明　細　書

発明の名称 ： 抗Ｂ７－Ｈ３抗体

技術分野

［0001］　本発明は、腫瘍の治療及び／又は予防剤として有用なＢ７－Ｈ３に結合する抗体、並びに当該抗体を用いた腫瘍の治療及び／又は予防法に関する。

背景技術

［0002］　Ｂ７－Ｈ３は１回膜貫通構造を有する蛋白質である（非特許文献１）。Ｂ７－Ｈ３のＮ末端側の細胞外領域には、２つのバリアントが存在し、バリアント１には各２ヶ所のＶまたはＣ様Ｉｇドメインが存在しバリアント２には各１ヶ所のＶまたはＣ様Ｉｇドメインが存在する。Ｃ末端側の細胞内領域には４５アミノ酸が存在している。

［0003］　Ｂ７－Ｈ３の受容体としては、１回膜貫通構造を有するＴＬＴ－２が報告されている（非特許文献２）。しかしながら、ＴＬＴ－２はＢ７－Ｈ３の受容体ではないと主張する論文もある。（非特許文献３）。前者の報告によると、受容体がＢ７－Ｈ３に結合することにより、ＣＤ８陽性Ｔ細胞の活性化を亢進する。

［0004］　Ｂ７－Ｈ３は臨床的に多くの癌、特に非小細胞肺癌、腎癌、尿路上皮癌、大腸癌、前立腺癌、多形神経膠芽腫、卵巣癌、膵臓癌、での高発現が報告されている（非特許文献４～
非特許文献１１）。また、前立腺癌では、Ｂ７－Ｈ３発現強度と腫瘍体積、前立腺外浸潤、グリムソンスコアなどの臨床病理学的な悪性度と正に相関すること、癌の進行と相関することが報告されている（非特許文献８）。同様に多形神経膠芽腫においてＢ７－Ｈ３発現と無再発生存率が負に相関する（非特許文献９）、膵臓癌ではＢ７－Ｈ３発現とリンパ節転移および病理学的進行度と相関している。（非特許文献１１）卵巣癌においてはＢ７－Ｈ３発現とリンパ節転移および病理学的進行度と相関している。

［0005］　また、Ｂ７－Ｈ３遺伝子に対するｓｉＲＮＡをＢ７－Ｈ３陽性癌細胞株に

導入することによって、ファイブロネクチンに対する接着性が低下し、細胞遊走能やマトリゲル浸潤能が低下することを報告している。（非特許文献１２）また、多形神経膠芽腫において、Ｂ７－Ｈ３の発現により、ＮＫ細胞による細胞死から逃避しているとの報告がある（非特許文献１３）。

[0006] 一方でＢ７－Ｈ３は、癌細胞のみならず腫瘍内または周囲の血管にも発現していることが報告されている（非特許文献５、非特許文献１４）。卵巣癌血管にＢ７－Ｈ３が発現していると、生存率が低下することが報告されている。

[0007] Ｂ７ファミリー分子は免疫系との関連性が示唆されている。Ｂ７－Ｈ３は単球、樹状細胞や活性化Ｔ細胞で発現することが報告されている（非特許文献１５）。Ｂ７－Ｈ３は細胞傷害性Ｔ細胞の活性化に伴い、ＣＤ４陽性、またはＣＤ８陽性Ｔ細胞の増殖を共刺激すると報告されている。しかしながら、Ｂ７－Ｈ３は共刺激をしないとの報告もなされている（非特許文献１）。

[0008] Ｂ７－Ｈ３分子が自己免疫疾患と関連するとの報告がある。リウマチや他の自己免疫疾患において、繊維芽細胞様の滑膜細胞と活性化Ｔ細胞の相互作用にＢ７－Ｈ３が重要であるとの報告（非特許文献１６）やＢ７－Ｈ３が活性化マクロファージからのサイトカインリリースの際の補助刺激因子となっており、敗血症発症に関わっているとの報告がある（非特許文献１７）。また、マウス喘息モデルに対し誘導相で抗Ｂ７－Ｈ３抗体を投与することにより、所属リンパ節におけるＴｈ２細胞誘導性のサイトカイン産生が抗マウスＢ７－Ｈ３抗体を投与することにより抑制され喘息が改善したとの報告がある（非特許文献１８）。

[0009] Ｂ７－Ｈ３に関しては、マウスＢ７－Ｈ３に対する抗体が、腫瘍内に浸潤するＣＤ８陽性Ｔ細胞を促進し、腫瘍増殖を抑制することが報告されている（非特許文献２４）。また、Ｂ７－Ｈ３のバリアント１を認識する抗体がアデノカルシノーマｉｎ　ｖｉｖｏ抗腫瘍効果を示すとの特許が記載されている（特許文献１）。

[0010] これらの研究にもかかわらず、現在までのところｉｎ　ｖｉｖｏで抗腫瘍

効果を示す抗Ｂ７－Ｈ３抗体のエピトープについては明確になっておらず、Ｂ７－Ｈ３の細胞外領域中の特定のアミノ酸配列が癌治療を目的としたモノクローナル抗体のエピトープとして有用であるという報告はない。

[0011] 同一の抗原に対する抗体であっても、エピトープや抗体の配列が異なることによって、抗体の性質は異なる。そして、これらの性質が異なることによって、臨床でヒトに投与した場合に薬剤の有効性や治療応答性の頻度、副作用や薬剤耐性の発生頻度等の点で異なる反応を示すことになる。

Ｂ７－Ｈ３に対する抗体についても、従来とは異なる特性を有する抗体の創出が強く求められていた。

先行技術文献

特許文献

[0012] 特許文献1：ＷＯ２００８／０６６６９１

非特許文献

[0013] 非特許文献1：Ｔｈｅ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ２００４年、第１７２巻、ｐ．２３５２－２３５９

非特許文献2：Ｐｒｏｃｅｅｄｉｎｇｓ ｏｆ ｔｈｅ ｎａｔｉｏｎａｌ Ａｃａｄｅｍｙ ｏｆ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ ｏｆ ｔｈｅ Ｕｎｉｔｅｄ Ｓｔａｔｅｓ ｏｆ Ａｍｅｒｉｃａ ２００８年、第１０５巻、ｐ．１０４９５－１０５００

非特許文献3：Ｅｕｒｏｐｅａｎ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ２００９年、第３９巻、ｐ．１７５４－１７６４

非特許文献4：Ｌｕｎｇ Ｃａｎｃｅｒ，２００９年、第６６巻、ｐ．２４５－２４９

非特許文献5：Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ２００８年、第１４巻、ｐ．５１５０－５１５７

非特許文献6：Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ２００８年、第１４巻、ｐ．４８００－４８０８

非特許文献7：Ｃａｎｃｅｒ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅ

ｒａｐｙ ２０１０年、第５９巻、ｐ．１１６３－１１７１
非特許文献8：Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ２００７年、第６７巻、ｐ．７８９３-７９００
非特許文献9：Ｈｉｓｔｏｐａｔｈｏｌｏｇｙ ２００８年、第５３巻、ｐ．７３-８０
非特許文献10：Ｍｏｄｅｒｎ Ｐａｔｈｏｌｏｇｙ ２０１０年、第２３巻、ｐ．１１０４-１１１２
非特許文献11：Ｂｒｉｔｉｓｈ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｃａｎｃｅｒ ２００９年、第１０１巻、ｐ．１７０９-１７１６
非特許文献12：Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｃａｎｃｅｒ Ｄｒｕｇ Ｔａｒｇｅｔｓ ２００８年、第８巻、ｐ．４０４－４１３
非特許文献13：Ｐｒｏｃｅｅｄｉｎｇｓ ｏｆ ｔｈｅ ｎａｔｉｏｎａｌ Ａｃａｄｅｍｙ ｏｆ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ ｏｆ ｔｈｅ Ｕｎｉｔｅｄ Ｓｔａｔｅｓ ｏｆ Ａｍｅｒｉｃａ ２００４年、第１０１巻、ｐ．１２６４０－１２６４５
非特許文献14：Ｍｏｄｅｒｎ Ｐａｔｈｏｌｏｇｙ ２０１０年、第２３巻、ｐ．１１０４-１１１２
非特許文献15：Ｎａｔｕｒｅ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ２００１年、第２巻、ｐ．２６９－２７４
非特許文献16：Ｔｈｅ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ２００８年、第１８０巻、ｐ．２９８９－２９９８
非特許文献17：Ｔｈｅ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ２０１０年、第１８５巻、ｐ．３６７７－３６８４
非特許文献18：Ｔｈｅ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ２００８年、第１８１巻、ｐ．４０６２－４０７１

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0014] 本発明の課題は、腫瘍に対して治療効果を有する医薬品となる抗体及び当

該抗体の機能性断片、並びに当該抗体又は当該抗体の機能性断片を用いた腫瘍の治療方法等を提供することである。

課題を解決するための手段

[0015] 本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討を行ったところ、Ｂ７－Ｈ３に特異的に結合して抗腫瘍活性を示す抗体を見出して本発明を完成させた。即ち、本発明は以下の発明を包含する。

（１）以下の特性を有することを特徴とする抗体又は当該抗体の機能性断片；

（ａ）Ｂ７－Ｈ３に特異的に結合する

（ｂ）抗体依存性細胞媒介食作用（ＡＤＣＰ）活性を有する

（ｃ）ｉｎ　ｖｉｖｏで抗腫瘍活性を有する

（２）Ｂ７－Ｈ３が配列番号６又は１０に記載のアミノ酸配列からなる分子である上記（１）に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片。

（３）Ｂ７－Ｈ３のドメインであるＩｇＣ１及び／又はＩｇＣ２に結合する上記（１）又は（２）に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片。

（４）ＩｇＣ１が配列番号６においてアミノ酸番号１４０乃至２４４に記載のアミノ酸配列からなるドメインであり、ＩｇＣ２が配列番号６においてアミノ酸番号３５８乃至４５６に記載のアミノ酸配列からなるドメインである上記（３）に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片。

（５）Ｂ７－Ｈ３への結合に対してＭ３０抗体と競合阻害活性を有する上記（１）乃至（４）のいずれか１項に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片。

[0016] （６）抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）活性及び／又は補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）活性を有する上記（１）乃至（５）のいずれか１項に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片。

（７）腫瘍が癌である上記（１）乃至（６）のいずれか１項に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片。

（８）癌が肺癌、乳癌、前立腺癌、膵癌、大腸癌、メラノーマ、肝癌、卵巣癌、膀胱癌、胃癌、食道癌又は腎癌である上記（７）に記載の抗体又は当該

抗体の機能性断片。

（９）重鎖における相補性決定領域として配列番号９２に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１、配列番号９３に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２及び配列番号９４に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３、並びに軽鎖における相補性決定領域として配列番号９５に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１、配列番号９６に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２及び配列番号９７に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ３を有する上記（１）乃至（８）のいずれか１項に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片。

（１０）配列番号５１においてアミノ酸番号２０乃至１４１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖の可変領域及び配列番号５３においてアミノ酸番号２３乃至１３０に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖の可変領域を有する上記（１）乃至（９）のいずれか１項に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片。

（１１）定常領域がヒト由来定常領域である上記（１）乃至（１０）のいずれか１項に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片。

[0017] （１２）配列番号６３に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号５９に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖を有する上記（１１）に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片。

（１３）ヒト化されている上記（１）乃至（１２）のいずれか１項に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片。

（１４）（ａ）配列番号８５においてアミノ酸番号２０乃至１４１に記載のアミノ酸配列、（ｂ）配列番号８７においてアミノ酸番号２０乃至１４１に記載のアミノ酸配列、（ｃ）配列番号８９においてアミノ酸番号２０乃至１４１に記載のアミノ酸配列、（ｄ）配列番号９１においてアミノ酸番号２０乃至１４１に記載のアミノ酸配列、（ｅ）（ａ）乃至（ｄ）の配列に対して少なくとも９５％以上の相同性を有するアミノ酸配列、及び（ｆ）（ａ）乃至（ｄ）の配列において1又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなる群から選択されたアミノ酸配列からなる重鎖の可変領域、並びに（ｇ）配列番号７１においてアミノ酸番号２１乃至１２８に記載の

アミノ酸配列、（ｈ）配列番号７３においてアミノ酸番号２１乃至１２８に記載のアミノ酸配列、（ｉ）配列番号７５においてアミノ酸番号２１乃至１２８に記載のアミノ酸配列、（ｊ）配列番号７７においてアミノ酸番号２１乃至１２８に記載のアミノ酸配列、（ｋ）配列番号７９においてアミノ酸番号２１乃至１２８に記載のアミノ酸配列、（ｌ）配列番号８１においてアミノ酸番号２１乃至１２８に記載のアミノ酸配列、（ｍ）配列番号８３においてアミノ酸番号２１乃至１２８に記載のアミノ酸配列、（ｎ）（ｇ）乃至（ｍ）の配列に対して少なくとも９５％以上の相同性を有するアミノ酸配列、及び（ｏ）（ｇ）乃至（ｍ）の配列において1又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなる群から選択されたアミノ酸配列からなる軽鎖の可変領域、を有する上記（１３）に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片。

（１５）配列番号８５においてアミノ酸番号２０乃至１４１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖の可変領域及び配列番号７１においてアミノ酸番号２１乃至１２８に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖の可変領域、配列番号８５においてアミノ酸番号２０乃至１４１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖の可変領域及び配列番号７３においてアミノ酸番号２１乃至１２８に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖の可変領域、配列番号８５においてアミノ酸番号２０乃至１４１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖の可変領域及び配列番号７５においてアミノ酸番号２１乃至１２８に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖の可変領域、配列番号８５においてアミノ酸番号２０乃至１４１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖の可変領域及び配列番号７７においてアミノ酸番号２１乃至１２８に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖の可変領域、配列番号８５においてアミノ酸番号２０乃至１４１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖の可変領域及び配列番号７９においてアミノ酸番号２１乃至１２８に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖の可変領域、配列番号８５においてアミノ酸番号２０乃至１４１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖の可変領域及び配列番号８１においてアミノ酸番号２１乃至１２８に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖

の可変領域、配列番号８５においてアミノ酸番号２０乃至１４１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖の可変領域及び配列番号８３においてアミノ酸番号２１乃至１２８に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖の可変領域、配列番号９１においてアミノ酸番号２０乃至１４１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖の可変領域及び配列番号７１においてアミノ酸番号２１乃至１２８に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖の可変領域、配列番号９１においてアミノ酸番号２０乃至１４１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖の可変領域及び配列番号７３においてアミノ酸番号２１乃至１２８に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖の可変領域、配列番号９１においてアミノ酸番号２０乃至１４１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖の可変領域及び配列番号７５においてアミノ酸番号２１乃至１２８に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖の可変領域、並びに配列番号９１においてアミノ酸番号２０乃至１４１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖の可変領域及び配列番号７７においてアミノ酸番号２１乃至１２８に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖の可変領域からなる群から選択される重鎖の可変領域及び軽鎖の可変領域を有する上記（１４）に記載の抗体又は抗体の機能性断片。

（１６）配列番号８５においてアミノ酸番号２０乃至４７１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号７１においてアミノ酸番号２１乃至２３３に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖、配列番号８５においてアミノ酸番号２０乃至４７１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号７３においてアミノ酸番号２１乃至２３３に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖、配列番号８５においてアミノ酸番号２０乃至４７１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号７５においてアミノ酸番号２１乃至２３３に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖、配列番号８５においてアミノ酸番号２０乃至４７１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号７７においてアミノ酸番号２１乃至２３３に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖、配列番号８５においてアミノ酸番号２０乃至４７１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号７９においてアミノ酸番号２１乃至２３３に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖

、配列番号８５においてアミノ酸番号２０乃至４７１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号８１においてアミノ酸番号２１乃至２３３に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖、配列番号８５においてアミノ酸番号２０乃至４７１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号８３においてアミノ酸番号２１乃至２３３に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖、配列番号９１においてアミノ酸番号２０乃至４７１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号７１においてアミノ酸番号２１乃至２３３に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖、配列番号９１においてアミノ酸番号２０乃至４７１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号７３においてアミノ酸番号２１乃至２３３に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖、配列番号９１においてアミノ酸番号２０乃至４７１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号７５においてアミノ酸番号２１乃至２３３に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖、並びに配列番号９１においてアミノ酸番号２０乃至４７１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号７７においてアミノ酸番号２１乃至２３３に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖からなる群から選択される重鎖及び軽鎖を有する上記（１４）又は（１５）に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片。

（１７）配列番号８５に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号７１に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖、配列番号８５に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号７３に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖、配列番号８５に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号７５に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖、配列番号８５に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号７７に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖、配列番号８５に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号７９に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖、配列番号８５に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号８１に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖、配列番号８５に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号８３に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖、配列番号９１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号７１に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖、配列番号９１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号

７３に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖、配列番号９１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号７５に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖、並びに配列番号９１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号７７に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖からなる群から選択される重鎖及び軽鎖を有する上記（１４）乃至（１６）のいずれか１項に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片。

（１８）機能性断片がＦａｂ、Ｆ（ａｂ）２、Ｆａｂ’及びＦｖからなる群から選択される上記（１）乃至（１７）のいずれか1項に記載の抗体の機能性断片。

（１９）上記（１）乃至（１８）のいずれか1項に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片をコードするポリヌクレオチド。

（２０）配列番号５０における５８乃至４２３のヌクレオチド配列、及び配列番号５２における６７乃至３９０のヌクレオチド配列を有する上記（１９）に記載のポリヌクレオチド。

（２１）配列番号６２のヌクレオチド配列、及び配列番号５８のヌクレオチド配列である上記（１９）又は（２０）に記載のポリヌクレオチド。

（２２）（ａ）配列番号８４においてヌクレオチド番号５８乃至４２３に記載のヌクレオチド配列、（ｂ）配列番号８６においてヌクレオチド番号５８乃至４２３に記載のヌクレオチド配列、（ｃ）配列番号８８においてヌクレオチド番号５８乃至４２３に記載のヌクレオチド配列、（ｄ）配列番号９０においてヌクレオチド番号５８乃至４２３に記載のヌクレオチド配列、及び（ｅ）（ａ）乃至（ｄ）に記載のヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチドが有するヌクレオチド配列からなる群から選択されたヌクレオチド配列、並びに（ｆ）配列番号７０においてヌクレオチド番号６１乃至３８４に記載のヌクレオチド配列、（ｇ）配列番号７２においてヌクレオチド番号６１乃至３８４に記載のヌクレオチド配列、（ｈ）配列番号７４においてヌクレオチド番号６１乃至３８４に記載のヌクレオチド配列、（

ｉ）配列番号７６においてヌクレオチド番号６１乃至３８４に記載のヌクレオチド配列、（ｊ）配列番号７８においてヌクレオチド番号６１乃至３８４に記載のヌクレオチド配列、（ｋ）配列番号８０においてヌクレオチド番号６１乃至３８４に記載のヌクレオチド配列、（ｌ）配列番号８２においてヌクレオチド番号６１乃至３８４に記載のヌクレオチド配列、及び（ｍ）（ｆ）乃至（ｌ）に記載のヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチドが有するヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列を有する上記（１９）又は（２０）に記載のポリヌクレオチド。

（２３）配列番号８４においてヌクレオチド番号５８乃至４２３に記載のヌクレオチド配列及び配列番号７０においてヌクレオチド番号６１乃至３８４に記載のヌクレオチド配列、配列番号８４においてヌクレオチド番号５８乃至４２３に記載のヌクレオチド配列及び配列番号７２においてヌクレオチド番号６１乃至３８４に記載のヌクレオチド配列、配列番号８４においてヌクレオチド番号５８乃至４２３に記載のヌクレオチド配列及び配列番号７４においてヌクレオチド番号６１乃至３８４に記載のヌクレオチド配列、配列番号８４においてヌクレオチド番号５８乃至４２３に記載のヌクレオチド配列及び配列番号７６においてヌクレオチド番号６１乃至３８４に記載のヌクレオチド配列、配列番号８４においてヌクレオチド番号５８乃至４２３に記載のヌクレオチド配列及び配列番号７８においてヌクレオチド番号６１乃至３８４に記載のヌクレオチド配列、配列番号８４においてヌクレオチド番号５８乃至４２３に記載のヌクレオチド配列及び配列番号８０においてヌクレオチド番号６１乃至３８４に記載のヌクレオチド配列、配列番号８４においてヌクレオチド番号５８乃至４２３に記載のヌクレオチド配列及び配列番号８２においてヌクレオチド番号６１乃至３８４に記載のヌクレオチド配列、配列番号９０においてヌクレオチド番号５８乃至４２３に記載のヌクレオチド配列及び配列番号７０においてヌクレオチド番号６１乃至３８４に記載のヌクレオチド配列、配列番号９０においてヌクレオチド番号５８乃至４２３に

記載のヌクレオチド配列及び配列番号７２においてヌクレオチド番号６１乃至３８４に記載のヌクレオチド配列、配列番号９０においてヌクレオチド番号５８乃至４２３に記載のヌクレオチド配列及び配列番号７４においてヌクレオチド番号６１乃至３８４に記載のヌクレオチド配列、並びに配列番号９０においてヌクレオチド番号５８乃至４２３に記載のヌクレオチド配列及び配列番号７６においてヌクレオチド番号６１乃至３８４に記載のヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列を有する上記（２２）に記載のポリヌクレオチド。

（２４）配列番号８４においてヌクレオチド番号５８乃至１４１３に記載のヌクレオチド配列及び配列番号７０においてヌクレオチド番号６１乃至６９９に記載のヌクレオチド配列、配列番号８４においてヌクレオチド番号５８乃至１４１３に記載のヌクレオチド配列及び配列番号７２においてヌクレオチド番号６１乃至６９９に記載のヌクレオチド配列、配列番号８４においてヌクレオチド番号５８乃至１４１３に記載のヌクレオチド配列及び配列番号７４においてヌクレオチド番号６１乃至６９９に記載のヌクレオチド配列、配列番号８４においてヌクレオチド番号５８乃至１４１３に記載のヌクレオチド配列及び配列番号７６においてヌクレオチド番号６１乃至６９９に記載のヌクレオチド配列、配列番号８４においてヌクレオチド番号５８乃至１４１３に記載のヌクレオチド配列及び配列番号７８においてヌクレオチド番号６１乃至６９９に記載のヌクレオチド配列、配列番号８４においてヌクレオチド番号５８乃至１４１３に記載のヌクレオチド配列及び配列番号８０においてヌクレオチド番号６１乃至６９９に記載のヌクレオチド配列、配列番号８４においてヌクレオチド番号５８乃至１４１３に記載のヌクレオチド配列及び配列番号８２においてヌクレオチド番号６１乃至６９９に記載のヌクレオチド配列、配列番号９０においてヌクレオチド番号５８乃至１４１３に記載のヌクレオチド配列及び配列番号７０においてヌクレオチド番号６１乃至６９９に記載のヌクレオチド配列、配列番号９０においてヌクレオチド番号５８乃至１４１３に記載のヌクレオチド配列及び配列番号７２においてヌク

レオチド番号６１乃至６９９に記載のヌクレオチド配列、配列番号９０においてヌクレオチド番号５８乃至１４１３に記載のヌクレオチド配列及び配列番号７４においてヌクレオチド番号６１乃至６９９に記載のヌクレオチド配列、並びに配列番号９０においてヌクレオチド番号５８乃至１４１３に記載のヌクレオチド配列及び配列番号７６においてヌクレオチド番号６１乃至６９９に記載のヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列を有する上記（２２）又は（２３）に記載のポリヌクレオチド。

（２５）配列番号８４に記載のヌクレオチド配列及び配列番号７０に記載のヌクレオチド配列、配列番号８４に記載のヌクレオチド配列及び配列番号７２に記載のヌクレオチド配列、配列番号８４に記載のヌクレオチド配列及び配列番号７４に記載のヌクレオチド配列、配列番号８４に記載のヌクレオチド配列及び配列番号７６に記載のヌクレオチド配列、配列番号８４に記載のヌクレオチド配列及び配列番号７８に記載のヌクレオチド配列、配列番号８４に記載のヌクレオチド配列及び配列番号８０に記載のヌクレオチド配列、配列番号８４に記載のヌクレオチド配列及び配列番号８２に記載のヌクレオチド配列、配列番号９０に記載のヌクレオチド配列及び配列番号７０に記載のヌクレオチド配列、配列番号９０に記載のヌクレオチド配列及び配列番号７２に記載のヌクレオチド配列、配列番号９０に記載のヌクレオチド配列及び配列番号７４に記載のヌクレオチド配列、並びに配列番号９０に記載のヌクレオチド配列及び配列番号７６に記載のヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列である上記（２２）乃至（２４）のいずれか１項に記載のポリヌクレオチド。

[0018] （２６）上記（１９）乃至（２５）のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドを含有する発現ベクター

（２７）上記（２６）に記載の発現ベクターにより形質転換された宿主細胞。

（２８）宿主細胞が真核細胞である上記（２７）に記載の宿主細胞。

（２９）上記（２７）又は（２８）に記載の宿主細胞を培養する工程、及び

当該工程で得られた培養物から目的の抗体又は当該抗体の機能性断片を採取する工程を含むことを特徴とする当該抗体又は当該断片の製造方法。

（３０）上記（２９）の製造方法により得られることを特徴とする抗体又は当該抗体の機能性断片。

（３１）機能性断片がＦａｂ、Ｆ(ａｂ)2、Ｆａｂ’及びＦｖからなる群から選択される上記（３０）に記載の抗体の機能性断片。

（３２）抗体依存性細胞傷害活性を増強させるために糖鎖修飾が調節されている上記（１）乃至（１８）、（３０）、（３１）のいずれか1項に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片。

（３３）上記（１）乃至（１８）、（３０）乃至（３２）に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片の少なくとも一つを含有することを特徴とする医薬組成物。

[0019] （３４）腫瘍治療用である上記（３３）に記載の医薬組成物。

（３５）上記（１）乃至（１８）、（３０）乃至（３２）に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片の少なくとも一つ、及び少なくとも一つの癌治療剤を含有することを特徴とする腫瘍治療用医薬組成物。

[0020] （３６）腫瘍が癌である上記（３４）又は（３５）に記載の医薬組成物。

（３７）癌が肺癌、乳癌、前立腺癌、膵癌、大腸癌、メラノーマ、肝癌、卵巣癌、膀胱癌、胃癌、食道癌又は腎癌である上記（３６）に記載の医薬組成物。

（３８）上記（１）乃至（１８）、（３０）乃至（３２）に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片の少なくとも一つを個体に投与することを特徴とする腫瘍の治療方法。

（３９）上記（１）乃至（１８）、（３０）乃至（３２）に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片の少なくとも一つ、及び少なくとも一つの癌治療剤を、同時に、別々に又は連続して個体に投与することを特徴とする腫瘍の治療方法。

[0021] （４０）腫瘍が癌である上記（３８）又は（３９）に記載の治療方法。

（４１）癌が肺癌、癌、乳癌、前立腺癌、膵癌、大腸癌、メラノーマ、肝癌、卵巣癌、膀胱癌、胃癌、食道癌又は腎癌である上記（４０）に記載の治療方法。

発明の効果

[0022] 本発明によれば、Ｂ７－Ｈ３に結合し、癌細胞に対して抗腫瘍活性を有する抗体を含有する癌の治療剤等を得ることができる。

図面の簡単な説明

[0023] [図1]図１は、抗Ｂ７－Ｈ３抗体のＮＣＩ－Ｈ３２２細胞に対するＡＤＣＰ活性の有無を示す図である。図中のエラーバーは標準誤差（ｎ＝３）を示す。

[図2]図２は、市販抗Ｂ７－Ｈ３抗体のＮＣＩ－Ｈ３２２細胞に対するＡＤＣＰ活性の有無を示す図である。

[図3]図３は、Ｍ３０抗体の空ベクター及びＢ７－Ｈ３発現２９３細胞に対するＡＤＣＣ活性の有無を示す図である。図中のエラーバーは標準誤差（ｎ＝３）を示す。また図中の「ｍｏｃｋ」は空ベクターを発現した２９３細胞に対するＭ３０のＡＤＣＣ活性を意味し、「Ｂ７Ｈ３」はＢ７－Ｈ３発現２９３細胞に対するＭ３０のＡＤＣＣ活性を意味する。

[図4]図４は、抗Ｂ７－Ｈ３抗体のＮＣＩ－Ｈ３２２細胞に対するＣＤＣ活性の有無を示す図である。図中のエラーバーは標準誤差（ｎ＝３）を示す。

[図5-1]図５－１は、Ｍ３０抗体のＢ７－Ｈ３欠損変異体（Ｂ７－Ｈ３　ＩｇＶ１）に対する反応性を示す図である。コントロール抗体の結合性を点線で、Ｍ３０ハイブリドーマ培養上清の結合性を実線にて示す。

[図5-2]図５－２は、Ｍ３０抗体のＢ７－Ｈ３欠損変異体（Ｂ７－Ｈ３　ＩｇＣ１）に対する反応性を示す図である。コントロール抗体の結合性を点線で、Ｍ３０ハイブリドーマ培養上清の結合性を実線にて示す。

[図5-3]図５－３は、Ｍ３０抗体のＢ７－Ｈ３欠損変異体（Ｂ７－Ｈ３　ＩｇＶ２）に対する反応性を示す図である。コントロール抗体の結合性を点線で、Ｍ３０ハイブリドーマ培養上清の結合性を実線にて示す。

[図5-4]図５－４は、Ｍ３０抗体のＢ７－Ｈ３欠損変異体（Ｂ７－Ｈ３　Ｉｇ

Ｃ２）に対する反応性を示す図である。コントロール抗体の結合性を点線で、Ｍ３０ハイブリドーマ培養上清の結合性を実線にて示す。

[図5-5]図５－５は、Ｍ３０抗体のＢ７－Ｈ３欠損変異体（Ｂ７－Ｈ３　ＩｇＣ１－Ｖ２－Ｃ２）に対する反応性を示す図である。コントロール抗体の結合性を点線で、Ｍ３０ハイブリドーマ培養上清の結合性を実線にて示す。

[図5-6]図５－６は、Ｍ３０抗体のＢ７－Ｈ３欠損変異体（Ｂ７－Ｈ３　ＩｇＶ２－Ｃ２）に対する反応性を示す図である。コントロール抗体の結合性を点線で、Ｍ３０ハイブリドーマ培養上清の結合性を実線にて示す。

[図6]図６は、ＮＣＩ－Ｈ３２２細胞を移植されたマウスに対する抗Ｂ７－Ｈ３抗体の抗腫瘍活性を示す図である。図中のエラーバーは標準誤差（ｎ＝１０）を示す。

[図7]図７は、生体内から貪食細胞を除去した場合のＭ３０抗体の抗腫瘍効果を示す図である。図中のエラーバーは標準誤差（ｎ＝８）を示す。また「ｍｍ＾３」は「mm^3」を意味する。

[図8]図８は、Ｍ３０抗体及びｃＭ３０抗体のＮＣＩ－Ｈ３２２細胞に対するＡＤＣＰ活性を示す図である。図中のエラーバーは標準誤差（ｎ＝４）を示す。

[図9]図９は、ＭＤＡ－ＭＢ－２３１細胞を移植されたマウスに対するＭ３０抗体及びｃＭ３０抗体の抗腫瘍効果を示す図である。図中のエラーバーは標準誤差（ｎ＝９）を示す。

[図10-1]図１０－１は、Ｍ３０のＢ７－Ｈ３バリアント１抗原の細胞外領域ポリペプチド抗原結合に対するｃＭ３０抗体及びＭ３０－Ｈ１－Ｌ４抗体の競合阻害活性を示す図である。図中のエラーバーは標準誤差（ｎ＝３）を示す。

[図10-2]図１０－２は、Ｍ３０のＢ７－Ｈ３バリアント２抗原の細胞外領域ポリペプチド抗原結合に対するｃＭ３０抗体及びＭ３０－Ｈ１－Ｌ４抗体の競合阻害活性を示す図である。図中のエラーバーは標準誤差（ｎ＝３）を示す。

[図11]図１１は、Ｍ３０抗体及びｃＭ３０抗体、Ｍ３０－Ｈ１－Ｌ４抗体のＮＣＩ－Ｈ３２２細胞に対してＡＤＣＰ活性を示す図である。図中のエラーバーは標準誤差（ｎ＝４）を示す。

