

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2008年9月4日 (04.09.2008)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2008/105560 A1

(51) 国際特許分類:

A61K 39/395 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
 A61K 49/00 (2006.01) C07K 16/18 (2006.01)
 A61P 9/14 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
 A61P 35/00 (2006.01) C12P 21/08 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2008/053898

(22) 国際出願日: 2008年2月27日 (27.02.2008)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:

特願2007-047534 2007年2月27日 (27.02.2007) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社 未来創薬研究所 (FORERUNNER PHARMA RESEARCH CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1530041 東京都目黒区駒場4-2-16 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 木村直紀 (KIMURA, Naoki) [JP/JP]; 〒1530041 東京都目黒区駒場4-2-16 株式会社未来創薬研究所内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 社本一夫, 外 (SHAMOTO, Ichio et al.); 〒1000004 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

規則4.17に規定する申立て:

— 出願し及び特許を与えられる出願人の資格に関する申立て (規則4.17(ii))

添付公開書類:

— 国際調査報告書
— 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION COMPRISING ANTI-GRP78 ANTIBODY AS ACTIVE INGREDIENT

(54) 発明の名称: 抗GRP78抗体を有効成分として含む医薬組成物

(57) Abstract: Disclosed is a novel pharmaceutical composition comprising an anti-GRP78 antibody. Specifically disclosed are: a novel method for treatment of cancer using an anti-GRP78 antibody; a novel cell growth inhibitor or anti-cancer agent comprising an anti-GRP78 antibody; and a novel anti-GRP78 antibody. It is tried to produce an anti-tumor antibody targeting for GRP78 which localizes on a cell membrane in a cancer cell, and an anti-GRP78 antibody can be successfully produced which can bind specifically to the cell surface of a cancer cell.

(57) 要約: 本発明は、抗GRP78抗体を用いた新規な医薬組成物を提供することを目的とする。より詳細には、抗GRP78抗体を用いた癌を治療する新規方法、抗GRP78抗体を含む新規な細胞増殖抑制剤および抗癌剤、ならびに新規な抗GRP78抗体を提供することを目的とする。本発明者は、癌細胞で局在が細胞膜へと変化しているGRP78を標的にした抗腫瘍抗体の作製を試み、癌細胞の細胞表面特異的に結合する抗GRP78抗体を得ることに成功し、上述の課題を解決するに至った。



WO 2008/105560 A1

明細書

抗 GRP78 抗体を有効成分として含む医薬組成物

技術分野

本発明は、癌の治療方法および抗癌剤に関する。

5 背景技術

GRP タンパク質 (glucose-regulated proteins) は、ER に局在する分子シャペロンである。グルコース欠乏時、あるいは、高次構造に異常が生じたタンパク質が小胞体 (ER) 内に蓄積したときなど、細胞がその内外から受ける様々な ER ストレスに応答して発現が誘導されるタンパク質ファミリーとして知られている (非特許文献 1)。

- 10 GRP78 は、分子量 78 kDa の GRP タンパク質であり、別名 BiP (immunoglobulin binding protein) としてもよく知られている。GRP78 の過剰発現実験、あるいはアンチセンスによるノックダウン実験から、GRP78 は ER ストレスによって引き起こされる細胞死に対して、その防御反応に関わっていることが明らかにされている (非特許文献 1)。

- 癌化した細胞、あるいは癌化によって変化した生体内環境は、低栄養、低酸素、低 pH など、つねに ER ストレスにさらされ続けているという状態だと考えられている。そしてそのことを支持するように、複数の癌細胞株や臨床癌検体において GRP78 タンパク質の発現上昇が確認されている (非特許文献 2~5)。さらに、トポイソメラーゼ阻害活性や血管新生阻害活性を機序として有する抗癌剤に対する抵抗性の獲得に、GRP78 タンパク質の発現上昇とその抗アポトーシス活性が深く関わっていることが、実験的に示されている (非特許文献 6、7)。臨床においても、GRP78 の発現が亢進している乳癌患者グループは、GRP78 の発現が低い群に比べて、アドリアマイシンによる化学療法の効果が低いことが示されている (非特許文献 8)。

これらの報告から、癌細胞の生存・悪性化・抗癌剤耐性のメカニズムに GRP78 の発現亢進がその一旦を担っていると推測されている (非特許文献 1)。

- 25 上述のとおり GRP78 は、ER に局在する分子シャペロンであることが知られているが、その一方で、一部の癌細胞では GRP78 タンパク質が細胞表面に局在することが報告されている。さらに、この細胞表面に局在が変化した GRP78 を標的とした抗腫瘍剤への応用の可能性が幾つかの全く異なる手法で示されている。

Rabdomiosarcoma 細胞株 TE671/RD を thapsigargin (Tg) で処理するとわずかに細胞膜が抗 GRP78 抗体で染色されることが FACS 解析により確認され、GRP78 が細胞膜に局在することが示された。(非特許文献 9)。

ただし、この報告は、Tg 処理による細胞死誘導時の一過性の現象をみたものであり
5、癌細胞における恒常的な GRP78 の局在変化を示したデータではない。また、用いた抗体が市販のヤギ由来ポリクローナル抗体であることから、そのエピトープも不明である。

その後、別のグループから、ファージ結合アッセイにより、2 種類の GRP78 結合ペプチド (WIFPWQL, WDLAWMFRLPVG) を取得し、これらがプレート上に固定した GRP78 タ
10ンパク質に結合するのみならず、前立腺癌細胞株 DU145 の細胞表面にも吸着し、インターナライズすることが報告されている (非特許文献 10)。この実験より、GRP78 が癌細胞の細胞膜上に局在している可能性が示された。

さらに、この GRP78 結合ペプチドを利用した抗腫瘍剤としての可能性が確認されている。すなわち、この GRP78 結合ペプチドにアポトーシス誘導ペプチド配列 (KLAKLAK
15)、(非特許文献 11) を付加したペプチド合成し、このペプチドが DU145 細胞に対して *in vitro* で細胞死誘導を引き起こすばかりでなく、マウス移植モデルを用いた *in vivo* 試験においても抗腫瘍効果を示すことが報告されている (非特許文献 10)。

その一方で別のグループは、血管新生を阻害することが知られているプラスミノーゲンの Kringle 5 (K5) と呼ばれるドメインが認識する標的分子を探索し、その結果、
20 K5 の標的が血管内皮細胞に発現する GRP78 タンパク質であることを明らかにしている (非特許文献 16)。さらにリコンビナント K5 が、GRP78 を介して、血管新生阻害反応のみならず、低酸素下で培養した各種癌細胞株に対して細胞死を誘導することを示している (非特許文献 16)。

このように、これら一連の実験から、癌細胞や血管内皮細胞の細胞表面に発現する
25 GRP78 に結合するペプチドが、抗腫瘍剤として有用であることが示されている。しかしながら、これらのペプチドが、細胞表面に発現していると思われる GRP78 のどの部分を認識しているのかまでは明らかにされておらず、このペプチドを利用した医薬品開発への応用は難しいと考えられる。

また、これらの知見とは別に、まったく異なる 2 つのグループが、それぞれ違ったアプローチにより、GRP78 が細胞膜に局在することを報告している。

あるグループは、受容体認識型 $\alpha 2$ マクログロブリン ($\alpha 2M^*$) が、前立腺癌細胞株
5 (1-LN) に対して増殖因子として機能することを示し (非特許文献 12)、その後、同一
のグループがその受容体が GRP78 であることを明らかにした (非特許文献 13)。この発見
により、長い間 ER タンパク質であると考えられていた GRP78 タンパク質が、その一方
で細胞膜上で増殖因子の受容体としても機能しているという新たな知見が加えられた
。

10

さらに別のグループは、前立腺癌の患者由来血清中に、“CNVSDKSC” というペプチド
配列を認識する抗体 (抗 CNVSDKSC 抗体) が存在することを突き止め、この抗体が認識
する抗原タンパク質を解析した結果、これが GRP78 タンパク質であることを明らかに
している (非特許文献 14)。しかしながら、実際 “CNVSDKSC” という配列、あるいはそ
15 れに類似の配列は GRP78 の内部には存在せず、この患者由来の抗体が、GRP78 のどの部
分を認識しているのかはこの時点では不明であった。

その後、別のグループが、この “CNVSDKSC” というペプチドの三次元構造を解析し
、GRP78 の構造中に同様の三次元構造を有する領域がないか検索を行った。その結果、
20 GRP78 の Leu⁹⁸-Leu¹¹⁵ に位置する “LIGRTWNDPSVQQDIKFL” という配列が、この配列に相
当することを発見した。そこでこの配列に対するウサギポリクローナル抗体を作製し
た結果、この抗体が前立腺癌株 1-LN、DU145、メラノーマ細胞株 DM413 といった癌細胞
の細胞表面を染色することが確認された。さらに、この抗体は前立腺癌細胞株に対し
て、 $\alpha 2M^*$ 添加時に見られるような、細胞内カルシウム濃度の上昇、細胞増殖の誘導、
25 そして TNF α に対する抗アポトーシス作用を示すことが確認された (非特許文献 15)。
このように、GRP78 の Leu⁹⁸-Leu¹¹⁵ に対する抗体が $\alpha 2M^*$ のリガンド活性をミミックした
ことから、GRP78 中のこの領域が $\alpha 2M^*$ 結合配列であることが明らかになった (非特許
文献 15)。

この報告によって、GRP78 が前立腺癌などでは細胞表面に局在することが確実となり、さらに GRP78 の Leu⁹⁸-Leu¹¹⁵ (LIGRTWNDPSVQQDIKFL) が、 $\alpha 2M^*$ 結合部位として細胞外に露呈していることも明らかにされた。

さらに、別のアプローチから、GRP78 の 98-115 の領域に対する抗体が、癌細胞の細胞表面を染色することが報告されており、この領域が GRP78 の細胞外エピトープとなりうるということが明らかにされている。

このように GRP78 タンパク質が多くの癌種で発現上昇していること、さらに、それが細胞膜上へと局在が変化していることが明らかにされているが、これらの知見をもとにして GRP78 を標的にした新たな抗体治療薬の作製をするのは困難であった。なぜなら、第一に、上述の GRP78 結合ペプチドは GRP78 タンパク質のどの領域に結合しているのか不明であることから、ペプチドと同様の効果を期待できる抗体の作製が不可能であった。実際、そのようなペプチドの作用を代替できるようなモノクローナル抗体も実在しない。第二に、GRP78 の 98-115 の領域に結合する抗体は、癌細胞の細胞膜上に結合できるが、 $\alpha 2M^*$ の増殖促進作用をミミックしてしまうことから、この抗体の抗腫瘍活性は期待できない。

従って、GRP78 に結合する抗体を用いて腫瘍活性を阻害することは困難であると考えられていた。

- 20 非特許文献 1 : Lee AS. Trends Biochem Sci. 2001, 26, 504-10
非特許文献 2 : Patierno, et al. 1998, Cancer Res. 47, 6220-24
非特許文献 3 : Bini et al. 1997, Electrophoresis. 18, 2832-41
非特許文献 4 : Gazit et al. 1999, Breast Cancer Res. Treat. 54, 135-46
非特許文献 5 : Fernandez et al. 2000, Breast Cancer Res. Treat. 59, 15-26
25 非特許文献 6 : Reddy et al, J. Bio. Chem. 2003, 278, 20915-24
非特許文献 7 : Dong et al, 2005, Cancer Res. 65, 5785-5791
非特許文献 8 : Lee et al. 2006, Cancer Res. 66, 7849-7853
非特許文献 9 : Delpino et al. 1998, Molecular Membrane Biology, 15, 21-26

非特許文献 10 : Arap et al. 2004, CANCER CELL. 6, 275-284

非特許文献 11 : Javadpour et al. 1996, J. Med. Chem. 39, 3107-3113

非特許文献 12 : Asplin et al. 2000, Archives of Biochemistry and Biophysics. 383, 135-141

5 非特許文献 13 : Misra et al. 2002, J. Biol. Chem. 277, 42082-42087

非特許文献 14 : Mintz et al. 2003, Nat Biotech. 21, 57-63

非特許文献 15 : Gonzalez-Gronow et al. 2006, Cancer Res. 66, 11424-11431

非特許文献 16 : Davidoson et al., 2005, Cancer Res. 65, 4663-4672

発明の開示

10 発明が解決しようとする課題

本発明は、抗 GRP78 抗体を用いた新規な医薬組成物を提供することを目的とする。より詳細には、抗 GRP78 抗体を用いた癌を治療する新規方法、抗 GRP78 抗体を含む新規な細胞増殖抑制剤および抗癌剤、ならびに新規な抗 GRP78 抗体を提供することを目的とする。

15 課題を解決するための手段

本発明者は、癌細胞で局在が細胞膜へと変化している GRP78 を標的にした抗腫瘍抗体の作製を試みた。そのためにはまず、癌細胞において細胞表面上に露呈した抗体のエピトープとなりうるアミノ酸を同定する必要があった。そこで、GRP78 タンパク質を精製し、これをマウスに免疫し、癌細胞を染色する抗体だけの選抜を行った。その結果、癌細胞の細胞表面特異的に結合する抗 GRP78 抗体を得ることに成功した。次に、得られた抗体の認識する配列の同定を試みた。この解析により、この抗体は GRP78 の 376-415 の 40 アミノ酸を特異的に認識していることを明らかにした。すなわち、GRP78 の 376-415 アミノ酸領域が細胞外に露呈していることが明らかになった。次にこのエピトープを認識する抗体が、細胞内に速やかにインターナライズされることを確認した。この抗体にトキシンを付加した scFv 抗体を作製し、in vitro で癌細胞株におけるその作用を解析した結果、得られたトキシン標識 scFv 抗体が癌細胞を特異的に殺傷することを明らかにした。さらに、癌細胞を移植したゼノグラフトマウスモデルを用い抗体の作用を解析したところ、抗体投与により移植した腫瘍の優位な増殖抑制が観察

された。これらの結果より、本抗体が *in vitro* ばかりでなく *in vivo* においても抗腫瘍活性を発揮できることが確認された。以上の知見により、GRP78 の細胞外領域に対する抗体が、抗腫瘍剤として有用であることを見出した。

以上の知見に基づいて、本発明の発明者らは、上記の課題を解決することができることを明らかにした。

具体的には、以下の (1) ~ (28) に記載する態様を提供する。

(1) グルコース制御タンパク質 78 (glucose-regulated protein 78 ; GRP78) に結合する抗体を含む、医薬組成物。

(2) 抗癌剤である、(1) 記載の組成物。

10 (3) 抗体がモノクローナル抗体である、(1) または (2) に記載の組成物。

(4) 抗体が細胞表面に局在した GRP78 に結合する抗体である、(1) ~ (3) いずれかに記載の組成物。

(5) 抗体が GRP78 を発現する細胞にインターナライズされる抗体である、(1) ~ (4) のいずれかに記載の組成物。

15 (6) 抗体が SEQ ID NO: 3 に記載のエピトープに結合する抗体である、(1) ~ (5) のいずれかに記載の組成物。

(7) 抗体が細胞障害性物質が結合した抗体である、(1) ~ (6) のいずれかに記載の組成物。

(8) GRP78 に結合する、モノクローナル抗体。

20 (9) 細胞表面に発現した GRP78 に結合することを特徴とする、(8) に記載の抗体。

(10) GRP78 を発現する細胞にインターナライズされることを特徴とする、(8) または (9) に記載の抗体。

(11) SEQ ID NO: 3 に記載のエピトープに結合することを特徴とする、(8) ~ (10) のいずれかに記載の抗体。

(12) 以下の (a) ~ (f) のいずれかの抗体：

(a) CDR1 として SEQ ID NO: 8 に記載のアミノ酸配列を有し、CDR2 として SEQ ID NO: 9 に記載のアミノ酸配列を有し、CDR3 として SEQ ID NO: 10 に記載のアミノ酸配

列を有する重鎖可変領域と、CDR1としてSEQ ID NO: 11に記載のアミノ酸配列を有し、CDR2としてSEQ ID NO: 12に記載のアミノ酸配列を有し、CDR3としてSEQ ID NO: 13に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を有する抗体；

(b) CDR1としてSEQ ID NO: 18に記載のアミノ酸配列を有し、CDR2としてSEQ ID NO: 19に記載のアミノ酸配列を有し、CDR3としてSEQ ID NO: 20に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域と、CDR1としてSEQ ID NO: 21に記載のアミノ酸配列を有し、CDR2としてSEQ ID NO: 22に記載のアミノ酸配列を有し、CDR3としてSEQ ID NO: 23に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を有する抗体；

(c) CDR1としてSEQ ID NO: 61に記載のアミノ酸配列を有し、CDR2としてSEQ ID NO: 62に記載のアミノ酸配列を有し、CDR3としてSEQ ID NO: 63に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域と、CDR1としてSEQ ID NO: 64に記載のアミノ酸配列を有し、CDR2としてSEQ ID NO: 65に記載のアミノ酸配列を有し、CDR3としてSEQ ID NO: 66に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を有する抗体；

(d) CDR1としてSEQ ID NO: 71に記載のアミノ酸配列を有し、CDR2としてSEQ ID NO: 72に記載のアミノ酸配列を有し、CDR3としてSEQ ID NO: 73に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域と、CDR1としてSEQ ID NO: 74に記載のアミノ酸配列を有し、CDR2としてSEQ ID NO: 75に記載のアミノ酸配列を有し、CDR3としてSEQ ID NO: 76に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を有する抗体；

(e) CDR1としてSEQ ID NO: 81に記載のアミノ酸配列を有し、CDR2としてSEQ ID NO: 82に記載のアミノ酸配列を有し、CDR3としてSEQ ID NO: 83に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域と、CDR1としてSEQ ID NO: 84に記載のアミノ酸配列を有し、CDR2としてSEQ ID NO: 85に記載のアミノ酸配列を有し、CDR3としてSEQ ID NO: 86に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を有する抗体；

(f) CDR1としてSEQ ID NO: 91に記載のアミノ酸配列を有し、CDR2としてSEQ ID NO: 92に記載のアミノ酸配列を有し、CDR3としてSEQ ID NO: 93に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域と、CDR1としてSEQ ID NO: 94に記載のアミノ酸配列を有し、CDR2としてSEQ ID NO: 95に記載のアミノ酸配列を有し、CDR3としてSEQ ID NO: 96に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を有する抗体；

が認識するエピトープと同じエピトープを認識することを特徴とする、(8) ~ (10) いずれかに記載の抗体。

(13) GRP78 を発現する細胞に対して細胞障害活性を有することを特徴とする、(8) ~ (12) いずれかに記載の抗体。

5 (14) 細胞障害性物質が結合していることを特徴とする、(13) に記載の抗体。

(15) 抗 GRP78 抗体を用いて細胞障害性物質を細胞内に送達する方法。

(16) 抗 GRP78 抗体に結合した細胞障害性物質により細胞の増殖を抑制する方法

。

(17) 細胞が癌細胞である、(15) または (16) に記載の方法。

10 (18) 細胞障害性物質を細胞内へ送達する為の抗 GRP78 抗体の使用。

(19) 細胞の増殖を抑制する為の、インターナライズ活性を有する抗 GRP78 抗体の使用。

(20) 細胞が癌細胞である、(18) または (19) に記載の使用。

(21) 抗 GRP78 抗体に細胞障害性物質が結合していることを特徴とする、(18) ~

15 (20) のいずれかに記載の使用。

(22) 以下の工程：

(a) GRP78 抗体を提供する工程、

(b) (a) の抗体がインターナライズ活性を有するか否か確認する工程、

(c) インターナライズ活性を有する工程を選択する工程、

20 (d) (c) で選択された抗体に細胞障害性物質を結合する工程。

を含む医薬組成物の製造方法。

(23) 医薬組成物が抗癌剤である、(22) に記載の製造方法。

(24) 抗 GRP78 抗体を用いた癌の診断方法。

(25) 標識物質が結合した抗 GRP78 抗体を用いることを特徴とする、(24) 記載の

25 診断方法。

(26) 細胞内に取り込まれた抗 GRP78 抗体を検出することを特徴とする、(24) または (25) に記載の診断方法。

(27) 標識物質が結合した抗 GRP78 抗体。

(28) SEQ ID NO: 3 のアミノ酸配列からなるポリペプチド又はその断片。

発明の効果

本発明は、GRP78 への結合活性を有し、かつインターナライズすることができる新規な抗体を提供することにより、GRP78 を細胞表面に露出している種々の腫瘍や癌を治療
5 するために使用することができる新規な医薬組成物を提供することができることを示した。また、この様な特性を有する抗体を使用することにより、種々の腫瘍や癌の診断方法を提供することができる。

図面の簡単な説明

〔図 1〕 図 1 は、得られた抗体の GRP78 への結合活性をウエスタンブロットにより
10 解析した図である。レーン 1 に DU145 細胞より調製した細胞可溶化サンプル (cell lysate)、レーン 2 に大腸菌より精製した GST 融合 GRP78 タンパク質を流し、各抗体で染色した。AS (anti serum) は細胞融合する前に採取したマウスの抗血清である。

〔図 2〕 図 2 は、得られた抗 GRP78 抗体の DU145 細胞の細胞表面に対する結合活性を FACS により解析した図である。

15 〔図 3〕 図 3 は、GA-20 抗体の各種癌細胞の細胞表面に対する結合活性を FACS により解析した図である。

〔図 4〕 図 4 は、(A) GA-20 抗体の各種不死化細胞株の細胞表面に対する結合活性を FACS により解析した図；および (B) 各種不死化細胞株における GRP78 タンパク質の発現を GA-20 を使ってウエスタンブロットを行い解析した図である。

20 〔図 5〕 図 5 は、GA-20、GA-21 抗体の細胞内へのインターナライズ活性を FACS により解析した図である。各抗体を DU145 細胞に反応させ、0℃、あるいは 37℃で 2 時間インキュベートした後、細胞表面に結合している抗体を二次抗体 (FITC 標識抗マウス IgG 抗体) で検出した。

〔図 6〕 図 6 は、DU145 の細胞表面に結合する GA-20 抗体、そして結合しない GA-31
25 抗体が細胞内に取り込まれるかを細胞免疫染色により解析した図である。各抗体を培養中の DU145 細胞に添加し、37℃で 3 時間培養を続けた。その後、下にしたスキームに従って細胞を処理し、細胞内に取り込まれた抗体を検出した。

〔図 7〕 図 7 は、GRP78 に結合する各抗体のエピトープをウエスタンブロットによ

り解析した図である。上段は、エピトープ解析に用いた GST 融合 GRP78 タンパク質 (1~6) の模式図である。下段は、それぞれの GST 融合 GRP78 タンパク質 (1~6) を SDS-PAGE し、各タンパク質に対する各抗体の反応性を解析したウエスタンブロットの結果を示す。

5 [図 8] 図 8 は、GA-20、GA-21 の GRP78 内のエピトープをさらに絞り込むために実施したウエスタンブロットの結果を示した図である。上段は、より狭い範囲に限定した GST 融合 GRP78 タンパク質の模式図である。下段は、それぞれの GST 融合 GRP78 タンパク質 (1~5) を SDS-PAGE し、各タンパク質に対する GA-20、GA-21 抗体の反応性を解析したウエスタンブロットの結果を示す。

10 [図 9] 図 9 は、大腸菌より精製したトキシン標識 GA-20 scFv 抗体 (GA20-PE40) がどのフラクションに溶出されているかを、GRP78 に対する結合活性を指標にした ELISA 系により検出し、解析した結果を示す。上段に、GA20-PE40 の GRP78 への結合活性を検出する ELISA の系を表した模式図を、下段に ELISA の結果得られた溶出フラクション結合活性を示す。

15 「Initial」は、GA20-PE40 の発現誘導を行った大腸菌ライセートを、「pass」は HisTrap カラムにアプライしたライセートのカラム素通りフラクションを、「wash」はカラムの洗浄フラクションを、そして、「elute 1」~「elute 7」は、カラムからの溶出フラクションを示す。

[図 10] 図 10 は、精製した GA20-PE40 の、DU145 細胞 (図 10A)、22Rv1 細胞 (20 図 10B)、または DG44 細胞 (図 10C) に対する細胞障害活性を示す図である。各細胞に溶出フラクション (elute 2、3、4) を 10% 濃度で添加し、その後生細胞の数を測定し、PBS 添加群における細胞数に対する割合を数値化した。

[図 11] 図 11 は、得られた抗 GRP78 抗体の 22Rv1 細胞の細胞表面に対する結合活性を FACS により解析した図である。

25 [図 12] 図 12(A) は、GA-20 抗体、そして再免疫により新たに得られた 4 種類の抗体 (GC-18 抗体、GC-20 抗体、GD-4 抗体、GD-17 抗体) のエピトープ解析に用いた GST 融合 GRP78 タンパク質の模式図である。図 12(B) は、各 GST 融合 GRP78 タンパク質が、IPTG 添加により大腸菌で発現誘導されていることを SDS-PAGE し、CBB 染色で確認した

結果である。

〔図 1 3〕 図13は、各抗体のエピトープをウエスタンブロットにより解析した図である。各GST融合GRP78タンパク質をSDS-PAGEし、各抗体の反応性を解析したウエスタンブロットの結果を示す。下の表は、ウエスタンブロットの結果から各抗体のエピ
5 トープを示したものである。

〔図 1 4〕 図14は、精製したGD17scFv-PE40の純度を調べるため、精製GD17scFv-PE40をSDS-PAGE後、CBB染色した図である。

〔図 1 5〕 図 15 は、精製した GD17scFv-PE40 の GRP78 タンパク質に対する結合活性、およびタンパク質の安定性を解析するため実施した ELISA の結果を示す。4℃保存
10 、37℃で一晩置いたもの、および、凍結融解を行った GD17scFv-PE40 を各濃度に希釈し、GST-GRP78 に対する結合活性を ELISA により解析した。下の表は、各標品の GRP78 タンパク質に対する結合活性を EC_{50} 値で示したものである。

〔図 1 6 A〕 図 16A は、精製した GD17scFv-PE40 の各種細胞株に対する細胞障害活性の結果を示したものである。GD17scFv-PE40 を各濃度に希釈し、癌細胞株（図 16A
15 ）に添加し、数日間培養後、生細胞数を解析した。最大活性の 50%の活性を与える抗体濃度（ EC_{50} 値）を表に示してある。

〔図 1 6 B〕 図 16B は、精製した GD17scFv-PE40 の各種細胞株に対する細胞障害活性の結果を示したものである。GD17scFv-PE40 を各濃度に希釈し、正常細胞株（図 16B）に添加し、数日間培養後、生細胞数を解析した。最大活性の 50%の活性を与える
20 抗体濃度（ EC_{50} 値）を表に示してある。

〔図 1 7〕 図 17 は、各種細胞株における GRP78 タンパク質の発現を GD-17 抗体を使ってウエスタンブロットを行い解析した図である。

〔図 1 8〕 図 18 は、GD17scFv-PE40 の、in vivo マウス移植モデルでの抗腫瘍活性を解析した結果である。22Rv1 を移植後（day0）、day17、day21、day23、day26、お
25 よび day29 に PBS（ビヒクル）あるいは GD17scFv-PE40 を 0.5 mg/kg で投与し（各矢印）、その後経時的に腫瘍体積を測定した。

発明の実施の形態

本発明の抗 GRP78 抗体は、GRP78 タンパク質（SEQ ID NO: 2）に結合する抗体であれ

ばよく、その由来（マウス、ラット、ヒト、等）、種類（モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体）および形状（改変抗体、低分子化抗体、修飾抗体、など）等は問われない。

本発明で用いられる抗 GRP78 抗体は特異的に GRP78 に結合することが好ましい。又
5、本発明で用いられる抗 GRP78 抗体はモノクローナル抗体であることが好ましい。

GRP78 は癌細胞などにおいて細胞膜上に局在することが知られている。本発明で用いられる抗 GRP78 抗体の好ましい態様の一つとして、GRP78 が細胞膜上に局在した際に細胞外に露呈される領域を認識する抗体を挙げることができる。

10 そのような抗体は、例えば、GRP78 タンパク質（SEQ ID NO: 2）を免疫原として抗体を作製し、作製された抗体の中から GRP78 を細胞膜上に発現する癌細胞（例えば、前立腺癌細胞株 DU145 など）に結合可能な抗体を選択すること等により取得することが可能である。より具体的には実施例に記載の方法などにより、GRP78 が細胞膜上に局在した際に細胞外に露呈される領域を認識する抗体を取得することが可能である。

15 本発明において GRP78 が細胞膜上に局在した際に細胞外に露呈する領域は、抗体がその領域に結合した際に $\alpha 2$ マクログロブリンの増殖促進作用がミミックされない領域であることが好ましく、特に GRP78 の 98 位から 115 位の領域以外の領域が好ましい。

GRP78 が細胞膜上に局在した際に細胞外に露呈される領域の好ましい例として、SEQ
20 ID NO: 2 のアミノ酸配列において 376 位から 415 位までの領域（SEQ ID NO: 3）を挙げることができる。従って、GRP78 が細胞膜上に局在した際に細胞外に露呈される領域を認識する抗体の好ましい例としては、GRP78 の 376 位から 415 位までの領域を認識する抗体を挙げることができる。GRP78 タンパク質のアミノ酸 376 位から 415 位までの領域を認識する抗体の例として、特に限定されないが、アミノ酸 384 位から 391 位（す
25 なわち、SEQ ID NO: 3 のアミノ酸 9～16）を認識する抗体、アミノ酸 392 位から 407 位（すなわち、SEQ ID NO: 3 のアミノ酸 17～32）を認識する抗体、アミノ酸 400 位から 415 位（すなわち、SEQ ID NO: 3 のアミノ酸 25～40）を認識する抗体、などを挙げることができる。抗体が目的のエピトープを認識するか否かは当業者に公知の方法に

より確認することが可能であり、例えば、実施例に記載の方法により確認することが可能である。

- 本発明で用いられる抗体の好ましい他の態様としてインターナライズ活性を有する
- 5 抗体を挙げることができる。本発明において「インターナライズ活性を有する抗体」とは、細胞表面上に局在した GRP78 に結合した際に細胞内（細胞質内、小胞内、他の小器官内など）に輸送される抗体を意味する。

- 抗体がインターナライズ活性を有するか否かは当業者に公知の方法を用いて確認することができる。例えば、標識物質を結合した抗 GRP78 抗体を GRP78 を発現する細胞（
- 10 例えば、前立腺癌細胞株 DU145 など）に接触させ該標識物質が細胞内に取り込まれたか否かを確認する方法、細胞障害性物質を結合した抗 GRP78 抗体を GRP78 を発現する細胞に接触させ該 GRP78 発現細胞に細胞死が誘導されたか否かを確認する方法、などにより確認することができる。より具体的には実施例に記載の方法などにより抗体がインターナライズ活性を有するか否かを確認することが可能である。

15

- 本発明において、特に好ましい抗体として、GRP78 が細胞膜上に局在した際に細胞外に露呈される領域を認識し、かつインターナライズ活性を有する抗体を挙げることができる。そのような抗体は、まず GRP78 が細胞膜上に局在した際に細胞外に露呈される領域を認識する抗体を上述の方法により選択し、その後、選択された抗体の中から
- 20 インターナライズ活性を有する抗体をさらに選択することにより取得することが可能である。

