

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5798199号

(P5798199)

(45) 発行日 平成27年10月21日(2015.10.21)

(24) 登録日 平成27年8月28日(2015.8.28)

(51) Int.Cl.

F I

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 K 39/395 Z N A T

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 P 35/00

請求項の数 2 (全 22 頁)

(21) 出願番号	特願2013-544897 (P2013-544897)	(73) 特許権者	503360115
(86) (22) 出願日	平成25年3月5日(2013.3.5)		国立研究開発法人科学技術振興機構
(86) 国際出願番号	PCT/JP2013/055927		埼玉県川口市本町四丁目1番8号
(87) 国際公開番号	W02013/133253	(74) 代理人	100064908
(87) 国際公開日	平成25年9月12日(2013.9.12)		弁理士 志賀 正武
審査請求日	平成25年9月27日(2013.9.27)	(74) 代理人	100094400
審査番号	不服2014-8951 (P2014-8951/J1)		弁理士 鈴木 三義
審査請求日	平成26年5月14日(2014.5.14)	(74) 代理人	100147267
(31) 優先権主張番号	特願2012-52334 (P2012-52334)		弁理士 大概 真紀子
(32) 優先日	平成24年3月8日(2012.3.8)	(72) 発明者	宇田 泰三
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		大分県大分市城崎町1-3-23 第6阜
早期審査対象出願			月マンション1003
		(72) 発明者	一二三 恵美
			大分県大分市数戸西町11-1-503
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗がん剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

可変領域が配列番号19のアミノ酸配列、又は当該アミノ酸配列のうち、第24～39番目、第55～61番目、及び第94～101番目のアミノ酸残基以外の領域において1若しくは数個のアミノ酸が置換、付加、若しくは欠失したアミノ酸配列、又は当該アミノ酸配列のうち、第24～39番目、第55～61番目、及び第94～101番目のアミノ酸残基以外の領域中のアミノ酸が置換、付加、若しくは欠失しており、かつ当該アミノ酸配列と95%以上の相同性を有するアミノ酸配列によって示され、かつ肺がん細胞に対する細胞障害性を有するポリペプチドからなり、単量体であるヒト抗体κ型軽鎖を含有することを特徴とする肺がんに対する抗がん剤。

【請求項2】

前記ヒト抗体κ型軽鎖が、配列番号20のアミノ酸配列中の219番目のシステインが削除又はシステイン以外のアミノ酸に置換されているアミノ酸配列、又は当該アミノ酸配列のうち、第24～39番目、第55～61番目、及び第94～101番目のアミノ酸残基以外の領域において1若しくは数個のアミノ酸が置換、付加、若しくは欠失したアミノ酸配列、又は当該アミノ酸配列のうち、第24～39番目、第55～61番目、及び第94～101番目のアミノ酸残基以外の領域中のアミノ酸が置換、付加、若しくは欠失しており、かつ当該アミノ酸配列と95%以上の相同性を有するアミノ酸配列によって示され、かつ肺がん細胞に対する細胞障害性を有するポリペプチドからなり、単量体であるヒト抗体κ型軽鎖である、請求項1に記載の肺がんに対する抗がん剤。

10

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、がん細胞、特に肺がん細胞に対して細胞障害性を示すヒト抗体κ型軽鎖を含有する抗がん剤に関する。

本願は、2012年3月8日に、日本に出願された特願2012-52334号に基づき優先権を主張し、その内容をここに援用する。

【背景技術】

【0002】

抗体は、重鎖（H鎖：Heavy chain）および軽鎖（L鎖：Light chain）から構成されている。重鎖および軽鎖は、可変領域（VR：Variable Region）および定常領域（CR：Constant Region）から構成されており、可変領域は、超可変領域（CDR：Complementarity Determining Region）を有している。さらに、抗体の軽鎖は、κ型およびλ型に分類される。

【0003】

近年、酵素様活性をもつ抗体、即ち、抗体酵素が注目を集めている。抗体酵素は、抗体の高い分子認識能と酵素活性とを併せ持つため、医療、化学工業、食品工業等といった、多くの面で応用が期待されている。特に、標的分子への特異性が高く、かつ酵素活性によって標的分子に対する障害性を発揮し得る抗体酵素は、副作用の少ない優れた抗がん剤となることが期待される。

【0004】

本発明者らは、これまで、抗体酵素に関して種々の独創的な研究を行ってきた（例えば、特許文献1を参照のこと）。従来、完全ヒト型配列を有する抗体酵素は、多発性骨髄腫患者から得られるベンスジョーンズタンパク（BJP）以外には得ることができなかった。多発性骨髄腫患者の患者数は少なく、また酵素活性を有するBJPも少ないため、ヒト型の抗体酵素を取得することは困難であった。しかし、ヒト型の抗体酵素は、人体に投与した際の副作用が少ないと予想されるために、国内外の製薬会社などは、有用なヒト型の抗体酵素が開発されることを待ち望んでいる。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】特開2006-197930号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明は、がん細胞、特に肺がん細胞に対して細胞障害性を示すヒト型抗体軽鎖を有効成分とする抗がん剤を提供することを主たる目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者らは、狂犬病ウイルスのワクチンを用いて、複数回にわたって過剰免疫されたボランティアから得られた末梢血から新規なヒト型抗体軽鎖を取得し、これらについて検討したところ、驚くべきことに、得られたヒト抗体κ型軽鎖のいくつかは、がん細胞、特に肺がん細胞に対する高い細胞障害性を有していることを見出し、発明を完成させた。

【0008】

すなわち、本発明に係る肺がんに対する抗がん剤は、可変領域が配列番号19のアミノ酸配列、又は当該アミノ酸配列のうち、第24～39番目、第55～61番目、及び第94～101番目のアミノ酸残基以外の領域において1若しくは数個のアミノ酸が置換、付加、若しくは欠失したアミノ酸配列、又は当該アミノ酸配列のうち、第24～39番目、第55～61番目、及び第94～101番目のアミノ酸残基以外の領域中のアミノ酸が置換、付加、若しくは欠失しており、かつ当該アミノ酸配列と95%以上の相同性を有する

アミノ酸配列によって示され、かつ肺がん細胞に対する細胞障害性を有するポリペプチドからなり、単量体であるヒト抗体κ型軽鎖を含有することを特徴とする。

【発明の効果】

【0009】

本発明によれば、がん細胞、特に肺がん細胞に対する細胞傷害性が高い抗がん剤を提供できる。本発明の抗がん剤は抗体酵素を有効成分とするため、がん細胞に対する特異性が高い。さらに、当該抗体酵素のアミノ酸配列は完全にヒト型であるため、ヒトに対するアレルギー等の問題がない。このため、本発明の抗がん剤は、活性の高い画期的な新型医薬品、及びその開発のための試料として非常に有用である。

【図面の簡単な説明】

10

【0010】

【図1】野生型のヒト抗体κ型軽鎖のアミノ酸配列を示す図である。

【図2】(a)は、単量体のヒト型抗体軽鎖を得るためのcDNAの設計の概略を示し、(b)は、変異導入前のヒト型抗体軽鎖と変異導入後のヒト型抗体軽鎖との組成の概略を示す。

【図3】クローン#1のポリペプチドを精製した結果を示す図であり、(a)は、クローン#1のポリペプチドを新たに一次精製した結果を示し、(b)は、クローン#1のポリペプチドを新たに二次精製した結果を示す。

【図4】各クローンのがん細胞に対する細胞障害性を調べた結果を示すグラフである。

【図5】各クローンのがん細胞に対する細胞障害性を調べた結果を示すグラフである。

20

【図6A】野生型のヒト抗体κ型軽鎖のアミノ酸配列を示す図である。

【図6B】野生型のヒト抗体κ型軽鎖のアミノ酸配列を示す図である。

【図6C】図6Bの続きであり、野生型のヒト抗体κ型軽鎖のアミノ酸配列を示す図である。

【図6D】野生型のヒト抗体κ型軽鎖のアミノ酸配列を示す図である。

【図6E】図6Dの続きであり、野生型のヒト抗体κ型軽鎖のアミノ酸配列を示す図である。

【図6F】図6Eの続きであり、野生型のヒト抗体κ型軽鎖のアミノ酸配列を示す図である。

【図6G】野生型のヒト抗体κ型軽鎖のアミノ酸配列を示す図である。

30

【図6H】図6Gの続きであり、野生型のヒト抗体κ型軽鎖のアミノ酸配列を示す図である。

【図6I】野生型のヒト抗体κ型軽鎖のアミノ酸配列を示す図である。

【図7】生体内におけるアッセイの結果を示す図である。

【図8】安全性試験（毒性試験）の結果を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0011】

本発明は、がん細胞に対する細胞障害性を有するヒト抗体κ型軽鎖を含む抗がん剤を提供する。本願明細書において、「ヒト抗体κ型軽鎖」は、ヒト由来の免疫グロブリンのκ型の軽鎖(Light chain)を指す。

40

【0012】

本願明細書において、「抗がん剤」とは、がん細胞を死滅させる、又は増殖を抑制若しくは阻害する活性を有する薬剤を意味する。

また、本願明細書において、「細胞傷害性」とは、細胞に対して死又は機能障害を与える性質を意味する。

【0013】

本発明に係る抗がん剤の有効成分であるヒト抗体κ型軽鎖（以下、「本発明に係るヒト抗体κ型軽鎖」ということがある。）は、具体的には、下記(1)～(8)のいずれかである。

(1) 可変領域が配列番号1のアミノ酸配列、又は当該アミノ酸配列において1若しくはは

50

数個のアミノ酸が置換、付加、若しくは欠失したアミノ酸配列、又は当該アミノ酸配列と95%以上の相同性を有するアミノ酸配列によって示されるポリペプチドからなり、二量体であるヒト抗体κ型軽鎖。

(2) 可変領域が配列番号7のアミノ酸配列、又は当該アミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が置換、付加、若しくは欠失したアミノ酸配列、又は当該アミノ酸配列と95%以上の相同性を有するアミノ酸配列によって示されるポリペプチドからなり、二量体であるヒト抗体κ型軽鎖。