[図12]図１２は、ｃＭ３０抗体及びＭ３０－Ｈ１－Ｌ４抗体のＮＣＩ－Ｈ３２２細胞に対してＡＤＣＣ活性を示す図である。図中のエラーバーは標準誤差（ｎ＝３）を示す。

[図13-1]図１３－１は、Ｂ７－Ｈ３バリアント１のヌクレオチド配列（配列番号５）を示す。

[図13-2]図１３－２は、Ｂ７－Ｈ３バリアント１のアミノ酸配列（配列番号６）を示す。

[図14-1]図１４－１は、Ｂ７－Ｈ３バリアント２のヌクレオチド配列（配列番号９）を示す。

[図14-2]図１４－２は、Ｂ７－Ｈ３バリアント２のアミノ酸配列（配列番号１０）を示す。

[図15-1]図１５－１は、Ｂ７－Ｈ３　ＩｇＶ１のヌクレオチド配列（配列番号２０）を示す。

[図15-2]図１５－２は、Ｂ７－Ｈ３　ＩｇＶ１のアミノ酸配列（配列番号２１）を示す。

[図16-1]図１６－１は、Ｂ７－Ｈ３　ＩｇＣ１のヌクレオチド配列（配列番号２２）を示す。

[図16-2]図１６－２は、Ｂ７－Ｈ３　ＩｇＣ１のアミノ酸配列（配列番号２３）を示す。

[図17-1]図１７－１は、Ｂ７－Ｈ３　ＩｇＶ２のヌクレオチド配列（配列番号２４）を示す。

[図17-2]図１７－２は、Ｂ７－Ｈ３　ＩｇＶ２のアミノ酸配列（配列番号２５）を示す。

[図18-1]図１８－１は、Ｂ７－Ｈ３　ＩｇＣ２のヌクレオチド配列（配列番号２６）を示す。

[図18-2]図１８－２は、Ｂ７－Ｈ３　ＩｇＣ２のアミノ酸配列（配列番号２７）を示す。

[図19-1]図１９－１は、Ｂ７－Ｈ３　ＩｇＣ１－Ｖ２－Ｃ２のヌクレオチド配列（配列番号２８）を示す。

[図19-2]図１９－２は、Ｂ７－Ｈ３　ＩｇＣ１－Ｖ２－Ｃ２のアミノ酸配列（配列番号２９）を示す。

[図20-1]図２０－１は、Ｂ７－Ｈ３　ＩｇＶ２－Ｃ２のヌクレオチド配列（配列番号３０）を示す。

[図20-2]図２０－２は、Ｂ７－Ｈ３　ＩｇＶ２－Ｃ２のアミノ酸配列（配列番号３１）を示す。

[図21-1]図２１－１は、Ｍ３０抗体重鎖のヌクレオチド配列（配列番号５０）を示す。

[図21-2]図２１－２は、Ｍ３０抗体重鎖のアミノ酸配列（配列番号５１）を示す。

[図22-1]図２２－１は、Ｍ３０抗体軽鎖のヌクレオチド配列（配列番号５２）を示す。

[図22-2]図２２－２は、Ｍ３０抗体軽鎖のアミノ酸配列（配列番号５３）を示す。

[図23]図２３は、ヒトκ鎖分泌シグナル、ヒトκ鎖定常領域及びヒトｐｏｌｙＡ付加シグナルのヌクレオチド配列（配列番号５６）を示す。

[図24]図２４は、ヒトＩｇＧ１シグナル配列及び定常領域のヌクレオチド配列（配列番号５７）を示す。

[図25-1]図２５－１は、Ｍ３０抗体キメラタイプ軽鎖のヌクレオチド配列（配列番号５８）を示す。

[図25-2]図２５－２は、Ｍ３０抗体キメラタイプ軽鎖のアミノ酸配列（配列番号５９）を示す。

[図26-1]図２６－１は、Ｍ３０抗体キメラタイプ重鎖のヌクレオチド配列（配列番号６２）を示す。

[図26-2]図２６－２は、Ｍ３０抗体キメラタイプ重鎖のアミノ酸配列（配列番号６３）を示す。

[図27-1]図２７－１は、Ｍ３０－Ｌ１タイプ軽鎖のヌクレオチド配列（配列番号７０）を示す。

[図27-2]図２７－２は、Ｍ３０－Ｌ１タイプ軽鎖のアミノ酸配列（配列番号７１）を示す。

[図28-1]図２８－１は、Ｍ３０－Ｌ２タイプ軽鎖のヌクレオチド配列（配列番号７２）を示す。

[図28-2]図２８－２は、Ｍ３０－Ｌ２タイプ軽鎖のアミノ酸配列（配列番号７３）を示す。

[図29-1]図２９－１は、Ｍ３０－Ｌ３タイプ軽鎖のヌクレオチド配列（配列番号７４）を示す。

[図29-2]図２９－２は、Ｍ３０－Ｌ３タイプ軽鎖のアミノ酸配列（配列番号７５）を示す。

[図30-1]図３０－１は、Ｍ３０－Ｌ４タイプ軽鎖のヌクレオチド配列（配列番号７６）を示す。

[図30-2]図３０－２は、Ｍ３０－Ｌ４タイプ軽鎖のアミノ酸配列（配列番号７７）を示す。

[図31-1]図３１－１は、Ｍ３０－Ｌ５タイプ軽鎖のヌクレオチド配列（配列番号７８）を示す。

[図31-2]図３１－２は、Ｍ３０－Ｌ５タイプ軽鎖のアミノ酸配列（配列番号７９）を示す。

[図32-1]図３２－１は、Ｍ３０－Ｌ６タイプ軽鎖のヌクレオチド配列（配列番号８０）を示す。

[図32-2]図３２－２は、Ｍ３０－Ｌ６タイプ軽鎖のアミノ酸配列（配列番号８１）を示す。

[図33-1]図３３－１は、Ｍ３０－Ｌ７タイプ軽鎖のヌクレオチド配列（配列番号８２）を示す。

[図33-2]図３３－２は、Ｍ３０－Ｌ７タイプ軽鎖のアミノ酸配列（配列番号８３）を示す。

[図34-1]図３４－１は、Ｍ３０－Ｈ１タイプ重鎖のヌクレオチド配列（配列番号８４）を示す。

[図34-2]図３４－２は、Ｍ３０－Ｈ１タイプ重鎖のアミノ酸配列（配列番号８５）を示す。

[図35-1]図３５－１は、Ｍ３０－Ｈ２タイプ重鎖のヌクレオチド配列（配列番号８６）を示す。

[図35-2]図３５－２は、Ｍ３０－Ｈ２タイプ重鎖のアミノ酸配列（配列番号８７）を示す。

[図36-1]図３６－１は、Ｍ３０－Ｈ３タイプ重鎖のヌクレオチド配列（配列番号８８）を示す。

[図36-2]図３６－２は、Ｍ３０－Ｈ３タイプ重鎖のアミノ酸配列（配列番号８９）を示す。

[図37-1]図３７－１は、Ｍ３０－Ｈ４タイプ重鎖のヌクレオチド配列（配列番号９０）を示す。

[図37-2]図３７－２は、Ｍ３０－Ｈ４タイプ重鎖のアミノ酸配列（配列番号９１）を示す。

[図38]図３８は、ＭＤＡ－ＭＢ－２３１細胞を移植されたマウスに対するヒト化Ｍ３０（Ｍ３０－Ｈ１－Ｌ４）抗体の抗腫瘍効果を示す図である。図中のエラーバーは標準誤差（ｎ＝６）を示す。

発明を実施するための形態

[0024] 本明細書中において、「癌」と「腫瘍」は同じ意味に用いている。

[0025] 本明細書中において、「遺伝子」という語には、ＤＮＡのみならずそのｍＲＮＡ、ｃＤＮＡ及びそのｃＲＮＡも含まれる。

[0026] 本明細書中において、「ポリヌクレオチド」という語は核酸と同じ意味で用いており、ＤＮＡ、ＲＮＡ、プローブ、オリゴヌクレオチド、及びプライマーも含まれる。

[0027] 本明細中においては、「ポリペプチド」と「蛋白質」は区別せずに用いている。

[0028] 本明細書中において、「細胞」には、動物個体内の細胞、培養細胞も含んでいる。

本明細書中において、「Ｂ７－Ｈ３」は、Ｂ７－Ｈ３蛋白質と同じ意味で用いており、また、Ｂ７－Ｈ３バリアント１及び／又はＢ７－Ｈ３バリアント２を意味する。

[0029] 本明細書中における、「細胞傷害」とは、何らかの形で、細胞に病理的な変化をもたらすことをいい、直接的な外傷にとどまらず、ＤＮＡの切断や塩基の二量体の形成、染色体の切断、細胞分裂装置の損傷、各種酵素活性の低下などあらゆる細胞の構造や機能上の損傷をいう。

[0030] 本明細書中における「細胞傷害活性」とは上記細胞傷害を引き起こすことをいう。

本明細書中における「抗体依存性細胞媒介食作用活性」とは、「ａｎｔｉｂｏｄｙ ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ ｃｅｌｌ ｐｈａｇｏｃｙｔｏｓｉｓ（ＡＤＣＰ）活性」のことであり、単球やマクロファージ細胞が抗体を介して腫瘍細胞等の標的細胞を貪食する作用活性を意味する。「抗体依存的貪食作用活性」ともいう。

本明細書中における「抗体依存性細胞傷害活性」とは、「ａｎｔｉｂｏｄｙ ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ ｃｅｌｌｕｌａｒ ｃｙｔｏｔｏｘｉｃｉｔｙ（ＡＤＣＣ）活性」のことであり、ＮＫ細胞が抗体を介して腫瘍細胞等の標的細胞を傷害する作用活性を意味する。

本明細書中における「補体依存性細胞傷害作用活性」とは、「ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔ ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ ｃｙｔｏｔｏｘｉｃｉｔｙ（ＣＤＣ）活性」のことであり、補体が抗体を介して腫瘍細胞等の標的細胞を傷害する作用活性を意味する。

[0031] 本明細書中における「抗体の機能性断片」とは、抗原との結合活性を有する抗体の部分断片であって当該抗体の持つ機能の全て又は一部を保持してい

る断片を意味しており、Ｆａｂ、Ｆ（ａｂ’）２、ｓｃＦｖ等を含む。また、Ｆ（ａｂ’）２を還元条件下で処理した抗体の可変領域の一価の断片であるＦａｂ’も抗体の機能性断片に含まれる。但し、抗原との結合能を有している限りこれらの分子に限定されない。また、これらの機能性断片には、抗体蛋白質の全長分子を適当な酵素で処理したもののみならず、遺伝子工学的に改変された抗体遺伝子を用いて適当な宿主細胞において産生された蛋白質も含まれる。

[0032] 本発明における「Ｆａｂ’」とは、上記のようにＦ（ａｂ’）２を還元条件下で処理した抗体の可変領域の一価の断片であり。但し、遺伝子工学的に改変された抗体遺伝子を用いて産生されるＦａｂ’も本発明におけるＦａｂ’に含まれる。

[0033] 本明細書における、「エピトープ」とは、特定の抗Ｂ７－Ｈ３抗体の結合するＢ７－Ｈ３の部分ペプチド又は部分立体構造を意味する。前記のＢ７－Ｈ３の部分ペプチドであるエピトープは、免疫アッセイ法等当業者によく知られている方法、例えば以下の方法によって決定することができる。まず、抗原の様々な部分構造を作製する。部分構造の作製にあたっては、公知のオリゴペプチド合成技術を用いることが出来る。例えば、Ｂ７－Ｈ７のＣ末端あるいはＮ末端から適当な長さで順次短くした一連のポリペプチドを当業者に周知の遺伝子組み換え技術を用いて作製した後、それらに対する抗体の反応性を検討し、大まかな認識部位を決定した後に、さらに短いペプチドを合成してそれらのペプチドとの反応性を検討することによって、エピトープを決定することができる。また、特定の抗体の結合する抗原の部分立体構造であるエピトープは、Ｘ線構造解析によって前記の抗体と隣接する抗原のアミノ酸残基を特定することによって決定することができる。

本明細書における「同一のエピトープに結合する抗体」とは、共通のエピトープに結合する異なる抗体を意味している。第一の抗体の結合する部分ペプチド又は部分立体構造に第二の抗体が結合すれば、第一の抗体と第二の抗体が同一のエピトープに結合すると判定することができる。また、第一の抗体

の抗原に対する結合に対して第二の抗体が競合する（即ち、第二の抗体が第一の抗体と抗原の結合を妨げる）ことを確認することによって、具体的なエピトープの配列又は構造が決定されていなくても、第一の抗体と第二の抗体が同一のエピトープに結合すると判定することができる。さらに、第一の抗体と第二の抗体が同一のエピトープに結合し、かつ第一の抗体が抗腫瘍活性等の特殊な効果を有する場合、第二の抗体も同様の活性を有することが期待できる。従って、第一の抗Ｂ７－Ｈ３抗体の結合する部分ペプチドに第二の抗Ｂ７－Ｈ３抗体が結合すれば、第一の抗体と第二の抗体がＢ７－Ｈ３の同一のエピトープに結合すると判定することができる。また、第一の抗Ｂ７－Ｈ３抗体のＢ７－Ｈ３に対する結合に対して第二の抗Ｂ７－Ｈ３抗体が競合することを確認することによって、第一の抗体と第二の抗体がＢ７－Ｈ３の同一のエピトープに結合する抗体と判定することができる。

[0034] 本明細書における「ＣＤＲ」とは、相補性決定領域（ＣＤＲ：Ｃｏｍｐｌｅｍｅｔａｒｉｔｙ ｄｅｔｅｒｒｉｎｇ ｒｅｇｉｏｎ）を意味する。抗体分子の重鎖及び軽鎖にはそれぞれ３箇所のＣＤＲがあることが知られている。ＣＤＲは、超可変領域（ｈｙｐｅｒｖａｒｉａｂｌｅ ｄｏｍａｉｎ）とも呼ばれ、抗体の重鎖及び軽鎖の可変領域内にあって、一次構造の変異性が特に高い部位であり、重鎖及び軽鎖のポリペプチド鎖の一次構造上において、それぞれ３ヶ所に分離している。本明細書中においては、抗体のＣＤＲについて、重鎖のＣＤＲを重鎖アミノ酸配列のアミノ末端側からＣＤＲＨ１、ＣＤＲＨ２、ＣＤＲＨ３と表記し、軽鎖のＣＤＲを軽鎖アミノ酸配列のアミノ末端側からＣＤＲＬ１、ＣＤＲＬ２、ＣＤＲＬ３と表記する。これらの部位は立体構造の上で相互に近接し、結合する抗原に対する特異性を決定している。

[0035] 本発明において、「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする」とは、市販のハイブリダイゼーション溶液ＥｘｐｒｅｓｓＨｙｂ Ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ Ｓｏｌｕｔｉｏｎ（クロンテック社製）中、６８℃でハイブリダイズすること、又は、ＤＮＡを固定したフィルターを用いて０．７

－１．０ＭのＮａＣｌ存在下６８℃でハイブリダイゼーションを行った後、０．１－２倍濃度のＳＳＣ溶液（１倍濃度ＳＳＣとは１５０　ｍＭ　ＮａＣｌ、１５　ｍＭ　クエン酸ナトリウムからなる）を用い、６８℃で洗浄することにより同定することができる条件又はそれと同等の条件でハイブリダイズすることをいう。

１．Ｂ７－Ｈ３

Ｂ７－Ｈ３は、抗原提示細胞に補助刺激分子として発現するＢ７ファミリーのひとつであり、Ｔ細胞上のレセプターに作用して免疫作用を促進又は抑制すると考えられている。

Ｂ７－Ｈ３は１回膜貫通構造を有する蛋白質であるが、Ｂ７－Ｈ３のＮ末端側の細胞外領域には２つのバリアントが存在する。Ｂ７－Ｈ３バリアント１（４Ｉｇ－Ｂ７－Ｈ３）には各２ヶ所のＶまたはＣ様Ｉｇドメインが存在し、Ｂ７－Ｈ３バリアント２（２Ｉｇ－Ｂ７－Ｈ３）には各１ヶ所のＶまたはＣ様Ｉｇドメインが存在する。

本発明で用いるＢ７－Ｈ３は、ヒト、非ヒト哺乳動物（ラット、マウス等）のＢ７－Ｈ３発現細胞から直接精製して使用するか、あるいは当該細胞の細胞膜画分を調製して使用することができ、また、Ｂ７－Ｈ３をｉｎ　ｖｉｔｒｏにて合成する、あるいは遺伝子操作により宿主細胞に産生させることによって得ることができる。遺伝子操作では、具体的には、Ｂ７－Ｈ３　ｃＤＮＡを発現可能なベクターに組み込んだ後、転写と翻訳に必要な酵素、基質及びエネルギー物質を含む溶液中で合成する、あるいは他の原核生物、又は真核生物の宿主細胞を形質転換させることによってＢ７－Ｈ３を発現させることにより、該蛋白質を得ることが出来る。

ヒトＢ７－Ｈ３バリアント１遺伝子のオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）のヌクレオチド配列は配列表の配列番号５に記載されており、そのアミノ酸配列は配列表の配列番号６に記載されている。また、配列番号５及び６の配列は図１３に記載されている。

ヒトＢ７－Ｈ３バリアント２遺伝子のＯＲＦのヌクレオチド配列は配列表の

配列番号９に記載されており、そのアミノ酸配列は配列表の配列番号１０に記載されている。また、配列番号９及び１０の配列は図１４に記載されている。

また、上記各Ｂ７－Ｈ３のアミノ酸配列において、１又は数個のアミノ酸が置換、欠失及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、当該蛋白質と同等の生物活性を有する蛋白質もＢ７－Ｈ３に含まれる。

[0036] シグナル配列が除かれた成熟ヒトＢ７－Ｈ３バリアント１は、配列番号６に示されるアミノ酸配列の２７番目から５３４番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列に相当する。また、シグナル配列が除かれた成熟ヒトＢ７－Ｈ３バリアント２は、配列番号６に示されるアミノ酸配列の２７番目から３１６番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列に相当する。

Ｂ７－Ｈ３バリアント１において、各ドメインはＮ末端からＩｇＶ１－ＩｇＣ１－ＩｇＶ２－ＩｇＣ２の順に存在しており、配列表の配列番号６においてＩｇＶ１はアミノ酸番号２７乃至１３９に相当し、ＩｇＣ１はアミノ酸番号１４０乃至２４４に相当し、ＩｇＶ２はアミノ酸番号２４５乃至３５７に相当し、ＩｇＣ２はアミノ酸番号３５８乃至４５６に相当する。また、Ｂ７－Ｈ３バリアント２において、各ドメインはＮ末端からＩｇＶ１－ＩｇＣ２の順に存在しており、配列表の配列番号１０においてＩｇＶ１はアミノ酸番号２７乃至１４０に相当し、ＩｇＣ２はアミノ酸番号１４１乃至２４３に相当する。

[0037] Ｂ７－Ｈ３のｃＤＮＡは例えば、Ｂ７－Ｈ３のｃＤＮＡを発現しているｃＤＮＡライブラリーを鋳型として、Ｂ７－Ｈ３のｃＤＮＡを特異的に増幅するプライマーを用いてポリメラーゼ連鎖反応（以下「ＰＣＲ」という）（Ｓａｉｋｉ，Ｒ．　Ｋ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ，（１９８８）２３９，４８７－４９）を行なう、いわゆるＰＣＲ法により取得することができる。なお、配列表の配列番号５又は９に示されるヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ、Ｂ７－Ｈ３と同等の生物活性を有する蛋白質をコ

ードするポリヌクレオチドもＢ７－Ｈ３のｃＤＮＡに含まれる。さらに、ヒト若しくはマウスＢ７－Ｈ３遺伝子座から転写されるスプライシングバリアント又はこれにストリンジェントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、かつ、Ｂ７－Ｈ３と同等の生物活性を有する蛋白質をコードするポリヌクレオチドもＢ７－Ｈ３のｃＤＮＡに含まれる。

[0038] また、配列表の配列番号６又は１０に示されるアミノ酸配列、又はこれらの配列からシグナル配列が除かれたアミノ酸配列において、１若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、又は付加されたアミノ酸配列からなり、Ｂ７－Ｈ３と同等の生物活性を有する蛋白質もＢ７－Ｈ３に含まれる。さらに、ヒト若しくはマウスＢ７－Ｈ３遺伝子座から転写されるスプライシングバリアントにコードされるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において、１若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、Ｂ７－Ｈ３と同等の生物活性を有する蛋白質もＢ７－Ｈ３に含まれる。

２．抗Ｂ７－Ｈ３抗体の製造

本発明のＢ７－Ｈ３に対する抗体は、常法を用いて、Ｂ７－Ｈ３又はＢ７－Ｈ３のアミノ酸配列から選択される任意のポリペプチドを動物に免疫し、生体内に産生される抗体を採取、精製することによって得ることができる。抗原となるＢ７－Ｈ３の生物種はヒトに限定されず、マウス、ラット等のヒト以外の動物に由来するＢ７－Ｈ３を動物に免疫することもできる。この場合には、取得された異種Ｂ７－Ｈ３に結合する抗体とヒトＢ７－Ｈ３との交差性を試験することによって、ヒトの疾患に適用可能な抗体を選別できる。

[0039] また、公知の方法（例えば、Ｋｏｈｌｅｒ ａｎｄ Ｍｉｌｓｔｅｉｎ，Ｎａｔｕｒｅ（１９７５）２５６，ｐ．４９５－４９７、Ｋｅｎｎｅｔ，Ｒ．ｅｄ．，Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，ｐ．３６５－３６７，Ｐｌｅｎｕｍ Ｐｒｅｓｓ，Ｎ．Ｙ．（１９８０））に従って、Ｂ７－Ｈ３に対する抗体を産生する抗体産生細胞とミエローマ細胞とを融合させることによりハイブリドーマを樹立し、モノクローナル抗体を得ることもできる。

[0040] なお、抗原となるＢ７－Ｈ３はＢ７－Ｈ３遺伝子を遺伝子操作により宿主細胞に産生させることによって得ることができる。

[0041] 具体的には、Ｂ７－Ｈ３遺伝子を発現可能なベクターを作製し、これを宿主細胞に導入して該遺伝子を発現させ、発現したＢ７－Ｈ３を精製すればよい。以下、具体的にＢ７－Ｈ３に対する抗体の取得方法を説明する。

（１） 抗原の調製

抗Ｂ７－Ｈ３抗体を作製するための抗原としては、Ｂ７－Ｈ３又はその少なくとも６個の連続した部分アミノ酸配列からなるポリペプチド、あるいはこれらに任意のアミノ酸配列や担体が付加された誘導体を挙げることができる。

[0042] Ｂ７－Ｈ３は、ヒトの腫瘍組織あるいは腫瘍細胞から直接精製して使用することができ、また、Ｂ７－Ｈ３をｉｎ ｖｉｔｒｏにて合成する、あるいは遺伝子操作により宿主細胞に産生させることによって得ることができる。

[0043] 遺伝子操作では、具体的には、Ｂ７－Ｈ３のｃＤＮＡを発現可能なベクターに組み込んだ後、転写と翻訳に必要な酵素、基質及びエネルギー物質を含む溶液中で合成する、あるいは他の原核生物、又は真核生物の宿主細胞を形質転換させることによってＢ７－Ｈ３を発現させることにより、抗原を得ることができる。

[0044] また、膜蛋白質であるＢ７－Ｈ３の細胞外領域と抗体の定常領域とを連結した融合蛋白質を適切な宿主・ベクター系において発現させることによって、分泌蛋白質として抗原を得ることも可能である。

[0045] Ｂ７－Ｈ３のｃＤＮＡは例えば、Ｂ７－Ｈ３のｃＤＮＡを発現しているｃＤＮＡライブラリーを鋳型として、Ｂ７－Ｈ３ ｃＤＮＡを特異的に増幅するプライマーを用いてポリメラーゼ連鎖反応（以下「ＰＣＲ」という）（Ｓａｉｋｉ，Ｒ． Ｋ．，ｅｔ ａｌ．Ｓｃｉｅｎｃｅ（１９８８）２３９，ｐ．４８７－４８９ 参照）を行なう、いわゆるＰＣＲ法により取得することができる。

[0046] ポリペプチドのイン・ビトロ（ｉｎ ｖｉｔｒｏ）合成としては、例えば

ロシュ・ダイアグノスティックス社製のラピッドトランスレーションシステム（ＲＴＳ）を挙げることができるが、これに限定されない。

[0047] 原核細胞の宿主としては、例えば、大腸菌（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ）や枯草菌（Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｓｕｂｔｉｌｉｓ）などを挙げることができる。目的の遺伝子をこれらの宿主細胞内で形質転換させるには、宿主と適合し得る種由来のレプリコンすなわち複製起点と、調節配列を含んでいるプラスミドベクターで宿主細胞を形質転換させる。また、ベクターとしては、形質転換細胞に表現形質（表現型）の選択性を付与することができる配列を有するものが好ましい。

[0048] 真核細胞の宿主細胞には、脊椎動物、昆虫、酵母などの細胞が含まれ、脊椎動物細胞としては、例えば、サルの細胞であるＣＯＳ細胞（Ｇｌｕｚｍａｎ，Ｙ．Ｃｅｌｌ（１９８１）２３，ｐ．１７５－１８２、ＡＴＣＣ ＣＲＬ－１６５０）、マウス線維芽細胞ＮＩＨ３Ｔ３（ＡＴＣＣ Ｎｏ．ＣＲＬ－１６５８）やチャイニーズ・ハムスター卵巣細胞（ＣＨＯ細胞、ＡＴＣＣ ＣＣＬ－６１）のジヒドロ葉酸還元酵素欠損株（Ｕｒｌａｕｂ，Ｇ． ａｎｄ Ｃｈａｓｉｎ，Ｌ．Ａ．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ（１９８０）７７，ｐ．４１２６－４２２０）等がよく用いられているが、これらに限定されない。

[0049] 上記のようにして得られる形質転換体は、常法に従い培養することができ、該培養により細胞内、又は細胞外に目的のポリペプチドが産生される。

[0050] 該培養に用いられる培地としては、採用した宿主細胞に応じて慣用される各種のものを適宜選択でき、大腸菌であれば、例えば、ＬＢ培地に必要に応じて、アンピシリン等の抗生物質やＩＰＭＧを添加して用いることができる。

[0051] 上記培養により、形質転換体の細胞内又は細胞外に産生される組換え蛋白質は、該蛋白質の物理的性質や化学的性質などを利用した各種の公知の分離操作法により分離・精製することができる。

[0052] 該方法としては、具体的には例えば、通常の蛋白質沈殿剤による処理、限

外濾過、分子ふるいクロマトグラフィー（ゲル濾過）、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーなどの各種液体クロマトグラフィー、透析法、これらの組合せなどを例示できる。

[0053] また、発現させる組換え蛋白質に６残基からなるヒスチジンタグを繋げることにより、ニッケルアフィニティーカラムで効率的に精製することができる。あるいは、発現させる組換え蛋白質にＩｇＧのＦｃ領域を繋げることにより、プロテインＡカラムで効率的に精製することができる。

[0054] 上記方法を組合せることにより容易に高収率、高純度で目的とするポリペプチドを大量に製造できる。

（２） 抗Ｂ７－Ｈ３モノクローナル抗体の製造

Ｂ７－Ｈ３と特異的に結合する抗体の例として、Ｂ７－Ｈ３と特異的に結合するモノクローナル抗体を挙げることができるが、その取得方法は、以下に記載する通りである。

[0055] モノクローナル抗体の製造にあたっては、一般に下記のような作業工程が必要である。

すなわち、

（ａ）抗原として使用する生体高分子の精製、

（ｂ）抗原を動物に注射することにより免疫した後、血液を採取しその抗体価を検定して脾臓摘出の時期を決定してから、抗体産生細胞を調製する工程、

（ｃ）骨髄腫細胞（以下「ミエローマ」という）の調製、

（ｄ）抗体産生細胞とミエローマとの細胞融合、

（ｅ）目的とする抗体を産生するハイブリドーマ群の選別、

（ｆ）単一細胞クローンへの分割（クローニング）、

（ｇ）場合によっては、モノクローナル抗体を大量に製造するためのハイブリドーマの培養、又はハイブリドーマを移植した動物の飼育、

（ｈ）このようにして製造されたモノクローナル抗体の生理活性、及びその

結合特異性の検討、あるいは標識試薬としての特性の検定、等である。

[0056] 以下、モノクローナル抗体の作製法を上記工程に沿って詳述するが、該抗体の作製法はこれに制限されず、例えば脾細胞以外の抗体産生細胞及びミエローマを使用することもできる。

[0057] （ａ）抗原の精製

抗原としては、前記したような方法で調製したＢ７－Ｈ３又はその一部を使用することができる。

[0058] また、Ｂ７－Ｈ３発現組換え体細胞より調製した膜画分、又はＢ７－Ｈ３発現組換え体細胞自身、さらに、当業者に周知の方法を用いて、化学合成した本発明の蛋白質の部分ペプチドを抗原として使用することもできる。

[0059] （ｂ）抗体産生細胞の調製

工程（ａ）で得られた抗原と、フロインドの完全又は不完全アジュバント、又はカリミョウバンのような助剤とを混合し、免疫原として実験動物に免疫する。実験動物は公知のハイブリドーマ作製法に用いられる動物を支障なく使用することができる。具体的には、たとえばマウス、ラット、ヤギ、ヒツジ、ウシ、ウマ等を使用することができる。ただし、摘出した抗体産生細胞と融合させるミエローマ細胞の入手容易性等の観点から、マウス又はラットを被免疫動物とするのが好ましい。

[0060] また、実際に使用するマウス及びラットの系統には特に制限はなく、マウスの場合には、たとえば各系統　Ａ、ＡＫＲ、ＢＡＬＢ／ｃ、ＢＤＰ、ＢＡ、ＣＥ、Ｃ３Ｈ、５７ＢＬ、Ｃ５７ＢＬ、Ｃ５７Ｌ、ＤＢＡ、ＦＬ、ＨＴＨ、ＨＴ１、ＬＰ、ＮＺＢ、ＮＺＷ、ＲＦ、Ｒ　ＩＩＩ、ＳＪＬ、ＳＷＲ、ＷＢ、１２９等が、またラットの場合には、たとえば、Ｗｉｓｔａｒ、Ｌｏｗ、Ｌｅｗｉｓ、Ｓｐｒａｇｕｅ、Ｄａｗｌｅｙ、ＡＣＩ、ＢＮ、Ｆｉｓｃｈｅｒ等を用いることができる。

これらのマウス及びラットは例えば日本クレア、日本チャールスリバー、等実験動物飼育販売業者より入手することができる。

[0061] このうち、後述のミエローマ細胞との融合適合性を勘案すれば、マウスで

はＢＡＬＢ／ｃ系統が、ラットではＷｉｓｔａｒ及びＬｏｗ系統が被免疫動物として特に好ましい。

[0062] また、抗原のヒトとマウスでの相同性を考慮し、自己抗体を除去する生体機構を低下させたマウス、すなわち自己免疫疾患マウスを用いることも好ましい。

[0063] なお、これらマウス又はラットの免疫時の週齢は、好ましくは５～１２週齢、さらに好ましくは６～８週齢である。

[0064] Ｂ７－Ｈ３又はこの組換え体によって動物を免疫するには、例えば、Ｗｅｉｒ，Ｄ．Ｍ．，Ｈａｎｄｂｏｏｋ ｏｆ Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ Ｖｏｌ．Ｉ．ＩＩ．ＩＩＩ．，Ｂｌａｃｋｗｅｌｌ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎｓ，Ｏｘｆｏｒｄ（１９８７）、Ｋａｂａｔ，Ｅ．Ａ．ａｎｄ Ｍａｙｅｒ，Ｍ．Ｍ．，Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ Ｉｍｍｕｎｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，Ｃｈａｒｌｅｓ Ｃ Ｔｈｏｍａｓ Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒ Ｓｐｒｉｎｇｆｉｅｌｄ，Ｉｌｌｉｎｏｉｓ（１９６４）等に詳しく記載されている公知の方法を用いることができる。

これらの免疫法のうち、本発明において好適な方法を具体的に示せば、たとえば以下のとおりである。

[0065] すなわち、まず、抗原である膜蛋白質画分、もしくは抗原を発現させた細胞を動物の皮内又は腹腔内に投与する。

[0066] ただし、免疫効率を高めるためには両者の併用が好ましく、前半は皮内投与を行い、後半又は最終回のみ腹腔内投与を行うと、特に免疫効率を高めることができる。

[0067] 抗原の投与スケジュールは、被免疫動物の種類、個体差等により異なるが、一般には、抗原投与回数３～６回、投与間隔２～６週間が好ましく、投与回数３～４回、投与間隔２～４週間がさらに好ましい。

[0068] また、抗原の投与量は、動物の種類、個体差等により異なるが、一般には０．０５～５ｍｇ、好ましくは０．１～０．５ｍｇ程度とする。

[0069] 追加免疫は、以上の通りの抗原投与の１～６週間後、好ましくは２～４週間後、さらに好ましくは２～３週間後に行う。

[0070] なお、追加免疫を行う際の抗原投与量は、動物の種類、大きさ等により異なるが、一般に、例えばマウスの場合には０．０５～５ｍｇ、好ましくは０．１～０．５ｍｇ、さらに好ましくは０．１～０．２ｍｇ程度とする。

[0071] 上記追加免疫から１～１０日後、好ましくは２～５日後、さらに好ましくは２～３日後に被免疫動物から抗体産生細胞を含む脾臓細胞又はリンパ球を無菌的に取り出す。その際に抗体価を測定し、抗体価が十分高くなった動物を抗体産生細胞の供給源として用いれば、以後の操作の効率を高めることができる。

[0072] ここで用いられる抗体価の測定法としては、例えば、ＲＩＡ法又はＥＬＩＳＡ法を挙げることができるがこれらの方法に制限されない。

[0073] 本発明における抗体価の測定は、例えばＥＬＩＳＡ法によれば、以下に記載するような手順により行うことができる。

[0074] まず、精製又は部分精製した抗原をＥＬＩＳＡ用９６穴プレート等の固相表面に吸着させ、さらに抗原が吸着していない固相表面を抗原と無関係な蛋白質、例えばウシ血清アルブミン（以下「ＢＳＡ」という）により覆い、該表面を洗浄後、第一抗体として段階希釈した試料（例えばマウス血清）に接触させ、上記抗原に試料中の抗体を結合させる。

[0075] さらに第二抗体として酵素標識されたマウス抗体に対する抗体を加えてマウス抗体に結合させ、洗浄後該酵素の基質を加え、基質分解に基づく発色による吸光度の変化等を測定することにより、抗体価を算出する。

[0076] 被免疫動物の脾臓細胞又はリンパ球からの抗体産生細胞の分離は、公知の方法（例えば、Ｋｏｈｌｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ（１９７５）２５６，ｐ．４９５，；Ｋｏｈｌｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｅｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．（１９７７）６，ｐ．５１１，；Ｍｉｌｓｔｅｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ（１９７７），２６６，ｐ．５５０，；Ｗａｌｓｈ，Ｎａｔｕｒｅ，（１９７７）２６６，ｐ．４９５）に従って行うことができる。例

えば、脾臓細胞の場合には、脾臓を細切して細胞をステンレスメッシュで濾過した後、イーグル最小必須培地（ＭＥＭ）に浮遊させて抗体産生細胞を分離する一般的方法を採用することができる。

[0077] （ｃ）骨髄腫細胞（以下、「ミエローマ」という）の調製

細胞融合に用いるミエローマ細胞には特段の制限はなく、公知の細胞株から適宜選択して用いることができる。ただし、融合細胞からハイブリドーマを選択する際の利便性を考慮して、その選択手続が確立しているＨＧＰＲＴ（Ｈｙｐｏｘａｎｔｈｉｎｅ－ｇｕａｎｉｎｅ　ｐｈｏｓｐｈｏｒｉｂｏｓｙｌ　ｔｒａｎｓｆｅｒａｓｅ）欠損株を用いるのが好ましい。

[0078] すなわち、マウス由来のＸ６３－Ａｇ８（Ｘ６３）、ＮＳ１－ＡＮＳ／１（ＮＳ１）、Ｐ３Ｘ６３－Ａｇ８．Ｕ１（Ｐ３Ｕ１）、Ｘ６３－Ａｇ８．６５３（Ｘ６３．６５３）、ＳＰ２／０－Ａｇ１４（ＳＰ２／０）、ＭＰＣ１１－４５．６ＴＧ１．７（４５．６ＴＧ）、ＦＯ、Ｓ１４９／５ＸＸＯ、ＢＵ．１等、ラット由来の２１０．ＲＳＹ３．Ａｇ．１．２．３（Ｙ３）等、ヒト由来のＵ２６６ＡＲ（ＳＫＯ－００７）、ＧＭ１５００・ＧＴＧ－Ａ１２（ＧＭ１５００）、ＵＣ７２９－６、ＬＩＣＲ－ＬＯＷ－ＨＭｙ２（ＨＭｙ２）、８２２６ＡＲ／ＮＩＰ４－１（ＮＰ４１）等である。これらのＨＧＰＲＴ欠損株は例えば、Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ　（ＡＴＣＣ）等から入手することができる。

[0079] これらの細胞株は、適当な培地、例えば８－アザグアニン培地［ＲＰＭＩ－１６４０培地にグルタミン、２－メルカプトエタノール、ゲンタマイシン、及びウシ胎児血清（以下「ＦＣＳ」という）を加えた培地に８－アザグアニンを加えた培地］、イスコフ改変ダルベッコ培地（Ｉｓｃｏｖｅ’ｓ　Ｍｏｄｉｆｉｅｄ　Ｄｕｌｂｅｃｃｏ’ｓ　Ｍｅｄｉｕｍ；以下「ＩＭＤＭ」という）、又はダルベッコ改変イーグル培地（Ｄｕｌｂｅｃｃｏ’ｓ　Ｍｏｄｉｆｉｅｄ　Ｅａｇｌｅ　Ｍｅｄｉｕｍ；以下「ＤＭＥＭ」という）で継代培養するが、細胞融合の３乃至４日前に正常培地［例えば、１０％　ＦＣＳを含むＡＳＦ１０４培地（味の素（株）社製）］で継代培養し、融合当日

に２×１０^{7}以上の細胞数を確保しておく。

[0080] （ｄ）細胞融合

抗体産生細胞とミエローマ細胞との融合は、公知の方法（Ｗｅｉｒ，Ｄ．Ｍ．，Ｈａｎｄｂｏｏｋｏｆ Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ Ｖｏｌ．Ｉ．ＩＩ．ＩＩＩ．，Ｂｌａｃｋｗｅｌｌ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎｓ，Ｏｘｆｏｒｄ（１９８７）、Ｋａｂａｔ，Ｅ．Ａ．ａｎｄ Ｍａｙｅｒ，Ｍ．Ｍ．，Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ Ｉｍｍｕｎｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，Ｃｈａｒｌｅｓ Ｃ Ｔｈｏｍａｓ Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒ Ｓｐｒｉｎｇｆｉｅｌｄ，Ｉｌｌｉｎｏｉｓ（１９６４）等）に従い、細胞の生存率を極度に低下させない程度の条件下で適宜実施することができる。

