

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5299902号
(P5299902)

(45) 発行日 平成25年9月25日(2013.9.25)

(24) 登録日 平成25年6月28日(2013.6.28)

(51) Int.Cl.	F I	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C O 7 K 14/705 (2006.01)	C O 7 K 14/705	
C O 7 K 19/00 (2006.01)	C O 7 K 19/00	
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	1 O 2
請求項の数 14 (全 22 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2008-556119 (P2008-556119)	(73) 特許権者	000003311
(86) (22) 出願日	平成20年1月30日(2008.1.30)		中外製薬株式会社
(86) 国際出願番号	PCT/JP2008/051333		東京都北区浮間5丁目5番1号
(87) 国際公開番号	W02008/093688	(74) 代理人	100102978
(87) 国際公開日	平成20年8月7日(2008.8.7)		弁理士 清水 初志
審査請求日	平成23年1月28日(2011.1.28)	(74) 代理人	100102118
(31) 優先権主張番号	特願2007-20155 (P2007-20155)		弁理士 春名 雅夫
(32) 優先日	平成19年1月30日(2007.1.30)	(74) 代理人	100160923
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		弁理士 山口 裕孝
		(74) 代理人	100119507
			弁理士 刑部 俊
		(74) 代理人	100142929
			弁理士 井上 隆一
		(74) 代理人	100148699
			弁理士 佐藤 利光
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 キメラFcγレセプター及び該レセプターを用いたADCC活性測定方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

マウスFcレセプター3またはマウスFcレセプター4から選択されるマウスFcレセプター細胞外領域ならびに、ヒト鎖の膜貫通領域及び細胞内領域またはヒトFcレセプター3の膜貫通領域及び細胞内領域を含むキメラタンパク質。

【請求項2】

請求項1に記載のキメラタンパク質をコードする遺伝子。

【請求項3】

請求項2記載の遺伝子を含むベクター。

【請求項4】

請求項1に記載のキメラタンパク質を発現する細胞。

【請求項5】

細胞がヒト由来の細胞である請求項4記載の細胞。

【請求項6】

細胞がNK細胞である請求項4または5の記載の細胞。

【請求項7】

以下の工程を含む、抗体のADCC活性の測定方法。

(a) 被検抗体と該被検抗体が結合する抗原を発現する細胞を接触させる工程、

(b) (a)の被検抗体と請求項4から6のいずれかに記載の細胞を接触させる工程、

(c) 被検抗体のADCC活性を測定する工程。

【請求項 8】

被検抗体がマウス由来抗体である請求項 7 記載の測定方法。

【請求項 9】

以下の工程を含む A D C C 活性を有する抗体のスクリーニング方法。

- (a) 被検抗体と該被検抗体が結合する抗原を発現する細胞を接触させる工程、
- (b) (a)の被検抗体と請求項 4 から 6 のいずれかに記載の細胞を接触させる工程、
- (c) 被検抗体の A D C C 活性を測定する工程、
- (d) A D C C 活性を有する抗体を選択する工程。

【請求項 10】

被検抗体がマウス由来抗体である請求項 9 記載のスクリーニング方法。

10

【請求項 11】

A D C C 活性を測定する為の請求項 1 に記載のキメラタンパク質の使用。

【請求項 12】

A D C C 活性を測定する為の請求項 4 から 6 のいずれかに記載の細胞の使用。

【請求項 13】

A D C C 活性を有する抗体のスクリーニングの為の請求項 1 に記載のキメラタンパク質の使用。

【請求項 14】

A D C C 活性を有する抗体のスクリーニングの為の請求項 4 から 6 のいずれかに記載の細胞の使用。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明はヒトFc レセプターまたはヒト 鎖とマウスFc レセプターとのキメラFc レセプターに関する。

【背景技術】

【0002】

抗体依存性細胞傷害活性(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC)を薬効メカニズムとする抗体医薬品を開発する場合、ADCC活性が強いクローンを選択することが重要である。ADCC活性を評価するには、目的とする抗原を発現する細胞(標的細胞)と、その標的細胞を殺傷するエフェクター細胞が用いられる。エフェクター細胞はFc レセプター(Fc R)を介して、標的細胞に結合した抗体のFc領域を認識する。Fc Rから伝達されるシグナルにより、エフェクター細胞が標的細胞を殺傷する。Fc Rはその細胞膜貫通領域において 鎖と呼ばれる分子と結合し、 鎖を介してADCCシグナルを伝達する(非特許文献1-3)。ADCCを引き起こすFc Rとしては、マウスではFc R3およびFc R4、ヒトではFc R3が知られている。ヒトFc RとマウスFc Rの膜貫通領域のアミノ酸配列を比較すると、ヒトFc R3とマウスFc R3では5/21アミノ酸が異なり、ヒトFc R3とマウスFc R4では7/21アミノ酸が異なる。またヒト 鎖とマウス 鎖を比較すると、膜貫通領域では1/21アミノ酸で配列が異なる(非特許文献4)。

30

【0003】

ヒト抗体のADCC活性を測定する場合はエフェクター細胞としてヒトNK細胞が用いられる。ヒトNK細胞はヒト末梢血単核球(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)からNK Cell アイソレーションキットII(ミルテニールバイオテック株式会社)を用いて精製することができる。あるいはPBMCをそのままエフェクター細胞として用いることもできる。PBMCは購入することも可能であり(Cambrex Corporation)、ボランティアから採血した新鮮な末梢血から調製してもいい。しかしながら、これらの細胞をエフェクター細胞として用いる場合、ロット間差や調製に手間がかかることが欠点として挙げられる。

40

【0004】

これらの欠点を回避するため、ヒト抗体のADCC活性を測定する場合にはエフェクター細胞としてヒトNK細胞株を用いる系が開発されている。ヒトNK細胞株NK92(ATCC)はヒトFc

50

Rを発現しないが、ヒト 鎖を発現する（非特許文献5）。そこで、ヒトFc R3をヒトNK細胞株NK92で強制発現することによりADCC活性を誘導することが可能となった（非特許文献6、7）。その結果、調製の手間が大幅に軽減され、ロット間差が少なく正確な測定が可能となった。又、ヒトFc R3の細胞外領域とヒト 鎖の膜貫通領域および細胞内領域を融合したキメラ分子がヒト抗体に関してADCC活性を示すことが報告されている（非特許文献8）。

【0005】

一方、マウス抗体のADCC活性を測定する場合はエフェクター細胞としてマウス脾臓細胞が用いられる（非特許文献9、10）。マウス脾臓細胞を調製するには、マウスから脾臓を摘出し、赤血球を溶血し、interleukin 2でNK細胞を活性化させる必要がある。しかしこのようにして調製した脾臓細胞は抗体非依存的に標的細胞を殺傷する活性(natural killer活性)が強いため、標的細胞によってはADCC活性が測定できないことがある。またエフェクター細胞の調製に労力が必要である。

【0006】

ヒトNK細胞株を用いたヒト抗体のADCC活性測定系が開発されているのに対し、マウスNK細胞株は一般的に知られていない為、マウス抗体のADCC活性をNK細胞株を用いて簡便に測定する系はこれまでに確立されていない。又、上述のようにヒトとマウスではFc レセプター及び 鎖の配列が異なることから、マウスFc RをそのままヒトNK92細胞に発現させても、ヒトFc Rと同等の強さでヒト 鎖と結合できないと考えられる。

従って、マウス抗体のADCC活性を測定するためには上述のようにマウス脾臓細胞を調製する方法か、抗体のFc部分をヒト抗体のものと入れ替えたキメラ抗体を作製して測定するというように非常に手間のかかる方法で測定せざるを得なかった。

【0007】

なお、本出願の発明に関連する先行技術文献情報を以下に示す。

【非特許文献1】Blood 2003, 101, 4479

【非特許文献2】J Immunol 1991, 146, 1571

【非特許文献3】Immunol Lett 2004, 92, 199

【非特許文献4】J Biol Chem 2006, 281, 17108

【非特許文献5】Leukemia Res 2003, 27, 935

【非特許文献6】97th AACR annual meeting 2006, abstract number 635

【非特許文献7】J Biol Chem 2004, 279, 53907

【非特許文献8】Blood 2006, 107, 4669

【非特許文献9】Oncol Rep 2006, 15, 361

【非特許文献10】Cell Immunol 1988, 115, 257

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明はマウスFc レセプター細胞外領域とヒトFc レセプター膜貫通領域を含むキメラレセプター、またはマウスFc レセプター細胞外領域とヒト 鎖膜貫通領域を含むキメラレセプターを提供することを課題とする。又、本発明は該キメラレセプターを用いたマウス抗体のADCC活性を測定する為の方法を提供することを課題とする。さらに、本発明は該キメラレセプターを用いたADCC活性を有するマウス抗体のスクリーニング方法を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者らは、上記の課題を解決するために、マウスFc R3あるいはマウスFc R4の細胞外領域と、ヒト 鎖あるいはヒトFc R3の膜貫通領域 - 細胞内領域を融合したキメラ分子を作製し、ヒトNK92細胞に発現させた。その結果、マウスFc R3-ヒト 鎖、マウスFc R3-ヒトFc R3、マウスFc R4-ヒト 鎖、マウスFc R4-ヒトFc R3のいずれの組み合わせでもADCC活性を誘導しうることを見出された。以上の知見により、本発明者らは、マ

ウスFc レセプターとヒトFc レセプターのキメラレセプター、又はマウスFc レセプターとヒト 鎖のキメラレセプターを用いることにより、マウス抗体のADCC活性を測定することが可能であることを見出した。さらに、本発明者らは、マウスFc レセプターとヒトFc レセプター、又はマウスFc レセプターとヒト 鎖のキメラレセプターを用いることにより、ADCC活性を有するマウス抗体のスクリーニングが可能であることを見出した。

