明　細　書

発明の名称 ： 新規抗ＤＲ５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、アポトーシス誘導に関与する細胞表面受容体に結合する抗体、並びに該抗体を用いた癌、自己免疫疾患もしくは炎症性疾患の治療及び／又は予防法に関する。

背景技術

[0002] アポトーシスは、生体内において不要な細胞やダメージを受けた細胞を排除して正常な細胞数を保つという生理学的なプロセスに必須の現象である。このアポトーシス調節機構が癌・免疫疾患においてしばしば損なわれていること、及びアポトーシス調節経路の理解が進んだことにより、癌・免疫疾患治療に利用可能な新規アポトーシス誘導剤の開発が進められている。特に、デスレセプターに代表されるアポトーシス誘導に関与する細胞表面受容体に対するリガンドや受容体に結合能を有する抗体にはこれら疾患に対する治療作用が期待されている（例えば非特許文献１を参照）。デスレセプターの一種であるＤｅａｔｈ　Ｒｅｃｅｐｔｏｒ　５（ＤＲ５）は、ＫＩＬＬＥＲ、ＴＲＩＣＫ２Ａ、ＴＲＡＩＬ－Ｒ２、ＴＲＩＣＫＢ、又はＣＤ２６２とも呼ばれることがあり、細胞にアポトーシスを誘導するアゴニスト抗体が複数知られている（例えば、非特許文献２若しくは３、又は特許文献１乃至６を参照）。いくつかの抗体は、現在、治療薬候補として臨床での開発段階にあり、当該受容体を発現している細胞（癌細胞・免疫疾患関連細胞）特異的に、アゴニスト的に作用し、これを死滅させる治療効果が期待されている。抗体による抗腫瘍作用にはＤＲ５の発現が必須であるものの、作用と発現レベルとの相関性は無いことが前臨床試験で明らかとなっている（非特許文献４）。この点に関しては、アポトーシス経路に関わるｃａｓｐａｓｅ－８やＢｃｌ－２などの細胞内シグナル分子の発現量などの多種類の要因により細胞応答が規定されるためと考えられている（非特許文献５）。

先行技術文献

特許文献

[0003] 特許文献1：国際公開第ＷＯ９８／５１７９３号パンフレット

特許文献2：国際公開第ＷＯ２００１／８３５６０号パンフレット

特許文献3：国際公開第ＷＯ２００２／９４８８０号パンフレット

特許文献4：国際公開第ＷＯ２００３／５４２１６号パンフレット

特許文献5：国際公開第ＷＯ２００６／８３９７１号パンフレット

特許文献6：国際公開第ＷＯ２００７／２２１５７号パンフレット

非特許文献

[0004] 非特許文献1：Ｃｅｌｌ Ｄｅａｔｈ ａｎｄ Ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｉｏｎ，１０：６６－７５（２００３）

非特許文献2：Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，１６２：２５９７－２６０５（１９９９）

非特許文献3：Ｎａｔｕｒｅ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ，７（８）：９５４－９６０（２００１）

非特許文献4：Ｃｅｌｌ Ｄｅａｔｈ ａｎｄ Ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｉｏｎ，１０：６６－７５（２００３）

非特許文献5：Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｏｎｃｏｌｏｇｙ，２６：３６２１－３６３０（２００８）

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 本発明の課題は、癌に対して治療効果を有する医薬品となる抗体、該抗体の機能性断片、並びに該抗体又は該抗体の機能性断片をコードするポリヌクレオチドを提供することである。

課題を解決するための手段

[0006] 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、細胞に顕著なアポトーシス誘導能を示す抗体を見出して、本発明を完成させた。

これにより、既存の抗体では十分な治療効果が得られない患者においても有効な治療効果をもたらす。

すなわち、本発明は以下の発明を包含する。

（１）重鎖配列が、CDRH1、CDRH2、CDRH3を有する可変領域を含み、前記CDRH1は配列番号８２に示されるアミノ酸配列からなり、前記CDRH2は配列番号８３又は８９に示されるいずれか一つのアミノ酸配列からなり、前記CDRH3は、配列番号８４に示されるアミノ酸配列からなること；及び

軽鎖配列がCDRL1、CDRL2、CDRL3を有する可変領域を含み、前記CDRL1は配列番号７９、８５、８６、８７又は８８に示されるいずれか一つのアミノ酸配列からなり、前記CDRL2は配列番号８０に示されるアミノ酸配列からなり、前記CDRL3は、配列番号８１に示されるアミノ酸配列からなること；

を特徴とする抗体又は該抗体の機能性断片。

（２）配列番号２０に示されるアミノ酸配列の２０乃至１４１番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域配列及び配列番号１６に示されるアミノ酸配列の２１乃至１３４番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域配列を含むことを特徴とする（１）に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

（３）キメラ抗体であることを特徴とする、（１）又は（２）に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

（４）配列番号２０に示されるアミノ酸配列の２０乃至４７１番目のアミノ酸残基からなる重鎖配列及び配列番号１６に示されるアミノ酸配列の２１乃至２３９番目のアミノ酸残基からなる軽鎖配列からなることを特徴とする（３）に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

（５）ヒト化されていることを特徴とする、（１）に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

（６）抗体又は該抗体の機能性断片であって、

（ａ）以下のアミノ酸配列からなる群から選択される重鎖可変領域配列：

ａ１）　配列番号４２に示されるアミノ酸配列の２０乃至１４１番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列；

ａ２）　配列番号７０に示されるアミノ酸配列の２０乃至１４１番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列；

ａ３）　ａ１）又はａ２）から選択されるアミノ酸配列と少なくとも９５％の相同性を持つアミノ酸配列；

ａ４）　ａ１）又はａ２）から選択されるアミノ酸配列と少なくとも９９％の相同性を持つアミノ酸配列；

ａ５）　ａ１）乃至ａ２）から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列に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；及び

（ｂ）以下のアミノ酸配列からなる群から選択される軽鎖可変領域配列：

ｂ１）　配列番号２８に示されるアミノ酸配列の２１乃至１３４番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列；

ｂ２）　配列番号５２に示されるアミノ酸配列の２１乃至１３４番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列；

ｂ３）　配列番号５８に示されるアミノ酸配列の２１乃至１３４番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列；

ｂ４）　配列番号６２に示されるアミノ酸配列の２１乃至１３４番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列；

ｂ５）　配列番号６６に示されるアミノ酸配列の２１乃至１３４番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列；

ｂ６）　ｂ１）乃至ａ５）から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列と少なくとも９５％の相同性を持つアミノ酸配列；

ｂ７）　ｂ１）乃至ｂ５）から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列と少なくとも９９％の相同性を持つアミノ酸配列；

ｂ８）　ｂ１）乃至５）から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列に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；

を含むことを特徴とする、（５）に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

（７）配列番号４２に示されるアミノ酸配列の２０乃至１４１番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域配列及び配列番号２８に示されるアミノ酸配列

の２１乃至１３４番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域配列を含むことを特徴とする（６）に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

（８）配列番号７０に示されるアミノ酸配列の２０乃至１４１番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域配列及び配列番号５２に示されるアミノ酸配列の２１乃至１３４番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域配列を含むことを特徴とする（６）に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

（９）配列番号７０に示されるアミノ酸配列の２０乃至１４１番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域配列及び配列番号５８に示されるアミノ酸配列の２１乃至１３４番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域配列を含むことを特徴とする（６）に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

（１０）配列番号７０に示されるアミノ酸配列の２０乃至１４１番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域配列及び配列番号６２に示されるアミノ酸配列の２１乃至１３４番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域配列を含むことを特徴とする（６）に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

（１１）配列番号７０に示されるアミノ酸配列の２０乃至１４１番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域配列及び配列番号６６に示されるアミノ酸配列の２１乃至１３４番目のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域配列を含むことを特徴とする（６）に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

（１２）配列番号４２に示されるアミノ酸配列の２０乃至４７１番目のアミノ酸残基からなる重鎖配列及び配列番号２８に示されるアミノ酸配列の２１乃至２３９番目のアミノ酸残基からなる軽鎖配列からなることを特徴とする（６）に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

（１３）配列番号７０に示されるアミノ酸配列の２０乃至４７１番目のアミノ酸残基からなる重鎖配列及び配列番号５２に示されるアミノ酸配列の２１乃至２３９番目のアミノ酸残基からなる軽鎖配列からなることを特徴とする（６）に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

（１４）配列番号７０に示されるアミノ酸配列の２０乃至４７１番目のアミノ酸残基からなる重鎖配列及び配列番号５８に示されるアミノ酸配列の２１

乃至２３９番目のアミノ酸残基からなる軽鎖配列からなることを特徴とする（６）に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

（１５）配列番号７０に示されるアミノ酸配列の２０乃至４７１番目のアミノ酸残基からなる重鎖配列及び配列番号６２に示されるアミノ酸配列の２１乃至２３９番目のアミノ酸残基からなる軽鎖配列からなることを特徴とする（６）に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

（１６）配列番号７０に示されるアミノ酸配列の２０乃至４７１番目のアミノ酸残基からなる重鎖配列及び配列番号６６に示されるアミノ酸配列の２１乃至２３９番目のアミノ酸残基からなる軽鎖配列からなることを特徴とする（６）に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

（１７）Ｆａｂ、Ｆ（ａｂ’）２、Ｆａｂ’及びＦｖからなる群から選択される、（１）乃至（１６）のいずれか一つに記載の抗体の機能性断片。

（１８）（１）乃至（１７）のいずれか一つに記載の抗体又は該抗体の機能性断片の少なくともいずれか一つを含有することを特徴とする、医薬組成物。

（１９）癌の治療及び／又は予防のための医薬組成物であることを特徴とする、（１８）に記載の医薬組成物。

（２０）（１）乃至（１７）に記載の抗体又は該抗体の機能性断片の少なくともいずれか一つ、並びに、ｐａｃｌｉｔａｘｅｌ、ｃａｒｂｏｐｌａｔｉｎ、ＣＰＴ－１１、又はｖｉｎｂｌａｓｔｉｎからなる群から選択される少なくともいずれか一つを含有することを特徴とする、癌の治療及び／又は予防のための医薬組成物。

（２１）癌が、肺癌、前立腺癌、甲状腺癌、胃癌、肝臓癌、卵巣癌、大腸癌、乳癌、膵臓癌、腎臓癌、子宮癌、メラノーマ、繊維肉腫、神経膠芽腫及び血球癌からなる群から選択される、（１９）又は（２０）に記載の医薬組成物。

（２２）（１）乃至（１７）に記載の抗体又は該抗体の機能性断片の少なくともいずれか一つを投与することを特徴とする、癌の治療及び／又は予防方

法。

（２３）（１）乃至（１７）に記載の抗体又は該抗体の機能性断片の少なくともいずれか一つ、並びに、ｐａｃｌｉｔａｘｅｌ、ｃａｒｂｏｐｌａｔｉｎ、ＣＰＴ－１１、ｖｉｎｂｌａｓｔｉｎ及び５－ＦＵからなる群から選択される少なくともいずれか一つを同時又は連続して投与することを特徴とする、癌の治療及び／又は予防方法。

（２４）癌が、肺癌、前立腺癌、甲状腺癌、胃癌、肝臓癌、卵巣癌、大腸癌、乳癌、膵臓癌、子宮癌、メラノーマ、神経膠芽腫及び血球癌からなる群から選択される、（２２）又は（２３）に記載の治療及び／又は予防方法。

