

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02013/133253

発行日 平成27年7月30日 (2015. 7. 30)

(43) 国際公開日 平成25年9月12日 (2013. 9. 12)

(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	E 4 B 0 2 4
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 5
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	4 H 0 4 5
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C 0 7 K 16/18	Z N A
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	A

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 34 頁)

出願番号 特願2013-544897 (P2013-544897)	(71) 出願人 503360115 独立行政法人科学技術振興機構 埼玉県川口市本町四丁目1番8号
(21) 国際出願番号 PCT/JP2013/055927	
(22) 国際出願日 平成25年3月5日 (2013.3.5)	
(31) 優先権主張番号 特願2012-52334 (P2012-52334)	(74) 代理人 100064908 弁理士 志賀 正武
(32) 優先日 平成24年3月8日 (2012.3.8)	(74) 代理人 100094400 弁理士 鈴木 三義
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	(74) 代理人 100147267 弁理士 大概 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
	(72) 発明者 一二三 恵美 大分県大分市敷戸西町11-1-503

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗がん剤

(57) 【要約】

本発明により、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が提供される。本発明の抗がん剤は主に、可変領域が配列番号1、9、若しくは13のアミノ酸配列、又はこれら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型軽鎖、又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型軽鎖を含有することを特徴とする。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(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% 以上の同一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 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% 以上の同一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 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% 以上の同一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 型軽鎖、

(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% 以上の同一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 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% 以上の同一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 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% 以上の同一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 型軽鎖、

(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% 以上の同一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 型軽鎖、又は

(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% 以上の同一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 型軽鎖
を含有することを特徴とする抗がん剤。

【請求項 2】

前記 (1) のヒト抗体 型軽鎖が、配列番号 2 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% 以上の同一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 型軽鎖であり、

前記 (2) のヒト抗体 型軽鎖が、配列番号 8 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% 以上の同一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 型軽鎖であり、

前記 (3) のヒト抗体 型軽鎖が、配列番号 10 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% 以上の同一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 型軽鎖であり、

前記 (4) のヒト抗体 型軽鎖が、配列番号 14 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

10

20

30

40

50

は当該アミノ酸配列と95%以上の同一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型軽鎖であり、

前記(5)のヒト抗体型軽鎖が、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%以上の同一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型軽鎖であり、

前記(6)のヒト抗体型軽鎖が、配列番号38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%以上の同一性を有するアミノ酸配列によって示されるポリペ

10

プチドからなり、二量体であるヒト抗体型軽鎖であり、又は

前記(7)のヒト抗体型軽鎖が、配列番号40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%以上の同一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型軽鎖である、

請求項1に記載の抗がん剤。

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、型および型に分類される。

30

【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。

40

【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】

50

【 0 0 0 5 】

【特許文献 1】特開 2 0 0 6 - 1 9 7 9 3 0 号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 6 】

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】

【 0 0 0 7 】

本発明者は、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、得られたヒト抗体型軽鎖のいくつかが、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。

10

【 0 0 0 8 】

すなわち、本発明に係る抗がん剤は、

(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 9 5 % 以上の同一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 9 5 % 以上の同一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型軽鎖、

20

(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 9 5 % 以上の同一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型軽鎖、

(4) 可変領域が配列番号 1 3 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 9 5 % 以上の同一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型軽鎖、

30

(5) 可変領域が配列番号 1 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 9 5 % 以上の同一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型軽鎖、

(6) 可変領域が配列番号 3 8 の 1 ~ 1 1 3 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 9 5 % 以上の同一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型軽鎖、

(7) 可変領域が配列番号 4 0 の 1 ~ 1 1 2 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 9 5 % 以上の同一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型軽鎖、又は

40

(8) 可変領域が配列番号 4 1 の 1 ~ 1 0 7 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 9 5 % 以上の同一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型軽鎖

を含有することを特徴とする。

【発明の効果】

【 0 0 0 9 】

50

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】

【0010】

【図1】野生型のヒト抗体 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。

【図6A】野生型のヒト抗体 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 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 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 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 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 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 型軽鎖のアミノ酸配列を示す図である。

【図6H】図6Gの続きであり、野生型のヒト抗体 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 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 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 型軽鎖」は、ヒト由来の免疫グロブリンの型の軽鎖(Light chain)を指す。

【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 型軽鎖(以下、「本発明に係るヒト抗体 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 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

10

20

30

40

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 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 型軽鎖。

(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 型軽鎖。

10

(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 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 型軽鎖。

(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 型軽鎖。

20

(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 型軽鎖。

【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 型軽鎖は、ヒト抗体 型軽鎖(#1)と称することもある。ヒト抗体 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 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。

30

【0015】

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。ヒト抗体 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 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。

40

【0016】

ヒト抗体 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 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ることから、ヒト抗体 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

50

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。

【 0 0 1 8 】

本発明に係るヒト抗体 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 型軽鎖 (# 1) の変異体と称することもある。ヒト抗体 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

【 0 0 1 9 】

本発明に係るヒト抗体 型軽鎖として用いられるヒト抗体 型軽鎖 (# 1) の変異体は、ヒト抗体 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 型軽鎖 (# 1) の変異体は、CDR 1、CDR 2、及び CDR 3 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 型軽鎖 (# 1) の変異体は、CDR 1、CDR 2、及び CDR 3 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

【 0 0 2 0 】

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 型軽鎖は、ヒト抗体 型軽鎖 (# 4) と称することもある。ヒト抗体 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 型軽鎖 (# 4) における CDR 1 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、CDR 2 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、CDR 3 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

【 0 0 2 1 】

ヒト抗体 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。

【 0 0 2 2 】

本発明に係るヒト抗体 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 型軽鎖 (# 4) の変異体と称することもある。ヒト抗体 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

【 0 0 2 3 】

本発明に係るヒト抗体 型軽鎖として用いられるヒト抗体 型軽鎖 (# 4) の変異体は、ヒト抗体 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 型軽鎖 (# 4) の変異体は、CDR 1、CDR 2、及び CDR 3 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

50

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型軽鎖は、ヒト抗体型軽鎖（#7）と称することもある。ヒト抗体型軽鎖（#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。

10

【0025】

ヒト抗体型軽鎖（#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%以上の同一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、ヒト抗体型軽鎖（#7）の変異体と称することもある。ヒト抗体型軽鎖（#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%以上の同一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。

20

【0027】

本発明に係るヒト抗体型軽鎖として用いられるヒト抗体型軽鎖（#7）の変異体は、ヒト抗体型軽鎖（#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。

30

【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型軽鎖は、ヒト抗体型軽鎖（22F6__単量体）と称することもある。ヒト抗体型軽鎖（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。

40

【0029】

ヒト抗体型軽鎖（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】

50

本発明に係るヒト抗体型軽鎖は、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型軽鎖(22F6__単量体)の変異体と称することもある。ヒト抗体型軽鎖(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型軽鎖として用いられるヒト抗体型軽鎖(22F6__単量体)の変異体は、ヒト抗体型軽鎖(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型軽鎖は、当該ヒト抗体型軽鎖(ポリペプチド)をコードす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型軽鎖をコードするポリヌクレオ

