



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105452294 B

(45)授权公告日 2019.08.02

(21)申请号 201480044559.2

(22)申请日 2014.08.08

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105452294 A

(43)申请公布日 2016.03.30

(30)优先权数据
2013-166164 2013.08.09 JP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2016.02.05

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2014/071094 2014.08.08

(87)PCT国际申请的公布数据
W02015/020212 JA 2015.02.12

(73)专利权人 东丽株式会社
地址 日本东京都

(72)发明人 冈野文义 斋藤孝则 南田佳孝
井户隆喜

(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所
11247
代理人 曾祯 段承恩

(51)Int.Cl.
C07K 16/18(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)
A61K 45/00(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61P 35/02(2006.01)
C07K 16/46(2006.01)
C12N 15/09(2006.01)
C12P 21/08(2006.01)

审查员 李颖

权利要求书2页 说明书33页
序列表40页

(54)发明名称

癌的治疗和/或预防用药物组合物

(57)摘要

本发明提供以CAPRIN-1为靶标的、比现有抗体抗肿瘤活性优异的抗体、以及该抗体作为癌的治疗和/或预防剂的用途。本发明提供以在癌细胞的表面特异性表达的CAPRIN-1多肽作为靶标的抗体、以及作为癌的治疗和/或预防剂的抗体的用途。提供抗体或其片段,包含重链可变区和轻链可变区,且与CAPRIN-1蛋白质具有免疫反应性,所述重链可变区包含序列号1、2和3的互补决定区,所述轻链可变区包含序列号4、5和6的互补决定区;以及包含该抗体或片段作为有效成分的用于癌的治疗和/或预防的药物组合物。

1. 抗体或其片段, 包含重链可变区和轻链可变区, 且与CAPRIN-1蛋白质具有免疫反应性, 所述重链可变区的互补决定区的序列依次为序列号1、2和3, 所述轻链可变区的互补决定区的序列依次为序列号4、5和6。

2. 根据权利要求1所述的抗体或其片段, 重链可变区包含序列号8的氨基酸序列, 且轻链可变区包含序列号15的氨基酸序列。

3. 根据权利要求1所述的抗体或其片段, 重链可变区包含序列号10的氨基酸序列, 且轻链可变区包含序列号15的氨基酸序列。

4. 根据权利要求1所述的抗体或其片段, 重链可变区包含序列号7的氨基酸序列, 且轻链可变区包含序列号15的氨基酸序列。

5. 根据权利要求1所述的抗体或其片段, 重链可变区包含序列号8的氨基酸序列, 且轻链可变区包含序列号13的氨基酸序列。

6. 根据权利要求1所述的抗体或其片段, 重链可变区包含序列号7的氨基酸序列, 且轻链可变区包含序列号12的氨基酸序列。

7. 根据权利要求1所述的抗体或其片段, 重链可变区包含序列号8的氨基酸序列, 且轻链可变区包含序列号12的氨基酸序列。

8. 根据权利要求1所述的抗体或其片段, 重链可变区包含序列号7的氨基酸序列, 且轻链可变区包含序列号13的氨基酸序列。

9. 根据权利要求1所述的抗体或其片段, 重链可变区包含序列号10的氨基酸序列, 且轻链可变区包含序列号14的氨基酸序列。

10. 根据权利要求1所述的抗体或其片段, 重链可变区包含序列号8的氨基酸序列, 且轻链可变区包含序列号11的氨基酸序列。

11. 根据权利要求1所述的抗体或其片段, 重链可变区包含序列号7的氨基酸序列, 且轻链可变区包含序列号11的氨基酸序列。

12. 根据权利要求1所述的抗体或其片段, 重链可变区包含序列号9的氨基酸序列, 且轻链可变区包含序列号15的氨基酸序列。

13. 根据权利要求1所述的抗体或其片段, 重链可变区包含序列号20的氨基酸序列, 且轻链可变区包含序列号21的氨基酸序列。

14. 根据权利要求1~13的任一项所述的抗体或其片段, 所述抗体是人源化抗体、嵌合抗体、单链抗体或多特异性抗体。

15. 根据权利要求1~13的任一项所述的抗体或其片段, 缀合了抗肿瘤剂。

16. 根据权利要求1~13的任一项所述的抗体或其片段, 所述抗体的重链恒定区中包含1个或多个氨基酸替换。

17. 根据权利要求1~13的任一项所述的抗体或其片段, 所述抗体是除去了岩藻糖的抗体, 所述岩藻糖结合于糖链还原末端的N-乙酰葡萄糖胺, 所述糖链是结合于重链恒定区的N-糖苷键糖链。

18. 抗体的组合物, 是所述抗体的组合物, 包含: 权利要求17所述的抗体、和在糖链还原末端的N-乙酰葡萄糖胺上结合了岩藻糖的权利要求1~16的任一项所述的抗体, 所述糖链是结合于重链恒定区的N-糖苷键糖链。

19. 细胞, 产生权利要求17所述的抗体或权利要求18所述的抗体的组合物。

20. 用于癌的治疗和/或预防的药物组合物,其特征在於,包含权利要求1~15的任一项所述的抗体或其片段、权利要求16或17所述的抗体或其片段、或者权利要求18所述的抗体的组合物作为有效成分。

21. 根据权利要求20所述的药物组合物,所述癌是乳癌、肾癌、胰癌、大肠癌、肺癌、脑瘤、胃癌、子宫癌、卵巢癌、前列腺癌、膀胱癌、食道癌、白血病、淋巴瘤、肝癌、胆囊癌、肉瘤、肥大细胞瘤、黑素瘤、肾上腺皮质癌、尤文氏瘤、霍奇金淋巴瘤、间皮瘤、多发性骨髓瘤、睾丸癌、甲状腺癌或头颈癌。

22. 用于癌的治疗和/或预防的组合药物,包含:权利要求20或21所述的药物组合物、和抗肿瘤剂。

23. DNA, 编码权利要求1~16的任一项所述的抗体或其片段。

24. 权利要求1~16的任一项所述的抗体或其片段、权利要求17所述的抗体、或权利要求18所述的抗体的组合物的用途,用于制造用于癌的治疗和/或预防的药物组合物或组合药物。

癌的治疗和/或预防用药物组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及针对CAPRIN-1的抗体或其片段的作为癌的治疗和/或预防剂等的新的医药用途。

背景技术

[0002] 癌是占有所有死亡原因的第一位的疾病,现行的治疗是以手术疗法为主、组合放疗法和化疗法的治疗。尽管近年来开发了新的手术方法、发现了新的抗癌剂,但现状是除了一部分癌以外,癌的治疗成绩并没有多大提高。近年来,随着分子生物学、癌免疫学的进步,与癌特异性地反应的抗体类、由细胞毒性T细胞识别的癌抗原类、编码癌抗原的基因类等被鉴定,对以癌抗原类为靶的特异性的癌治疗法的期待正在提高。

[0003] 细胞质增殖相关蛋白1 (Cytoplasmic-activation and proliferation-associated protein 1, CAPRIN-1) 作为已知在分裂间期的正常细胞发生活化和/或细胞分裂时表达,并在细胞内与RNA形成细胞内应激颗粒而参与mRNA的转运、翻译的控制等的细胞内蛋白质被知晓,并被发现在癌细胞的表面特异性地表达,作为用于癌治疗的抗体药物的靶正在被进行研究(专利文献1~19)。

[0004] 现有技术文献

[0005] 专利文献

[0006] 专利文献1:W02010/016526

[0007] 专利文献2:W02011/096517

[0008] 专利文献3:W02011/096528

[0009] 专利文献4:W02011/096519

[0010] 专利文献5:W02011/096533

[0011] 专利文献6:W02011/096534

[0012] 专利文献7:W02011/096535

[0013] 专利文献8:W02013/018886

[0014] 专利文献9:W02013/018894

[0015] 专利文献10:W02013/018892

[0016] 专利文献11:W02013/018891

[0017] 专利文献12:W02013/018889

[0018] 专利文献13:W02013/018883

[0019] 专利文献14:W02013/125636

[0020] 专利文献15:W02013/125654

[0021] 专利文献16:W02013/125630

[0022] 专利文献17:W02013/125640

[0023] 专利文献18:W02013/147169

[0024] 专利文献19:W02013/147176

发明内容

[0025] 发明要解决的课题

[0026] 本发明的目的是制作出以在癌细胞的表面特异性地表达的CAPRIN-1为靶的、与现有的抗体相比抗肿瘤活性优异的抗体,提供作为癌的治疗和/或预防剂的用途。

[0027] 用于解决课题的技术方案

[0028] 本发明具有以下特征。

[0029] 在本发明中,提供用于癌的治疗和/或预防的药物组合物,其特征在于,包含抗体或其片段作为有效成分,所述抗体或其片段包含重链可变区和轻链可变区,且与CAPRIN-1蛋白质具有免疫反应性,所述重链可变区包含序列号1、2和3的互补决定区,所述轻链可变区包含序列号4、5和6的互补决定区。

[0030] 在其实施方式中,上述癌是乳癌、肾癌、胰癌、大肠癌、肺癌、脑瘤、胃癌、子宫癌、卵巢癌、前列腺癌、膀胱癌、食道癌、白血病、淋巴瘤、肝癌、胆囊癌、肉瘤、肥大细胞瘤、黑素瘤、肾上腺皮质癌、尤文氏瘤、霍奇金淋巴瘤、间皮瘤、多发性骨髓瘤、睾丸癌、甲状腺癌、或头颈癌。

[0031] 在其他实施方式中,上述抗体是人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、单链型抗体或多特异性抗体(例如双特异性抗体)。

[0032] 本说明书包含作为本申请的优先权基础的日本专利申请2013-166164号的说明书和/或附图所记载的内容。

[0033] 发明的效果

[0034] 本发明所涉及的针对CAPRIN-1的抗体毒害癌细胞。因此,本发明所涉及的针对CAPRIN-1的抗体在癌的治疗和/或预防中是有用的。

具体实施方式

[0035] 本发明中使用的针对CAPRIN-1的多肽的抗体的抗肿瘤活性如后所述,通过在生物体外检查对表达该多肽的肿瘤细胞是否显示介由免疫细胞的细胞毒活性来评价,或者在生物体内检查对荷癌动物的肿瘤增殖抑制来评价。

[0036] 本发明所涉及的上述针对CAPRIN-1的抗体可以是单克隆抗体或多克隆抗体,优选为单克隆抗体,只要能够发挥抗肿瘤活性就可以是任何种类的抗体,包含例如,重组抗体(例如,合成抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体)、人源化抗体、嵌合抗体、单链抗体(scFv)等)、人抗体、它们的抗体片段(例如,Fab、F(ab')₂、Fv)等。这些抗体及其片段还可以通过本领域技术人员公知的方法制备。另外,在受试者是人的情况下,为了避免或抑制排斥反应,优选为人抗体或人源化抗体。

[0037] “与CAPRIN-1蛋白质特异性地结合”,是指与CAPRIN-1蛋白质特异性地结合,与除了CAPRIN-1蛋白质以外的蛋白质实质上不结合。

[0038] 另外,本发明中作为癌的治疗和/或预防的对象的受试者是人、宠物、家畜类、竞技用动物等哺乳动物,优选的受试者是人。

[0039] 以下,以下关于涉及本发明的抗原的制作、抗体的制作、以及药物组合物进行说明。

[0040] <抗体制作用抗原的制作>

[0041] 作为用于获取本发明所涉及的针对CAPRIN-1的抗体的致敏抗原使用的蛋白质或其片段,可以来源于人、狗、猫、牛、马、小鼠、大鼠、鸡等,对成为其来源的动物种类没有限制。但是优选考虑与在细胞融合中使用的母细胞的相容性来选择。一般来说,优选来源于哺乳动物的蛋白质,特别优选来源于人的蛋白质。例如当CAPRIN-1是人CAPRIN-1时,可以使用人CAPRIN-1蛋白质和/或其部分肽、表达人CAPRIN-1的细胞等。

[0042] 人CAPRIN-1及其同源物的碱基序列和氨基酸序列例如可以通过登录GenBank(美国NCBI),利用BLAST、FASTA等算法(Karlin and Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 5873-5877, 1993; Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402, 1997)来得到。

[0043] 在本发明中,当以人CAPRIN-1的碱基序列(序列号16或18)或氨基酸序列(序列号17或19)为基准时,包含与它们的ORF或成熟部分的碱基序列或氨基酸序列具有70%~100%、优选80%~100%、更优选90%~100%、进一步优选95%~100%、例如97%~100%、98%~100%、99%~100%或99.5%~100%的序列同一性的序列的核酸或蛋白质成为靶CAPRIN-1(将序列号17与序列号19的氨基酸序列比较,则690位以后的氨基酸残基不同)。这里,“%序列同一性”是将2个序列在导入间隙或不导入间隙的情况下以形成最大的类似度(或一致度)的方式比对(对齐)时,相同氨基酸(或碱基)相对于氨基酸(或碱基)的总数(包含间隙的数)的百分比(%)。

[0044] CAPRIN-1蛋白质的片段具有从作为由抗体所识别的最小单位的表位(抗原决定簇)的氨基酸长度至小于该蛋白质的全长的长度。表位是指在哺乳动物、优选人中具有抗原性或免疫原性的多肽片段,其最小单位包含约7~12个氨基酸、例如8~11个氨基酸。

[0045] 上述的人CAPRIN-1蛋白质和/或包含其部分肽的多肽片段可以按照例如Fmoc法(苄基甲基氧基羰基法)、tBoc法(叔丁基氧基羰基法)等化学合成法来合成(日本生化学会编、生化学实验讲座1、蛋白质的化学(蛋白质的化学)IV、化学修飾と肽合成(化学修饰和肽合成)、东京化学同人(日本)、1981年)。另外,还可以利用各种市售的肽合成仪通过常规方法合成。另外,可以使用公知的基因工程学方法(Sambrook等, Molecular Cloning, 第2版, Current Protocols in Molecular Biology(1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press、Ausubel等, Short Protocols in Molecular Biology, 第3版, A compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology(1995), John Wiley & Sons等),制备编码上述多肽的多核苷酸,将该多核苷酸整合到表达载体中并导入宿主细胞,在该宿主细胞中生产多肽,从而得到作为目的的人CAPRIN-1蛋白质和/或其多肽片段。

[0046] 编码上述多肽的多核苷酸可以通过公知的基因工程学方法和/或使用了市售的核酸合成仪的常规方法来容易地制备。例如包含人CAPRIN-1基因的碱基序列的DNA可以通过使用人染色体DNA或cDNA文库作为模板,使用以能扩增该碱基序列的方式设计的一对引物进行PCR,从而制备。PCR的反应条件可以适当设定,可以列举例如,使用耐热性DNA聚合酶(例如, Taq聚合酶、Pfu聚合酶等)和含有Mg²⁺的PCR缓冲液,将包含在94℃保持30秒(变性)、在55℃保持30秒~1分钟(退火)、在72℃保持2分钟(延伸)的反应过程作为1个循环,例如,进行30个循环后,在72℃反应7分钟的条件等,但不仅限于此。对于PCR的方法、条件等,例如记载于Ausubel等, Short Protocols in Molecular Biology, 第3版, A compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology(1995), John Wiley & Sons(特别是第15章)中。

[0047] 另外,可以基于CAPRIN-1基因碱基序列和CAPRIN-1蛋白质的氨基酸序列信息,制备合适的探针和/或引物,使用该探针和/或引物来对人等的cDNA文库进行筛选,从而分离所需的DNA。cDNA文库优选由表达CAPRIN-1的蛋白质的细胞、器官或组织来制作。这样的细胞或组织的例子是来源于精巢、以及白血病、乳癌、淋巴瘤、脑瘤、肺癌、胰癌、大肠癌、肾癌、胃癌、子宫癌、卵巢癌、前列腺癌、膀胱癌、食道癌、肉瘤、肥大细胞瘤、肝癌、胆囊癌、黑素瘤、肾上腺皮质癌、尤文氏瘤、霍奇金淋巴瘤、间皮瘤、多发性骨髓瘤、睾丸癌、甲状腺癌或头颈癌等的癌或肿瘤的细胞或组织。上述探针或引物的制备、cDNA文库的构建、cDNA文库的筛选、以及目的基因的克隆化等操作对于本领域技术人员而言是已知的,可以按照例如 Sambrook等, *Molecular Cloning*, 第2版, *Current Protocols in Molecular Biology* (1989)、Ausbel等(上述)等所记载的方法来进行。由这样得到的DNA,可以获得编码人CAPRIN-1蛋白质和/或其部分肽的DNA。

[0048] 作为导入表达载体的上述宿主细胞,只要是可表达上述多肽的细胞,就可以是任何细胞,作为原核细胞的例子可以列举大肠杆菌等,作为真核细胞的例子可以列举猴肾脏细胞COS1、中国仓鼠卵巢细胞CHO等哺乳动物细胞、人胎儿肾脏细胞株HEK293、小鼠胚胎皮肤细胞株NIH3T3、芽殖酵母、裂殖酵母等的酵母细胞、蚕细胞、爪蟾卵细胞等,但不限于这些。

[0049] 当使用原核细胞作为宿主细胞时,作为表达载体,使用具有能在原核细胞中复制的复制起点(Origin)、启动子、核糖体结合部位、多克隆位点、终止子、抗药性基因、营养缺陷型互补基因等的表达载体。作为大肠杆菌用表达载体,可以例示pUC系、pBluescriptII、pET表达系统、pGEX表达系统等。如果将编码上述多肽的DNA整合到这样的表达载体中,用该载体转化原核宿主细胞后,培养所得的转化体,则可以在原核宿主细胞中表达由上述DNA编码的多肽。此时,也可以将该多肽制成与其他蛋白质的融合蛋白质来表达。

[0050] 当使用真核细胞作为宿主细胞时,作为表达载体,使用具有启动子、剪接区、多聚(A)添加部位等的真核细胞用表达载体。作为这样的表达载体,可以例示pKA1、pCDM8、pSVK3、pMSG、pSVL、pBK-CMV、pBK-RSV、EBV载体、pRS、pcDNA3、pYES2等。与上述同样地,如果将编码上述多肽的DNA整合到这样的表达载体中,用该载体转化真核宿主细胞后,培养所得的转化体,则可以在真核宿主细胞中表达由上述DNA编码的多肽。当使用pIND/V5-His、pFLAG-CMV-2、pEGFP-N1、pEGFP-C1等作为表达载体时,可以作为附加了His标签(例如,(His)₆~(His)₁₀)、FLAG标签、myc标签、HA标签、GFP等各种标签的融合蛋白质表达上述多肽。

[0051] 表达载体向宿主细胞中的导入可以使用电穿孔法、磷酸钙法、脂质体法、DEAE葡聚糖法、显微注射、病毒感染、脂质体转染、与细胞膜透过性肽的结合等周知的方法。

[0052] 为了从宿主细胞中分离纯化目的多肽,可以将公知的分离操作组合来进行。可以列举例如,利用脲等变性剂和/或表面活性剂的处理、超声波处理、酶消化、盐析和/或溶剂分别沉淀法、透析、离心分离、超滤、凝胶过滤、SDS-PAGE、等电点电泳、离子交换层析、疏水层析、亲和层析、反相层析等,但不限于此。

[0053] 为了制作本发明的抗体,可以将如上制作的抗原如后述那样作为致敏抗原使用。

[0054] <抗体的结构>

[0055] 抗体(免疫球蛋白)通常是至少含有2条重链和2条轻链的杂多聚体糖蛋白质。除了

IgM以外,免疫球蛋白是由2条相同的轻(L)链和2条相同的重(H)链构成的约150kDa的杂四聚体糖蛋白质。典型地,各个轻链通过1个二硫共价键与重链连接,但在各种免疫球蛋白同种型的重链之间二硫键的数量有变化。各个重链和轻链也具有链内二硫键。各个重链在一端具有可变区(VH区),几个恒定区与其连接。各个轻链具有可变区(VL区),在其相反端具有1个恒定区。轻链的恒定区与重链最初的恒定区对齐,且轻链可变区与重链的可变区对齐。抗体的可变区通过被称为互补性决定区(CDR)的特定区域而表现特定的可变性,从而赋予抗体以结合特异性。在可变区中相对保守的部分被称为框架区(framework region;FR)。完整的重链和轻链的可变区包含3个互补决定区由4个框架区连接而成的结构,即从N末起FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3和FR4依次连接而成的结构。3个互补决定区在重链中从其N末端依次被称为CDRH1、CDRH2、CDRH3,同样在轻链中被称为CDRL1、CDRL2、CDRL3。在抗体对抗原的结合特异性中,CDRH3最为重要。另外,各链的CDR通过框架区以接近的状态被保持在一起,与来自其他链的互补决定区一同有助于抗体的抗原结合部位的形成。恒定区不直接有助于抗体与抗原结合,但表现各种效应器功能,例如,显示与抗体依赖性细胞性细胞毒活性(ADCC)的相关、介由对Fc γ 受体的结合而产生的吞噬作用(ADCP)、介由新生儿Fc受体(FcRn)的半衰期/清除速度、介由补体级联的C1q构成要素的补体依赖性细胞毒(CDC)。

[0056] <抗体的制作>

[0057] 本发明中的抗CAPRIN-1抗体是指与CAPRIN-1蛋白质的全长或其片段具有免疫反应性的抗体。

[0058] 这里,“免疫反应性”是指在生物体内抗体与CAPRIN-1抗原(CAPRIN-1蛋白质的全长或其部分多肽)结合的特性。介由本发明的抗体对CAPRIN-1的这样的结合而对肿瘤细胞发挥毒害(例如,死灭、抑制或衰退)的功能。本发明的抗体与CAPRIN-1蛋白质结合,从而可以毒害肿瘤,例如,乳癌、肾癌、胰癌、大肠癌(例如,结肠癌)、肺癌、脑瘤、胃癌、子宫癌、卵巢癌、前列腺癌、膀胱癌、食道癌、白血病、淋巴瘤、肝癌、胆囊癌、肉瘤、肥大细胞瘤、黑素瘤、肾上腺皮质癌、尤文氏瘤、霍奇金淋巴瘤、间皮瘤、多发性骨髓瘤、睾丸癌、甲状腺癌或头颈癌等。

[0059] 本发明的抗体优选只要是单克隆抗体就不特别限定,包含合成抗体、多特异性抗体(例如双特异抗体、三特异抗体等)、人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、单链抗体、抗体片段(例如,Fab、F(ab')₂、Fv)等。另外,抗体是免疫球蛋白分子的任意类例如IgG、IgE、IgM、IgA、IgD和IgY,或任意亚类例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2等。

[0060] 抗体进而除了糖基化以外,也可以通过去糖基化、乙酰化、甲酰化、酰胺化、磷酸化、或聚乙二醇(PEG)化等而被修饰。

[0061] 以下显示各种单克隆抗体的制作例。

[0062] 例如将表达CAPRIN-1的乳癌细胞株SK-BR-3等施与小鼠而进行免疫,从该小鼠取出脾脏,将细胞分离,然后使该细胞与小鼠骨髓瘤细胞融合,从所得的融合细胞(杂交瘤)中选择产生具有癌细胞增殖抑制作用的抗体的克隆。分离产生具有癌细胞增殖抑制作用的单克隆抗体的杂交瘤,培养该杂交瘤,从培养上清通过一般的亲和纯化法来纯化抗体,从而制备本发明的抗体。

[0063] 产生单克隆抗体的杂交瘤例如,也可以如下地制作。首先,按照公知的方法,用致敏抗原对动物进行免疫。作为一般的方法,可以通过将致敏抗原向哺乳动物的腹腔内或皮

下注射来进行。具体来说,可以将致敏抗原用PBS(磷酸盐缓冲液,Phosphate-Buffered Saline)和/或生理盐水等稀释成适当量、进行悬浮,在所得的悬浮液中根据需要适量混合通常的佐剂、例如弗氏完全佐剂,乳化后,每4~21天对哺乳动物施与,施与数次。另外,致敏抗原免疫时也可以使用合适的载体。

