

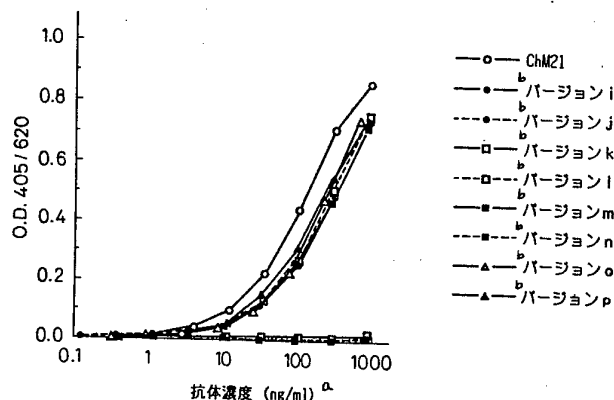


特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 6 C07K 16/30, C12P 21/08, C12N 15/13, 5/10, 1/21 // (C12P 21/08, C12R 1:91) (C12P 21/08, C12R 1:19) (C12N 1/21, C12R 1:19)	A1	(11) 国際公開番号 WO 95/14041 (43) 国際公開日 1995年5月26日 (26.05.95)
(21) 国際出願番号 PCT/JP94/01763 (22) 国際出願日 1994年10月19日 (19. 10. 94) (30) 優先権データ 特願平5/291078 1993年11月19日 (19. 11. 93) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP] 〒115 東京都北区浮間5丁目5番1号 Tokyo, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 大友俊彦 (OHTOMO, Toshihiko) [JP/JP] 佐藤 功 (SATO, Koh) [JP/JP] 土屋政幸 (TSUCHIYA, Masayuki) [JP/JP] 〒412 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka, (JP) (74) 代理人 弁理士 石田 敬, 外 (ISHIDA, Takashi et al.) 〒105 東京都港区虎ノ門一丁目8番10号 静光虎ノ門ビル 青和特許法律事務所 Tokyo, (JP)	(81) 指定国 AM, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, EE, FI, GE, HU, KG, KR, KZ, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MN, NO, NZ, PL, RO, RU, SI, SK, TJ, TT, UA, US, UZ, VN, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (KE, MW, SD, SZ). 添付公開書類 国際調査報告書	

(54) Title : RECONSTITUTED HUMAN ANTIBODY AGAINST HUMAN MEDULLOBLASTOMATOUS CELL

(54) 発明の名称 ヒト髄芽腫細胞に対する再構成ヒト抗体



a: Antibody concentration
b: version

(57) Abstract

A reconstituted antibody against a human medulloblastomatous cell, comprising (A) an L chain composed of (1) a C region of a human L chain and (2) a V region of an L chain comprising a human L-chain FR and an L-chain CDR of a mouse monoclonal antibody ONS-M21 against a human medulloblastomatous cell, and (B) an H chain composed of (1) a C region of a human H chain and (2) a V region of an H chain comprising a human H-chain FR and an H-chain CDR of a mouse monoclonal antibody ONS-M21 against a human medulloblastomatous cell. The major part of this reconstituted antibody originates in a human antibody and the mouse CDR has a low antigenicity. Therefore this antibody is reduced in the antigenicity against humans and hence is prospective as a remedy and diagnostic agent for brain tumor, such as medulloblastoma, which expresses to a high level the antigens which this antibody recognizes.

(57) 要約

(A) (1) ヒト L 鎖 C 領域、及び

(2) ヒト L 鎖 FR、及びヒト髄芽腫細胞に対するマウスモノクローナル抗体 ONS-M21 の L 鎖 CDR から成る L 鎖 V 領域、を含んで成る L 鎖；並びに

(B) (1) ヒト H 鎖 C 領域、及び

(2) ヒト H 鎖 FR、及びヒト髄芽腫細胞に対するマウスモノクローナル抗体 ONS-M21 の H 鎖 CDR から成る H 鎖 V 領域を含んで成る H 鎖；

を含んで成るヒト髄芽腫細胞に対する再構成された抗体。

この再構成ヒト抗体の大部分がヒト抗体に由来し、そしてマウス CDR は抗原性が低いから、本発明の再構成ヒト抗体はヒトに対する抗原性が低く、そしてそれ故に本抗体が認識する抗原を強く発現する髄芽腫をはじめとする脳腫瘍の治療剤、および診断薬として期待される。

情報としての用途のみ

PCT に基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁に PCT 加盟国を同定するために使用されるコード

AM	アルメニア	EE	エストニア	LK	スリランカ	RU	ロシア連邦
AT	オーストリア	ES	スペイン	LR	リベリア	SD	スーダン
AU	オーストラリア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SE	スウェーデン
BB	バルバドス	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SG	シンガポール
BE	ベルギー	GA	ガボン	LV	ラトヴィア	SI	スロヴェニア
BF	ブルキナ・ファソ	GB	イギリス	MC	モナコ	SK	スロヴァキア共和国
BG	ブルガリア	GE	グルジア	MD	モルドバ	SN	セネガル
BJ	ベナン	GN	ギニア	MG	マダガスカル	SZ	スワジランド
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	ML	マリ	TD	チャド
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	TG	トーゴ
CA	カナダ	IE	アイルランド	MR	モロッコ	TJ	タジキスタン
CF	中央アフリカ共和国	IS	アイスランド	MW	マラウイ	TM	トルクメニスタン
CG	コンゴ	IT	イタリア	MX	メキシコ	TT	トリニダード・トバゴ
CH	スイス	JP	日本	NE	ニジェール	UG	ウガンダ
CI	コート・ジボアール	KE	ケニア	NL	オランダ	US	米国
CM	カメルーン	KG	キルギスタン	NO	ノルウェー	UZ	ウズベキスタン共和国
CN	中国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NZ	ニュージーランド	VN	ヴェトナム
CZ	チェコ共和国	KR	大韓民国	PL	ポーランド		
DE	ドイツ	KZ	カザフスタン	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	LI	リヒテンシュタイン	RO	ルーマニア		

明 細 書

ヒト髄芽腫細胞に対する再構成ヒト抗体

技術分野

本発明は、ヒト髄芽腫細胞に対するマウスモノクローナル抗体 ONS-M21 の可変領域（V 領域）とヒト抗体の定常領域（C 領域）とから成るヒト／マウスキメラ抗体、ヒト軽鎖（L 鎖）V 領域及びヒト重鎖（H 鎖）V 領域の相補性決定領域（CDR）がヒト髄芽腫細胞に対するマウスモノクローナル抗体 ONS-M21 の CDR により置き換えられている再構成（reshaped）ヒト抗体およびそれらの抗体を構成する L 鎖または H 鎖に関する。

本発明はさらに、上記の抗体特にその V 領域をコードする DNA を提供する。本発明はさらに、前記 DNA を含んで成るベクター、特に発現ベクター、並びに該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、ヒト髄芽腫細胞に対するキメラ抗体の製造方法、及びヒト髄芽腫細胞に対する再構成ヒト抗体の製造方法を提供する。

本発明はまた、ヒト髄芽腫細胞に対する再構成ヒト抗体の H 鎖 V 領域と該抗体の L 鎖 V 領域とを連結して成る一本鎖 Fv 領域に関する。本発明はまた、該一本鎖 Fv 領域をコードする DNA、該 DNA を含んで成る組換えベクター、該組換えベクターにより形質転換された宿主、及び該宿主を用いる、前記一本鎖 Fv 領域の製造方法に関する。

背景技術

髄芽腫は、グリオーマと共に脳腫瘍の 40% を占める、原始神経

外胚葉性腫瘍の一つであり、10才未満の小児、特に、5～10才の間で好発する悪性脳腫瘍である。この腫瘍は胎生期の髄質上皮および基質層を構成する未分化な細胞の形態と配列のパターンを模倣する代表的な未分化腫瘍であり、神経細胞とグリア細胞の両方に分化する可能性を持つ未成熟な腫瘍であるとされている (Tamura, Kら、Cancer Res., 49: 5380-5384 (1989))。このような悪性脳腫瘍は、放射線、化学療法剤に感受性を示すことから、放射線療法および化学療法、さらには外科的療法が治療として行われる。

しかしながら、これらの治療法では、一時的な症状の緩解はみられるものの、数年以内に再発死亡するものが多く、平均生存日数は15カ月である。この原因は再発ガンが化学療法剤、放射線に耐性を持つようになるためであると考えられている。

一方、脳腫瘍の正確な判断は、組織学的手法に負うところが大きく、非常に高度な専門的知識と補助的診断技術が必要である。

従って、早期に診断し、根本的な治療をするための診断薬、治療薬の開発が急務とされている。

従来においても、いくつかの髄芽腫を認識するモノクローナル抗体による治療の試みがされている (Kemshead, J. T. ら、Int. J. Cancer, 31, 187-195 (1983)、Allan, P. M. ら、Int. J. Cancer, 31, 591-598 (1983)、Jones, D. ら、Br. J. Haematol., 57, 621-631 (1984)、Gross, N. ら、Cancer Res., 46, 2998-2994 (1986)、Wikstrand, C. D. ら、Cancer Res., 46, 5933-5940 (1986)、Gibson, F. M. ら、Int. J. Cancer, 39, 554-559 (1987)、

Feickert, H. J. ら、Cancer Res., 49, 4338-4343 (1989)、Jennings, M. T. ら、J. Neurol. Sci., 89, 63-78 (1989)、Takahashi, H. らNeurosurg., 27, 97-102 (1990)を参照)。

しかしながら、これらの抗体のほとんどは、正常組織や他の腫瘍をも認識するために、髄芽腫の診断・治療薬としては不適である等の問題がある。

最近、ヒトグリオーマに反応し、ADCC活性を示すヒト由来のモノクローナル抗体を用いた脳腫瘍の免疫療法(特開昭58-201994、特開昭59-137497、特開平4-346792を参照)が報告されている。

マウスのモノクローナル抗体はヒトにおいて高度に免疫原性(「抗原性」という場合もある)があり、そしてこの理由のため、ヒトにおけるそれらの療法的価値は制限される。さらに、マウス抗体は、予定された効果を妨害するのみならず、患者における不都合なアレルギー応答の危険をもたらす免疫応答を惹起することなくして頻回投与することはできない。

これらの問題を解決するため、ヒト型化(humanized)抗体の製造方法が開発された。マウス抗体は2つの方法でヒト型化することができる。より簡単な方法は、可変領域がもとのマウスモノクローナル抗体に由来しそして定常領域が適当なヒト抗体に由来するキメラ抗体を作製する方法である。得られるキメラ抗体はもとのマウス抗体の完全な可変領域を含有し、そしてもとのマウス抗体と同一の特異性をもって抗原に結合することを期待することができる。

さらに、キメラ抗体ではヒト以外に由来する蛋白質配列の比率が

実質的に減少しており、そしてそれ故にもとのマウス抗体に比べて免疫原性が低いと予想される。キメラ抗体は抗原によく結合しそして免疫原性が低い、マウス可変領域に対する免疫応答がなお生ずる可能性がある (LoBuglio, A. F. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 4220-4224, 1989)。

マウス抗体をヒト型化するための第二の方法は一層複雑であるが、しかしマウス抗体の潜在的な免疫原性をさらに大幅に低下させるものである。この方法においては、マウス抗体の可変領域からの相補性決定領域 (complementarity determining region; CDR) をヒト抗体可変領域に移植して「再構成」 (reshaped) ヒト抗体可変領域を作製する。

次に、これらの再構成ヒト可変領域をヒト抗体定常領域に連結する。最終的に再構成されたヒト型抗体のヒト以外の蛋白質配列に由来する部分はCDRと極く一部のフレームワーク (FR) のみである。CDRは超可変蛋白質配列により構成されている。これらは種特異的配列を示さない。これらの理由のため、マウスCDRを担持する再構成ヒト抗体はもはやヒトCDRを含有する天然ヒト抗体より強い免疫原性を有しないはずである。

再構成ヒト抗体についてはさらに、Riechmann, L. ら、Nature, 332, 323-327, 1988; Verhoeven, M. ら、Science, 239, 1534-1536, 1988; Kettleborough, C. A. ら、Protein Engng. 4, 773-783, 1991; Maeda, H. ら、Human Antibodies and Hybridoma, 2, 124-134, 1991; Gorman, S. D. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 4181

- 4185, 1991; Tempest, P. R. ら、Bio/T
echnology, 9, 266-271, 1991; Co, M.
S. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88,
2869-2873, 1991; Carter, P. ら、Proc.
Natl. Acad. Sci. USA, 89, 4285-4289,
1992; Co, M. S. ら、J. Immunol. 148, 11
49-1154, 1992; 及び Sato, K. ら、Cancer
Res. 53, 851-856, 1993を参照のこと。

前記のごとく、再構成ヒト抗体は治療目的のために有用であると
予想されるが、ヒト髄芽腫細胞に対する再構成ヒト抗体は知られて
いない。さらに、再構成ヒト抗体の製造方法であって任意の特定の
抗体に普遍的に適用し得る方法は存在しない。従って、特定の抗原
に対して十分に活性がある再構成ヒト抗体を作製するためには種々
の工夫が必要である（例えば、Sato, K. ら、Cancer
Res. 53, 1-6 (1993)）。

本発明者等は、髄芽腫患者の小脳より髄芽腫細胞株（ONS-7
6）を分離・確立した（Tamura, K. ら、Cancer R
es., 49, 5380-5384 (1989)）。そして、該髄
芽腫細胞株ONS-76をマウスに免疫することによりヒト髄芽腫
を特異的に認識するが、正常な脳組織と末梢血球細胞とは交差反応
しないマウスモノクローナル抗体（ONS-M21）を見出した
（Moriuchi, S. らBr. J. Cancer, 68, 83
1-837 (1993)）。本抗体が認識する抗原は髄芽腫をはじ
め一部のグリオーマ等の脳腫瘍に強く発現していることより、本抗
体の診断薬としての利用、さらにはADCC, CDCの誘導あるい
はトキシン、ラジオアイソトープ結合体による癌細胞の直接の破壊
が期待される。

発明の開示

従って、本発明はヒト髓芽腫細胞に対するマウスモノクローナル抗体ONS-M21の再構成ヒト抗体に関する。本発明はまた、該再構成ヒト抗体の作製の過程で有用なヒト／マウスキメラ抗体を提供する。本発明はさらに、マウスモノクローナル抗体ONS-M21の再構成ヒト抗体並びにキメラ抗体の製造のための遺伝子工学的方法に関する。

具体的には、本発明は、

(1) ヒト髓芽腫細胞に対するマウスモノクローナル抗体ONS-M21のL鎖V領域；並びに

(2) ヒト髓芽腫細胞に対するマウスモノクローナル抗体ONS-M21のH鎖V領域、または

(1) ヒト抗体L鎖C領域、及び前記ヒト髓芽腫細胞に対するマウスモノクローナル抗体ONS-M21のL鎖V領域を含んで成るL鎖；並びに

(2) ヒト抗体H鎖C領域、及びヒト髓芽腫細胞に対するマウスモノクローナル抗体ONS-M21のH鎖V領域を含んで成るH鎖；を含んで成る、ヒト髓芽腫細胞に対するキメラ抗体、さらには、

(1) ヒト抗体L鎖V領域のフレームワーク領域(FR)、及び

(2) ヒト髓芽腫細胞に対するマウスモノクローナル抗体ONS-M21のL鎖V領域のCDR、

を含んで成る、再構成ヒトL鎖V領域；並びに

(1) ヒト抗体H鎖V領域のFR、及び

(2) ヒト髓芽腫細胞に対するマウスモノクローナル抗体ONS-M21のH鎖V領域のCDR、

を含んで成る、再構成ヒトH鎖V領域から構成されるヒト髓芽腫細胞に対するマウスモノクローナル抗体ONS-M21の再構成ヒト

抗体に関する。

本発明はまた、前記種々の抗体を構成するL鎖またはH鎖のポリペプチド、およびそれらをコードするDNAに関する。

さらに、本発明は、上記DNAを含んで成る発現ベクターおよびそれら発現ベクターにより形質転換された宿主に関する。

本発明はさらにまた、ヒト髄芽腫細胞に対するキメラ抗体の製造方法、及びヒト髄芽腫細胞に対する再構成ヒト抗体の製造方法に関する。

本発明はまた、ヒト髄芽腫細胞に対する再構成ヒト抗体のH鎖V領域と該モノクローナル抗体のL鎖V領域とを連結して成る一本鎖Fv領域に関する。

本発明はさらに、上記一本鎖Fv領域をコードするDNA、該DNAを含んで成る組換えベクター、及び該組換え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、上記の宿主を培養し、該培養物から一本鎖Fv領域を採取することを特徴とする、一本鎖Fv領域の製造方法に関する。

図面の簡単な説明

図1は、それぞれL鎖およびH鎖の発現のために有用な、ヒトEF1- α プロモーター／エンハンサーを含んでなる発現プラスミドHEF-VL-g κ およびHEF-VH-g γ 1を示す。

図2は、キメラONS-M21抗体(ChM21)のヒト髄芽腫細胞株ONS-76に対する結合能を示すグラフである。

図3は、再構成ヒトONS-M21抗体L鎖V領域の第1バージョン(バージョン「a」)の作製ダイヤグラムである。

図4は、再構成ヒトONS-M21抗体V領域の作製のダイヤグ

ラムである。

図 5 は、再構成ヒト H 鎖とキメラ L 鎖からなる抗体のヒト髄芽腫細胞株 O N S - 7 6 に対する結合能を示すグラフである。

図 6 は、再構成ヒト H 鎖と再構成ヒト L 鎖のバージョン「a」から「h」の内一つとからなる 8 種類の再構成ヒト O N S - M 2 1 抗体のヒト髄芽腫細胞株 O N S - 7 6 に対する結合能を、キメラ抗体 (C h M 2 1) と比較して示す図である。

図 7 は、本発明の再構成ヒト H 鎖と再構成ヒト L 鎖のバージョン「i」, 「j」, 「l」, 「m」, 「o」および「p」の内一つとからなる 6 種類の再構成ヒト O N S - M 2 1 抗体のヒト髄芽腫細胞株 O N S - 7 6 に対する結合能を、キメラ抗体 (C h M 2 1) と再構成 L 鎖バージョン「k」および「n」を有する抗体と比較して示す図である。

図 8 は、本発明の一本鎖 F v 領域をコードする D N A の作製過程を模式的に示す図である。

図 9 は、本発明の一本鎖 F v 領域をコードする D N A を発現させるために使用する発現プラスミドの一例の構造を示す。

図 1 0 は、本発明の一本鎖 F v 領域 (s c F v - h M 2 1) の抗原結合活性を、再構成ヒト O N S - M 2 1 抗体及び該抗体の F a b 断片の抗原結合活性と比較して、マウスモノクローナル抗体 O N S - M 2 1 の抗原結合に対する阻害を指標として示すグラフである。

具体的な説明

マウス抗体 V 領域をコードする D N A のクローニング

ヒト髄芽腫細胞に対するマウスモノクローナル抗体の V 領域をコードする D N A をクローン化するためには、マウスモノクローナル抗体産生細胞から m R N A を調製した後、既知の方法により二本鎖

cDNAに変換し、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法を用いて、目的とするDNAを増幅することで得られる。このmRNAの供給源として、ヒト髄芽腫細胞に対するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマを作製することが必要である。このようなハイブリドーマとして、ONS-M21を挙げることができる。ハイブリドーマONS-M21の作製方法を参考例1に後記する。

（1）全RNAの採取

本発明において、全RNAを採取するため、ハイブリドーマ細胞を破壊し、グアニジンチオシアネート処理後、塩化セシウム密度勾配遠心を行った（Chirgwin, J. M. ら、Biochemistry, 18, 5294-5299, 1979）が、すでに他の蛋白質の遺伝子をクローニングする際に用いられた方法、例えばバナジウム複合体等のリボヌクレアーゼインヒビター存在下に界面活性剤処理、フェノール処理を行う（Berger, S. L. ら、Biochemistry, 18, 5143-5149, 1979）方法を用いることができる。

（2）二本鎖cDNAの採取

上記の如くして得た全RNAから一本鎖DNAを得るには、全RNAを鋳型にして、その3'末端にあるpolyA鎖に相補的なオリゴ（dT）をプライマーとして逆転写酵素で処理して全RNAに相補的な一本鎖DNA（cDNA）を合成する（Larrik, J. W. ら、Bio/Technology, 7, 934-938, 1989）ことができる。また、その時に、ランダムプライマーを用いてもよい。

（3）ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法によるマウス抗体V領域の増幅

次にポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法を用いて前記cDNAか

らマウス抗体V領域の特異的増幅を行う。マウス抗体V領域の増幅には、Jones, S. T. らBio/Technology, 9, 88-89, 1991に記載されているプライマーを用いることができる。ハイブリドーマONS-M21が産生するマウスモノクローナル抗体ONS-M21のクローニングに用いるプライマーを決定するにあたり、H鎖およびL鎖のタイピングをして両鎖の型を決める必要がある。

マウスモノクローナル抗体アイソタイピングキット（アマシャムインターナショナルp1c社製）を用いて、ONS-M21抗体のタイピングを行った結果、ONS-M21抗体はC κ 型L鎖および γ -1C型のH鎖を有することが明らかになった。ONS-M21のタイピングについて参考例2に後記する。

次に、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法を用いてマウスモノクローナル抗体のカッパ（ κ ）型L鎖V領域を増幅するため、配列番号：1～11に示す11種のオリゴヌクレオチドプライマー（Mouse Kappa Variable; MKV）及び配列番号：12に示すオリゴヌクレオチドプライマー（Mouse Kappa Constant; MKC）をそれぞれ5'-末端プライマー及び3'-末端プライマーとして使用する。

前記MKVプライマーはマウスカッパ型L鎖リーダー配列をコードするDNA配列とハイブリダイズし、そして前記MKCプライマーはマウスカッパ型L鎖C領域をコードするDNA配列とハイブリダイズする。

マウスモノクローナル抗体のH鎖V領域の増幅のため、配列番号：13～24に示す12種のオリゴヌクレオチドプライマー（Mouse Heavy Variable; MHV）及び配列番号：25に示すオリゴヌクレオチドプライマー（Mouse Heavy