50

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。

10

【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。

20

【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ので、好ましい。

30

【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型軽鎖は、精製されることが好ましい。ヒト抗体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。

40

【0044】

また、本発明に係るヒト抗体型軽鎖は、当該ヒト抗体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

50

る。細胞や組織からのヒト抗体 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 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 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。

【0046】

本発明に係る抗がん剤は、本発明に係るヒト抗体 型軽鎖を有効成分とする。本発明に係るヒト抗体 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はいないが、本発明に係るヒト抗体 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。

10

【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 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 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）、本発明に係るヒト抗体 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、本発明に係るヒト抗体 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。

50

【0051】

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。

【0052】

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、がんの種類識別に有用であることが期待される。

【実施例】

【0053】

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。

【0054】

[実施例1]

(1. 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、複数回にわたって過剰免疫されたボランティアから得られた末梢血から、Ficoll-paqueを用いて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、目的とするcDNA(cDNAライブラリ-)を調製した。

【0055】

(2. ヒト抗体型軽鎖遺伝子の取得)

前記1.で取得したcDNAを鋳型として、サブグループIIに属するV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PCR反応を行い、約750bpのPCR産物(サブグループIIに属する型軽鎖遺伝子)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、相同性検索により、それぞれの生殖細胞系列遺伝子(germline gene)におけるV遺伝子を推定した。この結果、得られた18クローンすべてがサブグループII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:A18b)、クローン#2(生殖細胞系列遺伝子型:A3/A19)、クローン#4(生殖細胞系列遺伝子型:O11/o1)、クローン#7(生殖細胞系列遺伝子型:A3/A19)、クローン#8(生殖細胞系列遺伝子型:A18b)、クローン#9(生殖細胞系列遺伝子型:A18b)、クローン#11(生殖細胞系列遺伝子型:A18b)、クローン#13(生殖細胞系列遺伝子型:A3/A19)、及びクローン#14(生殖細胞系列遺伝子型:A3/A19)の9クローンを以降の実験に用いた。

【0056】

(3. ヒト抗体型軽鎖の発現)

前記2.で取得した各クローンをそれぞれ、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(開始メチオニン)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

10

20

30

40

50

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。

【0058】

(5. ヒト抗体 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660bp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 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660bp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 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LEHHHHHH(配列番号23)を有していた。

【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。

【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（# 1 1 __ W T）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 __ W T））は配列番号 1 0 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 __ W T））は配列番号 1 2 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 __ W T））は配列番号 1 4 に示されるアミノ酸配列であり、クローン # 1 3 に係るヒト型抗体軽鎖（ヒト型抗体軽鎖（# 1 3 __ W T））は配列番号 1 6 に示されるアミノ酸配列であり、クローン # 1 4 に係るヒト型抗体軽鎖（ヒト型抗体軽鎖（# 1 4 __ W T））は配列番号 1 8 に示されるアミノ酸配列であり、クローン 2 2 F 6 に係るヒト型抗体軽鎖（ヒト型抗体軽鎖（2 2 F 6 __ W T））は配列番号 2 0 に示されるアミノ酸配列であり、クローン 2 3 D 4 に係るヒト型抗体軽鎖（ヒト型抗体軽鎖（2 3 D 4 __ W T））は配列番号 2 2 に示されるアミノ酸配列であった。

10

【 0 0 6 1 】

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 L E H H H H H H（配列番号 2 3）が付加されたポリペプチドであった。

【 0 0 6 2 】

（ 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 結合に關与するシステイン（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、c D N A を設計した。C 末端にプラスミドベクター由来の L E H H H H H H を付加したヒト型抗体軽鎖（# 1 __ W T）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 2 2 0 番目のシステインをコードする T G T を、G C T 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 2 2 0 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 2 2 0 番目がアラニンであるために、S - S 結合が形成されず、単量体となる。

20

【 0 0 6 3 】

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 T G T を、A L E H H H H H H（配列番号 2 5）（+ 終止コドン）をコードする G C T C T C G A G C A C C A C C A C C A C C A C C A C T G A（配列番号 2 6）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 A L E H H H H H H 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 __ W T）の変異体はヒト型抗体軽鎖（# 1 __ C 2 2 0 A）、ヒト型抗体軽鎖（# 8 __ W T）の変異体はヒト型抗体軽鎖（# 8 __ C 2 2 0 A）、ヒト型抗体軽鎖（# 9 __ W T）の変異体はヒト型抗体軽鎖（# 9 __ C 2 2 0 A）、ヒト型抗体軽鎖（# 1 1 __ W T）の変異体はヒト型抗体軽鎖（# 1 1 __ C 2 2 0 A）、ヒト型抗体軽鎖（# 4 __ W T）の変異体はヒト型抗体軽鎖（# 4 __ C 2 2 0 A）、ヒト型抗体軽鎖（# 2 __ W T）の変異体はヒト型抗体軽鎖（# 2 __ C 2 2 0 A）、ヒト型抗体軽鎖（# 7 __ W T）の変異体はヒト型抗体軽鎖（# 7 __ C 2 2 0 A）、ヒト型抗体軽鎖（# 1 3 __ W T）の変異体はヒト型抗体軽鎖（# 1 3 __ C 2 2 0 A）、ヒト型抗体軽鎖（# 1 4 __ W T）の変異体はヒト型抗体軽鎖（# 1 4 __ C 2 2 0 A）、ヒト型抗体軽鎖（2 2 F 6 __ W T）の変異体はヒト型抗体軽鎖（2 2 F 6 __ C 2 2 0 A）、ヒト型抗体軽鎖（2 3 D 4 __ W T）の変異体はヒト型抗体軽鎖（2 3 D 4 __ C 2 2 0 A）とそれぞれ称する。

30

40

【 0 0 6 4 】

（ 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 __ W T）及びヒト型抗体軽鎖（# 1 __ C 2 2 0 A）の一次精製における N

50

i - N T A カラムクロマトグラムおよび S D S - P A G E 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 S D S - P A G E 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 (2 5 m M の T r i s - H C l (p H 8 . 0)、0 . 2 5 M の N a C l、4 0 m M のイミダゾール、0 . 0 0 5 % の T w e e n 2 0) 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 4 0 m M から 3 0 0 m M 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 N i - N T A アガロースカラム (直径 1 c m、2 m l) を用い、精製を通して流速を 0 . 1 m l / 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 3 1 k D a のバンドが、フラクション番号 3 0 ~ 3 7 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。

【 0 0 6 5 】

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 (5 0 m M の酢酸ナトリウム (p H 5 . 4)、0 . 2 M の N a C l、0 . 0 0 5 % の T w e e n 2 0) 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、N a C l の濃度を 0 . 2 M から 0 . 4 M 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 S P 5 P W (T O S H O) を用い、精製を通して流速を 0 . 1 m l / 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 1 0 ~ 1 5)、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 2 5 ~ 3 0) に含まれる成分について、S D S - P A G E 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 3 1 k D a 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 3 1 k D a のバンドが a のみにおいて検出され、約 5 1 k D a 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 3 1 k D a であり、二量体は約 5 1 k D a 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。

