

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2006年3月16日 (16.03.2006)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2006/028197 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) C12P 21/08 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2005/016576
- (22) 国際出願日: 2005年9月2日 (02.09.2005)
- (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2004-259090 2004年9月6日 (06.09.2004) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 麒麟麦酒株式会社 (KIRIN BEER KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒1048288 東京都中央区新川二丁目10番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 片岡 之郎 (KATAOKA, Shiro) [JP/JP]; 〒3701295 群馬県高崎市宮原町3番地 麒麟麦酒株式会社 医薬探索研究所内 Gunma (JP). 戸村 高文 (TOMURA, Takafumi) [JP/JP]; 〒3701295 群馬県高崎市宮原町3番地 麒麟麦酒株式会社 医薬探索研究所内 Gunma (JP). 大谷 則子 (OTANI, Noriko) [JP/JP]; 〒3701295 群馬県高崎市宮原町3番地 麒麟麦酒株式会社 医薬探索研究所内 Gunma (JP).
- (74) 代理人: 平木 祐輔, 外 (HIRAKI, Yusuke et al.); 〒1050001 東京都港区虎ノ門4丁目3番20号 神谷町MTビル19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, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, 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, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: ANTI-A33 ANTIBODY

(54) 発明の名称: 抗A33抗体

(57) Abstract: It is intended to provide an antibody or a fragment of the antibody which can bind to A33, specifically attacks a tumor cell expressing A33 by using an immune system with ADCC or CDC and produces no HAHA; and a drug for preventing or treating presently intractable malignant tumors of various types such as solid tumor which contains the antibody or the antibody fragment as described above. Namely, an antibody capable of binding to A33 or a functional fragment thereof which is an A33-binding antibody produced by the hybridoma M10 (deposition number: FERM BP-10107), M96 (deposition number: FERM BP-10108), M165 (deposition number: FERM BP-10106), N26 (deposition number: FERM BP-10109), Q47 (deposition number: FERM BP-10104), Q54 (deposition number: FERM BP-10105) or R5 (deposition number: FERM BP-10107) or its functional fragment; and a drug for preventing or treating tumor which contains the above antibody or its functional fragment.

(57) 要約: A33に結合でき、かつA33を発現する腫瘍細胞をADCCやCDCによる免疫システムを用いて特異的に攻撃し、さらにHAHAの産生されない抗体またはその抗体断片の提供ならびに該抗体またはその抗体断片を含む、現在治療困難な固形腫瘍をはじめとした各種悪性腫瘍の予防又は治療剤の提供。 A33に結合できる抗体、またはその機能的断片であって、ハイブリドーマM10 (受託番号: FERM BP-10107)、M96 (受託番号: FERM BP-10108)、M165 (受託番号: FERM BP-10106)、N26 (受託番号: FERM BP-10109)、Q47 (受託番号: FERM BP-10104)、Q54 (受託番号: FERM BP-10105) またはR5 (受託番号: FERM BP-10107) により産生されるA33に結合する抗体、またはその機能的断片、ならびに該抗体、またはその機能的断片を含む腫瘍の予防または治療剤。

明 細 書

抗 A33 抗体

技術分野

本発明は A33 抗原に特異的に結合する抗 A33 抗体に関する。さらに本発明は、抗 A33 抗体を有効成分とする、A33 を発現している細胞に起因する疾患に対する予防又は治療剤、特に悪性腫瘍治療剤に関する。

背景技術

癌(腫瘍)は、わが国における死亡原因の第一位を占め、さらに患者数は年々増加してきており、有効性及び安全性の高い薬剤や治療法の開発が強く望まれている。中でも、大腸癌は、1999年度の調査で全癌の12.2%を占めており、死亡率は、男性では第3位、女性では第2位であるが、近年では著しく増加して今後、大腸癌は罹患率や死亡率で胃癌を追い抜くと予想されている。また、胃癌は、1999年度の調査で全癌の17.4%を占めており、死亡率は、男性では第2位、女性では第1位である。

治療薬としての抗体の使用は、種々の病態(癌型)の治療における重要かつ価値のあるアプローチとして認められつつある。抗体の特異性により、腫瘍特異的抗原が異種細胞の特性を示す病態の治療に有用である。抗体は、細胞表面に発現する蛋白質である腫瘍特異的抗原に結合し、このような細胞を有効に標的とする。現在、細胞膜上に存在するレセプターである CD20 を標的としたキメラ抗体 (Rituximab)、Her2/neu を標的としたヒト化抗体などのモノクローナル抗体が、悪性腫瘍を対象疾患として使用されており、その治療効果が認められている。抗体は、血中半減期が長く、抗原への特異性が高いという特徴を持ち、抗腫瘍剤として特に有用である。例えば、腫瘍特異的な抗原を標的とした抗体であれば、投与した抗体は腫瘍に集積することが推定されるので、補体依存性細胞傷害活性 (CDC) や抗体依存的細胞性細胞傷害活性 (ADCC) による、免疫システムの癌細胞に対する攻撃が期待できる。また、その抗体に放射性核種や細胞毒性物質などの

薬剤を結合しておくことにより、結合した薬剤を効率よく腫瘍部位に送達することが可能となり、同時に、非特異的な他組織への該薬剤到達量が減少することで、副作用の軽減も見込むことができる。腫瘍特異的抗原に細胞死を誘導するような活性がある場合はアゴニスティックな活性を持つ抗体を投与することで、また、腫瘍特異的抗原が細胞の増殖及び生存に関与する場合は中和活性を持つ抗体を投与することで、腫瘍特異的な抗体の集積と、抗体の活性による腫瘍の増殖停止又は退縮が期待される。抗体は、上記のようにその特徴から抗腫瘍剤として適用するのに適切であると考えられる。

最初の抗体製造への進出には、対象動物としてマウスが使用された。しかしながら、多数の理由によりマウス抗体の *in vivo* での使用は制限されている。ヒト宿主によって外来物として認識されるマウス抗体は、いわゆる「ヒト抗マウス抗体」すなわち「HAMA」応答を惹起する (Schiff et al., *Canc. Res.* (1985), 45, 879-885 参照)。さらに、マウス抗体の Fc 部分は、ヒト補体または細胞傷害活性の刺激に有効ではない。

このような問題を回避するためのアプローチのひとつとしてキメラ抗体が開発された (欧州特許出願 120694 及び 125023 参照)。キメラ抗体は、2つまたはそれ以上の種由来の抗体の一部 (マウス抗体の可変領域及びヒト抗体の定常領域など) を含む。このようなキメラ抗体の利点はマウス抗体の特徴は保持するが、ヒト Fc を持つためヒト補体または細胞傷害活性を刺激することができる。しかし、このようなキメラ抗体も依然として「ヒト抗キメラ抗体」すなわち「HACA」応答を惹起する (Bruggemann, et al., *J. Exp. Med.*, 170, 2153-2157, 1989 参照)。

さらに、置換された抗体の一部のみが相補性決定領域 (すなわち「CDR」) である組換え抗体が開発された (英国特許 GB2188638A 及び米国特許第 5585089 号)。CDR 移植技術を使用してマウス CDR、ヒト可変部フレームワーク及び定常領域からなる抗体 (すなわち「ヒト化抗体」) が産生されている (Riechmann, et al., *Nature* (1988), 332, 323-327 参照)。

「A33」と呼ばれるクラス I の細胞膜タンパクで Ig スーパーファミリーのひとつであり腫瘍特異的抗原である抗原に対するマウス抗 A33 抗体及びヒト化抗体について報告されている (特許文献 1 及び非特許文献 1 から 5 を参照)。この抗原は、

結腸癌及び胃癌に関連することが公知である（特許文献 2、特許文献 3 及び非特許文献 6 を参照）。また、このヒト化 A33 抗体を用いて、近年、フェーズ I の臨床試験を結腸癌患者を対象に行っている（非特許文献 4 および 5 を参照）。前者の抗体単独投与の報告では、抗体投与可能な患者 11 名のうち 1 名に部分反応が認められた。また、後者の抗体と化学療法との併用試験を行った報告では、抗体投与可能な患者 12 名のうち 3 名に部分反応、1 名に混合反応が認められた。近年、Genentech 社より開発が進められているアバスチン（ベバシズマブ；ヒト化抗 VEGF 抗体）でさえも、フェーズ I 臨床試験において、標準化学療法との併用で 12 名中 1 名の部分反応を示したという報告がある（Margolin K. et al., J. Clin. Oncol. (2001) 19, 851-856）。このことから、抗体単独投与で 11 名中 1 名に部分反応が認められたことは、大腸癌において高い抗腫瘍効果を示すことが期待される。

しかしながら、上記のようにフェーズ I 臨床試験において非常に高い腫瘍反応をヒト化 A33 抗体は示したが、両試験とも 50% 以上の高い確率でヒト抗ヒト化抗体（すなわち「HAHA」）が産生された。興味深いことに、腫瘍反応性の高かった患者に関しては、HAHA が認められなかった。

特許文献 1 米国特許第 5958412 号明細書

特許文献 2 米国特許第 5643550 号明細書

特許文献 3 米国特許第 5160723 号明細書

非特許文献 1 King D. J. et al., British J. Cancer (1995) 72, 1364-1372

非特許文献 2 Welt S. et al., J. Clinical Oncology (1994), 12, 1561-1571

非特許文献 3 Welt S. et al., J. Clinical Oncology (1996), 14, 1787-1797

非特許文献 4 Welt S. et al., Clinical Cancer Res. (2003), 9, 1338-1346

非特許文献 5 Welt S. et al., Clinical Cancer Res. (2003), 9, 1347-1353

非特許文献 6 Garin-Chesa P. G. et al., International J. Oncology (1996), 9, 465-471

発明の開示

本発明の目的は、A33 に結合でき、かつ A33 を発現する腫瘍細胞を ADCC や CDC

による免疫システムを用いて特異的に攻撃し、さらに HAHA の産生されない抗体を開発することにより現在治療困難な固形腫瘍をはじめとした各種悪性腫瘍の予防又は治療剤を提供することにある。

上述のように、A33 抗原を標的とした抗体は、抗腫瘍剤として適用するのに適切であると考えられる。しかも、HAHA の産生されない抗体であれば、さらに高い抗腫瘍効果が得られる可能性がある。そこで、本発明者らは、A33 に対する抗体の作製に関して鋭意研究した結果、A33 を発現する癌細胞に対して抗腫瘍効果を示すモノクローナル抗体の取得に成功し、さらに該モノクローナル抗体の可変領域の配列を特定し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は以下の通りである。

本発明は、その第 1 の態様において、マウス-マウスハイブリドーマにより産生される A33 と結合するモノクローナル抗体、例えば 263A17、125M10AA、125M165DAAA、125M96ABA、125N26F6AA、125Q47BA、125Q54AAAA 又は 125R5AAAA により産生される好ましくはヒト抗体であるモノクローナル抗体又はその機能的断片を提供する。263A17、125M10AA、125M165DAAA、125M96ABA、125N26F6AA、125Q47BA、125Q54AAAA 又は 125R5AAAA により産生されるモノクローナル抗体のタイプはヒトイムノグロブリン G (IgG) 型である。上述ハイブリドーマのうち 125M10AA、125M165DAAA、125M96ABA、125N26F6AA、125Q47BA、125Q54AAAA 又は 125R5AAAA は、2004 年 8 月 24 日付で独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（日本国 茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6）に、それぞれ順番に受託番号 FERM BP-10107（識別のための表示：M10）、FERM BP-10106（識別のための表示：M165）、FERM BP-10108（識別のための表示：M96）、FERM BP-10109（識別のための表示：N26）、FERM BP-10104（識別のための表示：Q47）、FERM BP-10105（識別のための表示：Q54）および FERM BP-10103（識別のための表示：R5）として寄託されている。

本発明の実施形態において、本発明の抗体は上記ハイブリドーマが産生する抗体の可変領域を有する、抗体又はその機能的断片である。

本発明の別の実施形態において、本発明の抗体はサブクラスが改変された抗体も含み、ハイブリドーマ 263A17 が産生する抗体であってサブクラスがヒト IgG1、

ヒト IgG2、ヒト IgG3 若しくはヒト IgG4 である抗体若しくはその機能的断片、ハイブリドーマ 125M10AA が産生する抗体であってサブクラスがヒト IgG1、ヒト IgG2、ヒト IgG3 若しくはヒト IgG4 である抗体若しくはその機能的断片、ハイブリドーマ 125M165DAAA が産生する抗体であってサブクラスがヒト IgG1、ヒト IgG2、ヒト IgG3 若しくはヒト IgG4 である抗体若しくはその機能断片、ハイブリドーマ 125M96ABA が産生する抗体であってサブクラスがヒト IgG1、ヒト IgG2、ヒト IgG3 若しくはヒト IgG4 である抗体若しくはその機能的断片、ハイブリドーマ 125N26F6AA が産生する抗体であってサブクラスがヒト IgG1、ヒト IgG2、ヒト IgG3 若しくはヒト IgG4 である抗体若しくはその機能的断片、ハイブリドーマ 125Q47BA が産生する抗体であってサブクラスがヒト IgG1、ヒト IgG2、ヒト IgG3 若しくはヒト IgG4 である抗体若しくはその機能的断片、ハイブリドーマ 125Q54AAAA が産生する抗体であってサブクラスがヒト IgG1、ヒト IgG2、ヒト IgG3 若しくはヒト IgG4 である抗体若しくはその機能的断片、またはハイブリドーマ 125R5AAAA が産生する抗体であってサブクラスがヒト IgG1、ヒト IgG2、ヒト IgG3 若しくはヒト IgG4 である抗体若しくはその機能的断片である。

また、本発明の別の態様において、本発明はハイブリドーマ 263A17、125M10AA、125M165DAAA、125M96ABA、125N26F6AA、125Q47BA、125Q54AAAA 又は 125R5AAAA が産生する抗体の可変領域を含む、A33 と結合する抗体又はその機能的断片を提供する。

本発明の実施形態において、本発明の抗体は配列番号 23 及び 25 に示されるアミノ酸配列の可変領域を有する抗体又はその機能的断片である。本発明の別の実施形態において、本発明の抗体は配列番号 27 及び 29 に示されるアミノ酸配列の可変領域を有する抗体又はその機能的断片である。本発明の別の実施形態において、本発明の抗体は配列番号 31 及び 33 に示されるアミノ酸配列の可変領域を有する抗体又はその機能的断片である。本発明の別の実施形態において、本発明の抗体は配列番号 35 及び 37 に示されるアミノ酸配列の可変領域を有する抗体又はその機能的断片である。本発明の別の実施形態において、本発明の抗体は配列番号 39 及び 41 に示されるアミノ酸配列の可変領域を有する抗体又はその機能的断片である。本発明の別の実施形態において、本発明の抗体は配列番号 43 及び 45

に示されるアミノ酸配列の可変領域を有する抗体又はその機能的断片である。本発明の別の実施形態において、本発明の抗体は配列番号 47 及び 49 に示されるアミノ酸配列の可変領域を有する抗体又はその機能的断片である。本発明の別の実施形態において、本発明の抗体は配列番号 51 及び 53 に示されるアミノ酸配列の可変領域を有する抗体又はその機能的断片である。本発明の別の実施形態において、本発明の抗体は配列番号 87 および 89 に示されるアミノ酸配列の全領域を有する抗体又はその機能的断片である。

本発明はさらに、別の態様において、上記の抗体又はその機能的断片であって、腫瘍（例えばヌードマウスに移植された大腸癌細胞株 COL0205 細胞に由来するもの）の増殖を抑制する抗体又はその機能的断片を提供する。腫瘍の抑制の際、腫瘍を担持する被検動物（例えば結腸癌細胞担癌マウスモデル等の担癌実験動物、体重 20g とする）に本発明の抗体又はその機能的断片を投与する量は、 $10\mu\text{g/body}$ ～ $100\mu\text{g/body}$ である。例えば、投与量として $100\mu\text{g/body}$ 又は 5mg/kg 、好ましくは $10\mu\text{g/body}$ 又は 0.5mg/kg が挙げられる。

本発明の実施形態において、本発明の抗体は下記のいずれかの特性を有する。

(a) ADCC 試験

正常ヒト末梢血由来単核球存在下において、A33 を発現したヒト癌細胞に対して抗体依存的細胞性細胞障害活性（ADCC）を示す。

(b) CDC 試験

ヒト血清由来補体存在下において、A33 を発現したヒト癌細胞に対して補体依存性細胞障害活性（CDC）を示す。

(c) In vivo 試験

A33 を発現したヒト癌細胞を担持した非ヒト動物に対して抗腫瘍効果を示す。

(d) 競合試験

キメラ抗 A33（ハイブリドーマ ATCC HB-8779 が産生する抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域と、ヒト IgG1 の重鎖定常領域および軽鎖定常領域から成る）と (i) 強く競合する（ブロッカー）、(ii) 弱く競合する（パーシャルブロッカー）、あるいは (iii) 競合しない（ノンブロッカー）。

(e) 免疫組織化学試験

ヒト成人結腸癌組織、ヒト成人正常結腸組織およびヒト正常小腸組織を染色する。

本発明はさらに、別の態様において、ハイブリドーマ 125M10AA (受託番号 FERM BP-10107)、125M165DAAA (受託番号 FERM BP-10106)、125M96ABA (受託番号 FERM BP-10108)、125N26F6AA (受託番号 FERM BP-10109)、125Q47BA (受託番号 FERM BP-10104)、125Q54AAAA (受託番号 FERM BP-10105) 及びハイブリドーマ 125R5AAAA (受託番号 FERM BP-10103) からなる群から選択されるハイブリドーマの保有する抗体をコードする核酸又は該抗体の機能的断片をコードする核酸、該核酸によりコードされるタンパク質、前記核酸を有する発現ベクター、該発現ベクターを有する大腸菌、酵母細胞、昆虫細胞、哺乳動物細胞及び植物細胞並びに哺乳動物からなる群から選ばれる宿主を提供する。

本発明はさらに、別の態様において、ハイブリドーマ 263A17、125M10AA、125M165DAAA、125M96ABA、125N26F6AA、125Q47BA、125Q54AAAA 及びハイブリドーマ 125R5AAAA からなる群から選択されるハイブリドーマから抗 A33 モノクローナル抗体をコードする遺伝子、例えば重鎖アミノ酸配列の可変領域をコードする遺伝子および軽鎖アミノ酸配列の可変領域をコードする遺伝子を単離し、該遺伝子を有する発現ベクターを構築し、該発現ベクターを宿主に導入して、該宿主を培養し、該モノクローナル抗体を発現せしめ、得られる宿主、宿主の培養上清又は宿主の分泌物等の培養物から抗 A33 モノクローナル抗体またはその機能的断片を採取することを含む、抗 A33 モノクローナル抗体またはその機能的断片の製造方法を提供する。

本発明はさらに、別の態様において、上記抗体又はその機能的断片を有効成分として含有する、腫瘍の予防、治療又は診断剤を提供する。

予防又は治療可能な腫瘍として、大腸癌、結腸癌、直腸癌、胃癌、膵臓癌、乳癌、黒色腫、腎細胞癌、子宮頸癌、子宮内膜癌、卵巣癌、食道癌、前立腺癌、睾丸癌、中皮癌からなる群から選ばれる少なくとも1つが挙げられる。

本発明のさらに別の実施形態において、本発明の抗体又はその機能的断片は、COL0205 細胞が移植された担癌ヌードマウスにおいて、腫瘍移植後に前記抗体又はその機能的断片の投与量 10 または 100 μ g/kg で Vehicle 投与群または抗

DNP-IgG1 抗体投与群と比べて有意に腫瘍の抑制が認められることを特徴とする。

本発明は、さらにハイブリドーマ M10（受託番号：FERM BP-10107）により產生される抗体が認識するエпитープと同じエпитープを認識する A33 に結合する抗体、ハイブリドーマ M96（受託番号：FERM BP-10108）により產生される抗体が認識するエпитープと同じエпитープを認識する A33 に結合する抗体、ハイブリドーマ M165（受託番号：FERM BP-10106）により產生される抗体が認識するエпитープと同じエпитープを認識する A33 に結合する抗体、ハイブリドーマ N26（受託番号：FERM BP-10109）により產生される抗体が認識するエпитープと同じエпитープを認識する A33 に結合する抗体、ハイブリドーマ Q47（受託番号：FERM BP-10104）により產生される抗体が認識するエпитープと同じエпитープを認識する A33 に結合する抗体、ハイブリドーマ Q54（受託番号：FERM BP-10105）により產生される抗体が認識するエпитープと同じエпитープを認識する A33 に結合する抗体、およびハイブリドーマ R5（受託番号：FERM BP-10103）により產生される抗体が認識するエпитープと同じエпитープを認識する A33 に結合する抗体である。

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願 2004-259090 号の明細書および／または図面に記載される内容を包含する。

図面の簡単な説明

図 1 A は、各モノクローナル精製抗体を用いて、COL0205 細胞を標的としたときの ADCC 活性を示す図である。

図 1 B は、各モノクローナル精製抗体を用いて、COL0205 細胞を標的としたときの CDC 活性を示す図である。

図 1 C は、各モノクローナル精製抗体を用いて、NCI-H508 細胞を標的としたときの ADCC 活性を示す図である。

図 1 D は、各モノクローナル精製抗体を用いて、NCI-H508 細胞を標的としたときの CDC 活性を示す図である。

図 2 A は、組換え型抗体を用いて、COL0205 細胞を標的としたときの ADCC 活性を示す図である。

図 2 B は、組換え型抗体を用いて、COL0205 細胞を標的としたときの CDC 活性を示す図である。

図 2 C は、組換え型抗体を用いて、NCI-H508 細胞を標的としたときの ADCC 活性を示す図である。

図 2 D は、組換え型抗体を用いて、NCI-H508 細胞を標的としたときの CDC 活性を示す図である。

図 3 A は、精製抗体及び組換え型抗体によるウエスタンブロット解析の結果を示す写真である。

図 3 B は、精製抗体及び組換え型抗体によるウエスタンブロット解析の結果を示す写真である。

図 4 は、精製抗体及び組換え型抗体によるヒト結腸癌組織の免疫組織染色の結果を示す写真である。

図 5 は、精製抗体及び組換え型抗体によるヒト正常小腸組織の免疫組織染色の結果を示す写真である。

図 6 は、精製抗体及び組換え型抗体によるヒト正常結腸組織の免疫組織染色の結果を示す写真である。

図 7 A は、COL0205 細胞を移植したときのマウス担癌モデルに対する組換え型抗体 cA33 および rec263 の抗腫瘍効果を示す図である。

図 7 B は、NCI-H508 細胞を移植したときのマウス担癌モデルに対する組換え型抗体 cA33 および rec263 の抗腫瘍効果を示す図である。

図 7 C は、COL0205 細胞を移植したときのマウス担癌モデルに対するハイブリドーマ精製抗体 125M10AA、125M165DAAA および 125M96ABA の抗腫瘍効果を示す図である。

図 7 D は、NCI-H508 細胞を移植したときのマウス担癌モデルに対する組換え型抗体 recN26 および recM165 の抗腫瘍効果を示す図である。

図 7 E は、NCI-H508 細胞をマトリジェルと共に移植したときのマウス担癌モデルに対する組換え型抗体 recN26 および recM165 の抗腫瘍効果を示す図である。

図 7 F は、NCI-H508 細胞をマトリジェルと共に移植したときのマウス担癌モデルに対する組換え型抗体 recM10 および recQ54 の抗腫瘍効果を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を詳細に説明する。

A33 について、すでにマウス抗 A33 抗体及びヒト化抗 A33 抗体が取得されており、マウス抗 A33 抗体 (Welt S. et al., J. Clinical Oncology (1994), 12, 1561-1571; Welt S. et al., J. Clinical Oncology (1996), 14, 1787-1797 参照) あるいはヒト化 A33 抗体 (Welt S. et al., Clinical Cancer Res. (2003), 9, 1338-1346; Welt S. et al., Clinical Cancer Res. (2003), 9, 1347-1353 参照) を用いて、結腸癌患者を対象にしたフェーズ I の臨床試験を実施したことも報告されている。しかしながら、非常に高い確率で HAMA あるいは HAHA が抗体投与患者に産生されてしまい、その後の臨床試験には至っていない。一方、非常に興味深いことに、ヒト化抗 A33 抗体の臨床試験で腫瘍反応性が認められた患者は、HAHA の産生が認められなかった。

本発明の新規ヒト抗 A33 モノクローナル抗体は完全ヒト抗体であり、マウス抗体あるいはヒト化抗体で常に問題となるマウスの配列からなる部分に対する抗原性については、すでに回避されている。すなわち、上述した臨床試験の報告ではヒト化抗体を用いたため HAHA が産生されたが、本発明の新規ヒト抗 A33 モノクローナル抗体は完全ヒト抗体であるため、抗体の抗原性が回避され、HAHA が産生されないので、結腸癌患者に対して、高い抗腫瘍効果が期待できる。

該抗体のクラスとしてはイムノグロブリン G (IgG)、同 A (IgA)、同 E (IgE) および同 M (IgM) が用いられるが、好ましくは IgG である。更に IgG のサブクラスとしては、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 が用いられるが、好ましくは IgG1、IgG2 および IgG4 であり、更に好ましくは IgG1 である。

以下、本発明で用いる語句の意味を明らかにすることにより、本発明を詳細に説明する。

1. A33 及びその抗体

本発明の抗体は、クラス I の細胞膜タンパクで Ig スーパーファミリーのひとつである A33 に対する抗体である。

本発明における「A33 と結合する抗体」とは、A33 又はその一部に反応性を有す

る抗体、または A33 またはその一部を認識する抗体である。「機能的断片」とは、抗体の一部分（部分断片）であって、抗体の抗原への作用を 1 つ以上保持するものを意味し、具体的には $F(ab')_2$ 、Fab'、Fab、Fv、ジスルフィド結合 Fv、一本鎖 Fv (scFv)、及びこれらの重合体等が挙げられる [D. J. King., Applications and Engineering of Monoclonal Antibodies., 1998 T. J. International Ltd]。あるいは、「機能的断片」は、抗体の断片であって抗原と結合しうる断片である。

本発明で「ヒト抗体」とは、ヒト由来の抗体遺伝子の発現産物である抗体を意味する。ヒト抗体は、後述のようにヒト抗体遺伝子座を導入し、ヒト由来抗体を産生する能力を有するトランスジェニック動物に抗原を投与することにより得ることができる。該トランスジェニック動物としてマウスが挙げられ、ヒト抗体を産生し得るマウスの作出方法は、例えば、国際公開 W002/43478 号公報に記載されている。

本発明の抗体としては、例えば、後述の実施例に記載される、A33 を発現する癌細胞に対して低濃度で抗腫瘍効果を示す各種の抗体、を挙げることができる。

本発明の抗体には、抗体を構成する重鎖及び/又は軽鎖の各々のアミノ酸配列において、1 又は数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有する重鎖及び/又は軽鎖からなるモノクローナル抗体も包含される。本発明の抗体のアミノ酸配列中に、前記のようなアミノ酸の部分的改変（欠失、置換、挿入、付加）は、そのアミノ酸配列をコードする塩基配列を部分的に改変することにより導入することができる。この塩基配列の部分的改変は、既知の部位特異的変異導入法（site specific mutagenesis）を用いて定法により導入することができる [Proc Natl Acad Sci USA., 1984 Vol81:5662]。ここで、抗体とは、イムノグロブリンを構成する重鎖可変領域及び重鎖定常領域、並びに軽鎖の可変領域及び軽鎖の定常領域を含む全ての領域が、イムノグロブリンをコードする遺伝子に由来するイムノグロブリンである。

本発明の抗体は、いずれのイムノグロブリンクラス及びアイソタイプを有する抗体をも包含する。

本発明の抗 A33 抗体は、下記のような製造方法によって製造することができる。即ち、例えば、A33、その一部又はその一部と抗原の抗原性を高めるための適当な

キャリア物質（例えば、牛血清アルブミン等）との結合物を、必要に応じて免疫賦活剤（フロインドの完全又は不完全アジュバント等）とともに、ヒト抗体産生トランスジェニックマウスなどの非ヒト哺乳動物に免疫する。A33 は、天然の A33 もリコンビナント A33 も用いることもできる。あるいは、A33 をコードする遺伝子を導入し、A33 を細胞表面に過剰に発現している動物細胞を投与することにより、免疫感作を行うことができる。モノクローナル抗体は、免疫感作動物から得た抗体産生細胞と、自己抗体産生能のない骨髓腫系細胞（ミエローマ細胞）を融合することにより得られるハイブリドーマを培養し、免疫に用いた抗原に対して特異的親和性を示すモノクローナル抗体を産生するクローンを選択することによって取得することができる。

本発明の抗体は、当業者に周知である遺伝子工学的改変（例えば、欧州特許 EP314161 公報を参照のこと）により異なるサブクラスのものに変換されたものも包含する。すなわち、本発明の抗体の可変領域をコードする DNA を用いて遺伝子工学的手法を用いて元のサブクラスとは異なるサブクラスの抗体を得ることができる。ADCC は、Macrophage, NK 細胞、好中球などの表面に発現している Fc Receptor を介して、抗体の定常領域と結合することにより細胞を認識し、認識した細胞が活性化することにより誘導される、細胞障害活性のことを言う。一方、CDC は抗体が抗原と結合することによって、活性化された補体系によって引き起こされる細胞障害活性のことを言う。これらの活性は、抗体のサブクラスによって、その活性の強弱が異なることが解っており、それは、抗体の定常領域の構造の違いに起因することがわかっている（Charles A. Janeway et. al. Immunobiology, 1997, Current Biology Ltd/Garland Publishing Inc.）。例えば、本発明の抗体のサブクラスを IgG2 又は IgG4 に変換することにより、Fc レセプターに対する結合度の低い抗体を取得することができる。逆に、本件発明の抗体のサブクラスを IgG1 又は IgG3 に変換することにより、Fc レセプターに対する結合度の高い抗体を取得することができる。さらに、本発明の抗体の定常領域のアミノ酸配列を遺伝子工学的に改変すること、あるいはそのような配列を有する定常領域配列と結合することにより、Fc レセプターに対する結合度を変化させること（Janeway CA. Jr. and Travers P. (1997), Immunobiology, Third Edition, Current Biology

Ltd./Garland Publishing Inc. 参照)、あるいは補体に対する結合度を変化させること (Mi-Hua Tao, et al. 1993. J. Exp. Med 参照) は可能である。例えば、重鎖定常部分の EU ナンバリングシステム (Sequences of proteins of immunological interest, NIH Publication No. 91-3242 を参照) における 331 番目のプロリン (P) をコードする配列 CCC をセリン (S) をコードする TCC に変異させプロリンをセリンに置換することにより補体に対する結合度を変化させることができる。仮に抗癌剤について考えた場合、抗体単独で細胞死誘導活性がない場合は、Fc レセプターを介した抗体依存性細胞障害活性 (ADCC) や補体依存性細胞傷害活性 (CDC) による抗腫瘍活性を有する抗体が望ましいが、抗体単独で細胞死誘導活性がある場合は Fc レセプターとの結合度が低い抗体がより望ましい場合もある。また免疫抑制剤について考えた場合、T 細胞と抗原提示細胞の結合のみを立体的に阻害する場合など ADCC 活性或いは CDC 活性を有さない抗体が望ましい。また、ADCC 活性或いは CDC 活性が毒性の原因となりうる場合、毒性の原因となる活性を Fc 部分の変異あるいはサブクラスを変更することにより回避した抗体が望ましい場合もある。

本発明において、モノクローナル抗体の製造にあたっては、下記の作業工程を包含する。すなわち、(1) 免疫原として使用する、生体高分子の精製及び/又は抗原タンパク質を細胞表面に過剰に発現している細胞の作製、(2) 抗原を動物に注射することにより免疫した後、血液を採取しその抗体価を検定して脾臓等の摘出の時期を決定してから、抗体産生細胞を調製する工程、(3) 骨髄腫細胞 (ミエローマ) の調製、(4) 抗体産生細胞とミエローマとの細胞融合、(5) 目的とする抗体を産生するハイブリドーマ群の選別、(6) 単一細胞クローンへの分割 (クローニング)、(7) 場合によっては、モノクローナル抗体を大量に製造するためのハイブリドーマの培養、又はハイブリドーマを移植した動物の飼育、(8) このようにして製造されたモノクローナル抗体の生理活性及びその認識特異性の検討、あるいは標識試薬としての特性の検定、等である。

A33 には、多型が存在するが、本発明の抗体は、現在知られている全ての A33 多型を認識して結合するので、患者の有する A33 の型の違いにかかわらず、本発明の抗体を含む治療・予防剤は有効に作用する。

以下、抗 A33 モノクローナル抗体の作製法を上記工程に沿って詳述するが、該抗体の作製法はこれに制限されず、例えば脾細胞以外の抗体産生細胞及びミエローマを使用することもできる。

(1) 抗原の精製

抗原としては、A33 をコードする DNA を動物細胞用発現ベクターに組み込み、該発現ベクターを動物細胞に導入し、取得した形質転換株そのものを使用できる。因みに、A33 のタンパク質の一次構造は公知である [GenBank accession No. NP_005305、配列番号 1 2] ので、当業者に周知の方法により、A33 のアミノ酸配列からペプチドを化学合成し、これを抗原として使用することもできる。

また、免疫原としては、A33 の全長を FM3A 細胞又は L929 細胞に導入し、細胞表面に A33 を過剰に発現している細胞も有効である。p Δ EGFP-N1-A33 は、A33 タンパク質をコードする DNA を、動物細胞用発現ベクター p Δ EGFP-N1 (改変 pEGFP-N1 [ベクトン・ディキンソン・バイオサイエンス・クロンテック社製] の EGFP タンパク質をコードしている領域を削除した) に組み込むことにより作製できる。ただし、A33 をコードする DNA、ベクター、宿主等はこれらに限定されない。

具体的には、p Δ EGFP-N1-A33 で FM3A 細胞又は L929 細胞を形質転換して得られた形質転換株を培養し、p Δ EGFP-N1 ベクターが挿入された細胞に獲得されるネオマイシン耐性の形質及びマウス A33 抗体 (ATCC No. HB-8779) を用いた A33 発現の確認とを指標に、A33 をその細胞表面に過剰に発現している FM3A 細胞又は L929 細胞を作製することができる。

(2) 抗体産生細胞の調製工程

(1) で得られた抗原と、フロインドの完全若しくは不完全アジュバント、又はカリミョウバンのような助剤とを混合し、免疫原として実験動物に免疫する。実験動物としては、ヒト由来の抗体を産生する能力を有するトランスジェニックマウスが最も好適に用いられるが、そのようなマウスは富塚らの文献 [Tomizuka. et al., Proc Natl Acad Sci USA., 2000 Vol 97:722] に記載されている。

マウス免疫の際の免疫原投与法は、皮下注射、腹腔内注射、静脈内注射、皮内注射、筋肉内注射、足蹠注射などいずれでもよいが、腹腔内注射、足蹠注射又は静脈内注射が好ましい。

免疫は、一回、又は、適当な間隔で（好ましくは2週間から4週間間隔で）複数回繰返し行うことができる。その後、免疫した動物の血清中の抗原に対する抗体価を測定し、抗体価が十分高くなった動物を抗体産生細胞の供給源として用いれば、以後の操作の効果を高めることができる。一般的には、最終免疫後3～5日後の動物由来の抗体産生細胞を、後の細胞融合に用いることが好ましい。

ここで用いられる抗体価の測定法としては、放射性同位元素免疫定量法（以下、「RIA法」という）、固相酵素免疫定量法（以下、「ELISA法」という）、蛍光抗体法、受身血球凝集反応法など種々の公知技術があげられるが、検出感度、迅速性、正確性、及び操作の自動化の可能性などの観点から、RIA法又はELISA法がより好適である。

本発明における抗体価の測定は、例えばELISA法によれば、以下に記載するような手順により行うことができる。まず、ヒト抗体に対する抗原をELISA用96穴プレート等の固相表面に吸着させ、さらに抗原が吸着していない固相表面を抗原と無関係なタンパク質、例えばウシ血清アルブミン（BSA）により覆い、該表面を洗浄後、一次抗体として段階希釈した試料（例えばマウス血清）に接触させ、上記抗原に試料中の抗A33抗体を結合させる。さらに二次抗体として酵素標識されたヒト抗体に対する抗体を加えてヒト抗体に結合させ、洗浄後該酵素の基質を加え、基質分解に基づく発色による吸光度の変化等を測定することにより、抗体価を算出する。

（3）ミエローマの調製工程

ミエローマとしては、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ又はヒト等の哺乳動物に由来する自己抗体産生能のない細胞を用いることが出来るが、一般的にはマウスから得られた株化細胞、例えば8-アザグアニン耐性マウス（BALB/c由来）ミエローマ株P3X63Ag8U.1（P3-U1）[Yelton, D. E. et al. Current Topics in Microbiology and Immunology, 81, 1-7 (1978)]、P3/NSI/1-Ag4-1（NS-1）[Kohler, G. et al. European J. Immunology, 6, 511-519 (1976)]、Sp2/0-Ag14（SP-2）[Shulman, M. et al. Nature, 276, 269-270 (1978)]、P3X63Ag8.653（653）[Kearney, J. F. et al. J. Immunology, 123, 1548-1550 (1979)]、P3X63Ag8（X63）[Horibata, K. and Harris, A. W. Nature, 256, 495-497 (1975)] など

を用いることが好ましい。これらの細胞株は、適当な培地、例えば 8-アザグアニン培地 [グルタミン、2-メルカプトエタノール、ゲンタマイシン及びウシ胎児血清（以下、「FCS」という）を加えた RPMI-1640 培地に 8-アザグアニンを加えた培地]、イスコフ改変ダルベッコ培地 (Iscove's Modified Dulbecco's Medium; 以下、「IMDM」という)、又はダルベッコ改変イーグル培地 (Dulbecco's Modified Eagle Medium; 以下、「DMEM」という) で継代培養するが、細胞融合の 3~4 日前に正常培地（例えば、10% FCS を含む DMEM 培地）で継代培養し、融合当日に 2×10^7 以上の細胞数を確保しておく。

(4) 細胞融合

抗体産生細胞は、形質細胞、及びその前駆細胞であるリンパ球であり、これは個体のいずれの部位から得てもよく、一般には脾臓、リンパ節、骨髓、扁桃、末梢血、又はこれらを適宜組み合わせたもの等から得ることができるが、脾細胞が最も一般的に用いられる。

最終免疫後、所定の抗体価が得られたマウスから抗体産生細胞が存在する部位、例えば脾臓を摘出し、抗体産生細胞である脾細胞を調製する。次いで、脾細胞とミエローマを融合させればよい。この脾細胞と工程 (3) で得られたミエローマを融合させる手段として現在最も一般的に行われているのは、細胞毒性が比較的少なく融合操作も簡単な、ポリエチレングリコールを用いる方法である。この方法は、例えば以下の手順よりなる。

脾細胞とミエローマとを無血清培地（例えば、DMEM）、又はリン酸緩衝生理食塩液（以下、「PBS」という）でよく洗浄し、脾細胞とミエローマの細胞数の比が 5:1 ~ 10:1 程度になるように混合し、遠心分離する。上清を除去し、沈澱した細胞群をよくほぐした後、攪拌しながら 1mL の 50% (w/v) ポリエチレングリコール（分子量 1000~4000）を含む無血清培地を滴下する。その後、10mL の無血清培地をゆっくりと加えた後遠心分離する。再び上清を捨て、沈澱した細胞を適量のヒポキサンチン・アミノプテリン・チミジン（以下「HAT」という）液及びヒトインターロイキン-6（以下、「IL-6」という）を含む正常培地（以下、「HAT 培地」という）中に懸濁して培養用プレート（以下、「プレート」という）の各ウェルに分注し、5% 炭酸ガス存在下、37℃で 2 週間程度培養する。途中適宜 HAT 培地を補う。

(5) ハイブリドーマ群の選択

上記ミエローマ細胞が、8-アザグアニン耐性株である場合、すなわち、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 (HGPRT) 欠損株である場合、融合しなかった該ミエローマ細胞、及びミエローマ細胞どうしの融合細胞は、HAT 含有培地中では生存できない。一方、抗体産生細胞どうしの融合細胞、あるいは、抗体産生細胞とミエローマ細胞とのハイブリドーマは生存することができるが、抗体産生細胞どうしの融合細胞には寿命がある。従って、HAT 含有培地中での培養を続けることによって、抗体産生細胞とミエローマ細胞との融合細胞であるハイブリドーマのみが生き残り、結果的にハイブリドーマを選択することができる。

コロニー状に生育してきたハイブリドーマについて、HAT 培地からアミノプテリンを除いた培地（以下、「HT 培地」という）への培地交換を行う。以後、培養上清の一部を採取し、例えば、ELISA 法により抗 A33 抗体価を測定する。ただし、ELISA 用の抗原として上記融合タンパク質を用いる場合は、ヒト IgG の Fc 領域に特異的に結合する抗体を産生するクローンを選択しないように、該クローンを除外する操作が必要である。そのようなクローンの有無は、例えばヒト IgG の Fc 領域を抗原とした ELISA 等により確認することができる。

以上、8-アザグアニン耐性の細胞株を用いる方法を例示したが、その他の細胞株もハイブリドーマの選択方法に応じて使用することができ、その場合使用する培地組成も変化する。