（２５）（２）、（４）又は（６）乃至（１６）のいずれか一つに記載の抗体をコードするポリヌクレオチド。

（２６）（２５）に記載のポリヌクレオチドであって、配列番号１９に示されるヌクレオチド配列の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及び配列番号１５に示されるヌクレオチド配列の６１乃至４０２番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列を含むことを特徴とするポリヌクレオチド。

（２７）（２５）に記載のポリヌクレオチドであって、配列番号１９に示されるヌクレオチド配列の５８乃至１４１３番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列及び配列番号１５に示されるヌクレオチド配列の６１乃至７１７番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列を含むことを特徴とするポリヌクレオチド。

（２８）（２５）に記載のポリヌクレオチドであって、

（ａ）以下のヌクレオチド配列からなる群から選択されるポリヌクレオチド：

ａ１）　配列番号４１に示されるヌクレオチド配列の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；

ａ２）　配列番号６９に示されるヌクレオチド配列の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；

ａ３）　ａ１）又はａ２）から選択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するポリヌクレオチドが保有するヌクレオチド配列；

ａ４）　ａ１）又はａ２）から選択されるヌクレオチド配列に１乃至数個のアミノ酸残基が置換、欠失又は付加されたヌクレオチド配列；及び

（ｂ）以下のヌクレオチド配列からなる群から選択されるポリヌクレオチド：

ｂ１）　配列番号２７に示されるヌクレオチド配列の６１乃至４０２番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列；

ｂ２）　配列番号５１に示されるヌクレオチド配列の６１乃至４０２番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列；

ｂ３）　配列番号５７に示されるヌクレオチド配列の６１乃至４０２番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列；

ｂ４）　配列番号６１に示されるヌクレオチド配列の６１乃至４０２番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列；

ｂ５）　配列番号６５に示されるヌクレオチド配列の６１乃至４０２番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列；

ｂ６）　ｂ１）乃至ｂ５）から選択されるいずれか一つ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保有するヌクレオチド配列；

ｂ７）　ｂ１）乃至ｂ５）から選択されるいずれか一つのヌクレオチド配列に１乃至数個のヌクレオチドが置換、欠失又は付加されたヌクレオチド配列；

を含むことを特徴とするポリヌクレオチド。

（２９）配列番号４１に示されるヌクレオチド配列の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からなるポリヌクレオチド及び配列番号２７に示されるヌクレオチド配列の６１乃至４０２番目のヌクレオチド

からなるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドを含むことを特徴とする（２８）に記載のポリヌクレオチド。

（３０）配列番号６９に示されるヌクレオチド配列の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からなるポリヌクレオチド及び配列番号５１に示されるヌクレオチド配列の６１乃至４０２番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドを含むことを特徴とする（２８）に記載のポリヌクレオチド。

（３１）配列番号６９に示されるヌクレオチド配列の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からなるポリヌクレオチド及び配列番号５７に示されるヌクレオチド配列の６１乃至４０２番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドを含むことを特徴とする（２８）に記載のポリヌクレオチド。

（３２）配列番号６９に示されるヌクレオチド配列の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からなるポリヌクレオチド及び配列番号６１に示されるヌクレオチド配列の６１乃至４０２番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドを含むことを特徴とする（２８）に記載のポリヌクレオチド。

（３３）配列番号６９に示されるヌクレオチド配列の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からなるポリヌクレオチド及び配列番号６５に示されるヌクレオチド配列の６１乃至４０２番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドを含むことを特徴とする（２８）に記載のポリヌクレオチド。

（３４）配列番号４１に示されるヌクレオチド配列の５８乃至１４１３番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド及び配列番号２７に示されるヌクレオチド配列の６１乃至７１７番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドを含むことを特徴とする（２８）に記載のポリヌクレオチド。

（３５）配列番号６９に示されるヌクレオチド配列の５８乃至１４１３番目

のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド及び配列番号５１に示されるヌクレオチド配列の６１乃至７１７番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドを含むことを特徴とする（２８）に記載のポリヌクレオチド。

（３６）配列番号６９に示されるヌクレオチド配列の５８乃至１４１３番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド及び配列番号５７に示されるヌクレオチド配列の６１乃至７１７番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドを含むことを特徴とする（２８）に記載のポリヌクレオチド。

（３７）配列番号６９に示されるヌクレオチド配列の５８乃至１４１３番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド及び配列番号６１に示されるヌクレオチド配列の６１乃至７１７番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドを含むことを特徴とする（２８）に記載のポリヌクレオチド。

（３８）配列番号６９に示されるヌクレオチド配列の５８乃至１４１３番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド及び配列番号６５に示されるヌクレオチド配列の６１乃至７１７番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドを含むことを特徴とする（２８）に記載のポリヌクレオチド。

（３９）（２５）乃至（３８）に記載のいずれか一つのポリヌクレオチドを含むベクター。

（４０）（２５）乃至（３８）に記載のいずれか一つのポリヌクレオチドを含む形質転換宿主細胞。

（４１）（３９）に記載のベクターを含む形質転換宿主細胞。

（４２）（４０）又は（４１）に記載の宿主細胞を培養し、培養産物から抗体を精製する工程を含む（２）、（４）又は（６）乃至（１６）に記載の抗体の生産方法。

（４３）配列番号２０に示されるアミノ酸配列の２０乃至４７１番目のアミ

ノ酸残基からなる重鎖配列及び配列番号１６に示されるアミノ酸配列の２１乃至２３９番目のアミノ酸残基からなる軽鎖配列からなる抗体と同じエピトープに結合することを特徴とする抗体又は該抗体の機能性断片。

（４４）配列番号２０に示されるアミノ酸配列の２０乃至４７１番目のアミノ酸残基からなる重鎖配列及び配列番号１６に示されるアミノ酸配列の２１乃至２３９番目のアミノ酸残基からなる軽鎖配列からなる抗体と競合することを特徴とする抗体又は該抗体の機能性断片。

（４５）Ｐａｐａｉｎ消化によって調製されたＦａｂフラグメントが、配列番号２３に記載の組換え蛋白質の２６番目のグリシン残基、３４番目のイソロイシン残基、３６番目のグルタミン酸残基、３７番目のアスパラギン酸残基、３８番目のグリシン残基、５６番目のアスパラギン酸残基、５７番目のロイシン残基、５８番目のロイシン残基、５９番目のフェニルアラニン残基、６１番目のロイシン残基及び６２番目のアルギニン残基と４Å以内の距離で隣接していることを特徴とする、（４３）又は（４４）に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

（４６）配列番号２３に記載の組換え蛋白質を構成する各アミノ酸残基とＦａｂフラグメント間の距離を、Ｘ線回折データを用いた複合体構造解析によって決定することを特徴とする、（４５）に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

[0007]

発明の効果

[0008] 本発明によれば、細胞に対するアポトーシス誘導を主な作用機序とする、癌の治療剤を得ることができる。

図面の簡単な説明

[0009] [図1]図１は、マウスＢ２７３抗体の殺細胞作用を示した図である。

[図2]図２は、ｃＢ２７３抗体及びｓＴＲＡＩＬのＤＲ５細胞外領域蛋白質に対する結合活性を示した図である。

[図3]図３は、Ｂｉａｃｏｒｅによるｃ Ｂ２７３抗体のヒトＤＲ５に対する結

合活性を示した図である。上段は測定チャートを示しており、縦軸は共鳴単位（ＲＵ：Ｒｅｓｏｎａｎｃｅ　Ｕｎｉｔ）、横軸は時間（秒）を示している。下段に分析ソフトによって算出されたｃＢ２７３抗体のＫｏｎ、Ｋｏｆｆ及びＫＤ値を示している。

[図4]図４は、ｃＢ２７３抗体のヒト癌細胞株に対するｉｎ　ｖｉｔｒｏ殺細胞作用を示した図である。Ａ）はヒト卵巣癌株、Ｂ）はヒト大腸癌株、Ｃ）はヒト肺癌株、Ｄ）はヒト乳癌株についての結果である。

[図5]図５は、ｃＢ２７３抗体のヒト癌細胞株に対するｉｎ　ｖｉｔｒｏ殺細胞作用を示した図である。Ａ）はヒト膵臓癌株、Ｂ）はヒトメラノーマ癌株、Ｃ）はヒト神経膠芽腫細胞株、Ｄ）はヒト子宮内膜癌株についての結果である。

[図6]図６は、ＤＲ５とｃＢ２７３　ＦａｂのＨ鎖、Ｌ鎖との相互作用を示した図である。

[図7]図７は、ＤＲ５とｃＢ２７３　ＦａｂのＨ鎖、Ｌ鎖との相互作用を示した図である。Ａ）はｃＢ２７３　ＦａｂＨ鎖とＤＲ５につき、お互いに４Å以内の距離にあるアミノ酸残基をスティックモデルで表示した図である。図中左側のＩｌｅ３４、Ｇｌｕ３６、Ａｓｐ３７、Ｇｌｙ３８、Ａｓｐ５６、Ｌｅｕ５７、Ｌｅｕ５８、Ｐｈｅ５９、Ｌｅｕ６１、Ａｒｇ６２はＤＲ５由来のアミノ酸残基であり、各アミノ酸残基番号は配列表の配列番号２３に示されるアミノ酸配列に対応している。また、図中右側のＰｈｅ３３、Ａｒｇ５０、Ａｓｎ５２、Ｔｙｒ５４、Ａｓｎ５５、Ｐｈｅ５９、Ｔｙｒ１０１、Ｔｙｒ１０２、Ｐｈｅ１０３、Ａｓｐ１０４はｃＢ２７３の重鎖由来のアミノ酸残基であり、各アミノ酸残基番号は配列表の配列番号２０の２０番目のグルタミン酸残基を起点として付与されている。Ｂ）はｃＢ２７３　ＦａｂＬ鎖とＤＲ５につき、お互いに４Å以内の距離にあるアミノ酸残基をスティックモデルで、それ以外をリボンモデルで表示した図である。図中左側のＧｌｙ２６、Ｇｌｕ３６、Ａｓｐ３７、Ｇｌｙ３８はＤＲ５由来のアミノ酸残基であり、各アミノ酸残基番号は配列表の配列番号２３に示されるアミノ酸配列に対応している。また、図中右側のＨｉｓ３３、Ａｓｎ３３、Ｖａｌ９

９、Ｔｒｐ１０１はｃＢ２７３の軽鎖由来のアミノ酸残基であり、各アミノ酸残基番号は配列表の配列番号１６の２１番目のアスパラギン酸残基を基点として付与されている。ｃＢ２７３のＦａｂフラグメントから４Å以内の距離にあるＤＲ５のアミノ酸残基は、配列表の配列番号２３に記載のアミノ酸配列の２６番目のグリシン残基、３４番目のイソロイシン残基、３６番目のグルタミン酸残基、３７番目のアスパラギン酸残基、３８番目のグリシン残基、５６番目のアスパラギン酸残基、５７番目のロイシン残基、５８番目のロイシン残基、５９番目のフェニルアラニン残基、６１番目のロイシン残基及び６２番目のアルギニン残基であった。