Constant; MHC) をそれぞれ 5' -末端プライマー及び 3' -末端プライマーとして使用する。

なお、本実施例では 5' -末端プライマーはその 5' -末端近傍に制限酵素 S a l I 切断部位を提供する配列 G T C G A C を含有し、そして 3' -末端プライマーはその 5' -末端近傍に制限酵素 X m a I 切断部位を提供するヌクレオチド配列 C C C G G G を含有するものを使用している。これらの制限酵素切断部位は可変領域をコードする目的の D N A 断片をクローニングベクターにサブクローニングするために用いられる限り、他の制限酵素切断部位でもよい。

次に、マウスモノクローナル抗体の目的とする可変領域をコードする D N A 断片を得るために、増幅生成物を制限酵素 S a l I 及び X m a I で切断した後、低融点アガロースまたはカラム〔P C R 産物精製用キット (Q I A G E N 等)、D N A 精製用キット (G E N E C L E A N I I 等) など〕により、分離・精製を行う。他方、プラスミド p U C 1 9 のとき適当なクローニングベクターを同じ制限酵素 S a l I 及び X m a I により切断させ、この p U C 1 9 に前記 D N A 断片を連結することにより、マウスモノクローナル抗体の目的とする可変領域をコードする D N A 断片を含むプラスミドを得る。

クローン化された D N A の配列決定は任意の常法例えば、自動 D N A シークエンサー (A p p l i e d B i o s y s t e m s I n c. 製) を用いて行うことができる。

目的とする D N A のクローン化及びその配列決定を実施例 1 及び 2 に具体的に記載する。

相補性決定領域 (C D R)

L 鎖及び H 鎖の各対の V 領域は抗原結合部位を形成する。L 鎖及び H 鎖上の可変領域は共通性のある比較的保存された 4 個のフレームワークと 3 個の超可変又は相補性決定領域 (C D R) により連結

されている (Kabat, E. A. ら、「Sequences of Proteins of Immunological Interest」, US Dept. Health and Human Services 1983)。

前記4個のフレームワーク領域 (FR) の多くの部分は β -シート構造をとり、その結果3個のCDRはループを形成する。CDRはある場合には β -シート構造の一部を形成することもある。3個のCDRはFRによって相互に立体的に非常に近い位置に保持され、そして対をなす領域の3個のCDRと共に抗原結合部位の形成に寄与する。

これらのCDR領域は、得られた抗体のV領域のアミノ酸配列と既知抗体のV領域の既知アミノ酸配列とを照合することによって、Kabat, E. A. ら、「Sequences of Proteins of Immunological Interest」の経験則から見出すことができ、実施例3において具体的に説明する。

キメラ抗体の作製

ヒト髄芽腫細胞に対する抗体の再構成ヒトV領域を設計するに先立って、使用するCDRが実際に抗原結合領域を形成することを確認する必要がある。この目的のため、キメラ抗体を作製した。さらに実施例1に記載されるモノクローナル抗体ONS-M21のクローン化されたDNAのヌクレオチド配列から推定されるマウス抗ヒト髄芽腫細胞抗体のアミノ酸配列を既知のマウス及びヒトの抗体のV領域と比較した。

モノクローナル抗体ONS-M21のマウスL鎖及びH鎖V領域をコードするDNA断片がクローニングされれば、これらのマウスV領域をヒト抗体定常領域をコードするDNAと連結して発現させ

ることによってキメラ抗ヒト髄芽腫細胞抗体が得られる。

キメラ抗体を作製するための基本的な方法は、クローン化された cDNA に存在するマウスリーダー配列及び V 領域配列を、哺乳類細胞発現ベクター中にすでに存在するヒト抗体 C 領域をコードする配列に連結することを含んで成る。

前記ヒト抗体 C 領域は任意のヒト L 鎖 C 領域およびヒト H 鎖 C 領域であることができ、例えばヒト L 鎖 C κ あるいは H 鎖 $\gamma-1$ C や $\gamma-4$ C を各々挙げることができる。

キメラ抗体の製造のためには 2 種類の発現ベクター、すなわちエンハンサー／プロモーター系のごとき発現制御領域による制御のもとでマウス L 鎖 V 領域及びヒト L 鎖 C 領域をコードする DNA を含んで成る発現ベクター、並びにエンハンサー／プロモーター系のごとき発現制御領域のもとでマウス H 鎖 V 領域及びヒト H 鎖 C 領域をコードする DNA を含んで成る発現ベクターを作製する。次に、これらの発現ベクターにより哺乳類細胞のごとき宿主細胞を同時形質転換し、そして形質転換された細胞をインービトロ又はインービボで培養してキメラ抗体を製造する（例えば WO 91-16928）。

あるいは、マウス L 鎖 V 領域及びヒト L 鎖 C 領域をコードする DNA 並びにマウス H 鎖 V 領域及びヒト H 鎖 C 領域をコードする DNA を単一の発現ベクターに導入し、そして該ベクターを用いて宿主細胞を形質転換し、次にこの形質転換された宿主をインービボ又はインービトロで培養して目的とするキメラ抗体を生産させる。

キメラ抗体の作製を実施例 4 に記載する。

マウス ONS-M21 κ 型 L 鎖リーダー領域及び V 領域をコードする cDNA を PCR 法を用いてサブクローンし、ヒトゲノム L 鎖 C κ 鎖領域をコードする DNA を含有する発現ベクターに連結する。マウス ONS-M21 抗体の $\gamma 1$ 型 H 鎖リーダー及び V 領域をコー

ドする cDNA を、PCR 法を用いてサブクローン化し、ヒト γ -1 C 領域をコードするゲノム DNA を含有する発現ベクターに連結する。

特に設計された PCR プライマーを用いて、マウス ONS-M21 の V 領域をコードする cDNA をそれらの 5' - 及び 3' - 末端において適当な塩基配列を導入して、それらが発現ベクターに容易に挿入されるように、且つそれらが該発現ベクター中で適切に機能するようにした（例えば、本発明では Kozak 配列の導入により転写効率を上げるように工夫されている）。次に、これらのプライマーを用いて PCR により増幅して得たマウス ONS-M21 の V 領域を、所望のヒト C 領域をすでに含有する HEF 発現ベクター（図 1）に挿入した。これらのベクターは、種々の哺乳類細胞系における遺伝子操作された抗体の一過性（transient）発現又は安定な発現のために適当である。

キメラ ONS-M21 抗体はヒト髄芽腫細胞に結合する活性を示した。従って正しいマウス V 領域がクローン化されそして配列が決定されていたことが示された。

再構成ヒト ONS-M21 抗体 V 領域の設計

マウスモノクローナル抗体の CDR がヒト抗体に移植されている再構成ヒト抗体を作製するためには、マウスモノクローナル抗体の FR とヒト抗体の FR との間に高い相同性が存在することが望ましい。従って、マウス ONS-M21 抗体の L 鎖及び H 鎖の V 領域を、Protein Data Bank を用いて構造が解明されているすべての既知抗体の V 領域と比較した。

マウス ONS-M21 の L 鎖 V 領域はヒト L 鎖 V 領域のサブグループ IV (HSGIV) のコンセンサス配列に最も類似しており、61.9% の相同性が存在する。

マウス ONS-M21 抗体の L 鎖 V 領域は既知ヒト抗体 L 鎖 V 領域との比較において、ヒト L 鎖 V 領域のサブグループ I の 1 構成員であるヒト L 鎖 V 領域 REI に 60.4% の類似性を示した。従って、再構成ヒト ONS-M21 抗体 L 鎖 V 領域の作製のための出発材料として REI の FR を使用した。

再構成ヒト ONS-M21 抗体 L 鎖 V 領域の 16 のバージョン「a」～「p」を設計した。第一のバージョン（バージョン「a」）においては、ヒト FR は再構成ヒト CAMPATH-1 H 抗体中に存在する REI に基く FR (Riechmann, L. ら、Nature 332, 323-327, (1988)) (WO92-197) 9 に記載の再構成ヒト PM-1 の L 鎖 V 領域のバージョン「a」と同一であり、そしてマウス CDR はマウス ONS-M21 抗体の L 鎖 V 領域中の CDR と同一とした。

表 1, 2 は、マウス ONS-M21 抗体の L 鎖 V 領域、REI の FR 及び 16 バージョンの再構成 ONS-M21 抗体の L 鎖 V 領域のアミノ酸配列を示す。

表 1

再構成ヒトONS-M21L鎖V領域の設計

	FR1						CDR1				FR2						CDR2			
	1			2			3				4						5			
	12345678901234567890123				45678901234					567890123456789							0123456			
ONS-M21VL	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTC				KASQNVGTNVA					WYQQKPGQSPKPLIY							SASYRYS			
RE1	DIQMTQSPSSLASVGDRVTITC									WYQQKPGKAPKLLIY										
RVL _a	DIQMTQSPSSLASVGDRVTITC				KASQNVGTNVA					WYQQKPGKAPKLLIY							SASYRYS			
RVL _b																				
RVL _c																				
RVL _d																				
RVL _e					SV															
RVL _f					SV															
RVL _g					SV															
RVL _h																				
RVL _i					SV					QS	P									
RVL _j					SV					QS	P									
RVL _k					SV															
RVL _l					SV					QS	P									
RVL _m										QS	P									
RVL _n		QKF								QS										
RVL _o										QS	P									
RVL _p										P										

表 2

再構成ヒトONS-M21L鎖V領域の設計 (続き)

	FR3			CDR3	FR4
	6	7	8	9	1 0
	7890123456789012345678	901234567	8901234567		
ONS-M21VL	GVPDRFTGSGSGTDFTLTITNVQSEDLADYFC			QQYNSYPRA	FGGGTKLEIK
RE1	GVPSRFSGSGSGTDFTFITSSLPEDIATYYC				FGQGTKVEIK
RVLa	GVPSRFSGSGSGTDFTFITSSLPEDIATYYC			QQYNSYPRA	FGQGTKVEIK
RVLb	_____Y_____			_____	_____
RVLc	_____F_____			_____	_____
RVLd	_____Y_____F_____			_____	_____
RVLe	_____			_____	_____
RVLf	_____F_____			_____	_____
RVLg	_____L_____F_____			_____	_____
RVLh	_____L_____			_____	_____
RVLi	_____L_____F_____			_____	_____
RVLj	_____L_____D-F_____			_____	_____
RVLk	_____L_____D-F_____			_____	_____
RVLl	_____			_____	_____
RVLm	_____			_____	_____
RVLn	_____			_____	_____
RVL o	_____			_____	_____
RVLp	_____			_____	_____

注：RE1のFR中の下線を付したアミノ酸はヒトRE1のアミノ酸配列 (Palm, W. ら、Hoppe-Seyler's, Z. Physiol. Chem., 356, 167-191, 1975) とは異なるアミノ酸の位置を示す。

マウスONS-M21のH鎖V領域はヒトH鎖V領域のサブグループI (HSGI) のコンセンサス配列に最も類似しており、57.9%の相同性が存在する。マウスONS-M21抗体のH鎖V領域は既知のヒト抗体H鎖V領域との比較において、FR1からFR3までは、ヒトH鎖V領域のサブグループIの1構成員であるヒト抗

体EuのH鎖V領域（Cunningham, B. J. ら、Biochemistry 9, 3161, 1970）に非常に類似していた。さらには、CDRのサイズもマウスONS-M21抗体とヒト抗体Euとの間で非常に類似していた。

このため、ヒト抗体EuのFRを、再構成ヒトONS-M21抗体のH鎖V領域の作製のための出発材料として用いた。

しかしながら、ヒト抗体EuのFR4のアミノ酸配列は、ヒト抗体のサブグループIコンセンサス配列と異った配列を有しているために、今回FR4に関してはヒトH鎖V領域がサブグループIに属するヒト抗体ND（Kenten, J. H. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 79, 6661-6665（1982））のFR4のアミノ酸配列を用いることとした。

再構成ヒトONS-M21抗体のH鎖V領域を設計した。ヒトFR1中の27位、28位、29位、30位およびFR3中の94位のアミノ酸をマウスONS-M21のアミノ酸と同一とした。

表 3

再構成ヒトONS-M21H鎖V領域の設計

FR1												CDR1				FR2							
1				2				3								4							
123456789012345678901234567890												12345				67890123456789							
ONS-M21VH EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIK												DTYIH				WAKQRPEQGLEWIG							
EU QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFS																WVRQAPGQGLEWMG							
RVHa QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGFNIK												DTYIH				WVRQAPGQGLEWMG							
CDR2												FR3											
5				6				7				8				9							
01223456789012345												67890123456789012222345678901234											
A												ABC											
ONS-M21VH RIDPADGNTKYDPKFQG												KATITADTSSNTAYLQLSSLTSED TAVYYCAS											
EU												RVTITADESTNTAYMELSSLRSED TAFYFCAG											
RVHa RIDPADGNTKYDPKFQG												RVTITADESTNTAYMELSSLRSED TAFYFCAG											
CDR3						FR4																	
1						1																	
0						1																	
56789012						34567890123																	
ONS-M21VH AYYVNQDY						WGQGTSTVTVSS																	
EU																							
ND						WGQGTSTVTVSS																	
RVHa AYYVNQDY						WGQGTSTVTVSS																	

再構成ヒトONS-M21抗体の作製

再構成ヒトONS-M21抗体V領域の作製を実施例5に具体的に記載する。

本発明の再構成ヒトONS-M21抗体は、

(A) (1) ヒトL鎖C領域、及び

(2) ヒトL鎖FR、及びヒト髄芽腫に対するマウスモノクローナル抗体ONS-M21のL鎖V領域CDRを含んで成るL鎖V領域、を含んで成るL鎖；並びに

(B) (1) ヒトH鎖C領域、及び

(2) ヒトH鎖FR、及びヒト髄芽腫に対するマウスモノクローナル抗体ONS-M21のH鎖V領域CDRを含んで成るH鎖V領域、を含んで成るH鎖；

から構成される。

特定の抗原に対して十分に活性がある再構成ヒト型化抗体を作成するために、前記ヒトFRのアミノ酸配列の一部を置換することが望ましい。

好ましい態様においては、前記L鎖V領域のFR2の46位のアミノ酸がプロリンであること、または、42, 43, 46位のアミノ酸が各々、グルタミン、セリン、プロリンの如きマウスFR由来のアミノ酸を有するものがよく、さらに好ましくは、表1、表2に於けるRVLi, RVLj, RVLl, RVLm, RVLo, RVLpのアミノ酸配列を有するものである。

前記ヒトL鎖C領域は任意のヒトL鎖C領域であることができ、例えばヒトκC領域であり；そして前記ヒトH鎖C領域は任意のヒトH鎖C領域であることができ、例えばヒトγ-1C領域、ヒトγ-4C領域等である。あるいは、前記ヒトL鎖C領域および／または前記ヒトH鎖C領域のかわりにトキシン、ラジオアイソトープを結合させてもよい。

再構成抗体の製造のためには、2種類の発現ベクター、すなわちエンハンサー／プロモーター系のごとき発現制御領域による制御のもとに前に定義した再構成ヒトL鎖をコードするDNAを含んで成る発現ベクター、及びエンハンサー／プロモーター系のごとき発現制御領域のもとに前に定義した再構成ヒトH鎖をコードするDNAを含んで成るもう一つの発現ベクターを作製する。次に、これらの発現ベクターを用いて哺乳類細胞のごとき宿主細胞を同時形質転換

し、そしてこの形質転換された細胞をインービボ又はインービトロで培養して再構成ヒト抗体を生産せしめる（例えば、WO 91-16927）。

あるいは、再構成L鎖をコードするDNA及び再構成ヒトH鎖をコードするDNAを単一の発現ベクターに導入し、そしてこのベクターを用いて宿主を形質転換し、次にこの形質転換された宿主細胞をインービボ又はインービトロで培養して目的とする再構成ヒト抗体を生産せしめる。

さらには、FabあるいはFvを、またはFvを連結させたシングルチェーンFvを適当な宿主で産生させ、前述の目的に使用することができる（例えばBird等、TIBTECH, 9, 132-137, (1991)を参照）。

以上のようにして目的とするキメラ抗体あるいはヒト型化抗体をコードする遺伝子で形質転換した形質転換体を培養し、産生したキメラ抗体あるいはヒト型化抗体は、細胞内または細胞外から分離し均一にまで精製することができる。

なお、本発明の目的蛋白質であるキメラ抗体あるいはヒト型化抗体の分離・精製を、プロテインAアガロースカラムを用いて行うことができる。また、その他に、通常の蛋白質で用いられる分離・精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。例えば各種クロマトグラフィー、限外濾過、塩析、透析等を適宜選択、組合せれば、キメラ抗体あるいはヒト型化抗体は分離・精製することができる。

ヒト髄芽腫細胞に対する本発明のキメラ抗体又は再構成ヒト抗体の製造のために任意の発現系、例えば真核細胞、例えば動物細胞、例えば樹立された哺乳類細胞系、真糸状菌細胞、及び酵母細胞、並びに原核細胞、例えば細菌細胞、例えば大腸菌細胞等を使用するこ

とができる。好ましくは、本発明のキメラ抗体又は再構成抗体は哺乳類細胞、例えばCOS細胞又はCHO細胞中で発現される。

これらの場合、哺乳類細胞での発現のために有用な常用のプロモーターを用いることができる。例えば、ヒト・サイトメガロウィルス前期 (human cytomegalovirus immediate early; HCMV) プロモーターを使用するのが好ましい。HCMVプロモーターを含有する発現ベクターの例には、HCMV-V_H-HC_γ1, HCMV-V_L-HC_κ 等であって、pSV2neoに由来するもの (国際公開出願WO92-19759 参照) が含まれる。

また、その他に、本発明のために用いることのできる哺乳動物細胞における遺伝子発現のプロモーターとしてはレトロウィルス、ポリオーマウィルス、アデノウィルス、シミアンウィルス40 (SV40) などのウィルスプロモーターやヒト・ポリペプチド・チェーン・エロンゲーション・ファクター1 α (HEF-1 α) などの哺乳動物細胞由来のプロモーターを用いればよい。例えばSV40のプロモーターを使用する場合は、Mulligan, R. C. らの方法 (Nature 277 108-114 (1979))、また、HEF-1 α プロモーターを使用する場合は、Mizushima, S. らの方法 (Nucleic Acids Research, 18, 5322, (1990)) に従えば容易に実施することができる。

複製起原としては、SV40、ポリオーマウィルス、アデノウィルス、牛パピローマウィルス (BPV) 等の由来のものを用いることができ、さらに宿主細胞系中での遺伝子コピー数増幅のため、発現ベクターは選択マーカーとして、ホスホトランスフェラーゼAPH (3') IIあるいはI (neo) 遺伝子、チミジンキナーゼ (T

K) 遺伝子、大腸菌キサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Ecogpt) 遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) 遺伝子等を含むことができる。

本発明はまた、ヒト髄芽腫細胞に対する再構成ヒト抗体のH鎖V領域とL鎖V領域とを連結して成る一本鎖Fv領域を提供する。このFvポリペプチドにおいてH鎖V領域とL鎖V領域は好ましくはリンカー、好ましくはペプチドリナーを介して連結されている。

一本鎖Fv領域におけるH鎖V領域は、再構成ヒト抗体のH鎖V領域として前記記載したもののいずれであってもよい。このH鎖V領域は、下記に定義されるアミノ酸配列：

CDR1: Asp Thr Tyr Ile His

CDR2: Arg Ile Asp Pro Ala Asp Gly Asn Thr Lys Tyr Asp Pro
Lys Phe Gln Gly

CDR3: Ala Tyr Tyr Val Asn Gln Asp Tyr

またはその一部から成る3個のCDR、および4個のFRを含む。

また、L鎖V領域は、下記に定義されるアミノ酸配列：

CDR1: Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala

CDR2: Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser

CDR3: Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg Ala

またはその一部から成る3個のCDR、および4個のFRを含む。

具体例として、配列番号：80に記載のアミノ酸配列中のアミノ酸番号1から116までのアミノ酸配列から成るH鎖V領域と、配列番号：40，43，46，47，50，51，54，55，58，61，62，63，66，69，70又は73の内のいずれかに記載のアミノ酸配列中のアミノ酸番号1から106までのアミノ酸配列から成るL鎖V領域を含んで成る一本鎖Fv領域が挙げられる。

また、好ましい1例として配列番号：80に記載のアミノ酸配列

中のアミノ酸番号 1 から 1 1 6 までのアミノ酸配列から成る H 鎖 V 領域と配列番号 : 7 3 に記載のアミノ酸配列中のアミノ酸番号 1 から 1 0 6 までのアミノ酸配列から成る L 鎖 V 領域とを含んで成る一本鎖 F v 領域が挙げられる。

これらの V 領域は好ましくはペプチドリンカーにより連結されている。ペプチドリンカーとしては、例えばアミノ酸 1 2 ~ 1 9 個から成る任意の一本鎖 F v 領域が挙げられるが、具体的な一例として Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser (配列番号 : 9 0) から成るペプチド断片が用いられる。

一本鎖 F v 領域の一例のアミノ酸配列を配列番号 : 8 9 に示し、このアミノ酸配列を有する一本鎖 F v 領域を、本発明において s c F v - h M 2 1 と称し、実施例 6 において詳細に説明する。

本発明の一本鎖 F v 領域をコードする DNA は、すでに詳細に説明した再構成ヒト O N S - M 2 1 抗体の H 鎖、又は H 鎖 V 領域をコードする DNA、及び再構成ヒト O N S - M 2 1 抗体の L 鎖、又は L 鎖 V 領域をコードする DNA を鎖型とし、それらの配列の内の所望のアミノ酸配列をコードする DNA 部分を、その両端を規定するプライマー対を用いて P C R 法により増幅することにより得られる。実施例 6 において、H 鎖 V 領域と、L 鎖 V 領域バージョン p とを含んで成る一本鎖 F v 領域をコードする DNA の作製方法を具体的に記載するが、L 鎖 V 領域のバージョン a ~ o のアミノ酸配列及びそれをコードする DNA の作製方法が詳細に記載されているから、それらにバージョン p において用いた方法を適用することにより、本発明の種々の一本鎖 F v 領域をコードする DNA を作製することができる。

また、一旦一本鎖 F v 領域をコードする DNA が作製されれば、それらを含む発現ベクター、及び該発現ベクターにより形質転

換された宿主は常法に従って得ることができ、また、その宿主を用いて常法に従って、一本鎖Fv領域を得ることができる。これらの具体例を実施例6に詳細に記載する。

ONS-76細胞に対するマウスONS-M21抗体の結合阻害能を指標にしてscFv-hM21の抗原結合活性をヒト型化ONS-M21抗体、およびFab断片と比較した結果、scFv-hM21はFab断片と同等の結合阻害能を示した。以上より、オリジナルの抗体と同程度のアフィニティーを持つ一本鎖Fv領域の構築に成功した。

一般に、一本鎖Fv領域はwhole IgGに比べ組織、腫瘍への移行性が優れており、今回構築したscFv-hM21は今後RI標識によるイメージングへの利用、およびトキシン、RIと結合させる事により治療薬としての利用が期待される。

実施例

次に、本発明を下記の実施例により具体的に説明するが、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. ヒト髄芽腫細胞に対するマウスモノクローナル抗体のV領域をコードするDNAのクローン化

ヒト髄芽腫細胞に対するマウスモノクローナル抗体ONS-M21の可変領域をコードするDNAを次の様にしてクローン化した。

1. メッセンジャーRNA (mRNA) の調整

ハイブリドーマONS-M21からのmRNAを、Fast Track mRNA Isolation Kit Version 3.2 (Invitrogen社製)を用いて調整した。

2. 二本鎖cDNAの合成

約4 μgのmRNAよりTHE COPY KIT (Invit

rogen社製)を用いて二本鎖cDNAを合成した。

3. 抗体可変領域をコードする遺伝子のPCR法による増幅

Thermal Cycler (Perkin Elmer Cetus社)を用いてPCR法を行なった。

(1) マウスL鎖V領域をコードする遺伝子の増幅

PCR法に使用するプライマーは、マウスカッパ型L鎖リーダー配列とハイブリダイズする配列番号: 1~11に示すMKV (Mouse Kappa Variable) プライマー (Jones, S. T. ら、Bio/Technology, 9, 88-89, (1991))を用いた。

PCR溶液100 μ lは、10 mM Tris-HCl (pH8.3), 50 mM KCl, 0.1 mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)、1.5 mM MgCl₂, 5ユニットのDNAポリメラーゼAmpli Taq (Perkin Elmer Cetus社)、0.1 μ Mの配列番号1~11に示すMKVプライマーと0.4 μ Mの配列番号12に示すMKCプライマー及び二本鎖cDNA 0.1 μ gを含有し、各々のMKC1~12プライマーについて別々に増幅した。これを50 μ lの鉱油で覆った後、94℃の初期温度にて3分間そして次に94℃にて1分間、50℃にて1分間及び72℃にて1分間、この順序で加熱した。この温度サイクルを30回反復した後、反応混合物をさらに72℃にて10分間インキュベートした。

(2) マウスH鎖V領域をコードするcDNAの増幅

PCRのためのプライマーとして配列番号: 13~24に示すMHV (Mouse Heavy Variable) プライマー1~12、及び配列番号: 25に示すMHC-G1 (Mouse Heavy Constant) プライマー (Jones, S. T.

