

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2013 年 10 月 3 日(03.10.2013)



(10) 国際公開番号

WO 2013/147153 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 15/09 (2006.01) C12N 1/19 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) C12N 1/21 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) C12N 5/10 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01) C12P 21/08 (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2013/059516

(22) 国際出願日: 2013 年 3 月 29 日(29.03.2013)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2012-076735 2012 年 3 月 29 日(29.03.2012) JP

(71) 出願人: 株式会社未来創薬研究所(FORERUNNER
PHARMA RESEARCH CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1530041
東京都目黒区駒場 4 - 2 - 16 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 川合 重人(KAWAI Shigeto); 〒1530041 東
京都目黒区駒場 4 - 2 - 16 株式会社未来創
薬研究所内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人セントクレスト国際特許
事務所(CENTCREST IP ATTORNEYS); 〒1040031

東京都中央区京橋 2 - 8 - 2 1 金鳳堂ビル 9
階 Tokyo (JP).

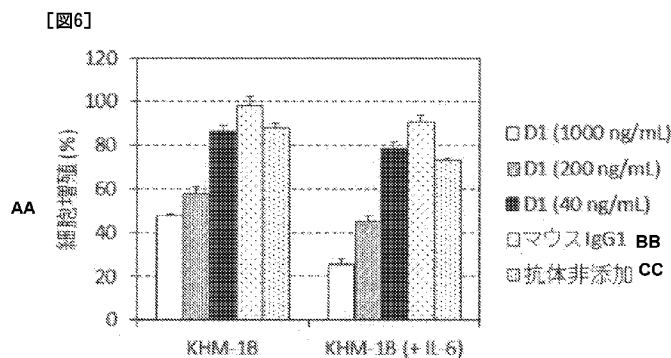
(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保
護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA,
BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES,
FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN,
IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR,
LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, 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, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保
護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW,
MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシ
ア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ
(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), OAPI
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).

[続葉有]

(54) Title: ANTI-LAMP5 ANTIBODY AND UTILIZATION THEREOF

(54) 発明の名称: 抗 LAMP5 抗体およびその利用



AA Cell proliferation (%)
BB Mouse IgG1
CC No antibody added

(57) Abstract: A monoclonal antibody recognizing the extracellular region of LAMP5. This antibody exhibits, on a multiple myeloma cell line, an antibody-dependent cell-mediated cytotoxic activity and/or a cell proliferation depressing activity in the presence of a toxin-labeled secondary antibody.

(57) 要約: LAMP5 の細胞外領域を認識するモノクローナル抗体を作製した。作製した抗体は、多発性骨髄腫細胞株に対して抗体依存性細胞介在性細胞傷害活性および/またはトキシン標識二次抗体存在下で細胞増殖抑制活性を示した。

WO 2013/147153 A1



添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト
(規則 5.2(a))

明 細 書

発明の名称：抗LAMP5抗体およびその利用

技術分野

[0001] 本発明は、抗LAMP5抗体、該抗体を利用した癌の治療等の方法、および該抗体を有効成分として含む癌細胞の増殖抑制剤（特に抗癌剤）に関する。

背景技術

[0002] 癌は、先進国において、死亡率の主要原因である。癌治療の目的で、多くの化学療法剤が過去50年間に開発された。化学療法剤の大半は、アルキル化剤、代謝拮抗剤、アンスラサイクリン、植物アルカロイド、トポイソメラーゼ阻害剤、および抗腫瘍剤に分類することができる。これらの薬剤すべてが細胞分裂またはDNAの合成に影響し、何らかの形で機能するメカニズムを通して治療効果をもたらす。

[0003] 特定の化学療法剤の有効性は、癌の間で、患者の間で、個々の患者における時間経過により異なる。化学療法剤に曝露された癌細胞は、こうした化学療法剤に対する耐性を生じ、他の複数の抗癌剤に対しても同様に交差耐性を生じることも多い。さらに、上記の化学療法剤のメカニズムによってこれらの化学療法剤が正常細胞に与える細胞傷害の結果もたらされる副作用を制御するため、化学療法剤の用量または用法は多くの場合制約される。

[0004] 従来の化学療法剤に代わり近年癌細胞に特異的に発現する分子を標的とする分子標的薬の開発が進められている。こうした分子標的薬の登場によって従来の化学療法剤に固有の副作用が回避され癌患者のQOLに寄与する癌治療が可能となっている。こうした分子標的薬には低分子（small molecule）の薬剤のほか抗体等の高分子の薬剤も含まれる。治療抗体は、細胞表面に発現する分子を標的にするものであるが、抗体という分子自体が生体内に生来存在する分子であり生体に与える毒性が低いという利点のほか、エフェクター機能を介した細胞傷害活性等、低分子薬剤以外の作用機序によって標的細胞を特異的に傷害し治療効果を発揮する利点も有するため、近年多くの治療抗体

が上市されてきている。

[0005] LAMP5 (別名BAD-LAMP、C20orf103、UNC-43、NCBI Reference Sequence: NM_012261およびNM_001199897) はI型膜貫通タンパクであり、Philippe P. Pierreらのグループによりマウスの脳に発現するLAMP (lysosome associated membrane proteins) 様タンパクとして見出されている (非特許文献1)。のちに同グループはヒトではpDCs (plasmacytoid dendritic cells) にもLAMP5が発現することを報告している (非特許文献2)。pDCsは自然免疫に関わる細胞で、ウイルス感染を関知し速やかにI型インターフェロンを産生する (非特許文献3)。またpDCsは主にリンパ節に存在するが、末梢血中にも少量ながら検出される。末梢血中のpDCsを効率的に解析するためにはpDCsを検出するための細胞表面マーカーが必要であるが、特異的なマーカーは少ない (非特許文献4)。

[0006] LAMP5はC末端に細胞内ソーティングシグナル配列を有し、pDCsにおいてはERGIC (endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment) と呼ばれる細胞内顆粒に局在する (非特許文献2)。一方、LAMP様タンパクは一般的にリソソームやエンドソームに局在し、一部は細胞膜にも発現する (非特許文献5および6)。癌細胞株でLAMP1やLAMP2が細胞膜上に発現することがFACSを用いた解析で示されている (非特許文献7)。しかし、分子標的薬の対象となり得る状態でLAMP5が細胞表面上に発現しているかどうかは知られていない。

先行技術文献

非特許文献

[0007] 非特許文献1: BAD-LAMP defines a subset of early endocytic organelles in subpopulations of cortical projection neurons. J. Cell Sci. (2007) 120: 353-65

非特許文献2: BAD-LAMP is a novel biomarker of nonactivated human plasmacytoid dendritic cells. Blood (2011) 118: 609-17

非特許文献3: The plasmacytoid monocyte/interferon producing cells

. Virchows Arch. (2003) 443: 703-17

非特許文献4: Novel markers of normal and neoplastic human plasmacytoid dendritic cells. Blood (2008) 111: 3778-92

非特許文献5: Intracellular trafficking of lysosomal membrane proteins. Bioessays (1996) 18: 379-89

非特許文献6: Lysosomal membrane glycoproteins. Structure, biosynthesis, and intracellular trafficking. J. Biol. Chem. (1991) 266: 21327-30

非特許文献7: Expression of Lamp-1 and Lamp-2 and their interactions with galectin-3 in human tumor cells. Int. J. Cancer (1998) 75: 105-11.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 本発明は、このような状況に鑑みてなされたものであり、細胞表面に発現したLAMP5に結合するモノクローナル抗体を提供することを課題とする。また、本発明は、LAMP5を発現した細胞に対して細胞傷害活性を有する抗LAMP5抗体を提供することを課題とする。さらに、本発明は、インタナライズ活性を有する抗LAMP5抗体を提供することを課題とする。さらに、本発明は、細胞傷害性物質が連結されたインタナライズ活性を有する抗LAMP5抗体を提供することを課題とする。さらに、本発明は、前記抗LAMP5抗体を含む医薬組成物（特に抗癌剤）を提供することを課題とする。さらに、本発明は、IL-6と組み合わせられることを特徴とする前記の抗LAMP5抗体を含む医薬組成物（特に、抗癌剤）を提供することを課題とする。さらに、本発明は前記抗LAMP5抗体の製造方法を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明者は、上記課題を解決すべく鋭意検討を行った結果、マイクロアレイ解析によりLAMP5が多発性骨髄腫に発現することを見出した。次に本発明者はLAMP5が細胞膜上に発現するか否かを検証するため、LAMP5の細胞外領域を

認識し、かつFACSに使用可能なモノクローナル抗体を作製した。作製した抗LAMP5抗体を用いて多発性骨髄腫細胞株におけるLAMP5の発現を検討したところ、細胞膜上にLAMP5が発現することが確認された。抗LAMP5抗体は多発性骨髄腫細胞株に対して抗体依存性細胞介在性細胞傷害（antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity：ADCC）活性およびトキシン標識二次抗体存在下で細胞増殖抑制活性を示した。また、IL-6存在下で抗LAMP5抗体の細胞増殖抑制活性が増強された。以上の結果から、本発明者は、抗LAMP5抗体が多発性骨髄腫の治療などに有用であることを見出し本発明を完成させた。より具体的には、本発明は、以下に関する。

〔１〕細胞表面に発現した配列番号８に規定されるポリペプチドの３９位から２８９位に存在するエピトープに結合するモノクローナル抗体。

〔２〕細胞表面に発現した配列番号６５に規定されるポリペプチドの３０位から２３５位に存在するエピトープに結合する〔１〕に記載のモノクローナル抗体。

〔３〕インタナライズ活性を有する〔１〕に記載のモノクローナル抗体。

〔４〕細胞傷害性物質が連結された〔３〕に記載のモノクローナル抗体。

〔５〕細胞傷害活性を有する〔１〕から〔４〕のいずれかに記載のモノクローナル抗体。

〔６〕細胞傷害活性が抗体依存性細胞傷害（ADCC）活性である〔５〕に記載のモノクローナル抗体。

〔７〕以下の（１）から（１１）のいずれかに記載のモノクローナル抗体。

（１）配列番号３５に記載のCDR１、配列番号３６に記載のCDR２および配列番号３７に記載のCDR３を含む重鎖可変領域、ならびに配列番号３８に記載のCDR１、配列番号３９に記載のCDR２および配列番号４０に記載のCDR３を含む軽鎖可変領域を含む抗体、

（２）配列番号４１に記載のCDR１、配列番号４２に記載のCDR２および配列番号４３に記載のCDR３を含む重鎖可変領域、ならびに配列番号４４に記載のCDR１、配列番号４５に記載のCDR２および配列番号４６に記載のCDR３を含む軽鎖可

変領域を含む抗体、

(3) 配列番号 47 に記載の CDR1、配列番号 48 に記載の CDR2 および配列番号 49 に記載の CDR3 を含む重鎖可変領域、ならびに配列番号 50 に記載の CDR1、配列番号 51 に記載の CDR2 および配列番号 52 に記載の CDR3 を含む軽鎖可変領域を含む抗体、

(4) 配列番号 53 に記載の CDR1、配列番号 54 に記載の CDR2 および配列番号 55 に記載の CDR3 を含む重鎖可変領域、ならびに配列番号 56 に記載の CDR1、配列番号 57 に記載の CDR2 および配列番号 58 に記載の CDR3 を含む軽鎖可変領域を含む抗体、

(5) ヒト IgG の重鎖定常領域を含む重鎖および／またはヒト抗体の軽鎖定常領域を含む軽鎖を含む、(1) から (4) のいずれかに記載のモノクローナル抗体、

(6) ヒト IgG の重鎖定常領域を含む重鎖が配列番号 68 に記載の重鎖定常領域を含む重鎖である、(5) に記載のモノクローナル抗体、

(7) ヒト抗体の軽鎖定常領域を含む軽鎖が配列番号 73 に記載の軽鎖定常領域を含む軽鎖である、(5) または (6) に記載のモノクローナル抗体、

(8) (1) から (7) のいずれかに記載の抗体において 1 もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および／または挿入された抗体であって、細胞表面に発現した配列番号 8 に規定されるポリペプチドの 39 位から 289 位に存在するエピトープに対して、(1) から (7) のいずれかに記載のモノクローナル抗体と同等の結合活性を有するモノクローナル抗体、

(9) ヒト IgG の重鎖定常領域を含む重鎖が、配列番号 68 の重鎖定常領域において、EU ナンバリングで表される 221 位、222 位、223 位、224 位、225 位、227 位、228 位、230 位、231 位、232 位、233 位、234 位、235 位、236 位、237 位、238 位、239 位、240 位、241 位、243 位、244 位、245 位、246 位、247 位、249 位、250 位、251 位、254 位、255 位、256 位、258 位、260 位、262 位、263 位、264 位、265 位、266 位、267 位、268 位、269 位、270 位、271 位、272 位、273 位、274 位、275 位、276 位、278 位、279 位、280 位、281 位、282 位、283 位、284 位、

285位、286位、288位、290位、291位、292位、293位、294位、295位、296位、297位、298位、299位、300位、301位、302位、303位、304位、305位、311位、313位、315位、317位、318位、320位、322位、323位、324位、325位、326位、327位、328位、329位、330位、331位、332位、333位、334位、335位、336位、337位、339位、376位、377位、378位、379位、380位、382位、385位、392位、396位、421位、427位、428位、429位、434位、436位および440位の群から選択されるアミノ酸の少なくとも1つの置換を含む重鎖である、(5) または(7)に記載のモノクローナル抗体、

(10) (1) から(9) のいずれかに記載の抗体が結合するエピトープと同じエピトープに結合するモノクローナル抗体、または、

(11) 細胞表面に発現した配列番号8に規定されるポリペプチドの39位から289位に存在するエピトープに対する(1) から(9) のいずれかに記載の抗体の結合に対して競合するモノクローナル抗体。

[8] 以下の(1) から(8) のいずれかに記載のベクター。

(1) 以下の(a) から(d) のいずれかに記載の重鎖可変領域；

(a) 配列番号35に記載のCDR1、配列番号36に記載のCDR2および配列番号37に記載のCDR3を含む重鎖可変領域；

(b) 配列番号41に記載のCDR1、配列番号42に記載のCDR2および配列番号43に記載のCDR3を含む重鎖可変領域；

(c) 配列番号47に記載のCDR1、配列番号48に記載のCDR2および配列番号49に記載のCDR3を含む重鎖可変領域；または

(d) 配列番号53に記載のCDR1、配列番号54に記載のCDR2および配列番号55に記載のCDR3を含む重鎖可変領域；

をコードするポリヌクレオチドを含むベクター、

(2) 前記(1) の(a) から(d) のいずれかに記載の重鎖可変領域および配列番号68の重鎖定常領域をコードするポリヌクレオチドを含むベクター、

(3) 前記(1) の(a) から(d) のいずれかに記載の重鎖可変領域およ

び配列番号 68 の重鎖定常領域をコードするポリヌクレオチドにおいて、E
Uナンバリングで表される221位、222位、223位、224位、225位、227位、228
位、230位、231位、232位、233位、234位、235位、236位、237位、238位、23
9位、240位、241位、243位、244位、245位、246位、247位、249位、250位、2
51位、254位、255位、256位、258位、260位、262位、263位、264位、265位、
266位、267位、268位、269位、270位、271位、272位、273位、274位、275位
、276位、278位、279位、280位、281位、282位、283位、284位、285位、286
位、288位、290位、291位、292位、293位、294位、295位、296位、297位、29
8位、299位、300位、301位、302位、303位、304位、305位、311位、313位、3
15位、317位、318位、320位、322位、323位、324位、325位、326位、327位、
328位、329位、330位、331位、332位、333位、334位、335位、336位、337位
、339位、376位、377位、378位、379位、380位、382位、385位、392位、396
位、421位、427位、428位、429位、434位、436位および440位の群から選択さ
れるアミノ酸の少なくとも1つの置換をコードする変異ヌクレオチドを含む
ベクター、

(4) 以下の(e)から(h)のいずれかに記載の軽鎖可変領域；

(e) 配列番号38に記載のCDR1、配列番号39に記載のCDR2および配列番
号40に記載のCDR3を含む軽鎖可変領域；

(f) 配列番号44に記載のCDR1、配列番号45に記載のCDR2および配列番
号46に記載のCDR3を含む軽鎖可変領域；

(g) 配列番号50に記載のCDR1、配列番号51に記載のCDR2および配列番
号52に記載のCDR3を含む軽鎖可変領域；または

(h) 配列番号56に記載のCDR1、配列番号57に記載のCDR2および配列番
号58に記載のCDR3を含む軽鎖可変領域；

をコードするポリヌクレオチドを含むベクター、

(5) 前記(4)の(e)から(h)のいずれかに記載の軽鎖可変領域およ
び配列番号73の軽鎖定常領域をコードするポリヌクレオチドを含む記載の
ベクター、

(6) 以下の (i) から (l) のいずれかに記載の重鎖可変領域および軽鎖可変領域；

(i) 配列番号 35 に記載の CDR1、配列番号 36 に記載の CDR2 および配列番号 37 に記載の CDR3 を含む重鎖可変領域、ならびに配列番号 38 に記載の CDR1、配列番号 39 に記載の CDR2 および配列番号 40 に記載の CDR3 を含む軽鎖可変領域；

(j) 配列番号 41 に記載の CDR1、配列番号 42 に記載の CDR2 および配列番号 43 に記載の CDR3 を含む重鎖可変領域、ならびに配列番号 44 に記載の CDR1、配列番号 45 に記載の CDR2 および配列番号 46 に記載の CDR3 を含む軽鎖可変領域；

(k) 配列番号 47 に記載の CDR1、配列番号 48 に記載の CDR2 および配列番号 49 に記載の CDR3 を含む重鎖可変領域、ならびに配列番号 50 に記載の CDR1、配列番号 51 に記載の CDR2 および配列番号 52 に記載の CDR3 を含む軽鎖可変領域；または

(l) 配列番号 53 に記載の CDR1、配列番号 54 に記載の CDR2 および配列番号 55 に記載の CDR3 を含む重鎖可変領域、ならびに配列番号 56 に記載の CDR1、配列番号 57 に記載の CDR2 および配列番号 58 に記載の CDR3 を含む軽鎖可変領域；

をコードするポリヌクレオチドを含むベクター、

(7) 前記 (6) の (i) から (l) のいずれかに記載の重鎖可変領域および軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド；ならびに配列番号 73 の軽鎖定常領域をコードするポリヌクレオチド、および／または配列番号 68 の重鎖定常領域をコードするポリヌクレオチド；

を含むベクター、または、

(8) 前記 (6) の (i) から (l) のいずれかに記載の重鎖可変領域および軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド；ならびに配列番号 73 の軽鎖定常領域をコードするポリヌクレオチド、および／または配列番号 68 の重鎖定常領域をコードするポリヌクレオチドにおいて、E

Uナンバリングで表される221位、222位、223位、224位、225位、227位、228位、230位、231位、232位、233位、234位、235位、236位、237位、238位、239位、240位、241位、243位、244位、245位、246位、247位、249位、250位、251位、254位、255位、256位、258位、260位、262位、263位、264位、265位、266位、267位、268位、269位、270位、271位、272位、273位、274位、275位、276位、278位、279位、280位、281位、282位、283位、284位、285位、286位、288位、290位、291位、292位、293位、294位、295位、296位、297位、298位、299位、300位、301位、302位、303位、304位、305位、311位、313位、315位、317位、318位、320位、322位、323位、324位、325位、326位、327位、328位、329位、330位、331位、332位、333位、334位、335位、336位、337位、339位、376位、377位、378位、379位、380位、382位、385位、392位、396位、421位、427位、428位、429位、434位、436位および440位の群から選択されるアミノ酸の少なくとも1つの置換をコードする変異ヌクレオチド；を含む、ベクター。

〔9〕以下の（1）から（4）のいずれかに記載のベクターを含む宿主細胞。

（1）〔8〕の（1）に記載のベクターおよび〔8〕の（4）に記載のベクター；

（2）〔8〕の（2）に記載のベクターおよび〔8〕の（5）に記載のベクター；

（3）〔8〕の（3）に記載のベクターおよび〔8〕の（5）に記載のベクター；または、

（4）〔8〕の（6）から（8）のいずれかに記載のベクター

〔10〕前記宿主細胞が、糖鎖にフコースを付加する能力が低い宿主細胞である〔9〕に記載の宿主細胞。

〔11〕前記糖鎖にフコースを付加する能力が低い宿主細胞が、フコシルトランスフェラーゼ、フコーストランスポーター、GMD（GDP-マンノース4，6-デヒドラターゼ）、F_x（GDP-ケト-6-デオキシマンノース

ス3, 5-エピメラーゼ, 4-レダクターゼ)、およびGFP (GDP- β -L-フコースピロフォスホリラーゼ) からなる群から選択される機能性タンパク質の一つまたはそれ以上が欠損している宿主細胞である〔10〕に記載の宿主細胞。

〔12〕前記宿主細胞が、糖鎖にバイセクティングN-アセチルグルコサミン構造を含む糖鎖を形成する活性を有する宿主細胞である〔9〕に記載の宿主細胞。

〔13〕前記糖鎖にバイセクティングN-アセチルグルコサミン構造を含む糖鎖を形成する活性を有する宿主細胞が、 β (1, 4)-ガラクトシルトランスフェラーゼ活性を有し、およびゴルジ常在ポリペプチドの機能性のゴルジ局在化ドメインをコードするポリヌクレオチドを含むベクターを含む宿主細胞である〔12〕に記載の宿主細胞。

〔14〕マンノシダーゼIの局在化ドメイン、 β (1, 2)-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIの局在化ドメイン、 β (1, 2)-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIIの局在化ドメイン、マンノシダーゼIの局在化ドメイン、および α 1-6コアフコシルトランスフェラーゼの局在化ドメインからなる群から選択される機能性のゴルジ局在化ドメインをコードするポリヌクレオチドを含むベクターを含み、 β (1, 4)-ガラクトシルトランスフェラーゼの触媒ドメインを含む融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む宿主細胞である〔13〕に記載の宿主細胞。

〔15〕〔9〕から〔14〕のいずれかに記載の宿主細胞の培養液から回収することを含む〔1〕から〔7〕に記載のモノクローナル抗体を製造する方法。

〔16〕〔15〕に記載の方法によって製造されたモノクローナル抗体。

〔17〕〔1〕から〔7〕、〔16〕のいずれかに記載のモノクローナル抗体を有効成分として含む医薬組成物。

〔18〕IL-6またはそのフラグメント、変異体、融合タンパク質、機能性誘

導体もしくはその塩と組み合わせられることを特徴とする〔１７〕に記載の医薬組成物。

〔１９〕〔１〕から〔７〕、〔１６〕のいずれかに記載のモノクローナル抗体を有効成分として含む抗癌剤。

〔２０〕癌が、多発性骨髄腫である〔１９〕に記載の抗癌剤。

〔２１〕IL-6またはそのフラグメント、変異体、融合タンパク質、機能性誘導体もしくはその塩と投与されることを特徴とする〔１９〕または〔２０〕に記載の抗癌剤。

発明の効果

[0010] 本発明によりLAMP5に結合するモノクローナル抗体が提供された。本発明のモノクローナル抗体は、細胞表面に発現したLAMP5に結合し、細胞傷害活性やインタナライズ活性を示すことができる。従って、本発明により、多発性骨髄腫などの癌に対する新たな抗癌剤や新たな治療法などの開発が可能となった。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]Human Genome U133 Plus 2.0 Arrayを用いた多発性骨髄腫臨床検体におけるLAMP5の発現を示すグラフである。

[図2A]抗LAMP5モノクローナル抗体D1、D2、D9、D10のLAMP5_CHO細胞への結合を評価したFACSの結果を示すグラフである。

[図2B]抗LAMP5モノクローナル抗体D1、D2、D9、D10のmLAMP5_CHO細胞への結合を評価したFACSの結果を示すグラフである。

[図3A]抗LAMP5ポリクローナル抗体を用いたウェスタンブロット解析により癌細胞株におけるLAMP5の発現を検出した結果を示す写真である。

[図3B]抗LAMP5ポリクローナル抗体を用いたウェスタンブロット解析により、脱糖鎖処理された癌細胞株におけるLAMP5の発現を検出した結果を示す写真である。

[図4A]抗LAMP5モノクローナル抗体D1（実線）、D2（破線）、D9（太線）、D10（点線）のKHM-1B細胞への結合を評価したFACSの結果を示す図である。

[図4B]抗LAMP5モノクローナル抗体D1（実線）、D2（破線）、D9（太線）、D10（点線）のIL-6刺激したKHM-1B細胞（B）への結合を評価したFACSの結果を示す図である。

[図5]抗LAMP5モノクローナル抗体D1、D2、D9、D10のKHM-1B細胞（IL-6刺激＋または－）に対するADCC活性を示すグラフである。

[図6]トキシン連結二次抗体の存在下における、抗LAMP5モノクローナル抗体D1のKHM-1B細胞（IL-6刺激＋または－）に対する細胞増殖抑制活性を示すグラフである。

[図7]ヒト抗体の定常領域の配列とアラインメントを示す図である。

発明を実施するための形態

[0012] 以下の定義および詳細な説明は、本明細書において説明する本発明の理解を容易にするために提供される。

[0013] 定義

アミノ酸

本明細書においては、例えば、Ala/A、Leu/L、Arg/R、Lys/K、Asn/N、Met/M、Asp/D、Phe/F、Cys/C、Pro/P、Gln/Q、Ser/S、Glu/E、Thr/T、Gly/G、Trp/W、His/H、Tyr/Y、Ile/I、Val/Vと表されるように、アミノ酸を1文字コードまたは3文字コード、またはその両方で表記する。なお、本発明で記載されているアミノ酸配列に含まれるアミノ酸は翻訳後に修飾（例えば、N末端のグルタミンのピログルタミル化によるピログルタミン酸への修飾は当業者によく知られた修飾である）を受ける場合もあるが、そのようにアミノ酸が翻訳後修飾された場合であっても当然のことながら本発明で記載されているアミノ酸配列に含まれる。

[0014] 抗原

本発明が提供する抗体は抗原としてLAMP5に結合する。LAMP5のアミノ酸配列は、GenBank登録番号NP_036393.1（配列番号：65）に開示されている。本発明において、LAMP5の定義には、全長タンパク質およびその断片の両方が含まれる。断片とは、LAMP5の任意の領域を含むポリペプチドであり、天然の

LAMP5の機能を有していなくてもよい。断片の例として、LAMP5の細胞外領域を含む断片が挙げられる。

[0015] LAMP5の全長タンパク質は、280アミノ酸からなり（配列番号：65）、シグナル配列は1-29位が相当し、細胞外領域は30-235位が相当し、膜貫通領域は236-256位が相当し、細胞内領域は257-280位が相当する。

