(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

(43) 国際公開日
2015 年 12 月 30 日(30.12.2015)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2015/198797 A1

(51) 国際特許分類:
A61K 39/00 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *A61P 43/00* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2015/065749

(22) 国際出願日: 2015 年 6 月 1 日(01.06.2015)

(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 2014-130925 2014 年 6 月 26 日(26.06.2014) JP

(71) 出願人: 国立大学法人 岡山大学 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION OKAYAMA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒7008530 岡山県岡山市北区津島中一丁目１番１号 Okayama (JP).

(72) 発明者: 三宅 康広 (MIYAKE, Yasuhiro); 〒7008530 岡山県岡山市北区津島中一丁目１番１号 国立大学法人岡山大学内 Okayama (JP).

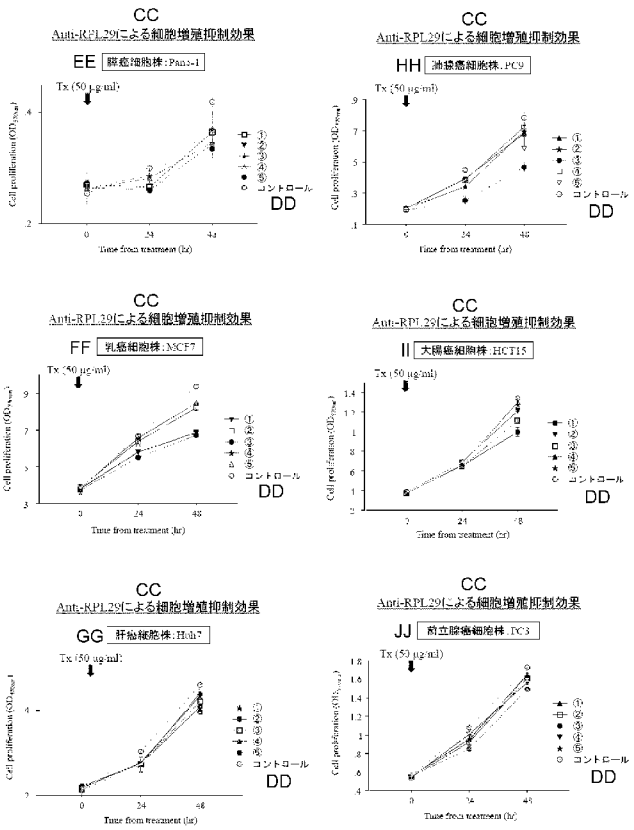
(74) 代理人: 庄司 隆, 外 (SHOJI, Takashi et al.); 〒5320011 大阪府大阪市淀川区西中島五丁目６番１３号 御幸ビル３０７号 Osaka (JP).

(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,

[続葉有]

(54) **Title**: NEW MOLECULARLY TARGETED DRUG FOR TREATING MALIGNANT TUMORS

(54) 発明の名称 : 悪性腫瘍治療の新規分子標的薬



CC Antiproliferative effect of anti-RPL29 antibody
DD control
EE Pancreatic cancer cell line Panc-1
FF Breast cancer cell line MCF-7
GG Liver cancer cell line Huh-7
HH Lung adenocarcinoma cell line PC-9
II Colon cancer cell line HCT-15
JJ Prostate cancer cell line PC-3

(57) **Abstract**: The present invention addresses the problem of providing a new molecularly targeted drug that targets RPL29, a ribosomal protein that has enhanced expression in malignant tumor cells. With regard to a molecularly targeted drug that targets RPL29, the present invention addresses the problem of providing an antitumor drug that has a higher efficacy on RPL29. Provided is a molecularly targeted drug comprising an antibody or peptide vaccine for RPL29, said molecularly targeted drug characterized in that the drug targets a segment of 5 or more amino acid residues within the amino acid sequence that constitutes the RPL29 protein, that is, a segment contained either in SEQ ID NO. 1 of the sequence listing or in an amino acid sequence contained in SEQ ID NO. 1 that has 1 or more amino acid residue deletions, substitutions, insertions, or additions.

(57) 要約:

[続葉有]

WO 2015/198797 A1

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, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, 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.

(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, ST, 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, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

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)）

悪性腫瘍細胞において発現の亢進しているリボソームタンパク質である RPL29 を標的とする新規分子標的薬を提供することを課題とする。RPL29 を標的とする分子標的薬に関し、RPL29 に対してより効果的に作用する抗腫瘍剤を提供することを課題とする。RPL29 に対する抗体又はペプチドワクチンからなる分子標的薬であって、RPL29 タンパク質を構成するアミノ酸配列のうち、配列表の配列番号１に示すアミノ酸配列、又は配列番号１に示すアミノ酸配列のうち１若しくは複数個のアミノ酸残基が欠失、置換、導入若しくは付加されたアミノ酸配列から選択され、少なくとも５個のアミノ酸残基を含む部分を標的とすることを特徴とする分子標的薬による。

明　細　書

発明の名称 ： 悪性腫瘍治療の新規分子標的薬

技術分野

[0001] 本発明は、悪性腫瘍細胞において発現の亢進しているリボソームタンパク質であるRPL29を標的とする新規分子標的薬に関する。

背景技術

[0002] 現在の悪性腫瘍に対する分子標的薬としては、肝癌や腎癌に使用されるソラフェニブ（Sorafenib）、大腸癌に使用されるセツキシマブ（Cetuximab）やベバシズマブ（Bevacizumab）、肺癌に使用されるエルロチニブ（Erlotinib）やゲフィチニブ（Gefitinib）、乳癌に使用されるトラスツズマブ（Trastuzumab）など多くの薬剤が開発されており、実地臨床で使用されている。各薬剤の標的物質としては、例えば癌キナーゼ、血管内皮増殖因子（Vascular Endothelial Growth Factor：VEGF）、上皮増殖因子受容体（Epidermal Growth Factor Receptor：EGFR）、HER2（human epidermal growth factor receptor type2）タンパク質等が挙げられる。しかし、悪性腫瘍に対する分子標的薬は、皮膚障害や消化管穿孔、間質性肺炎、肝不全など重篤な副作用による死亡例も報告されている。よって、より安全性の高い分子標的薬の登場が望まれている。

[0003] 健常者においても毎日数千個の悪性腫瘍（癌）細胞ができるといわれているが、必ずしも全員が発病するわけではない。自己免疫性肝炎（Autoimmune hepatitis：AIH）における肝発癌率は0.7% /年程度（Aliment Pharmacol Ther 2006;24:1197)と報告されており、C型慢性肝炎における肝発癌率が3% /年(Ann Intern Med 1999;131:174)に比べて明らかに低率である。

[0004] リボソームタンパク質であるRPL29（Ribosomal protein L29）は、大腸癌（非特許文献１）、肝細胞癌（非特許文献２）、胃癌（非特許文献３）、甲状腺癌（非特許文献４）、乳癌（非特許文献５）等様々な悪性腫瘍細胞で発現が亢進していることが報告されている。RPL29は細胞内部に発現していると

同時に細胞表面に発現している膜タンパクでもあり、RPL29の発現を低下させるとアポトーシスに陥る細胞が増加したり（非特許文献６）、細胞の分化が誘導される（非特許文献１）ことが報告されている。

[0005] 悪性腫瘍に対する分子標的薬に関し、RPL29を標的とする分子標的薬について検討した報告がある。健常者においても毎日数千個の癌細胞ができるといわれているにもかかわらず、必ずしも全員が癌を発病するわけではないことや、自己免疫性肝炎（AIH）における肝発癌率は0.7％/年程度と報告されており、C型慢性肝炎の3％/年に比べて明らかに低率であることが報告されている。そして、自己免疫性疾患の患者血清中に、悪性腫瘍細胞の増殖を抑制しうる免疫グロブリン（IgG）が存在することを確認し、RPL29を標的とする抗RPL29抗体であることが開示されている（特許文献１）。さらに特許文献１では抗RPL29抗体価を指標とする悪性腫瘍の検査方法についても開示されている。

先行技術文献

非特許文献

[0006] 非特許文献1：J Cell Physiol., 2006; 207(2):287-92

非特許文献2：Life Sci. 2007 Jan 23;80(7):690-8. Epub 2006 Dec 6

非特許文献3：BMC Cancer, 2010; 10: 240

非特許文献4：Cancer Res., 1998; 58: 4745

非特許文献5：Cancer Res., 1997; 57: 5148

非特許文献6：Carcinogenesis, 2004; 25 (6): 873-879

特許文献

[0007] 特許文献1：国際公開WO2013/111770号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 本発明は、悪性腫瘍細胞において発現の亢進しているリボソームタンパク質であるRPL29を標的とする新規分子標的薬を提供することを課題とする。RP

L29を標的とする分子標的薬に関し、RPL29に対してより効果的に作用する抗腫瘍剤を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0009] 本願発明者らは、上記課題を解決するために、より効果的に抗腫瘍効果が得られるRPL29タンパク質の分子標的薬について鋭意検討を重ねた結果、RPL29タンパク質のいずれかの部位を特異的に標的とすることで、より効果的に抗腫瘍効果が得られることを見出し、本発明を完成した。

[0010] すなわち本発明は、以下よりなる。

１．RPL29に対する抗体又はペプチドワクチンからなる分子標的薬であって、RPL29タンパク質を構成するアミノ酸配列のうち、配列表の配列番号１に示すアミノ酸配列の部分、又は配列番号１に示すアミノ酸配列のうち１若しくは複数個のアミノ酸残基が欠失、置換、導入若しくは付加されたアミノ酸配列の部分を標的とし、配列番号１に示すアミノ酸配列のうち、第41番目のR（アルギニン）から第159番目のE（グルタミン酸）で特定されるアミノ酸配列から選択され、少なくとも５個のアミノ酸残基を含む部分を標的とすることを特徴とする分子標的薬。

２．前項１に記載の分子標的薬が、配列表の配列番号１に示すアミノ酸配列の第146番目のQ（グルタミン）から159番目のE（グルタミン酸）、第81番目のV（バリン）から第135番目のA（アラニン）、又は第41番目のR（アルギニン）から第75番目のL（ロイシン）で特定されるいずれかのアミノ酸配列から選択され、各アミノ酸配列における連続する少なくとも５個のアミノ酸残基を含む部分を標的とすることを特徴とする、前項１に記載の分子標的薬。

