

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4550947号
(P4550947)

(45) 発行日 平成22年9月22日 (2010.9.22)

(24) 登録日 平成22年7月16日 (2010.7.16)

(51) Int. Cl.	F I	
C 0 7 K 1 6 / 1 8 (2006.01)	C O 7 K 1 6 / 1 8	
A 6 1 K 3 9 / 3 9 5 (2006.01)	A 6 1 K 3 9 / 3 9 5	E
A 6 1 P 3 5 / 0 0 (2006.01)	A 6 1 K 3 9 / 3 9 5	T
C 1 2 N 5 / 1 0 (2006.01)	A 6 1 P 3 5 / 0 0	
C 1 2 N 1 5 / 0 9 (2006.01)	C 1 2 N 5 / 0 0	A
請求項の数 19 (全 97 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願平9-66981
 (22) 出願日 平成9年3月19日 (1997.3.19)
 (65) 公開番号 特開平10-257893
 (43) 公開日 平成10年9月29日 (1998.9.29)
 審査請求日 平成16年3月17日 (2004.3.17)
 審判番号 不服2007-12718 (P2007-12718/J1)
 審判請求日 平成19年5月2日 (2007.5.2)

微生物の受託番号 FERM BP-5105
 微生物の受託番号 FERM BP-5106
 微生物の受託番号 FERM BP-5527
 微生物の受託番号 FERM BP-5528

(73) 特許権者 000001029
 協和発酵キリン株式会社
 東京都千代田区大手町1丁目6番1号
 (72) 発明者 中村 和靖
 東京都町田市本町田1411-10
 (72) 発明者 花井 陳雄
 神奈川県相模原市大野台7-9-15

合議体
 審判長 鶴飼 健
 審判官 加々美 一恵
 審判官 平田 和男

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ガングリオシドGM2に対するヒト型相補性決定領域 (CDR) 移植抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

抗体の重鎖 (H鎖) 可変領域 (V領域) が配列番号74、軽鎖 (L鎖) V領域が配列番号75記載のアミノ酸配列からなるガングリオシドGM2に特異的に反応するヒト型CDR移植抗体。

【請求項2】

抗体のH鎖V領域が配列番号74、L鎖V領域が配列番号76記載のアミノ酸配列からなるガングリオシドGM2に特異的に反応するヒト型CDR移植抗体。

【請求項3】

抗体のH鎖V領域が配列番号77、L鎖V領域が配列番号75記載のアミノ酸配列からなるガングリオシドGM2に特異的に反応するヒト型CDR移植抗体。

【請求項4】

抗体のH鎖V領域が配列番号77、L鎖V領域が配列番号78記載のアミノ酸配列からなるガングリオシドGM2に特異的に反応するヒト型CDR移植抗体。

【請求項5】

抗体のH鎖V領域が配列番号74、L鎖V領域が配列番号75記載のアミノ酸配列からなるガングリオシドGM2に特異的に反応する抗体KM8966。

【請求項6】

抗体のH鎖V領域が配列番号74、L鎖V領域が配列番号76記載のアミノ酸配列からなるガングリオシドGM2に特異的に反応する抗体KM8967。

【請求項7】

抗体のH鎖V領域が配列番号77、L鎖V領域が配列番号75記載のアミノ酸配列からなるガングリオシドGM2に特異的に反応する抗体KM8970。

【請求項 8】

抗体のH鎖V領域が配列番号77、L鎖V領域が配列番号78記載のアミノ酸配列からなるガングリオシドGM2に特異的に反応する抗体KM8969。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のアミノ酸配列をコードするDNA。

【請求項 10】

請求項 9 記載のDNAまたはその一部を含む組換えベクター。

10

【請求項 11】

請求項 10 記載の組換えベクターが、ヒト型キメラ抗体およびヒト型CDR移植抗体発現用タンデムカセットベクター、pKANTEX93に由来する組換えベクター。

【請求項 12】

請求項 10 または 11 記載の組換えベクターを含有する形質転換体。

【請求項 13】

請求項 5 記載の抗体KM8966を生産する形質転換株KM8966 (FERM BP-5105)。

【請求項 14】

請求項 6 記載の抗体KM8967を生産する形質転換株KM8967 (FERM BP-5106)。

【請求項 15】

請求項 7 記載の抗体KM8970を生産する形質転換株KM8970 (FERM BP-5528)。

20

【請求項 16】

請求項 8 記載の抗体KM8969を生産する形質転換株KM8969 (FERM BP-5527)。

【請求項 17】

請求項 12 ~ 16 のいずれか一項に記載の形質転換体を用いた請求項 1 ~ 8 記載の抗体の製造法。

【請求項 18】

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の抗体を有効成分として含有する抗腫瘍剤。

【請求項 19】

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の抗体を有効成分として含有する癌の診断薬。

30

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ガングリオシドGM2 (以下GM2と表記する) に対するヒト型相補性決定領域 (Complementarity Determining Region、以下CDRと表記する) 移植抗体に関する。本発明はさらに、上記の抗体、特にその可変領域 (以下V領域と表記する) をコードするDNAに関する。本発明は、該DNAを含んでなる発現ベクター、および該発現ベクターにより形質転換された宿主に関する。本発明はさらに、GM2に対するヒト型CDR移植抗体の製造方法、およびその治療および診断上の用途に関する。

【0002】

40

【従来の技術】

一般にマウス抗体をヒトに投与した場合、ヒト体内において、マウス抗体は異物として認識されるため、マウス抗体に対するヒト抗体 (Human Anti Mouse Antibody、以下HAMAと表記する) が惹起され、それらは投与されたマウス抗体と反応し、副作用を引き起こすこと (Dillman, R. O. らのJ. Clin. Oncol., 2, 881, 1984; Meeker, T. C. らのBlood, 65, 1349, 1985; LoBuglio, A. F. らのJ. Natl. Cancer Inst., 80, 932, 1988; Houghton, A. N. らのProc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82, 1242, 1985)、また、投与されたマウス抗体がはやくクリアランスされ (Pimm, M. V. らのJ. Nucl. Med., 26, 1011, 1985; Meeker, T. C. らのBlood, 65, 1349, 1985; Khazaeli, M. B. らのJ. Natl. Cancer Inst., 80, 937, 1988)、抗体の効果を減じてしまうことなどが知られている (Shawler, D.

50

L.らのJ. Immunol., 135, 1530, 1985 ; Courtenay - Luck, N. S. らのCancer Res., 46, 6489, 1986)。

【 0 0 0 3 】

これらの問題を解決するため、遺伝子組換え技術を利用してマウス抗体をヒト型キメラ抗体あるいはヒト型CDR移植抗体のようなヒト化抗体にすることが試みられている。ヒト型キメラ抗体とは、抗体V領域がヒト以外の動物の抗体由来で定常領域（以下C領域と表記する）がヒト抗体由来である抗体であり（Morrison, S. L. らのProc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, 81, 6851, 1984）、ヒトに投与した場合、HAMAはほとんど惹起されず、血中半減期が6倍伸びることが報告されている（LoBuglio, A. F. らのProc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, 86, 4220, 1989）。ヒト型CDR移植抗体とは、ヒト抗体のCDRをヒト以外の動物の抗体由来のCDRと置換した抗体のことであり（Jones, P. T.らのNature, 321, 522, 1986）、再形成ヒト抗体(reshaped human antibody)ともいわれている。ヒト型CDR移植抗体は、サルを用いた実験でマウス抗体に比べ免疫原性が低下し、血中半減期が4～5倍伸びることが報告されている（Hakimi, J.らのJ. Immunol., 147, 1352, 1991）。

10

【 0 0 0 4 】

また、抗体の細胞傷害活性に関しても、マウス抗体Fc領域よりも、ヒト抗体Fc領域の方がヒト補体やヒトエフェクター細胞を活性化することが報告されている。例えば、GD2に対するマウス抗体は、ヒト抗体Fc領域を有するヒト型キメラ抗体に変換することにより、ヒトエフェクター細胞を介した抗腫瘍効果が上昇することが報告されており（Mueller, B. M. らのJ. Immunol., 144, 1382, 1990）、また、CAMPATH - 1抗原に対するヒト型CDR移植抗体についても同様の結果が報告されている（Reichmann, L. らのNature, 332, 323, 1988）。これらの結果は、ヒトの臨床に使用する抗体としては、ヒト化抗体の方がマウス抗体より望ましいことを示している。

20

【 0 0 0 5 】

シアル酸を有する糖脂質の一種であるガングリオシドは動物の細胞膜を構成しており、親水性側鎖である糖鎖と、疎水性側鎖であるスフィンゴシンおよび脂肪酸とから構成される分子である。ガングリオシドの種類と発現量は、細胞種、臓器種、動物種等によって異なることが知られている。さらに細胞が癌化する過程においては、ガングリオシドの発現が量的および質的に変化を起こすことも知られている（Hakomori, S.らのCancer Res., 45, 2405, 1985）。例えば、悪性度が高いといわれている神経外胚葉系腫瘍である神経芽細胞腫、肺小細胞癌およびメラノーマでは、正常細胞にはほとんど認められないガングリオシドGD2、GD3、GM2等が発現していることが報告されており（Pukel, C. S.らのJ. Exp. Med., 155, 1133, 1982 ; Nudelman, E.らのJ. Biol. Chem., 257, 12752, 1982 ; Werkmeister, J. A.らのCancer Res., 47, 225, 1987 ; Mujoo, K. らのCancer Res., 47, 1098, 1987 ; Cheung, N. V. らのCancer Res., 45, 2642, 1985 ; Tai, T.らのProc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, 80, 5392, 1983）、これらガングリオシドに対する抗体はヒトの様々な癌の診断および治療に有用であると考えられている。

30

【 0 0 0 6 】

GM2 に対するヒト抗体は、ヒトメラノーマの治療に有用であることが示されている（Irie, R. F. らのLancet, 1, 786, 1989）。しかし、現在までに報告されたGM2に対する抗体は、ヒト以外の動物由来か、ヒト抗体ではIgMクラスの抗体のみである（Natoli, E. J. らのCancer Res., 46, 4116, 1986 ; Miyake, M.らのCancer Res., 48, 6154, 1988 ; Cahan, L. D.らのProc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, 79, 7629, 1982 ; Fredman, P. らのJ. Biol. Chem., 264, 12122, 1989）。IgMクラスの抗体は、分子量約15万であるIgGクラスの抗体と比較して、分子量が大きく（約90万）5量体構造を有しており、精製が難しい等の問題に加えて、血中半減期が短い、抗腫瘍効果が弱い（Bernstein, I. D.ら、Monoclonal Antibodies, Plenum Press, p.275, 1980）等の問題があり、ヒトへの応用には不適である。

40

【 0 0 0 7 】

以上のことから、ヒトへの応用にあたり、体内でHAMAが惹起されず、副作用が減少し、血

50

中半減期が延長し、さらには抗腫瘍効果が増大し、ヒト癌に対する高い診断および治療効果が期待される、IgGクラスのGM2に対するヒト化抗体が望まれる。

本発明者らは、特開平06-205694 においてヒト癌の診断および治療に有用な、GM2に特異的に反応するIgGクラスのヒト型キメラ抗体およびヒト型CDR移植抗体の製造方法を開示している。しかし、ヒト型キメラ抗体と同程度のGM2に対する結合活性、結合特異性およびGM2陽性細胞に対する抗腫瘍効果を有するヒト型CDR移植抗体はこれまでのところ得られていない。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】

前述したように、ヒト型CDR移植抗体はヒト癌等の診断および治療に有用であると考えられる。しかし、ヒト抗体の重鎖（以下、H鎖と表記する）V領域および軽鎖（以下、L鎖と表記する）V領域のCDRのみをヒト以外の動物抗体のH鎖可変領域およびL鎖可変領域のCDRに置換しただけでは、抗体活性が低下するため、ヒト型キメラ抗体と同程度のGM2に対する結合活性、結合特異性およびGM2陽性細胞に対する抗腫瘍効果を有するIgGクラスのGM2に対するヒト型CDR移植抗体（以下抗GM2ヒト型CDR移植抗体と表記する）の製造方法、さらには、すべての抗体に適応可能なヒト型CDR移植抗体の製造方法の確立が望まれている。

【0009】

【課題を解決するための手段】

本発明は、抗体のH鎖V領域のCDR 1～3が、配列番号1～3記載のアミノ酸配列、抗体のL鎖V領域のCDR 1～3が、配列番号4～6記載のアミノ酸配列からなり、H鎖およびL鎖V領域のフレームワーク（以下、FRと表記する）のうち、少なくともどちらか一方がヒト抗体の各サブグループに由来する共通配列(Human Most Homologous Consensus Sequence ; 以下、HMHCSと表記する、Kabat, E. A.らのSequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991) から選択されたアミノ酸配列を含む、抗GM2ヒト型CDR移植抗体に関する。さらに、該ヒト型CDR移植抗体のH鎖およびL鎖V領域のFRにおいて、1個以上のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列からなり、かつ、ガングリオシドGM2に特異的に反応するヒト以外の動物由来モノクローナル抗体のV領域領域を有するヒト型キメラ抗体と同程度の抗原結合活性、結合特異性および抗体依存性細胞傷害活性(ADCC)、さらに、補体依存性細胞傷害活性(CDC)を有する、H鎖C領域がヒト抗体IgGクラスであるヒト型CDR移植抗体に関する。

【0010】

【発明の実施の形態】

ヒト型CDR移植抗体は、H鎖およびL鎖V領域のCDRのみがヒト以外の動物由来の抗体のアミノ酸配列からなり、H鎖およびL鎖のV領域のFRおよびC領域がヒト抗体のアミノ酸配列からなる。ヒト以外の動物としては、マウス、ラット、ハムスター、ラビット等、ハイブリドーマを作製することが可能であれば、いかなるものでもよい。

【0011】

H鎖およびL鎖のV領域のFRについては、既知のヒト抗体のアミノ酸配列であればいかなるものでもよいが、例えば、Protein Data Bankに登録されているヒト抗体のアミノ酸配列、HMHCS から選択されたアミノ酸配列等があげられる。好ましくは、ヒト以外の動物由来モノクローナル抗体のFRと高い相同性を有したHMHCSのFRのアミノ酸配列を用いる。

【0012】

前述したように、ヒト抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のCDRをヒト以外の動物抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のCDRに置換しただけでは、抗体活性が低下してしまう。そこで、本発明は、ヒト型CDR移植抗体のH鎖またはL鎖V領域のFRにおいて、1個以上のアミノ酸を他のアミノ酸で置換することにより、ガングリオシドGM2に特異的に反応するヒト以外の動物由来モノクローナル抗体のV領域を有するヒト型キメラ抗体と同程度の抗原結合活性、結合特異性および抗体依存性細胞傷害活性(ADCC)、さらには補体依存性細胞傷害活性(CDC)を有するヒト型CDR移植抗体およびその方法に関する。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 3 】

本発明のヒト型CDR移植抗体のH鎖およびL鎖V領域のFRにおいて、1個以上のアミノ酸を置換するとは、ヒト抗体のアミノ酸配列を有しているヒト型CDR移植抗体のH鎖およびL鎖V領域のFR中の置換したいアミノ酸残基を、ガングリオシドGM2に特異的に反応するヒト以外の動物由来モノクローナル抗体のH鎖およびL鎖V領域のFRの相当する位置のアミノ酸残基に置換することである。H鎖およびL鎖V領域のFRの置換アミノ酸残基の位置としては、具体的には、H鎖V領域のFR中、38位、40位、67位、72位、84位、98位、L鎖V領域のFR中、4位、11位、15位、35位、42位、46位、59位、69位、70位、71位、72位、76位、77位、103位などがあげられる。

【 0 0 1 4 】

ガングリオシドGM2に特異的に反応するヒト以外の動物由来モノクローナル抗体の一例としては、抗GM2マウスモノクローナル抗体KM796(FERM BP-3340、特開平4-311385)があげられる。ガングリオシドGM2に特異的に反応するヒト以外の動物由来モノクローナル抗体のV領域を有するヒト型キメラ抗体の一例としては、抗GM2キメラ抗体KM966(FERM BP-3931、特開平6-205694)があげられる。

【 0 0 1 5 】

ガングリオシドGM2に特異的に反応するヒト以外の動物由来モノクローナル抗体のV領域を有するヒト型キメラ抗体と同程度の抗原結合活性、結合特異性および抗体依存性細胞傷害活性(ADCC)を有する抗体の一例としては、形質転換株KM8966(FERM BP-5105)の生産するKM8966、形質転換株KM8967(FERM BP-5106)の生産するKM8967および形質転換株KM8970(FERM BP-5528)の生産するKM8970があげられる。

【 0 0 1 6 】

ガングリオシドGM2に特異的に反応するヒト以外の動物由来モノクローナル抗体のV領域を有するヒト型キメラ抗体と同程度の抗原結合活性、結合特異性、抗体依存性細胞傷害活性(ADCC)および補体依存性細胞傷害活性(CDC)を有する抗体の例としては、形質転換株KM8969(FERM BP-5527)の生産するKM8969があげられる。

【 0 0 1 7 】

以下に、抗GM2ヒト型CDR移植抗体の製造法を示す。

1. ヒト化抗体発現用ベクターの構築

ヒト化抗体発現用ベクターとは、ヒト抗体のH鎖およびL鎖のC領域をコードするcDNAが組み込まれた動物細胞用発現ベクターであり、動物細胞用発現ベクターにヒト抗体のH鎖およびL鎖のC領域をコードするcDNAをそれぞれ挿入する、あるいは単一の動物細胞用発現ベクターにヒト抗体のH鎖およびL鎖のC領域をコードするcDNAを挿入することにより(このようなベクターをタンデムカセットベクターと称す)、構築することができる。ヒト抗体のC領域は任意のヒト抗体H鎖およびL鎖C領域であることができ、例えば、ヒト抗体H鎖の1型C領域(以下、C₁と表記する)やC₄型C領域(以下、C₄と表記する)あるいはヒト抗体L鎖の型C領域(以下、Cと表記する)等があげられる。動物細胞用発現ベクターとしては、ヒト抗体C領域をコードするcDNAを組み込み発現できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、pAGE107(Miyaji, H.らのCytotechnology, 3, 133, 1990)、pAGE103(Mizukami, T.らのJ. Biochem., 101, 1307, 1987)、pHSG274(Brady, G.らのGene, 27, 223, 1984)、pKCR(O'Hare, K.らのProc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 78, 1527, 1981)、pSG1 d2-4(Miyaji, H.らのCytotechnology, 4, 173, 1990)等があげられる。動物細胞用発現ベクターに用いるプロモーターとエンハンサーとしては、SV40の初期プロモーターとエンハンサー(Mizukami, T.らのJ. Biochem., 101, 1307, 1987)、モロニー Maus 白血病ウイルスのLTRプロモーターとエンハンサー(Kuwana, Y.らのBiochem. Biophys. Res. Commun., 149, 960, 1987)、免疫グロブリンH鎖のプロモーター(Mason, J. O.らのCell, 41, 479, 1985)とエンハンサー(Gillies, S. D.らのCell, 33, 717, 1983)等があげられる。構築したヒト化抗体発現用ベクターは、ヒト型キメラ抗体およびヒト型CDR移植抗体の動物細胞での発現に使用できる。

【 0 0 1 8 】

10

20

30

40

50

2. ヒト以外の動物抗体のV領域をコードするcDNAの取得

GM2に対するヒト以外の動物抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域をコードするcDNAは以下のようにして取得する。

抗GM2モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞mRNAを抽出し、cDNAを合成する。合成したcDNAより、ベクターとしてファージあるいはプラスミドを用いてライブラリーを作製する。該ライブラリーより、マウス抗体の各鎖のC領域部分のcDNAあるいはV領域部分のcDNAをプローブとして用い、H鎖V領域をコードするcDNAを有する組換えファージあるいは組換えプラスミドおよびL鎖V領域をコードするcDNAを有する組換えファージあるいは組換えプラスミドを単離し、組換えファージあるいは組換えプラスミド上の目的とする抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域の全塩基配列を決定する。塩基配列からH鎖V領域およびL鎖V領域の全アミノ酸配列を推定する。

【0019】

抗GM2モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞の一例としてはKM796 (FERM BP-3340、特開平4-311385) が挙げられる。

ハイブリドーマ細胞KM796から全RNAを調製する方法としては、チオシアン酸グアニジン・トリフルオロ酢酸セシウム法 [Methods in Enzymol., 154, 3(1987)]、また全RNAからポリ(A)⁺ RNAを調製する方法としては、オリゴ(dT)固定化セルロースカラム法 [モレキュラー・クロニング: ア・ラボラトリー・マニュアル(第2版)] などがあげられる。また、ハイブリドーマ細胞KM796からmRNAを調製するキットとしては、ファースト・トラック・mRNA・アイソレーション・キット (Fast Track mRNA Isolation Kit; インビトロジェン社製)、クイック・プレップ・mRNA・ピュリフィケーション・キット (Quick Prep mRNA Purification Kit; ファルマシア社製) などがあげられる。

【0020】

cDNAの合成およびcDNAライブラリー作製法としては、モレキュラー・クロニング: ア・ラボラトリー・マニュアル(第2版) やカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、サブメント1~34等に記載された方法、あるいは市販のキット、例えばスーパースクリプト・プラスミド・システム・フォー・cDNA・シンセシス・アンド・プラスミド・クロニング (Super ScriptTM Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning、ライフテクノロジーズ社製) やザップ-cDNA・シンセシス・キット [ZAP-cDNA Synthesis Kit、ストラタジーン社製] を用いる方法などがあげられる。cDNAライブラリーの作製の際、ハイブリドーマ細胞KM796から抽出したmRNAを鋳型として合成したcDNAを組み込むベクターは、該cDNAを組み込めるベクターであればいかなるものでも用いることができる。例えば、ZAP Express [ストラタジーズ (Strategies) 5, 58 (1992)]、pBluescript II SK(+) [ヌクレイック・アシッド・リサーチ (Nucleic Acids Research) 17, 9494 (1989)]、ZAP II (ストラタジーン社製)、gt10、gt11 [DNA クロニング、ア・プラクティカル・アプローチ (DNA Cloning, A Practical Approach), Vol. 1, 49 (1985)]、Lambda BlueMid (クローンテック社製)、ExCell I、pT7T3 18U (ファルマシア社製)、pcD2 [モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー (Mol. Cell. Biol.), 3, 280 (1983)] およびpUC18 [ジーン (Gene), 33, 103 (1985)] 等が用いられる。

【0021】

ベクターにより構築されるcDNAライブラリーを導入する大腸菌としては該cDNAライブラリーを導入、発現および維持できるものであればいかなるものでも用いることができる。たとえばXL1-Blue MRF' [ストラタジーズ (Strategies), 5, 81 (1992)]、C600 [ジェネティクス (Genetics), 39, 440 (1954)]、Y1088、Y1090 [サイエンス (Science), 222, 778 (1983)]、NM522 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (J. Mol. Biol.), 166, 1 (1983)]、K802 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (J. Mol. Biol.), 16, 118 (1966)] およびJM105 [ジーン (Gene), 38, 275 (1985)] 等が用いられる。cDNAライブラリーより、ヒト以外の抗体のH鎖およびL鎖のV領域をコードするcDNAクローンの選択は、アイソトープあるいは蛍光標識したプローブを用い

10

20

30

40

50

たコロニー・ハイブリダイゼーション法あるいはブランク・ハイブリダイゼーション法 [モレキュラー・クローニング: ア・ラボラトリー・マニュアル 第2版] により行うことができる。また、プライマーを調製し、ポリ(A) + RNA あるいは mRNA から合成した cDNA あるいは cDNA ライブラリーを鋳型として、ポリメラーゼ・チェイン・リアクション (Polymerase chain reaction; 以下、PCR と表記する) 法 [モレキュラー・クローニング: ア・ラボラトリー・マニュアル (第2版)、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、サプリメント 1 ~ 3 4] により H 鎖および L 鎖の V 領域をコードする DNA を調製することもできる。

【0022】

上記方法により選択された cDNA クローンを、適当な制限酵素などで切断後、pBluescript SK(-) (ストラタジーン社製) 等のプラスミドにクローニングし、通常用いられる塩基配列解析方法、例えば Sanger らのジデオキシ法 [Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 74, 5463(1977)] 等によって分析することにより、該 DNA の塩基配列を決定することができる。塩基配列の分析は、塩基配列自動分析装置、例えば 373A・DNA シークエンサー (アプライド・バイオシステムズ社製) 等を用いて行うことができる。

【0023】

3. ヒト以外の動物抗体の CDR の同定

抗体の H 鎖および L 鎖の各 V 領域は抗原結合部位を形成する。H 鎖および L 鎖の各 V 領域は配列の比較的保存された 4 個の FR とそれらを連結する配列の変化に富んだ 3 個の CDR からなっている (Kabat, E. A. らの Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991)。そして各 CDR は、既知の抗体の V 領域のアミノ酸配列 (Kabat, E. A. らの Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991) と比較することによって見出すことができる。

【0024】

4. ヒト型 CDR 移植抗体の V 領域をコードする DNA 配列の構築

抗 GM2 ヒト型 CDR 移植抗体の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域をコードする DNA 配列は以下のようにして取得する。

まず、GM2 に対するヒト以外の動物抗体の V 領域の CDR を移植するためのヒト抗体の V 領域のアミノ酸配列を H 鎖、L 鎖各々について選択する。ヒト抗体 V 領域のアミノ酸配列としては、既知のヒト抗体由来の V 領域のアミノ酸配列であればいかなるものでも用いることができる。例えば、Protein Data Bank に登録されているヒト抗体の V 領域のアミノ酸配列、HM HCS から選択されたアミノ酸配列等があげられるが、GM2 に対する結合活性、結合特異性、あるいは GM2 陽性細胞に対する抗腫瘍効果など目的の活性を有するヒト型 CDR 移植抗体を創製するためには、創製のもととなるヒト以外の動物由来のモノクローナル抗体の V 領域のアミノ酸配列と高い相同性を有することが望ましい。続いて、選択したヒト抗体の V 領域のアミノ酸配列のうち FR をコードする DNA 配列と創製のもととなるヒト以外の動物由来のモノクローナル抗体の V 領域の CDR のアミノ酸配列をコードする DNA 配列を連結させ、H 鎖、L 鎖各々の V 領域のアミノ酸配列をコードする DNA 配列をデザインする。デザインした DNA 配列をカバーするように各鎖について 6 本の合成 DNA を設計し、それらを用いて PCR を行う。あるいは、デザインした DNA 配列をカバーするように 35 ~ 84 塩基からなるアンチセンスおよびセンス DNA 配列を各々 6 ~ 7 本合成し、それらをアニーリングし、2 本鎖 DNA とした後に、連結反応を行う。増幅反応産物あるいは連結反応産物を適当なベクターにサブクローニング後、その塩基配列を決定し、目的のヒト型 CDR 移植抗体の各鎖の V 領域のアミノ酸配列をコードする DNA 配列を含むプラスミドを取得する。

【0025】

5. ヒト型 CDR 移植抗体の V 領域のアミノ酸配列の改変

ヒト型 CDR 移植抗体の V 領域のアミノ酸配列の改変は PCR を用いた変異導入法により行う。具体的には、改変後のアミノ酸残基をコードする DNA 配列を含む 20 ~ 40 塩基からなるセンス変異プライマーおよびアンチセンス変異プライマーを合成し、改変すべき V 領域のアミノ酸配列をコードする DNA 配列を含むプラスミドを鋳型として PCR を行う。増幅断片を適当

10

20

30

40

50

なベクターにサブクローニング後、その塩基配列を決定し、目的の変異が導入されたDNA配列を含むプラスミドを取得する。

【 0 0 2 6 】

6. ヒト型CDR移植抗体発現ベクターの構築

前記1のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体のH鎖およびL鎖のC領域のcDNAの上流に、前記4および5で取得したヒト型CDR移植抗体のH鎖およびL鎖のV領域をコードするDNA配列を挿入し、ヒト型CDR移植抗体発現ベクターを構築することができる。例えば、ヒト型CDR移植抗体のH鎖およびL鎖のV領域のアミノ酸配列をコードするDNA配列を構築するためのPCRの際に5' - および3' - 末端の合成DNAの末端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、所望のヒト抗体C領域のcDNAの上流にそれらが適切な形で発現するように挿入する。

10

【 0 0 2 7 】

7. ヒト型CDR移植抗体の発現、活性評価

前記6のヒト型CDR移植抗体発現ベクターを適当な宿主細胞に導入することによりヒト型CDR移植抗体を生産する形質転換株を得ることができる。

【 0 0 2 8 】

宿主細胞への発現ベクターの導入法としては、エレクトロポレーション法〔特開平02-257891、Miyaji, H.らのCytotechnology, 3, 133, 1990〕等があげられる。

ヒト型CDR移植抗体発現ベクターを導入する宿主細胞としては、ヒト型CDR移植抗体を発現させることができる宿主細胞であれば、いかなる細胞でも用いることができる。例えば、マウスSP2/0-Ag14細胞(ATCC CRL1581、以下SP2/0細胞と表記する)、マウスP3X63-Ag8.653細胞(ATCC CRL1580)、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子(以下DHFR遺伝子と表記する)が欠損したCHO細胞(Urlaub, G.らのProc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, 77, 4216, 1980)、ラットYB2/3HL.P2.G11.16Ag.20細胞(ATCC CRL1662、以下YB2/0細胞と表記する)等があげられる。

20

【 0 0 2 9 】

ベクターの導入後、ヒト型CDR移植抗体を生産する形質転換株は、特開平02-257891に開示されている方法に従い、Geneticin(ギブコ社製、以下G418と表記する)および牛胎児血清(Fetal Calf Serum、以下FCSと表記する)を含むRPMI1640培地により選択する。得られた形質転換株を培地中で培養することで培養上清中にヒト型CDR移植抗体を生産蓄積させることができる。培養上清中のヒト型CDR移植抗体の活性は酵素免疫測定法(以下ELISA法と表記する、Harlow, E.らのAntibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14, 1988)等により測定する。また、形質転換株は、特開平02-257891に開示されている方法に従い、DHFR遺伝子増幅系等を利用してヒト型CDR移植抗体の生産量を上昇させることができる。

30

【 0 0 3 0 】

ヒト型CDR移植抗体は、上記培養上清よりプロテインAカラムを用いて精製することができる(Harlow, E.らのAntibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 8, 1988)。また、その他に、通常の蛋白質で用いられる精製方法を使用することができる。例えば、ゲル濾過およびイオン交換クロマトグラフィー、限外濾過等を組合せて行い、精製することができる。精製したヒト型CDR移植抗体のH鎖、L鎖あるいは抗体分子全体の分子量は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動(以下SDS-PAGEと表記する、Laemmli, U. K.らのNature, 227, 680, 1970)やウエスタンブロッティング法(Harlow, E.らのAntibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 12, 1988)等で測定する。

40

【 0 0 3 1 】

精製したヒト型CDR移植抗体の抗原との反応性および培養癌細胞株に対する結合活性はELISA法および蛍光抗体法等により各々測定する。培養癌細胞株に対する補体依存性細胞傷害(Complement Dependent Cytotoxicity、以下CDCと表記する)活性および抗体依存性細胞傷害(Antibody Dependent Cell Mediated Cytotoxicity、以下ADCCと表記する)活性

50

はShitara, K. らの方法 (Cancer Immunol. Immunother., 36, 373, 1993) により測定する。

【0032】

本発明のヒト型CDR移植抗体はヒト由来培養癌細胞株と特異的に結合し、かつCDC活性およびADCC活性等の細胞傷害活性を示すため、ヒト癌等の診断、治療において有用である。また、ヒト以外の動物由来のモノクローナル抗体に比べ、ヒト抗体のアミノ酸配列に由来する部分がほとんどであるため、ヒト体内で強い抗腫瘍効果を発揮し、かつ免疫原性を示さず、その効果が長期間にわたり持続することが期待される。

【0033】

本発明のヒト型CDR移植抗体は単独でまたは少なくとも1種以上の製剤上許容される補助剤と共に抗腫瘍組成物として用いることができる。例えば、ヒト型CDR移植抗体を、生理食塩水やグルコース、ラクトース、マンニトール等の水溶液に溶解して適当な医薬組成物とする。または、ヒト型CDR移植抗体を常法に従って凍結乾燥し、これに塩化ナトリウムを加えることによって粉末注射剤を作成する。本医薬組成物は必要に応じ、製剤分野で周知の添加剤、例えば、製剤上許容される塩等を含有することができる。

【0034】

本医薬組成物の投与量は、患者の年齢、症状等によって異なるが、ヒトを含む哺乳動物に対し、ヒト型CDR移植抗体を0.2~20mg/kg/日投与する。投与は、1日1回(単回投与または連日投与)または間歇的に1週間に1~3回、2、3週間に1回静脈注射により行う。