[0016] LAMP5のシグナル配列（1-29位）の直下にHAタグ配列（アミノ酸配列YPYDVPDYA）を挿入したアミノ酸配列を配列番号：8に示す。シグナル配列が除去されたLAMP5タンパク質のアミノ酸配列は、配列番号：65の30-280位および配列番号：8の39-289位に相当する。

[0017] 抗原中に存在する抗原決定基を意味するエピトープは、本明細書において開示される抗LAMP5抗体中の抗原結合ドメインが結合する抗原上の部位を意味する。よって、例えば、エピトープは、その構造によって定義され得る。また、当該エピトープを認識する抗LAMP5抗体の抗原に対する結合活性によっても当該エピトープが定義され得る。抗原がペプチドまたはポリペプチドである場合には、エピトープを構成するアミノ酸残基によってエピトープを特定することも可能である。また、エピトープが糖鎖である場合には、特定の糖鎖構造によってエピトープを特定することも可能である。

[0018] 線状エピトープは、例えばアミノ酸の一次配列中で連続する複数のアミノ酸からなるエピトープのように、アミノ酸の一次配列から認識されるエピトープである。線状エピトープは、典型的には、少なくとも3つ、および最も普通には少なくとも5つ（例えば8～10個、6～20個）のアミノ酸が固有の配列において含まれる。

[0019] 立体構造エピトープは、線状エピトープとは対照的に、エピトープを含むアミノ酸の一次配列が、認識されたエピトープの単一の規定成分ではないエピトープ（例えば、アミノ酸の一次配列が、必ずしもエピトープを規定する抗体により認識されないエピトープ）である。立体構造エピトープは、線状エピトープに対して増大した数のアミノ酸を包含するかもしれない。立体構造エピトープの認識に関して、抗体は、ペプチドまたはタンパク質の三次元

構造を認識する。例えば、タンパク質分子が折り畳まれて三次元構造を形成する場合には、立体構造エピトープを形成するあるアミノ酸および/またはポリペプチド主鎖は、並列となり、抗体がエピトープを認識するのを可能にする。エピトープの立体構造を決定する方法には、例えばX線結晶学、二次元核磁気共鳴分光学並びに部位特異的なスピン標識および電磁常磁性共鳴分光学が含まれるが、これらには限定されない。例えば、Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology (1996)、第66巻、Morris (編) を参照のこと。

[0020] 結合活性

下記に抗体によるLAMP5（すなわちLAMP5分子中に存在するエピトープ）に対する結合の確認方法が例示されるが、本発明においては下記の方法に限定されるものではなく、当業者は抗体の抗原に対する結合活性を測定する公知の方法を適宜使用することが可能である。

[0021] 抗LAMP5抗体が、LAMP5分子中に存在する線状エピトープを認識することは、例えば次のようにして確認することができる。上記の目的のためにLAMP5の細胞外ドメインを構成するアミノ酸配列からなる線状のペプチドが合成される。当該ペプチドは、化学的に合成され得る。あるいは、LAMP5をコードするcDNA（例えば、NM_012261.2（配列番号：66）等がその例として挙げられ得る）中の、細胞外ドメインに相当するアミノ酸配列をコードする領域を利用して、遺伝子工学的手法により得られる。次に、細胞外ドメインを構成するアミノ酸配列からなる線状ペプチドと、抗LAMP5抗体との結合活性が評価される。例えば、固定化された線状ペプチドを抗原とするELISAによって、当該ペプチドに対する当該抗体の結合活性が評価され得る。あるいは、LAMP5発現細胞に対する当該抗体の結合における、線状ペプチドによる阻害のレベルに基づいて、線状ペプチドに対する結合活性が明らかにされ得る。これらの試験によって、線状ペプチドに対する当該抗体の結合活性が明らかにされ得る。

[0022] また、抗LAMP5抗体が立体構造エピトープを認識することは、次のようにして確認され得る。上記の目的のために、LAMP5を発現する細胞が調製される。

抗LAMP5抗体がLAMP5発現細胞に接触した際に当該細胞に強く結合する一方で、当該抗体が固定化されたLAMP5の細胞外ドメインを構成するアミノ酸配列からなる線状ペプチドに対して実質的に結合しないとき等が挙げられる。ここで「実質的に結合しない」とは、LAMP5発現細胞に対する結合活性の80%以下、通常50%以下、好ましくは30%以下、特に好ましくは15%以下の結合活性をいう。

[0023] 抗LAMP5抗体のLAMP5発現細胞に対する結合活性を測定する方法としては、例えば、Antibodies A Laboratory Manual記載の方法 (Ed Harlow, David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988) 359-420) が挙げられる。すなわちLAMP5発現細胞を抗原とするELISAやFACS (fluorescence activated cell sorting) の原理によって評価され得る。

[0024] ELISAフォーマットにおいて、抗LAMP5抗体のLAMP5発現細胞に対する結合活性は、酵素反応によって生成するシグナルレベルを比較することによって定量的に評価される。すなわち、LAMP5発現細胞を固定化したELISAプレートに被験抗体を加え、細胞に結合した被験抗体が、被験抗体を認識する酵素標識抗体を利用して検出される。あるいはFACSにおいては、被験抗体の希釈系列を作成し、LAMP5発現細胞に対する抗体結合力価 (titer) を決定することにより、LAMP5発現細胞に対する被験抗体の結合活性が比較され得る。

[0025] 緩衝液等に懸濁した細胞表面上に発現している抗原に対する被験抗体の結合は、フローサイトメーターによって検出することができる。フローサイトメーターとしては、例えば、次のような装置が知られている。

FACSCanto™ II

FACSAria™

FACSArray™

FACSVantage™ SE

FACSCalibur™ (いずれもBD Biosciences社の商品名)

EPICS ALTRA HyPerSort

Cytomics FC 500

EPICS XL-MCL ADC EPICS XL ADC

Cell Lab Quanta/Cell Lab Quanta SC (いずれもBeckman Coulter社の商品名)

[0026] 例えば、抗LAMP5抗体のLAMP5に対する結合活性の好適な測定方法の一例として、次の方法が挙げられる。まず、LAMP5を発現した細胞と反応させた被験抗体を認識するFITC標識した二次抗体で染色する。被験抗体を適宜好適な緩衝液によって希釈することによって、当該抗LAMP5抗体が所望の濃度に調製して用いられる。例えば、 $10\mu\text{g/ml}$ から 10ng/ml までの間のいずれかの濃度で使用され得る。次に、FACSCalibur (BD社) により蛍光強度と細胞数が測定される。当該細胞に対する抗体の結合量は、CELL QUEST Software (BD社) を用いて解析することにより得られた蛍光強度、すなわちGeometric Meanの値に反映される。したがって、当該Geometric Meanの値を得ることにより、被験抗体の結合量によって表される被験抗体の結合活性が測定され得る。上記のような方法を用いて、被験抗体が細胞表面に発現したLAMP5 (配列番号: 65) の30-280位 (配列番号: 8の39-289位) に存在するエピトープに結合するか否かを確認することが可能である。

[0027] 本発明の抗LAMP5抗体の好ましい態様の例として、以下の抗体が挙げられる。

(i) 本実施例に記載のD1抗体と同一のCDRを保持する抗体 (配列番号35に記載のCDR1、配列番号36に記載のCDR2および配列番号37に記載のCDR3を含む重鎖可変領域、ならびに配列番号38に記載のCDR1、配列番号39に記載のCDR2および配列番号40に記載のCDR3を含む軽鎖可変領域を含む抗体)

(ii) 本実施例に記載のD2抗体と同一のCDRを保持する抗体 (配列番号41に記載のCDR1、配列番号42に記載のCDR2および配列番号43に記載のCDR3を含む重鎖可変領域、ならびに配列番号44に記載のCDR1、配列番号45に記載のCDR2および配列番号46に記載のCDR3を含む軽鎖可変領域を含む抗体)

(iii) 本実施例に記載のD9抗体と同一のCDRを保持する抗体 (配列番号47に記載のCDR1、配列番号48に記載のCDR2および配列番号49に記載のCDR3を

含む重鎖可変領域、ならびに配列番号 5 0 に記載のCDR1、配列番号 5 1 に記載のCDR2および配列番号 5 2 に記載のCDR3を含む軽鎖可変領域を含む抗体)
(iv)本実施例に記載のD10抗体と同一のCDRを保持する抗体 (配列番号 5 3 に記載のCDR1、配列番号 5 4 に記載のCDR2および配列番号 5 5 に記載のCDR3を含む重鎖可変領域、ならびに配列番号 5 6 に記載のCDR1、配列番号 5 7 に記載のCDR2および配列番号 5 8 に記載のCDR3を含む軽鎖可変領域を含む抗体)

本実施例4-2に示されるFACS解析において、クローンD1、D2、D9、D10はいずれもLAMP5に濃度依存的に結合した (図2A)。特にクローンD1、D2、D10はクローンD9に比べて強く結合した (図2A)。一方、マウス由来のLAMP5 (mLAMP5) には、クローンD2が強く結合したが、クローンD1とD9は結合しなかった (図2B)。クローンD10はmLAMP5に弱く結合した (図2B)。

[0028] したがって、上記抗体はLAMP5に結合活性を有する抗体である。

[0029] 抗LAMP5抗体が、ある抗体とエピトープを共有することは、両者の同じエピトープに対する競合によって確認され得る。抗体間の競合は、交差ブロッキングアッセイなどによって検出される。例えば競合ELISAアッセイは、好ましい交差ブロッキングアッセイである。

[0030] 具体的には、交差ブロッキングアッセイにおいては、マイクロタイタープレートウェル上にコートしたLAMP5タンパク質が、候補となる競合抗体の存在下、または非存在下でプレインキュベートされた後に、被験抗体が添加される。ウェル中のLAMP5タンパク質に結合した被験抗体の量は、同じエピトープに対する結合に対して競合する候補となる競合抗体の結合能に間接的に相関している。すなわち同一エピトープに対する競合抗体の親和性が大きくなればなる程、被験抗体のLAMP5タンパク質をコートしたウェルへの結合活性は低下する。

[0031] LAMP5タンパク質を介してウェルに結合した被験抗体の量は、予め抗体を標識しておくことによって、容易に測定され得る。例えば、ビオチン標識された抗体は、アビジンペルオキシダーゼコンジュゲートと適切な基質を使用することにより測定される。ペルオキシダーゼなどの酵素標識を利用した交叉

ブロッキングアッセイは、特に競合ELISAアッセイといわれる。抗体は、検出あるいは測定が可能な他の標識物質で標識され得る。具体的には、放射標識あるいは蛍光標識などが公知である。

[0032] 候補の競合抗体の非存在下で実施される対照試験において得られる結合活性と比較して、競合抗体が、LAMP5に対する抗体の結合を少なくとも20%、好ましくは少なくとも30%、さらに好ましくは少なくとも40%、さらに好ましくは少なくとも50%ブロックできるならば、当該被験抗体は競合抗体と実質的に同じエピトープに結合するか、または同じエピトープに対する結合に対して競合する抗体である。

[0033] 抗LAMP5抗体が結合するエピトープの構造が同定されている場合には、被験抗体と対照抗体とがエピトープを共有することは、当該エピトープを構成するペプチドにアミノ酸変異を導入したペプチドに対する両者の抗体の結合活性を比較することによって評価され得る。

[0034] こうした結合活性を測定する方法としては、例えば、前記のELISAフォーマットにおいて変異を導入した線状のペプチドに対する被験抗体および対照抗体の結合活性を比較することによって測定され得る。ELISA以外の方法としては、カラムに結合した当該変異ペプチドに対する結合活性を、当該カラムに被験抗体と対照抗体を流下させた後に溶出液中に溶出される抗体を定量することによっても測定され得る。変異ペプチドを例えばGSTとの融合ペプチドとしてカラムに吸着させる方法は公知である。

[0035] また、同定されたエピトープが立体構造エピトープの場合には、被験抗体と対照抗体とがエピトープを共有することは、次の方法で評価され得る。まず、LAMP5を発現した細胞とエピトープに変異が導入されたLAMP5を発現した細胞が調製される。これらの細胞がPBS等の適切な緩衝液に懸濁された細胞懸濁液に対して被験抗体と対照抗体が添加される。次いで、適宜緩衝液で洗浄された細胞懸濁液に対して、被験抗体と対照抗体を認識することができるFITC標識された抗体が添加される。標識抗体によって染色された細胞の蛍光強度と細胞数がFACSCalibur (BD社) によって測定される。被験抗体と対照抗体の

濃度は好適な緩衝液によって適宜希釈することによって所望の濃度に調製して用いられる。例えば、 $10\mu\text{g/ml}$ から 10ng/ml までの間のいずれかの濃度で使用される。当該細胞に対する標識抗体の結合量は、CELL QUEST Software (BD社)を用いて解析することにより得られた蛍光強度、すなわちGeometric Meanの値に反映される。従って、当該Geometric Meanの値を得ることにより、標識抗体の結合量によって表される被験抗体と対照抗体の結合活性を測定することができる。

[0036] 本方法において、例えば「変異LAMP5発現細胞に実質的に結合しない」ことは、以下の方法によって判断することができる。まず、変異LAMP5を発現した細胞に対して結合した被験抗体と対照抗体が、標識抗体で染色される。次いで細胞の蛍光強度が検出される。蛍光検出にフローサイトメトリーとしてFACSCaliburを用いた場合、得られた蛍光強度はCELL QUEST Softwareを用いて解析され得る。抗体の存在下および非存在下でのGeometric Meanの値から、この比較値 ($\Delta\text{Geo-Mean}$) を下記の計算式に基づいて算出することにより、抗体の結合による蛍光強度の増加割合を求めることができる。

[0037] $\Delta\text{Geo-Mean} = \text{Geo-Mean (抗体存在下)} / \text{Geo-Mean (抗体非存在下)}$

[0038] 解析によって得られる被験抗体の変異LAMP5発現細胞に対する結合量が反映されたGeometric Mean比較値 (変異LAMP5分子 $\Delta\text{Geo-Mean}$ 値) を、被験抗体のLAMP5発現細胞に対する結合量が反映された $\Delta\text{Geo-Mean}$ 比較値と比較する。この場合において、変異LAMP5発現細胞およびLAMP5発現細胞に対する $\Delta\text{Geo-Mean}$ 比較値を求める際に使用する被験抗体の濃度は互いに同一または実質的に同一の濃度で調製されることが特に好ましい。予めLAMP5中のエピトープを認識していることが確認された抗体が、対照抗体として利用される。

[0039] 被験抗体の変異LAMP5発現細胞に対する $\Delta\text{Geo-Mean}$ 比較値が、被験抗体のLAMP5発現細胞に対する $\Delta\text{Geo-Mean}$ 比較値の、80%より小さければ、好ましくは50%より小さければ、さらに好ましくは30%より小さければ、特に好ましくは15%より小さければ、「変異LAMP5発現細胞に実質的に結合しない」ものとする。Geo-Mean値 (Geometric Mean) を求める計算式は、CELL QUEST Sof

ware User's Guide (BD biosciences社)に記載されている。比較値を比較することによってそれが実質的に同視し得る程度であれば、被験抗LAMP5抗体と対照抗LAMP5抗体のエピトープは同一であると評価され得る。

[0040] 抗体

本明細書において、抗体とは、天然のものであるかまたは部分的もしくは完全合成により製造された免疫グロブリンをいう。抗体はそれが天然に存在する血漿や血清等の天然資源や抗体を産生するハイブリドーマ細胞の培養上清から単離され得るし、または遺伝子組換え等の手法を用いることによって部分的にもしくは完全に合成され得る。抗体の例としては免疫グロブリンのアイソタイプおよびそれらのアイソタイプのサブクラスが好適に挙げられる。ヒトの免疫グロブリンとして、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgD、IgE、IgMの9種類のクラス（アイソタイプ）が知られている。本発明の抗体には、これらのアイソタイプのうちIgG1、IgG2、IgG3、IgG4が含まれ得る。

[0041] 所望の結合活性を有する抗体を作製する方法は当業者において公知である。以下に、LAMP5に結合する抗体（抗LAMP5抗体）を作製する非限定の一方法が例示される。

[0042] 抗LAMP5抗体は、公知の手段を用いてポリクローナルまたはモノクローナル抗体として取得され得る。抗LAMP5抗体としては、哺乳動物由来のモノクローナル抗体が好適に作製され得る。哺乳動物由来のモノクローナル抗体には、ハイブリドーマにより産生されるもの、および遺伝子工学的手法により抗体遺伝子を含む発現ベクターで形質転換した宿主細胞によって産生されるもの等が含まれる。なお、本発明のモノクローナル抗体には、「ヒト化抗体」や「キメラ抗体」が含まれる。

[0043] モノクローナル抗体産生ハイブリドーマは、公知技術を使用することによって、例えば以下のように作製され得る。すなわち、LAMP5タンパク質を感作抗原として使用して、通常の免疫方法にしたがって哺乳動物が免疫される。得られる免疫細胞が通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合される。次に、通常のスクリーニング法によって、LAMP5分子中のエピトープに結合す

るモノクローナルな抗体産生細胞をスクリーニングすることによって抗LAMP5抗体を産生するハイブリドーマが選択され得る。

[0044] モノクローナル抗体の作製は、例えば以下に示すように行われる。まず、配列番号：66にそのヌクレオチド配列が開示されたLAMP5遺伝子を発現することによって、抗体取得の感作抗原として使用される配列番号：65で表されるLAMP5タンパク質が取得され得る。すなわち、LAMP5をコードする遺伝子配列を公知の発現ベクターに挿入することによって適当な宿主細胞が形質転換される。当該宿主細胞中または培養上清中から所望のLAMP5タンパク質が公知の方法で精製される。培養上清中から可溶型のLAMP5を取得するためには、例えば、配列番号：65で表されるLAMP5ポリペプチド配列のうち、30から235位のアミノ酸からなるタンパク質が、配列番号：65で表されるLAMP5タンパク質の代わりに発現される。また、精製した天然のLAMP5タンパク質もまた同様に感作抗原として使用され得る。

[0045] 哺乳動物に対する免疫に使用する感作抗原として当該精製LAMP5タンパク質が使用できる。LAMP5の部分ペプチドもまた感作抗原として使用できる。この際、当該部分ペプチドはLAMP5のアミノ酸配列より化学合成によっても取得され得る。また、LAMP5遺伝子の一部を発現ベクターに組込んで発現させることによっても取得され得る。さらにはタンパク質分解酵素を用いてLAMP5タンパク質を分解することによっても取得され得るが、部分ペプチドとして用いるLAMP5ペプチドの領域および大きさは特に特別の態様に限定されない。好ましい領域は配列番号：65で表されるアミノ酸配列において30から235位ののアミノ酸に相当するアミノ酸配列から任意の配列が選択され得る。感作抗原とするペプチドを構成するアミノ酸の数は少なくとも5以上、例えば6以上、或いは7以上であることが好ましい。より具体的には8～50、好ましくは10～30残基のペプチドが感作抗原として使用され得る。

[0046] また、LAMP5タンパク質の所望の部分ポリペプチドやペプチドを異なるポリペプチドと融合した融合タンパク質が感作抗原として利用され得る。感作抗原として使用される融合タンパク質を製造するために、例えば、抗体のFc断

片やペプチドタグなどが好適に利用され得る。融合タンパク質を発現するベクターは、所望の二種類またはそれ以上のポリペプチド断片をコードする遺伝子がインフレームで融合され、当該融合遺伝子が前記のように発現ベクターに挿入されることにより作製され得る。融合タンパク質の作製方法はMolecular Cloning 2nd ed. (Sambrook, J et al., Molecular Cloning 2nd ed., 9.47-9.58 (1989) Cold Spring Harbor Lab. press)に記載されている。

- [0047] 当該感作抗原で免疫される哺乳動物としては、特定の動物に限定されるものではないが、細胞融合に使用する親細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましい。一般的には、げっ歯類の動物（例えば、マウス、ラット、ハムスター）、あるいはウサギ、サル等が好適に使用される。
- [0048] 公知の方法にしたがって上記の動物が感作抗原により免疫される。例えば、一般的な方法として、感作抗原が哺乳動物の腹腔内または皮下注射によって投与されることにより免疫が実施される。具体的には、PBS (Phosphate-Buffered Saline) や生理食塩水等で適当な希釈倍率で希釈された感作抗原が、所望により通常のアジュバント、例えばフロイント完全アジュバントと混合され、乳化された後に、当該感作抗原が哺乳動物に4から21日毎に数回投与される。また、感作抗原の免疫時には適当な担体を使用され得る。特に分子量の小さい部分ペプチドが感作抗原として用いられる場合には、アルブミン、キーホールリンペットヘモシアニン等の担体タンパク質と結合した当該感作抗原ペプチドを免疫することが望ましい場合もある。
- [0049] また、所望の抗体を産生するハイブリドーマは、DNA免疫を使用し、以下のようにしても作製され得る。DNA免疫とは、免疫動物中で抗原タンパク質をコードする遺伝子が発現され得るような態様で構築されたベクターDNAが投与された当該免疫動物中で、感作抗原が当該免疫動物の生体内で発現されることによって、免疫刺激が与えられる免疫方法である。タンパク質抗原が免疫動物に投与される一般的な免疫方法と比べて、DNA免疫には、次のような優位性が期待される。

- ーLAMP5のような膜タンパク質の構造を維持して免疫刺激が与えられ得る
- ー免疫抗原を精製する必要が無い

[0050] DNA免疫によって本発明のモノクローナル抗体を得るために、まず、LAMP5タンパク質を発現するDNAが免疫動物に投与される。LAMP5をコードするDNAは、PCRなどの公知の方法によって合成され得る。得られたDNAが適当な発現ベクターに挿入され、免疫動物に投与される。発現ベクターとしては、例えばpcDNA3.1などの市販の発現ベクターが好適に利用され得る。ベクターを生体に投与する方法として、一般的に用いられている方法が利用され得る。例えば、発現ベクターが吸着した金粒子が、遺伝子銃（gene gun）で免疫動物個体の細胞内に導入されることによってDNA免疫が行われる。

[0051] このように哺乳動物が免疫され、血清中におけるLAMP5に結合する抗体価の上昇が確認された後に、哺乳動物から免疫細胞が採取され、細胞融合に供される。好ましい免疫細胞としては、特に脾細胞が使用され得る。

[0052] 前記免疫細胞と融合される細胞として、哺乳動物のミエローマ細胞が用いられる。ミエローマ細胞は、スクリーニングのための適当な選択マーカーを備えていることが好ましい。選択マーカーとは、特定の培養条件の下で生存できる（あるいはできない）形質を指す。選択マーカーには、ヒポキサンチン-グアニン-ホスホリボシルトランスフェラーゼ欠損（以下HGPRT欠損と省略する）、あるいはチミジンキナーゼ欠損（以下TK欠損と省略する）などが公知である。HGPRTやTKの欠損を有する細胞は、ヒポキサンチン-アミノプテリン-チミジン感受性（以下HAT感受性と省略する）を有する。HAT感受性の細胞はHAT選択培地中でDNA合成を行うことができず死滅するが、正常な細胞と融合すると正常細胞のサルベージ回路を利用してDNAの合成を継続することができるためHAT選択培地中でも増殖するようになる。

[0053] HGPRT欠損やTK欠損の細胞は、それぞれ6チオグアニン、8アザグアニン、あるいは5' ブロモデオキシウリジンを含む培地で選択され得る。これらのピリミジンアナログをDNA中に取り込む正常な細胞は死滅する。他方、これらのピリミジンアナログを取り込めないこれらの酵素を欠損した細胞は、選択培地

の中で生存することができる。この他G418耐性と呼ばれる選択マーカーは、ネオマイシン耐性遺伝子によって2-デオキシストレプトタミン系抗生物質（ゲンタマイシン類似体）に対する耐性を与える。細胞融合に好適な種々のミエローマ細胞が公知である。

[0054] このようなミエローマ細胞として、例えば、P3 (P3x63Ag8.653) (J. Immunol. (1979) 123 (4), 1548-1550)、P3x63Ag8U.1 (Current Topics in Microbiology and Immunology (1978) 81, 1-7)、NS-1 (C. Eur. J. Immunol. (1976) 6 (7), 511-519)、MPC-11 (Cell (1976) 8 (3), 405-415)、SP2/0 (Nature (1978) 276 (5685), 269-270)、F0 (J. Immunol. Methods (1980) 35 (1-2), 1-21)、S194/5.XX0.BU.1 (J. Exp. Med. (1978) 148 (1), 313-323)、R210 (Nature (1979) 277 (5692), 131-133) 等が好適に使用され得る。

[0055] 基本的には公知の方法、例えば、ケーラーとミルステインらの方法 (Methods Enzymol. (1981) 73, 3-46) 等に準じて、前記免疫細胞とミエローマ細胞との細胞融合が行われる。

[0056] より具体的には、例えば細胞融合促進剤の存在下で通常の栄養培養液中で、前記細胞融合が実施され得る。融合促進剤としては、例えばポリエチレングリコール (PEG)、センダイウイルス (HVJ) 等が使用され、さらに融合効率を高めるために所望によりジメチルスルホキシド等の補助剤が添加されて使用される。

[0057] 免疫細胞とミエローマ細胞との使用割合は任意に設定され得る。例えば、ミエローマ細胞に対して免疫細胞を1から10倍とするのが好ましい。前記細胞融合に用いる培養液としては、例えば、前記ミエローマ細胞株の増殖に好適なRPMI1640培養液、MEM培養液、その他、この種の細胞培養に用いられる通常の培養液が使用され、さらに、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液が好適に添加され得る。

[0058] 細胞融合は、前記免疫細胞とミエローマ細胞との所定量を前記培養液中でよく混合し、予め37℃程度に加温されたPEG溶液（例えば平均分子量1000から

6000程度)が通常30から60% (w/v) の濃度で添加される。混合液が緩やかに混合されることによって所望の融合細胞 (ハイブリドーマ) が形成される。次いで、上記に挙げた適当な培養液が逐次添加され、遠心して上清を除去する操作を繰り返すことによりハイブリドーマの生育に好ましくない細胞融合剤等が除去され得る。

[0059] このようにして得られたハイブリドーマは、通常を選択培養液、例えばHAT培養液 (ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養液) で培養することにより選択され得る。所望のハイブリドーマ以外の細胞 (非融合細胞) が死滅するのに十分な時間 (通常、係る十分な時間は数日から数週間である) 上記HAT培養液を用いた培養が継続され得る。次いで、通常の限界希釈法によって、所望の抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングおよび単クローニングが実施される。

