも1つの改変が導入されたアミノ酸配列を含む(8)記載のヒト化抗体または該抗体断片。

(16) Claudin 3(以下、CLDN3と表記する)遺伝子によりコードされるポリペプチドの細胞外領域の立体構造を特異的に認識し、かつ該細胞外領域に結合する(1)~(4)のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

(17) モノクローナル抗体が、CLDN4の細胞外領域への結合において、ハイブリドーマKM3907(FERM BP 10885)から生産されるモノクローナル抗体と競合するモノクローナル抗体である、(1)~(4)および(16)のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

(18) モノクローナル抗体が、ハイブリドーマKM3907(FERM BP 10885)から生産されるモノクローナル抗体が結合するCLDN4の細胞外領域に存在するエピトープに結合するモノクローナル抗体である、(17)記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

(19) モノクローナル抗体が、ハイブリドーマKM3907(FERM BP 10885)から生産されるモノクローナル抗体である(18)に記載の抗体または該抗体断片。

(20) モノクローナル抗体が、遺伝子組換え抗体である、(16)~(18)のいずれか1項に記載の抗体または該抗体断片。

(21) 遺伝子組換え抗体が、ヒト型キメラ抗体、ヒト化抗体およびヒト抗体から選ばれる遺伝子組換え抗体である、(20)に記載の遺伝子組換え抗体または該抗体断片。

(22) 抗体のVHのCDR1、CDR2およびCDR3が、それぞれ配列番号59、60および61で示されるアミノ酸配列を含む、(21)に記載の遺伝子組換え抗体または該抗体断片。

(23) 抗体のVLのCDR1、CDR2およびCDR3が、それぞれ配列番号62、63および64で示されるアミノ酸配列を含む、(21)に記載の遺伝子組換え抗体または該抗体断片。

(24) 抗体のVHのCDR1、CDR2およびCDR3が、それぞれ配列番号59、60および61で示されるアミノ酸配列を含み、かつ、抗体のVLのCDR1、CDR2およびCDR3が、それぞれ配列番号62、63および64で示されるアミノ酸配列を含む、(21)に記載の遺伝子組換え抗体または該抗体断片。

(25) (16)~(19)のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体のVHおよびVLを含む、(21)記載のヒト型キメラ抗体または該抗体断片。

(26) 抗体のVHが配列番号56で示されるアミノ酸配列の20~138番目のアミノ酸配列を含み、かつ抗体のVLが配列番号58で示されるアミノ酸配列の23~130番目のアミノ酸配列を含む、(21)記載のヒト型キメラ抗体または該抗体断片。

(27) 抗体断片が、Fab、Fab'、F(ab')₂、一本鎖抗体(scFv)、二量体化V領域(Diabody)、ジスルフィド安定化V領域(dsFv)およびCDRを含むペプチドから選ばれる抗体断片である(1)~(26)のいずれか1項に記載の抗体断片。

(28) (1)~(6)および(16)~(19)のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ。

(29) ハイブリドーマが、ハイブリドーマKM3900(FERM BP 10751)である、(28)に記

10

20

30

40

50

載のハイブリドーマ。

(30) ハイブリドーマが、ハイブリドーマKM3907 (FERM BP 10885) である、(28) に記載のハイブリドーマ。

(31) (1) ~ (27) のいずれか 1 項に記載の抗体または該抗体断片をコードする DNA。

(32) (31) に記載の DNA を含有する組換え体ベクター。

(33) (32) に記載の組換え体ベクターを宿主細胞に導入して得られる形質転換株。

(34) (28) ~ (30) に記載のハイブリドーマまたは (33) に記載の形質転換株を培地に培養し、培養物中に (1) ~ (27) のいずれか 1 項に記載の抗体または該抗体断片を生成蓄積させ、該培養物から抗体または該抗体断片を採取することを特徴とする (1) ~ (27) のいずれか 1 項に記載の抗体または該抗体断片の製造方法。

10

(35) (1) ~ (27) のいずれか 1 項に記載の抗体または該抗体断片を用いる CLDN4 遺伝子によりコードされるポリペプチドの免疫学的検出または測定方法。

(36) (1) ~ (27) のいずれか 1 項に記載の抗体または該抗体断片を用いる CLDN4 遺伝子によりコードされるポリペプチドの検出または測定用試薬。

(37) (1) ~ (27) のいずれか 1 項に記載の抗体または該抗体断片を用いる CLDN4 遺伝子によりコードされるポリペプチドが関与する疾患の診断薬。

(38) CLDN4 遺伝子によりコードされるポリペプチドが関与する疾患が癌である、(37) に記載の診断薬。

(39) (1) ~ (27) のいずれか 1 項に記載の抗体または該抗体断片を有効成分として含有する CLDN4 遺伝子によりコードされるポリペプチドが関与する疾患の治療薬。

20

(40) CLDN4 遺伝子によりコードされるポリペプチドが関与する疾患が癌である、(39) に記載の治療薬。

(41) (1) ~ (27) のいずれか 1 項に記載の抗体または該抗体断片を用いて CLDN4 遺伝子によりコードされるポリペプチドが発現した細胞を検出または測定することを含む、CLDN4 遺伝子によりコードされるポリペプチドが関与する疾患の診断方法。

(42) (1) ~ (27) のいずれか 1 項に記載の抗体または該抗体断片を用いて CLDN4 遺伝子によりコードされるポリペプチドを検出または測定することを含む、CLDN4 遺伝子によりコードされるポリペプチドが関与する疾患の診断方法。

(43) CLDN4 遺伝子によりコードされるポリペプチドが関与する疾患が癌である、(41) または (42) に記載の診断方法。

30

(44) CLDN4 遺伝子によりコードされるポリペプチドが関与する疾患の診断薬を製造するための、(1) ~ (27) のいずれか 1 項に記載の抗体または該抗体断片の使用。

(45) CLDN4 遺伝子によりコードされるポリペプチドが関与する疾患の治療薬を製造するための、(1) ~ (27) のいずれか 1 項に記載の抗体または該抗体断片の使用。

(46) CLDN4 遺伝子によりコードされるポリペプチドが関与する疾患が癌である、(44) または (45) に記載の抗体または該抗体断片の使用。

(47) (16) ~ (27) のいずれか 1 項に記載の抗体または該抗体断片を用いる、CLDN4 遺伝子および/または CLDN3 遺伝子によりコードされるポリペプチドが関与する疾患の診断薬。

(48) CLDN4 遺伝子および/または CLDN3 遺伝子によりコードされるポリペプチドが関与する疾患が癌である、(47) に記載の診断薬。

40

(49) (16) ~ (27) のいずれか 1 項に記載の抗体または抗体断片を有効成分として含有する、CLDN4 遺伝子および/または CLDN3 遺伝子によりコードされるポリペプチドが関与する疾患の治療薬。

(50) CLDN4 遺伝子および/または CLDN3 遺伝子によりコードされるポリペプチドが関与する疾患が癌である、(49) に記載の治療薬。

【発明の効果】

【0015】

本発明により、CLDN4 遺伝子によりコードされるポリペプチドの細胞外領域の立体構造を特異的に認識し、かつ該細胞外領域に結合するモノクローナル抗体、および CLDN3 遺伝

50

子およびCLDN4遺伝子によりそれぞれコードされるポリペプチドの細胞外領域の立体構造を特異的に認識し、両ポリペプチドに結合するモノクローナル抗体を提供することができる。また、本発明により、CLDN4遺伝子によりコードされるポリペプチドが関与する各種疾患の治療薬または診断薬、およびCLDN3、CLDN4の両方が関与する各疾患の治療薬または診断薬を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】は、固定化したCLDN発現細胞、CLDN3/CHO、CLDN4/CHO、CLDN5/CHO、CLDN6/CHOおよびCLDN9/CHOに対する市販の抗CLDN4モノクローナル抗体3E2C1、抗myc抗体および抗His抗体の反応性をフローサイトメーター（以下、FCMと表記する）によって測定した結果を示す。縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を示す。

10

【図2】は、CLDN4 myc/His遺伝子導入CHO細胞（CLDN4/CHO）およびベクター導入CHO細胞（Vector/CHO）に対する抗CLDN4モノクローナル抗体KM3900の反応性をABI8200によって測定した結果を示す。縦軸は蛍光強度を示す。

【図3】は、CLDN4 myc/His遺伝子導入CHO細胞（CLDN4/CHO）およびベクター導入CHO細胞（Vector/CHO）に対する抗CLDN4モノクローナル抗体KM3900の反応性をFCMによって測定した結果を示す。縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を示す。

【図4】は、ウエスタンブロットでの抗CLDN4モノクローナル抗体KM3900の反応性を示す。レーン左から（1）分子量マーカー、（2）CLDN4 myc/His遺伝子導入CHO細胞（CLDN4/CHO）、（3）ベクター導入CHO細胞（Vector/CHO）、（4）Capan 2、（5）HPAF II。陰性対照抗体KM511、市販の抗CLDN4モノクローナル抗体3E2C1、抗CLDN4モノクローナル抗体KM3900を1次抗体として反応させた結果を示す。

20

【図5】は、免疫沈降法での抗CLDN4モノクローナル抗体KM3900の反応性を示す。レーン左から（1）分子量マーカー、（2）CLDN4 myc/His遺伝子導入CHO細胞（CLDN4/CHO）、（3）ベクター導入CHO細胞（Vector/CHO）、（4）Capan 2、（5）HPAF II、（6）CLDN6 myc/His遺伝子導入CHO細胞（CLDN6/CHO）。抗CLDN4モノクローナル抗体KM3900で免疫沈降後、陰性対照抗体の抗G CSF誘導体抗体KM511、市販の抗CLDN4モノクローナル抗体3E2C1を1次抗体として反応させた結果を示す。

【図6】は、抗CLDN4モノクローナル抗体KM3907のCLDN3タンパク質およびCLDN4タンパク質に対する反応性をウエスタンブロットにより検討した結果を示す。レーン左から(1)分子量マーカー、(2)CLDN4/CHO、(3)CLDN3/CHO、(4)ベクター導入CHO細胞（Vector/CHO）を示す。検出抗体として抗CLDN4モノクローナル抗体KM3907、陰性対照検出抗体の抗G CSF誘導体抗体KM511、陽性対照検出抗体として市販の抗CLDN3ポリクローナル抗体もしくは抗CLDN4モノクローナル抗体3E2C1を用いた。

30

【図7】は、抗CLDN4モノクローナル抗体KM3907のCLDN3タンパク質およびCLDN4タンパク質に対する反応性を免疫沈降法により検討した結果を示す。レーン左から、(1)抗CLDN3ポリクローナル抗体（NOVUS社製）で免疫沈降したCLDN3/CHO、(2)抗CLDN3ポリクローナル抗体で免疫沈降したVector/CHO、(3)KM3907で免疫沈降したCLDN3/CHO、(4)KM3907で免疫沈降したVector/CHO、(5)KM3907で免疫沈降したCLDN4/CHO、(6)KM3907で免疫沈降したVector/CHOを示す。陰性対照検出抗体として正常ウサギ血清（Normal Rabbit Serum）もしくはKM511、検出抗体として市販の抗CLDN3ポリクローナル抗体もしくは抗CLDN4モノクローナル抗体3E2C1を用いた。

40

【図8】は、CLDN4 myc/His遺伝子導入CHO細胞（CLDN4/CHO）およびCLDN6 myc/His遺伝子導入CHO細胞（CLDN6/CHO）に対するP3 U1培養上清（P3 U1 culture sup.）、陰性対照抗体IgG2a、抗CLDN4モノクローナル抗体KM3900の反応性をFCMによって測定した結果を示す。縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を示す。

【図9】は、Capan 2、HPAF II、Daudiに対するP3 U1培養上清（P3 U1 culture sup.）、陰性対照抗体IgG2a、抗CLDN4モノクローナル抗体KM3900の反応性をFCMによって測定した結果を示す。縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を示す。

【図10】は、ヒト癌細胞株 MCF7（乳癌）、HT 29（大腸癌）、SW480（大腸癌）、22Rv

50

1 (前立腺癌)、DU 145 (前立腺癌)、PC 3 (前立腺癌) に対する陰性対照抗体マウスIgG 2a、抗CLDN4モノクローナル抗体KM3900およびKM3907の反応性をFCMによって測定した結果を示す。縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を示す。

【図11】は、ウインドヒーリング法において、CLDN4 myc/His遺伝子導入CHO細胞 (CLDN4/CHO) に対して、陰性対照抗体の抗G-CSF誘導体抗体KM511および抗CLDN4モノクローナル抗体KM3900を1 μg/mLの濃度で添加する前 (0 h) と添加後21時間培養後 (21 h) の細胞剥離領域の典型的写真像を示す。

【図12】は、ウインドヒーリング法において、CLDN4 myc/His遺伝子導入CHO細胞 (CLDN4/CHO) およびベクター導入CHO細胞 (Vector/CHO) に対して陰性対照抗体の抗G-CSF誘導体抗体KM511および抗CLDN4モノクローナル抗体KM3900を1 μg/mLの濃度で添加する前 (0 h) と添加後21時間培養後 (21 h) の細胞剥離領域の細胞間距離を測定し、グラフ化した結果を示す。縦軸は細胞間距離 (μm) を、横軸は培養時間および処理した抗体を示す。

【図13】は、CLDN4 myc/His遺伝子導入CHO細胞 (CLDN4/CHO)、ベクター導入CHO細胞 (Vector/CHO)、ヒト膀胱癌細胞株Capan 2に対する市販の抗CLDN4モノクローナル抗体4A4の反応性をFCMによって測定した結果を示す。陰性対照は抗体未添加 (Buffer) を設定した。縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を示す。

【図14】は、精製した抗CLDN4ヒト型キメラ抗体cKM3900を還元状態 (メルカプトエタノール添加) および非還元状態 (メルカプトエタノール未添加) でSDS PAGEした結果を示す。

【図15】は、精製した抗CLDN4ヒト型キメラ抗体cKM3907を還元状態 (メルカプトエタノール添加) および非還元状態 (メルカプトエタノール未添加) でSDS PAGEした結果を示す。

【図16】は、陰性対照抗体の抗FGF 8ヒト型キメラ抗体cKM3034、抗CLDN4ヒト型キメラ抗体cKM3900および抗CLDN4モノクローナル抗体KM3900のヒト膀胱癌細胞株Capan 2に対する反応性をFCMによって測定した結果を示す。縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を示す。

【図17】は、陰性対照抗体の抗FGF 8ヒト型キメラ抗体cKM3034、抗CLDN4ヒト型キメラ抗体cKM3907および抗CLDN4モノクローナル抗体KM3907のヒト乳癌細胞株MCF7に対する反応性をFCMによって測定した結果を示す。縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を示す。

【図18】は、CLDN4 myc/His遺伝子導入CHO細胞 (CLDN4/CHO)、ヒト膀胱癌細胞株Capan 2、ヒト卵巣癌細胞株MCAS、ヒト乳癌細胞株MCF7に対する抗CLDN4ヒト型キメラ抗体cKM3900のADCC活性を測定した結果を示す。縦軸はADCC活性 (%)、横軸は抗体濃度を示す。実線は、抗体非添加時の傷害活性を示す。

【図19】は、CLDN4 myc/His遺伝子導入CHO細胞 (CLDN4/CHO)、CLDN3 myc/His遺伝子導入CHO細胞 (CLDN3/CHO)、ヒト卵巣癌細胞株MCAS、ヒト乳癌細胞株MCF7に対する抗CLDN4ヒト型キメラ抗体cKM3907のADCC活性を測定した結果を示す。縦軸はADCC活性 (%)、横軸は抗体濃度を示す。実線は、抗体非添加時の傷害活性を示す。

【図20】は、CLDN4 myc/His遺伝子導入CHO細胞 (CLDN4/CHO) に対する抗CLDN4ヒト型キメラ抗体cKM3900のCDC活性を測定した結果を示す。縦軸はCDC活性 (%)、横軸は抗体濃度を示す。

【図21】は、CLDN4 myc/His遺伝子導入CHO細胞 (CLDN4/CHO)、CLDN3 myc/His遺伝子導入CHO細胞 (CLDN3/CHO)、ヒト乳癌細胞株MCF7に対する抗CLDN4ヒト型キメラ抗体cKM3907のCDC活性を測定した結果を示す。縦軸はCDC活性 (%)、横軸は抗体濃度を示す。

【図22】は、CLDN4 myc/His遺伝子導入CHO細胞 (CLDN4/CHO) およびベクター導入CHO細胞 (Vector/CHO) に対する抗CLDN4モノクローナル抗体KM3900の細胞増殖抑制活性を測定した結果を示す。縦軸は抗体未添加サンプルを100 %とした場合の増殖率 (%)、横軸は添加抗体濃度を示す。

【図23】は、CLDN4 myc/His遺伝子導入CHO細胞 (CLDN4/CHO)、ヒト膀胱癌細胞株Capan 2、ヒト卵巣癌細胞株MCASに対する抗CLDN4ヒト型キメラ抗体cKM3900のin vivo抗腫瘍活性を示す。縦軸が腫瘍体積 (mm³)、横軸は細胞移植後の日数を示す。

【発明を実施するための最良の形態】

10

20

30

40

50

【 0 0 1 7 】

本発明は、CLDN4遺伝子によりコードされるポリペプチド（以下、CLDN4遺伝子によりコードされるポリペプチドをCLDN4と略記することもある）の細胞外領域の立体構造を特異的に認識し、かつ該細胞外領域に結合するモノクローナル抗体に関する。

CLDN4遺伝子としては、CLDN4をコードする遺伝子であればいずれでもよいが、配列番号1で示される塩基配列を含む遺伝子があげられる。また、配列番号1で示される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつCLDN4の機能を有するポリペプチドをコードする遺伝子なども本発明のCLDN4遺伝子に包含される。

【 0 0 1 8 】

ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAとは、配列番号1で示される塩基配列を有するDNAをプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブランク・ハイブリダイゼーション法、サザンプロット・ハイブリダイゼーション法、DNAマイクロアレイ法などにより得られるハイブリダイズ可能なDNAを意味し、具体的には、ハイブリダイズしたコロニーまたはブランク由来のDNA、もしくは該配列を有するPCR産物もしくはオリゴDNAを固定化したフィルターまたはスライドガラスを用いて、0.7~1.0 mol/Lの塩化ナトリウム存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1~2倍濃度のSSC溶液（1倍濃度のSSC溶液の組成は、150 mmol/L塩化ナトリウム、15 mmol/Lクエン酸ナトリウムを含む）を用い、65℃条件下でフィルターもしくはスライドガラスを洗浄することにより同定できるDNAをあげることができる。ハイブリダイゼーションは、[Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition(Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989)、Current Protocols in Molecular Biology(John Wiley & Sons,1987 1997)、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition(Oxford University Press, 1995)]などに記載されている方法に準じて行うことができる。ハイブリダイズ可能なDNAとしては、配列番号1で示される塩基配列と少なくとも60%以上の相同性を有するDNA、好ましくは80%以上の相同性を有するDNA、さらに好ましくは95%以上の相同性を有するDNAをあげることができる。

【 0 0 1 9 】

真核生物の蛋白質をコードする遺伝子の塩基配列には、しばしば遺伝子の多型が認められる。本発明において用いられる遺伝子に、このような多型によって塩基配列にわずかに変異を生じた遺伝子も、本発明のCLDN4遺伝子に包含される。

CLDN4としては、配列番号2で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号2で示されるアミノ酸配列において1つ以上のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列からなり、かつCLDN4の機能を有するポリペプチド、ならびに配列番号2で示されるアミノ酸配列と60%以上、好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつCLDN4の機能を有するポリペプチドなどがあげられる。

【 0 0 2 0 】

配列番号2で示されるアミノ酸配列において1つ以上のアミノ酸が欠失、置換、または付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチドは、[Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition(Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989)、Current Protocols in Molecular Biology(John Wiley & Sons,1987 1997)、Nucleic Acids Research,10,6487(1982)、Proc.Natl.Acad.Sci.USA,79,6409(1982)、Gene,34,315(1985)、Nucleic Acids Research,13,4431(1985)、Proc.Natl.Acad.Sci.USA,82,488(1985)]などに記載の部位特異的変異導入法を用いて、例えば配列番号2で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするDNAに部位特異的変異を導入することにより得ることができる。欠失、置換または付加されるアミノ酸の数は特に限定されないが、好ましくは1個~数十個、例えば、1~20個、より好ましくは1個~数個、例えば、1~5個のアミノ酸である。

【 0 0 2 1 】

本発明に記載される相同性の数値は、特に明示した場合を除き、当業者に公知の相同性検索プログラムを用いて算出される数値であってよいが、塩基配列については、BLAST [J

10

20

30

40

50

.Mol.Biol.,215,403 (1990)]においてデフォルトのパラメータを用いて算出される数値など、アミノ酸配列については、BLAST2[Nucleic Acids Res.,25,3389(1997);Genome Res.,7,649(1997);<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Education/BLASTinfo/information3.html>]においてデフォルトのパラメータを用いて算出される数値などがあげられる。

【 0 0 2 2 】

デフォルトのパラメータとしては、G (Cost to open gap)が塩基配列の場合は5、アミノ酸配列の場合は11、 E (Cost to extend gap)が塩基配列の場合は2、アミノ酸配列の場合は1、 - q (Penalty for nucleotide mismatch)が 3、 r (reward for nucleotide match)が 1、 - e (expect value)が10、 W(wordsize) が塩基配列の場合は 1 1 残基、アミノ酸配列の場合は3残基、 y (Dropoff(X)for blast extensions in bits)がblastnの場合は20、blastn以外のプログラムでは7、 X (X dropoff value for gapped alignment in bits)が15および Z (final X dropoff value for gapped alignment in bits)がblastnの場合は50、blastn以外のプログラムでは25である (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/html/blastcgihelp.html>)。

10

【 0 0 2 3 】

配列番号2で示されるアミノ酸配列の部分配列からなるポリペプチドは、当業者に公知の方法によって作製することができ、例えば、配列番号2で示されるアミノ酸配列をコードするDNAの一部を欠失させ、これを含む発現ベクターを導入した形質転換体を培養することにより作製することができる。また、こうして作製されるポリペプチドまたはDNAに基づいて、上記と同様の方法により、配列番号2で示されるアミノ酸配列の部分配列において1以上のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチドを得ることができる。

20

【 0 0 2 4 】

CLDN4の細胞外領域とは、例えば配列番号2で示される該ポリペプチドのアミノ酸配列を公知の膜貫通領域予測プログラムSOSUI(<http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp/sosuiFRame0.html>)、予測プログラムTMHMM ver.2(http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM_2.0/)またはExpASy Proteomics Server(<http://Ca.expasy.org/>)などを用いて予測された領域があげられる。

【 0 0 2 5 】

本発明におけるCLDN4の細胞外領域の具体例としては、ExpASy Proteomics Server(<http://Ca.expasy.org/>)において予測される細胞外ドメインの29～81番目および139～160番目、もしくは文献 [Cancer Immunol. Immunother.,54,431 445(2005)]で予測されている細胞外ドメインの28～76番目および141～159番目に相当する領域等が挙げられる。

30

本発明において、CLDN4の立体構造とは、CLDN4が細胞膜上でとりうる立体構造または該立体構造と同等の立体構造を有していればいずれでもよい。

【 0 0 2 6 】

本発明の抗体または該抗体断片がCLDN4の細胞外領域に結合することは、例えば公知の免疫学的検出法、好適には蛍光細胞染色法等を用いて、特定の抗原を発現した細胞と特定抗原に対する抗体の結合性を確認する方法により確認することができる。また、公知の免疫学的検出法 [Monoclonal Antibodies Principles and practice,Third edition,Academic Press(1996)、Antibodies A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory(1988)、単クローン抗体実験マニュアル、講談社サイエンティフィック(1987)] などを組み合わせて確認することもできる。

40

【 0 0 2 7 】

本発明において、CLDN4を発現した細胞としては、CLDN4を発現していればいずれの細胞でもよく、例えばヒト体内に天然に存在する細胞、ヒト体内に天然に存在する細胞から樹立された細胞株または遺伝子組換え技術により得られた細胞などがあげられる。

ヒト体内に天然に存在する細胞としては、癌患者体内において該ポリペプチドが発現している細胞があげられ、例えば、バイオプシーなどで得られた腫瘍細胞のうちで該ポリペプチドが発現している細胞があげられる。

50

【 0 0 2 8 】

ヒト体内に天然に存在する細胞から樹立された細胞株としては、上記の癌患者から得られた該ポリペプチドが発現している細胞を株化して得られた細胞株のうち、該ポリペプチドが発現している細胞株があげられ、例えば、ヒトから樹立された細胞株である膵癌細胞株Capan 2 (ATCC HTB 80) またはHPAF II (ATCC CRL 1997) などがあげられる。

遺伝子組換え技術により得られた細胞としては、具体的には、該ポリペプチドをコードするcDNAを含む発現ベクターを昆虫細胞または動物細胞などに導入することにより得られる、該ポリペプチドが発現した細胞などがあげられる。

【 0 0 2 9 】

また本発明は、CLDN4の細胞外領域に結合し、CLDN4中和活性を有するモノクローナル抗体に関する。 10

本発明におけるCLDN4中和活性とは、CLDN4の機能を阻害する活性をいう。CLDN4の機能としては、TJを形成することによる細胞間接着機能や、水溶性分子が上皮細胞間や血管内皮細胞間の間隙を自由に通り抜けるのを妨げるバリアーとしての機能 [Nat.Rev.Mol.Cell Biol.,2,285(2001)、J.Cell Biol.,147,195(1999)]、癌化および癌の悪性化に関する機能などがあげられる。癌化および癌の悪性化に関する機能としては、癌細胞の腫瘍形成能、浸潤能、転移能などを亢進する機能などがあげられる [Cancer Res.,65,7378(2005)]。

【 0 0 3 0 】

本発明の抗体としては、CLDN4の細胞外領域の立体構造を特異的に認識し、かつ該細胞外領域に結合する抗体またはその抗体断片、もしくはCLDN4の細胞外領域に結合し、CLDN4中和活性を有するモノクローナル抗体または抗体断片であればいずれの抗体も包含されるが、具体的には、配列番号2で表されるアミノ酸配列の28～76番目および141～159番目のアミノ酸配列から選ばれる、いずれか一方のアミノ酸配列からなる立体構造を認識する抗体があげられる。 20

【 0 0 3 1 】

配列番号2で表されるアミノ酸配列の28～76番目のアミノ酸配列からなる立体構造を認識する抗体としては、ハイブリドーマKM3907 (FERM BP 10885) から生産されるモノクローナル抗体KM3907、CLDN4の細胞外領域への結合についてモノクローナル抗体KM3907と競合する抗体、モノクローナル抗体KM3907が結合するCLDN4の細胞外領域に存在するエピトープに結合する抗体などがあげられる。 30

【 0 0 3 2 】

配列番号2で表されるアミノ酸配列の141～159番目のアミノ酸配列からなる立体構造を認識する抗体としては、ハイブリドーマKM3900 (FERM BP 10751) から生産されるモノクローナル抗体KM3900、CLDN4の細胞外領域への結合についてモノクローナル抗体KM3900と競合する抗体、モノクローナル抗体KM3900が認識するCLDN4の細胞外領域に存在するエピトープに結合する抗体などがあげられる。

【 0 0 3 3 】

本発明におけるモノクローナル抗体としては、ハイブリドーマにより生産される抗体、および抗体遺伝子を含む発現ベクターで形質転換した形質転換体により生産される遺伝子組換え抗体をあげることができる。 40

ハイブリドーマとは、ヒト以外の哺乳動物に抗原を免疫して取得されたB細胞と、ミエローマ細胞とを細胞融合させて得られる所望の抗原特異性を有するモノクローナル抗体を生産する細胞をいう。

【 0 0 3 4 】

ハイブリドーマは、例えば上記のCLDN4を発現した細胞などを抗原として調製し、該抗原を免疫した動物より抗原特異性を有する抗体生産細胞を誘導し、さらに、該抗体生産細胞と骨髓腫細胞とを融合させることにより、調製することができる。該ハイブリドーマを培養するか、あるいは該ハイブリドーマ細胞を動物に投与して該動物を腹水癌化させ、該培養液または腹水を分離、精製することにより抗CLDN4抗体を取得することができる。 50

【 0 0 3 5 】

抗原を免疫する動物としてはハイブリドーマを作製することが可能であれば、いかなるものも用いることができるが、マウス、ラット、ハムスター、ラビットなどが好適に用いられる。またこのような動物から抗体産生能を有する細胞を取得し、該細胞に*in vitro*で免疫を施した後に、骨髄腫細胞と融合して作製したハイブリドーマが生産する抗体なども本発明の抗体に包含される。

【 0 0 3 6 】

モノクローナル抗体とは、単一クローンの抗体産生細胞が分泌する抗体であり、ただ一つのエピトープ（抗原決定基ともいう）を認識し、アミノ酸配列（1次構造）が均一である。

本発明のモノクローナル抗体の具体例としては、ハイブリドーマKM3900により生産されたモノクローナル抗体KM3900、モノクローナル抗体KM3900と競合してCLDN4の細胞外領域に結合するモノクローナル抗体、およびモノクローナル抗体KM3900が結合するCLDN4細胞外領域に存在するエピトープに結合するモノクローナル抗体などがあげられる。

【 0 0 3 7 】

更に本発明のモノクローナル抗体の具体例としては、ハイブリドーマKM3907により生産されたモノクローナル抗体KM3907、モノクローナル抗体KM3907と競合してCLDN4の細胞外領域に結合するモノクローナル抗体、およびモノクローナル抗体KM3907が結合するCLDN4細胞外領域に存在するエピトープに結合するモノクローナル抗体などがあげられる。

ハイブリドーマKM3900は平成18年12月21日付でブダペスト条約に基づき独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6）にFERM BP 10751として寄託されており、またハイブリドーマKM3907は平成19年7月31日付けでブダペスト条約に基づき独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6）にFERM BP 10885として寄託されている。

【 0 0 3 8 】

遺伝子組換え抗体としては、ヒト型キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体または該抗体断片など、遺伝子組換え技術により製造される抗体を包含する。遺伝子組換え抗体において、抗原結合活性を有し、抗原性が低く、血中半減期が延長されたものは、治療薬として好ましい。

本発明の遺伝子組換え抗体の具体例としては、抗体VHのCDR1、CDR2およびCDR3が、それぞれ配列番号19、20および21で示されるアミノ酸配列を含む遺伝子組換え抗体、抗体VLのCDR1、CDR2およびCDR3が、それぞれ配列番号22、23および24で示されるアミノ酸配列を含む遺伝子組換え抗体、抗体VHのCDR1、CDR2およびCDR3が、それぞれ配列番号19、20および21を含み、抗体VLのCDR1、CDR2およびCDR3が、それぞれ配列番号22、23および24で示されるアミノ酸配列を含む遺伝子組換え抗体があげられる。

【 0 0 3 9 】

また、本発明の遺伝子組換え抗体としては、抗体VHのCDR1、CDR2およびCDR3が、それぞれ配列番号59、60および61で示されるアミノ酸配列を含む遺伝子組換え抗体、抗体VLのCDR1、CDR2およびCDR3が、それぞれ配列番号62、63および64で示されるアミノ酸配列を含む遺伝子組換え抗体、抗体VHのCDR1、CDR2およびCDR3が、それぞれ配列番号59、60および61を含み、かつ抗体VLのCDR1、CDR2およびCDR3が、それぞれ配列番号62、63および64で示されるアミノ酸配列を含む遺伝子組換え抗体も含まれる。

【 0 0 4 0 】

更に、本発明の遺伝子組換え抗体としては、CLDN4の細胞外領域への結合においてモノクローナル抗体KM3900と競合する遺伝子組換え抗体、CLDN4の細胞外領域への結合においてモノクローナル抗体KM3907と競合反応する遺伝子組換え抗体、モノクローナル抗体KM3900が認識するCLDN4の細胞外領域に存在するエピトープに結合する遺伝子組換え抗体、モノクローナル抗体KM3907が認識するCLDN4の細胞外領域に存在するエピトープに結合する遺伝子組換え抗体も包含される。

【0041】

ヒト型キメラ抗体は、非ヒト抗体の重鎖可変領域（以下、VHと表記する）および軽鎖可変領域（以下、VLと表記する）とヒト抗体の重鎖定常領域（以下、CHと表記する）および軽鎖定常領域（以下、CLと表記する）とからなる抗体をいう。

本発明のヒト型キメラ抗体は、以下のようにして製造することができる。すなわち、本発明の、CLDN4の立体構造を特異的に認識し、かつ該細胞外領域に結合するモノクローナル抗体、もしくはCLDN4の立体構造を特異的に認識し、CLDN4の中和活性を有するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマより、VHおよびVLをコードするcDNAを取得し、ヒト抗体のCHおよびCLをコードする遺伝子を有する動物細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築し、動物細胞へ導入して抗体を発現させて作製できる。

10

【0042】

ヒト型キメラ抗体のCHとしては、ヒトイムノグロブリン（以下、hIgと表記する）に属すればいかなるものでもよいが、hIgGクラスのもの好適であり、さらにhIgGクラスに属するhIgG1、hIgG2、hIgG3、hIgG4といったサブクラスのいずれも用いることができる。また、ヒト型キメラ抗体のCLとしては、hIgに属すればいずれのものでもよく、クラスあるいはサブクラスのものをを用いることができる。

【0043】

本発明のヒト型キメラ抗体としては、具体的には抗体のVHのCDR1、CDR2、CDR3のアミノ酸配列が、それぞれ配列番号19、20、21で示されるアミノ酸配列であり、および抗体のVLのCDR1、CDR2、CDR3のアミノ酸配列が、それぞれ配列番号22、23、24で示されるアミノ酸配列であるヒト型キメラ抗体、抗体のVHが配列番号16で示されるアミノ酸配列の20～142番目のアミノ酸配列および抗体のVLが配列番号18で示されるアミノ酸配列の23～130番目のアミノ酸配列を有する、ヒト型キメラ抗体などがあげられる。

