(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第6107655号
(P6107655)

(45)発行日　平成29年4月5日(2017.4.5)　(24)登録日　平成29年3月17日(2017.3.17)

(51)Int.Cl.		F I		
A61K 39/395	(2006.01)	A61K	39/395	E
A61P 35/00	(2006.01)	A61K	39/395	T
C07K 16/32	(2006.01)	A61K	39/395	C
C07K 16/46	(2006.01)	A61P	35/00	
		C07K	16/32	ZNA

請求項の数 8　(全 63 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2013-522419(P2013-522419)
(86)(22)出願日　平成25年3月29日(2013.3.29)
(86)国際出願番号　PCT/JP2013/059569
(87)国際公開番号　WO2013/147176
(87)国際公開日　平成25年10月3日(2013.10.3)
審査請求日　平成28年3月2日(2016.3.2)
(31)優先権主張番号　特願2012-80780(P2012-80780)
(32)優先日　平成24年3月30日(2012.3.30)
(33)優先権主張国　日本国(JP)

(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
(74)代理人　100180954
弁理士　漆山　誠一
(72)発明者　齋藤　孝則
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】胆嚢癌の治療及び／又は予防用医薬組成物

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

配列番号２～３０のうち偶数の配列番号で表されるいずれかのアミノ酸配列を有するＣＡＰＲＩＮ－１タンパク質、又は該タンパク質のアミノ酸配列における連続する７個以上のアミノ酸残基を含むその断片、と免疫学的反応性を有し、かつ胆嚢癌細胞表面のＣＡＰＲＩＮ－１タンパク質部分と特異的に結合する、抗体又はそのフラグメントを有効成分として含むことを特徴とする、胆嚢癌の治療及び／又は予防のための医薬組成物。

【請求項２】

前記ＣＡＰＲＩＮ－１タンパク質の断片が、配列番号２～３０のうち配列番号６及び配列番号１８を除く偶数の配列番号で表されるいずれかのアミノ酸配列中のアミノ酸残基番号２３３－３４３、アミノ酸残基番号５１２－Ｃ末端又はアミノ酸残基番号５０－９８の領域内の連続する７個以上のアミノ酸残基を含むことを特徴とする、請求項１に記載の医薬組成物。

【請求項３】

前記ＣＡＰＲＩＮ－１タンパク質の断片が、配列番号２６７、配列番号４２９、配列番号４２８、配列番号２７３、配列番号２６６、配列番号２７０、配列番号２７２又は配列番号２６９、配列番号４３０、配列番号４３１又は配列番号４３２で表されるアミノ酸配列における連続する７個以上のアミノ酸残基を含むことを特徴とする、請求項１又は２に記載の医薬組成物。

【請求項４】

前記抗体が、モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体である、請求項１～３のいずれか１項に記載の医薬組成物。
【請求項５】
前記抗体が、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、単鎖抗体又は多重特異性抗体である、請求項１～４のいずれか１項に記載の医薬組成物。
【請求項６】
前記抗体又はそのフラグメントが、以下の（ａ）～（ａｏ）のいずれかである、請求項１～５のいずれか１項に記載の医薬組成物。
（ａ）配列番号３７、３８及び３９で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号４１、４２及び４３で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む抗体又はそのフラグメント
（ｂ）配列番号４７、４８及び４９で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号５１、５２及び５３で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む抗体又はそのフラグメント
（ｃ）配列番号５７、５８及び５９で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号６１、６２及び６３で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む抗体又はそのフラグメント
（ｄ）配列番号６７、６８及び６９で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号７１、７２及び７３で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む抗体又はそのフラグメント
（ｅ）配列番号７７、７８及び７９で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号８１、８２及び８３で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む抗体又はそのフラグメント
（ｆ）配列番号８７、８８及び８９で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号９１、９２及び９３で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む抗体又はそのフラグメント
（ｇ）配列番号９７、９８及び９９で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号１０１、１０２及び１０３で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む抗体又はそのフラグメント
（ｈ）配列番号１０７、１０８及び１０９で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号１１１、１１２及び１１３で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む抗体又はそのフラグメント
（ｉ）配列番号１１７、１１８及び１１９で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号１２１、１２２及び１２３で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む抗体又はそのフラグメント
（ｊ）配列番号１２７、１２８及び１２９で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号１２１、１２２及び１２３で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む抗体又はそのフラグメント
（ｋ）配列番号１３２、１３３及び１３４で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号１３６、

１３７及び１３８で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む抗体又はそのフラグメント
（ｌ）配列番号１４２、１４３及び１４４で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号１４６、１４７及び１４８で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む抗体又はそのフラグメント
（ｍ）配列番号１４２、１４３及び１４４で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲを含む重鎖可変領域と配列番号１５２、１５３及び１５４で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む抗体又はそのフラグメント
（ｎ）配列番号１５７、１５８及び１５９で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号１６１、１６２及び１６３で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む抗体又はそのフラグメント
（ｏ）配列番号１６７、１６８及び１６９で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号１７１、１７２及び１７３で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む抗体又はそのフラグメント
（ｐ）配列番号１６７、１６８及び１６９で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号１７７、１７８及び１７９で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む抗体又はそのフラグメント
（ｑ）配列番号１６７、１６８及び１６９で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号１８２、１８３及び１８４で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む抗体又はそのフラグメント
（ｒ）配列番号１６７、１６８及び１６９で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号１８７、１８８及び１８９で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む抗体又はそのフラグメント
（ｓ）配列番号１６７、１６８及び１６９で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号１９２、１９３及び１９４で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む抗体又はそのフラグメント
（ｔ）配列番号１９７、１９８及び１９９で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号２０１、２０２及び２０３で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む抗体又はそのフラグメント
（ｕ）配列番号２０７、２０８及び２０９で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号２１１、２１２及び２１３で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む抗体又はそのフラグメント
（ｖ）配列番号２１７、２１８及び２１９で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号２２１、２２２及び２２３で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む抗体又はそのフラグメント
（ｗ）配列番号２２７、２２８及び２２９で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号２３１、２３２及び２３３で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む抗体又はそのフラグメント

（ｘ）配列番号２３７、２３８及び２３９で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号２４１、２４２及び２４３で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む抗体又はそのフラグメント

（ｙ）配列番号２４７、２４８及び２４９で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号２５１、２５２及び２５３で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む抗体又はそのフラグメント

（ｚ）配列番号２７６、２７７及び２７８で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号２８０、２８１及び２８２で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む抗体又はそのフラグメント

（ａａ）配列番号２７６、２７７及び２７８で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号２８６、２８７及び２８８で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む抗体又はそのフラグメント

（ａｂ）配列番号２９１、２９２及び２９３で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号２９５、２９６及び２９７で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む抗体又はそのフラグメント

（ａｃ）配列番号３０１、３０２及び３０３で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号３０５、３０６及び３０７で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む抗体又はそのフラグメント

（ａｄ）配列番号３１１、３１２及び３１３で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号３１５、３１６及び３１７で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む抗体又はそのフラグメント

（ａｅ）配列番号３２１、３２２及び３２３で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号３２５、３２６及び３２７で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む抗体又はそのフラグメント

（ａｆ）配列番号３３１、３３２及び３３３で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号３３５、３３６及び３３７で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む抗体又はそのフラグメント

（ａｇ）配列番号３４１、３４２及び３４３で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号３４５、３４６及び３４７で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む抗体又はそのフラグメント

（ａｈ）配列番号３５１、３５２及び３５３で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号３５４、３５５及び３５６で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む抗体又はそのフラグメント

（ａｉ）配列番号３５１、３５２及び３５７で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号３５４、３５５及び３５６で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む抗体又はそのフラグメント

（ａｊ）配列番号３７３、３７４及び３７５で表されるアミノ酸配列の相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号３７７、３７

８及び３７９で表されるアミノ酸配列の相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む抗体又はそのフラグメント
（ａｋ）配列番号３８３、３８４及び３８５で表されるアミノ酸配列の相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号３８７、３８８及び３８９で表されるアミノ酸配列の相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む抗体又はそのフラグメント
（ａｌ）配列番号３９３、３９４及び３９５で表されるアミノ酸配列の相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号３８７、３８８及び３８９で表されるアミノ酸配列の相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む抗体又はそのフラグメント
（ａｍ）配列番号３９８、３９９及び４００で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号４０２、４０３及び４０４で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む抗体又はそのフラグメント
（ａｎ）配列番号４０８、４０９及び４１０の相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号４１２、４１３及び４１４の相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む軽鎖可変領域とを含む抗体又はそのフラグメント
（ａｏ）配列番号４１８、４１９及び４２０の相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号４２２、４２３及び４２４の相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む軽鎖可変領域とを含む抗体又はそのフラグメント
【請求項７】
前記抗体又はそのフラグメントが、抗腫瘍剤とコンジュゲートされている、請求項１～６のいずれか１項に記載の医薬組成物。
【請求項８】
請求項１～７のいずれか１項に記載の医薬組成物と、抗腫瘍剤を含む医薬組成物とを組み合わせて含む、組み合わせ医薬品。

【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、ＣＡＰＲＩＮ－１タンパク質に対する抗体又はそのフラグメントの、胆嚢癌の治療及び／又は予防剤等としての医薬用途に関する。
【背景技術】
【０００２】
近年、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。癌特異的治療薬として一定の薬効が得られ注目されているが、標的となる抗原タンパク質の大部分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、抗原を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っている。したがって、癌細胞表面に特異的に発現する癌抗原を同定し、それを標的とした抗体を医薬品として使用することができれば、より副作用の少ない抗体医薬による治療が可能になると期待される。
【０００３】
ただ、癌の中でも胆嚢癌（胆のうがん）は自覚症状・初期症状に乏しく、早期発見が非常に困難な癌で、また、リンパ節転移や肝臓転移、肺転移、骨転移、腹膜播種など進行した胆嚢癌は非常に治療困難で、手術が不適応の胆嚢癌患者の５年生存率はほぼゼロ％であることや、治療が非常に困難であって、効果のある胆嚢癌の治療薬は開発されていないことが当業者の技術常識として知られている。
【０００４】

Ｃｙｔｏｐｌａｓｍｉｃ－ ａｎｄ ｐｒｏｌｉｆｅｒａｔｉｏｎ－ａｓｓｏｃｉａｔｅｅｄ 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として知られていたが、乳癌細胞などの癌細胞の表面に特異的に発現することが見出されたため、癌治療のための抗体医薬のターゲットとして研究が進められている（特許文献１）。しかしながら、特許文献１ではＣＡＰＲＩＮ－１タンパク質が胆嚢癌細胞上に発現することは確認されておらず、ＣＡＰＲＩＮ－１タンパク質が胆嚢癌の抗原タンパク質となりうることについての記載も示唆もない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【０００５】

【特許文献１】ＷＯ２０１０／０１６５２６

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００６】

本発明の目的は、胆嚢癌細胞の表面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の、胆嚢癌の治療及び／又は予防剤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】

【０００７】

本発明者は、鋭意研究の結果、ＣＡＰＲＩＮ－１タンパク質の一部が胆嚢癌細胞の細胞表面に発現していることを見出し、さらにはＣＡＰＲＩＮ－１タンパク質に対する抗体が、ＣＡＰＲＩＮ－１タンパク質を発現する胆嚢癌細胞を障害することを見出し、本発明を完成させるに至った。

【０００８】

したがって、本発明は、以下の特徴を有する。

【０００９】

本発明は、配列番号２～３０のうち偶数の配列番号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、を有する、ＣＡＰＲＩＮ－１タンパク質、又は該タンパク質のアミノ酸配列における連続する７個以上のアミノ酸残基を含むその断片、と免疫学的反応性を有する抗体又はそのフラグメントを有効成分として含むことを特徴とする、胆嚢癌の治療及び／又は予防のための医薬組成物を提供する。

【００１０】

別の実施形態において、上記抗体は、モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体である。

【００１１】

別の実施形態において、上記抗体は、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、単鎖抗体、又は多重特異抗体である。

【００１２】

別の実施形態において、上記抗体は、配列番号２７１、配列番号２７３又は配列番号２６６又は配列番号２７０又は配列番号２７２又は配列番号２６９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、を有するペプチド又その断片と免疫学的反応性を有する抗体である。

【００１３】

別の実施形態において、上記抗体は、以下の（ａ）～（ａｏ）のいずれかの抗体であって、かつ、前記ＣＡＰＲＩＮ－１タンパク質等と免疫学的反応性を有する抗体、又は該抗体を有効成分として含むことを特徴とする、胆嚢癌の治療及び／又は予防のための医薬組成物である。

【００１４】
（ａ）配列番号３７、３８及び３９で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号４１、４２及び４３で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む抗体。
【００１５】
（ｂ）配列番号４７、４８及び４９で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号５１、５２及び５３で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む抗体。
【００１６】
（ｃ）配列番号５７、５８及び５９で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号６１、６２及び６３で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む抗体。
【００１７】
（ｄ）配列番号６７、６８及び６９で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号７１、７２及び７３で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む抗体。
【００１８】
（ｅ）配列番号７７，７８及び７９で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号８１，８２及び８３で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む抗体。
【００１９】
（ｆ）配列番号８７，８８及び８９で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号９１，９２及び９３で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む抗体。
【００２０】
（ｇ）配列番号９７，９８及び９９で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号１０１，１０２及び１０３で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む抗体。
【００２１】
（ｈ）配列番号１０７，１０８及び１０９で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号１１１，１１２及び１１３で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む抗体。
【００２２】
（ｉ）配列番号１１７，１１８及び１１９で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号１２１，１２２及び１２３で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む抗体。
【００２３】
（ｊ）配列番号１２７，１２８及び１２９で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号１２１，１２２及び１２３で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む抗体。

【００２４】
（ｋ）配列番号１３２，１３３及び１３４で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号１３６，１３７及び１３８で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む抗体。
【００２５】
（ｌ）配列番号１４２，１４３及び１４４で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号１４６，１４７及び１４８で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む抗体。
【００２６】
（ｍ）配列番号１４２，１４３及び１４４で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号１５２，１５３及び１５４で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む抗体。
【００２７】
（ｎ）配列番号１５７，１５８及び１５９で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号１６１，１６２及び１６３で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む抗体。
【００２８】
（ｏ）配列番号１６７，１６８及び１６９で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号１７１，１７２及び１７３で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む抗体。
【００２９】
（ｐ）配列番号１６７，１６８及び１６９で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号１７７，１７８及び１７９で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む抗体。
【００３０】
（ｑ）配列番号１６７，１６８及び１６９で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号１８２，１８３及び１８４で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む抗体。
【００３１】
（ｒ）配列番号１６７，１６８及び１６９で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号１８７，１８８及び１８９で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む抗体。
【００３２】
（ｓ）配列番号１６７，１６８及び１６９で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号１９２，１９３及び１９４で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む抗体。
【００３３】
（ｔ）配列番号１９７，１９８及び１９９で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号２０１，２０２及び２０３で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む抗体。

【００３４】
（ｕ）配列番号２０７，２０８及び２０９で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号２１１，２１２及び２１３で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む抗体。
【００３５】
（ｖ）配列番号２１７，２１８及び２１９で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号２２１，２２２及び２２３で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む抗体。
【００３６】
（ｗ）配列番号２２７，２２８及び２２９で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号２３１，２３２及び２３３で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む抗体。
【００３７】
（ｘ）配列番号２３７，２３８及び２３９で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号２４１，２４２及び２４３で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む抗体。
【００３８】
（ｙ）配列番号２４７，２４８及び２４９で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号２５１，２５２及び２５３で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む抗体。
【００３９】
（ｚ）配列番号２７６、２７７及び２７８で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号２８０、２８１及び２８２で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む抗体。
【００４０】
（ａａ）配列番号２７６、２７７及び２７８で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号２８６、２８７及び２８８で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む抗体。
【００４１】
（ａｂ）配列番号２９１、２９２及び２９３で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号２９５、２９６及び２９７で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む抗体。
【００４２】
（ａｃ）配列番号３０１、３０２及び３０３で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号３０５、３０６及び３０７で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む抗体。
【００４３】
（ａｄ）配列番号３１１、３１２及び３１３で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号３１５、３１６及び３１７で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む抗体。

【００４４】
（ａｅ）配列番号３２１、３２２及び３２３で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号３２５、３２６及び３２７で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む抗体。
【００４５】
（ａｆ）配列番号３３１、３３２及び３３３で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号３３５、３３６及び３３７で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む抗体。
【００４６】
（ａｇ）配列番号３４１、３４２及び３４３で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号３４５、３４６及び３４７で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む抗体。
【００４７】
（ａｈ）配列番号３５１、３５２及び３５３で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号３５４、３５５及び３５６で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む抗体。
【００４８】
（ａｉ）配列番号３５１、３５２及び３５７で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号３５４、３５５及び３５６で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む抗体。
【００４９】
（ａｊ）配列番号３７３、３７４及び３７５で表されるアミノ酸配列の相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号３７７、３７８及び３７９で表されるアミノ酸配列の相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む抗体。
【００５０】
（ａｋ）配列番号３８３、３８４及び３８５で表されるアミノ酸配列の相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号３８７、３８８及び３８９で表されるアミノ酸配列の相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む抗体。
【００５１】
（ａｌ）配列番号３９３、３９４及び３９５で表されるアミノ酸配列の相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号３８７、３８８及び３８９で表されるアミノ酸配列の相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む抗体。
【００５２】
（ａｍ）配列番号３９８、３９９及び４００で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号４０２、４０３及び４０４で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む抗体。
【００５３】
（ａｎ）配列番号４０８、４０９及び４１０の相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号４１２、４１３及び４１４の相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む軽鎖可変領域とを含む抗体。

【００５４】
（ａｏ）配列番号４１８、４１９及び４２０の相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号４２２、４２３及び４２４の相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む軽鎖可変領域とを含む抗体。
【００５５】
本発明の別に実施形態において、本発明の抗体又はそのフラグメントが、抗腫瘍剤とコンジュゲートされている。
【００５６】
本発明はさらに、本発明の上記医薬組成物と、抗腫瘍剤を含む医薬組成物とを組み合わせて含む、組み合わせ医薬品を提供する。
【００５７】
本発明はさらに、本発明の上記医薬組成物又は上記組み合わせ医薬品を被験者に投与することを含む、胆嚢癌の治療及び／又は予防方法を提供する。
【００５８】
本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願2012-080780号の明細書及び／又は図面に記載される内容を包含する。
【発明の効果】
【００５９】
本発明で用いられるＣＡＰＲＩＮ－１タンパク質に対する抗体（以下、しばしば「抗ＣＡＰＲＩＮ－１抗体」とする）は、胆嚢癌細胞を障害する。したがって、ＣＡＰＲＩＮ－１タンパク質に対する抗体は胆嚢癌の治療や予防に有用である。
【発明を実施するための形態】
【００６０】
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で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドに対する抗体の抗腫瘍活性は、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、後述するように、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。
【００６１】
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・・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・・２７，２９）に示されている。
【００６２】
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（ホモログ又はオーソログ）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タンパク質のアミノ酸配列である（後述の実施例１参照）。ＣＡＰＲＩＮ－１タンパク質は、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。
【００６３】
本検討により、ＣＡＰＲＩＮ－１タンパク質が胆嚢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タンパク質のうち、胆嚢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。胆嚢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（断片）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）２３３－３４３、アミノ酸残基番号（ａａ）５１２－Ｃ末端、アミノ酸残基番号（ａａ）５０－９８の領域内の連続する７個以上のアミノ酸残基を含むペプチドが挙げられ、具体的には例えば、配列番号４２９、配列番号４２８、配列番号２７３（配列番号２７３で表されるアミノ酸配列の中でも、配列番号２７４又は配列番号２７５で表されるアミノ酸配列の領域が好ましい。）、配列番号２６６（配列番号２６６で表されるアミノ酸配列の中でも、配列番号２６７又は配列番号２６８で表されるアミノ酸配列の領域が好ましい。）、配列番号２７０、配列番号２７２、配列番号２６９、配列番号４３０、配列番号４３１又は配列番号４３２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、例えば９６％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上など、の配列同一性を有するアミノ酸配列における連続する７個以上のアミノ酸残基を含む部分ペプチドが挙げられ、本発明で用いられる抗体は、これらペプチドに結合する、かつ、抗腫瘍活性を示すすべての抗体が含まれる。