３．分子標的薬の標的部位が、以下の配列番号２４、２１、２４、２２、２３及び２５に示すいずれかのアミノ酸配列から選択される部分である、前項１に記載の分子標的薬。

pklgkrarariakg（配列番号２４）

qapkrtqaptkase（配列番号２１）

mrfakkhnkkglkk（配列番号２２）

lvkpkevkpkipkg（配列番号２３）

rlcrpkakakakak（配列番号２５）

４．分子標的薬が抗体であり、以下の配列番号２４、２１、２４、２２、２３及び２５に示すいずれかのアミノ酸配列における連続した少なくとも５アミノ酸残基をエピトープとして認識することを特徴とする抗RPL29抗体からなる、前項１又は３に記載の分子標的薬。

pklgkrarariakg（配列番号２４）

qapkrtqaptkase（配列番号２１）

mrfakkhnkkglkk（配列番号２２）

lvkpkevkpkipkg（配列番号２３）

rlcrpkakakakak（配列番号２５）

５．分子標的薬がペプチドワクチンであり、以下の配列番号２４、２１、２４、２２、２３及び２５に示すいずれかのアミノ酸配列における連続した少なくとも５アミノ酸残基を含む、RPL29に対するペプチドワクチンからなる、前項１又は３に記載の分子標的薬。

pklgkrarariakg（配列番号２４）

qapkrtqaptkase（配列番号２１）

mrfakkhnkkglkk（配列番号２２）

lvkpkevkpkipkg（配列番号２３）

rlcrpkakakakak（配列番号２５）

６．前項１～５のいずれか１に記載の分子標的薬を有効成分として含む抗悪性腫瘍剤。

７．悪性腫瘍が、膵癌、乳癌、肺腺癌、大腸癌、肝細胞癌、胃癌、甲状腺癌、卵巣癌、唾液腺腺様嚢胞癌、前立腺癌、バーキットリンパ腫、急性骨髄性白血病、粘液性脂肪肉腫、膠芽腫、胞巣状横紋筋肉腫、ウィルムス腫瘍、乏突起膠細胞腫、副腎皮質癌、多発性骨髄腫、結節性リンパ球優位型ホジキンリンパ腫、形質細胞白血病、髄芽腫、Ｂ細胞性慢性リンパ性白血病、肺線癌、肺扁平上皮癌、II型子宮内膜癌、びまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫、食道

癌、末梢Ｔ細胞リンパ腫、未分化大細胞型リンパ腫、ユーイング肉腫及び前駆Ｔ細胞リンパ芽球性白血病から選択される一種又は複数種である、前項６に記載の抗悪性腫瘍剤。

８．悪性腫瘍が、膵癌、乳癌、肺腺癌及び大腸癌から選択される一種又は複数種である、前項７に記載の抗悪性腫瘍剤。

発明の効果

[0011] 本発明のRPL29に対する抗体又はペプチドワクチンからなる分子標的薬によれば、悪性腫瘍細胞の増殖を抑制することができる。悪性腫瘍細胞において発現の亢進しているRPL29を標的とする本発明の分子標的薬は、悪性腫瘍細胞ができたとしても、本来生体内に備わっている抗RPL29抗体であって発病に至らない生体防御機構に係る抗体と同様の作用を有すると考えられる。係る物質を有効成分として含む抗悪性腫瘍剤は、安全性が高い薬剤であり、有用である。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]自己免疫性肝炎（AIH）３例、膵癌（PK）２例、肺癌（LK）１例より得た血液中に含まれる抗RPL29抗体について、RPL29（NCBI Reference Sequence：NP_000983.1）のアミノ酸配列から得られる８種類のペプチドについて間接ELISA法にてエピトープマッピングを行った結果を示す図である。（参考例１）

[図2]参考例１と同手法にて、さらに１２種類のペプチドについて間接ELISA法にてエピトープマッピングを行った結果を示す図である。（参考例２）

[図3]エピトープマッピングにより、抗原性が高いと認められるペプチド５種を各々抗原として作製した５種類のIgG抗体について、各種培養癌細胞の増殖に及ぼす効果を確認した結果を示す図である。（実施例１）

[図4]膵癌細胞Panc-1に及ぼすIgG146-159抗体の細胞増殖抑制効果を示す図である。（実施例２）

[図5]膵癌細胞Panc-1にIgG146-159抗体を加えて培養したときの細胞内シグナルの変化について確認した結果を示す図である。（実施例３）

[図6]肺腺癌細胞株PC9に及ぼすIgG102-115抗体の細胞増殖抑制効果を示す図である。（実施例４）

[図7]肺腺癌細胞株PC9にIgG102-115抗体を加えて培養したときの細胞内シグナルの変化について確認した結果を示す図である。（実施例５）

[図8]乳癌細胞株MCF7に及ぼすIgG 102-115抗体の細胞増殖抑制効果を示す図である。（実施例６）

[図9]肺腺癌細胞株PC9にIgG102-115抗体を加えて培養したときの細胞内シグナルの変化について確認した結果を示す図である。（実施例７）

[図10]乳癌細胞株MCF7にIgG102-115抗体を加えて培養したときの細胞内シグナルの変化について確認した結果を示す図である。（実施例８）

[図11]乳癌細胞株MCF7にIgG102-115抗体を加えて培養したときの細胞内シグナルの変化について確認した結果を示す図である。（実施例８）

発明を実施するための形態

[0013] 本発明は、悪性腫瘍細胞において発現の亢進しているリボソームタンパク質であるRPL29を標的とする分子標的薬に関する。本発明の分子標的薬は、RPL29に対してより効果的に作用し、抗腫瘍作用を有する。

[0014] 本明細書のRPL29を構成するアミノ酸配列は、60S ribosomal protein L29 [Homo sapiens]として、NCBI Reference Sequence: NP_000983.1（配列番号１）で特定されるアミノ酸配列に基づく。本発明の分子標的薬の標的となりうるアミノ酸配列は、配列番号１で特定されるアミノ酸配列又は配列番号１に示すアミノ酸配列のうち、１～複数個のアミノ酸残基が欠失、置換、導入若しくは付加されたアミノ酸配列であってもよい。

[0015] NCBI Reference Sequence: NP_000983.1: maksknhtth nqsrkwhrng ikkprsqrye slkgvdpkfl rnmrfakkhn kkglkkmqan nakamsarae aikalvkpke vkpkipkgvs rkldrlayia hpklgkrara riakglrlcr pkakakakak dqtkaqaaap asvpaqapkr tqaptkase（配列番号１）

[0016] アミノ酸残基の置換の場合には、アミノ酸側鎖の性質が保存されている別のアミノ酸に置換させることが望ましい。例えばアミノ酸側鎖の性質として

は、疎水性アミノ酸、親水性アミノ酸、脂肪族側鎖を有するアミノ酸、水酸基含有側鎖を有するアミノ酸、硫黄原子含有側鎖を有するアミノ酸、カルボン酸及びアミド含有側鎖を有するアミノ酸、塩基含有側鎖を有するアミノ離、及び、芳香族含有側鎖を有するアミノ酸を挙げることができる。

[0017] 本発明は、上述のRPL29に係る分子標的薬の標的となりうるアミノ酸配列のうち、特に効果的に作用し、抗腫瘍作用を有する領域を標的とする分子標的薬を提供することを課題とする。本発明は当該領域を標的とする抗体又はペプチドワクチンを提供することも課題とする。本発明におけるRPL29に対する抗体又はペプチドワクチンからなる分子標的薬は、RPL29タンパク質を構成するアミノ酸配列のうち、配列番号１に示すアミノ酸配列、又は配列番号１に示すアミノ酸配列のうち１若しくは複数個のアミノ酸残基が欠失、置換、導入若しくは付加されたアミノ酸配列から選択され、連続した少なくとも５個のアミノ酸残基を含む部分を標的とする。標的部位として好ましくは、配列番号１に示すアミノ酸配列のうち、第41番目のR（アルギニン）から第159番目のE（グルタミン酸）で特定されるアミノ酸配列から選択され、少なくとも５個のアミノ酸残基を含む部分であり、さらに好ましくは、配列表の配列番号１に示すアミノ酸配列の第146番目のQ（グルタミン）から159番目のE（グルタミン酸）、第81番目のV（バリン）から第135番目のA（アラニン）、又は第41番目のR（アルギニン）から第75番目のL（ロイシン）で特定される各アミノ酸配列における連続する少なくとも５個のアミノ酸残基を含む部分を標的とする。

[0018] より具体的には、本発明の分子標的薬は以下の配列番号２１、２４、２２、２３及び２５に示すいずれかのアミノ酸配列から選択される部分を標的とする。各々について配列表の配列番号１に示すアミノ酸配列における部位も示した。

146-159番目：qapkrtqaptkase（配列番号２１）

102-115番目：pklgkrarariakg（配列番号２４）

43-56番目：mrfakkhnkkglkk（配列番号２２）

75-88番目：lvkpkevkpkipkg（配列番号２３）

117-130番目：rlcrpkakakakak（配列番号２５）

[0019] 本発明は、上記配列番号２１～２５に示すいずれかのアミノ酸配列からなるペプチドにおける連続した少なくとも５アミノ酸残基をエピトープとして認識する、RPL29を標的とする抗RPL29抗体にも及ぶ。そして本発明は、上記の配列番号２１～２５に示すいずれかのアミノ酸配列、配列番号２１～２５に示すいずれかのアミノ酸配列のうち１若しくは複数個のアミノ酸残基が欠失、置換、導入若しくは付加されたアミノ酸配列を含むペプチドからなる、RPL29を標的とするペプチドワクチンにも及ぶ。

[0020] さらに、本発明におけるRPL29に対する抗体又はペプチドワクチンからなる分子標的薬を有効成分として含む抗悪性腫瘍剤にも及ぶ。例えば、有効成分が抗RPL29抗体からなる分子標的薬の場合には、記配列番号２１～２５に示すいずれかのアミノ酸配列からなるペプチドにおける連続した少なくとも５アミノ酸残基をエピトープとして認識する抗RPL29抗体を少なくとも１種含む抗悪性腫瘍剤であればよい。有効成分として含む抗体の種類は１種であってもよいし、複数種であってもよい。また、抗体の型としてはFabなどの抗原抗体反応をしうる部分ペプチドであってもよいが、好ましくはインタクト型の抗体である。同様に、有効成分がペプチドワクチンからなる分子標的薬の場合は、記配列番号２１～２５に示すいずれかのアミノ酸配列からなるペプチドワクチン、又は配列番号２１～２５に示すいずれかのアミノ酸配列のうち１若しくは複数個のアミノ酸残基が欠失、置換、導入若しくは付加されたアミノ酸配列を含むペプチドワクチンからなる、RPL29を標的とするペプチドワクチンを少なくとも１種含む抗悪性腫瘍剤であればよい。

[0021] 本明細書において、分子標的薬を有効成分として含む抗悪性腫瘍剤における悪性腫瘍とは、膵癌、乳癌、肺腺癌、大腸癌、肝細胞癌、胃癌、甲状腺癌、卵巣癌、唾液腺腺様嚢胞癌、前立腺癌、バーキットリンパ腫、急性骨髄性白血病、粘液性脂肪肉腫、膠芽腫、胞巣状横紋筋肉腫、ウィルムス腫瘍、乏突起膠細胞腫、副腎皮質癌、多発性骨髄腫、結節性リンパ球優位型ホジキン

リンパ腫、形質細胞白血病、髄芽腫、Ｂ細胞性慢性リンパ性白血病、肺線癌、肺扁平上皮癌、II型子宮内膜癌、びまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫、食道癌、末梢Ｔ細胞リンパ腫、未分化大細胞型リンパ腫、ユーイング肉腫及び前駆Ｔ細胞リンパ芽球性白血病から選択される一種又は複数種の癌であり、特に好ましくは膵癌、乳癌、肺腺癌及び大腸癌から選択される一種又は複数種の癌である。

