

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7774293号
(P7774293)

(45)発行日 令和7年11月21日(2025. 11. 21)

(24)登録日 令和7年11月13日(2025. 11. 13)

(51)Int. Cl.	F I
C 1 2 P 21/08 (2006. 01)	C 1 2 P 21/08
C 0 7 K 16/00 (2006. 01)	C 0 7 K 16/00 Z N A
C 1 2 N 15/13 (2006. 01)	C 1 2 N 15/13

請求項の数 6 (全 36 頁)

(21)出願番号	特願2021-534071(P2021-534071)	(73)特許権者	503360115
(86)(22)出願日	令和2年7月22日(2020. 7. 22)		国立研究開発法人科学技術振興機構
(86)国際出願番号	PCT/JP2020/028435		埼玉県川口市本町四丁目1番8号
(87)国際公開番号	W02021/015237	(74)代理人	100149548
(87)国際公開日	令和3年1月28日(2021. 1. 28)		弁理士 松沼 泰史
審査請求日	令和5年4月14日(2023. 4. 14)	(74)代理人	100163496
(31)優先権主張番号	特願2019-136403(P2019-136403)		弁理士 荒 則彦
(32)優先日	令和1年7月24日(2019. 7. 24)	(74)代理人	100161207
(33)優先権主張国・地域又は機関	日本国(JP)		弁理士 西澤 和純
		(74)代理人	100147267
			弁理士 大槻 真紀子
		(72)発明者	宇田 泰三
			大分県大分市城崎町1-3-23 第6阜
			月マンション1003
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】抗体酵素の革新的製造技術

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

酵素活性を有する又は酵素活性が向上した抗体 型軽鎖の製造方法であって、
可変領域が、カバット分類で可変領域のN末端から95番目のアミノ酸残基が、プロリン残基であるアミノ酸配列からなるポリペプチドである抗体 型軽鎖をコードするポリヌクレオチドについて、前記プロリン残基が欠失又は置換するように改変して、可変領域が、カバット分類で可変領域のN末端から95番目のアミノ酸残基が、欠失している又はプロリン残基以外のアミノ酸残基であるアミノ酸配列からなるポリペプチドである抗体 型軽鎖をコードするポリヌクレオチドを得る改変工程と、

前記改変工程後の抗体 型軽鎖をコードするポリヌクレオチドを含む発現用ベクターを用いて、細胞内又は細胞外発現系によって、酵素活性を有する抗体 型軽鎖を発現させる発現工程と、
を含み、

前記酵素活性を有する又は酵素活性が向上した抗体 型軽鎖の可変領域が以下の(1a)、(1c)、(2a)、(2c)、(3a)、及び(3c)からなる群より選択されるポリペプチドであり、

前記酵素活性を有する又は酵素活性が向上した抗体 型軽鎖の可変領域が以下の(1a)、(1c)、(2a)、又は(2c)のポリペプチドである場合、前記酵素活性がA分解活性であり、

前記酵素活性を有する又は酵素活性が向上した抗体 型軽鎖の可変領域が以下の(3a

）又は（３ｃ）のポリペプチドである場合、前記酵素活性がＰＤ－１分解活性である、製造方法。

（１ａ）配列番号１で表されるアミノ酸配列中のカバット分類で可変領域のＮ末端から９５番目のプロリン残基が欠失又は置換されているアミノ酸配列からなるポリペプチド；

（１ｃ）前記（１ａ）のポリペプチドのアミノ酸配列のうち、第２４～３９番目、第５５～６１番目、及び第９４～１０２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、前記（１ａ）のポリペプチドのアミノ酸配列と９０％以上の同一性を有し、且つカバット分類で可変領域のＮ末端から９５番目のアミノ酸残基が、欠失している又はプロリン残基以外のアミノ酸残基であるアミノ酸配列からなるポリペプチド；

（２ａ）配列番号２で表されるアミノ酸配列中のカバット分類で可変領域のＮ末端から９５番目のプロリン残基が欠失又は置換されているアミノ酸配列からなるポリペプチド；

（２ｃ）前記（２ａ）のポリペプチドのアミノ酸配列のうち、第２４～３９番目、第５５～６１番目、及び第９４～１０２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、前記（２ａ）のポリペプチドのアミノ酸配列と９０％以上の同一性を有し、且つカバット分類で可変領域のＮ末端から９５番目のアミノ酸残基が、欠失している又はプロリン残基以外のアミノ酸残基であるアミノ酸配列からなるポリペプチド；

（３ａ）配列番号３で表されるアミノ酸配列中のカバット分類で可変領域のＮ末端から９５番目のプロリン残基が欠失又は置換されているアミノ酸配列からなるポリペプチド；

（３ｃ）前記（３ａ）のポリペプチドのアミノ酸配列のうち、第２４～３９番目、第５５～６１番目、及び第９４～１０３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、前記（３ａ）のポリペプチドのアミノ酸配列と９０％以上の同一性を有し、且つカバット分類で可変領域のＮ末端から９５番目のアミノ酸残基が、欠失している又はプロリン残基以外のアミノ酸残基であるアミノ酸配列からなるポリペプチド

【請求項２】

酵素活性を有する又は酵素活性が向上した抗体 型軽鎖の製造方法であって、

可変領域が、カバット分類で可変領域のＮ末端から９５番目のアミノ酸残基が、プロリン残基であるアミノ酸配列からなるポリペプチドである抗体 型軽鎖をコードするポリヌクレオチドについて、前記プロリン残基が欠失又は置換するように改変して、可変領域が、カバット分類で可変領域のＮ末端から９５番目のアミノ酸残基が、欠失している又はプロリン残基以外のアミノ酸残基であるアミノ酸配列からなるポリペプチドである抗体 型軽鎖をコードするポリヌクレオチドを得る改変工程と、

前記改変工程後の抗体 型軽鎖をコードするポリヌクレオチドを含む発現用ベクターを用いて、細胞内又は細胞外発現系によって、酵素活性を有する抗体 型軽鎖を発現させる発現工程と、

を含み、

前記酵素活性を有する又は酵素活性が向上した抗体 型軽鎖の可変領域が以下の（４ａ）、（４ｃ）、（５ａ）、（５ｃ）、（６ａ）、（６ｃ）、（７ａ）、及び（７ｃ）からなる群より選択されるポリペプチドであり、

前記酵素活性を有する又は酵素活性が向上した抗体 型軽鎖の可変領域が以下の（４ａ）、（４ｃ）、（５ａ）、（５ｃ）、（６ａ）、又は（６ｃ）のポリペプチドである場合、前記酵素活性がＡ 分解活性であり、

前記酵素活性を有する又は酵素活性が向上した抗体 型軽鎖の可変領域が以下の（７ａ）又は（７ｃ）のポリペプチドである場合、前記酵素活性がＰＤ－１分解活性である、製造方法。

（４ａ）配列番号４で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド；

（４ｃ）配列番号４で表されるアミノ酸配列のうち、第２４～３９番目、第５５～６１番目、及び第９４～１０４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

10

20

30

40

50

くは欠失しており、配列番号4で表されるアミノ酸配列と90%以上の同一性を有し、且つカバット分類で可変領域のN末端から95番目のアミノ酸残基が、欠失している又はプロリン残基以外のアミノ酸残基であるアミノ酸配列からなるポリペプチド；

(5a) 配列番号5で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド；

(5c) 配列番号5で表されるアミノ酸配列のうち、第24～39番目、第55～61番目、及び第94～103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、配列番号5で表されるアミノ酸配列と90%以上の同一性を有し、且つカバット分類で可変領域のN末端から95番目のアミノ酸残基が、欠失している又はプロリン残基以外のアミノ酸残基であるアミノ酸配列からなるポリペプチド；

(6a) 配列番号6で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド；

(6c) 配列番号6で表されるアミノ酸配列のうち、第24～39番目、第55～61番目、及び第94～103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、配列番号6で表されるアミノ酸配列と90%以上の同一性を有し、且つカバット分類で可変領域のN末端から95番目のアミノ酸残基が、欠失している又はプロリン残基以外のアミノ酸残基であるアミノ酸配列からなるポリペプチド；

(7a) 配列番号7で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド；

(7c) 配列番号7で表される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、配列番号7で表されるアミノ酸配列と90%以上の同一性を有し、且つカバット分類で可変領域のN末端から95番目のアミノ酸残基が、欠失している又はプロリン残基以外のアミノ酸残基であるアミノ酸配列からなるポリペプチド

【請求項3】

酵素活性を有する又は酵素活性が向上した抗体 型軽鎖の製造方法であって、

可変領域が、カバット分類で可変領域のN末端から95番目のアミノ酸残基が、プロリン残基であるアミノ酸配列からなるポリペプチドである抗体 型軽鎖をコードするポリヌクレオチドについて、前記プロリン残基が欠失又は置換するように改変して、可変領域が、カバット分類で可変領域のN末端から95番目のアミノ酸残基が、欠失している又はプロリン残基以外のアミノ酸残基であるアミノ酸配列からなるポリペプチドである抗体 型軽鎖をコードするポリヌクレオチドを得る改変工程と、

前記改変工程後の抗体 型軽鎖をコードするポリヌクレオチドを含む発現用ベクターを用いて、細胞内又は細胞外発現系によって、酵素活性を有する抗体 型軽鎖を発現させる発現工程と、
を含み、

前記酵素活性が、トリプシン様補酵素活性であり、

前記酵素活性を有する又は酵素活性が向上した抗体 型軽鎖の可変領域が以下の(8a)及び(8c)からなる群より選択されるポリペプチドである、請求項1に記載の製造方法。

(8a) 配列番号8で表されるアミノ酸配列中のカバット分類で可変領域のN末端から95番目のプロリン残基が欠失又は置換されているアミノ酸配列からなるポリペプチド；

(8c) 前記(8a)のポリペプチドのアミノ酸配列のうち、第21～39番目、第55～61番目、及び第94～102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、前記(8a)のポリペプチドのアミノ酸配列と90%以上の同一性を有し、且つカバット分類で可変領域のN末端から95番目のアミノ酸残基が、欠失している又はプロリン残基以外のアミノ酸残基であるアミノ酸配列からなるポリペプチド

【請求項4】

酵素活性を有する又は酵素活性が向上した抗体 型軽鎖の製造方法であって、

可変領域が、カバット分類で可変領域のN末端から95番目のアミノ酸残基が、プロリン残基であるアミノ酸配列からなるポリペプチドである抗体 型軽鎖をコードするポリヌクレオチドについて、前記プロリン残基が欠失又は置換するように改変して、可変領域が

、カバット分類で可変領域のN末端から95番目のアミノ酸残基が、欠失している又はプロリン残基以外のアミノ酸残基であるアミノ酸配列からなるポリペプチドである抗体型軽鎖をコードするポリヌクレオチドを得る改変工程と、

前記改変工程後の抗体型軽鎖をコードするポリヌクレオチドを含む発現用ベクターを用いて、細胞内又は細胞外発現系によって、酵素活性を有する抗体型軽鎖を発現させる発現工程と、

を含み、

前記酵素活性が、トリプシン様補酵素活性であり、

前記酵素活性を有する又は酵素活性が向上した抗体型軽鎖の可変領域が以下の(9a)及び(9c)からなる群より選択されるポリペプチドである、製造方法。

(9a) 配列番号9で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド；

(9c) 配列番号9で表されるアミノ酸配列のうち、第21～39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、配列番号9で表されるアミノ酸配列と90%以上の同一性を有し、且つかバット分類で可変領域のN末端から95番目のアミノ酸残基が、欠失している又はプロリン残基以外のアミノ酸残基であるアミノ酸配列からなるポリペプチド

【請求項5】

前記抗体型軽鎖が、ヒト型又はマウス型である、請求項1～4のいずれか一項に記載の製造方法。

【請求項6】

可変領域が以下の(6a)及び(6c)からなる群より選択されるポリペプチドである、抗体型軽鎖。

(6a) 配列番号6で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド；

(6c) 配列番号6で表されるアミノ酸配列のうち、第24～39番目、第55～61番目、及び第94～103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、配列番号6で表されるアミノ酸配列と90%以上の同一性を有し、且つかバット分類で可変領域のN末端から95番目のアミノ酸残基が、欠失している又はプロリン残基以外のアミノ酸残基であるアミノ酸配列からなり、 A分解活性を有するポリペプチド

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、抗体酵素の革新的製造技術に関する。具体的には、抗体型軽鎖に酵素活性を付与する又は抗体型軽鎖の酵素活性を向上させる製造方法に関する。本願は、2019年7月24日に、日本に出願された特願2019-136403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)及び軽鎖(L鎖: Light chain)から構成されている。重鎖及び軽鎖は、可変領域(VR: Variable Region)及び定常領域(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、 型及び 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。特に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。

【 0 0 0 4 】

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 ～ 4 等参照）。

【 0 0 0 5 】

抗体酵素を医薬品として臨床上使用するためには、十分な活性を有する抗体酵素を安定して量産可能であることが重要である。しかしながら、多くの抗体酵素は、酵素活性が不十分であり、また、遺伝子組換え技術を用いて細胞内又は細胞外発現系によって人工的に合成した場合、性能が安定せず、ロット間の差が大きいという問題がある。

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 0 6 】

【 特許文献 1 】 日本国特開 2 0 0 6 - 1 9 7 9 3 0 号公報

【 特許文献 2 】 国際公開第 2 0 1 1 / 1 0 2 5 1 7 号

【 特許文献 3 】 国際公開第 2 0 1 3 / 1 3 3 2 5 3 号

【 特許文献 4 】 国際公開第 2 0 1 5 / 0 2 5 7 8 6 号

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 7 】

本発明は、より高酵素活性な抗体軽鎖からなる抗体酵素の製造方法、及び保存安定性に優れる当該抗体酵素を安定的に製造する方法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 】

【 0 0 0 8 】

発明者らは、抗体 軽鎖のアミノ酸配列中の、カバット分類で可変領域の N 末端から 9 5 番目のプロリン残基を欠失又は置換させることにより、酵素活性がより高い型抗体軽鎖が得られることを見出し、本発明を完成するに至った。また、本発明者らは、抗体軽鎖の製造時の精製工程において、抗体軽鎖を、第 1 0 族元素、第 1 1 族元素、及び第 1 2 族元素からなる群より選択される 1 種以上の金属イオンとインキュベートした後、当該金属イオンを除去することにより、より高活性な抗体軽鎖を含有する組成物を安定的に得られることを見出し、発明を完成させた。