【００６４】

本発明で用いられる上記抗ＣＡＰＲＩＮ－１抗体は、抗腫瘍活性を発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（例えばダイアボディ、トリアボディ、等）、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良い。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。

【００６５】

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。

【００６６】

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。

【００６７】

さらにまた、本発明における胆嚢癌の治療及び／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。

【００６８】

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

【００６９】

＜抗体作製用抗原の作製＞

本発明で用いられる抗ＣＡＰＲＩＮ－１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タンパク質がヒトＣＡＰＲＩＮ－１タンパク質の場合、ヒトＣＡＰＲＩＮ－１タンパク質やその部分ペプチド、ヒトＣＡＰＲＩＮ－１タンパク質を発現する細胞などを用いることができる。

【００７０】
ヒトＣＡＰＲＩＮ－１タンパク質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。
【００７１】
本発明では、ヒトＣＡＰＲＩＮ－１遺伝子の塩基配列（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、最大の類似度又は一致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。
【００７２】
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、約７～１２アミノ酸、例えば８～１１アミノ酸、からなる。具体例としては、配列番号２７３、配列番号２６６又は配列番号２７０又は配列番号２７２又は配列番号２６９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が挙げられる。
【００７３】
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ＤＮＡを調製し、該ＤＮＡを発現ベクターに組み込んで宿主細胞に導入し、該宿主細胞中でペプチドを生産させることにより、目的とするペプチドを得ることができる。
【００７４】
上記ポリペプチドをコードするＤＮＡ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対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Mg^{2+}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。

【００７５】

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、胆嚢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。

【００７６】

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。

【００７７】

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。

【００７８】

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。

【００７９】

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。

【００８０】

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て行うことができる。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、これらに限定されない。

【００８１】

＜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、Ｆｃγ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。

【００８２】

＜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。

【００８３】

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胆嚢癌を障害することができるならば、その種類を問わない。

【００８４】

抗体の例は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、合成抗体、多重特異性抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、単鎖抗体、抗体フラグメント（例えばＦａｂ、Ｆ（ａｂ’）$_2$、Ｆｖ、等）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ＩｇＧ$_1$，ＩｇＧ$_2$，ＩｇＧ$_3$，ＩｇＧ$_4$，ＩｇＡ$_1$，ＩｇＡ$_2$などである。

【００８５】

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、

又はペグ（ＰＥＧ）化などによって修飾されていてもよい。

【００８６】

以下に、種々の抗体の作製例を示す。

【００８７】

抗体が、モノクローナル抗体であるときには、例えば、ＣＡＰＲＩＮ－１タンパク質、ＣＡＰＲＩＮ－１タンパク質を発現する胆嚢癌細胞又はその細胞株（例えばＴＧＢＣ１４ＴＫＢ）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マ細胞とを融合させ、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。

【００８８】

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、公知の方法に従って、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当量に希釈、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。

【００８９】

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。

【００９０】

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マ細胞を用いる。このミエローマ細胞は、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（Ｇａｌｆｒｅ，Ｇ．ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ（１９７９）２７７，１３１－１３３）等が好適に使用される。

【００９１】

前記免疫細胞とミエローマ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。

【００９２】

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。

【００９３】
免疫細胞とミエローマ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、ミエローマ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、前記ミエローマ細胞株の増殖に好適なＲＰＭＩ１６４０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、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。
【００９４】
細胞融合は、前記免疫細胞とミエローマ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。
【００９５】
このようにして得られたハイブリドーマは、通常の選択培養液、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一クローニングを行う。
【００９６】
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マ細胞、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。
【００９７】
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、通常の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。
【００９８】
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。
【００９９】
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。
【０１００】
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、硫安沈殿、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カ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。
【０１０１】
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Ｘｅｎｏ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ＣＡＰＲ

ＩＮ－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、ミエローマ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。

【０１０２】

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。

【０１０３】

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もよい。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。

【０１０４】

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、遺伝子改変抗体（キメラ抗体、ヒト化抗体など）などであってもよい。

【０１０５】

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うる。後述の実施例では、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。これらのモノクローナル抗体は、配列番号４０、配列番号５０、配列番号６０、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、配列番号１２０、配列番号１３０、配列番号１３５、配列番号１４５、配列番号１６０、配列番号１７０、配列番号２００、配列番号２１０、配列番号２２０、配列番号２３０、配列番号２４０、配列番号２５０、配列番号２７９、配列番号２９４、配列番号３０４、配列番号３１４、配列番号３２４、配列番号３３４、配列番号３４４、配列番号３５９、配列番号３６３、配列番号３６８、配列番号３７２、配列番号３７６、配列番号３８６、配列番号３９６、配列番号４０１、配列番号４１１又は配列番号４２１のアミノ酸配列を有する重鎖可変（ＶＨ）領域と、配列番号４４、配列番号５４、配列番号６４、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、配列番号１２４，配列番号１３９、配列番号１４９、配列番号１５５、配列番号１６４、配列番号１７４、配列番号１８０、配列番号１８５、配列番号１９０、配列番号１９５、配列番号２０４、配列番号２１４、配列番号２２４、配列番号２３４、配列番号２４４、配列番号２５４、配列番号２８３、配列番号２８９、配列番号２９８、配列番号３０８、配列番号３１８、配列番号３２８、配列番号３３８、配列番号３４８、配列番号３６１、配列番号３６５、配列番号３７０、配列番号３８０、配列番号３９０、配列番号４０５、配列番号４１５又は配列番号４２５のアミノ酸配列を有する軽鎖可変（ＶＬ）領域を含み、ここで

、該ＶＨ領域に配列番号３７、配列番号４７、配列番号５７、配列番号６７、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１３２、配列番号１４２、配列番号１５７、配列番号１６７、配列番号１９７、配列番号２０７、配列番号２１７、配列番号２２７、配列番号２３７、配列番号２４７、配列番号２７６、配列番号２９１、配列番号３０１、配列番号３１１、配列番号３２１、配列番号３３１、配列番号３４１、配列番号３５１、配列番号３７３、配列番号３８３、配列番号３９３、配列番号３９８、配列番号４０８又は配列番号４１８のアミノ酸配列で表されるＣＤＲ１、配列番号３８、配列番号４８、配列番号５８、配列番号６８、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、配列番号１２８、配列番号１３３、配列番号１４３、配列番号１５８、配列番号１６８、配列番号１９８、配列番号２０８、配列番号２１８、配列番号２２８、配列番号２３８、配列番号２４８、配列番号２７７、配列番号２９２、配列番号３０２、配列番号３１２、配列番号３２２、配列番号３３２、配列番号３４２、配列番号３５２、配列番号３７４、配列番号３８４、配列番号３９４、配列番号３９９、配列番号４０９又は配列番号４１９のアミノ酸配列で表されるＣＤＲ２及び配列番号３９、配列番号４９、配列番号５９、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、配列番号１２９、配列番号１３４、配列番号１４４、配列番号１５９、配列番号１６９、配列番号１９９、配列番号２０９、配列番号２１９、配列番号２２９、配列番号２３９、配列番号２４９、配列番号２７８、配列番号２９３、配列番号３０３、配列番号３１３、配列番号３２３、配列番号３３３、配列番号３４３、配列番号３５３、配列番号３５７、配列番号３７５、配列番号３８５、配列番号３９５、配列番号４００、配列番号４１０、配列番号４２０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４１、配列番号５１、配列番号６１、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、配列番号１２１，配列番号１３６、配列番号１４６、配列番号１５２、配列番号１６１、配列番号１７１、配列番号１７７、配列番号１８２、配列番号１８７、配列番号１９２、配列番号２０１、配列番号２１１、配列番号２２１、配列番号２３１、配列番号２４１、配列番号２５１、配列番号２８０、配列番号２８６、配列番号２９５、配列番号３０５、配列番号３１５、配列番号３２５、配列番号３３５、配列番号３４５、配列番号３５４、配列番号３７７、配列番号３８７、配列番号４０２、配列番号４１２又は配列番号４２２のアミノ酸配列で表されるＣＤＲ１、配列番号４２、配列番号５２、配列番号６２、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、配列番号１２２、配列番号１３７、配列番号１４７、配列番号１５３、配列番号１６２、配列番号１７２、配列番号１７８、配列番号１８３、配列番号１８８、配列番号１９３、配列番号２０２、配列番号２１２、配列番号２２２、配列番号２３２、配列番号２４２、配列番号２５２、配列番号２８１、配列番号２８７、配列番号２９６、配列番号３０６、配列番号３１６、配列番号３２６、配列番号３３６、配列番号３４６、配列番号３５５、配列番号３７８、配列番号３８８、配列番号４０３、配列番号４１３又は配列番号４２３のアミノ酸配列で表されるＣＤＲ２及び配列番号４３、配列番号５３、配列番号６３、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１３８、配列番号１４８、配列番号１５４、配列番号１６３、配列番号１７３、配列番号１７９、配列番号１８４、配列番号１８９、配列番号１９４、配列番号２０３、配列番号２１３、配列番号２２３、配列番号２３３、配列番号２４３、配列番号２５３、配列番号２８２、配列番号２８８、配列番号２９７、配列番号３０７、配列番号３１７、配列番号３２７、配列番号３３７、配列番号３４７、配列番号３５６、配列番号３７９、配列番号３８９、配列番号４０４、配列番号４１４又は配列番号４２４のアミノ酸配列で表されるＣＤＲ３が含まれる。

【０１０６】

キメラ抗体は、異なる動物由来の配列を組み合わせて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。

【０１０７】

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。

【０１０８】

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。

【０１０９】

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；ＦＲ１～ＦＲ４を含む）をＮ末端側からＦＲ１－ＣＤＲ１－ＦＲ２－ＣＤＲ２－ＦＲ３－ＣＤＲ３－ＦＲ４の順で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）。

【０１１０】

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。

【０１１１】

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（ロイシン、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。

【０１１２】

抗体修飾物としては、例えば、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）等の各種分子と結合した抗体を挙げることができる。本発明で用いられる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。

【０１１３】

ここで「機能的に同等」とは、対象となる抗体が本発明で用いられる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。

【０１１４】

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，　ＭＪ．，　ａｎｄ　Ｓｍｉｔｈ，　Ｍ．　（１９８３）　Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｅｎｚｙｍｏｌ．　１００，　４６８－５００、Ｋｒａｍｅｒ，　Ｗ．　ｅｔ　ａｌ．，　（１９８４）　Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．　１２，　９４４１－９４５６、Ｋｒａｍｅｒ，　Ｗ．　ａｎｄ　Ｆｒｉｔｚ，　ＨＪ．，　（１９８７）　Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｅｎｚｙｍｏｌ．　１５４，　３５０－３６７、Ｋｕｎｋｅｌ，　ＴＡ．，　（１９８５）　Ｐｒｏｃ．　Ｎａｔｌ．　Ａｃａｄ．　Ｓｃｉ．　ＵＳＡ．　８２，　４８８－４９２、Ｋｕｎｋｅｌ　（１９８８）　Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｅｎｚｙｍｏｌ．　８５，　２７６３－２７６６）などを用いて、本発明で用いられる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。

【０１１５】

上記抗ＣＡＰＲＩＮ－１抗体が認識するＣＡＰＲＩＮ－１タンパク質のエピトープを認識する抗体は、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ＣＡＰＲＩＮ－１抗体が認識するＣＡＰＲＩＮ－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ＣＡＰＲＩＮ－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。

【０１１６】

本発明で用いられる抗体の親和定数Ｋａ（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$5\times10^{8}M^{-1}$、少なくとも$10^{9}M^{-1}$、少なくとも$5\times10^{9}M^{-1}$、少なくとも$10^{10}M^{-1}$、少なくとも$5\times10^{10}M^{-1}$、少なくとも$10^{11}M^{-1}$、少なくとも$5\times10^{11}M^{-1}$、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。

【０１１７】

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。

【０１１８】

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、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、ピポスルファン、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（ｔｒｉｅｔｈｉｌｅｎｅｔｈｉｏｐｈｏｓｐｈｏｒａｍｉｄｅ）、トリメチローロメラミン（ｔｒｉｍｅｔｈｙｌｏｌｏｍｅｌａｍｉｎｅ）、ブラタシン、ブラタシノン、カンプトセシン、ブリオスタチン、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、エレウテロビン、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（ｃａｒａｂｉｃｉｎ）、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、デトルビシン（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）、エピルビシン、エソルビシン、イダルビシン、マーセロマイシン（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）、ロドルビシン（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）、ゾルビシン（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）、フルダラビン（ｆｌｕｄａｒａｂｉｎｅ）、６－メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニン、アンシタビン、アザシチジン（ａｚａｃｉｔｉｄｉｎｅ）、６－アザウリジン（ａｚａｕｒｉｄｉｎｅ）、カルモフール、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン（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）、ビサントレン（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（ｍｉｔｏｇｕａｚｏｎｅ）、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）、ピラルビシン、ロソキサントロン（ｌｏｓｏｘａｎｔｒｏｎｅ）、ポドフィリン酸（ｐｏｄｏｐｈｙｌｌｉｎｉｃ ａｃｉｄ）、２－エチルヒドラジド、プロカルバジン、ラゾキサン（ｒａｚｏｘａｎｅ）、リゾキシン、シゾフィラン、スピロゲルマニウム（ｓｐｉｒｏｇｅｒｍａｎｉｕｍ）、テニュアゾン酸（ｔｅｎｕａｚｏｎｉｃ ａｃｉｄ）、トリアジコン（ｔｒｉａｚｉｑｕｏｎｅ）、ロリジン（ｒｏｒｉｄｉｎｅ）Ａ、アングイジン（ａｎｇｕｉｄｉｎｅ）、ウレタン、ビンデシン、ダカーバジン、マンノムスチン（ｍａｎｎｏｍｕｓｔｉｎｅ）、ミトブロニトール、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、ゲムシタビン（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、ビンブラスチン、エトポシド、イホスファミド、マイトキサントロン、ビンクリスチン、ビノレルビン、ノバントロン（ｎｏｖａｎｔｒｏｎｅ）、テニポシド、エダトレキセート（ｅｄａｔｒｅｘａｔｅ）、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、カペシタビン（ｃａｐｅｃｉｔａｂｉｎｅ）及

び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。
【０１１９】
抗体が、抗腫瘍剤とコンジュゲートした抗体である場合に、抗腫瘍活性を発揮するかどうかを評価する方法としては、例えば、マウス由来の抗ＣＡＰＲＩＮ－１抗体ならば、マウス抗体に結合する二次抗体に薬物が付いたものを同時に反応させて、ヒト癌細胞に対する抗腫瘍効果を生体外で評価することができる。例えば、Ｓａｐｏｒｉｎが結合された抗ヒトＩｇＧ抗体（Ｈｕｍ－ＺＡＰ（Ａｄｖａｎｃｅｄ Ｔａｒｇｅｔｉｎｇ Ｓｙｓｔｅｍｓ））を用いて評価ができる。
【０１２０】
また、本発明で用いられる抗体と、抗腫瘍剤を併用投与することで、より高い治療効果を得ることができる。本手法は、ＣＡＰＲＩＮ－１タンパク質が発現している癌患者に対して、外科的手術前後どちらにおいても適応できる。特に手術後に、従来抗腫瘍剤単独で処置されていたＣＡＰＲＩＮ－１タンパク質が発現している癌に対して、より高い癌再発防止や生存期間の延長が得られる。
【０１２１】
併用投与に用いられる抗腫瘍剤の例は、文献等で公知の上記の抗腫瘍剤、及び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。上記の内、特にシクロホスファミド、パクリタキセル、ドキセタキセル、ビノレルビンなどが好ましく用いられる。
【０１２２】
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。
【０１２３】
本発明で用いられる抗体は、ＣＡＰＲＩＮ－１タンパク質と免疫学的反応性を有する抗体、あるいは、ＣＡＰＲＩＮ－１タンパク質と特異的に結合する抗体であって、胆嚢癌に対する細胞障害活性、又は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、多重特異性抗体（例えばダイアボディ、トリアボディ、等）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。
【０１２４】
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抗ヒトＣＡＰＲＩＮ－１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、Ｋａｂａｔ ＥＵ ｎｕｍｂｅｒｉｎｇ ｓｙｓｔｅｍ（Ｋａｂａｔら、Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ, ５ｔｈＥｄ. Ｐｕｂｌｉｃ Ｈｅａｌｔｈ Ｓｅｒｖｉｃｅ, Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ, Ｂｅｔｈｅｓｄａ, 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ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３の配列を決定する。
【０１２５】

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 Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ 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タンパク質を免疫したのち、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。

【０１２６】

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。

【０１２７】

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。

【０１２８】

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（$Ｇ_{4}Ｓ$）３（Ｇ．－Ｂ．Ｋｉｍら，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ Ｄｅｓｉｇｎ ａｎｄ Ｓｅｌｅｃｔｉｏｎ ２００７，２０（９）：４２５－４３２）が挙げられる。

【０１２９】

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。

【０１３０】

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．，Ｍｏｎｏｃｌｏｎ

ａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ ｐｒａｃｔｉｃｅ.，１９９３ ＡＣＡＤＥＭＩＣ ＰＲＥＳＳ）。

【０１３１】

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）～（ａｏ）の抗体が挙げられる。

【０１３２】

（ａ）配列番号３７、３８及び３９で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号４１、４２及び４３で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む、ＷＯ２０１１／０９６５２８に記載の抗体（例えば、配列番号４０の重鎖可変領域及び配列番号４４の軽鎖可変領域で構成される抗体）。

【０１３３】

（ｂ）配列番号４７、４８及び４９で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号５１、５２及び５３で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む、ＷＯ２０１１／０９６５１９に記載の抗体（例えば、配列番号５０の重鎖可変領域及び配列番号５４の軽鎖可変領域で構成される抗体）。

【０１３４】

（ｃ）配列番号５７、５８及び５９で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号６１、６２及び６３で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む、ＷＯ２０１１／０９６５１７に記載の抗体（例えば、配列番号６０の重鎖可変領域及び配列番号６４の軽鎖可変領域で構成される抗体）。

【０１３５】

（ｄ）配列番号６７、６８及び６９で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号７１、７２及び７３で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む、ＷＯ２０１１／０９６５２８に記載の抗体（例えば、配列番号７０の重鎖可変領域及び配列番号７４の軽鎖可変領域で構成される抗体）。