ら、Bio/Technology, 9, 88-89, (1991))を使用した。

cDNAの増幅は、0.25 μ MのそれぞれのMHVプライマーと2.5 μ MのMHC-G1プライマーの混合物を用いて増幅した点を除いて、前記3.(1)においてL鎖V領域遺伝子の増幅について記載したのと同じ方法により増幅を行なった。

4. PCR生成物の精製および断片化

前記のようにしてPCR法により増幅したDNA断片を低融点アガロース(Sigma社製)にて精製し、そして10mM MgCl₂及び1mMジスレイトールを含有する10mM Tris-HCl (pH 7.9)中で5ユニットの制限酵素Xma I (New England Biolabs社製)を用いて37℃にて3時間消化した。

次に、40ユニットの制限酵素Sal I (宝酒造社製)により37℃にて2時間消化し、そして生ずるDNA断片を、1.5%低融点アガロース(Sigma社製)を用いるアガロースゲル電気泳動により分離した。

約450bp長のDNA断片を含有するアガロース片を切り取りそして65℃にて5分間溶融せしめ、そしてこれと同容積の2mM EDTA及び200mM NaClを含有する20mM Tris-HCl (pH 7.5)を加えた。この混合物をフェノール及びクロロホルムにより抽出し、そしてDNA断片をエタノール沈澱により回収し、そして1mM EDTAを含有する10mM Tris-HCl (pH 7.5)に溶解した。

こうして、マウスカッパ型L鎖可変領域をコードする遺伝子を含んで成るDNA断片、及びマウスH鎖可変領域をコードする遺伝子を含んで成るDNA断片を得た。上記DNA断片はいずれもその5'-末端にSal I 接着末端を有しそしてその3'-末端にXma I

接着末端を有する。

5. 連結及び形質転換

上記のようにして調製したマウスカッパ型L鎖V領域をコードする遺伝子を含んで成るS a l I - X m a I DNA断片約0.3 μ gを、S a l I 及びX m a I で消化することにより調製したp U C 1 9 ベクター約0.1 μ gと、50 mM T r i s - H C l (pH7.6), 10 mM M g C l ₂、10 mMジチオスレイトール、1 mM A T P、50 mg/mlのポリエチレングリコール(8000)及び1ユニットT4 DNAリガーゼ(G I B C O B R L 製)を含有する反応混合物中で、16℃にて4時間反応させ連結した。

次に、10 μ lの上記連結混合物を大腸菌D H 5 α のコンピテント細胞50 μ lに加え、そしてこの細胞を氷上で30分間、42℃にて1分間そして再び氷上で1分間静置した。次いで400 μ lの2×YT培地(M o l e c u l a r C l o n i n g : A L a b o r a t o r y M a n u a l, S a m b r o o k ら、C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y P r e s s, (1989))を加え、37℃にて1時間インキュベートした後、2×YT寒天培地(M o l e c u l a r C l o n i n g : A L a b o r a t o r y M a n u a l, S a m b r o o k ら、C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y P r e s s, (1989))上にこの大腸菌をまき、37℃にて一夜インキュベートして大腸菌形質転換体を得た。

この形質転換体を、50 μ g/mlのアンピシリンを含有する2×YT培地10 ml中で37℃にて一夜培養し、そしてこの培養物から、アルカリ法(M o l e c u l a r C l o n i n g : A L a b o r a t o r y M a n u a l, S a m b r o o k ら、C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y P r e s s,

(1989)) に従ってプラスミドDNAを調製した。

こうして得られた、ハイブリドーマONS-M21に由来するマウスカッパ型L鎖V領域をコードする遺伝子を含有するプラスミドをpUC-M21-V_Lと命名した。

上記の同じ方法に従って、ハイブリドーマONS-M21に由来するマウスH鎖V領域をコードする遺伝子を含有するプラスミドをSalI-XmaI DNA断片から作成し、そしてpUC-M21-V_Hと命名した。

実施例 2. DNAの塩基配列の決定

前記のプラスミド中のcDNAコード領域の塩基配列を、自動DNAシーケンサー (Applied Biosystem Inc製) およびTaq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystem Inc製) を用いて、メーカー指定のプロトコールに従って塩基配列を決定した。

プラスミドpUC-M21-V_Lに含まれるマウスONS-M21抗体のL鎖V領域をコードする遺伝子の塩基配列を配列番号26に示す。また、プラスミドpUC-M21-V_Hに含まれるマウスONS-M21抗体のH鎖V領域をコードする遺伝子の塩基配列を配列番号27に示す。

実施例 3. CDRの決定

L鎖及びH鎖のV領域の全般的構造は、互いに類似性を有しており、それぞれ4つのフレームワーク部分が3つの超可変領域、即ち相補性決定領域 (CDR) により連結されている。フレームワークのアミノ酸配列は、比較的良く保存されているが、一方、CDR領域のアミノ酸配列の変異性は極めて高い (Kabat, E. A. ら、
「Sequences of Proteins of Immu

n o l o g i c a l I n t e r e s t J U S D e p t . H e a l t h a n d H u m a n S e r v i c e s , 1 9 8 3) 。

この様な事実に基づき、ヒト髄芽腫細胞に対するマウスモノクローナル抗体の可変領域のアミノ酸配列をK a b a t らにより作成された抗体のアミノ酸配列のデータベースにあてはめて、相同性を調べることによりC D R 領域を表 4 に示す如く決定した。

表 4

プラスミド	配列番号	C D R (1)	C D R (2)	C D R (3)
pUC-M21-V _L	26	24-34	50-56	89-97
pUC-M21-V _H	27	31-35	50-66	99-106

実施例 4 . クローン化 c D N A の発現の確認 (キメラ O N S - M 2 1 抗体の作製)

発現ベクターの作製

キメラ O N S - M 2 1 抗体を発現するベクターを作製するため、それぞれマウス O N S - M 2 1 κ L 鎖及び H 鎖 V 領域をコードする c D N A クローン p U C - M 2 1 - V_L 及び p U C - M 2 1 - V_H を P C R 法により修飾した。そして H E F 発現ベクター (前記、W O 9 2 - 1 9 7 5 9 参照) (図 1 を参照のこと) に導入した。

L 鎖 V 領域のための後方プライマー O N S - L 7 2 2 S (配列番号 : 2 8) 及び H 鎖 V 領域のための後方プライマー O N S - H 3 . 2 S (配列番号 : 2 9) は、各々の V 領域のリーダー配列の最初をコードする D N A にハイブリダイズし且つ K o z a k コンセンサス配列 (K o z a k , M . ら、J . M o l . B i o l . 1 9 6 , 9 4 7 - 9 5 0 , 1 9 8 7) 及び H i n d I I I 制限部位を有するように設計した。L 鎖 V 領域のための前方プライマー O N S - L 7 2 2 A (配列番号 : 3 0) 及び H 鎖 V 領域のための前方プライマー O N S

—H 3. 2 A (配列番号: 31) は、J 領域の末端をコードする DNA 配列にハイブリダイズし且つスプライドナー配列及び Bam HI 制限部位を有するように設計した。

10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 100 μ M dNTPs, 1.5 mM MgCl₂, 100 pmole ずつの各プライマー、100 ng の鋳型 DNA (pUC-M21-V_L 又は pUC-M21-V_H)、及び 5 u の Ampli Taq 酵素を含有する 100 μ l の PCR 反応混合物を 50 μ l の鉱油で覆い、94 °C にて最初の変性の後、94 °C にて 1 分間、55 °C にて 1 分間、72 °C にて 1 分間のサイクルを 30 回行い、最後に 72 °C にて 10 分間インキュベートした。

PCR 生成物を 1.5% 低融点アガロースゲルを用いて精製し、HindIII 及び BamHI で消化し、そして L 鎖 V 領域については、HEF 発現ベクター HEF-V_L-g κ に、H 鎖 V 領域については HEF 発現ベクター HEF-V_H-g γ にそれぞれクローニングした。DNA 配列決定の後、正しい DNA 配列を有する DNA 断片を含むプラスミドをそれぞれ HEF-M21L-g κ , HEF-M21H-g γ 1 と命名した。

COS 細胞へのトランスフェクション

キメラ ONS-M21 抗体の一過性発現を観察するため、前記発現ベクターを COS 細胞において試験した。HEF-M21L-g κ と、HEF-M21H-g γ 1 Gene Pulser 装置 (BioRad 社製) を用いてエレクトロポレーションにより COS 細胞に同時形質転換した。各 DNA (10 μ g) を、PBS 中 1×10^7 細胞/ml の 0.8 ml のアリコートに加え、1,900 V、25 μ F の容量にてパルスを与えた。

室温にて 10 分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理

された細胞を、10%の γ -グロブリンフリーウシ胎児血清を含有するDMEM培養液（GIBCO社製）に加えた。72時間のインキュベーションの後、培養上清を集め、遠心分離により細胞破片を除去し、5倍量の結合緩衝液で平衡化したプロテインAアガロースカラム（Affi-Gel Protein A MAPS IIキット、BioRad）に適用した。カラムを15倍量の結合緩衝液で洗浄し、次に5倍量の溶出緩衝液で溶出した。溶出液を濃縮し、そしてマイクロコンセンレーター（Centricon 100, Amicon社製）を用いて緩衝液をPBSに変えた。

Cell-ELISA

抗原結合測定のためのCell-ELISAプレートを次のようにして調整した。96穴プレートに10%のウシ胎児血清を含有するRPMI培養液により 1×10^6 細胞/mlに調整したヒト髓芽腫細胞株ONS-76（Tamura et al., Cancer Res., 49, 5380-5384, (1989)）を加え、一晚培養した後、0.1%グルタルアルデヒド（半井化学薬品社製）にて固定した。ブロッキングの後、キメラONS-M21抗体を順次希釈して、各穴に加え、室温にてインキュベーション及び洗浄の後、アルカリホスファターゼ結合ヤギ抗-ヒトIgG抗体（Sigma社製）を加えた。インキュベーション及び洗浄の後、基質溶液を加え、次に405nmでの吸光度を測定した。

その結果、キメラ抗体ONS-M21は、髓芽腫細胞株ONS-76と特異的に結合したことにより、このキメラ抗体がマウスモノクローナル抗体ONS-M21のV領域の正しい構造を有することが示唆された（図2を参照のこと）。

実施例 5. 再構成ヒト ONS-M21 抗体の作製再構成ヒト ONS-M21 抗体 L 鎖 V 領域の作製

再構成ヒト ONS-M21 抗体 L 鎖を、PCR 法による CDR-グラフティングにより作製した。この方法を図 3 に模式的に示す。ヒト抗体 REI 由来の FR を有する再構成ヒト抗体 ONS-M21 (バージョン「a」) の作製のために 8 個の PCR プライマーを使用した。外部プライマー A (配列番号: 32) 及び H (配列番号: 33) は、HEF 発現ベクター HEF-V_L-gk の DNA 配列とハイブリダイズするように設計された。

CDR-グラフティングプライマー B (配列番号: 34)、C (配列番号: 35) 及び D (配列番号: 36) はセンス DNA 配列を有し、そして CDR-グラフティングプライマー E (配列番号: 37)、F (配列番号: 38) 及び G (配列番号: 39) はアンチ-センス DNA 配列を有しそしてそれぞれプライマー B、C 及び D の 5'-末端の DNA 配列に対する相補的 DNA 配列 (23 ~ 35 bp) を有する。

第一 PCR 段階において 4 つの反応 A-E, B-F, C-G、及び D-H を行い、そして各 PCR 生成物を精製した。第一 PCR からの 4 つの PCR 生成物をそれら自体の相補性によりアッセンブリさせた (WO 92-19759 参照)。次に、外部プライマー A 及び H を加えて、再構成ヒト ONS-M21 抗体 L 鎖 V 領域をコードする全長 DNA を増幅した (第 2 PCR)。前記 PCR においては、ヒト抗体 REI からの FR に基く再構成ヒト SK2 抗体 L 鎖 V 領域バージョン「a」をコードするプラスミド HEF-RV_L-SK2 a (特願平 5-129787 を参照) を鋳型として用いた。

第一 PCR 段階においては、10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 100 μ M dNTPs, 1.5 mM Mg

C1₂、100 ngの鋳型DNA、100 pmoleの各プライマー及び5 uのAmp1 i Taqを含有する100 μ lのPCR混合物を用いた。各PCRチューブは50 μ lの鉱油で覆膜した。最初に94 $^{\circ}$ Cで変性した後、94 $^{\circ}$ Cにて1分間、55 $^{\circ}$ Cにて1分間及び72 $^{\circ}$ Cにて1分間の反応サイクルを行い、次に72 $^{\circ}$ Cにて10分間インキュベートした。

PCR生成物A-E (218 bp), B-F (101 bp), C-G (131 bp) 及びD-H (147 bp)を1.5%低融点アガロースゲルを用いて精製し、第二PCRでアッセンブリした。第二PCRにおいては、1 μ gの各第一PCRの生成物、及び5 uのAmp1 i Taqを含有する98 μ lのPCR混合物を、94 $^{\circ}$ Cにて2分間、55 $^{\circ}$ Cにて2分間及び72 $^{\circ}$ Cにて2分間で2サイクルインキュベートし、そして次に100 pmoleの各外部プライマー(A及びH)を加えた。PCRチューブを50 μ lの鉱油で覆い、そして前記と同一の条件で30サイクルのPCRを行った。

第二PCRにより生じた516 bpのDNA断片を1.5%低融点アガロースゲルで精製し、BamHI及びHindIIIで消化し、得られたDNA断片をHEF発現ベクターHEF-VL-gkにクローニングした。DNA配列決定の後、再構成ヒトONS-M21抗体L鎖V領域の正しいアミノ酸配列をコードするDNA断片を含むプラスミドをHEF-RVL-M21a-g κ と命名した。本プラスミドHEF-RVL-M21a-g κ に含まれるL鎖V領域のアミノ酸配列および塩基配列を配列番号：40に示す。

再構成ヒトONS-M21抗体L鎖V領域のバージョン「b」を、PCRを用いる変異誘発法によって作製した。変異原プライマーFTY-1 (配列番号：41) およびFTY-2 (配列番号：42) は、71位のフェニルアラニンがチロシンに変異するように設計し

た。

プラスミド H E F - R V L - M 2 1 a - g κ を鋳型とし、上記プライマーを用いて増幅した後、最終生成物を精製し、B a m H I および H i n d I I I で消化し、得られた D N A 断片を H E F 発現ベクター H E F - V L - g κ にクローニングし、プラスミド H E F - R V L - M 2 1 b - g κ を得た。本プラスミド H E F - R V L - M 2 1 b - g κ に含まれる L 鎖 V 領域のアミノ酸配列および塩基配列を配列番号 4 3 に示す。

再構成ヒト O N S - M 2 1 抗体 L 鎖 V 領域の各バージョン「c」, 「d」, 「e」, 「f」, 「g」, 「h」, 「i」, 「j」, 「k」, 「l」, 「m」, 「n」, 「o」, 「p」を以下のようにして作製した。

バージョン「c」は、変異原プライマーとして 8 7 位のチロシンがフェニルアラニンに変異するように設計した M 2 1 M 2 S (配列番号: 4 4) および M 2 1 M 2 A (配列番号: 4 5) を用い、プラスミド H E F - R V L - M 2 1 a - g κ を鋳型 D N A として、P C R 法により増幅し、プラスミド H E F - R V L - M 2 1 c - g κ を得た。本プラスミド H E F - R V L - M 2 1 c - g κ に含まれる L 鎖 V 領域のアミノ酸配列および塩基配列を配列番号 4 6 に示す。

バージョン「d」は、変異原プライマーとして F T Y - 1 および F T Y - 2 と M 2 1 M 2 S および M 2 1 M 2 A を用い、プラスミド H E F - R V L - M 2 1 a - g κ を鋳型 D N A としてプラスミド H E F - R V L - M 2 1 d - g κ を得た。本プラスミド H E F - R V L - M 2 1 d - g κ に含まれる L 鎖 V 領域のアミノ酸配列および塩基配列を配列番号 4 7 に示す。

バージョン「e」は、変異原プライマーとして 2 0 位のスレオニンがセリンに、2 1 位のイソロイシンがバリンに変異するように設

計したM21M3S（配列番号：48）およびM21M3A（配列番号：49）を用い、プラスミドHEF-RVL-M21aを鋳型DNAとして増幅し、プラスミドHEF-RVL-M21e-gκを得た。本プラスミドHEF-RVL-M21e-gκに含まれるL鎖V領域に含まれるアミノ酸配列および塩基配列を配列番号50に示す。

バージョン「f」は、プラスミドHEF-RVL-M21c-gκをBamHIおよびHinfIで、プラスミドHEF-RVL-M21e-gκをHindIIIおよびHinfIで各々消化し、152bpおよび250bpのDNA断片を得た。これらDNA断片を15%低融点アガロースゲルを用いて分離、精製した後、連結し、HEF発現ベクターHEF-RVL-gκに挿入して、プラスミドHEF-RVL-M21f-gκを得た。本プラスミドHEF-RVL-M21f-gκに含まれるL鎖V領域のアミノ酸配列および塩基配列を配列番号51に示す。

バージョン「g」は、変異原プライマーとして73位のフェニルアラニンがロイシンに変異するように設計したM21M4S（配列番号：52）およびM21M4A（配列番号：53）を用い、プラスミドHEF-RVL-M21f-gκを鋳型DNAとして増幅し、プラスミドHEF-RVL-M21g-gκを得た。本プラスミドHEF-RVL-M21g-gκに含まれるL鎖V領域のアミノ酸配列および塩基配列を配列番号54に示す。

バージョン「h」は、変異原プライマーとしてM21M4SおよびM21M4Aを用い、プラスミドHEF-RVL-M21a-gκを鋳型DNAとして増幅し、プラスミドHEF-RVL-M21h-gκを得た。本プラスミドHEF-RVL-M21h-gκに含まれるL鎖V領域のアミノ酸配列および塩基配列を配列番号55

に示す。

バージョン「i」は、変異原プライマーとして42位のリジンがグルタミンに、43位のアラニンがセリンに、46位のロイシンがプロリンに変異するように設計したM21M5S（配列番号：56）およびM21M5A（配列番号：57）を用い、プラスミドHEF-RVL-M21g-gκを鋳型DNAとして増幅し、プラスミドHEF-RVL-M21i-gκを得た。本プラスミドHEF-RVL-M21i-gκに含まれるL鎖V領域のアミノ酸配列および塩基配列を配列番号58に示す。

バージョン「j」は、変異原プライマーとしてM21M5S、M21M5Aおよび85位のスレオニンがアスパラギン酸に変異するように設計したM21M6S（配列番号：59）とM21M6A（配列番号：60）を用い、プラスミドHEF-RVL-M21i-gκを鋳型DNAとして増幅し、プラスミドHEF-RVL-M21j-gκを得た。本プラスミドHEF-RVL-M21j-gκに含まれるL鎖V領域のアミノ酸配列および塩基配列を配列番号61に示す。

バージョン「k」は、変異原プライマーとしてM21M6SおよびM21M6Aを用い、プラスミドHEF-RVL-M21g-gκを鋳型DNAとして増幅し、プラスミドHEF-RVL-M21k-gκを得た。本プラスミドHEF-RVL-M21k-gκに含まれるL鎖V領域のアミノ酸配列および塩基配列を配列番号62に示す。

バージョン「l」は、プラスミドHEF-RVL-M21a-gκをBamHIおよびSfaNIで、プラスミドHEF-RVL-M21i-gκをHindIIIおよびSfaNIで各々消化し、227bpおよび169bpのDNA断片を分離、精製した。得られたD

N A断片を連結し、発現ベクターH E F - R V L - g κに挿入し、プラスミドH E F - R V L - M 2 1 1 - g κを得た。本プラスミドH E F - R V L - M 2 1 1 - g κに含まれるL鎖V領域のアミノ酸配列および塩基配列を配列番号63に示す。