【 0 0 6 6 】

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、N i - N T A 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。

【 0 0 6 7 】

(8 . がん細胞に対する細胞障害性)

各種ヒト抗体 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、A T C C より購入した A 5 4 9 (ヒト肺胞上皮がん細胞株) を用い、1 0 % F C S (ウシ胎児血清) 含有 F - 1 2 K 培地を用いる通常の方法で培養した。

【 0 0 6 8 】

まず、凍結された A 5 4 9 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 9 6 ウェルプレートに $100 \mu\text{L}$ ずつ播種した。3 7 °C で 2 4 時間培養した後、当該 9 6 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 $1 \text{ mg} / \text{mL}$ に調製した各ヒト抗体 型軽鎖を、各ウェルに $100 \mu\text{L}$ ずつ添加した。ヒト抗体 型軽鎖を添加してから 2 4 時間後、及び 4 8 時間後 (細胞を播種してから 4 8 時間後、7 2 時間後) に、各ウェルに W S T - 1 試薬 (R o c h e 社製) を $10 \mu\text{L}$ 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 (A b s 450 nm) を測定した。得られた吸光度の結果に基づき、ヒト抗体 型軽鎖を添加しなかったウェル (N . C .) の細胞生存率を 1 0 0 % とし、各ウェルの細胞生存率を求め、添加したヒト抗体 型軽鎖の細胞障害性を評価した。

【 0 0 6 9 】

各ヒト抗体 型軽鎖について、ヒト抗体 型軽鎖を添加してから 2 4 時間後及び 4 8 時

10

20

30

40

50

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

10

20

【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

30

【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。

40

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、ヒト抗体型軽鎖添加前(0時間)とヒト抗体型軽鎖添加後(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強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

50

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

10

20

30

40

【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

50

ミノ酸配列は配列番号 4 3 に、クローン (# 7 TR) のアミノ酸配列は配列番号 4 4 に、クローン (# 7 VL) のアミノ酸配列は配列番号 4 5 に、クローン (S 1 3) のアミノ酸配列は配列番号 4 6 に、クローン (S 2 1) のアミノ酸配列は配列番号 4 7 に、クローン (S 3 8) のアミノ酸配列は配列番号 4 8 に、クローン (# 1 0) のアミノ酸配列は配列番号 4 9 に、クローン (C 6 7) のアミノ酸配列は配列番号 5 0 に、クローン (C 8 2) のアミノ酸配列は配列番号 5 1 に、クローン (C 8 8) のアミノ酸配列は配列番号 5 2 に、クローン (# 7 G) のアミノ酸配列は配列番号 5 3 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 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】

