

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5923984号
(P5923984)

(45) 発行日 平成28年5月25日(2016.5.25)

(24) 登録日 平成28年4月28日(2016.4.28)

(51) Int.Cl.	F I	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	T
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	E
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1
請求項の数 7 (全 45 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2011-510197 (P2011-510197)
 (86) (22) 出願日 平成23年2月4日(2011.2.4)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2011/052414
 (87) 国際公開番号 W02011/096535
 (87) 国際公開日 平成23年8月11日(2011.8.11)
 審査請求日 平成26年1月28日(2014.1.28)
 (31) 優先権主張番号 特願2010-23455 (P2010-23455)
 (32) 優先日 平成22年2月4日(2010.2.4)
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

前置審査

(73) 特許権者 000003159
 東レ株式会社
 東京都中央区日本橋室町2丁目1番1号
 (74) 代理人 100091096
 弁理士 平木 祐輔
 (74) 代理人 100118773
 弁理士 藤田 節
 (72) 発明者 井戸 隆喜
 神奈川県鎌倉市手広6丁目10番1号 東
 レ株式会社基礎研究センター内
 (72) 発明者 岡野 文義
 神奈川県鎌倉市手広6丁目10番1号 東
 レ株式会社基礎研究センター内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌の治療及び／又は予防のための医薬品

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

C A P R I N - 1タンパク質と免疫学的反応性を有する、かつ癌細胞表面上に存在する C A P R I N - 1タンパク質の細胞外領域と特異的に結合する、及び抗腫瘍作用を有する抗体又はそのフラグメントと、1種類又は2種類以上の抗腫瘍剤とを、一緒に又は別々に、組み合わせて含むことを特徴とする、C A P R I N - 1を発現する癌の治療及び／又は予防のための医薬品。

【請求項2】

前記抗体又はそのフラグメントが、癌細胞表面上に存在する C A P R I N - 1タンパク質の細胞外領域の内、配列番号37で表されるアミノ酸配列に特異的に結合する抗体又はそのフラグメントであることを特徴とする、請求項1に記載の医薬品。

【請求項3】

前記 C A P R I N - 1タンパク質がヒト由来である、請求項1又は2に記載の医薬品。

【請求項4】

前記抗腫瘍剤が、シクロホスファミド、パクリタキセル、ドセタキセル、ビノレルビン並びにそれらの薬学的に許容可能な塩及び誘導体からなる群から選択される、請求項3に記載の医薬品。

【請求項5】

前記癌が乳癌、脳腫瘍、白血病、リンパ腫、肺癌、肥満細胞腫、腎癌、子宮頸癌、膀胱癌、食道癌、胃癌もしくは大腸癌である、請求項1～4のいずれか1項に記載の医薬品。

【請求項 6】

前記抗体が、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体又は組換え抗体である、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の医薬品。

【請求項 7】

前記抗体が、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、単鎖抗体又は二重特異性抗体である、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の医薬品。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、CAPRIN-1 タンパク質と免疫学的反応性を有する抗体又はそのフラグメントと、抗腫瘍剤とを組み合わせることを特徴とする、癌の治療及び/又は予防のための医薬品、並びにその使用、に関する。

10

【背景技術】

【0002】

癌は全死亡原因の第一位を占める疾患であり、現行の治療は、手術療法を主体に放射線療法と化学療法を組み合わせるものである。また、現行の治療は、同じ種類で同じ段階の癌を有するすべての患者に対して同じように治療する。これらの患者の少なくとも 40% は第一次治療に失敗し、したがって更なる一連の治療を行うことになる。そこでさらに治療が失敗すると癌が転移し、最終的には死亡する可能性が増大している。すなわち、現在の放射線療法と化学療法は、様々な癌種、個々の癌患者に合わせることができず、外科手術それ自体もほとんどの場合において癌の完治には不十分であるのが現状である。

20

【0003】

前述の癌治療の問題点を克服する技術として、癌細胞上の抗原タンパク質を標的にした、癌を治療するための各種抗体医薬が世の中に台頭してきた。具体例として、転移性乳癌を有する患者の治療薬として 1998 年に販売承認を受けている、Her 2 に特異的に結合するモノクローナル抗体を有効成分とする HERCEPTIN (登録商標) は、Her 2 過剰発現転移性乳癌患者において再発・転移乳癌患者の死亡者数の減少という臨床的な実効が証明されており、従来の化学療法剤と比較しても心毒性以外に重篤な副作用がなく、さらに注目すべき点として、化学療法剤との併用による乳癌に対する治療効果が証明されている (特許文献 1 ~ 3)。しかし、Her 2 をはじめ、抗体医薬の標的となる癌細胞上の抗原タンパク質のほとんどは正常細胞にも発現するものであり、抗体投与の結果、癌細胞だけでなく、抗原が発現する正常細胞も障害されてしまい、その結果生じる副作用が問題になる可能性がある。

30

【0004】

Cytoplasmic - and proliferation - associated protein 1 (CAPRIN - 1) は、休止期の正常細胞が活性化や細胞分裂を起こす際に発現し、また細胞内で RNA と細胞内ストレス顆粒を形成して mRNA の輸送、翻訳の制御に関与することなどが知られている細胞内タンパク質である。一方で、CAPRIN - 1 には色々な別名が存在しており、その一例として GPI - anchored membrane protein 1 や Membrane component surface marker 1 protein (M11S1) などがあり、あたかも本タンパク質が細胞膜タンパク質であることが知られていたかのような名称がある。これらの別名は、元々、CAPRIN - 1 の遺伝子配列が、GPI 結合領域を有し、大腸癌細胞に発現する膜タンパク質であるとする報告 (非特許文献 1) に由来するが、後にこの報告での CAPRIN - 1 の遺伝子配列は誤りであり、現在 GenBank 等に登録されている CAPRIN - 1 の遺伝子配列が 1 塩基欠損することによりフレームシフトが起きることで C 末端から 80 アミノ酸が欠損し、その結果生じる artifact (74 アミノ酸) が前報告での GPI 結合部分であり、さらに 5' 側にも遺伝子配列のエラーがあり、N 末端から 53 アミノ酸が欠損していることが報告されている (非特許文献 2)。また、現在 GenBank 等に登録されている CAPRIN - 1 の遺伝子配列がコードする

40

50

タンパク質は細胞膜タンパク質ではないことが報告されている（非特許文献2）。

【0005】

なお、CAPRIN-1が細胞膜タンパク質であるとする非特許文献1の報告に基づき、特許文献4及び5には、M11S1の名称で、CAPRIN-1が細胞膜タンパク質の1つとして抗体医薬の標的として癌治療に使用されることが記載されている（実施例には本タンパク質に対する抗体を用いた治療に関する記載は一切ない）。しかし、非特許文献2の報告の通り、特許文献4の出願当時から現在まで、CAPRIN-1は細胞表面には発現していないものであることが通説になっており、CAPRIN-1が細胞膜タンパク質であるという誤った情報のみに基づく特許文献4及び5の内容は、当業者の技術常識として理解されるべきものでないことは明らかである。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】日本国特開2006-316040号公報

【特許文献2】米国特許第7485302号

【特許文献3】米国特許第7449184号

【特許文献4】米国特許公開第2008/0075722号

【特許文献5】国際公開第WO2005/100998号

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】J. Biol. Chem., 270:20717-20723, 1995

【非特許文献2】J. Immunol., 172:2389-2400, 2004

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明の目的は、癌細胞の表面に特異的に発現する癌抗原タンパク質を同定し、それを標的とした抗体と抗腫瘍剤を組み合わせることにより、癌の治療及び/又は予防用医薬品としての用途を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者らは、鋭意研究の結果、イヌの精巣組織由来cDNAライブラリーと乳癌患犬の血清を用いたSEREX法により、担癌生体由来の血清中に存在する抗体と結合するタンパク質をコードするcDNAを取得し、取得した遺伝子及びそのヒト、ウシ、ウマ、マウス、ニワトリ相同性遺伝子を基にして、配列番号2~30のうち偶数の配列番号で示されるアミノ酸配列を有するCAPRIN-1タンパク質及びそれらCAPRIN-1タンパク質に対する抗体を作製した。そしてCAPRIN-1タンパク質が乳癌、脳腫瘍、白血病、リンパ腫、肺癌、子宮頸癌、膀胱癌、食道癌、大腸癌、胃癌、腎臓癌などの癌の細胞に特異的に発現していること、そしてCAPRIN-1タンパク質の一部がそれら癌細胞の細胞表面に特異的に発現していること、そして、それらCAPRIN-1の各癌細胞の細胞表面に発現する部分に対する抗体と特定の抗腫瘍剤を組み合わせることにより、顕著な癌治療効果が得られることを見出し、本発明を完成させるに至った。

20

30

40

【0010】

なお、本明細書では、「癌」という用語は、腫瘍や癌腫と互換的に使用される。

【0011】

したがって、本発明は、以下の特徴を有する。

【0012】

(1)CAPRIN-1タンパク質と免疫学的反応性を有する抗体又はそのフラグメントと、1種類又は2種類以上の抗腫瘍剤とを、一緒に又は別々に、組み合わせて含むことを特徴とする、癌の治療及び/又は予防のための医薬品。

50

【 0 0 1 3 】

(2) 上記 C A P R I N - 1 タンパク質と免疫学的反応性を有する抗体又はそのフラグメントが、癌細胞表面上に存在する C A P R I N - 1 タンパク質の細胞外領域と特異的に結合する抗体又はそのフラグメントであることを特徴とする、請求項 1 に記載の医薬品。

【 0 0 1 4 】

(3) 上記 C A P R I N - 1 タンパク質と免疫学的反応性を有する抗体又はそのフラグメントが、癌細胞表面上に存在する C A P R I N - 1 タンパク質の細胞外領域の内、配列番号 37 で表されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列と 80 % 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列、を有するポリペプチドと特異的に結合する抗体又はそのフラグメントであることを特徴とする、上記 (1) 又は (2) に記載の医薬品。

10

【 0 0 1 5 】

(4) 上記 C A P R I N - 1 タンパク質がヒト由来である、上記 (1) ~ (3) のいずれかに記載の医薬品。

【 0 0 1 6 】

(5) 上記抗腫瘍剤が明細書に記載の抗腫瘍剤である、上記 (1) ~ (4) のいずれかに記載の医薬品。

【 0 0 1 7 】

(6) 上記抗腫瘍剤が、シクロホスファミド、パクリタキセル、ドセタキセル、ビノレルビン並びにそれらの薬学的に許容可能な塩及び誘導体からなる群から選択される、上記 (5) に記載の医薬品。

20

【 0 0 1 8 】

(7) 上記癌が乳癌、脳腫瘍、白血病、リンパ腫、肺癌、肥満細胞腫、腎癌、子宮頸癌、膀胱癌、食道癌、胃癌もしくは大腸癌である、上記 (1) ~ (6) のいずれかに記載の医薬品。

【 0 0 1 9 】

(8) 上記抗体が、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、又は組換え抗体である、上記 (1) ~ (7) のいずれかに記載の医薬品。

【 0 0 2 0 】

(9) 上記抗体が、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、単鎖抗体又は二重特異性抗体である、上記 (1) ~ (8) のいずれかに記載の医薬品。

30

【 0 0 2 1 】

(10) 上記 (1) ~ (9) のいずれかに記載の医薬品を、癌をもつと疑われる被験者に投与することを含む、癌の治療及び / 又は予防のための方法。

【 0 0 2 2 】

(11) 上記医薬品に含まれる、抗体又はそのフラグメント及び抗腫瘍剤を、同時に又は別々に、前記被験者に投与することを含む、上記 (10) に記載の方法。

【 0 0 2 3 】

本明細書は、本願の優先権の基礎である日本国特許出願 2010-023455 号の明細書及び / または図面に記載される内容を包含する。

【 発明の効果 】

40

【 0 0 2 4 】

本発明により、顕著な副作用を検出することなく、広範囲の癌の縮小及び退縮の驚異的な相乗効果が得られる。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 2 5 】

【 図 1 】 C A P R I N - 1 タンパク質をコードする遺伝子の、正常組織及び腫瘍細胞株での発現パターンを示す図である。参照番号 1 ; C A P R I N - 1 タンパク質をコードする遺伝子の発現パターン、参照番号 2 ; G A P D H 遺伝子の発現パターンを示す。

【 図 2 】 癌細胞の細胞表面に反応する C A P R I N - 1 に対するモノクローナル抗体 (# 1 ~ # 11) による、 C A P R I N - 1 を発現する乳癌細胞株 M D A - M B - 1 5 7 に対

50

する細胞障害性を示す図である。参照番号 3 ; # 1 の C A P R I N - 1 に対するモノクローナル抗体、参照番号 4 ; # 2 の C A P R I N - 1 に対するモノクローナル抗体、参照番号 3 ; # 5 の C A P R I N - 1 に対するモノクローナル抗体、参照番号 6 ; # 4 の C A P R I N - 1 に対するモノクローナル抗体、参照番号 7 ; # 5 の C A P R I N - 1 に対するモノクローナル抗体、参照番号 8 ; # 6 の C A P R I N - 1 に対するモノクローナル抗体、参照番号 9 ; # 7 の C A P R I N - 1 に対するモノクローナル抗体、参照番号 10 ; # 8 の C A P R I N - 1 に対するモノクローナル抗体、参照番号 11 ; # 9 の C A P R I N - 1 に対するモノクローナル抗体、参照番号 12 ; # 10 の C A P R I N - 1 に対するモノクローナル抗体、参照番号 13 ; # 11 の C A P R I N - 1 に対するモノクローナル抗体を添加したときの活性、参照番号 14 ; C A P R I N - 1 タンパク自体には反応するが、癌細胞の細胞表面に反応しないモノクローナルを添加したときの活性、参照番号 15 ; 抗体の代わりに P B S を添加したときの活性を示す。

10

【図 3】抗腫瘍剤シクロホスファミドと癌細胞の細胞表面に反応する C A P R I N - 1 に対するモノクローナル抗体併用による、C A P R I N - 1 を発現する乳癌細胞株 M C F - 7 が移植されたヌードマウスに対する抗腫瘍効果を示す図である。参照番号 16 ; 抗体の代わりに P B S を投与、参照番号 17 ; シクロホスファミドを投与、参照番号 18 ; # 2 の C A P R I N - 1 に対するモノクローナル抗体を投与、参照番号 19 ; シクロホスファミドと抗 H e r 2 抗体を投与、参照番号 20 ; シクロホスファミドと # 2 の C A P R I N - 1 に対するモノクローナル抗体を投与したときのマウスの腫瘍の大きさを示す。

【図 4】抗腫瘍剤パクリタキセルと癌細胞の細胞表面に反応する C A P R I N - 1 に対するモノクローナル抗体併用による、C A P R I N - 1 を発現する乳癌細胞株 M C F - 7 が移植されたヌードマウスに対する抗腫瘍効果を示す図である。参照番号 21 ; 抗体の代わりに P B S を投与、参照番号 22 ; パクリタキセルを投与、参照番号 23 ; # 2 の C A P R I N - 1 に対するモノクローナル抗体を投与、参照番号 24 ; パクリタキセルと抗 H e r 2 抗体を投与、参照番号 25 ; パクリタキセルと # 2 の C A P R I N - 1 に対するモノクローナル抗体を投与したときのマウスの腫瘍の大きさを示す。

20

【図 5】抗腫瘍剤ドセタキセルと癌細胞の細胞表面に反応する C A P R I N - 1 に対するモノクローナル抗体併用による、C A P R I N - 1 を発現する乳癌細胞株 M C F - 7 が移植されたヌードマウスに対する抗腫瘍効果を示す図である。参照番号 26 ; 抗体の代わりに P B S を投与、参照番号 27 ; ドセタキセルを投与、参照番号 28 ; # 2 の C A P R I N - 1 に対するモノクローナル抗体を投与、参照番号 29 ; ドセタキセルと抗 H e r 2 抗体を投与、参照番号 30 ; ドセタキセルと # 2 の C A P R I N - 1 に対するモノクローナル抗体を投与したときのマウスの腫瘍の大きさを示す。

30

【図 6】抗腫瘍剤ビノレルピンと癌細胞の細胞表面に反応する C A P R I N - 1 に対するモノクローナル抗体併用による、C A P R I N - 1 を発現する乳癌細胞株 M C F - 7 が移植されたヌードマウスに対する抗腫瘍効果を示す図である。参照番号 31 ; 抗体の代わりに P B S を投与、参照番号 32 ; ビノレルピンを投与、参照番号 33 ; # 2 の C A P R I N - 1 に対するモノクローナル抗体を投与、参照番号 34 ; ビノレルピンと抗 H e r 2 抗体を投与、参照番号 35 ; ビノレルピンと # 2 の C A P R I N - 1 に対するモノクローナル抗体を投与されたマウスの腫瘍の大きさを示す。

40

【図 7】抗腫瘍剤シクロホスファミドと癌細胞の細胞表面に反応する C A P R I N - 1 に対するモノクローナル抗体併用による、C A P R I N - 1 を発現する乳癌細胞株 M C F - 7 が移植されたヌードマウスに対する抗腫瘍効果を示す図である。参照番号 36 ; 抗体の代わりに P B S を投与、参照番号 37 ; シクロホスファミドを投与、参照番号 38 ; # 9 の C A P R I N - 1 に対するモノクローナル抗体を投与、参照番号 39 ; シクロホスファミドと抗 H e r 2 抗体を投与、参照番号 40 ; シクロホスファミドと # 9 の C A P R I N - 1 に対するモノクローナル抗体を投与したときのマウスの腫瘍の大きさを示す。

【図 8】抗腫瘍剤パクリタキセルと癌細胞の細胞表面に反応する C A P R I N - 1 に対するモノクローナル抗体併用による、C A P R I N - 1 を発現する乳癌細胞株 M C F - 7 が移植されたヌードマウスに対する抗腫瘍効果を示す図である。参照番号 41 ; 抗体の代わ

50

りにPBSを投与、参照番号42；パクリタキセルを投与、参照番号43；#9のCAPRIN-1に対するモノクローナル抗体を投与、参照番号44；パクリタキセルと抗Her2抗体を投与、参照番号45；パクリタキセルと#9のCAPRIN-1に対するモノクローナル抗体を投与したときのマウスの腫瘍の大きさを示す。

【図9】抗腫瘍剤ドセタキセルと癌細胞の細胞表面に反応するCAPRIN-1に対するモノクローナル抗体併用による、CAPRIN-1を発現する乳癌細胞株MCF-7が移植されたヌードマウスに対する抗腫瘍効果を示す図である。参照番号46；抗体の代わりにPBSを投与、参照番号47；ドセタキセルを投与、参照番号48；#9のCAPRIN-1に対するモノクローナル抗体を投与、参照番号49；ドセタキセルと抗Her2抗体を投与、参照番号50；ドセタキセルと#9のCAPRIN-1に対するモノクローナル抗体を投与したときのマウスの腫瘍の大きさを示す。

10

【図10】抗腫瘍剤ビノレルピンと癌細胞の細胞表面に反応するCAPRIN-1に対するモノクローナル抗体併用による、CAPRIN-1を発現する乳癌細胞株MCF-7が移植されたヌードマウスに対する抗腫瘍効果を示す図である。参照番号51；抗体の代わりにPBSを投与、参照番号52；ビノレルピンを投与、参照番号53；#9のCAPRIN-1に対するモノクローナル抗体を投与、参照番号54；ビノレルピンと抗Her2抗体を投与、参照番号55；ビノレルピンと#9のCAPRIN-1に対するモノクローナル抗体を投与されたマウスの腫瘍の大きさを示す。

【発明を実施するための形態】

【0026】

20

本発明で用いられる配列番号2～30のうち偶数の配列番号のポリペプチドに対する抗体の抗腫瘍活性は、後述するように、生体内で担癌動物に対する腫瘍増殖の抑制を調べることによって、あるいは、生体外で該ポリペプチドを発現する腫瘍細胞に対して、免疫細胞又は補体を介した細胞障害活性を示すか否かを調べることによって評価することができる。

【0027】

なお、配列番号2～30のうち偶数の配列番号（すなわち、配列番号2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30）のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするポリヌクレオチドの塩基配列はそれぞれ、配列番号1～29のうち奇数の配列番号（すなわち、配列番号1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29）に示されている。

30

【0028】

本発明が開示する配列表の配列番号6, 8, 10, 12及び14で示されるアミノ酸配列は、イヌ精巢組織由来cDNAライブラリーと乳癌患犬の血清を用いたSEREX法により、担癌犬由来の血清中に特異的に存在する抗体と結合するポリペプチドとして、また配列番号2及び4で示されるアミノ酸配列は、そのヒト相同因子（ホモログ）として、配列番号16で示されるアミノ酸配列は、そのウシ相同因子として、配列番号18で示されるアミノ酸配列は、そのウマ相同因子として、配列番号20～28で示されるアミノ酸配列は、そのマウス相同因子として、配列番号30で示されるアミノ酸配列は、そのニワトリ相同因子として単離された、CAPRIN-1のアミノ酸配列である（後述の実施例1参照）。CAPRIN-1は、休止期の正常細胞が活性化や細胞分裂を起こす際に発現することが知られている。

