

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3552103号

(P3552103)

(45) 発行日 平成16年8月11日(2004.8.11)

(24) 登録日 平成16年5月14日(2004.5.14)

(51) Int. Cl.⁷

F I

C 0 7 K 16/08

C 0 7 K 16/08

A 6 1 K 39/395

A 6 1 K 39/395

S

A 6 1 P 1/16

A 6 1 P 1/16

A 6 1 P 31/20

A 6 1 P 31/20

C 1 2 N 15/09

C 1 2 P 21/08

請求項の数 14 (全 25 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2000-583967(P2000-583967)
 (86) (22) 出願日 平成11年11月19日(1999.11.19)
 (65) 公表番号 特表2002-531073(P2002-531073A)
 (43) 公表日 平成14年9月24日(2002.9.24)
 (86) 国際出願番号 PCT/KR1999/000699
 (87) 国際公開番号 WO2000/031141
 (87) 国際公開日 平成12年6月2日(2000.6.2)
 審査請求日 平成13年5月18日(2001.5.18)
 (31) 優先権主張番号 1998/49663
 (32) 優先日 平成10年11月19日(1998.11.19)
 (33) 優先権主張国 韓国(KR)

微生物の受託番号 KCTC 0531BP

微生物の受託番号 KCTC 0691BP

微生物の受託番号 KCTC 0529BP

(73) 特許権者 595001181
 コリア インスティテュート オブ サイ
 エンス アンド テクノロジー
 大韓民国 ソウル スンボクーク ハウォ
 ルゴクードン 39-1
 (73) 特許権者 597172498
 コリア・グリーン・クロス・コーポレイシ
 ヨン
 Korea Green Cross C
 orporation
 大韓民国キョンギード449-900・ヨ
 ンギン・タン・キフーングーユップ・クガ
 ルーリ #227
 (74) 代理人 100064746
 弁理士 深見 久郎

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 B型肝炎ウイルスの表面抗原 pre-S1 に対するヒト化抗体及びその製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号20で記載されるアミノ酸配列を含むヒト化重鎖の可変領域でできたHBVの表面抗原pre-S1に対するヒト化抗体。

【請求項2】

配列番号21で記載されるアミノ酸配列を含むヒト化重鎖の可変領域でできたHBVの表面抗原pre-S1に対するヒト化抗体。

【請求項3】

ヒト化抗体は、配列番号21で記載されるアミノ酸配列を含むヒト化重鎖の可変領域で、リジン¹²→バリン¹²、スレオニン²⁸→アラニン²⁸、スレオニン³⁰→セリン³⁰、メチオニン⁴⁸→イソロイシン⁴⁸、アルギニン⁶⁷→リジン⁶⁷、バリン⁶⁸→アラニン⁶⁸、メチオニン⁷⁰→ロイシン⁷⁰、バリン⁷⁹→アラニン⁷⁹、及びチロシン⁹⁵→フェニルアラニン⁹⁵の場合の中の少なくとも一つ以上のアミノ酸の変形がなされることを特徴とする請求項2に記載のヒト化抗体。

【請求項4】

配列番号23で記載されるアミノ酸配列を含むヒト化軽鎖の可変領域でできたHBVの表面抗原pre-S1に対するヒト化抗体。

【請求項5】

請求項1～3のいずれかに記載のヒト化抗体における可変領域を含むヒト化重鎖を暗号するヒト化重鎖遺伝子。

10

20

【請求項 6】

配列番号20で記載されたアミノ酸配列を含むヒト化重鎖の可変領域を暗号する請求項5に記載のヒト化重鎖遺伝子。

【請求項 7】

配列番号21で記載されたアミノ酸配列を含むヒト化重鎖の可変領域を暗号する請求項5に記載のヒト化重鎖遺伝子。

【請求項 8】

配列番号23で記載されたアミノ酸配列の可変領域を含むヒト化軽鎖を暗号するヒト化軽鎖遺伝子。

【請求項 9】

請求項5の遺伝子を含む重鎖発現ベクター。

【請求項 10】

請求項6の遺伝子がpRC/CMVに挿入されたことを特徴とする請求項9に記載の重鎖発現ベクター pCMV-HKR127HC(寄託番号: KCTC0531BP)。

【請求項 11】

請求項7の遺伝子がpRC/CMVに挿入されたことを特徴とする請求項9に記載の重鎖発現ベクター pCMV-HKR127(III)HC(寄託番号: KCTC0691BP)。

【請求項 12】

請求項8の遺伝子を含む軽鎖発現ベクター。

【請求項 13】

請求項8の遺伝子がpCMV-dhfrに挿入されたことを特徴とする請求項12に記載の軽鎖発現ベクター pKC-dhfr-HKR127(寄託番号: KCTC0529BP)。

【請求項 14】

請求項1、請求項2、請求項3または請求項4のHBVの表面抗原pre-S1に対するヒト化抗体を含む、HBV感染の予防とB型慢性肝炎の治療用薬学的組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の属する技術分野

本発明は、HBVの表面抗原 pre-S1に対するヒト化抗体に関するものである。

【0002】

より詳しくは、重鎖(heavy chain)及び軽鎖(light chain)で構成されたHBVの表面抗原pre-S1に対するヒト化抗体、重鎖と軽鎖を暗号する遺伝子、上記の遺伝子各々を含む発現ベクター、発現ベクターを含む形質転換体及び、HBV肝炎を予防したり、B型慢性肝炎を治療するために投与される上記のヒト化抗体を含む薬学的組成物に関するものである。

【0003】

発明の背景

HBVは、人体に侵入して慢性及び急性肝炎を起し、悪化した場合には、肝硬変と肝癌の原因になる病原体である。全世界的に患者数が3億に上るものと推計されている(Tiollais and Buendia, Sci. Am., 264, 48, 1991)。

HBVの皮膜は、お互いに異なった表面抗原を持った3個の蛋白質で構成されている。

具体的に、S抗原を含む主(major)蛋白質、S抗原とpre-S2抗原を含む中(middle)蛋白質、及びS抗原、pre-S2抗原とpre-S1抗原を含む大(large)蛋白質で構成される(Neurath, A. R. and Kent, S. B. H., Adv. Virus Res., 34: 65-142, 1988)。

これら全ての表面抗原蛋白質は、HBVを中和させて無力化する抗体を誘導し、特にpre-S部位により誘導される抗体は、ウイルスの除去及び急性HBV感染からの回復と関連があり、S抗原に対する無免疫反応(Non-responsiveness)を克服できる(Iwarson等, J. Med. Virol. 16: 89-96, 1985; Itoh, 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 9174-9178, 1986; Neurath 等, Vaccine 7: 234-236

40

50

, 1989; Budkowska等, J. Med. Virol. 20: 111-125, 1986; Milich等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 8168-8172, 1985; Milich等, J. Immunol. 137. 315-322, 1986)。

