

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6357113号
(P6357113)

(45) 発行日 平成30年7月11日(2018.7.11)

(24) 登録日 平成30年6月22日(2018.6.22)

(51) Int.Cl.		F I	
C07K	16/30	(2006.01)	C07K 16/30 ZNA
C12N	15/13	(2006.01)	C12N 15/13
C12N	1/15	(2006.01)	C12N 1/15
C12N	1/19	(2006.01)	C12N 1/19
C12N	1/21	(2006.01)	C12N 1/21

請求項の数 11 (全 45 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-560823 (P2014-560823)
 (86) (22) 出願日 平成26年2月7日(2014.2.7)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2014/052939
 (87) 国際公開番号 W02014/123227
 (87) 国際公開日 平成26年8月14日(2014.8.14)
 審査請求日 平成29年1月12日(2017.1.12)
 (31) 優先権主張番号 特願2013-23125 (P2013-23125)
 (32) 優先日 平成25年2月8日(2013.2.8)
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

(73) 特許権者 390004097
 株式会社医学生物学研究所
 愛知県名古屋市中区栄四丁目5番3号
 (74) 代理人 110001047
 特許業務法人セントクレスト国際特許事務所
 (72) 発明者 小野 健一郎
 愛知県名古屋市中区栄四丁目5番3号 株式会社医学生物学研究所内
 (72) 発明者 八木 香澄
 東京都板橋区板橋2-9-3 株式会社医学生物学研究所内

審査官 小田 浩代

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒトNRG1タンパク質に対する抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号：1に示されるヒトNRG1 - タンパク質における221～234位の領域又は配列番号：2に示されるヒトNRG1 - 1タンパク質における213～239位の領域に結合する抗体であって、下記(a)～(c)のいずれかに記載の特徴を有する、抗体

(a) 配列番号：3～5に記載のアミノ酸配列を各々相補性決定領域1～3として含む軽鎖可変領域と、配列番号：7～9に記載のアミノ酸配列を各々相補性決定領域1～3として含む重鎖可変領域とを保持する

(b) 配列番号：11～13に記載のアミノ酸配列を各々相補性決定領域1～3として含む軽鎖可変領域と、配列番号：15～17に記載のアミノ酸配列を各々相補性決定領域1～3として含む重鎖可変領域とを保持する

(c) 配列番号：19～21に記載のアミノ酸配列を各々相補性決定領域1～3として含む軽鎖可変領域と、配列番号：23～25に記載のアミノ酸配列を各々相補性決定領域1～3として含む重鎖可変領域とを保持する。

【請求項2】

配列番号：1に示されるヒトNRG1 - タンパク質における221～234位の領域又は配列番号：2に示されるヒトNRG1 - 1タンパク質における213～239位の領域に結合する抗体であって、下記(a)～(c)のいずれかに記載の特徴を有する、請求項1に記載の抗体

(a) 配列番号：6に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、又は、
配列番号：6に記載のアミノ酸配列のフレームワーク領域において1～10のアミノ酸が置換、欠失、付加及び/又は挿入されているアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、
配列番号：10に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、又は、
配列番号：10に記載のアミノ酸配列のフレームワーク領域において1～10のアミノ酸が置換、欠失、付加及び/又は挿入されているアミノ酸配列を含む重鎖可変領域とを保持する

(b) 配列番号：14に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、又は、
配列番号：14に記載のアミノ酸配列のフレームワーク領域において1～10のアミノ酸が置換、欠失、付加及び/又は挿入されているアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、
配列番号：18に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、又は、
配列番号：18に記載のアミノ酸配列のフレームワーク領域において1～10のアミノ酸が置換、欠失、付加及び/又は挿入されているアミノ酸配列とを含む重鎖可変領域とを保持する

(c) 配列番号：22に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、又は、
配列番号：22に記載のアミノ酸配列のフレームワーク領域において1～10のアミノ酸が置換、欠失、付加及び/又は挿入されているアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、
配列番号：26に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、又は、
配列番号：26に記載のアミノ酸配列のフレームワーク領域において1～10のアミノ酸が置換、欠失、付加及び/又は挿入されているアミノ酸配列を含む重鎖可変領域とを保持する。

【請求項3】

配列番号：1に示されるヒトNRG1 - タンパク質又は配列番号：2に示されるヒトNRG1 - 1タンパク質の切断を抑制する活性を有する、請求項1又は2に記載の抗体。

【請求項4】

配列番号：1に示されるヒトNRG1 - タンパク質又は配列番号：2に示されるヒトNRG1 - 1タンパク質による刺激に应答した、癌細胞におけるErbb3タンパク質のリン酸化を抑制する活性を有する、請求項1～3のうちのいずれか一項に記載の抗体。

【請求項5】

*in vivo*において腫瘍の増殖を抑制する活性を有する、請求項1～4のうちのいずれか一項に記載の抗体。

【請求項6】

請求項1～5のうちのいずれか一項に記載の抗体をコードするDNA。

【請求項7】

請求項1～5のうちのいずれか一項に記載の抗体を産生する、又は、請求項6に記載のDNAを含む、ハイブリドーマ。

【請求項8】

請求項1～5のうちのいずれか一項に記載の抗体を産生する、又は、請求項6に記載のDNAを含む、宿主細胞。

【請求項9】

請求項1～5のうちのいずれか一項に記載の抗体を作製するための方法であって、
請求項7に記載のハイブリドーマ又は請求項8に記載の宿主細胞を培養し、前記ハイブリドーマ、前記宿主細胞又はそれら培養液から、抗体を分離、精製する工程を含む方法。

【請求項10】

請求項1～5のうちのいずれか一項に記載の抗体を有効成分とする、癌を治療又は予防するための組成物。

【請求項11】

配列番号：1に示されるヒトNRG1 - タンパク質における221～234位の領域又は配列番号：2に示されるヒトNRG1 - 1タンパク質における213～239位の

10

20

30

40

50

領域に結合する抗体を有効成分とする、癌を治療又は予防するための組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヒトNRG1タンパク質に対する抗体に関し、より詳しくは、ヒトNRG1 - タンパク質又はヒトNRG1 - 1タンパク質に特異的に結合する抗体、該抗体をコードするDNA、前記抗体又は該DNAを含むハイブリドーマ、前記抗体を有効成分とする癌を治療又は予防するための組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

NRG1（ニューレグリン1）はEGFファミリーの一員であり、特に可溶性NRG1はErbb3又はErbb4に結合し、これら受容体のリガンドとして機能する。また、Erbb3及びErbb4は、EGF（上皮細胞増殖因子）受容体ファミリーの一員であり、可溶性NRG1がこれら受容体に結合することによって、当該受容体の構造が変化し、ホモあるいはヘテロ二量体化することも知られている。さらに、この二量体化に伴って、これら受容体の細胞内ドメインがリン酸化され、リン酸化された細胞内ドメインはさらなるシグナルタンパク質と結合し、様々なシグナル伝達が活性化される。そして、かかるNRG1が関与するシグナル伝達によって、細胞増殖、細胞分化、アポトーシス、細胞の移動、接着及び浸潤等、一連の生物学的反応が制御され、より具体的には、神経系及び心臓の成長及び発達や、乳癌、卵巣癌、大腸癌、胃癌、肺癌、甲状腺癌、神経膠腫、髄芽腫及びメラノーマ等の多種の癌に、NRG1は関与していることが明らかになっている。

【0003】

また、可溶性NRG1については、EGFファミリーに属する他の因子同様に、膜貫通型の前駆体から誘導される。すなわち、膜貫通型前駆体（pro-NRG1）として産生され、細胞表面（原形質膜）へ輸送されたのちに、マトロプロセアーゼ等の切断酵素によって、細胞外部分の膜近傍部が切断（シェディング）及び放出されると考えられている。かかるpro-NRG1の切断及び放出は、細胞表面のプロテアーゼによって生じ、pro-NRG1の切断機構については、血清中の因子やプロテインキナーゼC（PKC）の活性化因子であるPMA（ホルボール-12-ミリステート-13-アセテート、phorbol-12-myristate-13-acetate）によって活性化されることが報告されている（非特許文献1）。さらに、かかるプロテアーゼとして、これまでにTACE（腫瘍壊死因子-（TNF）変換酵素、ADAM17）及びADAM19（メルトリン）の2つが報告されており（非特許文献2及び3）、これらのプロテアーゼが活性化される機構については、PKC、Erk1/2及びp38等の関与が示されている（非特許文献4）。

【0004】

また、NRG1タンパク質については9つのアイソフォームが知られており、そのうちアイソフォーム1（NRG1-1）、アイソフォーム2（NRG1-）、アイソフォーム3（NRG1-2）等が前記膜貫通型の前駆体である。さらに、これらアイソフォームは、2つの大きな型、型（アイソフォーム2）及び型（アイソフォーム1及び3）に分類される。

【0005】

前述の通り、NRG1が関与するシグナル伝達によって、多種多様な生物学的反応が制御されているため、かかるシグナル伝達やそのシグナルの発端となる前記切断を、アイソフォームごとに解析又は制御することは、生命現象の解明、ひいては医療分野の発展に大きく貢献するものである。この点に関し、一般的に、タンパク質のアイソフォームを特異的に解析又はその機能を制御する上で、抗体は有効なツールとなり得ることが知られている。

【0006】

しかしながら、図1に示すように、NRG1タンパク質の型及び型アイソフォーム

10

20

30

40

50

間において、N末端から212番目のアミノ酸残基までの部分において実質的に一致しており、相違点は、EGFドメインのC末10アミノ酸残基長及びジャクスタメンブレン領域(juxtamembrane domain、EGFドメインよりC末端側で膜貫通配列よりN末端側の領域であり、前記切断を受ける領域)の僅か20アミノ酸程度しかない。さらにEGFドメインのC末部分に含まれる6つのシステイン残基の間隔は一致している。従って、かかる僅かな相違点を識別できる抗体を作製するのは極めて困難であるため、これらアイソフォームを特異的に認識し、さらにそれらアイソフォームが関与するシグナル伝達を抑制する抗体は開発されていないのが現状である。

【0007】

一方、前述の通り、NRG1は様々な生命現象に関与していることが明らかになっているため、各アイソフォームに特異的に結合するものではないが、NRG1に対する抗体が開発されている(非特許文献5~8)。

10

【0008】

例えば、非特許文献5には、抗NRG1抗体によってシュワン細胞の細胞分裂誘起反応を阻害されることが開示されている。非特許文献6には、抗NRG1抗体によって神経腫細胞(良性腫瘍細胞)の細胞分裂が抑制できたことから、抗NRG1抗体による神経腫の治療の可能性が示唆されている。また、非特許文献7には、肝細胞癌(HCC)由来細胞であるSK-HeP1の培養上清を添加することにより、同じくHCC由来細胞であるHepG2におけるErbB3のリン酸化が亢進するが、抗NRG1抗体により前処理した培養上清では、かかるリン酸化の亢進が生じなかったことが開示されている。さらに、非特許文献8においては、NRG1アイソフォーム6(SMDF)による増殖刺激に対して中和活性を示す抗体(3G11)が開示されている。しかしながら、かかる中和活性を示す抗体によっても、癌細胞であるMCF7やT47Dに対しては阻害効果が認められなかったことも明らかになっている(同文献、第248ページ左欄下から5行目~第248ページ左欄13行目の記載 参照)。このように、NRG1が関与すると想定されている様々な疾患の治療、特に癌の治療において十分な活性を有する、NRG1に対する抗体は開発されていないのが現状である。

20

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0009】

30

【非特許文献1】Loeber, Mol. Cell. Neurosci., 1998年、11巻、77~91ページ

【非特許文献2】Montero J.C., Mol. Cell Neurosci., 2000年、16巻、631~648ページ

【非特許文献3】Shirakabe K., J. Biol. Chem., 2001年、276巻、9352~9358ページ

【非特許文献4】Montero J.C., Biochem. J., 2002年、363巻、211~221ページ

【非特許文献5】Rosenbaum C., Exp Neurol., 1997年、148巻、2号、604~615ページ

40

【非特許文献6】Hansen MR., Glia, 2006年、53巻、6号、593~600ページ

【非特許文献7】Hsieh SY., Hepatology, 2011年、53巻、2号、504~516ページ

【非特許文献8】Osheroff PL., Growth Factors, 1999年、16巻、3号、241~253ページ

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

本発明は、前記従来技術の有する課題に鑑みてなされたものであり、ヒトNRG1タン

50

パク質のアイソフォームを特異的に認識し、かつ当該アイソフォームが関与するシグナル伝達を抑制することを可能とする抗体を提供することを目的とする。本発明は、ヒトNRG1タンパク質のアイソフォームに特異的な抗体であって抗腫瘍活性を有する抗体を提供することも目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明者らは、前記目的を達成すべく、ヒトNRG1タンパク質のアイソフォーム1及び2（ヒトNRG1-1タンパク質及びヒトNRG1-2タンパク質）の計11種の部分長タンパク質をマウスに免疫し、ヒトNRG1タンパク質に対するモノクローナル抗体を計80クローン取得した。さらに、これらモノクローナル抗体の中から、細胞表面にあるNRG1タンパク質に対する強い反応性を指標とし、4種のモノクローナル抗体（8a2、8a4、10bM3及び10b2M3）を選定した。そして、これらモノクローナル抗体について、ヒトNRG1タンパク質のアイソフォームに対する結合特異性についての解析、並びにエピトープの同定を行った結果、8a2はヒトNRG1-1タンパク質及びヒトNRG1-2タンパク質の両方に結合する抗体であり、そのエピトープは、ヒトNRG1-1タンパク質及びヒトNRG1-2タンパク質の共通領域である、EGFドメインよりもN末側であることが分かった。しかし、8a4については、ヒトNRG1-1タンパク質に結合しないが、ヒトNRG1-2タンパク質に特異的に結合する抗体であり、特にヒトNRG1-2タンパク質における221～234位の領域をエピトープとする抗体であることが明らかになった。さらに、10bM3及び10b2M3はいずれも、ヒトNRG1-2タンパク質に結合しないが、ヒトNRG1-1タンパク質に特異的に結合する抗体であり、特にヒトNRG1-1タンパク質における213～239位の領域をエピトープとする抗体であることが明らかとなった。このようにして、本発明者らは、ヒトNRG1-1タンパク質又はヒトNRG1-2タンパク質に特異的な抗体を得ることに成功した。

【0012】

本発明者らは、これらヒトNRG1タンパク質のアイソフォームに特異的なマウスモノクローナル抗体について、重鎖及び軽鎖の可変領域及びCDRの配列を決定した。さらに、決定した配列に基づき、定常領域をヒトIgGに由来するものに置換したキメラ抗体も作製した。そして、このようにして得られたキメラ抗体及びそれら抗体の基となった前記マウスモノクローナル抗体について、鋭意研究を重ねた結果、ヒトNRG1-1タンパク質における221～234位の領域又はヒトNRG1-2タンパク質における213～239位の領域と特異的に結合することによって、ヒトNRG1タンパク質が関与するシグナル伝達の発端となる、当該タンパク質の切断をこれら抗体は阻害できることを明らかにした。また、前記シグナル伝達において生じる、癌細胞におけるErbb3タンパク質のリン酸化も、これら抗体は抑制できることも見出した。さらに、これらヒトNRG1タンパク質のアイソフォームに特異的な抗体を、癌細胞を移植したマウスに投与することによって、当該腫瘍の増大が抑制されること、さらには当該マウスの生存率が有意に高くなることも見出した。一方、ヒトNRG1-1タンパク質及びヒトNRG1-2タンパク質の両方に結合する抗体（8a2）に関しては、ヒトNRG1タンパク質の切断に対する抑制活性、癌細胞におけるErbb3タンパク質のリン酸化に対する抑制活性及び*in vivo*における腫瘍の増殖を抑制する活性のいずれも有していないことも見出し、本発明を完成するに至った。すなわち、本発明は、以下<1>～<11>を提供するものである。

<1> 配列番号：1に示されるヒトNRG1-1タンパク質における221～234位の領域又は配列番号：2に示されるヒトNRG1-2タンパク質における213～239位の領域に結合する抗体であって、下記（a）～（c）のいずれかに記載の特徴を有する、抗体

（a）配列番号：3～5に記載のアミノ酸配列を各々相補性決定領域1～3として含む軽鎖可変領域と、配列番号：7～9に記載のアミノ酸配列を各々相補性決定領域1～3と

10

20

30

40

50

して含む重鎖可変領域とを保持する

(b) 配列番号：11～13に記載のアミノ酸配列を各々相補性決定領域1～3として含む軽鎖可変領域と、配列番号：15～17に記載のアミノ酸配列を各々相補性決定領域1～3として含む重鎖可変領域とを保持する

(c) 配列番号：19～21に記載のアミノ酸配列を各々相補性決定領域1～3として含む軽鎖可変領域と、配列番号：23～25に記載のアミノ酸配列を各々相補性決定領域1～3として含む重鎖可変領域とを保持する。

<2> 配列番号：1に示されるヒトNRG1 - タンパク質における221～234位の領域又は配列番号：2に示されるヒトNRG1 - 1タンパク質における213～239位の領域に結合する抗体であって、下記(a)～(c)のいずれかに記載の特徴を有する、<1>に記載の抗体

(a) 配列番号：6に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、又は、配列番号：6に記載のアミノ酸配列のフレームワーク領域において1～10のアミノ酸が置換、欠失、付加及び/又は挿入されているアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、

配列番号：10に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、又は、配列番号：10に記載のアミノ酸配列のフレームワーク領域において1～10のアミノ酸が置換、欠失、付加及び/又は挿入されているアミノ酸配列を含む重鎖可変領域とを保持する

(b) 配列番号：14に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、又は、配列番号：14に記載のアミノ酸配列のフレームワーク領域において1～10のアミノ酸が置換、欠失、付加及び/又は挿入されているアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、

配列番号：18に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、又は、配列番号：18に記載のアミノ酸配列のフレームワーク領域において1～10のアミノ酸が置換、欠失、付加及び/又は挿入されているアミノ酸配列とを含む重鎖可変領域とを保持する

(c) 配列番号：22に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、又は、配列番号：22に記載のアミノ酸配列のフレームワーク領域において1～10のアミノ酸が置換、欠失、付加及び/又は挿入されているアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、

配列番号：26に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、又は、配列番号：26に記載のアミノ酸配列のフレームワーク領域において1～10のアミノ酸が置換、欠失、付加及び/又は挿入されているアミノ酸配列を含む重鎖可変領域とを保持する。

<3> 配列番号：1に示されるヒトNRG1 - タンパク質又は配列番号：2に示されるヒトNRG1 - 1タンパク質の切断を抑制する活性を有する、<1>又は<2>に記載の抗体。

<4> 配列番号：1に示されるヒトNRG1 - タンパク質又は配列番号：2に示されるヒトNRG1 - 1タンパク質による刺激に应答した、癌細胞におけるErbb3タンパク質のリン酸化を抑制する活性を有する、<1>～<3>のうちのいずれか一に記載の抗体。

<5> in vivoにおいて腫瘍の増殖を抑制する活性を有する、<1>～<4>のうちのいずれか一に記載の抗体。

<6> <1>～<5>のうちのいずれか一に記載の抗体をコードするDNA。

<7> <1>～<5>のうちのいずれか一に記載の抗体を産生する、又は、<6>に記載のDNAを含む、ハイブリドーマ。

<8> <1>～<5>のうちのいずれか一に記載の抗体を産生する、又は、<6>に記載のDNAを含む、宿主細胞。

<9> <1>～<5>のうちのいずれか一に記載の抗体を作製するための方法であって、<7>に記載のハイブリドーマ又は<8>に記載の宿主細胞を培養し、前記ハイブリドーマ、前記宿主細胞又はそれら培養液から、抗体を分離、精製する工程を含む方法。

<10> <1>～<5>のうちのいずれか一に記載の抗体を有効成分とする、癌を治療

10

20

30

40

50

又は予防するための組成物。

< 1 1 > 配列番号：1に示されるヒトNRG1 - タンパク質における221～234位の領域又は配列番号：2に示されるヒトNRG1 - 1タンパク質における213～239位の領域に結合する抗体を有効成分とする、癌を治療又は予防するための組成物。