[0081] そのような方法は、例えば、ポリエチレングリコール等の高濃度ポリマー溶液中で抗体産生細胞とミエローマ細胞とを混合する化学的方法、電気的刺激を利用する物理的方法等を用いることができる。このうち、上記化学的方法の具体例を示せば以下のとおりである。

すなわち、高濃度ポリマー溶液としてポリエチレングリコールを用いる場合には、分子量１５００～６０００、好ましくは２０００～４０００のポリエチレングリコール溶液中で、３０～４０℃、好ましくは３５～３８℃の温度で抗体産生細胞とミエローマ細胞とを１～１０分間、好ましくは５～８分間混合する。

[0082] （ｅ）ハイブリドーマ群の選択

上記細胞融合により得られるハイブリドーマの選択方法は特に制限はないが、通常ＨＡＴ（ヒポキサンチン・アミノプテリン・チミジン）選択法（Ｋｏｈｌｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ（１９７５）２５６，ｐ．４９５；Ｍｉｌｓｔｅｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ（１９７７）２６６，ｐ．５５０）が用いられる。

[0083] この方法は、アミノプテリンで生存し得ないＨＧＰＲＴ欠損株のミエローマ細胞を用いてハイブリドーマを得る場合に有効である。

[0084] すなわち、未融合細胞及びハイブリドーマをＨＡＴ培地で培養することにより、アミノプテリンに対する耐性を持ち合わせたハイブリドーマのみを選択的に残存させ、かつ増殖させることができる。

[0085] （ｆ）単一細胞クローンへの分割（クローニング）

ハイブリドーマのクローニング法としては、例えばメチルセルロース法、軟アガロース法、限界希釈法等の公知の方法を用いることができる（例えばＢａｒｂａｒａ，Ｂ．Ｍ．ａｎｄ Ｓｔａｎｌｅｙ，Ｍ．Ｓ．：Ｓｅｌｅｃｔｅｄ Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｃｅｌｌｕｌａｒ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ ａｎｄ Ｃｏｍｐａｎｙ，Ｓａｎ Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ（１９８０）参照）。これらの方法のうち、特にメチルセルロース法などの三次元培養法が好適である。例えば、細胞融合により形成されたハイブリドーマ群をＣｌｏｎａＣｅｌｌ－ＨＹ Ｓｅｌｅｃｔｉｏｎ Ｍｅｄｉｕｍ Ｄ（ＳｔｅｍＣｅｌｌ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製 ＃０３８０４）などのメチルセルロース培地に懸濁して培養し、形成されたハイブリドーマコロニーを回収することでモノクローンハイブリドーマの取得が可能である。回収された各ハイブリドーマコロニーを培養し、得られたハイブリドーマ培養上清中に安定して抗体価の認められたものをＢ７－Ｈ３モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ株として選択する。

[0086] このようにして樹立されたハイブリドーマ株の例としては、Ｂ７－Ｈ３ハイブリドーマＭ３０を挙げることができる。なお、本明細書中においては、Ｂ７－Ｈ３ハイブリドーマＭ３０が産生する抗体を、「Ｍ３０抗体」又は単に「Ｍ３０」と記載する。

Ｍ３０抗体の重鎖は、配列表の配列番号５１に示されるアミノ酸配列を有する。また、Ｍ３０抗体の軽鎖は、配列表の配列番号５３に示されるアミノ酸配列を有する。なお、配列表の配列番号５１示される重鎖アミノ酸配列中で、１乃至１９番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列はシグナル配列であり、２０乃至１４１番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は可変領域であり、１４２乃至４７１番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は定常領

域である。また、配列表の配列番号５３に示される軽鎖アミノ酸配列中で、１乃至２２番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列はシグナル配列であり、２３乃至１３０番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は可変領域であり、１３１乃至２３５番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は定常領域である。

[0087] 配列表の配列番号５１に示される重鎖アミノ酸配列は、配列表の配列番号５０に示されるヌクレオチド配列によってコードされている。配列表の配列番号５０に示されるヌクレオチド配列の１乃至５７番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列は抗体の重鎖シグナル配列をコードしており、５８乃至４２３番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列は抗体の重鎖可変領域をコードしており、そして４２４乃至１４１３番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列は抗体の重鎖定常領域をコードしている。

[0088] 配列表の配列番号５３に示される軽鎖アミノ酸配列は、配列表の配列番号５２示されるヌクレオチド配列によってコードされている。配列表の配列番号５２に示されるヌクレオチド配列の１乃至６６番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列は抗体の軽鎖シグナル配列をコードしており、６７乃至３９０番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列は抗体の軽鎖可変領域をコードしており、そして３９１乃至７０５番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列は抗体の軽鎖定常領域をコードしている。

[0089] （ｇ）ハイブリドーマの培養によるモノクローナル抗体の調製

このようにして選択されたハイブリドーマは、これを培養することにより、モノクローナル抗体を効率よく得ることができるが、培養に先立ち、目的とするモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマをスクリーニングすることが望ましい。

[0090] このスクリーニングにはそれ自体既知の方法が採用できる。

[0091] 本発明における抗体価の測定は、例えば上記（ｂ）の項目で説明したＥＬＩＳＡ法により行うことができる。

[0092] 以上の方法によって得たハイブリドーマは、液体窒素中又は－８０℃以下

の冷凍庫中に凍結状態で保存することができる。

[0093] クローニングを完了したハイブリドーマは、培地をＨＴ培地から正常培地に換えて培養される。

[0094] 大量培養は、大型培養瓶を用いた回転培養、あるいはスピナー培養で行われる。この大量培養における上清から、ゲル濾過等、当業者に周知の方法を用いて精製することにより、本発明の蛋白質に特異的に結合するモノクローナル抗体を得ることができる。

[0095] また、同系統のマウス（例えば、上記のＢＡＬＢ／ｃ）、あるいはＮｕ／Ｎｕマウスの腹腔内にハイブリドーマを注射し、該ハイブリドーマを増殖させることにより、本発明のモノクローナル抗体を大量に含む腹水を得ることができる。

[0096] 腹腔内に投与する場合には、事前（３～７日前）に２，６，１０，１４－テトラメチルペンタデカン（２，６，１０，１４－ｔｅｔｒａｍｅｔｈｙｌｐｅｎｔａｄｅｃａｎｅ）（プリスタン）等の鉱物油を投与すると、より多量の腹水が得られる。

[0097] たとえば、ハイブリドーマと同系統のマウスの腹腔内に予め免疫抑制剤を注射し、Ｔ細胞を不活性化した後、２０日後に10^6～10^7個のハイブリドーマ・クローン細胞を、血清を含まない培地中に浮遊（０．５ｍｌ）させて腹腔内に投与し、通常腹部が膨満し、腹水がたまったところでマウスより腹水を採取する。この方法により、培養液中に比べて約１００倍以上の濃度のモノクローナル抗体が得られる。

[0098] 上記方法により得たモノクローナル抗体は、例えばＷｅｉｒ，Ｄ．Ｍ．：Ｈａｎｄｂｏｏｋ ｏｆ Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌ．Ｉ，ＩＩ，ＩＩＩ，Ｂｌａｃｋｗｅｌｌ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎｓ，Ｏｘｆｏｒｄ（１９７８）に記載されている方法で精製することができる。

[0099] かくして得られるモノクローナル抗体は、Ｂ７－Ｈ３に対して高い抗原特異性を有する。

[0100] （ｈ）モノクローナル抗体の検定

かくして得られたモノクローナル抗体のアイソタイプ及びサブクラスの決定は以下のように行うことができる。

[0101] まず、同定法としてはオクテルロニー（Ｏｕｃｈｔｅｒｌｏｎｙ）法、ＥＬＩＳＡ法、又はＲＩＡ法を挙げることができる。

[0102] オクテルロニー法は簡便ではあるが、モノクローナル抗体の濃度が低い場合には濃縮操作が必要である。

[0103] 一方、ＥＬＩＳＡ法又はＲＩＡ法を用いた場合は、培養上清をそのまま抗原吸着固相と反応させ、さらに第二次抗体として各種イムノグロブリンアイソタイプ、サブクラスに対応する抗体を用いることにより、モノクローナル抗体のアイソタイプ、サブクラスを同定することが可能である。

[0104] また、さらに簡便な方法として、市販の同定用のキット（例えば、マウスタイパーキット；バイオラッド社製）等を利用することもできる。

[0105] さらに、蛋白質の定量は、フォーリンロウリー法、及び２８０ｎｍにおける吸光度［１．４（ＯＤ２８０）＝イムノグロブリン１ｍｇ／ｍｌ］より算出する方法により行うことができる。

[0106] さらに、（２）の（ａ）乃至（ｈ）の工程を再度実施して別途に独立してモノクローナル抗体を取得した場合においても、Ｍ３０抗体と同等の細胞傷害活性を有する抗体を取得することが可能である。このような抗体の一例として、Ｍ３０抗体と同一のエピトープに結合する抗体を挙げることができる。Ｍ３０はＢ７－Ｈ３の細胞外領域中のドメインであるＩｇＣ１ドメイン又はＩｇＣ２ドメインにおけるエピトープを認識して、ＩｇＣ１ドメイン若しくはＩｇＣ２ドメイン又は両者に結合するので、特に当該エピトープとしてはＢ７－Ｈ３のＩｇＣ１ドメイン又はＩｇＣ２ドメインに存在するエピトープを挙げることができる。新たに作製されたモノクローナル抗体が、Ｍ３０抗体の結合する部分ペプチド又は部分立体構造に結合すれば、該モノクローナル抗体がＭ３０抗体と同一のエピトープに結合すると判定することができる。また、Ｍ３０抗体のＢ７－Ｈ３に対する結合に対して該モノクローナル

抗体が競合する（すなわち、該モノクローナル抗体が、Ｍ３０抗体とＢ７－Ｈ３の結合を妨げる）ことを確認することによって、具体的なエピトープの配列又は構造が決定されていなくても、該モノクローナル抗体がＭ３０抗体と同一のエピトープに結合すると判定することができる。エピトープが同一であることが確認された場合、該モノクローナル抗体がＭ３０抗体と同等の細胞傷害活性を有していることが強く期待される。

（３）その他の抗体

本発明の抗体には、上記Ｂ７－Ｈ３に対するモノクローナル抗体に加え、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺伝子組換え型抗体、例えば、キメラ（Ｃｈｉｍｅｒｉｃ）抗体、ヒト化（Ｈｕｍａｎｉｚｅｄ）抗体、ヒト抗体なども含まれる。これらの抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。

[0107] キメラ抗体としては、抗体の可変領域と定常領域が互いに異種である抗体、例えばマウス又はラット由来抗体の可変領域をヒト由来の定常領域に接合したキメラ抗体を挙げることができる（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．，８１，６８５１－６８５５，（１９８４）参照）。マウス抗ヒトＢ７－Ｈ３抗体Ｍ３０由来のキメラ抗体は、配列番号５１の２０乃至１４１番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖及び配列番号５３の２３乃至１３０番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖からなる抗体であり、任意のヒト由来の定常領域を有していて良い。このようなキメラ抗体の一例として、配列表の配列番号６３の１乃至４７１番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を有する重鎖、及び配列番号５９の１乃至２３３番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を有する軽鎖からなる抗体を挙げることができる。なお、配列表の配列番号６３に示される重鎖配列中で、１乃至１９番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列はシグナル配列であり、２０乃至１４１番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は可変領域であり、１４２乃至４７１番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は定常領域である。また、配列表

の配列番号５９に示される軽鎖配列中で、１乃至２０番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列はシグナル配列であり、２１乃至１２８番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は可変領域であり、１２９乃至２３３番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は定常領域である。

[0108] 配列表の配列番号６３に示される重鎖アミノ酸配列は、配列表の配列番号６２に示されるヌクレオチド配列によってコードされている。配列表の配列番号６２に示されるヌクレオチド配列の１乃至５７番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列は抗体の重鎖シグナル配列をコードしており、５８乃至４２３番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列は抗体の重鎖可変領域をコードしており、そして４２４乃至１４１３番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列は抗体の重鎖定常領域をコードしている。

[0109] 配列表の配列番号５９に示される軽鎖アミノ酸配列は、配列表の配列番号５８に示されるヌクレオチド配列によってコードされている。配列表の配列番号５８に示されるヌクレオチド配列の１乃至６０番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列は抗体の軽鎖シグナル配列をコードしており、６１乃至３８４番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列は抗体の軽鎖可変領域をコードしており、そして３８５乃至６９９番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列は抗体の軽鎖定常領域をコードしている。

[0110] ヒト化抗体としては、相補性決定領域（ＣＤＲ；ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔａｒｉｔｙ ｄｅｔｅｒｍｉｎｉｎｇ ｒｅｇｉｏｎ）のみをヒト由来の抗体に組み込んだ抗体（Ｎａｔｕｒｅ（１９８６）３２１，ｐ．５２２－５２５参照）、ＣＤＲ移植法によって、ＣＤＲの配列に加え一部のフレームワークのアミノ酸残基もヒト抗体に移植した抗体（国際公開パンフレットＷＯ９０／０７８６１）を挙げることができる。

[0111] 但し、Ｍ３０抗体由来のヒト化抗体としては、Ｍ３０抗体の６種全てのＣＤＲ配列を保持し、抗腫瘍活性を有する限り、特定のヒト化抗体に限定されない。なお、Ｍ３０抗体の重鎖可変領域は、配列表の配列番号９２に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１（ＮＹＶＭＨ）、配列番号９３に示され

るアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２（ＹＩＮＰＹＮＤＤＶＫＹＮＥＫＦＫＧ）、及び配列番号９４に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３（ＷＧＹＹＧＳＰＬＹＹＦＤＹ）を保有している。また、Ｍ３０抗体の軽鎖可変領域は、配列表の配列番号９５に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１（ＲＡＳＳＲＬＩＹＭＨ）、配列番号９６に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２（ＡＴＳＮＬＡＳ）、及び配列番号９７に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ３（ＱＱＷＮＳＮＰＰＴ）を保有している。

[0112] マウス抗体Ｍ３０のヒト化抗体の実例としては、（１）配列表の配列番号８５、８７、８９又は９１の２０乃至１４１番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列、（２）上記（１）のアミノ酸配列に対して少なくとも９５％以上の相同性を有するアミノ酸配列、及び（３）上記（１）のアミノ酸配列において１又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列のいずれか一つからなる重鎖可変領域を含む重鎖、並びに（４）配列番号７１、７３、７５、７７、７９、８１又は８３の２１乃至１２８番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列、（５）上記（４）のアミノ酸配列に対して少なくとも９５％以上の相同性を有するアミノ酸配列、及び（６）上記（４）のアミノ酸配列において１又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列のいずれか一つからなる軽鎖可変領域を含む軽鎖の任意の組合せを挙げることができる。

なお、本明細書中における「数個」とは、１乃至１０個、１乃至９個、１乃至８個、１乃至７個、１乃至６個、１乃至５個、１乃至４個、１乃至３個、又は１若しくは２個を意味する。

また、本明細書中におけるアミノ酸の置換としては保存的アミノ酸置換が好ましい。保存的アミノ酸置換とは、アミノ酸側鎖に関連のあるアミノ酸グループ内で生じる置換である。好適なアミノ酸グループは、以下のとおりである：酸性グループ＝アスパギン酸、グルタミン酸；塩基性グループ＝リジン、アルギニン、ヒスチジン；非極性グループ＝アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファ

ン；および非帯電極性ファミリー＝グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、スレオニン、チロシン。他の好適なアミノ酸グループは次のとおりである：脂肪族ヒドロキシグループ＝セリン及びスレオニン；アミド含有グループ＝アスパラギン及びグルタミン；脂肪族グループ＝アラニン、バリン、ロイシン及びイソロイシン；並びに芳香族グループ＝フェニルアラニン、トリプトファン及びチロシン。かかるアミノ酸置換は元のアミノ酸配列を有する物質の特性を低下させない範囲で行うのが好ましい。

[0113] 上記重鎖及び軽鎖の好適な組合せとしては、配列番号８５の２０乃至１４１番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖及び配列番号７１の２１乃至１２８番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖からなる抗体、配列番号８５の２０乃至１４１番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖及び配列番号７３の２１乃至１２８番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖からなる抗体、配列番号８５の２０乃至１４１番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖及び配列番号７５の２１乃至１２８番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖からなる抗体、配列番号８５の２０乃至１４１番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖及び配列番号７７の２１乃至１２８番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖からなる抗体、配列番号８５の２０乃至１４１番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖及び配列番号７９の２１乃至１２８番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖からなる抗体、配列番号８５の２０乃至１４１番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖及び配列番号８１の２１乃至１２８番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖からなる抗体、配列番号８５の２０乃至１４１番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖及び配列番号８３の２１乃至１２

８番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖からなる抗体、配列番号９１の２０乃至１４１番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖及び配列番号７１の２１乃至１２８番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖からなる抗体、配列番号９１の２０乃至１４１番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖及び配列番号７３の２１乃至１２８番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖からなる抗体、配列番号９１の２０乃至１４１番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖及び配列番号７５の２１乃至１２８番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖からなる抗体、並びに配列番号９１の２０乃至１４１番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖及び配列番号７７の２１乃至１２８番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖からなる抗体を挙げることができる。

[0114] さらに好適な組合せとしては、配列番号８５のアミノ酸配列を有する重鎖及び配列番号７１のアミノ酸配列を有する軽鎖からなる抗体、配列番号８５のアミノ酸配列を有する重鎖及び配列番号７３のアミノ酸配列を有する軽鎖からなる抗体、配列番号８５のアミノ酸配列を有する重鎖及び配列番号７５のアミノ酸配列を有する軽鎖からなる抗体、配列番号８５のアミノ酸配列を有する重鎖及び配列番号７７のアミノ酸配列を有する軽鎖からなる抗体、配列番号８５のアミノ酸配列を有する重鎖及び配列番号７９のアミノ酸配列を有する軽鎖からなる抗体、配列番号８５のアミノ酸配列を有する重鎖及び配列番号８１のアミノ酸配列を有する軽鎖からなる抗体、配列番号８５のアミノ酸配列を有する重鎖及び配列番号８３のアミノ酸配列を有する軽鎖からなる抗体、配列番号９１のアミノ酸配列を有する重鎖及び配列番号７１のアミノ酸配列を有する軽鎖からなる抗体、配列番号９１のアミノ酸配列を有する重鎖及び配列番号７３のアミノ酸配列を有する軽鎖からなる抗体、配列番号９１のアミノ酸配列を有する重鎖及び配列番号７５のアミノ酸配列を有する

軽鎖からなる抗体、並びに配列番号９１のアミノ酸配列を有する重鎖及び配列番号７７のアミノ酸配列を有する軽鎖からなる抗体を挙げることができる。

[0115] 上記の重鎖アミノ酸配列及び軽鎖アミノ酸配列と高い相同性を示す配列を組み合わせることによって、上記の各抗体と同等の細胞傷害性活性を有する抗体を選択することが可能である。このような相同性は、一般的には８０％以上の相同性であり、好ましくは９０％以上の相同性であり、より好ましくは９５％以上の相同性であり、最も好ましくは９９％以上の相同性である。また、重鎖又は軽鎖のアミノ酸配列に１乃至数個のアミノ酸残基が置換、欠失又は付加されたアミノ酸配列を組み合わせることによっても、上記の各抗体と同等の細胞傷害性活性を有する抗体を選択することが可能である。

[0116] 二種類のアミノ酸配列間の相同性は、Ｂｌａｓｔ ａｌｇｏｒｉｔｈｍ ｖｅｒｓｉｏｎ ２．２．２（Ａｌｔｓｃｈｕｌ, Ｓｔｅｐｈｅｎ Ｆ．, Ｔｈｏｍａｓ Ｌ．Ｍａｄｄｅｎ, Ａｌｅｊａｎｄｒｏ Ａ．Ｓｃｈａｆｆｅｒ, Ｊｉｎｇｈｕｉ Ｚｈａｎｇ, Ｚｈｅｎｇ Ｚｈａｎｇ, Ｗｅｂｂ Ｍｉｌｌｅｒ, ａｎｄ Ｄａｖｉｄ Ｊ．Ｌｉｐｍａｎ（１９９７），「Ｇａｐｐｅｄ ＢＬＡＳＴ ａｎｄ ＰＳＩ－ＢＬＡＳＴ：ａ ｎｅｗ ｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ ｏｆ ｐｒｏｔｅｉｎ ｄａｔａｂａｓｅ ｓｅａｒｃｈ ｐｒｏｇｒａｍｓ」，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２５：３３８９－３４０２）のデフォルトパラメーターを使用することによって決定することができる。Ｂｌａｓｔ ａｌｇｏｒｉｔｈｍは、インターネットで

1334907992153_0

にアクセスすることによっても使用することができる。

[0117] なお、配列表の配列番号８５、８７、８９又は９１に示される重鎖アミノ酸配列中で、１乃至１９番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列はシグナル配列であり、２０乃至１４１番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は可変領域であり、１４２乃至４７１番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配

列は定常領域である。

また、配列表の配列番号７１、７３、７５、７７、７９、８１又は８３に示される軽鎖アミノ酸配列中で、１乃至２０番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列はシグナル配列であり、２１乃至１２８番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は可変領域であり、１２９乃至２３３番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は定常領域である。

配列表の配列番号８５、８７、８９又は９１に示される重鎖アミノ酸配列は、それぞれ配列表の配列番号８４、８６、８８又は９０に示されるヌクレオチド配列によってコードされている。また、配列番号８４及び８５の配列は図３４に、配列番号８６及び８７の配列は図３５に、配列番号８８及び８９の配列は図３６に、配列番号９０及び９１の配列は図３７に各々記載されている。各ヌクレオチド配列の１乃至５７番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列は抗体の重鎖シグナル配列をコードしており、５８乃至４２３番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列は抗体の重鎖可変領域をコードしており、そして４２４乃至１４１３番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列は抗体の重鎖定常領域をコードしている。

配列表の配列番号７１、７３、７５、７７、７９、８１又は８３に示される軽鎖アミノ酸配列は、それぞれ配列表の配列番号７０、７２、７４、７６、７８、８０又８２に示されるヌクレオチド配列によってコードされている。また、配列番号７０及び７１の配列は図２７に、配列番号７２及び７３の配列は図２８に、配列番号７４及び７５の配列は図２９に、配列番号７６及び７７の配列は図３０に、配列番号７８及び７９の配列は図３１に、配列番号８０及び８１の配列は図３２に、配列番号８２及び８３の配列は図３３に各々記載されている。各ヌクレオチド配列の１乃至６０番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列は抗体の軽鎖シグナル配列をコードしており、６１乃至３８４番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列は抗体の軽鎖可変領域をコードしており、そして３８５乃至６９９番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列は抗体の軽鎖定常領域をコードしている。

[0118] これらのヌクレオチド配列と他の抗体のヌクレオチド配列との間の相同性についてもＢｌａｓｔ ａｌｇｏｒｉｔｈｍによって決定することができる。

[0119] 本発明の抗体としては、さらに、Ｍ３０抗体と同一のエピトープに結合する、ヒト抗体を挙げることができる。抗Ｂ７－Ｈ３ヒト抗体とは、ヒト染色体由来の抗体の遺伝子配列のみを有するヒト抗体を意味する。抗Ｂ７－Ｈ３ヒト抗体は、ヒト抗体の重鎖と軽鎖の遺伝子を含むヒト染色体断片を有するヒト抗体産生マウスを用いた方法（Ｔｏｍｉｚｕｋａ，Ｋ．ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ（１９９７）１６，ｐ．１３３－１４３，；Ｋｕｒｏｉｗａ，Ｙ．ｅｔ．ａｌ．，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．（１９９８）２６，ｐ．３４４７－３４４８；Ｙｏｓｈｉｄａ，Ｈ．ｅｔ．ａｌ．，Ａｎｉｍａｌ Ｃｅｌｌ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ：Ｂａｓｉｃ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｅｄ Ａｓｐｅｃｔｓ ｖｏｌ．１０，ｐ．６９－７３（Ｋｉｔａｇａｗａ，Ｙ．，Ｍａｔｓｕｄａ，Ｔ．ａｎｄ Ｉｉｊｉｍａ，Ｓ．ｅｄｓ．），Ｋｌｕｗｅｒ Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ，１９９９．；Ｔｏｍｉｚｕｋａ，Ｋ．ｅｔ．ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ（２０００）９７，ｐ．７２２－７２７等を参照。）によって取得することができる。

[0120] このようなヒト抗体産生マウスは、具体的には、内在性免疫グロブリン重鎖及び軽鎖の遺伝子座が破壊され、代わりに酵母人工染色体（Ｙｅａｓｔ ａｒｔｉｆｉｃｉａｌ ｃｈｒｏｍｏｓｏｍｅ，ＹＡＣ）ベクターなどを介してヒト免疫グロブリン重鎖及び軽鎖の遺伝子座が導入された遺伝子組み換え動物を、ノックアウト動物及びトランスジェニック動物の作製、及びこれらの動物同士を掛け合わせることにより作り出すことができる。

[0121] また、遺伝子組換え技術により、そのようなヒト抗体の重鎖及び軽鎖の各々をコードするｃＤＮＡ、好ましくは該ｃＤＮＡを含むベクターにより真核細胞を形質転換し、遺伝子組換えヒトモノクローナル抗体を産生する形質転換細胞を培養することにより、この抗体を培養上清中から得ることもできる

。

[0122] ここで、宿主としては例えば真核細胞、好ましくはＣＨＯ細胞、リンパ球やミエローマ等の哺乳動物細胞を用いることができる。

[0123] また、ヒト抗体ライブラリーより選別したファージディスプレイ由来のヒト抗体を取得する方法（Ｗｏｒｍｓｔｏｎｅ，Ｉ．Ｍ．ｅｔ．ａｌ，Ｉｎｖｅｓｔｉｇａｔｉｖｅ Ｏｐｈｔｈａｌｍｏｌｏｇｙ ＆ Ｖｉｓｕａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅ．（２００２）４３（７），ｐ．２３０１－２３０８；Ｃａｒｍｅｎ，Ｓ．ｅｔ．ａｌ．，Ｂｒｉｅｆｉｎｇｓ ｉｎ Ｆｕｎｃｔｉｏｎａｌ Ｇｅｎｏｍｉｃｓ ａｎｄ Ｐｒｏｔｅｏｍｉｃｓ（２００２），１（２），ｐ．１８９－２０３；Ｓｉｒｉｗａｒｄｅｎａ，Ｄ．ｅｔ．ａｌ．，Ｏｐｈｔｈａｌｍｏｌｏｇｙ（２００２）１０９（３），ｐ．４２７－４３１等参照。）も知られている。

[0124] 例えば、ヒト抗体の可変領域を一本鎖抗体（ｓｃＦｖ）としてファージ表面に発現させて、抗原に結合するファージを選択するファージディスプレイ法（Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（２００５），２３，（９），ｐ．１１０５－１１１６）を用いることができる。

[0125] 抗原に結合することで選択されたファージの遺伝子を解析することによって、抗原に結合するヒト抗体の可変領域をコードするＤＮＡ配列を決定することができる。

[0126] 抗原に結合するｓｃＦｖのＤＮＡ配列が明らかになれば、当該配列を有する発現ベクターを作製し、適当な宿主に導入して発現させることによりヒト抗体を取得することができる（ＷＯ９２／０１０４７、ＷＯ９２／２０７９１、ＷＯ９３／０６２１３、ＷＯ９３／１１２３６、ＷＯ９３／１９１７２、ＷＯ９５／０１４３８、ＷＯ９５／１５３８８、Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ（１９９４）１２，ｐ．４３３－４５５、Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（２００５）２３（９），ｐ．１１０５－１１１６）。

[0127] 新たに作製されたヒト抗体が、Ｍ３０抗体の結合する部分ペプチド又は部

分立体構造に結合すれば、該ヒト抗体がＭ３０抗体と同一のエピトープに結合すると判定することができる。また、Ｍ３０抗体のＢ７－Ｈ３に対する結合に対して該ヒト抗体が競合する（すなわち、該ヒト抗体が、Ｍ３０抗体とＢ７－Ｈ３の結合を妨げる）ことを確認することによって、具体的なエピトープの配列又は構造が決定されていなくても、該ヒト抗体がＭ３０抗体と同一のエピトープに結合すると判定することができる。エピトープが同一であることが確認された場合、該ヒト抗体がＭ３０抗体と同等の細胞傷害活性を有していることが強く期待される。

[0128] 以上の方法によって得られたキメラ抗体、ヒト化抗体、又はヒト抗体は、実施例３に示された方法等によって抗原に対する結合性を評価し、好適な抗体を選抜することができる。

[0129] 抗体の性質を比較する際の別の指標の一例としては、抗体の安定性を挙げることができる。示差走査カロリメトリー（ＤＳＣ）は、蛋白の相対的構造安定性の良い指標となる熱変性中点（Ｔｍ）を素早く、また正確に測定することができる装置である。ＤＳＣを用いてＴｍ値を測定し、その値を比較することによって、熱安定性の違いを比較することができる。抗体の保存安定性は、抗体の熱安定性とある程度の相関を示すことが知られており（Ｌｏｒｉ Ｂｕｒｔｏｎ，ｅｔ．ａｌ．，Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ ａｎｄ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（２００７）１２，ｐ．２６５－２７３）、熱安定性を指標に、好適な抗体を選抜することができる。抗体を選抜するための他の指標としては、適切な宿主細胞における収量が高いこと、及び水溶液中での凝集性が低いことを挙げることができる。例えば収量の最も高い抗体が最も高い熱安定性を示すとは限らないので、以上に述べた指標に基づいて総合的に判断して、ヒトへの投与に最も適した抗体を選抜する必要がある。

[0130] また、抗体の重鎖及び軽鎖の全長配列を適切なリンカーを用いて連結し、一本鎖イムノグロブリン（ｓｉｎｇｌｅ ｃｈａｉｎ ｉｍｍｕｎｏｇｌｏｂｕｌｉｎ）を取得する方法も知られている（Ｌｅｅ，Ｈ－Ｓ，ｅｔ．ａｌ

．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ（１９９９）３６，ｐ．６１－７１；Ｓｈｉｒｒｍａｎｎ，Ｔ．ｅｔ．ａｌ．，ｍＡｂｓ（２０１０），２，（１）ｐ．１－４）。このような一本鎖イムノグロブリンは二量体化することによって、本来は四量体である抗体と類似した構造と活性を保持することが可能である。また、本発明の抗体は、単一の重鎖可変領域を有し、軽鎖配列を有さない抗体であっても良い。このような抗体は、単一ドメイン抗体（ｓｉｎｇｌｅ ｄｏｍａｉｎ ａｎｔｉｂｏｄｙ：ｓｄＡｂ）又はナノボディ（ｎａｎｏｂｏｄｙ）と呼ばれており、実際にラクダ又はラマで観察され、抗原結合能が保持されていることが報告されている（Ｍｕｙｌｄｅｍａｎｓ Ｓ．ｅｔ．ａｌ．，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇ．（１９９４）７（９），１１２９－３５，Ｈａｍｅｒｓ－Ｃａｓｔｅｒｍａｎ Ｃ．ｅｔ．ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ（１９９３）３６３（６４２８）４４６－８）。上記の抗体は、本発明における抗体の機能性断片の一種と解釈することも可能である。

本発明には抗体又は当該抗体の機能性断片の修飾体も含まれる。当該修飾体とは、本発明の抗体又は当該抗体の機能性断片に化学的又は生物学的な修飾が施されてなるものを意味する。化学的な修飾体には、アミノ酸骨格への化学部分の結合、Ｎ－結合またはＯ－結合炭水化物鎖の化学修飾体等が含まれる。生物学的な修飾体には、翻訳後修飾（例えば、Ｎ－結合またはＯ－結合への糖鎖付加、Ｎ末またはＣ末のプロセッシング、脱アミド化、アスパラギン酸の異性化、メチオニンの酸化）されたもの、原核生物宿主細胞を用いて発現させることによりＮ末にメチオニン残基が付加したもの等が含まれる。また、本発明の抗体又は抗原の検出又は単離を可能にするために標識されたもの、例えば、酵素標識体、蛍光標識体、アフィニティ標識体もかかる修飾物の意味に含まれる。このような本発明の抗体又は当該抗体の機能性断片の修飾物は、元の本発明の抗体又は当該抗体の機能性断片の安定性及び血中滞留性の改善、抗原性の低減、かかる抗体又は抗原の検出又は単離等に有用である。

また、本発明の抗体に結合している糖鎖修飾を調節すること（グリコシル化、脱フコース化等）によって、抗体依存性細胞傷害活性を増強することが可能である。抗体の糖鎖修飾の調節技術としては、ＷＯ９９／５４３４２、ＷＯ００／６１７３９、ＷＯ０２／３１１４０等が知られているが、これらに限定されるものではない。本発明の抗体及び当該抗体の機能性断片には当該糖鎖修飾を調節された抗体及び当該抗体の機能性断片も含まれる。

[0131] 抗体遺伝子を一旦単離した後、適当な宿主に導入して抗体を作製する場合には、適当な宿主と発現ベクターの組み合わせを使用することができる。抗体遺伝子の具体例としては、本明細書に記載された抗体の重鎖配列をコードする遺伝子、及び軽鎖配列をコードする遺伝子を組み合わせたものを挙げることができる。宿主細胞を形質転換する際には、重鎖配列遺伝子と軽鎖配列遺伝子は、同一の発現ベクターに挿入されていることが可能であり、又別々の発現ベクターに挿入されていることも可能である。

真核細胞を宿主として使用する場合、動物細胞、植物細胞、真核微生物を用いることができる。特に動物細胞としては、哺乳類細胞、例えば、サルの細胞であるＣＯＳ細胞（Ｇｌｕｚｍａｎ，Ｙ．Ｃｅｌｌ（１９８１）２３，ｐ．１７５－１８２、ＡＴＣＣ　ＣＲＬ－１６５０）、マウス線維芽細胞ＮＩＨ３Ｔ３（ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－１６５８）やチャイニーズ・ハムスター卵巣細胞（ＣＨＯ細胞、ＡＴＣＣ　ＣＣＬ－６１）のジヒドロ葉酸還元酵素欠損株（Ｕｒｌａｕｂ，Ｇ．ａｎｄ　Ｃｈａｓｉｎ，Ｌ．Ａ．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．（１９８０）７７，ｐ．４１２６－４２２０）を挙げることができる。

原核細胞を使用する場合は、例えば、大腸菌、枯草菌を挙げることができる。

これらの細胞に目的とする抗体遺伝子又は当該抗体の機能性断片を形質転換により導入し、形質転換された細胞をｉｎ　ｖｉｔｒｏで培養することにより抗体が得られる。当該培養においては抗体の配列によって収量が異なる場合があり、同等な結合活性を持つ抗体の中から収量を指標に医薬としての生

産が容易なものを選別することが可能である。よって、本発明の抗体及び当該抗体の機能性断片には、上記形質転換された宿主細胞を培養する工程、及び当該工程で得られた培養物から目的の抗体又は当該抗体の機能性断片を採取する工程を含むことを特徴とする当該抗体又は当該断片の製造方法により得られる抗体又は当該抗体の機能性断片も含まれる。