(3) 可変領域が配列番号9のアミノ酸配列、又は当該アミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が置換、付加、若しくは欠失したアミノ酸配列、又は当該アミノ酸配列と95%以上の相同性を有するアミノ酸配列によって示されるポリペプチドからなり、二量体であるヒト抗体κ型軽鎖。

10

(4) 可変領域が配列番号13のアミノ酸配列、又は当該アミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が置換、付加、若しくは欠失したアミノ酸配列、又は当該アミノ酸配列と95%以上の相同性を有するアミノ酸配列によって示されるポリペプチドからなり、二量体であるヒト抗体κ型軽鎖。

(5) 可変領域が配列番号19のアミノ酸配列、又は当該アミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が置換、付加、若しくは欠失したアミノ酸配列、又は当該アミノ酸配列と95%以上の相同性を有するアミノ酸配列によって示されるポリペプチドからなり、単量体であるヒト抗体κ型軽鎖。

(6) 可変領域が配列番号38の1～113番目のアミノ酸配列、又は当該アミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が置換、付加、若しくは欠失したアミノ酸配列、又は当該アミノ酸配列と95%以上の相同性を有するアミノ酸配列によって示されるポリペプチドからなり、単量体であるヒト抗体κ型軽鎖。

20

(7) 可変領域が配列番号40の1～112番目のアミノ酸配列、又は当該アミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が置換、付加、若しくは欠失したアミノ酸配列、又は当該アミノ酸配列と95%以上の相同性を有するアミノ酸配列によって示されるポリペプチドからなり、二量体であるヒト抗体κ型軽鎖。

(8) 可変領域が配列番号41の1～107番目のアミノ酸配列、又は当該アミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が置換、付加、若しくは欠失したアミノ酸配列、又は当該アミノ酸配列と95%以上の相同性を有するアミノ酸配列によって示されるポリペプチドからなり、二量体であるヒト抗体κ型軽鎖。

30

【0014】

可変領域が配列番号1のアミノ酸配列によって示されるポリペプチドからなり、二量体であるヒト抗体κ型軽鎖は、ヒト抗体κ型軽鎖(#1)と称することもある。ヒト抗体κ型軽鎖(#1)は、上述した可変領域に、公知のヒト抗体定常領域が付加されたものであり得、一実施形態において、全長のアミノ酸配列は、配列番号2に示される。ヒト抗体κ型軽鎖(#1)におけるCDR1は、配列番号1および2のアミノ酸配列における第24～39番目であり、CDR2は、配列番号1および2のアミノ酸配列における第55～61番目であり、CDR3は、配列番号1および2のアミノ酸配列における第94～102番目である。

40

【0015】

野生型の抗体κ型軽鎖には、ジスルフィド結合を形成するためのシステインが存在しており、二量体を形成する。ヒト抗体κ型軽鎖(#1)は、野生型と同様に、他の軽鎖とジスルフィド結合を形成するためのシステインを有している。例えばヒト抗体κ型軽鎖(#1)が配列番号2のアミノ酸配列によって示されるポリペプチドからなる場合、当該システインは、配列番号2のアミノ酸配列中の220番目のシステインである。

【0016】

ヒト抗体κ型軽鎖(#1)は、後記実施例に示すように、がん細胞、特に肺がん細胞に対する細胞障害性を有する。このため、抗がん剤の有効成分として好適である。ヒト抗体κ型軽鎖(#1)の抗がん活性のためには、標的分子に対する高い分子認識能が重要であ

50

ることから、ヒト抗体κ型軽鎖（＃１）の抗がん活性の活性中心は、可変領域にある。

【００１７】

ポリペプチドを構成するアミノ酸残基のうちのいくつかのアミノ酸が、このポリペプチドの構造または機能に有意に影響することなく容易に改変され得ることは、当該分野において周知である。さらに、人為的に改変させるだけではなく、天然のタンパク質において、当該タンパク質の構造または機能を有意に変化させない変異体が存在することもまた周知である。なお、本願明細書において、特定のアミノ酸配列X中の１又は複数のアミノ酸を置換、付加、若しくは欠失させることを、変異させるという。

【００１８】

本発明に係るヒト抗体κ型軽鎖は、二量体を形成しており、可変領域が配列番号１のアミノ酸配列において１若しくは数個のアミノ酸が置換、付加、若しくは欠失したアミノ酸配列、又は当該アミノ酸配列と９５％以上の相同性を有するアミノ酸配列によって示されるポリペプチドからなるものであってもよい。当該ポリペプチドを、ヒト抗体κ型軽鎖（＃１）の変異体と称することもある。ヒト抗体κ型軽鎖（＃１）の変異体は、配列番号２のアミノ酸配列において、２２０番目のシステイン以外の１若しくは数個のアミノ酸が置換、付加、若しくは欠失したアミノ酸配列、又は当該アミノ酸配列と９５％以上の相同性を有するアミノ酸配列によって示されるポリペプチドからなるものであってもよい。

10

【００１９】

本発明に係るヒト抗体κ型軽鎖として用いられるヒト抗体κ型軽鎖（＃１）の変異体は、ヒト抗体κ型軽鎖（＃１）と同様に抗がん作用を有する二量体である。このため、ヒト抗体κ型軽鎖（＃１）の変異体は、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３は、配列番号１又は２のアミノ酸配列と同一であり（保存されており）、配列番号２のアミノ酸配列中の２２０番目のシステインに相当するシステインも保存されている。つまり、ヒト抗体κ型軽鎖（＃１）の変異体は、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３以外の領域中のアミノ酸が変異されており、可変領域の他の領域中のアミノ酸が変異されているものであることが好ましい。

20

【００２０】

可変領域が配列番号９のアミノ酸配列によって示されるポリペプチドからなり、二量体であるヒト抗体κ型軽鎖は、ヒト抗体κ型軽鎖（＃４）と称することもある。ヒト抗体κ型軽鎖（＃４）は、上述した可変領域に、公知のヒト抗体定常領域が付加されたものであり得、一実施形態において、全長のアミノ酸配列は、配列番号１０に示される。ヒト抗体κ型軽鎖（＃４）におけるＣＤＲ１は、配列番号９および１０のアミノ酸配列における第２４～４０番目であり、ＣＤＲ２は、配列番号９および１０のアミノ酸配列における第５６～６２番目であり、ＣＤＲ３は、配列番号９および１０のアミノ酸配列における第９５～１０２番目である。また、他の軽鎖とジスルフィド結合を形成するためのシステインは、配列番号１０のアミノ酸配列中の２２０番目のシステインである。

30

【００２１】

ヒト抗体κ型軽鎖（＃４）は、後記実施例に示すように、がん細胞、特に肺がん細胞に対する細胞障害性を有する。このため、抗がん剤の有効成分として好適である。

【００２２】

本発明に係るヒト抗体κ型軽鎖は、二量体を形成しており、可変領域が配列番号９のアミノ酸配列において１若しくは数個のアミノ酸が置換、付加、若しくは欠失したアミノ酸配列、又は当該アミノ酸配列と９５％以上の相同性を有するアミノ酸配列によって示されるポリペプチドからなるものであってもよい。当該ポリペプチドを、ヒト抗体κ型軽鎖（＃４）の変異体と称することもある。ヒト抗体κ型軽鎖（＃４）の変異体は、配列番号１０のアミノ酸配列において、２２０番目のシステイン以外の１若しくは数個のアミノ酸が置換、付加、若しくは欠失したアミノ酸配列、又は当該アミノ酸配列と９５％以上の相同性を有するアミノ酸配列によって示されるポリペプチドからなるものであってもよい。

40

【００２３】

本発明に係るヒト抗体κ型軽鎖として用いられるヒト抗体κ型軽鎖（＃４）の変異体は

50

、ヒト抗体κ型軽鎖（＃４）と同様に抗がん作用を有する二量体である。このため、ヒト抗体κ型軽鎖（＃４）の変異体は、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３は、配列番号９又は１０のアミノ酸配列と同一であり（保存されており）、配列番号１０のアミノ酸配列中の２２０番目のシステインに相当するシステインも保存されている。つまり、ヒト抗体κ型軽鎖（＃４）の変異体は、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３以外の領域中のアミノ酸が変異されており、可変領域の他の領域中のアミノ酸が変異されているものであることが好ましい。

【００２４】

可変領域が配列番号１３のアミノ酸配列によって示されるポリペプチドからなり、二量体であるヒト抗体κ型軽鎖は、ヒト抗体κ型軽鎖（＃７）と称することもある。ヒト抗体κ型軽鎖（＃７）は、上述した可変領域に、公知のヒト抗体定常領域が付加されたものであり得、一実施形態において、全長のアミノ酸配列は、配列番号１４に示される。ヒト抗体κ型軽鎖（＃７）におけるＣＤＲ１は、配列番号１３および１４のアミノ酸配列における第２４～３９番目であり、ＣＤＲ２は、配列番号１３および１４のアミノ酸配列における第５５～６１番目であり、ＣＤＲ３は、配列番号１３および１４のアミノ酸配列における第９４～１０１番目である。また、他の軽鎖とジスルフィド結合を形成するためのシステインは、配列番号１４のアミノ酸配列中の２１９番目のシステインである。

【００２５】

ヒト抗体κ型軽鎖（＃７）は、後記実施例に示すように、がん細胞、特に肺がん細胞に対する細胞障害性を有する。このため、抗がん剤の有効成分として好適である。

【００２６】

本発明に係るヒト抗体κ型軽鎖は、二量体を形成しており、可変領域が配列番号１３のアミノ酸配列において１若しくは数個のアミノ酸が置換、付加、若しくは欠失したアミノ酸配列、又は当該アミノ酸配列と９５％以上の相同性を有するアミノ酸配列によって示されるポリペプチドからなるものであってもよい。当該ポリペプチドを、ヒト抗体κ型軽鎖（＃７）の変異体と称することもある。ヒト抗体κ型軽鎖（＃７）の変異体は、配列番号１４のアミノ酸配列において、２１９番目のシステイン以外の１若しくは数個のアミノ酸が置換、付加、若しくは欠失したアミノ酸配列、又は当該アミノ酸配列と９５％以上の相同性を有するアミノ酸配列によって示されるポリペプチドからなるものであってもよい。