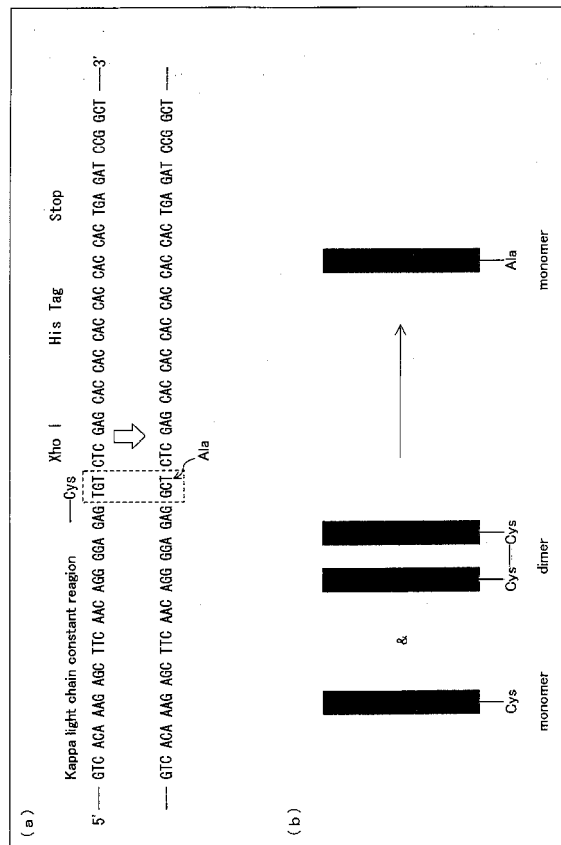
【0075】

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。

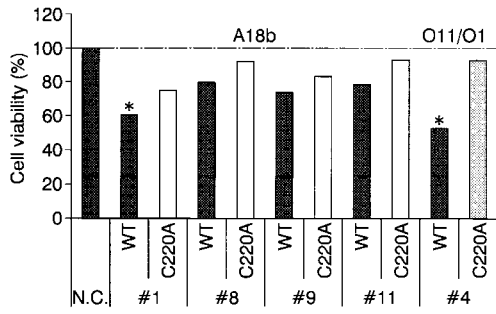
【図 1】

	可変領域	CDR1	CDR2
#1-4 (A18b)		DIVVMTOTPLSLSVTPGEPASISCRSSQSLHSDGKT-YLYWYLOKPGHSPHLLIYEVS	58
#2-3 (A3/A19)		DIVVMTGSPLSLVPYTPGEPASISCRSSQSLHSDGKT-YLYWYLOKPGHSPHLLIYEVS	58
#4-1 (O2/O1)		DIVVMTOTPLSLSVTPGEPASISCRSTOSLSDSDGVNPSFDWYVYKPKPGSQPQLLHIFG	59
#7-2 (A3/A19)		DIVVMTGSPLSLVPYTPGEPASISCRSSQSLHSDGKT-YLYWYLOKPGHSPHLLIYEVS	58
#8-2 (A18b)		DIVVMTOTPLSLSVTPGEPASISCRSSQSLHSDGKT-YLYWYLOKPGHSPHLLIYEVS	58
#9a-2 (A18b)		DIVVMTOTPLSLSVTPGEPASISCRSSQSLHSDGKT-YLYWYLOKPGHSPHLLIYEVS	58
#11-1 (A18b)		DIVVMTOTPLSLSVTPGEPASISCRSSQSLHSDGKT-YLYWYLOKPGHSPHLLIYEVS	58
#13-1 (A3/A19)		DIVVMTGSPLSLVPYTPGEPASISCRSSQSLHSDGKT-YLYWYLOKPGHSPHLLIYEVS	58
#14-1 (A3/A19)		DIVVMTGSPLSLVPYTPGEPASISCRSSQSLHSDGKT-YLYWYLOKPGHSPHLLIYEVS	58
22F6-4 (A3/A19)		DIVVMTGSPLSLVPYTPGEPASISCRSSQSLHSDGKT-YLYWYLOKPGHSPHLLIYEVS	58
23D4-1 (A3/A19)		DIVVMTGSPLSLVPYTPGEPASISCRSSQSLHSDGKT-YLYWYLOKPGHSPHLLIYEVS	58
		***** ** ** ** **	
	CDR3	定常領域	
#1-4 (A18b)	RFSSVDPDRFSGSGSDFTLKI SRVEADVGVVYVYQGLHLPQYIFGGGKLEIKRTVAA	118	
#2-3 (A3/A19)	RASVDPDRFSGSGSDFTLKI SRVEADVGVVYVYQGLHLPQYIFGGGKLEIKRTVAA	118	
#4-1 (O2/O1)	RASVDPDRFSGSGSDFTLKI SRVEADVGVVYVYQGLHLPQYIFGGGKLEIKRTVAA	118	
#7-2 (A3/A19)	RASVDPDRFSGSGSDFTLKI SRVEADVGVVYVYQGLHLPQYIFGGGKLEIKRTVAA	117	
#8-2 (A18b)	RFSSVDPDRFSGSGSDFTLKI SRVEADVGVVYVYQGLHLPQYIFGGGKLEIKRTVAA	117	
#9a-2 (A18b)	RFSSVDPDRFSGSGSDFTLKI SRVEADVGVVYVYQGLHLPQYIFGGGKLEIKRTVAA	117	
#11-1 (A18b)	RFSSVDPDRFSGSGSDFTLKI SRVEADVGVVYVYQGLHLPQYIFGGGKLEIKRTVAA	117	
#13-1 (A3/A19)	RASVDPDRFSGSGSDFTLKI SRVEADVGVVYVYQGLHLPQYIFGGGKLEIKRTVAA	118	
#14-1 (A3/A19)	RASVDPDRFSGSGSDFTLKI SRVEADVGVVYVYQGLHLPQYIFGGGKLEIKRTVAA	118	
22F6-4 (A3/A19)	RASVDPDRFSGSGSDFTLKI SRVEADVGVVYVYQGLHLPQYIFGGGKLEIKRTVAA	118	
23D4-1 (A3/A19)	RASVDPDRFSGSGSDFTLKI SRVEADVGVVYVYQGLHLPQYIFGGGKLEIKRTVAA	118	
	***** ** ** ** *		
#1-4 (A18b)	PSVFI FPPSDEQLKSGTASVQCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEGDSKDS	178	
#2-3 (A3/A19)	PSVFI FPPSDEQLKSGTASVQCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEGDSKDS	177	
#4-1 (O2/O1)	PSVFI FPPSDEQLKSGTASVQCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEGDSKDS	178	
#7-2 (A3/A19)	PSVFI FPPSDEQLKSGTASVQCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEGDSKDS	177	
#8-2 (A18b)	PSVFI FPPSDEQLKSGTASVQCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEGDSKDS	177	
#9a-2 (A18b)	PSVFI FPPSDEQLKSGTASVQCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEGDSKDS	177	
#11-1 (A18b)	PSVFI FPPSDEQLKSGTASVQCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEGDSKDS	178	
#13-1 (A3/A19)	PSVFI FPPSDEQLKSGTASVQCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEGDSKDS	177	
#14-1 (A3/A19)	PSVFI FPPSDEQLKSGTASVQCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEGDSKDS	177	
22F6-4 (A3/A19)	PSVFI FPPSDEQLKSGTASVQCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEGDSKDS	177	
23D4-1 (A3/A19)	PSVFI FPPSDEQLKSGTASVQCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEGDSKDS	177	
	***** ** ** ** *		
#1-4 (A18b)	YSLSSTLTLSKADYEKHKLYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	220	
#2-3 (A3/A19)	YSLSSTLTLSKADYEKHKLYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	219	
#4-1 (O2/O1)	YSLSSTLTLSKADYEKHKLYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	220	
#7-2 (A3/A19)	YSLSSTLTLSKADYEKHKLYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	219	
#8-2 (A18b)	YSLSSTLTLSKADYEKHKLYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	219	
#9a-2 (A18b)	YSLSSTLTLSKADYEKHKLYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	219	
#11-1 (A18b)	YSLSSTLTLSKADYEKHKLYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	219	
#13-1 (A3/A19)	YSLSSTLTLSKADYEKHKLYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	220	
#14-1 (A3/A19)	YSLSSTLTLSKADYEKHKLYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	219	
22F6-4 (A3/A19)	YSLSSTLTLSKADYEKHKLYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	219	
23D4-1 (A3/A19)	YSLSSTLTLSKADYEKHKLYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	219	
	***** ** ** ** *		

