

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2015-67611
(P2015-67611A)

(43) 公開日 平成27年4月13日(2015.4.13)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
CO7K 14/47 (2006.01)	CO7K 14/47 ZNA	2G045
CO7K 16/32 (2006.01)	CO7K 16/32	4B065
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53 N	4C084
GO1N 33/543 (2006.01)	GO1N 33/543 541A	4C085
GO1N 33/50 (2006.01)	GO1N 33/50 Z	4H045

審査請求 有 請求項の数 16 O L (全 16 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-191706 (P2014-191706)
 (22) 出願日 平成26年9月19日(2014.9.19)
 (31) 優先権主張番号 102135112
 (32) 優先日 平成25年9月27日(2013.9.27)
 (33) 優先権主張国 台湾(TW)
 (31) 優先権主張番号 103127229
 (32) 優先日 平成26年8月8日(2014.8.8)
 (33) 優先権主張国 台湾(TW)

(71) 出願人 514239420
 李光輝
 台湾台北市北投區林泉里5鄰中山路47號
 5F-1
 (74) 代理人 110000671
 八田国際特許業務法人
 (72) 発明者 李光輝
 台湾台北市北投區林泉里5鄰中山路47號
 5F-1
 (72) 発明者 尉軍
 中華人民共和国, 吉林省長春市水郷人家1
 9棟406室
 Fターム(参考) 2G045 AA26
 4B065 AA90X BA30 CA24 CA25 CA44
 CA46

最終頁に続く

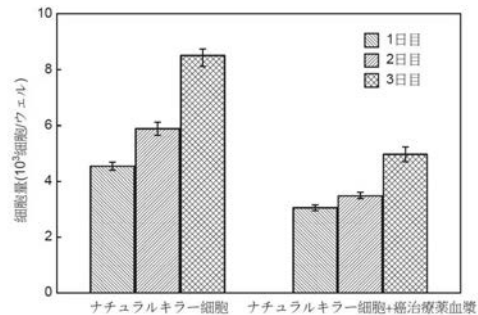
(54) 【発明の名称】 抗癌医薬組成物の選抜に用いるポリペプチド及びその応用

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 少なくとも一種のATP結合カセットトランスポーター抗体と結合するポリペプチドの提供。

【解決手段】 血液、血漿、又は血清試料中のATP結合カセットトランスポーター抗体の検出及び定量に用いるポリペプチド。更にATP結合カセットトランスポーター抗体を多く含む試料を選抜し、薬剤抵抗性癌細胞を死滅させる為の抗癌医薬組成物の使用。

【選択図】 図3



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

配列番号 1 ~ 7 からなる群から選択される少なくとも一のアミノ酸配列を有する、ポリペプチド。

【請求項 2】

少なくとも一種の A T P 結合カセットトランスポーター抗体と結合する、請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 3】

配列番号 1 ~ 7 からなる群から選択される少なくとも一のアミノ酸配列を有する、抗癌医薬組成物を選抜するための、ポリペプチドの使用。

10

【請求項 4】

人体から分離された血液、血漿、又は血清から前記抗癌医薬組成物を選抜する、請求項 3 に記載のポリペプチドの使用。

【請求項 5】

前記抗癌医薬組成物は、A T P 結合カセットトランスポーター抗体を少なくとも一種含む、請求項 3 に記載のポリペプチドの使用。

【請求項 6】

前記抗癌医薬組成物は、ナチュラルキラー細胞の癌細胞死滅能力を上昇させる、請求項 5 に記載のポリペプチドの使用。

【請求項 7】

前記抗癌医薬組成物は、化学療法と相乗作用して薬剤抵抗性癌細胞の量を抑える、請求項 5 に記載のポリペプチドの使用。

20

【請求項 8】

配列番号 1 ~ 7 からなる群から選択される少なくとも一のアミノ酸配列を有するポリペプチドと結合する抗体。

【請求項 9】

ナチュラルキラー細胞の癌細胞死滅能力を上昇させる、請求項 8 に記載の抗体。

【請求項 10】

化学療法と相乗作用して薬剤抵抗性を有する癌細胞の量を抑える、請求項 8 に記載の抗体。

30

【請求項 11】

配列番号 1 ~ 7 からなる群から選択される少なくとも一のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む、試料中の A T P 結合カセットトランスポーター抗体の量を検出する検出キット。

【請求項 12】

配列番号 1 ~ 7 からなる群から選択される少なくとも一のアミノ酸配列を有するポリペプチドをプローブとし、試料中の A T P 結合カセットトランスポーター抗体の量を検出する検出方法。

【請求項 13】

酵素結合免疫吸着法、ウェスタンブロッティング、バイオチップ法、磁気ビーズ分離定量法、及び他のプローブ検出法からなる群から選択される少なくとも一種の方法で、試料中の A T P 結合カセットトランスポーター抗体を検出する、請求項 12 に記載の検出方法。

40

【請求項 14】

少なくとも以下の手順：

- (a) 前記ポリペプチドを容器中にコーティングする；
- (b) 前記容器中の第一懸濁液を除去する；
- (c) 適切な濃度の前記試料を前記容器中に投入する；
- (d) 前記容器中の第二懸濁液を除去する；
- (e) 第二抗体を投入する；

50

(f) 前記容器中の第三懸濁液を除去する；及び
 (g) 前記容器中の前記第二抗体の量を検出する；
 を含む請求項 1 2 に記載の検出方法。

【請求項 1 5】

前記容器は 9 6 ウェルプレートである、請求項 1 2 に記載の検出方法。

【請求項 1 6】

前記試料は人体から分離された血液、血漿、および血清からなる群から選択される少なくとも一種である、請求項 1 2 に記載の検出方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本発明は抗癌医薬組成物の選抜に用いるポリペプチド及びその応用に関するものであり、特に ATP 結合カセットトランスポーター抗体の選抜に用いるポリペプチド及びその応用に関する。