40

【0029】

CAPRIN-1は、細胞表面には発現しないことが知られていたが、本検討により、CAPRIN-1タンパク質の一部が各種癌細胞の細胞表面に発現することが明らかになった。本発明では、CAPRIN-1タンパク質の内、癌細胞の細胞表面に発現する部分に結合する抗体が好ましく用いられる。癌細胞の細胞表面に発現するCAPRIN-1タンパク質中の部分ペプチドとして、配列表の配列番号2～30のうち配列番号6及び配列番号18を除く偶数番号で表されるアミノ酸配列中のアミノ酸残基番号（aa）50-98又はアミノ酸残基番号（aa）233-305の領域内の連続する7個以上のアミノ酸配列から成るポリペプチドが挙げられ、具体的には例えば、配列番号37で表されるアミ

50

ノ酸配列、又は該アミノ酸配列と80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列が挙げられ、本発明で用いられる抗体は、これらペプチドに(特異的に)結合する(または、これらペプチドを(特異的に)認識する、または、これらペプチドと免疫学的反応性を有する)、かつ、抗腫瘍活性を示すすべての抗体が含まれる。

【0030】

本発明で用いられる上記CAPRIN-1に対する抗体は、抗腫瘍活性を發揮しうる限りいかなる種類の抗体であってもよく、例えば、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、組換え抗体、例えば合成抗体、多重特異性抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、単鎖抗体(scFv)など、ヒト抗体、それらの抗体フラグメント、例えばFab、F(ab')₂、Fvなどを含む。これらの抗体及びそのフラグメントは、また当業者に公知の方法により調製することが可能である。本発明においては、CAPRIN-1タンパク質と特異的に結合することが可能な抗体が望ましいし、モノクローナル抗体であることが好ましいが、均質な抗体を安定に生産できるかぎり、ポリクローナル抗体であってもよい。また、被験者がヒトである場合には、拒絶反応を回避もしくは抑制するためにヒト抗体又はヒト化抗体であることが望ましい。

10

【0031】

ここで、「CAPRIN-1タンパク質と特異的に結合する」とは、CAPRIN-1タンパク質に特異的に結合し、それ以外のタンパク質と実質的に結合しないことを意味する。

20

【0032】

本発明で用いることができる抗体の抗腫瘍活性は、後述するように、生体内で担癌動物に対する腫瘍増殖の抑制を調べることによって、あるいは、生体外で該ポリペプチドを発現する腫瘍細胞に対して、免疫細胞又は補体を介した細胞障害活性を示すか否かを調べることによって評価することができる。

【0033】

さらにまた、本発明における癌の治療及び/又は予防の対象である被験者は、ヒト、ペット動物、家畜類、競技用動物などの哺乳動物であり、好ましい被験者は、ヒトである。

【0034】

以下に、本発明に関する抗原の作製、抗体の作製、ならびに医薬品、等について説明する。

30

【0035】

<抗体作製用抗原の作製>

本発明で用いられるCAPRIN-1に対する抗体を取得するための感作抗原として使用されるタンパク質又はその断片は、ヒト、イヌ、ウシ、ウマ、マウス、ラット、ニワトリなど、その由来となる動物種に制限されない。しかし細胞融合に使用する親細胞との適合性を考慮して選択することが好ましく、一般的には、哺乳動物由来のタンパク質が好ましく、特にヒト由来のタンパク質が好ましい。例えば、CAPRIN-1がヒトCAPRIN-1の場合、ヒトCAPRIN-1タンパク質やその部分ペプチド、ヒトCAPRIN-1を発現する細胞などを用いることができる。

40

【0036】

ヒトCAPRIN-1及びそのホモログの塩基配列及びアミノ酸配列は、例えばGenBank(米国NCBI)にアクセスし、BLAST、FASTAなどのアルゴリズム(Karlin and Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:5873-5877, 1993; Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, 1997)を利用することによって入手することができる。

【0037】

本発明では、ヒトCAPRIN-1の塩基配列(配列番号1もしくは3)又はアミノ酸配列(配列番号2もしくは4)を基準とした場合、これらのORF又は成熟部分の塩基配

50

列又はアミノ酸配列と70%~100%、好ましくは80%~100%、より好ましくは90%~100%、さらに好ましくは95%~100%、例えば97%~100%、98%~100%、99%~100%又は99.5%~100%の配列同一性を有する配列からなる核酸又はタンパク質がターゲットになる。ここで、「%配列同一性」は、2つの配列を、ギャップを導入してか又はギャップを導入しないで、最大の類似度となるようにアラインメント(整列)したとき、アミノ酸(又は塩基)の総数に対する同一アミノ酸(又は塩基)のパーセンテージ(%)を意味する。

【0038】

CAPRIN-1タンパク質の断片は、抗体が認識する最小単位であるエピトープ(抗原決定基)のアミノ酸長から、該タンパク質の全長未満の長さを有する。エピトープは、哺乳動物、好ましくはヒトにおいて、抗原性又は免疫原性を有するポリペプチド断片を指し、その最小単位は、(連続する)約7~12アミノ酸、例えば8~11アミノ酸、からなる。抗体と特異的に結合するCAPRIN-1タンパク質の部分配列の具体例としては、配列番号37で表されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列と80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列、において少なくとも約7~12アミノ酸を含む部分配列が挙げられる。

10

【0039】

上記した、ヒトCAPRIN-1タンパク質やその部分ペプチドを含むポリペプチドは、例えば、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)等の化学合成法に従って合成することができる(日本生化学会編、生化学実験講座1、タンパク質の化学IV、化学修飾とペプチド合成、東京化学同人(日本)、1981年)。また、各種の市販のペプチド合成機を利用して常法により合成することもできる。また、公知の遺伝子工学的手法(Sambrookら、Molecular Cloning、第2版、Current Protocols in Molecular Biology(1989)、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Ausubelら、Short Protocols in Molecular Biology、第3版、A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology(1995)、John Wiley & Sonsなど)を用いて、上記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを調製し、該ポリヌクレオチドを発現ベクターに組み込んで宿主細胞に導入し、該宿主細胞中でポリペプチドを生産させることにより、目的とするポリペプチドを得ることができる。

20

30

【0040】

上記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、公知の遺伝子工学的手法や市販の核酸合成機を用いた常法により、容易に調製することができる。例えば、配列番号1の塩基配列を含むDNAは、ヒト染色体DNA又はcDNAライブラリーを鋳型として使用し、配列番号1に記載した塩基配列を増幅できるように設計した一对のプライマーを用いてPCRを行うことにより調製することができる。PCRの反応条件は適宜設定することができ、例えば、耐熱性DNAポリメラーゼ(例えばTaqポリメラーゼなど)及びMg²⁺含有PCRバッファーを用いて、94℃で30秒間(変性)、55℃で30秒~1分間(アニーリング)、72℃で2分間(伸長)からなる反応行程を1サイクルとして、例えば30サイクル行った後、72℃で7分間反応させる条件などを挙げることができるが、これに限定されない。PCRの手法、条件等については、例えばAusubelら、Short Protocols in Molecular Biology、第3版、A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology(1995)、John Wiley & Sons(特に第15章)に記載されている。

40

【0041】

また、本明細書中の配列表の配列番号1~30に示される塩基配列及びアミノ酸配列の

50

情報に基づいて、適当なプローブやプライマーを調製し、それを用いてヒトなどのcDNAライブラリーをスクリーニングすることにより、所望のDNAを単離することができる。cDNAライブラリーは、配列番号2～30のうち偶数の配列番号のタンパク質を発現している細胞、器官又は組織から作製することが好ましい。そのような細胞や組織の例は、精巣、白血病、乳癌、リンパ腫、脳腫瘍、肺癌、大腸癌などの癌又は腫瘍に由来する細胞又は組織である。上記したプローブ又はプライマーの調製、cDNAライブラリーの構築、cDNAライブラリーのスクリーニング、ならびに目的遺伝子のクローニングなどの操作は当業者に既知であり、例えば、Sambrookら、Molecular Cloning, 第2版, Current Protocols in Molecular Biology (1989)、Ausbelら(上記)等に記載された方法に準じて行うことができる。このようにして得られたDNAから、ヒトCAPRIN-1タンパク質やその部分ペプチドをコードするDNAを得ることができる。

10

【0042】

上記宿主細胞としては、上記ポリペプチドを発現可能な細胞であればいかなるものであってもよく、原核細胞の例としては大腸菌など、真核細胞の例としてはサル腎臓細胞COS1、チャイニーズハムスター卵巣細胞CHO等の哺乳動物細胞、ヒト胎児腎臓細胞株HEK293、マウス胎仔皮膚細胞株NIH3T3、出芽酵母、分裂酵母等の酵母細胞、カイコ細胞、アフリカツメガエル卵細胞などが挙げられるが、これらに限定されない。

【0043】

宿主細胞として原核細胞を用いる場合、発現ベクターとしては、原核細胞中で複製可能なオリジン、プロモーター、リボソーム結合部位、マルチクローニングサイト、ターミネーター、薬剤耐性遺伝子、栄養要求性相補遺伝子、等を有する発現ベクターを用いる。大腸菌用発現ベクターとしては、pUC系、pBluescriptII、pET発現システム、pGEX発現システムなどが例示できる。上記ポリペプチドをコードするDNAをこのような発現ベクターに組み込み、該ベクターで原核宿主細胞を形質転換したのち、得られた形質転換体を培養すれば、前記DNAがコードしているポリペプチドを原核宿主細胞中で発現させることができる。この際、該ポリペプチドを、他のタンパク質との融合タンパク質として発現させることもできる。

20

【0044】

宿主細胞として真核細胞を用いる場合、発現ベクターとしては、プロモーター、スプライシング領域、ポリ(A)付加部位等を有する真核細胞用発現ベクターを用いる。そのような発現ベクターとしては、pKA1、pCDM8、pSVK3、pMSG、pSVL、pBK-CMV、pBK-RSV、EBVベクター、pRS、pcDNA3、pYES2等が例示できる。上記と同様に、上記ポリペプチドをコードするDNAをこのような発現ベクターに組み込み、該ベクターで真核宿主細胞を形質転換したのち、得られた形質転換体を培養すれば、前記DNAがコードしているポリペプチドを真核宿主細胞中で発現させることができる。発現ベクターとしてpIND/V5-His、pFLAG-CMV-2、pEGFP-N1、pEGFP-C1等を用いた場合には、Hisタグ(例えば(His)6～(His)10)、FLAGタグ、mycタグ、HAタグ、GFPなど各種タグを付加した融合タンパク質として、上記ポリペプチドを発現させることができる。

30

40

【0045】

発現ベクターの宿主細胞への導入は、電気穿孔法、リン酸カルシウム法、リポソーム法、DEAEデキストラン法、マイクロインジェクション、ウイルス感染、リポフェクション、細胞膜透過性ペプチドとの結合、等の周知の方法を用いることができる。

【0046】

宿主細胞から目的のポリペプチドを単離精製するためには、公知の分離操作を組み合わせを行うことができる。例えば尿素などの変性剤や界面活性剤による処理、超音波処理、酵素消化、塩析や溶媒分別沈殿法、透析、遠心分離、限外ろ過、ゲルろ過、SDS-PAGE、等電点電気泳動、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー等が挙げられるが、これらに限定

50

されない。

【0047】

<抗体の構造>

抗体は通常少なくとも2本の重鎖及び2本の軽鎖を含むヘテロ多量体糖タンパク質である。IgMは別として、2本の同一の軽(L)鎖及び2本の同一の重(H)鎖で構成される約150kDaのヘテロ四量体糖タンパク質である。典型的には、それぞれの軽鎖は1つのジスルフィド共有結合により重鎖に連結されているが、種々の免疫グロブリンアイソタイプの重鎖間のジスルフィド結合の数は変動する。それぞれの重鎖及び軽鎖はまた鎖内ジスルフィド結合も有する。それぞれの重鎖は一方の端に可変ドメイン(VH領域)を有し、それにいくつかの定常領域が続く。それぞれ軽鎖は可変ドメイン(VL領域)を有し、その反対の端に1つの定常領域を有する。軽鎖の定常領域は重鎖の最初の定常領域と整列しており、かつ軽鎖可変ドメインは重鎖の可変ドメインと整列している。抗体の可変ドメインは特定の領域が相補性決定領域(CDR)と呼ばれる特定の可変性を示して抗体に結合特異性を付与する。可変領域の相対的に保存されている部分はフレームワーク領域(FR)と呼ばれている。完全な重鎖及び軽鎖の可変ドメインはそれぞれ3つのCDRにより連結された4つのFRを含む。3つのCDRは重鎖ではそのN末から順にCDRH1, CDRH2, CDRH3、同様に軽鎖ではCDRL1, CDRL2, CDRL3と呼ばれている。抗体の抗原への結合特異性には、CDRH3が最も重要である。また、各鎖のCDRはFR領域によって近接した状態で一緒に保持され、他方の鎖からのCDRと共に抗体の抗原結合部位の形成に寄与する。定常領域は抗体が抗原に結合することに直接寄与しないが、種々のエフェクター機能、例えば、抗体依存性細胞性細胞障害活性(ADCC)への関与、Fc受容体への結合を介した食作用、新生児Fc受容体(FcRn)を介した半減期/クリアランス速度、補体カスケードのC1q構成要素を介した補体依存性細胞障害(CDC)を示す。

10

20

【0048】

<抗体の作製>

本発明における抗CAPRIN-1抗体とは、CAPRIN-1タンパク質の全長又はその断片と免疫学的反応性を有する抗体を意味する。

【0049】

ここで、「免疫学的反応性」とは、生体内で抗体とCAPRIN-1抗原とが結合する特性を意味し、このような結合を介して腫瘍を障害(例えば、死滅、抑制又は退縮)する機能が発揮される。すなわち、本発明で使用される抗体は、CAPRIN-1タンパク質と結合して腫瘍、例えば白血病、リンパ腫、乳癌、脳腫瘍、肺癌、食道癌、胃癌、腎臓癌、大腸癌などを障害することができるならば、その種類を問わない。

30

【0050】

抗体の例は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、組換え抗体、例えば合成抗体、多重特異性抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、単鎖抗体など、ヒト抗体、それらの抗体フラグメント(例えばFab、F(ab')₂、Fv)などを含む。また、抗体は、免疫グロブリン分子の任意のクラス、例えばIgG, IgE, IgM, IgA, IgD及びIgY、又は任意のサブクラス、例えばIgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2などである。これらの抗体又はそのフラグメントはいずれも、癌の細胞表面上に存在するCAPRIN-1タンパク質、好ましくはその細胞外領域のポリペプチド、と免疫学的反応性を有する(好ましくは、該タンパク質又は該ポリペプチドと特異的に結合する)ものであり、かつ、癌に対する細胞障害活性を示すものである。

40

【0051】

抗体はさらに、グリコシル化の他に、アセチル化、ホルミル化、アミド化、リン酸化、またはペグ(PEG)化などによって修飾されていてもよい。

【0052】

以下に、種々の抗体の作製例を示す。

【0053】

50

抗体が、モノクローナル抗体であるときには、例えば、CAPRIN-1を発現する乳癌細胞株SK-BR-3などをマウスに投与して免疫し、同マウスより脾臓を抽出し、細胞を分離の上、該細胞とマウスミエローム細胞とを融合させ、得られた融合細胞（ハイブリドーマ）の中から、癌細胞増殖抑制作用を持つ抗体を産生するクローンを選択する。癌細胞増殖抑制作用を持つモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを単離し、当該ハイブリドーマを培養し、培養上清から一般的なアフィニティ精製法により抗体を精製することで、調製することが可能である。

【0054】

モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、例えば以下のようにしても作製することができる。まず、公知の方法にしたがって、感作抗原を動物に免疫する。一般的方法として、感作抗原を哺乳動物の腹腔内又は皮下に注射することにより行われる。具体的には、感作抗原をPBS (Phosphate-Buffered Saline) や生理食塩水等で適量に希釈、懸濁したものに所望により通常のアジュバント、例えばフロイント完全アジュバントを適量混合し、乳化後、哺乳動物に4～21日毎に数回投与する。また、感作抗原免疫時に適当な担体を使用することもできる。

10

【0055】

このように哺乳動物を免疫し、血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを確認した後に、哺乳動物から免疫細胞を採取し、細胞融合に付すが、好ましい免疫細胞としては、特に脾細胞が挙げられる。

【0056】

前記免疫細胞と融合される他方の親細胞として、哺乳動物のミエローム細胞を用いる。このミエローム細胞は、公知の種々の細胞株、例えば、P3U1 (P3-X63Ag8U1)、P3 (P3x63Ag8.653) (J. Immunol. (1979) 123, 1548-1550)、P3x63Ag8U.1 (Current Topics in Microbiology and Immunology (1978) 81, 1-7)、NS-1 (Kohler, G. and Milstein, C. Eur. J. Immunol. (1976) 6, 511-519)、MPC-11 (Margulies, D.H. et al., Cell (1976) 8, 405-415)、SP2/0 (Shulman, M. et al., Nature (1978) 276, 269-270)、FO (deSt. Groth, S. F. et al., J. Immunol. Methods (1980) 35, 1-21)、S194 (Trowbridge, I.S. J. Exp. Med. (1978) 148, 313-323)、R210 (Galfré, G. et al., Nature (1979) 277, 131-133)等が好適に使用される。

20

30

【0057】

前記免疫細胞とミエローム細胞との細胞融合は、基本的には公知の方法、たとえば、ケーラーとミルステインらの方法 (Kohler, G. and Milstein, C. Methods Enzymol. (1981) 73, 3-46)等に準じて行うことができる。

40

【0058】

より具体的には、前記細胞融合は、例えば細胞融合促進剤の存在下に通常の栄養培養液中で実施される。融合促進剤としては、例えばポリエチレングリコール (PEG)、センダイウイルス (HVJ)等が使用され、更に所望により融合効率を高めるためにジメチルスルホキシド等の補助剤を添加使用することもできる。

【0059】

免疫細胞とミエローム細胞との使用割合は任意に設定することができる。例えば、ミエローム細胞に対して免疫細胞を1～10倍とするのが好ましい。前記細胞融合に用いる培養液としては、例えば、前記ミエローム細胞株の増殖に好適なRPMI 1640培養液、MEM培養液、その他、この種の細胞培養に用いられる通常の培養液が使用可能であり、

50

さらに、牛胎児血清（FCS）等の血清補液を併用することもできる。

【0060】

細胞融合は、前記免疫細胞とミエローム細胞との所定量を前記培養液中でよく混合し、予め37 程度に加温したPEG溶液（例えば平均分子量1000～6000程度）を通常30～60%（w/v）の濃度で添加し、混合することによって目的とするハイブリドーマを形成する。続いて、適当な培養液を逐次添加し、遠心して上清を除去する操作を繰り返すことによりハイブリドーマの生育に好ましくない細胞融合剤等を除去する。

【0061】

このようにして得られたハイブリドーマは、通常を選択培養液、例えばHAT培養液（ヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジンを含む培養液）で培養することにより選択される。上記HAT培養液での培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞（非融合細胞）が死滅するのに十分な時間（通常、数日～数週間）継続する。ついで、通常の限界希釈法を実施し、目的とする抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニング及び単クローニングを行う。

10

【0062】

また、ヒト以外の動物に抗原を免疫して上記ハイブリドーマを得る他に、ヒトリンパ球、例えばEBウイルスに感染したヒトリンパ球を*in vitro*でタンパク質、タンパク質発現細胞又はその溶解物で感作し、感作リンパ球をヒト由来の永久分裂能を有するミエローム細胞、例えばU266（登録番号TIB196）と融合させ、所望の活性（例えば、細胞増殖抑制活性）を有するヒト抗体を産生するハイブリドーマを得ることもできる。

20

【0063】

このようにして作製されるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、通常培養液中で継代培養することが可能であり、また、液体窒素中で長期保存することが可能である。

【0064】

すなわち、所望の抗原や所望の抗原を発現する細胞を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナルな抗体産生細胞（ハイブリドーマ）をスクリーニングすることによって作製できる。