【 0 0 0 9 】

すなわち、本発明に係る抗体 型軽鎖及びその製造方法は、下記〔 1 〕～〔 1 2 〕である。

〔 1 〕 酵素活性を有する又は酵素活性が向上した抗体 型軽鎖の製造方法であって、

可変領域が、カバット分類で可変領域の N 末端から 9 5 番目のアミノ酸残基が、プロリン残基であるアミノ酸配列からなるポリペプチドである抗体 型軽鎖をコードするポリヌクレオチドについて、前記プロリン残基が欠失又は置換するように改変して、可変領域が、カバット分類で可変領域の N 末端から 9 5 番目のアミノ酸残基が、欠失している又はプロリン残基以外のアミノ酸残基であるアミノ酸配列からなるポリペプチドである抗体 型軽鎖をコードするポリヌクレオチドを得る改変工程と、

前記改変工程後の抗体 型軽鎖をコードするポリヌクレオチドを含む発現用ベクターを用いて、細胞内又は細胞外発現系によって、酵素活性を有する抗体 型軽鎖を発現させる発現工程と、
を含む、製造方法。

〔 2 〕 前記抗体 型軽鎖が、ヒト型又はマウス型である、〔 1 〕に記載の製造方法。

〔 3 〕 前記酵素活性を有する又は酵素活性が向上した抗体 型軽鎖の可変領域が以下の（ 1 a ）～（ 3 c ）からなる群より選択されるポリペプチドである、〔 1 〕又は〔 2 〕に記載の製造方法。

（ 1 a ）配列番号 1 で表されるアミノ酸配列中のカバット分類で N 末端から 9 5 番目のプロリン残基が欠失又は置換されているアミノ酸配列からなるポリペプチド；

（ 1 b ）前記（ 1 a ）のポリペプチドのアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸

10

20

30

40

50

が置換、付加若しくは欠失し、且つカバット分類で可変領域のN末端から95番目のアミノ酸残基が、欠失している又はプロリン残基以外のアミノ酸残基であるアミノ酸配列からなるポリペプチド；

(1c) 前記(1a)のポリペプチドのアミノ酸配列と90%以上の同一性を有し、且つカバット分類で可変領域のN末端から95番目のアミノ酸残基が、欠失している又はプロリン残基以外のアミノ酸残基であるアミノ酸配列からなるポリペプチド；

(2a) 配列番号2で表されるアミノ酸配列中のカバット分類でN末端から95番目のプロリン残基が欠失又は置換されているアミノ酸配列；

(2b) 前記(2a)のポリペプチド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、且つカバット分類で可変領域のN末端から95番目のアミノ酸残基が、欠失している又はプロリン残基以外のアミノ酸残基であるアミノ酸配列からなるポリペプチド；

10

(2c) 前記(2a)のポリペプチドのアミノ酸配列と90%以上の同一性を有し、且つカバット分類で可変領域のN末端から95番目のアミノ酸残基が、欠失している又はプロリン残基以外のアミノ酸残基であるアミノ酸配列からなるポリペプチド；

(3a) 配列番号3で表されるアミノ酸配列中のカバット分類でN末端から95番目のプロリン残基が欠失又は置換されているアミノ酸配列；

(3b) 前記(3a)のポリペプチド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、且つカバット分類で可変領域のN末端から95番目のアミノ酸残基が、欠失している又はプロリン残基以外のアミノ酸残基であるアミノ酸配列からなるポリペプチド；

20

(3c) 前記(3a)のポリペプチドのアミノ酸配列と90%以上の同一性を有し、且つカバット分類で可変領域のN末端から95番目のアミノ酸残基が、欠失している又はプロリン残基以外のアミノ酸残基であるアミノ酸配列からなるポリペプチド

[4] 前記酵素活性を有する又は酵素活性が向上した抗体 型軽鎖の可変領域が以下の(4a)～(7c)からなる群より選択されるポリペプチドである、[1]～[3]のいずれか一つに記載の製造方法。

(4a) 配列番号4で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド；

(4b) 配列番号4で表される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、且つカバット分類で可変領域のN末端から95番目のアミノ酸残基が、欠失している又はプロリン残基以外のアミノ酸残基であるアミノ酸配列からなるポリペプチド；

30

(4c) 配列番号4で表されるアミノ酸配列と90%以上の同一性を有し、且つカバット分類で可変領域のN末端から95番目のアミノ酸残基が、欠失している又はプロリン残基以外のアミノ酸残基であるアミノ酸配列からなるポリペプチド；

(5a) 配列番号5で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド；

(5b) 配列番号5で表される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、且つカバット分類で可変領域のN末端から95番目のアミノ酸残基が、欠失している又はプロリン残基以外のアミノ酸残基であるアミノ酸配列からなるポリペプチド；

40

(5c) 配列番号5で表されるアミノ酸配列と90%以上の同一性を有し、且つカバット分類で可変領域のN末端から95番目のアミノ酸残基が、欠失している又はプロリン残基以外のアミノ酸残基であるアミノ酸配列からなるポリペプチド；

(6a) 配列番号6で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド；

(6b) 配列番号6で表される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、且つカバット分類で可変領域のN末端から95番目のアミノ酸残基が、欠失している又はプロリン残基以外のアミノ酸残基であるアミノ酸配列からなるポリペプチド；

(6c) 配列番号6で表されるアミノ酸配列と90%以上の同一性を有し、且つカバット分類で可変領域のN末端から95番目のアミノ酸残基が、欠失している又はプロリン残基

50

以外のアミノ酸残基であるアミノ酸配列からなるポリペプチド；

(7a) 配列番号7で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド；

(7b) 配列番号7で表される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、且つカバット分類で可変領域のN末端から95番目のアミノ酸残基が、欠失している又はプロリン残基以外のアミノ酸残基であるアミノ酸配列からなるポリペプチド；

(7c) 配列番号7で表されるアミノ酸配列と90%以上の同一性を有し、且つカバット分類で可変領域のN末端から95番目のアミノ酸残基が、欠失している又はプロリン残基以外のアミノ酸残基であるアミノ酸配列からなるポリペプチド

[5] 前記酵素活性を有する又は酵素活性が向上した抗体 型軽鎖の可変領域が以下の(8a)～(8c)からなる群より選択されるポリペプチドである、[1]又は[2]に記載の製造方法。

(8a) 配列番号8で表されるアミノ酸配列中のカバット分類でN末端から95番目のプロリン残基が欠失又は置換されているアミノ酸配列；

(8b) 前記(8a)のポリペプチド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、且つカバット分類で可変領域のN末端から95番目のアミノ酸残基が、欠失している又はプロリン残基以外のアミノ酸残基であるアミノ酸配列からなるポリペプチド；

(8c) 前記(8a)のポリペプチドのアミノ酸配列と90%以上の同一性を有し、且つカバット分類で可変領域のN末端から95番目のアミノ酸残基が、欠失している又はプロリン残基以外のアミノ酸残基であるアミノ酸配列からなるポリペプチド

[6] 前記酵素活性を有する抗体 型軽鎖の可変領域が以下の(9a)～(9c)からなる群より選択されるポリペプチドである、[1]、[2]、[5]のいずれか一つに記載の製造方法。

(9a) 配列番号9で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド；

(9b) 配列番号9で表される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、且つカバット分類で可変領域のN末端から95番目のアミノ酸残基が、欠失している又はプロリン残基以外のアミノ酸残基であるアミノ酸配列からなるポリペプチド；

(9c) 配列番号9で表されるアミノ酸配列と90%以上の同一性を有し、且つカバット分類で可変領域のN末端から95番目のアミノ酸残基が、欠失している又はプロリン残基以外のアミノ酸残基であるアミノ酸配列からなるポリペプチド

[7] 抗体 型軽鎖をコードするポリヌクレオチドを含む発現用ベクターを用いて、細胞内又は細胞外発現系によって、前記抗体 型軽鎖を発現させる発現工程と、

前記発現工程で得られた発現産物から、第1の充填剤を含むカラムを用いたカラムクロマトグラフィー法により、前記抗体 型軽鎖を含む粗精製物を得る第1の精製工程と、

前記抗体 型軽鎖を含む粗精製物に金属イオンを添加し、前記抗体 型軽鎖と前記金属イオンとが結合した抗体 型軽鎖複合体を含む粗精製物を得る添加工程と、

前記添加工程後の前記抗体 型軽鎖複合体を含む粗精製物から、第2の充填剤を含むカラムを用いたカラムクロマトグラフィー法により、前記抗体 型軽鎖複合体の精製物を得る第2の精製工程と、

前記第2の精製工程後の前記抗体 型軽鎖複合体の精製物から前記金属イオンを除去して抗体 型軽鎖の精製物を得る除去工程と、

を含む抗体 型軽鎖の製造方法。

[8] 前記除去工程をキレート剤の添加により行う、[7]に記載の抗体 型軽鎖の製造方法。

[9] 前記金属イオンが銅イオン、ニッケルイオン、亜鉛イオン、金イオン、銀イオン、及び白金イオンからなる群より選択される1種以上である、[7]又は[8]に記載の抗体 型軽鎖の製造方法。

[10] 前記抗体 型軽鎖は、可変領域が、カバット分類で可変領域のN末端から95

10

20

30

40

50

番目のアミノ酸残基が、欠失している又はプロリン残基以外のアミノ酸残基であるアミノ酸配列からなるポリペプチドである、〔 7 〕 ~ 〔 9 〕 のいずれか一つに記載の抗体 型軽鎖の製造方法。

〔 1 1 〕 前記発現工程前に、可変領域が、カバット分類で N 末端から 9 5 番目のアミノ酸残基が、プロリン残基であるアミノ酸配列からなるポリペプチドである抗体 型軽鎖をコードするポリヌクレオチドについて、前記プロリン残基が欠失又は置換するように改変して、可変領域が、カバット分類で可変領域の N 末端から 9 5 番目のアミノ酸残基が、欠失している又はプロリン残基以外のアミノ酸残基であるアミノ酸配列からなるポリペプチドである抗体 型軽鎖をコードするポリヌクレオチドを得る改変工程を更に含む、〔 1 0 〕 に記載の抗体 型軽鎖の製造方法。

10

〔 1 2 〕 酵素活性を有さない抗体 型軽鎖に酵素活性を付与する、又は抗体 型軽鎖の酵素活性を向上させる方法であって、

前記酵素活性を有さない抗体 型軽鎖の可変領域が、カバット分類で可変領域の N 末端から 9 5 番目のアミノ酸残基がプロリン残基であるアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、

前記酵素活性を有さない抗体 型軽鎖をコードするポリヌクレオチドを、前記プロリン残基が欠失又は置換するように改変することを含む、方法。

〔 1 3 〕 可変領域が以下の (4 a) ~ (7 c) からなる群より選択されるポリペプチドである、抗体 型軽鎖。

(4 a) 配列番号 4 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド ;

20

(4 b) 配列番号 4 で表される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、且つカバット分類で可変領域の N 末端から 9 5 番目のアミノ酸残基が、欠失している又はプロリン残基以外のアミノ酸残基であるアミノ酸配列からなるポリペプチド ;

(4 c) 配列番号 4 で表されるアミノ酸配列と 9 0 % 以上の同一性を有し、且つカバット分類で可変領域の N 末端から 9 5 番目のアミノ酸残基が、欠失している又はプロリン残基以外のアミノ酸残基であるアミノ酸配列からなるポリペプチド ;

(5 a) 配列番号 5 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド ;

(5 b) 配列番号 5 で表される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、且つカバット分類で可変領域の N 末端から 9 5 番目のアミノ酸残基が、欠失している又はプロリン残基以外のアミノ酸残基であるアミノ酸配列からなるポリペプチド ;

30

(5 c) 配列番号 5 で表されるアミノ酸配列と 9 0 % 以上の同一性を有し、且つカバット分類で可変領域の N 末端から 9 5 番目のアミノ酸残基が、欠失している又はプロリン残基以外のアミノ酸残基であるアミノ酸配列からなるポリペプチド ;

(6 a) 配列番号 6 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド ;

(6 b) 配列番号 6 で表される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、且つカバット分類で可変領域の N 末端から 9 5 番目のアミノ酸残基が、欠失している又はプロリン残基以外のアミノ酸残基であるアミノ酸配列からなるポリペプチド ;

40

(6 c) 配列番号 6 で表されるアミノ酸配列と 9 0 % 以上の同一性を有し、且つカバット分類で可変領域の N 末端から 9 5 番目のアミノ酸残基が、欠失している又はプロリン残基以外のアミノ酸残基であるアミノ酸配列からなるポリペプチド ;

(7 a) 配列番号 7 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド ;

(7 b) 配列番号 7 で表される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、且つカバット分類で可変領域の N 末端から 9 5 番目のアミノ酸残基が、欠失している又はプロリン残基以外のアミノ酸残基であるアミノ酸配列からなるポリペプチド ;

(7 c) 配列番号 7 で表されるアミノ酸配列と 9 0 % 以上の同一性を有し、且つカバット分類で可変領域の N 末端から 9 5 番目のアミノ酸残基が、欠失している又はプロリン残基

50

以外のアミノ酸残基であるアミノ酸配列からなるポリペプチド

〔 1 4 〕 可変領域が以下の (9 a) ~ (9 c) からなる群より選択されるポリペプチドである、抗体 型軽鎖。

(9 a) 配列番号 9 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド ;

(9 b) 配列番号 9 で表される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、且つカバット分類で可変領域の N 末端から 9 5 番目のアミノ酸残基が、欠失している又はプロリン残基以外のアミノ酸残基であるアミノ酸配列からなるポリペプチド ;

(9 c) 配列番号 9 で表されるアミノ酸配列と 9 0 % 以上の同一性を有し、且つカバット分類で可変領域の N 末端から 9 5 番目のアミノ酸残基が、欠失している又はプロリン残基以外のアミノ酸残基であるアミノ酸配列からなるポリペプチド

10

【発明の効果】

【 0 0 1 0 】

本発明に係る製造方法により得られる抗体 型軽鎖は、従来の抗体 型軽鎖よりも酵素活性が高いものであり、広く臨床適用可能な医薬品として期待できる。

また、本発明に係る抗体 型軽鎖の製造方法により、高活性な抗体 型軽鎖を安定的に製造することができる。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 1 】

【図 1 A】実施例 1 におけるコントロールケース（銅イオン無添加）での陽イオン交換クロマトグラムである。

20

【図 1 B】図 1 A に示す陽イオン交換クロマトグラムの各ピークの SDS - PAGE（非還元）の結果を示した図である。

【図 2 A】実施例 1 におけるケース 1（一次精製後の銅イオン添加及び二次精製後の銅イオン除去）での陽イオン交換クロマトグラムである。

【図 2 B】図 2 A に示す陽イオン交換クロマトグラムのピークの SDS - PAGE（非還元）の結果を示した図である。

【図 2 C】実施例 1 におけるケース 1（一次精製後の銅イオン添加及び二次精製後の銅イオン除去）で精製されたヒト抗体 型軽鎖を 4 で 3 ヶ月間保存した後での陽イオン交換クロマトグラムである。