【0035】

【実施例】

以下に、本発明の実施例を示すが、これにより本発明の範囲が限定されるものではない。実施例1. タンデムカセット型のヒト化抗体発現用ベクター、pKANTEX93の構築ヒト型CDR移植抗体のH鎖V領域をコードするcDNA断片およびヒト型CDR移植抗体のL鎖V領域をコードするcDNA断片を、それぞれヒト抗体C1 cDNAおよびヒト抗体C2 cDNAの上流に挿入し、ヒト型CDR移植抗体を動物細胞中で発現させるためのタンデムカセット型のヒト化抗体発現用ベクター、pKANTEX93を特開平2-257891に記載のプラスミドpSE1UK1SEd1-3を基にして以下のようにして構築した。構築したヒト化抗体発現用ベクターは、ヒト型キメラ抗体の動物細胞での発現にも使用できる。

【0036】

1. ラビット - グロビン遺伝子スプライシング、ポリAシグナルに存在する制限酵素ApaIおよびEcoRI部位の改変
ヒト化抗体発現用ベクターにヒト化抗体のV領域を制限酵素NotI - ApaI断片(H鎖)およびEcoRI - SphI断片(L鎖)でカセット式に挿入してヒト化抗体発現ベクターを構築可能とするために、プラスミドpSE1UK1SEd1-3のラビット - グロビン遺伝子スプライシング、ポリAシグナルに存在する制限酵素ApaIおよびEcoRI部位の改変を以下のようにして行なった。

【0037】

プラスミドpBluescript SK(-) (ストラタジーン社製)の3μgを10μlの10mMトリス - 塩酸(pH7.5)、10mM塩化マグネシウムおよび1mMジチオスレイトール(以下DTTと表記する)からなる緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素ApaI(宝酒造社製)を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、DNA Blunting Kit(宝酒造社製)を用い、ApaI消化によって生じた3'突出末端を平滑末端に変えた後、DNA Ligation Kit(宝酒造社製)を用いて連結した。このようにして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、図1に示したプラスミドpBSAを得た。

【0038】

さらに得られたプラスミドpBSAの3μgを10μlの50mMトリス - 塩酸(pH7.5)、10mM塩化マグネシウム、100mM塩化ナトリウムおよび1mM DTT からなる緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素EcoRI(宝酒造社製)を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、DNA Blunting Kit(宝酒造社製)を用い、EcoRI消化によって生じた5'突出末端を

10

20

30

40

50

平滑末端に変えた後、DNA Ligation Kit (宝酒造社製) を用いて連結した。このようにして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、図2に示したプラスミドpBSAEを得た。

【 0 0 3 9 】

次に、上記で得られたプラスミドpBSAEの3 µgを10 µlの10mMトリス - 塩酸 (pH7.5)、10mM塩化マグネシウム、50mM塩化ナトリウムおよび1mM DTTからなる緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素HindIII (宝酒造社製) を加えて37 °Cで1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、20 µlの10mMトリス - 塩酸 (pH7.5)、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTTからなる緩衝液に溶解し、10 µlずつに分け、一つには更に10単位の制限酵素SacII (東洋紡績社製) を加え、もう一つには更に10単位の制限酵素KpnI (宝酒造社製) を加えて各々37 °Cで1時間反応させた。両反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、各々約2.96kbのHindIII - SacII断片と約2.96kbのKpnI - HindIII断片を約0.3 µg回収した。

10

【 0 0 4 0 】

次に、プラスミドpSE1UK1SEd1-3の3 µgを10 µlの10mMトリス - 塩酸 (pH7.5)、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTT からなる緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素SacII (東洋紡績社製) と10単位の制限酵素KpnI (宝酒造社製) を加えて37 °Cで1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10 µlの10mMトリス - 塩酸 (pH7.5)、10mM塩化マグネシウム、50mM塩化ナトリウムおよび1mM DTT からなる緩衝液に溶解し、更に10単位の制限酵素HindIII (宝酒造社製) を加えて37 °Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約2.42kbのHindIII - SacII断片と約1.98kbのKpnI - HindIII断片を各々約0.2 µg回収した。

20

【 0 0 4 1 】

次に、上記で得られたpSE1UK1SEd1-3のHindIII - SacII断片0.1 µgとpBSAEのHindIII - SacII断片0.1 µgを全量20 µlの滅菌水に溶解し、Ready-To-Go T4 DNA Ligase (ファルマシア バイオテク社製) を用いて連結した。このようにして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、図3に示したプラスミドpBSH-Sを得た。また、上記で得られたpSE1UK1SEd1-3のKpnI - HindIII断片0.1 µgとpBSAEのKpnI - HindIII断片0.1 µgを全量20 µlの滅菌水に溶解し、Ready-To-Go T4 DNA Ligase (ファルマシア バイオテク社製) を用いて連結した。このようにして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、図4に示したプラスミドpBSK-Hを得た。

30

【 0 0 4 2 】

次に、上記で得られたプラスミドpBSH-SおよびpBSK-Hの3 µgを各々10 µlの10mMトリス - 塩酸 (pH7.5)、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTT からなる緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素ApaI (宝酒造社製) を加えて37 °Cで1時間反応させた。両反応液をエタノール沈殿し、各々DNA Blunting Kit (宝酒造社製) を用い、ApaI消化によって生じた3' 突出末端を平滑末端に変えた後、DNA Ligation Kit (宝酒造社製) を用いて連結した。このようにして得られた各々の組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、図5に示したプラスミドpBSH-SAおよびpBSK-HAを得た。

【 0 0 4 3 】

次に、上記で得られたプラスミドpBSH-SAおよびpBSK-HAの5 µgを各々10 µlの50mMトリス - 塩酸 (pH7.5)、10mM塩化マグネシウム、100mM塩化ナトリウムおよび1mM DTT からなる緩衝液に加え、更に1単位の制限酵素EcoRI (宝酒造社製) を加えて37 °Cで10分間反応させ、部分消化した。両反応液をエタノール沈殿し、各々DNA Blunting Kit (宝酒造社製) を用い、EcoRI消化によって生じた5' 突出末端を平滑末端に変えた後、アガロースゲル電気泳動にて分画し、各々約5.38kbの断片と約4.94kbの断片を約0.5 µg回収した。回収した各々の断片0.1 µgを全量20 µlの滅菌水に溶解し、Ready-To-Go T4 DNA Ligase (ファルマシア バイオテク社製) を用いて連結した。このようにして得られた各々の組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、図6に示したプラスミドpBSH-SAEおよびpBSK-HAEを得た。

40

【 0 0 4 4 】

50

次に、上記で得られたプラスミドpBSH-SAEおよびpBSK-HAEの3 μ gを各々10 μ lの50mMトリス - 塩酸 (pH7.5)、10mM塩化マグネシウム、100mM塩化ナトリウムおよび1mM DTT からなる緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素EcoRI (宝酒造社製) を加えて37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。両反応液をエタノール沈殿し、各々DNA Blunting Kit (宝酒造社製) を用い、EcoRI消化によって生じた5' 突出末端を平滑末端に変えた後、DNA Ligation Kit (宝酒造社製) を用いて連結した。このようにして得られた各々の組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、図7に示したプラスミドpBSH-SAEおよびpBSK-HAEを得た。得られた各プラスミドの10 μ gを用い、AutoRead Sequencing Kit (ファルマシア バイオテク社製) に添付の処方に従って反応後、A.L.F. DNA Sequencer (ファルマシア バイオテク社製) により電気泳動し、塩基配列を決定した結果、上記改変によりApaI、EcoRI部位ともに消失したことを確認した。

10

【0045】

2. ラビット - グロビン遺伝子スプライシング、ポリAシグナルおよびSV40初期遺伝子ポリAシグナルの下流への制限酵素SalI部位の導入

ヒト化抗体発現用ベクターの抗体H鎖、L鎖の発現プロモーターを任意のプロモーターに変換可能とするために、プラスミドpSE1UK1SEd1-3のラビット - グロビン遺伝子スプライシング、ポリAシグナルおよびSV40初期遺伝子ポリAシグナルの下流への制限酵素SalI部位の導入を以下のようにして行った。

【0046】

上記実施例1の1項で得られたプラスミドpBSK-HAEの3 μ gを10 μ lの10mMトリス - 塩酸 (pH7.5)、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTT からなる緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素NaeI (宝酒造社製) を加えて37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、20 μ lの50mMトリス - 塩酸 (pH9.0)、1mM塩化マグネシウムからなる緩衝液に溶解し、更に1単位のアルカリフォスファターゼ (E. coli C75、宝酒造社製) を加えて37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させ、5' 末端を脱リン酸化した。更に該反応液をフェノール - クロロホルム抽出後、エタノール沈殿を行ない、20 μ lの10mMトリス - 塩酸 (pH8.0)、1mMエチレンジアミン四酢酸二ナトリウムからなる緩衝液 (以下TE緩衝液と表記する) に溶解した。該反応液の1 μ lと0.1 μ gのリン酸化SalIリンカー (宝酒造社製) を全量が20 μ lとなるように滅菌水に加え、Ready-To-Go T4 DNA Ligase (ファルマシア バイオテク社製) を用いて連結した。このようにして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、図8に示したプラスミドpBSK-HAEESalIを得た。得られたプラスミドの10 μ gを用い、AutoRead Sequencing Kit (ファルマシア バイオテク社製) に添付の処方に従って反応後、A.L.F. DNA Sequencer (ファルマシア バイオテク社製) により電気泳動し、塩基配列を決定した結果、ラビット - グロビン遺伝子スプライシング、ポリAシグナルおよびSV40初期遺伝子ポリAシグナルの下流に一箇所の制限酵素SalI部位が導入されたことを確認した。

20

30

【0047】

3. ヘルペスシンプレックスウイルスチミジンキナーゼ (以下HSVtkと表記する) 遺伝子のポリAシグナルに存在する制限酵素ApaI部位の改変

プラスミドpSE1UK1SEd1-3のTn5 カナマイシンフォスホトランスフェラーゼ遺伝子下流のHSVtk遺伝子ポリAシグナルに存在する制限酵素ApaI部位の改変を以下のようにして行った。

40

【0048】

上記実施例1の1項で得られたプラスミドpBSAの3 μ gを10 μ lの10mMトリス - 塩酸 (pH7.5)、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTT からなる緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素SacII (東洋紡績社製) を加えて37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10 μ lの50mMトリス - 塩酸 (pH7.5)、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTT からなる緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素XhoI (宝酒造社製) を加えて37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約2.96kbのSacII - XhoI断片を約1 μ g回収した。

50

【 0 0 4 9 】

次に、プラスミドpSE1UK1SEd1-3の5 μ gを10 μ lの10mMトリス - 塩酸 (pH7.5)、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTT からなる緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素SacII (東洋紡績社製)を加えて37 $^{\circ}$ で1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10 μ lの50mMトリス - 塩酸 (pH7.5)、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTT からなる緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素XhoI (宝酒造社製)を加えて37 $^{\circ}$ で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約4.25kbのSacII - XhoI断片を約1 μ g回収した。

【 0 0 5 0 】

次に、上記で得られたpBSAのSacII - XhoI断片0.1 μ gとpSE1UK1SEd1-3のSacII - XhoI断片を全量20 μ lの滅菌水に加え、Ready-To-Go T4 DNA Ligase (ファルマシア バイオテク社製)を用いて連結した。このようにして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、図9に示したプラスミドpBSX-Sを得た。

10

【 0 0 5 1 】

次に、上記で得られたプラスミドpBSX-Sの3 μ gを10 μ lの10mMトリス - 塩酸 (pH7.5)、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTT からなる緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素ApaI (宝酒造社製)を加えて37 $^{\circ}$ で1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、DNA Blunting Kit (宝酒造社製)を用い、ApaI消化によって生じた3'突出末端を平滑末端に変えた後、DNA Ligation Kit (宝酒造社製)を用いて連結した。このようにして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、図10に示したプラスミドpBSX-S Aを得た。得られたプラスミドの10 μ gを用い、AutoRead Sequencing Kit (ファルマシア バイオテク社製)に添付の処方に従って反応後、A.L.F. DNA Sequencer (ファルマシア バイオテク社製)により電気泳動し、塩基配列を決定した結果、HSVtk遺伝子ポリAシグナルの制限酵素ApaI部位が消失したことを確認した。

20

【 0 0 5 2 】

4. ヒト化抗体L鎖発現ユニットの構築

モロニーマウス白血病ウイルスの末端反復配列のプロモーター/エンハンサーの下流にヒト抗体C α cDNAが存在し、かつヒト化抗体L鎖V領域をカセット式に挿入可能なヒト化抗体L鎖発現ユニットを有するプラスミドpMohC を以下のようにして構築した。

【 0 0 5 3 】

プラスミドpBluescript SK(-) (ストラタジーン社製)の3 μ gを10 μ lの10mMトリス - 塩酸 (pH7.5)、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTT からなる緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素SacI (宝酒造社製)を加えて37 $^{\circ}$ で1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10 μ lの10mMトリス - 塩酸 (pH7.5)、50mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTT からなる緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素ClaI (宝酒造社製)を加えて37 $^{\circ}$ で1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、DNA Blunting Kit (宝酒造社製)を用い、SacIおよびClaI消化によって生じた突出末端を平滑末端に変えた後、アガロースゲル電気泳動にて分画し、約2.96kbのDNA断片を約1 μ g回収した。回収したDNA断片0.1 μ gを全量20 μ lの滅菌水に加え、Ready-To-Go T4 DNA Ligase (ファルマシア バイオテク社製)を用いて連結した。このようにして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、図11に示したプラスミドpBSSCを得た。

30

40

【 0 0 5 4 】

次に、上記で得られたプラスミドpBSSCの3 μ gを10 μ lの10mMトリス - 塩酸 (pH7.5)、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTT からなる緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素KpnI (宝酒造社製)を加えて37 $^{\circ}$ で1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10 μ lの50mMトリス - 塩酸 (pH7.5)、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTT からなる緩衝液に溶解し、更に10単位の制限酵素XhoI (宝酒造社製)を加えて37 $^{\circ}$ で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約2.96kbのKpnI - XhoI断片を約1 μ g回収した。

【 0 0 5 5 】

50

次に、特開平6-205694に記載のプラスミドpAGE147の5 µgを10 µlの10mMトリス - 塩酸 (pH 7.5)、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTT からなる緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素KpnI (宝酒造社製)を加えて37 °Cで1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10 µlの50mMトリス - 塩酸 (pH7.5)、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTT からなる緩衝液に溶解し、更に10単位の制限酵素XhoI (宝酒造社製)を加えて37 °Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、モロニーマウス白血病ウイルスの末端反復配列のプロモーター/エンハンサーを含む約0.66kbのKpnI - XhoI断片を約0.3 µg回収した。

【0056】

次に、上記で得られたpBSSCのKpnI - XhoI断片0.1 µgとpAGE147のKpnI - XhoI断片0.1 µgを全量20 µlの滅菌水に溶解し、Ready-To-Go T4 DNA Ligase (ファルマシア バイオテク社製)を用いて連結した。このようにして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、図12に示したプラスミドpBSMoを得た。

10

【0057】

次に、上記で得られたプラスミドpBSMoの3 µgを10 µlの10mMトリス - 塩酸 (pH7.5)、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTT からなる緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素KpnI (宝酒造社製)を加えて37 °Cで1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10 µlの10mMトリス - 塩酸 (pH7.5)、50mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTT からなる緩衝液に溶解し、更に10単位の制限酵素HindIII (宝酒造社製)を加えて37 °Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約3.62kbのKpnI - Hind

20

【0058】

次に、配列番号12、13に記載の塩基配列を有する合成DNAを自動DNA合成機 (380A、アプライド バイオシステムズ社製)を用いて合成した。得られた合成DNAの0.3 µgずつを15 µlの滅菌水に加え、65 °Cで5分間加熱した。該反応液を室温にて30分間放置した後、2 µlの10倍緩衝液 [500mMトリス - 塩酸 (pH7.6)、100mM塩化マグネシウム、50mM DTT] と2 µlの10mM ATP を加え、更に10単位のT4ポリヌクレオチドキナーゼを加えて37 °Cで30分間反応させ、5'末端をリン酸化した。上記で得られたプラスミドpBSMo由来のKpnI - HindIII断片 (3.66kb) 0.1 µgとリン酸化合成DNA0.05 µgを全量20 µlの滅菌水に加え、Ready-To-Go T4 DNA Ligase (ファルマシア バイオテク社製)を用いて連結した。このようにして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、図13に示したプラスミドpBSMoSを得た。得られたプラスミドの10 µgを用い、AutoRead Sequencing Kit (ファルマシア バイオテク社製)に添付の処方に従って反応後、A.L.F. DNA Sequencer (ファルマシア バイオテク社製)により電気泳動し、塩基配列を決定した結果、目的の合成DNAが導入されたことを確認した。

30

【0059】

次に、特開平5-304989に記載のプラスミドpChiIgL1の3 µgを10 µlの50mMトリス - 塩酸 (pH7.5)、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTT からなる緩衝液に溶解し、更に10単位ずつの制限酵素EcoRI (宝酒造社製)およびEcoRV (宝酒造社製)を加えて37 °Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約9.70kb

40

【0060】

次に、配列番号14、15に記載の塩基配列を有する合成DNAを自動DNA合成機 (380A、アプライド バイオシステムズ社製)を用いて合成した。得られた合成DNAの0.3 µgずつを15 µlの滅菌水に加え、65 °Cで5分間加熱した。該反応液を室温にて30分間放置した後、2 µlの10倍緩衝液 [500mMトリス - 塩酸 (pH7.6)、100mM塩化マグネシウム、50mM DTT] と2 µlの10mM ATPを加え、更に10単位のT4ポリヌクレオチドキナーゼを加えて37 °Cで30分間反応させ、5'末端をリン酸化した。上記で得られたプラスミドpChiIgL1由来のEcoRI - EcoRV断片 (9.70kb) 0.1 µgとリン酸化合成DNA0.05 µgを全量20 µlの滅菌水に加え、Ready-To-Go T4 DNA Ligase (ファルマシア バイオテク社製)を用いて連結した。このようにして得

50

られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、図14に示したプラスミドpChiIgLA1Sを得た。

【0061】

次に、上記で得られたプラスミドpBSMoSの3 μ gを10 μ lの20mMトリス - 塩酸 (pH8.5)、100mM塩化カリウム、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTTからなる緩衝液に溶解し、更に10単位の制限酵素HpaI (宝酒造社製)を加えて37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10 μ lの50mMトリス - 塩酸 (pH7.5)、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTTからなる緩衝液に溶解し、更に10単位の制限酵素EcoRI (宝酒造社製)を加えて37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約3.66kbのHpaI - EcoRI断片を約1 μ g回収した。

10

【0062】

次に、上記で得られたプラスミドpChiIgLA1Sの10 μ gを10 μ lの20mMトリス - 酢酸 (pH7.9)、50mM酢酸カリウム、10mM酢酸マグネシウム、1mM DTT および100 μ g/ml牛血清アルブミン (以下BSAと表記する) からなる緩衝液に溶解し、更に10単位の制限酵素NlaIV (ニューイングランド バイオラブズ社製)を加えて37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10 μ lの50mMトリス - 塩酸 (pH7.5)、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTTからなる緩衝液に溶解し、更に10単位の制限酵素EcoRI (宝酒造社製)を加えて37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約0.41kbのNlaIV - EcoRI断片を約0.3 μ g回収した。

20

【0063】

次に、上記で得られたpBSMoSのHpaI - EcoRI断片を0.1 μ gとpChiIgLA1SのNlaIV - EcoRI断片0.1 μ gを全量20 μ lの滅菌水に加え、Ready-To-Go T4 DNA Ligase (ファルマシア バイオテク社製)を用いて連結した。このようにして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、図15に示したプラスミドpMohC を得た。

【0064】

5. ヒト化抗体H鎖発現ユニットの構築

モロニー Maus 白血病ウイルスの末端反復配列のプロモーター/エンハンサーの下流にヒト抗体C 1cDNAが存在し、かつヒト化抗体H鎖V領域をカセット式に挿入可能なヒト化抗体H鎖発現ユニットを有するプラスミドpMohC 1を以下のようにして構築した。

【0065】

上記実施例1の4項で得られたプラスミドpBSMoの3 μ gを10 μ lの50mMトリス - 塩酸 (pH7.5)、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTTからなる緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素XhoI (宝酒造社製)を加えて37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10 μ lの30mM酢酸ナトリウム (pH5.0)、100mM塩化ナトリウム、1mM酢酸亜鉛および10%グリセロールからなる緩衝液に溶解し、更に10単位のマングビーンヌクレアーゼ (宝酒造社製)を加えて37 $^{\circ}$ Cで10分間反応させた。該反応液をフェノール - クロロホルム抽出後、エタノール沈殿を行ない、DNA Blunting Kit (宝酒造社製)を用い、突出末端を平滑末端に変えた後、DNA Ligation Kit (宝酒造社製)を用いて連結した。このようにして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、図16に示したプラスミドpBSMoSalを得た。得られたプラスミドの10 μ gを用い、AutoRead Sequencing Kit (ファルマシア バイオテク社製)に添付の処方に従って反応後、A.L.F. DNA Sequencer (ファルマシア バイオテク社製)により電気泳動し、塩基配列を決定した結果、モロニー Maus 白血病ウイルスの末端反復配列のプロモーター/エンハンサーの上流の制限酵素XhoI部位が消失したことを確認した。

30

40

【0066】

次に、上記で得られたプラスミドpBSMoSalの3 μ gを10 μ lの10mMトリス - 塩酸 (pH7.5)、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTTからなる緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素KpnI (宝酒造社製)を加えて37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10 μ lの10mMトリス - 塩酸 (pH7.5)、50mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTTからなる緩衝液に溶解し、更に10単位の制限酵素HindIII (宝酒造社製)を加えて37 $^{\circ}$ Cで

50

1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約3.66kbのKpnI - HindIII断片を約1 μ g回収した。

【0067】

次に、配列番号16、17に記載の塩基配列を有する合成DNAを自動DNA合成機（380A、アプライド バイオシステムズ社製）を用いて合成した。得られた合成DNAの0.3 μ gずつを15 μ lの滅菌水に加え、65 $^{\circ}$ Cで5分間加熱した。該反応液を室温にて30分間放置した後、2 μ lの10倍緩衝液[500mMトリス - 塩酸（pH7.6）、100mM塩化マグネシウム、50mM DTT]と2 μ lの10mM ATPを加え、更に10単位のT4ポリヌクレオチドキナーゼを加えて37 $^{\circ}$ Cで30分間反応させ、5'末端をリン酸化した。上記で得られたプラスミドpBSMoSal由来のKpnI - HindIII断片（3.66kb）0.1 μ gとリン酸化合成DNA0.05 μ gを全量20 μ lの滅菌水に加え、Ready-To-Go T4 DNA Ligase（ファルマシア バイオテク社製）を用いて連結した。このようにして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、図17に示したプラスミドpBSMoSalSを得た。得られたプラスミドの10 μ gを用い、AutoRead Sequencing Kit（ファルマシア バイオテク社製）に添付の処方に従って反応後、A.L.F. DNA Sequencer（ファルマシア バイオテク社製）により電気泳動し、塩基配列を決定した結果、目的の合成DNAが導入されたことを確認した。

10

【0068】

次に、特開平5-304989に記載のプラスミドpChilgHB2の10 μ gを10 μ lの50mMトリス - 塩酸（pH7.5）、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTTからなる緩衝液に溶解し、更に10単位の制限酵素Eco52I（東洋紡績社製）を加えて37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10 μ lの30mM酢酸ナトリウム（pH5.0）、100mM塩化ナトリウム、1mM酢酸亜鉛および10%グリセロールからなる緩衝液に溶解し、更に10単位のマンギブーンヌクレアーゼ（宝酒造社製）を加えて37 $^{\circ}$ Cで10分間反応させた。該反応液をフェノール - クロロホルム抽出後、エタノール沈殿を行ない、DNA Blunting Kit（宝酒造社製）を用い、突出末端を平滑末端に変えた。エタノール沈殿後、10 μ lの10mMトリス - 塩酸（pH7.5）、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTT からなる緩衝液に溶解し、更に10単位の制限酵素ApaI（宝酒造社製）を加えて37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約0.99kbのApaI - 平滑末端断片を約0.7 μ g回収した。

20

【0069】

次に、プラスミドpBluescript SK(-)（ストラタジーン社製）の3 μ gを10 μ lの10mMトリス - 塩酸（pH7.5）、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTT からなる緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素ApaI（宝酒造社製）を加えて37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10 μ lの33mMトリス - 酢酸（pH7.9）、10mM酢酸マグネシウム、66mM酢酸カリウム、0.5mM DTTおよび100 μ g/ml BSAからなる緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素SmaI（宝酒造社製）を加えて30 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約3.0kbのApaI - SmaI断片を約1 μ g回収した。

30

【0070】

次に、上記で得られたpChilgHB2のApaI - 平滑末端断片0.1 μ gとpBluescript SK(-)のApaI - SmaI断片0.1 μ gを全量20 μ lの滅菌水に加え、Ready-To-Go T4 DNA Ligase（ファルマシア バイオテク社製）を用いて連結した。このようにして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、図18に示したプラスミドpBShC 1を得た。

40

【0071】

次に、上記で得られたプラスミドpBShC 1の5 μ gを10 μ lの10mMトリス - 塩酸（pH7.5）、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTT からなる緩衝液に溶解し、更に10単位の制限酵素ApaI（宝酒造社製）を加えて37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10 μ lの10mMトリス - 塩酸（pH7.5）、50mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTT からなる緩衝液に溶解し、更に10単位の制限酵素SpeI（宝酒造社製）を加えて37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約1.0kbのApaI - SpeI断片を約1 μ g回収した。

【0072】

50

次に、上記で得られたプラスミドpBSMoSaISの3 µgを10 µlの10mMトリス - 塩酸 (pH7.5)、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTT からなる緩衝液に溶解し、更に10単位の制限酵素ApaI (宝酒造社製) を加えて37 °Cで1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10 µlの10mMトリス - 塩酸 (pH7.5)、50mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTT からなる緩衝液に溶解し、更に10単位の制限酵素SpeI (宝酒造社製) を加えて37 °Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約3.66kbのApaI - SpeI断片を約1 µg回収した。

【 0 0 7 3 】

次に、上記で得られたpBShC 1のApaI - SpeI断片0.1 µgとpBSMoSaISのApaI - SpeI断片0.1 µgを全量20 µlの滅菌水に加え、Ready-To-Go T4 DNA Ligase (ファルマシア バイオテク社製) を用いて連結した。このようにして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、図19に示したプラスミドpMohC 1を得た。

10

【 0 0 7 4 】

6. タンデムカセット型のヒト化抗体発現用ベクター、pKANTEX93の構築

上記実施例1の1項から5項で得られた各種プラスミドを用いてタンデムカセット型のヒト化抗体発現用ベクター、pKANTEX93を以下のようにして構築した。

上記実施例1の1項で得られたプラスミドpBSh-SAEEの3 µgを10 µlの10mMトリス - 塩酸 (pH7.5)、50mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTT からなる緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素HindIII (宝酒造社製) を加えて37 °Cで1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10 µlの50mMトリス - 塩酸 (pH7.5)、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTT からなる緩衝液に溶解し、更に10単位の制限酵素SalI (宝酒造社製) を加えて37 °Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約5.42kbのHindIII - SalI断片を約1 µg回収した。

20

【 0 0 7 5 】

次に、実施例1の1項で得られたプラスミドpBSK-HAEEの5 µgを10 µlの10mMトリス - 塩酸 (pH7.5)、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTT からなる緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素KpnI (宝酒造社製) を加えて37 °Cで1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10 µlの10mMトリス - 塩酸 (pH7.5)、50mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTT からなる緩衝液に溶解し、更に10単位の制限酵素HindIII (宝酒造社製) を加えて37 °Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、ラビット - グロビン遺伝子スプライシング、ポリAシグナル、SV40初期遺伝子ポリAシグナルおよびSV40初期遺伝子プロモーターを含む約1.98kbのKpnI - HindIII断片を約0.8 µg回収した。

30

【 0 0 7 6 】

次に、実施例1の5項で得られたプラスミドpMohC 1の5 µgを10 µlの10mMトリス - 塩酸 (pH7.5)、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTT からなる緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素KpnI (宝酒造社製) を加えて37 °Cで1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10 µlの50mMトリス - 塩酸 (pH7.5)、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTT からなる緩衝液に溶解し、更に10単位の制限酵素SalI (宝酒造社製) を加えて37 °Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、ヒト型CDR移植抗体H鎖発現ユニットを含む約1.66kbのKpnI - SalI断片を約0.8 µg回収した。

40

【 0 0 7 7 】

次に、上記で得られたpBSh-SAEEのHindIII - SalI断片0.1 µgとpBSK-HAEEのKpnI - HindIII断片0.1 µgとpMohC 1のKpnI - SalI断片0.1 µgを全量20 µlの滅菌水に加え、Ready-To-Go T4 DNA Ligase (ファルマシア バイオテク社製) を用いて連結した。このようにして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、図20に示したプラスミドpMo 1SPを得た。

【 0 0 7 8 】

次に、上記で得られたプラスミドpMo 1SPの3 µgを10 µlの50mMトリス - 塩酸 (pH7.5)、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTT からなる緩衝液に加え、更

50

に10単位の制限酵素SalI（宝酒造社製）および制限酵素XhoI（宝酒造社製）を加えて37で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約9.06kbのSalI - XhoI断片を約1μg回収した。

【0079】

次に、実施例1の2項で得られたプラスミドpBSK-HAEESalの5μgを10μlの10mMトリス - 塩酸（pH7.5）、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTT からなる緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素KpnI（宝酒造社製）を加えて37で1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10μlの50mMトリス - 塩酸（pH7.5）、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTT からなる緩衝液に溶解し、更に10単位の制限酵素SalI（宝酒造社製）を加えて37で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、ラビット - グロビン遺伝子スプライシング、ポリAシグナルおよびSV40初期遺伝子ポリAシグナルを含む約1.37kbのKpnI - SalI断片を約0.7μg回収した。

10

【0080】

次に、実施例1の4項で得られたプラスミドpMohC の5μgを10μlの10mMトリス - 塩酸（pH7.5）、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTT からなる緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素KpnI（宝酒造社製）を加えて37で1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10μlの50mMトリス - 塩酸（pH7.5）、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTT からなる緩衝液に溶解し、更に10単位の制限酵素XhoI（宝酒造社製）を加えて37で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、ヒト型CDR移植抗体L鎖発現ユニットを含む約1.06kbのKpnI - XhoI断片を約0.7μg回収した。

20

【0081】

次に、上記で得られたpMo 1SPのSalI - XhoI断片0.1μgとpBSK-HAEESalのKpnI - SalI断片0.1μgとpMohC のKpnI - XhoI断片0.1μgを全量20μlの滅菌水に加え、Ready-To-Go T4 DNA Ligase（ファルマシア バイオテク社製）を用いて連結した。このようにして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、図21に示したプラスミドpMo 1SPを得た。

【0082】

次に、上記で得られたプラスミドpMo 1SPの3μgを10μlの50mMトリス - 塩酸（pH7.5）、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTT からなる緩衝液に溶解し、更に10単位の制限酵素XhoI（宝酒造社製）を加えて37で1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10μlの10mMトリス - 塩酸（pH7.5）、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTT からなる緩衝液に加え、更に1単位の制限酵素SacII（東洋紡績社製）を加えて37で10分間反応させ、部分消化した。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約8.49kbのSacII - XhoI断片を約0.2μg回収した。

30

【0083】

次に、実施例1の3項で得られたプラスミドpBSX-SA の3μgを10μlの10mMトリス - 塩酸（pH7.5）、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTT からなる緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素SacII（東洋紡績社製）を加えて37で1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10μlの50mMトリス - 塩酸（pH7.5）、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTT からなる緩衝液に溶解し、更に10単位の制限酵素XhoI（宝酒造社製）を加えて37で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約4.25kbのSacII - XhoI断片を約1μg回収した。

40

【0084】

次に、上記で得られたpMo 1SPのSacII - XhoI断片0.1μgとpBSX-SA のSacII - XhoI断片0.1μgを全量20μlの滅菌水に加え、Ready-To-Go T4 DNA Ligase（ファルマシア バイオテク社製）を用いて連結した。このようにして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、図22に示したプラスミドpKANTEX93を得た。