【 0 0 1 0 】

すなわち本願は以下の(1)から(20)を提供するものである。

(1) マウスFc レセプター細胞外領域及びヒト 鎖膜貫通領域を含むキメラタンパク質。

(2) ヒト 鎖細胞内領域をさらに含む(1)のキメラタンパク質。

10

(3) マウスFc レセプター細胞外領域及びヒトFc レセプター膜貫通領域を含むキメラタンパク質。

(4) ヒトFc レセプター細胞内領域をさらに含む(3)のキメラタンパク質。

(5) ヒトFc レセプターがヒトFc レセプター3である(3)または(4)のキメラタンパク質。

(6) マウスFc レセプターがマウスFc レセプター3である(1)から(5)いずれかのキメラタンパク質。

(7) マウスFc レセプターがマウスFc レセプター4である(1)から(5)いずれかのキメラタンパク質。

(8) (1)から(7)いずれかのキメラタンパク質をコードする遺伝子。

20

(9) (8)の遺伝子を含むベクター。

(10) (1)から(7)いずれかのキメラタンパク質を発現する細胞。

(11) 細胞がNK細胞である(10)の細胞。

(12) 細胞がヒト由来の細胞である(10)または(11)の細胞。

(13) 以下の工程を含む、抗体の細胞障害活性の測定方法。

(a) 被検抗体と該被検抗体が結合する抗原を発現する細胞を接触させる工程、

(b) (a)の被検抗体と(10)から(12)いずれかの細胞を接触させる工程、

(c) 被検抗体の細胞障害活性を測定する工程。

(14) 被検抗体がマウス由来抗体である(13)の測定方法。

(15) 以下の工程を含む細胞障害活性を有する抗体のスクリーニング方法。

30

(a) 被検抗体と該被検抗体が結合する抗原を発現する細胞を接触させる工程、

(b) (a)の被検抗体と(10)から(12)いずれかの細胞を接触させる工程、

(c) 被検抗体の細胞障害活性を測定する工程、

(d) 細胞障害活性を有する抗体を選択する工程。

(16) 被検抗体がマウス由来抗体である(15)のスクリーニング方法。

(17) 細胞障害活性を測定する為の(1)から(7)いずれかのキメラタンパク質の使用。

(18) 細胞障害活性を測定する為の(10)から(12)いずれかの細胞の使用。

(19) 細胞障害活性を有する抗体のスクリーニングの為の(1)から(7)いずれかのキメラタンパク質の使用。

40

(20) 細胞障害活性を有する抗体のスクリーニングの為の(10)から(12)いずれかの細胞の使用。

【 0 0 1 1 】

〔発明の実施の形態〕

本発明はマウスFc レセプターの細胞外領域およびヒトFc レセプターの膜貫通領域を含むキメラレセプターを提供する。さらに、本発明はマウスFc レセプターの細胞外領域およびヒト 鎖の膜貫通領域を含むキメラレセプターを提供する。

【 0 0 1 2 】

本発明のキメラレセプターは、細胞外領域にマウス抗体のFc領域が結合した場合、細胞内にシグナルを伝達する活性を有するレセプターであることが好ましい。

50

本発明で用いられるマウスFc レセプターは特に限定されず、どのようなマウスFc レセプターを用いてもよいが、好ましくはマウスFc レセプター3 (Fc R3) またはマウスFc レセプター4 (Fc R4) である。

マウスFc R3とマウスFc R4の発現分布を比較すると、マウスFc R3は主にNK細胞に、マウスFc R4はマクロファージと好中球に発現する(Immunity 2005, 23, 41)。またマウスFc R3はマウスIgG1、マウスIgG2aおよびマウスIgG2bに結合するのに対し、マウスFc R4はマウスIgG1には結合しない(Immunity 2005, 23, 41, Science 2005, 310, 1510)。従って、種々のマウス抗体のADCC活性を評価する際には、マウスIgG1でも測定できるマウスFc R3が好ましい。

【0013】

マウスFc レセプターをコードするDNAの塩基配列およびアミノ酸配列は公知の配列を用いることができる。マウスFc レセプター3及びマウスFc レセプター4をコードするDNAの塩基配列、アミノ酸配列としては、例えば、配列番号：1 (マウスFc レセプター3塩基配列)、配列番号：2 (マウスFc レセプター3アミノ酸配列)、配列番号：3 (マウスFc レセプター4塩基配列)、配列番号：4 (マウスFc レセプター4アミノ酸配列)に記載の配列を用いることができる。配列番号：2に記載のアミノ酸配列のうち、マウスFc レセプター3細胞外領域はアミノ酸番号31から212であり、配列番号：4に記載のアミノ酸配列のうち、マウスFc レセプター4細胞外領域はアミノ酸番号19から201である。

【0014】

受容体の細胞外領域は、細胞外領域全体であってもよいし、その一部であってもよいが、抗体のFc領域への結合活性などの活性を適切に反映できる点で細胞外領域全体を用いることが好ましい。受容体の細胞外領域の一部を用いる場合、抗体のFc領域への結合活性を維持していることが好ましい。本発明のキメラレセプターに用いられるマウスFc レセプター細胞外領域は、抗体のFc領域への結合能を有する限り、アミノ酸の置換、欠失、挿入、付加があってもよい。あるタンパク質と機能的に同等なタンパク質を調整するための、当業者によく知られた方法としては、タンパク質に変異を導入する方法が知られている。例えば、当業者であれば、部位特異的変異誘発法 (Hashimoto-Gotoh, T. et al. (1995) Gene 152, 271-275, Zoller, MJ, and Smith, M. (1983) Methods Enzymol. 100, 468-500, Kramer, W. et al. (1984) Nucleic Acids Res. 12, 9441-9456, Kramer W, and Frit z HJ (1987) Methods. Enzymol. 154, 350-367, Kunkel, TA (1985) Proc Natl Acad Sci USA. 82, 488-492, Kunkel (1988) Methods Enzymol. 85, 2763-2766) などを用いて作製することができる。このような変異体における、変異するアミノ酸数は、通常、50アミノ酸以内であり、好ましくは30アミノ酸以内であり、さらに好ましくは20アミノ酸以内であり、さらに好ましくは10アミノ酸以内であり、さらに好ましくは5アミノ酸以内である。

【0015】

変異するアミノ酸残基においては、アミノ酸側鎖の性質が保存されている別のアミノ酸に変異されることが好ましい。例えば、アミノ酸側鎖の性質としては、疎水性アミノ酸 (A, I, L, M, F, P, W, Y, V)、親水性アミノ酸 (R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S, T)、脂肪族側鎖を有するアミノ酸 (G, A, V, L, I, P)、水酸基含有側鎖を有するアミノ酸 (S, T, Y)、硫黄原子含有側鎖を有するアミノ酸 (C, M)、カルボン酸及びアミド含有側鎖を有するアミノ酸 (D, N, E, Q)、塩基含有側鎖を有するアミノ酸 (R, K, H)、芳香族含有側鎖を有するアミノ酸 (H, F, Y, W) を挙げることができる (括弧内はいずれもアミノ酸の一文字表記を表す)。

【0016】

あるアミノ酸配列に対する1又は複数個のアミノ酸残基の欠失、付加及び/又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列を有するポリペプチドがその生物学的活性を維持することはすでに知られている (Mark, D. F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1984) 81, 5662-5666, Zoller, M. J. & Smith, M. Nucleic Acids Research (19

10

20

30

40

50

82) 10, 6487-6500、Wang, A. et al., Science 224, 1431-1433、Dalbadie-McFarland, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1982) 79, 6409-6413)。

【0017】

本発明のキメラレセプターに用いられるマウスFc レセプター細胞外領域は、抗体のFc領域への結合能を有する限り、マウスFc レセプター（例えば、マウスFc レセプター3、マウスFc レセプター4など）と高い相同性を有するポリペプチドでもよい。本発明において高い相同性を有するポリペプチドとは、通常、70%以上、好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上の同一性を有するポリペプチドをいう。ポリペプチドの相同性を決定するには、文献（Wilbur, W. J. and Lipman, D. J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1983) 80, 726-730）に記載のアルゴリズムにしたがえばよい。

10

【0018】

また、マウスFc レセプターと相同性の高いポリペプチドをコードするDNAを単離するためには、通常ストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーション反応を行なってもよい。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は当業者であれば、適宜選択することができる。一例を示せば、25%ホルムアミド、より厳しい条件では50%ホルムアミド、4xSSC、50mM Hepes pH7.0、10xデンハルト溶液、20µg/ml変性サケ精子DNAを含むハイブリダイゼーション溶液中、42℃で一晩プレハイブリダイゼーションを行った後、標識したプローブを添加し、42℃で一晩保温することによりハイブリダイゼーションを行う。その後の洗浄における洗浄液および温度条件は、「1xSSC、0.1% SDS、37℃」程度で、より

20

【0019】

単離されたDNAの相同性は、アミノ酸配列全体で、少なくとも50%以上、さらに好ましくは70%以上、さらに好ましくは90%以上（例えば、95%、96%、97%、98%、99%以上）の配列の同一性を有する。配列の相同性は、BLASTN（核酸レベル）やBLASTX（アミノ酸レベル）のプログラム（Altschul et al. J. Mol. Biol., 215: 403-410, 1990）を利用して決定することができる。該プログラムは、Karlin及びAltschulによるアルゴリズムBLAST（Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:2264-2268, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 5873-5877, 1993）に基づいている。BLASTNによって塩基配列を解析する場合には、パラメーターは例えばscore = 100、wordlength = 12とする。また、BLASTXによってアミノ酸配列を解析する場合には、パラメーターは例えばscore = 50、wordlength = 3とする。また、Gapped BLASTプログラムを用いて、アミノ酸配列を解析する場合は、Altschulら（Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402, 1997）に記載されているように行うことができる。BLASTとGapped BLASTプログラムを用いる場合には、各プログラムのデフォルトパラメーター

30

40

を用いる。これらの解析方法の具体的な手法は公知である。
また、マウスFc レセプターをコードするDNA（配列番号：1、3）の配列情報を基に合成したプライマーを用いる遺伝子増幅法、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法を利用して、マウスFc レセプターと相同性の高いポリペプチドをコードするDNAを単離することも可能である。