[0064] 这样将哺乳动物进行免疫,确认在血清中所需的抗体水平升高,然后从哺乳动物采取免疫细胞,进行细胞融合,作为优选的免疫细胞,特别可以列举脾细胞。

[0065] 作为与上述免疫细胞融合的其他母细胞,使用哺乳动物的骨髓瘤细胞。作为该骨髓瘤细胞,优选使用公知的各种细胞株,例如P3U1(P3-X63Ag8U1)、P3(P3x63Ag8.653)(*J.Immunol.*(1979)123,1548-1550)、P3x63Ag8U.1(*Current Topics in Microbiology and Immunology*(1978)81,1-7)、NS-1(Kohler,G.and Milstein,C.*Eur.J.Immunol.*(1976)6,511-519)、MPC-11(Margulies,D.H.et al.,*Cell*(1976)8,405-415)、SP2/0(Shulman,M.et al.,*Nature*(1978)276,269-270)、F0(deSt.Groth,S.F.et al.,*J.Immunol.Methods*(1980)35,1-21)、S194(Trowbridge,I.S.J.*Exp.Med.*(1978)148,313-323)、R210(Galfre,G.et al.,*Nature*(1979)277,131-133)、240E-1、240E-W以及240E-W2等。

[0066] 上述免疫细胞与骨髓瘤细胞的细胞融合基本上可以按照公知的方法,例如Kohler和Milstein的方法(Kohler,G.and Milstein,C.*Methods Enzymol.*(1981)73,3-46)等进行。

[0067] 更具体地,上述细胞融合例如可在细胞融合促进剂的存在下、在通常的营养培养液中实施。作为融合促进剂,可以使用例如聚乙二醇(PEG)、仙台病毒(HVJ)等,进而根据需要为了提高融合效率,还可以添加使用二甲基亚砷等助剂。

[0068] 免疫细胞与骨髓瘤细胞的使用比例可以任意地设定。作为在上述细胞融合中使用的培养液,可以使用例如,适合上述骨髓瘤细胞株的增殖的RPMI1640培养液、MEM培养液、其他可以在这种细胞培养中使用的通常的培养液,进一步也可以合并使用胎牛血清(FCS)等血清补液。

[0069] 在细胞融合中,将规定量的上述免疫细胞和骨髓瘤细胞在上述培养液中充分混合,将预先加温至37℃左右的PEG溶液(例如平均分子量1000~6000左右)以通常30~60%(w/v)的浓度添加、混合,由此形成作为目的的杂交瘤。接着,优选将逐次添加适当的培养液、离心除去上清的操作反复进行,由此除去对于杂交瘤的生长不利的细胞融合剂等。

[0070] 这样得到的杂交瘤可以通过在通常的选择培养液,例如HAT培养液(含有次黄嘌呤、氨基嘌呤和胸腺嘧啶脱氧核苷的培养液)中培养来选择。上述HAT培养液中的培养持续对于除了作为目的的杂交瘤以外的细胞(非融合细胞)死灭充分的时间(通常数天~数周)。然后,实施通常的有限稀释法,进行产生目的抗体的杂交瘤的筛选和单克隆化。

[0071] 另外,除了对除人以外的动物免疫抗原来得到上述杂交瘤以外,还可以将人淋巴细胞、例如感染了EB病毒的人淋巴细胞在体外(*in vitro*)用蛋白质、蛋白质表达细胞或其溶解物致敏,使致敏淋巴细胞与来源于人的具有永久分裂能力的骨髓瘤细胞、例如U266(注册号TIB196)融合,得到产生具有所希望的活性(例如,细胞增殖抑制活性)的人抗体的杂交瘤。

[0072] 这样制备的产生单克隆抗体的杂交瘤可以在通常的培养液中传代培养,另外,可在液氮中长期保存。

[0073] 即,可以使用所需抗原或表达所需抗原的细胞作为致敏抗原,按照通常的免疫方法进行免疫,利用通常的细胞融合法使所得的免疫细胞与公知的母细胞融合,通过通常的筛选法筛选产生单克隆抗体的细胞(杂交瘤),从而制作。

[0074] 抗原的制备可以根据例如使用了动物细胞的方法(日本特表2007-530068)和/或使用了杆状病毒的方法(例如,国际公开第W098/46777号等)等进行。当抗原的免疫原性低时,可以使其与白蛋白等具有免疫原性的巨大分子结合而进行免疫。抗原也可以与佐剂一起施与而进行免疫。

[0075] 本发明的抗体进一步还可以作为将其抗体基因由杂交瘤克隆化,整合到适当的载体中,并将其导入宿主,使用基因重组技术而产生的基因重组型抗体而得到(参照例如Carl, A.K. Borrebaeck, James, W. Larrick, THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990)。具体来说,由杂交瘤的mRNA使用逆转录酶来合成抗体的可变区(V区)的cDNA。如果可得到编码目的抗体的V区的DNA,则将其与编码所希望的抗体恒定区(C区)的DNA连接,将连接产物整合到表达载体中。或者也可以将编码抗体的V区的DNA整合到包含抗体C区的DNA的表达载体中。上述DNA以在表达控制区域、例如增强子、启动子的控制下表达的方式整合到表达载体中。接着可以用该表达载体转化宿主细胞,使抗体表达。

[0076] 本发明的抗CAPRIN-1抗体的特征是优选为单克隆抗体,单克隆抗体包含人单克隆抗体、非人动物单克隆抗体(例如小鼠单克隆抗体、大鼠单克隆抗体、兔单克隆抗体、鸡单克隆抗体等)、嵌合单克隆抗体等。单克隆抗体可以通过培养杂交瘤来制作,所述杂交瘤通过将来自用CAPRIN-1蛋白质或其片段免疫的非人哺乳动物(例如小鼠、产生人抗体的小鼠、鸡、兔等)的脾细胞与骨髓瘤细胞的融合而得到。嵌合抗体是将来源于不同动物的序列组合而制作的抗体,例如是包含小鼠抗体的重链、轻链的可变区和人抗体的重链、轻链的恒定区的抗体等。嵌合抗体的制作可以使用公知的方法来进行,例如可以通过将编码抗体V区的DNA与编码人抗体C区的DNA连接,将其整合到表达载体中并导入宿主,而使其产生,从而得到。

[0077] 此外,在后述实施例中,制作了多种人源化单克隆抗体和人-兔嵌合单克隆抗体,确认了强抗肿瘤效果。这些单克隆抗体均在重链可变区(VH区域)包含序列号1的氨基酸序列所示的CDR1、序列号2的氨基酸序列所示的CDR2和序列号3的氨基酸序列所示的CDR3,在轻链可变区(VL区域)包含序列号4的氨基酸序列所示的CDR1、序列号5的氨基酸序列所示的CDR2和序列号6的氨基酸序列所示的CDR3。这些单克隆抗体分别包括:包含具有序列号7的氨基酸序列的VH区域和具有序列号11的氨基酸序列的VL区域的人源化抗体#0、包含具有序列号8的氨基酸序列的VH区域和具有序列号11的氨基酸序列的VL区域的人源化抗体#1、包含具有序列号8的氨基酸序列的VH区域和具有序列号12的氨基酸序列的VL区域的人源化抗体#2、包含具有序列号8的氨基酸序列的VH区域和具有序列号13的氨基酸序列的VL区域的人源化抗体#3、包含具有序列号7的氨基酸序列的VH区域和具有序列号12的氨基酸序列的VL区域的人源化抗体#4、包含具有序列号7的氨基酸序列的VH区域和具有序列号13的氨基酸序列的VL区域的人源化抗体#5、包含具有序列号7的氨基酸序列的VH区域和具有序列号15的氨基酸序列的VL区域的人源化抗体#6、包含具有序列号8的氨基酸序列的VH区域和具有序列号15的氨基酸序列的VL区域的人源化抗体#7、包含具有序列号9的氨基酸序列的VH

区域和具有序列号15的氨基酸序列的VL区域的人源化抗体#8、包含具有序列号10的氨基酸序列的VH区域和具有序列号14的氨基酸序列的VL区域的人源化抗体#9、包含具有序列号10的氨基酸序列的VH区域和具有序列号15的氨基酸序列的VL区域的人源化抗体#10、以及包含具有序列号20的氨基酸序列的VH区域和具有序列号21的氨基酸序列的VL区域的人-兔嵌合抗体。

[0078] 人源化抗体是也称为重构 (reshaped) 人抗体的改变抗体。人源化抗体通过将来源于免疫动物的抗体的互补决定区移植到人抗体的互补性决定区中来构建。其一般的基因重组方法也是已知的。

[0079] 具体来说,通过PCR法,由以末端部具有重叠部分的方式制作的数个寡核苷酸,合成以将例如小鼠抗体、兔抗体和/或鸡抗体的互补决定区与人抗体的框架区连接的方式设计的DNA序列。将所得的DNA与编码人抗体恒定区的DNA连接,接着整合到表达载体中,将其导入宿主而使其产生,从而得到人源化抗体(参照欧洲专利申请公开第EP239400号、国际公开第W096/02576号)。介由互补决定区连接的人抗体的人抗体的框架区可以选择使互补性决定区形成良好的抗原结合部位的框架区。根据需要,也可以替换抗体的可变区中的框架区的氨基酸,以使重构人抗体的互补性决定区形成适当的抗原结合部位(Sato K.et al., Cancer Research 1993,53:851-856)。另外,也可以替换为来源于各种人抗体的框架区(参照国际公开第W099/51743号)。

[0080] 在制作嵌合抗体或人源化抗体时,可以将可变区(例如,FR)和/或恒定区中的氨基酸用其他氨基酸替换等。

[0081] 氨基酸的替换是1个或多个、例如小于15个、小于10个、8个以下、7个以下、6个以下、5个以下、4个以下、3个以下、或2个以下的氨基酸、优选1~9氨基酸的替换,替换抗体应与未替换抗体在功能上等同。

[0082] 这里,“在功能上等同”是指成为对象的抗体与本发明的抗体具有同样的生物学或生物化学活性,具体来说,是指具有毒害肿瘤的功能、以及在对人应用时本质上不发生排斥反应等。作为这样的活性,可以列举例如细胞增殖抑制活性、或结合活性。

[0083] 作为用于制备与某多肽在功能上等同的多肽的本领域技术人员熟知的方法,已知在多肽中导入突变而进行氨基酸替换的方法。例如只要是本领域技术人员,就能够使用定点诱变法(Hashimoto-Gotoh,T.et al.,(1995)Gene 152,271-275、Zoller,MJ.,and Smith,M.(1983)Methods Enzymol.100,468-500、Kramer,W.et al.,(1984)Nucleic Acids Res.12,9441-9456、Kramer,W.and Fritz,HJ.,(1987)Methods Enzymol.154,350-367、Kunkel,TA.,(1985)Proc.Natl.Acad.Sci.USA.82,488-492、Kunkel(1988)Methods Enzymol.85,2763-2766)等,在本发明的抗体中导入适当氨基酸替换,由此制备与该抗体在功能上等同的抗体。

[0084] 在导入氨基酸替换时,期望替换是保守的氨基酸替换。保守的氨基酸替换是电荷、侧链、极性、芳香族性等性质类似的氨基酸之间的替换。性质类似的氨基酸例如可以分为碱性氨基酸(精氨酸、赖氨酸、组氨酸)、酸性氨基酸(天冬氨酸、谷氨酸)、无电荷极性氨基酸(甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、酪氨酸)、无极性氨基酸(亮氨酸、异亮氨酸、丙氨酸、缬氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、蛋氨酸)、支链氨基酸(亮氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)、芳香族氨基酸(苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸、组氨酸)等。

[0085] 作为抗体修饰物,可以列举例如与聚乙二醇(PEG)等各种分子结合的抗体。在本发明的抗体修饰物中,不限定所结合的物质。为了得到这样的抗体修饰物,可以通过对所得的抗体实施化学修饰来得到。这些方法在本领域已经被确立。

[0086] 识别CAPRIN-1蛋白质或其包含的CAPRIN-1片段多肽的抗体,可以利用本领域技术人员公知的方法得到。例如,可以通过下述方法等来得到:通过通常的方法(例如表位作图(epitope mapping)、后述的表位鉴定的方法等)确定由抗CAPRIN-1抗体所识别的CAPRIN-1蛋白质的表位,以具有该表位中所含的氨基酸序列的多肽为免疫原来制作抗体的方法;确定通过通常的方法制作的抗体的表位,选择表位与抗CAPRIN-1抗体相同的抗体的方法等。

[0087] 本发明的抗体是与CAPRIN-1具有免疫反应性的抗体、特异性地识别CAPRIN-1的抗体、或者与CAPRIN-1特异性地结合的抗体,并且是显示对癌细胞的毒活性、或肿瘤增殖抑制作用的抗体。该抗体优选是具有能够在施与该抗体的对象动物中几乎避免或完全避免产生排斥反应那样的结构的抗体。作为这样的抗体,例如在对象动物为人时,可以列举人抗体、人源化抗体、嵌合抗体(例如、人-兔嵌合抗体)、单链抗体、双特异性抗体等。这些抗体是作为重链和轻链的可变区来源于人抗体的抗体;重链和轻链的可变区包含来源于非人动物抗体的互补性决定区(CDR1、CDR2和CDR3)和来源于人抗体的框架区(FR1、FR2、FR3和FR4)的抗体;或重链和轻链的可变区来源于非人动物抗体、且重链和轻链的恒定区来源于人抗体的抗体的重组型抗体。优选的抗体是前2种抗体。

[0088] 这些重组型抗体可以如下制作。由杂交瘤等产生抗体的细胞克隆化编码针对人CAPRIN-1的单克隆抗体(例如,人单克隆抗体、小鼠单克隆抗体、大鼠单克隆抗体、兔单克隆抗体、鸡单克隆抗体等)的DNA,将其作为模板利用RT-PCR法等来制作编码该抗体的轻链可变区和重链可变区的DNA,例如,可以基于Kabat EU numbering system(Kabat等、Sequences of Proteins of Immunological Interest,5thEd.Public Health Service,National Institute of Health,Bethesda,Md.(1991))来确定轻链和重链的各可变区的序列、或各CDR1、CDR2、CDR3的序列、或各FR1、FR2、FR3、FR4的序列。

[0089] 进一步地,使用基因重组技术(Sambrook等,Molecular Cloning A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989))或DNA合成仪来制作编码这些各可变区的DNA或编码各互补决定区的DNA。其中,产生上述人单克隆抗体的杂交瘤可以通过在对产生人抗体的动物(例如,小鼠)免疫人CAPRIN-1后,使从该免疫动物切除的脾细胞与骨髓瘤细胞融合来制作。与此分别地,根据需要使用基因重组技术或DNA合成仪来制作编码来源于人抗体的轻链或重链的可变区和恒定区的DNA。

[0090] 在人源化抗体的情况下,通过将编码来源于人抗体的轻链或重链的可变区的DNA中的CDR编码序列替换成与它们对应的来源于除人以外的动物(例如小鼠、大鼠、兔、鸡等)的抗体的CDR编码序列,能够制作编码人源化抗体的DNA。例如,在将来源于人抗体的CDR编码序列替换成了来源于小鼠抗体的CDR编码序列的人源化抗体的情况下,可变区从N末端侧开始由人FR1、小鼠CDR1、人FR2、小鼠CDR2、人FR3、小鼠CDR3和人FR4依次构成。

[0091] 在嵌合抗体的情况下,通过将编码来源于除人以外的动物(例如、小鼠、大鼠、兔、鸡等)的抗体的轻链或重链的可变区的DNA分别与编码来源于人抗体的轻链或重链的恒定区的DNA连接,能够制作编码嵌合抗体的DNA。

[0092] 在单链抗体的情况下,该抗体是将重链可变区和轻链可变区通过连接物以直线状

连接而成的抗体,通过将编码重链可变区的DNA、编码连接物的DNA、和编码轻链可变区的DNA结合,能够制作编码单链抗体的DNA。这里,重链可变区和轻链可变区都来源于人抗体,或者来源于仅互补决定区被来源于除人以外的动物(例如小鼠、大鼠、兔、鸡等)的抗体的互补决定区替换而得的人抗体。另外,连接物包含12~19个氨基酸,可以列举例如15个氨基酸的(G₄S)₃(G.-B.Kim等,Protein Engineering Design and Selection 2007,20(9):425-432)。

[0093] 在双特异性抗体(例如,diabody)的情况下,该抗体是可与2个不同的表位特异性地结合的抗体,例如通过将编码重链可变区A的DNA、编码轻链可变区B的DNA、编码重链可变区B的DNA、和编码轻链可变区A的DNA以该顺序进行结合(其中编码轻链可变区B的DNA与编码重链可变区B的DNA可介由编码如上所述的连接物的DNA来结合),能够制作编码双特异性抗体的DNA。这里,重链可变区和轻链可变区都来源于人抗体,或者来源于仅互补决定区被来源于除人以外的动物(例如小鼠、大鼠、兔、鸡等)的抗体的互补决定区替换而得的人抗体。

[0094] 可以将如上所述制作的重组DNA整合到1个或多个适当的载体中,将其导入宿主细胞(例如,哺乳动物细胞、酵母细胞、昆虫细胞等),进行(共)表达,从而制作重组型抗体(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)。

[0095] 作为通过上述方法制作的本发明的抗体,可列举例如,后述的实施例中获得的含有包含序列号1、2和3的重链可变区和包含序列号4、5和6的轻链可变区的以下的抗体(a)~(l)。

[0096] (a) 包含序列号8的重链可变区和序列号15的轻链可变区的抗体

[0097] (b) 包含序列号10的重链可变区和序列号15的轻链可变区的抗体

[0098] (c) 包含序列号7的重链可变区和序列号15的轻链可变区的抗体

[0099] (d) 包含序列号8的重链可变区和序列号13的轻链可变区的抗体

[0100] (e) 包含序列号7的重链可变区和序列号12的轻链可变区的抗体

[0101] (f) 包含序列号8的重链可变区和序列号12的轻链可变区的抗体

[0102] (g) 包含序列号7的重链可变区和序列号13的轻链可变区的抗体

[0103] (h) 包含序列号10的重链可变区和序列号14的轻链可变区的抗体

[0104] (i) 包含序列号8的重链可变区和序列号11的轻链可变区的抗体

[0105] (j) 包含序列号7的重链可变区和序列号11的轻链可变区的抗体

[0106] (k) 包含序列号9的重链可变区和序列号15的轻链可变区的抗体

[0107] (l) 包含序列号20的重链可变区和序列号21的轻链可变区的抗体

[0108] 这里,序列号1、2和3所示的氨基酸序列分别是兔抗体的重链可变区的CDR1、CDR2和CDR3,序列号4、5和6所示的氨基酸序列分别是兔抗体的轻链可变区的CDR1、CDR2和CDR3。

[0109] 另外,本发明的人源化抗体、嵌合抗体、单链抗体或双特异性抗体是例如以下的抗体(i)~(xiv)。

[0110] (i) 重链的可变区包含序列号1、2和3的氨基酸序列和来源于人抗体的框架区的氨基酸序列或其替换体,以及轻链的可变区包含序列号4、5和6的氨基酸序列和来源于人抗体

的框架区的氨基酸序列或其替换体的抗体。

[0111] (ii) 重链的可变区包含序列号1、2和3的氨基酸序列和来源于人抗体的框架区的氨基酸序列或其替换体,且重链的恒定区包含来源于人抗体的氨基酸序列,以及轻链的可变区包含序列号4、5和6的氨基酸序列和来源于人抗体的框架区的氨基酸序列或其替换体,且轻链的恒定区包含来源于人抗体的氨基酸序列的抗体。

[0112] (iii) 重链的可变区包含序列号8的氨基酸序列,且重链的恒定区包含来源于人抗体的氨基酸序列,以及轻链的可变区包含序列号15的氨基酸序列,且轻链的恒定区包含来源于人抗体的氨基酸序列的抗体。

[0113] (iv) 重链的可变区包含序列号10的氨基酸序列,且重链的恒定区包含来源于人抗体的氨基酸序列,以及轻链的可变区包含序列号15的氨基酸序列,且轻链的恒定区包含来源于人抗体的氨基酸序列的抗体。

[0114] (v) 重链的可变区包含序列号7的氨基酸序列,且重链的恒定区包含来源于人抗体的氨基酸序列,以及轻链的可变区包含序列号15的氨基酸序列,且轻链的恒定区包含来源于人抗体的氨基酸序列的抗体。

[0115] (vi) 重链的可变区包含序列号8的氨基酸序列,且重链的恒定区包含来源于人抗体的氨基酸序列,以及轻链的可变区包含序列号13的氨基酸序列,且轻链的恒定区包含来源于人抗体的氨基酸序列的抗体。

[0116] (vii) 重链的可变区包含序列号7的氨基酸序列,且重链的恒定区包含来源于人抗体的氨基酸序列,以及轻链的可变区包含序列号12的氨基酸序列,且轻链的恒定区包含来源于人抗体的氨基酸序列的抗体。

[0117] (viii) 重链的可变区包含序列号8的氨基酸序列,且重链的恒定区包含来源于人抗体的氨基酸序列,以及轻链的可变区包含序列号12的氨基酸序列,且轻链的恒定区包含来源于人抗体的氨基酸序列的抗体。

[0118] (ix) 重链的可变区包含序列号7的氨基酸序列,且重链的恒定区包含来源于人抗体的氨基酸序列,以及轻链的可变区包含序列号13的氨基酸序列,且轻链的恒定区包含来源于人抗体的氨基酸序列的抗体。

[0119] (x) 重链的可变区包含序列号10的氨基酸序列,且重链的恒定区包含来源于人抗体的氨基酸序列,以及轻链的可变区包含序列号14的氨基酸序列,且轻链的恒定区包含来源于人抗体的氨基酸序列的抗体。

[0120] (xi) 重链的可变区包含序列号8的氨基酸序列,且重链的恒定区包含来源于人抗体的氨基酸序列,以及轻链的可变区包含序列号11的氨基酸序列,且轻链的恒定区包含来源于人抗体的氨基酸序列的抗体。

[0121] (xii) 重链的可变区包含序列号7的氨基酸序列,且重链的恒定区包含来源于人抗体的氨基酸序列,以及轻链的可变区包含序列号11的氨基酸序列,且轻链的恒定区包含来源于人抗体的氨基酸序列的抗体。

[0122] (xiii) 重链的可变区包含序列号9的氨基酸序列,且重链的恒定区包含来源于人抗体的氨基酸序列,以及轻链的可变区包含序列号15的氨基酸序列,且轻链的恒定区包含来源于人抗体的氨基酸序列的抗体。

[0123] (xiv) 重链的可变区包含序列号20的氨基酸序列,且重链的恒定区包含来源于人

抗体的氨基酸序列,以及轻链的可变区包含序列号21的氨基酸序列,且轻链的恒定区包含来源于人抗体的氨基酸序列的抗体。

[0124] 此外,人抗体重链和轻链的恒定区和可变区的框架区的序列例如可以由NCBI(美国:GenBank、UniGene等)获得,例如关于人IgG1重链恒定区,可以参照注册号J00228的序列,关于人IgG2重链恒定区,可以参照注册号J00230的序列,关于人IgG3重链恒定区,可以参照注册号X03604的序列,关于人IgG4重链恒定区,可以参照注册号K01316的序列,关于人轻链 κ 恒定区,可以参照注册号V00557、X64135、X64133等的序列,关于人轻链 λ 恒定区,可以参照注册号X64132、X64134等的序列。

[0125] 上述抗体优选具有细胞毒活性,由此可以发挥抗肿瘤效果(或者抗肿瘤活性)。

[0126] 进而,上述抗体只要具有特异性地识别CAPRIN-1这样的特异性,则各抗体的互补决定区的序列、框架区的序列和/或恒定区的序列中,可以有1个或数个氨基酸的替换、缺失或添加。这里数个是指优选为1~9个。