20

【0044】

また、本発明のヒト型キメラ抗体としては、抗体のVHのCDR1、CDR2、CDR3のアミノ酸配列が、それぞれ配列番号59、60、61で示されるアミノ酸配列であり、および抗体のVLのCDR1、CDR2、CDR3のアミノ酸配列が、それぞれ配列番号62、63、64で示されるアミノ酸配列であるヒト型キメラ抗体、抗体のVHが配列番号56で示されるアミノ酸配列の20～138番目のアミノ酸配列および抗体のVLが配列番号58で示されるアミノ酸配列の23～130番目のアミノ酸配列を含む、ヒト型キメラ抗体も包含される。

30

【0045】

ヒト化抗体は、非ヒト抗体のVHおよびVLのCDRのアミノ酸配列をヒト抗体のVHおよびVLの適切な位置に移植した抗体をいい、ヒト型CDR移植抗体、再構成抗体（reshaped antibody）ともいう。

本発明のヒト化抗体は、本発明のCLDN4の細胞外領域の立体構造を特異的に認識し、かつ該細胞外領域に結合するモノクローナル抗体、もしくはCLDN4の細胞外領域に結合し、CLDN4の中和活性を有するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマから産生される非ヒト抗体の、VHおよびVLのCDRのアミノ酸配列を、任意のヒト抗体のVHおよびVLのフレームワーク（以下、FRと記す）に移植した抗体可変領域（以下、V領域と記す）をコードするcDNAを構築し、ヒト抗体のCHおよびCLをコードする遺伝子を有する動物細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト化抗体発現ベクターを構築し、動物細胞へ導入することにより発現させ、製造することができる。

40

【0046】

ヒト抗体のVHおよびVLのFRのアミノ酸配列は、ヒト抗体由来のVHおよびVLのFRのアミノ酸配列であれば、いかなるものでも用いることができる。例えば、Protein Data Bankなどのデータベースに登録されているヒト抗体のVHおよびVLのFRのアミノ酸配列、またはSequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991)などに記載の、ヒト抗体のVHおよびVLのFRの各サブグループの共通アミノ酸配列などが用いられる。

50

【 0 0 4 7 】

ヒト化抗体のCHとしては、hIgに属すればいかなるものでもよいが、hIgGクラスのもの
が好適であり、さらにhIgGクラスに属するhIgG1、hIgG2、hIgG3、hIgG4といったサブクラ
スのいずれも用いることができる。また、ヒト化抗体のCLとしては、hIgに属すればいず
れのものでもよく、クラスあるいはクラスのものを用いることができる。

本発明のヒト化抗体の具体例としては、抗体のVHのCDR1、CDR2、CDR3が、それぞれ配列
番号19、20、21で示されるアミノ酸配列であり、および/または抗体のVLのCDR1、CDR2、
CDR3が、それぞれ配列番号22、23、24で示されるアミノ酸配列であるヒト化抗体または該
抗体断片、抗体のVHのCDR1、CDR2、CDR3が、それぞれ配列番号59、60、61で示されるアミ
ノ酸配列であり、および/または抗体のVLのCDR1、CDR2、CDR3が、それぞれ配列番号62、
63、64で示されるアミノ酸配列であるヒト化抗体または該抗体断片などがあげられる。

10

【 0 0 4 8 】

本発明のヒト化抗体のより具体的な例としては、抗体のVHが配列番号74で表されるアミ
ノ酸配列、または配列番号74で表されるアミノ酸配列中の41番目のPro、43番目のGln、44
番目のGly、48番目のMet、67番目のArg、68番目のVal、70番目のIle、および72番目のAla
から選ばれる少なくとも1つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配
列および抗体のVLが、配列番号76で示されるアミノ酸配列、または配列番号76で示される
アミノ酸配列中の1番目のAsp、10番目のSer、21番目のIle、48番目のLeu、71番目のAsp、
79番目のLeu、および81番目のProから選ばれる少なくとも1つのアミノ酸残基が他のアミ
ノ酸残基に置換されたアミノ酸配列をそれぞれ含むヒト化抗体などがあげられる。

20

【 0 0 4 9 】

例えば、以下に示すヒト化抗体があげられる。

抗体のVHのアミノ酸配列については、抗体のVHが配列番号74で表されるアミノ酸配列中
の41番目のPro、44番目のGly、48番目のMet、67番目のArg、68番目のVal、70番目のIle、
および72番目のAlaが、他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を有するヒト化抗体
。

【 0 0 5 0 】

好ましくは抗体のVHが配列番号74で表されるアミノ酸配列中の48番目のMet、67番目のA
rg、68番目のVal、70番目のIle、および72番目のAlaが、他のアミノ酸残基に置換された
アミノ酸配列を有するヒト化抗体。

30

好ましくは抗体のVHが配列番号74で表されるアミノ酸配列中の48番目のMet、68番目のV
al、70番目のIle、および72番目のAlaが、他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を
有するヒト化抗体。

【 0 0 5 1 】

好ましくは抗体のVHが配列番号74で表されるアミノ酸配列中の68番目のVal、70番目のI
le、および72番目のAlaが、他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を有するヒト化
抗体。

好ましくは抗体のVHが配列番号74で表されるアミノ酸配列中の48番目のMet、68番目のV
al、および70番目のIleが、他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を有するヒト化
抗体。

40

【 0 0 5 2 】

好ましくは抗体のVHが配列番号74で表されるアミノ酸配列中の68番目のVal、および70
番目のIleが、他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を有するヒト化抗体などがあ
げられる。

上記のアミノ酸改変の結果得られる抗体のVHのアミノ酸配列としては、配列番号74で表
されるアミノ酸配列中の41番目のProをHisに、43番目のGlnをLysに、44番目のGlyをSerに
、48番目のMetをIleに、67番目のArgをLysに、68番目のValをAlaに、70番目のIleをLeuに
、および72番目のAlaをValに、置換する改変から選ばれる少なくとも1つの改変が導入さ
れたアミノ酸配列があげられる。

【 0 0 5 3 】

50

8個の変更が導入されたVHのアミノ酸配列としては、具体的には、配列番号74で表されるアミノ酸配列中の41番目のProをHisに、43番目のGlnをLysに、44番目のGlyをSerに、48番目のMetをIleに、67番目のArgをLysに、68番目のValをAlaに、70番目のIleをLeuに、および72番目のAlaをValに、置換したアミノ酸配列があげられる。

7個の変更が導入されたVHのアミノ酸配列としては、具体的には、配列番号74で表されるアミノ酸配列中の41番目のProをHisに、44番目のGlyをSerに、48番目のMetをIleに、67番目のArgをLysに、68番目のValをAlaに、70番目のIleをLeuに、および72番目のAlaをValに、置換したアミノ酸配列、などがあげられる。

【0054】

6個の変更が導入されたVHのアミノ酸配列としては、具体的には、配列番号74で表されるアミノ酸配列中の44番目のGlyをSerに、48番目のMetをIleに、67番目のArgをLysに、68番目のValをAlaに、70番目のIleをLeuに、および72番目のAlaをValに、置換したアミノ酸配列、

41番目のProをHisに、48番目のMetをIleに、67番目のArgをLysに、68番目のValをAlaに、70番目のIleをLeuに、および72番目のAlaをValに、置換したアミノ酸配列、および

41番目のProをHisに、44番目のGlyをSerに、48番目のMetをIleに、68番目のValをAlaに、70番目のIleをLeuに、および72番目のAlaをValに、置換したアミノ酸配列、などがあげられる。

【0055】

5個の変更が導入されたVHのアミノ酸配列としては、具体的には、配列番号74で表されるアミノ酸配列中の48番目のMetをIleに、67番目のArgをLysに、68番目のValをAlaに、70番目のIleをLeuに、および72番目のAlaをValに、置換したアミノ酸配列、

41番目のProをHisに、48番目のMetをIleに、68番目のValをAlaに、70番目のIleをLeuに、および72番目のAlaをValに、置換したアミノ酸配列、および

44番目のGlyをSerに、48番目のMetをIleに、68番目のValをAlaに、70番目のIleをLeuに、および72番目のAlaをValに、置換したアミノ酸配列、などがあげられる。

【0056】

4個の変更が導入されたVHのアミノ酸配列としては、具体的には、配列番号74で表されるアミノ酸配列中の48番目のMetをIleに、68番目のValをAlaに、70番目のIleをLeuに、および72番目のAlaをValに、置換したアミノ酸配列、などがあげられる。

3個の変更が導入されたVHのアミノ酸配列としては、具体的には、配列番号74で表されるアミノ酸配列中の68番目のValをAlaに、70番目のIleをLeuに、および72番目のAlaをValに、置換したアミノ酸配列、

48番目のMetをIleに、70番目のIleをLeuに、および72番目のAlaをValに、置換したアミノ酸配列、

48番目のMetをIleに、68番目のValをAlaに、および72番目のAlaをValに、置換したアミノ酸配列、および

48番目のMetをIleに、68番目のValをAlaに、および70番目のIleをLeuに、置換したアミノ酸配列、などがあげられる。

【0057】

2個の変更が導入されたVHのアミノ酸配列としては、具体的には、配列番号74で表されるアミノ酸配列中の70番目のIleをLeuに、および72番目のAlaをValに、置換したアミノ酸配列、

48番目のMetをIleに、および72番目のAlaをValに、置換したアミノ酸配列、

48番目のMetをIleに、および68番目のValをAlaに、置換したアミノ酸配列、および

68番目のValをAlaに、および70番目のIleをLeuに、置換したアミノ酸配列、などがあげられる。

【0058】

1個の変更が導入されたVHのアミノ酸配列としては、具体的には、配列番号74で表されるアミノ酸配列中の

10

20

30

40

50

41番目のProをHisに置換したアミノ酸配列、43番目のGlnをLysに置換したアミノ酸配列、44番目のGlyをSerに置換したアミノ酸配列、48番目のMetをIleに置換したアミノ酸配列、67番目のArgをLysに置換したアミノ酸配列、68番目のValをAlaに置換したアミノ酸配列、70番目のIleをLeuに置換したアミノ酸配列、および72番目のAlaをValに置換したアミノ酸配列、があげられる。

【0059】

抗体のVLのアミノ酸配列については、抗体のVLが配列番号76で表されるアミノ酸配列中の1番目のAsp、21番目のIle、48番目のLeu、71番目のAsp、79番目のLeu、および81番目のProが、他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を有するヒト化抗体。

好ましくは抗体のVLが配列番号76で表されるアミノ酸配列中の1番目のAsp、21番目のIle、48番目のLeu、79番目のLeu、および81番目のProが、他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を有するヒト化抗体。

10

【0060】

好ましくは抗体のVLが配列番号76で表されるアミノ酸配列中の1番目のAsp、21番目のIle、48番目のLeu、および79番目のLeuが、他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を有するヒト化抗体。

好ましくは抗体のVLが配列番号76で表されるアミノ酸配列中の21番目のIle、48番目のLeu、および79番目のLeuが、他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を有するヒト化抗体。

【0061】

好ましくは抗体のVLが配列番号76で表されるアミノ酸配列中の21番目のIle、および48番目のLeuが、他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を有するヒト化抗体。

好ましくは抗体のVLが配列番号76で表されるアミノ酸配列中の48番目のLeu、および79番目のLeuが、他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を有するヒト化抗体などがあげられる。

20

【0062】

上記のアミノ酸改変の結果得られる抗体のVLのアミノ酸配列としては、配列番号76で表されるアミノ酸配列中の1番目のAspをGlnに、10番目のSerをIleに、21番目のIleをMetに、48番目のLeuをTrpに、71番目のAspをSerに、79番目のLeuをMetに、および81番目のProをAlaに、置換する改変から選ばれる少なくとも1つの改変が導入されたアミノ酸配列が

30

【0063】

7個の改変が導入されたVLのアミノ酸配列としては、具体的には、配列番号76で表されるアミノ酸配列中の1番目のAspをGlnに、10番目のSerをIleに、21番目のIleをMetに、48番目のLeuをTrpに、71番目のAspをSerに、79番目のLeuをMetに、および81番目のProをAlaに、置換したアミノ酸配列があげられる。

6個の改変が導入されたVLのアミノ酸配列としては、具体的には、配列番号76で表されるアミノ酸配列中の1番目のAspをGlnに、21番目のIleをMetに、48番目のLeuをTrpに、71番目のAspをSerに、79番目のLeuをMetに、および81番目のProをAlaに、置換したアミノ酸配列、

40

1番目のAspをGlnに、10番目のSerをIleに、21番目のIleをMetに、48番目のLeuをTrpに、79番目のLeuをMetに、および81番目のProをAlaに、置換したアミノ酸配列、

1番目のAspをGlnに、10番目のSerをIleに、21番目のIleをMetに、48番目のLeuをTrpに、71番目のAspをSerに、および79番目のLeuをMetに、置換したアミノ酸配列、などがあげられる。

【0064】

5個の改変が導入されたVLのアミノ酸配列としては、具体的には、配列番号76で表されるアミノ酸配列中の1番目のAspをGlnに、21番目のIleをMetに、48番目のLeuをTrpに、79番目のLeuをMetに、および81番目のProをAlaに、置換したアミノ酸配列、

1番目のAspをGlnに、21番目のIleをMetに、48番目のLeuをTrpに、71番目のAspをSerに

50

、および79番目のLeuをMetに、置換したアミノ酸配列、
1番目のAspをGlnに、10番目のSerをIleに、21番目のIleをMetに、48番目のLeuをTrpに
、および79番目のLeuをMetに、置換したアミノ酸配列、などがあげられる。

【0065】

4個の改変が導入されたVLのアミノ酸配列としては、具体的には、配列番号76で表されるアミノ酸配列中の1番目のAspをGlnに、21番目のIleをMetに、48番目のLeuをTrpに、および79番目のLeuをMetに、置換したアミノ酸配列、などがあげられる。

3個の改変が導入されたVLのアミノ酸配列としては、具体的には、配列番号76で表されるアミノ酸配列中の21番目のIleをMetに、48番目のLeuをTrpに、および79番目のLeuをMetに、置換したアミノ酸配列、などがあげられる。

【0066】

2個の改変が導入されたVLのアミノ酸配列としては、具体的には、配列番号76で表されるアミノ酸配列中の48番目のLeuをTrpに、および79番目のLeuをMetに、置換したアミノ酸配列、

21番目のIleをMetに、および79番目のLeuをMetに、置換したアミノ酸配列、

21番目のIleをMetに、および48番目のLeuをTrpに、置換したアミノ酸配列、などがあげられる。

【0067】

1個の改変が導入されたVLのアミノ酸配列としては、具体的には、配列番号76で表されるアミノ酸配列中の

1番目のAspをGlnに置換したアミノ酸配列、10番目のSerをIleに置換したアミノ酸配列、21番目のIleをMetに置換したアミノ酸配列、48番目のLeuをTrpに置換したアミノ酸配列、71番目のAspをSerに置換したアミノ酸配列、79番目のLeuをMetに置換したアミノ酸配列、および81番目のProをAlaに置換したアミノ酸配列があげられる。

【0068】

ヒト抗体は、元来、ヒト体内に天然に存在する抗体をいうが、最近の遺伝子工学的、細胞工学的、発生工学的な技術の進歩により作製されたヒト抗体ファージライブラリーおよびヒト抗体産生トランスジェニック動物から得られる抗体なども含まれる。

ヒト体内に天然に存在する抗体は、例えば、ヒト末梢血リンパ球を単離し、EBウイルスなどを感染させ不死化し、クローニングすることにより、該抗体を産生するリンパ球を培養でき、培養上清中より該抗体を精製することができる。

【0069】

ヒト抗体ファージライブラリーは、ヒトB細胞から調製した抗体遺伝子をファージ遺伝子に挿入することによりFab、scFvなどの抗体断片をファージ表面に発現させたライブラリーである。該ライブラリーより、抗原を固定化した基質に対する結合活性を指標として所望の抗原結合活性を有する抗体断片を表面に発現しているファージを回収することができる。該抗体断片は、さらに、遺伝子工学的手法により2本の完全なH鎖および2本の完全なL鎖からなるヒト抗体分子へも変換することができる。

【0070】

ヒト抗体産生トランスジェニック動物は、ヒト抗体遺伝子が細胞内に組込まれた動物を意味する。具体的には、例えば、マウスES細胞へヒト抗体遺伝子を導入し、該ES細胞をマウスの初期胚へ移植後、発生させることによりヒト抗体産生トランスジェニックマウスを作製することができる。ヒト抗体産生トランスジェニック動物からのヒト抗体の作製方法は、通常ヒト以外の動物で行われているハイブリドーマ作製方法によりヒト抗体産生ハイブリドーマを取得し、培養することで培養上清中にヒト抗体を産生蓄積させることができる。

【0071】

上述の抗体または抗体断片を構成するアミノ酸配列において、1つ以上のアミノ酸が欠失、付加、置換または挿入され、かつ上述の抗体またはその抗体断片と同様な活性を有する抗体またはその抗体断片も、本発明の抗体またはその抗体断片に包含される。

10

20

30

40

50

欠失、置換、挿入および/または付加されるアミノ酸の数は1個以上でありその数は特に限定されないが、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 79, 6409(1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci USA, 82, 488 (1985)等に記載の部位特異的変異導入法等の周知の技術により、欠失、置換もしくは付加できる程度の数である。例えば、1~数十個、好ましくは1~20個、より好ましくは1~10個、さらに好ましくは1~5個である。

【0072】

上記の抗体のアミノ酸配列において1つ以上のアミノ酸残基が欠失、置換、挿入または付加されたとは、次ぎのことを示す。同一配列中の任意、かつ1もしくは複数のアミノ酸配列中において、1または複数のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入または付加があることを意味する。また、欠失、置換、挿入または付加が同時に生じる場合もあり、置換、挿入または付加されるアミノ酸残基は天然型と非天然型いずれの場合もある。天然型アミノ酸残基としては、Lアラニン、Lアスパラギン、Lアスパラギン酸、Lグルタミン、Lグルタミン酸、グリシン、Lヒスチジン、Lイソロイシン、Lロイシン、Lリジン、Lメチオニン、Lフェニルアラニン、Lプロリン、Lセリン、Lスレオニン、Lトリプトファン、Lチロシン、LバリンおよびLシステインなどがあげられる。

【0073】

以下に、相互に置換可能なアミノ酸残基の好ましい例を示す。同一群に含まれるアミノ酸残基は相互に置換可能である。

A群：ロイシン、イソロイシン、ノルロイシン、バリン、ノルバリン、アラニン、2アミノブタン酸、メチオニン、Oメチルセリン、tブチルグリシン、tブチルアラニン、シクロヘキシルアラニン

B群：アスパラギン酸、グルタミン酸、イソアスパラギン酸、イソグルタミン酸、2アミノアジピン酸、2アミノスベリン酸

C群：アスパラギン、グルタミン

D群：リジン、アルギニン、オルニチン、2,4ジアミノブタン酸、2,3ジアミノプロピオン酸

E群：プロリン、3ヒドロキシプロリン、4ヒドロキシプロリン

F群：セリン、スレオニン、ホモセリン

G群：フェニルアラニン、チロシン

本発明の抗体断片としては、Fab、F(ab')₂、Fab'、scFv、diabody、dsFvおよびCDRを含むペプチドなどがあげられる。

【0074】

Fabは、IgGを蛋白質分解酵素パパイニンで処理して得られる断片のうち(H鎖の224番目のアミノ酸残基で切断される)、H鎖のN末端側約半分とL鎖全体がジスルフィド結合で結合した分子量約5万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

本発明のFabは、本発明のCLDN4の細胞外領域の立体構造を特異的に認識し、かつ該細胞外領域に結合するモノクローナル抗体、もしくはCLDN4の細胞外領域に結合し、CLDN4中和活性を有するモノクローナル抗体を蛋白質分解酵素パパイニンで処理して得ることができる。または、該抗体のFabをコードするDNAを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、製造することができる。

【0075】

F(ab')₂は、IgGのヒンジ領域の2個のジスルフィド結合の下部を酵素ペプシンで分解して得られた、2つのFab領域がヒンジ部分で結合して構成された、分子量約10万の抗原結合活性を有するフラグメントである。

本発明のF(ab')₂は、本発明のCLDN4の細胞外領域の立体構造を特異的に認識し、かつ該細胞外領域に結合するモノクローナル抗体、もしくはCLDN4の細胞外領域に結合し、CLD

10

20

30

40

50

N4中和活性を有するモノクローナル抗体を蛋白質分解酵素ペプシンで処理して得ることができる。または、下記のFab'をチオエーテル結合あるいはジスルフィド結合させ、作製することができる。

【0076】

Fab'は、上記F(ab')₂のヒンジ領域のジスルフィド結合を切断した分子量約5万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

本発明のFab'は、本発明のCLDN4の細胞外領域の立体構造を特異的に認識し、かつ該細胞外領域に結合するF(ab')₂、もしくはCLDN4の細胞外領域に結合し、CLDN4中和活性を有するF(ab')₂を還元剤ジチオスレイトール処理して得ることができる。または、該抗体のFab'断片をコードするDNAを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、製造することができる。

10

【0077】

scFvは、1本のVHと1本のVLとを適当なペプチドリinker（以下、Pと表記する）を用いて連結した、VH-P-VLないしはVL-P-VHポリペプチドで、抗原結合活性を有する抗体断片である。

本発明のscFvは、本発明のCLDN4の細胞外領域の立体構造を特異的に認識し、かつ該細胞外領域に結合するモノクローナル抗体、もしくはCLDN4の細胞外領域に結合し、CLDN4中和活性を有するモノクローナル抗体のVHおよびVLをコードするcDNAを取得し、scFvをコードするDNAを構築し、該DNAを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、製造することができる。

20

【0078】

diabodyは、scFvが二量体化した抗体断片で、二価の抗原結合活性を有する抗体断片である。二価の抗原結合活性は、同一であることもできるし、一方を異なる抗原結合活性とすることもできる。

本発明のdiabodyは、本発明のCLDN4の細胞外領域の立体構造を特異的に認識し、かつ該細胞外領域に結合するモノクローナル抗体、もしくはCLDN4の細胞外領域に結合し、CLDN4中和活性を有するモノクローナル抗体のVHおよびVLをコードするcDNAを取得し、scFvをコードするDNAをPのアミノ酸配列の長さが8残基以下となるように構築し、該DNAを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、製造することができる。

30

【0079】

dsFvは、VHおよびVL中のそれぞれ1アミノ酸残基をシステイン残基に置換したポリペプチドを該システイン残基間のジスルフィド結合を介して結合させたものをいう。システイン残基に置換するアミノ酸残基はReiterらにより示された方法 [Protein Engineering, 7, 697(1994)] に従って、抗体の立体構造予測に基づいて選択することができる。

本発明のdsFvは、本発明のCLDN4の細胞外領域の立体構造を特異的に認識し、かつ該細胞外領域に結合するモノクローナル抗体、もしくはCLDN4の細胞外領域に結合し、CLDN4中和活性を有するモノクローナル抗体のVHおよびVLをコードするcDNAを取得し、dsFvをコードするDNAを構築し、該DNAを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、製造することができる。

40

【0080】

CDRを含むペプチドは、VHまたはVLのCDRの少なくとも1領域以上を含んで構成される。複数のCDRを含むペプチドは、直接または適当なペプチドリinkerを介して結合させることができる。

本発明のCDRを含むペプチドは、本発明のCLDN4の細胞外領域の立体構造を特異的に認識し、かつ該細胞外領域に結合するモノクローナル抗体、もしくはCLDN4の細胞外領域に結合し、CLDN4中和活性を有するモノクローナル抗体のVHおよびVLのCDRをコードするDNAを

50

構築し、該DNAを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、製造することができる。

【0081】

また、CDRを含むペプチドは、Fmoc法（フルオレニルメチルオキシカルボニル法）、tBoc法（t-ブチルオキシカルボニル法）などの化学合成法によって製造することもできる。

本発明には、本発明のCLDN4の細胞外領域の立体構造を特異的に認識し、かつ該細胞外領域に結合するモノクローナル抗体または抗体断片、もしくはCLDN4の細胞外領域に結合し、CLDN4の中和活性を有するモノクローナル抗体またはその抗体断片に薬剤、タンパク質、放射性同位元素などを化学的あるいは遺伝子工学的に結合させた抗体とのコンジュゲートを包含する。

10

【0082】

本発明のコンジュゲートは、本発明のCLDN4の細胞外領域の立体構造を特異的に認識し、かつ該細胞外領域に結合するモノクローナル抗体またはその抗体断片、もしくはCLDN4の細胞外領域に結合し、CLDN4中和活性を有するモノクローナル抗体またはその抗体断片のH鎖あるいはL鎖のN末端側あるいはC末端側、抗体またはその抗体断片中の適当な置換基あるいは側鎖、さらには抗体またはその抗体断片中の糖鎖などに薬剤、タンパク質、放射性同位元素などを化学的手法〔抗体工学入門、金光修著、地人書館（1994）〕により結合させることにより製造することができる。

20

【0083】

また、本発明のCLDN4の細胞外領域の立体構造を特異的に認識し、かつ該細胞外領域に結合するモノクローナル抗体またはその抗体断片、もしくはCLDN4の細胞外領域に結合し、CLDN4中和活性を有するモノクローナル抗体または抗体断片をコードするDNAと、結合させたいタンパク質をコードするDNAを連結させて発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを、原核生物あるいは真核生物の宿主細胞へ導入するという遺伝子工学的手法によっても製造することができる。

【0084】

薬剤としては、化学療法剤、抗体医薬、免疫賦活剤、高分子の薬剤などがあげられる。

タンパク質としては、サイトカイン、増殖因子、毒素タンパク質、などがあげられる。

さらに、抗体または該抗体断片に結合させる薬剤は、プロドラッグの形態でもよい。本発明におけるプロドラッグとは、腫瘍環境に存在する酵素などによって化学的な修飾を受け、癌細胞を傷害する作用を有する物質に変換される薬剤をいう。

30

【0085】

化学療法剤としては、アルキル化剤、ニトロソウレア剤、代謝拮抗剤、抗癌性抗生物質、植物由来アルカロイド、トポイソメラーゼ阻害剤、ホルモン療法剤、ホルモン拮抗剤、アロマターゼ阻害剤、P糖蛋白阻害剤、白金錯体誘導体、M期阻害剤、キナーゼ阻害剤などのいかなる化学療法剤も包含される。化学療法剤としては、アミフォスチン（エチオール）、シスプラチン、ダカルバジン（DTIC）、ダクチノマイシン、メクロレタミン（ナイトロジェンマスタード）、ストレプトゾシン、シクロフォスファミド、イホスファミド、カルムスチン（BCNU）、ロムスチン（CCNU）、ドキシソルピシン（アドリアマイシン）、ドキシソルピシンリポ（ドキシル）、エピルピシン、ゲムシタピン（ゲムザール）、ダウノルピシン、ダウノルピシンリポ（ダウノゾーム）、プロカルバジン、マイトマイシン、シタラピン、エトポシド、メトトレキサート、5-フルオロウラシル、フルオロウラシル、ビンブラスチン、ピンクリスチン、ブレオマイシン、ダウノマイシン、ペプロマイシン、エストラムスチン、パクリタキセル（タキソール）、ドセタキセル（タキソテア）、アルデスロイキン、アスパラギナーゼ、プスルファン、カルボプラチン、オキサリプラチン、ネダプラチン、クラドリピン、カンプトテシン、CPT 11、10-ヒドロキシ-7-エチルカンプトテシン（SN38）、フロクスウリジン、フルダラビン、ヒドロキシウレア、イホスファミド、イダルピシン、メスナ、イリノテカン、ノギテカン、ミトキサントロン、トポテカン、ロ

40

50

イプロリド、メゲストロール、メルファラン、メルカプトプリン、ヒドロキシカルバミド、プリカマイシン、ミトタン、ペガスパラガーゼ、ペントスタチン、ピボプロマン、ストレプトゾシン、タモキシフェン、ゴセレリン、リュープロレニン、フルタミド、テニボシド、テストラクトン、チオグアニン、チオテパ、ウラシルマスタード、ビノレルピン、クロラムブシル、ハイドロコチゾン、プレドニゾロン、メチルプレドニゾロン、ピンデシン、ニムスチン、セムスチン、カベシタピン、トムデックス、アザシチジン、UFT、オキザロプラチン、ゲフィチニブ（イレッサ）、イマチニブ（STI571）、エルロチニブ、Flt3 阻害剤、vascular endothelial growth facotr receptor（VEGFR）阻害剤、fibroblast growth factor receptor（FGFR）阻害剤、epidermal growth factor receptor（EGFR）阻害剤（イレッサ、タルセバなど）ラディシコール、17 アリルアミノ 17 デメトキシゲルダナマイシン、ラパマイシン、アムサクリン、オール - トランスレチノイン酸、サリドマイド、アナストロゾール、ファドロゾール、レトロゾール、エキセメスタン、金チオマレート、D - ペニシラミン、ブシラミン、アザチオプリン、ミゾリピン、シクロスポリン、ラパマイシン、ヒドロコチゾン、ベキサロテン（ターグレチン）、タモキシフェン、デキサメタゾン、プロゲスチン類、エストロゲン類、アナストロゾール（アリミデックス）、ロイプリン、アスピリン、インドメタシン、セレコキシブ、アザチオプリン、ペニシラミン、金チオマレート、マレイン酸クロルフェニラミン、クロロフェニラミン、クレマシチン、トレチノイン、ベキサロテン、砒素、ボルテゾミブ、アロプリノール、ゲムツズマブ、イブリツモマブチウキセタン、1 3 1 トシツテマブ、タルグレチン、オゾガミン、クラリスロマシン、ロイコボリン、イファスファミド、ケトコナゾール、アミノグルテチミド、スラミン、メトトレキセート、Maytansinoidおよびその誘導体、などがあげられる。

10

20

【 0 0 8 6 】

化学療法剤と抗体とを結合させる方法としては、グルタルアルデヒドを介して化学療法剤と抗体のアミノ基間を結合させる方法、水溶性カルボジイミドを介して化学療法剤のアミノ基と抗体のカルボキシル基を結合させる方法等があげられる。

抗体医薬としては、抗体の結合によりアポトーシスが誘導される抗原、腫瘍の病態形成に関わる抗原または免疫機能を調節する抗原、病変部位の血管新生に関与する抗原に対する抗体があげられる。

【 0 0 8 7 】

抗体の結合によりアポトーシスが誘導される抗原としては、Cluster of differentiaton（以下、CDと記載する）19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD37、CD53、CD72、CD73、CD74、CDw75、CDw76、CD77、CDw78、CD79a、CD79b、CD80（B7.1）、CD81、CD82、CD83、CDw84、CD85、CD86（B7.2）、human leukocyte antigen（HLA）Class II、EGFRなどがあげられる。

30

【 0 0 8 8 】

腫瘍の病態形成に関わる抗原または免疫機能を調節する抗体の抗原としては、CD4、CD40、CD40リガンド、B7ファミリー分子（CD80、CD86、CD274、B7 DC、B7 H2、B7 H3、B7 H4）、B7ファミリー分子のリガンド（CD28、CTLA 4、ICOS、PD 1、BTLA）、OX 40、OX 40リガンド、CD137、tumor necrosis factor（TNF）受容体ファミリー分子（DR4、DR5、TNFR1、TNFR2）、TNF related apoptosis inducing ligand receptor（TRAIL）ファミリー分子、TRAILファミリー分子の受容体ファミリー（TRAIL R1、TRAIL R2、TRAIL R3、TRAIL R4）、receptor activator of nuclear factor kappa B ligand（RANK）、RANKリガンド、CD25、葉酸受容体4、サイトカイン〔interleukin 1（以下、interleukinをILと記す）、IL 1、IL 4、IL 5、IL 6、IL 10、IL 13、transforming growth factor（TGF）、TNF等〕、これらのサイトカインの受容体、ケモカイン（SLC、ELC、I 309、TARC、MDC、CTACK等）、これらのケモカインの受容体があげられる。

40

【 0 0 8 9 】

病変部位の血管新生を阻害する抗体の抗原としては、vascular endothelial growth factor（VEGF）、Angiopoietin、fibroblast growth factor（FGF）、EGF、platelet derived growth factor（PDGF）、insulin like growth factor（IGF）、erythropoietin（EPO

50

)、TGF、IL 8、Ephrin、SDF 1など、およびこれらの受容体があげられる。

免疫賦活剤としては、イムノアジュバントとして知られている天然物でもよく、具体例としては、免疫を亢進する薬剤が、(1) グルカン(レンチナン、シゾフィラン)、ガラクトシルセラミド(KRN7000)、菌体粉末(ピシバニール、BCG)、菌体抽出物(クレスチン)があげられる。

【0090】

高分子の薬剤としては、ポリエチレングリコール(以下、PEGと表記する)、アルブミン、デキストラン、ポリオキシエチレン、スチレンマレイン酸コポリマー、ポリビニルピロリドン、ピランコポリマー、ヒドロキシプロピルメタクリルアミドなどがあげられる。これらの高分子薬剤を抗体または抗体断片に結合させることにより、(1) 化学的、物理的あるいは生物学的な種々の因子に対する安定性の向上、(2) 血中半減期の顕著な延長、(3) 免疫原性の消失、抗体産生の抑制、などの効果が期待される[バイオコンジュゲート医薬品、廣川書店(1993)]。例えば、PEGと抗体を結合させる方法としては、PEG化修飾試薬と反応させる方法などがあげられる[バイオコンジュゲート医薬品、廣川書店(1993)]。PEG化修飾試薬としては、リジンの - アミノ基の修飾剤(特開昭61 178926)、アスパラギン酸およびグルタミン酸のカルボキシル基の修飾剤(特開昭56 23587)、アルギニンのグアニジノ基の修飾剤(特開平2 117920)などがあげられる。

10

【0091】

サイトカインまたは増殖因子としては、NK細胞、マクロファージ、好中球などの細胞を亢進するサイトカインまたは増殖因子であればいかなるものでもよいが、例えば、インターフェロン(以下、INFと記す)、INF、INF、IL 2、IL 12、IL 15、IL 18、IL 21、IL 23、顆粒球刺激因子(G-CSF)、顆粒球・マクロファージ刺激因子(GM-CSF)、マクロファージ刺激因子(M-CSF)などがあげられる。

20

【0092】

毒素タンパク質としては、リシン、ジフテリアトキシン、ONTAKなどがあげられ、毒性を調節するためにタンパク質に変異を導入したタンパク毒素も含まれる。

放射性同位元素としては、¹³¹I、¹²⁵I、⁹⁰Y、⁶⁴Cu、¹⁸⁸Tc、⁷⁷Lu、²¹¹Atなどがあげられる。放射性同位元素は、クロラミンT法等によって抗体に直接結合させることができる。また、放射性同位元素をキレートする物質を抗体に結合させてもよい。キレート剤としては、methylbenzyl-diethylene triamine-pentaacetic acid (MX-DTPA)などがあげられる。

