明　細　書

発明の名称 ： 細胞内への鉄の取り込み阻害剤

技術分野

[0001] 本発明は、細胞内への鉄の取り込み阻害剤、並びにヒトトランスフェリンとヒトトランスフェリンレセプターとの結合阻害剤に関する。

背景技術

[0002] トランスフェリンレセプター(ＴｆＲ)は、トランスフェリン(Ｔｆ)と結合した鉄を細胞内に取り込むための細胞膜構造として、最初網状赤血球上にあると同定された（非特許文献１）。ＴｆＲは、胎盤の栄養膜細胞や、活性化されたリンパ球、並びに腫瘍細胞などに発現していることが知られている。

[0003] 特許文献１には、ヒト抗体ライブラリーファージ Ｄｉｓｐｌａｙにより癌細胞膜上にあるＴｆＲと反応するファージ抗体（ｓｃＦｖ抗体）を取得し、これらのｓｃＦｖ抗体をＩｇＧ化し、完全なヒトＩｇＧ抗体を作製したことが記載されている。特許文献１ではさらに、得られた完全なヒト抗ＴｆＲ抗体の可変領域のＣＤＲについて少なくとも一つのアミノ酸を改変し、臨床応用に適した抗ＴｆＲ抗体を作製したことが記載されている。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：国際公開ＷＯ２０１４／０７３６４１号公報

非特許文献

[0005] 非特許文献1：J Clin Invest 1963; 42, 314-326

非特許文献2：Gene. 1991 Dec 15; 108(2): 193-9.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明は、ＴｆＲを標的とした、細胞内への鉄の取り込み阻害剤、並びにヒトＴｆとヒトＴｆＲとの結合阻害剤を提供することを解決すべき課題とした。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは上記課題を解決するために検討した結果、ヒトＴｆＲにおける所定の位置のアミノ酸配列を認識する抗体が、ヒトＴｆとヒトＴｆＲとの結合を阻害することができ、さらに細胞内への鉄の取り込みを阻害できることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0008] 即ち、本発明によれば、以下の発明が提供される。

（１） ヒトトランスフェリンレセプターの６２９番目～６３３番目のアミノ酸を認識する抗体を含む、細胞内への鉄の取り込み阻害剤。

（２） ヒトトランスフェリンとヒトトランスフェリンレセプターとの結合を阻害することにより、細胞内への鉄の取り込みを阻害する、（１）に記載の阻害剤。

（３） 前記抗体が、重鎖第１相補性決定領域（VH CDR1）、重鎖第２相補性決定領域（VH CDR2）、重鎖第３相補性決定領域（VH CDR3）がそれぞれ配列番号１、２、３であり、及び軽鎖第１相補性決定領域（VL CDR1）、軽鎖第２相補性決定領域（VL CDR2）、軽鎖第３相補性決定領域（VL CDR3）がそれぞれ配列番号４、５、６である抗体である、（１）または（２）に記載の阻害剤。

（４） 前記抗体が、重鎖が配列番号７を有し、軽鎖が配列番号８を有する抗体である、（１）から（３）の何れか一に記載の阻害剤。

（５） 抗体がヒト抗体又はヒト化抗体である、（１）から（４）の何れか一に記載の阻害剤。

（６） 抗体が、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ(ａｂ’)$_2$、一本鎖抗体（ｓｃＦｖ）、二量体化V領域（Ｄｉａｂｏｄｙ）、ジスルフィド安定化V領域（ｄｓＦｖ）およびＣＤＲを含むペプチドからなる群から選ばれる抗体断片である、（１）から（５）の何れか一に記載の阻害剤。

（７） 細胞内への鉄の過剰取り込みを伴う疾患又は症状の処置のために使用される、（１）から（６）の何れか一に記載の阻害剤。

（８） ヒトトランスフェリンレセプターの６２９番目～６３３番目のアミ

ノ酸を認識する抗体を含む、ヒトトランスフェリンとヒトトランスフェリンレセプターとの結合阻害剤。

（９） 前記抗体が、重鎖第１相補性決定領域（VH CDR1）、重鎖第２相補性決定領域（VH CDR2）、重鎖第３相補性決定領域（VH CDR3）がそれぞれ配列番号１、２、３であり、及び軽鎖第１相補性決定領域（VL CDR1）、軽鎖第２相補性決定領域（VL CDR2）、軽鎖第３相補性決定領域（VL CDR3）がそれぞれ配列番号４、５、６である抗体である、（８）に記載の阻害剤。

（１０） 前記抗体が、重鎖が配列番号７を有し、軽鎖が配列番号８を有する抗体である、（８）又は（９）に記載の阻害剤。

（１１） 抗体がヒト抗体又はヒト化抗体である、（８）から（１０）の何れか一に記載の阻害剤。

（１２） 抗体が、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、$F(ab')_2$、一本鎖抗体（ｓｃＦｖ）、二量体化V領域（Ｄｉａｂｏｄｙ）、ジスルフィド安定化V領域（ｄｓＦｖ）およびＣＤＲを含むペプチドからなる群から選ばれる抗体断片である、（８）から（１１）の何れか一に記載の阻害剤。

（１３） 細胞内への鉄の過剰取り込みを伴う疾患又は症状の処置のために使用される、（８）から（１２）の何れか一に記載の阻害剤。

[0009] （Ａ） ヒトトランスフェリンレセプターの６２９番目～６３３番目のアミノ酸を認識する抗体を対象者に投与することを含む、細胞内への鉄の取り込みを阻害する方法が提供される。

（Ｂ） ヒトトランスフェリンレセプターの６２９番目～６３３番目のアミノ酸を認識する抗体を対象者に投与することを含む、ヒトトランスフェリンとヒトトランスフェリンレセプターとの結合を阻害する方法が提供される。

（Ｃ） ヒトトランスフェリンレセプターの６２９番目～６３３番目のアミノ酸を認識する抗体を対象者に投与することを含む、細胞内への鉄の過剰取り込みを伴う疾患又は症状を処置する方法。

（Ｄ） 細胞内への鉄の取り込みの阻害において使用するための、ヒトトランスフェリンレセプターの６２９番目～６３３番目のアミノ酸を認識する抗

体。

（Ｅ）　ヒトトランスフェリンとヒトトランスフェリンレセプターとの結合の阻害において使用するための、ヒトトランスフェリンレセプターの６２９番目～６３３番目のアミノ酸を認識する抗体。

（Ｆ）　細胞内への鉄の過剰取り込みを伴う疾患又は症状の処置において使用するための、ヒトトランスフェリンレセプターの６２９番目～６３３番目のアミノ酸を認識する抗体。

（Ｇ）　細胞内への鉄の取り込み阻害剤の製造のための、ヒトトランスフェリンレセプターの６２９番目～６３３番目のアミノ酸を認識する抗体の使用。

（Ｈ）　ヒトトランスフェリンとヒトトランスフェリンレセプターとの結合阻害剤の製造のための、ヒトトランスフェリンレセプターの６２９番目～６３３番目のアミノ酸を認識する抗体の使用。

（Ｉ）　細胞内への鉄の過剰取り込みを伴う疾患又は症状の処置剤の製造のための、ヒトトランスフェリンレセプターの６２９番目～６３３番目のアミノ酸を認識する抗体の使用。