[図8-1]図８－１は、ＢｉａｃｏｒｅによるｈＢ２７３抗体のヒトＤＲ５に対する結合活性を示した図であり、各抗体における測定チャートを示している。

[図8-2]図８－２は、ＢｉａｃｏｒｅによるｈＢ２７３抗体のヒトＤＲ５に対する結合活性を示した表であり、分析ソフトによって算出された各抗体のＫｏｎ、Ｋｏｆｆ及びＫＤ値を示している。なお、図８－１の各チャートに付与された番号は、図８－２の表のＥｎｔｒｙ　Ｎｏに対応している。

[図9]図９は、ｈＢ２７３抗体のヒトＴリンパ腫由来細胞株であるＪｕｒｋａｔ細胞に対するｉｎ　ｖｉｔｒｏ殺細胞活性を示した図である。

[図10-1]図１０－１は、ＢｉａｃｏｒｅによるｈＢ２７３抗体のヒトＤＲ５に対する結合活性を示した図であり、各抗体における測定チャートを示している。

[図10-2]図１０－２は、ＢｉａｃｏｒｅによるｈＢ２７３抗体のヒトＤＲ５に対する結合活性を示した表であり、分析ソフトによって算出された各抗体のＫｏｎ、Ｋｏｆｆ及びＫＤ値を示している。なお、図１０－１の各チャートに付与された番号は、図１０－２の表のＥｎｔｒｙ　Ｎｏに対応している。

[図11]図１１は、ｈＢ２７３抗体のヒトＴリンパ腫由来細胞株であるＪｕｒｋａｔ細胞に対するｉｎ　ｖｉｔｒｏ殺細胞活性を示した図である。

[図12-1]図１２－１は、ＢｉａｃｏｒｅによるｈＢ２７３抗体ＣＤＲ改変体のヒトＤＲ５に対する結合活性を示した図であり、各抗体における測定チャー

トを示している。

[図12-2]図１２－２は、ＢｉａｃｏｒｅによるｈＢ２７３抗体ＣＤＲ改変体のヒトＤＲ５に対する結合活性を示した表であり、分析ソフトによって算出された各抗体のＫｏｎ、Ｋｏｆｆ及びＫＤ値を示している。なお、図１２－１の各チャートに付与された番号は、図１２－２の表のＥｎｔｒｙ　Ｎｏに対応している。

[図13-1]図１３－１は、示差走査カロリメトリー（ＤＳＣ）を用いたｈＢ２７３抗体ＣＤＲ改変体の熱安定性評価を示した図であり、各抗体における測定チャートを示している。

[図13-2]図１３－２は、示差走査カロリメトリー（ＤＳＣ）を用いたｈＢ２７３抗体ＣＤＲ改変体の熱安定性評価を示した図であり、各抗体における測定チャートを示している。

[図13-3]図１３－３は、図１３－1及び図１３－２のチャートから算出された各抗体のＴｍ値を示している。なお、図１３－１及び図１３－２の各チャートに付与された番号は、図１３－３のＥｎｔｒｙ　Ｎｏに対応している。

[図14]図１４は、ｈＢ２７３抗体ＣＤＲ改変体のヒトＴリンパ腫由来細胞株であるＪｕｒｋａｔ細胞に対するｉｎ　ｖｉｔｒｏ殺細胞活性を示した図である。

[図15]図１５は、ｈＢ２７３＿Ｈ２－１－ＮＥ／Ｌ１－ＮＫ抗体のヒト癌細胞株に対するｃａｓｐａｓｅ－３／７活性化作用及びｉｎ　ｖｉｔｒｏ殺細胞活性を示した図である。Ａ）はヒト大腸癌株ＨＣＴ－１５、Ｂ）はヒト神経膠芽種細胞株Ｕ－８７ＭＧについての結果である。

[図16]図１６は、ｃＢ２７３抗体のヒト大腸癌株ＣＯＬＯ　２０５移植ヌードマウスにおけるｉｎ　ｖｉｖｏ抗腫瘍活性を示した図である。

[図17]図１７は、ｃＢ２７３抗体のヒト膵臓癌株ＭＩＡＰａＣａ－２移植ヌードマウスにおけるｉｎ　ｖｉｖｏ抗腫瘍活性を示した図である。

[図18]図１８は、ｃＢ２７３抗体のヒト神経膠芽種細胞株Ｕ－８７ＭＧ移植ヌードマウスにおけるｉｎ　ｖｉｖｏ抗腫瘍活性を示した図である。

[図19]図１９　ｃＢ２７３抗体のヒト肺癌株ＮＣＩ－Ｈ２１２２移植ヌードマウスにおけるｉｎ　ｖｉｖｏ抗腫瘍活性（パクリタキセル＋カルボプラチン併用）を示した図である。

[図20]図２０は、ｃＢ２７３抗体のヒト肺癌株ＮＣＩ－Ｈ４６０移植ヌードマウスにおけるｉｎ　ｖｉｖｏ抗腫瘍活性（パクリタキセル＋カルボプラチン併用）を示した図である。

[図21]図２１は、ｃＢ２７３抗体のヒト大腸癌株ＤＬＤ－１移植ヌードマウスにおけるｉｎ　ｖｉｖｏ抗腫瘍活性（ＣＰＴ－１１併用）を示した図である。

[図22]図２２は、ｃＢ２７３抗体のヒト大腸癌株ＨＣＴ－１５移植ヌードマウスにおけるｉｎ　ｖｉｖｏ抗腫瘍活性（ＣＰＴ－１１併用）を示した図である。

[図23]図２３は、ｃＢ２７３抗体のヒト大腸癌株ＨＣＴ－１１６移植ヌードマウスにおけるｉｎ　ｖｉｖｏ抗腫瘍活性（ＣＰＴ－１１併用）を示した図である。

[図24]図２４は、ｃＢ２７３抗体のヒトメラノーマ株Ａ３７５移植ヌードマウスにおけるｉｎ　ｖｉｖｏ抗腫瘍活性（ビンブラスチン併用）を示した図である。

[図25]図２５は、ヒト大腸癌株ＨＣＴ－１５移植ヌードマウスにおけるｃＢ２７３抗体及びＣｏｎａｔｕｍｕｍａｂのｉｎ　ｖｉｖｏ抗腫瘍活性を比較した図である。

[図26]図２６は、ヒト肺癌株ＮＣＩ－Ｈ１９７５移植ヌードマウスにおけるｃＢ２７３抗体及びＣｏｎａｔｕｍｕｍａｂのｉｎ　ｖｉｖｏ抗腫瘍活性を比較した図である。

[図27]図２７は、ｈＢ２７３＿Ｈ２－１－ＮＥ／Ｌ１－ＮＫ抗体（図中ではｈＢ２７３と表記している）のヒト大腸癌株ＣＯＬＯ　２０５移植ヌードマウスにおけるｉｎ　ｖｉｖｏ抗腫瘍活性を示した図である。

[図28]図２８は、マウス抗体Ｂ２７３の重鎖をコードするｃＤＮＡのヌクレ

オチド配列、及びマウス抗体Ｂ２７３の重鎖のアミノ酸配列を示した図である。

[図29]図２９は、マウス抗体Ｂ２７３の軽鎖をコードするｃＤＮＡのヌクレオチド配列、及びマウス抗体Ｂ２７３の軽鎖のアミノ酸配列を示した図である。

[図30]図３０は、Ｂ２７３キメラタイプ軽鎖をコードするヌクレオチド配列、及びＢ２７３キメラタイプ軽鎖のアミノ酸配列を示した図である。

[図31]図３１は、Ｂ２７３キメラタイプ重鎖をコードするヌクレオチド配列、及びＢ２７３キメラタイプ重鎖のアミノ酸配列を示した図である。

[図32]図３２は、ｈＢ２７３＿Ｌ１タイプ軽鎖をコードするヌクレオチド配列、及びｈＢ２７３＿Ｌ１タイプ軽鎖のアミノ酸配列を示した図である。

[図33]図３２は、ｈＢ２７３＿Ｌ２タイプ軽鎖をコードするヌクレオチド配列、及びｈＢ２７３＿Ｌ２タイプ軽鎖のアミノ酸配列を示した図である。

[図34]図３４は、ｈＢ２７３＿Ｌ３タイプ軽鎖をコードするヌクレオチド配列、及びｈＢ２７３＿Ｌ３タイプ軽鎖のアミノ酸配列を示した図である。

[図35]図３５は、ｈＢ２７３＿Ｈ１タイプ重鎖をコードするヌクレオチド配列、及びｈＢ２７３＿Ｈ１タイプ重鎖のアミノ酸配列を示した図である。

[図36]図３６は、ｈＢ２７３＿Ｈ２タイプ重鎖をコードするヌクレオチド配列、及びｈＢ２７３＿Ｈ２タイプ重鎖のアミノ酸配列を示した図である。

[図37]図３７は、ｈＢ２７３＿Ｈ３タイプ重鎖をコードするヌクレオチド配列、及びｈＢ２７３＿Ｈ３タイプ重鎖のアミノ酸配列を示した図である。

[図38]図３８は、ｈＢ２７３＿Ｈ１－１タイプ重鎖をコードするヌクレオチド配列、及びｈＢ２７３＿Ｈ１－１タイプ重鎖のアミノ酸配列を示した図である。

[図39]図３９は、ｈＢ２７３＿Ｈ２－１タイプ重鎖をコードするヌクレオチド配列、及びｈＢ２７３＿Ｈ２－１タイプ重鎖のアミノ酸配列を示した図である。

[図40]図４０は、ｈＢ２７３＿Ｈ２－２タイプ重鎖をコードするヌクレオチ

ド配列、及びｈＢ２７３＿Ｈ２－２タイプ重鎖のアミノ酸配列を示した図である。

[図41]図４１は、ｈＢ２７３＿Ｈ２－３タイプ重鎖をコードするヌクレオチド配列、及びｈＢ２７３＿Ｈ２－３タイプ重鎖のアミノ酸配列を示した図である。

[図42]図４２は、ｈＢ２７３＿Ｈ２－４タイプ重鎖をコードするヌクレオチド配列、及びｈＢ２７３＿Ｈ２－４タイプ重鎖のアミノ酸配列を示した図である。

[図43]図４３は、ｈＢ２７３＿Ｈ２－５タイプ重鎖をコードするヌクレオチド配列、及びｈＢ２７３＿Ｈ２－５タイプ重鎖のアミノ酸配列を示した図である。

[図44]図４４は、ｈＢ２７３＿Ｌ１－ＮＥタイプ軽鎖をコードするヌクレオチド配列、及びｈＢ２７３＿Ｌ１－ＮＥタイプ軽鎖のアミノ酸配列を示した図である。

[図45]図４５は、ｈＢ２７３＿Ｌ１－ＮＦタイプ軽鎖をコードするヌクレオチド配列、及びｈＢ２７３＿Ｌ１－ＮＦタイプ軽鎖のアミノ酸配列を示した図である。

[図46]図４６は、ｈＢ２７３＿Ｌ１－ＮＫタイプ軽鎖をコードするヌクレオチド配列、及びｈＢ２７３＿Ｌ１－ＮＫタイプ軽鎖のアミノ酸配列を示した図である。

[図47]図４７は、ｈＢ２７３＿Ｌ１－ＮＬタイプ軽鎖をコードするヌクレオチド配列、及びｈＢ２７３＿Ｌ１－ＮＬタイプ軽鎖のアミノ酸配列を示した図である。

[図48]図４８は、ｈＢ２７３＿Ｈ２－１－ＮＥタイプ重鎖をコードするヌクレオチド配列、及びｈＢ２７３＿Ｈ２－１－ＮＥタイプ重鎖のアミノ酸配列を示した図である。

[図49]図４９は、Ｃｏｎａｔｕｍｕｍａｂの軽鎖をコードするｃＤＮＡのヌクレオチド配列、及びＣｏｎａｔｕｍｕｍａｂの軽鎖のアミノ酸配列を示し

た図である。

[図50]図５０は、Ｃｏｎａｔｕｍｕｍａｂの重鎖をコードするｃＤＮＡのヌクレオチド配列、及びＣｏｎａｔｕｍｕｍａｂの重鎖のアミノ酸配列を示した図である。

[図51]図５１は、ｈＢ２７３＿Ｈ２－１－ＮＥ／ｈＢ２７３＿Ｌ１－ＮＫ抗体のヒト癌細胞株に対するｉｎ　ｖｉｔｒｏ殺細胞活性を示した図である。Ａ）はヒト胃癌株、Ｂ）はヒト腎臓癌株、Ｃ）はヒト肝臓癌株、Ｄ）はヒト繊維肉腫株についての結果である。