30

【0065】

本発明で使用可能な抗体の別の例がポリクローナル抗体である。ポリクローナル抗体は、例えば、次のようにして得ることができる。

【0066】

天然のCAPRIN-1タンパク質、あるいはGSTなどとの融合タンパク質として大腸菌等の微生物において発現させた組換えCAPRIN-1タンパク質、又はその部分ペプチドをマウス、ヒト抗体産生マウス、ウサギ等の小動物に免疫し血清を得る。これを、例えば、硫酸沈殿、プロテインA、プロテインGカラム、DEAEイオン交換クロマトグラフィー、CAPRIN-1タンパク質や合成ペプチドをカップリングしたアフィニティークラム等により精製することにより調製する。後述の実施例では、CAPRIN-1タンパク質のアミノ酸配列中、癌細胞の細胞表面に発現する領域の一部のペプチド（配列番号37で表される）に対するウサギポリクローナル抗体が作製され、抗腫瘍効果が確認されている。

40

【0067】

ここで、ヒト抗体産生マウスとしては、例えばKMマウス（キリンファーマ/Medarex）及びXenomaマウス（Amgen）が知られている（例えば、国際公開第WO02/43478号、同第WO02/092812号など）。このようなマウスをCAPRIN-1タンパク質又はその断片で免疫するときには、完全ヒトポリクローナル抗体を血液から得ることができる。また、免疫後のマウスから脾臓細胞を取出し、ミエローム細胞との融合法によりヒト型モノクローナル抗体を作製することができる。

50

【0068】

抗原の調製は、例えば、動物細胞を用いた方法（特表2007-530068）やバキュロウイルスを用いた方法（例えば、国際公開第WO98/46777号など）などに準じて行うことができる。抗原の免疫原性が低い場合には、アルブミン等の免疫原性を有する巨大分子と結合させ、免疫を行えばよい。

【0069】

さらにまた、抗体遺伝子をハイブリドーマからクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し、遺伝子組換え技術を用いて産生させた遺伝子組換え型抗体を用いることができる（例えば、Carl, A. K. Borrebaeck, James, W. Larrick, THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990参照）。具体的には、ハイブリドーマのmRNAから逆転写酵素を用いて抗体の可変領域（V領域）のcDNAを合成する。目的とする抗体のV領域をコードするDNAが得られれば、これを所望の抗体定常領域（C領域）をコードするDNAと連結し、これを発現ベクターへ組み込む。又は、抗体のV領域をコードするDNAを、抗体C領域のDNAを含む発現ベクターへ組み込んでよい。発現制御領域、例えば、エンハンサー、プロモーターの制御のもとで発現するよう発現ベクターに組み込む。次に、この発現ベクターにより宿主細胞を形質転換し、抗体を発現させることができる。

【0070】

本発明で用いられる抗CAPRIN-1抗体は、モノクローナル抗体であることが好ましい。しかし、ポリクローナル抗体、組換え抗体もしくは遺伝子改変抗体（例えば、キメラ抗体、ヒト化抗体、単鎖抗体、二重特異性抗体など）などであってもよい。

【0071】

モノクローナル抗体には、ヒトモノクローナル抗体、非ヒト動物モノクローナル抗体（例えばマウスモノクローナル抗体、ラットモノクローナル抗体、ウサギモノクローナル抗体、ニワトリモノクローナル抗体など）などが含まれる。モノクローナル抗体は、CAPRIN-1タンパク質を免疫した非ヒト哺乳動物（例えば、マウス、ヒト抗体産生マウスなど）からの脾細胞とミエローマ細胞との融合によって得られたハイブリドーマを培養することによって作製される。後述の実施例では、マウスモノクローナル抗体が作製され、抗腫瘍効果が確認された。

【0072】

これらのモノクローナル抗体は、配列番号43、配列番号73、配列番号83、配列番号93、配列番号103、配列番号113又は配列番号123のアミノ酸配列を有する重鎖可変（VH）領域と、配列番号47、配列番号53、配列番号58、配列番号63、配列番号68、配列番号77、配列番号87、配列番号97、配列番号107、配列番号117又は配列番号127のアミノ酸配列を有する軽鎖可変（VL）領域とを含み、ここで、該VH領域に配列番号40、配列番号70、配列番号80、配列番号90、配列番号100、配列番号110又は配列番号120のアミノ酸配列で表されるCDR1、配列番号41、配列番号71、配列番号81、配列番号91、配列番号101、配列番号111又は配列番号121のアミノ酸配列で表されるCDR2及び配列番号42、配列番号72、配列番号82、配列番号92、配列番号102、配列番号112又は配列番号122のアミノ酸配列で表されるCDR3が含まれ、該VL領域に配列番号44、配列番号50、配列番号55、配列番号60、配列番号65、配列番号74、配列番号84、配列番号94、配列番号104、配列番号114又は配列番号124のアミノ酸配列で表されるCDR1、配列番号45、配列番号51、配列番号56、配列番号61、配列番号66、配列番号75、配列番号85、配列番号95、配列番号105、配列番号115又は配列番号125のアミノ酸配列で表されるCDR2及び配列番号46、配列番号52、配列番号57、配列番号62、配列番号67、配列番号76、配列番号86、配列番号96、配列番号106、配列番号116又は配列番号126のアミノ酸配列で表されるCDR3が含まれ

る。

【0073】

キメラ抗体は、異なる動物由来の配列を組み合わせで作製される抗体であり、例えば、マウス抗体の重鎖、軽鎖の可変領域とヒト抗体の重鎖、軽鎖の定常領域からなる抗体などである。キメラ抗体の作製は公知の方法を用いて行うことができ、例えば、抗体V領域をコードするDNAとヒト抗体C領域をコードするDNAとを連結し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入し産生させることにより得られる。

【0074】

ポリクローナル抗体には、ヒト抗体産生動物（例えば、マウス）にCAPRIN-1タンパク質を免疫して得られる抗体が含まれる。

10

【0075】

ヒト化抗体は、再構成（reshaped）ヒト抗体とも称される改変抗体である。ヒト化抗体は、免疫動物由来の抗体のCDRを、ヒト抗体の相補性決定領域へ移植することによって構築される。その一般的な遺伝子組換え手法も知られている。

【0076】

具体的には、マウス抗体のCDRとヒト抗体のフレームワーク領域（framework region；FR）を連結するように設計したDNA配列を、末端部にオーバーラップする部分を有するように作製した数個のオリゴヌクレオチドからPCR法により合成する。得られたDNAを、ヒト抗体定常領域をコードするDNAと連結し、次いで発現ベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させることにより得られる（欧州特許出願公開第EP239400号、国際公開第WO96/02576号参照）。CDRを介して連結されるヒト抗体のFRは、相補性決定領域が良好な抗原結合部位を形成するものが選択される。必要に応じ、再構成ヒト抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成するように抗体の可変領域におけるフレームワーク領域のアミノ酸を置換してもよい（Sato K. et al., Cancer Research 1993, 53: 851-856）。また、様々なヒト抗体由来のフレームワーク領域に置換してもよい（国際公開第WO99/51743号参照）。

20

【0077】

CDRを介して連結されるヒト抗体のフレームワーク領域は、相補性決定領域が良好な抗原結合部位を形成するものが選択される。必要に応じ、再構成ヒト抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成するように、抗体の可変領域におけるフレームワーク領域のアミノ酸を置換してもよい（Sato K. et al., Cancer Research 1993, 53: 851-856）。

30

【0078】

キメラ抗体やヒト化抗体を作製した後に、可変領域（例えば、FR）や定常領域中のアミノ酸を他のアミノ酸で置換等してもよい。

【0079】

アミノ酸の置換は、例えば15未満、10未満、8以下、7以下、6以下、5以下、4以下、3以下、又は2以下のアミノ酸、好ましくは1～5アミノ酸、より好ましくは1又は2アミノ酸、の置換であり、置換抗体は、未置換抗体と機能的に同等であるべきである。置換は、保存的アミノ酸置換が望ましく、これは、電荷、側鎖、極性、芳香族性などの性質の類似するアミノ酸間の置換である。性質の類似したアミノ酸は、例えば、塩基性アミノ酸（アルギニン、リジン、ヒスチジン）、酸性アミノ酸（アスパラギン酸、グルタミン酸）、無電荷極性アミノ酸（グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、システイン、チロシン）、無極性アミノ酸（ロイシン、イソロイシン、アラニン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン、メチオニン）、分枝鎖アミノ酸（トレオニン、バリン、イソロイシン）、芳香族アミノ酸（フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、ヒスチジン）などに分類しうる。

40

【0080】

抗体は、化学的に修飾されていてもよく、そのような抗体修飾物としては、例えば、ポ

50

リエチレングリコール (P E G)、抗腫瘍性化合物 (例えば、下記に例示の抗腫瘍剤) 等の各種分子と結合した抗体を挙げることができる。本発明の抗体修飾物においては、結合される物質は限定されない。このような抗体修飾物を得るには、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。これらの方法はこの分野において既に確立されている。

【 0 0 8 1 】

ここで「機能的に同等」とは、対象となる抗体が本発明の抗体と同様の生物学的あるいは生化学的活性、具体的には腫瘍を障害する機能、を有すること、ヒトへの適用時に拒絶反応を本質的に起こさないことなどを指す。このような活性としては、例えば、細胞増殖抑制活性、あるいは結合活性を例示することができる。

10

【 0 0 8 2 】

あるポリペプチドと機能的に同等なポリペプチドを調製するための、当業者によく知られた方法としては、ポリペプチドに変異を導入する方法が知られている。例えば、当業者であれば、部位特異的変異誘発法 (Hashimoto - Gotoh, T. et al., (1995) Gene 152, 271 - 275、Zoller, M.J., and Smith, M. (1983) Methods Enzymol. 100, 468 - 500、Kramer, W. et al., (1984) Nucleic Acids Res. 12, 9441 - 9456、Kramer, W. and Fritz, H.J., (1987) Methods Enzymol. 154, 350 - 367、Kunkel, T.A., (1985) Proc Natl. Acad. Sci. USA. 82, 488 - 492、Kunkel (1988) Methods Enzymol. 85, 2763 - 2766) などを用いて、本発明の抗体に適宜変異を導入することにより、該抗体と機能的に同等な抗体を調製することができる。

20

【 0 0 8 3 】

上記抗 C A P R I N - 1 抗体が認識する C A P R I N - 1 タンパク質のエピトープを認識する、すなわち該エピトープと特異的に結合する、抗体は、当業者に公知の方法により得ることが可能である。例えば、抗 C A P R I N - 1 抗体が認識する C A P R I N - 1 タンパク質のエピトープを通常の方法 (例えば、エピトープマッピングなど) により決定し、該エピトープに含まれるアミノ酸配列を有するポリペプチドを免疫原として抗体を作製する方法や、通常の方法で作製された抗体のエピトープを決定し、抗 C A P R I N - 1 抗体とエピトープが同じ抗体を選択する方法などにより得ることができる。ここで、「エピトープ」は、哺乳動物、好ましくはヒトにおいて、抗原性又は免疫原性を有するポリペプチド断片を指し、その最小単位は、約 7 ~ 12 アミノ酸、好ましくは 8 ~ 11 アミノ酸からなる。

30

【 0 0 8 4 】

本発明で用いられる抗体の親和定数 K_a (k_{on} / k_{off}) は、好ましくは、少なくとも $10^7 M^{-1}$ 、少なくとも $10^8 M^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^8 M^{-1}$ 、少なくとも $10^9 M^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^9 M^{-1}$ 、少なくとも $10^{10} M^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^{10} M^{-1}$ 、少なくとも $10^{11} M^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^{11} M^{-1}$ 、少なくとも $10^{12} M^{-1}$ 、あるいは、少なくとも $10^{13} M^{-1}$ である。

40

【 0 0 8 5 】

本発明で用いられる抗体は、抗腫瘍剤とコンジュゲートすることができる。抗体と抗腫瘍剤との結合は、アミノ基、カルボキシル基、ヒドロキシ基、チオール基などと反応性の基 (例えば、コハク酸イミジル基、ホルミル基、2 - ピリジルジチオ基、マレイイミジル基、アルコキシカルボニル基、ヒドロキシ基など) をもつスペーサーを介して行うことができる。

【 0 0 8 6 】

本発明で使用可能な抗腫瘍剤の例は、文献等で公知の下記の抗腫瘍剤、すなわち、パクリタキセル、ドキソルビシン、ダウノルビシン、シクロホスファミド、メトトレキサート

50

、5 - フルオロウラシル、チオテパ、ブスルファン、インプロスルファン、ピボスルファン、ベンゾドーパ (benzodopa)、カルボコン、メツレドーパ (meturedopa)、ウレドーパ (uredopa)、アルトレートアミン (altretamine)、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミド、トリエチレンチオホスホラミド (triethylenethiophosphoramid)、トリメチローロメラミン (trimethylolomelamine)、プラタシン、プラタシノン、カンプトセシン、プリオスタチン、カリスタチン (callystatin)、クリプトフィシン1、クリプトフィシン8、ドラスタチン、ズオカルマイシン、エレウテロピン、パンクラチスタチン、サルコジクチン (sarcodictyin)、スポンジスタチン、クロランブシル、クロロナファジン (chlorNaphazine)、コロホスファミド (cholophosphamide)、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシドヒドロクロリド、メルファラン、ノベンビチン (novembichin)、フェネステリン (phenesterine)、プレドニムスチン (prednimustine)、トロフォスファミド (trofosfamide)、ウラシルマスタード、カルムスチン、クロロゾトシン (chlorozotocin)、フォテムスチン (fotemustine)、ロムスチン、ニムスチン、ラニムスチン、カリケアマイシン (calicheamicin)、ダイネマイシン、クロドロネート、エスペラマイシン、アクラシノマイシン、アクチノマイシン、オースラマイシン (authramycin)、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン (cactinomycin)、カラビシン (carabycin)、カルミノマイシン、カルジノフィリン (carzinophilin)、クロモマイシン、ダクチノマイシン、デトルピシン (detorbicin)、6 - ジアゾ - 5 - オキソ - L - ノルロイシン、アドリアマイシン (adriamycin)、エピルピシン、エソルピシン、イダルピシン、マーセルロマイシン (marcellomycin)、マイトマイシンC、マイコフェノール酸 (mycophenolic acid)、ノガラマイシン (nogalamycin)、オリボマイシン (olivomycins)、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン (potfiromycin)、ピューロマイシン、ケラマイシン (quelamycin)、ロドルピシン (rodorubicin)、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン (tubercidin)、ウベニメクス、ジノスタチン (zinostatin)、ゾルピシン (zorubicin)、デノプテリン (denopterin)、プテロプテリン (pteropterin)、トリメトレキセート (trimetrexate)、フルダラピン (fludarabine)、6 - メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニン、アンシタピン、アザシチジン (azacitidine)、6 - アザウリジン (azauridine)、カルモフル、シタラピン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタピン (enocitabine)、フロキシウリジン (floxuridine) ; アンドロゲン類、例えばカルステロン (calusterone)、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトン (testolactone)、アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタン、フロリン酸 (frolinic acid)、アセグラトン、アルドホスファミドグリコシド、アミノレブリン酸、エニルウラシル、アムサクリン (amsacrine)、ベストラブシル (bestrabucil)、ビスアントレン (bisantrene)、エダトラキセート (edatraxate)、デフォファミン (defofamine)、デメコルシン (demecolcine)、ジアジコン (diaziquone)、エルフォルニチン (elfornithine)、酢酸エリプチニウム (elliptinium)、エポチロン (epothilone)、エトグルシド (etoglucid)、レンチナン、ロニダミン (lonidamine)、メイタンシン (maytansine)、アンサミトシン (ansamitocine)、ミトグアゾン (mitoguanzone)、ミトキサントロン、モピダンモール (mopidanmol)、ニトラエリン (nitraerine)、ペントスタチン、フェナメット (phenamet)、ピラルピシン、ロソキサントロン (losoxantrone)、ポドフィリン酸 (pod

10

20

30

40

50

ophyllinic acid)、2-エチルヒドラジド、プロカルバジン、ラゾキサ
ン(razoxane)、リゾキシ、シゾフィラン、スピロゲルマニウム(spiro
germanium)、テニユアゾン酸(tenuazonic acid)、トリアジ
コン(triaziquone)、ロリジン(roridine)A、アングイジン(a
nguidine)、ウレタン、ピンデシン、ダカーバジン、マンノムスチン(mann
omustine)、ミトプロニトール、ミトラクトール(mitolactol)、ピ
ポブロマン(pipobroman)、ガシトシン(gacytosine)、ドキセタ
キセル、クロランブシル、ゲムシタピン(gemcitabine)、6-チオグアニ
ン、メルカプトプリン、シスプラチン、オキサリプラチン、カルボプラチン、ピンブラスチ
ン、エトポシド、イホスファミド、マイトキサントロン、ピンクリスチン、ビノレルピン
、ノバントロン(novantrone)、テニポシド、エダトレキセート(edatre
xate)、ダウノマイシン、アミノプテリン、キセローダ(xeloda)、イバン
ドロナート(ibandronate)、イリノテカン、トポイソメラーゼインヒビター
、ジフルオロメチロールニチン(DMFO)、レチノイン酸、カペシタピン(capec
itabine)、並びにそれらの薬学的に許容可能な(公知の)塩又は(公知の)誘導
体を包含する。

10

【0087】

あるいは、本発明で用いられる抗体には、文献等で公知の、²¹¹At、¹³¹I、¹²⁵I、⁹⁰Y、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re、¹⁵³SM、²¹²Bi、³²P、¹⁷⁵Lu、¹⁷⁶Luなどの放射性同位体を結合することも可能である。放射性同位体は、腫瘍
の治療や診断のために有効なものが望ましい。

20

【0088】

本発明で用いられる抗体は、CAPRIN-1と免疫学的反応性を有する抗体、あるい
は、CAPRIN-1を特異的に認識する抗体、あるいは、CAPRIN-1と特異的に
結合する抗体であって、癌に対する細胞障害活性、例えば腫瘍増殖抑制作用を示す抗体で
ある。該抗体は、それを投与する対象動物において拒絶反応がほとんど又はまったく回避
されるような構造をもつ抗体であるべきである。そのような抗体としては、例えば対象動物
がヒトである場合、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体(例えばヒト-マウスキメラ抗体
)、単鎖抗体、二重特異性抗体などが挙げられる。これらの抗体は、重鎖及び軽鎖の可変
領域がヒト抗体由来のものであるか、あるいは、重鎖及び軽鎖の可変領域が非ヒト動物抗
体由来の相補性決定領域(CDR1、CDR2及びCDR3)とヒト抗体由来のフレーム
ワーク領域からなるものであるか、あるいは、重鎖及び軽鎖の可変領域が非ヒト動物抗体
由来のものであり、かつ、重鎖及び軽鎖の定常領域がヒト抗体由来のものである組換え型
抗体である。好ましい抗体は、前2つの抗体である。

30

【0089】

これらの組換え型抗体は、次のようにして作製することができる。ハイブリドーマなど
の抗体産生細胞からヒトCAPRIN-1に対するモノクローナル抗体(例えば、ヒトモ
ノクローナル抗体、マウスモノクローナル抗体、ラットモノクローナル抗体、ウサギモノ
クローナル抗体、ニワトリモノクローナル抗体など)をコードするDNAをクローニング
し、これを鋳型にして該抗体の軽鎖可変領域及び重鎖可変領域をコードするDNAをRT
-PCR法等により作製し、Kabata numbering system(Kabatら、Sequences of Proteins of Immunolog
ical Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institute of Health, Bethe
sda, Md. (1991))に基づいて軽鎖及び重鎖の各可変領域の配列又は各C
DR1、CDR2、CDR3の配列を決定する。

40

【0090】

さらに、これらの各可変領域をコードするDNA又は各CDRをコードするDNAを、
遺伝子組換え技術(Sambrookら、Molecular Cloning A L
aboratory Manual, Cold Spring Harbor Lab

50

oratory Press (1989))又はDNA合成機を用いて作製する。ここで、上記ヒトモノクローナル抗体産生ハイブリドーマは、ヒト抗体産生動物(例えば、マウス)にヒトCAPRIN-1を免疫したのち、該免疫動物から切除した脾細胞とミエローマ細胞とを融合させることによって作製することができる。これとは別に、必要に応じて、遺伝子組換え技術又はDNA合成機を用いてヒト抗体由来の軽鎖又は重鎖の可変領域及び定常領域をコードするDNAを作製する。

【0091】

ヒト化抗体の場合には、ヒト抗体由来の軽鎖又は重鎖の可変領域をコードするDNA中のCDRコーディング配列を、それらに対応する、ヒト以外の動物(例えばマウス、ラット、ニワトリなど)由来の抗体のCDRコーディング配列と置換したDNAを作製し、それによって得られたDNAをそれぞれ、ヒト抗体由来の軽鎖又は重鎖の定常領域をコードするDNAと連結することによって、ヒト化抗体をコードするDNAを作製することができる。