発明の効果

[0010]　本発明によれば、細胞内への鉄の取り込み阻害剤、並びにヒトＴｆとヒトＴｆＲとの結合阻害剤が提供される。本発明の阻害剤は、細胞内への鉄の過剰取り込みを伴う疾患又は症状の処置において有用である。本発明の阻害剤は、赤芽球などの鉄要求性が高い細胞の増殖抑制のために使用することができる。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]図１は、それぞれのＴｆＲ　ｍｕｔａｎｔ　ｆｒａｇｍｅｎｔのｐｏｉｎｔ　ｍｕｔａｔｉｏｎを行う部位を示す。

[図2]図２は、ＴｆＲ４３６と可溶性ｗｉｌｄ　ｔｙｐｅ　ＴｆＲ　（ｓＴｆＲ）　及びＴｆＲ　ｍｕｔａｎｔ　ｆｒａｇｍｅｎｔの反応性を示す。

[図3]図３は、ＴｆＲ４３６のＴｆ－ＴｆＲ結合阻害活性を示す。

[図4]図４は、ＴｆＲ４３６抗体の細胞増殖抑制効果に対するクエン酸鉄アンモニウムの効果を示す。

[図5]図５は、ＴｆＲ４３６抗体の添加によるＫ５６２細胞株内の鉄量変化を示す。

発明を実施するための形態

[0012] 次に、本発明について更に詳細に説明する。

定義および一般的技術

本明細書において別段定義しない限り、本発明に関して使用した科学技術用語は、当業者に通常理解されている意味を含むものとする。一般に、本明細書に記載の細胞および組織培養、分子生物学、免疫学、微生物学、遺伝学、タンパク質および核酸化学ならびにハイブリダイゼーションに関して使用した命名法およびその技術は、当技術分野で周知のものであり、通常使用されている。

[0013] 本発明の方法および技術は一般に、別段示さない限り、当技術分野で周知である従来の方法に従って、本明細書全体にわたって引用し論じた種々の一般的参照文献およびより具体的な参照文献に記載されているように実施する。

[0014] ＴｆＲ

ヒトトランスフェリン受容体（ＴｆＲ）はヒト三番染色体にコードされる７６０アミノ酸から構成される一回膜貫通型タンパクである(配列番号９)。このタンパクはＣＤ７１抗原としても知られ、細胞の鉄の取り込みに関与し、細胞の増殖に関与すると考えられている。本発明のＴｆＲは、構造上特別に限定せず、単量体、多量体、細胞膜に発現しているｉｎｔａｃｔ ｆｏｒｍ、細胞外領域に構成された可溶化ｆｏｒｍ、ｔｒｕｎｃｔｅｄ ｆｏｒｍ、また、遺伝子の変異や、欠損などによりｍｕｔａｔｉｏｎ ｆｏｒｍ、リン酸化などにより翻訳後修飾を受けたｆｏｒｍなども含め、すべてヒトＴｆＲを意味する。

[0015] 反応する及び反応性

本明細書において、「反応する」と「反応性」は特別に示さない限り、同じのことを意味する。すなわち、抗体が抗原を認識すること。この抗原は、細胞膜に発現するｉｎｔａｃｔ　ＴｆＲでもよいし、ｔｒｕｎｃｔｅｄ　ｆｏｒｍや、可溶化ｆｏｒｍでも良い。また、立体構造を保ったＴｆＲでもよいし、変性したＴｆＲでもよい。反応性を検討する手段として、フローサイトメーター（ＦＡＣＳ）、酵素結合免疫吸着検定法（ＥＬＩＳＡ）、ｗｅｓｔｅｒｎ－ｂｌｏｔ、蛍光微量測定技術（ＦＭＡＴ）表面プラズモン共鳴（ＢＩＡｃｏｒｅ）、免疫染色、免疫沈降などが挙げられる。

[0016] フローサイトメーターに用いる抗体としては、ＦＩＴＣなどの蛍光物質、ビオチンなどにより標識された抗体であっても、標識をされていない抗体であってもよい。用いた抗体の標識の有無、その種類により、蛍光標識アビジン、蛍光標識抗ヒト免疫グロブリン抗体などを使用する。反応性は、十分量の抗ＴｆＲ抗体（通常最終濃度が０．０１～１０μｇ／ｍＬ）を検体に加えて行い、陰性対照抗体、陽性対照抗体の反応性との比較を行うことにより評価することができる。

[0017] 抗体

本明細書では必要に応じて、慣習に従い以下の略号（括弧内）を使用する。

重鎖（Ｈ鎖）、軽鎖（Ｌ鎖）、重鎖可変領域（ＶＨ）、軽鎖可変領域（ＶＬ）、相補性決定領域（ＣＤＲ）、第１相補性決定領域（ＣＤＲ１）、第２相補性決定領域（ＣＤＲ２）、第３相補性決定領域（ＣＤＲ３）重鎖の第１相補性決定領域（ＶＨ　ＣＤＲ１）、重鎖の第２相補性決定領域（ＶＨ　ＣＤＲ２）、重鎖の第３相補性決定領域（ＶＨ　ＣＤＲ３）軽鎖の第１相補性決定領域（ＶＬ　ＣＤＲ１）、軽鎖の第２相補性決定領域（ＶＬ　ＣＤＲ２）、軽鎖の第３相補性決定領域（ＶＬ　ＣＤＲ３）。

[0018] 本明細書において、「抗体」という用語は、イムノグロブリンと同義であり、当技術分野で通常知られている通りに理解されるべきである。具体的には、抗体という用語は、抗体を作製する任意の特定の方法により限定される

ものではない。例えば、抗体という用語には、それだけに限らないが、組換え抗体、モノクローナル抗体、およびポリクローナル抗体がある。

[0019] 本明細書において、「ヒト抗体」という用語は、可変領域および定常領域の配列がヒト配列である任意の抗体を意味する。その用語は、ヒト遺伝子に由来する配列を有するが、例えば、考えられる免疫原性の低下、親和性の増大、望ましくない折りたたみを引き起こす可能性があるシステインの除去などを行うように変化させている抗体を包含する。その用語はまた、ヒト細胞に特有でないグリコシル化を施すことができる、非ヒト細胞中で組換えにより作製されたそのような抗体をも包含する。これらの抗体は、様々な形で調製することができる。

[0020] 本明細書において、「ヒト化抗体」という用語は、非ヒト由来の抗体を指し、非ヒト種の抗体配列に特徴的なアミノ酸残基が、ヒト抗体の対応する位置で認められる残基と置換されている。この「ヒト化」の工程が、その結果得られる抗体のヒトでの免疫原性を低下させると考えられる。当技術分野で周知の技術を使用して、非ヒト由来の抗体をヒト化できることが理解されるであろう。例えば、Ｗｉｎｔｅｒら、Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｔｏｄａｙ１４：４３～４６（１９９３）を参照されたい。対象とする抗体は、ＣＨ１、ＣＨ２、ＣＨ３、ヒンジドメイン、および／またはフレームワークドメインを対応するヒト配列と置換する組換えＤＮＡ技術によって工学的に作製することができる。例えば、ＷＯ９２／０２１９０、ならびに米国特許第５，５３０，１０１号、第５，５８５，０８９号、第５，６９３，７６１号、第５，６９３，７９２号、第５，７１４，３５０号、および第５，７７７，０８５号を参照できる。本明細書において、「ヒト化抗体」という用語は、その意味の範囲内で、キメラヒト抗体およびＣＤＲ移植抗体を含む。