【0020】

本発明のキメラレセプターにおいては、膜貫通領域としてヒトFc レセプター膜貫通領域またはヒト 鎖膜貫通領域が用いられる。

本発明で用いられるヒトFc レセプターは特に限定されず、どのようなヒトFc レセプターでもよいが、好ましくはヒトFc レセプター3である。ヒトFc レセプターをコード

50

するDNAの塩基配列およびアミノ酸配列は公知の配列を用いることができる。ヒトFc レセプター3をコードするDNAの塩基配列、アミノ酸配列としては、例えば、配列番号：5（ヒトFc レセプター3塩基配列）、配列番号：6（ヒトFc レセプター3アミノ酸配列）の配列を用いることができる。配列番号：6に記載のアミノ酸配列のうち、膜貫通領域はアミノ酸番号207から229である。

また、ヒト 鎖をコードするDNAの塩基配列、アミノ酸配列は公知であり、例えば、配列番号：7（ヒト 鎖塩基配列）、配列番号：8（ヒト 鎖アミノ酸配列）の配列を用いることができる。配列番号：8に記載のアミノ酸配列のうち、膜貫通領域はアミノ酸番号24から44である。

【0021】

受容体の膜貫通領域は膜貫通領域全体であってもよいし、その一部であってもよいが、シグナル伝達活性などの活性を適切に反映できる点で膜貫通領域全体を用いることが好ましい。膜貫通領域の一部を用いる場合、シグナル伝達活性を維持していることが好ましい。本発明のキメラレセプターに用いられる膜貫通領域は、アミノ酸の置換、欠失、挿入、付加があってもよい。又、本発明に用いられる膜貫通領域は、これらと相同性の高いポリペプチドであってもよい。アミノ酸の置換、欠失、挿入、付加および相同性の高いポリペプチドについては上述に記載のとおりである。アミノ酸が置換、欠失、挿入及び/又は付加されたポリペプチド、および相同性の高いポリペプチドは膜貫通領域のシグナル伝達活性を維持していることが好ましい。

【0022】

本発明のマウスFc レセプター細胞外領域とヒトFc レセプター膜貫通領域を含むキメラレセプターまたはマウスFc レセプター細胞外領域とヒト 鎖膜貫通領域を含むキメラレセプターは、さらに細胞内領域を含むことが好ましい。

本発明のキメラレセプターに用いられる細胞内領域は特に限定されず、どのような細胞内領域でもよいが、膜貫通領域としてヒトFc レセプター膜貫通領域が用いられる場合は細胞内領域としてヒトFc レセプター細胞内領域が用いられることが好ましく、膜貫通領域としてヒト 鎖が用いられる場合は細胞内領域としてヒト 鎖細胞内領域が用いられることが好ましい。

ヒトFc レセプター3細胞内領域は、例えば、配列番号：6に記載のアミノ酸配列のうち、アミノ酸番号230から254の領域を用いることができる。ヒト 鎖の細胞内領域は、例えば、配列番号：8に記載のアミノ酸配列のうちアミノ酸番号45から86の領域を用いることができる。

【0023】

受容体の細胞内領域は細胞内領域全体であってもよいし、その一部であってもよいが、シグナル伝達活性などの活性を適切に反映できる点で細胞内領域全体を用いることが好ましい。細胞内領域の一部を用いる場合、シグナル伝達活性を維持していることが好ましい。本発明のキメラレセプターに用いられる細胞内領域は、アミノ酸の置換、欠失、挿入、付加があってもよい。又、本発明に用いられる細胞内領域は、これらと相同性の高いポリペプチドであってもよい。アミノ酸の置換、欠失、挿入、付加および相同性の高いポリペプチドについては上述のとおりである。アミノ酸が置換、欠失、挿入及び/又は付加されたポリペプチド、および相同性の高いポリペプチドは細胞内領域のシグナル伝達活性を維持していることが好ましい。

【0024】

本発明のキメラレセプターの好ましい態様として、以下の(a)から(f)のキメラレセプターを挙げることができる。

(a) 配列番号：10のアミノ酸配列を有するキメラレセプター（マウスFc R3細胞外領域と、ヒトFc R3膜貫通領域および細胞内領域を含むキメラレセプター；マウスFc R3 - ヒトFc R3）。

(b) 配列番号：12のアミノ酸配列を有するキメラレセプター（マウスFc R3細胞外領域と、ヒト 鎖膜貫通領域および細胞内領域を含むキメラレセプター；マウスFc R3 - ヒ

10

20

30

40

50

ト鎖)。

(c) 配列番号：14のアミノ酸配列を有するキメラレセプター(マウスFc R4細胞外領域と、ヒトFc R3膜貫通領域および細胞内領域を含むキメラレセプター；マウスFc R4 - ヒトFc R3)。

(d) 配列番号：16のアミノ酸配列を有するキメラレセプター(マウスFc R4細胞外領域と、ヒト鎖膜貫通領域および細胞内領域を含むキメラレセプター；マウスFc R4 - ヒト鎖)。

(e) 上記(a)から(d)のキメラレセプターにおいて、1又は複数のアミノ酸配列が置換、欠失、付加および/または挿入されたレセプターであって、(a)から(d)のキメラレセプターと同等の活性を有するキメラレセプター。

(f) 上記(a)から(d)のキメラレセプターのアミノ酸配列と高い相同性を有するレセプターであって、(a)から(d)のキメラレセプターと同等の活性を有するキメラレセプター。

アミノ酸の置換、欠失、付加、挿入、および高い相同性については上述のとおりである。

【0025】

本発明において、(a)から(d)のキメラレセプターと「同等の活性」を有するとは、同等の生物学的活性や生化学的活性を有することをいう。本発明のキメラレセプターの生物学的活性や生化学的活性としては、マウス抗体のFc領域への結合能やADCCシグナル伝達能を挙げることができる。

本発明のキメラレセプターのマウス抗体のFc領域への結合活性は当業者に公知の方法で測定することが可能であり、例えば、ELISA、BIACORE、ウェスタンブロットなどの方法により測定することが可能である。

【0026】

本発明のキメラレセプターがADCCシグナルを伝達するか否かは当業者に公知の方法で確認することが可能であり、例えば、キメラレセプターを発現するヒトNK細胞(ヒトNK92細胞など)をエフェクター細胞として使用し、該NK細胞と標的細胞上に発現した抗原に結合したマウス抗体とを接触させ、ADCC活性を測定することにより確認することができる。より具体的には、後述の方法、または本発明の実施例に記載の方法で確認することが可能である。

【0027】

本発明のキメラレセプターをコードするDNA、及び該DNAの転写産物RNAもまた、本発明に含まれる。本発明のキメラレセプターをコードするDNAは当業者に公知の方法により調整することができる。例えば、本発明で細胞外領域、膜貫通領域として用いられるレセプターを発現している細胞よりcDNAライブラリを作製し、既知のDNA配列の一部をプローブにしてハイブリダイゼーションを行なうことにより、細胞外領域や膜貫通領域をコードするDNAを調整できる。それぞれ調整されたDNAを結合することにより本発明のキメラレセプターをコードするDNAを調整することが可能である。

【0028】

本発明のキメラレセプターをコードするDNAの塩基配列の例としては、配列番号：9(マウスFc R3 - ヒトFc R3)、配列番号：11(マウスFc R3 - ヒト鎖)、配列番号：13(マウスFc R4 - ヒトFc R3)、配列番号：15(マウスFc R4 - ヒト鎖)に記載の塩基配列を挙げることができる。

【0029】

調整された本発明のキメラレセプターをコードするDNAをベクターDNAと連結する。さらに、これより組換えベクターを作製し、大腸菌等に導入してコロニーを選択して所望の組換えベクターを調整することができる。DNAを保持するためのベクターDNAには、公知のもの(例えばpUC19、pBluescriptなど)を用いることができる。また、大腸菌は公知のもの(例えばDH5、JM109など)を用いることができる。目的とするDNAの塩基配列は公知の方法、例えばジデオキシヌクレオチドチェーンターミネーション法により確認することができる。又、自動塩基配列決定装置などを用いることもできる。

10

20

30

40

50

【0030】

また、本発明のDNAにおいては、発現に使用する宿主のコドン使用頻度を考慮して、より発現効率の高い塩基配列を設計することもできる(Grantham, R. et al., *Nucleic Acids Research* (1981) 9, r43-74)。また、本発明のDNAは市販のキットや公知の方法によって改変することができる。改変としては、例えば、制限酵素により消化、合成オリゴヌクレオチドや適当なDNAフラグメントの挿入、リンカーの付加、開始コドン及び/又は終止コドンの挿入、などが挙げられる。

【0031】

本発明のキメラレセプター発現のためにはプロモーターなどの発現制御領域のもとでキメラレセプターをコードするDNAを含む発現ベクターを作製する。この発現ベクターにより宿主細胞を形質転換して細胞にキメラレセプターを発現させる。ベクターにはエンハンサーなどが含まれていてもよい。

10

【0032】

宿主細胞での発現のために有用なプロモーターとしては、例えば、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、SV40などのウイルスプロモーターや、哺乳動物細胞由来のプロモーターなどを挙げる事ができる。

宿主細胞中への遺伝子導入のため、発現ベクターには選択マーカー遺伝子を含むことができる。

宿主細胞中への遺伝子導入は、リン酸カルシウム法、リポフェクション法、エレクトロポレーション法などの公知の方法により行なうことができる。

20

【0033】

本発明は、本発明のキメラレセプターをコードするDNAを含有するベクターを提供する。本発明で用いられるベクターは特に限定されず、いかなるベクターでもよい。ベクターは当業者が適宜選択することができ、例えば、pCOS1(W098/13388)、pME18S(Med. Immunol. 20, 27-32 (1990))、pEF-BOS(*Nucleic Acids Res.* 18, 5322 (1990))、pCDM8(*Nature* 329, 840-842 (1987))、pRSV-neo、pcDNA1/Amp(Invitrogen)、pcDNA1、pAMoERC3Sc、pCDM8(*Nature* 329, 840 (1987))、pAGE107(*Cytotechnology* 3, 133 (1990))、pREP4(Invitrogen)、pAGE103(*J. Biochem.* 101, 1307 (1987))、pAMoA、pAS3-3、pCAGGS(*Gene* 108, 193-200 (1991))、pBK-CMV、pcDNA3.1(Invitrogen)、pZeoSV(Stratagene)などを用いることができる。