【0004】

その中でpre-S1抗原は、pre-S2抗原やS抗原とは異なり、感染性ウイルス粒子等(infectious virus particles)に主に存在し(Heermann等, J. Virol. 52: 396-402, 1984)、人間肝細胞の感染に関与するために、pre-S1に特異な単クローン抗体は、HBV中和にとっても効果的に作用し(Neurath et al., Cell, 46, 429, 1986; Pontisso, et al., Virol., 173. 533 1989; Neurath et al., Vaccine, 7, 234, 1989)、HBV感染の予防とB型慢性肝炎の

10

【0005】

HBVに感染した場合、例えば、HBV陽性の母親から生まれた新生児やHBVに露出した医療機関従事者達または、慢性HBV関連肝疾患による肝移植手術患者等のHBV感染を防止するために現在までは、B型肝炎免疫グロブリン(以下“HBIG”と略称)を使用した(Beasley et al., Lancet, 2, 1099, 1983; Todo et al., Hepatol., 13, 619, 1991)。しかし、現在使用されているHBIGは、制限的な利用度、抗原に対する低い特異性(specificity)、製造過程中、汚染源に露出する心配等の短所があり、人間の血清を継続供給しなければならないという問題点があった。

20

【0006】

上記の問題点を解決するために、二十日鼠のHBV表面抗原に対する単クローン抗体を使用する方法が開発された。しかし、二十日鼠の単クローン抗体は、一般的に抗原に対する親和度が高く、大量生産が可能であるが、人間に注射した時に体内で免疫反応を誘発するという短所があった(Shawler et al., J. Immunol., 135, 1530, 1985)。

【0007】

上記の問題点を解決するために、ヒトの単クローン抗体を使用する技術が報告されたが、親和度が高いヒト単クローン抗体の生産技術は、実用化されていなかった。

【0008】

30

代りに、二十日鼠由来の単クローン抗体の高い親和度と特異性を維持したまま、人体内での免疫誘発能を最大限に減らす方法として、“ヒト化抗体”が開発された。ヒト化抗体は、二十日鼠抗体の抗原結合部位(CDRs)を遺伝工学的にヒト抗体に移植させたもので、大量生産が可能で、遺伝子の大部分をヒト化することにより人体内での免疫反応を大幅に減らせる長所がある(Riechmann et al., Nature, 332, 323, 1988; Nakatani et al., Protein Engineering, 7, 435, 1994)。

【0009】

本発明者達は、HBVの表面抗原pre-S1に対する二十日鼠の単クローン抗体KR127を開発したことがあり、KR127抗体の可変領域を暗号する遺伝子を分離して、その塩基配列を決定したことがある(大韓民国特許出願第97-30696号)。

40

【0010】

本発明では、上記二十日鼠の単クローン抗体KR127からヒト化抗体を製造し、HBV感染とB型慢性肝炎の治療に利用しようと、KR127抗体の軽鎖及び重鎖の可変領域配列と最も類似の人間の遺伝子を検索し、これを対象にヒト化抗体の軽鎖及び重鎖遺伝子を製造後、これらを発現ベクターにクローニングして宿主細胞を形質転換した後、これらを培養してヒト化抗体を得、二十日鼠単クローン抗体KR127と類似した抗原結合能を維持することを確認して本発明を完成した。

【0011】

発明の要旨

本発明の目的は、HBV表面抗原pre-S1に対する二十日鼠単クローン抗体KR127で抗原結合

50

能を維持した状態で二十日鼠由来のアミノ酸残基を大部分ヒト化させ、人体内での免疫反応誘発能を減少させたHBV表面抗原pre-S1に対するヒト化抗体を提供することである。

【0012】

上記の目的を達成するために、本発明では、HBVの表面抗原pre-S1に対する二十日鼠単一クローン抗体KR127の可変領域と最も類似したヒト抗体遺伝子を選別し、これらを対象に製造したヒト化抗体及びその軽鎖または重鎖のアミノ酸配列を提供する。

【0013】

また本発明は、HBVの表面抗原pre-S1に対する上記のヒト化抗体の軽鎖及び重鎖を暗号するヒト化抗体軽鎖及び重鎖遺伝子を提供する。

【0014】

本発明は、上記のHBVの表面抗原pre-S1に対するヒト化抗体の軽鎖及び重鎖遺伝子を含む発現ベクターで形質転換させた形質転換体を培養して、HBVの表面抗原pre-S1に対するヒト化抗体を製造する方法を提供する。

【0015】

併せて、本発明は、HBV肝炎を予防したり、B型慢性肝炎を治療用に上記のヒト化抗体を含む薬学的組成物を提供する。

【0016】

詳細な説明

以下、本発明を詳細に説明する。

【0017】

本発明では、配列19のアミノ酸配列の可変領域を含むヒト化重鎖からなるHBVの表面抗原pre-S1に対するヒト化抗体及び、配列22のアミノ酸配列を含むヒト化軽鎖からなるHBVの表面抗原pre-S1に対するヒト化抗体を提供する。

【0018】

また、本発明では、配列19のアミノ酸配列の可変領域を含むヒト化重鎖を暗号するHBVの表面抗原pre-S1に対するヒト化重鎖遺伝子HKR127HC及び配列22のアミノ酸配列の可変領域を含むヒト化軽鎖を暗号するHBVの表面抗原pre-S1に対するヒト化軽鎖遺伝子 HKR127KCを提供する。

【0019】

また、本発明では、上記の遺伝子HKR127HCを含む発現ベクターpCMV-HKR127HC（寄託番号：KCTC0531BP）及び上記の遺伝子HKR127KCを含む発現ベクターpKC-dhfr-HKR127（寄託番号：KCTC0529BP）を提供する。

【0020】

また、本発明では、発現ベクターpCMV-HKR127HCと発現ベクターpKC-dhfr-HKR127でCOS7細胞を形質転換して得た形質転換体HZIKR127を提供する。

【0021】

また、本発明では、上記の形質転換体HZIKR127を培養して、HBV表面抗原pre-S1に対するヒト化抗体HZKR127の製造方法を提供する。

【0022】

本発明では、HBVの表面抗原pre-S1に対するヒト化抗体を製造するために、まず、HBVの表面抗原pre-S1に対する二十日鼠単一クローン抗体KR127の可変領域配列と最も類似なヒト抗体を検索する。

【0023】

ジェンバンクデータベース(GenBank data base)から人間の免疫グロブリン生殖細胞株(germline)遺伝子を選別した結果、DP7が二十日鼠抗体KR127重鎖の可変領域遺伝子と最も類似したヒト抗体遺伝子であり、DPK12が二十日鼠抗体KR127軽鎖の可変領域遺伝子と最も類似したヒト抗体遺伝子であることを確認した。