10

【0092】

キメラ抗体の場合には、ヒト以外の動物(例えばマウス、ラット、ニワトリなど)由来の抗体の軽鎖又は重鎖の可変領域をコードするDNAをそれぞれ、ヒト抗体由来の軽鎖又は重鎖の定常領域をコードするDNAと連結することによって、キメラ抗体をコードするDNAを作製することができる。

【0093】

単鎖抗体の場合には、この抗体は重鎖可変領域と軽鎖可変領域とをリンカーを介して直線状に連結された抗体であり、重鎖可変領域をコードするDNA、リンカーをコードするDNA、及び軽鎖可変領域をコードするDNAを結合することによって単鎖抗体をコードするDNAを作製することができる。ここで、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域はいずれも、ヒト抗体由来のものであるか、あるいは、CDRのみヒト以外の動物(例えばマウス、ラット、ニワトリなど)由来の抗体のCDRによって置換されたヒト抗体由来のものである。また、リンカーは、12~19アミノ酸からなり、例えば15アミノ酸の(G4S)₃(G-B. Kimら, Protein Engineering Design and Selection 2007, 20(9): 425-432)が挙げられる。

20

【0094】

二重特異性抗体(diabody)の場合には、この抗体は2つの異なるエピトープと特異的に結合可能な抗体であり、例えば重鎖可変領域AをコードするDNA、軽鎖可変領域BをコードするDNA、重鎖可変領域BをコードするDNA、及び軽鎖可変領域AをコードするDNAをこの順序で結合する(ただし、軽鎖可変領域BをコードするDNAと重鎖可変領域BをコードするDNAとは上記のようなリンカーをコードするDNAを介して結合される。)ことによって二重特異性抗体をコードするDNAを作製することができる。ここで、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域はいずれも、ヒト抗体由来のものであるか、あるいは、CDRのみヒト以外の動物(例えばマウス、ラット、ニワトリなど)由来の抗体のCDRによって置換されたヒト抗体由来のものである。

30

【0095】

上記のようにして作製された組換えDNAを、1つ又は複数の適当なベクターに組み込み、これを宿主細胞(例えば、哺乳動物細胞、酵母細胞、昆虫細胞など)に導入し、(共)発現させることによって組換え型抗体を作製することができる(P. J. Delves, ANTIBODY PRODUCTION ESSENTIAL TECHNIQUES, 1997 WILEY; P. Shepherd and C. Dean, Monoclonal Antibodies, 2000 OXFORD UNIVERSITY PRESS; J. W. Goding, Monoclonal Antibodies: principles and practice, 1993 ACADEMIC PRESS)。

40

【0096】

50

上記の方法によって作製される本発明の抗体は、例えば以下の(a)~(k)の抗体が挙げられる。

【0097】

(a) 配列番号40、41及び42を含む重鎖可変領域CDR1~CDR3と配列番号44、45及び46を含む軽鎖可変領域CDR1~CDR3とを含む抗体(好ましくは配列番号43の重鎖可変領域及び配列番号47の軽鎖可変領域で構成される抗体)。

【0098】

(b) 配列番号40、41及び42を含む重鎖可変領域CDR1~CDR3と配列番号50、51及び52を含む軽鎖可変領域CDR1~CDR3とを含む抗体(好ましくは配列番号43の重鎖可変領域及び配列番号53の軽鎖可変領域で構成される抗体)。

10

【0099】

(c) 配列番号40、41及び42を含む重鎖可変領域CDR1~CDR3と配列番号55、56及び57を含む軽鎖可変領域CDR1~CDR3とを含む抗体(好ましくは配列番号43の重鎖可変領域及び配列番号58の軽鎖可変領域で構成される抗体)。

【0100】

(d) 配列番号40、41及び42を含む重鎖可変領域CDR1~CDR3と配列番号60、61及び62を含む軽鎖可変領域CDR1~CDR3とを含む抗体(好ましくは配列番号43の重鎖可変領域及び配列番号63の軽鎖可変領域で構成される抗体)。

【0101】

(e) 配列番号40、41及び42を含む重鎖可変領域CDR1~CDR3と配列番号65、66及び67を含む軽鎖可変領域CDR1~CDR3とを含む抗体(好ましくは配列番号43の重鎖可変領域及び配列番号68の軽鎖可変領域で構成される抗体)。

20

【0102】

(f) 配列番号70、71及び72を含む重鎖可変領域CDR1~CDR3と配列番号74、75及び76を含む軽鎖可変領域CDR1~CDR3とを含む抗体(好ましくは配列番号73の重鎖可変領域及び配列番号77の軽鎖可変領域で構成される抗体)。

【0103】

(g) 配列番号80、81及び82を含む重鎖可変領域CDR1~CDR3と配列番号84、85及び86を含む軽鎖可変領域CDR1~CDR3とを含む抗体(好ましくは配列番号83の重鎖可変領域及び配列番号87の軽鎖可変領域で構成される抗体)。

30

【0104】

(h) 配列番号90、91及び92を含む重鎖可変領域CDR1~CDR3と配列番号94、95及び96を含む軽鎖可変領域CDR1~CDR3とを含む抗体(例えば、配列番号93の重鎖可変領域及び配列番号97の軽鎖可変領域で構成される抗体)。

【0105】

(i) 配列番号100、101及び102を含む重鎖可変領域CDR1~CDR3と配列番号104、105及び106を含む軽鎖可変領域CDR1~CDR3とを含む抗体(例えば、配列番号103の重鎖可変領域及び配列番号107の軽鎖可変領域で構成される抗体)。

【0106】

(j) 配列番号110、111及び112を含む重鎖可変領域CDR1~CDR3と配列番号114、115及び116を含む軽鎖可変領域CDR1~CDR3とを含む抗体(例えば、配列番号113の重鎖可変領域及び配列番号117の軽鎖可変領域で構成される抗体)。

40

【0107】

(k) 配列番号120、121及び122を含む重鎖可変領域CDR1~CDR3と配列番号124、125及び126を含む軽鎖可変領域CDR1~CDR3とを含む抗体(例えば、配列番号123の重鎖可変領域及び配列番号127の軽鎖可変領域で構成される抗体)。

【0107】

ここで、配列番号40、41及び42、配列番号70、71及び72、配列番号80、

50

81及び82、配列番号90, 91及び92、配列番号100, 101及び102、配列番号110, 111及び112、配列番号120, 121及び122に示すアミノ酸配列はそれぞれ、マウス抗体重鎖可変領域のCDR1、CDR2及びCDR3であり、また、配列番号44、45及び46、配列番号50, 51及び52、配列番号55, 56及び57、配列番号60, 61及び62、配列番号65、66及び67、配列番号74, 75及び76、配列番号84、85及び86、配列番号94, 95及び96、配列番号104, 105及び106、配列番号114, 115及び116、配列番号124, 125及び126に示すアミノ酸配列はそれぞれ、マウス抗体軽鎖可変領域のCDR1、CDR2及びCDR3である。また、本発明のヒト化抗体、キメラ抗体、単鎖抗体又は二重特異性抗体は、例えば以下の抗体である(抗体(a)で例示する)。

10

【0108】

(i) 重鎖の可変領域が配列番号40、41及び42のアミノ酸配列及びヒト抗体由来のフレームワーク領域のアミノ酸配列を含み、かつ、軽鎖の可変領域が配列番号44、45及び46のアミノ酸配列及びヒト抗体由来のフレームワーク領域のアミノ酸配列を含む抗体(例えば、重鎖可変領域に配列番号43のアミノ酸配列を含み、かつ、軽鎖可変領域に配列番号47のアミノ酸配列を含む抗体)。

【0109】

(ii) 重鎖の可変領域が配列番号40、41及び42のアミノ酸配列及びヒト抗体由来のフレームワーク領域のアミノ酸配列を含み、かつ、重鎖の定常領域がヒト抗体由来のアミノ酸配列を含み、並びに、軽鎖の可変領域が配列番号44、45及び46のアミノ酸配列及びヒト抗体由来のフレームワーク領域のアミノ酸配列を含み、かつ、軽鎖の定常領域がヒト抗体由来のアミノ酸配列を含んでなる抗体(例えば、重鎖の可変領域が配列番号43のアミノ酸配列を含み、かつ、重鎖の定常領域がヒト抗体由来のアミノ酸配列を含み、並びに、軽鎖の可変領域が配列番号47のアミノ酸配列を含み、かつ、軽鎖の定常領域がヒト抗体由来のアミノ酸配列を含んでなる抗体)。

20

【0110】

なお、ヒト抗体重鎖及び軽鎖の定常領域及び可変領域の配列は、例えばNCBI(米国: GenBank、UniGeneなど)から入手可能であり、例えばヒトIgG1重鎖定常領域については登録番号J00228、ヒトIgG2重鎖定常領域については登録番号J00230、ヒトIgG3重鎖定常領域については登録番号X03604、ヒトIgG4重鎖定常領域については登録番号K01316、ヒト軽鎖定常領域については登録番号V00557、X64135、X64133など、ヒト軽鎖定常領域については登録番号X64132、X64134などの配列を参照することができる。

30

【0111】

上記抗体は、好ましくは、細胞障害活性を有しており、これによって抗腫瘍効果を発揮することができる。

【0112】

また、上記抗体における重鎖及び軽鎖の可変領域やCDRの特定の配列は、単に例示を目的としたものであり、特定の配列に限定されないことは明らかである。ヒトCAPRIN-1に対する別のヒト抗体又は非ヒト動物抗体(例えばマウス抗体)を産生しうるハイブリドーマを作製し、ハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体を回収し、ヒトCAPRIN-1との免疫学的結合性及び細胞障害活性を指標として目的の抗体であるか否かを判定する。それによって目的のモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを識別したのち、上記のとおり、該ハイブリドーマから目的の抗体の重鎖及び軽鎖の可変領域をコードするDNAを作製し配列決定し、該DNAを別の抗体の作製のために利用する。

40

【0113】

さらに本発明の上記抗体は、CAPRIN-1を特異的に認識するという特異性を有する限り、上記(i)から(iv)の各抗体の特にフレームワーク領域の配列及び/又は定常領域の配列において、1若しくは数個(好ましくは、1若しくは2個)のアミノ酸の置換、欠失又は付加があってもよい。ここで数個とは、2~5個、好ましくは2個又は3個

50

を意味する。

【0114】

本発明で用いられる抗体はさらに、本発明の上記抗体をコードするDNA、あるいは、上記抗体の重鎖又は軽鎖をコードするDNA、あるいは、上記抗体の重鎖又は軽鎖の可変領域をコードするDNAを利用して、遺伝子組換え技術により製造することもできる。そのようなDNAは、例えば抗体(a)の場合、配列番号40、41及び42のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む重鎖可変領域をコードするDNA、配列番号44、45及び46のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む軽鎖可変領域をコードするDNA、などを含む。

【0115】

これらの配列のDNAによってコードされる相補性決定領域(CDR)は、抗体の特異性を決定する領域であるため、抗体のそれ以外の領域(すなわち、定常領域及びフレームワーク領域)をコードする配列は他の抗体由来の配列であってもよい。ここで他の抗体とはヒト以外の生物由来の抗体も含むが、副作用低減の観点からはヒト由来のものが好ましい。すなわち、上記のDNAでは、重鎖及び軽鎖の各フレームワーク領域及び各定常領域をコードする領域がヒト抗体由来の対応アミノ酸配列をコードする塩基配列を含むことが好ましい。

【0116】

さらに、本発明で用いられる抗体をコードするDNAの別の例は、例えば抗体(a)の場合、配列番号43のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む重鎖可変領域をコードするDNA、軽鎖可変領域をコードする領域が配列番号47のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むDNAなどである。ここで、配列番号43のアミノ酸配列をコードする塩基配列の例は、配列番号48の塩基配列である。また、配列番号47のアミノ酸配列をコードする塩基配列の例は、配列番号49の塩基配列である。これらのDNAでも、重鎖及び軽鎖の各定常領域をコードする領域がヒト抗体由来の対応アミノ酸配列をコードする塩基配列を含むことが好ましい。

【0117】

上述のDNAは、例えば上記の方法又は以下の方法で得ることができる。まず、本発明の抗体に関わるハイブリドーマから、市販のRNA抽出キットを用いて全RNAを調製し、ランダムプライマー等を用いて逆転写酵素によりcDNAを合成する。次いで既知のマウス抗体重鎖遺伝子及び軽鎖遺伝子の各可変領域において、それぞれ保存されている配列のオリゴヌクレオチドをプライマーに用いたPCR法によって、抗体をコードするcDNAを増幅させる。定常領域をコードする配列については、既知の配列をPCR法で増幅することによって得ることができる。DNAの塩基配列は、配列決定用プラスミド又はファージに組み込むなどして、常法により決定することができる。

【0118】

上記抗体(a)~(k)に関わるDNAの具体例は以下の通りである。

【0119】

(i) 配列番号43、配列番号73、配列番号83、配列番号93、配列番号103、配列番号113、配列番号123、配列番号133、配列番号143又は配列番号153のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするDNAとして、配列番号48、配列番号78、配列番号88、配列番号98、配列番号108、配列番号118又は配列番号128の塩基配列を含むDNA。

【0120】

(ii) 配列番号47、配列番号53、配列番号58、配列番号63、配列番号68、配列番号77、配列番号87、配列番号97、配列番号107、配列番号117、配列番号127、配列番号137、配列番号147又は配列番号157のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするDNAとして、配列番号49、配列番号54、配列番号59、配列番号64、配列番号69、配列番号79、配列番号89、配列番号99、配列番号109、配列番号119又は配列番号129の塩基配列を含むDNA。

10

20

30

40

50

【0121】

本発明で用いられる抗CAPRIN-1抗体によるCAPRIN-1発現癌細胞に対する抗腫瘍効果は、以下の機序により起こると考えられる。

【0122】

CAPRIN-1発現細胞のエフェクター細胞抗体依存的細胞障害性(ADCC)、及びCAPRIN-1発現細胞の補体依存的細胞障害性(CDC)。

【0123】

従って、本発明で用いられる抗CAPRIN-1抗体の活性評価は、以下実施例に具体的に示されるように、生体外でCAPRIN-1タンパク質を発現する癌細胞に対して上記ADCC活性又はCDC活性を測定することで評価することができる。

10

【0124】

ADCC活性の測定は、例えばCytotoxicity Detection Kit (Roche)などの細胞障害活性測定用の市販のキットを使用することができる。この方法によれば、標的癌細胞と抗CAPRIN-1抗体とを氷上で反応させたのち、エフェクター細胞(例えばPBMC)と共に4時間培養し、培養上清について、培地に放出された乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)酵素活性又はCr51放射活性を測定することを含む手順によって行うことができる。また、CDC活性の測定は、標的癌細胞と抗CAPRIN-1抗体とを氷上で反応させたのち、補体溶液(例えば血清)と共に4時間培養し、培養上清について上記と同様の酵素活性又は放射活性を測定することを含む手順によって行うことができる。

20

【0125】

本発明で用いられる抗CAPRIN-1抗体は、癌細胞上のCAPRIN-1タンパク質と結合し、上記活性によって、抗腫瘍作用を示すことから、癌の治療あるいは予防に有用であると考えられる。すなわち本発明は、抗CAPRIN-1抗体を有効成分とする、癌の治療及び/又は予防のための医薬組成物を提供する。抗CAPRIN-1抗体を人体に投与する目的(抗体治療)で使用する場合には、免疫原性を低下させるため、ヒト抗体やヒト化抗体にすることが好ましい。

【0126】

なお、抗CAPRIN-1抗体と癌細胞表面上のCAPRIN-1タンパク質との結合親和性が高い程、抗CAPRIN-1抗体による、より強い抗腫瘍活性が得られる。従って、CAPRIN-1タンパク質と高い結合親和性を有する抗CAPRIN-1抗体を獲得できれば、より強い抗腫瘍効果が期待でき、癌の治療及び/または予防を目的とした医薬組成物として適応することが可能になる。高い結合親和性として、前述したように、結合定数(親和定数) $K_a(k_{on}/k_{off})$ が、好ましくは、少なくとも $10^7 M^{-1}$ 、少なくとも $10^8 M^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^8 M^{-1}$ 、少なくとも $10^9 M^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^9 M^{-1}$ 、少なくとも $10^{10} M^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^{10} M^{-1}$ 、少なくとも $10^{11} M^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^{11} M^{-1}$ 、少なくとも $10^{12} M^{-1}$ 、あるいは、少なくとも $10^{13} M^{-1}$ であることが望ましい。

30

【0127】

<抗原発現細胞への結合>

抗体がCAPRIN-1タンパク質に結合する能力は、実施例で述べられるようなたとえばELISA、ウエスタンブロット法、免疫蛍光及びフローサイトメトリー分析などを用いた結合アッセイを利用して特定することができる。

40

【0128】

<免疫組織化学染色>

CAPRIN-1タンパク質を認識する抗体は、当業者に周知の方法での免疫組織化学により、外科手術の間に患者から得た組織や、自然にまたはトランスフェクション後にCAPRIN-1を発現する細胞系を接種した異種移植組織を担持する動物から得た組織から、パラホルムアルデヒドまたはアセトン固定した凍結切片またはパラホルムアルデヒドで固定したパラフィン包埋した組織切片を使用して、CAPRIN-1との反応性に関し

50

て試験することができる。

【0129】

免疫組織化学染色のため、CAPRIN-1に対して反応性のある抗体を、様々な方法で染色させることができる。例えば、ホースラディッシュペルオキシダーゼ複合ヤギ抗マウス抗体やヤギ抗ウサギ抗体を反応させることにより、可視化することができる。

【0130】

<抗腫瘍剤>

本発明は、抗CAPRIN-1抗体と、上で例示したような抗腫瘍剤とを組み合わせることを特徴とする。抗CAPRIN-1抗体と抗腫瘍剤は、それぞれ抗腫瘍活性を有するが、これらを組み合わせて癌患者に投与することによって、実施例で示される通り相乗的に顕著な抗腫瘍効果、すなわち担癌動物モデルにおいて腫瘍をほぼ完全に退縮させる効果、が得られる。このような格別な抗腫瘍効果は、腫瘍の増殖が経時的に漸増するような、抗CAPRIN-1抗体及び抗腫瘍剤であっても、それらを併用するとき認められることから、まったく驚くべきことである。

【0131】

本発明において、抗CAPRIN-1抗体と組み合わせて用いられる抗腫瘍剤は、各種の癌や腫瘍の治療に使用されている、使用された、或いは使用されるであろう、化学療法剤のすべてを包含する。そのような抗腫瘍剤は、代謝拮抗薬、抗生物質抗癌剤、植物アルカロイド系抗癌剤、トポイソメラーゼ阻害剤、抗腫瘍アルキル化剤などであり、例えば文献等で公知の上記例示の抗腫瘍剤のすべてが含まれる。非限定的な具体的な例として、後述の実施例で使用された抗腫瘍剤、すなわちシクロホスファミド、パクリタキセル、ドセタキセル、ピノレルピンなどの抗癌剤が挙げられ、これらの顕著な抗腫瘍効果が確認されている。それゆえ、本発明においては、シクロホスファミド、パクリタキセル、ドセタキセル及びピノレルピン並びにそれらの薬学的に許容可能な塩又は誘導体から選択される1種類又は2種類以上を抗腫瘍剤として使用することができる。

【0132】

<癌の治療及び/又は予防用の医薬品>

本発明の癌の治療及び/又は予防用医薬品の標的は、CAPRIN-1遺伝子を発現する癌(細胞)であれば特に限定されない。

【0133】

本明細書で使用される「腫瘍」及び「癌」という用語は、悪性新生物を意味し、互換的に使用される。

【0134】

本発明の医薬品は、CAPRIN-1タンパク質と免疫学的反応性を有する抗体又はそのフラグメントと、1種類又は2種類以上の抗腫瘍剤とを、一緒に又は別々に、組み合わせて含むことを特徴とする。すなわち、これらの有効成分と一緒に組み合わせる場合、上記抗体又はそのフラグメントと上記抗腫瘍剤を担体(もしくは、賦形剤)中に一緒に混合して製剤化し医薬組成物とすることができる。一方、これらの有効成分を別々に組み合わせる場合、上記抗体又はそのフラグメントを有効成分として含有する医薬組成物と、上記抗腫瘍剤を有効成分として含有する医薬組成物とを別個に製剤化したのち製薬キットの形態の医薬品にすることができる。医薬組成物及び製薬キットについては、以下で具体的に説明される。

【0135】

本発明において対象となる癌としては、配列番号2~30のうち偶数の配列番号のアミノ酸配列を有するCAPRIN-1タンパク質をコードする遺伝子を発現している癌であり、好ましくは、乳癌、脳腫瘍、白血病、肺癌、リンパ腫、肥満細胞腫、腎癌、子宮頸癌、膀胱癌、食道癌、胃癌及び大腸癌である。