[0021] 抗体の可変領域においてフレームワーク領域（ＦＲ）の配列は、対応する抗原に対する特異的結合性に実質的な影響のない限り、特に限定されない。ヒト抗体のＦＲ領域を用いることが好ましいが、ヒト以外の動物種（例えばマウスやラット）のＦＲ領域を用いることもできる。

[0022] 抗体の一態様において、可変領域に加えて定常領域を含む（例えばIgG型抗体）。定常領域の配列は特に限定されない。例えば、公知のヒト抗体の定常領域を用いることができる。ヒト抗体の重鎖定常領域（ＣＨ）としては、ヒトイムノグロブリン（以下、ｈＩｇＧと表記する）に属すればいかなるものでもよいが、ｈＩｇＧクラスのものが好適であり、更にｈＩｇＧクラスに属するｈＩｇＧ１、ｈＩｇＧ２、ｈＩｇＧ３、ｈＩｇＧ４といったサブクラスのいずれも用いることができる。また、軽鎖定常領域（ＣＬ）としては、ｈＩｇに属すればいかなるものでもよく、κクラスあるいはλクラスのものを用いることができる。また、ヒト以外の動物種（例えばマウスやラット）の定常領域を用いることもできる。

[0023] 本明細書において、「改変体」や「改変抗体」とは、親抗体の可変領域（ＣＤＲ配列および／またはＦＲ配列）のアミノ酸配列に１または複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されていることである。

本発明において、「親抗体」とは、ＶＨは配列番号７、ＶＬは配列番号８で示されたアミノ酸配列を有するＴｆＲ４３６抗体である。アミノ酸配列において、１または数個（例えば、１から８個、好ましくは１から５個、より好ましくは１から３個、特に好ましくは１または２個）のアミノ酸が欠失、付加、置換及び／または挿入されている。ＴｆＲに対する結合活性を有する抗体のアミノ酸配列を調製するための、当業者によく知られた方法としては、タンパク質に変異を導入する方法が知られている。例えば、当業者であれば、部位特異的変異誘発法（Hashimoto-Gotoh, T, Mizuno, T, Ogasahara, Y, anＤＮＡkagawa, M. (1995) An oligodeoxyribonucleotide-directed dual amber method for site-directed mutagenesis. Gene 152, 271-275、Zoller, MJ, and Smith, M. (1983) Oligonucleotide-directed mutagenesis of ＤＮＡ fragments cloned into M13 vectors.Methods Enzymol. 100, 468-500、Kramer,W, Drutsa,V,Jansen,HW, Kramer,B, Pflugfelder,M, and Fritz,HJ (1984) The gapped duplex ＤＮＡ approach to oligonucleotide-directed mutation construction. Nucleic Acids Res. 12, 9441-9456、Kramer W,

and Fritz HJ (1987) Oligonucleotide-directed construction of mutations via gapped duplex ＤＮＡ Methods. Enzymol. 154, 350-367、Kunkel,TA (1985) Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection.Proc Natl Acad Sci ＵＳＡ. 82, 488-492）などを用いて、ＴｆＲに対する結合活性を有する抗体のアミノ酸配列に適宜変異を導入することにより、ＴｆＲに対する結合活性を有する抗体と機能的に同等な改変抗体を調製することができる。このように、抗体の可変領域又は定常領域において、１または数個のアミノ酸が変異しており、ＴｆＲに対する結合活性を有する抗体を使用することもできる。

[0024] 本明細書において、「活性が親抗体と同等である」とは、ヒトＴｆＲへの結合活性が同等であることを意味する。「同等」とは、必ずしも同程度の活性である必要はなく、活性が増強されていてもよいし、又、活性を有する限り活性が減少していてもよい。活性が減少している抗体としては、例えば、元の抗体と比較して３０％以上の活性、好ましくは５０％以上の活性、より好ましくは８０％以上の活性、さらに好ましくは９０％以上の活性、特に好ましくは９５％以上の活性を有する抗体を挙げることができる。

[0025] 結合活性としては、抗原を認識することを意味する。この抗原は、細胞膜に発現するｉｎｔａｃｔ ＴｆＲでもよいし、ｔｒｕｎｃｔｅｄ ｆｏｒｍや、可溶化ｆｏｒｍでも良い。また、立体構造を保ったＴｆＲでもよいし、変性したＴｆＲでもよい。たとえば、結合活性を検討する手段として、フローサイトメーター（ＦＡＣＳ）、酵素結合免疫吸着検定法（ＥＬＩＳＡ）、ｗｅｓｔｅｒｎ－ｂｌｏｔ、蛍光微量測定技術（ＦＭＡＴ）表面プラズモン共鳴（ＢＩＡｃｏｒｅ）などが挙げられる。

[0026] 抗体のＴｆ－ＴｆＲ結合阻害活性は、後記する「実施例２（２）Ｔｆ－ＴｆＲ結合阻害におけるＴｆＲ４３６抗体及び他社抗体の比較」に記載した方法に準じて測定することができる。ＴｆＲ溶液を基板（９６－ｗｅｌｌ ｐｌａｔｅ等）に分注して静置し、固相化し、ブロッキングする。次いで、ＨＲＰ標識したＴｆ溶液を分注し、さらに抗体を添加して、室温で反応させる

。その後、基板を洗浄し、発色試薬（ＴＭＢ等）を添加して反応させ、プレートリーダーで吸光度を測定する。上記操作により、当該抗体が、Ｔｆ－ＴｆＲ結合阻害活性を評価することができる。

[0027] 抗体の細胞内への鉄の取り込み阻害活性は、後記する「実施例３：ＴｆＲ４３６抗体の細胞増殖抑制効果に対するクエン酸鉄アンモニウムの効果」に記載した方法に準じて測定することができる。即ち、細胞を培養用メディウムに懸濁し、基板（９６ウエルプレートなど）に播種する。抗体を適当な濃度に連続希釈した溶液を作製し、上記細胞に添加する。さらに、クエン酸鉄アンモニウムを添加する。所定の期間、細胞を培養後、各ウエルをよく攪拌し、細胞培養液を別のプレート（例えば、Ｖ底９６－ｗｅｌｌプレートなど）に移す。そのうちの一部をＦＡＣＳ　Ｃａｌｉｂｕｒ（ＢＤ）に吸引させ、イベント数を測定する。得られたイベント数の４倍をウエルあたりの細胞数とし、抗体及びクエン酸鉄アンモニウム無添加のウエルにおける細胞数平均値を１００％として、各処理における増殖率を算出する。抗体が、濃度依存的に細胞の増殖を抑制し、この増殖停止が、クエン酸鉄アンモニウムの添加により回復する場合には、当該抗体が細胞内への鉄の取り込みを阻害することが実証される。

[0028] 抗体は、その由来で限定されず、ヒト抗体、マウス抗体、ラット抗体など、如何なる動物由来の抗体でもよい。又、キメラ化抗体、ヒト化抗体などでもよい。本発明における抗体の好ましい様態の一つとして、ヒト抗体である。

