

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(10) 国際公開番号

WO 2013/018891 A1

(43) 国際公開日

2013年2月7日(07.02.2013)

W O P O | P C T

- (51) 国際特許分類 :
C12N 15/09 (2006.01) A61P 35/02 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) C07K 16/30 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) C12P 21/08 (2006.01)
- (74) 代理人 : 平木 祐輔 , 外 (HIRAKI Yusuke et al.) ; 〒
1056232 東京都港区愛宕2丁目5番1号 愛宕
グリーンヒルズMORIタワー32階 Tokyo
(JP)-
- (21) 国際出願番号 : PCT/JP2012/069853
- (51) 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, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, 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, PE, PG, PH, PL, PT,
QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST,
SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (22) 国際出願日 : 2012年8月3日(03.08.2012)
- (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, LR, LS, MW,
MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシ
ア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ
(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR,
GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT,
NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).
- (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 2011-171377 2011年8月4日(04.08.2011) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 東レ
株式会社 (ORAY INDUSTRIES, INC.) [JP/JP]; 〒
1038666 東京都中央区日本橋室町2丁目1番1
号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者 ; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 岡野 文義
(OKANO Fumiyoshi) [JP/JP]; 〒2488555 神奈川県鎌
倉市手広6丁目10番1号 東レ株式会社 基
礎研究センター内 Kanagawa (JP). 小林 真一
(KOBAYASHI Shinichi) [JP/JP]; 〒2488555 神奈川県
鎌倉市手広6丁目10番1号 東レ株式会社
基礎研究センター内 Kanagawa (JP). 南田 佳孝
(MINAMIDA Yoshitaka) [JP/JP]; 〒2488555 神奈川県
鎌倉市手広6丁目10番1号 東レ株式会社
基礎研究センター内 Kanagawa (JP). 齋藤 孝則
(SAITO Takanori) [JP/JP]; 〒2488555 神奈川県鎌倉
市手広6丁目10番1号 東レ株式会社 基礎
研究センター内 Kanagawa (JP).
- 添付公開書類 :
- 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト
(規則 5.2(a))

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR TREATMENT AND/OR PROPHYLAXIS OF CANCER

(54) 発明の名称 癌の治療及び/ "又は予防用医薬組成物

(57) Abstract: The purpose of the present invention is to produce an antibody having higher antitumor activity than conventional antibodies that target CAPRIN-1, which is specifically expressed on the surface of a cancer cell, and to provide the use of the antibody as an agent for the treatment and/or prophylaxis of cancer. The present invention provides the use, as an agent for the treatment and/or prophylaxis of cancer, of an antibody that identifies and targets a cancer antigen protein that is specifically expressed on the surface of a cancer cell. More specifically, the present invention provides a pharmaceutical composition for the treatment and/or prophylaxis of cancer, the pharmaceutical composition being characterized by containing, as an active ingredient: an antibody that has immunological reactivity with CAPRIN-1 protein and that comprises a heavy-chain variable region including amino acid sequences represented by SEQ ID NOs: 5, 6, and 7 and a light-chain variable region including amino acid sequences represented by SEQ ID NOs: 9, 10, and 11; or a fragment of said antibody.

(57) 要約: 癌細胞の表面に特異的に発現するCAPRIN-1を標的とした従来の抗体よりも抗腫瘍活性の優れた抗体を作出し、癌の治療及び/ "又は予防剤としての用途を提供することを目的とする。癌細胞の表面に特異的に発現する癌抗原タンパク質を同定し、それを標的とした抗体の、癌の治療及び/ "又は予防剤としての用途、具体的には、配列番号5、6及び7に示すアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と配列番号9、10及び11に示すアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含み、かつ、CAPRIN-1タンパク質と免疫学的反応性を有する抗体又はそのフラグメントを有効成分として含むことを特徴とする、癌の治療及び/ "又は予防のための医薬組成物を提供する。



WO 2013/018891 A1

明 細 書

発明の名称 : 癌の治療及び／又は予防用医薬組成物

技術分野

[0001] 本発明は、CAPRIN—1に対する抗体又はそのフラグメントの、癌の治療及び／又は予防剤などとしての新規な医薬用途に関する。

背景技術

[0002] 癌は全死亡原因の第一位を占める疾患であり、現在行われている治療は手術療法を主体に放射線療法と化学療法を組み合わせたものである。近年の新しい手術法の開発や新たな抗癌剤の発見にも関わらず、一部の癌を除いて、癌の治療成績はあまり向上していないのが現状である。近年、分子生物学や癌免疫学の進歩によって、癌に特異的に反応する抗体類、細胞障害性T細胞により認識される癌抗原類、癌抗原をコードする遺伝子類などが同定されており、癌抗原類をターゲットにした特異的癌治療法への期待が高まっている（非特許文献1）。

[0003] 癌治療法においては、副作用を軽減するため、その抗原として認識されるペプチド、ポリペプチド又はタンパク質は、正常細胞にはほとんど存在せず、癌細胞に特異的に存在していることが望ましい。1991年、ベルギー国Ludwig研究所のBoonらは自己癌細胞株と癌反応性T細胞を用いたcDNA発現クローニング法によりCD8陽性T細胞が認識するヒトメラノーマ抗原MAGE1を単離した（非特許文献2）。その後、癌患者の生体内で自己の癌に反応して産生される抗体が認識する腫瘍抗原を遺伝子の発現クローニングの手法を取り入れて同定する、SEREX (serologic al identification of antigens by recombinant expression cloning) 法が報告され（非特許文献3及び特許文献1）、この方法により、正常細胞にはほとんど発現がなく、癌に特異的に発現するいくつかの癌抗原が単離されている（非特許文献4～9）。さらに、その一部をターゲットにして、癌抗原に特

異的に反応する免疫細胞を用いた細胞療法や、癌抗原を含むワクチンなどの癌特異的免疫療法の臨床試験が実施されている。

[0004] 一方、近年、癌細胞上の抗原タンパク質を標的にした、癌を治療するための各種抗体医薬が世の中に台頭してきた。癌特異的治療薬として一定の薬効が得られ注目されているが、標的となる抗原タンパク質の大部分は正常細胞にも発現するものであり、抗体投与の結果、癌細胞だけでなく、抗原が発現する正常細胞も障害されてしまい、その結果生じる副作用が問題になっている。したがって、癌細胞表面に特異的に発現する癌抗原を同定し、それを標的とした抗体を医薬品として使用することができれば、より副作用の少ない抗体医薬による治療が可能になると期待される。

[0005] C y t o p l a s m i c — a n d p r o l i f e r a t i o n — a s s o c i a t e e d p r o t e i n 1 (C A P R I N — 1) は、休止期の正常細胞が活性化や細胞分裂を起こす際に発現し、また細胞内でRNAと細胞内ストレス顆粒を形成してmRNAの輸送、翻訳の制御に参与する細胞内タンパク質として知られていたが、癌細胞の表面に特異的に発現することが見出され、癌治療のための抗体医薬のターゲットとして研究が進められている (特許文献2)。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1 :米国特許第5698396号

特許文献2 :WO2010/016526

非特許文献

[0007] 非特許文献1 :秋吉毅, 「癌と化学療法」、1997年、第24巻、p 551 - 519 (癌と化学療法社、日本)

非特許文献2 :Bruggen P. et al, Science, 254 : 1643 - 1647 (1991)

非特許文献3 :Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92 : 11810 - 11813 (1995)

非特許文献4 : Int. J. Cancer, 72 : 965 - 971 (1997)

非特許文献5 : Cancer Res., 58 : 1034 - 1041 (1998)

非特許文献6 : Int. J. Cancer, 29 : 652 - 658 (1998)

非特許文献7 : Int. J. Oncol., 14 : 703 - 708 (1999)

非特許文献8 : Cancer Res., 56 : 4766 - 4772 (1996)

非特許文献9 : Hum. Mol. Genet., 6 : 33 - 39 : 1997

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 本発明の目的は、癌細胞の表面に特異的に発現するCAPRIN_1を標的とした従来の抗体よりも抗腫瘍活性の優れた抗体を作出し、癌の治療及び/又は予防剤としての用途を提供することである。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明は、以下の特徴を有する。

[0010] 本発明では、配列番号5、6及び7に示すアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と配列番号9、10及び11に示すアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含み、かつ、CAPRIN-1タンパク質と免疫学的反応性を有する抗体又はそのフラグメントを提供する。

[0011] 別の実施形態において、上記抗体は、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、単鎖抗体、又は二重特異抗体である。

[0012] 本発明では、上記抗体又はそのフラグメントを有効成分として含むことを特徴とする、癌の治療及び/又は予防のための医薬組成物を提供する。

[0013] その実施形態において、上記癌は、乳癌、腎癌、膵臓癌、大腸癌、肺癌、脳腫瘍、胃癌、子宮頸癌、卵巣癌、前立腺癌、膀胱癌、食道癌、白血病、リ

ンパ腫、線維肉腫、肥満細胞腫又はメラノーマである。

[0014] 本明細書は本願の優先権主張の基礎となる日本国特許出願2011-171377号の開示内容を包含する。

発明の効果

[0015] 本発明で用いられるCAPRIN-1に対する抗体は、癌細胞を障害する。したがって、CAPRIN-1に対する抗体は癌の治療や予防に有用である。

発明を実施するための形態

[0016] 本発明で用いられるCAPRIN-1のポリペプチドに対する抗体の抗腫瘍活性は、後述するように、生体内で担癌動物に対する腫瘍増殖の抑制を調べることによって、あるいは、生体外で該ポリペプチドを発現する腫瘍細胞に対して、免疫細胞又は補体を介した細胞障害活性を示すか否かを調べることによって評価することができる。

[0017] 本発明で用いられるCAPRIN-1に対する抗体は、CAPRIN-1タンパク質と特異的に結合するモノクローナル抗体である。これらのモノクローナル抗体は、抗腫瘍活性を発揮しうる限りいかなる種類の抗体であってもよく、例えば、ヒト以外の動物抗体（例えば、マウスモノクローナル抗体、ラットモノクローナル抗体、ウサギモノクローナル抗体、ニワトリモノクローナル抗体など）、組換え抗体（例えば、合成抗体、多重特異性抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、単鎖抗体（scFv）など）、ヒト抗体、それらの抗体フラグメント（例えば、FabやF(ab')₂、Fvなど）を含む。これらの抗体及びそのフラグメントは、当業者に公知の方法により調製することが可能である。また、被験者がヒトである場合には、拒絶反応を回避又は抑制するためにヒト抗体又はヒト化抗体であることが望ましい。

[0018] 前記抗体は、免疫グロブリン分子の任意のクラス、例えば、IgG、IgE、IgM、IgA、IgD及びIgY、又は任意のサブクラス、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2などである。

[0019] さらに、前記抗体は、グリコシル化の他に、アセチル化、ホルミル化、アミド化、リン酸化、又はペグ (PEG) 化などによって修飾されていてもよい。

[0020] ここで、「CAPRIN-1タンパク質と特異的に結合する」とは、CAPRIN-1タンパク質に特異的に結合し、それ以外のタンパク質と実質的に結合しないことを意味する。

[0021] さらにまた、本発明における癌の治療及び/又は予防の対象である被験者は、ヒト、ペット動物、家畜類、競技用動物などの哺乳動物であり、好ましい被験者は、ヒトである。

[0022] 以下に、本発明に関する抗原の作製、抗体の作製、及び医薬組成物について説明する。

[0023] < 抗体作製用抗原の作製 >

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

[0024] ヒトCAPRIN-1及びそのホモログの塩基配列及びアミノ酸配列は、例えば、GenBank (米国NCBI) にアクセスし、BLAST、FASTAなどのアルゴリズム (Karlin and Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90 :5873-5877, 1993; Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25 :3389-3402, 1997) を利用することによって入手することができる。

[0025] 本発明では、ヒトCAPRIN-1の塩基配列 (配列番号1又は3) 又は

アミノ酸配列 (配列番号 2 又は 4) を基準とした場合、これらの ORF 又は成熟部分の塩基配列又はアミノ酸配列と 70% ~ 100%、好ましくは 80% ~ 100%、より好ましくは 90% ~ 100%、さらに好ましくは 95% ~ 100%、例えば、97% ~ 100%、98% ~ 100%、99% ~ 100% 又は 99.5% ~ 100% の配列同一性を有する配列からなる核酸又はタンパク質がターゲットになる。ここで、「%配列同一性」は、2つの配列を、ギャップを導入するか又はギャップを導入しないで、最大の類似度又は一致度となるようにアラインメント (整列) したとき、アミノ酸 (又は塩基) の総数に対する同一アミノ酸 (又は塩基) のパーセンテージ (%) を意味する。

[0026] CAPRIN_1 タンパク質の断片は、抗体が認識する最小単位であるエピトープ (抗原決定基) のアミノ酸長から、該タンパク質の全長未満の長さを有する。エピトープは、哺乳動物、好ましくはヒトにおいて、抗原性又は免疫原性を有するポリペプチド断片を指し、その最小単位は、約 7 ~ 12 アミノ酸、例えば、8 ~ 11 アミノ酸、からなる。