【０１３６】

（ｅ）配列番号７７、７８及び７９で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号８１、８２及び８３で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む、ＷＯ２０１１／０９６５２８に記載の抗体（例えば、配列番号８０の重鎖可変領域及び配列番号８４の軽鎖可変領域で構成される抗体）。

【０１３７】

（ｆ）配列番号８７、８８及び８９で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号９１、９２及び９３で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む、ＷＯ２０１１／０９６５２８に記載の抗体（例えば、配列番号９０の重鎖可変領域及び配列番号９４の軽鎖可変領域で構成される抗体）。

【０１３８】

（ｇ）配列番号９７、９８及び９９で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号１０１、１０２及び１０３で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む、ＷＯ２０１１／０９６５２８に記載の抗体（例えば、配列番号１００の重鎖可変領域及び配列番号１０４の軽鎖可変領域で構成される抗体）。

【０１３９】

（ｈ）配列番号１０７、１０８及び１０９で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領

域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号１１１、１１２及び１１３で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む、ＷＯ２０１１／０９６５２８に記載の抗体（例えば、配列番号１１０の重鎖可変領域及び配列番号１１４の軽鎖可変領域で構成される抗体）。

【０１４０】

（ｉ）配列番号１１７、１１８及び１１９で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号１２１、１２２及び１２３で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む、ＷＯ２０１１／０９６５３３に記載の抗体（例えば、配列番号１２０の重鎖可変領域及び配列番号１２４の軽鎖可変領域で構成される抗体）。

【０１４１】

（ｊ）配列番号１２７、１２８及び１２９で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号１２１、１２２及び１２３で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む、ＷＯ２０１１／０９６５３３に記載の抗体（例えば、配列番号１３０の重鎖可変領域及び配列番号１２４の軽鎖可変領域で構成される抗体）。

【０１４２】

（ｋ）配列番号１３２、１３３及び１３４で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号１３６、１３７及び１３８で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む、ＷＯ２０１１／０９６５３３に記載の抗体（例えば、配列番号１３５の重鎖可変領域及び配列番号１３９の軽鎖可変領域で構成される抗体）。

【０１４３】

（ｌ）配列番号１４２、１４３及び１４４で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号１４６、１４７及び１４８で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む、ＷＯ２０１１／０９６５３４に記載の抗体（例えば、配列番号１４５の重鎖可変領域及び配列番号１４９の軽鎖可変領域で構成される抗体）。

【０１４４】

（ｍ）配列番号１４２、１４３及び１４４で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号１５２、１５３及び１５４で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む、ＷＯ２０１１／０９６５３４に記載の抗体（例えば、配列番号１４５の重鎖可変領域及び配列番号１５５の軽鎖可変領域で構成される抗体）。

【０１４５】

（ｎ）配列番号１５７，１５８及び１５９のＣＤＲを含む重鎖可変領域と配列番号１６１，１６２及び１６３のＣＤＲを含む軽鎖可変領域とを含む、ＷＯ２０１１／０９６５３４に記載の抗体（例えば、配列番号１６０の重鎖可変領域および配列番号１６４の軽鎖可変領域で構成される抗体）。

【０１４６】

（ｏ）配列番号１６７、１６８及び１６９で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号１７１、１７２及び１７３で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む、ＷＯ２０１１／０９６５３４に記載の

抗体（例えば、配列番号１７０の重鎖可変領域及び配列番号１７４の軽鎖可変領域で構成される抗体）。

【０１４７】

（ｐ）配列番号１６７、１６８及び１６９で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号１７７、１７８及び１７９で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む、ＷＯ２０１０／０１６５２６に記載の抗体（例えば、配列番号１７０の重鎖可変領域及び配列番号１８０の軽鎖可変領域で構成される抗体）。

【０１４８】

（ｑ）配列番号１６７、１６８及び１６９で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号１８２、１８３及び１８４で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む、ＷＯ２０１０／０１６５２６に記載の抗体（例えば、配列番号１７０の重鎖可変領域及び配列番号１８５の軽鎖可変領域で構成される抗体）。

【０１４９】

（ｒ）配列番号１６７、１６８及び１６９で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号１８７、１８８及び１８９で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む、ＷＯ２０１０／０１６５２６に記載の抗体（例えば、配列番号１７０の重鎖可変領域及び配列番号１９０の軽鎖可変領域で構成される抗体）。

【０１５０】

（ｓ）配列番号１６７、１６８及び１６９で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号１９２、１９３及び１９４で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む、ＷＯ２０１０／０１６５２６に記載の抗体（例えば、配列番号１７０の重鎖可変領域及び配列番号１９５の軽鎖可変領域で構成される抗体）。

【０１５１】

（ｔ）配列番号１９７、１９８及び１９９で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号２０１、２０２及び２０３で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む、ＷＯ２０１０／０１６５２６に記載の抗体（例えば、配列番号２００の重鎖可変領域及び配列番号２０４の軽鎖可変領域で構成される抗体）。

【０１５２】

（ｕ）配列番号２０７、２０８及び２０９で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号２１１、２１２及び２１３で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む、ＷＯ２０１０／０１６５２６に記載の抗体（例えば、配列番号２１０の重鎖可変領域及び配列番号２１４の軽鎖可変領域で構成される抗体）。

【０１５３】

（ｖ）配列番号２１７、２１８及び２１９で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号２２１、２２２及び２２３で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む、ＷＯ２０１０／０１６５２６に記載の抗体（例えば、配列番号２２０の重鎖可変領域及び配列番号２２４の軽鎖可変領域で構成

される抗体）。
【０１５４】
（ｗ）配列番号２２７、２２８及び２２９で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号２３１、２３２及び２３３で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む、ＷＯ２０１０／０１６５２６に記載の抗体（例えば、配列番号２３０の重鎖可変領域及び配列番号２３４の軽鎖可変領域で構成される抗体）。
【０１５５】
（ｘ）配列番号２３７、２３８及び２３９で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号２４１、２４２及び２４３で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む、ＷＯ２０１０／０１６５２６に記載の抗体（例えば、配列番号２４０の重鎖可変領域及び配列番号２４４の軽鎖可変領域で構成される抗体）。
【０１５６】
（ｙ）配列番号２４７、２４８及び２４９で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号２５１、２５２及び２５３で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む、ＷＯ２０１０／０１６５２６に記載の抗体（例えば、配列番号２５０の重鎖可変領域及び配列番号２５４の軽鎖可変領域で構成される抗体）。
【０１５７】
（ｚ）配列番号２７６、２７７及び２７８で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号２８０、２８１及び２８２で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む、ＷＯ２０１３／０１８８９４に記載の抗体（例えば、配列番号２７９の重鎖可変領域及び配列番号２８３の軽鎖可変領域で構成される抗体）。
【０１５８】
（ａａ）配列番号２７６、２７７及び２７８で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号２８６、２８７及び２８８で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む、ＷＯ２０１３／０１８８９４に記載の抗体（例えば、配列番号２７９の重鎖可変領域及び配列番号２８９の軽鎖可変領域で構成される抗体）。
【０１５９】
（ａｂ）配列番号２９１、２９２及び２９３で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号２９５、２９６及び２９７で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む、ＷＯ２０１３／０１８８９４に記載の抗体（例えば、配列番号２９４の重鎖可変領域及び配列番号２９８の軽鎖可変領域で構成される抗体）。
【０１６０】
（ａｃ）配列番号３０１、３０２及び３０３で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号３０５、３０６及び３０７で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む、ＷＯ２０１３／０１８８９２に記載の抗体（例えば、配列番号３０４の重鎖可変領域及び配列番号３０８の軽鎖可変領域で構成される抗体）。
【０１６１】
（ａｄ）配列番号３１１、３１２及び３１３で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定

領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号３１５、３１６及び３１７で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む、ＷＯ２０１３／０１８８９１に記載の抗体（例えば、配列番号３１４の重鎖可変領域及び配列番号３１８の軽鎖可変領域で構成される抗体）。

【０１６２】

（ａｅ）配列番号３２１、３２２及び３２３で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号３２５、３２６及び３２７で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む、ＷＯ２０１３／０１８８８９に記載の抗体（例えば、配列番号３２４の重鎖可変領域及び配列番号３２８の軽鎖可変領域で構成される抗体）。

【０１６３】

（ａｆ）配列番号３３１、３３２及び３３３で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号３３５、３３６及び３３７で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む、ＷＯ２０１３／０１８８８３に記載の抗体（例えば、配列番号３３４の重鎖可変領域及び配列番号３３８の軽鎖可変領域で構成される抗体）。

【０１６４】

（ａｇ）配列番号３４１、３４２及び３４３で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号３４５、３４６及び３４７で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む抗体又はそのフラグメント（例えば、配列番号３４４の重鎖可変領域及び配列番号３４８の軽鎖可変領域で構成される抗体）。

【０１６５】

（ａｈ）配列番号３５１、３５２及び３５３で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号３５４、３５５及び３５６で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む抗体又はそのフラグメント（例えば、配列番号３５９の重鎖可変領域及び配列番号３６１の軽鎖可変領域で構成される抗体、配列番号３６８の重鎖可変領域及び配列番号３７０の軽鎖可変領域で構成される抗体、配列番号３７２の重鎖可変領域及び配列番号３７０の軽鎖可変領域で構成される抗体）。

【０１６６】

（ａｉ）配列番号３５１、３５２及び３５７で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号３５４、３５５及び３５６で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む抗体又はそのフラグメント（例えば、配列番号３６３の重鎖可変領域及び配列番号３６５の軽鎖可変領域で構成される抗体）。

【０１６７】

（ａｊ）配列番号３７３、３７４及び３７５で表されるアミノ酸配列の相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号３７７、３７８及び３７９で表されるアミノ酸配列の相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む抗体又はそのフラグメント（例えば、配列番号３７６の重鎖可変領域及び配列番号３８０の軽鎖可変領域で構成される抗体）。

【０１６８】

（ａｋ）配列番号３８３、３８４及び３８５で表されるアミノ酸配列の相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号３８７、３８８及び３８９で表されるアミノ酸配列の相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む抗体又はそのフラグメント（例えば、配列番号３８

６の重鎖可変領域及び配列番号３９０の軽鎖可変領域で構成される抗体）。
【０１６９】
（ａｌ）配列番号３９３、３９４及び３９５で表されるアミノ酸配列の相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号３８７、３８８及び３８９で表されるアミノ酸配列の相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む抗体又はそのフラグメント（例えば、配列番号３９６の重鎖可変領域及び配列番号３９０の軽鎖可変領域で構成される抗体）。
【０１７０】
（ａｍ）配列番号３９８、３９９及び４００で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号４０２、４０３及び４０４で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む抗体又はそのフラグメント（例えば、配列番号４０１の重鎖可変領域及び配列番号４０５の軽鎖可変領域で構成される抗体）。
【０１７１】
（ａｎ）配列番号４０８、４０９及び４１０の相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号４１２、４１３及び４１４の相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む軽鎖可変領域とを含む抗体又はそのフラグメント（例えば、配列番号４１１の重鎖可変領域及び配列番号４１５の軽鎖可変領域で構成される抗体）。
【０１７２】
（ａｏ）配列番号４１８、４１９及び４２０の相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む重鎖可変領域と配列番号４２２、４２３及び４２４の相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域とを含む軽鎖可変領域とを含む抗体又はそのフラグメント（例えば、配列番号４２１の重鎖可変領域及び配列番号４２５の軽鎖可変領域で構成される抗体）。
【０１７３】
ここで、配列番号６７、６８及び６９、配列番号７７，７８及び７９、配列番号８７，８８及び８９、配列番号９７，９８及び９９、配列番号１０７，１０８及び１０９、配列番号１１７，１１８及び１１９、配列番号１２７，１２８及び１２９、配列番号１３２、１３３及び１３４、配列番号１４２、１４３及び１４４、配列番号１５７、１５８及び１５９、配列番号１６７、１６８及び１６９、配列番号１６７、１６８及び１６９、配列番号１９７、１９８及び１９９、配列番号２０７、２０８及び２０９、配列番号２１７、２１８及び２１９、配列番号２２７、２２８及び２２９、配列番号２３７、２３８及び２３９、配列番号２４７、２４８及び２４９、配列番号２７６、２７７及び２７８、２９１、２９２及び２９３、３０１、３０２及び３０３、３１１、３１２及び３１３、３２１、３２２及び３２３、３３１、３３２及び３３３、３４１、３４２及び３４３、３７３、３７４及び３７５、３８３、３８４及び３８５、３９３、３９４及び３９５、３９８、３９９及び４００、４０８、４０９及び４１０、４１８、４１９及び４２０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７１、７２及び７３、配列番号８１，８２及び８３、配列番号９１，９２及び９３、配列番号１０１，１０２及び１０３、配列番号１１１、１１２及び１１３、配列番号１２１，１２２及び１２３、配列番号１３６、１３７及び１３８、配列番号１４６，１４７及び１４８、配列番号１５２，１５３及び１５４、配列番号１６１，１６２及び１６３、配列番号１７１，１７２及び１７３、配列番号１７７、１７８及び１７９、配列番号１８２、１８３及び１８４、配列番号１８７、１８８及び１８９、配列番号１９２、１９３及び１９４、配列番号２０１、２０２及び２０３、配列番号２１１、２１２及び２１３、配列番号２２１、２２２及び２２３、配列番号２３１、２３２及び２３３、配列番号２４１、２４２及び２４３、配列番号２５１、２５２及び２５３、配列番号２８０、２８１及び２８２、配列番号２８６、２８７及び２８８、配列番号２９５、２９６及び２９７、配列番号３０５、３０６及び３０７、配列番号３１５、３１６及び３１７、配列番号３２５

、３２６及び３２７、配列番号３３５、３３６及び３３７、配列番号３４５、３４６及び３４７、配列番号３７７、３７８及び３７９、配列番号３８７、３８８及び３８９、配列番号４０２、４０３及び４０４、配列番号４１２、４１３及び４１４配列番号４２２、４２３及び４２４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。

【０１７４】

また、配列番号３７、３８及び３９、配列番号４７、４８及び４９、配列番号５７、５８及び５９に示すアミノ酸配列は、ニワトリ抗体重鎖可変領域のＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３であり、さらにまた、配列番号４１、４２及び４３、配列番号５１、５２及び５３、配列番号６１、６２及び６３に示すアミノ酸配列はそれぞれ、ニワトリ抗体軽鎖可変領域のＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３である。

【０１７５】

また、配列番号３５１、３５２及び３５３に示すアミノ酸配列は、ウサギ抗体重鎖可変領域のＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３であり、さらにまた、配列番号３５４、３５５及び３５６に示すアミノ酸配列はそれぞれ、ウサギ抗体軽鎖可変領域のＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３である。

【０１７６】

また、本発明で用いられるヒト化抗体、キメラ抗体、単鎖抗体又は多重特異性抗体は、例えば以下の抗体である（抗体（ａｈ）で例示する）。

【０１７７】

（ｉ）重鎖の可変領域が配列番号３５１、３５２及び３５３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３５４、３５５及び３５６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。

【０１７８】

（ｉｉ）重鎖の可変領域が配列番号３５１、３５２及び３５３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３５４、３５５及び３５６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。

【０１７９】

（ｉｉｉ）重鎖の可変領域が配列番号３６８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む、並びに、軽鎖の可変領域が配列番号３７０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。

【０１８０】

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ＩｇＧ$_1$重鎖定常領域については登録番号Ｊ００２２８、ヒトＩｇＧ$_2$重鎖定常領域については登録番号Ｊ００２３０、ヒトＩｇＧ$_3$重鎖定常領域については登録番号Ｘ０３６０４、ヒトＩｇＧ$_4$重鎖定常領域については登録番号Ｋ０１３１６、ヒト軽鎖κ定常領域については登録番号Ｖ００５５７、Ｘ６４１３５、Ｘ６４１３３など、ヒト軽鎖λ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。

【０１８１】

なお、前記抗体（ａｈ）のヒト化抗体の具体例は、前記抗体（ａｉ）、重鎖可変領域の配列番号３６８の重鎖可変領域及び配列番号３７０の軽鎖可変領域で構成される抗体、配列番号３７２の重鎖可変領域及び配列番号３７０の軽鎖可変領域で構成される抗体である。

【０１８２】

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。
【０１８３】
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タンパク質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タンパク質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。
【０１８４】
さらに本発明で用いられる上記抗体は、ＣＡＰＲＩＮ－１タンパク質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個を意味する。
【０１８５】
本発明で用いられる抗ＣＡＰＲＩＮ－１抗体によるＣＡＰＲＩＮ－１タンパク質発現胆嚢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。
【０１８６】
ＣＡＰＲＩＮ－１タンパク質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タンパク質発現細胞の補体依存的細胞障害性（ＣＤＣ）。
【０１８７】
したがって、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胆嚢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。
【０１８８】
本発明で用いられる抗ＣＡＰＲＩＮ－１抗体は、胆嚢癌細胞上の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、胆嚢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、胆嚢癌の治療及び／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。
【０１８９】
なお、抗ＣＡＰＲＩＮ－１抗体と胆嚢癌細胞表面上の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。したがって、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、胆嚢癌の治療及び／又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）Ｋａ（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$5\times10^{8}M^{-1}$、少なくとも$10^{9}M^{-1}$、少なくとも$5\times10^{9}M^{-1}$、少なくとも$10^{10}M^{-1}$、少なくとも$5\times10^{10}M^{-1}$、少なくとも$10^{11}M^{-1}$、少なくとも$5\times10^{11}M^{-1}$、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。
【０１９０】
＜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。

【０１９１】
＜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、自然に又はトランスフェクション後にＣＡＰＲＩＮ－１タンパク質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又はアセトン固定した凍結切片又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タンパク質との反応性に関して試験することができる。
【０１９２】
免疫組織化学染色のため、ＣＡＰＲＩＮ－１タンパク質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。
【０１９３】
＜医薬組成物＞
本発明の胆嚢癌の治療及び／又は予防のための医薬組成物の標的は、ＣＡＰＲＩＮ－１遺伝子を発現する胆嚢癌（細胞）であれば特に限定されない。
【０１９４】
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。
【０１９５】
本発明において対象となる胆嚢癌としては、配列番号２～３０のうち偶数の配列番号のアミノ酸配列、該アミノ酸配列と８０％以上、好ましくは９０％以上、より好ましくは９５％以上、さらに好ましくは９７％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列、又はこれらのアミノ酸配列における７個以上、好ましくは８個以上の連続するアミノ酸残基を含むその部分配列をコードする遺伝子を発現している胆嚢癌である。胆嚢癌には、胆嚢部位に生じるものや（原発）、転移した癌も含まれるが、これらに限定されない。
【０１９６】
また、対象となる動物は、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。
【０１９７】
本発明で用いられる抗体を医薬組成物として用いる場合には、当業者に公知の方法で製剤化することが可能である。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て、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。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用量が得られるようにするものである。
【０１９８】
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。
【０１９９】
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。
【０２００】
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。

【０２０１】

投与は、経口又は非経口であり、好ましくは非経口投与であり、具体的には、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。