【背景技術】

【0002】

化学療法は中後期ステージの癌の主要な治療方法である。一般的に、一定期間の化学療法を行った癌患者の大半の癌細胞は死滅するが、少数の破壊されていない癌細胞が残留し、その量はおよそ $10^8 \sim 10^9$ である。それら残留癌細胞は大量の ATP 結合カセットトランスポーター (ATP binding - cassette transporter、以下「ABCトランスポーター」と略す) を発現し、ABCトランスポーターは細胞膜まで運ばれ、細胞内の化学療法薬剤の除去を行う。即ち、残留癌細胞はABCトランスポーターを利用し癌細胞内の化学療法薬剤を細胞外へ輸送し、そのため化学療法薬剤は有効に残留癌細胞を攻撃することが出来ない。これが臨床上的癌細胞薬剤抵抗性であり、化学療法以外の方法で薬剤抵抗性癌細胞を死滅させる方法が必要とされている。

20

【0003】

非特許文献 1 で述べられた癌細胞薬剤抵抗性と関連する ABCトランスポーターは、主に以下のサブファミリーを含む：

1 . ATP 結合カセットタンパク質サブファミリー B (ATP - binding cassette protein subfamily B) : 例えば ABCB1、多剤耐性タンパク質 1 (multi drug resistance protein 1, MDR1 と略す)、浸透性糖タンパク質 (permeability glycoprotein) と呼ぶ；または ABCB4 (MDR3 と呼ぶ)；これら以外にも例えば ABCB11、Pgp と同じファミリー (Sister of Pgp) であるもの。

30

2 . ATP 結合カセットタンパク質サブファミリー C (ATP - binding cassette protein subfamily C) : 例えば ABCC1、多剤耐性関連タンパク質 1 (multi drug resistance related protein 1, MRP1 と略す) と呼ぶ；または ABCC2、多剤耐性関連タンパク質 2 (multi drug resistance related protein 2, MRP2 と略す)；ABCC3 - 6、ABCC10 - 11 を含む可能性もある。

40

3 . ATP 結合カセットタンパク質サブファミリー G (ATP - binding cassette protein subfamily G) : 例えば ABCG2、ミトキサントロン耐性タンパク質 (mitoxantrone resistance protein, MXR と略す)、乳癌耐性タンパク質 (breast cancer resistance protein, BCRP と略す) と呼ぶ。

【0004】

特許文献 1 では、薬剤抵抗性癌細胞の表面に存在する大量の ABCトランスポーターを利用し、分子標的攻撃を行い、薬剤抵抗性癌細胞を死滅させる方法が開示された。それは人工の方法で ABCトランスポーター抗体を合成し、ABCトランスポーター抗体で細胞を死滅させる薬剤を運び、抗体分子標的薬とする。当該抗体分子標的薬は ABCトランス

50

ポーター抗体を通じて薬剤抵抗性癌細胞と結合し、薬剤により薬剤抵抗性癌細胞の周辺で細胞を死滅させる。

【0005】

しかし、直接的にABCトランスポーター抗体を合成する方法、若しくはABCトランスポーターを合成しABCトランスポーター抗体を選抜する方法で、ABCトランスポーター抗体/ABCトランスポーターの合成はフォールディングが正しく行われているかを考慮しなければならず、生産の際に考慮すべき要素が複雑かつ困難であり、コストの削減が難しい。また、従来技術で合成するABCトランスポーター抗体は単一のABCトランスポーターしか認識出来ず、全種類の薬剤抵抗性癌細胞への適用は難しい。それに、従来技術では、長期的に薬剤により薬剤抵抗性癌細胞を死滅させるには、体や腎臓への負担が小さくない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】米国特許第7785812号明細書

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Sarkadi B, Homolya L, Szakacs G, Varadi A. Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoinnity defense system. *Physiol Rev.* 2006, 86(4):1179-1236

【発明の概要】

【0008】

従来技術に欠点が存在するため、本発明はABCトランスポーター抗体の選抜に必要とする、構造が複雑なABCトランスポーターの代わりに、単純なプロセスで合成できるポリペプチドを提供する。

【0009】

また、本発明は各種の異なる種類の薬剤抵抗性癌細胞に適用可能な、複数種のABCトランスポーター抗体を含む医薬組成物を選抜する複数種のポリペプチド及びそれらの組み合わせを提供する。

【0010】

本発明は薬剤抵抗性癌細胞に対抗するため、体や腎臓に負担が小さい抗癌医薬組成物を提供するものである。

【0011】

また、本発明はナチュラルキラー細胞が癌細胞を死滅させる能力を上昇させる抗癌医薬組成物を提供する。

【0012】

さらに、本発明は癌細胞の薬剤抵抗性を低減でき、化学療法と相乗作用して、薬剤抵抗性癌細胞の量を抑える抗癌医薬組成物を提供する。

【0013】

本発明の一形態によると、下記配列番号1~7からなる群から選択される少なくとも一のアミノ酸配列を有するポリペプチドが提供される。

【0014】

なお、配列番号1~7は、それぞれ、ATP結合カセット輸送タンパク質配列からヒト白血球抗原と高い親和性を有する配列を選抜し、それにより設計したものであり、下記配列を有する。

【0015】

10

20

30

40

【0020】

好ましくは、前記抗癌医薬組成物は、ナチュラルキラー細胞の癌細胞死滅能力を上昇させる。

【0021】

好ましくは、前記抗癌医薬組成物は、化学療法と相乗作用して薬剤抵抗性を有する癌細胞の量を抑える。

【0022】

また、本発明の一形態によると、配列番号1～7からなる群から選択される少なくとも一のアミノ酸配列を有するポリペプチドと結合する抗体が提供される。当該抗体は、単離若しくは精製抗体又は人工抗体でありうる。

【0023】

好ましくは、前記抗体は、ナチュラルキラー細胞の癌細胞死滅能力を上昇させる。

【0024】

好ましくは、前記抗体は、化学療法と相乗作用して、薬剤抵抗性を有する癌細胞の量を抑える。

【0025】

また、本発明の一形態によると、試料中のATP結合カセットトランスポーター抗体の量を検出する検出キットが提供される。当該検出キットは、配列番号1～7からなる群から選択される少なくとも一のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。

【0026】

また、本発明の一形態によると、配列番号1～7からなる群から選択される少なくとも一のアミノ酸配列を有するポリペプチドをプローブとし、試料中のATP結合カセットトランスポーター抗体の量を検出する検出方法が提供される。

【0027】

好ましくは、前記検出方法は、酵素結合免疫吸着法、ウェスタンブロッティング、バイオチップ法、磁気ビーズ分離定量法、及び他のプローブ検出法からなる群から選択される少なくとも一種の方法で、試料中ATP結合カセットトランスポーター抗体を検出する。