なお、哺乳類培養細胞で生産される抗体の重鎖のカルボキシル末端のリジン残基が欠失することが知られており（Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒａｐｈｙ　Ａ，７０５：１２９－１３４（１９９５））、また、同じく重鎖カルボキシル末端のグリシン、リジンの２アミノ酸残基が欠失し、新たにカルボキシル末端に位置するプロリン残基がアミド化されることが知られている（Ａｎａｌｙｔｉｃａｌ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，３６０：７５－８３（２００７））。しかし、これらの重鎖配列の欠失及び修飾は、抗体の抗原結合能及びエフェクター機能（補体の活性化や抗体依存性細胞障害作用など）には影響を及ぼさない。従って、本発明には当該修飾を受けた抗体及び当該抗体の機能性断片も含まれ、重鎖カルボキシル末端において１又は２つのアミノ酸が欠失した欠失体、及びアミド化された当該欠失体（例えば、カルボキシル末端部位のプロリン残基がアミド化された重鎖）等を挙げることができる。但し、抗原結合能及びエフェクター機能が保たれている限り、本発明に係る抗体の重鎖のカルボキシル末端の欠失体は上記の種類に限定されない。本発明に係る抗体を構成する２本の重鎖は、完全長及び上記の欠失体からなる群から選択される重鎖のいずれか一種であっても良いし、いずれか二種を組み合わせたものであっても良い。各欠失体の量比は本発明に係る抗体を産生する哺乳類培養細胞の種類及び培養条件に影響を受け得るが、本発明に係る抗体の主成分としては２本の重鎖の双方でカルボキシル末端の１つのアミノ酸残基が欠失している場合を挙げることができる。　本発明の抗体のアイソタイプとしての制限はなく、例えばＩｇＧ（ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４）、ＩｇＭ、ＩｇＡ（ＩｇＡ１、ＩｇＡ２）、ＩｇＤあるいはＩｇＥ等を挙げることができるが、好ましくはＩｇＧ又はＩ

ｇＭ、さらに好ましくはＩｇＧ１又はＩｇＧ２を挙げることができる。

また本発明の抗体は、抗体の抗原結合部を有する抗体の機能性断片又はその修飾物であってもよい。抗体をパパイン、ペプシン等の蛋白質分解酵素で処理するか、あるいは抗体遺伝子を遺伝子工学的手法によって改変し適当な培養細胞において発現させることによって、該抗体の断片を得ることができる。このような抗体断片のうちで、抗体の持つ機能の全て又は一部を保持している断片を抗体の機能性断片と呼ぶことができる。

抗体の機能としては、一般的には抗原結合活性、抗原の活性を中和する活性、抗原の活性を増強する活性、抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）活性及び補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）活性を挙げることができるが、本発明に係る抗体及びその機能性断片が有する機能は、Ｂ７－Ｈ３に対する結合活性であり、好ましくは抗体依存性細胞媒介食作用（ＡＤＣＰ）活性であり、より好ましくは腫瘍細胞に対するＡＤＣＰ活性を介した細胞傷害活性（抗腫瘍活性）である。更に、本発明の抗体は、ＡＤＣＰ活性に加えて、ＡＤＣＣ活性及び／又はＣＤＣ活性を併せ持っていても良い。特に既存の抗腫瘍抗体を含有する医薬については、腫瘍細胞に直接的に働きかけ増殖シグナルを遮断すること、腫瘍細胞に直接的に働きかけ細胞死シグナルを誘導すること、血管新生を抑制すること、ＮＫ細胞を介してＡＤＣＣ活性を起こすこと、及び補体を介してＣＤＣ活性を誘導することにより腫瘍細胞の増殖を抑制することが報告されているが（Ｊ　Ｃｌｉｎ　Ｏｎｃｏｌ　２８：４３９０－４３９９．（２０１０）、Ｃｌｉｎ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ；　１６（１）；　１１-２０．（２０１０））、本願発明に係る抗Ｂ７－Ｈ３抗体が有するＡＤＣＰ活性については、既存の抗腫瘍抗体を含有する医薬の活性として報告されていることを少なくとも本発明者らは知らない。

[0132] 抗体の断片としては、例えば、Ｆａｂ、Ｆ（ａｂ’）２、Ｆｖ、又は重鎖及び軽鎖のＦｖを適当なリンカーで連結させたシングルチェインＦｖ（ｓｃＦｖ）、ｄｉａｂｏｄｙ（ｄｉａｂｏｄｉｅｓ）、線状抗体、及び抗体断片より形成された多特異性抗体などを挙げることができる。また、Ｆ（ａｂ’

）２を還元条件下で処理した抗体の可変領域の一価の断片であるＦａｂ’も抗体の断片に含まれる。

[0133] さらに、本発明の抗体は少なくとも２種類の異なる抗原に対して特異性を有する多特異性抗体であってもよい。通常このような分子は２種類の抗原に結合するものであるが（即ち、二重特異性抗体（ｂｉｓｐｅｃｉｆｉｃ ａｎｔｉｂｏｄｙ））、本発明における「多特異性抗体」は、それ以上（例えば、３種類）の抗原に対して特異性を有する抗体を包含するものである。

[0134] 本発明の多特異性抗体は、全長からなる抗体、又はそのような抗体の断片（例えば、Ｆ（ａｂ’）２二重特異性抗体）でもよい。二重特異性抗体は２種類の抗体の重鎖と軽鎖（ＨＬ対）を結合させて作製することもできるし、異なるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを融合させて、二重特異性抗体産生融合細胞を作製することによっても、作製することができる（Ｍｉｌｌｓｔｅｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ（１９８３）３０５，ｐ．５３７－５３９）。

[0135] 本発明の抗体は一本鎖抗体（ｓｃＦｖとも記載する）でもよい。一本鎖抗体は、抗体の重鎖可変領域と軽鎖可変領域とをポリペプチドのリンカーで連結することにより得られる（Ｐｌｕｃｋｔｈｕｎ，Ｔｈｅ Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ ｏｆ Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，１１３（Ｒｏｓｅｎｂｅｒｇ及びＭｏｏｒｅ編、Ｓｐｒｉｎｇｅｒ Ｖｅｒｌａｇ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，ｐ．２６９－３１５（１９９４）、Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（２００５），２３，ｐ．１１２６－１１３６）。また、２つのｓｃＦｖをポリペプチドリンカーで結合させて作製されるＢｉｓｃＦｖ断片を二重特異性抗体として使用することもできる。

[0136] 一本鎖抗体を作製する方法は当技術分野において周知である（例えば、米国特許第４，９４６，７７８号、米国特許第５，２６０，２０３号、米国特許第５，０９１，５１３号、米国特許第５，４５５，０３０号等を参照）。このｓｃＦｖにおいて、重鎖可変領域と軽鎖可変領域は、コンジュゲートを作らないようなリンカー、好ましくはポリペプチドリンカーを介して連結さ

れる（Ｈｕｓｔｏｎ，Ｊ．Ｓ．ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．（１９８８），８５，ｐ．５８７９－５８８３）。ｓｃＦｖにおける重鎖可変領域及び軽鎖可変領域は、同一の抗体に由来してもよく、別々の抗体に由来してもよい。

可変領域を連結するポリペプチドリンカーとしては、例えば１２～１９残基からなる任意の一本鎖ペプチドが用いられる。

[0137] ｓｃＦｖをコードするＤＮＡは、前記抗体の重鎖又は重鎖可変領域をコードするＤＮＡ、及び軽鎖又は軽鎖可変領域をコードするＤＮＡのうち、それらの配列のうちの全部又は所望のアミノ酸配列をコードするＤＮＡ部分を鋳型とし、その両端を規定するプライマー対を用いてＰＣＲ法により増幅し、次いで、さらにポリペプチドリンカー部分をコードするＤＮＡ、及びその両端が各々重鎖、軽鎖と連結されるように規定するプライマー対を組み合わせて増幅することにより得られる。

[0138] また、一旦ｓｃＦｖをコードするＤＮＡが作製されると、それらを含有する発現ベクター、及び該発現ベクターにより形質転換された宿主を常法に従って得ることができ、また、その宿主を用いることにより、常法に従ってｓｃＦｖを得ることができる。これらの抗体断片は、前記と同様にして遺伝子を取得し発現させ、宿主により産生させることができる。

[0139] 本発明の抗体は、多量化して抗原に対する親和性を高めたものであってもよい。多量化する抗体としては、１種類の抗体であっても、同一の抗原の複数のエピトープを認識する複数の抗体であってもよい。抗体を多量化する方法としては、ＩｇＧ　ＣＨ３ドメインと２つのｓｃＦｖとの結合、ストレプトアビジンとの結合、ヘリックスターン－ヘリックスモチーフの導入等を挙げることができる。

[0140] 本発明の抗体は、アミノ酸配列が異なる複数種類の抗Ｂ７－Ｈ３抗体の混合物である、ポリクローナル抗体であってもよい。ポリクローナル抗体の一例としては、ＣＤＲが異なる複数種類の抗体の混合物を挙げることができる。そのようなポリクローナル抗体としては、異なる抗体を産生する細胞の混

合物を培養し、該培養物から精製された抗体を用いることが出来る（ＷＯ２００４／０６１１０４号参照）。

[0141] 抗体の修飾物として、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）等の各種分子と結合した抗体を使用することもできる。

[0142] 本発明の抗体は、更にこれらの抗体と他の薬剤がコンジュゲートを形成しているもの（Ｉｍｍｕｎｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ）でもよい。このような抗体の例としては、該抗体が放射性物質や薬理作用を有する化合物と結合している物を挙げることができ（Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（２００５）２３，ｐ．１１３７－１１４６）、例えば、インジウム（^{111}Ｉｎ）カプロマブ ペンデチド（Ｉｎｄｉｕｍ（^{111}Ｉｎ）Ｃａｐｒｏｍａｂ ｐｅｎｄｅｔｉｄｅ）、テクネチウム（^{99m}Ｔｃ）ノフェツモマブ メルペンタン（Ｔｅｃｈｎｅｔｉｕｍ（^{99m}Ｔｃ）Ｎｏｆｅｔｕｍｏｍａｂ ｍｅｒｐｅｎｔａｎ）、インジウム（^{111}Ｉｎ）イブリツモマブ（Ｉｎｄｉｕｍ（^{111}Ｉｎ）Ｉｂｒｉｔｕｍｏｍａｂ）、イットリウム（^{90}Ｙ）イブリツモマブ（Ｙｔｔｒｉｕｍ（^{90}Ｙ）Ｉｂｒｉｔｕｍｏｍａｂ）、ヨード（^{131}Ｉ）トシツモマブ（Ｉｏｄｉｎｅ（^{131}Ｉ）Ｔｏｓｉｔｕｍｏｍａｂ）等を挙げることができる。

[0143] 得られた抗体は、均一にまで精製することができる。抗体の分離、精製は通常の蛋白質で使用されている分離、精製方法を使用すればよい。例えばカラムクロマトグラフィー、フィルター濾過、限外濾過、塩析、透析、調製用ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動等を適宜選択、組み合わせれば、抗体を分離、精製することができる（Ｓｔｒａｔｅｇｉｅｓ ｆｏｒ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ ａｎｄ Ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｚａｔｉｏｎ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｃｏｕｒｓｅ Ｍａｎｕａｌ，Ｄａｎｉｅｌ Ｒ．Ｍａｒｓｈａｋ ｅｔ ａｌ．ｅｄｓ．，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ（１９９６）；Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ．Ｅｄ Ｈａｒｌｏｗ ａｎｄ Ｄａｖｉｄ Ｌａｎｅ，Ｃｏｌｄ Ｓｐ

ｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ（１９８８））が、これらに限定されるものではない。

[0144] クロマトグラフィーとしては、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等を挙げることができる。

これらのクロマトグラフィーは、ＨＰＬＣやＦＰＬＣ等の液体クロマトグラフィーを用いて行うことができる。

[0145] アフィニティークロマトグラフィーに用いるカラムとしては、プロテインＡカラム、プロテインＧカラムを挙げることができる。例えばプロテインＡカラムを用いたカラムとして、Ｈｙｐｅｒ Ｄ，ＰＯＲＯＳ，Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ Ｆ．Ｆ．（ファルマシア）等を挙げることができる。

また抗原を固定化した担体を用いて、抗原への結合性を利用して抗体を精製することも可能である。

３．抗Ｂ７－Ｈ３抗体を含有する医薬

上述の「２．抗Ｂ７－Ｈ３抗体の製造」の項に記載された方法で得られる抗体は、癌細胞に対して細胞傷害活性を示すことから、医薬として、特に癌に対する治療剤及び／又は予防剤として用いることができる。

[0146] ｉｎ ｖｉｔｒｏでの抗体による殺細胞活性は、細胞の増殖の抑制活性で測定することができる。

[0147] 例えば、Ｂ７－Ｈ３を過剰発現している癌細胞株を培養し、培養系に種々の濃度で抗体を添加し、フォーカス形成、コロニー形成及びスフェロイド増殖に対する抑制活性を測定することができる。

[0148] ｉｎ ｖｉｖｏでの実験動物を利用した抗体の癌に対する治療効果は、例えば、Ｂ７－Ｈ３を高発現している腫瘍細胞株を移植したヌードマウスに抗体を投与し、癌細胞の変化を測定することができる。

[0149] 癌の種類としては、肺癌、腎癌、尿路上皮癌、大腸癌、前立腺癌、多形神経膠芽腫、卵巣癌、膵癌、乳癌、メラノーマ、肝癌、膀胱癌、胃癌、食道癌

等を挙げることができるが、治療対象となる癌細胞がＢ７－Ｈ３を発現している限りこれらに限定されない。

[0150] 本発明の医薬組成物において許容される製剤に用いる物質としては投与量や投与濃度において、医薬組成物を投与される者に対して非毒性のものが好ましい。

[0151] 本発明の医薬組成物は、ｐＨ、浸透圧、粘度、透明度、色、等張性、無菌性、安定性、溶解率、徐放率、吸収率、浸透率を変えたり、保持したりするための製剤用の物質を含むことができる。製剤用の物質として以下のものを挙げることができるが、これらに制限されない：グリシン、アラニン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン又はリジン等のアミノ酸類、抗菌剤、アスコルビン酸、硫酸ナトリウム又は亜硫酸水素ナトリウム等の抗酸化剤、リン酸、、クエン酸、ホウ酸バッファー、炭酸水素ナトリウム、トリスー塩酸（Ｔｒｉｓ－Ｈｃｌ）溶液等の緩衝剤、マンニトールやグリシン等の充填剤、エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）等のキレート剤、カフェイン、ポリビニルピロリジン、β－シクロデキストリンやヒドロキシプロピル－β－シクロデキストリン等の錯化剤、グルコース、マンノース又はデキストリン等の増量剤、単糖類、二糖類等の他の炭水化物、着色剤、香味剤、希釈剤、乳化剤やポリビニルピロリジン等の親水ポリマー、低分子量ポリペプチド、塩形成対イオン、塩化ベンズアルコニウム、安息香酸、サリチル酸、チメロサール、フェネチルアルコール、メチルパラベン、プロピルパラベン、クロレキシジン、ソルビン酸又は過酸化水素等の防腐剤、グリセリン、プロピレン・グリコール又はポリエチレングリコール等の溶媒、マンニトール又はソルビトール等の糖アルコール、懸濁剤、ソルビタンエステル、ポリソルベート２０やポリソルベート８０等のポリソルベート、トリトン（ｔｒｉｔｏｎ）、トロメタミン（ｔｒｏｍｅｔｈａｍｉｎｅ）、レシチン又はコレステロール等の界面活性剤、スクロースやソルビトール等の安定化増強剤、塩化ナトリウム、塩化カリウムやマンニトール・ソルビトール等の弾性増強剤、輸送剤、賦形剤、及び／又は薬学上の補助剤。これらの製剤用の物質の添加量は

、抗Ｂ７－Ｈ３抗体の重量に対して０．００１～１００倍、特に０．１～１０倍添加するのが好ましい。製剤中の好適な医薬組成物の組成は当業者によって、適用疾患、適用投与経路などに応じて適宜決定することができる。

[0152] 医薬組成物中の賦形剤や担体は液体でも固体でもよい。適当な賦形剤や担体は注射用の水や生理食塩水、人工脳脊髄液や非経口投与に通常用いられている他の物質でもよい。中性の生理食塩水や血清アルブミンを含む生理食塩水を担体に用いることもできる。医薬組成物にはｐＨ７．０－８．５のＴｒｉｓバッファー、ｐＨ４．０－５．５の酢酸バッファー、ｐＨ３．０－６．２のクエン酸バッファーを含むことができる。また、これらのバッファーにソルビトールや他の化合物を含むこともできる。

[0153] 本発明の医薬組成物には抗Ｂ７－Ｈ３抗体を含む医薬組成物並びに、抗Ｂ７－Ｈ３抗体及び少なくとも一つの癌治療剤を含む医薬組成物を挙げることができ、本発明の医薬組成物は選択された組成と必要な純度を持つ薬剤として、凍結乾燥品あるいは液体として準備される。抗Ｂ７－Ｈ３抗体を含む医薬組成物並びに、抗Ｂ７－Ｈ３抗体及び少なくとも一つの癌治療薬剤を含む医薬組成物はスクロースのような適当な賦形剤を用いた凍結乾燥品として成型されることもできる。

[0154] 上記の医薬組成物において、抗Ｂ７－Ｈ３抗体と共に含まれる癌治療剤は、抗Ｂ７－Ｈ３抗体と同時に、別々に、あるいは連続して個体に投与されても良いし、それぞれの投与間隔を変えて投与しても良い。このような癌治療剤として、ａｂｒａｘａｎｅ、ｃａｒｂｏｐｌａｔｉｎ、ｃｉｓｐｌａｔｉｎ、ｇｅｍｃｉｔａｂｉｎｅ、ｉｒｉｎｏｔｅｃａｎ（ＣＰＴ－１１）、ｐａｃｌｉｔａｘｅｌ、ｐｅｍｅｔｒｅｘｅｄ、ｓｏｒａｆｅｎｉｂ、ｖｉｎｂｌａｓｔｉｎ又は国際公開第ＷＯ２００３／０３８０４３号パンフレットに記載の薬剤、更にＬＨ－ＲＨアナログ（リュープロレリン、ゴセレリン等）、エストラムスチン・フォスフェイト、エストロジェン拮抗薬（タモキシフェン、ラロキシフェン等）、アロマターゼ阻害剤（アナストロゾール、レトロゾール、エキセメスタン等）等を挙げることができるが、抗腫瘍活性を

有する薬剤であれば、上記の薬剤に限定されない。

投与対象となる個体としては、特に限定されるものではないが、好ましくは哺乳動物、さらに好ましくはヒトを挙げることができる。

[0155] 本発明の医薬組成物は非経口投与用に調製することもできるし、経口による消化管吸収用に調製することもできる。製剤の組成及び濃度は投与方法によって決定することができるし、本発明の医薬組成物に含まれる、抗Ｂ７－Ｈ３抗体のＢ７－Ｈ３に対する親和性、即ち、Ｂ７－Ｈ３に対する解離定数（Ｋｄ値）に対し、親和性が高い（Ｋｄ値が低い）ほど、ヒトへの投与量を少なくしても薬効を発揮することができるので、この結果に基づいて本発明の医薬組成物の人に対する投与量を決定することもできる。投与量は、ヒト型抗Ｂ７－Ｈ３抗体をヒトに対して投与する際には、約０．００１～１００ｍｇ／ｋｇを１回あるいは１～１８０日間に１回の間隔で複数回投与すればよい。本発明の医薬組成物の形態としては、点滴を含む注射剤、坐剤、経鼻剤、舌下剤、経皮吸収剤などを挙げることができる。

[0156] 以下、実施例を示して本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。なお、下記実施例において遺伝子操作に関する各操作は特に明示がない限り、「モレキュラークローニング（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ）」（Ｓａｍｂｒｏｏｋ，Ｊ．，Ｆｒｉｔｓｃｈ，Ｅ．Ｆ．及びＭａｎｉａｔｉｓ，Ｔ．著、Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｅｓｓより１９８９年に発刊）に記載の方法により行うか、又は、市販の試薬やキットを用いる場合には市販品の指示書に従って使用した。

実施例

[0157] 以下、実施例において本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されない。

[0158] なお、下記実施例において遺伝子操作に関する各操作は特に明示がない限り、「モレキュラークローニング（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ）」（Ｓａｍｂｒｏｏｋ，Ｊ．，Ｆｒｉｔｓｃｈ，Ｅ．Ｆ．及びＭａｎｉａｔ

ｉｓ，Ｔ．著，Ｃｏｌｄ　ＳｐｒｉｎｇＨａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｅｓｓより１９８９年発刊）に記載の方法及びその他の当業者が使用する実験書に記載の方法により行うか、又は市販の試薬やキットを用いる場合には市販品の指示書に従って行った。

実施例１．プラスミド作製

１）－１　ヒトＢ７－Ｈ３発現ベクターの作製

１）－１－１　全長ヒトＢ７－Ｈ３バリアント１発現ベクターの作製

ＬＮＣａＰ細胞（Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ：ＡＴＣＣ）ｔｏｔａｌ　ＲＮＡより合成したｃＤＮＡを鋳型にプライマーセット：

プライマー１：

5’－ｃｔａｔａｇｇｇａｇａｃｃｃａａｇｃｔｇｇｃｔａｇｃａｔｇｃｔｇｃｇｔｃｇｇｃｇｇｇｇｃａｇ－3’（配列表の配列番号１）

及び、プライマー２：

5’－ａａｃｇｇｇｃｃｃｔｃｔａｇａｃｔｃｇａｇｃｇｇｃｃｇｃｔｃａｇｇｃｔａｔｔｔｃｔｔｇｔｃｃａｔｃａｔｃｔｔｃｔｔｔｇｃｔｇｔｃａｇ－3’（配列表の配列番号２）

を用いてＰＣＲ反応を行い、ヒトＢ７－Ｈ３バリアント１をコードするｃＤＮＡを増幅した。

次に、得られたＰＣＲ産物をＭａｇＥｘｔｒａｃｔｏｒ　ＰＣＲ　＆　Ｇｅｌ　ｃｌｅａｎｕｐ（ＴＯＹＯＢＯ社）にて精製した。更に、制限酵素（ＮｈｅＩ／ＮｏｔＩ）で消化した後、ＭａｇＥｘｔｒａｃｔｏｒ　ＰＣＲ＆Ｇｅｌ　ｃｌｅａｎｕｐ（ＴＯＹＯＢＯ社）にて精製した。ｐｃＤＮＡ３．１（＋）プラスミドＤＮＡを同じ制限酵素（ＮｈｅＩ／ＮｏｔＩ）で消化した後、ＭａｇＥｘｔｒａｃｔｏｒ　ＰＣＲ　＆　Ｇｅｌ　ｃｌｅａｎｕｐ（ＴＯＹＯＢＯ社）にて精製した。

上記精製ＤＮＡ溶液を混合し、更にＬｉｇａｔｉｏｎ　ｈｉｇｈ（ＴＯＹＯＢＯ社）を加え、１６℃で８時間インキュベートし、ライゲーションした。

上記反応物を大腸菌ＤＨ５αコンピテントセル（インビトロジェン社）に加え、形質転換した。

上記で得られたコロニーについて、ＰＣＲプライマーとＢＧＨ　ｒｅｖｅｒｓｅ　ＰｒｉｍｅｒでコロニーダイレクトｐＣＲを行い、候補クローンをセレクションした。

得られた候補クローンを液体培地（ＬＢ／Ａｍｐ）で培養し、ＭａｇＥｘｔｒａｃｔｏｒ－Ｐｌａｓｍｉｄ－（ＴＯＹＯＢＯ社）でプラスミドＤＮＡを抽出した。

得られたプラスミドＤＮＡを鋳型に

プライマー３（ＣＭＶ　ｐｒｏｍｏｔｅｒプライマー）：

５’－　ｃｇｃａａａｔｇｇｇｃｇｇｔａｇｇｃｇｔｇ　－３’（配列表の配列番号３）

及び、プライマー４（ＢＧＨ　ｒｅｖｅｒｓｅプライマー）

５’－　ｔａｇａａｇｇｃａｃａｇｔｃｇａｇｇ　－３’（配列表の配列番号４）

間のシーケンス解析を行い、取得クローンと提供ＣＤＳ配列を比較した。

配列を確認後、得られたクローンを２００ｍｌのＬＢ／Ａｍｐ培地で培養し、ＶｉｏＧｅｎｅ社　Ｐｌａｓｍｉｄ　Ｍｉｄｉ　Ｖ－１００キットを使って、プラスミドＤＮＡの抽出を行った。

本ベクターをｐｃＤＮＡ３．１－Ｂ７－Ｈ３と命名した。本ベクターにクローニングされたＢ７－Ｈ３バリアント１遺伝子のＯＲＦ部分の配列は配列表の配列番号５のヌクレオチド番号１乃至１６０２に示されている。また、Ｂ７－Ｈ３バリアント１のアミノ酸配列は配列表の配列番号６に示されている。

１）－１－２　全長ヒトＢ７－Ｈ３バリアント２発現ベクターの作製

ＬＮＣａＰ細胞ｔｏｔａｌ　ＲＮＡより合成したｃＤＮＡを鋳型に、以下に記すプライマーセット：

プライマー５

５’－ ｇｇｇｇａｃａａｇｔｔｔｇｔａｃａａａａａａｇｃａｇｇｃｔｔｃａｃｃａｔｇｃｔｇｃｇｔｃｇｇｃｇｇｇｇｃａｇｃｃｃｔｇ －３’（配列表の配列番号７）

プライマー６

５’－ ｇｇｇｇａｃｃａｃｔｔｔｇｔａｃａａｇａａａｇｃｔｇｇｇｔｃｇｇｃｔａｔｔｔｃｔｔｇｔ －３’（配列表の配列番号８）

を用いてＰＣＲを行い、ヒトＢ７－Ｈ３バリアント２をコードするｃＤＮＡを増幅した。

[0159] 実施例１）－１－１と同様に精製を行い、精製後のＰＣＲ産物をＧａｔｅｗａｙ ＢＰ反応によりｐＤＯＮＲ２２１ ｖｅｃｔｏｒ（インビトロジェン社）に組み込み、大腸菌ＴＯＰ１０（インビトロジェン社）を形質転換した。

形質転換後に得られたクローンについてコロニーＰＣＲにてインサートサイズの確認を行った。それぞれ、インサートの長さを確認した８つのクローンについて、ベクター側からインサートの方向へ１反応ずつのシークエンス反応を行い、インサートの３’及び５’の末端ＤＮＡ配列の確認を行った。配列を確認したエントリークローンとＧａｔｅｗａｙデスティネーションベクターｐｃＤＮＡ－ＤＥＳＴ４０（インビトロジェン社）でＧａｔｅｗａｙ ＬＲ反応を行った。大腸菌ＴＯＰ１０の形質転換後に得られたクローンについてコロニーＰＣＲにてインサートサイズの確認を行った。インサートの長さを確認したクローンについて、インサートの３’及び５’の末端ＤＮＡ配列の解析を行い、目的インサートが正しく挿入されたことを確認した。作製したクローンのプラスミドをインビトロジェン社 ＰｕｒｅＬｉｎｋ ＨｉＰｕｒｅ Ｐｌａｓｍｉｄ Ｍｅｇａｐｒｅｐ Ｋｉｔを用い１ｍｇ以上精製した。

本ベクターをｐｃＤＮＡ－ＤＥＳＴ４０－Ｂ７－Ｈ３バリアント２と命名した。本ベクターにクローニングされたＢ７－Ｈ３バリアント２遺伝子のＯＲＦ部分の配列は配列表の配列番号９のヌクレオチド番号１乃至９４８に示さ

れている。またＢ７－Ｈ３バリアント２のアミノ酸配列は配列表の配列番号１０に示されている。

１）－２　Ｂ７－Ｈ３部分蛋白質発現ベクターの作製

実施例１）－１－１のＢ７－Ｈ３バリアント１に係るＢ７－Ｈ３全長プラスミドをテンプレートとし、以下に記す領域をそれぞれＰＣＲにより増幅した。目的とする領域番号は配列番号５で示されるＢ７－Ｈ３のヌクレオチド番号に相当する。プライマーはＧａｔｅｗａｙ　ａｔｔ配列に加え、３’側はＳｔｏｐコドンを含むように設計した。

下記１）、２）、３）は２領域を増幅後、ＰＣＲで連結し１断片とした。即ち、１）はプライマー７及び１２とプライマー１５及び１１で増幅し、ＰＣＲ産物を更にプライマー７及び１１で増幅した。２）はプライマー８及び１３とプライマー１５及び１１で増幅し、ＰＣＲ産物を更にプライマー８及び１１で増幅した。３）はプライマー９及び１４とプライマー１５及び１１で増幅し、ＰＣＲ産物を更にプライマー９及び１１で増幅した。４）はプライマー１０及び１１で増幅した。５）はプライマー８及び１１で増幅した。６）はプライマー９及び１１で増幅した。

・目的領域

１）Ｂ７－Ｈ３バリアント１　ＯＲＦ：７９～４１７及び１３６９～１６０２　（５７３ｂｐ）

２）Ｂ７－Ｈ３バリアント１　ＯＲＦ：４１８～７３２及び１３６９～１６０２　（５４９ｂｐ）

３）Ｂ７－Ｈ３バリアント１　ＯＲＦ：７３３～１０７１及び１３６９～１６０２　（５７３ｂｐ）

４）Ｂ７－Ｈ３バリアント１　ＯＲＦ：１０７２～１６０２　（５３１ｂｐ）

５）Ｂ７－Ｈ３バリアント１　ＯＲＦ：４１８～１６０２　（１１８５ｂｐ）

６）Ｂ７－Ｈ３バリアント１　ＯＲＦ：７３３～１６０２　（８７０ｂｐ）

・プライマー番号及び塩基配列

プライマー７

５’－ ｇｇｇｇａｃａａｇｔｔｔｇｔａｃａａａａａａｇｃａｇｇｃｔｔｃｇｇａｇｃｃｃｔｇｇａｇｇｔｃｃａｇｇｔｃ －３’（配列表の配列番号１１）

プライマー８

５’－ ｇｇｇｇａｃａａｇｔｔｔｇｔａｃａａａａａａｇｃａｇｇｃｔｔｃｇｃｔｃｃｃｔａｃｔｃｇａａｇｃｃｃａｇｃａｔｇ －３’（配列表の配列番号１２）

プライマー９

５’－ ｇｇｇｇａｃａａｇｔｔｔｇｔａｃａａａａａａｇｃａｇｇｃｔｔｃｇｇａｇｃｃｇｔｇｇａｇｇｔｃｃａｇｇｔｃ －３’（配列表の配列番号１３）

プライマー１０

５’－ ｇｇｇｇａｃａａｇｔｔｔｇｔａｃａａａａａａｇｃａｇｇｃｔｔｃｇｃｔｃｃｃｔａｃｔｃｇａａｇｃｃｃａｇｃａｔｇ －３’（配列表の配列番号１４）

プライマー１１

５’－ ｇｇｇｇａｃｃａｃｔｔｔｇｔａｃａａｇａａａｇｃｔｇｇｇｔｃｔｃａｇｇｃｔａｔｔｔｃｔｔｇｔｃｃａｔｃａｔｃ －３’（配列表の配列番号１５）

プライマー１２

５’－ ｇｇｇａａｔｇｔｃａｔａｇｇｃｔｇｃｃｃｇｇｃｃａｃｃｔｇｃａｇｇｃｔｇａｃｇｇｃａｇ －３’（配列表の配列番号１６）

プライマー１３

５’－ ｇｇｇａａｔｇｔｃａｔａｇｇｃｔｇｃｃｃｔｇｔｇｇｇｇｃｔｔｃｔｃｔｇｇｇｇｔｇｔｇ －３’（配列表の配列番号１７）

プライマー１４

５’－ ｇｇｇａａｔｇｔｃａｔａｇｇｃｔｇｃｃｃｇｇｃｃａｃｃｔｇｃａｇｇｃｔｇａｃｇｇｃａｇ －３’（配列表の配列番号１８）

プライマー１５

５’－ ｇｇｇｃａｇｃｃｔａｔｇａｃａｔｔｃｃｃｃｃｃａｇａｇ －３’（配列表の配列番号１９）

実施例１）－１－１と同様に精製を行い、精製後の各増幅物をＧａｔｅｗａｙ ＢＰ反応によりｐＤＯＮＲ２２１ ｖｅｃｔｏｒに組み込み、大腸菌ＴＯＰ１０を形質転換した。形質転換後に得られたクローンについてコロニーＰＣＲにてインサートサイズの確認を行った。

インサートの長さを確認した各クローンについて、ベクター側からインサートの方向へ１反応ずつのシークエンス反応を行い、インサートの３’及び５’の末端ＤＮＡ配列の確認を行った。

目的のインサートが確認されたクローンについて、下記プライマーを用いてインサートの全ＤＮＡ配列についても確認を行った。配列解析の結果、全て目的配列情報と完全に一致したことが確認された。

配列を確認した各エントリークローンとｐＦＬＡＧ－ｍｙｃ－ＣＭＶ－１９－ＤＥＳＴ（インビトロジェン社）でＧａｔｅｗａｙ ＬＲ反応を行った。大腸菌ＤＨ１０Ｂ（インビトロジェン社）の形質転換後に得られたクローンについてコロニーＰＣＲにてインサートサイズの確認を行った。

インサートの長さを確認した各クローンについて、インサートの３’及び５’の末端ＤＮＡ配列の解析を行い、目的インサートが正しく挿入されたことを確認した。以下、上記１）から６）を組み込んだ発現ベクターをそれぞれＢ７－Ｈ３ ＩｇＶ１、Ｂ７－Ｈ３ ＩｇＣ１、Ｂ７－Ｈ３ ＩｇＶ２、Ｂ７－Ｈ３ ＩｇＣ２、Ｂ７－Ｈ３ ＩｇＣ１－Ｖ２－Ｃ２、Ｂ７－Ｈ３ ＩｇＶ２－Ｃ２と記す。

本ベクターにクローニングされたＢ７－Ｈ３ ＩｇＶ１、Ｂ７－Ｈ３ ＩｇＣ１、Ｂ７－Ｈ３ ＩｇＶ２、Ｂ７－Ｈ３ ＩｇＣ２、Ｂ７－Ｈ３ ＩｇＣ１－Ｖ２－Ｃ２、Ｂ７－Ｈ３ ＩｇＶ２－Ｃ２遺伝子のＯＲＦ部分のヌクレ

オチド配列はそれぞれ配列表の配列番号２０、２２、２４、２６、２８、３０に示されている。またＢ７－Ｈ３　ＩｇＶ１、Ｂ７－Ｈ３　ＩｇＣ１、Ｂ７－Ｈ３　ＩｇＶ２、Ｂ７－Ｈ３　ＩｇＣ２、Ｂ７－Ｈ３　ＩｇＣ１－Ｖ２－Ｃ２、Ｂ７－Ｈ３　ＩｇＶ２－Ｃ２のアミノ酸配列は配列表の配列番号２１、２３、２５、２７、２９、３１に示されている。また、配列番号２０及び２１の配列は図１５に、配列番号２２及び２３の配列は図１６に、配列番号２４及び２５の配列は図１７に、配列番号２６及び２７の配列は図１８に、配列番号２８及び２９の配列は図１９に、配列番号３０及び３１の配列は図２０に各々記載されている。

１）－３　Ｂ７ファミリー遺伝子発現ベクターの作製

Ｂ７ファミリー遺伝子であるＢ７ＲＰ－１、Ｂ７－Ｈ１、Ｂ７－ＤＣを発現ベクターｐＣＭＶ６－ＸＬ－４に組み込んだ遺伝子発現ベクター、ｐＣＭＶ６－ＸＬ－４－Ｂ７ＲＰ－１、ｐＣＭＶ６－ＸＬ－４－Ｂ７－Ｈ１、ｐＣＭＶ６－ＸＬ－４－Ｂ７－ＤＣはいずれもＯｒｉｇｅｎｅ社より購入した。

[0160] Ｂ７ファミリー遺伝子であるＣＤ８０、ＣＤ８６、Ｂ７－Ｈ４を発現するベクターは以下のように作製した。

ＣＤ８０、ＣＤ８６、Ｂ７－Ｈ４をエントリーベクターｐＥＮＴＲ／２２１に組み込んだクローンであるｐＥＮＴＲ／２２１－ＣＤ８０、ｐＥＮＴＲ／２２１－ＣＤ８６、ｐＥＮＴＲ／２２１－Ｂ７－Ｈ４をインビトロジェン社から購入した。