バージョン「m」は、変異原プライマーとしてM 2 1 M 5 S, M 2 1 M 5 Aおよび8位のプロリンがグルタミン酸に、9位のセリンがリジンに、10位のセリンがフェニルアラニンに変異するように設計したM 2 1 M 7 S（配列番号：64）とM 2 1 M 7 A（配列番号：65）を用い、プラスミドH E F - R V L - M 2 1 a - g κを鋳型DNAとして増幅し、プラスミドH E F - R V L - M 2 1 m - g κを得た。本プラスミドH E F - R V L - M 2 1 m - g κに含まれるL鎖V領域のアミノ酸配列および塩基配列を配列番号66に示す。

バージョン「n」は、変異原プライマーとして42位のリジンがグルタミン酸に、43位のアラニンがセリンに変異するように設計したM 2 1 M 8 S（配列番号：67）およびM 2 1 M 8 A（配列番号：68）を用い、プラスミドH E F - R V L - M 2 1 a - g κを鋳型DNAとしてプラスミドH E F - R V L - M 2 1 n - g κを得た。本プラスミドH E F - R V L - M 2 1 n - g κに含まれるL鎖V領域のアミノ酸配列および塩基配列を配列番号69に示す。

バージョン「o」は、プラスミドH E F - R V L - M 2 1 b - g κをB a m H IおよびB s r Iで、プラスミドH E F - R V L - M 2 1 a - g κをH i n d IIIおよびB s r Iで各々消化し、各プラスミドから251bpおよび142bpのDNA断片を分離、精製した。得られた各々のDNA断片を連結し、発現ベクターH E F - V L - g κに挿入し、プラスミドH E F - R V L - M 2 1 o - g κを得た。本プラスミドH E F - R V L - M 2 1 o - g κに含まれるL鎖V領

域のアミノ酸配列および塩基配列を配列番号70に示す。

バージョン「p」は、46位のロイシンをプロリンに変更するように設計した変異原プライマーM21M9S（配列番号：71）およびM21M9A（配列番号：72）を用い、プラスミドHEF-RVL-M21a-gκを鋳型DNAとして用い、プラスミドHEF-RVL-M21p-gκを得た。本プラスミドHEF-RVL-M21p-gκに含まれるL鎖V領域のアミノ酸配列および塩基配列を配列番号73に示す。

再構成ヒトONS-M21抗体H鎖V領域の作製

再構成ヒトONS-M21抗体H鎖V領域をコードするDNAを次の様にして設計した。ヒト抗体EuのFR1～3およびヒト抗体NDのFR4をコードするDNA配列をV領域（Kabat, E. A. ら、US Dept Health and Human Services, US Government Printing Offices, 1991）の「codon usage」に基づいて設計し、そしてマウスONS-M21抗体H鎖V領域のCDRをコードするDNA配列とつなげることにより、再構成ヒトONS-M21抗体H鎖V領域をコードする全長DNAを設計した。

次に、このDNA配列のそれぞれ5'側及び3'側にHindIII認識部位/KOZAKコンセンサス配列及びBamHI認識部位/スプライドナー配列を付加して、HEF発現ベクターに挿入できるようにした。

こうして設計したDNA配列を4個のオリゴヌクレオチドに分け、そして次に、これらのオリゴヌクレオチドのアセンブリーを妨害する可能性のあるオリゴヌクレオチド中の二次構造についてコンピューター解析した。

4個のオリゴヌクレオチド配列を配列番号：74～77に示す。

これらのオリゴヌクレオチドは111～137塩基の長さを有し、23～26bpのオーバーラップ領域を有する。オリゴヌクレオチド内のVH2（配列番号：74）、RVH4（配列番号：75）はセンスDNA配列を有し、そして他のVH1（配列番号：76）、RVH3（配列番号：77）はアンチセンスDNA配列を有する。これら4個のオリゴヌクレオチドのPCR法によるアセンブリーの方法を図に示す。（図4参照）

100ngずつの4種のオリゴヌクレオチド及び5uのAmpliTaqを含有する98 μ lのPCR混合物を、94℃にて2分間の最初の変性の後、94℃にて2分間、55℃にて2分間及び72℃にて2分間のから成る2サイクルのインキュベーションを行った。100pmoleずつのRHP1（配列番号：78）及びRHP2（配列番号：79）を外部プライマーとして添加した後、PCRチューブを50 μ lの鉱油で覆い、そして94℃にて1分間の最初の変性の後、94℃にて1分間、55℃にて1分間及び72℃にて1分間の38サイクルを行い、そして次に72℃にて10分間インキュベートした。

438bpのDNA断片を1.5%低融点アガロースゲルを用いて精製し、HindIII及びBamHIにより消化し、そして次にHEF発現ベクターHEF-VH-g γ 1にクローニングした。DNA配列決定の後、正しいH鎖V領域のアミノ酸配列をコードするDNA断片を含むプラスミドをHEF-RVH-M21-g γ 1と命名した。本プラスミドHEF-RVH-M21-g γ 1に含まれるH鎖V領域のアミノ酸配列および塩基配列を配列番号：80に示す。

再構成ヒトONS-M21抗体の各鎖を評価するため、まず、再構成ヒトONS-M21抗体H鎖のための発現ベクターHEF-RVH-M21-g γ 1とキメラONS-M21抗体L鎖のための発

現ベクターH E F - M 2 1 L - g γ 1 とによりC O S細胞を前記のようにして同時トランスフェクションし、前記のようにして抗体生成物を回収した後、前記のようにして抗原結合測定にかけた。

この結果を図5に示す。図5に示すように陽性対照としてのキメラ抗体(C h M 2 1)および再構成H鎖とキメラL鎖とからなる抗体(C h L / R V H)との間には抗原結合性に差がないことが確認された。

次に、再構成ヒト化O N S - M 2 1抗体L鎖の「a」から「p」の各バージョンと再構成ヒト化O N S - M 2 1抗体H鎖との組み合わせを評価するため、L鎖の各バージョンの発現プラスミドH E F - R V L - M 2 1 a - g κ からH E F - R V L - M 2 1 p - g κ の内のいずれか一つとH鎖発現プラスミドH E F - R V HとをC O S細胞に同時トランスフェクションし、前記実施例4のC e l l E L I S Aに記載のとおりの方法を用いて、得られた抗体について抗原結合測定を行った。その結果L鎖のバージョン「a」から「h」を有する抗体には抗原結合活性が見られなかった(図6を参照のこと)。

一方、「i」, 「j」, 「l」, 「m」, 「o」, 「p」の各L鎖バージョンを有する抗体は、陽性対照であるキメラO N S - M 2 1抗体(C h M 2 1)に匹敵する程度の良い抗原結合性を示し、この組み合わせがヒト抗体における機能的抗原結合部位を形成することが示唆された。なお、L鎖バージョン「k」および「n」を有する抗体には抗原結合活性が見られなかった(図7を参照のこと)。

このことから、L鎖F R 2の46位にプロリンを有する抗体は、良い抗原結合性を示す機能的抗原結合部位を再形成することが示唆された(表1, 2を参照)。

実施例 6. 再構成ヒト O N S - M 2 1 抗体一本鎖 F v (s c F v)領域の作成リンカー領域の構築

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
(配列番号: 90) からなるリンカー領域をコードする DNA を次のようにして設計した。リンカー領域をコードする DNA 配列 (H u s t o n, J. S. ら、P r o c. N a t l. A c a d. S c i. U S A 85, 5879-5883, (1988)) の 5' - 側に H 鎖 V 領域の F R 4 の C 末端の 5 アミノ酸残基をコードする 15 bp の DNA 配列を、3' - 側に L 鎖 V 領域の F R 1 領域の N 末端の 5 アミノ酸残基をコードする 15 bp の DNA 配列を付加し、さらに p U C 19 ベクターに挿入できるように、それぞれ 5' - 側及び 3' - 側に H i n d I I I 認識部位及び E c o R I 認識部位を付加した。

こうして設計した DNA 配列を基にセンス及びアンチセンス方向の 2 個のオリゴヌクレオチド s c F v - S および s c F v - A を合成した。

2 個のオリゴヌクレオチド配列を各々配列番号: 81 及び 82 に示す。これらのオリゴヌクレオチドは 84 塩基の長さを有し、81 bp のオーバーラップ領域を有する。

100 pmole ずつの 2 種のオリゴヌクレオチドを、50 mM T r i s - H C l (pH 7.6)、10 mM M g C l₂、10 mM ジチオスレイトール、1 mM A T P、50 mg/ml のポリエチレングリコール (8000) を含有する反応混合物 20 μ l 中で、96 $^{\circ}$ C にて 5 分、65 $^{\circ}$ C まで 20 分かけ温度を下げた後、65 $^{\circ}$ C にて 10 分、37 $^{\circ}$ C まで 20 分かけ温度を下げた後、37 $^{\circ}$ C にて 10 分、さらに 7 $^{\circ}$ C まで 20 分かけ温度を下げた後、7 $^{\circ}$ C にて 1 夜インキュベートしてアニーリングを行った。

上記のようにアニーリングしたDNAを、HindIII及びEcoRIで消化することにより調製したpUC19ベクターと連結した。DNA配列決定の後、正しいDNA配列を有するDNA断片を含むプラスミドをpUC-scFv-5と命名した。

再構成ヒトONS-M21抗体一本鎖Fv領域の作製

再構成ヒトONS-M21抗体一本鎖Fv領域を次の様にして作製した。再構成ヒトONS-M21抗体H鎖V領域、及びリンカー領域、及び再構成ヒトONS-M21抗体L鎖V領域をそれぞれPCR法を用いて増幅し、連結することにより、再構成ヒトONS-M21抗体一本鎖Fv領域を作製した。この方法を図8に模式的に示す。再構成ヒトONS-M21抗体一本鎖Fv領域の作製のために6個のPCRプライマー（A-E）を使用した。プライマーA、CおよびEはセンス配列を有し、プライマーB、DおよびFはアンチセンス配列を有する。

H鎖V領域のための後方プライマーSCP1（プライマーA、配列番号：83）は、H鎖V領域のN末端をコードするDNAにハイブリダイズし且つNcoI認識部位を有するように設計した。H鎖V領域のための前方プライマーSCP2（プライマーB、配列番号：84）は、H鎖V領域のC末端をコードするDNAにハイブリダイズし且つリンカーにオーバーラップするように設計した。リンカーのための後方プライマーSCP3（プライマーC、配列番号：85）は、リンカーのN末端をコードするDNAにハイブリダイズし、かつH鎖V領域のC末端をコードするDNAにオーバーラップするように設計した。

リンカーのための前方プライマーSCP4（プライマーD、配列番号：86）は、リンカーのC末端をコードするDNAにハイブリダイズし、かつL鎖V領域のN末端をコードするDNAにオーバー

ラップするように設計した。L鎖V領域のための後方プライマーSCP4（プライマーE、配列番号：87）は、リンカーのC末端をコードするDNAにハイブリダイズし、かつL鎖V領域のN末端をコードするDNAにオーバーラップするように設計した。L鎖V領域のための前方プライマーWS4-2（プライマーF、配列番号：88）は、L鎖V領域C末端をコードするDNAにハイブリダイズし且つFLAGペプチドをコードする配列（Hopp, T. P. ら、Bio/Technology, 6, 1204-1210, 1988）、2個の転写停止コドン及びEcoRI認識部位を有するように設計した。

第一PCR段階において3つの反応A-B, C-D、及びE-Fを行い、そして各PCR生成物を精製した。第一PCRから得られた3つのPCR生成物をそれら自体の相補性によりアッセンブルさせた。次に、プライマーA及びFを加えて、再構成ヒトONS-M21抗体一本鎖Fv領域をコードする全長DNAを増幅した（第2PCR）。なお、第一PCRにおいては、再構成ヒトONS-M21抗体H鎖V領域をコードするプラスミドHEF-RVH-M21-g γ 1（実施例5を参照）、リンカー領域をコードするプラスミドpUC-scfv-5、及び再構成ヒトONS-M21抗体L鎖V領域バージョン「p」をコードするプラスミドHEF-RVL-M21p-g κ （実施例5を参照）をそれぞれ鋳型として用いた。

第一PCR段階においては、10mM Tris-HCl (pH8.3)、50mM KCl、100 μ M dNTPs、1.5mM MgCl₂、100ngの各鋳型DNA、100pmoleの各PCRプライマー及び5ユニットのDNAポリメラーゼAmpli Taq（Perkin Elmer Cetus社）を含有する100 μ lのPCR混合物を用いた。各PCRチューブは50 μ lの鉱油で覆っ

た後、94℃にて1分間、55℃にて1分間及び72℃にて1分間、この順序で加熱した。この温度サイクルを30回反復した後、反応混合物をさらに72℃にて10分間インキュベートした。

PCR生成物A-B (382 bp)、C-D (92 bp)、及びE-F (363 bp)を1.5%低融点アガロースゲルを用いて精製し、第2 PCRでアッセンブルした。第2 PCRにおいては、鋳型として1 µgの各第一PCRの生成物、及び5 uのAmpliTaqを含有する98 µlのPCR混合物を、94℃にて2分、55℃にて2分及び72℃にて2分間で2サイクルインキュベートし、そして次にそれぞれ100 pmoleのプライマーA及びFを加えた。PCRチューブを50 µlの鉱油で覆い、そして94℃にて1分、55℃にて1分及び72℃にて2分間で30サイクルのPCRを行った。

第2 PCRにより生じた767 bpのDNA断片を1.5%低融点アガロースゲルで精製し、NcoI及びEcoRIで消化し、得られたDNA断片を発現ベクターpSCFVT7にクローニングした。なお、本発現ベクターpSCFVT7は、大腸菌ペリプラズム分泌発現系に適するpelBシグナル配列(Lei, S. P. ら、J. Bacteriology, 169, 4379-4383, 1987)を含んでいる。DNA配列決定の後、再構成ヒトONS-M21抗体一本鎖Fv領域の正しいアミノ酸配列をコードするDNA断片を含むプラスミドをpSCFVT7-hM21と命名した(図9を参照のこと)。本プラスミドpSCFVT7-hM21に含まれる再構成ヒトONS-M21抗体一本鎖Fv領域のアミノ酸配列及び塩基配列を配列番号: 89に示す。

大腸菌株BL21 (DE3) の形質転換

10 ngの上記プラスミドpSCFVT7-hM21を大腸菌BL21 (DE3) のコンピテント細胞50 µlに加え、そしてこの細

胞を氷上で30分間、42℃にて90秒間そして再び氷上で1分間静置した。次いで400 μ lの2×YT培地を加え、37℃にて1時間インキュベートした後、2×YT寒天培地上にこの大腸菌をまき、37℃にて一夜インキュベートして大腸菌形質転換体を得た。

再構成ヒトONS-M21抗体一本鎖Fv領域の発現誘導

この形質転換体を、1%グルコース及び50 μ g/mlのアンプシリンを含有するLB培地 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrookら、Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989)) 30ml中で37℃にて一夜培養した。次に、50 μ g/mlのアンプシリンを含有するLB培地で100倍に希釈し、37℃にて培養した。650nmでの吸光度が0.3程度に達したところで、最終濃度が0.5mMになる様にisopropylthio- β -D-galactoside (IPTG) を添加し、T7プロモーターの発現を誘導した。

37℃にてさらに一夜培養した後、培地を回収し、遠心分離により細胞破片を除去し、等量のPBSを加え、15mlの0.1M Glycine-HCl (pH3.0) で平衡化した後、等量のPBSにて中和した抗FLAGアフィニティーカラム (Anti-FLAG M2 Affinity Gel, IBI) に適用した。カラムを3倍量のPBSで洗浄し、次に6mlの0.1M Glycine-HCl (pH3.0) で溶出した。溶出液を濃縮し、マイクロコンセンレーター (Centricon10, Amicon社製) を用いて緩衝液をPBSに変えた。

Cell-ELISA

マウスモノクローナルONS-M21抗体の抗原結合に対する阻害活性を指標に再構成ヒトONS-M21抗体一本鎖Fv領域の抗

原結合活性を測定した。前記のようにして調整した C e l l - E L I S A プレートをブロッキングの後、500 ng/ml の濃度のマウスモノクローナル O N S - M 2 1 抗体と一緒に順次希釈した再構成ヒト O N S - M 2 1 抗体一本鎖 F v 領域、再構成ヒト O N S - M 2 1 抗体及び再構成ヒト O N S - M 2 1 抗体より調整した F a b 断片を各穴に加え、室温にてインキュベーション及び洗浄の後、アルカリホスファターゼ結合ヤギ抗マウス I g G 抗体 (Z Y M E D 社製) を加えた。インキュベーション及び洗浄の後、基質溶液を加え、次に 405 nm での吸光度を測定した。

その結果、再構成ヒト O N S - M 2 1 抗体一本鎖 F v 領域 (s c F v - h M 2 1) は再構成ヒト O N S - M 2 1 抗体 (h M 2 1) に比べ約 1 / 10 程度に阻害活性が減少していたものの、再構成ヒト O N S - M 2 1 抗体より調整した F a b 断片 (h M 2 1 - F a b) と同程度の阻害活性を示した (図 10 を参照のこと)。

このことから、再構成ヒト O N S - M 2 1 抗体一本鎖 F v 領域は、オリジナルの再構成ヒト O N S - M 2 1 抗体と同程度のアフィニティを示すことが示唆された。

なお、前記プラスミド H E F - R V L - M 2 1 p - g κ を有する大腸菌は *E s c h e r i c h i a c o l i* D H 5 α (H E F - R V L - M 2 1 p - g κ)、およびプラスミド H E F - R V H - M 2 1 - g γ 1 を含有する大腸菌は *E s c h e r i c h i a c o l i* D H 5 α (H E F - R V H - M 2 1 - g γ 1) として工業技術院生命工学工業技術研究所 (茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号) に、平成 5 年 11 月 18 日に、各々 F E R M B P - 4472 および、F E R M B P - 4471 としてブタペスト条約に基づき国際寄託された。

参考例 1. ハイブリドーマ ONS-M21 の作製

抗ヒト髄芽腫細胞モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、ヒト髄芽腫細胞 ONS-76 で免疫した BALB/c マウスの脾臓細胞とマウス骨髓腫細胞 P3U1 をポリエチレングリコールを用いた常法により融合して作製した。髄芽腫細胞株 ONS-76 と結合する活性を指標としたスクリーニングを行い、ハイブリドーマ ONS-M21 を樹立した (Moriuchi, S. ら、Br. J. Cancer, 68, 831-837 (1993))。

参考例 2. マウスモノクローナル抗体 ONS-M21 のタイピング

ハイブリドーマ ONS-M21 をマウス腹腔に移植し、得られた腹水をプロテイン A アガロースカラムにかけ、精製マウスモノクローナル抗体を得た。得られたマウスモノクローナル抗体 ONS-M21 の L 鎖および H 鎖のタイプを調べるために、マウスモノクローナル抗体アイソタイピングキット (アマシャムインターナショナル plc 社製) を用いてタイピングを行った。その結果、ONS-M21 抗体は κ 型 L 鎖および γ 1 型 H 鎖を有することが明らかになった。

ブダペスト条約第 13 規則の 2 に基く寄託された微生物への言及

寄託機関：工業技術院生命工学工業技術研究所

あて名：茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号

寄託番号及び寄託日

1. *Escherichia coli* DH 5 α (HEF-R
VL-M21p-g κ)

寄託番号：FERM BP-4472

寄託日：1993 年 11 月 18 日

2. E s c h e r i c h i a c o l i D H 5 α (H E F - R
V H - M 2 1 - g γ 1)

寄託番号 : F E R M B P - 4 4 7 1

寄託日 : 1 9 9 3 年 1 1 月 1 8 日

配列表

配列番号 : 1

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 : 合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGAAGTTGC CTGTTAGGCT GTTGGTGCTG 40

配列番号 : 2

配列の長さ : 39

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 : 合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGGAGWCAG ACACACTCCT GYTATGGGT 39

配列番号 : 3

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 : 合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGAGTGTGC TCACTCAGGT CCTGGSGTTG 40

配列番号 : 4

配列の長さ : 43

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：合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGAGGRCCT CTGCTCAGWT TYTTGGMWTC TTG 43

配列番号：5

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：合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGGATTTWC AGGTGCAGAT TWTCAGCTTC 40

配列番号：6

配列の長さ：37

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：合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGAGGTCY YTGYSAGYT YCTGRGG 37

配列番号：7

配列の長さ：41

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：合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGGGCWTCA AGATGGAGTC ACAKWYYCWG G 41

配列番号：8

配列の長さ：41

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：合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGTGGGGAY CTKTTTYCMM TTTTCAATT G 41

配列番号：9

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：合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGGTRTCCW CASCTCAGTT CCTTG 35

配列番号：10

配列の長さ：37

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：合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGTATATAT GTTTGTTGTC TATTTCT 37

配列番号 : 1 1

配列の長さ : 3 8

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 : 合成 D N A

配列

ACTAGTCGAC ATGGAAGCCC CAGCTCAGCT TCTCTTCC

38

配列番号 : 1 2

配列の長さ : 2 7

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 : 合成 D N A

配列

GGATCCCCGGG TGGATGGTGG GAAGATG

27

配列番号 : 1 3

配列の長さ : 3 7

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 : 合成 D N A

配列

ACTAGTCGAC ATGAAATGCA GCTGGGTCAT STTCTTC

37

配列番号 : 1 4

配列の長さ : 3 6

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：合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGGGATGGA GCTRTATCAT SYTCTT

36

配列番号：15

配列の長さ：37

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：合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGAAGWTGT GGTAAACTG GGTTTTT

37

配列番号：16

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：合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGRACTTTG GGYTCAGCTT GRTTT

35

配列番号：17

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：合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGGACTCCA GGCTCAATTT AGTTTTCCTT 40

配列番号 : 1 8

配列の長さ : 3 7

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 : 合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGGCTGTCY TRGSGCTRCT CTTCTGC 37

配列番号 : 1 9

配列の長さ : 3 6

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 : 合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGGRATGGA GCKGGRTCTT TMTCTT 36

配列番号 : 2 0

配列の長さ : 3 3

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 : 合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGAGAGTGC TGATTCTTTT GTG 33

配列番号：2 1

配列の長さ：4 0

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：合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGGMTTGGG TGTGGAMCTT GCTATTCCTG 40