【0028】

好ましくは、前記検出方法は、少なくとも以下の手順を含む。

- (a) 前記ポリペプチドを容器中にコーティングする；
- (b) 前記容器中の第一懸濁液を除去する；
- (c) 適切な濃度の前記試料を前記容器中に投入する；
- (d) 前記容器中の第二懸濁液を除去する；
- (e) 第二抗体を投入する；
- (f) 前記容器中の第三懸濁液を除去する；及び
- (g) 前記容器中の前記第二抗体の量を検出する。

【0029】

好ましくは、前記検出方法において、前記容器は96ウェルプレートである。

【0030】

好ましくは、前記検出方法において、前記試料は人体から分離された血液、血漿、又は血清からなる群から選択される少なくとも一種である。

【図面の簡単な説明】

【0031】

【図1】本発明に係るABCトランスポーター抗体の量を検出する検出方法の一実施形態を表すフローチャートである。

【図2】癌治療薬血漿の癌細胞の薬剤抵抗性に対する影響を表す棒グラフである。

【図3】癌治療薬血漿のナチュラルキラー細胞の癌細胞死滅作用に対する影響を表す棒グラフである。

【図4】本発明に係るポリペプチドを利用してABCトランスポーター抗体を精製する方法の一実施形態を表すフローチャート。

10

20

30

40

50

【発明を実施するための形態】

【0032】

従来の技術に制限や欠点が存在するため、本発明は抗癌医薬組成物を選抜するポリペプチド及び応用方法を提供する。即ち、構成が簡単なポリペプチドを用いて、抗体を多く含む医薬組成物を選抜し、前記医薬組成物で薬剤抵抗性癌細胞を死滅させる。

【0033】

ナチュラルキラー細胞（通常はCD3 - CD56 + サブセットのリンパ細胞と定義される）は人間の免疫システム上、癌細胞との対抗に重要であり、主に抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（antibody - dependent cell - mediated cytotoxicity, ADCCと略す）で癌細胞を死滅させる。詳しく言えば、癌細胞がABCトランスポーターを発現し（それにより薬剤抵抗性を持つ）体内又は外来のABCトランスポーター抗体と結合した時、ナチュラルキラー細胞表面のCD16分子（FcγRIII; 抗体定常部位（fragment of constant region）の受容体、人類抗体の定常部位と特異結合する）はABCトランスポーター抗体の定常部位（例えばIgG抗体の定常部位）を認識し結合する。その後ナチュラルキラー細胞の抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ADCC）を引き起こし、インターフェロン（IFN - ）等のサイトカインを放出し薬剤抵抗性癌細胞を死滅させる。

10

【0034】

発明者らの長年の経験及び研究結果により、従来の技術のABCトランスポーターを分子標的とする利点を有したまま、構成が複雑な抗体/タンパク質が必要、及び、薬剤で死滅させる、という二つの欠点を除去し、より簡易で体に負担の小さい薬剤抵抗性癌細胞の死滅法が開発できると考えた。即ち、多くの種類のABCトランスポーター抗体を含む医薬組成物の選抜に用いる直鎖状ポリペプチド抗原を開発する。上記医薬組成物中のABCトランスポーター抗体は薬剤抵抗性癌細胞ABCトランスポーターと結合し、分子標的となる。さらに、ABCトランスポーター抗体はナチュラルキラー細胞のADCC作用を引き起こし、薬剤抵抗性癌細胞を死滅させる。また、発明者は適切な直鎖状ポリペプチド抗原を設計することにより、選抜された医薬組成物のABCトランスポーター抗体は同時にABCトランスポーターを阻害することが出来、化学療法薬剤が細胞外へ輸送されることを止め、薬剤抵抗性を有する癌細胞の薬剤抵抗性を低減させると考える。

20

【実施例】

30

【0035】

以下、実施例を用いて本発明をより詳細に説明するが、本発明は以下の実施例のみに制限されない。本発明の範囲内において当業者は各種の変更や修飾を行うこと可能であり、それらも本発明に包含される。

【0036】

[実施例1] ABCトランスポーター直鎖状ポリペプチドの設計

バイオインフォマティクスを利用し、各種ABCトランスポーター（化学療法薬剤抵抗性を示すABCトランスポーター）配列から、ヒト白血球型抗原（Human leucocyte antigen, HLAと略す；即ち人類のMajor histocompatibility complex, MHCと略す）と高い親和性を持つ配列を探し出す。この方法で探し出した直鎖状ポリペプチド配列は、ABCトランスポーターの表面に位置する可能性があり、ABCトランスポーターの代わりにABCトランスポーター抗体と特異結合する。

40

【0037】

設計の改良及び実験による選抜を行った後、7種類の直鎖状ポリペプチド（ポリペプチドは一般的に20～50個のアミノ酸により組成するが、それに限られない）を開発した。即ち、配列番号1～7のアミノ酸配列を有するポリペプチドである。上記7種類のABCトランスポーター直鎖状ポリペプチド若しくはそれらの組み合わせは、少なくとも一種のABCトランスポーター抗体と結合し、抗癌医薬組成物を選抜することが出来る。特に、上記7種類のABCトランスポーター直鎖状ポリペプチド若しくはそれらの組み合わせ

50

は、少なくとも一種の癌化学療法の薬剤抵抗性を引き起こすABCトランスポーターの抗原決定基 (e p i t o p e) と構造が類似するため、化学療法の薬剤抵抗性を引き起こすABCトランスポーター抗体と結合でき、薬剤抵抗性癌細胞に対抗する抗癌医薬組成物を選抜することが出来る。

【0038】

その中で、前記ABCトランスポーター直鎖状ポリペプチドと少なくとも一種のABCトランスポーター抗体の結合力は、リン酸緩衝塩類溶液 (P h o s p h a t e B u f f e r e d S a l i n e , P B S と略す ; p H 7 . 4) と上記少なくとも一種のABCトランスポーター抗体の結合力より上回る。

【0039】

[実施例 2] ABCトランスポーター直鎖状ポリペプチドの合成

化学的方法で純度95%以上のABCトランスポーター直鎖状ポリペプチドを合成する。ペプチド合成会社にABCトランスポーター直鎖状ポリペプチドの合成を依頼してもよい。本願出願人は、Mission Biotech (明欣生物科技有限公司) に上記7種類のABCトランスポーター直鎖状ポリペプチドの合成を依頼している。