[0027] 上記した、ヒト CAPRIN-1 タンパク質やその部分ペプチドを含むポリペプチドは、例えば、Fmoc 法 (フルオレニルメチルオキシカルボニル法)、tBoc 法 (t-ブチルオキシカルボニル法) などの化学合成法に従って合成することができる (日本生化学会編、生化学実験講座 1、タンパク質の化学 IV、化学修飾とペプチド合成、東京化学同人 (日本)、1981 年)。また、各種の市販のペプチド合成機を利用して常法により合成することもできる。また、公知の遺伝子工学的手法 (Sambrook ら, Molecular Cloning, 第 2 版, Current Protocols in Molecular Biology (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Ausubel ら, Short Protocols in Molecular Biology, 第 3 版, A compendium of Methods from Current Protocols in Mole

cular Biology (1995), John Wiley & Sons など) を用いて、上記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを調製し、該ポリヌクレオチドを発現ベクターに組み込んで宿主細胞に導入し、該宿主細胞中でポリペプチドを生産させることにより、目的とするポリペプチドを得ることができる。

[0028] 上記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、公知の遺伝子工学的手法や市販の核酸合成機を用いた常法により、容易に調製することができる。例えば、ヒトCAPRIN-1遺伝子の塩基配列を含むDNAは、ヒト染色体DNA又はcDNAライブラリーを鋳型として使用し、配列番号1に記載した塩基配列を増幅できるように設計した一对のプライマーを用いてPCRを行うことにより調製することができる。PCRの反応条件は適宜設定することができるが、例えば、耐熱性DNAポリメラーゼ(例えば、Taqポリメラーゼ、Pfuポリメラーゼなど)及びMg²⁺含有PCRバッファーを用いて、94℃で30秒間(変性)、55℃で30秒~1分間(アニーリング)、72℃で2分間(伸長)からなる反応行程を1サイクルとして、例えば、30サイクル行った後、72℃で7分間反応させる条件などを挙げることができるが、これに限定されない。PCRの手法、条件などについては、例えば、Ausubel, Short Protocols in Molecular Biology, 第3版, A compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology (1995), John Wiley & Sons (特に第15章)に記載されている。

[0029] また、CAPRIN-1遺伝子の塩基配列やCAPRIN-1タンパク質のアミノ酸配列の情報に基づいて、適当なプローブやプライマーを調製し、それを用いてヒトなどのcDNAライブラリーをスクリーニングすることにより、所望のDNAを単離することができる。cDNAライブラリーは、CAPRIN-1タンパク質を発現している細胞、器官又は組織から作製することが好ましい。そのような細胞や組織の例は、精巣、白血病、乳癌、リン

パ腫、脳腫瘍、肺癌、膵臓癌、大腸癌などの癌又は腫瘍に由来する細胞又は組織である。上記したプローブ又はプライマーの調製、cDNAライブラリーの構築、cDNAライブラリーのスクリーニング、及び目的遺伝子のクローニングなどの操作は当業者に既知であり、例えば、Sambrookら、Molecular Cloning, 第2版, Current Protocols in Molecular Biology (1989)、Ausbelら(上記)などに記載された方法に準じて行うことができる。このようにして得られたDNAから、ヒトCAPRIN-1タンパク質やその部分ペプチドをコードするDNAを得ることができる。

[0030] 上記宿主細胞としては、上記ポリペプチドを発現可能な細胞であればいかなるものであってもよく、原核細胞の例としては大腸菌など、真核細胞の例としてはサル腎臓細胞COS1、チャイニーズハムスター卵巣細胞CHOなどの哺乳動物細胞、ヒト胎児腎臓細胞株HEK293、マウス胎仔皮膚細胞株NIH3T3、出芽酵母、分裂酵母などの酵母細胞、カイコ細胞、アフリカツメガエル卵細胞などが挙げられるが、これらに限定されない。

[0031] 宿主細胞として原核細胞を用いる場合、発現ベクターとしては、原核細胞中で複製可能なオリジン、プロモーター、リボソーム結合部位、マルチクローニングサイト、ターミネーター、薬剤耐性遺伝子、栄養要求性相補遺伝子などを有する発現ベクターを用いる。大腸菌用発現ベクターとしては、pUC系、pBluescriptIしpET発現システム、pGEX発現システムなどが例示できる。上記ポリペプチドをコードするDNAをこのような発現ベクターに組み込み、該ベクターで原核宿主細胞を形質転換したのち、得られた形質転換体を培養すれば、前記DNAがコードしているポリペプチドを原核宿主細胞中で発現させることができる。この際、該ポリペプチドを、他のタンパク質との融合タンパク質として発現させることもできる。

[0032] 宿主細胞として真核細胞を用いる場合、発現ベクターとしては、プロモーター、スプライシング領域、ポリ(A)付加部位などを有する真核細胞用発現ベクターを用いる。そのような発現ベクターとしては、pKA1、pCD

M8、pSVK3、pMSG、pSVL、pBK_CMV、pBK-RSV、EBVベクター、pRS、pcDNA3、pYES2などが例示できる。上記と同様に、上記ポリペプチドをコードするDNAをこのような発現ベクターに組み込み、該ベクターで真核宿主細胞を形質転換したのち、得られた形質転換体を培養すれば、前記DNAがコードしているポリペプチドを真核宿主細胞中で発現させることができる。発現ベクターとしてPIND/V5_His、pFLAG-CMV-2、pEGFP-N1、pEGFP-C1などを用いた場合には、Hisタグ（例えば、 $(His)_6 \sim (His)_{10}$ ）、FLAGタグ、mycタグ、HAタグ、GFPなどの各種タグを付加した融合タンパク質として、上記ポリペプチドを発現させることができる。

[0033] 発現ベクターの宿主細胞への導入は、電気穿孔法、リン酸カルシウム法、リポソーム法、DEAEデキストラン法、マイクロインジェクション、ウイルス感染、リポフェクション、細胞膜透過性ペプチドとの結合などの周知の方法を用いることができる。

[0034] 宿主細胞から目的のポリペプチドを単離精製するためには、公知の分離操作を組み合わせて行うことができる。例えば、尿素などの変性剤や界面活性剤による処理、超音波処理、酵素消化、塩析や溶媒分別沈殿法、透析、遠心分離、限外ろ過、ゲルろ過、SDS-PAGE、等電点電気泳動、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィーなどが挙げられるが、これらに限定されない。

[0035] < 抗体の構造 >

抗体は、通常少なくとも2本の重鎖及び2本の軽鎖を含むヘテロ多量体糖タンパク質である。IgM以外の免疫グロブリンは、2本の同一の軽(L)鎖及び2本の同一の重(H)鎖で構成される約150kDaのヘテロ四量体糖タンパク質である。典型的には、それぞれの軽鎖は、1つのジスルフィド共有結合により重鎖に連結されているが、種々の免疫グロブリンアイソタイプの重鎖間のジスルフィド結合の数は変動する。それぞれの重鎖及び軽鎖は

、また鎖内ジスルフィド結合も有する。それぞれの重鎖は、一方の端に可変ドメイン (V H領域) を有し、それにいくつかの定常領域が続く。それぞれ軽鎖は、可変ドメイン (V L領域) を有し、その反対の端に1つの定常領域を有する。軽鎖の定常領域は、重鎖の最初の定常領域と整列しており、かつ軽鎖可変ドメインは、重鎖の可変ドメインと整列している。抗体の可変ドメインは、特定の領域が相補性決定領域 (C D R) と呼ばれる特定の可変性を示して抗体に結合特異性を付与する。可変領域の相対的に保存されている部分は、フレームワーク領域 (F R) と呼ばれている。完全な重鎖及び軽鎖の可変ドメインはそれぞれ3つのC D Rにより連結された4つのF Rを含む。3つのC D Rは、重鎖ではそのN末から順にC D R H 1 , C D R H 2 , C D R H 3、同様に軽鎖ではC D R L 1 , C D R L 2 , C D R L 3 と呼ばれている。抗体の抗原への結合特異性には、C D R H 3 が最も重要である。また、各鎖のC D Rは、F R領域によって近接した状態で一緒に保持され、他方の鎖からのC D Rと共に抗体の抗原結合部位の形成に寄与する。定常領域は、抗体が抗原に結合することに直接寄与しないが、種々のエフェクター機能、例えば、抗体依存性細胞障害活性 (A D C C) への関与、F c 受容体への結合を介した食作用、新生児F c 受容体 (F c R n) を介した半減期/ クリアランス速度、補体カスケードのC 1 q 構成要素を介した補体依存性細胞障害 (C D C) を示す。

[0036] < 抗体の作製 >

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

[0037] ここで、「免疫学的反応性」とは、生体内で抗体とC A P R I N _ 1抗原とが結合する特性を意味し、このような結合を介して腫瘍を障害 (例えば、死滅、抑制又は退縮) する機能が、発揮される。すなわち、本発明で使用される抗体は、C A P R I N - 1タンパク質と結合して腫瘍、例えば、乳癌、腎癌、膵臓癌、大腸癌、肺癌、脳腫瘍、胃癌、子宮頸癌、卵巣癌、前立腺癌、膀胱癌、食道癌、白血病、リンパ腫、線維肉腫、肥満細胞腫又はメラノー

マなどを障害することができるならば、その種類を問わない。

[0038] 以下に、種々のモノクローナル抗体の作製例を示す。

[0039] 例えば、CAPRIN-1を発現する乳癌細胞株SK-BR-3などをマウスに投与して免疫し、同マウスより脾臓を抽出し、細胞を分離の上、該細胞とマウスミエローマ細胞とを融合させ、得られた融合細胞（ハイブリドーマ）の中から、癌細胞増殖抑制作用を持つ抗体を産生するクローンを選択する。癌細胞増殖抑制作用を持つモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを単離し、当該ハイブリドーマを培養し、培養上清から一般的なアフィニティ精製法により抗体を精製することで、調製することが可能である。

[0040] モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、例えば、以下のようにしても作製することができる。まず、公知の方法に従って、感作抗原を動物に免疫する。一般的方法として、感作抗原を哺乳動物の腹腔内又は皮下に注射することにより行われる。具体的には、感作抗原をPBS（Phosphate-Buffered Saline）や生理食塩水などで適量に希釈、懸濁したものに所望により通常のアジュバント、例えば、フロイント完全アジュバントを適量混合し、乳化後、哺乳動物に4～21日毎に数回投与する。また、感作抗原免疫時に適当な担体を使用することもできる。

[0041] このように哺乳動物を免疫し、血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを確認した後に、哺乳動物から免疫細胞を採取し、細胞融合に付すが、好ましい免疫細胞としては、特に脾細胞が挙げられる。

[0042] 前記免疫細胞と融合される他方の親細胞として、哺乳動物のミエローマ細胞を用いる。このミエローマ細胞は、公知の種々の細胞株、例えば、P3U1（P3-X63Ag8U1）、P3（P3x63Ag8.653）（J. Immunol. (1979) 123:1548-1550）、P3x63Ag8U.1（Current Topics in Microbiology and Immunology (1978) 81:1-7）、NS-1（Kohler, G. and Milstein, C., Eur. J. Immunol. (1976) 6:511-519）、MPC-11（M

argulies, D. H. et al., Cell (1976) 8:405-415)、SP2/0 (Shulman, M. et al., Nature (1978) 276:269-270)、F0 (deSt. Groth, S. F. et al., J. Immunol. Methods (1980) 35:1-21)、S194 (Trowbridge, S. J. Exp. Med. (1978) 148:313-323)、R210 (Galfré, G. et al., Nature (1979) 277:131-133)などが好適に使用される。

- [0043] 前記免疫細胞とミエローマ細胞との細胞融合は、基本的には公知の方法、例えば、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)などに準じて行うことができる。
- [0044] より具体的には、前記細胞融合は、例えば、細胞融合促進剤の存在下に通常の栄養培養液中で実施される。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール (PEG)、センダイウイルス (HVJ)などが使用され、さらに所望により融合効率を高めるためにジメチルスルホキシドなどの補助剤を添加使用することもできる。
- [0045] 免疫細胞とミエローマ細胞との使用割合は、任意に設定することができる。例えば、ミエローマ細胞に対して免疫細胞を1~10倍とするのが好ましい。前記細胞融合に用いる培養液としては、例えば、前記ミエローマ細胞株の増殖に好適なRPMI1640培養液、MEM培養液、その他、この種の細胞培養に用いられる通常の培養液が使用可能であり、さらに、牛胎児血清 (FCS)などの血清補液を併用することもできる。
- [0046] 細胞融合は、前記免疫細胞とミエローマ細胞との所定量を前記培養液中でよく混合し、予め37℃程度に加温したPEG溶液 (例えば、平均分子量1000~6000程度)を通常30~60% (w/v)の濃度で添加し、混合することによって目的とするハイブリドマを形成する。続いて、適当な培養液を逐次添加し、遠心して上清を除去する操作を繰り返すことによりハ

イブリドーマの生育に好ましくない細胞融合剤などを除去する。

[0047] このようにして得られたハイブリドーマは、通常の選択培養液、例えば、HAT培養液（ヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジンを含む培養液）で培養することにより選択される。上記HAT培養液での培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞（非融合細胞）が死滅するのに十分な時間（通常、数日〜数週間）継続する。ついで、通常の限界希釈法を実施し、目的とする抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニング及び単一クローニングを行う。