30

【図 3 A】比較例 1 におけるケース 2（一次精製後の銅イオン添加）で精製された直後、並びに、4 で 3 日間保存後及び 3 か月間保存後のヒト抗体 型軽鎖での陽イオン交換クロマトグラムである。

【図 3 B】図 3 A に示す陽イオン交換クロマトグラムの 4 で 3 か月間保存後のヒト抗体 型軽鎖の各ピークの SDS - PAGE（非還元）の結果を示した図である。

【図 4 A】実施例 2 におけるヒト抗体 型軽鎖（ S 3 5 ）、ヒト抗体 型軽鎖（ S 3 4 ）及びヒト抗体 型軽鎖（ S 3 8 ）の FRET - A ペプチドに対する分解活性の経時的な変化を示すグラフである。

【図 4 B】実施例 2 におけるヒト抗体 型軽鎖（ S 3 5 ）、ヒト抗体 型軽鎖（ S 3 4 ）及びヒト抗体 型軽鎖（ S 3 8 ）の可変領域のアミノ酸配列である。

40

【図 5 A】実施例 3 におけるヒト抗体 型軽鎖（ T 9 9 ）及びヒト抗体 型軽鎖（ T 9 9 P 9 5 ）の FRET - A ペプチドに対する分解活性の経時的な変化を示すグラフである。

【図 5 B】実施例 3 におけるヒト抗体 型軽鎖（ T 9 9 ）及びヒト抗体 型軽鎖（ T 9 9 P 9 5 ）の可変領域の立体構造を予測した図である。

【図 6 A】実施例 3 におけるヒト抗体 型軽鎖（ H 5 5 ）及びヒト抗体 型軽鎖（ H 3 4 ）の FRET - PD - 1 ペプチドに対する分解活性の経時的な変化を示すグラフである。

【図 6 B】実施例 3 におけるヒト抗体 型軽鎖（ H 5 5 ）及びヒト抗体 型軽鎖（ H 3 4 ）の可変領域のアミノ酸配列である。

【図 6 C】実施例 3 におけるヒト抗体 型軽鎖（ H 3 4 ）の FRET - A ペプチド、F

50

R E T - T a u ペプチド及び F R E T - P D - 1 ペプチドに対する分解活性の経時的な変化を示すグラフである。

【図 6 D】実施例 3 におけるヒト抗体 型軽鎖 (H 3 4) による P D - 1 ペプチドの分解試験後の溶液の高速液体クロマトグラムである。

【図 6 E】実施例 3 における組換えヒト P D - 1 及びヒト血清アルブミン (H S A) の分解試験後の各溶液の S D S - P A G E (非還元) の結果を示した図である。

【図 6 F】実施例 3 におけるヒト抗体 型軽鎖 (H 3 4) 及びヒト抗体 型軽鎖 (H 3 4 _ P 9 5 (+)) の F R E T - P D - 1 ペプチドに対する分解活性の経時的な変化を示すグラフである。

【図 7】実施例 4 におけるマウス抗体 型軽鎖 (I n f A - 1 5 L) 及びマウス抗体 型軽鎖 (I n f A - 1 5 L P 9 5) のトリブシン様 p - ニトロアニリン (R - p N A) に対する分解活性の経時的な変化を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 2 】

本発明及び本願明細書において、「抗体 型軽鎖」は、免疫グロブリンの 型の軽鎖 (Light chain) を指す。 型の抗体軽鎖の遺伝子は、生殖細胞遺伝子 (g e r m l i n e g e n e) に存在する V 遺伝子群、J 遺伝子群及び定常領域の遺伝子群から各遺伝子が選択されて再編成されることにより構築される。抗体 型軽鎖の由来としては、特別な限定はないが、哺乳動物由来であることが好ましく、ヒト由来又はマウス由来であることがより好ましい。

【 0 0 1 3 】

また、本発明及び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。

【 0 0 1 4 】

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又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又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。

【 0 0 1 5 】

抗体 型軽鎖の製造方法

[第 1 実施形態]

本発明の第 1 実施形態に係る抗体 型軽鎖の製造方法 (以下、「本発明の第 1 実施形態に係る製造方法」と略記する場合がある) は、酵素活性を有する又は酵素活性が向上した抗体 型軽鎖の製造方法であって、以下の工程をこの順に含む。

可変領域が、カバット分類で可変領域の N 末端から 9 5 番目のアミノ酸残基が、プロリン残基であるアミノ酸配列からなるポリペプチドである抗体 型軽鎖をコードするポリヌクレオチドについて、前記プロリン残基が欠失又は置換するように改変して、可変領域が、カバット分類で可変領域の N 末端から 9 5 番目のアミノ酸残基が、欠失している又はプロリン残基以外のアミノ酸残基であるアミノ酸配列からなるポリペプチドである抗体 型軽鎖をコードするポリヌクレオチドを得る改変工程；

前記改変工程後の抗体 型軽鎖をコードするポリヌクレオチドを含む発現用ベクターを用いて、細胞内又は細胞外発現系によって、酵素活性を有する抗体 型軽鎖を発現させる発現工程。

【 0 0 1 6 】

本発明の第 1 実施形態に係る製造方法によれば、従来の抗体 型軽鎖よりも酵素活性が高い抗体 型軽鎖が得られる。

次いで、本発明の第 1 実施形態に係る製造方法の各構成の詳細について、以下に説明する。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 7 】

< 改変工程 >

改変工程では、可変領域が、カバット分類で可変領域のN末端から95番目のアミノ酸残基が、プロリン残基であるアミノ酸配列からなるポリペプチドである抗体型軽鎖をコードするポリヌクレオチドについて、前記プロリン残基が欠失又は置換するように改変して、可変領域が、カバット分類で可変領域のN末端から95番目のアミノ酸残基が、欠失している又はプロリン残基以外のアミノ酸残基であるアミノ酸配列からなるポリペプチドである抗体型軽鎖をコードするポリヌクレオチドを得る。

本工程を行うことで、酵素活性を有さない抗体型軽鎖に酵素活性を付与する、或いは、低い活性しか示さない抗体型軽鎖の酵素活性を向上させることができる。すなわち、本工程は、「酵素活性を有さない抗体型軽鎖に酵素活性を付与する方法」又は「抗体型軽鎖の酵素活性を向上させる方法」ということもできる。

ここで、抗体型軽鎖の酵素活性を向上させるとは、改変前の抗体型軽鎖の酵素活性に対する、改変後の抗体型軽鎖の酵素活性が例えば10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%以上向上することを意味する。

【 0 0 1 8 】

前記プロリン残基が欠失又は置換するように改変する方法としては、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、可変領域のアミノ酸配列中のカバット分類で可変領域のN末端から95番目に存在するプロリン残基を容易に変異させる方法で行なうことができる。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又は置換変異体を作製することができる。

【 0 0 1 9 】

< 発現工程 >

発現工程では、改変工程後の抗体型軽鎖をコードするポリヌクレオチドを含む発現用ベクターを用いて、細胞内又は細胞外発現系等の当該技術分野で公知の発現系により抗体型軽鎖を発現させる。

【 0 0 2 0 】

組換え発現系を用いる場合、本発明に係る抗体型軽鎖をコードするポリヌクレオチドを組換え発現用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。組換え発現用ベクターは、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。

【 0 0 2 1 】

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、発現用ベクターは、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。

【 0 0 2 2 】

無細胞発現系（無細胞タンパク質合成系）を用いる場合、本発明に係る抗体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。

【 0 0 2 3 】

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、及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

10

20

30

40

50

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又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。

【 0 0 2 4 】

なお、種々のウィ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。

10

【 0 0 2 5 】

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、小胞体及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、膜タンパク質及び分泌タンパク質の成熟に必須な細胞成分である。

【 0 0 2 6 】

また、本発明に係る抗体 型軽鎖は、当該抗体 型軽鎖を天然に発現する細胞又は組織から取り出すこともできる。例えば、抗体又はオリゴヌクレオチドを用いて、本発明に係る抗体 型軽鎖を天然に発現する細胞又は組織を同定することができる。

20

【 0 0 2 7 】

その他、本発明に係る抗体 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。

【 0 0 2 8 】

本発明の第 1 実施形態に係る製造方法は、精製工程等のその他の工程を更に含むことができる。精製工程としては、公知の抗体の精製方法を用いて適宜実施することができるが、例えば、後述する第 1 の精製工程、添加工程、及び第 2 の精製工程からなる精製方法を用いることもできる。これら工程の詳細については後述する。

30

【 0 0 2 9 】

[第 2 実施形態]

本発明の第 2 実施形態に係る抗体 型軽鎖の製造方法（以下、「本発明の第 2 実施形態に係る製造方法」と略記する場合がある）は、以下の工程をこの順に含む。

抗体 型軽鎖をコードするポリヌクレオチドを含む発現用ベクターを用いて、細胞内又は細胞外発現系によって、前記抗体 型軽鎖を発現させる発現工程；

前記発現工程で得られた発現産物から、第 1 の充填剤を含むカラムを用いたカラムクロマトグラフィー法により、前記抗体 型軽鎖を含む粗精製物を得る第 1 の精製工程；

前記抗体 型軽鎖を含む粗精製物に金属イオンを添加し、前記抗体 型軽鎖と前記金属イオンとが結合した抗体 型軽鎖複合体を含む粗精製物を得る添加工程；

40

前記添加工程後の前記抗体 型軽鎖複合体を含む粗精製物から、第 2 の充填剤を含むカラムを用いたカラムクロマトグラフィー法により、前記抗体 型軽鎖複合体の精製物を得る第 2 の精製工程；

前記第 2 の精製工程後の前記抗体 型軽鎖複合体の精製物から前記金属イオンを除去して抗体 型軽鎖の精製物を得る除去工程。

【 0 0 3 0 】

本発明の第 2 実施形態に係る製造方法は、可変領域が、カバット分類で可変領域の N 末端から 95 番目のアミノ酸残基が、欠失している又はプロリン残基以外のアミノ酸残基であるアミノ酸配列からなるポリペプチドである抗体 型軽鎖に限定されず、その他の抗体 型軽鎖にも適用することができる。本発明の第 2 実施形態に係る製造方法によれば、保

50

存安定性に優れる抗体酵素を安定的に製造することができる。

以下、各工程について詳細を説明する。

【0031】

<発現工程>

発現工程では、抗体 型軽鎖をコードするポリヌクレオチドを含む発現用ベクターを用いて、細胞内又は細胞外発現系等の当該技術分野で公知の発現系により抗体 型軽鎖を発現させる。

【0032】

組換え発現系を用いる場合、本発明に係る抗体 型軽鎖をコードするポリヌクレオチドを組換え発現用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。組換え発現用ベクターは、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。

【0033】

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、発現用ベクターは、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。

【0034】

無細胞発現系（無細胞タンパク質合成系）を用いる場合、本発明に係る抗体 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。

【0035】

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、及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又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。

【0036】

なお、種々のウィ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。

【0037】

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、小胞体及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、膜タンパク質及び分泌タンパク質の成熟に必須な細胞成分である。

【0038】

また、本発明に係る抗体 型軽鎖は、当該抗体 型軽鎖を天然に発現する細胞又は組織から取り出すこともできる。例えば、抗体又はオリゴヌクレオチドを用いて、本発明に係る抗体 型軽鎖を天然に発現する細胞又は組織を同定することができる。

【0039】

その他、本発明に係る抗体 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。

【 0 0 4 0 】

< 第 1 の精製工程 >

第 1 の精製工程では、前記発現工程で得られた発現産物から、第 1 の充填剤を含むカラムを用いたカラムクロマトグラフィー法により、前記抗体 型軽鎖を含む粗精製物を得る。

【 0 0 4 1 】

前記発現工程で得られた発現産物から抗体 型軽鎖を精製する方法としては、周知の方法（例えば、細胞又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、硫安沈殿又はエタノール沈殿、酸抽出、陰イオン又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、及びレクチンクロマトグラフィー）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。

10

【 0 0 4 2 】

< 添加工程 >

添加工程では、前記抗体 型軽鎖を含む粗精製物に金属イオンを添加し、前記抗体 型軽鎖と前記金属イオンとが結合した抗体 型軽鎖複合体を含む粗精製物を得る。抗体 型軽鎖を含む粗組成物に金属イオンを添加することで、抗体 型軽鎖の二量体が容易に得られ、抗体 型軽鎖の酵素活性を保ちながら安定的に製造することができる。

20

【 0 0 4 3 】

本発明において、抗体 型軽鎖と結合させる金属イオンは、第 1 0 族元素、第 1 1 族元素、及び第 1 2 族元素からなる群より選択される 1 種以上である。抗体 型軽鎖には、前記金属イオンを 1 種類のみ結合させてもよく、2 種類以上を組み合わせで結合させてもよい。当該金属イオンとしては、生体への安全性の点から、銅イオン、ニッケルイオン、亜鉛イオン、金イオン、銀イオン、及び白金イオンからなる群より選択される 1 種以上であることが好ましく、量産性の点から、銅イオン、ニッケルイオン、及び亜鉛イオンからなる群より選択される 1 種以上であることがより好ましく、抗体 型軽鎖の生体に対する活性をより高められる点から、銅イオンであることがさらに好ましい。

30

【 0 0 4 4 】

抗体 型軽鎖を含む粗組成物に金属イオンを添加する方法としては、例えば、本発明に係る抗体 型軽鎖を、前記金属イオンを含む溶液中でインキュベートする方法等が挙げられる。抗体 型軽鎖の二量体と単量体が混在している溶液中で金属イオンとインキュベートしてもよく、いずれか一方のみを含むように精製された抗体 型軽鎖を金属イオンとインキュベートしてもよい。

【 0 0 4 5 】

本発明に係る抗体 型軽鎖と前記金属イオンとのインキュベート時間は、充分量の金属イオンが抗体 型軽鎖と結合し得るように、抗体 型軽鎖の種類、金属イオンの種類、溶媒、インキュベート温度等を考慮して適宜決定することができる。例えば、室温で 3 0 分間～4 8 時間インキュベートすることができ、その後、続く第 2 の精製工程に供されることが好ましい。

40

【 0 0 4 6 】

< 第 2 の精製工程 >

第 2 の精製工程では、前記添加工程後の前記抗体 型軽鎖複合体を含む粗精製物から、第 2 の充填剤を含むカラムを用いたカラムクロマトグラフィー法により、前記抗体 型軽鎖複合体の精製物を得る。

【 0 0 4 7 】

50

第2の精製工程における記抗体型軽鎖複合体を含む粗精製物から抗体型軽鎖複体の精製物を精製する方法としては、上記第1の精製工程において例示されたものと同様のものが挙げられる。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。