【０２０２】

また、患者の年齢、体重、性別、症状などにより適宜投与方法を選択することができる。抗体又は抗体をコードするポリヌクレオチドを含有する医薬組成物の投与量としては、例えば、一回につき体重１ｋｇあたり０．０００１ｍｇから１０００ｍｇ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０．００１～１０００００ｍｇ／ｂｏｄｙ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。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。

【０２０３】

本発明の医薬組成物を被験者に投与することによって胆嚢癌を治療及び／又は予防することができる。

【０２０４】

さらに、本発明の医薬組成物を、上記で例示したような抗腫瘍剤又は抗腫瘍剤を含む医薬組成物と組み合わせて、被験者に併用投与することを含む、胆嚢癌の治療及び／又は予防方法も本発明に包含される。本発明の抗体又はそのフラグメントと抗腫瘍剤は、同時に、あるいは、別々に被験者に投与されうる。別々に投与する場合には、いずれの医薬組成物が先であっても又は後であってもよく、それらの投与間隔、投与量、投与経路及び投与回数は、専門医によって適宜選択されうる。同時に投与する別の医薬剤型には、例えば、本発明の抗体又はそのフラグメントと抗腫瘍剤を、薬理学上許容される担体（もしくは媒体)中で混合し製剤化して得られる医薬組成物も包含されるものとする。また、抗腫瘍剤を含有する上記医薬組成物及び剤型のいずれに対しても、本発明の抗体を含有する医薬組成物及び剤型についての処方、製剤化、投与経路、用量、癌などの説明を適用しうる。したがって、本発明は、本発明の医薬組成物と、上で例示したような抗腫瘍剤を含む医薬組成物とを含む、胆嚢癌の治療及び／又は予防のための組み合わせ医薬品（「医薬キット」ともいう）も提供する。

【０２０５】

また、本発明は、本発明の抗体又はそのフラグメントと抗腫瘍剤とを、薬理学上許容される担体とともに含む、胆嚢癌の治療及び／又は予防のための医薬組成物も提供する。

【０２０６】

或いは、抗腫瘍剤は、本発明の抗体又はそのフラグメントにコンジュゲートされてもよい。該コンジュゲートは、上記と同様に、薬理学上許容される担体（もしくは媒体)と混合し製剤化して医薬組成物とすることができる。

【実施例】

【０２０７】

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。

【０２０８】

[実施例１]　ＳＥＲＥＸ法による癌抗原タンパク質の同定

（１）ｃＤＮＡ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（Ａｃｉｄ　ｇｕａｎｉｄｉｕｍ－Ｐｈｅｎｏｌ－Ｃｈｌｏｒｏｆｏｒｍ法）により全ＲＮＡを抽出し、

Ｏｌｉｇｏｔｅｘ－ｄＴ３０ ｍＲＮＡ ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ Ｋｉｔ（宝酒造社製）を用いてキット添付のプロトコールに従ってポリＡ ＲＮＡを精製した。

【０２０９】

この得られたｍＲＮＡ（５μｇ）を用いてイヌ精巣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 ＧｉｇａｐａｃｋＩＩＩ Ｇｏｌｄ Ｃｌｏｎｉｇ Ｋｉｔ（ＳＴＲＡＴＡＧＥＮＥ社製）を用い、キット添付のプロトコー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。

【０２１０】

（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巣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Φ９０×１５ｍｍ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－Ｓｃｉｎｅｃｅ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。

【０２１１】

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λ ＺＡＰ Ｅｘｐｒｅｓｓファージを宿主大腸菌（ＸＬ１－Ｂｌｕｒｅ 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 ＮａＨＣＯ$_{3}$ 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。このタンパク質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。

【０２１２】

かかる処理血清と上記融合タンパク質をブロットしたメンブレンをＴＢＳ－Ｔ（０．０５％ Ｔｗｅｅｎ２０／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＋Ｌ 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Φ９０×１５ｍｍのＮＺＹアガロースプレート上から採取し、ＳＭ緩衝液（１００ｍＭ ＮａＣｌ、１０ｍＭ ＭｇＣｌＳＯ$_{4}$、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。

【０２１３】

（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と、精製したファージ溶液２５０μｌさらにＥｘＡｓｓｉｓｔ　ｈｅｌｐｅｒ　ｐｈａｇｅ（ＳＴＲＡＴＡＧＥＮＥ社製）１μｌを混合した後３７℃で１５分間反応後、ＬＢ培地を３ｍｌ添加し３７℃で２．５～３時間培養を行い、直ちに７０℃の水浴にて２０分間保温した後、４℃、１０００×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２００μｌと、精製したファージ溶液１０μｌを混合した後３７℃で１５分間反応させ、５０μｌをアンピシリン（終濃度５０μｇ／ｍｌ）含有ＬＢ寒天培地に播き３７℃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５０μｇ／ｍｌ）含有ＬＢ培地３７℃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。

【０２１４】

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。このシークエ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タンパク質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。

【０２１５】

（４）ヒト胆嚢癌細胞でのＣＡＰＲＩＮ－１遺伝子発現解析

上記方法により得られた遺伝子に対しヒトの胆嚢癌細胞株ＴＧＢＣ１４ＴＫＢ（独立行

政法人理化学研究所より入手）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５０～１００ｍｇ及び各細胞株５～１０×10^6個の細胞からＴＲＩＺＯＬ試薬（ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社製）を用いて添付のプロトコールに従い全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ールに従い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、上記遺伝子特異的プライマーは、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、本細胞株ＴＧＢＣ１４ＴＫＢで発現が確認された。

【０２１６】

[実施例２] 抗ヒトＣＡＰＲＩＮ－１ポリクローナル抗体の作製

ＷＯ２０１０／０１６５２６の実施例３に従って作製したヒトＣＡＰＲＩＮ－１組換えタンパク質１ｍｇを等容量の不完全フロイントアジュバント（ＩＦＡ）溶液と混合し、これを２週間毎に４回、ウサギの皮下に投与を行った。その後血液を採取し、ポリクローナル抗体を含む抗血清を得た。さらにこの抗血清をプロテインＧ担体（ＧＥヘルスケアバイオサイエンス社製）を用いて精製し、抗ＣＡＰＲＩＮ－１ポリクローナル抗体を得た。また、抗原を投与していないウサギの血清を上記と同様にしてプロテインＧ担体を用いて精製したものをコントロール抗体とした。

【０２１７】

[実施例３] ヒト胆嚢癌でのＣＡＰＲＩＮ－１タンパク質の発現解析

（１）ヒト胆嚢癌細胞上でのＣＡＰＲＩＮ－１タンパク質の発現解析

ＣＡＰＲＩＮ－１遺伝子の発現が確認されたヒト胆嚢癌細胞株ＴＧＢＣ１４ＴＫＢについて、その細胞表面上にＣＡＰＲＩＮ－１タンパク質が発現しているかどうかを調べた。上記で遺伝子発現が認められたＴＧＢＣ１４ＴＫＢ10^6細胞を１．５ｍｌのミクロ遠心チューブにて遠心分離した。これに実施例２で調製した抗ＣＡＰＲＩＮ－１ポリクローナル抗体２μｇ（５μｌ）を添加し、さらに９５μｌ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、５μｌのＦＩＴＣ標識ヤギ抗ラビットＩｇＧ抗体（サンタクルズ社製）及び９５μｌ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、抗ＣＡＰＲＩＮ－１ポリクローナル抗体の代わりに実施例２で調製した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、抗ヒトＣＡＰＲＩＮ－１ポリクローナル抗体を添加されたＴＧＢＣ１４ＴＫＢ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、上記ヒト胆嚢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。

【０２１８】

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。

【０２１９】

（２）ヒト胆嚢癌組織におけるＣＡＰＲＩＮ－１タンパク質の発現解析

パラフィン包埋されたヒト胆嚢癌組織アレイ（ＢＩＯＭＡＸ社製）の胆嚢癌組織２６検

体を用いて、免疫組織化学染色を行った。ヒト胆嚢癌組織アレイを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％Ｔｗｅｅｎ２０を含む１０ｍＭクエン酸緩衝液（ｐＨ６．０）を満たした染色瓶にヒト胆嚢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、モイストチャンバー内で室温で１時間静置した。実施例２で調製した抗ＣＡＰＲＩＮ－１ポリクローナル抗体を５％ＦＢＳを含むＰＢＳ－Ｔ溶液で１０μｇ／ｍｌに調製した溶液をのせ、モイストチャンバー内で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、モイストチャンバー内で室温で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、Ｇｌｙｃｅｒｇｅｌ Ｍｏｕｎｔｉｎｇ Ｍｅｄｉｕｍ（ＤＡＫＯ社製）で封入後、観察を行った。その結果、ＣＡＰＲＩＮ－１タンパク質は全胆嚢癌組織２６検体の内、１９検体（７３％）で強い発現が認められた。

【０２２０】

[実施例４] 抗ＣＡＰＲＩＮ－１ポリクローナル抗体の胆嚢癌細胞に対する抗腫瘍効果（ＡＤＣＣ活性）

抗ＣＡＰＲＩＮ－１抗体が、ＣＡＰＲＩＮ－１タンパク質を発現する胆嚢癌細胞を障害することができるかどうかを検討した。実施例２で得た抗ヒトＣＡＰＲＩＮ－１ポリクローナル抗体を用いて評価を行った。ＣＡＰＲＩＮ－１タンパク質の発現が確認されているヒト胆嚢癌細胞ＴＧＢＣ１４ＴＫＢを10^6個５０ｍｌ容の遠心チューブに集め、１００μＣｉのクロミウム５１を加え３７℃で２時間インキュベートした。その後１０％牛胎児血清を含むＲＰＭＩ１６４０培地で３回洗浄し、９６穴Ｖ底プレート１穴あたり10^3個ずつ添加した。これに、上記抗ヒトＣＡＰＲＩＮ－１ポリクローナル抗体を１μｇ添加し、さらにヒト末梢血から分離したリンパ球をそれぞれ2×10^5個ずつ添加して、３７℃、５％CO_2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、抗ヒトＣＡＰＲＩＮ－１ポリクローナル抗体による胆嚢癌細胞に対するＡＤＣＣ活性を算出した。その結果、抗原が免疫されていないウサギの末梢血から調製したコントロール抗体を用いて同様の操作を行った場合、ＴＧＢＣ１４ＴＫＢに対して５％未満であり、抗体を添加しなかった場合においても５％未満であったのに対して、抗ヒトＣＡＰＲＩＮ－１ポリクローナル抗体を加えた場合には、１４％以上のＡＤＣＣ活性が確認された。したがって、抗ＣＡＰＲＩＮ－１抗体を用いたＡＤＣＣ活性により、ＣＡＰＲＩＮ－１タンパク質を発現する胆嚢癌細胞を障害することができることが明らかになった。なお、細胞障害活性は、上記のように、本発明で用いられる抗ＣＡＰＲＩＮ－１抗体、リンパ球及びクロミウム５１を取り込ませた10^3個の腫瘍細胞を混合して４時間培養し、培養後培地に放出されたクロミウム５１の量を測定して、以下計算式＊により算出した腫瘍細胞に対する細胞障害活性を示した結果である。

【０２２１】

＊式：細胞障害活性（％）＝抗ＣＡＰＲＩＮ－１抗体及びリンパ球を加えた際の腫瘍細胞からのクロミウム５１遊離量÷１Ｎ塩酸を加えた腫瘍細胞からのクロミウム５１遊離量×１００。

【０２２２】

[実施例５] 抗ＣＡＰＲＩＮ－１マウス及びニワトリモノクローナル抗体の作製

実施例２で作製したヒトＣＡＰＲＩＮ－１組換えタンパク質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回及び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（ベーリンガー社製）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％CO_2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。

【０２２３】

作製したハイブリドーマが産生する抗体のＣＡＰＲＩＮ－１タンパク質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２で調製したＣＡＰＲＩＮ－１タンパク溶液１μｇ／ｍｌを９６穴プレート１ウェル当たりに１００μｌ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４００μｌ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４００μｌ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１００μｌ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（ｌｉｆｅ ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製）を１ウェル当たり１００μｌ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１００μｌ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１００μｌ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。

【０２２４】

選抜したハイブリドーマを９６穴プレート１ウェル当たりに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タンパク質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２で調製したＣＡＰＲＩＮ－１タンパク質溶液１μｇ／ｍｌを９６穴プレート１ウェル当たりに１００μｌ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４００μｌ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４００μｌ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１００μｌ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（ｌｉｆｅ ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製）を１ウェル当たり１００μｌ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１００μｌ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１００μｌ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タンパク質に反応性を示すマウス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。

【０２２５】

次にそれらマウスモノクローナル抗体の内、ＣＡＰＲＩＮ－１タンパク質が発現する癌

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容のミ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１００μｌ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（ｌｉｆｅ　ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ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マウスモノクローナル抗体２２個（マウスモノクローナル抗体＃１～＃２２）を選抜した。

【０２２６】

また、ニワトリモノクローナル抗体を作製するために、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タンパク質）３００μｇを等量のフロイントの完全アジュバントと混合し、これをニワトリ１羽当たりの抗原溶液とした。抗原溶液を７週齢のニワトリの腹腔内に投与後、４週間毎に７回投与を行い免疫を完了した。最後の免疫から４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、鳥類細網内皮症ウイルスを用いてニワトリから形質転換法により樹立した、軽鎖が欠損しているニワトリミエローマ細胞とを５：１の比率にて混和し、そこに３７℃に加温した１０％ＦＢＳを含むＩＭＤＭ培地２００μｌとＰＥＧ１５００（ベーリンガー社製）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１０％ＦＢＳを含むＩＭＤＭ培地（ＨＡＴ選択培地）３００ｍｌ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３０枚に播種した。７日間、３７℃、５％CO_2の条件で培養することで、脾臓細胞とニワトリミエローマ細胞が融合したハイブリドーマを得た。

【０２２７】

作製したハイブリドーマが産生する抗体のＣＡＰＲＩＮ－１タンパク質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２で調製したＣＡＰＲＩＮ－１タンパク質溶液１μｇ／ｍｌを９６穴プレート１ウェル当たりに１００μｌ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４００μｌ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４００μｌ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１００μｌ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標識抗ニワトリＩｇＹ抗体（ＳＩＧＭＡ社製）を１ウェル当たり１００μｌ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１００μｌ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１００μｌ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。

【０２２８】

選抜したハイブリドーマを９６穴プレート１ウェル当たりに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タンパク質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。ヒトＣＡＰＲＩＮ－１タンパク質溶液１μｇ／ｍｌを９６穴プレート１ウェル当たりに１００μｌ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４００μｌ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４００μｌ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１００μｌ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標識抗ニワトリＩｇＹ抗体（ＳＩＧＭＡ社製））を１ウェル当たり１００μｌ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１００μｌ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１００μｌ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タンパク質に反応性を示すモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ株を複数個得た。

【０２２９】

次にそれらモノクローナル抗体のうち、ＣＡＰＲＩＮ－１タンパク質が発現する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、5×10^{5}個のヒト乳癌細胞株ＭＤＡ－ＭＢ－２３１Ｖを１．５ｍｌ容のミ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１００μｌ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３０倍希釈したＦＩＴＣ標識ヤギ抗ニワトリＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ）抗体（ＳｏｕｔｈｅｒｎＢｉｏｔｅｃｈ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培地を用いて行い、コントロールのサンプルとした。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、ＣＡＰＲＩＮ－１タンパク質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３個（ニワトリモノクローナル抗体＃１、＃２、＃３）を選抜した。

【０２３０】

[実施例６]　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５で選抜した２２個のマウスモノクローナル抗体ならびに３個のニワトリ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、マウスモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマにはマウス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、ニワトリモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマにはニワトリＦＲ１由来配列及びニワトリ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、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（ｌｉｆｅ ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製）にクローニングした。

【０２３１】

（１）－１　ＲＴ－ＰＣＲ

10^{6}個のマウスモノクローナル抗体を産生する各ハイブリドーマ株から、ｍＲＮＡ ｍｉｃｒｏ ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｋｉｔ（ＧＥヘルスケア社製）を用いてｍＲＮＡを調製し、ＳｕｐｅｒＳｃｒｉｐｔＩＩ １ｓｔ ｓｔｒａｎｄ ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ ｋｉｔ（ｌｉｆｅ ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製）を用いて、得られたｍＲＮＡを逆転写してｃＤＮＡを合成した。これら操作は各キットの添付プロトコールに従って行った。得られたｃＤＮＡを用いて、ＰＣＲ法により抗体遺伝子の増幅を行った。ＶＨ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２５７）及びマウス重鎖ＦＲ４配列に特異的なプライマー（配列番号２５８）を使用した。またＶＬ領域の遺伝子取得のために、マウス軽鎖ＦＲ１配列に特異的なプライマー（配列番号２５９）及びマウス軽鎖ＦＲ４に特異的なプライマー（配列番号２６０）を使用した。これらプライマーはＪｏｎｅｓ，　Ｓ．Ｔ．　ａｎｄ　Ｂｅｎｄｉｎｇ，　Ｍ．Ｍ．　Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　９，　８８－８９　（１９９１）を参考に設計した。ＰＣＲは、Ｅｘ－ｔａｑ（タカラバイオ社製）を用いた。１０×ＥＸ　Ｔａｑ　Ｂｕｆｆｅｒ　５μｌ

、ｄＮＴＰ Ｍｉｘｔｕｒｅ（２．５ｍＭ）４μｌ、プライマー（１．０μＭ）各２μｌ、Ｅｘ Ｔａｑ（５Ｕ／μｌ）０．２５μｌにｃＤＮＡサンプルを加え、滅菌水により総量５０μｌとした。９４℃で２分処理後、変性９４℃１分、アニーリング５８℃３０秒、伸長反応７２℃１分の組み合わせで３０サイクルの条件で行った。

【０２３２】

また、10^6個のニワトリモノクローナル抗体を産生する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、ＰｒｉｍｅＳｃｒｉｐｔＩＩ 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ールに従って行った。　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、ニワトリ抗体重鎖遺伝子可変領域及びニワトリ抗体軽鎖遺伝子可変領域をそれぞれ増幅した。ニワトリ抗体のＶＨ領域の遺伝子取得のために、ニワトリ重鎖ＦＲ１配列に特異的なプライマー及びニワトリ重鎖ＦＲ４配列に特異的なプライマーを使用した。またＶＬ領域の遺伝子取得のために、ニワトリ軽鎖ＦＲ１配列に特異的なプライマー及びニワトリ軽鎖ＦＲ４に特異的なプライマーを使用した。

【０２３３】

（１）－２　クローニング

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（キアゲン社製）を用いてその添付プロトコールに従って行った。精製した各ＤＮＡはＴＡクローニングキット（ｌｉｆｅ ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ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ＤＨ５ａ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（キアゲン社製）を用いて精製した。

【０２３４】

（１）－３　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２６１）及びＭ１３リバースプライマー（配列番号２６２）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、その添付プロトコールに従い行った。その結果、各々の遺伝子配列及びアミノ酸配列が決定された。