[0029] 抗体は、後述する抗体を産生する細胞や宿主あるいは精製方法により、アミノ酸配列、分子量、等電点又は糖鎖の有無や形態などが異なり得る。例えば、本発明で記載されているアミノ酸配列に翻訳後に修飾を受ける場合も本発明に含まれる。更に、既知の翻訳後修飾以外の部位に対する翻訳後修飾も、本発明に含まれる。また、抗体を原核細胞、例えば大腸菌で発現させた場合、本来の抗体のアミノ酸配列のN末端にメチオニン残基が付加される。本発明においては、このような抗体を使用してもよい。既知の翻訳後修飾以外の

部位に対する翻訳後修飾も、本発明に含まれる。

[0030] 抗体の作製

（１）ファージディスプレイライブラリーにより抗原と反応するｓｃＦｖ

抗体の取得は、当技術分野で知られているいくつかの方法に従って調製することができる。例えば、ファージディスプレイ技術を使用して、ＴｆＲに対する親和性が様々である抗体のレパートリーを含むライブラリーを提供することができる。次いで、これらのライブラリーをスクリーニングして、ＴｆＲに対する抗体を同定し単離することができる。好ましくは、ファージライブラリーは、ヒトＢ細胞から単離されたｍＲＮＡから調製されたヒトＶＬおよびＶＨｃＤＮＡを使用して生成されるｓｃＦｖファージディスプレイライブラリーである。そのようなライブラリーを調製しスクリーニングする方法は当技術分野で知られている。ヒトＴｆＲを抗原としてスクリーニングした反応性を示すファージクローンから遺伝物質を回収する。選択されたファージの遺伝子を解析すれば、抗原に結合するヒト抗体の可変領域をコードするＶＨ及びＶＬのＤＮＡ配列を決定することができる。このｓｃＦｖの配列を用いて、ｓｃＦｖをＩｇＧ化すれば、ヒト抗体を取得することができる。

[0031] （２）ｓｃＦｖのＩｇＧ化（ヒト抗体の作製）

Ｈ鎖またＬ鎖の発現ベクターを作製し、宿主細胞に発現させ、分泌した上清の回収・精製によりヒト抗体を取得する。また、ＶＨ及びＶＬを同一ベクターに発現すること（タンデム型）によりヒト抗体の取得もできる。これらの方法は周知であり、ＷＯ９２/０１０４７、ＷＯ９２/２０７９１、ＷＯ９３/０６２１３、ＷＯ９３/１１２３６、ＷＯ９３/１９１７２、ＷＯ９５/０１４３８、ＷＯ９５/１５３８８、ＷＯ９７/１０３５４などを参考にすることができる。

[0032] 具体的には、ＶＨをコードするＤＮＡを、重鎖定常領域（ＣＨ１、ＣＨ２およびＣＨ３）をコードする他のＤＮＡ分子と連結することによって、完全長重鎖遺伝子を取得することができる。ヒト重鎖定常領域遺伝子の配列は当技術分野で知られており（例えば、Ｋａｂａｔ，Ｅ．Ａ．ら、（１９９１）

Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ、第５版、Ｕ．Ｓ．Ｄｅｐａｒｔｍｅｎｔ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ ａｎｄ Ｈｕｍａｎ Ｓｅｒｖｉｃｅｓ、ＮＩＨ Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ Ｎｏ．９１－３２４２）、これらの領域を包含するＤＮＡ断片は標準的なＰＣＲ増幅によって得ることができる。重鎖定常領域は、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ、ＩｇＥ、ＩｇＭまたはＩｇＤの定常領域でよいが、最も好ましくはＩｇＧ１またはＩｇＧ２の定常領域である。ＩｇＧ１定常領域配列は、Ｇｍ（１）、Ｇｍ（２）、Ｇｍ（３）やＧｍ（１７）など、異なる個人間で生じることが知られている任意の様々な対立遺伝子またはアロタイプでよい。これらのアロタイプは、ＩｇＧ１定常領域中の天然に存在するアミノ酸置換に相当する。

[0033] ＶＬをコードするＤＮＡを、軽鎖定常領域ＣＬをコードする他のＤＮＡ分子と連結することによって、完全長Ｌ鎖遺伝子（ならびにＦａｂ軽鎖遺伝子）を取得することができる。ヒト軽鎖定常領域遺伝子の配列は当技術分野で知られており（例えば、Ｋａｂａｔ，Ｅ．Ａ．ら、（１９９１）Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ、第５版、Ｕ．Ｓ．Ｄｅｐａｒｔｍｅｎｔ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ ａｎｄ Ｈｕｍａｎ Ｓｅｒｖｉｃｅｓ、ＮＩＨ Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ Ｎｏ．９１－３２４２）、これらの領域を包含するＤＮＡ断片は標準的なＰＣＲ増幅によって得ることができる。軽鎖定常領域は、κまたはλの定常領域でよい。κ定常領域は、Ｉｎｖ（１）、Ｉｎｖ（２）やＩｎｖ（３）など、異なる個人間で生じることが知られている任意の様々な対立遺伝子でよい。λ定常領域は、３つのλ遺伝子のいずれかに由来するものでよい。

[0034] 上記のように得られたＨ鎖またＬ鎖コードするＤＮＡを発現ベクター中に挿入することにより、発現ベクターを作製し、宿主細胞に発現させ、分泌した上清の回収・精製によりヒト抗体を取得する。発現ベクターには、プラスミド、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）、

カリフラワーモザイクウイルスやタバコモザイクウイルスなどの植物ウイルス、コスミド、ＹＡＣ、ＥＢＶ由来エピソームなどが挙げられる。発現ベクターおよび発現調節配列は、使用する発現用宿主細胞と適合するように選択する。抗体軽鎖遺伝子および抗体重鎖遺伝子は、別々のベクター中に挿入することができるし、また両方の遺伝子を同じ発現ベクター中に挿入することもできる。抗体遺伝子を、標準的な方法（例えば、抗体遺伝子断片上の相補的な制限部位とベクターの連結、または制限部位が存在しない場合には平滑末端連結）によって発現ベクター中に挿入する。

[0035] 好都合なベクターは、上記に記載のように任意のＶＨまたはＶＬ配列を容易に挿入し発現させることができるように工学的に作製された適当な制限部位を有する機能的に完全なヒトＣＨまたはＣＬイムノグロブリン配列をコードするものである。そのようなベクターでは、通常、挿入されたＪ領域中のスプライス供与部位とヒトＣドメインに先行するスプライス受容部位の間で、またヒトＣＨエキソン内に存在するスプライス領域でもスプライシングが起こる。ポリアデニル化および転写終結は、コード領域の下流にある天然の染色体部位で起こる。組換え発現ベクターはまた、宿主細胞由来の抗体鎖の分泌を促進するシグナルペプチドをコードすることもできる。抗体鎖遺伝子は、シグナルペプチドがインフレームでイムノグロブリン鎖のアミノ末端と連結するようにベクター中にクローン化することができる。シグナルペプチドは、イムノグロブリンシグナルペプチドでもよく、あるいは異種性シグナルペプチド（すなわち非イムノグロブリンタンパク質由来のシグナルペプチド）でもよい。