[0127] 本发明的抗体对CAPRIN-1蛋白质或其片段的亲和常数 K_a (k_{on}/k_{off}) 优选至少为 $5 \times 10^8 M^{-1}$ 、至少为 $10^9 M^{-1}$ 、至少为 $5 \times 10^9 M^{-1}$ 、至少为 $10^{10} M^{-1}$ 、至少为 $5 \times 10^{10} M^{-1}$ 、至少为 $10^{11} M^{-1}$ 、至少为 $5 \times 10^{11} M^{-1}$ 、至少为 $10^{12} M^{-1}$ 、或者至少为 $10^{13} M^{-1}$ 、或者至少为 $10^{14} M^{-1}$ 。

[0128] 作为本发明的抗体所发挥的对表达CAPRIN-1的癌细胞的抗肿瘤效果的机制之一,有表达CAPRIN-1的细胞的效应细胞抗体依赖的细胞毒活性(ADCC)。将本发明的抗体的重链恒定区的氨基酸替换1个或数个,或者除去与结合于重链恒定区的N-糖苷键糖链中的N-乙酰葡萄糖胺结合的岩藻糖,能够增强本发明的抗体的由ADCC产生的抗肿瘤活性。进而,通过组合上述重链恒定区的氨基酸替换和岩藻糖除去,能够进一步增强本发明的抗体的由ADCC产生的抗肿瘤活性。

[0129] 另外,本发明中的除去了与结合于重链恒定区的N-糖苷键糖链中的N-乙酰葡萄糖胺结合的岩藻糖的抗体既可以是单独的该抗体,另外也可以是与结合了岩藻糖的抗体的组合物。在该抗体的组合物中,优选除去了岩藻糖的抗体是主成分。

[0130] 将重链恒定区的氨基酸替换了1个或数个的抗体,可以参照例如国际公开第W02004/063351号、国际公开第W02011/120135号、美国专利8388955号、国际公开第W02011/005481号、美国专利6737056号、国际公开第W02005/063351号来制作。除去了在重链恒定区中的N-糖苷键糖链中的N-乙酰葡萄糖胺上附加的岩藻糖的抗体或产生该抗体的细胞,可以参照例如美国专利6602684号、欧州专利1914244号、美国专利7579170号来制作。除去了与结合于重链恒定区的N-糖苷键糖链中的N-乙酰葡萄糖胺结合的岩藻糖的抗体和结合了岩藻糖的抗体的组合物或产生该组合物的细胞,可以参照例如美国专利8642292号来制作。

[0131] 本发明的抗体可以与抗肿瘤剂缀合。抗体与抗肿瘤剂的结合可以介由具有与氨基、羧基、羟基、硫醇基等为反应性的基团(例如,琥珀酰亚胺基、甲酰基、2-吡啶基二硫代基、马来酰亚胺基、烷氧基羰基、羟基等)的间隔物来进行。

[0132] 抗肿瘤剂的例子包含通过文献等而公知的下述抗肿瘤剂,即,紫杉醇、多柔比星、柔红霉素、环磷酰胺、甲氨蝶呤、5-氟尿嘧啶、噻替哌、白消安、英丙舒凡、哌泊舒凡、benzodopa、卡波醌、meturedopa、uredopa、六甲蜜胺(altretamine)、三亚乙基三聚氰胺、三亚乙基磷酰胺、三亚乙基硫代磷酰胺(triethylenethiophosphoramidate)、三羟甲基三聚氰胺(trimethylolomelamine)、布拉他辛、布拉他辛酮、喜树碱、苔藓虫素、海绵多聚乙酰

(callystatin)、cryptophycin1、cryptophycin8、海兔毒素(dolastatin)、倍癌霉素(duocarmycin)、艾榴塞洛素(eleutherobin)、水鬼蕉碱(pancratistatin)、葡枝珊瑚醇(sarcodictyin)、spongistatin、苯丁酸氮芥、萘氮芥(chlornaphazine)、氯磷酰胺(cholophosphamide)、雌莫司汀、异环磷酰胺、甲氮芥、盐酸甲氧氮芥、美法仑、新氮芥(novembichin)、苯芥胆甾醇(phenesterine)、泼尼莫司汀(prednimustine)、曲磷胺(trofosfamide)、乌拉莫司汀、卡莫司汀、氯乙链脲菌素(chlorozotocin)、福莫司汀(fotemustine)、洛莫司汀、尼莫司汀、雷莫司汀、卡奇霉素(calicheamicin)、达内霉素(dynemicin)、氯屈膦酸、埃斯培拉霉素(esperamicin)、阿克拉霉素、放线菌素、安曲霉素(authramycin)、重氮丝氨酸、博来霉素、放线菌素C(cactinomycin)、卡柔比星(carabycin)、洋红霉素、嗜癌菌素(carzinophilin)、色霉素、更生霉素、detorbicin、6-重氨基-5-氧代-L-正亮氨酸、阿霉素(adriamycin)、表柔比星、依索比星、伊达比星、麻西罗霉素(marcellomycin)、丝裂霉素C、霉酚酸(mycophenolic acid)、诺加霉素(nogalamycin)、橄榄霉素(olivomycins)、培洛霉素、甲基丝裂霉素(potfiromycin)、嘌呤霉素、三铁阿霉素(quelamycin)、罗多比星(rodorubicin)、链黑菌素、链佐星、杀结核菌素(tubercidin)、乌苯美司、净司他丁(zinostatin)、佐柔比星(zorubicin)、二甲叶酸(denopterin)、蝶罗呤(pteropterin)、三甲曲沙(trimetrexate)、氟达拉滨(fludarabine)、6-巯嘌呤、硫咪嘌呤、硫鸟嘌呤、安西他滨、阿扎胞苷(azacitidine)、6-氮杂尿苷(azauridine)、卡莫氟、阿糖胞苷、二脱氧尿苷、去氧氟尿苷、依诺他滨(enocitabine)、氟尿苷(floxuridine)；雄激素类、例如卡普睾酮(calusterone)、屈他雄酮丙酸酯、环硫雄醇、美雄烷、睾内酮(testolactone)、氨鲁米特、米托坦、曲洛司坦、亚叶酸(frolic acid)、醋葡醛内酯、醛磷酸胺糖苷、氨基乙酰丙酸、恩尿嘧啶(eniluracil)、安吡啶(amsacrine)、阿莫司汀(bestrabucil)、比生群(bisantrene)、依达曲沙(edatraxate)、defofamine、秋水仙胺(demecolcine)、地吡醌(diaziquone)、依氟鸟氨酸(elfornithine)、依利醋铵(elliptinium)、埃博霉素(epothilone)、依托格鲁(etoglucid)、香菇多糖、氯尼达明(lonidamine)、美登素(maytansine)、安丝菌素(ansamitocine)、米托胍脘(mitoguazone)、米托蒽醌、mopidanmol、二胺硝吡啶nitraerine、喷司他丁、蛋氨氮芥(phenamet)、吡柔比星、洛索蒽醌(losoxantrone)、足叶草酸(podophyllinic acid)、2-乙基酰肼、甲苄肼、雷佐生(razoxane)、根瘤菌素(rhizoxin)、西佐喃、锗螺胺(spirogermanium)、细交链孢菌酮酸(tenuazonic acid)、三乙撑亚胺苯醌(triaziquone)、杆孢菌素(roridine)A、蛇形菌素(anguidine)、聚氨酯、长春地辛、达卡巴嗪、甘露醇氮芥(mannomustine)、二溴甘露醇、二溴卫矛醇(mitolactol)、哌泊溴烷(pipobroman)、gacytosine、多西他赛、瘤可宁、吉西他滨(gemcitabine)、6-巯鸟嘌呤、巯嘌呤、顺铂、奥沙利铂、卡波铂、长春碱、足叶乙甙、异环磷酰胺、米托蒽醌、长春新碱、长春瑞滨、诺消灵(novantrone)、替尼泊苷、依达曲沙(edatrexate)、道诺霉素、氨蝶呤、希罗达(xeloda)、伊班膦酸盐(ibandronate)、伊立替康、拓扑异构酶抑制剂、二氟甲基鸟氨酸(DMFO)、视黄酸、卡培他滨(capecitabine),以及它们的药学上容许的盐或衍生物。

[0133] 在抗体是与抗肿瘤剂缀合了的抗体的情况下,作为评价是否发挥抗肿瘤活性的方法,例如,如果是来源于小鼠的抗CAPRIN-1抗体,则使在与小鼠抗体结合的二次抗体上附带了药物的物质同时反应,能够在生物体外评价对人癌细胞的抗肿瘤效果。例如,可以使用作

为结合了皂草素 (Saporin) 的二抗免疫毒素 (Second Immunotoxin) 的抗人IgG抗体 (Hum-ZAP (Advanced Targeting Systems)) 来进行评价。

[0134] 另外,通过将本发明的抗体与抗肿瘤剂合并使用施与,可以得到更高的治疗效果。本方法对表达CAPRIN-1的癌患者可以适应外科的手术前后的任一阶段。特别地在手术后,对目前用抗肿瘤剂单独处置的表达CAPRIN-1的癌,可以得到更好的癌复发防止和/或生存时间的延长。

[0135] 用于与本发明的抗体合并使用施与的抗肿瘤剂中可以例如上述抗肿瘤剂。特别优选使用环磷酰胺、紫杉醇、多西他赛、长春瑞滨。

[0136] 或者,本发明的抗体中也可以结合通过文献等而公知的 ^{211}At 、 ^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{90}Y 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{153}Sm 、 ^{212}Bi 、 ^{32}P 、 ^{175}Lu 、 ^{176}Lu 、 ^{89}Sr 、 ^{64}Cu 、 ^{111}In 等放射性同位素 (Hideo Saji, YAKUGAKU ZASSHI 128 (3) 323-332 8 (2008), Jpn)。放射性同位素期望是可有效地用于治疗或诊断肿瘤的放射性同位素。这样的放射性同位素也包含在本发明中的抗肿瘤剂中。

[0137] <抗肿瘤效果>

[0138] 认为本发明中使用的抗CAPRIN-1抗体对表达CAPRIN-1的癌细胞的抗肿瘤效果,是由以下机制所引起的:前述的表达CAPRIN-1的细胞的效应细胞抗体依赖的细胞毒活性 (ADCC)、和表达CAPRIN-1的细胞的抗体依赖的细胞吞噬 (ADCP)。但是并不意味着由该机制而限定本发明的范围。

[0139] 因此,本发明中使用的抗CAPRIN-1抗体的活性评价,如以下实施例中具体显示的那样,可以通过在生物体外对表达CAPRIN-1的癌细胞测定上述ADCC活性或ADCP活性,从而评价。

[0140] 认为本发明中使用的抗CAPRIN-1抗体与癌细胞上的CAPRIN-1蛋白质结合,通过上述活性等而显示抗肿瘤作用,因此在癌的治疗或预防中是有用的。即,本发明提供以抗CAPRIN-1抗体为有效成分的、用于癌的治疗和/或预防的药物组合物。在将抗CAPRIN-1抗体以施与人体的目的(抗体治疗)使用时,为了使免疫原性降低,优选制成人抗体和/或人源化抗体。

[0141] 此外,抗CAPRIN-1抗体与癌细胞表面上的CAPRIN-1蛋白质的结合亲和性越高,越能够由抗CAPRIN-1抗体得到更强的抗肿瘤活性。因此,本发明的抗体由于与CAPRIN-1蛋白质具有高的结合亲和性,因而可以期待更强的抗肿瘤效果,可以适应制成以癌的治疗和/或预防为目的的药物组合物。本发明的抗体作为高的结合亲和性,如上所述,优选具有至少 10^7M^{-1} 、至少 10^8M^{-1} 、至少 $5 \times 10^8\text{M}^{-1}$ 、至少 10^9M^{-1} 、至少 $5 \times 10^9\text{M}^{-1}$ 、至少 10^{10}M^{-1} 、至少 $5 \times 10^{10}\text{M}^{-1}$ 、至少 10^{11}M^{-1} 、至少 $5 \times 10^{11}\text{M}^{-1}$ 、至少 10^{12}M^{-1} 、至少 10^{13}M^{-1} 、或者至少 10^{14}M^{-1} 的结合常数(亲和常数) K_a ($k_{\text{on}}/k_{\text{off}}$)。

[0142] <对表达抗原的细胞的结合>

[0143] 抗体与CAPRIN-1结合的能力可以利用如实施例中所述那样的使用了例如ELISA法、蛋白质印迹法、免疫荧光和流式细胞仪分析等的结合检验来特定。

[0144] <免疫组织化学染色>

[0145] 识别CAPRIN-1的抗体可以在本领域技术人员公知的方法中的免疫组织化学中使用。例如,使用将外科手术期间从患者得到的组织、和/或从搭载了接种有自然地或在转染后表达CAPRIN-1的细胞系的异种移植组织的动物得到的组织进行低聚甲醛或丙酮固定而

得的冷冻切片,或用低聚甲醛固定并进行石蜡包埋而得的组织切片,关于与CAPRIN-1的反应性进行试验。

[0146] 为了进行免疫组织化学染色,可以用各种方法使对CAPRIN-1具有反应性的抗体染色。例如可以通过与辣根过氧化物酶复合山羊抗小鼠抗体、山羊抗兔抗体和/或山羊抗鸡抗体反应,从而进行可视化。

[0147] <药物组合物、和癌的治疗和/或预防方法>

[0148] 本发明的用于癌的治疗和/或预防的药物组合物的靶,只要是表达CAPRIN-1基因的癌(细胞)就没有特别限定。

[0149] 本说明书中使用的“肿瘤”和“癌”这样的术语是指恶性新生物,可以互换使用。

[0150] 作为在本发明中成为对象的癌,只要是在细胞膜表面上表达CAPRIN-1蛋白质的癌就可以是任何癌。优选为前述的乳癌、肾癌、胰癌、大肠癌、肺癌、脑瘤、胃癌、子宫癌、卵巢癌、前列腺癌、膀胱癌、食道癌、白血病、淋巴瘤、肝癌、胆囊癌、肉瘤、肥大细胞瘤、黑素瘤、肾上腺皮质癌、尤文氏瘤、霍奇金淋巴瘤、间皮瘤、多发性骨髓瘤、睾丸癌、甲状腺癌或头颈癌。

[0151] 上述癌更具体地包含例如,乳腺癌、复合型乳腺癌、乳腺恶性混合肿瘤、乳管内乳头状腺癌、肺腺癌、鳞状细胞癌、小细胞癌、大细胞癌、作为神经上皮组织性肿瘤的神胶质瘤、成胶质细胞瘤、成神经细胞瘤、室管膜瘤、神经元肿瘤、胎儿型的神经外胚层肿瘤、神经鞘瘤、纤维神经瘤、脑脊膜瘤、慢性淋巴细胞白血病、消化道淋巴瘤、消化器官淋巴瘤、小~中细胞型淋巴瘤、盲肠癌、升结肠癌、降结肠癌、横结肠癌、乙状结肠癌、直肠癌、卵巢上皮癌、胚细胞瘤、间质细胞瘤、胰管癌、浸润性胰管癌、胰癌的腺癌、腺泡细胞癌、腺扁平上皮癌、巨细胞瘤、胰管内乳头粘液性肿瘤、粘液性囊腺癌、胰母细胞瘤、胰头细胞瘤、Frants肿瘤、浆液性囊腺癌、固体乳头状癌、胃泌素瘤、胰高血糖素瘤、胰岛素瘤、多发性内分泌腺瘤综合症1(Wermer综合症)、非功能性胰岛细胞瘤、生长激素抑制素瘤、VIP产生瘤、子宫颈癌、子宫体癌、纤维肉瘤、骨·关节肉瘤、尤文肉瘤、肾母细胞瘤(Wilms'tumor)、肝母细胞瘤、软组织肉瘤、急性白血病、慢性白血病、脊髓肿瘤、软组织恶性肿瘤、畸胎瘤肿瘤、头颈癌包括下咽癌、中咽癌、舌癌、上咽癌、口腔癌、口唇癌、鼻窦癌、喉癌等,但不限于这些。

[0152] 另外,成为对象的优选的受试者(患者)是哺乳动物,例如是包含灵长类、宠物、家畜类、竞技用动物等的哺乳动物,特别优选是人、狗和猫。

[0153] 当将本发明中使用的抗体作为药物组合物使用时,可以利用本领域技术人员公知的方法进行制剂化。例如,可以以与水或除水以外的药学上容许的液体的无菌性溶液、或悬浮液剂的注射剂的形式非经口地使用。例如,认为可以与药理学上容许的载体或介质、具体来说为灭菌水和/或生理盐水、植物油、乳化剂、悬浮剂、表面活性剂、稳定剂、香味剂、赋形剂、媒介物(vehicle)、防腐剂、结合剂等适当组合,通过以一般认为的制药实施所要求的单位用量方式混和来进行制剂化。这些制剂中的有效分量,是可得到所指示的范围的适当的用量那样的量。

[0154] 用于注射的无菌组合物可以使用注射用蒸馏水这样的媒介物,按照通常的制剂实施来处方。

[0155] 作为注射用的水溶液,可以列举例如,生理盐水、含有葡萄糖和/或其他辅助剂、例如D-山梨糖醇、D-甘露糖、D-甘露醇、氯化钠的等渗液,也可以与适当的溶解助剂、例如醇、具体为乙醇、多元醇例如丙二醇、聚乙二醇、非离子性表面活性剂例如聚山梨醇酯80(TM)、

HCO-60合并使用。

[0156] 作为油性液可以列举芝麻油、大豆油,其也可以与作为溶解助剂的苯甲酸苄酯、苄醇合并使用。另外,还可以与缓冲剂例如磷酸盐缓冲液、乙酸钠缓冲液、镇痛剂例如盐酸普鲁卡因、稳定剂例如苄醇、苯酚、抗氧化剂配合。制备的注射液通常填充到适当的安瓿中。

[0157] 施与为经口或非经口,优选非经口施与,具体来说,可以列举注射剂型、经鼻施与剂型、经肺施与剂型、经皮施与型等。作为注射剂型的例子,可以通过例如静脉内注射、肌肉内注射、腹腔内注射、皮下注射等全身或局部性地施与。

[0158] 另外,可以根据患者的年龄、体重、性别、症状等选择适当的施与方法。作为含有抗体或编码抗体的多核苷酸的药物组合物的施与量,例如可以在一次每1kg体重为0.0001mg至1000mg的范围中选择。或者例如可以在每个患者0.001~100000mg/个体的范围中选择施与量,但未必限于这些数值。施与量、施与方法根据患者的体重、年龄、性别、症状等不同而变化,只要是本领域技术人员就可以适当选择。

[0159] 通过将包含本发明的抗体或其片段的上述药物组合物施与受试者,能够治疗和/或预防癌,优选为乳癌、肾癌、胰癌、大肠癌、肺癌、脑瘤、胃癌、子宫癌、卵巢癌、前列腺癌、膀胱癌、食道癌、白血病、淋巴瘤、肝癌、胆囊癌、肉瘤、肥大细胞瘤、黑素瘤、肾上腺皮质癌、尤文氏瘤、霍奇金淋巴瘤、间皮瘤、多发性骨髓瘤、睾丸癌、甲状腺癌或头颈癌。

[0160] 进而,本发明还包含癌的治疗和/或预防方法,该方法包括以下步骤:将本发明的药物组合物与如上述所例示的抗肿瘤剂或包含抗肿瘤剂的药物组合物组合,合并使用施与受试者。本发明的抗体或其片段与抗肿瘤剂可以同时施与受试者,或者分别施与受试者。分别施与时,任一药物组合物可以在先也可以在后,它们的施与间隔、施与量、施与途径和施与次数可由专业医师适当选择。同时施与的其他药物剂型还包含例如将本发明的抗体或其片段与抗肿瘤剂在药理学上容许的载体(或介质)中混合并进行制剂化而得的药剂型的药物组合物。另外,对含有抗肿瘤剂的上述药物组合物和剂型的任一者,可以适用对于含有本发明的抗体的药物组合物和剂型的处方、制剂化、施与途径、用量、癌等的说明。

[0161] 因此,本发明还提供:包含本发明的药物组合物、和含如以上所例示的抗肿瘤剂的药物组合物的用于癌的治疗和/或预防的组合药物,以及包括施与该组合药物的步骤的癌的治疗和/或预防方法。另外,本发明还提供在包含本发明的抗体或其片段和抗肿瘤剂的同时、还包含药理学上容许的载体的用于癌的治疗和/或预防的药物组合物。

[0162] <多肽和DNA>

[0163] 本发明还提供编码本发明的上述抗体的DNA、或者编码上述抗体的重链或轻链的DNA、或者编码上述抗体的重链或轻链的可变区的DNA。这样的DNA,例如在抗体(a)的情况下,包含:编码包含序列号1、2和3的氨基酸序列的碱基序列的包含重链可变区的DNA、包含编码序列号4、5和6的氨基酸序列的碱基序列的编码轻链可变区的DNA等。

[0164] 由于由这些序列的DNA所编码的互补决定区是决定抗体的特异性的区域,因而编码抗体的除此以外的区域(即,恒定区和框架区)的序列可以是来源于其他抗体的序列。这里其他抗体也包含来源于除人以外的生物的抗体,但从降低副作用的观点考虑优选来源于人的抗体。即,在上述的DNA中,编码重链和轻链的各框架区和各恒定区的区域,优选包含编码来源于人抗体的对应氨基酸序列的碱基序列。

[0165] 进而,编码本发明的抗体的DNA的其他例子,例如包含编码序列号8的氨基酸序列

的碱基序列的编码重链可变区的DNA、编码轻链可变区的区域包含编码序列号15的氨基酸序列的碱基序列的DNA等。其中,编码序列号8的氨基酸序列的碱基序列的例子是序列号23的碱基序列。另外,编码序列号15的氨基酸序列的碱基序列的例子是序列号30的碱基序列。这些DNA中,编码重链和轻链的各恒定区的区域,优选包含编码来源于人抗体的对应氨基酸序列的碱基序列。

[0166] 这些抗体的DNA可以通过例如上述的方法或以下的方法得到。首先,从涉及本发明的抗体的杂交瘤使用市售的RNA提取试剂盒制备总RNA,使用随机引物等通过逆转录酶合成cDNA。接着通过使用了已知的在小鼠抗体重链基因和轻链基因的各可变区中分别保守的序列的寡核苷酸作为引物的PCR法,来扩增编码抗体的cDNA。对于编码恒定区的序列,可以通过将已知的序列用PCR法扩增来得到。DNA的碱基序列可以插入到序列确定用质粒或噬菌体中等,通过常规方法来确定。