(6) クローニング工程

(2) の記載と同様の方法で抗体価を測定することにより、特異的抗体を産生することが判明したハイブリドーマを、別のプレートに移しクローニングを行う。このクローニング法としては、プレートの 1 ウェルに 1 個のハイブリドーマが含まれるように希釈して培養する限界希釈法、軟寒天培地中で培養しコロニーを回収する軟寒天法、マイクロマニピレーターによって 1 個ずつの細胞を取り出し培養する方法、セルソーターによって 1 個の細胞を分離する「ソータクローン」などが挙げられるが、限界希釈法が簡便であり、よく用いられる。

抗体価の認められたウェルについて、例えば限界希釈法によるクローニングを

2～4 回繰返し、安定して抗体価の認められたものを抗 A33 モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ株として選択する。

なお、本発明のヒト抗 A33 モノクローナル抗体の産生細胞であるマウスーマウスハイブリドーマ 125M10AA、125M165DAAA、125M96ABA、125N26F6AA、125Q47BA、125Q54AAAA 又は 125R5AAAA は、平成 16 年 8 月 24 日付で独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（日本国 茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6）に、それぞれ順番に受託番号 FERM BP-10107（識別のための表示：M10）、FERM BP-10106（識別のための表示：M165）、FERM BP-10108（識別のための表示：M96）、FERM BP-10109（識別のための表示：N26）、FERM BP-10104（識別のための表示：Q47）、FERM BP-10105（識別のための表示：Q54）および FERM BP-10103（識別のための表示：R5）として寄託されている。

（7）ハイブリドーマ培養によるモノクローナル抗体の調製

クローニングを完了したハイブリドーマは、培地を HT 培地から正常培地に換えて培養される。大量培養は、大型培養瓶を用いた回転培養、スピナー培養、あるいはホローファイバーシステム等を用いた培養で行われる。この大量培養における上清を、ゲルろ過等、当業者に周知の方法を用いて精製することにより、抗 A33 モノクローナル抗体を得ることができる。また、同系統のマウス（例えば BALB/c）若しくは nu/nu マウス、ラット、モルモット、ハムスター又はウサギ等の腹腔内で該ハイブリドーマを増殖させることにより、抗 A33 モノクローナル抗体を大量に含む腹水を得ることができる。精製の簡便な方法としては、市販のモノクローナル抗体精製キット（例えば、MabTrap GII キット；アマシャムファルマシアバイオテク社製）等を利用することもできる。

かくして得られるモノクローナル抗体は、A33 に対して高い抗原特異性を有する。

（8）モノクローナル抗体の検定

かくして得られたモノクローナル抗体のアイソタイプ及びサブクラスの決定は以下のように行うことができる。まず、同定法としてはオクテルロニー（Ouchterlony）法、ELISA 法、又は RIA 法が挙げられる。オクテルロニー法は簡便ではあるが、モノクローナル抗体の濃度が低い場合には濃縮操作が必要である。

一方、ELISA 法又は RIA 法を用いた場合は、培養上清をそのまま抗原吸着固相と反応させ、さらに二次抗体として各種イムノグロブリンアイソタイプ、サブクラスに対応する抗体を用いることにより、モノクローナル抗体のアイソタイプ、サブクラスを同定することが可能である。

さらに、タンパク質の定量は、フォーリンロウリー法、及び 280nm における吸光度 $[1.4 (OD_{280}) = \text{イムノグロブリン } 1\text{mg/mL}]$ より算出する方法等により行うことができる。

モノクローナル抗体の認識エピトープの同定は以下のようにして行うことができる。まず、モノクローナル抗体の認識する分子の様々な部分構造を作製する。部分構造の作製にあたっては、公知のオリゴペプチド合成技術を用いてその分子の様々な部分ペプチドを作成する方法、遺伝子組換え技術を用いて目的の部分ペプチドをコードする DNA 配列を好適な発現プラスミドに組み込み、大腸菌等の宿主内外で生産する方法等があるが、上記目的のためには両者を組み合わせて用いるのが一般的である。例えば、抗原タンパク質の C 末端又は N 末端から適当な長さで順次短くした一連のポリペプチドを当業者に周知の遺伝子組換え技術を用いて作製した後、それらに対するモノクローナル抗体の反応性を検討し、大まかな認識部位を決定する。

その後、さらに細かく、その対応部分のオリゴペプチド、又は該ペプチドの変異体等を、当業者に周知のオリゴペプチド合成技術を用いて種々合成し、本発明の予防又は治療剤が有効成分として含有するモノクローナル抗体のそれらペプチドに対する結合性を調べるか、又は該モノクローナル抗体と抗原との結合に対するペプチドの競合阻害活性を調べることによりエピトープを限定する。多種のオリゴペプチドを得るための簡便な方法として、市販のキット（例えば、SPOTs キット（ジェノシス・バイオテクノロジー社製）、マルチピン合成法を用いた一連のマルチピン・ペプチド合成キット（カイロン社製）等）を利用することもできる。

又、ハイブリドーマ等の抗体産生細胞からヒトモノクローナル抗体をコードする遺伝子をクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主（例えば哺乳類細胞細胞株、大腸菌、酵母細胞、昆虫細胞、植物細胞など）に導入し、遺

伝子組換え技術を用いて産生させた組換え型抗体を調製することもできる (P. J. Delves., ANTIBODY PRODUCTION ESSENTIAL TECHNIQUES., 1997 WILEY、P. Shepherd and C. Dean., Monoclonal Antibodies., 2000 OXFORD UNIVERSITY PRESS、J. W. Goding., Monoclonal Antibodies: principles and practice., 1993 ACADEMIC PRESS)。

本発明は、本発明の抗体を産生するハイブリドーマが保有する抗体の遺伝子配列を含む核酸、特に後述の本発明のハイブリドーマの産生する抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域の核酸も包含する。ここで、核酸には DNA 及び RNA が含まれる。

ハイブリドーマからモノクローナル抗体をコードする遺伝子を調製するには、モノクローナル抗体の L 鎖 V 領域、L 鎖 C 領域、H 鎖 V 領域及び H 鎖 C 領域をそれぞれコードする DNA を PCR 法等により調製する方法が採用される。プライマーは、抗 A33 抗体遺伝子又はアミノ酸配列から設計したオリゴ DNA を、鋳型としてはハイブリドーマから調製した DNA を使用することができる。これらの DNA を 1 つの適当なベクターに組み込み、これを宿主に導入して発現させるか、あるいはこれらの DNA をそれぞれ適当なベクターに組み込み、共発現させる。

ベクターには、宿主微生物で自律的に増殖し得るファージ又はプラスミドが使用される。プラスミド DNA としては、大腸菌、枯草菌又は酵母由来のプラスミドなどが挙げられ、ファージ DNA としては入ファージが挙げられる。

形質転換に使用する宿主としては、目的の遺伝子を発現できるものであれば特に限定されるものではない。例えば、細菌 (大腸菌、枯草菌等)、酵母、動物細胞 (COS 細胞、CHO 細胞等)、昆虫細胞が挙げられる。

宿主への遺伝子の導入方法は公知であり、任意の方法 (例えばカルシウムイオンを用いる方法、エレクトロポレーション法、スフェロプラスト法、酢酸リチウム法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法等) が挙げられる。また、後述の動物に遺伝子を導入する方法としては、マイクロインジェクション法、ES 細胞にエレクトロポレーションやリポフェクション法を使用して遺伝子を導入する方法、核移植法などが挙げられる。

本発明において、抗 A33 抗体は、形質転換体を培養し、その培養物から採取す

ることにより得ることができる。「培養物」とは、(a) 培養上清、(b) 培養細胞若しくは培養菌体又はその破砕物、(c) 形質転換体の分泌物のいずれをも意味するものである。形質転換体を培養するには、使用する宿主に適した培地を用い、静置培養法、ローラーボトルによる培養法などが採用される。

培養後、目的タンパク質が菌体内又は細胞内に生産される場合には、菌体又は細胞を破砕することにより抗体を採取する。また、目的抗体が菌体外又は細胞外に生産される場合には、培養液をそのまま使用するか、遠心分離等により菌体又は細胞を除去する。その後、タンパク質の単離精製に用いられる各種クロマトグラフィーを用いた一般的な生化学的方法を単独で又は適宜組み合わせて用いることにより、前記培養物中から目的の抗体を単離精製することができる。

さらに、トランスジェニック動物作製技術を用いて、目的抗体の遺伝子が内在性遺伝子に組み込まれた動物宿主、例えばトランスジェニックウシ、トランスジェニックヤギ、トランスジェニックヒツジ又はトランスジェニックブタを作製し、そのトランスジェニック動物から分泌されるミルク中からその抗体遺伝子に由来するモノクローナル抗体を大量に取得することも可能である (Wright, G., et al. (1991) Bio/Technology 9, 830-834)。ハイブリドーマをインビトロで培養する場合には、培養する細胞種の特性、試験研究の目的及び培養方法等の種々条件に合わせて、ハイブリドーマを増殖、維持及び保存させ、培養上清中にモノクローナル抗体を産生させるために用いられるような既知栄養培地、あるいは既知の基本培地から誘導調製されるあらゆる栄養培地を用いて実施することが可能である。

(9) 抗体の性質

本発明の抗体は下記のいずれかの特性を有する。

(a) ADCC 試験

正常ヒト末梢血由来単核球存在下において、A33 を発現したヒト癌細胞に対して抗体依存的細胞性細胞障害活性 (ADCC) を示す。

(b) CDC 試験

ヒト血清由来補体存在下において、A33 を発現したヒト癌細胞に対して補体依存性細胞障害活性 (CDC) を示す。

(c) In vivo 試験

A33 を発現したヒト癌細胞を担持した非ヒト動物に対して抗腫瘍効果を示す。

(d) 競合試験

キメラ抗 A33 (ハイブリドーマ ATCC HB-8779 が産生する抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域と、ヒト IgG1 の重鎖定常領域および軽鎖定常領域から成る) と (i) 強く競合する (ブロッカー)、(ii) 弱く競合する (パーシャルブロッカー)、あるいは (iii) 競合しない (ノンブロッカー)。

(e) 免疫組織化学試験

ヒト成人結腸癌組織、ヒト成人正常結腸組織およびヒト正常小腸組織を染色する。

このような抗体として、例えばハイブリドーマ 263A17、125M10AA、125M165DAAA、125M96ABA、125N26F6AA、125Q47BA、125Q54AAAAA 及びハイブリドーマ 125R5AAAAA の産生する抗体が挙げられ、125M10AA、125M165DAAA、125M96ABA、125N26F6AA、125Q47BA、125Q54AAAAA 又は 125R5AAAAA は、2004 年 8 月 24 日付で独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (日本国 茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6) に、それぞれ順番に受託番号 FERM BP-10107 (識別のための表示: M10)、FERM BP-10106 (識別のための表示: M165)、FERM BP-10108 (識別のための表示: M96)、FERM BP-10109 (識別のための表示: N26)、FERM BP-10104 (識別のための表示: Q47)、FERM BP-10105 (識別のための表示: Q54) および FERM BP-10103 (識別のための表示: R5) として寄託されている。

2. 医薬組成物

本発明のヒト抗 A33 抗体を含有する製剤もまた、本発明の範囲内に含まれる。このような製剤は、好ましくは、抗体に加えて、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、他の抗体又は抗生物質のような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。かかる予防又は治療剤は、種々の形態で投与することができ、それらの投与形態としては、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、点滴剤、坐薬等による非経口投与を挙げることができる。

その投与量は、症状、年齢、体重などによって異なるが、通常、経口投与では、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。

本発明は、本発明の抗体又は医薬組成物を用いた上記疾患の予防又は治療法をも包含し、さらに本発明は本発明の抗体の上記疾患の予防又は治療剤の製造への使用をも包含する。

本発明の抗体またはその機能的断片により予防・治療が可能な腫瘍は、大腸癌、結腸癌、直腸癌、胃癌、膵臓癌、乳癌、黒色腫、腎細胞癌、子宮頸癌、子宮内膜癌、卵巣癌、食道癌、前立腺癌、睾丸癌、中皮癌等であり、本発明の抗体を適用する際の腫瘍は1種類に限られず、複数種類の腫瘍が併発したものでもよい。

3. 製剤例

本発明の分子は、水又はそれ以外の薬理学的に許容し得る溶液に溶解した無菌性溶液又は懸濁液のアンプルとして使用に供される。また、無菌粉末製剤（本発明の分子を凍結乾燥するのが好ましい）をアンプルに充填しておき、使用時に薬理学的に許容し得る溶液で希釈してもよい。

以下、実施例を以て本発明をさらに詳細に説明するが、本発明がその実施例に記載される態様のみに限定されるものではない。

実施例1 マウス抗 A33 抗体の調製

ヒトモノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングや様々な実験に使用するためのポジティブコントロール抗体として、マウス抗 A33 抗体の調製を実施した。ATCC よりマウス抗 A33 抗体を産生する AS33 ハイブリドーマ (American Type Culture Collection (ATCC) No. HB-8779) を購入し、ATCC の付属説明書に従い、ハイブリドーマを培養した。このハイブリドーマを凍結保存した。その後、AS33 ハイブリドーマを 10% Low IgG Fetal Bovine Serum (ハイクローン社製) 含有 eRDF 培地 (極東製薬社製) に馴化した。この馴化したハイブリドーマを凍結保

存した。次に、その一部を抗体精製を目的として、ウシインシュリン ($5\mu\text{g/ml}$ 、ギブコ・ビーアールエル社製)、ヒトトランスフェリン ($5\mu\text{g/ml}$ 、ギブコ・ビーアールエル社製)、エタノールアミン (0.01mM 、シグマ社製)、亜セレン酸ナトリウム ($2.5\times 10^{-5}\text{mM}$ 、シグマ社製)、1% Low IgG Fetal Bovine Serum (ハイクローン社製) 含有 eRDF 培地 (極東製薬社製) に馴化した。フラスコにて培養し、培養上清を回収した。回収した上清中のハイブリドーマ由来精製抗体の濃度は 280nm の吸光度を測定し、 1mg/mL を 1.4 OD として算出した。

実施例2 キメラ抗 A33 抗体の調製

ヒトモノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングや様々な実験に使用するためのポジティブコントロール抗体として、重鎖及び軽鎖の定常領域がヒト IgG1 であるキメラ抗 A33 抗体の調製を実施した。

(1) キメラ抗 A33 抗体遺伝子の cDNA クローニングと発現ベクター作製

実施例1で購入したマウス抗 A33 抗体産生ハイブリドーマ AS33 を 10% Fetal Bovine Serum (ハイクローン社製) 含有 DMEM 培地 (ギブコ・ビーアールエル社製) で培養し、RNA 抽出試薬 ISOGEN (ニッポンジーン社製) を用いてプロトコールに従い、Total RNA を精製した。次に、Total RNA より OligotexTM-dT30<Super> (タカラバイオ社製) により polyA+RNA を精製した。得られた polyA+RNA ($2.5\mu\text{g}$) を材料として SMART RACE cDNA Amplification Kit (ベクトン・ディキンソン・バイオサイエンス・クロンテック社) を用いて、その添付の説明書に従ってクローニング実験を実施して、抗体遺伝子の可変領域の cDNA を取得した。

1) 1st strand cDNA の合成

polyA+RNA ($2.5\mu\text{g}$) / $3\mu\text{l}$

5' -CDS primer $1\mu\text{l}$

SMART II A oligo $1\mu\text{l}$

上記組成の反応液を 70°C で 2 分間インキュベートした後、下記の試薬及び酵素を加え 42°C で 1.5 時間インキュベートして cDNA の合成を行なった。

5X First-Strand buffer $2\mu\text{l}$

DTT (20 mM) $1\mu\text{l}$

dNTP Mix (10 mM) 1 μ l

PowerScript Reverse Transcriptase 1 μ l

反応終了後、100 μ l の Tricine Buffer を加えて 72°C で 7 分間インキュベートした。

2) PCR による重鎖遺伝子、軽鎖遺伝子の増幅

得られた cDNA を鋳型として、マウス抗 A33 抗体の重鎖（以下、重鎖は H 鎖とも称す）可変領域、および軽鎖（以下、軽鎖は L 鎖とも称す）可変領域 DNA の 3' 末端各々に特異的な PCR 用プライマー（H 鎖用：GPAHvR3Nhe (5' - GCC CTT GGT GCT AGC TGA AGA GAC GGT GAC CAG AGT CCC TTG -3') (配列番号 1))、L 鎖用：GPALvR3Bsi、(5' -GTG CAC GCC GCT GGT CAG GGC GCC TG-3') (配列番号 2)) のいずれか一方と、SMART RACE cDNA Amplification Kit 付属の UPM プライマー（合成した cDNA の 5' 末端に作製される共通配列に相補的なオリゴヌクレオチド）をプライマーセットとして使用し、PCR による H 鎖リーダ配列と可変領域（以下、HV とも称す）及び L 鎖リーダ配列と可変領域（以下、LV とも称す）の増幅を行った。cDNA の増幅は、KOD-Plus- DNA ポリメラーゼ（トーヨーボー社製）を用いて下記の反応液を調製して実施した。

sterile H ₂ O	29.5 μ l
cDNA	2.5 μ l
KOD-Plus- buffer (10X)	5 μ l
dNTP Mix (2mM)	4 μ l
MgSO ₄ (25 mM)	2 μ l
KOD-Plus-DNA polimerase (1 unit/ μ l)	1 μ l
Universal primer A mix (UPM) (10X)	5 μ l
Gene specific primers (GSP)	1 μ l
Total volume	50 μ l

サーマルサイクリングの増幅反応条件は下記のとおりで実施した。

5 cycles:

94°C 30 sec

72°C 1 min

5 cycles:

94°C 30 sec

70°C 30 sec

72°C 1 min

25 cycles

94°C 30 sec

68°C 30 sec

72°C 1 min

増幅した PCR 断片は、エタノール沈殿で回収した後、アガロースゲル電気泳動で回収し、メンブランを用いる DNA 精製キットである QIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン社製) にて精製した。精製した HV 及び LV の増幅断片は、それぞれ Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit (インビトロジェン社製) の PCR 4 Blunt- TOPO ベクターにサブクローニングを行い、得られたクローンのプラスミド DNA についてインサート DNA の塩基配列を解析した。DNA 塩基配列決定のためにプライマーとして、M13FW (5' - GTA AAA CGA CGG CCA GTG -3') (配列番号 3) 及び M13RV (5' - CAG GAA ACA GCT ATG AC -3') (配列番号 4) を用いた。決定した HV 及び LV の遺伝子領域中にコードされる抗体のアミノ酸配列は、King D. J. らの報告しているマウス抗 A33 抗体 (Br J Cancer. 1995 Dec;72 (6) :1364-72) 可変領域のアミノ酸配列と完全に一致した。

3) キメラ抗 A33 抗体の発現ベクター (N5KG1_mVhCA33) の作製

取得した抗体の HV 鎖を含むプラスミド DNA を鋳型として、末端に連結のための制限酵素部位を付加するようにデザインしたプライマー (増幅のためのプライマーセット GPAHv2F5Sal (5' - AGA GAG AGG TCG ACC CAC CAT GAA CTT TGG GCT GAG CTT AGT T -3') (配列番号 5) 及びプライマー GPAHvR3Nhe (配列番号 1)) を用いて、マウス抗 A33 抗体の HV を PCR で増幅 (94°C 3 分→94°C 10 秒、68°C 45 秒 (35 サイクル)→72°C 7 分) した。HV の増幅断片は精製した後、PCR 4 Blunt- TOPO ベクターでサブクローニングを行った。サブクローンについて挿入部分の DNA 塩基配列解析を行い、鋳型とした遺伝子配列と相違がないデザインどおりの配列を有するプラスミド DNA を選択した。そのプラスミド DNA を制限酵素 SalI と NheI

で消化して、アガロースゲル電気泳動で約 440 bp の DNA を回収し精製した。他方、ベクターである N5KG1-Val Lark (IDEC Pharmaceuticals, N5KG1 (US patent 6001358) の改変ベクター) については同様に制限酵素 SalI と NheI で処理を行った後、脱リン酸化処理として Alkaline Phosphatase (E. coli C75) (タカラバイオ社製) にて処理した後に、アガロースゲル電気泳動と DNA 精製キットで約 8.9kb の DNA を回収した。これら 2 つの断片を DNA Ligation kit Ver2.1 (タカラバイオ社製) にてライゲーション反応した後、大腸菌 DH5 α へ導入して形質転換体を得た。形質転換体をスクリーニングして目的とする HV が挿入されたクローン、N5KG1_GPA33Hv (クローン#2) を選択した。こうして得られた N5KG1_GPA33Hv に LV を挿入するため、本プラスミド DNA を制限酵素 BglII、及び、BsiWI で順次切断し、さらに脱リン酸化を行った後、約 9.2 kb のベクターDNA を精製した。他方、マウス抗 A33 抗体の LV を含むプラスミド DNA を鋳型として、LV 領域を PCR で増幅した。増幅のためのプライマーセットは、GPALv2FBgl (5' - AGA GAG AGA GAT CTC TCA CCA TGG GCA TCA AGA TGG AGT TTC AG -3') (配列番号 6) 及び GPALvR3Bsi (配列番号 2) を用いた。精製した LV の増幅断片は PCR 4 Blunt- TOP0 にてサブクローニングを行った。サブクローンについて挿入部分の DNA 塩基配列解析を行い、鋳型とした遺伝子配列と相違がないデザインどおりの配列を有するプラスミド DNA を選択した。その DNA を制限酵素 BglIII と BsiWI で消化して、アガロースゲル電気泳動で約 400 bp の DNA を回収し精製した。この DNA を制限酵素 BglIII と BsiWI 切断処理した前記の N5KG1_A33Hv ベクター断片にライゲーションして、大腸菌へ導入して形質転換体を得た。形質転換体をスクリーニングして、目的とする LV が挿入されたクローン、N5KG1_GPA33HvLv (クローン#2) を選択した。最終的に得られたキメラ抗 A33 抗体発現プラスミド DNA の大量精製を行い、L 鎖と H 鎖の DNA 断片挿入断片とその挿入部位周辺の DNA 塩基配列に変異がないことを確認した。

キメラ抗 A33 の重鎖可変領域、及び軽鎖可変領域をコードする DNA 並びに重鎖可変領域及び軽鎖可変領域のアミノ酸配列をそれぞれ以下に示す。

<キメラ抗 A33 重鎖核酸配列> (配列番号 7)

10 20 30 40 50 60

ATGAACTTTG GGCTGAGCTT GATTTTCCTT GTCCTAATTT TAAAAGGTGT CCAGTGTGAA
 70 80 90 100 110 120
 GTGAAGCTGG TGGAGTCTGG GGGAGGCTTA GTGAAGCCTG GAGGGTCCCT GAAACTCTCC
 130 140 150 160 170 180
 TGTGCAGCCT CTGGATTTCG TTTTCAGTACC TATGACATGT CTTGGGTTCG CCAGACTCCG
 190 200 210 220 230 240
 GAGAAGAGGC TGGAGTGGGT CGCAACCATT AGTAGTGGTG GTAGTTACAC CTACTATTTA
 250 260 270 280 290 300
 GACAGTGTGA AGGGCCGATT CACCATCTCC AGAGACAGTG CCAGGAACAC CCTATACCTG
 310 320 330 340 350 360
 CAAATGAGCA GTCTGAGGTC TGAGGACACG GCCTTGTATT ACTGTGCACC GACTACGGTA
 370 380 390 400 410 420
 GTCCCGTTTG CTTACTGGGG CCAAGGGACT CTGGTCACCG TCTCTTCAGC TAGC.....

<キメラ抗 A33 重鎖アミノ酸配列> (配列番号 8)

10 20 30 40 50 60
 MNFGLSLIFL VLILKGVQCE VKLVESGGGL VKPGGSLKLS CAASGFAFST YDMSWVRQTP
 70 80 90 100 110 120
 EKRLEWVATI SSGGSYTYYL DSVKGRFTIS RDSARNTLYL QMSSLRSEDY ALYYCAPTTV
 130 140
 VPFAYWGQGT LVTVSSAS..

<キメラ抗 A33 軽鎖核酸配列> (配列番号 9)

10 20 30 40 50 60
 ATGGGCATCA AGATGGAGTT TCAGACCCAG GTCTTTGTAT TCGTGTTGCT CTGGTTGTCT
 70 80 90 100 110 120
 GGTGTTGATG GAGACATTGT GATGACCCAG TCTCAAAAAT TCATGTCCAC ATCAGTAGGA
 130 140 150 160 170 180
 GACAGGGTCA GCATCACCTG CAAGGCCAGT CAGAATGTTC GTACTGTTGT AGCCTGGTAT
 190 200 210 220 230 240
 CAACAGAAAC CAGGGCAGTC TCCTAAAACA CTGATTACT TGGCCTCCAA CCGGCACACT

```

      250      260      270      280      290      300
GGAGTCCCTG ATCGCTTCAC AGGCAGTGGG TCTGGGACAG ATTTCACTCT CACCATTAGC
      310      320      330      340      350      360
AATGTGCAAT CTGAAGACCT GGCAGATTAT TTCTGTCTGC AACATTGGAG TTATCCTCTC
      370      380      390      400
ACGTTCGGCT CGGGGACAAA GTTGAAGTA AAACGT....

```

<キメラ抗 A33 軽鎖アミノ酸配列> (配列番号 10)

```

      10      20      30      40      50      60
MGIKMEFQTQ VFVFLVLLWS GVDGDIVMTQ SQKFMSTSVG DRVSITCKAS QNVRTVVAWY
      70      80      90     100     110     120
QQKPGQSPKT LIYLASNRHT GVPDRFTGSG SGTDFTLTIS NVQSEDLADY FCLQHSYPL
      130     140
TFGSGTKLEV KR.....

```

重鎖核酸配列 (配列番号 7) における抗体可変領域と抗体定常領域の境界は 408 番目のアデニン (A) と 409 番目のグアニン (G) の間に位置し、重鎖アミノ酸配列 (配列番号 8) における抗体可変領域と抗体定常領域の境界は 136 番目のセリン (S) と 137 番目のアラニン (A) の間に位置する。また、重鎖核酸配列 (配列番号 7) におけるシグナル配列と抗体可変領域の境界は 57 番目のチミン (T) と 58 番目のグアニン (G) の間に位置し、重鎖アミノ酸配列 (配列番号 8) におけるシグナル配列と抗体可変領域の境界は 19 番目のシステイン (C) と 20 番目のグルタミン酸 (E) の間に位置する。

以上より、キメラ抗 A33 抗体重鎖の可変領域の核酸配列 (配列番号 7) は 58 番目のグアニン (G) から 408 番目のアデニン (A) までである。また、重鎖の可変領域のアミノ酸配列 (配列番号 8) は 20 番目のグルタミン酸 (E) から 136 番目のセリン (S) までである。

軽鎖核酸配列 (配列番号 9) における抗体可変領域と抗体定常領域の境界は 393 番目のアデニン (A) と 394 番目のシトシン (C) の間に位置し、軽鎖アミノ酸配列 (配列番号 10) における抗体可変領域と抗体定常領域の境界は 131 番目のリジン (K) と 132 番目のアルギニン (R) の間に位置する。また、軽鎖核酸配列 (配

列番号 9) におけるシグナル配列と抗体可変領域の境界は 72 番目のアデニン (A) と 73 番目のグアニン (G) の間に位置し、軽鎖アミノ酸配列 (配列番号 10) におけるシグナル配列と抗体可変領域の境界は 24 番目のグアニン (G) と 25 番目のアスパラギン酸 (D) の間に位置する。

以上より、キメラ抗 A33 抗体軽鎖の可変領域の核酸配列 (配列番号 9) は 73 番目のグアニン (G) から 393 番目のアデニン (A) までである。また、軽鎖の可変領域のアミノ酸配列 (配列番号 10) は 25 番目のアスパラギン酸 (D) から 131 番目のリジン (K) までである。

後述する表 5 に合成 DNA の塩基配列を示す。

このように調製されたキメラ抗 A33 組換え型抗体発現ベクターを宿主細胞に導入し、組換え型抗体発現細胞を作製した。発現のための宿主細胞には、例えば CHO 細胞の dhfr 欠損株 (ATCC CRL-9096)、CHO-Ras (Katakura Y., et al., Cytotechnology, 31: 103-109, 1999)、HEK293T (ATCC CRL-11268) などが用いられる。

宿主細胞へのベクターの導入はエレクトロポレーションやリポフェクションなどにより実施した。エレクトロポレーションは抗体発現ベクター約 2 μ g を制限酵素で線状化し、Bio-Rad electrophoreter をもちいて 350V、500 μ F の条件で、 4×10^6 個の CHO 細胞に遺伝子を導入し、96well culture plate に播種した。リポフェクションは、LipofectAMINE Plus (ギブコ・ビーアールエル社製) を用いてマニュアルに従って実施した。ベクターの導入処理後、発現ベクターの選択マーカーに対応した薬剤を添加して培養を継続した。コロニーを確認した後、実施例 6 に示した方法によって、抗体発現株を選別した。選別した細胞からの抗体精製は、実施例 8 に従って行った。

実施例 3 抗原の調製

免疫原や抗体のスクリーニングなどで使用する A33 が細胞膜上に過剰発現している細胞を得るため、A33 全長アミノ酸の発現プラスミドベクターを作製した。A33 をコードする DNA は、PCR 法により作製した。

a) 全長 A33 発現ベクターの調製

全長 A33 発現ベクターを調製するために、A33 をコードする cDNA を保持するプラスミドベクター p Δ EGFP-N1-GPA33 を作製した。p Δ EGFP-N1-GPA33 は以下の方法で作製された。完全長 A33 DNA (GenBank DNA NM_005814: 配列番号 11, タンパク質 NP_005305: 配列番号 12) を、その 5' 末端に EcoRI 配列を、その 3' 末端に NotI 配列と終止コドンが付加する為のポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行い修飾した。ベクトン・ディキンソン・バイオサイエンス・クロンテック社より購入した Human Colon Marathon-Ready cDNA を鋳型とし、プライマーとして A33-F2 5'-GCAGACGAATTCAAGACCATGGTGGGGAAGAT -3' (配列番号 13) 及び A33-R1 5'-CTCGAGCGGCCGCTCTGCTGCTGGCCTGTCACTGGTCGAGGTG -3' (配列番号 14) を合成し、KOD-plus DNA ポリメラーゼ (トーヨーボー社製) を使用して、(94℃、15 秒; 60℃、30 秒; 68℃、60 秒間) $\times$ 30 サイクルの PCR 反応を行った。合成された配列を、EcoRI-NotI で消化し、EcoRI-NotI 断片として単離し、同一酵素で解裂されていた p Δ EGFP-N1-ベクター (改変 pEGFP-N1 [ベクトン・ディキンソン・バイオサイエンス・クロンテック社製] の EGFP タンパク質をコードしている領域を削除した) に連結した。得られたプラスミドを p Δ EGFP-N1-GPA33 と命名した。p Δ EGFP-N1-GPA33 に組み込まれた A33 は、977bp の cDNA がコードされている。以下、実施例中のすべての PCR の反応温度調節は、ジーンアンプ PCR システム 9700; (株) パーキンエルマー・ジャパン社製を使用した。

b) A33 発現細胞の作製

a) で作製した p Δ EGFP-N1-GPA33 を、FM3A 細胞 (厚生労働省研究資源バンク事業 (JCRB) No. 0701) 及び L929 細胞 (ATCC No. CCL-1) の 2 つの細胞株に導入して、2 種類の A33 発現細胞を作製した。FM3A 細胞には、エレクトロポレーション法を用いた。p Δ EGFP-N1-A33 ベクター 20 μ g を、BTX 社製エレクトロポレーターをもちいて 350V、950 μ F の条件で、 5×10^6 個の FM3A 細胞に遺伝子を導入し、6 well culture plate に播種した。37℃、5.0% 炭酸ガス下で 48 時間培養した後、G418 (ギブコ・ビーアールエル社製) を 1mg/mL になるように加え、1 週間培養した。細胞膜表面上に発現している A33 抗原の確認は、AS33 ハイブリドーマ (ATCC No. HB-8779) の培養上清を用いて行った。AS33 ハイブリドーマ培養上清を一次抗体、R-phycoerythrin 標識したヤギ抗マウス Ig gamma F(ab')₂ 抗体 (ダコー社

製)を2次抗体として用いたフローサイトメーター(FCM:ベクトンディキンソン社製)解析を行い、遺伝子導入された細胞でG418耐性の形質を獲得したものうち、細胞膜表面上にA33を発現している細胞を選択的にソーティングした。

L929細胞へは、Trans IT-LT1(タカラバイオ社製)を用いて導入した。遺伝子導入はマニュアルの方法にて行った。37℃、5.0%炭酸ガス下で24時間培養した後、G418(ギブコ・ビーアールエル社製)を1mg/mLになるように加え、1週間培養した。FM3A細胞のときと同様に、細胞膜表面上に発現しているA33抗原の確認は、AS33ハイブリドーマの培養上清を用いて行った。AS33ハイブリドーマ(ATCC No. HB-8779)を1次抗体、R-phycoerythrin 標識したヤギ抗マウス Ig gamma F(ab')₂抗体(ダコー社製)を2次抗体として用いたフローサイトメーター(FCM:ベクトンディキンソン社製)解析を行い、遺伝子導入された細胞でG418耐性の形質を獲得したものうち、細胞膜表面上にA33を発現している細胞を選択的にソーティングした。

両細胞株ともヒト全長A33抗原を高発現するシングルクローンが取得できた。A33抗原タンパク質を高発現したFM3A細胞をFM3A/A33と、L929細胞をL929/A33と命名した。

shA33EX-hFcタンパク質を免疫原あるいは、抗体をスクリーニングする際のELISAに使用するために作製した。

c) 可溶型細胞膜外A33ヒトFc融合タンパク質発現ベクターの調製

可溶型細胞膜外A33ヒトFc融合タンパク質発現ベクター(以下shA33EX-hFcと示す)を調製するために、A33の細胞膜外領域をコードするcDNAを保持するプラスミドベクター pTracer-CMV-humanFc-A33EXR を作製した。pTracer-CMV-humanFc-A33EXRは以下の方法で作製された。分泌シグナル配列を含む細胞膜外領域A33 DNA(配列番号11)を、その5'末端にEcoRI配列を、その3'末端にNotI配列と終止コドンが付加する為のポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を行い修飾した。a)で作製したpΔEGFP-N1-A33cDNAを鋳型とし、プライマーとしてA33-F2(配列番号13)及びGPA-EXCRR2' 5'-

CTCGAGCGGCCGCCAGTTCATGGAGGGAGATCTGACG-3'(配列番号15)を合成し、KOD-plus DNAポリメラーゼ(トーヨーボー社製)を使用して、(94℃、15秒;60℃、30秒;

68℃、60 秒間) × 30 サイクルの PCR 反応を行った。合成された配列を、EcoRI-NotI で消化し、EcoRI-NotI 断片として単離し、同一酵素で解裂されていた pTracer-CMV-humanFc ベクター (改変 pTracer-CMV [インビトロジェンライフテクノロジーズ社製] の Xba I 部位と Apa I 部位のところに FLAG 及びヒト IgG1 の Fc 領域を導入したプラスミド) に連結した得られたプラスミドを pTracer-CMV-humanFc-A33EXR と命名した。

PCR 用プライマー等のオリゴヌクレオチドの合成は、全て DNA 自動合成機 (モデル 3948 ; (株) パーキンエルマー・ジャパン・アプライドバイオシステムズ事業部製) を用いて、そのマニュアルに従って行った [Matteucci, M. D. and Caruthers, M. H. (1981) J. Am. Chem. Soc. 103, 3185-3191 参照]。各オリゴヌクレオチドは合成終了後、支持体から開裂させ脱保護を行い、得られた溶液を乾固した後蒸留水に溶解し、使用するまで -20℃ で凍結保存した。

d) shA33EX-hFc タンパク質の発現と精製

c) で構築した shA33EX-hFc タンパク質発現ベクターを宿主細胞に導入し、可溶性細胞膜外 A33 タンパク質発現細胞を作製した。発現のための宿主細胞には、例えば CHO 細胞の dhfr 欠損株 (ATCC CRL-9096)、CHO-Ras (Katakura Y., et al., Cytotechnology, 31: 103-109, 1999)、HEK293T (ATCC CRL-11268) などが用いられる。

宿主細胞へのベクターの導入はエレクトロポレーションやリポフェクションなどにより実施した。エレクトロポレーションは shA33EX-hFc タンパク質発現ベクター約 2 μ g を制限酵素で線状化し、Bio-Rad electrophoreter をもちいて 350V、500 μ F の条件で、 4×10^6 個の CHO 細胞に遺伝子を導入し、96well culture plate に播種した。リポフェクションは、LipofectAMINE Plus (ギブコ・ビーアールエル社製) を用いてマニュアルに従って実施した。ベクターの導入処理後、発現ベクターの選択マーカーに対応した薬剤を添加して培養を継続した。

培養上清からの shA33EX-hFc タンパク質の精製は以下の方法で行った。shA33EX-hFc タンパク質を含む培養上清を Hitrap Protein A FF (アマシャムファルマシアバイオテク社製) を用い、吸着緩衝液として PBS、溶出緩衝液として 20 mM クエン酸ナトリウム、50 mM 塩化ナトリウム (pH2.7) を用いてアフィニティー精

製した。溶出画分は 50 mM リン酸ナトリウム溶液 (pH 7.0) を添加して pH5.5 に調製した。調製された可溶型細胞膜外 A33 タンパク質溶液は、Amicon Ultra-15 (アミコン社製) を用いて PBS に置換し、孔径 0.22 μ m のメンブランフィルター MILLEX-GV (ミリポア社製) でろ過滅菌し、精製 shA33EX-hFc タンパク質を得た。shA33EX-hFc タンパク質の濃度は 280nm の吸光度を測定し、1mg/mL を 1.4 OD として算出した。

実施例 4 ヒト抗体産生マウスの作製

免疫に用いたマウスは、内因性 Ig 重鎖及び κ 軽鎖破壊の両者についてホモ接合体の遺伝的背景を有しており、かつ、ヒト Ig 重鎖遺伝子座を含む 14 番染色体断片 (SC20) 及びヒト Ig κ 鎖トランスジーン (KCo5) を同時に保持する。このマウスはヒト Ig 重鎖遺伝子座を持つ系統 A のマウスと、ヒト Ig κ 鎖トランスジーンを持つ系統 B のマウスとの交配により作製された。系統 A は、内因性 Ig 重鎖及び κ 軽鎖破壊の両者についてホモ接合体であり、子孫伝達可能な 14 番染色体断片 (SC20) を保持するマウス系統であり、例えば富塚らの報告 [Tomizuka, et al., Proc Natl Acad Sci USA., 2000 Vol97:722] に記載されている。また、系統 B は内因性 Ig 重鎖及び κ 軽鎖破壊の両者についてホモ接合体であり、ヒト Ig κ 鎖トランスジーン (KCo5) を保持するマウス系統 (トランスジェニックマウス) であり、例えば Fishwild らの報告 [Nat Biotechnol, (1996), 14:845] に記載されている。

系統 A の雄マウスと系統 B の雌マウス、あるいは系統 A の雌マウスと系統 B の雄マウスの交配により得られた、血清中にヒト Ig 重鎖及び κ 軽鎖が同時に検出される個体 [Ishida&Lonberg, IBC's 11th Antibody Engineering, Abstract 2000] を、以下の免疫実験に用いた。なお、前記ヒト抗体産生マウス (KM マウスと称する) は、契約を結ぶことによって、キリンビール株式会社より入手可能である。

実施例 5 A33 に対するヒトモノクローナル抗体の調製

本実施例におけるモノクローナル抗体の作製は、単クローン抗体実験操作入門 (安東民衛ら著作、講談社発行 1991) 等に記載されるような一般的方法に従って

調製した。免疫原としての A33 は、実施例 1 で調製した A33 発現 FM3A 細胞あるいは shA33EX-hFc タンパク質を用いた。被免疫動物は、実施例 2 で作製したヒト免疫グロブリンを産生するヒト抗体産生マウスを用いた。

A33 に対するヒトモノクローナル抗体の調製を目的として、ヒト抗体産生マウスに、実施例 3 で作製した A33 発現 FM3A 細胞 (1×10^7 細胞/匹) を腹腔内に RIBI アジュバント (コリクサ社製) と混合して初回免疫した。初回免疫から以降、同細胞と RIBI アジュバントを毎週計 8 回免疫した。以下に述べる脾臓の取得 3 日前に、shA33EX-hFc タンパク質 $20 \mu\text{g}$ /マウス個体を尾静脈投与及び $5 \mu\text{g}$ /マウス個体の Recombinant Human IL-6 を皮下投与した。

また、shA33EX-hFc タンパク質 $10 \mu\text{g}$ /マウス個体を CpG アジュバント (キアゲン社製) と混合して初回免疫した。初回免疫から以降、同タンパク質と CpG アジュバントを 2 週間毎に 2 回免疫し、さらに 2 週間後に同タンパク質のみ免疫した。以下に述べる脾臓の取得 3 日前に、shA33EX-hFc タンパク質 $10 \mu\text{g}$ /マウス個体を尾静脈投与した。

また、shA33EX-hFc タンパク質 $10 \mu\text{g}$ /マウス個体と A33 発現 FM3A 細胞 (5×10^6 細胞/匹) を RIBI アジュバントとともに腹腔内に免疫し、2 週間毎に 1~4 回免疫した。以下に述べる脾臓の取得 4 日前に、shA33EX-hFc タンパク質 $5 \mu\text{g}$ /マウス個体を腹腔内投与した。