【0024】

10

20

30

40

50

したがって、上記のヒト抗体遺伝子DP7、DPK12に二十日鼠抗体KR127のCDRsを移植して本発明のヒト化抗体の軽鎖及び重鎖可変領域遺伝子を製造する。

【0025】

本発明では、ヒト化抗体の軽鎖及び重鎖可変領域遺伝子を製造するにあたり、抗原結合部位に該当する二十日鼠抗体の重鎖と軽鎖のCDRsは、大部分二十日鼠抗体KR127のものをそのまま使用したが、抗原結合に参加しないものであると推定されるアミノ酸は、ヒト抗体のアミノ酸に置換した。また、上記のヒト抗体可変領域のアミノ酸中にCDRsの構造(conformation)に影響をおよぼすフレームワーク(framework region, FR)のいくつかのアミノ酸残基を二十日鼠抗体KR127の可変領域アミノ酸のものに替えてやる。

【0026】

具体的にヒト化抗体の重鎖遺伝子を製造するために、上記の二十日鼠単クローン抗体KR127の重鎖可変領域中でCDR1、2、3の一部分及びFR残基いくつかをヒト抗体重鎖可変領域DP7に移植させ、ヒト化重鎖遺伝子の可変領域HKR127HCv(HZII)を製造した(図1参照)。

【0027】

しかし、HKR127HCv(HZII)を使用して製造したヒト化抗体は、その抗原結合能を全く示さなかった。したがって、本発明では、抗原結合能を維持させるために二十日鼠抗体KR127のアミノ酸残基をさらに多く移植させたヒト化重鎖遺伝子の可変領域HKR127HCv(HZI)及びHKR127HCv(HZIII)を考案した(図1参照)。

【0028】

HKR127HCv(HZI)は、CDR1、3の全体及び一部分のCDR2と11FR残基を含む反面、HKR127HCv(HZIII)は、CDR1、3の全体及び一部分のCDR2と2FR残基を含む(図1参照)。

【0029】

完全な長さのHKR127HC(I)を製造するために、上記の新しいヒト化重鎖遺伝子の可変領域HKR127HCv(HZII)と重鎖のリーダーシーケンス(leader sequence)及びヒト抗体重鎖γ1の不変領域配列を持っているpRC/CMV-HC-HuS(KCTC 0229BP)を鋳型にして配列1と配列2、配列3と配列4、配列5と配列6、配列7と配列8、配列9と配列10、そして配列11と配列12の始発体を各々利用してPCRを行った(図2a参照)。

【0030】

上記の配列1と配列2、配列3と配列4、配列5と配列6、配列7と配列8、配列9と配列10によるPCR産物を接合(annealing)させ、これを再び鋳型にして配列1と配列10の始発体を利用して再組み換えPCRを行うことによって約431bpの断片を得た。これを配列11と配列12の始発体を各々利用したPCR産物と一緒に鋳型にして、配列1と配列12の始発体を利用してPCRを行うことによって、1431bpのヒト化重鎖遺伝子HKR127HC(I)を得、pBluescript SK(+)にクローニングしてpHKR127HC(I)と命名した。

【0031】

上記のヒト化重鎖遺伝子を合成する過程に使用された配列1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12の始発体の塩基配列を配列表に示した。具体的に、配列1の始発体は、その末端に制限酵素EcoRI配列を持ち、配列12の始発体は、その末端に制限酵素SalI配列を持っている。

【0032】

上記のように、製造されたヒト化重鎖遺伝子HKR127HC(I)の可変領域は、12、28、30、48、67、68、70、72、74、79及び95位置にKR127二十日鼠抗体の可変領域アミノ酸残基11個を含み、全体87個のFR残基中変更されないFR残基は、76個で、ヒトDP7遺伝子と87%の類似性を示す(図1参照)。

【0033】

HKR127(I)をさらにヒト化するために製造されたHKR127(III)は、72及び74位置に2個の二十日鼠由来のFR残基を持つ。また、完全な長さのHKR127HC(III)を製造するために、配列1と配列24、配列25と配列26、配列27と配列28そして配列11と配列12を利用して上記HKR127HC(I)の製造と同一の方法で(図2b)1431bpのヒト化重鎖遺伝子HKR127HC(III)を得、pBlues

10

20

30

40

50

cript SK(+))にクローニングしてpHKR127HC(III)と命名した。

【0034】

また、ヒト化抗体の軽鎖遺伝子を製造するために、上記の二十日鼠単一クローン抗体KR127の軽鎖可変領域中で、CDR1、3の全体とCDR2の一部をヒト抗体軽鎖DPK12に移植させ、ヒト化軽鎖遺伝子の可変領域HKR127KCv(HZII)を製造した(図3参照)。

【0035】

しかし、HKR127KCv(HZII)を使用して製造したヒト化抗体は、その抗原結合能を全く示さなかった。したがって、抗原結合能を維持させるために、二十日鼠抗体KR127のアミノ酸残基をさらに多く移植させたヒト化軽鎖遺伝子HKR127KCv(HZI)を考案した(図3参照)。

【0036】

完全な長さの新しいヒト化軽鎖遺伝子HKR127KC(I)を製造するために、上記HKR127KCv(HZII)と軽鎖のリーダーシーケンス(leader sequence)及びヒト抗体軽鎖κの不変領域配列を持っているpKC-dhfr-HuS(KCTC 0230BP)を鋳型にして、配列13と配列14、配列15と配列16そして配列17と配列18の始発体を各々利用してPCRを行った。

【0037】

具体的に、配列13と配列14、配列15と配列16の始発体を各々利用したPCR産物を一緒に鋳型にして、配列13と配列16の始発体を利用してPCRを行い、360bpの断片を合成した。これを再び配列17と配列18の始発体を利用してPCR産物と一緒に鋳型にして、配列13と配列18の始発体を利用して、PCRを行って739bpのヒト化軽鎖遺伝子HKR127KC(I)を得、pBluescript SK(+))にクローニングしてpHKR127KC(I)と命名した。

【0038】

上記のヒト化軽鎖遺伝子を合成する過程に使用された配列13、14、15、16、17、18の始発体の塩基配列を配列表に示した。具体的に配列13の始発体は、その末端に制限酵素HindIII配列を持ち、配列18の始発体は、その末端に制限酵素SalI配列を持っている。

【0039】

上記のように製造されたヒト化軽鎖遺伝子HKR127KC(I)の可変領域は、二十日鼠単一クローン抗体KR127軽鎖中の5個のアミノ酸残基を含み、全体83個のFR残基中変更されないFR残基は、78個で、ヒトDP7遺伝子と94%の同一性を示す(図3参照)。

【0040】

本発明は、HBVの表面抗原pre-S1に対するヒト化抗体の上記軽鎖及び重鎖遺伝子を含む発現ベクターで形質転換させた形質転換体を培養し、HBVの表面抗原pre-S1に対するヒト化抗体を製造する方法を提供する。