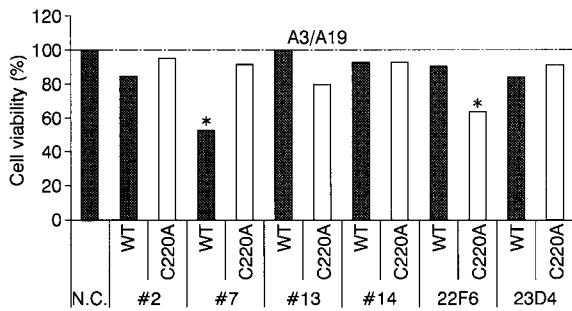
【図 2】



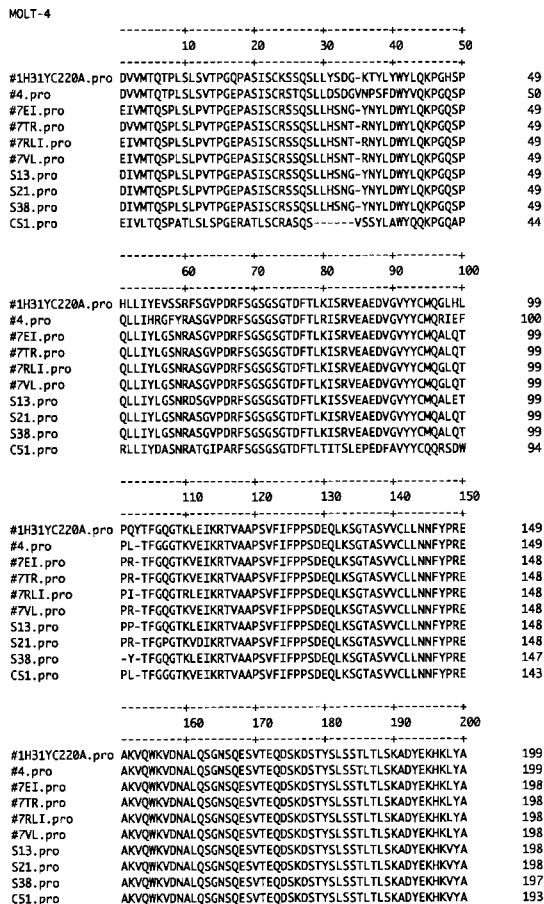
【 図 4 】



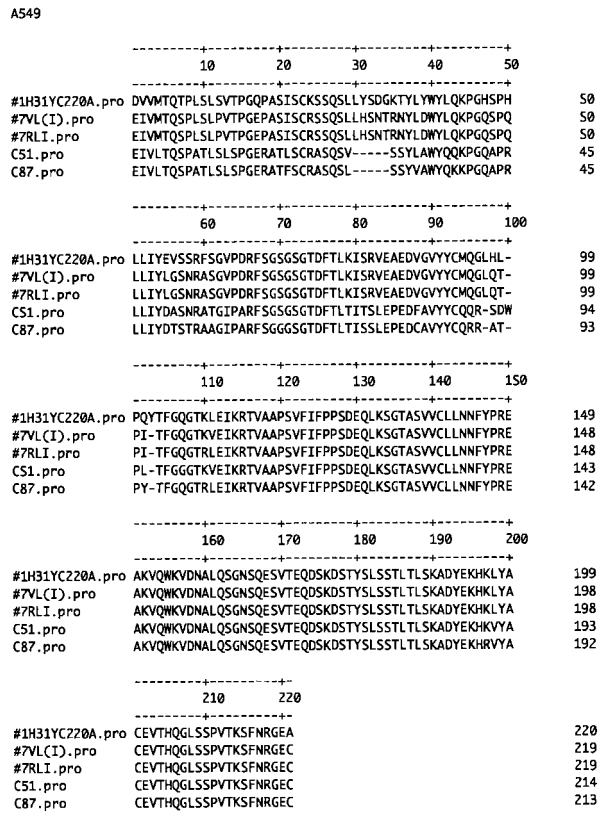
【 図 5 】



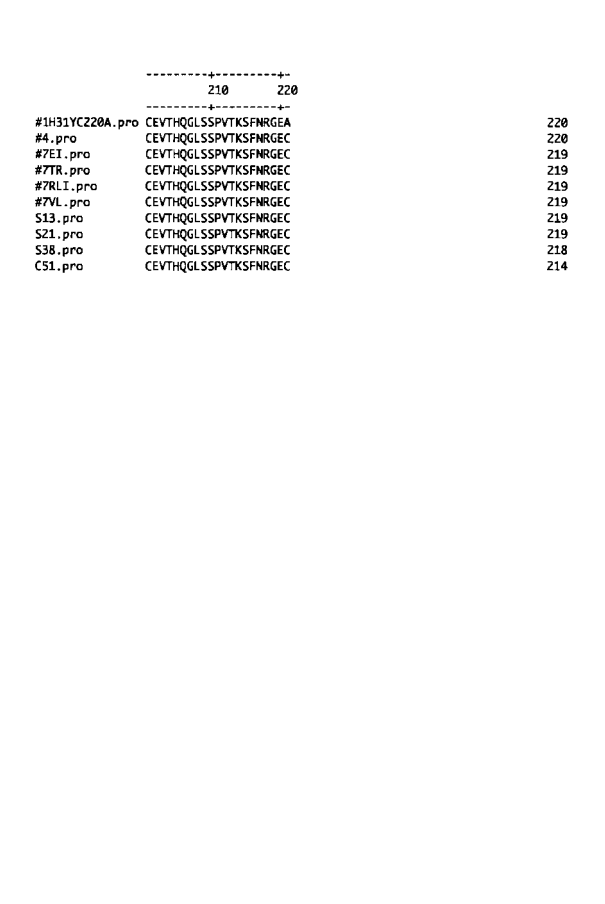
【 図 6 B 】



【 図 6 A 】



【 図 6 C 】



【 6 D 】

ES-2

		10	20	30	40	50
#1H31YC220A.pro	DVMTQTPLSL SVTPGEPASISCRSSQSLLSYSDG-KT-YLWYWKPGHS					
#4.pro	DVMTQTPLSL SVTPGEPASISCRSTQSLLDSDGVNP-SFDWYVQKPGQS					
#7.pro	DVMTQSPSLPVTGEPASISCRSSQSLLSHNG-YN-YLDWYKQPGQS					
#7RLI.pro	EIVMTQSPSLPVTGEPASISCRSSQSLLSHNT-RN-YLDWYKQPGQS					
#10.pro	DVMTQTPLSL SVTPGEPASISCRSSQSLLSHSDG-KT-YFYWYKQPGRS					
#11.pro	DIVMTQTPLSL SVTPGEPASISCRSSQSLLSHSDG-KT-YLWYKQPGQS					
22F6.pro	DIVMTQSPSLPVTGEPASISCRSSQSLLSHNG-FN-YLDWYKQPGQS					
22F6C220A.pro	DIVMTQSPSLPVTGEPASISCRSSQSLLSHNG-FN-YLDWYKQPGQS					
C51.pro	EIVLTQSPATLSL SPGERATLS CRASQS-----VSS-YLAWYQKPGQA					
C67.pro	EIVLTQSPATLSL SPGERATLS CRASQS-----VSSNLAWYQKPGQA					
C82.pro	EIVLTQSPATLSL SPGERATLS CRASQS-----VGP-FLAWYQKPGQA					
C88.pro	EIVLTQSPATLSL SPGERATLS CRASE5-----VSG-YLAWYQKPGQA					

		60	70	80	90	100
#1H31YC220A.pro	PHLLIYEVSRFSGVDRFSGSGSDTDFLTKISRVEADVGVYCMQ--G					
#4.pro	PQLLIHRGFYRASGVDRFSGSGSDTDFLTKISRVEADVGVYCMQ--R					
#7.pro	PQLLIYLGSRASGVDRFSGSGSDTDFLTKISRVEADVGVYCMQ--A					
#7RLI.pro	PQLLIYLGSRASGVDRFSGSGSDTDFLTKISRVEADVGVYCMQ--G					
#10.pro	PQLLIYEVSRFSGVDRFSGSGSDTDFLTKISRVEADVGVYCMQ--G					
#11.pro	PQLLIYEVSRFSGVDRFSGSGSDTDFLTKISRVEADVGVYCMQ--G					
22F6.pro	PQLLIYLGSTRASGVDRFSGSGSDTDFLTKISRVEADVGVYCMQ--A					
22F6C220A.pro	PQLLIYLGSTRASGVDRFSGSGSDTDFLTKISRVEADVGVYCMQ--A					
C51.pro	PRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSDTDFLTIISLEPEDFAVYCCQ--R					
C67.pro	PRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSDTDFLTIISLEPEDFAVYCCQ--R					
C82.pro	PRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSDTDFLTIISLEPEDFAVYCCQ--R					
C88.pro	PRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSDTDFLTIISLEPEDFAVYCCQ--R					

【 6 E 】

		110	120	130	140	150
#1H31YC220A.pro	LHLP---YTFGGQTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLN					
#4.pro	IEFP---LTFGGQTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLN					
#7.pro	LQTP---RTFGQTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLN					
#7RLI.pro	LQTP---ITFGQTKRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLN					
#10.pro	TYYP---HTFGQTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLN					
#11.pro	IHLP---YTFGGQTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLN					
22F6.pro	VQTP---FTFGPTRLDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLN					
22F6C220A.pro	VQTP---FTFGPTRLDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLN					
C51.pro	SDWP---LTFGGQTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLN					
C67.pro	SLW---TFGGQTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLN					
C82.pro	YTWP--G-NSFGGAKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLN					
C88.pro	SNWPPR--STFGQTKRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLN					