[0036] 抗体の発現ベクターは、抗体遺伝子および制御配列に加えて、宿主細胞中でのベクターの複製を制御する配列（例えば複製起点）や選択マーカー遺伝子などのさらなる配列を有してよい。選択マーカー遺伝子は、ベクターが導入されている宿主細胞の選択を促進する。例えば、通常、選択マーカー遺伝子は、ベクターが導入されている宿主細胞上に、Ｇ４１８、ハイグロマイシンやメトトレキセートなどの薬物に対する耐性を付与する。好ましい選択マ

ーカー遺伝子には、デヒドロ葉酸レダクターゼ（ＤＨＦＲ）遺伝子（ｄｈｆｒ－宿主細胞でメトトレキセート選択／増幅とともに使用する）、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子（Ｇ４１８選択用）、およびグルタミン酸合成酵素遺伝子がある。

[0037] 以上の方法で作製された抗体遺伝子発現ベクターにより宿主細胞を形質転換する。宿主細胞としては細菌、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞など、抗体を産生させる可能であればいかなる細胞でもよいが、動物細胞が好ましい。動物細胞として、チャイニーズハムスター卵巣細胞ＣＨＯ/ｄｈｆｒ（－)細胞ＣＨＯ/ＤＧ４４細胞、サル由来細胞ＣＯＳ細胞(A.Wright& S.L.Morrison, J.Immunol.１６０，３３９３－３４０２（１９９８))、ＳＰ２／Ｏ細胞(マウスミエローマ)(K.Motmans et al., Eur.J.Cancer Prev.５，５１２－５１９９(１９９６),R.P.Junghans et al.,Cancer Res.５０，１４９５－１５０２（１９９０)）など挙げられる。また、形質転換にはリポフェクチン法(R.W.Malone et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA ８６,６００７（１９８９),P.L.Felgner et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA ８４,７４１３（１９８７)、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法(F.L.Graham & A.J.van der Eb,Virology ５２，４５６－４６７(１９７３))、ＤＥＡＥ-Ｄｅｘｔｒａｎ法等が好適に用いられる。

[0038] 形質転換体を培養した後、形質転換体の細胞内又は培養液よりヒト抗体を分離する。抗体の分離・精製には、遠心分離、硫安分画、塩析、限外濾過、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーなどの方法を適宜組み合わせて利用することができる。

[0039] 抗体断片

抗体を基にして又は抗体をコードする遺伝子の配列情報を基にして抗体断片を作製することができる。抗体断片としてはＦａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ(ａｂ’)$_2$、ｓｃＦｖ、ｄｓＦｖ抗体が挙げられる。

[0040] Ｆａｂは、ＩｇＧをシステイン存在下パパイン消化することにより得られ

る、Ｌ鎖とＨ鎖可変領域、並びにＣＨ１ドメイン及びヒンジ部の一部からなるＨ鎖フラグメントとから構成される分子量約５万の断片である。本発明では、上記抗体をパパイン消化することにより得ることができる。また、上記抗体のＨ鎖の一部及びＬ鎖をコードするＤＮＡを適当なベクターに組み込み、当該ベクターを用いて形質転換した形質転換体よりＦａｂを調製することもできる。

[0041] Ｆａｂ’は、後述のＦ（ａｂ’）$_2$のＨ鎖間のジスルフィド結合を切断することにより得られる分子量が約５万の断片である。本発明では、上記抗体をペプシン消化し、還元剤を用いてジスルフィド結合を切断することにより得られる。また、Ｆａｂ同様に、Ｆａｂ’をコードするＤＮＡを用いて遺伝子工学的に調製することもできる。

[0042] Ｆ（ａｂ’）$_2$は、ＩｇＧをペプシン消化することにより得られる、Ｌ鎖とＨ鎖可変領域、並びにＣＨ１ドメイン及びヒンジ部の一部からなるＨ鎖フラグメントとから構成される断片（Ｆａｂ’）がジスルフィド結合で結合した分子量約１０万の断片である。本発明では、上記抗体をペプシン消化することにより得られる。また、Ｆａｂ同様に、Ｆ（ａｂ’）$_2$をコードするＤＮＡを用いて遺伝子工学的に調製することもできる。

[0043] ｓｃＦｖは、Ｈ鎖可変領域とＬ鎖可変領域とからなるＦｖを、片方の鎖のＣ末端と他方のＮ末端とを適当なペプチドリンカーで連結し一本鎖化した抗体断片である。ペプチドリンカーとしては例えば柔軟性の高い（ＧＧＧＧＳ）$_3$などを用いることができる。例えば、上記抗体のＨ鎖可変領域及びＬ鎖可変領域をコードするＤＮＡとペプチドリンカーをコードするＤＮＡを用いてｓｃＦｖ抗体をコードするＤＮＡを構築し、これを適当なベクターに組み込み、当該ベクターを用いて形質転換した形質転換体よりｓｃＦｖを調製することができる。

[0044] ｄｓＦｖは、Ｈ鎖可変領域及びＬ鎖可変領域の適切な位置にＣｙｓ残基を導入し、Ｈ鎖可変領域とＬ鎖可変領域とをジスルフィド結合により安定化させたＦｖ断片である。各鎖におけるＣｙｓ残基の導入位置は分子モデリング

により予測される立体構造に基づき決定することができる。本発明では例えば上記抗体のＨ鎖可変領域及びＬ鎖可変領域のアミノ酸配列から立体構造を予測し、かかる予測に基づき変異を導入したＨ鎖可変領域及びＬ鎖可変領域をそれぞれコードするＤＮＡを構築し、これを適当なベクターに組み込み、そして当該ベクターを用いて形質転換した形質転換体よりｄｓＦｖを調製することができる。

[0045] 尚、適当なリンカーを用いてｓｃＦｖ抗体、ｄｃＦｖ抗体などを連結させたり、ストレプトアビジンを融合させたりして抗体断片を多量体化することもできる。

[0046] 医薬組成物及び製剤

本発明の阻害剤を含む医薬組成物及び製剤も本発明の範囲内に含まれる。

本発明の阻害剤は、細胞内への鉄の過剰取り込みを伴う疾患又は症状の処置のために使用することができる。

細胞内への鉄の取り込み過剰を伴う疾患又は症状としては、鉄過剰症等を挙げることができる。

[0047] 医薬組成物及び製剤は、好ましくは、抗体に加え、生理学的に許容され得る希釈剤又はキャリアを含んでおり、他の薬剤との混合物であってもよい。適切なキャリアには、生理的食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水グルコース液、及び緩衝生理食塩水が含まれるが、これらに限定されるものではない。或いは、抗体は凍結乾燥（フリーズドライ）し、必要とされるときに上記のような緩衝水溶液を添加することにより再構成して使用してもよい。投与形態としては、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、シロップ剤等による経口投与、又は、注射剤（皮下注、静注、筋注、腹腔内注など）、経皮、経粘膜、経鼻、経肺、坐薬等による非経口投与を挙げることができる。本発明の医薬組成物による製剤単独の投与でもよいし、他の薬剤と併用でもよい。