【0048】

第1の精製工程における第1の充填剤と、第2の精製工程における第2の充填剤の組合せは、最終的に所望の精製度の抗体型軽鎖が精製可能な組み合わせであれば特に限定されるものではなく、抗体型軽鎖の種類、付加・修飾の有無等を考慮して適宜決定することができる。例えば、発現系を利用して合成する抗体型軽鎖がHisタグ等が付加されたエピトープ標識ポリペプチドの場合、第1の充填剤として標識されたエピトープに対するアフィニティの高いものを用い、第2の充填剤として、陰イオン又は陽イオン交換クロマトグラフィーを用いることが好ましい。この場合、第1の精製工程において、抗体型軽鎖を精製し、第2の精製工程において、単量体と二量体を分離して分画したり、金属イオンの結合の有無で分画したりすることができる。

10

【0049】

< 除去工程 >

除去工程では、前記第2の精製工程後の前記抗体型軽鎖複体の精製物から前記金属イオンを除去して抗体型軽鎖の精製物を得る。抗体型軽鎖複体の精製物から金属イオンを除去することで、後述する実施例に示すように、抗体型軽鎖の保存安定性を向上させることができる。

20

【0050】

抗体型軽鎖複体の精製物から前記金属イオンを除去する方法としては、例えば、抗体型軽鎖複体の精製物を、キレート剤を含む溶液中でインキュベートする方法等が挙げられる。

【0051】

除去工程において用いられるキレート剤としては、例えば、エチレンジアミン四酢酸（EDTA：ethylenediaminetetraacetic acid）、クエン酸、フィチン酸等が挙げられる。

【0052】

本発明の第2実施形態に係る製造方法は、上記各工程に加えて、その他の工程を含んでもよい。

30

例えば、本発明の第2実施形態に係る製造方法を用いて、上述した可変領域が、カバット分類で可変領域のN末端から95番目のアミノ酸残基が、欠失している又はプロリン残基以外のアミノ酸残基であるアミノ酸配列からなるポリペプチドである抗体型軽鎖を製造する場合には、改変工程を更に含んでもよい。

【0053】

< 改変工程 >

改変工程では、前記発現工程前に、可変領域が、カバット分類で可変領域のN末端から95番目のアミノ酸残基が、プロリン残基であるアミノ酸配列からなるポリペプチドである抗体型軽鎖をコードするポリヌクレオチドについて、前記プロリン残基が欠失又は置換するように改変して、可変領域が、カバット分類で可変領域のN末端から95番目のアミノ酸残基が、欠失している又はプロリン残基以外のアミノ酸残基であるアミノ酸配列からなるポリペプチドである抗体型軽鎖をコードするポリヌクレオチドを得る。

40

【0054】

前記プロリン残基が欠失又は置換するように改変する方法としては、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、可変領域のアミノ酸配列中のカバット分類で可変領域のN末端から95番目に存在するプロリン残基を容易に変異させる方法で行なうことができる。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又は置換変

50

異体を作製することができる。

【0055】

抗体 型軽鎖

本発明に係る抗体 型軽鎖は、可変領域が、カバット分類で可変領域のN末端から95番目のアミノ酸残基が、欠失している又はプロリン残基以外のアミノ酸残基であるアミノ酸配列からなるポリペプチドである。本発明に係る抗体 型軽鎖は、抗体酵素であり、従来の抗体酵素よりも高い酵素活性を有する。すなわち、本発明に係る抗体酵素は、可変領域が、カバット分類で可変領域のN末端から95番目のアミノ酸残基が、欠失している又はプロリン残基以外のアミノ酸残基であるアミノ酸配列からなるポリペプチドである抗体 型軽鎖からなり、認識した抗原を基質として酵素活性を発現するものである。本発明に係る抗体 型軽鎖は、上述した「抗体 型軽鎖の製造方法」により製造することができる。

10

【0056】

以降、本発明に係る抗体 型軽鎖を「プロリン欠失体」と称する場合がある。本明細書におけるプロリン欠失体とは、可変領域が、カバット分類で可変領域のN末端から95番目のアミノ酸残基が、プロリン残基ではないアミノ酸配列からなるペプチドであり、野生型の抗体 型軽鎖の相当するプロリン残基が欠失しているものであってもよく、当該プロリン残基がその他のアミノ酸残基に置換されているものであってもよい。

【0057】

なお、カバット (K a b a t) 分類によるアミノ酸配列の番号付けは、例えば、抗体のアミノ酸配列を K a b a t の番号付システム (K a b a t n u m b e r i n g s y s t e m) に従い、a b Y s i s ソフトウェア (U R L ; <http://www.abysis.org/>) を用いて解析することで行なうことができる。

20

【0058】

本発明に係る抗体 型軽鎖は、上記構成であるものであれば特に限定されるものではないが、医薬用途への適用可能性の点から、触媒三つ組残基様構造を有しているものが好ましい。なお、触媒三つ組残基様構造とは、例えば、セリン残基、ヒスチジン残基及びアスパラギン残基によって形成された、触媒活性を有していると考えられる構造である。触媒三つ組残基様構造を有している抗体 型軽鎖としては、例えば、サブグループIIに属するV 遺伝子を有するものや、サブグループI等の他のサブグループに属するV 遺伝子を有するもの、少なくともそれらの可変領域を有するもの、及びこれらの変異体が挙げられる。なお、野生型の抗体 型軽鎖は、例えば特許文献2に開示されているように、ヒトから採取した生体サンプル (例えば、リンパ球等) 由来の核酸を鋳型としたPCR等により得ることができ、さらに得られた野生型から公知の遺伝子組換え技術により各種変異体を得ることもできる。

30

【0059】

本発明に係る抗体 型軽鎖としては、特に、プロテアーゼ活性、アミダーゼ活性、核酸分解活性、がん細胞に対する細胞傷害性、又は抗ウィルス活性の少なくともいずれかの活性を有するものが好ましい。これらの活性を有する抗体 型軽鎖は、抗がん剤や抗ウィルス剤等として特に有用である。

40

【0060】

野生型の抗体 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。当該システインが他のアミノ酸 (例えばアラニン等) に置換された変異型の抗体 型軽鎖は、二量体を形成することができず、単量体で存在する。本発明に係る抗体 型軽鎖としては、単量体であってもよく、二量体を形成するものであってもよい。ただし、抗体 型軽鎖の種類によっては、単量体よりも二量体のほうがプロテアーゼ活性等の活性が高いものがあり、この場合には、二量体を形成するもののほうが好ましい。

【0061】

本発明に係る抗体 型軽鎖 (プロリン欠失体) としては、可変領域が下記 (1a) ~ (

50

3 c) からなる群より選択されるポリペプチドであることが好ましい。

(1 a) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列中の N 末端から 100 番目 (カバット分類で可変領域の N 末端から 95 番目) のプロリン残基が欠失又は置換されているアミノ酸配列からなるポリペプチド；

(1 b) 前記 (1 a) のポリペプチド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、且つカバット分類で可変領域の N 末端から 95 番目のアミノ酸残基が、欠失している又はプロリン残基以外のアミノ酸残基であるアミノ酸配列からなるポリペプチド；

(1 c) 前記 (1 a) のポリペプチドのアミノ酸配列と 90 % 以上の同一性を有し、且つカバット分類で可変領域の N 末端から 95 番目のアミノ酸残基が、欠失している又はプロリン残基以外のアミノ酸残基であるアミノ酸配列からなるポリペプチド；

10

(2 a) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列中の N 末端から 100 番目 (カバット分類で可変領域の N 末端から 95 番目) のプロリン残基が欠失又は置換されているアミノ酸配列；

(2 b) 前記 (2 a) のポリペプチド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、且つカバット分類で可変領域の N 末端から 95 番目のアミノ酸残基が、欠失している又はプロリン残基以外のアミノ酸残基であるアミノ酸配列からなるポリペプチド；

(2 c) 前記 (2 a) のポリペプチドのアミノ酸配列と 90 % 以上の同一性を有し、且つカバット分類で可変領域の N 末端から 95 番目のアミノ酸残基が、欠失している又はプロリン残基以外のアミノ酸残基であるアミノ酸配列からなるポリペプチド；

20

(3 a) 配列番号 3 で表されるアミノ酸配列中の N 末端から 100 番目 (カバット分類で可変領域の N 末端から 95 番目) のプロリン残基が欠失又は置換されているアミノ酸配列；

(3 b) 前記 (3 a) のポリペプチド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、且つカバット分類で可変領域の N 末端から 95 番目のアミノ酸残基が、欠失している又はプロリン残基以外のアミノ酸残基であるアミノ酸配列からなるポリペプチド；

(3 c) 前記 (3 a) のポリペプチドのアミノ酸配列と 90 % 以上の同一性を有し、且つカバット分類で可変領域の N 末端から 95 番目のアミノ酸残基が、欠失している又はプロリン残基以外のアミノ酸残基であるアミノ酸配列からなるポリペプチド

30

【0062】

上記 (1 a) ~ (3 c) のポリペプチドにおいて、カバット分類で可変領域の N 末端から 95 番目のプロリン残基から置換され得るアミノ酸残基としては、プロリン残基よりも側鎖の嵩が小さく、触媒三つ組残基様構造の構造を妨げないアミノ酸残基であれば特別な限定はない。そのようなアミノ酸残基としては、例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、セリン、トレオニン、アスパラギン、グルタミン、アラニン、グリシン、バリン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、システイン等が挙げられる。中でも、セリン又はアルギニンが好ましい。

【0063】

また、基準アミノ酸配列に対する、対象アミノ酸配列の配列同一性は、例えば次のようにして求めることができる。まず、基準アミノ酸配列及び対象アミノ酸配列をアラインメントする。ここで、各アミノ酸配列には、配列同一性が最大となるようにギャップを含めてもよい。続いて、基準アミノ酸配列及び対象アミノ酸配列において、一致したアミノ酸の数を算出し、下記式にしたがって、配列同一性を求めることができる。

40

【0064】

「配列同一性 (%)」 = $\frac{[一致したアミノ酸の数]}{[対象アミノ酸配列のアミノ酸の総数]} \times 100$

【0065】

可変領域が配列番号 1 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドであるヒト抗体

50

型軽鎖は、「ヒト抗体 型軽鎖 (S 3 5) 」と称することもある。ヒト抗体 型軽鎖 (S 3 5) 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 1 0 に示される。ヒト抗体 型軽鎖 (S 3 5) における C D R 1 は、配列番号 1 及び 1 0 のアミノ酸配列における第 2 4 ~ 3 9 番目であり、C D R 2 は、配列番号 1 及び 1 0 のアミノ酸配列における第 5 5 ~ 6 1 番目であり、C D R 3 は、配列番号 1 及び 1 0 のアミノ酸配列における第 9 4 ~ 1 0 2 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 1 0 のアミノ酸配列中の 2 1 9 番目のシステインである。

【 0 0 6 6 】

ヒト抗体 型軽鎖 (S 3 5) は、後記実施例に示すように、アミロイド の N 末端から 2 6 番目から 3 3 番目までのアミノ酸配列からなる抗原ペプチド (以下、「 A ペプチド」と称する場合がある) に対する分解活性を有しない。しかしながら、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列中のカバット分類で可変領域の N 末端から 9 5 番目のプロリン残基が欠失又は置換されているアミノ酸配列からなる可変領域を有するヒト抗体 型軽鎖、すなわち、可変領域が上記 (1 a) のポリペプチドであるヒト抗体 型軽鎖 (以下、「ヒト抗体 型軽鎖 (S 3 5) のプロリン欠失体」と称する場合がある) は、 A ペプチドに対する分解活性を発揮することができる。このため、抗アミロイド (A) 分解剤の有効成分として好適である。ヒト抗体 型軽鎖 (S 3 5) のプロリン欠失体の抗 A 分解活性のためには、標的分子に対する高い分子認識能が重要であることから、ヒト抗体 型軽鎖 (S 3 5) のプロリン欠失体の抗アミロイド 分解活性の活性中心は、可変領域、特に C D R 配列にある。

【 0 0 6 7 】

ヒト抗体 型軽鎖 (S 3 5) のプロリン欠失体は、酵素活性が損なわない程度の変異を有する変異体であってもよい。中でも、ヒト抗体 型軽鎖 (S 3 5) のプロリン欠失体の変異体としては、可変領域以外の領域に変異を有する変異体が好ましく、C D R 1 及び C D R 2 は配列番号 1 又は 1 0 で表されるアミノ酸配列と同一であり (保存されており) 、C D R 3 の C 末端のプロリン残基が欠失又は置換されているが、C D R 3 のその他のアミノ酸配列は同一であり (保存されており) 、且つ可変領域中の C D R 領域以外のアミノ酸がヒト抗体 型軽鎖 (S 3 5) から変異されていてもよい変異体により好ましい。ヒト抗体 型軽鎖 (S 3 5) のプロリン欠失体の変異体としては、例えば、可変領域が上記 (1 b) 又は上記 (1 c) のポリペプチドであるヒト抗体 型軽鎖等が挙げられる。

【 0 0 6 8 】

上記 (1 b) のポリペプチドにおいて、欠失、置換、若しくは付加されてもよいアミノ酸の数としては、1 個以上 5 個以下が好ましく、1 個以上 2 個以下がより好ましく、1 個がさらに好ましい。以下、可変領域が上記 (2 b) 又は上記 (3 b) 等のポリペプチドであるプロリン欠失体の変異体についても同様である。

【 0 0 6 9 】

また、一般的に起こり得るアミノ酸の置換としては、例えば、アラニン / セリン、バリン / イソロイシン、アスパラギン酸 / グルタミン酸、トレオニン / セリン、アラニン / グリシン、アラニン / トレオニン、セリン / アスパラギン、アラニン / バリン、セリン / グリシン、チロシン / フェニルアラニン、アラニン / プロリン、リシン / アルギニン、アスパラギン酸 / アスパラギン、ロイシン / イソロイシン、ロイシン / バリン、アラニン / グルタミン酸、アスパラギン酸 / グリシン等が挙げられる。

【 0 0 7 0 】

上記 (1 c) のポリペプチドにおいて、上記 (1 a) のアミノ酸配列からなるポリペプチドと機能的に同等であるためには、上記 (1 a) のポリペプチドと同様に配列番号 1 で表されるアミノ酸配列中のカバット分類で可変領域の N 末端から 9 5 番目のプロリン残基を有していないポリペプチドであって、そのアミノ酸配列が、上記 (1 a) のポリペプチドのアミノ酸配列と 9 0 % 以上の同一性であり、9 5 % 以上の同一性が好ましく、9 7 % 以上の同一性がより好ましく、9 9 % 以上の同一性がさらに好ましい。以下、可変領域が