[0167] 本发明还提供涉及上述抗体(i)~(xiv)的以下的(i)~(xv)所记载的多肽和DNA。

[0168] (i)选自序列号1、2和3所示的氨基酸序列中的重链CDR多肽、和编码该多肽的DNA。

[0169] (ii)选自序列号4、5和6所示的氨基酸序列的轻链CDR多肽、和编码该多肽的DNA。

[0170] (iii)包含序列号8和序列号15的氨基酸序列的多肽以及编码该多肽的DNA,例如包含序列号23和序列号30的碱基序列的DNA。

[0171] (iv)包含序列号10和序列号15的氨基酸序列的多肽以及编码该多肽的DNA,例如包含序列号25和序列号30的碱基序列的DNA。

[0172] (v)包含序列号7和序列号15的氨基酸序列的多肽以及编码该多肽的DNA,例如包含序列号22和序列号30的碱基序列的DNA。

[0173] (vi)包含序列号8和序列号13的氨基酸序列的多肽以及编码该多肽的DNA,例如包含序列号23和序列号28的碱基序列的DNA。

[0174] (vii)包含序列号7和序列号12的氨基酸序列的多肽以及编码该多肽的DNA,例如包含序列号22和序列号27的碱基序列的DNA。

[0175] (viii)包含序列号8和序列号12的氨基酸序列的多肽以及编码该多肽的DNA,例如包含序列号23和序列号27的碱基序列的DNA。

[0176] (ix)包含序列号7和序列号13的氨基酸序列的多肽以及编码该多肽的DNA,例如包含序列号22和序列号28的碱基序列的DNA。

[0177] (x)包含序列号10和序列号14的氨基酸序列的多肽以及编码该多肽的DNA,例如包含序列号25和序列号29的碱基序列的DNA。

[0178] (xi)包含序列号8和序列号11的氨基酸序列的多肽以及编码该多肽的DNA,例如包含序列号23和序列号26的碱基序列的DNA。

[0179] (xii)包含序列号7和序列号11的氨基酸序列的多肽以及编码该多肽的DNA,例如包含序列号22和序列号26的碱基序列的DNA。

[0180] (xiii)包含序列号9和序列号15的氨基酸序列的多肽以及编码该多肽的DNA,例如包含序列号24和序列号30的碱基序列的DNA。

[0181] (xiv)包含序列号20和序列号21的氨基酸序列的多肽以及编码该多肽的DNA,例如包含序列号31和序列号32的碱基序列的DNA。

[0182] (xv)在上述(i)~(xiv)所记载的多肽中在重链恒定区包含1个或多个氨基酸替换

的多肽或其片段、以及编码该多肽或其片段的DNA。

[0183] 这些多肽和DNA如上所述,可以使用基因重组技术来制作。

[0184] <本发明的归纳>

[0185] 以下归纳以上所说明的本发明。

[0186] (1) 抗体或其片段,包含重链可变区和轻链可变区,且与CAPRIN-1蛋白质具有免疫反应性,所述重链可变区包含序列号1、2和3的互补决定区,所述轻链可变区包含序列号4、5和6的互补决定区。

[0187] (2) 根据(1)所述的抗体或其片段,重链可变区包含序列号8的氨基酸序列,且轻链可变区包含序列号15的氨基酸序列。

[0188] (3) 根据(1)所述的抗体或其片段,重链可变区包含序列号10的氨基酸序列,且轻链可变区包含序列号15的氨基酸序列。

[0189] (4) 根据(1)所述的抗体或其片段,重链可变区包含序列号7的氨基酸序列,且轻链可变区包含序列号15的氨基酸序列。

[0190] (5) 根据(1)所述的抗体或其片段,重链可变区包含序列号8的氨基酸序列,且轻链可变区包含序列号13的氨基酸序列。

[0191] (6) 根据(1)所述的抗体或其片段,重链可变区包含序列号7的氨基酸序列,且轻链可变区包含序列号12的氨基酸序列。

[0192] (7) 根据(1)所述的抗体或其片段,重链可变区包含序列号8的氨基酸序列,且轻链可变区包含序列号12的氨基酸序列。

[0193] (8) 根据(1)所述的抗体或其片段,重链可变区包含序列号7的氨基酸序列,且轻链可变区包含序列号13的氨基酸序列。

[0194] (9) 根据(1)所述的抗体或其片段,重链可变区包含序列号10的氨基酸序列,且轻链可变区包含序列号14的氨基酸序列。

[0195] (10) 根据(1)所述的抗体或其片段,重链可变区包含序列号8的氨基酸序列,且轻链可变区包含序列号11的氨基酸序列。

[0196] (11) 根据(1)所述的抗体或其片段,重链可变区包含序列号7的氨基酸序列,且轻链可变区包含序列号11的氨基酸序列。

[0197] (12) 根据(1)所述的抗体或其片段,重链可变区包含序列号9的氨基酸序列,且轻链可变区包含序列号15的氨基酸序列。

[0198] (13) 根据(1)所述的抗体或其片段,重链可变区包含序列号20的氨基酸序列,且轻链可变区包含序列号21的氨基酸序列。

[0199] (14) 根据(1)~(13)所述的抗体或其片段,所述抗体是人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、单链抗体或多特异性抗体。

[0200] (15) 根据(1)~(13)所述的抗体或其片段,缀合了抗肿瘤剂。

[0201] (16) 根据(1)~(15)所述的抗体,所述抗体的重链恒定区中包含1个或多个氨基酸替换。

[0202] (17) 根据(1)~(16)所述的抗体,所述抗体是除去了岩藻糖的抗体,所述岩藻糖结合于糖链还原末端的N-乙酰葡萄糖胺,所述糖链是结合于重链恒定区的N-糖苷键糖链。

[0203] (18) 抗体的组合物,是所述抗体的组合物,包含:(17)所述的抗体、和在糖链还原

末端的N-乙酰葡萄糖胺上结合了岩藻糖的(1)~(16)所述的抗体,所述糖链是结合于重链恒定区的N-糖苷键糖链。

[0204] (19) 细胞,产生(17)所述的抗体或(18)所述的抗体的组合物。

[0205] (20) 用于癌的治疗和/或预防的药物组合物,其特征在于,包含(1)~(15)的任一项所述的抗体或其片段、(16)或(17)所述的抗体、或者(18)所述的抗体的组合物作为有效成分。

[0206] (21) 根据(20)所述的药物组合物,所述癌是乳癌、肾癌、胰癌、大肠癌、肺癌、脑瘤、胃癌、子宫癌、卵巢癌、前列腺癌、膀胱癌、食道癌、白血病、淋巴瘤、肝癌、胆囊癌、肉瘤、肥大细胞瘤、黑素瘤、肾上腺皮质癌、尤文氏瘤、霍奇金淋巴瘤、间皮瘤、多发性骨髓瘤、睾丸癌、甲状腺癌或头颈癌。

[0207] (22) 用于癌的治疗和/或预防的组合药物,包含:(20)或(21)所述的药物组合物、和包含抗肿瘤剂的药物组合物。

[0208] (23) DNA,编码(1)~(16)所述的抗体或其片段。

[0209] (24) 癌的治疗和/或预防方法,包括:将(1)~(16)的任一项所述的抗体或其片段、(17)所述的抗体、(18)所述的抗体的组合物、(20)或(21)所述的药物组合物、或者(22)所述的组合药物施与受试者的步骤。

[0210] 实施例

[0211] 以下,基于实施例更具体地说明本发明,但本发明的范围不受这些具体例限制。

[0212] 实施例1:使用了兔的抗CAPRIN-1单克隆抗体的制作

[0213] 将W02010/016526的实施例3中制备的人CAPRIN-1蛋白质300 μ g与等量的弗氏完全佐剂,将此作为每1只兔1的抗原溶液。第2次以后的免疫使用与弗氏不完全佐剂的混合物。将抗原溶液施与12周龄的兔的腹腔内后,每2~3周进行施与,施与8次,从而完成免疫。从最后的免疫起4天后摘出的各个脾脏获得淋巴细胞,与兔的骨髓瘤细胞240E-W2以1:2的比率混和,在其中加入加温至37 $^{\circ}$ C的将包含10%FBS的RPMI培养基200 μ L和PEG1500800 μ L混合而制备的PEG溶液,并静置5分钟,从而进行细胞融合。离心除去上清,然后用添加了2%当量的HAT溶液的包含10%的FBS的RPMI培养基(HAT选择培养基)300mL悬浮细胞,以96孔板的每1孔各100 μ L接种于80块板中。以7天、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂的条件培养,从而得到脾脏细胞与兔骨髓瘤细胞融合而成的杂交瘤。

[0214] 以由制作的杂交瘤所产生的抗体对CAPRIN-1蛋白质的反应性为指标筛选杂交瘤。将1 μ g/mL的CAPRIN-1蛋白质溶液在96孔板每1孔中添加100 μ L,在4 $^{\circ}$ C静置18小时。将各孔用PBS-T洗涤3次后,在每1孔中添加0.5%牛血清白蛋白(BSA)溶液400 μ L,在室温静置3小时。除去溶液,对每1孔用400 μ L的PBS-T洗涤孔3次后,在每1孔中添加上述所得的杂交瘤的各培养上清100 μ L,在室温静置2小时。用PBS-T洗涤各孔3次后,在每1孔中添加用PBS稀释至5000倍的HRP标记抗兔抗体100 μ L,在室温静置1小时。用PBS-T洗涤孔3次后,在每1孔中添加TMB底物溶液100 μ L,并静置15~30分钟,从而进行显色反应。显色后,在每1孔中添加1N硫酸100 μ L使反应停止,使用吸光度计测定450nm和595nm的吸光度值。其结果是,筛选出了多个产生吸光度值高的抗体的杂交瘤。

[0215] 将筛选出的杂交瘤以96孔板每1孔0.5个的方式添加到板中进行培养。1周后,观察到在孔中形成单个集落的杂交瘤。将这些孔的细胞进行进一步培养,以由克隆化的杂交瘤

产生的抗体对CAPRIN-1蛋白质的反应性为指标筛选杂交瘤。通过与上述同样的操作实施各抗体对CAPRIN-1蛋白质的反应性评价,结果获得了多个产生对CAPRIN-1蛋白质显示反应性的兔单克隆抗体的杂交瘤株。

[0216] 接着从这些对CAPRIN-1蛋白质显示反应性的兔单克隆抗体中筛选与表达CAPRIN-1的人癌细胞表面显示反应性的抗体。具体地,将 2×10^5 个人肺癌细胞株QG56和人乳癌细胞BT-474(从ATCC获得)分别用1.5mL容量的微量离心管进行离心分离,在其中添加上述各杂交瘤的培养上清100 μ L,在冰上静置1小时。用PBS洗涤后,添加用含0.5%的FBS的PBS(-)(0.5%FBS-PBS(-))稀释到100倍的FITC标记抗兔IgG(H+L)抗体或者Alexa488标记抗兔IgG(H+L),在冰上静置1小时。用0.5%FBS-PBS(-)洗涤后,将细胞悬浮在0.2 μ g/mL的碘化丙啶(Propidium iodide)和0.5%FBS-PBS(-)中,用FACSCaliburTM或者FACSVerseTM(ベクトン・デキソンアンドカンパニー)测定荧光强度。另一方面,使用杂交瘤培养用培养基进行与上述同样的操作,作为阴性对照的样品。其结果筛选出了1个与阴性对照相比荧光强度高、即与表达CAPRIN-1的癌细胞QG56以及BT-474的细胞表面较强地反应的兔抗CAPRIN-1单克隆抗体1。

[0217] 接着,对于上述得到的兔抗CAPRIN-1单克隆抗体,按照W02010/016526的实施例5所记载的方法,获得编码可变区的基因的扩增片段,分析基因序列及其氨基酸序列。具体地从产生兔抗CAPRIN-1单克隆抗体的杂交瘤提取mRNA,通过使用了兔可变区序列特异性引物的RT-PCR法,获得本抗体的重链可变(VH)区域和轻链可变(VL)区域的基因。将这些基因插入克隆载体中,按照常规方法确定各自的碱基序列。

[0218] 其结果确认了,所得的兔抗CAPRIN-1单克隆抗体包含序列号20所示的重链可变区,以及重链可变区中的CDR1~3分别由序列号1、序列号2、序列号3的氨基酸序列组成,并且包含序列号21所示的轻链可变区,以及轻链可变区中的CDR1~3分别由序列号4、序列号5、序列号6的氨基酸序列组成。

[0219] 接着确认所获得的兔抗CAPRIN-1单克隆抗体对各种人癌细胞的反应性。使获得的上述抗体分别与确认了CAPRIN-1基因表达的人癌细胞:乳癌细胞(BT-474、MDA-MB-361)、大肠癌细胞(HT-29)、肺癌细胞(QG56)、胃癌细胞(NCI-N87)、子宫癌细胞(HEC-1-A)、前列腺癌细胞(22Rv1)、胰癌细胞(Panc10.5)、肝癌细胞(Hep3B)、卵巢癌细胞(SKOV3)、肾癌细胞(Caki-2)、脑瘤细胞(U-87MG)、膀胱癌细胞(T24、HT-1376)、食道癌细胞(OE33)、白血病细胞(OCI-AML5)、淋巴瘤细胞(Ramos)、胆囊癌细胞(TGBC14TKB)、纤维肉瘤细胞(HT-1080)、黑素瘤细胞(G-361)、肾上腺皮质癌细胞(A-673)、尤文氏瘤细胞(RD-ES)、霍奇金淋巴瘤细胞(RPMI1666)、间皮瘤细胞(NCI-H2452)、多发性骨髓瘤细胞(IM-9)、睾丸癌细胞(NT/D1)、甲状腺癌细胞(TT)或头颈癌细胞(FaDu)反应,通过流式细胞仪法评价荧光强度。在1.5mL容量的微量离心管中收集各癌细胞分别 10^6 个,分别在各个管中添加上述所得的产生兔抗CAPRIN-1单克隆抗体的杂交瘤的培养上清(100 μ L),在4 $^{\circ}$ C使其反应1小时。用0.5%FBS-PBS(-)洗涤后,添加用0.5%FBS-PBS(-)稀释至50倍的FITC标记山羊抗兔IgG(H+L)抗体(Jackson ImmunoResearch社制),在4 $^{\circ}$ C静置60分钟。用0.5%FBS-PBS(-)洗涤后,在包含最终浓度为0.2 μ g/mL的碘化丙啶(Propidium iodide)的0.5%FBS-PBS(-)中悬浮细胞,用ACSCaliburTM或者FACSVerseTM(ベクトン・デキソンアンドカンパニー)测定荧光强度。另一方面,作为阴性对照,以使用杂交瘤培养用培养基进行与上述同样的操作而制备的

样品作为阴性对照的样品。其结果是,对于上述评价中使用的全部癌细胞,使用产生兔抗CAPRIN-1单克隆抗体的杂交瘤的培养上清时的荧光强度均比使用阴性对照时的荧光强度高。由以上的结果确认了,兔抗CAPRIN-1单克隆抗体与人癌细胞的癌细胞膜表面的CAPRIN-1反应。

[0220] 实施例2:人-兔嵌合抗CAPRIN-1单克隆抗体的制作

[0221] 将用于表达实施例1所确认的兔抗CAPRIN-1单克隆抗体的序列号20所示的重链可变区的氨基酸序列的基因、和用于表达序列号21所示的轻链可变区的基因,分别插入到已插入人IgG1的重链恒定区的哺乳类细胞表达用载体和已插入人IgG1的轻链恒定区的哺乳类细胞表达用载体中。将所制作的2种重组表达载体按照常规方法导入哺乳类细胞中,得到包含人-兔嵌合抗CAPRIN-1抗体(人-兔嵌合抗体)的培养上清。将所得的包含嵌合化抗体的培养上清按照常规方法使用Hitrap Protein A SepharoseFF (GEヘルスクエア社制)进行纯化,替换成PBS(-)并用0.22 μ m的过滤器(ミロア社制)进行过滤,从而制备人-兔嵌合抗CAPRIN-1单克隆抗体。

[0222] 实施例3:人源化抗CAPRIN-1单克隆抗体的制作

[0223] 接着,基于实施例1所确认的兔抗CAPRIN-1单克隆抗体的重链可变区中的CDR1~3以及轻链可变区中的CDR1~3的氨基酸序列和碱基序列的信息,设计碱基序列使得其能够表达重链可变区的CDR1~3分别由序列号1、序列号2和序列号3的氨基酸序列组成的序列号7所示的重链可变区的氨基酸序列,将其插入到已插入人IgG1的重链恒定区的哺乳类细胞表达用载体中。同样地,设计碱基序列使得其能够表达轻链可变区的CDR1~3分别由序列号4、序列号5和序列号6的氨基酸序列组成的序列号11所示的轻链可变区的氨基酸序列,将其插入到已插入人IgG1的轻链恒定区的哺乳类细胞表达用载体中。将上述2种重组表达载体按照常规方法导入哺乳类细胞中,获得含有包含序列号7所示的重链全长氨基酸序列和序列号11所示的轻链全长氨基酸序列的人源化抗体#0的培养上清。

[0224] 同样地,获得含有包含重链可变区的CDR1~3分别由序列号1、序列号2和序列号3的氨基酸序列组成的序列号8所示的重链可变区的氨基酸序列、和序列号11所示的轻链可变区的氨基酸序列的人源化抗体#1的培养上清。

[0225] 进而同样地,获得含有以下的人源化抗体#2~10的培养上清。

[0226] 包含序列号8所示的重链可变区的氨基酸序列、和轻链可变区的CDR1~3分别由序列号4、序列号5和序列号6的氨基酸序列组成的序列号12所示的轻链全长氨基酸序列的人源化抗体#2。

[0227] 包含序列号8所示的重链可变区的氨基酸序列、和轻链可变区的CDR1~3分别由序列号4、序列号5和序列号6的氨基酸序列组成的序列号13所示的轻链全长氨基酸序列的人源化抗体#3。

[0228] 包含序列号7所示的重链可变区的氨基酸序列、和序列号12所示的轻链全长氨基酸序列的人源化抗体#4。

[0229] 包含序列号7所示的重链可变区的氨基酸序列、和序列号13所示的轻链全长氨基酸序列的人源化抗体#5。

[0230] 包含序列号7所示的重链可变区的氨基酸序列、和轻链可变区的CDR1~3分别由序列号4、序列号5和序列号6的氨基酸序列组成的序列号15所示的轻链全长氨基酸序列的人

源化抗体#6。

[0231] 包含序列号8所示的重链可变区的氨基酸序列、和序列号15所示的轻链全长氨基酸序列的人源化抗体#7。

[0232] 包含重链可变区的CDR1~3分别由序列号1、序列号2和序列号3的氨基酸序列组成的序列号9所示的重链可变区的氨基酸序列、和序列号15所示的轻链全长氨基酸序列的人源化抗体#8。

[0233] 包含重链可变区的CDR1~3分别由序列号1、序列号2和序列号3的氨基酸序列组成的序列号10所示的重链可变区的氨基酸序列、和轻链可变区的CDR1~3分别由序列号4、序列号5和序列号6的氨基酸序列组成的序列号14所示的轻链全长氨基酸序列的人源化抗体#9。

[0234] 包含序列号10所示的重链可变区的氨基酸序列、和序列号15所示的轻链全长氨基酸序列的人源化抗体#10。

[0235] 将所得的含有人源化抗体#0~#10的培养上清按照常规方法使用Hitrap Protein A SepharoseFF (GEヘルスケア社制) 进行纯化, 替换成PBS(-) 并用0.22 μ m的过滤器(ミロア社制) 进行过滤, 从而制备人源化抗体#0~#10。

[0236] 实施例4: 人-兔嵌合抗体、人源化抗体#0~#10的抗原特异性和对癌细胞的反应性

[0237] 接着, 按照常规方法通过ELISA法确认实施例2中制备的人-兔嵌合抗体、和实施例3中制备的人源化抗体#0~#10对CAPRIN-1蛋白质的特异反应性。具体地, 预先在96孔板的每1孔中添加包含5 μ g/mL的CAPRIN-1蛋白质的PBS溶液各100 μ L, 在4 $^{\circ}$ C静置18小时。各孔用PBS-T洗涤后, 在每1孔中添加由包含5%的脱脂乳的PBS溶液组成的封闭溶液400 μ L, 在室温静置3小时。除去溶液并用PBS-T洗涤孔后, 在每1孔中各添加用含0.2%的脱脂乳的PBS调制成为1 μ g/mL的包含人-兔嵌合抗体、人源化抗体#0~#10的各溶液各50 μ L, 在室温静置1小时。作为阴性对照, 同时准备了以同样的抗体浓度添加了已确认不与CAPRIN-1蛋白质反应的人IgG抗体的孔、以及不添加抗体的孔。用PBS-T将各孔洗涤3次后, 在每1孔添加用含0.2%的脱脂乳的PBS稀释至3000倍的HRP标记抗人IgG抗体50 μ L, 在室温静置1小时。用PBS-T将孔洗涤3次后, 在每1孔中添加TMB底物溶液(Thermo社制) 100 μ L, 静置1~30分钟进行显色反应。显色后, 在每1孔中添加1N硫酸100 μ L使反应停止, 使用吸光度计测定450nm和630nm的吸光度值。另外, 同时也准备未固相化CAPRIN-1蛋白质的孔(非固相孔), 同样地添加各抗体进行测定。其结果显示, 作为阴性对照使用的添加了已确认不与CAPRIN-1蛋白质反应的人IgG抗体的孔的吸光度值与未添加抗体的孔为同等的低值; 与此相对, 分别添加了人-兔嵌合抗体和人源化抗体#0~#10的孔的吸光度值显示同等高的值。另外, 对未固相化CAPRIN-1蛋白质的孔, 人-兔嵌合抗体和人源化抗体#0~#10仅显示与阴性对照同等的吸光度值。由该结果确认了, 人-兔嵌合抗体和人源化抗体#0~#10与CAPRIN-1蛋白质特异性地反应。

[0238] 接着, 确认与CAPRIN-1蛋白质特异性地反应的人-兔嵌合抗体和人源化抗体#0~#10对各种人癌细胞以及小鼠癌细胞的反应性。使纯化了的人-兔嵌合抗体和人源化抗体#0~#10分别与已确认CAPRIN-1的基因表达的人癌细胞: 乳腺癌细胞(BT-474、MDA-MB-361)、大肠癌细胞(HT-29)、肺癌细胞(QG56)、胃癌细胞(NCI-N87)、子宫癌细胞(HEC-1-A)、前列腺癌细胞(22Rv1)、胰癌细胞(Panc10.5)、肝癌细胞(Hep3B)、卵巢癌细胞(SKOV3)、肾癌细胞(Caki-2)、脑瘤细胞(U-87MG)、膀胱癌细胞(T24、HT-1376)、食道癌细胞(OE33)、白血病细胞

(OCI-AML5)、淋巴瘤细胞 (Ramos)、胆囊癌细胞 (TGBC14TKB)、纤维肉瘤细胞 (HT-1080)、黑色素瘤细胞 (G-361)、肾上腺皮质癌细胞 (A-673)、尤文氏瘤细胞 (RD-ES)、霍奇金淋巴瘤细胞 (RPMI1666)、间皮瘤细胞 (NCI-H2452)、多发性骨髓瘤细胞 (IM-9)、睾丸癌细胞 (NT/D1)、甲状腺癌细胞 (TT) 或头颈癌细胞 (FaDu) 反应,通过流式细胞仪法评价荧光强度。具体地,在 1.5mL 容量的微量离心管中分别收集各癌细胞各 5×10^5 个,在各个管中添加人-兔嵌合抗体和人源化抗体#0~#10使最终浓度为 $50 \mu\text{g/mL}$,在 4°C 使其反应 1 小时。用 0.5% FBS-PBS (-) 洗涤 2 次,添加用 0.5% FBS-PBS (-) 稀释至 100 倍的 Alexa488 标记山羊抗人 IgG (H+L) 抗体 (Life Technologies 社制) 在 4°C 静置 60 分钟。用 0.5% FBS-PBS (-) 洗涤后,在包含最终浓度为 $0.2 \mu\text{g/mL}$ 的碘化丙啶 (Propidium iodide) 的 0.5% FBS-PBS (-) 中悬浮细胞,使用 FACSCalibur™ 或者 FACSVerse™ (ベクトン・デッキンソンアンドカンパニー) 测定荧光强度。另一方面,作为阴性对照,使用利用杂交瘤培养用培养基进行与上述同样的操作从而制备的样品。其结果是,对于上述评价中使用的所有癌细胞,人-兔嵌合抗体和人源化抗体#0~#10 的荧光强度比使用阴性对照时的荧光强度高。由以上结果确认了,人-兔嵌合抗体和人源化抗体#0~#10 与在人癌细胞膜表面上表达的 CAPRIN-1 蛋白质反应。