[0048] また、ヒト以外の動物に抗原を免疫して上記ハイブリドーマを得る他に、ヒトリンパ球、例えば、EBウイルスに感染したヒトリンパ球を *in vitro* でタンパク質、タンパク質発現細胞又はその溶解物で感作し、感作リンパ球をヒト由来の永久分裂能を有するミエローマ細胞、例えば、U266（登録番号TIB196）と融合させ、所望の活性（例えば、細胞増殖抑制活性）を有するヒト抗体を産生するハイブリドーマを得ることもできる。

[0049] このようにして作製されるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、通常の培養液中で継代培養することが可能であり、また、液体窒素中で長期保存することが可能である。

[0050] すなわち、所望の抗原や所望の抗原を発現する細胞を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法に従って免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナルな抗体産生細胞（ハイブリドーマ）をスクリーニングすることによって作製できる。

[0051] ここで、ヒト抗体産生マウスとしては、例えば、KMマウス（キリンファーマ/Medarex）及びXenomaウス（Amgen）が知られている（例えば、国際公開第WO02/43478号、同第WO02/092812号など）。このようなマウスをCAPRIN-1タンパク質又はその断片で免疫するときには、完全ヒトポリクローナル抗体を血液から得ることができ。また、免疫後のマウスから脾臓細胞を取出し、ミエローマ細胞との融

合法によりヒト型モノクローナル抗体を作製することができる。

[0052] 抗原の調製は、例えば、動物細胞を用いた方法（特表2007-530068）やバキュロウイルスを用いた方法（例えば、国際公開第WO98/46777号など）などに準じて行うことができる。抗原の免疫原性が低い場合には、アルブミンなどの免疫原性を有する巨大分子と結合させ、免疫を行えばよい。

[0053] さらにまた、抗体遺伝子をハイブリドーマからクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し、遺伝子組換え技術を用いて産生させた遺伝子組換え抗体を用いることができる（例えば、Carl, A. K., Borrebaeck, James, W. Larrick, THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990参照）。具体的には、ハイブリドーマのmRNAから逆転写酵素を用いて抗体の可変領域（V領域）のcDNAを合成する。目的とする抗体のV領域をコードするDNAが得られれば、これを所望の抗体定常領域（C領域）をコードするDNAと連結した後、発現ベクターへ組み込む。又は、抗体のV領域をコードするDNAを、抗体C領域のDNAを含む発現ベクターへ組み込んでもよい。発現制御領域、例えば、エンハンサー、プロモーターの制御のもとで発現するよう発現ベクターに組み込む。次に、この発現ベクターにより宿主細胞を形質転換し、抗体を発現させることができる。

[0054] 前述のように、本発明の抗CAPRIN₁抗体は、ヒト以外の動物のモノクローナル抗体、ヒトモノクローナル抗体、組換え抗体などの様々なモノクローナル抗体であることを特徴とする。

[0055] ヒト以外の動物のモノクローナル抗体やヒトモノクローナル抗体は、CAPRIN₁タンパク質を免疫したヒト以外の動物（例えば、マウス、ヒト抗体産生マウス、ニワトリ、ウサギなど）からの脾細胞とミエローマ細胞との融合によって得られたハイブリドーマを培養することによって作製されう

る。

[0056] 組換え抗体は、前述のように、キメラ抗体、ヒト化抗体、単鎖抗体、多重特異性抗体などを含む。

[0057] キメラ抗体は、ヒト以外の動物（例えば、マウス、ラット、ウサギやニワトリなど）由来の抗体の軽鎖又は重鎖の可変領域をコードするDNAをそれぞれ、ヒト抗体由来の軽鎖又は重鎖の定常領域をコードするDNAと連結することによって得られる融合遺伝子を、発現ベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させることにより作製することができる。

[0058] 具体的には、例えば、マウス抗体の重鎖、軽鎖の可変領域とヒト抗体の重鎖、軽鎖の定常領域からなる抗体などである。キメラ抗体の作製は、公知の方法を用いて行うことができ、例えば、抗体V領域をコードするDNAとヒト抗体C領域をコードするDNAとを連結し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入し産生させることにより得られる。後述の実施例では、ヒト—マウスキメラ抗体が作製され、抗腫瘍効果が確認された。本モノクローナル抗体は、配列番号8のアミノ酸配列を有する重鎖可変（VH）領域と、配列番号12のアミノ酸配列を有する軽鎖可変（VL）領域とを含み、ここで、該VH領域に配列番号5のアミノ酸配列で表されるCDR1、配列番号6のアミノ酸配列で表されるCDR2及び配列番号7のアミノ酸配列で表されるCDR3が含まれ、該VL領域に、配列番号9のアミノ酸配列で表されるCDR1、配列番号10のアミノ酸配列で表されるCDR2及び配列番号11のアミノ酸配列で表されるCDR3が含まれる。

[0059] ヒト化抗体は、再構成（reshaped）ヒト抗体とも称される改変抗体である。ヒト化抗体は、免疫動物由来の抗体のCDRを、ヒト抗体の相補性決定領域へ移植することによって構築される。すなわち、ヒト抗体由来の軽鎖又は重鎖の可変領域をコードするDNA中のCDRコーディング配列を、それらに対応する、ヒト以外の動物（例えば、マウス、ラット、ウサギやニワトリなど）由来の抗体のCDRコーディング配列と置換したDNAを作製し、それによって得られたDNAをそれぞれ、ヒト抗体由来の軽鎖又は重

鎖の定常領域をコードするDNAと連結して得られる融合遺伝子を発現ベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させることにより作製することができる。

[0060] 具体的には、例えば、マウス抗体やニワトリ抗体のCDRとヒト抗体のフレームワーク領域 (framework region; FR) を連結するように設計したDNA配列を、末端部にオーバーラップする部分を有するように作製した数個のオリゴヌクレオチドからPCR法により合成する。得られたDNAを、ヒト抗体定常領域をコードするDNAと連結し、次いで発現ベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させることにより得られる (欧州特許出願公開第EP239400号、国際公開第WO96/02576号参照)。CDRを介して連結されるヒト抗体のFRは、相補性決定領域が良好な抗原結合部位を形成するものが選択される。必要に応じ、再構成ヒト抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成するように抗体の可変領域におけるフレームワーク領域のアミノ酸を置換してもよい (Sato K. et al., Cancer Research, 1993, 53: 851—856)。また、様々なヒト抗体由来のフレームワーク領域に置換してもよい (国際公開第WO99/51743号参照)。

[0061] CDRを介して連結されるヒト抗体のフレームワーク領域は、相補性決定領域が良好な抗原結合部位を形成するものが選択される。必要に応じ、再構成ヒト抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成するように、抗体の可変領域におけるフレームワーク領域のアミノ酸を置換してもよい (Sato K. et al., Cancer Research, 1993, 53: 851—856)。

[0062] 単鎖抗体は、重鎖可変領域と軽鎖可変領域とをリンカーを介して直線状に連結された抗体である。単鎖抗体をコードするDNAは、重鎖可変領域をコードするDNA、リンカーをコードするDNA、及び軽鎖可変領域をコードするDNAを結合することによって作製することができる。ここで、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域はいずれも、ヒト抗体由来のものであるか、又は、

CDRのみヒト以外の動物（例えば、マウス、ラット、ウサギやニワトリなど）由来の抗体のCDRによって置換されたヒト抗体由来のものである。また、リンカーは、12～19アミノ酸からなり、例えば、15アミノ酸の（G₄S）₃（G. -B. Kimら, Protein Engineering Design and Selection 2007, 20(9): 425-432）が挙げられる。

[0063] 多重特異性抗体は、複数の異なるエピトープと特異的に結合可能な抗体である。例えば、二重特異性抗体（diabody）の場合には、2つの異なるエピトープと特異的に結合可能である。二重特異性抗体をコードするDNAは、例えば、重鎖可変領域AをコードするDNA、軽鎖可変領域BをコードするDNA、重鎖可変領域BをコードするDNA、及び軽鎖可変領域AをコードするDNAをこの順序で結合する（ただし、軽鎖可変領域BをコードするDNAと重鎖可変領域BをコードするDNAとは上記のようなリンカーをコードするDNAを介して結合される。）ことによって作製することができる。ここで、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域はいずれも、ヒト抗体由来のものであるか、又は、CDRのみヒト以外の動物（例えば、マウス、ラット、ウサギやニワトリなど）由来の抗体のCDRによって置換されたヒト抗体由来のものである。

[0064] キメラ抗体やヒト化抗体を作製した後に、可変領域（例えば、FR）や定常領域中のアミノ酸を他のアミノ酸で置換などしてもよい。

[0065] アミノ酸の置換は、例えば、15未満、10未満、8以下、7以下、6以下、5以下、4以下、3以下、又は2以下のアミノ酸、好ましくは1～5アミノ酸、より好ましくは1又は2アミノ酸、の置換であり、置換抗体は、未置換抗体と機能的に同等であるべきである。置換は、保存的アミノ酸置換が望ましく、これは、電荷、側鎖、極性、芳香族性などの性質の類似するアミノ酸間の置換である。性質の類似したアミノ酸は、例えば、塩基性アミノ酸（アルギニン、リジン、ヒスチジン）、酸性アミノ酸（アスパラギン酸、グルタミン酸）、無電荷極性アミノ酸（グリシン、アスパラギン、グルタミン

、セリン、トレオニン、システイン、チロシン)、無極性アミノ酸 (ロイシン、イソロイシン、アラニン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン、メチオニン)、分枝鎖アミノ酸 (ロイシン、バリン、イソロイシン)、芳香族アミノ酸 (フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、ヒスチジン) などに分類しうる。

[0066] 抗体修飾物としては、例えば、ポリエチレングリコール (PEG) などの各種分子と結合した抗体を挙げることができる。本発明の抗体修飾物においては、結合される物質は限定されない。このような抗体修飾物を得るには、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。これらの方法はこの分野において既に確立されている。

[0067] ここで「機能的に同等」とは、対象となる抗体が本発明の抗体と同様の生物学的又は生化学的活性、具体的には腫瘍を障害する機能を有すること、ヒトへの適用時に拒絶反応を本質的に起こさないことなどを指す。このような活性としては、例えば、細胞増殖抑制活性、又は結合活性を例示することができる。

[0068] あるポリペプチドと機能的に同等なポリペプチドを調製するための、当業者によく知られた方法としては、ポリペプチドに変異を導入する方法が知られている。例えば、当業者であれば、部位特異的変異誘発法 (Hashimoto-Gotoh, T. et al., (1995) Gene, 152: 271—275、Zoller, M.J., and Smith, M. (1983) Methods Enzymology, 100: 468-500、Kramer, W. et al., (1984) Nucleic Acids Res., 12: 9441-9456、Kramer, W. and Fritz, H.J., (1987) Methods Enzymology, 154: 350—367、Kunkel, T.A., (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 82: 488—492、Kunkel (1988) Methods Enzymology, 85: 2763—2766) などを用いて、本発明の抗体に適宜変異を導入することにより、

該抗体と機能的に同等な抗体を調製することができる。

[0069] 上記抗CAPRIN-1抗体が認識するCAPRIN-1タンパク質のエピトープを認識する抗体は、当業者に公知の方法により得ることが可能である。例えば、抗CAPRIN-1抗体が認識するCAPRIN-1タンパク質のエピトープを通常の方法（例えば、エピトープマッピングなど）により決定し、該エピトープに含まれるアミノ酸配列を有するポリペプチドを免疫原として抗体を作製する方法や、通常の方法で作製された抗体のエピトープを決定し、抗CAPRIN-1抗体とエピトープが同じ抗体を選択する方法などにより得ることができる。

[0070] 本発明の抗体の親和定数 K_a (k_{on}/k_{off}) は、好ましくは、少なくとも $10^7 M^{-1}$ 、少なくとも $10^8 M^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^8 M^{-1}$ 、少なくとも $10^9 M^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^9 M^{-1}$ 、少なくとも $10^{10} M^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^{10} M^{-1}$ 、少なくとも $10^{11} M^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^{11} M^{-1}$ 、少なくとも $10^{12} M^{-1}$ 、又は少なくとも $10^{13} M^{-1}$ である。

[0071] 本発明の抗体は、抗腫瘍剤とコンジュゲートすることができる。抗体と抗腫瘍剤との結合は、アミノ基、カルボキシル基、ヒドロキシ基、チオール基などと反応性の基（例えば、コハク酸イミジル基、ホルミル基、2-ピリジリジチオ基、マレイイミジル基、アルコキシカルボニル基、ヒドロキシ基など）をもつスペーサーを介して行うことができる。

[0072] 抗腫瘍剤の例は、文献などで公知の下記の抗腫瘍剤、すなわち、パクリタキセル、ドキソルビシン、ダウノルビシン、シクロホスファミド、メトトレキサート、5-フルオロウラシル、チオテパ、プスルファン、インプロスルファン、ピボスルファン、ベンゾドーパ (benzodopa)、カルボコン、メツレドーパ (meturedopa)、ウレドーパ (uredopa)、アルトレートアミン (altretamine)、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミド、トリエチレンチオホスホラミド (triethylenethiophosphoramidate)、トリメチロロメラミン (trimethylololomelamine)、プラタシン、プラ