【0041】

HBVの表面抗原pre-S1に対するヒト化抗体を製造するために、まず、本発明では、上記のヒト化抗体の軽鎖及び重鎖遺伝子を含む発現ベクターを製作する。

【0042】

具体的に、ヒト化重鎖を含む上記pHKR127HC(I)及びpHKR127HC(III)から本発明のヒト化重鎖を制限酵素を利用して分離した後、pRc/CMV(Invitrogen社製品)に挿入し、本発明のヒト化重鎖発現プラスミドpCMV-HKR127HCとpCMV-HKR127(III)HCを製造した(図5a及び図5c参照)。また、ヒト化軽鎖を含む上記のpHKR127KCから本発明のヒト化軽鎖を制限酵素を利用して分離した後、本発明者達が開発したことがあるpCMV-dhfr(KCTC 8671P)に挿入し、本発明のヒト化軽鎖発現プラスミドpKC-dhfr-HKR127を製造した(図5b参照)。

【0043】

上記の発現ベクターpCMV-HKR127HC、pCMV-HKR127(III)HC、または、pKC-dhfr-HKR127で大腸菌(E. coli)DH5α菌株を各々形質転換し、大腸菌形質転換体を製造し、pCMV-HKR127HCとpKC-dhfr-HKR127を韓国科学技術研究院附設生命工学研究所遺伝子銀行に1998年10月12日付で寄託した(受託番号:KCTC0531BP, KCTC0529BP)。また、pCMV-HKR127(III)HCを1999年11月15日付で寄託した(受託番号:KCTC0691BP)。

10

20

30

40

50

【0044】

本発明では、HBVの表面抗原pre-S1に対するヒト化抗体を発現するために、本発明のヒト化重鎖及びヒト化軽鎖遺伝子を含む発現ベクターpCMV-HKR127HCとpKC-dhfr-HKR127でCOS7細胞を一時的に形質転換させ、形質転換体を得た後、これを培養して本願発明のヒト化抗体HZKR127Iを分離する。

【0045】

また、pCMV-HKR127HCとpKC-dhfr-HKR127を利用して上記と同じ方法でHZKR127IIIを分離する。

【0046】

あわせて、本発明は、上記ヒト化抗体を含有する薬学的組成物を提供する。

10

本発明のヒト化抗体は、HZKR127IとHZKR127IIIを二十日鼠単一クローン抗体KR127との抗原結合親和度を比較して表1及び表2に示した(図6a及び図6b参照)。

【0047】

HBV抗原pre-S1に対するヒト化抗体の有効量を含む組成物は、薬学的に許容される賦形剤を含むことができ、抗-S単一クローン抗体またはラミブジン(lamivudin)と同様な抗-肝炎薬剤を含むことができる。

【0048】

また、上記ヒト化抗体は、薬学的に許容される賦形剤と一緒に処方でき、静脈内、皮下内及び筋肉内注入による処方が可能だ。

【0049】

20

本発明の薬学的組成物は、通常的に使用される固体または液体賦形剤、稀釈液及び注射剤の形態で使用できる。

【0050】

本発明の薬学的組成物は、1週間に約1～10 mg/kgで服用が可能で、望ましくは、3～5 mg/kgで服用する。

【0051】

以下、本発明を実施例によって詳細に説明する。

ただし、下記の実施例は、本発明を例示するものであり、本発明の内容が実施例によって限定されるものではない。

【0052】

30

<実施例 1> ヒト化重鎖遺伝子の製造

ヒト化重鎖可変領域を製造するためにまず、二十日鼠単一クローン抗体KR127の重鎖可変領域遺伝子とアミノ酸配列が最も類似したヒト抗体DP7をジェンバンクデータベースから選抜し、上記KR127の重鎖可変領域とDP7抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列及び塩基配列を比較し、これを根拠に最初のヒト化重鎖HKR127HCv(HZII)を考案後、考案した最初のヒト化重鎖を改善して、二番目のヒト化重鎖HKR127HCv(HZI)を考案した。

【0053】

具体的に、ヒト化重鎖可変領域遺伝子HKR127HCv(HZI)は、ヒト化抗体で抗体の構造に影響を与えるものと推定されるいくつかの二十日鼠フレームワークアミノ酸残基とCDR1、3及びCDR2の一部をヒト抗体重鎖可変領域DP7に移植させて、上記HKR127HCv(HZII)を製造した

40

後、これから下記のPCRによって製造した。

【0054】

重鎖の分泌に必要な重鎖リーダーシーケンスとヒト抗体重鎖不変領域遺伝子は、pRC/MV-HC-HuS(KCTC0229BP)から合成した。

【0055】

上記のリーダーシーケンス、ヒト化重鎖可変領域遺伝子HKR127HCv(HZII)、ヒト化重鎖不変領域遺伝子を再組み換えPCRによって連結して最終的にヒト化重鎖遺伝子HKR127HC(I)を製造した(図2a参照)。

【0056】

PCRに使用した始発体を配列1ないし配列12に記述した。

50

PCR反応条件は、94℃で1分、55℃で1分、72℃で1分、Taq DNA 重合酵素(polymerase)を使用して、30回行った。まず、配列1と配列2、配列3と配列4、配列5と配列6、配列7と配列8、配列9と配列10、配列11と配列12の始発体を使用して得たDNA断片の中から、配列1と配列2(113bp)、配列3と配列4(96bp)、配列5と配列6(120bp)、配列7と配列8(78bp)、配列9と配列10(87bp)の始発体を使用して得たDNA断片をアニーリングして配列1と配列10の始発体で再組み換えPCRして連結した。上記の合成された断片(431bp)を配列11と配列12の始発体を使用して合成されたDNA断片(1015bp)と配列1と配列12の始発体を使用して連結した。

【0057】

最終的に合成されたヒト化抗体重鎖遺伝子(約1431bp)を制限酵素EcoRIと制限酵素SalIで両端を切り、pBluescript SK(+)にクローニングしてpHKR127HC(I)と命名した。製造されたヒト化抗体重鎖遺伝子の塩基配列は、DNAシーケンシング(Sequencing)によって確認した。 10

【0058】

また、HKR127HC(I)をさらにヒト化するために二十日鼠フレームワークアミノ酸残基をより少なく含むHKR127(III)を製造した。上記のHKR127HC(I)と同一の製造方法で PCRには、配列24ないし配列28を始発体を使用した。

【0059】

<実施例 2> ヒト化軽鎖遺伝子の製造

ヒト化軽鎖可変領域を製造するために、まず、KR127の可変領域遺伝子とアミノ酸配列が最も類似したヒト抗体DPK12をジェンバンクデータベースから選抜し、上記KR127の軽鎖可変領域とDPK12抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列及び塩基配列を比較して、これを根拠に最初のヒト化軽鎖遺伝子HKR127KCv(HZII)を考案した後、考案された最初のヒト化軽鎖を改善して二番目のヒト化軽鎖遺伝子HKR127KCv(HZI)を考案した(図3参照)。 20

