

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2006-182661

(P2006-182661A)

(43) 公開日 平成18年7月13日(2006.7.13)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 T	4 C 0 8 5
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53 D	

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 7 頁)

(21) 出願番号	特願2004-375663 (P2004-375663)	(71) 出願人	304020292 国立大学法人徳島大学 徳島県徳島市新蔵町2丁目24番地
(22) 出願日	平成16年12月27日(2004.12.27)	(72) 発明者	西岡 安彦 徳島市蔵本町3丁目18番地の15 国立 大学法人徳島大学大学院ヘルスバイオサイ エンス研究部統合医療創生科学部門内
		(72) 発明者	首根 三郎 徳島市蔵本町3丁目18番地の15 国立 大学法人徳島大学大学院ヘルスバイオサイ エンス研究部統合医療創生科学部門内
		Fターム(参考)	4C085 AA13 AA14 AA19 DD62

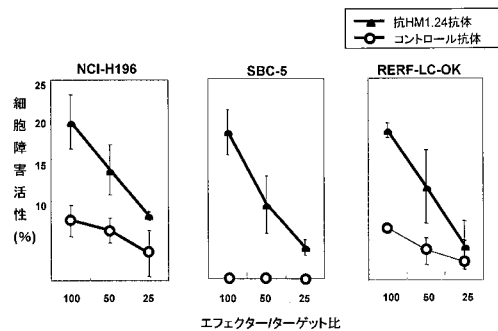
(54) 【発明の名称】 肺癌の免疫療法剤

(57) 【要約】

【課題】従来の化学療法だけでは長期的な治癒が期待できないので、従来の抗癌剤とは作用機序の異なる新しい治療方法としての免疫療法の確立が望まれる。進行性の肺癌等の固形癌の治療や再発防止に確固たる術のない現状を打開するため、安全・有効・均質な抗原を用いる癌の免疫療法の確立が期待される。

【解決手段】ヒト骨髄腫HM1.24タンパク質抗原に由来の免疫活性ドメインのアミノ酸配列、Leu Glu Gly Glu Ile Thr Thr Leu Asn His Lys Leuからなるペプチドに対する抗体；該抗体によるADCC(antibody-dependent cellular cytotoxicity)誘導作用に基づく癌の免疫療法剤；該抗体を用いる癌の診断剤等。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】

【請求項1】

アミノ酸配列、Leu Glu Gly Glu Ile Thr Thr Leu Asn His Lys Leuからなるペプチドに対する抗体を、薬効を奏する量、含有することを特徴とする癌の免疫療法剤。

【請求項2】

抗体がモノクローナル抗体である請求項1に記載の癌の免疫療法剤。

【請求項3】

癌が肺癌である請求項1又は2に記載の癌の免疫療法剤。

【請求項4】

アミノ酸配列、Leu Glu Gly Glu Ile Thr Thr Leu Asn His Lys Leuからなるペプチドに対する抗体を、抗原抗体反応を呈する量、含有する肺癌の診断剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

この発明は、癌の治療及び再発防止に有効な免疫療法剤に関するものである。更に詳しくは、ヒト骨髓腫のHM1.24タンパク質抗原の免疫活性ドメインに対する抗体を、抗体依存性細胞障害性(antibody-dependent cellular cytotoxicity、以下「ADCC」と略記する)の作用物質あるいは有効成分として用いる癌、特に、肺癌の免疫療法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

上記のHM1.24抗原は、II型の膜貫通・糖タンパク質であり、骨髓腫細胞で特異的に高発現されている抗原として1994年、小阪ら(徳島大学)により発見かつ報告された(非特許文献1)。その意義は、多発性骨髓腫やその他の癌に対する免疫療法の開発に有用かつ有望な手段あるいは標的を提示したことにある。爾後、この報告を契機として世界各地で、HM1.24抗原とその遺伝子並びに抗体を用いる多発性骨髓腫及びその他の癌の診断、免疫療法等の研究及び技術開発が活発に展開されてきた。

既に開発された主な技術として、例えば、抗HM1.24抗体による可溶性HM1.24タンパク質抗原の測定(特許文献1)、HM1.24抗原タンパク質をコードする遺伝子DNAとそのプロモーター領域並びにこれ等の用途(特許文献2)、発現ベクターによる可溶性HM1.24抗原タンパク質の量産(特許文献3)、HM1.24タンパク質によるパルス又は該遺伝子DNAの導入により作製された樹状細胞を有効成分として用いる癌ワクチン(特許文献4)、抗HM1.24モノクローナル・ヒト化抗体を用いるADCCによる骨髓腫の免疫療法(非特許文献2)等々が公知である。しかしながら、HM1.24を用いる免疫療法の実用化は未だ知られていない。

