

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3776137号

(P3776137)

(45) 発行日 平成18年5月17日(2006.5.17)

(24) 登録日 平成18年3月3日(2006.3.3)

(51) Int. Cl.	F I	
<b>C07K 14/00</b> (2006.01)	C07K 14/00	
<b>C12N 15/09</b> (2006.01)	C12N 15/00	Z N A A
<b>A61K 38/00</b> (2006.01)	A61K 37/02	
<b>A61P 35/00</b> (2006.01)	A61P 35/00	
<b>C12N 1/19</b> (2006.01)	C12N 1/19	
請求項の数 24 (全 26 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願平5-271291	(73) 特許権者	591000816
(22) 出願日	平成5年10月4日(1993.10.4)		ベーリングベルケ、アクチエンゲゼルシャフト
(65) 公開番号	特開平6-228195		BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT
(43) 公開日	平成6年8月16日(1994.8.16)		ドイツ連邦共和国 マールブルク、1
審査請求日	平成12年9月28日(2000.9.28)		
(31) 優先権主張番号	P4233152.8	(74) 代理人	100064285
(32) 優先日	平成4年10月2日(1992.10.2)		弁理士 佐藤 一雄
(33) 優先権主張国	ドイツ(DE)	(74) 代理人	100067079
			弁理士 小野寺 捷洋
		(74) 代理人	100091487
			弁理士 中村 行孝
		(72) 発明者	マテイアス、ゲールマン
			ドイツ連邦共和国ローラル、ウインゲルトシュトラッセ、11
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 プロドラッグ活性化のための融合タンパク質

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

少なくとも1個のプロドラッグ活性化酵素に結合している抗原結合領域を含む化合物であって、抗原結合領域が腫瘍関連抗原(TAA)に結合しかつ単一のポリペプチド鎖から成る化合物。

## 【請求項2】

化合物が共有結的に結合した炭水化物を有する、請求項1に記載の化合物。

## 【請求項3】

抗原結合領域が重鎖抗体の可変ドメインと軽鎖抗体の可変ドメイン(sFvフラグメント)とを有する、請求項1または2に記載の化合物。

## 【請求項4】

TAAがN-CAM、PEM、EGF-R、Sialyl-Le<sup>a</sup>、Sialyl-Le<sup>x</sup>、TF、GICA、GD3、GD2、TAG72、CA125、MabL6によって画定される24~25kDaの糖タンパク質またはCEA、好ましくはCEAである、請求項1~3のいずれか1項に記載の化合物。

## 【請求項5】

酵素が、ラクタマーゼ、好ましくはBacillus cereus II -ラクタマーゼ、ピログルタメートアミノペプチダーゼ、D-アミノペプチダーゼ、オキシダーゼ、ペルオキシダーゼ、ホスファターゼ、ヒドロキシニトリルリアーゼ、プロテアーゼ、エステラーゼ、カルボキシペプチダーゼ、好ましくはシュードモナス由来のカルボキシペプチダーゼG2、また

はグリコシダーゼである、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 6】

酵素が、 $\alpha$ -グルクロニダーゼ、好ましくは *E. coli*、*Kobayasia nipponica*、*Secale cereale* またはヒト  $\alpha$ -グルクロニダーゼである、請求項 5 に記載の化合物。

【請求項 7】

抗原結合領域がペプチドリンカーを介して酵素に連結している、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 8】

化学的方法によってまたは適当な発現系を選択することによってグリコシル化を行う、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の化合物。

10

【請求項 9】

*Saccharomyces cerevisiae* または、更に有利には *Hansenula polymorpha* で分泌発現を行う、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 10】

*E. coli* で発現し、次いで化学的にグリコシル化する、好ましくはガラクトシル化および/またはマンノシル化する、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 11】

*E. coli* でペリプラズム発現を行った sFv- $\alpha$ -ラクタマーゼ融合タンパク質を化学的にグリコシル化、好ましくはガラクトシル化および/またはマンノシル化する、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の化合物。

20

【請求項 12】

sFv- $\alpha$ -ラクタマーゼ融合タンパク質が *Saccharomyces cerevisiae* または *Hansenula polymorpha* で分泌発現を行う、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 13】

請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の化合物をコードする核酸。

【請求項 14】

CEA およびヒト  $\alpha$ -グルクロニダーゼに対するヒト化 sFv フラグメントをコードする、請求項 13 に記載の核酸。

【請求項 15】

第 1 表に示される配列を有する請求項 13 に記載の核酸。

30

【請求項 16】

請求項 13 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の核酸を含むベクター。

【請求項 17】

請求項 13 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の核酸または請求項 16 に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 18】

BHK、CHO、COS、HeLa、昆虫、タバコ植物、酵母または *E. coli* 細胞である、請求項 17 に記載の宿主細胞。

【請求項 19】

(a) 請求項 13 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の核酸または請求項 16 に記載のベクターを宿主細胞に導入し、  
 (b) この宿主細胞を培養し、  
 (c) 化合物を単離する、  
 ことを特徴とする、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の化合物の製造法。

40

【請求項 20】

(a) 請求項 17 または 18 に記載の宿主細胞を培養し、  
 (b) 化合物を単離する、  
 ことを特徴とする請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の化合物の製造法。

【請求項 21】

医薬または診断助剤を製造するための、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の化合物

50

の使用。

【請求項 2 2】

癌の治療のための医薬を製造するための、請求項 1 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載の化合物の使用。

【請求項 2 3】

請求項 1 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載の化合物を含む医薬。

【請求項 2 4】

請求項 1 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載の化合物を含む診断助剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

10

【産業上の利用分野】

本発明は、ほとんどまたはまったく細胞毒性を持たない化合物（プロドラッグ）を細胞毒性化合物（薬物）に代謝することができる少なくとも 1 種類の酵素に結合する抗原結合領域を含む化合物であって、この抗原結合領域が単一のポリペプチド鎖から成ることを特徴とする化合物に関する。共有結合によって結合した炭水化物がポリペプチド鎖上に存在することが有利である。

【0002】

【従来の技術】

治療用組成物として用いられるプロドラッグと抗体 - 酵素抱合体との組み合わせは、既に専門家の文献に記載されている。このことにより、特定の組織に向けられており且つプロドラッグ開裂酵素が結合する抗体が生体中に注入され、続いてこの酵素で活性化することができるプロドラッグ化合物を投与することができることになる。標的組織に結合した抗体 - 酵素抱合体の作用は、プロドラッグ化合物を結合した組織に対して細胞毒性作用を示す化合物へと転換しようとするものである。しかしながら、抗体 - 酵素抱合体についての研究では、これらの化学的抱合体は好ましくない薬物動態を示し、プロドラッグの不適切な部位特異的な腫瘍選択的開裂しかないことが判っている。幾人かの著者は、この明らかな欠点を、抗酵素抗体を追加注入して血漿から抗体 - 酵素抱合体を速やかに除去しようとすることによって、除去しようとしている（Sharmaら、Brit. J. Cancer, 61, 659, 1990）。抗体 - 酵素抱合体のもう一つの問題点は、再現性が高く且つ均質に多量を調製する可能性が限定されていることである。

20

30

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、工業的規模で調製することができ且つその薬物動態および薬理特性により治療目的に好適な融合タンパク質を見出すことであった。

【0004】

【課題を解決するための手段】

これに関連して、単一ポリペプチド鎖から成る抗原結合領域を有する化合物は炭水化物が有利に結合する融合タンパク質の調製とプロドラッグの活性化に使用するのに予想外に有利であることを見出した。

それ故、本発明は少なくとも 1 個の酵素に結合する抗原結合領域を有する化合物であって、その抗原結合領域が単一のポリペプチド鎖から成り、炭水化物が融合タンパク質に有利に結合している化合物に関する。

40

抗原結合領域とは、本発明の目的に対しては、抗体の少なくとも 2 個の変域ドメイン、好ましくは重鎖抗体の 1 個の変域ドメインと軽鎖抗体（s F v フラグメント）の 1 個の変域ドメインとを含む領域を意味する。しかしながら、抗原結合領域は、二価または多価構造、すなわち、例えば E P - A - 0 4 0 4 0 9 7 号明細書に記載されているように 2 個以上の結合領域を有することもできる。しかしながら、ヒトのまたはヒト化 s F v フラグメントが特に好ましく、中でもヒト化 s F v フラグメントが好ましい。

【0005】

抗原結合領域は、腫瘍関連抗原（TAA）に結合するのが好ましく、下記の TAA が特に

50

好ましい。

神経細胞接着分子 ( N - C A M )、  
多形上皮ムチン ( P E M )、表皮成長因子レセプター ( E G F - R )、  
トムセン・フリーデンライヒ抗原 ( T F )、  
消化管癌抗原 ( G I C A )、  
ガングリオシド G D <sub>3</sub> ( G D <sub>3</sub> )、  
ガングリオシド G D <sub>2</sub> ( G D <sub>2</sub> )、  
S i a l y l - L e <sup>a</sup>、S i a l y l - L e <sup>x</sup>、  
T A G 7 2、  
M A b L 6 によって画定される 2 4 ~ 2 5 k D a の糖タンパク質、  
C A 1 2 5、及び特に癌胎児性抗原 ( C E A )。

10

【 0 0 0 6 】

好ましい酵素は、ほとんどまたは全く細胞毒性を持たない化合物を細胞毒性化合物に代謝することができる酵素である。例には、E P - A 2 - 0 3 8 2 4 1 1 号明細書または E P - A 2 - 0 3 9 2 7 4 5 号明細書などに記載されている - ラクタマーゼ、ピログルタメートアミノペプチダーゼ、ガラクトシダーゼまたは D - アミノペプチダーゼ；例えば W O 9 1 / 0 0 1 0 8 号明細書に記載されているオキシダーゼ、例えば、エタノールオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、D - アミノ酸オキシダーゼまたは - グリセリル - ホスフェートオキシダーゼ；例えば E P - A 2 - 0 3 6 1 9 0 8 号明細書に記載されているペルオキシダーゼ；例えば E P - A 1 - 0 3 0 2 4 7 3 号明細書に記載