[0060] このようにして得られたハイブリドーマは、細胞融合に用いられたミエローマが有する選択マーカーに応じた選択培養液を利用することによって選択され得る。例えばHGPRTやTKの欠損を有する細胞は、HAT培養液 (ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養液) で培養することにより選択され得る。すなわち、HAT感受性のミエローマ細胞を細胞融合に用いた場合、HAT培養液中で、正常細胞との細胞融合に成功した細胞が選択的に増殖し得る。所望のハイブリドーマ以外の細胞 (非融合細胞) が死滅するのに十分な時間、上記HAT培養液を用いた培養が継続される。具体的には、一般に、数日から数週間の培養によって、所望のハイブリドーマが選択され得る。次いで、通常の限界希釈法によって、所望の抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングおよび単クローニングが実施され得る。

[0061] 所望の抗体のスクリーニングおよび単クローニングが、公知の抗原抗体反応に基づくスクリーニング方法によって好適に実施され得る。例えば、LAMP5に結合するモノクローナル抗体は、細胞表面に発現したLAMP5に結合することができる。このようなモノクローナル抗体は、例えば、FACS (fluorescence activated cell sorting) によってスクリーニングされ得る。FACSは、

蛍光抗体と接触させた細胞をレーザー光で解析し、個々の細胞が発する蛍光を測定することによって細胞表面に対する抗体の結合を測定することを可能にするシステムである。

[0062] FACSによって本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマをスクリーニングするためには、まずLAMP5を発現する細胞を調製する。スクリーニングのための好ましい細胞は、LAMP5を強制発現させた哺乳動物細胞である。宿主細胞として使用した形質転換されていない哺乳動物細胞を対照として用いることによって、細胞表面のLAMP5に対する抗体の結合活性が選択的に検出され得る。すなわち、宿主細胞に結合せず、LAMP5強制発現細胞に結合する抗体を産生するハイブリドーマを選択することによって、LAMP5モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマが取得され得る。

[0063] あるいは固定化したLAMP5発現細胞に対する抗体の結合活性がELISAの原理に基づいて評価され得る。例えば、ELISAプレートのウェルにLAMP5発現細胞が固定化される。ハイブリドーマの培養上清をウェル内の固定化細胞に接触させ、固定化細胞に結合する抗体が検出される。モノクローナル抗体がマウス由来の場合、細胞に結合した抗体は、抗マウスイムノグロブリン抗体によって検出され得る。これらのスクリーニングによって選択された、抗原に対する結合能を有する所望の抗体を産生するハイブリドーマは、限界希釈法等によりクローニングされ得る。

[0064] このようにして作製されるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは通常の培養液中で継代培養され得る。また、当該ハイブリドーマは液体窒素中で長期にわたって保存され得る。

[0065] 当該ハイブリドーマを通常の方法に従い培養し、その培養上清から所望のモノクローナル抗体が取得され得る。あるいはハイブリドーマをこれと適合性がある哺乳動物に投与して増殖せしめ、その腹水からモノクローナル抗体が取得され得る。前者の方法は、高純度の抗体を得るのに好適なものである。

[0066] 当該ハイブリドーマ等の抗体産生細胞からクローニングされる抗体遺伝子

によってコードされる抗体も好適に利用され得る。クローニングした抗体遺伝子を適当なベクターに組み込んで宿主に導入することによって、当該遺伝子によってコードされる抗体が発現する。抗体遺伝子の単離と、ベクターへの導入、そして宿主細胞の形質転換のための方法は、例えば、Vandammeらによって既に確立されている (Eur. J. Biochem. (1990) 192 (3), 767-775)。下記に述べるように組換え抗体の製造方法もまた公知である。

[0067] 例えば、抗LAMP5抗体を産生するハイブリドーマ細胞から、抗LAMP5抗体の可変領域 (V領域) をコードするcDNAが取得される。そのために、通常、まずハイブリドーマから全RNAが抽出される。細胞からmRNAを抽出するための方法として、例えば、次のような方法を利用することができる。

ーグアニジン超遠心法 (Biochemistry (1979) 18 (24), 5294-5299)

ーAGPC法 (Anal. Biochem. (1987) 162 (1), 156-159)

[0068] 抽出されたmRNAは、mRNA Purification Kit (GEヘルスケアバイオサイエンス製) 等を使用して精製され得る。あるいは、QuickPrep mRNA Purification Kit (GEヘルスケアバイオサイエンス製) などのように、細胞から直接全mRNAを抽出するためのキットも市販されている。このようなキットを用いて、ハイブリドーマからmRNAが取得され得る。得られたmRNAから逆転写酵素を用いて抗体V領域をコードするcDNAが合成され得る。cDNAは、AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit (生化学工業社製) 等によって合成され得る。また、cDNAの合成および増幅のために、SMART RACE cDNA増幅キット (Clontech製) およびPCRを用いた5'-RACE法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988) 85 (23), 8998-9002, Nucleic Acids Res. (1989) 17 (8), 2919-2932) が適宜利用され得る。さらにこうしたcDNAの合成の過程においてcDNAの両末端に後述する適切な制限酵素サイトが導入され得る。

[0069] 得られたPCR産物から目的とするcDNA断片が精製され、次いでベクターDNAと連結される。このように組換えベクターが作製され、大腸菌等に導入されコロニーが選択された後に、当該コロニーを形成した大腸菌から所望の組換

えベクターが調製され得る。そして、当該組換えベクターが目的とするcDNAの塩基配列を有しているか否かについて、公知の方法、例えば、ジデオキシヌクレオチドチェインターミネーション法等により確認される。

[0070] 可変領域をコードする遺伝子を取得するためには、可変領域遺伝子増幅用のプライマーを使った5'-RACE法を利用するのが簡便である。まずハイブリドーマ細胞より抽出されたRNAを鋳型としてcDNAが合成され、5'-RACE cDNAライブラリが得られる。5'-RACE cDNAライブラリの合成にはSMART RACE cDNA増幅キットなど市販のキットが適宜用いられる。

[0071] 得られた5'-RACE cDNAライブラリを鋳型として、PCR法によって抗体遺伝子が増幅される。公知の抗体遺伝子配列をもとにマウス抗体遺伝子増幅用のプライマーがデザインされ得る。これらのプライマーは、イムノグロブリンのサブクラスごとに異なる塩基配列である。したがって、サブクラスは予めIso Stripマウスモノクローナル抗体アイソタイピングキット（ロシュ・ダイアグノスティックス）などの市販キットを用いて決定しておくことが望ましい。

[0072] 具体的には、例えばマウスIgGをコードする遺伝子の取得を目的とするときには、重鎖として $\gamma 1$ 、 $\gamma 2a$ 、 $\gamma 2b$ 、 $\gamma 3$ 、軽鎖として κ 鎖と λ 鎖をコードする遺伝子の増幅が可能なプライマーが利用され得る。IgGの可変領域遺伝子を増幅するためには、一般に3'側のプライマーには可変領域に近い定常領域に相当する部分にアニールするプライマーが利用される。一方、5'側のプライマーには、5'-RACE cDNAライブラリ作製キットに付属するプライマーが利用される。

[0073] こうして増幅されたPCR産物を利用して、重鎖と軽鎖の組み合わせからなるイムノグロブリンが再構成され得る。再構成されたイムノグロブリンの、LAMP5に対する結合活性を指標として、所望の抗体がスクリーニングされ得る。LAMP5に対する抗体の取得を目的とするとき、抗体のLAMP5に対する結合は、特異的であることがさらに好ましい。LAMP5に結合する抗体は、例えば次のようにしてスクリーニングされ得る；

(1) ハイブリドーマから得られたcDNAによってコードされるV領域を含む抗体をLAMP5発現細胞に接触させる工程、

(2) LAMP5発現細胞と抗体との結合を検出する工程、および

(3) LAMP5発現細胞に結合する抗体を選択する工程。

[0074] 抗体とLAMP5発現細胞との結合を検出する方法は公知である。具体的には、先に述べたFACSなどの手法によって、抗体とLAMP5発現細胞との結合が検出され得る。抗体の結合活性を評価するためにLAMP5発現細胞の固定標本が適宜利用され得る。

[0075] 結合活性を指標とする抗体のスクリーニング方法として、ファージベクターを利用したパニング法も好適に用いられる。ポリクローナルな抗体発現細胞群より抗体遺伝子を重鎖と軽鎖のサブクラスのライブラリとして取得した場合には、ファージベクターを利用したスクリーニング方法が有利である。重鎖と軽鎖の可変領域をコードする遺伝子は、適当なリンカー配列で連結することによってシングルチェーンFv (scFv) を形成することができる。scFvをコードする遺伝子をファージベクターに挿入することにより、scFvを表面に発現するファージが取得され得る。このファージと所望の抗原との接触の後に、抗原に結合したファージを回収することによって、目的の結合活性を有するscFvをコードするDNAが回収され得る。この操作を必要に応じて繰り返すことにより、所望の結合活性を有するscFvが濃縮され得る。

[0076] 目的とする抗LAMP5抗体のV領域をコードするcDNAが得られた後に、当該cDNAの両末端に挿入した制限酵素サイトを認識する制限酵素によって当該cDNAが消化される。好ましい制限酵素は、抗体遺伝子を構成する塩基配列に出現する頻度が低い塩基配列を認識して消化する。さらに1コピーの消化断片をベクターに正しい方向で挿入するためには、付着末端を与える制限酵素の挿入が好ましい。上記のように消化された抗LAMP5抗体のV領域をコードするcDNAを適当な発現ベクターに挿入することによって、抗体発現ベクターが取得され得る。このとき、抗体定常領域(C領域)をコードする遺伝子と、前記V領域をコードする遺伝子とがインフレームで融合されれば、キメラ抗体が取得

される。ここで「キメラ抗体」とは、定常領域と可変領域の由来が異なる抗体をいう。したがって、マウスーヒトなどの異種キメラ抗体に加え、ヒトーヒト同種キメラ抗体も、本発明におけるキメラ抗体に含まれる。予め定常領域を有する発現ベクターに、前記V領域遺伝子を挿入することによって、キメラ抗体発現ベクターが構築され得る。具体的には、例えば、所望の抗体定常領域（C領域）をコードするDNAを保持した発現ベクターの5'側に、前記V領域遺伝子を消化する制限酵素の制限酵素認識配列が適宜配置され得る。同じ組み合わせの制限酵素で消化された両者がインフレーションで融合されることによって、キメラ抗体発現ベクターが構築される。

[0077] 抗体のアイソタイプは、抗体定常領域の構造によって決定される。IgG1、IgG2、IgG3およびIgG4の各アイソタイプの抗体定常領域は、それぞれ、C γ 1、C γ 2、C γ 3およびC γ 4と呼ばれる。ヒトC γ 1、C γ 2、C γ 3およびC γ 4の抗体定常領域を形成するポリペプチド配列は、配列番号68、69、70および71に例示されている。各ポリペプチド配列を形成するアミノ酸残基とkabatのEUナンバリングとの関係は図7に示されている。また、軽鎖の抗体定常領域は λ および κ 鎖の定常領域が適宜使用される。ヒト λ および κ の抗体定常領域を形成するポリペプチド配列は、配列番号：72および73に例示されている。

[0078] LAMP5に結合するモノクローナル抗体を製造するために、抗体遺伝子が発現制御領域による制御の下で発現するように発現ベクターに組み込まれる。抗体を発現するための発現制御領域とは、例えば、エンハンサーやプロモーターを含む。また、発現した抗体が細胞外に分泌されるように、適切なシグナル配列がアミノ末端に付加され得る。発現されたポリペプチドは上記配列のカルボキシル末端部分で切断され、切断されたポリペプチドが成熟ポリペプチドとして細胞外に分泌され得る。次いで、この発現ベクターによって適当な宿主細胞が形質転換されることによって、抗LAMP5抗体をコードするDNAを発現した組換え細胞が取得され得る。

[0079] 抗体遺伝子の発現のために、抗体重鎖（H鎖）および軽鎖（L鎖）をコード

するDNAは、それぞれ別の発現ベクターに組み込まれる。H鎖とL鎖が組み込まれたベクターによって、同じ宿主細胞に同時に形質転換（co-transfect）されることによって、H鎖とL鎖を備えた抗体分子が発現され得る。あるいはH鎖およびL鎖をコードするDNAが単一の発現ベクターに組み込まれることによって宿主細胞が形質転換され得る（W01994/011523を参照のこと）。

[0080] 単離された抗体遺伝子を適当な宿主に導入することによって抗体を作製するための宿主細胞と発現ベクターの多くの組み合わせが公知である。これらの発現系は、いずれも本発明の抗原結合ドメインを単離するのに応用され得る。真核細胞が宿主細胞として使用される場合、動物細胞、植物細胞、あるいは真菌細胞が適宜使用され得る。具体的には、動物細胞としては、次のような細胞が例示され得る。

（１）哺乳類細胞、：CHO、COS、ミエローマ、BHK（baby hamster kidney）、Hela、Vero、HEK（human embryonic kidney）293など

（２）両生類細胞：アフリカツメガエル卵母細胞など

（３）昆虫細胞：sf9、sf21、Tn5など

[0081] あるいは植物細胞としては、ニコティアナ・タバカム（*Nicotiana tabacum*）などのニコティアナ（*Nicotiana*）属由来の細胞による抗体遺伝子の発現系が公知である。植物細胞の形質転換には、カルス培養した細胞が適宜利用され得る。

[0082] さらに真菌細胞としては、次のような細胞を利用することができる。

ー酵母：サッカロミセス・セレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）などのサッカロミセス（*Saccharomyces*）属、メタノール資化酵母（*Pichia pastoris*）などのPichia属

ー糸状菌：アスペルギルス・ニガー（*Aspergillus niger*）などのアスペルギルス（*Aspergillus*）属

[0083] また、原核細胞を利用した抗体遺伝子の発現系も公知である。例えば、細菌細胞を用いる場合、大腸菌（*E. coli*）、枯草菌などの細菌細胞が適宜利用され得る。これらの細胞中に、目的とする抗体遺伝子を含む発現ベクターが

形質転換によって導入される。形質転換された細胞をin vitroで培養することにより、当該形質転換細胞の培養物から所望の抗体が取得され得る。

[0084] 組換え抗体の産生には、上記宿主細胞に加えて、トランスジェニック動物も利用され得る。すなわち所望の抗体をコードする遺伝子が導入された動物から、当該抗体を得ることができる。例えば、抗体遺伝子は、乳汁中に固有に産生されるタンパク質をコードする遺伝子の内部にインフレームで挿入することによって融合遺伝子として構築され得る。乳汁中に分泌されるタンパク質として、例えば、ヤギ β カゼインなどが利用され得る。抗体遺伝子が挿入された融合遺伝子を含むDNA断片はヤギの胚へ注入され、当該注入された胚が雌のヤギへ導入される。胚を受容したヤギから生まれるトランスジェニックヤギ（またはその子孫）が産生する乳汁からは、所望の抗体が乳汁タンパク質との融合タンパク質として取得され得る。また、トランスジェニックヤギから産生される所望の抗体を含む乳汁量を増加させるために、ホルモンがトランスジェニックヤギに対して投与され得る（Bio/Technology（1994），12（7），699-702）。

[0085] 本明細書において記載される抗LAMP5抗体がヒトに投与される場合、当該抗体における抗原結合ドメインとして、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺伝子組換え型抗体由来の抗原結合ドメインが適宜採用され得る。遺伝子組換え型抗体には、例えば、ヒト化（Humanized）抗体等が含まれる。これらの改変抗体は、公知の方法を用いて適宜製造される。

[0086] 本発明の抗LAMP5抗体における抗原結合ドメインの作製に用いられる抗体の可変領域は、通常、4つのフレームワーク領域（FR）に挟まれた3つの相補性決定領域（complementarity-determining region; CDR）で構成されている。CDRは、実質的に、抗体の結合特異性を決定している領域である。CDRのアミノ酸配列は多様性に富む。一方、FRを構成するアミノ酸配列は、異なる結合特異性を有する抗体の間でも、高い同一性を示すことが多い。そのため、一般に、CDRの移植によって、ある抗体の結合特異性を、他の抗体に移植するこ

とができるとされている。

[0087] ヒト化抗体は、再構成 (reshaped) ヒト抗体とも称される。具体的には、ヒト以外の動物、例えばマウス抗体のCDRをヒト抗体に移植したヒト化抗体などが公知である。ヒト化抗体を得るための一般的な遺伝子組換え手法も知られている。具体的には、マウスの抗体のCDRをヒトのFRに移植するための方法として、例えば重複伸長PCR (Overlap Extension PCR) が公知である。重複伸長PCRにおいては、ヒト抗体のFRを合成するためのプライマーに、移植すべきマウス抗体のCDRをコードする塩基配列が付加される。プライマーは4つのFRのそれぞれについて用意される。一般に、マウスCDRのヒトFRへの移植においては、マウスのFRと同一性の高いヒトFRを選択するのが、CDRの機能の維持において有利であるとされている。すなわち、一般に、移植すべきマウスCDRに隣接しているFRのアミノ酸配列と同一性の高いアミノ酸配列からなるヒトFRを利用するのが好ましい。

[0088] また連結される塩基配列は、互いにインフレームで接続されるようにデザインされる。それぞれのプライマーによってヒトFRが個別に合成される。その結果、各FRにマウスCDRをコードするDNAが付加された産物が得られる。各産物のマウスCDRをコードする塩基配列は、互いにオーバーラップするようにデザインされている。続いて、ヒト抗体遺伝子を鋳型として合成された産物のオーバーラップしたCDR部分を互いにアニールさせて相補鎖合成反応が行われる。この反応によって、ヒトFRがマウスCDRの配列を介して連結される。

[0089] 最終的に3つのCDRと4つのFRが連結されたV領域遺伝子は、その5'末端と3'末端にアニールし適当な制限酵素認識配列を付加されたプライマーによってその全長が増幅される。上記のように得られたDNAとヒト抗体C領域をコードするDNAとをインフレームで融合するように発現ベクター中に挿入することによって、ヒト型抗体発現用ベクターが作成できる。当該組込みベクターを宿主に導入して組換え細胞を樹立した後に、当該組換え細胞を培養し、当該ヒト化抗体をコードするDNAを発現させることによって、当該ヒト化抗体が当該培養細胞の培養物中に産生される (欧州特許公開EP239400、国際公開W01996/

002576参照)。

[0090] 上記のように作製されたヒト化抗体の抗原に対する結合活性を定性的または定量的に測定し、評価することによって、CDRを介して連結されたときに当該CDRが良好な抗原結合部位を形成するようなヒト抗体のFRが好適に選択できる。必要に応じ、再構成ヒト抗体のCDRが適切な抗原結合部位を形成するようにFRのアミノ酸残基を置換することもできる。例えば、マウスCDRのヒトFRへの移植に用いたPCR法を応用して、FRにアミノ酸配列の変異を導入することができる。具体的には、FRにアニーリングするプライマーに部分的な塩基配列の変異を導入することができる。このようなプライマーによって合成されたFRには、塩基配列の変異が導入される。アミノ酸を置換した変異型抗体の抗原に対する結合活性を上記の方法で測定し評価することによって所望の性質を有する変異FR配列が選択され得る (Cancer Res., (1993) 53, 851-856)。

[0091] また、ヒト抗体遺伝子の全てのレパートリーを有するトランスジェニック動物 (国際公開W01993/012227、W01992/003918、W01994/002602、W01994/025585、W01996/034096、W01996/033735参照) を免疫動物とし、DNA免疫により所望のヒト抗体が取得され得る。

[0092] さらに、ヒト抗体ライブラリを用いて、パンニングによりヒト抗体を取得する技術も知られている。例えば、ヒト抗体のV領域が一本鎖抗体 (scFv) としてファージディスプレイ法によりファージの表面に発現される。抗原に結合するscFvを発現するファージが選択され得る。選択されたファージの遺伝子を解析することにより、抗原に結合するヒト抗体のV領域をコードするDNA配列が決定できる。抗原に結合するscFvのDNA配列を決定した後、当該V領域配列を所望のヒト抗体C領域の配列とインフレームで融合させた後に適当な発現ベクターに挿入することによって発現ベクターが作製され得る。当該発現ベクターを上記に挙げたような好適な発現細胞中に導入し、当該ヒト抗体をコードする遺伝子を発現させることにより当該ヒト抗体が取得される。これらの方法は既に公知である (国際公開W01992/001047、W01992/020791、W0199

3/006213、W01993/011236、W01993/019172、W01995/001438、W01995/015388 参照)。

[0093] また、抗体遺伝子を取得する方法としてBernasconiら (Science (2002) 298, 2199-2202) またはW02008/081008に記載のようなB細胞クローニング (それぞれの抗体のコード配列の同定およびクローニング、その単離、およびそれぞれの抗体 (特に、IgG1、IgG2、IgG3またはIgG4) の作製のための発現ベクター構築のための使用等) の手法が、上記のほか適宜使用され得る。

[0094] EUナンバリングおよびKabatナンバリング

本発明で使用されている方法によると、抗体のCDRとFRに割り当てられるアミノ酸位置はKabatにしたがって規定される (Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institute of Health, Bethesda, Md., 1987年および1991年)。本明細書において、抗LAMP5抗体の可変領域のアミノ酸はKabatナンバリングにしたがい、定常領域のアミノ酸はKabatのアミノ酸位置に準じたEUナンバリングにしたがって表される。

[0095] アミノ酸の改変

抗体のアミノ酸配列中のアミノ酸の改変のためには、部位特異的変異誘発法 (Kunkelら (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985) 82, 488-492)) や重複伸長PCR等の公知の方法が適宜採用され得る。また、天然のアミノ酸以外のアミノ酸に置換するアミノ酸の改変方法として、複数の公知の方法もまた採用され得る (Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. (2006) 35, 225-249、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2003) 100 (11), 6353-6357)。例えば、終止コドンの1つであるUAGコドン (アンバーコドン) の相補的アンバーサプレッサーtRNAに非天然アミノ酸が結合されたtRNAが含まれる無細胞翻訳系システム (Clover Direct (Protein Express)) 等も好適に用いられる。

[0096] 本明細書において、アミノ酸の改変部位を表す際に用いられる「および/または」の用語の意義は、「および」と「または」が適宜組み合わせられたあらゆる組合せを含む。具体的には、例えば「33位、55位、および/または96位の

アミノ酸が置換されている」とは以下のアミノ酸の改変のバリエーションが含まれる；

(a)33位、(b)55位、(c)96位、(d)33位および55位、(e)33位および96位、(f)55位および96位、(g)33位および55位および96位。

[0097] 細胞傷害活性

本発明で使用される抗体は、好ましくは細胞傷害活性を有する抗体である。

[0098] 本発明における細胞傷害活性としては、例えば抗体依存性細胞介在性細胞傷害 (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity: ADCC) 活性、補体依存性細胞傷害 (complement-dependent cytotoxicity: CDC) 活性などを挙げることができる。本発明において、CDC活性とは補体系による細胞傷害活性を意味する。一方ADCC活性とは標的細胞の細胞表面抗原に特異的抗体が付着した際、そのFc部分にFc γ 受容体保有細胞（免疫細胞等）がFc γ 受容体を介して結合し、標的細胞に傷害を与える活性を意味する。

[0099] 抗LAMP5抗体がADCC活性を有するか否か、またはCDC活性を有するか否かは公知の方法により測定することができる（例えば、Current protocols in Immunology, Chapter7. Immunologic studies in humans, Editor, John E, Coligan et al., John Wiley & Sons, Inc., (1993)等）。

[0100] 具体的には、まず、エフェクター細胞、補体溶液、標的細胞の調製が実施される。

(1) エフェクター細胞の調製

CBA/Nマウスなどから脾臓を摘出し、RPMI1640培地（Invitrogen社製）中で脾臓細胞が分離される。10%ウシ胎児血清（FBS、HyClone社製）を含む同培地で洗浄後、細胞濃度を 5×10^6 /mlに調製することによって、エフェクター細胞が調製され得る。

(2) 補体溶液の調製

Baby Rabbit Complement (CEDARLANE社製) を10%FBS含有培地（Invitro

gen社製)にて10倍希釈し、補体溶液が調製され得る。

(3) 標的細胞の調製

LAMP5タンパク質を発現した細胞を0.2mCiの⁵¹Cr-クロム酸ナトリウム (GEヘルスケアバイオサイエンス社製) とともに、10%FBS含有DMEM培地中で37℃にて1時間培養することにより当該標的細胞が放射性標識され得る。LAMP5タンパク質を発現する細胞としては、LAMP5タンパク質をコードする遺伝子で形質転換された細胞、原発性多発性骨髄腫、転移性多発性骨髄腫が利用され得る。放射性標識後、細胞を10%FBS含有RPMI1640培地にて3回洗浄し、細胞濃度を 2×10^5 /mlに調製することによって、当該標的細胞が調製され得る。

[0101] ADCC活性、またはCDC活性は下記に述べる方法により測定され得る。ADCC活性の測定の場合は、各ウェルに、標的細胞と、抗LAMP5抗体を50 μ lずつ加えられた96ウェルU底プレート (Becton Dickinson社製) が氷上にて15分間静置される。その後、各ウェルにエフェクター細胞100 μ lが加えられたプレートは、炭酸ガスインキュベーター内で4時間インキュベートされる。抗体の終濃度は0または10 μ g/mlに調製され得る。インキュベーションの後、回収された100 μ lの上清中の放射活性が、ガンマカウンター (COBRA II AUTO-GAMMA、MODEL D5005、Packard Instrument Company社製) を用いて測定される。細胞傷害活性 (%) は得られた値を使用して $(A-C) / (B-C) \times 100$ の計算式に基づいて計算される。Aは各試料における放射活性 (cpm)、Bは1% NP-40 (nacalai tesque社製) を加えた試料における放射活性 (cpm)、Cは標的細胞のみを含む試料の放射活性 (cpm) を示す。

[0102] 一方、CDC活性の測定の場合は、各ウェルに、標的細胞と、抗LAMP5抗体が50 μ lずつ加えられた96ウェル平底プレート (Becton Dickinson社製) が氷上にて15分間静置される。その後、各ウェルに補体溶液100 μ lが加えられたプレートは、炭酸ガスインキュベーター内で4時間インキュベートされる。抗体の終濃度は0または3 μ g/mlに調製される。インキュベーションの後、回収された100 μ lの上清中の放射活性が、ガンマカウンターを用いて測定される。細胞傷害活性はADCC活性の測定と同様に計算される。

[0103] 本発明における、細胞傷害活性を有する抗LAMP5抗体の好ましい態様の例として、以下の抗体が挙げられる。

(i)本実施例に記載のD1抗体と同一のCDRを保持する抗体（配列番号35に記載のCDR1、配列番号36に記載のCDR2および配列番号37に記載のCDR3を含む重鎖可変領域、ならびに配列番号38に記載のCDR1、配列番号39に記載のCDR2および配列番号40に記載のCDR3を含む軽鎖可変領域を含む抗体）

(ii)本実施例に記載のD2抗体と同一のCDRを保持する抗体（配列番号41に記載のCDR1、配列番号42に記載のCDR2および配列番号43に記載のCDR3を含む重鎖可変領域、ならびに配列番号44に記載のCDR1、配列番号45に記載のCDR2および配列番号46に記載のCDR3を含む軽鎖可変領域を含む抗体）