【００２７】

本発明に係るヒト抗体κ型軽鎖として用いられるヒト抗体κ型軽鎖（＃７）の変異体は、ヒト抗体κ型軽鎖（＃７）と同様に抗がん作用を有する二量体である。このため、ヒト抗体κ型軽鎖（＃７）の変異体は、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３は、配列番号１３又は１４のアミノ酸配列と同一であり（保存されており）、配列番号１４のアミノ酸配列中の２１９番目のシステインに相当するシステインも保存されている。つまり、ヒト抗体κ型軽鎖（＃７）の変異体は、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３以外の領域中のアミノ酸が変異されており、可変領域の他の領域中のアミノ酸が変異されているものであることが好ましい。

【００２８】

可変領域が配列番号１９のアミノ酸配列によって示されるポリペプチドからなり、単量体であるヒト抗体κ型軽鎖は、ヒト抗体κ型軽鎖（２２Ｆ６__単量体）と称することもある。ヒト抗体κ型軽鎖（２２Ｆ６__単量体）は、上述した可変領域に、公知のヒト抗体定常領域が付加されたものであり得、一実施形態において、全長のアミノ酸配列は、配列番号２０のアミノ酸配列中の２１９番目のシステインが削除又はその他のアミノ酸（例えば、アラニン）に置換されたアミノ酸配列に示される。ヒト抗体κ型軽鎖（２２Ｆ６__単量体）におけるＣＤＲ１は、配列番号１９および２０のアミノ酸配列における第２４～３９番目であり、ＣＤＲ２は、配列番号１９および２０のアミノ酸配列における第５５～６１番目であり、ＣＤＲ３は、配列番号１９および２０のアミノ酸配列における第９４～１０１番目である。

【００２９】

ヒト抗体κ型軽鎖（２２Ｆ６―単量体）は、後記実施例に示すように、がん細胞、特に肺がん細胞に対する細胞障害性を有する。このため、抗がん剤の有効成分として好適である。

【００３０】

本発明に係るヒト抗体κ型軽鎖は、単量体であり、可変領域が配列番号２０のアミノ酸配列において１若しくは数個のアミノ酸が置換、付加、若しくは欠失したアミノ酸配列、又は当該アミノ酸配列と９５％以上の相同性を有するアミノ酸配列によって示されるポリペプチドからなるものであってもよい。当該ポリペプチドをヒト抗体κ型軽鎖（２２Ｆ６―単量体）の変異体と称することもある。ヒト抗体κ型軽鎖（２２Ｆ６―単量体）の変異体は、配列番号２０のアミノ酸配列において、２１９番目のシステインが削除又はその他のアミノ酸に置換されており、かつ２１９番目のアミノ酸以外の１若しくは数個のアミノ酸が置換、付加、若しくは欠失したアミノ酸配列、又は当該アミノ酸配列と９５％以上の相同性を有するアミノ酸配列によって示されるポリペプチドからなるものであってもよい。

10

【００３１】

本発明に係るヒト抗体κ型軽鎖として用いられるヒト抗体κ型軽鎖（２２Ｆ６―単量体）の変異体は、ヒト抗体κ型軽鎖（２２Ｆ６―単量体）と同様に抗がん作用を有する単量体である。このため、ヒト抗体κ型軽鎖（２２Ｆ６―単量体）の変異体は、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３は、配列番号１９又は２０のアミノ酸配列と同一であり（保存されており）、配列番号２０のアミノ酸配列中の２１９番目のシステインに相当するシステインは、削除又はその他のアミノ酸に置換されている。つまり、ヒト抗体κ型軽鎖（２２Ｆ６―単量体）の変異体は、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３以外の領域中のアミノ酸が変異されており、可変領域の他の領域中のアミノ酸が変異されているものであることが好ましい。

20

【００３２】

また、本発明に係るヒト抗体κ型軽鎖は、付加的なポリペプチドを含むものであってもよい。付加的なポリペプチドとしては、例えば、Ｈｉｓタグ、Ｍｙｃ、Ｆｌａｇ等のエピトープ標識ポリペプチドが挙げられる。

【００３３】

当業者は、周知技術を使用してポリペプチドを構成するアミノ酸残基のうちの１又は数個のアミノ酸を容易に変異させたり、エピトープ標識ポリペプチド等を付加することができる。例えば、公知の点変異導入法に従えば、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの任意の塩基を変異させることができる。また、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの任意の部位に対応するプライマーを設計して欠失変異体または付加変異体を作製することができる。

30

【００３４】

本発明に係るヒト抗体κ型軽鎖は、天然の精製産物、化学合成手順の産物、および原核生物宿主または真核生物宿主（例えば、細菌細胞、酵母細胞、高等植物細胞、昆虫細胞、および哺乳動物細胞を含む）から組換え技術によって産生された産物を含む。組換え産生手順において用いられる宿主に依存して、本発明に係るヒト抗体κ型軽鎖は、グリコシル化され得るか、または非グリコシル化され得る。さらに、本発明に係るヒト抗体κ型軽鎖はまた、いくつかの場合、宿主媒介プロセスの結果として、開始の改変メチオニン残基を含み得る。

40

【００３５】

本発明に係るヒト抗体κ型軽鎖は、アミノ酸がペプチド結合しているポリペプチドであればよいが、これに限定されるものではなく、ポリペプチド以外の構造を含む複合ポリペプチドであってもよい。本明細書中で使用される場合、「ポリペプチド以外の構造」としては、糖鎖およびイソプレノイド基等を挙げることができるが、特に限定されない。

【００３６】

本発明に係るヒト抗体κ型軽鎖は、当該ヒト抗体κ型軽鎖（ポリペプチド）をコードす

50

るポリヌクレオチドを含むベクターを用いて、組換え発現系や無細胞発現系等の当該技術分野で公知の発現系を用いて製造することができる。

【0037】

組換え発現系を用いる場合、本発明に係るヒト抗体κ型軽鎖をコードするポリヌクレオチドを組換え発現ベクターに組み込んだ後、公知の方法により発現可能な宿主に導入し、宿主（形質転換体）内で翻訳されて得られるポリペプチドを精製するという方法などを採用することができる。組換え発現ベクターは、プラスミドであってもなくてもよく、宿主に目的ポリヌクレオチドを導入することができればよい。

【0038】

このように宿主に外来ポリヌクレオチドを導入する場合、発現ベクターは、外来ポリヌクレオチドを発現するように宿主内で機能するプロモーターを組み込んであることが好ましい。組換え的に産生されたポリペプチドを精製する方法は、用いた宿主、ポリペプチドの性質によって異なるが、タグの利用等によって比較的容易に目的のポリペプチドを精製することが可能である。

【0039】

無細胞発現系（無細胞タンパク質合成系）を用いる場合、本発明に係るヒト抗体κ型軽鎖をコードするポリヌクレオチドを、リボソームやt-RNA等のタンパク質の翻訳・合成に必要な成分を含む溶液に添加し、適当な温度でインキュベートすることにより、合成されたポリペプチドを精製することが好ましい。

【0040】

無細胞タンパク質合成系としては、コムギ胚芽抽出液を用いる系、ウサギ網状赤血球抽出液を用いる系、大腸菌S30抽出液を用いる系、および植物の脱液胞化プロトプラストから得られる細胞成分抽出液を用いる系が挙げられる。一般的には、真核生物由来遺伝子の翻訳には真核細胞の系、すなわち、コムギ胚芽抽出液を用いる系またはウサギ網状赤血球抽出液を用いる系のいずれかが選択されるが、翻訳される遺伝子の由来（原核生物／真核生物）や、合成後のタンパク質の使用目的を考慮して、上記合成系から選択されればよい。これらの合成系としては、種々の市販のキットが用いられ得る。

【0041】

なお、種々のウイルス由来遺伝子産物は、その翻訳後に、小胞体、ゴルジ体等の細胞内膜が関与する複雑な生化学反応を経て活性を発現するものが多いので、各種生化学反応を試験管内で再現するためには細胞内膜成分（例えば、ミクロソーム膜）が添加される必要がある。植物の脱液胞化プロトプラストから得られる細胞成分抽出液は、細胞内膜成分を保持した無細胞タンパク質合成液として利用し得るのでミクロソーム膜の添加が必要とされないで、好ましい。

【0042】

本明細書中で使用される場合、「細胞内膜成分」は、細胞質内に存在する脂質膜よりなる細胞小器官（すなわち、小胞体、ゴルジ体、ミトコンドリア、葉緑体、液胞などの細胞内顆粒全般）が意図される。特に、小胞体およびゴルジ体はタンパク質の翻訳後修飾に重要な役割を果たしており、膜タンパク質および分泌タンパク質の成熟に必須な細胞成分である。

【0043】

宿主の発現系や無細胞タンパク質合成系により合成されたヒト抗体κ型軽鎖は、精製されることが好ましい。ヒト抗体κ型軽鎖を精製する工程は、周知の方法（例えば、細胞または組織を破壊した後に遠心分離して可溶性画分を回収する方法）で細胞や組織から細胞抽出液を調製した後、この細胞抽出液から周知の方法（例えば、硫酸沈殿またはエタノール沈殿、酸抽出、陰イオンまたは陽イオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、およびレクチンクロマトグラフィー）によって精製する工程が好ましいが、これらに限定されない。最も好ましくは、高速液体クロマトグラフィー（「HPLC」）が精製のために用いられる。

【0044】

また、本発明に係るヒト抗体κ型軽鎖は、当該ヒト抗体κ型軽鎖を天然に発現する細胞または組織から精製することもできる。例えば、抗体またはオリゴヌクレオチドを用いて、本発明に係るヒト抗体κ型軽鎖を天然に発現する細胞または組織を同定することができる。細胞や組織からのヒト抗体κ型軽鎖の精製は、宿主の発現系等を用いて合成されたヒト抗体κ型軽鎖を精製する場合と同様に行うこともできる。