[0022] RPL29を標的とする場合であっても、癌の種類によっては標的となる部位が必ずしも共通するとは限らない。例えば、膵癌の場合では、qapkrtqaptkase（配列番号２１）において最も抗腫瘍効果が認められ、次にlvkpkevkpkipkg（配列番号２３）、rlcrpkakakakak（配列番号２５）、mrfakkhnkkglkk（配列番号２２）、pklgkrarariakg（配列番号２４）の順で効果があると考えられる。非小細胞肺癌の場合には、pklgkrarariakg（配列番号２４）において最も抗腫瘍効果が認められ、次にqapkrtqaptkase（配列番号２１）、lvkpkevkpkipkg（配列番号２３）、mrfakkhnkkglkk（配列番号２２）、rlcrpkakakakak（配列番号２５）の順で効果があると考えられる。乳癌の場合には、pklgkrarariakg（配列番号２４）において最も抗腫瘍効果が認められ、次にmrfakkhnkkglkk（配列番号２２）、qapkrtqaptkase（配列番号２１）、lvkpkevkpkipkg（配列番号２３）、rlcrpkakakakak（配列番号２５）の順で効果があると考えられる。

[0023] 本発明の抗体は、上記の配列番号２１～２５に示すいずれかのアミノ酸配列、又は以下の配列番号２１～２５に示すいずれかのアミノ酸配列のうち１若しくは複数個のアミノ酸残基が欠失、置換、導入若しくは付加されたアミノ酸配列を含むペプチドを免疫原とし、自体公知の方法、又は今後開発される製造方法を適用することができる。上記ペプチドを免疫原とし、自体公知の方法によりポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体を作製することができる。抗体の作製方法は、当業者に公知の手法を用いることができる。

[0024] 本発明のペプチドワクチンは、上述のアミノ酸配列に基づいて、任意の位置からペプチドを合成して得ることができる。ペプチドの合成は、通常のペ

プチド化学において用いられる方法に準じて行うことが可能である。また本発明のペプチドは、公知の遺伝子工学的手法により合成することも可能である。遺伝子工学的な合成手法の一例としては、以下の方法が挙げられる。すなわち、目的のペプチドをコードするDNAを適当な宿主細胞に導入し、形質転換細胞を作製する。この形質転換細胞から産生されるペプチドを回収することにより、本発明のペプチドを得ることが可能である。また本発明のペプチドは、一度融合タンパク質として作製し、それを適切なプロテアーゼで分解することにより得ることも可能である。融合タンパク質を作製する方法は、本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドと他のペプチドをコードするポリヌクレオチドをフレームが一致するように連結してこれを発現ベクターに導入し、宿主で発現させればよく、当業者に公知の手法を用いることができる。

[0025] 本発明は、本発明の分子標的薬の製造方法にも及ぶ。本発明の分子標的薬がペプチドワクチンの場合は、上記の配列番号２１～２５に示すいずれかのアミノ酸配列を含むペプチド、又は配列番号２１～２５に示すいずれかのアミノ酸配列のうち１若しくは複数個のアミノ酸残基が欠失、置換、導入若しくは付加されたアミノ酸配列を含むペプチドを調製することにより製造することができる。また、本発明の分子標的薬が抗RPL29抗体の場合は、上記の配列番号２１～２５に示すいずれかのアミノ酸配列、又は以下の配列番号２１～２５に示すいずれかのアミノ酸配列のうち１若しくは複数個のアミノ酸残基が欠失、置換、導入若しくは付加されたアミノ酸配列を含むペプチドを免疫原として抗体（ペプチド抗体）を製造することができる。

[0026] 本明細書において、RPL29に対する抗体又はペプチドワクチンからなる分子標的薬を有効成分として含む抗悪性腫瘍剤には抗RPL29抗体を増強しうる物質を含んでいてもよい。抗RPL29抗体を増強しうる物質としては、抗RPL29抗体に対する免疫賦活化剤等が挙げられる。生体内の抗RPL29抗体に対する免疫賦活化剤としては、例えば生体内の抗体産生細胞の活性化剤、例えばIL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-13、GM-CSF、TNF-α、細菌及びその菌体成分、植物や真

菌の多糖体、核酸、脂溶性ビタミン、ミネラルオイルなどが挙げられる。生体内の抗体産生細胞としては、例えばＢ細胞や形質細胞が挙げられる。

[0027] 上記のRPL29に対する抗体又はペプチドワクチンからなる分子標的薬を有効成分として含む本発明の抗悪性腫瘍剤には、薬理学的に許容しうる担体を含ませることができる。上記の抗悪性腫瘍剤に用いられる薬理学的に許容しうる担体としては、例えば、賦形剤、崩壊剤若しくは崩壊補助剤、結合剤、滑沢剤、コーティング剤、色素、希釈剤、基剤、溶解剤若しくは溶解補助剤、等張化剤、ｐＨ調節剤、安定化剤、噴射剤、及び粘着剤等を挙げることができる。

[0028] 本発明の抗悪性腫瘍剤の投与形態としては、局所的に投与しても全身的に投与してもよい。非経口投与用の製剤は、滅菌した水性の、又は非水性の溶液、懸濁液及び乳濁液を含んでいてもよい。非水性希釈剤の例として、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物油、例えば、オリーブ油及び有機エステル組成物、例えば、エチルオレエートであり、これらは注射用に適している。水性担体には、水、アルコール性水性溶液、乳濁液、懸濁液、食塩水及び緩衝化媒体が含まれていてもよい。非経口的担体には、塩化ナトリウム溶液、リンゲルデキストロース、デキストロース及び塩化ナトリウム、リンゲル乳酸及び結合油が含まれていてもよい。静脈内担体には、例えば、液体用補充物、栄養及び電解質（例えば、リンゲルデキストロースに基づくもの）が含まれていてもよい。本発明の抗悪性腫瘍剤はさらに、保存剤及び他の添加剤、例えば，抗微生物化合物、抗酸化剤、キレート剤及び不活性ガスなどを含むことができる。

実施例

[0029] 本発明の理解を深めるために、参考例、実施例を示して本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではないことは、いうまでもない。参考例では、本発明を完成するに至った研究経緯を示す。以下の臨床検体を用いた本研究は、岡山大学内の倫理委員会により承認されている。

[0030] （参考例１）RPL29エピトープ解析（１回目）

本参考例では、下記の配列番号１で特定される60S ribosomal protein L29 [Homo sapiens] (NCBI Reference Sequence: NP_000983.1) のアミノ酸配列からなるタンパク質に関し、自己免疫性肝炎（AIH）３例、膵癌（PK）２例、肺癌（LK）１例より得た血液中に含まれる抗RPL29抗体について、間接ELISA法にてエピトープマッピングを行った。

配列番号２～９に示すアミノ酸からなるペプチドを、各々ペプチド合成器（ABIMED Multiple Peptide Synthesizer AMS 422）を用いて、Fmoc法により合成した。各々について配列番号１に示すアミノ酸配列における部位も示した。

P1: 1-30番目：maksknhtth nqsrkwhrng ikkprsqrye（配列番号２）

P2: 21-50番目：ikkprsqrye slkgvdpkfl rnmrfakkhn（配列番号３）

P3: 41-70番目：rnmrfakkhn kkglkkmqan nakamsarae（配列番号４）

P4: 61-90番目：nakamsarae aikalvkpke vkpkipkgvs（配列番号５）

P5: 81-110番目：vkpkipkgvs rkldrlayia hpklgkrara（配列番号６）

P6: 101-130番目：hpklgkrara riakglrlcr pkakakakak（配列番号７）

P7: 121-150番目：pkakakakak dqtkaqaaap asvpaqapkr（配列番号８）

P8: 141-159番目：asvpaqapkr tqaptkase（配列番号９）

[0031] ・間接ELISA法

１）10μg/mlの各ペプチド抗原を96 wellマイクロプレートの各wellに100μl加えて1 時間静置し抗原を固相化した。

２）1% ウシ血清アルブミン（bovine serum albumin）を300μl/well加えて15分間のブロッキング処理後、各血清又は血漿を100倍に希釈した溶液100μl/well添加し、1 時間反応させた。

３）洗浄後、1μg/mlのHRP標識抗ヒトIgG抗体を100μl/well添加し、1 時間反応させた。４）さらに洗浄後、2,2'-azino-bis[3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonateを100μl/well添加し、十分反応させた。

５）ELISAリーダー（Model 680 Microplate Reader: Bio-Rad Laboratories Ltd., Tokyo, Japan）で、波長405nmでの吸光度を測定した。陰性コントロー

ルは血清のかわりにウシ血清の希釈液とした。吸光度測定後に陰性コントロールの吸光度を引いた値を抗体価とした。

[0032] 上記方法によりエピトープマッピングを行い、エピトープ候補を探索したところ、配列番号４～８に示すアミノ酸配列からなるペプチド抗原、即ち、RPL29タンパク質を構成するアミノ酸配列のうち、配列表の配列番号１に示すアミノ酸配列のうち、第41番目のR（アルギニン）から第159番目のE（グルタミン酸）で特定されるアミノ酸配列から選択され部分に対して、抗原抗体反応が確認された（図１）。

[0033] （参考例２）RPL29エピトープ解析（２回目）

本参考例では、配列番号１０～２１に示すアミノ酸配列からなるペプチドを用いたほかは、参考例１と同手法にてエピトープマッピングを行った。各々について配列番号１に示すアミノ酸配列における部位も示した。

P-1: 41-55番目：rnmrfakkhn kkglk（配列番号１０）

P-2: 51-65番目：kkglkkmqan nakam（配列番号１１）

P-3: 61-75番目：nakamsarae aikal（配列番号１２）

P-4: 71-85番目：aikalvkpke vkpki（配列番号１３）

P-5: 81-95番目：vkpkipkgvs rkldr（配列番号１４）

P-6: 91-105番目：rkldrlayia hpklg（配列番号１５）

P-7: 101-115番目：hpklgkrara riakg（配列番号１６）

P-8: 111-125番目：riakglrlcr pkaka（配列番号１７）

P-9: 121-135番目：pkakakakak dqtka（配列番号１８）

P-10: 131-145番目：dqtkaqaaap asvpa（配列番号１９）

P-11: 141-155番目：asvpaqapkr tqapt（配列番号２０）

P-12: 146-159番目：qapkr tqaptkase（配列番号２１）

[0034] 上記方法によりエピトープマッピングを行い、エピトープ候補を探索したところ、配列番号１０～１１及び１４～１８、２１に示すアミノ酸配列からなるペプチド抗原、即ち配列表の配列番号１に示すアミノ酸配列の第81番目のV（バリン）から第135番目のA（アラニン）、第146番目のQ（グルタミン）

から159番目のE（グルタミン酸）、又は第41番目のR（アルギニン）から第75番目のL（ロイシン）で特定される各アミノ酸配列を標的とする部分がエピトープ候補と考えられた（図２）。

[0035] 上記結果解析より、配列番号２１～２５に示すアミノ酸配列からなるペプチド部分がエピトープ候補（標的部位）と考えられた。各々について配列番号１に示すアミノ酸配列における部位も示した。