タシノン、カンプトセシン、プリオスタチン、カリスタチン (c a l l y s t a t i n) 、クリプトフィシン1、クリプトフィシン8、ドラスタチン、ズオカルマイシン、エレウテロピン、パンクラチスタチン、サルコジクチン (s a r c o d i c t y i n) 、スポンジスタチン、クロランプシル、クロロナファジン (c h l o R N A p h a z i n e) 、コロホスファמיד (c h o l o p h o s p h a m i d e) 、エストラムスチン、イホスファמיד、メクロレタミン、メクロレタミンオキシドヒドロクロリド、メルファラン、ノベンピチン (n o v e m b i c h i n) 、フェネステリン (p h e n e s t e r i n e) 、プレドニムスチン (p r e d n i m u s t i n e) 、トロフオスファמיד (t r o f o s f a m i d e) 、ウラシルマスタード、カルムスチン、クロロゾトシン (c h l o r o z o t o c i n) 、フォテムスチン (f o t e m u s t i n e) 、ロムスチン、ニムスチン、ラニムスチン、カリケアマイシン (c a l i c h e a m i c i n) 、ダイネマイシン、クロドロネート、エスペラマイシン、アクラシノマイシン、アクチノマイシン、オーストラマイシン (a u t h r a m y c i n) 、アザセリン、ブレオマイシン、カクタノマイシン (c a c t i n o m y c i n) 、カラビシン (c a r a b i c i n) 、カルミノマイシン、カルジノフィリン (c a r z i n o p h i l i n) 、クロモマイシン、ダクチノマイシン、デトルピシン (d e t o r b i c i n) 、6_ジアゾ_5_オキソ_L-ノルロイシン、アドリアマイシン (a d r i a m y c i n) 、エピルピシン、エソルピシン、イダルピシン、マーセロマイシン (m a r c e l l o m y c i n) 、マイトマイシン C、マイコフエノール酸 (m y c o p h e n o l i c a c i d) 、ノガラマイシン (n o g a l a m y c i n) 、オリボマイシン (o l i v o m y c i n s) 、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン (p o t f i r o m y c i n) 、ピューロマイシン、ケラマイシン (q u e l a m y c i n) 、ロドルピシン (r o d o r u b i c i n) 、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン (t u b e r c i d i n) 、ウベニヌクス、ジノスタチン (z i n o s t a t i n) 、ゾリレピシン (z o r u b i c i n) 、デノプテ

リン (denopterin)、プテロプテリン (pteropterin)、トリメトレキサート (trimetrexate)、フルダラビン (fludarabine)、6-メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニン、アンシタビン、アザシチジン (azacitidine)、6-アザウリジン (azauridine)、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン (enocitabine)、フロキシウリジン (flouxuridine) ;アンドロゲン類、例えば、カルステロン (calusterone)、プロピオン酸ドモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトン (testolactone)、アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタン、フロリン酸 (frolinic acid)、アセグラトン、アルドホスファミドグリコシド、アミノレプリン酸、エニルウラシル、アムサクリン (amsacrine)、ベストラブシル (bestrabucic acid)、ビスアントレン (bisantrene)、エダトラキサート (edatraxate)、デフオファミン (defofamine)、デメコルシン (demecolcine)、ジアジコン (diaziquone)、エルフォルニチン (elfornithine)、酢酸エリプチニウム (elliptinium)、エポチロン (epothilone)、エトグルシド (etoglucid)、レンチナン、ロニダミン (lonidamine)、メイタンシン (maytansine)、アンサミトシン (ansamitoeine)、ミトグアゾン (mitoguazone)、ミトキサントロン、モピダンモール (mopidanmol)、ニトラエリン (nitraerine)、ペントスタチン、フェナメット (phenamet)、ピラルピシン、ロソキサントロン (losoxantrone)、ポドフィリン酸 (podosphyllinic acid)、2-エチルヒドラジド、プロカルバジン、ラゾキサン (razoxane)、リゾキシン、シゾフィラン、スピロゲルマニウム (spirogermanium)、テニユアゾン酸 (tenuazonic acid)、トリアジコン (triaziquone)、口

リジン (roridine) A、アンクイジン (anguidine)、ウレタン、ビンデシン、ダカーバジン、マンノムスチン (mannomustine)、ミトプロニトール、ミトラクトール (mitolactol)、ピポブロマン (pipobroman)、ガシトシン (gacytosine)、ドキセタキセル、クロランプシル、ゲムシタビン (gemcitabine)、6-チオグアニン、メルカプトプリン、シスプラチン、オキサリプラチン、カルボプラチン、ビンプラスチン、エトポシド、イホスファミド、マイトキサントロン、ビクリスチン、ビノレルビン、ノバントロン (novantrone)、テニポシド、エダトレキセート (edatrexate)、ダウノマイシン、アミノプテリン、キセローダ (xeloda)、イバンドロナート (ibandronate)、イリノテカン、トポイソメラーゼインヒビター、ジフルオロメチロールニチン (DMFO)、レチノイン酸、カペシタビン (capecitabine)、及びそれらの薬学的に許容可能な塩又は誘導体を包含する。

[0073] また、本発明の抗体と、抗腫瘍剤を併用投与することで、より高い治療効果を得ることができる。本手法は、CAPRIN_1が発現している癌患者に対して、外科的手術前後どちらにおいても適応できる。特に手術後に、従来抗腫瘍剤単独で処置されていたCAPRIN-1が発現している癌に対して、より高い癌再発防止や生存期間の延長が得られる。

[0074] 本発明の抗体との併用投与に用いられる抗腫瘍剤の例は、文献などで公知の下記の抗腫瘍剤、すなわち、バクリタキセル、ドキシソルビシン、ダウノルビシン、シクロホスファミド、メトトレキサート、5-フルオロウラシル、チオテパ、プスルファン、インプロスルファン、ピポスルファン、ベンゾドーパ (benzodopa)、カルボコン、メツレドーパ (meturedopa)、ウレドーパ (uredopa)、アルトレートアミン (altretamine)、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミド、トリエチレンチオホスホラミド (triethylenethiophosphoramidate)、トリメチロロメラミン (trimethylololo

melamine)、プラタシン、プラタシノン、カンプトセシン、プリオスタチン、カリスタチン (callystatin)、クリプトフィシン1、クリプトフィシン8、ドラスタチン、ズオカルマイシン、エレウテロピン、パンクラチスタチン、サルコジクチン (sarcodictyin)、スポンジスタチン、クロランブシル、クロロナファジン (chlorRNAphazine)、コロホスファミド (cholophosphamide)、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシドヒドロクロリド、メルファラン、ノベンビチン (novembichin)、フェネステリン (phenesterine)、プレドニムスチン (prednimustine)、トロフォスファミド (trofosfamide)、ウラシルマスタード、カルムスチン、クロロゾトシン (chlorozotocin)、フォテムスチン (fotemustine)、ロムスチン、ニムスチン、ラニムスチン、カリケアマイシン (calicheamicin)、ダイネマイシン、クロドロネート、エスペラマイシン、アクラシノマイシン、アクチノマイシン、オースラマイシン (authramycin)、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン (cactinomycin)、カラビシン (carabycin)、カルミノマイシン、カルジノフィリン (carzinophilin)、クロモマイシン、ダクチノマイシン、デトルビシン (detorbicin)、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、アドリアマイシン (adriamycin)、エピルビシン、エソルビシン、イダルビシン、マーセロマイシン (marcellomycin)、マイトマイシンC、マイコフェノール酸 (mycophenolic acid)、ノガラマイシン (nogalamycin)、オリボマイシン (olivomycins)、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン (potfiromycin)、ピューロマイシン、ケラマイシン (quelamycin)、ロドルビシン (rodorubicin)、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン (tubercidin)、ウベニヌクス、ジノスタチン (zinostatin)、ゾルビ

シン (z o r u b i c i n) 、 デノプテリン (d e n o p t e r i n) 、 プ
テロプテリン (p t e r o p t e r i n) 、 トリメトレキセート (t r i m
e t r e x a t e) 、 フルダラビン (f l u d a r a b i n e) 、 6-メル
カプトプリン、チアミプリン、チオグアニン、アンシタビン、アザシチジン
(a z a c i t i d i n e) 、 6-アザウリジン (a z a u r i d i n e)
、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エ
ノシタビン (e n o c i t a b i n e) 、 フロキシウリジン (f l o x u r
i d i n e) 、 カルステロン (c a l u s t e r o n e) 、 プロピオン酸
ドモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトン (t
e s t o l a c t o n e) 、 アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタ
ン、フロリン酸 (f r o l i n i c a c i d) 、 アセグラトン、アルドホ
スファミドグリコシド、アミノレプリン酸、エニルウラシル、アムサクリン
(a m s a c r i n e) 、 ベストラブシル (b e s t r a b u c i l) 、 ビ
サントレン (b i s a n t r e n e) 、 エダトラキセート (e d a t r a x
a t e) 、 デフォファミン (d e f o f a m i n e) 、 デメコルシン (d e
m e c o l c i n e) 、 ジアジコン (d i a z i q u o n e) 、 エルフオル
ニチン (e l f o r n i t h i n e) 、 エリプチニウム (e l l i p
t i n i u m) 、 エポチロン (e p o t h i l o n e) 、 エトグルシド (e
t o g l u c i d) 、 レンチナン、ロニタミン (l o n i d a m i n e) 、
メイタンシン (m a y t a n s i n e) 、 アンサミトシン (a n s a m i t
o c i n e) 、 ミトクアゾン (m i t o g u a z o n e) 、 ミトキサントロ
ン、モピダンモール (m o p i d a n m o l) 、 ニトラエリン (n i t r a
e r i n e) 、 ペントスタチン、フェナメット (p h e n a m e t) 、 ピラ
ルピシン、ロソキサントロン (l o s o x a n t r o n e) 、 ポドフィリン
酸 (p o d o p h y l l i n i c a c i d) 、 2-エチルヒドラジド、プ
ロカルバジン、ラゾキサン (r a z o x a n e) 、 リゾキシン、シゾフィラ
ン、スピロゲルマニウム (s p i r o g e r m a n i u m) 、 テニユアゾン
ic (t e n u a z o n i c a c i d) 、 トリアジコン (t r i a z i q u

one)、ロリジン (roridine) A、アングイジン (anguidine)、ウレタン、ビンデシン、ダカーバジン、マンノムスチン (mannomustine)、ミトプロニトール、ミトラクトール (mitolactol)、ピポゾロマン (pipobroman)、ガシトシン (gacytosine)、ドキセタキセル、クロランプシル、ゲムシタビン (gemcitabine)、6-チオグアニン、メルカプトプリン、シスプラチン、オキサリプラチン、カルボプラチン、ビンプラスチン、エトポシド、イホスファミド、マイトキサントロン、ビנקリスチン、ビノレルビン、ノバントロン (novantrone)、テニポシド、エダトレキセート (edatrexate)、ダウノマイシン、アミノプテリン、キセローダ (xeloda)、イバンドロナート (ibandronate)、イルノテカン、トポイソメラーゼインヒビター、ジフルオロメチロールニチン (DMFO)、レチノイン酸、カペシタビン (capecitabine)、及びそれらの薬学的に許容可能な (公知の) 塩又は (公知の) 誘導体を包含する。上記の内、特にシクロホスファミド、パクリタキセル、ドキセタキセル、ピノレルビンが好ましく用いられる。

[0075] あるいは、本発明の抗体には、文献などで公知の、²¹¹At、¹³¹I、¹²⁵I、⁹⁰Y、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re、¹⁵³Sm、²¹²Bi、³²P、¹⁷⁵Lu、¹⁷⁶Luなどの放射性同位体を結合することも可能である。放射性同位体は、腫瘍の治療や診断のために有効なものが望ましい。

[0076] 本発明の抗体は、CAPRIN-1と免疫学的反応性を有する抗体、CAPRIN_1を特異的に認識する抗体、又は、CAPRIN_1と特異的に結合する抗体であって、癌に対する細胞障害活性、又は腫瘍増殖抑制作用、を示す抗体である。該抗体は、それを投与する対象動物において拒絶反応がほとんど又はまったく回避されるような構造をもつ抗体であるべきである。そのような抗体としては、例えば、対象動物がヒトである場合、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体 (例えば、ヒト—マウスキメラ抗体)、単鎖抗体、二重特異性抗体などが挙げられる。これらの抗体は、(1) 重鎖及び軽鎖の可

変領域がヒト抗体由来のものであるか、(2) 重鎖及び軽鎖の可変領域がヒト以外の動物抗体由来の相補性決定領域 (CDR 1、CDR 2 及び CDR 3) とヒト抗体由来のフレームワーク領域からなるものであるか、又は、(3) 重鎖及び軽鎖の可変領域がヒト以外の動物抗体由来のものであり、かつ重鎖及び軽鎖の定常領域がヒト抗体由来のものである組換え抗体である。好ましい抗体は、(1) 又は (2) の抗体である。