20

【 0 0 0 7 】

- グルクロニダーゼが好ましく、Kobayasiana nipponica または Secale cereale 由来のものが好ましく、大腸菌またはヒト - グルクロニダーゼ由来が更に好ましい。個々の酵素の基質も前記の特許明細書で指摘されており、本願明細書の開示内容の一部を構成するものである。 - グルクロニダーゼの好ましい基質は N - ( D - グリコピラノシル ) ベンジルオキシカルボニルアントラサイクリン、特に N - ( 4 - ヒドロキシ - 3 - ニトロベンジルオキシカルボニル ) ドクソルピシン及びダウノルピシン = - D - グルクロニドである ( J.C. Florent ら、(1992) Int. Carbohydr. Symp. Paris, A262, 297 または S. Andrianomenjanahary ら、(1992) Int. Carbohydr. Symp. Paris, A264, 299 )。

30

【 0 0 0 8 】

本発明は、本発明による化合物をコードする核酸にも関する。特に好ましいものは、核酸並びにその変体 ( variant ) 及び変異体 ( mutant ) であって、ヒトの - グルクロニダーゼに連結した C E A ( 癌胎児性抗原 ) に対するヒト化 s F v フラグメントをコードするものであり、好ましくは第 1 表に示す配列を有するものである ( s F v - h u - G l u c

40

【 0 0 0 9 】

本発明による化合物は、通常は当業者に普通に知られている遺伝子操作の方法によって調製し、抗原結合領域を 1 種類以上の酵素に、直接またはリンカー、好ましくはペプチドリリンカーを介して、結合させることができる。用いることができるペプチドリリンカーは、例えば抗体のヒンジ領域またはヒンジ様アミノ酸配列である。この場合には、酵素は好ましくは N 末端で抗原結合領域に直接またはペプチドリリンカーを介して結合している。しかしながら、酵素または複数の酵素は、例えば W O 9 1 / 0 0 1 0 8 号明細書に記載されているように抗原結合領域に化学的に結合することもできる。

【 0 0 1 0 】

50

本発明の化合物のアミノ酸配列をコードする核酸は、通常は発現ベクターにクローニングされ、BHK、CHO、COS、HeLa、昆虫、タバコ植物、酵母または大腸菌細胞などの原核または真核宿主細胞に導入され、発現される。この方法で調製された化合物は、次に単離して、診断助剤または治療剤として用いることができる。本発明による化合物のもう一つの一般に知られている調製法は、ヒト以外のトランスジェニック哺乳類、好ましくはトランスジェニックヤギでコードする核酸を発現させることである。

#### 【0011】

本発明による核酸でトランスフェクションしたBHK細胞は、CEAに対して特異的であるだけでなく、完全な $\alpha$ -グルクロニダーゼ活性も有した融合タンパク質(sFv-hu-GluC)を発現する(例5を参照されたい)。

10

この融合タンパク質は、EP0501215A2号明細書(例M)に記載の方法によって抗-イディオタイプアフィニティークロマトグラフィによって精製した。この方法で精製した融合タンパク質の分子量は還元条件下でのSDS PAGEでは100kDaであるが、100及び200kDaの分子はそれぞれ非還元条件下で現れる。

#### 【0012】

本来の条件下でのゲルクロマトグラフィ(TSK-3000ゲルクロマトグラフィ)では、1個のタンパク質ピーク(例6、図1)を示し、これは特異性酵素活性試験において活性ピークと相関する(EP0501215A2号明細書)。標準的な分子量マーカと比較することによるピークの位置は、分子量が約200kDaであることを示している。この知見は、SDS PAGEからのデータと一緒に、機能的な酵素学的に活性なsFv-hu-GluC融合タンパク質は「二価分子」の形態をしており、すなわち2個の結合領域と2個の酵素分子を有する。本明細書には記載されていない実験から、融合タンパク質はある種の培養条件では4個の結合領域と4個の酵素分子を有する四量体(テトラマー)の形態をとることができる。sFv-hu-GluC融合タンパク質を精製して、イン・ビトロで機能の特性決定を行った後、融合タンパク質の薬物動態と腫瘍局在化をヒト胃癌を有するヌードマウスで決定した。機能的に活性な融合タンパク質の量を、器官を適宜処理した後様々な時間に器官及び腫瘍中で(例7)決定し、免疫学的測定法(3決定基試験、例8)によって決定した。代表的な実験の結果を、第4表に纏める。

20

#### 【0013】

驚くべきことには、腫瘍/血漿比はたった48時間後で5/1に達する。更に時間が経てば、この比率は更に好ましくなり、 $>200/1$ の値に達する(5日目)。sFv-hu-GluC融合タンパク質がこのような好ましい薬物動態を示す理由は、腫瘍に結合していない融合タンパク質が主としてマンノース6-ホスフェート及びガラクトースのレセプターによるインターナリゼーションによって血漿及び正常な組織から除去されるからである。(この現象の証拠は、例えば肝臓で分子内 $\alpha$ -グルクロニダーゼ濃度が増加することである)。

30

#### 【0014】

第5表に示されるように、sFv-hu-GluCは比較的少量のガラクトース、特に特定のレセプターへの結合に主に重要なマンノースを含んでいる。生成した融合タンパク質の炭水化物残基を介して結合している融合タンパク質/レセプター複合体を次に、インターナリゼーションによって細胞外区画から除去する。

40

主としてガラクトースとマンノースとによって媒介されるこの迅速インターナリゼーション機構は、本発明による融合タンパク質の有利な薬物動態と緊密に関連している。ガラクトース及び特にマンノースが結合する融合タンパク質のこれらの有利な薬物動態により、細胞外分布を行う親水性のプロドラッグを非特異的なプロドラッグ活性化を誘導することなく比較的初期に静脈内に投与することができる。この場合には、Sharmaら(Brit. J. Cancer, 61, 659, 1990)によって記載された除去工程は必要ない。第4表のデータに基づけば、適当なプロドラッグの注入(S. Adrianomenjanahariら、1992, Int. Carbohydrate Symp., Parts A264, 299)を、sFv-hu-GluC融合タンパク質の注射から3日後には重大な副作用を起こすことなく行うことが可能である(データは示されていない)

50

い)。

【0015】

同様に炭水化物の融合タンパク質への有利な結合は、例えば *Saccharomyces cerevisiae* または *Hansenula polymorpha* のような特定の酵母株での s F v - h u - G l u c 融合タンパク質の分泌発現によって行うこともできる。これらの生物は、適当な N - グリコシル化部位を有する融合タンパク質を極めて効果的にマンノシル化することができる (Goochee ら、*Biotechnology*, 9, 1347-1354, 1991)。酵母細胞で分泌発現を行ったこのような融合タンパク質は、BHK細胞で発現した s F v - h u - G l u c 融合タンパク質に匹敵するほどの高度のマンノシル化及び好ましい薬物動態を示す(データは示されていない)。この場合には、ガラクトースがないことは、融合タンパク質の極めて高度のマンノシル化によって補償される(第6表)。前記の s F v - h u - G l u c 融合タンパク質を遺伝子操作によって構築して、例9に詳細に記載するように、酵母中で発現させた。

10

【0016】

しかしながら、ヒト - グルクロニダーゼの代わりに、有利な特性を有する他のグルクロニダーゼを用いることも可能である。例えば、大腸菌の - グルクロニダーゼは、pH 7.4におけるその触媒活性はヒト - グルクロニダーゼの活性より著しく高いといった特別な利点を有する。例10において、s F v - 大腸菌 - G l u c 構築物を遺伝子操作の方法によって調製し、*Saccharomyces cerevisiae*において機能的に活性なマンノシル化した融合タンパク質として分泌発現を行った。薬物動態データは、酵母またはBHK細胞で発現した s F v - h u - G l u c 分子のものに匹敵する(第4表)。

20

【0017】

菌類 (fungus) *Kobayasia nipponica* 及び植物 *Secale cereale* 由来のグルクロニダーゼは、例えば、それらが単量体 (モノマー) として活性であるという利点を有する。例11では、遺伝子操作の方法を用いて、*Saccharomyces cerevisiae*での発現の後に s F v - B. c ereus - ラクタマーゼ I I 融合タンパク質をマンノシル化した形態で優先的に放出する構築物を調製した。

この融合タンパク質も本発明による融合タンパク質と同様に、プロドラッグの活性化に好ましい - グルクロニダーゼ薬物動態に基づいている(第4表)。

【0018】

更に、本発明による化合物をプロドラッグと組合せで用いるだけでなく、グルクロニドとして代謝されて不活性化する細胞増殖抑制剤を、投与した化合物によって毒性のある形態に転換することができる従来の化学療法の構成に用いることもできる。

30

【0019】

下記の例により、s F v - - G l u c 融合タンパク質の遺伝子操作による合成と、機能性の論証を行う。

出発材料はプラスミド p A B s t o p 4 3 1 / 2 6 h u m V<sub>H</sub> 及び p A B s t o p 4 3 1 / 2 6 h u m V<sub>L</sub> を含んでいた。これらのプラスミドは、抗 - C E A M A b B W 4 3 1 / 2 6 の V<sub>H</sub> 遺伝子と V<sub>L</sub> 遺伝子のヒト化したものを含む (Guessow と Seemann, 1991, *Meth. Enzymology*, 203, 99-121)。その他の出発材料は、プラスミド p A B s t o p 4 3 1 / 2 6 V<sub>H</sub> - h u - G l u c 1 H (E P - A 2 - 0 5 0 1 2 1 5 号明細書) であ