30

【0034】

本発明は、本発明のキメラレセプターを発現する細胞に関する。本発明のキメラレセプターを発現する細胞は、当業者に公知の方法で作製することが可能であり、例えば、本発明の上記ベクターを細胞に導入することにより作製することが可能である。本発明で用いられる細胞は特に限定されず、いかなる細胞を用いてもよいが、エフェクター細胞が好ましく、好ましくはNK細胞であり、特に好ましくはNK92細胞である。又、本発明で用いられる細胞はヒト由来細胞であることが好ましく、特にヒト由来NK細胞が好ましい。ヒトNK細胞は公知のヒトNK細胞を用いることもできるし、ヒトNK細胞を作製して用いることもできる。本発明で用いられる細胞はヒト鎖を発現する細胞でもヒト鎖を発現しない細胞でもよいが、ヒト鎖を発現する細胞であることが好ましい。ヒト鎖を発現しない細胞やヒト鎖の発現量が少ない細胞の場合、ヒト鎖をコードする遺伝子を導入して強制的にヒト鎖を発現させてもよい。

40

【0035】

本発明は、本発明のキメラレセプターを用いた抗体の細胞障害活性の測定方法を提供する。

細胞障害活性の測定は、本発明のキメラレセプターを用いて、通常の細胞障害活性の測定と同様に行なうことが可能である。

例えば、以下の工程を含む方法により行なうことができる。

(a) 被検抗体と該被検抗体が結合する抗原を発現する細胞を接触させる工程、

(b) (a)の被検抗体と本発明のキメラレセプターを発現する細胞を接触させる工程

50

(c) 被検抗体の細胞障害活性を測定する工程。

【0036】

本発明において測定とは、定量的または定性的な測定を含む。定性的な測定としては、例えば、単に被検抗体が細胞障害活性を有するか否かの測定、被検抗体が一定レベル以上の細胞障害活性を有するか否かの測定、被検抗体の細胞障害活性をコントロール抗体（陽性コントロール、陰性コントロール、など）と比較する測定などを挙げることができる。一方、定量的な検出としては、例えば、被検抗体の細胞障害活性の絶対値や相対値の測定、被検抗体の医薬品としての有用性の測定などを挙げることができる。

【0037】

又、本発明は、本発明のキメラレセプターを用いた、細胞障害活性を有する抗体のスクリーニング方法を提供する。

具体的には、以下の工程を含む方法により細胞障害活性を有する抗体のスクリーニングを行なうことが可能である。

- (a) 被検抗体と該被検抗体が結合する抗原を発現する細胞を接触させる工程、
- (b) (a)の被検抗体と本発明のキメラレセプターを発現する細胞を接触させる工程

- (c) 被検抗体の細胞障害活性を測定する工程、
- (d) 細胞障害活性を有する抗体を選択する工程。

【0038】

本発明のスクリーニング方法は、細胞障害活性を有しているか否か不明な被検抗体から細胞障害活性を有する抗体のスクリーニング、細胞障害活性を有している被検抗体から活性の高い抗体のスクリーニング、活性を有する被検抗体または活性を有するか否か不明な被検抗体から医薬品として有用な抗体のスクリーニング、など如何なるスクリーニング方法でもよい。

本発明の方法において、測定される細胞障害活性は、通常、抗体依存性細胞性細胞障害活性（ADCC活性）である。

本発明の方法で用いられる被検抗体は特に限定されず、いかなる抗体を用いてもよいが、通常、本発明のキメラレセプターの細胞外領域と結合可能な領域を有する。被検抗体の好ましい例として、マウス抗体またはマウス抗体由来のFc領域を有する抗体を挙げることができる。被検抗体のFc領域のアミノ酸配列は改変されていてもよく、又、抗体の糖鎖が改変されていてもよい。

【0039】

被検抗体が結合する抗原は特に限定されないが、膜タンパク質であることが好ましい。膜タンパク質の例としては、受容体、輸送タンパク質、イオンチャンネル、細胞膜抗原などを挙げることができる。

本発明において、被検抗体が結合する抗原の好ましい例として、疾患に関連した抗原を挙げることができる。疾患に関連した抗原とは、特定の疾患において発現が確認されている抗原であり、好ましくは正常状態と比較して特定の疾患において発現量が増加している抗原である。疾患に関連した抗原の例として、癌において高発現しているタンパク質や自己免疫疾患において高発現しているタンパク質などを挙げることができる。

【0040】

抗原を発現する細胞は如何なる細胞でもよく、被検抗体が結合する抗原をもともと発現する細胞でもよいし、該抗原をコードする遺伝子が導入されて抗原が強制的に発現される細胞でもよい。本発明の方法で用いられる抗原の好ましい例としては、癌細胞、B細胞などの自己免疫疾患関連細胞などを挙げることができる。

本発明の方法においては、通常、まず被検抗体と該被検抗体が結合する抗原を発現する細胞を接触させ、その後、抗原を発現する細胞に結合した被検抗体に本発明のキメラレセプターを発現する細胞を接触させる。しかしながら、被検抗体、抗原を発現する細胞、本発明のキメラレセプターを発現する細胞を接触させる順序は上述の順序に限定されず、被

10

20

30

40

50

検抗体、抗原を発現する細胞および本発明のキメラレセプターを発現する細胞を同時に接触させてもよいし、被検抗体と本発明のキメラレセプターを発現する細胞を接触させた後に抗原を発現する細胞を接触させてもよい。

【0041】

抗体がADCC活性を有するか否かは公知の方法により測定することができる（例えば、Current protocols in Immunology, Chapter7. Immunologic studies in humans, Editor, John E. Coligan et al., John Wiley & Sons, Inc.,(1993)等）。

具体的には、以下の方法により行なうことが可能である。

まずエフェクター細胞、標的細胞の調製が実施される。

(1) エフェクター細胞の調製

本発明のキメラレセプター発現細胞を細胞濃度 5×10^6 /mlに調製することによって、エフェクター細胞が調製できる。

(2) 標的細胞の調製

被検抗体が結合する抗原を発現する細胞を0.2 mCiの⁵¹Cr-クロム酸ナトリウム（GEヘルスケアバイオサイエンス社製）とともに、10% FBS含有RPMI1640培地中で37℃にて1時間培養することにより該標的細胞を放射性標識できる。放射性標識後、細胞を10% FBS含有RPMI1640培地にて3回洗浄し、細胞濃度を 2×10^5 /mlに調製することによって、該標的細胞が調製できる。

【0042】

ADCC活性の強度は下記に述べる方法により測定できる。96ウェルU底プレート（Becton Dickinson社製）に、標的細胞と、被検抗体を50 μlずつ加え、氷上にて15分間反応させる。その後、エフェクター細胞として本発明のキメラレセプターを発現する細胞を100 μl加え、炭酸ガスインキュベーター内で4時間培養する。抗体の終濃度は0または10 μg/mlとする。培養後、100 μlの上清を回収し、ガンマカウンター（COBRA II AUTO-GAMMA、MODEL D5005、Packard Instrument Company社製）で放射活性を測定する。細胞傷害活性(%)は得られた値を使用して(A-C) / (B-C) × 100の計算式に基づいて計算できる。Aは各試料における放射活性(cpm)、Bは1% NP-40 (nacal tesque社製)を加えた試料における放射活性(cpm)、Cは標的細胞のみを含む試料の放射活性(cpm)を示す。

本発明のスクリーニング方法により選択される細胞障害活性を有する抗体は、各種疾患の治療や予防のための医薬として用いることが可能である。例えば、癌や自己免疫疾患などの疾患に対する治療剤、予防剤として用いることが可能である。

【0043】

本発明はさらに、本発明のキメラレセプターを用いた細胞障害活性を有する抗体の製造方法を提供する。具体的には以下の工程を含む方法により製造することが可能である。

(a) 被検抗体と該被検抗体が結合する抗原を発現する細胞を接触させる工程、

(b) (a)の被検抗体と本発明のキメラレセプターを発現する細胞を接触させる工程、

(c) 被検抗体の細胞障害活性を測定する工程、

(d) 細胞障害活性を有する抗体を選択する工程、

(e) 選択された抗体をコードする遺伝子を含む発現ベクターを作製する工程、

(f) (e)のベクターを宿主細胞に形質転換する工程、

(g) (f)の宿主細胞を培養する工程、

(h) (g)で培養した宿主細胞から抗体を回収する工程。

選択された抗体をコードする遺伝子は、選択された抗体と全領域において同一のアミノ酸配列を有する抗体をコードする遺伝子でもよいし、選択された抗体と一部の領域において同一のアミノ酸配列を有する抗体をコードする遺伝子でもよい。選択された抗体と一部の領域において同一のアミノ酸配列を有する抗体の好ましい例としては、選択された抗体と同一の可変領域を有する抗体または選択された抗体と同一の相補鎖決定領域(complementarity determining region;CDR)を有する抗体を挙げることができる。可変領域またはCDR以外の領域を他の抗体由来の配列に置換する方法は公知である（欧州特許公開EP 2

10

20

30

40

50

39400、国際公開WO 96/02576参照)。

【0044】

これら抗体をヒトや哺乳動物の医薬として使用する場合には、それ自体を直接患者に投与する以外に、公知の製剤学的方法により製剤化して投与を行なうことも可能である。例えば、必要に応じて、錠剤、カプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、又は懸濁液剤の注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、薬理学上許容される担体もしくは媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、香味剤、ベヒクル、防腐剤、結合剤などと適宜組み合わせ、一般に認められた製薬実施に要求される単位容量形態で混和することによって製剤化することが考えられる。これら製剤における有効成分は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。錠剤、カプセル剤に混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガントガム、アラビアゴムのよう結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸のような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖又はサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油又はチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記の材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用蒸留水のようなベヒクルを用いて通常の製剤実施に従って処方することができる。