[0077] これらの組換え抗体は、次のようにして作製することができる。ハイブリドーマなどの抗体産生細胞からヒトCAPRIN-1に対するモノクローナル抗体 (例えば、ヒトモノクローナル抗体、マウスモノクローナル抗体、ラットモノクローナル抗体、ウサギモノクローナル抗体、ニワトリモノクローナル抗体など) をコードするDNAをクローニングし、これを錶型にして該抗体の軽鎖可変領域及び重鎖可変領域をコードするDNAをRT-PCR法などにより作製し、Kabat EU numbering system (Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, Md. (1991)) に基づいて軽鎖及び重鎖の各可変領域の配列又は各CDR 1、CDR 2、CDR 3の配列を決定する。

[0078] さらに、これらの各可変領域をコードするDNA又は各CDRをコードするDNAを、遺伝子組換え技術 (Sambrook *et al.*, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)) 又はDNA合成機を用いて作製する。ここで、上記ヒトモノクローナル抗体産生ハイブリドーマは、ヒト抗体産生動物 (例えば、マウス) にヒトCAPRIN-1を免疫したのち、該免疫動物から切除した脾細胞とミエロマ細胞とを融合させることによって作製することができる。これとは別に、必要に応じて、遺伝子組換え技術又はDNA合成機を用いてヒト抗体由

来の軽鎖又は重鎖の可変領域及び定常領域をコードするDNAを作製する。

[0079] 作製された組換えDNAを、1つ又は複数の適当なベクターに組み込み、これを宿主細胞（例えば、哺乳動物細胞、酵母細胞、昆虫細胞など）に導入し、（共）発現させることによって組換え抗体を作製することができる（P. J. Delves., ANTIBODY PRODUCTION ESSENTIAL TECHNIQUES., 1997 WILEY, P. Shepherd and C. Dean., Monoclonal Antibodies., 2000 OXFORD UNIVERSITY PRESS ; J. W. Goding., Monoclonal Antibodies: principles and practice., 1993 ACADEMIC PRESS）。

[0080] 上記の方法によって作製される本発明の抗体は、例えば、後述の実施例で取得された以下の（a）の抗体が挙げられる。

[0081] （a）配列番号5、6及び7に示すアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と配列番号9、10及び11に示すアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む抗体（例えば、配列番号8に示すアミノ酸配列からなる重鎖可変領域及び配列番号12に示すアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域で構成される抗体）。

[0082] ここで、配列番号5、6及び7に示すアミノ酸配列は、マウス抗体重鎖可変領域のCDR1、CDR2及びCDR3であり、また、配列番号9、10及び11に示すアミノ酸配列はそれぞれ、マウス抗体軽鎖可変領域のCDR1、CDR2及びCDR3である。

[0083] また、本発明のヒト化抗体、キメラ抗体、単鎖抗体又は多重特異性抗体は、例えば、以下の（i）（ii）又は（iii）の抗体である。

[0084] （i）重鎖の可変領域が配列番号5、6及び7に示すアミノ酸配列及びヒト抗体由来のフレームワーク領域のアミノ酸配列を含み、かつ、軽鎖の可変領域が配列番号9、10及び11に示すアミノ酸配列及びヒト抗体由来のフレームワーク領域のアミノ酸配列を含む抗体。

[0085] （ii）重鎖の可変領域が配列番号5、6及び7に示すアミノ酸配列及び

ヒト抗体由来のフレームワーク領域のアミノ酸配列を含み、かつ、重鎖の定常領域がヒト抗体由来のアミノ酸配列を含み、並びに、軽鎖の可変領域が配列番号 9、10 及び 11 に示すアミノ酸配列及びヒト抗体由来のフレームワーク領域のアミノ酸配列を含み、かつ、軽鎖の定常領域がヒト抗体由来のアミノ酸配列を含んでなる抗体。

[0086] (iii) 重鎖の可変領域が配列番号 8 に示すアミノ酸配列を含み、かつ、重鎖の定常領域がヒト抗体由来のアミノ酸配列を含み、並びに、軽鎖の可変領域が配列番号 12 に示すアミノ酸配列を含み、かつ、軽鎖の定常領域がヒト抗体由来に示すアミノ酸配列を含んでなる抗体。

[0087] なお、ヒト抗体重鎖及び軽鎖の定常領域及び可変領域の配列は、例えば、NCBI (米国 : GenBank、UniGene など) から入手可能であり、例えば、ヒトIgG1重鎖定常領域については、登録番号J00228、ヒトIgG2重鎖定常領域については、登録番号J00230、ヒトIgG3重鎖定常領域については、登録番号X03604、ヒトIgG4重鎖定常領域については、登録番号K01316、ヒト軽鎖κ定常領域については、登録番号V00557、X64135、X64133など、ヒト軽鎖δ定常領域については、登録番号X64132、X64134などの配列を参照することができる。

[0088] 上記抗体は、好ましくは、細胞障害活性を有しており、これによつて抗腫瘍効果を発揮することができる。

[0089] また、上記抗体における重鎖及び軽鎖の可変領域やCDRの特定の配列は、単に例示を目的としたものであり、特定の配列に限定されないことは明らかである。ヒトCAPRIN_1に対する別のヒト抗体又はヒト以外の動物抗体 (例えば、マウス抗体) を産生しうるハイブリドーマを作製し、ハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体を回収し、ヒトCAPRIN-1との免疫学的結合性及び細胞障害活性を指標として目的の抗体であるか否かを判定する。それによつて目的のモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを識別したのち、上記のとおり、該ハイブリドーマから目的の抗体の重鎖及び軽

鎖の可変領域をコードするDNAを作製し配列決定し、該DNAを別の抗体の作製のために利用する。

[0090] さらに上記抗体は、CAPRIN-1を特異的に認識するという特異性を有する限り、上記(a)の各抗体の特にフレームワーク領域の配列及び/又は定常領域の配列において、1もしくは数個のアミノ酸の置換、欠失又は付加があってもよい。ここで数個とは、好ましくは2~5個、より好ましくは2個又は3個を意味する。

[0091] 本発明はさらに、本発明の上記抗体をコードするDNA、上記抗体の重鎖又は軽鎖をコードするDNA、あるいは、上記抗体の重鎖又は軽鎖の可変領域をコードするDNAも提供する。そのようなDNAは、例えば、抗体(a)の場合、配列番号5、6及び7に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む重鎖可変領域をコードするDNA、配列番号9、10及び11に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む軽鎖可変領域をコードするDNAなどを含む。

[0092] これらの配列のDNAによってコードされる相補性決定領域(CDR)は、抗体の特異性を決定する領域であるため、抗体のそれ以外の領域(すなわち、定常領域及びフレームワーク領域)をコードする配列は、他の抗体由来の配列であってもよい。ここで他の抗体とは、ヒト以外の生物由来の抗体も含むが、副作用低減の観点からはヒト由来のものが好ましい。すなわち、上記のDNAでは、重鎖及び軽鎖の各フレームワーク領域及び各定常領域をコードする領域がヒト抗体由来の対応アミノ酸配列をコードする塩基配列を含むことが好ましい。

[0093] さらに、本発明の抗体をコードするDNAの別の例は、例えば、配列番号8に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む重鎖可変領域をコードするDNA、軽鎖可変領域をコードする領域が配列番号12に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むDNAなどである。ここで、配列番号8に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列の例は、配列番号13に示す塩基配列である。また、配列番号12に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列の例

は、配列番号 14 に示す塩基配列である。これらの DNA でも、重鎖及び軽鎖の各定常領域をコードする領域がヒト抗体由来の対応アミノ酸配列をコードする塩基配列を含むことが好ましい。

[0094] これら抗体の DNA は、例えば、上記の方法又は以下の方法で得ることができる。まず、本発明の抗体に関わるハイブリドーマから、市販の RNA 抽出キットを用いて全 RNA を調製し、ランダムプライマーなどを用いて逆転写酵素により cDNA を合成する。次いで既知のマウス抗体重鎖遺伝子及び軽鎖遺伝子の各可変領域において、それぞれ保存されている配列のオリゴヌクレオチドをプライマーに用いた PCR 法によって、抗体をコードする cDNA を増幅させる。定常領域をコードする配列については、既知の配列を PCR 法で増幅することによって得ることができる。DNA の塩基配列は、配列決定用プラスミド又はファージに組み込むなどして、常法により決定することができる。

[0095] 本発明で用いられる抗 CAPRIN-1 抗体による CAPRIN_1 発現癌細胞に対する抗腫瘍効果は、CAPRIN_1 発現細胞のエフェクター細胞抗体依存的細胞障害性 (ADCC)、及び CAPRIN_1 発現細胞の補体依存的細胞障害性 (CDC) により起こると考えられる。

[0096] また、上記機序による抗腫瘍効果は、癌細胞の細胞表面に発現する抗体が結合する標的分子の数に相関することが知られている (Niwa R., *Clinical Cancer Research* 2005 Mar 15; 11 (6) :2327—2336)。癌細胞の細胞表面に発現する標的分子の数は、細胞表面の分子数を測定できる既存の測定キットを用いて調べることが可能である。すなわち、抗体が結合する標的分子の数は、標的分子に対する抗体などを一次抗体として癌細胞に反応させ、予め分子数が知られた検量線ビーズと共に、蛍光標識された抗一次抗体を反応させ、サンプルの平均蛍光強度を測定し、検量線を得て標的分子の数を知ることができる。

[0097] したがって、本発明で用いられる抗 CAPRIN-1 抗体の活性評価は、以下実施例に具体的に示されるように、生体外で CAPRIN-1 を発現す

る癌細胞に対して上記ADCC活性又はCDC活性を測定すること、あるいは本発明にある抗CAPRIN-1抗体を一次抗体として用いた場合の癌細胞の細胞表面に発現するCAPRIN-1分子の数を調べることで評価することができる。

[0098] 本発明で用いられる抗CAPRIN-1抗体は、癌細胞上のCAPRIN-1タンパク質と結合し、上記活性によって、抗腫瘍作用を示すことから、癌の治療又は予防に有用であると考えられる。すなわち本発明は、抗CAPRIN-1抗体を有効成分とする、癌の治療及び/又は予防のための医薬組成物を提供する。抗CAPRIN-1抗体を人体に投与する目的（抗体治療）で使用する場合には、免疫原性を低下させるため、ヒト抗体やヒト化抗体にすることが好ましい。

[0099] なお、抗CAPRIN-1抗体と癌細胞表面上のCAPRIN-1タンパク質との結合親和性が高い程、抗CAPRIN-1抗体による、より強い抗腫瘍活性が得られる。したがって、CAPRIN-1タンパク質と高い結合親和性を有する抗CAPRIN-1抗体を獲得できれば、より強い抗腫瘍効果が期待でき、癌の治療及び/又は予防を目的とした医薬組成物として適応することが可能になる。高い結合親和性として、前述したように、結合定数（親和定数） K_a (k_{on}/k_{off}) が、好ましくは、少なくとも $10^7 M^{-1}$ 、少なくとも $10^8 M^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^8 M^{-1}$ 、少なくとも $10^9 M^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^9 M^{-1}$ 、少なくとも $10^{10} M^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^{10} M^{-1}$ 、少なくとも $10^{11} M^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^{11} M^{-1}$ 、少なくとも $10^{12} M^{-1}$ 、又は、少なくとも $10^{13} M^{-1}$ であることが望ましい。

[0100] また、抗CAPRIN-1抗体と結合する癌細胞表面上のCAPRIN-1分子の数が多し程、抗CAPRIN-1抗体による、より強い抗腫瘍活性が得られる。抗腫瘍効果を期待するためには、CAPRIN-1分子の数は、本発明にある抗CAPRIN-1抗体を測定に用いた場合に、該抗体が結合する癌細胞1個当たりのCAPRIN-1分子の数が 10^4 個以上、好ましくは 10^5 個以上が望ましい。

[01 01] < 抗原発現細胞への結合 >

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

[01 02] < 免疫組織化学染色 >

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

[01 03] 免疫組織化学染色のため、CAPRIN-1に対して反応性のある抗体を、様々な方法で染色させることができる。例えば、ホースラディッシュペルオキシダーゼ複合ヤギ抗マウス抗体、ヤギ抗ニワトリ抗体を反応させることにより、可視化することができる。

[01 04] < 医薬組成物 >

本発明の癌の治療及び/又は予防のための医薬組成物の標的は、CAPRIN-1遺伝子を発現する癌(細胞)であれば特に限定されない。

[01 05] 本明細書で使用される「腫瘍」及び「癌」という用語は、悪性新生物を意味し、互換的に使用される。

[01 06] 本発明において対象となる癌としては、CAPRIN-1タンパク質をコードする遺伝子を発現している癌であり、好ましくは、乳癌、腎癌、膵臓癌、大腸癌、肺癌、脳腫瘍、胃癌、子宮頸癌、卵巣癌、前立腺癌、膀胱癌、食道癌、白血病、リンパ腫、線維肉腫、肥満細胞腫又はメラノーマである。

[01 07] これらの特定の癌には、例えば、乳癌、複合型乳癌、乳癌悪性混合腫瘍、乳管内乳頭状腺癌、肺腺癌、扁平上皮癌、小細胞癌、大細胞癌、神経上皮組織性腫瘍である神経膠腫、脳室上衣腫、神経細胞性腫瘍、胎児型の神経外胚葉性腫瘍、神経鞘腫、神経線維腫、髄膜腫、慢性型¹⁾リンパ球性白血病、