40

【0020】

例1

M A b h u m 4 3 1 / 2 6 の V<sub>H</sub> 及び V<sub>L</sub> 遺伝子の増幅

オリゴヌクレオチド p A B - B a c k 及びリンカー - アンチ (第2表) を用いて、p A B s t o p 4 3 1 V<sub>H</sub> h u m (V<sub>H</sub> 4 3 1 / 2 6) 由来の V<sub>H</sub> 遺伝子に固有のシグナル配列を有する V<sub>H</sub> 遺伝子を増幅した (Guessow と Seemann, 1991, *Meth. Enzymology*, 203, 99-121)。オリゴヌクレオチドリンカー - センスと V<sub>L</sub> ( M u t ) - F o r (第3表) を用

50

いて p A B s t o p 4 3 1 V<sub>L</sub> h u m ( V<sub>L</sub> 4 3 1 / 2 6 ) を増幅した。

【 0 0 2 1 】

例 2

V<sub>H</sub> 4 3 1 / 2 6 及び V<sub>L</sub> 4 3 1 / 2 6 遺伝子フラグメントの結合

オリゴヌクレオチドリンカー - アンチ及びリンカー - センスは互いに部分的に相補性であり、V<sub>H</sub> ドメインと V<sub>L</sub> ドメインとを結合して s F v フラグメントを得るためのポリペプチドリンカーをコードする。増幅した V<sub>H</sub> フラグメントと V<sub>L</sub> フラグメントを融合するために、これらを精製して、下記のような 10 サイクル反応に用いる。

H<sub>2</sub>O 37.5 µl

dNTP ( 2.5 mM ) 5.0 µl

10

PCR 緩衝液 ( 10 × ) 5.0 µl

Taq ポリメラーゼ ( Perkin-Elmer Corp., エメリービル、カリフォルニア ) ( 2.5 U / µl )

0.5 µl

V<sub>L</sub> フラグメントの 0.5 µg / µl DNA 1.0 µl

V<sub>H</sub> フラグメントの 0.5 µg / µl DNA 1.0 µl

PCR 緩衝液 ( 10 × ) : 100 mM トリス、pH 8.3、500 mM KCl、15 mM MgCl<sub>2</sub>、0.1% ( w / v ) ゼラチン。

反応混合物の表面をパラフィンで密封した後、94 で 1 分、55 で 1 分、72 で 2 分プログラムした PCR 装置で 10 - サイクル反応を行い、フランキングプライマー p A B - B a c k 及び V<sub>L</sub> ( M u t ) - F o r を加え、更に 20 サイクルの反応を行う。生成する PCR フラグメントは、リンカーを介して V<sub>L</sub> 遺伝子に結合している V<sub>H</sub> 遺伝子から成る。V<sub>H</sub> 遺伝子に固有のシグナル配列も V<sub>H</sub> 遺伝子の前にある。オリゴヌクレオチド V<sub>L</sub> ( M u t ) - F o r も V<sub>L</sub> 遺伝子の最後のヌクレオチド塩基となり、C は G に置き代わっている。この PCR フラグメントはヒト化した一本鎖 F v ( s F v 4 3 1 / 2 6 ) をコードする。

20

【 0 0 2 2 】

例 3

h u - グルクロニダーゼ遺伝子を含む発現ベクター中への s F v 4 3 1 / 2 6 フラグメントのクローニング

( 2 ) からの s F v フラグメントを H i n d I I I と B a m H I で切断し、H i n d I I I で完全に開裂させ B g l I I I で部分的に開裂したベクター p A B 4 3 1 V<sub>H</sub> h u m / C H 1 + 1 h / - G l c に連結する。ベクター p A B s t o p 4 3 1 / 2 6 V<sub>H</sub> h u - G l u c 1 H は、V<sub>H</sub> に固有のシグナル配列を有する V<sub>H</sub> エキソン、C H 1 エキソン、ヒト I g G 3 C 遺伝子のヒンジエキソン及びヒト - グルクロニダーゼの完全な c D N A を含む。ヒト化した s F v 4 3 1 / 2 6、ヒンジエキソン及びヒト - グルクロニダーゼの遺伝子を含むプラスミドクローン p M C G - E 1 を単離する ( p M C G - E 1 ) 。

30

【 0 0 2 3 】

例 4

B H K 細胞での s F v - h u - G l u c 融合タンパク質の発現

クローン p M C G - E 1 を、ネオマイシン耐性遺伝子を有するプラスミド p R M H 1 4 0 と、メトトレキセート耐性遺伝子を有するプラスミド p S V 2 とで、B H K 細胞中にトランスフェクションする。B H K 細胞は、次いで、M A b B W 4 3 1 / 2 6 h u m の抗原結合特性とヒト - グルクロニダーゼの酵素活性を両方とも有する融合タンパク質を発現する。

40

【 0 0 2 4 】

例 5

s F v - h u - G l u c 融合タンパク質の抗原結合特性及び酵素活性の証明

s F v - h u - G l u c 融合タンパク質が 4 3 1 / 2 6 によって画定された C E A エピトープに特異的に結合することができ、同時にヒト - グルクロニダーゼの酵素活性を示すことができることを、特異性酵素活性試験 ( E P - A 2 - 0 5 0 1 2 1 5 号明細書 ) で

50

示した。この試験は、融合タンパク質が s F v 部分を介して抗原に結合した後に融合タンパク質の - グルクロニダーゼ部分によって 4 - メチルウンベリフェリル - グルクロニドから 4 - メチルウンベリフェロンの放出を測定する。測定した蛍光値を相対的蛍光単位 ( F U ) として記録する。この試験では、 C E A をコーティングしたプレートで融合タンパク質によるメチル - ウンベリフェロンの有意な放出を示す。対照的に、融合タンパク質は、 P E M ( 多形性上皮ムチン ) をコーティングしたコントロールプレートではメチルウンベリフェロンが全く放出されない。

#### 【 0 0 2 5 】

##### 例 6

T S K 3 0 0 0 ゲルクロマトグラフィ

2 5 μ l 中抗 - イディオタイプアフィニティークロマトグラフィによって精製した s F v - h u - G l u c 融合タンパク質 2 0 0 n g を、適当な移動相 ( P B S 、 p H 7 . 2 、 5 g / l マルトースと 4 . 2 g / l アルギニンを含む ) 中、 T S K ゲル G 3 0 0 0 S W X L カラム ( T O S O H A A S 品番 3 . 5 W x N 3 2 1 1 、 7 . 8 m m x 3 0 0 m m ) 上で、 0 . 5 m l / 分の流速でクロマトグラフィ処理を行った。 M e r c k H i t a c h i H P L C 装置 ( L - 4 0 0 0 U V 検出器、 L - 6 2 1 0 インテリジェントポンプ、 D - 2 5 0 0 クロマト積分計 ) を約 2 0 パールで操作し、溶出液の吸光度を 2 8 0 n m で測定し、 L K B 2 1 1 1 M u t i s a c フラクションコレクターを用いて 0 . 5 m l 画分ずつを集めた後、特異性酵素活性試験 ( S E A T ) ( E P 0 5 0 1 2 1 5 A 2 号明細書、例 J ) で分析した。この実験の結果を図 1 に示す。 2 8 0 n m の吸光度の測定によって検出できるピークの位置は、溶出液の特異性及び酵素活性 ( S E A T ) を決定するピークと一致することは明らかである。矢印で示される標準的タンパク質の分子量の位置に基づいて、機能的に活性な s F v - h u - G l u c 融合タンパク質の分子量は本来の条件下では約 2 0 0 k D a であると結論することができる。

#### 【 0 0 2 6 】

##### 例 7

融合タンパク質の決定のための器官 / 腫瘍の処理

下記の逐次的工程を行った。

皮下腫瘍を有し、融合タンパク質または抗体 - 酵素包合体で処理したヌードマウス ( C D I ) で眼窩後部放血を行った後、屠殺し、  
血液をただちに L i q u e m i n 2 5 0 0 0 ( H o f f m a n - L a R o c h e A G 製 ) 1 0 μ l を予め入れておいたエッペンドルフ試験管に移し、  
次に、遠心分離機 ( M e g a f u g e 1 . 0 、 H e r a e u s 製 ) 中で 2 5 0 0 r p m で 1 0 分間遠心分離を行い、  
血漿が得られ、試験まで冷凍し、  
器官または腫瘍を除去し、秤量した後、  
これらを P B S 、 p H 7 . 2 中で 1 % B S A 2 m l で完全にホモジナイズし、腫瘍ホモジネートを 0 . 1 N H C l で p H 4 . 2 に調整し ( - グルクロニダーゼは p H < 3 . 8 では不活性化するので、試料には加え過ぎてはならない ) 、  
総てのホモジネートを 1 6 0 0 0 g で 3 0 分間遠心分離し、  
透明な上澄液を除去し、  
腫瘍上澄液を 0 . 1 N N a O H で中和すると、  
上澄液と血漿を免疫学的試験で定量することができる。

#### 【 0 0 2 7 】

##### 例 8

3 決定基試験

試験を、下記のようにして行う。

マウス抗 - h u - G l u c 抗体 ( M A b 2 1 1 8 / 1 5 7 B e h r i n g w e r k e ) を P B S 、 p H 7 . 2 中で 2 μ g / m l まで希釈したものの 7 5 μ l を、マイクロタイタープレート ( ポリスチレン、 U 字形、 B 型、 N u n c 製、品番 4 - 6 0 4 4 5 ) のそれぞれ