【特許文献1】WO99/43703

【特許文献2】WO99/43803(特開2003-219894)

【特許文献3】WO01/77362

【特許文献4】WO2004/039398

【非特許文献1】Blood、第84巻(6号)、1922-1933、1994

【非特許文献2】Blood、第93巻(11号)、3922-3930、1999

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

前述した従来技術(例えば、特許文献3及び4)によれば、HM1.24タンパク質を構成する完全長アミノ酸配列(アミノ酸数180)やその断片(アミノ酸数115)等、10kDを超える高分子ペプチドを抗原として用いている。そのため、かかる抗原1分子上の多様なエピトープないしは免疫活性ドメインの存在は、その作用効果の確認と同定を複

10

20

30

40

50

雑かつ困難にしている。更に、これ等の抗原は、発現ベクターをCHO細胞に導入し得られる形質転換体の培養により量産されているので、抗原の高度精製、細胞や培養培地等に由来の毒性迷入因子の否定等々に係る品質管理及び品質保証の確立には長年を要する。換言すれば、量産されたHM1.24抗原の安全性と有効性並びに均質性の確定と保証が、従来技術の実用化を遅延かつ遅滞させていると思量される。

更に、例えば、多発性骨髄腫は抗癌剤に抵抗性を示す難治性の造血器腫瘍であり、従来の化学療法や自家造血幹細胞移植だけでは長期的な治癒が期待できず、従来の抗癌剤とは作用機序の異なる新しい治療方法の開発、例えば、免疫療法の確立が望まれているところである。

従って、上記の理由、及び難治性の多発性骨髄腫や速進行性の肺癌等の治療や再発防止に確固たる術のない現状にあっては、安全かつ有効、しかも均質な物質の提供とこれを用いる癌の免疫療法の確立は、患者とその家族、そして担当臨床医のみならず、全人類にとって、解決されるべき待望の課題である。

10

【課題を解決するための手段】

【0004】

本発明者は、上述した実情と課題解決の必要性を臨床面から深く体験かつ認識すると共に、前述HM1.24抗原が発見された機関（徳島大学）にあって、該抗原の有用性とその活用に熱い視線を注ぎ、癌の免疫療法の観点から長年にわたり多種多様な創意工夫と研究を重ねた。

その結果、本発明者は、ヒトHM1.24抗原に由来する種々の免疫活性ドメインのうち、配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるペプチドに対するモノクローナル抗体を用いることにより、次の(1)～(3)に記載の驚くべき発見をした：

20

HM1.24抗原が、多発性骨髄腫だけではなく、肺癌細胞においても高度に発現されていること。換言すれば、該抗原は、血液、骨髄及びリンパ系以外の体組織の癌、即ち、固形癌においても高発現されていること。

(2)肺癌細胞におけるHM1.24抗原の発現頻度は、実験例3において後述する通り、45%であり、多発性骨髄腫でのそれに比べ低値である。しかし、これまで肺癌において高頻度発現だとされている癌抗原、MAGE-3、p53、及びSART-3の発現頻度は40%台であるので、上記HM1.24抗原の発現頻度は、これ等の癌抗原に匹敵する発現率である。従って、該抗原とこれに対する抗体は、肺癌診断のための新規な手段あるいはマーカーになり得ること；及び

30

(3)抗HM1.24抗体は、多発性骨髄腫（前述の非特許文献2）だけではなく、固形癌である肺癌細胞に対してもADCC活性を発揮すること。しかも、該ADCC活性の強さは、上記(1)のHM1.24抗原の発現量に比例あるいは相関していること。

【0005】

以上の知見に基づき、この発明によれば、前述の課題を解決するための手段として、次の(1)～(3)が提供される：

(1)アミノ酸配列、Leu Glu Gly Glu Ile Thr Thr Leu Asn His Lys Leuからなるペプチドに対する抗体を、薬効を奏する量、含有することを特徴とする癌の免疫療法剤；

40

(2)抗体がモノクローナル抗体である上記(1)に記載の癌の免疫療法剤；
癌が肺癌である前記(1)又は(2)に記載の癌の免疫療法剤；及び

(4)アミノ酸配列、Leu Glu Gly Glu Ile Thr Thr Leu Asn His Lys Leuからなるペプチドに対する抗体を、抗原抗体反応を呈する量、含有する肺癌の診断剤。