リンパ腫、消化管型リンパ腫、消化器型リンパ腫、小一中細胞型リンパ腫、盲腸癌、上行結腸癌、下行結腸癌、横行結腸癌、S状結腸癌、直腸癌、卵巣上皮癌、胚細胞腫瘍、間質細胞腫瘍、膵管癌、浸潤性膵管癌、膵臓癌の腺癌、腺房細胞癌、腺扁平上皮癌、巨細胞腫、膵管内乳頭粘液性腫瘍、粘液性嚢胞腺癌、膵芽腫、漿液性嚢胞腺癌、固体乳頭状癌、ガストリノーマ、グルカゴノーマ、インスリノーマ、多発性内分泌腺腫症1（W e r m e r症候群）、非機能性島細胞腫、ソマトスタチノーマ、VIP産生腫瘍が含まれるが、これらに限定されない。

[01 08] また、対象となる好ましい被験者は、哺乳動物であり、例えば、霊長類、ペット動物、家畜類、競技用動物などを含む哺乳動物であり、特にヒト、イヌ及びネコが好ましい。

[01 09] 本発明で用いられる抗体を医薬組成物として用いる場合には、当業者に公知の方法で製剤化することが可能である。例えば、水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、又は懸濁液剤の注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、薬理学上許容される担体もしくは媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、結合剤などと適宜組み合わせ、一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製剤化することが考えられる。これら製剤における有効分量は指示された範囲の適当な用量が得られるようにするものである。

[01 10] 注射のための無菌組成物は注射用蒸留水のようなベヒクルを用いて通常の製剤実施に従って処方することができる。

[01 11] 注射用の水溶液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液、例えば、D-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウムが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール、具体的にはエタノール、ポリアルコール、例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、非イオン性界面活性剤、例えば、ポリソルベート80（TM）、HCO-60と併用してもよい。

- [01 12] 油性液としては、ゴマ油、大豆油があげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールと併用してもよい。また、緩衝剤、例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液、無痛化剤、例えば、塩酸プロカイン、安定剤、例えば、ベンジルアルコール、フェノール、酸化防止剤と配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填させる。
- [01 13] 投与は、経口又は非経口であり、好ましくは非経口投与であり、具体的には、注射剤型、経鼻投与剤型、経肺投与剤型、経皮投与型などが挙げられる。注射剤型の例としては、例えば、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射などにより全身又は局部的に投与することができる。
- [01 14] また、患者の年齢、体重、性別、症状などにより適宜投与方法を選択することができる。抗体又は抗体をコードするポリヌクレオチドを含有する医薬組成物の投与量としては、例えば、一回につき体重 1 k g あたり 0 . 0 0 0 1 m g から 1 0 0 0 m g の範囲で選ぶことが可能である。又は、例えば、患者あたり 0 . 0 0 1 ~ 1 0 0 0 0 0 m g / b o d y の範囲で投与量を選ぶことができるが、これらの数値に必ずしも制限されるものではない。投与量、投与方法は、患者の体重、年齢、性別、症状などにより変動するが、当業者であれば適宜選択することが可能である。
- [01 15] 本発明の抗体又はそのフラグメントを含む上記の医薬組成物を被験者に投与することによって癌、好ましくは、乳癌、腎癌、膵臓癌、大腸癌、肺癌、脳腫瘍、胃癌、子宮頸癌、卵巣癌、前立腺癌、膀胱癌、食道癌、白血病、リンパ腫、線維肉腫、肥満細胞腫又はメラノーマを治療及び/又は予防することができる。
- [01 16] さらに、本発明の医薬組成物を、上で例示したような抗腫瘍剤又は抗腫瘍剤を含む医薬組成物と組み合わせて、被験者に併用投与することを含む、癌の治療及び/又は予防方法も本発明に包含される。本発明の抗体又はそのフラグメントと抗腫瘍剤は、同時に、又は、別々に被験者に投与されうる。別々に投与する場合には、いずれの医薬組成物が先であっても又は後であってもよく、それらの投与間隔、投与量、投与経路及び投与回数は、専門医によ

つて適宜選択されうる。同時に投与する別の医薬剤型には、例えば、本発明の抗体又はそのフラグメントと抗腫瘍剤を、薬理学上許容される担体（又は媒体）中で混合し製剤化して得られる医薬組成物も包含されるものとする。また、抗腫瘍剤を含有する上記医薬組成物及び剤型のいずれに対しても、本発明の抗体を含有する医薬組成物及び剤型についての処方、製剤化、投与経路、用量、癌などの説明を適用しうる。

[01 17] したがって、本発明は、本発明の医薬組成物と、上で例示したような抗腫瘍剤を含む医薬組成物とを含む、癌の治療及び/又は予防のための組み合わせ医薬品も提供する。また、本発明は、本発明の抗体又はそのフラグメントと抗腫瘍剤とを、薬理学上許容される担体とともに含む、癌の治療及び/又は予防のための医薬組成物も提供する。

[01 18] < ポリペプチド及びDNA >

本発明は更に、上記抗体（a）に関わる以下のポリペプチド及びDNAも提供する。

[01 19] （i）配列番号8及び配列番号12に示すアミノ酸配列を含むポリペプチド、並びに該ポリペプチドをコードするDNA、例えば、配列番号13及び配列番号14に示す塩基配列を含むDNA。

[01 20] （ii）配列番号5、6及び7に示すアミノ酸配列からなる群から選択される、重鎖CDRポリペプチド、及び該ポリペプチドをコードするDNA。

[01 21] （iii）配列番号9、10及び11に示すアミノ酸配列から選択される、軽鎖CDRポリペプチド、及び該ポリペプチドをコードするDNA。

[01 22] これらのポリペプチド及びDNAは、上記のとおり、遺伝子組換え技術を用いて作製することができる。

[01 23] < 本発明の要約 >

上で説明した本発明を以下に要約する。

[01 24] （1）配列番号5、6及び7の相補性決定領域を含む重鎖可変領域と配列番号9、10及び11の相補性決定領域を含む軽鎖可変領域とを含み、かつ、CAPRIN-1タンパク質と免疫学的反応性を有する抗体又はそのフラ

グメント。

- [01 25] (2) ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、単鎖抗体又は二重特異性抗体である、(1)に記載の抗体又はそのフラグメント。
- [01 26] (3) 抗腫瘍剤とコンジュゲートした、(1)又は(2)に記載の抗体又はそのフラグメント。
- [01 27] (4) 配列番号5、6及び7の相補性決定領域を含む重鎖可変領域と配列番号9、10及び11の相補性決定領域を含む軽鎖可変領域とを含み、かつ、CAPRIN-1タンパク質と免疫学的反応性を有する抗体又はそのフラグメントを有効成分として含むことを特徴とする、癌の治療及び/又は予防のための医薬組成物。
- [01 28] (5) 前記癌が乳癌、腎癌、膵臓癌、大腸癌、肺癌、脳腫瘍、胃癌、子宮頸癌、卵巣癌、前立腺癌、膀胱癌、食道癌、白血病、リンパ腫、線維肉腫、肥満細胞腫又はメラノーマである、(4)に記載の医薬組成物。
- [01 29] (6) (4)又は(5)のいずれかに記載の医薬組成物と、抗腫瘍剤を含む医薬組成物とを含んでなる、癌の治療及び/又は予防のための組み合わせ医薬品。
- [01 30] (7) (1)又は(2)に記載の抗体又はそのフラグメントをコードするDNA。
- [01 31] (8) (1)~(3)のいずれかに記載の抗体又はそのフラグメント、(4)又は(5)に記載の医薬組成物、あるいは(6)に記載の組み合わせ医薬品を、被験者に投与することを含む、癌の治療及び/又は予防方法。

実施例

- [01 32] 以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらの具体例によって制限されないものとする。

- [01 33] < 実施例 1 各組織でのCAPRIN-1遺伝子の発現解析 >

CAPRIN-1遺伝子のイヌ及びヒトの正常組織及び各種細胞株における発現をW02010/016526の実施例1(4)に従ってRT-PCR法により調べた。その結果、健常なイヌ組織では精巢に強い発現が見られ

、一方イヌ乳癌及び腺癌組織で発現が見られた。さらに、ヒト組織での発現を併せて確認したところ、イヌCAPRIN-1遺伝子と同様、正常組織で発現が確認できたのは精巢のみだったが、癌細胞ではヒト乳癌細胞株7種 (ZR75_1、MCF7、T47D、SK_BR_3、MDA-MB-157、BT_20、MDA-MB-231V、MRK-nu-1) 及び膵臓癌細胞株4種 (Capan_2、MIA PaCa_2、Panc_1、BxPc-3) など、多種類の癌細胞株で発現が検出された。この結果から、CAPRIN-1は精巢以外の正常組織では発現が見られず、一方、各種癌細胞株に発現していることが確認された。

[0134] < 実施例2 CAPRIN-1に対するマウスモノクローナル抗体の作製 >
WO2010/016526の実施例3で調製した配列番号2のアミノ酸配列を有するヒトCAPRIN-1タンパク質100 μ gを等量のMPL+TDMアジュバント (シグマ社製) と混合し、これをマウス1匹当たりの抗原溶液とした。抗原溶液を6週齢のBa1b/c cマウス (日本SLC社製) の腹腔内に投与後、1週間毎に7回投与を行い免疫を完了した。最後の免疫から3日後に摘出したそれぞれの脾臓を滅菌した2枚のスライドガラスに挟んで擦り潰し、PBS (-) (白水社製) を用いて洗浄し1500rpmで10分間遠心して上清を除去する操作を3回繰り返して脾臓細胞を得た。得られた脾臓細胞とマウスミエローマ細胞SP2/0 (ATCCから購入) とを10:1の比率にて混和し、そこに37 $^{\circ}$ Cに加温した10% FBSを含むRPMI1640培地200 μ LとPEG1500 (ペーリンガー社製) 800 μ Lを混和して調製したPEG溶液を加えて5分間静置して細胞融合を行った。1700rpmで5分間遠心し、上清を除去後、Gibco社製のHAT溶液を2%当量加えた15% FBSを含むRPMI1640培地 (HAT選択培地) 150mLで細胞を懸濁し、96穴プレート (ヌンク社製) の1ウエル当たり100 μ Lずつ、プレート15枚に播種した。7日間、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂の条件で培養することで、脾臓細胞とミエローマ細胞が融合したハイブリドーマを得た。

[01 35] 作製したハイブリドーマが産生する抗体のCAPRIN-1タンパクに対する結合親和性を指標にハイブリドーマを選抜した。WO2010/016526の実施例3で調製したCAPRIN-1タンパク溶液1 μ g/mLを96穴プレート1ウエルあたりに100 μ L添加し、4 $^{\circ}$ Cにて18時間静置した。各ウエルをPBS-Tで3回洗浄後、0.5% Bovine Serum Albumin (BSA) 溶液 (シグマ社製) を1ウエル当たり400 μ L添加して室温にて3時間静置した。溶液を除いて、1ウエル当たり400 μ LのPBS-Tでウエルを3回洗浄後、上記で得られたハイブリドーマの各培養上清を1ウエル当たり100 μ L添加し、室温にて2時間静置した。PBS-Tで各ウエルを3回洗浄した後、PBSで5000倍に希釈したHRP標識抗マウスIgG (H+L) 抗体 (Invitrogen社製) を1ウエル当たり100 μ L添加して室温にて1時間静置した。PBS-Tでウエルを3回洗浄した後、TMB基質溶液 (Thermo社製) を1ウエル当たり100 μ L添加して15~30分間静置して発色反応を行った。発色後、1規定硫酸を1ウエル当たり100 μ L添加して反応を停止させ吸光度計を用いて450nmと595nmの吸光度値を測定した。その結果、吸光度値が高かった抗体を産生するハイブリドーマを複数個選抜した。

[01 36] 選抜したハイブリドーマを96穴プレート1ウエルあたりに0.5個となるようにプレートに添加し培養した。1週間後、ウエル中に単一のコロニーを形成しているハイブリドーマが観察された。それらウエルの細胞をさらに培養して、クローニングされたハイブリドーマが産生する抗体のCAPRIN-1タンパクに対する結合親和性を指標にハイブリドーマを選抜した。WO2010/016526の実施例3で調製したCAPRIN-1タンパク溶液1 μ g/mLを96穴プレート1ウエルあたりに100 μ L添加し、4 $^{\circ}$ Cにて18時間静置した。各ウエルをPBS-Tで3回洗浄後、0.5% BSA 溶液を1ウエル当たり400 μ L添加して室温にて3時間静置した。溶液を除いて、1ウエル当たり400 μ Lの?B3_丁でウエルを3回洗浄後、上記で得られたハイブリドーマの各培養上清を1ウエル当たり100 μ

L 添加し、室温にて2時間静置した。PBS-Tで各ウェルを3回洗浄後、PBSで5000倍に希釈したHRP標識抗マウスIgG (H+L) 抗体 (インビトロジェン社製) を1ウェル当たり100 μ L 添加して室温にて1時間静置した。PBS-Tでウェルを3回洗浄した後、TMB基質溶液 (Thermo社製) を1ウェル当たり100 μ L 添加して15~30分間静置して発色反応を行った。発色後、1規定硫酸を1ウェル当たり100 μ L 添加して反応を停止させ吸光度計を用いて450 nmと595 nmの吸光度値を測定した。その結果、CAPRIN-1タンパクに反応性を示すモノクローナル抗体を産生する112個のハイブリドーマ株を得た。