[0048] 本発明の阻害剤の投与量は、症状、年齢、体重などによって異なるが、通常、経口投与では、抗体の量として、成人に対して、１日約０．０１ｍｇ～

１０００ｍｇであり、これらを１回、又は数回に分けて投与することができる。また、非経口投与では、１回約０．０１ｍｇ～１０００ｍｇを皮下注射、筋肉注射又は静脈注射によって投与することができる。

[0049] 以下の実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

実施例

[0050] 以下の実施例においては、国際公開ＷＯ２０１４／０７３６４１号公報の段落００９０及び００９１に記載されているＴｆＲ４３６抗体を使用した。

[0051] ＴｆＲ４３６抗体のＣＤＲ配列を以下に示す。

ＶＨ　ＣＤＲ１：ＳＹＧＭＨ（配列番号１）

ＶＨ　ＣＤＲ２：ＶＩＳＹＤＧＳＮＫＹＹＡＤＳＶＫＧ（配列番号２）

ＶＨ　ＣＤＲ３：ＤＳＮＦＷＳＧＹＹＳＰＶＤＶ（配列番号３）

ＶＬ　ＣＤＲ１：ＴＲＳＳＧＳＩＡＳＮＳＶＱ（配列番号４）

ＶＬ　ＣＤＲ２：ＹＥＤＴＱＲＰＳ（配列番号５）

ＶＬ　ＣＤＲ３：ＱＳＹＤＳＡＹＨＷＶ（配列番号６）

[0052] ＴｆＲ４３６抗体のＶＨ配列及びＶＬ配列を以下に示す。

ＴｆＲ４３６　ＶＨ(配列番号７）

ＤＶＱＬＶＱＳＧＧＧＶＶＱＰＧＲＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＦＰＦＫＳＹＧＭ
ＨＷＶＲＱＡＰＧＫＧＬＥＷＶＡＶＩＳＹＤＧＳＮＫＹＹＡＤＳＶＫＧＲＦ
ＴＩＳＲＤＮＳＫＮＴＬＹＬＱＭＮＳＬＲＧＥＤＴＡＶＹＹＣＡＲＤＳＮＦ
ＷＳＧＹＹＳＰＶＤＶＷＧＱＧＴＴＶＴＶＳＳ

[0053] ＴｆＲ４３６　ＶＬ(配列番号８）

ＮＦＭＬＴＱＰＨＳＶＳＥＳＰＧＫＴＶＴＩＳＣＴＲＳＳＧＳＩＡＳＮＳＶ
ＱＷＹＱＱＲＰＧＳＡＰＩＴＶＩＹＥＤＴＱＲＰＳＧＶＰＤＲＦＳＧＳＩＤ
ＳＳＳＮＳＡＳＬＴＩＳＧＬＱＴＥＤＥＡＤＹＹＣＱＳＹＤＳＡＹＨＷＶＦ
ＧＧＧＴＫＬＡＶＬ

[0054] 実施例１：ＴｆＲ４３６抗体の結合部位の同定

ＴｆＲ４３６抗体はマウスＴｆＲと交差反応しないが、ハムスターＴｆＲ

と交差反応性を示した。ＴｆＲにおけるＴｒａｎｓｆｅｒｒｉｎ（ＴＦ）結合部位（５６９～７６０番目のアミノ酸）のアミノ酸配列のアライメントを行った。ヒトＴｆＲ配列において、ハムスターと同じ、マウスと異なるアミノ酸をピックアップした。ピックアップされたアミノ酸を図１に示されたようにｐｏｉｎｔ　ｍｕｔａｔｉｏｎを行い、可溶性ＴｆＲ　ｍｕｔａｎｔ　ｆｒａｇｍｅｎｔを作製した。

[0055] （１）可溶性ｗｉｌｄ　ｔｙｐｅ　ＴｆＲ（ｓＴｆＲ）及びＴｆＲ　ｍｕｔａｎｔ　ｆｒａｇｍｅｎｔ（ＭＦ１～ＭＦ７）の作製

ヒトＴｆＲ細胞外ｄｏｍａｉｎ（８９～７６０番目のアミノ酸）、あるいは図１に示されたそれぞれＴｆＲ　ｍｕｔａｎｔ　ｆｒａｇｍｅｎｔ（ＭＦ１～ＭＦ７）とＡＡＡＲＧＧＰＥＱＫＬＩＳＥＥＤＬＮＳＡＶＤＨＨＨＨＨＨ（配列番号１０）をコードする塩基配列を全合成した。発現ｖｅｃｔｏｒ　ｐＣＡＧＧＳ（非特許文献２．：Ｎｉｗａ　ｅｔ　ａｌ．　１９９１）にネオマイシン耐性遺伝子とＤＨＦＲ遺伝子を組み込んだベクターのマルチクローニングサイトにそれぞれ合成した遺伝子を挿入し、ｐＣＡＧＧＳ－Ｎｅｏ－ＤＨＦＲ－ｓＴＦＲ－ｍｙｃ－ｈｉｓ発現ｐｌａｓｍｉｄを作製した。Ｅｘｐｉｆｅｃｔａｍｉｎｅ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を用いてＥｘｐｉ２９３細胞（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）に上記ｐｌａｓｍｉｄをトランスフェクションし、３７℃、８％ＣＯ２、１３５ｒｐｍで５日間培養した。その後遠心により培養上清を回収し、ＡＫＴＡ　ｐｒｉｍｅ（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）にＨｉｓＴｒａｐＨＰ（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）カラムを接続し、結合バッファーに２０ｍＭ　Ｉｍｉｄａｚｏｌｅ／ＤＰＢＳ、溶出バッファーに５００ｍＭ　Ｉｍｉｄａｚｏｌｅ／ＤＰＢＳを用いてｓＴｆＲあるいはＭＦ１～ＭＦ７を精製した。溶出したタンパク質はＺｅｂａ　ｓｐｉｎ　ｃｏｌｕｍｎ　（Ｔｈｅｒｍｏ　ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を用いて３０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ、５％ｔｒｅｈａｌｏｓｅ、ｐＨ７．２にバッファー交換した。

[0056] （２）ＴｆＲ４３６抗体の結合部位の同定

上記精製したｓＴｆＲあるいはＭＦ１～ＭＦ７をＰＢＳＴ（Ｐｈｏｓｐｈａｔｅ Ｂｕｆｆｅｒｅｄ Ｓａｌｉｎｅ ｗｉｔｈ Ｔｗｅｅｎ２０，ＴａＫａＲａ） にて希釈し、６００ｎｇ／ｍＬから３倍希釈で７段階に調製した。その後Ｎｉ－ＮＴＡ ＨｉｓＳｏｒｂ Ｓｔｒｉｐｓ ９６－ｗｅｌｌ ｐｌａｔｅ（ＱＩＡＧＥＮ）に希釈液を１００μＬ／ｗｅｌｌに分注し、シェーカーに乗せ、室温で反応させた。１時間後ＰＢＳＴ Ｂｕｆｆｅｒで５回洗浄し、ＴｆＲ４３６抗体（１ｕｇ／ｍＬ）を１００μＬ／ｗｅｌｌに分注し、シェーカーに乗せ、室温で１時間反応させた。その後、ＰＢＳ－Ｔ Ｂｕｆｆｅｒで５回洗浄し、５０，０００倍希釈した二次抗体Ｆ（ａｂ’）２ Ｆｒａｇｍｅｎｔ Ａｎｔｉ－Ｈｕｍａｎ ＩｇＧ Ｆｃγ（Ｊａｃｋｓｏｎ Ｉｍｍｕｎｏ Ｒｅｓｅａｒｃｈ）１００μＬ／ｗｅｌｌに分注し室温で１時間反応させた。ＰＢＳＴ Ｂｕｆｆｅｒで５回洗浄後ＴＭＢ Ｓｏｌｕｂｌｅ Ｒｅａｇｅｎｔ（Ｈｉｇｈ Ｓｅｎｓｉｔｉｖｉｔｙ）（Ｓｃｙ Ｔｅｋ）を１００μＬ／ｗｅｌｌに分注し、室温、暗所で３分間反応させた後、ＴＭＢ Ｓｔｏｐ Ｂｕｆｆｅｒ（Ｓｃｙ Ｔｅｋ）を１００μＬ／ｗｅｌｌ添加し、１分間シェーカーで振とうさせ、プレートリーダーで４５０ｎ（ｒｅｆ．６２０ｎｍ）の吸光度を測定した。