【0085】

実施例2．抗GM2ヒト型キメラ抗体の発現

1. ヒト化抗体発現用ベクター、pKANTEX93を用いた抗GM2ヒト型キメラ抗体の発現上記実施

50

例1に記載のヒト化抗体発現用ベクター、pKANTEX93を用いて抗GM2ヒト型キメラ抗体の発現を以下のようにして行った。

(1) 抗GM2マウス抗体KM796のH鎖V領域cDNAが存在するプラスミドpBSH3の構築
プラスミドpBluescript SK(-) (ストラタジーン社製) の3 µgを10 µlの10mMトリス - 塩酸 (pH7.5)、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTT からなる緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素SacII (東洋紡績社製) およびKpnI (宝酒造社製) を加えて37 °Cで1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、DNA Blunting Kit (宝酒造社製) を用い、制限酵素消化によって生じた3' 突出末端を平滑末端に変えた。該反応液をエタノール沈殿し、20 µlの50mMトリス - 塩酸 (pH9.0)、1mM塩化マグネシウムからなる緩衝液に溶解し、更に1単位のアルカリフォスファターゼ (E.coli C75、宝酒造社製) を加えて37 °Cで1時間反応させ、5' 末端を脱リン酸化した後、アガロースゲル電気泳動にて分画し、約2.95kbのDNA断片を約1 µg回収した。

【 0 0 8 6 】

次に、配列番号18、19に記載の塩基配列を有する合成DNAを自動DNA合成機 (380A、アプライド バイオシステムズ社製) を用いて合成した。得られた合成DNAの0.3 µgずつを15 µlの滅菌水に加え、65 °Cで5分間加熱した。該反応液を室温にて30分間放置した後、2 µlの10倍緩衝液 [500mMトリス - 塩酸 (pH7.6)、100mM塩化マグネシウム、50mM DTT] と2 µlの10mM ATPを加え、更に10単位のT4ポリヌクレオチドキナーゼを加えて37 °Cで30分間反応させ、5' 末端をリン酸化した。上記で得られたプラスミドpBluescript SK(-)由来のDNA断片 (2.95kb) 0.1 µgとリン酸化合成DNA0.05 µgを全量20 µlの滅菌水に加え、Ready-To-Go T4 DNA Ligase (ファルマシア バイオテク社製) を用いて連結した。このようにして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、図23に示したプラスミドpBSNAを得た。得られたプラスミドの10 µgを用い、AutoRead Sequencing Kit (ファルマシア バイオテク社製) に添付の処方に従って反応後、A.L.F. DNA Sequencer (ファルマシア バイオテク社製) により電気泳動し、塩基配列を決定した結果、目的の合成DNAが導入されたことを確認した。

【 0 0 8 7 】

次に、上記で得られたプラスミドpBSNAの3 µgを10 µlの10mMトリス - 塩酸 (pH7.5)、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTT からなる緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素ApaI (宝酒造社製) を加えて37 °Cで1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10 µlの50mMトリス - 塩酸 (pH7.5)、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム、1mM DTT、100 µg/ml BSAおよび0.01% トライトンX-100からなる緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素NotI (宝酒造社製) を加えて37 °Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約2.95kbのDNA断片を約1 µg回収した。

【 0 0 8 8 】

次に、特開平6-205694に記載のプラスミドpChi796HM1の10 µgを10 µlの10mMトリス - 塩酸 (pH7.5)、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTT からなる緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素ApaI (宝酒造社製) を加えて37 °Cで1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10 µlの50mMトリス - 塩酸 (pH7.5)、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム、1mM DTT、100 µg/ml BSAおよび0.01% トライトンX-100 からなる緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素NotI (宝酒造社製) を加えて37 °Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約0.45kbのDNA断片を約0.3 µg回収した。

【 0 0 8 9 】

次に、上記で得られたpBSNAのApaI - NotI断片0.1 µgとpChi796HM1のApaI - NotI断片0.1 µgを全量20 µlの滅菌水に加え、Ready-To-Go T4 DNA Ligase (ファルマシア バイオテク社製) を用いて連結した。このようにして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、図24に示したプラスミドpBSH3を得た。

【 0 0 9 0 】

(2) 抗GM2マウス抗体KM796のL鎖V領域cDNAが存在するプラスミドpBSL3の構築
プラスミドpBluescript SK(-) (ストラタジーン社製) の3 µgを10 µlの10mMトリス - 塩

10

20

30

40

50

酸 (pH7.5)、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTT からなる緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素KpnI (宝酒造社製)を加えて37 で1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、DNA Blunting Kit (宝酒造社製)を用い、KpnI消化によって生じた3' 突出末端を平滑末端に変えた後、更にエタノール沈殿し、10 µ lの10mMトリス - 塩酸 (pH7.5)、10 mM塩化マグネシウムおよび1mM DTT からなる緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素SacI (宝酒造社製)を加えて37 で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約2.95kbのDNA断片を約1 µ g回収した。

【 0 0 9 1 】

次に、配列番号20、21に記載の塩基配列を有する合成DNAを自動DNA合成機 (380A、アプライド バイオシステムズ社製)を用いて合成した。得られた合成DNAの0.3 µ gずつを15 µ lの滅菌水に加え、65 で5分間加熱した。該反応液を室温にて30分間放置した後、2 µ lの10倍緩衝液 [500mMトリス - 塩酸 (pH7.6)、100mM塩化マグネシウム、50mM DTT] と2 µ lの10mM ATP を加え、更に10単位のT4ポリヌクレオチドキナーゼを加えて37 で30分間反応させ、5' 末端をリン酸化した。上記で得られたプラスミドpBluescript SK(-)由来のDNA断片 (2.95kb) 0.1 µ gとリン酸化合成DNA0.05 µ gを全量20 µ lの滅菌水に加え、Ready-To-Go T4 DNA Ligase (ファルマシア バイオテク社製)を用いて連結した。このようにして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、図25に示したプラスミドpBSESを得た。得られたプラスミドの10 µ gを用い、AutoRead Sequencing Kit (ファルマシア バイオテク社製)に添付の処方に従って反応後、A.L.F. DNA Sequencer (ファルマシア バイオテク社製)により電気泳動し、塩基配列を決定した結果、目的の合成DNAが導入されたことを確認した。

【 0 0 9 2 】

次に、上記で得られたプラスミドpBSESの3 µ gを10 µ lの50mMトリス - 塩酸 (pH7.5)、100 mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム、1mM DTT および100 µ g/mlBSAからなる緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素EcoRI (宝酒造社製)および制限酵素SplI (宝酒造社製)を加えて37 で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約2.95kbのDNA断片を約1 µ g回収した。

【 0 0 9 3 】

次に、特開平6-205694に記載のプラスミドpKM796L1の5 µ gを10 µ lの50mMトリス - 塩酸 (pH7.5)、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTT からなる緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素EcoRI (宝酒造社製)および制限酵素AflIII (宝酒造社製)を加えて37 で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約0.39kbのEcoRI - AflIII断片を約0.3 µ g回収した。次に、配列番号22、23に記載の塩基配列を有する合成DNAを自動DNA合成機 (380A、アプライドバイオシステムズ社製)を用いて合成した。得られた合成DNAの0.3 µ gずつを15 µ lの滅菌水に加え、65 で5分間加熱した。該反応液を室温にて30分間放置した後、2 µ lの10倍緩衝液 [500mMトリス - 塩酸 (pH7.6)、100mM塩化マグネシウム、50mM DTT] と2 µ lの10mM ATP を加え、更に10単位のT4ポリヌクレオチドキナーゼを加えて37 で30分間反応させ、5' 末端をリン酸化した。

【 0 0 9 4 】

次に、上記で得られたpBSES由来のEcoRI - SplI断片 (2.95kb) 0.1 µ gとpKM796L1由来のEcoRI - AflIII 0.1 µ gとリン酸化合成DNA0.05 µ gを全量20 µ lの滅菌水に加え、Ready-To-Go T4 DNA Ligase (ファルマシア バイオテク社製)を用いて連結した。このようにして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、図26に示したプラスミドpBSL3を得た。得られたプラスミドの10 µ gを用い、AutoRead Sequencing Kit (ファルマシア バイオテク社製)に添付の処方に従って反応後、A.L.F. DNA Sequencer (ファルマシア バイオテク社製)により電気泳動し、塩基配列を決定した結果、目的の合成DNAが導入されたことを確認した。

【 0 0 9 5 】

(3) 抗GM2ヒト型キメラ抗体発現ベクター、pKANTEX796の構築

上記実施例1で得られたヒト化抗体発現用ベクター、pKANTEX93および実施例2の1項(1)

10

20

30

40

50

、(2)で得られたプラスミドpBSH3、pBSL3を用いて抗GM2ヒト型キメラ抗体発現ベクター、pKANTEX796を以下のようにして構築した。

【0096】

プラスミドpBSH3の3 μ gを10 μ lの10mMトリス - 塩酸 (pH7.5)、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTT からなる緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素ApaI (宝酒造社製)を加えて37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10 μ lの50mMトリス - 塩酸 (pH7.5)、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム、1mM DTT、100 μ g/ml BSAおよび0.01%トライトンX-100からなる緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素NotI (宝酒造社製)を加えて37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約0.46kbのApaI - NotI断片を約0.3 μ g回収した。

10

【0097】

次に、プラスミドpKANTEX93の3 μ gを10 μ lの10mMトリス - 塩酸 (pH7.5)、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTT からなる緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素ApaI (宝酒造社製)を加えて37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10 μ lの50mMトリス - 塩酸 (pH7.5)、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム、1mM DTT、100 μ g/ml BSAおよび0.01%トライトンX-100からなる緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素NotI (宝酒造社製)を加えて37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約12.75kbのApaI - NotI断片を約1 μ g回収した。

【0098】

次に、上記で得られたpBSH3由来のApaI - NotI断片0.1 μ gとpKANTEX93由来のApaI - NotI断片0.1 μ gを全量20 μ lの滅菌水に加え、Ready-To-Go T4 DNA Ligase (ファルマシア バイオテック社製)を用いて連結した。このようにして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、図27に示したプラスミドpKANTEX796Hを得た。

20

【0099】

次に、プラスミドpBSL3の3 μ gを10 μ lの50mMトリス - 塩酸 (pH7.5)、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム、1mM DTT および100 μ g/ml BSAからなる緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素EcoRI (宝酒造社製)および制限酵素SplI (宝酒造社製)を加えて37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約0.4kbのEcoRI - SplI断片を約0.3 μ g回収した。

【0100】

次に、上記で得られたプラスミドpKANTEX796Hの3 μ gを10 μ lの50mMトリス - 塩酸 (pH7.5)、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム、1mM DTT および100 μ g/ml BSAからなる緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素EcoRI (宝酒造社製)および制限酵素SplI (宝酒造社製)を加えて37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約13.20kbのEcoRI - SplI断片を約1 μ g回収した。

30

【0101】

次に、上記で得られたpBSL3由来のEcoRI - SplI断片0.1 μ gとpKANTEX796H由来のEcoRI - SplI断片0.1 μ gを全量20 μ lの滅菌水に加え、Ready-To-Go T4 DNA Ligase (ファルマシア バイオテック社製)を用いて連結した。このようにして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、図28に示したプラスミドpKANTEX796を得た。

40

【0102】

(4) pKANTEX796を用いた抗GM2ヒト型キメラ抗体のYB2/0細胞での発現
YB2/0細胞 (ATCC CRL1662)へのプラスミドの導入は、エレクトロポレーション法 (Miyaji, H.らのCytotechnology, 3, 133, 1990)にて行った。実施例2の1項(3)で得られたpKANTEX796の4 μ gを 4×10^6 細胞のYB2/0細胞へ導入後、40mlのRPMI1640-FCS (10)培地 [FCSを10%、7.5%炭酸水素ナトリウム溶液を適量、200mM L-グルタミン溶液 (ギブコ社製)を3%、ペニシリン・ストレプトマイシン溶液 (ギブコ社製、5000U/mlペニシリンおよび5mg/mlストレプトマイシン含有)を0.5%含むRPMI1640培地 (日水製薬社製)]に懸濁し、96ウエルマイクロプレートに200 μ lずつ分注した。37 $^{\circ}$ C、5%CO₂インキュベーター内で24時間培養後、G418を終濃度が0.5mg/mlになるように添加して1~2週間培養した。形質転換株の

50

コロニーが出現したウエルより培養上清を回収し、上清中の抗GM2ヒト型キメラ抗体活性を下記(5)に記載のELISA法にて測定した。活性が認められたウエルの細胞については以下のようにして遺伝子増幅を行い、キメラ抗体発現量の上昇を試みた。まず、細胞をG418を0.5mg/ml、メソトレキセート(シグマ社製、以下MTXと表記する)を50nM含むRPMI1640-FCS(10)培地に $1\sim 2 \times 10^5$ 細胞/mlになるように懸濁し、24ウエルプレートに2mlずつ分注した。37℃、5%CO₂インキュベーター内で1~2週間培養して、50nM MTX耐性細胞を誘導した。50nM MTX耐性細胞が出現したウエルについてはさらに、MTXの終濃度を100nM、200nMと順次上昇させ、ELISA法による発現量の評価の後、最も高い発現量を示した細胞を選択した。選択した細胞は限界希釈法によるクローニングを2回行った後に、最終的なキメラ抗体安定発現細胞として確立した。確立した抗GM2ヒト型キメラ抗体安定発現細胞は約1~2 µg/mlの発現量を示し、pKANTEX93を用いて効率的かつ安定なヒト化抗体の発現が可能であることが確認された。

【0103】

(5) ELISA法

2ngのガングリオシドを5ngのフォスファチジルコリン(シグマ社製)と2.5ngのコレステロール(シグマ社製)とを含む2mlのエタノール溶液に溶解した。この溶液20 µlまたはこの溶液の希釈液20 µlを96ウエルマイクロプレート(グライナー社製)の各ウェルにそれぞれ分注し、風乾後、1%BSAを含むリン酸緩衝液(以下PBSと表記する)でブロッキングを行った。これに形質転換株の培養上清、精製したマウスモノクローナル抗体、精製したヒト型キメラ抗体または精製したヒト化抗体を50~100 µl加え、1~2時間室温で反応させた。反応後、各ウェルをPBSで洗浄後、ペルオキシダーゼ標識ウサギ抗マウスIg抗体(ダコ社製:400倍希釈で使用)あるいはペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒト鎖抗体(キルケガード&ペリー ラボラトリー社製:1000倍希釈で使用)を50~100 µl加え、1~2時間室温で反応させた。PBSで洗浄後、ABTS基質液[2,2'-アジノビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)の550mgを1リットルの0.1Mクエン酸緩衝液(pH4.2)に溶解し、使用直前に過酸化水素1 µl/mlを加えた溶液]を50~100 µl加えて発色させ、OD415を測定した。

【0104】

2. COS-7細胞(ATCC CRL1651)を用いた抗GM2ヒト型キメラ抗体の一過性発現

抗GM2ヒト型CDR移植抗体の各種バージョンの活性評価をより迅速に行なうために、pKANTEX796およびその改変体を用いてCOS-7細胞における抗GM2ヒト型キメラ抗体の一過性発現をリポフェクトアミン法を用いて以下のようにして行なった。

【0105】

(1) pKANTEX796の改変体の構築

動物細胞における一過性発現の効率は導入された発現ベクターのコピー数に依存していることから、より大きさの小さい発現ベクターの方が発現効率がよいことが考えられた。そこでpKANTEX796のヒト化抗体発現に影響を及ぼさないと考えられる領域を欠失させ、より小さなヒト化抗体発現ベクター、pT796を以下のようにして構築した。

【0106】

プラスミドpKANTEX796の3 µgを10 µlの10mMトリス-塩酸(pH7.5)、50mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTT からなる緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素HindIII(宝酒造社製)を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10 µlの50mMトリス-塩酸(pH7.5)、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTT からなる緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素MluI(宝酒造社製)を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、DNA Blunting Kit(宝酒造社製)を用い、制限酵素消化によって生じた5'突出末端を平滑末端に変えた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約9.60kbのDNA断片を約1 µg回収した。回収したDNA断片0.1 µgを全量20 µlの滅菌水に加え、Ready-To-Go T4 DNA Ligase(ファルマシアバイオテク社製)を用いて連結した。このようにして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、図29に示したプラスミドpT796を得た。

【0107】

10

20

30

40

50

(2) pKANTEX796、pT796を用いた抗GM2ヒト型キメラ抗体の一過性発現
 COS-7細胞を 1×10^5 細胞/mlで6穴プレート(ファルコン社製)に2mlずつ分注し、37℃で一晩培養した。100 μ lのOPTI-MEM 培地(ギブコ社製)にpKANTEX796あるいはpT796の2 μ gを加え、更に100 μ lのOPTI-MEM 培地(ギブコ社製)に10 μ lのLIPOFECTAMINE Reagent(ギブコ社製)を添加した溶液を加え、室温で40分間反応させ、DNA-リボソームの複合体を形成させた。一晩培養したCOS-7細胞を2mlのOPTI-MEM培地(ギブコ社製)で2回洗浄後、複合体を含む溶液を添加し、37℃で7時間培養後、溶液を除去し、2mlの10%のFCSを含有するDMEM培地(ギブコ社製)を添加し、37℃で培養した。培養後、24時間、48時間、72時間、96時間、120時間の時点で培養上清を回収し、必要に応じて濃縮操作を行ない、実施例2の1項(5)に記載のELISA法により培養上清中の抗GM2ヒト型キメラ抗体の活性評価を行なった。その結果を図30に示した。図30に示したようにpT796の方がpKANTEX796よりも高い抗GM2ヒト型キメラ抗体の一過性発現が認められ、その発現量は72時間から96時間で最も高く、約30ng/ml(GM2結合活性値で換算)の濃度であった。以上の結果より、pKANTEX93の大きさを小さくしたベクターを作製し、COS-7細胞に導入することで一過性発現系で発現ベクター由来のヒト化抗体の活性評価を行うことが可能であることが明らかとなった。また、後述する各種バージョンの抗GM2ヒト型CDR移植抗体の活性を正確に比較するために、下記(3)に記載のサンドイッチELISA法により一過性発現培養上清中の抗体濃度を測定した。

10

【0108】

(3) サンドイッチELISA法による各種培養上清中のヒト化抗体濃度の測定
 ヤギ抗ヒト α 鎖抗体(医学生物学研究所製)をPBSにて400倍希釈した溶液を50 μ lずつ96穴マイクロプレートに分注し、4℃にて一晩反応させた。抗体溶液を除去後、100 μ lの1%BSAを含むPBSで37℃、1時間ブロッキングを行なった。これに一過性発現培養上清、精製した抗GM2ヒト型キメラ抗体または精製した抗GM2ヒト化抗体を50 μ l加え、室温で1時間反応させた。反応後、溶液を除去し、PBSで洗浄後、ペルオキシダーゼ標識マウス抗ヒト α 鎖抗体(ザイメット社製)をPBSにて500倍希釈した溶液を50 μ l加え、室温で1時間反応させた。PBSで洗浄後、ABTS基質液を50 μ l加えて発色させ、OD415を測定した。

20

【0109】

実施例3. 抗GM2ヒト型CDR移植抗体の製造I

特開平6-205694の実施例2に記載の抗GM2ヒト型CDR移植抗体よりもGM2との結合活性が高い抗GM2ヒト型CDR移植抗体を以下のようにして製造した。

30

1. 抗GM2ヒト型CDR移植抗体H鎖およびL鎖V領域をコードするDNA配列の構築

(1) 特開平6-205694の実施例2の1項(1)に記載の抗GM2ヒト型CDR移植抗体H鎖V領域の改変

特開平6-205694の実施例2に記載の抗GM2ヒト型CDR移植抗体H鎖V領域のFRのいくつかのアミノ酸残基を元のマウス抗体KM796のアミノ酸残基に戻したバージョンをコードするDNAを以下のようにして構築した。置換させるアミノ酸残基としてはマウス抗体KM796のV領域のコンピューターモデルに基づき、置換により抗原結合活性が回復すると期待された残基を選択した。まず、配列番号24、25の塩基配列を有するDNAを自動DNA合成機(380A、アプライド バイオシステムズ社製)を用いて合成した。

40

【0110】

次に、特開平6-205694の実施例2の1項(1)の配列番号27の合成DNAの代わりに配列番号24の合成DNAを用いて同様の反応を行い、78位のグルタミンがスレオニンに、79位のフェニルアラニンがアラニンに、80位のセリンがチロシンに置換した配列番号26(塩基配列、アミノ酸配列は配列番号79に示す)で示したヒト型CDR移植抗体H鎖V領域のバージョン2を構築した。

次に、特開平6-205694の実施例2の1項(1)の配列番号25の合成DNAの代わりに配列番号25の合成DNAを用いて同様の反応を行い、27位のフェニルアラニンがチロシンに、30位のセリンがスレオニンに、40位のプロリンがセリンに、41位のプロリンがヒスチジンに置換した配列番号27(塩基配列、アミノ酸配列は配列番号80に示す)で示したヒト型CDR移

50

植抗体H鎖V領域のバージョン4を構築した。

【0111】

(2) 既知のヒト抗体H鎖V領域のHMHCsを用いた抗GM2ヒト型CDR移植抗体H鎖V領域の構築カバットらは、文献(「Sequences of Proteins of Immunological Interest」, US Dept. of Health and Human Services, 1991)において、各種ヒト抗体のアミノ酸配列を開示しており、さらに、これら既知のヒト抗体H鎖V領域について、そのFRの相同性からサブグループI~III(Human Sub Group I~III; 以下、HSGと表記する)に分類し、各サブグループ毎に共通配列を同定した。本発明者らは、それら共通配列から一義的にHMHCsを決定し、HMHCsを基礎として抗GM2ヒト型CDR移植抗体H鎖V領域を構築した。まず、基礎とするHMHCsを選択するために、マウス抗体KM796H鎖V領域のFRと、各サブグループのヒト抗体H鎖V領域のHMHCsのFRとの間の相同性を調べた(表1)。

10

【0112】

【表1】

第 1 表

マウス抗体 KM796H 鎖可変領域の FR と、各サブグループのヒト抗体 H 鎖可変領域の共通配列の FR との間の相同性 (%)

20

HSGI	HSGII	HSGIII
72.1	52.9	58.6

【0113】

その結果、サブグループIと最も類似していることが確認され、サブグループIのHMHCsを基礎として抗GM2ヒト型CDR移植抗体H鎖V領域をPCR法を用いて以下のようにして構築した。

30

配列番号28から33の塩基配列を有する合成DNAを自動DNA合成機(380A、アプライド バイオシステムズ社製)を用いて合成した。合成した各DNAを最終濃度が0.1 μ Mとなるように50 μ lの10mMトリス - 塩酸(pH8.3)、50mM塩化カリウム、1.5mM塩化マグネシウム、0.001%ゼラチン、200 μ M dNTP、0.5 μ M M13primer RV(宝酒造社製)、0.5 μ M M13primer M4(宝酒造社製)および2単位のTaKaRa Taq DNAポリメラーゼよりなる緩衝液に加え、50 μ lの鉱油で覆い、DNAサーマルサイクラー(PJ480、パーキン エルマー社製)にセットし、94 $^{\circ}$ Cにて2分間、55 $^{\circ}$ Cにて2分間、72 $^{\circ}$ Cにて2分間の30サイクルを行なった。該反応液をQIAquick PCR Purification Kit(キアジェン社製)を用いて精製後、30 μ lの10mMトリス - 塩酸(pH7.5)、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTT からなる緩衝液とし、更に10単位の制限酵素Apal(宝酒造社製)を加えて37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10 μ lの50mMトリス - 塩酸(pH7.5)、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム、1mM DTT、100 μ g/ml BSAおよび0.01%トライトンX-100 からなる緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素NotI(宝酒造社製)を加えて37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約0.44kbのApal - NotI断片を約0.2 μ g回収した。

40

【0114】

次に、上記実施例2の1項(1)で得られたプラスミドpBSH3の3 μ gを10 μ lの10mMトリス - 塩酸(pH7.5)、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTT からなる緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素Apal(宝酒造社製)を加えて37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10 μ lの50mMトリス - 塩酸(pH7.5)、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネ

50

シウム、1mM DTT、100 µg/ml BSAおよび0.01%トライトンX-100 からなる緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素NotI（宝酒造社製）を加えて37 °Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約2.95kbのApaI - NotI断片を約1 µg回収した。

【0115】

次に、上記で得られた抗GM2ヒト型CDR移植抗体H鎖V領域のApaI - NotI断片0.1 µgとpBSH3のApaI - NotI断片0.1 µgを全量20 µlの滅菌水に加え、Ready-To-Go T4 DNA Ligase（ファルマシア バイオテック社製）を用いて連結した。このようにして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌HB101株を形質転換した。形質転換株の10個のクローンより各プラスミドDNAを調製し、塩基配列の決定を行なった結果、目的の塩基配列を含む図31に示したプラスミドpBSH10を得た。pBSH10に含まれる抗GM2ヒト型CDR移植抗体H鎖V領域のアミノ酸配列を配列番号74に、および塩基配列を配列番号7に示した。構築した抗GM2ヒト型CDR移植抗体H鎖V領域のアミノ酸配列においてはマウス抗体KM796の抗原結合性を保持する目的で、可変領域のコンピューターモデルから選択したFR中の67位のアルギニン、72位のアラニン、84位のセリン、98位のアルギニンの各アミノ酸残基をマウス抗体KM796のH鎖V領域に見いだされるアミノ酸残基であるリジン、バリン、ヒスチジン、スレオニンにそれぞれ換えている。

10

【0116】

(3) 特開平6-205694の実施例2の1項(2)に記載の抗GM2ヒト型CDR移植抗体L鎖V領域の改変

まず、配列番号34の塩基配列を有するDNAを自動DNA合成機（380A、アプライドバイオシステムズ社製）を用いて合成し、特開平6-205694の実施例2の1項(2)の配列番号35の合成DNAの代わりに用いて同様の反応を行い、3'末端が制限酵素SpIIの対合末端である抗GM2ヒト型CDR移植抗体L鎖V領域cDNAを構築した。

20

【0117】

次に、実施例2の1項(2)で得られたプラスミドpBSL3の3 µgを10 µlの50mMトリス - 塩酸（pH7.5）、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム、1mM DTT および100 µg/ml BSAからなる緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素EcoRI（宝酒造社製）および制限酵素SpII（宝酒造社製）を加えて37 °Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約2.95kbのEcoRI - SpII断片を約1 µg回収した。

【0118】

次に、上記で得られた抗GM2ヒト型CDR移植抗体L鎖V領域cDNAのEcoRI - SpII断片0.1 µgとpBSL3のEcoRI - SpII断片0.1 µgを全量20 µlの滅菌水に加え、Ready-To-Go T4 DNA Ligase（ファルマシア バイオテック社製）を用いて連結した。このようにして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、図32に示したプラスミドpBSL16を得た。

30

【0119】

次に、上記で得られたプラスミドpBSL16に含まれる抗GM2ヒト型CDR移植抗体L鎖V領域のFRのいくつかのアミノ酸残基を元のマウス抗体KM796のアミノ酸残基に戻したバージョンをコードするDNAを以下のようにPCRによる変異導入法を用いて構築した（図33）。置換させるアミノ酸残基としてはマウス抗体KM796のV領域のコンピューターモデルに基づき、置換により抗原結合活性が回復すると期待された残基を選択した。

40

【0120】

変異を導入するためのアンチセンスおよびセンスのDNAプライマーを自動DNA合成機（380A、アプライド バイオシステムズ社製）を用いて合成し、pBSL16の1ngを鋳型として最終濃度0.5 µMのM13 Primer RV（宝酒造社製）とアンチセンスDNAプライマーおよびM13 Primer M4（宝酒造社製）とセンスDNAプライマーを用いて第一PCR反応を実施例3の1項(2)と同様にして行なった。各反応溶液をQIAquick PCR Purification Kit（キアジェン社製）を用いて20 µlの10mMトリス - 塩酸（pH8.0）で溶出、精製した後、各溶出液の5 µlを用いて第二PCR反応を実施例3の1項(2)と同様にして行なった。該反応液をQIAquick PCR Purification Kit（キアジェン社製）を用いて精製後、30 µlの50mMトリス - 塩酸（pH7.5）

50

、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム、1mM DTT および100 µg/ml BSAからなる緩衝液とし、更に10単位の制限酵素EcoRI（宝酒造社製）および制限酵素SpII（宝酒造社製）を加えて37 °Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約0.39kbの抗GM2ヒト型CDR移植抗体L鎖V領域の各種置換バージョンのEcoRI - SpII断片を約0.2 µg回収した。

【 0 1 2 1 】

次に、得られた抗GM2ヒト型CDR移植抗体L鎖V領域の各種置換バージョンのEcoRI - SpII断片0.1 µgとpBSL3のEcoRI - SpII断片0.1 µgを全量20 µlの滅菌水に加え、Ready-To-Go T4 DNA Ligase（ファルマシア バイオテク社製）を用いて連結した。このようにして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、形質転換株のクローンより各プラスミドDNAを調製し、塩基配列の決定を行ない、目的の変異を有する塩基配列を含むプラスミドを得た。

10

【 0 1 2 2 】

実際には、アンチセンス変異プライマーとして配列番号35、センス変異プライマーとして配列番号36の合成DNAを用いて、上記反応を行なうことにより配列番号37に示した抗GM2ヒト型CDR移植抗体L鎖V領域バージョン1を含むプラスミドpBSLV1を得た。構築した抗GM2ヒト型CDR移植抗体L鎖V領域バージョン1のアミノ酸配列においてはマウス抗体KM796の抗原結合性を保持する目的で、FR中の15位のバリンをマウス抗体KM796のL鎖V領域に見いだされるアミノ酸残基であるプロリンに換えている。

20

【 0 1 2 3 】

アンチセンス変異プライマーとして配列番号38、センス変異プライマーとして配列番号39の合成DNAを用いて、上記反応を行なうことにより配列番号40に示した抗GM2ヒト型CDR移植抗体L鎖V領域バージョン2を含むプラスミドpBSLV2を得た。構築した抗GM2ヒト型CDR移植抗体L鎖V領域バージョン2のアミノ酸配列においてはマウス抗体KM796の抗原結合性を保持する目的で、FR中の46位のロイシンをマウス抗体KM796のL鎖V領域に見いだされるアミノ酸残基であるトリプトファンに換えている。

30

【 0 1 2 4 】

アンチセンス変異プライマーとして配列番号41、センス変異プライマーとして配列番号42の合成DNAを用いて、上記反応を行なうことにより配列番号43に示した抗GM2ヒト型CDR移植抗体L鎖V領域バージョン3を含むプラスミドpBSLV3を得た。構築した抗GM2ヒト型CDR移植抗体L鎖V領域バージョン3のアミノ酸配列においてはマウス抗体KM796の抗原結合性を保持する目的で、FR中の79位のプロリン、82位のイソロイシンをともにマウス抗体KM796のL鎖V領域に見いだされるアミノ酸残基であるアラニンに換えている。

40

【 0 1 2 5 】

次に、バージョン1とバージョン2の置換を併せ持つ抗GM2ヒト型CDR移植抗体L鎖V領域を含むプラスミドpBSLV1+2を以下のようにして構築した。

上記で得られたプラスミドpBSLV1の3 µgを10 µlの10mMトリス - 塩酸（pH7.5）、50mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTT からなる緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素EcoRI（宝酒造社製）および制限酵素HindIII（宝酒造社製）を加えて37 °Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約0.20kbのEcoRI - HindIII断片を約0.2 µg回収した。

40

【 0 1 2 6 】

次に、上記で得られたプラスミドpBSLV2の3 µgを10 µlの10mMトリス - 塩酸（pH7.5）、50mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTT からなる緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素EcoRI（宝酒造社製）および制限酵素HindIII（宝酒造社製）を加えて37 °Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約3.2kbのEcoRI - HindIII断片を約1 µg回収した。

【 0 1 2 7 】

次に、上記で得られたpBSLV1のEcoRI - HindIII断片0.1 µgとpBSLV2のEcoRI - HindIII断片0.1 µgを全量20 µlの滅菌水に加え、Ready-To-Go T4 DNA Ligase（ファルマシア バイオ

50

テク社製)を用いて連結した。このようにして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、図34に示したプラスミドpBSLV1+2を得た。

【0128】

次に、上記で得られたプラスミドpBSLV1+2の1ngを鋳型として配列番号44の塩基配列を有する合成DNAをアンチセンス変異プライマーとして、また、配列番号45の塩基配列を有する合成DNAをセンス変異プライマーとして上記したPCR反応を行なうことにより配列番号46に示した抗GM2ヒト型CDR移植抗体L鎖V領域バージョン4を含むプラスミドpBSLV4を得た。構築した抗GM2ヒト型CDR移植抗体L鎖V領域バージョン4のアミノ酸配列においてはマウス抗体KM796の抗原結合性を保持する目的で、FR中の15位のバリン、46位のロイシン、69位のアスパラギン酸、70位のフェニルアラニン、71位のスレオニンの各アミノ酸残基をマウス抗体KM796のL鎖V領域に見いだされるアミノ酸残基であるプロリン、トリプトファン、セリン、チロシン、セリンにそれぞれ換えている。