【0045】

その他、本発明に係るヒト抗体κ型軽鎖は、化学合成することもできる。化学合成の方法は特に限定されず、ポリペプチドを化学合成する際に用いられるいずれの方法で行ってもよい。

10

【0046】

本発明に係る抗がん剤は、本発明に係るヒト抗体κ型軽鎖を有効成分とする。本発明に係るヒト抗体κ型軽鎖ががん細胞に対する細胞傷害性を示す作用機序は未だ完全に明らかにされていないが、本発明に係るヒト抗体κ型軽鎖は、がん細胞表面の特定の分子又は構造を特異的に認識して結合すると同時に、自身が有する酵素活性によりがん細胞の一部成分を分解する結果、がん細胞の機能が損なわれ、増殖が阻害されたり、細胞死が誘導されるのではないかと推察される。

【0047】

本発明に係る抗がん剤は、ヒトまたは動物についての使用のために、直接注入により投与され得る。本発明に係る抗がん剤はまた、非経口投与、粘膜投与、筋肉内投与、静脈内投与、皮下投与、眼内投与または経皮的投与のために処方され得る。代表的には、組成物中に含まれるタンパク質は、0.01～30mg/kg体重の用量、好ましくは、0.1～10mg/kg体重、より好ましくは、0.1～1mg/kg体重の用量で投与され得る。

20

【0048】

本発明に係る抗がん剤は、本発明に係るヒト抗体κ型軽鎖以外に、薬学的に受容可能なキャリア、希釈剤または賦形剤（それらの組み合わせを含む）を含み得る。治療的使用のための薬学的に受容可能なキャリアまたは賦形剤は、薬学分野で周知であり、そして例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro編、1985)に記載されている。薬学的に使用可能なキャリア、賦形剤または希釈剤の選択は、意図された投与経路および標準的薬学的慣行に従って、当業者によって容易に選択され得る。また、本発明に係る抗がん剤は、任意の適切な結合剤、滑沢剤、懸濁剤、被覆剤または可溶化剤をさらに含み得る。

30

【0049】

異なる送達系に依存して、組成／処方の必要条件は、異なり得る。例示として、本発明に係る抗がん剤は、ミニポンプを使用してまたは粘膜経路により、例えば、吸入のための鼻スプレーまたはエアロゾルとして、あるいは非経口的に送達するために処方され得る（ここで本発明に係る抗がん剤は、例えば、静脈内経路、筋肉内経路もしくは皮下経路による送達のために注射可能形態として処方される）。あるいは、この処方物は、両方の経路により送達されるように設計され得る。例えば本発明に係る抗がん剤は、特に肺がん細胞に対する細胞傷害性が高い。このため、本発明に係る抗がん剤は、吸入のための鼻スプレーまたはエアロゾル等の、鼻や気管支等から肺細胞まで効率よく送達することが可能な形態であることも好ましい。

40

【0050】

また、本発明に係る抗がん剤を生体内に投与する用途で用いる場合、有効成分であるヒト抗体κ型軽鎖の生体内における安定性（血中半減期）を向上させるための様々な技術が用いられ得る。例えば、neonatal Fc receptor (FcRn) がFcに結合すると、IgGなどの抗体の血中半減期が延長することが知られており（例えば、Roopenian, D. C. et. al., Nat Rev Immunol vol

50

． 7 7 1 5－7 2 5（2 0 0 7）参照）、本発明に係るヒト抗体κ型軽鎖のC末端を、F c R nとの結合活性を有するように改変することができる。また、本発明に係るヒト抗体κ型軽鎖をダイマー化すること、P E G（ポリエチレングリコール）を付加することもできる。

【0 0 5 1】

本発明に係る抗がん剤は、例えば、服用の態様についての説明書等とともにキット化することもできる。当該キットには、その他、本発明に係る抗がん剤と併用可能な各種医薬を含めることもできる。

【0 0 5 2】

また、本発明に係る抗がん剤は、標的分子の認識能が高い抗体κ型軽鎖を有効成分とするため、抗体κ型軽鎖の標的分子が細胞表面に存在していないがん細胞には細胞傷害性を発揮しない。このため、本発明の抗がん剤は、がんの種類の識別に有用であることが期待される。

【実施例】

【0 0 5 3】

次に、実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの例によって限定されるものではない。

【0 0 5 4】

[実施例 1]

（1．ヒト末梢血 c D N A の調製）

狂犬病ウイルスのワクチンを用いて、複数回にわたって過剰免疫されたボランティアから得られた末梢血から、F i c o l l－p a q u eを用いてリンパ球を分離した。R N A e x t r a c t i o n k i t（S t r a t a g e n e）を用いて、分離した約3．0 × 1 0⁷個のリンパ球からトータルRNAを得た。T h e r o m o S c r i p t R T－P C R S y s t e m（I n v i t r o g e n）を用い、o l i g o（d T）をプライマーとして、トータルRNAを逆転写することにより、目的とするc D N A（c D N Aライブラリー）を調製した。

【0 0 5 5】

（2．ヒト抗体κ型軽鎖遺伝子の取得）

前記1．で取得したc D N Aを鋳型として、サブグループI Iに属するV κ遺伝子を有する抗体軽鎖遺伝子を増幅するためのプライマーを用いた2段階のP C R反応を行い、約7 5 0 b pのP C R産物（サブグループI Iに属するκ型軽鎖遺伝子）を得た。これらのP C R産物をクローニングし、シーケンス解析を行い、相同性検索により、それぞれの生殖細胞系列遺伝子（g e r m l i n e g e n e）におけるV κ遺伝子を推定した。この結果、得られた1 8クローンすべてがサブグループI Iに属していた。このうち、クローン# 1（生殖細胞系列遺伝子型：A 1 8 b）、クローン# 2（生殖細胞系列遺伝子型：A 3／A 1 9）、クローン# 4（生殖細胞系列遺伝子型：O 1 1／o 1）、クローン# 7（生殖細胞系列遺伝子型：A 3／A 1 9）、クローン# 8（生殖細胞系列遺伝子型：A 1 8 b）、クローン# 9（生殖細胞系列遺伝子型：A 1 8 b）、クローン# 1 1（生殖細胞系列遺伝子型：A 1 8 b）、クローン# 1 3（生殖細胞系列遺伝子型：A 3／A 1 9）、及びクローン# 1 4（生殖細胞系列遺伝子型：A 3／A 1 9）の9クローンを以降の実験に用いた。

【0 0 5 6】

（3．ヒト抗体κ型軽鎖の発現）

前記2．で取得した各クローンをそれぞれ、H i s タグ配列サイトを有するプラスミドベクターに導入し、当該プラスミドベクターを大腸菌に導入して形質転換体を作製した。各形質転換体を培養し、I P T Gによる発現誘導を行ったところ、S D S－P A G E分析及び抗ヒト型（F a b'）₂抗体を用いたウェスタンブロッティングにより、大腸菌において発現したタンパク質がヒト型抗体軽鎖であることを同定することができた。得られたヒト型抗体軽鎖は、N末端にM（開始メチオニン）を、C末端にプラスミドベクター由来

の L E H H H H H H H (配列番号 23) を有していた。

【0057】

(4. ヒト末梢血 cDNA の調製)

狂犬病ウイルスのワクチンを用いて、複数回にわたって被験者を過剰免疫し、血清の中和活性を測定した。血清の中和活性が最も高かった (7. 2 IU) 被験者をドナーとして末梢血を採取し、Ficoll-paque を用いて当該末梢血からリンパ球を分離した。RNA extraction kit (Stratagene) を用いて、分離した約 3.0×10^7 個のリンパ球からトータル RNA を得た。ThermoScript RT-PCR System (Invitrogen) を用い、oligo (dT) をプライマーとして、トータル RNA を逆転写することにより、後述する PCR 反応において鋳型とする cDNA を調製した。

10

【0058】

(5. ヒト抗体 κ 型軽鎖遺伝子の取得)

前記 4. で取得した cDNA を鋳型として、ヒト抗体軽鎖遺伝子を網羅的に増幅するためのプライマーセットを用いて PCR 反応を行い、約 660 bp の PCR 産物を得た。この PCR 産物を精製し、大腸菌発現ベクター pET101/D-TOPO ベクター (登録商標、Invitrogen) に挿入し、LCA ライブラリを構築した。なお、pET101/D-TOPO ベクターに PCR 産物を挿入した発現ベクターからは、当該 PCR 産物がコードするタンパク質の C 末端に His タグを付加させたタンパク質が発現される。この LCA ライブラリの cDNA を鋳型として、サブグループ II に属する $V\kappa$ 遺伝子を有するヒト抗体軽鎖遺伝子を増幅するためのプライマーを用いて PCR 反応を行い、約 660 bp の PCR 産物を得た。これらの PCR 産物をクローニングし、シーケンス解析を行い、解析ソフトウェア (GENETIX (登録商標) Ver. 8) を用いて、アミノ酸配列ならびに軽鎖の可変領域および定常領域を推定し、それぞれの生殖細胞系列遺伝子 (germline gene) における $V\kappa$ 遺伝子を推定した。これらのクローンの中から、クローン 22F6 (生殖細胞系列遺伝子型: A3/A19) 及びクローン 23D4 (生殖細胞系列遺伝子型: A3/A19) の 2 クローンを以降の実験に用いた。得られたヒト型抗体軽鎖は、N 末端に M (開始メチオニン) を、C 末端にプラスミドベクター由来の L E H H H H H H H (配列番号 23) を有していた。