(1) 43-56番目：mrfakkhnkkglkk（配列番号２２）

(2) 75-88番目：lvkpkevkpkipkg（配列番号２３）

(3) 102-115番目：pklgkrarariakg（配列番号２４）

(4) 117-130番目：rlcrpkakakakak（配列番号２５）

(5) 146-159番目：qapkrtqaptkase（配列番号２１）

[0036] （実施例１）人工的に作製した抗RPL29抗体（ペプチド抗体）の抗腫瘍効果

生後3か月のウサギに、配列番号２１～２５で特定されるアミノ酸配列からなる各ペプチドのC端にC-KLHで修飾したペプチドを3回免疫（0週、2週、5週）した。最後の免疫から7日目に血清を採取した。抗体の作製は、GenScript社にSC1492 Custom Polyclonal Antibody Service until 3rd immunizationsにより依頼した。ペプチド特異的なポリクローナル抗体は、上記で採取した血清からAlltech Alltima C18 HPLC Column (AT88307 Alltech No.:88307)を使用して精製し、ペプチド抗体を得た。ウサギIgG (Sigma-Aldrich：I5006-10MG) をコントロール抗体として使用した。

[0037] 各ペプチド抗体について、各種腫瘍細胞に対する増殖抑制効果を調べた。各ペプチド抗体は、セントリカット超ミニ（KURABO）を用いてマニュアルに従い細胞培養に使用する培養液へ溶解させた。各培養細胞を5.0×10^4 cell/mlに調整後、細胞培養用96 wellプレートに100μl/wellで播種し、37℃で5% CO_2下にて培養した。

各培養細胞についての培養液は下記の通りである。

肝癌細胞株Huh7、膵癌細胞株Panc-1：DMEM（Invitrogen Co.）に加熱処理FBS(10%)、1% 非必須アミノ酸（Sigma-Aldrich Co.)、1% ピルビン酸Na(Sigma

-Aldrich Co., MO)、2mM L-グルタミン酸塩（Sigma-Aldrich Co.）、1% ペニシリン／ストレプトマイシン（Sigma-Aldrich Co.）。

大腸癌細胞株HCT15、乳癌細胞株MCF-7、肺腺癌細胞株PC-9、前立腺癌細胞株PC-3：RPMI-1640 培地（Sigma-Aldrich Co.）、 に加熱処理FBS(10%)、1% ペニシリン／ストレプトマイシン（Sigma-Aldrich Co.）。

[0038] 培養開始24時間後に、各ペプチドを抗原として作製した抗体(1)～(5)を50μg/ml各wellに加えた。コントロールには、培溶液のみを同量加えた。抗体投与直前又は抗体投与24時間後と48時間後、必要に応じて72時間後に、3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide（MTT：5 mg/ml リン酸緩衝液）溶液10μlを各wellに加えた。MTT添加4 時間後に培養液を除去し、DMSO 100μlを各wellに加えた。ELISAリーダー（Model 680 Microplate Reader: Bio-Rad Laboratories Ltd.）で、570 nmの吸光度を測定した。

(1) mrfakkhnkkglkk（配列番号２２）：IgG43-56

(2) lvkpkevkpkipkg（配列番号２３）：IgG75-88

(3) pklgkrarariakg（配列番号２４）：IgG102-115

(4) rlcrpkakakakak（配列番号２５）：IgG117-130

(5) qapkrtqaptkase（配列番号２１）：IgG146-159

[0039] 各種癌細胞株の増殖に及ぼす抗体の効果を図３に示した。図３に示す各抗体(1)～(5)は上記のとおりである。その結果、培養細胞株の種類に応じて抗体の細胞抑制効果に違いが認められたが、いずれかの抗体で細胞増殖抑制効果が認められた。

[0040] （実施例２）膵癌に及ぼすIgG 146-159抗体の効果

実施例１の結果、膵癌細胞に対しては(5)のペプチドを抗原として作製した抗体（IgG 146-159）が最も抗腫瘍効果が認められた。そこで、IgG 146-159抗体について各種濃度の抗体を加えて培養したときの膵癌細胞の増殖に及ぼす効果を確認した。コントロール抗体はウサギコントロール抗体とした。その結果、コントロール抗体では細胞増殖抑制効果はほとんど認められなかったが、IgG 146-159抗体では濃度依存的に細胞増殖抑制効果が確認された（図

４）。培養開始24時間後に25μg/mlを1回添加した場合の結果を図４（Ａ）に示し、24時間後及び48時間後の2日連続で添加した場合の結果を図４（Ｂ）に示した。その結果、培養開始24時間後に25μg/mlを1回添加するよりも24時間後と48時間後の2日連続で添加した方が培養開始72時間後における細胞増殖抑制効果が強く認められた。更に、 25μg/mlで2日連続添加するよりも50μg/mlで2日連続添加した方が細胞増殖抑制効果が強く認められた。以上より、連日投与の有効性も確認された。

[0041] （実施例３）膵癌に及ぼすIgG 146-159抗体の効果

膵癌細胞Panc-1にIgG 146-159抗体を加えて培養したときに細胞内シグナルの変化について確認した。

[0042] 膵癌細胞Panc-1を5.0×10^4 cell/ml に調整後、細胞培養用 6wellプレートに2 ml/wellで播種した。なお、実施例１と同様の培養液を用い、37℃で5% CO_2下に培養した。培養開始24時間後に、培養液に溶解させた抗体を加えた。コントロールには、溶解液のみを同量加えた。抗体投与24時間後に培養液を除去し、Pierce IP Lysis緩衝液(Thermo Fisher Scientific Inc.) 400μlを各wellに加えた。15分間攪拌した後、ビーズ破砕機（TAITEC）で細胞を破砕した。その後、13,000gで10分間遠沈し、上澄を回収した。得られた上澄に等量の2×サンプルバッファー（20% Glycerol, 4% SDS, 125mM Tris-HCl / pH6.8, 10% メルカプトエタノール, 0.004% ブロモフェノールブルー(BPB)）を等量添加し、5分間煮沸し、タンパク質を抽出した。

[0043] 上述の方法で抽出したタンパク質を、常法に従ってSDS-PAGEにより電気泳動を行った。電気泳動したタンパク質を常法に従ってPVDFメンブレンにブロッティングした。PVDF Blocking Reagent for Can Get Signal (TOYOBO)で1時間のブロッキング処理後、β-actin、Phospho-MDM2 (Ser166)、Phospho-p53 (Ser15)、p53、Bax、p21、Phospho-β-Catenin (Thr41/Ser45)、β-Catenin、Cyclin D1、Survivin、Met、C-myc、p27、Phospho-p70 S6K (Thr389)、Phospho-4E-BP1 (Thr37/46)、Phospho-MEK1/2 (Ser217/221)の各一次抗体（Cell signaling Techonology, Inc.)で1 時間処理した。メンブレンを洗浄後、H

RP標識抗IgG抗体（RPN2124: GE Healthcare）を二次抗体として1 時間反応させた。メンブレンを洗浄後、ECL Western Blotting Detection System (RPN2132: GE Healthcare)で発色させ、ルミノメーターで検出した。

その結果、IgG 146-159抗体を含む培養液で培養した場合に、細胞内シグナルのうちp53とβカテニンのリン酸化亢進、Baxとp21、p27の発現亢進、cyclin D1とSurvivinの発現低下、4E-BP1のリン酸化低下を認め、アポトーシスの亢進、β-catenin経路の抑制、mTOR経路の抑制が示唆された（図５）。

[0044] （実施例４）肺腺癌細胞株PC9に及ぼすIgG 102-115抗体の効果

実施例１の結果、肺腺癌細胞に対しては(3)のペプチドを抗原として作製した抗体（IgG 102-115）が最も抗腫瘍効果が認められた。そこで、IgG 102-115抗体について各種濃度の抗体を加えて培養したときの肺腺癌細胞の増殖に及ぼす効果を確認した。IgG 102-115抗体では濃度依存的に細胞増殖抑制効果が確認された（図６）。

[0045] （実施例５）肺腺癌細胞株PC9におけるIgG 102-115抗体による細胞内シグナル変化

肺腺癌細胞株PC9にIgG 102-115抗体を加えて培養したときの細胞内シグナルの変化について確認した。

[0046] 肺腺癌細胞株PC9を5.0×10^4 cell/ml に調整後、細胞培養用 6wellプレートに2 ml/wellで播種した。なお、実施例１と同様の培養液を用い、37℃で5% CO_2下に培養した。培養開始24時間後に、培養液に溶解させたIgG 102-115抗体（Anti-RPL29）を各々10μg/ml、25μg/ml、500μg/ml加えた。コントロールには、培溶液のみを同量加えた。実施例３に記載の方法と同手法でSDS-PAGEにより電気泳動を行い、同様にブロッティングした。実施例３と同手法により処理を行い、ルミノメーターで検出した。なお、Phospho-EGFR (Tyr1068)、Phospho-p53 (Ser15)、p53、Bax、p38 MAPK、Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182)、Stat3、Phospho-Stat3 (Tyr705)、c-Jun、Phospho-c-Jun (Ser63)、c-Fos、Phospho-c-Fos (Ser32)、p27、Phospho-CDC2 (Tyr15)、β-actin（以上、Cell signaling Techonology, Inc.）とRPL29 (Abnova Corporation) に

対する一次抗体を使用した。

その結果、IgG 102-115抗体を含む培養液で培養した場合に、細胞内シグナルのうちp53とc-Jun、c-Fosのリン酸化亢進、Baxとc-Fos、p27の発現亢進、EGF受容体とp38 MAPK、Stat3、CDC2のリン酸化低下を認め、アポトーシスの亢進と細胞周期の抑制が示唆された（図７）。

[0047] （実施例６）乳癌細胞MCF7に及ぼすIgG 102-115抗体の効果

実施例１の結果、乳癌細胞MCF7に対しては(3)のペプチドを抗原として作製した抗体（IgG 102-115）が最も抗腫瘍効果が認められた。そこで、IgG 102-115抗体について各種濃度の抗体を加えて培養したときの乳癌細胞の増殖に及ぼす効果を確認した。IgG 102-115抗体では濃度依存的に細胞増殖抑制効果が確認された（図８）。

[0048] （実施例７）肺腺癌細胞株PC9におけるIgG 102-115抗体による細胞内シグナル変化

肺腺癌細胞株PC9にIgG 102-115抗体を加えて培養したときの細胞内シグナルの変化について確認した。

[0049] 肺腺癌細胞株PC9を5.0×10^4 cell/ml に調整後、細胞培養用 6wellプレートに2 ml/wellで播種した。なお、実施例１と同様の培養液を用い、37℃で5% CO_2下に培養した。培養開始24時間後に、培養液に溶解させたIgG 102-115抗体（Anti-RPL29）を各々10μg/ml、25μg/ml、500μg/ml加えた。コントロールには、培溶液のみを同量加えた。実施例３に記載の方法と同手法でSDS-PAGEにより電気泳動を行い、同様にブロッティングした。実施例３と同手法により処理を行い、ルミノメーターで検出した。なお、Cleaved Caspase 8 (p43/p41)、Cleaved Caspase 3、Erk1/2、Phospho-Erk1/2 (Thr202/Tyr204)、Phospho-ASK1 (Thr845)、Phospho-Smad2 (Ser465/467)、Smad2/3、Smad4、RUNX3、β-actin (以上、Cell signaling Techonology, Inc.) とRPL29 (Abnova Corporation) に対する一次抗体を使用した。