配列を確認した各エントリークローンとｐｃＤＮＡ３．１－ＤＥＳＴ（インビトロジェン社）でＧａｔｅｗａｙ　ＬＲ反応を行った。大腸菌ＤＨ１０Ｂの形質転換後に得られたクローンについてコロニーＰＣＲにてインサートサイズの確認を行った。インサートの長さを確認した各クローンについて、インサートの３’及び５’の末端ＤＮＡ配列の解析を行い、目的インサートが正しく挿入されたことを確認した。

本ベクターにクローニングされたＢ７ＲＰ－１、Ｂ７－Ｈ１、Ｂ７－ＤＣ、ＣＤ８０、ＣＤ８６、Ｂ７－Ｈ４遺伝子のＯＲＦ部分のヌクレオチド配列は

それぞれ配列表の配列番号３２、３４、３６、３８、４０、４２に示されている。またＢ７ＲＰ－１、Ｂ７－Ｈ１、Ｂ７－ＤＣ、ＣＤ８０、ＣＤ８６、Ｂ７－Ｈ４のアミノ酸配列は配列表の配列番号３３、３５、３７、３９、４１、４３に示されている。

実施例２．モノクローナル抗体作製及び抗体スクリーニング

２）－１　免疫

４～６週齢のＢＡＬＢ／ｃＡｎＮＣｒｌＣｒｌｊマウス（日本チャールス・リバー社）、ＦｃｇＲII　ＫＯマウス（タコニック社、免疫生物学研究所）又はＧＡＮＰマウス（Ｔｒａｎｓｇｅｎｉｃ社）を使用した。０日目、７日目、１５日目、２４日目にベルセン（インビトロジェン）で剥がしたＬＮＣａＰ細胞、ＭＣＦ７細胞（ＡＴＣＣ）又はＡｓＰＣ１細胞（ＡＴＣＣ）を５ｘ１０^{6}細胞／マウスをマウス背部皮下に投与した。３１日目に同じ細胞を５ｘ１０^{6}細胞各マウスに静脈投与し、３４日目にマウス脾臓を採取しハイブリドーマ作製に用いた。

２）－２　ハイブリドーマの作製

脾臓細胞とマウスミエローマＰ３Ｘ６３Ａｇ８Ｕ．１細胞（ＡＴＣＣ）とをＰＥＧ４０００（ＩＢＬ社製）を用いて細胞融合しハイブリドーマを作製した。

[0161]　その結果、ＬＮＣａＰ細胞免疫マウスより計９６３９クローン、ＭＣＦ７細胞免疫マウスより４０４３クローン、ＡｓＰＣ１細胞免疫マウスより３６１７クローンのハイブリドーマを樹立した。得られたハイブリドーマ培養上清用いて抗体産生ハイブリドーマのＣＤＣアッセイによるスクリーニングを行った。

２）－３　抗体スクリーニング：ＣＤＣアッセイ

０日目に５０００ｃｅｌｌｓ／８０μＬとなるようにＬＮＣａＰ細胞又はＭＣＦ７細胞を希釈し、９６ｗｅｌｌ　ｐｌａｔｅに８０μＬ／ｗｅｌｌ添加し、一晩培養した。ハイブリドーマ培養上清を、細胞を播いたｐｌａｔｅに２０μＬ／ｗｅｌｌ　添加し、４℃で１時間静置した。ウサギ補体の希釈凍

結乾燥品（Ｃｅｄａｒｌａｎｅ社）に１バイアルあたり１ｍＬの滅菌水を氷上で添加した。１分間静置、混合したのち、１９ｍＬの０．１％　ＢＳＡ／ＲＰＭＩ　１６４０培地（ＢＳＡ　Ｓｉｇｍａ社）と混合した。３７℃で１時間反応を行った。

[0162] プレートを室温で３０分間放置し、室温に戻した。ＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ試薬（Ｐｒｏｍｅｇａ社）を各ウェルに１２０μＬ添加し、室温で１０分間反応した。プレートリーダー（ＡＲＶＯ　ＨＴＳ　Ｐｒｅｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ社）にて発光量を測定した。発光量の少ないウェルは、補体依存的な細胞死を誘導したと判断された。そのような補体依存的な細胞死を誘導した培養上清を産生するハイブリドーマを選択した。

その結果、それぞれＬＮＣａＰ免疫由来クローンより、２４クローン、ＭＣＦ７免疫由来クローンより３６クローン、ＡｓＰＣ１免疫由来クローンより３クローンのスクリーニング陽性クローンが得られた。

実施例３．抗原同定

３）－１　免疫沈降物の同定

３）－１－１　免疫沈降

ＭＣＦ７細胞を５－１０ｘ１０^{8}細胞培養した。これらの細胞はセルスクレーパーで剥離、回収した後、－８０度に凍結保存を行った。４℃に冷やした１％ＮＰ－４０（シグマアルドリッチ社）とＰｒｏｔｅａｓｅ　ｉｎｈｉｂｉｔｏｒ（ロシュ社）入りのＬｙｓｉｓ　ｂｕｆｆｅｒ　１０ｍｌを凍結細胞に添加し、氷上であわ立てないようにピペットでペレットを溶解した。完全にペレットが溶解したら氷上で、３０分放置した。可溶化したサンプルは、４℃、１００００－１５０００回転、２０分遠心分離し、上清を１５ｍｌファルコンチューブに移した。

Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｇ　ｓｅｐｈａｒｏｓｅ　４ＦＦ　ｂｅａｄｓ（アマシャムファルマシア社）５００μｌを３回洗浄し、Ｌｙｓｉｓ　ｂｕｆｆｅｒに置換した。氷上でｐｒｏｔｅｉｎ　Ｇ　ｓｅｐｈａｒｏｓｅ　４ＦＦ　ｂｅａｄｓ　５００μｌを可溶化したサンプル上清に添加し、一晩４℃で回転攪

拌した。

サンプルをＰｏｌｙｐｒｅｐ ｃｏｌｕｍｎ ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒａｐｈｙ ｃｏｌｕｍｎｓ（Ｂｉｏｒａｄ社）に通し、フォロースルーを免疫沈降サンプルとして用いた。

免疫沈降に用いる抗体液３μｇをリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）に置換した５０μｌのｐｒｏｔｅｉｎ Ｇ ｓｅｐｈａｒｏｓｅ ４ＦＦ ｂｅａｄｓに添加（１．５ｍｌ ｔｕｂｅ）、４℃にて１時間から１６時間回転攪拌して抗体をｂｅａｄｓに結合させた。免疫沈降サンプルに抗体が結合したｂｅａｄｓを添加し、４℃、３時間回転攪拌した。

カラムを空の１５ｍｌファルコンチューブに移し、６．５ｍｌ Ｌｙｓｉｓ ｂｕｆｆｅｒを添加した。この操作を４回繰り返した。

カラムの出口に蓋をして、５００μｌ Ｌｙｓｉｓ ｂｕｆｆｅｒでピペッティングし、１．５ｍｌチューブにｂｅａｄｓを回収した。この操作を２回繰り返した。

５０００回転で１分間、４℃遠心後、上清を静かに除き、９０μｌのＥｌｕｔｉｏｎ ｂｕｆｆｅｒ（１０ｍＭ Ｇｌｙｃｉｎｅ－ＨＣｌ ｐＨ２．０）を添加、ｖｏｌｔｅｘ後遠心した。１．５ｍｌ ｓｐｉｎ ｃｕｌｍｎのカラムを外し、１０μｌ １Ｍ Ｔｒｉｓ－ＨＣＬ、ｐＨ８．５を添加した。カラムを元に戻し、溶出分画を移し、１００００回転で１分間遠心した。１００μｌのサンプルを得た。

このサンプルを以下の３）－１－２に示すように、液層消化法によるＭＳ解析を行った。

３）－１－２　質量分析法による抗原同定

免疫沈降法により得られた画分を常法に従い、液層消化法にてトリプシン（モディファイドトリプシン、プロメガ社）を加え３７℃にて１６時間消化反応を行った。生成した消化ペプチドは液体クロマトグラフィー（ＬＣ）／タンデム質量分析装置（ＭＳ／ＭＳ）（サーモフィッシャーサイエンス社）に供した。得られた質量スペクトルデータは、データベース検索ソフトウエア

（Ｍａｓｃｏｔ、マトリクスサイエンス社）により分析した。データベースはＩｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｉｎｄｅｘ（ＩＰＩ）を用いた。その結果、３４種類の抗原が同定された。

同定された抗原情報の中から、細胞膜蛋白質であることを考慮した文献情報検索を行い、Ｂ７－Ｈ３（ＣＤ２９６）抗原（Ｂ７－Ｈ３バリアント１）に着目し、以下の３）－２及び３）－３の実験を行った。

３）－２　抗原遺伝子発現細胞の調製

ＮＩＨ－３Ｔ３細胞（ＡＴＣＣ）を５×１０^{4}細胞／ｃｍ^{2}になるようｃｏｌｌａｇｅｎ　ｔｙｐｅ　Ｉコートフラスコ（ＩＷＡＫＩ社製）に播種し１０％　ウシ胎児血清（ＦＢＳ）含有ＤＭＥＭ培地（インビトロジェン社）中で３７℃、５％　CO_2の条件下で１晩培養した。

翌日、実施例１）－１－１で作製されたｐｃＤＮＡ３．１－Ｂ７－Ｈ３、１）－１－２で作製されたｐｃＤＮＡ－ＤＥＳＴ４０－Ｂ７－Ｈ３バリアント２、及び空ベクターであるｐｃＤＮＡ－ＤＥＳＴ４０をそれぞれＮＩＨ－３Ｔ３細胞にＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００（インビトロジェン社製）を用いてトランスフェクションし、３７℃、５％　CO_2の条件下で更に１晩培養した。

翌日、トランスフェクションされたＮＩＨ－３Ｔ３細胞をトリプシン処理し、１０％　ＦＢＳ含有ＤＭＥＭで細胞を洗浄した後、５％ＦＢＳ含有ＰＢＳに懸濁した。得られた細胞懸濁液をフローサイトメトリー解析に使用した。

３）－３　フローサイトメトリー解析

ＭＳでＢ７－Ｈ３バリアント１を免疫沈降したハイブリドーマが産生する抗体のＢ７－Ｈ３に対する結合特異性をフローサイトメトリー法により確認した。実施例３）－２で調製した細胞懸濁液を遠心し、上清を除去した後、各ベクターをトランスフェクトしたＮＩＨ－３Ｔ３細胞に対しハイブリドーマ培養上清を加えて懸濁し、４℃で１時間静置した。

５％ＦＢＳ含有ＰＢＳで２回洗浄した後、５％ＦＢＳ含有ＰＢＳで１０００倍に希釈したＦｌｕｏｒｅｓｃｅｉｎ－ｃｏｎｊｕｇａｔｅｄ　ｇｏａｔ

ＩｇＧ ｆｒａｃｔｉｏｎ ｔｏ ｍｏｕｓｅ ＩｇＧ（Ｗｈｏｌｅ Ｍｏｌｅｃｕｌｅ）（ＩＣＮ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ社製 ＃５５４９３）を加えて懸濁し、４℃で１時間静置した。

５％ＦＢＳ含有ＰＢＳで２回洗浄した後、２μｇ／ｍｌ ７－ａｍｉｎｏａｃｔｉｎｏｍｙｃｉｎ Ｄ（インビトロジェン（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｏｂｅｓ）社製）を含む５％ＦＢＳ含有ＰＢＳに再懸濁し、フローサイトメーター（ＦＣ５００：ＢｅｃｋｍａｎＣｏｕｌｔｅｒ社）で検出を行った。データ解析はＦｌｏｗｊｏ（ＴｒｅｅＳｔａｒ社）で行った。

７－ａｍｉｎｏａｃｔｉｎｏｍｙｃｉｎ Ｄ陽性の死細胞をゲートで除外した後、生細胞のＦＩＴＣ蛍光強度のヒストグラムを作成した。

コントロールである空ベクターを導入したＮＩＨ－３Ｔ３細胞の蛍光強度ヒストグラムに対してＢ７－Ｈ３バリアント１発現ＮＩＨ－３Ｔ３細胞及びＢ７－Ｈ３バリアント２発現ＮＩＨ－３Ｔ３細胞のヒストグラムが強蛍光強度側にシフトしているサンプルを産生するハイブリドーマを抗Ｂ７－Ｈ３抗体産生ハイブリドーマとして取得した。

[0163] その結果、Ｌ７、Ｌ８、Ｌ１１、Ｍ３０、Ｍ３１の５クローンの抗Ｂ７－Ｈ３抗体産生ハイブリドーマ由来の抗体がＢ７－Ｈ３バリアント１及びＢ７－Ｈ３バリアント２と交差反応性を示すことが明らかとなった。

３）－４ モノクローナル抗体の癌細胞株に対する結合性の確認

実施例３）－３でＢ７－Ｈ３バリアント１及びＢ７－Ｈ３バリアント２への結合が確認されたモノクローナル抗体が、Ｂ７－Ｈ３バリアント１及びＢ７－Ｈ３バリアント２を高発現する癌細胞に結合するか否かを実施例３）－３と同様のフローサイトメトリー法で検討した。

トランスフェクションしたＮＩＨ－３Ｔ３細胞の代わりにヒト乳癌細胞株（ＭＤＡ－ＭＢ－２３１）（ＡＴＣＣ）、ヒト肺癌細胞株（ＮＣＩ－Ｈ３２２）（ＡＴＣＣ）が用いられた。その結果、樹立したモノクローナル抗体はいずれもこれらの癌細胞株に結合することが確認された。

３）－５ モノクローナル抗体のアイソタイプ決定

モノクローナル抗体のアイソタイプは、Ｍｏｕｓｅ ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ ｉｓｏｔｙｐｉｎｇ ｋｉｔ（Ｓｅｒｏｔｅｃ社製）により決定された。その結果、抗Ｂ７－Ｈ３抗体産生ハイブリドーマ（Ｌ７、Ｌ８、Ｌ１１、Ｍ３０、Ｍ３１）由来の抗体のアイソタイプは、いずれもＩｇＧ２ａであった。

３）－６　モノクローナル抗体の調製

モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ移植マウスの腹水又はハイブリドーマ培養上清（以下「抗体精製原料」という。）から精製した。

[0164] マウス腹水は以下のように調製した。まず、７－８週齢のＢＡＬＢ／ｃＡＪｃｌ－ｎｕ／ｎｕ（日本クレア）をプリスタン（Ｓｉｇｍａ社製）処理し、約３週間後に生理食塩水で洗浄したハイブリドーマをマウス１匹あたり１×１０^{7}細胞で腹腔内に移植した。１－２週間後に腹腔内に貯留した腹水を採取し０．２２μｍのフィルターを通して滅菌し抗体精製原料として用いた。

[0165] ハイブリドーマ培養上清はＣＥＬＬｉｎｅ（ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ社製）を使用し調製した。培地にＣｌｏｎａＣｅｌｌ－ＨＹ Ｇｒｏｗｔｈ Ｍｅｄｉｕｍ Ｅ（ＳｔｅｍＣｅｌｌ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製 ＃０３８０５）を用いる点以外はメーカーの指示書に従い培養した。回収された培養上清は０．４５μｍフィルターで濾過し、抗体精製原料として用いた。

[0166] 抗体はＲｅｃｏｍｂｉｎａｔ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ａ ｒＰＡ５０（ＲｅｐｌｉＧｅｎ社製）をホルミルーセルロファイン（生化学工業社製）に固定化したアフィニテイーカラム（以下「ホルミルセルロファインＰｒｏｔｅｉｎ Ａ」と略す）又はＨｉｔｒａｐ ＭａｂＳｅｌｅｃｔ ＳｕＲｅ（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ Ｂｉｏ－Ｓｃｉｅｎｃｅｓ社製）で精製された。ホルミルセルロファインＰｒｏｔｅｉｎ Ａでは、抗体精製原料を結合バッファー（３Ｍ ＮａＣｌ，１．５Ｍ Ｇｌｙｃｉｎｅ ｐＨ８．９）で３倍希釈したものをカラムに添加し、結合バッファーで洗浄後、０．１Ｍ クエン酸 ｐＨ４．０で溶出した。

一方、Ｈｉｔｒａｐ　ＭａｂＳｅｌｅｃｔ　ＳｕＲｅ（ＧＥヘルスケア社）では、抗体精製原料をカラムに添加しＰＢＳで洗浄後、２Ｍ　Ａｒｇｉｎｅ－ＨＣｌ　ｐＨ４．０で溶出した。

溶出された抗体溶液は中和後、ＰＢＳにバッファー置換された。

[0167] 抗体の濃度はＰＯＲＯＳ　Ｇ　２０μｍ　Ｃｏｌｕｍｎ，ＰＥＥＫ，４．６ｍｍ×１００ｍｍ，１．７ｍｌ（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）に結合させた抗体を溶出し、溶出液の吸光度（Ｏ．Ｄ．２８０ｎｍ）を測定することにより求めた。具体的には、平衡化バッファー（３０．６ｍＭリン酸２水素ナトリウム・１２水、１９．５ｍＭ　リン酸１カリウム、０．１５Ｍ　ＮａＣｌ、ｐＨ７．０）で平衡化したＰＯＲＯＳ　Ｇ　２０μｍにＰＢＳで希釈した抗体サンプルを添加し、平衡化バッファーでカラムを洗浄後、カラムに結合した抗体を溶離液（０．１％（ｖ／ｖ）　ＨＣｌ、０．１５Ｍ　ＮａＣｌ）で溶出した。溶出液の吸光度（Ｏ．Ｄ．２８０ｎｍ）のピーク面積を測定し、次式で濃度を算出した。

[0168] 抗体サンプル濃度（ｍｇ／ｍｌ）＝（抗体サンプルのピーク面積）／（標準品（ヒトＩｇＧ１）のピーク面積）×標準品の濃度（ｍｇ／ｍｌ）×サンプルの希釈倍率

また、得られた抗体に含まれるエンドトキシン濃度をエンドスペシーＥＳ－５０Ｍセット（生化学工業　＃０２０１５０）とエンドトキシン標準品ＣＳＥ－Ｌセット（生化学工業　＃０２００５５）を用いて測定し、１ＥＵ／ｍｇ以下であることを確認し以下の実験に使用した。

実施例４．抗Ｂ７－Ｈ３抗体の性質

４）－１　ＡＤＣＰ活性

Ｂａｌｂ／ｃ－ｎｕ／ｎｕマウス（♀、６－１０ｗｋ）（日本チャールズリバー社）に１．５ｍＬのチオグリコレートを腹腔内投与した。５日後に腹腔中のマクロファージ細胞を回収した。５００μＬ／ｗｅｌｌ（１ｘ10^5　ｃｅｌｌ／ｗｅｌｌ）を２４　ｗｅｌｌ　ｐｌａｔｅに添加し、３７℃で１晩培養した。本細胞をエフェクター細胞とした。

ターゲット細胞となるＮＣＩ－Ｈ３２２細胞のラベリングをＰＫＨ２６　ｄｙｅ　ｌａｂｅｌｉｎｇ　ｋｉｔ（Ｓｉｇｍａ社）を用いて行った。ターゲット細胞をＴｒｙｐＬＥ（インビトロジェン社）で剥離し、ＰＢＳで２回洗浄した。細胞をＤｉｌｕｅｎｔ　Ｃで1×10^7 ｃｅｌｌｓ／ｍｌになるよう懸濁した。ＰＫＨ２６　ｄｙｅ　ｓｔｏｃｋ（１ｍＭ）をＤｉｌｕｅｎｔ　Ｃで８μＭに希釈し、すぐに細胞浮遊液と等量のｄｙｅ希釈液を添加した。室温に５分間放置した。血清１ｍｌを添加し、更に血清入り培地を加え２回洗浄を行った。本細胞をターゲット細胞とした。

[0169] 実施例３）－６で得られた抗体を培養液で２０μｇ／ｍｌに希釈した。次に実施例４）－１－１で得られたターゲット細胞を、2×10^6／１００μｌ／ｔｕｂｅに分注し、混合した。氷上で３０分間静置した。上清を捨て、培養液で２回洗浄した。培養液５００μＬに懸濁した。エフェクター細胞から上清を除き、抗体を処理し培養液にサスペンドした細胞を添加し、混合した。CO_2インキュベータ内で３時間培養した。Ｔｒｙｐｓｉｎ－ＥＤＴＡで細胞を剥離し、細胞を回収した。回収した細胞にＦＩＴＣ標識抗マウスＣＤ１１ｂ抗体（ベクトンディッキンソン社）を加え、氷上で３０分間静置した。上清を捨て、培養液で２回洗浄した。回収した細胞を３００μｌの培養液で懸濁し、ＦＡＣＳ　Ｃａｌｉｂｕｒ（ベクトンディッキンソン社）にて測定を行った。ＣＤ１１ｂ陽性のマクロファージ細胞において、ＰＫＨ２６陽性画分を貪食陽性細胞として評価を行った（ｎ＝３）。

[0170] その結果、図１に示されるように、Ｌ７、Ｌ８、Ｌ１１、Ｍ３０、Ｍ３１はそれぞれマクロファージによるＮＣＩ－Ｈ３２２細胞の貪食率を４８．０±０．９％、５２．３±１．１％、５７．１±２．５％、６１．９±２．１％、５７．７±３．０％誘導したことから、Ｌ７、Ｌ８、Ｌ１１、Ｍ３０、Ｍ３１抗体はＮＣＩ－Ｈ３２２細胞に対してＡＤＣＰ活性を有することが示された。

[0171] 同様に、市販の抗Ｂ７－Ｈ３抗体を入手し、そのＡＤＣＰ活性を測定した。ラット抗ヒトＢ７－Ｈ３抗体ＭＩＨ３５（ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ社）、

マウス抗ヒトＢ７－Ｈ３抗体１８５５０４（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ社）、ＭＩＨ４２（Ｓｅｒｏｔｅｃ社）、ＤＣＮ７０（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ社）をそれぞれ入手した。これら抗体がＢ７－Ｈ３と結合することを実施例３）－３と同様の方法で確認した。これらの抗体を用いて、上記の方法にてＡＤＣＰ活性を測定した。

その結果、図２に示されるように、ＭＩＨ３５、ＭＩＨ４２、ＤＣＮ７０を１μｇ／ｍｌ添加した際、それぞれマクロファージによるＮＣＩ－Ｈ３２２細胞の貪食を４．２％、８．２％、１０．８％誘導した。このことから、ＭＩＨ３５、ＭＩＨ４２、ＤＣＮ７０はほとんどＡＤＣＰ活性を示さないことが明らかとなった。

これらのことより、今回のスクリーニングにより得られたＢ７－Ｈ３認識クローンＭ３０は市販Ｂ７－Ｈ３抗体と比較して特に強いＡＤＣＰ活性を有することが示された。

４）－２　ＡＤＣＣ活性

４）－２－１　エフェクター細胞の調製

ヌードマウスであるＣＡｎＮ．Ｃｇ－Ｆｏｘｎ１^{nu}／ＣｒｌＣｒｌｊ（日本チャールス・リバー社）より無菌的に脾臓を採取した。採取した脾臓を２枚のスライドグラスでホモジナイズし、ＢＤ　Ｐｈａｒｍ　Ｌｙｓｅ（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ社製　＃５５５８９９）を用いて溶血処理を行った。得られた脾臓細胞をＦｅｔａｌ　Ｂｏｖｉｎｅ　Ｓｅｒｕｍ，　Ｕｌｔｒａ－ｌｏｗ　ＩｇＧ（インビトロジェン社製）を１０％含むフェノールレッド不含ＲＰＭＩ１６４０（インビトロジェン社製）（以下「ＡＤＣＣ用培地」と略す。）に懸濁し、セルストレイナー（ポアサイズ４０μｍ：ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ社製）を通した後、生細胞数をトリパンブルー色素排除試験にて計測した。脾臓細胞懸濁液を遠心後、培地を除去し、生細胞密度で１．５×１０^{7}細胞／ｍｌになるようＡＤＣＣ用培地で再懸濁しエフェクター細胞とした。

４）－２－２　標的細胞の調製

実施例３）－３と同様の方法で作製したＢ７－Ｈ３発現２９３細胞（ＡＴＣＣ）及び空ベクターを発現した２９３細胞をトリプシン処理し、１０％　ＦＢＳ含有ＲＰＭＩ１６４０（インビトロジェン社）で細胞を洗浄後、１０％　ＦＢＳ含有ＲＰＭＩ１６４０に再懸濁し、各細胞４×１０^{6}個を０．２２μｍフィルターで滅菌したＣｈｒｏｍｉｕｍ－５１（５５５０ｋＢｑ）と混合し、３７℃、５％　CO_2の条件下で１時間ラベルした。ラベルした細胞を１０％　ＦＢＳ含有ＲＰＭＩ１６４０（インビトロジェン社）で３回洗浄し、ＡＤＣＣ用培地で２×１０^{5}細胞／ｍｌになるよう再懸濁し標的細胞とした。

４）－２－３　^{51}Ｃｒリリースアッセイ

２×１０^{5}細胞／ｍｌの標的細胞を５０μｌ／ウェルで９６穴Ｕ底マイクロプレートに分注した。そこにエフェクター細胞添加後の終濃度で２．５μｇ／ｍｌになるようＡＤＣＣ用培地で希釈したＭ３０、アイソタイプコントロール抗体（ｍＩｇＧ２ａ）（ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ社）を５０μｌ添加し、４℃で１時間静置した。そこに１．５×１０^{7}細胞／ｍｌのエフェクター細胞を１００μｌ添加し、３７℃、５％　CO_2の条件下で一晩培養した。翌日、上清をＬｕｍａＰｌａｔｅ（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ社製）に回収し、ガンマカウンターで放出されたガンマ線量を測定した。ＡＤＣＣ活性による細胞溶解率は次式で算出した。

[0172]　細胞溶解率（％）＝（Ａ－Ｂ）／（Ｃ－Ｂ）×１００

Ａ：サンプルウェルのカウント

Ｂ：自然放出（抗体・エフェクター細胞非添加ウェル）カウントの平均値（ｎ＝３）。抗体添加時とエフェクター細胞添加時にそれぞれＡＤＣＣ用培地を５０μｌ、１００μｌ添加した。それ以外はサンプルウェルと同様の操作を行った。

[0173]　Ｃ：最大放出（標的細胞を界面活性剤で溶解させたウェル）カウントの平均値（ｎ＝３）。抗体添加時にＡＤＣＣ用培地を５０μｌ、エフェクター細胞添加時にＴｒｉｔｏｎ－Ｘ１００を２％（ｖ／ｖ）含むＡＤＣＣ用培地を１００μｌを添加した。それ以外はサンプルウェルと同様の操作を行った。

[0174] ３回の実験の平均値で、エラーバーは、標準偏差を示し、Ｐ値はＳｔｕｄｅｎｔ’ｓ　ｔ－ｔｅｓｔにより算出した。測定結果を図３に示した。

その結果、Ｍ３０は、Ｂ７－Ｈ３発現２９３細胞に対して３１．６±３．３％の細胞溶解活性を示したことから、Ｍ３０抗体はＢ７－Ｈ３発現２９３細胞に対してＡＤＣＣ活性を有することが示された。

４）－３　ＣＤＣ活性

実施例２）－３－１に示す方法と同様の手法で実験を行った。評価細胞にはＮＣＩ－Ｈ３２２細胞を用いた。補体添加後の終濃度で２５μｇ／ｍｌになるように１０％ＦＢＳ含有ＲＰＭＩ１６４０（抗生物質入り：ペニシリン、ストレプトマイシン）で希釈した実施例３）－６で得られた抗Ｂ７－Ｈ３抗体（Ｌ７、Ｌ８、Ｌ１１、Ｍ３０、Ｍ３１）及びアイソタイプコントロール抗体（ｍＩｇＧ２ａ）を添加し、４℃で１時間静置した。そこにＲＰＭＩ１６４０で３０％に希釈したウサギ補体（ＣＥＤＡＲＬＡＮＥ社製　＃ＣＬ３０５１）を終濃度で５％になるよう添加し３７℃、５％　CO_2の条件下で１時間インキュベートし、更に室温で３０分間静置した。細胞生存率を測定するため、培養液と等量のＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ　Ｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｔ　Ｃｅｌｌ　Ｖｉａｂｉｌｉｔｙ　Ａｓｓａｙ（Ｐｒｏｍｅｇａ社製）を添加し、室温で１０分間攪拌した後、プレートリーダーで発光量を計測した。細胞生存率は次式で算出した。

[0175] 細胞生存率（％）＝（ａ－ｂ）／（ｃ－ｂ）×１００

ａ：サンプルウェルの発光量

ｂ：バックグラウンド（細胞・抗体非添加ウェル）発光量の平均値（ｎ＝３）。細胞播種時に細胞懸濁液の代わりに等量の１０％ＦＢＳ含有ＲＰＭＩ１６４０（抗生物質入り：ペニシリン、ストレプトマイシン）を添加し、抗体添加時に抗体希釈液と等量の１０％ＦＢＳ含有ＲＰＭＩ１６４０（抗生物質入り：ペニシリン、ストレプトマイシン）を添加した。それ以外はサンプルウェルと同様の操作を行った。

[0176] ｃ：抗体非添加ウェルの発光量の平均値（ｎ＝３）。抗体添加時に抗体希

釈液と等量の１０％ＦＢＳ含有ＲＰＭＩ１６４０（抗生物質入り：ペニシリン、ストレプトマイシン）を添加した。それ以外はサンプルウェルと同様の操作を行った。

[0177] 測定結果を図４に示した。３回の実験の平均値で、エラーバーは、標準偏差を示している。その結果、コントロール抗体、Ｌ７、Ｌ８、Ｌ１１、Ｍ３０、Ｍ３１は、それぞれ補体存在下でＮＣＩ－Ｈ３２２細胞に対し１０１．５±３．３％、６．３±４．２％、１３．６±９．１％、７．２±１．４％、７．５±１．８％、１２．８±２．０％の細胞生存率の低下を誘導したことから、Ｌ７、Ｌ８、Ｌ１１、Ｍ３０、Ｍ３１抗体はＮＣＩ－Ｈ３２２細胞に対しＣＤＣ活性を有することが示された。

４）－４　結合ドメインの決定

Ｍ３０がＢ７－Ｈ３のどのドメインに結合するかを実施例３）－３と同様のフローサイトメトリー法で検討した。実施例１）－１－３にて調整された各Ｂ７－Ｈ３部分蛋白質発現ベクターをトランスフェクションしたＮＩＨ－３Ｔ３細胞が用いられた。

その結果、図５に示すようにＭ３０は、Ｂ７－Ｈ３　ＩｇＣ１、Ｂ７－Ｈ３　ＩｇＣ２、Ｂ７－Ｈ３　ＩｇＣ１－Ｖ２－Ｃ２、Ｂ７－Ｈ３　ＩｇＶ２－Ｃ２に結合することが確認された。Ｂ７－Ｈ３　ＩｇＶ１、Ｂ７－Ｈ３　ＩｇＶ２には結合しなかった。

このことから、Ｍ３０はＢ７－Ｈ３のＣ１ドメイン（配列番号６のアミノ酸番号１４０乃至２４４に示されるアミノ酸配列）及びＣ２ドメイン（配列番号６のアミノ酸番号３５８乃至４５６に示されるアミノ酸配列）に結合することが示された。同様にして、Ｌ８、Ｌ１１及びＭ３１もＣ１ドメイン及びＣ２ドメインに結合することが示され、Ｌ７はＶ１ドメイン（配列番号６のアミノ酸番号２７乃至１３９に示されるアミノ酸配列）及びＶ２ドメイン（配列番号６のアミノ酸番号２４５乃至３５７に示されるアミノ酸配列）に結合することが示された。

[0178] よって、Ｍ３０はＢ７－Ｈ３の細胞外領域中のドメインであるＩｇＣ１ド

メイン及び／又はＩｇＣ２ドメインにおけるエピトープを認識して、ＩｇＣ１ドメイン若しくはＩｇＣ２ドメイン又は両者に結合することが示された。

４）－５　抗原特異性

Ｍ３０の抗原特異性を実施例３）－３と同様のフローサイトメトリー法で検討した。

実施例１）－１－４にて調整されたＢ７ファミリー蛋白質であるＣＤ８０、ＣＤ８６、Ｂ７－ＲＰ－１、Ｂ７－Ｈ１、Ｂ７－ＤＣ、Ｂ７－Ｈ４蛋白質発現ベクターをそれぞれトランスフェクションした２９３Ｔ細胞が用いられた。

その結果、Ｍ３０はＢ７ファミリー分子である、ＣＤ８０、ＣＤ８６、Ｂ７－ＲＰ－１、Ｂ７－Ｈ１、Ｂ７－ＤＣ、Ｂ７－Ｈ４へ結合しないことが示された。

実施例５．ｉｎ　ｖｉｖｏ抗腫瘍効果

５）－１　抗Ｂ７－Ｈ３抗体のｉｎ　ｖｉｖｏ抗腫瘍効果

ＮＣＩ－Ｈ３２２細胞をトリプシン処理して培養フラスコより剥がした後、１０％ＦＢＳ含有ＲＰＭＩ１６４０（インビトロジェン社）に懸濁後遠心し、上清を除去した。細胞を同培地で２回洗浄したあと、生理食塩水（大塚製薬工場製）に懸濁し、６週齢のＢＡＬＢ／ｃＡＪｃｌ－ｎｕ／ｎｕ（日本クレア社）に１×１０^{7}細胞／マウスで腋窩部皮下に移植した。移植日を０日目として１０、１７、２４、３１、３８日目にＬ７、Ｌ８、Ｌ１１、Ｍ３０、Ｍ３１抗体を５００μｇ／マウス（約２５ｍｇ／ｋｇ）で腹腔内投与した。コントロールには抗体と同体積（５００μｌ）のＰＢＳを腹腔内投与した。腫瘍体積を１０、１７、２４、３１、３８、４５日目に測定し、抗体投与による抗腫瘍効果を検討した。

その結果、Ｍ３０、Ｍ３１投与群ではＰＢＳ投与群に比べ、有意に腫瘍増殖が抑制された（４５日目時点の腫瘍体積についてＰＢＳ投与群との比較でＭ３０、Ｍ３１のＰ値はそれぞれＰ＜０．０５、Ｐ＜０．０１であった。Ｐ値はＳｔｕｄｅｎｔ’ｓ　ｔ－ｔｅｓｔにより算出）。また、４５日目時点で

の腫瘍増殖阻害率（＝１００－（抗体投与群の腫瘍体積の平均値）／（ＰＢＳ投与群の腫瘍体積の平均値）×１００）はＬ７、Ｌ８、Ｌ１１、Ｍ３０、Ｍ３１でそれぞれ－１６．１％、０．２％、２５．５％、４７．２％、５８．２％であった。Ｍ３０、Ｍ３１抗体でｉｎ　ｖｉｖｏで非常に強い抗腫瘍効果が観察された（図６）。

[0179] 以上の結果より、Ｍ３０及びＭ３１抗体がＢ７－Ｈ３抗原を認識し、抗腫瘍効果を示す抗体であることが明らかとなった。

５）－２　貪食細胞を除去した場合のｉｎ　ｖｉｖｏ抗腫瘍効果

生体内の貪食細胞を除去するため、クロドロネート封入リポソームを作製した。即ち、クロドロネート封入リポソームを生体内に投与することにより、生体内の貪食細胞（マクロファージ）が除去されることが報告されており（Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ　ｍｅｔｈｏｄｓ　１９９４年、第１７４巻、ｐ．８３－９３）、当該報告の方法に従い、クロドロネート封入リポソームを作製して、以下の実験に供した。