[0137] 次にそれらモノクローナル抗体の内、CAPRIN-1が発現する乳癌細胞の細胞表面に反応性を示すものを選抜した。具体的には、 10^6 個のヒト乳癌細胞株MDA-MB-231Vを1.5 mL容のマイクロ遠心チューブにて遠心分離し、これに上記各ハイブリドーマの培養上清100 μ Lを添加し、氷上で1時間静置した。PBSで洗浄した後、0.1% FBSを含むPBSで500倍希釈したFITC標識ヤギ抗マウスIgG抗体 (インビトロジェン社製) を添加し、氷上で1時間静置した。PBSで洗浄後、ベクトンディッキンソン株式会社のFACSキャリバーにて蛍光強度を測定した。一方、上記と同様の操作を、抗体の代わりに何も処理していない6週齢のBalb/cマウスの血清をハイブリドーマ培養用培地で500倍希釈したものを用いて行い、コントロールとした。その結果、コントロールに比べて蛍光強度が強い、すなわち、乳癌細胞の細胞表面に反応するモノクローナル抗体1個 (#1) を選抜した。

[0138] < 実施例3 選抜したモノクローナル抗体の特徴付け >

実施例2で得られたモノクローナル抗体について、WO2010/016526の実施例5に記載の方法に従って可変領域をコードする遺伝子配列及びそのアミノ酸配列を解析した。その結果、モノクローナル抗体#1は配列番号8に示すアミノ酸配列からなる重鎖可変領域と配列番号12に示すアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域から成るものであった。得られたモノクロー

ナル抗体# 1の重鎖可変領域をコードする遺伝子配列を配列番号13に、及びアミノ酸配列を配列番号8に、軽鎖可変領域をコードする遺伝子配列を配列番号14に及びアミノ酸配列を配列番号12に示す。

[0139] すなわち、モノクローナル抗体# 1は配列番号8に示すアミノ酸配列からなる重鎖可変領域と配列番号12に示すアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域から成り、そのうち、重鎖可変領域中のCDR1~3がそれぞれ配列番号5、配列番号6、配列番号7に示すアミノ酸配列から成り、軽鎖可変領域中のCDR1~3がそれぞれ配列番号9、配列番号10、配列番号11に示すアミノ酸配列から成ることが確認された。

[0140] < 実施例4 ヒト-マウスキメラモノクローナル抗体の作製 >

実施例3で得られた、配列番号13で示す遺伝子配列からなるマウスモノクローナル抗体# 1の重鎖可変領域を含む遺伝子増幅断片の両端を制限酵素処理した後精製し、マウス抗体由来のリーダー配列と配列番号37を含むヒトIgG₁の_{H1}鎖定常領域を既に挿入済みのp c D N A 4 / m y c - H i s (I n v i t r o g e n社製)ベクターへ常法に従って挿入した。また、配列番号14で示す遺伝子配列からなるマウスモノクローナル抗体# 1の軽鎖可変領域を含む遺伝子増幅断片の両端を制限酵素処理した後、精製し、マウス抗体由来のリーダー配列と配列番号38を含むヒトIgG₁の_{L1}鎖定常領域を既に挿入済みのp c D N A 3 . 1 / m y c - H i s (I n v i t r o g e n社製)ベクターへ常法に従って挿入した。

[0141] 次に、配列番号13で示されるマウスモノクローナル抗体# 1の重鎖可変領域が挿入された上記組換えベクターと、配列番号14で示されるマウスモノクローナル抗体# 1の軽鎖可変領域が挿入された上記組換えベクターをCHO-K1細胞(理研セルバンクより入手)に導入した。具体的には、12穴培養プレートの1ウエルあたりに1mLの10% FBSを含むHam's F12培地(I nv i t r o g e n社製)で培養された2 X 10⁵個のCHO-K1細胞を?B3(-)で洗浄したのちに、1ウエルあたり1mLの10% FBSを含むHam's F12培地を新たに加えたウエルに30分間の0p

t i M E M (I n v i t r o g e n 社 製) に 溶 解 し た 上 記 各 ベ ク タ ー 2 5 0 n g と P o l y f e c t t r a n s f e c t i o n r e a g e n t (Q I A G E N 社 製) 3 0 μ L と を 混 合 し た も の を 添 加 し た 。 上 記 組 換 え ベ ク タ ー を 導 入 し た C H 0 - K 1 細 胞 を 、 2 0 0 μ g / m L ゼ オ シ ン (I n v i t r o g e n 社 製) 及 び 2 0 0 μ g / m l ジ エ ネ チ シ ン (口 シ ュ 社 製) を 添 加 し た 1 0 % F B S を 含 む H a m ' s F 1 2 培 地 で 培 養 し た の ち 、 9 6 ウ エ ル プ レ - ト の 1 ウ エ ル 当 た り に 0 . 5 個 と な る よ う に 上 記 組 換 え ベ ク タ ー を 導 入 し た C H 0 - K 1 細 胞 を 播 種 し て 、 マ ウ ス モ ノ ク ロ ー ナ ル 抗 体 # 1 の 可 変 領 域 を 有 す る ヒ ト - マ ウ ス キ メ ラ モ ノ ク ロ ー ナ ル 抗 体 # 1 (# 1) を 安 定 的 に 産 生 す る 細 胞 株 を 作 製 し た 。

[0142] 作製した細胞株を150 cm² フラスコを用いて5 × 10⁵ 個 / mL で血清を含まない0 p t i C H 0 培地 (I n v i t r o g e n 社 製) 3 0 m L を用いて5日間培養し、ヒト-マウスキメラモノクローナル抗体# 1を含む培養上清を得た。

[0143] また、比較抗体として、W O 2 0 1 0 / 0 1 6 5 2 6 に記載されるマウス由来の抗C A P R I N - 1モノクローナル抗体で配列番号15の重鎖可変領域と配列番号16の軽鎖可変領域から成る比較抗体1、配列番号17の重鎖可変領域と配列番号18の軽鎖可変領域から成る比較抗体2、配列番号19の重鎖可変領域と配列番号20の軽鎖可変領域から成る比較抗体3、配列番号21の重鎖可変領域と配列番号22の軽鎖可変領域から成る比較抗体4、配列番号23の重鎖可変領域と配列番号24の軽鎖可変領域から成る比較抗体5、配列番号25の重鎖可変領域と配列番号26の軽鎖可変領域から成る比較抗体6、配列番号27の重鎖可変領域と配列番号28の軽鎖可変領域から成る比較抗体7、配列番号29の重鎖可変領域と配列番号30の軽鎖可変領域から成る比較抗体8、配列番号31の重鎖可変領域と配列番号32の軽鎖可変領域から成る比較抗体9、配列番号33の重鎖可変領域と配列番号34の軽鎖可変領域から成る比較抗体10、配列番号35の重鎖可変領域と配列番号36の軽鎖可変領域から成る比較抗体11についても上記と同様にし

て、ヒト—マウスキメラ比較モノクローナル抗体 1~ 11 安定的に産生する細胞株を作製し、作製した細胞株を 150 cm^2 フラスコを用いて 5×10^5 個/mL で血清を含まない 0 p t i C H O 培地 (I n v i t r o g e n 社製) 30 mL を用いて 5 日間培養し、ヒト—マウスキメラ比較抗体 1~ 11 を含む培養上清を得た。

[0144] < 実施例 5 抗 C A P R I N _ 1 抗体 # 1 を用いた各種癌細胞表面での C A P R I N _ 1 の発現 >

次に C A P R I N _ 1 遺伝子の発現が確認されたヒト乳癌細胞株 (Z R 7 5 _ 1、M C F 7、T 4 7 D、S K _ B R _ 3、M D A - M B - 1 5 7、B T - 2 0、M D A - M B - 2 3 1 V、M R K - n u - 1)、腎癌細胞株 (C a k i _ 1、C a k i _ 2、A 4 9 8、A C H N)、膀胱癌細胞株 (T 2 4)、卵巣癌細胞株 (S K O V 3)、肺癌細胞株 (Q G 5 6、A 5 4 9)、膵臓癌細胞株 (C a p a n _ 2、M I A P a C a _ 2)、前立腺癌細胞株 (P C 3)、子宮頸癌細胞株 (S W 7 5 6)、線維肉腫細胞株 (H T 1 0 8 0)、脳腫瘍細胞株 (T 9 8 G、U 8 7 M G、U 2 5 1、S N B 1 9、U 3 7 3)、胃癌細胞株 (M N K 2 8、M N K 4 5)、大腸癌細胞株 (H T 2 9、L o v o、C a C o 2、S W 4 8 0、H C T 1 1 6)、白血病細胞株 (A M L 5)、リンパ腫細胞株 (R a m o s) について、上記実施例 4 で得られた # 1 を含む培養上清を用いて、各細胞の細胞表面上での C A P R I N _ 1 タンパク質の発現を調べた。各細胞株それぞれ 5×10^5 細胞を 1.5 mL 容のマイクロ遠心チューブにて遠心分離した。抗体 # 1 を含む各細胞培養上清 (100 μ L) を添加し、氷上で 1 時間静置した。P B S で洗浄した後、0.1% F B S を含む P B S で希釈した F I T C 標識ヤギ抗マウス I g G (H + L) 抗体 (J a c k s o n I m m u n o R e s e a r c h 社製) を添加し、4 $^{\circ}$ C で 30 分間静置した。P B S で洗浄後、ベクトンディッキンソン株式会社の F A C S キヤリバーにて蛍光強度を測定した。陰性コントロールには二次抗体のみを反応したものをを用いた。その結果、抗体 # 1 を添加した細胞は、陰性コントロールに比べて蛍光強度が 35% 以上強かった。このことから、

上記ヒト癌細胞株の細胞膜表面上にCAPRIN-1タンパク質が発現していることが確認された。なお、上記蛍光強度の増強率は、各細胞における平均蛍光強度 (MFI値) の増加率にて表され、以下の計算式により算出した。

[0145] 平均蛍光強度の増加率 (蛍光強度の増強率) (%) = ((抗CAPRIN-1抗体を反応させた細胞のMFI値) - (コントロールMFI値)) ÷ (コントロールMFI値) × 100。

[0146] < 実施例6 CAPRIN-1に対する抗体の癌細胞に対する抗腫瘍効果 (ADCC活性) >

上記実施例4で得た、CAPRIN-1に対する抗体のヒト—マウスキメラモノクローナル抗体#1が、CAPRIN-1を発現する癌細胞を障害することができるかどうかを、ADCC活性を測定することによって検討した。#1を産生する細胞培養上清をHitrap ProteinA Sepharose FF (GEヘルスケア社製)を用いて精製し、PBS (-)に置換して0.22 μmのフィルター (ミリポア社製)で濾過したものを活性測定用の抗体として用いた。10⁶個のCAPRIN-1が発現が確認されているヒト乳癌細胞株MCF7、ヒト大腸癌細胞株HCT-116、ヒト膵臓癌細胞株MIA PaCa-2、ヒト腎臓癌細胞株Caki-2、ヒト肺癌細胞株QG56を50 mL容の遠心チューブに集め、100 μCiのクロミウム51を加え37℃で2時間インキュベートした。その後10%の「BSを含むRPMI 1640培地で3回洗浄し、96穴V底プレート1穴あたり2 × 10³個ずつ添加して標的細胞とした。これに、上記精製抗体#1及び上記実施例4で得たヒト—マウスキメラ比較抗体1~11をそれぞれ1 μg添加して、ヒト末梢血リンパ球細胞から定法を用いて分離したヒトNK細胞を含む細胞集団を1穴当たり、2 × 10⁵個添加して37℃、5% CO₂の条件下で4時間培養した。培養後、障害を受けた腫瘍細胞から放出される培養上清中のクロミウム51の量を測定し、抗CAPRIN-1抗体による癌細胞に対する細胞障害活性を算出した。陰性コントロールにはアイソタイプコントロ