[図52]図５２は、ｈＢ２７３＿Ｈ２－１－ＮＥ／ｈＢ２７３＿Ｌ１－ＮＫ抗体（図中ではｈＢ２７３と標記している）と５－ＦＵの併用によるヒト大腸癌株ＨＣＴ－１５移植ヌードマウスにおけるｉｎ　ｖｉｖｏ抗腫瘍活性、及びＣｏｎａｔｕｍｕｍａｂとの活性比較を示した図である。

[図53]図５３は、ｈＢ２７３＿Ｈ２－１－ＮＥ／ｈＢ２７３＿Ｌ１－ＮＫ抗体（図中ではｈＢ２７３と標記している）とパクリタキセルの併用によるヒト非小細胞肺癌株ＮＣＩ－Ｈ１９７５移植ヌードマウスにおけるｉｎ　ｖｉｖｏ抗腫瘍活性、及びＣｏｎａｔｕｍｕｍａｂとの活性比較を示した図である。

発明を実施するための形態

[0010] なお、本明細書中においては、「癌」と「腫瘍」は同じ意味に用いている。

[0011] 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も含まれるものとする。

[0012] 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ている。

[0013] 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。

[0014] 本明細書中において、「ＲＮＡ画分」とは、ＲＮＡを含んでいる画分をい

う。

[0015] 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。

[0016] 本明細書中において、「細胞の癌化」とは、細胞が接触阻止現象への感受性を喪失することや、足場非依存性増殖を示すこと等、細胞が異常な増殖を示すことをいい、このような異常な増殖を示す細胞を「癌細胞」という。

[0017] 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。

[0018] 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。

[0019] 本明細書中における「デスドメイン含有受容体」とは、ショウジョウバエの自殺遺伝子ｒｅａｐｅｒと相同性を示す「デスドメイン」と呼ばれるアポトーシスシグナル伝達領域を細胞内ドメインに持つ受容体分子（Ｆａｓ、ＴＮＦＲＩ、ＤＲ３、ＤＲ４、ＤＲ５及びＤＲ６を含むがこれらに限定されない）をいう。

[0020] 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。

[0021] 本明細書における「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。

[0022] 本明細書中における「単鎖可変部位抗体」は、シングルチェインＦｖ（ｓｃＦｖ）と同じ意味で用いられている。

[0023] 本明細書における、「エピトープ」とは、特定の抗体の結合する抗原の部分ペプチド又は部分立体構造を意味する。前記の抗原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行うことが出来る。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、抗原の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。又、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。

[0024] 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（すなわち、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、かつ第一の抗体がアポトーシス誘導活性等の特殊な効果を有する場合、第二の抗体も同様な活性を有することが期待できる。

[0025] 本明細書における「ＣＤＲ」とは、相補性決定領域（ＣＤＲ：Ｃｏｍｐｌ

ｅｍｅｔａｒｉｔｙ　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。

[0026] 本明細書中における「二次抗体」とは、抗体分子に特異的に結合して、該抗体分子同士を架橋する抗体をいう。

[0027] 本明細書において、「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。

[0028] 本明細書において、「１もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失もしくは付加されたアミノ酸配列」なる記載がある場合の「数個」とは、２乃至１０個の任意の数のアミノ酸残基を示している。より具体的には、１０個以下、５乃至６個以下、又は２乃至３個以下のアミノ酸が置換、欠失もしくは付加された場合に「数個のアミノ酸が置換、欠失もしくは付加された」という記載が使用される。

[0029] 本明細書において、例えば「配列番号３４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」なる記載は、「配列番号３４の２０乃至１４１番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域配列」と同じ意味で使用される。又、例えば「配列番号３４の２０乃至４７１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」なる記載は、「配列番号３４の２０乃至４７１番目のアミノ酸残基からなる重鎖配列」と同じ意味で使用される。

[0030] １． アポトーシス関連遺伝子について

本発明における抗体については、該抗体が特定の抗原に対して結合し、かつ該抗原を介して細胞傷害活性を示すことが要求される。また、正常細胞が殺傷されることを防ぐために、腫瘍細胞特異的に存在する抗原を選択する必要がある。このような抗原群の一例として、腫瘍細胞壊死因子（本明細書において以下「ＴＮＦ」という）関連アポトーシス誘導リガンド（本明細書において以下「ＴＲＡＩＬ」という）受容体群を挙げることができる。ＴＲＡＩＬは、ＴＮＦファミリー蛋白質のメンバーであり、これは、Ｆａｓリガンド及びＴＮＦ－αを含む（Ｗｉｌｅｙ ＳＲ，ｅｔ ａｌ．Ｉｍｍｕｎｉｔｙ １９９５ Ｄｅｃ；３（６）：６７３－８２）。これらの蛋白質は、アポトーシスの強力な誘導因子である。

[0031] これらのＴＮＦファミリー蛋白質の受容体は、細胞外ドメインのシステインリッチ反復配列により特徴付けられるが、その中でもＦａｓリガンドの受容体であるＦａｓ、及びＴＮＦαの受容体であるＴＮＦ受容体Ｉ（本明細書において以下「ＴＮＦＲＩ」という）は、ショウジョウバエの自殺遺伝子ｒｅａｐｅｒ （Ｇｏｌｓｔｅｉｎ，Ｐ．，ｅｔ ａｌ．（１９９５）Ｃｅｌｌ．８１，１８５－１８６，Ｗｈｉｔｅ，Ｋ，ｅｔ ａｌ．（１９９４）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２６４，６７７－６８３）と相同性を示す領域である「デスドメイン」と呼ばれるアポトーシスのシグナル伝達に必須の領域を細胞内ドメインに持ち、デスドメイン含有受容体と総称される。

[0032] ＴＲＡＩＬについては５種の受容体が同定されており、これらのうち２種

（ＤＲ４（ＴＲＡＩＬ－Ｒ１）及びＤＲ５（ＴＲＡＩＬ－Ｒ２））は、アポトーシスシグナルを伝達することが可能であり、他の３種（ＤｃＲ１（ＴＲＡＩＬ－Ｒ３）、 ＤｃＲ２（ＴＲＡＩＬ－Ｒ４）及びオステオプロテゲリン（ｏｓｔｅｏｐｒｏｔｅｇｅｒｉｎ：ＯＰＧ）は、アポトーシスシグナルを伝達しない。Ｆａｓ及びＴＮＦＲＩと同様に、ＤＲ４及びＤＲ５の両者の細胞内セグメントはデスドメインを含み、そしてＦａｓ関連デスドメイン蛋白質（本明細書において以下「ＦＡＤＤ」という）及びカスパーゼ８を含む経路を介してアポトーシスシグナルを伝達する（Ｃｈａｕｄｈａｒｙ ＰＭ，ｅｔ ａｌ．Ｉｍｍｕｎｉｔｙ １９９７ Ｄｅｃ；７（６）：８１３－２０；Ｓｃｈｎｅｉｄｅｒ Ｐ，ｅｔ ａｌ．Ｉｍｍｕｎｉｔｙ １９９７ Ｄｅｃ；７（６）：８２１－３０）。

上記の、Ｆａｓ、ＴＮＦＲＩ、ＤＲ４、ＤＲ５については、該分子に結合してアゴニストとして働く抗体が、該分子を細胞表面に保有する細胞に対して、アポトーシス誘導能を示すことが知られている（Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｃｅｌｌｕｌａｒ Ｐｈｙｓｉｏｌｏｇｙ，２０９：１２２１－１０２８（２００６）； Ｌｅｕｋｅｍｉｓ，Ａｐｌ；２１（４）：８０５－８１２（２００７）；Ｂｌｏｏｄ，９９：１６６６－１６７５（２００２）；Ｃｅｌｌｕｌａｒ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，Ｊａｎ；１５３（１）：１８４－１９３（１９９４））。上記のアゴニスト抗体の薬効は、二次抗体又はエフェクター細胞による架橋によって増強される（Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，１４９：３１６６－３１７３（１９９２）；Ｅｏｕｒｏｐｉａｎ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，Ｏｃｔ；２３（１０）：２６７６－２６８１（１９９３））。

[0033] ヒトＤＲ５（ｄｅａｔｈ ｒｅｃｅｐｔｏｒ ５）遺伝子のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列は、ＧｅｎＢａｎｋにＧＩ：２２５４７１１８（アクセッション番号：ＮＭ＿１４７１８７）として登録されている。なお、ＤＲ５のアミノ酸配列において、１もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、ＤＲ５と同等の生物活性を有する蛋白

質をコードするヌクレオチド配列も、ＤＲ５遺伝子のヌクレオチド配列に含まれる。また、ＤＲ５のアミノ酸配列において、１もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、ＤＲ５と同等の生物活性を有する蛋白質もＤＲ５に含まれる。

[0034] ２．抗ＤＲ５抗体の製造

本発明のＤＲ５に対する抗体は、常法を用いて、ＤＲ５又はＤＲ５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ＤＲ５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ＤＲ５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ＤＲ５に結合する抗体とヒトＤＲ５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。

[0035] 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、ＤＲ５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。

[0036] なお、抗原となるＤＲ５はＤＲ５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。

[0037] 具体的には、ＤＲ５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ＤＲ５を精製すればよい。以下、具体的にＤＲ５に対する抗体の取得方法を説明する

（１） 抗原の調製

抗ＤＲ５抗体を作製するための抗原としては、ＤＲ５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。

[0038] ＤＲ５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、ＤＲ５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。

[0039] 遺伝子操作では、具体的には、ＤＲ５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ＤＲ５を発現させることにより、抗原を得ることが出来る。

[0040] また、膜蛋白質であるＤＲ５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。

[0041] ＤＲ５のｃＤＮＡは例えば、ＤＲ５のｃＤＮＡを発現しているｃＤＮＡライブラリーを鋳型として、ＤＲ５ 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。

[0042] 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。

[0043] 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。

[0044] 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（Ｇｌｕｚｍａ

ｎ，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。

[0045] 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。

[0046] 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。

[0047] 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。

[0048] 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。

[0049] 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

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。

[0050] （２） 抗ＤＲ５モノクローナル抗体の製造

ＤＲ５と特異的に結合する抗体の例として、ＤＲ５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。

[0051] 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。

[0052] 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。

[0053] （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ＤＲ５又はその一部を使用することができる。