[0239] 实施例 5: 人-兔嵌合抗体以及人源化抗体#0~#10 对各种人癌细胞的抗肿瘤活性

[0240] 接着,通过 ADCC 活性来评价实施例 2 中制备的人-兔嵌合抗体和实施例 3 中制备的人源化抗体#0~#10 对各种人癌细胞的抗肿瘤效果。

[0241] 作为相对于人-兔嵌合抗体和人源化抗体#0~#10 的比较抗体,使用以下的抗 CAPRIN-1 抗体。

[0242] W02010/016526 中记载的抗体,即具有该文献中的序列号 26 的重链可变区和序列号 27 的轻链可变区的比较抗体 1、具有序列号 28 的重链可变区和序列号 29 的轻链可变区的比较抗体 2、具有序列号 30 的重链可变区和序列号 31 的轻链可变区的比较抗体 3、具有序列号 32 的重链可变区和序列号 33 的轻链可变区的比较抗体 4、具有序列号 34 的重链可变区和序列号 35 的轻链可变区的比较抗体 5、具有序列号 36 的重链可变区和序列号 37 的轻链可变区的比较抗体 6、具有序列号 38 的重链可变区和序列号 39 的轻链可变区的比较抗体 7、具有序列号 40 的重链可变区和序列号 41 的轻链可变区的比较抗体 8、具有序列号 42 的重链可变区和序列号 43 的轻链可变区的比较抗体 9、具有序列号 44 的重链可变区和序列号 45 的轻链可变区的比较抗体 10、具有序列号 46 的重链可变区和序列号 47 的轻链可变区的比较抗体 11。

[0243] W02011/096517 中记载的抗体,即具有该文献中的序列号 43 的重链可变区和序列号 47 的轻链可变区的比较抗体 12、具有序列号 43 的重链可变区和序列号 53 的轻链可变区的比较抗体 13。

[0244] W02011/096528 中记载的抗体,即具有该文献中的序列号 43 的重链可变区和序列号 47 的轻链可变区的比较抗体 14、具有序列号 51 的重链可变区和序列号 55 的轻链可变区的比较抗体 15、具有序列号 59 的重链可变区和序列号 63 的轻链可变区的比较抗体 16、具有序列号 76 的重链可变区和序列号 80 的轻链可变区的比较抗体 17、具有序列号 84 的重链可变区和序列号 88 的轻链可变区的比较抗体 18、具有序列号 92 的重链可变区和序列号 96 的轻链可变区的比较抗体 19。

[0245] W02011/096519 中记载的抗体,即具有该文献中的序列号 42 的重链可变区和序列

号46的轻链可变区的比较抗体20。

[0246] W02011/096533中记载的抗体,即具有该文献中的序列号43的重链可变区和序列号51的轻链可变区的比较抗体21、具有序列号47的重链可变区和序列号51的轻链可变区的比较抗体22、具有序列号63的重链可变区和序列号67的轻链可变区的比较抗体23。

[0247] W02011/096534中记载的抗体,即具有该文献中的序列号43的重链可变区和序列号47的轻链可变区的比较抗体24、具有序列号43的重链可变区和序列号51的轻链可变区的比较抗体25、具有序列号63的重链可变区和序列号67的轻链可变区的比较抗体26。

[0248] W02013/018894中记载的抗体,即具有该文献中的序列号9的重链可变区和序列号13的轻链可变区的比较抗体27、具有序列号19的重链可变区和序列号23的轻链可变区的比较抗体28、具有序列号9的重链可变区和序列号53的轻链可变区的比较抗体29、具有序列号58的重链可变区和序列号62的轻链可变区的比较抗体30、具有序列号63的重链可变区和序列号65的轻链可变区的比较抗体31、具有序列号69的重链可变区和序列号73的轻链可变区的比较抗体32、具有序列号77的重链可变区和序列号81的轻链可变区的比较抗体33。

[0249] W02013/018892中记载的抗体,即具有该文献中的序列号8的重链可变区和序列号12的轻链可变区的比较抗体34。

[0250] W02013/018891中记载的抗体,即具有该文献中的序列号8的重链可变区和序列号12的轻链可变区的比较抗体35。

[0251] W02013/018889中记载的抗体,即具有该文献中的序列号8的重链可变区和序列号12的轻链可变区的比较抗体36。

[0252] W02010/018883中记载的抗体,即具有该文献中的序列号8的重链可变区和序列号12的轻链可变区的比较抗体37。

[0253] W02013/125636中记载的抗体,即具有该文献中的序列号6的重链可变区和序列号7的轻链可变区的比较抗体38。

[0254] W02013/125654中记载的抗体,即具有该文献中的序列号52的重链可变区和序列号54的轻链可变区的比较抗体39。具有该文献中的序列号21的重链可变区和序列号23的轻链可变区的比较抗体40。具有该文献中的序列号25的重链可变区和序列号23的轻链可变区的比较抗体41。具有该文献中的序列号16的重链可变区和序列号18的轻链可变区的比较抗体42。具有该文献中的序列号29的重链可变区和序列号33的轻链可变区的比较抗体43。具有该文献中的序列号39的重链可变区和序列号43的轻链可变区的比较抗体44。具有该文献中的序列号49的重链可变区和序列号43的轻链可变区的比较抗体45。

[0255] W02013/125630中记载的抗体,即具有该文献中的序列号11的重链可变区和序列号15的轻链可变区的比较抗体46。

[0256] W02013/125640中记载的抗体,即具有该文献中的序列号11的重链可变区和序列号15的轻链可变区的比较抗体47。具有该文献中的序列号21的重链可变区和序列号25的轻链可变区的比较抗体48。

[0257] 此外,对于比较的上述抗体(比较抗体1~48),使用如下得到的抗体:将用于表达重链可变区的氨基酸序列的基因和用于表达轻链可变区的基因,分别插入到已插入人IgG1的重链恒定区的哺乳类细胞表达用载体pcDNA4/myc-His(Life Technologies社制)和已插入人IgG1的轻链恒定区的哺乳类细胞表达用载体pcDNA3.1/myc-His(Life Technologies

社制)中,将制作的2种重组表达载体按照常规方法导入哺乳类细胞,得到人嵌合化或人源化了的抗体,将该抗体使用Hitrap Protein A SepharoseFF (GEヘルスケア社制)进行纯化,替换成PBS(-)并用0.22 μ m的过滤器(ミリポア社制)进行过滤。

[0258] 另外,作为阴性对照,准备了添加了同型对照抗体的孔、未添加抗体的孔和添加了与CAPRIN-1蛋白质反应但对表达CAPRIN-1的人癌细胞表面不显示反应性的抗体的孔。各抗体添加到V底96孔板中,使最终浓度为5 μ g/mL。

[0259] 效应细胞使用利用常规方法从人末梢血单核细胞分离的人NK细胞。使用如下获得的细胞:使用末梢血单核细胞分离用的比重分离液Histopaque (シグマアルドリッチ社)分离人末梢血单核细胞,用被FITC荧光色素标记的抗体(抗人CD3抗体、抗人CD20抗体、抗人CD19抗体、抗人CD11c抗体、抗HLA-DR抗体(ファーマンジェン社))使其反应,使用细胞分选仪(FACS Vantage SE(ベクトン・デッキンソンアンドカンパニー))分离不被上述抗体染色的、包含NK细胞的细胞集团,从而获得;或使用人NK细胞分离试剂盒(ミルテニー社制)分离而获得。准备在添加了上述各抗体的V底96孔板中每1孔添加0.4~2.0 $\times 10^5$ 个人NK细胞而得的板。

[0260] 靶标细胞使用乳癌细胞(BT-474、MDA-MB-361)、大肠癌细胞(HT-29)、肺癌细胞(QG56)、胃癌细胞(NCI-N87)、子宫癌细胞(HEC-1-A)、前列腺癌细胞(22Rv1)、胰癌细胞(Panc10.5)、肝癌细胞(Hep3B)、卵巢癌细胞(SKOV3)、肾癌细胞(Caki-2)、脑瘤细胞(U-87MG)、膀胱癌细胞(T24、HT-1376)、食道癌细胞(OE33)、白血病细胞(OCI-AML5)、淋巴瘤细胞(Ramos)、胆囊癌细胞(TGBC14TKB)、纤维肉瘤细胞(HT-1080)、黑素瘤细胞(G-361)、肾上腺皮质癌(A-673)、尤文氏瘤(RD-ES)、霍奇金淋巴瘤(RPMI1666)、间皮瘤(NCI-H2452)、多发性骨髓瘤(IM-9)、睾丸癌(NT/D1)、甲状腺癌(TT)或头颈癌(FaDu)。分别在50mL容量的离心管中收集 10^6 个上述人癌细胞株,加入100 μ Ci的铬51(パーキンエルマー社制)在37 $^{\circ}$ C孵育1小时。然后用含10%的FBS的RPMI1640培养基洗涤3次,在上述添加了效应细胞以及各抗体的96穴V底板中每1孔添加各 2×10^3 个,在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂的条件下使其反应4小时。反应后,从各孔分别回收从受到毒害的癌细胞释放的培养上清中的包含铬51培养上清的培养上清50 μ L,添加到孔底面涂布了固体闪烁体的LumaPlate-96(パーキンエルマー社制)中,使其干燥,测定从受到毒害的癌细胞释放出的培养上清中的铬51的量,计算出抗CAPRIN-1抗体对癌细胞的抗肿瘤效果。

[0261] 其结果是,对乳癌细胞(BT-474),人源化抗体#7、人源化抗体#10、人源化抗体#6抗体显示54%以上的抗肿瘤效果,人源化抗体#3、人源化抗体#4、人源化抗体#2、人源化抗体#5显示50%以上的活性,人源化抗体#9、人源化抗体#1、人源化抗体#0、人-兔嵌合抗体、人源化抗体#8显示46%以上的活性;与此相对,比较抗体1~48为全部25%以下,阴性对照群均为10%以下。

[0262] 对乳癌细胞(MDA-MB-361),人源化抗体#7、人源化抗体#10、人源化抗体#6抗体显示52%以上的抗肿瘤效果,人源化抗体#3、人源化抗体#4、人源化抗体#2、人源化抗体#5显示45%以上的活性,人源化抗体#9、人源化抗体#1、人源化抗体#0、人-兔嵌合抗体、人源化抗体#8显示40%以上的活性;与此相对,比较抗体1~48全部为25%以下,阴性对照群均为6%以下。

[0263] 对大肠癌细胞(HT-29),人源化抗体#7、人源化抗体#10、人源化抗体#6显示43%以

上的抗肿瘤效果,人源化抗体#3、人源化抗体#4、人源化抗体#2、人源化抗体#5显示40%以上的活性,人源化抗体#9、人源化抗体#1、人源化抗体#0、人-兔嵌合抗体、人源化抗体#8显示35%以上的活性;与此相对,比较抗体1~48全部为20%以下,阴性对照群均为3%以下。

[0264] 对肺癌细胞(QG56),人源化抗体#7、人源化抗体#10、人源化抗体#6显示46%以上的抗肿瘤效果,人源化抗体#3、人源化抗体#4、人源化抗体#2、人源化抗体#5显示42%以上的活性,人源化抗体#9、人源化抗体#1、人源化抗体#0、人-兔嵌合抗体、人源化抗体#8显示38%以上的活性;与此相对,比较抗体1~48全部为22%以下,阴性对照群均为10%以下。

[0265] 对胃癌细胞(NCI-N87),人源化抗体#7、人源化抗体#10、人源化抗体#6显示45%以上的抗肿瘤效果,人源化抗体#3、人源化抗体#4、人源化抗体#2、人源化抗体#5显示38%以上的活性,人源化抗体#9、人源化抗体#1、人源化抗体#0、人-兔嵌合抗体、人源化抗体#8显示34%以上的活性;与此相对,比较抗体1~48全部为15%以下,阴性对照群均为8%以下。

[0266] 对子宫癌细胞(HEC-1-A),人源化抗体#7、人源化抗体#10、人源化抗体#6显示52%以上的抗肿瘤效果,人源化抗体#3、人源化抗体#4、人源化抗体#2、人源化抗体#5显示45%以上的活性,人源化抗体#9、人源化抗体#1、人源化抗体#0、人-兔嵌合抗体、人源化抗体#8显示40%以上的活性;与此相对,比较抗体1~48全部为20%以下,阴性对照群均为5%以下。

[0267] 对前列腺癌细胞(22Rv1),人源化抗体#7、人源化抗体#10、人源化抗体#6显示49%以上的抗肿瘤效果,人源化抗体#3、抗体#4、人源化抗体#2、人源化抗体#5显示45%以上的活性,人源化抗体#9、人源化抗体#1、人源化抗体#0、人-兔嵌合抗体、人源化抗体#8显示38%以上的活性;与此相对,比较抗体1~48全部为20%以下,阴性对照群均为12%以下。

[0268] 对胰癌细胞(Panc10.5),人源化抗体#7、人源化抗体#10、人源化抗体#6显示35%以上的抗肿瘤效果,人源化抗体#3、人源化抗体#4、人源化抗体#2、人源化抗体#5显示30%以上的活性,人源化抗体#9、人源化抗体#1、人源化抗体#0、人-兔嵌合抗体、人源化抗体#8显示24%以上的活性;与此相对,比较抗体1~48全部为10%以下,阴性对照群均为2%以下。

[0269] 对肝癌细胞(Hep3B),人源化抗体#7、人源化抗体#10、人源化抗体#6显示28%以上的抗肿瘤效果,人源化抗体#3、人源化抗体#4、人源化抗体#2、人源化抗体#5显示25%以上的活性,人源化抗体#9、人源化抗体#1、人源化抗体#0、人-兔嵌合抗体、人源化抗体#8显示21%以上的活性;与此相对,比较抗体1~48全部为12%以下,阴性对照群均为5%以下。

[0270] 对卵巢癌细胞(SKOV3),人源化抗体#7、人源化抗体#10、人源化抗体#6显示35%以上的抗肿瘤效果,人源化抗体#3、人源化抗体#4、人源化抗体#2、人源化抗体#5显示31%以上的活性,人源化抗体#9、人源化抗体#1、人源化抗体#0、人-兔嵌合抗体、人源化抗体#8显示27%以上的活性;与此相对,比较抗体1~48全部为15%以下,阴性对照群均为5%以下。

[0271] 对肾癌细胞(Caki-2),人源化抗体#7、人源化抗体#10、人源化抗体#6显示37%以上的抗肿瘤效果,人源化抗体#3、人源化抗体#4、人源化抗体#2、人源化抗体#5显示33%以上的活性,人源化抗体#9、人源化抗体#1、人源化抗体#0、人-兔嵌合抗体、人源化抗体#8显示26%以上的活性;与此相对,比较抗体1~48全部为15%以下,阴性对照群均为5%以下。

[0272] 对脑瘤细胞(U-87MG),人源化抗体#7、人源化抗体#10、人源化抗体#6显示36%以上的抗肿瘤效果,人源化抗体#3、人源化抗体#4、人源化抗体#2、人源化抗体#5显示29%以

上的活性,人源化抗体#9、人源化抗体#1、人源化抗体#0、人-兔嵌合抗体、人源化抗体#8显示24%以上的活性;与此相对,比较抗体1~48全部为10%以下,阴性对照群均为6%以下。

[0273] 对膀胱癌细胞(T24),人源化抗体#7、人源化抗体#10、人源化抗体#6显示36%以上的抗肿瘤效果,人源化抗体#3、人源化抗体#4、人源化抗体#2、人源化抗体#5显示33%以上的活性,人源化抗体#9、人源化抗体#1、人源化抗体#0、人-兔嵌合抗体、人源化抗体#8显示30%以上的活性;与此相对,比较抗体1~48全部为15%以下,阴性对照群均为6%以下。

[0274] 对膀胱癌细胞(HT-1376),人源化抗体#7、人源化抗体#10、人源化抗体#6显示45%以上的抗肿瘤效果,人源化抗体#3、人源化抗体#4、人源化抗体#2、人源化抗体#5显示40%以上的活性,人源化抗体#9、人源化抗体#1、人源化抗体#0、人-兔嵌合抗体、人源化抗体#8显示28%以上的活性;与此相对,比较抗体1~48全部为20%以下,阴性对照群均为7%以下。

[0275] 对食道癌细胞(OE33),人源化抗体#7、人源化抗体#10、人源化抗体#6显示35%以上的抗肿瘤效果,人源化抗体#3、人源化抗体#4、人源化抗体#2、人源化抗体#5显示33%以上的活性,人源化抗体#9、人源化抗体#1、人源化抗体#0、人-兔嵌合抗体、人源化抗体#8显示30%以上的活性;与此相对,比较抗体1~48全部为15%以下,阴性对照群均为6%以下。

[0276] 对白血病细胞(OCI-AML5),人源化抗体#7、人源化抗体#10、人源化抗体#6显示20%以上的抗肿瘤效果,人源化抗体#3、人源化抗体#4、人源化抗体#2、人源化抗体#5显示18%以上的活性,人源化抗体#9、人源化抗体#1、人源化抗体#0、人-兔嵌合抗体、人源化抗体#8显示15%以上的活性;与此相对,比较抗体1~48全部为10%以下,阴性对照群均为6%以下。

[0277] 对淋巴瘤细胞(Ramos),人源化抗体#7、人源化抗体#10、人源化抗体#6显示20%以上的抗肿瘤效果,人源化抗体#3、人源化抗体#4、人源化抗体#2、人源化抗体#5显示18%以上的活性,抗体#9、抗体#1、人源化抗体#0、人-兔嵌合抗体、人源化抗体#8显示15%以上的活性;与此相对,比较抗体1~48全部为10%以下,阴性对照群均为6%以下。

[0278] 对胆囊癌细胞(TGBC14TKB),人源化抗体#7、人源化抗体#10、人源化抗体#6显示35%以上的抗肿瘤效果,人源化抗体#3、人源化抗体#4、人源化抗体#2、人源化抗体#5显示30%以上的活性,人源化抗体#9、人源化抗体#1、人源化抗体#0、人-兔嵌合抗体、人源化抗体#8显示25%以上的活性;与此相对,比较抗体1~48全部为15%以下,阴性对照群均为6%以下。

[0279] 对纤维肉瘤细胞(HT-1080),人源化抗体#7、人源化抗体#10、人源化抗体#6显示30%以上的抗肿瘤效果,人源化抗体#3、抗体#4、人源化抗体#2、人源化抗体#5显示25%以上的活性,人源化抗体#9、人源化抗体#1、人源化抗体#0、人-兔嵌合抗体、人源化抗体#8显示20%以上的活性;与此相对,比较抗体1~48全部为10%以下,阴性对照群均为6%以下。

[0280] 对黑素瘤(G-361),人源化抗体#7、人源化抗体#10、人源化抗体#6显示25%以上的抗肿瘤效果,人源化抗体#3、人源化抗体#4、人源化抗体#2、人源化抗体#5显示21%以上的活性,人源化抗体#9、人源化抗体#1、人源化抗体#0、人-兔嵌合抗体、人源化抗体#8显示15%以上的活性;与此相对,比较抗体1~48全部为8%以下,阴性对照群均为6%以下。

[0281] 对肾上腺皮质癌细胞(A-673),人源化抗体#7、人源化抗体#10、人源化抗体#6显示50%以上的抗肿瘤效果,人源化抗体#3、人源化抗体#4、人源化抗体#2、人源化抗体#5显示

46%以上的活性,人源化抗体#9、人源化抗体#1、人源化抗体#0、人-兔嵌合抗体、人源化抗体#8显示40%以上的活性;与此相对,比较抗体1~48全部为20%以下,阴性对照群均为8%以下。

[0282] 对尤文氏瘤细胞(RD-ES),人源化抗体#7、人源化抗体#10、人源化抗体#6显示48%以上的抗肿瘤效果,人源化抗体#3、人源化抗体#4、人源化抗体#2、人源化抗体#5显示40%以上的活性,人源化抗体#9、人源化抗体#1、人源化抗体#0、人-兔嵌合抗体、人源化抗体#8显示31%以上的活性;与此相对,比较抗体1~48全部为15%以下,阴性对照群均为6%以下。

[0283] 对霍奇金淋巴瘤细胞(RPMI1666),人源化抗体#7、人源化抗体#10、人源化抗体#6显示40%以上的抗肿瘤效果,人源化抗体#3、人源化抗体#4、人源化抗体#2、人源化抗体#5显示36%以上的活性,人源化抗体#9、人源化抗体#1、人源化抗体#0、人-兔嵌合抗体、人源化抗体#8显示30%以上的活性;与此相对,比较抗体1~48全部为20%以下,阴性对照群均为5%以下。

[0284] 对间皮瘤细胞(NCI-H2452),人源化抗体#7、人源化抗体#10、人源化抗体#6显示35%以上的抗肿瘤效果,人源化抗体#3、人源化抗体#4、人源化抗体#2、人源化抗体#5显示39%以上的活性,人源化抗体#9、人源化抗体#1、人源化抗体#0、人-兔嵌合抗体、人源化抗体#8显示31%以上的活性;与此相对,比较抗体1~48全部为10%以下,阴性对照群均为5%以下。

[0285] 对多发性骨髓瘤细胞(IM-9),人源化抗体#7、人源化抗体#10、人源化抗体#6显示35%以上的抗肿瘤效果,人源化抗体#3、人源化抗体#4、抗体#2、人源化抗体#5显示30%以上的活性,人源化抗体#9、抗体#1、人源化抗体#0、人-兔嵌合抗体、人源化抗体#8显示27%以上的活性;与此相对,比较抗体1~48全部为10%以下,阴性对照群均为6%以下。

[0286] 对睾丸癌细胞(NT/D1),人源化抗体#7、人源化抗体#10、人源化抗体#6显示37%以上的抗肿瘤效果,人源化抗体#3、人源化抗体#4、人源化抗体#2、人源化抗体#5显示30%以上的活性,人源化抗体#9、人源化抗体#1、人源化抗体#0、人-兔嵌合抗体、人源化抗体#8显示25%以上的活性;与此相对,比较抗体1~48全部为11%以下,阴性对照群均为5%以下。

[0287] 对甲状腺癌细胞(TT),人源化抗体#7、人源化抗体#10、人源化抗体#6显示42%以上的抗肿瘤效果,人源化抗体#3、人源化抗体#4、人源化抗体#2、人源化抗体#5显示35%以上的活性,人源化抗体#9、人源化抗体#1、人源化抗体#0、人-兔嵌合抗体、人源化抗体#8显示30%以上的活性;与此相对,比较抗体1~48全部为15%以下,阴性对照群均为5%以下。

[0288] 对头颈癌细胞(FaDu),人源化抗体#7、人源化抗体#10、人源化抗体#6显示50%以上的抗肿瘤效果,人源化抗体#3、人源化抗体#4、人源化抗体#2、人源化抗体#5显示40%以上的活性,人源化抗体#9、人源化抗体#1、人源化抗体#0、人-兔嵌合抗体、人源化抗体#8显示35%以上的活性;与此相对,比较抗体1~48全部为20%以下,阴性对照群均为8%以下。

[0289] 由以上的结果明确了,人源化抗体#0~#10和人-兔嵌合抗体对乳癌、肾癌、胰癌、大肠癌、肺癌、脑瘤、胃癌、子宫癌、卵巢癌、前列腺癌、膀胱癌、食道癌、白血病、淋巴瘤、肝癌、胆囊癌、肉瘤、黑素瘤、肾上腺皮质癌、尤文氏瘤、霍奇金淋巴瘤、间皮瘤、多发性骨髓瘤、睾丸癌、甲状腺癌或头颈癌,与比较抗体相比显示有意义地强的抗肿瘤效果。

[0290] 另外,人源化抗体#0~#10和人-兔嵌合抗体与W02010/016526、W02011/096517、

W02011/096528、W02011/096519、W02011/096533、W02011/096534、W02011/096535、W02013/018886、W02013/018894、W02013/018892、W02013/018891、W02013/018889、W02013/018883、W02013/125636、W02013/125654、W02013/125630、W02013/125640、W02013/147169、W02013/147176的实施例所记载的全部针对CAPRIN-1的抗体相比,对上述记载的乳癌、肾癌、胰癌、大肠癌、肺癌、脑瘤、胃癌、子宫癌、卵巢癌、前列腺癌、膀胱癌、食道癌、白血病、淋巴瘤、肝癌、胆囊癌、肉瘤、黑素瘤、肾上腺皮质癌、尤文氏瘤、霍奇金淋巴瘤、间皮瘤、多发性骨髓瘤、睾丸癌、甲状腺癌或头颈癌均显示有意义地强的抗肿瘤活性。