[0180] ＮＣＩ－Ｈ３２２細胞をトリプシン処理して培養フラスコより剥がした後、１０％ＦＢＳ含有ＲＰＭＩ１６４０（インビトロジェン社）に懸濁後遠心し、上清を除去した。当該細胞を同培地で２回洗浄したあと、生理食塩水（ＰＢＳ、大塚製薬工場製）に懸濁し、６週齢のＢＡＬＢ／ｃＡＪｃｌ－ｎｕ／ｎｕ（日本クレア社）に1×10^{7}細胞／マウスで腋窩部皮下に移植した。移植日を－１４日目として０日目に群分けを行った。

マウス生体内のマクロファージを除去する群には、クロドロネート封入リポソームを０、４、７、１１、１４、１８、２１、２５、２８、３２日目に０．２ｍＬ／マウスで静脈注射した。また、陰性対照群にはＰＢＳを同日（０、４、７、１１、１４、１８、２１、２５、２８、３２日目）に０．２ｍＬ／マウスで静脈注射した。

次に、上記両群にＭ３０抗体を１、８、１５、２２、２９日目に５００μｇ／マウス（約２５ｍｇ／ｋｇ）で腹腔内投与した。また、陰性対照としてＭ３０抗体と同体積（５００μｌ）のＰＢＳを同日（１、８、１５、２２、２

９日目）に上記両群に腹腔内投与した。

腫瘍体積を０、８、１５、２２、２９、３６日目に測定し、抗体投与による抗腫瘍効果を検討した（ｎ＝８）。

その結果を表１、表２及び図７に示す。

[0181] [表1]

腫瘍体積	０日目		８日目		１５日目	
	平均値 (mm^3)	標準偏差	平均値 (mm^3)	標準偏差	平均値 (mm^3)	標準偏差
PBS+PBS 投与群	104.375	6.491581086	149	10.60828517	227.5	18.20027472
Clod lip+PBS 投与群	114.625	4.862162585	159.375	7.676349346	318.625	26.37567704
PBS+M30 投与群	103.5	7.221001118	123.625	14.89958952	145	19.58497967
Clod lip+M30 投与群	104.625	5.47049717	143.375	10.46753058	247.75	24.44947414

腫瘍体積	２２日目		２９日目		３６日目	
	平均値 (mm^3)	標準偏差	平均値 (mm^3)	標準偏差	平均値 (mm^3)	標準偏差
PBS+PBS 投与群	394.75	25.77772433	601.25	43.17065389	827	50.82638516
Clod lip+PBS 投与群	443.625	23.52653327	619.75	40.9550058	1002.75	78.18493415
PBS+M30 投与群	186.25	25.920035	301.75	47.13610612	415.25	79.84175197
Clod lip+M30 投与群	384.25	40.10644319	641.375	80.12176838	837.25	121.349223

[0182] ＰＢＳ静脈投与＋Ｍ３０抗体腹腔内投与群（ＰＢＳ＋Ｍ３０投与群）では、陰性対象となるＰＢＳ静脈投与＋ＰＢＳ腹腔内投与群（ＰＢＳ＋ＰＢＳ投与群）に比べ、有意に腫瘍増殖が抑制された。即ち、３６日目時点の腫瘍体積についてＰＢＳ＋ＰＢＳ投与群との比較でＰＢＳ＋Ｍ３０投与群のＰ値はＰ＜０．０５であった（Ｐ値はＳｔｕｄｅｎｔ’ｓ　ｔ－ｔｅｓｔにより算出）。また、３６日目時点での腫瘍増殖阻害率（＝１００－（ＰＢＳ＋Ｍ３０投与群の腫瘍体積の平均値）／（ＰＢＳ＋ＰＢＳ投与群の腫瘍体積の平均値）×１００）は４９．８％であった（表２）。

一方、クロドロネート封入リポソーム静脈投与＋ＰＢＳ腹腔内投与群（Ｃｌｏｄ　ｌｉｐ＋ＰＢＳ投与群）及びクロドロネート封入リポソーム静脈投与＋Ｍ３０抗体腹腔内投与群（Ｃｌｏｄ　ｌｉｐ＋Ｍ３０投与群）では腫瘍増殖の抑制は認められなかった。即ち、３６日目時点の腫瘍体積についてＰＢＳ＋ＰＢＳ投与群との比較でＣｌｏｄ　ｌｉｐ＋ＰＢＳ投与群およびＣｌｏ

ｄ　ｌｉｐ＋Ｍ３０投与群のＰ値はそれぞれＰ＝０．５２、Ｐ＝１であった（Ｐ値はＳｔｕｄｅｎｔ’ｓ　ｔ－ｔｅｓｔにより算出）。また、３６日目時点での腫瘍増殖阻害率（＝１００－（Ｃｌｏｄ　ｌｉｐ＋ＰＢＳ投与群又はＣｌｏｄ　ｌｉｐ＋Ｍ３０投与群の腫瘍体積の平均値）／（ＰＢＳ＋ＰＢＳ投与群の腫瘍体積の平均値）×１００）はそれぞれ－２１．２％、－１．４％であった（表２）。

[0183] [表2]

腫瘍増殖阻害率（%）	８日目	１５日目	２２日目	２９日目	３６日目
Clod lip+PBS 投与群	－６．６	－３９．４	－１２．６	－３．５	－２１．２
PBS+M30 投与群	１７．５	３６．４	５２．８	４９．７	４９．８
Clod lip+M30 投与群	３．２	－８．６	２．６	－６．６	－１．４

[0184] 以上の結果より、Ｍ３０抗体の抗腫瘍効果はクロドロネート封入リポソーム投与により抑制されたことが示されたことから、Ｍ３０抗体の抗腫瘍効果は主にマクロファージを介した効果であることが明らかとなった。

実施例６．マウス抗体Ｍ３０のｃＤＮＡのクローニングと配列の決定

６）－１　マウス抗体Ｍ３０の重鎖及び軽鎖のＮ末端アミノ酸配列の決定

マウス抗体Ｍ３０の重鎖及び軽鎖のＮ末端アミノ酸配列を決定するために、実施例３）－６で精製したマウス抗体Ｍ３０をＳＤＳ－ＰＡＧＥで分離した。分離後のゲルからＰＶＤＦ膜（ポアサイズ　０．４５μｍ；インビトロジェン社製）にゲル中のタンパク質を転写し、洗浄バッファー（２５ｍＭ　ＮａＣｌ、１０ｍＭホウ酸ナトリウムバッファー　ｐＨ８．０）で洗浄した後、染色液（５０％メタノール、２０％酢酸、０．０５％クマシーブリリアントブルー）に５分間浸して染色してから、９０％メタノールで脱色した。

ＰＶＤＦ膜上で可視化された重鎖（移動度が小さい方のバンド）及び軽鎖（移動度が大きい方のバンド）に相当するバンド部分を切りとった。

軽鎖に相当するバンドについては、少量の０．５％ポリビニルピロリドン／１００ｍＭ酢酸溶液中で、３７℃で３０分間保温した後、水でよく洗浄し、次に、Ｐｆｕピログルタミン酸アミノペプチダーゼキット（タカラバイオ株

式会社）を用いて修飾Ｎ末端残基を除去し、水で洗浄した後風乾した。Ｐｒｏｃｉｓｅ（登録商標）ｃＬＣプロテインシーケンサーＭｏｄｅｌ４９２ｃＬＣ（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）を用いて、自動エドマン法（Ｅｄｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．（１９６７）Ｅｕｒ．Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．１，８０参照）によりそれぞれのＮ末端アミノ酸配列の同定を試みた。

その結果、マウス抗体Ｍ３０の重鎖に相当するバンドのＮ末端のアミノ酸配列は、

ＥＶＱＬＱＱＳＧＰＥ（配列表の配列番号４４）

であり、軽鎖に相当するバンドのＮ末端アミノ酸配列は、

ＩＶＬＳＱＳＰＴＩＬＳＡＳＰ（配列表の配列番号４５）

であった。

６－２）マウス抗体Ｍ３０産生ハイブリドーマからのｍＲＮＡの調製

マウス抗体Ｍ３０の重鎖及び軽鎖をコードするｃＤＮＡをクローニングするため、マウス抗体Ｍ３０産生ハイブリドーマよりＱｕｉｃｋ　Ｐｒｅｐ　ｍＲＮＡ　Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ　Ｋｉｔ（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ社）を用いてｍＲＮＡを調製した。

６－３）マウス抗体Ｍ３０のｃＤＮＡのクローニングと配列の決定

マウス抗体Ｍ３０の重鎖及び軽鎖のアイソタイプがγ２ａとκであること（実施例３）－５）、実施例１－１）で決定した重鎖及び軽鎖のＮ末端アミノ酸配列、及び抗体のアミノ酸配列データベース（Ｋａｂａｔ，Ｅ．Ａ．ｅｔ　ａｌ．，（１９９１）　ｉｎ　Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ　ｏｆ　Ｐｒｏｔｅｉｎｓ　ｏｆ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｉｎｔｅｒｅｓｔ　Ｖｏｌ．Ｉ及びＩＩ，Ｕ．Ｓ．Ｄｅｐａｒｔｍｅｎｔ　ｏｆ　Ｈｅａｌｔｈ　ａｎｄ　Ｈｕｍａｎ　Ｓｅｒｖｉｃｅｓ参照）を参考にして、抗体遺伝子翻訳領域の５’末端側と終止コドンを含む３’末端部分にそれぞれハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプライマーをいくつか合成し、実施例６－２）で調製したｍＲＮＡとＴａＫａＲａ　Ｏｎｅ　Ｓｔｅｐ　ＲＮＡ　ＰＣＲ　Ｋｉｔ（ＡＭＶ）（タカラバイオ社）を用いて重鎖、及び軽鎖をコードするｃＤＮＡ

を増幅したところ、下記のプライマーセットで抗体の重鎖、及び軽鎖をコードするｃＤＮＡを増幅することができた。

重鎖用プライマーセット

プライマー１６

５’－ａａｇａａｔｔｃａｔｇｇａａｔｇｇａｇｔｔｇｇａｔａ－３’（配列表の配列番号４６）

プライマー１７

５’－ａａｇａｔａｔｃｔｃａｔｔｔａｃｃｃｇｇａｇｔｃｃｇｇｇａｇａａ－３’（配列表の配列番号４７）

軽鎖用プライマーセット

プライマー１８

５’－ａａｇａａｔｔｃａｔｇｇａｔｔｔｔｃｔｇｇｔｇｃａｇ－３’（配列表の配列番号４８）

プライマー１９

５’－ａａｇａｔａｔｃｔｔａａｃａｃｔｃａｔｔｃｃｔｇｔｔｇａａｇｃｔ－３’（配列表の配列番号４９）

ＰＣＲで増幅された重鎖、及び軽鎖のｃＤＮＡをそれぞれｐＥＦ６／Ｖ５－Ｈｉｓ　ＴＯＰＯ　ＴＡ　Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　Ｋｉｔ（インビトロジェン社）を用いてクローニングし、クローニングされた重鎖、軽鎖の各ヌクレオチド配列を遺伝子配列解析装置（「ＡＢＩ　ＰＲＩＳＭ　３７００　ＤＮＡ　Ａｎａｌｙｚｅｒ；Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ」又は「Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ　３７３０ｘｌ　Ａｎａｌｙｚｅｒ；Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ」）を用いて決定した。シーケンスの反応は、ＧｅｎｅＡｍｐ　９７００（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ社）を用いた。

決定されたマウス抗体Ｍ３０の重鎖をコードするｃＤＮＡのヌクレオチド配列を配列表の配列番号５０に示し、アミノ酸配列を配列番号５１に示した。また、配列番号５０及び５１の配列は図２１に記載されている。

決定されたマウス抗体Ｍ３０の軽鎖をコードするｃＤＮＡのヌクレオチド配列を配列表の配列番号５２に示し、アミノ酸配列を配列表の配列番号５３に示した。また、配列番号５２及び５３の配列は図２２に記載されている。

また、重鎖及び軽鎖のアミノ酸配列を、抗体のアミノ酸配列のデータベースであるＫａｂａｔＭａｎ（ＰＲＯＴＥＩＮＳ：Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ，　Ｆｕｎｃｔｉｏｎ　ａｎｄ　Ｇｅｎｅｔｉｃｓ，２５（１９９６），１３０－１３３．参照）を用いて比較検討した結果、マウス抗体Ｍ３０の重鎖については、配列表の配列番号５１のアミノ酸番号２０乃至１４１に示されるアミノ酸配列が可変領域であることが明らかになった。またマウス抗体Ｍ３０の軽鎖については、配列表の配列番号５３のアミノ酸番号２３乃至１３０に示されるアミノ酸配列が可変領域であることが明らかとなった。

実施例７．キメラ抗体Ｍ３０（ｃＭ３０抗体）の作製

７）－１　汎用発現ベクターｐＥＦ６ＫＣＬ及びｐＥＦ１ＦＣＣＵの作製

７）－１－１　キメラ及びヒト化軽鎖発現ベクターｐＥＦ６ＫＣＬの構築

プラスミドｐＥＦ６／Ｖ５－ＨｉｓＢ（インビトロジェン社）を鋳型として下記プライマーを用いてＰＣＲを行うことにより、ＢＧＨｐＡの直後（Ｓｅｑｕｅｎｃｅ　Ｐｏｓｉｔｉｏｎ　２１７４）から、Ｓｍａ　Ｉ（Ｓｅｑｕｅｎｃｅ　Ｐｏｓｉｔｉｏｎ　２９５８）までのＤＮＡ断片（ｆ１　ｏｒｉｇｉｎ　ｏｆ　ｒｅｐｌｉｃａｔｉｏｎ及びＳＶ４０　ｐｒｏｍｏｔｏｒ　ａｎｄ　ｏｒｉｇｉｎを含むＤＮＡフラグメント、以下、「フラグメントＡ」とする。）を取得した。

プライマー２０

5’－ｃｃａｃｇｃｇｃｃｃｔｇｔａｇｃｇｇｃｇｃａｔｔａａｇｃ－3’（配列表の配列番号５４）

プライマー２１

5’－ａａａｃｃｃｇｇｇａｇｃｔｔｔｔｔｇｃａａａａｇｃｃｔａｇｇ－3’（配列表の配列番号５５）

得られたフラグメントＡと、ヒトκ鎖分泌シグナル及びヒトκ鎖定常領域

及びヒトｐｏｌｙＡ付加シグナルをコードするＤＮＡ配列を含むＤＮＡフラグメント（配列番号５６：以下、「フラグメントＢ」とする。配列番号５６の配列は図２３に記載されている）をＯｖｅｒｌａｐ　Ｅｘｔｅｎｓｉｏｎ　ＰＣＲにより結合した。得られたフラグメントＡとフラグメントＢとが結合したＤＮＡ断片を制限酵素ＫｐｎＩ及びＳｍａＩで消化し、制限酵素ＫｐｎＩ及びＳｍａＩで消化したプラスミドｐＥＦ６／Ｖ５－ＨｉｓＢ（インビトロジェン社）とライゲーションし、ＥＦ１プロモーターの下流にシグナル配列、クローニングサイト、ヒトκ鎖定常領域、及びヒトｐｏｌｙＡ付加シグナル配列をもつ、キメラ及びヒト化軽鎖発現ベクターｐＥＦ６ＫＣＬを構築した。

７）－２　ｐＥＦ１ＫＣＬの構築

上記の方法で得られたｐＥＦ６ＫＣＬから制限酵素ＫｐｎＩ及びＳｍａＩで切り出されたＤＮＡ断片を、ＫｐｎＩ及びＳｍａＩで消化したｐＥＦ１／ｍｙｃ－ＨｉｓＢ（インビトロジェン社）とライゲーションし、プラスミドｐＥＦ１ＫＣＬを構築した。

７）－３　キメラ及びヒト化重鎖発現ベクターｐＥＦ１ＦＣＣＵの構築

ヒトＩｇＧ１シグナル配列及び定常領域のアミノ酸をコードするＤＮＡ配列を含むＤＮＡ断片（配列番号５７：配列番号５７の配列は図２４に記載されている）を制限酵素ＮｈｅＩ及びＰｍｅＩで消化し、ＮｈｅＩ及びＰｍｅＩで消化したプラスミドｐＥＦ１ＫＣＬと結合し、ＥＦ１プロモーターの下流にシグナル配列、クローニングサイト、ヒト重鎖定常領域、及びヒトｐｏｌｙＡ付加シグナル配列をもつキメラ及びヒト化重鎖発現ベクターｐＥＦ１ＦＣＣＵを構築した。

７）－４　Ｍ３０キメラタイプ軽鎖発現ベクターの構築

マウス抗体Ｍ３０の軽鎖をコードするｃＤＮＡをテンプレートとして、ＫＯＤ－Ｐｌｕｓ－（ＴＯＹＯＢＯ社）と下記のプライマーセットで軽鎖の可変領域をコードするｃＤＮＡを含む部分を増幅し、制限酵素ＮｄｅＩ及びＢｓｉＷＩで切り出されるＤＮＡ断片を、キメラ及びヒト化抗体軽鎖発現汎用ベ

クター（ｐＥＦ６ＫＣＬ）を制限酵素ＮｄｅＩ及びＢｓｉＷＩで切断した箇所に挿入することにより、Ｍ３０キメラタイプ軽鎖発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターを「ｐＥＦ６ＫＣＬ／Ｍ３０Ｌ」と命名した。Ｍ３０キメラタイプ軽鎖のヌクレオチド配列を配列表の配列番号５８に示し、アミノ酸配列を配列番号５９に示した。また、配列番号５８及び５９の配列は図２５に記載されている。なお、配列表の配列番号５９に記載のｃＭ３０抗体軽鎖のアミノ酸配列において１２８番目のスレオニン残基は軽鎖可変領域のカルボキシル末端であり、配列表の配列番号５３に記載のＭ３０抗体軽鎖のアミノ酸配列において１３０番目のアラニン残基に対応するが、配列番号５９に記載のアミノ酸配列においては既にヒト抗体軽鎖由来のスレオニン残基に置換されている。

軽鎖用プライマーセット

プライマー２２

５’－ａａａｃａｔａｔｇｇｃｃａａａｔｔｇｔｔｃｔｃｔｃｃｃａｇｔｃｔｃｃａａｃａａｔｃｃ－３’（配列表の配列番号６０）

プライマー２３

５’－ａａａｃｇｔａｃｇｔｔｔｃａｇｃｔｃｃａｇｃｔｔｇｇｔｃｃｃａｇｔａｃｃｇ－３’（配列表の配列番号６１）

７）－５　Ｍ３０キメラタイプ重鎖発現ベクターの構築

マウス抗体Ｍ３０の重鎖をコードするｃＤＮＡをテンプレートとして、ＫＯＤ－Ｐｌｕｓ－（ＴＯＹＯＢＯ社）と下記のプライマーセットＡを用いてＰＣＲを行うことにより得られたＤＮＡ断片と下記のプライマーセットＢを用いてＰＣＲを行うことにより得られたＤＮＡ断片を、下記のプライマーセットＣを用いたＯｖｅｒｌａｐ　Ｅｘｔｅｎｓｉｏｎ　ＰＣＲにより結合することにより、可変領域の中にあるＢｌｐＩを除去するとともに重鎖の可変領域をコードするｃＤＮＡを含む部分を増幅した。制限酵素ＢｌｐＩで切り出されるＤＮＡ断片を、キメラ及びヒト化抗体重鎖発現汎用ベクター（ｐＥＦ１ＦＣＣＵ）を制限酵素ＢｌｐＩで切断した箇所に挿入することにより、Ｍ

３０キメラタイプ重鎖発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターを「ｐＥＦ１ＦＣＣＵ／Ｍ３０Ｈ」と命名した。

Ｍ３０キメラタイプ重鎖のヌクレオチド配列を配列表の配列番号６２に示し、アミノ酸配列を配列番号６３に示した。また、配列番号６２及び６３の配列は図２６に記載されている。

プライマーセットＡ

プライマー２４

５’－ａａａｇｃｔｇａｇｃｇａｇｇｔｃｃａｇｃｔｇｃａｇｃａｇｔｃｔｇｇａｃｃｔｇａｇ－３’（配列表の配列番号６４）

プライマー２５

５’－ｇａｇｇｔｃａｇｇｃｔｇｃｔｇａｇｔｔｃｃａｔｇｔａｇｇｃｔｇｔｇｃｔｇ－３’（配列表の配列番号６５）

プライマーセットＢ

プライマー２６

５’－ｃａｇｃａｃａｇｃｃｔａｃａｔｇｇａａｃｔｃａｇｃａｇｃｃｔｇａｃｃｔｃ－３’（配列表の配列番号６６）

プライマー２７

５’－ａａａｇｃｔｇａｇｃｔｇａｃｔｇｔｇａｇａｇｔｇｇｔｇｃｃｔｔｇｇｃｃｃｃａｇ－３’（配列表の配列番号６７）

プライマーセットＣ

プライマー２８

５’－ａａａｇｃｔｇａｇｃｇａｇｇｔｃｃａｇｃｔｇｃａｇｃａｇｔｃｔｇｇａｃｃｔｇａｇ－３’（配列表の配列番号６８）

プライマー２９

５’－ａａａｇｃｔｇａｇｃｔｇａｃｔｇｔｇａｇａｇｔｇｇｔｇｃｃｔｔｇｇｃｃｃｃａｇ－３’（配列表の配列番号６９）

７）－６　キメラ抗体Ｍ３０調製

７）－６－１　キメラ抗体Ｍ３０の生産

１．２×１０９個の対数増殖期のＦｒｅｅＳｔｙｌｅ　２９３Ｆ細胞（インビトロジェン社）を新鮮な１．２ＬのＦｒｅｅＳｔｙｌｅ２９３　ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　ｍｅｄｉｕｍ　（インビトロジェン社）に播種し、３７℃、８％CO_2インキュベーター内で９０ｒｐｍで一時間振とう培養した。Ｐｏｌｙｅｔｈｙｌｅｎｅｉｍｉｎｅ（Ｐｏｌｙｓｃｉｅｎｃｅ　＃２４７６５）３．６ｍｇをＯｐｔｉ－Ｐｒｏ　ＳＦＭ培地（インビトロジェン社）２０ｍｌに溶解し、次にＰｕｒｅＬｉｎｋ　ＨｉＰｕｒｅ　Ｐｌａｓｍｉｄキット（インビトロジェン社）を用いて調製したｐＥＦ１ＦＣＣＵ／Ｍ３０Ｈ（０．４ｍｇ）及びｐＥＦ６ＫＣＬ／Ｍ３０Ｌ（０．８ｍｇ）を２０ｍｌのＯｐｔｉ－Ｐｒｏ　ＳＦＭ培地に懸濁した。Ｐｏｌｙｅｔｈｙｌｅｎｅｉｍｉｎｅ／Ｏｐｔｉ－Ｐｒｏ　ＳＦＭ混合液２０ｍｌに、発現ベクター／Ｏｐｔｉ－Ｐｒｏ　ＳＦＭ混合液２０ｍｌを加え穏やかに攪拌し、更に５分間放置した後にＦｒｅｅＳｔｙｌｅ　２９３Ｆ細胞に添加した。３７℃、８％CO_2インキュベーターで７日間、９０ｒｐｍで振とう培養して得られた培養上清をＤｉｓｐｏｓａｂｌｅ　Ｃａｐｓｕｌｅ　Ｆｉｌｔｅｒ　（Ａｄｖａｎｔｅｃ　＃ＣＣＳ－０４５－Ｅ１Ｈ）でろ過した。

ｐＥＦ１ＦＣＣＵ／Ｍ３０ＨとｐＥＦ６ＫＣＬ／Ｍ３０Ｌとの組合せによって取得されたキメラ抗体Ｍ３０を「ｃＭ３０」又は「ｃＭ３０抗体」と命名した。

７）－６－２　ｃＭ３０の精製

実施例７－１）で得られた培養上清を、ｒＰｒｏｔｅｉｎＡアフィニティークロマトグラフィー（４－６℃下）（ＧＥヘルスケア・ジャパン社）とセラミックヒドロキシルアパタイト（室温下）の２段階工程で精製した。ｒＰｒｏｔｅｉｎＡアフィニティークロマトグラフィー精製後とセラミックヒドロキシルアパタイト精製後のバッファー置換工程は室温下で実施した。

最初に、培養上清１１００－１２００ｍｌを、ＰＢＳで平衡化したＭａｂＳｅｌｅｃｔＳｕＲｅ（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ社製、ＨｉＴｒａｐカラム：容積１ｍｌ×２連結）にアプライした。培養液

がカラムに全て入ったのち、ＰＢＳ１５－３０ｍｌでカラムを洗浄した。次に２Ｍアルギニン塩酸塩溶液（ｐＨ４．０）で溶出し、抗体の含まれる画分を集めた。その画分を脱塩カラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ社製、ＨｉＴｒａｐ　Ｄｅｓａｌｔｉｎｇカラム：容積５ｍｌ×２連結）で５ｍＭ　リン酸ナトリウム／５０ｍＭ　ＭＥＳ／２０ｍＭ　ＮａＣｌ／ｐＨ６．５のバッファーへ置換を行った。

更にその置換した抗体溶液を、５ｍＭ　ＮａＰｉ／５０ｍＭ　ＭＥＳ／２０ｍＭ　ＮａＣｌ／ｐＨ６．５のバッファーで平衡化されたセラミックハイドロキシルアパタイトカラム（日本バイオラッド、Ｂｉｏ－Ｓｃａｌｅ　ＣＨＴ２－１　Ｈｙｄｒｏｘｙａｐａｔｉｔｅ　Ｃｏｌｕｍｎ：容積２ｍｌ）にアプライした。塩化ナトリウムによる直線的濃度勾配溶出を実施し、抗体の含まれる画分を集めた。当該画分を脱塩カラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ社製、ＨｉＴｒａｐ　Ｄｅｓａｌｔｉｎｇカラム：容積５ｍｌｘ２連結）でＣＢＳ（１０ｍＭクエン酸緩衝液／１４０ｍＭ塩化ナトリウム、ｐＨ６．０）への液置換を行った。

最後にＣｅｎｔｒｉｆｕｇａｌ　ＵＦ　Ｆｉｌｔｅｒ　Ｄｅｖｉｃｅ　ＶＩＶＡＳＰＩＮ２０（分画分子量３０Ｋ，Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ社，４℃下）にて濃縮し、ＩｇＧ濃度を１．０ｍｇ／ｍｌ以上に調製し精製サンプルとした。

実施例８．ｃＭ３０抗体の活性

８）－１　ｃＭ３０抗体のＢ７－Ｈ３に対する結合活性

Ｍ３０抗体及びｃＭ３０抗体のＢ７－Ｈ３抗原との親和性は、表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）装置（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ社）により測定した。定法により、抗マウスＩｇＧ又は抗ヒトＩｇＧ抗体をセンサーチップに固定化し、そこへＭ３０抗体サンプル又はｃＭ３０抗体を結合した後に、各濃度のリコンビナントＢ７－Ｈ３バリアント２抗原の細胞外領域ポリペプチド（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ社製：＃２３１８－Ｂ３－０５０／ＣＦ）を添加し、ランニングバッファー（リン酸バッファー、０．０５％　ＳＰ２０）中で

の抗体に対する結合量を経時的に測定した。測定した結合量を、専用ソフトウェア（ＢＩＡｅｖａｌｕａｔｉｏｎ　Ｖｅｒｓｉｏｎ４．１、ＧＥヘルスケア社)により解析し解離定数を算出した。

その結果、Ｍ３０抗体及びｃＭ３０抗体はそれぞれ５．８９ｎＭ及び３．４３ｎＭの解離定数でリコンビナントＢ７－Ｈ３抗原に結合した。このことから、Ｍ３０抗体及びｃＭ３０抗体はＢ７－Ｈ３抗原に結合し、その結合強度はほぼ同等であることが確かめられた。

８）－２　ｃＭ３０抗体のＡＤＣＰ活性

健常人の末梢血単核球（ＰＢＭＣ）を定法に従い分離した。ＲＰＭＩ－１０％ＦＣＳ（インビトロジェン社）中に懸濁し、フラスコ中に播種した。CO_2インキュベータで一晩培養を行った。培養上清を捨て、フラスコに付着した細胞にＭ－ＣＳＦ及びＧＭ－ＣＳＦ（ＰｅｐｒｏＴｅｃｈ社）を添加したＲＰＭＩ－１０％ＦＣＳを加え、２週間培養した。細胞をＴｒｙｐＬＥで剥離し、回収した。５００μｌ／ｗｅｌｌ（1×10^5　ｃｅｌｌ／ｗｅｌｌ）を２４　ｗｅｌｌ　ｐｌａｔｅに添加し、３７℃で１晩培養した。本細胞をエフェクター細胞とした。

ターゲット細胞となるＮＣＩ－Ｈ３２２細胞のラベリングをＰＫＨ２６　ｄｙｅ　ｌａｂｅｌｉｎｇ　ｋｉｔ　（Ｓｉｇｍａ社）を用いて行った。ターゲット細胞をＴｒｙｐＬＥで剥離し、ＰＢＳで２回洗浄した。細胞をＤｉｌｕｅｎｔ　Ｃで1×10^7　ｃｅｌｌｓ／ｍｌになるよう懸濁した。ＰＫＨ２６　ｄｙｅ　ｓｔｏｃｋ　（１ｍＭ）をＤｉｌｕｅｎｔ　Ｃで８μＭに希釈し、すぐに細胞浮遊液と等量のｄｙｅ　希釈液を添加した。室温に５分間放置した。血清１ｍｌを添加し、更に血清入り培地を加え２回洗浄を行った。

[0185]　Ｍ３０及びｃＭ３０抗体を培養液で２０μｇ／ｍｌに希釈した。ターゲット細胞を、2×10^6／１００μｌ／ｔｕｂｅ分注、混合した。氷上で３０分間静置した。上清を捨て、培養液で２回洗浄した。培養液５００μｌに懸濁した。エフェクター細胞から上清を除き、抗体を処理し培養液にサスペンドした細胞を添加し、混合した。CO_2インキュベータ内で３時間培養した。Ｔ

ｒｙｐｓｉｎ－ＥＤＴＡで細胞を剥離し、細胞を回収した。回収した細胞にＦＩＴＣ標識抗マウスＣＤ１１ｂ抗体（ベクトンディッキンソン社）を加え、氷上で３０分間静置した。上清を捨て、培養液で２回洗浄した。回収した細胞を３００μＬの場位置で懸濁し、ＦＡＣＳ　Ｃａｌｉｂｕｒ（ベクトンディッキンソン社）にて測定を行った。ＣＤ１１ｂ陽性のマクロファージ細胞において、ＰＫＨ２６陽性画分を貪食陽性細胞として評価を行った。

[0186] その結果、図８に示されるように、１０μｇ／ｍｌのＭ３０及びｃＭ３０抗体を添加した際、それぞれマクロファージによるＮＣＩ－Ｈ３２２細胞の貪食を３３±１％及び３５±２％誘導した。このことから、ｃＭ３０抗体はＭ３０抗体と同様にＮＣＩ－Ｈ３２２細胞に対してＡＤＣＰ活性を有することが示された。同様の実験結果がＭＤＡ－ＭＢ－２３１細胞（ＡＴＣＣ）に対するＡＤＣＰ活性においても得られた。

８）－３　ｃＭ３０抗体のｉｎ　ｖｉｖｏ抗腫瘍効果

ＭＤＡ－ＭＢ－２３１細胞をトリプシン処理して培養フラスコより剥がした後、１０％　ＦＢＳ含有ＲＰＭＩ１６４０培地（インビトロジェン社）に懸濁後遠心し、上清を除去した。細胞を同培地で２回洗浄したあと、ＢＤマトリゲル基底膜マトリックス（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ社製）に懸濁し、６週齢のマウス（ＣＢ１７／Ｉｃｒ－Ｐｒｋｄｃ［ｓｃｉｄ］／ＣｒｌＣｒｌｊ、日本チャールス・リバー株式会社）に５×１０^{6}細胞／マウスで腋窩部皮下に移植した。移植日を０日目として１４、２１、２８、３５、４２日目にＭ３０抗体、ｃＭ３０抗体を５００μｇ／マウス（約２５ｍｇ／ｋｇ）で腹腔内投与した。腫瘍体積を１４、１８、２１、２５、２８、３２、３５、３９、４２、４６、４９、５２日目に測定し、抗体投与による抗腫瘍効果を検討した。

その結果、Ｍ３０抗体、ｃＭ３０抗体投与群では、抗体を投与しない無処置群に比べ、有意に腫瘍増殖が抑制された。５２日目時点の腫瘍重量について無処置群との比較でＭ３０抗体、ｃＭ３０抗体のＰ値は共にＰ＜０．００１であった。Ｐ値はＤｕｎｎｅｔｔ型多重比較により算出した。

また、５２日目時点での腫瘍増殖阻害率（＝１００－（抗体投与群の腫瘍体積の平均値）／（無処置群の腫瘍体積の平均値）×１００）はＭ３０抗体で７１．３％、ｃＭ３０抗体で７１．７％であり、ｃＭ３０抗体はＭ３０抗体と同様にｉｎ　ｖｉｖｏで非常に強い抗腫瘍効果が観察された（図９）。

実施例９．マウス抗ヒトＢ７－Ｈ３抗体＃Ｍ３０のヒト化抗体の設計

９）－１　Ｍ３０のヒト化バージョンの設計

９）－１－１　Ｍ３０の可変領域の分子モデリング

Ｍ３０の可変領域の分子モデリングは、相同性モデリングとして一般的に公知の方法（Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ，２０３，１２１－１５３，（１９９１））によって実行された。Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｄａｔａ　Ｂａｎｋ（Ｎｕｃ．Ａｃｉｄ　Ｒｅｓ．３５，Ｄ３０１－Ｄ３０３（２００７））に登録されるヒト免疫グロブリンの可変領域の１次配列（Ｘ線結晶構造から誘導される三次元構造が入手可能である）を、実施例６－３）で決定されたＭ３０の可変領域と比較した。

結果として、３ＢＫＹが、Ｍ３０の軽鎖の可変領域に対して同様にフレームワーク中に欠損がある抗体の中で、最も高い配列相同性を有するとして選択された。また、３ＤＧＧが、Ｍ３０の重鎖の可変領域に対して最も高い配列相同性を有するとして選択された。

フレームワーク領域の三次元構造は、Ｍ３０の軽鎖及び重鎖に対応する３ＢＫＹ及び３ＤＧＧの座標を組み合わせて、「フレームワークモデル」を得ることによって作製された。Ｍ３０のＣＤＲは、Ｔｈｏｒｎｔｏｎ　ｅｔ　ａｌ．（Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２６３，８００－８１５，（１９９６））の分類、及びＨ３ルール（ＦＥＢＳ　ｌｅｔｔｅｒ　３９９，１－８（１９９６））に従って、ＣＤＲＨ１（配列番号９２）、ＣＤＲＨ２（配列番号９３）及びＣＤＲＨ３（配列番号９４）、ＣＤＲＬ１（配列番号９５）、ＣＤＲＬ２（配列番号９６）、ＣＤＲＬ３（配列番号９７）に対し最も近いコンホメーションを有する座標としてそれぞれ２ＨＯＪ、１ＢＢＤ、１Ｑ９Ｏ、２ＦＢＪ、１ＬＮＫ、１ＴＥＴを選び、フレームワークモデルに組み込まれ

た。

[0187] 最後に、エネルギーの点でＭ３０の可変領域の可能性のある分子モデルを得るために、不利な原子間接触を除くためのエネルギー計算を行った。上記手順を、市販の蛋白質立体構造予測プログラムＰｒｉｍｅ及び配座探索プログラムＭａｃｒｏＭｏｄｅｌ（Ｓｃｈｒｏｄｉｎｇｅｒ、ＬＬＣ）を用いて行った。