30

【0093】

本発明においては、本発明で用いられる抗体と、1つ以上の他の薬剤と組み合わせて投与することや、または放射線照射とを組み合わせることもできる。他の薬剤としては、上述の化学療法剤、抗体医薬、免疫賦活剤、サイトカインまたは増殖因子などがあげられる。

放射線照射としては、X線、γ線などの光子(電磁波)照射、電子線、陽子線、重粒子線などの粒子線照射などが含まれる。

【0094】

組み合わせて投与する方法としては、本発明で用いられる抗体との同時投与でもよいし、また、本発明で用いられる抗体の投与と前後して投与しても構わない。

40

本発明の検出方法、定量方法、検出試薬、定量試薬または診断薬は、特定の標識体を本発明の抗体に標識して用いる方法があげられる。標識体としては、通常の免疫学的検出または測定法で用いられる標識体があげられ、アルカリフォスファターゼ、ペルオキシダーゼ、ルシフェラーゼなどの酵素、アクリジニウムエステル、ロフィンなどの発光物質、フルオレシニン・イソシアネート(FITC)、RITCなどの蛍光物質などがあげられる。

【0095】

本発明のCLDN4の細胞外領域の立体構造を特異的に認識し、かつ該細胞外領域に結合するモノクローナル抗体、およびCLDN4の細胞外領域に結合し、CLDN4中和活性を有するモノクローナル抗体には、CLDN4の細胞外領域の立体構造を特異的に認識し、かつCLDN4細胞外領域に結合するモノクローナル抗体であって、CLDN3遺伝子によりコードされるポリペプ

50

チド（以下、CLDN3にコードされるポリペプチドを、CLDN3と略記することもある）の細胞外領域の立体構造を特異的に認識し、かつCLDN3の細胞外領域に結合するモノクローナル抗体、およびCLDN4の細胞外領域に特異的に結合し、かつCLDN4中和活性を有するモノクローナル抗体であって、CLDN3の細胞外領域の立体構造を特異的に認識し、かつCLDN3細胞外領域に結合するモノクローナル抗体を包含する。

【0096】

CLDN3の細胞外領域とは、例えば配列番号26で示される該ポリペプチドのアミノ酸配列を公知の膜貫通領域予測プログラムSOSUI(<http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp/sosuiFRame0.html>)、予測プログラムTMHMM ver.2(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM> 2.0/)またはExPASy Proteomics Server(<http://Ca.expasy.org/>)などを用いて予測された領域があげられる。

10

【0097】

本発明におけるCLDN3遺伝子によりコードされるポリペプチドの細胞外領域の具体例としては、ExPASy Proteomics Server(<http://Ca.expasy.org/>)において予測される細胞外ドメインの30～80番目および137～159番目、もしくは文献[Cancer Immunol. Immunother., 54, 431-445(2005)]で予測される細胞外ドメインの27～75番目および140～158番目に相当する領域があげられる。

【0098】

本発明のCLDN4の細胞外領域の立体構造を特異的に認識し、かつCLDN4細胞外領域に結合するモノクローナル抗体であって、CLDN3の細胞外領域の立体構造を特異的に認識し、かつCLDN3の細胞外領域に結合するモノクローナル抗体としては、CLDN3とCLDN4の両方の細胞外領域の立体構造を特異的に認識でき、両方の細胞外領域に結合できるモノクローナル抗体であればいかなるものでもよく、例えばハイブリドーマKM3907から産生される抗CLDN4モノクローナル抗体KM3907があげられる。

20

【0099】

また、本発明のCLDN4の細胞外領域に特異的に結合し、かつCLDN4中和活性を有するモノクローナル抗体であって、CLDN3の細胞外領域の立体構造を特異的に認識し、かつCLDN3細胞外領域に結合するモノクローナル抗体としては、CLDN3の細胞外領域の立体構造を特異的に認識でき、かつCLDN3とCLDN4の両方の細胞外領域に結合でき、CLDN4中和活性を有するモノクローナル抗体であればいかなるものでもよく、例えばハイブリドーマKM3907から産生される抗CLDN4モノクローナル抗体KM3907があげられる。ハイブリドーマKM3907は平成19年7月31日付でブダペスト条約に基づき独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6）にFERM BP 10885として寄託されている。

30

【0100】

本発明のCLDN4の細胞外領域の立体構造を特異的に認識し、かつCLDN4細胞外領域に結合するモノクローナル抗体であって、CLDN3の細胞外領域の立体構造を特異的に認識し、かつCLDN3の細胞外領域に結合するモノクローナル抗体は、上記CLDN4の細胞外領域の立体構造を特異的に認識し、かつCLDN4細胞外領域に結合するモノクローナル抗体の中から、更にCLDN3の細胞外領域の立体構造を特異的に認識し、かつCLDN3の細胞外領域に結合するモノクローナル抗体を選択することにより作製することができる。

40

【0101】

本発明のCLDN4の細胞外領域に特異的に結合し、かつCLDN4中和活性を有するモノクローナル抗体であって、CLDN3の細胞外領域の立体構造を特異的に認識し、かつCLDN3細胞外領域に結合するモノクローナル抗体は、上記CLDN4の細胞外領域に特異的に結合し、かつCLDN4中和活性を有するモノクローナル抗体の中から、更にCLDN3の細胞外領域の立体構造を特異的に認識し、かつCLDN3細胞外領域に結合するモノクローナル抗体を選択することにより作製することができる。

【0102】

CLDN4の細胞外領域の立体構造を特異的に認識し、かつCLDN4細胞外領域に結合する遺伝

50

子組換え抗体であって、CLDN3の細胞外領域の立体構造を特異的に認識し、CLDN3細胞外領域に結合する遺伝子組換え抗体、およびCLDN4の細胞外領域に特異的に結合し、かつCLDN4中和活性を有する遺伝子組換え抗体であって、CLDN3の細胞外領域の立体構造を特異的に認識し、CLDN3細胞外領域に結合する遺伝子組換え抗体は、上記のCLDN4の細胞外領域の立体構造を認識し、かつCLDN4の細胞外領域に結合する遺伝子組換え抗体、またはCLDN4の細胞外領域に特異的に結合し、かつCLDN4中和活性を有する遺伝子組換え抗体と同様にして、作製することができる。

【0103】

本発明のCLDN4の細胞外領域の立体構造を特異的に認識し、かつCLDN4細胞外領域に結合する遺伝子組換え抗体であって、CLDN3の細胞外領域の立体構造を特異的に認識し、CLDN3の細胞外領域に結合する遺伝子組換え抗体の具体例としては、抗体VHのCDR1、CDR2およびCDR3が、それぞれ配列番号59、60および61で示されるアミノ酸配列を含む遺伝子組換え抗体、抗体VLのCDR1、CDR2およびCDR3が、それぞれ配列番号62、63および64で示されるアミノ酸配列を含む遺伝子組換え抗体、抗体VHのCDR1、CDR2およびCDR3が、それぞれ配列番号59、60および61を含み、抗体VLのCDR1、CDR2およびCDR3が、それぞれ配列番号62、63および64で示されるアミノ酸配列を含む遺伝子組換え抗体、CLDN4の細胞外領域への結合において抗CLDN4モノクローナル抗体KM3907と競合する遺伝子組換え抗体、モノクローナル抗体KM3907が認識するCLDN4の細胞外領域に存在するエピトープに結合する遺伝子組換え抗体、抗体のVHが配列番号56で示されるアミノ酸配列の20～138番目のアミノ酸配列および/または抗体のVLが配列番号58で示されるアミノ酸配列の23～130番目のアミノ酸配列を含む、遺伝子組換え抗体も包含される。

【0104】

以下に、本発明の抗体の製造方法について、具体的に説明する。

1. モノクローナル抗体の製造方法

(1) 抗原の調製

下記に記載の方法により、CLDN4全長またはその部分長をコードするcDNAを含む発現ベクターを大腸菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞等に導入することにより、抗原となるCLDN4もしくはCLDN4を発現させた細胞を得ることができる。また、CLDN4を多量に発現している各種ヒト腫瘍培養細胞、ヒト組織などからCLDN4を精製したり、そのものを抗原とすることもできる。さらに、CLDN4の部分配列を有する合成ペプチドを調製し、抗原に用いることもできる。

【0105】

本発明で用いられるポリペプチドとしては、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)やCurrent Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997)などに記載された方法等を用い、例えば以下の方法により、これをコードするDNAを宿主細胞中で発現させて、製造することができる。

【0106】

まず、全長cDNAを適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換えベクターを作製する。この際もし必要であれば、全長cDNAをもとにしてポリペプチドをコードする部分を含む適当な長さのDNA断片を調製し、上記全長cDNAの代わりに該DNA断片を使用してもよい。次いで、該組換えベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより、ポリペプチドを生産する形質転換体を得ることができる。

【0107】

宿主細胞としては、大腸菌、動物細胞等、目的とする遺伝子を発現できるものであればいずれをも用いることができる。

発現ベクターとしては、使用する宿主細胞において自律複製可能又は染色体中への組込が可能で、ポリペプチドをコードするDNAを転写できる位置に適当なプロモーターを含有しているものが用いられる。

【0108】

10

20

30

40

50

大腸菌等の原核生物を宿主細胞として用いる場合には、本発明において用いられるポリペプチドをコードするDNAを含有してなる組換えベクターは、原核生物中で自律複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、本発明において用いられるDNA及び転写終結配列を含むベクターであることが好ましい。該組換えベクターは、さらに、プロモーターを制御する遺伝子を含んでいてもよい。

【 0 1 0 9 】

発現ベクターとしては、例えば、pBTrp2、pBTac1、pBTac2（いずれもRoche Diagnostic社製）、pKK233—2（Pharmacia社製）、pSE280（Invitrogen社製）、pGEMEX 1（Promega社製）、pQE 8（QIAGEN社製）、pKYP10（特開昭58 110600）、pKYP200 [Agricultural Biological Chemistry, 48, 669 (1984)]、pLSA1 [Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989)]、pGEL1 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4306 (1985)]、pBluescript II SK() (Stratagene社製)、pTrs30 [大腸菌JM109/pTrs30 (FERM BP 5407)より調製]、pTrs32[大腸菌 JM109/pTrs32 (FERM BP 5408)より調製]、pGHA2 [大腸菌 IGHA2(FERM BP 400)より調製、特開昭60 221091]、pGKA2[大腸菌 IGKA2(FERM BP 6798)より調製、特開昭60 221091]、pTerm2 (US4686191, US4939094, US5160735)、pSupex、pUB110、pTP5、pC194、pEG400 [J. Bacteriol., 172, 2392 (1990)]、pGEX (Pharmacia社製)、pETシステム（Novagen社製）、pME18S FL3等を挙げることができる。

10

【 0 1 1 0 】

プロモーターとしては、使用する宿主細胞中で機能を発揮できるものであればいかなるものでもよい。例えば、trpプロモーター（Ptrp）、lacプロモーター、PLプロモーター、PRプロモーター、T7プロモーター等の、大腸菌やファージ等に由来するプロモーターを挙げることができる。また、Ptrpを2つ直列させたタンデムプロモーター、tacプロモーター、lac T7プロモーター、let Iプロモーター等のように、人為的に設計改変されたプロモーター等も用いることができる。

20

【 0 1 1 1 】

また、上記組換えベクターとしては、リボソーム結合配列であるシャイン・ダルガルノ（Shine Dalgarno）配列と開始コドンとの間を適当な距離（例えば6～18塩基）に調節したプラスミドを用いることが好ましい。本発明において用いられるポリペプチドをコードするDNAの塩基配列においては、宿主内での発現に最適なコドンとなるように塩基を置換することができ、これにより、目的とするポリペプチドの生産率を向上させることができる。さらに、上記組換えベクターにおける遺伝子の発現には転写終結配列は必ずしも必要ではないが、構造遺伝子の直下に転写終結配列を配置することが好ましい。

30

【 0 1 1 2 】

宿主細胞としては、エシェリヒア属等に属する微生物、例えば、大腸菌 XL1 Blue、大腸菌 XL2 Blue、大腸菌 DH1、大腸菌 MC1000、大腸菌 KY3276、大腸菌 W1485、大腸菌 JM109、大腸菌 HB101、大腸菌 No.49、大腸菌 W3110、大腸菌 NY49、大腸菌 DH5 等を挙げることができる。

組換えベクターの導入方法としては、上記宿主細胞へDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、カルシウムイオンを用いる方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 69, 2110 (1972)]、Gene, 17, 107 (1982)やMolecular & General Genetics, 168, 111 (1979)に記載の方法等を挙げることができる。

40

【 0 1 1 3 】

動物細胞を宿主として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、pcDNA1、pcDM8（フナコシ社より市販）、pAGE107 [特開平3 22979; Cytotechnology, 3, 133, (1990)]、pAS3 3（特開平2 227075）、pCDM8 [Nature, 329, 840, (1987)]、pcDNA1/Amp（Invitrogen社製）、pcDNA3.1（Invitrogen社製）、pREP4（Invitrogen社製）、pAGE103 [J. Biochemistry, 101, 1307 (1987)]、pAGE210、pME18SFL3、pKANTEX93 [W097/10354]などを挙げることができる。

【 0 1 1 4 】

プロモーターとしては、動物細胞中で機能を発揮できるものであればいずれも用いるこ

50

とができ、例えば、サイトメガロウイルス (CMV) のIE (immediate early) 遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、SR プロモーター、モロニーマウス白血病ウイルス (moloney murine leukemia virus) のプロモーターおよびエンハンサー等を挙げることができる。また、ヒトCMVのIE遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

【0115】

宿主細胞としては、ヒトの細胞であるナマルバ (Namalwa) 細胞、サルの細胞であるCOS細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞であるCHO細胞、HBT5637 (特開昭63 299) 等を挙げることができる。

10

組換えベクターの導入方法としては、動物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133(1990)]、リン酸カルシウム法 (特開平2 227075)、リポフェクション法 [Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 84, 7413(1987)] などを挙げることができる。

【0116】

遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)に記載されている方法等に準じて、分泌生産、融合蛋白質発現等を行うことができる。真核生物由来の細胞で発現させた場合には、糖あるいは糖鎖が付加されたポリペプチドを得ることができる。

20

以上のようにして得られる形質転換体を培地に培養し、培養物中に該ポリペプチドを生成蓄積させ、該培養物から採取することにより、ポリペプチドを製造することができる。該形質転換体を培地に培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。

【0117】

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lacプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピル-Dチオガラクトピラノシド等を、trpプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸等を培地に添加してもよい。

30

【0118】

動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているRPMI1640培地 [The Journal of the American Medical Association, 199, 519(1967)]、EagleのMEM培地 [Science, 122, 501(1952)]、ダルベッコ改変MEM培地 [Virology, 8, 396(1959)]、199培地 [Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 73, 1 (1950)] 又はこれら培地にFCS等を添加した培地等を用いることができる。培養は、通常pH6~8、30~40、5% CO₂存在下の条件下で1~7日間行う。また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0119】

上記のとおり、本発明において用いられるポリペプチドをコードするDNAを組み込んだ組換えベクターを保有する微生物、動物細胞等由来の形質転換体を、通常の培養方法に従って培養して該ポリペプチドを生成蓄積させ、該培養物より採取することにより、本発明において用いられるポリペプチドを製造することができる。

40

遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)に記載されている方法等に準じて、分泌生産、融合蛋白質発現等を行うことができる。

【0120】

ポリペプチドの生産方法としては、宿主細胞内に生産させる方法、宿主細胞外に分泌させる方法、及び宿主細胞外膜上に生産させる方法があり、使用する宿主細胞や、生産させるポリペプチドの構造を変えることにより、適切な方法を選択することができる。

50

ポリペプチドが宿主細胞内又は宿主細胞外膜上に生産される場合、ポールソンらの方法 [J . Biol.Chem., 264, 17619(1989)]、ロウらの方法 [Proc.Natl.Acad.Sci., USA, 86, 8227(1989)、Genes Develop., 4, 1288(1990)]、又は特開平05 336963、W094/23021等に記載の方法を用いることで、該遺伝子産物を宿主細胞外に分泌させることができる。

【 0 1 2 1 】

また、特開平2 227075 に記載されている方法に準じて、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子等を用いた遺伝子増幅系を利用して生産量を上昇させることもできる。

ポリペプチドは、例えば、以下のようにして単離・精製することができる。

ポリペプチドが細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後に細胞を遠心分離により回収し、水系緩衝液に懸濁後、超音波破碎機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られる上清から、通常の酵素の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル (DEAE) - セファロース、DIAION HPA 75 (三菱化学社製) 等のレジンをを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S Sepharose FF (Pharmacia社製) 等のレジンをを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンをを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独又は組み合わせて用い、精製標品を得ることができる。

【 0 1 2 2 】

また、ポリペプチドが細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、同様に細胞を回収後破碎し、遠心分離を行うことにより、沈殿画分として該ポリペプチドの不溶体を回収する。回収した該ポリペプチドの不溶体を蛋白質変性剤で可溶化する。該可溶化液を希釈又は透析することにより、該ポリペプチドを正常な立体構造に戻した後、上記と同様の単離精製法によりポリペプチドの精製標品を得ることができる。

【 0 1 2 3 】

ポリペプチド又はその糖修飾体等の誘導体が細胞外に分泌された場合には、培養上清において該ポリペプチド又はその糖修飾体等の誘導体を回収することができる。即ち、該培養上清を上記と同様の遠心分離等の手法により処理することにより可溶性画分を取得し、該可溶性画分から、上記と同様の単離精製法を用いることにより、精製標品を得ることができる。

【 0 1 2 4 】

また、本発明において用いられるポリペプチドは、Fmoc法 (フルオレニルメチルオキシカルボニル法)、tBoc法 (t - ブチルオキシカルボニル法) 等の化学合成法によっても製造することができる。また、Advanced ChemTech社、パーキン・エルマー社、Pharmacia社、Protein Technology Instrument社、Synthecell Vega社、PerSeptive社、島津製作所等のペプチド合成機を利用して化学合成することもできる。

【 0 1 2 5 】

(2) 動物の免疫と抗体産生細胞の調製

3~20週令のマウス、ラットまたはハムスターに上記のように調製した抗原を免疫して、その動物の脾臓、リンパ節、末梢血中の抗体産生細胞を採取する。また、免疫原性が低く上記の動物で十分な抗体価の上昇が認められない場合には、CLDN4ノックアウトマウスを被免疫動物として用いる方法もある。

【 0 1 2 6 】

免疫は、動物の皮下あるいは静脈内あるいは腹腔内に、適当なアジュバント [例えば、フロインドの完全アジュバント (Complete Freund's Adjuvant) や水酸化アルミニウムゲルと百日咳菌ワクチンなど] とともに抗原を投与することにより行う。抗原が部分ペプチドである場合には、BSA (ウシ血清アルブミン) やKLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) などのキャリア蛋白質とコンジュゲートを作製し、これを免疫原として用いる。

【 0 1 2 7 】

抗原の投与は、1回目の投与の後1~2週間おきに5~10回行う。各投与後3~7日目に眼底静脈叢より採血し、その血清が抗原と反応することを酵素免疫測定法 [Antibodies A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988]などで調べる。免疫に用いた抗原に対し、その血清が十分な抗体価を示したマウス、ラットまたはハムスターを脾臓細胞の供給源として提供する。

【0128】

脾臓細胞と骨髄腫細胞の融合に供するにあたって、抗原物質の最終投与後3~7日目に、免疫したマウス、ラットまたはハムスターより脾臓を摘出し、脾臓細胞を採取する。脾臓をMEM培地(日水製薬社製)中で細断し、ピンセットでほぐし、遠心分離(1200rpm、5分間)した後、上清を捨て、トリス-塩化アンモニウム緩衝液(pH7.65)で1~2分間処理し赤血球を除去し、MEM培地で3回洗浄して融合用脾臓細胞として提供する。

10

【0129】

(3) 骨髄腫細胞の調製

骨髄腫細胞としては、マウスから得られた株化細胞を使用する。たとえば、8-アザグアニン耐性マウス(BALB/c由来)骨髄腫細胞株P3 X63Ag8 U1(P3 U1) [Current Topics in Microbiology and Immunology, 18, 1(1978)]、P3 NS1/1 Ag41(NS 1) [European J. Immunology, 6, 511(1976)]、SP2/0 Ag14(SP 2) [Nature, 276, 269(1978)]、P3 X63 Ag865 3(653) [J. Immunology, 123, 1548(1979)]、P3 X63 Ag8(X63) [Nature, 256, 495(1975)]などが用いられる。これらの細胞株は、8-アザグアニン培地[RPMI 1640培地にグルタミン(1.5 mM)、2-メルカプトエタノール(5×10^{-5} M)、ジェンタマイシン(10 μ g/mL)および牛胎児血清(FCS)を加えた培地(以下、正常培地という。)に、さらに8-アザグアニン(15 μ g/mL)を加えた培地で継代するが、細胞融合の3~4日前に正常培地に継代し、融合当日 2×10^7 個以上の細胞数を確保する。

20

【0130】

(4) 細胞融合

前述した抗体産生細胞と骨髄腫細胞をMEM培地またはPBS(リン酸二ナトリウム1.83 g、リン酸一カリウム0.21 g、食塩7.65 g、蒸留水1リットル、pH7.2)でよく洗浄し、細胞数が、抗体産生細胞:骨髄腫細胞=5~10:1になるよう混合し、遠心分離(1200 rpm、5分間)した後、上清を捨て、沈澱した細胞群をよくほぐした後、攪拌しながら、37℃で、ポリエチレングライコール-1000(PEG 1000)2 g、MEM 2 mLおよびジメチルスルホキシド0.7 mLの混液0.2~1 mL/ 10^6 抗体産生細胞を加え、1~2分間毎にMEM培地1~2 mLを数回加えた後、MEM培地を加えて全量が50 mLになるようにする。遠心分離(900 rpm、5分間)後、上清を捨て、ゆるやかに細胞をほぐした後、メスピペットによる吸込み、吹出しでゆるやかに細胞をHAT培地[正常培地にヒポキサンチン(10^{-4} mol/L)、チミジン(1.5×10^{-5} mol/L)およびアミノプテリン(4×10^{-7} mol/L)を加えた培地]100 mL中に懸濁する。この懸濁液を96穴培養用プレートに100 μ L/ウェルずつ分注し、5% CO₂インキュベーター中、37℃で7~14日間培養する。

30

【0131】

培養後、培養上清の一部をとり後で述べるバインディングアッセイなどにより、本発明において用いられるポリペプチドを含む抗原に反応し、ポリペプチドを含まない抗原に反応しないものを選択する。

40

また、ついで、限界希釈法によりクローニングを2回繰り返す[1回目は、HT培地(HAT培地からアミノプテリンを除いた培地)、2回目は、正常培地を使用する]、安定して強い抗体価の認められたものをモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ株として選択する。

【0132】

(5) モノクローナル抗体の調製

プリスタン処理[2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン(Pristane)0.5 mLを腹腔内投与し、2週間飼育する]した8~10週令のマウスまたはヌードマウスに、(4)で得られた抗CLDN4モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞 $2 \times 10^6 \sim 5 \times 10^7$ 細胞

50

ノ匹を腹腔内注射する。10～21日でハイブリドーマは腹水癌化する。このマウスから腹水を採取し、遠心分離（3,000 rpm、5分間）して固形分を除去後、40～50 % 硫酸アンモニウムで塩析した後、カプリル酸沈殿法、DEAE - セファロースカラム、プロテイン A - カラムあるいはゲル濾過カラムによる精製を行ない、IgGあるいは、IgM画分を集め、精製モノクローナル抗体とする。

【0133】

抗体のサブクラスの決定は、サブクラスタイピングキットを用いて酵素免疫測定法により行う。蛋白量の定量は、ローリー法および280 nmでの吸光度より算出する。

(6) バインディングアッセイ

抗原としては、本項(1)に記載の方法により、本発明において用いられるCLDN4ポリペプチドをコードするcDNAを含む発現ベクターを大腸菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞等に導入して得た遺伝子導入細胞やリコンビナント蛋白質、あるいはヒト組織から得た精製ポリペプチドや部分ペプチドを用いる。抗原が部分ペプチドである場合には、BSA(ウシ血清アルブミン)やKLH(Keyhole Limpet hemocyanin)などのキャリア蛋白質とコンジュゲートを作製して、これを用いる。

10

【0134】

これら抗原を96穴プレートに分注し固着化した後、第1抗体として、被免疫動物血清、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの培養上清もしくは精製抗体を分注して反応させる。PBSまたはPBS 0.05%Tweenで、よく洗浄した後、第2抗体としてビオチン、酵素、化学発光物質あるいは放射線化合物等で標識した抗イムノグロブリン抗体を分注して反応させる。PBS Tweenでよく洗浄した後、第2抗体の標識物質に応じた反応を行なう。

20

【0135】

CLDN4の細胞外領域への結合について取得したモノクローナル抗体と競合する抗体は、上述のバインディングアッセイ系に、被検抗体を添加して反応させることで取得できる。すなわち、被検抗体を加えた時にモノクローナル抗体の結合が阻害される抗体をスクリーニングすることにより、CLDN4の細胞外領域への結合について取得したモノクローナル抗体と競合するモノクローナル抗体を取得することができる。

【0136】

(7) CLDN4の機能阻害アッセイ

評価細胞として、(1)に記載の方法により、本発明において用いられるCLDN4ポリペプチドをコードするcDNAを含む発現ベクターを動物細胞等に導入して得た遺伝子導入細胞、あるいはCLDN4を発現している正常細胞や癌細胞を用いる。

30

CLDN4の機能であるTJの形成を本発明の抗体または該抗体断片が阻害する活性を評価する方法としては、CLDN4を発現している正常細胞や癌細胞に抗体または該抗体断片を反応させ、細胞間で形成されるTJの形成が阻害されることを、電子顕微鏡等を用いて観察する方法、細胞間接着領域におけるCLDN4の発現が抑制されることを免疫染色法やウエスタンブロッティング法等を用いて評価する方法などが挙げられる[J.Cell.Biol.,147,195(1999)]。

【0137】

本発明の抗体または該抗体断片が、CLDN4の機能である上皮バリアー機能を阻害する活性を、評価する方法としては、CLDN4を発現している正常細胞や癌細胞に対して抗体または該抗体断片を反応させ、Trans epithelial electric resistanceが低下することを測定する方法、細胞間隙を介した物質の透過性が亢進していることを、適当なトレーサー(例えばFITC Dextranなど)を用いて測定する方法などが挙げられる [J.Cell.Biol.,147,195(1999)]。

40

【0138】

本発明の抗体または該抗体断片が、CLDN4の機能である癌細胞の腫瘍形成能、浸潤能、転移能などを阻害する活性を、評価するアッセイ方法としては、これらの細胞に抗体または該抗体断片を反応させ、ウインドヒーリング法 [Methods.Mol.Biol.,96,177(1999)]、軟寒天培地内コロニー形成法 [Proc.Natl.Acad.Sci.USA,72,4435(1975)]、インページョン

50

アッセイやマイグレーションアッセイなどのトランスウェル法 [J.Exp.Med,115,453(1962)] などを用いて測定する方法があげられる。

【 0 1 3 9 】

以上の方法を用いて、本発明の抗体または該抗体断片のCLDN4中和活性を評価することができる。

(8) CLDN3およびCLDN4両方に反応するモノクローナル抗体の作製

CLDN4の細胞外領域の立体構造を特異的に認識し、CLDN4の細胞外領域に結合し、かつCLDN3の細胞外領域の立体構造を特異的に認識し、CLDN3の細胞外領域に結合するモノクローナル抗体または該抗体断片、およびCLDN4の細胞外領域に特異的に結合し、CLDN4中和活性を有し、かつCLDN3の細胞外領域の立体構造を特異的に認識し、CLDN3細胞外領域に結合するモノクローナル抗体または該抗体断片は、上記1 (6)記載と同様にして、CLDN4発現細胞、CLDN4リコンビナントタンパク質、ヒト組織から得た精製CLDN4ポリペプチドやCLDN4部分ペプチド等に反応するモノクローナル抗体を選択し、そのモノクローナル抗体からCLDN3発現細胞、CLDN3リコンビナントタンパク質、ヒト組織から得た精製CLDN3ポリペプチドやCLDN3部分ペプチド等に反応するモノクローナル抗体を選択することで、作製することができる。

10

【 0 1 4 0 】

2 . 遺伝子組換え抗体の作製

遺伝子組換え抗体の作製例として、以下にヒト型キメラ抗体およびヒト化抗体の作製方法を示す。

20

(1) 遺伝子組換え抗体発現用ベクターの構築

遺伝子組換え抗体発現用ベクターとは、ヒト抗体のCHおよびCLをコードするDNAが組み込まれた動物細胞用発現ベクターであり、動物細胞用発現ベクターにヒト抗体のCHおよびCLをコードするDNAをそれぞれクローニングすることにより構築することができる。

【 0 1 4 1 】

ヒト抗体のC領域は任意のヒト抗体のCHおよびCLを用いることができる。例えば、ヒト抗体の 1 サブクラスのCHおよび クラスのCLなどがあげられる。ヒト抗体のCHおよびCLをコードするDNAとしてはエキソンとイントロンからなる染色体DNAを用いることも、cDNAを用いることもできるが、cDNAを用いるのが好ましい。動物細胞用発現ベクターとしては、ヒト抗体のC領域をコードする遺伝子を組み込み発現できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、pAGE107 [Cytotechnol.,3,133(1990)]、pAGE103 [J.Biochem.,101,1307(1987)]、pHSG274[Gene,27,223(1984)]、pKCR[Proc.Natl.Acad.Sci.USA,7,8,1527(1981)]、pSG1bd2 4[Cytotechnol.,4,173(1990)]、pSE1UK1Sed1 3[Cytotechnol.,1,3,79(1993)]などがあげられる。動物細胞用発現ベクターに用いるプロモーターとエンハンサーとしては、SV40の初期プロモーター[J.Biochem.,101,1307(1987)]、モロニーマウス白血病ウイルスのLTR[Biochem.Biophys.Res.Comm.,149,960(1987)]、免疫グロブリンH鎖のプロモーター [Cell,41,479(1985)]とエンハンサー [Cell,33,717(1983)]などがあげられる。

30

【 0 1 4 2 】

遺伝子組換え抗体発現用ベクターは、抗体H鎖およびL鎖が別々のベクター上に存在するタイプ、あるいは同一のベクター上に存在するタイプ(タンデム型)のどちらでも用いることができるが、遺伝子組換え抗体発現ベクターの構築の容易さ、動物細胞への導入の容易さ、動物細胞内での抗体H鎖およびL鎖の発現量のバランスが均衡するなどの点からタンデム型の遺伝子組換え抗体発現用ベクターの方が好ましい[J.Immunol.Methods,167,271(1994)]。タンデム型の遺伝子組換え抗体発現用ベクターとしては、pKANTEX93 [W097/10354]、pEE18[Hybridoma,17,559(1998)]などがあげられる。

40

【 0 1 4 3 】

(2) ヒト以外の動物由来の抗体のV領域をコードするcDNAの取得およびアミノ酸配列の解析

非ヒト抗体のVH及びVLをコードするcDNAは以下の様にして取得することができる。

50

非ヒト抗体を産生するハイブリドーマ細胞よりmRNAを抽出し、cDNAを合成する。合成したcDNAをファージ或いはプラスミドなどのベクターにクローニングしてcDNAライブラリーを作製する。該ライブラリーより、非ヒト抗体のC領域部分或いはV領域部分をコードするDNAをプローブとして用い、VHまたはVLをコードするcDNAを有する組換えファージ或いは組換えプラスミドをそれぞれ単離する。組換えファージ或いは組換えプラスミド上の目的とする非ヒト抗体のVHまたはVLの全塩基配列をそれぞれ決定し、塩基配列よりVHまたはVLの全アミノ酸配列をそれぞれ推定する。

【 0 1 4 4 】

ヒト以外の動物としては、マウス、ラット、ハムスター、ラビットなどのハイブリドーマ細胞を作製することが可能であれば、いかなるものも用いることができる。

10

ハイブリドーマ細胞から全RNAを調製する方法としては、チオシアン酸グアニジン - トリフルオロ酢酸セシウム法 [Methods in Enzymol.,154,3(1987)] 等、またキットとしてはRNA easy kit (QIAGEN社製) 等が挙げられる。全RNAからmRNAを調製する方法としては、オリゴ (dT) 固定化セルロースカラム法 [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition(Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989)] 等、またキットとしてはOligoTM dT30<Super>mRNA Purification Kit (Takara社製) 等があげられる。ハイブリドーマ細胞からmRNAを調製するキットとしては、Fast Track mRNA Isolation Kit (Invitrogen社製)、Quick Prep mRNA Purification Kit (Pharmacia社製) 等があげられる。

【 0 1 4 5 】

cDNAの合成及びcDNAライブラリー作製法としては、常法 [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition(Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989) ; Current Protocols in Molecular Biology], Supplement 1 34]、或いは市販のキット、例えば、Super Script™ Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning(Invitrogen社製) やZAP cDNA Synthesis Kit(Stratagene社製) を用いる方法等があげられる。

20

【 0 1 4 6 】

cDNAライブラリーの作製の際、ハイブリドーマ細胞から抽出したmRNAを鋳型として合成したcDNAを組み込むベクターは、該cDNAを組み込めるベクターであればいかなるものでも用いることができる。例えば、ZAP Express[Strategies,5,58(1992)]、pBluescript II SK(+)[Nucleic Acids Research,17,9494(1989)]、ZAPII (Stratagene社製)、gt10、gt11 [DNA Cloning:A Practical Approach,1,49(1985)]、Lambda BlueMid (Clontech社製)、ExCell、pT7T3 18U (Pharmacia社製)、pcD2 [Mol.Cell.Biol.,3,280 (1983)] 及びpUC18[Gene,33,103(1985)] 等が用いられる。