[0291] 此外,抗肿瘤效果是显示将针对CAPRIN-1的抗体、效应细胞和摄入了铬51的靶标细胞混合并培养4小时,测定培养后释放到培养基中的铬51的量,通过以下计算式*计算出的对癌细胞株的细胞毒活性的结果。

[0292] *式:细胞毒活性(%)=(加入了针对CAPRIN-1的抗体和效应细胞时从靶标细胞游离的铬51游离量-从靶标细胞自然游离的铬51自然游离量)÷(从加入了1N盐酸的靶标细胞游离的铬51游离量-从靶标细胞自然游离的铬51自然游离量)×100。

[0293] 实施例6-1:替换了重链恒定区中的氨基酸的人源化抗CAPRIN-1单克隆抗体的制作

[0294] 制作具有替换了实施例3中得到的人源化抗体#0、#2、#3、#4、#5、#6、#7、#8、#9、#10的重链恒定区中的一部氨基酸而成的序列号33所记载的重链恒定区的抗CAPRIN-1抗体(以下记载为改I型抗CAPRIN-1抗体)。合成编码具有上述重链恒定区和序列号7所示的重链可变区的重链氨基酸序列的DNA,将其按照常规方法插入哺乳类细胞表达用载体中。另外,准备将编码序列号11所示的轻链可变区的氨基酸的DNA插入到已插入编码人IgG1的轻链恒定区的基因的哺乳类细胞表达用载体中而成的重组表达载体。将制作的2种重组表达载体按照常规方法导入哺乳类细胞中,获得人源化抗体#0的改I型抗CAPRIN-1抗体#0的培养上清。进而对于实施例3所记载的人源化抗体#1、#2、#3、#4、#5、#6、#7、#8、#9、#10也通过与上述同样的方法分别获得包含改I型抗CAPRIN-1抗体#1、#2、#3、#4、#5、#6、#7、#8、#9、#10的培养上清。将所得的包含改I型抗CAPRIN-1抗体#0~#10的各培养上清按照常规方法使用Hitrap Protein A SepharoseFF(GEヘルスケア社制)进行纯化,替换成PBS(-)并用0.22μm的过滤器(ミロア社制)进行过滤,从而制备改I型抗CAPRIN-1抗体#0~#10。

[0295] 接着制作具有替换了实施例3中得到的人源化抗体#0、#1、#2、#3、#4、#5、#6、#7、#8、#9、#10的重链恒定区中的一部分氨基酸而成的序列号34所记载的重链恒定的抗CAPRIN-1抗体(以下记载为改II型抗CAPRIN-1抗体)。合成编码具有上述重链恒定区和序列号7所示的重链可变区的重链氨基酸序列的DNA,将其按照常规方法插入哺乳类细胞表达用载体中。另外,准备上述所制作的、将编码序列号11所示的轻链可变区的氨基酸的DNA插入到已插入编码人IgG1的轻链恒定区的基因的哺乳类细胞表达用载体中而成的重组表达载体。将这2种重组表达载体按照常规方法导入哺乳类细胞中,获得改II型抗CAPRIN-1抗体#0的培养上清。进而对于实施例3所记载的人源化抗体#1、#2、#3、#4、#5、#6、#7、#8、#9、#10也通过与上述同样的方法分别获得包含改II型抗CAPRIN-1抗体#1、#2、#3、#4、#5、#6、#7、#8、#9、#10的培养上清。将所得的包含改II型抗CAPRIN-1抗体#0~#10的各培养上清按照常规方法使用Hitrap Protein A SepharoseFF(GEヘルスケア社制)进行纯化,替换成PBS(-)并用0.22μm的过滤器(ミロア社制)进行过滤,从而制备改II型抗CAPRIN-1抗体#0~#10。

[0296] 实施例6-2:具有在结合于重链恒定区的全部N-糖苷键糖链中、糖链还原末端的N-乙酰葡萄糖胺上未结合岩藻糖的糖链的抗CAPRIN-1抗体的制作

[0297] 接着,通过以下方法获得具有在结合于实施例3中得到的人源化抗体#0、#1、#2、#3、#4、#5、#6、#7、#8、#9、#10的重链恒定区的全部N-糖苷键糖链中、糖链还原末端的N-乙酰葡萄糖胺上未结合岩藻糖的糖链的抗CAPRIN-1抗体(以下记载为改III型抗CAPRIN-1抗体)。按照常规方法将插入有GDP-6-脱氧-D-来苏-4-己酮糖还原酶(RMD)基因的包含新霉素抗性基因的哺乳类细胞表达载体使用基因导入试剂FreeStyle™ MAX Reagent(Life technologies)导入哺乳类细胞株CHO细胞中,所述GDP-6-脱氧-D-来苏-4-己酮糖还原酶是不催化将GDP-6-脱氧-D-来苏-4-己酮糖转换为GDP-L-岩藻糖的反应的酶。将导入了上述基因的CHO细胞用包含G-418的培养液进行培养,制作RMD表达的CHO细胞的稳定池(stable pool)。从该稳定池(stable pool)通过有限稀释法克隆化7个RMD恒常表达的CHO细胞。通过定量PCR法每隔1周评价克隆化的7个各RMD-CHO细胞中的RMD基因表达量,评价3次,选定RMD基因恒常稳定表达的CHO细胞(RMD-CHO细胞)。向恒常表达RMD的上述RMD-CHO细胞中,与实施例3同样地,分别按照常规方法导入将编码序列号7所示的重链可变区的氨基酸序列的基因、和编码序列号11所示的轻链可变区的氨基酸的基因分别插入已插入人IgG1的重链恒定区的哺乳类细胞表达用载体和已插入人IgG1的轻链恒定区的哺乳类细胞表达用载体而得的重组表达载体,获得包含改III型抗CAPRIN-1抗体#0的培养上清。进而对于实施例3所记载的人源化抗体#1、#2、#3、#4、#5、#6、#7、#8、#9、#10也通过与上述同样的方法分别获得包含改III型抗CAPRIN-1抗体#1、#2、#3、#4、#5、#6、#7、#8、#9、#10的培养上清。将所得的包含改III型抗CAPRIN-1抗体#0~#10的各培养上清按照常规方法使用Hitrap Protein A SepharoseFF(GEヘルスケア社制)进行纯化,替换成PBS(-)并用0.22μm的过滤器(ミロア社制)进行过滤,从而进行制备,获得包含改III型抗CAPRIN-1抗体#0的抗体组合物。同样地获得包含改III型抗CAPRIN-1抗体#1~#10的抗体纯化物。通过LabChip(注册商标)GXII(PerkinElmer社)来评价纯化后的这些抗体组合物中所含的具有在结合于重链恒定区的全部N-糖苷键糖链中、糖链还原末端的N-乙酰葡萄糖胺上未结合岩藻糖的糖链的抗CAPRIN-1抗体的比例,结果均为80%以上。

[0298] 将向上述RMD-CHO细胞中,与实施例3同样地分别按照常规方法导入将编码序列号7所示的重链可变区的氨基酸序列的基因、和编码序列号11所示的轻链可变区的氨基酸的基因分别插入到已插入人IgG1的重链恒定区的包含潮霉素抗性基因的哺乳类细胞表达用载体和已插入人IgG1的轻链恒定区的包含潮霉素抗性基因的哺乳类细胞表达用载体而得的重组表达载体,将获得的上述细胞用包含潮霉素B的培养液进行培养,制作表达改III型抗CAPRIN-1抗体#0的稳定池(stable pool)。由该稳定池(stable pool)通过有限稀释法制作恒常稳定表达改III型抗CAPRIN-1抗体#0的细胞。通过LabChip(注册商标)GXII(PerkinElmer社)来评价各细胞所产生的包含改III型抗CAPRIN-1抗体#0~#10的纯化后抗体组合物中所含的具有在结合于重链恒定区的全部N-糖苷键糖链中、糖链还原末端的N-乙酰葡萄糖胺上未结合岩藻糖的糖链的抗CAPRIN-1抗体的比例,结果均为80%以上。

[0299] 实施例6-3:重链恒定区中的氨基酸被替换、且具有在结合于重链恒定区的全部N-糖苷键糖链中、糖链还原末端的N-乙酰葡萄糖胺上未结合岩藻糖的糖链的抗CAPRIN-1抗体的制作

[0300] 接着,制作具有替换实施例3所记载的人源化抗体#0、#1、#2、#3、#4、#5、#6、#7、#8、#9、#10的重链恒定区中的一部分氨基酸而成的序列号34记载的重链恒定区、且具有在结合于抗体的重链恒定区的全部N-糖苷键糖链中、糖链还原末端的N-乙酰葡萄糖胺上未结合岩藻糖的糖链的抗CAPRIN-1抗体(以下记载为改IV型抗CAPRIN-1抗体)。向实施例6-2中制作的恒常表达GDP-6-脱氧-D-来苏-4-己酮糖还原酶(RMD)的RMD-CHO细胞中,导入实施例6-1中制作的合成编码具有突变型重链恒定区和序列号7所示的人IgG1的重链可变区的重链氨基酸序列的DNA并将其按照常规方法插入而得的哺乳类细胞表达用载体、以及合成编码序列号11所示的轻链可变区的氨基酸的DNA并将其插入到已插入编码人IgG1的轻链恒定区的氨基酸的基因的哺乳类细胞表达用载体中而得的重组表达载体,获得人源化抗体#0的改IV型抗CAPRIN-1抗体#0的培养上清。进而对于实施例3所记载的人源化抗体#1、#2、#3、#4、#5、#6、#7、#8、#9、#10也通过与上述同样的方法分别获得包含改IV型抗CAPRIN-1抗体#1、#2、#3、#4、#5、#6、#7、#8、#9、#10的培养上清。将所得的包含改IV型抗CAPRIN-1抗体#0~#10的各培养上清按照常规方法使用Hitrap Protein A SepharoseFF(GEヘルスケア社制)进行纯化,替换成PBS(-)并用0.22 μ m的过滤器(ミリポア社制)进行过滤,获得包含改IV型抗CAPRIN-1抗体#0的抗体组合物。同样地获得包含改IV型抗CAPRIN-1抗体#1~#10的抗体纯化物。通过LabChip(注册商标)GXII(PerkinElmer社)来评价纯化后的这些抗体组合物中所含的具有在结合于重链恒定区的全部N-糖苷键糖链中、糖链还原末端的N-乙酰葡萄糖胺上未结合岩藻糖的糖链的抗CAPRIN-1抗体的比例,结果均为80%以上。

[0301] 将实施例6-1中制作的、导入了合成编码具有突变型重链恒定区和序列号7所示的人IgG1的重链可变区的重链氨基酸序列的DNA并将其按照常规方法插入而成的包含潮霉素耐性基因的哺乳类细胞表达用载体、和合成编码序列号11所示的轻链可变区的氨基酸的DNA并将其插入到已插入编码人IgG1的轻链恒定区的氨基酸的基因的包含潮霉素耐性基因的哺乳类细胞表达用载体中而得的重组表达载体的上述细胞,用包含潮霉素B的培养液进行培养,制作表达改IV型抗CAPRIN-1抗体#0的稳定池(stable pool)。从稳定池(stable pool)通过有限稀释法制作恒常稳定表达改IV型抗CAPRIN-1抗体#0的细胞。进而对于实施例3所记载的人源化抗体#1、#2、#3、#4、#5、#6、#7、#8、#9、#10也通过与上述同样的方法制作恒常稳定表达改IV型抗CAPRIN-1抗体#1、#2、#3、#4、#5、#6、#7、#8、#9、#10的细胞。通过LabChip(注册商标)GXII(PerkinElmer社)来评价包含各细胞所产生的包含改IV型抗CAPRIN-1抗体#0~#10的纯化后的抗体组合物中所含的具有在结合于重链恒定区的全部N-糖苷键糖链中、糖链还原末端的N-乙酰葡萄糖胺上未结合岩藻糖的糖链的抗CAPRIN-1抗体的比例,结果均为80%以上。

[0302] 实施例7:改变型抗CAPRIN-1抗体的抗原特异性和对癌细胞的反应性

[0303] 通过与实施例4同样的方法确认实施例6-1~3中制备的包含改I型抗CAPRIN-1抗体#0~#10、改II型抗CAPRIN-1抗体#0~#10、改III型抗CAPRIN-1抗体#0~#10的各抗体组合物和包含改抗IV型CAPRIN-1抗体#0~#10的各抗体组合物(以下记载为改变型抗CAPRIN-1抗体)对CAPRIN-1蛋白质的特异反应性。其结果是,作为阴性对照使用的添加了已确认不与CAPRIN-1蛋白质反应的人IgG抗体的孔的吸光度值,与未添加抗体的孔为同等的低值;与此相对,分别添加了各改变型抗CAPRIN-1抗体的孔的吸光度值全部为同等高的值。另外,对未固相化CAPRIN-1蛋白质的孔,全部改变型抗CAPRIN-1抗体仅显示与阴性对照同等的吸光

度值。由该结果确认了,全部改变型抗CAPRIN-1抗体与CAPRIN-1蛋白质特异性地反应。

[0304] 接着,通过与实施例4同样的方法确认各改变型抗CAPRIN-1抗体对各种人癌细胞的反应性。本评价中使用乳癌细胞(BT-474、MDA-MB-361)、大肠癌细胞(HT-29)、肺癌细胞(QG56)、胃癌细胞(NCI-N87)、子宫癌细胞(HEC-1-A)、前列腺癌细胞(22Rv1)、胰癌细胞(Panc10.5)、肝癌细胞(Hep3B)、卵巢癌细胞(SKOV3)、肾癌细胞(Caki-2)、脑瘤细胞(U-87MG)、膀胱癌细胞(T24、HT-1376)、食道癌细胞(OE33)、白血病细胞(OCI-AML5)、淋巴瘤细胞(Ramos)、胆囊癌细胞(TGBC14TKB)、纤维肉瘤细胞(HT-1080)、黑素瘤细胞(G-361)、肾上腺皮质癌细胞(A-673)、尤文氏瘤细胞(RD-ES)、霍奇金淋巴瘤细胞(RPMI1666)、间皮瘤细胞(NCI-H2452)、多发性骨髓瘤细胞(IM-9)、睾丸癌细胞(NT/D1)、甲状腺癌细胞(TT)、头颈癌细胞(FaDu)。其结果是,对于评价中使用的所有癌细胞,各改变型抗CAPRIN-1抗体的荧光强度均比使用阴性对照时的荧光强度高。由以上的结果确认了,全部改变型抗CAPRIN-1抗体与位于人癌细胞膜表面上的CAPRIN-1蛋白质特异性地反应。

[0305] 实施例8:改变型抗CAPRIN-1抗体对各种人癌细胞的抗肿瘤活性

[0306] 与实施例5同样地通过ADCC活性分别评价实施例6-1~6-3中制备的改变型抗CAPRIN-1抗体(包含改I型抗CAPRIN-1抗体#0~#10、改II型抗CAPRIN-1抗体#0~#10、改III型抗CAPRIN-1抗体#0~#10的各抗体组合物以及包含改IV型抗CAPRIN-1抗体#0~#10的各抗体组合物)对各种人癌细胞的抗肿瘤效果。作为阴性对照,准备了添加了同型对照抗体的孔、未添加抗体的孔和添加了虽然与CAPRIN-1蛋白质反应但与表达CAPRIN-1的人癌细胞表面不显示反应性的抗体的孔。作为比较抗体,使用改变之前的各抗CAPRIN-1抗体即人源化抗体#0~#10。各抗体添加到V底96孔板使最终浓度为0.01~1 μ g/mL。

[0307] 靶标细胞使用乳癌细胞(BT-474、MDA-MB-361)、大肠癌细胞(HT-29)、肺癌细胞(QG56)、胃癌细胞(NCI-N87)、子宫癌细胞(HEC-1-A)、前列腺癌细胞(22Rv1)、胰癌细胞(Panc10.5)、肝癌细胞(Hep3B)、卵巢癌细胞(SKOV3)、肾癌细胞(Caki-2)、脑瘤细胞(U-87MG)、膀胱癌细胞(T24、HT-1376)、食道癌细胞(OE33)、白血病细胞(OCI-AML5)、淋巴瘤细胞(Ramos)、胆囊癌细胞(TGBC14TKB)、纤维肉瘤细胞(HT-1080)、黑素瘤细胞(G-361)、肾上腺皮质癌细胞(A-673)、尤文氏瘤细胞(RD-ES)、霍奇金淋巴瘤细胞(RPMI1666)、间皮瘤细胞(NCI-H2452)、多发性骨髓瘤细胞(IM-9)、睾丸癌细胞(NT/D1)、甲状腺癌细胞(TT)、头颈癌细胞(FaDu)。在50mL容量的离心管分别收集10⁶个上述人癌细胞株,加入100 μ Ci的铬51(パーキンエルマー社制)在37 $^{\circ}$ C孵育1小时后,用包含10%的FBS的RPMI1640培养基洗涤3次,在添加了所述各抗体的96穴V底板中每1孔各添加2 \times 10³个使其反应。

[0308] 效应细胞使用利用常规方法从人末梢血单核细胞分离的人NK细胞。准备在添加上述各抗体、靶标细胞并使其反应后的V底96孔板中每1孔添加0.4~2.0 \times 10⁵个人NK细胞而得的板,在37 $^{\circ}$ C、5%、CO₂的条件下使其反应4小时反应。反应后,从各孔分别回收包含从受到毒害的癌细胞释放出的铬51的培养上清各50 μ L,通过与实施例5同样的方法测定从受到毒害的癌细胞释放出的培养上清中的铬51的量,计算出抗CAPRIN-1抗体对癌细胞的抗肿瘤效果。

[0309] 其结果是,对乳癌细胞(BT-474),作为包含改变型抗CAPRIN-1抗体的改I型抗CAPRIN-1抗体#0~#10、改II型抗CAPRIN-1抗体#0~#10、改III型抗CAPRIN-1抗体#0~#10的各抗体组合物以及包含改IV型抗CAPRIN-1抗体#0~#10的各抗体组合物分别显示出与阴

性对照相比较强的抗肿瘤效果。另外,包含改I型抗CAPRIN-1抗体#0~#10、改II型抗CAPRIN-1抗体#0~#10以及改III型抗CAPRIN-1抗体#0~#10的各抗体组合物在显示与作为比较抗体的改变之前的抗体(人源化抗体#0~#10)各自所示的抗肿瘤效果相同的抗肿瘤效果时的抗体浓度,与改变之前的各抗体浓度相比为约13~20分之1的浓度。另外,包含改IV型抗CAPRIN-1抗体#0~#10的各抗体组合物在获得与改变之前的抗体相同的抗肿瘤效果时,与改变之前的各抗体浓度相比为约150分之1的浓度。由以上的结果判明了,改变型抗CAPRIN-1抗体(包含改I型抗CAPRIN-1抗体#0~#10、改II型抗CAPRIN-1抗体#0~#10、改III型抗CAPRIN-1抗体#0~#10和改IV型抗CAPRIN-1抗体#0~#10的各抗体组合物)与改变之前的各抗体相比抗肿瘤活性提高。另外判明了,包含改IV型抗CAPRIN-1抗体#0~#10的各抗体组合物,与包含改I型抗CAPRIN-1抗体#0~#10、改II型抗CAPRIN-1抗体#0~#10和改III型抗CAPRIN-1抗体#0~#10的各抗体组合物相比,获得了更强的抗肿瘤效果。

[0310] 此外,对评价中使用的乳癌细胞(MDA-MB-361)、大肠癌细胞(HT-29)、肺癌细胞(QG56)、胃癌细胞(NCI-N87)、子宫癌细胞(HEC-1-A)、前列腺癌细胞(22Rv1)、胰癌细胞(Panc10.5)、肝癌细胞(Hep3B)、卵巢癌细胞(SKOV3)、肾癌细胞(Caki-2)、脑瘤细胞(U-87MG)、膀胱癌细胞(T24、HT-1376)、食道癌细胞(OE33)、白血病细胞(OCI-AML5)、淋巴瘤细胞(Ramos)、胆囊癌细胞(TGBC14TKB)、纤维肉瘤细胞(HT-1080)、黑素瘤细胞(G-361)、肾上腺皮质癌细胞(A-673)、尤文氏瘤细胞(RD-ES)、霍奇金淋巴瘤细胞(RPMI1666)、间皮瘤细胞(NCI-H2452)、多发性骨髓瘤细胞(IM-9)、睾丸癌细胞(NT/D1)、甲状腺癌细胞(TT)、头颈癌细胞(FaDu),同样也获得了更强的抗肿瘤效果。

[0311] 产业上的可利用性

[0312] 本发明的抗体对于癌的治疗和/或预防是有用的。

[0313] 此外,将本说明书中引用的所有刊物、专利和专利申请直接作为参考引入本说明书中。

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser His
 20 25 30

Ser Leu Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Asp Ile Arg Ser Gly Gly Ser Ala Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala Lys
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Thr
 85 90 95

Arg Thr Asn Gly Pro Ser Asp Leu Thr Asn Arg Leu Asp Leu Trp Gly
 100 105 110

[0003]

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 8

<211> 121

<212> PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 8

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser His
 20 25 30

Ser Leu Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Asp Ile Arg Ser Gly Gly Ser Ala Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala Lys
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr
 85 90 95

Arg Thr Asn Gly Pro Ser Asp Leu Thr Asn Arg Leu Asp Leu Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 9

<211> 120

[0004]

<212> PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 9

Gln Ser Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser
 1 5 10 15

Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser His Ser
 20 25 30

Leu Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 35 40 45

Asp Ile Arg Ser Gly Gly Ser Ala Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly
 50 55 60

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Thr Ser Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
 65 70 75 80

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Thr Arg
85 90 95

Thr Asn Gly Pro Ser Asp Leu Thr Asn Arg Leu Asp Leu Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 10

<211> 121

<212> PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 10

Glu Gln Ser Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

[0005]

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser His
20 25 30

Ser Leu Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Asp Ile Arg Ser Gly Gly Ser Ala Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr
85 90 95

Arg Thr Asn Gly Pro Ser Asp Leu Thr Asn Arg Leu Asp Leu Trp Gly

100

105

110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 11

<211> 113

<212> PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 11

Ala Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Gln Ser Leu Tyr Asn Asn
 20 25 30

[0006]

Glu Asn Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg
 35 40 45

Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
 65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Phe Ala Ile Tyr Tyr Cys Leu Gly Glu Phe Ser Cys
 85 90 95

Gly Ser Ala Asp Cys Phe Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110

Lys

<210> 12
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> 人 (Homo sapiens)

<400> 12

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Gln Ser Leu Tyr Asn Asn
 20 25 30

Glu Asn Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Arg
 35 40 45

Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe
 50 55 60

[0007]

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Leu
 65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Glu Phe Ser Cys
 85 90 95

Gly Ser Ala Asp Cys Phe Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110

Lys

<210> 13
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> 人 (Homo sapiens)

<400> 13

Glu Asn Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Arg
 35 40 45

Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
 65 70 75 80

Gln Cys Glu Asp Phe Ala Ile Tyr Tyr Cys Leu Gly Glu Phe Ser Cys
 85 90 95

Gly Ser Ala Asp Cys Phe Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110

Lys

[0009]

<210> 15
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 人 (Homo sapiens)

<400> 15

Gln Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp
 1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Gln Ser Leu Tyr Asn Asn Glu
 20 25 30

Asn Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Arg Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
 65 70 75 80

Cys Glu Asp Phe Ala Ile Tyr Tyr Cys Leu Gly Glu Phe Ser Cys Gly
 85 90 95

Ser Ala Asp Cys Phe Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

- <210> 16
- <211> 5562
- <212> DNA
- <213> 人 (Homo sapiens)

- <220>
- <221> CDS
- <222> (190).. (2319)

[0010]