９）－１－２　ヒト化Ｍ３０に対するアミノ酸配列の設計

ヒト化Ｍ３０抗体の構築を、ＣＤＲグラフティング（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８６，１００２９－１００３３（１９８９））として一般的に公知の方法によって行った。

アクセプター抗体は、フレームワーク領域内のアミノ酸相同性に基づいて選択された。Ｍ３０のフレームワーク領域の配列を、抗体のアミノ酸配列のＫａｂａｔデータベース（Ｎｕｃ．Ａｃｉｄ　Ｒｅｓ．２９，２０５－２０６（２００１））の全てのヒトフレームワークと比較し、結果として、ｍＡｂ４９‘ＣＬ抗体（ＮＣＢＩのＧｅｎＢａｎｋ：　Ｄ１６８３８．１及びＤ１６８３７．１）がフレームワーク領域についての７０％の配列相同性に起因して、アクセプターとして選択された。

ｍＡｂ４９‘ＣＬについてのフレームワーク領域のアミノ酸残基を、Ｍ３０についてのアミノ酸残基と整列させ、異なるアミノ酸が使用される位置を同定した。これらの残基の位置は、上で構築されたＭ３０の三次元モデルを使用して分析され、そしてアクセプター上にグラフティングされるべきドナー残基が、Ｑｕｅｅｎ　ｅｔ　ａｌ．（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８６，１００２９－１００３３（１９８９））によって与えられる基準によって選択された。選択されたいくつかのドナー残基をアクセプター抗体に移入することによって、ヒト化＃３２Ａ１配列を以下の実施例に記載されるように構築した。

９）－２　Ｍ３０重鎖のヒト化

９）－２－１　Ｍ３０－Ｈ１タイプ重鎖：

配列表の配列番号６３に示されるｃＭ３０重鎖のアミノ酸番号２０（グルタミン酸）、２４（グルタミン）、２８（プロリン）、３０（ロイシン）、３１（バリン）、３５（アラニン）、３９（メチオニン）、５７（リジン）、５９（リジン）、６７（イソロイシン）、８６（リジン）、８７（アラニン）、８９（グルタミン）、９１（セリン）、９３（リジン）、９５（セリン）、１０６（スレオニン）、１１０（セリン）、１３６（スレオニン）、１３７（ロイシン）をそれぞれグルタミン、バリン、アラニン、バリン、リジン、セリン、バリン、アルギニン、アラニン、メチオニン、アルギニン、バリン、イソロイシン、アラニン、グルタミン酸、スレオニン、アルギニン、スレオニン、ロイシン、バリンに置き換えることを伴い設計されたヒト化Ｍ３０重鎖を「Ｍ３０－Ｈ１タイプ重鎖」と命名した。

Ｍ３０－Ｈ１タイプ重鎖のアミノ酸配列を配列番号８５に示した。

９）－２－２　Ｍ３０－Ｈ２タイプ重鎖：

配列表の配列番号６３に示されるｃＭ３０重鎖のアミノ酸番号２０（グルタミン酸）、２４（グルタミン）、２８（プロリン）、３０（ロイシン）、３１（バリン）、３５（アラニン）、３９（メチオニン）、５７（リジン）、５９（リジン）、８６（リジン）、８７（アラニン）、８９（グルタミン）、９１（セリン）、９３（リジン）、９５（セリン）、１０６（スレオニン）、１１０（セリン）、１３６（スレオニン）、１３７（ロイシン）をそれぞれグルタミン、バリン、アラニン、バリン、リジン、セリン、バリン、アルギニン、アラニン、アルギニン、バリン、イソロイシン、アラニン、グルタミン酸、スレオニン、アルギニン、スレオニン、ロイシン、バリンに置き換えることを伴い設計されたヒト化Ｍ３０重鎖を「Ｍ３０－Ｈ２タイプ重鎖」と命名した。

Ｍ３０－Ｈ２タイプ重鎖のアミノ酸配列を配列番号８７に示した。

９）－２－３　Ｍ３０－Ｈ３タイプ重鎖：

配列表の配列番号６３に示されるｃＭ３０重鎖のアミノ酸番号２４（グルタミン）、２８（プロリン）、３０（ロイシン）、３１（バリン）、３５（

アラニン）、３９（メチオニン）、５９（リジン）、８９（グルタミン）、９１（セリン）、９３（リジン）、９５（セリン）、１０６（スレオニン）、１１０（セリン）、１３６（スレオニン）、１３７（ロイシン）をそれぞれバリン、アラニン、バリン、リジン、セリン、バリン、アラニン、イソロイシン、アラニン、グルタミン酸、スレオニン、アルギニン、スレオニン、ロイシン、バリンに置き換えることを伴い設計されたヒト化Ｍ３０重鎖を「Ｍ３０－Ｈ３タイプ重鎖」と命名した。

Ｍ３０－Ｈ３タイプ重鎖のアミノ酸配列を配列番号８９に示した。

９）－２－４　Ｍ３０－Ｈ４タイプ重鎖：

配列表の配列番号６３に示されるｃＭ３０重鎖のアミノ酸番号２４（グルタミン）、２８（プロリン）、３０（ロイシン）、３１（バリン）、３５（アラニン）、３９（メチオニン）、５９（リジン）、９５（セリン）、１０６（スレオニン）、１１０（セリン）、１３６（スレオニン）、１３７（ロイシン）をそれぞれバリン、アラニン、バリン、リジン、セリン、バリン、アラニン、スレオニン、アルギニン、スレオニン、ロイシン、バリンに置き換えることを伴い設計されたヒト化Ｍ３０重鎖を「Ｍ３０－Ｈ４タイプ重鎖」と命名した。

Ｍ３０－Ｈ４タイプ重鎖のアミノ酸配列を配列番号９１に示した。

９）－３　Ｍ３０軽鎖のヒト化

９）－３－１　Ｍ３０－Ｌ１タイプ軽鎖：

配列表の配列番号５９に示されるｃＭ３０軽鎖のアミノ酸番号２１（グルタミン）、２５（セリン）、２９（スレオニン）、３０（イソロイシン）、３３（アラニン）、３８（リジン）、３９（バリン）、４１（メチオニン）、４２（スレオニン）、６１（セリン）、６２（セリン）、６４（リジン）、６５（プロリン）、６６（トリプトファン）、７７（バリン）、８９（セリン）、９０（チロシン）、９１（セリン）、９７（バリン）、９９（アラニン）、１０２（アラニン）、１０４（スレオニン）、１１９（スレオニン）、１２３（ロイシン）、１２５（ロイシン）をそれぞれグルタミン酸、スレ

オニン、アラニン、スレオニン、ロイシン、アルギニン、アラニン、ロイシン、セリン、グルタミン、アラニン、アルギニン、ロイシン、ロイシン、イソロイシン、アスパラギン酸、フェニルアラニン、スレオニン、ロイシン、プロリン、フェニルアラニン、バリン、グルタミン、バリン、イソロイシンに置き換えることを伴い設計されたヒト化Ｍ３０軽鎖を「Ｍ３０－Ｌ１タイプ軽鎖」と命名した。

Ｍ３０－Ｌ１タイプ軽鎖のアミノ酸配列を配列番号７１に示した。

９）－３－２　Ｍ３０－Ｌ２タイプ軽鎖：

配列表の配列番号５９に示されるｃＭ３０軽鎖のアミノ酸番号２１（グルタミン）、２５（セリン）、２９（スレオニン）、３０（イソロイシン）、３３（アラニン）、３８（リジン）、３９（バリン）、４１（メチオニン）、４２（スレオニン）、６１（セリン）、６２（セリン）、６４（リジン）、６５（プロリン）、７７（バリン）、８９（セリン）、９１（セリン）、９７（バリン）、９９（アラニン）、１０２（アラニン）、１０４（スレオニン）、１１９（スレオニン）、１２３（ロイシン）、１２５（ロイシン）をそれぞれグルタミン酸、スレオニン、アラニン、スレオニン、ロイシン、アルギニン、アラニン、ロイシン、セリン、グルタミン、アラニン、アルギニン、ロイシン、イソロイシン、アスパラギン酸、スレオニン、ロイシン、プロリン、フェニルアラニン、バリン、グルタミン、バリン、イソロイシンに置き換えることを伴い設計されたヒト化Ｍ３０軽鎖を「Ｍ３０－Ｌ２タイプ軽鎖」と命名した。

Ｍ３０－Ｌ２タイプ軽鎖のアミノ酸配列を配列番号７３に示した。

９）－３－３　Ｍ３０－Ｌ３タイプ軽鎖：

配列表の配列番号５９に示されるｃＭ３０軽鎖のアミノ酸番号２９（スレオニン）、３０（イソロイシン）、３３（アラニン）、３８（リジン）、３９（バリン）、４１（メチオニン）、６２（セリン）、６５（プロリン）、７７（バリン）、９１（セリン）、９７（バリン）、９９（アラニン）、１０２（アラニン）、１０４（スレオニン）、１１９（スレオニン）、１２３（

ロイシン）、１２５（ロイシン）をそれぞれアラニン、スレオニン、ロイシン、アルギニン、アラニン、ロイシン、アラニン、ロイシン、イソロイシン、スレオニン、ロイシン、プロリン、フェニルアラニン、バリン、グルタミン、バリン、イソロイシンに置き換えることを伴い設計されたヒト化Ｍ３０軽鎖を「Ｍ３０－Ｌ３タイプ軽鎖」と命名した。

Ｍ３０－Ｌ３タイプ軽鎖のアミノ酸配列を配列番号７５に示した。

９）－３－４　Ｍ３０－Ｌ４タイプ軽鎖：

配列表の配列番号５９に示されるｃＭ３０軽鎖のアミノ酸番号２１（グルタミン）、２５（セリン）、２９（スレオニン）、３０（イソロイシン）、３３（アラニン）、３８（リジン）、３９（バリン）、４１（メチオニン）、４２（スレオニン）、６１（セリン）、６２（セリン）、６４（リジン）、６６（トリプトファン）、７７（バリン）、８９（セリン）、９０（チロシン）、９１（セリン）、９６（アルギニン）、９７（バリン）、９９（アラニン）、１０２（アラニン）、１０４（スレオニン）、１１９（スレオニン）、１２３（ロイシン）、１２５（ロイシン）をそれぞれグルタミン酸、スレオニン、アラニン、スレオニン、ロイシン、アルギニン、アラニン、ロイシン、セリン、グルタミン、アラニン、アルギニン、ロイシン、イソロイシン、アスパラギン酸、フェニルアラニン、スレオニン、セリン、ロイシン、プロリン、フェニルアラニン、バリン、グルタミン、バリン、イソロイシンに置き換えることを伴い設計されたヒト化Ｍ３０軽鎖を「Ｍ３０－Ｌ４タイプ軽鎖」と命名した。

Ｍ３０－Ｌ４タイプ軽鎖のアミノ酸配列を配列番号７７に示した。

９）－３－５　Ｍ３０－Ｌ５タイプ軽鎖：

配列表の配列番号５９に示されるｃＭ３０軽鎖のアミノ酸番号２９（スレオニン）、３０（イソロイシン）、３３（アラニン）、３８（リジン）、３９（バリン）、４１（メチオニン）、６２（セリン）、７７（バリン）、９１（セリン）、９７（バリン）、９９（アラニン）、１０２（アラニン）、１０４（スレオニン）、１１９（スレオニン）、１２３（ロイシン）、１２５

（ロイシン）をそれぞれアラニン、スレオニン、ロイシン、アルギニン、アラニン、ロイシン、アラニン、イソロイシン、スレオニン、ロイシン、プロリン、フェニルアラニン、バリン、グルタミン、バリン、イソロイシンに置き換えることを伴い設計されたヒト化Ｍ３０軽鎖を「Ｍ３０－Ｌ５タイプ軽鎖」と命名した。

Ｍ３０－Ｌ５タイプ軽鎖のアミノ酸配列を配列番号７９に示した。

９）－３－６　Ｍ３０－Ｌ６タイプ軽鎖：

配列表の配列番号５９に示されるｃＭ３０軽鎖のアミノ酸番号２１（グルタミン）、２５（セリン）、２９（スレオニン）、３０（イソロイシン）、３３（アラニン）、３８（リジン）、３９（バリン）、４１（メチオニン）、４２（スレオニン）、６１（セリン）、６２（セリン）、６４（リジン）、６６（トリプトファン）、７７（バリン）、８９（セリン）、９０（チロシン）、９１（セリン）、９７（バリン）、９９（アラニン）、１０２（アラニン）、１０４（スレオニン）、１１９（スレオニン）、１２３（ロイシン）、１２５（ロイシン）をそれぞれグルタミン酸、スレオニン、アラニン、スレオニン、ロイシン、アルギニン、アラニン、ロイシン、セリン、グルタミン、アラニン、アルギニン、ロイシン、イソロイシン、アスパラギン酸、フェニルアラニン、スレオニン、ロイシン、プロリン、フェニルアラニン、バリン、グルタミン、バリン、イソロイシンに置き換えることを伴い設計されたヒト化Ｍ３０軽鎖を「Ｍ３０－Ｌ６タイプ軽鎖」と命名した。

Ｍ３０－Ｌ６タイプ軽鎖のアミノ酸配列を配列番号８１に示した。

９）－３－７　Ｍ３０－Ｌ７タイプ軽鎖：

配列表の配列番号５９に示されるｃＭ３０軽鎖のアミノ酸番号２１（グルタミン）、２５（セリン）、２９（スレオニン）、３０（イソロイシン）、３３（アラニン）、３８（リジン）、３９（バリン）、４１（メチオニン）、４２（スレオニン）、６１（セリン）、６２（セリン）、６４（リジン）、６６（トリプトファン）、７７（バリン）、８９（セリン）、９１（セリン）、９７（バリン）、９９（アラニン）、１０２（アラニン）、１０４（ス

レオニン）、１１９（スレオニン）、１２３（ロイシン）、１２５（ロイシン）をそれぞれグルタミン酸、スレオニン、アラニン、スレオニン、ロイシン、アルギニン、アラニン、ロイシン、セリン、グルタミン、アラニン、アルギニン、ロイシン、イソロイシン、アスパラギン酸、スレオニン、ロイシン、プロリン、フェニルアラニン、バリン、グルタミン、バリン、イソロイシンに置き換えることを伴い設計されたヒト化Ｍ３０軽鎖を「Ｍ３０－Ｌ７タイプ軽鎖」と命名した。

Ｍ３０－Ｌ７タイプ軽鎖のアミノ酸配列を配列番号８３に示した。

（実施例１０）ヒト化抗体の作製

１０）－１　Ｍ３０－Ｌ１、Ｍ３０－Ｌ２、Ｍ３０－Ｌ３、Ｍ３０－Ｌ４、Ｍ３０－Ｌ５、Ｍ３０－Ｌ６、及びＭ３０－Ｌ７タイプ軽鎖発現ベクターの構築

配列表の配列番号７１のアミノ酸番号２１乃至１２８、配列番号７３のアミノ酸番号２１乃至１２８、配列番号７５のアミノ酸番号２１乃至１２８、配列番号７７のアミノ酸番号２１乃至１２８、配列番号７９のアミノ酸番号２１乃至１２８、配列番号８１のアミノ酸番号２１乃至１２８、及び配列番号８３のアミノ酸番号２１乃至１２８にそれぞれ示される、Ｍ３０－Ｌ１、Ｍ３０－Ｌ２、Ｍ３０－Ｌ３、Ｍ３０－Ｌ４、Ｍ３０－Ｌ５、Ｍ３０－Ｌ６、及びＭ３０－Ｌ７タイプ軽鎖可変領域をコードする遺伝子を含むＤＮＡを上記アミノ酸配列に係る配列番号に対応するヌクレオチド配列に係る配列番号７０、７２、７４、７６、７８、８０及び８２に基づき合成し（ＧＥＮＥＡＲＴ社、人工遺伝子合成サービス）、制限酵素ＮｄｅＩ及びＢｓｉＷＩで切り出されるＤＮＡ断片を、キメラ及びヒト化抗体軽鎖発現汎用ベクター（ｐＥＦ６ＫＣＬ）を制限酵素ＮｄｅＩ及びＢｓｉＷＩで切断した箇所に挿入することにより、Ｍ３０－Ｌ１、Ｍ３０－Ｌ２、Ｍ３０－Ｌ３、Ｍ３０－Ｌ４、Ｍ３０－Ｌ５、Ｍ３０－Ｌ６、及びＭ３０－Ｌ７タイプ軽鎖発現ベクターを構築した。

得られた発現ベクターをそれぞれ「ｐＥＦ６ＫＣＬ／Ｍ３０－Ｌ１」、「ｐ

ＥＦ６ＫＣＬ／Ｍ３０－Ｌ２」、「ｐＥＦ６ＫＣＬ／Ｍ３０－Ｌ３」、「ｐＥＦ６ＫＣＬ／Ｍ３０－Ｌ４」、「ｐＥＦ６ＫＣＬ／Ｍ３０－Ｌ５」、「ｐＥＦ６ＫＣＬ／Ｍ３０－Ｌ６」、及び「ｐＥＦ６ＫＣＬ／Ｍ３０－Ｌ７」と命名した。

１０）－２　Ｍ３０－Ｈ１、Ｍ３０－Ｈ２、Ｍ３０－Ｈ３、及びＭ３０－Ｈ４タイプ重鎖発現ベクターの構築

配列表の配列番号８５のアミノ酸番号２０乃至１４１、配列番号８７のアミノ酸番号２０乃至１４１、配列番号８９のアミノ酸番号２０乃至１４１、及び配列番号９１のアミノ酸番号２０乃至１４１にそれぞれ示される、Ｍ３０－Ｈ１、Ｍ３０－Ｈ２、Ｍ３０－Ｈ３、及びＭ３０－Ｈ４タイプ重鎖可変領域をコードする遺伝子を含むＤＮＡを上記アミノ酸配列に係る配列番号に対応するヌクレオチド配列に係る配列番号８４、８６、８８及び９０に基づき合成し（ＧＥＮＥＡＲＴ社　人工遺伝子合成サービス）、制限酵素ＢｌｐＩで切り出されるＤＮＡ断片を、ヒト化抗体重鎖発現汎用ベクター（ｐＥＦ１ＦＣＣＵ）を制限酵素ＢｌｐＩで切断した箇所に挿入することにより、Ｍ３０－Ｈ１、Ｍ３０－Ｈ２、Ｍ３０－Ｈ３、及びＭ３０－Ｈ４タイプ重鎖発現ベクターを構築した。

得られた発現ベクターをそれぞれ「ｐＥＦ１ＦＣＣＵ／Ｍ３０－Ｈ１」、「ｐＥＦ１ＦＣＣＵ／Ｍ３０－Ｈ２」、「ｐＥＦ１ＦＣＣＵ／Ｍ３０－Ｈ３」、及び「ｐＥＦ１ＦＣＣＵ／Ｍ３０－Ｈ４」と命名した。

１０）－３　ヒト化抗体の生産

１．２×１０^{9}個の対数増殖期のＦｒｅｅＳｔｙｌｅ　２９３Ｆ細胞（インビトロジェン社）を新鮮な１．２ＬのＦｒｅｅＳｔｙｌｅ２９３　ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　ｍｅｄｉｕｍ　（インビトロジェン社）に播種し、３７℃、８％CO_2インキュベーター内で９０ｒｐｍで一時間振とう培養した。Ｐｏｌｙｅｔｈｙｌｅｎｅｉｍｉｎｅ（Ｐｏｌｙｓｃｉｅｎｃｅ　＃２４７６５）３．６ｍｇをＯｐｔｉ－Ｐｒｏ　ＳＦＭ培地（インビトロジェン社）２０ｍｌに溶解し、次にＰｕｒｅＬｉｎｋ　ＨｉＰｕｒｅ　Ｐｌａｓｍｉｄキット（

インビトロジェン社）を用いて調製した重鎖発現ベクター（０．４ｍｇ）及び軽鎖発現ベクター（０．８ｍｇ）を２０ｍｌのＯｐｔｉ－Ｐｒｏ　ＳＦＭ培地に懸濁した。Ｐｏｌｙｅｔｈｙｌｅｎｅｉｍｉｎｅ／Ｏｐｔｉ－Ｐｒｏ　ＳＦＭ混合液２０ｍｌに、発現ベクター／Ｏｐｔｉ－Ｐｒｏ　ＳＦＭ混合液２０ｍｌを加え穏やかに攪拌し、更に５分間放置した後にＦｒｅｅＳｔｙｌｅ　２９３Ｆ細胞に添加した。３７℃、８％CO_2インキュベーターで７日間、９０ｒｐｍで振とう培養して得られた培養上清をＤｉｓｐｏｓａｂｌｅ　Ｃａｐｓｕｌｅ　Ｆｉｌｔｅｒ　（Ａｄｖａｎｔｅｃ　＃ＣＣＳ－０４５－Ｅ１Ｈ）でろ過した。

ｐＥＦ１ＦＣＣＵ／Ｍ３０－Ｈ１とｐＥＦ６ＫＣＬ／Ｍ３０－Ｌ１との組合せによって取得されたＭ３０のヒト化抗体を「Ｍ３０－Ｈ１－Ｌ１」、ｐＥＦ１ＦＣＣＵ／Ｍ３０－Ｈ１とｐＥＦ６ＫＣＬ／Ｍ３０－Ｌ２との組合せによって取得されたＭ３０のヒト化抗体を「Ｍ３０－Ｈ１－Ｌ２」、ｐＥＦ１ＦＣＣＵ／Ｍ３０－Ｈ１とｐＥＦ６ＫＣＬ／Ｍ３０－Ｌ３との組合せによって取得されたＭ３０のヒト化抗体を「Ｍ３０－Ｈ１－Ｌ３」、ｐＥＦ１ＦＣＣＵ／Ｍ３０－Ｈ１とｐＥＦ６ＫＣＬ／Ｍ３０－Ｌ４との組合せによって取得されたＭ３０のヒト化抗体を「Ｍ３０－Ｈ１－Ｌ４」、ｐＥＦ１ＦＣＣＵ／Ｍ３０－Ｈ４とｐＥＦ６ＫＣＬ／Ｍ３０－Ｌ１との組合せによって取得されたＭ３０のヒト化抗体を「Ｍ３０－Ｈ４－Ｌ１」、ｐＥＦ１ＦＣＣＵ／Ｍ３０－Ｈ４とｐＥＦ６ＫＣＬ／Ｍ３０－Ｌ２との組合せによって取得されたＭ３０のヒト化抗体を「Ｍ３０－Ｈ４－Ｌ２」、ｐＥＦ１ＦＣＣＵ／Ｍ３０－Ｈ４とｐＥＦ６ＫＣＬ／Ｍ３０－Ｌ３との組合せによって取得されたＭ３０のヒト化抗体を「Ｍ３０－Ｈ４－Ｌ３」、ｐＥＦ１ＦＣＣＵ／Ｍ３０－Ｈ４とｐＥＦ６ＫＣＬ／Ｍ３０－Ｌ４との組合せによって取得されたＭ３０のヒト化抗体を「Ｍ３０－Ｈ４－Ｌ４」、ｐＥＦ１ＦＣＣＵ／Ｍ３０－Ｈ１とｐＥＦ６ＫＣＬ／Ｍ３０－Ｌ５との組合せによって取得されたＭ３０のヒト化抗体を「Ｍ３０－Ｈ１－Ｌ５」、ｐＥＦ１ＦＣＣＵ／Ｍ３０－Ｈ１とｐＥＦ６ＫＣＬ／Ｍ３０－Ｌ６との組合せによって取得されたＭ３０のヒト化抗

体を「Ｍ３０－Ｈ１－Ｌ６」、及びｐＥＦ１ＦＣＣＵ／Ｍ３０－Ｈ１とｐＥＦ６ＫＣＬ／Ｍ３０－Ｌ７との組合せによって取得されたＭ３０のヒト化抗体を「Ｍ３０－Ｈ１－Ｌ７」、と命名した。

１０）－４　ヒト化抗体の精製

実施例６－１）で得られた培養上清を、ｒＰｒｏｔｅｉｎＡアフィニティークロマトグラフィー（４－６℃下）とセラミックヒドロキシルアパタイト（室温下）の２段階工程で精製した。ｒＰｒｏｔｅｉｎＡアフィニティークロマトグラフィー精製後とセラミックヒドロキシルアパタイト精製後のバッファー置換工程は室温下で実施した。

最初に、培養上清１１００－１２００ｍｌを、ＰＢＳで平衡化したＭａｂＳｅｌｅｃｔＳｕＲｅ（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ社製、ＨｉＴｒａｐカラム：容積１ｍｌ×２連結）にアプライした。培養液がカラムに全て入ったのち、ＰＢＳ１５－３０ｍｌでカラムを洗浄した。

次に２Ｍアルギニン塩酸塩溶液（ｐＨ４．０）で溶出し、抗体の含まれる画分を集めた。当該画分を脱塩カラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ社製、ＨｉＴｒａｐ　Ｄｅｓａｌｔｉｎｇカラム：容積５ｍｌ×２連結）で５ｍＭ　リン酸ナトリウム／５０ｍＭ　ＭＥＳ／２０ｍＭ　ＮａＣｌ／ｐＨ６．５のバッファーへ置換を行った。

更にその置換した抗体溶液を、５ｍＭ　ＮａＰｉ／５０ｍＭ　ＭＥＳ／２０ｍＭ　ＮａＣｌ／ｐＨ６．５のバッファーで平衡化されたセラミックハイドロキシルアパタイトカラム（日本バイオラッド、Ｂｉｏ－Ｓｃａｌｅ　ＣＨＴ２－１　Ｈｙｄｒｏｘｙａｐａｔｉｔｅ　Ｃｏｌｕｍｎ：容積２ｍｌ）にアプライした。塩化ナトリウムによる直線的濃度勾配溶出を実施し、抗体の含まれる画分を集めた。

当該画分を脱塩カラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ社製、ＨｉＴｒａｐ　Ｄｅｓａｌｔｉｎｇカラム：容積５ｍｌｘ２連結）でＣＢＳ（１０ｍＭクエン酸緩衝液／１４０ｍＭ塩化ナトリウム、ｐＨ６．０）への液置換を行った。

最後にＣｅｎｔｒｉｆｕｇａｌ　ＵＦ　Ｆｉｌｔｅｒ　Ｄｅｖｉｃｅ　ＶＩＶＡＳＰＩＮ２０（分画分子量３０Ｋ，Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ社，４℃下）にて濃縮し、ＩｇＧ濃度を１．０ｍｇ／ｍｌ以上に調製し精製サンプルとした。

１０）－５　ヒト化抗体のＢ７－Ｈ３抗原への結合性

抗原であるヒトＢ７－Ｈ３とヒト化Ｍ３０抗体との結合性は、表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）装置（ＢＩＡＣＯＲＥ社）により測定した。定法により、抗ヒトＩｇＧ抗体をセンサーチップに固定化し、そこへ上記１０）－４で得られたヒト化Ｍ３０抗体の精製サンプルを結合した後に、各濃度のＢ７－Ｈ３バリアント２抗原の細胞外領域ポリペプチド（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ社製：＃２３１８－Ｂ３－０５０／ＣＦ）を添加し、ランニングバッファー（リン酸バッファー、０．０５％　ＳＰ２０）中での抗体に対する結合量を経時的に測定した。測定した結合量を、専用ソフトウェア（ＢＩＡ　ｅｖａｌｕａｔｉｏｎ）により解析し解離定数（ＫＤ［Ｍ］）を算出した。ｃＭ３０抗体を測定回ごとに陽性対照として測定を行った。その結果は表３のとおりであり、ヒト化Ｍ３０抗体はいずれもＢ７－Ｈ３抗原に対して結合活性を有していた。

[0188]

[表3]

	KD [M]
M30-H1-L1	8.7E-08
M30-H1-L2	1.0E-07
M30-H1-L3	1.0E-07
M30-H1-L4	1.6E-08
M30-H4-L1	1.3E-07
M30-H4-L2	1.4E-07
M30-H4-L3	1.6E-07
M30-H4-L4	1.2E-08
M30-H1-L5	1.9E-09
M30-H1-L6	3.4E-09
M30-H1-L7	2.7E-09
cM30	7.3E-10

[0189] 実施例１１．Ｍ３０抗体、ｃＭ３０抗体及びヒト化Ｍ３０抗体のＢ７－Ｈ３抗原結合に対する競合阻害活性の測定

Ｍ３０抗体のＢ７－Ｈ３バリアント１及びバリアント２への結合に対するｃＭ３０抗体、ヒト化Ｍ３０抗体（Ｍ３０－Ｈ１－Ｌ４抗体）の競合阻害活性を以下の方法で測定した。

[0190] ＥＺ－Ｌｉｎｋ Ｓｕｌｆｏ－ＮＨＳ－ＬＣ Ｂｉｏｔｉｎｙｌａｔｉｏ

ｎ Ｋｉｔ（Ｔｈｅｒｍｏ ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社製 ＃２１４３５）を使用し添付のプロトコールに従い、マウスモノクローナル抗体Ｍ３０をそれぞれビオチン化した（以下、ビオチン化Ｍ３０をそれぞれ、「ｂＭ３０」と表記する。）。また、下記ＥＬＩＳＡ法に用いるバッファーは全てＢＤ ＯＰＴＩ ＥＩＡ （ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ ＃５５０５３６）を用いた。

Ｂ７－Ｈ３バリアント１の細胞外領域ポリペプチド（Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ社製：＃１９４９－Ｂ３－０５０／ＣＦ）及びＢ７－Ｈ３バリアント２の細胞外領域ポリペプチド（Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ社製：＃２３１８－Ｂ３－０５０／ＣＦ）をＣｏａｔｉｎｇ ｂｕｆｆｅｒで０．５μｇ／ｍｌに希釈してイムノプレート（Ｎｕｎｃ社製 ＃４４２４０４）に１００μｌ／ウェルで分注し、４℃で一晩静置することでプレートに蛋白質を吸着させた。翌日、ウェルをａｓｓａｙ ｄｉｌｕｅｎｔを２００μｌ／ウェルで分注し、室温で４時間静置した。

ウェル中の液を除去後、５μｇ／ｍｌのビオチン化抗体と各種濃度（０μｇ／ｍｌ、１μｇ／ｍｌ、５μｇ／ｍｌ、２５μｇ／ｍｌ、５０μｇ／ｍｌ、１２５μｇ／ｍｌ）の非標識抗体の混合溶液をａｓｓａｙ ｄｉｌｕｅｎｔにそれぞれ１００μｌ／ウェルで分注し、１時間室温で静置した。

Ｗａｓｈ ｂｕｆｆｅｒで２回ウェルを洗浄した後、ａｓｓａｙ ｄｉｌｕｅｎｔで５００倍に希釈したＳｔｒｅｐｔａｖｉｄｉｎ－ｈｏｒｓｅｒａｄｉｓｈ Ｐｅｒｏｘｉｄａｓｅ Ｃｏｎｊｕｇａｔｅ（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ Ｂｉｏ－Ｓｃｉｅｎｃｅｓ社製 ＃ＲＰＮ１２３１Ｖ）を１００μｌ／ウェルで添加し、室温で１時間静置した。

ウェル中の液を除去し、ｗａｓｈ ｂｕｆｆｅｒで２回ウェルを洗浄した後、Ｓｕｂｓｔｒａｔｅ Ｓｏｌｕｔｉｏｎを１００μｌ／ウェルで添加し攪拌しながら発色反応を行った。発色後、ｂｌｏｃｋｉｎｇ ｂｕｆｆｅｒを１００μｌ／ウェルで添加して発色反応を止め、プレートリーダーで４５０ｎｍの吸光度を測定した。

[0191] その結果、ｂＭ３０のみを添加したウェルの吸光度はＢ７－Ｈ３バリアント１の細胞外領域ポリペプチド及びＢ７－Ｈ３バリアント２の細胞外領域ポリペプチドを付着させたプレートでそれぞれ２．３６±０．０５、１．９０±０．２０（平均値±標準偏差（ｎ＝１２））であった。

[0192] 図１０のグラフ中の吸光度はそれぞれ平均値±標準偏差（ｎ＝３）で示している。コントロールＩｇＧは、ｂＭ３０のＢ７－Ｈ３に対する結合を阻害しなかった。

一方、ｂＭ３０のＢ７－Ｈ３に対する結合は、Ｂ７－Ｈ３バリアント１の細胞外領域ポリペプチド及びＢ７－Ｈ３バリアント２の細胞外領域ポリペプチドを付着させたプレートいずれにおいてもＭ３０抗体自身又はそのキメラ抗体であるｃＭ３０抗体及びヒト化抗体であるＭ３０－Ｈ１－Ｌ４により阻害されることが示された。

[0193] 即ち、ｃＭ３０抗体及びヒト化抗体（Ｍ３０－Ｈ１－Ｌ４抗体）はＭ３０抗体と同一のＢ７－Ｈ３抗原エピトープを認識していることが示された。

実施例１２．ヒト化Ｍ３０抗体の活性

１２）－１　ヒト化Ｍ３０抗体のＡＤＣＰ活性

健常人ＰＢＭＣを定法に従い分離した。ＲＰＭＩ－１０％ＦＣＳ中に懸濁し、フラスコ中に播種した。CO_2インキュベータで一晩培養を行った。培養上清を捨て、フラスコに付着した細胞にＭ－ＣＳＦ及びＧＭ－ＣＳＦ（ＰｅｐｒｏＴｅｃｈ社）を添加したＲＰＭＩ－１０％ＦＣＳを加え、２週間培養した。細胞をＴｒｙｐＬＥで剥離し、回収した。５００μｌ／ｗｅｌｌ（１ｘ10^5 ｃｅｌｌ／ｗｅｌｌ）を２４ ｗｅｌｌ ｐｌａｔｅに添加し、３７℃で１晩培養した。本細胞をエフェクター細胞とした。

ターゲット細胞となるＮＣＩ－Ｈ３２２細胞のラベリングをＰＫＨ２６ ｄｙｅ ｌａｂｅｌｉｎｇ ｋｉｔ（Ｓｉｇｍａ社）を用いて行った。ターゲット細胞をＴｒｙｐＬＥで剥離し、ＰＢＳで２回洗浄した。細胞をＤｉｌｕｅｎｔ Ｃで$1x10^7$ ｃｅｌｌｓ／ｍｌになるよう懸濁した。ＰＫＨ２６ ｄｙｅ ｓｔｏｃｋ（１ｍＭ）をＤｉｌｕｅｎｔ Ｃで８μＭに希釈し、

すぐに細胞浮遊液と等量のｄｙｅ希釈液を添加した。室温に５分間放置した。血清１ｍｌを添加し、更に血清入り培地を加え２回洗浄を行った。

[0194] Ｍ３０抗体、ｃＭ３０抗体及びヒト化Ｍ３０抗体（Ｍ３０－Ｈ１－Ｌ４抗体）をＲＰＭＩ－１０％ＦＣＳ（インビトロジェン社）で２０μｇ／ｍｌに希釈した。ターゲット細胞（ＮＣＩ－Ｈ３２２細胞）を、２ｘ１０^{6} ｃｅｌｌｓ／１００μｌ／ｔｕｂｅ分注、混合した。氷上で３０分間静置した。

上清を捨て、培養液で２回洗浄した。培養液５００μＬに懸濁した。

エフェクター細胞から上清を除き、Ｍ３０抗体、ｃＭ３０抗体及びヒト化Ｍ３０抗体（Ｍ３０－Ｈ１－Ｌ４抗体）を処理し培養液にサスペンドした細胞を添加し、混合した。CO_2インキュベータ内で３時間培養した。

Ｔｒｙｐｓｉｎ－ＥＤＴＡで細胞を剥離し、細胞を回収した。

回収した細胞にＦＩＴＣ標識抗マウスＣＤ１１ｂ抗体（ベクトンディッキンソン社）を加え、氷上で３０分間静置した。

上清を捨て、培養液で２回洗浄した。

回収した細胞を３００ｕｌの場位置で懸濁し、ＦＡＣＳ Ｃａｌｉｂｕｒ（ベクトンディッキンソン社）にて測定を行った。ＣＤ１１ｂ陽性のマクロファージ細胞において、ＰＫＨ２６陽性画分を貪食陽性細胞として評価を行った。

