

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5464698号
(P5464698)

(45) 発行日 平成26年4月9日 (2014.4.9)

(24) 登録日 平成26年1月31日 (2014.1.31)

(51) Int. Cl.	F I
G O 1 N 33/574 (2006.01)	G O 1 N 33/574 Z
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 E
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00

請求項の数 4 (全 20 頁)

(21) 出願番号	特願2009-520639 (P2009-520639)	(73) 特許権者	000001029
(86) (22) 出願日	平成20年6月26日 (2008.6.26)		協和発酵キリン株式会社
(86) 国際出願番号	PCT/JP2008/061669		東京都千代田区大手町1丁目6番1号
(87) 国際公開番号	W02009/001904	(74) 代理人	100105647
(87) 国際公開日	平成20年12月31日 (2008.12.31)		弁理士 小栗 昌平
審査請求日	平成23年6月24日 (2011.6.24)	(74) 代理人	100105474
(31) 優先権主張番号	60/946, 278		弁理士 本多 弘徳
(32) 優先日	平成19年6月26日 (2007.6.26)	(74) 代理人	100108589
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 市川 利光
		(73) 特許権者	510097747
			独立行政法人国立がん研究センター
			東京都中央区築地五丁目1番1号
		(74) 代理人	100105647
			弁理士 小栗 昌平

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗癌抗体を有効成分とする医薬を投与する患者のスクリーニング方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

固形がんに対する抗体が認識する抗原をがん細胞表面上に発現している固形がん患者の試料中の E-カドヘリンの細胞接着機能が、標準サンプルのカドヘリンの細胞接着機能と比較して、低下または欠損している固形がん患者を選択することを特徴とする、固形がんに対する抗体を有効成分とする医薬を投与する固形がん患者、または、固形がんに対する抗体を有効成分とする医薬の有効率が高い固形がん患者のスクリーニング方法。

【請求項2】

固形がんに対する抗体が、抗 P E R P 抗体である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

E-カドヘリンの細胞接着機能を遺伝子工学的な方法または免疫学的方法により測定する請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

免疫学的方法が、試料にカドヘリンを認識する抗体を反応させ、その反応性を測定する方法である請求項3に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、抗癌抗体を有効成分とする医薬を投与する患者のスクリーニングする方法、抗癌抗体を有効成分とする医薬の有効率が高い患者のスクリーニング方法、抗癌抗体を有

効成分とする医薬の有効率を高める方法、および抗癌抗体を有効成分とする医薬の投与方法に関する。

【背景技術】

【0002】

抗体医薬は、抗体を有効成分とした薬剤である。抗体は、特定の分子（抗原）に特異的に結合する性質を有する（非特許文献1）。

【0003】

抗体医薬は、がん患者の治療において有用である。現在、抗HER2抗体のトラスツズマブ（Trastuzumab、Herceptin：登録商標）や、抗EGFR抗体のセツキシマブ（Cetuximab、Erbix：登録商標）（非特許文献1）などが上市されている。

10

【0004】

抗体医薬が投与される患者は、抗癌抗体の投与前にがん細胞上の抗原の発現を解析する。抗体医薬が効果を示すには、抗体分子が、がん細胞の抗原に結合する必要がある（非特許文献1）。従って、がん細胞上に抗原発現が認められる患者をスクリーニングし、選別された患者にのみ抗体医薬を投与する方法が行われている（非特許文献2）。具体例として、トラスツズマブを投与する前のハーセプテスト（登録商標）が挙げられる。ハーセプテストは、トラスツズマブの抗原であるHER2発現の検査キットであり、患者の癌組織のHER2発現量を、免疫組織染色法で測定する検査である（非特許文献2）。ハーセプテストにより、HER2発現が認められた患者にのみ、トラスツズマブは投与される（非特許文献3）。

20

【0005】

抗体医薬を投与する患者のスクリーニングは、副作用の点で重要である。また、効果が期待できない患者に対して投与すべきではない。トラスツズマブの副作用として心毒性が（非特許文献4）、セツキシマブの副作用として重篤なニキビ様皮膚紅斑などが（非特許文献5）、それぞれ報告されている。

【0006】

しかしながら、抗原発現の有無で患者を選別したとしても、全ての患者で抗体医薬が奏功するわけではない。ハーセプテストで選別したHER2高発現の乳がん患者を対象とした第2相臨床試験において、ハーセプチンの奏功率は36%であったと報告されている（非特許文献6）。

30

【0007】

E-カドヘリンは、細胞膜表面に局在し、細胞と細胞との接着の形成およびその維持に関与している（非特許文献7）。E-カドヘリンは、E-カドヘリン単独で機能するのではなく、いくつかの分子と協働することで機能する（非特許文献7）。カテニンは、E-カドヘリンの細胞内ドメインに結合することにより、E-カドヘリンと細胞骨格との連結を行っている（非特許文献7）。

【0008】

がん患者において、E-カドヘリン機能の欠損が知られている。E-カドヘリン機能の欠損としては、E-カドヘリントンパク質の発現量が低下する場合と、E-カドヘリントンパク質と協働する分子の発現量が低下する場合などが知られている（非特許文献8）。胃癌患者の14%においてE-カドヘリントンパク質の発現の欠損が認められ、さらにE-カドヘリンの発現が認められた患者のうち48%の患者においてE-カドヘリンが細胞膜上に局在していなかったことが、知られている（非特許文献9）。

40

【0009】

E-カドヘリン機能の欠損と、患者の予後とが関連することが報告されている（非特許文献10）。例えば、放射線療法やホルモン療法を施されている前立腺がん患者のうち、E-カドヘリンのタンパク質の発現量が低い患者は、E-カドヘリンのタンパク質発現が正常な患者と比べて、予後不良であるとの報告がある（非特許文献10）。

【0010】

50

ヒト大腸がん細胞株を移植したマウスモデルにおいて、抗カドヘリン抗体の投与によりカドヘリン機能が中和された結果、抗HLA抗体の延命効果が増強されることが報告されている（非特許文献11）。この報告において、カドヘリン機能を中和するような薬剤は、抗体医薬の作用増強剤として有用である可能性が示唆されている（非特許文献11）。

しかしながら、がん細胞が生来有するカドヘリン機能の状態を調べることにより、抗癌抗体医薬が有効性な患者をスクリーニングできることは知られていない。

【非特許文献1】Nature Reviews Cancer 2006; 6: 714-27

【非特許文献2】European Journal of Cancer 2000; 36: 170-6

【非特許文献3】Clinical Cancer Research 2001; 7: 1669-75

【非特許文献4】British Journal of Cancer 2006; 94: 1016-20

【非特許文献5】Journal of Clinical Oncology 2004; 22: 1201-8

【非特許文献6】Journal of Clinical Oncology 2005; 23: 2162-71

【非特許文献7】Molecular Cell Biology Research Communications 1999; 2: 77-85

【非特許文献8】Cancer and Metastasis Review 1999; 18: 15-30

【非特許文献9】Annals of Surgery 2005; 242: 676-83

【非特許文献10】Cancer Research 1994; 54: 3929-33

【非特許文献11】Cancer Research 2002; 62: 6891-900

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

抗癌抗体医薬を患者に投与する場合は、抗体医薬の有効性を予測するために、投与の前に抗癌抗体が認識するがん細胞上の抗原の発現を解析する。しかしながら、抗原が発現している患者をスクリーニングして抗体医薬を投与したとしても、それらの患者で該抗体医薬が奏功するとは限らない。また、抗体医薬は高価であるため、有効性が期待される患者をあらかじめスクリーニングして投与することが求められる。以上のことから、抗癌抗体医薬を投与する前に、抗癌抗体医薬の有効性が期待できる患者をスクリーニングする方法が、求められている。