【発明の効果】

【0013】

本発明によれば、ヒトNRG1タンパク質のアイソフォームを特異的に認識し、かつ当該アイソフォームが関与するシグナル伝達を抑制することを可能とする抗体を提供することが可能となる。また、本発明によれば、ヒトNRG1タンパク質のアイソフォームに特異的な抗体であって抗腫瘍活性を有する抗体を提供することも可能となる。

10

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】ヒトNRG1 - タンパク質とヒトNRG1 - 1タンパク質との間にて、構造及びアミノ酸配列を対比した結果、並びに本発明の抗体を作製するために免疫原として用いた部分長タンパク質（ag4～ag13及びagP）のヒトNRG1タンパク質における位置関係を示す概略図である。

【図2】取得したヒトNRG1タンパク質に対する抗体（8a2、8a4、10bM3及び10b2M3）と、N末端にHAタグを付加したヒトNRG1 - タンパク質又はヒトNRG1 - 1タンパク質を安定的に高発現する細胞株（NRG1 - a / st293T又はNRG1 - b / st293T）との結合の程度をフローサイトメトリーによって解析した結果を示す、ドット - プロット図である。

20

【図3】8a2と、ヒトNRG1 - の部分長タンパク質（ag4a～ag13a及びagPa）並びにヒトNRG1 - 1の部分長タンパク質（ag4b～ag13b及びagPb）との結合の程度をELISAによって解析した結果を示す、グラフである。

【図4】8a4と、ヒトNRG1 - の部分長タンパク質及びヒトNRG1 - 1の部分長タンパク質との結合の程度をELISAによって解析した結果を示す、グラフである。

【図5】10bM3と、ヒトNRG1 - の部分長タンパク質及びヒトNRG1 - 1の部分長タンパク質との結合の程度をELISAによって解析した結果を示す、グラフである。

30

【図6】10b2M3と、ヒトNRG1 - の部分長タンパク質及びヒトNRG1 - 1の部分長タンパク質との結合の程度をELISAによって解析した結果を示す、グラフである。

【図7】10bM3及び10b2M3と、N末端にHAタグを付加したヒトNRG1 - タンパク質、ヒトNRG1 - 1タンパク質又はヒトNRG1 - 2タンパク質を安定的に高発現する細胞株（NRG1 - a / st293T、NRG1 - b / st293T又はNRG1 - b2 / st293T）との結合の程度をフローサイトメトリーによって解析した結果を示す、ドット - プロット図である。

【図8】本発明の抗体（8a4、10bM3及び10b2M3）と、EGFファミリーに属する因子（EGF、HB - EGF、TGfa（TGf））、AREG、NRG1 - a（NRG1 - ）及びNRG1 - b（NRG1 - 1）との結合の程度をELISAによって解析した結果を示す、グラフである。

40

【図9】PMAによって生じるヒトNRG1 - タンパク質の切断に対する抑制活性を、8a2並びに本発明の抗体（8a4、10bM3及び10b2M3）について、フローサイトメトリーにより解析した結果を示すグラフである。縦軸は、PMA添加後の細胞（NRG1 - a / st293T）表面に残存しているヒトNRG1 - タンパク質量（平均蛍光強度）を示す。また、各群における4つの棒は、左から順に80、20、5及び1ug / mLの濃度にて各抗体を添加した際の結果を示す（グラフの表記に関し、図10、11、19、21及び22において同様である）。

【図10】PMAによって生じるヒトNRG1 - 1タンパク質の切断に対する抑制活性

50

を、8 a 2 並びに本発明の抗体 (8 a 4、1 0 b M 3 及び 1 0 b 2 M 3) について、フローサイトメトリーにより解析した結果を示すグラフである。

【図 1 1】P M A によって生じるヒト N R G 1 - 2 タンパク質の切断に対する抑制活性を、8 a 2 並びに本発明の抗体 (8 a 4、1 0 b M 3 及び 1 0 b 2 M 3) について、フローサイトメトリーにより解析した結果を示すグラフである。

【図 1 2】P M A によって生じるヒト N R G 1 - タンパク質の切断に対する抑制活性を、8 a 2、8 a 5、8 a 7、8 a 1 7、8 a 1 8、8 a 6、1 3 a 3 及び本発明の抗体 (8 a 4) について、フローサイトメトリーにより解析した結果を示すグラフである。

【図 1 3】P M A によって生じるヒト N R G 1 - 1 タンパク質の切断に対する抑制活性を、8 a 2、8 a 5、8 a 7、8 a 1 7、8 a 1 8 及び本発明の抗体 (1 0 b M 3) につ

10

いて、フローサイトメトリーにより解析した結果を示すグラフである。
 【図 1 4】ヒト N R G 1 - タンパク質によって誘起される E r b B 3 のリン酸化に対する抑制活性を、8 a 2 並びに本発明の抗体 (8 a 4、1 0 b M 3 及び 1 0 b 2 M 3) についてウェスタンブロットにより解析した結果を示す写真である。図中、「E r b B 3」は各細胞における E r b B 3 タンパク質の量を示し、「P - E r b B 3」は各細胞におけるリン酸化された E r b B 3 タンパク質の量を示す。また、各群における「m A b」は、左から順に各抗体の添加濃度が 5 0、1 0 及び 5 u g / m L であることを示す (図中の表記に関し、図 1 5 において同様である)。

【図 1 5】ヒト N R G 1 - 1 タンパク質によって誘起される E r b B 3 のリン酸化に対する抑制活性を、本発明の抗体 (1 0 b M 3 及び 1 0 b 2 M 3) についてウェスタンブ

20

ロットにより解析した結果を示す写真である。
 【図 1 6】本発明のキメラ抗体 (c h - 8 a 4、c h - 1 0 b M 3 及び c h - 1 0 b 2 M 3) と、N R G 1 - a / s t 2 9 3 T、N R G 1 - b / s t 2 9 3 T 又は N R G 1 - b 2 / s t 2 9 3 T との結合の程度をフローサイトメトリーによって解析した結果を示す、ドット - プロット図である。

【図 1 7】8 a 4 及び c h - 8 a 4 と、ヒト N R G 1 - タンパク質との結合の程度をフローサイトメトリーによって解析した結果を示す、グラフである。

【図 1 8】c h - 8 a 4 と、ヒト N R G 1 - の部分長タンパク質 (a g 4 a ~ a g 1 3 a 及び a g P a) 並びにヒト N R G 1 - の部分長タンパク質 (a g 4 b ~ a g 1 3 b 及び a g P b) との結合の程度を E L I S A によって解析した結果を示す、グラフである。

30

【図 1 9】c h - 1 0 b M 3 と、ヒト N R G 1 - の部分長タンパク質及びヒト N R G 1 - の部分長タンパク質との結合の程度を E L I S A によって解析した結果を示す、グラフである。

【図 2 0】c h - 1 0 b 2 M 3 と、ヒト N R G 1 - の部分長タンパク質及びヒト N R G 1 - の部分長タンパク質との結合の程度を E L I S A によって解析した結果を示す、グラフである。

【図 2 1】P M A によって生じるヒト N R G 1 - タンパク質の切断に対する抑制活性を、本発明のキメラ抗体 (c h - 8 a 4、c h - 1 0 b M 3 及び c h - 1 0 b 2 M 3) について、フローサイトメトリーにより解析した結果を示すグラフである。

【図 2 2】P M A によって生じるヒト N R G 1 - 1 タンパク質の切断に対する抑制活性を、本発明のキメラ抗体 (c h - 8 a 4、c h - 1 0 b M 3 及び c h - 1 0 b 2 M 3) について、フローサイトメトリーにより解析した結果を示すグラフである。

40

【図 2 3】8 a 2 を投与したゼノグラフトマウスにおける、腫瘍体積の経時的変化を示すグラフである。横軸は、抗体の投与を開始した日を 0 日とした際の経過日数を示す (横軸の表記については、図 2 4 ~ 2 6 において同様である)。

【図 2 4】本発明の抗体 (8 a 4 又は c h - 8 a 4) を投与したゼノグラフトマウスにおける、腫瘍体積の経時的変化を示すグラフである。

【図 2 5】本発明の抗体 (1 0 b 2 M 3 又は c h - 1 0 b 2 M 3) を投与したゼノグラフトマウスにおける、腫瘍体積の経時的変化を示すグラフである。

【図 2 6】本発明の抗体 (8 a 4、c h - 8 a 4、1 0 b 2 M 3 又は c h - 1 0 b 2 M 3

50

)を投与したゼノグラフトマウスの生存率の経時的変化を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0015】

後述の実施例において示す通り、本発明者らは、ヒトNRG1タンパク質のアイソフォーム1又は2(ヒトNRG1-1タンパク質又はヒトNRG1-タンパク質)に特異的な抗体を作製することに成功した。さらに、得られた抗体のエピトープを同定すると共に、これら抗体はヒトNRG1タンパク質が関与するシグナル伝達に対し、顕著な抑制活性を有していることも見出した。従って、本発明は、ヒトNRG1タンパク質のアイソフォームに対して特異的に結合する以下の抗体を提供する。

【0016】

配列番号：1に示されるヒトNRG1-タンパク質における221~234位の領域又は配列番号：2に示されるヒトNRG1-1タンパク質における213~239位(好ましくは、232~239位)の領域に結合する抗体。

【0017】

本発明における「抗体」は、免疫グロブリンのすべてのクラス及びサブクラスを含む。「抗体」には、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体が含まれ、また、抗体の機能的断片の形態も含む意である。「ポリクローナル抗体」は、異なるエピトープに対する異なる抗体を含む抗体調製物である。また、「モノクローナル抗体」とは、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体(抗体断片を含む)を意味する。ポリクローナル抗体とは対照的に、モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基を認識するものである。本発明の抗体は、好ましくはモノクローナル抗体である。本発明の抗体は、自然環境の成分から分離され、及び/又は回収された(即ち、単離された)抗体である。

【0018】

本発明において「NRG1」は、ニューレグリン1、HRG(ヘレグリン)、HGL、HRGA、NDF(Neu分化因子)、ARIA(アセチルコリン受容体誘導活性因子)、GGF2(グリア成長因子2)、SMDF(感覚運動神経由来因子)等とも称されるタンパク質である。

【0019】

ヒト由来のNRG1タンパク質のアイソフォーム2(ヒトNRG1-タンパク質)は、典型的には、配列番号：1に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質(RefSeq ID:NP_039258で特定されるタンパク質、RefSeq ID:NM_013964で特定される塩基配列がコードするタンパク質)である。従って、「ヒトNRG1-タンパク質における221~234位の領域」は、典型的には、配列番号：1に記載の221位のスレオニン残基~234位のリジン残基のアミノ酸配列からなる領域である。

【0020】

ヒト由来のNRG1タンパク質のアイソフォーム1(ヒトNRG1-1タンパク質)は、典型的には、配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質(RefSeq ID:NP_039250で特定されるタンパク質、RefSeq ID:NM_013956で特定される塩基配列がコードするタンパク質)である。従って、「ヒトNRG1-1タンパク質における213~239位(又は232~239位)の領域」は、典型的には、配列番号：2に記載の213位のプロリン残基(又は232位のヒスチジン残基)~239位のグルタミン酸残基のアミノ酸配列からなる領域である。

【0021】

なお、ヒトNRG1タンパク質において型であるか型であるかは、EGFドメインのC末10アミノ酸残基長及びジャクスタメンブレン領域(juxtamembrane domain、EGFドメインよりC末端側で膜貫通配列よりN末端側の領域)をコードするエクソンの選択の違いによって判別することができる。すなわち、ヒトNRG1-タンパク質は、エクソン11を含むヒトNRG1スプライシングバリエーションによってコードされるタンパク質であり、ヒトNRG1-タンパク質は、エクソン12aを含むヒ

10

20

30

40

50

トNRG1スプライシングバリエーションによってコードされるタンパク質である。さらに、型において、エクソン12aの次のエクソンとしてエクソン13を有するヒトNRG1スプライシングバリエーションによってコードされるタンパク質がヒトNRG1-1タンパク質であり、エクソン13を有していないヒトNRG1スプライシングバリエーションによってコードされるタンパク質がヒトNRG1-2タンパク質である。エクソンの番号については、RefSeq ID: NM_013964 (ヒトNRG1-)、RefSeq ID: NM_013956 (ヒトNRG1-1) 及びRefSeq ID: NM_013957 (ヒトNRG1-2) のエクソンに関する記載を参照のこと。

【0022】

また、ヒトNRG1-タンパク質における221~234位の領域又はヒトNRG1-1タンパク質における213~239位の領域は、このような典型的なアミノ酸配列を有するもの以外に、天然においてアミノ酸が変異したものも存在しうる。従って、前記アミノ酸配列以外に、配列番号: 1に記載の221~234位の領域又は配列番号: 2に記載の213~239位(又は232~239位)の領域において、1若しくは複数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列からなるものも含まれる。アミノ酸配列の置換、欠失、挿入若しくは付加は、一般的には、10アミノ酸以内(例えば、5アミノ酸以内、3アミノ酸以内、1アミノ酸)である。

【0023】

また、本発明の抗体が結合する部位、すなわち「エピトープ」は、抗原(前述の領域)中に存在する抗原決定基(抗体中の抗原結合ドメインが結合する抗原上の部位)を意味する。従って、本発明におけるエピトープは、アミノ酸の一次配列中において連続する複数のアミノ酸からなるポリペプチド(線状エピトープ)であってもよく、アミノ酸の一次配列中において隣接していないアミノ酸が、ペプチド又はタンパク質の折り畳み等の三次元構造によって近傍にくることにより形成されるポリペプチド(不連続エピトープ、構造的エピトープ)であってもよい。また、かかるエピトープとしては、典型的には、少なくとも3つ、及び最も普通には少なくとも5つ(例えば8~10個、6~20個)のアミノ酸からなる。

【0024】

本発明の抗体が、ヒトNRG1-タンパク質又はヒトNRG1-1タンパク質中の前記特定の領域に結合することによって抑制することのできる「ヒトNRG1タンパク質が関与するシグナル伝達」としては、ヒトNRG1タンパク質の可溶型とEGF受容体とが結合することによって活性化される一連の生物学的反応のみならず、このシグナル伝達の発端となるヒトNRG1タンパク質の切断(いわゆるシェディング)及び放出を含む意味である。すなわち、本発明の抗体としては、ヒトNRG1-タンパク質又はヒトNRG1-1タンパク質の切断、該切断によって生じた可溶性NRG1タンパク質の放出、可溶性NRG1タンパク質とEGF受容体(ErbB3又はErbB4)との結合、該結合に伴うErbB3又はErbB4の構造の変化、該構造の変化によって誘導されるErbB3又はErbB4のホモあるいはヘテロ二量体化、該二量体化に伴う(ヒトNRG1-タンパク質又はヒトNRG1-1タンパク質による刺激に应答した)ErbB3又はErbB4のリン酸化、該リン酸化によって惹起されるMAPK経路の活性化、前記リン酸化によって惹起されるPI3K-Akt経路の活性化、並びに、これら経路の活性化によって誘導される、細胞の増殖、細胞の分化、細胞の移動、細胞の接着及び細胞の浸潤等のうちの少なくともいずれか一の過程を抑制する活性を有していればよい。

【0025】

また、これら過程のうち、「ヒトNRG1-タンパク質又はヒトNRG1-1タンパク質の切断」、「ヒトNRG1-タンパク質又はヒトNRG1-1タンパク質による刺激に应答したErbB3又はErbB4のリン酸化」及び「細胞の増殖」のうちの少なくともいずれか一の過程を抑制する活性を有する抗体が好ましく、当該3過程全てを抑制する活性を有する抗体がより好ましい。

【0026】

10

20

30

40

50

「ヒトNRG1 - タンパク質又はヒトNRG1 - 1タンパク質の切断」は、PMA、PKC、Erk1/2及びp38等によって活性化されたTACE、ADAM19等のプロテアーゼによる、ヒトNRG1 - 又はヒトNRG1 - 1タンパク質のジャクスタメンブレン領域内における切断を意味する。また、かかる切断を抑制する活性は、例えば、後述の実施例5に示す方法にて評価することができる。

【0027】

「ヒトNRG1 - タンパク質又はヒトNRG1 - 1タンパク質による刺激に応答したErbB3又はErbB4のリン酸化」は、可溶性NRG1タンパク質とErbB3又はErbB4との結合等に応答した、ErbB3又はErbB4の細胞内ドメインのチロシンリン酸化を意味する。本発明の抗体による抑制の対象として、好ましくはErbB3 10
タンパク質のリン酸化であり、より好ましくは癌細胞におけるErbB3タンパク質のリン酸化である。また、かかるリン酸化を抑制する活性は、例えば、後述の実施例6に示す方法にて評価することができる。

【0028】

本発明における「細胞の増殖の抑制」は、細胞の増殖自体（細胞の分裂）の抑制のみならず、細胞の死（アポトーシス等）の誘導による細胞の増殖抑制を含む意味である。また、本発明の抗体による抑制の対象として、好ましくは癌細胞の増殖であり、より好ましくはin vivoにおける癌細胞（腫瘍）の増殖である。さらに、かかるin vivo 20
における腫瘍の増殖を抑制する活性は、例えば、後述の実施例11に示す方法にて評価することができる。本発明の抗体の好ましい態様は、当該方法において、がん細胞株移植80日後において、陰性対照群における腫瘍体積を100%とした際に、腫瘍体積を30%以下（例えば、25%以下、20%以下、15%以下、10%以下、5%以下、0%）にすることができる抗体である。

【0029】

また、本発明の抗体による抑制の対象となる癌の種類としては、NRG1と多種の癌との関連は以下に示す通り明らかになっているので、特に制限はない。

【0030】

例えば、肺癌ではErbB2、ErbB3及びErbB4の発現が多く調べられており、ErbB3が過剰発現すること（Poller, D. N. et al. (1992) J. Pathol., 168, 275 - 280）、及びErbB3の過剰発現と劣悪な予後 30
とが相関すること（Yi, E. S. et al. (1997) Mod. Pathol., 10, 142 - 148）が示されている。さらにNRG1によるErbBの活性化が癌化をもたらすことも報告されている（Al Moustafa, A. E. et al. (1999) Anticancer Res., 19, 481 - 486、Gollamudi, M. et al. (2004) Lung Cancer, 43, 135 - 143）。また、EGFRもErbB3とのヘテロダイマーを形成することによって、NRG1が制御するシグナル伝達に関わっていることも示されている（Engelman, J. A. et al. (2006) Clin. Cancer Res., 12, 4372 - 4376）。さらに、ゲフィチニブ投与を行った非小細胞肺癌患者においてErbB3の遺伝子増幅が観察されたことも報告されている（Cappuzzo, F. et al. (2005) 40
Br. J. Cancer, 93, 1334 - 1340）。

【0031】

また、卵巣癌に関しては、当該癌及びそれに由来する多くの株化細胞において、NRG1の発現と細胞増殖との関連が示されている。さらに、各種ErbB受容体の発現レベル、特にErbB3およびErbB2の発現レベルがNRG1応答性と密接に関わっていることが示されている（Aguilar, Z. et al. (1999) Oncogene, 18, 6050 - 6062、Gilmour, L. M. et al. (2002) Clin. Cancer Res., 8, 3933 - 3942）。

【0032】

さらに、大腸癌においては、NRG1がオートクライン様式でErbB2/ErbB3 50

を活性化し、他の増殖因子非依存的な細胞増殖をもたらすことが示されている (Venkateswarlu, S. et al. (2002) *Oncogene*, 21, 78 - 86)。

【0033】

また、胃癌で ErbB3 が発現亢進していることも報告されており (Sanidas, E. E. et al. (1993) *Int. J. Cancer*, 54, 935 - 940)、間葉細胞の産生する NRG1 - がパラクライン様式で機能して癌化に寄与することが示唆されている (Noguchi, H. et al. (1999) *Gastroenterology*, 117, 1119 - 1127)。さらに、ErbB4 の過剰発現も胃癌において報告されており、NRG1 - が ErbB4 を介して機能していることも示唆されている。