(iii)本実施例に記載のD10抗体と同一のCDRを保持する抗体（配列番号53に記載のCDR1、配列番号54に記載のCDR2および配列番号55に記載のCDR3を含む重鎖可変領域、ならびに配列番号56に記載のCDR1、配列番号57に記載のCDR2および配列番号58に記載のCDR3を含む軽鎖可変領域を含む抗体）

本実施例6-1に示される通り、KHM-1B細胞に対してクローンD1、D2、D10がADCCを誘導することが示された（図5）。またADCC活性はKHM-1B細胞のIL-6刺激の有無にかかわらず観察された（図5）。

[0104] 本発明における抗LAMP5抗体は、本実施例6-1に示された評価によるカルセイン遊離率が、IL-6刺激の無い場合において、好ましくは50%以上、より好ましくは55%以上、より好ましくは60%以上、最も好ましくは65%以上の抗体であり、IL-6刺激が有る場合において、好ましくは60%以上、より好ましくは65%以上、より好ましくは70%以上、最も好ましくは75%以上の抗体である。

[0105] ADCC活性が増強された抗LAMP5抗体

本発明の抗LAMP5抗体としてはADCC活性が増強された抗LAMP5抗体も好適に使用され得る。前記のように、ADCC活性とは標的細胞の細胞表面抗原に特異的抗体が付着した際、そのFc部分にFc γ 受容体発現細胞（免疫細胞等）がFc γ 受容体を介して結合し、標的細胞に傷害を与える活性を意味するため、免

疫細胞等のFc γ 受容体発現細胞のFc γ 受容体に対する結合活性を増強することによって、抗LAMP5抗体が介在するADCC活性を増強することが可能である。免疫細胞等のFc γ 受容体発現細胞のFc γ 受容体に対する結合活性を増強する方法として、少なくとも下記の三つの公知の方法が利用され得る。

[0106] (1) Fc領域のアミノ酸が改変された抗LAMP5抗体

本発明の抗LAMP5抗体に含まれるFc領域のアミノ酸の改変によってFc γ レセプターに対する結合活性が増強された抗LAMP5抗体が取得され得る。改変のための好ましいIgG型免疫グロブリンのFc領域としては、例えばヒトIgG (IgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4、およびそれらの改変体) のFc領域が挙げられる。

[0107] 他のアミノ酸への改変は、Fc γ レセプターに対する結合活性が増強されるかぎり、いかなる位置のアミノ酸も改変され得る。本発明の抗LAMP5抗体が、ヒトFc領域としてヒトIgG1のFc領域を含んでいる場合、Fc γ レセプターに対する結合が、ヒトIgG1由来のFc領域の結合活性より増強する効果をもたらす改変が含まれていることが好ましい。Fc γ レセプターに対する結合活性を増強するためのアミノ酸改変としては、例えばW02007/024249、W02007/021841、W02006/031370、W02000/042072、W02004/029207、W02004/099249、W02006/105338、W02007/041635、W02008/092117、W02005/070963、W02006/020114、W02006/116260およびW02006/023403などにおいて報告されている。

[0108] そのような改変が可能なアミノ酸として、例えば、EUナンバリングで表される221位、222位、223位、224位、225位、227位、228位、230位、231位、232位、233位、234位、235位、236位、237位、238位、239位、240位、241位、243位、244位、245位、246位、247位、249位、250位、251位、254位、255位、256位、258位、260位、262位、263位、264位、265位、266位、267位、268位、269位、270位、271位、272位、273位、274位、275位、276位、278位、279位、280位、281位、282位、283位、284位、285位、286位、288位、290位、291位、292位、293位、294位、295位、296位、297位、298位、299位、300位、301位、302位、303位、304位、305位、311位、313位、315位、317位、318位、

320位、322位、323位、324位、325位、326位、327位、328位、329位、330位、331位、332位、333位、334位、335位、336位、337位、339位、376位、377位、378位、379位、380位、382位、385位、392位、396位、421位、427位、428位、429位、434位、436位および440位の群から選択される少なくともひとつ以上のアミノ酸が挙げられる。これらのアミノ酸の改変によって、本発明の抗LAMP5抗体のFc領域のFc γ レセプターに対する結合が増強され得る。

[0109] 本発明に使用するために、特に好ましい改変としては、例えば、本発明の抗LAMP5抗体のFc領域のEUナンバリングで表される；

221位のアミノ酸がLysまたはTyrのいずれか、

222位のアミノ酸がPhe、Trp、GluまたはTyrのいずれか、

223位のアミノ酸がPhe、Trp、GluまたはLysのいずれか、

224位のアミノ酸がPhe、Trp、GluまたはTyrのいずれか、

225位のアミノ酸がGlu、LysまたはTrpのいずれか、

227位のアミノ酸がGlu、Gly、LysまたはTyrのいずれか、

228位のアミノ酸がGlu、Gly、LysまたはTyrのいずれか、

230位のアミノ酸がAla、Glu、GlyまたはTyrのいずれか、

231位のアミノ酸がGlu、Gly、Lys、ProまたはTyrのいずれか、

232位のアミノ酸がGlu、Gly、LysまたはTyrのいずれか、

233位のアミノ酸がAla、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

234位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

235位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

236位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

237位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

238位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

239位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

240位のアミノ酸がAla、Ile、MetまたはThrのいずれか、

241位のアミノ酸がAsp、Glu、Leu、Arg、TrpまたはTyrのいずれか、

243位のアミノ酸がLeu、Glu、Leu、Gln、Arg、TrpまたはTyrのいずれか、

244位のアミノ酸がHis、

245位のアミノ酸がAla、

246位のアミノ酸がAsp、Glu、HisまたはTyrのいずれか、

247位のアミノ酸がAla、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Thr、ValまたはTyrのいずれか、

249位のアミノ酸がGlu、His、GlnまたはTyrのいずれか、

250位のアミノ酸がGluまたはGlnのいずれか、

251位のアミノ酸がPhe、

254位のアミノ酸がPhe、MetまたはTyrのいずれか、

255位のアミノ酸がGlu、LeuまたはTyrのいずれか、

256位のアミノ酸がAla、MetまたはProのいずれか、

258位のアミノ酸がAsp、Glu、His、SerまたはTyrのいずれか、

260位のアミノ酸がAsp、Glu、HisまたはTyrのいずれか、

262位のアミノ酸がAla、Glu、Phe、IleまたはThrのいずれか、

263位のアミノ酸がAla、Ile、MetまたはThrのいずれか、

264位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、TrpまたはTyrのいずれか、

265位のアミノ酸がAla、Leu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

266位のアミノ酸がAla、Ile、MetまたはThrのいずれか、

267位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gl

n、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

268位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Thr、ValまたはTrpのいずれか、

269位のアミノ酸がPhe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

270位のアミノ酸がGlu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、TrpまたはTyrのいずれか、

271位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

272位のアミノ酸がAsp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

273位のアミノ酸がPheまたはIleのいずれか、

274位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

275位のアミノ酸がLeuまたはTrpのいずれか、

276位のアミノ酸が、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

278位のアミノ酸がAsp、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、ValまたはTrpのいずれか、

279位のアミノ酸がAla、

280位のアミノ酸がAla、Gly、His、Lys、Leu、Pro、Gln、TrpまたはTyrのいずれか、

281位のアミノ酸がAsp、Lys、ProまたはTyrのいずれか、

282位のアミノ酸がGlu、Gly、Lys、ProまたはTyrのいずれか、

283位のアミノ酸がAla、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、ArgまたはTyrのいずれか、

284位のアミノ酸がAsp、Glu、Leu、Asn、ThrまたはTyrのいずれか、

285位のアミノ酸がAsp、Glu、Lys、Gln、TrpまたはTyrのいずれか、

286位のアミノ酸がGlu、Gly、ProまたはTyrのいずれか、
288位のアミノ酸がAsn、Asp、GluまたはTyrのいずれか、
290位のアミノ酸がAsp、Gly、His、Leu、Asn、Ser、Thr、TrpまたはTyrのいずれか、291位のアミノ酸がAsp、Glu、Gly、His、Ile、GlnまたはThrのいずれか、
292位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Pro、ThrまたはTyrのいずれか、
293位のアミノ酸がPhe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、
294位のアミノ酸がPhe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、
295位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、
296位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、ThrまたはValのいずれか、
297位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、
298位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Met、Asn、Gln、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、
299位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Val、TrpまたはTyrのいずれか、
300位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、ValまたはTrpのいずれか、
301位のアミノ酸がAsp、Glu、HisまたはTyrのいずれか、
302位のアミノ酸がIle、
303位のアミノ酸がAsp、GlyまたはTyrのいずれか、
304位のアミノ酸がAsp、His、Leu、AsnまたはThrのいずれか、
305位のアミノ酸がGlu、Ile、ThrまたはTyrのいずれか、
311位のアミノ酸がAla、Asp、Asn、Thr、ValまたはTyrのいずれか、

313位のアミノ酸がPhe、

315位のアミノ酸がLeu、

317位のアミノ酸がGluまたはGln、

318位のアミノ酸がHis、Leu、Asn、Pro、Gln、Arg、Thr、ValまたはTyrのいずれか、

320位のアミノ酸がAsp、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Asn、Pro、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

322位のアミノ酸がAla、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Pro、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

323位のアミノ酸がIle、

324位のアミノ酸がAsp、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

325位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

326位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Gly、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

327位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

328位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

329位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

330位のアミノ酸がCys、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

331位のアミノ酸がAsp、Phe、His、Ile、Leu、Met、Gln、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

332位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

333位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Ser、Thr、ValまたはTyrのいずれか、

334位のアミノ酸がAla、Glu、Phe、Ile、Leu、ProまたはThrのいずれか、

335位のアミノ酸がAsp、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

336位のアミノ酸がGlu、LysまたはTyrのいずれか、

337位のアミノ酸がGlu、HisまたはAsnのいずれか、

339位のアミノ酸がAsp、Phe、Gly、Ile、Lys、Met、Asn、Gln、Arg、SerまたはThrのいずれか、

376位のアミノ酸がAlaまたはValのいずれか、

377位のアミノ酸がGlyまたはLysのいずれか、

378位のアミノ酸がAsp、

379位のアミノ酸がAsn、

380位のアミノ酸がAla、AsnまたはSerのいずれか、

382位のアミノ酸がAlaまたはIleのいずれか、

385位のアミノ酸がGlu、

392位のアミノ酸がThr、

396位のアミノ酸がLeu、

421位のアミノ酸がLys、

427位のアミノ酸がAsn、

428位のアミノ酸がPheまたはLeuのいずれか、

429位のアミノ酸がMet、

434位のアミノ酸がTrp、

436位のアミノ酸がIle、または

440位のアミノ酸がGly、His、Ile、LeuまたはTyrのいずれか、

の群から選択される少なくともひとつ以上のアミノ酸の改変が挙げられる。

また、改変されるアミノ酸の数は特に限定されず、一箇所のみのアミノ酸が改変され得るし、二箇所以上のアミノ酸が改変され得る。二箇所以上のアミ

ノ酸の改変の組合せとしては、例えば表 1 および 2 に記載されるような組合せが挙げられる。

[0110]

[表1]

アミノ酸の組合せ	アミノ酸の組合せ
K370E/P396L/D270E	S239Q/I332Q
Q419H/P396L/D270E	S267D/I332E
V240A/P396L/D270E	S267E/I332E
R255L/P396L/D270E	S267L/A327S
R255L/P396L/D270E	S267Q/A327S
R255L/P396L/D270E/R292G	S298A/I332E
R255L/P396L/D270E	S304T/I332E
R255L/P396L/D270E/Y300L	S324G/I332D
F243L/D270E/K392N/P396L	S324G/I332E
F243L/R255L/D270E/P396L	S324I/I332D
F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L	S324I/I332E
F243L/R292P/Y300L/P396L	T260H/I332E
F243L/R292P/Y300L	T335D/I332E
F243L/R292P/P396L	V240I/V266I
F243L/R292P/V305I	V264I/I332E
F243L/R292P	D265F/N297E/I332E
S298A/E333A/K334A	D265Y/N297D/I332E
E380A/T307A	F243L/V262I/V264W
K326M/E333S	N297D/A330Y/I332E
K326A/E333A	N297D/T299E/I332E
S317A/K353A	N297D/T299F/I332E
A327D/I332E	N297D/T299H/I332E
A330L/I332E	N297D/T299I/I332E
A330Y/I332E	N297D/T299L/I332E
E258H/I332E	N297D/T299V/I332E
E272H/I332E	P230A/E233D/I332E
E272I/N276D	P244H/P245A/P247V
E272R/I332E	S239D/A330L/I332E
E283H/I332E	S239D/A330Y/I332E
E293R/I332E	S239D/H268E/A330Y
F241L/V262I	S239D/I332E/A327A
F241W/F243W	S239D/I332E/A330I
F243L/V264I	S239D/N297D/I332E
H268D/A330Y	S239D/S298A/I332E
H268E/A330Y	S239D/V264I/I332E
K246H/I332E	S239E/N297D/I332E
L234D/I332E	S239E/V264I/I332E
L234E/I332E	S239N/A330L/I332E
L234G/I332E	S239N/A330Y/I332E
L234I/I332E	S239N/S298A/I332E
L234I/L235D	S239Q/V264I/I332E
L234Y/I332E	V264E/N297D/I332E
L235D/I332E	V264I/A330L/I332E
L235E/I332E	V264I/A330Y/I332E
L235I/I332E	V264I/S298A/I332E
L235S/I332E	Y296D/N297D/I332E

[0111] [表2]

L328A/I332D	Y296E/N297D/I332E
L328D/I332D	Y296H/N297D/I332E
L328D/I332E	Y296N/N297D/I332E
L328E/I332D	Y296Q/N297D/I332E
L328E/I332E	Y296T/N297D/I332E
L328F/I332D	D265Y/N297D/T299L/I332E
L328F/I332E	F241E/F243Q/V262T/V264E
L328H/I332E	F241E/F243R/V262E/V264R
L328I/I332D	F241E/F243Y/V262T/V264R
L328I/I332E	F241L/F243L/V262I/V264I
L328M/I332D	F241R/F243Q/V262T/V264R
L328M/I332E	F241S/F243H/V262T/V264T
L328N/I332D	F241W/F243W/V262A/V264A
L328N/I332E	F241Y/F243Y/V262T/V264T
L328Q/I332D	I332E/A330Y/H268E/A327A
L328Q/I332E	N297D/I332E/S239D/A330L
L328T/I332D	N297D/S298A/A330Y/I332E
L328T/I332E	S239D/A330Y/I332E/K326E
L328V/I332D	S239D/A330Y/I332E/K326T
L328V/I332E	S239D/A330Y/I332E/L234I
L328Y/I332D	S239D/A330Y/I332E/L235D
L328Y/I332E	S239D/A330Y/I332E/V240I
N297D/I332E	S239D/A330Y/I332E/V264T
N297E/I332E	S239D/A330Y/I332E/V266I
N297S/I332E	S239D/D265F/N297D/I332E
P227G/I332E	S239D/D265H/N297D/I332E
P230A/E233D	S239D/D265I/N297D/I332E
Q295E/I332E	S239D/D265L/N297D/I332E
R255Y/I332E	S239D/D265T/N297D/I332E
S239D/I332D	S239D/D265V/N297D/I332E
S239D/I332E	S239D/D265Y/N297D/I332E
S239D/I332N	S239D/I332E/A330Y/A327A
S239D/I332Q	S239D/I332E/H268E/A327A
S239E/D265G	S239D/I332E/H268E/A330Y
S239E/D265N	S239D/N297D/I332E/A330Y
S239E/D265Q	S239D/N297D/I332E/K326E
S239E/I332D	S239D/N297D/I332E/L235D
S239E/I332E	S239D/V264I/A330L/I332E
S239E/I332N	S239D/V264I/S298A/I332E
S239E/I332Q	S239E/V264I/A330Y/I332E
S239N/I332D	F241E/F243Q/V262T/V264E/I332E
S239N/I332E	F241E/F243R/V262E/V264R/I332E
S239N/I332N	F241E/F243Y/V262T/V264R/I332E
S239N/I332Q	F241R/F243Q/V262T/V264R/I332E
S239Q/I332D	S239D/I332E/H268E/A330Y/A327A
S239Q/I332E	S239E/V264I/S298A/A330Y/I332E
S239Q/I332N	F241Y/F243Y/V262T/V264T/N297D/I332E

[0112] 本明細書において「抗LAMP5抗体のFc領域のFc γ レセプターに対する結合活性が増強された」とは、前記のアミノ酸の改変が施された抗LAMP5抗体のFc領域のFc γ RI、Fc γ RIIa、Fc γ RIIb、Fc γ RIIIaおよび/またはFc γ RIIIbのいずれかのヒトFc γ レセプターに対する結合活性が、これらのヒトFc γ レセプターに対する前記のアミノ酸の改変が施される前の抗LAMP5抗体のFc領域の結合活性よりも高いことをいう。例えば、上記の解析方法にもとづいて、対照とする改変前の抗LAMP5抗体の結合活性に比較して改変後の抗LAMP5抗体の結合活性が、105%以上、好ましくは110%以上、115%以上、120%以上、125%以上、特に好ましくは130%以上、135%以上、140%以上、145%以上、150%以上、155%以上、160%以上、165%以上、170%以上、175%以上、180%以上、185%以上、190%以上、195%以上、2倍以上、2.5倍以上、3倍以上、3.5倍以上、4倍以上、4.5倍以上、5倍以上、7.5倍以上、10倍以上、20倍以上、30倍以上、40倍以上、50倍以上、60倍以上、70倍以上、80倍以上、90倍以上、100倍以上の結合活性を示すことをいう。

[0113] (2) Fc領域に結合する糖鎖中のフコース含量が減少している抗LAMP5抗体
本発明の抗LAMP5抗体の非限定の好ましい態様として、当該抗LAMP5抗体のFc領域に結合した糖鎖の組成がフコース欠損糖鎖を結合したFc領域の割合が高くなるように修飾された抗LAMP5抗体が挙げられる。抗体のFc領域に結合するN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンからフコース残基を除去すると、Fc γ RIIIaに対する親和性が増強されることが知られている(J. Biol. Chem. (2003) 278, 3466-3473)。こうしたFc領域を含むIgG1抗体は、後述するADCC活性が増強されていることが知られていることから、当該Fc領域を含む抗LAMP5抗体は、本発明の医薬組成物に含まれる抗LAMP5抗体としても有用である。抗体Fc領域に結合するN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンからフコース残基が除去された抗体の非限定の好ましい一態様として、グリコシル化の修飾がされた抗体(W0199/054342)が挙げられる。

[0114] 抗体Fc領域に結合するN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチル

グルコサミンからフコース残基が除去された抗体の異なる非限定の好ましい一態様として、糖鎖に付加するフコースが欠損した抗体（W02000/061739、W02002/031140、W02006/067913等）もまた挙げられる。糖鎖修飾を受けるポリペプチドの糖鎖構造を形成する活性が改変された結果、糖鎖にフコースを付加する能力が低い宿主細胞が、糖鎖に付加するフコースが欠損した抗体を作製するために用いられる。当該宿主細胞において所望の抗体遺伝子を発現することによって、当該宿主細胞の培養液からその糖鎖中のフコースが欠損した当該抗体が回収され得る。ポリペプチドの糖鎖構造を形成する活性として、フコシルトランスフェラーゼ（EC2.4.1.152）、フコーストランスポーター（SLC35C1）、GMD（GDP - マンノース4,6 - デヒドラターゼ）（EC4.2.1.47）、Fx（GDP - ケト - 6 - デオキシマンノース3,5 - エピメラーゼ, 4 - レダクターゼ）（EC1.1.1.271）、およびGFPP（GDP - β - L - フコースピロフォスフォリラーゼ）（EC2.7.7.30）からなる群から選択される酵素またはトランスポーターの活性が非限定の好ましい例として挙げられ得る。これらの酵素またはトランスポーターは、その活性を発揮することができれば必ずしもその構造は特定されない。本明細書においては、これらの活性を発揮することが可能なタンパク質を機能性タンパク質という。これらの活性を改変する方法の非限定の一態様として、これらの活性の欠失が挙げられる。これらの活性が欠失した宿主細胞を作製するために、これらの機能性タンパク質の遺伝子を機能不能に破壊する方法等公知の方法が適宜採用され得る（W02000/061739、W02002/031140、W02006/067913等）。そのような活性が欠失した宿主細胞は、CHO細胞、BHK細胞、NS0細胞、SP2/0細胞、Y0骨髓腫細胞、P3X63マウス骨髓腫細胞、PER細胞、PER.C6細胞、またはハイブリドーマ細胞等に内在性であるこれらの機能性タンパク質の遺伝子を機能不能に破壊する方法等によって作製され得る。

[0115] 抗LAMP5抗体遺伝子を含む発現ベクターが形質導入された前記の宿主細胞の培養上清から回収することによって、抗体Fc領域に結合するN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンからフコース残基が除去さ

れた抗LAMP5抗体が回収される。

[0116] (3) バイセクティングN-アセチルグルコサミンが付加されたFc領域を含む抗LAMP5抗体

本発明の抗LAMP5抗体の非限定の好ましい一態様として、バイセクティングN-アセチルグルコサミンが付加されたFc領域を含む抗LAMP5抗体も挙げられる。バイセクティングGlcNAc構造を含む糖鎖を有する抗体 (W02002/079255等) が公知である。バイセクティングGlcNAc構造を含む糖鎖を形成する活性を有する宿主細胞が、バイセクティングGlcNAc構造を含む糖鎖が付加された抗体を作製するために用いられる。非限定の好ましい一態様では、GnTIII (β -1, 4-マンノシル-グリコプロテイン, 4- β -N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ) (EC2.4.1.144) 活性またはGalT (β -1, 4-ガラクトシルトランスフェラーゼ) (EC2.4.1.38) 活性を有する機能性タンパク質をコードする遺伝子を発現する宿主細胞が作製される。別の非限定の好ましい一態様では、前記の機能性タンパク質に加えて、ヒトManII (マンノシダーゼII) (3.2.1.114) 活性を有する機能性タンパク質をコードする遺伝子、GnTI (β -1, 2-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼI) (EC2.4.1.94) 活性を有する機能性タンパク質をコードする遺伝子、GnTII (β -1, 2-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼII) (EC2.4.1.143) 活性を有する機能性タンパク質をコードする遺伝子、ManI (マンノシダーゼ) (EC3.2.1.113) 活性を有する機能性タンパク質をコードする遺伝子、および α -1, 6-フコシルトランスフェラーゼ (EC2.4.1.68) と共発現する宿主細胞が作製される (W02004/065540)。前記のようなバイセクティングGlcNAc構造を含む糖鎖を形成する活性を有する宿主細胞は、CHO細胞、BHK細胞、NS0細胞、SP2/0細胞、Y0骨髓腫細胞、P3X63マウス骨髓腫細胞、PER細胞、PER.C6細胞、またはハイブリドーマ細胞等に前記の機能性タンパク質の遺伝子を含む発現ベクターを形質導入することによって作製され得る。

[0117] 抗LAMP5抗体遺伝子を含む発現ベクターが形質導入された前記の宿主細胞の培養上清から回収することによって、バイセクティングN-アセチルグルコサ

ミンが付加されたFc領域を含む抗LAMP5抗体が回収される。

[0118] 抗体に連結された糖鎖構造を解析するためには公知の方法が使用され得る。非限定の一態様では、本発明の抗LAMP5抗体に、N-Glycosidase F (Roche diagnostics) を作用させることによって、抗LAMP5抗体に結合する糖鎖がタンパク質から遊離される (J. Pharm. Sci. (1994) 83(12), 1670-1675)。エタノールを用いた除タンパク質操作の後 (J. Clin. Invest. (2001), 108(11), 1687-95)、遊離糖鎖が濃縮乾固され、次いで2-アミノピリジンによって蛍光標識が施される (Anal. Biochem. (1995) 230 (2), 229-238)。得られた2-AB化糖鎖が、セルロースカートリッジを用いた固相抽出により脱試薬された後遠心分離により濃縮され、精製2-AB化糖鎖として以後の解析に供される。次に、 β -Galactosidase (生化学工業) を精製2-AB化糖鎖に作用させることによって、アガラクトシル2-AB化糖鎖が調製される。本発明の抗LAMP5抗体から遊離された糖鎖を出発材料として調製されたアガラクトシル2-AB化糖鎖は、アミドカラムTSKgel Amide-80 (東ソー) による順相HPLCによって分析され、そのクロマトグラムが比較される。

[0119] インタナライズ活性を有する抗体

本発明で使用される抗体は、好ましくはインタナライズ活性を有する抗体である。本発明において、インタナライズ活性とは本発明の抗体が細胞表面に発現したLAMP5に結合した際にエンドサイトーシス等のメカニズムによって細胞内 (細胞質内、小胞内、他の小器官内等) に輸送される活性を意味する。本発明の抗LAMP5抗体がインタナライズ活性を有するか否かは当業者に公知の方法を用いて確認することが可能である。例えば、LAMP5を発現した細胞に標識物質が連結された抗LAMP5抗体を接触させ当該標識物質が細胞内に取り込まれたか否かを確認する方法、LAMP5を発現した細胞に細胞傷害性物質が連結された抗LAMP5抗体を接触させ当該LAMP5を発現した細胞に細胞死が誘導されたか否かを確認する方法等によって確認することが可能である。