上記(2c)又は上記(3c)等のポリペプチドであるプロリン欠失体の変異体についても同様である。

【0071】

また、ヒト抗体 型軽鎖(S35)のプロリン欠失体の変異体としては、例えば、配列番号10のアミノ酸配列中の95番目のプロリン残基が欠失しており、かつ219番目のシステインがアラニンに置換されたアミノ酸配列によって示されるポリペプチド等が挙げられる。

【0072】

可変領域が配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドであるヒト抗体 型軽鎖は、「ヒト抗体 型軽鎖(T99)」と称することもある。ヒト抗体 型軽鎖(T99)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13に示される。ヒト抗体 型軽鎖(T99)におけるCDR1は、配列番号2及び13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2及び13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2及び13のアミノ酸配列における第94～102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13のアミノ酸配列中の219番目のシステインである。

【0073】

ヒト抗体 型軽鎖(T99)は、後記実施例に示すように、A ペプチドに対する分解活性を有しない。しかしながら、配列番号2で表されるアミノ酸配列中のカバット分類で可変領域のN末端から95番目のプロリン残基が欠失又は置換されているアミノ酸配列からなる可変領域を有するヒト抗体 型軽鎖、すなわち、可変領域が上記(2a)のポリペプチドであるヒト抗体 型軽鎖(以下、「ヒト抗体 型軽鎖(T99)のプロリン欠失体」と称する場合がある)は、A ペプチドに対する分解活性を発揮することができる。このため、抗A 分解剤の有効成分として好適である。ヒト抗体 型軽鎖(T99)のプロリン欠失体の抗A 分解活性のためには、標的分子に対する高い分子認識能が重要であることから、ヒト抗体 型軽鎖(T99)のプロリン欠失体の抗アミロイド 分解活性の活性中心は、可変領域、特にCDR配列にある。

【0074】

ヒト抗体 型軽鎖(T99)のプロリン欠失体は、酵素活性が損なわない程度の変異を有する変異体であってもよい。中でも、ヒト抗体 型軽鎖(T99)のプロリン欠失体の変異体としては、可変領域以外の領域に変異を有する変異体が好ましく、CDR1及びCDR2は配列番号2又は13で表されるアミノ酸配列と同一であり(保存されており)、CDR3のC末端のプロリン残基が欠失又は置換されているが、CDR3のその他のアミノ酸配列は同一であり(保存されており)、且つ可変領域中のCDR領域以外のアミノ酸がヒト抗体 型軽鎖(T99)から変異されていてもよい変異体がより好ましい。ヒト抗体 型軽鎖(T99)のプロリン欠失体の変異体としては、例えば、可変領域が上記(2b)又は上記(2c)のポリペプチドであるヒト抗体 型軽鎖等が挙げられる。

【0075】

また、ヒト抗体 型軽鎖(T99)のプロリン欠失体の変異体としては、例えば、配列番号13のアミノ酸配列中の95番目のプロリン残基が欠失しており、かつ219番目のシステインがアラニンに置換されたアミノ酸配列によって示されるポリペプチド等が挙げられる。

【0076】

可変領域が配列番号3で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドであるヒト抗体 型軽鎖は、「ヒト抗体 型軽鎖(H55)」と称することもある。ヒト抗体 型軽鎖(H55)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15に示される。ヒト抗体 型軽鎖(H55)におけるCDR1は、配列番号3及び15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3及び15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3及び15のアミノ酸配列における第94～103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15のアミノ酸配列中の215番目のシステインである。

【0077】

ヒト抗体 型軽鎖(H55)は、後記実施例に示すように、細胞傷害性T細胞の表面にある免疫チェックポイント受容体であるPD-1のN末端から124番目から141番目までのアミノ酸配列からなる抗原ペプチド(以下、「PD-1ペプチド」と称する場合がある)に対する分解活性を有しない。しかしながら、配列番号3で表されるアミノ酸配列中のカバット分類で可変領域のN末端から95番目のプロリン残基が欠失又は置換されているアミノ酸配列からなる可変領域を有するヒト抗体 型軽鎖(以下、「ヒト抗体 型軽鎖(H55)のプロリン欠失体」と称する場合がある)は、PD-1ペプチドに対する分解活性を発揮することができる。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 型軽鎖(H55)のプロリン欠失体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ることから、ヒト抗体 型軽鎖(H55)のプロリン欠失体の抗がん活性の活性中心は、可変領域、特にCDR配列にある。

【0078】

ヒト抗体 型軽鎖(H55)のプロリン欠失体は、酵素活性が損なわない程度の変異を有する変異体であってもよい。中でも、ヒト抗体 型軽鎖(H55)のプロリン欠失体の変異体としては、可変領域以外の領域に変異を有する変異体が好ましく、CDR1及びCDR2は配列番号3又は15で表されるアミノ酸配列と同一であり(保存されており)、CDR3のC末端のプロリン残基が欠失又は置換されているが、CDR3のその他のアミノ酸配列は同一であり(保存されており)、且つ可変領域中のCDR領域以外のアミノ酸がヒト抗体 型軽鎖(H55)から変異されていてもよい変異体により好ましい。ヒト抗体 型軽鎖(H55)のプロリン欠失体の変異体としては、例えば、可変領域が上記(3b)又は上記(3c)のポリペプチドであるヒト抗体 型軽鎖等が挙げられる。

【0079】

また、ヒト抗体 型軽鎖(H55)のプロリン欠失体の変異体としては、例えば、配列番号15のアミノ酸配列中の95番目のプロリン残基が欠失しており、かつ215番目のシステインがアラニンに置換されたアミノ酸配列によって示されるポリペプチド等が挙げられる。

【0080】

本発明に係る抗体 型軽鎖(プロリン欠失体)としては、可変領域が下記(4a)～(7c)からなる群より選択されるポリペプチドであることがより好ましい。

(4a) 配列番号4で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド；

(4b) 配列番号4で表される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、且つカバット分類で可変領域のN末端から95番目のアミノ酸残基が、欠失している又はプロリン残基以外のアミノ酸残基であるアミノ酸配列からなるポリペプチド；

(4c) 配列番号4で表されるアミノ酸配列と90%以上の同一性を有し、且つカバット分類で可変領域のN末端から95番目のアミノ酸残基が、欠失している又はプロリン残基以外のアミノ酸残基であるアミノ酸配列からなるポリペプチド；

(5a) 配列番号5で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド；

(5b) 配列番号5で表される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、且つカバット分類で可変領域のN末端から95番目のアミノ酸残基が、欠失している又はプロリン残基以外のアミノ酸残基であるアミノ酸配列からなるポリペプチド；

(5c) 配列番号5で表されるアミノ酸配列と90%以上の同一性を有し、且つカバット分類で可変領域のN末端から95番目のアミノ酸残基が、欠失している又はプロリン残基以外のアミノ酸残基であるアミノ酸配列からなるポリペプチド；

(6a) 配列番号6で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド；

(6b) 配列番号6で表される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、且つカバット分類で可変領域のN末端から95番目のアミノ酸残基が、欠失している又はプロリン残基以外のアミノ酸残基であるアミノ酸配列からなるポリペプチド；

(6c) 配列番号6で表されるアミノ酸配列と90%以上の同一性を有し、且つカバット分類で可変領域のN末端から95番目のアミノ酸残基が、欠失している又はプロリン残基以外のアミノ酸残基であるアミノ酸配列からなるポリペプチド；

(7a) 配列番号7で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド；

(7b) 配列番号7で表される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、且つカバット分類で可変領域のN末端から95番目のアミノ酸残基が、欠失している又はプロリン残基以外のアミノ酸残基であるアミノ酸配列からなるポリペプチド；

(7c) 配列番号7で表されるアミノ酸配列と90%以上の同一性を有し、且つカバット分類で可変領域のN末端から95番目のアミノ酸残基が、欠失している又はプロリン残基以外のアミノ酸残基であるアミノ酸配列からなるポリペプチド

【0081】

可変領域が配列番号4で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドであるヒト抗体型軽鎖は、「ヒト抗体 型軽鎖(S34)」と称することもある。また、可変領域が配列番号5で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドであるヒト抗体 型軽鎖は、「ヒト抗体 型軽鎖(S38)」と称することもある。ヒト抗体 型軽鎖(S34)及びヒト抗体 型軽鎖(S38)は、上記ヒト抗体 型軽鎖(S35)のプロリン欠失体である。なお、一実施形態において、ヒト抗体 型軽鎖(S34)の全長アミノ酸配列は、配列番号11に示され、ヒト抗体 型軽鎖(S38)の全長アミノ酸配列は、配列番号12に示される。

【0082】

ヒト抗体 型軽鎖(S34)におけるCDR1は、配列番号4及び11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4及び11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4及び11のアミノ酸配列における第94～104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11のアミノ酸配列中の219番目のシステインである。

【0083】

ヒト抗体 型軽鎖(S38)におけるCDR1は、配列番号5及び12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5及び12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5及び12のアミノ酸配列における第94～103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12のアミノ酸配列中の218番目のシステインである。

【0084】

ヒト抗体 型軽鎖(S34)及びヒト抗体 型軽鎖(S38)は、酵素活性が損なわれない程度の変異を有する変異体であってもよい。中でも、ヒト抗体 型軽鎖(S34)の変異体及びヒト抗体 型軽鎖(S38)の変異体としては、可変領域以外の領域に変異を有する変異体が好ましく、CDR1、CDR2及びCDR3は配列番号4、5、11又は12で表されるアミノ酸配列と同一であり(保存されており)、且つ可変領域中のCDR領域以外のアミノ酸がヒト抗体 型軽鎖(S34)及びヒト抗体 型軽鎖(S38)から変異されていてもよい変異体により好ましい。ヒト抗体 型軽鎖(S34)の変異体としては、例えば、可変領域が上記(4b)又は上記(4c)のポリペプチドであるヒト抗体 型軽鎖等が挙げられる。ヒト抗体 型軽鎖(S38)の変異体としては、例えば、可変領域が上記(5b)又は上記(5c)のポリペプチドであるヒト抗体 型軽鎖等が挙げられる。

【0085】

可変領域が配列番号6で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドであるヒト抗体

型軽鎖は、「ヒト抗体 型軽鎖 (T 9 9 P 9 5) 」と称することもある。ヒト抗体 型軽鎖 (T 9 9 P 9 5) は、ヒト抗体 型軽鎖 (T 9 9) のプロリン欠失体である。なお、一実施形態において、ヒト抗体 型軽鎖 (T 9 9 P 9 5) の全長アミノ酸配列は、配列番号 1 4 に示される。ヒト抗体 型軽鎖 (T 9 9 P 9 5) における C D R 1 は、配列番号 6 及び 1 4 のアミノ酸配列における第 2 4 ~ 3 9 番目であり、C D R 2 は、配列番号 6 及び 1 4 のアミノ酸配列における第 5 5 ~ 6 1 番目であり、C D R 3 は、配列番号 6 及び 1 4 のアミノ酸配列における第 9 4 ~ 1 0 3 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 1 4 のアミノ酸配列中の 2 1 8 番目のシステインである。

【 0 0 8 6 】

10

ヒト抗体 型軽鎖 (T 9 9 P 9 5) は、酵素活性が損なわない程度の変異を有する変異体であってもよい。中でも、ヒト抗体 型軽鎖 (T 9 9 P 9 5) の変異体としては、可変領域以外の領域に変異を有する変異体が好ましく、C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 は配列番号 6 又は 1 4 で表されるアミノ酸配列と同一であり (保存されており)、且つ可変領域中の C D R 領域以外のアミノ酸がヒト抗体 型軽鎖 (T 9 9 P 9 5) から変異されていてもよい変異体がより好ましい。ヒト抗体 型軽鎖 (T 9 9 P 9 5) の変異体としては、例えば、可変領域が上記 (6 b) 又は上記 (6 c) のポリペプチドであるヒト抗体 型軽鎖等が挙げられる。

【 0 0 8 7 】

20

可変領域が配列番号 7 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドであるヒト抗体 型軽鎖は、「ヒト抗体 型軽鎖 (H 3 4) 」と称することもある。ヒト抗体 型軽鎖 (H 3 4) は、ヒト抗体 型軽鎖 (H 5 5) のプロリン欠失体である。なお、一実施形態において、ヒト抗体 型軽鎖 (H 3 4) の全長アミノ酸配列は、配列番号 1 6 に示される。ヒト抗体 型軽鎖 (H 3 4) における C D R 1 は、配列番号 7 及び 1 6 のアミノ酸配列における第 2 4 ~ 3 9 番目であり、C D R 2 は、配列番号 7 及び 1 6 のアミノ酸配列における第 5 5 ~ 6 1 番目であり、C D R 3 は、配列番号 7 及び 1 6 のアミノ酸配列における第 9 4 ~ 1 0 1 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 1 6 のアミノ酸配列中の 2 1 3 番目のシステインである。

【 0 0 8 8 】

30

ヒト抗体 型軽鎖 (H 3 4) は、酵素活性が損なわない程度の変異を有する変異体であってもよい。中でも、ヒト抗体 型軽鎖 (H 3 4) の変異体としては、可変領域以外の領域に変異を有する変異体が好ましく、C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 は配列番号 7 又は 1 6 で表されるアミノ酸配列と同一であり (保存されており)、且つ可変領域中の C D R 領域以外のアミノ酸がヒト抗体 型軽鎖 (H 3 4) から変異されていてもよい変異体がより好ましい。ヒト抗体 型軽鎖 (H 3 4) の変異体としては、例えば、可変領域が上記 (7 b) 又は上記 (7 c) のポリペプチドであるヒト抗体 型軽鎖等が挙げられる。

【 0 0 8 9 】

また、本発明に係る抗体 型軽鎖 (プロリン欠失体) としては、可変領域が下記 (8 a) ~ (8 c) からなる群より選択されるポリペプチドであることも好ましい。

(8 a) 配列番号 8 で表されるアミノ酸配列中の N 末端から 1 0 0 番目 (カバット分類で可変領域の N 末端から 9 5 番目) のプロリン残基が欠失又は置換されているアミノ酸配列 ;

40

(8 b) 前記 (8 a) のポリペプチド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、且つカバット分類で可変領域の N 末端から 9 5 番目のアミノ酸残基が、欠失している又はプロリン残基以外のアミノ酸残基であるアミノ酸配列からなるポリペプチド ;

(8 c) 前記 (8 a) のポリペプチドのアミノ酸配列と 9 0 % 以上の同一性を有し、且つカバット分類で可変領域の N 末端から 9 5 番目のアミノ酸残基が、欠失している又はプロリン残基以外のアミノ酸残基であるアミノ酸配列からなるポリペプチド