10

【0034】

また、乳癌においては、ErbB2 が過剰発現していない患者の30%で NRG1 の発現亢進がみられ、NRG1 は ErbB2 / ErbB3 を介して乳腺上皮細胞の癌化に関わっていることが示されている (Li, Q. et al. (2004) *Cancer Res.*, 64, 7078 - 7085)。また、エストロゲン受容体陰性の乳癌ではエストロゲン陽性の乳癌より高い確率で NRG1 の発現が見られる (Normanno, N. et al. (1995) *Breast Cancer Res. Treat.* 35, 293 - 297)。さらに NRG1 や ErbB とホルモン要求性の関連については多くの研究がなされており (Tang, C. K. et al. (1996) *Cancer Res.*, 56, 3350 - 3358、Grunt, T. W. et al. (1995) *Int. J. Cancer*, 63, 560 - 567、Pietras, R. J. et al. (1995) *Oncogene*, 10, 2435 - 2446)、NRG1 が発現する乳癌は予後が劣悪であることが示唆されている (Lupu, R. et al. (1996) *Breast Cancer Res. Treat.*, 38, 57 - 66)。NRG1 の過剰発現は、エストロゲン刺激や ErbB2 の過剰発現の有無にかかわらず、MMP-9 や VEGF の発現亢進を介して乳癌の進展および転移をもたらす (Atlas, E. et al. (2003) *Mol. Cancer Res.*, 1, 165 - 175)。

20

【0035】

また、前立腺では ErbB1、ErbB2、ErbB3 及び NRG1 の発現が示されており、NRG1 がパラクライン様式で前立腺の分化に関わっていること、また、NRG1 / ErbB シグナル伝達経路の異常が初期癌化をもたらすことが示唆されている (Grasso, A. W. et al. (1997) *Oncogene*, 15, 2705 - 2716、Lyne, J. C. et al. (1997) *Cancer J. Sci. Am.*, 3, 21 - 30)。また別の研究では、前立腺癌の多くで NRG1 及び ErbB3 が過剰発現しており、NRG1 - がオートクライン様式で機能することが示されている (Leung, H. Y. et al. (1997) *Br. J. Urol.*, 79, 212 - 216)。また、NRG1 による ErbB2 / ErbB3 の活性化は、アンドロゲン受容体の活性化及びホルモン非存在下での前立腺癌再発に関わることも示されている (Gregory, C. W. et al. (2005) *Clin. Cancer Res.*, 11, 1704 - 1712)。

30

40

【0036】

また、甲状腺癌及びリンパ節転移においても NRG1 の発現亢進が示されている。また、甲状腺癌の中で最も頻度が高い甲状腺乳頭癌では、多くの症例で NRG1 が核に検出される。NRG1 の発現亢進や核での染色と ErbB の発現に相関は認められないことから、ErbB を介さない NRG1 の作用メカニズムの存在も示唆される (Fluge, O. et al. (2000) *Int. J. Cancer*, 87, 763 - 770)。

【0037】

また、神経膠腫 (グリオーマ) でも、NRG1 が発現すること (Westphal, M. et al. (1997) *J. Neurooncol.*, 35, 335 - 346) や

50

、NRG1によるシグナルが細胞生存に関わっていること (Flores, A. I. et al. (2000) J. Neurosci., 20, 7622-7630)、さらにNRG1が接着関連分子の活性化を介して浸潤に寄与していることが示唆されている (van der Horst, E. H. et al. (2005) Int. J. Cancer, 113, 689-698)。

【0038】

また、髄芽腫ではその87%でNRG1の発現がみられ、ErbB2及びErbB4が発現している症例においてより強く発現する傾向があり、さらに、これら3因子全ての発現と転移についても記載されている (Gilbertson, R. J. et al. (1998) Cancer Res., 58, 3932-3941)。

10

【0039】

また、色素細胞及び多くのメラノーマ由来培養細胞では、NRG1/ErbBのシステムによって増殖が制御されている可能性が示されている (Gordon-Thomson, C. et al. (2005) Melanoma Res., 15, 21-28)。さらに、NRG1の過剰発現及び分泌は、オートクラインないしパラクライン様式で細胞増殖や遊走を制御することも示されている (Stove, C. et al. (2003) J. Invest. Dermat., 121, 802-812)。

【0040】

また、膵臓癌では、癌組織でNRG1が多く発現していることや、タイプNRG1の発現レベルと患者の生存率とが相関することが示されている (Kolb, A. et al. (2007) Int. J. Cancer, 120, 514-523)。

20

【0041】

さらに、NRG1は、アクチン骨格の制御を介して癌細胞の浸潤を促進することも示されている (Hijazi, M. M. et al. (2000) Int. J. Oncol., 17, 629-641)。さらに、トラスツズマブはHER2過剰発現が認められた患者に投与される抗HER2抗体であるが、NRG1 (NRGa2c)が高発現している場合はHER2の発現が高値でなくても有意に奏効する可能性が示されている (de Alava, E. et al. (2007) J. Clin. Oncol., 25, 2656-2663)。また、乳癌細胞を用いた研究では、NRG1が癌幹細胞の自己複製能を制御するとともにIL-8など様々な細胞外分泌タンパク質を産生させ、癌幹細胞ニッチ (微小環境) を熟成させる機能を果たすことが示されている (Hinojara, K. et al. (2012) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 109, 6584-6589)。

30

【0042】

本発明の抗体の他の好ましい態様としては、下記(a)~(c)のいずれかに記載の特徴を有する抗体であり、他のより好ましい態様としては、下記(a)~(c)のいずれかに記載の特徴を有し、配列番号：1に示されるヒトNRG1 - タンパク質における221~234位の領域又は配列番号：2に示されるヒトNRG1 - 1タンパク質における213~239位 (好ましくは、232~239位) の領域に結合する抗体が挙げられる。

40

(a)

軽鎖CDR1~CDR3のアミノ酸配列 (配列番号：3~5に記載のアミノ酸配列又は該アミノ酸配列の少なくともいずれかにおいて1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び/又は挿入されているアミノ酸配列) を含む軽鎖可変領域と、

重鎖CDR1~CDR3のアミノ酸配列 (配列番号：7~9に記載のアミノ酸配列又は該アミノ酸配列の少なくともいずれかにおいて1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び/又は挿入されているアミノ酸配列) を含む重鎖可変領域とを保持する

(b)

軽鎖CDR1~CDR3のアミノ酸配列 (配列番号：11~13に記載のアミノ酸配列又は該アミノ酸配列の少なくともいずれかにおいて1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠

50

失、付加及びノ又は挿入されているアミノ酸配列)を含む軽鎖可変領域と、

重鎖CDR1~CDR3のアミノ酸配列(配列番号:15~17に記載のアミノ酸配列又は該アミノ酸配列の少なくともいずれかにおいて1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及びノ又は挿入されているアミノ酸配列)を含む重鎖可変領域とを保持する

(c)

軽鎖CDR1~CDR3のアミノ酸配列(配列番号:19~21に記載のアミノ酸配列又は該アミノ酸配列の少なくともいずれかにおいて1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及びノ又は挿入されているアミノ酸配列)を含む軽鎖可変領域と、

重鎖CDR1~CDR3のアミノ酸配列(配列番号:23~25に記載のアミノ酸配列又は該アミノ酸配列の少なくともいずれかにおいて1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及びノ又は挿入されているアミノ酸配列)を含む重鎖可変領域とを保持する。

10

【0043】

また、本発明の抗体のより好ましい態様としては、下記(a)~(c)のいずれかに記載の特徴を有する抗体であり、他のより好ましい態様としては、下記(a)~(c)のいずれかに記載の特徴を有し、配列番号:1に示されるヒトNRG1-タンパク質における221~234位の領域又は配列番号:2に示されるヒトNRG1-1タンパク質における213~239位(好ましくは、232~239位)の領域に結合する抗体が挙げられる。

(a)

配列番号:6に記載のアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及びノ又は挿入されているアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、

20

配列番号:10に記載のアミノ酸配列または該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及びノ又は挿入されているアミノ酸配列を含む重鎖可変領域とを保持する

(b)

配列番号:14に記載のアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及びノ又は挿入されているアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、

配列番号:18に記載のアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及びノ又は挿入されているアミノ酸配列とを含む重鎖可変領域とを保持する

30

(c)

配列番号:22に記載のアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及びノ又は挿入されているアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、

配列番号:26に記載のアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及びノ又は挿入されているアミノ酸配列を含む重鎖可変領域とを保持する。

【0044】

一旦、上記軽鎖可変領域と重鎖可変領域とからなる抗体が得られた場合、当業者であれば、その抗体が認識するヒト由来の配列番号:1に示されるヒトNRG1-タンパク質における221~234位の領域又は配列番号:2に示されるヒトNRG1-1タンパク質における212~239位(又は232~239位)の領域上のペプチド領域(エピトープ)を特定して、そのペプチド領域に結合し、かつ、ヒトNRG1-タンパク質又はヒトNRG1-1タンパク質が関与するシグナル伝達を抑制する種々の抗体を作製することができる。抗体のエピトープは、後述の実施例において示す通り、ヒトNRG1-

40

タンパク質又はヒトNRG1-1タンパク質のアミノ酸配列から得られたオーバーラップする合成オリゴペプチドへの結合をELISA等により調べるなどの周知の方法によって決定することができる。また、ファージディスプレイによるペプチドライブラリーをエピトープマッピングに用いることもできる。さらに、二つの抗体が同一または立体的に

50

重なり合ったエピトープと結合するかどうかは、競合アッセイ法により決定することができる。

【0045】

本発明の抗体には、マウス抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、及び、これら抗体の機能的断片が含まれる。本発明の抗体を医薬としてヒトに投与する場合は、副作用低減の観点から、キメラ抗体、ヒト化抗体、あるいはヒト抗体が望ましい。

【0046】

本発明において「キメラ抗体」とは、ある種の抗体の可変領域とそれとは異種の抗体の定常領域とを連結した抗体である。キメラ抗体は、例えば、抗原をマウスに免疫し、そのマウスモノクローナル抗体の遺伝子から抗原と結合する抗体可変部（可変領域）を切り出して、ヒト骨髄由来の抗体定常部（定常領域）遺伝子と結合し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入して産生させることにより取得することができる（例えば、特開平8-280387号公報、米国特許第4816397号公報、米国特許第4816567号公報、米国特許第5807715号公報）。また、本発明において「ヒト化抗体」とは、非ヒト由来の抗体の抗原結合部位（CDR）の遺伝子配列をヒト抗体遺伝子に移植（CDRグラフトイング）した抗体であり、その作製方法は、公知である（例えば、EP239400、EP125023、WO90/07861、WO96/02576参照）。本発明において、「ヒト抗体」とは、すべての領域がヒト由来の抗体である。ヒト抗体の作製においては、ヒトB細胞より活性のある抗体の産生をスクリーニングする方法、ファージディスプレイ法、免疫することで、ヒト抗体のレパトリーを生産することが可能なトランスジェニック動物（例えばマウス）を利用すること等が可能である。ヒト抗体の作製手法は、公知である（例えば、Nature, 362: 255-258 (1993)、Intern. Rev. Immunol, 13: 65-93 (1995)、J. Mol. Biol, 222: 581-597 (1991)、Nature Genetics, 15: 146-156 (1997)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97: 722-727 (2000)、特開平10-146194号公報、特開平10-155492号公報、特許2938569号公報、特開平11-206387号公報、特表平8-509612号公報、特表平11-505107号公報）。

【0047】

本発明において抗体の「機能的断片」とは、抗体の一部分（部分断片）であって、配列番号：1に示されるヒトNRG1-タンパク質における221~234位の領域又は配列番号：2に示されるヒトNRG1-1タンパク質における212~239位（又は232~239位）の領域に結合するものを意味する。具体的には、Fab、Fab'、F(ab')₂、可変領域断片(Fv)、ジスルフィド結合Fv、一本鎖Fv(scFv)、sc(Fv)₂、ダイアボディー、多特異性抗体、及びこれらの重合体等が挙げられる。

【0048】

ここで「Fab」とは、1つの軽鎖及び重鎖の一部からなる免疫グロブリンの一価の抗原結合断片を意味する。抗体のパパイン消化によって、また、組換え方法によって得ることができる。「Fab'」は、抗体のヒンジ領域の1つ又はそれより多いシステインを含めて、重鎖CH1ドメインのカルボキシ末端でのわずかの残基の付加によって、Fabとは異なる。「F(ab')₂」とは、両方の軽鎖と両方の重鎖の部分からなる免疫グロブリンの二価の抗原結合断片を意味する。

【0049】

「可変領域断片(Fv)」は、完全な抗原認識及び結合部位を有する最少の抗体断片である。Fvは、重鎖可変領域および軽鎖可変領域が非共有結合により強く連結されたダイマーである。「一本鎖Fv(scFv)」は、抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含み、これらの領域は、単一のポリペプチド鎖に存在する。「sc(Fv)₂」は、2つの重鎖可変領域及び2つの軽鎖可変領域をリンカー等で結合して一本鎖にしたものである。「ダイアボディー」とは、二つの抗原結合部位を有する小さな抗体断片であり、この断

10

20

30

40

50

片は、同一ポリペプチド鎖の中に軽鎖可変領域に結合した重鎖可変領域を含み、各領域は別の鎖の相補的領域とペアを形成している。「多特異性抗体」は、少なくとも2つの異なる抗原に対して結合特異性を有するモノクローナル抗体である。例えば、二つの重鎖が異なる特異性を持つ二つの免疫グロブリン重鎖/軽鎖対の同時発現により調製することができる。

【0050】

本発明の抗体には、望ましい活性（抗原への結合活性、ヒトNRG1-タンパク質又はヒトNRG1-1タンパク質が関与するシグナル伝達を抑制する活性、及び/又は他の生物学的特性）を減少させることなく、そのアミノ酸配列が修飾された抗体が含まれる。本発明の抗体のアミノ酸配列変異体は、本発明の抗体鎖をコードするDNAへの変異導入によって、またはペプチド合成によって作製することができる。そのような修飾には、例えば、本発明の抗体のアミノ酸配列内の残基の置換、欠失、付加及び/又は挿入を含む。抗体のアミノ酸配列が改変される部位は、改変される前の抗体と同等の活性を有する限り、抗体の重鎖または軽鎖の定常領域であってもよく、また、可変領域（フレームワーク領域及びCDR）であってもよい。CDR以外のアミノ酸の改変は、抗原との結合親和性への影響が相対的に少ないと考えられるが、現在では、CDRのアミノ酸を改変して、抗原へのアフィニティーが高められた抗体をスクリーニングする手法が公知である（PNAS, 102: 8466-8471 (2005)、Protein Engineering, Design & Selection, 21: 485-493 (2008)、国際公開第2002/051870号、J. Biol. Chem., 280: 24880-24887 (2005)、Protein Engineering, Design & Selection, 21: 345-351 (2008)）。

【0051】

改変されるアミノ酸数は、好ましくは、10アミノ酸以内、より好ましくは5アミノ酸以内、最も好ましくは3アミノ酸以内（例えば、2アミノ酸以内、1アミノ酸）である。アミノ酸の改変は、好ましくは、保存的な置換である。本発明において「保存的な置換」とは、化学的に同様な側鎖を有する他のアミノ酸残基で置換することを意味する。化学的に同様なアミノ酸側鎖を有するアミノ酸残基のグループは、本発明の属する技術分野でよく知られている。例えば、酸性アミノ酸（アスパラギン酸及びグルタミン酸）、塩基性アミノ酸（リシン・アルギニン・ヒスチジン）、中性アミノ酸においては、炭化水素鎖を持つアミノ酸（グリシン・アラニン・バリン・ロイシン・イソロイシン・プロリン）、ヒドロキシ基を持つアミノ酸（セリン・トレオニン）、硫黄を含むアミノ酸（システイン・メチオニン）、アミド基を持つアミノ酸（アスパラギン・グルタミン）、イミノ基を持つアミノ酸（プロリン）、芳香族基を持つアミノ酸（フェニルアラニン・チロシン・トリプトファン）で分類することができる。

【0052】

また「同等の活性を有する」とは、抗原への結合活性または前記シグナル伝達を抑制する活性が対象抗体（代表的には、後述の実施例において示す、8a4、10bM3又は10b2M3）と同等（例えば、70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上）であることを意味する。抗原への結合活性は、例えば、後述の実施例において示す通り、抗原との反応性をELISAにより解析することや、抗原を発現する細胞を作製し、抗体サンプルとの反応性をフローサイトメーターで解析することにより評価することができる。また、前記シグナル伝達を抑制する活性は、例えば、後述の実施例に示す方法にて、PMA刺激を与えた細胞表面におけるNRG1タンパク質の残存率、NRG1タンパク質による刺激を与えた癌細胞におけるErbb3タンパク質のリン酸化の程度、ゼノグラフトマウスにおける腫瘍体積等を指標として、評価することができる。

【0053】

また、本発明の抗体の改変は、例えば、グリコシル化部位の数又は位置を変化させる等の抗体の翻訳後プロセスの改変であってもよい。これにより、例えば、抗体のADCC活性を向上させることができる。抗体のグリコシル化とは、典型的には、N-結合又はO-

10

20

30

40

50

結合である。抗体のグリコシル化は、抗体を発現するために用いる宿主細胞に大きく依存する。グリコシル化パターンの改変は、糖生産に関わる特定の酵素の導入又は欠失等の公知の方法で行うことができる（特開2008-113663号公報、米国特許第5047335号、米国特許第5510261号、米国特許第5278299号、国際公開第99/54342号）。さらに、本発明においては、抗体の安定性を増加させる等の目的で脱アミド化されるアミノ酸若しくは脱アミド化されるアミノ酸に隣接するアミノ酸を他のアミノ酸に置換することにより脱アミド化を抑制してもよい。また、グルタミン酸を他のアミノ酸へ置換して、抗体の安定性を増加させることもできる。本発明は、こうして安定化された抗体をも提供するものである。

【0054】

本発明の抗体は、ポリクローナル抗体であれば、抗原（ヒトNRG1 - タンパク質における221～234位又はヒトNRG1 - 1タンパク質における213～239位（又は232～239位）のアミノ酸配列からなるポリペプチド、その部分ペプチド、またはこれらが発現する細胞等）で動物を免疫し、その抗血清から、従来手段（例えば、塩析、遠心分離、透析、カラムクロマトグラフィー等）によって、精製して取得することができる。また、モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ法や組換えDNA法によって作製することができる。

【0055】

ハイブリドーマ法としては、代表的には、コーラー及びミルスタインの方法（Kohler & Milstein, Nature, 256: 495 (1975)）が挙げられる。この方法における細胞融合工程に使用される抗体産生細胞は、前記抗原で免疫された動物（例えば、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、サル、ヤギ、ニワトリ、ラクダ）の脾臓細胞、リンパ節細胞、末梢血白血球などである。免疫されていない動物から予め単離された上記の細胞又はリンパ球等に対して、抗原を培地中で作用させることによって得られた抗体産生細胞も使用することが可能である。ミエローマ細胞としては公知の種々の細胞株を使用することが可能である。抗体産生細胞及びミエローマ細胞は、それらが融合可能であれば、異なる動物種起源のものでもよいが、好ましくは、同一の動物種起源のものである。ハイブリドーマは、例えば、抗原で免疫されたマウスから得られた脾臓細胞と、マウスミエローマ細胞との間の細胞融合により産生され、その後のスクリーニングにより、ヒトNRG1 - タンパク質又はヒトNRG1 - 1タンパク質に特異的なモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを得ることができる。ヒトNRG1 - タンパク質又はヒトNRG1 - 1タンパク質に特異的なモノクローナル抗体は、ハイブリドーマを培養することにより、また、ハイブリドーマを投与した哺乳動物の腹水から、取得することができる。

【0056】

組換えDNA法は、上記本発明の抗体をコードするDNAをハイブリドーマやB細胞等からクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主細胞（例えば哺乳類細胞株、大腸菌、酵母細胞、昆虫細胞、植物細胞等）に導入し、本発明の抗体を組換え抗体として産生させる手法である（例えば、P. J. Delves, Antibody Production: Essential Techniques, 1997 WILEY、P. Shepherd and C. Dean Monoclonal Antibodies, 2000 OXFORD UNIVERSITY PRESS、Vandamme A. M. et al., Eur. J. Biochem. 192: 767 - 775 (1990)）。本発明の抗体をコードするDNAの発現においては、重鎖又は軽鎖をコードするDNAを別々に発現ベクターに組み込んで宿主細胞を形質転換してもよく、重鎖及び軽鎖をコードするDNAを単一の発現ベクターに組み込んで宿主細胞を形質転換してもよい（国際公開第94/11523号公報 参照）。本発明の抗体は、上記宿主細胞を培養し、宿主細胞内又は培養液から分離・精製し、実質的に純粋で均一な形態で取得することができる。抗体の分離・精製は、通常のポリペプチドの精製で使用されている方法を使用することができる。トランスジェニック動物作製技術を用いて、抗体遺伝子が組み込まれ