【0136】

これらの特定の癌には、例えば、乳癌、複合型乳癌、乳癌悪性混合腫瘍、乳管内乳頭状腺癌、肺腺癌、扁平上皮癌、小細胞癌、大細胞癌、神経上皮組織性腫瘍である神経膠

10

20

30

40

50

腫(グリオーマ)、脳室上衣腫、神経細胞性腫瘍、胎児型の神経外胚葉性腫瘍、神経鞘腫、神経線維腫、髄膜腫、慢性型リンパ球性白血病、リンパ腫、消化管型リンパ腫、消化器型リンパ腫、小～中細胞型リンパ腫、盲腸癌、上行結腸癌、下行結腸癌、横行結腸癌、S状結腸癌、直腸癌などが包含されるが、これらに限定されない。

【0137】

また、対象となる被験者は、哺乳動物であり、例えば霊長類、ペット動物、家畜類、競技用動物などを含む哺乳動物であり、特にヒト、イヌ及びネコが好ましい。

【0138】

<医薬組成物>

本発明の癌の治療及び/又は予防用医薬品を構成する有効成分、すなわち上記抗体もしくはそのフラグメント及び上記抗腫瘍剤は、それらを一緒に混合した医薬組成物或いはそれらの別個の医薬組成物として、当業者に公知の方法で製剤化することが可能である。

【0139】

例えば、水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、又は懸濁液剤の注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、薬理学上許容される担体もしくは媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、結合剤などと適宜組み合わせ、一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製剤化することが考えられる。また、本発明の医薬組成物には薬理学上許容される塩を含むことも可能である。薬理学上許容可能な塩としては、例えば、塩酸またはリン酸などの無機酸、または酢酸、酒石酸、マンデル酸等の有機酸を用いることができる。また、遊基カルボキシル基と形成される塩を用いることができ、例えば、ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、二価の鉄の水酸化物などの無機塩基、及びイソプロピルアミン、トリメチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインなどの有機塩基から誘導することもできる。

【0140】

注射のための無菌組成物は注射用蒸留水のようなベヒクルを用いて通常の製剤実施に従って処方することができる。

【0141】

注射用の水溶液としては、例えば生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液、例えばD-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウムが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えばアルコール、具体的にはエタノール、ポリアルコール、例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、非イオン性界面活性剤、例えばポリソルベート80(TM)、HCO-60と併用してもよい。

【0142】

油性液としてはゴマ油、大豆油があげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールと併用してもよい。また、緩衝剤、例えばリン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液、無痛化剤、例えば、塩酸プロカイン、安定剤、例えばベンジルアルコール、フェノール、酸化防止剤と配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填させる。

【0143】

投与は、経口又は非経口であり、非経口投与としては、注射剤型、経鼻投与剤型、経肺投与剤型、経皮投与型などが挙げられる。注射剤型の例としては、例えば、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射などにより全身又は局部的に投与することができる。また、非経口投与の場合、時間をかけたゆっくりとしたインフュージョン投与が可能である。また、患者の年齢、体重、性別、症状などにより適当投与方法を選択することができる。抗体を含有する医薬組成物については非経口投与が好ましいが、一方、抗腫瘍剤を含有する医薬組成物については、抗腫瘍剤の種類や適応症に応じて経口投与又は非経口投与のいずれかが選択される。

【0144】

本発明の癌の治療及び/又は予防のための医薬組成物において、上記抗体の投与量とし

10

20

30

40

50

ては、例えば、一回につき体重 1 k g あたり 0 . 0 0 0 1 m g から 1 0 0 0 m g の範囲で選ぶことが可能である。あるいは、例えば、患者あたり 0 . 0 0 1 ~ 1 0 0 0 0 0 m g / b o d y の範囲で投与量を選ぶことができるが、これらの数値に必ずしも制限されるものではない。また、上記抗腫瘍剤の投与量としては、例えば、患者あたり 1 ~ 1 0 0 0 m g / b o d y 、好ましくは 1 0 ~ 5 0 0 m g / b o d y の範囲で投与量を選ぶことができるが、これらの数値に必ずしも制限されるものではない。なお、投与量、投与方法は、患者の体重、年齢、性別、症状などにより変動するが、当業者であれば適宜選択することが可能である。

【 0 1 4 5 】

< 投与方法 >

本発明の癌の治療及び / 又は予防剤による癌の治療及び / 又は予防は、上記の医薬組成物として投与することの他に様々な形式を含む。例えば、本発明の癌の治療及び / 又は予防剤の各有効成分は、同時に、または順序に従って個別に投与することができる。具体例として、約 3 週間までの時間間隔内で、すなわち 1 番目の有効成分を投与した直後から約 3 週間までに 2 番目の有効成分を投与することができる。その際、外科的処置に引き続いて実施しても、1 番目の薬剤と 2 番目の薬剤の投与間に外科的処置を実施してもよい。また、本発明の癌の治療及び / 又は予防剤を、複数の投与サイクルに従って投与してもよい。例えば、本発明の癌の治療及び / 又は予防剤の各有効成分の同時投与を実施した場合、両方の有効成分を含む医薬組成物を約 2 日から約 3 週間を 1 サイクルとして投与する。その後は該治療サイクルを担当する医師の判断に従って、必要に応じて繰り返すことも可能である。同様に順序に従った処方を計画する場合、それぞれの個々の薬剤の投与期間が同じ期間に及ぶように調節する。サイクル間の間隔は 0 ~ 2 ヶ月まで変えることができる。本発明の癌の治療及び / 又は予防剤の各有効成分の投与量は、医薬組成物での各有効成分の投与量と同様に設定することができる。

【 0 1 4 6 】

< 製薬キット >

本発明の癌の治療及び / 又は予防用の医薬品は、製薬キットの形態であってもよい。製薬キットとは、癌を治療または予防する方法において、有効成分である上記抗 C A P R I N - 1 抗体もしくはそのフラグメント及び上記抗腫瘍剤を別個の医薬組成物の形態で使用するためのパッケージであり、該パッケージには各有効成分を投与するための指示書が含まれる。製薬キットに含まれる癌の治療及び / 又は予防用の上記医薬組成物の各有効成分は、各有効成分を一緒に又は別々に投与できるようにそれぞれが上記の通り製剤化された医薬組成物の形態でありうる。また、製薬キットには、各有効成分を上記投与方法に従って投与できるよう、1 つまたは複数回の用量に十分な量の有効成分が含まれる。

【 0 1 4 7 】

上で具体的に説明した内容に基づいて、本発明はさらに、本発明の上記医薬品を、癌をもつと疑われる（癌をもつことを包含する。）被験者に投与することを含む、癌の治療及び / 又は予防のための方法を提供する。また、その実施形態において、上記医薬品に含まれる、抗体又はそのフラグメント及び抗腫瘍剤は、同時に又は別々に、上記被験者に投与される。

【 実施例 】

【 0 1 4 8 】

以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらの具体例によって制限されないものとする。

【 0 1 4 9 】

実施例 1 S E R E X 法による新規癌抗原タンパクの同定

(1) c D N A ライブラリーの作製

健常な犬の精巣組織から酸グアニジウム - フェノール - クロロホルム法 (A c i d g u a n i d i u m - P h e n o l - C h l o r o f o r m 法) により全 R N A を抽出し、O l i g o t e x - d T 3 0 m R N A p u r i f i c a t i o n K i t (宝酒造社

10

20

30

40

50

製)を用いてキット添付のプロトコルに従ってポリA RNAを精製した。

【0150】

この得られたmRNA(5µg)を用いてイヌ精巢cDNAファージライブラリーを合成した。cDNAファージライブラリーの作製にはcDNA Synthesis Kit, ZAP-cDNA Synthesis Kit, ZAP-cDNA Giga pack II Gold Cloning Kit (STRATAGENE社製)を用い、キット添付のプロトコルに従ってライブラリーを作製した。作製したcDNAファージライブラリーのサイズは 7.73×10^5 pfu/mlであった。

【0151】

(2) 血清によるcDNAライブラリーのスクリーニング

上記作製したイヌ精巢cDNAファージライブラリーを用いて、イムノスクリーニングを行った。具体的には90×15mmのNZYアガロースプレートに2210クローンとなるように宿主大腸菌(XL1-Blue MRF')に感染させ、42℃、3~4時間培養し、溶菌斑(プラーク)を作らせ、IPTG(イソプロピル-β-D-チオガラクトシド)を浸透させたニトロセルロースメンブレン(Hybond C Extra: GE Healthcare Bio-Science社製)でプレートを37℃で4時間覆うことによりタンパク質を誘導・発現させ、メンブレンにタンパク質を転写した。その後メンブレンを回収し0.5%脱脂粉乳を含むTBS(10mM Tris-HCl, 150mM NaCl pH7.5)に浸し4℃で一晩振盪することによって非特異反応を抑制した。このフィルターを500倍希釈した患犬血清と室温で2~3時間反応させた。

【0152】

上記患犬血清としては、乳癌の患犬より採取した血清を用いた。これらの血清は-80℃で保存し、使用直前に前処理を行った。血清の前処理方法は、以下の方法による。すなわち、外来遺伝子を挿入していないZAP Expressファージを宿主大腸菌(XL1-Blue MRF')に感染させた後、NZYプレート培地上で37℃、一晩培養した。次いで0.5M NaClを含む0.2M NaHCO₃ pH8.3のバッファーをプレートに加え、4℃で15時間静置後、上清を大腸菌/ファージ抽出液として回収した。次に、回収した大腸菌/ファージ抽出液をNHS-カラム(GE Healthcare Bio-Science社製)に通液して、大腸菌・ファージ由来のタンパク質を固定化した。このタンパク固定化カラムに患犬血清を通液・反応させ、大腸菌及びファージに吸着する抗体を血清から取り除いた。カラムを素通りした血清画分は、0.5%脱脂粉乳を含むTBSにて500倍希釈し、これをイムノスクリーニング材料とした。

【0153】

かかる処理血清と上記融合タンパク質をプロットしたメンブレンをTBS-T(0.05% Tween 20/TBS)にて4回洗浄を行った後、二次抗体として0.5%脱脂粉乳を含むTBSにて5000倍希釈を行ったヤギ抗イヌIgG(Goat anti Dog IgG-h+I HRP conjugated: BETHYL Laboratories社製)を、室温1時間反応させ、NBT/BCIP反応液(Roche社製)を用いた酵素発色反応により検出し、発色反応陽性部位に一致するコロニーを90×15mmのNZYアガロースプレート上から採取し、SM緩衝液(100mM NaCl, 10mM MgClSO₄, 50mM Tris-HCl, 0.01%ゼラチン pH7.5)500µlに溶解させた。発色反応陽性コロニーが単一化するまで上記と同様の方法で、二次、三次スクリーニングを繰り返し、血清中のIgGと反応する30940個のファージクローンをスクリーニングして、5個の陽性クローンを単離した。

【0154】

(3) 単離抗原遺伝子の相同性検索

上記方法により単離した5個の陽性クローンを塩基配列解析に供するため、ファージベクターからプラスミドベクターに転換する操作を行った。具体的には宿主大腸菌(XL1-Blue MRF')を吸光度OD₆₀₀が1.0となるよう調製した溶液200µl

10

20

30

40

50

と、精製したファージ溶液 250 μ l さらに Ex Assist helper phage (STRATAGENE 社製) 1 μ l を混合した後 37 °C で 15 分間反応後、LB 培地を 3 ml 添加し 37 °C で 2.5 ~ 3 時間培養を行い、直ちに 70 °C の水浴にて 20 分間保温した後、4 °C、1000 \times g、15 分間遠心分離を行い上清をファージミド溶液として回収した。次いでファージミド宿主大腸菌 (SOLR) を吸光度 OD₆₀₀ が 1.0 となるよう調製した溶液 200 μ l と、精製したファージ溶液 10 μ l を混合した後 37 °C で 15 分間反応させ、50 μ l をアンピシリン (終濃度 50 μ g/ml) 含有 LB 寒天培地に播き 37 °C 一晩培養した。トランスフォームした SOLR のシングルコロニーを採取し、アンピシリン (終濃度 50 μ g/ml) 含有 LB 培地 37 °C にて培養後、QIAGEN plasmid Miniprep Kit (キアゲン社製) を使って目的のインサートを持つプラスミド DNA を精製した。

10

【0155】

精製したプラスミドは、配列番号 31 に記載の T3 プライマーと配列番号 32 に記載の T7 プライマーを用いて、プライマーウォーキング法によるインサート全長配列の解析を行った。このシーケンス解析により配列番号 5, 7, 9, 11, 13 に記載の遺伝子配列を取得した。この遺伝子の塩基配列及びアミノ酸配列 (配列番号 6, 8, 10, 12, 14) を用いて、相同性検索プログラム BLASTサーチ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) を行い既知遺伝子との相同性検索を行った結果、得られた 5 個の遺伝子全てが CAPRIN-1 をコードする遺伝子であることが判明した。5 個の遺伝子間の配列同一性は、タンパク質に翻訳される領域において塩基配列 100%、アミノ酸配列 99% であった。この遺伝子のヒト相同因子をコードする遺伝子との配列同一性は、タンパク質に翻訳される領域において、塩基配列 94%、アミノ酸配列 98% であった。ヒト相同因子の塩基配列を配列番号 1, 3 に、アミノ酸配列を配列番号 2, 4 に示す。また、取得したイヌ遺伝子のウシ相同因子をコードする遺伝子との配列同一性は、タンパク質に翻訳される領域において、塩基配列 94%、アミノ酸配列 97% であった。ウシ相同因子の塩基配列を配列番号 15 に、アミノ酸配列を配列番号 16 に示す。なお、ヒト相同因子をコードする遺伝子とウシ相同因子をコードする遺伝子との配列同一性は、タンパク質に翻訳される領域において、塩基配列 94%、アミノ酸配列 93 ~ 97% であった。また、取得したイヌ遺伝子のウマ相同因子をコードする遺伝子との配列同一性は、タンパク質に翻訳される領域において、塩基配列 93%、アミノ酸配列 97% であった。ウマ相同因子の塩基配列を配列番号 17 に、アミノ酸配列を配列番号 18 に示す。なお、ヒト相同因子をコードする遺伝子とウマ相同因子をコードする遺伝子との配列同一性は、タンパク質に翻訳される領域において、塩基配列 93%、アミノ酸配列 96% であった。また、取得したイヌ遺伝子のマウス相同因子をコードする遺伝子との配列同一性は、タンパク質に翻訳される領域において、塩基配列 87 ~ 89%、アミノ酸配列 95 ~ 97% であった。マウス相同因子の塩基配列を配列番号 19, 21, 23, 25, 27 に、アミノ酸配列を配列番号 20, 22, 24, 26, 28 に示す。なお、ヒト相同因子をコードする遺伝子とマウス相同因子をコードする遺伝子との配列同一性は、タンパク質に翻訳される領域において、塩基配列 89 ~ 91%、アミノ酸配列 95 ~ 96% であった。また、取得したイヌ遺伝子のニワトリ相同因子をコードする遺伝子との配列同一性は、タンパク質に翻訳される領域において、塩基配列 82%、アミノ酸配列 87% であった。ニワトリ相同因子の塩基配列を配列番号 29 に、アミノ酸配列を配列番号 30 に示す。なお、ヒト相同因子をコードする遺伝子とニワトリ相同因子をコードする遺伝子との配列同一性は、タンパク質に翻訳される領域において、塩基配列 81 ~ 82%、アミノ酸配列 86% であった。

20

30

40

【0156】

(4) 各組織での遺伝子発現解析

上記方法により得られた遺伝子に対しイヌ及びヒトの正常組織及び各種細胞株における発現を RT-PCR 法により調べた。逆転写反応は以下の通り行なった。すなわち、各組織 5 mg 及び各細胞株 5 ~ 10 \times 10⁶ 個の細胞から TRIzol 試薬 (in vitro

50

gen社製)を用いて添付のプロトコルに従い全RNAを抽出した。この全RNAを用いてSuperscript First-Strand Synthesis System for RT-PCR(invitrogen社製)により添付のプロトコルに従いcDNAを合成した。PCR反応は、取得した遺伝子特異的なプライマー(配列番号33及び34に記載)を用いて以下の通り行った。すなわち、逆転写反応により調製したサンプル0.25µl、上記プライマーを各2µM、0.2mM各dNTP、0.65UのExTaqポリメラーゼ(宝酒造社製)となるように各試薬と添付バッファーを加え全量を25µlとし、Thermal Cycler(BIO RAD社製)を用いて、94 - 30秒、60 - 30秒、72 - 30秒のサイクルを30回繰り返して行った。なお、上記遺伝子特異的なプライマーは、配列番号5の塩基配列(イヌCAPRIN-1遺伝子)中の206番~632番及び配列番号1の塩基配列(ヒトCAPRIN-1遺伝子)中の698番~1124番塩基の領域を増幅するものであった。比較対照のため、GAPDH特異的なプライマー(配列番号35及び36に記載)も同時に用いた。その結果、図1に示すように、健全なイヌ組織では精巣に強い発現が見られ、一方イヌ乳癌及び腺癌組織で発現が見られた。さらに、取得した遺伝子のヒト相同因子の発現を併せて確認したところ、イヌCAPRIN-1遺伝子と同様、正常組織で発現が確認できたのは精巣のみだったが、癌細胞では乳癌、脳腫瘍、白血病、肺癌、食道癌細胞株など、多種類の癌細胞株で発現が検出され、特に多くの乳癌細胞株で発現が確認された。この結果から、CAPRIN-1は精巣以外の正常組織では発現が見られず、一方、多くの癌細胞で発現しており、特に乳癌細胞株に発現していることが確認された。

【0157】

なお、図1中、縦軸の参照番号1は、上記で同定した遺伝子の発現パターンを、参照番号2は、比較対照であるGAPDH遺伝子の発現パターンを示す。

【0158】

(5)免疫組織化学染色

(5)-1 マウス及びイヌ正常組織におけるCAPRIN-1の発現

マウス(Balb/c、雌)及びイヌ(ビーグル犬、雌)をエーテル麻酔下及びケタミン/イソフルラン麻酔下で放血させ、開腹後、各臓器(胃、肝臓、眼球、胸腺、筋肉、骨髄、子宮、小腸、食道、心臓、腎臓、唾液腺、大腸、乳腺、脳、肺、皮膚、副腎、卵巣、膵臓、脾臓、膀胱)をそれぞれPBSの入った10cmディッシュに移した。PBS中で各臓器を切り開き、4% paraformaldehyde(PFA)を含む0.1Mリン酸緩衝液(pH7.4)で一晩還流固定した。還流液を捨て、PBSで各臓器の組織表面をすすぎ、10% ショ糖を含むPBS溶液を50ml容の遠心チューブに入れ、その中に各組織を入れて4℃で2時間ローターを用いて振とうした。20% ショ糖を含むPBS溶液に入れ替え、4℃で組織が沈むまで静置後、30% ショ糖を含むPBS溶液に入れ替え、4℃で組織が沈むまで静置した。組織を取り出し、必要な部分を手術用メスで切りだした。次に、OCTコンパウンド(Tissue Tek社製)をかけて組織表面になじませた後、クライオモールドに組織を配置した。ドライアイスの上にクライオモールドをおいて急速凍結させた後、クライオスタット(LEICA社製)を用いて10~20µmに薄切し、スライドガラスごとヘアードライヤーで30分間風乾し、薄切組織がのったスライドガラス作製した。次にPBS-T(0.05% Tween20を含む生理食塩水)を満たした染色瓶に入れて5分ごとにPBS-Tを入れ替える操作を3回行った。切片周囲の余分な水分をキムワイプでふき取り、DAKOPEN(DAKO社製)で囲んだ後、ブロッキング液として、マウス組織はMOMマウスIgブロッキング試薬(VECTASTAIN社製)を、イヌ組織は10% FBSを含むPBS-T溶液をそれぞれのせ、モイストチャンバー上で室温で1時間静置した。次に、実施例3で作製した癌細胞表面に反応する、配列番号:73の重鎖可変領域と配列番号:77の軽鎖可変領域を有するCAPRIN-1に対するモノクローナル抗体(モノクローナル抗体#6)をブロッキング液で10µg/mlに調製した溶液をのせ、モイストチャンバー内で4℃下で一晩静置した。PBS-Tで10分間3回洗浄を行った後、ブロッキング液で250倍に希釈した