れのウェルに入れ、

マイクロタイタープレートのカバーをして室温で一晩インキュベーションし、次いで、マイクロタイタープレートを0.05Mトリス-クエン酸緩衝液、pH7.4のウェル当たり250 $\mu$ lで3回洗浄し、

この方法でコーティングしたこれらのマイクロタイタープレートを遮断溶液(1%カゼイン/PBS、pH7.2)250 $\mu$ lを用いてそれぞれのウェルで室温で30分間インキュベーションし(非特異的結合部位の遮断)(必要のないコーティングしたマイクロタイタープレートを室温で24時間乾燥した後、長期保存のためにコーティングしたアルミニウムバッグに乾燥カートリッジと共に密封し、

遮断中に、未処理の96ウェルのU字形マイクロタイタープレート(ポリスチレン、Reinner製、品番12058)中で、10試料+2陽性コントロール+1陰性コントロールを1%カゼイン/PBS、pH7.2で1:2に8段階で希釈し(試料150 $\mu$ lから出発し、試料75 $\mu$ lを採取して、カゼイン溶液75 $\mu$ lに加える、など)、

遮断溶液を抗-hu-GluC抗体をコーティングしたマイクロタイタープレートから吸引し、ウェル当たり希釈試料50 $\mu$ lを希釈プレートから試験プレートへ移し、室温で30分間インキュベーションし、

試料のインキュベーション中に、ABC-AP試薬(Vectastain、品番AK-5000)を作成し、試薬A(Avidin-DH)2滴を1%カゼイン/PBS、pH7.2、10ml中で十分に混合し、試薬B(ビオチン化アルカリ性ホスファターゼ)2滴を加えて十分に混合し(ABC-AP溶液は使用の少なくとも30分前に作成しなければならない)、

試験プレートをELISA洗浄緩衝液(Behringwerke、品番OSEW96)で3回洗浄し、

ビオチン標識した検出用抗体混合物(マウス抗431/26抗体(MAb2064/353、Behringwerke)及びマウス抗-CEA抗体(MAb250/183、Behringwerke)との1+1混合物を1%カゼイン/PBS、pH7.2、で希釈して5 $\mu$ g/mlの濃度としたもの、それぞれの抗体の最終濃度は2.5 $\mu$ g/ml)、50 $\mu$ lをそれぞれのウェルに入れ、

試験プレートをELISA洗浄緩衝液で3回洗浄し、

調整したABC-AP溶液50 $\mu$ lをそれぞれのウェルに入れて、室温で30分間インキュベーションし、

ABC-APインキュベーション中に、基質を作成し(それぞれの試験に対して新鮮な基質:1mM 4-メチルウンベリフェリルホスフェート、品番M-8843、Sigma製、0.5Mトリス+0.01%MgCl<sub>2</sub>、pH9.6)、

試験プレートをELISA洗浄緩衝液で7回洗浄し、

基質50 $\mu$ lをそれぞれのウェルに入れ、試験プレートをカバーして37 $^{\circ}$ Cで2時間インキュベーションした後、

停止溶液(0.2Mグリシン+0.2%SDS、pH11.7)150 $\mu$ lをそれぞれのウェルに加え、

蛍光分析法による評価をFluoroscanII(ICN Biomedicals、カタログ番号78-611-00)中で、励起波長355nmで発光波長460nmで行い、

試料中の融合タンパク質の未知濃度を同一実験に含まれる陽性コントロールについての蛍光値(精製したsFv-hu-GluCを校正プロットとしてCEA5 $\mu$ g/mlと混合したものを有する希釈系)に基づいて測定する。

【0028】

例9

酵母中のsFv-hu-GluC融合タンパク質の発現

例2からの一本鎖Fv(sFv)をオリゴ2577及び2561(第7表)で増幅し、XbaI/HindIIIで消化したベクターpUC19中にクローニングする(図2)。

10

20

30

40

50

ヒト - グルクロニダーゼ遺伝子をプラスミド pAB431 / 26 V<sub>H</sub> hum / CH1 + 1H / - Gluc (例3) からのオリゴ2562及び2540で増幅し、BglII / HindIII (図3) で切断した pUC19 (図2) 中のプラスミド sFv431 / 26 に連結する。

KpnI / NcoI フラグメントを sFv431 / 26 由来のオリゴ2587及び2627 (第9表) で増幅し、KpnI / NcoI (図4) で消化した酵母発現ベクター pIXY 中にクローニングする。

pUC19 (図3) のプラスミド sFv431 / 26 hu - Gluc 由来の BstEII / HindIII フラグメントを、V<sub>H</sub> 遺伝子、リンカー及び V<sub>L</sub> 遺伝子の一部を有し (V<sub>H</sub> / link / V<sub>K</sub> part .、pIXY120 中)、BstEII で消化し、部分的に HindIII で消化したベクター pIXY120 中に連結する (図5)。

pIXY120 中で得られるプラスミド sFv431 / 26 hu - Gluc を *Saccharomyces cerevisiae* 中に形質転換し、融合タンパク質を発現させる。

【0029】

例10

酵母中での sFv - 大腸菌 - - グルクロニダーゼ融合タンパク質の発現

大腸菌グルクロニダーゼ遺伝子をオリゴ2638及び2639 (第10表) で pRAJ275 (Jeffersonら、Proc. Natl. Acad. Sci, USA, 83: 8447 - 8451, 1986) から増幅し、BglII / HindIII (図6) で切断した pUC19 中 (例9、図2) で sFv431 / 26 中に連結する。

pUC19 中の sFv431 / 26 大腸菌 - Gluc からの BstEII / HindIII フラグメントを、BstEII / HindIII (図7) で部分的に消化した pIXY120 (例9、図4) におけるベクター V<sub>H</sub> / link / V<sub>K</sub> part 中にクローニングする。

pIXY120 中のプラスミド sFv431 / 26 大腸菌 - Gluc を *Saccharomyces cerevisiae* 中に形質転換し、融合タンパク質を発現させる。

【0030】

例11

酵母中における sFv - - ラクタマーゼ融合タンパク質の発現

例2からの一本鎖 Fv (sFv) をオリゴ2587及び2669 (第11表) で増幅し、KpnI / HindIII で消化した pUC19 ベクターに連結する (図8)。

- ラクタマーゼ II 遺伝子 (Hussainら、J. Bacteriol., 164: 223 - 229, 1985) を *Bacillus cereus* の完全な DNA からオリゴ2673及び2674で増幅し、EcoRI / HindIII で消化した pUC19 ベクターに連結する (図9)。- ラクタマーゼ遺伝子の BclI / HindIII フラグメントを、BglII / HindIII で切断した pUC19 中の sFv431 / 26 に連結する (図10)。

KpnI / HindIII sFv - - ラクタマーゼフラグメントを KpnI で消化し、HindIII で部分的に消化した pIXY120 に連結する (図11)。プラスミドを *Saccharomyces cerevisiae* 中で形質転換し、MAb431 / 26 の抗原結合特性と *Bacillus cereus* - ラクタマーゼの酵素活性を両方とも有する融合タンパク質を発現させる。

【0031】

【表1】

10

20

30

40

第1表

CCAAGCTTAT GAATATGCAA ATCCTGCTCA TGAATATGCA AATCCTCTGA	50	
ATCTACATGG TAAATATAGG TTTGTCTATA CCACAAACAG AAAAACATGA	100	
GATCACAGTT CTCTCTACAG TTRACTGAGCA CACAGGACCT CACC ATG GGA TGG	153	
		Met Gly Trp
AGC TGT ATC ATC CTC TTC TTG GTA GCA ACA GCT ACA GGTAAGGGGC	199	
Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr		
		-10
TCACAGTAGC AGGCTTGAGG TCTGGACATA TATATGGGTG ACAATGACAT	249	10
CCACTTTGCC TTTCTCTCCA CA GGT GTC CAC TCC CAG GTC CAA CTG CAG	293	
		Gly Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln
		1
GAG AGC GGT CCA GGT CTT GTG AGA CCT AGC CAG ACC CTG AGC CTG	343	
Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu		
		10 20
ACC TGC ACC GTG TCT GGC TTC ACC ATC AGC AGT GGT TAT AGC TGG	388	
Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Thr Ile Ser Ser Gly Tyr Ser Trp		
		30
CAC TGG GTG AGA CAG CCA CCT GGA CGA GGT CTT GAG TGG ATT GGA	433	
His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile Gly		
		40 50
TAC ATA CAG TAC AGT GGT ATC ACT AAC TAC AAC CCC TCT CTC AAA	478	20
Tyr Ile Gln Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys		
		60
AGT AGA GTG ACA ATG CTG GTA GAC ACC AGC AAG AAC CAG TTC AGC	523	
Ser Arg Val Thr Met Leu Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser		
		70 80
CTG AGA CTC AGC AGC GTG ACA GCC GCC GAC ACC GCG GTC TAT TAT	558	
Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr		
		90
TGT GCA AGA GAA GAC TAT GAT TAC CAC TGG TAC TTC GAT GTC TGG	613	
Cys Ala Arg Glu Asp Tyr Asp Tyr His Trp Tyr Phe Asp Val Trp		
		100 110
GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA GGA GGC GGT GGA TCG	658	
Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser <u>Glv Glv Glv Glv Ser</u>		
		120
GGC GGT GGT GGG TCG GGT GGC GGC GGA TCT GAC ATC CAG CTG ACC	703	30
<u>Glv Glv Glv Glv Ser Glv Glv Glv Glv Ser</u> Asp Ile Gln Leu Thr		
		130 140
CAG AGC CCA AGC AGC CTG AGC GCC AGC GTG GGT CAC AGA GTG ACC	748	
Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr		
		150
ATC ACC TGT AGT ACC AGC TCG AGT GTA AGT TAC ATG CAC TGG TAC	793	
Ile Thr Cys Ser Thr Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr		
		160 170
CAG CAG AAG CCA GGT AAG GCT CCA AAG CTG CTG ATC TAC AGC ACA	838	
Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Thr		
		180