10

【0129】

次に、上記で得られたプラスミドpBSLV1+2の1ngを鋳型として配列番号47の塩基配列を有する合成DNAをアンチセンス変異プライマーとして、また、配列番号48の塩基配列を有する合成DNAをセンス変異プライマーとして上記したPCR反応を行なうことにより配列番号49に示した抗GM2ヒト型CDR移植抗体L鎖V領域バージョン8を含むプラスミドpBSLV8を得た。構築した抗GM2ヒト型CDR移植抗体L鎖V領域バージョン8のアミノ酸配列においてはマウス抗体KM796の抗原結合性を保持する目的で、FR中の15位のバリン、46位のロイシン、69位のアスパラギン酸、70位のフェニルアラニン、71位のスレオニン、76位のセリン、77位のロイシン、78位のグルタミンの各アミノ酸残基をマウス抗体KM796のL鎖V領域に見いだされるアミノ酸残基であるプロリン、トリプトファン、セリン、チロシン、セリン、アルギニン、メチオニン、グルタミン酸にそれぞれ換えている。

20

【0130】

次に、上記で得られたプラスミドpBSLV4の1ngを鋳型として配列番号50の塩基配列を有する合成DNAをアンチセンス変異プライマーとして、また、配列番号51の塩基配列を有する合成DNAをセンス変異プライマーとして上記したPCR反応を行なうことにより配列番号52に示した抗GM2ヒト型CDR移植抗体L鎖V領域バージョンLm-2を含むプラスミドpBSLm-2を得た。構築した抗GM2ヒト型CDR移植抗体L鎖V領域バージョンLm-2のアミノ酸配列においてはマウス抗体KM796の抗原結合性を保持する目的で、FR中の15位のバリン、35位のチロシン、46位のロイシン、69位のアスパラギン酸、70位のフェニルアラニン、71位のスレオニンの各アミノ酸残基をマウス抗体KM796のL鎖V領域に見いだされるアミノ酸残基であるプロリン、フェニルアラニン、トリプトファン、セリン、チロシン、セリンにそれぞれ換えている。

30

【0131】

次に、上記で得られたプラスミドpBSLV4の1ngを鋳型として配列番号53の塩基配列を有する合成DNAをアンチセンス変異プライマーとして、また、配列番号54の塩基配列を有する合成DNAをセンス変異プライマーとして上記したPCR反応を行なうことにより配列番号55に示した抗GM2ヒト型CDR移植抗体L鎖V領域バージョンLm-8を含むプラスミドpBSLm-8を得た。構築した抗GM2ヒト型CDR移植抗体L鎖V領域バージョンLm-8のアミノ酸配列においてはマウス抗体KM796の抗原結合性を保持する目的で、FR中の15位のバリン、46位のロイシン、69位のアスパラギン酸、70位のフェニルアラニン、71位のスレオニン、72位のフェニルアラニン、76位のセリンの各アミノ酸残基をマウス抗体KM796のL鎖V領域に見いだされるアミノ酸残基であるプロリン、トリプトファン、セリン、チロシン、セリン、ロイシン、アルギニンにそれぞれ換えている。

40

【0132】

次に、バージョンLm-2とバージョンLm-8の置換を併せ持つ抗GM2ヒト型CDR移植抗体L鎖V領域を含むプラスミドpBSLm-28を以下のようにして構築した。
上記で得られたプラスミドpBSLm-2の3μgを10μlの50mMトリス-塩酸(pH7.5)、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTTからなる緩衝液に加え、更に10単

50

位の制限酵素EcoRI（宝酒造社製）を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10μlの10mMトリス - 塩酸（pH7.5）、50mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム、1mM DTT および100μg/ml BSAからなる緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素XbaI（宝酒造社製）を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約0.24kbのEcoRI - XbaI断片を約0.2μg回収した。

【0133】

次に、上記で得られたプラスミドpBSLm - 8の3μgを10μlの50mMトリス - 塩酸（pH7.5）、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTTからなる緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素EcoRI（宝酒造社製）を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10μlの10mMトリス - 塩酸（pH7.5）、50mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム、1mM DTTおよび100μg/ml BSAからなる緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素XbaI（宝酒造社製）を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約3.16kbのEcoRI - XbaI断片を約1μg回収した。

次に、上記で得られたpBSLm - 2のEcoRI - XbaI断片0.1μgとpBSLm - 8のEcoRI - XbaI断片0.1μgを全量20μlの滅菌水に加え、Ready-To-Go T4 DNA Ligase（ファルマシア バイオテック社製）を用いて連結した。このようにして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、図35に示したプラスミドpBSLm - 28を得た。プラスミドpBSLm - 28に含まれる抗GM2ヒト型CDR移植抗体L鎖V領域バージョンLm - 28を配列番号8（塩基配列、アミノ酸配列は配列番号75に示す）に示した。構築した抗GM2ヒト型CDR移植抗体L鎖V領域バージョンLm - 28のアミノ酸配列においてはマウス抗体KM796の抗原結合性を保持する目的で、FR中の15位のバリリン、35位のチロシン、46位のロイシン、69位のアスパラギン酸、70位のフェニルアラニン、71位のスレオニン、72位のフェニルアラニン、76位のセリンの各アミノ酸残基をマウス抗体KM796のL鎖V領域に見いだされるアミノ酸残基であるプロリン、フェニルアラニン、トリプトファン、セリン、チロシン、セリン、ロイシン、アルギニンにそれぞれ換えている。

【0134】

（4）既知のヒト抗体L鎖V領域のHMHCSを用いた抗GM2ヒト型CDR移植抗体L鎖V領域の構築カバットらは、文献（「Sequences of Proteins of Immunological Interest」, US Dept. of Health and Human Services, 1991）において、各種ヒト抗体のアミノ酸配列を開示しており、さらに既知のヒト抗体L鎖V領域について、そのFRの相同性からHSG I ~ IVに分類し、各サブグループ毎にHMHCSが同定した。本発明者らは、それら共通配列から一義的にHMHCSを決定し、HMHCSを基礎として抗GM2ヒト型CDR移植抗体L鎖V領域を構築した。まず、基礎とするHMHCSを選択するために、マウス抗体KM796L鎖V領域のFRと、各サブグループのヒト抗体L鎖V領域のHMHCSのFRとの間の相同性を調べた（表2）。

【0135】

【表2】

第 2 表

マウス抗体 KM796L 鎖可変領域の FR と、各サブグループのヒト抗体 L 鎖可変領域の共通配列の FR との間の相同性 (%)

HSGI	HSGII	HSGIII	HSGIV
70.0	65.0	68.8	67.5

10

20

30

40

50

【0136】

その結果、サブグループIと最も類似していることが確認され、サブグループIのHMHCSを基礎として抗GM2ヒト型CDR移植抗体L鎖V領域をPCR法を用いて以下のようにして構築した。

配列番号56から61の塩基配列を有する合成DNAを自動DNA合成機（380A、アプライド バイオシステムズ社製）を用いて合成した。合成した各DNAを最終濃度が0.1 μMとなるように50 μlの10mMトリス - 塩酸（pH8.3）、50mM塩化カリウム、1.5mM塩化マグネシウム、0.001%ゼラチン、200 μM dNTP、0.5 μM M13primer RV（宝酒造社製）、0.5 μM M13primer M4（宝酒造社製）および2単位のTaKaRa Taq DNAポリメラーゼよりなる緩衝液に加え、50 μlの鉍油で覆い、DNAサーマルサイクラー（PJ480、パーキン エルマー社製）にセットし、94 10にて2分間、55 にて2分間、72 にて2分間の30サイクルを行なった。該反応液をQIAquick PCR Purification Kit（キアジェン社製）を用いて精製後、30 μlの50mMトリス - 塩酸（pH7.5）、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム、1mM DTT および100 μg/ml BSAからなる緩衝液とし、更に10単位の制限酵素EcoRI（宝酒造社製）および制限酵素SpII（宝酒造社製）を加えて37 で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約0.39kbのEcoRI - SpII断片を約0.2 μg回収した。

【0137】

次に、上記で得られた抗GM2ヒト型CDR移植抗体L鎖V領域のEcoRI - SpII断片0.1 μgとpBSL3のEcoRI - SpII断片0.1 μgを全量20 μlの滅菌水に加え、Ready-To-Go T4 DNA Ligase（ファルマシア バイオテック社製）を用いて連結した。このようにして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌HB101株を形質転換した。形質転換株の10個のクローンより各プラスミドDNAを調製し、塩基配列の決定を行なった結果、目的の塩基配列を含む図36に示したプラスミドpBSHSGIを得た。pBSHSGIに含まれる抗GM2ヒト型CDR移植抗体L鎖V領域のアミノ酸配列を配列番号76に、および塩基配列を配列番号9に示した。構築した抗GM2ヒト型CDR移植抗体L鎖V領域のアミノ酸配列においてはマウス抗体KM796の抗原結合性を保持する目的で、V領域のコンピューターモデルから選択したFR中の4位のメチオニン、11位のロイシン、15位のバリン、35位のチロシン、42位のアラニン、46位のロイシン、69位のアスパラギン酸、70位のフェニルアラニン、71位のスレオニン、77位のロイシン、103位のバリンの各アミノ酸残基をマウス抗体KM796のL鎖V領域に見いだされるアミノ酸残基であるロイシン、メチオニン、プロリン、フェニルアラニン、セリン、トリプトファン、セリン 30、チロシン、セリン、メチオニン、ロイシンにそれぞれ換えている。

【0138】

2. 各種置換バージョンの抗GM2ヒト型CDR移植抗体の一過性発現による活性評価

上記実施例3の1項（1）から（4）で構築した各種置換を有する抗GM2ヒト型CDR移植抗体H鎖、L鎖V領域からなる各種置換バージョンの抗GM2ヒト型CDR移植抗体を以下のようにして一過性発現にて活性評価を行った。

まず、各種置換を有する抗GM2ヒト型CDR移植抗体H鎖V領域の評価を行うために、実施例2の2項（1）で得られた抗GM2ヒト型キメラ抗体一過性発現ベクター、pT796のマウス抗体H鎖V領域を各種置換を有する抗GM2ヒト型CDR移植抗体H鎖V領域で置換した発現ベクター、pT796HCDRHV2、pT796HCDRHV4、pT796HCDRH10を以下のようにして構築した。また、比較のため特開平6-205694 の実施例2の1項（1）で得られた抗GM2ヒト型CDR移植抗体H鎖V領域で置換した発現ベクター、pT796HCDRも構築した。

【0139】

プラスミドpT796の3 μgを10 μlの50mMトリス - 塩酸（pH7.5）、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム、1mM DTT および100 μg/ml BSAからなる緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素EcoRI（宝酒造社製）および制限酵素SpII（宝酒造社製）を加えて37 で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約9.20kbのEcoRI - SpII断片を約1 μg回収した。 次に、実施例3の1項（3）で得られたプラスミドpBSL16の3 μgを10 μlの50mMトリス - 塩酸（pH7.5）、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム、1mM DTT および100 μg/ml BSAからなる緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素EcoRI（宝酒造社製 50

）および制限酵素SpII（宝酒造社製）を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約0.39kbのEcoRI - SpII断片を約0.3 μg回収した。

【0140】

次に、上記で得られたpT796のEcoRI - SpII断片0.1 μgとpBSL16のEcoRI - SpII断片0.1 μgを全量20 μlの滅菌水に加え、Ready-To-Go T4 DNA Ligase（ファルマシア バイオテク社製）を用いて連結した。このようにして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、図37に示したプラスミドpT796LCDRを得た。

【0141】

次に、上記で得られたプラスミドpT796LCDRの3 μgを10 μlの10mMトリス - 塩酸（pH7.5）、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTT からなる緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素Apal（宝酒造社製）を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10 μlの50mMトリス - 塩酸（pH7.5）、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム、1mM DTT、100 μg/ml BSAおよび0.01%トライトンX-100 からなる緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素NotI（宝酒造社製）を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約9.11kbのApal - NotI断片を約1 μg回収した。

【0142】

次に、特開平6-205694の実施例2の1項（1）で得られた抗GM2ヒト型CDR移植抗体H鎖V領域および実施例3の1項（1）で得られた抗GM2ヒト型CDR移植抗体H鎖V領域の置換バージョン2、バージョン4の各0.1 μgとpT796LCDRのApal - NotI断片0.1 μgを全量20 μlの滅菌水に加え、Ready-To-Go T4 DNA Ligase（ファルマシア バイオテク社製）を用いて連結した。このようにして得られた各組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、図38に示したプラスミドpT796HLCDR、pT796HLCDRHV2およびpT796HLCDRHV4を得た。

【0143】

次に、実施例3の1項（2）で得られたプラスミドpBSH10の3 μgを10 μlの10mMトリス - 塩酸（pH7.5）、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTT からなる緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素Apal（宝酒造社製）を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10 μlの50mMトリス - 塩酸（pH7.5）、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム、1mM DTT、100 μg/ml BSAおよび0.01%トライトンX-100 からなる緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素NotI（宝酒造社製）を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約0.44kbのApal - NotI断片を約0.3 μg回収した。

【0144】

次に、pBSH10のApal - NotI断片0.1 μgとpT796LCDRのApal - NotI断片0.1 μgを全量20 μlの滅菌水に加え、Ready-To-Go T4 DNA Ligase（ファルマシア バイオテク社製）を用いて連結した。このようにして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、図39に示したプラスミドpT796HLCDRH10を得た。

【0145】

次に、上記で得られた各プラスミド、pT796HLCDR、pT796HLCDRHV2、pT796HLCDRHV4、pT796HLCDRH10の3 μgを10 μlの50mMトリス - 塩酸（pH7.5）、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム、1mM DTT および100 μg/ml BSAからなる緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素EcoRI（宝酒造社製）および制限酵素SpII（宝酒造社製）を加えて37℃で1時間反応させた。各反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、各々約9.15kbのEcoRI - SpII断片を約1 μg回収した。

【0146】

次に、実施例2の1項（2）で得られたプラスミドpBSL3の5 μgを10 μlの50mMトリス - 塩酸（pH7.5）、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム、1mM DTT および100 μg/ml BSAからなる緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素EcoRI（宝酒造社製）および制限酵素SpII（宝酒造社製）を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約0.39kbのEcoRI - SpII断片を約0.4 μg回収した。

【0147】

次に、pT796HLCDR、pT796HLCDRHV2、pT796HLCDRHV4、pT796HLCDRH10のEcoRI - SpII断片各

10

20

30

40

50

0.1 µgとpBSL3のEcoRI - SpII断片0.1 µgを全量20 µlの滅菌水に加え、Ready-To-Go T4 DNA Ligase (ファルマシア バイオテック社製)を用いて連結した。このようにして得られた各組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、図40に示したプラスミドpT796HCDR、pT796HCDRHV2、pT796HCDRHV4、pT796HCDRH10を得た。

【0148】

次に、得られたプラスミドpT796HCDR、pT796HCDRHV2、pT796HCDRHV4、pT796HCDRH10の2 µgを用いて実施例2の1項(5)および2項(2)、(3)に記載の方法に従って、抗GM2ヒト型CDR移植抗体の一過性発現および培養上清中の抗GM2ヒト型CDR移植抗体の活性評価を行った。各プラスミドの導入後、72時間後に培養上清を回収し、培養上清中のGM2結合活性および抗体濃度より、陽性コントロールであるキメラ抗体の活性を100%とした時の相対活性値を算出した。図41に結果を示した。

10

【0149】

その結果、置換バージョン2および4のアミノ酸残基の置換のみでは抗GM2ヒト型CDR移植抗体の抗原結合活性の回復にほとんど影響を与えないが、pBSH10由来の抗GM2ヒト型CDR移植抗体H鎖V領域すなわち、既知のヒト抗体H鎖V領域のHMHCSを基礎として構築した抗GM2ヒト型CDR移植抗体H鎖V領域を用いることで抗原結合活性が回復することが明らかとなった。

【0150】

以上の結果から、新しい抗GM2ヒト型CDR移植抗体H鎖V領域として配列番号7(塩基配列、アミノ酸配列は配列番号74に示す)に示した既知のヒト抗体H鎖V領域の共通配列を基礎として構築した抗GM2ヒト型CDR移植抗体H鎖V領域を選択した。

20

次に、各種置換を有する抗GM2ヒト型CDR移植抗体L鎖V領域の評価を行うために、上記で得られた抗GM2ヒト型CDR移植抗体一過性発現ベクター、pT796HCDRH10のマウス抗体L鎖V領域を各種置換を有する抗GM2ヒト型CDR移植抗体L鎖V領域で置換した発現ベクター、pT796HLCDRLV1、pT796HLCDRLV2、pT796HLCDRLV3、pT796HLCDRLV4、pT796HLCDRLV8、pT796HLCDRLm-2、pT796HLCDRLm-8、pT796HLCDRLm-28、pT796HLCDRHSGLを以下のようにして構築した。

【0151】

プラスミドpT796HCDRH10の3 µgを10 µlの50mMトリス - 塩酸(pH7.5)、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム、1mM DTT および100 µg/ml BSAからなる緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素EcoRI(宝酒造社製)および制限酵素SpII(宝酒造社製)を加えて37

30

【0152】

で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約9.15kbのEcoRI - SpII断片を約1 µg回収した。

次に、実施例3の1項(3)、(4)で得られた各プラスミドpBSLV1、pBSLV2、pBSLV3、pBSLV4、pBSLV8、pBSLm-2、pBSLm-8、pBSLm-28、pBSHSGLの3 µgを10 µlの50mMトリス - 塩酸(pH7.5)、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム、1mM DTT および100 µg/ml BSAからなる緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素EcoRI(宝酒造社製)および制限酵素SpII(宝酒造社製)を加えて37

40

【0153】

で1時間反応させた。各反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、各々約0.39kbのEcoRI - SpII断片を約0.3 µg回収した。

次に、上記で得られたpT796HCDRH10のEcoRI - SpII断片0.1 µgと各種置換バージョンの抗GM2ヒト型CDR移植抗体L鎖V領域のEcoRI - SpII断片0.1 µgを全量20 µlの滅菌水に加え、Ready-To-Go T4 DNA Ligase (ファルマシア バイオテック社製)を用いて連結した。このようにして得られた各組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、図42に示したプラスミドpT796HLCDRLV1、pT796HLCDRLV2、pT796HLCDRLV3、pT796HLCDRLV4、pT796HLCDRLV8、pT796HLCDRLm-2、pT796HLCDRLm-8、pT796HLCDRLm-28、pT796HLCDRHSGLを得た。

【0154】

次に、得られたプラスミドpT796HLCDRLV1、pT796HLCDRLV2、pT796HLCDRLV3、pT796HLCDRLV4、pT796HLCDRLV8、pT796HLCDRLm-2、pT796HLCDRLm-8、pT796HLCDRLm-28、pT796HLCDR

50

RHSGSLおよび上記で得られた特開平6-205694の実施例2に記載の抗GM2ヒト型CDR移植抗体を発現するプラスミドpT796HLCDRの各2 μ gを用いて実施例2の1項(5)および2項(2)、(3)に記載の方法に従って、抗GM2ヒト型CDR移植抗体の一過性発現および培養上清中の抗GM2ヒト型CDR移植抗体の活性評価を行った。各プラスミドの導入後、72時間後に培養上清を回収し、培養上清中のGM2結合活性および抗体濃度より、陽性コントロールであるキメラ抗体の活性を100%とした時の相対活性値を算出した。図43に結果を示した。

【0155】

その結果、置換バージョン1、2、3、4および8のアミノ酸残基の置換のみでは抗GM2ヒト型CDR移植抗体の抗原結合活性の回復にほとんど影響を与えないが、置換バージョンLm-2、Lm-8のアミノ酸残基の置換により抗GM2ヒト型CDR移植抗体の抗原結合活性が回復することが明らかとなった。そしてさらに、Lm-2とLm-8のアミノ酸残基の置換を併せ持つ置換バージョンLm-28ではキメラ抗体とほぼ同等の高い抗原結合活性が見られ、Lm-28において置換させたアミノ酸残基が抗原結合活性において極めて重要であったことが明らかとなった。

10

【0156】

以上の結果から、新しい抗GM2ヒト型CDR移植抗体L鎖V領域の第一番目として配列番号8(塩基配列、アミノ酸配列は配列番号75に示す)に示した抗GM2ヒト型CDR移植抗体L鎖V領域バージョンLm-28を選択した。

また、pBSHSGSL由来の抗GM2ヒト型CDR移植抗体L鎖V領域すなわち、既知のヒト抗体L鎖V領域のHMCSを基礎として構築した抗GM2ヒト型CDR移植抗体L鎖V領域を用いることでも抗原結合活性が回復することが明らかとなった。

20

【0157】

以上の結果から、新しい抗GM2ヒト型CDR移植抗体L鎖V領域の第二番目として配列番号9(塩基配列、アミノ酸配列は配列番号76に示す)に示した既知のヒト抗体L鎖V領域の共通配列を基礎として構築した抗GM2ヒト型CDR移植抗体L鎖V領域を選択した。

なお、GM2に対して高い結合活性を示した抗GM2ヒト型CDR移植抗体L鎖V領域においては既知のヒト型CDR移植抗体の製造例からは推測できないアミノ酸残基をマウス抗体L鎖V領域に見いだされるアミノ酸残基に換えており、それらアミノ酸残基の同定が抗GM2ヒト型CDR移植抗体の製造において極めて重要であったことが明らかとなった。

30

【0158】

また、既知のヒト抗体V領域のHMCSを基礎とした抗GM2ヒト型CDR移植抗体H鎖、L鎖V領域を有する抗GM2ヒト型CDR移植抗体が高い抗原結合活性を示したことから、本法はヒト型CDR移植抗体の製造において有用であることが示された。

【0159】

3. 抗GM2ヒト型CDR移植抗体の安定発現株の取得

上記実施例3の2項(5)の結果より、特開平6-205694の実施例2に記載の抗GM2ヒト型CDR移植抗体よりも高い抗原結合活性を持つ抗GM2ヒト型CDR移植抗体として、H鎖V領域として配列番号74記載のアミノ酸配列を有し、L鎖V領域として配列番号75記載のアミノ酸配列を有するKM8966およびH鎖V領域として配列番号74記載のアミノ酸配列を有し、L鎖V領域として配列番号76記載のアミノ酸配列を有するKM8967を安定に発現する細胞株KM8966およびKM8967を以下のようにして取得した。

40

【0160】

上記実施例3の2項(5)で得られたプラスミドpT796HLCDRLm-28およびpT796HLCDRHSGSLの3 μ gを10 μ lの20mMトリス-塩酸(pH8.5)、100mM塩化カリウム、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTT からなる緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素BamHI(宝酒造社製)を加えて37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。各反応液をエタノール沈殿し、10 μ lの50mMトリス-塩酸(pH7.5)、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTT からなる緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素XhoI(宝酒造社製)を加えて37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。各反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、各々約4.93kbのBamHI-XhoI断片を約1 μ g回収した。

50

【0161】

次に、実施例1で得られたプラスミドpKANTEX93の3 μ gを10 μ lの20mMトリス - 塩酸 (pH8.5)、100mM塩化カリウム、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTT からなる緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素BamHI (宝酒造社製)を加えて37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10 μ lの50mMトリス - 塩酸 (pH7.5)、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTT からなる緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素XhoI (宝酒造社製)を加えて37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約8.68kbのBamHI - XhoI断片を約1 μ g回収した。

【0162】

次に、上記で得られたpT796HLCDRM-28およびpT796HLCDRHSGLのBamHI - XhoI断片0.1 μ gとpKANTEX93のBamHI - XhoI断片0.1 μ gを全量20 μ lの滅菌水に加え、Ready-To-Go T4 DNA Ligase (ファルマシア バイオテク社製)を用いて連結した。

このようにして得られた各組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、図44に示したプラスミドpKANTEX796HLCDRM-28 およびpKANTEX796HLCDRHSGLを得た。

【0163】

次に、上記で得られたプラスミドpKANTEX796HLCDRM-28 およびpKANTEX796HLCDRHSGLの各4 μ gを用いて実施例2の1項(4)に記載の方法に従って、YB2/0細胞(ATCC CRL1662)を形質転換し、最終的にG418(0.5mg/ml)およびMTX(200nM)による選択を行い、約40 μ g/mlのpKANTEX796HLCDRM-28由来の抗GM2ヒト型CDR移植抗体、KM8966を産生する形質転換株KM8966および約30 μ g/mlのpKANTEX796HLCDRHSGL由来の抗GM2ヒト型CDR移植抗体、KM8967を産生する形質転換株KM8967を取得した。KM8966とKM8967は平成7年5月23日付で、工業技術院生命工学工業技術研究所(茨城県つくば市東一丁目1番3号、以下所在地は同様)にそれぞれFERM BP-5105、FERM BP-5106 として寄託されている。

【0164】

4. 抗GM2ヒト型CDR移植抗体KM8966およびKM8967の精製

上記実施例3の3項で得られた形質転換株、KM8966およびKM8967を、G418を0.5mg/ml、MTXを200nM含むGIT培地(日本製薬社製)に懸濁し、特開平6-205694の実施例1の11項に記載の方法に従い、約0.5リットルの培養液から精製抗GM2ヒト型CDR移植抗体KM8966を18mg、KM8967を12mg取得した。得られた精製抗GM2ヒト型CDR移植抗体および抗GM2ヒト型キメラ抗体KM966の各3 μ gを、公知の方法(Laemli, U. K.らのNature, 227, 680, 1970)に従って電気泳動し、分子量を調べた。その結果を図45に示した。図45に示したように、還元条件下では抗体H鎖の分子量は約50キロダルトン、抗体L鎖の分子量は約25キロダルトンであり、正しい分子量のH鎖およびL鎖の発現が確認された。また、非還元条件下では抗GM2ヒト型CDR移植抗体の分子量は約150キロダルトンであり、2本のH鎖および2本のL鎖からなる正しい大きさの抗体の発現が確認された。また、各抗GM2ヒト型CDR移植抗体のH鎖、L鎖のN末端アミノ酸配列をプロテインシーケンサー(470A、アプライド バイオシステムズ社製)を用いて自動エドマン分解により解析した結果、構築したV領域のDNA配列から予想されるアミノ酸配列が得られた。

【0165】

5. 抗GM2ヒト型CDR移植抗体KM8966およびKM8967のin vitroにおけるGM2との反応性

抗GM2ヒト型キメラ抗体KM966および精製した抗GM2ヒト型CDR移植抗体KM8966、KM8967とGM2との反応性を実施例2の1項(5)に記載のELISA法を用いて測定した結果を図46に示した。GM2(N-アセチルGM2)は培養細胞株HPB-ALL(大星らの蛋白質核酸酵素, 23, 697, 1978)より公知の方法(Hanai, N.らのJ. Biol. Chem., 263, 10915, 1988)に準じて精製したものをを用いた。図46より精製抗GM2ヒト型CDR移植抗体KM8966は抗GM2ヒト型キメラ抗体KM966と同等の結合活性を示した。一方、精製抗GM2ヒト型CDR移植抗体KM8967は抗GM2ヒト型キメラ抗体KM966の約1/4~1/5の結合活性を示した。

【0166】

6. 抗GM2ヒト型CDR移植抗体KM8966およびKM8967の反応特異性

ガングリオシドGM1、N-アセチルGM2、N-グリコシルGM2、N-アセチルGM3、N-グリコリ

10

20

30

40

50

ルGM3、GD1a、GD1b（ヤトロソ社製）、GD2、GD3（ヤトロソ社製）、GQ1b（ヤトロソ社製）に対する抗GM2ヒト型キメラ抗体KM966および抗GM2ヒト型CDR移植抗体KM8966、KM8967の反応性を実施例2の1項（5）に記載のELISA法を用いて測定した結果を図47に示した。なお、GM1とGD1aはウシ脳より、N - アセチルGM2は培養細胞株HPB - ALL（大星らの蛋白質核酸酵素，23，697，1978）より、N - グリコリルGM2とN - グリコリルGM3はマウス肝臓より、N - アセチルGM3はイヌ赤血球より、GD2は培養細胞株IMR32（ATCC CCL127）よりそれぞれ公知の方法（Hanai, N.らのJ. Biol. Chem., 263, 10915, 1988）に準じて精製した。

【0167】

また、抗体溶液の濃度は10 µg/mlで行った。図47に示したように、抗GM2ヒト型CDR移植抗体KM8966およびKM8967は抗GM2ヒト型キメラ抗体KM966と同様にGM2（N - アセチルGM2、N - グリコリルGM2）に特異的に反応することが確認された。

10

7. 抗GM2ヒト型CDR移植抗体KM8966およびKM8967の癌細胞との反応性

ヒト肺小細胞癌培養細胞株SBC - 3（JCRB 0818）の 1×10^6 細胞をPBSに懸濁させ、マイクロチューブ（トレフ社製）に取り、遠心分離（1,200rpm、2分間）して細胞を洗浄後、抗GM2ヒト型キメラ抗体KM966または精製した抗GM2ヒト型CDR移植抗体KM8966またはKM8967を50 µl（50 µg/ml）加えて攪拌し、4 で1時間反応させた。反応後、PBSで3回遠心分離して洗浄した後、フルオレッセインイソシアネートで蛍光標識したプロテインA（30倍希釈、ペーリンガー マンハイム社製）20 µlを加えて攪拌後、4 で1時間反応させた。反応後、PBSで3回遠心分離して洗浄した後、さらにPBSに懸濁し、フローサイトメーター、EPICS Elite（コールター社製）で解析を行った。対照（コントロール）として抗GM2ヒト型CDR移植抗体無添加で上記と同様の操作を行い、解析した。その結果を図48に示した。抗GM2ヒト型CDR移植抗体KM8966およびKM8967は抗GM2ヒト型キメラ抗体KM966と同様にヒト肺小細胞癌株SBC - 3と強い反応を示した。

20

【0168】

8. 抗GM2ヒト型CDR移植抗体KM8966およびKM8967のin vitro抗腫瘍効果：CDC活性

（1）標的細胞の調製

RPMI1640-FCS（10）培地にて培養した標的細胞SBC - 3を 5×10^6 細胞/500 µlに調製し、 $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ （第一化学薬品社製）を3.7MBq添加し、37 で1時間反応後、培地で3回洗浄した。次いで4 で30分間培地中に放置し、遠心分離後、培地を加え、 1×10^6 細胞/mlに調製した。

30

（2）補体の調製

健常人血清を調製し、ヒト補体源として用いた。

【0169】

（3）CDC活性の測定

96ウエルU字底プレートに抗GM2ヒト型キメラ抗体KM966または精製した抗GM2ヒト型CDR移植抗体KM8966またはKM8967を各最終濃度0.05 ~ 50 µg/mlとなるように加え、各々に（1）で調製した標的細胞を50 µl（ 5×10^4 細胞/ウエル）添加した。室温で1時間反応後、遠心分離し、上清を除去し、（2）で得たヒト補体を最終濃度15% V/Vとなるように添加し、37 で1時間反応させた。遠心分離後、上清の ^{51}Cr 量を - カウンターにて測定した。自然解離 ^{51}Cr

40

量は、標的細胞に抗体、補体溶液の代わりに培地のみを添加し、上記と同様に上清の ^{51}Cr 量を測定することによって求めた。全解離 ^{51}Cr 量は、標的細胞に抗体、補体溶液の代わりに1規定の塩酸を添加し、上記と同様に上清の ^{51}Cr 量を測定することによって求めた。CDC活性は下式により求めた。

【0170】

【数1】

$$\text{CDC 活性 (\%)} = \frac{\text{検体上清中の } ^{51}\text{Cr 量} - \text{自然解離 } ^{51}\text{Cr 量}}{\text{全解離 } ^{51}\text{Cr 量} - \text{自然解離 } ^{51}\text{Cr 量}} \times 100$$

【 0 1 7 1 】

その結果を図49に示した。抗GM2ヒト型CDR移植抗体KM8966およびKM8967のCDC活性は抗GM2ヒト型キメラ抗体KM966に比べ低いことが明らかとなった。 10

【 0 1 7 2 】

9. 抗GM2ヒト型CDR移植抗体KM8966およびKM8967のin vitro抗腫瘍効果：ADCC活性

(1) 標的細胞の調製

RPMI1640-FCS (10) 培地にて培養した標的細胞SBC - 3を 1×10^6 細胞/500 μ lに調製し、 $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (第一化学薬品社製) を3.7MBq添加し、37 $^\circ\text{C}$ で1時間反応後、培地で3回洗浄した。次いで4 $^\circ\text{C}$ で30分間培地中に放置し、遠心分離後、培地を加え、 2×10^5 細胞/mlに調製した。