10

【0045】

注射用の水溶液としては、例えば生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液、例えばD-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウムが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えばアルコール、具体的にはエタノール、ポリアルコール、例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、非イオン性界面活性剤、例えばポリソルベート80、HCO-50などと併用してもよい。

20

【0046】

油性液としてはゴマ油、大豆油などが挙げられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールと併用してもよい。また、緩衝剤、例えばリン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液、無痛化剤、例えば塩酸プロカイン、安定剤、例えばベンジルアルコール、フェノール、酸化防止剤などと配合してもよい、調整された注射液は通常、適当なアンブールに充填される。

30

患者への投与は、例えば動脈内注射、静脈内注射、皮下注射などのほか、鼻腔内の、経気管支的、筋肉内、経皮的、又は経口的に当業者に公知の方法により行ないうる。

なお本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

【図面の簡単な説明】

【0047】

【図1】フローサイトメトリーによるDSG3-Ba/F3細胞におけるDSG3発現の測定結果を示す図である。太線はDSG3モノクローナル抗体(R&D Systems社)、実線は陰性対照抗体(マウスIgG2a、Becton Dickinson社)、点線は一次抗体なし、を示す。

【図2】マウス脾臓細胞をエフェクター細胞とした場合のADCC活性測定結果を示す図である。

40

【図3】マウスFc R4 - ヒトFc R3、マウスFc R4 - ヒト 発現NK92細胞をエフェクター細胞とした場合のADCC活性測定結果を示す図である。

【図4】マウスFc R3 - ヒト 発現NK92細胞をエフェクター細胞とした場合のADCC活性測定結果を示す図である。

【図5】マウスFc R3 - ヒトFc R3発現NK92細胞をエフェクター細胞とした場合のADCC活性測定結果を示す図である。

【図6】ヒトFc R3発現NK92細胞をエフェクター細胞とした場合のADCC活性測定結果を示す図である。

【図7】抗claudin3モノクローナル抗体のADCC活性測定結果を示す図である。

50

【実施例】

【0048】

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

【実施例1】Fc R発現NK92細胞株の樹立

1-1) マウスFc R4発現ベクターの構築

Mouse spleen cDNA (Clontech社)を鋳型とし、制限酵素EcoRI配列を含むセンスプライマー(mFcR4-EcoRI-F、配列番号：17)、制限酵素NotI配列を含むアンチセンスプライマー(mFcR4-NotI-R、配列番号：18)を用いたPCRによりマウスFc R4遺伝子を増幅し、制限酵素EcoRIおよびNotIで処理した後、哺乳細胞発現用プラスミド(pMCDN)のEcoRI-NotIサイトにクローニングした(pMCDN/mFcR4)。pMCDNはマウスCMVプロモーター(Accession No. U68299)による制御下で誘導発現が可能で、ネオマイシン耐性遺伝子とDHFR遺伝子が組み込まれたベクターである。クローニングした塩基配列はABI3730 DNAシーケンサーを用いたシーケンシングによって確認した。配列番号：3にマウスFc R4の塩基配列を、配列番号：4にマウスFc R4のアミノ酸配列を示す。得られた配列は公知の配列(NM_144559)と比較して422番目の塩基がCからTに変わっていたため、141番目のアミノ酸がセリンからロイシンに変化していた。

10

【0049】

1-2) マウスFc R3発現ベクターの構築

Mouse spleen cDNA (Clontech社)を鋳型とし、制限酵素EcoRI配列を含むセンスプライマー(mFcR3-EcoRI-F、配列番号：19)、制限酵素NotI配列を含むアンチセンスプライマー(mFcR3-NotI-R、配列番号：20)を用いたPCRによりマウスFc R3遺伝子を増幅し、制限酵素EcoRIおよびNotIで処理した後、プラスミドpMCDNのEcoRI-NotIサイトにクローニングした(pMCDN/mFcR3)。クローニングした塩基配列はABI3730 DNAシーケンサーを用いたシーケンシングによって確認した。配列番号：1にマウスFc R3の塩基配列を、配列番号：2にマウスFc R3のアミノ酸配列を示す。

20

【0050】

1-3) マウスFc R4-ヒトFc R3キメラ発現ベクターの構築

マウスFc R4遺伝子が組み込まれたプラスミドpMCDN/mFcR4を鋳型とし、センスプライマー(mFcR4-EcoRI-F)、アンチセンスプライマー(m4h3-mR、配列番号：21)を用いたPCRによりマウスFc R4の細胞外領域を増幅した。次にヒトFc R3遺伝子(塩基配列：配列番号：5、アミノ酸配列：配列番号：6)が組み込まれたプラスミドpMCDN(pMCDN/hFcR3)を鋳型とし、センスプライマー(m4h3-hF、配列番号：22)、アンチセンスプライマー(ベクタープライマー：pMCM-R1、配列番号：23)を用いたPCRによりヒトFc R3の膜貫通領域および細胞内領域を増幅した。これらの増幅産物を等量ずつ混合した後、mFcR4-EcoRI-FプライマーおよびpMCM-R1プライマーで再び増幅し、制限酵素EcoRIおよびNotIで処理し、プラスミドpMCDNのEcoRI-NotIサイトに組み込むことによりマウスFc R4-ヒトFc R3キメラ(マウスFc R4-ヒトFc R3)発現ベクターを構築した(pMCDN/mFcR4-hFcR3)。クローニングした塩基配列はABI3730 DNAシーケンサーを用いたシーケンシングによって確認した。配列番号：13にマウスFc R4-ヒトFc R3の塩基配列を、配列番号：14にマウスFc R4-ヒトFc R3のアミノ酸配列を示す。

30

40

【0051】

1-4) マウスFc R4-ヒト鎖キメラ発現ベクターの構築

マウスFc R4遺伝子が組み込まれたプラスミドpMCDN/mFcR4を鋳型とし、センスプライマー(mFcR4-EcoRI-F)、アンチセンスプライマー(m4hG-mR、配列番号：24)を用いたPCRによりマウスFc R4の細胞外領域を増幅した。次にhuman spleen cDNA (Clontech社)を鋳型とし、センスプライマー(m4hG-hF、配列番号：25)、アンチセンスプライマー(m4hG-hR、配列番号：26)を用いたPCRによりヒト鎖(塩基配列：配列番号：7、アミノ酸配列：配列番号：8)の細胞外領域の2アミノ酸、膜貫通領域および細胞内領域を増幅した。これらの増幅産物を等量ずつ混合した後、mFcR4-EcoRI-Fプライマーおよびm4hG-hR

50

プライマーで再び増幅し、制限酵素EcoRIで処理し、プラスミドpMCDNのEcoRI-EcoRVサイトに組み込むことによりマウスFc R4-ヒト鎖キメラ(マウスFc R4-ヒト)発現ベクターを構築した(pMCDN/mFcR4-hG)。クローニングした塩基配列はABI3730 DNAシーケンサーを用いたシーケンシングによって確認した。配列番号：15にマウスFc R4-ヒトの塩基配列を、配列番号：16にマウスFc R4-ヒトのアミノ酸配列を示す。

【0052】

1-5) マウスFc R3-ヒトFc R3キメラ発現ベクターの構築

マウスFc R3遺伝子が組み込まれたプラスミドpMCDN/mFcR3を鋳型とし、センスプライマー(mFcR3-EcoRI-F)、アンチセンスプライマー(m3h3-mR、配列番号：27)を用いたPCRによりマウスFc R3の細胞外領域を増幅した。次にマウスFc R4-ヒトFc R3遺伝子が組み込まれたプラスミドpMCDN/mFcR4-hFcR3を鋳型とし、センスプライマー(m3h3-hF、配列番号：28)、アンチセンスプライマー(pMCM-R1)を用いたPCRによりヒトFc R3の膜貫通領域および細胞内領域を増幅した。これらの増幅産物を等量ずつ混合した後、mFcR3-EcoRI-FプライマーおよびpMCM-R1プライマーで再び増幅し、制限酵素EcoRIおよびNotIで処理し、プラスミドpMCDNのEcoRI-NotIサイトに組み込むことによりマウスFc R3-ヒトFc R3キメラ(マウスFc R3-ヒトFc R3)発現ベクターを構築した(pMCDN/mFcR3-hFcR3)。クローニングした塩基配列はABI3730 DNAシーケンサーを用いたシーケンシングによって確認した。配列番号：9にマウスFc R3-ヒトFc R3の塩基配列を、配列番号：10にマウスFc R3-ヒトFc R3のアミノ酸配列を示す。

【0053】

1-6) マウスFc R3-ヒト鎖キメラ発現ベクターの構築

マウスFc R3遺伝子が組み込まれたプラスミドpMCDN/mFcR3を鋳型とし、センスプライマー(mFcR3-EcoRI-F)、アンチセンスプライマー(m3hG-mR、配列番号：29)を用いたPCRによりマウスFc R3の細胞外領域を増幅した。次にマウスFc R4-ヒト鎖遺伝子が組み込まれたプラスミドpMCDN/mFcR4-hGを鋳型とし、センスプライマー(m3hG-hF、配列番号：30)、アンチセンスプライマー(pMCM-R1)を用いたPCRによりヒト鎖の細胞外領域の2アミノ酸、膜貫通領域および細胞内領域を増幅した。これらの増幅産物を等量ずつ混合した後、mFcR3-EcoRI-FプライマーおよびpMCM-R1プライマーで再び増幅し、制限酵素EcoRIおよびNotIで処理し、プラスミドpMCDNのEcoRI-NotIサイトに組み込むことによりマウスFc R3-ヒト鎖キメラ(マウスFc R3-ヒト)発現ベクターを構築した(pMCDN/mFcR3-hG)。配列番号：11にマウスFc R3-ヒトの塩基配列を、配列番号：12にマウスFc R3-ヒトのアミノ酸配列を示す。