本発明に用いられる好ましい抗体の例として、例えば、以下（a）から（s）の抗体を挙げることができる。

- 25 (a) CDR1 として SEQ ID NO: 8 のアミノ酸配列、CDR2 として SEQ ID NO: 9 のアミノ酸配列、CDR3 として SEQ ID NO: 10 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を含む抗体。

- (b) CDR1 として SEQ ID NO: 11 のアミノ酸配列、CDR2 として SEQ ID NO: 12 の

アミノ酸配列、CDR3 として SEQ ID NO: 13 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含む抗体。

(c) (a) の重鎖可変領域と (b) の軽鎖可変領域を含む抗体。

(d) CDR1 として SEQ ID NO: 18 のアミノ酸配列、CDR2 として SEQ ID NO: 19 の
5 アミノ酸配列、CDR3 として SEQ ID NO: 20 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を含む抗体。

(e) CDR1 として SEQ ID NO: 21 のアミノ酸配列、CDR2 として SEQ ID NO: 22 のアミノ酸配列、CDR3 として SEQ ID NO: 23 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含む抗体。

10 (f) (d) の重鎖可変領域と (e) の軽鎖可変領域を含む抗体。

(g) CDR1 として SEQ ID NO:61 のアミノ酸配列、CDR2 として SEQ ID NO:62 のアミノ酸配列、CDR3 として SEQ ID NO:63 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を含む抗体。

(h) CDR1 として SEQ ID NO:64 のアミノ酸配列、CDR2 として SEQ ID NO:65 のア
15 ミノ酸配列、CDR3 として SEQ ID NO:66 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含む抗体。

(i) (g) の重鎖可変領域と (h) の軽鎖可変領域を含む抗体。

(j) CDR1 として SEQ ID NO:71 のアミノ酸配列、CDR2 として SEQ ID NO:72 のア
ミノ酸配列、CDR3 として SEQ ID NO:73 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を含む抗
20 体。

(k) CDR1 として SEQ ID NO:74 のアミノ酸配列、CDR2 として SEQ ID NO:75 のアミノ酸配列、CDR3 として SEQ ID NO:76 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含む抗体。

(l) (j) の重鎖可変領域と (k) の軽鎖可変領域を含む抗体。

25 (m) CDR1 として SEQ ID NO:81 のアミノ酸配列、CDR2 として SEQ ID NO:82 のアミノ酸配列、CDR3 として SEQ ID NO:83 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を含む抗体。

(n) CDR1 として SEQ ID NO:84 のアミノ酸配列、CDR2 として SEQ ID NO:85 のア

ミノ酸配列、CDR3 として SEQ ID NO:86 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含む抗体。

(o) (m) の重鎖可変領域と (n) の軽鎖可変領域を含む抗体。

(p) CDR1 として SEQ ID NO:91 のアミノ酸配列、CDR2 として SEQ ID NO:92 のア
5 ミノ酸配列、CDR3 として SEQ ID NO:93 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を含む抗体。

(q) CDR1 として SEQ ID NO:94 のアミノ酸配列、CDR2 として SEQ ID NO:95 のア
ミノ酸配列、CDR3 として SEQ ID NO:96 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含む抗体。

10 (r) (p) の重鎖可変領域と (q) の軽鎖可変領域を含む抗体。

(s) (a) から (r) のいずれかの抗体が認識するエピトープと同じエピトープを
認識する抗体。

ある抗体と同じエピトープを認識する抗体は、例えば、以下の方法により得ることができる。

15 被検抗体が、ある抗体とエピトープを共有することは、両者の同じエピトープに対する競合によって確認することができる。抗体間の競合は、交叉ブロッキングアッセイなどによって検出される。例えば競合 ELISA アッセイは、好ましい交叉ブロッキングアッセイである。具体的には、交叉ブロッキングアッセイにおいては、マイクロタイタープレートのウェル上にコートした GRP78 タンパク質を、候補の競合抗体の存在
20 下、または非存在下でプレインキュベートした後に、本発明の抗 GRP78 抗体が添加される。ウェル中の GRP78 タンパク質に結合した本発明の抗 GRP78 抗体の量は、同じエピトープへの結合に対して競合する候補競合抗体（被検抗体）の結合能に間接的に相関している。すなわち同一エピトープに対する被検抗体の親和性が大きくなればなる程、本発明の抗 GRP78 抗体の GRP78 タンパク質をコートしたウェルへの結合量は低下
25 し、被検抗体の GRP78 タンパク質をコートしたウェルへの結合量は増加する。

ウェルに結合した抗体量は、予め抗体を標識しておくことによって、容易に測定することができる。たとえば、ビオチン標識された抗体は、アビジンペルオキシダーゼコンジュゲートと適切な基質を使用することにより測定できる。ペルオキシダーゼな

どの酵素標識を利用した交叉ブロッキングアッセイを、特に競合 ELISA アッセイと言う。抗体は、検出あるいは測定が可能な他の標識物質で標識することができる。具体的には、放射標識あるいは蛍光標識などが公知である。

更に被検抗体が本発明の抗 GRP78 抗体と異なる種に由来する定常領域を有する場合
5 には、ウェルに結合した抗体の量を、その抗体の定常領域を認識する標識抗体によって測定することもできる。あるいは同種由来の抗体であっても、クラスが相違する場合
10 には、各クラスを識別する抗体によって、ウェルに結合した抗体の量を測定することができる。

候補の競合抗体非存在下で実施されるコントロール試験において得られる結合活性
10 と比較して、候補抗体が、少なくとも 20%、好ましくは少なくとも 20-50%、さらに好ましくは少なくとも 50%、抗 GRP78 抗体の結合をブロックできるならば、該候補競合抗体は本発明の抗 GRP78 抗体と実質的に同じエピトープに結合するか、又は同じエ
15 ピトープへの結合に対して競合する抗体である。

15 本発明で用いられる抗体の好ましい他の態様の一つとして、細胞障害性物質が結合した抗体を挙げる
20 ことができる。細胞障害性物質が結合した抗体が細胞内に取り込まれた場合、細胞障害性物質によって該抗体を取り込んだ細胞に殺傷作用や細胞死を誘導することが可能である。従って、細胞障害性物質が結合した抗体は、さらにインターナライズ活性を有することが好ましい。

20 本発明の細胞障害性物質が結合した抗 GRP78 抗体の好ましい態様として、例えば、GRP78 を発現する癌細胞 (DU145、22Rv1、MCF7、など) に対して、傷害活性を有する又は細胞死を誘導する抗体を挙げる
25 ことができる。

本発明で用いられる細胞障害性物質は細胞に殺傷作用や細胞死を誘導できるものであれば如何なる物質でもよく、例えば、トキシン、放射性物質、化学療法剤などを
25 挙げる
30 ことができる。これらの本発明における細胞障害性物質は、生体内で活性な細胞障害性物質に変換されるプロドラッグを含む。プロドラッグの活性化は酵素的な変換であっても、非酵素的な変換であっても良い。

本発明においてトキシンとは、微生物、動物又は植物由来の細胞毒性を示す種々のタンパク質やポリペプチド等を意味する。本発明で用いられるトキシンとしては、例えば、次のものを挙げることができる。ジフテリアトキシン A 鎖 (Diphtheria toxin A Chain) (Langone J. J., et al., *Methods in Enzymology*, 93, 307-308, 1983)、シュードモナスエンドトキシン (Pseudomonas Exotoxin) (*Nature Medicine*, 2, 350-353, 1996)、リシン鎖 (Ricin A Chain) (Fulton R. J., et al., *J. Biol. Chem.*, 261, 5314-5319, 1986; Sivam G., et al., *Cancer Res.*, 47, 3169-3173, 1987; Cumber A. J. et al., *J. Immunol. Methods*, 135, 15-24, 1990; Wawrzynczak E. J., et al., *Cancer Res.*, 50, 7519-7562, 1990; Gheeite V., et al., *J. Immunol. Methods*, 142, 223-230, 1991);

10 無糖鎖リシン A 鎖 (Deglycosylated Ricin A Chain) (Thorpe P. E., et al., *Cancer Res.*, 47, 5924-5931, 1987); アブリン A 鎖 (Abrin A Chain) (Wawrzynczak E. J., et al., *Br. J. Cancer*, 66, 361-366, 1992; Wawrzynczak E. J., et al., *Cancer Res.*, 50, 7519-7562, 1990; Sivam G., et al., *Cancer Res.*, 47, 3169-3173, 1987; Thorpe P. E., et al., *Cancer Res.*, 47, 5924-5931, 1987); ゲロニン (Gelonin) (Sivam G., et al.,

15 *Cancer Res.*, 47, 3169-3173, 1987; Cumber A. J. et al., *J. Immunol. Methods*, 135, 15-24, 1990; Wawrzynczak E. J., et al., *Cancer Res.*, 50, 7519-7562, 1990; Bolognesi A., et al., *Clin. exp. Immunol.*, 89, 341-346, 1992); ポークウイード抗ウィルスタンパク質 (PAP-s; Pokeweed anti-viral protein from seeds) (Bolognesi A., et al., *Clin. exp. Immunol.*, 89, 341-346, 1992); ブリオジン (Briodin) (Bolognesi A., et

20 al., *Clin. exp. Immunol.*, 89, 341-346, 1992); サポリン (Saporin) (Bolognesi A., et al., *Clin. exp. Immunol.*, 89, 341-346, 1992); モモルジン (Momordin) (Cumber A. J., et al., *J. Immunol. Methods*, 135, 15-24, 1990; Wawrzynczak E. J., et al., *Cancer Res.*, 50, 7519-7562, 1990; Bolognesi A., et al., *Clin. exp. Immunol.*, 89, 341-346, 1992); モモルコキン (Momorcochin) (Bolognesi A., et al., *Clin. exp. Immunol.*,

25 89, 341-346, 1992); ジアンシン 32 (Dianthin 32) (Bolognesi A., et al., *Clin. exp. Immunol.*, 89, 341-346, 1992); ジアンシン 30 (Dianthin 30) (Stirpe F., Barbieri L., *FEBS letter* 195, 1-8, 1986); モデッシン (Modeccin) (Stirpe F., Barbieri L., *FEBS letter* 195, 1-8, 1986); ビスカミン (Viscumin) (Stirpe F., Barbieri L., *FEBS*

letter 195, 1-8, 1986); ボルケシン (Volkesin) (Stirpe F., Barbieri L., FEBS letter 195, 1-8, 1986); ドデカンドリン (Dodecandrin) (Stirpe F., Barbieri L., FEBS letter 195, 1-8, 1986); トリチン (Tritin) (Stirpe F., Barbieri L., FEBS letter 195, 1-8, 1986); ルフィン (Luffin) (Stirpe F., Barbieri L., FEBS letter 195, 1-8, 1986 5); トリコキリン (Trichokirin) (Casellas P., et al., Eur. J. Biochem. 176, 581-588, 1988; Bolognesi A., et al., Clin. exp. Immunol., 89, 341-346, 1992)。

本発明において放射性物質とは、放射性同位体を含む物質のことをいう。放射性同位体は特に限定されず、如何なる放射性同位体を用いてもよいが、例えば、 ^{32}P 、 ^{14}C 、 ^{125}I 、 ^3H 、 ^{131}I 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re などを用いることが可能である。

10

本発明において化学療法剤とは、上記のトキシン、放射性物質以外の細胞障害活性を有する物質を意味し、サイトカイン、抗腫瘍剤、酵素などが含まれる。本発明で用いられる化学療法剤は特に限定されないが、低分子量の化学療法剤が好ましい。分子量が小さい場合、抗体への結合の後も、抗体の機能に干渉する可能性が低いと考えら
15 れる。本発明において、低分子量の化学療法剤とは、通常 100~2000、好ましくは 200~1000 の分子量を有する。本発明においては特に限定されないが、例えば、以下の化学療法剤を用いることができる。メルファラン (Melphalan) (Rowland G.F., et al., Nature 255, 487-488, 1975); シスプラチン (Cis-platinum) (Hurwitz E. and Haimovich J., Method In Enzymology 178, 369-375, 1986; Schechter B., et al., Int. J. Cancer
20 48, 167-172, 1991); カルボプラチン (Carboplatin) (Ota, Y., et al., Asia-Oceania J. Obstet. Gynaecol. 19, 449-457, 1993); マイトマイシン C (Mitomycin C) (Noguchi, A., et al., Bioconjugate Chem. 3, 132-137, 1992); アドリアマイシン (Adriamycin (Doxorubicin)) (Shih, L.B., et al., Cancer Res. 51 4192-4198, 1991; Zhu, Z., et al., Cancer Immunol. Immunother 40, 257-267, 1995; Trail, P.A., et al., Science
25 261, 212-215, 1993; Zhu, Z., et al., Cancer Immunol. Immunother 40, 257-267, 1995; Kondo, Y., et al., Jpn. J. Cancer Res. 86 1072-1079, 1995; Zhu, Z., et al., Cancer Immunol. Immunother 40, 257-267, 1995; Zhu, Z., et al., Cancer Immunol. Immunother 40, 257-267, 1995); ダウノルビシン (Daunorubicin) (Dillman, R.O., et al., Cancer

Res. 48, 6097-6102, 1988 ; Hudecz, F., et al., Bioconjugate Chem. 1, 197-204, 1990 ; Tukada Y. et al., J.Natl. Cancer Inst. 75, 721-729, 1984) ; ブレオマイシン (Bleomycin) (Manabe, Y., et al., Biochem.Biophys.Res.Comm. 115, 1009-1014, 1983) ; ネオカルチノスタチン (Neocarzinostatin) (Kitamura K., et al., Cancer Immunol.Immunother 36, 177-184, 1993 ; Yamaguchi T., et al., Jpn. J.Cancer Res. 85, 167-171, 1994) ; メトトレキサート (Methotrexate) (Kralovec, J., et al., Cancer Immunol.Immunother 29, 293-302, 1989 ; Kulkarni, P.N., et al., Cancer Res. 41, 2700-2706, 1981 ; Shin, L.B., et al., Int.J.Cancer 41, 832-839, 1988 ; Gamett M.C., et al., Int.J.Cancer 31, 661-670, 1983) ; 5-フルオロウリジン (5-Fluorouridine) (Shin, L.B., Int.J.Cancer 46, 1101-1106, 1990) ; 5-フルオロ-2'-デオキシウリジン (5-Fluoro-2'-deoxyuridine) (Goerlach A., et al., Bioconjugate Chem. 2, 96-101, 1991) ; シトシンアラビノシド (Cytosine arabinoside) (Hurwitz E., et al., J.Med.Chem. 28, 137-140, 1985) ; アミノプテリン (Aminopterin) (Kanellos J., et al., Immunol.Cell.Biol. 65, 483-493, 1987) ; ビンクリスチン (Vincristine) (Johnson J.R., et al., Br.J.Cancer 42, 17, 1980) ; ビンデシン (Vindesine) (Johnson J.R., et al., Br.J.Cancer 44, 472-475, 1981) ; インターロイキン 2 (IL-2)、腫瘍壊死因子アルファ (TNF α)、インターフェロン (INF)、カルボキシペプチダーゼ (Carboxypeptidase)、アルカリフォスファターゼ (Alkaline Phosphatase)、ベータラクタマーゼ (β -lactamase)、シチジンデアミナーゼ (Cytidine deaminase)。

20

本発明において用いられる細胞障害性物質は一種類でもよいし、二種以上の細胞障害性物質が組み合わせられて用いられてもよい。

抗 GRP78 抗体と上記の細胞障害性物質との結合は共有結合または非共有結合等により行なうことができる。これら細胞障害性物質を結合した抗体の作製方法は公知である。

抗 GRP78 抗体と細胞障害性物質は、それら自身が有する連結基などを介して直接結合されてもよいし、また、リンカーや中間支持体などの他の物質を介して間接的に結

合されてもよい。抗 GRP78 抗体と細胞障害性物質が直接結合される場合の連結基は、例えば SH 基を用いたジスルフィド結合が挙げられる。具体的には抗体の Fc 領域の分子内ジスルフィド結合を還元剤、例えばジチオトレイトール等にて還元し、細胞障害性物質内のジスルフィド結合を同様に還元して、両者をジスルフィド結合にて結合する。結合前に活性化促進剤、例えばエルマン試薬 (Ellman's reagent) にて抗体か細胞障害性物質のいずれか一方を活性化させ両者のジスルフィド結合形成を促進してもよい。抗 GRP78 抗体と細胞障害性物質を直接結合するその他の方法としては、例えば、シッフ塩基を用いた方法、カルボジイミド法、活性エステル法 (N-hydroxysuccinimide 法)、Mixed anhydride を用いた方法、ジアゾ反応を用いた方法などを挙げることができる。

抗 GRP78 抗体と細胞障害性物質の結合は、他の物質を介して間接的に結合することも可能である。間接的に結合する為の他の物質は特に限定されず、例えば、アミノ基、カルボキシル基、メルカプト基等をいずれか 1 種類または 2 種類以上の組み合わせで 2 個以上有する化合物、ペプチドリinker、抗 GRP78 抗体への結合能を有する化合物などを挙げることができる。アミノ基、カルボキシル基、メルカプト基等をいずれか 1 種類または 2 種類以上の組み合わせで 2 個以上有する化合物の例としては、例えば、N-スクシニミジル 3-(2-ピリジリジチオ) プロピオネート (SPDP: N-Succinimidyl 3-(2-pyridylditio) propionate) (Wawrzynczak E.J., et al., Cancer Res., 50, 7519-7562, 1990; Thorpe P.E., et al., Cancer Res., 47, 5924-5931, 1987); スクシニミジル 6-3-[2-ピリジリジチオ] プロピオンアミド) ヘキサノエート (LC-SPDP: Succinimidyl 6-3-[2-pyridylditio] propinamide) hexanoate) (Hermanson G.T., BIOCONJUGATE Techniques, 230-232, 1996); スルホスクシニミジル 6-3-[2-ピリジリジチオ] プロピオンアミド) ヘキサノエート (Sulfo-LC-SPDP: Sulfosuccinimidyl 6-3-[2-pyridylditio] propinamide) hexanoate) (Hermanson G.T., BIOCONJUGATE Techniques, 230-232, 1996); N-スクシニミジル 3-(2-ピリジリジチオ) ブチレート (SPDB: N-Succinimidyl 3-(2-pyridylditio) butyrate) (Wawrzynczak E.J., et al., Br. J. Cancer, 66, 361-366, 1992); スクシニミジロキシカルボニル- α -(2-ピリジリ

ジチオ) トルエン (SMPT: Succinimidylloxycarbonyl- α -(2-pyridyldithio) toruene) (Thorpe P.E., et al., Cancer Res., 47, 5924-5931, 1987); スクシニミジル 6- (α -メチル)-[2-ピリジルジチオ]トルアミド) ヘキサノエート (LC-SMPT: Succinimidyl 6- (α -methyl- [2-pyridyldithio] toruamide) hexanoate) (Hermanson G.T.,

5 BIOCONJUGATE Techniques, 232-235, 1996); スルホスクシニミジロル 6- (α -メチル-[2-ピリジルジチオ]トルアミド) ヘキサノエート (Sulfo-LC-SMPT: Sulfosuccinimidyl 6- (α -methyl- [2-pyridyldithio] toruamide) hexanoate) (Hermanson G.T.,

BIOCONJUGATE Techniques, 232-235, 1996); スクシニミジル-4- (p-マレイミドフェニル) ブチレート (SMPB: Succinimidyl-4- (p-maleimidophenyl) butyrate) (Hermanson

10 G.T., BIOCONJUGATE Techniques, 242-243, 1996); スルホ-スクシニミジル 4- (p-マレイミドフェニル) ブチレート (Sulfo-SMPB: Sulfo-Succinimidyl-4- (p-maleimidophenyl) butyrate) (Hermanson G.T., BIOCONJUGATE Techniques, 242-243, 1996); m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシニミドエステル (MBS: m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester) (Hermanson G.T., BIOCONJUGATE

15 Techniques, 237-238, 1996); m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスルホスクシニミドエステル (Sulfo-MBS: m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysulfosuccinimide ester) (Hermanson G.T., BIOCONJUGATE Techniques, 237-238, 1996); S-アセチルメルカプトスクシニクアノヒドライド (SAMSA: S-Acetyl mercaptosuccinic anhydride) (Casellas P., et al., Eur. J. Biochem, 176, 581-588, 1988); ジメチル 3,3'-ジチオ

20 ビスプロリオニミデート (DTBP: Dimethyl 3, 3'-ditiobisprorionimide) (Casellas P., et al., Eur. J. Biochem, 176, 581-588, 1988); 2-イミノチオレーン (2-Iminotiolane) (Thorpe P.E., et al., Cancer Res., 47, 5924-5931, 1987) など

を挙げることができる。

抗 GRP78 抗体と細胞障害性物質との結合に用いられるその他の物質として、例えば

25 、ペプチド、抗体、ポリ L-グルタミン酸 (PGA)、カルボキシメチルデキストラン、デキストラン、アミノデキストラン、アビジン・ビオチン、シス・アコニット酸、グルタミン酸ジヒドラジド、ヒト血清アルブミン (HSA) 等を挙げることができる。

更に、タンパク質性の細胞障害性物質は、遺伝子工学的な手法によって抗体と結合

することも可能である。具体的には、たとえば上記細胞障害性ペプチドをコードする DNA と抗 GRP78 抗体をコードする DNA をインフレームで融合させて発現ベクター中に組み込んだ組換えベクターが構築できる。該ベクターを適切な宿主細胞に導入することにより得られる形質転換細胞を培養し、組み込んだ DNA を発現させて、毒性ペプチド

5 を結合した抗 GRP78 抗体を融合タンパク質として得ることができる。抗体との融合タンパク質を得る場合、一般に、抗体の C 末端側にタンパク質性の薬剤や毒素を配置される。抗体と、タンパク質性の薬剤や毒素の間には、ペプチドリinkerを介在させることもできる。

10 本発明の抗 GRP78 モノクローナル抗体は、公知の手段を用いて取得できる。本発明の抗 GRP78 抗体として、特に哺乳動物由来のモノクローナル抗体が好ましい。哺乳動物由来のモノクローナル抗体は、ハイブリドーマにより産生されるもの、および遺伝子工学的手法により抗体遺伝子を含む発現ベクターで形質転換した宿主により産生されるもの等を含む。

15 モノクローナル抗体産生ハイブリドーマは公知技術を使用して、例えば、以下のようにして作製できる。まず、GRP78 タンパク質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する。免疫動物から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て、ハイブリドーマを得る。更に、このハイブリドーマから、通常のスクリーニング法により、目的とする抗体を産生する細胞をスク

20 リーニングすることによって抗 GRP78 抗体を産生するハイブリドーマが選択できる。

具体的には、モノクローナル抗体の作製は例えば以下に示すように行われる。まず、GRP78 遺伝子を発現することによって、抗体取得の感作抗原として使用される GRP78 タンパク質 (SEQ ID NO: 2) が取得できる。ヒト GRP78 遺伝子の塩基配列は既に公知である (SEQ ID NO: 1)。すなわち、GRP78 をコードする遺伝子配列を公知の発現ベク

25 ターに挿入して適当な宿主細胞を形質転換させた後、その宿主細胞中または培養上清中から目的のヒト GRP78 タンパク質が公知の方法で精製できる。また、精製した天然の GRP78 タンパク質も同様に使用できる。生成は通常のイオンクロマトグラフィやアフィニティクロマトグラフィなどの複数のクロマトグラフィを単数回又は複数回、組

み合わせて又は単独で使用するにより生成することができる。また、本発明で用いられるように、GRP78 タンパク質の所望の部分ポリペプチドを異なるポリペプチドと融合した融合タンパク質を免疫原として利用することもできる。免疫原とする融合タンパク質を製造するために、例えば抗体の Fc 断片やペプチドタグ等を利用することができる。5 融合タンパク質を発現するベクターは所望の二種類又はそれ以上のポリペプチド断片をコードする遺伝子をインフレームで融合させ、当該融合遺伝子を前記の様に発現ベクターに挿入することにより作製することができる。融合タンパク質の作製方法は Molecular Cloning 2nd ed. (Sambrook, J. et al., Molecular Cloning 2nd ed., 9.47-9.58, Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載されている。

- 10 このようにして精製された GRP78 タンパク質を哺乳動物に対する免疫に使用する感作抗原として使用できる。GRP78 の部分ペプチドもまた感作抗原として使用できる。たとえば、次のようなペプチドを感作抗原とすることができる：

ヒト GRP78 のアミノ酸配列より化学合成によって取得されたペプチド；

- ヒト GRP78 遺伝子の一部を発現ベクターに組込んで発現させることによって取得さ
15 れたペプチド；

ヒト GRP78 タンパク質をタンパク質分解酵素により分解することによって取得されたペプチド。

- 部分ペプチドとして用いる GRP78 の領域および大きさは限定されるものではない。好ましい領域は GRP78 の 376 位から 415 位までの領域 (SEQ ID NO: 3) から選択する
20 ことができる。感作抗原とするペプチドを構成するアミノの数は、少なくとも 3 以上、たとえば、5 以上、あるいは 6 以上であることが好ましい。より具体的には、8~50、好ましくは 10~30 残基のペプチドを感作抗原とすることができる。

- 該感作抗原で免疫される哺乳動物は、特に限定されない。モノクローナル抗体を細胞融合法によって得るためには、細胞融合に使用する親細胞との適合性を考慮して免
25 疫動物を選択するのが好ましい。一般的には、げっ歯類の動物が免疫動物として好ましい。具体的には、マウス、ラット、ハムスター、あるいはウサギを免疫動物とすることができる。その他、サル等を免疫動物とすることもできる。

公知の方法にしたがって上記の動物が感作抗原により免疫できる。例えば、一般的

方法として、感作抗原を腹腔内または皮下に注射することにより哺乳動物を免疫することができる。具体的には、該感作抗原が哺乳動物に 4 から 21 日毎に数回投与される。感作抗原は、PBS (Phosphate-Buffered Saline) や生理食塩水等で適当な希釈倍率で希釈して免疫に使用される。更に、感作抗原をアジュバントとともに投与することができる。例えばフロイント完全アジュバントと混合し、乳化して、感作抗原とすることができる。また、感作抗原の免疫時には適当な担体を使用できる。特に分子量の小さい部分ペプチドが感作抗原として用いられる場合には、該感作抗原ペプチドをアルブミン、キーホールリンペットヘモシアニン等の担体タンパク質と結合させて免疫することが望ましい。

- 10 このように哺乳動物が免疫され、血清中における所望の抗体量の上昇が確認された後に、哺乳動物から免疫細胞が採取され、細胞融合に付される。好ましい免疫細胞としては、特に脾細胞が使用できる。

前記免疫細胞と融合される細胞として、哺乳動物のミエローマ細胞が用いられる。

- ミエローマ細胞は、スクリーニングのための適当な選択マーカーを備えていることが好ましい。選択マーカーとは、特定の培養条件の下で生存できる（あるいはできない）形質を指す。選択マーカーには、ヒポキサンチン-グアニン-ホスホリボシルトランスフェラーゼ欠損（以下 HGPRT 欠損と省略する）、あるいはチミジンキナーゼ欠損（以下 TK 欠損と省略する）などが公知である。HGPRT や TK の欠損を有する細胞は、ヒポキサンチン-アミノプテリン-チミジン感受性（以下 HAT 感受性と省略する）を有する。

- 20 HAT 感受性の細胞は HAT 選択培地中で DNA 合成を行うことができず死滅するが、正常な細胞と融合すると正常細胞のサルベージ回路を利用して DNA の合成を継続することができるため HAT 選択培地中でも増殖するようになる。

- HGPRT 欠損や TK 欠損の細胞は、それぞれ 6 チオグアニン、8 アザグアニン（以下 8AG と省略する）、あるいは 5' ブロモデオキシウリジンを含む培地で選択することができる。正常な細胞はこれらのピリミジンアナログを DNA 中に取り込んでしまうので死滅するが、これらの酵素を欠損した細胞は、これらのピリミジンアナログを取り込めない
- 25 。正常な細胞はこれらのピリミジンアナログを DNA 中に取り込んでしまうので死滅するが、これらの酵素を欠損した細胞は、これらのピリミジンアナログを取り込めない
- ので選択培地の中で生存することができる。この他 G418 耐性と呼ばれる選択マーカーは、ネオマイシン耐性遺伝子によって 2-デオキシストレプトタミン系抗生物質（ゲンタ

マイシン類似体)に対する耐性を与える。細胞融合に好適な種々のミエローマ細胞が公知である。例えば、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 5 (Margulies. D.H. et al., Cell (1976) 8, 405-415)、SP2/0 (Shulman, M. et al., Nature (1978) 276, 269-270)、F0 (de St. 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) 等のようなミエローマ細胞を利用することができる。

- 10 前記免疫細胞とミエローマ細胞の細胞融合は公知の方法、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) 等に準じて行なうことが可能である。

より具体的には、例えば細胞融合促進剤の存在下で通常の栄養培養液中で、前記細胞融合が実施できる。融合促進剤としては、例えばポリエチレングリコール (PEG)、
15 センダイウイルス (HVJ) 等を使用することができる。更に融合効率を高めるために所望によりジメチルスルホキシド等の補助剤を加えることもできる。

免疫細胞とミエローマ細胞との使用割合は任意に設定できる。例えば、ミエローマ細胞に対して免疫細胞を 1 から 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
20 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を利用することができる。さらに、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を培養液に添加することができる。

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 溶液を混合することによって目的とする融合細胞 (ハイブリドーマ) が形成される。細胞融合法においては、例えば平均分子量 1000 から
25 6000 程度の PEG を、通常 30 から 60% (w/v) の濃度で添加することができる。続いて、上記に挙げた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が除去される。

このようにして得られたハイブリドーマは、細胞融合に用いられたミエローマが有

する選択マーカーに応じた選択培養液を利用することによって選択することができる。例えば HGPRT や TK の欠損を有する細胞は、HAT 培養液（ヒポキサンチン、アミノプ
テリンおよびチミジンを含む培養液）で培養することにより選択できる。すなわち、
HAT 感受性のミエローマ細胞を細胞融合に用いた場合、HAT 培養液中で、正常細胞との
5 細胞融合に成功した細胞が選択的に増殖させることができる。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、上記 HAT 培養液を用いた
培養が継続される。具体的には、一般に、数日から数週間の培養によって、目的とす
るハイブリドーマを選択することができる。ついで、通常の限界希釈法を実施するこ
とによって、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および単一
10 クローニングが実施できる。あるいは、GRP78 を認識する抗体を国際公開 W003/104453
に記載された方法によって作成することもできる。

目的とする抗体のスクリーニングおよび単一クローニングは、公知の抗原抗体反応
に基づくスクリーニング方法によって好適に実施できる。例えば、ポリスチレン等で
できたビーズや市販の 96 ウェルのマイクロタイタープレート等の担体に抗原を結合さ
15 せ、ハイブリドーマの培養上清と反応させる。次いで担体を洗浄した後に酵素で標識
した二次抗体等を反応させる。もしも培養上清中に感作抗原と反応する目的とする抗
体が含まれる場合、二次抗体はこの抗体を介して担体に結合する。最終的に担体に結
合する二次抗体を検出することによって、目的とする抗体が培養上清中に存在してい
るかどうか決定できる。抗原に対する結合能を有する所望の抗体を産生するハイブ
20 リドーマを限界希釈法等によりクローニングすることが可能となる。この際、抗原と
しては免疫に用いたものを始め、実施的に同質な GRP78 タンパク質が好適に使用で
きる。