ール抗体を添加したものをを用いた。上記NK細胞を含んだ細胞は、定法に従って、ヒト末梢血からヒト末梢血単核球細胞分離用の比重分離液Histopaque（シグマアルドリッチ社）を用いて分離したヒト末梢血単核球細胞をFITC蛍光色素が標識された各種抗体（抗ヒトCD3抗体、抗ヒトCD20抗体、抗ヒトCD19抗体、抗ヒトCD11c抗体、抗HLA-DR抗体（ベクトンアンドディッキンソン社））で反応させ、セルソーター（FACS Vantage SE（ベクトンアンドディッキンソン社））を用いて、上記抗体で染まらない細胞集団を分離したものあるいは、ヒトNK細胞分離キット（ミルテニー社製）を用いて分離したものをを用いた。癌細胞に対する細胞障害活性の評価の結果、アイソタイプコントロール抗体を用いた場合ならびに比較抗体1〜比較抗体11を用いた場合の細胞障害活性は、ヒト乳癌細胞株MCF7、ヒト肺癌細胞株QG56、ヒト大腸癌細胞株HCT-116、ヒト膵臓癌細胞株MIA PaCa_2、ヒト腎臓癌細胞株Caki_2に対してすべて5%未満であったのに対して、抗体#1抗体は、ヒト乳癌細胞株MCF7、ヒト肺癌細胞株QG56、ヒト大腸癌細胞株HCT-116、ヒト膵臓癌細胞株MIA PaCa_2、ヒト腎臓癌細胞株Caki_2に対してそれぞれ21%、11%、21%、27%、23%の細胞障害活性を示した。同様に、他の癌細胞、乳癌細胞株ZR75-1、T47D、Hs578丁、BT_20、SK_BR_3、MDA-MB-231V、MRK_nu_1、ダリオーマ細胞株T98G、U373、肺癌細胞株A549、腎臓癌細胞株Caki_1、ACHN、子宮頸癌細胞株SW756、膀胱癌細胞株T24、胃癌細胞株MKN28、MKN45、大腸癌細胞株SW480、白血病細胞株AML5及びリンパ腫細胞株Ramosについて、アイソタイプコントロール抗体を用いた場合ならびに比較抗体1〜比較抗体11を用いた場合はいずれも4%未満であったのに対し、抗体#1は10%以上の細胞障害活性が認められた。以上の結果より、取得したCAPRIN-1に対するモノクローナル抗体#1は、ADCC活性によってCAPRIN-1を発現する癌細胞を障害することが示され、比較抗体1〜比較抗体11

に比べて抗体# 1は、ヒト癌細胞に対して強い細胞障害活性を示すことが明らかになった。

[0147] なお、細胞障害活性は、上記のように、本発明で用いられるCAPRIN_1に対する抗体、リンパ球（NK細胞を含む集団）細胞及びクロミウム51を取り込ませた 2×10^3 個の各癌細胞株を混合して4時間培養し、培養後培地に放出されたクロミウム51の量を測定して、以下の計算式により算出した癌細胞株に対する細胞障害活性を示した結果である。

[0148] 式：細胞障害活性（%）= CAPRIN_1に対する抗体及びリンパ球（NK細胞を含む集団）細胞を加えた際の標的細胞からのクロミウム51遊離量 ÷ 1N塩酸を加えた標的細胞からのクロミウム51遊離量 × 100。

[0149] <実施例7 マウス生体内における抗CAPRIN_1モノクローナル抗体の抗腫瘍効果>

次に、上記実施例4で得た、ヒト—マウスキメラモノクローナル抗体# 1の担癌マウス生体内における抗腫瘍効果を評価した。使用した抗体は抗体# 1を産生する各細胞の培養上清をカラム精製したものをを用いた。同様にして、上記実施例4で作製した抗CAPRIN_1抗体のヒト—マウスキメラ比較モノクローナル抗体1~11についても担癌マウス生体内における抗腫瘍効果を評価した。

[0150] CAPRIN_1を発現するヒト由来の癌細胞株を移植した担癌マウスを用いて、# 1の抗体の抗腫瘍効果を検討した。65匹のBalb/cヌードマウス（日本SLC社製）の背部皮下に、1匹あたり 2×10^6 個のヒト膝臓癌細胞株Capan_2細胞（ATCCより購入）を移植し、腫瘍が直径5mm程度の大きさになるまで成長させた。前記担癌マウスに# 1の抗体及びヒト—マウスキメラ比較抗体1~11をそれぞれ1匹あたり $200 \mu\text{g}$ （ $200 \mu\text{I}$ ）ずつ、1抗体につき5匹に腹腔内投与した。その後、2日間計3回、同量の各抗体を各担癌マウスの腹腔に投与し、毎日腫瘍の大きさを計測し、抗腫瘍効果を観察した。一方、残り5匹の担癌マウスに対して、抗体の代わりにPBS（-）を投与し、これをコントロール群とした。なお、腫瘍の

大きさは、 $0.5 \times (\text{長径} \times \text{短径} \times \text{短径})$ の計算式を用いて、体積を算出した。

[0151] 抗腫瘍効果の観察の結果、CAPRIN-1に対する抗体#1を投与した検討群は、抗体投与後29日目には、同日のコントロール群の腫瘍の大きさを100%としたときに、65%にまで腫瘍の増殖が抑えられた。一方、ヒト—マウスキメラ比較抗体1~11を投与したマウスは、およそ85%であった。この結果から、取得したCAPRIN-1に対する抗体#1は、CAPRIN-1を発現する癌細胞に対して、生体内で抗腫瘍効果を発揮することが示された。また、比較抗体1~11に比べて、抗体#1は生体内でより強い抗腫瘍効果を発揮することが示された。

[0152] < 実施例8 抗CAPRIN-1抗体#1が認識する各種癌細胞表面でのCAPRIN-1の分子数 >

ヒト乳癌細胞株 (ZR75_1、MCF7、T47D、SK_BR_3、MDA-MB-157、BT_20、MDA-MB-231V、MRK_nu-1)、腎癌細胞株 (Caki-1、Caki-2、A498、ACHN)、膀胱癌細胞株 (T24)、卵巣癌細胞株 (SKOV3)、肺癌細胞株 (QG56、A549)、膵臓癌細胞株 (MIA PaCa_2、Capan-2)、前立腺癌細胞株 (PC3)、子宮頸癌細胞株 (SW756)、線維肉腫細胞株 (HT1080)、脳腫瘍細胞株 (T98G、U87MG、U251、SNB19、U373)、胃癌細胞株 (MNK28、MNK45)、大腸癌細胞株 (HT29、Lovo、CaCo2、SW480、HCT116)、白血病細胞株 (AML5)、リンパ腫細胞株 (Ramos) について、抗CAPRIN-1抗体#1が認識する各種癌細胞表面でのCAPRIN-1分子の数を分子数測定キットQIFIKIT (DAKO社製) を用いて調べた。同様にして、上記実施例4で作製した抗CAPRIN-1モノクローナル抗体である比較抗体1~比較抗体11についても各種癌細胞表面でのCAPRIN-1分子の数を調べた。

[0153] 添付プロトコールに従い、各細胞株に抗体#1及び比較抗体1~比較抗体

11を最終濃度が $5\mu\text{g}/\text{mL}$ となるようにPBSで希釈し、各細胞株に添加して30分反応させた。PBSで洗浄した後、キットに添付の検量ビーズとともに各細胞株へキットに添付の蛍光標識された二次抗体抗マウスIgG抗体を添加して氷上で45分間静置した。各細胞株及び検量ビーズをPBSで洗浄後、ベクトンディツキンソン株式会社のFACSキャリバーにて蛍光強度を測定して平均蛍光強度値 (mean) を得た。また、比較抗体についても同様の測定を行い、meanを得た。陰性コントロールにはアイソタイプコントロール抗体を反応させたものを用い、meanを得た。各平均蛍光強度値 (mean) を用いてキットに添付の方法に従い分子数を算出した。その結果、抗体#1が認識する各種癌細胞表面でのCAPRIN-1の分子数は、調べたすべてのヒト癌細胞において、細胞1個当たり 10^5 個以上であった。一方比較モノクローナル抗体1~11については細胞1個当たり 10^5 個より少なかった。

産業上の利用可能性

[01 54] 本発明の抗体は、癌の治療及び/又は予防のため有用である。

[01 55] 本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

請求の範囲

- [請求項1] 配列番号5、6及び7の相補性決定領域を含む重鎖可変領域と配列番号9、10及び11の相補性決定領域を含む軽鎖可変領域とを含み、かつ、CAPRIN_1タンパク質と免疫学的反応性を有する抗体又はそのフラグメント。
- [請求項2] ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、単鎖抗体又は多重特異性抗体である、請求項1に記載の抗体又はそのフラグメント。
- [請求項3] 抗腫瘍剤がコンジュゲートされた、請求項1又は2に記載の抗体又はそのフラグメント。
- [請求項4] 請求項1～3のいずれか1項に記載の抗体又はそのフラグメントを有効成分として含むことを特徴とする、癌の治療及び/又は予防のための医薬組成物。
- [請求項5] 前記癌が乳癌、腎癌、膵臓癌、大腸癌、肺癌、脳腫瘍、胃癌、子宮頸癌、卵巣癌、前立腺癌、膀胱癌、食道癌、白血病、リンパ腫、線維肉腫、肥満細胞腫又はメラノーマである、請求項4に記載の医薬組成物。
- [請求項6] 請求項4又は5に記載の医薬組成物と、抗腫瘍剤を含む医薬組成物とを含んでなる、癌の治療及び/又は予防のための組み合わせ医薬品。
- [請求項7] 請求項1又は2に記載の抗体又はそのフラグメントをコードするDNA。
- [請求項8] 請求項1～3のいずれか1項に記載の抗体又はそのフラグメント、請求項4又は5に記載の医薬組成物、あるいは請求項6に記載の組み合わせ医薬品を、被験者に投与することを含む、癌の治療及び/又は予防方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT / JP2 0 1 2 / 0 6 9 8 5 3

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C 1 2 N1 5/09 (2 0 0 6 . 0 1) i , A 6 1 K 39/395 (2 0 0 6 . 0 1) i , A 6 1 P 35/0 0 (2 0 0 6 . 0 1) i , A 6 1 P 35/02 (2 0 0 6 . 0 1) i , C 0 7 K1 6/30 (2 0 0 6 . 0 1) i , C 1 2 P21 / 0 8 (2 0 0 6 . 0 1) n

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)

C 1 2 N1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0 , C 0 7 K1 6 / 0 0 - 1 6 / 4 6

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

Jitsuyo	Shinan	Koho	1922-1	996	Jitsuyo	Shinan	Toroku	Koho	1996-2012
Kokai	Jitsuyo	Shinan	Koho	1971-2012	Toroku	Jitsuyo	Shinan	Koho	1994-2012

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

CAplu s / REGI STRY /EMBASE / BI OS I S (STN) , J STPlu s / JMEDPlus / JST 7 5 8 0 (JDreaml I) , PubMed, WPI

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2010/016525 AI (Toray Industries, Inc.), 11 February 2010 (11.02.2010), & EP 2324842 AI & US 2011/0123492 AI & CN 102112146 A & KR 2011-0044854 A	1-7
A	WO 2010/016526 AI (Toray Industries, Inc.), 11 February 2010 (11.02.2010), & EP 2322221 AI & US 2011/0256144 AI & CN 102170907 A & KR 2011-0039475 A	1-7
A	WO 2010/016527 AI (Toray Industries, Inc.), 11 February 2010 (11.02.2010), & EP 2325648 AI & US 2011/0136121 AI & CN 102171570 A & KR 2011-0052665 A	1-7

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

"I" 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 August, 2012 (21.08.12)

Date of mailing of the international search report
04 September, 2012 (04.09.12)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT / JP2 012 / 069853

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GRILL B. et al. Activation/ Division of Lymphocytes Results in Increased Levels of Cytoplasmic Activation/ Proliferation- Associated Protein-1: Prototype of a New Family of Proteins. J. Immunol., 2004, Vol. 172, p. 2389-2400	1-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT / JP2 012 / 069853

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.: 8
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 8 pertains to a method for treatment of the human body by the rapy and thus relates to a subject matter on which it is not required to carry out an international search under the provision of PCT Rule 39.1 (iv).
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 additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the 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.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N15/09 (2006. 01) i , A61K39/395 (2006. 01) i , A61P35/00 (2006. 01) i , A61P35/02 (2006. 01) i , C07K16/30 (2006. 01) i , C12P21/08 (2006. 01) n

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N15/00- 15/90 , C07K16/00- 16/46

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	1922-	年
日本国公開実用新案公報	1971-2	年
日本国実用新案登録公報	1996-	年
日本国登録実用新案公報	1994-2	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)

CAplus/REGISTRY/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDream1), PubMed, WPI

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 請求項の番号
A	Wo 2010/016525 AI (東レ株式会社) 2010. 02. 11 & EP 2324842 A1 & US 2011/0123492 AI & CN 102112146 A & KR 2011-0044854 A	1-7
A	wo 2010/016526 AI (東レ株式会社) 2010. 02. 11 & EP 2322221 AI & US 2011/0256144 AI & CN 102170907 A & KR 2011-0039475 A	1-7

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

- IA 「特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの
- IE 「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
- I 「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)
- Iθ 「口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- IP 「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

- 「」 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
- 「」 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
- IY 「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
- I& 「同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 21. 08. 2012	国際調査報告の発送日 04. 09. 2012
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA / JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 三原 健治 電話番号 03-3581-1101 内線 3448

4B 2937

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 請求項の番号
A	wo 2010/016527 AI (東レ株式会社) 2010. 02. 11 & EP 2325648 A1 & US 2011/0136121 AI & CN 102171570 A & KR 2011-0052665 A	1-7
A	GRILL B. et al. Activation/Division of Lymphocytes Results in Increased Levels of Cytoplasmic Activation/Proliferation-Associated Protein-1 : Prototype of a New Family of Proteins. J. Immunol. ,2004 ,Vol. 172 ,p. 2389-2400	1-7

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

法第8条第3項 (PCT 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. 請求項 _____ 8 _____ 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、請求項 8 は治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT規則 39.1(iv) の規定により、国際調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. 請求項 _____ 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. 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則 6.4(a) の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところ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項について作成した。
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項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

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