【0060】

二番目のヒト化軽鎖は、二十日鼠抗体のCDR1、2、3といくつかのFR残基をヒト抗体軽鎖に移植させたものである。

【0061】

軽鎖の分泌に必要な軽鎖リーダーシーケンスとヒト抗体軽鎖不変領域遺伝子は、pKC-d hfr-HuS(KCTC 0230BP)から合成した。

【0062】

上記のリーダーシーケンス、ヒト化軽鎖可変領域遺伝子HKR127KCv(HZI)、ヒト化軽鎖不変領域遺伝子を再組み換えPCRによって連結し、最終的にヒト化軽鎖遺伝子HKR127KC(I)を製造した(図4参照)。 30

【0063】

PCRに利用した始発体を配列13から配列18に記述した。

PCR反応条件は、94℃で1分、55℃で1分、72℃で1分、30回行った。まず、配列13と配列14、配列15と配列16、配列17と配列18の始発体を使用して得たDNA断片中、配列13と配列14(101bp)、配列15と配列16(159bp)の始発体を使用して得たDNA断片をアニーリングして配列3と配列16の始発体で再組み換えPCRして、連結し合成された断片(248bp)を配列17と配列18の始発体で合成されたDNA断片(515bp)と配列9と配列18の始発体で連結し、最終的にヒト化抗体軽鎖遺伝子(736bp)を合成した。 40

【0064】

合成されたヒト化抗体軽鎖遺伝子を制限酵素HindIIIと制限酵素SalIで両端を切り、pBlue script SK(+)にクローニングしてpHKR127KCと命名した。合成されたヒト化抗体軽鎖遺伝子の塩基配列は、DNAシーケンシングによって確認した。

【0065】

<実施例 3> ヒト化重鎖発現プラスミドの製造

プラスミドpHKR127HC(I)及びpHKR127HC(III)を制限酵素SalIで切断後、クレナウ(Klenow)酵素で端をブラント(blunt)にした後、制限酵素NotIで再び切って、ヒト化重鎖遺伝子を分離した。 50

【0066】

一方、pRc/CMV (Invitrogen社製品)を制限酵素XbaIで切って、クレナウ酵素で端をブラントにした後、制限酵素NotIで再び切ってベクターを分離した。

【0067】

分離したベクターに上記のヒト化重鎖遺伝子を連結し、ヒト化重鎖発現ベクターpCMV-HKR127HC及びpCMV-HKR127(III)HCを製作した。製作したヒト化重鎖発現ベクターpCMV-HKR127HC及びpCMV-HKR127(III)HCは、KCTCに寄託した(寄託番号:KCTC0531BP、KCTC0691BP)、完成したベクターは、図5a及び図5cに示した。

【0068】

10

<実施例 4> ヒト化軽鎖発現プラスミドの製造

プラスミドpHKR359KCを制限酵素HindIIIとApaIで切って、ヒト化軽鎖遺伝子を分離し、これをpCMV-dhfr(KCTC8671P)のHindIIIとApaI位置に挿入し、ヒト化軽鎖発現ベクターpKC-dhfr-HKR127を製作した。

【0069】

製作したヒト化軽鎖発現ベクターpKC-dhfr-HKR127をKCTCに寄託した(寄託番号:KCTC0529BP)。完成したベクターは、図5bに示した。

【0070】

<実施例 5> ヒト化抗体のCOS7細胞で発現

仔牛血清が10%添加されたDMEM培養培地(GIBCO社製品)で37℃、5%炭酸ガスを維持しながらCOS7細胞を継代培養した。上記の細胞を100mm皿に接種して、37℃で一晩培養した。

【0071】

一方、上記の実施例3と実施例4で得た、発現ベクターpCMV-HKR127HCとpKC-dhfr-HKR127の5μgを各々OPTI MEM I 800μlで希釈して、50μlのリポフェクタミン(Lipofectamine, GIBCO社製品)もOPTI MEM I 800μlで希釈した。上記の混合物を15mlチューブで混合後、15分以上室温で放置した。混合物を放置する間に、前日接種しておいたCOS7細胞をOPTI MEM I (GIBCO社製品)で2回洗浄した。

【0072】

DNA-リポフェクタミン混合物に6.4mlのOPTI MEM Iを添加して混合した後、上記で洗浄したCOS7細胞上に均一に注いだ。炭酸ガス恒温器で72時間の間培養後、培養液の上層液を集め、超遠心濾過装置(Ultrafiltration Kit)で濃縮後、抗-ヒト抗体(anti-human IgG)と抗-ヒト抗体-HRPコンジュゲート(conjugate)を利用したサンドイッチエリサ(Sandwich ELISA)によって抗体の濃度を測定した。

【0073】

<実施例 6> ヒト化抗体のHBV表面抗原pre-S1に対する結合能

本研究室で製造したHBVの表面抗原pre-S1(アミノ酸1-56)をマイクロプレートの各ウェルに1μgずつコーティングし、実施例5で定量された抗体の濃度に基づき、抗体0、0.25、0.5、1、2、3、4、5、7.5、10、20、40ngずつを添加した後、抗-ヒト抗体(Fc specific)に西洋ワサビ過酸化酵素(horseradish peroxidase)が結合(conjugation)された抗体を2次抗体として結合させる間接エリサを行い、492nmで吸光度を測定した。

【0074】

対照群には、精製したKR127を使用し、その結果は、表1と表2に示した。KR127の抗原結合能を分析する時には、抗-二十日鼠抗体(Fc specific)に西洋ワサビ過酸化酵素(horseradish peroxidase)が結合(conjugation)された抗体を2次抗体に使用した。

【0075】

【表1】

KR127I と HZKR127I の HBV 表面抗原 pre-S1 に対する結合能 (吸光度、492nm)

添加量 (ng)	0	0.25	0.5	1	2	3	4	5	7.5	10	20	40
KR127	0.09	0.12	0.15	0.20	0.30	0.36	0.43	0.54	0.60	0.80	1.16	1.64
HZKR127I	0.09	0.12	0.17	0.26	0.35	0.43	0.60	0.71	0.79	1.12	1.48	1.77

【0076】

【表2】

10

HZKR127I と HZKR127III の HBV 表面抗原 pre-S1 に対する結合能 (吸光度、492nm)

添加量 (ng)	0	0.25	0.5	1	2	3	4	5	7.5	10	20	40
HZKR127I	0.06	0.19	0.25	0.58	0.65	0.75	0.86	1.02	1.25	1.39	1.95	2.07
HZKR127III	0.06	0.20	0.37	0.60	0.87	1.10	1.24	1.37	1.65	1.89	2.04	2.10

【0077】

<実施例 7> ヒト化抗体の抗原結合親和度

20

ヒト化抗体の HBVpre-S1 抗原に対する親和度を調べるために、競争的エリサ方法 (Competitive ELISA; Ryu et al., J. Med. Virol., 52, 226, 1997) を利用して抗原結合親和度を測定した。

【0078】

まず、 $1 \times 10^{-7} \sim 1 \times 10^{-12}$ M 濃度の HBV 抗原に対して各々 COS7 から生産した抗体と対照群の KR127 5 ng ずつを 37℃ で 2 時間の間結合させた後、その反応物を 96 ウェルにコーティングされている抗原と結合させた。