【 0 0 9 0 】

50

可変領域が配列番号 8 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドであるマウス抗体型軽鎖は、「マウス抗体 型軽鎖 (Inf A - 15 L)」と称することもある。マウス抗体 型軽鎖 (Inf A - 15 L) 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 17 に示される。マウス抗体 型軽鎖 (Inf A - 15 L) における CDR 1 は、配列番号 8 及び 17 のアミノ酸配列における第 21 ~ 39 番目であり、CDR 2 は、配列番号 8 及び 17 のアミノ酸配列における第 55 ~ 61 番目であり、CDR 3 は、配列番号 8 及び 17 のアミノ酸配列における第 94 ~ 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 17 のアミノ酸配列中の 219 番目のシステインである。

10

【0091】

マウス抗体 型軽鎖 (Inf A - 15 L) は、後記実施例に示すように、ベンゾイル基 (Bz 基) - D 体 / L 体アルギニン - パラニトロアニリン (pNA) からなる基質 (以下、「トリプシン様 pNA (R - pNA)」と称する場合がある) に対する分解活性を有しない。しかしながら、配列番号 8 で表されるアミノ酸配列中のカバット分類で可変領域の N 末端から 95 番目のプロリン残基が欠失又は置換されているアミノ酸配列からなる可変領域を有するヒト抗体 型軽鎖、すなわち、可変領域が上記 (8a) のポリペプチドであるマウス抗体 型軽鎖 (以下、「マウス抗体 型軽鎖 (Inf A - 15 L) のプロリン欠失体」と称する場合がある) は、R - pNA に対する分解活性を発揮することができる。このため、トリプシン様酵素として用いることができる。マウス抗体 型軽鎖 (Inf A - 15 L) のプロリン欠失体のトリプシン様酵素活性のためには、標的分子に対する高い分子認識能が重要であることから、マウス抗体 型軽鎖 (Inf A - 15 L) のプロリン欠失体のトリプシン様酵素活性の活性中心は、可変領域、特に CDR 配列にある。

20

【0092】

マウス抗体 型軽鎖 (Inf A - 15 L) のプロリン欠失体は、酵素活性が損なわない程度の変異を有する変異体であってもよい。中でも、マウス抗体 型軽鎖 (Inf A - 15 L) のプロリン欠失体の変異体としては、可変領域以外の領域に変異を有する変異体为好ましく、CDR 1 及び CDR 2 は配列番号 8 又は 17 で表されるアミノ酸配列と同一であり (保存されており)、CDR 3 の C 末端から 2 番目及び 3 番目のプロリン残基のうち少なくともいずれか一方のプロリン残基が欠失又は置換されているが、CDR 3 のその他のアミノ酸配列は同一であり (保存されており)、且つ可変領域中の CDR 領域以外のアミノ酸がマウス抗体 型軽鎖 (Inf A - 15 L) から変異されていてもよい変異体がより好ましい。マウス抗体 型軽鎖 (Inf A - 15 L) のプロリン欠失体の変異体としては、例えば、可変領域が上記 (8b) 又は上記 (8c) のポリペプチドであるマウス抗体 型軽鎖等が挙げられる。

30

【0093】

また、マウス抗体 型軽鎖 (Inf A - 15 L) のプロリン欠失体の変異体としては、例えば、配列番号 17 のアミノ酸配列中の 95 番目のプロリン残基が欠失しており、かつ 219 番目のシステインがアラニンに置換されたアミノ酸配列によって示されるポリペプチド等が挙げられる。

40

【0094】

本発明に係る抗体 型軽鎖 (プロリン欠失体) としては、可変領域が下記 (9a) ~ (9c) からなる群より選択されるポリペプチドであることも好ましい。

(9a) 配列番号 9 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド;

(9b) 配列番号 9 で表される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、且つカバット分類で可変領域の N 末端から 95 番目のアミノ酸残基が、欠失している又はプロリン残基以外のアミノ酸残基であるアミノ酸配列からなるポリペプチド;

(9c) 配列番号 9 で表されるアミノ酸配列と 90% 以上の同一性を有し、且つカバット分類で可変領域の N 末端から 95 番目のアミノ酸残基が、欠失している又はプロリン残基

50

以外のアミノ酸残基であるアミノ酸配列からなるポリペプチド

【0095】

可変領域が配列番号9で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドであるマウス抗体型軽鎖は、「マウス抗体 型軽鎖 (InfA - 15L P95)」と称することもある。マウス抗体 型軽鎖 (InfA - 15L P95) は、マウス抗体 型軽鎖 (InfA - 15L) のプロリン欠失体である。なお、一実施形態において、マウス抗体 型軽鎖 (InfA - 15L P95) の全長アミノ酸配列は、配列番号18に示される。マウス抗体 型軽鎖 (InfA - 15L P95) におけるCDR1は、配列番号9及び18のアミノ酸配列における第21～39番目であり、CDR2は、配列番号9及び18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9及び18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18のアミノ酸配列中の218番目のシステインである。

10

【0096】

マウス抗体 型軽鎖 (InfA - 15L P95) は、酵素活性が損なわない程度の変異を有する変異体であってもよい。中でも、マウス抗体 型軽鎖 (InfA - 15L P95) の変異体としては、可変領域以外の領域に変異を有する変異体が好ましく、CDR1、CDR2及びCDR3は配列番号9又は18で表されるアミノ酸配列と同一であり（保存されており）、且つ可変領域中のCDR領域以外のアミノ酸がマウス抗体 型軽鎖 (InfA - 15L P95) から変異されていてもよい変異体がより好ましい。マウス抗体 型軽鎖 (InfA - 15L P95) の変異体としては、例えば、可変領域が上記(9b)又は上記(9c)のポリペプチドであるヒト抗体 型軽鎖等が挙げられる。

20

【0097】

また、本発明に係る抗体 型軽鎖は、上記例示されたものに限定されず、例えば、公知の抗体 型軽鎖に対して、カバット分類で可変領域のN末端から95番目に存在するプロリン残基を欠失又は置換させることで、抗原認識能を保ちながら、酵素活性を発現させ得る。

【0098】

また、本発明に係る抗体 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タグ、Flagタグ等のエピトープ標識ポリペプチドが挙げられる。

30

【0099】

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又は付加変異体を作製することができる。

【0100】

本発明に係る抗体 型軽鎖は、天然の精製産物、化学合成手順の産物、及び原核生物宿主又は真核生物宿主（例えば、細菌細胞、酵母細胞、高等植物細胞、昆虫細胞、及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、本発明に係る抗体 型軽鎖は、グリコシル化され得るか、又は非グリコシル化され得る。さらに、本発明に係る抗体 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

【0101】

本発明に係る抗体 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

50

、糖鎖及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。

【0102】

医薬組成物

本発明に係る抗体 型軽鎖は、抗がん剤や抗ウィルス剤、アミロイド 分解剤等の医薬組成物として特に好適に用いられる。

【0103】

本発明に係る抗がん剤（本発明に係る抗体 型軽鎖を有効成分とする抗がん剤）は、ヒト又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、眼内投与又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 ~ 30 mg / kg 体重の用量、好ましくは、0.1 ~ 10 mg / kg 体重、より好ましくは、0.1 ~ 1 mg / kg 体重の用量で投与され得る。

【0104】

本発明に係る抗がん剤は、本発明に係る抗体 型軽鎖以外に、薬学的に受容可能なキャリア、希釈剤又は賦形剤（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又は賦形剤は、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、賦形剤又は希釈剤の選択は、意図された投与経路及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、被覆剤又は可溶化剤をさらに含み得る。

【0105】

異なる送達系に依存して、組成 / 処方の必要条件是、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又は粘膜経路により、例えば、吸入のための鼻スプレー又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。その他、吸入のための鼻スプレー又はエアロゾル等の、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。

【0106】

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、有効成分である抗体 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. 7 715 - 725 (2007) 参照）、本発明に係る抗体 型軽鎖の C 末端を、FcRn 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、本発明に係る抗体 型軽鎖をダイマー化すること、PEG（ポリエチレングリコール）を付加することもできる。

【0107】

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。

【0108】

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 型軽鎖を有効成分とするため、抗体 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】

【0109】

以下、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。

【0110】

[ヒト抗体 型軽鎖の発現系の構築]

以下の実施例等において、配列番号10のアミノ酸配列からなるヒト抗体 型軽鎖(S35)、配列番号13のアミノ酸配列からなるヒト抗体 型軽鎖(T99)、配列番号15のアミノ酸配列からなるヒト抗体 型軽鎖(H55)、配列番号11のアミノ酸配列からなるヒト抗体 型軽鎖(S34)、配列番号12のアミノ酸配列からなるヒト抗体 型軽鎖(S38)、配列番号14のアミノ酸配列からなるヒト抗体 型軽鎖(T99 P95)、配列番号16のアミノ酸配列からなるヒト抗体 型軽鎖(H34)、配列番号17のアミノ酸配列からなるマウス抗体 型軽鎖(InfA-15L)、配列番号18のアミノ酸配列からなるマウス抗体 型軽鎖(InfA-15L P95)、配列番号19のアミノ酸配列からなるヒト抗体 型軽鎖(#7__wt)を用いた。これらのヒト抗体 型軽鎖は、Bリンパ球によって産生されたヒト抗体 型軽鎖をバンク化したものである。

10

【0111】

これらのヒト抗体 型軽鎖は、それぞれ、大腸菌発現系により発現させた。具体的には、各ヒト抗体 型軽鎖をコードする塩基配列からなるcDNAを、His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、IPTGによる発現誘導を行ったところ、SDS-PAGE分析及び抗ヒト型(Fab')2抗体を用いたウエ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(メチオニン)を、C末端にプラスミドベクター由来のLEHHHHHH(配列番号20)を有していた。

20

【0112】

[ヒト抗体 型軽鎖の発現及び精製]

金属イオンによる処理及び金属イオンの除去を行っていないヒト抗体 型軽鎖は、以下のようにして発現させ、精製した。

【0113】

まず、前記で作製した発現用ベクターを導入した大腸菌の形質転換体を、37℃で一晩、LB培地中で培養した後、培養液にIPTGを終濃度10μM(μmol/L)となるように添加し、18℃で一晩培養した。培養終了後、遠心分離処理により培養物から集菌した菌体に、塩化ナトリウム含有トリスバッファー(25mM Tris-HCl、0.25M NaCl、pH8.0)を添加し、超音波処理により菌体を破碎した後、遠心分離処理を行い、可溶性画分を回収した。

30

【0114】

次に、第1の精製工程として、この可溶性画分を、Ni-NTA Agaroseを充填したNi-NTAカラム(Qiagen社製)にアプライし、適量の前記塩化ナトリウム含有トリスバッファーを当該Ni-NTAカラムに通過させて、発現させたヒト抗体 型軽鎖を当該Ni-NTAカラムに吸着させた。その後、溶離液として、イミダゾール濃度を0.03Mから0.3Mまでグラジエントをかけたイミダゾール含有トリスバッファー(25mM Tris-HCl、0.25M NaCl、imidazole、pH8.0)を用いて、当該Ni-NTAカラムからヒト抗体 型軽鎖を溶出させ、ヒト抗体 型軽鎖含有画分を分取した。回収したヒト抗体 型軽鎖含有画分は、酢酸バッファー(50mM 酢酸、pH5.5)で4、12~24時間透析した。

40

【0115】

その後、第2の精製工程として、透析済のヒト抗体 型軽鎖含有画分を、陽イオン交換カラム(製品番号:SP-5PW、TOSOH社製)にアプライし、適量の前記酢酸バッファーを当該陽イオン交換カラムに通過させて、発現させたヒト抗体 型軽鎖を当該陽イオン交換カラムに吸着させた。その後、溶離液として、塩化ナトリウム濃度を0.15Mから0.45Mまでグラジエントをかけた塩化ナトリウム含有酢酸バッファー(50mM

50

酢酸、NaCl、pH 5.5)又は塩化ナトリウム濃度を0.0w/v%から15.0w/v%までグラジエントをかけた塩化ナトリウム含有Tris-HClバッファー(pH 8.0)を用いて、当該陽イオン交換カラムからヒト抗体型軽鎖を溶出させ、ヒト抗体型軽鎖含有画分を分取した。或いは、陽イオン交換カラムの代わりに、サイズ排除クロマトグラフィー(カラム;HiLoadTM16/60 SuperdexTM 200pg(GE Healthcare))を用いて、溶出溶媒としてPBS(pH=7.4)を使用して精製した。

回収したヒト抗体型軽鎖含有画分は、塩化ナトリウム含有トリスバッファー(20mM Tris-HCl、0.15M NaCl、pH 8.5)で4、12~24時間透析した後、さらにPBS(pH 7.4)で4、12~24時間透析した。透析後のものを、ヒト抗体型軽鎖として用いた。

10

【0116】

[酵素活性の評価]

以下の構造式で示されるFRETペプチドを基質とする評価系を用いて、各ヒト抗体型軽鎖の酵素活性を評価した。構造式中、「MCA」は7-メトキシクマリン-4-メチルアミド構造を示し、「DNP」は2,4-ジニトロフェニル基を示す。「Lys」はリシン残基を示し、「D-Arg」はD体のアルギニン残基を示す。

【0117】

MCA-(抗原ペプチド)-Lys(DNP)-(D-Arg)₃

【0118】

抗原ペプチドの種類及び配列は以下の表1に示す。表1中、「A」はアミロイドを示し、「Tau」はタウタンパク質を示し、いずれも認知症の原因物質である。「PD-1」は免疫チェックポイント分子である。いずれもカッコ内は、全長アミノ酸配列のうちのN末端からの位置を示しており、部分ペプチドを用いた。また、タウタンパク質のアミノ酸配列において「pS」はリン酸化されたセリン残基を意味する。

20

【0119】

[表1]

	アミノ酸配列	配列番号
Aβ(26-33)	5'-SNKGAIIG-3'	21
Tau(391-408)	5'-EIVYKpSPVVSGDTpSPRHL-3'	22
PD-1(124-141)	5'-GAISLAPKAQIKESLRAE-3'	23

【0120】

ヒト抗体型軽鎖の終濃度が5μM、FRET基質の終濃度が100μMとなるように100μLのPBS(pH 7.4)に添加して、37℃で120時間までインキュベーションし、基質の切断によるp-ニトロアニリン(主波長405nm、副波長620nm)の濃度の経時的な変化を測定した。

【0121】

[実施例1]

ヒト抗体型軽鎖(#7_wt)を用いて、精製工程における銅イオンの添加後、さらに銅イオンの除去を行なうことによるヒト抗体型軽鎖の保存安定性に対して及ぼす影響を調べた。

40

【0122】

具体的には、前記の[ヒト抗体型軽鎖の発現及び精製]の通り、銅イオン非存在下で発現及び精製する方法(コントロールケース)において、Ni-NTAカラム精製後の溶出液に終濃度が15μMとなるように銅イオンを添加して4、12~16時間インキュベートした後に前記酢酸バッファーで透析し、さらに陽イオン交換カラム精製後の溶出液を終濃度が50mMとなるようにエチレンジアミン四酢酸(EDTA:ethylenediaminetetraacetic acid)を添加した前記塩化ナトリウム含有トリスバッファーで透析した後に