【0054】

1-7) Fc R発現ベクターのNK92細胞株への導入

プラスミドpMCDN/mFcR4-hFcR3、pMCDN/mFcR4-hG、pMCDN/mFcR3-hFcR3、pMCDN/mFcR3-hG、およびpMCDN/hFcR3を制限酵素PvuIで消化した後、NK92細胞株(ATCCより購入)へエレクトロポレーションにより導入し、500 µg/ml Geneticin (Invitrogen社)での選抜により、マウスFc R4-ヒトFc R3、マウスFc R4-ヒト、マウスFc R3-ヒトFc R3、マウスFc R3-ヒト、およびヒトFc R3を定常的に発現するNK92細胞株を樹立した。これらのNK92細胞株の培養には500 µg/ml Geneticin、penicillin/streptomycin (Invitrogen社)、100 U/ml recombinant human interleukin-2 (Peprotech社)、10% fetal bovine serum (FBS、Invitrogen社)、10% horse serum (Invitrogen社)、0.11 mM 2-mercaptoethanol (Invitrogen社)、0.2 mM inositol (Sigma社)、0.02 mM folic acid (Sigma社)を含むAlpha minimum essential medium without ribonucleosides and deoxyribonucleosides with L-glutamine培地(Invitrogen社)を用いた。

【0055】

〔実施例2〕抗ヒトdesmoglein3抗体の作製

2-1) ヒトdesmoglein3発現細胞株の樹立

ヒトdesmoglein3 (DSG3) 遺伝子(塩基配列：配列番号：31、アミノ酸配列：配列番号：32)が組み込まれた哺乳細胞発現用プラスミド(pMCN/DSG3)を制限酵素PvuIで消化した

10

20

30

40

50

後、CHO細胞株DG44 (Invitrogen社)へエレクトロポレーションにより導入し、500 µg/mlのGeneticinでの選抜により、DSG3を定常的に発現するCHO細胞株(DSG3-DG44)を樹立した。pMCNは、mouse CMVプロモータ (ACCESSION No. U68299)による制御下で誘導発現が可能で、ネオマイシン耐性遺伝子が組み込まれたベクターである。DSG3-DG44細胞の培養には500 µg/ml Geneticin、HT supplement (Invitrogen社)、penicillin/streptomycinを含むCHO-S-SFM II培地 (Invitrogen社)を用いた。

【 0 0 5 6 】

2 - 2) 可溶性ヒトdesmoglein3/マウスIgG2a-Fc融合タンパク質の作製

抗DSG3抗体作製のための免疫抗原として可溶性ヒトdesmoglein3/マウスIgG2a-Fc融合タンパク質(DSG3-Fc)を作製した。まずプラスミドpMCDNに、DSG3細胞外領域(Met1-Leu616)とマウスIgG2a定常領域を、マウスIgG2a定常領域のヒンジ部位の制限酵素CpoI配列で連結した遺伝子(DSG3-Fc、塩基配列: 配列番号: 33、アミノ酸配列: 配列番号: 34)をクローニングした(pMCDN/DSG3-Fc)。プラスミドpMCDN/DSG3-FcをDG44細胞へエレクトロポレーションにより導入し、500 µg/ml Geneticinで選抜することにより、DSG3-Fcを定常的に発現するCHO細胞株(DSG3-Fc-DG44)を樹立した。次に、このDSG3-Fc-DG44の培養上清からDSG3-Fcを精製した。培養上清をHi Trap ProteinG HPカラム(Cat. No. 17-0404-01、GEヘルスケアバイオサイエンス社)にアプライし、結合バッファー(20mMリン酸ナトリウム、pH 7.0)にて洗浄後、溶出バッファー(0.1M グリシン-HCl、pH 2.7)で溶出した。溶出液は中和バッファー(1M Tris-HCl、pH 9.0)を加えたチューブに溶出することにより直ちに中和した。この溶出液をSuperdex 200 HR 10/30 (GEヘルスケアバイオサイエンス社)によるゲルろ過に供し、溶媒をPBSに置換した。精製したDSG3-FcはDC protein assay kit (BIO-RAD社)を用いて、該キットに添付されたウシIgGを標準試料とした濃度に換算し定量した。

【 0 0 5 7 】

2 - 3) 抗DSG3抗体の作製

MRL/MpJUmCrj-lpr/lprマウス(7-8週令、日本チャールス・リバーより購入)を免疫動物として用いた。初回免疫では100 µgのDSG3-Fcをフロイント完全アジュバント(Becton Dickinson社)を用いてエマルジョン化し、皮下に投与した。追加免疫として2週間後に50 µgのDSG3-Fcをフロイント不完全アジュバント(Becton Dickinson社)を用いてエマルジョン化し、皮下に投与した。以降1週間間隔で追加免疫を3回行った。最終免疫として50 µgのDSG3-Fcを尾静脈に投与した。最終免疫の4日後に脾臓細胞を摘出し、マウスミエローマ細胞株P3-X63Ag8U1 (ATCCより購入)と2:1になるように混合し、PEG1500 (ロシュ・ダイアグノスティックス社)を加える事により細胞融合を実施した。続いてRPMI1640培地(Invitrogen社)を加えた後に、遠心分離で上清を除くことによりPEG1500を除去した。10%FBSを含むRPMI1640培地にて懸濁した融合細胞を100 µl/wellとなるように96穴プレートに播種した。翌日、100 µl/wellの10%FBS、1 x HAT media supplement (Sigma社)、0.5 x BM-Condimed H1 Hybridoma cloning supplement (ロシュ・ダイアグノスティックス社)を含むRPMI1640培地(HAT培地)を添加した。2日後および3日後にそれぞれ培養液の半分をHAT培地に置き換え、7日後の培養上清をスクリーニングに供した。スクリーニングは、DSG3-DG44細胞への結合を検出するフローサイトメトリーによって実施した。このスクリーニングにより得られた陽性クローンを限界希釈法によりモノクローン化することにより、DSG3に特異的に結合するモノクローナル抗体であるDF366を産生するハイブリドーマを樹立した。このハイブリドーマをultra-low IgG FBS (Invitrogen社)をFBSの代わりに加えたHAT培地にて培養し、その培養上清から、Hi Trap ProteinG HPカラムを用いてDF366抗体を精製した。PD-10カラム(GEヘルスケアバイオサイエンス社)を用いて溶媒をPBSに置換した。精製したDF366抗体の濃度はDC protein assay kitを用いて定量した。DF366抗体のアイソタイプがマウスIgG1であることをIsostrip (ロシュ・ダイアグノスティックス社)を用いた解析により確認した。

【 0 0 5 8 】

DF366抗体のDSG3-DG44細胞に対する結合をフローサイトメトリーにより測定した。5x10

10

20

30

40

50

⁴個のDSG3-DG44を3 μ g/mlのDF366抗体と氷上で30分間反応させ、洗浄した。次に、二次抗体としてFITC標識抗マウスIgG抗体(Beckman Coulter社)と氷上にて30分間反応させ、洗浄し、フローサイトメトリーに供した。フローサイトメーターはFACS Calibur (Becton Dickinson社)を用いた。DF366抗体はDSG3-DG44細胞に結合したが、親株であるDG44細胞には結合しなかった。従ってDF366抗体がDSG3に特異的に結合することが確認された。

【 0 0 5 9 】

2 - 4) ヒトIgG1キメラDF366抗体(DF366c)の作製

DF366抗体を産生するハイブリドーマから、DF366抗体のH鎖可変領域遺伝子(塩基配列: 配列番号: 35、アミノ酸配列: 配列番号: 36)およびL鎖可変領域遺伝子(塩基配列: 配列番号: 37、アミノ酸配列: 配列番号: 38)をクローニングした。次にこれらの遺伝子をヒトIgG1のH鎖定常領域遺伝子およびL鎖(鎖)定常領域遺伝子の塩基配列にインフ
10
レームで連結した。まず、H鎖可変領域遺伝子の5'末端塩基配列とコザック配列と制限酵素EcoRI配列を有するプライマー、および3'末端塩基配列の相補配列と制限酵素NheI配列を有するアンチセンスプライマーを用いてPCRを実施した。次に、L鎖可変領域遺伝子の5'末端塩基配列とコザック配列と制限酵素BamHI配列を有するプライマー、および3'
20
末端塩基配列の相補配列と制限酵素BsiWI配列を有するアンチセンスプライマーを用いてPCRを実施した。得られた増幅産物を制限酵素EcoRIおよびNheI、またはBamHIおよびBsiWIで処理し、ヒトIgG1キメラ抗体発現プラスミド(pMCDN/G1k)のEcoRI-NheIサイト、またはBamHI-BsiWIサイトに組み込んだ(pMCDN/G1k-DF366)。pMCDN/G1kは、プラスミドpMCDNにヒトIgG1のH鎖定常領域遺伝子(塩基配列: 配列番号: 39、アミノ酸配列: 配列番号: 40
20
)およびL鎖(鎖)定常領域遺伝子(塩基配列: 配列番号: 41、アミノ酸配列: 配列番号: 42)がクローニングされている。制限酵素NheI配列によりマウスH鎖可変領域とヒトH鎖定常領域が連結され、制限酵素BsiWI配列によりマウスL鎖可変領域とヒトL鎖定常領域が連結される。

【 0 0 6 0 】

プラスミドpMCDN/G1k-DF366をDG44細胞へエレクトロポレーションにより導入した。500 μ g/ml Geneticinでの選抜により、ヒトIgG1キメラDF366抗体(DF366c)を定常的に発現するCHO細胞(DF366c-DG44)を樹立した。次に、このDF366c-DG44の培養上清よりHi Trap rProtein Aカラム(GEヘルスケアバイオサイエンス社)を用いてDF366c抗体を精製した。PD-10カラムを用いて溶媒をPBSに置換した。精製したDF366c抗体の濃度はDC protein assay kit
30
を用いて定量した。DF366c抗体のH鎖遺伝子全長の塩基配列を配列番号: 43、アミノ酸配列を配列番号: 44、L鎖遺伝子全長の塩基配列を配列番号: 45、アミノ酸配列を配列番号: 46に示す。