配列番号：2 2

配列の長さ：3 7

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：合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGGGCAGAC TTACATTCTC ATTCCTG 37

配列番号：2 3

配列の長さ：3 8

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：合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGGATTTTG GGCTGATTTT TTTTATTG 38

配列番号：2 4

配列の長さ：3 7

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：合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGATGGTGT TAAGTCTTCT GTACCTG

37

配列番号：25

配列の長さ：28

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：合成DNA

配列

GGATCCCGGG CCAGTGGATA GACAGATG

28

配列番号：26

配列の長さ：382

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：cDNA

起源

生物名：マウス

直接の起源

クローン：pUC-M21-V_L

特徴： 1...72 sig peptide

73...382 mat peptide

配列

ATG GAG TCA CAT ATT CAG GTC TTT GTA TAC ATG TTG CTG TGG TTG	45
Met Glu Ser His Ile Gln Val Phe Val Tyr Met Leu Leu Trp Leu	
5 10 15	
TCT GGT GTT GAT GGA GAC ATT GTG ATG ACC CAG TCT CAA AAA TTC	90
Ser Gly Val Asp Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe	
20 25 30	
ATG TCC ACA TCA GTA GGA GAC AGG GTC AGC GTC ACC TGC AAG GCC	135
Met Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala	
35 40 45	
AGT CAG AAT GTG GGT ACT AAT GTA GCC TGG TAT CAA CAG AAA CCA	180
Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro	
50 55 60	
GGG CAA TCT CCT AAA CCA CTG ATT TAC TCG GCA TCC TAT CGG TAC	225
Gly Gln Ser Pro Lys Pro Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr	
65 70 75	
AGT GGA GTC CCT GAT CGC TTC ACA GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT	270
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp	
80 85 90	
TTC ACT CTC ACC ATC ACC AAT GTG CAG TCT GAA GAC TTG GCA GAC	315
Phe Thr Leu Thr Ile Thr Asn Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Asp	
95 100 105	
TAT TTC TGT CAG CAA TAT AAC AGC TAT CCT CGG GCG TTC GGT GGA	360
Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg Ala Phe Gly Gly	
110 115 120	
GGC ACC AAA CTG GAA ATC AAA C	382
Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	
125	

配列番号 : 2 7

配列の長さ : 4 0 9

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 : c D N A

起源

生物名 : マウス

直接の起源

クローン : p U C - M 2 1 - V_H

特徴 : 1 . . 5 7 s i g p e p t i d e

5 8 . . 4 0 9 m a t p e p t i d e

配列

ATG AAA TGC AGC TGG GTC ATG TTC TTC CTG ATG GCA GTG GTT ACA	45
Met Lys Cys Ser Trp Val Met Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr	
5 10 15	
GGG GTC AAT TCA GAG GTT CAG CTG CAG CAG TCT GGG GCA GAG CTT	90
Gly Val Asn Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu	
20 25 30	
GTG AAG CCA GGG GCC TCA GTC AAG TTG TCC TGC ACA GCT TCT GGC	135
Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly	
35 40 45	
TTC AAC ATT AAA GAC ACC TAT ATA CAC TGG GCG AAG CAG AGG CCT	180
Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Ala Lys Gln Arg Pro	
50 55 60	
GAA CAG GGC CTG GAG TGG ATT GGA AGG ATT GAT CCT GCG GAT GGT	225
Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asp Gly	
65 70 75	
AAT ACT AAA TAT GAC CCG AAG TTC CAG GGC AAG GCC ACT ATA ACA	270
Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr	
80 85 90	
GCA GAC ACA TCC TCC AAC ACA GCC TAC CTG CAG CTC AGC AGC CTG	315
Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu	
95 100 105	
ACA TCT GAG GAC ACT GCC GTC TAT TAC TGT GCT TCG GCC TAC TAT	360
Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Ala Tyr Tyr	
110 115 120	
GTT AAC CAG GAC TAC TGG GGT CAA GGA ACC TCA GTC ACC GTC TCC	405
Val Asn Gln Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser	
125 130 135	
TCA G	409
Ser	

配列番号 : 2 8

配列の長さ : 3 4

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 : 合成DNA

配列

GATAAGCTTC CACCATGGGC TTCAAGATGG AGTC 34

配列番号 : 2 9

配列の長さ : 3 4

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 : 合成DNA

配列

GGCGGATCCA CTCACGTTTG ATTTCCAGTT TGGT 34

配列番号 : 3 0

配列の長さ : 4 3

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 : 合成DNA

配列

GATAAGCTTC CACCATGAAA TGCAGCTGGG TCATGTTCTT CCT 43

配列番号 : 3 1

配列の長さ : 3 4

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：合成DNA

配列

GGCGGATCCA CTCACCTGAG GAGACGGTGA CTGA

34

配列番号：32

配列の長さ：18

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：合成DNA

配列

CAGACAGTGG TTCAAAGT

18

配列番号：33

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：合成DNA

配列

GAATTCGGAT CCACTCACGT TTGATT

26

配列番号：34

配列の長さ：44

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：合成DNA

配列

AGTCAGAATG TGGGTACTAA TGTAGCCTGG TACCAGCAGA AGCC 44

配列番号 : 3 5

配列の長さ : 3 8

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 : 合成DNA

配列

TCCTATCGGT ACAGTGGTGT GCCAAGCAGA TTCAGCGG 38

配列番号 : 3 6

配列の長さ : 4 7

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 : 合成DNA

配列

GCTACCTACT ACTGCCAGCA ATATAACAGC TATCCTCGGG CGTTCGG 47

配列番号 : 3 7

配列の長さ : 4 4

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 : 合成DNA

配列

ACATTAGTAC CCACATTCTG ACTGGCCTTA CAGGTGATGG TCAC 44

配列番号 : 3 8

配列の長さ : 4 7

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 : 合成DNA

配列

GGCACACCAC TGTACCGATA GGATGCCGAG TAGATCAGCA GCTTTGG 47

配列番号 : 3 9

配列の長さ : 4 4

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 : 合成DNA

配列

GGATAGCTGT TATATTGCTG GCAGTAGTAG GTAGCGATGT CCTC 44

配列番号 : 4 0

配列の長さ : 3 7 9

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 : 合成

起源

生物名 : マウス及びヒト

直接の起源

クローン : HEF-RVL-M21a-gκ

アミノ酸 - 19 -- 1 : leader

アミノ酸 1 - 2 3 : F R 1
 アミノ酸 2 4 - 3 4 : C D R 1
 アミノ酸 3 5 - 4 9 : F R 2
 アミノ酸 5 0 - 5 6 : C D R 2
 アミノ酸 5 7 - 8 8 : F R 3
 アミノ酸 8 9 - 9 7 : C D R 3
 アミノ酸 9 8 - 1 0 7 : F R 4

配列

ATG GGA TGG AGC TGT ATC ATC CTC TCC TTG GTA GCA ACA GCT ACA	45
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Ser Leu Val Ala Thr Ala Thr	
-19 15 -10 -5	
GGT GTC CAC TCC GAC ATC CAG ATG ACC CAG AGC CCA AGC AGC CTG	90
Gly Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu	
-1 1 5 10	
AGC GCC AGC GTG GGT GAC AGA GTG ACC ATC ACC TGT AAG GCC AGT	135
Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser	
15 20 25	
CAG AAT GTG GGT ACT AAT GTA GCC TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGA	180
Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly	
30 35 40	
AAG GCT CCA AAG CTG CTG ATC TAC TCG GCA TCC TAT CGG TAC AGT	225
Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser	
45 50 55	
GGT GTG CCA AGC AGA TTC AGC GGT AGC GGT AGC GGT ACC GAC TTC	270
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe	
60 65 70	
ACC TTC ACC ATC AGC AGC CTC CAG CCA GAG GAC ATC GCC ACC TAC	315
Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr	
75 80 85	
TAC TGC CAG CAA TAT AAC AGC TAT CCT CGG GCG TTC GGC CAA GGG	360
Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg Ala Phe Gly Gln Gly	
90 95 100	
ACC AAG GTG GAA ATC AAA C	379
Thr Lys Val Glu Ile Lys	
105	

配列番号 : 4 1

配列の長さ : 3 1

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 : 合成 DNA

配列

GGTACCGACT ACACCTTCAC CATCAGCAGC C

31

配列番号 : 4 2

配列の長さ : 3 1

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 : 合成 DNA

配列

GGTGAAGGTG TAGTCGGTAC CGCTACCGCT A

31

配列番号 : 4 3

配列の長さ : 3 7 9

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 : 合成

起源

生物名 : マウス及びヒト

直接の起源

クローン : HEF-RVL-M21b-gκ

アミノ酸 - 19 -- 1 : leader

アミノ酸 1 - 2 3 : F R 1
 アミノ酸 2 4 - 3 4 : C D R 1
 アミノ酸 3 5 - 4 9 : F R 2
 アミノ酸 5 0 - 5 6 : C D R 2
 アミノ酸 5 7 - 8 8 : F R 3
 アミノ酸 8 9 - 9 7 : C D R 3
 アミノ酸 9 8 - 1 0 7 : F R 4

配列

ATG GGA TGG AGC TGT ATC ATC CTC TCC TTG GTA GCA ACA GCT ACA	45
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Ser Leu Val Ala Thr Ala Thr	
-19 -15 -10 -5	
GGT GTC CAC TCC GAC ATC CAG ATG ACC CAG AGC CCA AGC AGC CTG	90
Gly Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu	
-1 1 5 10	
AGC GCC AGC GTG GGT GAC AGA GTG ACC ATC ACC TGT AAG GCC AGT	135
Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser	
15 20 25	
CAG AAT GTG GGT ACT AAT GTA GCC TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGA	180
Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly	
30 35 40	
AAG GCT CCA AAG CTG CTG ATC TAC TCG GCA TCC TAT CGG TAC AGT	225
Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser	
45 50 55	
GGT GTG CCA AGC AGA TTC AGC GGT AGC GGT AGT GGT ACC GAC TAC	270
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr	
60 65 70	
ACC TTC ACC ATC AGC AGC CTC CAG CCA GAG GAC ATC GCC ACC TAC	315
Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr	
75 80 85	
TAC TGC CAG CAA TAT AAC AGC TAT CCT CGG GCG TTC GGC CAA GGG	360
Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg Ala Phe Gly Gln Gly	
90 95 100	
ACC AAG GTG GAA ATC AAA C	379
Thr Lys Val Glu Ile Lys	
105	

配列番号 : 4 4

配列の長さ : 2 9

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 : 合成 D N A

配列

GCTACCTACT TCTGCCAGCA ATATAACAG

29

配列番号 : 4 5

配列の長さ : 2 9

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 : 合成 D N A

配列

TGCTGGCAGA AGTAGGTAGC GATGTCCTC

29

配列番号 : 4 6

配列の長さ : 3 7 9

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 : 合成

起源

生物名 : マウス及びヒト

直接の起源

クローン : H E F - R V L - M 2 1 c - g κ

アミノ酸 - 1 9 - - 1 : l e a d e r

アミノ酸 1 - 2 3 : F R 1
 アミノ酸 2 4 - 3 4 : C D R 1
 アミノ酸 3 5 - 4 9 : F R 2
 アミノ酸 5 0 - 5 6 : C D R 2
 アミノ酸 5 7 - 8 8 : F R 3
 アミノ酸 8 9 - 9 7 : C D R 3
 アミノ酸 9 8 - 1 0 7 : F R 4

配列

ATG GGA TGG AGC TGT ATC ATC CTC TCC TTG GTA GCA ACA GCT ACA	45
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Ser Leu Val Ala Thr Ala Thr	
-19 -15 -10 -5	
GGT GTC CAC TCC GAC ATC CAG ATG ACC CAG AGC CCA AGC AGC CTG	90
Gly Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu	
-1 1 5 10	
AGC GCC AGC GTG GGT GAC AGA GTG ACC ATC ACC TGT AAG GCC AGT	135
Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser	
15 20 25	
CAG AAT GTG GGT ACT AAT GTA GCC TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGA	180
Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly	
30 35 40	
AAG GCT CCA AAG CTG CTG ATC TAC TCG GCA TCC TAT CGG TAC AGT	225
Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser	
45 50 55	
GGT GTG CCA AGC AGA TTC AGC GGT AGC GGT AGC GGT ACC GAC TTC	270
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe	
60 65 70	
ACC TTC ACC ATC AGC AGC CTC CAG CCA GAG GAC ATC GCC ACC TAC	315
Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr	
75 80 85	
TTC TGC CAG CAA TAT AAC AGC TAT CCT CGG GCG TTC GGC CAA GGG	360
Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg Ala Phe Gly Gln Gly	
90 95 100	
ACC AAG GTG GAA ATC AAA C	379
Thr Lys Val Glu Ile Lys	
105	

配列番号 : 4 7

配列の長さ : 3 7 9

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 : 合成

起源

生物名 : マウス及びヒト

直接の起源

クローン : H E F - R V L - M 2 1 d - g κ

アミノ酸 - 1 9 - - 1 : l e a d e r

アミノ酸 1 - 2 3 : F R 1

アミノ酸 2 4 - 3 4 : C D R 1

アミノ酸 3 5 - 4 9 : F R 2

アミノ酸 5 0 - 5 6 : C D R 2

アミノ酸 5 7 - 8 8 : F R 3

アミノ酸 8 9 - 9 7 : C D R 3

アミノ酸 9 8 - 1 0 7 : F R 4

配列

ATG GGA TGG AGC TGT ATC ATC CTC TCC TTG GTA GCA ACA GCT ACA	45
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Ser Leu Val Ala Thr Ala Thr	
-19 -15 -10 -5	
GGT GTC CAC TCC GAC ATC CAG ATG ACC CAG AGC CCA AGC AGC CTG	90
Gly Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu	
-1 1 5 10	
AGC GCC AGC GTG GGT GAC AGA GTG ACC ATC ACC TGT AAG GCC AGT	135
Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser	
15 20 25	
CAG AAT GTG GGT ACT AAT GTA GCC TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGA	180
Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly	
30 35 40	

AAG GCT CCA AAG CTG CTG ATC TAC TCG GCA TCC TAT CGG TAC AGT	225
Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser	
45 50 55	
GGT GTG CCA AGC AGA TTC AGC GGT AGC GGT AGC GGT ACC GAC TAC	270
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr	
60 65 70	
ACC TTC ACC ATC AGC AGC CTC CAG CCA GAG GAC ATC GCC ACC TAC	315
Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr	
75 80 85	
TTC TGC CAG CAA TAT AAC AGC TAT CCT CGG GCG TTC GGC CAA GGG	360
Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg Ala Phe Gly Gln Gly	
90 95 100	
ACC AAG GTG GAA ATC AAA C	379
Thr Lys Val Glu Ile Lys	
105	

配列番号 : 4 8

配列の長さ : 2 9

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 : 合成DNA

配列

TGACAGAGTG TCCGTCACCT GTAAGGCCA 29

配列番号 : 4 9

配列の長さ : 2 9

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 : 合成DNA

配列

TTACAGGTGA CGGACACTCT GTCACCCAC 29

配列番号 : 5 0

配列の長さ : 3 7 9

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 : 合成

起源

生物名 : マウス及びヒト

直接の起源

クローン : H E F - R V L - M 2 1 e - g κ

アミノ酸 - 1 9 - - 1 : l e a d e r

アミノ酸 1 - 2 3 : F R 1

アミノ酸 2 4 - 3 4 : C D R 1

アミノ酸 3 5 - 4 9 : F R 2

アミノ酸 5 0 - 5 6 : C D R 2

アミノ酸 5 7 - 8 8 : F R 3

アミノ酸 8 9 - 9 7 : C D R 3

アミノ酸 9 8 - 1 0 7 : F R 4

配列

ATG GGA TGG AGC TGT ATC ATC CTC TCC TTG GTA GCA ACA GCT ACA	45
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Ser Leu Val Ala Thr Ala Thr	
-19 -15 -10 -5	

GGT GTC CAC TCC GAC ATC CAG ATG ACC CAG AGC CCA AGC AGC CTG	90
Gly Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu	
-1 5 10	

AGC GCC AGC GTG GGT GAC AGA GTG TCC GTC ACC TGT AAG GCC AGT	135
Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser	
15 20 25	

CAG AAT GTG GGT ACT AAT GTA GCC TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGA	180
Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly	
30 35 40	

AAG GCT CCA AAG CTG CTG ATC TAC TCG GCA TCC TAT CGG TAC AGT	225
Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser	
45 50 55	
GGT GTG CCA AGC AGA TTC AGC GGT AGC GGT AGC GGT ACC GAC TTC	270
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe	
60 65 70	
ACC TTC ACC ATC AGC AGC CTC CAG CCA GAG GAC ATC GCC ACC TAC	315
Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr	
75 80 85	
TAC TGC CAG CAA TAT AAC AGC TAT CCT CGG GCG TTC GGC CAA GGG	360
Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg Ala Phe Gly Gln Gly	
90 95 100	
ACC AAG GTG GAA ATC AAA C	379
Thr Lys Val Glu Ile Lys	
105	

配列番号 : 5 1

配列の長さ : 3 7 9

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 : 合成

起源

生物名 : マウス及びヒト

直接の起源

クローン : H E F - R V L - M 2 1 f - g κ

アミノ酸 - 1 9 - - 1 : l e a d e r

アミノ酸 1 - 2 3 : F R 1

アミノ酸 2 4 - 3 4 : C D R 1

アミノ酸 3 5 - 4 9 : F R 2

アミノ酸 5 0 - 5 6 : C D R 2

アミノ酸 5 7 - 8 8 : F R 3

アミノ酸 8 9 - 9 7 : C D R 3

アミノ酸 9 8 - 1 0 7 : F R 4

配列

ATG GGA TGG AGC TGT ATC ATC CTC TCC TTG GTA GCA ACA GCT ACA	45
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Ser Leu Val Ala Thr Ala Thr	
-19 -15 -10 -5	
GGT GTC CAC TCC GAC ATC CAG ATG ACC CAG AGC CCA AGC AGC CTG	90
Gly Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu	
-1 1 5 10	
AGC GCC AGC GTG GGT GAC AGA GTG TCC GTC ACC TGT AAG GCC AGT	135
Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser	
15 20 25	
CAG AAT GTG GGT ACT AAT GTA GCC TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGA	180
Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly	
30 35 40	
AAG GCT CCA AAG CTG CTG ATC TAC TCG GCA TCC TAT CGG TAC AGT	225
Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser	
45 50 55	
GGT GTG CCA AGC AGA TTC AGC GGT AGC GGT AGC GGT ACC GAC TTC	270
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe	
60 65 70	
ACC TTC ACC ATC AGC AGC CTC CAG CCA GAG GAC ATC GCC ACC TAC	315
Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr	
75 80 85	
TTC TGC CAG CAA TAT AAC AGC TAT CCT CGG GCG TTC GGC CAA GGG	360
Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg Ala Phe Gly Gln Gly	
90 95 100	
ACC AAG GTG GAA ATC AAA C	379
Thr Lys Val Glu Ile Lys	
105	

配列番号 : 5 2

配列の長さ : 2 6

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 : 合成DNA

配列

GACTTCACCT TGACCATCAG CAGCCT

26

配列番号 : 5 3

配列の長さ : 2 6

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 : 合成DNA

配列

CTGCTGATGG TCAAGGTGAA GTCGGT

26

配列番号 : 5 4

配列の長さ : 3 7 9

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 : 合成

起源

生物名 : マウス及びヒト

直接の起源

クローン : HEF-RVL-M21g-gκ

アミノ酸 - 19 -- 1 : leader

アミノ酸 1 - 23 : FR1

アミノ酸 24 - 34 : CDR1

アミノ酸 35 - 49 : FR2

アミノ酸 50 - 56 : CDR2

アミノ酸 57 - 88 : FR3

アミノ酸 89 - 97 : CDR3

アミノ酸 9 8 - 1 0 7 : F R 4

配列

ATG GGA TGG AGC TGT ATC ATC CTC TCC TTG GTA GCA ACA GCT ACA Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Ser Leu Val Ala Thr Ala Thr -19 -15 -10 -5	45
GGT GTC CAC TCC GAC ATC CAG ATG ACC CAG AGC CCA AGC AGC CTG Gly Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu -1 1 5 10	90
AGC GCC AGC GTG GGT GAC AGA GTG TCC GTC ACC TGT AAG GCC AGT Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser 15 20 25	135
CAG AAT GTG GGT ACT AAT GTA GCC TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGA Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly 30 35 40	180
AAG GCT CCA AAG CTG CTG ATC TAC TCG GCA TCC TAT CGG TAC AGT Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser 45 50 55	225
GGT GTG CCA AGC AGA TTC AGC GGT AGC GGT AGC GGT ACC GAC TTC Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe 60 65 70	270
ACC TTG ACC ATC AGC AGC CTC CAG CCA GAG GAC ATC GCC ACC TAC Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr 75 80 85	315
TTC TGC CAG CAA TAT AAC AGC TAT CCT CGG GCG TTC GGC CAA GGG Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg Ala Phe Gly Gln Gly 90 95 100	360
ACC AAG GTG GAA ATC AAA C Thr Lys Val Glu Ile Lys 105	379

配列番号 : 5 5

配列の長さ : 3 7 9

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 : 合成

起源

生物名：マウス及びヒト

直接の起源

クローン：H E F - R V L - M 2 1 h - g κ

アミノ酸 - 1 9 - - 1 : l e a d e r

アミノ酸 1 - 2 3 : F R 1

アミノ酸 2 4 - 3 4 : C D R 1

アミノ酸 3 5 - 4 9 : F R 2

アミノ酸 5 0 - 5 6 : C D R 2

アミノ酸 5 7 - 8 8 : F R 3

アミノ酸 8 9 - 9 7 : C D R 3

アミノ酸 9 8 - 1 0 7 : F R 4

配列

ATG GGA TGG AGC TGT ATC ATC CTC TCC TTG GTA GCA ACA GCT ACA	45
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Ser Leu Val Ala Thr Ala Thr	
-19 -15 -10 -5	
GGT GTC CAC TCC GAC ATC CAG ATG ACC CAG AGC CCA AGC AGC CTG	90
Gly Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu	
-1 1 5 10	
AGC GCC AGC GTG GGT GAC AGA GTG ACC ATC ACC TGT AAG GCC AGT	135
Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser	
15 20 25	
CAG AAT GTG GGT ACT AAT GTA GCC TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGA	180
Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly	
30 35 40	
AAG GCT CCA AAG CTG CTG ATC TAC TCG GCA TCC TAT CGG TAC AGT	225
Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser	
45 50 55	
GGT GTG CCA AGC AGA TTC AGC GGT AGC GGT AGC GGT ACC GAC TTC	270
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe	
60 65 70	
ACC TTG ACC ATC AGC AGC CTC CAG CCA GAG GAC ATC GCC ACC TAC	315
Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr	
75 80 85	