50

前記PBSで透析した以外は、前記の〔ヒト抗体 型軽鎖の発現及び精製〕と同様にして調製する方法（ケース1）により、ヒト抗体 型軽鎖（#7__wt）を得た。得られたヒト抗体 型軽鎖（#7__wt）を4 で3ヶ月間保存した。

【0123】

〔比較例1〕

前記の〔ヒト抗体 型軽鎖の発現及び精製〕の通り、銅イオン非存在下で発現及び精製する方法（コントロールケース）において、Ni-NTAカラム精製後の溶出液に終濃度が15 μ Mとなるように銅イオンを添加して4 、12～16時間インキュベートした後に前記酢酸バッファで透析した以外は、前記の〔ヒト抗体 型軽鎖の発現及び精製〕と同様にして調製する方法（ケース2）により、ヒト抗体 型軽鎖（#7__wt）を得た。得られたヒト抗体 型軽鎖（#7__wt）を4 で3日間又は3ヶ月間保存した。

【0124】

図1Aに、コントロールケース（銅イオン無添加）における陽イオン交換クロマトグラム（各保持時間における溶出液のUV（280nm）吸収値（mAU）と溶離液の塩化ナトリウム濃度（M））を、図1Bに図1Aに示すフラクション1～3のSDS-PAGE（非還元）の結果を、それぞれ示した。フラクション1にはヒト抗体 型軽鎖（#7__wt）の単量体のみが含まれており、フラクション2には単量体と二量体の両方が含まれていたが、単量体のほうが多く含まれていた。フラクション3には、主に二量体が含まれていた。

【0125】

図2Aにケース1（一次精製後に銅イオン添加、二次精製後に銅イオン除去）における陽イオン交換クロマトグラムを、図2Bに図2Aに示すフラクション1AのSDS-PAGE（非還元）の結果を、図2Cに4 で3ヶ月間保存した後のケース1における陽イオン交換クロマトグラムを、それぞれ示した。ケース1では、1つの大きなピークが、コントロールケースのフラクション3に相当する位置に観察された。SDS-PAGEの結果によれば、このフラクション1Aに含まれているヒト抗体 型軽鎖（#7__wt）はほぼ二量体であり、銅イオン存在下で精製することにより、単量体よりも二量体が形成されやすいことが確かめられた。また、4 で3ヶ月間保存後においても、1つの大きなピークが、コントロールケースのフラクション3に相当する位置に観察された。このことから、銅イオンを除去することで、長期間安定して保存できることが明らかとなった。

【0126】

図3Aにケース2（一次精製後に銅イオン添加）における陽イオン交換クロマトグラムを、図3Bに図3Aに示すフラクション1B及び2BのSDS-PAGE（非還元）の結果を、それぞれ示した。ケース2では、精製直後では、1つの大きなピークが、コントロールケースのフラクション3に相当する位置に観察されたが、4 で3日間、3か月間保存することで、経時的にピークが増える傾向がみられた。増えたピークについても二量体であることから、銅イオンが存在することで、二量体の一部の構造が不安定になっているものと推察された。

【0127】

〔実施例2〕

ヒト抗体 型軽鎖（S35）、ヒト抗体 型軽鎖（S34）及びヒト抗体 型軽鎖（S38）を用いて、A ペプチドに対する分解活性を評価した。

具体的には、実施例1のケース1と同様の方法を用いて、ヒト抗体 型軽鎖（S35）、ヒト抗体 型軽鎖（S34）及びヒト抗体 型軽鎖（S38）を得た。次いで、FRET基質の濃度を25 μ Mとした以外は、前記〔酵素活性の評価〕と同様の方法を用いて、各ヒト抗体 型軽鎖のA ペプチドに対する分解活性を評価した。

【0128】

図4Aは、ヒト抗体 型軽鎖（S35）、ヒト抗体 型軽鎖（S34）及びヒト抗体 型軽鎖（S38）のFRET-A ペプチドに対する分解活性の経時的な変化を示すグラフである。ヒト抗体 型軽鎖（S34）及びヒト抗体 型軽鎖（S38）では、経時的に

蛍光強度が上昇しており、A ペプチドに対する分解活性が認められた。これに対して、ヒト抗体 型軽鎖 (S 3 5) では、蛍光がほとんど検出されず、A ペプチドに対する分解活性はみられなかった。

【 0 1 2 9 】

図 4 B に、ヒト抗体 型軽鎖 (S 3 5)、ヒト抗体 型軽鎖 (S 3 4) 及びヒト抗体 型軽鎖 (S 3 8) の可変領域のアミノ酸配列を示した。図 4 B において、2 / 2 D - 2 8 * 0 1 は、受精卵染色体上に存在するサブグループ I I の V 遺伝子にコードされている軽鎖の一つであり、ヒト抗体 型軽鎖 (S 3 5)、ヒト抗体 型軽鎖 (S 3 4) 及びヒト抗体 型軽鎖 (S 3 8) の可変領域に相当する部分のアミノ酸配列 (配列番号 2 4) が示されている。また、「 - 」は、2 / 2 D - 2 8 * 0 1 と同じアミノ酸残基であることを示している。アミノ酸配列の比較から、ヒト抗体 型軽鎖 (S 3 5) がカバット分類で可変領域の N 末端から 9 5 番目にプロリン残基を有しているのに対して、ヒト抗体 型軽鎖 (S 3 8) では当該プロリン残基を欠失しており、ヒト抗体 型軽鎖 (S 3 4) では当該プロリン残基がセリン残基に置換されている。このプロリン残基が欠失又は置換されることによって、抗体酵素の活性が顕著に向上するものと推察された。

【 0 1 3 0 】

[実施例 3]

可変領域のアミノ酸配列のうち、カバット分類で可変領域の N 末端から 9 5 番目のプロリン残基の有無による抗体酵素の活性への影響を調べた。すなわち、可変領域のアミノ酸配列のうち、カバット分類で可変領域の N 末端から 9 5 番目のプロリン残基を有するクローンであるヒト抗体 型軽鎖 (T 9 9)、及びヒト抗体 型軽鎖 (T 9 9) の可変領域のアミノ酸配列のうちカバット分類で可変領域の N 末端から 9 5 番目のプロリン残基を欠失させたヒト抗体 型軽鎖 (T 9 9 P 9 5) を用いて、A ペプチドに対する分解活性を評価した。

【 0 1 3 1 】

具体的には、実施例 1 のケース 1 と同様の方法を用いて、ヒト抗体 型軽鎖 (T 9 9) 及びヒト抗体 型軽鎖 (T 9 9 P 9 5) を得た。次いで、前記 [酵素活性の評価] と同様の方法を用いて、各ヒト抗体 型軽鎖の A ペプチドに対する分解活性を評価した。

【 0 1 3 2 】

図 5 A は、ヒト抗体 型軽鎖 (T 9 9) 及びヒト抗体 型軽鎖 (T 9 9 P 9 5) の F R E T - A ペプチドに対する分解活性の経時的な変化を示すグラフである。ヒト抗体 型軽鎖 (T 9 9 P 9 5) では、経時的に蛍光強度が上昇しており、A ペプチドに対する分解活性が認められた。これに対して、ヒト抗体 型軽鎖 (T 9 9) では、蛍光がほとんど検出されず、A ペプチドに対する分解活性はみられなかった。

【 0 1 3 3 】

図 5 B に、ヒト抗体 型軽鎖 (T 9 9) 及びヒト抗体 型軽鎖 (T 9 9 P 9 5) の可変領域の立体構造を予測した図を示した。図 5 B 中、「S 2 7 a」はカバット分類で可変領域の N 末端から 2 7 a 番目のセリン残基、「H 2 7 d」はカバット分類で可変領域の N 末端から 2 7 d 番目のヒスチジン残基、「H 9 3」はカバット分類で可変領域の N 末端から 9 3 番目のヒスチジン残基、「P 9 5」はカバット分類で可変領域の N 末端から 9 5 番目のプロリン残基、「D 1」はカバット分類で可変領域の N 末端から 1 番目のアスパラギン酸を示す。可変領域のアミノ酸配列のうち、カバット分類で可変領域の N 末端から 9 5 番目のプロリン残基を欠失させることで、酵素活性サイト (触媒三つ組み残基様構造) を構成するアミノ酸残基の距離 (図 5 B 中の H 9 3 及び D 1 の距離) が大きく変化することが明らかとなった。

【 0 1 3 4 】

ヒト抗体 型軽鎖 (S 3 5) もヒト抗体 型軽鎖 (T 9 9) と同様に、図 5 B に示す触媒三つ組み残基様構造を有することが確かめられており、サブグループ I I の V 遺伝子の多くが、この触媒三つ組み残基様構造を有すると考えられているが、当該遺伝子から作製される 型軽鎖の全てが酵素活性を示すわけではない。しかしながら、可変領域のアミ

ノ酸配列のうち、カバット分類で可変領域のN末端から95番目のプロリン残基を欠失させる、又はプロリン残基よりも構造のコンパクトなアミノ酸残基に置換することで、触媒三つ組み残基様構造を適切な配置に変化させることができ、抗体にペプチターゼ活性を付与できる可能性が示唆された。

【0135】

[実施例4]

サブグループIのV遺伝子に由来するクローンについて、可変領域のアミノ酸配列のうち、カバット分類で可変領域のN末端から95番目のプロリン残基の有無による抗体酵素の活性への影響を調べた。すなわち、可変領域のアミノ酸配列のうち、カバット分類で可変領域のN末端から95番目のプロリン残基を有するクローンであるヒト抗体 型軽鎖 (H55)、及び可変領域のアミノ酸配列のうち、カバット分類で可変領域のN末端から95番目のプロリン残基を有しないヒト抗体 型軽鎖 (H34)を用いて、PD-1ペプチドに対する分解活性を評価した。

10

【0136】

具体的には、実施例1のケース1と同様の方法を用いて、ヒト抗体 型軽鎖 (H55) 及びヒト抗体 型軽鎖 (H34)を得た。次いで、前記[酵素活性の評価]と同様の方法を用いて、各ヒト抗体 型軽鎖のPD-1ペプチドに対する分解活性を評価した。

【0137】

図6Aは、ヒト抗体 型軽鎖 (H55) 及びヒト抗体 型軽鎖 (H34)のFRET-PD-1ペプチドに対する分解活性の経時的な変化を示すグラフである。ヒト抗体 型軽鎖 (H34)では、経時的に蛍光強度が上昇しており、PD-1ペプチドに対する分解活性が認められた。これに対して、ヒト抗体 型軽鎖 (H55)では、蛍光がほとんど検出されず、PD-1ペプチドに対する分解活性はみられなかった。

20

【0138】

図6Bに、ヒト抗体 型軽鎖 (H55) 及びヒト抗体 型軽鎖 (H34)の可変領域のアミノ酸配列を示した。図6Bにおいて、1-39*01及び1-5*03はそれぞれ受精卵染色体上に存在するサブグループIのV遺伝子にコードされている軽鎖の一つであり、それぞれヒト抗体 型軽鎖 (H55) 及びヒト抗体 型軽鎖 (H34)の可変領域に相当する部分のアミノ酸配列 (配列番号25及び26) が示されている。また、「-」は、ヒト抗体 型軽鎖 (H55) については1-39*01と同じアミノ酸残基であることを、ヒト抗体 型軽鎖 (H34) については1-5*03と同じアミノ酸残基であることを示している。アミノ酸配列の比較から、ヒト抗体 型軽鎖 (H55) がカバット分類で可変領域のN末端から95番目にプロリン残基を有しているのに対して、ヒト抗体 型軽鎖 (H34)では当該プロリン残基がアルギニン残基に置換されている。このことから、このプロリン残基が欠失又は置換されることによって、サブグループIのV遺伝子に由来するクローンについても同様に、抗体酵素の活性が顕著に向上するものと推察された。

30

【0139】

ヒト抗体 型軽鎖 (H34)の基質特異性を検討するために、前記[酵素活性の評価]と同様の方法を用いて、Aペプチド、Tauペプチド及びPD-1ペプチドに対する分解活性を評価した。

40

【0140】

図6Cは、ヒト抗体 型軽鎖 (H34)のFRET-Aペプチド、FRET-Tauペプチド及びFRET-PD-1ペプチドに対する分解活性の経時的な変化を示すグラフである。ヒト抗体 型軽鎖 (H34)のPD-1ペプチドに対する分解活性は認められたが、FRET-Aペプチド、FRET-Tauペプチドに対する分解活性は認められなかった。よって、ヒト抗体 型軽鎖 (H34)は、PD-1ペプチドを特異的に認識し、分解することが明らかとなった。

【0141】

ヒト抗体 型軽鎖 (H34)によるPD-1ペプチドの分解サイトを同定するために、上記分解試験後の溶液を高速液体クロマトグラフ (HPLC) にて分析し、さらに、現れ

50

たピークを集めて質量分析 (MS) にて解析した。各測定条件を以下に示す。

【0142】

(HPLCの条件)

装置: Waters Delta 600, Waters 2489 UV/Visible Detector (Waters社製)

カラム: Cosmosil type, 5C18-AR-2 (4.6 × 250 mm), nacalai

移動相: A相 (MilliQ water in 0.05% TFA)、B相 (Acetonitrile in 0.05% TFA)

Gradient: 90% A相 to 40% A相 in 50 min (1% / min)

Flow rate: 1.0 mL / min

Detection: 220 nm

【0143】

(MSの条件)

装置: microTOF-Q (Bruker Daltonics製)

【0144】

図6Dに、ヒト抗体 型軽鎖 (H34) によるPD-1ペプチドの分解試験後の溶液の高速液体クロマトグラムを示した。PD-1ペプチドの分解サイトは、Q (グルタミン) とI (イソロイシン) との間のペプチド結合であることが明らかとなった。

【0145】

さらに、ヒト抗体 型軽鎖 (H34) の全長の組換えヒトPD-1に対する分解活性を評価した。具体的には、基質として全長の組換えヒトPD-1、及びコントロール基質としてヒト血清アルブミン (HSA) を用いた以外は、前記 [酵素活性の評価] と同様の方法を用いて、評価を行なった。

【0146】

図6Eに、分解試験後の各溶液のSDS-PAGE (非還元) の結果を示した。矢印で示す部分にPD-1の分解断片が確認され、ヒト抗体 型軽鎖 (H34) の全長の組換えヒトPD-1に対する分解活性が認められた。