20

【0059】

各クローンのシーケンスの結果、クローン #1 に係るヒト型抗体軽鎖 (ヒト型抗体軽鎖 (#1__WT)) の全長は、配列番号 27 に示される塩基配列であり、クローン #8 に係るヒト型抗体軽鎖 (ヒト型抗体軽鎖 (#8__WT)) の全長は、配列番号 28 に示される塩基配列であり、クローン #9 に係るヒト型抗体軽鎖 (ヒト型抗体軽鎖 (#9__WT)) の全長は、配列番号 29 に示される塩基配列であり、クローン #11 に係るヒト型抗体軽鎖 (ヒト型抗体軽鎖 (#11__WT)) の全長は、配列番号 30 に示される塩基配列であり、クローン #4 に係るヒト型抗体軽鎖 (ヒト型抗体軽鎖 (#4__WT)) の全長は、配列番号 31 に示される塩基配列であり、クローン #2 に係るヒト型抗体軽鎖 (ヒト型抗体軽鎖 (#2__WT)) の全長は、配列番号 32 に示される塩基配列であり、クローン #7 に係るヒト型抗体軽鎖 (ヒト型抗体軽鎖 (#7__WT)) の全長は、配列番号 33 に示される塩基配列であり、クローン #13 に係るヒト型抗体軽鎖 (ヒト型抗体軽鎖 (#13__WT)) の全長は、配列番号 34 に示される塩基配列であり、クローン #14 に係るヒト型抗体軽鎖 (ヒト型抗体軽鎖 (#14__WT)) の全長は、配列番号 35 に示される塩基配列であり、クローン 22F6 に係るヒト型抗体軽鎖 (ヒト型抗体軽鎖 (22F6__WT)) の全長は、配列番号 36 に示される塩基配列であり、クローン 23D4 に係るヒト型抗体軽鎖 (ヒト型抗体軽鎖 (23D4__WT)) の全長は、配列番号 37 に示される塩基配列であった。

40

【0060】

各塩基配列から推定されるアミノ酸配列を図 1 に示す。また、図 1 には、可変領域、定常領域および CDR1~3 の位置も示した。クローン #1 に係るヒト型抗体軽鎖 (ヒト型

50

抗体軽鎖（＃１__WT））は配列番号２に示されるアミノ酸配列であり、クローン＃８に係るヒト型抗体軽鎖（ヒト型抗体軽鎖（＃８__WT））は配列番号４に示されるアミノ酸配列であり、クローン＃９に係るヒト型抗体軽鎖（ヒト型抗体軽鎖（＃９__WT））は配列番号６に示されるアミノ酸配列であり、クローン＃１１に係るヒト型抗体軽鎖（ヒト型抗体軽鎖（＃１１__WT））は配列番号８に示されるアミノ酸配列であり、クローン＃４に係るヒト型抗体軽鎖（ヒト型抗体軽鎖（＃４__WT））は配列番号１０に示されるアミノ酸配列であり、クローン＃２に係るヒト型抗体軽鎖（ヒト型抗体軽鎖（＃２__WT））は配列番号１２に示されるアミノ酸配列であり、クローン＃７に係るヒト型抗体軽鎖（ヒト型抗体軽鎖（＃７__WT））は配列番号１４に示されるアミノ酸配列であり、クローン＃１３に係るヒト型抗体軽鎖（ヒト型抗体軽鎖（＃１３__WT））は配列番号１６に示されるアミノ酸配列であり、クローン＃１４に係るヒト型抗体軽鎖（ヒト型抗体軽鎖（＃１４__WT））は配列番号１８に示されるアミノ酸配列であり、クローン２２Ｆ６に係るヒト型抗体軽鎖（ヒト型抗体軽鎖（２２Ｆ６__WT））は配列番号２０に示されるアミノ酸配列であり、クローン２３Ｄ４に係るヒト型抗体軽鎖（ヒト型抗体軽鎖（２３Ｄ４__WT））は配列番号２２に示されるアミノ酸配列であった。

10

【００６１】

なお、本実施例で使用した野生型のヒト型抗体軽鎖は、図１に示す各アミノ酸配列のＮ末端にメチオニンが、Ｃ末端にプラスミドベクター由来のＬＥＨＨＨＨＨＨ（配列番号２３）が付加されたポリペプチドであった。

【００６２】

20

（６．単量体のヒト型抗体軽鎖の作製）

前記２．及び５．で取得したクローンのヒト抗体κ型軽鎖は、Ｃ末端にあるシステインによりジスルフィド（Ｓ－Ｓ）結合が形成されるため、二量体を形成している。そこで、Ｓ－Ｓ結合に関与するシステイン（図１のアミノ酸配列のＣ末端のシステイン）をアラニンに置換する変異を導入して、単量体のヒト型抗体酵素のみが形成されるように、ｃＤＮＡを設計した。Ｃ末端にプラスミドベクター由来のＬＥＨＨＨＨＨＨを付加したヒト型抗体軽鎖（＃１__WT）に対するこの設計の詳細を図２に示す。図２の（ａ）に示すように、全長のヒト型抗体酵素の遺伝子における２２０番目のシステインをコードするＴＧＴを、ＧＣＴに置換した。これによって、図２の（ｂ）に示すように、元のアミノ酸配列では２２０番目がシステインであるために二量体が形成されるが、置換後のアミノ酸では２２

30

【００６３】

具体的には、野生型の全長のヒト型抗体酵素の遺伝子における上記システインをコードするＴＧＴを、ＡＬＥＨＨＨＨＨ（配列番号２５）（＋終止コドン）をコードするＧＣＴＣＴＣＧＡＧＣＡＣＣＡＣＣＡＣＣＡＣＣＡＣＣＡＣＴＧＡ（配列番号２６）に置換した。つまり、本実施例で使用した単量体のヒト型抗体軽鎖は、図１に示す各アミノ酸配列のＮ末端にメチオニンが付加されており、かつＣ末端のシステインに代えてＡＬＥＨＨＨＨＨＨが付加されたポリペプチドであった。なお、こうして得られたＳ－Ｓ結合に寄与するシステインをアラニンに置換した変異体のうち、ヒト型抗体軽鎖（＃１__WT）の変異体はヒト型抗体軽鎖（＃１__Ｃ２２０Ａ）、ヒト型抗体軽鎖（＃８__WT）の変異体はヒト型抗体軽鎖（＃８__Ｃ２２０Ａ）、ヒト型抗体軽鎖（＃９__WT）の変異体はヒト型抗体軽鎖（＃９__Ｃ２２０Ａ）、ヒト型抗体軽鎖（＃１１__WT）の変異体はヒト型抗体軽鎖（＃１１__Ｃ２２０Ａ）、ヒト型抗体軽鎖（＃４__WT）の変異体はヒト型抗体軽鎖（＃４__Ｃ２２０Ａ）、ヒト型抗体軽鎖（＃２__WT）の変異体はヒト型抗体軽鎖（＃２__Ｃ２２０Ａ）、ヒト型抗体軽鎖（＃７__WT）の変異体はヒト型抗体軽鎖（＃７__Ｃ２２０Ａ）、ヒト型抗体軽鎖（＃１３__WT）の変異体はヒト型抗体軽鎖（＃１３__Ｃ２２０Ａ）、ヒト型抗体軽鎖（＃１４__WT）の変異体はヒト型抗体軽鎖（＃１４__Ｃ２２０Ａ）、ヒト型抗体軽鎖（２２Ｆ６__WT）の変異体はヒト型抗体軽鎖（２２Ｆ６__Ｃ２２０Ａ）、ヒト型抗体軽鎖（２３Ｄ４__WT）の変異体はヒト型抗体軽鎖（２３Ｄ４__Ｃ２２０Ａ）とそれぞれ称する。

40

50

【0064】

(7. ヒト型抗体軽鎖の精製)

各ヒト型抗体軽鎖を以下の様に一次精製および二次精製した。図3の(a)は、ヒト型抗体軽鎖(#1__WT)及びヒト型抗体軽鎖(#1__C220A)の一次精製におけるNi-NTAカラムクロマトグラムおよびSDS-PAGE分析の結果を示す図である。図3の(b)は、二次精製における陽イオン交換クロマトグラムおよびSDS-PAGE分析の結果を示す図である。

図3の(a)左段に示すように、サンプルのアプライ後に素通り画分が流れ切るまで、緩衝液A(25mMのTris-HCl(pH8.0)、0.25MのNaCl、40mMのイミダゾール、0.005%のTween20)を流した。そして、左段のグラフにおける破線に示されるように、イミダゾールの濃度を40mMから300mMまで漸次的に上昇させて、ゲルと結合した成分を溶出させた。カラムとしてNi-NTAアガロースカラム(直径1cm、2ml)を用い、精製を通して流速を0.1ml/分に維持した。図3の(a)の右段に示すように、目的とする約31kDaのバンドが、フラクション番号30~37に検出された。このサンプルを1つにまとめて、次の二次精製を行った。

【0065】

図3の(b)の左段に示すように、サンプルのアプライ後に素通り画分が流れ切るまで、緩衝液A(50mMの酢酸ナトリウム(pH5.4)、0.2MのNaCl、0.005%のTween20)を流した。そして、左段のグラフにおける破線に示されるように、NaClの濃度を0.2Mから0.4Mまで漸次的に上昇させて、ゲルと結合した成分を溶出させた。カラムとしてSP5PW(TOSHO)を用い、精製を通して流速を0.1ml/分に維持した。精製前のサンプル、グラフ中の破線に囲まれた「a」の領域(フラクション番号10~15)、およびグラフ中の破線に囲まれた「c」の領域(フラクション番号25~30)に含まれる成分について、SDS-PAGEによって分析した。図3の(b)の右段に示すように、還元サンプルにおいて目的とする約31kDaのバンドが、aおよびcにおいて検出された。また、非還元サンプルにおいて約31kDaのバンドがaのみにおいて検出され、約51kDaのバンドがcのみにおいて検出された。上述のように、抗体軽鎖の単量体は約31kDaであり、二量体は約51kDaである。したがって、サンプルaは抗体軽鎖の単量体の画分であり、サンプルcは抗体軽鎖の二量体の画分である。

【0066】

その他のクローンにおいても、クローン(#1)と同様に、野生型のヒト型抗体軽鎖の発現産物中には二量体と単量体が含まれており、Ni-NTAカラムクロマトグラムおよび陽イオン交換クロマトグラムによる2段階精製によって二量体が精製され、S-S結合に寄与するシステインをアラニンに変異させた変異体の発現産物中には単量体が含まれており、同様の2段階精製によって単量体が精製された。

【0067】

(8. がん細胞に対する細胞障害性)