【 0 0 3 2 】

【表 2】

第1表 (続 き)

TCC AAC CTG GCT TCT GGT GTG CCA AGC AGA TTC AGC GGT AGC GGT	883
Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly	
190 200	
AGC GGT ACC GAC TTC ACC TTC ACC ATC AGC AGC CTC CAG CCA GAG	928
Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu	
210	
GAC ATC GCC ACC TAC TAC TGC CAT CAG TGG AGT AGT TAT CCC ACG	973
Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Thr	
220 230	
TTC GGC CAA GGG ACC AAG CTG GAG ATC AAA GGTGAGTAGA ATTTAAACTT	1023
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	
240	
TGCTTCCTCA GTTGGATCTG AGTAACTCCC AATCTTCTCT CTGCA GAG CTC AAA	1077
Glu Leu Lys	
ACC CCA CTT GGT GAC ACA ACT CAC ACA TGC CCA CGG TGC CCA	1119
Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro Arg Cys Pro	
250	
GGTAAGCCAG CCCAGGACTC GCCCTCCAGC TCAAGGCGGG ACAAGAGCCC	1159
TAGAGTGGCC TGAGTCCAGG GACAGGCCCC AGCAGGGTGC TGACGCATCC	1219
ACCTCCATCC CAGATCCCCG TAACTCCCAA TCTTCTCTCT GCA GCG GCG GCG	1271
Ala Ala Ala	
260	
GCG GTG CAG GGC GGG ATG CTG TAC CCC CAG GAG AGC CCG TCG CGG	1316
Ala Val Gln Gly Gly Met Leu Tyr Pro Gln Glu Ser Pro Ser Arg	
270	
GAG TGC AAG GAG CTG GAC GGC CTC TGG AGC TTC CGC GCC GAC TTC	1361
Glu Cys Lys Glu Leu Asp Gly Leu Trp Ser Phe Arg Ala Asp Phe	
280 290	
TCT GAC AAC CGA CGC CGG GGC TTC GAG GAG CAG TGG TAC CGG CGG	1406
Ser Asp Asn Arg Arg Arg Gly Phe Glu Glu Gln Trp Tyr Arg Arg	
300	
CCG CTG TGG GAG TCA GGC CCC ACC GTG GAC ATG CCA GTT CCC TCC	1451
Pro Leu Trp Glu Ser Gly Pro Thr Val Asp Met Pro Val Pro Ser	
310 320	
AGC TTC AAT GAC ATC AGC CAG GAC TGG CGT CTG CGG CAT TTT GTC	1496
Ser Phe Asn Asp Ile Ser Gln Asp Trp Arg Leu Arg His Phe Val	
330	
GGC TGG GTG TGG TAC GAA CGG GAG GTG ATC CTG CCG GAG CGA TGG	1541
Gly Trp Val Trp Tyr Glu Arg Glu Val Ile Leu Pro Glu Arg Trp	
340 350	
ACC CAG GAC CTG CGC ACA AGA GTG GTG CTG AGG ATT GGC AGT GCC	1586
Thr Gln Asp Leu Arg Thr Arg Val Val Leu Arg Ile Gly Ser Ala	
360	
CAT TCC TAT GCC ATC GTG TGG GTG AAT GGG GTC GAC ACG CTA GAG	1631
His Ser Tyr Ala Ile Val Trp Val Asn Gly Val Asp Thr Leu Glu	
370 380	
CAT GAG GGG GGC TAC CTC CCC TTC GAG GCC GAC ATC AGC AAC CTG	1676
His Glu Gly Gly Tyr Leu Pro Phe Glu Ala Asp Ile Ser Asn Leu	
390	
GTC CAG GTG GGG CCC CTG CCC TCC CGG CTC CGA ATC ACT ATC GCC	1721
Val Gln Val Gly Pro Leu Pro Ser Arg Leu Arg Ile Thr Ile Ala	
400 410	

10

20

30

40

【 0 0 3 3 】

【 表 3 】

## 第1表 (続 き)

ATC	AAC	AAC	ACA	CTC	ACC	CCC	ACC	ACC	CTG	CCA	CCA	GGG	ACC	ATC	1765	
Ile	Asn	Asn	Thr	Leu	Thr	Pro	Thr	Thr	Leu	Pro	Pro	Gly	Thr	Ile		
									420							
CAA	TAC	CTG	ACT	GAC	ACC	TCC	AAG	TAT	CCC	AAG	GGT	TAC	TTT	GTC	1811	
Gln	Tyr	Leu	Thr	Asp	Thr	Ser	Lys	Tyr	Pro	Lys	Gly	Tyr	Phe	Val		
				430										440		
CAG	AAC	ACA	TAT	TTT	GAC	TTT	TTC	AAC	TAC	GCT	GGA	CTG	CAG	CGG	1856	
Gln	Asn	Thr	Tyr	Phe	Asp	Phe	Phe	Asn	Tyr	Ala	Gly	Leu	Gln	Arg		
									450							
TCT	GTA	CTT	CTG	TAC	ACG	ACA	CCC	ACC	ACC	TAC	ATC	GAT	GAC	ATC	1901	10
Ser	Val	Leu	Leu	Tyr	Thr	Thr	Pro	Thr	Thr	Tyr	Ile	Asp	Asp	Ile		
				460										470		
ACC	GTC	ACC	ACC	AGC	GTG	GAG	CAA	GAC	AGT	GGG	CTG	GTG	AAT	TAC	1946	
Thr	Val	Thr	Thr	Ser	Val	Glu	Gln	Asp	Ser	Gly	Leu	Val	Asn	Tyr		
									480							
CAG	ATC	TCT	GTC	AAG	GGC	AGT	AAC	CTG	TTC	AAG	TTG	GAA	GTG	CGT	1991	
Gln	Ile	Ser	Val	Lys	Gly	Ser	Asn	Leu	Phe	Lys	Leu	Glu	Val	Arg		
				490										500		
CTT	TTG	GAT	GCA	GAA	AAC	AAA	GTC	GTG	GCG	AAT	GGG	ACT	GGG	ACC	2036	
Leu	Leu	Asp	Ala	Glu	Asn	Lys	Val	Val	Ala	Asn	Gly	Thr	Gly	Thr		
									510							
CAG	GGC	CAA	CTT	AAG	GTG	CCA	GGT	GTC	AGC	CTC	TGG	TGG	CCG	TAC	2081	
Gln	Gly	Gln	Leu	Lys	Val	Pro	Gly	Val	Ser	Leu	Trp	Trp	Pro	Tyr		
				520										530		
CTG	ATG	CAC	GAA	CGC	CCT	GCC	TAT	CTG	TAT	TCA	TTG	GAG	GTG	CAG	2126	20
Leu	Met	His	Glu	Arg	Pro	Ala	Tyr	Leu	Tyr	Ser	Leu	Glu	Val	Gln		
									540							
CTG	ACT	GCA	CAG	ACG	TCA	CTG	GGG	CCT	GTG	TCT	GAC	TTC	TAC	ACA	2171	
Leu	Thr	Ala	Gln	Thr	Ser	Leu	Gly	Pro	Val	Ser	Asp	Phe	Tyr	Thr		
				550										560		
CTC	CCT	GTG	GGG	ATC	CGC	ACT	GTG	GCT	GTC	ACC	AAG	AGC	CAG	TTC	2216	
Leu	Pro	Val	Gly	Ile	Arg	Thr	Val	Ala	Val	Thr	Lys	Ser	Gln	Phe		
									570							
CTC	ATC	AAT	GGG	AAA	CCT	TTC	TAT	TTC	CAC	GGT	GTC	AAC	AAG	CAT	2261	
Leu	Ile	Asn	Gly	Lys	Pro	Phe	Tyr	Phe	His	Gly	Val	Asn	Lys	His		
				580										590		
GAG	GAT	GCG	GAC	ATC	CGA	GGG	AAG	GGC	TTC	GAC	TGG	CCG	CTG	CTG	2306	
Glu	Asp	Ala	Asp	Ile	Arg	Gly	Lys	Gly	Phe	Asp	Trp	Pro	Leu	Leu		
									600							
GTG	AAG	GAC	TTC	AAC	CTG	CTT	CGC	TGG	CTT	GGT	GCC	AAC	GCT	TTC	2351	30
Val	Lys	Asp	Phe	Asn	Leu	Leu	Arg	Trp	Leu	Gly	Ala	Asn	Ala	Phe		
				610										620		
CGT	ACC	AGC	CAC	TAC	CCC	TAT	GCA	GAG	GAA	GTG	ATG	CAG	ATG	TGT	2396	
Arg	Thr	Ser	His	Tyr	Pro	Tyr	Ala	Glu	Glu	Val	Met	Gln	Met	Cys		
									630							
GAC	CGC	TAT	GGG	ATT	GTG	GTC	ATC	GAT	GAG	TGT	CCC	GGC	GTG	GGC	2441	
Asp	Arg	Tyr	Gly	Ile	Val	Val	Ile	Asp	Glu	Cys	Pro	Gly	Val	Gly		
				640										650		
CTG	GCG	CTG	CCG	CAG	TTC	TTC	AAC	AAC	GTT	TCT	CTG	CAT	CAC	CAC	2486	
Leu	Ala	Leu	Pro	Gln	Phe	Phe	Asn	Asn	Val	Ser	Leu	His	His	His		
									660							
ATG	CAG	GTG	ATG	GAA	GAA	GTG	GTG	CGT	AGG	GAC	AAG	AAC	CAC	CCC	2531	
Met	Gln	Val	Met	Glu	Glu	Val	Val	Arg	Arg	Asp	Lys	Asn	His	Pro		
				670										680		40