また、ヒト以外の動物に抗原を免疫することによって上記ハイブリドーマを得る方
法以外に、ヒトリンパ球を抗原感作して目的とする抗体を得ることもできる。具体的
25 には、まずインビトロにおいてヒトリンパ球を GRP78 タンパク質で感作する。次いで
免疫感作されたリンパ球を適当な融合パートナーと融合させる。融合パートナーには
、たとえばヒト由来であって永久分裂能を有するミエローマ細胞を利用することがで
きる（特公平 1-59878 号公報参照）。この方法によって得られる抗 GRP78 抗体は、GRP78

タンパク質への結合活性を有するヒト抗体である。

- さらに、ヒト抗体遺伝子の全てのレパートリーを有するトランスジェニック動物に対して抗原となる GRP78 タンパク質を投与することによって、抗 GRP78 ヒト抗体を得ることもできる。免疫動物の抗体産生細胞は、適当な融合パートナーとの細胞融合や
- 5 エプスタインバーウイルスの感染などの処理によって不死化させることができる。このようにして得られた不死化細胞から GRP78 タンパク質に対するヒト抗体を単離することによってもできる（国際公開 WO 94/25585、WO93/12227、WO 92/03918、WO 94/02602 参照）。更に不死化された細胞をクローニングすることにより、目的の反応特異性を有する抗体を産生する細胞をクローニングすることもできる。トランスジェニック動物
- 10 を免疫動物とするときには、当該動物の免疫システムは、ヒト GRP78 を異物と認識する。したがって、ヒト GRP78 に対するヒト抗体を容易に得ることができる。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できる。また、該ハイブリドーマを液体窒素中で長期にわたって保存することもできる。
- 15 当該ハイブリドーマを通常の方法に従い培養し、その培養上清から目的とするモノクローナル抗体を得ることができる。あるいはハイブリドーマをこれと適合性がある哺乳動物に投与して増殖させ、その腹水としてモノクローナル抗体を得ることもできる。前者の方法は、高純度の抗体を得るのに適している。

- 本発明においては、抗体産生細胞からクローニングされた抗体遺伝子によってコー
- 20 ドされる抗体を利用することもできる。クローニングした抗体遺伝子は、適当なベクターに組み込んで宿主に導入することによって、抗体として発現させることができる。抗体遺伝子の単離と、ベクターへの導入、そして宿主細胞の形質転換のための方法は既に確立されている（例えば、Vandamme, A. M. et al., Eur. J. Biochem. (1990) 192, 767-775 参照）。

- 25 たとえば、抗 GRP78 抗体を産生するハイブリドーマ細胞から、抗 GRP78 抗体の可変領域（V 領域）をコードする cDNA を得ることができる。そのためには、通常、まずハイブリドーマから全 RNA が抽出される。細胞から mRNA を抽出するための方法として、たとえば、グアニジン超遠心法（Chirgwin, J. M. et al., Biochemistry (1979) 18,

5294-5299)、AGPC 法 (Chomczynski, P. et al., Anal. Biochem. (1987) 162, 156-159) などを用いることができる。

抽出された mRNA は、mRNA Purification Kit (GE ヘルスケアバイオサイエンス製) 等を使用して精製することができる。あるいは、QuickPrep mRNA Purification Kit (5 GE ヘルスケアバイオサイエンス製) などのように、細胞から直接全 mRNA を抽出するためのキットも市販されている。このようなキットを用いて、ハイブリドーマから全 mRNA を得ることもできる。得られた mRNA から逆転写酵素を用いて抗体 V 領域をコードする cDNA を合成することができる。cDNA は、AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit (生化学工業社製) 等によって合成することができる。また、cDNA の合
10 成および増幅のために、5'-Ampli FINDER RACE Kit (Clontech 製) および PCR を用いた 5'-RACE 法 (Frohman, M. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988) 85, 8998-9002、Belyavsky, A. et al., Nucleic Acids Res. (1989) 17, 2919-2932) を利用することができる。更にこうした cDNA の合成の過程において cDNA の両末端に後述する適切な制限酵素サイトが導入できる。

15 得られた PCR 産物から目的とする cDNA 断片が精製され、次いでベクター DNA と連結される。このように組換えベクターが作製され、大腸菌等に導入されコロニーが選択された後に、該コロニーを形成した大腸菌から所望の組換えベクターが調製できる。そして、該組換えベクターが目的とする cDNA の塩基配列を有しているか否かについて、公知の方法、例えば、ジデオキシヌクレオチドチェインターミネーション法等によ
20 り確認できる。

可変領域をコードする遺伝子を得るために、可変領域遺伝子増幅用のプライマーを使った PCR 法を利用することもできる。まず抽出された mRNA を鋳型として cDNA を合成し、cDNA ライブラリーを得る。cDNA ライブラリーの合成には市販のキットを用いるのが便利である。実際には、少数の細胞のみから得られる mRNA は極めて微量なので、
25 それを直接精製すると収率が低い。したがって通常は、抗体遺伝子を含まないことが明らかなキャリア RNA を添加した後に精製される。あるいは一定量の RNA を抽出できる場合には、抗体産生細胞の RNA のみでも効率よく抽出することができる。たとえば
10 以上、あるいは 30 以上、好ましくは 50 以上の抗体産生細胞からの RNA 抽出には、

キャリア RNA の添加は必要でない場合がある。

得られた cDNA ライブラリーを鋳型として、PCR 法によって抗体遺伝子が増幅される。抗体遺伝子を PCR 法によって増幅するためのプライマーが公知である。たとえば、論文 (J. Mol. Biol. (1991) 222, 581-597) などの開示に基づいて、ヒト抗体遺伝子増幅用のプライマーをデザインすることができる。これらのプライマーは、イムノグロブリンのサブクラスごとに異なる塩基配列となる。したがって、サブクラスが不明の cDNA ライブラリーを鋳型とするときには、あらゆる可能性を考慮して PCR 法を行う。

- 10 具体的には、たとえばヒト IgG をコードする遺伝子の取得を目的とするときには、重鎖として $\gamma 1 \sim \gamma 5$ 、軽鎖として κ 鎖と λ 鎖をコードする遺伝子の増幅が可能なプライマーを利用することができる。IgG の可変領域遺伝子を増幅するためには、一般に 3' 側のプライマーにはヒンジ領域に相当する部分にアニールするプライマーが利用される。一方 5' 側のプライマーには、各サブクラスに応じたプライマーを用いることができる。

重鎖と軽鎖の各サブクラスの遺伝子増幅用プライマーによる PCR 産物は、それぞれ独立したライブラリーとする。こうして合成されたライブラリーを利用して、重鎖と軽鎖の組み合わせからなるイムノグロブリンを再構成することができる。再構成されたイムノグロブリンの、GRP78 に対する結合活性を指標として、目的とする抗体をスクリーニングすることができる。

本発明の抗体の GRP78 への結合は、特異的であることがさらに好ましい。GRP78 に結合する抗体は、たとえば次のようにしてスクリーニングすることができる。

- (1) ハイブリドーマから得られた cDNA によってコードされる V 領域を含む抗体を GRP78 に接触させる工程、
- 25 (2) GRP78 と抗体との結合を検出する工程、および
- (3) GRP78 に結合する抗体を選択する工程。

抗体と GRP78 との結合を検出する方法は公知である。具体的には、担体に固定した

GRP78 に対して被験抗体を反応させ、次に抗体を認識する標識抗体を反応させる。洗浄後に担体上の標識抗体が検出されれば、当該被験抗体の GRP78 への結合を証明できる。標識には、ペルオキシダーゼや β -ガラクトシダーゼ等の酵素活性タンパク質、あるいは FITC 等の蛍光物質を利用することができる。抗体の結合活性を評価するために

5 GRP78 を発現する細胞の固定標本を利用することもできる。

結合活性を指標とする抗体のスクリーニング方法として、ファージベクターを利用したパニング法を用いることもできる。上記のように抗体遺伝子を重鎖と軽鎖のサブクラスのライブラリーとして取得した場合には、ファージベクターを利用したスクリーニング方法が有利である。重鎖と軽鎖の可変領域をコードする遺伝子は、適当なり

10 ンカー配列で連結することによってシングルチェーン Fv (scFv) とすることができる。scFv をコードする遺伝子をファージベクターに挿入すれば、scFv を表面に発現するファージを得ることができる。このファージを目的とする抗原と接触させて、抗原に結合したファージを回収すれば、目的の結合活性を有する scFv をコードする DNA を回収することができる。この操作を必要に応じて繰り返すことにより、目的とする結合

15 活性を有する scFv を濃縮することができる。

本発明において抗体をコードするポリヌクレオチドは、抗体の全長をコードしていてもよいし、あるいは抗体の一部をコードしていてもよい。抗体の一部とは、抗体分子の任意の部分と言う。以下、抗体の一部を示す用語として、抗体断片を用いる場合

20 がある。本発明における好ましい抗体断片は、抗体の相補鎖決定領域 (complementarity determination region; CDR) を含む。更に好ましくは、本発明の抗体断片は、可変領域を構成する 3 つの CDR の全てを含む。

目的とする抗 GRP78 抗体の V 領域をコードする cDNA が得られた後に、該 cDNA の両末端に挿入した制限酵素サイトを認識する制限酵素によって該 cDNA が消化される。好

25 ましい制限酵素は、抗体遺伝子を構成する塩基配列に出現する可能性が低い塩基配列を認識して消化する。更に 1 コピーの消化断片をベクターに正しい方向で挿入するためには、付着末端を与える制限酵素が好ましい。上記のように消化された抗 GRP78 抗体の V 領域をコードする cDNA を適当な発現ベクターに挿入することによって、抗体発

現ベクターを得ることができる。このとき、抗体定常領域（C 領域）をコードする遺伝子と、前記 V 領域をコードする遺伝子とをインフレームで融合させることによって、キメラ抗体を得ることができる。ここで、キメラ抗体とは、定常領域と可変領域の由来の生物が異なることを言う。したがって、マウス-ヒトなどの異種キメラ抗体に加え
5、ヒト-ヒト同種キメラ抗体も、本発明におけるキメラ抗体に含まれる。予め定常領域を有する発現ベクターに、前記 V 領域遺伝子を挿入して、キメラ抗体発現ベクターを構築することもできる。

具体的には、たとえば、所望の抗体定常領域（C 領域）をコードする DNA を保持した発現ベクターの 5' 側に、前記 V 領域遺伝子を消化する制限酵素の制限酵素認識配列を
10 配置しておくことができる。両者を同じ組み合わせの制限酵素で消化し、インフレームで融合させることによって、キメラ抗体発現ベクターが構築される。

本発明の抗 GRP78 抗体を製造するために、抗体遺伝子を発現制御領域による制御の下で発現するように発現ベクターに組み込むことができる。抗体を発現するための発現制御領域とは、例えば、エンハンサーやプロモーターを含む。次いで、この発現ベ
15 クターで適当な宿主細胞を形質転換することによって、抗 GRP78 抗体をコードする DNA を発現する組換え細胞を得ることができる。

抗体遺伝子の発現にあたり、抗体重鎖（H 鎖）および軽鎖（L 鎖）をコードする DNA は、それぞれ別の発現ベクターに組み込むことができる。H 鎖と L 鎖を組み込まれたベ
20 クターを、同じ宿主細胞に同時に形質転換（co-transfect）することによって、H 鎖と L 鎖を備えた抗体分子を発現させることができる。あるいは H 鎖および L 鎖をコードする DNA を単一の発現ベクターに組み込んで宿主細胞を形質転換させてもよい（国際公開 WO 94/11523 参照）。

25 抗体遺伝子を一旦単離し、適当な宿主に導入して抗体を作製するための宿主と発現ベクターの多くの組み合わせが公知である。これらの発現系は、いずれも本発明に応用することができる。真核細胞を宿主として使用する場合、動物細胞、植物細胞、あるいは真菌細胞が使用できる。具体的には、本発明に利用することができる動物細胞

としては、例えば、哺乳類細胞（CHO、COS、ミエローマ、BHK (baby hamster kidney)、Hela、Vero など）、両生類細胞（アフリカツメガエル卵母細胞など）、昆虫細胞（sf9、sf21、Tn5 など）などを用いることが可能である。

あるいは植物細胞としては、ニコティアナ・タバカム (*Nicotiana tabacum*) などの
5 ニコティアナ (*Nicotiana*) 属由来の細胞による抗体遺伝子の発現系が公知である。植物細胞の形質転換には、カルス培養した細胞を利用することができる。

更に真菌細胞としては、酵母（サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) などのサッカロミセス (*Saccharomyces*) 属、メタノール資化酵母 (*Pichia pastoris*) などの *Pichia* 属)、糸状菌（アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*
10) などのアスペルギルス (*Aspergillus*) 属) などを用いることができる。

あるいは原核細胞を利用した抗体遺伝子の発現系も公知である。たとえば、細菌細胞を用いる場合、大腸菌 (*E. coli*)、枯草菌などの細菌細胞を本発明に利用することができる。

哺乳類細胞を用いる場合、常用される有用なプロモーター、発現させる抗体遺伝子
15 、その 3' 側下流にポリ A シグナルを機能的に結合させた発現ベクターを構築することができる。例えばプロモーター／エンハンサーとしては、ヒトサイトメガロウイルス前期プロモーター／エンハンサー (human cytomegalovirus immediate early promoter/enhancer) を挙げることができる。

20 また、その他に本発明の抗体の発現に使用できるプロモーター／エンハンサーとして、ウイルスプロモーター／エンハンサー、あるいはヒトエロンゲーションファクター-1 α (HEF1 α) などの哺乳類細胞由来のプロモーター／エンハンサー等が挙げられる。プロモーター／エンハンサーを利用することができるウイルスとして、具体的には、レトロウイルス、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、シミアンウイルス 40 (SV40
25) 等を示すことができる。

SV40 プロモーター／エンハンサーを使用する場合は Mulligan らの方法 (Nature (1979) 277, 108) を利用することができる。また、HEF1 α プロモーター／エンハンサーは Mizushima らの方法 (Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322) により、容易に目

的とする遺伝子発現に利用することができる。

大腸菌の場合、常用される有用なプロモーター、抗体分泌のためのシグナル配列および発現させる抗体遺伝子を機能的に結合させて当該遺伝子が発現できる。プロモーターとしては、例えば lacZ プロモーター、araB プロモーターを挙げることができる。

- 5 lacZ プロモーターを使用する場合は Ward らの方法 (Nature (1989) 341, 544-546 ; FASEBJ. (1992) 6, 2422-2427) を利用することができる。あるいは araB プロモーターは Better らの方法 (Science (1988) 240, 1041-1043) により、目的とする遺伝子の発現に利用することができる。

- 10 抗体分泌のためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに産生させる場合、pelB シグナル配列 (Lei, S. P. et al., J. Bacteriol. (1987) 169, 4379) を使用すればよい。そして、ペリプラズムに産生された抗体を分離した後、尿素のグアニジン塩酸塩の様なタンパク質変性剤を使用することによって所望の結合活性を有するように、抗体の構造が組み直される (refolded)。

- 15 発現ベクターに挿入される複製起源としては、SV40、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、ウシパピローマウイルス (BPV) 等の由来のものをを用いることができる。さらに、宿主細胞系で遺伝子コピー数増幅のため、発現ベクター中に、選択マーカー挿入することができる。具体的には、アミノグリコシドトランスフェラーゼ (APH) 遺伝子、チミジンキナーゼ (TK) 遺伝子、大腸菌キサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Ecogpt) 遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素 (dhfr) 遺伝子等の選択マ
20 ーカーを利用することができる。

- これらの発現ベクターを宿主細胞に導入し、形質転換された宿主細胞をインビトロまたはインビボで培養して目的とする抗体を産生させる。宿主細胞の培養は公知の方法に従い行う。例えば、培養液として、DMEM、MEM、RPMI1640、IMDM を使用することが
25 でき、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を併用することもできる。

前記のように発現、産生された抗体は、通常のタンパク質の精製で使用されている

公知の方法を単独で使用するによって又は適宜組み合わせることによって精製できる。例えば、プロテイン A カラムなどのアフィニティーカラム、クロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、透析等を適宜選択、組み合わせることにより、抗体を分離、精製することができる (Antibodies A Laboratory Manual. Ed Harlow, 5 David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)。

また、組換え型抗体の産生には、上記宿主細胞に加えて、トランスジェニック動物を利用することもできる。すなわち目的とする抗体をコードする遺伝子を導入された動物から、当該抗体を得ることができる。例えば、抗体遺伝子は、乳汁中に固有に産生されるタンパク質をコードする遺伝子の内部にインフレームで挿入することによって融合遺伝子として構築できる。乳汁中に分泌されるタンパク質として、たとえば、ヤギ β カゼインなどを利用することができる。抗体遺伝子が挿入された融合遺伝子を含む DNA 断片はヤギの胚へ注入され、該注入胚が雌のヤギへ導入される。胚を受容したヤギから生まれるトランスジェニックヤギ（またはその子孫）が産生する乳汁からは、所望の抗体を乳汁タンパク質との融合タンパク質として取得できる。また、トランスジェニックヤギから産生される所望の抗体を含む乳汁量を増加させるために、ホルモンがトランスジェニックヤギに適宜使用できる (Ebert, K.M. et al., Bio/Technology (1994) 12, 699-702)。本発明の組み換え抗体の C 領域として、動物抗体由来の C 領域を使用できる。例えばマウス抗体の H 鎖 C 領域としては、 $C\gamma 1$ 、 $C\gamma 2a$ 、 $C\gamma 2b$ 、 $C\gamma 3$ 、 $C\mu$ 、 $C\delta$ 、 $C\alpha 1$ 、 $C\alpha 2$ 、 $C\epsilon$ が、L 鎖 C 領域としては $C\kappa$ 、 $C\lambda$ が使用できる。また、マウス抗体以外の動物抗体としてラット、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、ラクダ、サル等の動物抗体が使用できる。これらの配列は公知である。また、抗体またはその産生の安定性を改善するために、C 領域を修飾することができる。本発明において、抗体がヒトに投与される場合、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺伝子組換え型抗体とすることができる。遺伝子組換え型抗体とは、例えば、キメラ (Chimeric) 抗体、ヒト化 (Humanized) 抗体などを含む。

これらの改変抗体は、公知の方法を用いて製造することができる。キメラ抗体は、互いに由来の異なる可変領域と定常領域を連結した抗体を言う。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は、マウス-ヒト-異種キメラ抗体である。マウス抗体の可変領域をコードする DNA をヒト抗体の定常領域をコードする DNA と連結させ、これを発現ベクターに組み込むことによって、キメラ抗体をを発現する組換えベクターが作製できる。該ベクターにより形質転

5 換された組換え細胞を培養し、組み込まれた DNA を発現させることによって、培養中に生産される該キメラ抗体を取得できる。キメラ抗体およびヒト化抗体の C 領域には、ヒト抗体のものが使用される。例えば H 鎖においては、C γ 1、C γ 2、C γ 3、C γ 4、C μ 、C δ 、C α 1、C α 2、および C ϵ を C 領域として利用することができる。また L 鎖においては C κ 、および C λ を C 領域として使用できる。これらの C 領域のアミノ酸配列

10 、ならびにそれをコードする塩基配列は公知である。また、抗体そのもの、あるいは抗体の産生の安定性を改善するために、ヒト抗体 C 領域を修飾することができる。

一般にキメラ抗体は、ヒト以外の動物由来抗体の V 領域とヒト抗体由来の C 領域とから構成される。これに対してヒト化抗体は、ヒト以外の動物由来抗体の相補性決定

15 領域 (CDR ; complementarity determining region) と、ヒト抗体由来のフレームワーク領域 (FR ; framework region) およびヒト抗体由来の C 領域とから構成される。ヒト化抗体はヒト体内における抗原性が低下しているため、本発明の治療剤の有効成分として有用である。

抗体の可変領域は、通常、4 つのフレーム (FR) には含まれた 3 つの相補性決定領域

20 (complementarity-determining region ; CDR) で構成されている。CDR は、実質的に、抗体の結合特異性を決定している領域である。CDR のアミノ酸配列は多様性に富む。一方 FR を構成するアミノ酸配列は、異なる結合特異性を有する抗体の間でも、高い相同性を示すことが多い。そのため、一般に、CDR の移植によって、ある抗体の結合特異性を、他の抗体に移植することができるとされている。

25

ヒト化抗体は、再構成 (reshaped) ヒト抗体とも称される。具体的には、ヒト以外の動物、たとえばマウス抗体の CDR をヒト抗体に移植したヒト化抗体などが公知である。ヒト化抗体を得るための一般的な遺伝子組換え手法も知られている。

具体的には、マウスの抗体の CDR をヒトの FR に移植するための方法として、たとえば Overlap Extension PCR が公知である。Overlap Extension PCR においては、ヒト抗体の FR を合成するためのプライマーに、移植すべきマウス抗体の CDR をコードする塩基配列が付加される。プライマーは 4 つの FR のそれぞれについて用意される。一般に

5、マウス CDR のヒト FR への移植においては、マウスの FR と相同性の高いヒト FR を選択するのが、CDR の機能の維持において遊離であるとされている。すなわち、一般に、移植すべきマウス CDR に隣接している FR のアミノ酸配列と相同性の高いアミノ酸配列からなるヒト FR を利用するのが好ましい。

また連結される塩基配列は、互いにインフレームで接続されるようにデザインされる。それぞれのプライマーによってヒト FR が個別に合成される。その結果、各 FR に

10 マウス CDR をコードする DNA が付加された産物が得られる。各産物のマウス CDR をコードする塩基配列は、互いにオーバーラップするようにデザインされている。続いて、ヒト抗体遺伝子を鋳型として合成された産物のオーバーラップした CDR 部分を互いにアニールさせて相補鎖合成反応が行われる。この反応によって、ヒト FR がマウス CDR

15 の配列を介して連結される。

最終的に 3 つの CDR と 4 つの FR が連結された V 領域遺伝子は、その 5' 末端と 3' 末端にアニールし適当な制限酵素認識配列を付加されたプライマーによってその全長が増幅される。上記のように得られた DNA とヒト抗体 C 領域をコードする DNA とをイン

20 フレームで融合するように発現ベクター中に挿入することによって、ヒト型抗体発現用ベクターが作成できる。該組込みベクターを宿主に導入して組換え細胞を樹立した後、該組換え細胞を培養し、該ヒト化抗体をコードする DNA を発現させることによって、該ヒト化抗体が該培養細胞の培養物中に産生される（欧州特許公開 EP 239400、国際公開 WO 96/02576 参照）。

上記のように作製されたヒト化抗体の抗原への結合活性を定性的又は定量的に測定

25 し、評価することによって、CDR を介して連結されたときに該 CDR が良好な抗原結合部位を形成するようなヒト抗体の FR が好適に選択できる。必要に応じ、再構成ヒト抗体の CDR が適切な抗原結合部位を形成するように FR のアミノ酸残基を置換することもできる。たとえば、マウス CDR のヒト FR への移植に用いた PCR 法を応用して、FR にアミ

ノ酸配列の変異を導入することができる。具体的には、FR にアニーリングするプライマーに部分的な塩基配列の変異を導入することができる。このようなプライマーによって合成された FR には、塩基配列の変異が導入される。アミノ酸を置換した変異型抗体の抗原への結合活性を上記の方法で測定し評価することによって所望の性質を有する変異 FR 配列が選択できる (Sato, K. et al., Cancer Res, 1993, 53, 851-856)。

また、ヒト抗体の取得方法も知られている。例えば、ヒトリンパ球をインビトロで所望の抗原または所望の抗原を発現する細胞で感作する。次いで、感作リンパ球をヒトミエローマ細胞融合させることによって、抗原への結合活性を有する所望のヒト抗体が取得できる (特公平 1-59878 参照)。融合パートナーであるヒトミエローマ細胞には、例えば U266 などを利用することができる。

また、ヒト抗体遺伝子の全てのレパートリーを有するトランスジェニック動物を所望の抗原で免疫することにより所望のヒト抗体が取得できる (国際公開 WO 93/12227、WO 92/03918、WO 94/02602、WO 94/25585、WO 96/34096、WO 96/33735 参照)。さらに、ヒト抗体ライブラリーを用いて、パンニングによりヒト抗体を取得する技術も知られている。例えば、ヒト抗体の V 領域を一本鎖抗体 (scFv) としてファージディスプレイ法によりファージの表面に発現させ、抗原に結合するファージを選択することができる。選択されたファージの遺伝子を解析することにより、抗原に結合するヒト抗体の V 領域をコードする DNA 配列が決定できる。抗原に結合する scFv の DNA 配列を決定した後、当該 V 領域配列を所望のヒト抗体 C 領域の配列とインフレームで融合させた後に適当な発現ベクターに挿入することによって発現ベクターが作製できる。該発現ベクターを上記に挙げたような好適な発現細胞中に導入し、該ヒト抗体をコードする遺伝子を発現させることにより該ヒト抗体が取得できる。これらの方法は既に公知である (国際公開 WO 92/01047、WO 92/20791、WO 93/06213、WO 93/11236、WO 93/19172、WO 95/01438、WO 95/15388)。

本発明の抗体には、GRP78 タンパク質に結合する限り、IgG に代表される二価抗体だけでなく、一価抗体、若しくは IgM に代表される多価抗体も含まれる。本発明の多価

抗体には、全て同じ抗原結合部位を有する多価抗体、または、一部もしくは全て異なる抗原結合部位を有する多価抗体が含まれる。本発明の抗体は、抗体の全長分子に限られず、GRP78 タンパク質に結合する限り、低分子化抗体またはその修飾物であってもよい。

- 5 低分子化抗体は、全長抗体 (whole antibody、例えば whole IgG 等) の一部分が欠損している抗体断片を含む。GRP78 抗原への結合能を有する限り、抗体分子の部分的な欠損は許容される。本発明における抗体断片は、重鎖可変領域 (VH) および軽鎖可変領域 (VL) のいずれか、または両方を含んでいることが好ましい。VH または VL のアミノ酸配列は、置換、欠失、付加及び／又は挿入を含むことができる。さらに GRP78 抗原への結合能を有する限り、VH および VL のいずれか、または両方の一部を欠損させることもできる。又、可変領域はキメラ化やヒト化されていてもよい。抗体断片の具体例としては、例えば、Fab、Fab'、F (ab')₂、Fvなどを挙げることができる。また、低分子化抗体の具体例としては、例えば、Fab、Fab'、F (ab')₂、Fv、scFv (single chain Fv)、ディアボディー (Diabody)、sc (Fv)₂ (single chain (Fv)₂)などを挙げることができる。これら抗体の多量体 (例えば、ダイマー、トリマー、テトラマー、ポリマー) も、本発明の低分子化抗体に含まれる。
- 10
- 15

- 抗体の断片は、抗体を酵素で処理して抗体断片を生成させることによって得ることができる。抗体断片を生成する酵素として、例えばパパイン、ペプシン、あるいはプラスミンなどが公知である。あるいは、これら抗体断片をコードする遺伝子を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させることができる (例えば、Co, M.S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976, Better, M. & Horwitz, A. H. Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496, Plueckthun, A. & Skerra, A. Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496, Lamoyi, E., Methods in Enzymology (1989) 121, 652-663, Rousseaux, J. et al., Methods in Enzymology (1989) 121, 663-669、Bird, R. E. et al., TIBTECH (1991) 9, 132-137 参照)。
- 20
- 25

消化酵素は、抗体断片の特定の位置を切断し、次のような特定の構造の抗体断片を与える。このような酵素的に得られた抗体断片に対して、遺伝子工学的手法を利用すると、抗体の任意の部分を欠失させることができる：

パパイン消化：F (ab) 2 または Fab；

ペプシン消化：F (ab') 2 または Fab'；

プラスミン消化：Facb。

- 5 ダイアボディーは、遺伝子融合により構築された二価 (bivalent) の抗体断片を指す (Holliger P et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90: 6444-6448 (1993)、EP404,097号、W093/11161号等)。ダイアボディーは、2本のポリペプチド鎖から構成されるダイマーである。通常、ダイマーを構成するポリペプチド鎖は、各々、同じ鎖中で VL 及び VH がリンカーにより結合されている。ダイアボディーにおけるリンカーは、一般に、
- 10 VL と VH が互いに結合できない位に短い。具体的には、リンカーを構成するアミノ酸残基は、例えば、5 残基程度である。そのため、同一ポリペプチド鎖上にコードされる VL と VH とは、単鎖可変領域フラグメントを形成できず、別の単鎖可変領域フラグメントと二量体を形成する。その結果、ダイアボディーは 2 つの抗原結合部位を有することとなる。
- 15 scFv は、抗体の H 鎖 V 領域と L 鎖 V 領域とを連結することにより得られる。scFv において、H 鎖 V 領域と L 鎖 V 領域は、リンカー、好ましくはペプチドリリンカーを介して連結される (Huston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, 1988, 85, 5879-5883.)。scFv における H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域は、本明細書に抗体として記載されたもののいずれの抗体由来であってもよい。V 領域を連結するペプチドリリンカー
- 20 には、特に制限はない。例えば 3 から 25 残基程度からなる任意の一本鎖ペプチドをリンカーとして用いることができる。V 領域は、たとえば上記のような PCR 法によって連結することができる。PCR 法による V 領域の連結のために、まず前記抗体の H 鎖または H 鎖 V 領域をコードする DNA 配列、および前記抗体の L 鎖または L 鎖 V 領域をコードする DNA 配列の全部あるいは所望の部分アミノ酸配列をコードする DNA が鋳型として
- 25 利用される。

増幅すべき DNA の両端の配列に対応する配列を有するプライマーの一对を用いた PCR 法によって、H 鎖と L 鎖の V 領域をコードする DNA がそれぞれ増幅される。次いで、ペプチドリリンカー部分をコードする DNA を用意する。ペプチドリリンカーをコードす

る DNA も PCR を利用して合成することができる。このとき利用するプライマーの 5' 側に、別に合成された各 V 領域の増幅産物と連結できる塩基配列を付加しておく。次いで、[H 鎖 V 領域 DNA] - [ペプチドリンカー DNA] - [L 鎖 V 領域 DNA] の各 DNA と、アセンブリー PCR 用のプライマーを利用して PCR 反応を行う。アセンブリー PCR 用のプライマーは、[H 鎖 V 領域 DNA] の 5' 側にアニールするプライマーと、[L 鎖 V 領域 DNA] の 3' 側にアニールするプライマーとの組み合わせからなる。すなわちアセンブリー PCR 用プライマーとは、合成すべき scFv の全長配列をコードする DNA を増幅することができるプライマーセットである。一方 [ペプチドリンカー DNA] には各 V 領域 DNA と連結できる塩基配列が付加されている。その結果、これらの DNA が連結され、さらにアセンブリー PCR 用のプライマーによって、最終的に scFv の全長が増幅産物として生成される。一旦 scFv をコードする DNA が作製されると、それらを含む発現ベクター、および該発現ベクターにより形質転換された組換え細胞が常法に従って取得できる。また、その結果得られる組換え細胞を培養して該 scFv をコードする DNA を発現させることにより、該 scFv が取得できる。

15

sc (Fv) 2 は、2 つの VH 及び 2 つの VL をリンカー等で結合して一本鎖にした低分子化抗体である (Hudson et al, J Immunol. Methods 1999 ; 231 : 177-189)。sc (Fv) 2 は、例えば、scFv をリンカーで結ぶことによって作製できる。