DF366c抗体のDSG3-DG44細胞およびDG44細胞に対する結合をフローサイトメトリーにより測定した。3x10⁴個の細胞を10 μ g/mlのDF366c抗体と氷上で1時間反応させ、洗浄した。次に、二次抗体としてFITC標識抗ヒトIgG抗体(Beckman Coulter社)と氷上にて1時間反応させ、洗浄し、フローサイトメトリーに供した。フローサイトメーターはFACS Calibur (Becton Dickinson社)を用いた。DF366c抗体はDSG3-DG44細胞に結合したが、親株であるDG44細胞には結合しなかった。従ってDF366c抗体がDSG3に特異的に結合することが確認された。
40

【 0 0 6 1 】

2 - 5) マウスIgG2aキメラDF366抗体(DF366m)の作製

DF366抗体のH鎖可変領域遺伝子の塩基配列をマウスIgG2aのH鎖定常領域遺伝子の塩基配列にインフ
レームで連結した。まず、H鎖可変領域遺伝子の5'末端塩基配列とコザック配列と制限酵素EcoRI配列を有するプライマー、および3'末端塩基配列の相補配列にc
残基を付加したアンチセンスプライマーを用いてPCRを実施した。得られた増幅産物を制限酵素EcoRIで処理し、マウスIgG2aキメラH鎖発現プラスミド(pMCD/G2a)のEcoRI-NruIサ
イトに組み込むことによりマウスIgG2aキメラDF366抗体H鎖発現ベクターを構築した(pMCD/G2a-DF366)。pMCD/G2aは、哺乳細胞発現用プラスミドpMCDにマウスIgG2aのH鎖定常領域
遺伝子(塩基配列: 配列番号: 47、アミノ酸配列: 配列番号: 48)がクローニングされ
50

ており、H鎖可変領域にH鎖定常領域の制限酵素NruI配列が連結される。pMCDベクターは、mouse CMVプロモータ（ACCESSION No. U68299）による制御下で誘導発現が可能で、DHF R遺伝子が組み込まれたベクターである。

【 0 0 6 2 】

DF366抗体のL鎖可変領域遺伝子の塩基配列をマウスIgG2aのL鎖(鎖)定常領域遺伝子の塩基配列にインフレームで連結した。まず、L鎖可変領域遺伝子の5'末端塩基配列とコザック配列と制限酵素EcoRI配列を有するプライマー、および3'末端塩基配列の相補配列にgcccg残基を付加したアンチセンスプライマーを用いてPCRを実施した。得られた増幅産物を制限酵素EcoRIで処理し、マウスIgG2aキメラL鎖(鎖)発現プラスミド(pMCN/k)のEcoRI-NruIサイトに組み込むことによりマウスIgG2aキメラDF366抗体L鎖発現ベクターを構築した(pMCN/k-DF366)。pMCN/kは、プラスミドpMCNにマウスIgG2aのL鎖(鎖)定常領域遺伝子(塩基配列：配列番号：49、アミノ酸配列：配列番号：50)がクローニングされており、L鎖可変領域にL鎖(鎖)定常領域の制限酵素NruI配列が連結される。

10

【 0 0 6 3 】

プラスミドpMCD/G2a-DF366およびプラスミドpMCN/k-DF366をDG44細胞へエレクトロポレーションにより導入した。500 µg/ml Geneticinおよび核酸(HT supplement)不含培地での選抜により、マウスIgG2aキメラDF366抗体(DF366m)を定常的に発現するCHO細胞(DF366m-DG44)を樹立した。次に、このDF366m-DG44の培養上清よりHi Trap ProteinG HPカラムを用いてDF366m抗体を精製した。PD-10カラムを用いて溶媒をPBSに置換した。精製したDF366m抗体の濃度はDC Protein Assay kitを用いて定量した。DF366m抗体は、フローサイトメトリー解析によりDF366c抗体と同様にDSG3に特異的に結合することを確認した。なお二次抗体にはFITC標識抗マウスIgG抗体(Beckman Coulter社)を用いた。DF366m抗体のH鎖遺伝子全長の塩基配列を配列番号：51、アミノ酸配列を配列番号：52、L鎖遺伝子全長の塩基配列を配列番号：53、アミノ酸配列を配列番号：54に示す。

20

【 0 0 6 4 】

2 - 6) 低フコースDF366抗体の作製

プラスミドpMCDN/G1k-DF366をフコーストランスポーターノックアウトCHO細胞株(FTPKO-DXB11細胞、国際公開公報WO2006/067913、国際公開公報WO2006/067847)へエレクトロポレーションにより導入した。500 µg/ml Geneticinでの選抜により、低フコースヒトIgG1キメラDF366抗体(低フコースDF366c)を定常的に発現するCHO細胞(低フコースDF366c-DXB11)を樹立した。次に、この低フコースDF366c-DXB11の培養上清よりHi Trap rProtein Aカラムを用いて低フコースDF366c抗体を精製した。PD-10カラムを用いて溶媒をPBSに置換し、DC Protein Assay kitにより抗体濃度を定量した。

30

プラスミドpMCD/G2a-DF366およびプラスミドpMCN/k-DF366をFTPKO-DXB11細胞へエレクトロポレーションにより導入した。500 µg/ml Geneticinおよび核酸(HT supplement)不含培地での選抜により、低フコースマウスIgG2aキメラDF366抗体(低フコースDF366m)を定常的に発現するCHO細胞(低フコースDF366m-DXB11)を樹立した。次に、この低フコースDF366m-DXB11の培養上清よりHi Trap ProteinG HPカラムを用いて低フコースDF366m抗体を精製した。PD-10カラムを用いて溶媒をPBSに置換し、DC Protein Assay kitにより抗体濃度を定量した。

40

【 0 0 6 5 】

〔実施例3〕抗DSG3抗体のADCC活性の測定

3 - 1) 標的細胞株の樹立

ヒトdesmoglein3 (DSG3)遺伝子(塩基配列：配列番号：31、アミノ酸配列：配列番号：32)が組み込まれた哺乳細胞発現用プラスミド(pMCDN/DSG3)を制限酵素PvuIで消化した後Ba/F3細胞(理化学研究所バイオリソースセンターより購入)へエレクトロポレーションにより導入し、500 µg/ml Geneticinでの選抜により、DSG3を定常的に発現するBa/F3細胞株(DSG3-Ba/F3)を樹立した。DSG3-Ba/F3細胞の培養には500 µg/ml Geneticin、penicillin/streptomycin、recombinant mouse interleukin-3 (R&D Systems社)、10% FBSを含むRPMI 1640培地(Invitrogen社)を用いた。

50

DSG3の発現はフローサイトメトリーにて確認した(図1)。すなわち、DSG3-Ba/F3細胞を10 µg/mlの抗DSG3モノクローナル抗体(R&D Systems社)もしくは陰性対照抗体(マウスIgG2a、Becton Dickinson社)と氷上にて1時間反応後、洗浄した。続いて二次抗体(FITC標識抗マウスIg抗体、Becton Dickinson社)と氷上にて1時間反応させ、洗浄後、フローサイトメーター(FACS Calibur、Becton Dickinson社)にて測定した。

【0066】

3-2) ADCC活性の測定方法

実験には、penicillin/streptomycin、10% FBSを含むRPMI1640培地(RPMI培地)を用いた。DSG3-Ba/F3細胞株 1×10^6 個を3.7 MBqのChromium-51 (GEヘルスケアバイオサイエンス社)を含む約200 µlのRPMI培地に懸濁した後に、5%炭酸ガスインキュベーター中で37 °Cにて1時間培養した。洗浄後、細胞密度を 2×10^5 cells/mlに調製し、96ウェルU底プレートに50 µlずつ分注した。次に、抗体溶液を各ウェルに50 µlずつ添加した。室温で15分間静置後、エフェクター細胞(後述)を100 µlずつ添加した。プレートは5%炭酸ガスインキュベーター中で37 °Cにて4-6時間静置した。その後、各ウェルから上清を100 µlずつ回収し、ガンマカウンター(1480 WIZARD 3"、Wallac社)にて放射活性を測定した。下式に基づいて特異的クロム遊離率を算出した。

特異的クロム遊離率(%) = $(A-C) \times 100 / (B-C)$

Aは各ウェルにおける放射活性(cpm)、Bは50 µlの細胞と150 µlの2% Nonidet P-40溶液(Code No. 252-23、ナカライテスク社)を添加したウェルにおける放射活性(cpm)の平均値、Cは50 µlの細胞と150 µlのRPMI培地を添加したウェルにおける放射活性(cpm)の平均値を示す。測定はduplicateにて行い、特異的クロム遊離率の平均値及び標準偏差を算出した。

【0067】

3-3) マウス脾臓細胞をエフェクター細胞としたADCC活性の測定

エフェクター細胞として、C3Hマウス(日本チャールス・リバー社)から調製した脾臓細胞に50 ng/mlリコンビナントヒトinterleukin-2 (Peprotech社)を添加した細胞(SPL)、もしくは脾臓細胞を50 ng/mlリコンビナントヒトinterleukin-2存在下で4日間培養した細胞(SPL-LAK)を用いた。3-2)に従いADCC活性を測定した。ウェルあたりのエフェクター細胞数は 5×10^5 個(SPL)もしくは 2×10^5 個(SPL-LAK)とし、ADCC誘導時間は6時間とした。陰性対照抗体としてマウスIgG2a (Becton Dickinson社)およびヒトIgG1 (Serotec社)を用いた。

DF366m抗体および低フコースDF366m抗体では弱いADCC活性が測定されたが、DF366c抗体および低フコースDF366c抗体ではほとんどADCC活性は測定されなかった(図2)。