[0120] 抗LAMP5抗体に連結させて細胞傷害活性を発揮する細胞傷害性物質としては、化学療法剤、毒性ペプチド等が非限定の好適な例として挙げられる。化学

療法剤としては、例えば次のような化学療法剤が例示できる：アザリビン (azaribine)、アナストロゾール (anastrozole)、アザシチジン (azacytidine)、ブレオマイシン (bleomycin)、ボルテゾミブ (bortezomib)、ブリオスタチン-1 (bryostatatin-1)、ブスルファン (busulfan)、カンプトテシン (camptothecin)、10-ヒドロキシカンプトテシン (10-hydroxycamptothecin)、カルムスチン (carmustine)、セレブレックス (celebrex)、クロラムブシル (chlorambucil)、シスプラチン (cisplatin)、イリノテカン (irinotecan)、カルボプラチン (carboplatin)、クラドリビン (cladribine)、シクロホスファミド (cyclophosphamide)、シタラビン (cytarabine)、ダカルバジン (dacarbazine)、ドセタキセル (docetaxel)、ダクチノマイシン (dactinomycin)、ダウノマイシングルクロニド (daunomycin glucuronide)、ダウノルビシン (daunorubicin)、デキサメタゾン (dexamethasone)、ジエチルスチルベストロール (diethylstilbestrol)、ドキソルビシン (doxorubicin)、ドキソルビシングルクロニド (doxorubicin glucuronide)、エピルビシン (epirubicin)、エチニルエストラジオール (ethinyl estradiol)、エストラムスチン (estramustine)、エトポシド (etoposide)、エトポシドグルクロニド (etoposide glucuronide)、フロキシウリジン (flouxuridine)、フルダラビン (fludarabine)、フルタミド (flutamide)、フルオロウラシル (fluorouracil)、フルオキシメステロン (fluoxymesterone)、ゲムシタビン (gemcitabine)、ヒドロキシプロゲステロンカプロエート (hydroxyprogesterone caproate)、ヒドロキシウレア (hydroxyurea)、イダルビシン (idarubicin)、イフォスファミド (ifosfamide)、ロイコボリン (leucovorin)、ロムスチン (lomustine)、マイタンシノイド (maytansinoid)、メクロレタミン (mechlorethamine)、メドロキシプロゲステロンアセテート (medroxyprogesterone acetate)、メゲストロールアセテート (megestrol acetate)、メルファラン (melphalan)、メルカプトプリン (mercaptopurine)、メトトレキセート (methotrexate)、ミトキサントロン (mitoxantrone)、ミトラマイシン (mithramycin)、ミトマイシン (mito

mycin)、ミトタン (mitotane)、フェニルブチレート (phenylbutyrate)、プレドニゾン (prednisone)、プロカルバジン (procarbazine)、パクリタキセル (paclitaxel)、ペントスタチン (pentostatin)、セムスチン (semustine)、ストレプトゾシン (streptozocin)、タモキシフェン (tamoxifen)、タキサン類 (taxanes)、タキソール (taxol)、テストステロンプロピオネート (testosterone propionate)、サリドマイド (thalidomide)、チオグアニン (thioguanine)、チオテパ (thiotepa)、テニポシド (teniposide)、トポテカン (topotecan)、ウラシルマスタード (uracil mustard)、ビンブラスチン (vinblastine)、ビノレルビン (vinorelbine)、ビンクリスチン (vincristine)。

[0121] 本発明において、好ましい化学療法剤は、低分子の化学療法剤である。低分子の化学療法剤は、抗体への結合の後も、抗体の機能に干渉する可能性が低い。本発明において、低分子の化学療法剤は、通常100~2000、好ましくは200~1000の分子量を有する。ここに例示した化学療法剤は、いずれも低分子の化学療法剤である。これらの本発明における化学療法剤は、生体内で活性な化学療法剤に変換されるプロドラッグを含む。プロドラッグの活性化は酵素的な変換であり得るし、非酵素的な変換でもあり得る。

[0122] また、抗体は毒性ペプチド（トキシン）で修飾され得る。毒性ペプチドの例としては、例えば、次のものが好適に挙げられる。

ジフテリアトキシンA鎖 (Diphtheria toxin A Chain) (Langone J.J., et al., Methods

in Enzymology (1983) 93, 307-308)

シュードモナスエンドトキシン (Pseudomonas Exotoxin) (Nature Medicine (1996) 2, 350-353)

リシン鎖 (Ricin A Chain) (Fulton R.J. et al., J.Biol.Chem. (1986) 261, 5314-5319; Sivam G. et al., Cancer Res. (1987) 47, 3169-3173; Cumber A.J. et al., J.Immunol.Methods (1990) 135, 15-24; Wawrzynczak E.J. et al., Cancer Res. (1990) 50, 7519

-7562; Gheeite V. et al., J.Immunol.Methods (1991) 142,223-230
)

無糖鎖リシンA鎖 (Deglicosylated Ricin A Chain) (Thorpe P.E. et al., Cancer Res. (1987) 47, 5924-5931)

アブリンA鎖 (Abrin A Chain) (Wawrzynczak E.J. et al., Br.J.Cancer (1992) 66, 361-366; Wawrzynczak E.J.,et al. Cancer Res. (1990) 50, 7519-7562; Sivam G.,et al. Cancer Res. (1987) 47, 3169-3173; Thorpe P.E. et al., Cancer Res. (1987) 47, 5924-5931)

ゲロニン (Gelonin) (Sivam G. et al., Cancer Res. (1987) 47, 3169-3173; Cumber A.J. et al., J.Immunol.Methods (1990) 135, 15-24; Wawrzynczak E.J. et al. Cancer Res., (1990) 50, 7519-7562; Bolognesi A. et al., Clin.exp.Immunol. (1992) 89, 341-346
)

ポークウイード抗ウィルス蛋白 (PAP-s; Pokeweed anti-viral protein from seeds) (Bolognesi A. et al., Clin.exp.Immunol. (1992) 89, 341-346)

ブリオジン (Briodin) (Bolognesi A. et al., Clin.exp.Immunol. (1992) 89, 341-346)

サポリン (Saporin) (Bolognesi A.,et al., Clin.exp.Immunol. (1992) 89, 341-346)

モモルジン (Momordin) (Cumber A.J. et al., J.Immunol.Methods (1990) 135, 15-24;Wawrzynczak E.J. et al., Cancer Res. (1990) 50, 7519-7562; Bolognesi A. et al.,Clin.exp.Immunol. (1992) 89, 341-346)

モモルコキン (Momorcochin) (Bolognesi A. et al., Clin.exp.Immunol. (1992) 89, 341-346)

ジアンシン32 (Dianthin 32) (Bolognesi A. et al., Clin.exp.Imm

unol. (1992) 89, 341-346)

ジアンシン 30 (Dianthin 30) (Stirpe F., Barbieri L., FEBS letter (1986) 195, 1-8)

モデッシン (Modeccin) (Stirpe F., Barbieri L., FEBS letter (1986) 195, 1-8)

ビスカミン (Viscumin) (Stirpe F., Barbieri L., FEBS letter (1986) 195, 1-8)

ボルケシン (Volkesin) (Stirpe F., Barbieri L., FEBS letter (1986) 195, 1-8)

ドデカンドリン (Dodecandrin) (Stirpe F., Barbieri L., FEBS letter (1986) 195, 1-8)

トリチン (Tritin) (Stirpe F., Barbieri L., FEBS letter (1986) 195, 1-8)

ルフイン (Luffin) (Stirpe F., Barbieri L., FEBS letter (1986) 195, 1-8)

トリコキリン (Trichokirin) (Casellas P., et al., Eur.J.Biochem. (1988) 176, 581-588; Bolognesi A., et al., Clin.exp.Immunol., (1992) 89, 341-346)。

[0123] また別の態様では、一または二以上の低分子化学療法剤と毒性ペプチドをそれぞれ組み合わせることによって、抗体が修飾され得る。抗LAMP5抗体と上記の低分子化学療法剤との連結には共有結合または非共有結合が利用され得る。これら化学療法剤を連結した抗体の作製方法は公知である。

[0124] さらに、タンパク質性の薬剤や毒素は、遺伝子工学的な手法によって抗体と連結され得る。具体的には、例えば上記毒性ペプチドをコードするDNAと抗LAMP5抗体をコードするDNAをインフレームで融合させて発現ベクター中に組み込んだ組換えベクターが構築され得る。当該ベクターを適切な宿主細胞に導入することにより得られる形質転換細胞が培養され、組み込んだDNAが発現される。こうして、毒性ペプチドを連結した抗LAMP5抗体が融合タンパク質と

して取得され得る。抗体との融合タンパク質を得る場合、一般に、抗体のC末端側にタンパク質性の薬剤や毒素が連結される。抗体と、タンパク質性の薬剤や毒素の間には、ペプチドリンカーまたは化学架橋剤が介在され得る。

[0125] ペプチドリンカーを構成するアミノ酸配列は、抗LAMP5抗体の結合作用を阻害しない限り、任意の配列が適宜採用され得る。例えば、ペプチドリンカーの場合、次のようなアミノ酸配列が使用され得る。

Ser

Gly・Ser

Gly・Gly・Ser

Ser・Gly・Gly

Gly・Gly・Gly・Ser（配列番号：74）

Ser・Gly・Gly・Gly（配列番号：75）

Gly・Gly・Gly・Gly・Ser（配列番号：76）

Ser・Gly・Gly・Gly・Gly（配列番号：77）

Gly・Gly・Gly・Gly・Gly・Ser（配列番号：78）

Ser・Gly・Gly・Gly・Gly・Gly（配列番号：79）

Gly・Gly・Gly・Gly・Gly・Gly・Ser（配列番号：80）

Ser・Gly・Gly・Gly・Gly・Gly・Gly（配列番号：81）

(Gly・Gly・Gly・Gly・Ser) n

(Ser・Gly・Gly・Gly・Gly) n

[n は 1 以上の整数である]

[0126] ペプチドリンカーのアミノ酸配列は、目的に応じて当業者が適宜選択することができる。例えば上記のペプチドリンカーの長さを決定する n は、通常1～5、好ましくは1～3、より好ましくは1または2である。

[0127] あるいは、合成化学物リンカー（化学架橋剤）を利用することによって抗LAMP5抗体と細胞傷害性物質が連結され得る。ペプチド化合物などの架橋に通常用いられている架橋剤が本発明に好適に使用され得る。例えば次のような化学架橋剤が公知である。これらの架橋剤は市販されている。

N-ヒドロキシスクシンイミド (NHS)、
ジスクシンイミジルスベレート (DSS)、
ビス (スルホスクシンイミジル) スベレート (BS3)、
ジチオビス (スクシンイミジルプロピオネート) (DSP)、
ジチオビス (スルホスクシンイミジルプロピオネート) (DTSSP)、
エチレングリコールビス (スクシンイミジルスクシネート) (EGS)、
エチレングリコールビス (スルホスクシンイミジルスクシネート) (スルホ-EGS)、
ジスクシンイミジル酒石酸塩 (DST)、ジスルホスクシンイミジル酒石酸塩 (スルホ-DST)、
ビス [2- (スクシンイミドオキシカルボニルオキシ) エチル] スルホン (BSO-COES)、および
ビス [2- (スルホスクシンイミドオキシカルボニルオキシ) エチル] スルホン (スルホ-BSO-COES) 等

[0128] 医薬組成物

別の観点において、本発明は、本発明の抗LAMP5抗体を有効成分として含有する医薬組成物を提供する。また、本発明は抗LAMP5抗体を有効成分として含有する細胞増殖抑制剤（特に抗癌剤）に関する。本発明の細胞増殖抑制剤（特に抗癌剤）は、癌を罹患している対象または罹患している可能性がある対象に投与されることが好ましい。

[0129] 本発明において、抗LAMP5抗体を有効成分として含有する細胞増殖抑制剤は、抗LAMP5抗体を対象に投与する工程を含む細胞増殖を抑制する方法、または、細胞増殖抑制剤の製造における抗LAMP5抗体の使用と表現することもできる。

[0130] また、本発明において、抗LAMP5抗体を有効成分として含有する抗癌剤は、抗LAMP5抗体を対象に投与する工程を含む癌を予防または治療する方法、または、抗癌剤の製造における抗LAMP5抗体の使用と表現することもできる。

[0131] 本発明において、抗LAMP5抗体を有効成分として含有するとは、抗LAMP5抗

体を主要な活性成分として含むという意味であり、抗LAMP5抗体の含有率を制限するものではない。本発明の医薬組成物（例えば、細胞増殖抑制剤、特に抗癌剤。以下同様。）に含有される抗体はLAMP5タンパク質と結合する限り特に制限はなく、本明細書中に記載された抗体が例示され得る。

[0132] 本発明の抗LAMP5抗体は、IL-6（例えば配列番号：67で表されるポリペプチド）またはそのフラグメント、変異体、融合タンパク質、機能性誘導体もしくはその塩と組み合わせて使用することが可能である。抗LAMP5抗体、およびIL-6またはそのフラグメント、変異体、融合タンパク質、機能性誘導体もしくはその塩は、癌の治療において同時に、別々に、または、順次に投与するために組み合わせて使用され得る。本発明において、抗LAMP5抗体、およびIL-6またはそのフラグメント、変異体、融合タンパク質、機能性誘導体もしくはその塩は、共に含有される配合剤の形で提供することが可能である。また、抗LAMP5抗体を含有する薬剤とIL-6またはそのフラグメント、変異体、融合タンパク質、機能性誘導体もしくはその塩を含有する薬剤が別々に提供され、これらの薬剤が、同時に、別々に、または順次に使用され得る。さらに、抗LAMP5抗体を含有する薬剤とIL-6またはそのフラグメント、変異体、融合タンパク質、機能性誘導体もしくはその塩を含有する薬剤から構成されるキットとして提供され得る。別々にまたは順次に使用される場合、その使用される時間間隔は問われないが、抗LAMP5抗体の使用に先立ってIL-6またはそのフラグメント、変異体、融合タンパク質、機能性誘導体もしくはその塩が使用されることが好ましい。当該時間間隔は当業者が適宜設定することが可能である。

[0133] IL-6は、数種類の細胞型によって産生され、分泌される多機能サイトカインである。この多面性サイトカインは、免疫反応、急性期反応および造血をはじめとする細胞防御機序で中心的な役割を果たす。IL-6は、すでにクローン化された185アミノ酸を有する20~26kDa糖タンパク質である。IL-6は、以前はB細胞刺激因子2（BSF-2）、インターフェロノーベータ2および肝細胞刺激因子と呼ばれていた。IL-6は、肝臓、脾臓および骨髄などをはじめとする

多数の各種組織および単球、線維芽細胞、内皮細胞、B細胞およびT細胞をはじめとする多種多様な細胞型によって分泌される。IL-6は、ウイルス、2本鎖RNA、バクテリアおよびバクテリアリポ多糖類およびIL-1およびTNFなどの炎症性サイトカインをはじめとする多種多様なシグナルによって転写レベルで活性化される。

[0134] IL-6の生物学的活性は、一方がIL-6受容体（もしくはgp80）と呼ばれ、もう一方がgp130と呼ばれる2種類のタンパク質を含む膜受容体系が介在する。gp130は、277個のアミノ酸からなる細胞内ドメインを含む918個のアミノ酸長の膜貫通糖タンパク質であり、IL-6、IL-11、LIF、オンコスタチンM、CNTF（毛様体神経栄養因子）、CT-1の受容体を含む、複数のサイトカイン受容体のサブユニット成分である。IL-6はgp130を通じて作用するサイトカインのプロトタイプであり、そのサイトカインファミリーは「IL-6型サイトカイン」とも呼ばれている。

[0135] gp130は、低親和性受容体鎖に結合することによって、上記のサイトカインの高親和性受容体の形成に関与する。したがって、gp130は、「親和性コンバーター」とも呼ばれている。サイトカイン受容体に結合するリガンドは、gp130の二量化（IL-6受容体の場合）またはLIFRベータサブユニットとして知られているgp130関連タンパク質とのヘテロ二量化（LIF、オンコスタチンMおよびCNTFの受容体の場合）をもたらす。個々のリガンドの結合は、細胞内シグナル伝導の最初の工程としてヤヌスキナーゼ（JAK）として知られているチロシンキナーゼファミリーの活性化/会合を伴う。細胞内シグナル伝達プロセスには、チロシンリン酸化反応およびSTATs（シグナルトランスデューサーおよび転写アクチベーター）と呼ばれる活性化因子が含まれる。

[0136] ヒトgp130遺伝子は、染色体5および17上の2つの異なる染色体座に相同な遺伝子として位置しているように思われる。2つの異なるgp130遺伝子配列の存在は、霊長類に限定され、他の脊椎動物には認められない。

[0137] IL-6、IL-11、CNTF、オンコスタチンMおよびLIFのシグナル伝達活性は、特にgp130に結合する各種モノクローナル抗体によって遮断され得る。これに加

え、サイトカインもしくはそれらの受容体の存在とは関係なく、gp130を直接活性化するモノクローナル抗体の存在も認められている。

[0138] gp130を指向する他のモノクローナル抗体は、IL-6介在機能を阻害することが知られている。90および110Kdaの分子量を有する可溶型のgp130 (sgp130) が、ヒト血清内に認められている。これらは成分としてのgp130とともに受容体系を利用するこれらのサイトカインの生体機能を阻害し得る。

[0139] IL-6Rの細胞外ドメインに対応するIL-6Rの可溶型 (sIL-6R) は、血中および尿中に糖タンパク質として認められる人体の天然の産物である。sIL-6R分子の例外的特性は、これらがヒト細胞を含む多数の細胞型でIL-6の強力な作用薬として作用するという点である。IL-6Rの細胞質内ドメインがないにもかかわらず、sIL-6RはIL-6に反応してgp130の二量化を誘発することができ、これはさらに後続のIL-6 - 特異的シグナル伝達および生物学的効果を介在する。sIL-6Rには、IL-6特異的生物学的活性に必須であるgp130との2種類の相互作用があり、活性化IL-6受容体複合体は、2つのgp130鎖、2つのIL-6Rおよび2つのIL-6リガンドによって形成される六量体構造であるということが提唱されている。

[0140] 正常な被験者におけるsIL-6R (作用薬) の循環濃度は比較的高く、10ng/mlの上記可溶性gp130 (天然のIL-6拮抗薬) の循環濃度に匹敵し得る (Corbiら、Eur. J. Cardiotherac. Surg. (2000) 18 (1) 98-103)。これに対し、IL-6の循環濃度は低く、約10pg/mlかそれ以下である (Kadoら、Acta Diabetol. (1999) (1-2) 67-72)。このように、疾患におけるsIL-6Rを併用投与せずに単独でインビボ投与した場合のIL-6の影響は、有効である場合とそうでない場合とがあり、特定の疾患および体内の特定の部位における可溶性作用薬/拮抗薬の濃度によって異なる。

[0141] sIL-6RとIL-6とを結合させるキメラ分子が開発され (Chebathら、Eur. Cytokine Netw. (1997) (4) 359-65)、「IL-6R/IL-6」と命名されている。IL-6R/IL-6は、sIL-6RとIL-6をコードするcDNAの全コーディング領域を融合させることによって生成される (図4を参照)。組換えIL-6R/IL-6は、CHO

細胞内で産生された (Chedathら、W01999/002552)。IL-6R/IL-6は、sIL-6RとIL-6の混合物に比べ高い効率で、インビボでgp130鎖に結合する (Kolletら、Blood. (1999) 94 (3) 923-31)。本発明のIL-6の変異体、融合タンパク質、機能性誘導体には、例えばIL-6R/IL-6のような分子も含まれる。

[0142] 本発明で使用される「IL-6R/IL-6」は、IL-6のすべてまたは生物学的活性分画に融合したgp80の可溶性部分を有するキメラ分子である。このキメラ分子の部分は、相互に直接融合させることもでき、またはジスルフィド架橋もしくはポリペプチドリンカーなどの任意の適切なリンカーによって結合させることもできる。リンカーは、短いリンカーペプチドであり、短いもので、例えば1〜3アミノ酸残基長、比較的長いもので、例えば13〜18アミノ酸残基長であり得る。該リンカーは、例えばsIL-6Rのアミノ酸配列とIL-6のアミノ酸配列との間に導入される、E-F-M (Glu-Phe-Met) のトリペプチドまたはGlu-Phe-Gly-Ala-Gly-Leu-Val-Leu-Gly-Gly-Gln-Phe-Metの13アミノ酸のペプチドなどであってもよい。IL-6R/IL-6の例は、当技術分野で周知であり、W01999/02552もしくはW01997/32891等に詳細に記載されている。

[0143] 本発明で使用している「変異体」という用語は、元のIL-6もしくはIL-6R/IL-6と比較して生成物の活性をあまり変化させることなく、IL-6もしくはIL-6R/IL-6の自然発生成分のアミノ酸残基の1つもしくはそれ以上が、異なるアミノ酸残基によって置き換えられているか、もしくは削除されているか、もしくは1つまたはそれ以上のアミノ酸残基がIL-6もしくはIL-6R/IL-6の元の配列に付加されているような、IL-6もしくはIL-6R/IL-6の類似体を表す。これらの変異体は、既知の合成法および/または部位特異的突然変異誘発技術もしくはその他の既知の好適な技術によって製造される。

[0144] 本発明による変異体には、中程度にストリンジントな条件下もしくはストリンジントな条件下で、IL-6もしくはIL-6R/IL-6をコードする核酸 (例えば、DNA、RNA) の相補鎖にハイブリダイズする核酸 (例えば、DNA、RNA) によってコードされたタンパク質を含む。「ストリンジントな条件」という用語は、当業者が「ストリンジント」として従来表現しているハイブリ

ダイゼーションおよびその後の洗浄条件を表している。Ausubelら (Current Protocols in Molecular Biology, supra, Interscience, N.Y., §§ 6.3 and 6.4 (1987, 1992)) およびSambrookら (Sambrook, J. C., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) を参照。

[0145] 非限定の一態様では、ストリンジェントな条件の例としては、例えば5分間2xSSCおよび0.5%SDS、15分間2xSSCおよび0.1%SDS、30～60分間37℃で0.1xSSCおよび0.5%SDS、次いで30～60分間68℃で0.1xSSCおよび0.5%SDSなどでの試験ハイブリッドの計算 T_m 値より12～20℃低い洗浄条件などが含まれる。当業者には、ストリンジェントな条件は、DNA配列、オリゴヌクレオチドプローブ (10～40塩基など)、あるいは混合ヌクレオチドプローブの長さによって異なるということが理解される。混合プローブを使用する場合には、SSCの代わりにテトラメチルアンモニウムクロライド (TMAC) を使用することが好ましい (前記Ausubelらを参照されたい)。「中程度にストリンジェントな条件」とは、42℃で0.2xSSCおよび0.1%SDSの場合など、さらに低い温度、低い塩類もしくは低い洗剤濃度における洗浄条件を意味する (前記Ausubelらを参照されたい)。

[0146] このような変異体は、実質的に類似しているかもしくはIL-6もしくはIL-6R/IL-6に比べて活性が良好であるように、IL-6もしくはIL-6R/IL-6の配列を十分に複製しているアミノ酸配列を有していることが好ましい。

[0147] IL-6の特徴的活性は、IL-6R (gp80エレメント) に結合する能力であり、IL-6R/IL-6の特徴的活性は、gp130に結合する能力にある。IL-6R/IL-6のgp130に対する結合を測定するためのELISAについては、本明細書に引用することによって完全に取り込まれているW01999/02552に詳細な説明がある。変異体がIL-6Rもしくはgp130の個々の結合領域に対する実質的結合活性を備えているかぎり、IL-6もしくはIL-6R/IL-6に対する同様の類似した活性も備えているとみなすことができる。したがって、所与の変異体が、W01999/02552に記載

されているように、固定化されたIL-6Rもしくはgp130に結合するか否かを判断するための簡単なサンドイッチ結合検定をこのような変異体に適用することからなる日常の実験手段によってIL-6もしくはIL-6R/IL-6と少なくとも実質的に同じ活性を備えているかを判定することができる。

[0148] 例えば、まず、マイクロタイター96ウェルプレート（Nunc社）に抗ヒトIL-6Rモノクローナル抗体を塗布し、50ng/mlのIL-6R（いずれもR&Dシステムズ社）を付加する。リン酸バッファー生理食塩水で洗浄した後に、IL-6を0.1～50 ng/mlの範囲の各種濃度でそれぞれのウェルに塗布する。40℃で一昼夜インキュベーションした後に、ウサギポリクローナル抗IL-6抗体を添加し、次に、着色反応（Sigma社）によって検出される、ホースラディッシュペルオキシダーゼに抱合されたヤギ抗ラビットIgを添加する。そして、インキュベーションして洗浄した後、ホースラディッシュペルオキシダーゼに対応する色原性基質（例えば、3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンチジン（TMB）等）を添加し、吸光度等を測定することにより、IL-6の固定化されたIL-6Rに結合する活性を評価することができる。

[0149] 好ましい実施態様では、あらゆるこのような変異体は、W01999/02552に含まれる成熟IL-6またはIL-6R/IL-6キメラ分子の配列と少なくとも40%同一性または相同性を有する。さらに好ましくは、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、または最も好ましくは少なくとも90%同一性または相同性を有する。

[0150] 同一性は、2つまたはそれ以上のポリペプチド配列間、または2つまたはそれ以上のポリヌクレオチド配列間の、該配列の比較によって決定された関係を反映する。一般的に、同一性は、比較されている配列の全長に渡って、それぞれ2つのポリヌクレオチドまたは2つのポリペプチド配列の、ヌクレオチド-ヌクレオチド、またはアミノ酸-アミノ酸間の正確な一致をいう。

[0151] 正確な一致がない配列に対しては、「%同一性」が決定され得る。一般的に、比較されるべき2つの配列は、該配列間に最大の相関関係が得られるように整列される。これは、整合の程度を高めるために、片方または両方の配

列のいずれかにおける「ギャップ (gap)」の挿入を含む。％同一性は、比較される各配列の全長に渡って決定されても良く（いわゆるグローバルアラインメント）、またはより短く定義された長さに渡って決定されても良い（いわゆるローカルアラインメント）。グローバルアラインメントは、同じかまたは非常に類似した長さの配列に特に適しており、ローカルアラインメントは、不同の長さの配列により適している。

[0152] 2つまたはそれより多くの配列の同一性と相同性を比較する方法は、当該分野においてよく知られている。したがって、例えば、ウィスコンシン シー クエンス アナリシス パッケージ、バージョン9.1 (Wisconsin Sequence Analysis Package, version 9.1) (Devereux J et al., 1984) で使用可能なプログラム、例えばBESTFITおよびGAPなどのプログラムが、2つのポリヌクレオチド間の％同一性ならびに2つのポリペプチド間の％同一性および％相同性を決定するために使用され得る。BESTFITは、スミスとウォーターマン (Smith and Waterman) の「ローカルホモロジー」アルゴリズム (1981) を使用し、2つの配列間の相同性の最適な単一領域を見つける。配列間の同一性および/または相同性を決定するための他のプログラムも、当業者に知られており、例えば、BLASTファミリーのプログラム (www.ncbi.nlm.nih.gov でNCBIのホームページから利用可能) およびFASTAである。

[0153] 本発明によって使用され得るIL-6またはIL-6R/IL-6キメラの変異体、またはそれをコードする核酸としては、本明細書中に表わされる教示および指針に基づいて、過度の実験なしに、通常の当業者により日常的に得られ得る置換ペプチドまたはヌクレオチドとして実質的に対応する有限の配列が包含される。

[0154] 本発明による変異体についての好ましい変化は、「保存的」置換として知られるものである。IL-6またはIL-6R/IL-6キメラの保存的アミノ酸置換は、十分に類似した物理化学的な特性を有する群の範囲内の同義アミノ酸を含み得るものであり、その群のメンバー間における置換は分子の生物学的機能を保存するものであろう。とくに挿入または欠失が、例えば30以下、好ましく