(2) エフェクター細胞の調製

健常人静脈血50mlを採血し、ヘパリンナトリウム (武田薬品社製、1,000U/ml) 0.5mlを加え穏やかに混ぜた。これをPolymorphprep (ナイコメッド社製) に重層後、遠心分離し、リンパ球層 (PBMC) を分離した。リンパ球をRPMI1640-FCS (10) 培地にて3回遠心分離、洗浄後、培地に再懸濁し (5×10^6 細胞/ml)、エフェクター細胞とした。 20

【 0 1 7 3 】

(3) ADCC活性の測定

96ウエルU字底プレートに抗GM2ヒト型キメラ抗体KM966または精製した抗GM2ヒト型CDR移植抗体KM8966またはKM8967を各最終濃度0.05 ~ 50 $\mu\text{g/ml}$ となるように加え、各々に(1)で調製した標的細胞50 μ l (1×10^4 細胞/ウエル) および(2)で調製したエフェクター細胞100 μ l (5×10^5 細胞/ウエル) を添加した。37 $^\circ\text{C}$ で4時間反応させ、遠心分離後、上清の ^{51}Cr 量を β -カウンターにて測定した。自然解離 ^{51}Cr 量は、標的細胞に抗体、エフェクター細胞の代わりに培地のみを添加し、上記と同様に上清の ^{51}Cr 量を測定することによって求めた。全解離 ^{51}Cr 量は、標的細胞に抗体、エフェクター細胞の代わりに1規定の塩酸を添加し、上記と同様に上清の ^{51}Cr 量を測定することによって求めた。ADCC活性は下式により求めた。 30

【 0 1 7 4 】

【 数 2 】

$$\text{ADCC 活性 (\%)} = \frac{\text{検体上清中の } ^{51}\text{Cr 量} - \text{自然解離 } ^{51}\text{Cr 量}}{\text{全解離 } ^{51}\text{Cr 量} - \text{自然解離 } ^{51}\text{Cr 量}} \times 100$$

【 0 1 7 5 】

その結果を図50に示した。抗GM2ヒト型CDR移植抗体KM8966は抗GM2ヒト型キメラ抗体KM966と同程度のADCC活性を示し、一方、抗GM2ヒト型CDR移植抗体KM8967は抗GM2ヒト型キメラ抗体KM966に比べ若干低いADCC活性を示した。

【 0 1 7 6 】

実施例 4 . 抗GM2ヒト型CDR移植抗体の製造 II

実施例3で製造した抗GM2ヒト型CDR移植抗体KM8966およびKM8967は抗GM2ヒト型キメラ抗体KM966と同程度の抗原結合活性、結合特異性、ADCC活性を示したが、一方、ヒト補体を用いたCDC活性が低いことが明らかとなった。そこでより高いCDC活性を有する抗GM2ヒト型CDR移植抗体を以下のようにして製造した。

【0177】

1. 抗GM2ヒト型CDR移植抗体KM8966のH鎖V領域の改変

実施例3で製造した抗GM2ヒト型CDR移植抗体のうち、より高いCDC活性を示したKM8966のH鎖V領域（配列番号74）のアミノ酸残基を変異させ、CDC活性の上昇を検討した。置換させたアミノ酸残基としては実施例3の各種置換の結果およびマウス抗体KM796のV領域のコンピューターモデルを参考としてランダムに選択した。置換の導入方法としては実施例3の1項（2）で得られた抗GM2ヒト型CDR移植抗体H鎖V領域を含むプラスミドpBSH10の1ngを鋳型として実施例3の1項（3）に記載の変異を有するアンチセンスおよびセンスの合成DNAをプライマーとするPCR法により行った。

【0178】

実際には、アンチセンス変異プライマーとして配列番号62、センス変異プライマーとして配列番号63の合成DNAを用いて実施例3の1項（3）に記載の反応を行うことにより配列番号64に示した抗GM2ヒト型CDR移植抗体H鎖V領域バージョンHM1を含むプラスミドpBSHM1を得た。HM1のアミノ酸配列においては配列番号7のFR中の38位のアルギニン、40位のアラニン、43位のグルタミン、44位のグリシンの各アミノ酸残基をマウス抗体KM796H鎖V領域に見い出されるアミノ酸残基であるリジン、セリン、リジン、セリンにそれぞれ換えている。

【0179】

また、アンチセンス変異プライマーとして配列番号65、センス変異プライマーとして配列番号66の合成DNAを用いて実施例3の1項（3）に記載の反応を行うことにより配列番号10（塩基配列、アミノ酸配列は配列番号77に示す）に示した抗GM2ヒト型CDR移植抗体H鎖V領域バージョンHM2を含むプラスミドpBSHM2を得た。HM2のアミノ酸配列（配列番号77）においては配列番号74のFR中の38位のアルギニン、40位のアラニンの各アミノ酸残基をマウス抗体KM796H鎖V領域に見い出されるアミノ酸残基であるリジン、セリンにそれぞれ換えている。

【0180】

また、アンチセンス変異プライマーとして配列番号67、センス変異プライマーとして配列番号68の合成DNAを用いて実施例3の1項（3）に記載の反応を行うことにより配列番号69に示した抗GM2ヒト型CDR移植抗体H鎖V領域バージョンHM3を含むプラスミドpBSHM3を得た。HM3のアミノ酸配列においては配列番号74のFR中の68位のバリン、70位のイソロイシンの各アミノ酸残基をマウス抗体KM796H鎖可変領域に見い出されるアミノ酸残基であるアラニン、ロイシンにそれぞれ換えている。

【0181】

また、プラスミドpBSHM3の1ngを鋳型として、アンチセンス変異プライマーとして配列番号62、センス変異プライマーとして配列番号63の合成DNAを用いて実施例3の1項（3）に記載の反応を行うことにより配列番号70に示した抗GM2ヒト型CDR移植抗体H鎖V領域バージョンHM31を含むプラスミドpBSHM31を得た。HM31のアミノ酸配列においてはHM3のFR中の38位のアルギニン、40位のアラニン、43位のグルタミン、44位のグリシンの各アミノ酸残基をマウス抗体KM796H鎖V領域に見い出されるアミノ酸残基であるリジン、セリン、リジン、セリンにそれぞれ換えている。

【0182】

また、プラスミドpBSHM3の1ngを鋳型として、アンチセンス変異プライマーとして配列番号65、センス変異プライマーとして配列番号66の合成DNAを用いて実施例3の1項（3）に記載の反応を行うことにより配列番号71に示した抗GM2ヒト型CDR移植抗体H鎖V領域バージョンHM32を含むプラスミドpBSHM32を得た。HM32のアミノ酸配列においてはHM3のFR中の38位のアルギニン、40位のアラニンの各アミノ酸残基をマウス抗体KM796H鎖V領域に見い出されるアミノ酸残基であるリジン、セリンにそれぞれ換えている。

【 0 1 8 3 】

2. 各種置換の抗GM2ヒト型CDR移植抗体H鎖V領域を有する抗GM2ヒト型CDR移植抗体のCDC活性の評価

(1) 発現ベクターの構築

上記実施例4の1項で得られた各種置換を有する抗GM2ヒト型CDR移植抗体H鎖V領域とKM8966L鎖V領域（配列番号75）を有する各種抗GM2ヒト型CDR移植抗体の発現ベクターを以下のようにして取得した。

【 0 1 8 4 】

上記実施例4の1項で得られたプラスミドpBSHM1、pBSHM2、pBSHM3、pBSHM31、pBSHM32の各3 μ gを10 μ lの10mMトリス - 塩酸（pH7.5）、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTT からなる緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素ApaI（宝酒造社製）を加えて37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10 μ lの50mMトリス - 塩酸（pH7.5）、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム、1mM DTT、100 μ g/ml BSAおよび0.01%トライトンX-100 からなる緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素NotI（宝酒造社製）を加えて37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約0.44kbのApaI - NotI断片を約0.2 μ g回収した。

【 0 1 8 5 】

次に、上記実施例3の3項で得られたプラスミドpKANTEX796HLCDRLm-28の各3 μ gを10 μ lの10mMトリス - 塩酸（pH7.5）、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTT からなる緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素ApaI（宝酒造社製）を加えて37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10 μ lの50mMトリス - 塩酸（pH7.5）、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム、1mM DTT、100 μ g/ml BSAおよび0.01%トライトンX-100 からなる緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素NotI（宝酒造社製）を加えて37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約13.14kbのApaI - NotI断片を約1 μ g回収した。

【 0 1 8 6 】

次に、上記で得られたpBSHM1、pBSHM2、pBSHM3、pBSHM31、pBSHM32のApaI - NotI断片各0.1 μ gとpKANTEX796HLCDRLm-28のApaI - NotI断片0.1 μ gを全量20 μ lの滅菌水に加え、Ready-To-Go T4 DNA Ligase（ファルマシア バイオテク社製）を用いて連結した。このようにして得られた各組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、図51に示したプラスミドpKANTEX796HM1Lm-28、pKANTEX796HM2Lm-28、pKANTEX796HM3Lm-28、pKANTEX796HM31Lm-28、pKANTEX796HM32Lm-28を得た。

【 0 1 8 7 】

(2) 各種置換を有する抗GM2ヒト型CDR移植抗体の発現

上記実施例4の2項(1)で得られたプラスミドpKANTEX796HM1Lm-28、pKANTEX796HM2Lm-28、pKANTEX796HM3Lm-28、pKANTEX796HM31Lm-28、pKANTEX796HM32Lm-28の各4 μ gを用いて実施例2の1項(4)に記載の方法に従って、YB2/0細胞（ATCC CRL1662）を形質転換し、最終的にG418（0.5mg/ml）およびMTX（200nM）による選択を行い、約2~5 μ g/mlの各種発現ベクターに由来する抗GM2ヒト型CDR移植抗体を産生する形質転換株を取得した。

【 0 1 8 8 】

(3) 各種置換を有する抗GM2ヒト型CDR移植抗体の精製

上記実施例4の2項(2)で得られた各種形質転換株をG418を0.5mg/ml、MTXを200nM含むGIT培地（日本製薬社製）に懸濁し、特開平6-205694の実施例1の11項に記載の方法に従い、約0.6リットルの培養液から各種の精製抗GM2ヒト型CDR移植抗体を約1~3mg取得した。なお、各種発現ベクターに由来する抗GM2ヒト型CDR移植抗体は以後、便宜的に以下の名称で記述した（pKANTEX796HM1Lm-28：M1-28、pKANTEX796HM2Lm-28：M2-28、pKANTEX796HM3Lm-28：M3-28、pKANTEX796HM31Lm-28：M31-28、pKANTEX796HM32Lm-28：M32-28）。得られた各種精製抗GM2ヒト型CDR移植抗体、抗GM2ヒト型CDR移植抗体KM8966および抗GM2ヒト型キメラ抗体KM966の各4 μ gを、公知の方法（Laemli, U. K. らのNature, 227, 680, 1970）に従って電気泳動し、分子量を調べた。その結果を図52に示した。図52に示したよう

に、還元条件下では抗体H鎖の分子量は約50キロダルトン、抗体L鎖の分子量は約25キロダルトンであり、正しい分子量のH鎖およびL鎖の発現が確認された。また、非還元条件下では抗GM2ヒト型CDR移植抗体の分子量は約150キロダルトンであり、2本のH鎖および2本のL鎖からなる正しい大きさの抗体の発現が確認された。また、各種精製抗GM2ヒト型CDR移植抗体のH鎖、L鎖のN末端アミノ酸配列をプロテインシーケンサー（470A、アプライドバイオシステムズ社製）を用いて自動エドマン分解により解析した結果、構築したV領域のDNA配列から予想されるアミノ酸配列が得られた。

【 0 1 8 9 】

(4) 各種置換を有する抗GM2ヒト型CDR移植抗体のCDC活性

上記実施例4の2項(3)で得られた各種置換を有する抗GM2ヒト型CDR移植抗体、抗GM2ヒト型CDR移植抗体KM8966および抗GM2ヒト型キメラ抗体KM966のCDC活性を上記実施例3の8項に記載の方法に従って測定した結果を図53に示した。図53に示したように、各種置換を有する抗GM2ヒト型CDR移植抗体のうち、発現ベクター-pKANTEX796HM2Lm-28に由来する抗GM2ヒト型CDR移植抗体M2-28が最も高いCDC活性を示し、その活性は実施例3で製造した抗GM2ヒト型CDR移植抗体KM8966よりも高いことが明らかとなった。この事実は実施例4の1項で作製した各種置換のうちバージョンHM2で置換させたアミノ酸残基がCDC活性の上昇に極めて重要であったことを示している。バージョンHM2で置換させたアミノ酸残基はマウス抗体KM796V領域のコンピューターモデルから、L鎖V領域との相互作用面に位置し、その置換はV領域全体の構造に影響を与えることが示唆されたが、そのようなアミノ酸残基は個々の抗体により異なることが最近のヒト型CDR移植抗体の製造において示されており、それらを正確に予測する方法は未だ確立されておらず、本実施例は今後のヒト型CDR移植抗体の製造において非常に重要な知見を与えるものである。

【 0 1 9 0 】

なお、発現ベクター-pKANTEX796HM2Lm-28に由来する抗GM2ヒト型CDR移植抗体M2-28はKM8970と命名し、KM8970を産生する形質転換株KM8970は平成8年5月9日付で、工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM BP-5528として寄託されている。

【 0 1 9 1 】

3. 抗GM2ヒト型CDR移植抗体KM8966のL鎖V領域の改変

実施例3で製造した抗GM2ヒト型CDR移植抗体KM8966のL鎖V領域(配列番号8)のアミノ酸残基を置換させ、CDC活性の上昇を検討した。置換させたアミノ酸残基としては実施例3の各種置換の結果からCDR2の構造を支持することが本ヒト型CDR移植抗体の活性に重要であることが示唆されたため、59位のセリン残基を選択した。置換の導入方法としては実施例3の1項(3)で得られた抗GM2ヒト型CDR移植抗体L鎖V領域を含むプラスミドpBSLm-28の1ngを鋳型として実施例3の1項(3)に記載の変異を有するアンチセンスおよびセンスの合成DNAをプライマーとするPCR法により行った。

【 0 1 9 2 】

実際には、アンチセンス変異プライマーとして配列番号72、センス変異プライマーとして配列番号73の合成DNAを用いて実施例3の1項(3)に記載の反応を行うことにより配列番号11(塩基配列、アミノ酸配列は配列番号78に示す)に示した抗GM2ヒト型CDR移植抗体L鎖V領域バージョンLm-28No.1を含むプラスミドpBSLm-28No.1を得た。Lm-28No.1のアミノ酸配列(配列番号78)においては配列番号75のFR中の59位のセリンをマウス抗体KM796L鎖V領域に見い出されるアミノ酸残基であるアラニンに換えている。

【 0 1 9 3 】

4. 新しい置換を持つ抗GM2ヒト型CDR移植抗体L鎖V領域を有する抗GM2ヒト型CDR移植抗体のCDC活性の評価

(1) 発現ベクターの構築

上記実施例4の3項で得られた置換を有する抗GM2ヒト型CDR移植抗体L鎖V領域と各種抗GM2ヒト型CDR移植抗体H鎖V領域からなる各種抗GM2ヒト型CDR移植抗体の発現ベクターを以下のようにして取得した。

【 0 1 9 4 】

上記実施例4の3項で得られたプラスミドpBSLm-28No.1の6 μ gを10 μ lの50mMトリス - 塩酸 (pH7.5)、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム、1mM DTT および100 μ g/ml BSAからなる緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素EcoRI (宝酒造社製) および制限酵素SpII (宝酒造社製) を加えて37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約0.39kbのEcoRI - SpII断片を約0.4 μ g回収した。

【0195】

次に、上記実施例3の3項で得られたプラスミドpKANTEX796HLCDRm-28および上記実施例4の2項(1)で得られたプラスミドpKANTEX796HM1Lm-28、pKANTEX796HM2Lm-28、pKANTEX796HM3Lm-28の各3 μ gを10 μ lの50mMトリス - 塩酸 (pH7.5)、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム、1mM DTT および100 μ g/ml BSAからなる緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素EcoRI (宝酒造社製) および制限酵素SpII (宝酒造社製) を加えて37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約13.19kbのEcoRI - SpII断片を約1 μ g回収した。

【0196】

次に、上記で得られたpBSLm-28No.1のEcoRI - SpII断片0.1 μ gとpKANTEX796HLCDRm-28、pKANTEX796HM1Lm-28、pKANTEX796HM2Lm-28、pKANTEX796HM3Lm-28のEcoRI - SpII断片各0.1 μ gを全量20 μ lの滅菌水に加え、Ready-To-Go T4 DNA Ligase (ファルマシア バイオテク社製) を用いて連結した。このようにして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、図54に示したプラスミドpKANTEX796HLM-28No.1、pKANTEX796HM1Lm-28No.1、pKANTEX796HM2Lm-28No.1、pKANTEX796HM3Lm-28No.1を得た。

【0197】

(2) L鎖V領域に置換を有する抗GM2ヒト型CDR移植抗体の発現

上記実施例4の4項(1)で得られたプラスミドpKANTEX796HLM-28No.1、pKANTEX796HM1Lm-28No.1、pKANTEX796HM2Lm-28No.1、pKANTEX796HM3Lm-28No.1の各4 μ gを用いて実施例2の1項(4)に記載の方法に従って、YB2/0細胞 (ATCC CRL1662) を形質転換し、最終的にG418 (0.5mg/ml) およびMTX (200nM) による選択を行い、約2~5 μ g/mlの各種発現ベクターに由来する抗GM2ヒト型CDR移植抗体を産生する形質転換株を取得した。

【0198】

(3) L鎖V領域に置換を有する抗GM2ヒト型CDR移植抗体の精製

上記実施例4の4項(2)で得られた各種形質転換株をG418を0.5mg/ml、MTXを200nM含むGIT培地 (日本製薬社製) に懸濁し、特開平6-205694の実施例1の11項に記載の方法に従い、約0.6リットルの培養液から各種の精製抗GM2ヒト型CDR移植抗体を約1~3mg取得した。なお、各種発現ベクターに由来する抗GM2ヒト型CDR移植抗体は以後、便宜的に以下の名称で記述した (pKANTEX796HLM-28No.1 : h796H-No.1、pKANTEX796HM1Lm-28No.1 : M1-No.1、pKANTEX796HM2Lm-28No.1 : M2-No.1、pKANTEX796HM3Lm-28No.1 : M3-No.1)。得られた各種精製抗GM2ヒト型CDR移植抗体および抗GM2ヒト型キメラ抗体KM966の各4 μ gを、公知の方法 (Laemli, U. K. らのNature, 227, 680, 1970) に従って電気泳動し、分子量を調べた。その結果を図55に示した。図55に示したように、還元条件下では抗体H鎖の分子量は約50キロダルトン、抗体L鎖の分子量は約25キロダルトンであり、正しい分子量のH鎖およびL鎖の発現が確認された。また、非還元条件下では抗GM2ヒト型CDR移植抗体の分子量は約150キロダルトンであり、2本のH鎖および2本のL鎖からなる正しい大きさの抗体の発現が確認された。また、各種精製抗GM2ヒト型CDR移植抗体のH鎖、L鎖のN末端アミノ酸配列をプロテインシーケンサー (470A、アプライドバイオシステムズ社製) を用いて自動エドマン分解により解析した結果、構築したV領域のDNA配列から予想されるアミノ酸配列が得られた。

【0199】

(4) L鎖V領域に置換を有する抗GM2ヒト型CDR移植抗体のCDC活性

上記実施例4の4項(3)で得られたL鎖V領域に置換を有する各種抗GM2ヒト型CDR移植抗体、抗GM2ヒト型CDR移植抗体KM8970、抗GM2ヒト型CDR移植抗体KM8966および抗GM2ヒト型キメラ抗体KM966のCDC活性を上記実施例3の8項に記載の方法に従って測定した結果を図56に

示した。図56に示したように、L鎖V領域にのみ置換を導入することにより、そのCDC活性が上昇することが明らかとなった（KM8966とh796H-No.1の活性の比較から明らかである）。そしてさらにL鎖V領域の置換と共にH鎖V領域を置換させた場合には、M2-No.1 即ち、実施例4の2項で得られた抗GM2ヒト型CDR移植抗体KM8970のH鎖V領域との組み合わせの抗体が最も高いCDC活性を示し、その活性はKM8970と同等以上であることが明らかとなった。これらの事実は、実施例4の3項で置換させたL鎖V領域のアミノ酸残基がCDC活性の上昇に極めて重要であり、またKM8970で置換させたH鎖V領域のアミノ酸残基とCDC活性の上昇に対して協調的に作用することを示している。L鎖V領域バージョンLm-28No.1で置換させたアミノ酸残基はマウス抗体KM796V領域のコンピューターモデルからは、抗原であるGM2との直接的な作用や各CDR残基との相互作用への関与は考えられなかったが、本実施例の結果から、V領域全体の構造維持に極めて重要であったことが示唆された。このような知見は既存のヒト化抗体製造法からは予測不可能であり、今後のヒト型CDR移植抗体製造に対して非常に重要な示唆を与えるであろう。

【 0 2 0 0 】

なお、発現ベクターpKANTEX796HM2Lm-28No.1に由来する抗GM2ヒト型CDR移植抗体M2-No.1はKM8969と命名し、KM8969を産生する形質転換株KM8969は平成8年5月9日付で、工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM BP-5527として寄託されている。

【 0 2 0 1 】

5. 抗GM2ヒト型CDR移植抗体KM8969およびKM8970の *in vitro*におけるGM2との反応性
抗GM2ヒト型キメラ抗体KM966および抗GM2ヒト型CDR移植抗体KM8969、KM8970とGM2との反応性を実施例2の1項（5）に記載のELISA法を用いて測定した結果を図57に示した。図57より抗GM2ヒト型CDR移植抗体KM8969およびKM8970は抗GM2ヒト型キメラ抗体KM966と同等の結合活性を示した。

【 0 2 0 2 】

6. 抗GM2ヒト型CDR移植抗体KM8969およびKM8970の反応特異性
各種ガングリオシドに対する抗GM2ヒト型キメラ抗体KM966および抗GM2ヒト型CDR移植抗体KM8969、KM8970の反応性を実施例3の6項に記載の方法を用いて測定した結果を図58に示した。図58に示したように、抗GM2ヒト型CDR移植抗体KM8969およびKM8970は抗GM2ヒト型キメラ抗体KM966と同様にGM2（N - アセチルGM2、N - グリコリルGM2）に特異的に反応することが確認された。

【 0 2 0 3 】

7. 抗GM2ヒト型CDR移植抗体KM8969およびKM8970の癌細胞との反応性
ヒト肺小細胞癌培養細胞株SBC - 3（JCRB 0818）に対する抗GM2ヒト型キメラ抗体KM966および抗GM2ヒト型CDR移植抗体KM8969、KM8970の反応性を二次抗体としてフルオレッセインイソシアネートで蛍光標識したウサギ抗ヒトIgG抗体（ダコ社製）を用いて実施例3の7項に記載の方法により測定した結果を図59に示した。
図59に示したように、抗GM2ヒト型CDR移植抗体KM8969およびKM8970は抗GM2ヒト型キメラ抗体KM966と同様にヒト肺小細胞癌株SBC - 3と強い反応を示した。

【 0 2 0 4 】

8. 抗GM2ヒト型CDR移植抗体KM8969およびKM8970の *in vitro*抗腫瘍効果：ADCC活性ヒト肺小細胞癌培養細胞株SBC - 3（JCRB 0818）に対する抗GM2ヒト型キメラ抗体KM966および抗GM2ヒト型CDR移植抗体KM8966、KM8969、KM8970のADCC活性を実施例3の9項に記載の方法に従って測定した結果を図60に示した。図60に示したように、抗GM2ヒト型CDR移植抗体KM8969およびKM8970はヒト肺小細胞癌培養細胞株SBC - 3に対して抗GM2ヒト型キメラ抗体KM966と同程度のADCC活性を示した。

【 0 2 0 5 】

9. 抗GM2ヒト化抗体の *in vitro*抗腫瘍活性の比較：CDC活性の比較
上記実施例3、4で確立した各種の抗GM2ヒト化抗体（KM966、KM8966、KM8969、KM8970）のCDC活性を反応時間を延長して比較した。具体的には上記実施例3の8項に記載の方法のヒト補体を添加してからの反応時間を4時間として行った。その結果を図61に示した。図61

10

20

30

40

50

に示したように、4時間の反応によりいずれのヒト化抗体のCDC活性も上昇し、抗体濃度が5 μ g/ml以上の条件下では、抗GM2ヒト型キメラ抗体KM966と抗GM2ヒト型CDR移植抗体KM8966、KM8969およびKM8970は同程度のCDC活性を示すことが明らかとなった。特に、KM8969は最も高いCDC活性を示し、その活性は抗GM2ヒト型キメラ抗体KM966の約1/2程度であり、実施例4の検討により、CDC活性のより高い抗GM2ヒト型CDR移植抗体を製造することができたことが明らかとなった。

【0206】

以上、抗GM2ヒト型CDR移植抗体の製造およびその各種の活性評価を記述してきたが、それらの結果は確立した抗GM2ヒト型CDR移植抗体がヒトの癌治療上有用であることを示している。

10

【0207】

【発明の効果】

本発明により、ヒト型キメラ抗体と同程度のGM2に対する結合活性、結合特異性およびガングリオシドGM2陽性細胞に対する抗腫瘍効果を有する、ガングリオシドGM2に対するヒト型CDR移植抗体およびその製造方法が提供される。

【0208】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：5

20

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

Asp Tyr Asn Met Asp

1 5

30

【0209】

配列番号：2

配列の長さ：17

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

40

配列：

Tyr Ile Tyr Pro Asn Asn Gly Gly Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe Lys

1 5 10 15

Ser

17

【0210】

配列番号 : 3

配列の長さ : 11

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列 :

10

Tyr Gly His Tyr Tyr Gly Tyr Met Phe Ala Tyr
 1 5 10 11

【 0 2 1 1 】

配列番号 : 4

配列の長さ : 10

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

20

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列 :

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His
 1 5 10

【 0 2 1 2 】

30

配列番号 : 5

配列の長さ : 7

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列 :

40

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser
 1 5 7

【 0 2 1 3 】

配列番号 : 6

配列の長さ : 9

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列 :

10

Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Tyr Thr

1 5 9

【 0 2 1 4 】

配列番号 : 7

配列の長さ : 433

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

20

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列の特徴 :

特徴を表す記号 : sig peptide

存在位置 : -19...-1

特徴を決定した方法 : S

特徴を表す記号 : domain

存在位置 : 31...35

特徴を決定した方法 : S

他の情報 : 超可変部領域1

特徴を表す記号 : domain

30

存在位置 : 50...66

特徴を決定した方法 : S

他の情報 : 超可変部領域2

特徴を表す記号 : domain

存在位置 : 99...109

特徴を決定した方法 : S

他の情報 : 超可変部領域3

配列 :

atg gga tgg agc tgg atc ttt ctc ttc ctc ctg tca gga act gca ggt 48

Met Gly Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly

40

-19 -15 -10 -5

gtc ctc tct gag gtg cag ctg gtg cag tct gga gca gag gtg aag aag 96

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

-1 1 5 10

cct ggg gcc tca gtg aag gtc tcc tgc aag gct tcc gga tac acc ttc 144

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe

15 20 25

act gac tac aac atg gac tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctc 192

Thr Asp Tyr Asn Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu

30 35 40 45

50

Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
 30 35 40
 cca aag ctt tgg atc tac agc aca tcc aac ctg gct tct ggt gtg cca 240
 Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
 45 50 55
 tct aga ttc agc ggt agc ggt agc ggt aca tct tac tct ctc acc atc 288
 Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
 60 65 70
 agc cga ctc cag cca gag gac atc gct aca tac tac tgc cag caa agg 336
 Ser Arg Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg 10
 75 80 85 90
 agt agt tac ccg tac acg ttc ggc ggg ggg acc aag gtg gaa atc aaa 384
 Ser Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 95 100 105
 cgt acg 390
 Arg Thr
 108

【 0 2 1 6 】

配列番号 : 9

配列の長さ : 390 20

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列の特徴 :

特徴を表す記号 : sig peptide

存在位置 : -22..-1

特徴を決定した方法 : S

特徴を表す記号 : domain

存在位置 : 24..33 30

特徴を決定した方法 : S

他の情報 : 超可変部領域1

特徴を表す記号 : domain

存在位置 : 49..55

特徴を決定した方法 : S

他の情報 : 超可変部領域2

特徴を表す記号 : domain

存在位置 : 86..96

特徴を決定した方法 : S

他の情報 : 超可変部領域3 40

配列 :

atg cat ttt caa gtg cag att ttc agc ttc ctg cta atc agt gcc tca 48
 Met His Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
 -22 -20 -15 -10
 gtc ata atg tcc aga gga gac atc cag ctg acc cag tct cca tcc tcc 96
 Val Ile Met Ser Arg Gly Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser
 -5 -1 1 5 10
 atg tct gca tct cca gga gac aga gtc acc atc act tgt agt gca agt 144
 Met Ser Ala Ser Pro Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser
 15 20 25 50

15	20	25		
act gac tac aac atg gac tgg gtg aag cag agc cct gga caa ggg ctc	192			
Thr Asp Tyr Asn Met Asp Trp Val Lys Gln Ser Pro Gly Gln Gly Leu				
30	35	40	45	
gag tgg atg gga tat att tat cct aac aat ggt ggt act ggc tac aac	240			
Glu Trp Met Gly Tyr Ile Tyr Pro Asn Asn Gly Gly Thr Gly Tyr Asn				
50	55	60		
cag aag ttc aag agc aag gtc acc att acc gta gac aca tcc acg agc	288			
Gln Lys Phe Lys Ser Lys Val Thr Ile Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser				
65	70	75		10
aca gcc tac atg gag ctg cac agc ctg aga tct gag gac acg gcc gtg	336			
Thr Ala Tyr Met Glu Leu His Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val				
80	85	90		
tat tac tgt gcg acc tac ggt cat tac tac ggc tac atg ttt gct tac	384			
Tyr Tyr Cys Ala Thr Tyr Gly His Tyr Tyr Gly Tyr Met Phe Ala Tyr				
95	100	105		
tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca gcc tcc acc aag ggc	432			
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly				
110	115	120	125	
c				433
【 0 2 1 8 】				20
配列番号 : 11				
配列の長さ : 390				
配列の型 : 核酸				
鎖の数 : 二本鎖				
トポロジー : 直鎖状				
配列の種類 : 他の核酸 合成DNA				
配列の特徴 :				
特徴を表す記号 : sig peptide				
存在位置 : -22..-1				30
特徴を決定した方法 : S				
特徴を表す記号 : domain				
存在位置 : 24..33				
特徴を決定した方法 : S				
他の情報 : 超可変部領域1				
特徴を表す記号 : domain				
存在位置 : 49..55				
特徴を決定した方法 : S				
他の情報 : 超可変部領域2				
特徴を表す記号 : domain				40
存在位置 : 86..96				
特徴を決定した方法 : S				
他の情報 : 超可変部領域3				
配列 :				
atg cat ttt caa gtg cag att ttc agc ttc ctg cta atc agt gcc tca	48			
Met His Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser				
-22 -20 -15 -10				
gtc ata atg tcc aga gga gat atc cag ctg acc cag agc cca agc agc	96			
Val Ile Met Ser Arg Gly Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser				
-5 -1 1 5 10				50

配列番号：14

配列の長さ：21

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

AATTCGTACG GTGGCTGCAC C

21

【 0 2 2 2 】

10

配列番号：15

配列の長さ：17

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

GGTGCAGCCA CCGTACG

17

【 0 2 2 3 】

20

配列番号：16

配列の長さ：26

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

CTCGCGACTA GTGGGCCCGC GGCCGC

26

【 0 2 2 4 】

30

配列番号：17

配列の長さ：34

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

AGCTGCGGCC GCGGGCCCAC TAGTCGCGAG GTAC

34

【 0 2 2 5 】

10

配列番号：18

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

GTGGCGGCCG CTTGGGCCCG

20

【 0 2 2 6 】

20

配列番号：19

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

CGGGCCCAAG CGGCCGCCAC

20

【 0 2 2 7 】

30

配列番号：20

配列の長さ：36

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

CATGAATTCT TCGTACGGTT CGATAAATCG ATACCG

36

【 0 2 2 8 】

10

配列番号：21

配列の長さ：40

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

CGGTATCGAT TTATCGAACC GTACGAAGAA TTCATGAGCT

40

【 0 2 2 9 】

20

配列番号：22

配列の長さ：35

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

CACGTTCGGA GGGGGACCA AGCTGAAAT AAAAC

35

【 0 2 3 0 】

30

配列番号 : 23

配列の長さ : 35

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列 :