[0054] また、ＤＲ５発現組換え体細胞より調製した膜画分、又はＤＲ５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。

[0055] （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。

[0056] 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。

[0057] 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。

[0058] 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。

[0059] 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。

[0060] ＤＲ５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　Ｔｈｏ

ｍａｓ 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。

[0061] 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。

[0062] 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。

[0063] 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。

[0064] （ｃ）骨髄腫細胞（以下、「ミエローマ」という）

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。

[0065] 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。

[0066] （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。

[0067] 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。

[0068] （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。

[0069] 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。

[0070] 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。

[0071] （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　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇ

ｙ，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ＤＲ５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。

[0072] 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、ＤＲ５ハイブリドーマＢ２７３を挙げることができる。なお、本明細書中においては、ハイブリドーマＢ２７３が産生する抗体を、「Ｂ２７３抗体」又は単に「Ｂ２７３」と記載する。Ｂ２７３抗体の重鎖は、配列表の配列番号８に示されるアミノ酸配列を有する。また、Ｂ２７３抗体の軽鎖は、配列表の配列番号１０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８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４６５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１０に示される軽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１３３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、１３４乃至２３８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。

[0073] 配列表の配列番号８に示される重鎖アミノ酸配列は、配列表の配列番号７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７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４２

３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１３９５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。

[0074] 配列表の配列番号１０に示される軽鎖アミノ酸配列は、配列表の配列番号９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９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軽鎖シグナル配列をコードしており、５８乃至３９９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４００乃至７１４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。

[0075] （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。

[0076] 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。

[0077] 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。

[0078] 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。

[0079] 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。

[0080] 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。

[0081] 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。

[0082] 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。

[0083] 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。

[0084] 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。

[0085] かくして得られるモノクローナル抗体は、ＤＲ５に対して高い抗原特異性を有する。

[0086] （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。

[0087] 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。

[0088] 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。

[0089] 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。

[0090] 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。

[0091] 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。

[0092] 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、Ｂ２７３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、Ｂ２７３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。新たに作製されたモノクローナル抗体が、Ｂ２７３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Ｂ２７３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、Ｂ２７３抗体のＤＲ５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、Ｂ２７３抗体とＤＲ５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Ｂ２７３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Ｂ２７３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。

[0093] また、実施例４に示されるように、抗体のＦａｂフラグメントとＤＲ５の複合体のＸ線回折データから、Ｆａｂフラグメントに近接したＤＲ５側のアミノ酸残基を特定することが可能である。具体的には、任意の抗体に由来するＦａｂフラグメントが、配列表の配列番号２３に記載のアミノ酸配列の２６番目のグリシン残基、３４番目のイソロイシン残基、３６番目のグルタミン酸残基、３７番目のアスパラギン酸残基、３８番目のグリシン残基、５６番目のアスパラギン酸残基、５７番目のロイシン残基、５８番目のロイシン

残基、５９番目のフェニルアラニン残基、６１番目のロイシン残基及び６２番目のアルギニン残基と４Å以内の距離で隣接している場合に、該抗体はＢ２７３と同一のエピトープ特異性を有すると判断することができる。

[0094] （３）その他の抗体

本発明の抗体には、上記ＤＲ５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。

[0095] 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ＤＲ５抗体Ｂ２７３由来のキメラ抗体は、配列番号２０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１６の２１乃至１３４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２０の２０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１６の２１乃至２３９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２０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１６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１３４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、１３５乃至２３９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。

[0096] 配列表の配列番号２０に示される重鎖アミノ酸配列は、配列表の配列番号１９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１９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。

[0097] 配列表の配列番号１６に示される軽鎖アミノ酸配列は、配列表の配列番号１５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１５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４０２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４０３乃至７１７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。

[0098] 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。

[0099] 但し、Ｂ２７３抗体由来のヒト化抗体としては、Ｂ２７３の６種全てのＣＤＲ配列を保持し、細胞にアポトーシスを誘導する活性を持つ限り、特定のヒト化抗体に限定されない。なお、Ｂ２７３抗体の重鎖可変領域は、配列表の配列番号８２に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１（ＧＹＦＭＮ）、配列番号８３に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２（ＲＦＮＰＹＮＧＤＴＦＹＮＱＫＦＫＧ）、及び配列番号８４に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３（ＳＡＹＹＦＤＳＧＧＹＦＤＹ）を保有している。また、Ｂ

２７３抗体の軽鎖可変領域は、配列表の配列番号７９に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１（ＲＳＳＱＳＬＶＨＳＮＧＮＴＹＬＨ）、配列番号８０に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２（ＫＶＳＮＲＦＳ）、及び配列番号８１に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ３（ＳＱＳＴＨＶＰＷＴ）を保有している。

[0100] さらに、上記ＣＤＲに１個乃至数個のアミノ酸残基が置換、欠失又は付加された配列を、Ｂ２７３抗体に由来するＣＤＲ改変抗体の有するＣＤＲ配列として使用することができる。ＣＤＲＬ１の１アミノ酸残基置換体の例として、配列表の配列番号８５に示されるアミノ酸配列からなる配列（ＲＳＳＱＳＬＶＨＳＮＥＮＴＹＬＨ）、配列番号８６に示されるアミノ酸配列からなる配列（ＲＳＳＱＳＬＶＨＳＮＦＮＴＹＬＨ）、配列番号８７に示されるアミノ酸配列からなる配列（ＲＳＳＱＳＬＶＨＳＮＫＮＴＹＬＨ）、又は配列番号８８に示されるアミノ酸配列からなる配列（ＲＳＳＱＳＬＶＨＳＮＬＮＴＹＬＨ）を挙げることができる。又、ＣＤＲＨ２の１アミノ酸残基置換体の例として、配列番号８９に示されるアミノ酸配列からなる配列（ＲＦＮＰＹＮＥＤＴＦＹＮＱＫＦＫＧ）を挙げることができる。

[0101] 一般に蛋白質のアスパラギン脱アミド化は、C末端側に隣接するアミノ酸との間で、環状コハク酸イミド遷移状態を形成して、進行する（Ｇｅｉｇｅｒ，Ｔ．ａｎｄ Ｃｌａｒｋｅ，Ｓ．（１９８７）Ｄｅａｍｉｄａｔｉｏｎ，Ｉｓｏｍｅｒｉｚａｔｉｏｎ，ａｎｄ ｒａｃｅｍｉｚａｔｉｏｎ ａｔ ａｓｐａｒａｇｉｎｙｌ ａｎｄ ａｓｐａｒｔｙｌ ｒｅｓｉｄｕｅｓ ｉｎ ｐｅｐｔｉｄｅｓ．Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄｅ－ｌｉｎｋｅｄ ｒｅａｃｔｉｏｎｓ ｔｈａｔ ｃｏｎｔｒｉｂｕｔｅ ｔｏ ｐｒｏｔｅｉｎ ｄｅｇｒａｄａｔｉｏｎ．Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６２，７８５－７９４）。環状コハク酸イミド遷移状態形成に律速となるのは隣接アミノ酸の側鎖の大きさであり、従って、もっとも脱アミド化が早いのは側鎖が最も小さなグリシンである。反対にＣ末端側隣接基を大きな側鎖を有するアミノ酸に置換することで、脱アミド化速度を抑制することが可能である。Ｂ２７３抗

体はＣＤＲＬ１及びＣＤＲＨ２に脱アミド化されやすいＮＧ（アスパラギングリシン）配列を有している。そこで、本発明者らは、隣接基を、グリシンから、より大きな側鎖を有する、リジン、フェニルアラニン、ロイシン、グルタミン酸に変更した点変異体を作製した。即ち、ＣＤＲＨ２についてはＮＧ（アスパラギングリシン）配列をＮＥ（アスパラギングルタミン酸）配列に変異させ、ＣＤＲＬ１についてはＮＧ（アスパラギングリシン）配列をＮＬ（アスパラギンロイシン）配列、ＮＦ（アスパラギンフェニルアラニン）配列、ＮＫ（アスパラギンリジン）配列、ＮＥ（アスパラギングルタミン酸）配列にそれぞれ変異させることによって、抗体の脱アミド化が抑制される。

[0102] 上記のＣＤＲを含む抗体の実例として、配列表の配列番号８２に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１、配列番号８３に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２、及び配列番号８４に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３を含む重鎖可変領域、並びに配列表の配列番号７９に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１、配列番号８０に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２、及び配列番号８１に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ３を含む軽鎖可変領域を含むことからなる抗体、配列表の配列番号８２に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１、配列番号８９に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２、及び配列番号８４に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３を含む重鎖可変領域、並びに配列表の配列番号８５に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１、配列番号８０に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２、及び配列番号８１に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ３を含む軽鎖可変領域を含むことからなる抗体、配列表の配列番号８２に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１、配列番号８９に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２、及び配列番号８４に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３を含む重鎖可変領域、並びに配列表の配列番号８６に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１、配列番号８０に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２、及び配列番号８１に示されるアミノ酸配列からなるＣ

ＤＲＬ３を含む軽鎖可変領域を含むことからなる抗体、配列表の配列番号８２に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１、配列番号８９に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２、及び配列番号８４に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３を含む重鎖可変領域、並びに配列表の配列番号８７に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１、配列番号８０に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２、及び配列番号８１に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ３を含む軽鎖可変領域を含むことからなる抗体、又は配列表の配列番号８２に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１、配列番号８９に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２、及び配列番号８４に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３を含む重鎖可変領域、並びに配列表の配列番号８８に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１、配列番号８０に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２、及び配列番号８１に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ３を含む軽鎖可変領域を含むことからなる抗体を挙げることができる。

[0103] マウス抗体Ｂ２７３のヒト化抗体（ＣＤＲ改変抗体を含む）の実例としては、配列表の配列番号３４、３６、３８、４０、４２、４４、４６、４８、５０、又は７０の２０乃至１４１番目のアミノ酸残基からなる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、及び配列番号２８、３０、３２、５２、５８、６２又は６６の２１乃至１３４番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列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。

[0104] 好適な組合せとしては、配列番号３４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及び配列番号２８の２１乃至１３４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ことを特徴とする抗体、配列番号３４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及び配列番号３０の２１乃至１３４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ことを特徴とする抗体、配列番号３４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及び配列番号３２の２１乃至１３４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ことを特徴とする抗体、配列番号３６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及び配列番号２８の２１乃至１３４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ことを特徴とする抗体、配列番号３６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及び配列番号３０の２１乃至１３４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ことを特徴とする抗体、配列番号３６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及び配列番号３２の２１乃至１３４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ことを特徴とする抗体、配列番号３８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及び配列番号２８の２１乃至１３４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ことを特徴とする抗体、配列番号３８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及び配列番号３０の２１乃至１３４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ことを特徴とする抗体、配列番号３８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及び配列番号３２の２１乃至１３４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ことを特徴とする抗体、配列番号４０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及び配列番号２８の２１乃至１３４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ことを特徴とする抗体、配列番号４２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及び配列番号２８の２１乃至１３４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ことを特徴とする抗体、配列番号４４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及び配列番号２８の２１乃至