【0147】

さらに、ヒト抗体 型軽鎖 (H34) におけるカバット分類で可変領域のN末端から95番目のプロリン残基の有無による酵素活性に対する影響を評価するために、ヒト抗体 型軽鎖 (H34) のカバット分類で可変領域のN末端から95番目にプロリン残基を挿入した変異体 (以下、「ヒト抗体 型軽鎖 (H34 __ P95 (+)) 」と称する場合がある) (配列番号27) を準備した。

【0148】

具体的には、実施例1のケース1と同様の方法を用いて、ヒト抗体 型軽鎖 (H34) 及びヒト抗体 型軽鎖 (H34 __ P95 (+)) を得た。次いで、前記 [酵素活性の評価] と同様の方法を用いて、各ヒト抗体 型軽鎖のPD-1ペプチドに対する分解活性を評価した。

【0149】

図6Fは、ヒト抗体 型軽鎖 (H34) 及びヒト抗体 型軽鎖 (H34 __ P95 (+)) のFRET-PD-1ペプチドに対する分解活性の経時的な変化を示すグラフである。ヒト抗体 型軽鎖 (H34) では、経時的に蛍光強度が上昇しており、PD-1ペプチドに対する分解活性が認められた。これに対して、ヒト抗体 型軽鎖 (H34 __ P95 (+)) では、蛍光がほとんど検出されず、PD-1ペプチドに対する分解活性はみられなかった。このことから、カバット分類で可変領域のN末端から95番目のプロリン残基の有無によって、抗体酵素の活性が変化することが確かめられた。

【0150】

以上の結果から、サブグループIIのV 遺伝子に由来する抗体 型軽鎖に限らず、他

10

20

30

40

50

のサブグループのV 遺伝子に由来する抗体 型軽鎖においても、可変領域のアミノ酸配列中のカバット分類でN末端から95番目に存在するプロリン残基を欠失又は置換させることで、酵素活性を引き出せる可能性が示唆された。

【0151】

【実施例5】

マウスのV 遺伝子に由来するクローンについて、可変領域のアミノ酸配列のうち、カバット分類で可変領域のN末端から95番目のプロリン残基の有無による抗体酵素の活性への影響を調べた。すなわち、可変領域のアミノ酸配列のうち、カバット分類で可変領域のN末端から95番目のプロリン残基を有するクローンであるマウス抗体 型軽鎖 (InfA-15L)、及び可変領域のアミノ酸配列のうち、カバット分類で可変領域のN末端から95番目のプロリン残基を欠失させたマウス抗体 型軽鎖 (InfA-15L P95) を用いて、トリプシン様パラニトロアニリン (R-pNA) に対する分解活性を評価した。なお、R-pNAは、以下の構造を有する基質であり、アルギニンとpNA間のペプチド結合が加水分解されることで、pNAが解離し、蛍光が検出される。

【0152】

R-pNA : ベンゾイル基 (Bz基) - D体/L体アルギニン - pNA

【0153】

具体的には、実施例1のケース1と同様の方法を用いて、マウス抗体 型軽鎖 (InfA-15L) 及びマウス抗体 型軽鎖 (InfA-15L P95) を得た。次いで、基質として、R-pNAを用いた以外は、前記[酵素活性の評価]と同様の方法を用いて、各ヒト抗体 型軽鎖のR-pNAに対する分解活性を評価した。

【0154】

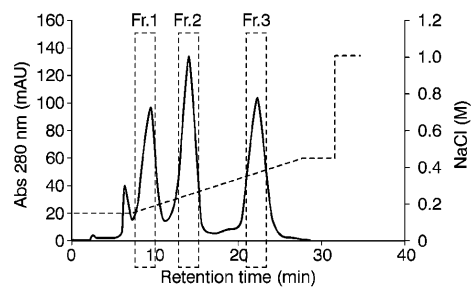
図7は、マウス抗体 型軽鎖 (InfA-15L) 及びマウス抗体 型軽鎖 (InfA-15L P95) のR-pNAに対する分解活性の経時的な変化を示すグラフである。マウス抗体 型軽鎖 (InfA-15L P95) では、経時的に蛍光強度が上昇しており、R-pNAに対する分解活性が認められた。これに対して、マウス抗体 型軽鎖 (InfA-15L) では、蛍光がほとんど検出されず、R-pNAに対する分解活性はみられなかった。このことから、マウス抗体 型軽鎖においても、ヒト抗体 型軽鎖と同様に、可変領域のアミノ酸配列中のカバット分類で可変領域のN末端から95番目に存在するプロリン残基を欠失させることで、抗体酵素の活性が顕著に向上するものと推察された。

【産業上の利用可能性】

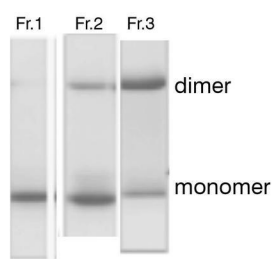
【0155】

本発明は、ヒト抗体 型軽鎖を有効成分とする医薬品の製造分野や、新規抗がん剤の開発、がん治療の分野、認知症治療の分野において利用可能である。

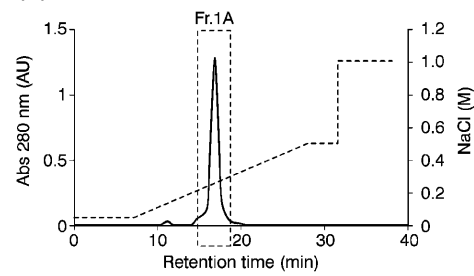
【 図 1 A 】



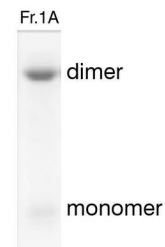
【 図 1 B 】



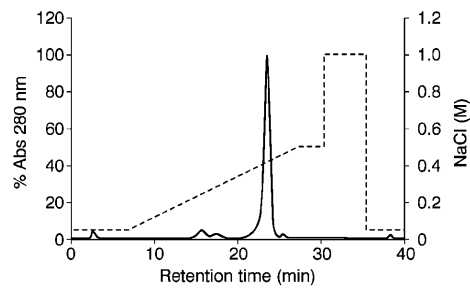
【 図 2 A 】



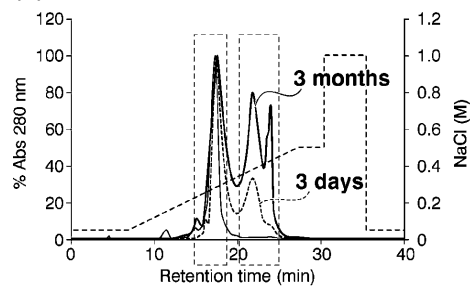
【 図 2 B 】



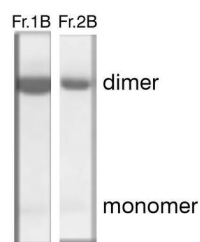
【 図 2 C 】



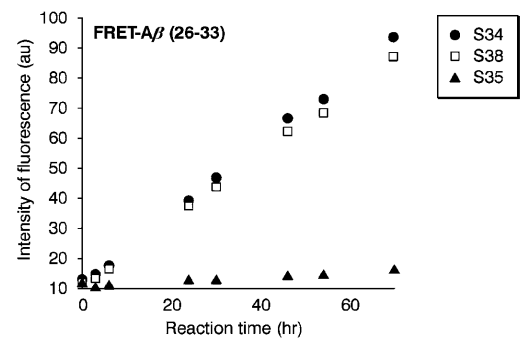
【 図 3 A 】



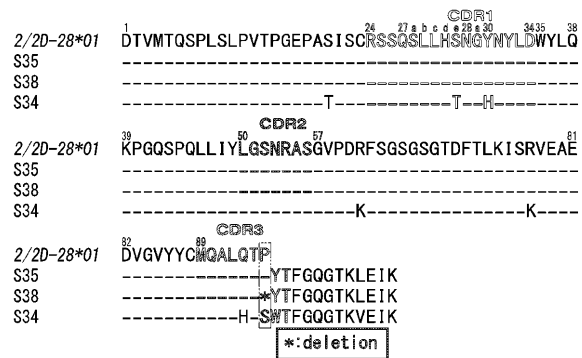
【 図 3 B 】



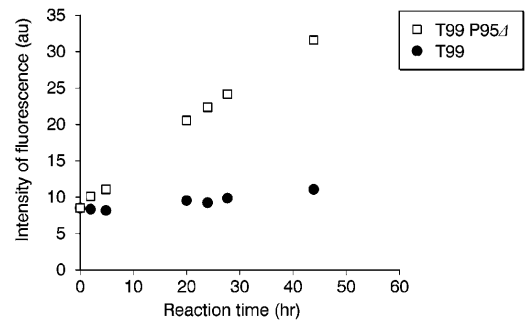
【 図 4 A 】



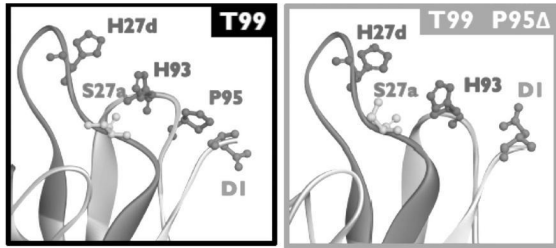
【 図 4 B 】



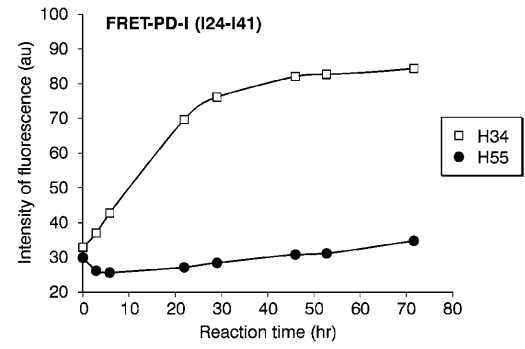
【 図 5 A 】



【 図 5 B 】



【 図 6 A 】



10

【 図 6 B 】

1-39*01
H55
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNIWYQQKPGKA
-----I-R-V-----
CDR1
24 30 35

1-5*03
H34
DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKA
-----I-R-V-----
CDR1
24 30 35

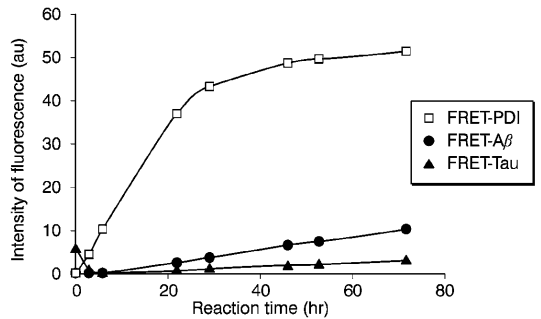
1-39*01
H55
PKLLIYAASSLSGVPSPRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY
-----T-----
CDR2
44 50 57 61 71 81

1-5*03
H34
PKLLIYDASSLESQVPSPRFSGSGSGTDFTLTISSLQPDFATY
-----K-T-----
CDR2
44 50 57 61 71 81

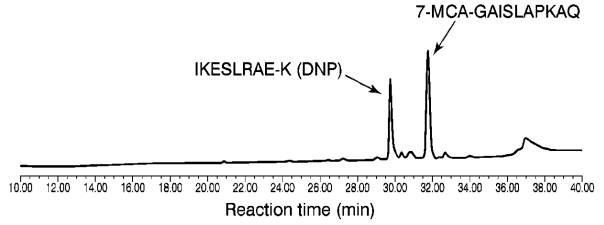
1-39*01
H55
YCQGSYSTP
-----D-----RYTFGGGKLDIK
CDR3
87 89 95

1-5*03
H34
YCQQNSYS
-----ST-----RTFGGQTKLEIK
CDR3
87 89 95

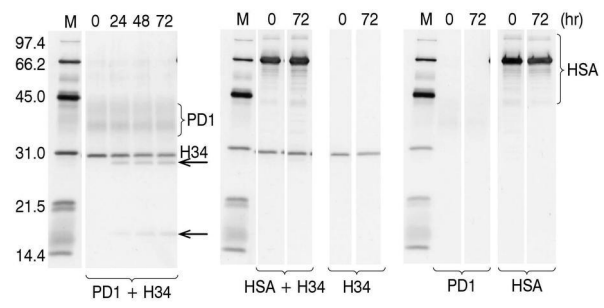
【 図 6 C 】



【 図 6 D 】



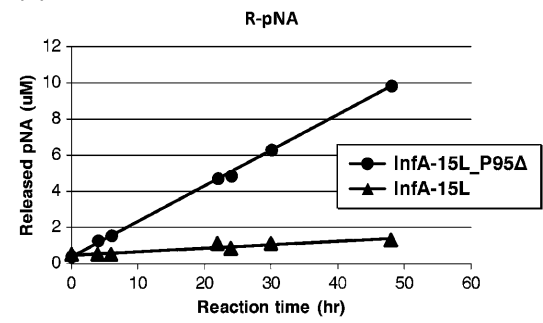
【 図 6 E 】



【 図 6 F 】



【 図 7 】



【 配列表 】

0007774293000001.app

フロントページの続き

特許法第30条第2項適用 発行者：日本化学会生体関連化学部会、日本化学会バイオテクノロジー部会、刊行物名：第12回バイオ関連化学シンポジウム、講演予稿集（第44頁）、発行年月日：2018年9月9日、にて公開した。また、集会名：第12回バイオ関連化学シンポジウム、開催場所：大阪大学吹田キャンパス（大阪府吹田市山田丘2-1）、開催日：2018年9月10日、講演題目：2C-09 抗体に酵素作用を持たせる方法（第4報）、にて発表した。

特許法第30条第2項適用 発行者：日本化学会、刊行物名：日本化学会第99春季年会、講演予稿集（講演番号：3G3-19）、発行年月日：2019年3月1日、にて公開した。また、集会名：日本化学会第99春季年会、開催場所：甲南大学岡本キャンパス（兵庫県神戸市東灘区岡本8-9-1）、開催日：2019年3月18日、講演題目：3G3-19 抗体に酵素作用を持たせる方法（第5報）、にて発表した。

前置審査

(72)発明者 一二三 恵美

大分県大分市敷戸西町11-1-503

審査官 上村 直子

(56)参考文献 特開2007-202445(JP,A)

特開2007-202444(JP,A)

特開2007-202443(JP,A)

特開2006-347922(JP,A)

国際公開第2011/102517(WO,A1)

国際公開第2015/025786(WO,A1)

特表2011-510047(JP,A)

特表2010-518815(JP,A)

特表2015-501814(JP,A)

国際公開第2013/133253(WO,A1)

国際公開第2019/079496(WO,A1)

特表2014-503188(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-15/90

C07K 16/00-19/00

C12P 21/08

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

GenBank/EMBL/DDBJ/GenSeq

UniProt/GenSeq