【 0 0 3 4 】

【 表 4 】

## 第1表 (続 き)

GCG	GTC	GTG	ATG	TGG	TCT	GTG	GCC	AAC	GAG	CCT	GCG	TCC	CAC	CTA	2576	
Ala	Val	Val	Met	Trp	Ser	Val	Ala	Asn	Glu	Pro	Ala	Ser	His	Leu		
GAA	TCT	GCT	GGC	TAC	TAC	TTG	AAG	ATG	GTG	ATC	GCT	CAC	ACC	AAA	2621	
Glu	Ser	Ala	Gly	Tyr	Tyr	Leu	Lys	Met	Val	Ile	Ala	His	Thr	Lys		
TCC	TTG	GAC	CCC	TCC	CGG	CCT	GTG	ACC	TTT	GTG	AGC	AAC	TCT	AAC	2666	
Ser	Leu	Asp	Pro	Ser	Arg	Pro	Val	Thr	Phe	Val	Ser	Asn	Ser	Asn		
TAT	GCA	GCA	GAC	AAG	GGG	GCT	CCG	TAT	GTG	GAT	GTG	ATC	TGT	TTG	2711	
Tyr	Ala	Ala	Asp	Lys	Gly	Ala	Pro	Tyr	Val	Asp	Val	Ile	Cys	Leu		10
AAC	AGC	TAC	TAC	TCT	TGG	TAT	CAC	GAC	TAC	GGG	CAC	CTG	GAG	TTG	2756	
Asn	Ser	Tyr	Tyr	Ser	Trp	Tyr	His	Asp	Tyr	Gly	His	Leu	Glu	Leu		
ATT	CAG	CTG	CAG	CTG	GCC	ACC	CAG	TTT	GAG	AAC	TGG	TAT	AAG	AAG	2801	
Ile	Gln	Leu	Gln	Leu	Ala	Thr	Gln	Phe	Glu	Asn	Trp	Tyr	Lys	Lys		
TAT	CAG	AAG	CCC	ATT	ATT	CAG	AGC	GAG	TAT	GGA	GCA	GAA	ACG	ATT	2846	
Tyr	Gln	Lys	Pro	Ile	Ile	Gln	Ser	Glu	Tyr	Gly	Ala	Glu	Thr	Ile		
GCA	GGG	TTT	CAC	CAG	GAT	CCA	CCT	CTG	ATG	TTC	ACT	GAA	GAG	TAC	2891	
Ala	Gly	Phe	His	Gln	Asp	Pro	Pro	Leu	Met	Phe	Thr	Glu	Glu	Tyr		
CAG	AAA	AGT	CTG	CTA	GAG	CAG	TAC	CAT	CTG	GGT	CTG	GAT	CAA	AAA	2936	
Gln	Lys	Ser	Leu	Leu	Glu	Gln	Tyr	His	Leu	Gly	Leu	Asp	Gln	Lys		20
CGC	AGA	AAA	TAT	GTG	GTT	GGA	GAG	CTC	ATT	TGG	AAT	TTT	GCC	GAT	2981	
Arg	Arg	Lys	Tyr	Val	Val	Gly	Glu	Leu	Ile	Trp	Asn	Phe	Ala	Asp		
TTC	ATG	ACT	GAA	CAG	TCA	CCG	ACG	AGA	GTG	CTG	GGG	ATT	AAA	AAG	3026	
Phe	Met	Thr	Glu	Gln	Ser	Pro	Thr	Arg	Val	Leu	Gly	Asn	Lys	Lys		
GGG	ATC	TTC	ACT	CGG	CAG	AGA	CAA	CCA	AAA	AGT	GCA	GCG	TTC	CTT	3071	
Gly	Ile	Phe	Thr	Arg	Gln	Arg	Gln	Pro	Lys	Ser	Ala	Ala	Phe	Leu		
TTG	CGA	GAG	AGA	TAC	TGG	AAG	ATT	GCC	AAT	GAA	ACC	AGG	TAT	CCC	3116	
Leu	Arg	Glu	Arg	Tyr	Trp	Lys	Ile	Ala	Asn	Glu	Thr	Arg	Tyr	Pro		
CAC	TCA	GTA	GCC	AAG	TCA	CAA	TGT	TTG	GAA	AAC	AGC	CCG	TTT	ACT	3161	
His	Ser	Val	Ala	Lys	Ser	Gln	Cys	Leu	Glu	Asn	Ser	Pro	Phe	Thr		30
TGA	GCAAGACTGA	TACCACCTGC	GTGTCCCTTC	CTCCCCGAGT	CAGGGCGACT	3214										
...																
TCCACAGCAG	CAGAACAAGT	GCCTCCTGGA	CTGTTACCGG	CAGACCAGAA	3264											
CGTTTCTGGC	CTGGGTTTTG	TGGTCATCTA	TTCTAGCAGG	GAACACTAAA	3314											

【 0 0 3 5 】

【 表 5 】

## 第2表

pAB-Back:

5' ACC AGA AGC TTA TGA ATA TGC AAA TC' 3'

Linker-Anti:

5' GCC ACC CGA CCC ACC ACC GCC CGA TCC ACC GCC TCC TGA  
GGA GAC GGT GAC CGT GGT C' 3'

【0036】

【表6】

## 第3表

リンカー - センス :

5' GGT GGA TCG GGC GGT GGT GGG TCG GGT GGC GGC GGA TCT  
GAC ATC CAG CTG ACC CAG AGC 3'

VL(Mut)-For:

5' TGC AGG ATC CAA CTG AGG AAG CAA AGT TTA AAT TCT ACT  
CAC CTT TGA TC 3'

【0037】

【表7】

10

20

30

第4表

MzSto1を行するCD1nu/nuマウスにおけるsFv-huβGluC 融合タンパク質の薬物動態

3決定基試験で測定した組織1g当たりまたは血漿1ml当たりのsFv-huβGluCのng数

組織型	マウス 1 0.05 h	マウス 2 3 h	マウス 3 24 h	マウス 4 48 h	マウス 5a 120 h	マウス 5b 120 h
-----	-----------------	--------------	---------------	---------------	-----------------	-----------------

腫瘍	24.8	4	7.7	2.1	2.2	6.2
脾臓	15.4	4.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
肝臓	40.9	10.1	0.8	0.8	0.3	<0.1
腸	5.2	4.4	1.1	1.2	0.6	<0.1
腎臓	44.4	7	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
肺	154.8	17.3	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
心臓	148.3	8.2	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
血漿	630.9	95	2.7	0.4	<0.1	<0.1

マウス当たり精製した融合タンパク質0.8μgの前脈内注射

【0038】

【表8】

第5表  
BHK細胞からのsFv-hu $\beta$ -Gluc融合タンパク質の炭水化物含量における単糖類成分の分析

	フコース	ガラクトサミン	N-アセチル グルコサミン	ガラクトース	グルコース	マンノース	N-アセチル ノイラミン酸
sFv-hu $\beta$ -Gluc	4	2	30	8	1	43	4

精製したsFv-hu $\beta$ -Gluc融合タンパク質をその炭水化物含量について検討した。この結果、加水分解の後、下記の個々の成分は記載されたモル比（炭水化物のモル数 / sFv-hu $\beta$ -Glucのモル数）であることがわかった。

マンノース、グルコサミン及びガラクトースのモル比から、高マンノース型および/またはハイブリッド型構造（複合型構造の外に）が存在すると結論することができる。それ故、マンノース、ガラクトース、アセチルノイラミン酸或いはN-アセチルグルコサミンは末端に存在し、マンノースはマンノース6-ホスフェートとしても存在できる。

10

20

30

40

50

方法：

ノイラミン酸はHermentinとSeidat(1991)GBF Monographs 15巻、185~188頁の方法(80 で0.1N硫酸の存在下にて30分間加水分解した後、0.4N水酸化ナトリウム溶液で中和)によって、パルスアメロメトリー検出法による高pHアニオン交換クロマトグラフィ(HPAE-PAD)によって測定した。

単糖類成分も同様に、Hardyら、(1988)Analytical Biochemistry, 170, 54-62に記載の方法を基としたHPAE-PAD(100で2Nトリフルオロ酢酸の存在下にて4時間加水分解した後、Speed Vacで蒸発乾固)によって測定した。

【0039】

【表9】

第6表 Saccharomyces cerevisiaeからのsFv-huβGluc融合タンパク質の炭水化物含量における単糖類成分の分析

sFv-huβGluc (mol/mol)	6	12	150	mol/mol
	グルコサミン	グルコース	マンノース	

【0040】

【表10】

## 第7表

pUC19中クローニングのsFv431/26用のオリゴ

## sFv for (2561)

5' TTT TTA AGC TTA GAT CTC CAC CTT GGT C 3'

10

## sFv back (2577)

5' AAA AAT CTA GAA TGC AGG TCC AAC TGC AGG  
AGA G 3'

【0041】

【表11】

## 第8表

20

sFv pUC19中クローニングのhum.  $\beta$ -Gluc用のオリゴHum. $\beta$ -Gluc. back オリゴ (2562)

5' AAA AAA GTG ATC AAA GCG TCT GGC GGG CCA CAG  
GGC GGG ATC CTG TAC 3'

Hum. $\beta$ -Gluc for オリゴ (2540)

5' TTT TAA GCT TCA AGT AAA CGG GCT GTT 3'