30

【 0 1 4 7 】

ファージ或いはプラスミドベクターにより構築されるcDNAライブラリーを導入する大腸菌としては該cDNAライブラリーを導入、発現及び維持できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、XL1 Blue MRF ' [Strategies,5,81(1992)]、C600[Genetics,39,440(1954)]、Y1088、Y1090[Science,222,778(1983)]、NM522[J.Mol.Biol.,166,1(1983)]、K802[J.Mol.Biol.,16,118(1966)]及びJM105[Gene,38,275(1985)]等が用いられる。

【 0 1 4 8 】

cDNAライブラリーからの非ヒト抗体のVHまたはVLをコードするcDNAクローンの選択法としては、アイソトープ或いは蛍光標識したプローブを用いたコロニー・ハイブリダイゼーション法或いはプラーク・ハイブリダイゼーション法[Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition(Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989)]により選択することができる。また、プライマーを調製し、mRNAから合成したcDNA或いはcDNAライブラリーを鋳型として、Polymerase Chain Reaction [以下、PCR法と表記する ; Molecular Cloning,A Laboratory Manual, Second Edition、Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989);Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1 34] によりVHまたはVLをコードするcDNAを調製することもできる。

40

【 0 1 4 9 】

50

上記方法により選択されたcDNAを、適当な制限酵素等で切断後、pBluescript SK() (Stratagene社製)等のプラスミドにクローニングし、通常用いられる塩基配列解析方法、例えば、サンガー (Sanger, F.)らのジデオキシ法 [Proc.Natl.Acad.Sci.USA,74,5463(1977)] 等の反応を行い、塩基配列自動分析装置、例えば、A.L.F.DNAシーケンサー (Pharmacia社製)等を用いて解析することで該cDNAの塩基配列を決定することができる。

【 0 1 5 0 】

決定した塩基配列からVH及びVLの全アミノ酸配列をそれぞれ推定し、既知の抗体のVH及びVLの全アミノ酸配列 [Sequences of Proteins of Immunological Interest,US Dept.Health and Human Services(1991)] と比較することにより、取得したcDNAが分泌シグナル配列を含む抗体のVH及びVLの完全なアミノ酸配列をコードしているかをそれぞれ確認することができる。分泌シグナル配列を含む抗体のVH及びVLの完全なアミノ酸配列に関しては、既知の抗体のVH及びVLの全アミノ酸配列 [Sequences of Proteins of Immunological Interest,US Dept.Health and Human Services(1991)] と比較することにより、分泌シグナル配列の長さ及びN末端アミノ酸配列を推定でき、更にはそれらが属するサブグループを知ることができる。また、VH及びVLの各CDRのアミノ酸配列についても、既知の抗体のVH及びVLのアミノ酸配列 [Sequences of Proteins of Immunological Interest,US Dept.Health and Human Services(1991)] と比較することによって見出すことができる。

【 0 1 5 1 】

更にVH及びVLの完全なアミノ酸配列を用いて任意のデータベース、例えば、SWISS PROTやPIR Protein等に対してBLAST法 [J.Mol.Biol.,215,403(1990)] 等の配列の同源性検索を行い、用いるアミノ酸配列が新規なものであるかどうかを確認することができる。

(3) ヒト型キメラ抗体発現ベクターの構築

本項2の(1)に記載の遺伝子組換え抗体発現用ベクターのヒト抗体のCHまたはCLをコードするそれぞれの遺伝子の5'末端に、それぞれ非ヒト抗体のVHまたはVLをコードするcDNAをそれぞれクローニングし、ヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築することができる。例えば、非ヒト抗体のVHまたはVLをコードするcDNAの3'末端側と、ヒト抗体のCHまたはCLの5'末端側とを連結するために、連結部分の塩基配列が適切なアミノ酸をコードし、かつ適当な制限酵素認識配列になるように設計した、VHおよびVLのcDNAを作製する。作製されたVHおよびVLのcDNAを、それぞれを本項2の(1)に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体のCHまたはCLをコードするそれぞれの遺伝子の5'末端にそれらが適切な形で発現するようにそれぞれクローニングし、ヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築することができる。また、非ヒト抗体VHまたはVLをコードするcDNAを、適当な制限酵素の認識配列を両端に有する合成DNAを用いてPCR法によりそれぞれ増幅し、それぞれを本項2の(1)に記載の遺伝子組換え抗体発現用ベクターにクローニングすることもできる。

【 0 1 5 2 】

(4) ヒト化抗体のV領域をコードするcDNAの構築

ヒト化抗体のVHまたはVLをコードするcDNAは、以下の様にして構築することができる。まず、非ヒト抗体のVHまたはVLのCDRのアミノ酸配列を移植するヒト抗体のVHまたはVLのフレームワーク領域 (以下、FRと表記する) のアミノ酸配列をそれぞれ選択する。選択するFRのアミノ酸配列としては、ヒト抗体由来のものであれば、いずれのものでも良い。例えば、Protein Data Bank等のデータベースに登録されているヒト抗体のFRのアミノ酸配列、ヒト抗体のFRの各サブグループの共通アミノ酸配列 [Sequences of Proteins of Immunological Interest,US Dept.Health and Human Services(1991)] 等があげられる。抗体の結合活性の低下を抑えるため、元の抗体のVHまたはVLのFRのアミノ酸配列とできるだけ高い同源性 (少なくとも60%以上) のFRのアミノ酸配列を選択する。次に、選択したヒト抗体のVHまたはVLのFRのアミノ酸配列に、もとの抗体のCDRのアミノ酸配列をそれぞれ移植し、ヒト化抗体のVHまたはVLのアミノ酸配列をそれぞれ設計する。設計したアミノ酸配列を抗体の遺伝子の塩基配列に見られるコドンの使用頻度 [Sequences of Proteins of Immunological Interest,US Dept.Health and Human Services(1991)] を考慮してDNA配列に変換し、ヒト化抗体のVHまたはVLのアミノ酸配列をコードするDNA配列をそれぞれ

設計する。設計したDNA配列に基づき、100塩基前後の長さからなる数本の合成DNAを合成し、それらを用いてPCR法を行う。この場合、PCRでの反応効率及び合成可能なDNAの長さから、H鎖、L鎖とも6本の合成DNAを設計することが好ましい。

【0153】

また、両端に位置する合成DNAの5'末端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、本項2の(1)で構築したヒト化抗体発現用ベクターに容易にヒト化抗体のVHまたはVLをコードするcDNAをクローニングすることができる。PCR反応後、増幅産物をpBluescript SK() (Stratagene社製)等のプラスミドにそれぞれクローニングし、本項2の(2)に記載の方法により、塩基配列を決定し、所望のヒト化抗体のVHまたはVLのアミノ酸配列をコードするDNA配列を有するプラスミドを取得する。

10

【0154】

(5) ヒト化抗体のV領域のアミノ酸配列の改変

ヒト化抗体は、非ヒト抗体のVH及びVLのCDRのみをヒト抗体のVH及びVLのFRに移植しただけでは、その抗原結合活性は元の非ヒト抗体に比べて低下してしまうことが知られている [BIO/TECHNOLOGY, 9, 266(1991)]。この原因としては、元の非ヒト抗体のVH及びVLでは、CDRだけでなく、FR内のアミノ酸残基が直接的或いは間接的に抗原結合活性に関与しているため、ヒト化により非ヒト抗体のFRのアミノ酸残基が、ヒト抗体のFRのアミノ酸残基に置換されると、結抗原合活性が低下してしまうと考えられている。この問題を解決するため、ヒト化抗体では、ヒト抗体のVH及びVLのFRのアミノ酸配列の中で、直接抗原との結合に関与しているアミノ酸残基、CDRのアミノ酸残基と相互作用するアミノ酸残基、および抗体の立体構造を維持し、間接的に抗原との結合に関与しているアミノ酸残基を同定し、それらのアミノ酸残基を元の非ヒト抗体のアミノ酸残基に置換することにより、低下した抗原結合活性を上昇させることが行われている [BIO/TECHNOLOGY, 9, 266(1991)]。ヒト化抗体の作製においては、それら抗原結合活性に関わるFRのアミノ酸残基を如何に効率よく同定するために、X線結晶解析 [J. Mol. Biol., 112, 535(1977)] 或いはコンピューターモデリング [Protein Engineering, 7, 1501(1994)] 等による抗体の立体構造の構築及び解析が行われている。これら抗体の立体構造の情報は、ヒト化抗体の作製に多くの有益な情報をもたらして来たが、その一方、あらゆる抗体に適用可能なヒト化抗体の作製法は未だ確立されておらず、現状ではそれぞれの抗体について数種の改変体を作製し、それぞれの抗原結合活性との相関を検討する等の種々の試行錯誤が必要である。

20

30

【0155】

ヒト抗体のVH及びVLのFRのアミノ酸残基は、改変用合成DNAを用いて本項2の(4)に記載のPCR法を行うことにより、改変させることができる。PCR後の増幅産物について本項2の(2)に記載の方法により、塩基配列を決定し、目的の改変が施されたことを確認する。

(6) ヒト化抗体発現ベクターの構築

本項2の(1)に記載の遺伝子組換え抗体発現用ベクターのヒト抗体のCHまたはCLをコードするそれぞれの遺伝子上流に、構築した遺伝子組換え抗体のVHまたはVLをコードするcDNAをそれぞれクローニングし、ヒト化抗体発現ベクターを構築することができる。

【0156】

例えば、本項2の(4)及び(5)でヒト化抗体のVHまたはVLを構築する際に用いる合成DNAのうち、両端に位置する合成DNAの5'末端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、本項2の(1)に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体のCHまたはCLをコードするそれぞれの遺伝子上流にそれらが適切な形で発現するようにそれぞれクローニングすることができる。

40

【0157】

(7) 遺伝子組換え抗体の一過性発現

作製した多種類のヒト化抗体の抗原結合活性を効率的に評価するために、本項2の(3)及び(6)に記載の遺伝子組換え抗体発現ベクター、或いはそれらを改変した発現ベクターを用いて遺伝子組換え抗体の一過性発現を行うことができる。発現ベクターを導入する宿主細胞としては、遺伝子組換え抗体を発現できる宿主細胞であれば、いかなる細胞で

50

も用いることができるが、その発現量の高さから、COS 7細胞 (ATCC CRL1651) が一般に用いられる [Methods in Nucleic Acids Res.,CRC press,283(1991)]。COS 7細胞への発現ベクターの導入法としては、DEAE デキストラン法 [Methods in Nucleic Acids Res.,CRC press,283(1991)]、リポフェクション法 [Proc.Natl.Acad.Sci.USA,84,7413(1987)] 等があげられる。

【 0 1 5 8 】

発現ベクターの導入後、培養上清中の遺伝子組換え抗体の発現量及び抗原結合活性は酵素免疫抗体法 [以下、ELISA法と表記する ; Monoclonal Antibodies Principles and practice, Third edition,Academic Press(1996)、Antibodies A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory(1988)、単クローン抗体実験マニュアル、講談社サイエンティフィック(1987)] 等により測定できる。

10

【 0 1 5 9 】

(8) 遺伝子組換え抗体の安定発現

本項 2 の (3) 及び (6) に記載の遺伝子組換え抗体発現ベクターを適当な宿主細胞に導入することにより遺伝子組換え抗体を安定に発現する形質転換株を得ることができる。

宿主細胞への発現ベクターの導入法としては、エレクトロポレーション法 [特開平 2 25 7891、Cytotechnology,3,133(1990)] 等があげられる。

【 0 1 6 0 】

遺伝子組換え抗体発現ベクターを導入する宿主細胞としては、遺伝子組換え抗体を発現させることができる宿主細胞であれば、いかなる細胞でも用いることができる。例えば、マウス SP2/0 Ag14細胞 (ATCC CRL1581)、マウス P3X63 Ag8.653細胞 (ATCC CRL1580)、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子 (以下、dhfrと表記する) が欠損した CHO細胞 [Proc.Natl.Acad.Sci.USA,77,4216(1980)]、レクチン耐性を獲得した Lec13[Somatic Cell and Molecular genetics,12,55(1986)]、1,6 フコース転移酵素遺伝子が欠損した CHO細胞 (W005/35586、W002/31140)、ラット YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20細胞 (ATCC CRL1662) などがあげられる。

20

【 0 1 6 1 】

上記宿主細胞の他、細胞内糖ヌクレオチド GDP フコースの合成に關与する酵素などの蛋白質、N グリコシド結合複合型糖鎖の還元末端の N アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が結合する糖鎖修飾に關与する酵素などの蛋白質または細胞内糖ヌクレオチド GDP フコースのゴルジ体への輸送に關与する蛋白質などの活性が低下または欠失した宿主細胞、好ましくは W005/35586、W002/31140 等に記載の 1,6 フコース転移酵素遺伝子が欠損した CHO細胞などを用いることもできる。

30

【 0 1 6 2 】

発現ベクターの導入後、遺伝子組換え抗体を安定に発現する形質転換株は、特開平 2 25 7891 に開示されている方法に従い、G418 硫酸塩 (以下、G418 と表記する : SIGMA 社製) 等の薬剤を含む動物細胞培養用培地で培養することにより選択できる。動物細胞培養用培地としては、RPMI1640 培地 (Invitrogen 社製)、GIT 培地 (日本製薬社製)、EX CELL301 培地 (JRH 社製)、IMDM 培地 (Invitrogen 社製)、Hybridoma SFM 培地 (Invitrogen 社製)、またはこれら培地に牛胎児血清 (以下、FCS と表記する) 等の各種添加物を添加した培地等を用いることができる。得られた形質転換株を培地中で培養することで培養上清中に遺伝子組換え抗体を発現蓄積させることができる。培養上清中の遺伝子組換え抗体の発現量及び抗原結合活性は ELISA 法等により測定できる。また、形質転換株は、特開平 2 257891 に開示されている方法に従い、DHFR 増幅系等を利用して遺伝子組換え抗体の発現量を上昇させることができる。

40

【 0 1 6 3 】

遺伝子組換え抗体は、形質転換株の培養上清よりプロテイン A カラムを用いて精製することができる [Monoclonal Antibodies Principles and practice,Third edition,Academic Press(1996)、Antibodies A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory(1988)]。また、その他に通常、蛋白質の精製で用いられる精製方法を使用することができる。

50

例えば、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー及び限外濾過等を組み合わせて行い、精製することができる。精製した遺伝子組換え抗体のH鎖、L鎖或いは抗体分子全体の分子量は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 [以下、SDS PAGEと表記する : Nature, 227,680(1970)] やウエスタンブロッティング法 [Monoclonal Antibodies Principles and practice, Third edition, Academic Press(1996)、Antibodies A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory(1988)] 等で測定することができる。

【 0 1 6 4 】

3 . 本発明の抗体または抗体断片の活性評価

精製した本発明の抗体または抗体断片の反応特異性は、下記のようにして評価することができる。

CLDN3遺伝子 (配列番号25)、CLDN4遺伝子 (配列番号1)、CLDN5遺伝子 (配列番号29)、CLDN6 (配列番号5) およびCLDN9遺伝子 (配列番号33) をクローニングし、各遺伝子を発現させたCLDN発現細胞を作製する。次に、CLDN3 (配列番号26)、CLDN4 (配列番号2)、CLDN5 (配列番号30)、CLDN6 (配列番号6) またはCLDN9 (配列番号34) が、それぞれ発現した細胞株と精製抗体との反応性を、ELISA法および蛍光抗体法 [Cancer Immunol.Immunother.,36,373(1993)] など測定する。また、CLDN発現細胞の膜画分または膜タンパク質を、適切な条件下で抽出することで、立体構造を保持したCLDN3 (配列番号26)、CLDN4 (配列番号2)、CLDN5 (配列番号30)、CLDN6 (配列番号6) またはCLDN9 (配列番号34) タンパク質をそれぞれ調製し、これら抽出したCLDNタンパク質と精製抗体との反応性を、表面プラズモン共鳴 (SPR) を利用したBIAcore™やELISA法等により測定してもよい。抗原を発現している培養細胞株に対する細胞傷害活性は、CDC活性、ADCC活性等を、公知の方法 [Cancer Immunol.Immunother.,36,373(1993)] で測定し、評価することができる。

【 0 1 6 5 】

また、精製した本発明の抗体または該抗体断片のCLDN4に対する機能阻害活性は、CLDN4発現細胞を用いて、前述の1 (7) 記載の方法などによって評価することができる。

4 . 本発明の抗CLDN4モノクローナル抗体またはその抗体断片を用いた疾患の診断方法

本発明の抗体または該抗体断片を用いてCLDN4または該ポリペプチドが発現した細胞を検出または定量することにより、CLDN4が関連する疾患を診断することができる。

【 0 1 6 6 】

CLDN4が関与する疾患としては、該ポリペプチドが発現している細胞が関与する疾患であればいかなるものでもよく、例えば癌があげられる。癌としては、上皮由来の癌があげられ、具体的には、乳癌、子宮癌、大腸癌、胃癌、卵巣癌、肺癌、腎臓癌、直腸癌、甲状腺癌、子宮頸癌、小腸癌、前立腺癌または膵臓癌などがあげられる。

本発明においてCLDN4を検出または測定する対象となる生体試料としては、組織細胞、血液、血漿、血清、唾液、尿、糞便、組織液、培養液など、該ポリペプチドを含む可能性のあるものであれば特に限定されない。

【 0 1 6 7 】

CLDN4が関連する疾患のうち、例えば癌の診断は以下のようにして行うことができる。

複数の健常者の生体から採取した生体試料について、本発明の抗体または該抗体断片、またはこれらの誘導体を用い、下記の免疫学的手法を用いて、CLDN4の検出または測定を行い、健常者の生体試料中の該ポリペプチドの発現量を確認する。被験者の生体試料中についても同様に該ポリペプチドの発現量を調べ、その発現量を健常者の発現量と比較する。被験者の該ポリペプチドの発現量が健常者と比較して増加している場合には、癌が陽性であると診断できる。

【 0 1 6 8 】

本発明の抗体または該抗体断片、またはこれらの誘導体を含有する診断薬は、目的の診断法に応じて、抗原抗体反応を行なうための試薬、該反応の検出用試薬を含んでもよい。抗原抗体反応を行なうための試薬としては、緩衝剤、塩などがあげられる。検出用試薬としては、抗体もしくは該抗体断片、またはこれらの誘導体、またはこれらの誘導体を認識

する標識された二次抗体、標識物の基質など、通常の免疫学的検出または測定法に用いられる試薬があげられる。

【0169】

本発明においてCLDN4の量を検出または測定する方法としては、任意の公知の方法があげられる。例えば、免疫学的検出または測定方法などがあげられる。

免疫学的検出または測定方法とは、標識を施した抗原または抗体を用いて、抗体量または抗原量を検出または測定する方法である。免疫学的検出または測定方法としては、放射性物質標識免疫抗体法（RIA）、酵素免疫測定法（EIAまたはELISA）、蛍光免疫測定法（FIA）、発光免疫測定法（luminescent immunoassay）、ウエスタンブロット法および物理化学的手法（TIA、LAPIA、PCIA）などがあげられる。

10

【0170】

放射性物質標識免疫抗体法（RIA）としては、例えば、抗原または抗原を発現した細胞などに、本発明の抗体または該抗体断片を反応させ、さらに放射線標識を施した抗イムノグロブリン抗体または結合断片を反応させた後、シンチレーションカウンターなどで測定する方法があげられる。

酵素免疫測定法（EIAまたはELISA）としては、例えば、抗原または抗原を発現した細胞などに、本発明の抗体または該抗体断片を反応させ、さらに標識を施した抗イムノグロブリン抗体または結合断片を反応させた後、発色色素を吸光光度計で測定する方法があげられ、例えばサンドイッチELISA法などが用いられる。酵素免疫測定法で用いる標識体としては、前述のとおり、任意の公知（石川榮次ら編、酵素免疫測定法、医学書院）の酵素標識を用いることができる。例えば、アルカリフォスファターゼ標識、ペルオキシダーゼ標識、ルシフェラーゼ標識、ビオチン標識などを用いることができる。

20

【0171】

サンドイッチELISA法は、固相に抗体を結合させた後、検出または測定したい抗原をトラップさせ、トラップされた抗原に第2の抗体を反応させる方法である。該ELISA法では、検出または測定したい抗原を認識する抗体または抗体断片であって、抗原認識部位の異なる2種類の抗体を準備し、そのうち、一方の抗体または抗体断片を予めプレート（例えば、96ウェルプレート）に吸着させ、第2の抗体または抗体断片をFITCなどの蛍光物質、ペルオキシダーゼなどの酵素、ビオチンなどで標識しておく。上記の抗体が吸着したプレートに、生体内から分離された、細胞またはその破碎液、組織またはその破碎液、細胞培養上清、血清、胸水、腹水、眼液などを反応させた後、標識したモノクローナル抗体または抗体断片を反応させ、標識物質に応じた検出反応を行う。該方法により、被験サンプル中の抗原濃度を測定する場合には、濃度既知の抗原を段階的に希釈して作製した検量線より、被験サンプル中の抗原濃度を算出することができる。サンドイッチELISA法に用いる抗体としては、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体のいずれを用いてもよく、Fab、Fab'、F(ab)などの抗体フラグメントを用いてもよい。サンドイッチELISA法で用いる2種類の抗体の組み合わせとしては、異なるエピトープを認識するモノクローナル抗体または抗体断片の組み合わせでもよいし、ポリクローナル抗体とモノクローナル抗体または抗体断片の組み合わせでもよい。

30

【0172】

蛍光免疫測定法（FIA）としては、文献 [Monoclonal Antibodies Principles and practice, Third edition, Academic Press(1996) ; 単クローン抗体実験マニュアル、講談社サイエンティフィック (1987)] などに記載された方法があげられる。蛍光免疫測定法で用いる標識体としては、前述のとおり、任意の公知（川生明著、蛍光抗体法、ソフトサイエンス社）の蛍光標識を用いることができる。例えば、FITC標識、RITC標識などを用いることができる。

40

【0173】

発光免疫測定法（luminescent immunoassay）としては、 [Monoclonal Antibodies Principles and practice, Third edition, Academic Press(1996)、単クローン抗体実験マニュアル、講談社サイエンティフィック (1987)] などに記載された方法を用いて行うこと

50

ができる。発光免疫測定法で用いる標識体としては、前述のとおり、任意の公知 [今井一洋編、生物発光と化学発光、廣川書店；臨床検査42(1998)] の発光体標識があげられる。例えば、アクリジニウムエステル標識、ロフィン標識などを用いることができる。

【 0 1 7 4 】

ウエスタンブロット法は、抗原または抗原を発現した細胞などをSDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 [Antibodies A Laboratory Manual(Cold Spring Harbor Laboratory,1988)] で分画した後、該ゲルをPVDF膜またはニトロセルロース膜にブロッティングし、該膜に抗原を認識する抗体または抗体断片を反応させ、さらにFITCなどの蛍光物質、ペルオキシダーゼなどの酵素標識、ビオチン標識などを施した抗マウスIgG抗体または結合断片を反応させた後、該標識を可視化することによって確認する方法である。ウエスタンブロット法の一例を以下に示す。

10

【 0 1 7 5 】

配列番号2で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現している細胞や組織を溶解し、還元条件下でレーンあたりのタンパク量として0.1~30 μ gをSDS PAGE法により泳動する。泳動されたタンパク質をPVDF膜にトランスファーし1%BSAを含むPBS(以下、BSA PBSと表記する)に室温で30分間反応させブロッティング操作を行う。ここで本発明のモノクローナル抗体を反応させ、0.05%のTween 20を含むPBS(以下、Tween PBSと表記する)で洗浄し、ペルオキシダーゼ標識したヤギ抗マウスIgGを室温で2時間反応させる。Tween PBSで洗浄し、ECL™Western blotting detection reagents(Amersham社製)などを用いてモノクローナル抗体が結合したバンドを検出することにより、配列番号2で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを検出することができる。ウエスタンブロッティングでの検出に用いられる抗体としては、天然型の立体構造を保持していないポリペプチドに結合できる抗体が用いられる。

20

【 0 1 7 6 】

物理化学的手法とは、具体的には、本発明の抗体または該抗体断片を用いて、抗原であるCLDN4と本発明の抗体または該抗体断片とを結合させることにより凝集体を形成させて、この凝集体を検出することにより行う。この他に物理化学的手法としては、毛細管法、一次元免疫拡散法、免疫比濁法あるいはラテックス免疫比濁法等があげられる [臨床検査法提要、金原出版、499(1998)]。

【 0 1 7 7 】

例えば、ラテックス免疫比濁法では、抗体または抗原を感作させた粒径0.1~1 μ m程度のポリスチレンラテックス等の担体を用い、対応する抗原あるいは抗体により抗原抗体反応を起こさせると、反応液中の散乱光は増加し、透過光は減少する。この変化を吸光度あるいは積分球濁度として検出することにより被験サンプル中の抗原濃度を測定することができる。

30

【 0 1 7 8 】

本発明の抗体または該抗体断片は、CLDN4の細胞外領域に結合できるため、該ポリペプチドが発現している細胞の検出に好適に用いられる。

該ポリペプチドが発現している細胞の検出には、公知の免疫学的検出法を用いることができるが、免疫沈降法、免疫細胞染色法、および免疫組織染色法などが、好ましく用いられる。また、FMAT8100HTSシステム(アプライドバイオシステム社製)を用いる蛍光抗体染色法なども用いることができる。

40

【 0 1 7 9 】

免疫沈降法とは、該ポリペプチドを発現した細胞などを本発明のモノクローナル抗体または抗体断片と反応させた後、プロテインG-セファロースなどのイムノグロブリンに特異的な結合能を有する担体を加えて抗原抗体複合体を沈降させる方法である。あるいは以下のような方法によっても行なうことができる。

ELISA用96ウェルプレートに上述した本発明の抗体または該抗体断片を固相化した後、BSA PBSによりブロッティングする。抗体が精製されていない状態の例えばハイブリドーマ株培養上清などの精製されていない状態である場合には、抗マウスイムノグロブリンあるい

50

はラットイムノグロブリンまたはプロテイン A あるいは G などをあらかじめ ELISA 用 96 ウェルプレートに固相化し BSA PBS でブロッキングした後、ハイブリドーマ株培養上清を分注して結合させる。BSA PBS を捨て PBS でよく洗浄した後、配列番号 2 で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現している細胞や組織の溶解液を反応させる。よく洗浄した後のプレートより免疫沈降物を SDS PAGE 用サンプルバッファーで抽出し、上記のウエスタンブロッティングにより検出を行う。

【 0 1 8 0 】

免疫細胞染色法および免疫組織染色法とは抗原を発現した細胞または組織などを、場合によっては抗体の通過性を良くするため界面活性剤やメタノールなどで処理した後、本発明の抗体を反応させ、さらに FITC などの蛍光標識、ペルオキシダーゼなどの酵素標識、ビオチン標識などを施した抗イムノグロブリン抗体または結合断片を反応させた後、該標識を可視化し、顕微鏡にて顕鏡するか、あるいは蛍光標識の抗体と細胞を反応させ、フローサイトメーターにて解析する蛍光抗体染色法（フローサイトメトリー）である。例えば、文献 [Monoclonal Antibodies Principles and practice, Third edition, Academic Press (1996)、単クローン抗体実験マニュアル、講談社サイエンティフィック (1987)] などに記載された方法を用いて行うことができる。特に、本発明の抗体または該抗体断片は、CLDN4 の細胞外領域に結合できるため、フローサイトメトリーにより天然型の立体構造を保持して発現している細胞の検出に好ましく用いられる。

10

【 0 1 8 1 】

また、蛍光抗体染色法の原理を利用した FMAT8100HTS システム（アプライドバイオシステム社製）を用いることにより、形成された抗体 - 抗原複合体と、抗体 - 抗原複合体の形成に関与していない遊離の抗体または抗原とを分離することなく、抗原量または抗体量を測定することができる。

20

5 . 本発明の CLDN3 および CLDN4 の両方々に反応するモノクローナル抗体またはその抗体断片を用いた疾患の診断方法

本発明の CLDN4 の細胞外領域の立体構造を特異的に認識し、CLDN4 の細胞外領域に結合し、かつ CLDN3 の細胞外領域の立体構造を特異的に認識し、CLDN3 の細胞外領域に結合するモノクローナル抗体または該抗体断片、または CLDN4 の細胞外領域に特異的に結合し、CLDN4 中和活性を有し、かつ CLDN3 の細胞外領域の立体構造を特異的に認識し、CLDN3 の細胞外領域に結合するモノクローナル抗体または該抗体断片を用いて、CLDN4 および/または CLDN3 が発現した細胞を検出または定量することにより、CLDN4 および/または CLDN3 が関連する疾患を診断することができる。

30

【 0 1 8 2 】

CLDN3 および/または CLDN4 が関与する疾患としては、該ポリペプチドが発現している細胞が関与する疾患であればいかなるものでもよく、例えば癌があげられる。癌としては、上皮由来の癌があげられ、具体的には、乳癌、子宮癌、大腸癌、胃癌、卵巣癌、子宮頸癌または前立腺などがあげられる。

CLDN4 および/または CLDN3 の検出、測定および診断は、上記 4 と同様にして行うことができる。

【 0 1 8 3 】

6 . 本発明の抗 CLDN4 モノクローナル抗体または該抗体断片を用いた疾患の治療方法
本発明の CLDN4 の細胞外領域の立体構造を特異的に認識し、かつ該細胞外領域に結合するモノクローナル抗体またはその抗体断片、もしくは CLDN4 の細胞外領域に結合し、CLDN4 中和活性を有するモノクローナル抗体またはその抗体断片は、CLDN4 が関与する疾患の治療に用いることができる。

40

【 0 1 8 4 】

CLDN4 が関与する疾患としては、該ポリペプチドが発現している細胞が関与する疾患であればいかなるものでもよく、例えば癌があげられる。癌としては、上皮由来の癌があげられ、具体的には、乳癌、子宮癌、大腸癌、胃癌、卵巣癌、肺癌、腎臓癌、直腸癌、甲状腺癌、子宮頸癌、小腸癌、前立腺癌または膵臓癌などがあげられる。

50

本発明の治療剤としては、本発明の抗体または該抗体断片を有効成分とする癌の治療剤があげられる。ADCC活性やCDC活性などのエフェクター活性を有するがん治療剤、あるいはアポトーシス誘導作用による癌の治療剤等も、本発明の治療剤として包含される。

【0185】

本発明の抗体または該抗体断片は、細胞膜に発現しているCLDN4の立体構造を認識することができるので、生体内で存在するCLDN4を発現している細胞を認識することができる。従って、本発明の抗体または該抗体断片で、かつエフェクター活性を有する抗体または該抗体断片は、*in vivo*および*in vitro*において、CLDN4を発現している細胞を傷害することができる。また、このような本発明の抗体または該抗体断片は、生体内のCLDN4発現細胞を傷害し、減少させることができるので、治療剤として特に有効に用いられる。

10

【0186】

本発明の抗体または該抗体断片、またはこれらの誘導体を含有する治療剤は、有効成分としての該抗体もしくは該抗体断片、またはこれらの誘導体のみを含むものであってもよいが、通常は薬理的に許容される1以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが望ましい。

投与経路は、治療に際して最も効果的なものを使用するのが望ましく、経口投与、または口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内および静脈内などの非経口投与をあげることができ、抗体またはペプチド製剤の場合、望ましくは静脈内投与をあげることができる。投与形態としては、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、軟膏、テープ剤などがあげられる。

20

【0187】

経口投与に適切な製剤としては、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤などがあげられる。乳剤およびシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトール、果糖などの糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコールなどのグリコール類、ごま油、オリーブ油、大豆油などの油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類などの防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミントなどのフレーバー類などを添加剤として用いて製造できる。カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤などは、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニトールなどの賦形剤、デンプン、アルギン酸ナトリウムなどの崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルクなどの滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチンなどの結合剤、脂肪酸エステルなどの界面活性剤、グリセリンなどの可塑剤などを添加剤として用いて製造できる。

30

【0188】

非経口投与に適切な製剤としては、注射剤、座剤、噴霧剤などがあげられる。注射剤は、塩溶液、ブドウ糖溶液、あるいは両者の混合物からなる担体などを用いて調製される。座剤はカカオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸などの担体を用いて調製される。また、噴霧剤は該抗体または抗体断片自体、ないしは受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ該抗体または抗体断片を微細な粒子として分散させ吸収を容易にさせる担体などを用いて調製される。担体として具体的には乳糖、グリセリンなどが例示される。該抗体または抗体断片および用いる担体の性質により、エアロゾル、ドライパウダーなどの製剤が可能である。また、これらの非経口剤においても経口剤で添加剤として例示した成分を添加することもできる。

40

【0189】

投与量または投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢、体重などにより異なるが、通常成人1日当たり10 μg/kg~8 mg/kgである。

7. 本発明のCLDN3およびCLDN4の両方に反応するモノクローナル抗体または該抗体断片を用いた疾患の治療方法

本発明のCLDN4の細胞外領域の立体構造を特異的に認識し、CLDN4の細胞外領域に結合し、かつCLDN3の細胞外領域の立体構造を特異的に認識し、CLDN3の細胞外領域に結合するモノクローナル抗体または該抗体断片、またはCLDN4の細胞外領域に特異的に結合し、CLDN4中和活性を有し、かつCLDN3の細胞外領域の立体構造を特異的に認識し、CLDN3の細胞外領

50

域に結合するモノクローナル抗体または該抗体断片は、CLDN4および/またはCLDN3が関与する疾患の治療に用いることができる。

【0190】

CLDN3および/またはCLDN4が関与する疾患としては、該ポリペプチドが発現している細胞が関与する疾患であればいかなるものでもよく、例えば癌があげられる。癌としては、上皮由来の癌があげられ、具体的には、乳癌、子宮癌、大腸癌、胃癌、卵巣癌、子宮頸癌または前立腺などがあげられる。