10

20

30

40

50

たトランスジェニック動物（ウシ、ヤギ、ヒツジ、ブタ等）を作製すれば、そのトランスジェニック動物のミルクから、抗体遺伝子に由来するモノクローナル抗体を大量に取得することも可能である。

【0057】

従って、本発明は、本発明の抗体をコードするDNA、本発明の抗体を産生する又は本発明の抗体をコードするDNAを含むハイブリドーマをも提供することができる。また、本発明は、以下に示す本発明の抗体を作製するための方法も提供することができる。

【0058】

配列番号：1に示されるヒトNRG1 - タンパク質における221～234位の領域又は配列番号：2に示されるヒトNRG1 - 1タンパク質における213～239位からなるペプチド、該ペプチドの部分ペプチド又は該ペプチドを含むタンパク質を、動物に免疫する工程と、前記免疫された動物から抗体を精製する工程と、前工程にて精製された抗体の中から、前記ペプチドのいずれかと結合できる抗体を選択する工程とを含む、本発明の抗体を作製するための方法。

【0059】

かかる本発明の抗体を作製するための方法において、免疫される「動物」としては特に制限はなく、前述の通り、例えば、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、サル、ヤギ、ニワトリ、ラクダ等の非ヒト動物が挙げられる。また、「免疫された動物からの抗体の精製」においては、例えば、前述の通り、免疫された動物の抗血清から、従来手段（例えば、塩析、遠心分離、透析、カラムクロマトグラフィー等）によって抗体を精製してもよい。また、免疫された動物から取得した抗体産生細胞とミエロマ細胞とを融合し、得られたハイブリドーマから従来手段によって抗体を精製してもよい。このようにして精製された抗体の中から、前記ペプチドのいずれかと結合できる抗体を「選択」する方法としても特に制限はなく、例えば、後述の実施例において示す通り、前記ペプチドとの反応性をELISAにより解析することや、前記ペプチドを発現する細胞を作製し、抗体との反応性をフローサイトメーターで解析する方法が挙げられる。

【0060】

また、本発明の抗体においては、薬剤若しくはプロドラッグ等の化合物又は分子が結合していてもよい。かかる抗体を投与することにより、ヒトNRG1 - タンパク質又はヒトNRG1 - 1タンパク質が発現している部位（例えば、癌細胞）に、該化合物又は分子を送達することができる。そのような薬物又はプロドラッグとしては特に制限はないが、本発明の抗体による抗腫瘍効果を相加的又は相乗的に増強するという観点から、抗腫瘍性を有する物質が好ましい。かかる抗腫瘍性を有する物質としては特に制限されるものではなく、例えば、抗癌剤（イリノテカン（CPT-11）、イリノテカンの代謝産物SN-38（10-ヒドロキシ-7-エチルカンプトテシン）、アドリアマイシン、タキソール、5-フルオロウラシル、ニムスチン、ラミニスチン等のアルキル化剤、ゲムシタピン、ヒドロキシカルバミド等の代謝拮抗剤、エトポシド、ビンクリスチン等の植物アルカロイド、マイトマイシン、プレオマイシン等の抗癌性抗生物質、シスプラチン等の白金製剤、ソラフェニブ、エルロチニブ等の分子標的剤、メトトレキサート、シトシンアラビノシド、6-チオグアニン、6-メルカプトプリン、シクロフォスファミド、イフォスファミド、プスルファン等が挙げられる。また、放射性同位体も本発明の抗体に結合する抗腫瘍性を有する物質として好適に利用できる。

【0061】

また、抗体と前記化合物又は分子との結合も、当該技術分野で公知の方法により行うことができ、直接的結合及び間接的結合のいずれでもよい。例えば、直接的な結合として、共有結合を利用することができる。間接的な結合としては、リンカーを介した結合を利用することができる。かかるリンカーを介した結合については、当業者であれば、例えばHermanson, G. T. *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, 1996; Harris, J. M. and Zalipsky, S. 編, *Poly(ethylene glycol)*, Chemistry and

10

20

30

40

50

Biological Applications, ACS Symposium Series, 1997; Veronese, F. and Harris, J. M. 編, Peptide and protein PEGylation. Advanced Drug Delivery Review 54(4), 2002の記載を参照しながら行うことができる。本発明の抗体1分子に結合する前記化合物又は分子の数は、理論的には特に限定されないが、抗体と化合物等とからなる複合体の安定性や製造容易性等の観点から、通常1~10個、好ましくは1~8個である。

【0062】

また、後述の実施例において、本発明の抗体により、*in vivo*において腫瘍の増殖を抑制することや、癌細胞移植動物(ゼノグラフトマウス)を延命できることから、癌の治療又は予防に利用することができる。従って、本発明は、本発明の抗体を有効成分とする癌を治療又は予防するための組成物、並びに本発明の抗体の治療上又は予防上の有効量を、ヒトに投与する工程を含んでなる、癌を治療又は予防するための方法をも提供するものである。なお、本発明の抗体が標的とする癌としては、前述の通り特に制限はなく、多種の癌が標的となり得る。

10

【0063】

本発明の抗体を有効成分とする癌を治療又は予防するための組成物は、本発明の抗体と任意の成分、例えば生理食塩水、葡萄糖水溶液又はリン酸塩緩衝液等を含む形態で使用することができる。本発明の癌を治療又は予防するための組成物は、必要に応じて液体又は凍結乾燥した形態で製形成しても良く、任意に薬学的に許容される担体若しくは媒体、例えば、安定化剤、防腐剤、等張化剤等を含むさせることもできる。

20

【0064】

薬学的に許容される担体としては、凍結乾燥した製剤の場合、マンニトール、ラクトース、サッカロース、ヒトアルブミン等を例として挙げることができ、液状製剤の場合には、生理食塩水、注射用水、リン酸塩緩衝液、水酸化アルミニウム等を例として挙げるができるが、これらに限定されるものではない。

【0065】

本発明の癌を治療又は予防するための組成物の投与方法は、投与対象の年齢、体重、性別、健康状態等により異なるが、経口投与、非経口投与(例えば、静脈投与、動脈投与、局所投与)のいずれかの投与経路で投与することができる。当該組成物の投与量は、患者の年齢、体重、性別、健康状態、癌の進行の程度及び投与する組成物の成分により変動するが、一般的に静脈内投与の場合、成人には体重1kg当たり1日0.1~1000mg、好ましくは1~100mgである。

30

【0066】

本発明の癌を治療又は予防するための方法においては、本発明の抗体を投与方法としては前述の通り特に制限はなく、経口投与、非経口投与のいずれかの投与経路で投与することができる。当業者であれば前記薬学的に許容される担体若しくは媒体等を選択し、適した組成物の形態をとることにより達成できる。ヒトに投与される本発明の抗体の治療上又は予防上の「有効量」は、前述の通り、当業者であれば、患者の年齢、体重、性別、健康状態、癌の進行の程度、投与経路等を考慮して決定することができる。また、本発明の抗体の投与対象となる「ヒト」としては特に制限はなく、例えば、癌を罹患しているヒトである。また、予防、癌の再発を抑えるという観点から、癌を化学療法、放射線療法、外科療法等によって除去した後のヒトであってもよい。

40

【0067】

さら、本発明の癌を治療又は予防するための方法においては、本発明の抗体を投与する工程の他、本発明の抗体の有効性を評価する工程を含んでいてもよい。すなわち、本発明の抗体の治療上又は予防上の有効量をヒトに投与する工程と、該投与後のヒトにおいて、本発明の抗体の有効性を評価する工程とを含む、癌を治療又は予防するための方法を、本発明は提供する。

【0068】

50

本発明の抗体の「有効性の評価」については特に制限はなく、例えば、投与後の腫瘍のサイズ、癌の転移能又は各種癌マーカーの発現が投与前と比べ低減していれば、癌の治療等において本発明の抗体は有効であると判定することができる。また、癌に伴う異常、例えば、体重減少、腹痛、背痛、食欲低下、嘔気、嘔吐及び全身性倦怠感、虚弱、並びに黄疸等を指標としても、本発明の抗体の有効性を評価することができる。さらに、本発明の抗体による治療後、腫瘍組織を切除した場合、該腫瘍組織におけるヒトNRG1タンパク質のアイソフォームが関与するシグナル伝達の程度を調べることによっても、癌の治療等において本発明の抗体は有効であると判定することができる。例えば、腫瘍組織において通常亢進されるErbb3のリン酸化が、本発明の抗体の投与によって阻害されていることが検出されれば、癌の治療等において本発明の抗体は有効であると判定することができる。

10

【0069】

本発明の抗体は、前述の通り、多種の癌においてNRG1タンパク質の発現亢進等が認められているため、癌の治療や予防のみならず、癌の検査への応用も考えられる。特に、本発明の抗体のエピトープが存在するヒトNRG1 - タンパク質における221~234位の領域又はヒトNRG1 - 1タンパク質における213~239位の領域は、NRG1タンパク質の細胞外領域であるため、細胞免疫染色やフローサイトメトリー等において、簡便かつ効率良く、ヒトNRG1 - タンパク質又はヒトNRG1 - 1タンパク質を発現している癌細胞を検出することができる。また、本発明は、上記本発明の抗体を有効成分とする癌の検査薬を提供する。

20

【0070】

本発明の抗体を癌の検査に用いる場合あるいは癌の治療における腫瘍部位の検出に用いる場合、本発明の抗体は、標識したものであってもよい。標識としては、例えば、放射性物質、蛍光色素、化学発光物質、酵素、補酵素を用いることが可能である。本発明の抗体を検査薬として調剤するには、合目的な任意の手段を採用して任意の剤型でこれを得ることができる。例えば、精製した抗体についてその抗体価を測定し、適当にPBS等で希釈した後、0.1%アジ化ナトリウム等を防腐剤として加えることができる。また、例えば、ラテックス等に本発明の抗体を吸着させたものについて抗体価を求め、適当に希釈し、防腐剤を添加して用いることもできる。

【0071】

また、本発明において、ヒトNRG1 - タンパク質における221~234位の領域又はヒトNRG1 - 1タンパク質における213~239位（又は232~239位）の領域に結合する抗体が、抗がん活性を有することが判明したことから、ヒトNRG1 - タンパク質における221~234位又はヒトNRG1 - 1タンパク質における213~239位（好ましくは、232~239位）からなるポリペプチド又はその部分ペプチドを癌ワクチンとして、ヒトを含む哺乳動物に投与することも可能である（例えば、特開2007-277251号公報、特開2006-052216号公報を参照のこと）。本発明は、このような癌ワクチン用途に用いられる、ヒトNRG1 - タンパク質における221~234位又はヒトNRG1 - 1タンパク質における213~239位（好ましくは、232~239位）のアミノ酸配列からなるポリペプチド又はその部分ペプチドを含む癌ワクチン組成物をも提供するものである。製剤化する場合には、上記本発明の癌を治療又は予防するための組成物と同様に、薬学的に許容される担体若しくは媒体、例えば、安定化剤、防腐剤、等張化剤等を含むさせることができる。

30

40

【実施例】**【0072】**

以下、実施例に基づいて本発明をより具体的に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。なお、本明細書において、NRG1 - タンパク質はNRG1 - a、NRG1 - 1タンパク質はNRG1 - b、NRG1 - 2タンパク質はNRG1 - b2とも称する。

【0073】

50

(実施例1)

<ヒトNRG1タンパク質に結合する抗体の作製>

以下に示す方法にて、ヒトNRG1タンパク質に結合する抗体を作製した。

【0074】

1. NRG1 (NRG1 - a及びNRG1 - b2) のcDNA取得

ヒトNRG1 - a及びNRG1 - bのcDNA配列 (HRG - : NM_013964、HRG - 1 : NM_013956) に基づき、共通配列である5' UTRと3' UTRとに下記のプライマーを設計した。

1st PCR

NRG1__5' - 1 :

5' - CTTGGACCAAACTCGCCTGCG - 3' (配列番号 : 27)

NRG1__3' - 1 : 5' - ATAAAGTTTTACAGGTGAATCTATGTG - 3' (配列番号 : 28)

2nd PCR

NRG1__5' - 2 :

5' - GTAGAGCGCTCCGTCTCCGG - 3' (配列番号 : 29)

NRG1__3' - 2 :

5' - GGTTTTATACAGCAATAGGGTCTTG - 3' (配列番号 : 30)

【0075】

ヒト膵臓癌細胞MIA PaCa - 2 (ATCC : CRL - 1420) 及びAsPC - 1 (ATCC : CRL - 1682) から抽出したtotal RNAから、SuperScript III cells direct cDNA Synthesis System (Invitrogen社製 : 18080 - 200) を用いてcDNAを作製し、これを鋳型として、KOD Plus Ver. 2 (東洋紡社製 : KOD - 211) を用いたnested PCRによってNRG1のタンパク質コード領域全長を含むcDNAを増幅した。1st PCRは[98 20秒、60 20秒、68 130秒]を35サイクル、2nd PCRは[98 15秒、61 20秒、68 130秒]を35サイクルの条件で行った。2nd PCRの増幅産物をpT7Blue T - Vector (Novagen社製 : 69820) にクローニングし、塩基配列を確認した。塩基配列の確認には、オートシーケンサー (アプライドバイオシステムズ社製) を用いた。MIA PaCa - 2由来のcDNAからクローニングしたcDNAはヒトNRG1 - aの配列と一致していたため、NRG1 - a - pT7と名づけた。AsPC - 1由来のcDNAからクローニングしたcDNAは、ヒトNRG1 - bの配列と比較すると膜貫通領域より5'側に24塩基長の欠失が見られ、ヒトNRG1 - b2の配列と一致していたため、NRG1 - b2 - pT7と名づけた。

【0076】

2. NRG1 (NRG1 - b) のcDNA取得

NRG1 - b2のcDNAをもとに、PCRによってNRG1 - bのcDNAを作製した。PCRはNRG1 - b2 - pT7を鋳型として用い、下記のプライマーとPfu (Promega社製 : M774A) を使用して[95 50秒、58 30秒、72 10分]を25サイクルの条件で行った。

24in F :

5' - catccttgaggattgaatttatggagGCGGAGGAGCTGT ACCAGAAGAGAGTG - 3' (配列番号 : 31)

24in R :

5' - ctccataaattcaatcccaagatgCTTGTAAGAAGCTGGCCATTACGTAGTTTTGGC - 3' (配列番号 : 32)

なお、小文字で示した部分はNRG1 - b特異的配列 (b2で欠失する配列) に相当する。

10

20

30

40

50

【0077】

増幅産物をDpnIで消化し、常法に従ってクローニングした。得た配列はヒトNRG1-bの配列と一致していたため、NRG1-b-pT7と名づけた。

【0078】

3. 膜型NRG1を発現する細胞の作製

ヒトNRG1-a、NRG1-b又はNRG1-b2の全長を安定発現する動物細胞を、以下のように作製した。なおリコンビナントNRG1分子の発現を確認するために、それぞれN末端にHAタグを付加した。

【0079】

NRG1-a-pT7、NRG1-b-pT7又はNRG1-b2-pT7を鋳型として、下記のプライマーにより2段階のPCRで増幅させたDNAの末端をNotIとBamHIで切断し、動物細胞用発現ベクターのNotI-BamHIサイトに挿入した。動物細胞用の発現ベクターには、CMVプロモーターで制御され、IRES配列により目的遺伝子とPuromycin-EGFP融合タンパク質とが同時に発現されるpQCxmhIPGを用いた。pQCxmhIPGは、本発明者らが「BD Retro-X Q Vectors」(Clontech社製:631516)のpQCXIP Retroviral Vectorを改変したベクターである。作製したベクターは、NRG1-a-pQCxmhIPG、NRG1-b-pQCxmhIPG及びNRG1-b2-pQCxmhIPGと各々名付けた。

1st PCR

full__+HA-1:

5'-tatgatgtgcccggattatgcccTCCGAGCGCAAAGAAGGCAGAG-3' (配列番号:33)

full__R__BamHI:

5'-CGGGATCCTACAGCAATAGGGTCTTGGTTAG-3' (配列番号:34、下線部はBamHI認識配列)

2nd PCR

full__+HA-2:

5'-AATAGCGGCGCCGCAACCATGccttatgatgtgcccggattatgccc-3' (配列番号:35、下線部はNotI認識配列)

full__R__BamHI:

5'-CGGGATCCTACAGCAATAGGGTCTTGGTTAG-3' (配列番号:34、下線部はBamHI認識配列)

小文字部分はHAタグをコードする配列である。

【0080】

作製したベクターを、Pantropic Retroviral Expression System(Clontech社製:K1063-1)を用いて以下のように293T細胞に導入した。Collagen-coated 100mm dishに80~90%コンフルエント状態のGP2-293(Clontech社製:K1063-1)を準備し、Lipofectamine 2000(Invitrogen社製:11668-019)を用いて、上で構築した発現ベクター(NRG1-a-pQCxmhIPG、NRG1-b-pQCxmhIPG又はNRG1-b2-pQCxmhIPG)とpVSV-G(Clontech社製:K1063-1)を11.2ugずつ共導入した。48時間後、ウイルス粒子を含む上清を回収し、超遠心(18,000rpm、1.5時間、4)によってウイルス粒子を沈殿させ、その沈殿物を30uLのTNE(50mM Tris-HCl[pH=7.8]、130mM NaCl、1mM EDTA)で懸濁し、レトロウイルスベクター濃縮液を調製した。レトロウイルスベクター濃縮液5uLを、8ug/mLのHexadimethrine bromide(SIGMA社製:H-9268)を含んだ150uLのDMEM(SIGMA社製:D5796)-10%FBSで希釈し、ウイルス粒子含有培地を調製した。96穴のマイクロプレートに約4

10

20

30

40

50

0%コンフルエントの状態になるように準備した293Tの培地を、調製したウイルス粒子入りの培地に交換した。これらの細胞を5ug/mLのPuromycin(SIGMA社製:P-8833)を含むDMEM(SIGMA社製:D5796)-10%FBSで培養することによって、目的遺伝子が発現している細胞を得た。

【0081】

次に、樹立した細胞を常法に従って単クローン化し、細胞表面上に目的タンパク質が多く発現するクローンを選択した。これは、各クローンを抗HAタグ抗体(MBL社製:M132-3)及びPE標識抗マウスIgG抗体(ベックマンコールター社製:IM0855)で染色し、フローサイトメトリーでの平均蛍光強度を測定することによって行った。以上により、N末端にHAタグを付加したNRG1を安定的に高発現する細胞株(NRG1-a/st293T、NRG1-b/st293T及びbNRG1-b2/st293T)を樹立した。

10

【0082】

4. NRG1の部分長を分泌発現する細胞の作製

NRG1のEGFドメイン(aa181-aa222)又はEGFドメインと、切断領域(NRG1-aはaa181-aa242、NRG1-bはaa181-aa247)とを発現する動物細胞を、以下のように作製した。

【0083】

NRG1-a-pT7又はNRG1-b-pT7を鋳型として、下記のプライマーによりPCRで増幅させたNRG1部分長DNAの末端をNotI及びBamHIで切断し、動物細胞分泌発現用ベクターのNotI-BamHIサイトに挿入した。このベクターは、上に記載したpQCxmhIPGのクローニングサイト上流にIgの分泌シグナルペプチドをコードする配列(5'-ATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTA CTGCTGCTCTGGGTTC CAGGTTC CACTGGT-3'、配列番号:36)を組み込んだ、目的タンパク質を強制的に分泌発現させるためのベクターである。作製したベクターは、ag4a-pQCxmhIPG、ag4b-pQCxmhIPGおよびag5a-pQCxmhIPGと名付けた。

20

ag4a

EGF__F__NotI: 5'-AATAGCGGCCCGCAAAATGTGCGGAGAAAGGAGAAAAC-3'(配列番号:37、下線部はNotI認識配列)

30

EGF-a__R__BamHI: 5'-CGGGATCCAGTACATCTTGCTCCAGTG-3'(配列番号:38、下線部はBamHI認識配列)

ag4b

EGF__F__NotI: 5'-AATAGCGGCCCGCAAAATGTGCGGAGAAAGGAGAAAAC-3'(配列番号:39、下線部はNotI認識配列)