[0057] 結果は図２に示すように、ＴｆＲ４３６抗体はＴｆＲ ｍｕｔａｎｔ ｆｒａｇｍｅｎｔ ＭＦ５との反応性低下がみられたが、その他のｍｕｔａｎｔ ｆｒａｇｍｅｎｔとの反応性の低下は見られなかった。つまり、ＴｆＲの６２９番目、６３０番目、６３３番目のアミノ酸を他のアミノ酸に置換すると、ＴｆＲ４３６抗体がＴｆＲと認識できなくなる。アミノ酸６２９番目～６３３番目はＴｆＲ４３６抗体の認識エピトープであることが示唆された。

[0058] 実施例２：Ｔｆ－ＴｆＲ結合阻害におけるＴｆＲ４３６抗体及び比較用抗体の比較

（１）比較用抗体Ａ２４の作製

特許文献ＵＳ２００８／０１９３４５３にヒトＴｆＲに対するＡ２４抗体

が記載されている。ＴｆＲ４３６抗体とこの抗体を比較するため、寄託されたＨｙｂｒｉｄｏｍａを入手し、抗体を生産した。具体的には、Ｈｙｂｒｉｄｏｍａ　をＲＰＭＩ１６４０　（ＧＩＢＣＯ）、ＦＢＳ１０％の培地に細胞濃度が１～２ｘ１０^{5}／ｍＬになるようにまきこみ、３７℃の５％CO_2インキュベーターで培養した。拡大培養後、遠心により細胞を回収し、ＰＢＳで２回洗浄後無血清培地ｃｏｓｍｅｄｉｕｍ００５　（コスモバイオ）、０．５％　Ｎｕｔｒｉｄｏｍａ－ＣＳ　（Ｒｏｃｈｅ）にてさらに５５０ｍＬになるまで拡大培養した。細胞がコンフルエントになってから５日後に遠心により培養上清を回収した。

[0059]　回収された上清をプロテインＡ担体（Ａｂ－Ｃａｐｃｈｅｒ　ＥｘＴｒａ：プロテノバ社）にアプライし、プロテインＡ　と結合している抗体を０．１　Ｍグリシン塩酸緩衝液（ｐＨ　２．７）で溶出し、速やかに１Ｍ　Ｔｒｉｓ塩酸緩衝液（ｐＨ　８．５）で中和した。その後ウルトラセル限外ろ過ディスク（Ｍｅｒｃｋ　Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）を用いてＰＢＳにバッファー交換を行った。

[0060]（２）Ｔｆ－ＴｆＲ結合阻害におけるＴｆＲ４３６抗体及び他社抗体の比較

実施例１に記載されたｓＴｆＲをＰＢＳＴにて５．０μｇ／ｍＬになるように調整し、ＭａｘｉＳｏｒｐ　９６－ｗｅｌｌ　ｐｌａｔｅ（Ｎｕｎｃ）に希釈液を１００μＬ／ｗｅｌｌに分注して４℃で一晩静置し固相化した。翌日に固相液を捨て、１００％ブロックエース（ＤＳ　Ｐｈａｒｍａ　Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌ）２００μＬ／ｗｅｌｌで室温静置しブロッキングした。１時間後ＰＢＳＴ　Ｂｕｆｆｅｒで５回洗浄後、ＨＲＰ標識したＴｆ（２ｕｇ／ｍＬ）５０μＬ／ｗｅｌｌを分注し、更にＴｆＲ４３６抗体、Ａ２４抗体（１０μｇ／ｍＬから２倍希釈系列）またはｈｏｌｏ－Ｔｆ（Ｓｉｇｍａ）３００μｇ／ｍＬから２倍希釈系列）を５０μＬ／ｗｅｌｌで添加した。室温で１時間反応させた後、ＰＢＳＴ　Ｂｕｆｆｅｒで５回洗浄し、ＴＭＢ　Ｓｏｌｕｂｌｅ　Ｒｅａｇｅｎｔ（Ｈｉｇｈ　Ｓｅｎｓｉｔｉｖｉｔｙ）を１００μＬ／ｗｅｌｌに分注し、室温暗所で反応させた。２５分間後、Ｔ

ＭＢ　Ｓｔｏｐ　Ｂｕｆｆｅｒを１００μＬ／ｗｅｌｌ添加し、１分間シェーカーで震とうさせた、プレートリーダーで４５０ｎｍ　（ｒｅｆ．６２０ｎｍ）の吸光度を測定した。

[0061] 結果は図３に示すように、ＴｆＲ４３６抗体は遥かに低い用量で（１００ｎｇ／ｍＬ）完全にＴｆ－ＴｆＲの結合を阻害した。一方、Ａ２４抗体は１０　μｇ／ｍＬの用量でも完全にＴｆ－ＴｆＲの結合を阻害できず、Ｔｆ－ＴｆＲの結合を５０％しか阻害できなかった。Ｔｆ－ＴｆＲの結合阻害において、ＴｆＲ４３６抗体が優れていることが示唆された。

[0062] 実施例３：ＴｆＲ４３６抗体の細胞増殖抑制効果に対するクエン酸鉄アンモニウムの効果

上記の実験結果に示すように、ＴｆＲ４３６抗体はＴｆＲアミノ酸６２９番目～６３３番目を認識し、完全にＴｆ－ＴｆＲの結合を阻害する。この阻害により、細胞内への鉄の取り込みが完全に阻害される。つまり、ＴｆＲ４３６抗体は細胞内への鉄の取り込み阻害剤である。鉄は細胞の生存や増殖に不可欠な物質であり、細胞内鉄欠乏になると細胞増殖停止や細胞死が起こる。ＴｆＲ４３６抗体が細胞の増殖を抑制するかどうか、またこの増殖抑制は鉄欠乏原因であることについてｎｏｎ－ｔｒａｓｆｅｒｒｉｎ　ｂｏｕｎｄ　ｉｒｏｎ　ｕｐｔａｋｅの鉄ドナーとして知られているクエン酸鉄アンモニウムを用いて検討した。具体的には、Ｋ５６２細胞を細胞数が５０００個／ｍｌとなるよう培養用メディウム（ＲＰＭＩ１６４０、１０％ＦＢＳ、１％Ｐ／Ｓ）に懸濁し、９６ウエルプレートに１００μｌ／ｗｅｌｌずつ播種した。ＴｆＲ４３６抗体を１００μｇ／ｍｌから５倍連続希釈した溶液を作製し、Ｋ５６２細胞に５０μＬずつ添加した（最終濃度：２５～０．３μｇ／ｍｌ）。更に、１２０μＭのクエン酸鉄アンモニウム（和光純薬）５０μＬを添加した（最終濃度：３０μＭ）。３７℃の５％CO_2インキュベータ内に９６時間で培養後、各ウエルをよく攪拌し、１５０μｌの細胞培養液をＶ底９６－ｗｅｌｌプレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ）に移し、その２５μｌをＦＡＣＳ　Ｃａｌｉｂｕｒ（ＢＤ）に吸引させ、イベント数を測定した。得られ