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明は、以下の(1)～(22)に関する。

(1) 抗癌抗体が認識する抗原を発現している患者から試料を採取し、該試料中のカドヘリン機能を測定し、カドヘリン機能が低下または欠損している患者を選択することを特徴とする、抗癌抗体を有効成分とする医薬を投与する患者のスクリーニング方法。

(2) カドヘリンが、E-カドヘリンである(1)に記載の方法。

(3) 患者が固形がん患者である(1)または(2)に記載の方法。

(4) 抗癌抗体が、固形がんに対する抗体である、(1)～(3)のいずれか1項に記載の方法。

(5) 抗癌抗体が、抗PERP抗体である、(1)～(4)のいずれか1項に記載の方法。

(6) カドヘリン機能を測定する方法が、遺伝子工学的な方法または免疫学的方法である(1)～(4)のいずれかの1項に記載の方法。

(7) 免疫学的方法が、試料にカドヘリンを認識する抗体を反応させ、その反応性を測定する方法である(6)に記載の方法。

(8) 抗癌抗体が認識する抗原を発現している患者から試料を採取し、該試料中のカドヘリン機能を測定し、カドヘリン機能が低下または欠損している患者を選択することを特徴とする、抗癌抗体を有効成分とする医薬の有効率が高い患者のスクリーニング方法。

(9) カドヘリンが、E-カドヘリンである(8)に記載の方法。

(10) 患者が固形がん患者である(8)または(9)に記載の方法。

(11) 抗癌抗体が、固形がんに対する抗体である、(8)～(10)のいずれか1項に記載の方法。

(12) 抗癌抗体が、抗PERP抗体である、(8)～(11)のいずれか1項に記載の方法。

10

(13) カドヘリン機能を測定する方法が、遺伝子工学的的方法または免疫学的方法である(8)～(12)のいずれかの1項に記載の方法。

(14) 免疫学的方法が、試料にカドヘリンを認識する抗体を反応させ、その反応性を測定する方法である(13)に記載の方法。

(15) 抗癌抗体が認識する抗原を発現している患者から試料を採取し、当該試料中のカドヘリン機能を測定し、カドヘリン機能が低下または欠損している患者を、抗癌抗体を有効成分とする医薬を投与する患者として選択することを特徴とする、抗癌抗体を有効成分とする医薬の有効率を高める方法。

(16) カドヘリンが、E-カドヘリンである(15)に記載の方法。

20

(17) 患者が固形がん患者である(15)または(16)の方法。

(18) 抗癌抗体が、固形癌に対する抗体である、(15)～(17)のいずれか1項に記載の方法。

(19) 抗癌抗体が、抗PERP抗体である、(15)～(18)のいずれか1項に記載の方法。

(20) カドヘリン機能を測定する方法が、遺伝子工学的的方法または免疫学的方法である(15)～(19)のいずれかの1項に記載の方法。

(21) 免疫学的方法が、試料にカドヘリンを認識する抗体を反応させ、その反応性を測定する方法である(20)に記載の方法。

(22) (1)～(14)のいずれか1項に記載の方法によりスクリーニングされた患者に、抗癌抗体を有効成分とする医薬を投与することを特徴とする、抗癌抗体を有効成分とする医薬の投与方法。

30

【発明の効果】

【0013】

本発明は、抗癌抗体が認識する抗原を発現している患者から試料を採取し、該試料中のカドヘリン機能を測定し、カドヘリン機能が低下または欠損している患者を選択することを特徴とする、抗癌抗体を有効成分とする医薬を投与するための患者のスクリーニング方法、抗癌抗体を有効成分とする医薬の有効率が高い患者のスクリーニング方法、および抗癌抗体を有効成分とする医薬の有効率を高める方法を提供する。

【図面の簡単な説明】

40

【0014】

【図1】図1は、マウス *in vivo* モデルにおける抗PERP抗体KM3481の抗腫瘍活性を検討した結果を示す。マウス *in vivo* モデルに用いた細胞株の名前を、各グラフに標記した。プロットは群ごとのV/V0の平均値を、エラーバーは標準偏差をそれぞれ示す(n=5)。黒丸実線は生理食塩水を投与した群、白丸実線はKM3481を投与した群の値である。＊は、それぞれの時点においてP値が0.05以下であることを示す。

【図2】図2は、マウス *in vivo* モデルにおける抗PERP抗体KM3481の抗腫瘍活性を検討した結果を示す。マウス *in vivo* モデルに用いた細胞株の名前を、各グラフに標記した。プロットは群ごとのV/V0の平均値を、エラーバーは標準偏差を

50

それぞれ示す（ $n = 5$ ）。黒丸実線は生理食塩水を投与した群、白丸実線はKM3481を投与した群の値である。

【図3】図3は、マウス *in vivo* モデルにおける抗PERP抗体KM3481の抗腫瘍活性を検討した結果を示す。マウス *in vivo* モデルに用いた細胞株の名前を、各グラフに標記した。プロットは個体ごとの腫瘍体積の値を示す。黒丸実線は無処置のマウス、白丸実線はKM3481を投与したマウスの値である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0015】

本発明は、抗癌抗体が認識する抗原を発現している患者から試料を採取し、その試料中のカドヘリン機能を測定し、がん細胞が生来持つカドヘリン機能が低下または欠損している患者を選択することにより、従来よりも抗癌抗体の有効率が高く、より抗癌抗体が有効な患者をスクリーニングする方法を提供する。

10

本発明におけるがん（癌）とは、造血器、上皮組織、または非上皮組織に発生する悪性腫瘍であり、上皮および非上皮組織に発生する癌を固形癌という。

【0016】

カドヘリンとは、カドヘリンモチーフと呼ばれる特徴的なアミノ酸の繰り返し配列を含む分子群をいい、カドヘリンモチーフを有する分子群をカドヘリンスーパーファミリーという。

カドヘリンは、細胞同士の接着および結合に関与する機能分子である。従って、本発明でいう、カドヘリン機能の低下または欠損とは、カドヘリンの細胞接着能が低下または欠損した結果、細胞－細胞同士の接着が低下または欠損することをいう。

20

細胞同士の接着および結合の様態としては、密着結合（tight junction）、固定結合（anchoring junction）、連絡結合（communicating junction）などが挙げられ、固定結合は、さらに接着結合（adherens junction）、デスモソーム（desmosome）、ヘミデスモソーム（hemidesmosome）などが挙げられる（細胞の分子生物学第3版、Bruce Albertsら編、東京、教育社（1996）、p. 949－1009）。