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

【 6 F 】

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

【 6 G 】

8xPC-3

		10	20	30	40	50
#4.pro	DVMTQTPLSL SVTPGEPASISCRSTQSLLDSDGVNPSFDWYVQKPGQS					50
#7G.pro	DVMTQSPSLPVTGEPASISCRSSQSLLSHNGYN-YLDWYKQPGQS					49
#7E1.pro	EIVMTQSPSLPVTGEPASISCRSSQSLLSHNGYN-YLDWYKQPGQS					49
#7RLI.pro	EIVMTQSPSLPVTGEPASISCRSSQSLLSHNT-RN-YLDWYKQPGQS					49
#7V1.pro	EIVMTQSPSLPVTGEPASISCRSSQSLLSHNT-RN-YLDWYKQPGQS					49
#13.pro	DVMTQSPSLPVTGEPASISCRSSQSLLSHNGYN-YLDWYKQPGQS					49
#14.pro	DIVMTQSPSLPVTGEPASISCRSSQSLLSHNGYN-YLDWYKQPGQS					49
22F6.pro	DIVMTQSPSLPVTGEPASISCRSSQSLLSHNGFN-YLDWYKQPGQS					49

		60	70	80	90	100
#4.pro	QLLIHRGFYRASGVDRFSGSGSDTDFLTKISRVEADVGVYCMQRIEF					100
#7G.pro	QLLIYLGSRASGVDRFSGSGSDTDFLTKISRVEADVGVYCMQGLQT					99
#7E1.pro	QLLIYLGSRASGVDRFSGSGSDTDFLTKISRVEADVGVYCMQALQT					99
#7RLI.pro	QLLIYLGSRASGVDRFSGSGSDTDFLTKISRVEADVGVYCMQGLQT					99
#7V1.pro	QLLIYLGSRASGVDRFSGSGSDTDFLTKISRVEADVGVYCMQGLQT					99
#13.pro	QLLIYLGSRASGVDRFSGSGSDTDFLTKISRVEADVGVYCMQALQT					99
#14.pro	QLLIYLGSRASGVDRFSGSGSDTDFLTKISRVEADVGVYCMQALQT					99
22F6.pro	QLLIYLGSTRASGVDRFSGSGSDTDFLTKISRVEADVGVYCMQAVQT					99

		110	120	130	140	150
#4.pro	PL-TFGGQTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNIFYPRE					149
#7G.pro	PR-TFGGQTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNIFYPRE					148
#7E1.pro	PR-TFGGQTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNIFYPRE					148
#7RLI.pro	PI-TFGGQTKRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNIFYPRE					148
#7V1.pro	PR-TFGGQTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNIFYPRE					148
#13.pro	PPWTFGGQTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNIFYPRE					149
#14.pro	PR-TFGGQTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNIFYPRE					148
22F6.pro	PF-TFGPTRLDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNIFYPRE					148

		160	170	180	190	200
#4.pro	AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSSLTLSKADYEKHKLYA					199
#7G.pro	AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSSLTLSKADYEKHKLYA					198
#7E1.pro	AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSSLTLSKADYEKHKLYA					198
#7RLI.pro	AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSSLTLSKADYEKHKLYA					198
#7V1.pro	AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSSLTLSKADYEKHKLYA					198
#13.pro	AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSSLTLSKADYEKHKLYA					199
#14.pro	AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSSLTLSKADYEKHKLYA					198
22F6.pro	AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSSLTLSKADYEKHKLYA					198

【 図 6 H 】

	210	220
#4.pro	CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	220
#7G.pro	CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	219
#7E1.pro	CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	219
#7RLI.pro	CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	219
#7VL.pro	CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	219
#13.pro	CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	220
#14.pro	CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	219
Z2F6.pro	CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	219

【 図 7 】

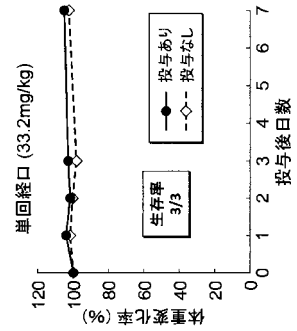
【 図 6 I 】

B-16

	10	20	30	40	50
#7.pro	DVVMTQSPLSLPVTGPAPASISCRSSQSLHNSGYNLWYLYKPKGQSPQ				
#7.pro	LLIYLSNRASGVPDRFSGSGSGDTFLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTP				
#7.pro	RTFGQGTKVEIKRTVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAK				
#7.pro	VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSTLTLSKADYEKHKLYACE				
#7.pro	VTHQGLSSPVTKSFNRGEC				

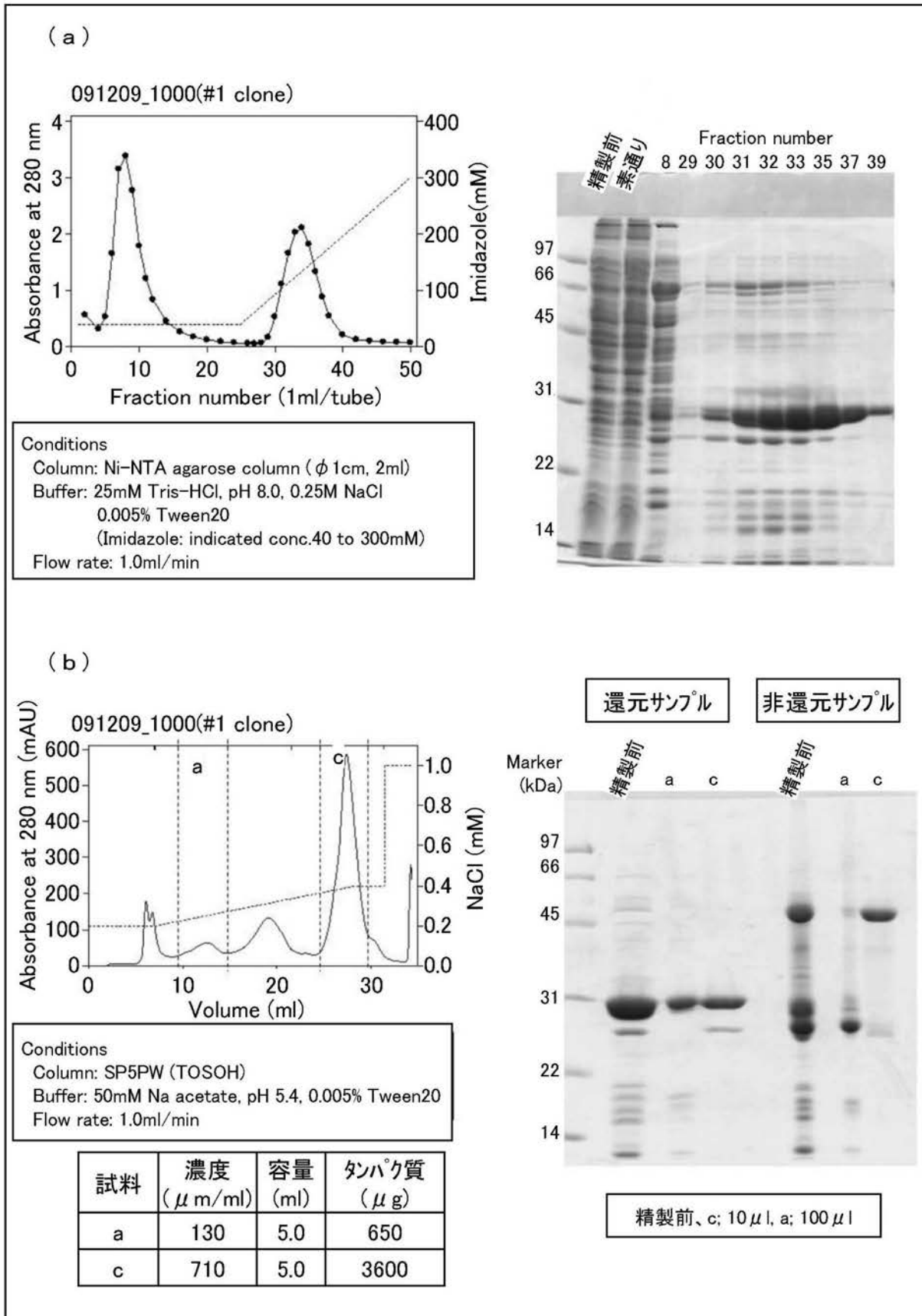
In vivo assay (via oral)