MOMビオチン標識抗IgG抗体(VECTASTAIN社製)をのせ、モイストチャンパー内で室温で1時間静置した。PBS-Tで10分間3回洗浄を行った後、アビジン-ビオチンABC試薬(VECTASTAIN社製)をのせ、モイストチャンパー内で室温で5分間静置した。PBS-Tで10分間3回洗浄を行った後、DAB発色液(DAB 10mg + 30% H₂O₂ 10μl / 0.05M Tris-HCl (pH 7.6) 50ml)をのせ、モイストチャンパー内で室温で30分間静置した。蒸留水でリンスし、ヘマトキシリン試薬(DAKO社製)を載せて室温で1分間静置後、蒸留水でリンスした。70%、80%、90%、95%、100%の各エタノール溶液に順番に1分間ずつ入れた後、キシレン中で一晩静置した。スライドガラスを取り出し、Glycer gel Mounting Medium (DAKO社製)で封入後、観察を行った。その結果、CAPRIN-1は、唾液腺、腎臓、結腸、胃の各組織において細胞内で僅かに発現が認められたが、細胞表面での発現は認められず、また、その他の臓器由来の組織では全く発現が認められなかった。なお、本結果は、配列番号103の重鎖可変領域と配列番号107の軽鎖可変領域を有するCAPRIN-1に対するモノクローナル抗体(モノクローナル抗体#9)を用いた場合も同様であった。

10

【0159】

(5) - 2 イヌ乳癌組織におけるCAPRIN-1の発現

病理診断で悪性乳癌と診断されたイヌの凍結された乳癌組織108検体を用いて、上述と同様の方法で凍結切片スライド作製及び実施例3で作製したモノクローナル抗体#6を用いた免疫組織化学染色を行った。その結果、CAPRIN-1は108検体中100検体(92.5%)で発現が確認され、特に異型度の高い癌細胞表面に強く発現していた。なお、本結果は、実施例3で作製したモノクローナル抗体#9を用いた場合も同様であった。

20

【0160】

(5) - 3 ヒト乳癌組織におけるCAPRIN-1の発現

パラフィン包埋されたヒト乳癌組織アレイ(BIOMAX社製)の乳癌組織188検体を用いて、免疫組織化学染色を行った。ヒト乳癌組織アレイを60で3時間処理後、キシレンを満たした染色瓶に入れて5分ごとにキシレンを入れ替える操作を3回行った。次にキシレンの代わりにエタノール及びPBS-Tで同様の操作を行った。0.05% Tween 20を含む10mM クエン酸緩衝液(pH 6.0)を満たした染色瓶にヒト乳癌組織アレイを入れ、125で5分間処理後、室温で40分以上静置した。切片周囲の余分な水分をキムワイプでふき取り、DAKOPENで囲み、Peroxidase Block (DAKO社製)を適量滴下した。室温で5分間静置後、PBS-Tを満たした染色瓶に入れて5分ごとにPBS-Tを入れ替える操作を3回行った。ブロッキング液として、10% FBSを含むPBS-T溶液をのせ、モイストチャンパー内で室温で1時間静置した。次に実施例4で作製した癌細胞表面に反応するモノクローナル抗体#6を5% FBSを含むPBS-T溶液で10μg/mlに調製した溶液をのせ、モイストチャンパー内で4で一晩静置し、PBS-Tで10分間3回洗浄を行った後、Peroxidase Labelled Polymer Conjugated (DAKO社製)適量滴下し、モイストチャンパー内で室温で30分間静置した。PBS-Tで10分間3回洗浄を行った後、DAB発色液(DAKO社製)をのせ、室温で10分程度静置した後、発色液を捨て、PBS-Tで10分間3回洗浄を行った後、蒸留水でリンスし、70%、80%、90%、95%、100%の各エタノール溶液に順番に1分間ずつ入れた後、キシレン中で一晩静置した。スライドガラスを取り出し、Glycer gel Mounting Medium (DAKO社製)で封入後、観察を行った。その結果、CAPRIN-1は全乳癌組織188検体の内、138検体(73%)で強い発現が認められた。なお、本結果は、実施例3で作製したモノクローナル抗体#2または#9を用いた場合も同様であった。

30

40

【0161】

(5) - 4 ヒト悪性脳腫瘍におけるCAPRIN-1の発現

50

パラフィン包埋されたヒト悪性脳腫瘍組織アレイ (BIOMAX社製) の悪性脳腫瘍組織 247 検体を用いて、上述 (5) - 3 と同様の方法で実施例 3 で作製したモノクローナル抗体 # 6 を用いた免疫組織化学染色を行った。その結果、CAPRIN - 1 は全悪性脳腫瘍組織 247 検体の内、227 検体 (92%) で強い発現が認められた。なお、本結果は、実施例 3 で作製したモノクローナル抗体 # 2 または # 9 を用いた場合も同様であった。

【0162】

(5) - 5 ヒト乳癌転移リンパ節における CAPRIN - 1 の発現

パラフィン包埋されたヒト乳癌転移リンパ節組織アレイ (BIOMAX社製) の乳癌転移リンパ節組織 150 検体を用いて、上述 (5) - 3 と同様の方法で実施例 3 で作製したモノクローナル抗体 # 6 を用いた免疫組織化学染色を行った。その結果、CAPRIN - 1 は全乳癌転移リンパ節組織 150 検体の内、136 検体 (90%) で強い発現が認められた。すなわち、乳癌から転移した癌組織においても CAPRIN - 1 は強く発現することが判った。なお、本結果は、実施例 3 で作製したモノクローナル抗体 # 2 または # 9 を用いた場合も同様であった。

10

【0163】

(5) - 6 ヒト各種癌組織における CAPRIN - 1 の発現

パラフィン包埋されたヒト各種癌組織アレイ (BIOMAX社製) の検体を用いて、上述と同様の方法によって、実施例 3 で作製したモノクローナル抗体 # 6 を用いた免疫組織化学染色を行った。その結果、CAPRIN - 1 は食道癌、結腸癌、直腸癌、肺癌、腎癌、膀胱癌及び子宮頸癌で強い発現が認められた。なお、本結果は、モノクローナル抗体 # 2 または # 9 を用いた場合も同様であった。

20

【0164】

実施例 2 ヒト新規癌抗原タンパクの作製

(1) 組換えタンパク質の作製

配列番号 1 の遺伝子を基に、以下の方法にてヒト相同遺伝子の組換えタンパク質を作製した。PCR は、乳癌組織・細胞 cDNA より RT - PCR 法による発現が確認できた cDNA を 1 μ l、Sac I 及び Xho I 制限酵素切断配列を含む 2 種類のプライマー (配列番号 38 及び及び 39 に記載) を各 0.4 μ M, 0.2 mM dNTP, 1.25 U の PrimeSTAR HS ポリメラーゼ (宝酒造社製) となるように各試薬と添付バッファーを加え全量を 50 μ l とし、Thermal Cycler (BIORAD社製) を用いて、98 - 10 秒、68 - 2.5 分のサイクルを 30 回繰り返すことにより行った。なお、上記 2 種類のプライマーは、配列番号 2 のアミノ酸配列全長をコードする領域を増幅するものであった。PCR 後、増幅された DNA を 1% アガロースゲルにて電気泳動し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製) を用いて約 2.1 kbp の DNA 断片を精製した。

30

【0165】

精製した DNA 断片をクローニングベクター PCR - Blunt (Invitrogen社製) にライゲーションした。これを大腸菌に形質転換後プラスミドを回収し、増幅された遺伝子断片が目的配列と一致することをシークエンスで確認した。目的配列と一致したプラスミドを Sac I 及び Xho I 制限酵素で処理し、QIAquick Gel Extraction Kit で精製後、目的遺伝子配列を、Sac I、Xho I 制限酵素で処理した大腸菌用発現ベクター pET30a (Novagen社製) に挿入した。このベクターの使用により His タグ融合型の組換えタンパク質が産生できる。このプラスミドを発現用大腸菌 BL21 (DE3) に形質転換し、1 mM IPTG による発現誘導を行うことで目的タンパク質を大腸菌内で発現させた。

40

(2) 組換えタンパク質の精製

上記で得られた、配列番号 1 の遺伝子を発現するそれぞれの組換え大腸菌を 30 μ g / ml カナマイシン含有 LB 培地にて 600 nm での吸光度が 0.7 付近になるまで 37 で培養後、イソプロピル - D - 1 - チオガラクトピラノシド終濃度が 1 mM となる

50

よう添加し、37 で4時間培養した。その後4800rpmで10分間遠心し集菌した。この菌体ペレットをリン酸緩衝化生理食塩水に懸濁し、さらに4800rpmで10分間遠心し菌体の洗浄を行った。

【0166】

この菌体をリン酸緩衝化生理食塩水に懸濁し、氷上にて超音波破碎を行った。大腸菌超音波破碎液を6000rpmで20分間遠心分離し、得られた上清を可溶性画分、沈殿物を不溶性画分とした。

【0167】

可溶性画分を、定法に従って調製したニッケルキレートカラム(担体: Chelating Sepharose (商標) Fast Flow (GE HealthCare社)、カラム容量5ml、平衡化緩衝液50mM 塩酸緩衝液(pH8.0))に添加した。未吸着画分をカラム容量の10倍量の50mM 塩酸緩衝液(pH8.0)と20mM イミダゾール含有20mM リン酸緩衝液(pH8.0)にて洗浄操作を行った後、直ちに、100mM イミダゾール含有20mM リン酸緩衝液(pH8.0)にて6ベッド溶出した。クマシー染色によって目的タンパク質の溶出を確認した100mM イミダゾール含有20mM リン酸緩衝液(pH8.0)溶出画分を強陰イオン交換カラム(担体: Q Sepharose (商標) Fast Flow (GE HealthCare社)、カラム容量5ml、平衡化緩衝液としての20mM リン酸緩衝液(pH8.0))に添加した。未吸着画分をカラム容量の10倍量の20mM リン酸緩衝液(pH7.0)と200mM 塩化ナトリウム含有20mM リン酸緩衝液(pH7.0)にて洗浄操作を行った後、直ちに、400mM 塩化ナトリウム含有20mM リン酸緩衝液(pH7.0)にて5ベッド溶出を行い、配列番号2に示されるアミノ酸配列を有する各タンパク質の精製画分を得た。

【0168】

上記方法によって得られた各精製標品のうち、200μlを1mlの反作用緩衝液(20mM Tris-HCl, 50mM NaCl, 2mM CaCl₂ pH7.4)に分注を行った後、エンテロキナーゼ(Novagen社製)2μl添加した後、室温にて一晚静置、反応を行い、Hisタグを切断し、Enterokinase Cleavage Capture Kit(Novagen社製)を用いて添付プロトコルに従って精製を行った。次に、上記方法によって得られた精製標品1.2mlを、限外ろ過NANOSEP 10K OMEGA(PALL社製)を用いて、生理用リン酸緩衝液(日水製薬社製)置換した後、HTタフリンアクロディスク0.22μm(PALL社製)にて無菌ろ過を行い、これを以下の実験に用いた。

【0169】

実施例3 CAPRIN-1に対するマウス及びモノクローナル抗体の作製

実施例2で調製した配列番号2に示される、抗原タンパク質(ヒトCAPRIN-1)100μgを等量のMPL+TDMアジュバント(シグマ社製)と混合し、これをマウス1匹当たりの抗原溶液とした。抗原溶液を6週齢のBalb/cマウス(日本SLC社製)の腹腔内に投与後、1週間毎にさらに3回すなわち24回投与を行い免疫を完了した。最後の免疫から3日後に摘出したそれぞれの脾臓を滅菌した2枚のスライドガラスに挟んで擦り潰し、PBS(-)(日水社製)を用いて洗浄し1500rpmで10分間遠心して上清を除去する操作を3回繰り返して脾臓細胞を得た。得られた脾臓細胞とマウスミエローマ細胞SP2/0(ATCCから購入)とを10:1の比率にて混和し、そこに37 に加温した10%FBSを含むRPMI1640培地200μlとPEG1500(ペーリンガー社製)800μlを混和して調製したPEG溶液を加えて5分間静置して細胞融合を行った。1700rpmで5分間遠心し、上清を除去後、Gibco社製のHAT溶液を2%当量加えた15%FBSを含むRPMI1640培地(HAT選択培地)150mlで細胞を懸濁し、96穴プレート(ヌンク社製)の1ウェル当たり100μlずつ、プレート15枚に播種した。7日間、37、5%CO₂の条件で培養することで、脾臓細胞とミエローマ細胞が融合したハイブリドーマを得た。

【0170】

作製したハイブリドーマが産生する抗体のCAPRIN-1タンパクに対する結合親和性を指標にハイブリドーマを選抜した。実施例1で調製したCAPRIN-1タンパク溶液 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ を96穴プレート1ウェル当たり $100\mu\text{l}$ 添加し、4にて18時間静置した。各ウェルをPBS-Tで3回洗浄後、0.5% Bovine Serum Albumin (BSA) 溶液(シグマ社製)を1ウェル当たり $400\mu\text{l}$ 添加して室温にて3時間静置した。溶液を除いて、1ウェル当たり $400\mu\text{l}$ のPBS-Tでウェルを3回洗浄後、上記で得られたハイブリドーマの各培養上清を1ウェル当たり $100\mu\text{l}$ 添加し、室温にて2時間静置した。PBS-Tで各ウェルを3回洗浄した後、PBSで5000倍に希釈したHRP標識抗マウスIgG(H+L)抗体(インビトロジェン社製)を1ウェル当たり $100\mu\text{l}$ 添加して室温にて1時間静置した。PBS-Tでウェルを3回洗浄した後、TMB基質溶液(Thermo社製)を1ウェル当たり $100\mu\text{l}$ 添加して15~30分間静置して発色反応を行った。発色後、1規定硫酸を1ウェル当たり $100\mu\text{l}$ 添加して反応を停止させ吸光度計を用いて450nmと595nmの吸光度値を測定した。その結果、吸光度値が高かった抗体を産生するハイブリドーマを複数個選抜した。

10

【0171】

選抜したハイブリドーマを96穴プレート1ウェル当たり0.5個となるようにプレートに添加し培養した。1週間後、ウェル中に単一のコロニーを形成しているハイブリドーマが観察された。それらウェルの細胞をさらに培養して、クローニングされたハイブリドーマが産生する抗体のCAPRIN-1タンパクに対する結合親和性を指標にハイブリドーマを選抜した。実施例1で調製したCAPRIN-1タンパク溶液 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ を96穴プレート1ウェル当たり $100\mu\text{l}$ 添加し、4にて18時間静置した。各ウェルをPBS-Tで3回洗浄後、0.5% BSA溶液を1ウェル当たり $400\mu\text{l}$ 添加して室温にて3時間静置した。溶液を除いて、1ウェル当たり $400\mu\text{l}$ のPBS-Tでウェルを3回洗浄後、上記で得られたハイブリドーマの各培養上清を1ウェル当たり $100\mu\text{l}$ 添加し、室温にて2時間静置した。PBS-Tで各ウェルを3回洗浄後、PBSで5000倍に希釈したHRP標識抗マウスIgG(H+L)抗体(インビトロジェン社製)を1ウェル当たり $100\mu\text{l}$ 添加して室温にて1時間静置した。PBS-Tでウェルを3回洗浄した後、TMB基質溶液(Thermo社製)を1ウェル当たり $100\mu\text{l}$ 添加して15~30分間静置して発色反応を行った。発色後、1規定硫酸を1ウェル当たり $100\mu\text{l}$ 添加して反応を停止させ吸光度計を用いて450nmと595nmの吸光度値を測定した。その結果、CAPRIN-1タンパクに反応性を示すモノクローナル抗体を産生する150個のハイブリドーマ株を得た。

20

30

【0172】

次にそれらモノクローナル抗体の内、CAPRIN-1が発現する乳癌細胞の細胞表面に反応性を示すものを選抜した。具体的には、 10^6 個のヒト乳癌細胞株MDA-MB-231Vを 1.5ml 容のマイクロ遠心チューブにて遠心分離し、これに上記各ハイブリドーマの培養上清 $100\mu\text{l}$ を添加し、氷上で1時間静置した。PBSで洗浄した後、0.1% FBSを含むPBSで500倍希釈したFITC標識ヤギ抗マウスIgG抗体(インビトロジェン社製)を添加し、氷上で1時間静置した。PBSで洗浄後、ベクトンディッキンソン株式会社のFACSキャリバーにて蛍光強度を測定した。一方、上記と同様の操作を、抗体の代わりに何も処理していない6週齢のBalb/cマウスの血清をハイブリドーマ培養用培地で500倍希釈したものを用いて行い、コントロールとした。その結果、コントロールに比べて蛍光強度が強い、すなわち、乳癌細胞の細胞表面に反応するモノクローナル抗体11個(#1~#11)を選抜した。

40

【0173】

実施例4 選抜した抗体の特徴付け

(1) 抗CAPRIN-1モノクローナル抗体の可変領域遺伝子のクローニング

実施例3で選抜した11個のマウスモノクローナル抗体をそれぞれ産生する各ハイブリドーマ株から、mRNAを抽出し、マウスFR1由来配列及びマウスFR4由来の配列に

50

特異的なプライマーを使用したRT-PCR法により、全ての抗CAPRIN-1モノクローナル抗体の重鎖可変(VH)領域及び軽鎖可変(VL)領域の遺伝子を取得した。配列決定のために、それら遺伝子をpCR2.1ベクター(インビトロジェン社製)にクローニングした。及びまた、CAPRIN-1を発現する乳癌細胞の細胞表面に反応するモノクローナル抗体を産生するマウス由来ハイブリドーマ株2株から、mRNAを抽出し、マウスFR1由来配列及びマウスFR4由来の配列に特異的なプライマーを使用したRT-PCR法により、各抗体の重鎖可変(VH)領域及び軽鎖可変(VL)領域の遺伝子を取得した。配列決定のために、それら遺伝子をpCR2.1ベクター(Invitrogen社製)にクローニングした。

【0174】

(1)-1 RT-PCR

10⁶個の各ハイブリドーマ株から、High Pure RNA Isolation Kit (Roche社製)を用いて全RNAを抽出した後、PrimeScript I 1st strand cDNA Synthesis Kit (Takara社製)を用いてcDNAを合成した。これら操作は各キットの添付プロトコルに従って行った。

【0175】

合成したcDNAを鋳型としKOD-Plus-DNA Polymerase (TOYOBO社製)を用いて、常法に従い、PCR法にて、マウス抗体重鎖遺伝子可変領域及びマウス抗体軽鎖遺伝子可変領域をそれぞれ増幅した。

【0176】

マウス抗体のVH及びVL領域の遺伝子取得のために、マウス重鎖FR1配列に特異的なプライマー(配列番号130)、マウス重鎖FR4配列に特異的なプライマー(配列番号131)、マウス軽鎖FR1配列に特異的なプライマー(配列番号132)及びマウス軽鎖FR4に特異的なプライマー(配列番号133)を使用した。

【0177】

上記で得られた各PCR産物を用いてアガロースゲルにて電気泳動を行い、VH領域及びVL領域それぞれのDNAバンドを切り出した。DNA断片はQIAquick Gel purification kit (QIAGEN社製)を用いてその添付プロトコルに従って行った。精製した各DNAはTAKAクローニングキット(Invitrogen社製)を用いてpCR2.1ベクターにクローニングした。連結したベクターをDH5・コンピテントセル(TOYOBO社製)に定法に従い形質転換を行った。各形質転換体それぞれ10クローンを培地(100µg/mlアンピシリン)で37℃一晩培養後、各プラスミドDNAをQiaspin Miniprep kit (QIAGEN社製)を用いて精製した。

【0178】

(1)-2 配列決定

上記で得られた各プラスミド中のVH領域及びVL領域の遺伝子配列解析は、M13フォワードプライマー(配列番号134)及びM13リバースプライマー(配列番号135)を用いて、蛍光シーケンサー(ABI社製DNAシーケンサー3130XL)により、ABI社製のビッグダイターミネーターVer3.1サイクルシーケンシングキットを用いて、その添付プロトコルに従って行った。その結果、各々の遺伝子配列が決定された(各々10クローンで一致)。

【0179】

得られたモノクローナル抗体の重鎖可変領域の遺伝子配列をそれぞれ配列番号48、配列番号78、配列番号88、配列番号98、配列番号108、配列番号118及び配列番号128に、並びにそのアミノ酸配列をそれぞれ配列番号43、配列番号73、配列番号83、配列番号93、配列番号103、配列番号113、及び配列番号123に、軽鎖可変領域の遺伝子配列をそれぞれ配列番号49、配列番号54、配列番号59、配列番号64、配列番号69、配列番号79、配列番号89、配列番号99、配列番号109、配列

10

20

30

40

50

番号 119 及び配列番号 129 に、並びにそのアミノ酸配列をそれぞれ配列番号 47、配列番号 53、配列番号 58、配列番号 63、配列番号 68、配列番号 77、配列番号 87、配列番号 97、配列番号 107、配列番号 117 及び配列番号 127 に示す。