【0017】

カドヘリンスーパーファミリーとしては、接着結合（adherens junction）において機能するカドヘリン、あるいはデスモソーム（desmosome）において機能するカドヘリンなどが挙げられる。

30

接着結合で機能するカドヘリンスーパーファミリーとしては、E－カドヘリン（別名カドヘリン1）、カドヘリン2（N－カドヘリン）、カドヘリン3（P－カドヘリン）、カドヘリン4（R－カドヘリン）、カドヘリン5（VE－カドヘリン）、カドヘリン6（K－カドヘリン）、カドヘリン7、カドヘリン8、カドヘリン9（T1－カドヘリン）、カドヘリン10（T2－カドヘリン）、カドヘリン11（OB－カドヘリン）、カドヘリン12（N－カドヘリン2）、カドヘリン13（H－カドヘリン）、カドヘリン15（M－カドヘリン）、カドヘリン16（KSP－カドヘリン）、カドヘリン17（LI－カドヘリン）、カドヘリン18、カドヘリン19、カドヘリン20、カドヘリン22、カドヘリン23、カドヘリン24、カドヘリン26などが挙げられ、好ましくは、E－カドヘリンが挙げられる。

40

デスモソームにおいて機能することができるカドヘリンとしては、デスモグレイン－1、デスモグレイン－2、デスモグレイン－3、デスモグレイン－4、デスモコリンなどが挙げられる。

本発明では、抗癌抗体を投与する前に、抗癌抗体の有効性が期待できる患者をスクリーニングするために、まず初めに抗癌抗体が認識する抗原を発現している患者から試料を採取し、カドヘリン機能を測定し、カドヘリン機能が低下または欠損している患者を選別する。

本発明において、抗癌抗体が認識する抗原を発現している患者の試料としては、体液、血液、凍結組織切片、ホルマリン固定／パラフィン包埋切片、組織抽出液などが挙げられ

50

、これら組織から抽出したDNAおよびmRNAなども含まれる。

本発明において患者とは、特に制限は無いが、がんと疑われる患者が好ましく、固形癌と疑われる患者が特に好ましい。固形がんの具体例としては、乳癌、子宮体癌、子宮頸癌、卵巣癌、前立腺癌、膀胱癌、腎癌、胃癌、食道癌、肝癌、胆道癌、大腸癌、直腸癌、膵癌、肺癌、口頭頸部癌、骨肉腫、胸腺腫、中皮腫、メラノーマまたは脳腫瘍などが挙げられ、これら原発巣の癌に伴う転移も含まれる。

【0018】

カドヘリン機能の低下または欠損とは、カドヘリン分子、カドヘリンと協働する分子、またはカドヘリンの発現を制御する分子の発現量の異常、これらタンパク質分子のアミノ酸の置換、欠損、またはこれら分子の遺伝子の異常により、カドヘリン機能が低下または欠損することがあげられる。

10

カドヘリン分子、カドヘリンと協働する分子、またはカドヘリンの発現を制御する分子の発現量の異常としては、該タンパク質の発現が上昇または低下した結果、カドヘリンタンパク質発現の低下、カドヘリンと協働するタンパク質発現の低下することなどがあげられ、これによりカドヘリン分子が有する細胞接着機能が低下または欠損することとなる。

また、カドヘリン分子、カドヘリンと協働する分子、またはカドヘリンの発現を制御する分子の遺伝子の異常としては、mRNAの転写に關与するDNA上のプロモーター、エンハンサー、非翻訳領域などの配列に、置換、欠損および挿入などが生じ、遺伝子発現が正常に制御されないことなどがあげられ、その結果、カドヘリン分子、カドヘリンと協働する分子またはカドヘリンの発現を制御する分子の発現の異常が引き起こされる。

20

更に、カドヘリン分子、カドヘリンと協働する分子、またはカドヘリンの発現を制御する分子の遺伝子の異常としては、該タンパク質をコードするDNAに、置換、欠損および挿入など遺伝子変異が生じることなどがあげられ、その結果、カドヘリン分子またはカドヘリンと協働する分子に、アミノ酸付加、欠質または置換が生じ、カドヘリン分子が有する細胞接着機能が低下または欠損することとなる。

本発明のカドヘリン機能を測定する方法としては、カドヘリンの細胞接着能を測定する他に、カドヘリン自体あるいはカドヘリンと協働する分子の発現量、細胞内局在、変異、またはこれらのタンパク質の遺伝子をコードする染色体の異常を測定する方法などの方法が挙げられる。

【0019】

30

カドヘリンと協働する分子としては α カテニン、 β カテニン、 γ カテニン、ビンキュリン、 α -アクチニン、プラコグロビン、プラコフィリン、デスモプラキン、アクチン、ケラチンなどが挙げられる。カドヘリンの発現を制御する分子としては、Slug/Snailファミリー、SIP1 (survival of motor neuron protein interacting protein 1)、Twist、ZEB1 (Zinc finger E-box binding homeobox 1) などが挙げられる。

【0020】

本発明において、カドヘリン機能の測定方法としては、患者の試料中のカドヘリン機能を測定する方法であればどんな方法であってもよいが、具体的には、カルシウム含有培地で癌細胞を旋回培養した場合に、細胞の集合塊をつくるか否かによりカドヘリンの細胞接着能を測定する方法 (Science, 251, 1451-1455, 1991) が挙げられる。カドヘリンおよびカドヘリンと協働する分子のタンパク質または遺伝子の解析方法としては、免疫学的方法、遺伝子工学的方法などがあげられるが、好ましくは免疫学的方法が挙げられる。免疫学的方法としては、患者の試料にカドヘリンを認識する抗体を反応させ、その反応性を測定する免疫組織化学法が好ましく用いられる。

40

【0021】

免疫学的方法としては、イムノアッセイ法、イムノブロットィング法、免疫沈降反応凝集反応、補体結合反応、溶血反応、免疫金法、クロマトグラフィー法、免疫組織化学法など抗原抗体反応を利用した方法であればいかなるものも包含されるが、好ましくは免疫組

50

織化学法が挙げられる。

遺伝子工学的的方法としては、R T - P C R法、ノーザンブロッティング法、i n s i t uハイブリダイゼーション法、D N Aマイクロアレイ法等が挙げられる。

イムノアッセイ法は、各種標識を施した抗原または抗体を用いて、抗体または抗原を検出あるいは定量する方法であり、抗原または抗体の標識方法に応じて、放射免疫検出法（R I A）、酵素免疫検出法（E I AまたはE L I S A）、蛍光免疫検出法（F I A）、発光免疫検出法（l u m i n e s c e n t i m m u n o a s s a y）、物理化学的検出法、フローサイトメトリーなどがあげられる。

放射免疫検出法で用いる放射性標識体としては、任意の公知（石川榮次ら編、酵素免疫測定法、医学書院、1987年発行）の放射性同位元素を用いることができる。例えば、 ^{32}P 、 ^{125}I 、 ^{131}I 等を用いることができる。

酵素免疫検出法で用いる酵素標識体としては、任意の公知（石川榮次ら編、酵素免疫測定法、医学書院、1987年発行）の酵素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、ペルオキシダーゼ、ルシフェラーゼ等を用いることができる。