免疫されたマウスから脾臓を外科的に取得し、 350mg/mL 炭酸水素ナトリウム、 50 単位/mL ペニシリン、 $50 \mu\text{g/mL}$ ストレプトマイシンを含む無血清 DMEM 培地 (ギブコ・ビーアールエル社製) (以下「無血清 DMEM 培地」という) 10mL 中に入れ、メッシュ (セルストレイナー: ファルコン社製) 上でスパーテルを用いてつぶした。メッシュを通過した細胞懸濁液を遠心して細胞を沈澱させた後、この細胞を無血清 DMEM 培地で 2 回洗浄してから、無血清 DMEM 培地に懸濁して細胞数を測定した。一方、 10% FCS (シグマ社製) を含む DMEM 培地 (ギブコ・ビーアールエル社製) (以下、「血清入り DMEM 培地」という) にて、 37°C 、 5% 炭酸ガス存在下で細胞濃度が 1×10^6 細胞/mL を越えないように培養したミエローマ細胞 SP2/0 (ATCC No. CRL-1581) を同様に無血清 DMEM 培地で洗浄し、無血清 DMEM 培地に懸濁して細胞数を測定した。回収した細胞の懸濁液とマウスミエローマ懸濁液とを

細胞数 5:1 で混合し、遠心後、上清を完全に除去した。このペレットに、融合剤として 50% (w/v) ポリエチレングリコール 1500 (ペーリンガーマンハイム社製) 1mL を、ピペットの先でペレットを撈拌しながらゆっくり添加した後、予め 37℃ に加温しておいた無血清 DMEM 培地 1mL を 2 回に分けてゆっくり添加し、さらに 7mL の無血清 DMEM 培地を添加した。遠心後、上清を除去して得られた融合細胞を、以下に記載する限界希釈法によるスクリーニングに供した。ハイブリドーマの選択は、10% FCS、IL-6 (10ng/mL) (または 10% ハイブリドーマクローニングファクター (以下「HCF」という。: バイオベース社製)) 及びヒポキサンチン (H)、アミノプテリン (A)、チミジン (T) (以下、「HAT」という。: シグマ社製) を含有する DMEM 培地中で培養することにより行った。さらに、HT (シグマ社製)、10% FCS、IL-6 (または 10% HCF) 含有 DMEM 培地を用いて限界希釈法によりシングルクローンにした。培養は、96 穴マイクロタイタープレート (ベクトンディッキンソン社製) 中で行った。抗 A33 ヒトモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマクローンの選択 (スクリーニング) 及び各々のハイブリドーマが産生するヒトモノクローナル抗体の特徴付けは、後述する酵素標識免疫吸着アッセイ (ELISA) 及びフローサイトメトリー (FMC) で測定することにより行った。

実施例 6 に述べる Cell ELISA、タンパク ELISA、並びに FMC 解析により、ヒト免疫グロブリン γ 鎖 (hIg γ) 及びヒト免疫グロブリン軽鎖 κ を有し、かつ A33 に特異的な反応性を有するヒトモノクローナル抗体を産生する多数のハイブリドーマを得た。なお、本実施例を含め以下のいずれの実施例中、並びに実施例における試験結果として示した表又は図中においては、各々の本発明のヒト抗 A33 モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマクロンは記号を用いて命名した。また、当該記号の前後に「抗体」を付したものは、それぞれのハイブリドーマにより産生される抗体、または当該ハイブリドーマから単離された抗体遺伝子 (全長あるいは可変領域) を保持する宿主細胞により生産された組換え抗体を意味する。また文脈上明らかな範囲において、ハイブリドーマクロンの名称が抗体の名称をあらわす場合がある。以下のハイブリドーマクロンはシングルクローンを表す: 263A17、125M10AA、125M165DAAA、125M96ABA、125N26F6AA、125Q47BA、125Q54AAAA 及び 125R5AAAA。125M10AA、125M165DAAA、125M96ABA、125N26F6AA、

125Q47BA、125Q54AAAA 又は 125R5AAAA は、2004 年 8 月 24 日付で独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（日本国 茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6）に、それぞれ順番に受託番号 FERM BP-10107（識別のための表示：M10）、FERM BP-10106（識別のための表示：M165）、FERM BP-10108（識別のための表示：M96）、FERM BP-10109（識別のための表示：N26）、FERM BP-10104（識別のための表示：Q47）、FERM BP-10105（識別のための表示：Q54）および FERM ABP-10103（識別のための表示：R5）として寄託されている。

実施例 6 ヒト免疫グロブリン γ 鎖 (hIg γ) 及びヒト免疫グロブリン軽鎖 κ (Ig κ) を有する、ヒト抗 A33 モノクローナル抗体産生クローンの選択

Cell ELISA の場合、以下のように実施した。実施例 3 で作製した FM3A/A33 を 96 穴プレート（ファルコン社製）の各ウェルに 1×10^5 個加えた後、ハイブリドーマ上清を加え、4℃で 30 分間インキュベートした。次いで、2 %FCS 入りの PBS で 2 回洗浄し、西洋ワサビペルオキシダーゼで標識されたヤギ抗ヒト IgG F(ab')₂ 抗体（50 μ g/ウェル：IBL 社製）を加え、4℃で 30 分間インキュベートした。2 % FCS 入り PBS で 2 回洗浄し、TMB 発色基質（DAKO 社製）を各ウェルに 100 μ L ずつ加え、室温下で 20 分間インキュベートした。各ウェルに 0.5M 硫酸（100 μ L/ウェル）を加え、反応を止めた。波長 450nm（参照波長 570nm）での吸光度をマイクロプレートリーダー（1420 ARVO マルチラベルカウンター：WALLAC 社製）で測定して陽性反応を示した抗体産生クローンを選択した。この際に、A33 抗原を発現していない FM3A 細胞をネガティブコントロールとして使用した。すなわち、FM3A/A33 細胞に反応し、FM3A 細胞に反応しない培養上清を、陽性反応を示した抗体産生クローンとして選択した。

また、タンパク ELISA の場合は、以下のように実施した。実施例 3 で作製した shA33EX-hFc タンパク質を 1 μ g/ml 炭酸緩衝液 pH 9.4 に調製したものを 50 μ L ずつ、ELISA 用 96 穴マイクロプレート（Maxisorp、ヌンク社製）の各ウェルに加え、室温で 1 時間あるいは 4℃で一晩インキュベートし、shA33EX-hFc タンパク質をマイクロプレートに吸着させた。次いで、上清を捨て、各ウェルに 10 %FCS 入り PBS を加え、37℃で 1 時間インキュベートし、shA33EX-hFc タンパク質が結合

していない部位をブロックした。このようにして、各ウェルを shA33EX-hFc タンパク質でコーティングしたマイクロプレートを作製した。各ウェルに、各々のハイブリドーマの培養上清 (50 μ l) を加え、室温下で 1 時間反応させた後、各ウェルを 0.1% Tween20 含有 PBS (PBS-T) で 2 回洗浄した。次いで、西洋ワサビペルオキシダーゼで標識されたヒツジ抗ヒト Ig κ 抗体 (50 μ l/ウェル、The Binding Site 社製) を 0.1% Tween20 含有 PBS (PBS-T) で 2500 倍に希釈した溶液を、各ウェルに 50 μ l 加え、37°C 1 時間インキュベートした。マイクロプレートを、PBS-T で 3 回洗浄後、TMB 発色基質液 (DAKO 社製) を各ウェルに 100 μ l ずつ加え、室温下で 20 分間インキュベートした。各ウェルに 0.5M 硫酸 (100 μ l/ウェル) を加え、反応を止めた。波長 450nm (参照波長 570nm) での吸光度をマイクロプレートリーダー (VersaMax、モレキュラーデバイス社製) で測定して、陽性反応を示した抗体産生クローンを選択した。

さらに、FMC の場合は、以下のように実施した。A33 抗原を発現するヒト大腸癌細胞株 COL0205 細胞に対するハイブリドーマ培養上清の反応性の検討を行った。2 $\times 10^6$ /ml の濃度で COL0205 細胞株を 0.1%Na₃N₃、2%FCS 含有 PBS の Staining Buffer (SB) に浮遊させた。細胞浮遊液 (50 μ l/ウェル) を 96-well 丸底プレート (ベクトンディッキンソン社製) に分注した。各々のハイブリドーマの培養上清 (50 μ l) を加え、氷温下 30 分間インキュベートした。陰性コントロールは各サブクラスに応じ、ヒト IgG1 抗体 (シグマ社製) を用い、ハイブリドーマ培養培地で 2 μ g/ml の濃度に調製し、50 μ l 添加後氷温下 30 分間インキュベートした。SB で 2 回洗浄した後、RPE 蛍光標識ヤギ抗ヒト IgG F(ab')₂ 抗体 (Southern Biotech 社製) 50 μ l を加え、氷温下 30 分間インキュベートした。SB で 1 回洗浄した後、300 μ l の FACS 緩衝液に懸濁し、FACS (FACScalibur、ベクトンディッキンソン社製) で各細胞の平均蛍光強度を測定した。その結果、COL0205 細胞株に強い結合活性を有することから、細胞に発現している A33 と結合する抗体であることが判明した。

実施例 7 各モノクローナル抗体培養上清のサブクラス同定

shA33EX-hFc タンパク質を 1 μ g/ml 炭酸緩衝液 (以下、「PBS」という。) に調製

したものを 50 μ l ずつ、ELISA 用 96 穴マイクロプレート (Maxisorp、ヌンク社製) の各ウェルに加え、室温で 1 時間あるいは 4℃で一晩インキュベートし、shA33EX-hFc タンパク質をマイクロプレートに吸着させた。次いで、上清を捨て、各ウェルに 10%FCS 入り PBS を加え、室温で 1 時間あるいは 4℃で一晩インキュベートし、shA33EX-hFc タンパク質が結合していない部位をブロックした。このようにして、各ウェルを shA33EX-hFc タンパク質でコーティングしたマイクロプレートを作製した。次いで、0.1% Tween20 含有 PBS (PBS-T) で 2 回洗浄し、各ウェルにそれぞれ西洋ワサビペルオキシダーゼで標識されたヒツジ抗ヒト IgG1 抗体、ヒツジ抗ヒト IgG2 抗体、ヒツジ抗ヒト IgG3 抗体又はヒツジ抗ヒト IgG4 抗体 (それぞれ 1600、6400、25000、25000 倍希釈、50 μ L/ウェル、The Binding Site 社製) を加え、室温下で 1.5 時間インキュベートした。0.1% Tween20 含有 PBS (PBS-T) で 3 回洗浄後、基質緩衝液 (TMB、100 μ L/ウェル、DAKO 社製) を各ウェルに加え、室温下で 20 分間インキュベートした。次いで、0.5M 硫酸 (100 μ L/ウェル) を加え、反応を止めた。波長 450nm (参照波長 570nm) での吸光度をマイクロプレートリーダー (VersaMax、モレキュラーデバイス社製) で測定し、各クローンのサブクラスを決定した。ヒト抗 A33 抗体は、ADCC 及び CDC 活性を重要視しているため、サブクラスが IgG1 のもののみ選抜した。

最終的に選択したクローンのみの結果を表 1 に示す。

表 1

抗体名	サブクラス	COL0205に対する反応性
抗DNP-IgG1	IgG1	—
cA33	IgG1	+
263A17	IgG1	+
125M10AA	IgG1	+
125M165DAAA	IgG1	+
125M96ABA	IgG1	+
125N26F6AA	IgG1	+
125Q47BA	IgG1	+
125Q54AAAA	IgG1	+
125R5AAAA	IgG1	+

実施例 8 各抗体の調製

実施例 6 から得られたハイブリドーマの培養上清からのヒト抗 A33 モノクローナル抗体の精製は以下の方法で行った。ヒト抗 A33 モノクローナル抗体を含む培養上清を 10 % ultra low IgG FBS (インビトロジェン社製) を含む SFM 培地 (インビトロジェン社製) で培養した培養上清を Protein A Fast Flow gel (アマシヤムファルマシアバイオテク社製) を用い、吸着緩衝液として PBS、溶出緩衝液として 0.02M グリシン緩衝液 (pH 3.6) を用いてアフィニティー精製した。溶出画分は 1M Tris (pH 8.0) を添加して pH7.2 付近に調整した。調製された抗体溶液は、Sephadex G25 脱塩カラム (NAP カラム; アマシヤムファルマシアバイオテク社製) を用いて PBS に置換し、孔径 0.22 μ m のメンブランフィルター MILLEX-GV (ミリポア社製) でろ過滅菌し、精製ヒト抗 A33 モノクローナル抗体を得た。精製抗体の濃度は 280nm の吸光度を測定し、1mg/mL を 1.4 OD として算出した。

実施例 9 A33 発現細胞に対する各モノクローナル精製抗体の反応試験

A33 抗原を発現するヒト大腸癌細胞株 COL0205 細胞、LoVo 細胞 (ATCC No. CCL-229)、LS174T 細胞 (ATCC No. CL-188) 及び NCI-H508 細胞 (ATCC No. CCL-253) に対する実施例 8 で取得した各モノクローナル精製抗体の反応性の検討を、FCM で行った。また、陰性コントロール細胞として A33 抗原を発現していないヒト大腸癌細胞株 HT-29 細胞 (ATCC No. HTB-38) も行った。 2×10^6 /ml の濃度で各細胞株を 0.1%Na₃N₃、2%FCS 含有 PBS の Staining Buffer (SB) に浮遊させた。細胞浮遊液 (50 μ l/ウェル) を 96-well 丸底プレート (ベクトンディッキンソン社製) に分注した。各々のモノクローナル精製抗体を SB で 2000、400、80、16ng/ml を 50 μ l 加え、氷温下 30 分間インキュベートした。陰性コントロールはサブクラスに応じ、ヒト IgG1 抗体 (シグマ社製) を用い、SB で 2000、400、80、16ng/ml の濃度に調製し、50 μ l 添加後氷温下 30 分間インキュベートした。SB で 2 回洗浄した後、FITC 蛍光標識ヤギ抗ヒト IgG F(ab')₂ 抗体 (Southern Biotech 社製) 50 μ l を加え、氷温下 30 分間インキュベートした。SB で 1 回洗浄した後、300 μ l の FACS 緩衝液に懸濁し、FACS (FACScan、ベクトンディッキンソン社製) で各細胞の平均蛍光強度を測定した。

その結果を表 2 に示す。COL0205 細胞では、平均蛍光強度半値を 90、LoVo 細胞では、平均蛍光強度半値を 25、LS174T 細胞では、平均蛍光強度半値を 125、NCI-H508 細胞では、平均蛍光強度半値を 125 とし、そこに達する抗体濃度が $10 \leq x < 100$ ng/ml のときは + + +、 $100 \leq x < 1000$ ng/ml のときは + +、 $1000 \leq x < 10000$ ng/ml のときは +、結合が認められなかった場合は、- と示した。A33 抗原を発現しているどの細胞に対しても、各モノクローナル精製抗体は結合を示した。

表 2

抗体名	COL0205	LoVo	LS174T	NCI-H508	HT-29
抗DNP-IgG1	-	-	-	-	-
CA33	+++	+++	++	++	-
263A17	++	++	++	++	-
125M10AA	+++	+++	+++	+++	-
125M165DAAA	+++	+++	++	++	-
125M96ABA	+++	+++	++	++	-
125N26F6AA	+++	+++	++	++	-
125Q47BA	+++	+++	++	++	-
125Q54AAAA	+++	+++	++	++	-
125R5AAAA	+++	+++	++	++	-

平均蛍光強度半値 90
 10<= x <100 ng/ml: +++
 100<= x <1000 ng/ml: ++
 1000<= x <10000 ng/ml: +
 結合なし;-

平均蛍光強度半値 25
 10<= x <100 ng/ml: +++
 100<= x <1000 ng/ml: ++
 1000<= x <10000 ng/ml: +
 結合なし;-

平均蛍光強度半値 125
 10<= x <100 ng/ml: +++
 100<= x <1000 ng/ml: ++
 1000<= x <10000 ng/ml: +
 結合なし;-

平均蛍光強度半値 125
 10<= x <100 ng/ml: +++
 100<= x <1000 ng/ml: ++
 1000<= x <10000 ng/ml: +
 結合なし;-

実施例 10 各モノクローナル精製抗体のマウス抗 A33 抗体との競合試験

実施例 8 で取得した各モノクローナル精製抗体が、マウス抗 A33 抗体と同様なエピトープを認識するか否かを FCM を用いた競合実験にて検討した。 $2 \times 10^6/\text{ml}$ の濃度で COL0205 細胞株を 0.1% NaN_3 、2%FCS 含有 PBS の Staining Buffer (SB) に浮遊させた。細胞浮遊液 ($50 \mu\text{l}$ /ウェル) を 96-well 丸底プレート (ベクトンディッキンソン社製) に分注した。そこに、実施例 1 で調製したマウス抗 A33 精製抗体を $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で加えたものと加えないものを、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の各モノクローナル精製抗体 ($50 \mu\text{l}$) とともにウェルに加え、氷温下 30 分間インキュベートした。抗 A33 精製抗体を加えないマウス陰性コントロールは、ヒト IgG1 抗体 (シグマ社製) を用い、SB で $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度に調製し、 $50 \mu\text{l}$ 添加後氷温下 30 分間インキュベートした。SB で 2 回洗浄した後、FITC 蛍光標識ヤギ抗ヒト IgG F(ab')₂ 抗体 (アイビーエル社製) $50 \mu\text{l}$ を加え、氷温下 30 分間インキュベートした。SB で 1 回洗浄した後、 $300 \mu\text{l}$ の FACS 緩衝液に懸濁し、FACS (FACScan、ベクトンディッキンソン社製) で各細胞の平均蛍光強度を測定した。各モノクローナル精製抗体のマウス A33 抗体との阻害率を下記式により算出した：阻害率 = $\{100 - (100 \times \text{マウス A33 抗体プレインキュベートした後の平均蛍光強度}) / (\text{マウス A33 抗体なしでプレインキュベートした後の平均蛍光強度})\}$ 。阻害率が 25% 以下のものを「ノンブロッカー」、25% 以上 90 未満のものを「パーシャルブロッカー」、90% 以上のものを「ブロッカー」と命名した。その結果、263A17、125M10AA 及び 125M96ABA は、「ノンブロッカー」、125M165DAAA 及び 125N26F6AA は「ブロッカー」、125Q47BA、125Q54AAAA 及び 125R5AAAA は、「パーシャルブロッカー」と分類された。その結果を表 3 に示す。

表 3

抗体名	阻害率 (%)	分類
cA33	94.2	ブロッカー
263A17	3.7	ノンブロッカー
125M10AA	5.0	ノンブロッカー
125M165DAAA	96.0	ブロッカー
125M96ABA	22.8	ノンブロッカー
125N26F6AA	98.0	ブロッカー
125Q47BA	64.1	パーシャルブロッカー
125Q54AAAA	46.5	パーシャルブロッカー
125R5AAAA	63.9	パーシャルブロッカー

実施例 1 1 正常ヒト単核球の取得方法

最初に正常ヒト末梢血由来単核球を Ficoll (Ficoll-PaquePLUS: アマシャム・ファルマシア・バイオテック社製) を用いて定法に従って調製した。抗凝固剤としてクエン酸ナトリウム液を含んだ採血バッグ (テルモ社製) に採取した正常ヒト血液を Ficoll に重層し、比重遠心 (800G、室温 15 分間) により単核細胞を分離した。中間層を単核球として抽出して PBS で希釈して 200G で 10 分間遠心分離を 3 回繰り返し、上清中に残留した血小板を除去した。以上の方法で正常ヒト末梢血由来単核球 (以下 PBMC という) を取得し、実施例 12 の PBMC として使用した。さらに、PBMC から CD4+ T cell Isolation kit II (ミルテニバイオテック社製) を用い、付属の説明書に従って CD4+ T 細胞を単離した残りの細胞群も実施例 12 の PBMC として使用した。

実施例 1 2 各モノクローナル精製抗体での細胞傷害性試験

抗体を介した細胞傷害性活性は、NK 細胞或いは好中球などのキラー活性を有す

る細胞と抗体の存在下でターゲット細胞への傷害活性（抗体依存性細胞性細胞傷害活性（Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity）、以下、ADCC）、及び補体と抗体の存在下でターゲット細胞への傷害活性（補体依存性細胞傷害活性（Complement-Dependent Cytotoxicity）以下、CDC）の測定を実施した。抗体は、実施例 8 で作製した各モノクローナル精製抗体と抗 A33 抗体のコントロールとして cA33 組換え型抗体を用いた。さらに、陰性コントロールとして抗 DNP IgG1 抗体を用いた。

方法は簡単には、ターゲット細胞に放射性クロム（ ^{51}Cr ）を細胞質内に取り込ませ、細胞死により培養液中に遊離される ^{51}Cr 量を γ 線量で測定した。

具体的には、ターゲット細胞として大腸癌細胞株 COLO205（ATCC No. CCL-86）及び NCI-H508 細胞（ATCC No. CCL-253）を 10^6 個を $15\mu\text{L}$ の Fetal Calf Serum (FCS) に懸濁し、 $50\mu\text{L}$ （ 37MBq/mL ）の ^{51}Cr ラベルされたクロム酸ナトリウム（パーキエルマー社製：以下、 ^{51}Cr と書く）を添加し、1 時間 37°C で培養した。次に、培地を 10mL 添加し、遠心して培地を捨てることを 3 回繰り返すことで、細胞内に取り込まれていない ^{51}Cr を除いた。

ADCC アッセイは、 ^{51}Cr ラベルしたターゲット細胞 5000 個に対して、実施例 11 記載の方法で取得した健常人末梢血単核球 500000 個を、V 底 96 ウェルプレート（コースター社製）中で全体容量 $200\mu\text{L}$ で、各抗体濃度とともに 37°C 、5% CO_2 存在下で 4 時間培養した。

CDC アッセイは、 ^{51}Cr ラベルしたターゲット細胞 5000 個に対して、最終濃度 5% のヒト血清由来補体（シグマ社製）を、V 底 96 ウェルプレート中で全体容量 $200\mu\text{L}$ で、各抗体濃度とともに 37°C 、5% CO_2 存在下で 4 時間培養した。

ADCC・CDC アッセイともに培養後、プレートを遠心して細胞を沈めた後、各モノクローナル精製抗体を $0.4\text{--}500\text{ng/mL}$ に調製し $50\mu\text{L}$ を粉末シンチレーター含有の 96 穴プレート（LumaplateTM-96：パッカー社製）に移し、 55°C 、1.5 時間で乾燥した。乾燥を確認後、専用カバー（TopSealTM-A:96-well Microplates：パッカー社製）でプレートをカバーし、シンチレーションカウンター（トップカウント：パッカー社製）で γ 線量を測定した。

その結果を図 1A～図 1D、表 4 に示す。ADCC は、COLO205 細胞の場合は、特異

的溶解率半値を 15%とし、そこに達する抗体濃度が $1 \leq x < 10 \text{ ng/ml}$ のときは++、 $10 \leq x < 100 \text{ ng/ml}$ のときは++、 $100 \leq x < 1000 \text{ ng/ml}$ のときは+、特異的溶解率が認められなかった場合は、-と示した。また、NCI-H508 細胞の場合は、特異的溶解率半値を 15%とし、そこに達する抗体濃度が $1 \leq x < 10 \text{ ng/ml}$ のときは+++、 $10 \leq x < 100 \text{ ng/ml}$ のときは++、 $100 \leq x < 1000 \text{ ng/ml}$ のときは+、特異的溶解率が認められなかった場合は、-と示した。

CDC では、COL0205 細胞の場合は、特異的溶解率半値を 10%とし、そこに達する抗体濃度が $10 \leq x < 100 \text{ ng/ml}$ のときは+++、 $100 \leq x < 1000 \text{ ng/ml}$ のときは++、 $x \geq 1000 \text{ ng/ml}$ のときは+、特異的溶解率が認められなかった場合は、-と示した。また、NCI-H508 細胞の場合は、特異的溶解率半値を 25%とし、そこに達する抗体濃度が $10 \leq x < 100 \text{ ng/ml}$ のときは+++、 $100 \leq x < 1000 \text{ ng/ml}$ のときは++、 $x \geq 1000 \text{ ng/ml}$ のときは+、特異的溶解率が認められなかった場合は、-と示した。

ADCC では、cA33 及び 125Q54AAAA が高い傷害活性を示した。一方、CDC では、125M10AA が高い傷害活性を示した。

表 4

細胞名	COL0205		NCI-H508	
	ADCC	CDC	ADCC	CDC
抗DNP-IgG1	-	-	-	-
CA33	+++	-	+++	-
263A17	++	++	+++	++
125M10AA	++	+++	+++	+++
125M165DAAA	++	+	+++	++
125M96ABA	+	++	++	+++
125N26F6AA	++	-	++	+
125Q47BA	++	++	++	++
125Q54AAAA	+++	++	+++	++
125R5AAAA	++	++	+++	++

特異的溶解率半値 15%
 $1 < x < 10$ ng/ml; +++
 $10 < x < 100$ ng/ml; ++
 $100 < x < 1000$ ng/ml; +
 特異的溶解なし; -

特異的溶解率半値 10%
 $10 < x < 100$ ng/ml; +++
 $100 < x < 1000$ ng/ml; ++
 $x \geq 1000$ ng/ml; +
 特異的溶解なし; -

特異的溶解率半値 15%
 $1 < x < 10$ ng/ml; +++
 $10 < x < 100$ ng/ml; ++
 $100 < x < 1000$ ng/ml; +
 特異的溶解なし; -

特異的溶解率半値 25%
 $10 < x < 100$ ng/ml; +++
 $100 < x < 1000$ ng/ml; ++
 $x \geq 1000$ ng/ml; +
 特異的溶解なし; -

実施例 1 3 各モノクローナル抗体をコードする遺伝子の調製

(1) 各モノクローナル抗体の cDNA 合成

ハイブリドーマ 263A17、125M10AA、125M165DAAA、125M96ABA、125N26F6AA、125Q47BA、125Q54AAAA 及び 125R5AAAA を 10ng/mL IL-6 または 10% HCF (バイオベース社製)、10% Fetal Bovine Serum (ハイクローン社製) 含有 DMEM 培地 (ギブコ・ビーアールエル社製) で培養し、遠心分離により細胞を集めた後 ISOGEN (日本ジーン社製) を添加し、取扱説明書にしたがって Total RNA を抽出した。抗体 cDNA の可変領域のクローニングは、SMART RACE cDNA amplification Kit (ベクトン・ディキンソン・バイオサイエンス・クローンテック社製) を用い、添付の説明書にしたがって行った。

5 μ g の total RNA を鋳型として、1st strand cDNA を作製した。

1st strand cDNA の合成

Total RNA 5 μ g/3 μ l

5' CDS 1 μ l

SMART oligo 1 μ l

上記組成の反応液を 70°C で 2 分間インキュベートした後、

5×Buffer 2 μ l

DTT 1 μ l

DNTP mix 1 μ l

PowerScript Reverse Transcriptase 1 μ l

を加え 42°C で 1.5 時間インキュベートした。

さらに、100 μ l の Tricine Buffer を加えた後、72°C で 7 分間インキュベートし、1st strand cDNA を取得した。

(2) PCR による重鎖遺伝子、軽鎖遺伝子の増幅と塩基配列の確認

(2) - 1 ; ハイブリドーマ 263A17 の PCR による重鎖遺伝子、軽鎖遺伝子の増幅 cDNA の増幅は、KOD-Plus- DNA ポリメラーゼ (トーヨーボー社製) を用いて下記の反応液を調製して実施した。

sterile H₂O 29.5 μ l

cDNA 2.5 μ l

KOD-Plus- buffer (10X)	5 μ l
dNTP Mix (2mM)	4 μ l
MgSO ₄ (25 mM)	2 μ l
KOD-Plus- (1 unit/ μ l)	1 μ l
Universal primer A mix (UPM) (10X)	5 μ l
Gene specific primers (GSP)	1 μ l
Total volume	50 μ l

上記組成の反応液を再蒸留水にて最終容量 50 μ l とし、PCR に供した。

263A17 の重鎖遺伝子の増幅は、SMART RACE cDNA Amplification Kit 付属の UPM プライマーと IgG1p プライマー (5' -TCTTGTCACCTTGGTGTGCTGGGCTTG-3') (配列番号 16) を用い、98℃ 1 秒、68℃ 30 秒のサイクルを 30 回繰り返した。一方、263A17 の軽鎖遺伝子の増幅は、UPM プライマーと hk-2 (5' -GTT GAA GCT CTT TGT GAC GGG CGA GC -3') (配列番号 17) プライマーを使って、98℃ 1 秒、68℃ 30 秒のサイクルを 30 回繰り返して増幅した。

(2) -2 ; ハイブリドーマ 125M10AA、125M96ABA、125Q47BA、125Q54AAAA 及び 125R5AAAA の PCR による重鎖遺伝子、軽鎖遺伝子の増幅

反応条件は、(2) -1 と同様に行った。125M10AA、125M96ABA、125Q47BA、125Q54AAAA 及び 125R5AAAA の重鎖遺伝子の増幅は、UPM プライマーと IgG1p プライマー (配列番号 16) を用い、98℃ 1 秒、68℃ 30 秒のサイクルを 30 回繰り返した。さらに、この反応液 1 μ l を鋳型とし、NUPM プライマー (SMART RACE cDNA amplification Kit ; ベクトン・ディキンソン・バイオサイエンス・クローンテック社製) と IgG2p/G134 プライマー (5' - TGC ACG CCG CTG GTC AGG GCG CCT GAG TTC C-3') (配列番号 18) を用いて、98℃ 1 秒、68℃ 30 秒のサイクルを 20 回繰り返した。一方、125M10AA、125M96ABA、125Q47BA、125Q54AAAA 及び 125R5AAAA の軽鎖遺伝子の増幅は、UPM プライマーと hk-2 プライマー (配列番号 17) を使って、98℃ 1 秒、68℃ 30 秒のサイクルを 30 回繰り返して増幅した。さらに、この反応液 1 μ l を鋳型とし、NUPM プライマーと hk-5 プライマー (5' - AGG CAC ACA ACA GAG GCA GTT CCA GAT TTC-3') (配列番号 19) を用いて、98℃ 1 秒、68℃ 30 秒のサイクルを 20 回繰り返した。

(2) -3; ハイブリドーマ 125M165DAAA 及び 125N26F6AA の PCR による重鎖遺伝子、軽鎖遺伝子の増幅

反応条件は、(2) -1 と同様に行った。125M165DAAA 及び 125N26F6AA の重鎖遺伝子の増幅は、UPM プライマーと hh-2 プライマー (5' -GCT GGA GGG CAC GGT CAC CAC GCT G-3') (配列番号 20) を用い、98℃ 1 秒、68℃ 30 秒のサイクルを 30 回繰り返した。さらに、この反応液 1 μ l を鋳型とし、NUPM プライマーと hh-4 プライマー (5' - GGT GCC AGG GGG AAG ACC GAT GG-3') (配列番号 21) を用いて、98℃ 1 秒、68℃ 30 秒のサイクルを 20 回繰り返した。一方、125M165DAAA 及び 125N26F6AA の軽鎖遺伝子の増幅は、UPM プライマーと hk-2 プライマー (配列番号 17) を使って、98℃ 1 秒、68℃ 30 秒のサイクルを 30 回繰り返して増幅した。さらに、この反応液 1 μ l を鋳型とし、NUPM プライマーと hk-5 プライマー (配列番号 19) を用いて、98℃ 1 秒、68℃ 30 秒のサイクルを 20 回繰り返した。

以上のように増幅した各々の重鎖及び軽鎖の PCR 断片は、エタノール沈殿で回収した後、アガロースゲル電気泳動で回収し、メンブランを用いる DNA 精製キットである QIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン社製) にて精製した。精製した HV 増幅断片あるいは LV 増幅断片は、それぞれ Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit (インビトロジェン社製) の PCR 4 Blunt- TOPO ベクターにサブクローニングを行い、得られたクローンのプラスミド DNA についてインサート DNA の塩基配列を解析した。DNA 塩基配列決定のためにプライマーとして、M13FW (配列番号 3) 及び M13RV (配列番号 4) を用いた。

263A17 の重鎖可変領域、及び軽鎖可変領域をコードする DNA 並びに重鎖可変領域及び軽鎖可変領域のアミノ酸配列をそれぞれ以下に示す。

<263A17 重鎖核酸配列> (配列番号 22)

10	20	30	40	50	60
ATGGAGTTTG	GGCTGAGCTG	GCTTTTCTT	GTGGCTATTT	TAAAAGGTGT	CCAGTGTGAG
70	80	90	100	110	120
GTGCAGTTGT	TGGAGTCTGG	GGGAGGCTTG	GTACAGCCTG	GGGGTCCCT	GAGACTCTCC
130	140	150	160	170	180
TGTGCAGCCT	CTGGATTCAC	CTTTAGCAGC	TATGCCATGA	GCTGGATCCG	CCAGGCTCCA

190	200	210	220	230	240
GGGAAGGGGC	TGGAGTGGGT	CTCAGCTATT	AGTGCTAGTG	GTGGTAGCAC	ATACTACGCA
250	260	270	280	290	300
GACTCCGTGA	AGGGCCGGTT	CACCATCTCC	AGAGACAATT	CCAAGAACAC	GCTGTATCTG
310	320	330	340	350	360
CAAATGAACA	GCCTGAGAGC	CGAGGACACG	GCCGTATATT	ACTGTGCGAA	AGATCGGATA
370	380	390	400	410	420
GTGGGAGCTA	CGAACTACTA	CTACGGTATG	GACGTCTGGG	GCCAAGGGAC	CACGGTCACC
430	440	450	460	470	480
GTCTCCTCAG	CTAGC.....				

<263A17 重鎖アミノ酸配列> (配列番号 23)

10	20	30	40	50	60
MEFGLSWLFL	VAILKGVQCE	VQLLES GGGL	VQPGGSLRLS	CAASGFTFSS	YAMSWIRQAP
70	80	90	100	110	120
GKGLEWVSAI	SASGGSTYYA	DSVKGRFTIS	RDNSKNTLYL	QMNSLRAEDT	AVYYCAKDRI
130	140	150	160	170	180
VGATNYYYGM	DVWGQGTTVT	VSSAS.....			

<263A17 軽鎖核酸配列> (配列番号 24)

10	20	30	40	50	60
ATGGACATGA	GGGTCCCCGC	TCAGCTCCTG	GGGCTCCTGC	TGCTCTGGTT	CCCAGGTTCC
70	80	90	100	110	120
AGATGCGACA	TCCAGATGAC	CCAGTCTCCA	CCTTCCGTGT	CTGCATCTGT	AGGAGACAGA
130	140	150	160	170	180
GTCACCATCA	CTTGTCGGGC	GAGTCAGGGT	ATTAGCAGCT	GGTTAGCCTG	GTATCAGCAT
190	200	210	220	230	240
AAACCAGGGA	AAGCCCCAAA	GCTCCTGATC	TATGGTGCAT	CCAGTTTGCA	AAGTGGGGTC
250	260	270	280	290	300
CCATCAAGGT	TCAGCGGCAG	TGGATCTGGG	ACAGATTTC	CTCTCACC	CAGCAGCCTG
310	320	330	340	350	360

CAGCCTGAAG ATTTTGAAC TTACTATTGT CAACAGGCTA ATAGTTTCCC TATCACCTTC

370 380 390

GGCCAAGGGA CACGACTGGA GATTAAACGT

<263A17 軽鎖アミノ酸配列> (配列番号 25)

10 20 30 40 50 60

MDMRVPAQLL GLLLLWFPGS RCDIQMTQSP PSVSASVGDR VTITCRASQG ISSWLAWYQH

70 80 90 100 110 120

KPGKAPKLLI YGASSLQSGV PSRFSGSGSG TDFTLTISSL QPEDFATYYC QQANSFPITF

130

GQGTRLEIKR

重鎖核酸配列(配列番号 22)における抗体可変領域と抗体定常領域の境界は 429 番目のアデニン (A) と 430 番目のグアニン (G) の間に位置し、重鎖アミノ酸配列 (配列番号 23) における抗体可変領域と抗体定常領域の境界は 143 番目のセリン (S) と 144 番目のアラニン (A) の間に位置する。また、重鎖核酸配列 (配列番号 22) におけるシグナル配列と抗体可変領域の境界は 57 番目のチミン (T) と 58 番目のグアニン (G) の間に位置し、重鎖アミノ酸配列 (配列番号 23) におけるシグナル配列と抗体可変領域の境界は 19 番目のシステイン (C) と 20 番目のグルタミン酸 (E) の間に位置する。

以上より、263A17 抗体重鎖の可変領域の核酸配列 (配列番号 22) は 58 番目のグアニン (G) から 429 番目のアデニン (A) までである。また、重鎖の可変領域のアミノ酸配列 (配列番号 23) は 20 番目のグルタミン酸 (E) から 143 番目のセリン (S) までである。

軽鎖核酸配列(配列番号 24)における抗体可変領域と抗体定常領域の境界は 387 番目のアデニン (A) と 388 番目のシトシン (C) の間に位置し、軽鎖アミノ酸配列 (配列番号 25) における抗体可変領域と抗体定常領域の境界は 129 番目のリジン (K) と 130 番目のアルギニン (R) の間に位置する。また、軽鎖核酸配列 (配列番号 24) におけるシグナル配列と抗体可変領域の境界は 66 番目のシトシン (C) と 67 番目のグアニン (G) の間に位置し、軽鎖アミノ酸配列 (配列番号 25) におけるシグナル配列と抗体可変領域の境界は 22 番目のシステイン (C) と 23 番目のア

スパラギン酸 (D) の間に位置する。

以上より、263A17 抗体軽鎖の可変領域の核酸配列 (配列番号 24) は 67 番目のグアニン (G) から 387 番目のアデニン (A) までである。また、軽鎖の可変領域のアミノ酸配列 (配列番号 25) は 23 番目のアスパラギン酸 (D) から 129 番目のリジン (K) までである。

125M10AA の重鎖可変領域、及び軽鎖可変領域をコードする DNA 並びに重鎖可変領域及び軽鎖可変領域のアミノ酸配列をそれぞれ以下に示す。

<125M10AA 重鎖核酸配列> (配列番号 26)

10	20	30	40	50	60
ATGGATCTCA	TGTGCAAGAA	AATGAAGCAC	CTGTGGTTCT	TCCTCCTGCT	GGTGGCGGCT
70	80	90	100	110	120
CCCAGATGGG	TCCTGTCCCA	GCTGCAGGTG	CAGGAGTCGG	GCCCAGGACT	GGTGAAGCCT
130	140	150	160	170	180
TCGGAGACCC	TGTCCCTCAT	CTGCACTGTC	TCTGGTGGCT	CCATCAGGAC	CAGTGGTTAC
190	200	210	220	230	240
TACTGGGGCT	GGTTCCGCCA	GCCCCAGGG	AAGGGACTGG	AGTGGATTGG	GACTAGTCAT
250	260	270	280	290	300
AATAGTGGGA	GCACCTACTA	CAACCCGTCC	CTCAAGAGTC	GAGTCACCAT	ATCCGTAGAC
310	320	330	340	350	360
ACGTCCAAGA	ACCAGTTCTC	CCTGAAGCTG	AACTCTGTGA	CCGCCGCAGA	CACGGCTGTG
370	380	390	400	410	420
TATTACTGTG	CGAGACAAGG	TTACGATTTT	AAAGTCAATA	TAGACGTCTG	GGGACAAGGG
430	440	450			
ACCACGGTCA	CCGTCTCCTC	AGCTAGC...			

<125M10AA 重鎖アミノ酸配列> (配列番号 27)

10	20	30	40	50	60
MDLMCKKMKH	LWFFLLLVAA	PRWVLSQLQV	QESGPGLVKP	SETLSLICTV	SGGSIRTSKY
70	80	90	100	110	120
YWGWFRRPPG	KGLEWIGTSH	NSGSTYYNPS	LKSRVTISVD	TSKNQFSLKL	NSVTAADTAV

130 140 150

YYCARQGYDF KVNIDVWGQG TTVTVSSAS.

<125M10AA 軽鎖核酸配列> (配列番号 28)

10	20	30	40	50	60
ATGGAAGCCC	CAGCTCAGCT	TCTCTTCCTC	CTGCTACTCT	GGCTCCCAGA	TACCACCGGA
70	80	90	100	110	120
GAAATTGTGT	TGACACAGTC	TCCAGCCACC	CTGTCTTTGT	CTCCAGGGGA	AAGAGCCACC
130	140	150	160	170	180
CTCTCCTGCA	GGGCCAGTCA	GAGTGTTAGC	AGCTACTTAG	CCTGGTACCA	ACAGAAACCT
190	200	210	220	230	240
GGCCAGGCTC	CCAGGCTCCT	CATCTATGAT	GCATCCAACA	GGGCCACTGG	CATCCCAGCC
250	260	270	280	290	300
AGGTTTCAGTG	GCAGTGGGTC	TGGGACAGAC	TTCACTCTCA	CCATCAGCAG	CCTAGAGCCT
310	320	330	340	350	360
GAAGATTTTG	CAGTTTATTA	CTGTCAGCAG	CGTAGCAACT	GGCCGCTCAC	TTTCGGCGGA
370	380	390			
GGGACCAAGG	TGGAGATCAA	ACGA.....			