EGF-b__R__BamHI: 5'-CGGGATCCCTTGGCAGCGATCACCAAGTAAACTCAT-3'(配列番号:40、下線部はBamHI認識配列)

ag5a

EGF__F__NotI: 5'-AATAGCGGCCCGCAAAATGTGCGGAGAAAGGAGAAAAC-3'(配列番号:37、下線部はNotI認識配列)

40

preTM__R__BamHI: 5'-CGGGTACCCCACTCTCTTCTGGTACAGCTC-3'(配列番号:41、下線部はBamHI認識配列)。

【0084】

作製したベクターを上記と同様にPantropic Retroviral Expression System(Clontech社製:K1063-1)を用いて293T細胞に導入し、5ug/mLのPuromycin(SIGMA社製:P-8833)を含むDMEM(SIGMA社製:D5796)-10%FBSで培養することによって、目的遺伝子を安定的に発現する細胞株(ag4a/st293T、ag4b/st293T及びag5a/st293T)を樹立した。

【0085】

50

5. NRG1部分長精製タンパク質（動物細胞由来リコンビナントタンパク質の調製）
 以上のように樹立した発現細胞株（ag4a/st293T、ag4b/st293T及びag5a/st293T）を、CD293（Invitrogen社製）それぞれ1Lで培養した。培養上清を回収し、そこからTALON Purification Kit（Clontech社製：K1253-1）を用いてリコンビナントタンパク質を精製した。精製したタンパク質（ag4a、ag4b及びag5a）は、SDS-PAGE及びウエスタンブロットにて確認した。さらにプロテインアッセイキットII（BioRad社製：500-0002JA）を用いてタンパク質濃度を決定した。

【0086】

6. NRG1の部分長を発現する大腸菌の作製

NRG1の細胞外領域全長（NRG1-aはaa1-aa242、NRG1-bはaa1-aa247）、EGFドメインと切断領域（NRG1-aはaa181-aa242、NRG1-bはaa181-aa247）、EGFドメインのN末端から切断領域の若しくはタイプ特異的な配列まで（NRG1-aはaa181-aa234、NRG1-bはaa181-aa239）、EGFドメインと切断領域のうち若しくはタイプ特異的な配列（NRG1-aはaa213-aa234、NRG1-bはaa213-aa239）、又は、EGFドメインの若しくはタイプ特異的な配列から切断領域（NRG1-aはaa213-aa242、NRG1-bはaa213-aa247）を発現する大腸菌を、以下のように作製した。

【0087】

NRG1-a-pT7又はNRG1-b-pT7を鋳型として、下記のプライマーによってPCRで増幅させた。

ag8a、ag8b

EC__petF__BamHI：5'-CGGGATCCCATGTCCGAGCGCAAGGAAAGG-3'（配列番号：42、下線部はBamHI認識配列）

EGF__petR__SalI：5'-ACGCGTCGACCACTCTCTTCTGGTACAGCTC-3'（配列番号：43、下線部はSalI認識配列）

ag10a、ag10b

EGF__petF__BamHI：5'-CGGGATCCACCCTGGGACCAAGCC-3'（配列番号：44、下線部はBamHI認識配列）

EGF__petR__SalI：5'-ACGCGTCGACCACTCTCTTCTGGTACAGCTC-3'（配列番号：43、下線部はSalI認識配列）

ag11a

EGF__petF__BamHI：5'-CGGGATCCACCCTGGGACCAAGCC-3'（配列番号：44、下線部はBamHI認識配列）

a-specific__pet__R__SalI：5'-ACGCGTCGACCGCCTTTCTTTGGTTTTGG-3'（配列番号：45、下線部はSalI認識配列）

ag11b

EGF__petF__BamHI：5'-CGGGATCCACCCTGGGACCAAGCC-3'（配列番号：44、下線部はBamHI認識配列）

b-specific__pet__R__SalI：5'-ACGCGTCGACCGCCTCCATAAATTC AATCC-3'（配列番号：46、下線部はSalI認識配列）

ag12a

a-specific__pGEX__F__BamHI：5'-CGGGATCCCTGGCCAACCTGGATTCACTGG-3'（配列番号：47、下線部はBamHI認識配列）

a-specific__pGEX__R__XhoI：5'-CCGCTCGAGctaCGCCTTTTCTTTGGTTTTGG-3'（配列番号：48、下線部はXhoI認識配列、小文字は停止コドンに相当）

ag12b

10

20

30

40

50

b - s p e c i f i c _ p G E X _ F _ B a m H I : 5 ' - C G G G A T C C T G C C C A A A T G A G T T T A C T G G T G - 3 ' (配列番号 : 4 9 、 下線部は B a m H I 認識配列)

b - s p e c i f i c _ p G E X _ R _ X h o I : 5 ' - C C G C T C G A G c t a C G C C T C C A T A A A T T C A A T C C - 3 ' (配列番号 : 5 0 、 下線部は X h o I 認識配列、小文字は停止コドンに相当)

a g 1 3 a

a - s p e c i f i c _ p G E X _ F _ B a m H I : 5 ' - C G G G A T C C T G C C A A C C T G G A T T C A C T G G - 3 ' (配列番号 : 4 7 、 下線部は B a m H I 認識配列)

p r e T M _ p G E X _ R _ X h o I : 5 ' - C C G C T C G A G c t a C A C T C T C T T C T G G T A C A G C T C - 3 ' (配列番号 : 5 1 、 下線部は X h o I 認識配列、小文字は停止コドンに相当)

a g 1 3 b

b - s p e c i f i c _ p G E X _ F _ B a m H I : 5 ' - C G G G A T C C T G C C C A A A T G A G T T T A C T G G T G - 3 ' (配列番号 : 4 9 、 下線部は B a m H I 認識配列)

p r e T M _ p G E X _ R _ X h o I : 5 ' - C C G C T C G A G c t a C A C T C T C T T C T G G T A C A G C T C - 3 ' (配列番号 : 5 1 、 下線部は X h o I 認識配列、小文字は停止コドンに相当) 。

【 0 0 8 8 】

a g 8 a 、 a g 8 b 、 a g 1 0 a 、 a g 1 0 b 、 a g 1 1 a 及び a g 1 1 b は、増幅した N R G 1 部分長 DNA の末端を B a m H I と S a I I とで切断して p E T 2 8 a (N o v a g e n 社製 : 6 9 8 6 4 - 3) の B a m H I - X h o I サイトに挿入した。これらを用いて B L 2 1 を形質転換し、a g 8 a / B L 2 1 、 a g 8 b / B L 2 1 、 a g 1 0 a / B L 2 1 、 a g 1 0 b / B L 2 1 、 a g 1 1 a / B L 2 1 及び a g 1 1 b / B L 2 1 と各々名付けた。

【 0 0 8 9 】

また、a g 1 2 a 、 a g 1 2 b 、 a g 1 3 a 及び a g 1 3 b は、増幅した N R G 1 部分長 DNA の末端を B a m H I と X h o I とで切断して p G E X 4 T - 1 (A m e r s h a m 社製 : 2 8 - 9 5 4 5 - 4 9) の B a m H I - X h o I サイトに挿入した。これらを用いて B L 2 1 を形質転換し、a g 1 2 a / B L 2 1 、 a g 1 2 b / B L 2 1 、 a g 1 3 a / B L 2 1 及び a g 1 3 b / B L 2 1 と各々名付けた。

【 0 0 9 0 】

7 . N R G 1 部分長精製タンパク質 (大腸菌由来リコンビナントタンパク質) の調製
以上のようにして樹立した大腸菌株のうち、a g 8 a / B L 2 1 、 a g 8 b / B L 2 1 、 a g 1 0 a / B L 2 1 、 a g 1 0 b / B L 2 1 、 a g 1 1 a / B L 2 1 及び a g 1 1 b / B L 2 1 は、カナマイシン添加 L B 培地 0 . 5 L でそれぞれ培養し、1 m M の I P T G で発現誘導を行った。集菌したペレットを P B S 中で破碎し、その不溶画分を 6 M ウレア / P B S で可溶化したのち、T A L O N P u r i f i c a t i o n K i t (C l o n t e c h 社製 ; K 1 2 5 3 - 1) を用いてリコンビナントタンパク質を精製した。

【 0 0 9 1 】

また、a g 1 2 a / B L 2 1 、 a g 1 2 b / B L 2 1 、 a g 1 3 a / B L 2 1 及び a g 1 3 b / B L 2 1 は、アンピシリン添加 L B 培地 0 . 5 L でそれぞれ培養し 1 m M の I P T G で発現誘導を行った。集菌したペレットは 1 m M D T T / P B S (K C l f r e e) 中で破碎し、その可溶画分から G l u t a t h i o n e S e p h a r o s e 4 B (G E ヘルスケア社製 : 1 7 - 0 7 5 6 - 0 5) を用いてリコンビナントタンパク質を精製した。

【 0 0 9 2 】

精製したタンパク質 (a g 8 a 、 a g 8 b 、 a g 1 0 a 、 a g 1 0 b 、 a g 1 1 a 、 a

10

20

30

40

50

g 1 1 b、a g 1 2 a、a g 1 2 b、a g 1 3 a及びa g 1 3 b)はSDS - P A G E及びウエスタンブロットにて確認した。またプロテインアッセイキットI I (B i o R a d社製：5 0 0 - 0 0 0 2 J A)を用いてタンパク質濃度を決定した。

【 0 0 9 3 】

8 . N R G 1 部分長精製タンパク質 (合成ペプチド) の調製

N R G 1 の切断領域 (N R G 1 - a は a a 2 2 3 - a a 2 4 2、N R G 1 - b は a a 2 2 3 - a a 2 4 7) を含むペプチド (C T E N V P M K V Q N Q E K A E E L Y Q K R V L (配列番号：5 2) 及び C Q N Y V M A S F Y K H L G I E F M E A E E L Y Q K R V L (配列番号：5 3)) は、受託サービス (M B L 社) にて F m o c 法で合成した。ペプチドはそれぞれ常法に従って K L H に結合させ、a g P a 及び a g P b を得た。

10

【 0 0 9 4 】

9 . 抗原免疫

a g 5 a、a g 7 a、a g 7 b、a g 8 a、a g 8 b、a g 1 0 a、a g 1 0 b、a g 1 3 a、a g 1 3 b、a g P a 又は a g P b は、同量のコンプリートアジュバント (S I G M A 社製：F 5 8 8 1) と混合してエマルジョンにし、4 ~ 5 週齢の B A L B / c マウス (日本エスエルシー社製) 等に 1 匹当たり 5 ~ 2 0 u g、3 ~ 7 日おきに 6 回免疫した。最終免疫の 3 日後にマウスからリンパ球細胞を摘出し、マウス骨髄腫細胞 P 3 U 1 (P 3 - X 6 3 A g 8 U 1) と融合させた。

【 0 0 9 5 】

1 0 . 細胞融合

細胞融合は次に示す一般的な方法を基本として行った。全ての培地中の F B S は、5 6 で 3 0 分間保温する処理によって非働化したものを使用した。P 3 U 1 は、R P M I 1 6 4 0 - 1 0 % F B S (P e n i c i l l i n - S t r e p t o m y c i n 含有) で培養して準備した。摘出したマウスリンパ球細胞と P 3 U 1 とを 1 0 : 1 ~ 2 : 1 の割合で混合し、遠心した。沈殿した細胞に 5 0 % ポリエチレングリコール 4 0 0 0 (M e r c k 社製：1 . 0 9 7 2 7 . 0 1 0 0) を徐々に加えながら穏やかに混合後、遠心した。沈殿した融合細胞を、1 5 % F B S を含む H A T 培地 (R P M I 1 6 4 0、H A T - s u p p l e m e n t (I n v i t r o g e n 社製：1 1 0 6 7 - 0 3 0)、P e n i c i l l i n - S t r e p t o m y c i n) で適宜希釈し、9 6 穴のマイクロプレートに 2 0 0 u L / ウェルで播種した。融合細胞を C O ₂ インキュベータ (5 % C O ₂、3 7) 中で培養し、コロニーが形成されたところで培養上清をサンプリングし、下記のようにスクリーニングを行った。

20

30

【 0 0 9 6 】

1 1 . 抗 N R G 1 モノクローナル抗体産生細胞の選択

抗 N R G 1 抗体を産生するハイブリドーマは、酵素免疫測定法 (E L I S A) によって選定した。本アッセイにはそれぞれ免疫原として使用したリコンビナントヒト N R G 1 タンパク質を 9 6 ウェルの E L I S A プレート (n u n c 社製) に 0 . 5 u g / m L、5 0 u L / ウェルで分注し、室温 2 時間又は 4 一晩静置して吸着させたものを用いた。溶液を除去後、1 % B S A (ナカライ社製：0 1 8 6 3 - 3 5) - 5 % S u c r o s e (W A K K O 社製) - P B S を 1 5 0 u L / ウェル加え、室温で 2 時間静置することによって、残存する活性基をブロックした。静置後、溶液を除去し、一次抗体としてハイブリドーマ培養上清を 5 0 u L / ウェル分注し、1 時間静置した。該プレートを 0 . 0 5 % T w e e n 2 0 - P B S で洗浄後、二次抗体として 1 0 0 0 0 倍希釈した H R P 標識抗マウス I g G 抗体 (M B L 社製：3 3 0) を 5 0 u L / ウェル加えて室温で 1 時間静置した。該プレートを 0 . 0 5 % T w e e n 2 0 - P B S で洗浄後、発色液 (5 m M クエン酸ナトリウム、0 . 8 m M 3 . 3 ' . 5 . 5 ' テトラメチルベンチジン - 2 H C l、1 0 % N , N - ジメチルホルムアミド、0 . 6 2 5 % ポリエチレングリコール 4 0 0 0、5 m M クエン酸一水和物、5 m M H 2 O 2) を 5 0 u L / ウェル添加し室温 2 0 分静置して発色させ、1 M リン酸を 5 0 u L / ウェル添加して発色を停止させたのち、4 5 0 n m の吸光度をプレートリーダー (サーマフィッシャーサイエンティフィック社製) を用いて測定した。

40

50

【0097】

ここで選択したハイブリドーマの培養上清は、さらに、免疫原として使用したリコンビナントタンパク質と同一のタグ配列を持つ他の精製リコンビナントタンパク質に反応しないことを同様のELISAによって確認した。これにより、産生される抗体はタグ部分やリンカー部分ではなくNRG1を認識するものであることを確認した。

【0098】

そして、ここで選択したハイブリドーマを、15%FBSを含むHT培地(RPMI 1640、HT-supplement(Invitrogen社製:21060-017)、Penicillin-Streptomycin)で拡大培養した後、限界希釈法によって単クローン化した。

【0099】

12. 抗NRG1モノクローナル抗体の取得

単クローン化した各ハイブリドーマを無血清培地(GIBCO社製:12300-067)で培養し、その培養上清から、Protein A-Sepharoseを用いた一般的なアフィニティー精製法により抗体を精製した。これら抗体のヒトNRG1に対する反応性は、前記同様に、免疫原として使用した精製タンパク質を用いた酵素免疫測定法(ELISA)によって確認した。一次抗体として、抗NRG1抗体を5ug/mLを最大濃度としてPBSで段階希釈したものを用いた。結果、すべての抗体が濃度依存的にヒトNRG1に反応することを確認した。

【0100】

このようにして、抗NRG1抗体を産生するハイブリドーマを計80取得した(ag8aを免疫原として39クローン、ag8bを免疫原として16クローン、ag10aを免疫原として16クローン、ag10bを免疫原として2クローン、ag13aを免疫原として4クローン、agPaを免疫原として3クローン)。

【0101】

(実施例2)

<取得抗体の細胞表面NRG1に対する反応性>

取得した抗NRG1抗体のうち、細胞表面NRG1に強く反応するものを、フローサイトメトリーを用いた一般的な方法によって選定した。各抗体の、同条件下(同数のNRG1-a/st293T又はNRG1-b/st293T(5×10^4 個)と、293T(1×10^4 個)と、同濃度の各精製抗体(5ug/mL)と、同濃度の二次抗体(1/100希釈)(ベックマンコールター社製:IM0855)とを用いたフローサイトメトリーの平均蛍光強度を解析した。陽性対照として抗HAタグ抗体(MBL社製:M132-3)を用い、細胞表面上のNRG1の発現を確認した。また、抗体濃度依存的な平均蛍光強度についてもデータを取得し、低濃度での検出能を解析することで、相対的な親和性を評価した。得られた結果を図2に示す。

【0102】

図2に示す通り、取得抗体のうち、8a2、8a4、10bM3及び10b2M3の4抗体が細胞表面上のNRG1に強く反応することが明らかになった。さらに、8a2はNRG1-aとNRG1-bの両方に反応し、8a4はNRG1-a特異的に、10bM3と10b2M3とはNRG1-bに特異的に反応することが明らかになった。

【0103】

(実施例3)

<取得抗体のエピトープ解析>

8a2、8a4、10bM3及び10b2M3が認識する配列を、リコンビナントNRG1タンパク質に対する反応性を評価することによって解析した。すなわち、複数のNRG1部分長タンパク質を用いて、これらに対する各抗体の反応を前記と同様の酵素免疫測定法(ELISA)で検出することによって行った。得られた結果をグラフ化したものを図3~6に示す。縦軸は吸光度を表す。また、NRG1-a及びNRG1-bと、各NRG1部分長タンパク質との対応関係を図1に示す。

【0104】

また、10bM3及び10b2M3が認識する配列については、細胞表面のNRG1-b2に対する反応をフローサイトメトリーによっても解析した。前記同様の方法で、NRG1-b/st293Tに対する反応性とNRG1-b2/st293Tに対する反応性を比較した。得られた結果を図7に示す。

【0105】

図4に示す通り、8a4については、agPa(ヒトNRG1-タンパク質の221~244位)及びag12a(ヒトNRG1-タンパク質の212~235位)に反応することが明らかになった。さらに、図2に示す通り、8a4はヒトNRG1-1タンパク質とは反応しないことから、8a4は、NRG1タンパク質のタイプのアイソフォーム特異的な配列、すなわちヒトNRG1-タンパク質における221~234位の領域を認識することが明らかになった。

10

【0106】

また、図5~7に示す通り、10bM3及び10b2M3については、実施例2に記載の結果同様に、ヒトNRG1-タンパク質とは反応しないことから、これら抗体は、NRG1タンパク質のタイプのアイソフォーム特異的な配列、すなわち、ヒトNRG1-1タンパク質における213~239位の領域を認識することが明らかになった。

【0107】

さらに、フローサイトメトリーによる解析において評価に用いているのは、細胞に発現しているNRG1タンパク質であるため、当該解析の方が前記ELISAよりも、抗体との反応に供したNRG1タンパク質のコンフォメーション等がより正しく保たれている可能性が高いと考えられる。従って、フローサイトメトリーによる解析結果(図7に示した結果)を重視するに、10bM3及び10b2M3は、ヒトNRG1-2タンパク質とは反応しないことから、これら抗体は、NRG1タンパク質-1タンパク質に特異的な配列、すなわち、ヒトNRG1-1タンパク質における232~239位の領域を認識している可能性も考えられる。

20

【0108】

なお、図3に示す通り、8a2については、ag8a(ヒトNRG1-タンパク質の1~243位)及びag8b(ヒトNRG1-1タンパク質の1~248位)に反応し、ag10a(ヒトNRG1-タンパク質の173~243位)及びag10b(ヒトNRG1-1タンパク質の173~248位)に反応しないことから、EGFドメインよりN末端側の共通領域を認識することが明らかになった。

30

【0109】

(実施例4)

<EGFファミリーの他の因子に対する反応性>

NRG1タンパク質はEGFファミリーに属するタンパク質であるが、EGFドメイン以外の領域では、EGFファミリーの他のタンパク質とNRG1タンパク質とは殆ど類似していない。また、EGFドメインに関しては、EGFドメインの第1から第6のシステインの間で、NRG1タンパク質は、HB-EGF(ヘパリン結合EGF様成長因子)との相同性は45%であり、AREG(アンフィレグリン)との相同性は35%であり、TGF-(トランスフォーミング成長因子)との相同性は32%であり、EGFとの相同性は27%である(Holmesら、Science、1992年、256巻、1205~1210ページ参照)。