また 2 つの VH 及び 2 つの VL が、一本鎖ポリペプチドの N 末端側を基点として VH、VL、VH、VL ([VH] リンカー [VL] リンカー [VH] リンカー [VL]) の順に並んでいることを特徴とする抗体が好ましい。

2 つの VH と 2 つの VL の順序は特に上記配置に限定されず、どのような順序で並べられていてもよい。例えば以下のような配置も挙げることができる。

[VL] リンカー [VH] リンカー [VH] リンカー [VL]
 [VH] リンカー [VL] リンカー [VL] リンカー [VH]
 [VH] リンカー [VH] リンカー [VL] リンカー [VL]
 [VL] リンカー [VL] リンカー [VH] リンカー [VH]
 [VL] リンカー [VH] リンカー [VL] リンカー [VH]

抗体の可変領域を結合するリンカーとしては、遺伝子工学により導入し得る任意のペプチドリinker、または合成化合物リンカー（例えば、Protein Engineering, 9 (3), 299-305, 1996 参照）に開示されるリンカー等を用いることができる。本発明において5 はペプチドリinkerが好ましい。ペプチドリinkerの長さは特に限定されず、目的に応じて当業者が適宜選択することができる。通常、ペプチドリinkerを構成するアミノ酸残基は、1 から 100 アミノ酸、好ましくは 3 から 50 アミノ酸、更に好ましくは 5 から 30 アミノ酸、特に好ましくは 12 から 18 アミノ酸（例えば、15 アミノ酸）である。

- 10 ペプチドリinkerを構成するアミノ酸配列は、scFv の結合作用を阻害しない限り、任意の配列とすることができる。

あるいは、合成化学物リンカー（化学架橋剤）を利用して V 領域を連結することもできる。ペプチド化合物などの架橋に通常用いられている架橋剤を本発明に利用することができる。例えば N-ヒドロキシスクシンイミド (NHS)、ジスクシンイミジルスベレート (DSS)、ビス（スルホスクシンイミジル）スベレート (BS3)、ジチオビス（スクシンイミジルプロピオネート）(DSP)、ジチオビス（スルホスクシンイミジルプロピオネート）(DTSSP)、エチレングリコールビス（スクシンイミジルスクシネート）(EGS)、エチレングリコールビス（スルホスクシンイミジルスクシネート）（スルホ-EGS）、ジスクシンイミジル酒石酸塩 (DST)、ジスルホスクシンイミジル酒石酸塩（スルホ-DST）20 ）、ビス [2-（スクシンイミドオキシカルボニルオキシ）エチル] スルホン (BSOCOES)、ビス [2-（スルホスクシンイミドオキシカルボニルオキシ）エチル] スルホン（スルホ-BSOCOES）などを用いることが可能である。

4 つの抗体可変領域を結合する場合には、通常、3 つのリンカーが必要となる。複数25 のリンカーは、同じでもよいし、異なるリンカーを用いることもできる。本発明において好ましい低分子化抗体は Diabody 又は sc (Fv) 2 である。このような低分子化抗体を得るには、抗体を酵素、例えば、パパイン、ペプシンなどで処理し、抗体断片を生成させるか、又はこれら抗体断片をコードする DNA を構築し、これを発現ベクター

に導入した後、適当な宿主細胞で発現させればよい（例えば、Co, M. S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976 ; Better, M. and Horwitz, A. H., Methods Enzymol. (1989) 178, 476-496 ; Pluckthun, A. and Skerra, A., Methods Enzymol. (1989) 178, 497-515 ; Lamoyi, E., Methods Enzymol. (1986) 121, 652-663 ; Rousseaux, J. et al., Methods Enzymol. (1986) 121, 663-669 ; Bird, R. E. and Walker, B. W., Trends Biotechnol. (1991) 9, 132-137 参照)。

さらに、本発明の抗体は、ポリエチレングリコール (PEG) 等の各種分子と結合させた抗体修飾物として使用することもできる。このような抗体修飾物は、本発明の抗体
10 に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。抗体の修飾方法はこの分野においてすでに確立されている。

さらに、本発明の抗体は二重特異性抗体 (bispecific antibody) であってもよい。二重特異性抗体とは、異なるエピトープを認識する可変領域を同一の抗体分子内に有する抗体をいうが、当該エピトープは異なる分子中に存在していてもよいし、同一の
15 分子中に存在していてもよい。すなわち本発明において、二重特異性抗体は GRP78 分子上の異なるエピトープを認識する抗原結合部位を有することもできる。又、一方の認識部位が GRP78 を認識し、他方の認識部位が細胞障害性物質を認識する二重特性抗体とすることも可能である。本発明における「抗体」にはこれらの抗体も包含される。

20 また本発明においては、GRP78 以外の抗原を認識する二重特異性抗体を組み合わせることもできる。たとえば、GRP78 と同様に標的とする癌細胞の細胞表面に特異的に発現する抗原であって、GRP78 とは異なる抗原を認識するような二重特異性抗体を組み合わせることができる。

二重特異性抗体を製造するための方法は公知である。たとえば、認識抗原が異なる 2
25 種類の抗体を結合させて、二重特異性抗体を作製することができる。結合させる抗体は、それぞれが H 鎖と L 鎖を有する 1/2 分子であっても良いし、H 鎖のみからなる 1/4 分子であっても良い。あるいは、異なるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを融合させて、二重特異性抗体産生融合細胞を作製することもできる。さらに、

遺伝子工学的手法により二重特異性抗体が作製できる。

抗体の結合活性

抗体の抗原結合活性の測定には公知の手段を使用することができる (Antibodies A
5 Laboratory Manual. Ed Harlow, David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988
)。例えば、ELISA (酵素結合免疫吸着検定法)、EIA (酵素免疫測定法)、RIA (放射免
疫測定法) あるいは蛍光免疫法などを用いることができる。更に、細胞に発現する抗
原に対する抗体の結合活性を測定する手法としては、例えば、前記 Antibodies A
Laboratory Manual 中の 359 - 420 ページに記載されている方法が挙げられる。

10 また、緩衝液等に懸濁した細胞表面上に発現している抗原と当該抗原に対する抗体
との結合を測定する方法として、特にフローサイトメーターを使用した方法を好適に
用いることが出来る。使用するフローサイトメーターとしては例えば、FACSCanto™ II
、FACS Aria™、FACSArray™、FACSVantage™ SE、FACSCalibur™ (以上、BD Biosciences
社) や、EPICS ALTRA HyPerSort、Cytomics FC 500、EPICS XL-MCL ADC EPICS XL ADC
15 、Cell Lab Quanta / Cell Lab Quanta SC (以上、Beckman Coulter 社) などを挙げる
ことができる。

被検 GRP78 抗体の抗原に対する結合活性の好適な測定方法の一例として、GRP78 を発
現する細胞と反応させた被検抗体を認識する FITC 標識した二次抗体で染色後、
FACSCalibur (BD 社) により測定を行い、その蛍光強度を CELL QUEST Software (BD
20 社) を用いて解析する方法を挙げることができる。

増殖抑制活性

抗 GRP78 抗体に基づく細胞増殖抑制効果を評価又は測定する方法として、以下の方
法が好適に使用される。試験管内において該細胞増殖抑制活性を評価又は測定する方
25 法としては、培地中に添加した [³H] ラベルしたチミジンの生細胞による取り込みを DNA
複製能力の指標として測定する方法が用いられる。より簡便な方法としてトリパンブ
ルー等の色素を細胞外に排除する能力を顕微鏡下で計測する色素排除法や、MTT 法が用
いられる。後者は、生細胞がテトラゾリウム塩である MTT (3- (

- 4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) を青色のホルマザン産物へ転換する能力を有することを利用している。より具体的には、被検細胞の培養液にリガンドと共に被検抗体を添加して一定時間を経過した後に、MTT 溶液を培養液に加えて一定時間静置することにより MTT を細胞に取り込ませる。その結果、黄色の
- 5 化合物である MTT が細胞内のミトコンドリア内のコハク酸脱水素酵素により青色の化合物に変換される。この青色生成物を溶解し呈色させた後にその吸光度を測定することにより生細胞数の指標とするものである。MTT 以外に、MTS、XTT、WST-1、WST-8 等の試薬も市販されており (nacalai tesque など) 好適に使用することができる。活性の測定に際しては、対照抗体を用いることも可能である。

10

- また、生体内で細胞増殖抑制活性を評価又は測定する方法として、腫瘍担持マウスモデルを用いることができる。例えば、GRP78 を発現する癌細胞を非ヒト被検動物の皮内又は皮下に移植後、当日又は翌日から毎日又は数日間隔で被検抗体を静脈又は腹腔内に投与する。腫瘍の大きさを経日的に測定することにより細胞増殖抑制活性を評価
- 15 することができる。試験管内での評価と同様に対照抗体を投与し、抗 GRP78 抗体投与群における腫瘍の大きさが対照抗体投与群における腫瘍の大きさよりも有意に小さいことにより細胞増殖抑制活性を判定することができる。非ヒト被検動物としてマウスを用いる場合には、胸腺を遺伝的に欠損してその T リンパ球の機能を欠失したヌード (nu/nu) マウスを好適に用いることができる。当該マウスを使用することにより、投
- 20 与された抗体による細胞増殖抑制活性の評価・測定に当たって被検動物中の T リンパ球の関与を除くことができる。

細胞の増殖を抑制する方法

- 本発明は、GRP78 を発現する細胞と本発明の抗体とを接触させることにより当該細胞
- 25 の増殖を抑制する方法を提供する。本発明の抗体は、本発明の細胞増殖抑制剤に含有される GRP78 タンパク質に結合する抗体として上述したとおりである。抗 GRP78 抗体と接触させる細胞は GRP78 が発現している細胞であれば特に限定されないが、GRP78 が細胞膜上に局在する細胞であることが好ましく、又、疾患に関連した細胞であるこ

とが好ましい。疾患に関連した細胞の好ましい例として癌細胞を挙げることができる。また、悪性腫瘍内に存在する血管内皮細胞（腫瘍血管）もこれに含まれる。対象となる癌種は特に限定されず、例えば前立腺癌、乳癌、膵臓癌、肝臓癌、肺癌、食道癌、メラノーマ、大腸癌、胃癌、卵巣癌、膀胱癌、脳腫瘍を挙げることができる。

5

抗 GRP78 抗体を用いた送達方法

本発明は抗 GRP78 抗体を用いて細胞障害性物質を細胞内に伝達する方法に関する。本方法に用いられる抗体は上述の細胞障害性物質が結合した抗 GRP78 抗体である。その場合、インターナライズ活性を有する抗体であることが好ましい。細胞障害性物質

10 の送達は細胞障害性物質が結合した抗 GRP78 抗体と GRP78 を発現する細胞を接触させることにより行なうことができる。本発明において細胞障害性物質が送達される細胞は特に限定されないが、好ましくは GRP78 が細胞膜上に局在する細胞であり、又、好ましくは疾患に関連した細胞である。疾患に関連した細胞の例としては癌細胞を挙げることができる。また、悪性腫瘍内に存在する血管内皮細胞（腫瘍血管）もこれに含

15 まれる。対象となる癌種は特に限定されず、例えば前立腺癌、乳癌、膵臓癌、肝臓癌、肺癌、食道癌、メラノーマ、大腸癌、胃癌、卵巣癌、膀胱癌、脳腫瘍を挙げることができる。

本発明において接触は、in vitro で行われてもよいし、in vivo で行われてもよい

20 。この場合において、添加される抗体の形状としては、溶液又は凍結乾燥等により得られる固体等の形状が適宜使用できる。水溶液として添加される場合にあっては、純粋に抗体のみを含有する水溶液であってもよいし、例えば界面活性剤、賦形剤、着色料、着香料、保存料、安定剤、緩衝剤、懸濁剤、等張化剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、流動性促進剤、矯味剤等を含む溶液であってもよい。添加する濃度は特に限定され

25 ないが、培養液中の最終濃度として、好ましくは 1 pg/ml から 1 g/ml の範囲であり、より好ましくは 1 ng/ml から 1 mg/ml であり、更に好ましくは 1 μ g/ml から 1 mg/ml が好適に使用されうる。

また本発明において in vivo での「接触」は GRP78 発現細胞を体内に移植した非ヒ

ト動物や、内在的に GRP78 を発現する癌細胞を有するヒトを含む動物に投与することによっても行われる。投与方法は経口、非経口投与のいずれかによって実施できる。

特に好ましくは非経口投与による投与方法であり、係る投与方法としては具体的には、注射投与、経鼻投与、経肺投与、経皮投与などが挙げられる。注射投与の例として

- 5 は、例えば、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射などによって本発明の医薬組成物細胞増殖阻害剤および抗癌剤が全身または局所的に投与できる。また、被験動物の年齢、症状により適宜投与方法を選択することができる。水溶液として投与される場合にあっては純粋に抗体のみを含有する水溶液であってもよいし、例えば界面活性剤、賦形剤、着色料、着香料、保存料、安定剤、緩衝剤、懸濁剤、等張化剤、
10 結合剤、崩壊剤、滑沢剤、流動性促進剤、矯味剤等を含む溶液であってもよい。投与量としては、例えば、一回の投与につき体重 1 kg あたり 0.0001mg から 1000mg の範囲で投与量が選択できる。あるいは、例えば、患者あたり 0.001 から 100000mg/body の範囲で投与量が選択できる。しかしながら、本発明の抗体投与量はこれらの投与量に制限されるものではない。

15

医薬組成物

別の観点においては、本発明は、GRP78 タンパク質に結合する抗体を含有する医薬組成物を特徴とする。又、本発明は GRP78 タンパク質に結合する抗体を含有する細胞増殖抑制剤、特に抗癌剤を特徴とする。本発明の細胞増殖抑制剤および抗癌剤は、癌を

- 20 罹患している対象または罹患している可能性がある対象に投与されることが好ましい。
。

- 本発明において、GRP78 タンパク質に結合する抗体を含有する細胞増殖抑制剤は、GRP78 タンパク質に結合する抗体を対象に投与する工程を含む細胞増殖を抑制する方法、または、細胞増殖抑制剤の製造における GRP78 タンパク質に結合する抗体の使用
25 と表現することもできる。

また、本発明において、GRP78 タンパク質に結合する抗体を含有する抗癌剤は、GRP78 タンパク質に結合する抗体を対象に投与する工程を含む癌を予防または治療する方法

、または、抗癌剤の製造における GRP78 タンパク質に結合する抗体の使用と表現することもできる。

本発明の医薬組成物（例えば、細胞増殖抑制剤、抗癌剤。）に含有される抗体は GRP78
5 タンパク質と結合する限り特に制限はなく、本明細書中に例示されたいずれの抗体も
用いることができる。

本発明の医薬組成物の投与方法は、経口、非経口投与のいずれかによって実施できる。
特に好ましくは非経口投与による投与方法であり、係る投与方法としては具体的
10 には、注射投与、経鼻投与、経肺投与、経皮投与などが挙げられる。注射投与の例と
しては、例えば、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射などによって本発
明の医薬組成物が全身または局部的に投与できる。また、患者の年齢、症状により適
宜投与方法を選択することができる。投与量としては、例えば、一回の投与につき体
重 1 kg あたり 0.0001mg から 1000mg の範囲で投与量が選択できる。あるいは、例えば
15 、患者あたり 0.001 から 100000mg/body の範囲で投与量が選択できる。しかしながら
、本発明の医薬組成物はこれらの投与量に制限されるものではない。

本発明の医薬組成物は、常法に従って製剤化することができ（例えば、Remington's
Pharmaceutical Science, latest edition, Mark Publishing Company, Easton, U.S.A
20 ）、医薬的に許容される担体や添加物を共に含むものであってもよい。例えば界面活性
剤、賦形剤、着色料、着香料、保存料、安定剤、緩衝剤、懸濁剤、等張化剤、結合剤
、崩壊剤、滑沢剤、流動性促進剤、矯味剤等が挙げられるが、これらに制限されず、
その他常用の担体が適宜使用できる。具体的には、軽質無水ケイ酸、乳糖、結晶セル
ロース、マンニトール、デンプン、カルメロースカルシウム、カルメロースナトリウ
25 ム、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビ
ニルアセタールジエチルアミノアセテート、ポリビニルピロリドン、ゼラチン、中鎖
脂肪酸トリグリセライド、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油 60、白糖、カルボキシメ
チルセルロース、コーンスターチ、無機塩類等を挙げることができる。

医薬品の製造方法

本発明はさらに、以下の工程を含む医薬品、特に抗癌剤の製造方法を提供する。

以下の工程を含む医薬組成物の製造方法

- 5 (a) 抗 GRP78 抗体を提供する工程、
- (b) (a) の抗体がインターナライズ活性を有するか否か確認する工程、
- (c) インターナライズ活性を有する工程を選択する工程、
- (d) (c) で選択された抗体に細胞障害性物質を結合する工程。

インターナライズ活性を有するか否かは上述の方法により確認することが可能であ

- 10 る。又、抗 GRP78 抗体、細胞障害性物質についても上述の抗 GRP78 抗体、細胞障害性物質を用いることができる。

癌の診断

本発明は抗 GRP78 抗体を用いた疾患の診断方法、特に癌の診断方法を提供する。

- 15 本発明の診断方法は細胞内に取り込まれた抗 GRP78 抗体を検出することにより行なうことが可能である。本発明で用いられる抗 GRP78 抗体はインターナライズ活性を有していることが好ましく、又、標識物質で標識されていることが好ましい。

従って、本発明の診断方法の好ましい態様として、標識物質で標識され、かつインターナライズ活性を有する抗 GRP78 抗体を用いた診断方法を挙げることができる。標

- 20 識物質を結合する抗 GRP78 抗体は上述の抗 GRP78 抗体を用いることができる。

- 抗 GRP78 抗体に結合する標識物質は特に限定されず、例えば、蛍光色素、酵素、補酵素、化学発光物質、放射性物質などの当業者に公知の標識物質を用いることが可能であり、具体的な例としては、ラジオアイソトープ (32P、14C、125I、3H、131I など)、フルオレセイン、ローダミン、ダンシルクロリド、ウンベリフェロン、ルシフェラ
- 25 ーゼ、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、ホースラディッシュパーオキシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、サッカリドオキシダーゼ、マイクロペルオキシダーゼ、ビオチンなどを挙げることができる。標識物質としてビオチンを用いる場合には、ビオチン標識抗体を添加後に

、アルカリホスファターゼなどの酵素を結合させたアビジンをさらに添加することが好ましい。標識物質と抗 GRP78 抗体との結合のためには、グルタルアルデヒド法、マレイミド法、ピリジルジスルフィド法、過ヨウ素酸法、などの公知の方法が使用できる。

- 5 抗体への標識物質の結合は当業者に公知の方法により行なうことができる。

本発明の方法によって診断される疾患が癌の場合、対象となる癌種は特に限定されず、例えば前立腺癌、乳癌、膵臓癌、肝臓癌、肺癌、食道癌、メラノーマ、大腸癌、胃癌、卵巣癌、膀胱癌、脳腫瘍を挙げることができる。

本発明における診断は *in vivo* で行われてもよく、又、*in vitro* で行われてもよい

10。

診断が *in vitro* で行なわれる場合、例えば、以下の工程を含む方法により行なうことができる。

- (a) 被検者から採取された試料を提供する工程、
- (b) (a) の試料と標識物質が結合した抗 GRP78 抗体を接触させる工程、
- 15 (c) 細胞内に取り込まれた抗体を検出する工程。

採取される試料は特に限定されないが、例えば、被験者から採取された細胞、組織などが例示できる。又、生物の体から採取された組織若しくは細胞が固定化された標本又は細胞の培養液などの、被検試料から得られる二次的な試料も本発明の試料に含まれる。

- 20 診断が *in vivo* で行なわれる場合、例えば、以下の工程を含む方法により行なうことができる。

- (a) 標識物質が結合した抗 GRP78 抗体を被験者に投与する工程、
- (b) 癌細胞内に取り込まれた抗体を検出する工程。

- 抗 GRP78 抗体の投与量は標識物質の種類、診断される疾患の種類などにより当業者
25 が適宜決定することができる。標識された抗 GRP78 抗体は上述の方法により製剤化してもよい。

本発明はさらに、以下の工程を含む診断薬、特に癌の診断薬の製造方法を提供する

- 。
- (a) 抗 GRP78 抗体を提供する工程、
 - (b) (a) の抗体がインターナライズ活性を有するか否か確認する工程、
 - (c) インターナライズ活性を有する工程を選択する工程、
 - 5 (d) (c) で選択された抗体に標識物質を結合する工程。

インターナライズ活性を有するか否かは上述の方法により確認することが可能である。又、抗 GRP78 抗体、標識物質についても上述の抗 GRP78 抗体、標識物質を用いることができる。

10 GRP78 部分ペプチド

- 本発明は SEQ ID NO: 3 (GRP78 の 376 位から 415 位) のアミノ酸配列からなるポリペプチド又はその断片を提供する。SEQ ID NO: 3 (GRP78 の 376 位から 415 位) のアミノ酸配列からなるポリペプチド又はその断片は、本発明の抗体を作製する際の免疫原や作製された抗体の結合活性の評価に有用である。本発明において断片は、少なくと
- 15 も 5 アミノ酸以上であり、好ましくは 10 アミノ酸以上、さらに好ましくは 15 アミノ酸以上の断片である。SEQ IN NO:3 のアミノ酸配列からなるポリペプチドの断片の例としては、特に限定されないが、GRP78 の 384 位から 391 位のアミノ酸配列からなる断片 (SEQ ID NO:3 の 9~16 のアミノ酸配列からなる断片)、GRP78 の 392 位から 407 位のアミノ酸配列からなる断片 (SEQ ID NO:3 の 17~32 のアミノ酸配列からなる断片)、
- 20 GRP78 の 400 位から 415 位のアミノ酸配列からなる断片 (SEQ ID NO:3 の 25~40 のアミノ酸配列からなる断片) などを挙げることができる。

[実施例]

実施例 1：免疫

25 1-1. 免疫原の調製

1-1-1. GRP78 大腸菌発現ベクターの作成

GRP78 大腸菌発現ベクターを構築するため、まず GRP78 遺伝子のクローニングを以下のとおり行った。まずヒト Colon adenocarcinoma cDNA (MTC Multiple Tissue cDNA

panel, クロンテック) を鋳型にして Pyrobest Taq ポリメラーゼ (タカラ) を用いて以下の条件で RT-PCR を行い、全長 GRP78 遺伝子をクローニングした。

GRP-1 : atgaagctct cccctggiggc (SEQ ID NO: 26)

GRP-2 : ctacaactca tctttttctg ctgta (SEQ ID NO: 27)

5 (94℃ 30 秒、58℃ 30 秒、72℃ 120 秒 : 27 サイクル)

次に、得られた PCR 産物を鋳型にして、以下の条件で再度 PCR を行い、SEQ ID NO: 1 の塩基配列のうち、塩基番号 55~1965 の GRP78 遺伝子断片に 5' 端、3' 端にそれぞれ BamHI、XhoI 切断配列が付加された GRP78 cDNA 断片を得た。

GRP-GST-1 : aaaggatccg aggaggagga caagaaggag gacgtggg (SEQ ID NO: 28)

10 GRP-GST-2 : ttctctgagc tacaactcat ctttttctgc tgtatcctc (SEQ ID NO: 29)

(94℃ 30 秒、64℃ 30 秒、72℃ 120 秒 : 25 サイクル)

これを BamHI、XhoI で切断し、同じく BamHI、XhoI で切断した大腸菌 GST 融合発現ベクター (pGEX-6P-1, アマシャムファルマシア) の GST コード領域の下流に挿入し、GRP78-GST 融合タンパク質発現ベクター (pGEX-GRP78-full) を構築した。

15

1-1-2. GST 融合 GRP78 タンパク質の発現誘導と精製

次に、GRP78 結合抗体を取得するための免疫原として、GRP78 タンパク質の調製を行った。

まず、pGEX-GRP78-full で大腸菌 (BL21) を形質転換した。これを LB 培地 (300 ML
20) で培養し、OD₆₁₀ が 0.5 以上になったところで、IPTG を 0.5 mM になるように加え、タンパク質の発現誘導を行った。5 時間培養後、大腸菌を遠心により集菌した。

集菌した大腸菌を 30 ml の B-BER (ピアス社) に懸濁し可溶化を行った。次に、この可溶化した大腸菌溶解物を PBS で 10 倍に希釈し、これに PBS で平衡化したグルタチオンセファロース 4B (アマシャムファルマシア) を添加し、4℃で一晩インキュベートした。
25 その後、PBS で数回洗浄して未吸着タンパク質を除去し、プロテアーゼ反応液 (50mM Tris-HCl、150 mM NaCl、1 mM EDTA、1 mM DTT、pH 7.5) 中で、PreScission プロテアーゼ (アマシャムファルマシア) を 4℃で一晩反応させた。この操作により、GRP78-GST 融合タンパク質の GST タンパク質と GRP78 タンパク質 (アミノ酸 19~654) とを分離切

断した。続いて、プロテアーゼ消化によって溶出された GRP78 タンパク質を、Superdex 200 HR 10 30 カラム（アマシャムファルマシア）を用いて、ゲルろ過クロマトグラフィーで分離し、目的の GRP78 タンパク質（アミノ酸 19～654）を回収した。

5 1-2. 免疫

初回免疫では COMPLETE ADJUBANT（DIFCO: DF263810）で、二回目以降は IMCOMPLETE ADJUBANT（DIFCO: DF263910）により GRP78 タンパク質のエマルジョンを作成し、これを 50 μ g/mouse で各マウス〔（MRL/lpr、オス、4週齢）（Balb/c、メス、6週齢）：いずれも日本チャールスリバーより購入〕3匹ずつに皮下注射により免疫した（テルモシリン 10 ジ 1 mL、針 26G）。初回免疫から 2 週間後に 2 回目の免疫を実施し、以降 1 週間おきに計 4～5 回免疫を行った。最終免疫では、GRP78（50 μ g）を 100 μ l の PBS に懸濁し、尾静脈注射により免疫を行い、その 3 日後に細胞融合を実施した。

1-3. ハイブリドーマの作成

15 細胞融合は以下のように行った。マウスより脾臓を無菌的に摘出し、medium 1（RPMI1640+PS）中ですりつぶして単一細胞懸濁液にした。これを 70 μ m のナイロンメッシュ（Falcon）に通して脂肪組織等を取り除き、細胞数をカウントした。得られた B 細胞をマウスミエローマ細胞（P3U1 細胞）と、およそ 2:1 の細胞数比になるように混合し、1 mL の 50%PEG（Roche、cat #: 783 641）を加えて、細胞融合を行った。融合 20 した細胞を medium 2〔RPMI1640+PS、10%FCS、HAT（Sigma、H0262）、5%BM condimed H1（Roche: #1088947）〕に懸濁し、適当枚数（10 枚）の 96 ウエルプレートに 200 μ L/ウェルで分注し、37℃で培養した。1 週間後に培養上清を用いて、ハイブリドーマのスクリーニングを行った。

25 実施例 2：細胞膜上に局在する GRP78 を認識する抗 GRP78 抗体のスクリーニング

2-1. GRP78 結合抗体の ELISA によるスクリーニング（一次スクリーニング）

細胞表面に局在する抗 GRP78 抗体を取得するため、まずは GRP78 に結合する抗体のスクリーニングを行った。結合抗体のスクリーニングには ELISA を用いた。

大腸菌より精製した GRP78 タンパク質を $1\mu\text{g/ml}$ でコーティングした ELISA 用プレート (NUNC) に、ハイブリドーマの培養上清を反応させ、1 時間インキュベートした。その後、アルカリフォスファターゼ (AP) 標識抗マウス IgG (ZYMED : #62-6622) で 1 時間反応後、 1mg/ml の基質 (SIGMA : S0942-50TAB) を加え発色させた。プレートリー
5 ダー (BioRad 社) により OD_{405} を測定し、ELISA 陽性ウェルを選抜した。

2-2. 細胞表面に局在する抗 GRP78 抗体の FACS によるスクリーニング (二次スクリーニング)

一次スクリーニングで、陽性だったウェルの培養上清を用いて、前立腺癌細胞株 (10 DU145) に対する反応性を、FACS により解析した。

DU145 (ATCC より入手) は 10%FCS、 1mM ピルビン酸ナトリウム、 0.1mM NEAA を含む EMEM (invitrogen) で培養・継代を行った。 1mM EDTA/PBS で DU145 をはがし、これにハイブリドーマの培養上清を反応させ、 4°C で 1 時間インキュベートした。その後 FITC 標識抗マウス IgG 抗体 (BECKMAN COULTER : PN IM0819) を加え、 4°C で 30 分インキュ
15 ベートした。その後、各ハイブリドーマ培養上清の DU145 細胞表面に対する結合活性を FACS (ベクトンディッキンソン) にて解析した。

2-3. 限界希釈 (Limiting dilution)

FACS 解析により DU145 細胞への結合活性がわずかでも認められたウェルを選抜し、
20 これらについて限界希釈 (limiting dilution ; LD) を行い、ウェル中のハイブリドーマの単一クローン化を行った。すなわち、各ウェルの細胞数を測定し、 3 cells/well となるように 96 well プレートに播種した。約 10 日間培養し、コロニーが出現したウェルの培養上清について、再び ELISA を行い、結合活性を指標にして抗体産生単一クローンのスクリーニングを行った。これら一連の作業により、GRP78 結合抗体を 6 クロ
25 ーン得た (GA-19 抗体、GA-20 抗体、GA-21 抗体、GA-23 抗体、GA-28 抗体、GA-31 抗体)。

2-4. サブタイプの決定

抗体のサブタイプ決定は IsoStrip (Roche #1 493 027) を用いて行った。サブタイプ決定には PBS (-) で 10 倍希釈したハイブリドーマの培養上清を用いた。

精製した各抗体のサブタイプは以下に示すとおりである。

表 1

抗体	サブタイプ
GA-19	G1
GA-20	M
GA-21	G3
GA-23	G2a
GA-28	G1
GA-31	G1

5

2-5. 抗体の精製

得られた単クローンのハイブリドーマの培養上清 50 mL から GA-19 抗体、GA-23 抗体、GA-28 抗体、GA-31 抗体は、Hi Trap Protein G HP 1 mL カラム (Amersham Biosciences #17-0404-01) を用いて、また、IgM および IgG3 である GA-20 抗体、GA-21 抗体は、Protein L-agarose (SIGMA) 1 mL をオープンカラムに充填し、抗体の精製を行った。ハイブリドーマ上清を流速 1 mL/min で吸着させ、20 mL の 20 mM リン酸バッファー (pH7.0) で洗浄した後、3.5 mL の 0.1 M Glycine-HCl (pH2.7) で溶出した。溶出分画は、あらかじめ 1 M Tris-HCl (pH9.0) を 50 μ L ずつ加えたエッペンドルフチューブに 0.5 mL ずつ回収した。OD_{280nm} を測定し、抗体が含まれている分画をまとめ、PBS (-) を加えて全量 2.5 mL とした後、PD-10 カラム (Amersham Biosciences #17-0851-01) を用いて PBS (-) にバッファー置換した。精製した抗体は 0.22 μ m フィルター (MILLIPORE #SLGV033RS) を通し、以下詳細に各精製抗体の性質について検討を行った。