【0022】

発光免疫検出法で用いる発光標識体としては、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）〕の発光体を用いることができる。例えば、アクリジニウムエステル、ロフィン等を用いることができる。

蛍光免疫検出法、またはフローサイトリーで用いる蛍光標識体としては、任意の公知（川生明著、蛍光抗体法、ソフトサイエンス社製、1983年発行）の蛍光物質を用いることができる。例えば、F I T C、T R I T C、P E、C y 5、P C 5、ローダミン等の蛍光物質を用いることができる。

免疫組織化学法で用いる検出方法としては、酵素免疫検出法、または蛍光免疫検出法で用いる酵素標識体、あるいは蛍光標識体を用いて検出する方法や、ペルオキシダーゼ-抗ペルオキシダーゼ複合法、および免疫金法などが挙げられる。

物理化学的検出方法としては、p a r t i c l e c o u n t i n g i m m u n o a s s a y（P C I A）法、t u r b i d i m e t r i c i m m u n o a s s a y（T I A）法などが挙げられる。

【0023】

免疫組織化学法の具体的な方法を以下に示す。

患者の試料に、カドヘリンに特異的に反応する抗体（一次抗体）を反応させる。次に、上記に示す酵素、蛍光あるいは放射性同位元素などが標識された一次抗体に特異的に反応する抗体（二次抗体）を用いて、カドヘリンの発現を測定する。

上記の測定方法を用いて、カドヘリンの発現が低下または欠損している患者を選別することにより、抗癌抗体を有効成分とする医薬を投与する患者をスクリーニングする。より具体的には、以下の方法により患者をスクリーニングする。

カドヘリン抗体による反応が、陽性あるいは陰性の、細胞株または異種移植組織切片を、標準サンプルとして準備し、標準サンプルと、患者から得られた試料について免疫組織染色を行う。カドヘリン陰性あるいは陽性の標準サンプルと、患者から得られた試料との染色状態を比較して、細胞膜を中心に明らかな染色像が認められない患者を、カドヘリン機能が欠損または欠損している患者として選別し、当該選別した患者を。抗癌抗体を有効成分とする医薬を投与する患者とする。

また、ヒト組織におけるカドヘリンの染色が、陰性、弱陽性、陽性または強陽性である標準サンプルをそれぞれ準備し、標準サンプルと比較して弱陽性および陰性の染色像の患者を、カドヘリン発現が低下または欠損した患者として選択してもよい。

その他、上記記載の標準サンプルおよび患者サンプル組織を準備し、該組織からタンパク質、D N Aまたはm R N Aなどを抽出して、標準サンプルと患者サンプルとのカドヘリンの発現を比較し、標準サンプルと比較してその発現量が低下している患者を、カドヘリン発現が低下または欠損している患者としてもよい。

【0024】

上記に例示された方法により、カドヘリン機能が低下または欠損している患者を選別した後、これらの患者を抗癌抗体を有効成分とする医薬を投与する患者とし、当該医薬を投与する。この投与方法により、抗癌抗体を有効成分とする医薬の有効率を高めることができる。

本発明において抗体とは、抗体および該抗体断片、またはそれらの誘導体を包含しており、分子の形態および作用機構は限定されない。

本発明における抗体としては、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体などが挙げられるが、好ましくはモノクローナル抗体が用いられる。

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が、好ましくは遺伝子組換え抗体が用いられる。

遺伝子組換え抗体としては、ヒト化抗体、ヒト抗体または該抗体断片など、遺伝子組換えにより製造される抗体を包含する。

本発明におけるヒト化抗体は、ヒト型キメラ抗体およびヒト型CDR移植抗体を包含する。ヒト型キメラ抗体とは、ヒト以外の動物の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。

ヒト型CDR移植抗体とは、ヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLのCDRのアミノ酸配列をヒト抗体のVHおよびVLの適切な位置に移植した抗体をいう。

ヒト抗体とは、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。

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、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、遺伝子工学的な方法により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。

【0025】

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いう。具体的には、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、通常のヒト以外の動物で行われているハイブリドーマ作製方法により、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。

【0026】

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。

Fabは、IgGを蛋白質分解酵素パパインで処理して得られる断片のうち（H鎖の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。

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抗体断片である。

Fab'は、上記F(ab')₂のヒンジ領域のジスルフィド結合を切断した、分子量約

10

20

30

40

50

5万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

s c F vは、1本のVHと1本のVLとを、適当なペプチドリンカー（以下、Pと表記する）を用いて連結したVH-P-VL、またはVL-P-VHポリペプチドで、抗原結合活性を有する抗体断片である。

D i a b o d yは、s c F v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。

d s F v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、R e i t e rらにより示された方法〔P r o t e i n E n g i n e e r i n g, 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。

C D Rを含むペプチドは、VHまたはVLのC D Rの少なくとも1領域以上を含んで構成される。複数のC D Rを含むペプチドは、直接または適当なペプチドリンカーを介して結合させることができる。また、C D Rを含むペプチドは、F m o c法（フルオレニルメチルオキシカルボニル法）、t B o c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。

【0027】

本発明における抗癌抗体とは、上記、癌に対する抗体であれば特定の作用機序に限定されない。抗癌抗体の作用機序としては、抗体依存性細胞傷害活性（以下、A D C C活性という）、補体依存性細胞傷害活性（以下、C D C活性という）などが挙げられる。A D C C活性とは、抗体依存的に、生体内の免疫細胞を介してがん細胞を傷害する活性である。C D C活性とは、生体内の補体を介してがん細胞を傷害する活性である。

【0028】

本発明における抗癌抗体の作用機序としては、抗体が抗原に結合することによって、抗原の機能を修飾する活性であってもよい。抗体が抗原に結合することによって、抗原の機能を修飾する活性を有する抗癌抗体とは、抗原が生来持つ生理活性を、抗原抗体反応によって修飾することで、がん細胞の増殖・生存を阻害する抗体などが挙げられる。

【0029】

本発明における抗体または該抗体断片の誘導体としては、細胞傷害性のある物質を抗体に共有結合させた誘導体、細胞傷害性のある物質を分子間力結合によって結合させる分子を、抗体に共有結合させた誘導体、または、細胞傷害性のあるプロドラッグを共有結合させた誘導体などが挙げられる。

【0030】

細胞傷害性のある物質とは、がん細胞を傷害する能力を有する物質であれば、いかなるものでも良い。好ましくは、放射性同位元素、タンパク質または化学療法剤などが挙げられる。

がん細胞を傷害する潜在能力を有する放射性同位元素の例としては、 ^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{90}Y 、 ^{64}Cu 、 ^{199}Tc 、 ^{77}Lu 、 ^{211}At などが挙げられる。

患者の免疫系を活性化して、がん細胞を間接的に傷害する能力を有するタンパク質の例としては、免疫担当細胞を活性化するサイトカインが好適であり、例えば、ヒトインターロイキン2（h I L - 2）、ヒト顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（H G M - C S F）、ヒトマクロファージコロニー刺激因子（H M - C S F）、ヒトインターロイキン12（h I L - 12）等が挙げられる。また、がん細胞を直接傷害する、リシン、a u r i s t a t i nやジフテリア毒素などの毒素を用いることができる。