【０２３５】

すなわち、これらのモノクローナル抗体は、配列番号４０（配列番号４５）、配列番号５０（配列番号５５）、配列番号６０（配列番号６５）、配列番号７０（配列番号７５）、配列番号８０（配列番号８５）、配列番号９０（配列番号９５）、配列番号１００（配列番号１０５）、配列番号１１０（配列番号１１５）、配列番号１２０（配列番号１２５）、配列番号１３０（配列番号１３１）、配列番号１３５（配列番号１４０）、配列番号１４５（配列番号１５０）、配列番号１６０（配列番号１６５）、配列番号１７０（配列番号１７５）、配列番号２００（配列番号２０５）、配列番号２１０（配列番号２１５）、配列番号２２０（配列番号２２５）、配列番号２３０（配列番号２３５）、配列番号２４０（配列番号２４５）又は配列番号２５０（配列番号２５５）のアミノ酸配列を有する重鎖可変（ＶＨ）領域（括弧内は遺伝子配列の配列番号）と、配列番号４４（配列番号４６）、配列番号５４（配列番号５６）、配列番号６４（配列番号６６）、配列番号７４（配列番号７６）、配列番号８４（配列番号８６）、配列番号９４（配列番号９６）、配列番号１０４（配列番号１０６）、配列番号１１４（配列番号１１６）、配列番号１２４（配列番号１２６）、配列番号１３９（配列番号１４１）、配列番号１４９（配列番号１５

１）、配列番号１５５（配列番号１５６）、配列番号１６４（配列番号１６６）、配列番号１７４（配列番号１７６）、配列番号１８０（配列番号１８１）、配列番号１８５（配列番号１８６）、配列番号１９０（配列番号１９１）、配列番号１９５（配列番号１９６）、配列番号２０４（配列番号２０６）、配列番号２１４（配列番号２１６）、配列番号２２４（配列番号２２６）、配列番号２３４（配列番号２３６）、配列番号２４４（配列番号２４６）又は配列番号２５４（配列番号２５６）のアミノ酸配列を有する軽鎖可変（ＶＬ）領域（括弧内は遺伝子配列の配列番号）を含み、ここで、該ＶＨ領域に配列番号３７、配列番号４７、配列番号５７、配列番号６７、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１３２、配列番号１４２、配列番号１５７、配列番号１６７、配列番号１９７、配列番号２０７、配列番号２１７、配列番号２２７、配列番号２３７又は配列番号２４７のアミノ酸配列で表されるＣＤＲ１、配列番号３８、配列番号４８、配列番号５８、配列番号６８、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、配列番号１２８、配列番号１３３、配列番号１４３、配列番号１５８、配列番号１６８、配列番号１９８、配列番号２０８、配列番号２１８、配列番号２２８、配列番号２３８又は配列番号２４８のアミノ酸配列で表されるＣＤＲ２及び配列番号３９、配列番号４９、配列番号５９、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、配列番号１２９、配列番号１３４、配列番号１４４、配列番号１５９、配列番号１６９、配列番号１９９、配列番号２０９、配列番号２１９、配列番号２２９、配列番号２３９又は配列番号２４９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４１、配列番号５１、配列番号６１、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、配列番号１２１，配列番号１３６、配列番号１４６、配列番号１５２、配列番号１６１、配列番号１７１、配列番号１７７、配列番号１８２、配列番号１８７、配列番号１９２、配列番号２０１、配列番号２１１、配列番号２２１、配列番号２３１、配列番号２４１又は配列番号２５１のアミノ酸配列で表されるＣＤＲ１、配列番号４２、配列番号５２、配列番号６２、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、配列番号１２２，配列番号１３７、配列番号１４７、配列番号１５３、配列番号１６２、配列番号１７２、配列番号１７８、配列番号１８３、配列番号１８８、配列番号１９３、配列番号２０２、配列番号２１２、配列番号２２２、配列番号２３２、配列番号２４２又は配列番号２５２のアミノ酸配列で表されるＣＤＲ２及び配列番号４３、配列番号５３、配列番号６３、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１３８、配列番号１４８、配列番号１５４、配列番号１６３、配列番号１７３、配列番号１７９、配列番号１８４、配列番号１８９、配列番号１９４、配列番号２０３、配列番号２１３、配列番号２２３、配列番号２３３、配列番号２４３又は配列番号２５３のアミノ酸配列で表されるＣＤＲ３が含まれる。

【０２３６】

得られたモノクローナル抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列を配列番号４０、配列番号５０、配列番号６０、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、配列番号１２０、配列番号１３０、配列番号１３５、配列番号１４５、配列番号１６０、配列番号１７０、配列番号２００、配列番号２１０、配列番号２２０、配列番号２３０、配列番号２４０及び配列番号２５０に、軽鎖可変領域のアミノ酸配列を配列番号４４、配列番号５４、配列番号６４、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、配列番号１２４，配列番号１３９、配列番号１４９、配列番号１５５、配列番号１６４、配列番号１７４、配列番号１８０、配列番号１８５、配列番号１９０、配列番号１９５、配列番号２０４、配列番号２１４、配列番号２２４、配列番号２３４、配列番号２４４及び配列番号２５４に示す。

【０２３７】

すなわちマウスモノクローナル抗体＃１は配列番号７０の重鎖可変領域と配列番号７４の軽鎖可変領域から成り、＃２は配列番号８０の重鎖可変領域と配列番号８４の軽鎖可変

領域から成り、＃３は配列番号９０の重鎖可変領域と配列番号９４の軽鎖可変領域から成り、＃４は配列番号１００の重鎖可変領域と配列番号１０４の軽鎖可変領域から成り、＃５は配列番号１１０の重鎖可変領域と配列番号１１４の軽鎖可変領域から成り、＃６は配列番号１２０の重鎖可変領域と配列番号１２４の軽鎖可変領域から成り、＃７は配列番号１３０の重鎖可変領域と配列番号１２４の軽鎖可変領域から成り、＃８は配列番号１３５の重鎖可変領域と配列番号１３９の軽鎖可変領域から成り、＃９は配列番号１４５の重鎖可変領域と配列番号１４９の軽鎖可変領域から成り、＃１０は配列番号１４５の重鎖可変領域と配列番号１５５の軽鎖可変領域から成り、＃１１は配列番号１６０の重鎖可変領域と配列番号１６４の軽鎖可変領域から成り、＃１２は配列番号１７０の重鎖可変領域と配列番号１７４の軽鎖可変領域から成り、＃１３は配列番号１７０の重鎖可変領域と配列番号１８０の軽鎖可変領域から成り、＃１４は配列番号１７０の重鎖可変領域と配列番号１８５の軽鎖可変領域から成り、＃１５は配列番号１７０の重鎖可変領域と配列番号１９０の軽鎖可変領域から成り、＃１６は配列番号１７０の重鎖可変領域と配列番号１９５の軽鎖可変領域から成り、＃１７は配列番号２００の重鎖可変領域と配列番号２０４の軽鎖可変領域から成り、＃１８は配列番号２１０の重鎖可変領域と配列番号２１４の軽鎖可変領域から成り、＃１９は配列番号２２０の重鎖可変領域と配列番号２２４の軽鎖可変領域から成り、＃２０は配列番号２３０の重鎖可変領域と配列番号２３４の軽鎖可変領域から成り、＃２１は配列番号２４０の重鎖可変領域と配列番号２４４の軽鎖可変領域から成り、＃２２は配列番号２５０の重鎖可変領域と配列番号２５４の軽鎖可変領域から成る。

【０２３８】

得られたニワトリモノクローナル抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列を配列番号４０、配列番号５０、配列番号６０に、軽鎖可変領域のアミノ酸配列を配列番号４４、配列番号５４、配列番号６４に示す。

【０２３９】

すなわち、ニワトリモノクローナル抗体＃１は配列番号４０の重鎖可変領域と配列番号４４の軽鎖可変領域から成り、そのうち、重鎖可変領域中のＣＤＲ１～３がそれぞれ配列番号３７、配列番号３８、配列番号３９のアミノ酸配列から成り、軽鎖可変領域中のＣＤＲ１～３がそれぞれ配列番号４１、配列番号４２、配列番号４３のアミノ酸配列から成り、ニワトリモノクローナル抗体＃２は配列番号５０の重鎖可変領域と配列番号５４の軽鎖可変領域から成り、そのうち、重鎖可変領域中のＣＤＲ１～３がそれぞれ配列番号４７、配列番号４８、配列番号４９のアミノ酸配列から成り、軽鎖可変領域中のＣＤＲ１～３がそれぞれ配列番号５１、配列番号５２、配列番号５３のアミノ酸配列から成り、ニワトリモノクローナル抗体＃３は配列番号６０の重鎖可変領域と配列番号６４の軽鎖可変領域から成り、そのうち、重鎖可変領域中のＣＤＲ１～３がそれぞれ配列番号５７、配列番号５８、配列番号５９のアミノ酸配列から成り、軽鎖可変領域中のＣＤＲ１～３がそれぞれ配列番号６１、配列番号６２、配列番号６３のアミノ酸配列から成る。

【０２４０】

（２）ヒト－ニワトリキメラ組換え抗体及びマウス－ニワトリキメラ抗体の作製

上記（１）で得られた、配列番号４０で示されるニワトリモノクローナル抗体＃１の重鎖可変領域の遺伝子増幅断片の両端を制限酵素処理した後精製し、配列番号２６３を含むニワトリ抗体由来のリーダー配列と配列番号２６４を含むヒトＩｇＧ$_1$のＨ鎖定常領域を既に挿入済みのｐｃＤＮＡ４／ｍｙｃ－Ｈｉｓ（ｌｉｆｅ ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製）ベクターへ常法に従って挿入した。また、配列番号４４で示されるにニワトリモノクローナル抗体＃１の軽鎖可変領域の遺伝子増幅断片の両端を制限酵素処理した後精製し、配列番号２６３を含むニワトリ抗体由来のリーダー配列と配列番号２６５を含むヒトＩｇＧ$_1$のＬ鎖定常領域を既に挿入済みのｐｃＤＮＡ３．１／ｍｙｃ－Ｈｉｓ（ｌｉｆｅ ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製）ベクターへ常法に従って挿入した。

【０２４１】

次に、配列番号４０で示されるニワトリモノクローナル抗体＃１の重鎖可変領域が挿入された上記組換えベクターと、配列番号４４で示されるニワトリモノクローナル抗体＃１

の軽鎖可変領域が挿入された上記組換えベクターをＣＨＯ－Ｋ１細胞（理研セルバンクより入手）に導入した。具体的には、１２穴培養プレートの１ウェル当たりに１ｍｌの１０％ＦＢＳを含むＨａｍ’ｓＦ１２培地（ｌｉｆｅ ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製）で培養された２×１０^{5}個のＣＨＯ－Ｋ１細胞をＰＢＳ（－）で洗浄したのちに、１ウェル当たり１ｍｌの１０％ ＦＢＳを含むＨａｍ’ｓＦ１２培地を新たに加えたウェルに３０μｌのＯｐｔｉＭＥＭ（ｌｉｆｅ ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製）に溶解した上記各ベクター２５０ｎｇとＰｏｌｙｆｅｃｔ ｔｒａｎｓｆｅｃｔｉｏｎ ｒｅａｇｅｎｔ（ＱＩＡＧＥＮ社製）３０μｌとを混合したものを添加した。上記組換えベクターを導入したＣＨＯ－Ｋ１細胞を、２００μｇ／ｍｌゼオシン（ｌｉｆｅ ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製）ならびに２００μｇ／ｍｌジェネチシン（ロシュ社製）を添加した１０％ＦＢＳを含むＨａｍ’ｓＦ１２培地で培養したのち、９６ウェルプレートの１ウェル当たりに０．５個となるように上記組換えベクターを導入したＣＨＯ－Ｋ１細胞を播種して、ニワトリモノクローナル抗体＃１の可変領域を有するヒト－ニワトリキメラ抗体＃１（＃１）を安定的に産生する細胞株を作製した。上記方法と同様にして、ニワトリモノクローナル抗体＃２ならびに＃３についてもヒト－ニワトリキメラ抗体＃２（＃２）ならびにヒト－ニワトリキメラ抗体＃３（＃３）を安定的に産生する細胞株を作製した。

【０２４２】

作製した細胞株を１５０ｃｍ^{2}フラスコを用いて５×１０^{5}個／ｍｌで血清を含まないＯｐｔｉＣＨＯ培地（ｌｉｆｅ ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製）３０ｍｌを用いて５日間培養し、＃１、＃２又は＃３を含む培養上清を得た。

【０２４３】

同様にして、配列番号４０で示されるニワトリモノクローナル抗体＃１の重鎖可変領域の遺伝子増幅断片の両端を制限酵素処理した後精製し、ニワトリ抗体由来のリーダー配列とマウスＩｇＧ$_{1}$のＨ鎖定常領域を既に挿入済みのｐｃＤＮＡ４／ｍｙｃ－Ｈｉｓ（ｌｉｆｅ ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製）ベクターへ常法に従って挿入した。また、配列番号４４で示されるにニワトリモノクローナル抗体＃１の軽鎖可変領域の遺伝子増幅断片の両端を制限酵素処理した後精製し、ニワトリ抗体由来のリーダー配列とマウスＩｇＧ$_{1}$のＬ鎖定常領域を既に挿入済みのｐｃＤＮＡ３．１／ｍｙｃ－Ｈｉｓ（ｌｉｆｅ ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製）ベクターへ常法に従って挿入した。これらを上記と同様にＣＨＯ－Ｋ１細胞に導入してニワトリモノクローナル抗体＃１の可変領域を有するマウス－ニワトリキメラ抗体＃１を安定的に産生する細胞株を作製した。上記方法と同様にして、ニワトリモノクローナル抗体＃２ならびに＃３についてもマウス－ニワトリキメラ抗体＃２（＃２）ならびにマウス－ニワトリキメラ抗体＃３（＃３）を安定的に産生する細胞株を作製した。

【０２４４】

作製した細胞株を１５０ｃｍ^{2}フラスコを用いて５×１０^{5}個／ｍｌで血清を含まないＯｐｔｉＣＨＯ培地（ｌｉｆｅ ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製）３０ｍｌを用いて５日間培養し、マウス－ニワトリキメラ抗体＃１、マウス－ニワトリキメラ抗体＃２ならびにマウス－ニワトリキメラ抗体＃３を含む培養上清を得た。

【０２４５】

（３）取得したモノクローナル抗体を用いた胆嚢癌細胞表面でのＣＡＰＲＩＮ－１タンパク質の発現

次にＣＡＰＲＩＮ－１遺伝子の発現が確認された胆嚢癌細胞株ＴＧＢＣ１４ＴＫＢについて、その細胞表面上にＣＡＰＲＩＮ－１タンパク質が発現しているかどうかを調べた。ＴＧＢＣ１４ＴＫＢ１０^{6}細胞を１．５ｍｌ容のミクロ遠心チューブにて遠心分離した。これに実施例４で作製した癌細胞表面に反応する、＃１から＃２２の抗ＣＡＰＲＩＮ－１マウスモノクローナル抗体ならびに上記（２）で作製した抗ＣＡＰＲＩＮ－１マウス－ニワトリキメラ抗体＃１、マウス－ニワトリキメラ抗体＃２、マウス－ニワトリキメラ抗体＃３を含む培養上清（１００μｌ）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（ｌｉｆｅ ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製）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、＃１から＃２２の抗ＣＡＰＲＩＮ－１マウスモノクローナル抗体ならびにマウス－ニワトリキメラ抗体＃１、マウス－ニワトリキメラ抗体＃２、マウス－ニワトリキメラ抗体＃３を含む培養上清の代わりにアイソタイプ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、＃１～＃２２のモノクローナル抗体、マウス－ニワトリキメラ抗体＃１、マウス－ニワトリキメラ抗体＃２、マウス－ニワトリキメラ抗体＃３を添加された細胞は、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。具体的例を挙げると、マウス－ニワトリキメラ抗体＃１を用いた場合は２００％以上の蛍光強度の増強を示した。このことから、上記ヒト胆嚢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。

【０２４６】

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

（４）抗ＣＡＰＲＩＮ－１抗体のヒト胆嚢癌細胞に対する抗腫瘍効果（ＡＤＣＣ活性）

上記で得た抗体のうち、ヒト－ニワトリキメラ抗体＃１を用いてヒト胆嚢癌細胞に対する細胞障害活性（ＡＤＣＣ活性）を評価した。上記（２）で得たヒト－ニワトリキメラ抗体＃１を含む培養上清をＨｉｔｒａｐ ＰｒｏｔｅｉｎＡ ＳｅｐｈａｒｏｓｅＦＦ（ＧＥヘルスケア社製）を用いて精製し、ＰＢＳ（－）に置換して０．２２μｍ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。10^6個のヒト胆嚢癌細胞株ＴＧＢＣ１４ＴＫＢを５０ｍｌ容の遠心チューブに集め、１００μＣｉのクロミウム５１を加え３７℃で２時間インキュベートした。その後１０％ＦＢＳを含むＲＰＭＩ１６４０培地で３回洗浄し、９６穴Ｖ底プレート１穴あたり2×10^3個ずつ添加して標的細胞とした。これに、上記精製抗体を１穴あたり１．２μｇ添加した。さらに、ヒト末梢血リンパ球細胞から以下の手法を用いてヒトＮＫ細胞を含む細胞集団を分離した。すなわち、ヒト末梢血単核球細胞をＦＩＴＣ蛍光色素で標識された抗体（抗ヒトＣＤ３抗体、抗ヒトＣＤ２０抗体、抗ヒトＣＤ１９抗体、抗ヒトＣＤ１１ｃ抗体、抗ＨＬＡ－ＤＲ抗体（ベクトンアンドディッキンソン社））で反応させ、セルソーター（ＦＡＣＳ Ｖａｎｔａｇｅ ＳＥ（ベクトンアンドディッキンソン社））を用いて、上記抗体で染まらないＮＫ細胞を含んだ細胞集団を分離したもの、又はヒトＮＫ細胞分離キット（ＮＫセルアイソレーションキット（ミルテニー社製））を用いて分離したものを得た。得られたＮＫ細胞を含む細胞を１ウェル当たり2×10^5個添加して、３７℃、５％、CO_2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５１の量を測定し、抗ＣＡＰＲＩＮ－１抗体による胆嚢癌細胞に対するＡＤＣＣ活性を算出した。その結果、ＴＧＢＣ１４ＴＫＢに対して、ＣＡＰＲＩＮ－１タンパク質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ならびに抗体を添加しなかった場合の細胞障害活性はいずれも５％未満であったのに対して、ヒト－ニワトリキメラ抗体＃１は２０％の細胞障害活性が得られた。なお、＃１～＃２２の抗ＣＡＰＲＩＮ－１マウスモノクローナル抗体、ヒト－ニワトリキメラ抗体＃２ならびにヒト－ニワトリキメラ抗体＃３についても上記と同様にしてＴＧＢＣ１４ＴＫＢに対する細胞障害活性を調べたところ、ＣＡＰＲＩＮ－１タンパク質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ならびに抗体を添加しなかった場合の細胞障害活性は５％未満であったのに対して、１５％以上の細胞障害活性が見られた。以上の結果より、取得した抗ＣＡＰＲＩＮ－１モノクローナル抗体は、ＡＤＣＣ活性によってＣＡＰＲＩＮ－１タンパク質を発現する癌細胞を障害することが示された。なお、細胞障害活性は、上記のように、本発明で用いられる抗ＣＡＰＲＩＮ－１抗体、ヒトＮＫ細胞を含む細胞集団及びクロミウム５１を取り込ませた2×10^3個の腫瘍細胞を混合して４時間培養し、培養後培地に