GTACGTTTTA TTTCCAGCTT GGTCCCCCCT CCGAA 35

【 0 2 3 1 】

配列番号 : 24

配列の長さ : 61

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列 :

TCGACACCAG CAAGAACACA GCCTACCTGA GACTCAGCAG CGTGACAGCC GCCGACACCG 60
C 61

【 0 2 3 2 】

配列番号 : 25

配列の長さ : 60

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列 :

CCGGATACAC ATTCACTGAC TACAACATGG ACTGGGTGAG ACAGAGCCAT GGACGAGGTC 60

【 0 2 3 3 】

配列番号 : 26

配列の長さ : 442

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列の特徴 :

特徴を表す記号 : sig peptide

存在位置 : -19...-1

10

20

30

40

50

特徴を決定した方法 : S
 特徴を表す記号 : domain
 存在位置 : 31..35
 特徴を決定した方法 : S
 他の情報 : 超可変部領域1
 特徴を表す記号 : domain
 存在位置 : 50..66
 特徴を決定した方法 : S
 他の情報 : 超可変部領域2
 特徴を表す記号 : domain
 存在位置 : 99..109
 特徴を決定した方法 : S
 他の情報 : 超可変部領域3

10

配列 :

```

ggccgcacc atg gga tgg agc tgg atc ttt ctc ttc ctc ctg tca gga act 51
      Met Gly Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr
      -19          -15          -10
-----
gct ggt gtc ctc tct cag gtc caa ctg cag gag agc ggt cca ggt ctt 99
Ala Gly Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu
-5          -1  1          5          10
-----
gtg agg cct agc cag acc ctg agc ctg acc tgc acc gtg tcc gga ttc 147
Val Arg Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe
      15          20          25
-----
acc ttc agc gac tac aac atg gac tgg gtg aga cag cca cct gga cga 195
Thr Phe Ser Asp Tyr Asn Met Asp Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg
      30          35          40
-----
ggt ctc gag tgg att gga tat att tat cct aac aat ggt ggt act ggc 243
Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Asn Asn Gly Gly Thr Gly
      45          50          55
-----
tac aac cag aag ttc aag agc aga gtg aca atg ctg gtc gac acc agc 291
Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Ser Arg Val Thr Met Leu Val Asp Thr Ser
      60          65          70          75
-----
aag aac aca gcc tac ctg aga ctc agc agc gtg aca gcc gcc gac acc 339
Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr
      80          85          90
-----
gcg gtc tat tat tgt gca acc tac ggt cat tac tac ggc tac atg ttt 387
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr Tyr Gly His Tyr Tyr Gly Tyr Met Phe
      95          100         105
-----
gct tac tgg ggt caa ggt acc acc gtc aca gtc tcc tca gcc tcc acc 435
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
      110         115         120
-----
aag ggc c 442
Lys Gly
      125

```

【 0 2 3 4 】

配列番号 : 27

配列の長さ : 442

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

50

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の特徴：

特徴を表す記号：sig peptide

存在位置：-19..-1

特徴を決定した方法：S

特徴を表す記号：domain

存在位置：31..35

特徴を決定した方法：S

他の情報：超可変部領域1

特徴を表す記号：domain

存在位置：50..66

特徴を決定した方法：S

他の情報：超可変部領域2

特徴を表す記号：domain

存在位置：99..109

特徴を決定した方法：S

他の情報：超可変部領域3

10

配列：

ggccgcacc atg gga tgg agc tgg atc ttt ctc ttc ctc ctg tca gga act 51
Met Gly Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr

20

-19 -15 -10

gct ggt gtc ctc tct cag gtc caa ctg cag gag agc ggt cca ggt ctt 99
Ala Gly Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu

-5 -1 1 5 10

gtg agg cct agc cag acc ctg agc ctg acc tgc acc gtg tcc gga tac 147
Val Arg Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr

15 20 25

acc ttc act gac tac aac atg gac tgg gtg aga cag agc cat gga cga 195
Thr Phe Thr Asp Tyr Asn Met Asp Trp Val Arg Gln Ser His Gly Arg

30 35 40

30

ggt ctc gag tgg att gga tat att tat cct aac aat ggt ggt act ggc 243
Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Asn Asn Gly Gly Thr Gly

45 50 55

tac aac cag aag ttc aag agc aga gtg aca atg ctg gtc gac acc agc 291
Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Ser Arg Val Thr Met Leu Val Asp Thr Ser

60 65 70 75

aag aac cag ttc agc ctg aga ctc agc agc gtg aca gcc gcc gac acc 339
Lys Asn Gln Phe Ser Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr

80 85 90

gcg gtc tat tat tgt gca acc tac ggt cat tac tac ggc tac atg ttt 387
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr Tyr Gly His Tyr Tyr Gly Tyr Met Phe

95 100 105

40

gct tac tgg ggt caa ggt acc acc gtc aca gtc tcc tca gcc tcc acc 435
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr

110 115 120

aag ggc c 442

Lys Gly

125

【 0 2 3 5 】

配列番号：28

配列の長さ：100

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

CAGGAAACAG CTATGACGCG GCCGCCACCA TGGGATGGAG CTGGATCTTT CTCTTCCTCC 60
TGTCAGGAAC TGCAGGTGTC CTCTCTGAGG TGCAGCTGGT 100

10

【 0 2 3 6 】

配列番号：29

配列の長さ：100

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

AGTCAGTGAA GGTGTATCCG GAAGCCTTGC AGGAGACCTT CACTGAGGCC CCAGGCTTCT 60
TCACCTCTGC TCCAGACTGC ACCAGCTGCA CCTCAGAGAG 100

20

【 0 2 3 7 】

配列番号：30

配列の長さ：100

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

CGGATACACC TTCACTGACT ACAACATGGA CTGGGTGCCA CAGGCCCTG GACAAGGGCT 60
CGAGTGGATG GGATATATTT ATCCTAACAA TGGTGGTACT 100

30

40

【 0 2 3 8 】

配列番号：31

配列の長さ：94

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

AGCTCCATGT AGGCTGTGCT CGTGGATGTG TCTACGGTAA TGGTGACCTT GCTCTTGAAC 60
TTCTGGTTGT AGCCAGTACC ACCATTGTTA GGAT 100

10

【 0 2 3 9 】

配列番号：32

配列の長さ：96

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

AGCACAGCCT ACATGGAGCT GCACAGCCTG AGATCTGAGG ACACGGCCGT GTATTACTGT 60
GCGACCTACG GTCATTACTA CGGCTACATG TTTGCT 96

20

【 0 2 4 0 】

配列番号：33

配列の長さ：90

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

GTTTTCCCAG TCACGACGGG CCCTTGGTGG AGGCTGAGGA GACGGTGACC AGGGTTCCT 60
GGCCCCAGTA AGCAAACATG TAGCCGTAGT 90

30

40

【 0 2 4 1 】

配列番号 : 34

配列の長さ : 68

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列 :

GTACTACTGC CAGCAAAGGA GTAGTTACCC GTACACGTTT GCCTGGGGGA CCAAGGTGGA 60
AATCAAAC 68

10

【 0 2 4 2 】

配列番号 : 35

配列の長さ : 25

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列 :

ACTCTGTAC CTGGGCTAGC GCTCA 25

20

【 0 2 4 3 】

配列番号 : 36

配列の長さ : 25

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列 :

TGAGCGCTAG CCCAGGTGAC AGAGT 25

30

40

【 0 2 4 4 】

配列番号 : 37

配列の長さ : 390

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列の特徴 :

特徴を表す記号 : sig peptide

存在位置 : -22...-1

50

特徴を決定した方法 : S
 特徴を表す記号 : domain
 存在位置 : 24..33
 特徴を決定した方法 : S
 他の情報 : 超可変部領域1
 特徴を表す記号 : domain
 存在位置 : 49..55
 特徴を決定した方法 : S
 他の情報 : 超可変部領域2
 特徴を表す記号 : domain
 存在位置 : 86..96
 特徴を決定した方法 : S
 他の情報 : 超可変部領域3

10

配列 :

```

atg cat ttt caa gtg cag att ttc agc ttc ctg cta atc agt gcc tca 48
Met His Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
-22 -20 -15 -10
-----
gtc ata atg tcc aga gga gat atc cag ctg acc cag agc cca agc agc 96
Val Ile Met Ser Arg Gly Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser
-5 -1 1 5 10
-----
ctg agc gct agc cca ggt gac aga gtg acc atc acg tgc agt gcc agc 144
Leu Ser Ala Ser Pro Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser
15 20 25
-----
tca agt gta agt tac atg cac tgg tat cag cag aaa cca ggt aag gct 192
Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
30 35 40
-----
cca aag ctt ctg atc tac agc aca tcc aac ctg gct tct ggt gtg cca 240
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
45 50 55
-----
tct aga ttc agc ggt agc ggt agc ggt aca gac ttc acc ttc acc atc 288
Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile
60 65 70
-----
agc agc ctc cag cca gag gac atc gct aca tac tac tgc cag caa agg 336
Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg
75 80 85 90
-----
agt agt tac ccg tac acg ttc ggc ggg ggg acc aag gtg gaa atc aaa 384
Ser Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
95 100 105
-----
cgt acg 390
Arg Thr
108

```

20

30

40

【 0 2 4 5 】

配列番号 : 38

配列の長さ : 25

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列 :

GTGCTGTAGA TCCAAAGCTT TGGAG

25

【 0 2 4 6 】

配列番号 : 39

配列の長さ : 25

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列 :

CTCCAAAGCT TTGGATCTAC AGCAC

25

【 0 2 4 7 】

配列番号 : 40

配列の長さ : 390

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列の特徴 :

特徴を表す記号 : sig peptide

存在位置 : -22..-1

特徴を決定した方法 : S

特徴を表す記号 : domain

存在位置 : 24..33

特徴を決定した方法 : S

他の情報 : 超可変部領域1

特徴を表す記号 : domain

存在位置 : 49..55

特徴を決定した方法 : S

他の情報 : 超可変部領域2

特徴を表す記号 : domain

存在位置 : 86..96

特徴を決定した方法 : S

他の情報 : 超可変部領域3

配列 :

atg cat ttt caa gtg cag att ttc agc ttc ctg cta atc agt gcc tca 48

10

20

30

40

50

Met His Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
 -22 -20 -15 -10
 gtc ata atg tcc aga gga gat atc cag ctg acc cag agc cca agc agc 96
 Val Ile Met Ser Arg Gly Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser
 -5 -1 1 5 10
 ctg agc gct agc gtg ggt gac aga gtg acc atc acg tgc agt gcc agc 144
 Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser
 15 20 25
 tca agt gta agt tac atg cac tgg tat cag cag aaa cca ggt aag gct 192
 Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala 10
 30 35 40
 cca aag ctt tgg atc tac agc aca tcc aac ctg gct tct ggt gtg cca 240
 Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
 45 50 55
 tct aga ttc agc ggt agc ggt agc ggt aca gac ttc acc ttc acc atc 288
 Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile
 60 65 70
 agc agc ctc cag cca gag gac atc gct aca tac tac tgc cag caa agg 336
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg 20
 75 80 85 90
 agt agt tac ccg tac acg ttc ggc ggg ggg acc aag gtg gaa atc aaa 384
 Ser Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 95 100 105

cgt acg 390
 Arg Thr
 108

【 0 2 4 8 】

配列番号 : 41

配列の長さ : 25

30

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列 :

ACGTAGCAGC ATCTTCAGCC TGGAG

25

【 0 2 4 9 】

40

配列番号 : 42

配列の長さ : 25

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列 :

10

CTCCAGGCTG AAGATGCTGC TACGT

25

【 0 2 5 0 】

配列番号 : 43

配列の長さ : 390

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列の特徴 :

20

特徴を表す記号 : sig peptide

存在位置 : -22...-1

特徴を決定した方法 : S

特徴を表す記号 : domain

存在位置 : 24...33

特徴を決定した方法 : S

他の情報 : 超可変部領域1

特徴を表す記号 : domain

存在位置 : 49...55

特徴を決定した方法 : S

他の情報 : 超可変部領域2

特徴を表す記号 : domain

存在位置 : 86...96

特徴を決定した方法 : S

他の情報 : 超可変部領域3

30

配列 :

atg cat ttt caa gtg cag att ttc agc ttc ctg cta atc agt gcc tca 48

Met His Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser

-22 -20 -15 -10

gtc ata atg tcc aga gga gat atc cag ctg acc cag agc cca agc agc 96

Val Ile Met Ser Arg Gly Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser

-5 -1 1 5 10

ctg agc gct agc gtg ggt gac aga gtg acc atc acg tgc agt gcc agc 144

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

15 20 25

tca agt gta agt tac atg cac tgg tat cag cag aaa cca ggt aag gct 192

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

30 35 40

cca aag ctt ctg atc tac agc aca tcc aac ctg gct tct ggt gtg cca 240

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro

50

45	50	55	
tct aga ttc agc ggt agc ggt agc ggt aca gac ttc acc ttc acc atc	288		
Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile			
60	65	70	
agc agc ctc cag gct gaa gat gct gct aca tac tac tgc cag caa agg	336		
Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg			
75	80	85	90
agt agt tac ccg tac acg ttc ggc ggg ggg acc aag gtg gaa atc aaa	384		
Ser Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys			
95	100	105	
cgt acg	390		
Arg Thr			
108			

【 0 2 5 1 】

配列番号 : 44

配列の長さ : 25

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列 :

ATGGTGAAAG AGTAAGATGT ACCGC

25

【 0 2 5 2 】

配列番号 : 45

配列の長さ : 25

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列 :

GCGGTACATC TTACTCTTTC ACCAT

25

【 0 2 5 3 】

配列番号 : 46

配列の長さ : 390

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列の特徴 :

特徴を表す記号 : sig peptide

存在位置 : -22...-1

特徴を決定した方法 : S

10

20

30

40

50

特徴を表す記号 : domain
 存在位置 : 24..33
 特徴を決定した方法 : S
 他の情報 : 超可変部領域1
 特徴を表す記号 : domain
 存在位置 : 49..55
 特徴を決定した方法 : S
 他の情報 : 超可変部領域2
 特徴を表す記号 : domain
 存在位置 : 86..96
 特徴を決定した方法 : S
 他の情報 : 超可変部領域3

10

配列 :

```

atg cat ttt caa gtg cag att ttc agc ttc ctg cta atc agt gcc tca 48
Met His Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
-22 -20 -15 -10
-----
gtc ata atg tcc aga gga gat atc cag ctg acc cag agc cca agc agc 96
Val Ile Met Ser Arg Gly Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser
-5 -1 1 5 10
-----
ctg agc gct agc cca ggt gac aga gtg acc atc acg tgc agt gcc agc 144
Leu Ser Ala Ser Pro Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser
15 20 25
-----
tca agt gta agt tac atg cac tgg tat cag cag aaa cca ggt aag gct 192
Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
30 35 40
-----
cca aag ctt tgg atc tac agc aca tcc aac ctg gct tct ggt gtg cca 240
Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
45 50 55
-----
tct aga ttc agc ggt agc ggt agc ggt aca tct tac tct ttc acc atc 288
Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Phe Thr Ile
60 65 70
-----
agc agc ctc cag cca gag gac atc gct aca tac tac tgc cag caa agg 336
Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg
75 80 85 90
-----
agt agt tac ccg tac acg ttc ggc ggg ggg acc aag gtg gaa atc aaa 384
Ser Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
95 100 105
-----
cgt acg 390
Arg Thr
108

```

20

30

40

【 0 2 5 4 】

配列番号：47

配列の長さ：40

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

TCTGGCTCCA TTCGGCTGAT GGTGAAAGAG TAAGATGTAC

40

【 0 2 5 5 】

10

配列番号：48

配列の長さ：40

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

GTACATCTTA CTCTTTCACC ATCAGCCGAA TGGAGCCAGA

40

【 0 2 5 6 】

配列番号：49

配列の長さ：390

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の特徴：

特徴を表す記号：sig peptide

存在位置：-22..-1

特徴を決定した方法：S

特徴を表す記号：domain

存在位置：24..33

特徴を決定した方法：S

他の情報：超可変部領域1

特徴を表す記号：domain

存在位置：49..55

特徴を決定した方法：S

他の情報：超可変部領域2

特徴を表す記号：domain

存在位置：86..96

特徴を決定した方法：S

他の情報：超可変部領域3

配列：

atg cat ttt caa gtg cag att ttc agc ttc ctg cta atc agt gcc tca 48

30

20

40

50

Met His Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
 -22 -20 -15 -10
 gtc ata atg tcc aga gga gat atc cag ctg acc cag agc cca agc agc 96
 Val Ile Met Ser Arg Gly Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser
 -5 -1 1 5 10
 ctg agc gct agc cca ggt gac aga gtg acc atc acg tgc agt gcc agc 144
 Leu Ser Ala Ser Pro Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser
 15 20 25
 tca agt gta agt tac atg cac tgg tat cag cag aaa cca ggt aag gct 192
 Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala 10
 30 35 40
 cca aag ctt tgg atc tac agc aca tcc aac ctg gct tct ggt gtg cca 240
 Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
 45 50 55
 tct aga ttc agc ggt agc ggt agc ggt aca tct tac tct ttc acc atc 288
 Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Phe Thr Ile
 60 65 70
 agc cga atg gag cca gag gac atc gct aca tac tac tgc cag caa agg 336
 Ser Arg Met Glu Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg 20
 75 80 85 90
 agt agt tac ccg tac acg ttc ggc ggg ggg acc aag gtg gaa atc aaa 384
 Ser Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 95 100 105

cgt acg 390
 Arg Thr
 108

【 0 2 5 7 】

配列番号 : 50

配列の長さ : 20

30

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列 :

TTCTGCTGGA ACCAGTGCAT

20

【 0 2 5 8 】

40

配列番号 : 51

配列の長さ : 20

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列 :

10

ATGCACTGGT TCCAGCAGAA

20

【 0 2 5 9 】

配列番号 : 52

配列の長さ : 390

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列の特徴 :

20

特徴を表す記号 : sig peptide

存在位置 : -22...-1

特徴を決定した方法 : S

特徴を表す記号 : domain

存在位置 : 24...33

特徴を決定した方法 : S

他の情報 : 超可変部領域1

特徴を表す記号 : domain

存在位置 : 49...55

特徴を決定した方法 : S

30

他の情報 : 超可変部領域2

特徴を表す記号 : domain

存在位置 : 86...96

特徴を決定した方法 : S

他の情報 : 超可変部領域3

配列 :

atg cat ttt caa gtg cag att ttc agc ttc ctg cta atc agt gcc tca 48

Met His Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser

-22 -20 -15 -10

gtc ata atg tcc aga gga gat atc cag ctg acc cag agc cca agc agc 96

40

Val Ile Met Ser Arg Gly Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser

-5 -1 1 5 10

ctg agc gct agc cca ggt gac aga gtg acc atc acg tgc agt gcc agc 144

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

15 20 25

tca agt gta agt tac atg cac tgg ttc cag cag aaa cca ggt aag gct 192

Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala

30 35 40

cca aag ctt tgg atc tac agc aca tcc aac ctg gct tct ggt gtg cca 240

Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro

50

45	50	55		
tct aga ttc agc ggt agc ggt agc ggt aca tct tac tct ttc acc atc	288			
Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Phe Thr Ile				
60	65	70		
agc agc ctc cag cca gag gac atc gct aca tac tac tgc cag caa agg	336			
Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg				
75	80	85	90	
agt agt tac ccg tac acg ttc ggc ggg ggg acc aag gtg gaa atc aaa	384			
Ser Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys				
95	100	105		
cgt acg	390			
Arg Thr				
108				

【 0 2 6 0 】

配列番号 : 53

配列の長さ : 25

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列 :

TGGAGTCGGC TGATGGTGAG AGAGT

25

【 0 2 6 1 】

配列番号 : 54

配列の長さ : 25

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列 :

ACTCTCTCAC CATCAGCCGA CTCCA

25

【 0 2 6 2 】

配列番号 : 55

配列の長さ : 390

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列の特徴 :

特徴を表す記号 : sig peptide

存在位置 : -22...-1

特徴を決定した方法 : S

10

20

30

40

50

特徴を表す記号 : domain
 存在位置 : 24..33
 特徴を決定した方法 : S
 他の情報 : 超可変部領域1
 特徴を表す記号 : domain
 存在位置 : 49..55
 特徴を決定した方法 : S
 他の情報 : 超可変部領域2
 特徴を表す記号 : domain
 存在位置 : 86..96
 特徴を決定した方法 : S
 他の情報 : 超可変部領域3

10

配列 :

```

atg cat ttt caa gtg cag att ttc agc ttc ctg cta atc agt gcc tca 48
Met His Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
-22 -20 -15 -10
-----
gtc ata atg tcc aga gga gat atc cag ctg acc cag agc cca agc agc 96
Val Ile Met Ser Arg Gly Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser
-5 -1 1 5 10
-----
ctg agc gct agc cca ggt gac aga gtg acc atc acg tgc agt gcc agc 144
Leu Ser Ala Ser Pro Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser
15 20 25
-----
tca agt gta agt tac atg cac tgg tat cag cag aaa cca ggt aag gct 192
Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
30 35 40
-----
cca aag ctt tgg atc tac agc aca tcc aac ctg gct tct ggt gtg cca 240
Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
45 50 55
-----
tct aga ttc agc ggt agc ggt agc ggt aca tct tac tct ctc acc atc 288
Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
60 65 70
-----
agc cga ctc cag cca gag gac atc gct aca tac tac tgc cag caa agg 336
Ser Arg Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg
75 80 85 90
-----
agt agt tac ccg tac acg ttc ggc ggg ggg acc aag gtg gaa atc aaa 384
Ser Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
95 100 105
-----
cgt acg 390
Arg Thr
108

```

20

30

40

【 0 2 6 3 】

配列番号：56

配列の長さ：94

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

CAGGAAACAG CTATGACGAA TTCCACCATG CATTTC AAG TGCAGATTTT CAGCTTCCTG 60
CTAATCAGTG CCTCAGTCAT AATGTCCAGA GGAG 94

10

【 0 2 6 4 】

配列番号：57

配列の長さ：88

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

ACAAGTGATG GTGACTCTGT CTCCTGGAGA TGCAGACATG GAGGATGGAG ACTGGGTCAG 60
CTGGATGTCT CCTCTGGACA TTATGACT 88

20

【 0 2 6 5 】

配列番号：58

配列の長さ：92

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

ACAGAGTCAC CATCACTTGT AGTGCAAGTT CAAGTGTAAG TTACATGCAC TGGTTTCAGC 60
AGAAACCAGG GAAATCACCT AAGCTCTGGA TC 92

30

40

【 0 2 6 6 】

配列番号：59

配列の長さ：87

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

AAGATGTACC GCTACCGCTA CCGCTGAATC TAGATGGCAC ACCAGAAGCT AAATTTGAAG 60
TTGAGTAGAT CCAGAGCTTA GGTGATT 87

10

【 0 2 6 7 】

配列番号：60

配列の長さ：89

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

TAGCGGTAGC GGTACATCTT ACTCTCTCAC CATCAGCAGC ATGCAGCCTG AAGATTTTGC 60
AACTTATTAC TGTCAGCAAA GGAGTAGTT 89

20

【 0 2 6 8 】

配列番号：61

配列の長さ：84

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

GTTTTCCCAG TCACGACCGT ACGTTTGATT TCCAGCTTGG TCCCCTGGCC GAACGTGTAC 60
GGGTA ACTAC TCCTTTGCTG ACAG 84

30

40

【 0 2 6 9 】

配列番号 : 62

配列の長さ : 35

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列 :

ACTCGAGGCT CTTTCCAGGG CTCTGCTTCA CCCAG 35

【 0 2 7 0 】

10

配列番号 : 63

配列の長さ : 35

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列 :

CTGGGTGAAG CAGAGCCCTG GAAAGAGCCT CGAGT 35

【 0 2 7 1 】

配列番号 : 64

配列の長さ : 433

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列の特徴 :

特徴を表す記号 : sig peptide

存在位置 : -19..-1

特徴を決定した方法 : S

特徴を表す記号 : domain

存在位置 : 31..35

特徴を決定した方法 : S

他の情報 : 超可変部領域1

特徴を表す記号 : domain

存在位置 : 50..66

特徴を決定した方法 : S

他の情報 : 超可変部領域2

特徴を表す記号 : domain

存在位置 : 99..109

特徴を決定した方法 : S

他の情報 : 超可変部領域3

配列 :

atg gga tgg agc tgg atc ttt ctc ttc ctc ctg tca gga act gca ggt 48

20

30

40

50

Met Gly Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly
 -19 -15 -10 -5
 gtc ctc tct gag gtg cag ctg gtg cag tct gga gca gag gtg aag aag 96
 Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 -1 1 5 10
 cct ggg gcc tca gtg aag gtc tcc tgc aag gct tcc gga tac acc ttc 144
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 15 20 25
 act gac tac aac atg gac tgg gtg aag cag agc cct gga aag agc ctc 192
 Thr Asp Tyr Asn Met Asp Trp Val Lys Gln Ser Pro Gly Lys Ser Leu 10
 30 35 40 45
 gag tgg atg gga tat att tat cct aac aat ggt ggt act ggc tac aac 240
 Glu Trp Met Gly Tyr Ile Tyr Pro Asn Asn Gly Gly Thr Gly Tyr Asn
 50 55 60
 cag aag ttc aag agc aag gtc acc att acc gta gac aca tcc acg agc 288
 Gln Lys Phe Lys Ser Lys Val Thr Ile Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser
 65 70 75
 aca gcc tac atg gag ctg cac agc ctg aga tct gag gac acg gcc gtg 336
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu His Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val 20
 80 85 90
 tat tac tgt gcg acc tac ggt cat tac tac ggc tac atg ttt gct tac 384
 Tyr Tyr Cys Ala Thr Tyr Gly His Tyr Tyr Gly Tyr Met Phe Ala Tyr
 95 100 105
 tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca gcc tcc acc aag ggc 432
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 110 115 120 125
 c 433

【 0 2 7 2 】

配列番号 : 65

配列の長さ : 24

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列 :

TGTCCAGGGC TCTGCTTCAC CCAG

24

【 0 2 7 3 】

10

20

30

40

配列番号：66

配列の長さ：24

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

CTGGGTGAAG CAGAGCCCTG GACA

24

【 0 2 7 4 】

10

配列番号：67

配列の長さ：25

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

TCTACGGTCA AGGTGGCCTT GCTCT

25

【 0 2 7 5 】

20

配列番号：68

配列の長さ：25

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

AGAGCAAGGC CACCTTGACC GTAGA

25

【 0 2 7 6 】

配列番号：69

配列の長さ：433

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の特徴：

特徴を表す記号：sig peptide

存在位置：-19...-1

特徴を決定した方法：S

特徴を表す記号：domain

40

50

存在位置：31..35

特徴を決定した方法：S

他の情報：超可変部領域1

特徴を表す記号：domain

存在位置：50..66

特徴を決定した方法：S

他の情報：超可変部領域2

特徴を表す記号：domain

存在位置：99..109

特徴を決定した方法：S

他の情報：超可変部領域3

10

配列：

atg gga tgg agc tgg atc ttt ctc ttc ctc ctg tca gga act gca ggt 48
Met Gly Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly
-19 -15 -10 -5

gtc ctc tct gag gtg cag ctg gtg cag tct gga gca gag gtg aag aag 96
Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
-1 1 5 10

cct ggg gcc tca gtg aag gtc tcc tgc aag gct tcc gga tac acc ttc 144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
15 20 25

20

act gac tac aac atg gac tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctc 192
Thr Asp Tyr Asn Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
30 35 40 45

gag tgg atg gga tat att tat cct aac aat ggt ggt act ggc tac aac 240
Glu Trp Met Gly Tyr Ile Tyr Pro Asn Asn Gly Gly Thr Gly Tyr Asn
50 55 60

cag aag ttc aag agc aag gcc acc ttg acc gta gac aca tcc acg agc 288
Gln Lys Phe Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser
65 70 75

30

aca gcc tac atg gag ctg cac agc ctg aga tct gag gac acg gcc gtg 336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu His Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
80 85 90

tat tac tgt gcg acc tac ggt cat tac tac ggc tac atg ttt gct tac 384
Tyr Tyr Cys Ala Thr Tyr Gly His Tyr Tyr Gly Tyr Met Phe Ala Tyr
95 100 105

tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca gcc tcc acc aag ggc 432
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
110 115 120 125

c 433

40

【 0 2 7 7 】

配列番号：70

配列の長さ：433

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の特徴：

特徴を表す記号：sig peptide

存在位置：-19..-1

50

特徴を決定した方法：S
 特徴を表す記号：domain
 存在位置：31..35
 特徴を決定した方法：S
 他の情報：超可変部領域1
 特徴を表す記号：domain
 存在位置：50..66
 特徴を決定した方法：S
 他の情報：超可変部領域2
 特徴を表す記号：domain
 存在位置：99..109
 特徴を決定した方法：S
 他の情報：超可変部領域3

10

配列：

```

atg gga tgg agc tgg atc ttt ctc ttc ctc ctg tca gga act gca ggt 48
Met Gly Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly
-19          -15          -10          -5
-----
gtc ctc tct gag gtg cag ctg gtg cag tct gga gca gag gtg aag aag 96
Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
          -1  1          5          10
-----
cct ggg gcc tca gtg aag gtc tcc tgc aag gct tcc gga tac acc ttc 144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
          15          20          25
-----
act gac tac aac atg gac tgg gtg aag cag agc cct gga aag agc ctc 192
Thr Asp Tyr Asn Met Asp Trp Val Lys Gln Ser Pro Gly Lys Ser Leu
          30          35          40          45
-----
gag tgg atg gga tat att tat cct aac aat ggt ggt act ggc tac aac 240
Glu Trp Met Gly Tyr Ile Tyr Pro Asn Asn Gly Gly Thr Gly Tyr Asn
          50          55          60
-----
cag aag ttc aag agc aag gcc acc ttg acc gta gac aca tcc acg agc 288
Gln Lys Phe Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser
          65          70          75
-----
aca gcc tac atg gag ctg cac agc ctg aga tct gag gac acg gcc gtg 336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu His Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
          80          85          90
-----
tat tac tgt gcg acc tac ggt cat tac tac ggc tac atg ttt gct tac 384
Tyr Tyr Cys Ala Thr Tyr Gly His Tyr Tyr Gly Tyr Met Phe Ala Tyr
          95          100          105
-----
tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca gcc tcc acc aag ggc 432
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
110          115          120          125
-----

```

20

30

40

c

433

【 0 2 7 8 】

配列番号：71
 配列の長さ：433
 配列の型：核酸
 鎖の数：二本鎖
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：他の核酸 合成DNA
 配列の特徴：

50

特徴を表す記号 : sig peptide

存在位置 : -19...-1

特徴を決定した方法 : S

特徴を表す記号 : domain

存在位置 : 31...35

特徴を決定した方法 : S

他の情報 : 超可変部領域1

特徴を表す記号 : domain

存在位置 : 50...66

特徴を決定した方法 : S

他の情報 : 超可変部領域2

特徴を表す記号 : domain

存在位置 : 99...109

特徴を決定した方法 : S

他の情報 : 超可変部領域3

10

配列 :

atg gga tgg agc tgg atc ttt ctc ttc ctc ctg tca gga act gca ggt 48

Met Gly Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly

-19 -15 -10 -5

gtc ctc tct gag gtg cag ctg gtg cag tct gga gca gag gtg aag aag 96

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

-1 1 5 10

20

cct ggg gcc tca gtg aag gtc tcc tgc aag gct tcc gga tac acc ttc 144

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe

15 20 25

act gac tac aac atg gac tgg gtg aag cag agc cct gga caa ggg ctc 192

Thr Asp Tyr Asn Met Asp Trp Val Lys Gln Ser Pro Gly Gln Gly Leu

30 35 40 45

gag tgg atg gga tat att tat cct aac aat ggt ggt act ggc tac aac 240

Glu Trp Met Gly Tyr Ile Tyr Pro Asn Asn Gly Gly Thr Gly Tyr Asn

50 55 60

30

cag aag ttc aag agc aag gcc acc ttg acc gta gac aca tcc acg agc 288

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

65 70 75

aca gcc tac atg gag ctg cac agc ctg aga tct gag gac acg gcc gtg 336

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

80 85 90

tat tac tgt gcg acc tac ggt cat tac tac ggc tac atg ttt gct tac 384

Tyr Tyr Cys Ala Thr Tyr Gly His Tyr Tyr Gly Tyr Met Phe Ala Tyr

95 100 105

40

tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca gcc tcc acc aag ggc 432

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly

110 115 120 125

c

433

【 0 2 7 9 】

配列番号 : 72

配列の長さ : 20

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列 :