その結果、IgG 102-115抗体を含む培養液で培養した場合に、Cleaved Caspase 8とCleaved Caspase 3の発現亢進が認められ、アポトーシスの亢進が示

唆された（図９）。そして、Phospho-JNKの発現亢進が認められた（図９）。また、Phospho-Smad2とRUNX3の発現亢進が認められ、TGF-βシグナル経路の活性化が示唆された（図９）。

[0050] （実施例８）乳癌細胞株MCF7細胞におけるIgG 102-115抗体による細胞内シグナル変化

乳癌細胞株MCF7細胞にIgG 102-115抗体を加えて培養したときに細胞内シグナルの変化について確認した。

[0051] 乳癌細胞株MCF7細胞を5.0×10^4 cell/ml に調整後、細胞培養用 6wellプレートに2 ml/wellで播種した。なお、実施例１と同様の培養液を用い、37℃で5% CO_2下に培養した。培養開始24時間後に、培養液に溶解させたIgG 102-115抗体（Anti-RPL29）を各々10μg/ml、25μg/ml、500μg/ml加えた。コントロールには、培溶液のみを同量加えた。実施例３に記載の方法と同手法でSDS-PAGEにより電気泳動を行い、同様にブロッティングした。実施例３と同手法により処理を行い、ルミノメーターで検出した。なお、Cleaved Caspase 8 (p43/p41)、Phospho-p53 (Ser15)、P53、Bcl-2、Bax、Cleaved Caspase 3、Phospho-PTEN (Ser380)、PTEN、p-β-Catenin (Thr41/Ser45)、β-Catenin、Cyclin D1、p27、Stat3、Phospho-Stat3 (Ser727)、Phospho-ELK-1 (Ser383)、c-Jun、Phospho-c-Jun (Ser63)、RPL29、Erk1/2、Phospho-Erk1/2 (Thr202/Tyr204)、Phospho-ASK1 (Thr845)、ASK1、Phospho-TAK1 (Thr184/187)、TAK1、JNK、Phospho-JNK (Thr183/Tyr185)、P38 MAPK、Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182)、Phospho-Smad2 (Ser465/467)、Phospho-Smad3 (Ser423/425) 、Smad2/3、Smad4、Phospho-Smad1/5 (Ser463/465)、RUNX3、PI3 Kinase p110α、E-cadherin、N-cadherin、β-actin（以上、Cell signaling Techonology, Inc.）とRPL29（Abnova Corporation）に対する一次抗体を使用した。

その結果、IgG 102-115抗体を含む培養液で培養した場合にCleaved caspase 8、Phospho-p53、Bax、Cleaved Caspase 3の発現亢進が認められ、アポトーシスの亢進が示唆された（図１０）。そして、Phospho-β-cateninの発現亢進とCyclin D1の発現低下が認められ、β-Catenin経路の不活性化が示唆さ

れた（図１０）。また、Phospho-JNKの発現亢進が認められた（図１０）。Phospho-JNKの発現亢進が認められた（図１１）。Phospho-Smad2とPhospho-Smad3、RUNX3の発現亢進が認められ、TGF-βシグナル経路の活性化が示唆された（図１１）。N-cadherinの発現低下が認められた（図１１）。

産業上の利用可能性

[0052] 以上詳述したように、本発明で特定されるRPL29に対する抗体又はペプチドワクチンからなる分子標的薬によれば、悪性腫瘍細胞の増殖を抑制することができる。本発明の悪性腫瘍細胞において発現の亢進しているRPL29を標的とする物質は、悪性腫瘍細胞ができたとしても、本来生体内に備わっている抗RPL29抗体であって発病に至らない生体防御機構に係る抗体（特許文献１）と同様の作用を有すると考えられる。係る物質を有効成分として含む本発明の抗悪性腫瘍剤は、安全性が高い薬剤であり、有用である。

請求の範囲

[請求項1] RPL29に対する抗体又はペプチドワクチンからなる分子標的薬であって、RPL29タンパク質を構成するアミノ酸配列のうち、配列表の配列番号１に示すアミノ酸配列の部分、又は配列番号１に示すアミノ酸配列のうち１若しくは複数個のアミノ酸残基が欠失、置換、導入若しくは付加されたアミノ酸配列の部分を標的とし、配列番号１に示すアミノ酸配列のうち、第41番目のR（アルギニン）から第159番目のE（グルタミン酸）で特定されるアミノ酸配列から選択され、少なくとも５個のアミノ酸残基を含む部分を標的とすることを特徴とする分子標的薬。

[請求項2] 請求項１に記載の分子標的薬が、配列表の配列番号１に示すアミノ酸配列の第146番目のQ（グルタミン）から159番目のE（グルタミン酸）、第81番目のV（バリン）から第135番目のA（アラニン）、又は第41番目のR（アルギニン）から第75番目のL（ロイシン）で特定されるいずれかのアミノ酸配列から選択され、各アミノ酸配列における連続する少なくとも５個のアミノ酸残基を含む部分を標的とすることを特徴とする、請求項１に記載の分子標的薬。

[請求項3] 分子標的薬の標的部位が、以下の配列番号２４、２１、２４、２２、２３及び２５に示すいずれかのアミノ酸配列から選択される部分である、請求項１に記載の分子標的薬。

pklgkrarariakg（配列番号２４）

qapkrtqaptkase（配列番号２１）

mrfakkhnkkglkk（配列番号２２）

lvkpkevkpkipkg（配列番号２３）

rlcrpkakakakak（配列番号２５）

[請求項4] 分子標的薬が抗体であり、以下の配列番号２４、２１、２４、２２、２３及び２５に示すいずれかのアミノ酸配列における連続した少なくとも５アミノ酸残基をエピトープとして認識することを特徴とする抗

RPL29抗体からなる、請求項１又は３に記載の分子標的薬。

pklgkrarariakg（配列番号２４）

qapkrtqaptkase（配列番号２１）

mrfakkhnkkglkk（配列番号２２）

lvkpkevkpkipkg（配列番号２３）

rlcrpkakakakak（配列番号２５）

[請求項5] 分子標的薬がペプチドワクチンであり、以下の配列番号２４、２１、２４、２２、２３及び２５に示すいずれかのアミノ酸配列における連続した少なくとも５アミノ酸残基を含む、RPL29に対するペプチドワクチンからなる、請求項１又は３に記載の分子標的薬。

pklgkrarariakg（配列番号２４）

qapkrtqaptkase（配列番号２１）

mrfakkhnkkglkk（配列番号２２）

lvkpkevkpkipkg（配列番号２３）

rlcrpkakakakak（配列番号２５）

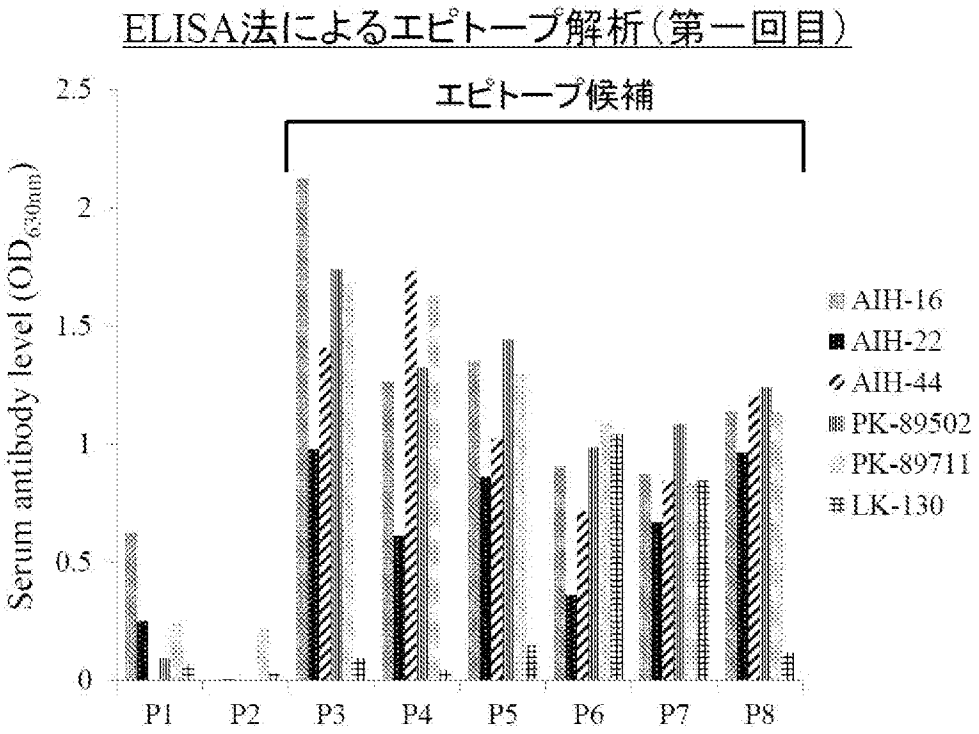
[請求項6] 請求項１～５のいずれか１に記載の分子標的薬を有効成分として含む抗悪性腫瘍剤。

[請求項7] 悪性腫瘍が、膵癌、乳癌、肺腺癌、大腸癌、肝細胞癌、胃癌、甲状腺癌、卵巣癌、唾液腺腺様嚢胞癌、前立腺癌、バーキットリンパ腫、急性骨髄性白血病、粘液性脂肪肉腫、膠芽腫、胞巣状横紋筋肉腫、ウィルムス腫瘍、乏突起膠細胞腫、副腎皮質癌、多発性骨髄腫、結節性リンパ球優位型ホジキンリンパ腫、形質細胞白血病、髄芽腫、Ｂ細胞性慢性リンパ性白血病、肺線癌、肺扁平上皮癌、II型子宮内膜癌、びまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫、食道癌、末梢Ｔ細胞リンパ腫、未分化大細胞型リンパ腫、ユーイング肉腫及び前駆Ｔ細胞リンパ芽球性白血病から選択される一種又は複数種である、請求項６に記載の抗悪性腫瘍剤。