15

20 実施例3：GRP78抗体の解析

3-1. ウエスタンブロット解析

得られた抗体が、大腸菌より精製した GRP78 (GST-GRP78)、さらに、DU145 細胞内で発現する GRP78 に特異的に結合することを確認するため、ウエスタンブロットを行った。

レーン 1 に、DU145 細胞 (1×10^6 cells) を $300 \mu\text{l}$ の NP40 溶解バッファー (0.5% NP40、10mM Tris-HCl、150mM NaCl、5mM EDTA、pH 7.5) で可溶化した細胞可溶化サンプルを、レーン 2 に大腸菌より精製した GST 融合 GRP78 タンパク質 (0.1 μg) をアプライし、定法に従って PVDF 膜にブロットした。これを各抗体 (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) で反応させ、
5 二次抗体 (HRP 標識抗マウス IgG) で反応後、ECL ウェスタンブロット検出試薬 (GE ヘルスケア) でタンパク質の検出を行った。その結果、得られた各抗体ともに、大腸菌で発現させた GST 融合 GRP78 タンパク質ばかりでなく細胞内で内在性に発現する GRP78 タンパク質も特異的に認識することが確認された (図 1)。

10 3-2. FACS 解析

3-2-1. 前立腺癌株 (DU145) の細胞表面結合活性

精製した各抗 GRP78 抗体が、癌細胞の細胞表面を染色するかを FACS により解析した。

1 mM EDTA ではがした DU145 細胞に、FACS バッファー中で各抗体 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) と 4
15 °C で 1 時間インキュベートした。その後 FITC 標識抗マウス IgG 抗体 (BECKMAN COULTER : PN IM0819) を加え、4°C で 30 分インキュベートした。その後、DU145 細胞表面の GRP78 への結合活性を FACS (ベクトンディッキンソン) にて解析した。

その結果、得られた抗 GRP78 抗体 6 クロンのうち、2 クローン (GA-20 抗体、GA-21 抗体) が DU145 細胞を染色した (図 2)。

20 このことから、GA-20 抗体、GA-21 抗体は、癌細胞で発現する GRP78 分子の細胞外エピトープを認識していることが確認された。

GA-20 抗体の重鎖可変領域の塩基配列を SEQ ID NO: 4 に、重鎖可変領域のアミノ酸配列を SEQ ID NO: 5 に、軽鎖可変領域の塩基配列を SEQ ID NO: 6 に、軽鎖可変領域のアミノ酸配列を SEQ ID NO: 7 に、それぞれ記載する。又、GA-20 抗体の重鎖可変領域の CDR1 のアミノ酸配列を SEQ ID NO: 8 に、CDR2 のアミノ酸配列を SEQ ID NO: 9
25 に、CDR3 のアミノ酸配列を SEQ ID NO: 10 に、軽鎖可変領域の CDR1 のアミノ酸配列を SEQ ID NO: 11 に、CDR2 のアミノ酸配列を SEQ ID NO: 12 に、CDR3 のアミノ酸配列を SEQ ID NO: 13 に、それぞれ記載する。

GA-21 抗体の重鎖可変領域の塩基配列を SEQ ID NO: 14 に、重鎖可変領域のアミノ酸配列を SEQ ID NO: 15 に、軽鎖可変領域の塩基配列を SEQ ID NO: 16 に、軽鎖可変領域のアミノ酸配列を SEQ ID NO: 17 に、それぞれ記載する。又、GA-21 抗体の重鎖可変領域の CDR1 のアミノ酸配列を SEQ ID NO: 18 に、CDR2 のアミノ酸配列を SEQ ID NO: 19
5 に、CDR3 のアミノ酸配列を SEQ ID NO: 20 に、軽鎖可変領域の CDR1 のアミノ酸配列を SEQ ID NO: 21 に、CDR2 のアミノ酸配列を SEQ ID NO: 22 に、CDR3 のアミノ酸配列を SEQ ID NO: 23 に、それぞれ記載する。

3-2-2. 他の癌種に対する FACS 結合活性の評価

10 次に、細胞表面に局在する GRP78 認識抗体 GA-20 抗体を用いて、他の癌種に対する FACS 反応性を調べた。卵巣癌細胞株 (ES-2、SKOV3)、乳癌細胞株 (MCF7)、大腸癌細胞株 (LoVo)、前立腺癌細胞株 (DU145、LNCap、22Rv1、PC3) は、ATCC より購入し、ATCC 推奨の培養条件で培養を行った。これらの細胞に対して GA-20 抗体 (10 μ g/ml) を用いて前述のとおり染色し、FACS 解析を行った。その結果、GA-20 抗体は DU145 だけで
15 なく LoVo、LNCap、22Rv1 など複数の癌細胞も染色することが確認された (図 3)。

3-2-3. 癌以外の細胞に対する FACS 結合活性の評価

次に、癌細胞以外の細胞株に対する FACS 結合活性を解析した。サル腎細胞 (COS7)、ヒト正常繊維芽細胞 (MRC5)、マウスプロ B 細胞 (Ba/F3)、マウス繊維芽細胞 (NIH3T3
20)、ハムスター卵巣細胞 (DG44) は、ATCC より購入し、ATCC 指定の培地で培養を行った。これらの細胞を、GA-20 抗体 (10 μ g/ml) で染色し、FACS 解析を行った。同時に、NP40 溶解バッファーで細胞を可溶化し、GA-20 抗体 (2 μ g/ml) でウエスタンブロットを行った。その結果、これらの細胞はすべて GRP78 を発現しているのにも関わらず (図 4B)、FACS で染色されなかった (図 4A)。このことから、細胞は GRP78 を発現して
25 いても、癌細胞などある特定の細胞でしか、細胞表面へと局在しないことが推測された。

3-3. インターナライズ活性の解析

3-3-1. FACS による解析

細胞表面を染色する抗 GRP78 認識抗体 (GA-20 抗体、GA-21 抗体) にインターナライズ活性があるかを調べるため、以下の実験を行った。

DU145 細胞を 1mM EDTA ではがし、一方は、FACS バッファー (2%FCS、0.05%NaN₃を含む PBS) 中で各抗体 (10 μg/ml) と 0℃で 2 時間作用させ、もう一方は、培養液中 (10%FCS を含む RPMI1640) で各抗体 (10 μg/ml) と 37℃で 2 時間インキュベートした。その後 FITC 標識マウス IgG で細胞表面に残存する抗体の検出を FACS 解析により行った。

その結果、いずれの抗体とも 37℃で二時間反応させることにより細胞表面より抗体が消失することが確認された (図 5)。

3-3-2. 細胞免疫染色による解析

次にこの現象が、抗体の細胞外への放出ではないことを確認するため、以下の実験を行った。ディッシュ中で培養している DU145 細胞に、GA-20 抗体、あるいは、ネガティブコントロールとして細胞表面には結合しない GA-31 抗体をそれぞれ 20 μg/ml ずつ添加し、37℃で 3 時間培養した。これを PBS で洗浄後、グリシンバッファー (0.1M Glycin、pH 2.7) で細胞を 2 回洗浄し、細胞表面に結合する抗体を除去した。その後、4%パラホルムアルデヒドを室温で 10 分間作用させ細胞を固定し、続いて 0.1%Triton X100 を 5 分間室温で作用させた。これを FITC 標識マウス IgG で染色し、細胞内に取り込まれた抗体を蛍光顕微鏡 (キーエンス) で観察した。

その結果、細胞表面に結合する活性を有する GA-20 抗体においては、抗体が細胞内に検出されたが、細胞表面に結合しない GA-31 抗体では細胞内に抗体が検出されなかった (図 6)。この結果から、37℃で 3 時間培養することにより、細胞表面に結合した GA-20 抗体が細胞内に取り込まれていることが確認された。

25

実施例 4 : EPITOPE 解析

4-1. エピトープマップ用 GST 融合タンパク質の調製

4-1-1. エピトープマップ用 GST 融合タンパク質発現ベクターの作成

各抗体のエピトープを同定することを目的として、まず GRP78 タンパク質をさまざまな領域ごとに分けた GST 融合タンパク質の大腸菌発現ベクターの構築を行った。

4-1-1-1. GST-GRP78-N (19-350) 発現ベクターの構築

- 5 pGEX-GRP78-full を鋳型にして、センスプライマーに GRP-GST-1 (SEQ ID NO: 28) を、アンチセンスプライマーGRP-GST-3 (SEQ ID NO: 30) を用いて 94℃ 30 秒、64℃ 30 秒、72℃ 120 秒×25 サイクルで PCR を行い、5' 端、3' 端にそれぞれ BamHI、XhoI 切断配列が付加された GRP78 (アミノ酸 19-350 をコード) する cDNA 断片を得た。

- これを BamHI、XhoI で切断し、同じく BamHI、XhoI で切断した大腸菌 GST 融合発現
10 ベクター (pGEX-6P-1) の GST コード領域の下流に挿入し、GRP78-GST 融合タンパク質発現ベクター (pGEX-GRP78-N (19-350)) を構築した。

4-1-1-2. GST-GRP78-C (289-654) 発現ベクターの構築

- pGEX-GRP78-full を鋳型にして、センスプライマーに GRP-GST-4 (SEQ ID NO: 31)
15 を、アンチセンスプライマーGRP-GST-2 (SEQ ID NO: 29) を用いて 94℃ 30 秒、64℃ 30 秒、72℃ 120 秒×25 サイクルで PCR を行い、5' 端、3' 端にそれぞれ BamHI、XhoI 切断配列が付加された GRP78 (アミノ酸 289-654 をコード) する cDNA 断片を得た。

- これを BamHI、XhoI で切断し、同じく BamHI、XhoI で切断した大腸菌 GST 融合発現
ベクター (pGEX-6P-1) の GST コード領域の下流に挿入し、GRP78-GST 融合タンパク質
20 発現ベクター (pGEX-GRP78-C (289-654)) を構築した。

4-1-1-3. GST-GRP78-C (289-350) 発現ベクターの構築

- pGEX-GRP78-full を鋳型にして、センスプライマーに GRP-GST-4 (SEQ ID NO: 31)
を、アンチセンスプライマーGRP-GST-3 (SEQ ID NO: 30) を用いて 94℃ 30 秒、72℃ 30
25 秒×25 サイクルで PCR を行い、5' 端、3' 端にそれぞれ BamHI、XhoI 切断配列が付加された GRP78 (アミノ酸 289-350 をコード) する cDNA 断片を得た。

これを BamHI、XhoI で切断し、同じく BamHI、XhoI で切断した大腸菌 GST 融合発現
ベクター (pGEX-6P-1) の GST コード領域の下流に挿入し、GRP78-GST 融合タンパク質

発現ベクター (pGEX-GRP78-C (289-350)) を構築した。

4-1-1-4. GST-GRP78-C (289-445) 発現ベクターの構築

pGEX-GRP78-full を鋳型にして、センスプライマーに GRP-GST-4 (SEQ ID NO: 31)
5 を、アンチセンスプライマーGRP-GST-5 (SEQ ID NO: 32) を用いて 94℃ 30 秒、72℃ 30
秒×25 サイクルで PCR を行い、5' 端、3' 端にそれぞれ BamHI、XhoI 切断配列が付加さ
れた GRP78 (アミノ酸 289-445 をコード) する cDNA 断片を得た。

これを BamHI、XhoI で切断し、同じく BamHI、XhoI で切断した大腸菌 GST 融合発現
ベクター (pGEX-6P-1) の GST コード領域の下流に挿入し、GRP78-GST 融合タンパク質
10 発現ベクター (pGEX-GRP78-C (289-445)) を構築した。

4-1-1-5. GST-GRP78-C (289-538) 発現ベクターの構築

pGEX-GRP78-full を鋳型にして、センスプライマーに GRP-GST-4 (SEQ ID NO: 31)
を、アンチセンスプライマーGRP-GST-6 (SEQ ID NO: 33) を用いて 94℃ 30 秒、72℃ 30
15 秒×25 サイクルで PCR を行い、5' 端、3' 端にそれぞれ BamHI、XhoI 切断配列が付加さ
れた GRP78 (アミノ酸 289-538 をコード) する cDNA 断片を得た。

これを BamHI、XhoI で切断し、同じく BamHI、XhoI で切断した大腸菌 GST 融合発現
ベクター (pGEX-6P-1) の GST コード領域の下流に挿入し、GRP78-GST 融合タンパク質
発現ベクター (pGEX-GRP78-C (289-538)) を構築した。

20

4-1-1-6. GST-GRP78 (345-385) 発現ベクターの構築

pGEX-GRP78-full を鋳型にして、センスプライマーに GRP-GST-7 (SEQ ID NO: 34)
を、アンチセンスプライマーGRP-GST-8 (SEQ ID NO: 35) を用いて 94℃ 30 秒、64℃ 30
秒、72℃ 30 秒×25 サイクルで PCR を行い、5' 端、3' 端にそれぞれ BamHI、XhoI 切断
25 配列が付加された GRP78 (アミノ酸 345-385 をコード) する cDNA 断片を得た。

これを BamHI、XhoI で切断し、同じく BamHI、XhoI で切断した大腸菌 GST 融合発現
ベクター (pGEX-6P-1) の GST コード領域の下流に挿入し、GRP78-GST 融合タンパク質
発現ベクター (pGEX-GRP78 (345-385)) を構築した。

4-1-1-7. GST-GRP78 (376-415) 発現ベクターの構築

pGEX-GRP78-full を鋳型にして、センスプライマーに GRP-GST-9 (SEQ ID NO: 36) を、アンチセンスプライマーGRP-GST-10 (SEQ ID NO: 37) を用いて 94℃ 30 秒、64℃
5 30 秒、72℃ 30 秒×25 サイクルで PCR を行い、5' 端、3' 端にそれぞれ BamHI、XhoI 切断配列が付加された GRP78 (アミノ酸 376-415 をコード) する cDNA 断片を得た。

これを BamHI、XhoI で切断し、同じく BamHI、XhoI で切断した大腸菌 GST 融合発現ベクター (pGEX-6P-1) の GST コード領域の下流に挿入し、GRP78-GST 融合タンパク質発現ベクター (pGEX-GRP78 (376-415)) を構築した。

10

4-1-1-8. GST-GRP78 (406-445) 発現ベクターの構築

pGEX-GRP78-full を鋳型にして、センスプライマーに GRP-GST-11 (SEQ ID NO: 38) を、アンチセンスプライマーGRP-GST-5 (SEQ ID NO: 32) を用いて 94℃ 30 秒、64℃ 30
15 秒、72℃ 30 秒×25 サイクルで PCR を行い、5' 端、3' 端にそれぞれ BamHI、XhoI 切断配列が付加された GRP78 (アミノ酸 406-445 をコード) する cDNA 断片を得た。

これを BamHI、XhoI で切断し、同じく BamHI、XhoI で切断した大腸菌 GST 融合発現ベクター (pGEX-6P-1) の GST コード領域の下流に挿入し、GRP78-GST 融合タンパク質発現ベクター (pGEX-GRP78 (406-445)) を構築した。

20 4-1-1-9. GST-GRP78 (345-445) 発現ベクターの構築

pGEX-GRP78-full を鋳型にして、センスプライマーに GRP-GST-7 (SEQ ID NO: 34) を、アンチセンスプライマーGRP-GST-5 (SEQ ID NO: 32) を用いて 94℃ 30 秒、64℃ 30
秒、72℃ 30 秒×25 サイクルで PCR を行い、5' 端、3' 端にそれぞれ BamHI、XhoI 切断配列が付加された GRP78 (アミノ酸 345-445 をコード) する cDNA 断片を得た。

25 これを BamHI、XhoI で切断し、同じく BamHI、XhoI で切断した大腸菌 GST 融合発現ベクター (pGEX-6P-1) の GST コード領域の下流に挿入し、GRP78-GST 融合タンパク質発現ベクター (pGEX-GRP78 (345-445)) を構築した。

以下に使用したプライマーの配列を示す。

GRP-GST-1 : aaaggatccg aggaggagga caagaaggag gacgtggg (SEQ ID NO: 28)

GRP-GST-2 : ttctcgcagc tacaactcat ctttttctgc tgtatcctc (SEQ ID NO: 29)

5 GRP-GST-3 : ttctcgcagc taatcagaat ctccaacac ttcttgacg ggc (SEQ ID NO: 30)

GRP-GST-4 : aaaggatccc ggcgcgaggt agaaaaggcc aaac (SEQ ID NO: 31)

GRP-GST-5 : ttctcgcagct aggtaggcac cactgtgttc cttgg (SEQ ID NO: 32)

GRP-GST-6 : ttctcgcagct agatttcttc aggtgtcagg cgatt (SEQ ID NO: 33)

GRP-GST-7 : ttggatccg tgttgaaga ttctgatttg aaga (SEQ ID NO: 34)

10 GRP-GST-8 : ttctcgcagct aggatggttc cttgccattg aagaa (SEQ ID NO: 35)

GRP-GST-9 : aaaggatcca aagatttctt caatggcaag ga (SEQ ID NO: 36)

GRP-GST-10 : ttctcgcagct ataccaggtc acctgtatct tgate (SEQ ID NO: 37)

GRP-GST-11 : aaaggatcct ctggtgatca agatacaggt gac (SEQ ID NO: 38)

15 4-1-2. 各 GST 融合 GRP78 タンパク質の発現誘導

これら構築した各大腸菌発現ベクターを用いて、それぞれ大腸菌 BL21 株にトランスフォームした。これら大腸菌を LB 培地（各 1 ml）で培養し、対数増殖期に IPTG（最終 1 mM）を添加し、タンパク質発現を誘導した。4～5 時間後に大腸菌を回収し、SDS

20 SDS-PAGE、続いて PVDF 膜にブロットし、ウエスタンブロットに用いた。

4-2. 各抗体のエピトープマップ

上記で調製した、GRP78 タンパク質の各領域 GST 融合タンパク質を用いて、ウエスタンブロットを行い、得られた各抗 GRP78 抗体が、GRP78 タンパク質のどの領域を認識する

25 るか調べた。

最初のウエスタンブロットの結果（図 7）より、FACS で細胞を染色しない GA-19 抗体は N 端半分（19-350）を、GA-23 抗体、GA-28 抗体、GA-31 抗体は、C 端の 538-654 の領域を認識していた。

一方、FACS で細胞を染色する GA-20 抗体、GA-21 抗体は、ウエスタンブロットの染色パターンから、350-445 の約 100 アミノ酸にまたがる領域を認識していることが明らかになった。

次に、この 350-445 の領域を 3 つの領域に分割した GST 融合タンパク質を作成し、
5 上記と同様にウエスタンブロットを行い GA-20 抗体、GA-21 抗体の結合領域の同定を行った。その結果、GA-20 抗体、GA-21 抗体のエピトープは、GRP78 タンパク質内アミノ酸番号 376-415 の 40 アミノ酸であることが分かった (図 8)。

10 実施例 5 : 細胞外領域認識抗 GRP78 抗体 (GA-20 抗体) を利用した細胞死誘導剤の作製

5-1. GA-20 抗体の可変領域のクローニングとアミノ酸配列の解析

ハイブリドーマ約 5×10^6 個から Trizol (#15596-018, Life technologies) を用いて total RNA を精製した。得られた total RNA $1 \mu\text{g}$ より SMART RACE cDNA Amplification Kit (CLONTECH #PT3269-1) を用い、添付のマニュアルにしたがって全長 cDNA を合成
15 した。得られた cDNA を鋳型にして、Advantage 2 PCR Enzyme System (CLONTECH #PT3281-1) を用い、以下の条件で PCR を行って GA-20 抗体の重鎖 (VH) 、および軽鎖 (VL) の可変領域をコードする遺伝子を増幅した。

軽鎖可変領域のクローニング用プライマー

20 ユニバーサルプライマーミックス (UPM) ~k (VL-k)

UPM : Kit に添付

VL-k : gct cac tgg atg gtg gga aga tg (SEQ ID NO: 39)

重鎖可変領域のクローニング用プライマー

25 UPM~VH-M

UPM : Kit に添付

VH-M : cca cca gat tct tat cag aca gg (SEQ ID NO: 40)

94℃ 5 秒、72℃ 2 分、5 サイクル

94℃ 5 秒、70℃ 10 秒、72℃ 2 分、5 サイクル

94℃ 5 秒、68℃ 10 秒、72℃ 2 分、27 サイクル

5. 上記操作により増幅した遺伝子断片を pCRII-TOPO (Invitrogen TOPO TA-cloning kit, #45-0640) に TA-クローニングし、その後それぞれのインサートについて ABI3730 シークエンサーにより塩基配列を確認した。

5-2. トキシン標識 GA-20_一本鎖 Fv 抗体 (GA20_PE40) の作製

- 10 5-2-1. GA20_PE40 発現ベクターの作製

5-2-1-1. pET22b_His_PE40 の作製

細胞表面に局在する GRP78 を特異的に認識する抗体 GA-20 抗体をベースにして、イムノトキシン (PE40) を標識した細胞死誘導抗体の作製を試みた。

- 15 まず GA-20 抗体の一本鎖 Fv (scFv) にトキシン (PE40) を付加したトキシン標識抗体 (GA20_PE40) をコードする発現ベクターの構築を行った。イムノトキシンである PE40 遺伝子は、ATCC より購入したプラスミド DNA (pJH8) を鋳型とし、以下の条件で PCR 増幅を行った。

- 20 5' 端に EcoRI 認識配列、続いて 18 アミノ酸からなるリンカー配列を付加したセンスプライマー (PE-1)、及び 5' 端に NotI 認識配列、続いて終止コドン、ER 移行シグナル配列 (KDEL)、FLAG タグ配列を付加したアンチセンスプライマー (PE-2) を用い、10 ×KOD-Plus バッファー、2mM dNTPs、25mM MgSO₄、KOD-Plus (タカラ社製) 中で、

98℃ 10 秒、72℃ 5 秒、68℃ 4 分、5 サイクル

98℃ 10 秒、70℃ 5 秒、68℃ 4 分、5 サイクル

98℃ 10 秒、68℃ 4 分、25 サイクル

- 25 で PCR 増幅を行った。プライマー配列は以下に示すとおりである。

PE-1 : taagaattcg gtggcgcgcc ggagttcccg aaaccgtcca ccccgccggg ttcttctggt
ttagagggcg gcagcctggc cgcgctg (SEQ ID NO: 41)

PE-2 : acttagcggc cgctcactac agttcgtctt tcttatcgtc gtcaccttg tagtccggcg
gtttgccggg ctggc (SEQ ID NO: 42)

この PCR 反応による増幅産物を pGEM-T Easy Vector System I (Promega 社製) を用
5 いて pGEM-T easy に挿入した。配列は ABI3730 シークエンサーにより確認した。

次に、大腸菌発現ベクター pET22b ベクター (Novagen 社製) の PelB シグナル配列下
に His タグ配列、HindIII 認識配列、EcoRI 認識配列、NotI 認識配列を挿入し、pET22b_His
の作製を行った。

そして、PCR 増幅により pGEM-T easy にクローニングした PE40 遺伝子を EcoRI、NotI
10 により消化してアガロースゲルより切り出し、この遺伝子断片を pET22b_His の
EcoRI-NotI 間へ挿入し、pET22b_His_PE40 を作製した。

5-2-1-2. pET22b_His_GA20scFv-PE40 の構築

GA20 抗体の一本鎖 Fv、すなわち 15 アミノ酸からなるリンカー配列 ((
15 GlyGlyGlyGlySer)₃) (SEQ ID NO: 43) で連結した GA-20 抗体の重鎖可変領域と軽鎖
可変領域をコードする遺伝子断片を以下の条件で PCR を行い増幅した。

まず pCRII-TOPO に TA-クローニングした GA-20 抗体重鎖可変領域を鋳型にして、重
鎖可変領域はセンスプライマー (GA20-1 ; SEQ ID NO: 44)、アンチセンスプライマー
(GA20-2 ; SEQ ID NO: 45) を用い、一方、軽鎖可変領域はセンスプライマー (GA20-3
20 ; SEQ ID NO: 46)、アンチセンスプライマー (GA20-4 ; SEQ ID NO: 47) を用い、pyrobest
DNA ポリメラーゼ (TAKARA#R005) により 94℃ 1 分反応後、94℃ 30 分、72℃ 30 分、
25 サイクルで PCR 増幅を行った。

次に、ここで得られた重鎖、および、軽鎖可変領域の PCR 産物を S-300 HR カラム (
25 Amersham Biosciences #27-5130-01) で精製して、各々 1 μL ずつを同一チューブに混
合し pyrobest DNA ポリメラーゼを用いて 94℃ 1 分反応後、94℃ 30 分、72℃ 30 分、
5 サイクルでアニール反応を行った。

アニール後の反応液 1 μ L をプライマー GA20-1 (SEQ ID NO: 44)、GA20-4 (SEQ ID NO: 47) を用いて以下の条件で pyrobest DNA ポリメラーゼ により 94°C 1 分反応後、94°C 30 分、72°C 1 分、25 サイクルで PCR 増幅を行った。

- 5 増幅した断片を S-400 HR カラム (Amersham Biosciences #27-5140-01) で精製して、EcoRI-HindIII で切断し、アガロースゲルより切り出した。これを 5-2-1-1 で作製した pET22b_His_PE40 の HindIII、EcoR 間に挿入して、塩基配列を確認し、pET22b_His_GA20scFv-PE40 を作製した。

- 10 用いたプライマーの配列を以下に示す。

GA20-1 : aaaagcttga ggtccagctg caacagtctg g (SEQ ID NO: 44)

GA20-2 : cccgaaccac caccaccga accaccacca cctgaggaga cggtagctga gggtcc (SEQ ID NO: 45)

GA20-3 : tggttcgggt ggtgggtggtt cgggtgggtgg cggatcggac attgtgatgt cacagictcc
15 atcct (SEQ ID NO: 46)

GA20-4 : ttgaattctt tgatttccag cttggtgcct c (SEQ ID NO: 47)

得られた GA20_PE40 の塩基配列を SEQ ID NO: 24 に、その塩基配列が規定するアミノ酸配列を SEQ ID NO: 25 にそれぞれ示す。

- 20 5-2-2. トキシン標識 GA-20_一本鎖 Fv 抗体 (GA20_PE40) の精製

pET22b_His_GA20scFv-PE40 でトランスフォームした大腸菌 BL21 株を 50 μ g/ml のアンピシリンを含む LB Agar plate に撒いた。生育したシングルコロニーをピックアップし、50 μ g/ml の carbenicillin (コスモバイオ) を含む LB 培地 (3ml) で培養した。4 時間培養後、生育した菌を 200ml の carbenicillin (50 μ g/ml) を含む LB 培地に
25 拡大し、培養を続けた。対数増殖期になったところで、培養液を新しい LB 培地 (carbenicillin 入り、200ml) に置換し、IPTG (final 1mM) を添加して、タンパク質発現の誘導を行った。5 時間培養後、菌を遠心により回収した。

プロテアーゼインヒビターコンプリート EDTA フリー (ロッシュ) 存在下で 20 ml

B-BER（ピラス社）に懸濁して菌を可溶化し、続いて不溶性タンパク質を遠心により除去して、cell lystate を調製した。この細胞可溶化サンプルを HisTrap カラム（HiTrap chelating HP 1 ml, アマシャムファルマシア）にアプライし、添付のプロトコールに従って GA20-PE40 の精製を行った。すなわち、カラムに吸着したタンパク質を、結合
5 バッファー（20mM リン酸ナトリウム、0.5M NaCl、10mM イミダゾール、pH 7.4）で洗浄し、溶出バッファー（20mM リン酸ナトリウム、0.5M NaCl、500mM イミダゾール、pH 7.4）で 500 μ l ずつ計 7 フラクション分取することにより溶出を行った。

溶出した各フラクションについて、目的のトキシン標識 GA20 抗体がどのフラクションに溶出されているかを確認するため、GRP78 に対する結合活性を指標にした ELISA
10 アッセイを行い、溶出フラクション結合活性を調べた。ELISA は以下のとおり実施した。大腸菌より精製した GST-GRP78、あるいはネガティブコントロールとして HB-EGF タンパク質（R&D 社）を 1 μ g/ml でコートしたプレート（NUNC）に、Diluent バッファー（1%BSA、50 mM Tris、1 mM MgCl₂、150 mM NaCl、0.05% Tween20）で 40 倍に希釈した各フラクションを添加した。室温で 1 時間反応後、TBS-T（TBS- 0.05% Tween20）
15 で 3 回プレートを洗浄し、抗 Flag 抗体（M2 抗体、シグマ）を 1 μ g/ml 加え、室温で 1 時間インキュベートした。再び TBS-T で 3 回洗浄した後、アルカリフォスファターゼ標識抗マウス IgG（ZYMED）で 1 時間反応後、1mg/ml 基質（シグマ）で発色を行った。

その結果、溶出フラクション 2、3（Elute 2、3）で GRP78 に特異的な結合活性が認められ、このことより Elute 2、3 に GA20-PE40 タンパク質が濃縮されていることが確
20 認された（図 9 下）。

そこで Elute 2、3、4 を、PD-10 カラム（GE ヘルスケア）を用いて、添付の説明文書に従って PBS へのバッファー置換を行った。これらは、0.22 μ m のフィルター（ミリポア）を通しろ過滅菌を行い、細胞障害活性の検討に用いた。

25 5-3. トキシン標識抗 GRP78 抗体（GA20-PE40）の抗腫瘍活性の解析

得られた GA20-PE40 について、細胞死誘導活性を解析した。

ハムスター卵巣細胞 DG44 は、 1×10^3 /well で、前立腺癌細胞株 DU145、22Rv1 は 6×10^3 /well で 90 μ l/well ずつ 96 well plate に撒いた。翌日、GA20-PE40 分画（Elute 2

、3、4) および PBS を $10 \mu\text{l}/\text{well}$ ずつ添加し、 37°C で培養した。5 日後に、WST-8 (同仁化学) 試薬により生細胞数を測定し、コントロール (PBS 添加群) と比較した生細胞の割合を数値化し、グラフにした。

その結果、DG44 では細胞生育における GA20-PE40 の影響はまったく認められなかった (図 10C) のに対し、2 種類の前立腺癌細胞株 (DU145、22Rv1) では、GRP78 結合活性が認められた Elute 2、3 で、細胞障害活性が認められた (DU145 について図 10A、22Rv1 について図 10B)。

この結果から、GRP78 の細胞外エピトープ (350-445) に対する抗体が、抗腫瘍剤として有用であることが明らかになった。

10

実施例 6 : 再免疫による抗 GRP78 抗体の取得

6-1. 免疫原 GST-GRP78 (376-415) タンパク質の調製

実施例 4 に記載したこれまでの解析から、GRP78 タンパク質のアミノ酸 376 位~415 位からなる領域が GRP78 の細胞外領域であることが推測された。そこで次に、この領域を再免疫し、GRP78 の細胞外領域を認識するアフィニティの強い抗体の樹立を試みた。

まず実施例 4 に記載した GST-GRP78 (376-415) 発現ベクター (pGEX-GRP78 (376-415)) で形質転換した大腸菌 (BL21) を LB 培地 (250 ml) で培養し、 OD_{610} が 0.5 以上になったところで IPTG (1 mM) によるタンパク質の発現誘導を行った。5 時間培養の後大腸菌を集菌し、25 ml の B-PER (ピラス社) で可溶化した。次に、この可溶化した大腸菌溶解物を PBS で 10 倍に希釈し、これに PBS で平衡化したグルタチオンセファロース 4B (アマシャムファルマシア) を添加し、 4°C で一晩インキュベートした。その後、グルタチオンセファロース 4B を PBS で数回洗浄して未吸着タンパク質を除去し、目的タンパク質を 20 mM グルタチオンで溶出した。