がん細胞を傷害する能力を有する化学療法剤の例としては、ナイトロジェンマスタード、サイクロフォスファミドなどのアルキル化剤、5-フルオロウラシル、メソトレキセートなどの代謝拮抗剤、ダウノマイシン、ブレオマイシン、マイトマイシンC、ダウノルビシン、ドキソルビシンなどの抗生物質、ビンクリスチン、ビンブラスチン、ビンデシンのような植物アルカロイド、タモキシフェン、デキサメタゾンなどのホルモン剤、シスプラ

10

20

30

40

50

チンなどの白金製剤、Maytansinoidおよび該誘導体などの抗癌剤〔臨床腫瘍学、日本臨床腫瘍研究会編、癌と化学療法社（1996）〕、またはハイドロコチゾン、プレドニゾンなどのステロイド剤、アスピリン、インドメタシンなどの非ステロイド剤、金チオマレート、ペニシラミンなどの免疫調節剤、サイクロフォスファミド、アザチオプリンなどの免疫抑制剤、マレイン酸クロルフェニラミン、クレマシチンのような抗ヒスタミン剤等の抗炎症剤〔炎症と抗炎症療法、医歯薬出版株式会社（1982）〕などが挙げられる。

【0031】

がん細胞を傷害する能力を有する細胞傷害性のある物質を、分子間力結合によって結合させる分子の具体例としては、methy lbenzy ldi ethylene- tri amin e penta acetic acid (MX-DTPA) が挙げられる。

10

細胞傷害活性のあるプロドラッグとしては、バルガンシクロビル、アシクロビル、イリノテカン、テガフル等が挙げられる。

【0032】

本発明において抗癌抗体が認識する抗原は、がん細胞表面上に発現していればいかなる抗原であってもよく、特定の抗原に限定されるものではない。

例えば、4回膜貫通型の膜タンパク質、細胞膜上に発現するサイトカイン、増殖因子、サイトカインあるいはケモカインの受容体、cluster of different iation antigen (CD抗原)、免疫制御タンパク質、トランスポーター、接着関連分子、がん胎児性抗原、糖鎖、糖タンパク質、ガングリオシド、がん細胞膜表面上の糖鎖または糖タンパク質に結合したサイトカインまたはケモカインなどが挙げられる。

20

【0033】

がん細胞膜上に発現している4回膜貫通型のタンパク質とは、がん細胞の表面上に発現している特徴を有していればよく、その分子はいかなる機能の分子でもよい。具体例としては、CD20、CD81、D6. 1A/CO-029/TM4SF3、CD63 (HOP-26、LAMP-3)、tetraspanin-5 (Tspan-5、Tm4sf9)、CD82 (KAI1)、CD151 (PETA-3/SFA-1)、CD9 (MRP-1)、SDTM4SF、peripherin-2 (peripherin/rds)、CD53 (panleukocyte Ag)、OSP/claudin-11 (OAP-1, Tspan-3)、KAI1 COOH-terminal interacting tetraspanin (KITENIN)、CD37、T-cell acute lymphoblastic leukemia antigen-1 (TALLA-1)、CO-029、TM4SF5 (transmembrane 4 superfamily, member 5)、ROM-1 (rod outer segment membrane protein 1)、new EST tetraspan (NET-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7)、TSSC6 (Phemx)、MP20、Tspan-5、TM4SF4 (II-TMP)、TM4-B、divalent metal transporter (DMT1)、stargazin (TARP)、occludin、myelin and lymphocyte protein (MAL)、claudin family (CLDN-1, -2, -3, -4, -5, -7, -8, -9, -10, -11, -12-16, -18)、claudin like protein of 24kDa (CLP24)、peripheral myelin protein (PMP22)、p53 apoptosis effector related to PMP22 (PERP)、growth arrest specific 3 (gas3)、PAS11、connexin、Epithelial membrane protein-2 (EMP2)、plasmolipin、brain cell membrane protein 1 (BCMP1)、platelet-endothelial tetraspan antigen 3 (PETA-3)、oligodendrocyte-specific protein (OS

30

40

50

P)、sarcospan (SPN)、MVP17 (rMAL、VIP17、MAL)、uroplakin 1B (UPK1B)、connexin32 (Cx32)、TAPA-1 (target of the antiproliferative antibody 1)、NAG-2、C. perfringens enterotoxin receptor (CPE-R) および ART-1 (AML1-regulated transmembrane protein 1) などが挙げられる。

【0034】

細胞膜上に発現するサイトカインとしては、例えば細胞膜に貫通する形で合成されるサイトカインや、タンパク質翻訳後修飾を受ける前の Latent 型が細胞表面に結合しているサイトカインなどが挙げられる。

10

細胞膜に貫通する形で合成されるサイトカインとしては、例えば、TNF α (tumor necrosis factor alpha)、HB-EGF (heparin binding-EGF like growth factor)、TNF β 、CD40リガンド、OX40リガンド、CD70、RANKL (receptor activator of nuclear factor kappa B ligand)、TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor)、FASリガンド、TWEAK、IL-1 α 、IL-1 β 、リンホタクチン、CD30リガンド、4-1BBリガンドなどが挙げられる。

タンパク質翻訳後修飾を受ける前の Latent 型が細胞表面に結合する性質を有するサイトカインとしては、例えば TGF β ファミリーなどが挙げられる。

20

【0035】

増殖因子の受容体としては、増殖因子のシグナルを受容する細胞膜表面上のタンパク質であればいかなるものでも良い。例えば、human EGF receptor 1 (HER1)、HER2、HER3、HER4、insulin receptor、insulin-like growth factor I receptor (IGF-IR)、IGF-IR、insulin receptor related receptor、platelet derived growth factor receptor (PDGFR) α 、PDGFR β 、CSF1R、c-kit、c-fms、fetus liver kinase receptor、VEGFR1 (Flt-1)、VEGFR2 (KDR)、VEGFR3 (Flt-4)、fibroblast growth factor (FGF) receptor group の FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4 などが挙げられる。

30

【0036】

サイトカインの受容体としては、サイトカインのシグナルを受容する細胞膜表面上のタンパク質であればいかなるものでも良い。サイトカイン受容体の具体例としては、Epo (erythropoietin)、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-9、IL-11、IL-13、G-CSF (granulocyte colony stimulating factor)、IL-15、GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor)、OSM (oncostatin M)、LIF (leukemia inhibitory factor)、IFN γ (interferon-gamma)、IFN α 、IFN γ 、IFN β 、TGF β (transforming growth factor beta)、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-1RA、IL-10、IL-12、MIF (macrophage migration inhibitory factor)、IL-16、IL-17、IL-18 および IL-23 などが挙げられる。

40

【0037】

ケモカインの受容体としては、ケモカインのシグナルを受容する細胞膜表面上のタンパク質であればいかなるものでも良い。例えば、CCR1 {chemokine (C-C motif) receptor 1}、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、C

50

CR6、CCR7、CCR8、CCR9、CCR10、CXCR1 {chemokine (C-X-C motif) receptor}、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR5、CXCR6、XCR1 {chemokine (C motif) receptor 1} およびCX3CR1 {chemokine (C-X3-C) receptor 1} などが挙げられる。