<125M10AA 軽鎖アミノ酸配列> (配列番号 29)

10	20	30	40	50	60
MEAPAQLLFL	LLLWL PDTTG	EIVLTQSPAT	LSLSPGERAT	LSCRASQSVS	SYLAWYQQKP
70	80	90	100	110	120
GQAPRLLIYD	ASNRATGIPA	RFSGSGSGTD	FTLTISSELP	EDFAVYYCQQ	RSNWPLTFGG
130					
GTKVEIKR..					

重鎖核酸配列(配列番号 26)における抗体可変領域と抗体定常領域の境界は 441 番目のアデニン (A) と 442 番目のグアニン (G) の間に位置し、重鎖アミノ酸配列 (配列番号 27) における抗体可変領域と抗体定常領域の境界は 147 番目のセリン (S) と 148 番目のアラニン (A) の間に位置する。また、重鎖核酸配列 (配列番号 26) におけるシグナル配列と抗体可変領域の境界は 78 番目のシトシン (C) と

79 番目のシトシン (C) の間に位置し、重鎖アミノ酸配列 (配列番号 27) におけるシグナル配列と抗体可変領域の境界は 26 番目のセリン (S) と 27 番目のグルタミン (Q) の間に位置する。

以上より、125M10AA 抗体重鎖の可変領域の核酸配列 (配列番号 26) は 79 番目のシトシン (C) から 441 番目のアデニン (A) までである。また、重鎖の可変領域のアミノ酸配列 (配列番号 27) は 27 番目のグルタミン (Q) から 147 番目のセリン (S) までである。

軽鎖核酸配列 (配列番号 28) における抗体可変領域と抗体定常領域の境界は 381 番目のアデニン (A) と 382 番目のシトシン (C) の間に位置し、軽鎖アミノ酸配列 (配列番号 29) における抗体可変領域と抗体定常領域の境界は 127 番目のリジン (K) と 128 番目のアルギニン (R) の間に位置する。また、軽鎖核酸配列 (配列番号 28) におけるシグナル配列と抗体可変領域の境界は 60 番目のアデニン (A) と 61 番目のグアニン (G) の間に位置し、軽鎖アミノ酸配列 (配列番号 29) におけるシグナル配列と抗体可変領域の境界は 20 番目のグリシン (G) と 21 番目のグルタミン酸 (E) の間に位置する。

以上より、125M10AA 抗体軽鎖の可変領域の核酸配列 (配列番号 28) は 61 番目のグアニン (G) から 381 番目のアデニン (A) までである。また、軽鎖の可変領域のアミノ酸配列 (配列番号 29) は 21 番目のグルタミン酸 (E) から 127 番目のリジン (K) までである。

125M165DAAA 重鎖可変領域、及び軽鎖可変領域をコードする DNA 並びに重鎖可変領域及び軽鎖可変領域のアミノ酸配列をそれぞれ以下に示す。

<125M165DAAA 重鎖核酸配列> (配列番号 30)

10	20	30	40	50	60
ATGGAGTTTG	GGCTGAGCTG	GGTTTCCTC	GTTGCTCTTT	TAAGAGGTGT	CCAGTGTCAG
70	80	90	100	110	120
GTGCAGCTGG	TGGAGTCTGG	GGGAGGCGTG	GTCCAGCCTG	GGAGGTCCCT	GAGACTCTCC
130	140	150	160	170	180
TGTGCAGCGT	CTGGATTCAC	CTTCAGTTAT	TATGGCATGC	ACTGGGTCCG	CCAGGCTCCA
190	200	210	220	230	240

GGCAAGGGGC TGGAGTGGGT GGCAGTTATA TGGTATGATG GAAGTAATAA ATACTATGCA
 250 260 270 280 290 300
 GACTCCGTGA AGGGCCGATT CACCATCTCC AGAGACAATT CCAAGAAAAC GCTGTATCTG
 310 320 330 340 350 360
 CAAATGAACA GCCTGAGAGC CGAGGACACG GCTGTGTATT ACTGTGCGAG AGATGGGCAT
 370 380 390 400 410 420
 AGCAGTGGCT GGGGGGACTT CCAGCACTGG GGCCAGGGCA CCCTGGTCAC CGTCTCCTCA
 430
 GCTAGC...

<125M165DAAA 重鎖アミノ酸配列> (配列番号 31)

10 20 30 40 50 60
 MEFGLSWVFL VALLRGVQCQ VQLVESGGGV VQPGRSLRLS CAASGFTFSY YGMHWVRQAP
 70 80 90 100 110 120
 GKGLEWVAVI WYDGSNKYYA DSVKGRFTIS RDNSKKTLYL QMNSLRAEDT AVYYCARDGH
 130 140 150
 SSGWGDFQHW GQGTLVTVSS AS.....

<125M165DAAA 軽鎖核酸配列> (配列番号 32)

10 20 30 40 50 60
 ATGGAAGCCC CAGCTCAGCT TCTCTTCCTC CTGCTACTCT GGCTCCCAGA TACCACCGGA
 70 80 90 100 110 120
 GAAATTGTGT TGACACAGTC TCCAGCCACC CTGTCTTTGT CTCCAGGGGA AAGAGCCACC
 130 140 150 160 170 180
 CTCTCCTGCA GGGCCAGTCA GAGTGTTAGC AGCTCCTTAG CCTGGTACCA ACAGAAACCT
 190 200 210 220 230 240
 GGCCAGGCTC CCAGGCTCCT CATCTATGAT GCATCCAACA GGGCCACTGG CATCCCAGCC
 250 260 270 280 290 300
 AGGTTCAAGT GCAGTGGGTC TGGGACAGAC TTTACTCTCA CCATCAGCAG CCTAGAGCCT
 310 320 330 340 350 360
 GAAGATTTTG CAATTTATTA CTGTCAGCAG CGTAGCAACT GGCTCCGAC GTTCGGCCAA

370 380 390
 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGA.....
 <125M165DAAA 軽鎖アミノ酸配列> (配列番号 33)
 10 20 30 40 50 60
 MEAPALLFL LLLWLPDTTG EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SSLAWYQQKP
 70 80 90 100 110 120
 GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAIYYCQQ RSNWPPTFGQ
 130
 GTKVEIKR.

重鎖核酸配列(配列番号 30)における抗体可変領域と抗体定常領域の境界は 420 番目のアデニン (A) と 421 番目のグアニン (G) の間に位置し、重鎖アミノ酸配列 (配列番号 31) における抗体可変領域と抗体定常領域の境界は 140 番目のセリン (S) と 141 番目のアラニン (A) の間に位置する。また、重鎖核酸配列 (配列番号 30) におけるシグナル配列と抗体可変領域の境界は 57 番目のチミン (T) と 58 番目のシトシン (C) の間に位置し、重鎖アミノ酸配列 (配列番号 31) におけるシグナル配列と抗体可変領域の境界は 19 番目のシステイン (C) と 20 番目のグルタミン (Q) の間に位置する。

以上より、125M165DAAA 抗体重鎖の可変領域の核酸配列 (配列番号 30) は 58 番目のシトシン (C) から 420 番目のアデニン (A) までである。また、重鎖の可変領域のアミノ酸配列 (配列番号 31) は 20 番目のグルタミン (Q) から 140 番目のセリン (S) までである。

軽鎖核酸配列(配列番号 32)における抗体可変領域と抗体定常領域の境界は 381 番目のアデニン (A) と 382 番目のシトシン (C) の間に位置し、軽鎖アミノ酸配列 (配列番号 33) における抗体可変領域と抗体定常領域の境界は 127 番目のリジン (K) と 128 番目のアルギニン (R) の間に位置する。また、軽鎖核酸配列 (配列番号 32) におけるシグナル配列と抗体可変領域の境界は 60 番目のアデニン (A) と 61 番目のグアニン (G) の間に位置し、軽鎖アミノ酸配列 (配列番号 33) におけるシグナル配列と抗体可変領域の境界は 20 番目のグリシン (G) と 21 番目のグルタミン酸 (E) の間に位置する。

以上より、125M165DAAA 抗体軽鎖の可変領域の核酸配列（配列番号 32）は 61 番目のグアニン（G）から 381 番目のアデニン（A）までである。また、軽鎖の可変領域のアミノ酸配列（配列番号 33）は 21 番目のグルタミン酸（E）から 127 番目のリジン（K）までである。

125M96ABA 重鎖可変領域、及び軽鎖可変領域をコードする DNA 並びに重鎖可変領域及び軽鎖可変領域のアミノ酸配列をそれぞれ以下に示す。

<125M96ABA 重鎖核酸配列>（配列番号 34）

10	20	30	40	50	60
ATGAAGCACC	TGTGGTTCTT	CCTCCTGCTG	GTGGCGGCTC	CCAGATGGGT	CCTGTCCCAA
70	80	90	100	110	120
CTGCAGCTGC	AGGAGTCGGG	CCCAGGACTG	GTGAAGCCTT	CGGAGACCCT	GTCCCTCACC
130	140	150	160	170	180
TGCACTGTCT	CTGGTGGCTC	CATCAGCACT	AGTAGTTACT	ACTGGGGCTG	GATCCGCCAG
190	200	210	220	230	240
CCCCCGGGA	AGGGCCTGGA	ATGGATTGGG	ACTATCTATT	ATAATGGGAG	CACCTACTAC
250	260	270	280	290	300
AGCCCGTCCC	TCAAGAGTCG	AGTCAGTATA	TCCGTAGACA	CGTCCAAGAA	CCAGTTCTCC
310	320	330	340	350	360
CTGAAGCTGA	GCTCTGTGAC	CGCCGCAGAC	ACGTCTGTGT	ATTACTGTGC	GAGACAAGGT
370	380	390	400	410	420
TACGATATTA	AAATCAATAT	AGACGTCTGG	GGCCAAGGGA	CCACGGTCAC	CGTCTCCTCA
430					
GCTAGC...					

<125M96ABA 重鎖アミノ酸配列>（配列番号 35）

10	20	30	40	50	60
MKHLWFFLL	VAAPRWLSQ	LQLQESGPG	L VKPSETLSLT	CTVSGGSIST	SSYYWGWIRQ
70	80	90	100	110	120
PPGKGLEWIG	TIYYNGSTYY	SPSLKSRVSI	SVDTSKNQFS	LKLSSVTAAD	TSVYYCARQG
130	140	150			

YDIKINIDVW GQGTTVTVSS AS.....

<125M96ABA 軽鎖核酸配列> (配列番号 36)

10	20	30	40	50	60
ATGGAAGCCC	CAGCTCAGCT	TCTCTTCCTC	CTGCTACTCT	GGCTCCCAGA	TACCACCGGA
70	80	90	100	110	120
GAAATTGTGT	TGACACAGTC	TCCAGCCACC	CTGTCTTTGT	CTCCAGGGGA	AAGAGCCACC
130	140	150	160	170	180
CTCTCCTGCA	GGGCCAGTCA	GAGTGTTAGC	AGCTACTTAG	CCTGGTACCA	ACAGAAACCT
190	200	210	220	230	240
GGCCAGGCTC	CCAGGCTCCT	CATCTATGTT	GCATCCAACA	GGGCCACTGG	CATCCCAGCC
250	260	270	280	290	300
AGGTTCAGTG	GCAGTGGGTC	TGGGACAGAC	TTCCTCTCTCA	CCATCAGCAG	CCTAGAGCCT
310	320	330	340	350	360
GAAGATTTTG	CAGTTTATTA	CTGTCAGCAG	CGTAGCAACT	GGCCGCTCAC	TTTCGGCGGA
370	380	390			
GGGACCAAGG	TGGAGATCAA	ACGA.....			

<125M96ABA 軽鎖アミノ酸配列> (配列番号 37)

10	20	30	40	50	60
MEAPAQLLFL	LLLWLPTDTG	EIVLTQSPAT	LSLSPGERAT	LSCRASQSVS	SYLAWYQKQP
70	80	90	100	110	120
GQAPRLLIYV	ASNRATGIPA	RFSGSGSGTD	FTLTSSLEP	EDFAVYYCQQ	RSNWPLTFGG
130					
GTKVEIKR..					

重鎖核酸配列(配列番号 34)における抗体可変領域と抗体定常領域の境界は 420 番目のアデニン (A) と 421 番目のグアニン (G) の間に位置し、重鎖アミノ酸配列(配列番号 35)における抗体可変領域と抗体定常領域の境界は 140 番目のセリン (S) と 141 番目のアラニン (A) の間に位置する。また、重鎖核酸配列(配列番号 34)におけるシグナル配列と抗体可変領域の境界は 57 番目のシトシン (C) と 58 番目のシトシン (C) の間に位置し、重鎖アミノ酸配列(配列番号 35)にお

けるシグナル配列と抗体可変領域の境界は 19 番目のセリン (S) と 20 番目のグルタミン (Q) の間に位置する。

以上より、125M96ABA 抗体重鎖の可変領域の核酸配列 (配列番号 34) は 58 番目のシトシン (C) から 420 番目のアデニン (A) までである。また、重鎖の可変領域のアミノ酸配列 (配列番号 35) は 20 番目のグルタミン (Q) から 140 番目のセリン (S) までである。

軽鎖核酸配列 (配列番号 36) における抗体可変領域と抗体定常領域の境界は 381 番目のアデニン (A) と 382 番目のシトシン (C) の間に位置し、軽鎖アミノ酸配列 (配列番号 37) における抗体可変領域と抗体定常領域の境界は 127 番目のリジン (K) と 128 番目のアルギニン (R) の間に位置する。また、軽鎖核酸配列 (配列番号 36) におけるシグナル配列と抗体可変領域の境界は 60 番目のアデニン (A) と 61 番目のグアニン (G) の間に位置し、軽鎖アミノ酸配列 (配列番号 37) におけるシグナル配列と抗体可変領域の境界は 20 番目のグリシン (G) と 21 番目のグルタミン酸 (E) の間に位置する。

以上より、125M165DAAA 抗体軽鎖の可変領域の核酸配列 (配列番号 36) は 61 番目のグアニン (G) から 381 番目のアデニン (A) までである。また、軽鎖の可変領域のアミノ酸配列 (配列番号 37) は 21 番目のグルタミン酸 (E) から 127 番目のリジン (K) までである。

125N26F6AA 重鎖可変領域、及び軽鎖可変領域をコードする DNA 並びに重鎖可変領域及び軽鎖可変領域のアミノ酸配列をそれぞれ以下に示す。

<125N26F6AA 重鎖核酸配列> (配列番号 38)

10	20	30	40	50	60
ATGGAGTTTG	GGCTGAGCTG	GGTTTTCTC	GTTGCTCTTT	TAAGAGGTGT	CCAGTGTCAG
70	80	90	100	110	120
GTGCAGTTGG	TGGAGTCTGG	GGGAGGCGTG	GTCCAGCCTG	GGAGGTCCT	GAGACTCTCC
130	140	150	160	170	180
TGTGCAGCGT	CTGGATTAC	CTTCAGTCAC	TATGGCATGC	ACTGGGTCCG	CCAGGCTCCA
190	200	210	220	230	240
GGCAAGGGGC	TGGAGTGGGT	GGCACTTATA	TGGTATGATG	GAAGTAATAA	ATACTATGCA

250 260 270 280 290 300
 GACTCCGTGA AGGGCCGATT CACCATCTCC AGAGACAATT CCAAGAACAC GCTGTATCTG
 310 320 330 340 350 360
 CAAATGAACA GCCTGAGAGC CGAGGACACG GCTGTGTATT ACTGTGCGAG AGATCCCTTA
 370 380 390 400 410 420
 GCAGCTGGTA CGTCCTACTT TGACTACTGG GGCCAGGGAA CCCTGGTCAC CGTCTCCTCA
 430
 GCTAGC...

<125N26F6AA 重鎖アミノ酸配列> (配列番号 39)

10 20 30 40 50 60
 MEFGLSWVFL VALLRGVQCQ VQLVESGGGV VQPGRSLRLS CAASGFTFSH YGMHWVRQAP
 70 80 90 100 110 120
 GKGLEWVALI WYDGSNKYYA DSVKGRFTIS RDNSKNTLYL QMNSLRAEDT AVYYCARDPL
 130 140 150
 AAGTSYFDYW GQGTLVTVSS AS.....

<125N26F6AA 軽鎖核酸配列> (配列番号 40)

10 20 30 40 50 60
 ATGTCGCCAT CACAACATCAT TGGGTTTCTG CTGCTCTGGG TTCCAGCCTC CAGGGGTGAA
 70 80 90 100 110 120
 ATTGTGCTGA CTCAGTCTCC AGACTTTCAG TCTGTGACTC CAAAGGAGAA AGTCACCATC
 130 140 150 160 170 180
 ACCTGCCGGG CCAGTCAGAG CATTGGTAGT AGCTTACACT GGTACCAGCA GAAACCAGAT
 190 200 210 220 230 240
 CAGTCTCCAA AGCTCCTCAT CAAGTATGCT TCCCAGTCCT TCTCAGGGGT CCCCTCGAGG
 250 260 270 280 290 300
 TTCAGTGGCA GTGGATCTGG GACAGATTTC ACCCTCACCA TCAATAGCCT GGAAGCTGAA
 310 320 330 340 350 360
 GATGCTGCAG CGTATTACTG TCATCAGAGT AGTAGTTTAC CATTCACTTT CGGCCCTGGG
 370 380

ACCAAAGTGG ATATCAAACG A

<125N26F6AA 軽鎖アミノ酸配列> (配列番号 41)

10	20	30	40	50	60
MSPSQLIGFL LLWVPASRGE IVLTQSPDFQ SVTPKEKVTI TCRASQSIGS SLHWYQQKPD					
70	80	90	100	110	120
QSPKLLIKYA SQSFSGVPSR FSGSGSGTDF TLTINSLEAE DAAAYYCHQS SSLPFTFGPG					
130	TKVDIKR...				

重鎖核酸配列(配列番号 38)における抗体可変領域と抗体定常領域の境界は 420 番目のアデニン (A) と 421 番目のグアニン (G) の間に位置し、重鎖アミノ酸配列 (配列番号 39) における抗体可変領域と抗体定常領域の境界は 140 番目のセリン (S) と 141 番目のアラニン (A) の間に位置する。また、重鎖核酸配列 (配列番号 38) におけるシグナル配列と抗体可変領域の境界は 57 番目のチミン (T) と 58 番目のシトシン (C) の間に位置し、重鎖アミノ酸配列 (配列番号 39) におけるシグナル配列と抗体可変領域の境界は 19 番目のシステイン (C) と 20 番目のグルタミン (Q) の間に位置する。

以上より、125M96ABA 抗体重鎖の可変領域の核酸配列 (配列番号 38) は 58 番目のシトシン (C) から 420 番目のアデニン (A) までである。また、重鎖の可変領域のアミノ酸配列 (配列番号 39) は 20 番目のグルタミン (Q) から 140 番目のセリン (S) までである。

軽鎖核酸配列(配列番号 40)における抗体可変領域と抗体定常領域の境界は 388 番目のアデニン (A) と 389 番目のシトシン (C) の間に位置し、軽鎖アミノ酸配列 (配列番号 41) における抗体可変領域と抗体定常領域の境界は 126 番目のリジン (K) と 127 番目のアルギニン (R) の間に位置する。また、軽鎖核酸配列 (配列番号 40) におけるシグナル配列と抗体可変領域の境界は 57 番目のチミン (T) と 58 番目のグアニン (G) の間に位置し、軽鎖アミノ酸配列 (配列番号 41) におけるシグナル配列と抗体可変領域の境界は 19 番目のグリシン (G) と 20 番目のグルタミン酸 (E) の間に位置する。

以上より、125M96ABA 抗体軽鎖の可変領域の核酸配列 (配列番号 40) は 58 番目

のグアニン (G) から 388 番目のアデニン (A) までである。また、軽鎖の可変領域のアミノ酸配列 (配列番号 41) は 20 番目のグルタミン酸 (E) から 126 番目のリジン (K) までである。

125Q47BA の重鎖可変領域、及び軽鎖可変領域をコードする DNA 並びに重鎖可変領域及び軽鎖可変領域のアミノ酸配列をそれぞれ以下に示す。

<125Q47BA 重鎖核酸配列> (配列番号 42)

10	20	30	40	50	60
ATGGAGTTTG	GGCTGAGCTG	GCTTTTTCTT	GTGGCTATTT	TAAAAGGTGT	CCAGTGTGAG
70	80	90	100	110	120
GTGCAGCTGT	TGGAGTCTGG	GGGAGGCTTG	GTACAGCCTG	GGGGGTCCCT	GAGACTCTCC
130	140	150	160	170	180
TGTGCAGCCT	CTGGATTAC	CTTTAGCAGC	TATGCCATGA	GCTGGGTCCG	CCAGGCTCCA
190	200	210	220	230	240
GGGAAGGGGC	TGGAGTGGGT	CTCAGATATT	AGTGGTAGTG	GTGGTTACAC	ATACTACGCA
250	260	270	280	290	300
GACTCCGTGA	AGGGCCGGTT	CACCATCTCC	AGAGACAATT	CCAAGAACAC	GCTGTATCTG
310	320	330	340	350	360
CAAATGAACA	GCCTGAGAGC	CGAGGACACG	GCCGTATATT	ACTGTGCGAA	AACAGGCGAT
370	380	390	400	410	420
GGTTCGGGGA	GTTATTCCCC	TGACTCCTGG	GGCCAGGGAA	CCCTGGTCAC	CGTCTCCTCA
430					
GCTAGC...					

<125Q47BA 重鎖アミノ酸配列> (配列番号 43)

10	20	30	40	50	60
MEFGLSWLFL	VAILKGVQCE	VQLLESGGGL	VQPGGSLRLS	CAASGFTFSS	YAMTWVRQAP
70	80	90	100	110	120
GKGLEWVSDI	SGSGGYTYYA	DSVKGRFTIS	RDNSKNTLYL	QMNSLRAEDT	AVYYCAKTGA
130	140	150			
GSGSYSPDSW	GQGTLVTVSS	AS.....			

<125Q47BA 軽鎖核酸配列> (配列番号 44)

10	20	30	40	50	60
ATGGACATGA	GGGTCCTCGC	TCAGCTCCTG	GGGCTCCTGC	TGCTCTGTTT	CCCAGGTGCC
70	80	90	100	110	120
AGATGTGACA	TCCAGATGAC	CCAGTCTCCA	TCCTCACTGT	CTGCATCTGT	AGGAGACAGA
130	140	150	160	170	180
GTCACCATCA	CTTGTCGGGC	GAGTCAGGGT	ATTAGCAGCT	GGTTAGCCTG	GTATCAGCAG
190	200	210	220	230	240
AAACCAGAGA	AAGCCCCTAA	GTCCCTGATC	TATGCTGCAT	CCAGTTTGCA	AAGTGGGGTC
250	260	270	280	290	300
CCATCAAGGT	TCAGCGGCAG	TGGATCTGGG	ACAGATTTC	CTCTCACC	CAGCAGCCTG
310	320	330	340	350	360
CAGCCTGAAG	ATTTTGCAAC	TTATTACTGC	CAACAGTATA	ATAGTTACCC	GTACACTTTT
370	380	390			
GGCCAGGGGA	CCAAGCTGGA	GATCAAACGA			

<125Q47BA 軽鎖アミノ酸配列> (配列番号 45)

10	20	30	40	50	60
MDMRVLAQLL	GLLLLCFPGA	RCDIQMTQSP	SSLSASVGDR	VTITCRASQG	ISSWLAWYQQ
70	80	90	100	110	120
KPEKAPKSLI	YAASSLQSGV	PSRFSGSGSG	TDFTLTISL	QPEDFATYYC	QQYNSYPYTF
130					
GQGTKLEIKR					

重鎖核酸配列(配列番号 42)における抗体可変領域と抗体定常領域の境界は 420 番目のアデニン (A) と 421 番目のグアニン (G) の間に位置し、重鎖アミノ酸配列(配列番号 43)における抗体可変領域と抗体定常領域の境界は 140 番目のセリン (S) と 141 番目のアラニン (A) の間に位置する。また、重鎖核酸配列(配列番号 42)におけるシグナル配列と抗体可変領域の境界は 57 番目のチミン (T) と 58 番目のグアニン (G) の間に位置し、重鎖アミノ酸配列(配列番号 43)におけるシグナル配列と抗体可変領域の境界は 19 番目のシステイン (C) と 20 番目のグ

ルタミン酸 (E) の間に位置する。

以上より、125Q47BA 抗体重鎖の可変領域の核酸配列 (配列番号 42) は 58 番目のグアニン (G) から 420 番目のアデニン (A) までである。また、重鎖の可変領域のアミノ酸配列 (配列番号 43) は 20 番目のグルタミン酸 (E) から 140 番目のセリン (S) までである。

軽鎖核酸配列 (配列番号 44) における抗体可変領域と抗体定常領域の境界は 387 番目のアデニン (A) と 388 番目のシトシン (C) の間に位置し、軽鎖アミノ酸配列 (配列番号 45) における抗体可変領域と抗体定常領域の境界は 129 番目のリジン (K) と 130 番目のアルギニン (R) の間に位置する。また、軽鎖核酸配列 (配列番号 44) におけるシグナル配列と抗体可変領域の境界は 66 番目のチミン (T) と 67 番目のグアニン (G) の間に位置し、軽鎖アミノ酸配列 (配列番号 45) におけるシグナル配列と抗体可変領域の境界は 22 番目のシステイン (C) と 23 番目のアスパラギン酸 (D) の間に位置する。

以上より、125Q47BA 抗体軽鎖の可変領域の核酸配列 (配列番号 44) は 67 番目のグアニン (G) から 387 番目のアデニン (A) までである。また、軽鎖の可変領域のアミノ酸配列 (配列番号 45) は 23 番目のアスパラギン酸 (D) から 129 番目のリジン (K) までである。

125Q54AAAA の重鎖可変領域、及び軽鎖可変領域をコードする DNA 並びに重鎖可変領域及び軽鎖可変領域のアミノ酸配列をそれぞれ以下に示す。

<125Q54AAAA 重鎖核酸配列> (配列番号 46)

10	20	30	40	50	60
ATGGAGTTTG	GGCTGAGCTG	GCTTTTTCTT	GTGGCTATTT	TAAAAGGTGT	CCAGTGTGAG
70	80	90	100	110	120
GTGCAGCTGT	TGGAGTCTGG	GGGAGGCTTG	GTACAGCCTG	GGGGGTCCCT	GAGACTCTCC
130	140	150	160	170	180
TGTGCAGCCT	CTGGATTCAC	CTTTAGCAGC	TATGCCATGA	GCTGGGTCCG	CCAGGCTCCA
190	200	210	220	230	240
GGGAAGGGGC	TGGAGTGGGT	CTCAGATATT	AGTGGTAGTG	GTGGTTACAC	ATACTACGCA
250	260	270	280	290	300

GACTCCGTGA AGGGCCGGTT CACCATCTCC AGAGACAATT CCAAGAACAC GCTGTATCTG
 310 320 330 340 350 360
 CAAATGAACA GCCTGAGAGC CGAGGACACG GCCGTATATT ACTGTGCGAA AACAGGCGAT
 370 380 390 400 410 420
 GGTTCGGGGA GTTATTCCCC TGA CTCTGG GGCAGGGAA CCCTGGTCAC CGTCTCCTCA
 430

GCTAGC...

<125Q54AAAA 重鎖アミノ酸配列> (配列番号 47)

10 20 30 40 50 60
 MEFGLSWLFL VAILKGVQCE VQLLESGGGL VQPGGSLRLS CAASGFTFSS YAMSWVRQAP
 70 80 90 100 110 120
 KGKLEWVSDI SGSGGYTYYA DSVKGRFTIS RDNSKNTLYL QMNSLRAEDT AVYYCAKTGD
 130 140 150

GSGSYSPDSW GQGTILTVSS AS.....

<125Q54AAAA 軽鎖核酸配列> (配列番号 48)

10 20 30 40 50 60
 ATGGACATGA GGGTCCTCGC TCAGCTCCTG GGGCTCCTGC TGCTCTGTTT CCCAGGTGCC
 70 80 90 100 110 120
 AGATGTGACA TCCAGATGAC CCAGTCTCCA TCCTCACTGT CTGCATCTGT AGGAGACAGA
 130 140 150 160 170 180
 GTCACCATCA CTTGTCGGGC GAGTCAGGGT ATTAGCAGGT GGTTAGCCTG GTATCAGCAG
 190 200 210 220 230 240
 AAACCAGAGA AAGCCCCTAA GTCCCTGATC TATGCTGCAT CCAGTTTGCA AAGTGGGGTC
 250 260 270 280 290 300
 CCATCAAGGT TCAGCGGCAG TGGATCTGGG ACAGATTTC A CTCTACCAT CAGCAGCCTG
 310 320 330 340 350 360
 CAGCCTGAAG ATTTTGCAAC TTATTACTGC CAACAGTATA ATAGTTACCC GTACACTTTT
 370 380 390
 GGCCAGGGGA CCAAGCTGGA GATCAAACGA

<125Q54AAAA 軽鎖アミノ酸配列> (配列番号 49)

10	20	30	40	50	60
MDMRVLAQLL GLLLLCFPGA RCDIQMTQSP SLSASVGDR VTITCRASQG ISRWLAWYQQ					
70	80	90	100	110	120
KPEKAPKSLI YAASSLQSGV PSRFSGSGSG TDFTLTISSL QPEDFATYYC QQYNSYPYTF					
130					
GQGTKLEIKR					

重鎖核酸配列(配列番号 46)における抗体可変領域と抗体定常領域の境界は 420 番目のアデニン (A) と 421 番目のグアニン (G) の間に位置し、重鎖アミノ酸配列 (配列番号 47) における抗体可変領域と抗体定常領域の境界は 140 番目のセリン (S) と 141 番目のアラニン (A) の間に位置する。また、重鎖核酸配列 (配列番号 46) におけるシグナル配列と抗体可変領域の境界は 57 番目のチミン (T) と 58 番目のグアニン (G) の間に位置し、重鎖アミノ酸配列 (配列番号 47) におけるシグナル配列と抗体可変領域の境界は 19 番目のシステイン (C) と 20 番目のグルタミン酸 (E) の間に位置する。

以上より、125Q54AAAA 抗体重鎖の可変領域の核酸配列 (配列番号 46) は 58 番目のグアニン (G) から 420 番目のアデニン (A) までである。また、重鎖の可変領域のアミノ酸配列 (配列番号 47) は 20 番目のグルタミン酸 (E) から 140 番目のセリン (S) までである。

軽鎖核酸配列(配列番号 48)における抗体可変領域と抗体定常領域の境界は 387 番目のアデニン (A) と 388 番目のシトシン (C) の間に位置し、軽鎖アミノ酸配列 (配列番号 49) における抗体可変領域と抗体定常領域の境界は 129 番目のリジン (K) と 130 番目のアルギニン (R) の間に位置する。また、軽鎖核酸配列 (配列番号 48) におけるシグナル配列と抗体可変領域の境界は 66 番目のチミン (T) と 67 番目のグアニン (G) の間に位置し、軽鎖アミノ酸配列 (配列番号 49) におけるシグナル配列と抗体可変領域の境界は 22 番目のシステイン (C) と 23 番目のアスパラギン酸 (D) の間に位置する。

以上より、125Q54AAAA 抗体軽鎖の可変領域の核酸配列 (配列番号 48) は 67 番目のグアニン (G) から 387 番目のアデニン (A) までである。また、軽鎖の可変

領域のアミノ酸配列（配列番号 49）は 23 番目のアスパラギン酸（D）から 129 番目のリジン（K）までである。

125R5AAAA の重鎖可変領域、及び軽鎖可変領域をコードする DNA 並びに重鎖可変領域及び軽鎖可変領域のアミノ酸配列をそれぞれ以下に示す。

<125R5AAAA 重鎖核酸配列>（配列番号 50）

10	20	30	40	50	60
ATGGAGTTTG	GGCTGAGCTG	GCTTTTTCTT	GTGGCTATTT	TAAAAGGTGT	CCAGTGTGAG
70	80	90	100	110	120
GTGCAGCTGT	TGGAGTCTGG	GGGAGGCTTG	GTACAGCCTG	GGGGGTCCCT	GAGACTCTCC
130	140	150	160	170	180
TGTGCAGCCT	CTGGATTAC	CTTTAGCAGC	TATGCCATGA	GCTGGGTCCG	CCAGGCTCCA
190	200	210	220	230	240
GGGAAGGGGC	TGGAGTGGGT	CTCAGATATT	AGTGGTAGTG	GTGGTTACAC	ATACTACGCA
250	260	270	280	290	300
GACTCCGTGA	AGGGCCGGTT	CACCATCTCC	AGAGACAATT	CCAAGAAAAC	GCTGTATCTG
310	320	330	340	350	360
CAAATGAACA	GCCTGAGAGC	CGAGGACACG	GCCGTATATT	ACTGTGCGAA	AACAGGCGAT
370	380	390	400	410	420
GGTTCGGGGA	GTTATTCCCC	TGACTACTGG	GGCCAGGGAA	CCCTGGTCAC	CGTCTCCTCA
430					
GCTAGC...					

<125R5AAAA 重鎖アミノ酸配列>（配列番号 51）

10	20	30	40	50	60
MEFGLSWLFL	VAILKGVQCE	VQLLESGGGL	VQPGGSLRLS	CAASGFTFSS	YAMSWVRQAP
70	80	90	100	110	120
GKGLEWVSDI	SGSGGYTYYA	DSVKGRFTIS	RDNSKKTLYL	QMNSLRAEDT	AVYYCAKTGD
130	140	150			
GSGSYSPDYW	GQGTLVTVSS	AS.....			

<125R5AAAA 軽鎖核酸配列>（配列番号 52）

```

      10      20      30      40      50      60
ATGGACATGA GGGTCCTCGC TCAGCTCCTG GGGTCCTGC TGCTCTGTTT CCCAGGTGCC
      70      80      90     100     110     120
AGATGTGACA TCCAGATGAC CCAGTCTCCA TCCTCACTGT CTGCATCTGT AGGAGACAGA
     130     140     150     160     170     180
GTCACCATCA CTTGTCGGGC GAGTCAGGGT ATTAGCAGCT GGTTAGCCTG GTATCAGCAG
     190     200     210     220     230     240
AAACCAGAGA AAGCCCCTAA GTCCCTGATC TATGCTGCAT CCAGTTTGCA AAGTGGGGTC
     250     260     270     280     290     300
CCATCAAGGT TCAGCGGCAG TGGATCTGGG ACAGATTTC A CTCTCACCAT CAGCAGCCTG
     310     320     330     340     350     360
CAGCCTGAAG ATTTTGCAAC TTATTACTGC CAACAGTATA ATAGTTACCC GTACACTTTT
     370     380     390
GGCCAGGGGA CCAAGCTGGA GATCAAACGA

```

<125R5AAAA 軽鎖アミノ酸配列> (配列番号 53)

```

      10      20      30      40      50      60
MDMRVLAQLL GLLLLCFPGA RCDIQMTQSP SLSASVGDR VTITCRASQG ISSWLAWYQQ
      70      80      90     100     110     120
KPEKAPKSLI YAASSLQSGV PSRFSGSGSG TDFTLTISSL QPEDFATYYC QQYNSYPYTF
     130
GQGTKLEIKR

```

重鎖核酸配列(配列番号 50)における抗体可変領域と抗体定常領域の境界は 420 番目のアデニン (A) と 421 番目のグアニン (G) の間に位置し、重鎖アミノ酸配列(配列番号 51)における抗体可変領域と抗体定常領域の境界は 140 番目のセリン (S) と 141 番目のアラニン (A) の間に位置する。また、重鎖核酸配列(配列番号 50)におけるシグナル配列と抗体可変領域の境界は 57 番目のチミン (T) と 58 番目のグアニン (G) の間に位置し、重鎖アミノ酸配列(配列番号 51)におけるシグナル配列と抗体可変領域の境界は 19 番目のシステイン (C) と 20 番目のグルタミン酸 (E) の間に位置する。

以上より、125R5AAAA 抗体重鎖の可変領域の核酸配列（配列番号 50）は 58 番目のグアニン（G）から 420 番目のアデニン（A）までである。また、重鎖の可変領域のアミノ酸配列（配列番号 51）は 20 番目のグルタミン酸（E）から 140 番目のセリン（S）までである。

軽鎖核酸配列（配列番号 52）における抗体可変領域と抗体定常領域の境界は 387 番目のアデニン（A）と 388 番目のシトシン（C）の間に位置し、軽鎖アミノ酸配列（配列番号 53）における抗体可変領域と抗体定常領域の境界は 129 番目のリジン（K）と 130 番目のアルギニン（R）の間に位置する。また、軽鎖核酸配列（配列番号 52）におけるシグナル配列と抗体可変領域の境界は 66 番目のチミン（T）と 67 番目のグアニン（G）の間に位置し、軽鎖アミノ酸配列（配列番号 53）におけるシグナル配列と抗体可変領域の境界は 22 番目のシステイン（C）と 23 番目のアスパラギン酸（D）の間に位置する。

以上より、125R5AAAA 抗体軽鎖の可変領域の核酸配列（配列番号 52）は 67 番目のグアニン（G）から 387 番目のアデニン（A）までである。また、軽鎖の可変領域のアミノ酸配列（配列番号 53）は 23 番目のアスパラギン酸（D）から 129 番目のリジン（K）までである。

実施例 14 ハイブリドーマ 125N26F6AA 及び 125M10AA に発現するヒト抗体重鎖遺伝子、軽鎖遺伝子の定常領域を含む全長配列の決定

実施例 13 において、各抗体の抗体可変領域の DNA 塩基配列及びアミノ酸配列を決定したが、KM マウス由来ハイブリドーマ 125N26F6AA 及び 125M10AA について定常領域を含む全長配列の解析を実施した。cDNA の合成は実施例 13 に従って、ハイブリドーマ 125N26F6AA 及び 125M10AA より調製した Total RNA を材料として SMART RACE cDNA amplification Kit（ベクトン・ディキンソン・バイオサイエンス・クローンテック社製）を用いて行なった。

1st strand cDNA の合成

Total RNA 5 μ g/3 μ l

3' CDS primer 1 μ l

H₂O 1 μ l

上記組成の反応液を 70℃で 2 分間インキュベートした後、

5×Buffer 2 μ l

DTT 1 μ l

dNTP mix 1 μ l

PowerScript Reverse Transcriptase 1 μ l

を加え 42℃で 1.5 時間インキュベートした。

さらに、50 μ l の Tricine Buffer を加えた後、72℃で 7 分間インキュベートし、1st strand cDNA を取得した。

定常領域のコード領域全体を含む DNA を取得するために、上記の合成した cDNA をテンプレートとし、また各抗体遺伝子の 5'端の ATG イニシエーションコドン付近に結合する配列を有する合成 DNA (5'プライマー) とヒト抗体遺伝子 3'非翻訳領域に特異的に結合する合成 DNA (3'プライマー) をプライマーセットとして用いて、PCR による増幅反応を行った。この増幅反応により、抗体遺伝子 (cDNA) の ATG イニシエーションコドンから、ストップコドンを含む 3'非翻訳領域までの全長配列を得ることができる。

125N26F6AA の重鎖の DNA 増幅は、H 鎖 5' プライマー: N26H5Sal1 (配列番号 58) と H 鎖 3' プライマー: H_3UTR1848 (5'- CGGGGTACGTGCCAAGCATCCTCGTG -3'、配列番号 74) のプライマーセット、または、H 鎖 5' プライマー: N26H5Sal1 (配列番号 58) と H 鎖 3' プライマー: H_3UTR1875 (5'- ATGCTGGGCGCCCGGAAGTATGTAC -3'、配列番号 75) のプライマーの組合せで、94℃ 15 秒、68℃ 2 分のインキュベーションサイクルを 35 回繰り返した。一方、125N26F6AA の軽鎖 (κ) の増幅は、L 鎖 5' 用プライマー: N26KA10Minor L Bgl (配列番号 64) と L 鎖 3' 用プライマー: L_3UTR_823 (5' -GAAAGATGAGCTGGAGGACCGCAATA -3'、配列番号 76) のプライマーセットを用いて行なった。プライマー以外の反応液組成は実施例 13 の (2)-1 と同じ組成にて実施した。

125M10AA の重鎖の DNA 増幅用としては、H 鎖 5' 用プライマー: M10H5Sal (配列番号 70) と H 鎖 3' 用プライマー: H_3UTR1848 (配列番号 74) のプライマー

セット、または、H鎖5'プライマー：M10H5Sal（配列番号70）とH鎖3'プライマー：H_3UTR1875（配列番号75）であり、125M10AAの軽鎖（ κ ）のDNA増幅用としては、L鎖5'用プライマー：M10KBgl（配列番号66）とL鎖3'用プライマー：L_3UTR_823（配列番号76）のプライマーセットである。