溶出フラクションを SDS-PAGE 後、CBB により染色し、目的のタンパク質を含むフラクションをまとめた。このサンプルをさらにゲルろ過クロマトグラフィー (Superdex 200 16/60、GE ヘルスケア) を用いて PBS 中で不純タンパク質と分離を行い、目的タンパク質だけを高純度に精製した。この精製タンパク質を免疫原として以下の実験に使

用した。

6-2. GST-GRP78 (376-415) タンパク質の免疫

実施例 6-1 で精製した GST-GRP78 (376-415) を、実施例 1-2 と同様の手法によりマウス [(MRL/lpr、オス、4 週齢) (Balb/c、メス、6 週齢) : いずれも日本チャールスリバーより購入] に免疫した。ハイブリドーマの作製は、実施例 1-3 に記載のとおり行った。

6-3. 抗 GRP78 抗体のスクリーニング

10 6-3-1. MBP-GRP78 (376-415) タンパク質の精製

GRP78 (アミノ酸 376 位~415 位) とマルトース結合タンパク質 (MBP) の融合タンパク質 (MBP-GRP78 (376-415)) の調製は以下のとおり行った。

実施例 4 で作成した pGEX-GRP78 (376-415) を BamHI-SalI で切断し、GRP78 (376-415) をコードする遺伝子断片を切り出した。これを、pMAL-c2X (New England BioLabs) の BamHI-SalI 間に挿入し、MBP-GRP78 (376-415) 発現ベクター pMAL-c2X-GRP78 (376-415) を構築した。

次に、このベクターで形質転換した大腸菌 BL21 株を LB 培地 (250 ml) で培養し、 OD_{610} が 0.5 以上になったところで IPTG (1 mM) によるタンパク質の発現誘導を行った。5 時間培養の後大腸菌を遠心により集菌し、25 ml の B-PER (ピアス社) で可溶化した。次に、この可溶化した大腸菌溶解物をカラムバッファー (20 mM Tris、pH 7.5、200 mM NaCl、1 mM EDTA) で 5 倍に希釈し、これにカラムバッファーで平衡化したアミロースレジン (New England BioLabs) を添加し、4℃で一晩インキュベートした。その後、カラムバッファーでアミロースレジンを数回洗浄して未吸着タンパク質を除去し、目的タンパク質を溶出バッファー (10 mM マルトースを含むカラムバッファー) で溶出した。溶出フラクションを SDS-PAGE 後、CBB 染色により目的のタンパク質を含むフラクションを同定し、これらを 1 つにまとめ、PD10 カラムにより PBS にバッファー置換した。ここで精製した MBP-GRP78 (376-415) は、結合抗体の ELISA スクリーニング用として以下の実験に使用した。

6-3-2. GRP78 結合抗体の ELISA によるスクリーニング（一次スクリーニング）

実施例 6-3-1 で精製した MBP-GRP78 (376-415) を $1\mu\text{g/ml}$ でコートした ELISA 用プレートを用いて、GRP78 タンパク質のアミノ酸 376 位～415 位の領域に結合する抗体のスクリーニングを行った。

方法は実施例 2-1 に記載のとおりである。MBP-GRP78 (376-415) タンパク質への結合活性を指標にした一次スクリーニングで絞られた GRP78 結合抗体を、引き続いて以下に記載する二次スクリーニングにかけた。

10 6-3-3. 細胞表面に局在する抗 GRP78 抗体の FACS によるスクリーニング（二次スクリーニング）

一次スクリーニングで得られた GRP78 結合抗体について、次に前立腺癌細胞株 (DU145 および 22Rv1 (ATCC CRL-2505)) に対する結合活性を指標に二次スクリーニングを行った。方法は実施例 2-2 に記載のとおりである。

15 その結果、前立腺癌細胞株を FACS で染色する抗体として、あらたに GC-18 抗体、GC-20 抗体、GD-4 抗体、GD-17 抗体の 4 抗体が見出された。

これら抗体について、実施例 2-3 に記載の方法で限界希釈し、モノクローン化した。これら抗体のサブタイプは、実施例 2-4 に記載の方法にて決定した。各抗体のサブタイプは以下に示すとおりである。

20 表 2

抗体	サブタイプ
GC-18	G1
GC-20	G1
GD-4	G1
GD-17	G1

続いて、実施例 2-5 に記載の方法により抗体の精製を行い、以下詳細に抗体の性質について解析を行った。

6-4. 再免疫により新たに得られた抗体の解析

6-4-1. FACS 解析

精製した 4 種類の抗体が癌細胞の細胞表面を染色することを確認するため、前立腺癌細胞株 (22Rv1) を用いて、FACS 解析を行った。各抗体 (10 μ g/ml) で細胞を染色し

5、以下実施例 3-2-1 に記載の方法により FACS 解析を行った。

その結果、これらの抗体はいずれも、22Rv1 細胞の細胞表面に結合することが確認された (図 11)。

6-4-2. エピトープマッピング

10 ここで得られた 4 種類の抗体は、GST-GRP78 (376-415) タンパク質を免疫して樹立していることから、GRP78 のアミノ酸 376 位~415 位の部分領域を認識している抗体である。そこで次に、さらにこの領域を図 12A に示すとおり 4 つの領域 (アミノ酸 376 位~391 位 (すなわち、SEQ ID NO: 3 のアミノ酸 1~16)、アミノ酸 384 位~399 位 (すなわち、SEQ ID NO: 3 のアミノ酸 9~24)、アミノ酸 392 位~407 位 (すなわち、SEQ ID NO: 3 のアミノ酸 17~32)、アミノ酸 400 位~415 位 (すなわち、SEQ ID NO: 3 のアミノ酸 25~40)) に分割し、4 種類の抗体がそれぞれ GRP78 のアミノ酸 376 位~415 位中のどの配列を認識しているかを調べた。

6-4-2-1. エピトープマップ用 GST 融合タンパク質の調製

20 6-4-2-1-1. エピトープマップ用 GST 融合タンパク質発現ベクターの作成

まず GRP78 タンパク質のアミノ酸 376 位~391 位、アミノ酸 384 位~399 位、アミノ酸 392 位~407 位、そしてアミノ酸 400 位~415 位からなる領域をそれぞれコードする DNA 断片を以下のとおり作成した。

GRP78 (376-391) (すなわち、SEQ ID NO: 3 のアミノ酸 1~16) をコードする DNA 断片はオリゴマー (GEP1/GEP2 ; それぞれ SEQ ID NO: 48 および 49) を、GRP78 (384-399) (すなわち、SEQ ID NO: 3 のアミノ酸 9~24) をコードする DNA 断片はオリゴマー (GEP3/GEP4 ; それぞれ SEQ ID NO: 50 および 51) を、GRP78 (392-407) (すなわち、SEQ ID NO: 3 のアミノ酸 17~32) をコードする DNA 断片はオリゴマー (GEP5/GEP6 ; それ

ぞれ SEQ ID NO: 52 および 53) を、GRP78 (400-415) (すなわち、SEQ ID NO: 3 のアミノ酸 25~40) をコードする DNA 断片はオリゴマー (GEP7/GEP8 ; それぞれ SEQ ID NO: 54 および 55) をそれぞれアニールさせることにより作製した。

5 以下にここで使用したオリゴマーの配列を示す。

GEP1 : gatccaaaga gtcttccaat ggcaaggaaac catcccgctgg cataaaccca gatc (SEQ ID NO: 48)

GEP2 : tcgagatctg ggtttatgcc acgggatggt tccttgccat tgaagaactc ttg (SEQ ID NO: 49)

10 GEP3 : gatcccatc ccgtggcata aaccagatg aagctgtagc gtatgggtgt gctc (SEQ ID NO: 50)

GEP4 : tcgagagcag caccatagc tacagcttca tctgggttta tgccacggga tggg (SEQ ID NO: 51)

GEP5 : gatccgaagc tgtagcgtat ggtgtgtgtg tccaggctgg tgtgtctctt ggtc (SEQ ID NO: 52)

GEP6 : tcgagaccag agagcacacc agccctggaca gcagcaccat acgtacagc ttgc (SEQ ID NO: 53)

GEP7 : gatccgtcca ggctgggtgtg ctctctgggtg atcaagatac aggtgacctg gtac (SEQ ID NO: 54)

20 GEP8 : tcgagtagca ggtcacctgt atcttgatca ccagagagca caccagcctg gacg (SEQ ID NO: 55)

ここで作製した DNA 断片を、BamHI、XhoI で切断した大腸菌 GST 融合発現ベクター (pGEX-6P-1) の GST コード領域の下流に挿入し、各領域をコードする GRP78-GST 融合タンパク質発現ベクター (それぞれ pGEX-GRP78 (376-391)、pGEX-GRP78 (384-399)、
25 pGEX-GRP78 (392-407)、pGEX-GRP78 (400-415)) を構築した。

6-4-2-1-2. 各 GST 融合 GRP78 タンパク質の発現誘導

これら構築した大腸菌発現ベクターは、大腸菌 BL21 株にトランスフォームし、実施

例 4-1-2 に記載の方法によりタンパク質の発現誘導を行った。その結果、図 12B に示すとおり、目的のタンパク質が大腸菌で発現していることが確認された。そこでこのタンパク質を用いて、以下エピトープマップに用いた。

5 6-4-2-2. 各抗体のエピトープマップ

上記のとおり調製した GST 融合タンパク質を用いてウエスタンブロットを行い、得られた各抗 GRP78 抗体が、GRP78 タンパク質のどの領域を認識するか調べた。

ウエスタンブロットの染色パターン（図 13）から、GD-17 抗体は GRP78 のアミノ酸 384 位～391 位にまたがる領域を、GC-18 抗体と GC-20 抗体はアミノ酸 392 位～407 位にまたがる領域を、また GD-4 抗体はアミノ酸 400 位～415 位の領域を認識していることが分った。また、初期に得られた GA-20 抗体も GD-4 抗体と同じ領域を認識していることが分かった（図 13）。

6-4-3. 可変領域のクローニングとアミノ酸配列の決定

15 新たに得られた抗体（GC-18 抗体、GC-20 抗体、GD-4 抗体、GD-17 抗体）の可変領域のクローニングとアミノ酸配列の解析を実施例 5-1 に記載の方法により行った。ただし、これら抗体はすべて IgG₁ であったため、重鎖可変領域は、以下の VH-G1 プライマー（SEQ ID NO: 56）：

VH-G1 : cca cca gat tct tat cag aca gg (SEQ ID NO: 56)

20 を用いてクローニングを実施した。

増幅した軽鎖および重鎖遺伝子断片を pCRII-TOPO (Invitrogen TOPO TA-cloning kit、#45-0640) に TA-クローニングし、その後それぞれのインサートについて塩基配列を確認した。

25

GRP78 のアミノ酸 392 位～407 位にまたがる領域に結合する GC-18 抗体の重鎖可変領域の塩基配列を SEQ ID NO: 57 に、重鎖可変領域の塩基配列アミノ酸配列を SEQ ID NO: 58 に、軽鎖可変領域の塩基配列を SEQ ID NO: 59 に、軽鎖可変領域のアミノ酸配列を

SEQ ID NO: 60 に、それぞれ記載する。また、GC-18 抗体の重鎖可変領域の CDR1 のアミノ酸配列を SEQ ID NO: 61 に、CDR2 のアミノ酸配列を SEQ ID NO: 62 に、CDR3 のアミノ酸配列を SEQ ID NO: 63 に、軽鎖可変領域の CDR1 のアミノ酸配列を SEQ ID NO: 64 に、CDR2 のアミノ酸配列を SEQ ID NO: 65 に、CDR3 のアミノ酸配列を SEQ ID NO: 66 5 に、それぞれ記載する。

GRP78 のアミノ酸 392 位～407 位にまたがる領域に結合する GC-20 抗体の重鎖可変領域の塩基配列を SEQ ID NO: 67 に、重鎖可変領域のアミノ酸配列を SEQ ID NO: 68 に、軽鎖可変領域の塩基配列を SEQ ID NO: 69 に、軽鎖可変領域のアミノ酸配列を SEQ ID 10 NO: 70 に、それぞれ記載する。また、GC-20 抗体の重鎖可変領域の CDR1 のアミノ酸配列を SEQ ID NO: 71 に、CDR2 のアミノ酸配列を SEQ ID NO: 72 に、CDR3 のアミノ酸配列を SEQ ID NO: 73 に、軽鎖可変領域の CDR1 のアミノ酸配列を SEQ ID NO: 74 に、CDR2 のアミノ酸配列を SEQ ID NO: 75 に、CDR3 のアミノ酸配列を SEQ ID NO: 76 に、それぞれ記載する。

15

GRP78 のアミノ酸 400 位～415 位の領域に結合する GD-4 抗体の重鎖可変領域の塩基配列を SEQ ID NO: 77 に、重鎖可変領域のアミノ酸配列を SEQ ID NO: 78 に、軽鎖可変領域の塩基配列を SEQ ID NO: 79 に、軽鎖可変領域のアミノ酸配列を SEQ ID NO: 80 に、それぞれ記載する。また、GD-4 抗体の重鎖可変領域の CDR1 のアミノ酸配列を SEQ 20 ID NO: 81 に、CDR2 のアミノ酸配列を SEQ ID NO: 82 に、CDR3 のアミノ酸配列を SEQ ID NO: 83 に、軽鎖可変領域の CDR1 のアミノ酸配列を SEQ ID NO: 84 に、CDR2 のアミノ酸配列を SEQ ID NO: 85 に、CDR3 のアミノ酸配列を SEQ ID NO: 86 に、それぞれ記載する。

25 GRP78 のアミノ酸 384 位～391 位にまたがる領域に結合する GD-17 抗体の重鎖可変領域の塩基配列を SEQ ID NO: 87 に、重鎖可変領域のアミノ酸配列を SEQ ID NO: 88 に、軽鎖可変領域の塩基配列を SEQ ID NO: 89 に、軽鎖可変領域のアミノ酸配列を SEQ ID NO: 90 に、それぞれ記載する。また、GD-17 抗体の重鎖可変領域の CDR1 のアミノ酸配

列を SEQ ID NO: 91 に、CDR2 のアミノ酸配列を SEQ ID NO: 92 に、CDR3 のアミノ酸配列を SEQ ID NO: 93 に、軽鎖可変領域の CDR1 のアミノ酸配列を SEQ ID NO: 94 に、CDR2 のアミノ酸配列を SEQ ID NO: 95 に、CDR3 のアミノ酸配列を SEQ ID NO: 96 に、それぞれ記載する。

5

実施例 7: トキシン標識 GD17 一本鎖抗体 (GD17_scFv-PE40) による薬効解析

7-1. GD17_scFv-PE40 発現ベクターの作製

GD-17 抗体の一本鎖 Fv、すなわち 15 アミノ酸からなるリンカー配列 ((GlyGlyGlyGlySer)₃) (SEQ ID NO: 43) で連結した GD-17 抗体の重鎖可変領域と軽鎖

10 可変領域をコードする遺伝子断片を以下の条件で PCR を行い増幅した。

まず pCRII-TOPO に TA-クローニングした GD-17 抗体重鎖可変領域を鋳型にして、重鎖可変領域はセンスプライマー (GD17-1、SEQ ID NO: 97)、アンチセンスプライマー (GD17-2、SEQ ID NO: 98) を用い、一方、軽鎖可変領域はセンスプライマー (GD17-3、SEQ ID NO: 99)、アンチセンスプライマー (GD17-4、SEQ ID NO: 100) を用い、pyrobest

15 DNA ポリメラーゼ (TAKARA#R005) により 94℃ 1 分反応後、94℃ 30 分、72℃ 30 分、25 サイクルで PCR 増幅を行った。

次に、ここで得られた重鎖、および、軽鎖可変領域の PCR 産物を S-300 HR カラム (Amersham Biosciences #27-5130-01) で精製して、各々 1 μL ずつを同一チューブに混合し pyrobest DNA ポリメラーゼを用いて 94℃ 1 分反応後、94℃ 30 分、72℃ 30 分、

20 5 サイクルでアニール反応を行った。

アニール後の反応液 1 μL をプライマー GD17-1 (SEQ ID NO: 97)、GD17-4 (SEQ ID NO: 100) を用いて以下の条件で pyrobest DNA ポリメラーゼにより 94℃ 1 分反応後、94℃ 30 分、72℃ 1 分、25 サイクルで PCR 増幅を行った。

増幅した断片を S-400 HR カラム (Amersham Biosciences #27-5140-01) で精製して

25 、EcoRI-HindIII で切断し、アガロースゲルより切り出した。これを実施例 5-2-1-1

で作製した pET22b_His_PE40 の HindIII、EcoRI 間に挿入して、塩基配列を確認し、pET22b_His_GD17scFv-PE40 を作製した。

用いたプライマーの配列を以下に示す。

GD17-1 : aaaagcttca ggttcagctc cagcagtctg g (SEQ ID NO: 97)

GD17-2 : cccgaaccac caccaccga accaccacca cctgaggaga ctgtgagagt ggtgcct (SEQ ID NO: 98)

5 GD17-3 : tgggtcgggt ggtgggtggtt cgggtgggtgg cggatcggat gttgtgatga cccaaactcc ac (SEQ ID NO: 99)

GD17-4 : ttgaattctt tcagctccag cttggtccc (SEQ ID NO: 100)

得られた GD17scFv_PE40 の塩基配列を SEQ ID NO: 101 に、その塩基配列が規定する

10 アミノ酸配列を SEQ ID NO: 102 にそれぞれ示す。

7-2. トキシン標識一本鎖抗体の大量精製

pET22b_His_GD17scFv-PE40 で形質転換した大腸菌 BL21 株を carbenicillin (50 μ g/ml) を含む LB 培地で培養した。対数増殖期になったところで IPTG (最終用量 1 mM
15) を添加し、室温 (24℃) で一晚培養してタンパク質誘導を行った。遠心にて回収した大腸菌は、結合バッファー (20 mM リン酸ナトリウム、500 mM NaCl、20 mM イミダゾール、pH 7.4) 中に懸濁し、ソニケーションにより破碎し、可溶性画分を HisTrap FF crude カラム (GE ヘルスケア) にかけた。その後目的タンパク質を溶出バッファー (20 mM リン酸ナトリウム、500 mM NaCl、500 mM イミダゾール、pH 7.4) で溶出し、TBS
20 バッファーで 10 倍程度希釈した後、これを M2 アガロース (シグマ) を充填して作製したアフィニティゲルにかけた。AKTA エクスプローラ (GE ヘルスケア) を用いて目的タンパク質を M2 溶出バッファー (0.1 M グリシン-HCl、pH. 3.5) で溶出し、これを速やかに PD10 カラム (GE ヘルスケア) を用いて PBS にバッファー置換し最終標品とした。

25 精製した GD17scFv-PE40 は、SDS-PAGE 後 CBB 染色を行い、100%の純度で精製されていることを確認した (図 14)。

7-3. GRP78 タンパク質に対する結合活性の解析

次に、精製 GD17scFv-PE40 タンパク質の GRP78 結合活性を解析した。4℃ 保存、37℃ で一晩置いたもの、および、凍結融解を行った標品で、それぞれ固相化 GRP78 に対する結合活性を ELISA で測定・比較した。

各標品を希釈用バッファー（1% BSA、50 mM Tris、1 mM MgCl_2 、150 mM NaCl、0.05 % Tween 20）で希釈し、これを大腸菌より精製した GST-GRP78（1 $\mu\text{g/ml}$ ）でコートしたプレート（NUNC）に添加した。室温で 1 時間反応後、TBS-T（TBS-0.05% Tween 20）で 3 回プレートを洗浄し、抗 Flag 抗体（M2 抗体、シグマ）を 1 $\mu\text{g/ml}$ 加え、室温で 1 時間インキュベートした。再び TBS-T で 3 回洗浄した後、アルカリフォスファターゼ標識抗マウス IgG（ZYMED）で 1 時間反応後、1 mg/ml 基質（シグマ）で発色を行った。

10。

その結果、GD17scFv-PE40 タンパク質の GRP78 タンパク質に対する結合活性は、4℃ 保存、37℃ で一晩置いたもの、および、凍結融解を行った標品でいずれも $\text{EC}_{50}=1.3 \text{ nM}$ 前後であることが分かり、本精製標品は比較的安定なタンパク質であることが示された（図 15）。

15

7-4. in vitro 細胞死誘導活性の解析

次に、精製した GD17scFv-PE40 の細胞死誘導活性について、癌細胞株（22Rv1、LNCap、MCF7、BxPC3、PANC1、SKOV3）あるいは、ヒト由来正常細胞株（HUVEC、MRC5）、マウス由来正常細胞株（CHO、NIH3T3、BaF3）を用いて解析した。

20 実験に用いた細胞株は、HUVEC は CAMBREX 社より、その他の細胞株は ATCC より購入し、それぞれ入手もとの指南書に従って培養を行った。

各細胞を 96 well プレートに撒き、翌日、GD17scFv-PE40 を 10% FCS を含む RPMI1640 培地（インビトロジェン）で各濃度に希釈し、細胞に添加した。5 日間培養後、生細胞の数を WST-8（ナカライ）にて測定した。

25 その結果、癌細胞に対しては、細胞ごとに感受性に差があるものの、最大活性の 50 % の活性を示す濃度（ EC_{50} 値）が、2~20 nM 程度と強い細胞死誘導活性を有することが確認された（図 16A）。特に、MCF7 や 22Rv1 細胞に対しては EC_{50} 値が 2~4 nM 程度であり強力な細胞障害活性が確認された。一方、ヒトおよびマウス正常細胞に対しては

、まったく活性がないか、高濃度での添加でわずかに細胞障害活性が確認される程度であった（図 16B）。

この感受性の差が、実験に用いた細胞間における GRP78 タンパク質の発現の有無によるものでないことを確認するため、GD-17 抗体を用いてウエスタンブロットを行った。
5。細胞より定法に従って細胞溶解物を調製し、SDS-PAGE 後、GD-17 抗体（2 μ g/ml）を用いてウエスタンブロットを行った。図 17 の結果より、GD17scFv-PE40 による細胞障害活性が認められなかった細胞株においても GD-17 抗体に特異的に染まるバンドが検出され、このことから、GD17scFv-PE40 による癌細胞特異的な細胞障害活性は、癌細胞と正常細胞での GRP78 タンパク質の発現の有無によるのではなく、両細胞間における
10 GRP78 タンパク質の局在の違いに起因するものと考えられた。

7-5. in vivo 抗腫瘍活性の解析

ヒト前立腺癌細胞株 22Rv1 細胞（ATCC CRL-2505）を、0.05%トリプシン添加 0.02%EDTA 溶液で回収後、細胞数 1×10^7 細胞/0.2 mL HBSS（SIGMA Cat. No. H 9269）で
15 ヌードマウス（オス、7 週齢（CAnN.Cg-Foxn1^{nu}/CrlCrlj（BALB-nu/nu）：日本チャールス・リバー株式会社）の腹部皮下に移植した。腫瘍の生着を確認し、移植 16 日目（day16）に腫瘍体積と体重で 7 群（対照群 1 群、薬剤投与群 6 群）に群分けを行った。

群分けの翌日（day17）、day21、day23、day26、day29 の各日に対照群に生理食塩液
20、薬剤投与群に 0.5 mg/kg の用量の GD17scFv-PE40 を、10 mL/kg の投与量で静脈内に瞬時投与した。経時的に腫瘍体積を測定し、最終投与 2 日後（day31）を最終測定とした。

図 18 にその結果を示す。最終測定時の腫瘍増殖抑制率は 47%であり、腫瘍体積のデータをノンパラメトリック型 Dunnett 多重比較により解析した結果、0.5 mg/kg 投与群
25 で有意な腫瘍増殖抑制効果が見出された。この結果より、GRP78 を標的とした GD17scFv-PE40 の有効性が in vivo においても示され、GRP78 を標的とする抗体が癌治療抗体として有用であることが証明された。

産業上の利用可能性

本発明は、GRP78 への結合活性を有し、かつインターナライズすることができる新規な抗体を提供することにより、GRP78 を細胞表面に露出している種々の腫瘍や癌を治療するために使用することができる新規な医薬組成物を提供することができることを示した。また、この様な特性を有する抗体を使用することにより、種々の腫瘍や癌の診断方法を提供することができる。

請求の範囲

1. グルコース制御タンパク質 78 (glucose-regulated protein 78 ; GRP78) に結合する抗体を含む、医薬組成物。
2. 抗癌剤である、請求項 1 記載の組成物。
- 5 3. 抗体がモノクローナル抗体である、請求項 1 または 2 に記載の組成物。
4. 抗体が細胞表面に局在した GRP78 に結合する抗体である、請求項 1 から 3 のいずれかに記載の組成物。
5. 抗体が GRP78 を発現する細胞にインターナライズされる抗体である、請求項 1 から 4 のいずれかに記載の組成物。
- 10 6. 抗体が SEQ ID NO: 3 に記載のエピトープに結合する抗体である、請求項 1 から 5 のいずれかに記載の組成物。
7. 抗体が細胞障害性物質が結合した抗体である、請求項 1 から 6 のいずれかに記載の組成物。
8. GRP78 に結合する、モノクローナル抗体。
- 15 9. 細胞表面に発現した GRP78 に結合することを特徴とする、請求項 8 に記載の抗体。
10. GRP78 を発現する細胞にインターナライズされることを特徴とする、請求項 8 または 9 に記載の抗体。
11. SEQ ID NO: 3 に記載のエピトープに結合することを特徴とする、請求項 8 から 10 のいずれかに記載の抗体。
- 20 12. 以下の (a) ~ (f) のいずれかの抗体：
 - (a) CDR1 として SEQ ID NO: 8 に記載のアミノ酸配列を有し、CDR2 として SEQ ID NO: 9 に記載のアミノ酸配列を有し、CDR3 として SEQ ID NO: 10 に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域と、CDR1 として SEQ ID NO: 11 に記載のアミノ酸配列を有し、CDR2 として SEQ ID NO: 12 に記載のアミノ酸配列を有し、CDR3 として SEQ ID NO: 13 に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を有する抗体；
 - (b) CDR1 として SEQ ID NO: 18 に記載のアミノ酸配列を有し、CDR2 として SEQ ID NO: 19 に記載のアミノ酸配列を有し、CDR3 として SEQ ID NO: 20 に記載のアミノ酸配

列を有する重鎖可変領域と、CDR1 として SEQ ID NO: 21 に記載のアミノ酸配列を有し、CDR2 として SEQ ID NO: 22 に記載のアミノ酸配列を有し、CDR3 として SEQ ID NO: 23 に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を有する抗体；

(c) CDR1 として SEQ ID NO: 61 に記載のアミノ酸配列を有し、CDR2 として SEQ ID NO: 62 に記載のアミノ酸配列を有し、CDR3 として SEQ ID NO: 63 に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域と、CDR1 として SEQ ID NO: 64 に記載のアミノ酸配列を有し、CDR2 として SEQ ID NO: 65 に記載のアミノ酸配列を有し、CDR3 として SEQ ID NO: 66 に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を有する抗体；

(d) CDR1 として SEQ ID NO: 71 に記載のアミノ酸配列を有し、CDR2 として SEQ ID NO: 72 に記載のアミノ酸配列を有し、CDR3 として SEQ ID NO: 73 に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域と、CDR1 として SEQ ID NO: 74 に記載のアミノ酸配列を有し、CDR2 として SEQ ID NO: 75 に記載のアミノ酸配列を有し、CDR3 として SEQ ID NO: 76 に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を有する抗体；

(e) CDR1 として SEQ ID NO: 81 に記載のアミノ酸配列を有し、CDR2 として SEQ ID NO: 82 に記載のアミノ酸配列を有し、CDR3 として SEQ ID NO: 83 に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域と、CDR1 として SEQ ID NO: 84 に記載のアミノ酸配列を有し、CDR2 として SEQ ID NO: 85 に記載のアミノ酸配列を有し、CDR3 として SEQ ID NO: 86 に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を有する抗体；

(f) CDR1 として SEQ ID NO: 91 に記載のアミノ酸配列を有し、CDR2 として SEQ ID NO: 92 に記載のアミノ酸配列を有し、CDR3 として SEQ ID NO: 93 に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域と、CDR1 として SEQ ID NO: 94 に記載のアミノ酸配列を有し、CDR2 として SEQ ID NO: 95 に記載のアミノ酸配列を有し、CDR3 として SEQ ID NO: 96 に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を有する抗体；

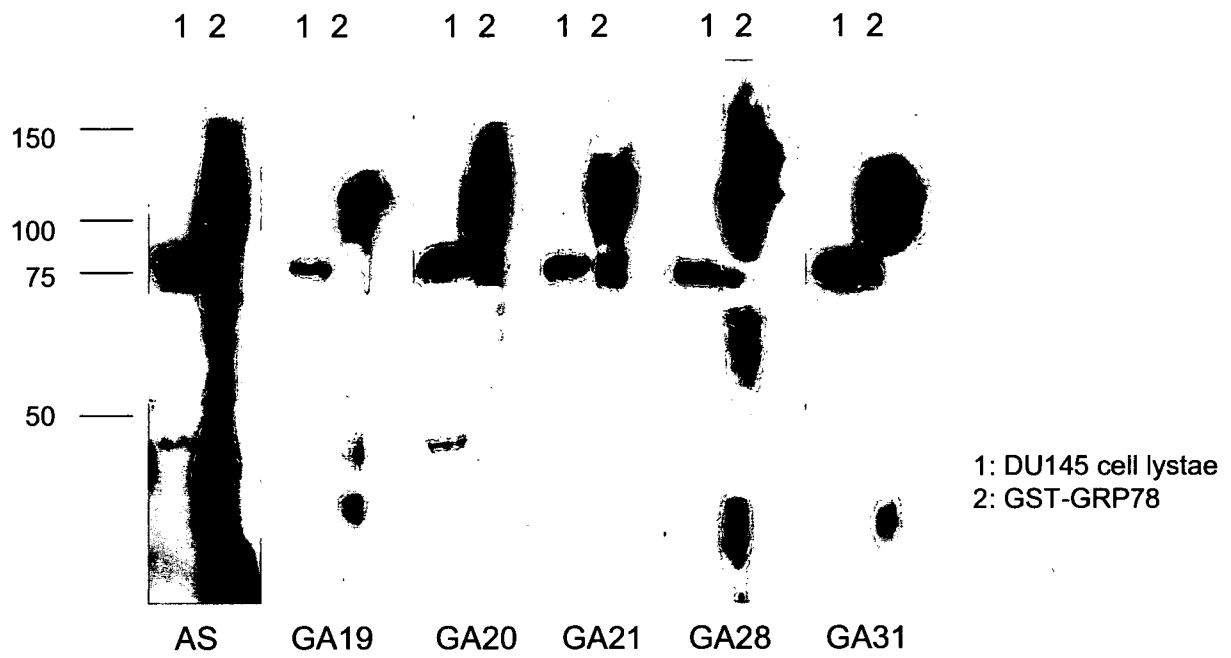
が認識するエピトープと同じエピトープを認識することを特徴とする、請求項 8 から 11 のいずれかに記載の抗体。