TAC TGC CAG CAA TAT AAC AGC TAT CCT CGG GCG TTC GGC CAA GGG 360
 Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg Ala Phe Gly Gln Gly
 90 95 100

ACC AAG GTG GAA ATC AAA C 379
 Thr Lys Val Glu Ile Lys
 105

配列番号 : 5 6

配列の長さ : 2 9

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 : 合成 DNA

配列

GGACAGAGTC CAAAGCCGCT GATCTACTC 29

配列番号 : 5 7

配列の長さ : 2 9

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 : 合成 DNA

配列

ATCAGCGGCT TTGGACTCTG TCCTGGCTT 29

配列番号 : 5 8

配列の長さ : 3 7 9

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 : 合成

起源

生物名：マウス及びヒト

直接の起源

クローン：H E F - R V L - M 2 1 i - g κ

アミノ酸 - 1 9 - - 1 : l e a d e r

アミノ酸 1 - 2 3 : F R 1

アミノ酸 2 4 - 3 4 : C D R 1

アミノ酸 3 5 - 4 9 : F R 2

アミノ酸 5 0 - 5 6 : C D R 2

アミノ酸 5 7 - 8 8 : F R 3

アミノ酸 8 9 - 9 7 : C D R 3

アミノ酸 9 8 - 1 0 7 : F R 4

配列

ATG GGA TGG AGC TGT ATC ATC CTC TCC TTG GTA GCA ACA GCT ACA	45
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Ser Leu Val Ala Thr Ala Thr	
-19 -15 -10 -5	
GGT GTC CAC TCC GAC ATC CAG ATG ACC CAG AGC CCA AGC AGC CTG	90
Gly Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu	
-1 1 5 10	
AGC GCC AGC GTG GGT GAC AGA GTG TCC GTC ACC TGT AAG GCC AGT	135
Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser	
15 20 25	
CAG AAT GTG GGT ACT AAT GTA GCC TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGA	180
Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly	
30 35 40	
CAG AGT CCA AAG CCG CTG ATC TAC TCG GCA TCC TAT CGG TAC AGT	225
Gln Ser Pro Lys Pro Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser	
45 50 55	
GGT GTG CCA AGC AGA TTC AGC GGT AGC GGT AGC GGT ACC GAC TTC	270
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe	
60 65 70	
ACC TTG ACC ATC AGC AGC CTC CAG CCA GAG GAC ATC GCC ACC TAC	315
Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr	
75 80 85	

TTC TGC CAG CAA TAT AAC AGC TAT CCT CGG GCG TTC GGC CAA GGG 360
 Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg Ala Phe Gly Gln Gly
 90 95 100

ACC AAG GTG GAA ATC AAA C 379
 Thr Lys Val Glu Ile Lys
 105

配列番号 : 5 9

配列の長さ : 2 6

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 : 合成 D N A

配列

GAGGACATCG CTGACTACTT CTGCCA 26

配列番号 : 6 0

配列の長さ : 2 6

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 : 合成 D N A

配列

AAGTAGTCAG CGATGTCCTC TGGCTG 26

配列番号 : 6 1

配列の長さ : 3 7 9

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 : 合成

起源

生物名：マウス及びヒト

直接の起源

クローン：H E F - R V L - M 2 1 j - g κ

アミノ酸 - 1 9 - - 1 : l e a d e r

アミノ酸 1 - 2 3 : F R 1

アミノ酸 2 4 - 3 4 : C D R 1

アミノ酸 3 5 - 4 9 : F R 2

アミノ酸 5 0 - 5 6 : C D R 2

アミノ酸 5 7 - 8 8 : F R 3

アミノ酸 8 9 - 9 7 : C D R 3

アミノ酸 9 8 - 1 0 7 : F R 4

配列

ATG GGA TGG AGC TGT ATC ATC CTC TCC TTG GTA GCA ACA GCT ACA	45
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Ser Leu Val Ala Thr Ala Thr	
-19 -15 -10 -5	
GGT GTC CAC TCC GAC ATC CAG ATG ACC CAG AGC CCA AGC AGC CTG	90
Gly Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu	
-1 1 5 10	
AGC GCC AGC GTG GGT GAC AGA GTG TCC GTC ACC TGT AAG GCC AGT	135
Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser	
15 20 25	
CAG AAT GTG GGT ACT AAT GTA GCC TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGA	180
Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly	
30 35 40	
CAG AGT CCA AAG CCG CTG ATC TAC TCG GCA TCC TAT CGG TAC AGT	225
Gln Ser Pro Lys Pro Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser	
45 50 55	
GGT GTG CCA AGC AGA TTC AGC GGT AGC GGT AGC GGT ACC GAC TTC	270
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe	
60 65 70	
ACC TTG ACC ATC AGC AGC CTC CAG CCA GAG GAC ATC GCC GAC TAC	315
Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Asp Tyr	
75 80 85	

TTC	TGC	CAG	CAA	TAT	AAC	AGC	TAT	CCT	CGG	GCG	TTC	GGC	CAA	GGG	360
Phe	Cys	Gln	Gln	Tyr	Asn	Ser	Tyr	Pro	Arg	Ala	Phe	Gly	Gln	Gly	
				90					95					100	

ACC	AAG	GTG	GAA	ATC	AAA	C	379
Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys		
				105			

配列番号 : 6 2

配列の長さ : 3 7 9

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 : 合成

起源

生物名 : マウス及びヒト

直接の起源

クローン : H E F - R V L - M 2 1 k - g κ

アミノ酸 - 1 9 - - 1 : l e a d e r

アミノ酸 1 - 2 3 : F R 1

アミノ酸 2 4 - 3 4 : C D R 1

アミノ酸 3 5 - 4 9 : F R 2

アミノ酸 5 0 - 5 6 : C D R 2

アミノ酸 5 7 - 8 8 : F R 3

アミノ酸 8 9 - 9 7 : C D R 3

アミノ酸 9 8 - 1 0 7 : F R 4

配列

ATG	GGA	TGG	AGC	TGT	ATC	ATC	CTC	TCC	TTG	GTA	GCA	ACA	GCT	ACA	45
Met	Gly	Trp	Ser	Cys	Ile	Ile	Leu	Ser	Leu	Val	Ala	Thr	Ala	Thr	
-19				-15					-10					-5	

GGT	GTC	CAC	TCC	GAC	ATC	CAG	ATG	ACC	CAG	AGC	CCA	AGC	AGC	CTG	90
Gly	Val	His	Ser	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	
			-1	1					5					10	

AGC GCC AGC GTG GGT GAC AGA GTG TCC GTC ACC TGT AAG GCC AGT	135
Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser	
15 20 25	
CAG AAT GTG GGT ACT AAT GTA GCC TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGA	180
Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly	
30 35 40	
AAG GCT CCA AAG CTG CTG ATC TAC TCG GCA TCC TAT CGG TAC AGT	225
Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser	
45 50 55	
GGT GTG CCA AGC AGA TTC AGC GGT AGC GGT AGC GGT ACC GAC TTC	270
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe	
60 65 70	
ACC TTG ACC ATC AGC AGC CTC CAG CCA GAG GAC ATC GCC GAC TAC	315
Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Asp Tyr	
75 80 85	
TTC TGC CAG CAA TAT AAC AGC TAT CCT CGG GCG TTC GGC CAA GGG	360
Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg Ala Phe Gly Gln Gly	
90 95 100	
ACC AAG GTG GAA ATC AAA C	379
Thr Lys Val Glu Ile Lys	
105	

配列番号 : 6 3

配列の長さ : 3 7 9

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 : 合成

起源

生物名 : マウス及びヒト

直接の起源

クローン : H E F - R V L - M 2 1 1 - g κ

アミノ酸 - 1 9 - - 1 : l e a d e r

アミノ酸 1 - 2 3 : F R 1

アミノ酸 2 4 - 3 4 : C D R 1
 アミノ酸 3 5 - 4 9 : F R 2
 アミノ酸 5 0 - 5 6 : C D R 2
 アミノ酸 5 7 - 8 8 : F R 3
 アミノ酸 8 9 - 9 7 : C D R 3
 アミノ酸 9 8 - 1 0 7 : F R 4

配列

ATG GGA TGG AGC TGT ATC ATC CTC TCC TTG GTA GCA ACA GCT ACA	45
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Ser Leu Val Ala Thr Ala Thr	
-19 -15 -10 -5	
GGT GTC CAC TCC GAC ATC CAG ATG ACC CAG AGC CCA AGC AGC CTG	90
Gly Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu	
-1 1 5 10	
AGC GCC AGC GTG GGT GAC AGA GTG TCC GTC ACC TGT AAG GCC AGT	135
Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser	
15 20 25	
CAG AAT GTG GGT ACT AAT GTA GCC TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGA	180
Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly	
30 35 40	
CAG AGT CCA AAG CCG CTG ATC TAC TCG GCA TCC TAT CGG TAC AGT	225
Gln Ser Pro Lys Pro Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser	
45 50 55	
GGT GTG CCA AGC AGA TTC AGC GGT AGC GGT AGC GGT ACC GAC TTC	270
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe	
60 65 70	
ACC TTC ACC ATC AGC AGC CTC CAG CCA GAG GAC ATC GCC ACC TAC	315
Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr	
75 80 85	
TAC TGC CAG CAA TAT AAC AGC TAT CCT CGG GCG TTC GGC CAA GGG	360
Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg Ala Phe Gly Gln Gly	
90 95 100	
ACC AAG GTG GAA ATC AAA C	379
Thr Lys Val Glu Ile Lys	
105	

配列番号 : 6 4

配列の長さ : 2 6

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：合成DNA

配列

CAGAGCCAAA AGTTCCTGAG CGCCAG

26

配列番号：65

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：合成DNA

配列

CTCAGGAACT TTTGGCTCTG GGTCAT

26

配列番号：66

配列の長さ：379

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：合成

起源

生物名：マウス及びヒト

直接の起源

クローン：HEF-RVL-M21m-gκ

アミノ酸 -19--1:leader

アミノ酸 1-23:FR1

アミノ酸 24-34:CDR1

アミノ酸 3 5 - 4 9 : F R 2
 アミノ酸 5 0 - 5 6 : C D R 2
 アミノ酸 5 7 - 8 8 : F R 3
 アミノ酸 8 9 - 9 7 : C D R 3
 アミノ酸 9 8 - 1 0 7 : F R 4

配列

ATG GGA TGG AGC TGT ATC ATC CTC TCC TTG GTA GCA ACA GCT ACA	45
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Ser Leu Val Ala Thr Ala Thr	
-19 -15 -10 -5	
GGT GTC CAC TCC GAC ATC CAG ATG ACC CAG AGC CAA AAG TTC CTG	90
Gly Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Leu	
-1 1 5 10	
AGC GCC AGC GTG GGT GAC AGA GTG ACC ATC ACC TGT AAG GCC AGT	135
Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser	
15 20 25	
CAG AAT GTG GGT ACT AAT GTA GCC TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGA	180
Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly	
30 35 40	
CAG AGT CCA AAG CCG CTG ATC TAC TCG GCA TCC TAT CGG TAC AGT	225
Gln Ser Pro Lys Pro Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser	
45 50 55	
GGT GTG CCA AGC AGA TTC AGC GGT AGC GGT AGC GGT ACC GAC TTC	270
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe	
60 65 70	
ACC TTC ACC ATC AGC AGC CTC CAG CCA GAG GAC ATC GCC ACC TAC	315
Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr	
75 80 85	
TAC TGC CAG CAA TAT AAC AGC TAT CCT CGG GCG TTC GGC CAA GGG	360
Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg Ala Phe Gly Gln Gly	
90 95 100	
ACC AAG GTG GAA ATC AAA C	379
Thr Lys Val Glu Ile Lys	
105	

配列番号 : 6 7

配列の長さ : 2 9

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：合成DNA

配列

GGACAGAGTC CAAAGCTGCT GATCTACTC

29

配列番号：68

配列の長さ：29

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：合成DNA

配列

ATCAGCAGCTT TGGACTCTG TCCTGGCTT

29

配列番号：69

配列の長さ：379

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：合成

起源

生物名：マウス及びヒト

直接の起源

クローン：HEF-RVL-M21n-gκ

アミノ酸 -19--1：leader

アミノ酸 1-23：FR1

アミノ酸 24-34：CDR1

アミノ酸 35-49：FR2

アミノ酸 50 - 56 : CDR 2

アミノ酸 57 - 88 : FR 3

アミノ酸 89 - 97 : CDR 3

アミノ酸 98 - 107 : FR 4

配列

ATG GGA TGG AGC TGT ATC ATC CTC TCC TTG GTA GCA ACA GCT ACA	45
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Ser Leu Val Ala Thr Ala Thr	
-19 -15 -10 -5	
GGT GTC CAC TCC GAC ATC CAG ATG ACC CAG AGC CCA AGC AGC CTG	90
Gly Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu	
-1 1 5 10	
AGC GCC AGC GTG GGT GAC AGA GTG ACC ATC ACC TGT AAG GCC AGT	135
Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser	
15 20 25	
CAG AAT GTG GGT ACT AAT GTA GCC TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGA	180
Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly	
30 35 40	
CAG AGT CCA AAG CTG CTG ATC TAC TCG GCA TCC TAT CGG TAC AGT	225
Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser	
45 50 55	
GGT GTG CCA AGC AGA TTC AGC GGT AGC GGT AGC GGT ACC GAC TTC	270
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe	
60 65 70	
ACC TTC ACC ATC AGC AGC CTC CAG CCA GAG GAC ATC GCC ACC TAC	315
Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr	
75 80 85	
TAC TGC CAG CAA TAT AAC AGC TAT CCT CGG GCG TTC GGC CAA GGG	360
Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg Ala Phe Gly Gln Gly	
90 95 100	
ACC AAG GTG GAA ATC AAA C	379
Thr Lys Val Glu Ile Lys	
105	

配列番号 : 70

配列の長さ : 379

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：合成

起源

生物名：マウス及びヒト

直接の起源

クローン：H E F - R V L - M 2 1 o - g κ

アミノ酸 - 1 9 - - 1 : l e a d e r

アミノ酸 1 - 2 3 : F R 1

アミノ酸 2 4 - 3 4 : C D R 1

アミノ酸 3 5 - 4 9 : F R 2

アミノ酸 5 0 - 5 6 : C D R 2

アミノ酸 5 7 - 8 8 : F R 3

アミノ酸 8 9 - 9 7 : C D R 3

アミノ酸 9 8 - 1 0 7 : F R 4

配列

ATG GGA TGG AGC TGT ATC ATC CTC TCC TTG GTA GCA ACA GCT ACA	45
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Ser Leu Val Ala Thr Ala Thr	
-19 -15 -10 -5	
GGT GTC CAC TCC GAC ATC CAG ATG ACC CAG AGC CCA AGC AGC CTG	90
Gly Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu	
-1 1 5 10	
AGC GCC AGC GTG GGT GAC AGA GTG ACC ATC ACC TGT AAG GCC AGT	135
Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser	
15 20 25	
CAG AAT GTG GGT ACT AAT GTA GCC TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGA	180
Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly	
30 35 40	
CAG AGT CCA AAG CCG CTG ATC TAC TCG GCA TCC TAT CGG TAC AGT	225
Gln Ser Pro Lys Pro Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser	
45 50 55	
GGT GTG CCA AGC AGA TTC AGC GGT AGC GGT AGC GGT ACC GAC TTC	270
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe	
60 65 70	

ACC TTC ACC ATC AGC AGC CTC CAG CCA GAG GAC ATC GCC ACC TAC	315
Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr	
75 80 85	
TAC TGC CAG CAA TAT AAC AGC TAT CCT CGG GCG TTC GGC CAA GGG	360
Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg Ala Phe Gly Gln Gly	
90 95 100	
ACC AAG GTG GAA ATC AAA C	379
Thr Lys Val Glu Ile Lys	
105	

配列番号 : 7 1

配列の長さ : 2 3

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 : 合成DNA

配列

GCTCCAAAGC CGCTGATCTA CTC 23

配列番号 : 7 2

配列の長さ : 2 3

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 : 合成DNA

配列

TAGATCAGCG GCTTTGGAGC CTT 23

配列番号 : 7 3

配列の長さ : 3 7 9

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：合成

起源

生物名：マウス及びヒト

直接の起源

クローン：H E F - R V L - M 2 1 p - g κ

アミノ酸 - 1 9 - - 1 : l e a d e r

アミノ酸 1 - 2 3 : F R 1

アミノ酸 2 4 - 3 4 : C D R 1

アミノ酸 3 5 - 4 9 : F R 2

アミノ酸 5 0 - 5 6 : C D R 2

アミノ酸 5 7 - 8 8 : F R 3

アミノ酸 8 9 - 9 7 : C D R 3

アミノ酸 9 8 - 1 0 7 : F R 4

配列

ATG GGA TGG AGC TGT ATC ATC CTC TCC TTG GTA GCA ACA GCT ACA	45
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Ser Leu Val Ala Thr Ala Thr	
-19 -15 -10 -5	
GGT GTC CAC TCC GAC ATC CAG ATG ACC CAG AGC CCA AGC AGC CTG	90
Gly Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu	
-1 1 5 10	
AGC GCC AGC GTG GGT GAC AGA GTG ACC ATC ACC TGT AAG GCC AGT	135
Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser	
15 20 25	
CAG AAT GTG GGT ACT AAT GTA GCC TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGA	180
Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly	
30 35 40	
AAG GCT CCA AAG CCG CTG ATC TAC TCG GCA TCC TAT CGG TAC AGT	225
Lys Ala Pro Lys Pro Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser	
45 50 55	
GGT GTG CCA AGC AGA TTC AGC GGT AGC GGT AGC GGT ACC GAC TTC	270
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe	
60 65 70	

ACC TTC ACC ATC AGC AGC CTC CAG CCA GAG GAC ATC GCC ACC TAC	315
Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr	
75 80 85	
TAC TGC CAG CAA TAT AAC AGC TAT CCT CGG GCG TTC GGC CAA GGG	360
Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg Ala Phe Gly Gln Gly	
90 95 100	
ACC AAG GTG GAA ATC AAA C	379
Thr Lys Val Glu Ile Lys	
105	

配列番号 : 7 4

配列の長さ : 1 3 7

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 : 合成 D N A

配列

AAGAAGCCTG GGTCCTCAGT GAAGGTCTCC TGCAAGGCTT CTGGCTTCAA	50
CATTAAAGAC ACCTATATAC ACTGGGTGCG CCAGGCTCCA GGACAGGGCC	100
TGGAGTGGAT GGGAAGGATT GATCCTGAGG ATGGTAA	137

配列番号 : 7 5

配列の長さ : 1 1 1

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 : 合成 D N A

配列

TGAGATCTGA GGACACAGCC TTTTATTTCT GTGCAAGTGC CTACTATGTT	50
AACCAGGACT ACTGGGGCCA AGGGACCACT GTCACCGTCT CCTCAGGTGA	100
GTGGATCCGA C	111

配列番号：7 6

配列の長さ：1 3 0

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：合成DNA

配列

```
ACCTTCACTG AGGACCCAGG CTTCTTCACC TCAGCTCCAG ACTGCACCAG 50
CTGCACCTGG GAGTGAGCAC CTGGAGCTAC AGCCAGCAAG AAGAAGACCC 100
TCCAGGTCCA GTCCATGGTG GAAGCTTATC 130
```

配列番号：7 7

配列の長さ：1 3 2

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：合成DNA

配列

```
AAAGGCTGTG TCCTCAGATC TCAGGCTGCT GAGCTCCATG TAGGCTGTGT 50
TCGTGGATTC GTCTGCAGTG ATTGTGACTC GGCCCTGGAA CTTGGGGTCA 100
TATTTAGTAT TACCATCCGC AGGATCAATC CT 132
```

配列番号：7 8

配列の長さ：2 5

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：合成DNA

配列

GATAAGCTTC CACCATGGAC TGGAC

25

配列番号 : 7 9

配列の長さ : 2 5

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 : 合成DNA

配列

GTCGGATCCA CTCACCTGAG GAGAC

25

配列番号 : 8 0

配列の長さ : 4 0 9

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 : 合成

起源

生物名 : マウス及びヒト

直接の起源

クローン : HEF-RVH-M21- γ 1

アミノ酸 - 19 -- 1 : leader

アミノ酸 1 - 30 : FR1

アミノ酸 31 - 35 : CDR1

アミノ酸 36 - 49 : FR2

アミノ酸 50 - 66 : CDR2

アミノ酸 67 - 98 : FR3

アミノ酸 99 - 106 : CDR3

アミノ酸 1 0 7 - 1 1 7 : F R 4

配列

ATG GAC TGG ACC TGG AGG GTC TTC TTC TTG CTG GCT GTA GCT CCA Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Phe Leu Leu Ala Val Ala Pro -19 -15 -10 -5	45
GGT GCT CAC TCC CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGA GCT GAG GTG Gly Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val -1 1 5 10	90
AAG AAG CCT GGG TCC TCA GTG AAG GTC TCC TGC AAG GCT TCT GGC Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly 15 20 25	135
TTC AAC ATT AAA GAC ACC TAT ATA CAC TGG GTG CGC CAG GCT CCA Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro 30 35 40	180
GGA CAG GGC CTG GAG TGG ATG GGA AGG ATT GAT CCT GCG GAT GGT Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asp Gly 45 50 55	225
AAT ACT AAA TAT GAC CCG AAG TTC CAG GGC CGA GTC ACA ATC ACT Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr 60 65 70	270
GCA GAC GAA TCC ACG AAC ACA GCC TAC ATG GAG CTC AGC AGC CTG Ala Asp Glu Ser Thr Asn Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu 75 80 85	315
AGA TCT GAG GAC ACA GCC TTT TAT TTC TGT GCA AGT GCC TAC TAT Arg Ser Glu Asp Thr Ala Phe Tyr Phe Cys Ala Ser Ala Tyr Tyr 90 95 100	360
GTT AAC CAG GAC TAC TGG GGC CAA GGG ACC ACT GTC ACC GTC TCC Val Asn Gln Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser 105 110 115	405
TCA G Ser	409