【0068】

3-4) Fc R発現NK92細胞株をエフェクター細胞としたADCC活性の測定

エフェクター細胞として、Fc R発現NK92細胞株(実施例1、マウスFc R4-ヒトFc R3、マウスFc R4-ヒトFc R3、マウスFc R3-ヒトFc R3、マウスFc R3-ヒトFc R3発現NK92細胞)を用いた。3-2)に従いADCC活性を測定した。ウェルあたりのエフェクター細胞数は 5×10^4 個、ADCC誘導時間は4時間とした。陰性対照抗体としてマウスIgG2a (Becton Dickinson社)およびヒトIgG1 (Serotec社)を用いた。

マウスFc R4-ヒトFc R3、マウスFc R4-ヒトFc R3発現NK92細胞を用いた場合はDF366m抗体、DF366c抗体ともにADCC活性が測定され、低フコースDF366m抗体、低フコースDF366c抗体ではADCC活性がさらに顕著に増加していた(図3)。

マウスFc R3-ヒトFc R3発現NK92細胞を用いた場合はDF366m抗体で強いADCC活性が測定され、低フコースDF366m抗体ではADCC活性がさらに増加していた。DF366c抗体および低フコースDF366c抗体では弱いADCC活性が測定された(図4)。

マウスFc R3-ヒトFc R3発現NK92細胞ではADCC活性が弱かったが、これはFc Rの発現量が少なかったことが原因として推察された(図5)。

ヒトFc R3発現NK92細胞を用いた場合はDF366c抗体で強いADCC活性が測定され、低フコースDF366c抗体ではADCC活性がさらに顕著に増加していた。DF366m抗体ではADCC活性が弱

10

20

30

40

50

かったのに対し、低フコースDF366m抗体では強いADCC活性が測定された(図6)。

以上の結果から、マウス脾臓細胞では弱いADCC活性しか測定できない場合でも、キメラFc R発現NK92細胞を用いることにより、強いADCC活性を測定できることが示された。特に、マウスFc R4発現NK92細胞では低フコース抗体によるADCC活性増強が明確に測定された。また、ヒトFc R3発現NK92細胞ではマウス抗体のADCC活性が十分に測定できず、マウス抗体のADCC活性を測定するためにはキメラFc R発現NK92細胞が優れていることが示された。

【0069】

〔実施例4〕抗claudin3抗体のADCC活性の測定

抗claudin3モノクローナル抗体のADCC活性を測定した(図7)。乳癌細胞株MCF7(ATCCから購入)を標的細胞とし、測定方法は〔実施例3〕に従った。用いた抗体は、CDN16(マウスIgG2b、H鎖アミノ酸配列：配列番号55、L鎖アミノ酸配列：配列番号56)、CDN27(マウスIgG2a、H鎖アミノ酸配列：配列番号57、L鎖アミノ酸配列：配列番号58)、CDN35(マウスIgG2a、H鎖アミノ酸配列：配列番号59、L鎖アミノ酸配列：配列番号60)である。エフェクター細胞としてSPL(4.5×10^5 個/ウェル、ADCC誘導時間6時間)を用いた場合、ほとんどADCC活性が測定できなかった。マウスFc R4-ヒトFc R3、マウスFc R4-ヒト発現NK92細胞(5×10^4 個/ウェル、ADCC誘導時間4時間)を用いた場合、顕著なADCC活性が測定された。中でもCDN35が強いADCC活性を示した。

以上の結果から、マウス脾臓細胞ではADCC活性が十分に測定できない場合でも、キメラFc R発現NK92細胞を用いることによりADCC活性の測定が可能となり、各抗体のADCC活性を正確に比較できることが示された。

【産業上の利用可能性】

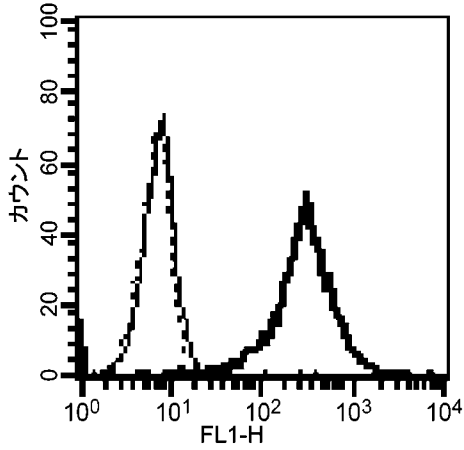
【0070】

本発明のキメラタンパク質をエフェクター細胞に発現させることにより、マウス抗体のADCC活性を測定するためのエフェクター細胞調製の手間が大幅に軽減され、ロット間差が少なく正確な測定が可能となった。本発明のキメラタンパク質を発現させたエフェクター細胞を用いることで、癌や自己免疫疾患などの疾患に対する治療や予防のための、細胞障害活性を有する抗体を効率的にスクリーニングすることが可能である。

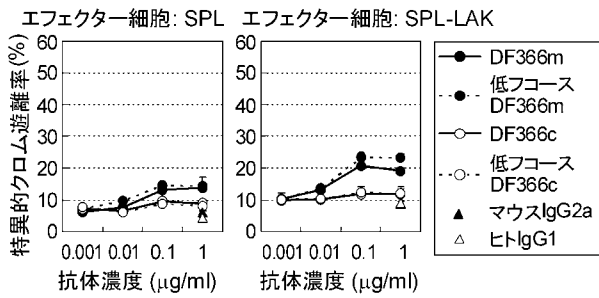
10

20

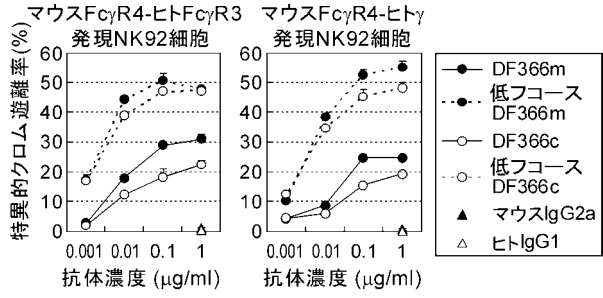
【 図 1 】



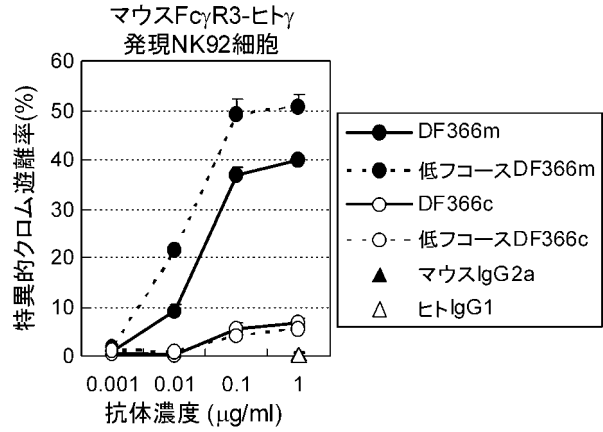
【 図 2 】



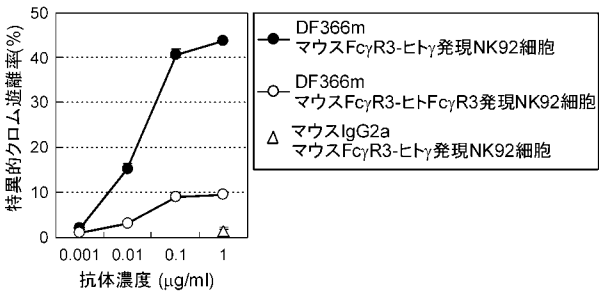
【 図 3 】



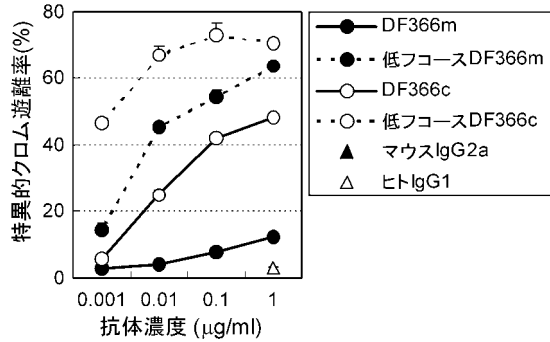
【 図 4 】



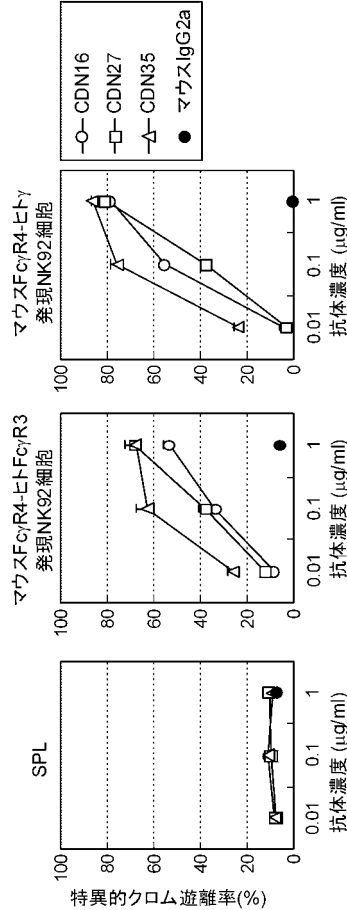
【 図 5 】



【 図 6 】



【 図 7 】



【配列表】

0005299902000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		
G 0 1 N 33/15 (2006.01)		G 0 1 N 33/15		Z
G 0 1 N 33/53 (2006.01)		G 0 1 N 33/53		N

(74)代理人 100128048
 弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506
 弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100130845
 弁理士 渡邊 伸一

(74)代理人 100114340
 弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889
 弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072
 弁理士 川本 和弥

(72)発明者 川合 重人
 東京都目黒区駒場四丁目2番16号 株式会社未来創薬研究所内

審査官 渡邊 潤也

(56)参考文献 特開2004-147565(JP,A)
 Blood,2006 Jun 15,107(12),p.4669-77
 J.Biol.Chem.,2004 Dec 24,279(52),p.53907-14

(58)調査した分野(Int.Cl.,DB名)
 C12N 15/00-15/90
 C07K 19/00
 C A p l u s / B I O S I S (S T N)
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
 T h o m s o n I n n o v a t i o n