【0040】

合成したABCトランスポーター直鎖状ポリペプチドを67%の酢酸に入れ (直鎖状ポリペプチド5mg / 67%酢酸1mL) 、 - 20 で低温貯蔵する。

【0041】

[実施例 3] : 抗癌医薬組成物の選抜

前記7種類のABCトランスポーター直鎖状ポリペプチド中の少なくとも一種を試料 (例えば人体から分離した血液、血漿、又は血清の少なくとも一種) と混ぜ、試料中のABCトランスポーター直鎖状ポリペプチド抗体複合体 (以下はポリペプチド抗体複合体と略す) の量を検出した。ポリペプチド抗体複合体の量が多いものは、試料中にABCトランスポーター抗体を大量に含み、抗癌医薬組成物として使え、ナチュラルキラー細胞の抗体依存性細胞媒介性細胞傷害を引き起こし、ABCトランスポーターを発現している薬剤抵抗性癌細胞を死滅させる。

【0042】

その中で、酵素結合免疫吸着法 (E n z y m e - l i n k e d i m m u n o s o r b e n t a s s a y , E L I S A と略す) 又は他のポリペプチドをプローブとした検出法 (例えばウェスタンブロットティング、バイオチップ法、磁気ビーズ分離定量法) を利用し、試料中のABCトランスポーター抗体の量を検出し、抗癌医薬組成物に適した試料、特に少なくとも一種の化学療法の薬剤抵抗性を引き起こすABCトランスポーターの抗体を含む抗癌医薬組成物を選抜する。以下では酵素結合免疫吸着法を例に挙げて詳しく説明する：

図1は、本発明に係る、ABCトランスポーター抗体の量を検出する検出方法の一実施形態を表すフローチャートである。図1によると、ABCトランスポーター抗体の量を検出する方法は少なくとも以下の手順を含む。

ステップS1 : ポリペプチドを容器中にコーティングする ;

ステップS2 : 容器中の第一懸濁液を除去する ;

ステップS3 : 適切な濃度の試料を容器中に投入する ;

ステップS4 : 容器中の第二懸濁液を除去する ;

ステップS5 : 第二抗体を投入する ;

ステップS6 : 容器中にある第三懸濁液を除去する ; 及び

ステップS7 : 容器中の第二抗体の量を検出する。

【0043】

好ましい形態によると、ステップS1の容器は96ウェルプレートである。ステップS1は96ウェルプレートの第一ウェル及び第二ウェルに100 μ LのABCトランスポーター直鎖状ポリペプチドを加え、第三ウェル及び第四ウェルに100 μ Lの植物性タンパク質ポリペプチドを加え、4 で8時間 (又は一晩) コーティングする。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 4 】

ここで、前記 A B C トランスポーター直鎖状ポリペプチド及び植物性タンパク質ポリペプチド分子は、すでにリン酸緩衝塩類溶液 (P h o s p h a t e B u f f e r e d S a l i n e , P B S と略す ; p H 7 . 4) を用いて、5 ~ 2 0 μ g / m L まで希釈している。また、前記 A B C トランスポーター直鎖状ポリペプチドは配列番号 1 ~ 7 からなる群から選択される少なくとも一のアミノ酸配列を有するポリペプチドを同じ比例で混合したものである。

【 0 0 4 5 】

A B C トランスポーター直鎖状ポリペプチドの第一ウェルは実験群、植物性ポリペプチドの第三ウェルは対照群、A B C トランスポーター直鎖状ポリペプチドの第二ウェルは第一陰性対照群、植物性ポリペプチドの第四ウェルは第二陰性対照群である。

10

【 0 0 4 6 】

また、ステップ S 2 は第一ウェル、第二ウェル、第三ウェル、第四ウェルの第一懸濁液を除去する。好ましくは、第一懸濁液を除去した後、リン酸緩衝塩類溶液 (p H 7 . 4) で三回洗う。

【 0 0 4 7 】

さらに、ステップ S 3 の試料として、人体から分離された血漿 (血液、血清でもよいが、それらに限られない) を用いた。前記適切な濃度の試料として、血漿 (又は血液、血清でもよいが、それに限らない) をリン酸緩衝塩類溶液 (p H 7 . 4) で 1 0 0 ~ 2 0 0 倍希釈したものを用いた。ステップ S 3 は、第一ウェル及び第三ウェルに前記適切な濃度の試料を 1 0 0 μ L 加え、第二ウェル及び第四ウェルに酸緩衝塩類溶液 (p H 7 . 4) を 1 0 0 μ L 加え、適切な温度で一定の時間作用させる。好ましくは、室温で 2 時間作用させる。

20

【 0 0 4 8 】

ステップ S 4 は第一ウェル、第二ウェル、第三ウェル、第四ウェルの第二懸濁液を除去した。好ましくは、第二懸濁液を除去した後、リン酸緩衝塩類溶液 (p H 7 . 4) で三回洗う。

【 0 0 4 9 】

ステップ S 5 の第二抗体として、ヒトの A B C トランスポーター抗体と特異結合する抗体 (例えばウサギ抗ヒト I g G (F c 特異的) 抗体又はヤギ抗ヒト I g G (F c 特異的) 抗体) を用いる。ステップ S 5 では、適切な量 (例えば 2 0 0 μ L) 及び濃度の第二抗体 (例えばリン酸緩衝塩類溶液 (p H 7 . 4) で 1 0 0 0 0 倍希釈したもの) を加え、適切な温度で一定の時間作用させる。好ましくは、室温で 2 時間作用させる。

30

【 0 0 5 0 】

ステップ S 6 は第一ウェル、第二ウェル、第三ウェル、第四ウェルの第三懸濁液を除去する。好ましくは、第三懸濁液を除去した後、リン酸緩衝塩類溶液 (p H 7 . 4) で三 ~ 五回洗う。

【 0 0 5 1 】

ステップ S 7 の検出原理は、前記第二抗体のある酵素を利用し、ある化合物をある発色化合物に変換する。これにより前記第二抗体の含量は酵素の量及び色の濃さに比率し、色の濃さから第二抗体の量を推定できる。好適な場合、上記第二抗体の酵素は、テトラメチルベンジジン (T e t r a m e t h y l b e n z i d i n e , T M B と略す) を青の化合物に転化する。或いは、ステップ S 7 の検出原理は第二抗体にある蛍光物質を利用し、蛍光強度で第二抗体の量を推定する。