本発明の抗体による治療は、上記6と同様にして調製した治療剤、治療方法で行うことができる。

【0191】

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

【実施例1】

【0192】

CLDN myc/His遺伝子導入CHO細胞株の造成

(1) CLDN4 myc/His遺伝子導入CHO細胞株

日本DNAデータバンクに登録されているヒトCLDN4遺伝子(配列番号1)を含むプラスミド(AK126315)を鋳型として100 ng、10×KOD緩衝液1を10 μL、2 mmol/L dNTPを10 μL、25 mmol/L塩化マグネシウムを4 μL、1 μg/μLの配列番号9および配列番号10記載の塩基配列を有するプライマーをそれぞれ1 μL、KOD polymerase(東洋紡績社製)を1 μLを含む100 μLの反応液を調製し、PCR反応を行った。反応条件は、96 °Cで3分間変性処理後、94 °Cで1分間、55 °Cで1分間、72 °Cで1分間のサイクルを30~40サイクル行い、更に72 °Cで7分間の反応で行った。以下、特に記載の無い限り、PCRの反応条件は上述の条件で行い、ヒトCLDN4遺伝子のC末端にmyc/Hisが付加された融合蛋白質(以下、CLDN4 myc/Hisと表記する)をコードする遺伝子を増幅した。CLDN4 myc/Hisの塩基配列およびアミノ酸配列を配列番号3および配列番号4に示した。反応液をアガロースゲル電気泳動で分離し、得られた約0.7 kbpの遺伝子断片をGel Extraction Kit(QIAGEN社製)を用いて抽出した。得られた遺伝子断片を、pBluescriptII SK()ベクターのSma I、EcoR Vあるいは、EcoR I Kpn I サイトに挿入し、Ligation high(東洋紡績社製)を用いて連結した後、コーエンらの方法[Proc.Natl.Acad.Sci.USA,69, 2110(1972)]により大腸菌DH5 株を形質転換した。得られた形質転換体より、自動プラスミド抽出機(クラボウ社製)を用いてプラスミドを抽出し、配列番号3記載の塩基配列を含むプラスミドpBluescriptII SK() CLDN4 myc/Hisを取得した。

【0193】

pBluescriptII SK() CLDN4 myc/HisをEcoR IとKpn Iで消化し、human CLDN4 myc/Hisを含む遺伝子断片を、EcoR IとKpn Iで消化したpKANTEX93ベクター(W097/10354)に連結し、上記のコーエンらの方法に従い形質転換体を得た後、プラスミド抽出キット(QIAGEN社製)を用いてプラスミドpKANTEX CLDN4 myc/Hisを取得した。

次に、pKANTEX CLDN4 myc/Hisは、エレクトロポレーション法[Cytotechnology,3,133(1990)]により以下のようにしてCHO/DG44細胞[Somatic Cell and Molecular Genetics,12,55(1986)]へ導入した。

【0194】

細胞は、10%ウシ胎児血清(Life technologies社製)、50 μg/mL Gentamicin(ナカライテスク社製)を添加したIMDM培地(Lifetechnologies社製)(以下、A3培地と表記する)に1×HT supplement(Life technologies社製)を添加した培地で継代したものをを用いた。CHO/DG44細胞をK PBS緩衝液[137 nmol/L塩化カリウム2.7 nmol/L塩化ナトリウム、8.1 mmol/Lリン酸一水素二ナトリウム、1.5 nmol/Lリン酸二水素一ナトリウム、4 mmol/L塩化マグネシウム緩衝液]に懸濁して 8×10^5 細胞/mLとし、細胞懸濁液200 μL(1.6×10^5 個の細胞を含む)を上記プラスミド10 μgと混和した。該混和液をキュベット(電極間距離2 mm)に移し、GenePulserII(BioRad社製)装置を用いてパルス電圧0.35 kV、電気容量250 μFの条

10

20

30

40

50

件で遺伝子導入を行った。キュベットを氷上で静置後、キュベット中の細胞懸濁液を、A3培地を含むフラスコに懸濁し、37℃、5%CO₂存在下、インキュベーターで培養した。5日間培養後、0.5 mg/mL G418 (CALBIOCHEM社製) を添加したA3培地に培地交換し培養を行い、しばらく継代培養を続け、遺伝子導入より約2週間後に、G418耐性株を取得した。

【0195】

得られたG418耐性株を5細胞/mLとなるように、0.5 mg/mL G418 を添加したA3培地で希釈し、96穴プレートに100 μLずつ分注し、500 nmol/L メソトレキセート (以下、MTXと記載する。) を加え、培養を行いMTX耐性株を取得した。その結果、CLDN4 myc/His遺伝子導入CHO細胞株 (以下、CLDN4/CHOと記載する) を取得した。

(2) CLDN5 myc/His遺伝子導入CHO細胞株の造成

日本DNAデータバンクに登録されているヒトCLDN5遺伝子 (配列番号29) を含むプラスミド (AK092561) を鋳型として、配列番号41および配列番号42記載の塩基配列を有するプライマーを用いる以外は、上記CLDN4/CHO細胞と同様にして、ヒトCLDN5遺伝子のC末端にmyc/Hisが付加された融合蛋白質 (以下、CLDN5 myc/Hisと表記する) をコードする遺伝子配列を増幅し、CLDN5 myc/His遺伝子導入CHO細胞株 (以下、CLDN5/CHOと記載する) を作製した。Human CLDN5 myc/Hisの塩基配列およびアミノ酸配列を配列番号31および配列番号32に記載した。

(3) CLDN6 myc/His遺伝子導入CHO細胞株の造成

日本DNAデータバンクに登録されているヒトCLDN6遺伝子 (配列番号5) を含むプラスミド (XM 012518) を鋳型として、配列番号11および配列番号12記載の塩基配列を有するプライマーを用いる以外は、上記CLDN4/CHO細胞と同様にして、ヒトCLDN6遺伝子のC末端にmyc/Hisが付加された融合蛋白質 (以下、CLDN6 myc/Hisと表記する) をコードする遺伝子配列を増幅し、CLDN6 myc/His遺伝子導入CHO細胞株 (以下、CLDN6/CHOと記載する) を作製した。Human CLDN6 myc/Hisの塩基配列およびアミノ酸配列を配列番号7および配列番号8に記載した。

(4) CLDN3 myc/His遺伝子導入CHO細胞株の造成

BDクロンテック社より購入したヒト大腸組織由来cDNAを鋳型として5 μL、10 × ExTaq緩衝液を2 μL、2.5 mmol/L dNTPを1.6 μL、25 mmol/L 塩化マグネシウムを1.6 μL、0.1 μg/μLの配列番号37および配列番号38記載の塩基配列を有するプライマーをそれぞれ 1 μL、ExTaq polymerase (宝酒造社製) を0.1 μL、ジメチルスルフォキシド (以下DMSOと表記する) を1 μLを含む20 μLの反応液を調製しPCR反応を行った。反応条件は、96℃で3分間変性処理後、95℃で1分間、50℃で1分間、72℃で1分間のサイクルを40サイクル行い、更に72℃で7分間の反応で行った。反応産物をアガロースゲル電気泳動で分離し、約0.7 kbpの遺伝子断片をGel Extraction Kit (QIAGEN社製) を用いて抽出した。以下は実施例1 (1)と同様にして、pBluescriptII SK(+) CLDN3を取得した。pBluescriptII SK(+) CLDN3に含まれるCLDN3の塩基配列は、accession No.NM 001306でGene bankに登録されている配列番号25で表されるCLDN3の塩基配列の557番目のAがGに置換しているものの、この塩基配列によりコードされるアミノ酸配列は、配列番号26で表されるCLDN3のアミノ酸配列と同じであった。

【0196】

次に、これを鋳型にして、配列番号39および配列番号40記載の塩基配列を有するプライマーを用いて反応液を調製し、PCR反応を行った。PCR反応は、96℃で3分間変性処理後、95℃で1分間、50℃で1分間、72℃で1分間のサイクルを40サイクル行い、更に72℃で7分間反応させて行い、ヒトCLDN3遺伝子のC末端にmyc/Hisが付加された融合蛋白質 (以下、CLDN3 myc/Hisと表記する) をコードする遺伝子断片を増幅した。CLDN3 myc/Hisの塩基配列およびアミノ酸配列を配列番号27および配列番号28にそれぞれ記載した。反応産物をアガロースゲル電気泳動で分離し、約0.7 kbpの遺伝子断片をGel Extraction Kit (QIAGEN社製) を用いて抽出した。以下は、実施例1 (1)と同様にして、配列番号27記載の塩基配列を含むプラスミドpBluescriptII SK(+) CLDN3 myc/HisおよびpKANTEX CLDN3 myc/Hisを取得し、CLDN3高発現細胞 (以下、CLDN3/CHOと記載する) を取得した。

(5) CLDN9 myc/His遺伝子導入CHO細胞株の造成

10×KOD緩衝液1を5μL、2 mmol/L dNTPを5μL、25 mmol/L 塩化マグネシウムを2 μL、1 μg/μLの配列番号43~48記載の塩基配列を有する合成DNAをそれぞれ0.1 μL、KOD polymeraseを0.5 μL、DMSOを2.5 μLをそれぞれ含む50μLの反応液を調製しPCR反応を行った。反応条件は、96 で3分間変性処理を行い、94 で1分間、62 で1分間、72 で1分間のサイクルを25サイクル行い、更に72 で7分間の反応で行った。この結果、ヒトCLDN9遺伝子のC末端にmyc/Hisが付加された融合蛋白質（以下、CLDN9 myc/Hisと表記する）をコードする塩基配列を増幅した。human CLDN9 myc/Hisの塩基配列およびアミノ酸配列を配列番号35および配列番号36にそれぞれ記載した。反応産物をアガロースゲル電気泳動で分離し、約0.7 kbpの増幅断片をGel Extraction Kitを用いて抽出した。以下は、実施例 1 - (1)と同様にして、配列番号35記載の塩基配列を含むプラスミドpBluescriptII SK () CLDN9 myc/HisおよびpKANTEX CLDN9 myc/Hisを取得し、CLDN9高発現細胞株（以下、CLDN9/CHOと記載する）を取得した。

10

(6) CLDN発現細胞の確認

上記実施例 1 (1) ~ (5) で取得された形質転換細胞 1~5×10⁶個を、70%エタノール - PBS 1 mLに懸濁して氷温中で30分間固定した。96穴U字プレートに1~5×10⁶個/ウェルとなるように分注し遠心分離（1500 rpm、5分間）した後、上清を除いてBSA PBSで氷温中30分間ブロッキングした。遠心分離により上清を除いて、1次抗体としてCLDN4の細胞内領域を認識する市販抗CLDN4モノクローナル抗体3E2C1（Zymed社製）、抗myc抗体PL14（MBL社製）、抗His抗体（QIAGEN社製）、マウスIgG1アイソタイプコントロール（DAKO社製）を、最終濃度がそれぞれ0.5、1、0.1、0.1μg/mLとなるようにBSA PBSで希釈し、100μL/ウェルで分注し氷温中で60分間反応させた。反応後、BSA PBSで1回洗浄し、2次抗体としてBSA PBSで50倍希釈したFITC標識抗マウスイムノグロブリンG（H+L）（DAKO社製）を100μL/ウェルに加え、氷温中、遮光下で30分間反応させた。再びBSA PBSで1回洗浄した後、細胞はPBSに懸濁してフローサイトメーター（以下、FCMと表記する）（ベックマンコールター社製）で蛍光強度を測定した。

20

【 0 1 9 7 】

その結果を図1に示す。図1に示したように、CLDN4/CHOには、抗CLDN4抗体、抗myc抗体および抗His抗体いずれの抗体も反応したことから、mycタグおよびHisタグが融合したCLDN4が発現していることが明らかになった。一方、CLDN3/CHO、CLDN5/CHO、CLDN6/CHOおよびCLDN9/CHOには、抗CLDN4抗体は反応せず、抗myc抗体および抗His抗体が反応したことから、CLDN3/CHO、CLDN5/CHO、CLDN6/CHOおよびCLDN9/CHOには、mycタグおよびHisタグが融合したCLDNが発現していることが明らかになった。

30

【 実施例 2 】

【 0 1 9 8 】

抗CLDN4モノクローナル抗体の作製

(1) 免疫原の調製

膵臓癌細胞株Capan 2（ATCC HTB 80）もしくはCLDN4/CHOを3~5日間培養し、0.02 % EDTA溶液（ナカライテスク社製）またはセルスクレーパーを用いて剥離した。1匹あたり6×10⁶個から1×10⁷個の細胞数となるようPBSに懸濁して調製した。

40

【 0 1 9 9 】

(2) 動物の免疫と抗体産生細胞の調製

実施例 2 (1) で調製したCapan 2細胞を百日咳ワクチン（千葉県血清研究所製）1×10⁸細胞とともに6週令雄BXSbマウス（日本エスエルシー社製）3匹/1群に投与した。投与1週間後より、毎週1回 計4回投与し、該マウスの眼底より部分採血した。その血中抗体価を、実施例 2 (3) に示す蛍光抗体染色法を行い、ABI8200セルラーディテクションシステム（アプライドバイオ社製）または、FCM（ベックマンコールター社製）で測定し、十分な抗体価が認められたマウスから最終免疫3日後に脾臓を摘出した。

【 0 2 0 0 】

脾臓をMEM（Minimum Essential Medium）培地（日水製薬社製）中で細断し、ピンセツ

50

トでほぐし、遠心分離（250×g、5分間）した。得られた沈殿画分にトリス - 塩化アンモニウム緩衝液（pH7.6）を添加し、1～2分間処理することにより赤血球を除去した。得られた沈殿画分（細胞画分）をMEM培地で3回洗浄し、細胞融合に用いた。

（3）細胞を用いた蛍光抗体染色法（ABI8200セルラードイテクションシステム）

アッセイ用の細胞はCLDN4/CHOと、pKANTEX93ベクターのみを導入したCHO細胞（以下、vector/CHO）を用いた。CLDN4/CHOおよびvector/CHO細胞を、10% FCS入りIscove's Modified Dulbecco's Medium（Invitrogen社製）で2～3日間培養し、Trypsin EDTA溶液（Invitrogen社製）で剥離した細胞をMediumに懸濁し、ABI8200用黒色96ウェルプレートに 1×10^4 個/50 μ L Medium/ウェルで播種し、1晩培養した。該プレートに一次抗体として被免疫マウス抗血清、ハイブリドーマ培養上清を10 μ L/ウェル分注し、2次抗体としてALEXA647標識抗マウスイムノグロブリンG（H+L）（Invitrogen社製）を100 μ L/ウェルで加えて遮光下で4時間放置した。レーザー光633 He/Neで励起され650～685 nmの波長をABI8200セルラードイテクションシステム（アプライドバイオ社製）で測定した。

【0201】

（4）細胞を用いた蛍光抗体染色法

アッセイ用の細胞はCLDN4/CHOとvector/CHOを用いた。CLDN4/CHOおよびvector/CHO細胞を、10% FCS入りIscove's Modified Dulbecco's Medium（Invitrogen社製）で2～3日間培養し、0.02% EDTA溶液（ナカライテスク社製）で剥離した各細胞をPBSで洗浄した。抗体の非特異的な吸着を防ぐために、BSA PBSを用いて氷温中20分間、細胞をブロッキングした。5×10⁵個/50 μ L/BSA PBSとなるように96ウェルU字プレートに分注し、遠心分離（1800 rpm、2分間）した後、上清を除いて1次抗体として被免疫マウス抗血清、ハイブリドーマ培養上清を50 μ L/ウェルで分注し、氷温中で30分間反応させた。反応後、PBSを用いて遠心分離法で3回洗浄し、2次抗体としてALEXA488標識抗マウスイムノグロブリンG（H+L）（Invitrogen社製）を50 μ L/ウェルで加えて氷温中、遮光下で30分間反応させた。再びPBSを用いて遠心分離法で3回洗浄し、PBSに懸濁してレーザー光 488 nm アルゴンで励起される510～530 nmの波長をFCM（ベックマンコールター社製）で測定した。

（5）マウス骨髄腫細胞の調製

8 - アザグアニン耐性マウス骨髄腫細胞株P3X63Ag8U.1（P3 U1:ATCCより購入）を正常培地（10% FCS RPMI培地）で培養し、細胞融合時に2×10⁷個以上の細胞を確保し、細胞融合に親株として供した。

（6）ハイブリドーマの作製

実施例2 - （2）で得られたマウス脾臓細胞と実施例2 - （5）で得られた骨髄腫細胞とを10:1になるよう混合し、遠心分離（250×g、5分間）した。得られた沈殿画分の細胞群をよくほぐした後、攪拌しながら、37℃で、ポリエチレングリコール - 1000（PEG 1000）1 g、MEM培地 1 mLおよびジメチルスルホキシド0.35 mLの混液を10⁶個のマウス脾臓細胞あたり0.5 mL加え、該懸濁液に1～2分間毎にMEM培地 1 mLを数回加えた後、MEM培地を加えて全量が50 mLになるようにした。

【0202】

該懸濁液を遠心分離（900rpm、5分間）し、得られた沈殿画分の細胞をゆるやかにほぐした後、該細胞を、メスピペットによる吸込み吸出しでゆるやかにHAT培地 [10%ウシ胎児血清添加RPMI培地にHAT Media Supplement（Invitrogen社製）を加えた培地] 100 mL中に懸濁した。該懸濁液を96ウェル培養用プレートに200 μ L/ウェルずつ分注し、5% CO₂インキュベーター中、37℃で8～10日間培養した。

【0203】

培養後、培養上清を実施例2 - （3）および2 - （4）に記載した蛍光抗体染色で調べ、CLDN4/CHO株と反応してvector/CHOに反応しないウェルを選び、そのウェルに含まれる細胞から限界希釈法によるクローニングを2回繰り返した。抗CLDN4モノクローナル抗体産生ハイブリドーマKM3900（図2、図3）、およびハイブリドーマKM3907を確立した。

（7）モノクローナル抗体の精製

プリスタン処理した7週令ヌード雌マウス（ICR）に実施例2 - （6）で得られたハイ

ブリドーマ株を $5 \sim 20 \times 10^6$ 細胞/匹を腹腔内注射した。10~21日後、ハイブリドーマが腹水癌化することにより腹水のたまったマウスから、腹水を採取(1~8 mL/匹)した。

【0204】

該腹水を遠心分離(1200×g、5分間)し固形分を除去した。精製IgGモノクローナル抗体は、カプリル酸沈殿法 [Antibodies A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory(1988)] により精製することにより取得した。モノクローナル抗体のサブクラスの決定は、実施例2-(3)の方法で行い、2次抗体としてサブクラス特異的ALEXA647標識抗マウスイムノグロブリン(Invitrogen社製)を用いた。その結果、各抗体のサブクラスは、KM3900、KM3907共にマウスIgG2aサブクラスであることが明らかになった。

【実施例3】

【0205】

抗CLDN4モノクローナル抗体の反応性の検討

(1) 抗CLDN4モノクローナル抗体KM3900およびKM3907を用いたウエスタンブロットによるCLDN3またはCLDN4の検出

5×10^6 細胞のCLDN4/CHO、vector/CHO、膵臓癌細胞株Capan 2(ATCC HTB 80)およびHPA F II(ATCC CRL 1997)から、それぞれ細胞抽出液を調製し、SDS ポリアクリルアミド電気泳動を行った。その後、PVDF膜(ミリポア社製)に転写し、該膜をBSA PBSでブロッキングした。BSA PBSを除いた該膜に一次抗体として陽性対照抗体の市販抗CLDN4モノクローナル抗体3E2C1(Zymed社製)、ハイブリドーマKM3900の培養上清、ハイブリドーマKM3907の培養上清、または陰性対照抗体KM511(抗G-CSF誘導体抗体) [Agric. Biol. Chem., 53, 1095(1989)] を4℃で一晩反応させた。該膜をTween PBSでよく洗浄し、ペルオキシターゼ標識抗マウスイムノグロブリンG(H+L)(Zymed社製)を室温で1時間反応させた。再び該膜をTween PBSでよく洗浄し、ECL™ western blotting detection reagents(アマシヤムファルマシア社製)を用いて、抗体が結合したバンドを検出した。その結果、市販の抗CLDN4モノクローナル抗体3E2C1はCLDN4タンパク質を検出できたが、モノクローナル抗体KM3900およびKM3907はCLDN4を検出できなかった(図4、図6)。

【0206】

同様にしてCLDN3/CHOから細胞抽出液を調製し、KM3907のCLDN3に対する反応性を検討した。その結果、市販の抗CLDN3ポリクローナル抗体(Zymed社製)はCLDN3蛋白質を検出できたが、モノクローナル抗体KM3907はCLDN3を検出できなかった(図6)。

(2) 抗CLDN4モノクローナル抗体KM3900およびKM3907を用いた免疫沈降法によるCLDN3またはCLDN4の検出

96ウェルELISAプレートに、50 µg/mLのKM3900またはKM3907を100 µL/ウェルずつ添加し、4℃で1晩反応させ、PBS洗浄後、非特異吸着を防ぐためBSA PBSでブロッキングを行った。 5×10^7 細胞のCLDN4/CHO、Vector/CHO、CLDN6/CHO、ヒト膵臓癌細胞株Capan 2、またはHPAF IIに、1 mLの細胞溶解用緩衝液 [50 mmol/L Tris HCl(pH7.2)、1% Triton X 100, 150 mmol/L NaCl、2 mmol/L MgCl₂、2 mmol/L CaCl₂、0.1% Na₃Iodoacetamide、50 mmol/L N ethylmaleimide、1 mg/mL Leupeptin、0.1 mmol/L Dithiothreitol] を加え、4℃で2時間放置後、遠心分離して細胞抽出液を調製した。BSA PBSを捨てた該プレートに、調製した細胞抽出液を50 µL/ウェルで分注し、4℃で1晩放置した。Tween PBSでプレートを洗浄後、SDS PAGE用サンプルバッファー [2% SDS、62 mmol/L Tris HCl(pH6.8)、10% Glycerol] で溶解したものをサンプルとしてイムノブロットを行った。

【0207】

SDS ポリアクリルアミド電気泳動後のサンプルをPVDF膜(ミリポア社製)に転写し、該膜をBSA PBSでブロッキングした。BSA PBSを除いた該膜に1次抗体として陽性対照の抗体として、市販の抗CLDN4モノクローナル抗体3E2C1(Zymed社製)、または抗CLDN3ポリクローナル抗体(Zymed社製)、または陰性対照抗体としてKM511(抗G-CSF誘導体抗体) 1 µg/mLを室温で2時間反応させた。反応後、該膜をTween PBSでよく洗浄し、ペルオキシターゼ標識抗マウスイムノグロブリンG(H+L)(Zymed社)を室温で1時間反応させた。再び該膜をTween PBSでよく洗浄し、ECL™ western blotting detection reagents(アマ

10

20

30

40

50

シヤムファルマシア社製)を用いて、抗体が結合したバンドを検出した。その結果、分子量22 kDa付近にバンドが検出されたことから、抗CLDN4モノクローナル抗体KM3900およびKM3907は、CLDN4を免疫沈降可能な抗体であることが示された(図5、図7)。

【0208】

同様にしてCLDN3/CHOから細胞抽出液を調製し、抗CLDN4モノクローナル抗体KM3907のCLDN3に対する反応性を検討した。その結果、分子量22kDa付近にバンドが検出されたことから、モノクローナル抗体KM3907は、CLDN3を免疫沈降可能な抗体であることが示された(図7)。

従って、本発明の抗CLDN4モノクローナル抗体KM3900およびKM3907は、変性したCLDN4タンパク質には反応せず、立体構造を保持したCLDN4タンパク質にのみ反応する抗体であることが明らかになった。

【0209】

(3) 抗CLDN4モノクローナル抗体KM3900およびKM3907のCLDN3、CLDN4、CLDN5、CLDN6およびCLDN9発現細胞に対する反応性

CLDN3/CHO、CLDN4/CHO、CLDN5/CHO、CLDN6/CHOおよびCLDN9/CHOを3~4日間培養し、0.02% EDTA溶液(ナカライテスク社製)で剥離し、回収した細胞をPBSで洗浄し、抗体の非特異的な吸着を避けるためにBSA PBSを用いて、氷温中で30分間ブロッキングした。1~5×10⁵個/100μL/BSA PBSとなるように96穴U字プレートに分注し、遠心分離(1500 rpm、5分間)した後、上清を除いて1次抗体として被免疫マウス抗血清、ハイブリドーマKM3900の培養上清(8.6μg/mL)、5μg/mLに希釈した抗CLDN4モノクローナル抗体KM3900およびKM3907、マウスIgG2aアイソタイプコントロール(DAKO社製)を100μL/ウェルで分注し、氷温中で60分間反応させた。反応後、BSA PBSで1回洗浄し、2次抗体としてBSA PBSで50倍希釈したFITC標識抗マウスIgG2a(Dako社製)を100μL/ウェルで加えて氷温中、遮光下で30分間反応させた。再びBSA PBSで1回洗浄し、PBSに懸濁してFCM(ベックマンコールター社製)で蛍光強度を測定した。

【0210】

各細胞に対する反応性を下記表1に示し、典型的な反応のヒストグラムを図8に示した。

【0211】

【表1】

抗CLDN4モノクローナル抗体の反応性

Antibody	CLDN 発現細胞				
	CLDN3	CLDN4	CLDN5	CLDN6	CLDN9
KM3900	—	+	—	—	—
KM3907	+	+	—	—	—

【0212】

表1に示したように、抗CLDN4モノクローナル抗体KM3900は、CLDN4/CHOのみに反応し、その他のCLDN発現細胞には反応しなかった。また、抗CLDN4モノクローナル抗体KM3907はCLDN3/CHOおよびCLDN4/CHOの両方に反応したが、その他のCLDN発現細胞には反応しなかった。従って、抗CLDN4モノクローナル抗体KM3900およびKM3907は、細胞に発現したCLDN4の細胞外領域の立体構造を認識し、結合することが明らかになった。更に、抗CLDN4モノクローナル抗体KM3907は、CLDN4とCLDN3の両方の細胞外領域を認識し、結合することが明らかになった。

(4) 抗CLDN4モノクローナル抗体の癌細胞に対する反応性

ヒト膵臓癌細胞株Capan 2およびHPAF II、ヒトリンパ腫細胞株Daudi(ATCC CCL 213)

10

20

30

50

、ヒト乳癌細胞株MCF7(ATCC HTB22)、ヒト大腸癌細胞株HT 29(ATCC HTB 38)、SW480(ATCC CCL 228)、ヒト前立腺癌細胞株22Rv1(ATCC CRL 2505)、DU 145(ATCC HTB 81)およびPC 3(ATCC CRL 1435)細胞を、3~4日間培養し、接着細胞については0.02 % EDTA溶液(ナカライテスク社製)を用いて剥離して、細胞を回収した。回収した細胞をPBSで洗浄し、抗体の非特異的な吸着を防ぐためにBSA PBSを用いて、氷温中で30分間ブロッキングした。1~5 × 10⁵個/100 μL BSA PBSとなるように96穴U字プレートに分注し、遠心分離(1500 rpm、5分間)した後、上清を除いて一次抗体として被免疫マウス抗血清、ハイブリドーマKM3900の培養上清(8.6 μg/mL)、5 μg/mLに希釈した抗CLDN4モノクローナル抗体KM3900およびKM3907、またはマウスIgG2aアイソタイプコントロール(DAKO社製)を100 μL/ウェルで分注し、氷温中で60分間反応させた。BSA PBSで1回洗浄し、二次抗体としてBSA PBSで50倍希釈したFITC標識抗マウスイムノグロブリンG(H+L)(DAKO社製)を100 μL/ウェルで加えて氷温中、遮光下で30分間反応させた。反応後、細胞をBSA PBSで1回洗浄し、PBSに懸濁し、FCM(ベックマンコールター社製)で蛍光強度を測定した。

10

【0213】

図9に、ヒト膵臓癌細胞株Capan 2およびHPAF II、ヒトリンパ腫細胞株Daudi(ATCC CCL 213)に抗CLDN4モノクローナル抗体KM3900を8.6 μg/mLで反応させた場合のヒストグラムを示す。図9に示したように、抗CLDN4モノクローナル抗体KM3900はヒト膵臓癌細胞株Capan 2およびHPAF IIに強く結合したが、リンパ腫細胞株Daudiにほとんど結合しなかった。

また、図10に、ヒト乳癌細胞株MCF7(ATCC HTB22)、ヒト大腸癌細胞株HT 29(ATCC HTB 38)、SW480(ATCC CCL 228)、ヒト前立腺癌細胞株22Rv1(ATCC CRL 2505)、DU 145(ATCC HTB 81)、PC 3(ATCC CRL 1435)に、抗CLDN4モノクローナル抗体KM3900もしくはKM3907を5 μg/mLで反応させた場合のヒストグラムを示す。図10に示したように、抗CLDN4モノクローナル抗体KM3900およびKM3907はヒト乳癌細胞株MCF7、ヒト大腸癌細胞株HT 29およびSW480、ヒト前立腺癌細胞株22Rv1、DU 145およびPC 3に強く結合することが明らかになった。

20

【0214】

従って、抗CLDN4モノクローナル抗体KM3900およびKM3907は、乳癌、大腸癌、膵臓癌および前立腺癌細胞に発現しているCLDN4に結合することが明らかになった。

【実施例4】

【0215】

抗CLDN4モノクローナル抗体によるCLDN4中和活性

30

(1) ウウンドヒーリング法による細胞運動能へのKM3900の効果

CLDN4/CHOもしくはvector/CHOを3 × 10⁴個/100 μL/ウェルとなるように96ウェルプレートに播種し2日間培養した後、チップの先で縦に線を引くようにして単層培養した細胞の一部を剥がした。抗CLDN4モノクローナル抗体KM3900および陰性対照の抗体KM511(抗GCSF誘導体抗体)を、最終濃度が1 μg/mLとなるように培地に添加し、21時間培養した。抗体添加前(0 h)と培養21時間後(21 h)の剥離領域を写真撮影し、細胞間距離を測定した。CLDN4/CHOにおける写真像を図11に示す。また、各群6ウェルで実施した結果をまとめたグラフを図12に示す。

【0216】

その結果、KM3900を添加したCLDN4/CHOのウェルでは、細胞間距離の縮小が阻害される傾向が確認され、さらにKM511と比較して有意にCLDN4/CHOの細胞運動能が阻害された(Student t検定、P<0.01)。一方、Vector/CHOではKM3900添加とKM511添加で細胞間距離の縮小に違いは認められなかった。

40

以上の結果より、抗CLDN4モノクローナル抗体KM3900が、CLDN4発現細胞の細胞運動能を抑制することが明らかとなった。

【実施例5】

【0217】

FCMによるAbnova社製抗CLDN4モノクローナル抗体4A4の反応性の検討

CLDN4/CHO、vector/CHOおよびヒト膵臓癌細胞株Capan 2を3~4日間培養し、0.02 % EDTA溶液(ナカライテスク社製)で剥離し、細胞を回収した。回収した細胞をPBSで洗浄し、

50

抗体の非特異的な吸着を避けるためにBSA PBSを用いて、氷温中で30分間ブロッキングした。1~5×10⁵個/100μL BSA PBSとなるように96ウェルU字プレートに分注し、遠心分離(1500 rpm、5分間)した後、上清を除いてBSA PBSで5μg/mLに希釈した5μg/mL 抗CLDN4モノクローナル抗体4A4(Abnova社製)またはBSA PBSを100μL/ウェルで分注し、氷温中で60分間反応させた。BSA PBSで1回洗浄し、2次抗体としてBSA PBSで50倍希釈したFITC標識抗マウスIgG(H+L)(DAKO社製)を100μL/ウェルで加えて、氷温中、遮光下で30分間反応させた。反応後、細胞をBSA PBSで1回洗浄し、PBSに懸濁し、FCM(ベックマンコールター社製)で蛍光強度を測定した。

【0218】

図13にCLDN4/CHO、vector/CHOおよびヒト膵臓癌細胞株Capan 2に抗CLDN4モノクローナル抗体4A4を5μg/mLで反応させた場合のヒストグラムを示す。その結果、市販の抗CLDN4モノクローナル抗体4A4はCLDN4/CHOおよびヒト膵臓癌細胞株Capan 2に結合しなかった。以上のことから、抗CLDN4モノクローナル抗体4A4は、細胞外領域の立体構造を認識し、結合することができないモノクローナル抗体であることが明らかになった。

【実施例6】

【0219】

抗CLDN4モノクローナル抗体の可変領域をコードするcDNAの単離、解析

(1) 抗CLDN4モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞からのmRNAの調製

実施例2に記載のハイブリドーマKM3900、およびKM3907より、RNAeasy Maxi kit(QIAGEN社製)およびOligotexTM dT30<Super>mRNA Purification Kit(Takara社製)を用いて、添付の仕様説明書に従い、それぞれのハイブリドーマ細胞5×10⁷細胞より、マウスモノクローナル抗体KM3900のmRNAおよびマウスモノクローナル抗体KM3907のmRNAを調製した。

【0220】

(2) 抗CLDN4モノクローナル抗体KM3900およびKM3907の、H鎖およびL鎖可変領域の遺伝子クローニング

実施例5-(1)で取得した抗CLDN4モノクローナル抗体KM3900のmRNAの1μgから、BD SMARTTMRACE cDNA Amplification Kit(BD Biosciences社製)を用いて、添付の使用説明書に従い、5'側にキット添付のBD SMART IITM A Oligonucleotide配列を有するcDNAを取得した。取得されたcDNAを鋳型として、キット添付のユニバーサルプライマーAmixと、配列番号13で示したマウスIg()特異的プライマー(mG2aa2)を用いてPCR反応を行いVHのcDNA断片を増幅した。またIg()特異的プライマーの代わりに配列番号14で示したマウスIg()特異的プライマー(mKa2)を用いてPCRを行いVLのcDNA断片を増幅した。

【0221】

同様に、KM3907cDNAを鋳型として、キット添付のユニバーサルプライマーAmixと、配列番号53で示したマウスIg()特異的プライマー(mG2aa1)を用いてPCR反応を行いVHのcDNAを増幅した。また、Ig()特異的プライマーの代わりに配列番号54で示したマウスIg()特異的プライマー(mKa1)を用いてPCRを行いVLのcDNA断片を増幅した。

PCR反応は、94℃で5分間加熱後、94℃で30秒間、72℃で3分間のサイクルを5回、94℃で30秒間、70℃で30秒間、72℃で3分間のサイクルを5回、94℃で30秒間、68℃で30秒間、72℃で3分間のサイクルを30回、それぞれ行った後、更に72℃で10分間反応させた。PCR反応はPTC 200 DNA Engine(BioRad社製)を用いて行った。得られたPCR産物はKM3900H鎖、KM3900L鎖共に約600 bpのサイズであった。また、KM3907H鎖は600 bp、KM3907L鎖は800 bpのサイズであった。