放出されたクロミウム５１の量を測定して、以下計算式＊により算出した腫瘍細胞に対する細胞障害活性を示した結果である。

【０２４７】

＊式：細胞障害活性（％）＝抗ＣＡＰＲＩＮ－１抗体及びヒトＮＫ細胞を含む細胞集団を加えた際の腫瘍細胞からのクロミウム５１遊離量÷１Ｎ塩酸を加えた腫瘍細胞からのクロミウム５１遊離量×１００。

【０２４８】

[実施例７] 癌細胞の細胞表面に反応する抗ＣＡＰＲＩＮ－１抗体が結合するＣＡＰＲＩＮ－１タンパク質中のペプチドの同定

上記で取得した、癌細胞の細胞表面に反応する＃１２～＃２２の抗ＣＡＰＲＩＮ－１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。

【０２４９】

まず、ＰＢＳで１μｇ／μｌの濃度に溶解した組換えＣＡＰＲＩＮ－１タンパク質溶液１００μｌ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４０μｇに、＃１２～＃２２の抗ＣＡＰＲＩＮ－１モノクローナル抗体をそれぞれ５０μｇ添加し、２０ｍＭ リン酸緩衝液（ｐＨ７．０）１ｍｌにメスアップして撹拌混合しながら４℃で一晩反応させた。

【０２５０】

次に、トリプシン（プロメガ社製）を終濃度０．２μｇ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）、５ｍＭ ＥＤＴＡ、１５０ｍＭ ＮａＣｌ、１％ＮＰ－４０）中で混合し、それぞれ３０分間反応させた。

【０２５１】

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１００μｌ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ールに従った。

【０２５２】

その結果、＃１２～＃２２の抗ＣＡＰＲＩＮ－１モノクローナル抗体がいずれも認識するＣＡＰＲＩＮ－１タンパク質の部分配列として、配列番号２７３のポリペプチドが同定された。さらに、モノクローナル抗体＃１３～＃１６、＃１７～＃１９及び＃２１が認識する、上記配列番号２７３のポリペプチド中の部分配列として配列番号２７４のペプチドが同定され、さらにその部分配列ペプチドである配列番号２７５のペプチドをモノクローナル抗体＃１３～＃１６が認識することが判った。

【０２５３】

また、ヒト－ニワトリキメラモノクローナル抗体＃１、ヒト－ニワトリキメラモノクローナル抗体＃３、マウスモノクローナル抗体＃１、＃２、＃３、＃４、＃５、＃６、＃７、＃８、＃９、＃１０、＃１１を用いて、それらが認識するＣＡＰＲＩＮ－１タンパク質中のエピトープペプチドの同定を行った。ヒトＣＡＰＲＩＮ－１タンパク質のアミノ酸配列中、１２～１６アミノ酸から成る、９３個の候補ペプチドを合成し、それぞれ１ｍｇ／ｍｌの濃度になるようにＤＭＳＯで溶解した。

【０２５４】

各ペプチドを０．１Ｍ炭酸ナトリウム緩衝液（ｐＨ９．６）中に３０μｇ／ｍｌの濃度になるように溶解し、９６穴プレート（Ｎｕｎｃ社製、製品番号：４３６００６）の１穴

あたり１００μｌずつ添加して４℃で一晩静置した。液を捨て、１０ｍＭエタノールアミン／０．１Ｍ炭酸ナトリウム緩衝液（ＰＨ９．６）を１穴あたり２００μｌずつ添加し、室温で１時間静置した後、液を捨て、０．５％Ｔｗｅｅｎ２０を含むＰＢＳ（ＰＢＳＴ）にて２回洗浄することによって、各ペプチドが固相化されたプレートを作製した。

【０２５５】

これに、ヒト－ニワトリキメラモノクローナル抗体＃１（＃１）、ヒト－ニワトリキメラモノクローナル抗体＃３（＃３）及びマウスモノクローナル抗体（＃１、＃２、＃３、＃４、＃５、＃６、＃７、＃８、＃９、＃１０、＃１１）を含む細胞培養上清を１穴あたり５０μｌ添加し、室温で１時間振とうした後、液を除去し、ＰＢＳＴにて３回洗浄した。次に、ヒト－ニワトリキメラモノクローナル抗体ウェルにはＨＲＰが標識された抗ヒトＩｇＧ（ｌｉｆｅ ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製）抗体をＰＢＳＴにて３０００～４０００倍希釈した２次抗体溶液を、マウスモノクローナル抗体にはＨＲＰが標識された抗マウスＩｇＧ（ｌｉｆｅ ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製）抗体をＰＢＳＴにて３０００～４０００倍希釈した２次抗体溶液を、それぞれ５０μｌずつ添加した後、液を除去し、ＰＢＳＴにて６回洗浄を行った。

【０２５６】

ＴＭＢ基質溶液（Ｔｈｅｒｍｏ社製）を１ウェル当たり１００μｌ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１００μｌ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、抗ＣＡＰＲＩＮ－１抗体のヒト－ニワトリキメラモノクローナル抗体＃１、抗体＃１～＃５の抗ＣＡＰＲＩＮ－１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２６６のポリペプチドが同定された。さらに、ヒト－ニワトリキメラモノクローナル抗体＃１、マウスモノクローナル抗体＃３及び＃４が認識する、上記配列番号２６６のポリペプチド中の部分配列として配列番号２６７のペプチドが同定され、マウスモノクローナル抗体＃１、＃２及び＃５が認識する、上記配列番号２６６のポリペプチド中の部分配列として配列番号２６８のペプチドが同定された。したがって、配列番号２６６のポリペプチドが抗ＣＡＰＲＩＮ－１抗体のヒト－ニワトリキメラモノクローナル抗体＃１、マウスモノクローナル抗体＃１、＃２、＃３、＃４及び＃５のエピトープ領域を含んでいることが判った。また、抗ＣＡＰＲＩＮ－１モノクローナル抗体＃６、＃７及び＃８がいずれも認識するＣＡＰＲＩＮ－１タンパク質の部分配列として、配列番号２７０のアミノ酸配列を含むポリペプチドが同定された。したがって、配列番号２７０のポリペプチドが抗ＣＡＰＲＩＮ－１抗体＃６、＃７ならびに＃８のエピトープ領域を含んでいることが判った。さらにまた、抗ＣＡＰＲＩＮ－１モノクローナル抗体＃９、＃１０及び＃１１がいずれも認識するＣＡＰＲＩＮ－１タンパク質の部分配列として、配列番号２７２のアミノ酸配列を含むポリペプチドが同定された。したがって、配列番号２７２のポリペプチドが抗ＣＡＰＲＩＮ－１抗体＃９、＃１０ならびに＃１１のエピトープ領域を含んでいることが判った。さらにまた、ヒト－ニワトリキメラモノクローナル抗体＃３が認識するＣＡＰＲＩＮ－１タンパク質の部分配列として、配列番号２６９のアミノ酸配列を含むポリペプチドが同定された。したがって、配列番号２６９のポリペプチドがヒト－ニワトリキメラモノクローナル抗体＃３のエピトープ領域を含んでいることが判った。

【０２５７】

［実施例８］　ＣＡＰＲＩＮ－１タンパク質に対するマウスモノクローナル抗体＃３０、＃３４～３６の作製

（１）マウス抗ＣＡＰＲＩＮ－１モノクローナル抗体＃３０、＃３４～３６の作製

ＷＯ２０１０／０１６５２６の実施例３で調製した配列番号２のアミノ酸配列を有するヒトＣＡＰＲＩＮ－１タンパク質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７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（ベーリンガー社製）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％CO_2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。

【０２５８】

作製したハイブリドーマが産生する抗体のＣＡＰＲＩＮ－１タンパク質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。ＷＯ２０１０／０１６５２６の実施例３に記載の手法で調製したＣＡＰＲＩＮ－１タンパク溶液１μｇ／ｍｌを９６穴プレート１ウェル当たりに１００μｌ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４００μｌ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４００μｌ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１００μｌ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（ｌｉｆｅ　ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製）を１ウェル当たり１００μｌ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１００μｌ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１００μｌ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。

【０２５９】

選抜したハイブリドーマを９６穴プレート１ウェル当たりに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。ＷＯ２０１０／０１６５２６の実施例３に記載の手法で調製したＣＡＰＲＩＮ－１タンパク溶液１μｇ／ｍｌを９６穴プレート１ウェル当たりに１００μｌ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４００μｌ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４００μｌ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１００μｌ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（ｌｉｆｅ　ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製）を１ウェル当たり１００μｌ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１００μｌ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１００μｌ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複数個のハイブリドーマ株を得た。

【０２６０】

次にそれらモノクローナル抗体の内、ＣＡＰＲＩＮ－１を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容のミ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１００μｌ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（ｌｉｆｅ ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ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４個（マウス抗ＣＡＰＲＩＮ－１抗体＃３０、＃３４～３６）を選抜した。

【０２６１】

（２）各マウス抗ＣＡＰＲＩＮ－１モノクローナル抗体が認識するＣＡＰＲＩＮ－１エピトープの同定

取得したモノクローナル抗体４個それぞれが認識するＣＡＰＲＩＮ－１エピトープ領域の同定を行った。ヒトＣＡＰＲＩＮ－１タンパク質のアミノ酸配列中、１２～１６アミノ酸から成る、９３個の候補ペプチドを合成し、それぞれ１ｍｇ／ｍｌの濃度になるようにＤＭＳＯで溶解した。

【０２６２】

各ペプチドを０．１Ｍ炭酸ナトリウム緩衝液（ｐＨ９．６）中に３０μｇ／ｍｌの濃度になるように溶解し、９６穴プレート（Ｎｕｎｃ社製、製品番号：436006）の１穴あたり１００μｌずつ添加して４℃で一晩静置した。液を捨て、１０ｍＭエタノールアミン／０．１Ｍ炭酸ナトリウム緩衝液（ＰＨ９．６）を１穴あたり２００μｌずつ添加し、室温で１時間静置した後、液を捨て、０．５％Ｔｗｅｅｎ２０を含むＰＢＳ（ＰＢＳＴ）にて２回洗浄することによって、各ペプチドが固相化されたプレートを作製した。

【０２６３】

これに、抗ＣＡＰＲＩＮ－１抗体＃１を含む細胞培養上清を１穴あたり５０μｌ添加し、室温で１時間振とうした後、液を除去し、ＰＢＳＴにて３回洗浄した。次に、ＨＲＰが標識された抗マウスＩｇＧ（ｌｉｆｅ ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製）抗体をＰＢＳＴにて３０００～４０００倍希釈した２次抗体溶液をウェルに５０μｌずつ添加した後、液を除去し、ＰＢＳＴにて６回洗浄を行った。

【０２６４】

ＴＭＢ基質溶液（Ｔｈｅｒｍｏ社製）を１ウェル当たり１００μｌ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１００μｌ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。

【０２６５】

その結果、マウス抗ＣＡＰＲＩＮ－１抗体＃３０が認識するＣＡＰＲＩＮ－１の部分配列として配列番号４２９のポリペプチド、マウス抗ＣＡＰＲＩＮ－１抗体＃３４が認識するＣＡＰＲＩＮ－１の部分配列として配列番号４３１のポリペプチド、マウス抗ＣＡＰＲＩＮ－１抗体＃３５及び３６が認識するＣＡＰＲＩＮ－１の部分配列として配列番号４３２のポリペプチドが同定された。

【０２６６】

（３）各マウス抗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

取得したモノクローナル抗体について、ＷＯ２０１０／０１６５２６の実施例５に記載の方法に従って可変領域をコードする遺伝子配列及びそのアミノ酸配列を解析した。

【０２６７】

その結果、マウス抗ＣＡＰＲＮ－１抗体＃３０は配列番号３４４に示すアミノ酸配列からなる重鎖可変領域と配列番号３４８に示すアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含むものであった。重鎖可変領域をコードする遺伝子配列を配列番号３４９に、軽鎖可変領域をコードする遺伝子配列を配列番号３５０に示す。さらに、重鎖可変領域中のＣＤＲ１～３がそれぞれ配列番号３４１、配列番号３４２、配列番号３４３に示すアミノ酸配列からなり、軽鎖可変領域中のＣＤＲ１～３がそれぞれ配列番号３４５、配列番号３４６、配列番

号３４７に示すアミノ酸配列からなることが示された。
【０２６８】
また、マウス抗ＣＡＰＲＮ－１抗体＃３４は配列番号４０１に示すアミノ酸配列からなる重鎖可変領域と配列番号４０５に示すアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含むものであった。重鎖可変領域をコードする遺伝子配列を配列番号４０６に、軽鎖可変領域をコードする遺伝子配列を配列番号４０７に示す。さらに、重鎖可変領域中のＣＤＲ１～３がそれぞれ配列番号３９８、配列番号３９９、配列番号４００に示すアミノ酸配列からなり、軽鎖可変領域中のＣＤＲ１～３がそれぞれ配列番号４０２、配列番号４０３、配列番号４０４に示すアミノ酸配列からなることが示された。
【０２６９】
マウス抗ＣＡＰＲＮ－１抗体＃３５は配列番号４１１に示すアミノ酸配列からなる重鎖可変領域と配列番号４１５に示すアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含むものであった。重鎖可変領域をコードする遺伝子配列を配列番号４１６に、軽鎖可変領域をコードする遺伝子配列を配列番号４１７に示す。さらに、重鎖可変領域中のＣＤＲ１～３がそれぞれ配列番号４０８、配列番号４０９、配列番号４１０に示すアミノ酸配列からなり、軽鎖可変領域中のＣＤＲ１～３がそれぞれ配列番号４１２、配列番号４１３、配列番号４１４に示すアミノ酸配列からなることが示された。
【０２７０】
マウス抗ＣＡＰＲＮ－１モノクローナル抗体＃３６は配列番号４２１に示すアミノ酸配列からなる重鎖可変領域と配列番号４２５に示すアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含むものであった。重鎖可変領域をコードする遺伝子配列を配列番号４２６に、軽鎖可変領域をコードする遺伝子配列を配列番号４２７に示す。さらに、重鎖可変領域中のＣＤＲ１～３がそれぞれ配列番号４１８、配列番号４１９、配列番号４２０に示すアミノ酸配列からなり、軽鎖可変領域中のＣＤＲ１～３がそれぞれ配列番号４２２、配列番号４２３、配列番号４２４に示すアミノ酸配列からなることが示された。
【０２７１】
（４）各マウス抗ＣＡＰＲＩＮ－１モノクローナル抗体を用いた胆嚢癌細胞膜面上でのＣＡＰＲＩＮ－１タンパク質の発現解析
ヒトの胆嚢癌細胞株ＴＧＢＣ１４ＴＫＢについて、その細胞表面上にＣＡＰＲＩＮ－１タンパク質が発現しているかどうかを調べた。上記胆嚢癌細胞株５×10^5細胞を１．５ｍｌのミクロ遠心チューブにて遠心分離した。これに各マウス抗ＣＡＰＲＩＮ－１抗体を最終濃度が２０μｇ/ｍｌとなるように反応させて、氷上で１時間静置した。ＰＢＳで洗浄した後、１００倍希釈したＡｌｅｘａ４８８標識Ｇｏａｔ ａｎｔｉ－ｍｏｕｓｅ ＩｇＧ抗体（ｌｉｆｅ ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製）を反応させ、氷上で３０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。陰性コントロールとして、二次抗体のみを反応させたものを陰性コントロールとした。その結果、抗ＣＡＰＲＩＮ－１抗体を添加された細胞は、コントロールに比べて、胆嚢癌細胞も蛍光強度が３５％以上強かった。このことから、胆嚢癌細胞株の細胞膜表面上にＣＡＰＲＩＮ－１タンパクが発現していることが確認された。
【０２７２】
［実施例９］　ＣＡＰＲＩＮ－１タンパク質に対するマウスモノクローナル抗体＃３１～３３の作製
（１）マウス抗ＣＡＰＲＩＮ－１抗体＃３１の作製
ＷＯ２０１０／０１６５２６の実施例３で調製した配列番号２のアミノ酸配列を有するヒトＣＡＰＲＩＮ－１タンパク質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７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（ベーリンガー社製）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％CO_2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。

【０２７３】

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。ＷＯ２０１０／０１６５２６の実施例３に記載の手法で調製したＣＡＰＲＩＮ－１タンパク溶液１μｇ／ｍｌを９６穴プレート１ウェル当たりに１００μｌ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４００μｌ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４００μｌ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１００μｌ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（ｌｉｆｅ ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製）を１ウェル当たり１００μｌ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１００μｌ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１００μｌ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。

【０２７４】

選抜したハイブリドーマを９６穴プレート１ウェル当たりに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。ＷＯ２０１０／０１６５２６の実施例３に記載の手法で調製したＣＡＰＲＩＮ－１タンパク溶液１μｇ／ｍｌを９６穴プレート１ウェル当たりに１００μｌ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４００μｌ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４００μｌ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１００μｌ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（ｌｉｆｅ ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製）を１ウェル当たり１００μｌ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１００μｌ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１００μｌ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６１個のハイブリドーマ株を得た。

【０２７５】

次にそれらモノクローナル抗体の内、ＣＡＰＲＩＮ－１を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容のミ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１００μｌ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（ｌｉｆｅ ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ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マウスモノクローナル抗体１個（マウス抗ＣＡＰＲＩＮ－１抗体＃３１）を選抜した。

【０２７６】

（２）マウス抗ＣＡＰＲＩＮ－１抗体＃３１が認識するＣＡＰＲＩＮ－１エピトープの同定

上記（１）で取得した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（マウス抗ＣＡＰＲＩＮ－１抗体＃３１）を用いて、認識するＣＡＰＲＩＮ－１エピトープ領域の同定を行った。ヒトＣＡＰＲＩＮ－１タンパク質のアミノ酸配列中、１２～１６アミノ酸から成る、９３個の候補ペプチドを合成し、それぞれ１ｍｇ／ｍｌの濃度になるようにＤＭＳＯで溶解した。

【０２７７】

各ペプチドを０．１M炭酸ナトリウム緩衝液（ｐＨ９．６）中に３０μｇ／ｍｌの濃度になるように溶解し、９６穴プレート（Ｎｕｎｃ社製、製品番号：４３６００６）の１穴あたり１００μｌずつ添加して４℃で一晩静置した。液を捨て、１０mMエタノールアミン／０．１M炭酸ナトリウム緩衝液（ＰＨ９．６）を１穴あたり２００μｌずつ添加し、室温で１時間静置した後、液を捨て、０．５％Ｔｗｅｅｎ２０を含むＰＢＳ（ＰＢＳＴ）にて２回洗浄することによって、各ペプチドが固相化されたプレートを作製した。

【０２７８】

これに、抗ＣＡＰＲＩＮ－１抗体＃３１を含む細胞培養上清を１穴あたり５０μｌ添加し、室温で１時間振とうした後、液を除去し、ＰＢＳＴにて３回洗浄した。次に、ＨＲＰが標識された抗マウスＩｇＧ（ｌｉｆｅ ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製）抗体をＰＢＳＴにて３０００～４０００倍希釈した２次抗体溶液をウェルに５０μｌずつ添加した後、液を除去し、ＰＢＳＴにて６回洗浄を行った。