13. GRP78 を発現する細胞に対して細胞障害活性を有することを特徴とする、請求項 8 から 12 のいずれかに記載の抗体。

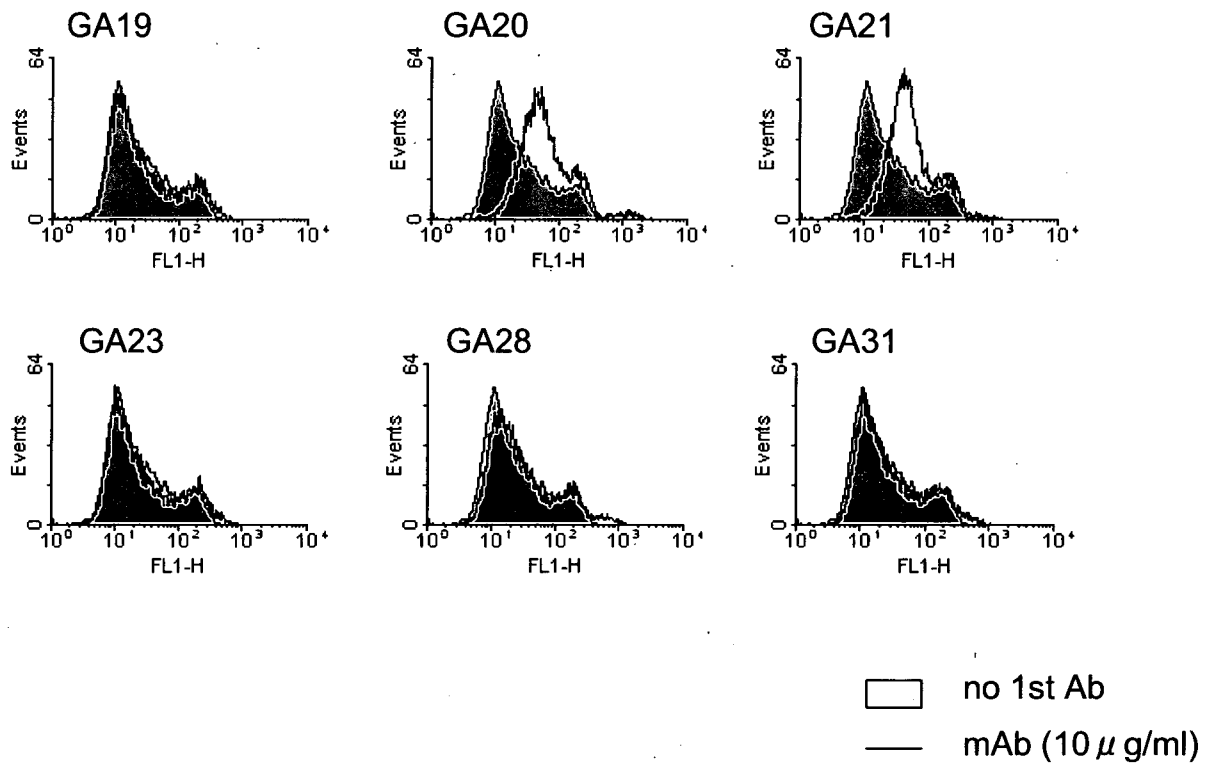
14. 細胞障害性物質が結合していることを特徴とする、請求項 13 に記載の抗体。

15. 15. 抗 GRP78 抗体を用いて細胞障害性物質を細胞内に送達する方法。
16. 16. 抗 GRP78 抗体に結合した細胞障害性物質により細胞の増殖を抑制する方法。
17. 17. 細胞が癌細胞である、請求項 15 または 16 に記載の方法。
18. 18. 細胞障害性物質を細胞内へ送達する為の抗 GRP78 抗体の使用。
- 5 19. 19. 細胞の増殖を抑制する為の、インターナライズ活性を有する抗 GRP78 抗体の使用。
20. 20. 細胞が癌細胞である、請求項 18 または 19 に記載の使用。
21. 21. 抗 GRP78 抗体に細胞障害性物質が結合していることを特徴とする、請求項 18 から 20 のいずれかに記載の使用。
- 10 22. 22. 以下の工程：
 - (a) GRP78 抗体を提供する工程、
 - (b) (a) の抗体がインターナライズ活性を有するか否か確認する工程、
 - (c) インターナライズ活性を有する工程を選択する工程、
 - (d) (c) で選択された抗体に細胞障害性物質を結合する工程。
- 15 23. 23. 含む医薬組成物の製造方法。
24. 24. 医薬組成物が抗癌剤である、請求項 22 に記載の製造方法。
25. 25. 抗 GRP78 抗体を用いた癌の診断方法。
26. 26. 標識物質が結合した抗 GRP78 抗体を用いることを特徴とする、請求項 24 に記載の診断方法。
- 20 27. 27. 細胞内に取り込まれた抗 GRP78 抗体を検出することを特徴とする、請求項 24 または 25 に記載の診断方法。
28. 28. 標識物質が結合した抗 GRP78 抗体。
29. 29. SEQ ID NO: 3 のアミノ酸配列又はその断片からなるポリペプチド。

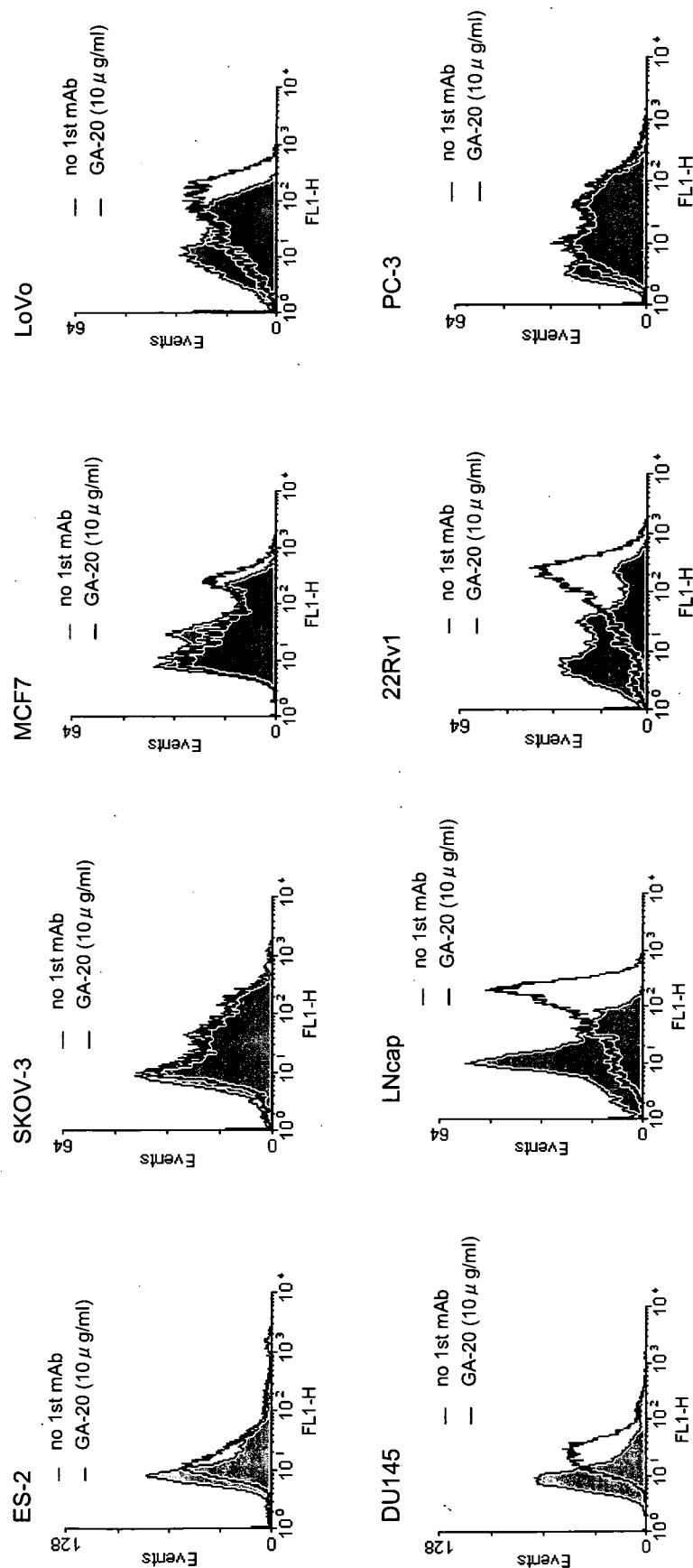
[図 1]



[2]

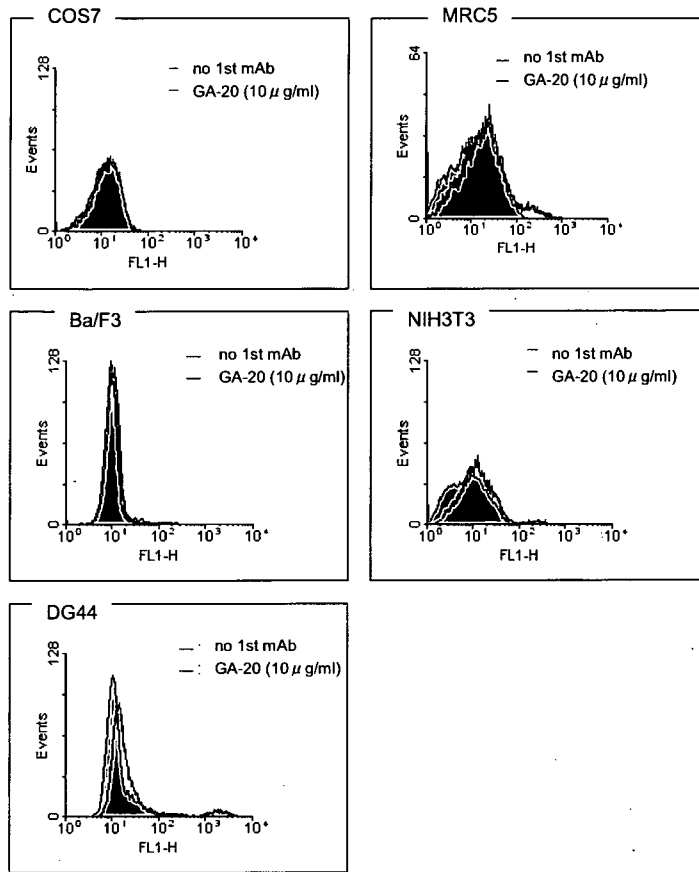


[図 3]

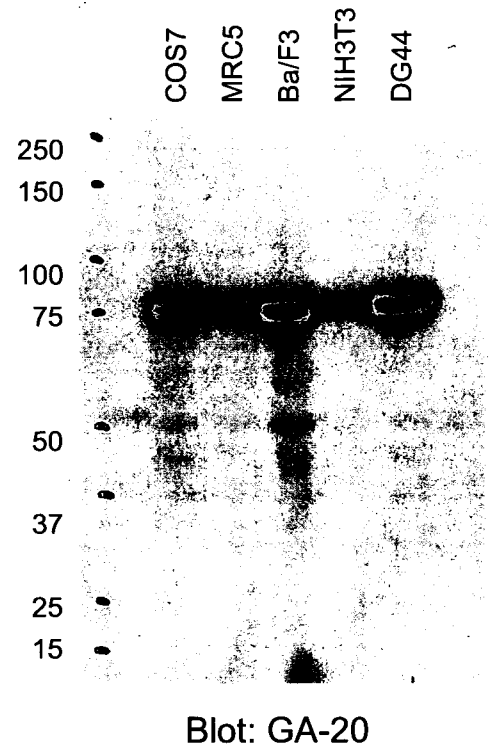


[4]

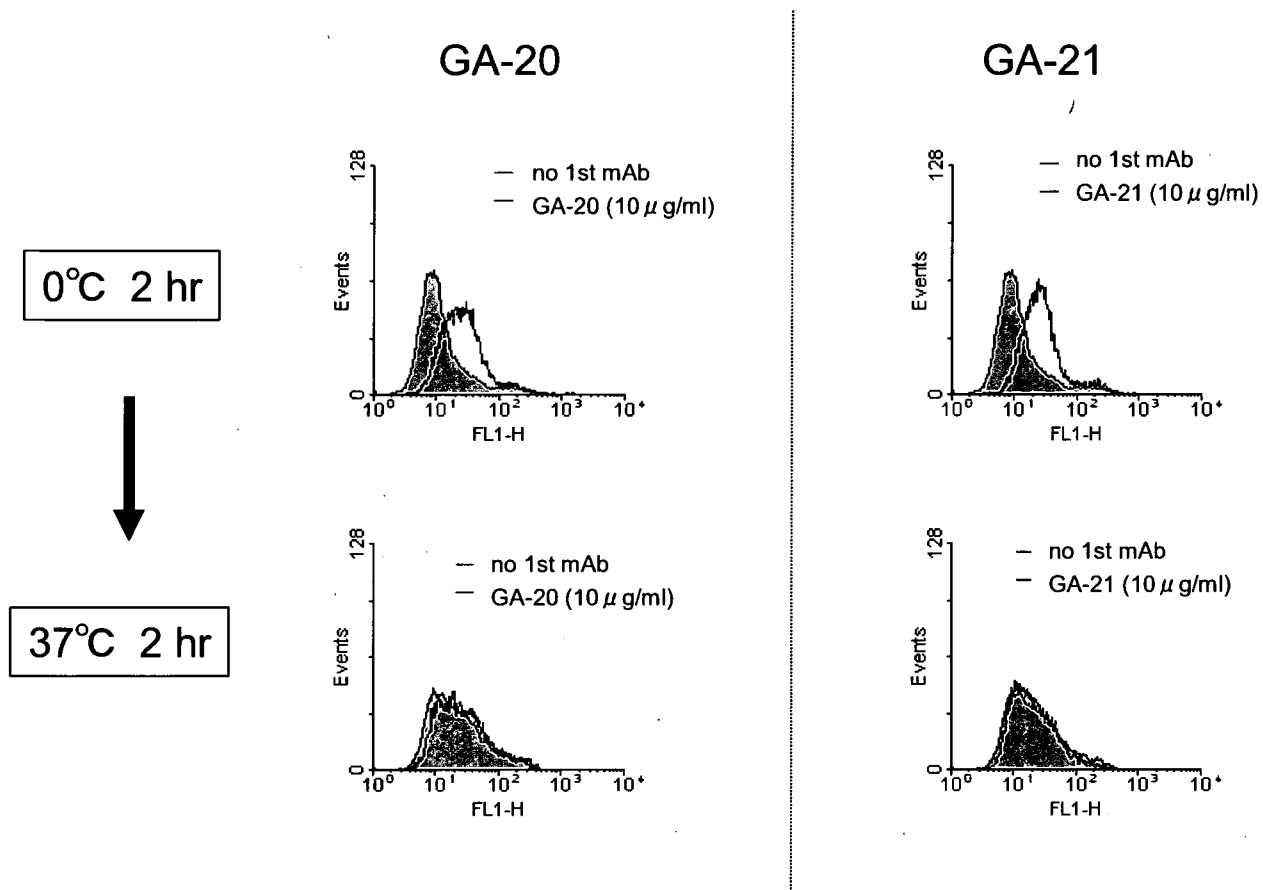
(A)



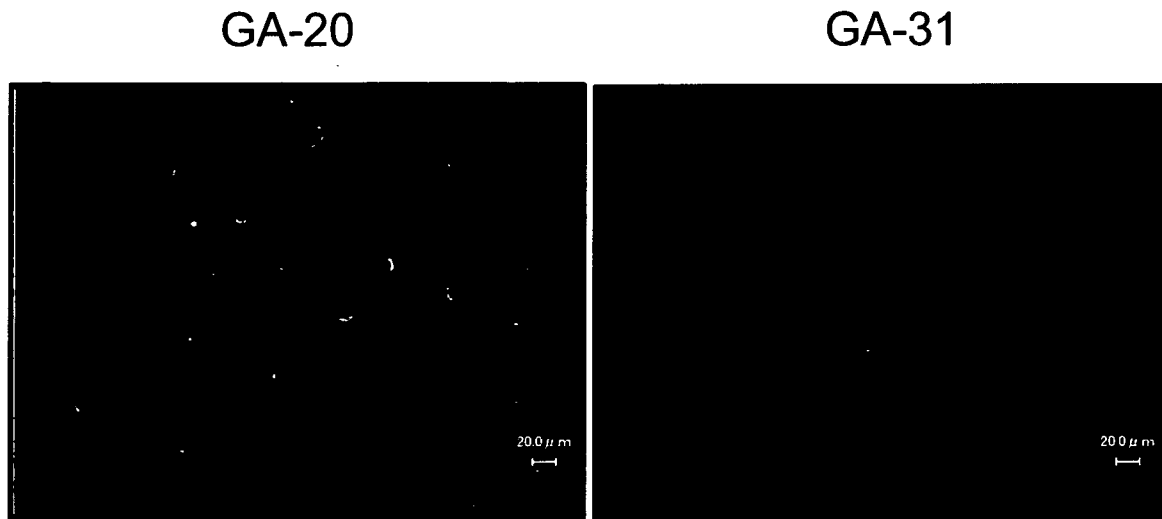
(B)



[図 5]

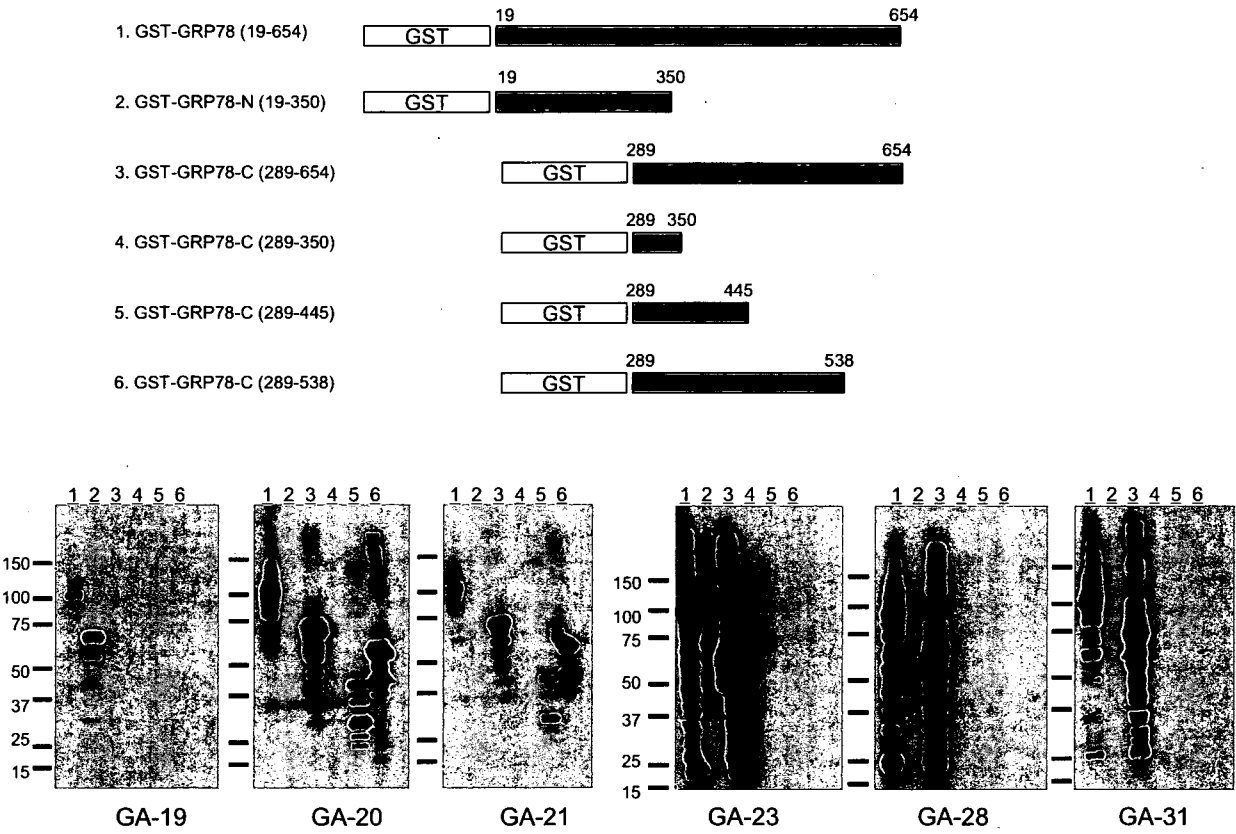


[図 6]

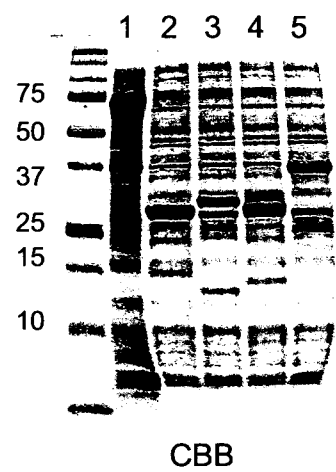
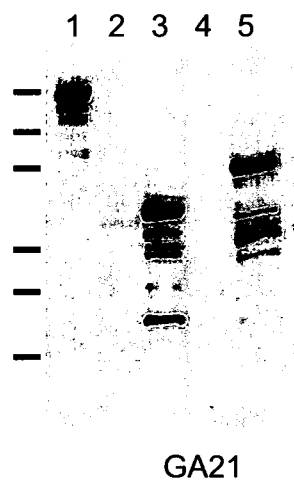
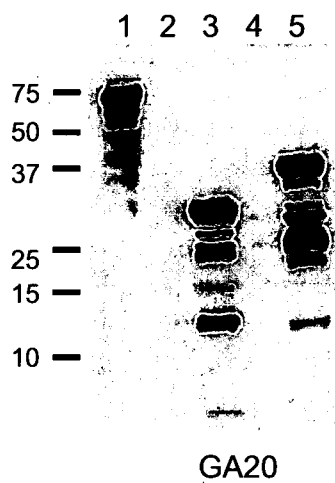
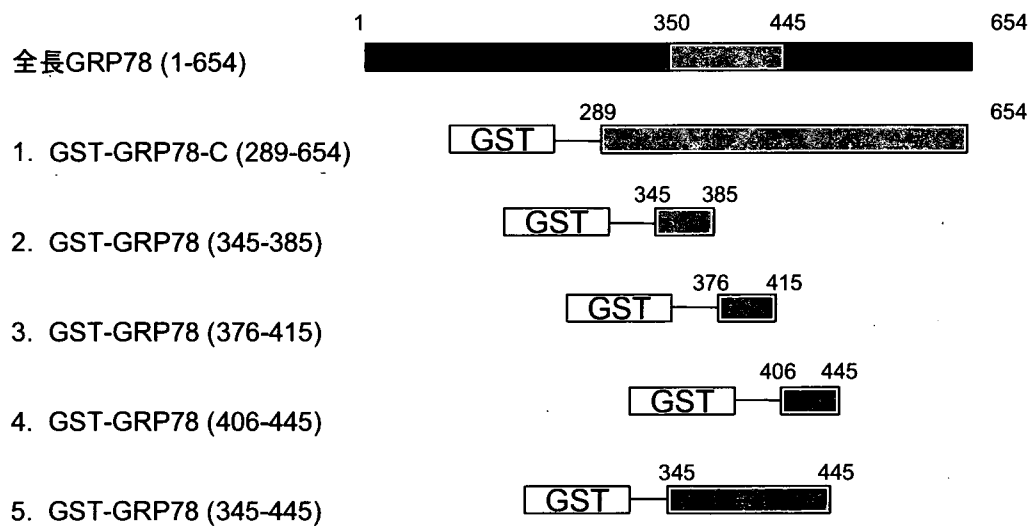


Cells
↓
Add 20 μ g/ml of mAbs
↓
Incubation (3 hrs at 37°C)
↓
wash cells with 0.1M glycine (pH_2.7)
↓
fix (4 % PFA) & permeabilize (0.1% Triton X-100)
↓
Detection with FITC-anti mouse IgG

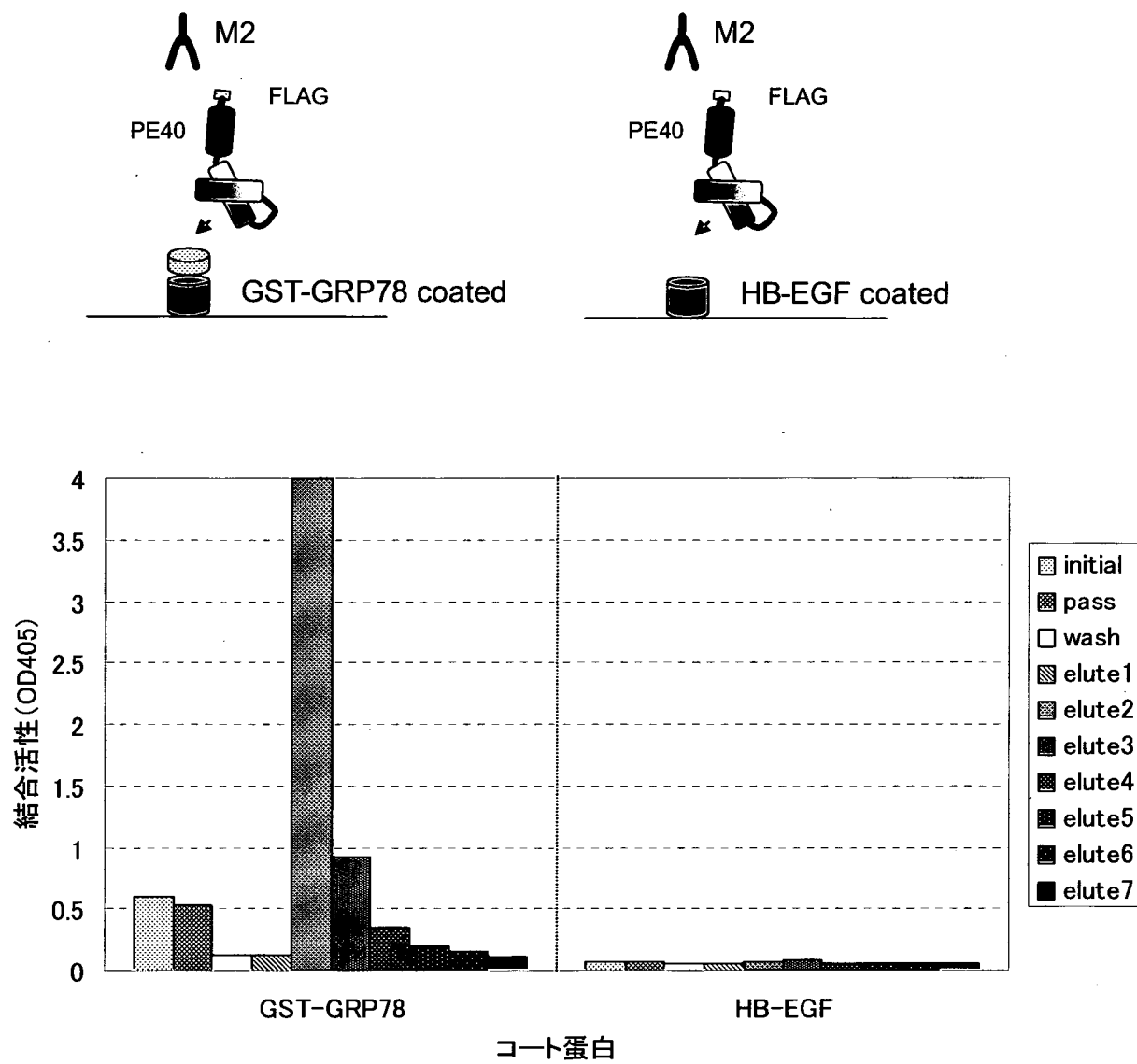
[図 7]



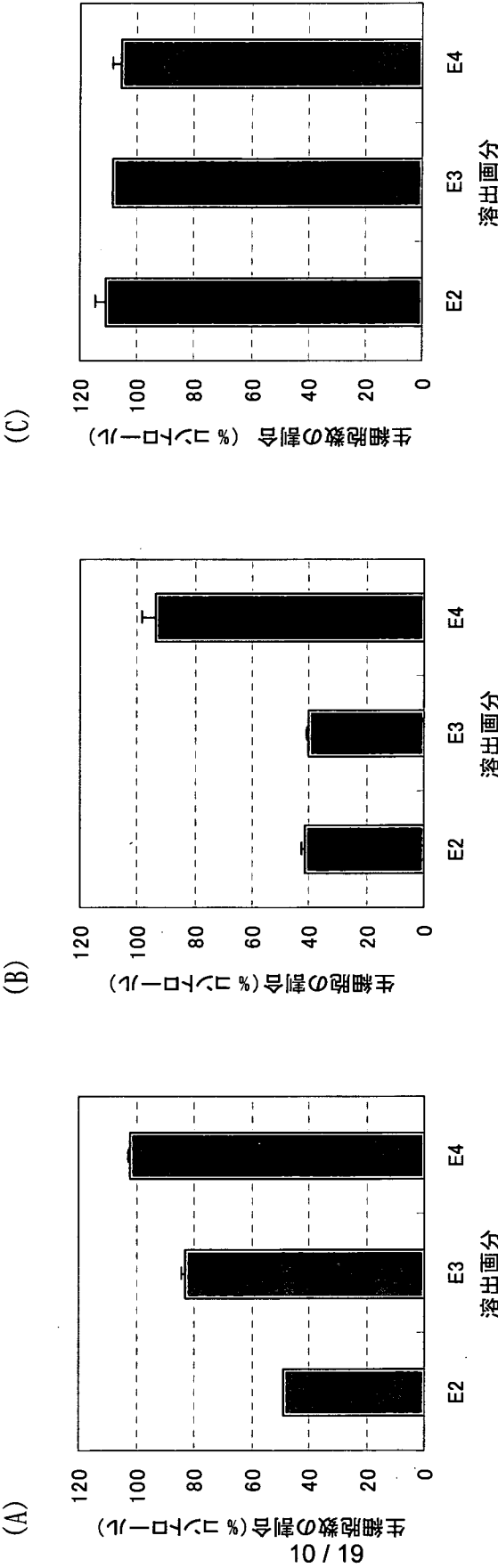
[図 8]