は10以下のわずかなアミノ酸のみを含むものであり、例えばシステイン残基など機能的配座に重要なアミノ酸の除去または入れ替えをしない場合、アミノ酸の挿入および欠失もまた、その機能を変化させることなく前記配列内でなされることは明らかである。このような欠失および/または挿入によって産生されるタンパク質およびその変異体は、本発明の範囲内である。保存的アミノ酸置換は当業者に周知である。

[0155] 本発明に使用するためのIL-6またはIL-6R/IL-6キメラのムテインを得るために使用され得る、タンパク質でのアミノ酸置換体の製造例としては、Markらによる米国特許第4,959,314号明細書、同第4,588,585号明細書および同第4,737,462号明細書；Kothsらによる同第5,116,943号明細書、Namenらによる同第4,965,195号明細書、Chongらによる同第4,879,111号明細書、Leeらによる同第5,017,691号明細書などにおいて示された周知の方法手順、および米国特許第4,904,584号明細書（Shawら）に示されたリジン置換タンパク質などが挙げられる。

[0156] 本発明に関連して利用されるIL-6の特異的変異体についても記載がある（W 01994/03492）。さらに、欧州特許第667872（B1）号明細書には野生型IL-6に比べ生物学的活性が改善された突然変異IL-6についての記述がある。これに加え、欧州特許第656117（B1）号明細書には、IL-6の超作用薬を単離させるための方法が記載されている。突然変異体もしくは超作用薬は、本発明にしたがって使用してもよい。

[0157] 「融合タンパク質」という用語は、例えば体液内において長期の滞留時間を有する他のタンパク質と融合された、IL-6またはIL-6R/IL-6、またはその変異体または断片からなるポリペプチドのことをいう。したがって、IL-6またはIL-6R/IL-6は、例えば免疫グロブリンまたはその断片といった他のタンパク質、ポリペプチドなどと融合され得る。

[0158] 本明細書中で使用される場合、「機能的誘導体」は、本技術分野において周知の方法で、残基の側鎖またはN末もしくはC末基として存在する官能基から製造され得るIL-6またはIL-6R/IL-6キメラの誘導体、ならびにそれらの変

異体および融合タンパク質を含み、薬学的に許容し得るかぎり、すなわちIL-6またはIL-6R/IL-6の活性と実質的に類似しているタンパク質の活性を破壊せず、それを含む組成物において毒性を与えないかぎり、本発明に含まれる。

[0159] 例えば、これらの誘導体には、抗原部位を遮蔽し、体液中でIL-6R/IL-6の滞留時間を延長させ得るポリエチレングリコール側鎖などがある。他の誘導体としては、カルボキシル基の脂肪族エステル、アンモニアまたは1級アミンもしくは2級アミンと反応することによるアミノキシル基のアミド、アクリル成分とともに形成されたアミノ酸残基の遊離アミノ基のN-アシル誘導体（例えばアルカノイルもしくは炭素環式アロイル基）もしくはアシル成分とともに形成された遊離ヒドロキシル基のO-アシル誘導体（例えばセリルもしくはスレオニル残基の誘導体など）などが挙げられる。

[0160] 本発明による「フラグメント」は、例えば、IL-6もしくはIL-6R/IL-6の活性画分であってもよい。フラグメントという用語は、分子のいずれかのサブセット、すなわち、gp130の作用薬としての活性を備えた所望の生物学的活性を保持する短いペプチドを表す。フラグメントは、IL-6もしくはIL-6R/IL-6のどちらかの末端からアミノ酸を除去し、その特性を残りのフラグメントで検査してIL-6Rもしくはgp130のそれぞれに結合させることによってすぐに製造可能である。ポリペプチドのN-末端またはC-末端のどちらかから一度に1個のアミノ酸を除去するためのプロテアーゼが当技術分野で周知であり、したがって、所望の生物学的活性を保持しているフラグメントを判定するためには単に通常の実験を行えばよい。

[0161] IL-6またはIL-6R/IL-6の断片、その変異体および融合タンパク質としては、本発明においては、そのタンパク質自身、または、アクセサリー分子と共存する形態であり得る。また、例えば糖残基もしくはリン酸残基、タンパク質分子がその残基に連結された形態でもあり得る。また、タンパク質分子もしくはその糖残基部分が凝集体を形成した形態でもあり得る。いずれの形態であっても、gp130に対するアゴニスト活性を有する限り、本発明のIL-6またはIL-6R/IL-6の断片、その変異体および融合タンパク質に含まれ得る。

[0162] 本書記載の「塩類」という用語は、カルボキシル基の塩類およびIL-6もしくはIL-6R/IL-6分子またはその類似体のアミノ基の酸付加塩類の両方を表す。カルボキシル基の塩類は、当技術分野で周知の手段によって形成することができ、例えばナトリウム塩、カルシウム塩、第二鉄塩および亜鉛塩などの無機塩類、ならびに例えばトリエタノールアミン、アルギニンもしくはリシン、ピペリジン、プロカインなどのアミン類とともに形成された塩基として有機塩基を有する塩類が含まれる。酸付加塩類には、例えば塩酸もしくは硫酸などの無機酸を有する塩類および、例えば酢酸もしくはシュウ酸などの有機酸を有する塩類などが挙げられる。当然のことながら、このような塩はいずれもIL-6もしくはIL-6R/IL-6の生物学的活性、すなわちgp130を通じてシグナル伝達する能力を保持していなくてはならない。

[0163] 本発明の好ましい態様では、本発明のIL-6またはそのフラグメント、変異体、融合タンパク質もしくは塩は、1つ以上の部位でグリコシル化されている。

[0164] IL-6R/IL-6のグリコシル化された形態は、本発明によればきわめて好ましいキメラ分子であり、W01999/02552に記載されている。本明細書に記載のIL-6R/IL-6は、いずれもヒト由来である、成熟自然発生IL-6の全コーディング配列に自然発生した可溶性IL-6受容体 δ -Valの全コーディング配列を融合させることにより取得した組換え糖タンパク質である。当業者であれば、グリコシル化IL-6を組換え手段によっても、すなわち真核生物発現系内に発現させることによっても産生することが可能である。

[0165] 本発明によれば、作用薬は、酵母細胞、昆虫細胞、バクテリアなどの適切な真核細胞種もしくは原核細胞種で産生可能である。作用薬は、哺乳類の細胞内で産生することが好ましいが、W01999/02552にIL-6R/IL-6に関して記載されているように、遺伝子組換えCHO細胞内で産生することがもっとも好ましい。ヒト由来のタンパク質が好ましい一方で、当業者は、本書記載の生物学的活性を保持している限り、他のいずれかの生物由来の類似した融合タンパク質も本発明によれば使用可能であることを理解するであろう。

[0166] 本発明のさらなる態様では、本発明のIL-6またはそのフラグメント、変異体、融合タンパク質もしくは塩は、グリコシル化されない。この場合、キメラ分子は、グリコシル残基を合成できないが、通常は産生組変えタンパク質の高収率能を備えているバクテリア細胞内で産生できるので、好都合である。非グリコシル化IL-6の産生については、例えば欧州特許第504751 (B1) 号明細書に詳細に記載されている。

[0167] さらに別の態様では、本発明のIL-6またはそのフラグメント、変異体、融合タンパク質もしくは塩は、免疫グロブリン融合体を含んでいる、すなわち本発明による分子は、免疫グロブリンのすべてもしくは一部、特に免疫グロブリンのFcフラグメントに融合される。免疫グロブリンを産生するための方法は、例えばW02001/03737に記載されている方法など、当技術分野では周知である。当業者であるなら、本発明における産生された融合タンパク質がIL-6もしくはIL-6R/IL-6の生物学的活性を有していること（すなわちgp130シグナル伝達の刺激能を保持していること）を理解するであろう。産生された融合タンパク質は、体液中の残留時間（半減期）の延長、比活性度の亢進、発現レベルの向上、もしくは融合タンパク質の精製促進など、特性が改善されていることが理想的である。

[0168] 本発明のIL-6またはそのフラグメント、変異体、融合タンパク質もしくは塩は、Ig分子の定常領域に融合することが好ましい。これは、例えばヒトIgG1のCH2およびCH3領域など重鎖領域に融合させてもよい。IgG2もしくはIgG4異性体、または例えばIgMもしくはIgAの異性体、他のIg分子のサブタイプなど、Ig分子の他の異性体も、本発明による融合タンパク質の産生に好適である。したがって、融合タンパク質は、単量体、多量体、ヘテロ多量体もしくはホモ多量体のいずれであってもよい。

[0169] 本発明のIL-6またはそのフラグメント、変異体、融合タンパク質もしくは塩の機能性誘導体をポリマーに抱合させて、安定性、半減期、生体利用効率、人体による耐性、免疫原性などのタンパク質の特性を改善することができる。

[0170] したがって、本発明の好ましい態様は、アミノ酸残基上の1つもしくはそれ以上の側鎖として存在する1つもしくはそれ以上の官能基に結合した少なくとも1つの部分を有する、本発明のIL-6またはそのフラグメント、変異体、融合タンパク質もしくは塩の機能性誘導体に関する。

[0171] 本発明の特に好ましい態様は、ポリエチレングリコール（PEG）に結合した本発明によるIL-6またはそのフラグメント、変異体、融合タンパク質もしくは塩に関する。ポリエチレングリコール化は、例えばW01992/13095に記載されている方法など、周知の方法で実施してよい。

[0172] 本発明の医薬組成物は、経口、非経口投与のいずれかによって患者に投与することができる。好ましくは非経口投与である。係る投与方法としては具体的には、注射投与、経鼻投与、経肺投与、経皮投与などが挙げられる。注射投与の例としては、例えば、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射などによって本発明の医薬組成物が全身または局部的に投与できる。また、患者の年齢、症状により適宜投与方法を選択することができる。投与量としては、例えば、一回の投与につき体重1kgあたり0.0001mgから1000mgの範囲で投与量が選択できる。あるいは、例えば、患者あたり0.001から100000mg/bodyの範囲で投与量が選択できる。しかしながら、本発明の医薬組成物はこれらの投与量に制限されるものではない。

[0173] 本発明の医薬組成物は、常法に従って製剤化することができ（例えば、Remington's Pharmaceutical Science, latest edition, Mark Publishing Company, Easton, U.S.A）、医薬的に許容される担体や添加物を共に含むものであってもよい。医薬的に許容される担体および添加物としては、例えば界面活性剤、賦形剤、着色料、着香料、保存料、安定剤、緩衝剤、懸濁剤、等張化剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、流動性促進剤、矯味剤等が挙げられる。さらにこれらに制限されず、その他常用の担体や添加物が適宜使用できる。具体的には、軽質無水ケイ酸、乳糖、結晶セルロース、マンニトール、デンプン、カルメロースカルシウム、カルメロースナトリウム、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニル

アセタールジエチルアミノアセテート、ポリビニルピロリドン、ゼラチン、中鎖脂肪酸トリグリセライド、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油60、白糖、カルボキシメチルセルロース、コーンスターチ、無機塩類等を担体として挙げることができる。

[0174] 抗LAMP5抗体は、本発明の医薬組成物（例えば、細胞増殖抑制剤、特に抗癌剤）に含有されるLAMP5タンパク質に結合する抗体として前記の通りである。抗LAMP5抗体が結合する細胞はLAMP5が発現している細胞であれば特に限定されない。本発明における好ましいLAMP5発現細胞は癌細胞である。より好ましくは、多発性骨髄腫である。本発明の方法は、これらの癌の、原発巣および転移層のいずれに対しても適用することができる。さらに好ましい癌細胞は、原発性多発性骨髄腫、および転移性多発性骨髄腫である。

[0175] 本発明において「接触」は、例えば、試験管内で培養しているLAMP5発現細胞の培養液に抗体を添加することにより行われる。この場合において、添加される抗体の形状としては、溶液または凍結乾燥等により得られる固体等の形状が適宜使用できる。水溶液として添加される場合にあっては純粋に抗体のみを含有する水溶液であってもよいし、例えば上記の界面活性剤、賦形剤、着色料、着香料、保存料、安定剤、緩衝剤、懸濁剤、等張化剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、流動性促進剤、矯味剤等を含む溶液であってもよい。添加する濃度は特に限定されないが、培養液中の最終濃度として、好ましくは1pg/mlから1g/mlの範囲であり、より好ましくは1ng/mlから1mg/mlであり、さらに好ましくは1μg/mlから1mg/mlで使用され得る。

[0176] また本発明において「接触」はさらに、別の態様では、LAMP5発現細胞（例えば、癌細胞）を体内に移植した非ヒト動物や内在的にLAMP5発現細胞（例えば、癌細胞）を有する動物に投与することによっても行われる。投与方法は経口、非経口投与のいずれかによって実施できる。特に好ましくは非経口投与による投与方法であり、係る投与方法としては具体的には、注射投与、経鼻投与、経肺投与、経皮投与などが挙げられる。注射投与においては、例えば、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射などによって本発明の

医薬組成物（例えば、抗癌剤などの細胞増殖抑制剤）が全身または局部的に投与できる。また、被験動物の年齢、症状により適宜投与方法を選択することができる。水溶液として投与される場合にあっては純粋に抗体のみを含有する水溶液であってもよいし、例えば上記の界面活性剤、賦形剤、着色料、着香料、保存料、安定剤、緩衝剤、懸濁剤、等張化剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、流動性促進剤、矯味剤等を含む溶液であってもよい。投与量としては、例えば、一回の投与につき体重1kgあたり0.0001mgから1000mgの範囲で投与量が選択できる。あるいは、例えば、患者あたり0.001から100000mg/bodyの範囲で投与量が選択できる。しかしながら、本発明の抗体投与量はこれらの投与量に制限されるものではない。

実施例

[0177] 以下本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

[0178] （実施例1）マイクロアレイを用いたLAMP5の発現解析

多発性骨髄腫臨床検体におけるLAMP5の発現を公共のマイクロアレイデータセットGSE26760を用いて検討したところ、多くの検体でLAMP5（プローブID:219463_at）の発現が認められた（図1）。なお、このデータセットは多発性骨髄腫患者からCD138陽性骨髄細胞を精製し、Human Genome U133 Plus 2.0 Array（Affymetrix社）を用いてマイクロアレイ解析を行ったものである（Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma, Nature（2011）471:467-72）。

[0179] （実施例2）LAMP5に対するモノクローナル抗体の作製

2-1. LAMP5発現ベクターの作製

癌細胞株U-937（JCRB）からTrizol（Invitrogen社）を用いて調製されたtotal RNAから、SuperScript III Reverse Transcriptase（Invitrogen社）を用いてcDNAが作製された。このcDNAを鋳型として、フォワードプライマー（LAMP5-F、配列番号：1）とリバースプライマー（LAMP5-R、配列番号：2）を用いてPCRによって増幅されたLAMP5遺伝子がpCR2.1-TOP0ベクター（In

vitrogen社)にクローニングされた(pCR2.1_LAMP5)。pCR2.1_LAMP5に挿入された配列がシーケンスされ、NCBI Reference Sequence:NM_012261の配列と同じであることが確認された。

[0180] 次にLAMP5のシグナル配列(アミノ酸番号1-29)の直下にHAタグ配列(アミノ酸配列YPYDVPDYA)を挿入した発現ベクターを作製するため、シグナル配列の部分がEcoRIサイトとKozak配列を有するフォワードプライマー(Eco-Kozak-LAMP5-F、配列番号:3)とHAタグ配列を有するリバープライマー(HAtag-LAMP5-R、配列番号:4)を用いてPCR増幅され、シグナル配列以外の部分がHAタグ配列を有するフォワードプライマー(HAtag-LAMP5-F、配列番号:5)とNotIサイトを有するリバープライマー(LAMP5-Not-R、配列番号:6)を用いてPCR増幅された。鋳型にはpCR2.1_LAMP5が用いられた。得られた二つの増幅産物がアニールされたものを鋳型として、さらにEco-Kozak-LAMP5-FとLAMP5-Not-Rを用いて増幅されたPCR増幅産物がpCR2.1-TOP0ベクターにクローニングされた(pCR2.1_HA-LAMP5)。続いてpCR2.1_HA-LAMP5をEcoRIとNotIで消化することによって生じたLAMP5を含む挿入断片が、哺乳動物細胞用発現ベクターpCOSIIのEcoRI-NotIサイトにクローニングされた(pCOSII_HA-LAMP5)。pCOSIIベクターは、ヒトEEF1A1プロモーター(NCBI Reference Sequence:NM_001402)の制御下で遺伝子発現の誘導が可能で、かつネオマイシン耐性遺伝子が組み込まれたベクターである。pCOSII_HA-LAMP5の開始コドンからストップコドンまでの塩基配列を配列番号:7に、アミノ酸配列を配列番号:8に示した。

[0181] 2-2. マウスCD40リガンド発現ベクターの作製

II型膜タンパクであるマウスCD40リガンド(CD40L、NCBI Reference Sequence:NM_011616)はB細胞上のCD40と結合することにより、B細胞を活性化させ、抗体産生能を亢進させることが知られている(Enforced and prolonged CD40 ligand expression triggers autoantibody production in vivo. Eur J Immunol (2001) 31: 3484-92, Synergistic antibody induction by antigen-CD40 ligand fusion protein as improved i

mmunogen. Immunology (2005) 115: 215-22)。そこでLAMP5に対する抗体を効率的に作製するため、LAMP5とCD40Lを共発現するよう作製された細胞株が免疫源として用いられた。

[0182] 市販のマウス脾臓cDNAライブラリを鋳型として、EcoRIサイトとKozak配列を有するフォワードプライマー (mCD40L-1、配列番号：9) とNotIサイトを有するリバープライマー (mCD40L-2、配列番号：10) を用いてPCRによって増幅されたCD40L遺伝子がEcoRIとNotIで消化された後に、哺乳動物細胞用発現ベクターpMCH2iのEcoRI-NotIサイトにクローニングされた (pMCH2i_CD40L)。pMCH2iベクターはマウスCMVプロモーター (NCBI Reference Sequence :U68299) の制御下で遺伝子発現の誘導が可能で、ハイグロマイシン耐性遺伝子が組み込まれたベクターである。pMCH2i_CD40Lの開始コドンからストップコドンまでの塩基配列を配列番号：11に、アミノ酸配列を配列番号：12に示した。

[0183] 2-3. 免疫用LAMP5/CD40L強制発現Ba/F3細胞株の作製

PvuIで消化されたpCOSII_HA-LAMP5が、マウスB細胞株Ba/F3 (理化学研究所バイオリソースセンター) へエレクトロポレーションにより導入された。ジェネティシンで選抜することにより、N末端HAタグ付加LAMP5を定常的に発現するBa/F3細胞株が樹立された (LAMP5_Ba/F3)。LAMP5の発現は抗HAタグ抗体 (Sigma社、Cat.No.H7411-100UG) を用いたFACSにより確認された。

[0184] 次にpMCH2i_CD40LをPvuI消化後、LAMP5_Ba/F3細胞株へエレクトロポレーションにより導入し、ハイグロマイシンで選抜することにより、LAMP5とCD40Lを共発現するBa/F3細胞株を樹立した (LAMP5/CD40L_Ba/F3)。CD40Lの発現は抗CD40L抗体 (Abcam社、Cat.No.ab24934) を用いたFACSにより確認された。LAMP5/CD40L_Ba/F3細胞株は10%FBS (fetal bovine serum)、1ng/mLマウスIL-3、ペニシリン/ストレプトマイシン、500 µg/mLジェネティシン、1mg/mLハイグロマイシンを添加したRPMI1640培地で培養された。

[0185] 2-4. スクリーニング用LAMP5強制発現CHO細胞株の作製

抗LAMP5抗体のスクリーニングに用いるため、N末端にV5タグ (アミノ酸配

列GKPIPNPLLGLDST)を付加したLAMP5を発現するCHO細胞株が下記のように樹立された。

[0186] 始めに、N末端にV5タグ配列を付加されたシグナル配列が除かれたLAMP5遺伝子が哺乳動物細胞用発現ベクターpMCN2_CD43ssベクターにクローニングされた。pMCN2_CD43ssベクターはマウスCMVプロモーターの制御下で遺伝子発現の誘導が可能で、ネオマイシン耐性遺伝子が組み込まれたベクターである。また同ベクターには改変ヒトCD43シグナル配列（アミノ酸配列MASLLLLLGVLVVSPDALG）がクローニングされており、SalI-NotIサイトに目的遺伝子をクローニングすることにより、当該目的遺伝子によってコードされるタンパク質を膜タンパクまたは分泌タンパクとして産生させることができる。まずpCR2.1_LAMP5を鋳型として、SalIサイトおよびV5タグ配列を有するフォワードプライマー（SalI-G-V5-LAMP5-F、配列番号：13）とNotIサイトを有するリバースプライマー（LAMP5-Not-R）を用いてLAMP5遺伝子がPCR増幅された。SalIとNotIで消化された増幅産物が、pMCN2_CD43ssベクターのSalI-NotIサイトにクローニングされた（pMCN2_CD43ss_V5-LAMP5）。pMCN2_CD43ss_V5-LAMP5の開始コドンからストップコドンまでの塩基配列を配列番号：14に、アミノ酸配列を配列番号：15に示した。

[0187] 続いてPvuIで消化されたpMCN2_CD43ss_V5-LAMP5がCHO細胞株DG44（Invitrogen社）へエレクトロポレーションにより導入された。ジェネティシンで選抜することにより、N末端V5タグ付加LAMP5を定常的に発現するCHO細胞株が樹立された（LAMP5_CHO）。LAMP5_CHO細胞株はHT supplement、ペニシリン/ストレプトマイシン、500 µg/mLジェネティシンが添加されたCHO-S-SFM II培地で培養された。LAMP5の発現は、抗V5タグ抗体（Invitrogen社、Cat.No.R960-25）を用いたFACSにより確認された。

[0188] 2-5. 抗LAMP5モノクローナル抗体の作製

Balb/cマウス（メス、6週令、日本チャールス・リバー株式会社）に対し、一回当たり 5×10^6 細胞のLAMP5/CD40L_Ba/F3細胞が尾静脈から4回投与された（day0、14、22、29）。引き続き同細胞が腹腔内に17回投与された（day35、42

、49、56、63、70、77、84、91、99、120、127、133、140、147、155、176)。
最後に同細胞が尾静脈から1回投与された日(day190)の3日後に摘出された脾臓から単離された免疫細胞からハイブリドーマが作製された。ハイブリドーマの作製に当たっては、まず脾臓細胞がマウスミエローマ細胞株P3-X63Ag8U1(ATCC)と約1.5:1になるよう混合された。混合液にPEG1500(Roche Diagnostics社)を徐々に加えることによって細胞を融合させた。次にペニシリン/ストレプトマイシンを添加したRPMI1640培地を加えられた混合液から遠心分離によって上清を除去することによりPEG1500が除去された。最後にHAT培地(10%FBS、ペニシリン/ストレプトマイシン、1xHAT Media Supplement(Sigma社)、0.5xBM-Condimed H1 Hybridoma Cloning Supplement(Roche Diagnostics社)を添加したRPMI1640培地)が加えられた懸濁液は、96ウェル平底プレート8枚にP3-X63Ag8U1細胞が 1×10^5 細胞/ウェルになるように播種された。37℃、5%CO₂インキュベーターにて7日間培養後、スクリーニングが行われた。スクリーニングは、培養上清中に産生された抗体のLAMP5_CHO細胞および親株CHO細胞に対する結合をフローサイトメーター(FACS Calibur、Becton Dickinson社)で測定することにより行われた。二次抗体にはFITC標識抗マウスIgG抗体(Goat F(ab')₂ Fragment Anti-Mouse IgG (H+L)-FITC、ベックマン・コールター社、Cat.No. IM0819)が用いられた。親株CHO細胞には結合せずLAMP5_CHO細胞だけに結合する抗体が検出されたウェルが選択された。限界希釈法により当該ウェルからハイブリドーマのモノクローン化が行われた。以上から抗LAMP5モノクローナル抗体D1、D2、D9、D10が樹立された。これらの抗体のアイソタイプをIsostrip(Roche Diagnostics社)を用いて測定したところ、D1、D2、D10はマウスIgG1 κ 、D9はマウスIgG2b κ であった。

[0189] 次に、樹立したハイブリドーマをFBSの代わりにUltra Low IgG FBS(In vitrogen社)を添加したHAT培地で培養し、その培養上清からHiTrap Protein G HPカラム(GE Healthcare社)を用いて抗体を精製した。精製抗体の濃度はDC Protein Assay Kit I(Bio-Rad Laboratories社)を用いて測

定された。

[0190] (実施例3) 抗LAMP5モノクローナル抗体の可変領域遺伝子配列の決定

実施例2で作製された抗LAMP5モノクローナル抗体の可変領域の遺伝子配列が決定された。まず 1×10^7 細胞のハイブリドーマからTrizolを用いて調製されたtotal RNAからSmart Race cDNA Amplification Kit (Clontech社)を用いてcDNAが合成された。プライマーにはマウスIgG1重鎖定常領域に相補的なプライマー(配列番号: 16)、マウスIgG2b重鎖定常領域に相補的なプライマー(配列番号: 17)、またはマウス κ 鎖定常領域に相補的なプライマー(配列番号: 18)が用いられた。次にpCR2.1-TOP0ベクターにクローニングされた各増幅産物の挿入配列が、シーケンサーを用いて決定された。各抗体の可変領域配列を以下の表3および4にまとめた。

[0191] [表3]

抗体		配列番号 (塩基配列)	配列番号 (アミノ酸配列)
D1	重鎖可変領域	19	20
	軽鎖可変領域	21	22
D2	重鎖可変領域	23	24
	軽鎖可変領域	25	26
D9	重鎖可変領域	27	28
	軽鎖可変領域	29	30
D10	重鎖可変領域	31	32
	軽鎖可変領域	33	34

[0192]

[表4]

抗体			配列番号（アミノ酸配列）
D1	重鎖	CDR1	35
		CDR2	36
		CDR3	37
	軽鎖	CDR1	38
		CDR2	39
		CDR3	40
D2	重鎖	CDR1	41
		CDR2	42
		CDR3	43
	軽鎖	CDR1	44
		CDR2	45
		CDR3	46
D9	重鎖	CDR1	47
		CDR2	48
		CDR3	49
	軽鎖	CDR1	50
		CDR2	51
		CDR3	52
D10	重鎖	CDR1	53
		CDR2	54
		CDR3	55
	軽鎖	CDR1	56
		CDR2	57
		CDR3	58