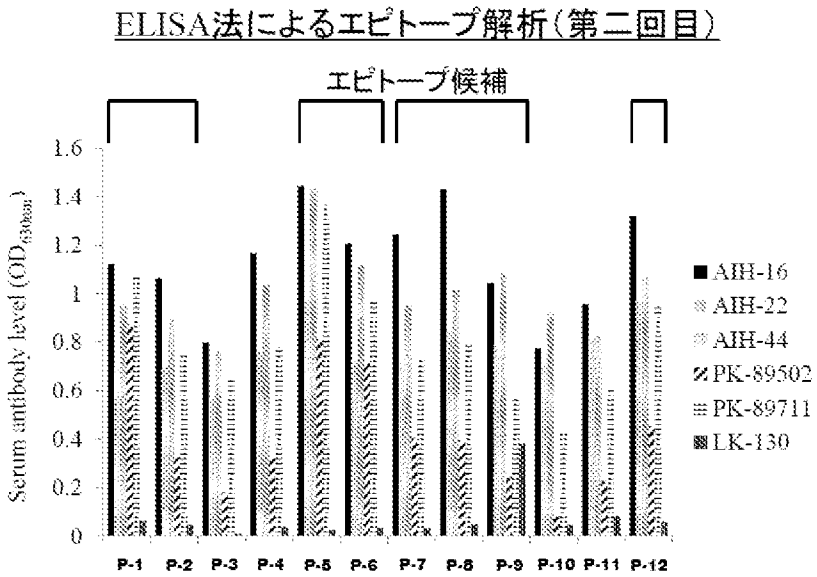
[請求項8] 悪性腫瘍が、膵癌、乳癌、肺腺癌及び大腸癌から選択される一種又は

複数種である、請求項７に記載の抗悪性腫瘍剤。

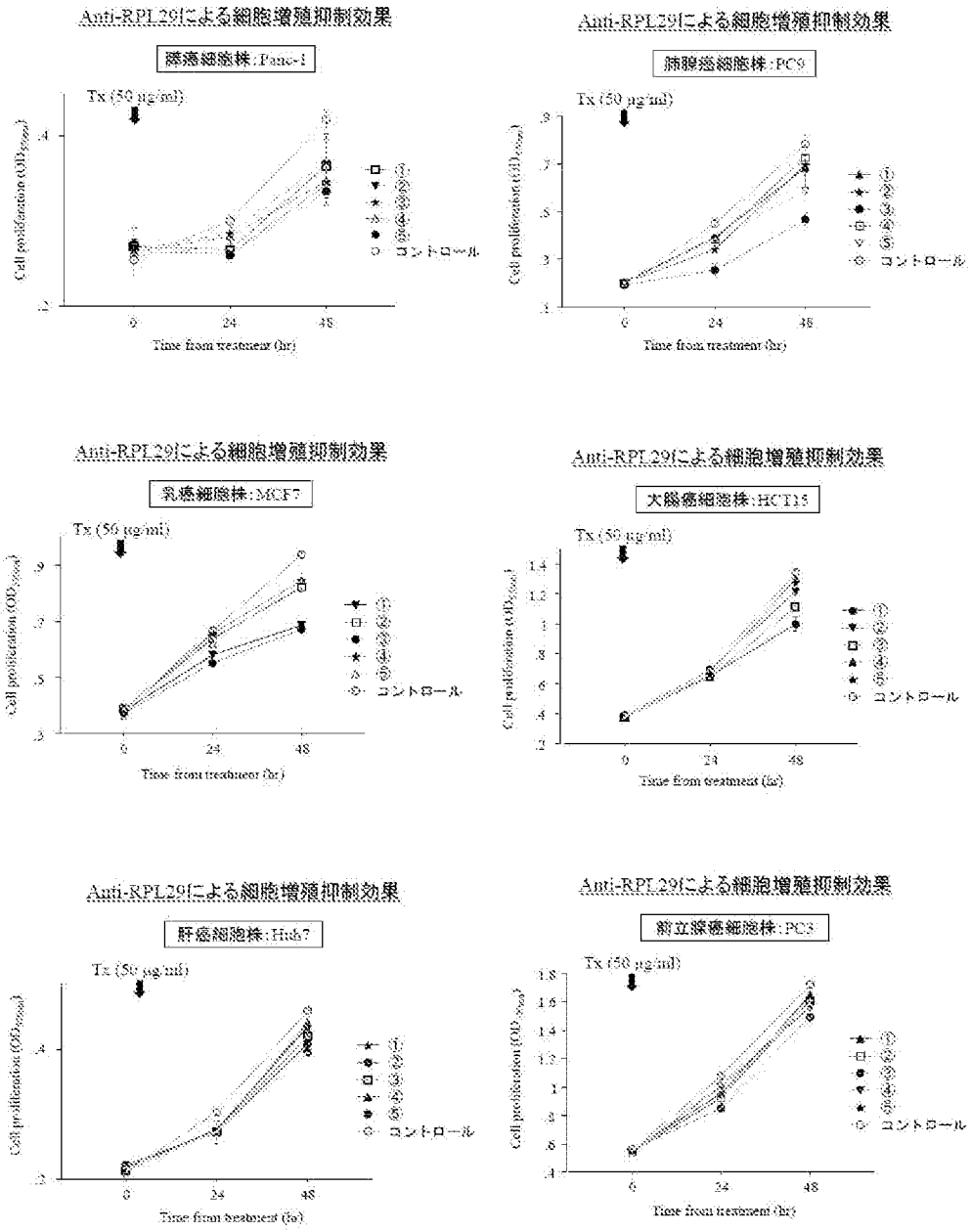
[図1]


ELISA法によるエピトープ解析（第一回目）
エピトープ候補
Serum antibody level (OD630nm)
2.5
2
1.5
1
0.5
0
P1
P2
P3
P4
P5
P6
P7
P8
AIH-16
AIH-22
AIH-44
PK-89502
PK-89711
LK-130

[図2]

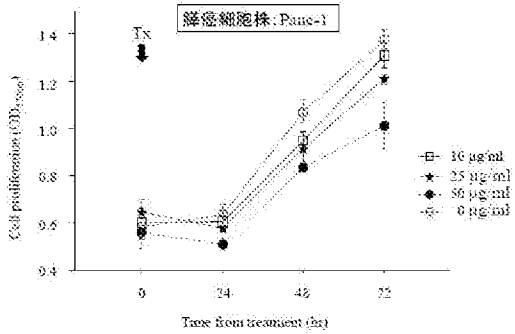

ELISA法によるエピトープ解析（第二回目）
エピトープ候補
Serum antibody level (OD630nm)
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
P-1
P-2
P-3
P-4
P-5
P-6
P-7
P-8
P-9
P-10
P-11
P-12
AIH-16
AIH-22
AIH-44
PK-89502
PK-89711
LK-130

[図3]

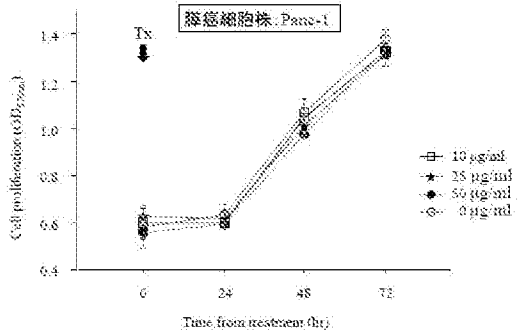

Anti-RPL29による細胞増殖抑制効果
膵癌細胞株：Panc-1
Tx (50 μg/ml)
Cell proliferation (OD450nm)
Time from treatment (hr)
0
24
48
コントロール
Anti-RPL29による細胞増殖抑制効果
肺腺癌細胞株：PC9
Tx (50 μg/ml)
Cell proliferation (OD450nm)
Time from treatment (hr)
コントロール
Anti-RPL29による細胞増殖抑制効果
乳癌細胞株：MCF7
Tx (50 μg/ml)
Cell proliferation (OD450nm)
Time from treatment (hr)
コントロール
Anti-RPL29による細胞増殖抑制効果
大腸癌細胞株：HCT15
Tx (50 μg/ml)
Cell proliferation (OD450nm)
Time from treatment (hr)
コントロール
Anti-RPL29による細胞増殖抑制効果
肝癌細胞株：Huh7
Tx (50 μg/ml)
Cell proliferation (OD450nm)
Time from treatment (hr)
コントロール
Anti-RPL29による細胞増殖抑制効果
前立腺癌細胞株：PC3
Tx (50 μg/ml)
Cell proliferation (OD450nm)
Time from treatment (hr)
コントロール

[図4]

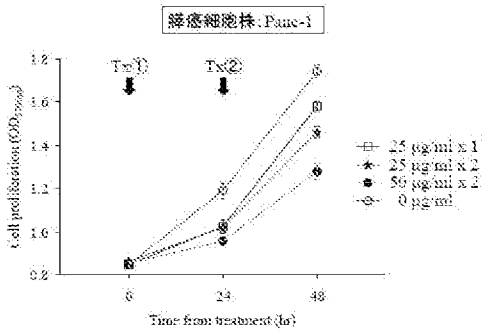
(A) Rabbit IgG146-159による細胞増殖抑制効果



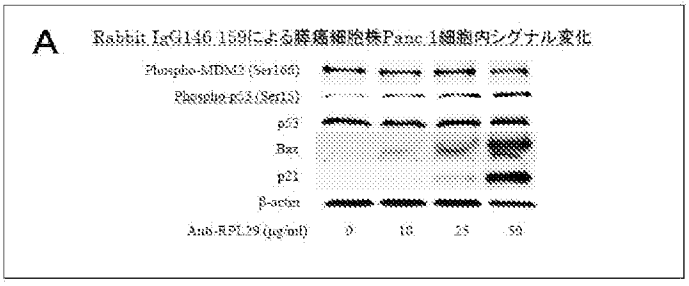
Control IgGによる細胞増殖抑制効果

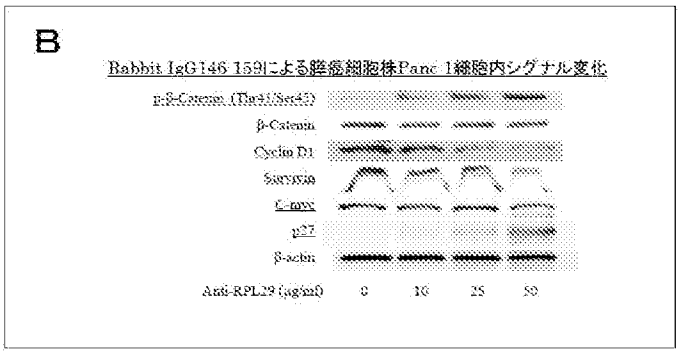


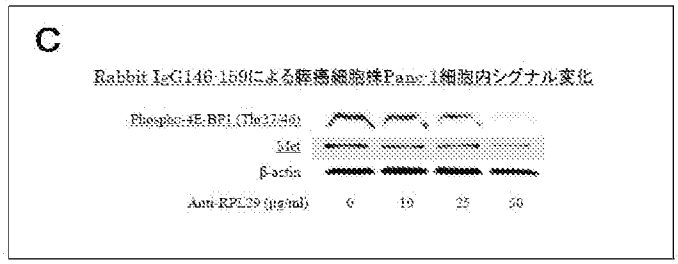
(B) Rabbit IgG146-159による細胞増殖抑制効果



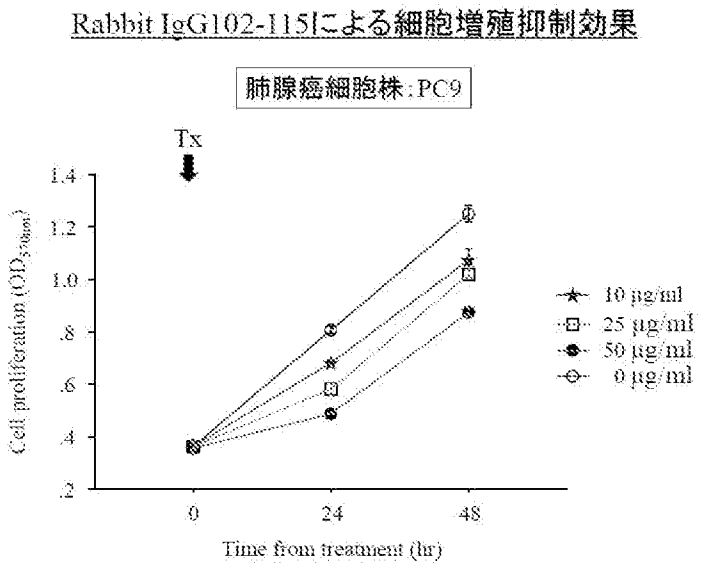
[図5]