10

TGAATCTAGC TGGCACACCA

20

【 0 2 8 0 】

配列番号 : 73

配列の長さ : 20

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列 :

20

TGGTGTGCCA GCTAGATTCA

配列番号 : 74

配列の長さ : 120

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列の特徴 : 可変部領域

配列 :

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

30

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Asn Asn Gly Gly Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Lys Ser Lys Val Thr Ile Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

40

85 90 95

Ala Thr Tyr Gly His Tyr Tyr Gly Tyr Met Phe Ala Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

配列番号 : 75

配列の長さ : 107

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

50

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

10

配列番号 : 78

配列の長さ : 108

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列の特徴 : 可変部領域

20

配列 :

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30
 His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
 35 40 45
 Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Leu Gln Pro Glu
 65 70 75 80
 Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Tyr Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
 100 105 108

30

配列番号 : 79

配列の長さ : 120

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列の特徴 : 可変部領域

40

配列 :

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Asn Met Asp Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Tyr Pro Asn Asn Gly Gly Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe

50

- 【図 1 7】はプラスミドpBSMoSa1Sの造成工程を示した図である。
- 【図 1 8】はプラスミドpBShC 1の造成工程を示した図である。
- 【図 1 9】はプラスミドpMohC 1の造成工程を示した図である。
- 【図 2 0】はプラスミドpMo 1SPの造成工程を示した図である。
- 【図 2 1】はプラスミドpMo 1SPの造成工程を示した図である。
- 【図 2 2】はプラスミドpKANTEX93の造成工程を示した図である。
- 【図 2 3】はプラスミドpBSNAの造成工程を示した図である。
- 【図 2 4】はプラスミドpBSh3の造成工程を示した図である。
- 【図 2 5】はプラスミドpBSESの造成工程を示した図である。
- 【図 2 6】はプラスミドpBSL3の造成工程を示した図である。 10
- 【図 2 7】はプラスミドpKANTEX796Hの造成工程を示した図である。
- 【図 2 8】はプラスミドpKANTEX796の造成工程を示した図である。
- 【図 2 9】はプラスミドpT796の造成工程を示した図である。
- 【図 3 0】はプラスミドpKANTEX796およびpT796による抗GM2ヒト型キメラ抗体の一過性発現を示した図である。縦軸はGM2結合活性を示した抗体濃度、横軸はプラスミドを導入しからの時間をそれぞれ示す。
- 【図 3 1】はプラスミドpBSh10の造成工程を示した図である。
- 【図 3 2】はプラスミドpBSL16の造成工程を示した図である。
- 【図 3 3】はPCRによる変異導入法および変異の導入されたDNA断片のクローニング工程を示した図である。 20
- 【図 3 4】はプラスミドpBSLV1+2の造成工程を示した図である。
- 【図 3 5】はプラスミドpBSLm-28の造成工程を示した図である。
- 【図 3 6】はプラスミドpBSHSGLの造成工程を示した図である。
- 【図 3 7】はプラスミドpT796LCDRの造成工程を示した図である。
- 【図 3 8】はプラスミドpT796HLCDR、pT796HLCDRHV2、pT796HLCDRHV4の造成工程を示した図である。
- 【図 3 9】はプラスミドpT796HLCDRH10の造成工程を示した図である。
- 【図 4 0】はプラスミドpT796HCDR、pT796HCDRHV2、pT796HCDRHV4、pT796HCDRH10の造成工程を示した図である。
- 【図 4 1】はプラスミドpT796、pT796HCDR、pT796HCDRHV2、pT796HCDRHV4、pT796HCDRH10を用いた抗GM2ヒト型CDR移植抗体の一過性発現による活性評価を示した図である。縦軸に用いたプラスミド、横軸にキメラ抗体の活性を100%とした時の相対活性値をそれぞれ示す。 30
- 【図 4 2】はプラスミドpT796HLCDRLV1、pT796HLCDRLV2、pT796HLCDRLV3、pT796HLCDRLV4、pT796HLCDRLV8、pT796HLCDRLm-2、pT796HLCDRLm-8、pT796HLCDRLm-28、pT796HLCDRHSGLの造成工程を示した図である。
- 【図 4 3】はプラスミドpT796、pT796HLCDR、pT796HLCDRLV1、pT796HLCDRLV2、pT796HLCDRLV3、pT796HLCDRLV4、pT796HLCDRLV8、pT796HLCDRLm-2、pT796HLCDRLm-8、pT796HLCDRLm-28、pT796HLCDRHSGLを用いた抗GM2ヒト型CDR移植抗体の一過性発現による活性評価を示した図である。縦軸に用いたプラスミド、横軸にキメラ抗体の活性を100%とした時の相対活性値をそれぞれ示す。 40
- 【図 4 4】はプラスミドpKANTEX796HLCDRLm-28、pKANTEX796HLCDRHSGLの造成工程を示した図である。
- 【図 4 5】は抗GM2ヒト型キメラ抗体KM966と精製した抗GM2ヒト型CDR移植抗体KM8966およびKM8967のSDS-PAGE(4~15%グラジエントゲルを使用)の電気泳動パターンを示した図である。左側が還元条件、右側が還元条件でそれぞれ電気泳動を行った図である。レーンの左側より、高分子マーカー、KM966、KM8966、KM8967、低分子マーカー、KM966、KM8966、KM8967の泳動パターンをそれぞれ示す。
- 【図 4 6】は抗GM2ヒト型キメラ抗体KM966と精製した抗GM2ヒト型CDR移植抗体KM8966およびKM8967のGM2との結合活性を示した図である。縦軸はGM2との結合活性、横軸は抗体濃度 50

をそれぞれ示す。

【図47】は抗GM2ヒト型キメラ抗体KM966と精製した抗GM2ヒト型CDR移植抗体KM8966およびKM8967の各種ガングリオシドとの反応性を示した図である。縦軸にガングリオシドの種類、横軸に結合活性をそれぞれ示す。AcGM2はN-アセチルGM2、GcGM2はN-グリコリルGM2、AcGM3はN-アセチルGM3、GcGM3はN-グリコリルGM3を示す。

【図48】は抗GM2ヒト型キメラ抗体KM966と精製した抗GM2ヒト型CDR移植抗体KM8966およびKM8967のヒト肺小細胞癌株SBC-3との反応性を示した図である。縦軸に細胞数、横軸に蛍光強度をそれぞれ示す。下段より、コントロール、KM8967、KM8966、KM966の反応性をそれぞれ示す。

【図49】は抗GM2ヒト型キメラ抗体KM966と精製した抗GM2ヒト型CDR移植抗体KM8966およびKM8967のヒト肺小細胞癌株SBC-3に対するCDC活性を示した図である。縦軸に細胞障害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。

10

【図50】は抗GM2ヒト型キメラ抗体KM966と精製した抗GM2ヒト型CDR移植抗体KM8966およびKM8967のヒト肺小細胞癌株SBC-3に対するADCC活性を示した図である。縦軸に細胞障害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。

【図51】はプラスミドpKANTEX796HM1Lm-28、pKANTEX796HM2Lm-28、pKANTEX796HM3Lm-28、pKANTEX796HM31Lm-28、pKANTEX796HM32Lm-28の造成工程を示した図である。

【図52】は抗GM2ヒト型キメラ抗体KM966、抗GM2ヒト型CDR移植抗体KM8966および各種置換を有する抗GM2ヒト型CDR移植抗体のSDS-PAGE(4~15%グラジエントゲルを使用)の電気泳動パターンを示した図である。左側が非還元条件、右側が還元条件でそれぞれ電気泳動を行った図である。Mが分子量マーカー(矢印で示した、上から205Kd、140Kd、83Kd、45Kd、32.6Kd、18Kd、7.5Kdを示す)、1がKM966、2がKM8966、3がM1-28、4がM2-28、5がM3-28、6がM31-28、7がM32-28の泳動パターンをそれぞれ示す。

20

【図53】は抗GM2ヒト型キメラ抗体KM966、抗GM2ヒト型CDR移植抗体KM8966および各種置換を有する抗GM2ヒト型CDR移植抗体のヒト肺小細胞癌株SBC-3に対するCDC活性を示した図である。縦軸に細胞障害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。

【図54】はプラスミドpKANTEX796HLm-28No.1、pKANTEX796HM1Lm-28No.1、pKANTEX796HM2Lm-28No.1、pKANTEX796HM3Lm-28No.1の造成工程を示した図である。

【図55】は抗GM2ヒト型キメラ抗体KM966および各種置換を有する抗GM2ヒト型CDR移植抗体のSDS-PAGE(4~15%グラジエントゲルを使用)の電気泳動パターンを示した図である。左側が非還元条件、右側が還元条件でそれぞれ電気泳動を行った図である。Mが分子量マーカー(矢印で示した、上から205Kd、140Kd、83Kd、45Kd、32.6Kd、18Kd、7.5Kdを示す)、1がKM966、2がh796H-No.1、3がM1-No.1、4がM2-No.1、5がM3-No.1の泳動パターンをそれぞれ示す。

30

【図56】は抗GM2ヒト型キメラ抗体KM966、抗GM2ヒト型CDR移植抗体KM8966、KM8970および各種置換を有する抗GM2ヒト型CDR移植抗体のヒト肺小細胞癌株SBC-3に対するCDC活性を示した図である。縦軸に細胞障害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。

【図57】は抗GM2ヒト型キメラ抗体KM966と抗GM2ヒト型CDR移植抗体KM8969およびKM8970のGM2との結合活性を示した図である。縦軸はGM2との結合活性、横軸は抗体濃度をそれぞれ示す。

40

【図58】は抗GM2ヒト型キメラ抗体KM966と抗GM2ヒト型CDR移植抗体KM8969およびKM8970の各種ガングリオシドとの反応性を示した図である。縦軸にガングリオシドの種類、横軸に結合活性をそれぞれ示す。AcGM2はN-アセチルGM2、GcGM2はN-グリコリルGM2、AcGM3はN-アセチルGM3、GcGM3はN-グリコリルGM3を示す。

【図59】は抗GM2ヒト型キメラ抗体KM966と抗GM2ヒト型CDR移植抗体KM8969およびKM8970のヒト肺小細胞癌株SBC-3との反応性を示した図である。縦軸に細胞数、横軸に蛍光強度をそれぞれ示す。下段より、コントロール、KM966、KM8970、KM8969の反応性をそれぞれ示す。

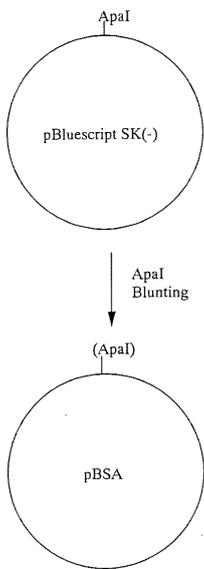
【図60】は抗GM2ヒト型キメラ抗体KM966と抗GM2ヒト型CDR移植抗体KM8966、KM8969およびKM8970のヒト肺小細胞癌株SBC-3に対するADCC活性を示した図である。縦軸に細胞障害

50

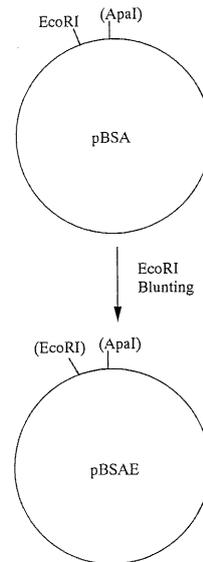
活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。

【図61】は抗GM2ヒト型キメラ抗体KM966と抗GM2ヒト型CDR移植抗体KM8966、KM8969およびKM8970のヒト肺小細胞癌株SBC-3に対するCDC活性をヒト補体を加えてからの反応時間が1時間と4時間で比較した図である。縦軸に細胞障害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。(1)とは、反応時間が1時間を示し、(4)とは、反応時間が4時間を示す。