各種ヒト抗体κ型軽鎖のがん細胞に対する細胞障害性について試験した。がん細胞は、ATCCより購入したA549(ヒト肺胞上皮がん細胞株)を用い、10%FCS(ウシ胎児血清)含有F-12K培地を用いる通常の方法で培養した。

【0068】

まず、凍結されたA549細胞を融解して回復させた後、 5×10^3 細胞/ウェルとなるように96ウェルプレートに100μLずつ播種した。37℃で24時間培養した後、当該96ウェルプレートに添加されている培地をデカンテーションで除去した後、約1mg/mLに調製した各ヒト抗体κ型軽鎖を、各ウェルに100μLずつ添加した。ヒト抗体κ型軽鎖を添加してから24時間後、及び48時間後(細胞を播種してから48時間後、72時間後)に、各ウェルにWST-1試薬(Roche社製)を10μLずつ添加し、1、1.5、及び2時間後に、生成されたホルマザン色素の吸光度(Abs450nm)を測定した。得られた吸光度の結果に基づき、ヒト抗体κ型軽鎖を添加しなかったウェ

ル (N. C.) の細胞生存率を 100% とし、各ウェルの細胞生存率を求め、添加したヒト抗体 κ 型軽鎖の細胞障害性を評価した。

【0069】

各ヒト抗体 κ 型軽鎖について、ヒト抗体 κ 型軽鎖を添加してから 24 時間後及び 48 時間後の細胞生存率を、図 4、図 5、表 1 及び表 2 に示す。生殖細胞系列遺伝子型が A18b 又は O11/o1 であったクローンの結果を図 4 及び表 1 に、生殖細胞系列遺伝子型が A3/A19 であったクローンの結果を図 5 及び表 2 に示した。また、表 1 および 2 には、ウェル内におけるヒト抗体 κ 型軽鎖の濃度も示した。

【0070】

【表 1】

クローン	ウェル内終濃度 (μM)	細胞生存率 (%)	
		24 時間後	48 時間後
#1_WT	44	60	60
#1_C220A	40	72	75
#8_WT	29	79	81
#8_C220A	38	96	93
#9_WT	20	78	75
#9_C220A	40	86	84
#11_WT	28	73	80
#11_C220A	44	95	94
#4_WT	20	50	54
#4_C220A	44	96	93

【0071】

【表 2】

クローン	ウェル内終濃度 (μM)	細胞生存率 (%)	
		24 時間後	48 時間後
#2_WT	27	81	86
#2_C220A	40	94	95
#7_WT	35	49	53
#7_C220A	40	92	93
#13_WT	40	101	101
#13_C220A	56	97	81
#14_WT	32	100	94
#14_C220A	40	89	88
22F6_WT	62	80	92
22F6_C220A	32	65	64
23D4_WT	28	83	85
23D4_C220A	44	96	92

【0072】

この結果、クローン (#1_WT)、クローン (#4_WT)、クローン (#7_WT)、及びクローン (22F6_C220A) の 4 つのクローンが、A549 細胞に 40～50% 程度の細胞傷害性を示した。その他のクローンについては、A549 細胞に対してがん細胞障害性は殆ど認められなかった。

当該 4 クローンのうち、クローン (#4_WT) 及びクローン (#7_WT) は特に強い細胞傷害性を示した。中でもクローン (#7_WT) は、ヒト抗体 κ 型軽鎖添加前 (0 時間) とヒト抗体 κ 型軽鎖添加後 (48 時間) において、ウェル内の細胞数がほとんど変化しなかったことから、クローン (#7_WT)、すなわちヒト抗体 κ 型軽鎖 (#7) は、A549 細胞の増殖を抑制する効果があることが示唆された。

また、今回用いたクローンの結果から、二量体（WT）のほうが単量体よりも細胞傷害性が高い傾向が観察されたことから、二量体に強い細胞傷害性が存在することも示唆された。

また、他のクローンを含めたものについても、各種細胞株に対し、上記と同様にヒト抗体κ型軽鎖の細胞障害性を評価した。その結果を表3に示す。

【0073】

【表3】

細胞の種類	クローン名	細胞生存率(%)	
		添加後24時間	添加後48時間
A549	#1 H31Y C220A	72	53
	#7 VL(I)	77	82
	#7 RLI	74	90
	C51	78	87
	C87	75	65
MOLT-4	#1 H31Y C220A	57.1	60.2
	#4 wt	73.8	90.6
	#7 EI	87	80.2
	#7 TR	93.2	74.1
	#7 RLI	55	73
	#7 VL	77.3	84.2
	S13	75.3	108
	S21	78.2	91.3
	S38	77.3	85.5
	C51	59.4	63
ES-2	#1 H31Y C220A	59.9	72.7
	#4	83.9	93.3
	#7 wt	98.3	98.6
	#7 RLI	100	94.8
	#10	79.9	92.4
	#11	57	78.8
	22F6	63.1	89
	22F6 C220A	53.2	67.4
	C51	71.2	70.7
	C67	69.7	76.1
	C82	62.2	72.7
	C88	78.1	76.6
BxPC	#4	58	63.3
	#7 G	88.3	71.9
	#7 EI	80.5	69.9
	#7 RLI	87.9	77.3
	#7 VL	77.7	75.9
	#13	120.4	67.6
	#14	116.6	69.3
	22F6	115.2	65.5
B-16	#7 wt	85	92

【0074】

この結果、クローン（#1_H31Y_C220A）が、A549細胞、MOLT-4細胞、ES-2細胞に対し高い細胞傷害性を示した。また、クローン（#7_RLI）、クローン（C51）が、MOLT-4細胞に対し高い細胞傷害性を示した。さらに、クローン（#4）が、ES-2細胞に対し高い細胞傷害性を示した。

なお、クローン（#1_H31Y_C220A）のアミノ酸配列は配列番号38に、クローン（#7_VL(I)）のアミノ酸配列は配列番号39に、クローン（#7_RLI

）のアミノ酸配列は配列番号４０に、クローン（Ｃ５１）のアミノ酸配列は配列番号４１に、クローン（Ｃ８７）のアミノ酸配列は配列番号４２に、クローン（＃７　ＥＩ）のアミノ酸配列は配列番号４３に、クローン（＃７　ＴＲ）のアミノ酸配列は配列番号４４に、クローン（＃７　ＶＬ）のアミノ酸配列は配列番号４５に、クローン（Ｓ１３）のアミノ酸配列は配列番号４６に、クローン（Ｓ２１）のアミノ酸配列は配列番号４７に、クローン（Ｓ３８）のアミノ酸配列は配列番号４８に、クローン（＃１０）のアミノ酸配列は配列番号４９に、クローン（Ｃ６７）のアミノ酸配列は配列番号５０に、クローン（Ｃ８２）のアミノ酸配列は配列番号５１に、クローン（Ｃ８８）のアミノ酸配列は配列番号５２に、クローン（＃７　Ｇ）のアミノ酸配列は配列番号５３に、それぞれ記載されている。

また、図7、図8に示す通り、本願のヒト抗体κ型軽鎖を含有する抗がん剤は、動物実験において毒性を全く示さなかった。

【産業上の利用可能性】

【 0 0 7 5 】

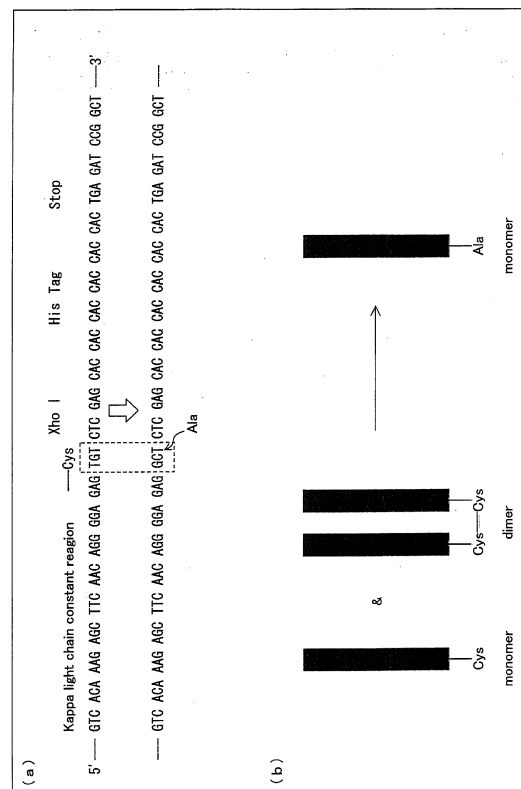
本発明は、新規抗がん剤の開発、がん治療の分野において利用可能である。

10

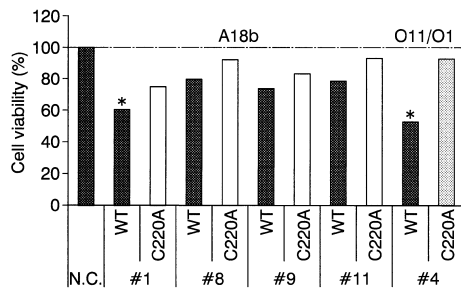
【図 1】

[illegible]