配列番号 : 8 1

配列の長さ : 8 4

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：合成DNA

配列

AGCTTGTAC CGTCTCCTCA GGTGGTGGTG GTTCGGGTGG TGGTGGTTCC 50

GGTGGTGGCG GATCGGACAT CCAGATGACC CAGG 84

配列番号：82

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：合成DNA

配列

AATTCCTGGG CCATCTGGAT GTCCGATCCG CCACCACCCG AACCACCACC 50

ACCCGAACCA CCACCACCTG AGGAGACGGT GACA 84

配列番号：83

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：合成DNA

配列

CAGCCATGGC GCAGTGTGCA GCTGGTGCAG TCTG 34

配列番号：84

配列の長さ：41

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：合成DNA

配列

CCACCCGAAC CACCACCACC TGAGGAGACG GTGACAGTGG T 41

配列番号 : 8 5

配列の長さ : 4 1

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 : 合成DNA

配列

GGGACCACTG TCACCGTCTC CTCAGGTGGT GGTGGTTCGG G 41

配列番号 : 8 6

配列の長さ : 4 1

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 : 合成DNA

配列

GGGCTCTGGG TCATCTGGAT GTCCGATCCG CCACCACCCG A 41

配列番号 : 8 7

配列の長さ : 4 4

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 : 合成DNA

配列

TCGGACATCC AGATGACCCA GAGCCCAAGC AGCCTGAGCG CCAG 44

配列番号： 8 8

配列の長さ： 5 7

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： 合成DNA

配列

CAAGAATTCT TATTATTTAT CGTCATCGTC TTTGTAGTCT TTGATTTCGA 50

CCTTGGT 57

配列番号： 8 9

配列の長さ： 8 2 2

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： 合成

起源

生物名： マウス及びヒト

直接の起源

クローン： p S C F V T 7 - h M 2 1

配列の特徴：

アミノ酸 1 - 2 2 : l e a d e r

アミノ酸 2 3 - 1 3 9 : H 鎖 V 領域

アミノ酸 1 4 0 - 1 5 4 : リンカー

アミノ酸 1 5 5 - 2 6 1 : L 鎖 V 領域

アミノ酸 2 6 2 - 2 6 9 : F L A G

F v ポリペプチド s c F v - h M 2 1 のアミノ酸配列及びそれをコードするヌクレオチド配列。

配列

ATG AAA TAC CTA TTG CCT ACG GCA GCC GCT GGA TTG TTA TTA CTC	45
Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu	15
5	10
GCT GCC CAA CCA GCC ATG GCG CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGA	90
Ala Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly	30
20	25
GCT GAG GTG AAG AAG CCT GGG TCC TCA GTG AAG GTC TCC TGC AAG	135
Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys	45
35	40
GCT TCT GGC TTC AAC ATT AAA GAC ACC TAT ATA CAC TGG GTG CGC	180
Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Arg	60
50	55
CAG GCT CCA GGA CAG GGC CTG GAG TGG ATG GGA AGG ATT GAT CCT	225
Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Arg Ile Asp Pro	75
65	70
GCG GAT GGT AAT ACT AAA TAT GAC CCG AAG TTC CAG GGC CGA GTC	270
Ala Asp Gly Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val	90
80	85
ACA ATC ACT GCA GAC GAA TCC ACG AAC ACA GCC TAC ATG GAG CTC	315
Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Asn Thr Ala Tyr Met Glu Leu	105
95	100
AGC AGC CTG AGA TCT GAG GAC ACA GCC TTT TAT TTC TGT GCA AGT	360
Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Phe Tyr Phe Cys Ala Ser	120
110	115
GCC TAC TAT GTT AAC CAG GAC TAC TGG GGC CAA GGG ACC ACT GTC	405
Ala Tyr Tyr Val Asn Gln Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val	135
125	130
ACC GTC TCC TCA GGT GGT GGT GGT TCG GGT GGT GGT GGT TCG GGT	450
Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly	150
140	145
GGT GGC GGA TCG GAC ATC CAG ATG ACC CAG AGC CCA AGC AGC CTG	495
Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu	165
155	160
AGC GCC AGC GTG GGT GAC AGA GTG ACC ATC ACC TGT AAG GCC AGT	540
Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser	180
170	175
CAG AAT GTG GGT ACT AAT GTA GCC TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGA	585
Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly	195
185	190

AAG GCT CCA AAG CCG CTG ATC TAC TCG GCA TCC TAT CGG TAC AGT	630
Lys Ala Pro Lys Pro Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser	
200 205 210	
GGT GTG CCA AGC AGA TTC AGC GGT AGC GGT AGC GGT ACC GAC TTC	675
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe	
215 220 225	
ACC TTC ACC ATC AGC AGC CTC CAG CCA GAG GAC ATC GCT ACC TAC	720
Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr	
230 235 240	
TAC TGC CAG CAA TAT AAC AGC TAT CCT CGG GCG TTC GGC CAA GGG	765
Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg Ala Phe Gly Gln Gly	
245 250 255	
ACC AAG GTC GAA ATC AAA GAC TAC AAA GAC GAT GAC GAT AAA	807
Thr Lys Val Glu Ile Lys Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys	
260 265	
TAATAAGAAT TCTTG	822

配列番号 : 9 0

配列の長さ : 4 5

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 : 合成

特徴 : F v ポリペプチドのリンカー部分のアミノ酸配列及びそれを
コードするヌクレオチド配列

配列

GGT GGT GGT GGT TCG GGT GGT GGT GGT TCG GGT GGT GGC GGA TCG	45
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser	
5 10 15	

請 求 の 範 囲

1. 下記に定義されるアミノ酸配列：

CDR1：Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala

CDR2：Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser

CDR3：Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg Ala

またはその一部から成る3個の相補性決定領域（CDR）および4個のフレームワーク領域（FR）を含むヒト髄芽腫細胞に対する抗体のL鎖可変領域（V領域）。

2. 請求項1のL鎖可変領域（V領域）、並びにヒトL鎖定常領域（C領域）から構成されるヒト髄芽腫細胞に対する抗体のL鎖。

3. 前記L鎖V領域のFRがマウス抗体由来であることを特徴とする請求項2に記載のL鎖。

4. 前記L鎖V領域が配列番号：26に示されるアミノ酸配列を有することを特徴とする請求項2に記載のL鎖。

5. 前記L鎖V領域のFRがヒト抗体由来であることを特徴とする請求項2に記載のL鎖。

6. 前記L鎖V領域のFRがヒト抗体REI由来であることを特徴とする請求項2又は5に記載のL鎖。

7. 前記L鎖V領域の2番目のFRにおいて46位のアミノ酸がプロリンであることを特徴とする請求項5または6に記載のL鎖。

8. 前記L鎖V領域の2番目のFRにおいて42位、43位および46位のアミノ酸が各々、グルタミン、セリン、プロリンであることを特徴とする請求項5または6に記載のL鎖。

9. 前記L鎖V領域が下記アミノ酸配列から成る4個のFRのいずれか一組を含むことを特徴とする請求項2に記載のL鎖。

(1) FR1：Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
FR 2 : Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro
Leu Ile Tyr
FR 3 : Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys
FR 4 : Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

(2) FR 1 : Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
FR 2 : Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Pro
Leu Ile Tyr
FR 3 : Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys
FR 4 : Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

10. 前記ヒトL鎖C領域がκC領域であることを特徴とする請求項2に記載のL鎖。

11. 下記に定義されるアミノ酸配列：

CDR1 : Asp Thr Tyr Ile His

CDR2 : Arg Ile Asp Pro Ala Asp Gly Asn Thr Lys Tyr Asp Pro
Lys Phe Gln Gly

CDR3 : Ala Tyr Tyr Val Asn Gln Asp Tyr

またはその一部から成る3個のCDRおよび4個のFRを含むヒト髄芽腫細胞に対する抗体のH鎖V領域。

12. 請求項11のH鎖V領域、並びにヒトH鎖C領域から構成されるヒト髄芽腫細胞に対する抗体のH鎖。

13. 前記H鎖V領域のFRがマウス抗体由来であることを特徴とする請求項12に記載のH鎖。

14. 前記H鎖V領域が配列番号：27に示されるアミノ酸配列を有することを特徴とする請求項12に記載のH鎖。

15. 前記H鎖V領域のFRがヒト抗体由来であることを特徴とする請求項12に記載のH鎖。

16. 前記H鎖V領域のFRがサブグループIのヒト抗体由来であることを特徴とする請求項12または15記載のH鎖。

17. 前記H鎖V領域のFRがヒト抗体Eu由来であることを特徴とする請求項12または15に記載のH鎖。

18. 前記H鎖V領域が下記のアミノ酸配列から成る4個のFRを、含むことを特徴とする請求項15に記載のH鎖。

FR1 : Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly
Phe Asn Ile Lys

FR2 : Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
Gly

FR3 : Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Asn Thr Ala
Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala
Phe Tyr Phe Cys Ala Ser

FR4 : Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

19. 前記ヒトC領域が γ -1C領域または γ -4C領域であることを特徴とする請求項15に記載のH鎖。

20. 請求項2に記載のL鎖および請求項12に記載のH鎖からなるヒト髄芽腫細胞に対する抗体。

21. 前記V領域のFRがマウス抗体由来であることを特徴とする請求項20に記載の抗体。

22. 前記 V 領域の F R がヒト抗体由来であることを特徴とする請求項 20 に記載の抗体。

23. 請求項 1 に記載のアミノ酸配列またはその一部からなる 3 個の C D R および 4 個の F R を含む L 鎖 V 領域ならびにヒト L 鎖 C 領域からなるヒト髄芽腫細胞に対する抗体の L 鎖をコードする D N A。

24. 前記 L 鎖 V 領域が配列番号 58, 61, 63, 66, 70 あるいは 73 で示されるヌクレオチド配列であることを特徴とする特許請求の範囲第 23 項記載の D N A。

25. 請求項 11 に記載のアミノ酸配列またはその一部からなる 3 個の C D R および 4 個の F R を含む H 鎖 V 領域ならびにヒト H 鎖 C 領域からなるヒト髄芽腫細胞に対する抗体の H 鎖をコードする D N A。

26. 前記 H 鎖 V 領域が配列番号 80 で示されるヌクレオチド配列であることを特徴とする請求項 25 に記載の D N A。

27. 請求項 23 または 24 に記載の D N A またはその一部を含む組換えベクター。

28. 請求項 25 または 26 に記載の D N A またはその一部を含む組換えベクター。

29. 請求項 27 に記載の組換えベクターおよび請求項 28 に記載の組換えベクターにより同時形質転換された形質転換体。

30. 請求項 29 に記載の形質転換体を培養し、次いで、産生された目的とする抗体を分離することを特徴とする遺伝子組換え技術を使用した、ヒト髄芽腫細胞に対する抗体の製造方法。

31. 請求項 11 に記載の H 鎖 V 領域と請求項 1 に記載の L 鎖 V 領域をペプチドリinker を介して連結して成る一本鎖 F v 領域。

32. 前記リンカーペプチドが次のアミノ酸配列：

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

を有する請求項 3 1 に記載の一本鎖 F v 領域。

33. 配列番号：8 0 に記載のアミノ酸配列中アミノ酸番号 1 から 1 1 6 までのアミノ酸配列から成る H 鎖 V 領域と、配列番号：4 0, 4 3, 4 6, 4 7, 5 0, 5 1, 5 4, 5 5, 5 8, 6 1, 6 2, 6 3, 6 6, 6 9, 7 0 又は 7 3 の内のいずれかに記載のアミノ酸配列中アミノ酸番号 1 から 1 0 6 までのアミノ酸配列から成る L 鎖 V 領域を含んで成る請求項 3 1 又は 3 2 に記載の一本鎖 F v 領域。

34. 配列番号：8 0 に記載のアミノ酸配列中アミノ酸番号 1 から 1 1 6 までのアミノ酸配列から成る H 鎖 V 領域と、配列番号：7 3 に記載のアミノ酸配列中アミノ酸番号 1 から 1 0 6 までのアミノ酸配列から成る L 鎖 V 領域とを含んで成る、請求項 3 1 又は 3 2 に記載の一本鎖 F v 領域。