【0222】

得られたPCR産物の塩基配列を決定するため、アガロースゲル電気泳動で分離し、PCR産物をGel Extraction Kit(QIAGEN社製)を用いて抽出した。得られた抽出断片を、Sma Iで消化したpBluescriptII SK()ベクターに、Ligation high(東洋紡績社製)を用いて連結した後、コーエンらの方法[Proc.Natl.Acad.Sci.USA,69,2110(1972)]により大腸菌DH5株を形質転換した。得られた形質転換体より自動プラスミド抽出機(クラボウ社製)

を用いてプラスミドを抽出し、BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (PEバイオシステムズ社製)を用い添付の説明書に従って反応後、同社のシーケンサーABI PRISM3700により塩基配列を解析した。その結果、cDNAの5'末端に開始コドンと推定されるATG配列が存在する、完全長のH鎖cDNAを含むプラスミド、およびL鎖cDNAを含むプラスミドが取得された。

【0223】

その結果、ハイブリドーマKM3900からはH鎖cDNAを含むプラスミドKM3900VH H202およびL鎖cDNAを含むプラスミドKM3900VL K23が取得され、ハイブリドーマKM3907からはH鎖cDNAを含むプラスミドKM3907G2a101およびL鎖cDNAを含むKM3907Ka103が取得された。

(3) 抗CLDN4モノクローナル抗体のV領域のアミノ酸配列の解析

プラスミドKM3900VH H202に含まれていたVHの全塩基配列を配列番号15に、該塩基配列から推定された、シグナル配列を含んだ分泌型VHの全アミノ酸配列を配列番号16に、プラスミドKM3900VL K23に含まれていたVLの全塩基配列を配列番号17に、および該塩基配列から推定された、シグナル配列を含んだ分泌型VLの全アミノ酸配列を配列番号18にそれぞれ示した。既知のマウス抗体の配列データ [SEQUENCES of Proteins of Immunological Interest, US Dept.Health and Human Services(1991)] との比較、並びに精製した抗CLDN4モノクローナル抗体KM3900のH鎖及びL鎖のN末端アミノ酸配列をプロテインシーケンサー (島津製作所社製: PPSQ 10) を用いて解析した結果との比較から、単離した各々のcDNAは分泌シグナル配列を含む抗CLDN4モノクローナル抗体KM3900をコードする完全長cDNAであり、H鎖については配列番号16に記載のアミノ酸配列の1から19番目が、L鎖については配列番号18に記載のアミノ酸配列の1から22番目が分泌シグナル配列であることが明らかとなった。

【0224】

また、プラスミドKM3907G2a101に含まれていたVHの全塩基配列を配列番号55に、該塩基配列から推定された、シグナル配列を含んだVHの全アミノ酸配列を配列番号56に、プラスミドKM3907Ka103に含まれていたVLの全塩基配列を配列番号57に、および該塩基配列から推定された、シグナル配列を含んだVLの全アミノ酸配列を配列番号58にそれぞれ示した。上記と同様の解析から、単離した各々のcDNAは分泌シグナル配列を含む抗CLDN4モノクローナル抗体KM3907をコードする完全長cDNAであり、H鎖については配列番号56に記載のアミノ酸配列の1から19番目が、L鎖については配列番号58に記載のアミノ酸配列の1から22番目が分泌シグナル配列であることが明らかとなった。

【0225】

次に、抗CLDN4モノクローナル抗体KM3900、KM3907のVHおよびVLのアミノ酸配列の新規性について検討した。配列解析システムとしてGCG Package (version 9.1、Genetics Computer Group社)を用い、既存の蛋白質のアミノ酸配列データベースをBLASTP法 [Nucleic Acids Res., 25, 3389(1997)] により検索した。その結果、VH、VLともに完全に一致するアミノ酸配列は認められず、抗CLDN4モノクローナル抗体KM3900、KM3907のVHおよびVLは、それぞれ新規なアミノ酸配列を有していることが確認された。

【0226】

また、抗CLDN4モノクローナル抗体KM3900、KM3907のVHおよびVLのCDRを、既知の抗体のアミノ酸配列 [SEQUENCES of Proteins of Immunological Interest, US Dept.Health and Human Services(1991)] と比較することにより同定した。抗CLDN4モノクローナル抗体KM3900のVHのCDR1、CDR2およびCDR3のアミノ酸配列を配列番号19、20および21に、VLのCDR1、CDR2およびCDR3のアミノ酸配列を配列番号22、23および24にそれぞれ示した。

【0227】

また、抗CLDN4モノクローナル抗体KM3907のVHのCDR1、CDR2およびCDR3のアミノ酸配列を配列番号59、60および61に、VLのCDR1、CDR2およびCDR3のアミノ酸配列を配列番号62、63および64にそれぞれ示した。

【実施例7】

【0228】

10

20

30

40

50

抗CLDN4ヒト型キメラ抗体の作製

(1) 抗CLDN4ヒト型キメラ抗体発現ベクター-cKM3900 93およびcKM3907 93の構築

WO97/10354に記載のヒト化抗体発現用ベクター-pKANTEX93と実施例6(2)で得られたプラスミドKM3900 H202およびKM3900 K23を用いて抗CLDN4ヒト型キメラ抗体発現ベクター-cKM3900 93を以下のようにして構築した。

【0229】

プラスミドKM3900VH H202を鋳型として100 ng、10×KOD緩衝液1を5 μL、2 mmol/L dNTPを5 μL、25 mmol/L 塩化マグネシウムを2 μL、10 μmol/Lの配列番号49および50記載の塩基配列を有するプライマーをそれぞれ 1 μL、およびKOD polymerase (東洋紡績社製)を1 μL、を含む50 μLの反応液を調製し、PCR反応を行った。PCR反応は96 で3分間変性処理後、94 で1分間、58 で1分間、72 で1分間のサイクルを35サイクル、更に72 で5分間の反応で行った。この反応によって、pKANTEX93に挿入するための制限酵素認識配列が付加されたKM3900のVHをコードする遺伝子断片を増幅した。同様に、プラスミドKM3900 K23を鋳型として100 ng、10×KOD緩衝液1を5 μL、2 mmol/L dNTPを5 μL、25 mmol/L 塩化マグネシウムを2 μL、10 μmol/Lの配列番号51および52記載の塩基配列を有するプライマーをそれぞれ 1 μL、KOD polymerase (東洋紡績社製)を1 μL、を含む反応液を調製し、PCR反応は上記と同様にして行い、pKANTEX93に挿入するための制限酵素認識配列が付加されたKM3900のVLをコードする遺伝子断片を増幅した。

【0230】

同様にして、実施例6(2)で得られたプラスミドKM3907G2a101およびKM3907Ka103を用いて抗CLDN4ヒト型キメラ抗体発現ベクター-cKM3907 93を構築した。VH増幅用のプライマーの配列を配列番号65および66に、VL増幅用のプライマーの配列を配列番号67および68に示した。

それぞれの反応産物をアガロースゲル電気泳動で分離し、得られた約0.4 kbpの増幅断片をGel Extraction Kit (QIAGEN社製)を用いて抽出した。得られた遺伝子断片を、Sma Iで消化したpBluescriptII SK()ベクターに、Ligation high (東洋紡績社製)を用いて連結した後、形質転換体は、実施例1-(1)と同様にして、KM3900のVHをコードする塩基配列を含むプラスミドVH5と、VLをコードする塩基配列を含むプラスミドVL7を取得した。

【0231】

プラスミドVH5を制限酵素Apa IおよびNot Iで、プラスミドVL7を制限酵素EcoR IおよびBsiW Iでそれぞれ消化した後、それぞれの反応産物をアガロースゲル電気泳動で分離し、得られた約0.4 kbpの遺伝子断片をGel Extraction Kit (QIAGEN社製)を用いて抽出した。VプラスミドH5を消化して得られた断片を、同じくApa IおよびNot Iで消化したpKANTEX 93ベクターに連結し、上記と同様にして形質転換体を得た後、プラスミド抽出キット (QIAGEN社製)を用いて、KM3900のVHが挿入されたpKANTEX93ベクターを得た。次に、該ベクターをEcoR IおよびBsiW Iで消化した後、前述のプラスミドVL7を消化して得られた断片と連結して、実施例1-(1)と同様にして形質転換体を得た後、プラスミド抽出キットを用いて、KM3900のVHおよびVLが挿入された抗CLDN4ヒト型キメラ抗体発現ベクター-cKM3900 93を取得した。

【0232】

(2) 抗CLDN4ヒト型キメラ抗体の動物細胞での発現

上記(1)で得られた抗CLDN4ヒト型キメラ抗体発現ベクター-cKM3900 93を用いて抗CLDN4ヒト型キメラ抗体の動物細胞での発現を、常法 [Antibody Engineering, A Practical Guide, W.H. Freeman and Company(1992)] により行い、cKM3900 93が導入された形質転換株を取得した。また、同様にしてKM3907のVHおよびVLが挿入された抗CLDN4ヒト型キメラ抗体発現ベクター-cKM3907 93を取得した。

【0233】

(3) 精製抗体の取得

上記(2)で得られた形質転換株を、それぞれ通常の培養法で培養した後、細胞懸濁液

10

20

30

40

50

を回収し、3000 rpm、4 の条件で15分間の遠心分離を行って培養上清を回収した後、培養上清は0.22 μ m孔径MillexGVフィルター（ミリポア社製）を用いて濾過滅菌した。得られた培養上清よりProteinA High capacityレジン（Milipore社製）カラムを用いて、添付の説明書に従い、抗CLDN4ヒト型キメラ抗体cKM3900、c KM3907（以下cKM3900、c KM3907と表記する）を精製した。

【0234】

得られたcKM3900、cKM3907の精製標品の精製度および発現分子サイズを、グラジュエントゲル（ATTO社製、カタログ番号：E T520L）を用いて、添付の説明書に従い、SDS PAGEにより確認した。

cKM3900の結果を図14、cKM3907の結果を図15に示した。精製した抗CLDN4ヒト型キメラ抗体の泳動パターンは、非還元条件下では分子量150～200キログルトン（以下、kDaと表記する）付近に1本のバンドが、還元条件下では約50 kDaと約25 kDaの2本のバンドが認められた。このような泳動パターンは、IgGクラスの抗体を、同様な条件下でSDS PAGEを行った結果[Antibodies A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14(1988)、Monoclonal Antibodies Principles and Practice, Academic Press Limited(1996)]と一致している。従って、抗CLDN4ヒト型キメラ抗体cKM3900およびcKM3907が正しい構造の抗体分子として発現されていることが確認された。

10

【実施例8】

【0235】

抗CLDN4ヒト型キメラ抗体の活性評価

20

（1）FCMにおける癌細胞株との反応性

cKM3900の評価細胞としてCLDN4を発現する膵臓癌細胞株Capan 2を用い、cKM3907の評価細胞としてCLDN3とCLDN4の両方を発現する乳癌細胞株MCF7を用いた。細胞を3～4日間培養し、0.02 % EDTA溶液（ナカライテスク社製）で剥離し、細胞を回収した。回収した細胞をPBSで洗浄し、抗体の非特異的な吸着を避けるためにBSA PBSを用いて、氷温中で30分間ブロッキングした。1～5×10⁵個/100 μ L BSA PBSとなるように96穴U字プレートに分注し、遠心分離（1500 rpm、5分間）した後、上清を除いて一次抗体として5 μ g/mLの陰性対照抗体cKM3034（抗FGF8ヒト型キメラ抗体）[US2004/0091480]、抗CLDN4モノクローナル抗体KM3900もしくはKM3907、抗CLDN4ヒト型キメラ抗体cKM3900もしくはcKM3907を100 μ L/ウェル分注し、氷温中で60分間反応させた。BSA PBSで1回洗浄し、二次抗体としてBSA PBSで50倍希釈したFITC標識抗マウスイムノグロブリンG（H+L）（DAKO社製）もしくはFITC標識抗ヒトイムノグロブリンG（H+L）（Jackson Laboratories社製）を100 μ L/ウェル加えて氷温中、遮光下で30分間反応させた。再びBSA PBSで1回洗浄し、PBSに懸濁してFCM（ベックマンコールター社製）で蛍光強度を測定した。

30

【0236】

図16に陰性対照抗体cKM3034（抗FGF8ヒト型キメラ抗体）、抗CLDN4モノクローナル抗体KM3900および抗CLDN4ヒト型キメラ抗体cKM3900の反応性をヒストグラムで示す。抗CLDN4ヒト型キメラ抗体cKM3900は抗CLDN4モノクローナル抗体KM3900と同様に、Capan 2に反応することが明らかになった。

図17に陰性対照抗体cKM3034（抗FGF8ヒト型キメラ抗体）、抗CLDN4モノクローナル抗体KM3907および抗CLDN4ヒト型キメラ抗体cKM3907の反応性をヒストグラムで示す。抗CLDN4ヒト型キメラ抗体cKM3907は抗CLDN4モノクローナル抗体KM3907と同様に、MCF7に反応することが明らかになった。

40

【0237】

（2）抗CLDN4ヒト型キメラ抗体のADCC活性

実施例7で取得した抗CLDN4ヒト型キメラ抗体cKM3900およびcKM3907のADCC活性を、以下のようにして測定した。cKM3900の標的細胞には、CLDN4 myc/His遺伝子導入CHO細胞株（CLDN4/CHO）、本実施例の（1）で用いたCLDN4を発現するヒト膵臓癌細胞株Capan 2、ヒト卵巣癌細胞株MCAS、ヒト乳癌細胞株MCF7を用いた。cKM3907の評価細胞には、CLDN4/CHO、CLDN3 myc/His遺伝子導入CHO細胞株（CLDN3/CHO）、ヒト卵巣癌細胞株MCAS、本実施

50

例の(1)で用いたCLDN4とCLDN3の両方を発現するヒト乳癌細胞株MCF7を用いた。エフェクター細胞溶液の調製にはPolymorphprep (NYCOMED社製)を用いた。

【0238】

(2) - 1 標的細胞溶液の調製

RPMI1640 FCS(10)培地 [FCSを10%含むRPMI1640培地 (Invitrogen社製)] を用いて培養したCapan 2を遠心分離操作及び懸濁によりADCC活性測定用培地であるRPMI1640 FCS(1) [1% FCSを含むRPMI1640培地 (Invitrogen社製)] で洗浄した後、ADCC活性測定用培地によって、細胞濃度を 2×10^5 細胞/mLに調製し、標的細胞溶液とした。

【0239】

(2) - 2 エフェクター細胞溶液の調製

健康人静脈血30 mLを採取し、ヘパリンナトリウム (清水製薬社製) 0.5 mLを加え穏やかに混ぜた。これをPolymorphprep (NYCOMED社製)を用いて添付の使用説明書に従い、単核球 (PBMC) 画分を分離した。分離したPBMC画分は、ADCC活性測定用培地で2回遠心分離して洗浄後、適宜懸濁し、エフェクター細胞溶液とした。

【0240】

(2) - 3 ADCC活性の測定

96ウェルU字底プレート (Falcon社製) に上記(2) - 1で調製した標的細胞溶液の50 μ L (1×10^4 細胞/ウェル) を分注した。次いで(2) - 2で調製したエフェクター細胞溶液を50 μ L (エフェクター細胞と標的細胞の比が25:1となるように希釈したもの) を添加した。更に、抗CLDN4ヒト型キメラ抗体cKM3900もしくはcKM3907をADCC活性測定用培地で希釈し、各最終濃度0.001~10 μ g/mLとなるように加えて全量を150 μ Lとし、37℃で4時間反応させた。反応後、プレートを遠心分離し、上清中の乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) 活性を、LDH Cytotoxic Test (WAKO社製)を用いて、添付の説明書にしたがって吸光度データを取得することで測定した。標的細胞自然遊離の吸光度データは、エフェクター細胞溶液および抗体溶液の代わりにADCC活性測定用培地を用いて、また、エフェクター細胞自然遊離の吸光度データは、標的細胞溶液および抗体溶液の代わりにADCC活性測定用培地を用いて、上記と同様の操作を行うことで取得した。標的細胞全遊離の吸光度データは、抗体溶液およびエフェクター細胞溶液の代わりにADCC活性測定用培地を用い、反応終了の45分前に20 μ Lの9% Triton X 100溶液を添加して反応させ、上記と同様の操作を行うことで取得した。ADCC活性は次式により求めた。

(式)

ADCC活性 (%) = { (検体の吸光度 - (エフェクター細胞・標的細胞自然遊離の吸光度)) / (標的細胞全遊離の吸光度 - 標的細胞自然遊離の吸光度) } \times 100

cKM3900の結果を図18に、cKM3907の結果を図19に示した。抗CLDN4ヒト型キメラ抗体cKM3900は抗体濃度依存的にCLDN4発現細胞に対してADCC活性を発揮することが明らかとなった。また、抗CLDN4ヒト型キメラ抗体cKM3907は抗体濃度依存的にCLDN4およびCLDN3発現細胞に対してADCC活性を発揮することが明らかとなった。

【0241】

(3) 抗CLDN4ヒト型キメラ抗体のCDC活性

実施例7で取得した抗CLDN4ヒト型キメラ抗体cKM3900およびcKM3907のCDC活性を、以下のようにして測定した。cKM3900の標的細胞には、CLDN4/CHOを用いた。cKM3907の標的細胞にはCLDN4/CHO、CLDN3/CHOおよびCLDN3とCLDN4の両方を発現するヒト乳癌細胞株MCF7を用いた。

【0242】

(3) - 1 標的細胞溶液の調整

各種細胞株を0.02% EDTA Solution (ナカライテスク社製) で剥離し、CDC測定用培地として作製した1.4% BSA (Invitrogen社製)、50 μ g/mL Gentamicin (ナカライテスク社製) を含むRPMI1640培地 (Invitrogen社製) で洗浄後、同培地で 2×10^5 cells/mLに懸濁し、標的細胞溶液とした。

【0243】

10

20

30

40

50

(3) - 2 ヒト補体溶液の調整

ヒト補体血清SERA, COMPLEMENT (SIGMA社製、S1764) を脱イオン水1 mLにて溶解し、等量のCDC測定用培地を加えて2倍に希釈し、ヒト補体溶液とした。

(3) - 3 CDC活性の測定

96 well 平底 plate (SUMILON社製) の各wellに上記(3) - 2で調製した補体溶液を50 μ L分注した。次いで上記(3) - 1で調製した標的細胞溶液を50 μ Lに加え、さらにCDC用培地で希釈した各抗体溶液を50 μ L添加して、全量を150 μ Lとし37、5% CO₂条件下で2時間反応させた。各wellに細胞増殖試薬WST 1 (Roche社製) を15 μ Lずつ添加してプレートミキサーで攪拌し、37、5% CO₂条件下で4時間反応させ415 nmにおける吸光度をE max precision microplate reader (WAKO社製) を用いて測定した。補体溶液50 μ L、CDC用培地100 μ Lを加えたwellをブランクとして、また標的細胞、補体溶液、CDC用培地を各50 μ Lずつ加えたwell (抗体非添加) の吸光度を測定し、CDC活性は次式により算出した。

10

(式)

CDC活性 (%) = { 1 - (抗体添加サンプル吸光度 - ブランク吸光度) / (抗体非添加吸光度 - ブランク吸光度) } \times 100

抗CLDN4ヒト型キメラ抗体cKM3900の結果を図20に、抗CLDN4ヒト型キメラ抗体cKM3907の結果を図21にそれぞれ示した。抗CLDN4ヒト型キメラ抗体cKM3900は、抗体濃度依存的にCLDN4発現細胞に対しCDC活性を発揮することが明らかとなった。また、抗CLDN4ヒト型キメラ抗体cKM3907は、抗体濃度依存的にCLDN4およびCLDN3発現細胞に対しCDC活性を発揮することが明らかとなった。

20

【実施例9】

【0244】

CLDN4発現細胞に対する抗CLDN4モノクローナル抗体の細胞増殖阻害活性

CLDN4発現細胞に対する細胞増殖阻害活性を検討するため、抗CLDN4モノクローナル抗体KM3900またはKM3907存在下のCLDN4発現CHO細胞の細胞増殖能を検討した。

CLDN4/CHOもしくはvector/CHOを 1×10^3 個/100 μ L/穴となるように96穴プレートに播種し、24時間培養した後、KM3900、KM3907または陰性対照抗体KM511を、最終濃度が31.6 ~ 0.1 μ g/mLとなるように培地に添加し、96時間培養した。培養後、IMDM培地で50%に希釈したWST 1試薬 (ロシュ・ダイアグノスティクス社製) を20 μ L/ウェルに加え、37で2時間インキュベーションした後、マイクロプレート分光光度計を用い、450 nm (対照波長650 nm) の吸光度を測定した。抗体を添加せず培地のみを加えたウェル (コントロール) の値を100%として、抗体を加え96時間培養したウェルの相対増殖率 (%) を算出した。

30

【0245】

その結果を図17に示した。図17に示したように抗CLDN4モノクローナル抗体KM3900は、vector/CHOの細胞増殖は阻害しなかったが、CLDN4/CHOの細胞増殖を阻害した。また、抗CLDN4モノクローナル抗体KM3907も同様にCLDN4/CHOの細胞増殖を特異的に阻害した。従って、抗CLDN4モノクローナル抗体KM3900およびKM3907は、CLDN4特異的に反応し、CLDN4機能を阻害することが明らかとなった。

40

【実施例10】

【0246】

マウスゼノグラフトモデルにおける抗CLDN4ヒト型キメラ抗体の薬効評価

抗CLDN4ヒト型キメラ抗体cKM3900のin vivo薬効を評価するため、CLDN4 myc/His遺伝子導入細胞 (CLDN4/CHO)、ヒト膵癌細胞株、ヒト卵巣癌細胞株のマウスゼノグラフト初期癌モデルにおけるin vivo薬効評価を行なった。

CLDN4/CHO、ヒト膵臓癌細胞株のCapan 2(ATCC HTB 80)およびヒト卵巣癌細胞株のMCAS (JCRB JCRB0240) を0.02% EDTA Solution (ナカライテスク社製) で剥離しPBSで洗浄後、PRMI1640培地 (GIBCO BRL社製) を加え、300 \times g、5分間遠心分離して上清を除去した。同培地を加えて遠心分離操作により洗浄後、CLDN4/CHOおよびCapan 2は 5×10^7 細胞/mL、MCASは 1×10^7 細胞/mLに調製した。各細胞懸濁液をSCIDマウス雌6-7週齢 (日本クレア社製) の右

50

脇下に、それぞれ100 μ Lで皮下移植した。移植同日から、抗体投与群はPBSで希釈した抗体溶液を10 mg/kgで尾静脈投与し、コントロール群は等量のPBSのみを尾静脈投与した(1群2匹)。投与は1週間に2回、計6回行い、腫瘍が観察された時点からノギスで腫瘍径を測定した。腫瘍体積は以下の式により算出した。

【0247】

$$\text{腫瘍体積(mm}^3\text{)} = \text{長径} \times \text{短径}^2 \times 0.5$$

結果を図18に示した。図18に示したように、CLDN4/CHO、ヒト膵臓癌細胞株Capan 2およびヒト卵巣癌細胞株のMCAS移植初期癌モデルにおいて、抗CLDN4ヒト型キメラ抗体cKM3900は顕著な抗腫瘍効果を示した。従って、本発明の抗CLDN4抗体は、CLDN4を発現している腫瘍に対して抗腫瘍活性を示すことが明らかになった。

10

【実施例11】

【0248】

抗CLDN4ヒト化抗体の作製

(1) 抗CLDN4ヒト化抗体のVHおよびVLのアミノ酸配列の設計

まず、抗CLDN4ヒト化抗体のVHのアミノ酸配列を以下のようにして設計した。

配列番号19~21でそれぞれ示される抗体VHのCDR1~3のアミノ酸配列を移植するためのヒト抗体のVHのFRのアミノ酸配列を選択した。カバットらは、既知の様々なヒト抗体のVHをそのアミノ酸配列の相同性から3種類のサブグループ(HSG I~III)に分類し、更に、それらのサブグループ毎に共通配列を報告している[SEQUENCES of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services(1991)]。それら共通配列は、ヒトにおいてより免疫原性が低下する可能性が考えられることから、それら共通配列を基に抗CLDN4ヒト化抗体のVHのアミノ酸配列を設計することとした。より結合活性の高い抗CLDN4ヒト化抗体を作製するために、設計にあたってはヒト抗体のVHの3種類のサブグループの共通配列のFRのアミノ酸配列のうち、CLDN4遺伝子にコードされるポリペプチドの細胞外領域に結合し、CLDN4の中和活性を有するモノクローナル抗体である、抗CLDN4マウス抗体KM3900のVHのFRのアミノ酸配列と最も高い相同性を有するFRのアミノ酸配列を選択した。

20

【0249】

相同性を検索した結果、HSGI、HSGIIおよびHSGIIIとの相同性はそれぞれ73.2%、57.3%および59.8%であった。従って、KM3900のVH領域のFRのアミノ酸配列はサブグループIと最も高い相同性を有していた。

30

以上の結果から、ヒト抗体のVHのサブグループIの共通配列のFRのアミノ酸配列の適切な位置に抗CLDN4マウス抗体KM3900のVHのCDRのアミノ酸配列を移植した。しかし、配列番号16に記載のKM3900のVHのアミノ酸配列中の20番目のGlu、39番目のIle、93番目のLys、103番目のArgは、カバットらがあげるヒト抗体FRのアミノ酸配列の相当する部位において、最も使用される頻度が高いアミノ酸残基ではないが、比較的高い頻度で使用されるアミノ酸残基であるため、上記のKM3900のアミノ酸配列で認められるアミノ酸残基を用いることとした。このようにして、配列番号74で示される抗CLDN4ヒト化抗体のVHのアミノ酸配列HV0を設計した。

【0250】

次に、抗CLDN4ヒト化抗体のVLのアミノ酸配列を以下のようにして設計した。

40

配列番号22~24でそれぞれ示される抗体VLのCDR1~3のアミノ酸配列を移植するためのヒト抗体のVLのFRのアミノ酸配列を選択した。カバットらは、既知の様々なヒト抗体のVLをそのアミノ酸配列の相同性から4種類のサブグループ(HSG I~IV)に分類し、更に、それらのサブグループ毎に共通配列を報告している[Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services(1991)]。そこでVHの場合と同様にして、ヒト抗体のVLの4種類のサブグループの共通配列のFRのアミノ酸配列のうち、CLDN4遺伝子にコードされるポリペプチドの細胞外領域に結合し、CLDN4の中和活性を有するモノクローナル抗体である、抗CLDN4マウス抗体KM3900のVLのFRのアミノ酸配列と最も高い相同性を有するFRのアミノ酸配列を選択した。

【0251】

50

相同性を検索した結果、HSGI、HSGII、HSGIIIおよびHSGIVとの相同性はそれぞれ72.5%、62.5%、68.8%および71.3%であった。従って、KM3900のVLのFRのアミノ酸配列はサブグループIと最も高い相同性を有していた。

以上の結果から、ヒト抗体のVLのサブグループIの共通配列のFRのアミノ酸配列の適切な位置に抗CLDN4マウス抗体KM3900のVLのCDRのアミノ酸配列を移植した。しかし、配列番号18に記載のKM3900のVLのアミノ酸配列中の26番目のLeu、94番目のTyr、127番目のLeuは、カバットらがあげるヒト抗体FRのアミノ酸配列の相当する部位において、最も使用される頻度が高いアミノ酸残基ではないが、比較的高い頻度で使用されるアミノ酸残基であるため、上記のKM3900のアミノ酸配列で認められるアミノ酸残基を用いることとした。このようにして、配列番号76で示される抗CLDN4ヒト化抗体のVLのアミノ酸配列LV0を設計した。

10

【0252】

上記で設計した抗CLDN4ヒト化抗体のVHのアミノ酸配列HV0およびVLのアミノ酸配列LV0は、選択したヒト抗体のFRのアミノ酸配列に抗CLDN4マウス抗体KM3900のCDRのアミノ酸配列のみを移植した配列であるが、一般に、ヒト化抗体を作製する場合には、単なるヒト抗体のFRへのマウス抗体のCDRのアミノ酸配列の移植のみでは結合活性が低下してしまうことが多い。結合活性の低下を回避するため、ヒト抗体とマウス抗体で異なっているFRのアミノ酸残基のうち、結合活性に影響を与えると考えられるアミノ酸残基を、CDRのアミノ酸配列の移植とともに、改変することが行われている。そこで、本実施例においても、結合活性に影響を与えると考えられるFRのアミノ酸残基を以下のようにして同定した。

20

【0253】

まず、上記で設計した抗CLDN4ヒト化抗体のVHのアミノ酸配列HV0およびVLのアミノ酸配列LV0よりなる抗体V領域（HV0LV0）の三次元構造をコンピューターモデリングの手法を用いて構築した。三次元構造座標作製に関してはソフトウェアAbM(Oxford Molecular社製)を用いて構築した。三次元構造の表示についてはソフトウェアPro Explore(Oxford Molecular社製)あるいはViewerLite(Accelrys社製)を用いてそれぞれ添付の使用説明書に従い、行った。また、抗CLDN4マウスモノクローナル抗体KM3900のV領域の三次元構造のコンピューターモデルも同様にして構築した。更に、HV0LV0のVHおよびVLのFRのアミノ酸配列において、抗CLDN4マウス抗体KM3900と異なっているアミノ酸残基について順次、抗CLDN4マウス抗体KM3900の相当する位置に見られるアミノ酸残基へ改変したアミノ酸配列からなる三次元構造モデルを同様にして構築し、抗CLDN4マウス抗体KM3900、HV0LV0および改変体のV領域の三次元構造を比較した。

30

【0254】

その結果、HV0LV0のFRのアミノ酸残基の中で抗原結合部位の三次元構造を変化させ、抗体の結合活性に影響を与えると考えられるアミノ酸残基として、配列番号74に記載のHV0では41番目のPro、43番目のGln、44番目のGly、48番目のMet、67番目のArg、68番目のVal、70番目のIle、および72番目のAlaを、配列番号76に記載のLV0では1番目のAsp、10番目のSer、21番目のIle、48番目のLeu、71番目のAsp、79番目のLeu、および81番目のProをそれぞれ選択した。これらの選択したアミノ酸残基のうち、少なくとも1つ以上のアミノ酸配列をマウス抗体KM3900の同じ部位に存在するアミノ酸残基へ改変し、様々な改変を有するヒト化抗体のVHおよびVLを設計した。具体的には、抗体VHについては、配列番号74で示されるアミノ酸配列の41番目のProをHisに、43番目のGlnをLysに、44番目のGlyをSerに、48番目のMetをIleに、67番目のArgをLysに、68番目のValをAlaに、70番目のIleをLeuに、および72番目のAlaをValに置換するアミノ酸改変のうち、少なくとも1つの改変を導入した。また、VLについては、配列番号76で示されるアミノ酸配列の1番目のAspをGlnに、10番目のSerをIleに、21番目のIleをMetに、48番目のLeuをTrpに、71番目のAspをSerに、79番目のLeuをMetに、および81番目のProをAlaに置換するアミノ酸改変のうち、少なくとも1つの改変を導入した。

40

(2) 抗CLDN4ヒト化抗体のVHをコードするcDNAの構築

本実施例(1)で設計した抗CLDN4ヒト化抗体のVHのアミノ酸配列HV0をコードするcDNA

50

を、PCRを用いて以下のようにして構築した。

【0255】

まず、設計したアミノ酸配列と、W02005/121338A1に記載の配列番号12の1～18番目に記載の抗PERPマウス抗体KM3411のH鎖の分泌シグナル配列とを繋げて完全な抗体アミノ酸配列とした。次に、該アミノ酸配列を遺伝子コドンに変換した。1つのアミノ酸残基に対して複数の遺伝子コドンが存在する場合は、抗体の遺伝子の塩基配列に見られる使用頻度[SEQUENCES of Proteins of Immunological Interest, US Dept.Health and Human Services(1991)]を考慮し、対応する遺伝子コドンを選定した(配列番号73)。決定した遺伝子コドンを繋げて、完全な抗体V領域のアミノ酸配列をコードするcDNAの塩基配列を設計し、更に5'末端と3'末端にPCR反応時の増幅用プライマーの結合塩基配列(ヒト化抗体発現用ベクターへクローニングするための制限酵素認識配列も含む)を付加した。設計した塩基配列を5'末端側から約100塩基ずつ計4本の塩基配列に分け(隣り合う塩基配列は、その末端に約20塩基の重複配列を有するようにする)、それらをセンス鎖、アンチセンス鎖の交互の順で、合成オリゴヌクレオチド(配列番号77～80)を合成した。

10

【0256】

各オリゴヌクレオチド(配列番号77～80)を最終濃度が0.1 μ mol/Lとなるように50 μ Lの反応液に加えて、0.5 μ mol/L T3プライマー(Takara Shuzo社製)、0.5 μ mol/L T7プライマー(Takara Shuzo社製)および1単位のKOD polymerase(東洋紡績社製)を用いて、KOD polymeraseに添付の使用説明書に従い、PCRを行った。この際の反応条件は使用説明書に記載された条件(94 30秒間、50 30秒間、74 60秒間のサイクルを30サイクル)に従った。該反応液をエタノール沈殿した後、滅菌水に溶解し、適当な制限酵素処理を行った後に、プラスミドpBluescript II SK() (Stratagene社製)に連結した。このようにして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌DH5 株を形質転換し、形質転換株の株よりプラスミドDNAを調製し、BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Applied Biosystems社製)を用いて塩基配列を解析した結果、目的の塩基配列を有するプラスミドpBS/HV0を得た。

20

【0257】

次に、本実施例(1)で設計したFRのアミノ酸残基の改変は、変異を有する合成オリゴヌクレオチドを作製し、上記のPCRを行うか、上記で作製したHV0をコードするcDNAを含むプラスミドDNAを鋳型として変異を有する合成DNAをプライマーとしてPCRを行い、増幅遺伝子断片を単離することにより行った。改変後のアミノ酸残基の遺伝子コドンについては、抗CLDN4マウス抗体KM3900に見られる遺伝子コドンとなるように行った。また、以下、特に記載の無い場合、94 30秒間、55 30秒間、72 60秒間のサイクルを35サイクルのPCR反応で反応させた。PCR反応はKOD plus polymerase(TOYOBO社製)を使用して行った。また、使用した合成オリゴヌクレオチドはファスマック社製のものである。