A
Rabbit IgG146-159による膵癌細胞株Panc-1細胞内シグナル変化
Phospho-MDM2 (Ser166)
Phospho-p53 (Ser15)
p53
Bax
p21
β-actin
Anti-RPL29 (μg/ml) 0 10 25 50

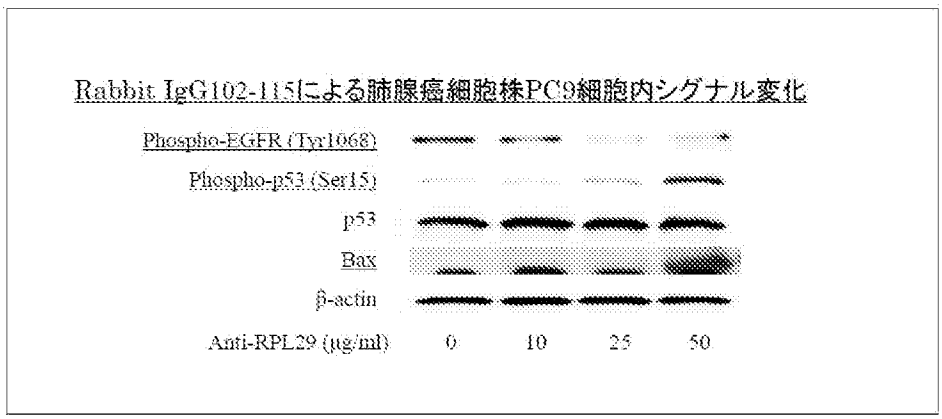

B
Rabbit IgG146-159による膵癌細胞株Panc-1細胞内シグナル変化
p-β-Catenin (Thr41/Ser45)
β-Catenin
Cyclin D1
Survivin
c-myc
p27
β-actin
Anti-RPL29 (μg/ml) 0 10 25 50

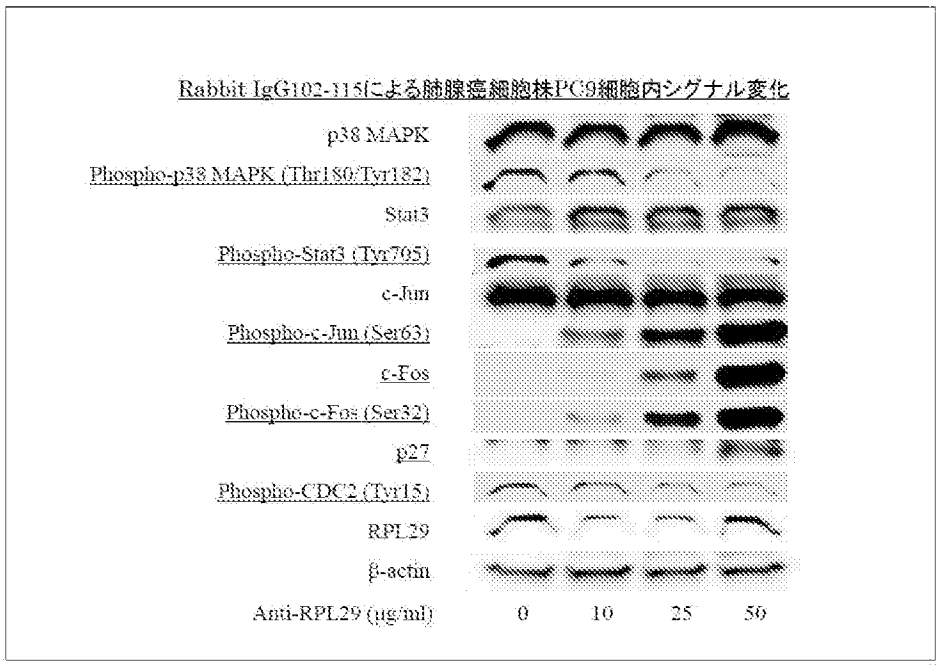

C
Rabbit IgG146-159による膵癌細胞株Panc-1細胞内シグナル変化
Phospho-4E-BP1 (Thr37/46)
Met
β-actin
Anti-RPL29 (μg/ml) 0 10 25 50

[図6]

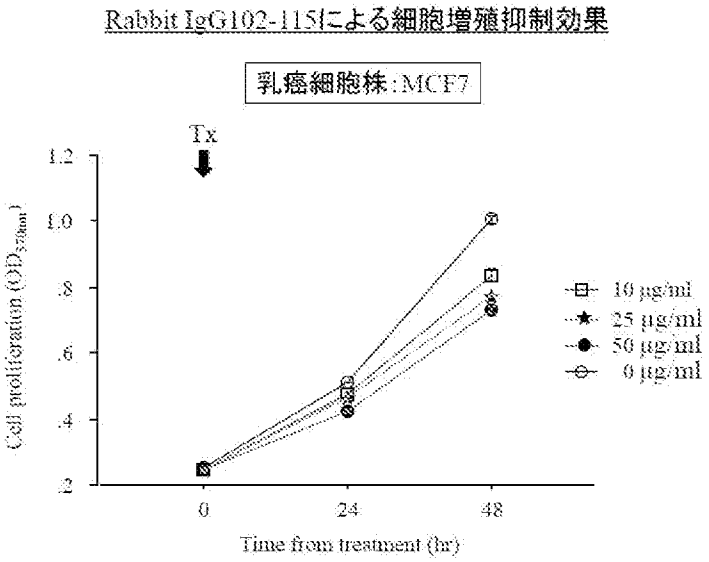

Rabbit IgG102-115による細胞増殖抑制効果
肺腺癌細胞株:PC9
Tx
Cell proliferation (OD570nm)
1.4
1.2
1.0
.8
.6
.4
.2
0
24
48
Time from treatment (hr)
10 μg/ml
25 μg/ml
50 μg/ml
0 μg/ml

[図7]

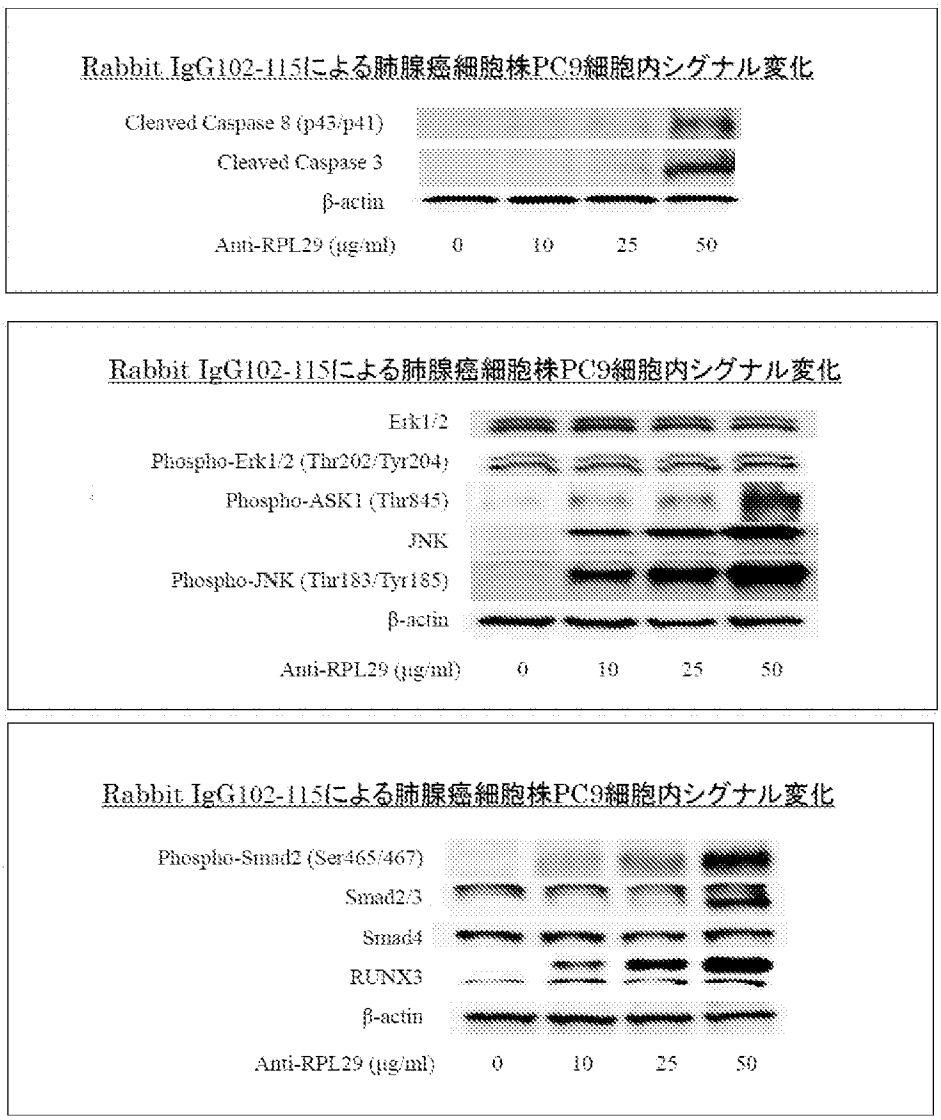

Rabbit IgG102-115による肺腺癌細胞株PC9細胞内シグナル変化
Phospho-EGFR (Tyr1068)
Phospho-p53 (Ser15)
p53
Bax
β-actin
Anti-RPL29 (μg/ml)
0
10
25
50


Rabbit IgG102-115による肺腺癌細胞株PC9細胞内シグナル変化
p38 MAPK
Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182)
Stat3
Phospho-Stat3 (Tyr705)
c-Jun
Phospho-c-Jun (Ser63)
c-Fos
Phospho-c-Fos (Ser32)
p27
Phospho-CDC2 (Tyr15)
RPL29
β-actin
Anti-RPL29 (μg/ml)
0
10
25
50