35. 配列番号：8 9 に記載のアミノ酸配列から成る請求項 3 1 に記載の一本鎖 F v 領域。

36. 請求項 3 1 ～ 3 5 のいずれか 1 項に記載の一本鎖 F v 領域をコードする DNA。

37. 請求項 3 6 に記載の DNA を含んで成る組換えベクター。

38. 請求項 3 7 に記載の組換えベクターにより形質転換された宿主。

39. 請求項 3 8 に記載の形質転換体を培養し、該培養物から一本鎖 F v 領域を採取することを特徴とする、一本鎖 F v 領域の製造方法。

Fig.1

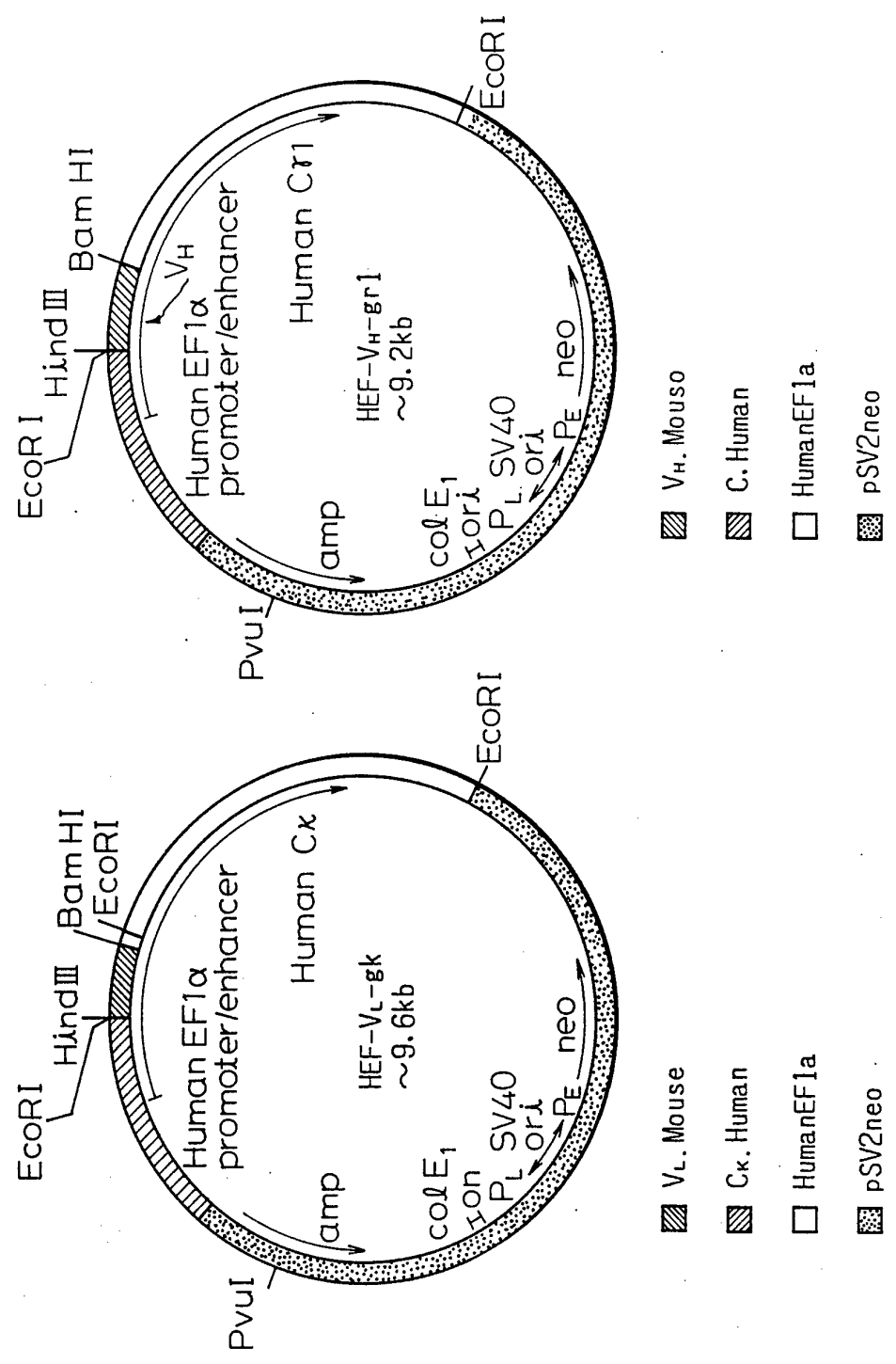


Fig.2

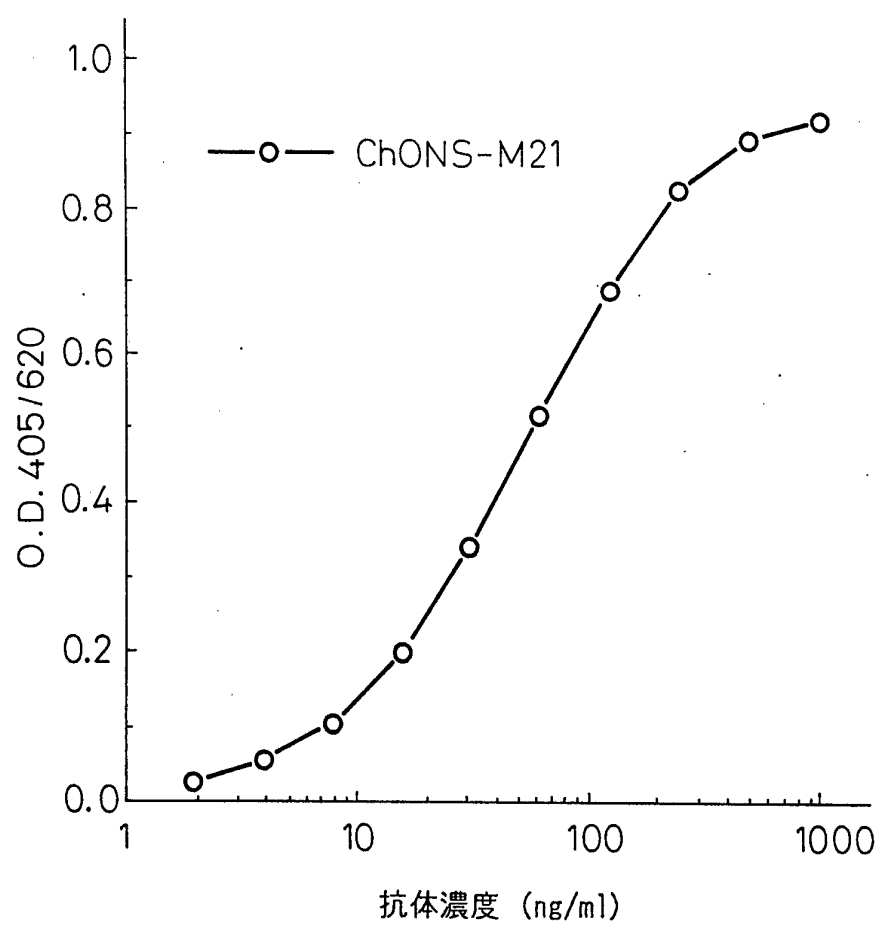


Fig.3

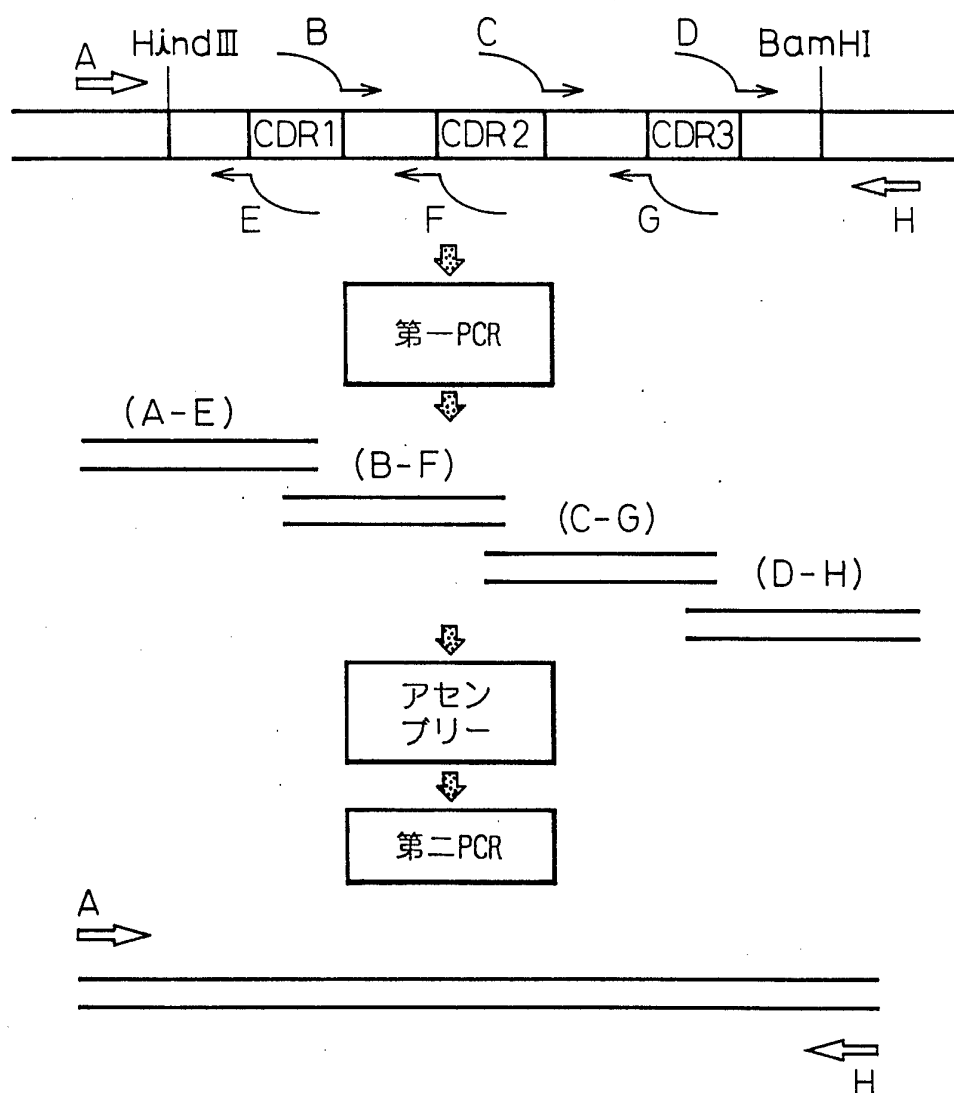


Fig.4

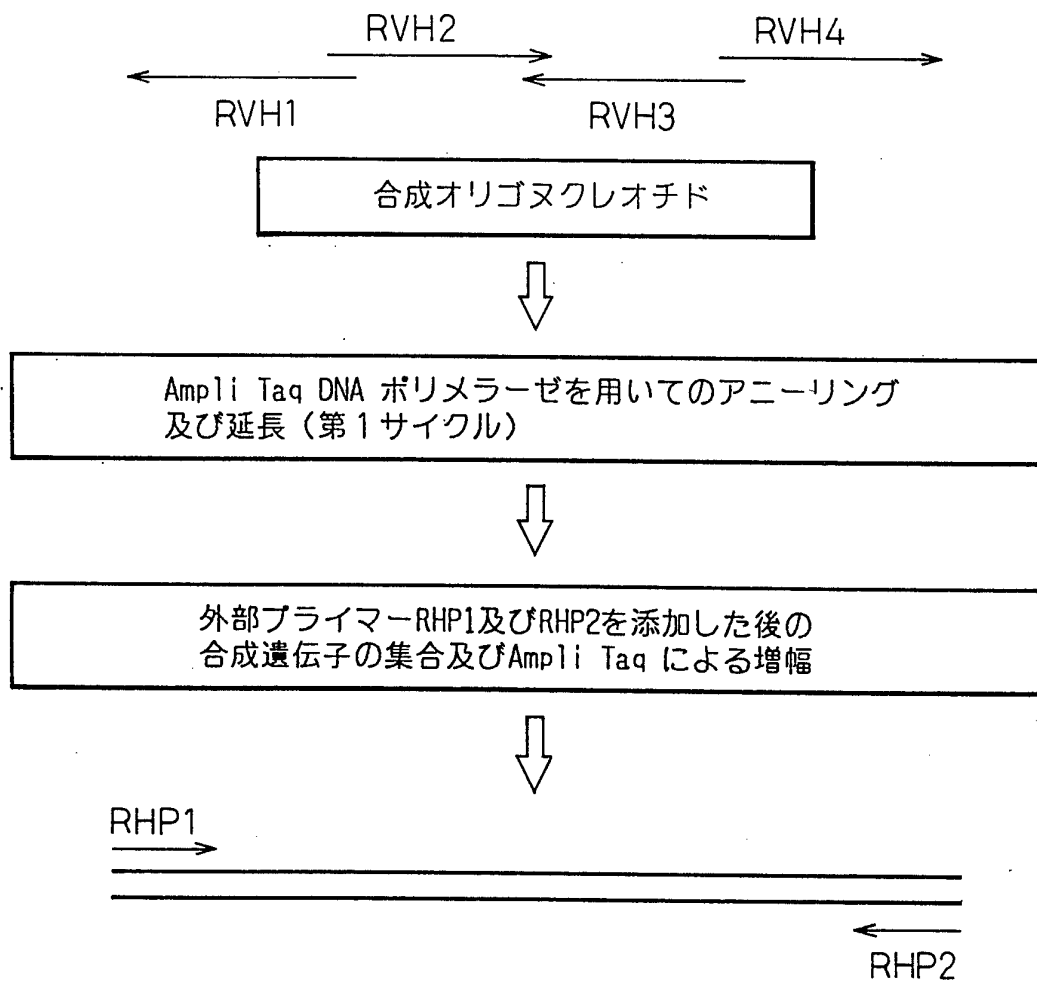


Fig.5

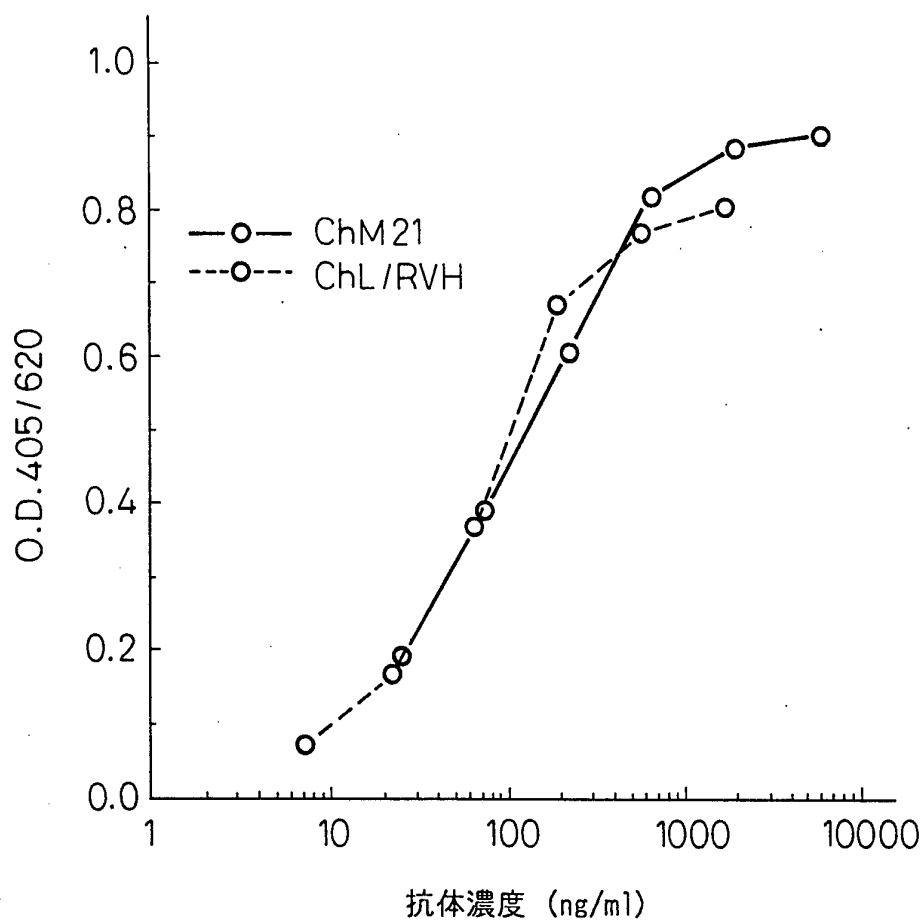


Fig.6

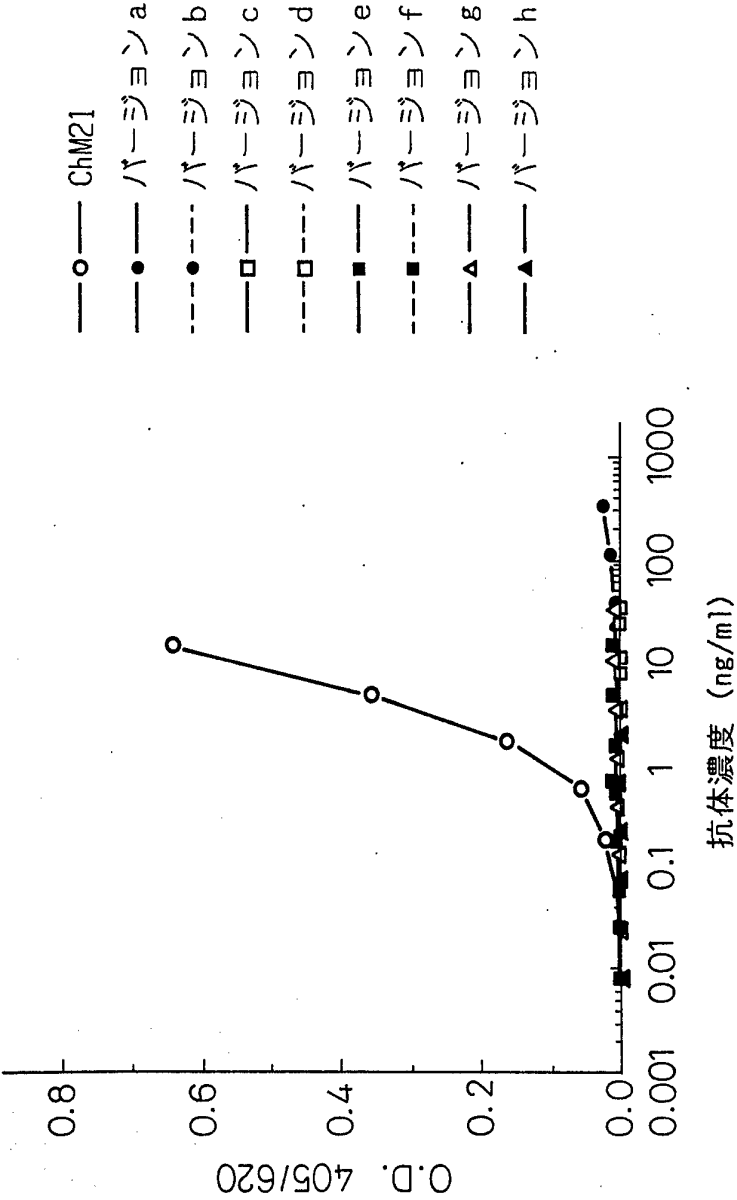


Fig.7

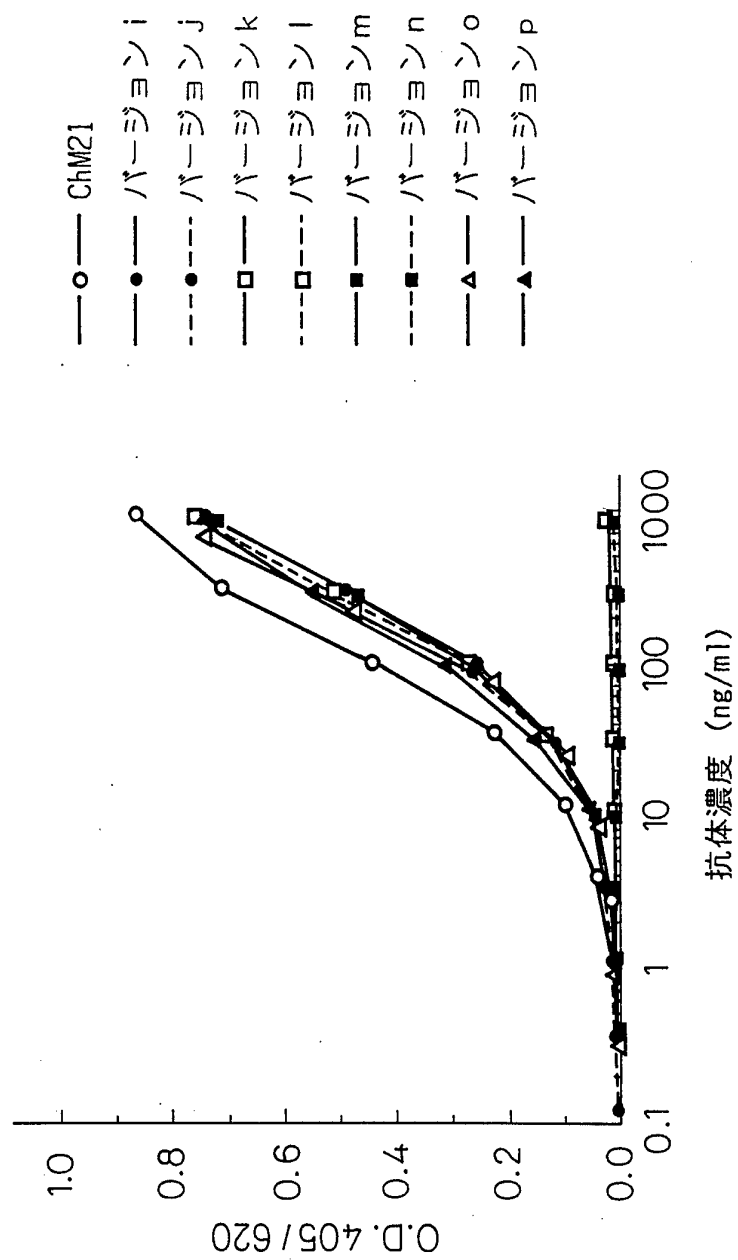


Fig. 8

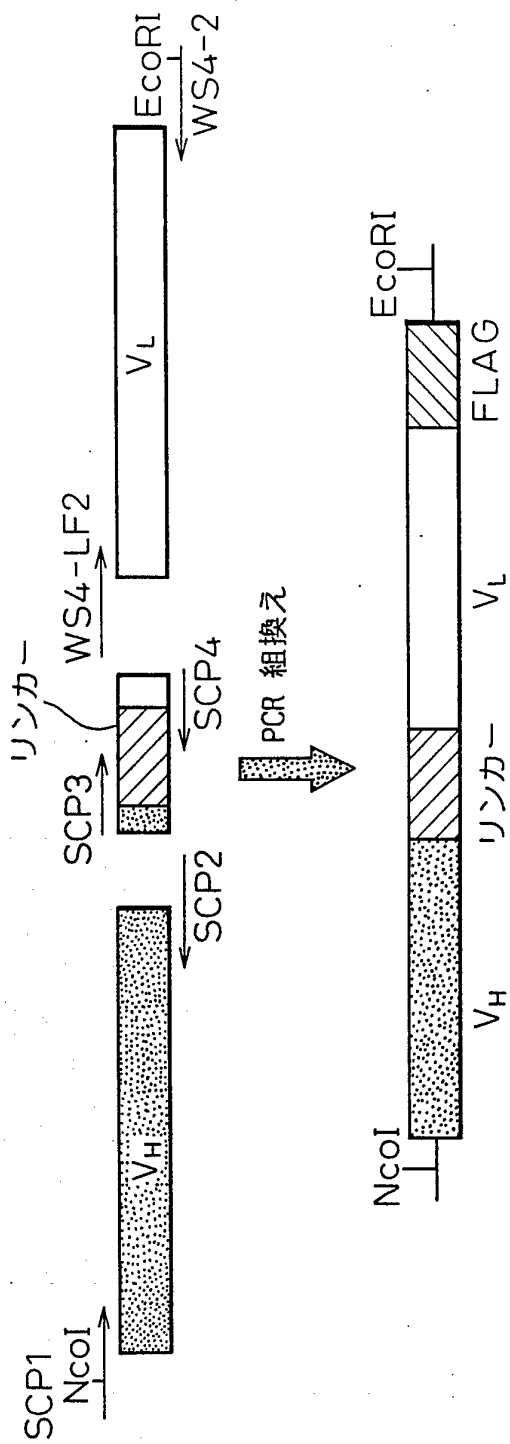


Fig.9

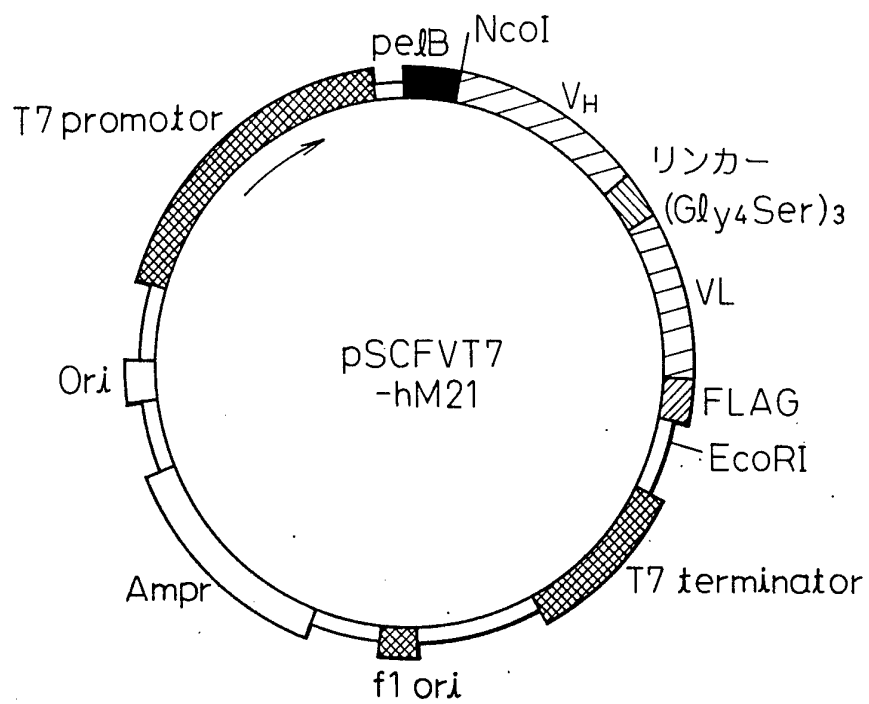
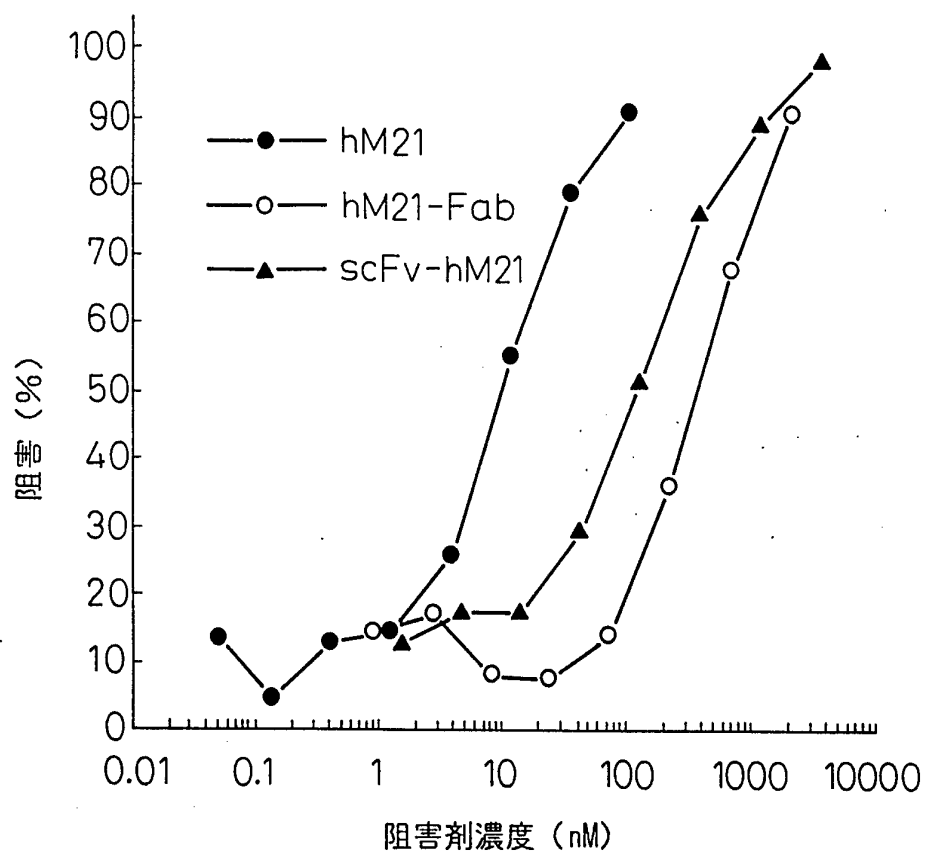


Fig.10



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP94/01763

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ C07K16/30, C12P21/08, C12N15/13, C12N5/10, C12N1/21,
(C12P21/08, C12R1:91), (C12P21/08, C12R1:19), (C12N1/21, C12R:91),
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ C07K16/30, C12P21/08, C12N15/13, C12N5/10, C12N1/21

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

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

WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	British Journal of Cancer, Vol. 68, No. 5, (November, 1993), S. Moriuchi et al. "Characterisation of a new mouse monoclonal antibody (ONS-M21) reactive with both medullo blastomas and gliomas" p.831-837	1-4, 10-14, 20-21, 23, 25, 27-32, 36-39 5-9, 15-19, 22, 24, 26, 33-35
Y	JP, A, 61-47500 (Research Development Corporation of Japan), March 7, 1986 (07. 03. 86) & EP, A1, 171496	1-4, 10-14, 20-21, 23, 25, 27-30
Y	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 85 (August, 1988), J.S. Huston et al, "Protein engineering of antibody binding sites: Recovery of specific activity in an anti- digoxin single-chain Fv analogue produced in Escherichia coli" p.5879-5883	31, 32, 36-39



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

January 17, 1995 (17. 01. 95)

Date of mailing of the international search report

February 14, 1995 (14. 02. 95)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl⁶ C07K16/30, C12P21/08, C12N15/13, C12N5/10, C12N1/21, (C12P21/08, C12R1:91),										
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl⁶ C07K16/30, C12P21/08, C12N15/13, C12N5/10, C12N1/21 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの										
国際調査で使った電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS										
C. 関連すると認められる文献 <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示</th> <th>関連する 請求の範囲の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td rowspan="2">British Journal of Cancer, 第68巻, 第5号, (11月, 1993), S. Moriuch et al. 「Characterisation of a new mouse monoclonal antibody (ONS-M21) reactive with both medullo blastomas and gliomas」 p.831-837</td> <td>1-4, 10-14, 20-21, 23, 25, 27-32, 36-39</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>5-9, 15-19, 22, 24, 26, 33-35</td> </tr> </tbody> </table>			引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	Y	British Journal of Cancer, 第68巻, 第5号, (11月, 1993), S. Moriuch et al. 「Characterisation of a new mouse monoclonal antibody (ONS-M21) reactive with both medullo blastomas and gliomas」 p.831-837	1-4, 10-14, 20-21, 23, 25, 27-32, 36-39	A	5-9, 15-19, 22, 24, 26, 33-35
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号								
Y	British Journal of Cancer, 第68巻, 第5号, (11月, 1993), S. Moriuch et al. 「Characterisation of a new mouse monoclonal antibody (ONS-M21) reactive with both medullo blastomas and gliomas」 p.831-837	1-4, 10-14, 20-21, 23, 25, 27-32, 36-39								
A		5-9, 15-19, 22, 24, 26, 33-35								
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。										
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献										
国際調査を完了した日 17.01.95		国際調査報告の発送日 14.02.95								
名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 河野直樹 ㊞ 4B 9161 電話番号 03-3581-1101 内線 3448								

C (続き). 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP, A, 61-047500 (新技術開発事業団), 7. 3月. 1986 (07. 03. 86) & EP, A1, 171496	1-4, 10-14, 20-21, 23, 25, 27-30
Y	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 第85巻, (8月. 1988), J. S. Huston et al, 「Protein engineering of antibody binding sites: Recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in Escherichia coli」 p. 5879-5883	31, 32, 36-39

第2ページA欄の続き

(C12P21/08, C12R1:19), (C12N1/21,
C12R1:19)