【0180】

すなわち、モノクローナル抗体 #1 は配列番号 43 の重鎖可変領域と配列番号 47 の軽鎖可変領域から成り、#2 は配列番号 43 の重鎖可変領域と配列番号 53 の軽鎖可変領域から成り、#3 は配列番号 43 の重鎖可変領域と配列番号 58 の軽鎖可変領域から成り、#4 は配列番号 43 の重鎖可変領域と配列番号 63 の軽鎖可変領域から成り、#5 は配列番号 43 の重鎖可変領域と配列番号 68 の軽鎖可変領域から成り、#6 は配列番号 73 の重鎖可変領域と配列番号 77 の軽鎖可変領域から成り、#7 は配列番号 83 の重鎖可変領域と配列番号 87 の軽鎖可変領域から成り、#8 は配列番号 93 の重鎖可変領域と配列番号 97 の軽鎖可変領域から成り、#9 は配列番号 103 の重鎖可変領域と配列番号 107 の軽鎖可変領域から成り、#10 は配列番号 113 の重鎖可変領域と配列番号 117 の軽鎖可変領域から成り、#11 は配列番号 123 の重鎖可変領域と配列番号 127 の軽鎖可変領域から成る。

10

(2) 抗 CAPRIN-1 抗体 #2 及び #9 を用いた各種癌細胞表面での CAPRIN-1 の発現

次に CAPRIN-1 遺伝子の発現が確認された乳癌細胞株 7 種 (MDA-MB-157, T47D, MRK-nu-1, MDA-MB-231V, BT20, SK-BR-3, MDA-MB-231T) 及びその他の乳癌細胞株 3 種 (MDA-MB-231C, MCF-7, ZR75-1)、グリオーマ細胞株 5 種 (T98G, SNB19, U251, U87MG, U373)、腎臓癌細胞株 4 種 (Caki-1, Caki-2, A498, ACHN)、胃癌細胞株 2 種 (MNK28, MKN45)、大腸癌細胞株 5 種 (HT29, LoVo, Caco2, SW480, HCT116)、肺癌細胞株 3 種 (A549, QG56, PC8)、白血病細胞株 4 種 (AML5, Namalwa, BDCM, RPI1788)、リンパ腫細胞株 1 種 (Ramos)、子宮頸癌細胞株 1 種 (SW756)、膀胱癌細胞株 1 種 (T24) 及び食道癌細胞株 1 種 (KYSE180) について、実施例 3 で得られた #2 及び #9 を産生するハイブリドーマの培養上清を用いて、各細胞の細胞表面上での CAPRIN-1 タンパク質の発現を調べた。各細胞株それぞれ 10^6 細胞を 1.5 ml 容のマイクロ遠心チューブにて遠心分離した。実施例 3 で得られた #2 及び #9 を産生するハイブリドーマの培養上清 (100 μ l) を添加し、氷上で 1 時間静置した。PBS で洗浄した後、0.1% FBS を含む PBS で 500 倍希釈した FITC 標識ヤギ抗ヒト IgG (H+L) 抗体 (Southern Biotech 社製) 及び FITC 標識抗マウス IgG (H+L) 抗体 (Invitrogen 社製) を添加し、氷上で 1 時間静置した。PBS で洗浄後、ベクトンディッキンソン株式会社の FACS キャリバーにて蛍光強度を測定した。一方、上記と同様の操作を、ハイブリドーマ培養用の培地を用いて行い、陰性コントロールとした。その結果、#2 及び #9 の抗体を添加した細胞は、コントロールに比べて、いずれも蛍光強度が 20% 以上強かった。このことから、上記ヒト癌細胞株の細胞膜表面上に CAPRIN-1 タンパク質が発現していることが確認された。なお、上記蛍光強度の増強率は、各細胞における平均蛍光強度 (MFI 値) の増加率にて表され、以下の計算式により算出した。

20

30

40

【0181】

平均蛍光強度の増加率 (蛍光強度の増強率) (%) = ((抗ヒト CAPRIN-1 抗体を反応させた細胞の MFI 値) - (コントロール MFI 値)) \div (コントロール MFI 値) \times 100。

【0182】

(3) CAPRIN-1 に対する抗体の癌細胞に対する抗腫瘍効果 (ADCC 活性)

上記で選抜した #1 ~ #11 の CAPRIN-1 に対するモノクローナル抗体の癌細胞に対する細胞障害活性 (ADCC 活性) を評価した。#1 ~ #11 のモノクローナル抗体を産生する各ハイブリドーマをハイブリドーマ SFM (インビトロジェン社製) 培地を用

50

いて培養し、得られた上清をHitrap Protein A Sepharose FF (GEヘルスケア社製)を用いて精製し、PBS(-)に置換して0.22 μmのフィルター(ミリポア社製)で濾過したものを活性測定用の抗体として用いた。10⁶個のヒト乳癌細胞株MDA-MB-157を50 ml容の遠心チューブに集め、100 μCiのクロミウム(Cr)51を加え37 °Cで2時間インキュベートした。その後10% FBSを含むRPMI 1640培地で3回洗浄し、96穴V底プレート1穴あたり10³個ずつ添加して標的細胞とした。これに、上記精製抗体をそれぞれ1 μg添加し、さらにマウス脾臓から分離したマウスリンパ球を2 × 10⁵個添加して、37 °C、5% CO₂の条件下で4時間培養した。培養後、障害を受けた腫瘍細胞から放出される培養上清中のクロミウム(Cr)51の量を測定し、抗CAPRIN-1抗体による癌細胞に対するADCC活性を算出した。その結果、#1~#11の全てのモノクローナル抗体が、MDA-MB-157に対して、20%以上のADCC活性を示した。具体的には、例えば、#1は22.1%、#2は29.1%、#6は30.2%、#9は32.4%の細胞障害活性が得られた(図1参照)。一方、実施例2で作製した、CAPRIN-1タンパク自体には反応するが、癌細胞の細胞表面に反応しないモノクローナル抗体を用いて同様の操作を行った場合、細胞障害活性は認められなかった(図1参照)。以上の結果より、取得した抗CAPRIN-1モノクローナル抗体(#1~#11は、ADCC活性によってCAPRIN-1を発現する癌細胞を障害することが示された。同様にして、他のヒト癌細胞である、グリオーマ細胞株T98G、U373、肺癌細胞株A549、QG56、腎臓癌細胞株Caki-1、ACHN、子宮頸癌細胞株SW756、膀胱癌細胞株T24、食道癌細胞株KYSE180、胃癌細胞株MNK28、MNK45、大腸癌細胞株SW480、白血病細胞株AML5及びリンパ腫細胞株Ramosに対する抗CAPRIN-1抗体による癌細胞に対するADCC活性を算出した。その結果、#1~#11の全てのモノクローナル抗体が、アイソタイプコントロールに比べて高いADCC活性を示した。具体的には、例えばT98Gに対して、#9は12%以上(アイソタイプコントロールは1.3%)、U373に対して、#9は16%以上(アイソタイプコントロールは3%)、A549に対して、#9は24%以上(アイソタイプコントロールは2.6%)、QG56に対して、#9は20%以上(アイソタイプコントロールは0.2%)、Caki-1に対して、#9は23%以上(アイソタイプコントロールは3.0%)、ACHNに対して、#9は14%以上(アイソタイプコントロールは1.5%)、SW756に対して、#9は16%以上(アイソタイプコントロールは2.5%)、T24に対して、#9は18%以上(アイソタイプコントロールは2.1%)、KYSE180に対して、#9は22%以上(アイソタイプコントロールは3.0%)、MNK28に対して、#9は15%以上(アイソタイプコントロールは1.7%)、MNK45に対して、#9は10%以上(アイソタイプコントロールは2.3%)、SW480に対して、#9は17%以上(アイソタイプコントロールは1.3%)、AML5に対して、#9は10%以上(アイソタイプコントロールは3.0%)及びRamosに対して、#9は10%以上の活性を示した(アイソタイプコントロールは4.1%)。以上の結果より、取得した抗CAPRIN-1抗体(#1~#11)は、CAPRIN-1を発現する各種ヒト癌細胞を障害することが示された。

【0183】

(4) CAPRIN-1に対する抗体の癌細胞に対する抗腫瘍効果(CDC活性)

上記で選抜した#1~#11のCAPRIN-1に対するモノクローナル抗体の癌細胞に対する細胞障害活性(CDC活性)を評価した。ウサギから採血した血液をエッペンドルフチューブに入れ、室温で60分間、静置した後3000 rpmで5分間、遠心分離することで、CDC活性測定用の血清を調製した。ヒト乳癌細胞であるMDA-MB-231Vを10⁵個を50 ml容の遠心チューブに集め、100 μCiのクロミウム51を加え37 °Cで2時間インキュベートした後、10% FBSを含むRPMI培地で3回洗浄した。その後上記で調製したウサギ血清を50%含むRPMI培地で懸濁し、96穴V底プレート1穴あたり10³個ずつ添加した。これに実施例3で得た#1~#13のモノクローナル抗体をそれぞれ1 μgずつ添加して、37 °C、5% CO₂の条件下で4時間培

10

20

30

40

50

養した。培養後、障害を受けた腫瘍細胞から放出される培養上清中のクロミウム 51 の量を測定し、ハイブリドーマ上清中の抗CAPRIN-1モノクローナル抗体によるMDA-MB-231Vに対するCDC活性を算出した。その結果、#1~#11の全てのモノクローナル抗体が、30%以上のCDC活性を示した。一方、実施例2で作製した、CAPRIN-1タンパク自体には反応するが、癌細胞の細胞表面に反応しないモノクローナル抗体を用いて同様の操作を行った場合、細胞障害活性は認められなかった。従って、CAPRIN-1に対するモノクローナル抗体(#1~#11)は、CDC活性によっても、CAPRIN-1を発現する腫瘍細胞を障害することができることが明らかになった。

【0184】

実施例5 癌細胞の細胞表面に反応するCAPRIN-1に対する抗体が結合するCAPRIN-1タンパク質中のペプチドの同定 10

上記で取得した、癌細胞の細胞表面に反応する#1~#11のCAPRIN-1に対するモノクローナル抗体を用いて、それらが認識するCAPRIN-1タンパク質中の部分配列の同定を行った。

【0185】

まず、PBSで1 μ g/ μ lの濃度に溶解した組換えCAPRIN-1タンパク質溶液100 μ lに、終濃度が10mMになるようにDTT(Fluka社製)を添加し、95、5分間反応させてCAPRIN-1タンパク質内のジスルフィド結合の還元を行い、次に終濃度20mMのヨードアセトアミド(和光純薬社製)を添加し、37、遮光条件下にて30分間チオール基のアルキル化反応を行った。得られた還元アルキル化CAPRIN-1タンパク質40 μ gに、#1~#11のCAPRIN-1に対するモノクローナル抗体をそれぞれ50 μ g添加し、20mMリン酸緩衝液(pH7.0)1mlにメスアップして攪拌混合しながら4で一晩反応させた。 20

【0186】

次に、トリプシン(プロメガ社製)を終濃度0.2 μ gとなるように添加し、37 1時間、2時間、4時間、12時間反応させた後、予め1%BSA(シグマ社製)を含むPBSでブロッキングし、PBSで洗浄したプロテインA-ガラスビーズ(GE社製)と1mM炭酸カルシウム、NP-40緩衝液(20mMリン酸緩衝液(pH7.4)、5mMEDTA、150mMNaCl、1%NP-40)中で混合し、それぞれ30分間反応させた。 30

【0187】

反応液を25mM炭酸アンモニウム緩衝液(pH8.0)で洗浄した後、0.1%ギ酸100 μ lを用いて抗原抗体複合体を溶出し、溶出液についてQ-TOF Premier(Waters-MicroMass社製)を用いてLC-MS解析を行った。解析は機器に付属のプロトコルに従った。

【0188】

その結果、#1~#11のCAPRIN-1に対するモノクローナル抗体がいずれも認識するCAPRIN-1の部分配列として、配列番号37のポリペプチドが同定された。

【0189】

実施例6 抗腫瘍剤による癌細胞表面上のCAPRIN-1発現の影響 40

(1) 癌細胞に対する抗腫瘍剤の50%阻害濃度の算出

抗腫瘍剤による癌細胞表面上のCAPRIN-1発現の影響を評価するため、癌細胞(MCF-7)を用いて、抗腫瘍剤の50%阻害濃度の算出を行った。ヒト乳癌細胞株MCF-7について、現在乳癌治療薬として用いられている抗腫瘍剤4種(シクロホスファミド:“エンドキサン”(登録商標、塩野義製薬株式会社製)、パクリタキセル:“タキソール”(登録商標、ブリストル・マイヤーズ社製)、ドセタキセル:“タキソテール”(登録商標、サノファ・アバンティス社製)、ピノレルピン:“ナベルピン”(登録商標、協和発酵キリン株式会社製)の50%阻害濃度を調べた。細胞を1 \times 10⁵ cells/mlになるように調製し、6穴プレートにて37、5%CO₂条件下1日培養を行った。次に、各抗腫瘍剤を最終濃度0.001 μ M, 0.01 μ M, 0.1 μ M, 1.0 μ M 50

、 $10\ \mu\text{M}$ それぞれ処理し、 37°C 、 $5\%\ \text{CO}_2$ 条件下で2日培養を行った。培養液を除去した後、PBS(-)で2回洗浄を行い、 $0.25\%\ \text{Trypsin-EDTA}$ を添加して細胞を剥がし、PBS(-)で $100\ \mu\text{l}$ に調製した後、 0.4% トリパンブルーストック溶液を $10\ \mu\text{l}$ 加えて混合し、血球計算盤を用いて生細胞数を測定した。各抗腫瘍剤未処理の生細胞数を 100% としたときの各化学療法剤処理時の生細胞の割合を算出し、本検討の結果から 50% 阻害濃度を概算して、さらにその濃度付近の抗腫瘍剤を調製し、上述と同様の操作を行うことにより詳細な 50% 阻害濃度を算出することとした。

【0190】

一例として、抗腫瘍剤シクロホスファミドでの検討内容を記載する。MCF-7を $1 \times 10^5\ \text{cells/ml}$ になるように調製し、6穴プレートにて 37°C 、 $5\%\ \text{CO}_2$ 条件下1日培養を行った。次に、シクロホスファミドを最終濃度 $1 \times 10^{-1}\ \mu\text{M}$ 、 $5 \times 10^{-2}\ \mu\text{M}$ 、 $2 \times 10^{-2}\ \mu\text{M}$ 、 $1 \times 10^{-2}\ \mu\text{M}$ それぞれ処理し、 37°C 、 $5\%\ \text{CO}_2$ 条件下で2日培養を行った。培養液を除去した後、PBS(-)で2回洗浄を行い、 $0.25\%\ \text{Trypsin-EDTA}$ を添加して細胞を剥がし、PBS(-)で $100\ \mu\text{l}$ に調製し、 0.4% トリパンブルーストック溶液を $10\ \mu\text{l}$ 加えて混合し、血球計算盤を用いて生細胞数を測定した。本検討の結果から 50% 阻害濃度を $3 \times 10^{-2}\ \mu\text{M}$ とした。同様の操作により、各癌細胞における各抗腫瘍剤のIC50を以下に算定した(表1)。

【表1】

MCF-7に対する各抗腫瘍剤の 50% 阻害濃度

シクロホスファミド (μM)	3×10^{-2}
パクリタキセル (μM)	1×10^{-2}
ドセタキセル (μM)	1×10^{-4}
ビノレルビン (μM)	2×10^{-2}

【0191】

(2) 抗腫瘍剤を癌細胞に作用させた時のCAPRIN-1発現への影響

(1)で算出した 50% 阻害濃度の各抗腫瘍剤を癌細胞株(MCF-7)に処理して、その細胞表面上のCAPRIN-1タンパク質の発現挙動について調べた。

【0192】

ヒト乳癌細胞株MCF-7に処理して、その細胞表面上のCAPRIN-1タンパク質の発現挙動について調べた。細胞を $1 \times 10^5\ \text{cells/ml}$ になるように調製し、6穴プレートにて 37°C 、 $5\%\ \text{CO}_2$ 条件下で1日培養した。次に、(1)で算出した 50% 阻害濃度による抗腫瘍剤及びコントロールとしてPBS(-)をそれぞれ処理し、 37°C 、 $5\%\ \text{CO}_2$ 条件下で2日培養した。培養液を除去した後、PBS(-)で2回洗浄を行い、セルスクレーパーを用いて細胞を剥がした。次に、それら細胞を $1.5\ \text{ml}$ のマイクロ遠心チューブにて遠心分離した。これにマウス抗CAPRIN-1モノクローナル抗体#9を $1\ \mu\text{g}$ ($5\ \mu\text{l}$)を添加し、さらに $95\ \mu\text{l}$ の 0.1% 牛胎児血清を含むPBSで懸濁後、氷上で1時間静置した。PBSで洗浄した後、 $5\ \mu\text{l}$ のFITC標識ヤギ抗ラビットIgG抗体(サンタクルズ社製)及び $95\ \mu\text{l}$ の 0.1% 牛胎児血清(FBS)を含むPBSで懸濁し、氷上で1時間静置した。PBSで洗浄後、ベクトンディッキンソン株式会社のFACSキャリバーにて蛍光強度を測定した。一方、上記と同様の操作を、マウス抗CAPRIN-1モノクローナル抗体の代わりにコントロール抗体を用いて行い、コントロールとした。その結果、抗腫瘍剤処理に関わらず傾向強度に違いは見られなかった。すなわち、抗腫瘍剤を処理しなかったMCF-7に抗CAPRIN-1抗体を添加した場合に得られた蛍光強度は、コントロール抗体を添加した場合に比べて、 32% の増強を示した。一方、抗腫瘍剤を処理したMCF-7を用いて同様の検討をした結果、抗腫瘍剤を処理しなかった場合と全く同じ 32% の蛍光強度の増強を示した。このことから、乳癌細胞に抗腫瘍剤を処理しても、乳癌細胞上のCAPRIN-1の発現に何ら影響を及ぼさない事が判明した。なお、上記蛍光強度の増強率は、各細胞における平均蛍光強度(M

F I 値)の増加率にて表され、以下の計算式により算出した。

【0193】

平均蛍光強度の増加率(蛍光強度の増強率)(%) = ((抗ヒトCAPRIN-1抗体を反応させた細胞のMFI値) - (コントロールMFI値)) ÷ (コントロールMFI値) × 100。

【0194】

実施例7 *in vivo*における抗CAPRIN-1抗体と抗腫瘍剤との併用療法(1)CAPRIN-1を発現するヒト乳癌細胞株MCF-7を移植した担癌マウスを用いて、抗CAPRIN-1モノクローナル抗体と抗腫瘍剤併用による抗腫瘍効果を検討した。以下にMCF-7を担癌させたマウスを用いた抗腫瘍効果の検討方法、結果について記載する。280匹のヌードマウス(日本SLC社製)の背部皮下に、1匹あたり 10^6 個のMCF-7(ATCCより購入)を移植し、腫瘍が直径7mm程度の大きさになるまで成長させた。

10

【0195】

次に、以下の実験区1及び実験区2で詳述するとおり、MCF-7を移植した担癌マウスは、抗CAPRIN-1抗体のみ投与する群、抗腫瘍剤(4種)のみ投与する群、抗腫瘍剤と抗Her2抗体(マウス抗ヒトErbb2モノクローナル抗体、アイソタイプ: IgG2b(R&D systems社製、カタログ番号: MAB11291))を併用投与する群、抗腫瘍剤とCAPRIN-1に対するモノクローナル抗体を併用投与する群、最後にコントロール(PBS(-))を投与する)群の5つの群に分け、さらに全ての投与群にはマウスPBMCを投与した。

20

【0196】

<実験区1>

(抗CAPRIN-1抗体のみ投与する群)

5匹の担癌マウスに対して#2のCAPRIN-1に対するモノクローナル抗体を1匹あたり5mg/kg/shotずつ、試験開始0, 4, 8, 11, 15, 17日に腹腔内投与し、Balb/cマウス脾臓から分離したPBMCを1匹あたり 1×10^7 cells/0.2mL(RPMI1640)ずつ、試験開始0, 8, 15日に静脈内投与した。

【0197】

(シクロホスファミド投与群)

5匹の担癌マウスに対して、シクロホスファミドを1匹あたり80mg/kg/shotずつ、試験開始0, 4日に腹腔内投与し、Balb/cマウス脾臓から分離したPBMCを1匹あたり 1×10^7 cells/0.2mL(RPMI1640)ずつ、試験開始0, 8, 15日に静脈投与した。

30

【0198】

(パクリタキセル投与群)

5匹の担癌マウスに対して、パクリタキセルを1匹あたり15mg/kg/shotずつ、試験開始0, 3日に腹腔内投与し、Balb/cマウス脾臓から分離したPBMCを1匹あたり 1×10^7 cells/0.2mL(RPMI1640)ずつ、試験開始0, 8, 15日に静脈内投与した。