30

(3) 抗CLDN4ヒト化抗体のVLをコードするcDNAの構築

本実施例(1)で設計した抗CLDN4ヒト化抗体のVLのアミノ酸配列をコードするcDNAを、PCRを用いて以下のようにして構築した。

【0258】

まず、設計したアミノ酸配列と、W02005/121338A1に記載の配列番号14の1～22番目に記載の抗PERPマウス抗体KM3411のL鎖の分泌シグナル配列とを繋げて完全な抗体アミノ酸配列とした。次に、該アミノ酸配列を遺伝子コドンに変換した。1つのアミノ酸残基に対して複数の遺伝子コドンが存在する場合は、抗体の遺伝子の塩基配列に見られる使用頻度[SEQUENCES of Proteins of Immunological Interest, US Dept.Health and Human Services(1991)]を考慮し、対応する遺伝子コドンを選定した(配列番号75)。決定した遺伝子コドンを繋げて、完全な抗体V領域のアミノ酸配列をコードするcDNAの塩基配列を設計し、更に5'末端と3'末端にPCR反応時の増幅用プライマーの結合塩基配列(ヒト化抗体発現用ベクターへクローニングするための制限酵素認識配列も含む)を付加した。設計した塩基配列を5'末端側から約100塩基ずつ計4本の塩基配列に分け(隣り合う塩基配列は、その末端に約20塩基の重複配列を有するようにする)、それらをセンス鎖、アンチセンス鎖

40

50

の交互の順で、合成オリゴヌクレオチド（配列番号81～84）を合成した。

【0259】

各オリゴヌクレオチド（配列番号81～84）を最終濃度が0.1 μmol/Lとなるように50 μLの反応液に加えて、0.5 μmol/L T7プライマー（Takara Shuzo社製）、0.5 μmol/L T3プライマー（Takara Shuzo社製）および1単位のKOD polymerase（東洋紡績社製）を用いて、KOD polymeraseに添付の使用説明書に従い、上記（2）と同様にPCRを行った。反応液をエタノール沈殿した後、滅菌水に溶解し、適当な制限酵素処理を行った後に、プラスミドpBluescript II SK（）（Stratagene社製）に連結した。このようにして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌DH5 株を形質転換し、形質転換株よりプラスミドDNAを調製し、BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit（Applied Biosystems社製）を用いて塩基配列を解析した結果、目的の塩基配列を有するプラスミドpBS/LV0を取得した。

10

【0260】

次に、本実施例（1）で設計したFRのアミノ酸残基の改変は、変異を有する合成オリゴヌクレオチドを作製し、上記のPCRを行うか、上記で作製したLV0をコードするcDNAを含むプラスミドDNAを鋳型として変異を有する合成DNAをプライマーとしてPCRを行い、増幅遺伝子断片を単離することにより行った。改変後のアミノ酸残基の遺伝子コドンについては、抗CLDN4マウス抗体KM3900で見られる遺伝子コドンとなるように行った。

【0261】

また以下、特に記載の無い場合、94 30秒間、55 30秒間、72 60秒間のサイクルを35サイクルのPCR反応で反応させた。PCR反応はKOD plus polymerase（TOYOBO社製）を使用して行った。また、使用した合成オリゴヌクレオチドはファスマック社製のものである。

20

（4）抗CLDN4ヒト化抗体発現ベクターの構築

WO97/10354に記載のヒト化抗体発現用ベクターpKANTEX93の適当な位置に本実施例（2）および（3）で得られたHV0およびLV0をコードするそれぞれのcDNA、あるいはそれらの改変体をコードするcDNAを挿入し、各種抗CLDN4ヒト化抗体発現ベクターを構築した。

（5）抗CLDN4ヒト化抗体の動物細胞を用いた安定発現および精製抗体の取得

抗CLDN4ヒト化抗体の動物細胞を用いた安定発現および培養上清からの抗体の精製は、実施例7に記載の方法と同様にして行った。

30

【実施例12】

【0262】

抗CLDN4抗体の認識エピトープの同定

抗CLDN4モノクローナル抗体のエピトープを解析するため、CLDN4の2つの細胞外領域（EL1、EL2と記す）を、それぞれCLDN6の細胞外領域のアミノ酸配列に置換したCLDN4とCLDN6の融合タンパク質を発現させた細胞を作製した。これらの、CLDN4とCLDN6の融合タンパク質を発現した細胞に対する、抗CLDN4モノクローナル抗体KM3900およびKM3907の反応性を検討することで、抗体のエピトープの同定を行った。

（1）CLDN4とCLDN6融合蛋白質発現CHO細胞株の造成

実施例1（1）および実施例1（3）で作製したCLDN4 myc/HisおよびCLDN6 myc/Hisをコードする遺伝子を制限酵素EcoRI、KpnI、PstIで切断した。EcoRI PstI断片（約250 bp）とPstI KpnI断片（約500 bp）をアガロースゲル電気泳動で分離/回収した後、CLDN4 myc/His由来のEcoRI PstI断片とCLDN6 myc/His由来のPstI KpnI断片をLigation high（東洋紡績社製）を用いて連結し、pBluescriptII SK（）ベクターのEcoRI KpnIサイトに挿入した。その結果、N末側の細胞外領域（以下EL1と表記する）がCLDN4のアミノ酸配列、C末側の細胞外領域（以下EL2と表記する）がCLDN6のアミノ酸配列を有し、かつC末端側にmyc/Hisが付加された融合タンパク質をコードする遺伝子（以下、4 EL1/6 EL2）を作製した。4 EL1/6 EL2の遺伝子配列およびアミノ酸配列を配列番号69および配列番号70に示した。

40

【0263】

50

同様の方法により、CLDN6 myc/His由来のEcoRI PstI断片とCLDN4 myc/His由来のPstI KpnI断片を用いて、EL1がCLDN6のアミノ酸配列、EL2がCLDN4のアミノ酸配列を有し、かつC末側にmyc Hisが付加された融合蛋白質をコードする遺伝子（以下、6 EL1/4 EL2）を作製した。6 EL1/4 EL2の遺伝子配列およびアミノ酸配列を配列番号71および72に示した。

実施例1（1）と同様の方法で、4 EL1/6 EL2および6 EL1/4 EL2を、制限酵素EcoR IとKpn Iで消化したpKANTEX93ベクター（W097/10354）に挿入し、発現ベクターを作製し、エレクトロポレーション法[Cytotechnology,3,133(1990)]によりCHO/DG44細胞[Somatic Cell and Molecular Genetics,12,555(1986)]へ導入後、薬剤選抜を実施し、4 EL1/6 EL2遺伝子導入CHO細胞株（以下、4 EL1/6 EL2/CHO）および6 EL1/4 EL2遺伝子導入CHO細胞株（以下、6 EL1/4 EL2/CHO）を取得した。

10

（2）抗CLDN4モノクローナル抗体KM3900およびKM3907の4 EL1/6 EL2および6 EL1/4 EL2発現細胞に対する反応性

実施例3（3）と同様の方法により、抗CLDN4モノクローナル抗体KM3900およびKM3907の、4 EL1/6 EL2/CHOおよび6 EL1/4 EL2/CHOに対する反応性を、FCMにより検討した。各細胞に対する反応性を下記表2に示した。

【0264】

【表2】

抗 CLDN4 モノクローナル抗体の反応性

Antibody	CHO 発現細胞	
	4-EL1/6-EL2	6-EL1/4-EL2
KM3900	—	+
KM3907	+	—

【0265】

表2に示したように、抗CLDN4モノクローナル抗体KM3900は、6 EL1/4 EL2/CHOに反応し、4 EL1/6 EL2/CHOには反応しなかった。抗CLDN4モノクローナル抗体KM3907は4 EL1/6 EL2/CHOに反応し、6 EL1/4 EL2/CHOには反応しなかった。

30

以上の結果から、抗CLDN4モノクローナル抗体KM3900はCLDN4の141～159番目のアミノ酸配列からなる立体構造を認識し、抗CLDN4モノクローナル抗体KM3907はCLDN4の28～76番目のアミノ酸配列からなる立体構造を認識し、結合することが明らかとなった。

【産業上の利用可能性】

【0266】

本発明によれば、CLDN4の細胞外領域の立体構造を特異的に認識し、かつ該細胞外領域に結合するモノクローナル抗体または該抗体断片、CLDN4の細胞外領域の立体構造に特異的に結合し、CLDN4中和活性を有するモノクローナル抗体または該抗体断片、および、CLDN4とCLDN3の両方の細胞外領域の立体構造を特異的に認識し、かつ両方の細胞外領域に結合するモノクローナル抗体または該抗体断片、該抗体を産生するハイブリドーマ、該抗体をコードするDNA、該DNAを含んでいるベクター、該ベクターを形質転換して得られる形質転換体、該ハイブリドーマまたは形質転換体を用いる抗体または該抗体断片の製造方法、ならびに該抗体または抗体断片を用いる癌の診断薬または治療薬を提供することができる。

40

【配列表フリーテキスト】

【0267】

配列番号 3 - 人工配列の説明：CLDN4 myc/His配列

配列番号 4 - 人工配列の説明：CLDN4 myc/His配列

配列番号 7 - 人工配列の説明：CLDN6 myc/His配列

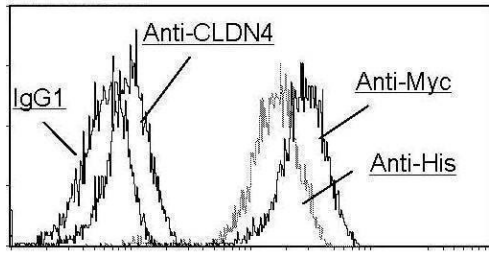
50

配列番号 8 - 人工配列の説明 : CLDN6 myc/His配列	
配列番号 9 - 人工配列の説明 : 合成DNA	
配列番号10 - 人工配列の説明 : 合成DNA	
配列番号11 - 人工配列の説明 : 合成DNA	
配列番号12 - 人工配列の説明 : 合成DNA	
配列番号13 - 人工配列の説明 : マウス IgG 1 プライマー mG2aa2	
配列番号14 - 人工配列の説明 : マウス プライマー mKa2	
配列番号27 - 人工配列の説明 : CLDN3 myc/His配列	
配列番号28 - 人工配列の説明 : CLDN3 myc/His配列	
配列番号31 - 人工配列の説明 : CLDN5 myc/His配列	10
配列番号31 - 人工配列の説明 : CLDN5 myc/His配列	
配列番号35 - 人工配列の説明 : CLDN9 myc/His配列	
配列番号36 - 人工配列の説明 : CLDN9 myc/His配列	
配列番号37 - 人工配列の説明 : 合成DNA	
配列番号38 - 人工配列の説明 : 合成DNA	
配列番号39 - 人工配列の説明 : 合成DNA	
配列番号40 - 人工配列の説明 : 合成DNA	
配列番号41 - 人工配列の説明 : 合成DNA	
配列番号42 - 人工配列の説明 : 合成DNA	
配列番号43 - 人工配列の説明 : 合成DNA	20
配列番号44 - 人工配列の説明 : 合成DNA	
配列番号45 - 人工配列の説明 : 合成DNA	
配列番号46 - 人工配列の説明 : 合成DNA	
配列番号47 - 人工配列の説明 : 合成DNA	
配列番号48 - 人工配列の説明 : 合成DNA	
配列番号49 - 人工配列の説明 : 合成DNA KM3900H フォワード	
配列番号50 - 人工配列の説明 : 合成DNA KM3900H リバース	
配列番号51 - 人工配列の説明 : 合成DNA KM3900L フォワード	
配列番号52 - 人工配列の説明 : 合成DNA KM3900L リバース	
配列番号53 - 人工配列の説明 : マウス IgGプライマー	30
配列番号54 - 人工配列の説明 : マウス プライマー	
配列番号55 - 人工配列の説明 : KM3907VH DNA配列	
配列番号56 - 人工配列の説明 : KM3907VH アミノ酸配列	
配列番号57 - 人工配列の説明 : KM3907VL DNA配列	
配列番号58 - 人工配列の説明 : KM3907VL アミノ酸配列	
配列番号59 - 人工配列の説明 : KM3907 HCDR1	
配列番号60 - 人工配列の説明 : KM3907 HCDR2	
配列番号61 - 人工配列の説明 : KM3907 HCDR3	
配列番号62 - 人工配列の説明 : KM3907 LCDR1	
配列番号63 - 人工配列の説明 : KM3907 LCDR2	40
配列番号64 - 人工配列の説明 : KM3907 LCDR3	
配列番号65 - 人工配列の説明 : KM3907H増幅フォワードプライマー	
配列番号66 - 人工配列の説明 : KM3907H増幅リバースプライマー	
配列番号67 - 人工配列の説明 : KM3907L増幅フォワードプライマー	
配列番号68 - 人工配列の説明 : KM3907L増幅リバースプライマー	
配列番号69 - 人工配列の説明 : 4 EL1/6 EL2 DNA配列	
配列番号70 - 人工配列の説明 : 4 EL1/6 EL2 アミノ酸配列	
配列番号71 - 人工配列の説明 : 6 EL1/4 EL2 DNA配列	
配列番号72 - 人工配列の説明 : 6 EL1/4 EL2 アミノ酸配列	
配列番号73 - 人工配列の説明 : 抗CLDN4ヒト化抗体 HVO DNA配列	50

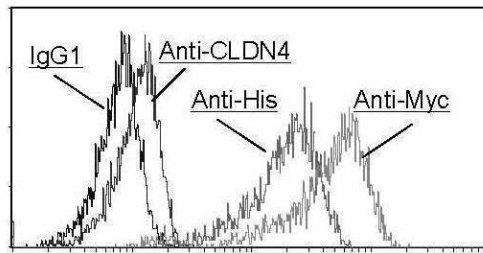
配列番号74 - 人工配列の説明：抗CLDN4ヒト化抗体 HV0アミノ酸配列
配列番号75 - 人工配列の説明：抗CLDN4ヒト化抗体 LV0 DNA配列
配列番号76 - 人工配列の説明：抗CLDN4ヒト化抗体 LV0アミノ酸配列
配列番号77 - 人工配列の説明：HV0の合成DNA
配列番号78 - 人工配列の説明：HV0の合成DNA
配列番号79 - 人工配列の説明：HV0の合成DNA
配列番号80 - 人工配列の説明：HV0の合成DNA
配列番号81 - 人工配列の説明：LV0の合成DNA
配列番号82 - 人工配列の説明：LV0の合成DNA
配列番号83 - 人工配列の説明：LV0の合成DNA
配列番号84 - 人工配列の説明：LV0の合成DNA

【 図 1 】

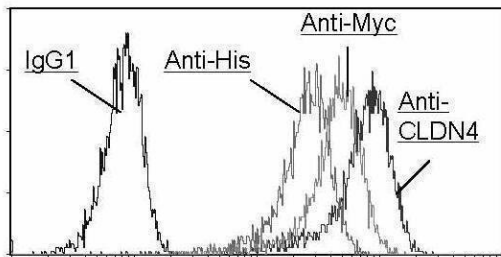
CLDN3 / CHO



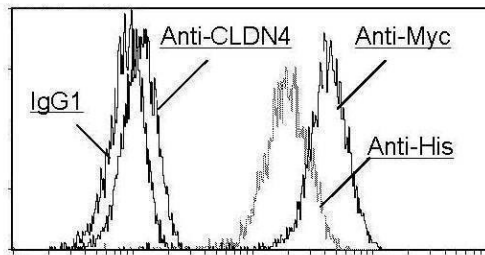
CLDN6 / CHO



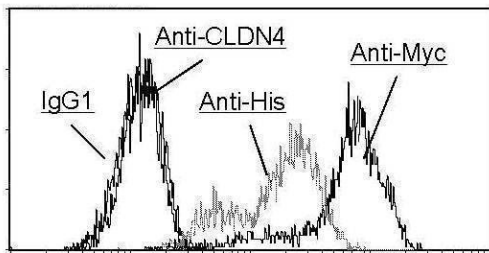
CLDN4 / CHO



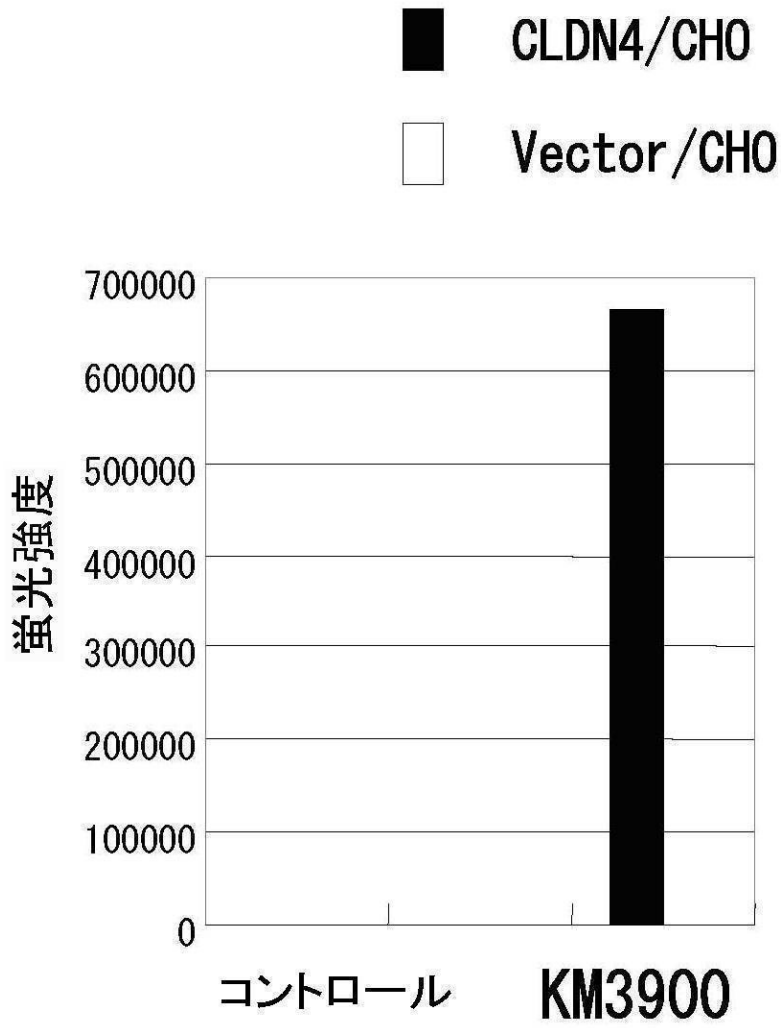
CLDN9 / CHO



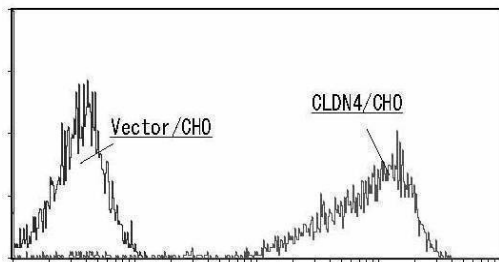
CLDN5 / CHO



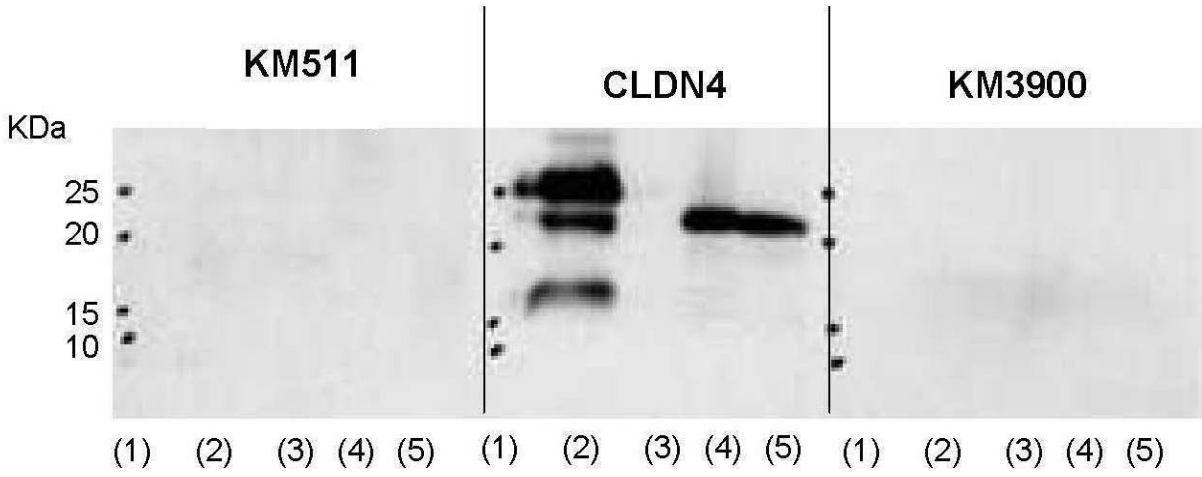
【 図 2 】



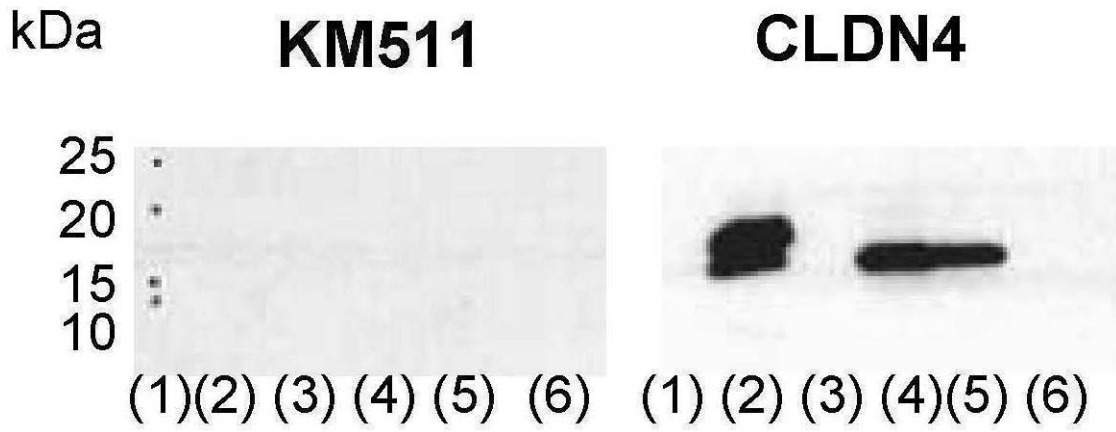
【 図 3 】



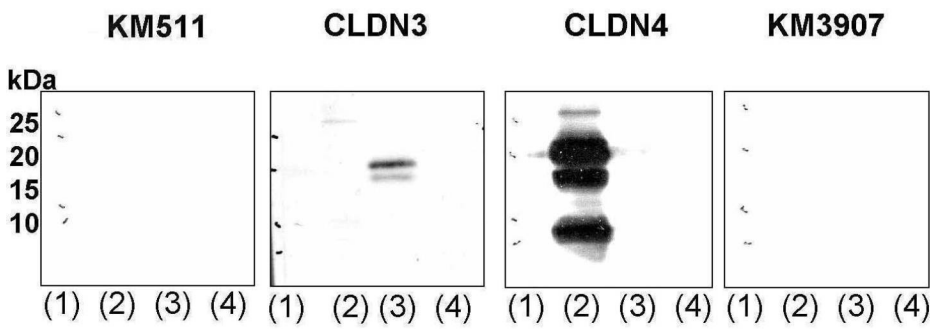
【 図 4 】



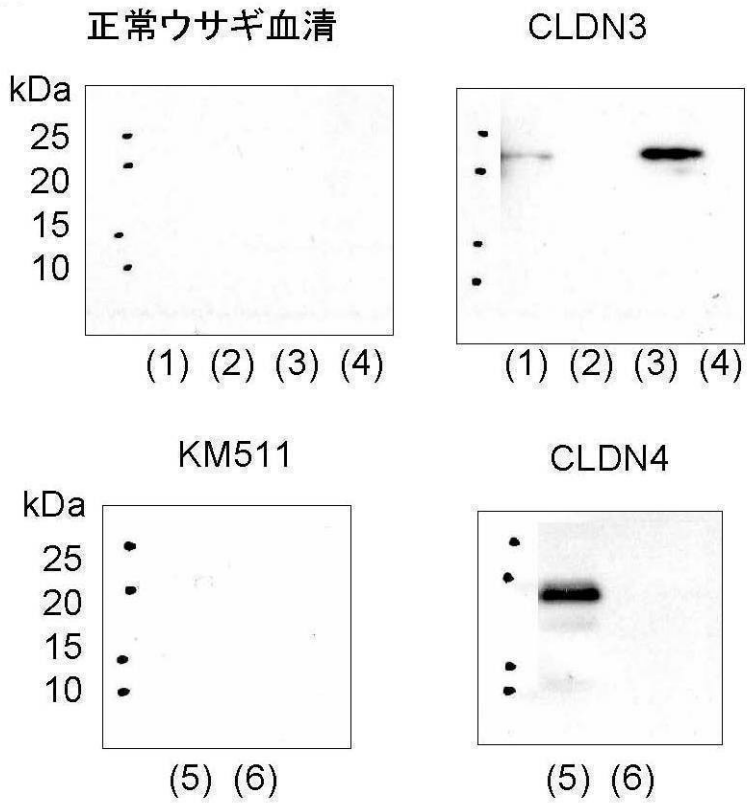
【 図 5 】



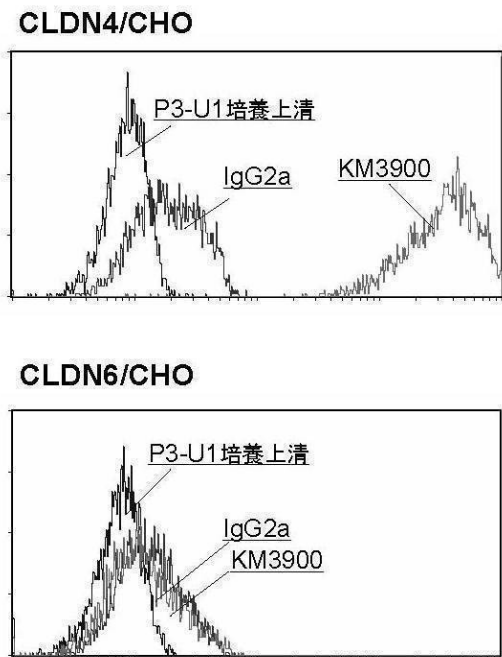
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】

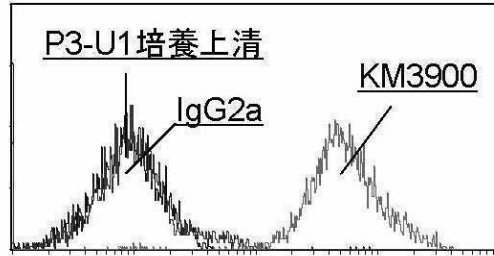
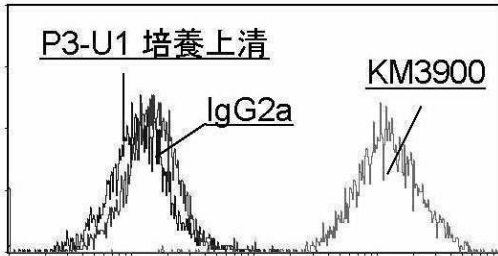


【 図 9 】

膵癌

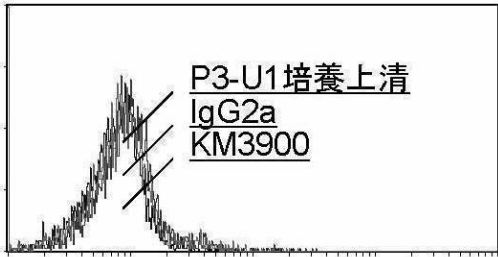
Capan-2

HPAF- II

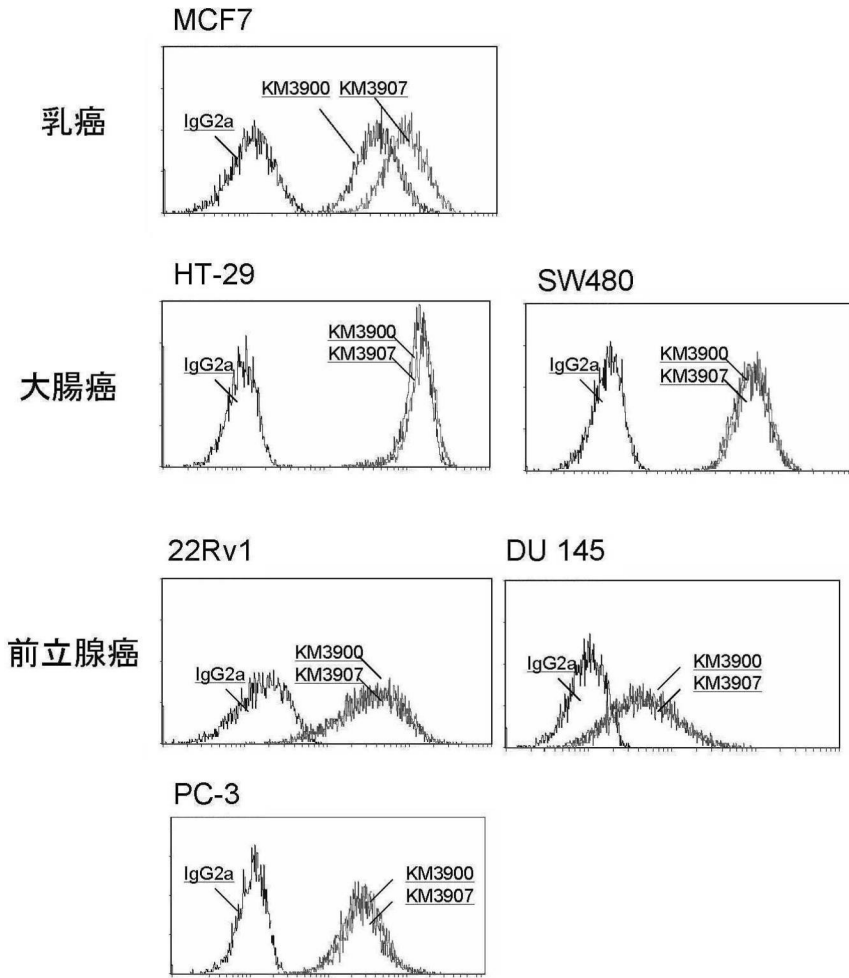


リンパ腫

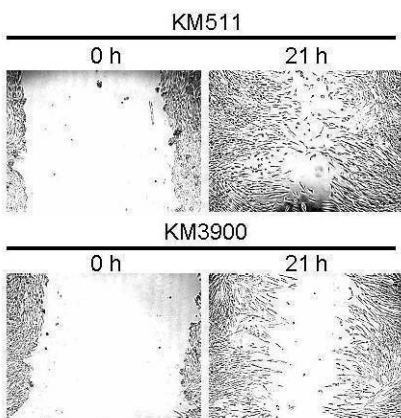
Daudi



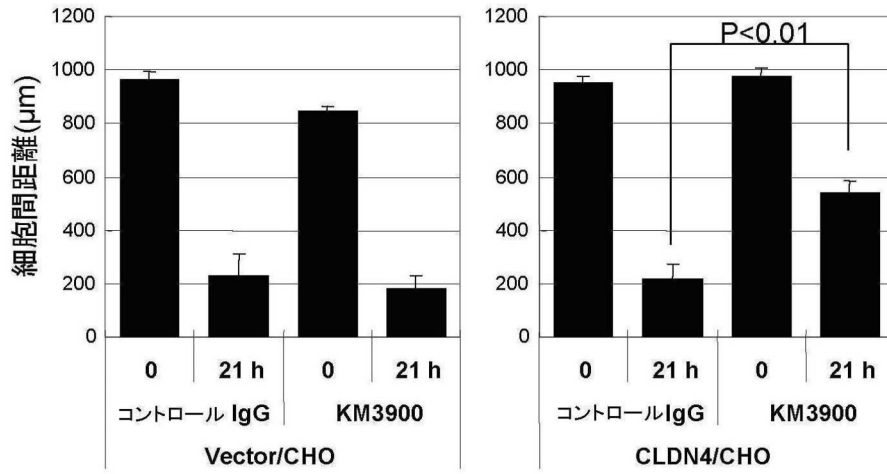
【 図 1 0 】



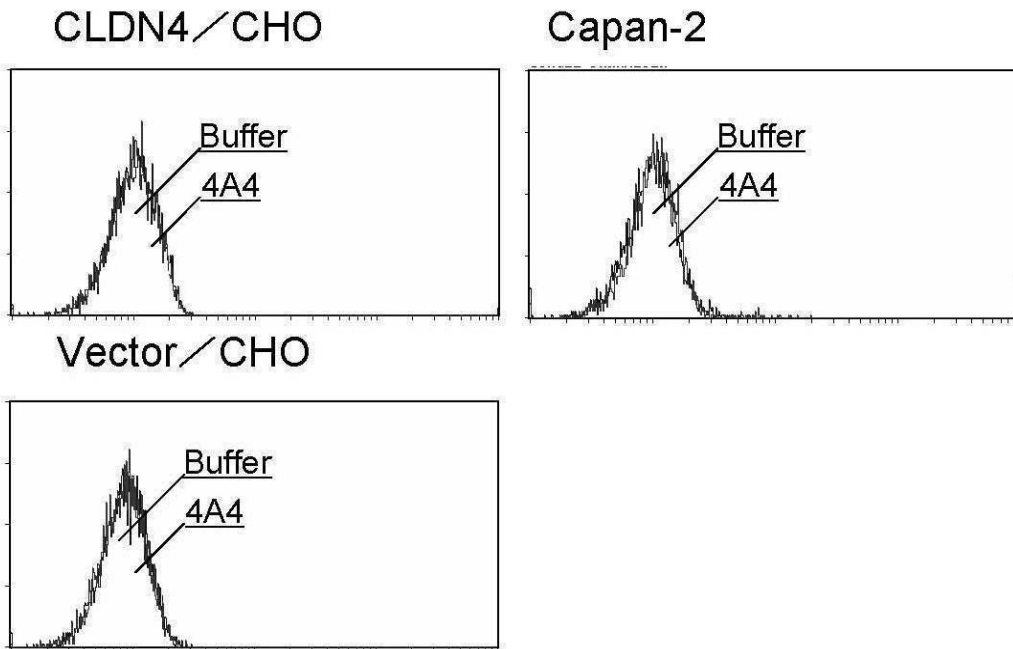
【 図 1 1 】



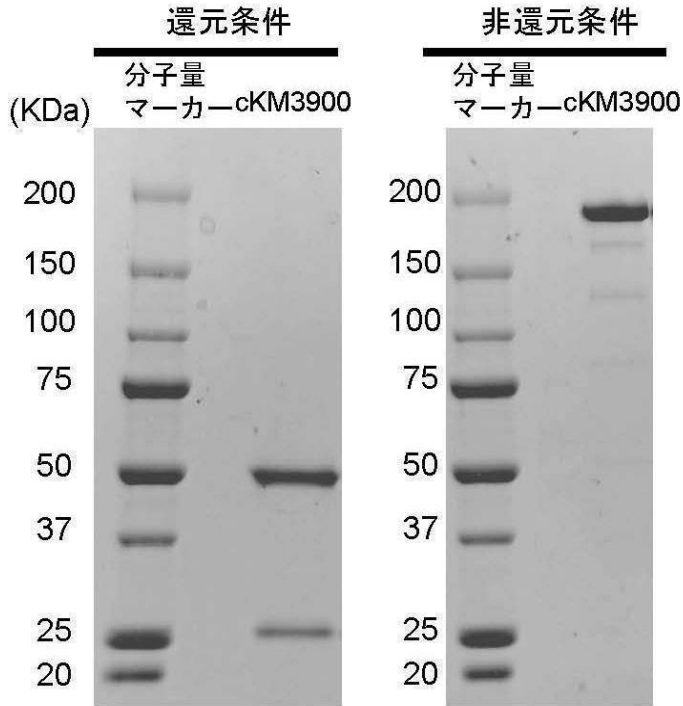
【 図 1 2 】



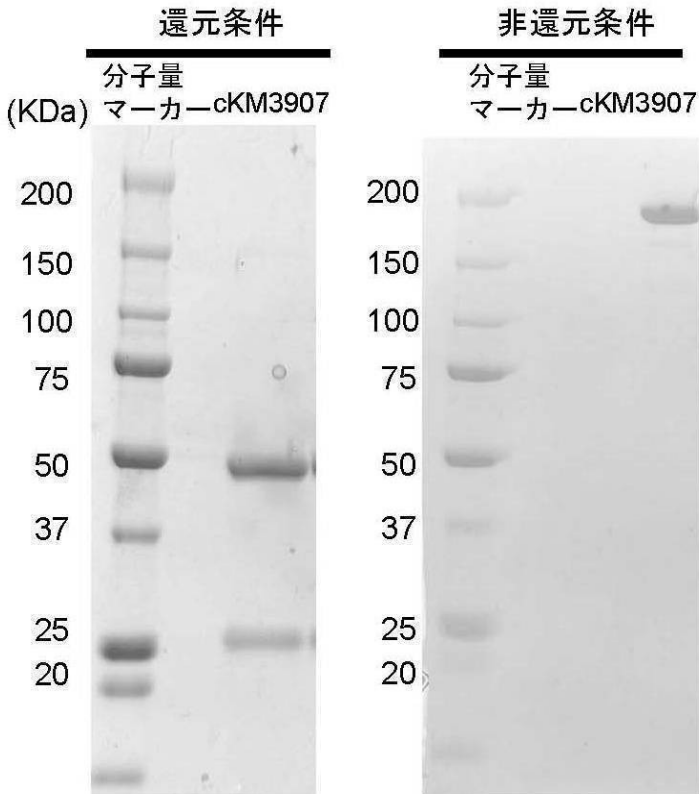
【 図 1 3 】



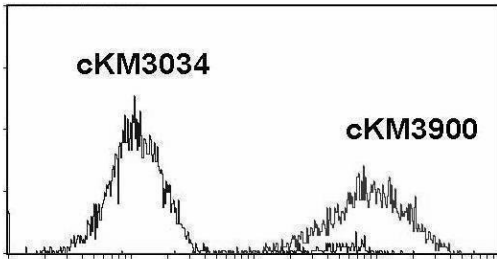
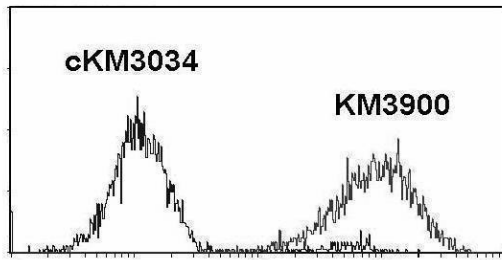
【図14】