30

【0042】

【表12】

## 第9表

pIXY120中クローニングのsFv/hum-β-Gluc用のオリゴ

PCR oligo VHpIXY back (2587)

5' TTT TGG TAC CTT TGG ATA AAA GAC AGG TCC AAC TGC AGG  
AGA G 3'

10

PCR oligo VKpIXY for (2627)

5' A AAA CCA TGG GAA TTC AAG CTT CGA GCT GGT ACT ACA  
GGT 3'

20

【0043】

【表13】

第10表

sFvpUC19中クローニングのE. coli β-Gluc用のオリゴ

E. coli β-Gluc. for (2639)

5' TTT TAA GCT TCC ATG GCG GCC GCT CAT TGT TTG  
CCT CCC TGC TG 3'

30

E. coli β-Gluc. back (2638)

5' AAA AAG ATC TCC GCG TCT GGC GGG CCA CAG TTA  
CGT GTA GAA ACC CCA 3'

【0044】

【表14】

40

## 第11表

pIXY120中クローニングのsFv/ $\beta$ -ラクタマーゼ用のオリゴ

PCR オリゴ VHpIXY back (2587)

5'    TTT TGG TAC CTT TGG ATA AAA GAC AGG TCC AAC TGC AGG    10  
       AGA G        3'

PCR オリゴ VKpIXY/ $\beta$ -ラクタマーゼ for (2669)

5'    AAA AAG CTT AGA TCT CCA GCT TGG TCC C    3'    20

PCR オリゴ link/ $\beta$ -ラクタマーゼ back (2673)

5'    AAA GAA TTC TGA TCA AAT CCT CGA GCT CAG GTT CAC  
       AAA AGG TAG AGA AAA CAG T    3'    リンカー    30

PCR オリゴ  $\beta$ -ラクタマーゼ for (2674)