増幅した各PCR断片は、エタノール沈殿で回収した後、アガロースゲル電気泳動で回収し、QIAquick Gel Extraction Kit（株キアゲン社製）にて精製した。精製した増幅断片は、それぞれ Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit（Invitrogen社製）のPCR 4 Blunt- TOPO ベクターにサブクローニングした。取得したクローンについて、シーケンシング鑄型用 DNA 調製試薬である TempliPhi DNA Amplification Kit（アマシャムバイオサイエンス株式会社製）を使用して、添付のプロトコールに従ってシーケンシング鑄型用 DNA を調製して、インサート DNA の塩基配列を決定した。ヒト抗体重鎖の DNA 塩基配列解析のプライマーとして、M13FW（配列番号3）、M13RV（配列番号4）、hh4（配列番号21）、hh1（5'-CCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCAC-3'）（配列番号77）、CMVH903F（5'-GACACCCTCATGATCTCCCGGACC-3'）（配列番号78）、CMVHR1303（5'-TGTTCTCCGGCTGCCCATTGCTCT-3'）（配列番号79）、hh-6（5'-GGTCCGGGAGATCATGAGGGTGTCTT-3'）（配列番号80）、hh-2（配列番号20）、H_3UTR1848（配列番号74）、及びH_3UTR1875（配列番号75）を、また、ヒト抗体軽鎖（ κ ）の DNA 塩基配列解析用のプライマーとして、M13FW（配列番号3）、M13RV（配列番号4）、hk-5（配列番号19）、及びhk-1（5'-TGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTC-3'）（配列番号81）を用いた。

125N26F6AA 抗体の重鎖、及び軽鎖全領域をコードする DNA 並びに重鎖及び軽鎖全領域のアミノ酸配列をそれぞれ以下に示す。

<125N26F6AA 重鎖核酸配列>（配列番号82）

10	20	30	40	50	60
ATGGAGTTTG GGCTGAGCTG GGTTCCTC GTTGCTCTT TAAGAGGTGT CCAGTGTCAG					
70	80	90	100	110	120

GTGCAGTTGG TGGAGTCTGG GGGAGGCGTG GTCCAGCCTG GGAGGTCCCT GAGACTCTCC

130 140 150 160 170 180
TGTGCAGCGT CTGGATTAC CTTCACTCAC TATGGCATGC ACTGGGTCCG CCAGGCTCCA

190 200 210 220 230 240
GGCAAGGGGC TGGAGTGGGT GGCACCTATA TGGTATGATG GAAGTAATAA ATACTATGCA

250 260 270 280 290 300
GACTCCGTGA AGGGCCGATT CACCATCTCC AGAGACAATT CCAAGAACAC GCTGTATCTG

310 320 330 340 350 360
CAAATGAACA GCCTGAGAGC CGAGGACACG GCTGTGTATT ACTGTGCGAG AGATCCCTTA

370 380 390 400 410 420
GCAGCTGGTA CGTCCTACTT TGACTIONTGG GGCCAGGGAA CCCTGGTCAC CGTCTCCTCA

430 440 450 460 470 480
GCCTCCACCA AGGGCCCATC GGTCTTCCCC CTGGCACCCCT CCTCCAAGAG CACCTCTGGG

490 500 510 520 530 540
GGCACAGCGG CCCTGGGCTG CCTGGTCAAG GACTACTTCC CCGAACCAGG GACGGTGTGG

550 560 570 580 590 600
TGGAATCAG GCGCCCTGAC CAGCGGCGTG CACACCTTCC CGGCTGTCCT ACAGTCCTCA

610 620 630 640 650 660
GGACTCTACT CCCTCAGCAG CGTGGTGACC GTGCCCTCCA GCAGCTTGGG CACCCAGACC

670 680 690 700 710 720
TACATCTGCA ACGTGAATCA CAAGCCCAGC AACACCAAGG TGGACAAGAA AGTTGAGCCC

730 740 750 760 770 780
AAATCTTGTG ACAAACCTCA CACATGCCCA CCGTGCCCAG CACCTGAACT CCTGGGGGGA

790 800 810 820 830 840
CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC CCCAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC CCGGACCCCT

850 860 870 880 890 900
GAGGTCACAT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACC CTGAGGTCAA GTTCAACTGG

910 920 930 940 950 960
TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTACAAC

970 980 990 1000 1010 1020
AGCACGTACC GTGTGGTCAG CGTCCTCACC GTCCTGCACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG

1030 1040 1050 1060 1070 1080
GAGTACAAGT GCAAGGTCTC CAACAAAGCC CTCCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC

1090 1100 1110 1120 1130 1140
AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG AGAACCACAG GTGTACACCC TGCCCCCATC CCGGGATGAG

1150 1160 1170 1180 1190 1200
CTGACCAAGA ACCAGGTCAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG GCTTCTATCC CAGCGACATC

1210 1220 1230 1240 1250 1260
GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG GAGAACAACCT ACAAGACCAC GCCTCCCGTG

1270 1280 1290 1300 1310 1320
CTGGACTCCG ACGGCTCCTT CTCCTCTAC AGCAAGCTCA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG

1330 1340 1350 1360 1370 1380
CAGCAGGGGA ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG

1390 1400 1410
CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC TCCGGGTAAA TGA

<125N26F6AA 重鎖アミノ酸配列> (配列番号 83)

10 20 30 40 50 60
MEFGLSWVFL VALLRGVQCQ VQLVESGGGV VQGRSLRLS CAASGFTFSH YGMHWVRQAP

70 80 90 100 110 120
GKGLEWVALI WYDGSNKYYA DSVKGRFTIS RDNSKNTLYL QMNSLRAEDT AVYYCARDPL

130 140 150 160 170 180
AAGTSYFDYW GQGTLVTVSS ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS

190 200 210 220 230 240
WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP

250 260 270 280 290 300
KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMIS RTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW

310 320 330 340 350 360
YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS

370 380 390 400 410 420
KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV

430 440 450 460 470 480
LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

<125N26F6AA 軽鎖核酸配列> (配列番号 84)

10 20 30 40 50 60
ATGTCGCCAT CACAACATCAT TGGGTTTCTG CTGCTCTGGG TTCCAGCCTC CAGGGGTGAA

70 80 90 100 110 120
ATTGTGCTGA CTCAGTCTCC AGACTTTCAG TCTGTGACTC CAAAGGAGAA AGTCACCATC

130 140 150 160 170 180
ACCTGCCGGG CCAGTCAGAG CATTGGTAGT AGCTTACACT GGTACCAGCA GAAACCAGAT

190 200 210 220 230 240
CAGTCTCCAA AGCTCCTCAT CAAGTATGCT TCCCAGTCCT TCTCAGGGGT CCCCTCGAGG

250 260 270 280 290 300
TTCAGTGGCA GTGGATCTGG GACAGATTTC ACCCTCACCA TCAATAGCCT GGAAGCTGAA

310 320 330 340 350 360
GATGCTGCAG CGTATTACTG TCATCAGAGT AGTAGTTTAC CATTCACTTT CGGCCCTGGG

370 380 390 400 410 420
ACCAAAGTGG ATATCAAACG AACTGTGGCT GCACCATCTG TCTTCATCTT CCCGCCATCT

430 440 450 460 470 480

GATGAGCAGT TGAAATCTGG AACTGCCTCT GTTGTGTGCC TGCTGAATAA CTTCTATCCC

490 500 510 520 530 540
AGAGAGGCCA AAGTACAGTG GAAGGTGGAT AACGCCCTCC AATCGGGTAA CTCCCAGGAG

550 560 570 580 590 600
AGTGTCACAG AGCAGGACAG CAAGGACAGC ACCTACAGCC TCAGCAGCAC CCTGACGCTG

610 620 630 640 650 660
AGCAAAGCAG ACTACGAGAA ACACAAAGTC TACGCCTGCG AAGTCACCCA TCAGGGCCTG

670 680 690 700
AGCTCGCCCG TCACAAAGAG CTTCAACAGG GGAGAGTGTT AG

<125N26F6AA 軽鎖アミノ酸配列> (配列番号 85)

10 20 30 40 50 60
MSPSQLIGFL LLWVPASRGE IVLTQSPDFQ SVTPKEKVTI TCRASQSIGS SLHWYQQKPD

70 80 90 100 110 120
QSPKLLIKYA SQSFSGVPSR FSGSGSGTDF TLTINSLEAE DAAAYYCHQS SSLPFTFGPG

130 140 150 160 170 180
TKVDIKRTVA APSVFIFPPS DEQLKSGTAS VVCLLNNFYP REAKVQWKVD NALQSGNSQE

190 200 210 220 230
SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GEC

125M10AA 抗体の重鎖、及び軽鎖全領域をコードする DNA 並びに重鎖及び軽鎖全領域のアミノ酸配列をそれぞれ以下に示す。

<125M10AA 重鎖核酸配列> (配列番号 86)

10	20	30	40	50	60
ATGGATCTCA	TGTGCAAGAA	AATGAAGCAC	CTGTGGTTCT	TCCTCCTGCT	GGTGGCGGCT
70	80	90	100	110	120
CCCAGATGGG	TCCTGTCCCA	GCTGCAGGTG	CAGGAGTCGG	GCCCAGGACT	GGTGAAGCCT
130	140	150	160	170	180
TCGGAGACCC	TGTCCCTCAT	CTGCACTGTC	TCTGGTGGCT	CCATCAGGAC	CAGTGGTTAC
190	200	210	220	230	240
TACTGGGGCT	GGTTCCGCCA	GCCCCCAGGG	AAGGGACTGG	AGTGGATTGG	GACTAGTCAT
250	260	270	280	290	300
AATAGTGGGA	GCACCTACTA	CAACCCGTCC	CTCAAGAGTC	GAGTCACCAT	ATCCGTAGAC
310	320	330	340	350	360
ACGTCCAAGA	ACCAGTTCTC	CCTGAAGCTG	AACTCTGTGA	CCGCCGCAGA	CACGGCTGTG
370	380	390	400	410	420
TATTACTGTG	CGAGACAAGG	TTACGATTTT	AAAGTCAATA	TAGACGTCTG	GGGACAAGGG
430	440	450	460	470	480
ACCACGGTCA	CCGTCTCCTC	AGCCTCCACC	AAGGGCCCAT	CGGTCTTCCC	CCTGGCACCC
490	500	510	520	530	540
TCCTCCAAGA	GCACCTCTGG	GGGCACAGCG	GCCCTGGGCT	GCCTGGTCAA	GGACTACTTC
550	560	570	580	590	600

CCCGAACCGG TGACGGTGTC GTGGAActCA GGC GCCCTGA CCAGCGGCGT GCACACCTTC

610 620 630 640 650 660
CCGGCTGTCC TACAGTCCTC AGGACTCTAC TCCCTCAGCA GCGTGGTGAC CGTGCCCTCC

670 680 690 700 710 720
AGCAGCTTGG GCACCCAGAC CTACATCTGC AACGTGAATC ACAAGCCCAG CAACACCAAG

730 740 750 760 770 780
GTGGACAAGA AAGTTGAGCC CAAATCTTGT GACAAAActC ACACATGCCC ACCGTGCCCCA

790 800 810 820 830 840
GCACCTGAAC TCCTGGGGGG ACCGTCAGTC TTCCTCTTCC CCCCCAAAACC CAAGGACACC

850 860 870 880 890 900
CTCATGATCT CCCGGACCCC TGAGGTCACA TCGTGGTG TGGACGTGAG CCACGAAGAC

910 920 930 940 950 960
CCTGAGGTCA AGTTCAActG GTACGTGGAC GCGTGGAGG TGCATAATGC CAAGACAAAG

970 980 990 1000 1010 1020
CCGCGGGAGG AGCAGTACAA CAGCACGTAC CGTGTGGTCA GCGTCCTCAC CGTCCTGCAC

1030 1040 1050 1060 1070 1080
CAGGACTGGC TGAATGGCAA GGAGTACAAG TGCAAGGTCT CCAACAAAGC CCTCCCAGCC

1090 1100 1110 1120 1130 1140
CCCATCGAGA AAACCATCTC CAAAGCCAAA GGGCAGCCCC GAGAACCACA GGTGTACACC

1150 1160 1170 1180 1190 1200
CTGCCCCCAT CCCGGGATGA GCTGACCAAG AACCAGGTCA GCCTGACCTG CCTGGTCAAA

1210 1220 1230 1240 1250 1260
GGCTTCTATC CCAGCGACAT CGCCGTGGAG TGGGAGAGCA ATGGGCAGCC GGAGAACAAC

1270 1280 1290 1300 1310 1320
TACAAGACCA CGCCTCCCGT GCTGGACTCC GACGGCTCCT TCTTCCTCTA CAGCAAGCTC

1330 1340 1350 1360 1370 1380
ACCGTGGACA AGAGCAGGTG GCAGCAGGGG AACGTCTTCT CATGCTCCGT GATGCATGAG

1390 1400 1410 1420 1430
GCTCTGCACA ACCACTACAC GCAGAAGAGC CTCTCCCTGT CTCCGGGTAA ATGA

<125M10AA 重鎖アミノ酸配列> (配列番号 87)

10 20 30 40 50 60
MDLMCKKMKH LWFFLLLVA PRWLSQLQV QESGGLVKP SETLSLICTV SGGSIIRTSY

70 80 90 100 110 120
YWGWRQPPG KGLEWIGTSH NSGSTYYNPS LKSRVTISVD TSKNQFSLKL NSVTAADTAV

130 140 150 160 170 180
YYCARQGYDF KVNIDVWGQG TTVTVSSAST KGPSVFPLAP SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF

190 200 210 220 230 240
PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVVTVP SSGTQTYIC NVNHPKPSNTK

250 260 270 280 290 300

VDKKVEPKSC DKHTCPPCP APELLGGSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED

310 320 330 340 350 360
PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA

370 380 390 400 410 420
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSRDELTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN

430 440 450 460 470 480
YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSPGK

<125M10AA 軽鎖核酸配列> (配列番号 88)

10 20 30 40 50 60
ATGGAAGCCC CAGCTCAGCT TCTCTTCCTC CTGCTACTCT GGCTCCCAGA TACCACCGGA

70 80 90 100 110 120
GAAATTGTGT TGACACAGTC TCCAGCCACC CTGTCTTTGT CTCCAGGGGA AAGAGCCACC

130 140 150 160 170 180
CTCTCCTGCA GGGCCAGTCA GAGTGTTAGC AGCTACTTAG CCTGGTACCA ACAGAAACCT

190 200 210 220 230 240
GGCCAGGCTC CCAGGCTCCT CATCTATGAT GCATCCAACA GGGCCACTGG CATCCCAGCC

250 260 270 280 290 300
AGGTTTCAGTG GCAGTGGGTC TGGGACAGAC TTCACTCTCA CCATCAGCAG CCTAGAGCCT

310 320 330 340 350 360
GAAGATTTTG CAGTTTATTA CTGTCAGCAG CGTAGCAACT GGCCGCTCAC TTTCGGCGGA

370 380 390 400 410 420
GGGACCAAGG TGGAGATCAA ACGAACTGTG GCTGCACCAT CTGTCTTCAT CTCCCCGCCA

430 440 450 460 470 480
TCTGATGAGC AGTTGAAATC TGGAAGTGCC TCTGTTGTGT GCCTGCTGAA TAACTTCTAT

490 500 510 520 530 540
CCCAGAGAGG CCAAAGTACA GTGGAAGGTG GATAACGCCC TCCAATCGGG TAACTCCCAG

550 560 570 580 590 600
GAGAGTGTCA CAGAGCAGGA CAGCAAGGAC AGCACCTACA GCCTCAGCAG CACCCTGACG

610 620 630 640 650 660
CTGAGCAAAG CAGACTACGA GAAACACAAA GTCTACGCCT GCGAAGTCAC CCATCAGGGC

670 680 690 700
CTGAGCTCGC CCGTCACAAA GAGCTTCAAC AGGGGAGAGT GTTAG

<125M10AA 軽鎖アミノ酸配列> (配列番号 89)

10 20 30 40 50 60
MEAPAQLLFL LLLWLPTTG EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP

70 80 90 100 110 120
GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPLTFGG

130 140 150 160 170 180
GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ

190 200 210 220 230
 ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYKHK VYACEVTHQG LSSPVTGSFN RGEC

実施例 15 組換え抗体発現ベクターの構築

263A17、125M10AA、125M165DAAA、125N26F6AA 及び 125Q54AAAA 抗体については、組換え抗体発現ベクターを構築した。

263A17、125M165DAAA 及び 125N26F6AA 抗体については、取得した抗体の HV 鎖を含むプラスミド DNA を鋳型として、末端に連結のための制限酵素部位（5' 末側 SalI、3' 末側 NheI）を付加するように設計したプライマーを用いた。具体的なプライマーは、以下のとおり。

263A17 ;

HV 鎖 5' 用プライマー : A33 2-6A2 H VH3-23 Sal I (配列番号 54)

5' -GCG ACT AAG TCG ACC ATG GAG TTT GGG CTG AGC TG-3'

HV 鎖 3' 用プライマー : A33 2-6A2 H VH3-23 Nhe I (配列番号 55)

5' - TGG GCC CTT GGT GCT AGC TGA GGA GAC GGT GAC CG-3'

125M165DAAA ;

HV 鎖 5' 用プライマー : M165H5Sal (配列番号 56)

5' -AGA GAG AGA GGT CGA CCA CCA TGG AGT TTG GGC TGA GCT GGG TTT -3'

HV 鎖 3' 用プライマー : M165H3Nhe (配列番号 57)

5' - AGA GAG AGA GGC TAG CTG AGG AGA CGG TGA CCA GGG TGC -3'

125N26F6AA ;

HV 鎖 5' 用プライマー : N26H5SalI (配列番号 58)

5' -AGA GAG AGA GGT CGA CCA CCA TGG AGT TTG GGC TGA GCT GGG TTT -3'

HV 鎖 3' 用プライマー : N26H3NheI (配列番号 59)

5' - AGA GAG AGA GGC TAG CTG AGG AGA CGG TGA CCA GGG TTC CC -3'

各 A33 抗体の HV を PCR で増幅（94℃ 3 分→94℃ 10 秒、68℃ 45 秒（35 サイクル）→72℃ 7 分）した。増幅された DNA 断片を SalI、NheI で消化し、同一酵素で解裂されていた N5KG1-Val Lark ベクター（IDEC Pharmaceuticals, N5KG1 (US patent 6001358) の改変ベクター）に導入した。挿入された配列がサブクローニ

ングした HV の DNA 塩基配列解析によって決定されたものと同一であることを、ベクターを鋳型として配列を決定することにより確認した。

引き続き、得られた HV が挿入されたプラスミドベクターに LV の挿入を行った。取得した抗体の LV 鎖を含むプラスミド DNA を鋳型として、末端に連結のための制限酵素部位（5' 末側 BglII、3' 末側 BsiWI）を付加するように設計したプライマーを用いた。具体的なプライマーは、以下のとおり。

263A17；

LV 鎖 5' 用プライマー：A33 2-6A2 K L19 BglII（配列番号 60）

5' -ATC ACA GAT CTC TCA CCA TGG ACA TGA GGG TCC CC-3'

LV 鎖 3' 用プライマー：A33 2-6A2 K L19 BsiWI（配列番号 61）

5' - ACA GAT GGT GCA GCC ACC GTA CGT TTA ATC TCC AG-3'

125M165DAAA；

LV 鎖 5' 用プライマー：M165K5L6Bgl2（配列番号 62）

5' -AGA GAG AGA GAG ATC TCA CCA TGG AAG CCC CAG CTC AGC TTC TCT-3'

LV 鎖 3' 用プライマー：M165K3L6BsiWI（配列番号 63）

5' - AGA GAG AGA GCG TAC GTT TGA TTT CCA CCT TGG TCC CTT GGC-3'

125N26F6AA；

LV 鎖 5' 用プライマー：N26KA10Minor L Bgl（配列番号 64）

5' -AGA GAG AGA GAT CTC TCA CCA TGT CGC CAT CAC AAC TCA TTG GG -3'

LV 鎖 3' 用プライマー：N26KA10Minor L Bsi（配列番号 65）

5' -AGA GAG AGA GCG TAC GTT TGA TAT CCA CTT TGG TCC CAG GG-3'、

各 A33 抗体の LV を PCR で増幅（94℃ 3 分→94℃ 10 秒、68℃ 45 秒（35 サイクル）→72℃ 7 分）した。増幅した DNA 断片を BglII、BsiWI で消化し、同一酵素で解裂されていた N5KG1-HV ベクターに導入した。挿入された配列がサブクロニングした LV の DNA 塩基配列解析によって決定されたものと同一であることを、ベクターを鋳型として配列を決定することにより確認した。

125M10AA 及び 125Q54AAAA 抗体については、取得した抗体の LV 鎖を含むプラスミド DNA を鋳型として、末端に連結のための制限酵素部位（5' 末側 BglII、3' 末側 BsiWI）を付加するように設計したプライマーを用いた。具体的なプライマ

ーは、以下のとおり。

125M10AA ;

LV 鎖 5' 用プライマー : M10KBgl (配列番号 66)

5' -AGAGAGAGAGAGATCTCACCATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCT -3'

LV 鎖 3' 用プライマー : M10KBsi (配列番号 67)

5' - AGAGAGAGAGCGTACGTTTGATCTCCACCTTGGTCCCTCCG -3'

125Q54AAAA ;

LV 鎖 5' 用プライマー : Q54K5Bgl (配列番号 68)

5' -AGAGAGAGAGAGATCTCACCATGGACATGAGGGTCCTCGCTCAGC -3'

LV 鎖 3' 用プライマー : Q54K3Bsi (配列番号 69)

5' - AGAGAGAGAGCGTACGTTTGATCTCCAGCTTGGTCCCCTGG -3'

各 A33 抗体の LV を PCR で増幅 (94℃ 3 分→94℃ 10 秒、68℃ 45 秒 (35 サイクル) →72℃ 7 分) した。増幅した DNA 断片を BglII、BsiWI で消化し、同一酵素で解裂されていた N5KG1-Val Lark ベクターに導入した。挿入された配列がサブクローニングした LV の DNA 塩基配列解析によって決定されたものと同一であることを、ベクターを鋳型として配列を決定することにより確認した。

引き続き、得られた LV が挿入されたプラスミドベクターに HV の挿入を行った。取得した抗体の HV 鎖を含むプラスミド DNA を鋳型として、末端に連結のための制限酵素部位 (5' 末側 SalI、3' 末側 NheI) を付加するように設計したプライマーを用いた。具体的なプライマーは、以下のとおり。

125 M10AA ;

HV 鎖 5' 用プライマー : M10H5Sal (配列番号 70)

5' - AGA GAG AGA GGT CGA CCA CCA TGG ATC TCA TGT GCA AGA AAA TGA AGC -3'

HV 鎖 3' 用プライマー : M10H3Nhe (配列番号 71)

5' AGA GAG AGA GGC TAG CTG AGG AGA CGG TGA CCG TGG TCC CT -3'

125 Q54AAAA ;

HV 鎖 5' 用プライマー : Q54H5Sal (配列番号 72)

5' - AGA GAG AGA GGT CGA CCA CCA TGG AGT TTG GGC TGA GCT GGC TTT-3'

HV 鎖 3' 用プライマー : Q54H3Nhe (配列番号 73)

5' - AGA GAG AGA GGC TAG CTG AGG AGA CGG TGA CCA GGG TTC CC-3'

各 A33 抗体の HV を PCR で増幅 (94℃ 3 分→94℃ 10 秒、68℃ 45 秒 (35 サイクル) →72℃ 7 分) した。増幅した DNA 断片を SalI、NheI で消化し、同一酵素で解裂されていた N5KG1-LV ベクターに導入した。挿入された配列がサブクローニングした HV の DNA 塩基配列解析によって決定されたものと同一であることを、ベクターを鋳型として配列を決定することにより確認した。

表 5 に合成 DNA の塩基配列を、表 6 に組換えベクター及び産生される抗体の名称を示す。

表 5

No	プライマー名	配列 (5' to 3')	長さ	配列番号
1	GPAHvR3Nhe	GCC CTT GGT GCT AGC TGA AGA GAC GGT GAC CAG AGT CCC TTG	42	1
2	GPALvR3Bsi	GTG CAC GCC GCT CAG GGC GCC TG	26	2
3	M13FW	GTA AAA CGA CGG CCA GTG	18	3
4	M13RV	CAG GAA ACA GCT ATG AC	17	4
5	GPAHv2F5Sal	AGA GAG AGG TCG ACC CAC CAT GAA CTT TGG GCT GAG CTT AGT T	43	5
6	GPALv2FBgl	AGA GAG AGA GAT CTC TCA CCA TGG GCA TCA AGA TGG AGT TTC AG	44	6
7	A33-F2	GCA GAC GAA TTC AAG ACC ATG GTG GGG AAG AT	32	13
8	A33-R1	CTC GAG CGG CCG CTC TGC TGC TGG CCT GTC ACT GGT CGA GGT G	43	14
9	GPA-EXCRR2	CTC GAG CGG CCG CCA GTT CAT GGA GGG AGA TCT GAC G	37	15
10	1gGlp	TCT TGT CCA CCT TGG TGT TGC TGG GCT TGT G	31	16
11	hk-2	GTT GAA GCT CTT TGT GAC GGG CGA GC	26	17
12	1gG2p/G134	TGC ACG CCG CTG GTC AGG GCG CCT GAG TTC C	31	18
13	hk-5	AGG CAC ACA ACA GAG GCA GTT CCA GAT TTC	30	19
14	hh-2	GCT GGA GGG CAC GGT CAC CAC GCT G	25	20
15	hh-4	GGT GCC AGG GGG AAG ACC GAT GG	23	21
16	A33 2-6A2 H VH3-23 SalI	GCG ACT AAG TCG ACC ATG GAG TTT GGG CTG AGC TG	35	54
17	A33 2-6A2 H VH3-23 NheI	TGG GCC CTT GGT GCT AGC TGA GGA GAC GGT GAC CG	35	55
18	M165H5Sal	AGA GAG AGA GGT CGA CCA CCA TGG AGT TTG GGC TGA GCT GGG TTT	45	56
19	M165H3Nhe	AGA GAG AGA GGC TAG CTG AGG AGA CCG TGA CCA GGG TGC	39	57
20	N26H5Sal	AGA GAG AGA GGT CGA CCA CCA TGG AGT TTG GGC TGA GCT GGG TTT	45	58
21	N26H3NheI	AGA GAG AGA GGC TAG CTG AGG AGA CCG TGA CCA GGG TTC CC	41	59
22	A33 2-6A2 K L19 BglII	ATC ACA GAT CTC TCA CCA TGG ACA TGA GGG TCC CC	35	60
23	A33 2-6A2 K L19 BsiWI	ACA GAT GGT GCA GCC ACC GTA CGT TTA ATC TCC AG	35	61
24	M165K5L6Bgl2	AGA GAG AGA GAG ATC TCA CCA TGG AAG CCC CAG CTC AGC TTC TCT	45	62
25	M165K3L6BsiW1	AGA GAG AGA GCG TAC GTT TGA TTT CCA CCT TGG TCC CTT GGC	42	63
26	N26KA10Minor L Bgl	AGA GAG AGA GAT CTC TCA CCA TGT CGC CAT CAC AAC TCA TTG GG	44	64
27	N26KA10Minor L Bsi	AGA GAG AGA GCG TAC GTT TGA TAT CCA CTT TGG TCC CAG GG	41	65
28	M10KBgl	AGA GAG AGA GAG ATC TCA CCA TGG AAG CCC CAG CTC AGC TTC TCT	45	66
29	M10KBSi	AGA GAG AGA GCG TAC GTT TGA TCT CCA CCT TGG TCC CTC CG	41	67
30	Q54K5Bgl	AGA GAG AGA GAG ATC TCA CCA TGG ACA TGA GGG TCC TCG CTC AGC	45	68
31	Q54K3Bsi	AGA GAG AGA GCG TAC GTT TGA TCT CCA GCT TGG TCC CTT GG	41	69
32	M10H5Sal	AGA GAG AGA GGT CGA CCA TGG ATC TCA TGT GCA AGA AAA TGA AGC	48	70
33	M10H3Nhe	AGA GAG AGA GGC TAG CTG AGG AGA CCG TGA CCG TGG TCC CT	41	71
34	Q54H5Sal	AGA GAG AGA GGT CGA CCA CCA TGG AGT TTG GGC TGA GCT GGC TTT	45	72
35	Q54H3Nhe	AGA GAG AGA GGC TAG CTG AGG AGA CCG TGA CCA GGG TTC CC	41	73
36	H 3UTR1848	CGG GGT ACG TGC CAA GCA TCC TCG TG	26	74
37	H 3UTR1875	ATG CTG GGC GCC CGG GAA GTA TGT AC	26	75
38	L 3UTR 823	GAA AGA TGA GCT GGA GGA CCG CAA TA	26	76
39	hh-1	CCA AGG GCC CAT CCG TCT TCC CCC TGG CAC	30	77
40	CMVH903F	GAC ACC CTC ATG ATC TCC CGG ACC	24	78
41	CMVHR1303	TGT TCT CCG GCT GCC CAT TGC TCT	24	79
42	hh-6	GGT CCG GGA GAT CAT GAG GGT GTC CTT	27	80
43	hk-1	TGG CTG CAC CAT CTG TCT TCA TCT TC	26	81

表 6

抗体	ベクター名称	サブクラス	組換え抗体の名称
263A17	N5KG1-Val Lark	IgG1	rec263
125M10AA	N5KG1-Val Lark	IgG1	recM10
125M165DAAA	N5KG1-Val Lark	IgG1	recM165
125N26F6AA	N5KG1-Val Lark	IgG1	recN26
125Q54AAAA	N5KG1-Val Lark	IgG1	recQ54

実施例 16 組換え型抗体の作製

実施例 15 で構築した組換え型抗体発現ベクターを宿主細胞に導入し、組換え型抗体発現細胞を作製した。発現のための宿主細胞には、例えば CHO 細胞の dhfr 欠損株 (ATCC CRL-9096)、CHO-Ras (Katakura Y., et al., Cytotechnology, 31: 103-109, 1999)、HEK293T (ATCC CRL-11268) などが用いられる。

宿主細胞へのベクターの導入はエレクトロポレーションやリポフェクションなどにより実施した。エレクトロポレーションは抗体発現ベクター約 2 μ g を制限酵素で線状化し、Bio-Rad electrophoreter をもちいて 350V、500 μ F の条件で、 4×10^6 個の CHO 細胞に遺伝子を導入し、96well culture plate に播種した。リポフェクションは、LipofectAMINE Plus (ギブコ・ピーアールエル社製) を用いてマニュアルに従って実施した。ベクターの導入処理後、発現ベクターの選択マーカーに対応した薬剤を添加して培養を継続した。コロニーを確認した後、実施例 6 に示した方法によって、抗体発現株を選別した。選別した細胞からの抗体精製は、吸着後 PBS で洗浄して、Mab Select Protein A 3.2 $\times$ 10cm カラム (アマシャムファルマシアバイオテク社製) を用い、吸着後 PBS で洗浄して、20mM (グリシン) クエン酸ナトリウム、50mM NaCl (pH2.7) 緩衝液で溶出した。溶出液を 50mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0) にて中和した。次に、陰イオン交換カラムである Hitrap Q HP Sepharose カラム (アマシャムファルマシアバイオテク社製) で、さらに同じく陽イオンカラムである Hitrap SP HP Sepharose カラム (アマシャムファルマシアバイオテク社製) で精製した。調製された抗体溶液は、透析膜 (10000 カット、Spectrum Laboratories 社製) を用いて PBS に置換し、孔径 0.22 μ m のメンブランフィルター MILLEX-GV (ミリポア社製) でろ過滅菌し、純度を少なくとも 95% 以上、エンドトキシン 0.1 EU/mg 以下の精製抗体を取得した。組換え型の精製抗 A33 抗体の濃度は 280nm の吸光度を測定し、1mg/mL を 1.4 OD として算

出した。

実施例 17 組換え型抗体による反応試験

A33 抗原を発現するヒト大腸癌細胞株 COL0205 細胞、LS174T 細胞 (ATCC No. CL-188) 及び NCI-H508 細胞 (ATCC No. CCL-253) に対する実施例 16 で取得した組換え型抗体の反応性の検討を、FCM で行った。また、陰性コントロール細胞として A33 抗原を発現していないヒト大腸癌細胞株 HT-29 細胞 (ATCC No. HTB-38) も行った。試験方法は、実施例 9 と同様に行った。

その結果を表 7 に示す。COL0205 細胞では、平均蛍光強度半値を 45、LS174T 細胞では、平均蛍光強度半値を 100、NCI-H508 細胞では、平均蛍光強度半値を 175 とし、そこに達する抗体濃度が $10 \leq x < 100 \text{ ng/ml}$ のときは + + +、 $100 \leq x < 1000 \text{ ng/ml}$ のときは + +、 $1000 \leq x < 10000 \text{ ng/ml}$ のときは +、結合が認められなかった場合は、- と示した。A33 抗原を発現しているどの細胞に対しても、組換え型抗体は結合を示した。

表 7

抗体名	COL0205	LS174T	NCI-H508	HT-29
抗DNP-IgG1	-	-	-	-
CA33	+++	+++	+++	-
rec263	++	++	++	-
recM10	+++	+++	+++	-
recM165	++	++	++	-
recN26	++	+++	+++	-
recQ54	+++	+++	+++	-

平均蛍光強度半値 45
 10<math>\leq x<100</math> ng/ml; ++
 100<math>\leq x<1000</math> ng/ml; ++
 1000<math>\leq x<10000</math> ng/ml; +
 結合なし; -

平均蛍光強度半値 100
 10<math>\leq x<100</math> ng/ml; +++
 100<math>\leq x<1000</math> ng/ml; ++
 1000<math>\leq x<10000</math> ng/ml; +
 結合なし; -

平均蛍光強度半値 175
 10<math>\leq x<100</math> ng/ml; +++
 100<math>\leq x<1000</math> ng/ml; ++
 1000<math>\leq x<10000</math> ng/ml; +
 結合なし; -

実施例 18 組換え型抗体のマウス抗 A33 抗体との競合試験

実施例 16 で取得した組換え型抗体をマウス抗 A33 抗体と同様なエピトープを認識するか否かを FCM を用いた競合実験にて検討した。試験方法は、実施例 10 と同様に行った。

実施例 10 の各モノクローナル精製抗体の結果と同様に、rec263 及び recM10 は、「ノンブロッカー」、recM165 及び recN26 は「ブロッカー」、recQ54 は、「パーシャルブロッカー」と分類された。その結果を表 8 に示す。

表 8

抗体名	阻害率 (%)	分類
cA33	94.6	ブロッカー
rec263	15.3	ノンブロッカー
recM10	0.2	ノンブロッカー
recM165	93.4	ブロッカー
recN26	95.3	ブロッカー
recQ54	44.6	パーシャルブロッカー

実施例 19 組換え型抗体での細胞傷害性試験

実施例 16 で取得した組換え型抗体での ADCC 及び CDC の測定を実施した。ADCC アッセイは、 ^{51}Cr ラベルしたターゲット細胞 (COL0205 あるいは NCI-H508) 5000 個に対して、実施例 11 記載の方法で取得した健常人末梢血単核球 50 万個を、V 底 96 ウェルプレート (コースター社製) 中で全体容量 200 μL で、各抗体濃度とともに 37°C、5% CO_2 存在下で 4 時間培養した。

CDC アッセイは、 ^{51}Cr ラベルしたターゲット細胞 (COL0205 あるいは NCI-H508) 5000 個に対して、最終濃度 5% のヒト血清由来補体 (シグマ社製) を、V 底 96 ウェルプレート中で全体容量 200 μL で、各抗体濃度とともに 37°C、5% CO_2 存在下で 4 時間培養した。

試験方法は、実施例 12 と同様に行った。

その結果を図 2A～図 2D および表 9 に示す。ADCC は、特異的溶解率半値を COL0205 細胞をターゲットとしたときは、12.5%とし、NCI-H508 細胞をターゲットとしたときは、30%とした。そこに達する抗体濃度が $1 \leq x < 10 \text{ ng/ml}$ のときは+++, $10 \leq x < 100 \text{ ng/ml}$ のときは++, $100 \leq x < 1000 \text{ ng/ml}$ のときは+, 特異的溶解率が認められなかった場合は、-と示した。CDC では、特異的溶解率半値を COL0205 細胞をターゲットとしたときは、7%とし、NCI-H508 細胞をターゲットとしたときは、20%とした。そこに達する抗体濃度が $10 \leq x < 100 \text{ ng/ml}$ のときは+++, $100 \leq x < 1000 \text{ ng/ml}$ のときは++, $x \geq 1000 \text{ ng/ml}$ のときは+, 特異的溶解率が認められなかった場合は、-と示した。ADCC では、cA33, recM10 及び recQ54 が高い傷害活性を示した。一方、CDC では、recM10 が高い傷害活性を示した。

表 9

細胞名	COL0205			NCI-H508		
	ADCC	CDC		ADCC	CDC	
抗DNP-IgG1	-	-		-	-	
CA33	+++	±		++	++	
rec263	++	++		++	++	
recM10	+++	+++		++	+++	
recM165	++	+		++	++	
recN26	++	+		++	++	
recQ54	+++	++		++	++	
特異的溶解率半値 12.5% 特異的溶解率半値 7% 特異的溶解率半値 30% 特異的溶解率半値 20% 1<=x<10 ng/ml; +++ 10<=x<100 ng/ml; +++ 1<=x<10 ng/ml; +++ 10<=x<100 ng/ml; +++ 10<=x<100 ng/ml; ++ 100<=x<1000 ng/ml; ++ 10<=x<100 ng/ml; ++ 100<=x<1000 ng/ml; ++ 100<=x<1000 ng/ml; + 1000<=x<10000 ng/ml; + 100<=x<1000 ng/ml; + 1000<=x<10000 ng/ml; + 特異的溶解なし; - x>=10000 ng/ml; ± 特異的溶解なし; - x>=10000 ng/ml; ± 特異的溶解なし; - 特異的溶解なし; - 特異的溶解なし; - 特異的溶解なし; -						

実施例 20 精製抗体及び組換え型抗体によるウエスタンブロット解析

マウス抗 A33 抗体及び humanized A33 抗体は、コンフォメーションなエピトープを認識すると報告されている。すなわち、ウエスタンブロッティング解析で、還元条件 (5% β -メルカプトエタノール) 下では、反応性が認められないと報告されている。そこで、ヒト抗 A33 精製抗体及び組換え型抗体の反応性について調べることを目的とし、ウエスタンブロット解析を実施した。

実施例 3 で調製した shA33EX-hFc タンパク質を還元 (5% β -メルカプトエタノール) 及び非還元条件下で、10~20% ポリアクリルアミドグラジェントゲル (第一化学薬品社製) による SDS-PAGE によって分離した。このとき、1 レーンあたり shA33EX-hFc タンパク質が 2.5ng になるように希釈した。一方、マーカーとしてビオチン化 SDS-PAGE スタンダード ブロードレンジ (バイオラッド社製) も 1 レーンにアプライした。shA33EX-hFc タンパク質を PVDF 膜にパンザーセミドライエレクトロブロッター (第一化学薬品) にて 150mA/枚、1 時間ブロットした。TBS 緩衝液及び 0.05% Tween 入り TBS (TTBS) にて、タンパク質がブロッティングされた膜を洗浄し、ブロックエース (大日本製薬社製) にてブロッキングを行った。TTBS にて 2 回を洗浄した。125M10AA、125Q54AAAA、125M96ABA、125Q47BA、及び 125R5AAAA は、ハイブリドーマ精製抗体を 1 μ g/ml で、室温 60 分にて反応させた。一方、キメラ抗 A33 抗体、125M165DAAA (すなわち recM165) 及び 125N26F6AA (すなわち recN26) は、組換え型抗体を 1 μ g/ml で、室温 60 分にて反応させた。TTBS で洗浄した後、検出用抗体として、1000 倍希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼで標識されたヤギ抗ヒト Kappa 鎖 F(ab')₂ 抗体 (バイオソース社製) を用いた。このとき、マーカーを検出するために 3000 倍希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼで標識されたストレプトアビジンも加えて反応させた。TTBS で 2 回、PBS で 1 回洗浄したのち、ウエスタンブロッティングディテクションシステム ECL-plus (アマシャム・バイオサイエンス社製) を用い、バンドの検出を行った。イメージアナライザー LAS-100 (フジフィルム社製) を用い、化学発光を取り込み、画像処理を行った。

結果を図 3A および図 3B に示す。その結果、125Q54AAAA のみ還元条件下でも約 67 kD タンパク質のバンドと反応した。その他の抗体は、キメラ抗 A33 抗体と同

様に非還元条件下でのみ反応が認められた。

実施例 21 精製抗体及び組換え型抗体での免疫組織化学

ヒト抗 A33 抗体の特異性、選択性がキメラ抗 A33 抗体と同等か否かを評価するために、免疫組織化学によって腫瘍組織切片及び正常組織切片との反応性を解析した。

(1) 精製抗体及び組換え型抗体の蛍光標識

実施例 8 によって調製された各モノクローナル精製抗体あるいは実施例 16 で調製された組換え型抗体、rec263、125M10AA、recM165、recN26 及び 125Q54AAA を Alexa Fluor™488 (モリキュラー・プローブ社製) で直接標識した。陽性コントロールとしてキメラ抗 A33 抗体、陰性コントロールとして抗 DNP-IgG1 抗体も同様に直接標識した。精製抗体及び組換え型抗体の蛍光標識化は以下のように行った。Alexa Fluor™488 を付属の説明書に従い、実施例 8 あるいは実施例 16 で調製した抗 A33 抗体に結合させた。2mg/ml の精製抗体及び組換え型抗体 0.5ml に 50 μ l の 1M 炭酸緩衝液を添加後、Alexa Fluor™488 と混合し、攪拌しながら室温 1 時間反応させた。ヒドロキシルアミンを添加し反応を止め、ゲルろ過カラム(NAP5、アマシャム・ファルマシア・バイオテック社製)に混合液を供し、抗体に未結合の Alexa Fluor™488 を除去した。この条件で抗体 1 分子に 4-6 つの蛍光物質が結合した。蛍光標識された抗体は COL0205 細胞に結合し、その結合活性は標識されていない抗体と同等であった。