【0038】

CD抗原は、がん細胞に発現していればいかなるものでも良く、例えば、上皮性の細胞に発現するCD抗原が挙げられる。具体的には、CD1、CD9、CD10、CD13、CDw17、CD21、CD24、CD26、CD29、CD39、CD40、CD44、CD46、CD47、CD52、CD55、CD58、CD60、CD66、CD73、CD74、CD75、CD77、CD81、CD88、CD91、CD92、CD98、CD99、CD104、CD109、CD110、CD111、CD112、CDw113、CD116、CD118、CD120、CD124、CD129、CD133、CDw136、CDw137、CD138、CD142、CD143、CDw145、CD151、CD164、CD165、CD166、CD167、CD174、CD175、CD176、CD178、CD224、CD227、CD234、CD239、CD249、CD295、CD296、CD324、CD326、CD331、CD332、CD333、CD334およびCD339などがあげられる。

【0039】

免疫制御タンパク質としては、免疫を調節するがん細胞膜表面上のタンパク質であればいかなるものでも良い。例えば免疫に関わる細胞に対して直接シグナルを流して、その細胞の機能を調節するタンパク質や、生体内の微小環境をに作用し、免疫細胞の機能を間接的に調節するタンパク質が包含される。具体的には、HLA-A (human leukocyte antigen-A)、HLA-B、HLA-C、HLA-DP、HLA-DQ、HLA-DR、HLA-E、HLA-F、HLA-G、MIC-A、MIC-B、HLA-DO、B7.1、B7.2、B7-H1、B7-H2、B7-DC、B7-H3、B7-H4、Adenosin deaminase、dipeptidyl peptidase IV、ADAM (a disintegrin and metalloproteinase domain) family、fibroblast activation protein (FAP)、RCAS-1、Thioredoxinなどが挙げられる。

【0040】

トランスポーターとしては、細胞膜を介した細胞内外のイオン並びに、有機物質の輸送を行う細胞膜表面上のタンパク質であればいかなるものでも良い。トランスポーターとは、ATPのエネルギーを利用して輸送を行うABC (ATP binding cassette) ファミリーと、ATPのエネルギーを利用しないで輸送を行うSLC (Solute carrier) ファミリーの二つが挙げられるが、本発明においてトランスポーターとしてはいずれでもよい。

ABCトランスポーターとしては、MRP1 {Multidrug resistance-associated protein 1、別名ATP-binding cassette sub-family C member 1 (ABCC1)}、MRP2 (ABCC2)、MRP3 (ABCC3)、MRP4 (ABCC4)、MRP5 (ABCC5)、MRP6 (ABCC6)、MRP8 (ABCC8)、MRP9 (ABCC9)、MRP10 (ABCC10)、MRP11 (ABCC11)、MRP12 (ABCC12)、MRP13 (ABCC13)、MXR、MDR1 {Multidrug resistance protein 1、別名ATP-binding cassette sub-family B member 1 (ABCB1)}、MDR4 (ABCB4)、MDR5 (ABCB5)、MDR6 (ABCB6)、MDR7 (ABCB7)、MDR8 (ABCB8)、MDR9 (ABCB9)、MDR10 (ABCB10)、MDR11 (ABCB11) などが挙げられる。

SLCトランスポーターとしてはSLC1A1、SLC1A2、SLC1A3、SLC1A4、SLC1A5、SLC1A6、SLC1A7、SLC7A1、SLC7A2、SLC7A3、SLC7A4、SLC7A5、SLC7A6、SLC7A7、SLC7A8、SLC7A9、SLC7A10、SLC7A11、SLC7A12、SLC7A13、SLC7A14などが挙げられる。

【0041】

接着関連分子の抗原としては、がん細胞表面上に発現し、細胞接着に関与している分子であればいかなる分子でもよい。例えば、コラーゲンファミリー分子、フィブロネクチン、ビトロネクチン、セレクチンファミリー分子、インテグリンファミリー分子、ラミニン、テイネシン、VCAM (vascular cell adhesion molecule)、EPCAM、ICAM、IgCAM、ALCAM、MAdCAM、NCAM、GlyCAM、CEAなどが挙げられる。

10

【0042】

糖鎖抗原としては、がん細胞において特異的に高発現している糖鎖であればいかなるものでも良い。例えば、T抗原、Tn抗原、sialyl T抗原、sialyl Tn抗原、GalNAc-T1、GalNAc-T2、GalNAc-T3、GalNAc-T4、Le^a抗原、sialyl-Le^a抗原、Le^x抗原、sialyl-Le^x抗原、Le^y抗原などが挙げられる。

ガングリオシドとしては、GD1a、GD1b、GD2、GD3、GM1、GM2、GM3、GT1b、GQ1bなどが挙げられる。

20

糖タンパク質としては、mucin-1、mucin-2、mucin-3、mucin-4、mucin-5AC、mucin-5B、mucin-6、mucin-11/12、mucin-16、mucin-17などが挙げられる。

【0043】

がん細胞膜表面上の糖鎖または糖タンパク質に結合するサイトカインまたはケモカインとしては、サイトカインまたはケモカインが、がん細胞表面上の糖鎖または糖タンパク質に結合し、細胞表面の抗原として認識され得るものであれば、いかなるものでも構わない。

がん細胞膜上の糖鎖または糖タンパク質に結合するサイトカインとしては、例えばFGFファミリー分子、PDGF、BMP (bone morphogenetic protein)、GM-CSF、HGF (hepatocyte growth factor)、HB-EGF、neuregulin-1、amphiregulinなどが挙げられる。

30

がん細胞膜上の糖鎖または糖タンパク質に結合するケモカインとしては、例えば、細胞膜表面上のグリコサミノグリカン結合モチーフであるアミノ酸配列BBXB、またはBXXBを有するケモカインが挙げられる。BBXBのBとは、塩基性アミノ酸を示し、Xとはいかなるアミノ酸でも良い。これらのグリコサミノグリカン結合モチーフを持つケモカインとしては、例えばCXCL12、CCL3、CCL4、CCL5、CXCL8、CCL2、XCL1などが挙げられる。

【0044】

40

上記に示した抗癌抗体を有効成分とする医薬の投与経路としては、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、又は口腔内、鼻腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内、腹腔内及び静脈内等の非経口投与をあげることができ、抗体又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、テープ剤等があげられる。

【0045】

経口投与に適当な製剤としては、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等があげられる。乳剤及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、果糖等の糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール等のグリコール類、ご

50

ま油、オリーブ油、大豆油等の油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類等の防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミント等のフレーバー類等を添加剤として用いて製造できる。カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等は、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニトール等の賦形剤、デンプン、アルギン酸ナトリウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルク等の滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、グリセリン等の可塑剤等を添加剤として用いて製造できる。

【0046】

非経口投与に適切な製剤としては、注射剤、座剤、噴霧剤等があげられる。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等を用いて調製される。座剤はカカオ脂、水素化脂肪又はカルボン酸等の担体を用いて調製される。また、噴霧剤は該抗体そのもの、ないしは受容者の口腔及び気道粘膜を刺激せず、かつ該抗体を微細な粒子として分散させ吸収を容易にさせる担体等を用いて調製される。担体として具体的には乳糖、グリセリン等が例表される。該抗体及び用いる担体の性質により、エアロゾル、ドライパウダー等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。