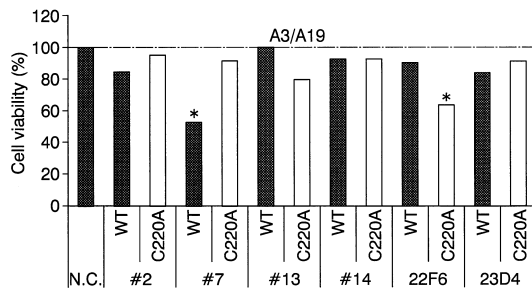
【図 2】



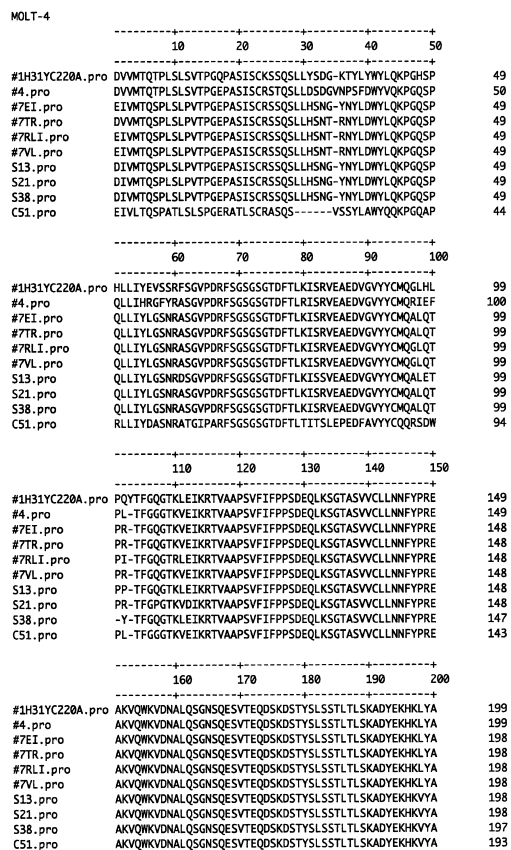
【図 4】



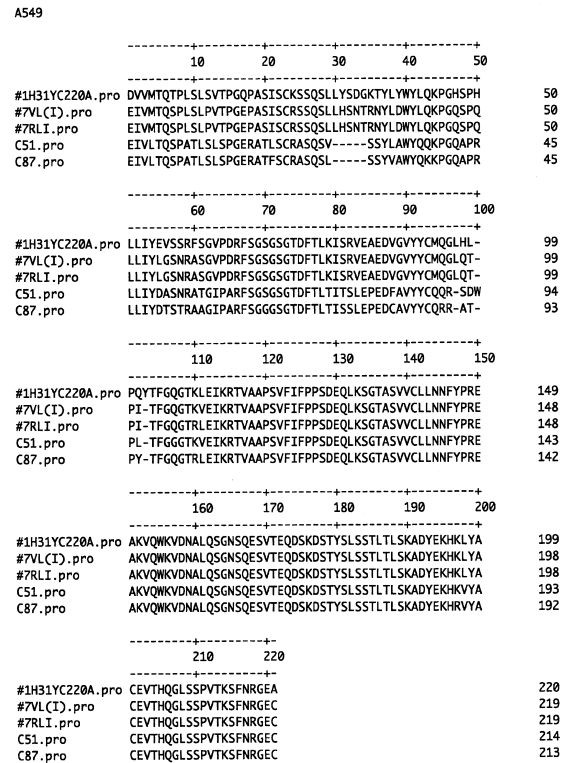
【図 5】



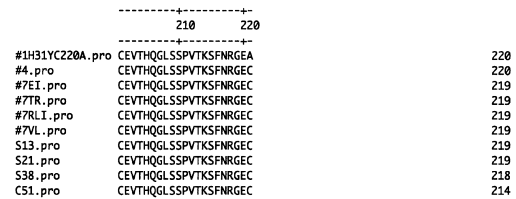
【図 6 B】



【図 6 A】



【図 6 C】



【図 6 D】

ES-2

		10	20	30	40	50
#1H31YC220A.pro	DVMTQTPLSLSVTPGEPASISCRSSQSLLSYDG-KT-YLWYQLKPGHS					
#4.pro	DVMTQTPLSLSVTPGEPASISCRSTQSLLDSDGVNP-SFDWYVQKPGQS					
#7.pro	DVMTQSPSLSPVTPGEPASISCRSSQSLLSHNG-YN-YLDWYLKPGQS					
#7RLI.pro	EIVMTQSPSLSPVTPGEPASISCRSSQSLLSHNT-RN-YLDWYLKPGQS					
#10.pro	DVMTQTPLSLSVTPGEPASISCRSSQSLLSYDG-KT-YFYWYLQRPGRS					
#11.pro	DVMTQTPLSLSVTPGEPASISCRSSQSLLSYDG-KT-YLWYQLKPGQS					
22F6.pro	DVMTQSPSLSPVTPGEPASISCRSSQSLLSHNG-FN-YLDWYLKPGQS					
22F6C220A.pro	DVMTQSPSLSPVTPGEPASISCRSSQSLLSHNG-FN-YLDWYLKPGQS					
C51.pro	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQS-----VSS-YLAWYQKPGQA					
C67.pro	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQS-----VSSNLAWYQKPGQA					
C82.pro	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQS-----VGP-FLAWYQKPGQA					
C88.pro	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASES-----VSG-YLAWYQKPGQA					

		60	70	80	90	100
#1H31YC220A.pro	PHLLIYEVSSRFSGVDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDGVYYCMQ--G					
#4.pro	PQLLIHRGFYRASGVDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDGVYYCMQ--R					
#7.pro	PQLLIYLGSNRASGVDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDGVYYCMQ--A					
#7RLI.pro	PQLLIYLGSNRASGVDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDGVYYCMQ--G					
#10.pro	PQLLIQEVSSRFSGVDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDGVYYCMQ--G					
#11.pro	PQLLIYEVSSRFSGVDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDGVYYCMQ--G					
22F6.pro	PQLLIYLGSTRASGVDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDGVYFCMQ--A					
22F6C220A.pro	PQLLIYLGSTRASGVDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDGVYFCMQ--A					
C51.pro	PRLLIYDASNRTGIPARFSGSGGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQ--R					
C67.pro	PRLLIYGASSRATGIPARFSGSGGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQYQS					
C82.pro	PRLLIYDTSRATGIPARFSGSGGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQ--R					
C88.pro	PRLLIYEASNRTGIPARFSGSGGPDFTLTISLEPEDFAVYYCQ--R					

【図 6 F】

		210	220
#1H31YC220A.pro	KHKLYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEEA		
#4.pro	KHKLYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC		
#7.pro	KHKLYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC		
#7RLI.pro	KHKLYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC		
#10.pro	KHKLYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC		
#11.pro	KHKLYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC		
22F6.pro	KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC		
22F6C220A.pro	KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEEA		
C51.pro	KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC		
C67.pro	KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC		
C82.pro	KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC		
C88.pro	KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC		

【図 6 E】

		110	120	130	140	150
#1H31YC220A.pro	LHLP----QYTFGGQTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLN					
#4.pro	IEFP----LTFGGGQTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLN					
#7.pro	LQTP----RTFGGQTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLN					
#7RLI.pro	LQTP----ITFGGQTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLN					
#10.pro	TYVP----HTFGGQTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLN					
#11.pro	IHLP----YTFGGQTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLN					
22F6.pro	VQTP----FTFGPGTRLDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLN					
22F6C220A.pro	VQTP----LTFGGQTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLN					
C51.pro	SDWP----LTFGGGQTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLN					
C67.pro	SLW-----TFGGGQTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLN					
C82.pro	YTNP--G-NSFGGGAKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLN					
C88.pro	SNMPPR--STFGGQTKRLEMKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLN					

		160	170	180	190	200
#1H31YC220A.pro	NFYPREAKVQMKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYE					
#4.pro	NFYPREAKVQMKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYE					
#7.pro	NFYPREAKVQMKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYE					
#7RLI.pro	NFYPREAKVQMKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYE					
#10.pro	NFYPREAKVQMKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYE					
#11.pro	NFYPREAKVQMKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYE					
22F6.pro	NFYPREAKVQMKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYE					
22F6C220A.pro	NFYPREAKVQMKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYE					
C51.pro	NFYPREAKVQMKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYE					
C67.pro	NFYPREAKVQMKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYE					
C82.pro	NFYPREAKVQMKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYE					
C88.pro	NFYPREAKVQMKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYE					

【図 6 G】

BxPC-3

		10	20	30	40	50
#4.pro	DVMTQTPLSLSVTPGEPASISCRSTQSLLDSDGVNPSFDWYVQKPGQSP					50
#7G.pro	DVMTQSPSLSPVTPGEPASISCRSSQSLLSHNGYN-YLDWYLKPGQSP					49
#7EI.pro	EIVMTQSPSLSPVTPGEPASISCRSSQSLLSHNGYN-YLDWYLKPGQSP					49
#7RLI.pro	EIVMTQSPSLSPVTPGEPASISCRSSQSLLSHNTNRN-YLDWYLKPGQSP					49
#7VL.pro	EIVMTQSPSLSPVTPGEPASISCRSSQSLLSHNTNRN-YLDWYLKPGQSP					49
#13.pro	DVMTQSPSLSPVTPGEPASISCRSSQSLLSHNGYN-YLDWYLKPGQSP					49
#14.pro	DVMTQSPSLSPVTPGEPASISCRSSQSLLSHNGYN-YLDWYLKPGQSP					49
22F6.pro	DVMTQSPSLSPVTPGEPASISCRSSQSLLSHNGFN-YLDWYLKPGQSP					49

		60	70	80	90	100
#4.pro	QLLIHRGFYRASGVDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDGVYYCMQRIEF					100
#7G.pro	QLLIYLGSNRASGVDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDGVYYCMQGLQT					99
#7EI.pro	QLLIYLGSNRASGVDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDGVYYCMQALQT					99
#7RLI.pro	QLLIYLGSNRASGVDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDGVYYCMQGLQT					99
#7VL.pro	QLLIYLGSNRASGVDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDGVYYCMQGLQT					99
#13.pro	QLLIYLGSNRASGVDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDGVYYCMQALQT					99
#14.pro	QLLIYLGSNRASGVDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDGVYYCMQALQT					99
22F6.pro	QLLIYLGSTRASGVDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDGVYFCMQAVQT					99

		110	120	130	140	150
#4.pro	PL-TFGGQTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPRE					149
#7G.pro	PR-TFGGQTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPRE					148
#7EI.pro	PR-TFGGQTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPRE					148
#7RLI.pro	PI-TFGGQTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPRE					148
#7VL.pro	PR-TFGGQTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPRE					148
#13.pro	PPWTFGGQTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPRE					149
#14.pro	PR-TFGGQTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPRE					148
22F6.pro	PF-TFGPGTRLDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPRE					148