【発明の効果】

【0006】

この発明は、肺癌、乳癌等の固形癌等の治療及び再発防止に優れて安全かつ有効そして均質な免疫療法剤を提供することにより、これ等の癌に対する免疫療法の確立を可能にする。換言すれば、この発明が人類の諸活動にもたらす精神的、物質的あるいは経済的效果は

50

計り知れない。この発明は、世界の保健と医療行政に寄与するだけでなく、人類待望の癌の制圧に多大に貢献すると共に、長寿と延命という福音を全ての人類にもたらす。

【発明を実施するための最良の形態】

【0007】

この発明の実施の形態に関し、次の通り詳述する：

ヒトHM1.24抗原に対する抗体：

この発明に係る抗体は、ヒトHM1.24抗原に由来する種々の免疫活性ドメインのうち、配列番号1に記載のアミノ酸配列、Leu Glu Gly Glu Ile Thr Thr Leu Asn His Lys Leuからなるペプチドに対する種々の抗体である。本発明によれば、これ等の抗体は、ADCCの活性物質あるいは作用物質、ADCCによる癌の免疫療法剤の有効成分、肺癌の診断剤等として用いることができる。尚、かかる抗体のヒトでの臨床使用では、その副作用の軽減あるいは安全性を考慮し、ヒトに対し異物（異種抗原）にならないよう留意選定する必要がある。この観点から、臨床使用では、例えば、ポリクローナル抗体に比べ、モノクローナル抗体が、また、マウスモノクローナル抗体に比べ、該モノクローナル抗体をヒト型に改造したマウス・ヒトキメラ抗体が望ましい。更に望ましくは、上記キメラ抗体を更に改造したCDR（complementary determining region：相補性決定領域）置換ヒト化抗体や、遺伝子工学により製造されるヒト型モノクローナル抗体を挙げることができる。

10

尚、前述した配列番号1に記載のアミノ酸配列は、該アミノ酸配列に対する抗体と同一機能の抗体の作成が可能な限り、少なくとも1個のアミノ酸残基を置換、付加、又は欠失させることができる。

20

【0008】

（2）癌の免疫療法剤としての形態

この発明に係る抗体は、アンプルやバイアル瓶等に分注され、液状又は乾燥のかたちで密封された状態で提供される。尚、ADCCによる癌の免疫療法における該抗体の投与量は、約1～約500 μ g/ドーズが望ましい。

【0009】

以下、実験例及び実施例を上げ、本発明の構成と効果を具体的に説明する。但し、この発明は、これ等の実験例及び実施例だけに限定されるわけではない。

30

（実験例1）

【0010】

（1）肺癌細胞株：

後述する実験例では合計33株の肺癌細胞株を用いた。その内訳は、次の通りである：非小細胞肺癌に由来の合計26細胞株（腺癌が15細胞株、扁平上皮癌が5細胞株、及び大細胞癌が6細胞株）、及び小細胞肺癌に由来の合計7細胞株。

【0011】

（2）抗HM1.24抗体：

ヒトHM1.24抗原の免疫活性ドメインである配列番号1に記載のアミノ酸配列、即ち、Leu Glu Gly Glu Ile Thr Thr Leu Asn His Lys Leuからなるペプチドに対するマウスモノクローナル抗体を用いた。

40

【実施例1】

【0012】

肺癌細胞株におけるHM1.24抗原の発現の測定：

実験例1（1）に記載の合計33株の各肺癌細胞株におけるHM1.24抗原の発現を、実験例1（2）に記載のマウスモノクローナル抗HM1.24抗体を用いたフローサイトメトリーによりそれぞれ測定し。即ち、 5×10^5 細胞当たり1 μ gの上記抗体を用いて染色した後、FACS caliberによりフローサイトメトリーを行い、CellQuest softwareにて解析した。発現量はmean specific fluorescence intensity（MSFI）で定量化し、MSFI>10を高発現株とした。

50

その結果を表 1 に示す。全肺癌細胞株の 45% (15/33) において HM1.24 抗原の発現を認めた。更に、多発性骨髄腫株における HM1.24 抗原の発現量に匹敵する高発現株の割合は、全体の 21% (7/33) であった。

尚、肺癌細胞における HM1.24 抗原の上記頻度 (45%) は、多発性骨髄腫での発現頻度に比較し低値であるが、肺癌細胞における癌抗原発現という観点からみると、これまでに肺癌で高率に発現されているとされる MAGE-3、p53、及び SART-3 の癌抗原発現が 40% 台であることから、HM1.24 抗原はこれらの癌抗原に匹敵する発現率であると判断される。
(以下余白)