(2) 免疫組織化学

使用した組織切片は、ヒト成人結腸癌凍結組織切片(バイオチェーン社製)、ヒト成人正常結腸凍結組織切片(バイオチェーン社製)、ヒト成人小腸凍結組織切片(バイオチェーン社製)及びヒト成人胃凍結組織切片(バイオチェーン社製)である。10%ヤギ血清(ギブコ・ビーアールエル社製)含有 PBS で、室温にて 1-2 時間ブロッキングした。PBS にて 2 回洗浄し、実施例 21(1)で Alexa Fluor™488 にて標識された各モノクローナル精製抗体あるいは組換え型抗体を 1 μ g/ml で室温 30~60 分反応させた。その後、封入し、蛍光顕微鏡(BX51、オリンパス社製)で観察し、画像はオリンパス社製 DP70 にて解析した。

その結果を図 4~6 に示す。Garin-Chesa P. らの報告している大腸癌組織の免疫組織染色(Int. J. Oncology 1996 9: 465-471)と同様にキメラ抗 A33 抗体、rec263、125M10AA、recM165、recN26 及び 125Q54AAA とともに結腸癌組織の腺上皮細胞や形成異常腺構造に幅広く、均一に強く染色することが認められた(図 4)。また、正常小腸組織(図 5)、正常結腸組織(図 6)にもキメラ抗 A33 抗体と同様な染色が認められた。一方、正常胃組織では、論文でも染色が認められなかったのと同様本抗体でも染色が認められなかった。また、陰性コントロールの抗 DNP-IgG1 抗体では、すべての組織で染色は認められなかった。

実施例 2 2 マウス担癌モデルに対するハイブリドーマ精製抗体及び組換え型抗体の効果

実施例 16 から得られたヒト抗 A33 組換え型抗体の効果を、以下に記載する方法に従ってマウス担癌モデルを用いて検討した。使用した大腸癌細胞株は、COL0205 細胞と NCI-H508 細胞である。

COL0205 細胞株を使用したマウス担癌モデルの作製方法は、以下のとおりである。6 週齢の Balb/c ノードマウス(日本クレア社より購入)の背部皮下に、大腸癌細胞株 COL0205 を 5×10^6 /マウス個体で移植した。移植後 1、2、7 及び 10 日後に 10 匹 1 群として、担癌マウスの腹腔内に、キメラ抗 A33 及び rec263 抗体 10、100 μ g/マウス個体(200 μ l の 1%ノードマウス血清含有 PBS に溶解したもの)を投与し、移植 7、9、11、14、17、21 日後の腫瘍の大きさを測定した。抗体の陰性コントロール(Control)として、同量のヒト抗 DNP-IgG1 抗体を使用した。「vehicle」は抗体投与をするにあたり溶解するための媒体として使用した 1%ノードマウス血清含有 PBS (200 μ l) を示す。

NCI-H508 細胞株を使用したマウス担癌モデルの作製方法は、以下のとおりである。6 週齢の Balb/c ノードマウス(日本クレア社より購入)の背部皮下に、大腸癌細胞株 NCI-H508 を腫瘍細胞の生着性を高めるマウス悪性肉腫からなるマトリジェル(ベクトン・ディキンソン・バイオサイエンス社製)と 1:1 の容量になるように、 1×10^7 /マウス個体で移植した。移植後 1、4 及び 7 日後に 10 匹 1 群として、担癌マウスの腹腔内に、キメラ抗 A33 及び rec263 抗体 10、100 μ g/マウス個

体 (200 μ l の 1%ヌードマウス血清含有 PBS に溶解したもの) を投与し、移植 7、11、14、18、21、27、33、40、48、55、62 日後の腫瘍の大きさを測定した。抗体の陰性コントロール (Control) として、同量のヒト抗 DNP-IgG1 抗体を使用した。

「vehicle」は抗体投与をするにあたり溶解するための媒体として使用した 0.1%ヌードマウス血清含有 PBS (200 μ l) を示す。

以上の実験の結果を図 7 に示す。

COL0205 細胞株を移植した系では、rec263 抗体を 10 μ g/マウス個体で投与した群では、Vehicle 投与群と比較して、移植後 7、9、11 日後に腫瘍を有意に抑制することが認められた ($p < 0.05$)。抗 DNP-IgG1 抗体投与群と比較して、移植後 7、9、11、14 日後に腫瘍の大きさに有意な差が認められた ($p < 0.05$)。また、100 μ g/マウス個体で投与した群では、抗 DNP-IgG1 抗体投与群と比較して、移植後 14、17 日後に腫瘍を有意に抑制することが認められた ($p < 0.05$)。一方、キメラ抗 A33 組換え型抗体を 10 μ g/マウス個体で投与した群では、Vehicle 投与群と比較して、移植後 7、11 日後に腫瘍を有意に抑制することが認められた ($p < 0.05$)。抗 DNP-IgG1 抗体投与群と比較して、移植後 7、9、11、14、17、21 日後に腫瘍を有意に抑制することが認められた ($p < 0.05$)。また、100 μ g/マウス個体で投与した群では、Vehicle 投与群と比較して、移植後 7、9、14 日後に腫瘍を有意に抑制することが認められた ($p < 0.05$)。抗 DNP-IgG1 抗体投与群と比較して、移植後 7、9、11、14、17、21 日後に腫瘍を有意に抑制することが認められた ($p < 0.05$) (図 7 A)。

一方、NCI-H508 細胞株を移植した系では、rec263 抗体を 10 μ g/マウス個体で投与した群では、抗腫瘍効果を全く示さなかった。一方、100 μ g/マウス個体で投与した群では、Vehicle 投与群と比較して、移植後 18 日後以降で腫瘍を有意に抑制することが認められた ($p < 0.05$)。また、抗 DNP-IgG1 抗体投与群と比較して、ほぼすべての測定日で腫瘍を有意に抑制することが認められた ($p < 0.05$)。一方、キメラ抗 A33 組換え型抗体を 10 μ g/マウス個体で投与した群では、Vehicle 投与群と比較して、移植後 21、55、62 日後に腫瘍を有意に抑制することが認められた ($p < 0.05$)。また、抗 DNP-IgG1 抗体投与群と比較して、移植後 7、21、33 日後に腫瘍を有意に抑制することが認められた ($p < 0.05$)。また、100 μ g/マウス個

体で投与した群では、Vehicle 投与群と比較して、ほぼすべての測定日で腫瘍を有意に抑制することが認められた ($p < 0.05$)。また、抗 DNP-IgG1 抗体投与群と比較して、移植後 33 日後まで腫瘍を有意に抑制することが認められた ($p < 0.05$)。

以上のことから、本発明の抗体は 2 種類の大腸癌細胞株を用いたマウス担癌モデルで高い抗腫瘍効果を有することが示された (図 7B)。

ヒト抗 A33 産生ハイブリドーマ精製抗体及びヒト抗 A33 組換え型抗体の効果を、マウス担癌モデルを用いて検討した。使用した大腸癌細胞株は、COL0205 細胞と NCI-H508 細胞である。

(125M10AA, 125M165DAAA 及び 125M96ABA ハイブリドーマより精製した抗体の COL0205 細胞株を使用したときの抗腫瘍効果)

6 週齢の Balb/c ノードマウス (日本クレア社より購入) の背部皮下に、大腸癌細胞株 COL0205 を 5×10^6 /マウス個体で移植した。移植後 1、3、7、10、14、17 日後に 10 匹 1 群として (Vehicle 投与群は、15 匹 1 群)、担癌マウスの腹腔内に、125M10AA、125M165DAAA 及び 125M96ABA 抗体 $20 \mu\text{g}$ /マウス個体 ($200 \mu\text{l}$ の 1% ノードマウス血清含有 PBS に溶解したもの) を投与し、移植 7、10、12、14、17 日後の腫瘍の大きさを測定した。「vehicle」は抗体投与をするにあたり溶解するための媒体として使用した 1% ノードマウス血清含有 PBS ($200 \mu\text{l}$) を示す。

以上の実験の結果を図 7C に示す。図 7C 中、M10 は 125M10AA 抗体を、M96 は 125M96ABA 抗体を、M165 は 125M165DAAA 抗体を示す。125M10AA 抗体を投与した群では、Vehicle 投与群と比較して、移植後すべての測定日において腫瘍を有意に抑制することが認められた ($p < 0.05$)。また、125M165DAAA 抗体を投与した群では、Vehicle 投与群と比較して、移植後 12、14、17 日後に腫瘍を有意に抑制することが認められた ($p < 0.05$)。一方、125M96ABA 抗体を投与した群では、Vehicle 投与群と比較して、移植後 12、14 日後に腫瘍を有意に抑制することが認められた ($p < 0.05$)。

(N26 及び M165 組換え型抗体の COL0205 及び NCI-H508 細胞株を使用したときの抗腫瘍効果)

6 週齢の Balb/c ノードマウス (日本クレア社より購入) の背部皮下に、大腸癌

細胞株 COL0205 を 5×10^6 /マウス個体で移植した。移植後 1、3、6 日後に 10 匹 1 群として、担癌マウスの腹腔内に、recN26 及び recM165 抗体 10 及び $100 \mu\text{g}$ /マウス個体 ($200 \mu\text{l}$ の 1%ヌードマウス血清含有 PBS に溶解したもの) を投与し、移植 8、10、13、15、17、20、23 日後の腫瘍の大きさを測定した。

以上の実験の結果を図 7D に示す。図 7D 中、M165-10 は recM165 抗体 ($10 \mu\text{g}$ /匹投与) を、M165-100 は recM165 抗体 ($100 \mu\text{g}$ /匹投与) を、N26-10 は recN26 抗体 ($10 \mu\text{g}$ /匹投与) を、N26-100 は recN26 抗体 ($100 \mu\text{g}$ /匹投与) を示す。recN26 抗体を $10 \mu\text{g}/\text{head}$ で投与した群では、Vehicle 投与群と比較して、移植後 10、13 日後において腫瘍を有意に抑制することが認められた ($p < 0.05$)。recN26 抗体を $100 \mu\text{g}/\text{head}$ で投与した群では、Vehicle 投与群と比較して、移植後 8、10、13、15、17、20 日後において腫瘍を有意に抑制することが認められた ($p < 0.05$)。また、recM165 抗体を $100 \mu\text{g}/\text{head}$ で投与した群では、Vehicle 投与群と比較して、移植後 8、10、13、15、17、20 日後に腫瘍を有意に抑制することが認められた ($p < 0.05$)。

6 週齢の Balb/c ヌードマウス (日本クレア社より購入) の背部皮下に、大腸癌細胞株 NCI-H508 を腫瘍細胞の生着性を高めるマウス悪性肉腫からなるマトリジェル (ベクトン・ディキンソン・バイオサイエンス社製) と 1:1 の容量になるように、 1×10^7 /マウス個体で移植した。移植後 1、4 及び 7 日後に 10 匹 1 群 (Vehicle 投与群は、12 匹 1 群) として、担癌マウスの腹腔内に、recN26 及び recM165 抗体 10 及び $100 \mu\text{g}$ /マウス個体 ($200 \mu\text{l}$ の 1%ヌードマウス血清含有 PBS に溶解したもの) を投与し、移植後 11、18、28、36、43、50、57、64 日後の腫瘍の大きさを測定した。

以上の実験の結果を図 7E に示す。図 7E 中、N26-10 は recN26 抗体 ($10 \mu\text{g}$ /匹投与) を、N26-100 は recN26 抗体 ($100 \mu\text{g}$ /匹投与) を、M165-10 は recM165 抗体 ($10 \mu\text{g}$ /匹投与) を、M165-100 は recM165 抗体 ($100 \mu\text{g}$ /匹投与) を示す。NCI-H508 細胞株を移植した系では、recN26 抗体を $10 \mu\text{g}$ /マウス個体で投与した群では、Vehicle 投与群と比較して、移植後 11、18、36、43 日後に腫瘍を有意に抑制することが認められた ($p < 0.05$)。また、 $100 \mu\text{g}$ /マウス個体で投与した群では、Vehicle 投与群と比較して、移植後 11、18、28、36、50 日後に腫瘍を有意に抑制

することが認められた ($p < 0.05$)。一方、recM165 抗体を $10 \mu\text{g}$ /マウス個体で投与した群では、Vehicle 投与群と比較して、移植後 11、18 日後に腫瘍を有意に抑制することが認められた ($p < 0.05$)。また、 $100 \mu\text{g}$ /マウス個体で投与した群では、Vehicle 投与群と比較して、移植後全ての測定日において腫瘍を有意に抑制することが認められた ($p < 0.05$)。

(M10 及び Q54 組換え型抗体の NCI-H508 細胞株を使用したときの抗腫瘍効果)

6 週齢の Balb/c ノードマウス (日本クレア社より購入) の背部皮下に、大腸癌細胞株 NCI-H508 を腫瘍細胞の生着性を高めるマウス悪性肉腫からなるマトリジェル (ベクトン・ディキンソン・バイオサイエンス社製) と 1:1 の容量になるように、 1×10^7 /マウス個体で移植した。移植後 1、4 及び 7 日後に 10 匹 1 群として、担癌マウスの腹腔内に、recM10 及び recQ54 抗体 10 及び $100 \mu\text{g}$ /マウス個体 ($200 \mu\text{l}$ の 1% ノードマウス血清含有 PBS に溶解したもの) を投与し、移植後 14、21、28、35、42、49、56、63 日後の腫瘍の大きさを測定した。

以上の実験の結果を図 7F に示す。図 7F 中、M10-10 は recM10 抗体 ($10 \mu\text{g}$ /匹投与) を、M10-100 は recM10 抗体 ($100 \mu\text{g}$ /匹投与) を、Q54-10 は recQ54 抗体 ($10 \mu\text{g}$ /匹投与) を、Q54-100 は recQ54 抗体 ($100 \mu\text{g}$ /匹投与) を示す。NCI-H508 細胞株を移植した系では、recM10 抗体を $10 \mu\text{g}$ /マウス個体で投与した群では、Vehicle 投与群と比較して、移植後 14、21、28、42、49、56 日後に腫瘍を有意に抑制することが認められた ($p < 0.05$)。また、 $100 \mu\text{g}$ /マウス個体で投与した群では、Vehicle 投与群と比較して、移植後 14、21、28、35、42、49、56 日後に腫瘍を有意に抑制することが認められた ($p < 0.05$)。一方、recQ54 抗体を $10 \mu\text{g}$ /マウス個体で投与した群では、Vehicle 投与群と比較して、移植後 28、42 日後に腫瘍を有意に抑制することが認められた ($p < 0.05$)。また、 $100 \mu\text{g}$ /マウス個体で投与した群では、Vehicle 投与群と比較して、移植後 14、21、28、35、42、56 日後に腫瘍を有意に抑制することが認められた ($p < 0.05$)。

本明細書に引用されたすべての刊行物は、その内容の全体を本明細書に取り込むものとする。また、添付の請求の範囲に記載される技術思想及び発明の範囲を逸脱しない範囲内で本発明の種々の変形及び変更が可能であることは当業者には

容易に理解されるであろう。本発明はこのような変形及び変更をも包含することを意図している。

産業上の利用可能性

本発明により、A33 を発現している細胞に起因する疾患に対する予防又は治療剤、特に悪性腫瘍治療薬として A33 多型を有する患者にも有用である分子が提供された。

現在 A33 の mRNA には 9 つの多型が知られているが、そのうちの 7 つは非翻訳領域における多型である。また、残りの 2 つのうちの 1 つは 3 番目のコドンにおける多型であるためアミノ酸置換をしないサイレントミューテーションである。また、残りの 2 つのうちのもう 1 つはアミノ酸置換を伴う多型であるがシグナル配列内にある。以上のことから、本抗体は、A33 の多型にかかわらず治療、予防剤に有効である。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

請求の範囲

1. A33 に結合するヒト抗体またはその機能的断片。
2. 抗体重鎖定常領域のクラスが IgG である、請求項 1 に記載のヒト抗体またはその機能的断片。
3. IgG のサブクラスが IgG1 である、請求項 2 に記載のヒト抗体またはその機能的断片。
4. 以下の (a) ～ (g) からなる群から選択されるハイブリドーマにより產生される、請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載のヒト抗体またはその機能的断片。
 - (a) M10 (受託番号 : FERM BP-10107)、
 - (b) M96 (受託番号 : FERM BP-10108)、
 - (c) M165 (受託番号 : FERM BP-10106)、
 - (d) N26 (受託番号 : FERM BP-10109)、
 - (e) Q47 (受託番号 : FERM BP-10104)、
 - (f) Q54 (受託番号 : FERM BP-10105) および
 - (g) R5 (受託番号 : FERM BP-10103)
5. 以下の (a) ～ (g) からなる群から選択されるハイブリドーマにより產生される抗体が認識するエピトープと同じエピトープを認識する、請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載のヒト抗体またはその機能的断片。
 - (a) M10 (受託番号 : FERM BP-10107)、
 - (b) M96 (受託番号 : FERM BP-10108)、
 - (c) M165 (受託番号 : FERM BP-10106)、
 - (d) N26 (受託番号 : FERM BP-10109)、
 - (e) Q47 (受託番号 : FERM BP-10104)、
 - (f) Q54 (受託番号 : FERM BP-10105) および
 - (g) R5 (受託番号 : FERM BP-10103)
6. 以下の (a) ～ (g) からなる群から選択されるハイブリドーマにより產生される抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域を有する、請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載のヒト抗体またはその機能的断片。

- (a) M10 (受託番号：FERM BP-10107)、
- (b) M96 (受託番号：FERM BP-10108)、
- (c) M165 (受託番号：FERM BP-10106)、
- (d) N26 (受託番号：FERM BP-10109)、
- (e) Q47 (受託番号：FERM BP-10104)、
- (f) Q54 (受託番号：FERM BP-10105) および
- (g) R5 (受託番号：FERM BP-10103)

7. 以下の (h) ～ (o) からなる群から選択される重鎖可変領域および軽鎖可変領域を有する、請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載のヒト抗体またはその機能的断片。

- (h) 配列番号 23 で示される重鎖アミノ酸配列の可変領域および配列番号 25 で示される軽鎖アミノ酸配列の可変領域、
- (i) 配列番号 27 で示される重鎖アミノ酸配列の可変領域および配列番号 29 で示される軽鎖アミノ酸配列の可変領域、
- (j) 配列番号 31 で示される重鎖アミノ酸配列の可変領域および配列番号 33 で示される軽鎖アミノ酸配列の可変領域、
- (k) 配列番号 35 で示される重鎖アミノ酸配列の可変領域および配列番号 37 で示される軽鎖アミノ酸配列の可変領域、
- (l) 配列番号 39 で示される重鎖アミノ酸配列の可変領域および配列番号 41 で示される軽鎖アミノ酸配列の可変領域、
- (m) 配列番号 43 で示される重鎖アミノ酸配列の可変領域および配列番号 45 で示される軽鎖アミノ酸配列の可変領域、
- (n) 配列番号 47 で示される重鎖アミノ酸配列の可変領域および配列番号 49 で示される軽鎖アミノ酸配列の可変領域および
- (o) 配列番号 51 で示される重鎖アミノ酸配列の可変領域および配列番号 53 で示される軽鎖アミノ酸配列の可変領域

8. 請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載のヒト抗体またはその機能的断片を有効成分とする、医薬組成物。

9. 請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載のヒト抗体またはその機能的断片を

有効成分とする、腫瘍の予防または治療剤。

10. 腫瘍が、A33 を発現している癌細胞を含む腫瘍である、請求項9に記載の腫瘍の予防または治療剤。

11. 腫瘍が、大腸癌、結腸癌、直腸癌、胃癌、膵臓癌、乳癌、黒色腫、腎細胞癌、子宮頸癌、子宮内膜癌、卵巣癌、食道癌、前立腺癌、睾丸癌および中皮癌からなる群から選択される、請求項9または10に記載の腫瘍の予防または治療剤。

12. 以下の(a)～(g)からなる群から選択されるハイブリドーマ。

- (a) M10 (受託番号: FERM BP-10107)、
- (b) M96 (受託番号: FERM BP-10108)、
- (c) M165 (受託番号: FERM BP-10106)、
- (d) N26 (受託番号: FERM BP-10109)、
- (e) Q47 (受託番号: FERM BP-10104)、
- (f) Q54 (受託番号: FERM BP-10105) および
- (g) R5 (受託番号: FERM BP-10103)

13. 請求項12に記載のハイブリドーマを培養し、培養物から抗体を取得することを特徴とする、抗体の製造方法。

14. 請求項12に記載のハイブリドーマから A33 に結合する抗体をコードする遺伝子を単離し、該遺伝子を有する発現ベクターを作製し、該発現ベクターを宿主に導入して、該宿主を培養し、培養物から該抗体を取得することを特徴とする、抗体の製造方法。

15. 請求項12に記載のハイブリドーマから A33 に結合する抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域をコードする遺伝子を単離し、該遺伝子を有する発現ベクターを作製し、該発現ベクターを宿主に導入して、該宿主を培養し、培養物から該抗体を取得することを特徴とする、抗体の製造方法。

16. 以下の(p)～(w)からなる群から選択される重鎖可変領域および軽鎖可変領域を有する発現ベクターを作製し、該発現ベクターを宿主に導入して、該宿主を培養し、培養物から該抗体を取得することを特徴とする、抗体の製造方法。

(p) 配列番号22で示される重鎖核酸配列の可変領域および配列番号24で示され

る軽鎖核酸配列の可変領域、

(q) 配列番号 26 で示される重鎖核酸配列の可変領域および配列番号 28 で示される軽鎖核酸配列の可変領域、

(r) 配列番号 30 で示される重鎖核酸配列の可変領域および配列番号 32 で示される軽鎖核酸配列の可変領域、

(s) 配列番号 34 で示される重鎖核酸配列の可変領域および配列番号 36 で示される軽鎖核酸配列の可変領域、

(t) 配列番号 38 で示される重鎖核酸配列の可変領域および配列番号 40 で示される軽鎖核酸配列の可変領域、

(u) 配列番号 42 で示される重鎖核酸配列の可変領域および配列番号 44 で示される軽鎖核酸配列の可変領域、

(v) 配列番号 46 で示される重鎖核酸配列の可変領域および配列番号 48 で示される軽鎖核酸配列の可変領域および

(w) 配列番号 50 で示される重鎖核酸配列の可変領域および配列番号 52 で示される軽鎖核酸配列の可変領域

17. 宿主が、大腸菌、酵母細胞、昆虫細胞、哺乳動物細胞、植物細胞、植物および哺乳動物からなる群から選択される、請求項 13～16 のいずれか 1 項に記載の製造方法。