		160	170	180	190	200
#4.pro	AKVQMKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKLYA					199
#7G.pro	AKVQMKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKLYA					198
#7EI.pro	AKVQMKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKLYA					198
#7RLI.pro	AKVQMKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKLYA					198
#7VL.pro	AKVQMKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKLYA					198
#13.pro	AKVQMKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKLYA					199
#14.pro	AKVQMKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKLYA					198
22F6.pro	AKVQMKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKLYA					198

【図 6 H】

	-----+-----+-----	
	210 220	
	-----+-----+-----	
#4.pro	CEVTHQGLSSPVTKSFNRRGEC	220
#7c.pro	CEVTHQGLSSPVTKSFNRRGEC	219
#7E1.pro	CEVTHQGLSSPVTKSFNRRGEC	219
#7RI1.pro	CEVTHQGLSSPVTKSFNRRGEC	219
#7VL.pro	CEVTHQGLSSPVTKSFNRRGEC	219
#13.pro	CEVTHQGLSSPVTKSFNRRGEC	220
#14.pro	CEVTHQGLSSPVTKSFNRRGEC	219
Z2F6.pro	CEVTHQGLSSPVTKSFNRRGEC	219

【図 6 I】

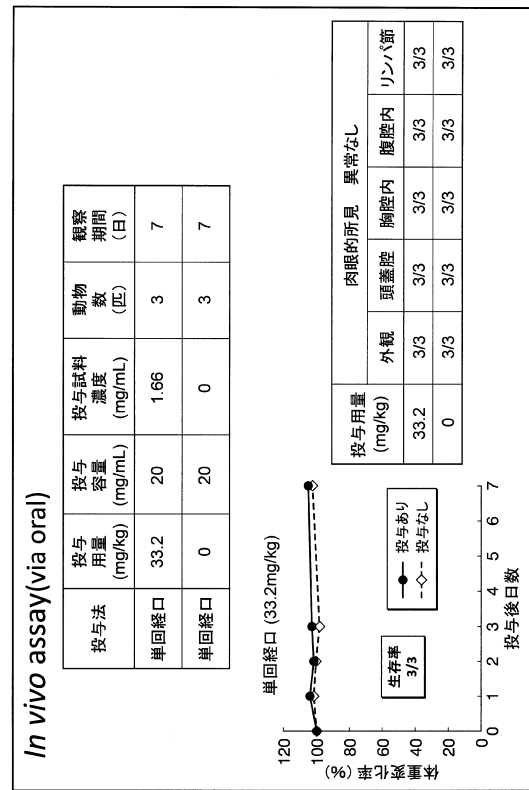
B-16

```

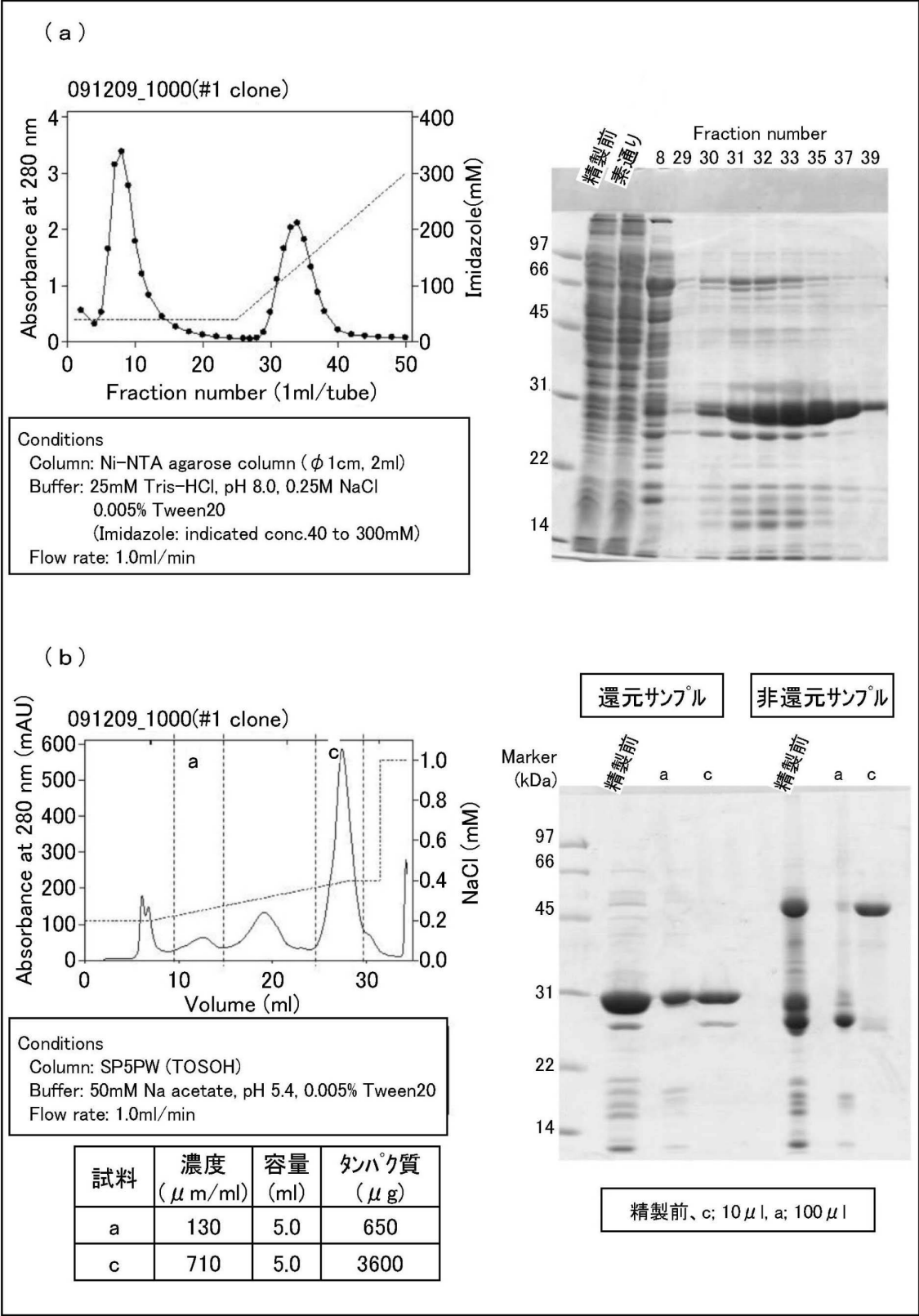
+-----+
+       +       +       +       +
+   10   20   30   40   50
+-----+
#7.pro  DVVMTQSPFLSPVTPGEPASISCRSSQSLHNSNGYNYLDWYLQKPGQSPQ
+-----+
+       +       +       +       +
+   60   70   80   90  100
+-----+
#7.pro  LLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTP
+-----+
+       +       +       +       +
+  110  120  130  140  150
+-----+
#7.pro  RTFGQGTQKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK
+-----+
+       +       +       +       +
+  160  170  180  190  200
+-----+
#7.pro  VQWIKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKLYACE
+-----+
+       +
+   210
+-----+
#7.pro  VTHQGLSSPVTKSFNRGEC

```

【図 7】



【図 3】

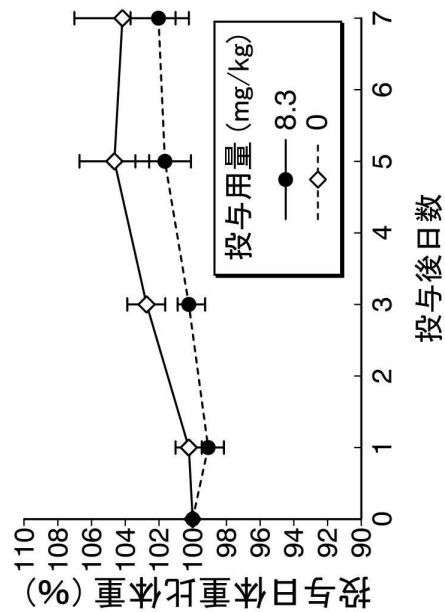


ヒト型「スーパー抗体酵素」の安全性試験(毒性試験)

- 1, 単回経口投与試験(観察期間7日間)
- 2, 単回腹腔内投与急性毒性試験(観察期間7日間)
- 3, 単回尾静脈内投与急性毒性試験(観察期間7日間)
- 4, 7日間反復投与毒性試験
- 5, 単回静脈内投与毒性試験(観察期間28日間)

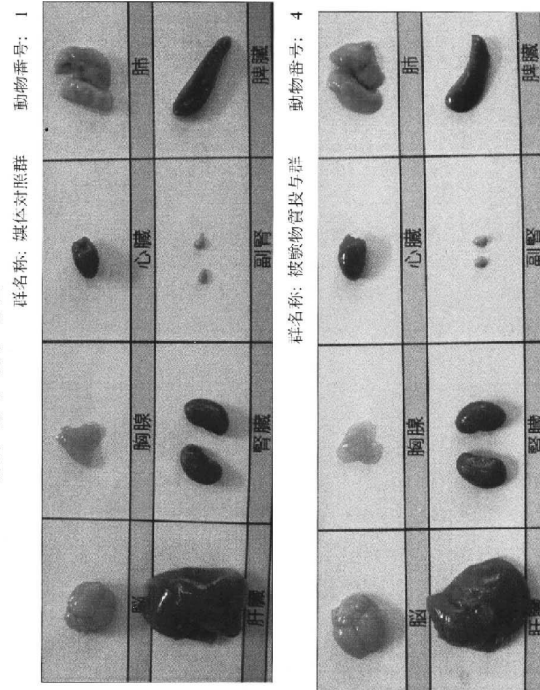
全てにおいて異常なし

体重変化



7日間反復投与毒性試験(尾静脈)の
マウスの体重変化

剖検所見



7日間反復投与毒性試験(尾静脈)時の
マウスの剖検所見

フロントページの続き

合議体

審判長 田村 明照

審判官 大宅 郁治

審判官 新留 素子

(56)参考文献 特表2011-521647 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K38/00-45/08

CA、Biosis、Medline、Embase (STN)、JSTplus、JMEDplus、JST7580