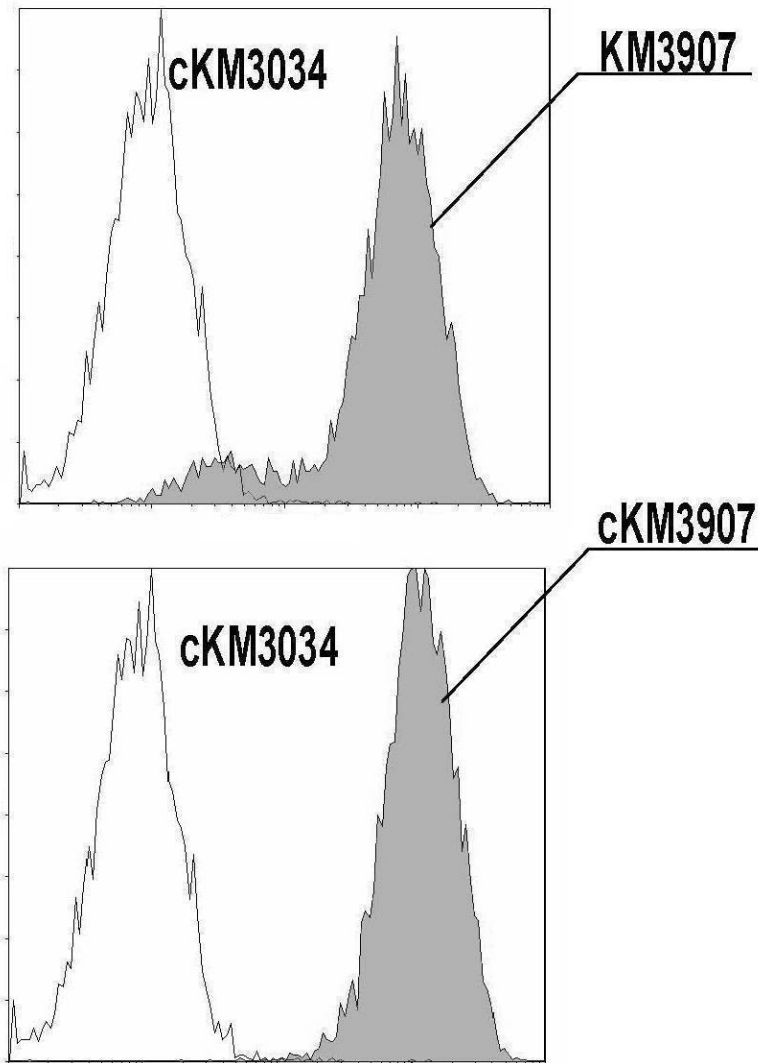
【図15】



【 図 1 6 】

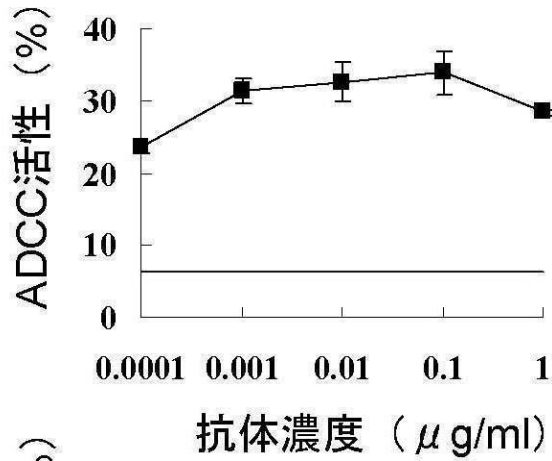


【 図 17 】

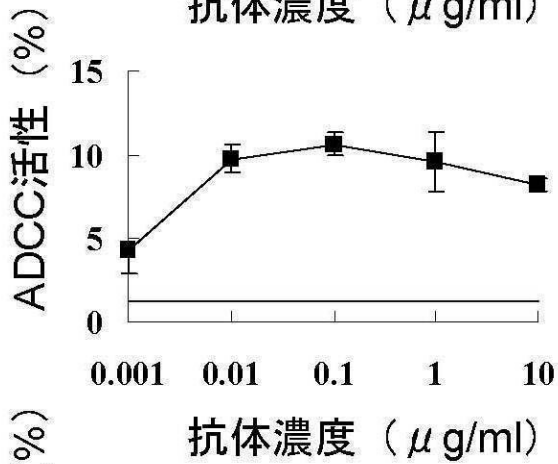


【 図 1 8 】

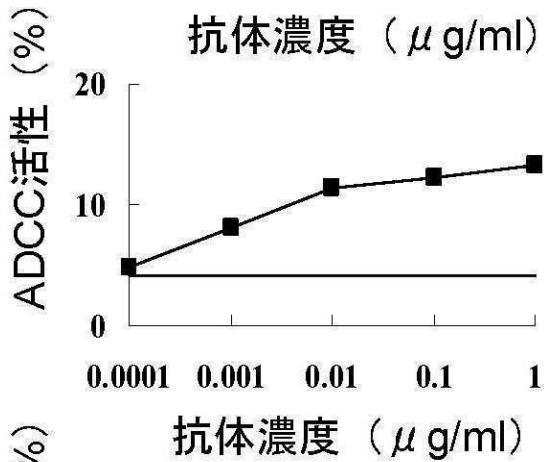
CLDN4/CHO



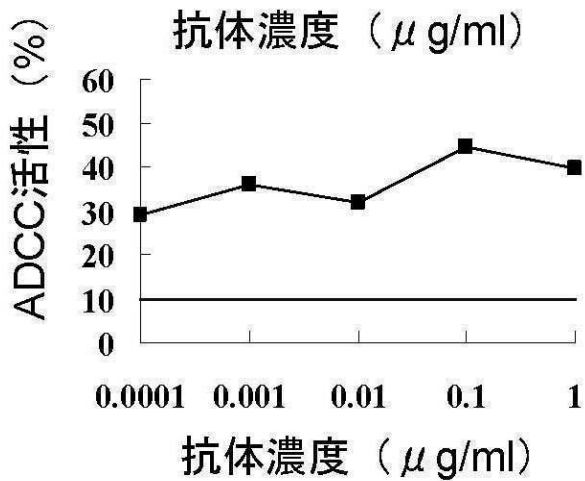
Capan-2



MCAS

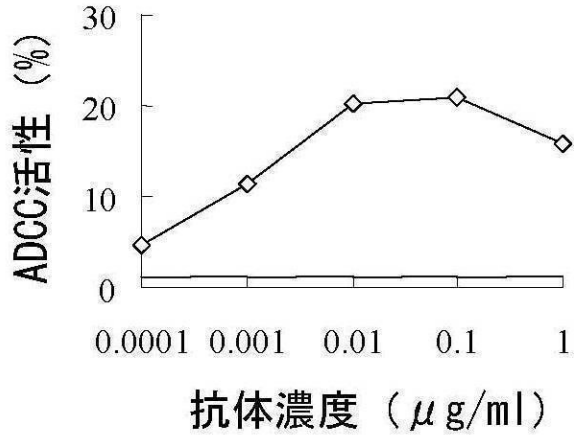


MCF7

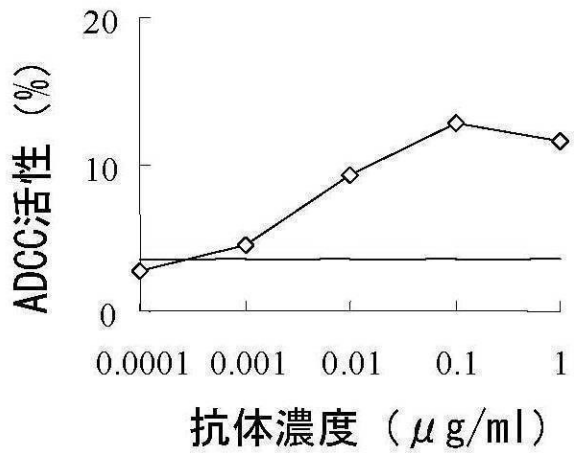


【 図 1 9 】

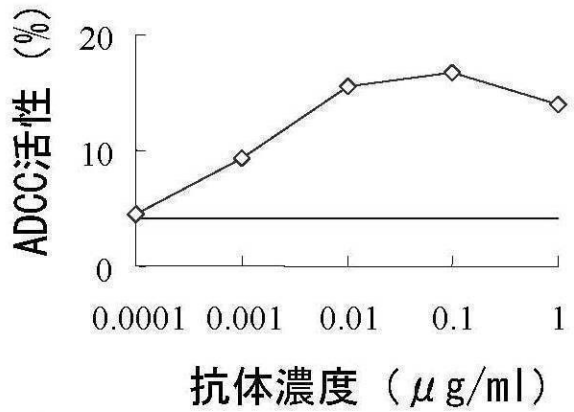
CLDN4/CHO



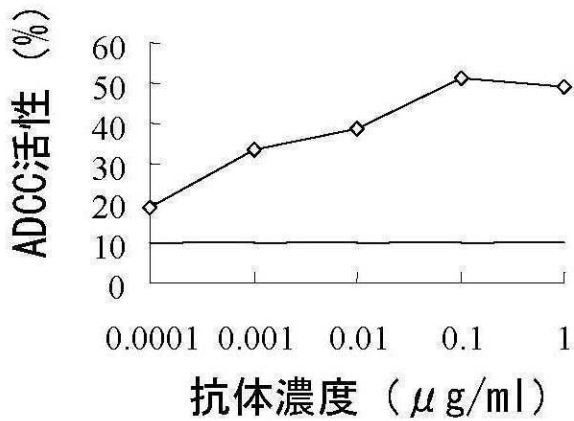
CLDN3/CHO



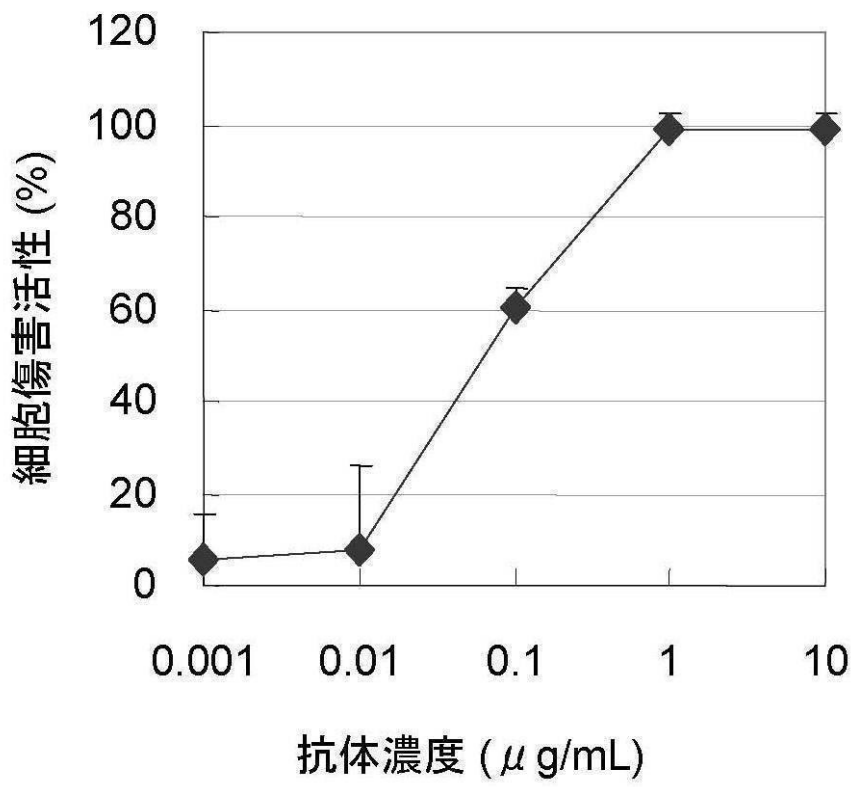
MCAS



MCF7

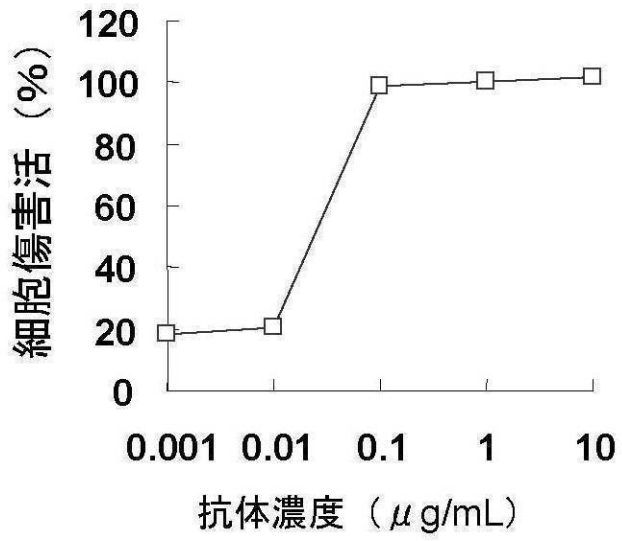


【圖 20】

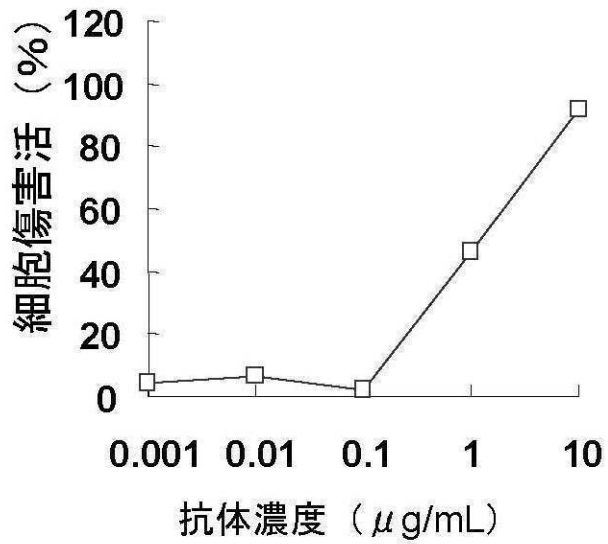


【 図 2 1 】

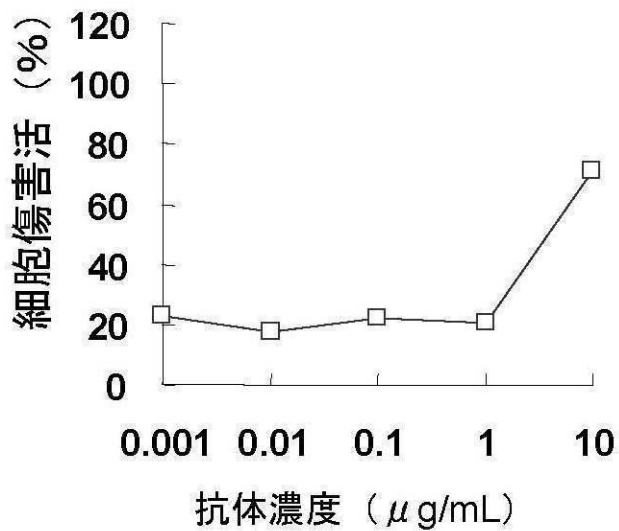
CLDN4/CHO



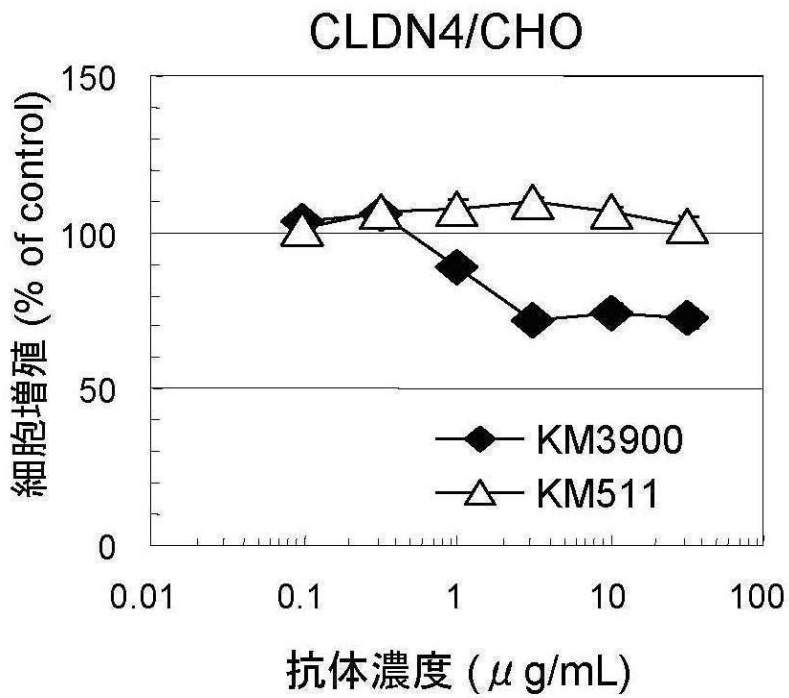
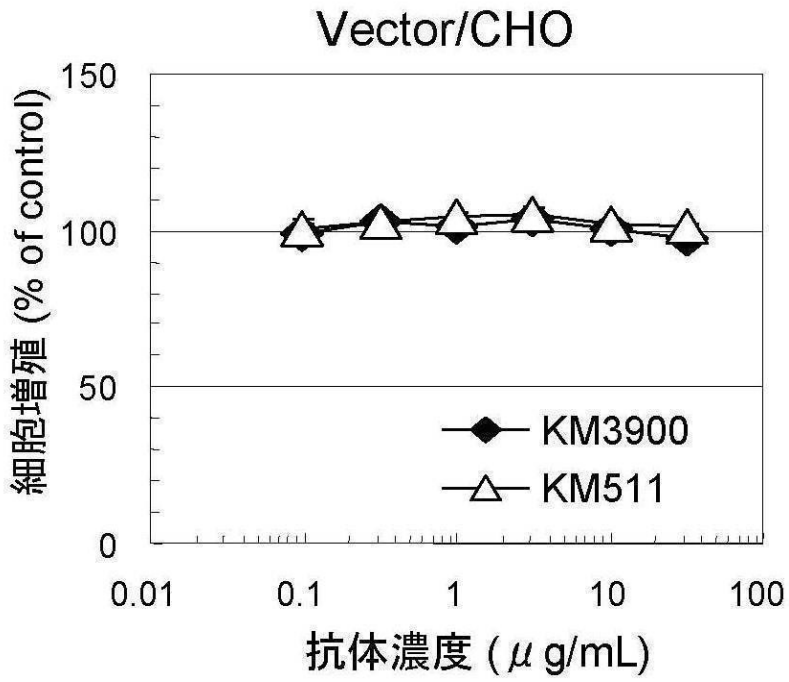
CLDN3/CHO



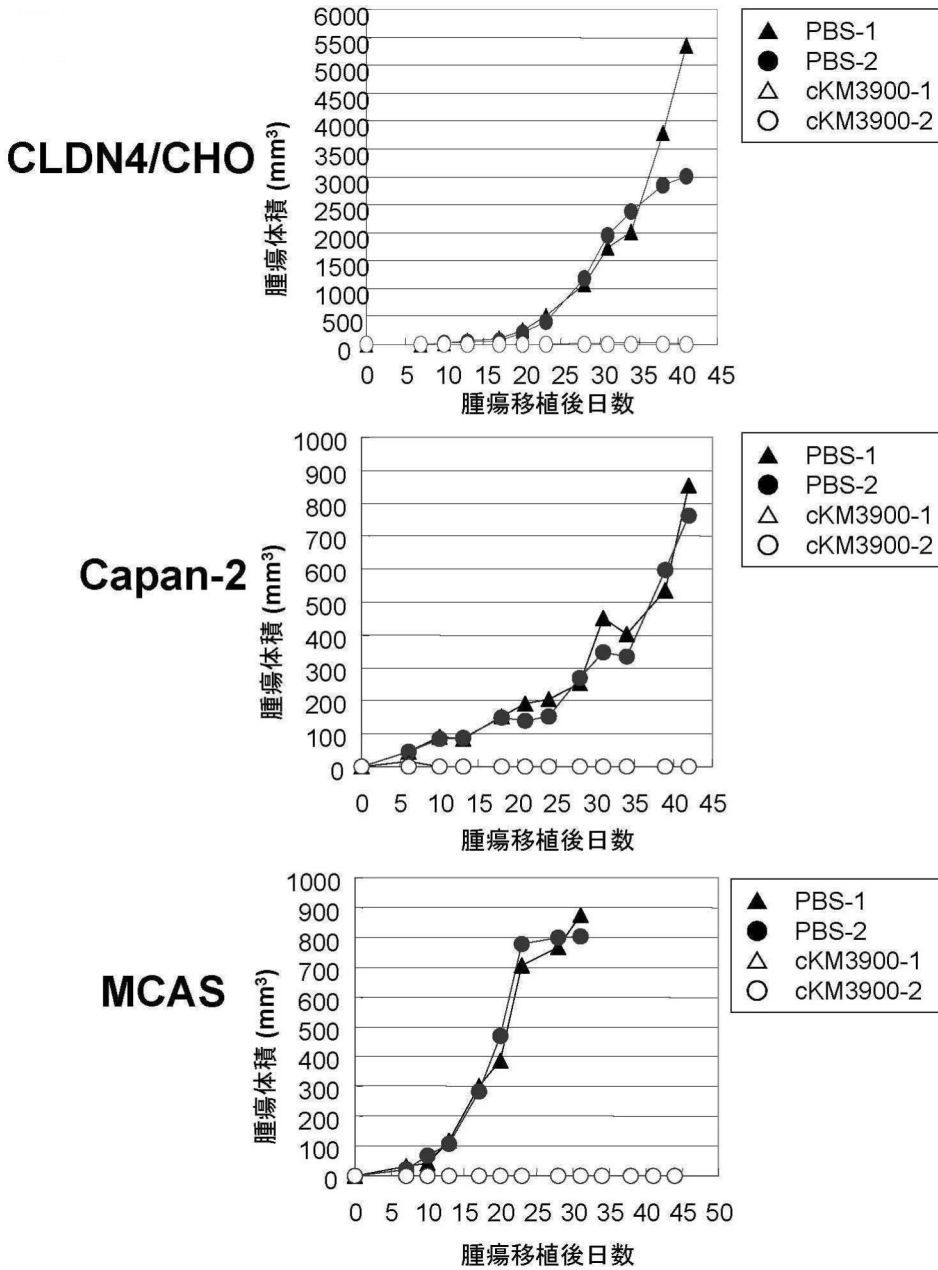
MCF7



【圖 2 2】



【 図 2 3 】



【 配列表 】

2008114733000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2008/054769
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N15/00(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C07K16/32(2006.01)i, C07K16/46(2006.01)i, C07K19/00(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(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) C12N15/00, A61K39/395, A61P35/00, C07K16/32, C07K16/46, C07K19/00, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N15/09, C12P21/08, G01N33/53 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2008 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2008 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2008 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) MEDLINE/CAplus/BIOSIS/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2006-525351 A (Nastech Pharmaceutical Company Inc.), 09 November, 2006 (09.11.06),	1-5, 7, 8, 16-18, 20, 21, 35-40, 44-50
Y	& WO 2004/098647 A3 & WO 2004/098647 A2 & EP 1620732 A3 & EP 1620732 A2 & MX 05011644 A & CN 1816745 A & CA 2523870 A1	1-40, 44-50
Y	OFFNER, S., et al., Epithelial tight junction proteins as potential antibody targets for pancreatic carcinoma therapy. Cancer Immunol. Immunother., 2005, Vol.54, pp.431-445	1-40, 44-50
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 02 April, 2008 (02.04.08)		Date of mailing of the international search report 15 April, 2008 (15.04.08)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/054769

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
(International Patent Classification (IPC))

C12N15/09(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i

(According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/054769

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

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

1. Claims Nos.: 41-43
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The inventions in the above claims pertain to diagnostic methods to be practiced on the human body.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

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

Remark on Protest
the

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

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2008/054769									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. 特別ページ参照											
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/00, A61K39/395, A61P35/00, C07K16/32, C07K16/46, C07K19/00, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N15/09, C12P21/08, G01N33/53											
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2008年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2008年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2008年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2008年	日本国実用新案登録公報	1996-2008年	日本国登録実用新案公報	1994-2008年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2008年										
日本国実用新案登録公報	1996-2008年										
日本国登録実用新案公報	1994-2008年										
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) MEDLINE/CAPLUS/BIOSIS/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号									
X	JP 2006-525351 A (ナステック・ファーマシューティカル・カンパニー) 2006.11.09 & WO 2004/098647 A3 & WO 2004/098647 A2 & EP 1620732 A3 & EP 1620732 A2 & MX 05011644 A & CN 1816745 A & CA 2523870 A1	1-5、7、8、 16-18、20、 21、35-40、 44-50									
Y		1-40、44- 50									
Y	OFFNER, S., et al., Epithelial tight junction proteins as potential antibody targets for pancreatic carcinoma therapy. Cancer Immunol. Immunother., 2005, Vol.54, pp.431-445	1-40、44- 50									
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。		<input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。									
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献									
国際調査を完了した日 02.04.2008		国際調査報告の発送日 15.04.2008									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 佐々木 大輔 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B 3962								

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2008/054769

発明の属する分野の分類

C12N15/00(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C07K16/32(2006.01)i,
C07K16/46(2006.01)i, C07K19/00(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i,
C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)i,
G01N33/53(2006.01)i

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2008/054769

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

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

1. 請求の範囲 41-43 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、上記請求の範囲に記載された発明は、人間を診断する方法に係るものである。
2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

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

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I		テーマコード(参考)
C 0 7 K 16/32 (2006.01)	C 0 7 K 16/32		
C 0 7 K 16/46 (2006.01)	C 0 7 K 16/46		
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	1 0 2	
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 1 2 P 21/08		
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	C 0 7 K 16/28		
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 P 35/00		
	A 6 1 K 39/395	T	
	A 6 1 K 39/395	Y	
	G 0 1 N 33/53	D	

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

(72)発明者 安藤 博司

東京都町田市旭町 3 丁目 6 番 6 号 協和発酵キリン株式会社 抗体研究所内

(72)発明者 鈴木 昌代

東京都町田市旭町 3 丁目 6 番 6 号 協和発酵キリン株式会社 抗体研究所内

(72)発明者 河本 忍

東京都町田市旭町 3 丁目 6 番 6 号 協和発酵キリン株式会社 研究推進部内

(72)発明者 中野 まり子

東京都町田市旭町 3 丁目 6 番 6 号 協和発酵キリン株式会社 抗体研究所内

(72)発明者 中村 和靖

東京都町田市旭町 3 丁目 6 番 6 号 協和発酵キリン株式会社 抗体研究所内

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA53 BA54 BA63 CA02 CA07 DA02 EA04 GA03
GA14 GA18 GA27
4B064 AG26 AG27 CA10 CA19 CA20 CC24 CE12 DA01 DA13
4B065 AA91X AA91Y AA93Y AB01 AB05 AC14 BA02 BA08 CA25 CA44
CA46
4C085 AA14 CC03 CC05 CC23 DD62 DD63 EE01
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA76 EA28 EA51 FA72
FA74 GA26

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	抗Claudin-4抗体		
公开(公告)号	JPWO2008114733A1	公开(公告)日	2010-07-01
申请号	JP2009505202	申请日	2008-03-14
申请(专利权)人(译)	协和発酵キリン株式会社		
[标]发明人	太田 聡 安藤 博司 鈴木 昌代 河本 忍 中野 まり子 中村 和靖		
发明人	太田 聡 安藤 博司 鈴木 昌代 河本 忍 中野 まり子 中村 和靖		
IPC分类号	C12N15/09 C12N1/15 C12N1/21 C12N1/19 C12N5/10 C07K16/32 C07K16/46 C12P21/08 C07K16/28 A61K39/395 A61P35/00 G01N33/53		
CPC分类号	C07K16/28 A61K2039/505 C07K2317/24 C07K2317/34 C07K2317/56 C07K2317/565 C07K2317/73 C07K2317/732 C07K2317/734 C07K2317/76		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12N1/15 C12N1/21 C12N1/19 C12N5/00.101 C07K16/32 C07K16/46 C12N5/00.102 C12P21/08 C07K16/28 A61K39/395.N A61P35/00 A61K39/395.T A61K39/395.Y G01N33/53.D		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA53 4B024/BA54 4B024/BA63 4B024/CA02 4B024/CA07 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA03 4B024/GA14 4B024/GA18 4B024/GA27 4B064/AG26 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA91X 4B065/AA91Y 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/AA14 4C085/CC03 4C085/CC05 4C085/CC23 4C085/DD62 4C085/DD63 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA28 4H045/EA51 4H045/FA72 4H045/FA74 4H045/GA26		
优先权	2007068064 2007-03-16 JP 2007223803 2007-08-30 JP		
其他公开文献	JPWO2008114733A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明的目的是涉及由克劳丁4 (以下称为Claudin-4) 基因编码的多肽和/或由克劳丁3 (以下称为CLDN3) 基因编码的多肽的疾病。本发明提供了用于诊断的治疗剂和单克隆抗体或使用它们的方法。本发明具体地识别CLDN4的细胞外区域的三维结构, 并且具体地识别CLDN4和CLDN3的细胞外区域的三维结构或与细胞外区域结合的单克隆抗体或抗体片段, 以及与细胞外区域结合的单克隆抗体或抗体片段, 产生该抗体的杂交瘤, 编码该抗体的DNA, 包含该DNA的载体, 通过对该载体进行转化而获得的转化体, 提供了一种使用杂交瘤或转化体产生抗体或抗体片段的方法, 以及使用该抗体或抗体片段的涉及由CLDN4和/或CLDM3基因编码的多肽的疾病的诊断或治疗剂。

Antibody	CLDN 発現細胞				
	CLDN3	CLDN4	CLDN5	CLDN6	CLDN9
KM3900	-	+	-	-	-
KM3907	+	+	-	-	-