10

【0047】

投与量又は投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢、体重等により異なるが、通常成人1日当たり $10\mu\text{g}/\text{kg} \sim 20\text{mg}/\text{kg}$ である。

以下に、本発明の実施例を示すが、これにより本発明の範囲が限定されるものではない。

20

【実施例】

【0048】

実施例1

抗癌抗体の抗腫瘍活性を検討するために、マウス *in vivo* モデルにおける抗癌抗体の効果を検討した。マウス *in vivo* モデルとして、ヒトがん細胞を皮下に移植したマウスを用い、皮下に生着した腫瘍体積を指標に効果を判定した。

In vitro で継代維持しているヒトがん細胞株 A549 (ATCC No. CRL-1682)、Capan-2 (ATCC No. HTB-80)、CFPAC-1 (ATCC No. CRL-1918)、HPAC (ATCC No. CRL-2119)、KP-3L (JCRB 0178.1)、MIA PaCa-2 (ATCC No. CRL-1420)、Hep G2 (ATCC No. HB-8065)、Calu-3 (ATCC No. HTB-55)、MEC (東北大学加齢医学研究所附属医用細胞資源センター TKG0629)、IHGGK (東北大学加齢医学研究所附属医用細胞資源センター TKG0623) の細胞懸濁液を、または、*in vivo* で継代維持しているヒトがん細胞 PANC-1 (ATCC No. CRL-1469)、Lee-7 (実験動物中央研究所) の腫瘍組織切片を、雄性 SCID マウス (日本クレア) の腹側に移植した。それぞれの細胞株の必要性に応じて、腫瘍細胞の生着性を高くするため、がん細胞を移植する3-4日前に、抗 Asialo GM1 抗体 (和光純薬工業社製) を1匹あたり $20\mu\text{L}$ 腹腔内に前処置するか、またはX線 (250Rad) を全身照射する前処置を、マウスに行った。

30

40

【0049】

がん細胞を移植してから10-25日後に、がん細胞の生着が確認された個体を選択して、腫瘍体積が群ごとに偏らないように群を構成した。1群あたりの例数は2-5とした。対照群には生理食塩水 (大塚製薬社製) を、抗体投与群には、ヒト-マウスキメラ抗 p53 apoptosis effector related to PMP22 (PERP) 抗体 KM3481 (WO2005/121338A1) を、1週間に2回の頻度で3-4週間、 $1\text{mg}/\text{kg}$ の用量でマウス尾静脈内に投与した。対照群の場合は、無処置か、または生理食塩水を投与した。

【0050】

50

抗体を投与する日に腫瘍体積を測定した。腫瘍の長径と短径を測定し、式1に代入して腫瘍体積を求めた。投与を開始した日の腫瘍体積を V_0 、各測定日の腫瘍体積を V として、個体毎に V と V_0 の比(V/V_0)を計算した。1群例数を5で構成した実験では、 V/V_0 の値を統計学的な解析に使用した。統計解析は、統計解析ソフトSAS(SASインスティテュート)を用いて行った。P値が0.05以下のときに差異は有意であると判断した。

式1：腫瘍体積(mm^3) = 長径(mm) × 短径(mm) × 短径(mm) × 0.5

【0051】

MIA PaCa-2、PANC-1、KP-3L、MEC、Hep G2のマウスモデルにおいて、抗PERP抗体KM3481を投与した群の腫瘍体積は、生理食塩水を投与した群に比べ、統計学的に有意に小さかった。従って、抗PERP抗体は、MIA PaCa-2、PANC-1、KP-3L、MEC、Hep G2の腫瘍に対して抗腫瘍活性を有することが明らかになった(図1)。一方、Calu-3、Capan-2(図2)、HPAC、CFPAC-1、AsPC-1、IHGGK、Li-7(図3)に対する、KM3481の抗腫瘍活性は認められなかった。

【0052】

実施例2

次に、細胞接着に関与するE-カドヘリンと、抗PERP抗体KM3481が認識するPERPの発現を免疫組織染色法で解析した。マウス皮下に生着したそれぞれの腫瘍組織を、抗PERP抗体KM3481を投与していないマウス個体から採取した。壊死していない腫瘍組織部分を切り出し、O.C.T.コンパウンド(サクラファインテック社製)に封埋した。O.C.T.コンパウンドに封埋した腫瘍組織を、液体窒素で凍結させ、凍結組織を得た。各凍結組織よりクライオスタットで切片を作製した。ビオチン標識抗PERP抗体KM3481およびストレプトアビジンHRP(DAKO社製)を用いてPERP染色標本作製した。また、抗E-カドヘリン抗体(DAKO社製)およびENVISION+ (DAKO社製)を用いてE-カドヘリン染色標本作製した。

作製した標本について光学顕微鏡下で観察し、反応性を陰性(-)、弱陽性(±)、中等度陽性(+)、強陽性(++)の4段階で評価した結果を、表1に示した。

【0053】

【表 1】

表 1 PERP および E-カドヘリンの発現

細胞	PERP*	E-カドヘリン*
AsPC-1	++	++
Capan-2	++	++
CFPAC-1	++	++
HPAC	++	++
KP-3L	++	++
MIA PaCa-2	±	—
Hep G2	+	+
Calu-3	++	++
MEC	+	—
IHGGK	++	++
PANC-1	++	—
Li-7	+	+

* ++強陽性、+中程度陽性、±弱陽性、—陰性

【0054】

表 1 に示したように、測定した全ての細胞株、すなわち AsPC-1、Capan-2、CFPAC-1、HPAC、KP-3L、MIA PaCa-2、Hep G2、Calu-3、MEC、IHGGK、PANC-1、Li-7 で、PERP の発現が認められた。

一方、E-カドヘリンの発現は、AsPC-1、Capan-2、CFPAC-1、HPAC、KP-3L、Hep G2、Calu-3、IHGGK、Li-7 で認められたが、MIA PaCa-2、MEC、PANC-1 では認められなかった。

【0055】

実施例 3

実施例 1 および 2 で示された、E-カドヘリンの発現の有無と、抗 PERP 抗体 KM3481 の薬効の相関について検討を行い、抗 PERP 抗体 KM3481 の抗腫瘍活性の有無と E-カドヘリンの発現に関して、カテゴリー分割表を作成した（表 2）。それぞれのカテゴリーに属する細胞株の名前を表に記載した。

【0056】

【表 2】

表 2

		E-カドヘリン発現	
		あり	なし
薬効	あり	KP-3L Hep G2	PANC-1 MIA PaCa-2 MEC
	なし	AsPC-1 Capan-2 CFPAC-1 HPAC IHGGK Li-7 Calu-3	

10

20

【0057】

更に、E-カドヘリン陰性の株に対する抗PERP抗体KM3481の薬効発現と比べて、E-カドヘリン陽性の株に対する抗PERP抗体KM3481の薬効発現の頻度が高いかどうかを、Fisherの直接確率計算法で統計学的に解析した。P値が0.05以下のときに差異は有意であると判断した。