10

【0013】

【表 1】

組織型	細胞株数	発現株数 (%)	高発現株数 (%)	低発現株数 (%)
非小細胞肺癌 (内訳)	26	11 (42)	5 (19)	6 (23)
腺癌	15	7 (47)	4 (27)	3 (20)
扁平上皮癌	5	2 (40)	1 (20)	1 (20)
大細胞癌	6	2 (33)	0 (0)	2 (33)
小細胞肺癌	7	4 (57)	2 (29)	2 (29)
合計	33	15 (45)	7 (21)	8 (24)

20

【実施例 2】

【0014】

HM1.24 抗原の発現に及ぼすサイトカインの影響：

インターロイキン IL-6 (100 ng/ml)、インターフェロン IFN- γ (100 U/ml) 及び IFN- γ (500 U/ml) をそれぞれ添加混合した培養液を用い、実験例 1 (1) に記載の合計 33 株の各肺癌細胞株を 48 時間培養の後、HM1.24 抗原の発現量を実施例 1 の記載と同様にして測定した。

30

その結果、IFN- γ 及び IFN- γ の両者で HM1.24 発現の増強が認められた。この増強効果は、全体的には、IFN- γ の方が IFN- γ に比べ強い傾向にあった。但し、IFN- γ にだけ増強される細胞株も検出された。

【実施例 3】

【0015】

抗 HM1.24 抗体の ADCC 活性の測定：

抗 HM1.24 抗体 (2 μ g/ml) の ADCC 活性は、6 時間の 51 Cr 遊離試験により測定した。尚、ターゲット細胞には実験例 1 (1) に記載の合計 33 株の各 51 Cr 標識肺癌細胞株を、また、エフェクター細胞として SCID (severe combined immunodeficient: 重症複合免疫不全症) マウスの脾細胞を、そして比較対照には骨髄腫細胞 RPMI 8226 をそれぞれ用いた。

40

その結果を図 1 に示す。各ターゲット細胞 (肺癌細胞株) の HM1.24 抗原の発現量に比例し、ADCC 誘導効果が生じることが確認された。骨髄腫細胞 RPMI 8226 における ADCC 活性は、肺癌細胞株 SBC-5 細胞でのそれと同等であったことから、NCI-H196 細胞に対する ADCC 活性は、上記の骨髄腫細胞に対する活性に比べ、明らかに高いと判断された。

【産業上の利用可能性】

【0016】

50

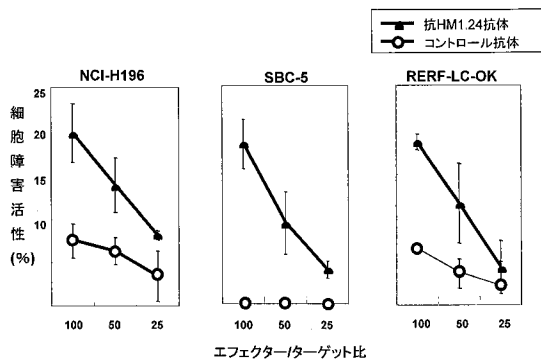
この発明は、肺癌、乳癌等の固形癌等の治療及び再発防止のための免疫療法及び臨床検査において有用であり、医薬品、診断剤等の製造・販売の分野で利用できる。

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1】NCI-H196、SBC-5及びRERF-LC-OKの各肺癌細胞株に対する抗ヒトHM1.24抗体のADCC活性を示す図である。

【図1】



【配列表】

2006182661000001.app

专利名称(译)	肺癌免疫治疗剂		
公开(公告)号	JP2006182661A	公开(公告)日	2006-07-13
申请号	JP2004375663	申请日	2004-12-27
申请(专利权)人(译)	国立大学法人徳島大学		
[标]发明人	西岡安彦 曾根 三郎		
发明人	西岡 安彦 曾根 三郎		
IPC分类号	A61K39/395 A61P35/00 G01N33/53		
FI分类号	A61K39/395.T A61P35/00 G01N33/53.D		
F-TERM分类号	4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA19 4C085/DD62		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：建立免疫疗法作为一种新的治疗方法，其具有与常规抗癌药物不同的作用机制，因为单独的常规化疗不能期望长期治愈。使用安全，有效和同质抗原建立癌症免疫疗法有望克服目前尚未确定的治疗实体癌如进行性肺癌和预防复发的操作状态。抗肽的抗体，其由源自人骨髓瘤HM 1.24蛋白抗原的免疫活性结构域的氨基酸序列组成，Leu Glu Gly Glu Ile Thr Thr Leu Asn His Lys Leu;抗抗体依赖性细胞毒性的抗体) 基于诱导作用的癌症免疫治疗剂;使用该抗体的癌症诊断剂。点域1