１３４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ことを特徴とする抗体、配列番号４６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及び配列番号２８の２１乃至１３４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ことを特徴とする抗体、配列番号４８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及び配列番号２８の２１乃至１３４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ことを特徴とする抗体、配列番号５０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及び配列番号２８の２１乃至１３４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ことを特徴とする抗体、配列番号７０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及び配列番号５２の２１乃至１３４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ことを特徴とする抗体、配列番号７０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及び配列番号５８の２１乃至１３４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ことを特徴とする抗体、配列番号７０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及び配列番号６２の２１乃至１３４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ことを特徴とする抗体、又は配列番号７０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及び配列番号６６の２１乃至１３４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ことを特徴とする抗体を挙げることができる。

[0105] さらに好適な組合せとしては、配列番号３４の２０乃至４７１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及び配列番号２８の２１乃至２３９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からなる抗体、配列番号３４の２０乃至４７１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及び配列番号３０の２１乃至２３９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からなる抗体、配列番号３４の２０乃至４７１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及び配列番号３２の２１乃至２３９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からなる抗体、配列番号３６の２０乃至４７１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及び配列番号２８の２１乃至２３９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からなる抗体、配列番号３６の２０乃至４７１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及び配列番号３０の２１乃至２３９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からなる抗体、配列番号３６の２０乃至４７１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及び配列番号３２の２１乃至２３９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からなる抗体、配列番号３８の２０乃至４７１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及び配列番号２８の２１乃至２３９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からなる抗体、配列番号３８の２０乃至４７１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及び配列番号３０の２１乃至２３９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からなる抗体、配列番号３８の２０乃至４７１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及び配列番号３２の２１乃至２３９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からなる抗体、配列番号４０の２０乃至４７１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及び配列番号２８の２１乃至２３９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からなる抗体、配列番号４２の２０乃至４７１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及び配列番号２８の２１乃至２３９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からなる抗体、配列番号４４の２０乃至４７１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及び配列番号２８の２１乃至２３９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からなる抗体、配列番号４６の２０乃至４７１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及び配列番号２８の２１乃至２３９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からなる抗体、配列番号４８の２０乃至４７１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及び配列番号２８の２１乃至２３９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からなる抗体、配列番号５０の２０乃至４７１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及び配列番号２８の２１乃至２３９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からなる抗体、配列番号７０の２０乃至４７１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及び配列番号５２の２１乃至２３９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からなる抗体、配列番号７０の２０乃至４７１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及び配列番号５８の２１乃至２３９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からなる抗体、配列番号７０の２０乃至４７１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及び配列番号６２の２１乃至２３９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からなる抗体、又は配列番号７０の２０乃至４７１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及び配列番号６６の２１乃至２３９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からなる抗体、を挙げることができる。

[0106] より好適な組合せとしては、配列番号４２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及び配列番号２８の２１乃至１３４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ことを特徴とする抗体、配列番号７０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及び配列番号５２の２１乃至１３４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ことを特徴とする抗体、配列番号７０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及び配列番号５８の２１乃至１３４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ことを特徴とする抗体、配列番号７０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及び配列番号６２の２１

乃至１３４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ことを特徴とする抗体、又は配列番号７０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及び配列番号６６の２１乃至１３４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ことを特徴とする抗体、を挙げることができる。

[0107] 最も好適な組合せとしては、配列番号４２の２０乃至４７１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及び配列番号２８の２１乃至２３９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からなる抗体、配列番号７０の２０乃至４７１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及び配列番号５２の２１乃至２３９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からなる抗体、配列番号７０の２０乃至４７１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及び配列番号５８の２１乃至２３９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からなる抗体、配列番号７０の２０乃至４７１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及び配列番号６２の２１乃至２３９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からなる抗体、又は配列番号７０の２０乃至４７１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及び配列番号６６の２１乃至２３９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からなる抗体、を挙げることができる。

[0108] 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。置換、欠失又は付加されるアミノ酸残基数は、一般的には１０アミノ酸残基以下

であり、好ましくは５乃至６アミノ酸残基以下であり、より好ましくは２乃至３アミノ酸残基以下であり、最も好ましくは１アミノ酸残基である。

[0109] 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ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ｂｌａｓｔにアクセスすることによっても使用することができる。なお、上記のＢｌａｓｔ ａｌｇｏｒｉｔｈｍによってＩｄｅｎｔｉｔｙ（又はＩｄｅｎｔｉｔｉｅｓ）及びＰｏｓｉｔｉｖｉｔｙ（又はＰｏｓｉｔｉｖｉｔｉｅｓ）の２種類のパーセンテージの値が計算される。前者は相同性を求めるべき二種類のアミノ酸配列の間でアミノ酸残基が一致した場合の値であり、後者は化学構造の類似したアミノ酸残基も考慮した数値である。本明細書においては、アミノ酸残基が一致している場合のＩｄｅｎｔｉｔｙ（同一性）の値を持って相同性の値とする。

[0110] なお、配列表の配列番号３４、３６、３８、４０、４２、４４、４６、４８、５０、又は７０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２８、３０、３２、５２、５８、６２、又は６６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１３４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、１３５乃至２３９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。

[0111] 配列表の配列番号３４、３６、３８、４０、４２、４４、４６、４８、５０、又は７０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３３、３５、３７、３９、４１、４３、４５、４７、４９、又は６９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。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。

[0112] 配列表の配列番号２８、３０、３２、５２、５８、６２、又は６６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２７、２９、３１、５１、５７、６１、又は６５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。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４０２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４０３乃至７１７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。

[0113] 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。

[0114] 本発明の抗体としては、さらに、Ｂ２７３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ＤＲ５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ＤＲ５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．，Ｎａｔ

ｕｒｅ 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。

[0115] 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。

[0116] 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。

[0117] 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。

[0118] 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 Ｆｕｎｃｔｉｏ

ｎａｌ 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。

[0119] 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。

[0120] 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。

[0121] 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）。

[0122] 新たに作製されたヒト抗体が、Ｂ２７３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Ｂ２７３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、Ｂ２７３抗体のＤＲ５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、Ｂ２７３抗体とＤＲ５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Ｂ２７３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Ｂ２７３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。

[0123] また、実施例４に示されるように、抗体のＦａｂフラグメントとＤＲ５の複合体のＸ線回折データから、Ｆａｂフラグメントに近接したＤＲ５側のアミノ酸残基を特定することが可能である。具体的には、任意の抗体に由来するＦａｂフラグメントが、配列表の配列番号２３に記載のアミノ酸配列の２６番目のグリシン残基、３４番目のイソロイシン残基、３６番目のグルタミン酸残基、３７番目のアスパラギン酸残基、３８番目のグリシン残基、５６番目のアスパラギン酸残基、５７番目のロイシン残基、５８番目のロイシン残基、５９番目のフェニルアラニン残基、６１番目のロイシン残基及び６２番目のアルギニン残基と４Å以内の距離で隣接している場合に、該抗体はＢ２７３と同一のエピトープに結合すると判断することができる。

[0124] 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。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。実施例１０で示された示差走査カトリメトリー（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。

[0125] 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 ｉｍｍｕｎｏｇｌｏ

ｂｕｌｉｎ）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含まれる。

[0126] 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。

[0127] 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。動物細胞としては、（１）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。また、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。以上の培養法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。

[0128] 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ＩｇＭ、さらに好ましくはＩｇＧ１又はＩｇＧ２を挙げることができる。

[0129] 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、抗体全長分子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活性、補体依存性細胞傷害活性及び補体依存性細胞性細胞傷害活性を挙げることができる。本発明における抗体の機能性断片が保持する機能は、ＤＲ５に対する結合活性であり、好ましくは細胞にアポトーシスを誘導する活性であり、より好ましくは癌細胞に対するアポトーシスの誘導を介した細胞傷害活性である。但し、本発明の抗体は、

細胞にアポトーシスを誘導する活性に加えて、抗体依存性細胞傷害活性、補体依存性細胞傷害活性及び／又は補体依存性細胞性細胞傷害活性を併せ持っていても良い。

[0130] 例えば、抗体の断片としては、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。

[0131] 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。

[0132] 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）。

[0133] 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。

[0134] 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。

[0135] 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。

[0136] 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。

[0137] 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、ヘリックスーターン－ヘリックスモチーフの導入等を挙げることができる。

[0138] 本発明の抗体は、アミノ酸配列が異なる複数種類の抗ＤＲ５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）。

[0139] 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。

[0140] 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る（Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（２００５）２３，ｐ．１１３７－１１４６）。

[0141] 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　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ（１９８８））が、これら

に限定されるものではない。

[0142] 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。

[0143] 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。

[0144] 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。

[0145] 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。

（４）その他の抗ＤＲ５抗体の具体例

例えば、国際公開パンフレット、ＷＯ９８／５１７９３、 ＷＯ２００１／８３５６０、ＷＯ２００２／９４８８０、ＷＯ２００３／５４２１６、ＷＯ２００６／８３９７１、ＷＯ２００７／２２１５７にＤＲ５発現細胞にアポトーシスを誘導する抗ＤＲ５抗体が記載されている。また、Ｔｉｇａｔｕｚｕｍａｂ（ＣＳ－１００８）、Ｌｅｘａｔｕｍｕｍａｂ（ＨＧＳ－ＥＴＲ２）、ＨＧＳ－ＴＲ２Ｊ、Ｄｒｏｚｉｔｕｍａｂ（ＡＰＯＭＡＢ）、Ｃｏｎａｔｕｍｕｍａｂ（ＡＭＧ－６５５）、ＬＢＹ１３５と呼ばれる抗ＤＲ５抗体について、臨床試験が継続中であるか、あるいは過去に臨床試験が実施されていた。本出願の出願日当時も臨床試験が継続中であるのは、Ｔｉｇａｔｕｚｕｍａｂ、Ｌｅｘａｔｕｍｕｍａｂ、Ｃｏｎａｔｕｍｕｍａｂである。本明細書に記載の新規抗ＤＲ５抗体は、上記のＴｉｇａｔｕｚｕｍａｂ、Ｌｅｘａｔｕｍｕｍａｂ、Ｃｏｎａｔｕｍｕｍａｂ及びＤｒｏｚｉｔｕｍａｂと比較した場合に、より優れたｉｎ ｖｉｔｒｏ及び／又はｉｎ ｖｉｖｏ

における抗腫瘍活性を有している。

[0146] ３．抗ＤＲ５抗体を含有する医薬

上述の「２．抗ＤＲ５抗体の製造」の項に記載された方法で得られる抗体は、生体内でのＤＲ５のアポトーシス関連受容体に対してアゴニストとして働き、受容体を介して癌細胞に対してアポトーシスを誘導し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。

[0147] ｉｎ ｖｉｔｒｏでの抗体による殺細胞活性は、アポトーシス関連受容体を過剰発現している細胞における細胞の増殖の抑制活性で測定することができる。

[0148] 例えば、ＤＲ５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。

[0149] 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、ＤＲ５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。

[0150] 癌の種類としては、肺癌、前立腺癌、甲状腺癌、胃癌、肝臓癌、卵巣癌、大腸癌、乳癌、膵臓癌、腎臓癌、子宮内膜癌を含む子宮癌、メラノーマを含む黒色腫、繊維肉腫、神経膠芽腫、血球癌（白血病、リンパ腫等）等を挙げることができるが、治療対象となる癌細胞がＤＲ５を発現している限りこれらに限定されない。