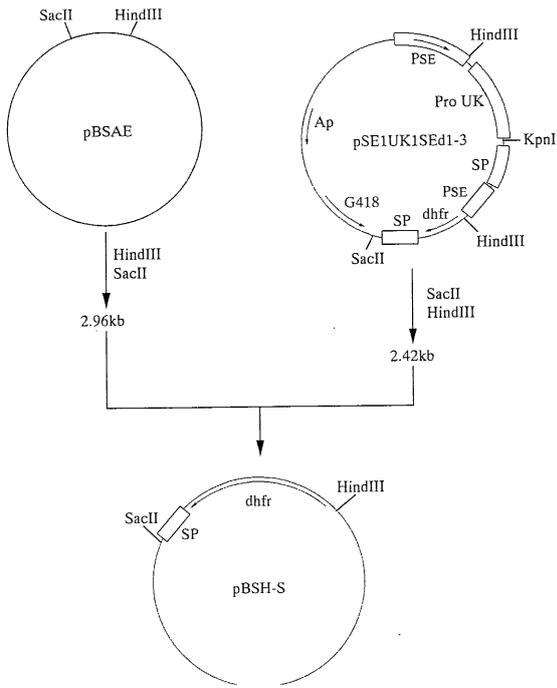
【図1】



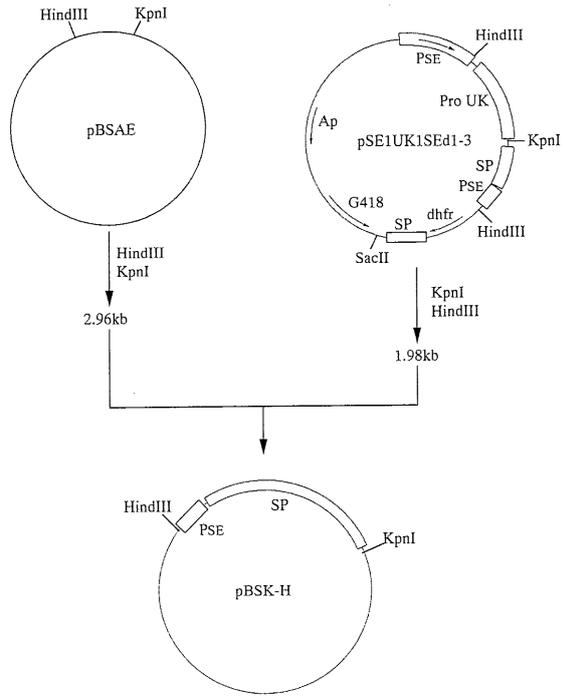
【図2】



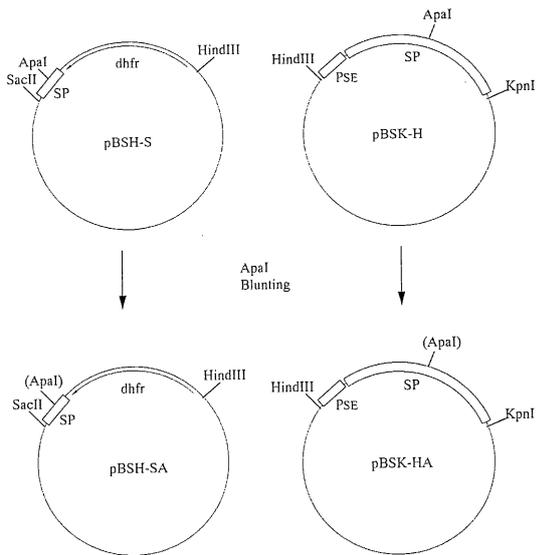
【 図 3 】



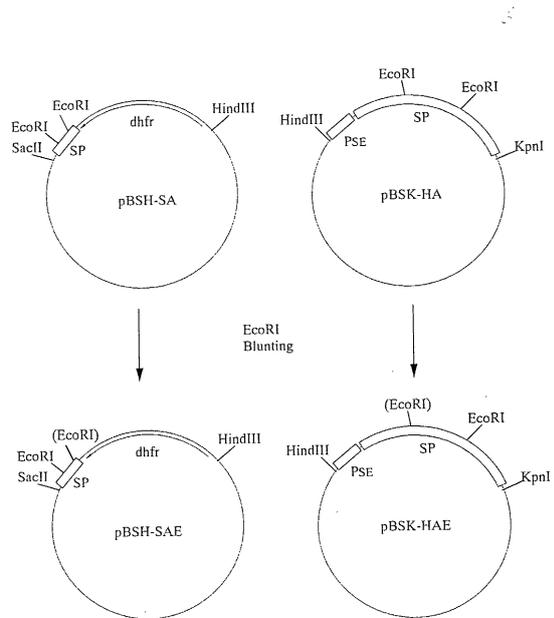
【 図 4 】



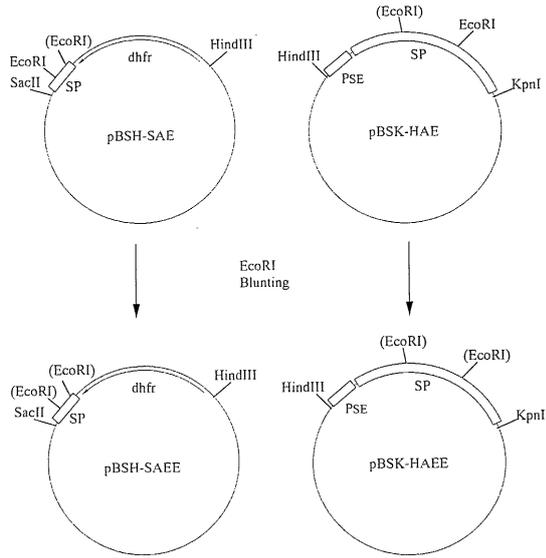
【 図 5 】



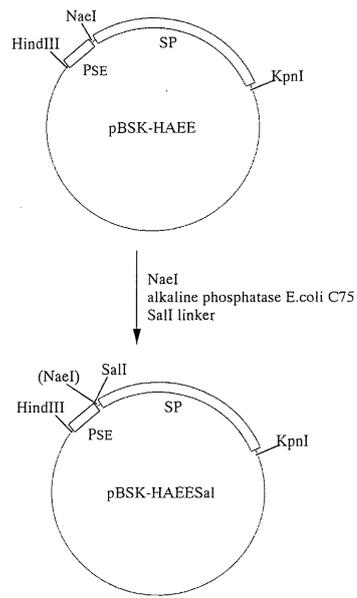
【 図 6 】



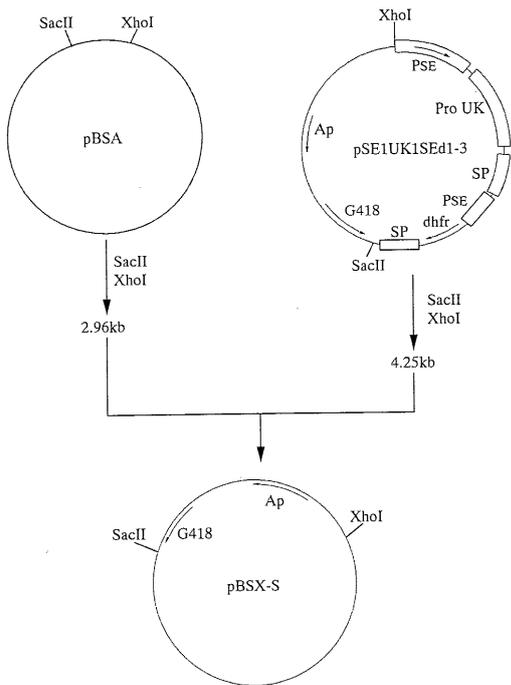
【 図 7 】



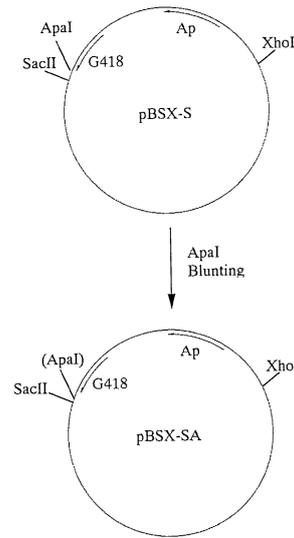
【 図 8 】



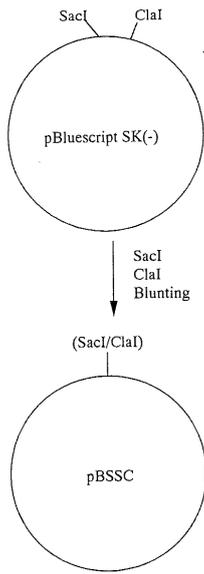
【 図 9 】



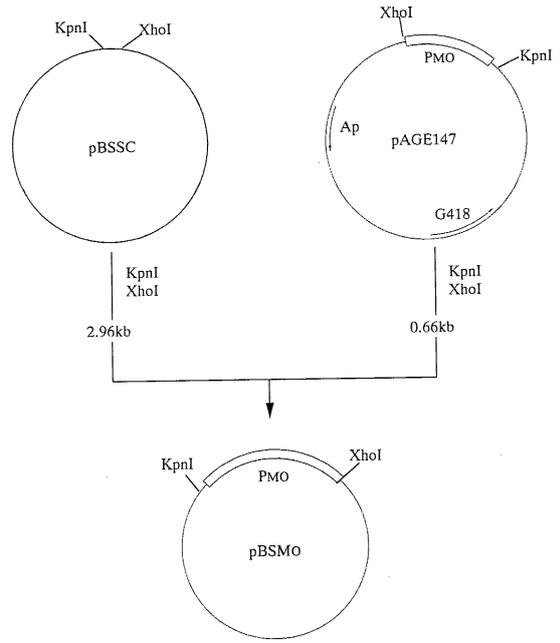
【 図 10 】



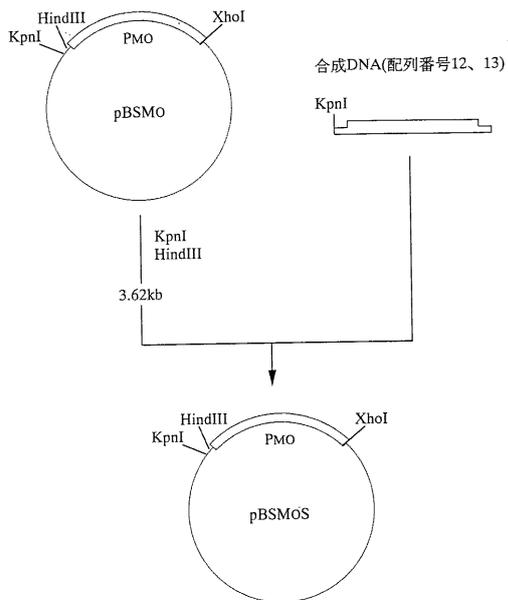
【 図 1 1 】



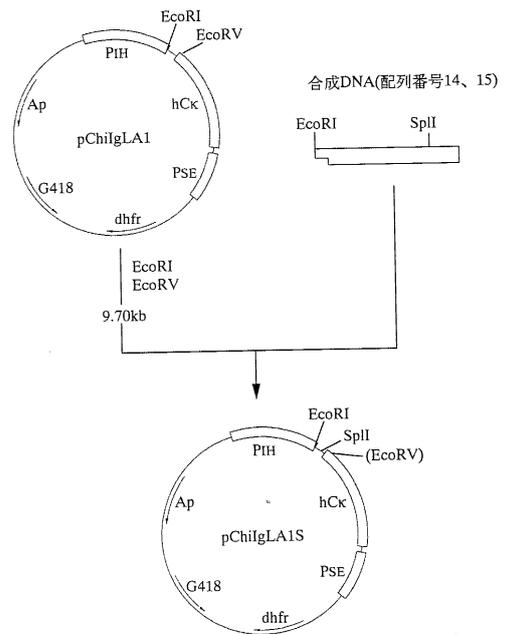
【 図 1 2 】



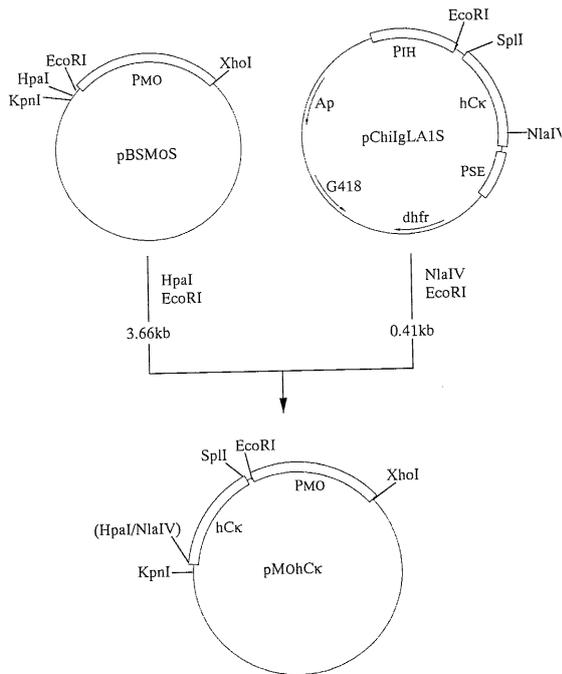
【 図 1 3 】



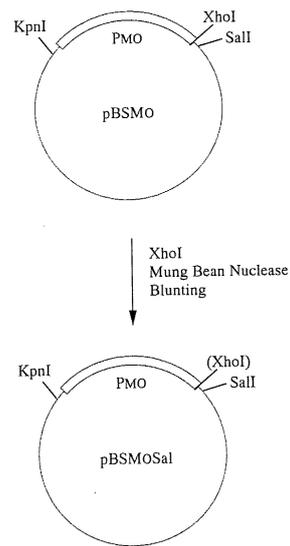
【 図 1 4 】



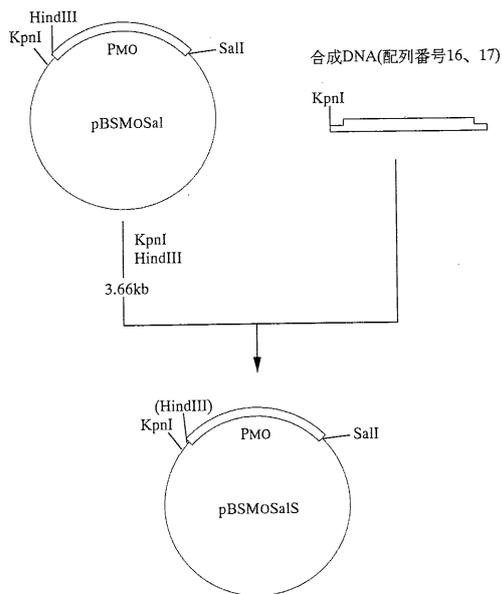
【 図 15 】



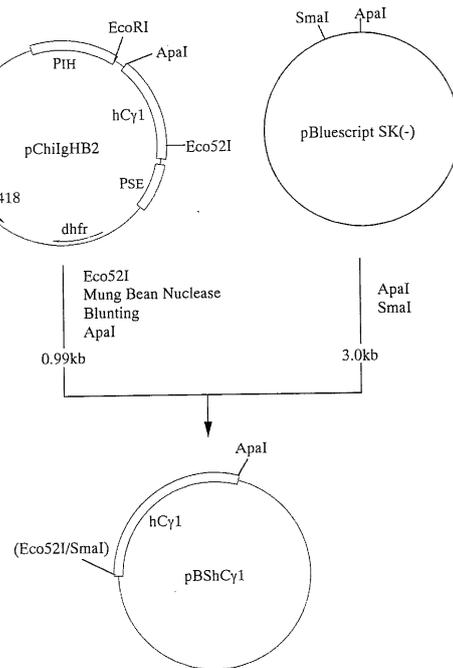
【 図 16 】



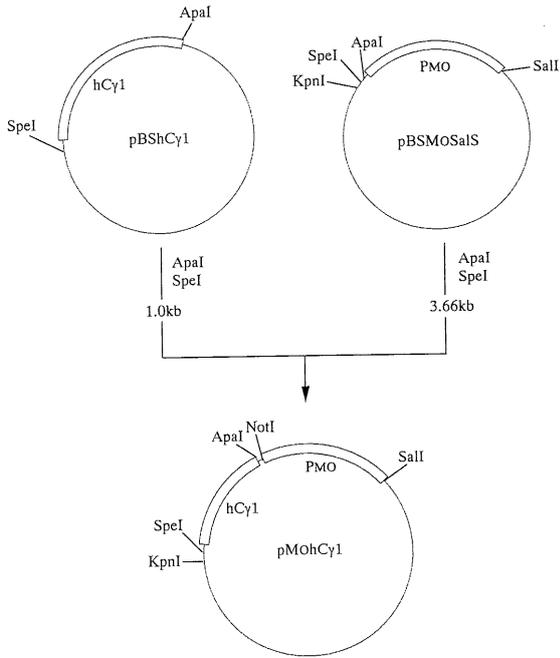
【 図 17 】



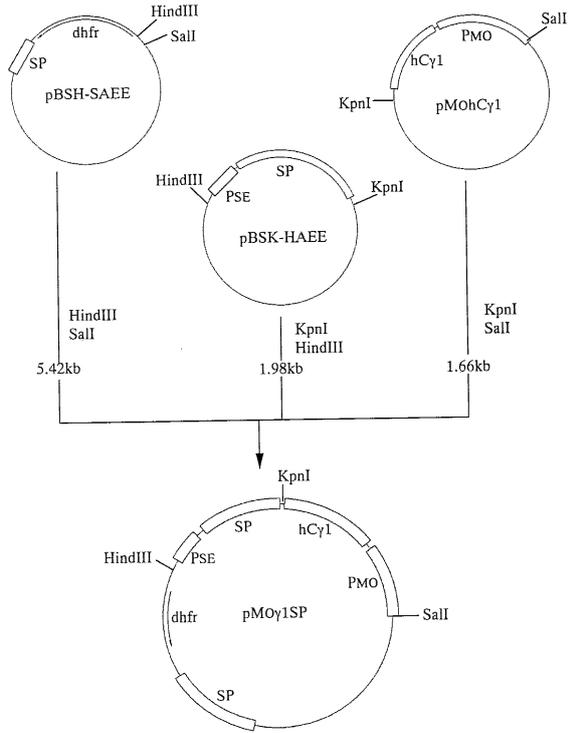
【 図 18 】



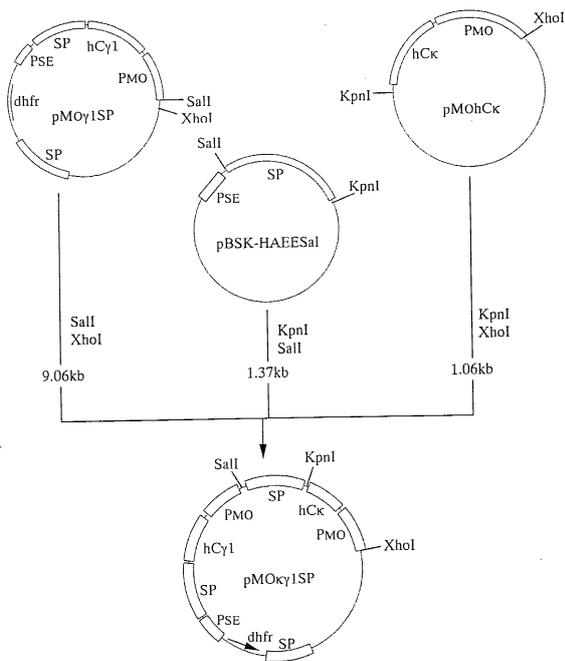
【 図 19 】



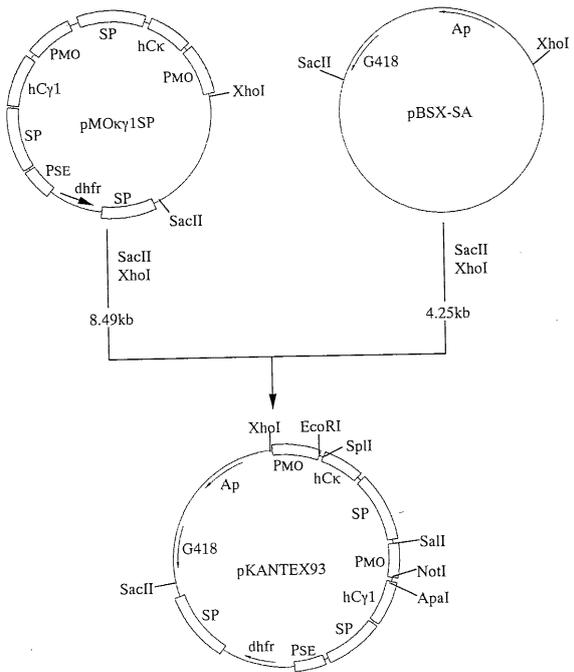
【 図 20 】



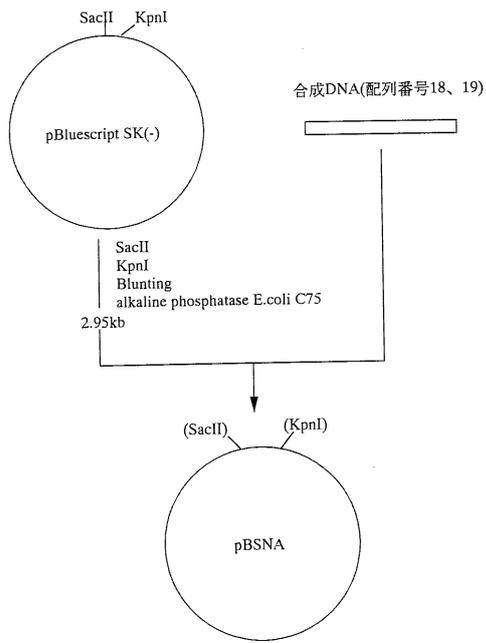
【 図 21 】



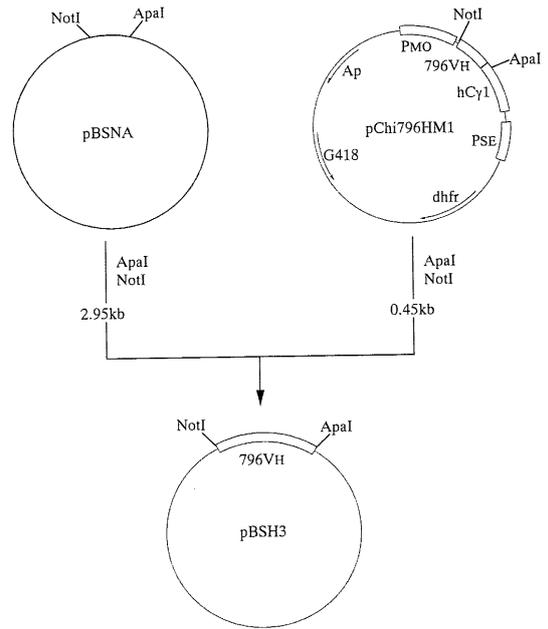
【 図 22 】



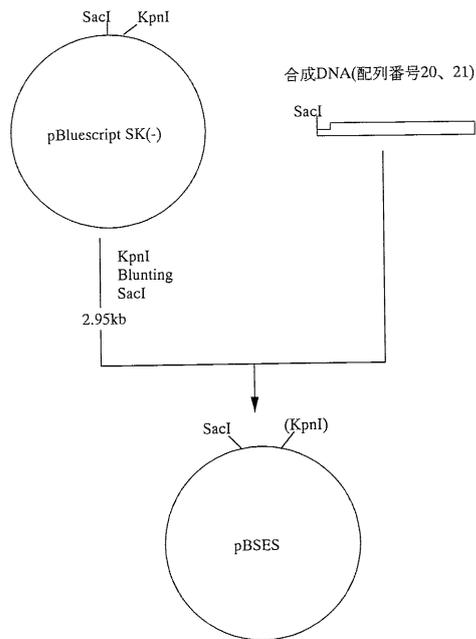
【 図 2 3 】



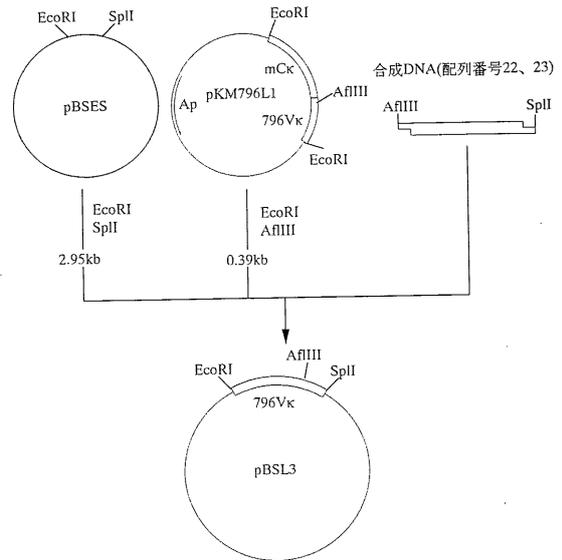
【 図 2 4 】



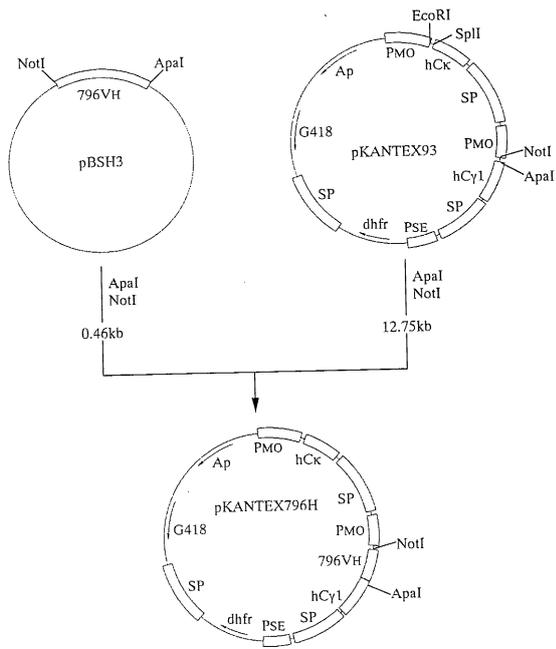
【 図 2 5 】



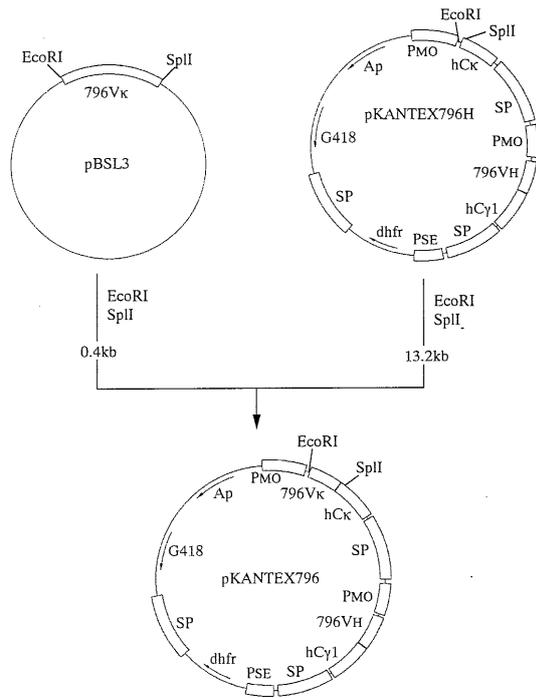
【 図 2 6 】



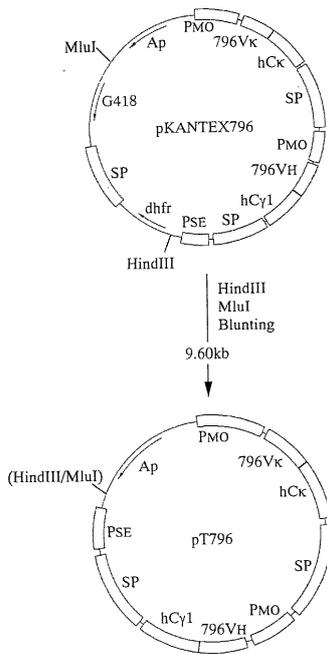
【 図 27 】



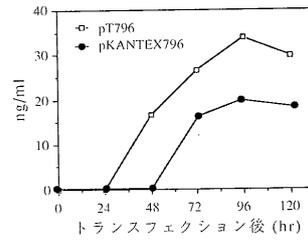
【 図 28 】



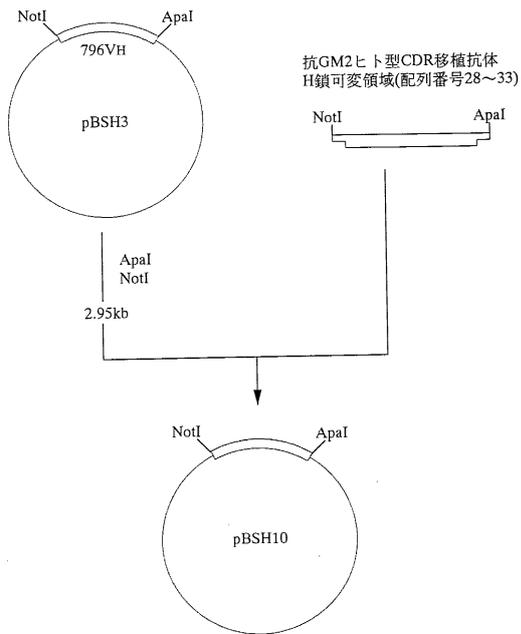
【 図 29 】



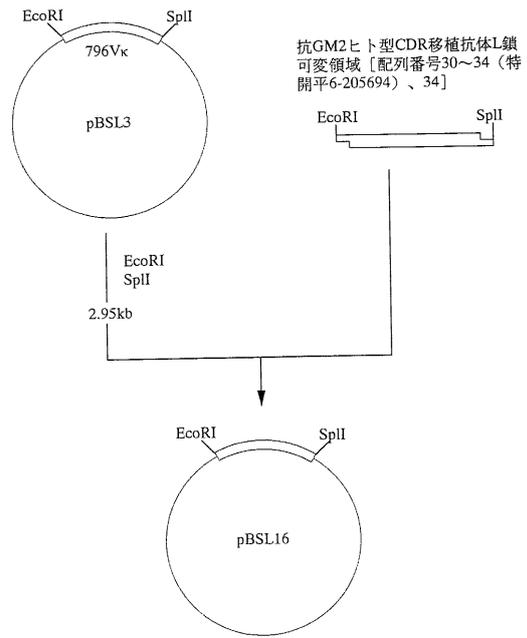
【 図 30 】



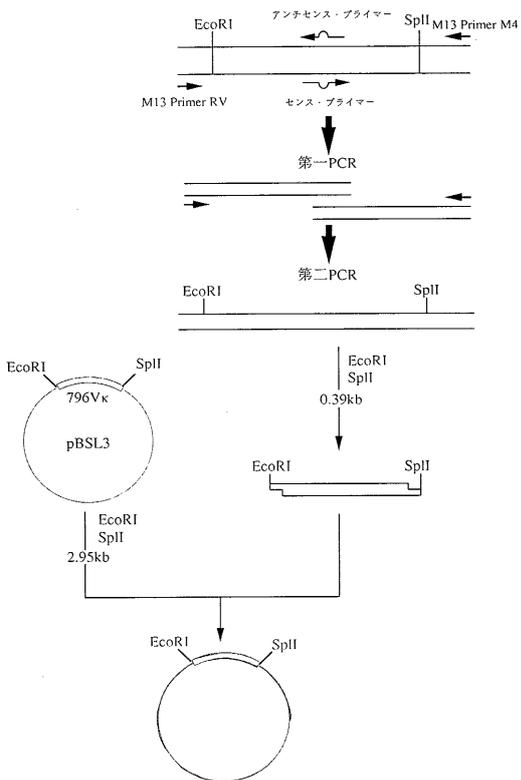
【図31】



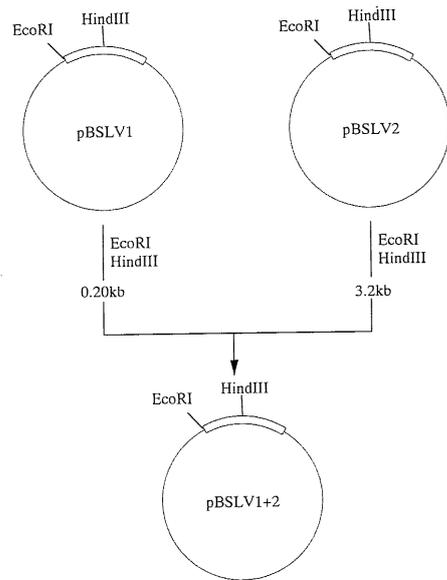
【図32】



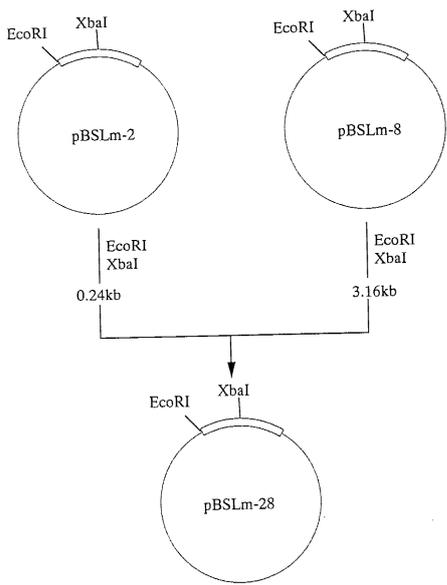
【図33】



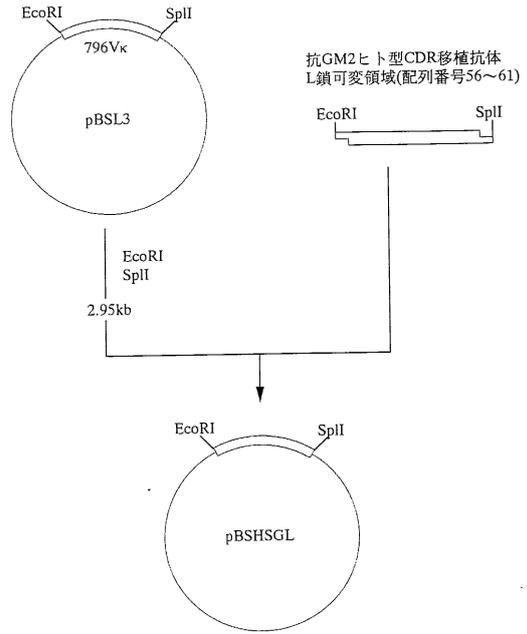
【図34】



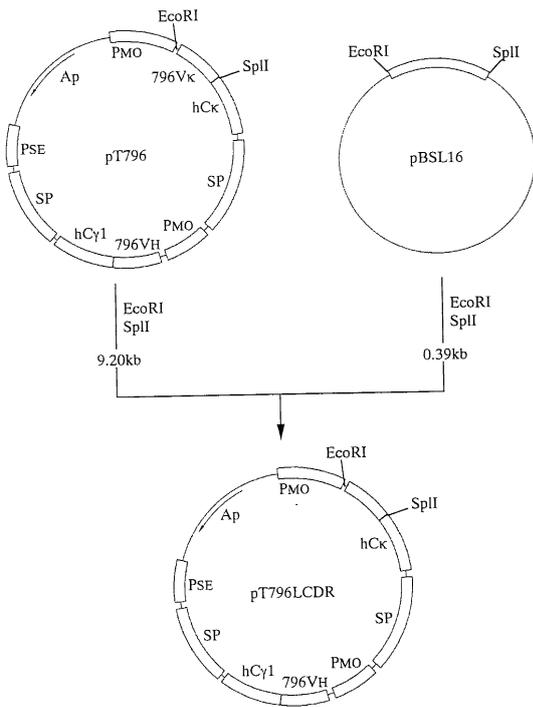
【 図 3 5 】



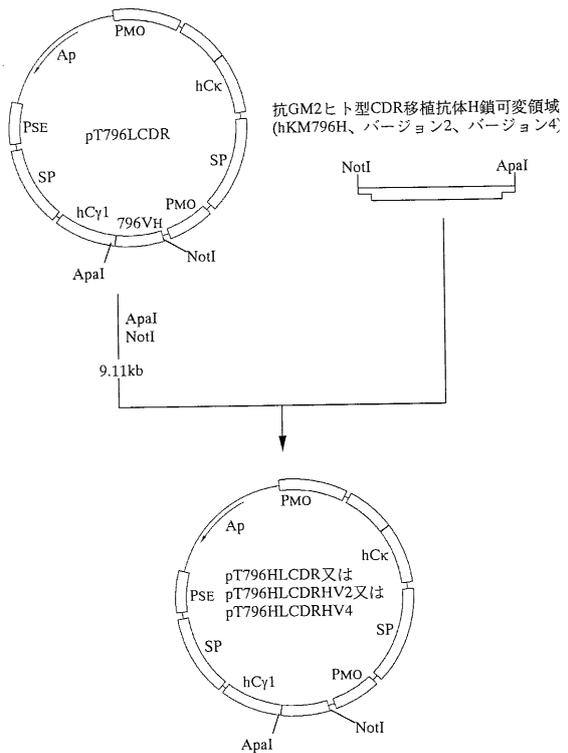
【 図 3 6 】



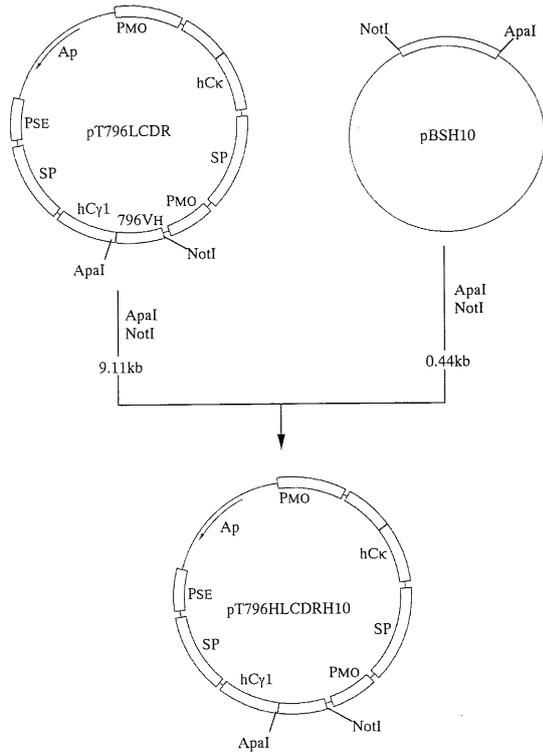
【 図 3 7 】



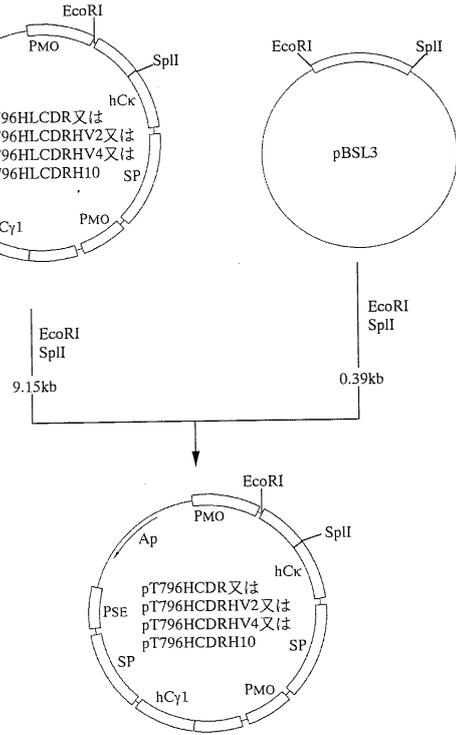
【 図 3 8 】



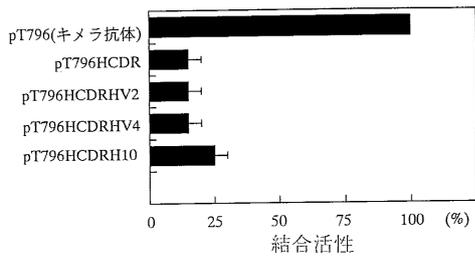
【図39】



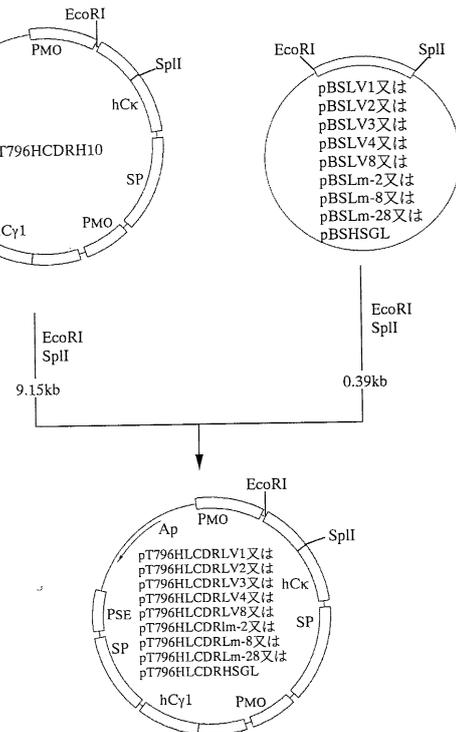
【図40】



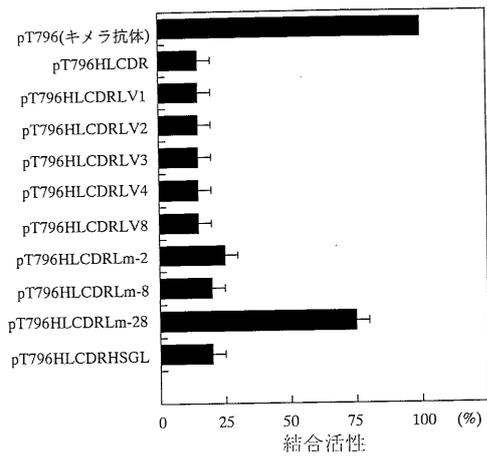
【図41】



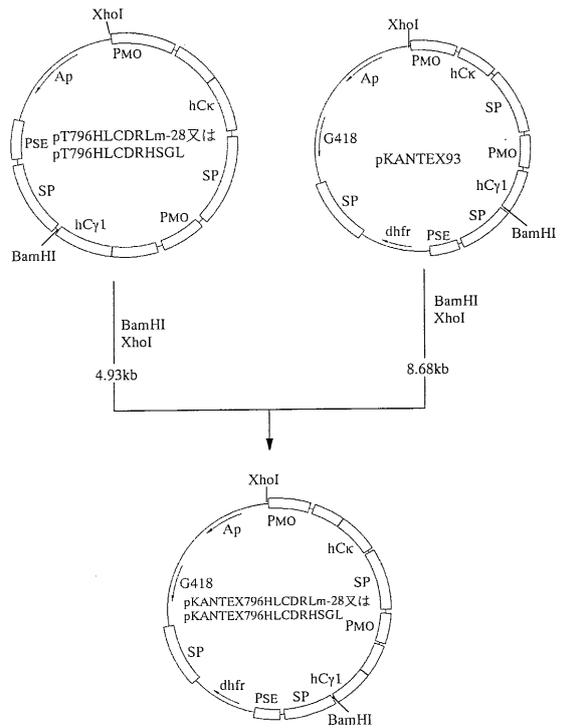
【図42】



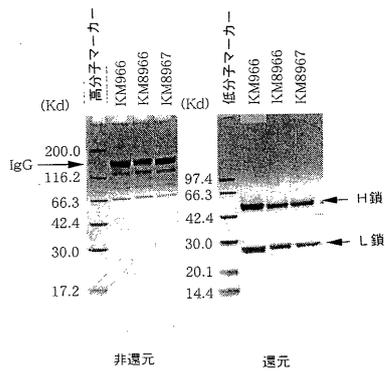
【図43】



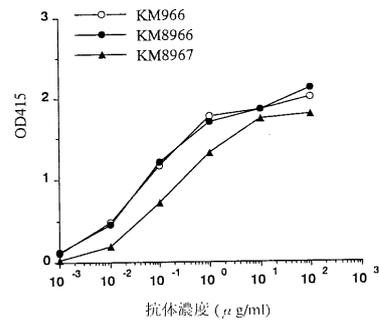
【図44】



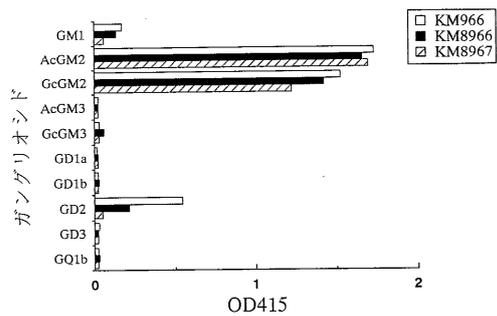
【図45】



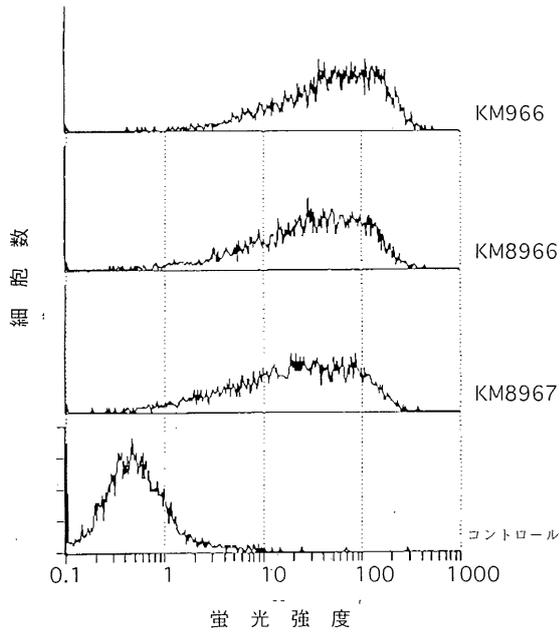
【図46】



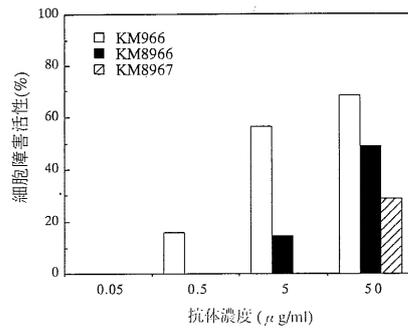
【図47】



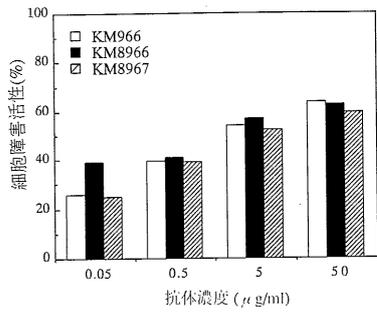
【図48】



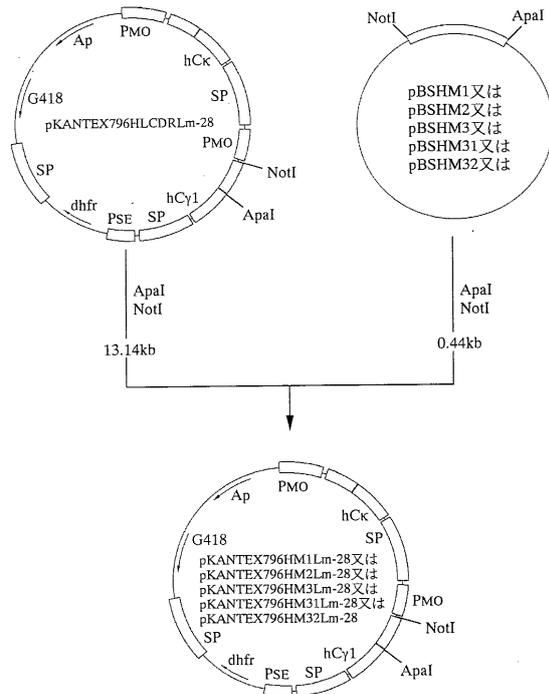
【図49】



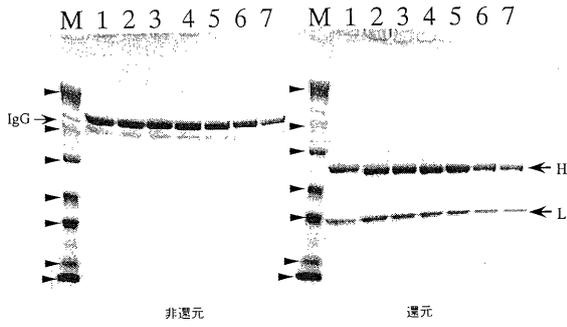
【図50】



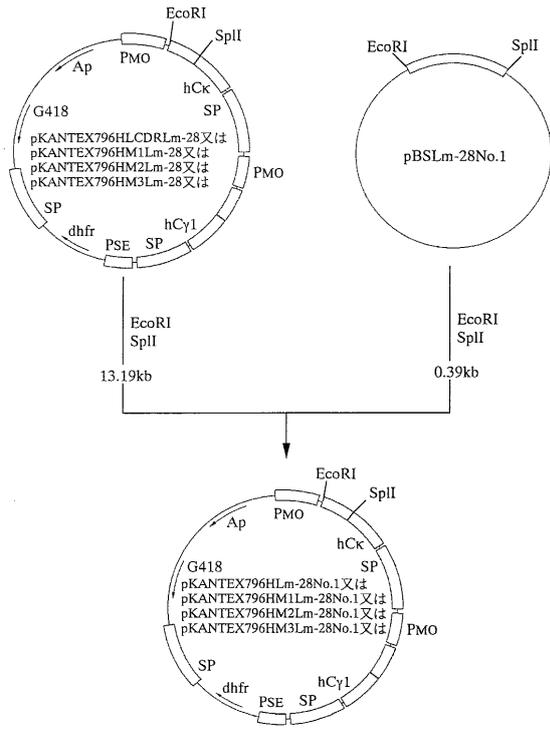
【図51】



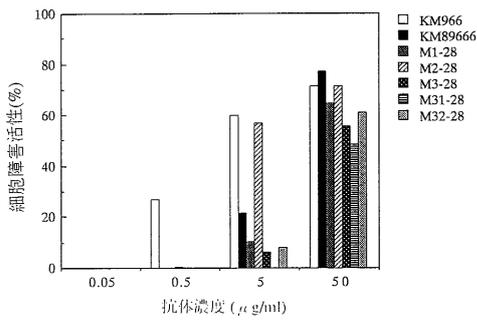
【 図 5 2 】



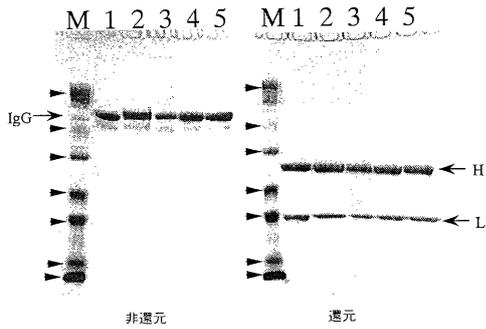
【 図 5 4 】



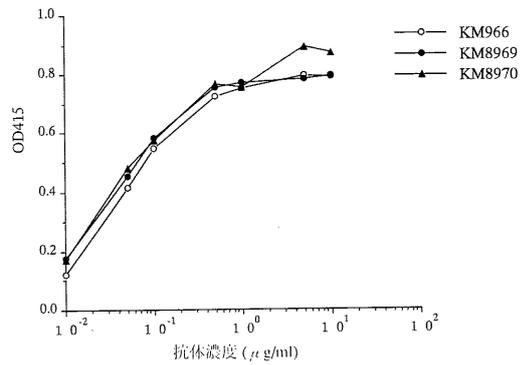
【 図 5 3 】



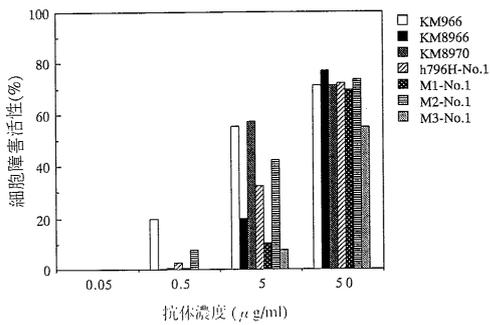
【 図 5 5 】



【 図 5 7 】



【 図 5 6 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
<i>C 1 2 P 21/08 (2006.01)</i>		C 1 2 N 15/00	Z N A A
<i>G 0 1 N 33/53 (2006.01)</i>		C 1 2 P 21/08	
<i>G 0 1 N 33/531 (2006.01)</i>		G 0 1 N 33/53	D
<i>G 0 1 N 33/574 (2006.01)</i>		G 0 1 N 33/531	A
<i>G 0 1 N 33/577 (2006.01)</i>		G 0 1 N 33/574	A
		G 0 1 N 33/577	B

- (56)参考文献 特表平4 - 5 0 2 4 0 8 (J P , A)
 特開平6 - 2 0 5 6 9 4 (J P , A)
 特表平8 - 5 0 3 4 6 8 (J P , A)

- (58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
 C12N15/00-15/90
 PUBMED, JSTPLUS
 CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS
 SWISSPLOT/PIR/GENESEQ
 GENBANK/EMBL/DDJB/GENESEQ