【0058】

30

その結果、E-カドヘリン陰性の株で抗PERP抗体の薬効が認められた確率は100%であり、一方、E-カドヘリン陽性の株で抗PERP抗体の薬効が認められた確率は22%であった。即ち、E-カドヘリン陰性の3/3株全てで抗PERP抗体の薬効が認められ、E-カドヘリン陽性の2/9株で抗PERP抗体の薬効が認められた。従って、抗PERP抗体の薬効が認められる確率の偏りは、Fisherの直接確率計算法で求めたP値が0.455であったことから、有意な偏りであることが明らかになった。

以上の結果から、E-カドヘリンの発現が低下または欠損している患者を選択することで、患者のがん細胞に発現しているがん抗原に対する抗体の有効率を高めることができることが、明らかになった。

【0059】

40

本発明を詳細にまた特定の実施態様を参照して説明したが、本発明の精神と範囲を逸脱することなく様々な変更や修正を加えることができることは当業者にとって明らかである。

本出願は、2007年6月26日出願の米国仮特許出願(60/946,278)、に基づくものであり、その内容はここに参照として取り込まれる。すべての引用される参照は内容として取り込まれる。

【産業上の利用可能性】

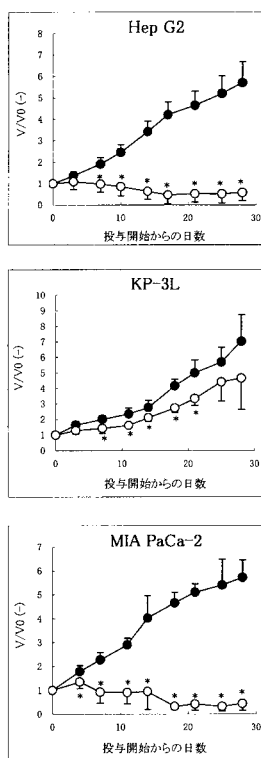
【0060】

本発明は、抗癌抗体が認識する抗原を発現している患者から試料を採取し、該試料中のカドヘリン機能を測定し、カドヘリン機能が低下または欠損している患者を選択すること

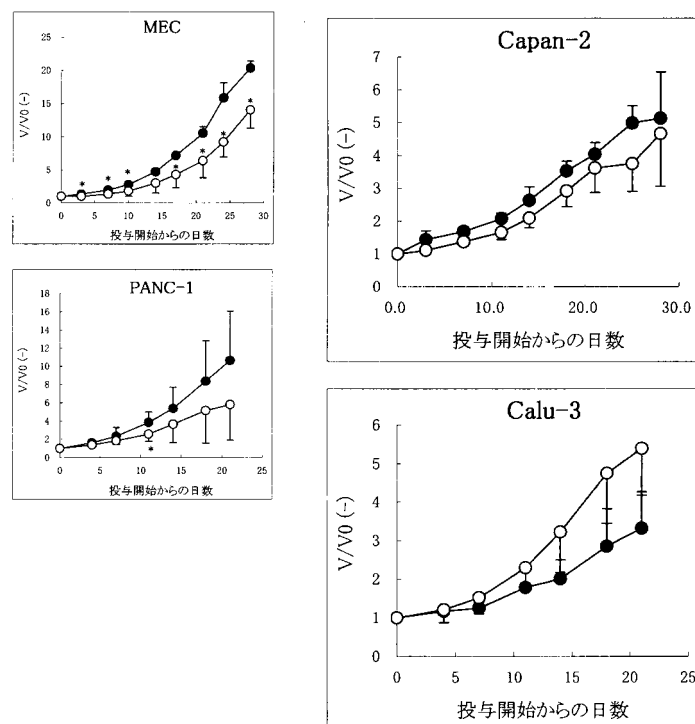
50

を特徴とする、抗癌抗体を有効成分とする医薬を投与するための患者のスクリーニング方法、抗癌抗体を有効成分とする医薬の有効率が高い患者のスクリーニング方法、および抗癌抗体を有効成分とする医薬の有効率を高める方法を提供する。

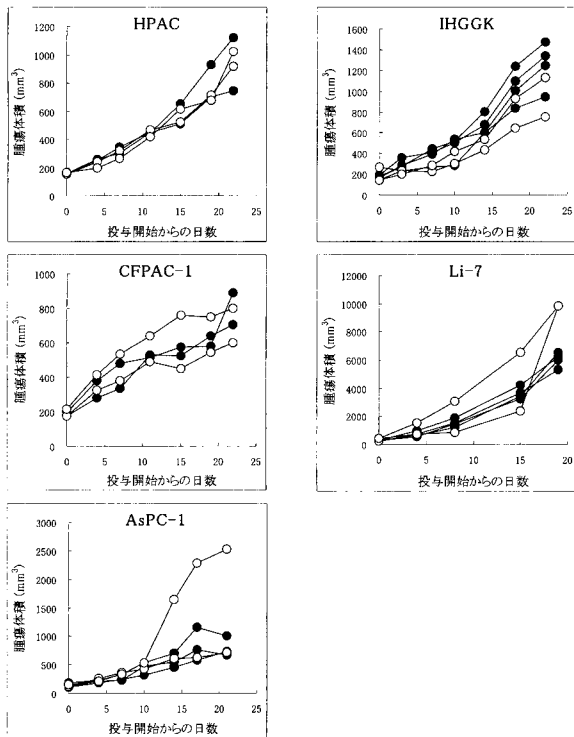
【図 1】



【図 2】



【図 3】



フロントページの続き

- (74)代理人 100105474
弁理士 本多 弘徳
- (74)代理人 100108589
弁理士 市川 利光
- (74)代理人 100129160
弁理士 古館 久丹子
- (72)発明者 佐藤 崇
静岡県駿東郡長泉町下土狩 1 1 8 8 協和発酵キリン株式会社 医薬研究センター内
- (72)発明者 木本 直哉
静岡県駿東郡長泉町下土狩 1 1 8 8 協和発酵キリン株式会社 医薬研究センター内
- (72)発明者 大木 祐二
東京都千代田区大手町一丁目 6 番 1 号 協和発酵キリン株式会社 本社内
- (72)発明者 古谷 安希子
東京都町田市旭町 3 丁目 6 - 6 協和発酵キリン株式会社 東京研究所内
- (72)発明者 石田 浩幸
静岡県駿東郡長泉町下土狩 1 1 8 8 協和発酵キリン株式会社 医薬研究センター内
- (72)発明者 落合 淳志
千葉県柏市柏の葉 6 - 5 - 1 国立がんセンター研究所支所内

審査官 山村 祥子

- (56)参考文献 特開平 1 0 - 1 2 7 2 8 3 (J P, A)
Seminars in Oncology, 1 9 9 9 年, Vol.26, No.4 Suppl.12, p.60-70
病理と臨床, 2 0 0 0 年, Vol.18, No.4, p.320-327

- (58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)
- | | |
|---------|-------------|
| G 0 1 N | 3 3 / 5 7 4 |
| A 6 1 K | 3 9 / 3 9 5 |
| A 6 1 P | 3 5 / 0 0 |
| A 6 1 P | 4 3 / 0 0 |