図 1 A

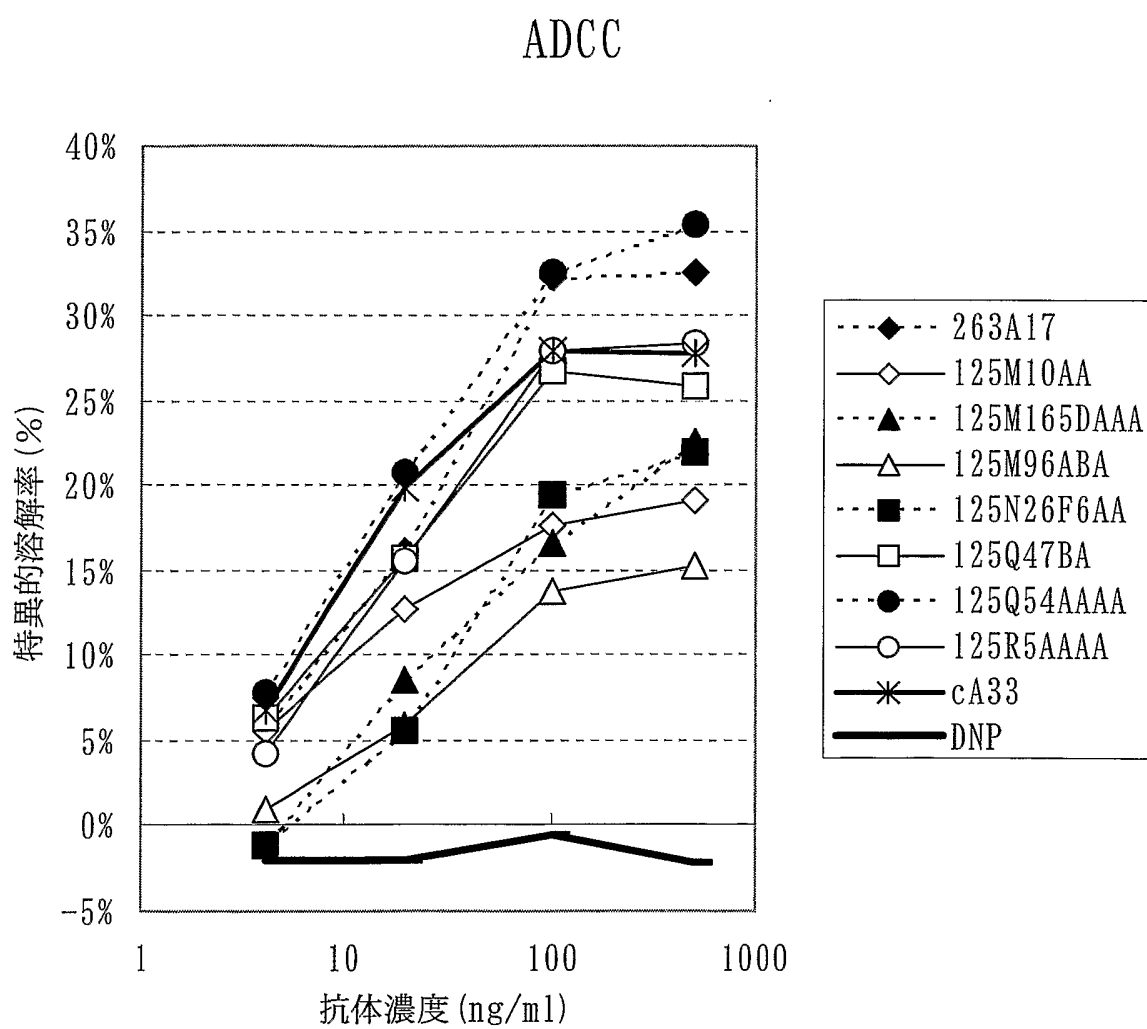


図 1 B

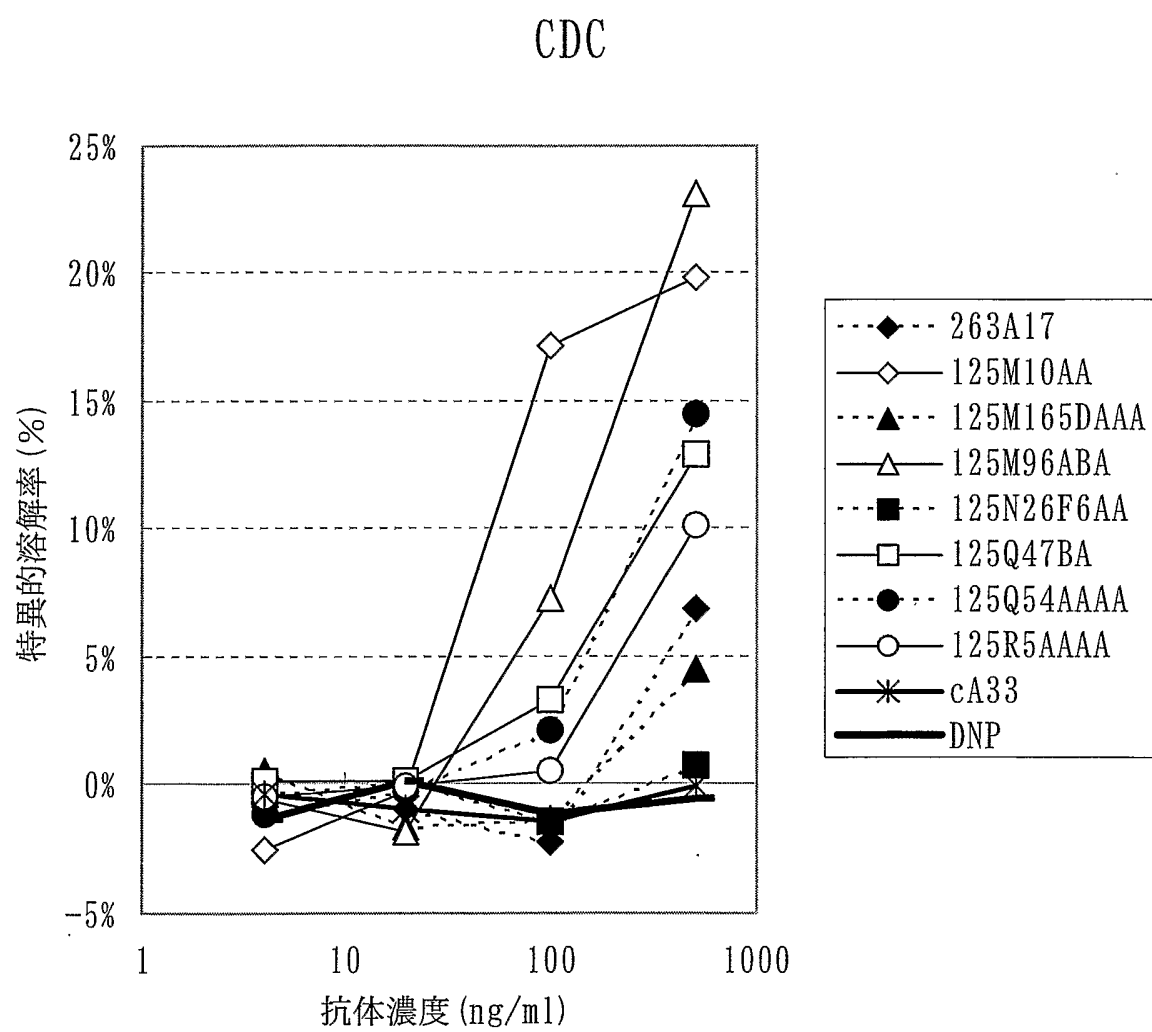


図 1 C

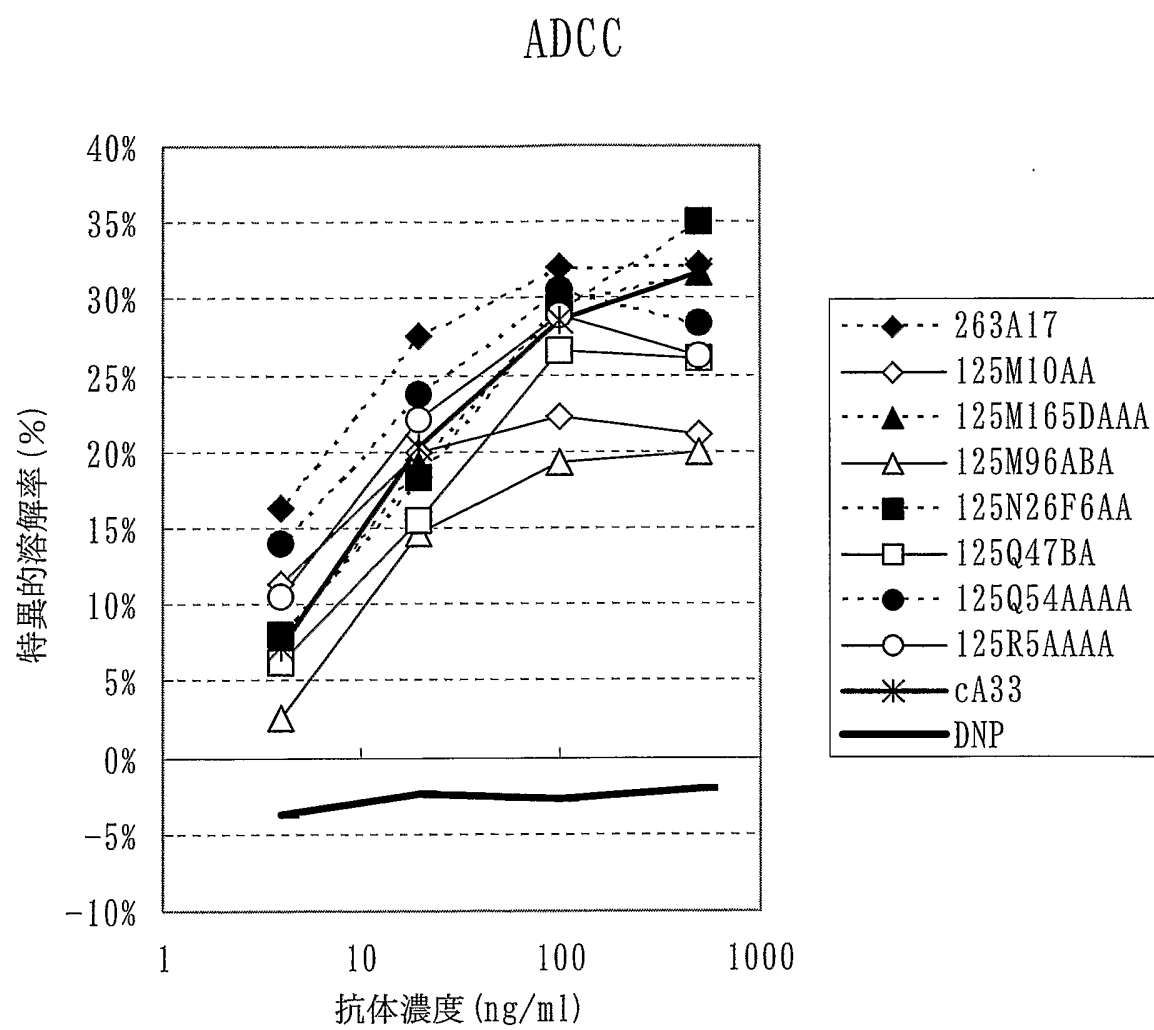


図 1 D

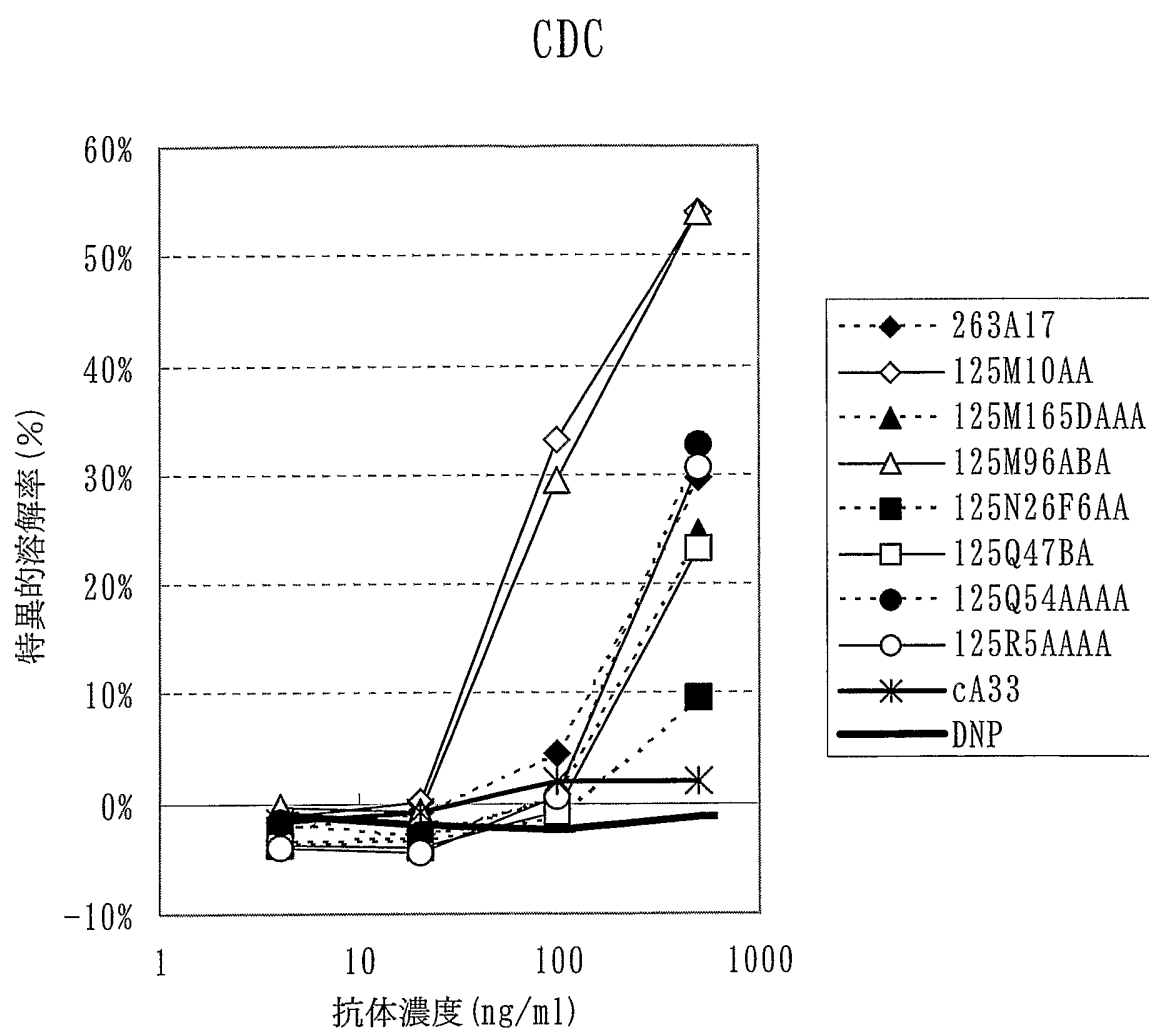


図 2 A

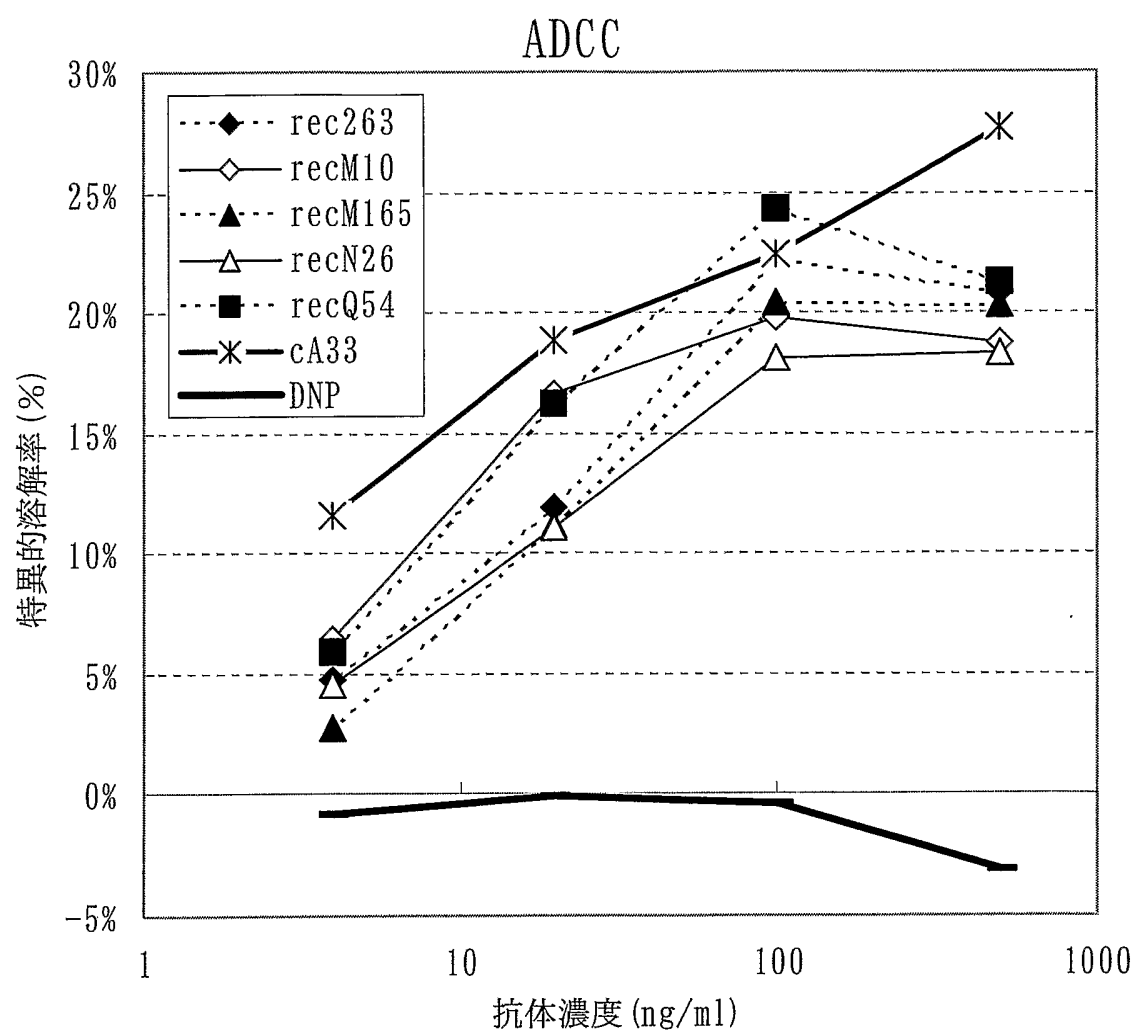


図 2 B

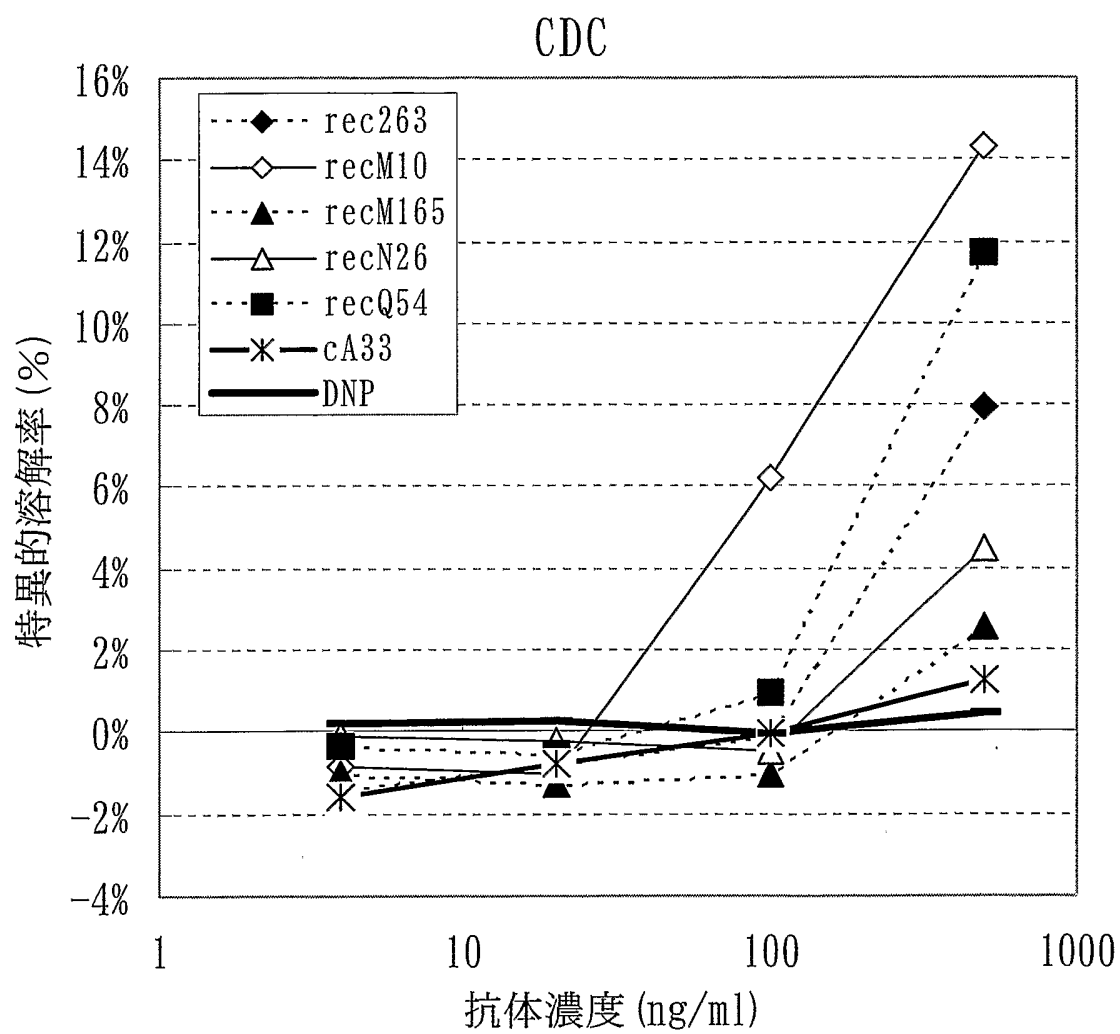


図 2 C

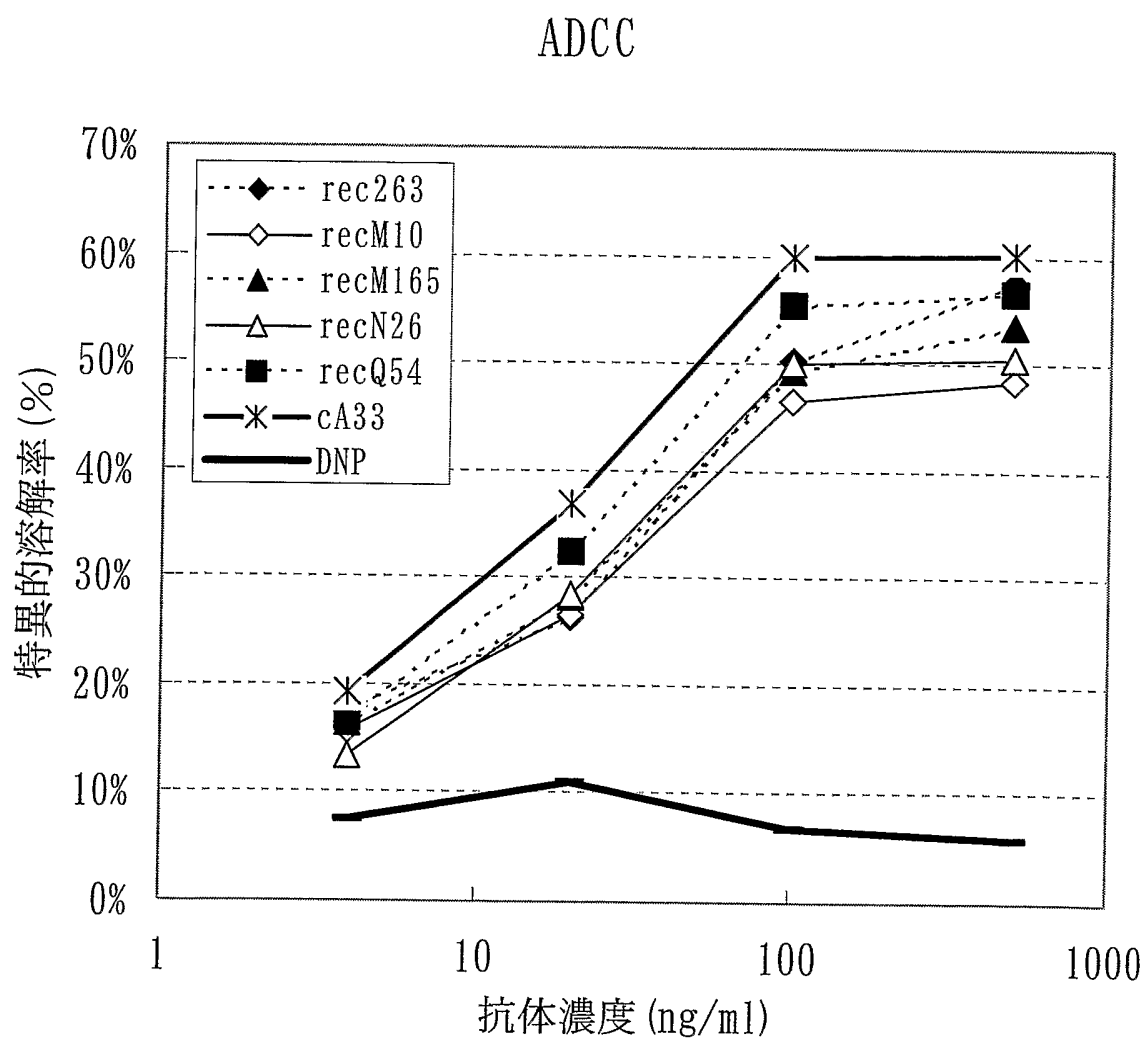
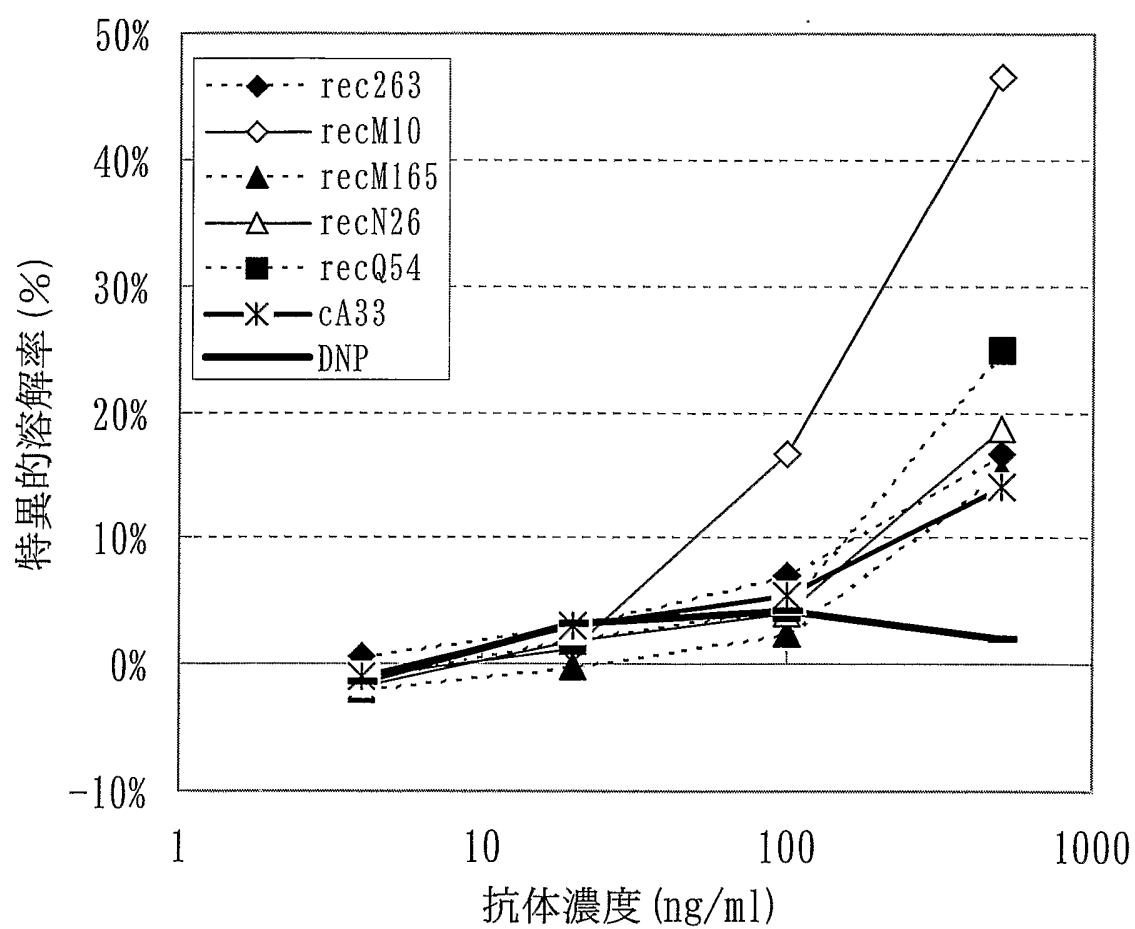
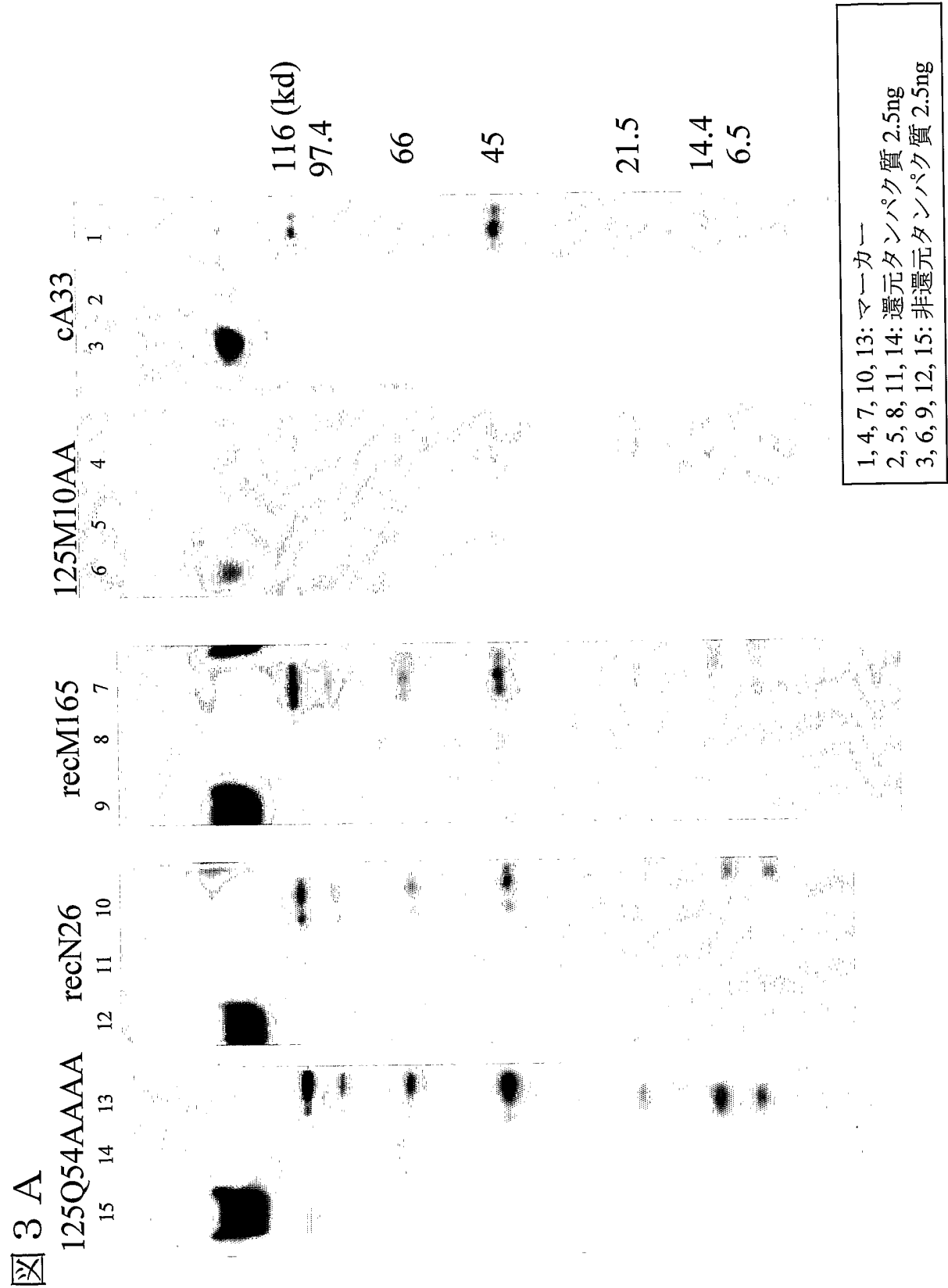


図 2 D

CDC





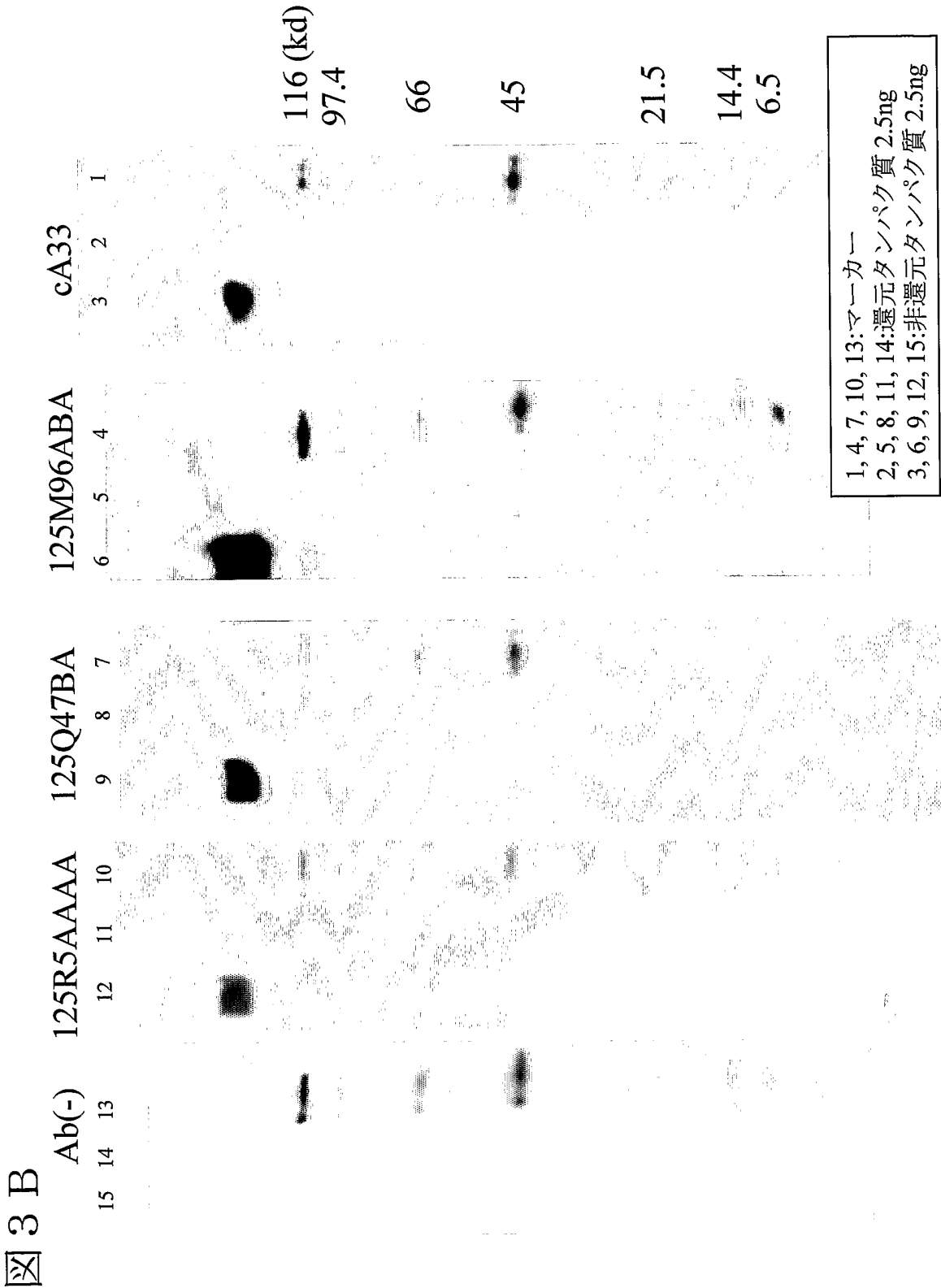


図 4

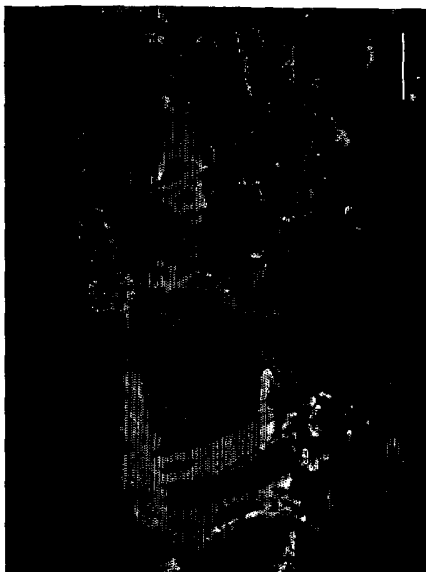
a) キメラ抗体トA33抗体



b) rec263



c) 125M10AA



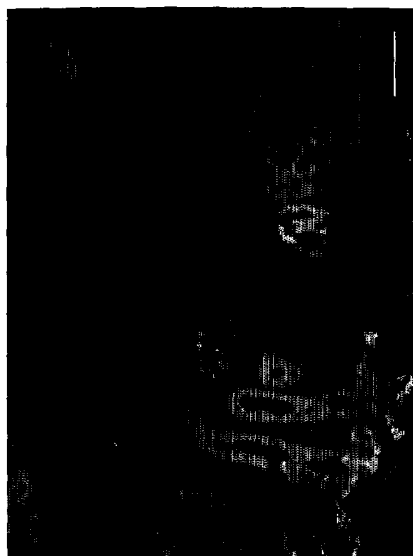
d) recM165



e) recN26



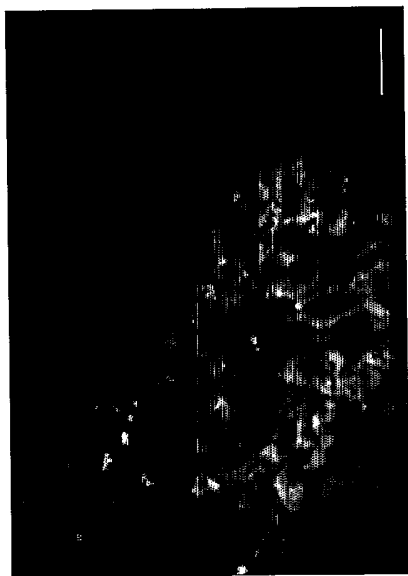
f) 125Q54AAA



Bar=200 μm

図 5

a) キメラ抗ヒトA33抗体



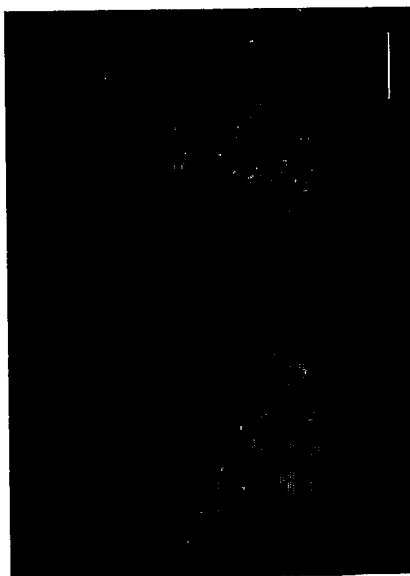
b) rec263



c) 125M10AA



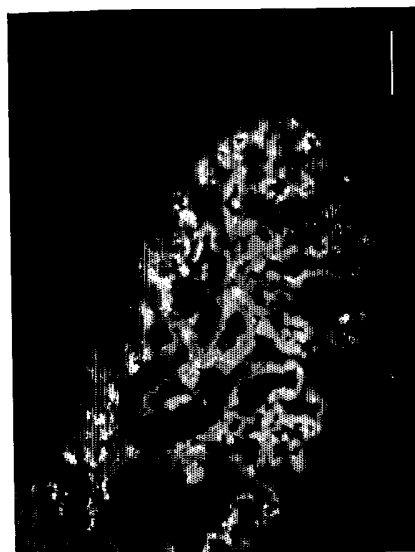
d) recM165



e) recN26



f) 125Q54AAA



Bar=200 μ m

図 6

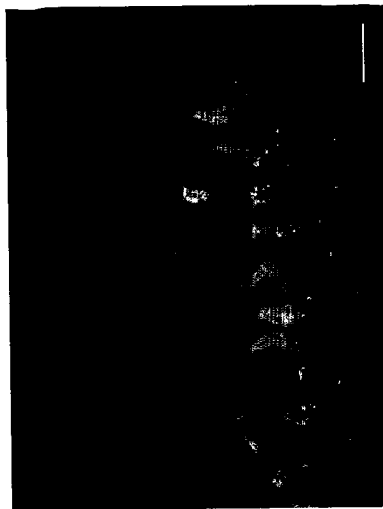
a) キメラ抗ヒトA33抗体



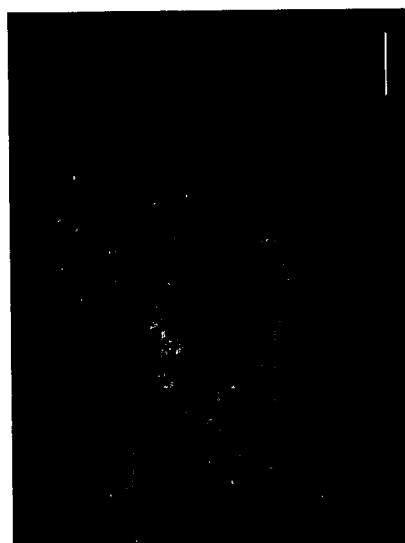
b) rec263



c) 125M10AA



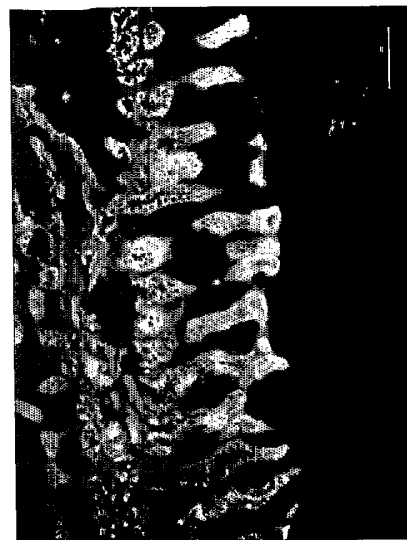
d) recM165



e) recN26



f) 125Q54AAA



Bar=200 μ m

図 7 A

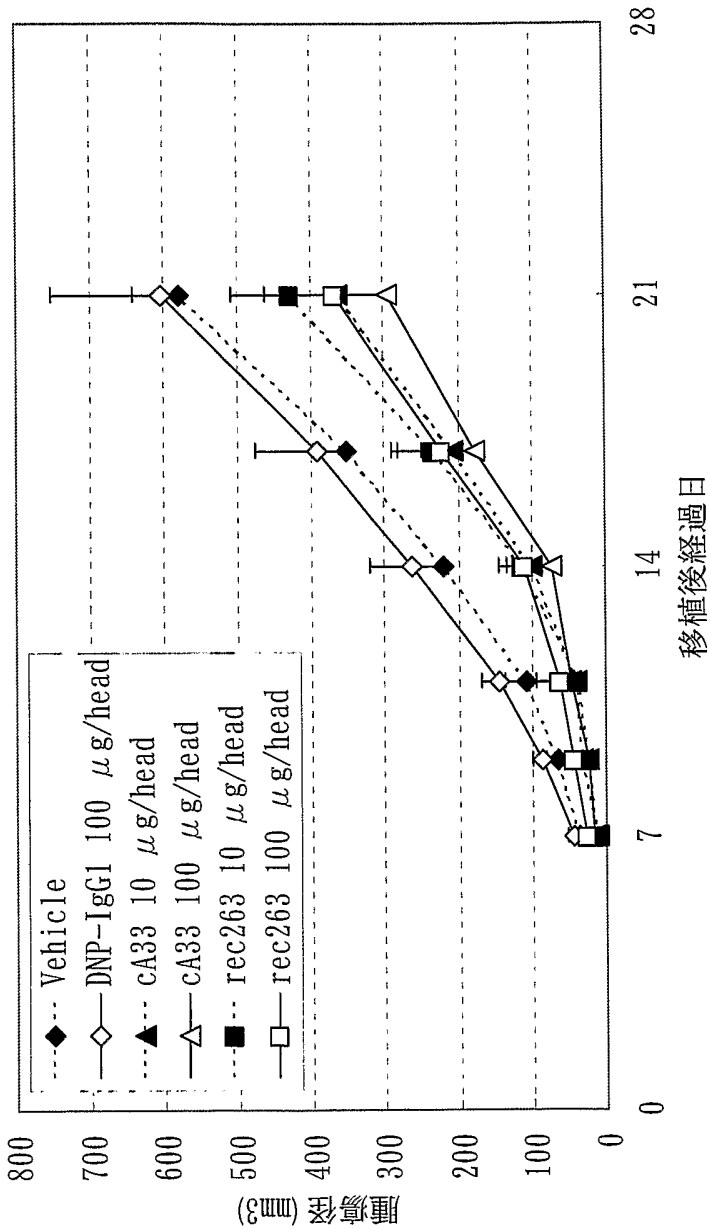


図 7 B

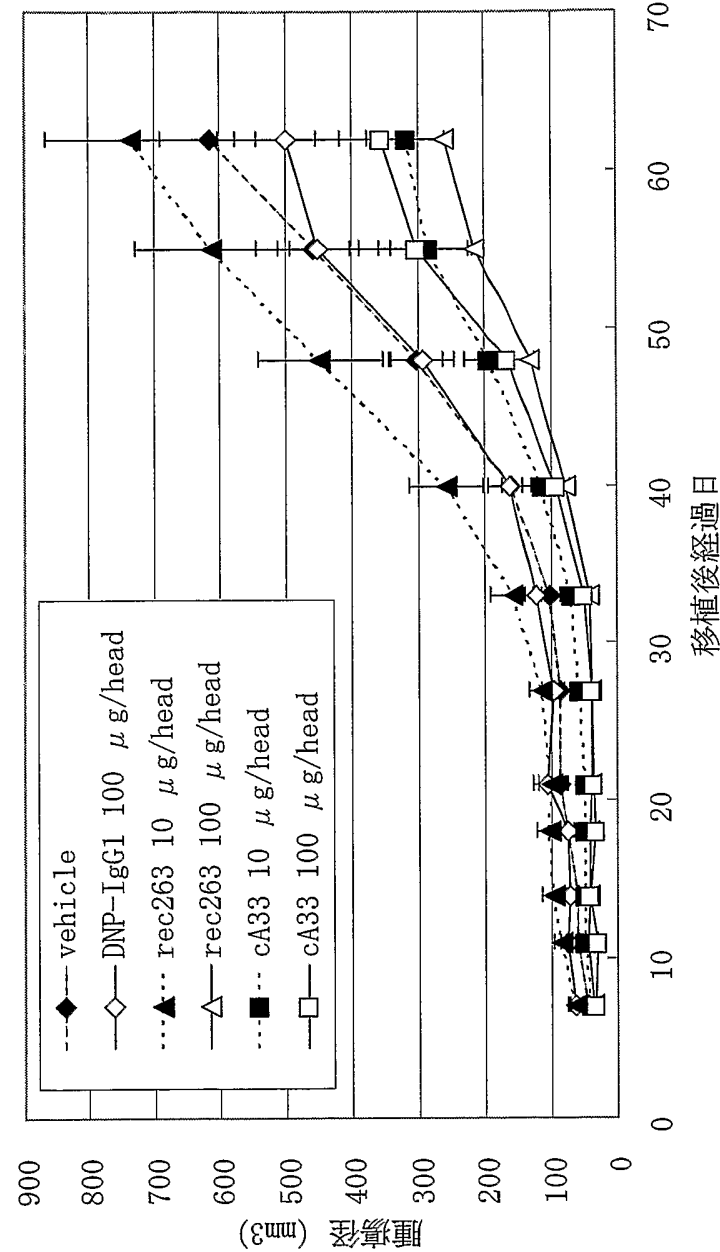
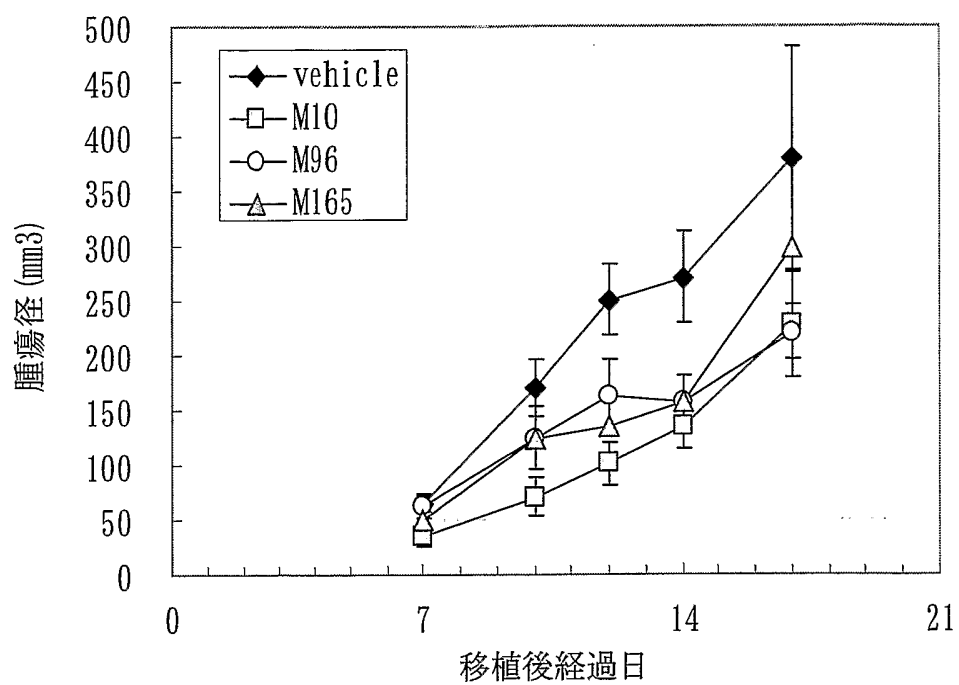


図 7 C

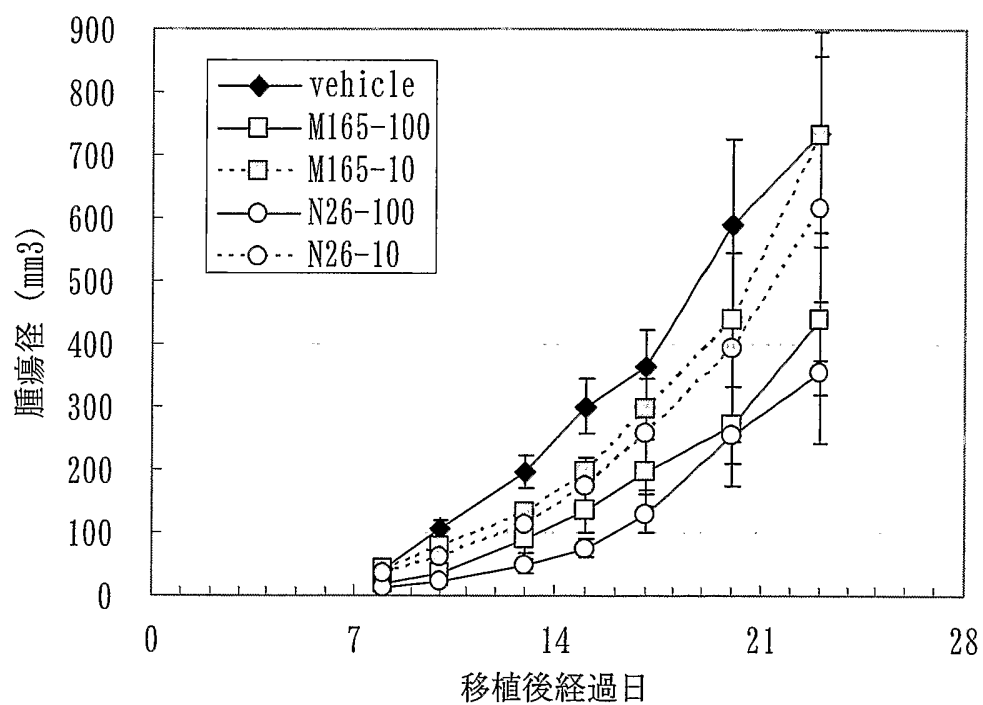


M10 : 125M10AA

M96 : 125M96ABA

M165 : 125M165DAAA

図 7 D



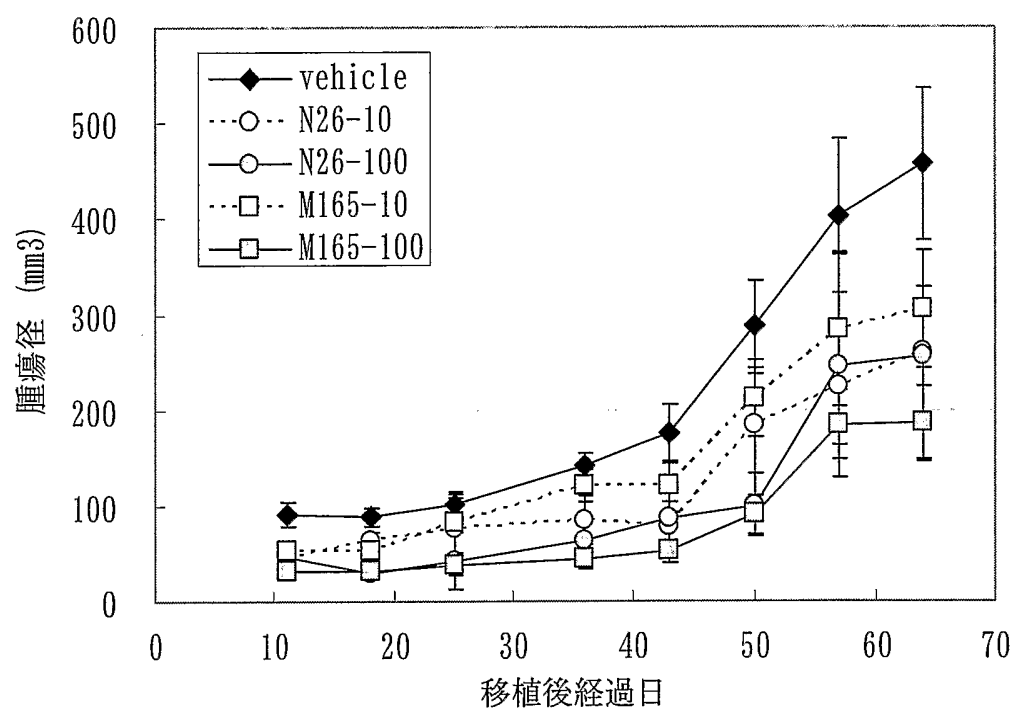
M165-10 : recM165-10 $\mu\text{g}/\text{head}$

M165-100 : recM165-100 $\mu\text{g}/\text{head}$

N26-10 : recN26-10 $\mu\text{g}/\text{head}$

N26-100 : recN26-100 $\mu\text{g}/\text{head}$

図 7 E



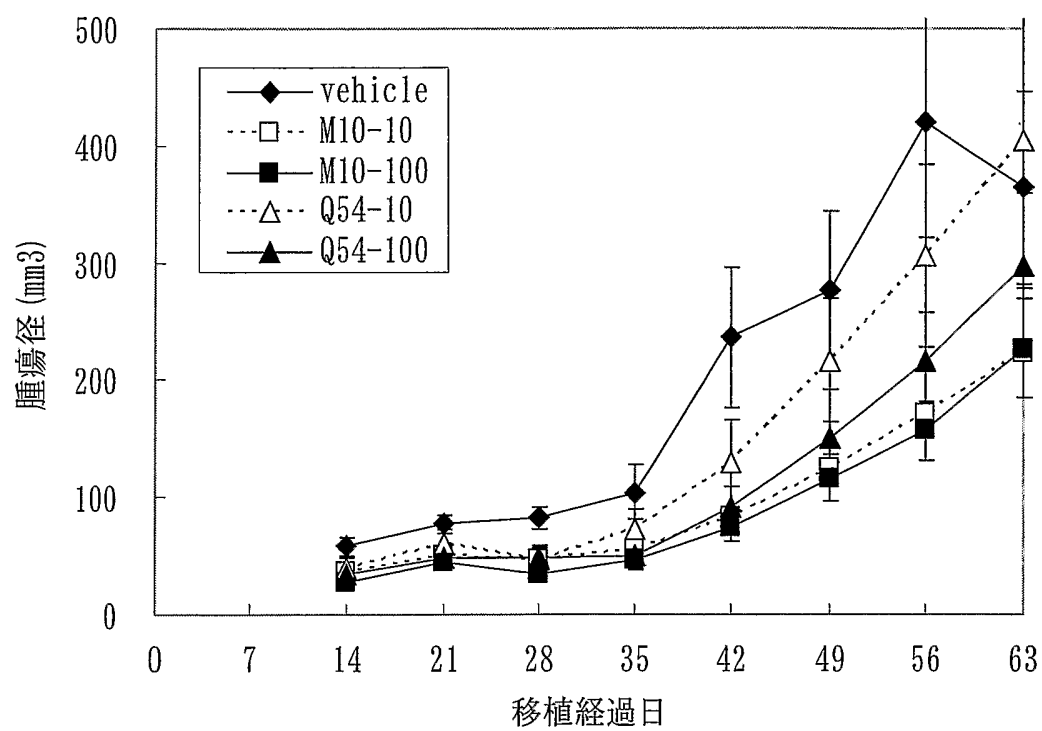
N26-10 : recN26-10 $\mu\text{g}/\text{head}$