【0079】

上記の結果から HBV と結合した抗原の量を最終的に測定し、その結果を図 6 に示した。

KR127 と HZKR127I の抗原結合親和度を比較した結果、KR127 とよく似た値 ($7 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$) を示した (図 6 a 参照)。

30

【0080】

HZKR127I と HZKR127III の抗原結合親和度を比較してみた結果、HZKR127I は $7 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ 、HZKR127III は $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ で大きな差は見られなかった (図 6 b 参照)。

【0081】

発明の効果

上記で詳しく見たように、本発明の HBV 表面抗原 pre-S1 に対するヒト化抗体は、二十日鼠単一クローン抗体と類似した抗原結合能を示す反面、二十日鼠単一クローン抗体よりアミノ酸残基が、さらにヒト化され人体内での免疫誘発能が顕著に減少することにより、HBV 感染の予防及び治療に有用に利用できる。

40

【0082】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> KOREA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
KOREA GREEN CROSS CORPORATION

<120> HUMANIZED ANTIBODY SPECIFIC FOR SURFACE ANTIGEN PRE-S1 OF HBV AND
PREPARATION METHOD THEREOF

<130> 9FP0-11-03

10

<150> KR 1998-49663

<151> 1998-11-19

<160> 28

<170> KOPATIN 1.5

<210> 1

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> synthetic oligonucleotide primer 1

<400> 1

gagaattcac attcacgatg tacttg

26

<210> 2

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> synthetic oligonucleotide primer 2

<400> 2

ggccccaggc ttcaccactt cagctcc

27

<210> 3
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic oligonucleotide primer 3

<400> 3
gtgaagcctg gggcctca 18

10

<210> 4
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic oligonucleotide primer 4

<400> 4
agaactactg aatgcgtagc cagaagc 27

20

<210> 5
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic oligonucleotide primer 5

<400> 5
gcattcagta gttcttggat gaactgg 27

30

<210> 6
<211> 27
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic oligonucleotide primer 6

<400> 6

aatccgtcca atccactcaa gaccctg

27

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> synthetic oligonucleotide primer 7

<400> 7

tggattggac ggatttatcc t

21

<210> 8

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> synthetic oligonucleotide primer 8

<400> 8

ggatttgtct gcagtcagtg tggccttgcc ctggaactt

39

<210> 9

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> synthetic oligonucleotide primer 9

<400> 9
actgcagaca aatccacgag cacagcctac atggagctc 39

<210> 10
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic oligonucleotide primer 10 10

<400> 10
gtcgtactct cttgcacaga aatagaccgc cgt 33

<210> 11
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic oligonucleotide primer 11 20

<400> 11
gcaagagagt acgacgaggc ttactggggc caa 33

<210> 12
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic oligonucleotide primer 12 30

<400> 12
cggtcgactc attaccgg agacag 26

<210> 13

<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic oligonucleotide primer 13

<400> 13

caaagcttgg aagcaagatg gattca

26

10

<210> 14
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic oligonucleotide primer 14

<400> 14

tggagtttgg gtcacaaaga tatccccaca ggtacc

36

20

<210> 15
<211> 48
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic oligonucleotide primer 15

<400> 15

atgacccaaa ctccactttc ttgtcgggt acccctggac aaccagcc

48

30

<210> 16
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic oligonucleotide primer 16

<400> 16

caccagatag attaggcgct ttggagactg gcctggcctt

39

<210> 17

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> synthetic oligonucleotide primer 17

<400> 17

ctaattctatc tgggtgtctaa actggactct ggagtcctt

39

<210> 18

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> synthetic oligonucleotide primer 18

<400> 18

gaagtcgacc taacact

17

<210> 19

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> variable region of heavy chain in mouse KRI27 antibody

<400> 19

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

1

5

10

15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Ser
 20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

10

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Val Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Arg Glu Tyr Asp Glu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ala
 115

20

<210> 20
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> variable region of humanized heavy chain HKR127HC(HZI)

<400> 20
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

30

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Ser
 20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Arg Glu Tyr Asp Glu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

10

Val Ser Ser
 115

<210> 21
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> variable region of humanized heavy chain HKR127HC(HZI11)

20

<400> 21
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Ser
 20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

30

Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95
 Ala Arg Glu Tyr Asp Glu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
 115

<210> 22
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> variable region of light chain in mouse KR127 antibody

<400> 22
 Asp Ile Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ile Leu Ser Val Thr Ile Gly
 1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
 20 25 30

Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ile Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Val Gln Gly
 85 90 95

Thr His Phe Pro Gln Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg

10

20

30

<210> 23
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> variable region of humanized light chain

<400> 23
 Asp Ile Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

10

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
 20 25 30

Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

20

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Val Gln Gly
 85 90 95

Thr His Phe Pro Gln Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg

30

<210> 24
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic oligonucleotide primer 24

<400>	24		
gttcatccaa gaactggtga aggtgta		27	
<210>	25		
<211>	27		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220>			
<223>	synthetic oligonucleotide primer 25		10
<400>	25		
agttcttgga tgaactgggt gcgacga		27	
<210>	26		
<211>	27		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220>			
<223>	synthetic oligonucleotide primer 26		20
<400>	26		
gctcgtggat ttgtctgcag tcattgt		27	
<210>	27		
<211>	27		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220>			
<223>	synthetic oligonucleotide primer 27		30
<400>	27		
gacaaatcca cgagcacagt ctacatg		27	
<210>	28		
<211>	27		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220>			
<223>	synthetic oligonucleotide primer 28		40
<400>	28		
gtcgtactct ctgcacagt aatacac		27	

【 0 0 8 3 】

【図面の簡単な説明】

【図 1 a】HBV表面抗原pre-S1に対する二十日鼠単一クローン抗体KR127及びヒト化抗体重鎖の可変領域（V_H領域）のアミノ酸配列及び塩基配列を比較したものである。

【図 1 b】HBV表面抗原pre-S1に対する二十日鼠単一クローン抗体KR127及びヒト化抗体重鎖の可変領域（V_H領域）のアミノ酸配列及び塩基配列を比較したものである。