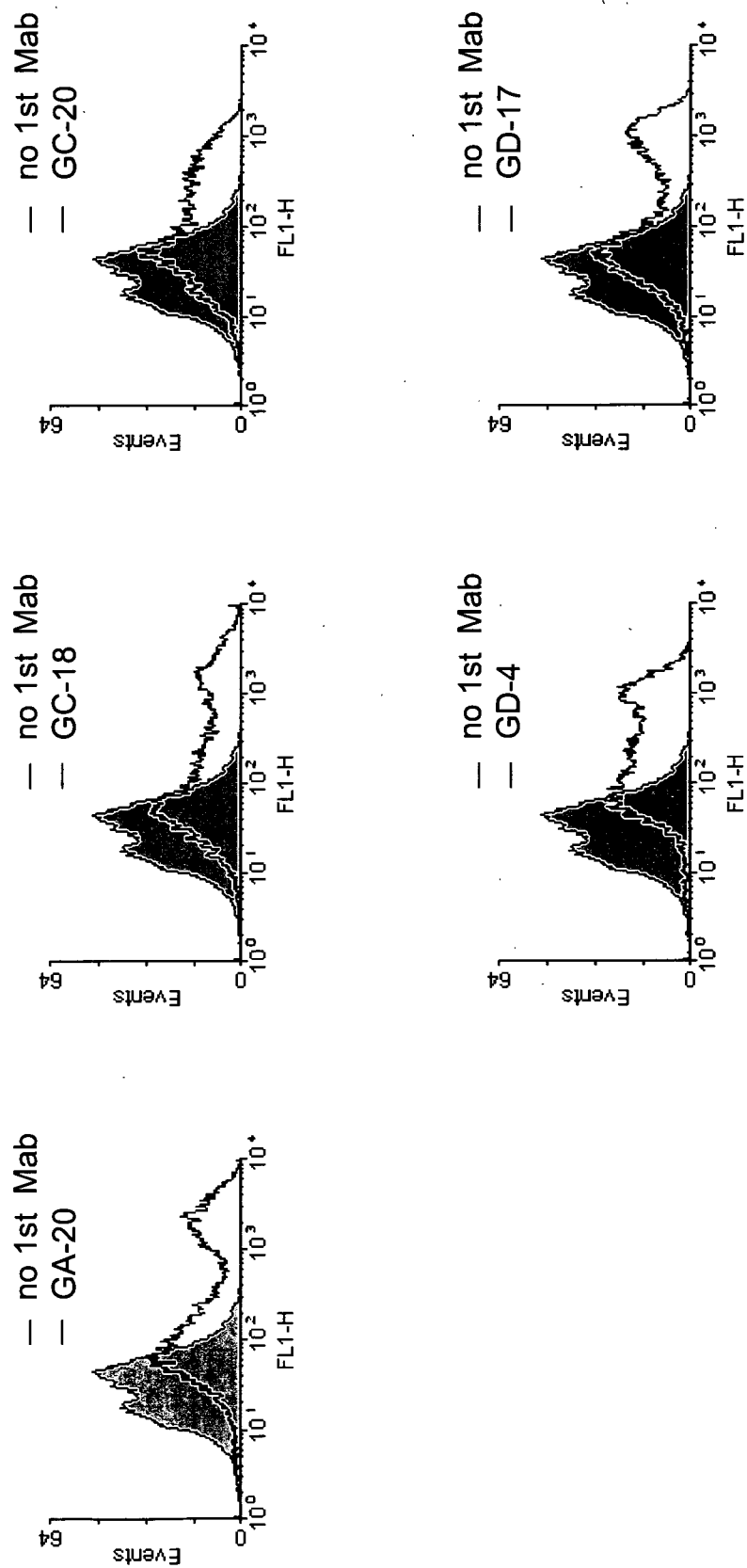
[図 9]



[図 10]



[図 11]

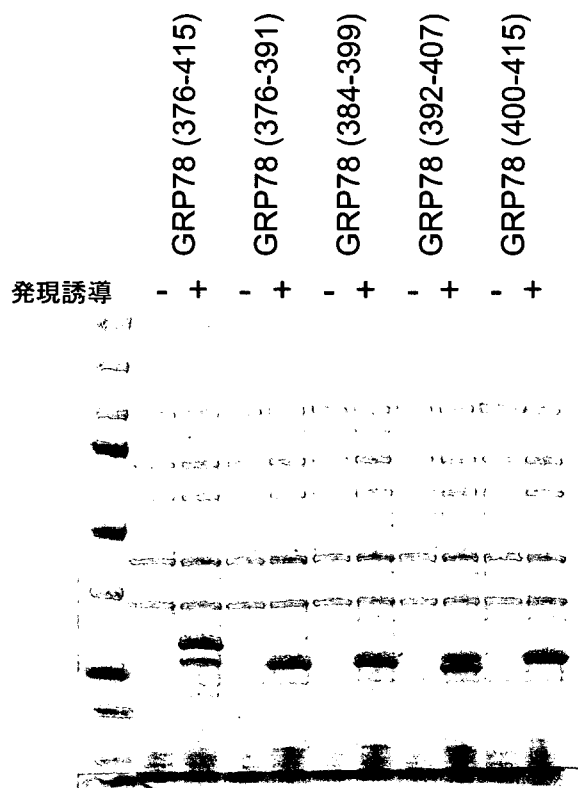


[図 1 2]

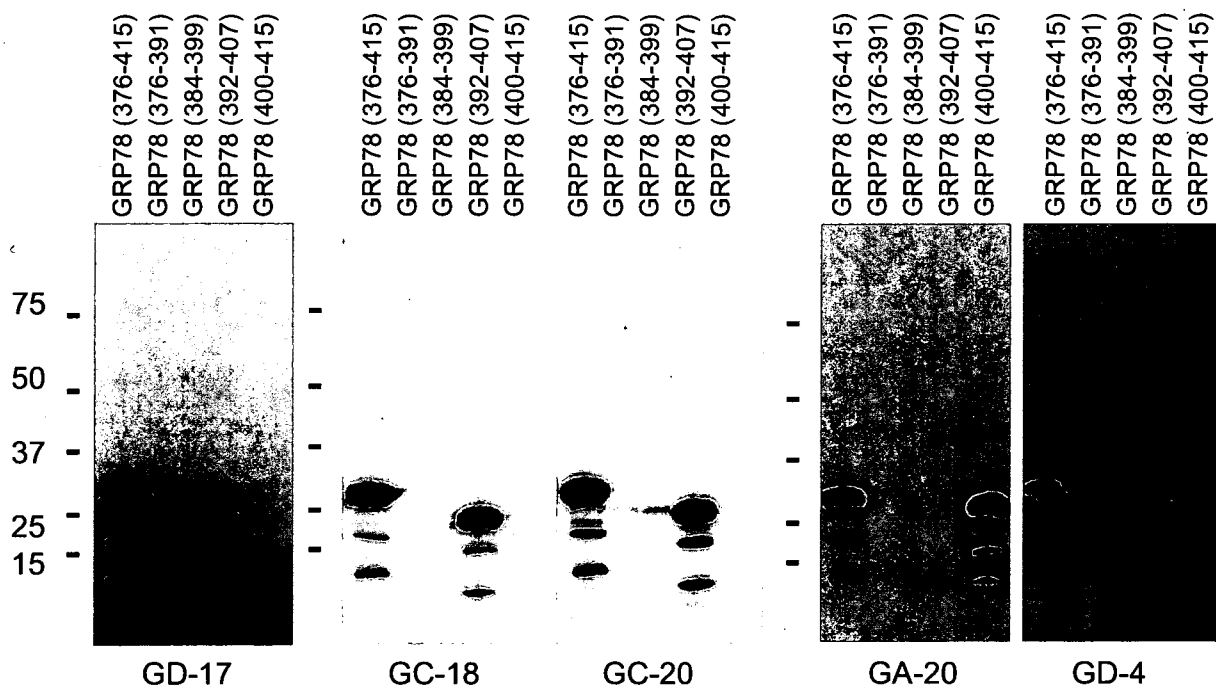
(A)



(B)

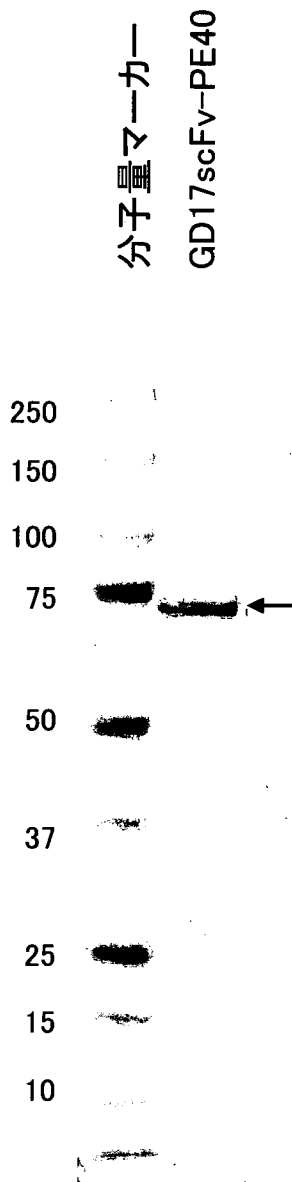


[図 13]

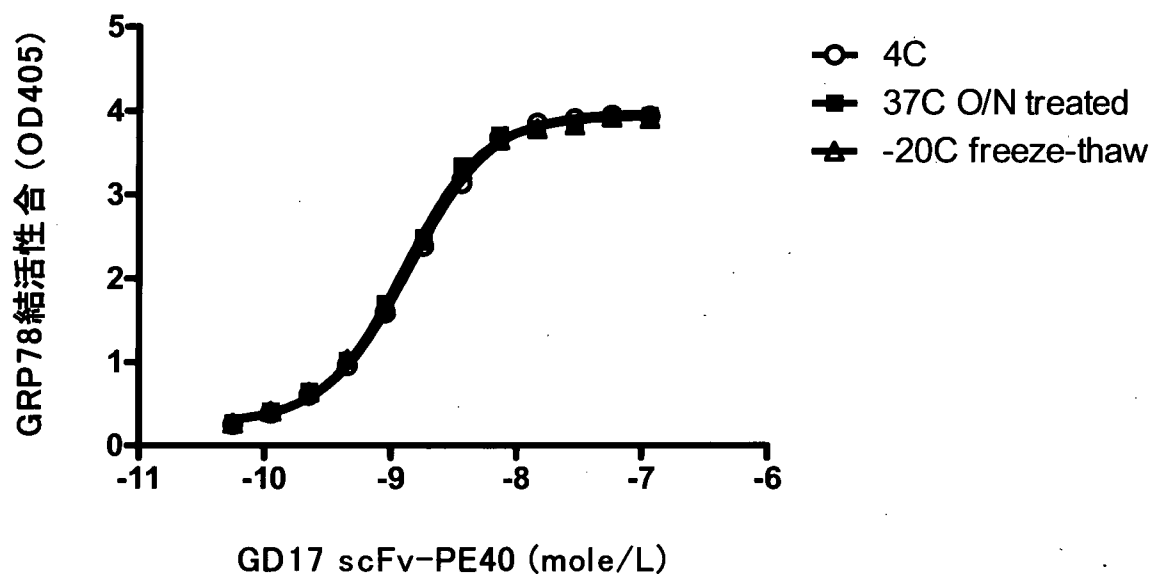


抗体	エピトープ
GD-17	384-391
GC-18	392-407
GC-20	
GA-20	400-415
GD-4	

[図 1 4]

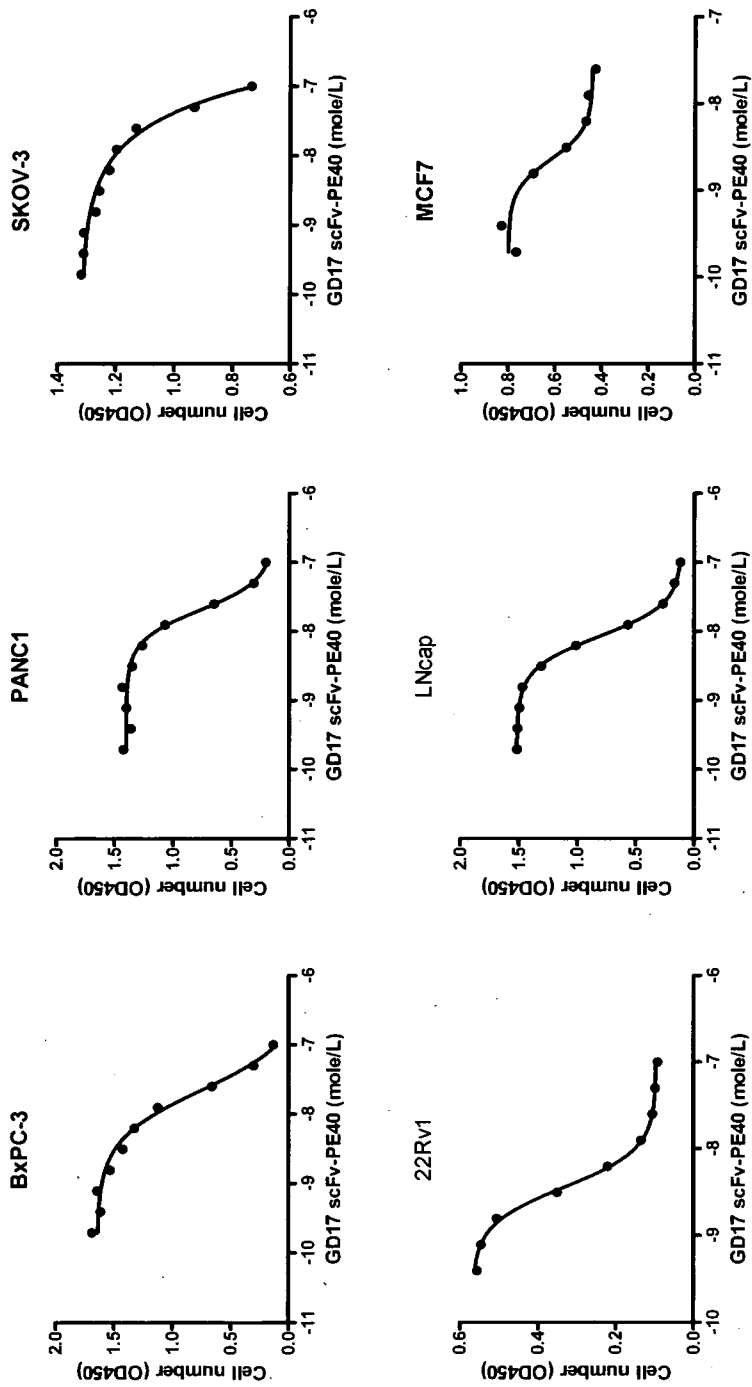


[図 15]



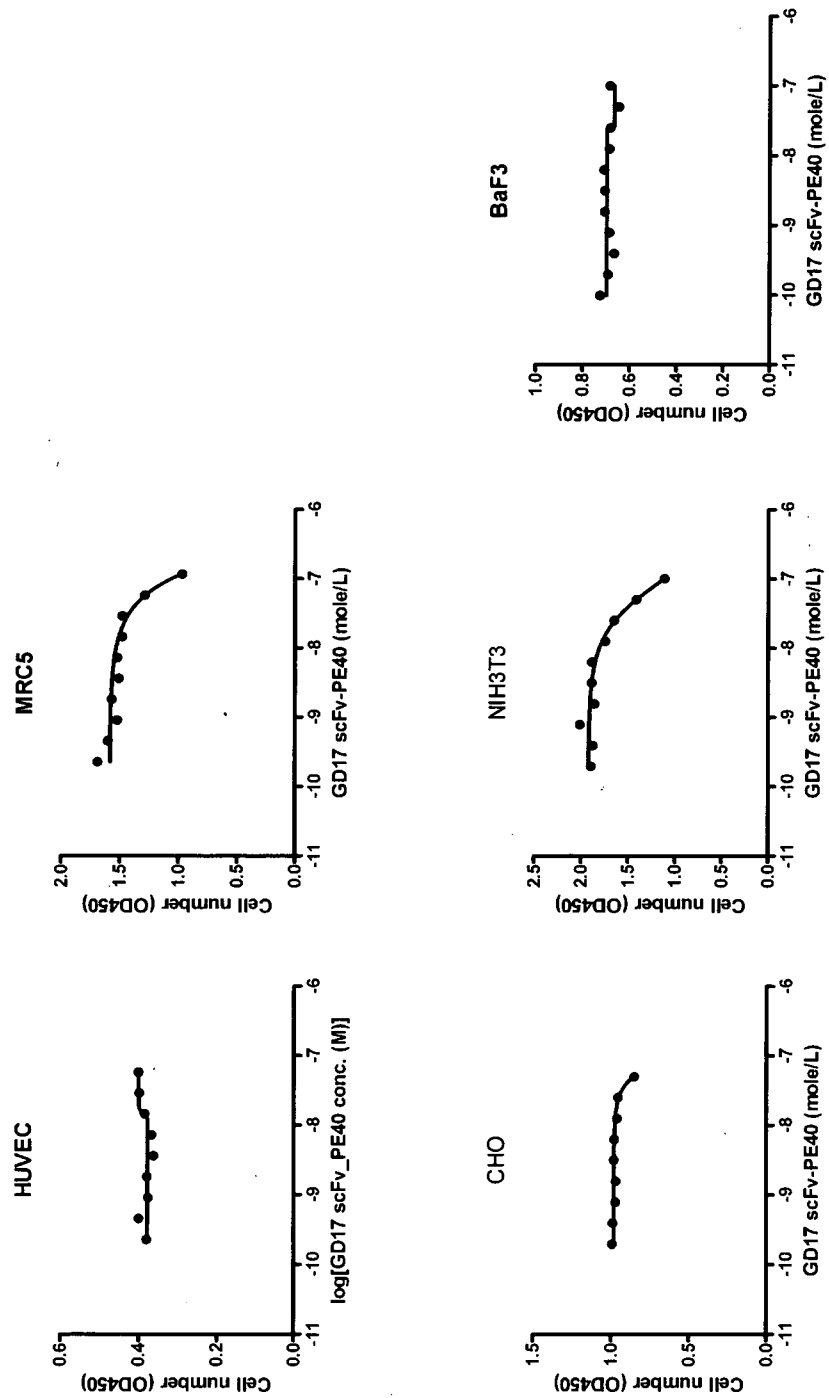
	4C	37C O/N treated	-20C freeze-thaw
EC50	1.407e-009	1.250e-009	1.270e-009

[図 16 A]

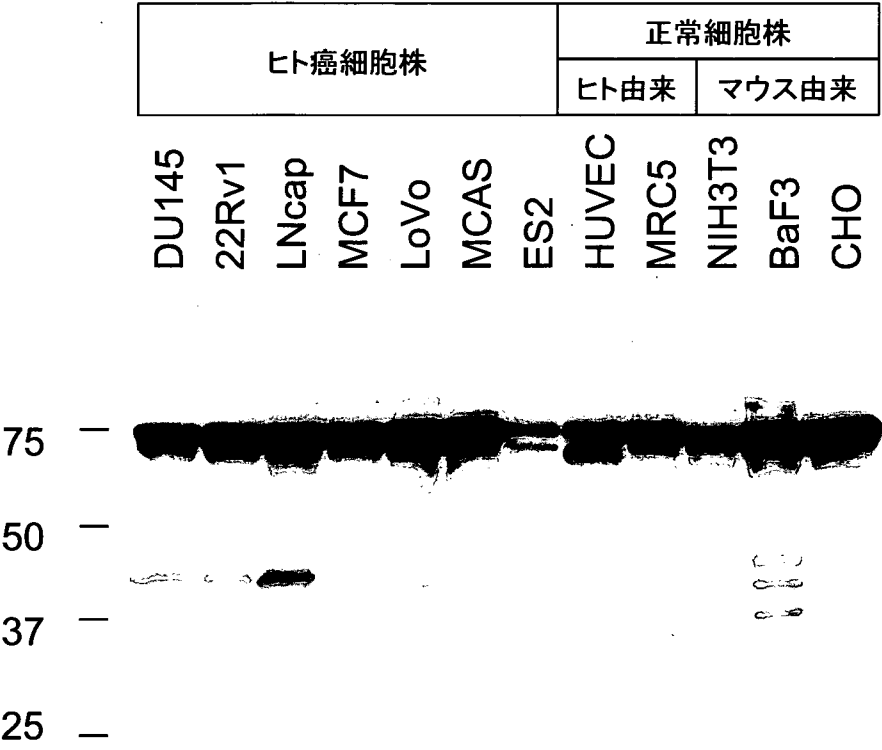


細胞	EC50
22Rv1	3.58E-09
LNcap	8.42E-09
MCF7	2.27E-09
BxPC3	2.23E-08
PANC1	2.04E-08
SKOV3	~ 5E-06

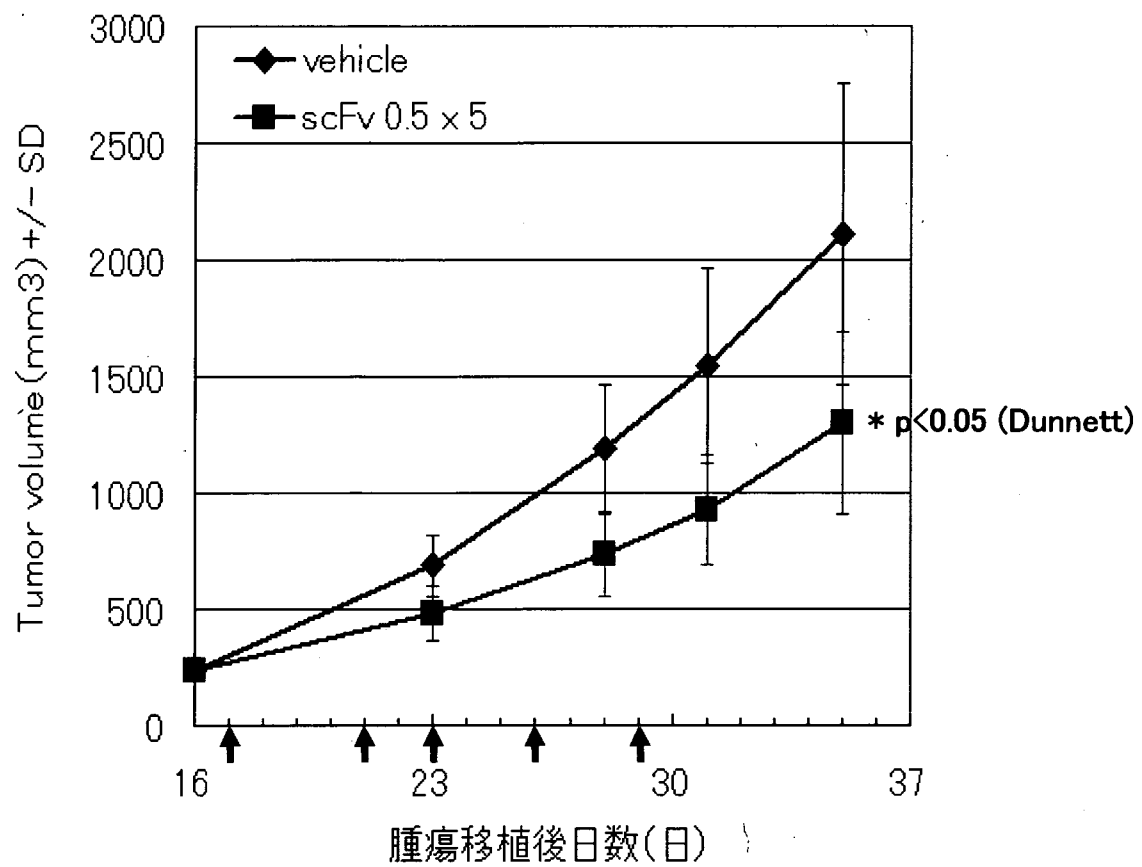
[図 1 6 B]



[図 1 7]



[図 18]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/053898

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K39/395(2006.01)i, A61K49/00(2006.01)i, A61P9/14(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C07K16/18(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K39/395, A61K49/00, A61P9/14, A61P35/00, A61P43/00, C07K16/18, C12N15/09, C12P21/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2008
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2008	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2008

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (STN), CAPLUS (STN), EMBASE (STN), MEDLINE (STN), REGISTRY (STN), WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 05/85862 A1 (UNIVERSITY COLLEGE LONDON), 15 September, 2005 (15.09.05),	1-4, 7-9, 13, 14, 27
A	Full text; examples (Family: none)	5, 6, 10-12, 22, 23, 28
X	DATABASE BIOSIS ON STN, (2005) ACC.NO. 2005: 529385 ABSTRACT & PIZZO, SV ET AL. 'ATTENUATION	1-4, 7-9, 13, 14, 27
A	OF MITOGENESIS AND CELLULAR PROLIFERATION IN 1-LN PROSTATE CANCER CELLS TREATED WITH ANTIBODIES AGAINST GRP78, A SURFACE BINDING PROTEIN OF ALPHA-2.' FASEB JOURNAL, (2005.03. 04) 19(4 SUPPL2 PART1) P.A253	5, 6, 10-12, 22, 23, 28

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
21 May, 2008 (21.05.08)

Date of mailing of the international search report
03 June, 2008 (03.06.08)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/053898

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	CHATTERJEE, S. ET AL. 'INDUCTION OF M(r) 78,000 GLUCOSE-REGULATED STRESS PROTEIN IN POLY (ADENOSINE DIPHOSPHATE-RIBOSE) POLYMERASE-AND NICOTINAMIDE ADENINE DINUCLEOTIDE-DEFICIENT V79 CELL LINES AND ITS RELATION TO RESISTANCE TO THE TOPOISOMERASE II INHIBITOR ETOPOSIDE.' CANCER RESEARCH, (1994) 54(16) P.4405-4411 full text; P.4406, left column, lines 11 to 14, 13th to 10th lines from the bottom, P.4408, left column, FIG.3	1-4, 7-9, 14, 27 5, 6, 10-12, 13, 22, 23, 28
X A	WO 2004/20999 A1 (UNIV TEXAS SYSTEM), 11 March, 2004 (11.03.04), Full text; examples & AU 2002/364501 A1	1-4, 7-9, 14, 27 5, 6, 10-12, 13, 22, 23, 28
X A	JP 2004-515751 A (Board of Regents, the University of Texas System), 27 May, 2004 (27.05.04), Full text; examples & WO 02/20722 A2 & AU 2001/090652 A1 & EP 1315965 A2 & US 2004/0048243 A1 & AU 2007/203251 A1 & AU 2007/216854 A1	1-4, 7-9, 14, 27 5, 6, 10-12, 13, 22, 23, 28

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/053898

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

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

1. ☒ Claims Nos.: 15-21, 24-26
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The inventions of claims 15-21 and 24-26 include embodiments relating to a method for treatment of the human body by therapy or diagnosis using an anti-GRP78 antibody. Thus, the inventions of these claims relate to a subject
(continued to extra sheet)
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

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

Remark on Protest
the

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/053898

Continuation of Box No.II-1 of continuation of first sheet (2)

matter which this international searching authority is not required, under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv), to search.

<Subject of search>

Claims 28 includes a polypeptide depicted in SEQ ID NO:3 as well as multiple partial peptides of the polypeptides depicted in SEQ ID NO:3 and having no limitation in the number of amino acid residues or location in the sequence depicted in SEQ ID NO:3. Among these polypeptides, the polypeptide depicted in Seq ID NO:3 is the only one which is supported in the description in the meaning within PCT Article 6 and disclosed in the description in the meaning within PCT Article 5 on first inspection about the fact that it is actually used as an immunogen in Example 6 in the description, can produce an anti-GRP78 monoclonal antibody which is capable of being internalized in a GRP78-expressing cell and is therefore useful.

Such being the case, with regard to claim 28, the prior art search was only made on the polypeptide depicted in SEQ ID NO:3.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. A61K39/395 (2006.01) i, A61K49/00 (2006.01) i, A61P9/14 (2006.01) i, A61P35/00 (2006.01) i, A61P43/00 (2006.01) i, C07K16/18 (2006.01) i, C12N15/09 (2006.01) i, C12P21/08 (2006.01) i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. A61K39/395, A61K49/00, A61P9/14, A61P35/00, A61P43/00, C07K16/18, C12N15/09, C12P21/08

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 0 8 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 0 8 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 0 8 年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS (STN), C Aplus (STN), EMBASE (STN), MEDLINE (STN), REGISTRY (STN), WPIDS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	WO 05/85862 A1 (UNIVERSITY COLLEGE LONDON) 2005.09.15 文献全体 ; EXAMPLE (ファミリーなし)	1-4, 7-9, 13, 14, 27 5, 6, 10-12, 22, 23, 28

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

2 1 . 0 5 . 2 0 0 8

国際調査報告の発送日

0 3 . 0 6 . 2 0 0 8

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)
郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5
東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官 (権限のある職員)

大久保 元浩

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 5 2

4 C

8 8 2 8

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	DATABASE BIOSIS ON STN, (2005) ACC.NO. 2005:529385 ABSTRACT & PIZZO, SV ET AL. 'ATTENUATION OF MITOGENESIS AND CELLULAR PROLIFERATION IN 1-LN PROSTATE CANCER CELLS TREATED WITH ANTIBODIES AGAINST GRP78, A SURFACE BINDING PROTEIN OF ALPHA-2.' FASEB JOURNAL, (2005.03.04) 19(4 SUPPL2 PART1) P.A253	1-4, 7-9, 13, 14, 27 5, 6, 10-12, 22, 23, 28
X A	CHATTERJEE, S. ET AL. 'INDUCTION OF M(r) 78,000 GLUCOSE-REGULATED STRESS PROTEIN IN POLY(ADENOSINE DIPHOSPHATE-RIBOSE) POLYMERASE-AND NICOTINAMIDE ADENINE DINUCLEOTIDE-DEFICIENT V79 CELL LINES AND ITS RELATION TO RESISTANCE TO THE TOPOISOMERASE II INHIBITOR ETOPOSIDE.' CANCER RESEARCH, (1994) 54(16) P.4405-4411 文献全体 ; P.4406 左欄第 11-14 行・下から第 13-10 行、P.4408 左欄 FIG.3	1-4, 7-9, 14, 27 5, 6, 10-12, 13, 22, 23, 28
X A	WO 2004/20999 A1 (UNIV TEXAS SYSTEM) 2004.03.11 文献全体 ; EXAMPLES & AU 2002/364501 A1	1-4, 7-9, 14, 27 5, 6, 10-12, 13, 22, 23, 28
X A	JP 2004-515751 A (ボード・オブ・リージェンツ・ザ・ユニバーシテイ・オブ・テキサス・システム) 2004.05.27 文献全体 ; 実施例 & WO 02/20722 A2 & AU 2001/090652 A1 & EP 1315965 A2 & US 2004/0048243 A1 & AU 2007/203251 A1 & AU 2007/216854 A1	1-4, 7-9, 14, 27 5, 6, 10-12, 13, 22, 23, 28

法第8条第3項（P C T 17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 15-21, 24-26 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
請求の範囲 15-21, 24-26 の発明はいずれも抗 G R P 7 8 抗体を用いた治療又は診断による人体の処置方法に係る態様を含むものであって、P C T 第 1 7 条 (2) (a) (i) 及び P C T 規則 3 9. 1 (i v) の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であって P C T 規則 6. 4 (a) の第 2 文及び第 3 文の規定に従って記載されていない。

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとの国際調査機関は認めた。

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

☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。

☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

<調査の範囲について>

請求の範囲 2 8 には、SEQ ID NO:3 で表されるポリペプチドそれ自体の他、当該 SEQ ID NO:3 のポリペプチドの一部でアミノ酸数や SEQ ID NO:3 中の部位において特段限定されない多数種のペプチド群が含まれるが、そのうち、明細書の実施例 6 で現実免疫原として採用され、GRP 7 8 発現細胞にインターナライズされる性質を有する抗GRP 7 8 モノクローナル抗体を生ぜしめ得るものである点において有用であることが、PCT 6 条の意味において明細書中で一応裏付けられまた PCT 5 条の意味において明細書中で一応の開示があると言える程度に確認されていると言えるのは、SEQ ID NO:3 のポリペプチド自体についてのみに過ぎない。

よって、請求の範囲 2 8 に関し、先行技術調査は SEQ ID NO:3 で表されるポリペプチド自体のみについて行った。