40

【 0 0 5 2 】

好ましい形態では、ステップ S 7 の具体的手順は第一ウェル、第二ウェル、第三ウェル、第四ウェルに 1 0 0 μ L T M B を加え、2 0 分間反応させた後に 2 M の H ₂ S O ₄ を 5 0 μ L 加え、反応を中止させる。測定波長 4 5 0 n m 、参照波長 6 3 0 n m で吸光度 (O D 値) を測定し、特異的結合指数 (s p e c i f i c b i n d i n g i n d e x , S B I と略す) を計算する。

50

$SBI = (\text{実験群の吸光度} - \text{第一陰性対照群の吸光度}) / (\text{対照群の吸光度} - \text{第二陰性対照群の吸光度})$

SBI値で試料(例えば人体から分離した血液、血漿、又は血清の少なくとも一種、しかしこれらに限らない)の選抜を行う場合、値が1.5以上のものは癌治療用の抗癌医薬組成物としてナチュラルキラー細胞の抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(即ちADCC)を引き起こすことができる。上述抗癌医薬組成物中、SBI値が1.5を上回る血液は癌治療薬血液と呼ぶ; SBI値が1.5を上回る血漿は癌治療薬血漿と呼ぶ; SBI値が1.5を上回る血清は癌治療薬血清と呼ぶ。

【0053】

[実施例4] 抗癌医薬組成物効果実験

(1) 化学療法薬剤抵抗性を有する癌細胞株の選抜

24ウェルプレート中に濃度 5×10^4 cells/mLのMCF-7乳癌細胞株を加える。100nMのミトキサントロン(即ちMitoxantrone、化学療法薬剤の一種; 米国Sigma-Aldrich社から購入可能、商品名はMitoxantrone dihydrochloride)を加えて1ヶ月間継代培養し、生き残った細胞がミトキサントロン薬剤抵抗性を有するMCF-7乳癌細胞である。

【0054】

(2) 抗癌医薬組成物の癌細胞薬剤抵抗性に対する影響

96ウェルプレート中にミトキサントロン薬剤抵抗性を有するMCF-7乳癌細胞を加え、各ウェルに5000個ずつ細胞を入れる。対照群中に100nMのミトキサントロンを加えて培養する。実験群中に100nMのミトキサントロン及び5%の癌治療薬血漿(95µLの細胞液に5µL癌治療薬血漿加える)を加えて培養する。24、48、72時間培養後、MTT試験(MTT assay)で検出し細胞の生存率を計算する。

【0055】

図2は、癌治療薬血漿の、癌細胞の薬剤抵抗性に対する影響を表す棒グラフである。図2では、左側はミトキサントロンを加えた対照群、右側はミトキサントロン及び癌治療薬血漿を加え培養した実験群である。対照群細胞を1日間、2日間、3日間培養したところ、細胞量は、それぞれ 6.4×10^3 細胞/ウェル、 9.4×10^3 細胞/ウェル、 12.9×10^3 細胞/ウェルに達した。実験群細胞を1日間、2日間、3日間培養したところ、細胞量は、それぞれ 4.0×10^3 細胞/ウェル、 4.8×10^3 細胞/ウェル、 6.2×10^3 細胞/ウェルに達し、同期間培養した対照群細胞と比べて有意な差があった($p < 0.001$)。

【0056】

図2より、癌治療薬血漿はミトキサントロン薬剤抵抗性を有するMCF-7乳癌細胞の成長を抑制し、抑制効果は作用時間とともに増加した。その中で、癌治療薬血漿で1日間作用させた後は37.5%抑制、2日間作用させた後は48.9%抑制、3日間作用させた後は51.9%抑制されていた。

【0057】

これにより、本発明の7種類のABCトランスポーター直鎖状ポリペプチドで選抜した癌治療薬血漿は、高濃度のABCトランスポーター抗体を持ち、薬剤抵抗性癌細胞表面のABCトランスポーターと結合できるため、薬剤抵抗性癌細胞が化学療法薬剤を細胞外へ輸送することを阻害し、化学療法の効果を長期間発揮させられる。さらに、本発明の7種類のABCトランスポーター直鎖状ポリペプチドで選抜した癌治療薬血漿を利用し選抜した抗癌医薬組成物は、癌細胞の薬剤抵抗性を低減でき、化学療法と相乗作用して、薬剤抵抗性癌細胞の量を有意に抑制する。

【0058】

(3) 抗癌医薬組成物の、ナチュラルキラー細胞の癌細胞死滅作用に対する影響

96ウェルプレート中にミトキサントロン薬剤抵抗性を有するMCF-7乳癌細胞を加え、各ウェルに5000個ずつ細胞を入れる。対照群中各ウェルに 2×10^4 個のナチュラルキラー細胞を加える。実験群中各ウェルに 2×10^4 個のナチュラルキラー細胞及び

10

20

30

40

50

5%の癌治療薬血漿(95 μ Lの細胞液に5 μ L癌治療薬血漿加える)を加えて培養する。24、48、72時間培養後、MTT試験(MTT assay)で検出しMCF-7乳癌細胞の生存率を計算する。

【0059】

図3は、癌治療薬血漿の、ナチュラルキラー細胞の癌細胞を死滅させる作用に対する影響を表す棒グラフである。図3では、左側はナチュラルキラー細胞を加えた対照群、右側はナチュラルキラー細胞及び癌治療薬血漿を加え培養した実験群である。対照群細胞を1日間、2日間、3日間培養したところ、細胞量は、それぞれ4.5 $\times 10^3$ 細胞/ウェル、5.9 $\times 10^3$ 細胞/ウェル、8.5 $\times 10^3$ 細胞/ウェルに達した。実験群細胞を1日間、2日間、3日間培養したところ、細胞量は、それぞれ3.1 $\times 10^3$ 細胞/ウェル、3.5 $\times 10^3$ 細胞/ウェル、5.0 $\times 10^3$ 細胞/ウェルに達し、同期間培養した対照群細胞と比べて有意な差があった($p < 0.001$)。 10