[0195] その結果を図１１に示す。

ヒト化Ｍ３０抗体（Ｍ３０－Ｈ１－Ｌ４抗体）を添加した群では、Ｍ３０抗体及びｃＭ３０抗体を添加した群と同様に、ＮＣＩ－Ｈ３２２細胞に対してＡＤＣＰ活性が認められた。

１２）－２ ヒト化Ｍ３０抗体のＡＤＣＣ活性

健常人ＰＢＭＣを定法に従い分離した。ＲＰＭＩ－１０％ＦＣＳ中に懸濁し、フラスコ中に播種した。CO_2インキュベータで一晩培養を行った。

浮遊細胞を回収し、洗浄操作を行い末梢血リンパ球（ＰＢＬ）とした。得られたＰＢＬをＦｅｔａｌ Ｂｏｖｉｎｅ Ｓｅｒｕｍ（インビトロジェン社製）を１０％含むフェノールレッド不含ＲＰＭＩ１６４０（インビトロジェ

ン社製）（以下「ＡＤＣＣ用培地」と略す。）に懸濁し、セルストレイナー（ポアサイズ４０μｍ：ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ社製）を通した後、生細胞数をトリパンブルー色素排除試験にて計測した。脾臓細胞懸濁液を遠心後、培地を除去し、生細胞密度で２．５×１０^{6}細胞／ｍｌになるようＡＤＣＣ用培地で再懸濁しエフェクター細胞とした。

[0196] ＮＣＩ－Ｈ３２２細胞をトリプシン処理し、１０％ＦＢＳ含有ＲＰＭＩ１６４０で細胞を洗浄後、１０％　ＦＢＳ含有ＲＰＭＩ１６４０に再懸濁し、各細胞４×１０^{6}個を０．２２μｍフィルターで滅菌したＣｈｒｏｍｉｕｍ－５１（５５５０ｋＢｑ）と混合し、３７℃、５％　CO_2の条件下で１時間ラベルした。ラベルした細胞をＡＤＣＣ用培地で３回洗浄し、ＡＤＣＣ用培地で２×１０^{5}細胞／ｍｌになるよう再懸濁し標的細胞とした。

２×１０^{5}細胞／ｍｌの標的細胞を５０μｌ／ウェルで９６穴Ｕ底マイクロプレートに分注した。そこにエフェクター細胞添加後の終濃度で１、１０、１００、１０００ｎｇ／ｍｌになるようＡＤＣＣ用培地で希釈したｃＭ３０抗体並びにヒト化Ｍ３０抗体（Ｍ３０－Ｈ１－Ｌ４、Ｍ３０－Ｈ４－Ｌ４、Ｍ３０－Ｈ１－Ｌ５、Ｍ３０－Ｈ１－Ｌ６、Ｍ３０－Ｈ１－Ｌ７）の各抗体を５０μｌ添加した。そこに２．５×１０^{6}細胞／ｍｌのエフェクター細胞を１００μｌ添加し、３７℃、５％　CO_2の条件下で４時間培養した。上清をＬｕｍａＰｌａｔｅ（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ社製）に回収し、ガンマカウンターで放出されたガンマ線量を測定した。ＡＤＣＣ活性による細胞溶解率は次式で算出した。

[0197] 細胞溶解率（％）＝（Ａ－Ｂ）／（Ｃ－Ｂ）×１００

Ａ：サンプルウェルのカウント

Ｂ：自然放出（抗体・エフェクター細胞非添加ウェル）カウントの平均値（ｎ＝３）。抗体添加時とエフェクター細胞添加時にそれぞれＡＤＣＣ用培地を５０μｌ、１００μｌ添加した。それ以外はサンプルウェルと同様の操作を行った。

[0198] Ｃ：最大放出（標的細胞を界面活性剤で溶解させたウェル）カウントの平

均値（ｎ＝３）。抗体添加時にＡＤＣＣ用培地を５０μｌ、エフェクター細胞添加時にＴｒｉｔｏｎ－Ｘ１００を２％（ｖ／ｖ）含むＡＤＣＣ用培地を１００μｌを添加した。それ以外はサンプルウェルと同様の操作を行った。

[0199] その結果を表４及び図１２に示す。

３回の実験の平均値で、エラーバーは、標準偏差を示し、Ｐ値はＳｔｕｄｅｎｔ’ｓ ｔ－ｔｅｓｔにより算出した。

Ｍ３０－Ｈ１－Ｌ４抗体添加群では、ｃＭ３０抗体添加群と同様に、ＡＤＣＣ活性が認められた。その他のヒト化Ｍ３０抗体（Ｍ３０－Ｈ４－Ｌ４、Ｍ３０－Ｈ１－Ｌ５、Ｍ３０－Ｈ１－Ｌ６、Ｍ３０－Ｈ１－Ｌ７）についても同様にＡＤＣＣ活性が認められた。

[0200] [表4]

	1 ng/mL		10 ng/mL		100 ng/mL		1000 ng/mL	
	平均値 (%)	標準偏差	平均値 (%)	標準偏差	平均値 (%)	標準偏差	平均値 (%)	標準偏差
ヒトＩｇＧ	3.8	1.6	6.8	1.5	3.9	1.4	6.5	0.5
ｃＭ３０	11.1	1.2	40.5	2.7	84.3	2.3	88.2	4.0
M30-H1-L4	11.5	1.0	43.1	0.1	83.6	0.7	84.7	1.0
M30-H4-L4	7.6	1.1	26.6	1.6	68.9	2.6	81.7	1.5
M30-H1-L5	9.6	1.1	30.5	2.0	67.8	5.0	78.8	3.0
M30-H1-L6	9.8	1.6	32.0	2.2	74.7	4.0	81.3	2.0
M30-H1-L7	8.3	0.7	29.4	0.7	71.7	2.0	80.7	0.7

[0201] １２）－３ ヒト化Ｍ３０抗体のｉｎ ｖｉｖｏ抗腫瘍効果

ＭＤＡ－ＭＢ－２３１細胞をトリプシン処理して培養フラスコより剥がした後、１０％ ＦＢＳ含有ＲＰＭＩ１６４０培地（ライフテクノロジーズ社）に懸濁後遠心し、上清を除去した。細胞を同培地で２回洗浄したあと、ＢＤマトリゲル基底膜マトリックス（ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ社製）に懸濁し、６週齢のマウス（ＦＯＸ ＣＨＡＳＥ ＳＣＩＤ Ｃ．Ｂ．１７／Ｉｃｒ－ｓｃｉｄ／ｓｃｉｄＪｃｌ、日本クレア株式会社）に５×１０^{6}細胞／マウスで腋窩部皮下に移植した。移植日を０日目として１４、２１、２８、３５、４２日目にヒト化Ｍ３０抗体（Ｍ３０－Ｈ１－Ｌ４抗体）を１０、１、０．１、０．０１ｍｇ／ｋｇ（各約２００、２０、２、０．２μｇ／マウ

ス）で腹腔内投与した。腫瘍体積を１４、１８、２１、２５、２８、３１、３５、３９、４２、４５、４９日目に測定し、抗体投与による抗腫瘍効果を検討した。

その結果、ヒト化Ｍ３０抗体（Ｍ３０－Ｈ１－Ｌ４抗体）の１０、１、０．１ｍｇ／ｋｇ投与群では、抗体を投与しない無処置群に比べ、有意に腫瘍増殖が抑制された。４９日目時点の腫瘍重量について無処置群との比較でヒト化Ｍ３０抗体（Ｍ３０－Ｈ１－Ｌ４抗体）の１０、１および０．１ｍｇ／ｋｇ投与群の腫瘍増殖阻害率（％）（＝１００－（抗体投与群の腫瘍重量の平均値）／（無処置群の腫瘍重量の平均値）×１００）はそれぞれ、６７、５４、５１％で、Ｐ値はいずれもＰ＜０．０００１であった。Ｐ値はＤｕｎｎｅｔｔ型多重比較により算出した。

また、４９日目時点でのＭ３０－Ｈ１－Ｌ４抗体の腫瘍増殖阻害率（％）（＝１００－（抗体投与群の腫瘍体積の平均値）／（無処置群の腫瘍体積の平均値）×１００）は１０、１、０．１、０．０１ｍｇ／ｋｇ投与群でそれぞれ８４、６８、６１、３０％であり、ヒト化Ｍ３０抗体（Ｍ３０－Ｈ１－Ｌ４抗体）は、Ｍ３０抗体及びｃＭ３０抗体と同様に、ｉｎ　ｖｉｖｏで非常に強い抗腫瘍効果が観察され、その効果には用量反応性が確認された（図３８）。

産業上の利用可能性

[0202] 本発明の抗Ｂ７－Ｈ３抗体は抗腫瘍活性を有し、該抗Ｂ７－Ｈ３抗体を含む医薬組成物は抗癌剤となり得る。

配列表フリーテキスト

[0203] 配列番号１　－　ＰＣＲプライマー１

配列番号２　－　ＰＣＲプライマー２

配列番号３　－　ＣＭＶ　ｐｒｏｍｏｔｅｒプライマー：プライマー３

配列番号４　－　ＢＧＨ　ｒｅｖｅｒｓｅプライマー：プライマー４

配列番号５　－　Ｂ７－Ｈ３バリアント１のヌクレオチド配列

配列番号６　－　Ｂ７－Ｈ３バリアント１のアミノ酸配列

配列番号７　－　ＰＣＲプライマー５

配列番号８　－　ＰＣＲプライマー６

配列番号９　－　Ｂ７－Ｈ３バリアント２のヌクレオチド配列

配列番号１０　－　Ｂ７－Ｈ３バリアント２のアミノ酸配列

配列番号１１　－　ＰＣＲプライマー７

配列番号１２　－　ＰＣＲプライマー８

配列番号１３　－　ＰＣＲプライマー９

配列番号１４　－　ＰＣＲプライマー１０

配列番号１５　－　ＰＣＲプライマー１１

配列番号１６　－　ＰＣＲプライマー１２

配列番号１７　－　ＰＣＲプライマー１３

配列番号１８　－　ＰＣＲプライマー１４

配列番号１９　－　ＰＣＲプライマー１５

配列番号２０　－　Ｂ７－Ｈ３　ＩｇＶ１のヌクレオチド配列

配列番号２１　－　Ｂ７－Ｈ３　ＩｇＶ１のアミノ酸配列

配列番号２２　－　Ｂ７－Ｈ３　ＩｇＣ１のヌクレオチド配列

配列番号２３　－　Ｂ７－Ｈ３　ＩｇＣ１のアミノ酸配列

配列番号２４　－　Ｂ７－Ｈ３　ＩｇＶ２のヌクレオチド配列

配列番号２５　－　Ｂ７－Ｈ３　ＩｇＶ２のアミノ酸配列

配列番号２６　－　Ｂ７－Ｈ３　ＩｇＣ２のヌクレオチド配列

配列番号２７　－　Ｂ７－Ｈ３　ＩｇＣ２のアミノ酸配列

配列番号２８　－　Ｂ７－Ｈ３　ＩｇＣ１－Ｖ２－Ｃ２のヌクレオチド配列

配列番号２９　－　Ｂ７－Ｈ３　ＩｇＣ１－Ｖ２－Ｃ２のアミノ酸配列

配列番号３０　－　Ｂ７－Ｈ３　ＩｇＶ２－Ｃ２のヌクレオチド配列

配列番号３１　－　Ｂ７－Ｈ３　ＩｇＶ２－Ｃ２のアミノ酸配列

配列番号３２　－　Ｂ７ＲＰ－１のヌクレオチド配列

配列番号３３　－　Ｂ７ＲＰ－１のアミノ酸配列

配列番号３４　－　Ｂ７－Ｈ１のヌクレオチド配列

配列番号３５　－　Ｂ７－Ｈ１のアミノ酸配列

配列番号３６　－　Ｂ７－ＤＣのヌクレオチド配列

配列番号３７　－　Ｂ７－ＤＣのアミノ酸配列

配列番号３８　－　ＣＤ８０のヌクレオチド配列

配列番号３９　－　ＣＤ８０のアミノ酸配列

配列番号４０　－　ＣＤ８６のヌクレオチド配列

配列番号４１　－　ＣＤ８６のアミノ酸配列

配列番号４２　－　Ｂ７－Ｈ４のヌクレオチド配列

配列番号４３　－　Ｂ７－Ｈ４のアミノ酸配列

配列番号４４　－　マウス抗体Ｍ３０重鎖のＮ末端のアミノ酸配列

配列番号４５　－　マウス抗体Ｍ３０軽鎖のＮ末端のアミノ酸配列

配列番号４６　－　ＰＣＲプライマー１６

配列番号４７　－　ＰＣＲプライマー１７

配列番号４８　－　ＰＣＲプライマー１８

配列番号４９　－　ＰＣＲプライマー１９

配列番号５０　－　Ｍ３０抗体重鎖をコードするｃＤＮＡのヌクレオチド配列

配列番号５１　－　Ｍ３０抗体重鎖のアミノ酸配列

配列番号５２　－　Ｍ３０抗体軽鎖をコードするｃＤＮＡのヌクレオチド配列

配列番号５３　－　Ｍ３０抗体軽鎖のアミノ酸配列

配列番号５４　－　ＰＣＲプライマー２０

配列番号５５　－　ＰＣＲプライマー２１

配列番号５６　－　ヒトκ鎖分泌シグナル、ヒトκ鎖定常領域及びヒトｐｏｌｙＡ付加シグナルをコードするＤＮＡ配列

配列番号５７　－　ヒトＩｇＧ１シグナル配列及び定常領域のアミノ酸をコードするＤＮＡ配列を含むＤＮＡ断片

配列番号５８　－　Ｍ３０抗体キメラタイプ軽鎖をコードするｃＤＮＡのヌ

クレオチド配列

配列番号５９　－　Ｍ３０抗体キメラタイプ軽鎖のアミノ酸配列

配列番号６０　－　ＰＣＲプライマー２２

配列番号６１　－　ＰＣＲプライマー２３

配列番号６２　－　Ｍ３０抗体キメラタイプ重鎖をコードするｃＤＮＡのヌクレオチド配列

配列番号６３　－　Ｍ３０抗体キメラタイプ重鎖のアミノ酸配列

配列番号６４　－　ＰＣＲプライマー２４

配列番号６５　－　ＰＣＲプライマー２５

配列番号６６　－　ＰＣＲプライマー２６

配列番号６７　－　ＰＣＲプライマー２７

配列番号６８　－　ＰＣＲプライマー２８

配列番号６９　－　ＰＣＲプライマー２９

配列番号７０　－　Ｍ３０－Ｌ１タイプ軽鎖のヌクレオチド配列

配列番号７１　－　Ｍ３０－Ｌ１タイプ軽鎖のアミノ酸配列

配列番号７２　－　Ｍ３０－Ｌ２タイプ軽鎖のヌクレオチド配列

配列番号７３　－　Ｍ３０－Ｌ２タイプ軽鎖のアミノ酸配列

配列番号７４　－　Ｍ３０－Ｌ３タイプ軽鎖のヌクレオチド配列

配列番号７５　－　Ｍ３０－Ｌ３タイプ軽鎖のアミノ酸配列

配列番号７６　－　Ｍ３０－Ｌ４タイプ軽鎖のヌクレオチド配列

配列番号７７　－　Ｍ３０－Ｌ４タイプ軽鎖のアミノ酸配列

配列番号７８　－　Ｍ３０－Ｌ５タイプ軽鎖のヌクレオチド配列

配列番号７９　－　Ｍ３０－Ｌ５タイプ軽鎖のアミノ酸配列

配列番号８０　－　Ｍ３０－Ｌ６タイプ軽鎖のヌクレオチド配列

配列番号８１　－　Ｍ３０－Ｌ６タイプ軽鎖のアミノ酸配列

配列番号８２　－　Ｍ３０－Ｌ７タイプ軽鎖のヌクレオチド配列

配列番号８３　－　Ｍ３０－Ｌ７タイプ軽鎖のアミノ酸配列

配列番号８４　－　Ｍ３０－Ｈ１タイプ重鎖のヌクレオチド配列

配列番号８５　－　Ｍ３０－Ｈ１タイプ重鎖のアミノ酸配列

配列番号８６　－　Ｍ３０－Ｈ２タイプ重鎖のヌクレオチド配列

配列番号８７　－　Ｍ３０－Ｈ２タイプ重鎖のアミノ酸配列

配列番号８８　－　Ｍ３０－Ｈ３タイプ重鎖のヌクレオチド配列

配列番号８９　－　Ｍ３０－Ｈ３タイプ重鎖のアミノ酸配列

配列番号９０　－　Ｍ３０－Ｈ４タイプ重鎖のヌクレオチド配列

配列番号９１　－　Ｍ３０－Ｈ４タイプ重鎖のアミノ酸配列

配列番号９２　－　Ｍ３０抗体のＣＤＲＨ１のアミノ酸配列

配列番号９３　－　Ｍ３０抗体のＣＤＲＨ２のアミノ酸配列

配列番号９４　－　Ｍ３０抗体のＣＤＲＨ３のアミノ酸配列

配列番号９５　－　Ｍ３０抗体のＣＤＲＬ１のアミノ酸配列

配列番号９６　－　Ｍ３０抗体のＣＤＲＬ２のアミノ酸配列

配列番号９７　－　Ｍ３０抗体のＣＤＲＬ３のアミノ酸配列

請求の範囲

［請求項1］ 以下の特性を有することを特徴とする抗体又は当該抗体の機能性断片；

（ａ）Ｂ７－Ｈ３に特異的に結合する

（ｂ）抗体依存性細胞媒介食作用（ＡＤＣＰ）活性を有する

（ｃ）ｉｎ　ｖｉｖｏで抗腫瘍活性を有する

［請求項2］ Ｂ７－Ｈ３が配列番号６又は１０に記載のアミノ酸配列からなる分子である請求項１に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片。

［請求項3］ Ｂ７－Ｈ３のドメインであるＩｇＣ１及び／又はＩｇＣ２に結合する請求項１又は２に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片。

［請求項4］ ＩｇＣ１が配列番号６においてアミノ酸番号１４０乃至２４４に記載のアミノ酸配列からなるドメインであり、ＩｇＣ２が配列番号６においてアミノ酸番号３５８乃至４５６に記載のアミノ酸配列からなるドメインである請求項３に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片。

［請求項5］ Ｂ７－Ｈ３への結合に対してＭ３０抗体と競合阻害活性を有する請求項１乃至４のいずれか１項に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片。

［請求項6］ 抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）活性及び／又は補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）活性を有する請求項１乃至５のいずれか１項に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片。

［請求項7］ 腫瘍が癌である請求項１乃至６のいずれか１項に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片。

［請求項8］ 癌が肺癌、乳癌、前立腺癌、膵癌、大腸癌、メラノーマ、肝癌、卵巣癌、膀胱癌、胃癌、食道癌又は腎癌である請求項７に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片。

［請求項9］ 重鎖における相補性決定領域として配列番号９２に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１、配列番号９３に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２及び配列番号９４に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３、並びに軽鎖における相補性決定領域として配列番号９５に記載の

アミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１、配列番号９６に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２及び配列番号９７に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ３を有する請求項１乃至８のいずれか１項に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片。

[請求項10] 配列番号５１においてアミノ酸番号２０乃至１４１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖の可変領域及び配列番号５３においてアミノ酸番号２３乃至１３０に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖の可変領域を有する請求項１乃至９のいずれか１項に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片。

[請求項11] 定常領域がヒト由来定常領域である請求項１乃至１０のいずれか１項に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片。

[請求項12] 配列番号６３に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号５９に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖を有する請求項１１に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片。

[請求項13] ヒト化されている請求項１乃至１２のいずれか１項に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片。

[請求項14] （ａ）配列番号８５においてアミノ酸番号２０乃至１４１に記載のアミノ酸配列、（ｂ）配列番号８７においてアミノ酸番号２０乃至１４１に記載のアミノ酸配列、（ｃ）配列番号８９においてアミノ酸番号２０乃至１４１に記載のアミノ酸配列、（ｄ）配列番号９１においてアミノ酸番号２０乃至１４１に記載のアミノ酸配列、（ｅ）（ａ）乃至（ｄ）の配列に対して少なくとも９５％以上の相同性を有するアミノ酸配列、及び（ｆ）（ａ）乃至（ｄ）の配列において１又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなる群から選択されたアミノ酸配列からなる重鎖の可変領域、並びに（ｇ）配列番号７１においてアミノ酸番号２１乃至１２８に記載のアミノ酸配列、（ｈ）配列番号７３においてアミノ酸番号２１乃至１２８に記載のアミノ酸配列、（ｉ）配列番号７５においてアミノ酸番号２１乃至１２

８に記載のアミノ酸配列、（ｊ）配列番号７７においてアミノ酸番号２１乃至１２８に記載のアミノ酸配列、（ｋ）配列番号７９においてアミノ酸番号２１乃至１２８に記載のアミノ酸配列、（ｌ）配列番号８１においてアミノ酸番号２１乃至１２８に記載のアミノ酸配列、（ｍ）配列番号８３においてアミノ酸番号２１乃至１２８に記載のアミノ酸配列、（ｎ）（ｇ）乃至（ｍ）の配列に対して少なくとも９５％以上の相同性を有するアミノ酸配列、及び(ｏ)（ｇ）乃至（ｍ）の配列において１又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなる群から選択されたアミノ酸配列からなる軽鎖の可変領域、を有する請求項１３に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片。

［請求項15］ 配列番号８５においてアミノ酸番号２０乃至１４１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖の可変領域及び配列番号７１においてアミノ酸番号２１乃至１２８に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖の可変領域、配列番号８５においてアミノ酸番号２０乃至１４１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖の可変領域及び配列番号７３においてアミノ酸番号２１乃至１２８に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖の可変領域、配列番号８５においてアミノ酸番号２０乃至１４１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖の可変領域及び配列番号７５においてアミノ酸番号２１乃至１２８に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖の可変領域、配列番号８５においてアミノ酸番号２０乃至１４１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖の可変領域及び配列番号７７においてアミノ酸番号２１乃至１２８に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖の可変領域、配列番号８５においてアミノ酸番号２０乃至１４１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖の可変領域及び配列番号７９においてアミノ酸番号２１乃至１２８に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖の可変領域、配列番号８５においてアミノ酸番号２０乃至１４１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖の可変領域及び配列番号８１においてアミノ酸番号２１乃至１２８に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖の可変領域、配列番号８５においてアミ

ノ酸番号２０乃至１４１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖の可変領域及び配列番号８３においてアミノ酸番号２１乃至１２８に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖の可変領域、配列番号９１においてアミノ酸番号２０乃至１４１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖の可変領域及び配列番号７１においてアミノ酸番号２１乃至１２８に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖の可変領域、配列番号９１においてアミノ酸番号２０乃至１４１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖の可変領域及び配列番号７３においてアミノ酸番号２１乃至１２８に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖の可変領域、配列番号９１においてアミノ酸番号２０乃至１４１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖の可変領域及び配列番号７５においてアミノ酸番号２１乃至１２８に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖の可変領域、並びに配列番号９１においてアミノ酸番号２０乃至１４１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖の可変領域及び配列番号７７においてアミノ酸番号２１乃至１２８に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖の可変領域からなる群から選択される重鎖の可変領域及び軽鎖の可変領域を有する請求項１４に記載の抗体又は抗体の機能性断片。

［請求項16］ 配列番号８５においてアミノ酸番号２０乃至４７１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号７１においてアミノ酸番号２１乃至２３３に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖、配列番号８５においてアミノ酸番号２０乃至４７１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号７３においてアミノ酸番号２１乃至２３３に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖、配列番号８５においてアミノ酸番号２０乃至４７１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号７５においてアミノ酸番号２１乃至２３３に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖、配列番号８５においてアミノ酸番号２０乃至４７１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号７７においてアミノ酸番号２１乃至２３３に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖、配列番号８５においてアミノ酸番号２

０乃至４７１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号７９においてアミノ酸番号２１乃至２３３に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖、配列番号８５においてアミノ酸番号２０乃至４７１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号８１においてアミノ酸番号２１乃至２３３に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖、配列番号８５においてアミノ酸番号２０乃至４７１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号８３においてアミノ酸番号２１乃至２３３に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖、配列番号９１においてアミノ酸番号２０乃至４７１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号７１においてアミノ酸番号２１乃至２３３に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖、配列番号９１においてアミノ酸番号２０乃至４７１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号７３においてアミノ酸番号２１乃至２３３に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖、配列番号９１においてアミノ酸番号２０乃至４７１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号７５においてアミノ酸番号２１乃至２３３に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖、並びに配列番号９１においてアミノ酸番号２０乃至４７１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号７７においてアミノ酸番号２１乃至２３３に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖からなる群から選択される重鎖及び軽鎖を有する請求項１４又は１５に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片。

［請求項17］ 配列番号８５に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号７１に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖、配列番号８５に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号７３に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖、配列番号８５に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号７５に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖、配列番号８５に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号７７に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖、配列番号８５に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号７９に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖、配列番号８５に記載のアミノ

酸配列からなる重鎖及び配列番号８１に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖、配列番号８５に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号８３に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖、配列番号９１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号７１に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖、配列番号９１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号７３に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖、配列番号９１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号７５に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖、並びに配列番号９１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号７７に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖からなる群から選択される重鎖及び軽鎖を有する請求項１４乃至１６のいずれか１項に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片。

[請求項18] 機能性断片がＦａｂ、Ｆ(ａｂ)２、Ｆａｂ’及びＦｖからなる群から選択される請求項１乃至１７のいずれか１項に記載の抗体の機能性断片。

[請求項19] 請求項１乃至１８のいずれか1項に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片をコードするポリヌクレオチド。

[請求項20] 配列番号５０における５８乃至４２３のヌクレオチド配列、及び配列番号５２における６７乃至３９０のヌクレオチド配列を有する請求項１９に記載のポリヌクレオチド。

[請求項21] 配列番号６２のヌクレオチド配列、及び配列番号５８のヌクレオチド配列である請求項１９又は２０に記載のポリヌクレオチド。

[請求項22] （ａ）配列番号８４においてヌクレオチド番号５８乃至４２３に記載のヌクレオチド配列、（ｂ）配列番号８６においてヌクレオチド番号５８乃至４２３に記載のヌクレオチド配列、（ｃ）配列番号８８においてヌクレオチド番号５８乃至４２３に記載のヌクレオチド配列、（ｄ）配列番号９０においてヌクレオチド番号５８乃至４２３に記載のヌクレオチド配列、及び（ｅ）（ａ）乃至（ｄ）に記載のヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとスト

リンジェントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチドが有するヌクレオチド配列からなる群から選択されたヌクレオチド配列、並びに（ｆ）配列番号７０においてヌクレオチド番号６１乃至３８４に記載のヌクレオチド配列、（ｇ）配列番号７２においてヌクレオチド番号６１乃至３８４に記載のヌクレオチド配列、（ｈ）配列番号７４においてヌクレオチド番号６１乃至３８４に記載のヌクレオチド配列、（ｉ）配列番号７６においてヌクレオチド番号６１乃至３８４に記載のヌクレオチド配列、（ｊ）配列番号７８においてヌクレオチド番号６１乃至３８４に記載のヌクレオチド配列、（ｋ）配列番号８０においてヌクレオチド番号６１乃至３８４に記載のヌクレオチド配列、（ｌ）配列番号８２においてヌクレオチド番号６１乃至３８４に記載のヌクレオチド配列、及び（ｍ）（ｆ）乃至（ｌ）に記載のヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチドが有するヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列を有する請求項１９又は２０に記載のポリヌクレオチド。

［請求項23］ 配列番号８４においてヌクレオチド番号５８乃至４２３に記載のヌクレオチド配列及び配列番号７０においてヌクレオチド番号６１乃至３８４に記載のヌクレオチド配列、配列番号８４においてヌクレオチド番号５８乃至４２３に記載のヌクレオチド配列及び配列番号７２においてヌクレオチド番号６１乃至３８４に記載のヌクレオチド配列、配列番号８４においてヌクレオチド番号５８乃至４２３に記載のヌクレオチド配列及び配列番号７４においてヌクレオチド番号６１乃至３８４に記載のヌクレオチド配列、配列番号８４においてヌクレオチド番号５８乃至４２３に記載のヌクレオチド配列及び配列番号７６においてヌクレオチド番号６１乃至３８４に記載のヌクレオチド配列、配列番号８４においてヌクレオチド番号５８乃至４２３に記載のヌクレオチド配列及び配列番号７８においてヌクレオチド番号６１乃至３８４

に記載のヌクレオチド配列、配列番号８４においてヌクレオチド番号５８乃至４２３に記載のヌクレオチド配列及び配列番号８０においてヌクレオチド番号６１乃至３８４に記載のヌクレオチド配列、配列番号８４においてヌクレオチド番号５８乃至４２３に記載のヌクレオチド配列及び配列番号８２においてヌクレオチド番号６１乃至３８４に記載のヌクレオチド配列、配列番号９０においてヌクレオチド番号５８乃至４２３に記載のヌクレオチド配列及び配列番号７０においてヌクレオチド番号６１乃至３８４に記載のヌクレオチド配列、配列番号９０においてヌクレオチド番号５８乃至４２３に記載のヌクレオチド配列及び配列番号７２においてヌクレオチド番号６１乃至３８４に記載のヌクレオチド配列、配列番号９０においてヌクレオチド番号５８乃至４２３に記載のヌクレオチド配列及び配列番号７４においてヌクレオチド番号６１乃至３８４に記載のヌクレオチド配列、並びに配列番号９０においてヌクレオチド番号５８乃至４２３に記載のヌクレオチド配列及び配列番号７６においてヌクレオチド番号６１乃至３８４に記載のヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列を有する請求項２２に記載のポリヌクレオチド。

［請求項24］ 配列番号８４においてヌクレオチド番号５８乃至１４１３に記載のヌクレオチド配列及び配列番号７０においてヌクレオチド番号６１乃至６９９に記載のヌクレオチド配列、配列番号８４においてヌクレオチド番号５８乃至１４１３に記載のヌクレオチド配列及び配列番号７２においてヌクレオチド番号６１乃至６９９に記載のヌクレオチド配列、配列番号８４においてヌクレオチド番号５８乃至１４１３に記載のヌクレオチド配列及び配列番号７４においてヌクレオチド番号６１乃至６９９に記載のヌクレオチド配列、配列番号８４においてヌクレオチド番号５８乃至１４１３に記載のヌクレオチド配列及び配列番号７６においてヌクレオチド番号６１乃至６９９に記載のヌクレオチド配列、配列番号８４においてヌクレオチド番号５８乃至１４１３に記載

のヌクレオチド配列及び配列番号７８においてヌクレオチド番号６１乃至６９９に記載のヌクレオチド配列、配列番号８４においてヌクレオチド番号５８乃至１４１３に記載のヌクレオチド配列及び配列番号８０においてヌクレオチド番号６１乃至６９９に記載のヌクレオチド配列、配列番号８４においてヌクレオチド番号５８乃至１４１３に記載のヌクレオチド配列及び配列番号８２においてヌクレオチド番号６１乃至６９９に記載のヌクレオチド配列、配列番号９０においてヌクレオチド番号５８乃至１４１３に記載のヌクレオチド配列及び配列番号７０においてヌクレオチド番号６１乃至６９９に記載のヌクレオチド配列、配列番号９０においてヌクレオチド番号５８乃至１４１３に記載のヌクレオチド配列及び配列番号７２においてヌクレオチド番号６１乃至６９９に記載のヌクレオチド配列、配列番号９０においてヌクレオチド番号５８乃至１４１３に記載のヌクレオチド配列及び配列番号７４においてヌクレオチド番号６１乃至６９９に記載のヌクレオチド配列、並びに配列番号９０においてヌクレオチド番号５８乃至１４１３に記載のヌクレオチド配列及び配列番号７６においてヌクレオチド番号６１乃至６９９に記載のヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列を有する請求項２２又は２３に記載のポリヌクレオチド。

［請求項25］ 配列番号８４に記載のヌクレオチド配列及び配列番号７０に記載のヌクレオチド配列、配列番号８４に記載のヌクレオチド配列及び配列番号７２に記載のヌクレオチド配列、配列番号８４に記載のヌクレオチド配列及び配列番号７４に記載のヌクレオチド配列、配列番号８４に記載のヌクレオチド配列及び配列番号７６に記載のヌクレオチド配列、配列番号８４に記載のヌクレオチド配列及び配列番号７８に記載のヌクレオチド配列、配列番号８４に記載のヌクレオチド配列及び配列番号８０に記載のヌクレオチド配列、配列番号８４に記載のヌクレオチド配列及び配列番号８２に記載のヌクレオチド配列、配列番号９０

に記載のヌクレオチド配列及び配列番号７０に記載のヌクレオチド配列、配列番号９０に記載のヌクレオチド配列及び配列番号７２に記載のヌクレオチド配列、配列番号９０に記載のヌクレオチド配列及び配列番号７４に記載のヌクレオチド配列、並びに配列番号９０に記載のヌクレオチド配列及び配列番号７６に記載のヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列である請求項２２乃至２４のいずれか１項に記載のポリヌクレオチド。

[請求項26] 請求項１９乃至２５のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドを含有する発現ベクター

[請求項27] 請求項２６に記載の発現ベクターにより形質転換された宿主細胞。

[請求項28] 宿主細胞が真核細胞である請求項２７に記載の宿主細胞。

[請求項29] 請求項２７又は２８に記載の宿主細胞を培養する工程、及び当該工程で得られた培養物から目的の抗体又は当該抗体の機能性断片を採取する工程を含むことを特徴とする当該抗体又は当該断片の製造方法。

[請求項30] 請求項２９の製造方法により得られることを特徴とする抗体又は当該抗体の機能性断片。

[請求項31] 機能性断片がＦａｂ、Ｆ(ａｂ)2、Ｆａｂ’及びＦｖからなる群から選択される請求項３０に記載の抗体の機能性断片。

[請求項32] 抗体依存性細胞傷害活性を増強させるために糖鎖修飾が調節されている請求項１乃至１８、３０、３１のいずれか1項に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片。

[請求項33] 請求項１乃至１８、３０乃至３２に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片の少なくとも一つを含有することを特徴とする医薬組成物。

[請求項34] 腫瘍治療用である請求項３３に記載の医薬組成物。

[請求項35] 請求項１乃至１８、３０乃至３２に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片の少なくとも一つ、及び少なくとも一つの癌治療剤を含有することを特徴とする腫瘍治療用医薬組成物。

[請求項36] 腫瘍が癌である請求項３４又は３５に記載の医薬組成物。

[請求項37] 癌が肺癌、乳癌、前立腺癌、膵癌、大腸癌、メラノーマ、肝癌、卵巣癌、膀胱癌、胃癌、食道癌又は腎癌である請求項３６に記載の医薬組成物。

[請求項38] 請求項１乃至１８、３０乃至３２に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片の少なくとも一つを個体に投与することを特徴とする腫瘍の治療方法。

[請求項39] 請求項１乃至１８、３０乃至３２に記載の抗体又は当該抗体の機能性断片の少なくとも一つ、及び少なくとも一つの癌治療剤を、同時に、別々に又は連続して個体に投与することを特徴とする腫瘍の治療方法。

[請求項40] 腫瘍が癌である請求項３８又は３９に記載の治療方法。

[請求項41] 癌が肺癌、乳癌、前立腺癌、膵癌、大腸癌、メラノーマ、肝癌、卵巣癌、膀胱癌、胃癌、食道癌又は腎癌である請求項４０に記載の治療方法。