40

【0199】

(ドセタキセル投与群)

5匹の担癌マウスに対して、ドセタキセルを1匹あたり10mg/kg/shotずつ、試験開始0, 3日に腹腔内投与し、Balb/cマウス脾臓から分離したPBMCを1匹あたり 1×10^7 cells/0.2mL(RPMI1640)ずつ、試験開始0, 8, 15日に静脈内投与した。

【0200】

(ピノレルピン投与群)

5匹の担癌マウスに対して、ピノレルピンを1匹あたり1mg/kg/shotずつ、試験開始0日に腹腔内投与し、Balb/cマウス脾臓から分離したPBMCを1匹あた

50

り 1×10^7 cells / 0.2 mL (RPMI 1640) ずつ、試験開始 0, 8, 15 日に静脈内投与した。

【0201】

(シクロホスファミドと抗 Her 2 抗体の投与群)

5 匹の担癌マウスに対して、シクロホスファミドを 1 匹あたり 80 mg / kg / shot ずつ、試験開始 0、4 日に腹腔内投与し、同時に抗 Her 2 抗体を 1 匹あたり 5 mg / kg / shot ずつ、試験開始 0、4、8、11、15、17 日に腹腔内投与し、Balb / c マウス脾臓から分離した PBMC を 1 匹あたり 1×10^7 cells / 0.2 mL (RPMI 1640) ずつ、試験開始 0、8、15 日に静脈内投与した。

【0202】

(パクリタキセルと抗 Her 2 抗体の投与群)

5 匹の担癌マウスに対して、パクリタキセルを 1 匹あたり 15 mg / kg / shot ずつ、試験開始 0、3 日に腹腔内投与し、同時に抗 Her 2 抗体を 1 匹あたり 5 mg / kg / shot ずつ、試験開始 0、4、8、11、15、17 日に腹腔内投与し、Balb / c マウス脾臓から分離した PBMC を 1 匹あたり 1×10^7 cells / 0.2 mL (RPMI 1640) ずつ、試験開始 0、8、15 日に静脈内投与した。

【0203】

(ドセタキセルと抗 Her 2 抗体の投与群)

5 匹の担癌マウスに対して、ドセタキセルを 1 匹あたり 10 mg / kg / shot ずつ、試験開始 0、3 日に腹腔内投与し、同時に抗 Her 2 抗体を 1 匹あたり 5 mg / kg / shot ずつ、試験開始 0、4、8、11、15、17 日に腹腔内投与し、Balb / c マウス脾臓から分離した PBMC を 1 匹あたり 1×10^7 cells / 0.2 mL (RPMI 1640) ずつ、試験開始 0、8、15 日に静脈内投与した。

【0204】

(ピノレルピンと抗 Her 2 の投与群)

5 匹の担癌マウスに対して、ピノレルピンを 1 匹あたり 1 mg / kg / shot ずつ、試験開始 0 日に腹腔内投与し、同時に抗 Her 2 抗体を 1 匹あたり 5 mg / kg / shot ずつ、試験開始 0、4、8、11、15、17 日に腹腔内投与し、Balb / c マウス脾臓から分離した PBMC を 1 匹あたり 1×10^7 cells / 0.2 mL (RPMI 1640) ずつ、試験開始 0、8、15 日に静脈内投与した。

【0205】

(シクロホスファミドと抗 CAPRIN - 1 抗体の投与群)

5 匹の担癌マウスに対して、シクロホスファミドを 1 匹あたり 80 mg / kg / shot ずつ、試験開始 0、4 日に腹腔内投与し、同時に # 2 の CAPRIN - 1 に対するモノクローナル抗体を 1 匹あたり 5 mg / kg / shot ずつ、試験開始 0、4、8、11、15、17 日に腹腔内投与し、Balb / c マウス脾臓から分離した PBMC を 1 匹あたり 1×10^7 cells / 0.2 mL (RPMI 1640) ずつ、試験開始 0、8、15 日に静脈内投与した。

【0206】

(パクリタキセルと抗 CAPRIN - 1 抗体の投与群)

5 匹の担癌マウスに対して、パクリタキセルを 1 匹あたり 15 mg / kg / shot ずつ、試験開始 0、3 日に腹腔内投与し、同時に # 2 の CAPRIN - 1 に対するモノクローナル抗体を 1 匹あたり 5 mg / kg / shot ずつ、試験開始 0、4、8、11、15、17 日に腹腔内投与し、Balb / c マウス脾臓から分離した PBMC を 1 匹あたり 1×10^7 cells / 0.2 mL (RPMI 1640) ずつ、試験開始 0、8、15 日に静脈内投与した。

【0207】

(ドセタキセルと抗 CAPRIN - 1 抗体の投与群)

5 匹の担癌マウスに対して、ドセタキセルを 1 匹あたり 10 mg / kg / shot ずつ、試験開始 0、3 日に腹腔内投与し、同時に # 2 の CAPRIN - 1 に対するモノクロー

10

20

30

40

50

ナル抗体を1匹あたり5mg/kg/shotずつ、試験開始0、4、8、11、15、17日に腹腔内投与し、Balb/cマウス脾臓から分離したPBMCを1匹あたり 1×10^7 cells/0.2mL(RPMI1640)ずつ、試験開始0、8、15日に静脈内投与した。

【0208】

(ピノレルピンと抗CAPRIN-1抗体の投与群)

ピノレルピンと抗CAPRIN-1抗体の5匹の担癌マウスに対して、ピノレルピンを1匹あたり1mg/kg/shotずつ、試験開始0日に腹腔内投与し、同時に#2のCAPRIN-1に対するモノクローナル抗体を1匹あたり5mg/kg/shotずつ、試験開始0、4、8、11、15、17日に腹腔内投与し、Balb/cマウス脾臓から分離したPBMCを1匹あたり 1×10^7 cells/0.2mL(RPMI1640)ずつ、試験開始0、8、15日に静脈内投与した。

10

【0209】

<実験区2>

抗CAPRIN-1抗体のみ投与する群、シクロホスファミドと抗CAPRIN-1抗体の投与群、パクリタキセルと抗CAPRIN-1抗体の投与群、ドセタキセルと抗CAPRIN-1抗体の投与群及びピノレルピンと抗CAPRIN-1抗体の投与群については、抗CAPRIN-1抗体として#9のCAPRIN-1に対するモノクローナル抗体を投与する以外は、実験区1と同様に設定した。

【0210】

シクロホスファミド投与群、パクリタキセル投与群、ドセタキセル投与群、ピノレルピン投与群、シクロホスファミドと抗Her2抗体の投与群、パクリタキセルと抗Her2抗体の投与群、ドセタキセルと抗Her2抗体の投与群及びピノレルピンと抗Her2抗体の投与群については、実験区1と同様に設定した。

20

【0211】

上記各実験区の各投与群について、毎日腫瘍の大きさを計測し、抗腫瘍効果を観察した。なお、5匹の担癌マウスに対して、抗体の代わりにPBS(-)を投与した群についてはコントロール群とした。なお、腫瘍の大きさは、長径×短径×短径×0.5の計算式を用いて、体積を算出した。

【0212】

抗腫瘍効果の観察の結果、実験区1では、PBS(-)を投与したコントロール群の試験開始から26日目の腫瘍体積を100%とした場合に、各抗腫瘍剤投与群では約79%程度、抗CAPRIN-1抗体のみ投与する群では約56%程度、各抗腫瘍剤と抗Her2抗体の投与群では約74%にまで退縮した。一方、各抗腫瘍剤と抗CAPRIN-1抗体の投与群では、14日目には数10%にまで腫瘍が退縮し、22日目以降には腫瘍はほぼ完全に退縮した。(図3~6参照)

30

また、実験区2では、PBS(-)を投与したコントロール群の試験開始から26日目の腫瘍体積を100%とした場合に、各抗腫瘍剤投与群では約68%程度、抗CAPRIN-1抗体のみ投与する群では約45%程度、各抗腫瘍剤と抗Her2抗体の投与群では約55%にまで退縮した。一方、各抗腫瘍剤と抗CAPRIN-1抗体の投与群では、14日目には数10%にまで腫瘍が退縮し、22日目以降には腫瘍はほぼ完全に退縮した。(図7~図10参照)

40

【産業上の利用可能性】

【0213】

本発明は、癌の治療及び/又は予防に有用である。

【0214】

本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

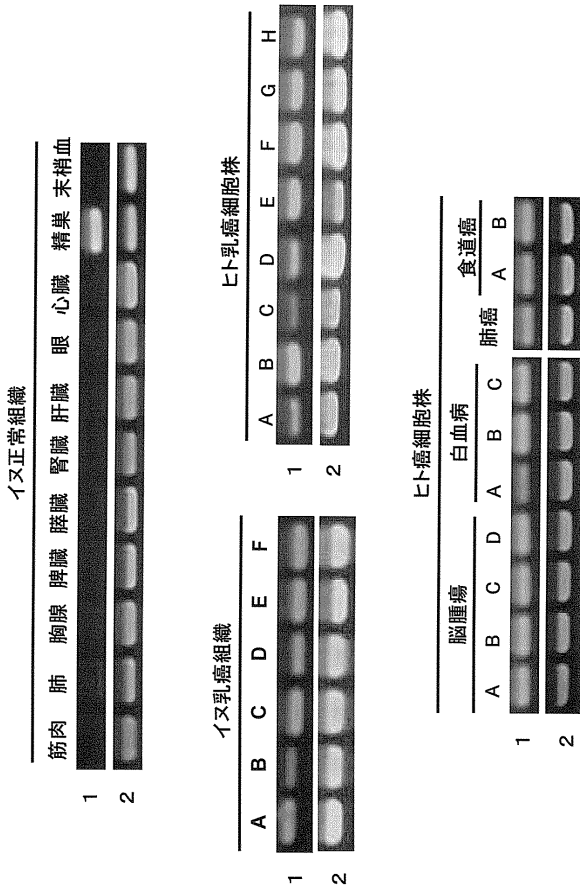
【配列表フリーテキスト】

【0215】

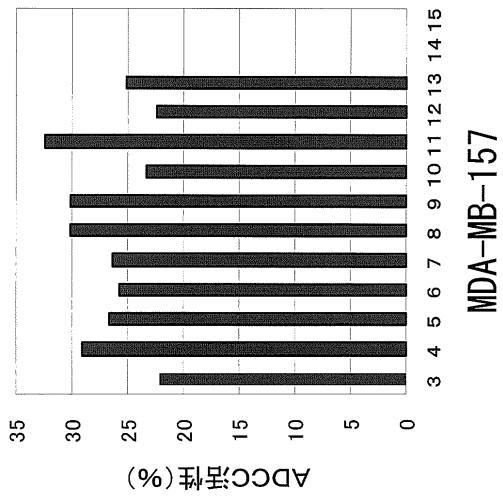
50

- 配列番号 3 1 : T 3 プライマー
- 配列番号 3 2 : T 7 プライマー
- 配列番号 3 3、3 4 : プライマー
- 配列番号 3 5、3 6 : GAPDH プライマー
- 配列番号 3 8、3 9 : プライマー
- 配列番号 1 3 0 ~ 1 3 5 : プライマー

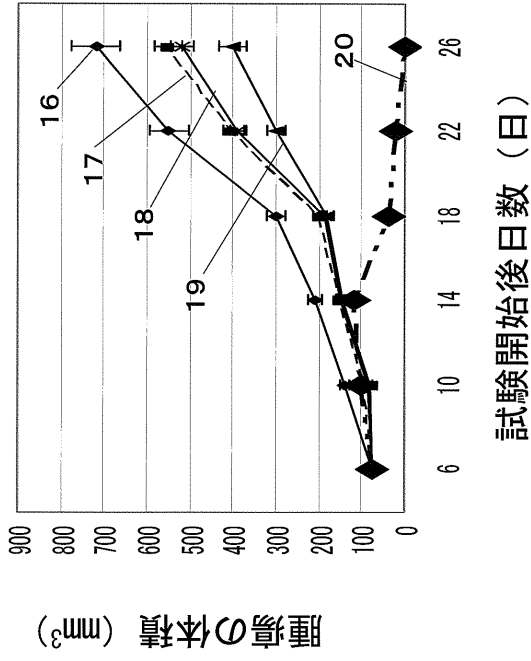
【 図 1 】



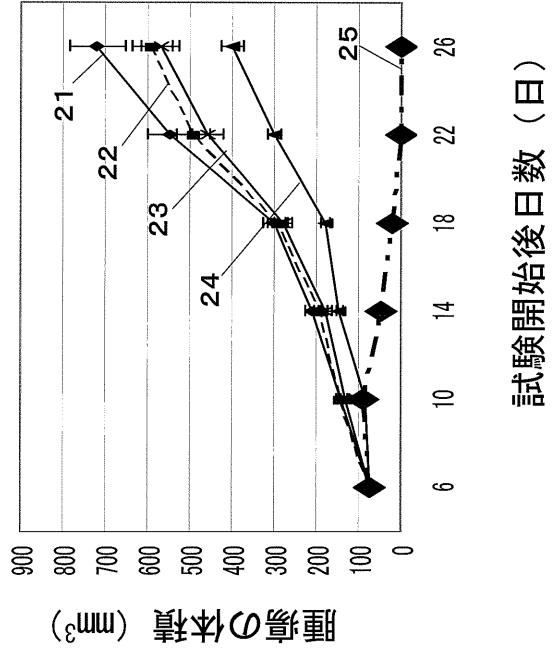
【 図 2 】



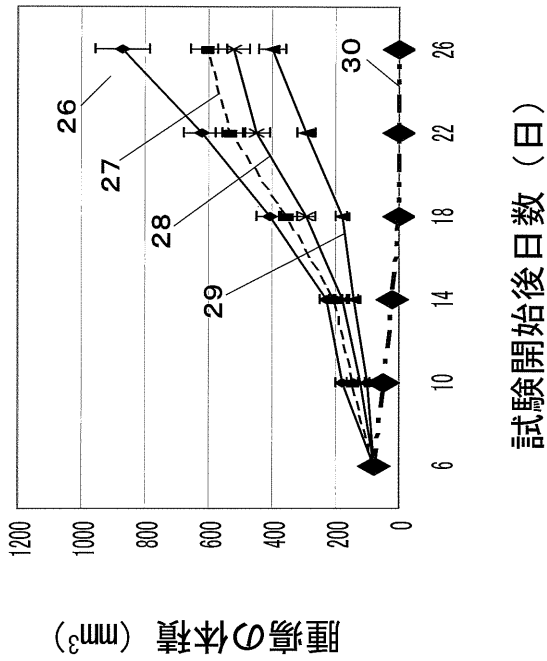
【図3】



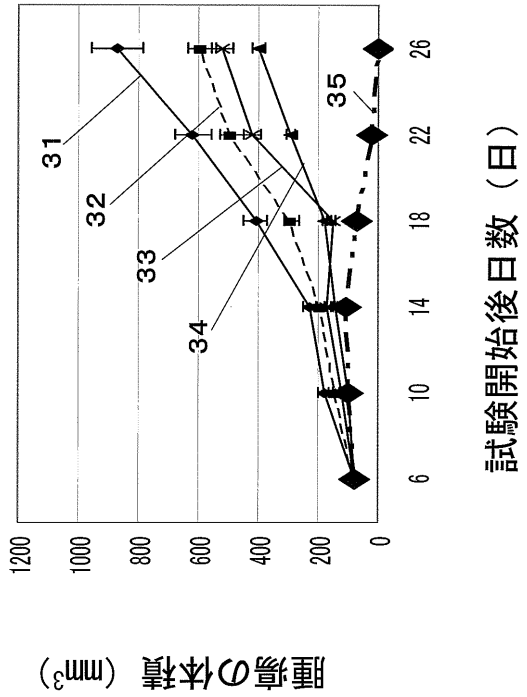
【図4】



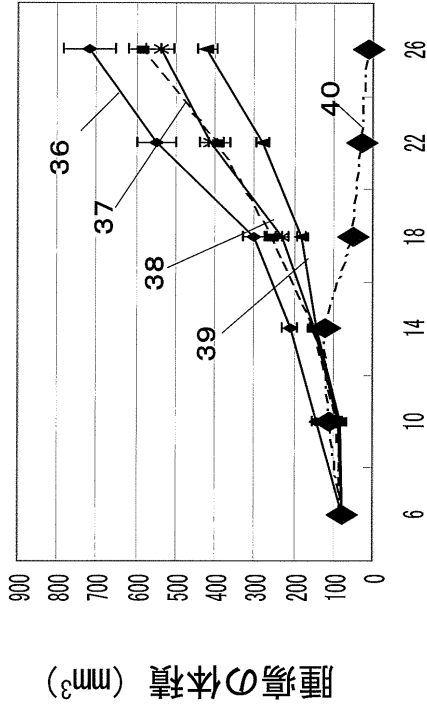
【図5】



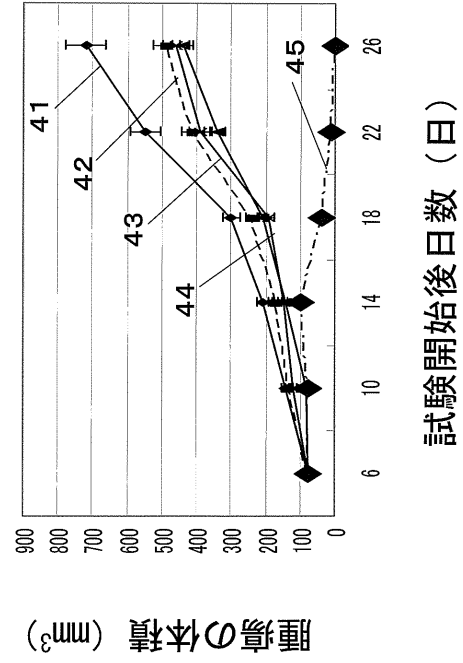
【図6】



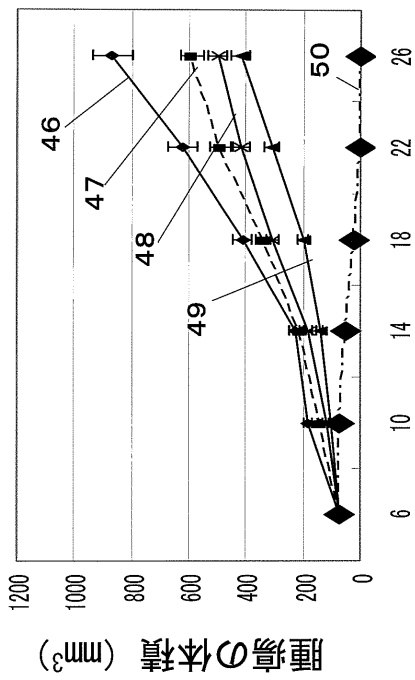
【図7】



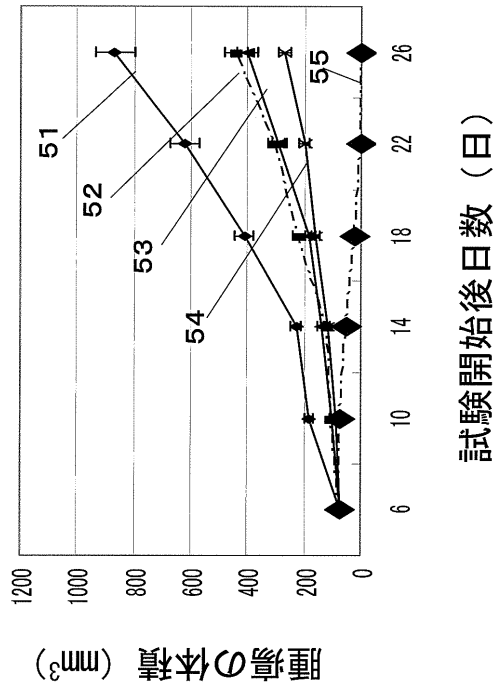
【図8】



【図9】



【図10】



【配列表】

0005923984000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 K 31/337 (2006.01) A 6 1 P 35/02
A 6 1 K 31/475 (2006.01) A 6 1 K 31/337
A 6 1 K 31/675 (2006.01) A 6 1 K 31/475
A 6 1 K 31/675

(72)発明者 成田 義規
神奈川県鎌倉市手広6丁目10番1号 東レ株式会社基礎研究センター内

審査官 小森 潔

(56)参考文献 国際公開第02/083070(WO,A1)
Journal of Biological Chemistry, 1995年, Vol. 270, No. 35, p20717-20723
British Journal of Cancer, 1978年, Vol. 37, No. 5, p833-840
Oncologist, 2001年, Vol. 6, No. 2, p133-146

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
A 6 1 K 39/395
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)