たイベント数の４倍をウエルあたりの細胞数とし、抗体及びクエン酸鉄アンモニウム無添加のウエルにおける細胞数平均値を１００％として、各処理における増殖率を算出した。

[0063] 結果は図４に示すように、ＴｆＲ４３６抗体は濃度依存的にＫ５６２の増殖を抑制した。この増殖停止は、クエン酸鉄アンモニウムの添加により回復した。この結果より、ＴｆＲ４３６抗体が細胞内への鉄の取り込みを阻害することが示唆された。

[0064] 実施例４：ＴｆＲ４３６抗体の添加による細胞株内鉄量の変化

Ｋ５６２細胞株を用いて、ＴｆＲ４３６抗体の添加による細胞内鉄量変化を確認した。具体的には、Ｋ５６２細胞を０．５ｘ１０^{5}ｃｅｌｌｓ／ｍＬになるように播種したＴ１５０フラスコ（ＩＭＤＭ＋１０％－ＦＢＳ；６０ｍＬ）に対して、ＴｆＲ４３６抗体を終濃度５μｇ／ｍＬになるように添加した。比較対照として、ＴｆＲ００６抗体（特許５９８０２０２号に記載）、Ａ２４抗体、ヒトモノクローナルＩｇＧ１抗体（Ｎｅｇａ　ｍＡｂ）、及びＤＰＢＳ緩衝液（未処理）を用意し、ＴｆＲ４３６抗体と同様に添加した。３７℃、５％－CO_2インキュベーターにて９６時間培養した後、各サンプルの細胞数をカウントし、１．０ｘ１０^{7}ｃｅｌｌｓを回収した。細胞はＤＰＢＳにて３回洗浄した後、細胞ペレットに２５０μＬのＬｙｓｉｓＭ　Ｒｅａｇｅｎｔ（Ｒｏｃｈｅ；　ｃａｔ．＃　０４　７１９　９５６　００１）と２．５μＬの６Ｎ－ＨＣｌを添加・混和し、室温にて１時間静置した。遠心後、回収した上清を鉄定量に用いた。鉄定量は、メタロアッセイ鉄測定ＬＳ（フェロジン法）（Ｍｅｔａｌｌｏｇｅｎｉｃｓ；　ｃａｔ．＃ＦＥ３１Ｍ）に従い実施した。結果を図５に示した。

[0065] 結果は図５に示すように、未処理、Ｎｅｇａ　ｍＡｂ、ＴｆＲ００６、ＴｆＲ４３６及びＡ２４を添加したＫ５６２細胞内の鉄量は、それぞれ１．１５、１．２０、０．２７、０．２５及び０．８１ｎｍｏｌとなった。このことから、抗ＴｆＲ抗体添加により、細胞内へのトランスフェリン鉄取込みが抑制され、鉄量が減少することが示唆された。また、Ａ２４抗体と比較して

ＴｆＲ００６抗体とＴｆＲ４３６抗体は、鉄取込み抑制効果が高いことが明らかとなった。さらに、この実験結果は、ＴｆＲ００６抗体よりＴｆＲ４３６抗体で、鉄取込み抑制効果が高いことを示している。

請求の範囲

[請求項1] ヒトトランスフェリンレセプターの６２９番目～６３３番目のアミノ酸を認識する抗体を含む、細胞内への鉄の取り込み阻害剤。

[請求項2] ヒトトランスフェリンとヒトトランスフェリンレセプターとの結合を阻害することにより、細胞内への鉄の取り込みを阻害する、請求項１に記載の阻害剤。

[請求項3] 前記抗体が、重鎖第１相補性決定領域（VH CDR1）、重鎖第２相補性決定領域（VH CDR2）、重鎖第３相補性決定領域（VH CDR3）がそれぞれ配列番号１、２、３であり、及び軽鎖第１相補性決定領域（VL CDR1）、軽鎖第２相補性決定領域（VL CDR2）、軽鎖第３相補性決定領域（VL CDR3）がそれぞれ配列番号４、５、６である抗体である、請求項１または２に記載の阻害剤。

[請求項4] 前記抗体が、重鎖が配列番号７を有し、軽鎖が配列番号８を有する抗体である、請求項１から３の何れか一項に記載の阻害剤。

[請求項5] 抗体がヒト抗体又はヒト化抗体である、請求項１から４の何れか一項に記載の阻害剤。

[請求項6] 抗体が、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$、一本鎖抗体（ｓｃＦｖ）、二量体化V領域（Ｄｉａｂｏｄｙ）、ジスルフィド安定化V領域（ｄｓＦｖ）およびＣＤＲを含むペプチドからなる群から選ばれる抗体断片である、請求項１から５の何れか一項に記載の阻害剤。

[請求項7] 細胞内への鉄の過剰取り込みを伴う疾患又は症状の処置のために使用される、請求項１から６の何れか一項に記載の阻害剤。

[請求項8] ヒトトランスフェリンレセプターの６２９番目～６３３番目のアミノ酸を認識する抗体を含む、ヒトトランスフェリンとヒトトランスフェリンレセプターとの結合阻害剤。

[請求項9] 前記抗体が、重鎖第１相補性決定領域（VH CDR1）、重鎖第２相補性決定領域（VH CDR2）、重鎖第３相補性決定領域（VH CDR3）がそれぞれ配列番号１、２、３であり、及び軽鎖第１相補性決定領域（VL CDR

1）、軽鎖第２相補性決定領域（VL CDR2）、軽鎖第３相補性決定領域（VL CDR3）がそれぞれ配列番号４、５、６である抗体である、請求項８に記載の阻害剤。

[請求項10] 前記抗体が、重鎖が配列番号７を有し、軽鎖が配列番号８を有する抗体である、請求項８又は９に記載の阻害剤。

[請求項11] 抗体がヒト抗体又はヒト化抗体である、請求項８から１０の何れか一項に記載の阻害剤。

[請求項12] 抗体が、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$、一本鎖抗体（ｓｃＦｖ）、二量体化V領域（Ｄｉａｂｏｄｙ）、ジスルフィド安定化V領域（ｄｓＦｖ）およびＣＤＲを含むペプチドからなる群から選ばれる抗体断片である、請求項８から１１の何れか一項に記載の阻害剤。

[請求項13] 細胞内への鉄の過剰取り込みを伴う疾患又は症状の処置のために使用される、請求項８から１２の何れか一項に記載の阻害剤。