N26-100 : recN26-100 $\mu\text{g}/\text{head}$

M165-10 : recM165-10 $\mu\text{g}/\text{head}$

M165-100 : recM165-100 $\mu\text{g}/\text{head}$

図 7 F



M10-10 : recM10-10 $\mu\text{g}/\text{head}$

M10-100 : recM10-100 $\mu\text{g}/\text{head}$

Q54-10 : recQ54-10 $\mu\text{g}/\text{head}$

Q54-100 : recQ54-100 $\mu\text{g}/\text{head}$

SEQUENCE LISTING

<110> KIRIN BEER KABUSHIKI KAISHA

<120> Anti A33 antibody

<130> PH-2569-PCT

<140>

<141>

<150> JP 2004/259090

<151> 2004-09-06

<160> 89

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 1

gcccttggtg ctagctgaag agacggtgac cagagtcctt tg

42

<210> 2

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 2

gtgcacgccg ctggtcaggg cgcctg

26

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 3

gtaaaacgac ggccagtg

18

<210> 4

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 4

caggaaacag ctatgac

17

<210> 5

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 5

agagagaggt cgaccaccca tgaactttgg gctgagctta gtt

43

<210> 6

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 6

agagagagag atctctcacc atgggcatca agatggagtt tcag

44

<210> 7

<211> 414

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

```

atgaactttg ggctgagctt gattttcctt gtcctaattt taaaagggtgt ccagtgtgaa 60
gtgaagctgg tggagtctgg gggaggctta gtgaagcctg gagggtcctt gaaactctcc 120
tgtgcagcct ctggattcgc tttcagtacc tatgacatgt cttgggttcg ccagactccg 180
gagaagaggg tggagtgggt cgcaaccatt agtagtggtg gtagttacac ctactattta 240
gacagtgtga agggccgatt caccatctcc agagacagtg ccaggaacac cctataacctg 300
caaatgagca gtctgaggtc tgaggacacg gccttgtatt actgtgcacc gactacggta 360
gtcccgtttg ctactggggg ccaagggact ctggtcaccg tctcttcagc tagc      414

```

<210> 8

<211> 138

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

```

Met Asn Phe Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Val Leu Ile Leu Lys Gly
  1             5             10             15

```

```

Val Gln Cys Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys
          20             25             30

```

```

Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe
      35             40             45

```

Ser Thr Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu
 50 55 60

Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Leu
 65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Ala Arg Asn
 85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Pro Thr Thr Val Val Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 115 120 125

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 130 135

<210> 9

<211> 396

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

atgggcatca agatggagt tcagaccag gtctttgtat tegtgttgct ctggttgtct 60
 ggtgttgatg gagacattgt gatgaccag tctcaaaaat tcatgtccac atcagtagga 120
 gacagggtca gcatcacctg caaggccagt cagaatgttc gtactgttgt agcctggtat 180

caacagaaac cagggcagtc tcctaaaaca ctgatttact tggcctccaa ccggcacact 240
 ggagtccttg atcgcttcac aggcagtgga tctgggacag atttcactct caccattagc 300
 aatgtgcaat ctgaagacct ggcagattat ttctgtctgc aacattggag ttatcctctc 360
 acgttcggct cggggacaaa gttaggaagta aaacgt 396

<210> 10

<211> 132

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Met Gly Ile Lys Met Glu Phe Gln Thr Gln Val Phe Val Phe Val Leu

1 5 10 15

Leu Trp Leu Ser Gly Val Asp Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln

20 25 30

Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys

35 40 45

Ala Ser Gln Asn Val Arg Thr Val Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro

50 55 60

Gly Gln Ser Pro Lys Thr Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Arg His Thr

65 70 75 80

Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

85 90 95

Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys
 100 105 110

Leu Gln His Trp Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu
 115 120 125

Glu Val Lys Arg
 130

<210> 11

<211> 2793

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 11

ctaccccttt gtgagcagtc taggactttg tacacctgtt aagtagggag aaggcagggg 60
 aggtggctgg ttttaagggga acttgagga agtagggaag actcctcttg ggacctttgg 120
 agtaggtgac acatgagccc agccccagct cacctgccaa tccagctgag gagctcacct 180
 gccaatccag ctgaggctgg gcagaggtgg gtgagaagag ggaaaattgc agggacctcc 240
 agttgggcca ggccagaagc tgcctgtagct ttaaccagac agctcagacc tgtctggagg 300
 ctgccagtga caggttaggt ttagggcaga gaagaagcaa gaccatgggt gggaagatgt 360
 ggccctgtgt gtggacactc tgtgcagtca gggtgaccgt cgatgccatc tctgtggaaa 420

ctccgcagga cgttcttcgg gcttcgcagg gaaagagtgt caccctgccc tgcacctacc 480
 acatttcac ctccagtga gagggactta ttcaatggga taagctcctc ctactcata 540
 cggaagggt ggtcatctgg ccgttttcaa aaaaaacta catccatggt gagctttata 600
 agaatcgct cagcatatcc aacaatgctg agcagtcga tgccctccatc accattgatc 660

agctgacat ggctgacaac ggcacctacg agtggtctgt ctgctgatg tcagacctgg 720
agggcaacac caagtcacgt gtccgcctgt tggctctgt gccacctcc aaaccagaat 780
gcggcatcga gggagagacc ataattggga acaacatcca gctgacctgc caatcaaagg 840
agggtcacc aaccttcag tacagctgga agaggtaaaa catcctgaat caggagcagc 900
ccctggccca gccagcctca ggtcagcctg tctccctgaa gaatatctcc acagacacat 960
cgggttacta catctgtacc tccagcaatg aggaggggac gcagttctgc aacatcacgg 1020
tggccgtcag atctccctcc atgaacgtgg ccctgtatgt gggcatcgcg gtgggcgtgg 1080
ttgcagccct cattatcatt ggcatcatca tctactgtcg ctgctgccga gggaaggacg 1140
acaacactga agacaaggag gatgcaaggc cgaaccggga agcctatgag gagccaccag 1200
agcagctaag agaactttcc agagagaggg aggaggagga tgactacagg caagaagagc 1260
agaggagcac tgggcgtgaa tccccggacc acctcgacca gtgacaggcc agcagcagag 1320
ggcggcggag gaagggttag gggttcattc tcccgttcc tggcctccct tctcctttct 1380
aagccctgtt ctctgtccc tccatcccag acattgatgg ggacatttct tccccagigt 1440
cagctgtggg gaacatggct ggcctggtaa gggggtccct gtgctgatcc tgcctgacct 1500
actgtcctgt gaagtaacct ctctggctg tgacacctgg tgcgggcctg gccctcactc 1560
aagaccaggc tgcagcctcc acttccctcg tagttggcag gagctcctgg aagcacagcg 1620
ctgagcatgg ggcgtctcca ctcaagaact tccaggagg cgatgccagc ctgggggggt 1680
gggggcgtgc ctgctcacct gtgtgccag cacctggagg ggcaccaggt ggagggtttg 1740
cactccacac atctttcttg aatgaatgaa agaataagt agtatgctg ggccctgcat 1800
tggcctggcc tccagctccc actccctttc caacctcact tccgtagct gccagtatgt 1860
tccaaacctt cctgggaagg ccacctcca ctctgtctgc acaggccctg gggagctttt 1920
gcccacacac ttccatctc tgcctgtcaa tatgtacct gtccctccag gcccatctca 1980
aatcacaagg atttctctaa ccctatccta attgtccaca tacgtggaaa caatcctgtt 2040
actctgtccc acgtccaatc atgggccaca aggcacagtc ttctgagcga gtgctctcac 2100
tgtattagag cgccagctcc ttggggcagg gcctgggcct catggctttt gctttccctg 2160
aagccctagt agctggcgcc catcctagtg ggcacttaag ctttaattggg gaaactgctt 2220
tgattggttg tgccttccct tctctggtct ccttgagatg atcgtagaca cagggaigat 2280
tcccaccaa acccagctat tcattcagtg agttaaacac gaattgattt aaagtgaaca 2340
cacacaaggg agcttgcttg cagatggtct gagttcttgt gtcctggtaa ttctctcca 2400
ggccagaata attggcatgt ctctcaacc cacatggggg tcttggttgt tctgcatcc 2460

cgataacctca gccctggccc tgcccagccc atttgggctc tggttttctg gtggggctgt 2520
 cctgctgccc tcccacagcc tccttctgtt tgtcgagcat ttcttctact cttagagagct 2580
 caggcagcgt tagggctgct taggtctcat ggaccagtgg ctggtctcac ccaactgcag 2640
 ttactattg ctatcttttc tggatgatca gaaaaataat tccataaatc tattgtctac 2700
 ttgcgatttt ttaaaaaatg tataatttta tatatatgtt taaatccttt gcttcattcc 2760
 aaatgctttc agtaataata aaattgtggg tgg 2793

<210> 12

<211> 319

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Met Val Gly Lys Met Trp Pro Val Leu Trp Thr Leu Cys Ala Val Arg
 1 5 10 15

Val Thr Val Asp Ala Ile Ser Val Glu Thr Pro Gln Asp Val Leu Arg
 20 25 30

Ala Ser Gln Gly Lys Ser Val Thr Leu Pro Cys Thr Tyr His Thr Ser
 35 40 45

Thr Ser Ser Arg Glu Gly Leu Ile Gln Trp Asp Lys Leu Leu Leu Thr
 50 55 60

His Thr Glu Arg Val Val Ile Trp Pro Phe Ser Asn Lys Asn Tyr Ile
 65 70 75 80

His Gly Glu Leu Tyr Lys Asn Arg Val Ser Ile Ser Asn Asn Ala Glu
85 90 95

Gln Ser Asp Ala Ser Ile Thr Ile Asp Gln Leu Thr Met Ala Asp Asn
100 105 110

Gly Thr Tyr Glu Cys Ser Val Ser Leu Met Ser Asp Leu Glu Gly Asn
115 120 125

Thr Lys Ser Arg Val Arg Leu Leu Val Leu Val Pro Pro Ser Lys Pro
130 135 140

Glu Cys Gly Ile Glu Gly Glu Thr Ile Ile Gly Asn Asn Ile Gln Leu
145 150 155 160

Thr Cys Gln Ser Lys Glu Gly Ser Pro Thr Pro Gln Tyr Ser Trp Lys
165 170 175

Arg Tyr Asn Ile Leu Asn Gln Glu Gln Pro Leu Ala Gln Pro Ala Ser
180 185 190

Gly Gln Pro Val Ser Leu Lys Asn Ile Ser Thr Asp Thr Ser Gly Tyr
195 200 205

Tyr Ile Cys Thr Ser Ser Asn Glu Glu Gly Thr Gln Phe Cys Asn Ile
210 215 220

Thr Val Ala Val Arg Ser Pro Ser Met Asn Val Ala Leu Tyr Val Gly
225 230 235 240

Ile Ala Val Gly Val Val Ala Ala Leu Ile Ile Ile Gly Ile Ile Ile
245 250 255

Tyr Cys Cys Cys Cys Arg Gly Lys Asp Asp Asn Thr Glu Asp Lys Glu
260 265 270

Asp Ala Arg Pro Asn Arg Glu Ala Tyr Glu Glu Pro Pro Glu Gln Leu
275 280 285

Arg Glu Leu Ser Arg Glu Arg Glu Glu Glu Asp Asp Tyr Arg Gln Glu
290 295 300

Glu Gln Arg Ser Thr Gly Arg Glu Ser Pro Asp His Leu Asp Gln
305 310 315

<210> 13

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 13

gcagacgaat tcaagaccat ggtggggaag at

32

<210> 14

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 14

ctcgagcggc cgctctgctg ctggcctgtc actggtcgag gtg

43

<210> 15

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 15

ctcgagcggc cgccagttca tggagggaga tctgacg

37

<210> 16

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 16

tcttgtccac cttggtgttg ctgggcttgt g

31

<210> 17

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 17

gttgaagctc tttgtgacgg gcgagc

26

<210> 18

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 18

tgcacgccgc tggtcagggc gcctgagttc c

31

<210> 19

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 19

aggcacacaa cagaggcagt tccagatttc

30

<210> 20

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 20

gctggagggc acggtcacca cgctg

25

<210> 21

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 21

ggtgccaggg ggaagaccga tgg

23

<210> 22

<211> 435

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 22

atggagtttg ggctgagctg gctttttctt gtggctatatt taaaagggtg ccagtgtgag 60
gtgcagttgt tggagtctgg gggaggcttg gtacagcctg gggggtcct gagactctcc 120
tgtgcagcct ctggattcac ctttagcagc tatgccatga gctggatccg ccaggctcca 180
gggaaggggc tggagtgggt ctgagctatt agtgctagtg gtggtagcac atactacgca 240
gactccgiga agggccggtt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg 300
caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gccgtatatt actgtgcgaa agatcggata 360
gtgggagcta cgaactacta ctacggtatg gacgtctggg gccaaggac cacggtcacc 420
gtctcctcag ctagc 435

<210> 23

<211> 145

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Ala Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala
65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Arg Ile Val Gly Ala Thr Asn Tyr Tyr Tyr
115 120 125

Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala
130 135 140

Ser

145

<210> 24

<211> 390

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 24

```

atggacatga gggccccgc tcagctcctg gggctcctgc tgctctggtt cccaggttcc 60
agatgcgaca tccagatgac ccagctcca cctccgigt ctgcatcigt aggagacaga 120
gtcaccatca cttgtcgggc gagtcagggt attagcagct ggtagcctg gtaacagcat 180
aaaccagga aagccccaaa gctcctgac tatggatcat ccagtttgca aagtggggtc 240
ccatcaaggt tcagcggcag tggatctggg acagatttca ctctcaccat cagcagcctg 300
cagcctgaag attttgcaac ttactattgt caacaggcta atagtttccc tatcaccttc 360
ggccaaggga cagcactgga gattaaacgt                                     390

```

<210> 25

<211> 130

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp

1

5

10

15

Phe Pro Gly Ser Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Pro Ser
20 25 30

Val Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
35 40 45

Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys
50 55 60

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val
65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
85 90 95

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
100 105 110

Ala Asn Ser Phe Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile
115 120 125

Lys Arg
130

<210> 26

<211> 447

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 26

atggatctca tgtgcaagaa aatgaagcac ctgtggttct tcctcctgct ggtggcggct 60
 cccagatggg tcctgtccca gctgcaggctg caggagtcgg gcccaggact ggtgaagcct 120
 tcggagaccc tgtccctcat ctgcacigtct tctgggtggct ccatcaggac cagtgggttac 180
 tactggggct ggttccgcca gccccagggt aagggtactgg agtggattgg gactagtcat 240
 aatagtggga gcacctacta caaccgtcc ctcaagagtc gagtcacat atccgtagac 300
 acgtccaaga accagttctc cctgaagctg aactctgtga ccgccgcaga cacggctgtg 360
 tattactgtg cgagacaagg ttacgatttt aaagtcaata tagacgtctg gggacaagggt 420
 accacgggtca ccgtctcctc agctagc 447

<210> 27

<211> 149

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

Met Asp Leu Met Cys Lys Lys Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu

1

5

10

15

Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp Val Leu Ser Gln Leu Gln Val Gln Glu

20

25

30

Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Ile Cys

35

40

45

Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Arg Thr Ser Gly Tyr Tyr Trp Gly Trp

50

55

60

Phe Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Thr Ser His

65 70 75 80
 Asn Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr
 85 90 95
 Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Asn Ser
 100 105 110
 Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gln Gly Tyr
 115 120 125
 Asp Phe Lys Val Asn Ile Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
 130 135 140
 Val Ser Ser Ala Ser
 145

<210> 28

<211> 384

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 28

atggaagccc cagctcagct tctcttcctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga 60
 gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 120
 ctctcctgca gggccagtca gagtgtagc agctacttag cctggtacca acagaaacct 180
 ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 240
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 300
 gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggccgctcac tttcggcgga 360

gggaccaagg tggagatcaa acga

384

<210> 29

<211> 128

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro

1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser

20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser

35 40 45

Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro

50 55 60

Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala

65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser

85 90 95

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser

100 105 110

Asn Trp Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 115 120 125

<210> 30

<211> 426

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 30

atggagtttg ggctgagctg ggttttcctc gttgctcttt taagagggtg ccagtgtcag 60
 gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcgtg gtccagcctg ggaggtccct gagactctcc 120
 tgtgcagcgt ctggattcac cttcagttat tatggcatgc actgggtccg ccagggtcca 180
 ggcaaggggc tggagtgggt ggcagttata tggatgatg gaagtaataa atactatgca 240
 gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaaaac gctgtatctg 300
 caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgagag agatgggcat 360
 agcagtggct ggggggactt ccagcactgg ggccaggga ccctggtcac cgtctcctca 420
 gctagc 426

<210> 31

<211> 142

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly

1 5 10 15
Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
 20 25 30
Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45
Ser Tyr Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
Glu Trp Val Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala
65 70 75 80
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Lys
 85 90 95
Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110
Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly His Ser Ser Gly Trp Gly Asp Phe Gln
 115 120 125
His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 130 135 140

<210> 32

<211> 384

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 32

```

atggaagccc cagctcagct tctcttcctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga 60
gaaatttgtt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 120
ctctcctgca gggccagtc gagtggttag agctcccttag cctggtagca acagaaacct 180
ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 240
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttactctca ccatcagcag cctagagcct 300
gaagattttg caatttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggctccgac gticggccaa 360
gggaccaagg tggaaatcaa acga                                     384

```

<210> 33

<211> 128

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

```

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
  1             5             10            15

```

```

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
      20             25            30

```

```

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
      35             40            45

```

```

Val Ser Ser Ser Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
      50             55            60

```

Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala
 65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 85 90 95

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Ile Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser
 100 105 110

Asn Trp Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 115 120 125

<210> 34

<211> 426

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 34

atgaagcacc tgtggttctt cctcctgctg gtggcggctc ccagatgggt cctgtcccaa 60
 ctgcagctgc aggagtcggg cccaggactg gtgaagcctt cggagaccct gtccctcacc 120
 tgcactgtct ctggtggctc catcagcact agtagttact actggggctg gatccgccag 180
 cccccggga agggcctgga atggattggg actatctatt ataatgggag cacctactac 240
 agcccgctcc tcaagagtcg agtcagtata tccgtagaca cgtccaagaa ccagttctcc 300
 ctgaagctga gctctgtgac cgccgcagac acgtctgtgt attactgtgc gagacaaggt 360
 tacgatatta aaatcaatat agacgtctgg ggccaaggga ccacggtcac cgtctcctca 420
 gctagc 426

<210> 35

<211> 142

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp

1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys

20 25 30

Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile

35 40 45

Ser Thr Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys

50 55 60

Gly Leu Glu Trp Ile Gly Thr Ile Tyr Tyr Asn Gly Ser Thr Tyr Tyr

65 70 75 80

Ser Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Ser Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys

85 90 95

Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ser

100 105 110

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gln Gly Tyr Asp Ile Lys Ile Asn Ile Asp

115 120 125

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 130 135 140

<210> 36

<211> 384

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 36

atggaagccc cagctcagct tctcttccct ctgctactct ggctcccaga taccaccgga 60
 gaaatttgtt tgacacagtc tccagccacc cigtctttgt ctccagggga aagagccacc 120
 ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agctacttag cctggtacca acagaaacct 180
 ggccaggctc ccaggctcct catctatgtt gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 240
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttactctca ccatcagcag cctagagcct 300
 gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggccgctcac ttctggcgga 360
 gggaccaagg tggagatcaa acga 384

<210> 37

<211> 128

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 37

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
 1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser

	20		25		30										
Leu	Ser	Pro	Gly	Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser
	35		40		45										
Val	Ser	Ser	Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro
	50		55		60										
Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr	Val	Ala	Ser	Asn	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Ala
65			70		75									80	
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser
			85		90									95	
Ser	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Arg	Ser
	100		105		110										
Asn	Trp	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg
	115		120		125										

<210> 38

<211> 426

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 38

atggagtttg ggctgagctg ggttttcctc gttgctcttt taagaggigt ccagtgtcag 60
gtgcagtttg tggagtctgg gggaggcgtg gtccagcctg ggaggtccct gagactctcc 120
tgtgcagcgt ctggattcac cttcagtcac tatggcatgc actgggtccg ccaggctcca 180

ggcaaggggc tggagtgggt ggcacttata tggatatgatg gaagtaataa atactatgca 240
 gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg 300
 caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgcgag agatccctta 360
 gcagctggta cgtcctactt tgactactgg ggccaggga ccttggcac cgtctcctca 420
 gctagc 426

<210> 39

<211> 142

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 39

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly

1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln

20 25 30

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe

35 40 45

Ser His Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

50 55 60

Glu Trp Val Ala Leu Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala

65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn

85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Pro Leu Ala Ala Gly Thr Ser Tyr Phe Asp
 115 120 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 130 135 140

<210> 40

<211> 378

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 40

atgtcgccat cacaactcat tgggtttctg ctgctctggg ttccagcctc caggggtgaa 60
 attgtgciga ctacgtctcc agactttcag tctgtgactc caaaggagaa agtcaccatc 120
 acctgccggg ccagtcagag cattggtagt agcttacact ggtaccagca gaaaccagat 180
 cagtctccaa agctcctcat caagtatgct tcccagtcct tctcaggggt cccctcgagg 240
 ttcagtgga gtggatctgg gacagatttc accctcacca tcaatagcct ggaagctgaa 300
 gatgctgcag cgtattactg tcatcagagt agtagtttac cattcacttt cggccctggg 360
 accaaagtgg atatcaaa 378

<210> 41

<211> 126

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 41

Met Ser Pro Ser Gln Leu Ile Gly Phe Leu Leu Leu Trp Val Pro Ala

1 5 10 15

Ser Arg Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val

20 25 30

Thr Pro Lys Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile

35 40 45

Gly Ser Ser Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys

50 55 60

Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser Gly Val Pro Ser Arg

65 70 75 80

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser

85 90 95

Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Ala Tyr Tyr Cys His Gln Ser Ser Ser

100 105 110

Leu Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys

115 120 125

<210> 42

<211> 426

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 42

```

atggagttag ggctgagctg gctttttctt gtggctatatt taaaagggtg ccagtgtag 60
gtgcagctgt tggagtctgg gggaggcttg gtacagcctg gggggtcct gagactctcc 120
tgtgcagcct ctggattcac ctacagcagc tacgccatga cctgggtccg ccaggctcca 180
gggaaggggc tggagtgggt ctacagatatt agtggtagtg gtggttatac atactacgca 240
gactccgtga agggccggtt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg 300
caaatgaaca gccagagagc cgaggacacg gccgtatatt actgtgcgaa aacaggcgct 360
ggttcgggga gttattcccc tgactcctgg ggccaggga cctgggtcac cgtctcctca 420
gctagc                                         426

```

<210> 43

<211> 142

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 43

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly

1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln

20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe

35 40 45

Ser Ser Tyr Ala Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

50 55 60
 Glu Trp Val Ser Asp Ile Ser Gly Ser Gly Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala
 65 70 75 80
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
 85 90 95
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Lys Thr Gly Ala Gly Ser Gly Ser Tyr Ser Pro Asp
 115 120 125
 Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 130 135 140

<210> 44

<211> 390

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 44

atggacatga gggtcctcgc tcagctcctg gggtcctcgc tgctctgitt cccagggtgcc 60
 agatgtgaca tccagatgac ccagtcctcca tcctcactgt ctgcatctgt aggagacaga 120
 gtcaccatca cttgtcgggc gagtcagggt attagcagct ggtagcctg giatcagcag 180
 aaaccagaga aagcccctaa gtcctgac tatgctgcat ccagtttgca aagtggggtc 240
 ccatcaaggt tcagcggcag tggatctggg acagatttca ctctcaccat cagcagcctg 300
 cagcctgaag attttgcaac ttattactgc caacagtata atagttaccc gtacactitt 360

ggccagggga ccaagctgga gatcaaacga

390

<210> 45

<211> 130

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 45

Met Asp Met Arg Val Leu Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Cys

1 5 10 15

Phe Pro Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser

20 25 30

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser

35 40 45

Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys

50 55 60

Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val

65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

85 90 95

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln

100 105 110

Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile

115

120

125

Lys Arg

130

<210> 46

<211> 426

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 46

```

atggagtttg ggctgagctg gctttttctt gtggctatatt taaaaggtgt ccagtgtgag 60
gtgcagctgt tggagtctgg gggaggcttg gtacagcctg gggggtcctt gagactctcc 120
tgtgcagcct ctggattcac ctttagcagc tatgccaiga gctgggtccg ccaggctcca 180
gggaaggggc tggagtgggt ctacagatatt agtggtagtg gtggttacac atactacgca 240
gactccgtga agggccggtt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg 300
caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gccgtatatt actgtgcgaa aacaggcgat 360
ggttcgggga gtattcccc tgactcctgg ggccaggga ccttggtcac cgtctcctca 420
gctagc                                         426

```

<210> 47

<211> 142

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly

1 5 10 15
Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45
Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60
Glu Trp Val Ser Asp Ile Ser Gly Ser Gly Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala
65 70 75 80
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
85 90 95
Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110
Tyr Tyr Cys Ala Lys Thr Gly Asp Gly Ser Gly Ser Tyr Ser Pro Asp
115 120 125
Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
130 135 140

<210> 48

<211> 390

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 48

```

atggacatga gggtcctcgc tcagctcctg gggctcctgc tgctctgttt cccaggigcc 60
agatgtgaca tccagatgac ccagctccca tcctcactgt ctgcatctgt aggagacaga 120
gtcaccatca ctgttcgggc gagtcagggt attagcaggt ggtagcctg gtatcagcag 180
aaaccagaga aagcccctaa gtccctgata tatgtgcat ccagtttgca aagtggggtc 240
ccatcaaggt tcagcggcag tggatctggg acagatttca ctctcaccat cagcagcctg 300
cagcctgaag attttgcaac ttattactgc caacagtata atagttaccc gtacacittt 360
ggccagggga ccaagctgga gatcaaacga                               390

```

<210> 49

<211> 130

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 49

```

Met Asp Met Arg Val Leu Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Cys
  1              5              10              15

```

```

Phe Pro Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
      20              25              30

```

```

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
      35              40              45

```

```

Gln Gly Ile Ser Arg Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys
      50              55              60

```

Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val
 65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 85 90 95

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 100 105 110

Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 115 120 125

Lys Arg
 130

<210> 50

<211> 426

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 50

atggagtttg ggctgagctg gctttttctt gtggctatatt taaaagggtgt ccagtgtgag 60
 gtgcagctgt tggagtctgg gggaggcttg gtacagcctg gggggtcctt gagactctcc 120
 tgtgcagcct ctggattcac ctttagcagc tatgccatga gctgggtccg ccaggctcca 180
 gggaaggggc tggagtgggt ctcagatatt agtggtagtgt gtggttacac atactacgca 240
 gactccgtga agggccggtt caccatctcc agagacaatt ccaagaaaac gcigtatctg 300
 caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gccgtatatt actgtgcaa aacaggcgat 360
 ggttcgggga gttattcccc tgactactgg ggccaggga ccctggtcac cgtctcctca 420

gctagc

426

<210> 51

<211> 142

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 51

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly

1

5

10

15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln

20

25

30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe

35

40

45

Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

50

55

60

Glu Trp Val Ser Asp Ile Ser Gly Ser Gly Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala

65

70

75

80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Lys

85

90

95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val

100

105

110

Tyr Tyr Cys Ala Lys Thr Gly Asp Gly Ser Gly Ser Tyr Ser Pro Asp
 115 120 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 130 135 140

<210> 52

<211> 390

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 52

atggacatga gggtcctcgc tcagctcctg gggctcctgc tgctctgttt cccagggtgcc 60
 agatgtgaca tccagatgac ccagtcicca tcctcactgt ctgcatctgt aggagacaga 120
 gtcaccatca cttgtcgggc gagtcagggt attagcagct ggtagcctg gtatcagcag 180
 aaaccagaga aagcccctaa gtccctgac tatgctgcat ccagtttgca aagtggggtc 240
 ccatcaaggt tcagcggcag tggatctggg acagatttca ctctcaccat cagcagcctg 300
 cagcctgaag attttgcaac ttattactgc caacagtata atagttaccc gtacactttt 360
 ggccagggga ccaagctgga gatcaaacga 390

<210> 53

<211> 130

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 53

Met Asp Met Arg Val Leu Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Cys

1 5 10 15
Phe Pro Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
 20 25 30
Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
 35 40 45
Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys
 50 55 60
Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val
65 70 75 80
Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 85 90 95
Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 100 105 110
Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 115 120 125
Lys Arg
 130

<210> 54

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 54

gcgactaagt cgaccatgga gtttgggctg agctg

35

<210> 55

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 55

tgggcccttg gtgctagctg aggagacggt gaccg

35

<210> 56

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 56

agagagagag gtcgaccacc atggagtttg ggctgagctg ggttt

45

<210> 57

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 57

agagagagag gctagctgag gagacggtga ccagggtgc

39

<210> 58

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 58

agagagagag gtcgaccacc atggagtttg ggctgagctg ggttt

45

<210> 59

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 59

agagagagag gctagctgag gagacggtga ccagggtcc c

41

<210> 60

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 60

atcacagatc tctcaccatg gacatgaggg tcccc

35

<210> 61

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 61

acagatgggtg cagccaccgt acgtttaatc tccag

35

<210> 62

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 62

agagagagag agatctcacc atggaagccc cagctcagct tctct

45

<210> 63

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 63

agagagagag cgtacgtttg atttcacct tggtccttg gc

42

<210> 64

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 64

agagagagag atctctcacc atgtcgccat cacaactcat tggg

44

<210> 65

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 65

agagagagag cgtacgtttg atatccactt tgggtcccagg g

41

<210> 66

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 66

agagagagag agatctcacc atggaagccc cagctcagct tctct

45

<210> 67

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 67

agagagagag cgtacgtttg atctccacct tggtcctcc g

41

<210> 68

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 68

agagagagag agatctcacc atggacatga gggtcctcgc tcagc

45

<210> 69

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 69

agagagagag cgtacgtttg atctccagct tggccccctg g

41

<210> 70

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 70

agagagagag gtcgaccacc atggatctca tgtgcaagaa aatgaagc

48

<210> 71

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 71

agagagagag gctagctgag gagacggtga ccgtggtccc t

41

<210> 72

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 72

agagagagag gtcgaccacc atggagtttg ggctgagctg gcttt

45

<210> 73

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 73

agagagagag gctagctgag gagacggtga ccagggttcc c

41

<210> 74

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 74

cggggtacgt gccaaagcatc ctcgtg

26

<210> 75

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 75

atgctgggcg cccgggaagt atgtac

26

<210> 76

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 76

gaaagatgag ctggaggacc gcaata

26

<210> 77

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 77

ccaagggccc atcggctcttc cccctggcac

30

<210> 78

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 78

gacaccctca tgatctcccg gacc

24

<210> 79

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 79

tggttctccgg ctgccattg ctct

24

<210> 80

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 80

ggtcgaggag atcatgaggg tgcctt

27

<210> 81

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 81

tggtgcacc atctgtcttc atcttc

26

<210> 82

<211> 1413

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 82

atggagttag ggctgagctg ggttttcttc gttgctcttt taagaggtgt ccagtgtcag 60
gtgcagttgg tggagtctgg gggaggcgtg gtccagcctg ggaggtcctt gagactctcc 120
tgtgcagcgt ctggattcac cttcagtcac tatggcatgc actgggtccg ccaggctcca 180
ggcaaggggc tggagtgggt ggcacttata tggatgatg gaagtaataa atactatgca 240
gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg 300
caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgcgag agatccctta 360
gcagctggta cgtcctactt tgactactgg ggccaggga ccttggtcac cgtctcctca 420
gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 480
ggcacagcgg ccttgggctg cctggtaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgtc 540
tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggtgtcctt acagtccctca 600
ggactctact cctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 660
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 720
aaatcttgtg acaaaactca cacatgcca ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga 780
ccgtcagttt tctcttcccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccctt 840
gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc caccgaagacc ctgagggtcaa gttcaactgg 900
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgaggagga gcagtacaac 960
agcacgtacc gtgtgggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 1020

gagtacaagt gcaaggctct caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 1080
 aaagccaaag ggcagccccc agaaccacag gtgtacaccc tgcccccata ccgggatgag 1140
 ctgaccaaga accaggctcag ccigacctgc ctgggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1200
 gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccggtg 1260
 ctggactccg acggctcctt ctctctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcagggtg 1320
 cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 1380
 cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa tga 1413

<210> 83

<211> 470

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 83

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly

1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln

20 25 30

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe

35 40 45

Ser His Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

50 55 60

Glu Trp Val Ala Leu Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala

65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Pro Leu Ala Ala Gly Thr Ser Tyr Phe Asp
115 120 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
130 135 140

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
145 150 155 160

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
165 170 175

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
180 185 190

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
195 200 205

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
210 215 220

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
225 230 235 240

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
245 250 255

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
260 265 270

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
275 280 285

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
290 295 300

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
305 310 315 320

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
325 330 335

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
340 345 350

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
355 360 365

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
370 375 380

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
385 390 395 400

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 405 410 415

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 420 425 430

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 435 440 445

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 450 455 460

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 84

<211> 702

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 84

atgtcgccat cacaactcat tgggtttctg ctgctctggg ttccagcctc caggggtgaa 60
 attgtgctga ctgagctctc agactttcag tctgtgactc caaaggagaa agtcaccatc 120
 acctgccggg ccagtcagag catiggtagt agcttacact ggtaccagca gaaaccagat 180
 cagtcctcaa agtcctcat caagtatgt tcccagtcct tctcaggggt cccctcgagg 240
 tttagtggca gtggatctgg gacagatttc accctacca tcaatagcct ggaagctgaa 300
 gatgctgcag cgtattactg tcatcagagt agtagtttac cattcacttt cggccctggg 360
 accaaagtgg atatcaaacg aactgtggct gcaccatcig tcttcatcct cccgccatct 420
 gatgagcagt tgaaatctgg aactgcctct gttgtgtgcc tgctgaataa ctctatccc 480

agagaggcca aagtacagtg gaaggtggat aacgccctcc aatcgggtaa ctcccaggag 540
 agtgtcacag agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg 600
 agcaaagcag actacgagaa acacaaagtc tacgcctgcg aagtcaccca tcagggcctg 660
 agctcgcccg tcacaaagag ctccaacagg ggagagtgtt ag 702

<210> 85

<211> 233

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 85

Met Ser Pro Ser Gln Leu Ile Gly Phe Leu Leu Leu Trp Val Pro Ala

1 5 10 15

Ser Arg Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val

20 25 30

Thr Pro Lys Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile

35 40 45

Gly Ser Ser Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys

50 55 60

Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser Gly Val Pro Ser Arg

65 70 75 80

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser

85 90 95

Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Ala Tyr Tyr Cys His Gln Ser Ser Ser
100 105 110

Leu Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Thr
115 120 125

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
130 135 140

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
145 150 155 160

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
165 170 175

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
180 185 190

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
195 200 205

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
210 215 220

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 86

<211> 1434

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 86

atggatctca tgtgcaagaa aatgaagcac ctgtggttct tcctcctgct ggtggcggct 60
cccagatggg tcctgtccca gctgcaggct caggagtcgg gcccaggact ggtgaagcct 120
tcggagaccc tgtccctcat ctgcactgtc tctgggtggct ccatcaggac cagtggttac 180
tactggggct ggttcgcga gccccaggg aagggactgg agtggattgg gactagtcac 240
aatagtggga gcacctacta caaccgtcc ctcaagagtc gagicacat atccgtagac 300
acgtccaaga accagttctc cctgaagctg aactctgtga ccgccgcaga cacggctgtg 360
tattactgtg cgagacaagg ttacgatttt aaagtcaata tagacgtctg gggacaaggg 420
accacggtca cgtctcctc agcctccacc aaggggccat cgtcttccc cctggcacc 480
tcctccaaga gcacctctgg gggcacagcg gccctgggct gcctgggtcaa ggactacttc 540
ccgaaccgg tgacgggtgc gtggaactca ggccgctga ccagcggcgt gcacaccttc 600
ccggctgtcc tacagtcctc aggactctac tccctcagca gcgtgggtgac cgtgccctcc 660
agcagcttgg gcaccagac ctacatctgc aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag 720
gtggacaaga aagttgagcc caaatcttgt gacaaaactc acacatgcc accgtgcca 780
gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc ttcctcttcc cccaaaacc caaggacacc 840
ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca tgcgtgggtg tggacgtgag ccacgaagac 900
cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac ggctggagg tgcataatgc caagacaaag 960
ccgcgggagg agcagtaca cagcacgtac cgtgtgggtc gcgtcctcac cgtcctgcac 1020
caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag tgcaaggctt ccaacaaagc cctcccagcc 1080
cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc 1140
ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag aaccaggtca gcctgacctg cctgggtcaaa 1200
ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac 1260
tacaagacca cgctcccgt gctggactcc gacggctcct tcttctcta cagcaagctc 1320
accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag 1380
gctctgcaca accactacac gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa atga 1434

<210> 87

<211> 477

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 87

Met Asp Leu Met Cys Lys Lys Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu

1

5

10

15

Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp Val Leu Ser Gln Leu Gln Val Gln Glu

20

25

30

Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Ile Cys

35

40

45

Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Arg Thr Ser Gly Tyr Tyr Trp Gly Trp

50

55

60

Phe Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Thr Ser His

65

70

75

80

Asn Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr

85

90

95

Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Asn Ser

100

105

110

Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gln Gly Tyr

115

120

125

Asp Phe Lys Val Asn Ile Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
130 135 140

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
145 150 155 160

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
165 170 175

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
180 185 190

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
195 200 205

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
210 215 220

Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
225 230 235 240

Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
245 250 255

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
260 265 270

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
275 280 285

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
290 295 300

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
305 310 315 320

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
325 330 335

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
340 345 350

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
355 360 365

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
370 375 380

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
385 390 395 400

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
405 410 415

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
420 425 430

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
435 440 445

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn

450

455

460

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

465

470

475

<210> 88

<211> 705

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 88

```

atggaagccc cagctcagct tctcttcctc ctgtactct ggctcccaga taccaccgga 60
gaaatttgtg tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 120
ctctccigca gggccagtc gagtgttage agctacttag cctggtacca acagaaacct 180
ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 240
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttactctca ccatcagcag cctagagcct 300
gaagattttg cagtttattt ctgtcagcag cgtagcaact ggccgctcac ttccggcgga 360
gggaccaagg tggagatcaa acgaactgtg gctgcacat ctgtcttcat ctcccgcca 420
tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 480
cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggt gataacgccc tccaatcggg taactcccag 540
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 600
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 660
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag 705

```

<210> 89

<211> 234

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 89

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
35 40 45

Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
50 55 60

Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
85 90 95

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser
100 105 110

Asn Trp Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
115 120 125

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
130 135 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
145 150 155 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
165 170 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
195 200 205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/016576

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09 (2006.01), **C07K16/30** (2006.01), **C12N5/10** (2006.01), **C12P21/08** (2006.01), **A61K39/395** (2006.01), **A61P35/00** (2006.01)

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)

C12N15/09 (2006.01), **C07K16/30** (2006.01), **C12N5/10** (2006.01), **C12P21/08** (2006.01), **A61K39/395** (2006.01), **A61P35/00** (2006.01)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS/WPI (DIALOG), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/Geneseq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 62-111697 A (Sloan Kettering Institute for Cancer Research), 22 May, 1987 (22.05.87), & EP 199141 A & CA 1306706 C	1-3, 5, 8-11
Y	JP 2004-515230 A (Medarex, Inc.), 27 May, 2004 (27.05.04), & WO 2002/43478 A2 & AU 200239422 A & US 2002/199213 A1 & EP 1354034 A2 & KR 2003074634 A & CN 1487996 A & IN 200300651 P2 & MX 2003004793 A1	1-3, 5, 8-11

☒ 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
07 December, 2005 (07.12.05)

Date of mailing of the international search report
20 December, 2005 (20.12.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/016576

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	TOMIZUKA, K. et al., Double trans-chromosomic mice: maintenance of two individual human chromosome fragments containing Ig heavy and kappa loci and expression of fully human antibodies. Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 2000, Vol.97, No.2, pages 722 to 727	1-17
A	WELT, S. et al., Preliminary report of a phase I study of combination chemotherapy and humanized A33 antibody immunotherapy in patients with advanced colorectal cancer. Clin.Cancer Res. 2003, Vol.9, No.4, pages 1347 to 1353	1-17

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. **C12N15/09** (2006.01), **C07K16/30** (2006.01), **C12N5/10** (2006.01), **C12P21/08** (2006.01), **A61K39/395** (2006.01), **A61P35/00** (2006.01)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. **C12N15/09** (2006.01), **C07K16/30** (2006.01), **C12N5/10** (2006.01), **C12P21/08** (2006.01), **A61K39/395** (2006.01), **A61P35/00** (2006.01)

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

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)

BIOSIS/WPI(DIALOG), GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/Geneseq

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 請求の範囲の番号
Y	JP 62-111697 A (スローン・ケッティング インスティテュート フォー キャンサー リサーチ) 1987.05.22 & EP 199141 A & CA 1306706 C	1-3, 5, 8-11
Y	JP 2004-515230 A (メダレックス, インコーポレーテッド) 2004.05.27 & WO 2002/43478 A2 & AU 200239422 A & US 2002/199213 A1 & EP 1354034 A2 & KR 2003074634 A & CN 1487996 A & IN 200300651 P2 & MX 2003004793 A1	1-3, 5, 8-11

☒ 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

07.12.2005

国際調査報告の発送日

20.12.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高堀 栄二

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

4 B

9281

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 請求の範囲の番号
A	TOMIZUKA, K. et al. Double trans-chromosomic mice: maintenance of two individual human chromosome fragments containing Ig heavy and kappa loci and expression of fully human antibodies. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000, Vol. 97, No. 2, p. 722-727	1-17
A	WELT, S. et al. Preliminary report of a phase I study of combination chemotherapy and humanized A33 antibody immunotherapy in patients with advanced colorectal cancer. Clin. Cancer Res. 2003, Vol. 9, No. 4, p. 1347-1353	1-17