40

【0110】

このように、EGFドメインにおけるNRG1タンパク質との相同性はいずれも低いものであるが、EGFドメイン周辺を認識する8a4、10bM3及び10b2M3について、他のEGFファミリーの因子への反応性を、前記同様ELISAによって解析した。すなわち、EGF(R&D社製:236-EG-200)、HB-EGF(R&D社製:259-HE-050/CF)、TGF-alpha(R&D社製:239-A-100)、AREG(R&D製:262-AR-100/CF)、NRG1-a(R&D社製:

50

296-HR-050/CF)又はNRG1-b(R&D社製:396-HB-050/CF)をそれぞれ96穴のELISAプレートに0.5ug/mL、50uL/ウェルで分注して固相化し、各抗体の10ug/mL及び1ug/mLでの反応を検出した。その結果、図8に示す通り、8a4、10bM3及び10b2M3はいずれも他のEGFファミリーの因子には反応しなかった。

【0111】

(実施例5)

<取得抗体のNRG1切断阻害活性についての評価1>

取得した抗体について、ヒトNRG1-タンパク質又はヒトNRG1-1タンパク質が関与するシグナル伝達を特異的に抑制できるかどうかを評価した。すなわち、該シグナル伝達の発端となるこれらタンパク質の切断を特異的に取得した抗体が抑制できるかどうかを以下に示す方法にて評価した。

【0112】

前記HA-NRG1-a/st293T、HA-NRG1-b/st293T又はHA-NRG1-b2/st293Tを、96穴のマイクロプレートに1ウェルあたり20000細胞播種し、37℃で6時間培養した。細胞がプレート底面に接着したことを確認したのち、血清を含まないDMEM培地に交換して、さらに15時間培養した。

【0113】

次に、8a2、8a4、10bM3、10b2M3又はコントロール抗体(MBL社製:M075-3)を添加した培地に交換し、37℃で60分間インキュベートした。この際の抗体濃度は80、20、5、1及び0ug/mLの5段階で、1ウェルあたりの培地量は60uLである。続いて、600nMに調整したPMA添加培地を1ウェルあたり30uL添加し混合することによって、最終濃度200nMとなるようにPMAを添加した。37℃で30分間培養した後、ピペッティングによって細胞を回収した。なお、全てのサンプルは3ウェルずつ作製した。また、PMA(ホルボール-12-ミリステート-13-アセテート)はプロテインキナーゼC(PKC)を活性化することにより、NRG1にシェディングを誘導することが明らかになっている。

【0114】

一連の処理を行ったのちに、これらの細胞の表面に残存しているNRG1分子を、NRG1のN末端に付加されているHAタグをフローサイトメトリーで検出することによって解析した。一次抗体として2ug/mLに希釈したビオチン化抗HAタグ抗体(MBL社製:M132-3)、二次抗体として1/100希釈したPE標識ストレプトアビジン(インビトロジェン社製:S866)を使用し、常法に従って行った。得られた結果を図9~11に示す。縦軸はフローサイトメトリーでの平均蛍光強度を表す。また、各サンプルの値は、3ウェルずつ測定した結果の平均である。

【0115】

図9~11に示す通り、HA-NRG1-a/st293Tに対しては8a4が、HA-NRG1-b/st293Tに対しては10bM3及び10b2M3が、濃度依存的に切断を阻害することが示された。すなわち、各々のアイソフォームに特異的な領域(ヒトNRG1-タンパク質における221~234位の領域又はヒトNRG1-1タンパク質における213~239位(又は232~239位)の領域)を認識する8a4、10bM3及び10b2M3が切断阻害活性を有することが明らかになった。

【0116】

<取得抗体のNRG1切断阻害活性についての評価2>

実施例1にて取得した抗NRG1抗体(8a2、8a5、8a17、8a18、8a7、8a6、13a3、8a4及び10bM3)を用い、これら抗体のエピトープと、NRG1切断阻害活性との相関について解析した。

【0117】

8a2、8a5、8a17、8a18及び8a7は、NRG1-1及びNRG1-1に結合する抗体である。8a2、8a5、8a17及び8a18のエピトープはいずれも

10

20

30

40

50

、EGFドメインよりN末側の領域である。8a7のエピトープは、EGFドメインにおけるNRG1- とNRG1- 1との共通領域である。

【0118】

8a6、13a3及び8a4は、NRG1- に特異的に結合する抗体である。8a6及び13a3のエピトープはいずれも、EGFドメインのC末側の領域(NRG1- とNRG1- 1とにおいて相同性の低い領域)である。8a4のエピトープは、前述の通り、ヒトNRG1- タンパク質における221~234位の領域である。

【0119】

10bM3は、前述の通り、NRG1- 1に特異的に結合する抗体であり、そのエピトープは、ヒトNRG1- 1タンパク質における213~239位(又は232~239位)の領域である。

10

【0120】

なお、これら抗NRG1抗体は、実施例2及び3に記載の方法にて同定した。また、これら抗NRG1抗体のNRG1切断阻害活性の評価は、前述の方法と同様の方法を用いて行った。すなわち、前記HA-NRG1-a/s t 293T又はHA-NRG1-b/s t 293Tを、48穴のマイクロプレートに1ウェルあたり20000細胞播種し、37 で6時間培養した。細胞がプレート底面に接着したことを確認したのち、血清を含まないDMEM培地に交換して、さらに15時間培養した。

【0121】

次に、前記抗NRG1抗体又はコントロール抗体(MBL:M075-3)を添加した培地に交換し、37 で120分間インキュベートした。この際の抗体濃度は100及び10ug/mLの2段階で、1ウェルあたりの培地量は250uLである。続いて、200nMに調整したPMA添加培地を1ウェルあたり250uL添加し混合することによって、最終濃度100nMとなるようにPMAを添加した。37 で30分間培養した後、ピペティングによって細胞を回収した。

20

【0122】

一連の処理を行ったのちに、これらの細胞の表面に残存しているNRG1分子を、NRG1のN末端に付加されているHAタグをフローサイトメトリーで検出することによって解析した。一次抗体として2ug/mLに希釈したビオチン化抗HAタグ抗体(MBL社製:M132-3)、二次抗体として1/100希釈したPE標識ストレプトアビジン(インビトロジェン社製:S866)を使用し、常法に従って行った。得られた結果を図12及び13に示す。縦軸はフローサイトメトリーでの平均蛍光強度を表す。

30

【0123】

図12及び13に示す通り、前述の結果同様に、ヒトNRG1- タンパク質に対しては8a4が、ヒトNRG1- 1に対しては10bM3が、濃度依存的に切断を阻害することが示された。一方、ヒトNRG1- タンパク質における221~234位の領域及びヒトNRG1- 1タンパク質における213~239位の領域以外の領域を認識する抗体(8a2、8a5、8a17、8a18、8a7、8a6及び13a3)については、いずれもNRG1タンパク質に対する切断阻害活性が認められなかった。特に、ヒトNRG1- タンパク質における221~234位の領域にかなり近接している領域をエピトープとする8a6及び13a3においてさえ、かかる活性を確認することができなかった。従って、ヒトNRG1- タンパク質における221~234位の領域及びヒトNRG1- 1タンパク質における213~239位の領域は、抗体がNRG1タンパク質に対する切断を阻害する上で重要な認識部位であることが確認された。

40

【0124】

(実施例6)

<取得抗体のNRG1中和活性についての評価>

取得した抗体について、ヒトNRG1- タンパク質又はヒトNRG1- 1タンパク質が関与するシグナル伝達を特異的に抑制できるかどうかを評価した。すなわち、これらタンパク質の刺激に特異的に応答して生じる、癌細胞のEr b B3タンパク質のリン酸化

50

を、取得した抗体が抑制できるかどうかを以下に示す方法にて評価した。

【0125】

ヒト乳がんの株化培養細胞であるMCF7(ATCC社製:HTB-22)を用いて、NRG1で刺激した際に誘起されるErbb3のリン酸化を、取得した抗NRG1抗体が阻害できるか、すなわち抗NRG1抗体にNRG1を中和する活性があるかどうかをウエスタンブロット法によって解析した。DMEM-10%FBS(Penicillin-Streptomycin含有)で培養したMCF7を、6穴プレートに1ウェルあたり25000細胞播種し、37℃で6時間培養した。細胞がプレート底面に接着したことを確認したのち、血清を含まないDMEM培地に交換して、さらに24時間培養した。

【0126】

そして、ここに、NRG1-a及びNRG1-bのリコンビナントタンパク質(R&D社製:296-HR/CF及び396-HB/CF)と抗NRG1抗体を37℃で60分間インキュベートしたものを1ウェルあたり500uL添加した。この際、リコンビナントタンパク質の濃度は100ng/mL(NRG1-a)又は5ng/mL(NRG1-b)であり、抗体濃度は50、10、5及び0ug/mLの4段階である。

【0127】

これを37℃で30分間培養した後、1ウェルあたり200uLのSDSサンプルバッファー(62.5mM Tris-HCl[pH=6.8]、5%Glycerol、2%SDS、0.003%BPB、5%2-mercaptoethanol)で細胞を回収した。

【0128】

回収した細胞サンプルを加熱処理したのち15uLずつをSDS-PAGEに供し、1/1000希釈した抗リン酸化Erbb3ウサギ抗体(Cell Signaling社製:#4791S)又は抗Erbb3ウサギ抗体(Cell Signaling社製:#4754)と、1/5000希釈したHRP標識抗ウサギIgG抗体(MBL社製:458)とを用いてウエスタンブロットを施行した。得られた結果を図14及び15に示す。

【0129】

図14及び15に示す通り、8a4はNRG1-aによるErbb3のリン酸化を、10bM3及び10b2M3はNRG1-bによるErbb3のリン酸化をそれぞれ濃度依存的に阻害した。すなわち、8a4、10bM3及び10b2M3がNRG1中和活性を有することが明らかになった。

【0130】

(実施例7)

<8a4、10bM3及び10b2M3抗体の重鎖及び軽鎖可変領域遺伝子の単離、並びにCDRの同定>

本発明の抗体(8a4、10bM3及び10b2M3)について、以下に示す方法にて重鎖及び軽鎖の可変領域遺伝子を単離し、さらにこれら可変領域中のCDRを同定した。

【0131】

ハイブリドーマを培養し、一般的な方法によりtotal RNAを抽出した。次に、GeneRacerキット(Invitrogen社製:L1502-01)を用いた5'-RACE法により、cDNAを取得した。このcDNAを鋳型とし、GeneRacer 5' Primer(5'-CGACTGGAGCACGAGGACACTGA-3'(配列番号:54))とCH1(mouse IgG1 constant領域1)3' Primer(5'-AATTTTCTTGTCCACCTGG-3'(配列番号:55))とを用いてPlatinum Taq DNA Polymerase High Fidelity(Invitrogen社製:11304-029)でPCR([94℃30秒、57℃30秒、72℃50秒]を35サイクル)を実施し、抗体重鎖可変領域の遺伝子(cDNA)を増幅した。一方、抗体軽鎖についても同様にGeneRacer 5' PrimerとCk(constant領域)3' Primer(5'-CTAACACTTCATTCTGTTGAAGCTCT-3'(配列番号:56))

10

20

30

40

50

とを用いてPCRを実施して、遺伝子(cDNA)を増幅した。増幅した遺伝子断片をそれぞれpT7Blue T-Vector(Novagen社製:69820)にクローニングし、オートシーケンサー(アプライドバイオシステムズ社製)を用いて配列を解析した。そして、得られた塩基配列がコードするアミノ酸、及び各CDRの配列を決定した。その結果は以下の通りである。

【0132】

<8a4重鎖可変領域>

EVQLQQSGADLVKPGASVKLSCTASGFNIDKDDYIHWVKQR
PEQGLEWIGWIDPENGDT EYASQFQGKATITADTSSNTAY
LQLRSLTSEDTAVYYCTTSDHRAWFAFWGLGTLVTVSS

10

(配列番号:10)

<8a4重鎖可変領域のCDR1>

DDYIH (配列番号:7)

<8a4重鎖可変領域のCDR2>

WIDPENGDT EYASQFQG (配列番号:8)

<8a4重鎖可変領域のCDR3>

SDHRAWFAF (配列番号:9)

<8a4軽鎖可変領域>

DVLMTQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQTIVHRNGNTYLEW
YLQKPGQSPKLLIYRVS NRFSGV PDRFSGSGSGTDFTLKI
SRVEAEDLGVYYCFQGS HVPLTFGAGTKL

20

(配列番号:6)

<8a4軽鎖可変領域のCDR1>

RSSQTIVHRNGNTYLE (配列番号:3)

<8a4軽鎖可変領域のCDR2>

RVS NRF S (配列番号:4)

<8a4軽鎖可変領域のCDR3>

FQGS HVPLT (配列番号:5)

<10bM3重鎖可変領域>

EVQLVESGGGLVKPGGSRKLS CAASGFTFSDYGIHWVRQA
PEKGLEWLA YISSGSSTIYYADTVKGRFTISRDN AKNTLF
LQMTSLRSEDTAMY YCARGSNYVGY YAMDYWGQGTSTVTS
S

30

(配列番号:18)

<10bM3重鎖可変領域のCDR1>

DYGIH (配列番号:15)

<10bM3重鎖可変領域のCDR2>

YISSGSSTIYYADTVKG (配列番号:16)

<10bM3重鎖可変領域のCDR3>

GSNYVGY YAMDY (配列番号:17)

40

<10bM3軽鎖可変領域>

DIVMTQSPSSSLAVTAGEKVTMRCKSSQSL LWSV NQKNYLS
WYQQKEGQSPKLLIYGAS IRESWVPDRFTGSGSGTDFTLT
ISNVHAEDLAVYYCQH NHGRFLPLTFGGGTKL

(配列番号:14)

<10bM3軽鎖可変領域のCDR1>

KSSQSL LWSV NQKNYLS (配列番号:11)

<10bM3軽鎖可変領域のCDR2>

GASIRES (配列番号:12)

<10bM3軽鎖可変領域のCDR3>

50

QH NHGRFLPLT (配列番号: 13)

< 10b2M3重鎖可変領域 >

QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYAFSSSWMNWVKQR
PGKGLEWIGRIYPGDGDIYYNGKFKGKATLTADKSSSTAY
MQLNSLTSSEDSAVYFCARTFNYPFFAYWQGTLVTVSS

(配列番号: 26)

< 10b2M3重鎖可変領域のCDR1 >

SSWMN (配列番号: 23)

< 10b2M3重鎖可変領域のCDR2 >

RIYPGDGDIYYNGKFKG (配列番号: 24)

< 10b2M3重鎖可変領域のCDR3 >

TFNYPFFAY (配列番号: 25)

< 10b2M3軽鎖可変領域 >

DILMTQSPSSSLTVSTGEKVTMSCKSSQSLLASANQNNYLA
WHQQKPGRSPKMLIIWASTRVS GVPDRFIGSGSGTDFTLT
INSVQAEDLAVYYCQQSYSAPTTFGAGTKL

(配列番号: 22)

< 10b2M3軽鎖可変領域のCDR1 >

KSSQSLLASANQNNYLA (配列番号: 19)

< 10b2M3軽鎖可変領域のCDR2 >

WASTRVS (配列番号: 20)

< 10b2M3軽鎖可変領域のCDR3 >

QQSYSAPT (配列番号: 21)

(実施例8)

< 8a4キメラ抗体、10bM3キメラ抗体及び10b2M3キメラ抗体の作製 >

本発明のマウスモノクローナル抗体(8a4、10bM3及び10b2M3)の定常領域をヒトIgG1由来のものに置換したキメラ抗体を、以下に示す方法にて作製した。

【0133】

実施例7において決定した遺伝子配列をもとに以下のPCR増幅用プライマーを設計し、PCRによって抗体可変領域を増幅した。この際、分泌シグナル配列はロンザ社推奨の配列に変換し、また増幅断片の末端に制限酵素認識配列を付加した(重鎖可変領域はHindIII認識配列及びXhoI認識配列、軽鎖可変領域はHindIII及びBsiWI認識配列を付加)。

【0134】

< 8a4重鎖 >

8a4__VH__F__signal__HindIII:

5' - ATATAAAAGCTTACCATGGAATGGAGCTGGGTGTTCCCT
GTTCTTTCTGTCCGTGACCACAGGCGTGCAATTCCTGAGGTT
CAGCTGCAGCAGTCTGGG - 3'

(配列番号: 57、下線部はHindIII認識配列)

8a4__VH__R__XhoI:

5' - ATATACTCGAGACAGTGACCAGAGTCCCTAGGCC - 3'

(配列番号: 58、下線部はXhoI認識配列)

< 8a4軽鎖 >

8a4__VK__F__signal__HindIII:

5' - ATATAAAAGCTTACCATGTCTGTGCTTACCCAGGTGCT
GGGACTGCTGCTGCTGTGGCTGACAGACGCCCGCTGTGAT
GTTTTGATGACCCAAACTCCACTCTCC - 3'

(配列番号: 59、下線部はHindIII認識配列)

8a4/10b2M3__VK__R__BsiWI:

10

20

30

40

50

5' - ATATACCGTACGTTTTATTTCCAGCTTGGTCCCAGCAC
CGAAC - 3' (配列番号: 60、下線部はBsiWI認識配列)

< 10bM3重鎖 >

10bM3__VH__F__signal__HindIII:

5' - ATATAAAGCTTACCATGGAATGGAGCTGGGTGTTCCCT
GTTCTTTCTGTCCGTGACCACAGGCGTGCAATCTGAGGTG
CAGCTGGTGGAGTCTGGG - 3'

(配列番号: 61、下線部はHindIII認識配列)

10bM3__VH__R__XhoI:

5' - ATATACTCGAGACGGTGACTGAGGTTCCCTTGACC - 3' 10

(配列番号: 62、下線部はXhoI認識配列)

< 10bM3軽鎖 >

10bM3__VK__F__signal__HindIII:

5' - ATATAAAGCTTACCATGTCTGTGCCTACCCAGGTGCT
GGGACTGCTGCTGCTGTGGCTGACAGACGCCCGCTGTGAC
ATTTGTGATGACCCAGTCTCC - 3'

(配列番号: 63、下線部はHindIII認識配列)

10bM3__VK__R__BsiWI:

5' - ATATACGTACGTTTTAGCTCCAACCTTGGTCCCACCCAC
C - 3' 20

(配列番号: 64、下線部はBsiWI認識配列)

< 10b2M3重鎖 >

10b2M3__VH__F__signal__HindIII:

5' - ATATAAAGCTTACCATGGAATGGAGCTGGGTGTTCCCT
GTTCTTTCTGTCCGTGACCACAGGCGTGCAATCTCAGGTT
CAGCTGCAGCAGTCTGG - 3'

(配列番号: 65、下線部はHindIII認識配列)

10b2M3__VH__XhoI:

5' - TAGCGCTCGAGACAGTGAACAGAGT - 3' 30

(配列番号: 66、下線部はXhoI認識配列)

< 10b2M3軽鎖 >

10b2M3__VK__F__signal__HindIII:

5' - ATATAAAGCTTACCATGTCTGTGCCTACCCAGGTGCT
GGGACTGCTGCTGCTGTGGCTGACAGACGCCCGCTGTGAC
ATTTTGTGATGACTCAGTCTCC - 3'

(配列番号: 67、下線部はHindIII認識配列)

8a4/10b2M3__VK__R__BsiWI:

5' - ATATACGTACGTTTTATTTCCAGCTTGGTCCCAGCAC
CGAAC - 3' 40

(配列番号: 60、下線部はBsiWI認識配列)。

【0135】

得られたPCR産物を上記の制限酵素で切断し、常法によって、ヒトIgG1の定常領域を組み込んだロンザ社のヒトIgG1抗体産生用ベクターに挿入した。これらのベクターを使用して、ロンザ社推奨プロトコルに基づいてキメラ抗体産生細胞株を樹立し、それらの培養上清からProteinAを用いてキメラ抗体(8a4キメラ抗体、10bM3キメラ抗体及び10b2M3キメラ抗体)を精製した。このようにして得られたキメラ抗体に関し、8a4キメラ抗体をch-8a4、10bM3キメラ抗体をch-10bM3、10b2M3キメラ抗体をch-10b2M3とも以下、称する。

【0136】

(実施例9)