【0060】

図3より、癌治療薬血漿はナチュラルキラー細胞の癌細胞死滅効果を有意に上昇させ、効果は作用時間とともに増加した。その中で、癌治療薬血漿の作用による死滅効果は1日間作用させた後は31.1%、2日間作用させた後は40.7%、3日間作用させた後は41.2%上昇した。

【0061】

これにより、本発明の7種類のABCトランスポーター直鎖状ポリペプチドで選抜した癌治療薬血漿は、高濃度のABCトランスポーター抗体を持ち、ナチュラルキラー細胞の抗体依存性細胞媒介性細胞傷害を引き起こすことができるため、ナチュラルキラー細胞の癌細胞死滅効果を上昇させ、大幅に薬剤抵抗性癌細胞の量を下げる。 20

【0062】

本発明者らの長年の経験及び研究結果により、動物体内で本発明の医薬組成物を投薬する場合、化学療法ごとに150~300mL投薬することを勧める。

【0063】

[実施例5] ABCトランスポーターの精製

図4は、本発明に係る、ポリペプチドを利用してABCトランスポーターを精製する方法の一実施形態を表すフローチャートである。図4によると、本発明に係る、ポリペプチドを利用してABCトランスポーターを精製する方法は、少なくとも以下の手順を含む。 30

ステップS11: ポリペプチドを有する磁気ビーズを合成し、ポリペプチド磁気ビーズを作る；

ステップS12: ポリペプチド磁気ビーズと試料を混合し、混合液を得る；

ステップS13: 上記混合液を磁気カラムに通す；

ステップS14: 緩衝液をカラムに投入し、ポリペプチド抗体複合体磁気ビーズ中のポリペプチド磁気ビーズ及びABCトランスポーターを分離する。

【0064】

その中で、ステップS11のポリペプチドは配列番号1~7からなる群から選択される少なくとも一のアミノ酸配列を有する。ステップS11は磁気ビーズ会社に依頼してもよい。例えばTaiwan Advanced Nanotech Inc. (台湾圓點奈米技術股ふん有限公司)に依頼する。 40

【0065】

ステップS12において、混合液はポリペプチド抗体複合体磁気ビーズを含む。

【0066】

ステップS13において、混合液中のポリペプチド抗体複合体磁気ビーズは磁力の影響を受けカラムに付着する。

【0067】

ステップS14において、緩衝液はポリペプチド磁気ビーズとABCトランスポーター抗体のリンクを破壊できるものを選ぶ。ステップS11を磁気ビーズ会社に依頼した場合は適切な緩衝液が提供される。 50

【0068】

この方法で精製したABCトランスポーター抗体は、ナチュラルキラー細胞の抗体依存性細胞媒介性細胞傷害を引き起こせ、さらに抗癌薬剤又は抗癌医薬組成物の合成に利用できる。

【0069】

上述により、本発明が提供する7種類のABCトランスポーター直鎖状ポリペプチドは、癌治療薬血液、癌治療薬血漿、癌治療薬血清の選抜、又はABCトランスポーター抗体などの抗癌医薬組成物の精製に利用できる。上述の抗癌医薬組成物はナチュラルキラー細胞の癌細胞死滅効果を全体的に上昇させ、また、薬剤抵抗性癌細胞の薬剤抵抗性も低減され、これにより化学療法薬剤は薬剤抵抗性癌細胞を死滅させる効果を得る。

10

【0070】

本発明は抗癌医薬組成物の選抜に用いるポリペプチド、即ち配列番号1～7からなる群から選択される少なくとも一のアミノ酸配列、又は配列番号1～7からなる群から選択される少なくとも一のアミノ酸配列を含む20～50個のアミノ酸により組成するポリペプチドを提案する。

【0071】

また、配列番号1～7のアミノ酸配列に一つ又は複数のアミノ酸が置換、欠失または挿入し、派生した少なくとも一種類のATP結合カセットトランスポーター抗体と結合できるポリペプチドも、本発明に包含される。

【0072】

上述の実施例は本発明の好適な実施形態を示したにすぎず、本発明の範囲を限定するものではない。そのため、本発明の思想や範囲から逸脱しない範囲で様々な変更を施しても、本発明に包含される。