<400> 16
 cagagggctg ctggctggct aagtcctcc cgctcccggc tctcgctca ctaggagcgg 60
 ctctcggtgc agcgggacag ggcgaagcgg cctgcgcca cggagcgcgc gacactgccc 120
 ggaagggacc gccacccttg cccctcagc tgcccactcg tgattccag cggcctccgc 180
 gcgcgcacg atg ccc tcg gcc acc agc cac agc ggg agc ggc agc aag tcg 231
 Met Pro Ser Ala Thr Ser His Ser Gly Ser Gly Ser Lys Ser
 1 5 10
 tcc gga ccg cca ccg ccg tcg ggt tcc tcc ggg agt gag gcg gcc gcg 279
 Ser Gly Pro Pro Pro Pro Ser Gly Ser Ser Gly Ser Glu Ala Ala Ala
 15 20 25 30
 gga gcc ggg gcc gcc gcg ccg gct tct cag cac ccc gca acc ggc acc 327
 Gly Ala Gly Ala Ala Ala Pro Ala Ser Gln His Pro Ala Thr Gly Thr
 35 40 45
 ggc gct gtc cag acc gag gcc atg aag cag att ctc ggg gtg atc gac 375
 Gly Ala Val Gln Thr Glu Ala Met Lys Gln Ile Leu Gly Val Ile Asp
 50 55 60

aag aaa ctt cgg aac ctg gag aag aaa aag ggt aag ctt gat gat tac	423
Lys Lys Leu Arg Asn Leu Glu Lys Lys Lys Gly Lys Leu Asp Asp Tyr	
65 70 75	
cag gaa cga atg aac aaa ggg gaa agg ctt aat caa gat cag ctg gat	471
Gln Glu Arg Met Asn Lys Gly Glu Arg Leu Asn Gln Asp Gln Leu Asp	
80 85 90	
gcc gtt tet aag tac cag gaa gtc aca aat aat ttg gag ttt gca aaa	519
Ala Val Ser Lys Tyr Gln Glu Val Thr Asn Asn Leu Glu Phe Ala Lys	
95 100 105 110	
gaa tta cag agg agt ttc atg gca cta agt caa gat att cag aaa aca	567
Glu Leu Gln Arg Ser Phe Met Ala Leu Ser Gln Asp Ile Gln Lys Thr	
115 120 125	
ata aag aag aca gca cgt cgg gag cag ctt atg aga gaa gaa gct gaa	615
Ile Lys Lys Thr Ala Arg Arg Glu Gln Leu Met Arg Glu Glu Ala Glu	
130 135 140	
cag aaa cgt tta aaa act gta ctt gag cta cag tat gtt ttg gac aaa	663
Gln Lys Arg Leu Lys Thr Val Leu Glu Leu Gln Tyr Val Leu Asp Lys	
145 150 155	
[0011]	
ttg gga gat gat gaa gtg cgg act gac ctg aaa caa ggt ttg aat gga	711
Leu Gly Asp Asp Glu Val Arg Thr Asp Leu Lys Gln Gly Leu Asn Gly	
160 165 170	
gtg cca ata ttg tcc gaa gag gag ttg tca ttg ttg gat gaa ttc tat	759
Val Pro Ile Leu Ser Glu Glu Glu Leu Ser Leu Leu Asp Glu Phe Tyr	
175 180 185 190	
aag cta gta gac cct gaa cgg gac atg agc ttg agg ttg aat gaa cag	807
Lys Leu Val Asp Pro Glu Arg Asp Met Ser Leu Arg Leu Asn Glu Gln	
195 200 205	
tat gaa cat gcc tcc att cac ctg tgg gac ctg ctg gaa ggg aag gaa	855
Tyr Glu His Ala Ser Ile His Leu Trp Asp Leu Leu Glu Gly Lys Glu	
210 215 220	
aaa cct gta tgt gga acc acc tat aaa gtt cta aag gaa att gtt gag	903
Lys Pro Val Cys Gly Thr Thr Tyr Lys Val Leu Lys Glu Ile Val Glu	
225 230 235	
cgt gtt ttt cag tca aac tac ttt gac agc acc cac aac cac cag aat	951

	Arg Val Phe Gln Ser Asn Tyr Phe Asp Ser Thr His Asn His Gln Asn	
	240	245 250
	ggg ctg tgt gag gaa gaa gag gca gcc tca gca cct gca gtt gaa gac	999
	Gly Leu Cys Glu Glu Glu Glu Ala Ala Ser Ala Pro Ala Val Glu Asp	
	255	260 265 270
	cag gta cct gaa gct gaa cct gag cca gca gaa gag tac act gag caa	1047
	Gln Val Pro Glu Ala Glu Pro Glu Pro Ala Glu Glu Tyr Thr Glu Gln	
		275 280 285
	agt gaa gtt gaa tca aca gag tat gta aat aga cag ttc atg gca gaa	1095
	Ser Glu Val Glu Ser Thr Glu Tyr Val Asn Arg Gln Phe Met Ala Glu	
		290 295 300
	aca cag ttc acc agt ggt gaa aag gag cag gta gat gag tgg aca gtt	1143
	Thr Gln Phe Thr Ser Gly Glu Lys Glu Gln Val Asp Glu Trp Thr Val	
		305 310 315
	gaa acg gtt gag gtg gta aat tca ctc cag cag caa cct cag gct gca	1191
	Glu Thr Val Glu Val Val Asn Ser Leu Gln Gln Gln Pro Gln Ala Ala	
		320 325 330
[0012]	tcc cct tca gta cca gag ccc cac tct ttg act cca gtg gct cag gca	1239
	Ser Pro Ser Val Pro Glu Pro His Ser Leu Thr Pro Val Ala Gln Ala	
	335	340 345 350
	gat ccc ctt gtg aga aga cag cga gta caa gac ctt atg gca caa atg	1287
	Asp Pro Leu Val Arg Arg Gln Arg Val Gln Asp Leu Met Ala Gln Met	
		355 360 365
	cag ggt ccc tat aat ttc ata cag gat tca atg ctg gat ttt gaa aat	1335
	Gln Gly Pro Tyr Asn Phe Ile Gln Asp Ser Met Leu Asp Phe Glu Asn	
		370 375 380
	cag aca ctt gat cct gcc att gta tct gca cag cct atg aat cca aca	1383
	Gln Thr Leu Asp Pro Ala Ile Val Ser Ala Gln Pro Met Asn Pro Thr	
		385 390 395
	caa aac atg gac atg ccc cag ctg gtt tgc cct cca gtt cat tct gaa	1431
	Gln Asn Met Asp Met Pro Gln Leu Val Cys Pro Pro Val His Ser Glu	
		400 405 410
	tct aga ctt gct cag cct aat caa gtt cct gta caa cca gaa gcg aca	1479
	Ser Arg Leu Ala Gln Pro Asn Gln Val Pro Val Gln Pro Glu Ala Thr	
		415 420 425 430

	cag gtt cct ttg gta tca tcc aca agt gag ggg tac aca gca tct caa Gln Val Pro Leu Val Ser Ser Thr Ser Glu Gly Tyr Thr Ala Ser Gln 435 440 445	1527
	ccc ttg tac cag cct tct cat gct aca gag caa cga cca cag aag gaa Pro Leu Tyr Gln Pro Ser His Ala Thr Glu Gln Arg Pro Gln Lys Glu 450 455 460	1575
	cca att gat cag att cag gca aca atc tct tta aat aca gac cag act Pro Ile Asp Gln Ile Gln Ala Thr Ile Ser Leu Asn Thr Asp Gln Thr 465 470 475	1623
	aca gca tca tca tcc ctt cct gct gcg tct cag cct caa gta ttt cag Thr Ala Ser Ser Ser Leu Pro Ala Ala Ser Gln Pro Gln Val Phe Gln 480 485 490	1671
	gct ggg aca agc aaa cct tta cat agc agt gga atc aat gta aat gca Ala Gly Thr Ser Lys Pro Leu His Ser Ser Gly Ile Asn Val Asn Ala 495 500 505 510	1719
[0013]	gct cca ttc caa tcc atg caa acg gtg ttc aat atg aat gcc cca gtt Ala Pro Phe Gln Ser Met Gln Thr Val Phe Asn Met Asn Ala Pro Val 515 520 525	1767
	cct cct gtt aat gaa cca gaa act tta aaa cag caa aat cag tac cag Pro Pro Val Asn Glu Pro Glu Thr Leu Lys Gln Gln Asn Gln Tyr Gln 530 535 540	1815
	gcc agt tat aac cag agc ttt tct agt cag cct cac caa gta gaa caa Ala Ser Tyr Asn Gln Ser Phe Ser Ser Gln Pro His Gln Val Glu Gln 545 550 555	1863
	aca gag ctt cag caa gaa cag ctt caa aca gtg gtt ggc act tac cat Thr Glu Leu Gln Gln Glu Gln Leu Gln Thr Val Val Gly Thr Tyr His 560 565 570	1911
	ggt tcc cca gac cag tcc cat caa gtg act ggt aac cac cag cag cct Gly Ser Pro Asp Gln Ser His Gln Val Thr Gly Asn His Gln Gln Pro 575 580 585 590	1959
	cct cag cag aac act gga ttt cca cgt agc aat cag ccc tat tac aat Pro Gln Gln Asn Thr Gly Phe Pro Arg Ser Asn Gln Pro Tyr Tyr Asn 595 600 605	2007
	agt cgt ggt gtg tct cgt gga ggc tcc cgt ggt gct aga ggc ttg atg	2055

	Ser Arg Gly Val Ser Arg Gly Gly Ser Arg Gly Ala Arg Gly Leu Met	
	610 615 620	
	aat gga tac cgg ggc cct gcc aat gga ttc aga gga gga tat gat ggt	2103
	Asn Gly Tyr Arg Gly Pro Ala Asn Gly Phe Arg Gly Gly Tyr Asp Gly	
	625 630 635	
	tac cgc cct tca ttc tct aac act cca aac agt ggt tat aca cag tct	2151
	Tyr Arg Pro Ser Phe Ser Asn Thr Pro Asn Ser Gly Tyr Thr Gln Ser	
	640 645 650	
	cag ttc agt gct ccc cgg gat tac tct ggc tat caa cgg gat gga tat	2199
	Gln Phe Ser Ala Pro Arg Asp Tyr Ser Gly Tyr Gln Arg Asp Gly Tyr	
	655 660 665 670	
	cag cag aat ttc aag cga ggc tct ggg cag agt gga cca cgg gga gcc	2247
	Gln Gln Asn Phe Lys Arg Gly Ser Gly Gln Ser Gly Pro Arg Gly Ala	
	675 680 685	
	cca cga ggt cgt gga ggg ccc cca aga ccc aac aga ggg atg ccg caa	2295
	Pro Arg Gly Arg Gly Gly Pro Pro Arg Pro Asn Arg Gly Met Pro Gln	
	690 695 700	
[0014]	atg aac act cag caa gtg aat taa tctgattcac aggattatgt ttaatcgcca	2349
	Met Asn Thr Gln Gln Val Asn	
	705	
	aaaacacact ggccagtgtg ccataatatg ttaccagaag agttattatc tatttgttct	2409
	ccctttcagg aaacttattg taaagggact gttttcatcc cataaagaca ggactacaat	2469
	tgtcagcttt ctattacctg gatatggaag gaaactatgt ttactctgca tgttctgtcc	2529
	taagcgtcat cttgagcctt gcacatgata ctcagattcc tcacccttgc ttaggagtaa	2589
	aacaatatac tttacagggt gataataatc tccatagtta tttgaagtgg cttgaaaaag	2649
	gcaagattga cttttatgac attggataaa atctacaaat cagccctega gttattcaat	2709
	gataactgac aaactaaatt atttccctag aaaggaagat gaaaggagtg gagtgtggtt	2769
	tggcagaaca actgcatttc acagcttttc cagttaaatt ggagcactga acgttcagat	2829
	gcataccaaa ttatgcatgg gtcctaatca cacatataag gctggctacc agctttgaca	2889
	cagcactgtt catctggcca aacaactgtg gttaaaaaca catgtaaaat gctttttaac	2949

	agctgatact gtataagaca aagccaagat gcaaaattag gctttgattg gcactttttg	3009
	aaaaatatgc aacaaatatg ggatgtaatc cggatggccg cttctgtact taatgtgaaa	3069
	tatttagata cctttttgaa cacttaacag tttctttgag acaatgactt ttgtaaggat	3129
	tggtactatc tatcattcct tatgacatgt acattgtctg tcaactaatcc ttggattttg	3189
	ctgtattgtc acctaaattg gtacaggtac tgatgaaaat ctctagtga taatcataac	3249
	actctcggtc acatgttttt ccttcagctt gaaagctttt ttttaaagg aaaagatacc	3309
	aatgcctgc tgctaccacc cttttcaatt gctatctttt gaaaggcacc agtatgtgtt	3369
	ttagattgat ttccctgttt cagggaaatc acggacagta gtttcagttc tgatggtata	3429
	agcaaaacaa ataaaacggt tataaaagtt gtatcttgaa aactgggtg tcaacagcta	3489
	gcagcttatg tgattcacc catgccacgt tagtgtcaca aattttatgg tttatctcca	3549
	gcaacatttc tctagtactt gcacttatta tcttttgtct aatttaacct taactgaatt	3609
[0015]	ctccgtttct cctggaggca tttatattca gtgataatc cttcccttag atgcataggg	3669
	agagtctcta aatttgatgg aatggacac ttgagtagtg acttagcctt atgtactctg	3729
	ttggaatttg tgctagcagt ttgagcacta gttctgtgtg cctaggaagt taatgctgct	3789
	tattgtctca ttctgacttc atggagaatt aatcccacct ttaagcaaag gctactaagt	3849
	taatggtatt ttctgtgcag aaattaaatt ttattttcag catttagccc aggaattctt	3909
	ccagtaggtg ctcagctatt taaaacaaa actattctca aacattcacc attagacaac	3969
	tggagttttt gctggttttg taacctacca aatggatag gctgttgaac attccacatt	4029
	caaaagtttt gtagggtggt gggaaatggg ggatcttcaa tgtttatttt aaaataaaat	4089
	aaaataagtt cttgactttt ctcatgtgtg gttgtggtac atcatattgg aagggtaac	4149
	ctgttacttt ggcaaatgag ttttttttg ctagcacctc cccttgctg ctttaaatga	4209
	catctgctg ggatgtacca caaccatag ttacctgtat cttaggggaa tggataaaat	4269
	atgtgtggtt tactgggtaa tcctagatg atgtatgctt gcagtcctat ataaaactaa	4329

	atttgctatc tgtgtagaaa ataatttcat gacatttaca atcaggactg aagtaagttc	4389
	ttcacacagt gacctctgaa tcagtttcag agaagggatg ggggagaaaa tgccttctag	4449
	gttttgaact tctatgcatt agtgcagatg ttgtgaatgt gtaaagggtg tcatagtttg	4509
	actgtttcta tgtatgtttt ttcaaagaat tgttcctttt tttgaactat aatttttctt	4569
	tttttggtta ttttaccatc acagtttaaa tgtatatctt ttatgtctct actcagacca	4629
	tatttttaa ggggtgcctc attatggggc agagaacttt tcaataagtc tcattaagat	4689
	ctgaatcttg gttctaagca ttctgtataa tatgtgattg cttgtcctag ctgcagaagg	4749
	ccttttgttt ggtcaaatgc atattttagc agagtttcaa ggaaatgatt gtcacacatg	4809
	tcactgtagc ctcttggtgt agcaagctca catacaaat acttttgtat atgcataata	4869
	taaatcatct catgtggata tgaacttct tttttaaac ttaaaaagg tgaatgttat	4929
	tgattacctt gattagggea gttttatttc cagatcctaa taattcctaa aaaatatgga	4989
[0016]	aaagtttttt ttcaatcatt gtacctgat attaaaaca atatccttta agtatttcta	5049
	atcagttage ttctacagtt cttttgtctc cttttatatg cagctcttac gtgggagact	5109
	tttccactta aaggagacat agaatgtgtg cttattctca gaagttcat taactgaggt	5169
	gatgagttaa caactagttg agcagtcagc ttctaagtg ttttaggaca tttgttcatt	5229
	atattttccg tcatataact agaggaagtg gaatgcagat aagtccgaa ttcaaccct	5289
	tcattttatg ttttaagctcc tgaatctgca ttccacttgg gttgttttta agcattctaa	5349
	attttagttg attataagtt agatttcaca gaatcagtat tgccttgat cttgtccttt	5409
	ttatggagtt aacggggagg aagaccctc aggaaaacga aagtaaattg ttaaggctca	5469
	tcttcatacc tttttcatt ttgaatccta caaaaatact gcaaaagact agtgaatggt	5529
	taaaattaca ctagattaaa taatatgaaa gtc	5562
	<210> 17	
	<211> 709	

<212> PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 17

Met Pro Ser Ala Thr Ser His Ser Gly Ser Gly Ser Lys Ser Ser Gly
 1 5 10 15

Pro Pro Pro Pro Ser Gly Ser Ser Gly Ser Glu Ala Ala Ala Gly Ala
 20 25 30

Gly Ala Ala Ala Pro Ala Ser Gln His Pro Ala Thr Gly Thr Gly Ala
 35 40 45

Val Gln Thr Glu Ala Met Lys Gln Ile Leu Gly Val Ile Asp Lys Lys
 50 55 60

Leu Arg Asn Leu Glu Lys Lys Lys Gly Lys Leu Asp Asp Tyr Gln Glu
 65 70 75 80

[0017]

Arg Met Asn Lys Gly Glu Arg Leu Asn Gln Asp Gln Leu Asp Ala Val
 85 90 95

Ser Lys Tyr Gln Glu Val Thr Asn Asn Leu Glu Phe Ala Lys Glu Leu
 100 105 110

Gln Arg Ser Phe Met Ala Leu Ser Gln Asp Ile Gln Lys Thr Ile Lys
 115 120 125

Lys Thr Ala Arg Arg Glu Gln Leu Met Arg Glu Glu Ala Glu Gln Lys
 130 135 140

Arg Leu Lys Thr Val Leu Glu Leu Gln Tyr Val Leu Asp Lys Leu Gly
 145 150 155 160

Asp Asp Glu Val Arg Thr Asp Leu Lys Gln Gly Leu Asn Gly Val Pro

Leu Val Arg Arg Gln Arg Val Gln Asp Leu Met Ala Gln Met Gln Gly
355 360 365

Pro Tyr Asn Phe Ile Gln Asp Ser Met Leu Asp Phe Glu Asn Gln Thr
370 375 380

Leu Asp Pro Ala Ile Val Ser Ala Gln Pro Met Asn Pro Thr Gln Asn
385 390 395 400

Met Asp Met Pro Gln Leu Val Cys Pro Pro Val His Ser Glu Ser Arg
405 410 415

Leu Ala Gln Pro Asn Gln Val Pro Val Gln Pro Glu Ala Thr Gln Val
420 425 430

Pro Leu Val Ser Ser Thr Ser Glu Gly Tyr Thr Ala Ser Gln Pro Leu
435 440 445

[0019]

Tyr Gln Pro Ser His Ala Thr Glu Gln Arg Pro Gln Lys Glu Pro Ile
450 455 460

Asp Gln Ile Gln Ala Thr Ile Ser Leu Asn Thr Asp Gln Thr Thr Ala
465 470 475 480

Ser Ser Ser Leu Pro Ala Ala Ser Gln Pro Gln Val Phe Gln Ala Gly
485 490 495

Thr Ser Lys Pro Leu His Ser Ser Gly Ile Asn Val Asn Ala Ala Pro
500 505 510

Phe Gln Ser Met Gln Thr Val Phe Asn Met Asn Ala Pro Val Pro Pro
515 520 525

Val Asn Glu Pro Glu Thr Leu Lys Gln Gln Asn Gln Tyr Gln Ala Ser

	<210> 18	
	<211> 3553	
	<212> DNA	
	<213> 人 (Homo sapiens)	
	<220>	
	<221> CDS	
	<222> (190).. (2274)	
	<400> 18	
	cagagggctg ctggetggct aagtcctec cgctcccgge tctcgctca ctaggagcgg	60
	ctctcggtgc agcgggacag ggcgaagcgg cctgcgccca cggagcgcgc gacactgccc	120
	ggaagggacc gccacccttg cccctcage tgcccacteg tgatttcag cggcctcgc	180
	gcgcgcacg atg ccc tcg gcc acc agc cac agc ggg agc ggc agc aag tcg	231
	Met Pro Ser Ala Thr Ser His Ser Gly Ser Gly Ser Lys Ser	
	1 5 10	
[0021]	tcc gga ccg cca ccg ccg tcg ggt tcc tcc ggg agt gag gcg gcc gcg	279
	Ser Gly Pro Pro Pro Pro Ser Gly Ser Ser Gly Ser Glu Ala Ala Ala	
	15 20 25 30	
	gga gcc ggg gcc gcc gcg ccg gct tct cag cac ccc gca acc ggc acc	327
	Gly Ala Gly Ala Ala Ala Pro Ala Ser Gln His Pro Ala Thr Gly Thr	
	35 40 45	
	ggc gct gtc cag acc gag gcc atg aag cag att ctc ggg gtg atc gac	375
	Gly Ala Val Gln Thr Glu Ala Met Lys Gln Ile Leu Gly Val Ile Asp	
	50 55 60	
	aag aaa ctt cgg aac ctg gag aag aaa aag ggt aag ctt gat gat tac	423
	Lys Lys Leu Arg Asn Leu Glu Lys Lys Lys Gly Lys Leu Asp Asp Tyr	
	65 70 75	
	cag gaa cga atg aac aaa ggg gaa agg ctt aat caa gat cag ctg gat	471
	Gln Glu Arg Met Asn Lys Gly Glu Arg Leu Asn Gln Asp Gln Leu Asp	
	80 85 90	
	gcc gtt tct aag tac cag gaa gtc aca aat aat ttg gag ttt gca aaa	519
	Ala Val Ser Lys Tyr Gln Glu Val Thr Asn Asn Leu Glu Phe Ala Lys	
	95 100 105 110	

	gaa tta cag agg agt ttc atg gca cta agt caa gat att cag aaa aca	567
	Glu Leu Gln Arg Ser Phe Met Ala Leu Ser Gln Asp Ile Gln Lys Thr	
	115 120 125	
	ata aag aag aca gca cgt cgg gag cag ctt atg aga gaa gaa gct gaa	615
	Ile Lys Lys Thr Ala Arg Arg Glu Gln Leu Met Arg Glu Glu Ala Glu	
	130 135 140	
	cag aaa cgt tta aaa act gta ctt gag cta cag tat gtt ttg gac aaa	663
	Gln Lys Arg Leu Lys Thr Val Leu Glu Leu Gln Tyr Val Leu Asp Lys	
	145 150 155	
	ttg gga gat gat gaa gtg cgg act gac ctg aaa caa ggt ttg aat gga	711
	Leu Gly Asp Asp Glu Val Arg Thr Asp Leu Lys Gln Gly Leu Asn Gly	
	160 165 170	
	gtg cca ata ttg tcc gaa gag gag ttg tca ttg ttg gat gaa ttc tat	759
	Val Pro Ile Leu Ser Glu Glu Glu Leu Ser Leu Leu Asp Glu Phe Tyr	
	175 180 185 190	
	aag cta gta gac cct gaa cgg gac atg agc ttg agg ttg aat gaa cag	807
	Lys Leu Val Asp Pro Glu Arg Asp Met Ser Leu Arg Leu Asn Glu Gln	
[0022]	195 200 205	
	tat gaa cat gcc tcc att cac ctg tgg gac ctg ctg gaa ggg aag gaa	855
	Tyr Glu His Ala Ser Ile His Leu Trp Asp Leu Leu Glu Gly Lys Glu	
	210 215 220	
	aaa cct gta tgt gga acc acc tat aaa gtt cta aag gaa att gtt gag	903
	Lys Pro Val Cys Gly Thr Thr Tyr Lys Val Leu Lys Glu Ile Val Glu	
	225 230 235	
	cgt gtt ttt cag tca aac tac ttt gac agc acc cac aac cac cag aat	951
	Arg Val Phe Gln Ser Asn Tyr Phe Asp Ser Thr His Asn His Gln Asn	
	240 245 250	
	ggg ctg tgt gag gaa gaa gag gca gcc tca gca cct gca gtt gaa gac	999
	Gly Leu Cys Glu Glu Glu Glu Ala Ala Ser Ala Pro Ala Val Glu Asp	
	255 260 265 270	
	cag gta cct gaa gct gaa cct gag cca gca gaa gag tac act gag caa	1047
	Gln Val Pro Glu Ala Glu Pro Glu Pro Ala Glu Glu Tyr Thr Glu Gln	
	275 280 285	
	agt gaa gtt gaa tca aca gag tat gta aat aga cag ttc atg gca gaa	1095
	Ser Glu Val Glu Ser Thr Glu Tyr Val Asn Arg Gln Phe Met Ala Glu	