[0151] また、ＤＲ５に対する抗体は炎症性細胞に対してアポトーシスを誘導することが知られている（Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．１９９６，９８（２），２７１－２７８；Ｉｎｔ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１９９６，８（１０），１５９５－１６０２）。従って、本発明の抗体は、自己免疫疾患又は炎症性疾患の治療剤として用いることも可能である。この自己免疫又は炎症性の疾患としては、例として、全身性エリテマトーデス、橋本病、関節リウマチ、宿主移植片病、シェーグレン症候群、悪性貧血、アジソン病、硬皮症、グッドパ

スチャー症候群、クローン病、自己免疫溶血性貧血、生殖不能症、重症筋無力症、多発性硬化症、バセドー病、血栓不足紫斑病、インスリン依存糖尿病、アレルギー、喘息、アトピー疾患、動脈硬化症、心筋炎、心筋症、糸球腎炎、再生不良性貧血、臓器移植後の拒絶反応が挙げることができる。

[0152] 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。

[0153] 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ー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ＤＲ５抗体の重量に対して０．０１～１００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。

[0154] 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。

[0155] 本発明の医薬組成物には抗ＤＲ５抗体を含む医薬組成物並びに、抗ＤＲ５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ＤＲ５抗体を含む医薬組成物並びに、抗ＤＲ５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。

[0156] 上記の医薬組成物において、抗ＤＲ５抗体と共に含まれる癌治療剤は、抗ＤＲ５抗体と同時に、別々に、あるいは連続して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、５－ＦＵ又は国際公開第ＷＯ２００３／０３８０４３号パンフレットに記載の薬剤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。

[0157] 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ＤＲ５抗体のＤＲ５に対する親和性、即ち、ＤＲ５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ＤＲ５抗体をヒトに対して投与する際には、約０．１～１００ｍｇ／ｋｇを１～１８０日間に１回投与すればよい。

[0158] 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。

[0159] 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。

[0160]

実施例 1

[0161] マウス抗体Ｂ２７３の作製

１）－１　ヒトＤＲ５蛋白質（ヒトＤＲ５細胞外領域ヒトＦｃ融合体）の作製

１）－１－１　ヒトＤＲ５細胞外領域発現ベクターの作製

ヒトＤＲ５蛋白質（アイソフォーム２：ＮＰ＿６７１７１６）を発現させるベクターは、ＣＭＶプロモーターの下流にヒトＤＲ５細胞外領域とヒトＩｇＧ１／Ｆｃ領域を融合させた遺伝子を配置することにより構築した。

[0162] １）－１－２　ヒトＤＲ５蛋白質の作製

２９３ＦｒｅｅＳｔｙｌｅ細胞への発現ベクターの導入及び培養上清の回収はインビトロジェン社（現ライフテクノロジーズジャパン株式会社）にて実施した。

[0163] １）－１－３　ヒトＤＲ５蛋白質の精製

上記ｂ）で得られた培養上清を、ＰｒｏｔｅｉｎＡアフィニティカラムクロマトグラフィーを用いて精製した。培養上清５Ｌ分をＰＢＳで平衡化した「Ｈｉｔｒａｐ　ＰｒｏｔｅｉｎＡＦＦ」（ＧＥヘルスケアジャパン株式会社Ｃａｔ．ｎｏ．１７－５０７９－０１）にアプライし、ＰＢＳで洗浄した。次に２Ｍアルギニン溶液（ｐＨ４．０）を添加し、ヒトＤＲ５蛋白質の含まれる画分を集めた。その画分をＣｅｎｔｒｉｆｕｇａｌ　Ｆｉｌｔｅｒ　Ｄｅｖｉｃｅ（ＡｍｉｃｏｎＵｌｔｒａ４、分画分子量１０Ｋ、ミリポア社）に添加し、ＰＢＳへの液置換及び濃縮をおこなった。最終的な容量を６ｍｌとし、精製サンプル（ｒＤＲ５－ｈＦｃ）とした。精製品の蛋白定量は「Ｍｉｃｒｏ　ＢＣＡ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ａｓｓａｙ　Ｋｉｔ」（ＰＩＥＲＣＥ　＃２３２３５）を用いて定量した。標準品はキットに含まれる「Ａｌｂｕｍｉｎ　Ｓｔａｎｄａｒｄ」を用いた。

[0164] １）－２　免疫

5～６週齢のＢＡＬＢ／ｃＡＪｃｌマウス（日本クレア社）を使用した。０日目に１）－１－３で調製した５０μｇのｒＤＲ５－ｈＦｃ　とＦｒｅｕｎｄ　Ｃｏｍｐｌｅｔｅ　Ａｊｕｖａｎｔ（和光純薬社製）を混合（体積比で１：１）したものをマウス首筋付近に皮下投与した。１４日目と２８日目に５０μｇのｒＤＲ５－ｈＦｃとＦｒｅｕｎｄ　Ｉｎｃｏｍｐｌｅｔｅ　Ａｊｕｖａｎｔ（和光純薬社製）を混合（体積比で１：１）したものをマウス背部に皮下投与した。４２日目に５０μｇのｒＤＲ５－ｈＦｃをマウス腹腔内に投与し、４５日目にマウス脾臓を採取してハイブリドーマ作製に用いた。

[0165] １）－３　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細胞とをＰＥＧ４０

００（免疫生物研究所社製）を用いて細胞融合し、ＣｌｏｎａＣｅｌｌ－ＨＹ Ｓｅｌｅｃｔｉｏｎ Ｍｅｄｉｕｍ Ｄ（ＳｔｅｍＣｅｌｌ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製 ＃０３８０４）に希釈して培養した。出現し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を作製した。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用いて抗ＤＲ５抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングを行った。

[0166] １）－４ Ｃｅｌｌ－ＥＬＩＳＡ法による抗体スクリーニング

１）－４－１ ヒトＤＲ５変異体発現ベクター（ｐｃＤＮＡ３．１－ＤＲ５Ｍ）の構築

ヒトＤＲ５蛋白質（アイソフォーム２：ＮＰ＿６７１７１６）をコードするｃＤＮＡをｐｃＤＮＡ３．１（＋）ベクターにクローニングし、デスドメイン内にある３３４番目のアミノ酸であるＬをＤに置換して発現するようデザインしたデスドメイン改変発現ベクターｐｃＤＮＡ３．１－ＤＲ５Ｍを構築した。

[0167] １）－４－２ 抗原遺伝子発現細胞の調製

ＨＥＫ２９３細胞を１０％ＦＢＳ含有ＤＭＥＭ培地中７．５ｘ１０^{5}細胞／ｍｌになるよう調製した。それに対し、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ２０００（ライフテクノロジーズジャパン社製）を用いて、デスドメイン改変ＤＲ５発現ベクターｐｃＤＮＡ３．１－ＤＲ５ＭもしくはコントロールとしてｐｃＤＮＡ３．１－ｍｏｃｋを導入し、９６穴ハーフエリアマイクロプレート（コーニング社製）に５０μｌずつ分注し、１０％ＦＢＳ含有ＤＭＥＭ培地中で３７℃、５％CO_2の条件下で一晩培養した。得られた導入細胞を接着状態のまま、Ｃｅｌｌ－ＥＬＩＳＡに使用した。

[0168] １）－４－３ Ｃｅｌｌ－ＥＬＩＳＡ

１）－４－２で調製した発現ベクター導入ＨＥＫ２９３細胞の上清を除去後、ｐｃＤＮＡ３．１－ＤＲ５ＭとｐｃＤＮＡ３．１－ｍｏｃｋ導入ＨＥＫ２９３細胞のそれぞれに対しハイブリドーマ培養上清を添加し、４℃で１時

間静置した。ウェル中の細胞を５％　ＦＢＳ含有ＰＢＳで１回洗浄後、５％ＦＢＳ含有ＰＢＳで５００倍に希釈したＧｏａｔ　ａｎｔｉ－ＭｏｕｓｅＩｇＧ，Ｐｅｒｏｘｉｄａｓｅ　Ｃｏｎｊｕｇａｔｅｄ（Ｃｈｅｍｉｃｏｎ社製　＃ＡＰ１８１Ｐ）を加えて、４℃で１時間静置した。ウェル中の細胞を５％ＦＢＳ含有ＰＢＳで５回洗浄した後、ＯＰＤ発色液（ＯＰＤ溶解液（０．０５Ｍ　クエン酸３ナトリウム、０．１Ｍ　リン酸水素２ナトリウム・１２水　ｐＨ４．５）にｏ－フェニレンジアミン二塩酸塩（和光純薬社製）、H_2O_2をそれぞれ０．４ｍｇ／ｍｌ、０．６％（ｖ／ｖ）になるように溶解）を２５μｌ／ウェルで添加した。時々攪拌しながら発色反応を行い、１Ｍ　ＨＣｌを２５μｌ／ウェルを添加して発色反応を停止させた後、プレートリーダー（ＡＲＶＯ：ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ社）で４９０ｎｍの吸光度を測定した。細胞膜表面上に発現するＤＲ５に特異的に結合する抗体を産生するハイブリドーマを選択するため、ｐｃＤＮＡ３．１－ｍｏｃｋ導入ＨＥＫ２９３細胞（コントロール）と比較し、ｐｃＤＮＡ３．１－ＤＲ５Ｍ発現ベクター導入ＨＥＫ２９３細胞の方でより高い吸光度を示す培養上清を産生するハイブリドーマを抗ＤＲ５抗体産生陽性として選択した。

[0169]　１）－５　フローサイトメトリー法による抗体スクリーニング

１）－５－１　抗原遺伝子発現細胞の調製

２９３Ｔ細胞を５×１０^{4}細胞／ｃｍ^{2}になるよう２２５平方ｃｍフラスコ（住友ベークライト社製）に播種し、１０％ＦＢＳ含有ＤＭＥＭ培地中で３７℃、５％CO_2の条件下で一晩培養した。翌日、ｐｃＤＮＡ３．１－ＤＲ５ＭとコントロールとしてｐｃＤＮＡ３．１－ｍｏｃｋをそれぞれ２９３Ｔ細胞にＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００を用いて導入し、３７℃、５％CO_2の条件下でさらに一晩培養した。翌日、発現ベクター導入２９３Ｔ細胞をＴｒｙｐＬＥ　Ｅｘｐｒｅｓｓ（ライフテクノロジーズジャパン社製）で処理し、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。

[0170] １）－５－２　フローサイトメトリー解析

１）－５－１で調製した２９３Ｔ細胞懸濁液を遠心し、上清を除去した後、ｐｃＤＮＡ３．１－ＤＲ５Ｍ導入２９３Ｔ細胞とｐｃＤＮＡ３．１－ｍｏｃｋ導入２９３Ｔ細胞のそれぞれ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）（Ｃａｐｐｅｌ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３回洗浄した後、２μｇ／ｍｌ　７－ａｍｉｎｏａｃｔｉｎｏｍｙｃｉｎ　Ｄ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ（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ｐｃＤＮＡ３．１－ｍｏｃｋ導入２９３Ｔ細胞の蛍光強度ヒストグラムに対しｐｃＤＮＡ３．１－ＤＲ５Ｍ導入２９３Ｔ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ＤＲ５抗体産生陽性として選択した。