< 8 a 4 キメラ抗体、1 0 b M 3 キメラ抗体及び 1 0 b 2 M 3 キメラ抗体の反応性 >

得られたキメラ抗体の N R G 1 に対する反応性を、フローサイトメトリー及び酵素免疫測定法 (E L I S A) によって確認した。フローサイトメトリーは前述と同様の方法で行った。なお、フローサイトメトリーにおいて、一次抗体として各キメラ抗体又はコントロール抗体を 5 u g / m L に希釈したものを、二次抗体として 1 / 1 0 0 希釈した P E 標識抗ヒト I g G 抗体 (ベックマンコールター社製 : I M 0 5 5 0) を用いた。得られた結果を図 1 6 に示す。

【 0 1 3 7 】

図 1 6 に示した結果から明らかなように、c h - 8 a 4 は N R G 1 - a に、c h - 1 0 b M 3 及び c h - 1 0 b 2 M 3 は N R G 1 - b に反応し、活性を維持していることが示された。また、c h - 8 a 4 の反応性は前に前記キメラ化前 (8 a 4) のものより向上しているように見られたため、さらに、抗体低濃度条件での平均蛍光強度についてもデータを取得した。すなわち、8 a 4、c h - 8 a 4 及びコントロール抗体をそれぞれ 5 u g / m L を最大濃度として P B S で段階希釈し、各濃度でのフローサイトメトリーの平均蛍光強度を解析した。その結果、図 1 7 に示す通り、8 a 4 はキメラ化することによって予想外に反応性が向上していることが明らかになった。

10

【 0 1 3 8 】

また、酵素免疫測定法 (E L I S A) を、一次抗体として各キメラ抗体を 5 u g / m L に希釈したものを、二次抗体として 1 / 5 0 0 0 希釈した H R P 標識抗ヒト I g G 抗体 (M B L 社製 : 2 0 6) を用い、前述と同様の方法で行った。その結果、図 1 8 ~ 2 0 に示す通り、各キメラ抗体はもとのマウス抗体と同等の反応特異性を有していることが明らかになった。

20

【 0 1 3 9 】

(実施例 1 0)

< 8 a 4 キメラ抗体、1 0 b M 3 キメラ抗体及び 1 0 b 2 M 3 キメラ抗体の N R G 1 切断阻害活性 >

実施例 8 において作製したキメラ抗体の切断阻害活性も、前述と同様の方法で解析した。その結果、図 2 1 及び 2 2 に示す通り、細胞膜上 N R G 1 の切断を誘導した際のフローサイトメトリーでの蛍光強度は、前述のマウス抗体の切断阻害活性を解析した場合と同様の挙動を見せた。従って、各キメラ抗体はもとのマウス抗体と同様の切断阻害活性を有していることが明らかになった。

30

【 0 1 4 0 】

(実施例 1 1)

< ゼノグラフトマウス (初期癌モデル) を用いた抗腫瘍活性評価 >

取得した抗 N R G 1 抗体の抗腫瘍活性を判定するため、ゼノグラフトマウスを用いて評価を行った。ヒト肺癌細胞株 A C C - L C - 1 7 6 (名古屋大学所属の高橋隆らが樹立したものを、同大学から受領) を R P M I - 1 0 % F B S (P e n i c i l l i n - S t r e p t o m y c i n 含有) で培養し、c o l l a g e n a s e T y p e I (G I B C O 社製 : 1 7 1 0 0 - 0 1 7) を 2 m g / m L となるように C e l l D i s s o c i a t i o n B u f f e r e n z y m e f r e e P B S - b a s e d (I n v i t r o g e n 社製 : 1 3 1 5 1 - 0 1 4) に添加した溶液で、剥離した。洗浄後、R P M I 1 6 4 0 培地で 1×10^7 細胞数 / m L となるように懸濁した。M a t r i g e l (B D 社製 : 3 5 4 2 3 0) を等量加えて懸濁したのち、6 週齢メスの S C I D マウス (日本クレア社製 : C . B 1 7 / I c r - s c i d J c l) の右腹側部に 2 0 0 u L ずつ皮下移植した。同日から、1 m g / m L となるように P B S で希釈した抗体溶液又は P B S を 3 0 0 u L ずつ腫瘍局所投与した。用いた抗体は、8 a 2、8 a 4、8 a 4 キメラ抗体、1 0 b 2 M 3、1 0 b 2 M 3 キメラ抗体の 5 種類であり、それぞれマウス 6 匹ずつに投与した。投与は移植当日と 6 日目、1 0 日目、1 4 日目、2 1 日目および 2 8 日目の計 6 回行った。腫瘍が観察された時点からノギスで腫瘍径を測定し、腫瘍体積を以下の式により算出した。

40

50

腫瘍体積 (mm³) = 長径 × 短径² × 0.5
 得られた結果を図 23 ~ 25 に示す。

【0141】

また、前記抗体投与後のゼノグラフトマウスの生存率についても分析した。得られた結果を図 26 に示す。

【0142】

図 23 に示した結果から明らかなように、8a2 抗体については、抗腫瘍活性においてもコントロール抗体との間で有意差は見られなかった。一方、図 24 及び 25 に示した結果から明らかなように、8a4 抗体投与群、10b2M3 抗体投与群、ch-8a4 抗体投与群及び ch-10b2M3 抗体投与群の腫瘍体積は、コントロール群と比較して、移植後 38 日でそれぞれ 7.7%、0%、0% 及び 16.2% であり、49 日目でもそれぞれ 8.3%、0%、0% 及び 15.4% であり、最後に確認した 80 日目でも、19.2%、0%、0% 及び 26.7% であった。従って、本発明の抗 NRG1 抗体は、腫瘍増大を有意に阻害できることが明らかになった (P < 0.05)。

【0143】

また、生存率に関しては、図 26 に示した結果から明らかなように、コントロール群では、約 100 日後に全個体死亡したのに対し、8a4 抗体投与群、10b2M3 抗体投与群、ch-8a4 抗体投与群及び ch-10b2M3 抗体投与群では、約 100 日を経過しても、全個体が生存しており、本発明の抗体による延命効果が示された。特に、ch-10b2M3 抗体投与群、10b2M3 抗体投与群及び 8a4 抗体投与群では 300 日経過後もなお、50% 以上の個体が生存していた。従って、8a4、10b2M3、ch-8a4 及び ch-10b2M3 は、抗腫瘍効果を有していることが明らかになった。

【産業上の利用可能性】

【0144】

以上説明したように、本発明によれば、ヒト NRG1 タンパク質のアイソフォームを特異的に認識し、かつ当該アイソフォームが関与するシグナル伝達を抑制することを可能とする抗体を提供することが可能となる。また、本発明の抗体は、腫瘍の増殖を抑制する活性においても優れるため、癌を治療又は予防する点においても有用である。

【配列表フリーテキスト】

【0145】

配列番号：3

< 223 > 軽鎖可変領域の CDR1 (8a4)

配列番号：4

< 223 > 軽鎖可変領域の CDR2 (8a4)

配列番号：5

< 223 > 軽鎖可変領域の CDR3 (8a4)

配列番号：6

< 223 > 軽鎖可変領域 (8a4)

配列番号：7

< 223 > 重鎖可変領域の CDR1 (8a4)

配列番号：8

< 223 > 重鎖可変領域の CDR2 (8a4)

配列番号：9

< 223 > 重鎖可変領域の CDR3 (8a4)

配列番号：10

< 223 > 重鎖可変領域 (8a4)

配列番号：11

< 223 > 軽鎖可変領域の CDR1 (10bM3)

配列番号：12

< 223 > 軽鎖可変領域の CDR2 (10bM3)

10

20

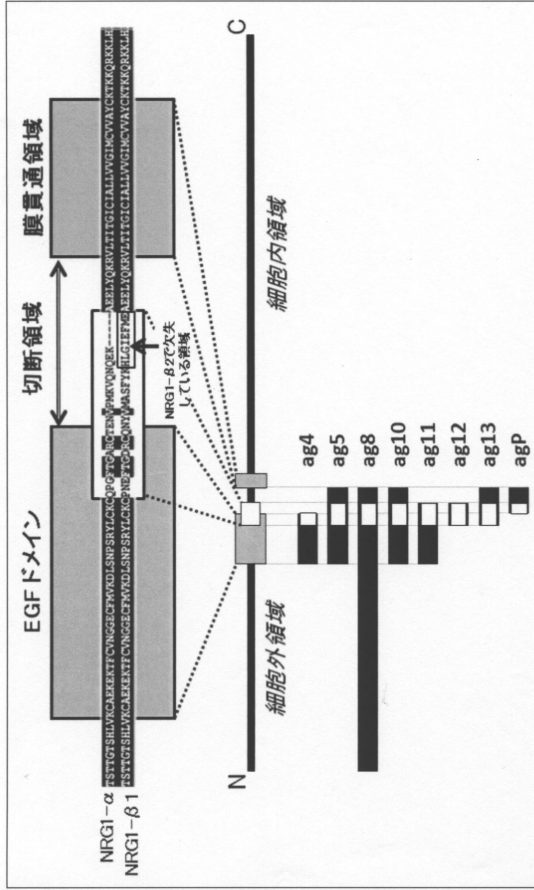
30

40

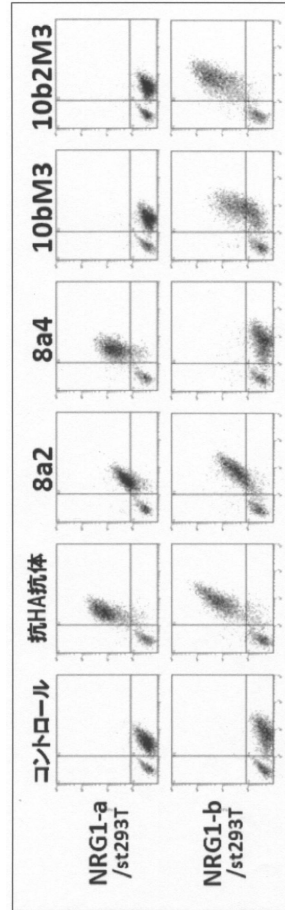
50

- 配列番号：13
< 223 > 軽鎖可変領域のCDR3 (10bM3)
- 配列番号：14
< 223 > 軽鎖可変領域 (10bM3)
- 配列番号：15
< 223 > 重鎖可変領域のCDR1 (10bM3)
- 配列番号：16
< 223 > 重鎖可変領域のCDR2 (10bM3)
- 配列番号：17
< 223 > 重鎖可変領域のCDR3 (10bM3) 10
- 配列番号：18
< 223 > 重鎖可変領域 (10bM3)
- 配列番号：19
< 223 > 軽鎖可変領域のCDR1 (10b2M3)
- 配列番号：20
< 223 > 軽鎖可変領域のCDR2 (10b2M3)
- 配列番号：21
< 223 > 軽鎖可変領域のCDR3 (10b2M3)
- 配列番号：22
< 223 > 軽鎖可変領域 (10b2M3) 20
- 配列番号：23
< 223 > 重鎖可変領域のCDR1 (10b2M3)
- 配列番号：24
< 223 > 重鎖可変領域のCDR2 (10b2M3)
- 配列番号：25
< 223 > 重鎖可変領域のCDR3 (10b2M3)
- 配列番号：26
< 223 > 重鎖可変領域 (10b2M3)
- 配列番号：27 ~ 35、37 ~ 51 及び 54 ~ 67
< 223 > 人工的に合成されたプライマーの配列 30
- 配列番号：36
< 223 > 人工的に合成されたオリゴヌクレオチドの配列