◇ : KR127 ; ● : HZKR127I ; ○ : HZKR127III

FIG. 1b

FIG. 1a

	Q	V	Q	L	Q	S	G	P	E	L	V	K	P		
KR127VH	CAG	GTC	CAG	CTG	CAG	GAT	TCT	GGA	GCT	GAA	GTG	AAG	AGG	CCT	42
DP7	CAG	GTC	CAG	CTG	CTG	GAT	TCT	GGA	GCT	GAA	GTG	AAG	AGG	CCT	
H2II	CAG	GTC	CAG	CTG	CTG	GAT	TCT	GGA	GCT	GAA	GTG	AAG	AGG	CCT	
H2I	CAG	GTC	CAG	CTG	CTG	GAT	TCT	GGA	GCT	GAA	GTG	AAG	AGG	CCT	
H2III	CAG	GTC	CAG	CTG	CTG	GAT	TCT	GGA	GCT	GAA	GTG	AAG	AGG	CCT	42
H2IIII	-	-	-	-	V	-	-	A	-	V	K	-	-	-	
H2I	-	-	-	-	V	-	-	A	-	V	-	-	-	-	
H2IIII	-	-	-	-	V	-	-	A	-	V	K	-	-	-	
	G	A	S	G	K	I	S	C	K	A	S	G	Y	A	
KR127VH	GGG	GCC	TCA	GTG	AAG	ATT	TCC	TGC	AAA	GCT	TCT	GGC	TAC	ACC	84
DP7	GGG	GCC	TCA	GTG	AAG	ATT	TCC	TGC	AAA	GCT	TCT	GGC	TAC	ACC	
H2II	GGG	GCC	TCA	GTG	AAG	ATT	TCC	TGC	AAA	GCT	TCT	GGC	TAC	ACC	
H2I	GGG	GCC	TCA	GTG	AAG	ATT	TCC	TGC	AAA	GCT	TCT	GGC	TAC	ACC	
H2III	GGG	GCC	TCA	GTG	AAG	ATT	TCC	TGC	AAA	GCT	TCT	GGC	TAC	ACC	84
H2II	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
H2I	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	T	
H2IIII	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	F	S	S	T	W	M	N	W	V	K	Q	R	P	G	
KR127VH	TTC	AGT	AGT	TCT	TGG	ATG	AAC	TGG	GTG	AGA	CAG	AGC	CCT	GGA	126
DP7	TTC	ACC	AGC	TAC	TAT	ATG	AAC	TGG	GTG	CGA	CAG	GGC	CCT	GGA	
H2II	TTC	ACC	AGT	TCT	TGG	ATG	AAC	TGG	GTG	CGA	CAG	GGC	CCT	GGA	
H2I	TTC	ACC	AGT	TCT	TGG	ATG	AAC	TGG	GTG	CGA	CAG	GGC	CCT	GGA	
H2III	TTC	ACC	AGT	TCT	TGG	ATG	AAC	TGG	GTG	CGA	CAG	GGC	CCT	GGA	
H2II	-	T	-	Y	-	-	-	-	-	R	-	A	-	-	
H2I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	A	-	-	
H2IIII	-	T	-	-	-	-	-	-	-	R	-	A	-	-	
	Q	G	L	E	W	I	G	R	I	V	P	G	D	G	
KR127VH	CAG	GGT	CTT	GAG	TGG	ATT	GGA	CGG	ATT	TAT	CCT	GGA	GAT	GGA	168
DP7	CAA	GGG	CTT	GAG	TGG	ATT	GGA	ATA	ATC	ACT	AGT	GGT	GGT	GGT	
H2II	CAG	GGT	CTT	GAG	TGG	ATT	GGA	CGG	ATT	TAT	CCT	GGA	GAT	GGA	
H2I	CAG	GGT	CTT	GAG	TGG	ATT	GGA	CGG	ATT	TAT	CCT	GGA	GAT	GGA	
H2III	CAG	GGT	CTT	GAG	TGG	ATT	GGA	CGG	ATT	TAT	CCT	GGA	GAT	GGA	
H2II	-	-	-	-	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
H2I	-	-	-	-	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
H2IIII	-	-	-	-	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	D	T	N	Y	N	G	K	F	K	G	K	A	T	L	
KR127VH	GAT	ACT	ACA	TAC	AAT	GGG	AAG	TTC	CAG	GGC	AGA	GCC	ACA	CTG	210
DP7	AGC	ACA	AGT	TAC	GCA	CAG	AAG	TTC	CAG	GGC	AGA	GTC	ACA	ATG	
H2II	AGT	ACT	ACT	TAC	GCA	CAG	AAG	TTC	CAG	GGC	AGA	GTC	ACA	ATG	
H2I	GAT	ACT	ACT	TAC	GCA	CAG	AAG	TTC	CAG	GGC	AGA	GTC	ACA	ATG	
H2III	GAT	ACT	ACT	TAC	GCA	CAG	AAG	TTC	CAG	GGC	AGA	GTC	ACA	ATG	
H2II	-	-	-	-	A	Q	-	-	-	R	V	-	-	M	
H2I	-	-	-	-	A	Q	-	-	-	R	V	-	-	M	
H2IIII	-	-	-	-	A	Q	-	-	-	R	V	-	-	M	

【 ㊦ 1 b 】

[illegible]