5'    TTT AAG CTT ATT TTA ATA AAT CCA ATG T    3'    40

## 【図面の簡単な説明】

【図1】TSK3000ゲルクロマトグラフィ分析の結果を示す説明図。

【図2】pUC19中プラスミドsFv431/26の構築を示す説明図。

【図3】pUC19中プラスミドsFv431/26 hu - Glucの構築を示す説明図。    40

【図4】pIXY120中ベクターV<sub>H</sub>/link/V<sub>K</sub> partの構築を示す説明図。

【図5】pIXY120中sFv431/26 hu - Glucの構築を示す説明図。

【図6】pUC19中sFv431/26 E. Coli - Glucの構築を示す説明図。

【図7】pIXY120中sFv431/26 E. Coli - Glucの構築を示す説明図。

【図8】pUC19中sFv431/26の構築を示す説明図。

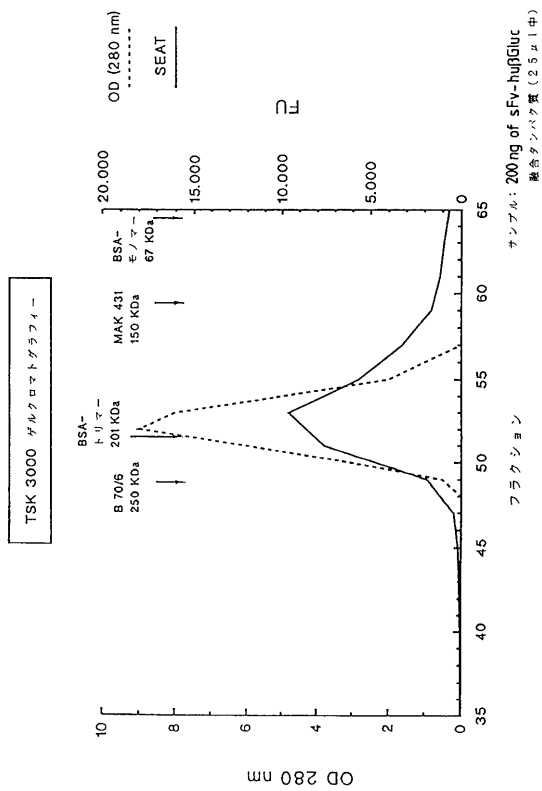
【図9】pUC19中 - ラクタマーゼ遺伝子の構築を示す説明図。

【図10】pUC19中431/26sFv/ - ラクタマーゼ遺伝子の構築を示す説明    50

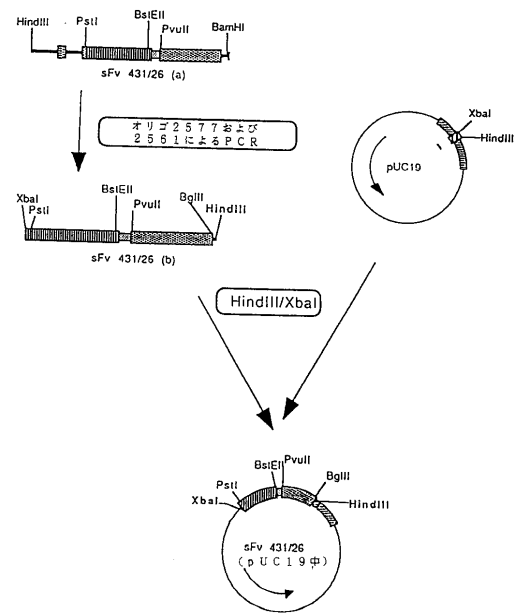
図。

【図11】 pIXY120中431/26 sFv / -ラクターゼ遺伝子の構築を示す説明図。

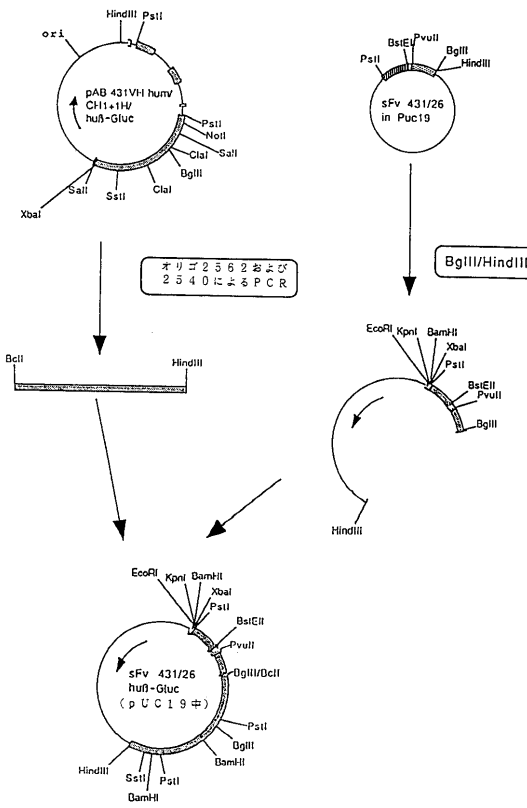
【図1】



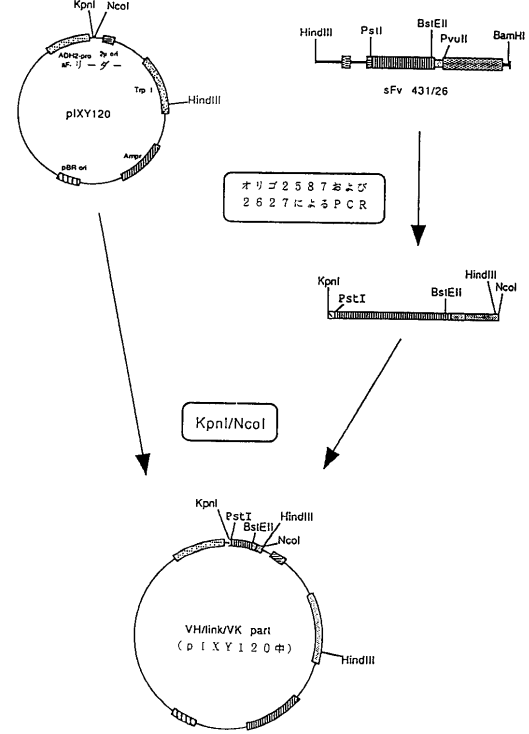
【図2】



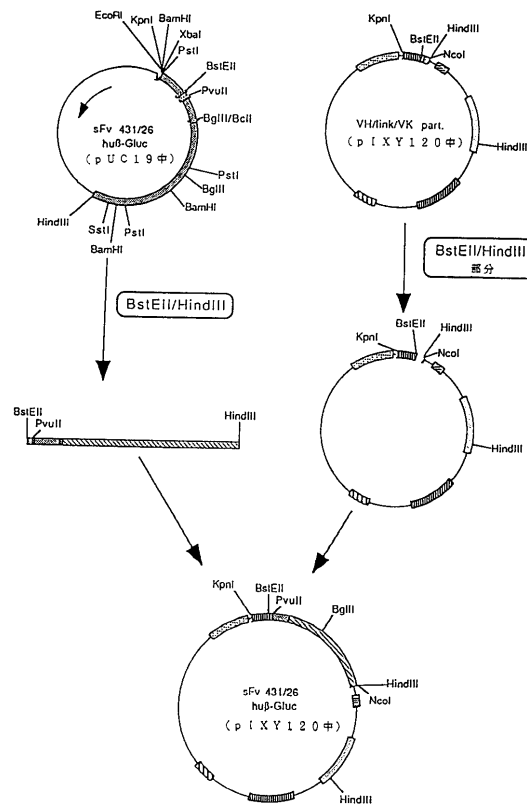
【 図 3 】



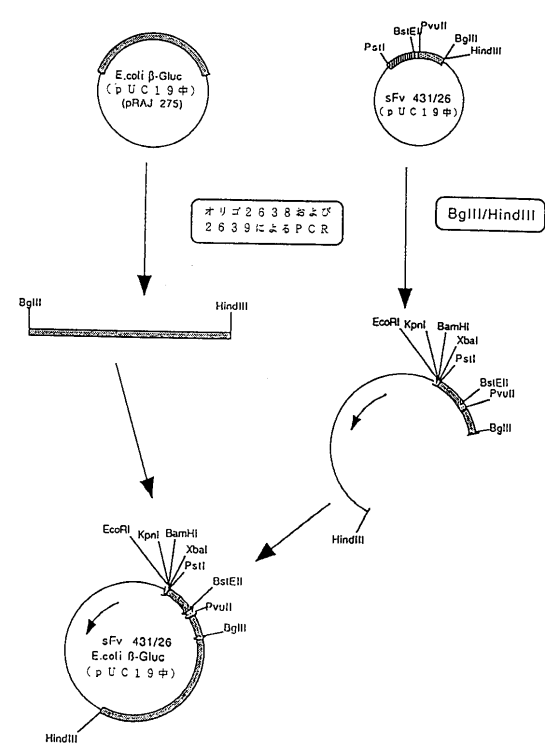
【 図 4 】



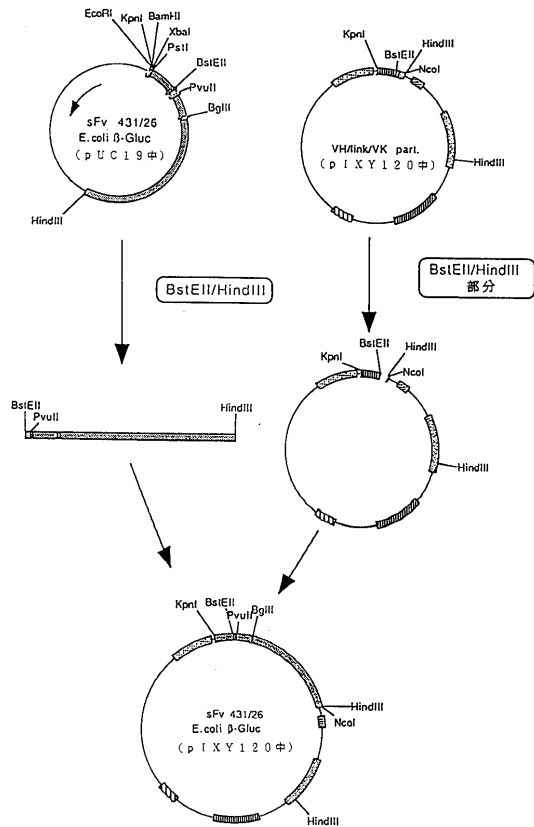
【 図 5 】



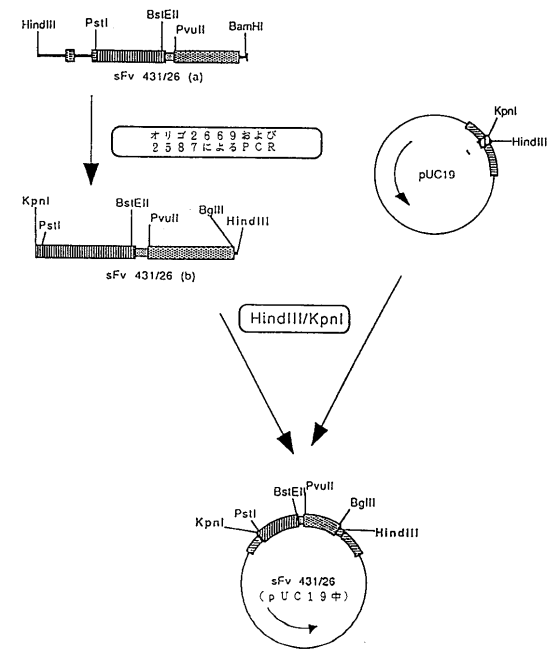
【 図 6 】



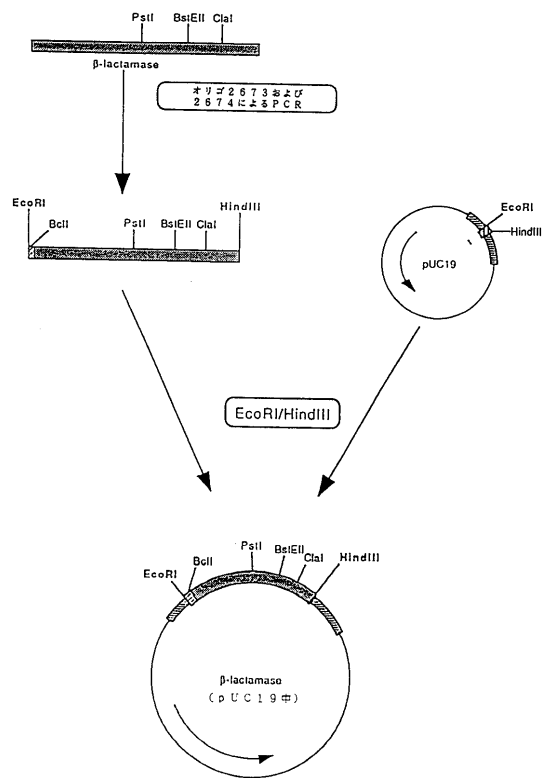
【 図 7 】



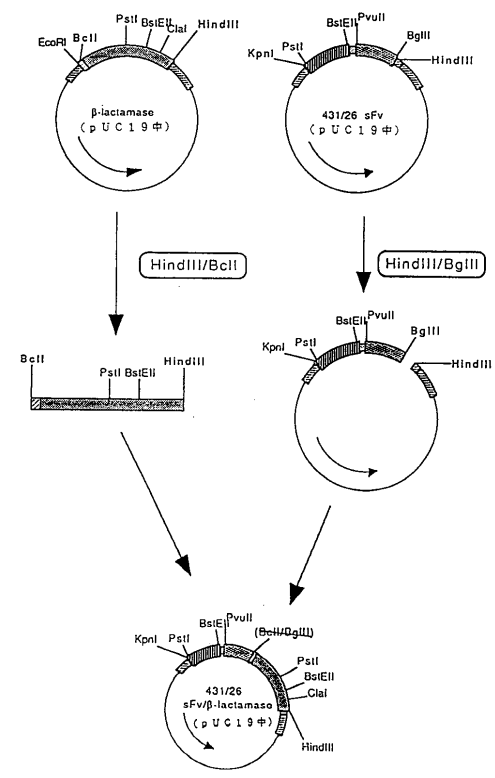
【 図 8 】



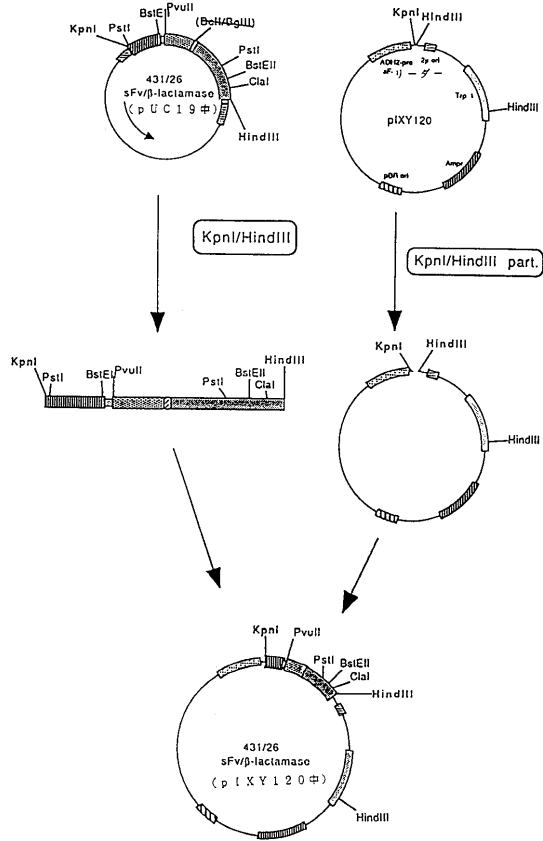
【 図 9 】



【 図 10 】



【 図 11 】



## フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	
<b>C 1 2 P 21/02 (2006.01)</b>		C 1 2 P 21/02	C
<b>G 0 1 N 33/53 (2006.01)</b>		G 0 1 N 33/53	D
C 1 2 R 1/865 (2006.01)		C 1 2 N 1/19	
		C 1 2 R 1:865	
		C 1 2 P 21/02	C
		C 1 2 R 1:865	

- (72)発明者 ゲルハルト、ゼーマン  
ドイツ連邦共和国マールブルク エルンハウゼン、ワイスドルンウェーク、3 2
- (72)発明者 クラウス、ボスレット  
ドイツ連邦共和国マールブルク アン、デル、ハウシュタット、6 4
- (72)発明者 イエルク、チェック  
ドイツ連邦共和国マールブルク、ヘーエンウェーク、3

審査官 斎藤 真由美

- (56)参考文献 国際公開第 9 1 / 0 0 9 1 3 4 (WO, A 1)  
国際公開第 9 1 / 0 0 2 0 7 8 (WO, A 1)  
国際公開第 9 0 / 0 1 2 5 9 2 (WO, A 1)  
国際公開第 9 1 / 0 1 0 7 4 1 (WO, A 1)

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-90  
C07K 13/00-19/00  
C12P 21/00-08  
C12N 1/00-9/99  
A61K 31/00-48/00  
A61P 1/00-43/00  
PubMed、MEDLINE(STN)  
BIOSIS/WPI(DIALOG)  
EUROPAT(QUESTEL)  
GenBank/DDBJ/EMBL/GeneSeq  
SwissProt/PIR/GeneSeq