[0193] （実施例4）抗LAMP5モノクローナル抗体のマウスLAMP5への結合解析

4-1. マウスLAMP5強制発現CHO細胞株の作製

作製した抗LAMP5モノクローナル抗体のマウスLAMP5（mLAMP5）への交差性を検討するため、LAMP5と同様の方法でN末端V5タグ付加mLAMP5発現ベクターが作製された。まず市販マウス脳cDNAライブラリを鋳型として、フォワードプライマー（mLAMP5-F、配列番号：59）とリバースプライマー（mLAMP5-R、配列番号：60）を用いてPCR増幅されたmLAMP5遺伝子がpCR2.1-TOP0ベクターにクローニングされた（pCR2.1_mLAMP5）。次にpCR2.1_mLAMP5を鋳型として、SalIサイトおよびV5タグ配列を有するフォワードプライマー（SalI-G-V5-mLAMP5-F、配列番号：61）とNotIサイトを有するリバースプライマー（mLAMP5-NotI-R、配列番号：62）を用いてmLAMP5遺伝子がPCR増幅された。SalIとNotIで消化された当該増幅産物がpMCN2_CD43ssベクターのSalI-NotIサ

イトにクローニングされた (pMCN2_CD43ss_V5-mLAMP5)。pMCN2_CD43ss_V5-mLAMP5の開始コドンからストップコドンまでの塩基配列を配列番号：63に、アミノ酸配列を配列番号：64に示した。

[0194] 続いてPvuI消化されたpMCN2_CD43ss_V5-mLAMP5がCHO細胞株DG44へエレクトロポレーションにより導入された。ジェネティシンで選抜することにより、N末端V5タグ付加mLAMP5を定常的に発現するCHO細胞株が樹立された (mLAMP5_CHO)。mLAMP5の発現は抗V5タグ抗体を用いたFACSにより確認された。mLAMP5_CHO細胞株はHT supplement、ペニシリン/ストレプトマイシン、500 µg/mL ジェネティシンを添加したCHO-S-SFM II培地で培養された。

[0195] 4-2. 抗LAMP5モノクローナル抗体のマウスLAMP5への結合解析

実施例2で作製した抗LAMP5モノクローナル抗体のLAMP5およびmLAMP5への結合がFACSで評価された。まずFACS/PBS (0.2%BSA(bovine serum albumin)、0.1% sodium azideを添加したPBS(-)) に懸濁されたLAMP5_CHO (実施例2) またはmLAMP5_CHOが、1ウェル当たり 5×10^4 細胞ずつ96ウェルU底プレートに播種された。各ウェルに抗LAMP5モノクローナル抗体が終濃度10、2、0.4、0.08、0.016 µg/mLで加えられた後、氷上で1時間反応させた。反応後、FACS/PBSで洗浄された細胞懸濁液は、FITC標識抗マウスIgG抗体と氷上で1時間反応させた。反応後、FACS/PBSで洗浄された細胞は、10 µg/mL propidium iodide (Sigma社) を添加したFACS/PBSに懸濁された。細胞の染色強度がフローサイトメーターで測定された。データ解析にはpropidium iodideで染色されない生細胞のみが用いられた。その結果、クローンD1、D2、D9、D10はいずれもLAMP5に濃度依存的に結合した (図2A)。特にクローンD1、D2、D10はクローンD9に比べて強く結合した (図2A)。一方、mLAMP5にはクローンD2が強く結合したが、クローンD1とD9は結合しなかった (図2B)。クローンD10はmLAMP5に弱く結合した (図2B)。以上から作製した4クローンはいずれも抗原結合特性が異なることが明らかとなった。

[0196] (実施例5) 癌細胞株におけるLAMP5の発現解析

5-1. ウェスタンブロットによるLAMP5の発現解析

市販の抗LAMP5ポリクローナル抗体を用いたウェスタンブロットによって癌細胞株におけるLAMP5の発現が評価された。検体として多発性骨髄腫細胞株KHM-1B (JCRB)、組織球性リンパ腫 (histiocytic lymphoma) 細胞株U-937 (JCRB)、急性単球性白血病 (acute monocytic leukemia) 細胞株THP-1 (JCRB)、急性骨髄性白血病 (acute myeloid leukemia) 細胞株NKM-1 (JCRB)、B・骨髄単球性混合性白血病 (biphenotypic B-myelomonocytic leukemia) 細胞株MV-4-11 (ATCC)、B細胞リンパ腫 (B cell lymphoma) 細胞株JM1 (ATCC)、LAMP5/CD40L_Ba/F3 (実施例2)、およびBa/F3 (理化学研究所バイオリソースセンター) が用いられた。なお、多発性骨髄腫の病態にはインターロイキン6 (IL-6) が関与することが知られているため、10ng/mL IL-6 (Peprotech社、Cat.No.200-06) 存在下で培養したKHM-1B細胞におけるLAMP5の発現も評価された。まず 1×10^7 細胞の各細胞をPBSで洗浄後、1mLのlysis buffer (50mM Tris-HCl(pH7.4), 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Triton X-100, Protease Inhibitor Cocktail (Sigma社)) を用いて溶解することによって全細胞溶解液が得られた。等量の2xSample Buffer (Sigma社) と混合された当該溶解液は、加熱処理後、30 μ LずつがSDS-PAGE電気泳動に供された。泳動後、転写されたPVDFメンブレン (Immobilon-P、Millipore社) は、抗LAMP5ポリクローナル抗体 (Anti-C20orf103 (266-280) antibody produced in rabbit、Sigma社、Cat.No.SAB1101729) 8 μ g/mLと室温にて1時間反応させた。二次抗体にはHRP標識抗ウサギIgG抗体 (GE Healthcare社、Cat.No.NA934-1ML) が用いられた。最後にECL Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare社) を用いて得られた発光が、X線フィルムに露光、もしくはイメージアナライザー (LAS 4000mini、GE Healthcare社) を用いて検出された。その結果、LAMP5/CD40L_Ba/F3で強いバンドが検出されたのに対し、親株であるBa/F3ではほとんどバンドが認められなかったことから、用いた抗体がLAMP5を特異的に検出することが確認された (図3A)。さらにKHM-1B、U-937、NKM-1、MV-4-11、JM1でもバンドが認められた (図3A)。

[0197] LAMP5は糖鎖修飾されることが知られているため、PNGase F (New Englan

d Biolabs社、Cat.No.P0704S) を用いて脱糖鎖処理された、KHM-1B (IL-6存在下で培養したもの)、MV-4-11、LAMP5/CD40L_Ba/F3およびBa/F3の全細胞溶解液が、ウェスタンブロットに供された。その結果、脱糖鎖処理によりアミノ酸配列から想定される分子量である31kDa付近にバンドが認められた (図3B)。MV-4-11とLAMP5/CD40L_Ba/F3ではさらに低分子量のバンドも2本確認された (図3B)。以上からKHM-1BとMV-4-11でLAMP5タンパクが発現し、IL-6によりその発現量が亢進することが示された。

[0198] 5-2. FACSによる発現解析

次にKHM-1B細胞 (IL-6刺激+または-) におけるLAMP5発現をFACSにより測定した。FACSには抗LAMP5モノクローナル抗体D1、D2、D9、D10、および陰性対照としてマウスIgG1 κ (Pharmingen社、Cat.No. 553447) を10 μ g/mLの濃度で用い、実施例4と同様に行った。その結果KHM-1Bの細胞膜上にLAMP5が検出され、その発現量がIL-6刺激により亢進することが確認された (図4)。

[0199] (実施例6) 抗LAMP5モノクローナル抗体のADCC活性および細胞増殖抑制活性の検討

6-1. 抗LAMP5モノクローナル抗体のADCC活性の検討

実施例2で作製した抗LAMP5モノクローナル抗体の抗体依存性細胞介在性細胞傷害 (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity: ADCC) 活性が測定された。Calcein-AM (Wako Pure Chemical Industries社、Cat.No. 349-07201) 存在下で1.5時間培養されたKHM-1B細胞 (IL-6刺激+または-) が、10%FBSおよびペニシリン/ストレプトマイシンを添加したRPMI1640培地 (以下培地) で洗浄された後、培地を用いて 2×10^5 細胞/mLの濃度に懸濁された。細胞懸濁液が96ウェルU底プレートに50 μ L/ウェルずつ加えられた。次に培地で希釈された抗LAMP5モノクローナル抗体D1、D2、D9、D10、および陰性対照として用いられたマウスIgG1 κ が50 μ L/ウェルずつ加えられた。抗体の終濃度は1 μ g/mLに調製された。氷上にて15分間静置後、培地で 5×10^5 細胞/mLの濃度に調製されたエフェクター細胞が100 μ L/ウェルずつ加えられた。エフェクター細胞として、マウスFc γ receptor III (NCBI Reference Sequence:NM_0

10188) の細胞外領域とヒトFcε receptor I-gamma (NCBI Reference Sequence:NM_004106) の膜貫通領域および細胞内領域を融合させたキメラタンパクをNK-92細胞 (ATCC) に定常発現させた細胞 (W02008/093688) が用いられた。プレートに37℃、5%CO₂インキュベーターにて3時間培養後、回収された各ウェル当たり100μLの培養上清の蛍光強度が、マイクロプレートリーダー (ARVO SX 1420 multilabel counter、PerkinElmer社) を用いて測定された。以下の式に測定値を代入することによって特異的カルセイン遊離率 (%) が決定された。

[0200] 特異的カルセイン遊離率(%)=(A-C)x100/(B-C)

[0201] ここで、Aは各ウェルの測定値、Bは1% Nonidet P-40で細胞を溶解させたウェルの測定値の平均値、Cは標的細胞のみを添加したウェルの測定値の平均値である。実験は三重測定 (triplicate) で行い、特異的カルセイン遊離率の平均値と標準偏差が算出された。

[0202] 実験の結果、マウスIgG1κと比較してクローンD1、D2、D10と反応させた培養上清から高い特異的カルセイン遊離率が観察され、KHM-1B細胞に対してクローンD1、D2、D10がADCCを誘導することが示された (図5)。またADCC活性はKHM-1B細胞のIL-6刺激の有無にかかわらず観察された (図5)。

[0203] 6-2. 抗LAMP5モノクローナル抗体の細胞増殖抑制活性の検討

トキシン結合二次抗体の存在下における抗LAMP5モノクローナル抗体D1による細胞増殖抑制活性が測定された。トキシン結合二次抗体として、サポリン標識抗マウスIgG抗体 (Mab-Zap、Advanced Targeting Systems社) を用いられた。96ウェル平底プレートに4x10⁴細胞/ウェルで播種されたKHM-1B細胞 (IL-6刺激+または-) に対して、D1抗体 (1000、200、40ng/mL) またはマウスIgG1κ (5000ng/mL) が加えられた。Mab-Zapは2500ng/mLの濃度で加えられた。当該プレートは3日間培養後、各ウェル中の細胞増殖がWST-8 (Cell Count Reagent SF、Nacalai Tesque社) を用いて測定された。実験は三重測定で行い、培地だけを加えたウェルを0%、細胞だけを加えたウェルを100%として、平均値と標準偏差が算出された。培地として10%FBSおよびペニシリン/

ストレプトマイシンを添加したRPMI1640培地が用いられ、IL-6によって刺激した実験では10ng/mLのIL-6が添加された。実験の結果、D1抗体はトキシン結合二次抗体存在下で、濃度依存的に細胞増殖を抑制した（図6）。従って抗LA MP5抗体に直接トキシンを結合することでも癌細胞の増殖を抑制できる可能性が示された。

産業上の利用可能性

[0204] 本発明のモノクローナル抗体は、細胞表面に発現したLAMP5に結合し、細胞傷害活性やインタナライズ活性を示すことができる。本発明によれば、多発性骨髄腫などの癌に対する新たな抗癌剤や新たな治療法の開発が可能となるため、本発明は、特に医療の分野において利用可能である。また、本発明のモノクローナル抗体は、LAMP5の検出、精製、あるいは機能調節などを行うための試薬としても利用可能である。

配列表フリーテキスト

[0205] 配列番号1 : LAMP5-F
配列番号2 : LAMP5-R
配列番号3 : Eco-Kozak-LAMP5-F
配列番号4 : HAtag-LAMP5-R
配列番号5 : HAtag-LAMP5-F
配列番号6 : LAMP5-Not-R
配列番号7 : pCOSII_HA-LAMP5
配列番号8 : pCOSII_HA-LAMP5
配列番号9 : mCD40L-1
配列番号10 : mCD40L-2
配列番号13 : SalI-G-V5-LAMP5-F
配列番号14 : pMCN2_CD43ss_V5-LAMP5
配列番号15 : pMCN2_CD43ss_V5-LAMP5
配列番号16 : mIgG_CHプライマー
配列番号17 : mIgG2b_CHプライマー

配列番号18 : Mk_CLプライマー

配列番号59 : mLAMP5-F

配列番号60 : mLAMP5-R

配列番号61 : SalI-G-V5-mLAMP5-F

配列番号62 : mLAMP5-NotI-R

配列番号63 : pMCN2_CD43ss_V5-mLAMP5

配列番号64 : pMCN2_CD43ss_V5-mLAMP5

配列番号68 : N末端にアラニンが付加されたヒトIgG1(AAC82527.1)

配列番号69 : N末端にアラニンが付加されたヒトIgG2(AAB59393.1)

配列番号71 : N末端にアラニンが付加されたヒトIgG4(AAB59394.1)

配列番号74 : リンカー

配列番号75 : リンカー

配列番号76 : リンカー

配列番号77 : リンカー

配列番号78 : リンカー

配列番号79 : リンカー

配列番号80 : リンカー

配列番号81 : リンカー

請求の範囲

- [請求項1] 細胞表面に発現した配列番号 8 に規定されるポリペプチドの 39 位から 289 位に存在するエピトープに結合するモノクローナル抗体。
- [請求項2] 細胞表面に発現した配列番号 65 に規定されるポリペプチドの 30 位から 235 位に存在するエピトープに結合する請求項 1 に記載のモノクローナル抗体。
- [請求項3] インタナライズ活性を有する請求項 1 に記載のモノクローナル抗体。
- [請求項4] 細胞傷害性物質が連結された請求項 3 に記載のモノクローナル抗体。
- [請求項5] 細胞傷害活性を有する請求項 1 から 4 のいずれかに記載のモノクローナル抗体。
- [請求項6] 細胞傷害活性が抗体依存性細胞傷害（ADCC）活性である請求項 5 に記載のモノクローナル抗体。
- [請求項7] 以下の（1）から（11）のいずれかに記載のモノクローナル抗体。
- （1）配列番号 35 に記載のCDR1、配列番号 36 に記載のCDR2および配列番号 37 に記載のCDR3を含む重鎖可変領域、ならびに配列番号 38 に記載のCDR1、配列番号 39 に記載のCDR2および配列番号 40 に記載のCDR3を含む軽鎖可変領域を含む抗体、
- （2）配列番号 41 に記載のCDR1、配列番号 42 に記載のCDR2および配列番号 43 に記載のCDR3を含む重鎖可変領域、ならびに配列番号 44 に記載のCDR1、配列番号 45 に記載のCDR2および配列番号 46 に記載のCDR3を含む軽鎖可変領域を含む抗体、
- （3）配列番号 47 に記載のCDR1、配列番号 48 に記載のCDR2および配列番号 49 に記載のCDR3を含む重鎖可変領域、ならびに配列番号 50 に記載のCDR1、配列番号 51 に記載のCDR2および配列番号 52 に記載のCDR3を含む軽鎖可変領域を含む抗体、

(4) 配列番号 5 3 に記載の CDR1、配列番号 5 4 に記載の CDR2 および配列番号 5 5 に記載の CDR3 を含む重鎖可変領域、ならびに配列番号 5 6 に記載の CDR1、配列番号 5 7 に記載の CDR2 および配列番号 5 8 に記載の CDR3 を含む軽鎖可変領域を含む抗体、

(5) ヒト IgG の重鎖定常領域を含む重鎖および／またはヒト抗体の軽鎖定常領域を含む軽鎖を含む、(1) から (4) のいずれかに記載のモノクローナル抗体、

(6) ヒト IgG の重鎖定常領域を含む重鎖が配列番号 6 8 に記載の重鎖定常領域を含む重鎖である、(5) に記載のモノクローナル抗体、

(7) ヒト抗体の軽鎖定常領域を含む軽鎖が配列番号 7 3 に記載の軽鎖定常領域を含む軽鎖である、(5) または (6) に記載のモノクローナル抗体、

(8) (1) から (7) のいずれかに記載の抗体において 1 もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および／または挿入された抗体であって、細胞表面に発現した配列番号 8 に規定されるポリペプチドの 3 9 位から 2 8 9 位に存在するエピトープに対して、(1) から (7) のいずれかに記載のモノクローナル抗体と同等の結合活性を有するモノクローナル抗体、

(9) ヒト IgG の重鎖定常領域を含む重鎖が、配列番号 6 8 の重鎖定常領域において、E U ナンバリングで表される 221 位、222 位、223 位、224 位、225 位、227 位、228 位、230 位、231 位、232 位、233 位、234 位、235 位、236 位、237 位、238 位、239 位、240 位、241 位、243 位、244 位、245 位、246 位、247 位、249 位、250 位、251 位、254 位、255 位、256 位、258 位、260 位、262 位、263 位、264 位、265 位、266 位、267 位、268 位、269 位、270 位、271 位、272 位、273 位、274 位、275 位、276 位、278 位、279 位、280 位、281 位、282 位、283 位、284 位、285 位、286 位、288 位、290 位、291 位、292 位、293 位、294 位、295 位、296 位、297 位、298 位、299 位、300 位、301 位、302 位、303 位、304 位、305 位、3

11位、313位、315位、317位、318位、320位、322位、323位、324位、325位、326位、327位、328位、329位、330位、331位、332位、333位、334位、335位、336位、337位、339位、376位、377位、378位、379位、380位、382位、385位、392位、396位、421位、427位、428位、429位、434位、436位および440位の群から選択されるアミノ酸の少なくとも1つの置換を含む重鎖である、(5)または(7)に記載のモノクローナル抗体、

(10) (1) から (9) のいずれかに記載の抗体が結合するエピトープと同じエピトープに結合するモノクローナル抗体、または、

(11) 細胞表面に発現した配列番号8に規定されるポリペプチドの39位から289位に存在するエピトープに対する(1)から(9)のいずれかに記載の抗体の結合に対して競合するモノクローナル抗体。

[請求項8]

以下の(1)から(8)のいずれかに記載のベクター。

(1) 以下の(a)から(d)のいずれかに記載の重鎖可変領域；

(a) 配列番号35に記載のCDR1、配列番号36に記載のCDR2および配列番号37に記載のCDR3を含む重鎖可変領域；

(b) 配列番号41に記載のCDR1、配列番号42に記載のCDR2および配列番号43に記載のCDR3を含む重鎖可変領域；

(c) 配列番号47に記載のCDR1、配列番号48に記載のCDR2および配列番号49に記載のCDR3を含む重鎖可変領域；または

(d) 配列番号53に記載のCDR1、配列番号54に記載のCDR2および配列番号55に記載のCDR3を含む重鎖可変領域；

をコードするポリヌクレオチドを含むベクター、

(2) 前記(1)の(a)から(d)のいずれかに記載の重鎖可変領域および配列番号68の重鎖定常領域をコードするポリヌクレオチドを含むベクター、

(3) 前記(1)の(a)から(d)のいずれかに記載の重鎖可変領

域および配列番号 68 の重鎖定常領域をコードするポリヌクレオチドにおいて、E U ナンバリングで表される 221 位、222 位、223 位、224 位、225 位、227 位、228 位、230 位、231 位、232 位、233 位、234 位、235 位、236 位、237 位、238 位、239 位、240 位、241 位、243 位、244 位、245 位、246 位、247 位、249 位、250 位、251 位、254 位、255 位、256 位、258 位、260 位、262 位、263 位、264 位、265 位、266 位、267 位、268 位、269 位、270 位、271 位、272 位、273 位、274 位、275 位、276 位、278 位、279 位、280 位、281 位、282 位、283 位、284 位、285 位、286 位、288 位、290 位、291 位、292 位、293 位、294 位、295 位、296 位、297 位、298 位、299 位、300 位、301 位、302 位、303 位、304 位、305 位、311 位、313 位、315 位、317 位、318 位、320 位、322 位、323 位、324 位、325 位、326 位、327 位、328 位、329 位、330 位、331 位、332 位、333 位、334 位、335 位、336 位、337 位、339 位、376 位、377 位、378 位、379 位、380 位、382 位、385 位、392 位、396 位、421 位、427 位、428 位、429 位、434 位、436 位および 440 位の群から選択されるアミノ酸の少なくとも 1 つの置換をコードする変異ヌクレオチドを含むベクター、

(4) 以下の (e) から (h) のいずれかに記載の軽鎖可変領域；

(e) 配列番号 38 に記載の CDR1、配列番号 39 に記載の CDR2 および配列番号 40 に記載の CDR3 を含む軽鎖可変領域；

(f) 配列番号 44 に記載の CDR1、配列番号 45 に記載の CDR2 および配列番号 46 に記載の CDR3 を含む軽鎖可変領域；

(g) 配列番号 50 に記載の CDR1、配列番号 51 に記載の CDR2 および配列番号 52 に記載の CDR3 を含む軽鎖可変領域；または

(h) 配列番号 56 に記載の CDR1、配列番号 57 に記載の CDR2 および配列番号 58 に記載の CDR3 を含む軽鎖可変領域；

をコードするポリヌクレオチドを含むベクター、

(5) 前記 (4) の (e) から (h) のいずれかに記載の軽鎖可変領域および配列番号 73 の軽鎖定常領域をコードするポリヌクレオチド

を含む記載のベクター、

(6) 以下の (i) から (l) のいずれかに記載の重鎖可変領域および軽鎖可変領域；

(i) 配列番号 35 に記載の CDR1、配列番号 36 に記載の CDR2 および配列番号 37 に記載の CDR3 を含む重鎖可変領域、ならびに配列番号 38 に記載の CDR1、配列番号 39 に記載の CDR2 および配列番号 40 に記載の CDR3 を含む軽鎖可変領域；

(j) 配列番号 41 に記載の CDR1、配列番号 42 に記載の CDR2 および配列番号 43 に記載の CDR3 を含む重鎖可変領域、ならびに配列番号 44 に記載の CDR1、配列番号 45 に記載の CDR2 および配列番号 46 に記載の CDR3 を含む軽鎖可変領域；

(k) 配列番号 47 に記載の CDR1、配列番号 48 に記載の CDR2 および配列番号 49 に記載の CDR3 を含む重鎖可変領域、ならびに配列番号 50 に記載の CDR1、配列番号 51 に記載の CDR2 および配列番号 52 に記載の CDR3 を含む軽鎖可変領域；または

(l) 配列番号 53 に記載の CDR1、配列番号 54 に記載の CDR2 および配列番号 55 に記載の CDR3 を含む重鎖可変領域、ならびに配列番号 56 に記載の CDR1、配列番号 57 に記載の CDR2 および配列番号 58 に記載の CDR3 を含む軽鎖可変領域；

をコードするポリヌクレオチドを含むベクター、

(7) 前記 (6) の (i) から (l) のいずれかに記載の重鎖可変領域および軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド；ならびに配列番号 73 の軽鎖定常領域をコードするポリヌクレオチド、および／または配列番号 68 の重鎖定常領域をコードするポリヌクレオチド；

を含むベクター、または、

(8) 前記 (6) の (i) から (l) のいずれかに記載の重鎖可変領域および軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド；ならびに

配列番号 73 の軽鎖定常領域をコードするポリヌクレオチド、および／または配列番号 68 の重鎖定常領域をコードするポリヌクレオチドにおいて、E U ナンバリングで表される 221 位、222 位、223 位、224 位、225 位、227 位、228 位、230 位、231 位、232 位、233 位、234 位、235 位、236 位、237 位、238 位、239 位、240 位、241 位、243 位、244 位、245 位、246 位、247 位、249 位、250 位、251 位、254 位、255 位、256 位、258 位、260 位、262 位、263 位、264 位、265 位、266 位、267 位、268 位、269 位、270 位、271 位、272 位、273 位、274 位、275 位、276 位、278 位、279 位、280 位、281 位、282 位、283 位、284 位、285 位、286 位、288 位、290 位、291 位、292 位、293 位、294 位、295 位、296 位、297 位、298 位、299 位、300 位、301 位、302 位、303 位、304 位、305 位、311 位、313 位、315 位、317 位、318 位、320 位、322 位、323 位、324 位、325 位、326 位、327 位、328 位、329 位、330 位、331 位、332 位、333 位、334 位、335 位、336 位、337 位、339 位、376 位、377 位、378 位、379 位、380 位、382 位、385 位、392 位、396 位、421 位、427 位、428 位、429 位、434 位、436 位および 440 位の群から選択されるアミノ酸の少なくとも 1 つの置換をコードする変異ヌクレオチド；
を含む、ベクター。

[請求項9] 以下の（１）から（４）のいずれかに記載のベクターを含む宿主細胞。

（１）請求項 8 の（１）に記載のベクターおよび請求項 8 の（４）に記載のベクター；

（２）請求項 8 の（２）に記載のベクターおよび請求項 8 の（５）に記載のベクター；

（３）請求項 8 の（３）に記載のベクターおよび請求項 8 の（５）に記載のベクター；または、

（４）請求項 8 の（６）から（８）のいずれかに記載のベクター

[請求項10] 前記宿主細胞が、糖鎖にフコースを付加する能力が低い宿主細胞で

ある請求項 9 に記載の宿主細胞。

[請求項11] 前記糖鎖にフコースを付加する能力が低い宿主細胞が、フコシルトランスフェラーゼ、フコーストランスポーター、GMD（GDP-マンノース 4，6-デヒドラターゼ）、F_x（GDP-ケトー 6-デオキシマンノース 3，5-エピメラーゼ，4-レダクターゼ）、および GFPP（GDP-β-L-フコースピロフォスフォリラーゼ）からなる群から選択される機能性タンパク質の一つまたはそれ以上が欠損している宿主細胞である請求項 10 に記載の宿主細胞。