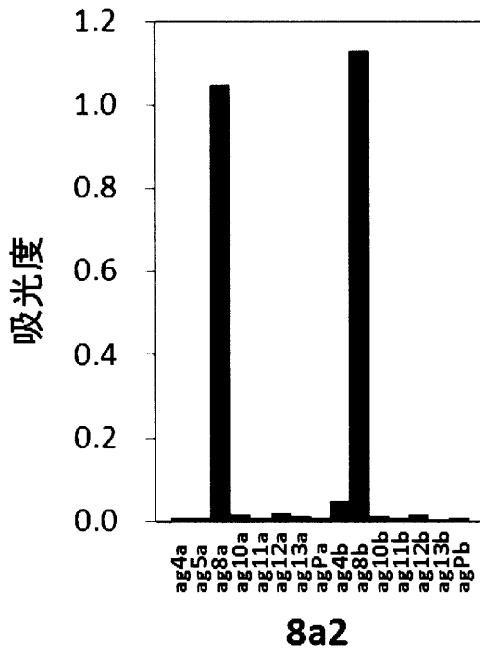
【 図 1 】



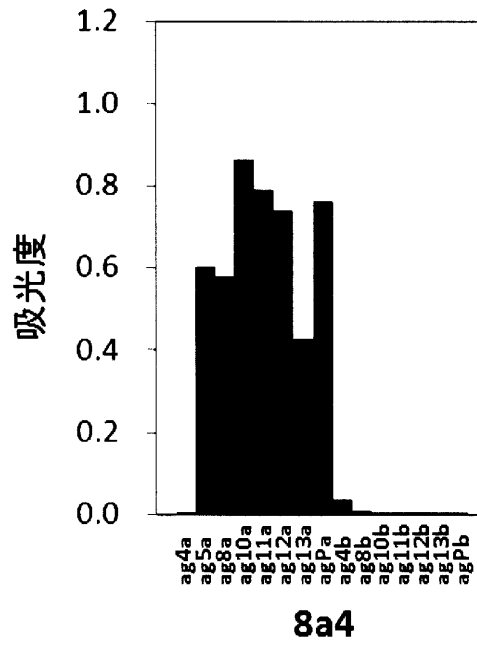
【 図 2 】



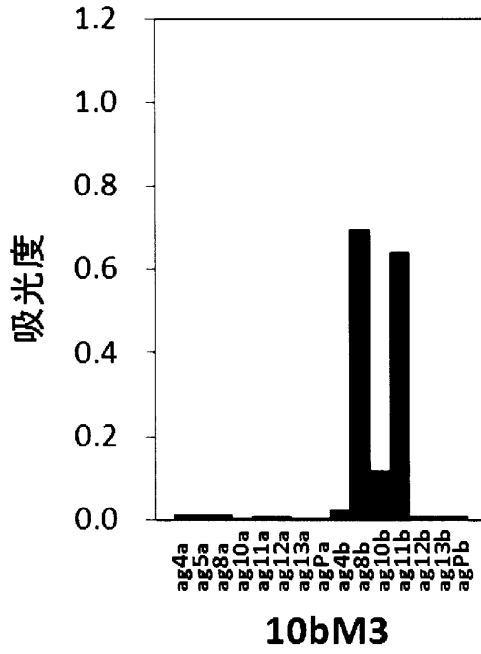
【 図 3 】



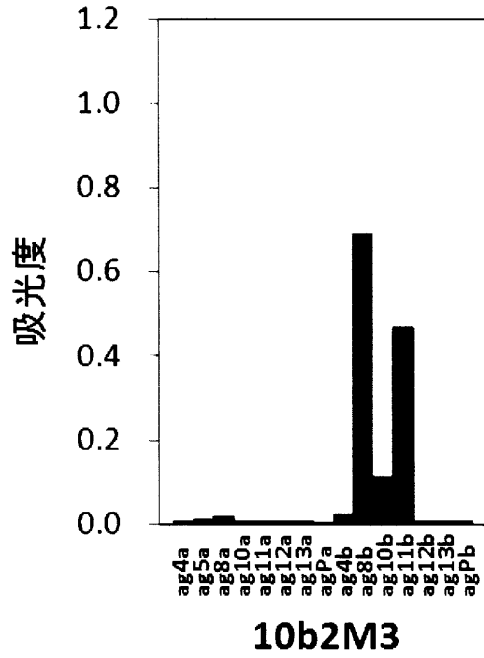
【 図 4 】



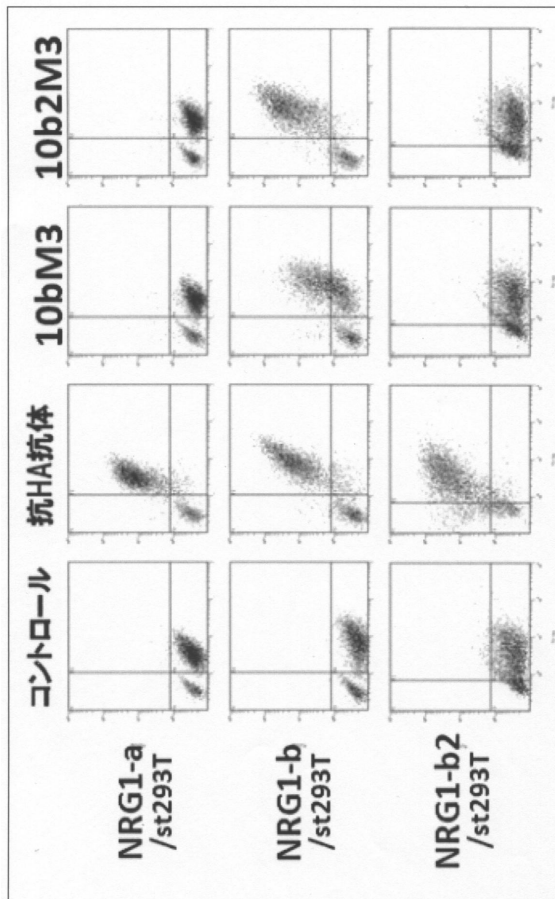
【 図 5 】



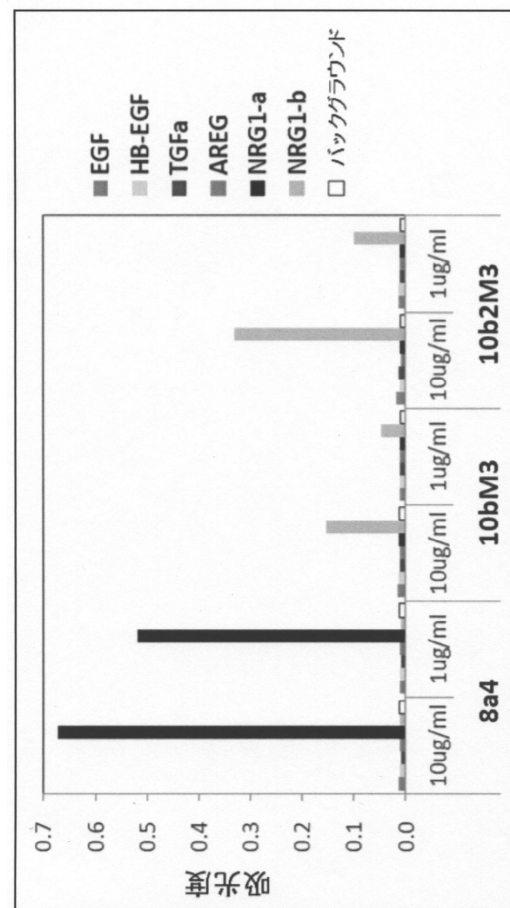
【 図 6 】



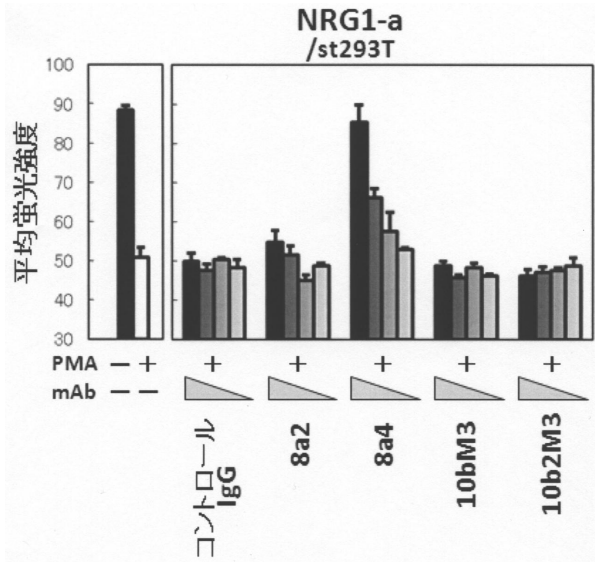
【 図 7 】



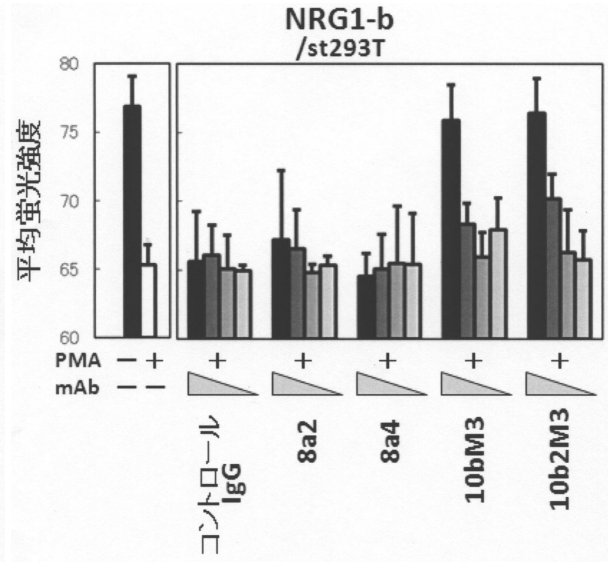
【 図 8 】



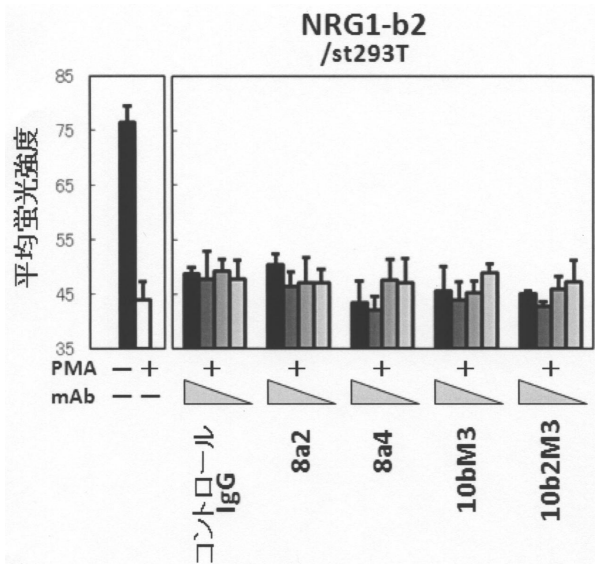
【図9】



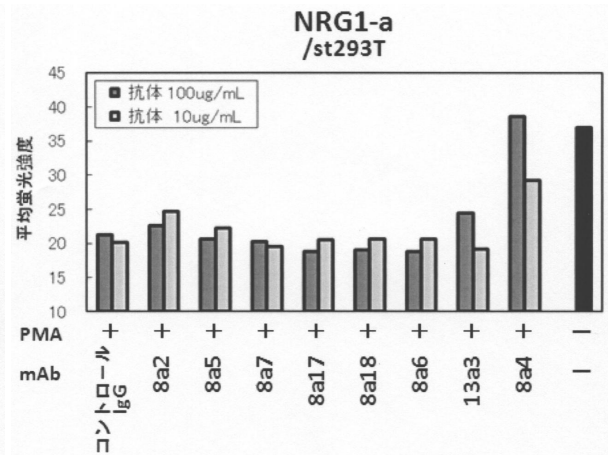
【図10】



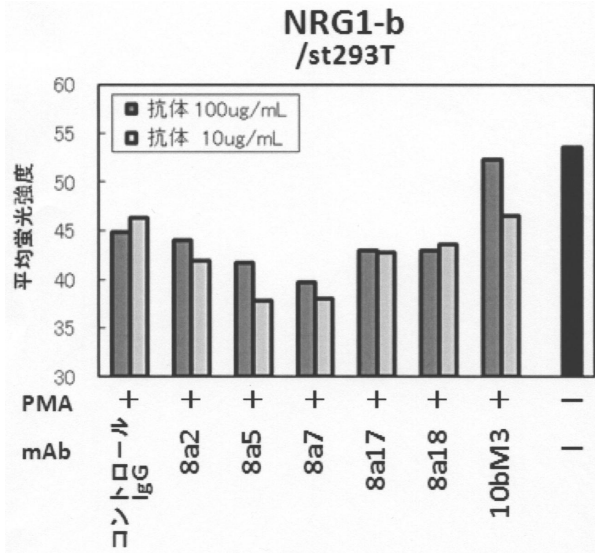
【図11】



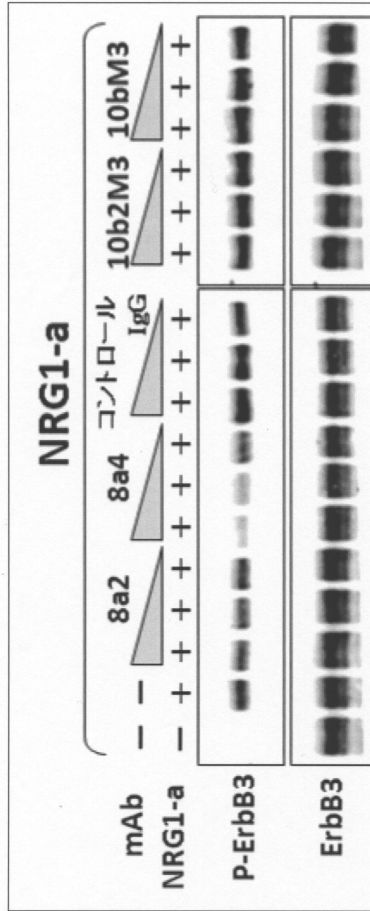
【図12】



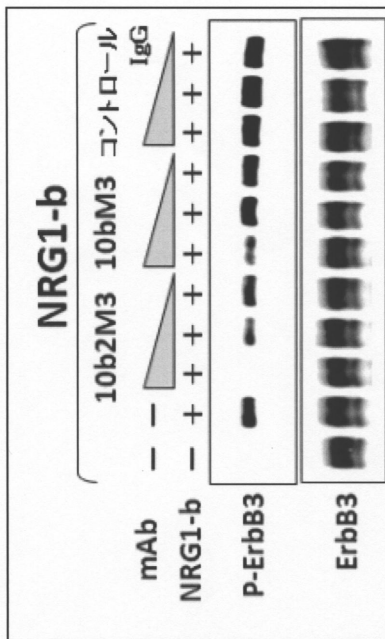
【 図 1 3 】



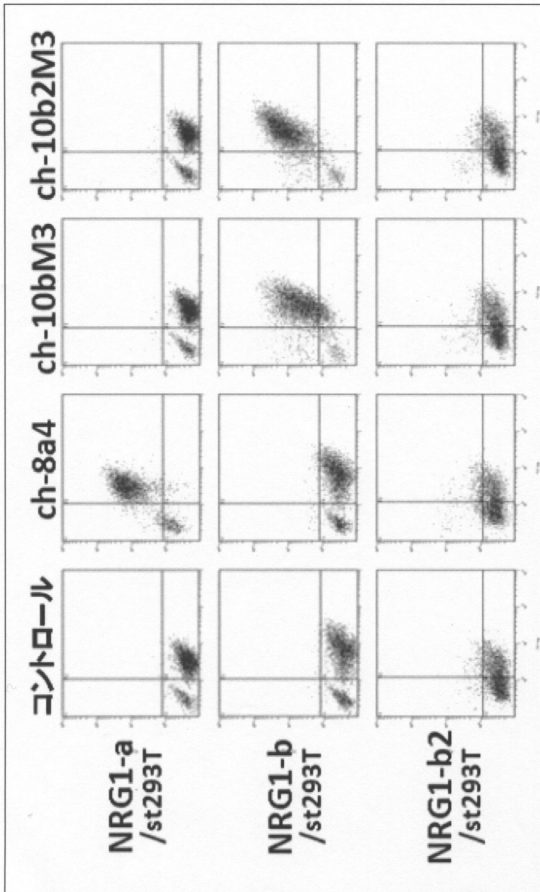
【 図 1 4 】



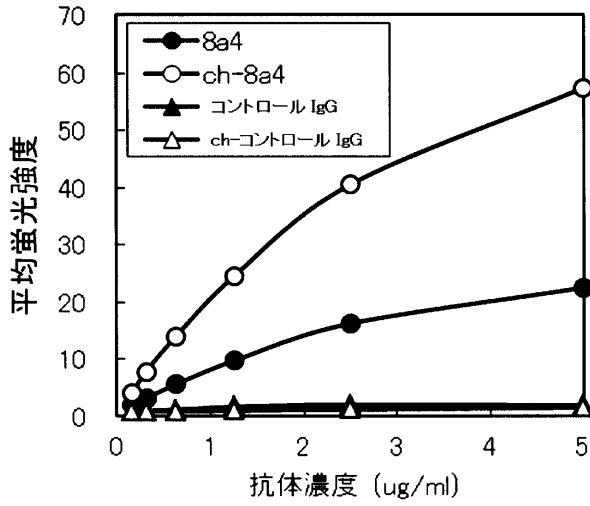
【 図 1 5 】



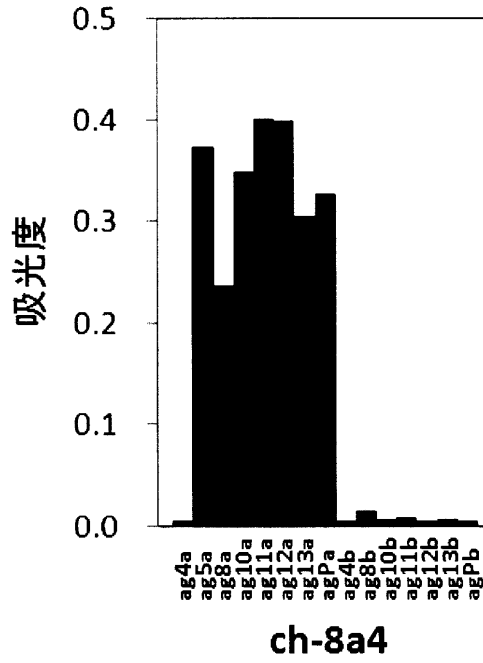
【 図 1 6 】



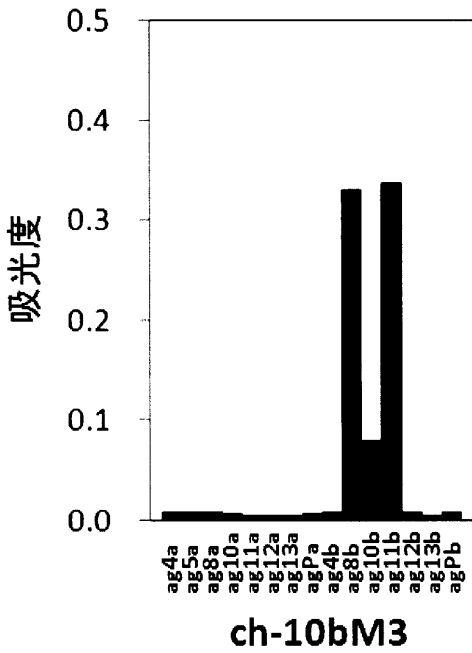
【図17】



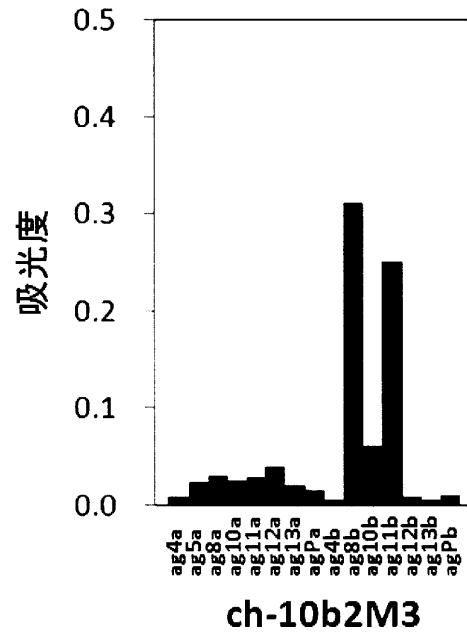
【図18】



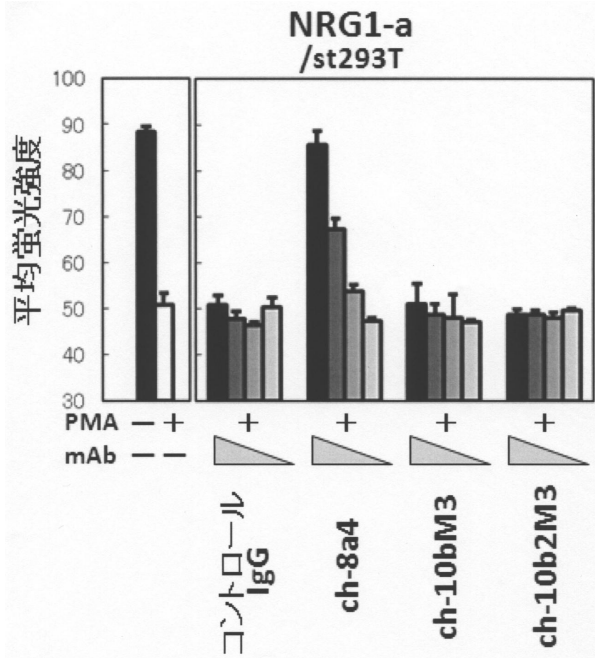
【図19】



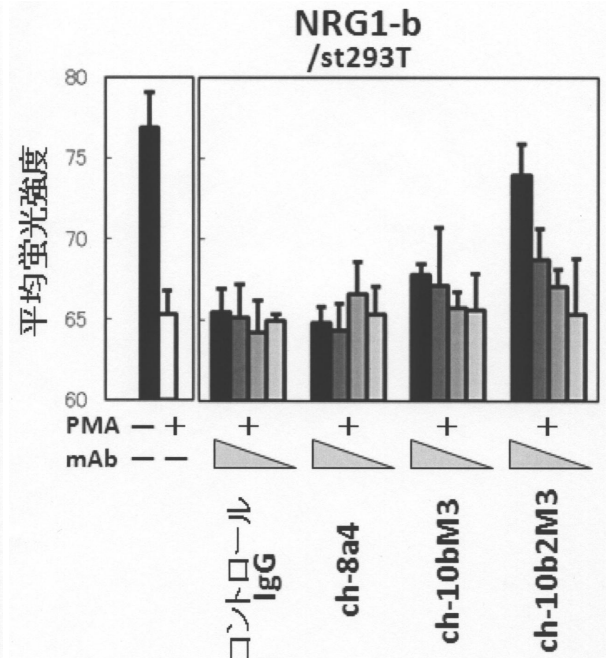
【図20】



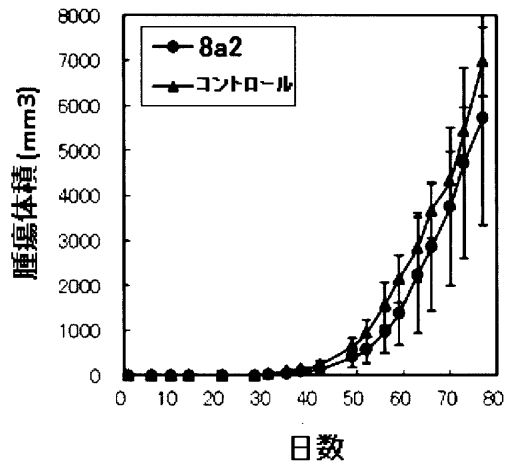
【 図 2 1 】



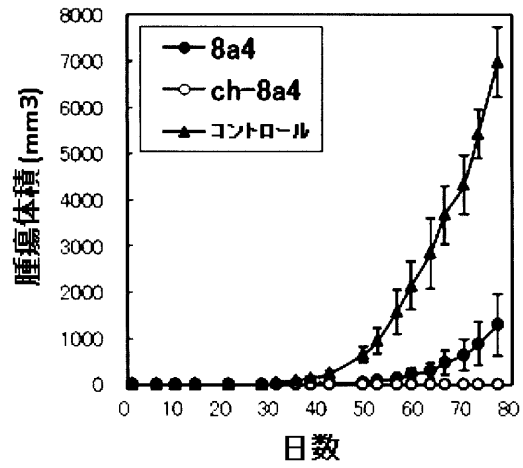
【 図 2 2 】



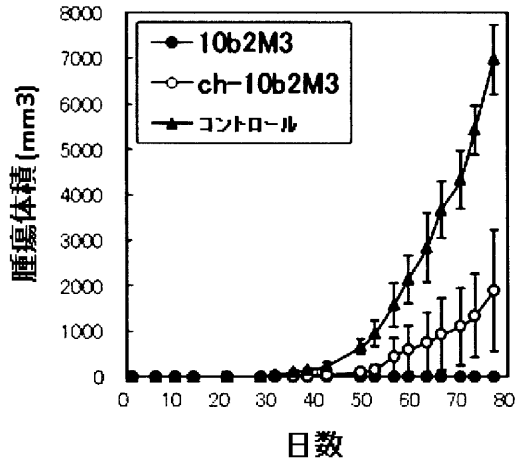
【 図 2 3 】



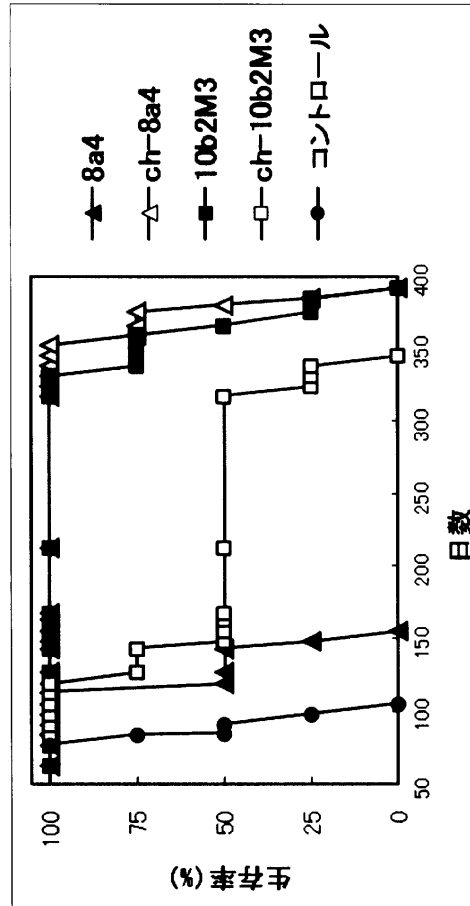
【 図 2 4 】



【図 25】



【図 26】



【配列表】

0006357113000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10
C 1 2 N	5/16 (2006.01)	C 1 2 N	5/16
C 1 2 N	15/06 (2006.01)	C 1 2 N	15/06 1 0 0
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	C 1 2 P	21/08
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395 T
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00
C 0 7 K	16/46 (2006.01)	C 0 7 K	16/46

(56)参考文献 特開2003-137900(JP,A)

Srinivasan, R. et al., Expression of the c-erbB-3/HER-3 and c-erbB-4/HER-4 growth factor receptors and their ligands, neuregulin-1 alpha, neuregulin-1 beta, and betacellulin, in normal endometrium and endometrial cancer, *Clin. Cancer Res.*, 1999年, Vol. 5, pp. 2877-2883

Holmes, W. E. et al., Identification of heregulin, a specific activator of p185erbB2, *Science*, 1992年, Vol. 256, pp. 1205-1210

Hijazi, M. M. et al., Heregulin regulates the actin cytoskeleton and promotes invasive properties in breast cancer cell lines, *Int. J. Oncol.*, 2000年, Vol. 17, pp. 629-641

Sun, M. et al., HER family receptor abnormalities in lung cancer brain metastases and corresponding primary tumors, *Clin. Cancer Res.*, 2009年, Vol. 15, pp. 4829-4837

Hansen, M. R. et al., Constitutive neuregulin-1/ErbB signaling contributes to human vestibular schwannoma proliferation, *Glia*, 2006年, Vol. 53, pp. 593-600

Hsieh, S. Y. et al., Neuregulin/erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3 autocrine loop contributes to invasion and early recurrence of human hepatoma, *Hepatology*, 2011年, Vol. 53, pp. 504-516

Herrlich, A. M. et al., Heregulin, a necessary intermediate in osmotic stress-induced AQP5 expression, *FASEB Journal, Annual Meeting of the Professional Research Scientists on Experimental Biology.*, 2002年, Vol. 16, p. A56, 108.5

Wen, D. et al., Structural and functional aspects of the multiplicity of Neu differentiation factors, *Mol. Cell. Biol.*, 1994年, Vol. 14, pp. 1909-1919

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0

UniProt/GeneSeq

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

PubMed

Caplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS(STN)