【０２７９】

ＴＭＢ基質溶液（Ｔｈｅｒｍｏ社製）を１ウェル当たり１００μｌ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１００μｌ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。

【０２８０】

その結果、（１）で得られたマウス抗ＣＡＰＲＩＮ－１抗体＃３１が認識するＣＡＰＲＩＮ－１の部分配列として、配列番号４３０のポリペプチドが同定された。

【０２８１】

（３）マウス抗ＣＡＰＲＩＮ－１抗体＃３２及び３３の作製

上記（１）と同様の方法で、（２）で同定した配列番号４３０のアミノ酸配列を有するポリペプチドとキャリアタンパク質のＫＬＨ（Ｋｅｙｈｏｌｅ ｌｉｍｐｅｔ ｈａｅｍｏｃｙａｎｉｎ）との融合タンパク質を免疫原として、等量のアジュバント剤ＴｉｔｅｒＭａｘ Ｇｏｌｄ（登録商標）（ＣｙｔＲｘ社）と混合して７日間隔でマウスの腹腔に１回あたり１００μg投与した。合計４回の投与を行った後、最終免疫から３日後のマウスから脾臓細胞を得て、上記（１）と同様の方法にてマウスミエローマ細胞と融合してハイブリドーマを作製した。その後、作製したハイブリドーマの培養上清中に含まれる各抗体とＷＯ２０１０／０１６５２６の実施例３で調製したＣＡＰＲＩＮ－１タンパク溶液１μｇ／ｍｌ並びに免疫原として用いた配列番号５のアミノ酸配列とキャリアタンパク質のＢＳＡとの融合タンパク質との反応性を指標に抗体を選抜した。ＷＯ２０１０／０１６５２６の実施例３で調製したＣＡＰＲＩＮ－１タンパク溶液１μｇ／ｍｌと配列番号５のアミノ酸配列とキャリアタンパク質のＢＳＡとの融合タンパク質３０μg／ｍｌをそれぞれ９６穴プレート１ウェル当たりに１００μｌ添加して４℃にて１８時間静置した。各ウェルをＰＢＳ－Ｔで洗浄後、ブロックエース（ＤＳファーマバイオメディカル社）溶液を１ウ

ェル当たり４００μｌ添加して室温にて３時間静置した。溶液を除いて、ＰＢＳ－Ｔでウェルを洗浄後、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１００μｌ添加し、室温で２時間静置した。ＰＢＳ－Ｔで各ウェルを洗浄した後、ＰＢＳで５０００倍に希釈したＨＲＰ標識抗マウスＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ）抗体（ｌｉｆｅ ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製）を１ウェル当たり１００μｌ添加して室温にて１時間静置した。ＰＢＳ－Ｔでウェルを洗浄した後、ＴＭＢ基質溶液（Ｔｈｅｒｍｏ社製）を１ウェル当たり１００μｌ添加して５～３０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１００μｌ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選抜した。

【０２８２】

選抜したハイブリドーマを９６穴プレート１ウェル当たりに０．３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の部分配列の配列番号４３０のアミノ酸配列に対する結合親和性を指標に上記と同様の方法を用いて、配列番号４３０のアミノ酸に対する抗体を産生するハイブリドーマを得た。

【０２８３】

得られたハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体の内、ＣＡＰＲＩＮ－１を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容のミ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１００μｌ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（ｌｉｆｅ ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ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たサンプル、及び二次抗体のみを反応させたサンプルを陰性コントロールとして行った。その結果、陰性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マウスモノクローナル抗体２個（マウス抗ＣＡＰＲＩＮ－１抗体＃３２、マウス抗ＣＡＰＲＩＮ－１抗体＃３３）を得た。

【０２８４】

得られたマウス抗ＣＡＰＲＩＮ－１抗体＃３２並びに＃３３が免疫原であるＣＡＰＲＩＮ－１の部分配列である配列番号４３０のアミノ酸配列を有するポリペプチドに特異的に反応することを調べた。０．１Ｍの炭酸ナトリウム水溶液で３０μｇ／ｍｌに調製した配列番号４３０のアミノ酸配列を含む溶液及び配列番号４３０のアミノ酸配列を含まないＣＡＰＲＩＮ－１の部分配列をそれぞれＥＬＩＳＡ用９６ウェルプレートイモビライザーアミノ（ヌンク社）に１００μｇ／ｍｌずつ添加して、４℃にて一昼夜反応させてペプチドをウェルに結合させた。ペプチドが結合したウェルに１０ｍＭエタノールアミンを含む０．１Ｍ炭酸ナトリウム水溶液を添加して室温で１時間静置した。ウェル内の溶液を除去後、ＰＢＳ－Ｔで洗浄したのち、ブロックエース溶液を１ウェル当たり４００μｌ添加して室温にて３時間静置した。ウェル内の溶液を除去し、ＰＢＳ－Ｔで洗浄後、マウス抗ＣＡＰＲＩＮ－３１＃３２並びに＃３３を含む培養上清をそれぞれ１ウェルあたりに５０μＬ添加して、室温にて１時間反応させた。その後ＰＢＳ－Ｔで洗浄して、ブロックエース溶液で５０００倍に希釈したＨＲＰ標識抗マウスＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ）抗体（ｌｉｆｅ ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製）を１ウェル当たり５０μｌ添加して室温にて１時間静置した。ＰＢＳ－Ｔでウェルを十分に洗浄した後、ＴＭＢ基質溶液（Ｔｈｅｒｍｏ社製）を１ウェル当たり１００μｌ添加して５～３０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１００μｌ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ところ、配列番号４３０のアミノ酸配列を含まないＣＡ

ＰＲＩＮ－１の部分配列には全く反応せず、配列番号４３０のアミノ酸配列を有するポリペプチドのみにマウス抗ＣＡＰＲＩＮ－１抗体＃３２並びに＃３３は特異的に反応した。したがって、配列番号４３０のポリペプチドがマウスモノクローナル抗体＃３２及び＃３３のエピトープ領域を含んでいることが確認された。

【０２８５】

（４）マウス抗ＣＡＰＲＩＮ－１抗体＃３１～３３の特徴付け

（１）と（３）で得られたマウス抗ＣＡＰＲＩＮ－１抗体＃３１～３３について、ＷＯ２０１０／０１６５２６の実施例５に記載の方法に従って可変領域をコードする遺伝子の増幅断片を取得し、遺伝子配列並びにそのアミノ酸配列を解析した。その結果得られたマウス抗ＣＡＰＲＩＮ－１抗体＃３１の重鎖可変領域をコードする遺伝子配列を配列番号３８１に、及びアミノ酸配列を配列番号３７６に、軽鎖可変領域をコードする遺伝子配列を配列番号３８２、及びアミノ酸配列を配列番号３８０に示す。また、得られたマウス抗ＣＡＰＲＩＮ－１抗体＃３２の重鎖可変領域をコードする遺伝子配列を配列番号３９１に、及びアミノ酸配列を配列番号３８６に、軽鎖可変領域をコードする遺伝子配列を配列番号３９２に及びアミノ酸配列を配列番号３９０に示す。さらにまた、得られたマウス抗ＣＡＰＲＩＮ－１抗体＃３３の重鎖可変領域をコードする遺伝子配列を配列番号３９７に、及びアミノ酸配列を配列番号３９６、軽鎖可変領域をコードする遺伝子配列を配列番号３９２に、及びアミノ酸配列を配列番号３９０に示す。

【０２８６】

また、マウス抗ＣＡＰＲＩＮ－１抗体＃３１の重鎖可変領域中のＣＤＲ１～３がそれぞれ配列番号３７３、配列番号３７４、配列番号３７５のアミノ酸配列からなり、軽鎖可変領域中のＣＤＲ１～３がそれぞれ配列番号３７７、配列番号３７８、配列番号３７９のアミノ酸配列からなることが確認された。また、マウス抗ＣＡＰＲＩＮ－１抗体＃３２の重鎖可変領域中のＣＤＲ１～３がそれぞれ配列番号３８３、配列番号３８４、配列番号３８５のアミノ酸配列からなり、軽鎖可変領域中のＣＤＲ１～３がそれぞれ配列番号３８７、配列番号３８８、配列番号３８９のアミノ酸配列からなることが確認された。さらにまた、マウス抗ＣＡＰＲＩＮ－１抗体＃３３の重鎖可変領域中のＣＤＲ１～３がそれぞれ配列番号３９３、配列番号３９４、配列番号３９５のアミノ酸配列からなり、軽鎖可変領域中のＣＤＲ１～３がそれぞれ配列番号３８７、配列番号３８８、配列番号３８９のアミノ酸配列からなることが確認された。

【０２８７】

［実施例１０］　マウス抗ＣＡＰＲＩＮ－１モノクローナル抗体＃３０～３６を用いた胆嚢癌細胞膜面上でのＣＡＰＲＩＮ－１タンパク質の発現解析

ヒトの胆嚢癌細胞株ＴＧＢＣ１４ＴＫＢについて、その細胞表面上にＣＡＰＲＩＮ－１タンパク質が発現しているかどうかをマウス抗ＣＡＰＲＩＮ－１モノクローナル抗体＃３０～３６を用いて調べた。ＴＧＢＣ１４ＴＫＢを５×１０^{5}細胞を１．５ｍｌのミ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＃３０～３６を最終濃度が２０μｇ/ｍｌとなるようにそれぞれ反応させて、氷上で１時間静置した。ＰＢＳで洗浄した後、１００倍希釈したＡｌｅｘａ４８８標識Ｇｏａｔ ａｎｔｉ－ｍｏｕｓｅ　ＩｇＧ抗体（ｌｉｆｅ ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製）を反応させ、氷上で３０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。陰性コントロールとして、二次抗体のみを反応させたものを陰性コントロールとした。その結果、マウス抗ＣＡＰＲＩＮ－１モノクローナル抗体＃３０～３６を添加されたＴＧＢＣ１４ＴＫＢは、コントロールに比べて蛍光強度が３５％以上強かった。このことから、上記胆嚢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。

【０２８８】

［実施例１１］　ヒト－マウスキメラ抗ＣＡＰＲＩＮ－１抗体の作製

マウス抗ＣＡＰＲＩＮ－１抗体＃３０～３６のそれぞれの重鎖可変領域を含んだ遺伝子増幅断片の両端を制限酵素処理した後精製し、マウス抗体由来のリーダー配列と配列番号

２６４のアミノ酸配列を含むヒトＩｇＧ１のＨ鎖定常領域を既に挿入済みのｐｃＤＮＡ４／ｍｙｃ－Ｈｉｓ（ｌｉｆｅ ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製）ベクターへ常法に従って挿入した。また、マウス抗ＣＡＰＲＩＮ－１抗体＃３０～３６のそれぞれの軽鎖可変領域を含んだ遺伝子増幅断片の両端を制限酵素処理した後精製し、マウス抗体由来のリーダー配列と配列番号２６５のアミノ酸配列を含むヒトＩｇＧ１のＬ鎖定常領域を既に挿入済みのｐｃＤＮＡ３．１／ｍｙｃ－Ｈｉｓ（ｌｉｆｅ ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製）ベクターへ常法に従って挿入した。

【０２８９】

次に、上記にあるマウス抗ＣＡＰＲＩＮ－１抗体＃３０～３６のそれぞれの重鎖可変領域が挿入された上記組換えベクターと、軽鎖可変領域が挿入された上記組換えベクターをＣＨＯ－Ｋ１細胞（理研セルバンクより入手）に導入した。具体的には、１２穴培養プレートの１ウェル当たりに１ｍｌの１０％ＦＢＳを含むＨａｍ’ｓ Ｆ１２培地（ｌｉｆｅ ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製）で培養された2×10^{5}個のＣＨＯ－Ｋ１細胞をＰＢＳ（－）で洗浄したのちに、１ウェル当たり１ｍｌの１０％ＦＢＳを含むＨａｍ’ｓ Ｆ１２培地を新たに加えたウェルに３０μｌのＯｐｔｉＭＥＭ（ｌｉｆｅ ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製）に溶解した上記各ベクター２５０ｎｇとＰｏｌｙｆｅｃｔ ｔｒａｎｓｆｅｃｔｉｏｎ ｒｅａｇｅｎｔ（ＱＩＡＧＥＮ社製）３０μｌとを混合したものを添加した。上記組換えベクターを導入したＣＨＯ－Ｋ１細胞を、２００μｇ／ｍｌゼオシン（ｌｉｆｅ ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製）並びに２００μｇ／ｍｌジェネチシン（ロシュ社製）を添加した１０％ＦＢＳを含むＨａｍ’ｓＦ１２培地で培養したのち、９６ウェルプレートの１ウェル当たりに０．５個となるように上記組換えベクターを導入したＣＨＯ－Ｋ１細胞を播種して、マウス抗ＣＡＰＲＩＮ－１抗体＃３０～３６のそれぞれの可変領域を有するヒト－マウスキメラ抗ＣＡＰＲＩＮ－１抗体＃３０～３６をそれぞれ安定的に産生する細胞株を作製した。

【０２９０】

作製した細胞株を１５０ｃｍ^{2}フラスコを用いて5×10^{5}個／ｍｌで血清を含まないＯｐｔｉＣＨＯ培地（ｌｉｆｅ ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製）３０ｍｌを用いて５日間培養し、ヒト－マウスキメラ抗ＣＡＰＲＩＮ－１抗体＃３０～３６をそれぞれ含む培養上清を得た。

【０２９１】

［実施例１２］ 抗ＣＡＰＲＩＮ－１抗体の胆嚢癌細胞に対する抗腫瘍活性（ＡＤＣＣ活性）

配列番号４２９～４３２に示すＣＡＰＲＩＮ－１由来ペプチドに対する抗体におけるＣＡＰＲＩＮ－１を発現する胆嚢癌細胞に対する細胞障害性の強さを評価するためにヒト－マウスキメラ抗ＣＡＰＲＩＮ－１抗体＃３０～３６を用いてＡＤＣＣ活性を測定した。胆嚢癌細胞株ＴＧＢＣ１４ＴＫＢを10^{6}個５０ｍｌ容の遠心チューブに集め、１００μＣｉのクロミウム５１を加え３７℃で２時間インキュベートした。その後１０％牛胎児血清を含むＲＰＭＩ１６４０培地で３回洗浄した。９６穴Ｖ底プレート各ウェルにヒト－マウスキメラ抗ＣＡＰＲＩＮ－１抗体＃３０～３６をそれぞれのウェルに添加して最終濃度が５μg/mlとなるように添加し、さらにエフェクター細胞にヒト末梢血リンパ球細胞から定法を用いて分離したヒトＮＫ細胞を１ウェル当たり2×10^{5}個添加した。そこにクロミウム５１を取り込ませた前記胆嚢癌細胞を１ウェルあたり2×10^{3}個となるように混合して４時間培養し、培養後培地に放出されたクロミウム５１の量を測定して、以下計算式＊により胆嚢癌細胞株に対する細胞障害活性を算出した。

【０２９２】

＊式：細胞障害活性（％）＝ＣＡＰＲＩＮ－１に対する抗体及びリンパ球を加えた際の標的細胞からのクロミウム５１遊離量÷１Ｎ塩酸を加えた標的細胞からのクロミウム５１遊離量×１００。

【０２９３】

その結果、いずれのヒト－マウスキメラ抗ＣＡＰＲＩＮ－１抗体も胆嚢癌細胞に対して

２０％以上の活性を示したのに対して、陰性コントロールとして用いたヒトＩｇＧ１抗体では胆嚢癌細胞に対しても７％未満の活性であった。

【０２９４】

［実施例１３］　ウサギを用いた抗ＣＡＰＲＩＮ－１モノクローナル抗体の作製

（１）ウサギ抗ＣＡＰＲＩＮ－１モノクローナル抗体＃１の作製

抗原タンパク質（ヒトＣＡＰＲＩＮ－１）３００μｇを等量のフロイントの完全アジュバントと混合し、これをウサギ１羽当たりの抗原溶液とした。２回目以降の免疫にはフロインとの不完全アジュバントと混合したものを使用した。抗原溶液を７週齢のウサギの腹腔内に投与後、４週間毎に７回投与を行って免疫を完了した。最後の免疫から４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ウサギのミエローマ細胞とを５：１の比率にて混和し、そこに３７℃に加温した１０％　ＦＢＳを含むＩＭＤＭ培地２００μｌとＰＥＧ１５００（ベーリンガー社製）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１０％　ＦＢＳを含むＩＭＤＭ培地（ＨＡＴ選択培地）３００ｍｌ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３０枚に播種した。７日間、３７℃、５％　CO_2の条件で培養することで、脾臓細胞とウサギミエローマ細胞が融合したハイブリドーマを得た。

【０２９５】

作製したハイブリドーマが産生する抗体のＣＡＰＲＩＮ－１タンパク質に対する反応性を指標にハイブリドーマを選抜した。ＣＡＰＲＩＮ－１タンパク溶液１μｇ／ｍｌを９６穴プレート１ウェル当たりに１００μｌ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４００μｌ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４００μｌ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１００μｌ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標識抗ウサギ抗体を１ウェル当たり１００μｌ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１００μｌ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１００μｌ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。

【０２９６】

選抜したハイブリドーマを９６穴プレート１ウェル当たりに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タンパクに対する反応性を指標にハイブリドーマを選抜した。ＣＡＰＲＩＮ－１タンパク溶液１μｇ／ｍｌを９６穴プレート１ウェル当たりに１００μｌ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４００μｌ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４００μｌ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１００μｌ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標識抗ウサギＩｇＧ抗体を１ウェル当たり１００μｌ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１００μｌ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１００μｌ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タンパク質に反応性を示す

ウサギモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ株を複数個得た。

【０２９７】

次にそれらＣＡＰＲＩＮ－１タンパク質に反応性を示すウサギモノクローナル抗体からＣＡＰＲＩＮ－１が発現する癌細胞表面に反応性を示すものを選抜した。具体的には、２×１０^{5}個のヒト乳癌細胞株ＭＤＡ－ＭＢ－２３１Ｖ並びにヒト肺癌細胞株ＱＧ５６をそれぞれ１．５ｍｌ容のミ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１００μｌを添加し、氷上で１時間静置した。ＰＢＳで洗浄した後、０．０５％　ＦＢＳを含むＰＢＳ（－）で１００倍希釈したＦＩＴＣ標識抗ウサギＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ）抗体あるいはＡｌｅｘａ４８８標識抗ウサギＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ）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培地を用いて行い、陰性コントロールのサンプルとした。その結果、陰性コントロールに比べて蛍光強度が強い、すなわち、ＣＡＰＲＩＮ－１が発現している癌細胞ＭＤＡ－ＭＢ－２３１並びにＱＧ５６の細胞表面に反応するウサギ抗ＣＡＰＲＩＮ－１モノクローナル抗体１個（ウサギ抗ＣＡＰＲＩＮ－１モノクローナル抗体＃１）を選抜した。