	290	295	300	
	aca cag ttc acc agt ggt gaa aag gag cag gta gat gag tgg aca gtt			1143
	Thr Gln Phe Thr Ser Gly Glu Lys Glu Gln Val Asp Glu Trp Thr Val			
	305	310	315	
	gaa acg gtt gag gtg gta aat tca ctc cag cag caa cct cag gct gca			1191
	Glu Thr Val Glu Val Val Asn Ser Leu Gln Gln Gln Pro Gln Ala Ala			
	320	325	330	
	tcc cct tca gta cca gag ccc cac tct ttg act cca gtg gct cag gca			1239
	Ser Pro Ser Val Pro Glu Pro His Ser Leu Thr Pro Val Ala Gln Ala			
	335	340	345	350
	gat ccc ctt gtg aga aga cag cga gta caa gac ctt atg gca caa atg			1287
	Asp Pro Leu Val Arg Arg Gln Arg Val Gln Asp Leu Met Ala Gln Met			
		355	360	365
	cag ggt ccc tat aat ttc ata cag gat tca atg ctg gat ttt gaa aat			1335
	Gln Gly Pro Tyr Asn Phe Ile Gln Asp Ser Met Leu Asp Phe Glu Asn			
		370	375	380
[0023]	cag aca ctt gat cct gcc att gta tct gca cag cct atg aat cca aca			1383
	Gln Thr Leu Asp Pro Ala Ile Val Ser Ala Gln Pro Met Asn Pro Thr			
		385	390	395
	caa aac atg gac atg ccc cag ctg gtt tgc cct cca gtt cat tct gaa			1431
	Gln Asn Met Asp Met Pro Gln Leu Val Cys Pro Pro Val His Ser Glu			
		400	405	410
	tct aga ctt gct cag cct aat caa gtt cct gta caa cca gaa gcg aca			1479
	Ser Arg Leu Ala Gln Pro Asn Gln Val Pro Val Gln Pro Glu Ala Thr			
		415	420	425
	cag gtt cct ttg gta tca tcc aca agt gag ggg tac aca gca tct caa			1527
	Gln Val Pro Leu Val Ser Ser Thr Ser Glu Gly Tyr Thr Ala Ser Gln			
		435	440	445
	ccc ttg tac cag cct tct cat gct aca gag caa cga cca cag aag gaa			1575
	Pro Leu Tyr Gln Pro Ser His Ala Thr Glu Gln Arg Pro Gln Lys Glu			
		450	455	460
	cca att gat cag att cag gca aca atc tct tta aat aca gac cag act			1623
	Pro Ile Asp Gln Ile Gln Ala Thr Ile Ser Leu Asn Thr Asp Gln Thr			
		465	470	475

	aca gca tca tca tcc ctt cct gct gcg tct cag cct caa gta ttt cag Thr Ala Ser Ser Ser Leu Pro Ala Ala Ser Gln Pro Gln Val Phe Gln 480 485 490	1671
	gct ggg aca agc aaa cct tta cat agc agt gga atc aat gta aat gca Ala Gly Thr Ser Lys Pro Leu His Ser Ser Gly Ile Asn Val Asn Ala 495 500 505 510	1719
	gct cca ttc caa tcc atg caa acg gtg ttc aat atg aat gcc cca gtt Ala Pro Phe Gln Ser Met Gln Thr Val Phe Asn Met Asn Ala Pro Val 515 520 525	1767
	cct cct gtt aat gaa cca gaa act tta aaa cag caa aat cag tac cag Pro Pro Val Asn Glu Pro Glu Thr Leu Lys Gln Gln Asn Gln Tyr Gln 530 535 540	1815
	gcc agt tat aac cag agc ttt tct agt cag cct cac caa gta gaa caa Ala Ser Tyr Asn Gln Ser Phe Ser Ser Gln Pro His Gln Val Glu Gln 545 550 555	1863
[0024]	aca gag ctt cag caa gaa cag ctt caa aca gtg gtt ggc act tac cat Thr Glu Leu Gln Gln Glu Gln Leu Gln Thr Val Val Gly Thr Tyr His 560 565 570	1911
	ggt tcc cca gac cag tcc cat caa gtg act ggt aac cac cag cag cct Gly Ser Pro Asp Gln Ser His Gln Val Thr Gly Asn His Gln Gln Pro 575 580 585 590	1959
	cct cag cag aac act gga ttt cca cgt agc aat cag ccc tat tac aat Pro Gln Gln Asn Thr Gly Phe Pro Arg Ser Asn Gln Pro Tyr Tyr Asn 595 600 605	2007
	agt cgt ggt gtg tct cgt gga ggc tcc cgt ggt gct aga ggc ttg atg Ser Arg Gly Val Ser Arg Gly Gly Ser Arg Gly Ala Arg Gly Leu Met 610 615 620	2055
	aat gga tac cgg ggc cct gcc aat gga ttc aga gga gga tat gat ggt Asn Gly Tyr Arg Gly Pro Ala Asn Gly Phe Arg Gly Gly Tyr Asp Gly 625 630 635	2103
	tac cgc cct tca ttc tct aac act cca aac agt ggt tat aca cag tct Tyr Arg Pro Ser Phe Ser Asn Thr Pro Asn Ser Gly Tyr Thr Gln Ser 640 645 650	2151
	cag ttc agt gct ccc cgg gat tac tct ggc tat caa cgg gat gga tat Gln Phe Ser Ala Pro Arg Asp Tyr Ser Gly Tyr Gln Arg Asp Gly Tyr	2199

	655	660	665	670	
	cag cag aat ttc aag cga ggc tct ggg cag agt gga cca cgg gga gcc				2247
	Gln Gln Asn Phe Lys Arg Gly Ser Gly Gln Ser Gly Pro Arg Gly Ala				
		675	680	685	
	cca cga ggt aat att ttg tgg tgg tga tcctagctcc taagtggagc				2294
	Pro Arg Gly Asn Ile Leu Trp Trp				
		690			
	ttctgttctg gccttgaag agctgttaat agtctgcatg ttaggaatac atttatcctt				2354
	tccagacttg ttgctagga ttaaatgaaa tgctctgttt ctaaaactta atcttggacc				2414
	caaattttaa tttttgaatg atttaatttt cctgttact atataaactg tcttgaanaac				2474
	tagaacatat tctcttctca gaaaaagtgt tttccaact gaaaattatt tttcaggtcc				2534
	taaaacctgc taaatgtttt taggaagtac ttactgaaac atttttgtaa gacatttttg				2594
	gaatgagatt gaacatttat ataaatttat tattcctctt tcattttttt gaaacatgcc				2654
[0025]	tattatattt tagggccaga caccctttaa tggccggata agccatagtt aacatttaga				2714
	gaaccattta gaagtgatag aactaatgga atttgcaatg ccttttggac ctctattagt				2774
	gatataaata tcaagttatt tctgactttt aaacaaaact cccaattcc taacttattg				2834
	agctatactt aaaaaaatt acaggttttag agagtttttt gttttcttt tactgttga				2894
	aaactacttc ccattttggc aggaagttaa cctatttaac aattagagct agcatttcat				2954
	gtagtctgaa attctaaatg gttctctgat ttgaggagg ttaaacaatca aacaggttcc				3014
	ctctattggc cataacatgt ataaaatgtg tgtaaggag gaattacaac gtactttgat				3074
	ttgaatacta gtagaaactg gccaggaaaa aggtacattt ttctaaaaat taatggatca				3134
	cttgggaatt actgacttga ctagaagtat caaaggatgt ttgcatgtga atgtgggtta				3194
	tgttctttcc cacctttag catattcgat gaaagttgag ttaactgata gctaaaaatc				3254
	tgttttaaca gcatgtaaaa agttatttta tctgttaaaa gtcattatac agttttgaat				3314
	gttatgtagt ttctttttaa cagtttaggt aataaggtct gttttcattc tgggtctttt				3374

attaattttg atagtatgat gttacttact actgaaatgt aagctagagt gtacactaga 3434
 atgtaagctc catgagagca ggtaccttgt ctgtcttctc tgctgtatct attcccaacg 3494
 cttgatgatg gtgcctggca catagtaggc actcaataaa tatttgttga atgaatgaa 3553

<210> 19
 <211> 694
 <212> PRT
 <213> 人 (Homo sapiens)

<400> 19

Met Pro Ser Ala Thr Ser His Ser Gly Ser Gly Ser Lys Ser Ser Gly
 1 5 10 15

Pro Pro Pro Pro Ser Gly Ser Ser Gly Ser Glu Ala Ala Ala Gly Ala
 20 25 30

[0026]

Gly Ala Ala Ala Pro Ala Ser Gln His Pro Ala Thr Gly Thr Gly Ala
 35 40 45

Val Gln Thr Glu Ala Met Lys Gln Ile Leu Gly Val Ile Asp Lys Lys
 50 55 60

Leu Arg Asn Leu Glu Lys Lys Lys Gly Lys Leu Asp Asp Tyr Gln Glu
 65 70 75 80

Arg Met Asn Lys Gly Glu Arg Leu Asn Gln Asp Gln Leu Asp Ala Val
 85 90 95

Ser Lys Tyr Gln Glu Val Thr Asn Asn Leu Glu Phe Ala Lys Glu Leu
 100 105 110

Gln Arg Ser Phe Met Ala Leu Ser Gln Asp Ile Gln Lys Thr Ile Lys
 115 120 125

Lys Thr Ala Arg Arg Glu Gln Leu Met Arg Glu Glu Ala Glu Gln Lys
 130 135 140

Arg Leu Lys Thr Val Leu Glu Leu Gln Tyr Val Leu Asp Lys Leu Gly
 145 150 155 160

Asp Asp Glu Val Arg Thr Asp Leu Lys Gln Gly Leu Asn Gly Val Pro
 165 170 175

Ile Leu Ser Glu Glu Glu Leu Ser Leu Leu Asp Glu Phe Tyr Lys Leu
 180 185 190

Val Asp Pro Glu Arg Asp Met Ser Leu Arg Leu Asn Glu Gln Tyr Glu
 195 200 205

His Ala Ser Ile His Leu Trp Asp Leu Leu Glu Gly Lys Glu Lys Pro
 210 215 220

[0027]

Val Cys Gly Thr Thr Tyr Lys Val Leu Lys Glu Ile Val Glu Arg Val
 225 230 235 240

Phe Gln Ser Asn Tyr Phe Asp Ser Thr His Asn His Gln Asn Gly Leu
 245 250 255

Cys Glu Glu Glu Glu Ala Ala Ser Ala Pro Ala Val Glu Asp Gln Val
 260 265 270

Pro Glu Ala Glu Pro Glu Pro Ala Glu Glu Tyr Thr Glu Gln Ser Glu
 275 280 285

Val Glu Ser Thr Glu Tyr Val Asn Arg Gln Phe Met Ala Glu Thr Gln
 290 295 300

Phe Thr Ser Gly Glu Lys Glu Gln Val Asp Glu Trp Thr Val Glu Thr
 305 310 315 320

Val Glu Val Val Asn Ser Leu Gln Gln Gln Pro Gln Ala Ala Ser Pro
 325 330 335

Ser Val Pro Glu Pro His Ser Leu Thr Pro Val Ala Gln Ala Asp Pro
 340 345 350

Leu Val Arg Arg Gln Arg Val Gln Asp Leu Met Ala Gln Met Gln Gly
 355 360 365

Pro Tyr Asn Phe Ile Gln Asp Ser Met Leu Asp Phe Glu Asn Gln Thr
 370 375 380

Leu Asp Pro Ala Ile Val Ser Ala Gln Pro Met Asn Pro Thr Gln Asn
 385 390 395 400

[0028] Met Asp Met Pro Gln Leu Val Cys Pro Pro Val His Ser Glu Ser Arg
 405 410 415

Leu Ala Gln Pro Asn Gln Val Pro Val Gln Pro Glu Ala Thr Gln Val
 420 425 430

Pro Leu Val Ser Ser Thr Ser Glu Gly Tyr Thr Ala Ser Gln Pro Leu
 435 440 445

Tyr Gln Pro Ser His Ala Thr Glu Gln Arg Pro Gln Lys Glu Pro Ile
 450 455 460

Asp Gln Ile Gln Ala Thr Ile Ser Leu Asn Thr Asp Gln Thr Thr Ala
 465 470 475 480

Ser Ser Ser Leu Pro Ala Ala Ser Gln Pro Gln Val Phe Gln Ala Gly
 485 490 495

Thr Ser Lys Pro Leu His Ser Ser Gly Ile Asn Val Asn Ala Ala Pro
500 505 510

Phe Gln Ser Met Gln Thr Val Phe Asn Met Asn Ala Pro Val Pro Pro
515 520 525

Val Asn Glu Pro Glu Thr Leu Lys Gln Gln Asn Gln Tyr Gln Ala Ser
530 535 540

Tyr Asn Gln Ser Phe Ser Ser Gln Pro His Gln Val Glu Gln Thr Glu
545 550 555 560

Leu Gln Gln Glu Gln Leu Gln Thr Val Val Gly Thr Tyr His Gly Ser
565 570 575

Pro Asp Gln Ser His Gln Val Thr Gly Asn His Gln Gln Pro Pro Gln
580 585 590

[0029]

Gln Asn Thr Gly Phe Pro Arg Ser Asn Gln Pro Tyr Tyr Asn Ser Arg
595 600 605

Gly Val Ser Arg Gly Gly Ser Arg Gly Ala Arg Gly Leu Met Asn Gly
610 615 620

Tyr Arg Gly Pro Ala Asn Gly Phe Arg Gly Gly Tyr Asp Gly Tyr Arg
625 630 635 640

Pro Ser Phe Ser Asn Thr Pro Asn Ser Gly Tyr Thr Gln Ser Gln Phe
645 650 655

Ser Ala Pro Arg Asp Tyr Ser Gly Tyr Gln Arg Asp Gly Tyr Gln Gln
660 665 670

Asn Phe Lys Arg Gly Ser Gly Gln Ser Gly Pro Arg Gly Ala Pro Arg
675 680 685

Gly Asn Ile Leu Trp Trp
690

<210> 20

<211> 118

<212> PRT

<213> 兔

<400> 20

Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser His Ser
20 25 30

Leu Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
35 40 45

[0030]

Asp Ile Arg Ser Gly Gly Ser Ala Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly
50 55 60

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Thr Ser Thr Thr Val Ala Leu Lys Met Thr
65 70 75 80

Ser Leu Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Thr Arg Thr Asn
85 90 95

Gly Pro Ser Asp Leu Thr Asn Arg Leu Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 21

	aactgggcta agggaaggtt caccatttcc cgggacaact ctaagaatac actgtatttg	240
	caaatgaata gcttgcgcgc cgaggataca gccgtgtact tctgtaccgg gacaaacgga	300
	cccagcgacc tgaccaatag gctcgacctc tggggacagg gcacattggt gacagtgtcc	360
	tca	363
	<210> 23	
	<211> 363	
	<212> DNA	
	<213> 人 (Homo sapiens)	
	<400> 23	
	gaggtgcagc tcgtcgagag cggcggaggc etcgtccaac ctggaggcag cctgagactg	60
	agttgcgccg cttccggctt cagcctgtcc agccactccc tcggctgggt gaggcaggcc	120
	cctggcaagg gactggagtg gatcggcgat atccgcagcg gaggtccgc ttactatgcc	180
	aactgggcta agggaaggtt caccatttcc cgggacaaca gcaagaatac cctgtatttg	240
[0032]	caaatgaata gcttgcgcgc cgaggataca gccgtgtact actgtaccgg gacaaacgga	300
	cccagcgacc tgaccaatag gctcgacctc tggggacagg gcacattggt gacagtgtcc	360
	tca	363
	<210> 24	
	<211> 360	
	<212> DNA	
	<213> 人 (Homo sapiens)	
	<400> 24	
	cagagcctgg tcgagagcgg cggaggcctc gtgcaaccgg gaggcagcct gcggctgagc	60
	tgcgctgccg gcggcttttc cctctccagc cacagcctgg gatgggtcag gcaagcccct	120
	ggcaaaggcc tcgagtggat tggcgatata cggtcgggag gcagcgcta ttacgctaac	180
	tgggctaagg gaaggtttac catttccgg accagctcca aaaacacagt gtatctgcaa	240
	atgaattccc tgcgggccga agacacagcc gtctactttt gcacaaggac aaacggaccc	300

agcgacctca ccaataggct cgacctctgg ggacagggaa ccctcgtgac agtgtccagc 360

<210> 25
 <211> 363
 <212> DNA
 <213> 人 (Homo sapiens)

<400> 25
 gaacagagcc tggtcgagag cggcggaggc ctcgtgcaac ccggaggcag cctgcggctg 60
 agctgcgctg ccagcggctt ttccctctcc agccacagcc tgggatgggt caggcaagcc 120
 cctggcaaag gcctcgagtg gattggcgat atccgggccg gaggcagcgc ctattacgct 180
 aactgggcta agggaagggt taccatttcc cgggataact ccaaaaacac actgtatctg 240
 caaatgaatt ccctgcgggc cgaagacaca gccgtctact attgcacaag gacaaaacgga 300
 cccagcgacc tcaccaatag gctcgacctc tggggacagg gaaccctcgt gacagtgctc 360
 agc 363

[0033]

<210> 26
 <211> 339
 <212> DNA
 <213> 人 (Homo sapiens)

<400> 26
 gccatcaaaa tgacacagag ccccagctcc ctctccgcca gcgtgggaga ccgggtgacc 60
 atcaattgcc aggcttcca gtcctctac aataacgaaa acctcgctg gttccaacag 120
 aaaccggca aggtgcccaa gaggetcatc tacggagcca gcaccctggc ctccggagtg 180
 tcttccgggt tctccggcag cggctctgga accgaattca cattgaccat tagcaacctg 240
 cagcctgagg acttcgctac atactactgt ctgggagagt tttcctgcgg cagcgcgat 300
 tgcttcgcct ttggcggagg cacaaaggtc gagatcaaa 339

<210> 27
 <211> 339
 <212> DNA

	<213> 人 (Homo sapiens)	
	<400> 27	
	gagatcgtcc tgacacagag cccagctcc ctctccgcca gcgtgggaga ccgggtgacc	60
	atcaattgcc aggcttccca gtccctctac aataacgaaa acctcgctg gttccaacag	120
	aaaccggca aggtgcccaa gaggtcatc tacggagcca gcaccctggc ctccggagtg	180
	tcttccgggt tctccggcag cggtcttggc accgaattca cattgacct tagcaacctg	240
	cagcctgagg acttcgctac atactactgt ctgggagagt tttctgcgg cagcggcgat	300
	tgcttcgcct ttggcggagg cacaaaggtc gagatcaaa	339
	<210> 28	
	<211> 339	
	<212> DNA	
	<213> 人 (Homo sapiens)	
	<400> 28	
[0034]	gagcaggtcc tgacacagag cccagctcc ctctccgcca gcgtgggaga ccgggtgacc	60
	atcaattgcc aggcttccca gtccctctac aataacgaaa acctcgctg gttccaacag	120
	aaaccggca aggtgcccaa gaggtcatc tacggagcca gcaccctggc ctccggagtg	180
	tcttccgggt tctccggcag cggtcttggc accgaattca cattgacct tagcaacctg	240
	cagcctgagg acttcgctat ctactactgt ctgggagagt tttctgcgg cagcggcgat	300
	tgcttcgcct ttggcggagg cacaaaggtc gagatcaaa	339
	<210> 29	
	<211> 339	
	<212> DNA	
	<213> 人 (Homo sapiens)	
	<400> 29	
	gacattgtgc tcaccaate ccctccage ctgagcgcga gcgtgggaga ccgggtgaca	60
	atcaattgcc aagccagcca gagcctgtat aacaatgaga atctggcttg gtttcagcaa	120
	aagcctggca aagtgcctaa gcggtgatt tacggagcca gcaccctcgc cagcggcgtc	180

[0035]

tccagcaggt tttccggatc cggatccgga accgaattca cactgacaat cagctccctc 240
 cagtgtgagg atttcgctat ctattactgt ctgggagagt tttcctgtgg cagcgccgat 300
 tgctttgcct ttggcggagg cacaaaggtc gagattaag 339

<210> 30

<211> 336

<212> DNA

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 30

caagtgetca cccaatcccc ttccagcctg agcgcagcg tgggagaccg ggtgacaatc 60
 aattgccaag ccagccagag cctgtataac aatgagaatc tggcttggtt tcagcaaaag 120
 cctggcaaag tgctaagcg gctgatttac ggagccagca ccctcgccag cggcgtctcc 180
 agcaggtttt ccgatccgg atccggaacc gaattcacac tgacaatcag ctccctccag 240
 tgtgaggatt tcgctatcta ttactgtctg ggagagtttt cctgtggcag cgccgattgc 300
 tttgcctttg gcggaggcac aaaggtcgag attaag 336

<210> 31

<211> 354

<212> DNA

<213> 兔

<400> 31

cagtcgctgg aggagtccgg gggtcgcctg gtcacgcctg ggacaccctt gacactcacc 60
 tgcacagcct ctggattctc cctcagtagc cattcattgg gctgggtccg ccaggtcca 120
 gggaaggggc tggaatggat cggagacatt aggagtggg gtagcgcata ctacgcgaac 180
 tgggcaaaag gccgattcac catctccaga acctcgacca cgggtgctct gaagatgacc 240
 agtctgacaa ccgaggacac ggccacctat ttctgtacca gaactaatgg tcccagtgat 300
 ctgactaata ggttgatct ctggggccag ggcaccctgg tcaccgtctc ctca 354

<210> 32
 <211> 336
 <212> DNA
 <213> 兔

<400> 32
 caagtactga cccagactcc atcctccgtg tctgcagctg tgggaggcac agtcaccatc 60
 aactgccagg ccagtcagag tctttataat aacgaaaatt tagcctggtt tcagcagaaa 120
 ccagggcagc ctccaagcg cctgatctat ggtgcatcca ctctggcatc tggggttctca 180
 tcgcggttca aaggcagtgg atctgggaca cagttcactc tcaccatcgg cgacgtgcag 240
 tgtgacgatg ctgccattta ctattgtcta ggcaattta gttgtggtag tgctgattgt 300
 tttgctttcg gcggaggac cgaggtggtc gtcaaa 336

[0036]

<210> 33
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> 人 (Homo sapiens)

<400> 33

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Asp Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

[0037]

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Leu Pro Glu Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 34

<211> 330

<212> PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

[0038] <400> 34

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

				85					90					95		
Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	
				100					105					110		
Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Asp	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	
				115					120					125		
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	
				130					135					140		
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	
				145					150					155		
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	
				165					170					175		
[0039]																
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	
				180					185					190		
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	
				195					200					205		
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Glu	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	
				210					215					220		
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	
				225					230					235		
Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	
				245					250					255		
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	
				260					265					270		

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

[0040]

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330