[請求項12] 前記宿主細胞が、糖鎖にバイセクティングN-アセチルグルコサミン構造を含む糖鎖を形成する活性を有する宿主細胞である請求項 9 に記載の宿主細胞。

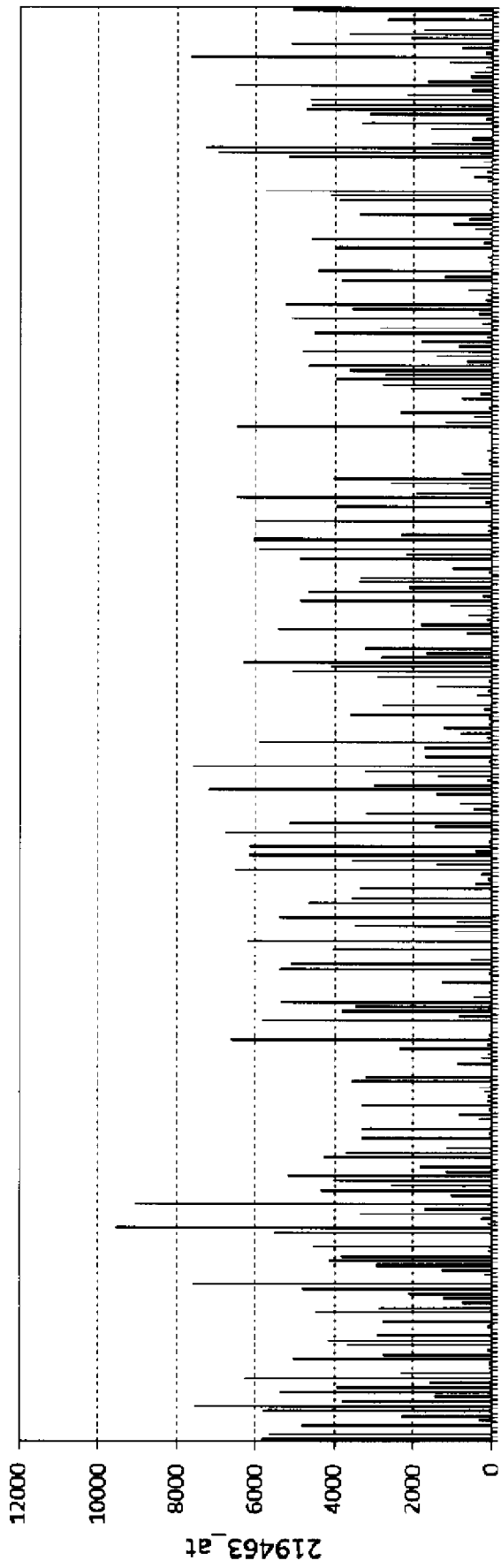
[請求項13] 前記糖鎖にバイセクティングN-アセチルグルコサミン構造を含む糖鎖を形成する活性を有する宿主細胞が、β（1，4）-ガラクトシルトランスフェラーゼ活性を有し、およびゴルジ常在ポリペプチドの機能性のゴルジ局在化ドメインをコードするポリヌクレオチドを含むベクターを含む宿主細胞である請求項 12 に記載の宿主細胞。

[請求項14] マンノシダーゼ I の局在化ドメイン、β（1，2）-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I の局在化ドメイン、β（1，2）-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ II の局在化ドメイン、マンノシダーゼ I の局在化ドメイン、および α 1-6 コア フコシルトランスフェラーゼの局在化ドメインからなる群から選択される機能性のゴルジ局在化ドメインをコードするポリヌクレオチドを含むベクターを含み、β（1，4）-ガラクトシルトランスフェラーゼの触媒ドメインを含む融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む宿主細胞である請求項 13 に記載の宿主細胞。

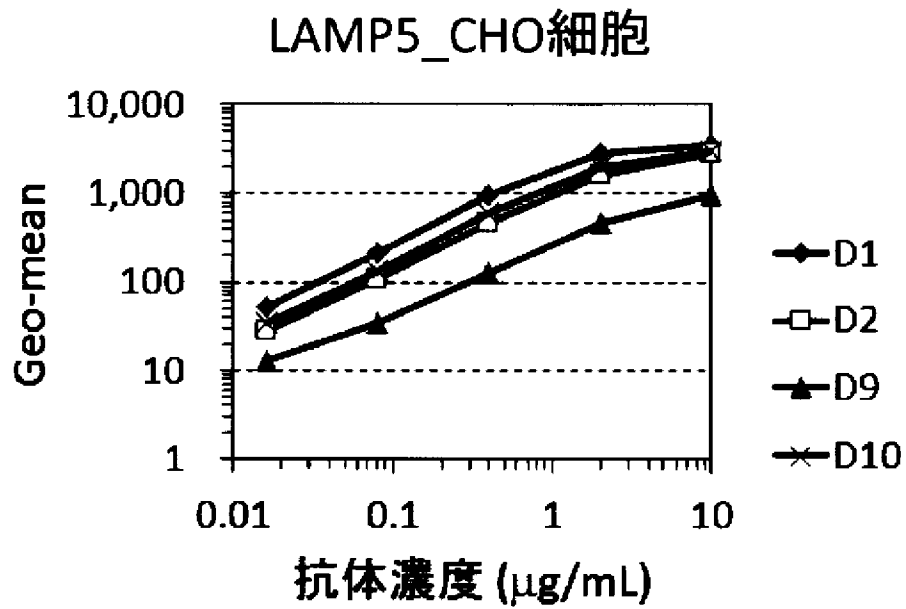
[請求項15] 請求項 9 から 14 のいずれかに記載の宿主細胞の培養液から回収することを含む請求項 1 から 7 に記載のモノクローナル抗体を製造する方法。

- [請求項16] 請求項 1 5 に記載の方法によって製造されたモノクローナル抗体。
- [請求項17] 請求項 1 から 7、 1 6 のいずれかに記載のモノクローナル抗体を有効成分として含む医薬組成物。
- [請求項18] IL-6またはそのフラグメント、変異体、融合タンパク質、機能性誘導体もしくはその塩と組み合わせられることを特徴とする請求項 1 7 に記載の医薬組成物。
- [請求項19] 請求項 1 から 7、 1 6 のいずれかに記載のモノクローナル抗体を有効成分として含む抗癌剤。
- [請求項20] 癌が、多発性骨髄腫である請求項 1 9 に記載の抗癌剤。
- [請求項21] IL-6またはそのフラグメント、変異体、融合タンパク質、機能性誘導体もしくはその塩と投与されることを特徴とする請求項 1 9 または 2 0 に記載の抗癌剤。

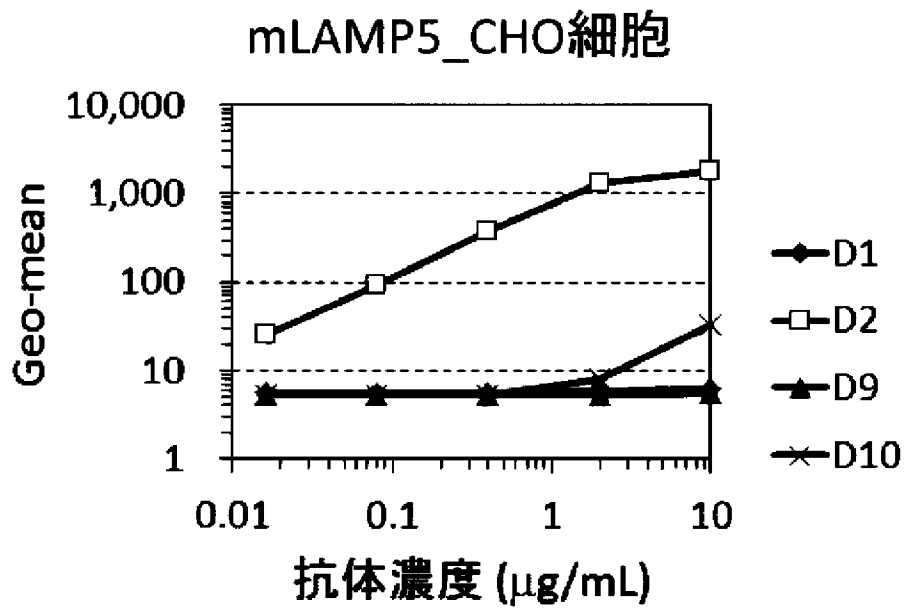
[図1]



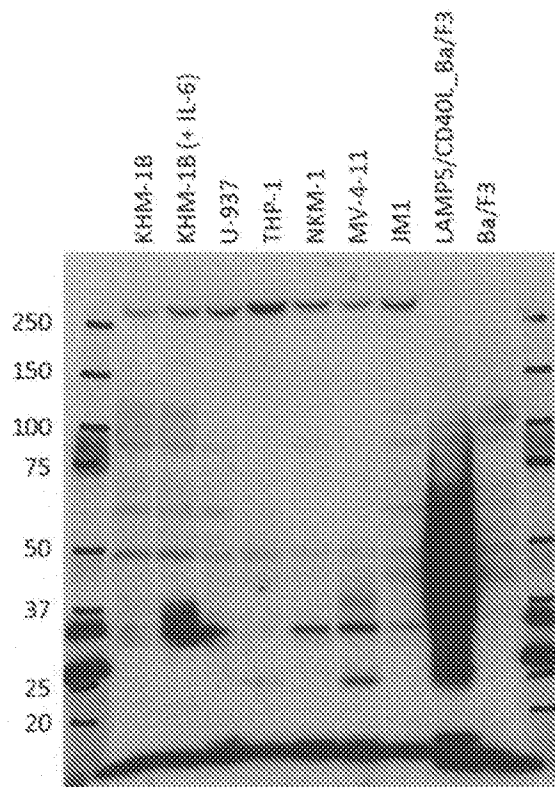
[図2A]



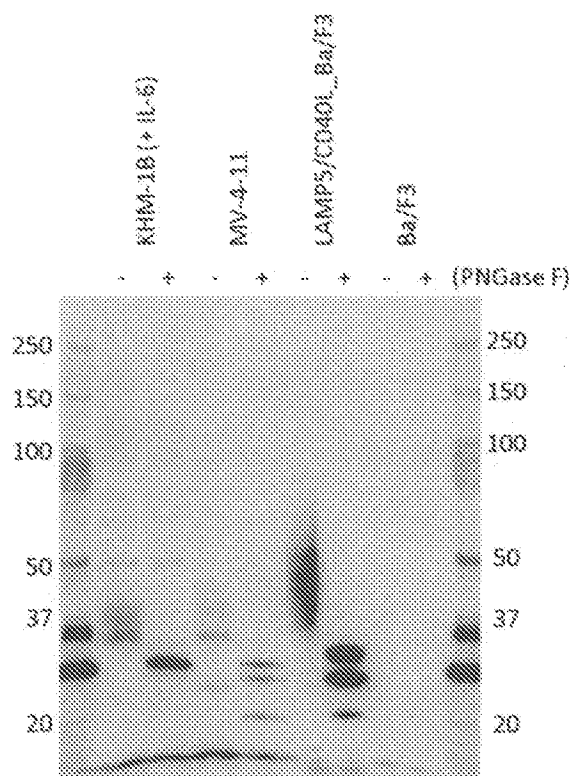
[図2B]



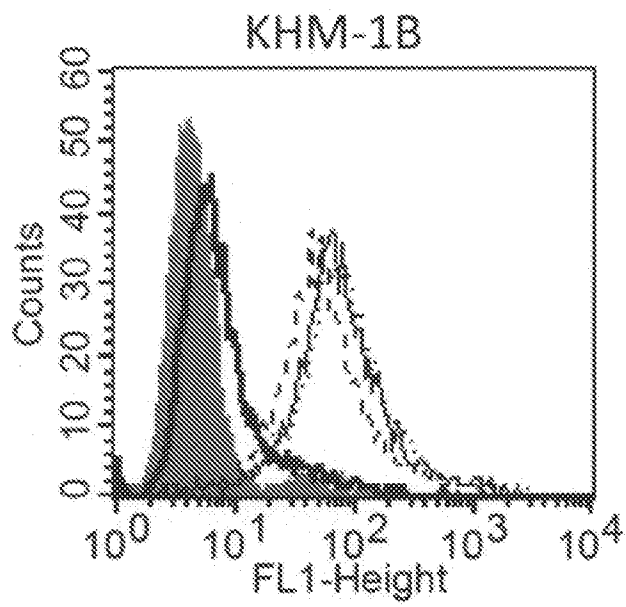
[図3A]



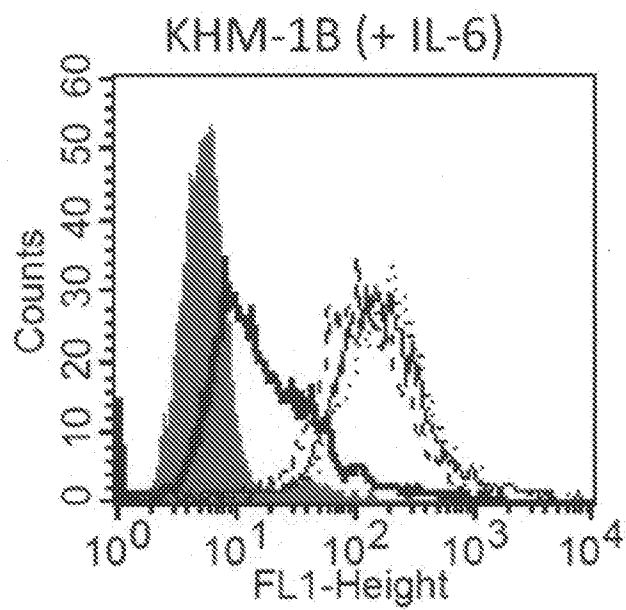
[図3B]



[図4A]

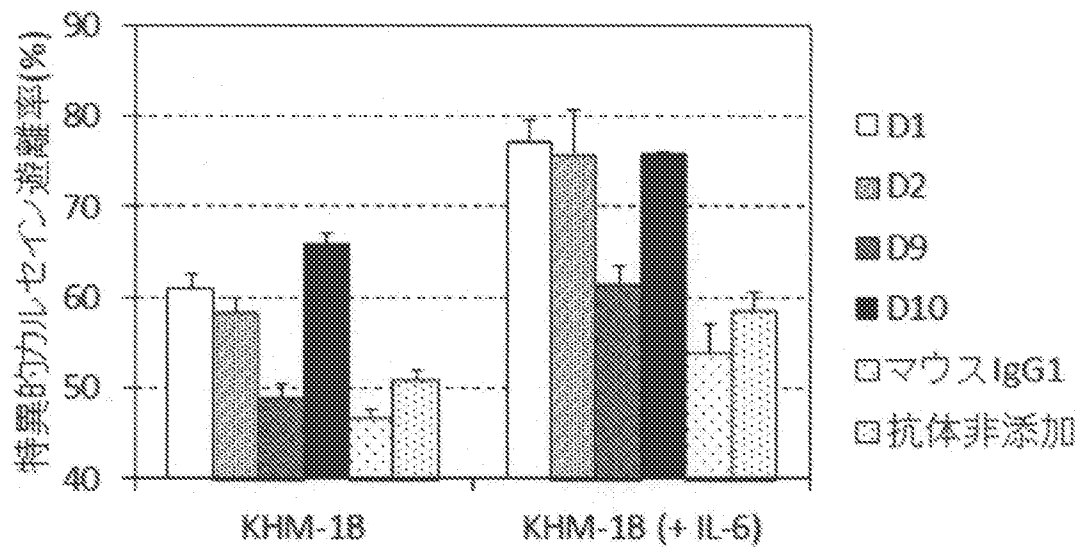


[図4B]

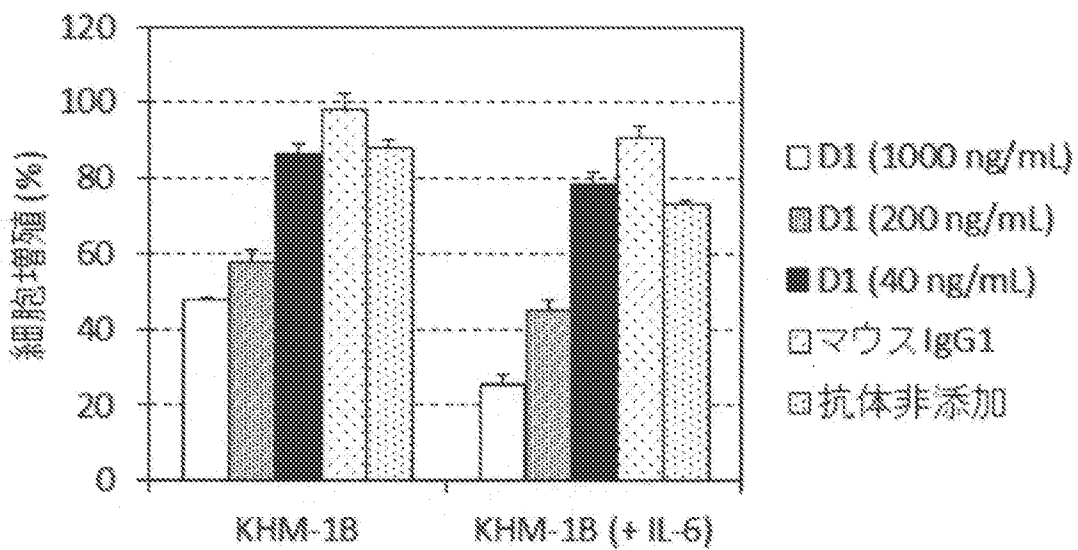


— D1
- - - D2
— D9
.... D10
■ マウスIgG1

[図5]



[図6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/059516

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C07K19/00(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12P21/08(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)

C12N15/00-15/877, A61K39/00-39/44, A61K49/00-49/04, A61K51/00, A61P35/00-35/04, C07K1/00-19/00

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)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamIII), Science Direct, PubMed

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 1932854 A1 (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM)), 18 June 2008 (18.06.2008), paragraphs [0143] to [0152] & WO 2008/075174 A2	1, 2, 5, 6
X Y	Axel Defays, et al, BAD-LAMP is a novel biomarker of nonactivated human plasmacytoid dendritic cells, Blood, 2011.07.21, Vol.118, No.3, pages 609 to 617	1, 5, 6 17-21
Y	WO 2011/093097 A1 (Forerunner Pharma Research Co., Ltd.), 04 August 2011 (04.08.2011), claims; paragraphs [0004], [0009] & US 2012/0328624 A1 & EP 2530091 A1	17-21



Further documents are listed in the continuation of Box C.



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

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"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)

"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

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
24 June, 2013 (24.06.13)

Date of mailing of the international search report
02 July, 2013 (02.07.13)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/059516

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2010/119691 A1 (The University of Tokyo), 21 October 2010 (21.10.2010), claims; paragraphs [0010] to [0012] & US 2012/0128678 A1 & EP 2420515 A1	17-21
Y	JP 05-506574 A (The Trustees of Columbia University in the City of New York), 30 September 1993 (30.09.1993), claims & EP 521985 A1 & WO 1991/014438 A1 & DE 69127749 C & DE 69127749 D & AU 7558291 A & AT 158615 T & CA 2078689 A & AU 654811 B & CA 2078689 A1	18,21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/059516

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.:
1, 2, 5, 6 and 17-21

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.

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

In document 1 (EP 1932854 A1 (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM)), 18 June 2008 (18.06.2008), paragraphs [0143] to [0152]), it is described that a peptide having the sequence KMTANQVQIPRDRSQYKPMC (which corresponds to a region laying between position-270 to position-288 in the polypeptide defined in SEQ ID NO: 8 in the invention described in claim 1) is administered to mouse and rat to produce an anti-BAD-LAMP monoclonal antibody.

In document 2 (Axel Defays, et al, BAD-LAMP is a novel biomarker of nonactivated human plasmacytoid dendritic cells, Blood, 2011.07.21, Vol.118, No.3, pages 609 to 617 (particularly page 610, left column, lines 31 to 59; page 611, right column, lines 34 to 41)), it is described that a peptide having the sequence KMTANQVQIPRDRSQYKPM (which corresponds to a region laying between position-270 to position-288 in the polypeptide defined in SEQ ID NO: 8 in the invention described in claim 1) is administered to rat to produce an anti-BAD-LAMP monoclonal antibody.

Therefore, the invention of claim 1 cannot be considered to be novel in the light of the inventions disclosed in the documents 1 and 2, and does not have a special technical feature.

Consequently, the following six inventions (invention groups) are involved in claims.

Meanwhile, the invention of claim 1 having no special technical feature is classified into invention 1.

(Invention 1) claims 1, 2, 5, 6 and, 17-21: a monoclonal antibody which can bind to an epitope located in a region laying between position-39 to position-289 in the polypeptide defined in SEQ ID NO: 8 and expressed on the surface of a cell.

(Invention 2) claims 3 and 4: a monoclonal antibody which can bind to an epitope and has an internalizing activity, wherein the epitope is located in a region lying between position-39 to position-289 in the polypeptide defined in SEQ ID NO: 8 and expressed on the surface of a cell.

(Invention 3) parts of claims 7-9, and claims 10-16: an antibody which contains a heavy-chain variable region comprising CDR1 described in SEQ ID NO: 35, CDR2 described in SEQ ID NO: 36 and CDR3 described in SEQ ID NO: 37 and a light-chain variable region comprising CDR1 described in SEQ ID NO: 38, CDR2 described in SEQ ID NO: 39 and CDR3 described in SEQ ID NO: 40.

(Invention 4) parts of claims 7-9: an antibody which contains a heavy-chain variable region comprising CDR1 described in SEQ ID NO: 41, CDR2 described in SEQ ID NO: 42 and CDR3 described in SEQ ID NO: 43 and a light-chain variable region comprising CDR1 described in SEQ ID NO: 44, CDR2 described in SEQ ID NO: 45 and CDR3 described in SEQ ID NO: 46.

(Invention 5) parts of claims 7-9: an antibody which contains a heavy-chain variable region comprising CDR1 described in SEQ ID NO: 47, CDR2 described in SEQ ID NO: 48 and CDR3 described in SEQ ID NO: 49 and a light-chain variable region comprising CDR1 described in SEQ ID NO: 50, CDR2 described in SEQ ID NO: 51 and CDR3 described in SEQ ID NO: 52.

(Continued to next extra sheet)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/059516

(Invention 6) parts of claims 7-9: an antibody which contains a heavy-chain variable region comprising CDR1 described in SEQ ID NO: 53, CDR2 described in SEQ ID NO: 54 and CDR3 described in SEQ ID NO: 55 and a light-chain variable region comprising CDR1 described in SEQ ID NO: 56, CDR2 described in SEQ ID NO: 57 and CDR3 described in SEQ ID NO: 58.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C07K19/00(2006.01)i,
C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12P21/08(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 (I P C))

Int.Cl. C12N15/00-15/877, A61K39/00-39/44, A61K49/00-49/04, A61K51/00, A61P35/00-35/04, C07K1/00-19/00

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

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 3 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 3 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 3 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)

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTplus/JMEDplus/JST7580(JDreamIII), Science Direct, PubMed

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	EP 1932854 A1 (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM)) 2008.06.18, [0143]-[0152] & WO 2008/075174 A2	1, 2, 5, 6
X Y	Axel Defays, et al, BAD-LAMP is a novel biomarker of nonactivated human plasmacytoid dendritic cells, Blood, 2011.07.21, Vol.118, No.3, 第 609-617 頁	1, 5, 6 17-21

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ 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

「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
「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
「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)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「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
「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
「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
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

2 4 . 0 6 . 2 0 1 3

国際調査報告の発送日

0 2 . 0 7 . 2 0 1 3

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)
郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5
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)

一宮 里枝

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

4 B

3 4 4 1

C (続き) . 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
Y	WO 2011/093097 A1 (株式会社未来創薬研究所) 2011.08.04, 請求の範囲, [0004], [0009] & US 2012/0328624 A1 & EP 2530091 A1	17-21
Y	WO 2010/119691 A1 (国立大学法人東京大学) 2010.10.21, 請求の範囲, [0010]-[0012] & US 2012/0128678 A1 & EP 2420515 A1	17-21
Y	JP 05-506574 A (ザ・トラスティーズ・オブ・コロンビア・ユニバーシティ・イン・ザ・シティ・オブ・ニューヨーク) 1993.09.30, 特許請求の範囲 & EP 521985 A1 & WO 1991/014438 A1 & DE 69127749 C & DE 69127749 D & AU 7558291 A & AT 158615 T & CA 2078689 A & AU 654811 B & CA 2078689 A1	18, 21

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（P C T 17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を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P C T 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ろの国際調査機関は認めた。
特別ページ参照

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ため、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ため、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。

請求項 1, 2, 5, 6, 17-21

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。

文献 1 (EP 1932854 A1 (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM)) 2008.06.18, [0143]-[0152]) には、KMTANQVQIPRDRSQYKHC という配列のペプチド(請求項 1 に係る発明の配列番号 8 に規定されるポリペプチドの 270 から 288 位に相当)をマウスとラットに投与して抗 BAD-LAMP モノクローナル抗体を生産した旨記載されている。

また、文献 2 (Axel Defays, et al, BAD-LAMP is a novel biomarker of nonactivated human plasmacytoid dendritic cells, Blood, 2011.07.21, Vol.118, No.3, 第 609-617 頁 (特に、第 610 頁左欄第 31-59 行目, 第 611 頁右欄第 34-41 行目参照)) には、KMTANQVQIPRDRSQYKHC という配列のペプチド(請求項 1 に係る発明の配列番号 8 に規定されるポリペプチドの 270 から 288 位に相当)をラットに投与して抗 BAD-LAMP モノクローナル抗体を生産した旨記載されている。

したがって、請求項 1 に係る発明は、文献 1、2 に記載された発明に対して新規性が認められず、特別な技術的特徴を有しない。

よって、請求の範囲には、以下に示す 6 の発明(群)が含まれる。

なお、特別な技術的特徴を有しない請求項 1 に係る発明は、発明 1 に区分する。

(発明 1) 請求項 1、2、5、6、17-21: 細胞表面に発現した配列番号 8 に規定されるポリペプチドの 39 位から 289 位に存在するエピトープに結合するモノクローナル抗体。

(発明 2) 請求項 3、4: 細胞表面に発現した配列番号 8 に規定されるポリペプチドの 39 位から 289 位に存在するエピトープに結合し、かつ、インタナライズ活性を有するモノクローナル抗体。

(発明 3) 請求項 7~9 の一部、10~16: 配列番号 35 に記載の CDR1、配列番号 36 に記載の CDR2 および配列番号 37 に記載の CDR3 を含む重鎖可変領域、ならびに配列番号 38 に記載の CDR1、配列番号 39 に記載の CDR2 および配列番号 40 に記載の CDR3 を含む軽鎖可変領域を含む抗体。

(発明 4) 請求項 7~9 の一部: 配列番号 41 に記載の CDR1、配列番号 42 に記載の CDR2 および配列番号 43 に記載の CDR3 を含む重鎖可変領域、ならびに配列番号 44 に記載の CDR1、配列番号 45 に記載の CDR2 および配列番号 46 に記載の CDR3 を含む軽鎖可変領域を含む抗体。

(発明 5) 請求項 7~9 の一部: 配列番号 47 に記載の CDR1、配列番号 48 に記載の CDR2 および配列番号 49 に記載の CDR3 を含む重鎖可変領域、ならびに配列番号 50 に記載の CDR1、配列番号 51 に記載の CDR2 および配列番号 52 に記載の CDR3 を含む軽鎖可変領域を含む抗体。

(発明 6) 請求項 7~9 の一部: 配列番号 53 に記載の CDR1、配列番号 54 に記載の CDR2 および配列番号 55 に記載の CDR3 を含む重鎖可変領域、ならびに配列番号 56 に記載の CDR1、配列番号 57 に記載の CDR2 および配列番号 58 に記載の CDR3 を含む軽鎖可変領域を含む抗体。