【０２９８】

次に、選抜したウサギ抗ＣＡＰＲＩＮ－１モノクローナル抗体＃１が認識するＣＡＰＲＩＮ－１エピトープを同定した。ヒトＣＡＰＲＩＮ－１タンパク質のアミノ酸配列中、１２～１６アミノ酸から成る、９３個の候補ペプチドを合成し、それぞれ１ｍｇ／ｍｌの濃度になるようにＤＭＳＯで溶解した。各ペプチドを０．１Ｍ炭酸ナトリウム緩衝液（ｐＨ９．６）中に３０μｇ／ｍｌの濃度になるように溶解し、９６穴プレート（Ｎｕｎｃ社製、製品番号：４３６００６）の１穴あたり１００μｌずつ添加して４℃で一晩静置した。液を捨て、１０ｍＭエタノールアミン／０．１Ｍ炭酸ナトリウム緩衝液（ＰＨ９．６）を１穴あたり２００μＬずつ添加し、室温で１時間静置した後、液を捨て、０．５％Ｔｗｅｅｎ２０を含むＰＢＳ（ＰＢＳＴ）にて２回洗浄することによって、各ペプチドが固相化されたプレートを作製した。確認のため本プレートにＣＡＰＲＩＮ－１タンパクを固相化したウェルも前記の方法に従って用意した。これに、定法で精製したウサギ抗ＣＡＰＲＩＮ－１モノクローナル抗体＃１を０．１ｕｇ／ｍＬの濃度で１穴あたり５０μＬ添加し、室温で１時間振とうした後、液を除去し、ＰＢＳＴにて３回洗浄した。次に、ＨＲＰが標識された抗ウサギＩｇＧ抗体をＰＢＳＴにて３０００～４０００倍希釈した２次抗体溶液をウェルに５０μＬずつ添加した後、液を除去し、ＰＢＳＴにて６回洗浄を行った。ＴＭＢ基質溶液（Ｔｈｅｒｍｏ社製）を１ウェル当たり１００μＬ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１００μＬ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、ウサギ抗ＣＡＰＲＩＮ－１モノクローナル抗体ウサギ抗ＣＡＰＲＩＮ－１モノクローナル抗体＃１は、ＣＡＰＲＩＮ－１の部分配列である合成した９３個のペプチドのうち、配列番号４３０に示すアミノ酸配列を有するポリペプチドのみに反応性を示し、他のポリペプチドには反応性を示さなかった。また。ウサギ抗ＣＡＰＲＩＮ－１モノクローナル抗体＃１はＣＡＰＲＩＮ－１タンパクに特異的に反応性を示した。この結果からウサギ抗ＣＡＰＲＩＮ－１モノクローナル抗体＃１のエピトープは、配列番号４３０のポリペプチドに含まれていることが判った。

【０２９９】

次に、上記で得られたウサギ抗ＣＡＰＲＩＮ－１モノクローナル抗体＃１について、ＷＯ２０１０／０１６５２６の実施例５に記載の方法に従って可変領域をコードする遺伝子の増幅断片を取得し、遺伝子配列並びにそのアミノ酸配列を解析した。具体的にはウサギ抗ＣＡＰＲＩＮ－１モノクローナル抗体＃１を産生するハイブリドーマからｍＲＮＡを抽出し、ウサギ可変領域配列に特異的なプライマーを使用したＲＴ－ＰＣＲ法により、本抗体の重鎖可変（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（ｌｉｆｅ　ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製）にクローニングした。クローニングして得られた各プラスミド中のＶＨ領域及びＶＬ領

域の遺伝子配列は、Ｍ１３フォワードプライマー及びＭ１３リバースプライマーを用いて、蛍光シーケンサーによりそれぞれ決定した。

【０３００】

その結果得られたウサギ抗ＣＡＰＲＩＮ－１モノクローナル抗体＃１は、配列番号３５９に示す重鎖可変領域及び重鎖可変領域中のＣＤＲ１～３がそれぞれ配列番号３５１、配列番号３５２、配列番号３５３のアミノ酸配列からなり、配列番号３６１に示す軽鎖可変領域及び軽鎖可変領域中のＣＤＲ１～３がそれぞれ配列番号３５４、配列番号３５５、配列番号３５６のアミノ酸配列からなることが確認された。

【０３０１】

（２）ヒト－ウサギキメラ抗ＣＡＰＲＩＮ－１抗体＃１の作製

上記で取得したウサギ抗ＣＡＰＲＩＮ－１モノクローナル抗体＃１の重鎖可変領域を発現させるための配列番号３５８に示す遺伝子と、軽鎖可変領域を発現させるための配列番号３６０に示す遺伝子をそれぞれヒトＩｇＧ１の重鎖定常領域が挿入された哺乳類細胞発現用ベクター及びヒトＩｇＧ１の軽鎖定常領域が挿入された哺乳類細胞発現用ベクターに挿入した。作製した２つの組み換え発現ベクターを定法に従って哺乳類細胞に導入してヒト化されたヒト－ウサギキメラ抗ＣＡＰＲＩＮ－１抗体＃１を含む培養上清を得た。

【０３０２】

（３）ヒト－ウサギキメラ抗ＣＡＰＲＩＮ－１抗体＃１の抗原特異性、癌細胞への反応性及び抗腫瘍活性

（２）で得たヒト－ウサギキメラ抗ＣＡＰＲＩＮ－１抗体＃１の培養上清を定法に従ってＨｉｔｒａｐ　ＰｒｏｔｅｉｎＡ　ＳｅｐｈａｒｏｓｅＦＦ（ＧＥヘルスケア社製）を用いて精製し、ＰＢＳ（－）に置換して０．２２μｍのフィルター（ミリポア社製）で濾過したものを用いて、抗原特異性と癌細胞への反応性及び抗腫瘍効果を調べた。

【０３０３】

まず、（１）と同様にして、ＣＡＰＲＩＮ－１タンパク質およびウサギ抗ＣＡＰＲＩＮ－１モノクローナル抗体＃１のエピトープである配列番号４３０のアミノ酸配列を有するポリペプチドに対するヒト－ウサギキメラ抗ＣＡＰＲＩＮ－１抗体＃１の反応特異性を調べたところ、ヒト－ウサギキメラ抗ＣＡＰＲＩＮ－１抗体＃１は、ウサギ抗ＣＡＰＲＩＮ－１モノクローナル抗体＃１と同様にＣＡＰＲＩＮ－１タンパク質および配列番号４３０のアミノ酸配列を有するポリペプチドに対する反応特異性を有していることを確認した。

【０３０４】

次に胆嚢癌細胞株ＴＧＢＣ１４ＴＫＢについて、ヒト－ウサギキメラ抗ＣＡＰＲＩＮ－１抗体＃１の各細胞の細胞表面上でのＣＡＰＲＩＮ－１タンパク質の反応性を調べた。各細胞株それぞれ10^6細胞を１．５ｍｌ容のミクロ遠心チューブにて遠心分離した。上記抗体を含む各細胞培養上清（１００μｌ）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１００倍に希釈したＡｌｅｘａ４８８標識ヤギ抗ヒトＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ）抗体（ｌｉｆｅ　ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製）を添加し、４℃で６０分間静置した。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。陰性コントロールには二次抗体のみを反応したものを用いた。その結果、ヒト－ウサギキメラ抗ＣＡＰＲＩＮ－１抗体＃１は、陰性コントロールに比べて、蛍光強度が３０％以上強い反応性を示した。このことから、上記ヒト癌細胞株の細胞膜表面上に配列番号４３０で示されるＣＡＰＲＩＮ－１タンパク質の一部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。平均蛍光強度の増加率（蛍光強度の増強率）（％）＝（（抗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。

【０３０５】

さらに次に、ヒト－ウサギキメラ抗ＣＡＰＲＩＮ－１抗体＃１の胆嚢癌細胞株ＴＧＢＣ１４ＴＫＢに対する抗腫瘍活性を評価した。10^6個の胆嚢癌細胞株を５０ｍｌ容の遠心チューブに集め、１００μＣｉのクロミウム５１を加え３７℃で２時間インキュベートし

た。その後１０％ＦＢＳを含むＲＰＭＩ１６４０培地で３回洗浄しターゲット細胞を準備した。精製されたヒト－ウサギキメラ抗ＣＡＰＲＩＮ－１抗体＃１が最終濃度が５μｇ／ｍｌとなるように９６穴Ｖ底プレートにそれぞれ添加した。次に、定法に従って調製したヒト末梢血リンパ球細胞からヒトＮＫ細胞を分離し、１ウェル当たり2×10^{5}個を添加した。ターゲットと抗体を添加した９６ウェルＶ底プレートに１ウェル当たり2×10^{3}個を混合し、３７℃、５％、CO_2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５１の量を測定し、抗ＣＡＰＲＩＮ－１抗体による胆嚢癌細胞に対する細胞障害活性を算出した。陰性コントロールにはアイソタイプコントロール抗体を添加したものを用いた。その結果、アイソタイプコントロール抗体を用いた場合の細胞障害活性は胆嚢癌細胞に対しても５％未満であったのに対して、ヒト－ウサギキメラ抗ＣＡＰＲＩＮ－１抗体＃１は、胆嚢癌細胞に対しても２５％以上の抗腫瘍活性を示した。以上の結果より、配列番号４３０に示すＣＡＰＲＩＮ－１由来ペプチドに対する抗体ヒト－ウサギキメラ抗ＣＡＰＲＩＮ－１抗体＃１はＡＤＣＣ活性によってＣＡＰＲＩＮ－１を発現する胆嚢癌細胞に対して抗腫瘍活性を発揮することが明らかとなった。

【０３０６】

［実施例１４］　ヒト化抗ＣＡＰＲＩＮ－１抗体＃１～３の作製

次に、ウサギ抗ＣＡＰＲＩＮ－１抗体＃１のヒト化抗体を作製した。ウサギ抗ＣＡＰＲＩＮ－１モノクローナル抗体＃１の重鎖可変領域のアミノ配列情報を基に、重鎖可変領域中のＣＤＲ１～３が配列番号３５１、配列番号３５２及び配列番号３５７のアミノ酸からなり、フレームワーク領域がヒト抗体の配列を含む重鎖可変領域（配列番号３６３）を発現できるように、配列番号３６２の塩基配列を設計し、これをヒトＩｇＧ１の重鎖定常領域が挿入された哺乳類細胞発現用ベクターに挿入した。同様にして、軽鎖可変領域中のＣＤＲ１～３が配列番号３５４、配列番号３５５及び配列番号３５６のアミノ酸からなり、フレームワーク領域がヒト抗体の配列を含む軽鎖可変領域（配列番号３６５）を発現できるように、配列番号３６４の塩基配列を設計し、これをヒトＩｇＧ１の軽鎖定常領域が挿入された哺乳類細胞発現用ベクターに挿入した。上記２つの組換え発現ベクターを定法に従って哺乳類細胞に導入して、ヒト化抗ＣＡＰＲＩＮ－１抗体＃１を含む培養上清を得た。

【０３０７】

また、ウサギ抗ＣＡＰＲＩＮ－１モノクローナル抗体＃１の重鎖可変領域中のアミノ配列情報を基に、ＣＤＲ１～３が配列番号３５１、配列番号３５２及び配列番号３５３のアミノ酸からなり、フレームワーク領域がヒト抗体の配列を含む重鎖可変領域（配列番号３６８）を発現できるように、配列番号３６７の塩基配列を設計し、これをヒトＩｇＧ１の重鎖定常領域が挿入された哺乳類細胞発現用ベクターに挿入した。同様にして、軽鎖可変領域中のＣＤＲ１～３が配列番号３５４、配列番号３５５及び配列番号３５６のアミノ酸からなり、フレームワーク領域がヒト抗体の配列を含む軽鎖可変領域（配列番号３７０）を発現できるように、配列番号３６９の塩基配列を設計し、これをヒトＩｇＧ１の軽鎖定常領域が挿入された哺乳類細胞発現用ベクターに挿入した。上記２つの組換え発現ベクターを定法に従って哺乳類細胞に導入して、ヒト化抗ＣＡＰＲＩＮ－１抗体＃２を含む培養上清を得た。

【０３０８】

さらに、ウサギ抗ＣＡＰＲＩＮ－１モノクローナル抗体＃１の重鎖可変領域中のアミノ配列情報を基に、ＣＤＲ１～３が配列番号３５１、配列番号３５２及び配列番号３５３のアミノ酸からなり、フレームワーク領域がヒト抗体の配列を含む重鎖可変領域（配列番号３７２）を発現できるように、配列番号３７１の塩基配列を設計し、これをヒトＩｇＧ１の重鎖定常領域が挿入された哺乳類細胞発現用ベクターに挿入した。同様にして、軽鎖可変領域中のＣＤＲ１～３が配列番号３５４、配列番号３５５及び配列番号３５６のアミノ酸からなり、フレームワーク領域がヒト抗体の配列を含む軽鎖可変領域（配列番号３７０）を発現できるように、配列番号３６９の塩基配列を設計し、これをヒトＩｇＧ１の軽鎖

定常領域が挿入された哺乳類細胞発現用ベクターに挿入した。上記２つの組換え発現ベクターを定法に従って哺乳類細胞に導入して、ヒト化抗ＣＡＰＲＩＮ－１抗体＃３を含む培養上清を得た。

【０３０９】

ヒト化抗ＣＡＰＲＩＮ－１抗体の抗原特異性、癌細胞への反応性及び抗腫瘍活性

上記で得た３種のヒト化抗ＣＡＰＲＩＮ－１抗体＃１～＃３のＣＡＰＲＩＮ－１に対する反応性を評価した結果、ＣＡＰＲＩＮ－１タンパク質、配列番号４３０に示すエピトープペプチド及び胆嚢癌細胞株に対する反応性はヒト－ウサギキメラ抗ＣＡＰＲＩＮ－１モノクローナル抗体＃１と同レベルであった。さらに、これら３種のヒト化抗ＣＡＰＲＩＮ－１抗体の胆嚢癌細胞株に対する抗腫瘍活性を評価したところ、いずれの抗体もヒト－ウサギキメラ抗ＣＡＰＲＩＮ－１モノクローナル抗体＃１と同レベルの抗腫瘍活性を示した。

【０３１０】

［実施例１５］　マウス抗ＣＡＰＲＩＮ－１モノクローナル抗体＃２３～２９を用いた胆嚢癌細胞膜面上でのＣＡＰＲＩＮ－１タンパク質の発現解析

次に、ＷＯ／２０１３／０１８８９４で得られた配列番号２７６、２７７及び２７８で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む配列番号２７９で表される重鎖可変領域と配列番号２８０、２８１及び２８２で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む配列番号２８３で表される軽鎖可変領域からなる抗ＣＡＰＲＩＮ－１モノクローナル抗体＃２３、配列番号２７６、２７７及び２７８で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む配列番号２７９で表される重鎖可変領域と配列番号２８６、２８７及び２８８で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む配列番号２８９で表される軽鎖可変領域からなる抗ＣＡＰＲＩＮ－１モノクローナル抗体＃２４、配列番号２９１、２９２及び２９３で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む配列番号２９４で表される重鎖可変領域と配列番号２９５、２９６及び２９７で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む配列番号２９８で表される軽鎖可変領域からなる抗ＣＡＰＲＩＮ－１モノクローナル抗体＃２５、ＷＯ／２０１３／０１８８９４で得られた配列番号３０１、３０２及び３０３で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む配列番号３０４で表される重鎖可変領域と配列番号３０５、３０６及び３０７で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む配列番号３０８で表される軽鎖可変領域からなる抗ＣＡＰＲＩＮ－１モノクローナル抗体＃２６、ＷＯ／２０１３／０１８８９１で得られた配列番号３１１、３１２及び３１３で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む配列番号３１４で表される重鎖可変領域と配列番号３１５、３１６及び３１７で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む配列番号３１８で表される軽鎖可変領域からなる抗ＣＡＰＲＩＮ－１モノクローナル抗体＃２７、ＷＯ／２０１３／０１８８８９で得られた配列番号３２１、３２２及び３２３で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む配列番号３２４で表される重鎖可変領域と配列番号３２５、３２６及び３２７で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む配列番号３２８で表される軽鎖可変領域からなる抗ＣＡＰＲＩＮ－１モノクローナル抗体＃２８及びＷＯ／２０１３／０１８８８３で得られた配列番号３３１、３３２及び３３３で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む配列番号３３４で表される重鎖可変領域と配列番号３３５、３３６及び３３７で表されるアミノ酸配列からなる相補性決定領域（それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む配列番号３３８で表される軽鎖可変領域からなる抗ＣＡＰＲＩＮ－１モノクローナル抗体＃２９を用いて、実

施例１０と同様に胆嚢癌細胞株ＴＧＢＣ１４ＴＫＢについて、その細胞表面上にＣＡＰＲＩＮ－１タンパク質が発現しているかどうかを調べたところ、実施例１０のマウス抗ＣＡＰＲＩＮ－１モノクローナル抗体＃３０～３６と同等の胆嚢癌細胞株への反応性が得られた。

【０３１１】

［実施例１６］　ヒト－マウスキメラ抗ＣＡＰＲＩＮ－１抗体＃２３～２９の胆嚢癌細胞に対する抗腫瘍活性

実施例１１と同様の方法にて実施例１５に記載のマウス抗ＣＡＰＲＩＮ－１抗体＃２３～２９のそれぞれの可変領域を有するヒト－マウスキメラ抗ＣＡＰＲＩＮ－１抗体＃２３～２９をそれぞれ安定的に産生する細胞株を作製して、ヒト－マウスキメラ抗ＣＡＰＲＩＮ－１抗体＃２３～２９をそれぞれ含む培養上清を得た。この上清を定法で精製したものを用いて、胆嚢癌細胞に対する抗腫瘍活性を調べた。ＣＡＰＲＩＮ－１を発現する胆嚢癌細胞に対する細胞障害性の強さを評価するためにヒト－マウスキメラ抗ＣＡＰＲＩＮ－１抗体＃２３～２９を用いてＡＤＣＣ活性を測定した。実施例１２と同様の方法で、胆嚢癌細胞株ＴＧＢＣ１４ＴＫＢに対するＡＤＣＣ活性を評価した結果、いずれのヒト－マウスキメラ抗ＣＡＰＲＩＮ－１抗体も胆嚢癌細胞株ＴＧＢＣ１４ＴＫＢに２０％以上の活性を示したのに対して、陰性コントロールとして用いたヒトＩｇＧ１抗体では胆嚢癌細胞に対して５％未満の活性であった。

【産業上の利用可能性】

【０３１２】

本発明の抗体は、胆嚢癌の治療及び／又は予防に有用である。

【０３１３】

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】

0006107655000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. FI
C07K 16/46

(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

審査官 山村 祥子

(56)参考文献 国際公開第２０１０／０１６５２６（WO, Ａ１）
国際公開第２０１０／０１６５２５（WO, Ａ１）
国際公開第２０１０／０１６５２７（WO, Ａ１）
国際公開第２０１１／０９６５３５（WO, Ａ１）
国際公開第２０１３／０１８８８５（WO, Ａ１）
国際公開第２０１３／０１８８８６（WO, Ａ１）
KADDER T.,et al., Two new miR-16 targets: caprin-1 and HMGA1, proteins implicated in cell proliferation, Biology of the Cell, ２００９年, Vol.101, p.511-524

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
Ａ６１Ｋ ３９／３９５
Ａ６１Ｐ ３５／００
Ｃ０７Ｋ １６／３２
Ｃ０７Ｋ １６／４６
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）