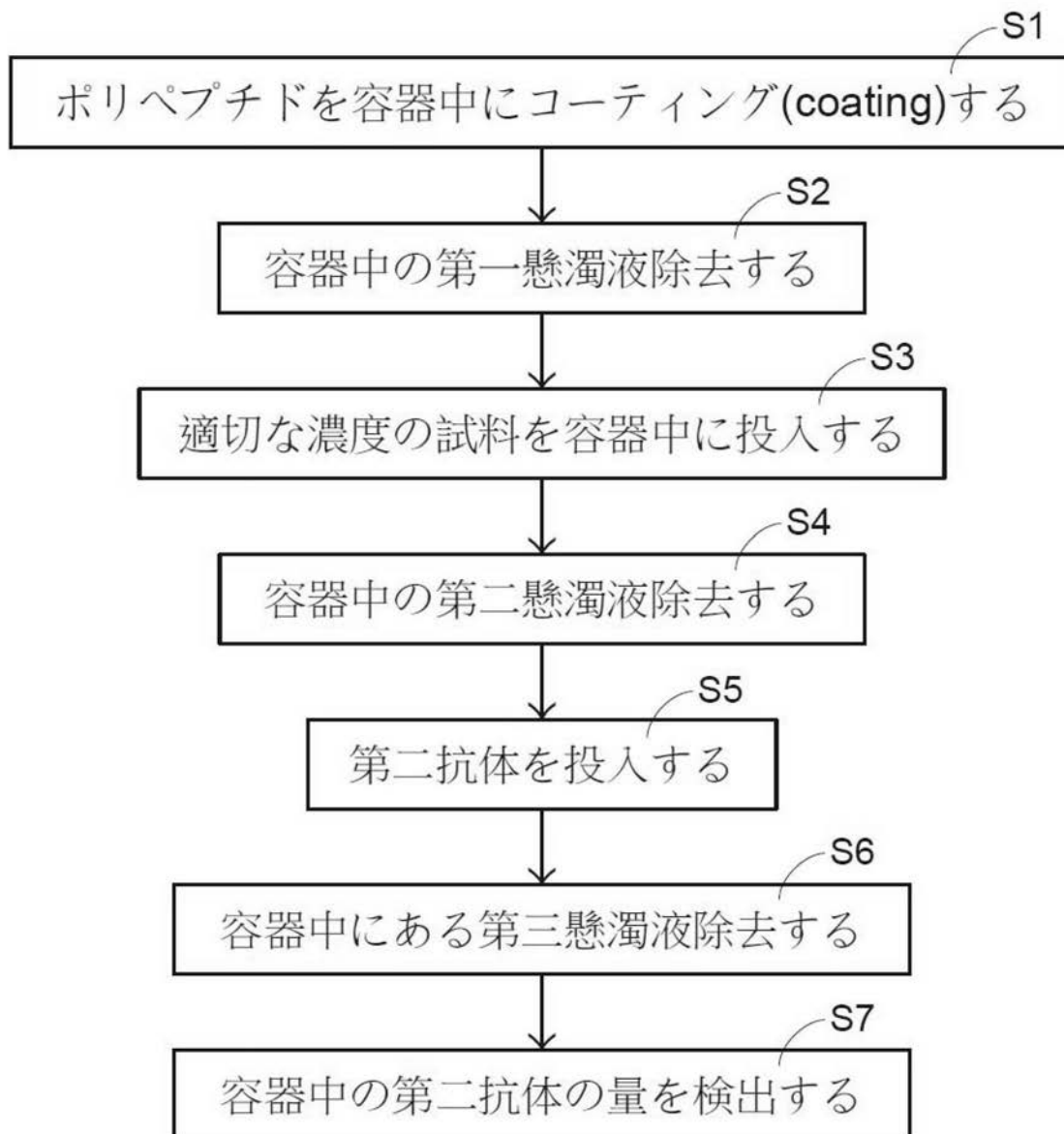
20

【符号の説明】

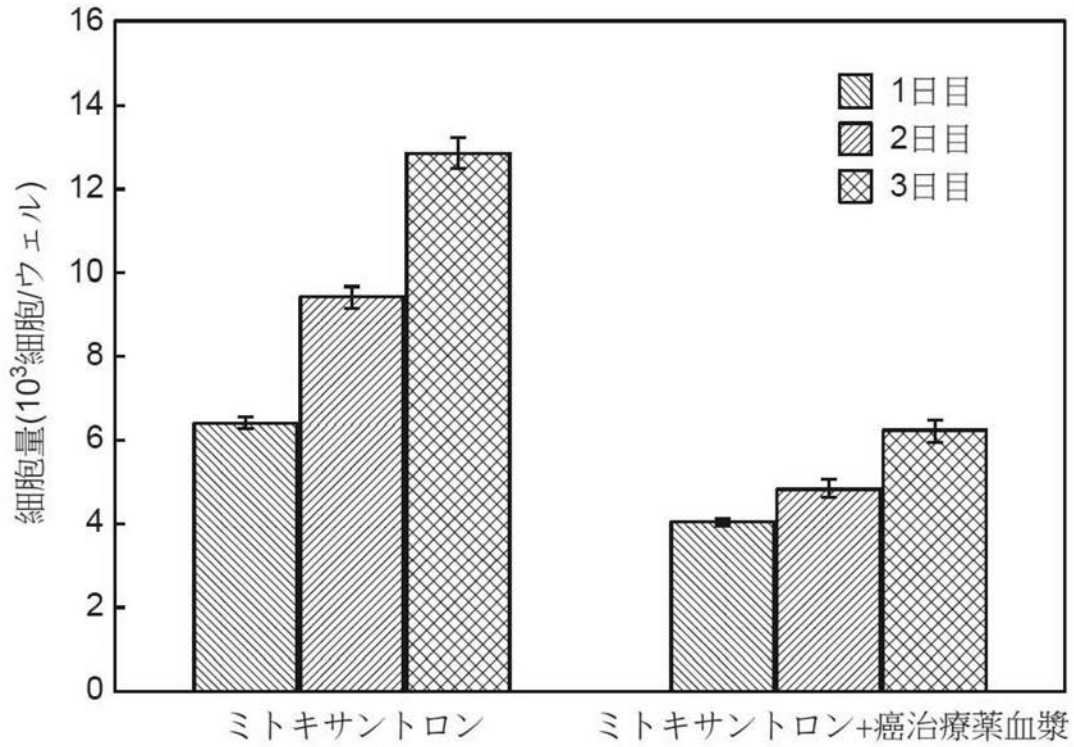
【0073】

S1、S2、S3、S4、S5、S6、S7、S11、S12、S13、S14 ステップ。

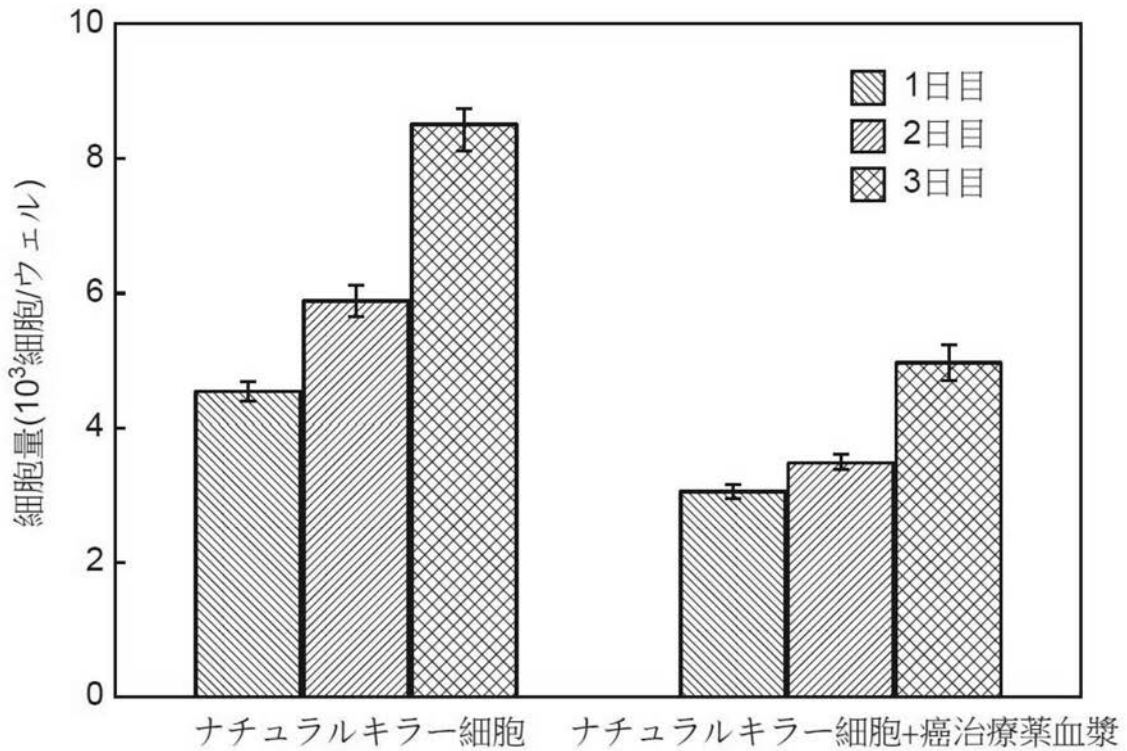
【図 1】



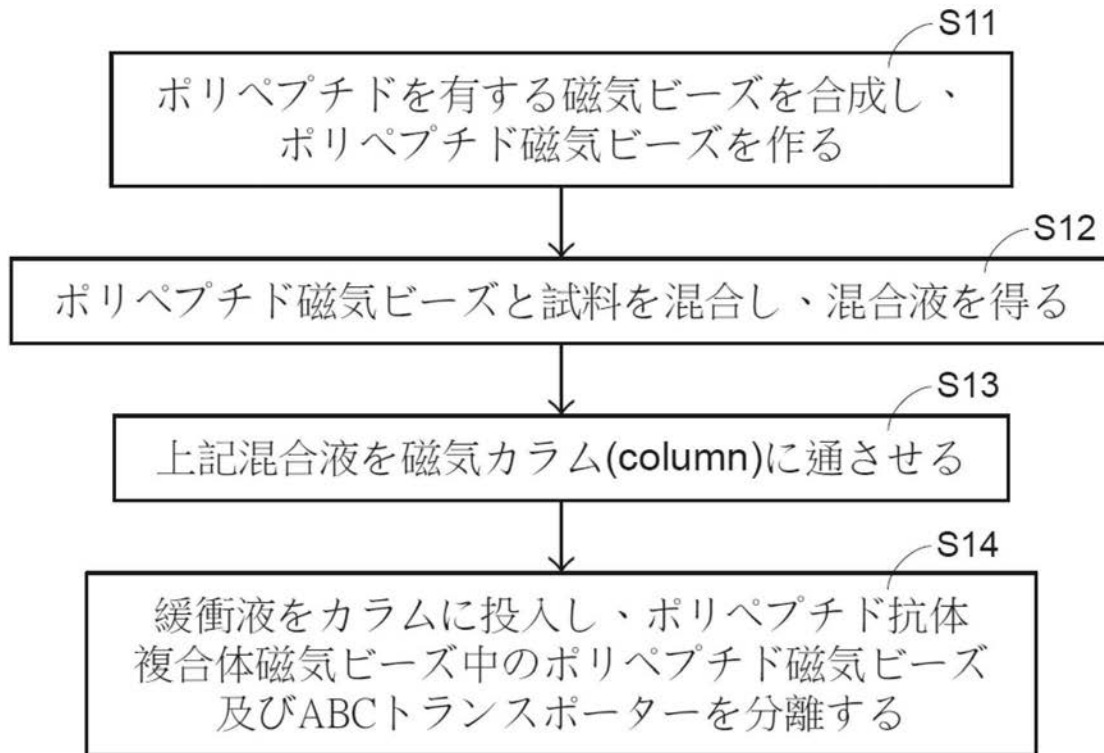
【図2】



【図3】



【 図 4 】



【 配列表 】

[2015067611000001.app](#)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
G 0 1 N	33/15	(2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K	45/06	(2006.01)	A 6 1 K 45/06	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
C 1 2 N	5/0783	(2010.01)	A 6 1 K 39/395	N
C 1 2 N	5/09	(2010.01)	C 1 2 N 5/00	2 0 2 L
			C 1 2 N 5/00	2 0 2 U

Fターム(参考) 4C084 AA17 AA20 MA02 NA14 ZB261 ZB262 ZC751 ZC752
 4C085 AA13 BB11 CC12 CC13 CC14 EE01
 4H045 AA11 AA20 AA30 CA40 CA41 DA75 DA76 DA86 EA20 EA51
 FA74

专利名称(译)	用于选择抗癌药物组合物的多肽及其应用		
公开(公告)号	JP2015067611A	公开(公告)日	2015-04-13
申请号	JP2014191706	申请日	2014-09-19
[标]申请(专利权)人(译)	李光辉		
申请(专利权)人(译)	李 光 辉		
[标]发明人	李光辉 尉 军		
发明人	李 光 辉 尉 军		