投与方法	投与用量 (mg/kg)	投与容量 (mg/mL)	投与試料濃度 (mg/mL)	動物数 (匹)	観察期間 (日)
単回経口	33.2	20	1.66	3	7
単回経口	0	0	3	7	



投与用量 (mg/kg)	肉眼の所見 異常なし			
	外観	頭蓋腔	胸腔内	腹腔内
33.2	3/3	3/3	3/3	3/3
0	3/3	3/3	3/3	3/3

【 図 3 】

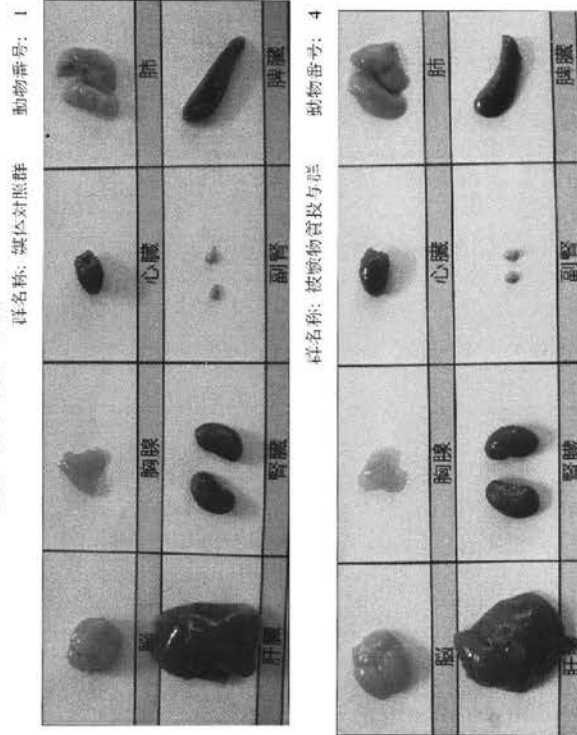


ヒト型「スーパー抗体酵素」の安全性試験(毒性試験)

- 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)

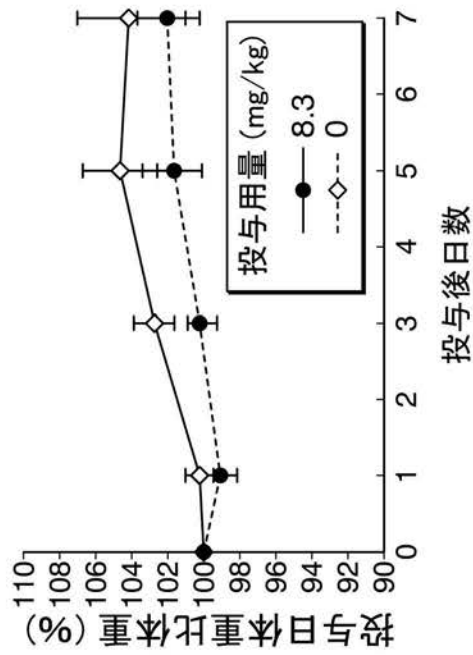
全てにおいて異常なし

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

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

2013133253000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成25年9月27日(2013.9.27)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

(1) 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%以上の同一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型軽鎖、又は

(2) 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%以上の同一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型軽鎖、
を含有することを特徴とする抗がん剤。

【請求項2】

前記(1)のヒト抗体型軽鎖が、配列番号10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%以上の同一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型軽鎖であり、又は

前記(2)のヒト抗体型軽鎖が、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%以上の同一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型軽鎖である、
請求項1に記載の抗がん剤。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0008

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0008】

すなわち、本発明に係る抗がん剤は、

(1) 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%以上の同一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型軽鎖、又は

(2) 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%以上の同一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型軽鎖、
を含有することを特徴とする。

【手続補正書】

【提出日】平成26年1月20日(2014.1.20)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【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 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列によって示され、かつ肺癌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 型軽鎖を含有することを特徴とする肺癌に対する抗がん剤。

【請求項 2】

前記ヒト抗体 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 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列によって示され、かつ肺癌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 型軽鎖である、請求項 1 に記載の肺癌に対する抗がん剤。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0008

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0008】

すなわち、本発明に係る肺癌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 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列によって示され、かつ肺癌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 型軽鎖を含有することを特徴とする。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2013/055927
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K39/395(2006.01)i, A61P11/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C07K16/18(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K39/395, A61P11/00, A61P35/00, C07K16/18, C12N15/09		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2013 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2013 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2013		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2011/102517 A1 (Japan Science and Technology Agency), 25 August 2011 (25.08.2011), entire text; particularly, paragraphs [0297] to [0300]; fig. 51 & EP 2537931 A1 & US 2012/0322135 A1	1,2
X	JP 2006-197930 A (Hiroshima-Ken), 03 August 2006 (03.08.2006), paragraph [0056]; fig. 20 (Family: none)	1,2
X	JP 2006-501856 A (Integrigen, Inc.), 19 January 2006 (19.01.2006), paragraph [0141]; sequence no.4, 6 & WO 2004/033658 A2 & EP 1565553 A2 & US 2006/0088883 A1	1,2
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T"
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X"
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y"
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&"
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 18 April, 2013 (18.04.13)		Date of mailing of the international search report 07 May, 2013 (07.05.13)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/055927

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2005-508176 A (Pfizer Products Inc.), 31 March 2005 (31.03.2005), paragraphs [0203] to [0207], [0237] & WO 2003/040170 A2 & EP 1476185 A2 & US 2003/0211100 A1	1, 2
X	WO 2008/029807 A1 (Japan Science and Technology Agency), 13 March 2008 (13.03.2008), entire text; particularly, examples 3, 8 (Family: none)	1, 2
X	JP 2011-526480 A (Bristol-Myers Squibb Co.), 13 October 2011 (13.10.2011), paragraph [0253]; example 7; fig. 2, 10 & WO 2009/100110 A1 & EP 2240203 A1 & US 2010/0330078 A1	1, 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/055927

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
See extra sheet.