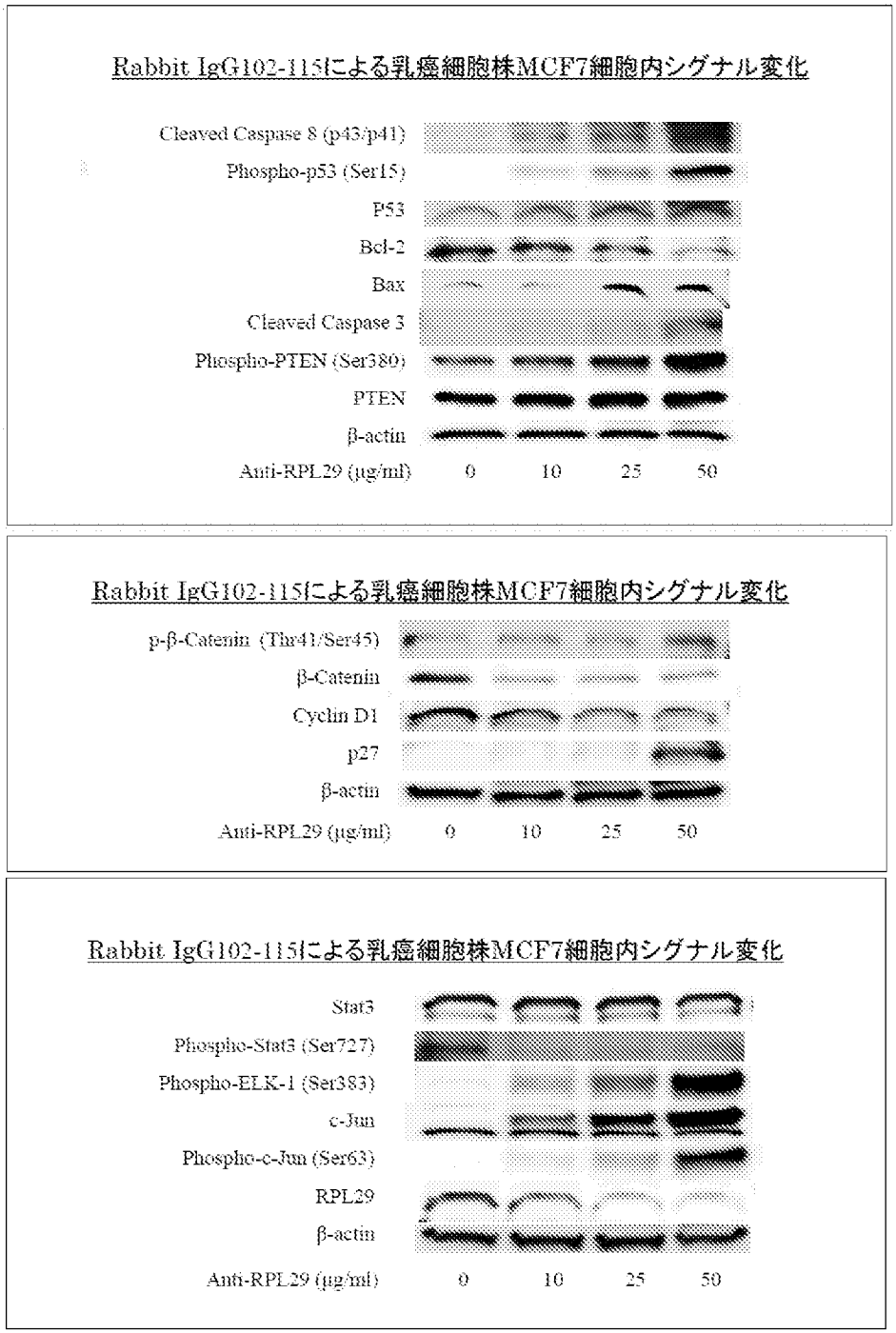
[図8]


Rabbit IgG102-115による細胞増殖抑制効果
乳癌細胞株:MCF7
Tx
Cell proliferation (OD570nm)
1.2
1.0
.8
.6
.4
.2
0
24
48
Time from treatment (hr)
10 μg/ml
25 μg/ml
50 μg/ml
0 μg/ml

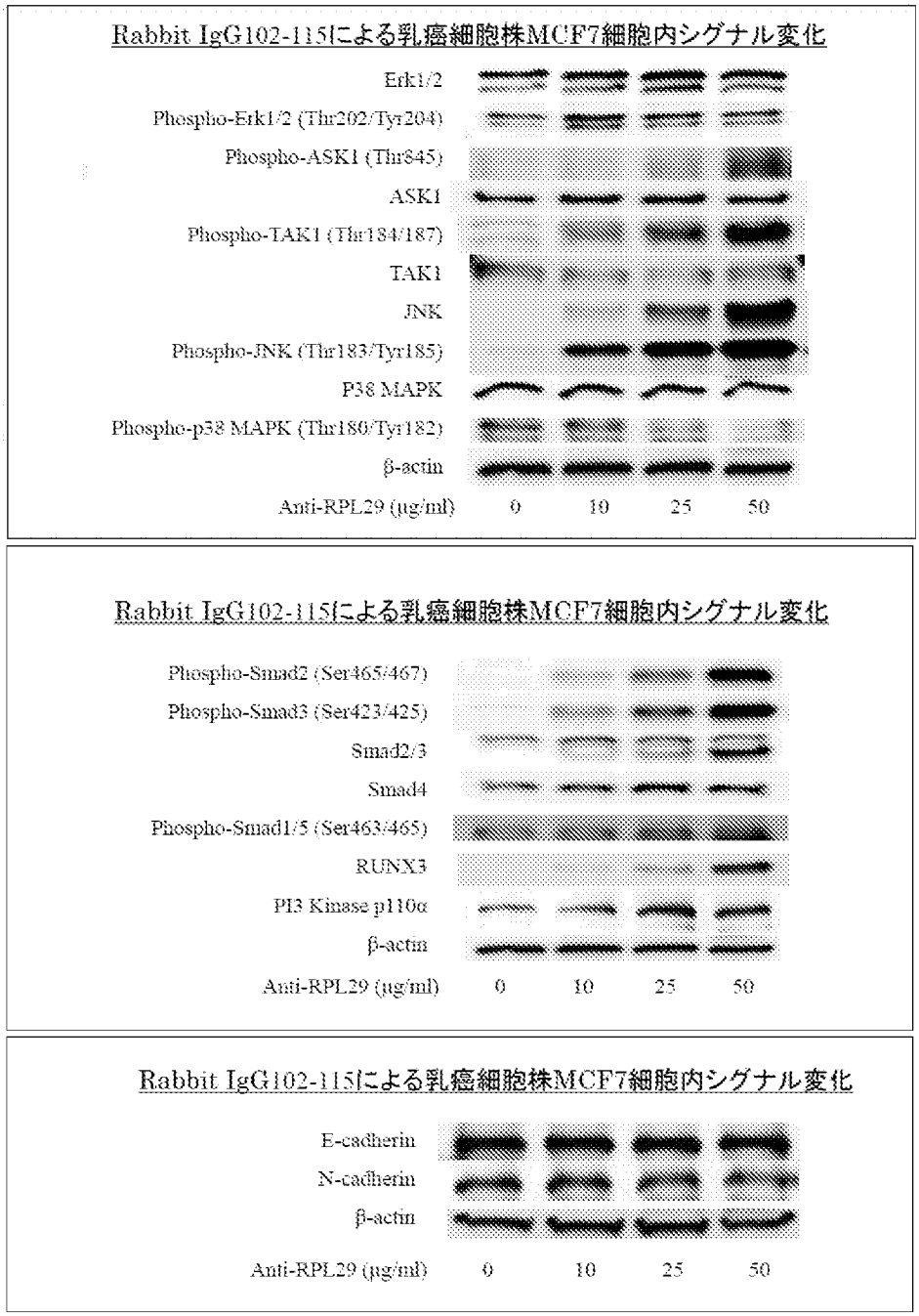
[図9]


Rabbit IgG102-115による肺腺癌細胞株PC9細胞内シグナル変化
Cleaved Caspase 8 (p43/p41)
Cleaved Caspase 3
β-actin
Anti-RPL29 (μg/ml) 0 10 25 50
Rabbit IgG102-115による肺腺癌細胞株PC9細胞内シグナル変化
Erk1/2
Phospho-Erk1/2 (Thr202/Tyr204)
Phospho-ASK1 (Thr845)
JNK
Phospho-JNK (Thr183/Tyr185)
β-actin
Anti-RPL29 (μg/ml) 0 10 25 50
Rabbit IgG102-115による肺腺癌細胞株PC9細胞内シグナル変化
Phospho-Smad2 (Ser465/467)
Smad2/3
Smad4
RUNX3
β-actin
Anti-RPL29 (μg/ml) 0 10 25 50

[図10]


Rabbit IgG102-115による乳癌細胞株MCF7細胞内シグナル変化
Cleaved Caspase 8 (p43/p41)
Phospho-p53 (Ser15)
P53
Bcl-2
Bax
Cleaved Caspase 3
Phospho-PTEN (Ser380)
PTEN
β-actin
Anti-RPL29 (μg/ml) 0 10 25 50
Rabbit IgG102-115による乳癌細胞株MCF7細胞内シグナル変化
p-β-Catenin (Thr41/Ser45)
β-Catenin
Cyclin D1
p27
β-actin
Anti-RPL29 (μg/ml) 0 10 25 50
Rabbit IgG102-115による乳癌細胞株MCF7細胞内シグナル変化
Stat3
Phospho-Stat3 (Ser727)
Phospho-ELK-1 (Ser383)
c-Jun
Phospho-c-Jun (Ser63)
RPL29
β-actin
Anti-RPL29 (μg/ml) 0 10 25 50

[図11]


Rabbit IgG102-115による乳癌細胞株MCF7細胞内シグナル変化
Erk1/2
Phospho-Erk1/2 (Thr202/Tyr204)
Phospho-ASK1 (Thr845)
ASK1
Phospho-TAK1 (Thr184/187)
TAK1
JNK
Phospho-JNK (Thr183/Tyr185)
P38 MAPK
Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182)
β-actin
Anti-RPL29 (μg/ml) 0 10 25 50
Rabbit IgG102-115による乳癌細胞株MCF7細胞内シグナル変化
Phospho-Smad2 (Ser465/467)
Phospho-Smad3 (Ser423/425)
Smad2/3
Smad4
Phospho-Smad1/5 (Ser463/465)
RUNX3
PI3 Kinase p110α
β-actin
Anti-RPL29 (μg/ml) 0 10 25 50
Rabbit IgG102-115による乳癌細胞株MCF7細胞内シグナル変化
E-cadherin
N-cadherin
β-actin
Anti-RPL29 (μg/ml) 0 10 25 50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2015/065749

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
A61K39/00(2006.01)i, *A61K39/395*(2006.01)i, *A61P35/00*(2006.01)i, *A61P43/00*(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)
A61K39/00, A61K39/395, A61P35/00, A61P43/00

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	1996-2015
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2015	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2015

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(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 2013/111770 A1 (Okayama University), 01 August 2013 (01.08.2013), entire text; particularly, claims; paragraph [0021]; referential examples 1 to 7; examples 1 to 13 & US 2015/0004183 A1	1-8

☐ 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	Date of mailing of the international search report
08 July 2015 (08.07.15)	21 July 2015 (21.07.15)

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
Japan Patent Office 3-4-3,Kasumigaseki,Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915,Japan	Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１５／０６５７４９

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　A61K39/00(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P43/00(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（ＩＰＣ））

Int.Cl.　A61K39/00, A61K39/395, A61P35/00, A61P43/00

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	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０１５年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１５年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１５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）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (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	関連する請求項の番号
X	WO 2013/111770 A1 (国立大学法人　岡山大学) 2013.08.01, 全文、特に、請求の範囲、[0021]、参考例１－７，実施例１－１３ & US 2015/0004183 A1	1-8

☐　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	国際調査報告の発送日
０８．０７．２０１５	２１．０７．２０１５

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）　４Ｕ　５２７７
長岡　真
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４３９