IPC分类号	C07K14/47 C07K16/32 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/50 G01N33/15 A61K45/00 A61K45/06 A61P43/00 A61P35/00 A61K39/395 C12N5/0783 C12N5/09		
CPC分类号	A61K39/00 C07K14/47 C07K16/18 G01N33/68 G01N2333/47		
FI分类号	C07K14/47.ZNA C07K16/32 G01N33/53.N G01N33/543.541.A G01N33/50.Z G01N33/15.Z A61K45/00 A61K45/06 A61P43/00.121 A61P35/00 A61K39/395.D A61K39/395.N C12N5/00.202.L C12N5/00.202.U C12N5/0783 C12N5/09		
F-TERM分类号	2G045/AA26 4B065/AA90X 4B065/BA30 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA17 4C084/AA20 4C084/MA02 4C084/NA14 4C084/ZB261 4C084/ZB262 4C084/ZC751 4C084/ZC752 4C085/AA13 4C085/BB11 4C085/CC12 4C085/CC13 4C085/CC14 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/CA41 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/EA51 4H045/FA74		
优先权	102135112 2013-09-27 TW 103127229 2014-08-08 TW		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供结合至少一种ATP结合盒转运蛋白抗体的多肽。 解决方案：用于血液，血浆或血清样品中ATP结合盒转运蛋白抗体检测和定量的多肽。此外，使用抗癌药物组合物用于选择富含ATP结合盒转运蛋白抗体的样品和杀死耐药性癌细胞。 点域