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/055927

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

Claim 1 relates to an antitumor agent which is characterized by containing any one of human antibody κ light chains (1)-(8), while claim 2 relates to an antitumor agent of claim 1, wherein the human antibody κ light chains (1)-(8) respectively comprise specific polypeptides.

The (1)-(8) in claim 1 are common only in being "an antitumor agent which is characterized by containing a human antibody κ light chain". An antitumor agent which contains (1) (document 1), an antitumor agent which contains (2) (documents 2 and 3), an antitumor agent which contains (4) (documents 2-4), an antitumor agent which contains (6) (document 1), an antitumor agent which contains (7) (document 5) and an antitumor agent which contains (8) (document 6) are, however, publicly known, respectively. Consequently, the above-mentioned common feature cannot be considered as a special technical feature within the meaning of PCT Rule 13.2.

Consequently, since a novel special technical feature is not shared among the general inventive concepts of the inventions which are respectively set forth in (1) to (8) in claim 1, it is not considered that these inventions are relevant to a group of inventions which are so linked as to form a single general inventive concepts, and it is considered that these inventions are relevant to invention groups which comprise eight inventions different from one another.

Document 1: WO 2011/102517 A1 (Japan Science and Technology Agency), 25 August 2011 (25.08.2011)

Document 2: JP 2006-197930 A (Hiroshima-Ken), 03 August 2006 (03.08.2006)

Document 3: JP 2006-501856 A (Integrigen, Inc.), 19 January 2006 (19.01.2006)

Document 4: JP 2005-508176 A (Pfizer Products Inc.), 31 March 2005 (31.03.2005)

Document 5: WO 2008/029807 A1 (Japan Science and Technology Agency), 13 March 2008 (13.03.2008)

Document 6: JP 2011-526480 A (Bristol-Myers Squibb Co.), 13 October 2011 (13.10.2011)

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 3 / 0 5 5 9 2 7									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. A61K39/395(2006.01)i, A61P11/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C07K16/18(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i											
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. A61K39/395, A61P11/00, A61P35/00, C07K16/18, C12N15/09											
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2013年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2013年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2013年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2013年	日本国実用新案登録公報	1996-2013年	日本国登録実用新案公報	1994-2013年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2013年										
日本国実用新案登録公報	1996-2013年										
日本国登録実用新案公報	1994-2013年										
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号									
X	WO 2011/102517 A1 (独立行政法人科学技術振興機構) 2011.08.25, 文献全体、特に、[0297] ~ [0300]、図51 & EP 2537931 A1 & US2012/0322135 A1	1, 2									
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。											
* 引用文献のカテゴリー		の日の後に公表された文献									
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの		「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの									
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの		「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの									
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)		「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの									
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」同一パテントファミリー文献									
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願											
国際調査を完了した日 18.04.2013		国際調査報告の発送日 07.05.2013									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 小森 潔	4U 3762								
		電話番号 03-3581-1101 内線 3439									

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 3 / 0 5 5 9 2 7
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	JP 2006-197930 A (広島県) 2006.08.03, 【0056】、図20 (ファミリーなし)	1,2
X	JP 2006-501856 A (インテグリジェン, インコーポレイテッド) 2006.01.19, 【0141】、配列番号4、配列番号6 & WO 2004/033658 A2 & EP 1565553 A2 & US 2006/0088883 A1	1,2
X	JP 2005-508176 A (ファイザー・プロダクツ・インク) 2005.03.31, 【0203】～【0207】、【0237】 & WO 2003/040170 A2 & EP 1476185 A2 & US 2003/0211100 A1	1,2
X	WO 2008/029807 A1 (独立行政法人科学技術振興機構) 2008.03.13, 文献全体、特に、実施例3、実施例8 (ファミリーなし)	1,2
X	JP 2011-526480 A (プリストルマイヤーズ・スクイブ・カンパニ ー) 2011.10.13, 【0253】、実施例7、図2、図10 & WO 2009/100110 A1 & EP 2240203 A1 & US 2010/0330078 A1	1,2

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 3 / 0 5 5 9 2 7

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求項 _____ は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。つまり、
2. 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

特別ページを参照のこと。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

様式PCT/ISA/210 (第1ページの続葉(2)) (2009年7月)

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 3 / 0 5 5 9 2 7

請求項1は、(1)～(8)のいずれかのヒト抗体 κ 型軽鎖を含有することを特徴とする抗がん剤に関するものであり、請求項2は、前記(1)～(8)のヒト抗体 κ 型軽鎖が、特定のポリペプチドからなる請求項1に記載の抗がん剤に関するものである。

請求項1の(1)～(8)は、それぞれ「ヒト抗体 κ 型軽鎖を含有することを特徴とする抗がん剤」の点でのみ共通するが、(1)を含有する抗がん剤(文献1)、(2)を含有する抗がん剤(文献2、3)、(4)を含有する抗がん剤(文献2～4)、(6)を含有する抗がん剤(文献1)、(7)を含有する抗がん剤(文献5)、(8)を含有する抗がん剤(文献6)はそれぞれ公知であるから、この点についてPCT規則13.2における特別な技術的特徴とすることはできない。

よって、請求項1の(1)～(8)にそれぞれ記載される発明の一般的発明概念の間には、新規な特別な技術的特徴が共有されていないことから、これらの発明は単一の一般的発明概念を形成しているように連関している一群の発明であるとは認められず、異なった8個の発明からなる発明群であると認められる。

文献1 : WO 2011/102517 A1 (独立行政法人科学技術振興機構) 2011.08.25

文献2 : JP 2006-197930 A (広島県) 2006.08.03

文献3 : JP 2006-501856 A (インテグリジェン, インコーポレイテッド) 2006.01.19

文献4 : JP 2005-508176 A (ファイザー・プロダクツ・インク) 2005.03.31

文献5 : WO 2008/029807 A1 (独立行政法人科学技術振興機構) 2008.03.13

文献6 : JP 2011-526480 A (プリストルーマイヤーズ・スクイブ・カンパニー) 2011.10.13

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA46 CA06 DA06 EA04 GA11 HA01
4C085 AA13 CC08 DD32 DD34 DD62 DD88 EE01 GG01
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA42 DA76 EA28 FA74 GA23 GA31

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。