FIG. 2a

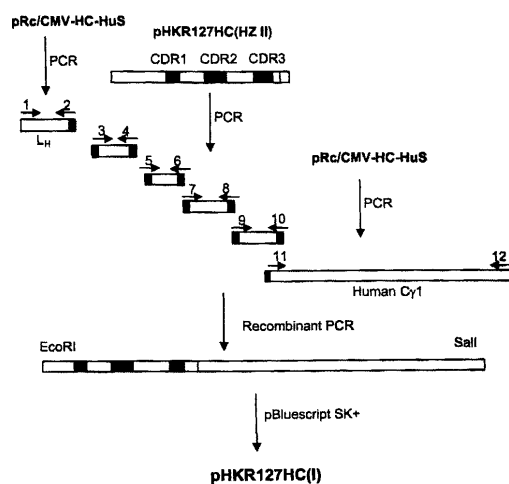


FIG. 2b

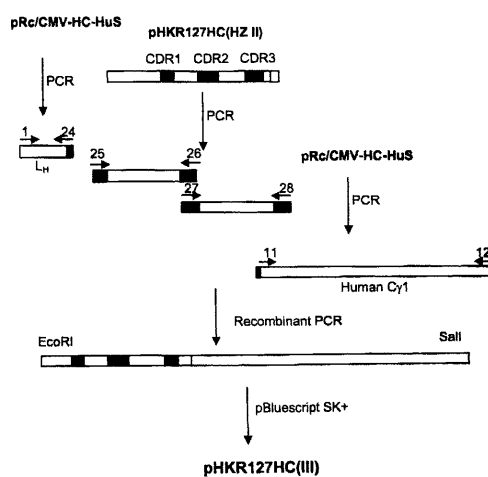


FIG. 3a

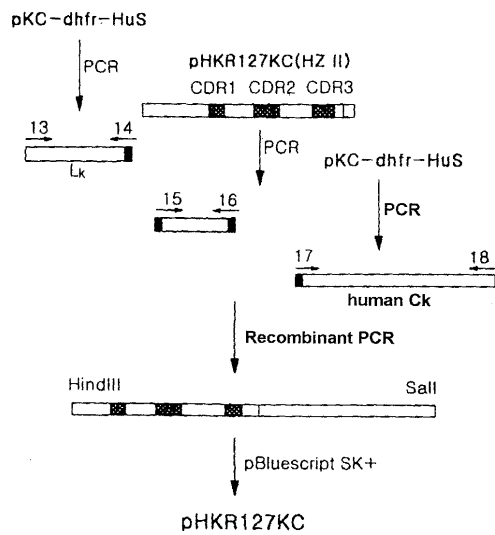
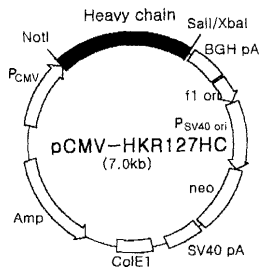
RR127VK	D	A	T	T	M	T	C	A	T	P	L	I	L	S	V	T	
DPK12	GAT	ATC	ATG	ATG	ATC	ACC	CAG	ACT	CCA	CTT	ATT	TTG	TGC	GTT	ACC	42	
H2I1	GAT	ATT	GTG	ATC	ACC	CAG	ACT	CCA	CTT	ATT	TTG	TGC	GTT	ACC			
H2I1	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-	S	-	-	-	-		
H2I1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	-	-	-	-		
RR127VK	I	G	Q	P	A	S	I	S	C	K	S	S	Q	S			
DPK12	ATT	GGA	GCA	CAG	GCC	TCC	ATC	TCT	TGC	AAG	TCA	AGT	CAG	AGC	84		
H2I1	CTC	GGA	GCA	CAG	GCC	TCT	ATC	TCT	TGC	AAG	TCA	AGT	CAG	AGC			
H2I1	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
H2I1	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
RR127VK	L	L	Y	S	N	G	K	T	Y	L	N	W	L	L		126	
DPK12	CTC	TTG	TAT	AGT	AAT	GGA	AAA	ACC	TAT	TTG	AT	TGG	TAC	TTG			
H2I1	CTC	TTG	TAT	AGT	AAT	GGA	AAA	ACC	TAT	TTG	AT	TGG	TAC	TTG			
H2I1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
H2I1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
RR127VK	Q	R	P	G	Q	S	P	K	R	L	I	Y	L	V		168	
DPK12	CAG	AGG	CCA	GGC	CAG	TCT	CCA	AGG	CGC	CTG	ATC	TAT	GAA	GTT			
H2I1	CAG	AGG	CCA	GGC	CAG	TCT	CCA	AGG	CGC	CTG	ATC	TAT	GAA	GTT			
H2I1	-	K	-	-	-	P	-	Q	L	-	-	-	-	-	-		
H2I1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
RR127VK	S	K	L	D	S	G	V	P	D	R	F	T	G	S		210	
DPK12	TCT	AAA	CGT	GTC	TCT	GGA	GTC	CCT	GAC	AGG	TTG	ACT	GGC	AGT			
H2I1	TCT	AAA	CGT	GTC	TCT	GGA	GTC	CCT	GAC	AGG	TTG	ACT	GGC	AGT			
H2I1	-	-	R	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
H2I1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	-	-	-	-		

FIG. 3b

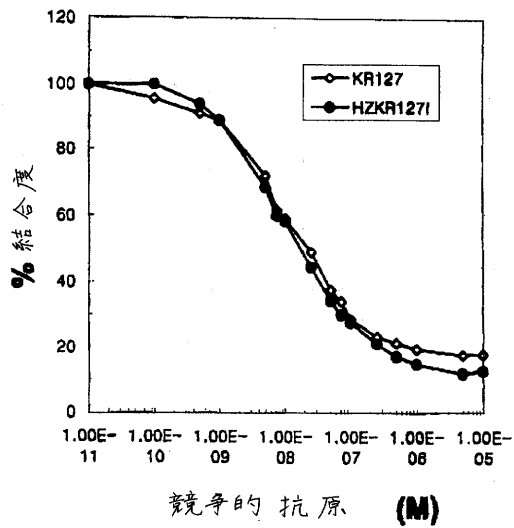
[illegible]

【図 4】

FIG. 4

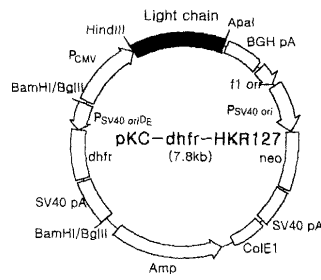
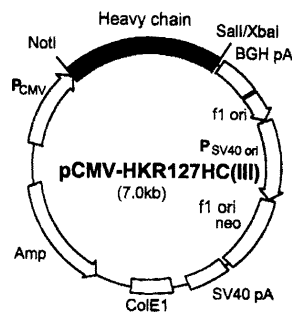
【図 5 a】
FIG. 5a

【図 6 a】

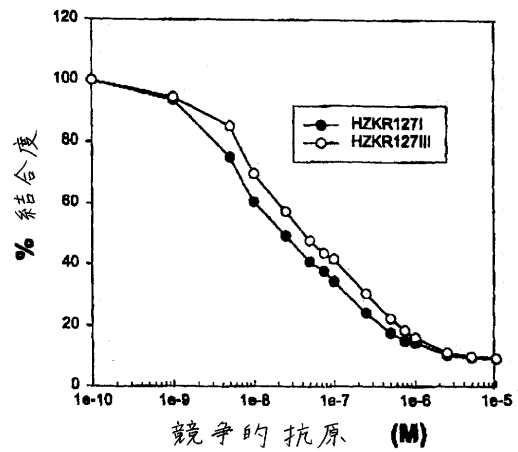


【図 5 b】

FIG. 5b

【図 5 c】
FIG. 5c

【図 6 b】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷

C 1 2 P 21/08

F I

C 1 2 N 15/00 Z N A A

(74)代理人 100085132

弁理士 森田 俊雄

(74)代理人 100083703

弁理士 仲村 義平

(74)代理人 100091409

弁理士 伊藤 英彦

(74)代理人 100096781

弁理士 堀井 豊

(74)代理人 100096792

弁理士 森下 八郎

(72)発明者 ホン, ヒョ・ジョン

大韓民国、3 0 5-3 5 0 タエジョン-シ、ユーソン-ク、カジョン-ドン、2 3 7、キット・
アパートメント、ナンバー・1 5-4 0 1

(72)発明者 リュ, チュン・ジェイ

大韓民国、3 0 5-3 3 3 タエジョン-シ、ユーソン-ク、オウン-ドン、9 9、ハンビット・
アパートメント、ナンバー・1 3 6-1 2 0 3

(72)発明者 フア, ヒャンスク

大韓民国、3 0 5-3 9 0 タエジョン-シ、ユーソン-ク、ジョンミン-ドン、エキスポ・アパ
ートメント、ナンバー・1 0 6-1 5 0 8

審査官 高堀 栄二

(56)参考文献 国際公開第9 3/1 6 1 9 2 (WO, A 1)

Hybridoma, Vol. 19, No. 2 (2000) p. 185-189

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, D B名)

SwissProt/PIR/GeneSeq

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

BIOSIS/WPI(DIALOG)

PubMed