[0171] １）－６　殺細胞作用スクリーニング

１）－５及び１）－６で抗ＤＲ５抗体産生陽性として選択したハイブリドーマ培養上清を用いて、ヒトＴリンパ腫由来細胞株Ｊｕｒｋａｔに対する細胞死誘導作用を確認した。５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣＬ（ｐＨ８．５）で５０μｇ／ｍｌに調製したＡｆｉｎｉＰｕｒｅ　Ｇｏａｔ　ａｎｔｉ－ｍｏｕｓｅ　ＩｇＧ　Ｆｃ　ｓｐｅｃｉｆｉｃ（Ｊａｃｋｓｏｎ社製　＃１１５－００５－０７１）を９６穴ハーフエリアマイクロプレート（コーニング社製）に２５μｌずつ分注し４℃で１晩静置した。ウェル中をＰＢＳで２回洗浄した後、ハイブリドーマ培養上清を加えて、４℃で１晩静置した。各ウェルを

ＰＢＳで２回洗浄した後、１０％ＦＢＳ含有ＲＰＭＩ１６４０培地中４．０ｘ１０^{4}細胞／ｍｌになるよう調製したＪｕｒｋａｔ細胞を２５μｌ／ウェルで添加し、３７℃、５％CO_2の条件下で２０時間培養した。ＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ Ｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｔ Ｃｅｌｌ Ｖｉａｂｉｌｉｔｙ Ａｓｓａｙ ｋｉｔ（Ｐｒｏｍｅｇａ社製 ＃Ｇ７５７１）を用いて生細胞由来のＡＴＰ量を定量することによりハイブリドーマ培養上清中に存在する抗ＤＲ５モノクローナル抗体の殺細胞作用を評価した。その結果、ハイブリドーマ培養用培地添加と比較し、８割以上のＡＴＰ量減少を示す５種類のモノクローナル抗体（Ｂ０８６、Ｂ１３９、Ｂ１９２、Ｂ２７３、Ｂ４６７）を産生するハイブリドーマを樹立した。

[0172] １）－７ 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、Ｂ０８６、Ｂ１３９、Ｂ１９２、Ｂ２７３、Ｂ４６７のアイソタイプはＩｇＧ１、κ鎖である事が確認された。

[0173] １）－８ 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（以下「抗体精製原料」という。）から精製した。

[0174] 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（日本エスエルシー）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。

[0175] 抗体は Ｈｉｔｒａｐ ＭａｂＳｅｌｅｃｔ ＳｕＲｅ（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ Ｂｉｏ－Ｓｃｉｅｎｃｅｓ社製）で精製された。すなわち抗体精製原料をカラムに添加しＰＢＳで洗浄後、２Ｍ Ａｒｇｉｎｉｎｅ－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。抗体の濃度はＰＯＲＯＳ　Ｇ　２０μｍ　Ｃｏｌｕｍｎ　ＰＥＥＫ，４．６ｍｍ×５０ｍｍ，０．８３ｍｌ（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。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リムルス　ＥＳ－ＩＩ　シングルテスト　ワコー（和光純薬工業　２９５－５１０３０　コントロールスタンダードエンドトキシンを含む）と、トキシノメーター（和光純薬工業　ＥＴ－３０１、又はＥＴ－５０００）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。

[0176] １）－９　マウス抗体Ｂ２７３のヒト癌細胞株に対するｉｎ　ｖｉｔｒｏ殺細胞活性

ヒトＴリンパ腫由来細胞株Ｊｕｒｋａｔ又はヒト神経膠芽種細胞株Ｕ－８７ＭＧをそれぞれ１０％ＦＢＳ含有ＲＰＭＩ１６４０培地又は１０％ＦＢＳ含有ＭＥＭ（Ｍｉｎｉｍｕｍ　Ｅｓｓｅｎｔｉａｌ　Ｍｅｄｉｕｍ）培地で４．４ｘ１０^{4}細胞／ｍｌになるよう調製し、白色透明底９６穴マイクロプレート（コーニング社製）に４５μｌ／ウェルで添加し、３７℃、５％CO_2の条件下で一晩培養した。マウスＢ２７３抗体又はマウスＩｇＧ１抗体（Ｒ＆Ｄ社製）をＡｆｉｎｉＰｕｒｅ　Ｇｏａｔ　ａｎｔｉ－ｍｏｕｓｅ　ＩｇＧ　Ｆｃ　ｓｐｅｃｉｆｉｃ（Ｊａｃｋｓｏｎ社製　＃１１５－００５－０７１）と等濃度で混合後、マウスＢ２７３抗体又はマウスＩｇＧ１抗体の終濃

度が１０，０００～０．０１ｎｇ／ｍｌとなるように５μｌ／ウェルで添加し、３７℃、５％CO_2の条件下で２４時間培養した。各ウェル中の生細胞由来のＡＴＰ量をＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ Ｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｔ Ｃｅｌｌ Ｖｉａｂｉｌｉｔｙ Ａｓｓａｙ ｋｉｔ（Ｐｒｏｍｅｇａ社製 ＃Ｇ７５７１）を用いて添付のプロトコールに従いルミノメーター（パーキンエルマー社製）にて測定し、抗体液の代わりに培地を添加したウェルの値を１００％として殺細胞活性を評価した（図１）。各グラフは細胞生存率を平均値±標準偏差（ｎ＝３）で示している。その結果、マウスＢ２７３抗体は両細胞株に対して濃度依存的に殺細胞作用を示すことが明らかとなった。

[0177]

実施例 2

[0178] マウス抗体Ｂ２７３遺伝子のクローニングとヒトキメラ抗体遺伝子の作製

２）－１ マウス抗体Ｂ２７３のcDNAのクローニングと配列の決定

２）－１－１ マウス抗体Ｂ２７３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Ｂ２７３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１－８で精製したマウス抗体Ｂ２７３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；Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ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り、Ｐｒｏｃｉｓｅ（登録商標）ｃＬＣ プロテインシーケンサー Ｍｏｄｅｌ ４９２ｃＬＣ（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Ｂ２７３の重鎖に相当するバンドのＮ末端のアミノ酸配列は、

ＥＶＱＬＱＱＳＧＰＥＬＶＫＰＧ（配列表の配列番号１）であり、軽鎖に相当するバンドのＮ末端アミノ酸配列は、

ＤＶＶＭＴＱＴＰＬＳＬＰＶＳＬＧＤＱＡＳ（配列表の配列番号２）であった。

[0179] ２）－１－２　マウス抗体Ｂ２７３産生ハイブリドーマからのｍＲＮＡの調製

マウス抗体Ｂ２７３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Ｂ２７３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。

[0180] ２）－１－３　マウス抗体Ｂ２７３のｃＤＮＡのクローニングと配列の決定

実施例１－７から、マウス抗体Ｂ２７３の重鎖及び軽鎖のアイソタイプがγ１とκであること、上記２）－１－１で決定した重鎖及び軽鎖のＮ末端アミノ酸配列、及びカバトらにより作成された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および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、２）－１－２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

５’－ａａｇａａｔｔｃａｔｇｇｇａｔｇｇａｇｃｔｇｔａｔｃ－３’（ＭＨ２５８Ｅ１Ｆ１：配列表の配列番号３）

５’－ａａｇａｔａｔｃｔｔａｔｔｔａｃｃａｇｇａｇａｇｔｇｇｇａｇａｇ－３’（Ｇ１ＥＶＲ１：配列表の配列番号４）

軽鎖用プライマーセット

５’－ａａｇａａｔｔｃａｔｇａａｇｔｔｇｃｃｔｇｔｔａｇｇ－３’（ＭＫ１９ＥＩＦ１：配列表の配列番号５）

５’－ａａｇａｔａｔｃｔｔａａｃａｃｔｃａｔｔｃｃｔｇｔｔｇａａｇｃｔ－３’（ＫＥＶＲ１：配列表の配列番号６）

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（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ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」あるいは「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Ｂ２７３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７に示し、アミノ酸配列を配列番号８に示した。マウス抗体Ｂ２７３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９に示し、アミノ酸配列を配列表の配列番号１０に示した。配列番号７及び８の配列は図２８に、配列番号９及び１０の配列は図２９に、それぞれ記載されている。

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Ｂ２７３の重鎖については

、配列表の配列番号８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Ｂ２７３の軽鎖については、配列表の配列番号１０のアミノ酸番号２０乃至１３３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。

[0181] ２）－２　キメラ抗体Ｂ２７３発現ベクターの作製

２）－２－１　汎用発現ベクターｐＥＦ６ＫＣＬ及びｐＥＦ１ＦＣＣＵの作製

２）－２－１－１　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（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ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。

５’－ｃｃａｃｇｃｇｃｃｃｔｇｔａｇｃｇｇｃｇｃａｔｔａａｇｃ－３’（プライマーＥＦＦ１：配列表の配列番号１１）

５’－ａａａｃｃｃｇｇｇａｇｃｔｔｔｔｔｇｃａａａａｇｃｃｔａｇｇ－３’（プライマーＥＦｓｍａＲ：配列表の配列番号１２）

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１３　以下、「フラグメントＢ」とする。）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　（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ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。

[0182] ２）－２－１－２　ｐＥＦ１／ＫＣＬ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（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）とライゲーションし、プラスミドｐＥＦ１ＫＣＬを構築した。

[0183] ２）－２－１－３　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１４）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。

[0184] ２）－２－２　Ｂ２７３キメラタイプ軽鎖発現ベクターの構築

マウス抗体Ｂ２７３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、Ｂ２７３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／Ｂ２７３Ｌ」と命名した。Ｂ２７３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１５に示し、アミノ酸配列を配列番号１６に示した。配列番号１５及び１６の配列は、図３０に記載されている。なお、配列表の配列番号１６に記載のキメラタイプ軽鎖アミノ酸配列の１３４番目のアミノ酸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１０に記載のマウス抗体Ｂ２７３

の軽鎖アミノ酸配列の１３３番目のアラニン残基に対応するが、配列番号１６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

５’－ａａａｃａｔａｔｇｇｃｇａｔｇｔｔｇｔｇａｔｇａｃｃｃａａａｃｔｃｃａｃｔｃｔｃｃ－３’（Ｂ２７３ＬＦ：配列表の配列番号１７）

５’－ａａａｃｇｔａｃｇｔｔｔｇａｔｔｔｃｃａｇｃｔｔｇｇｔｇｃｃｔｃｃａｃｃｇａａｃｇ－３’（Ｂ２７３ＬＲ：配列表の配列番号１８）

２）－２－３　Ｂ２７３キメラタイプ重鎖発現ベクターの構築

マウス抗体Ｂ２７３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で重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、Ｂ２７３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それぞれ「ｐＥＦ１ＦＣＣＵ／Ｂ２７３Ｈ」と命名した。Ｂ２７３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１９に示し、アミノ酸配列を配列番号２０に示した。配列番号１９及び２０の配列は、図３１に記載されている。

重鎖用プライマーセット

５’－ａａａｇｃｔｇａｇｃｇａｇｇｔｔｃａｇｃｔｇｃａｇｃａｇｔｃｔｇｇａｃｃｔｇａｇｃ－３’（Ｂ２７３ＨＦ：配列表の配列番号２１）

５’－ａａａｇｃｔｇａｇｃｔｇａｃｔｇｔｇａｇａｇｔｇｇｔｇｃｃｔｔｇｇｃｃｃｃａｇｔａｇ－３’（Ｂ２７３ＨＲ：配列表の配列番号２２）

２）－３　キメラ抗体Ｂ２７３の調製

２）－３－１　キメラ抗体Ｂ２７３の生産

１．２×10^9個の対数増殖期のＦｒｅｅＳｔｙｌｅ　２９３Ｆ細胞（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）を新鮮な１．２ＬのＦｒｅｅＳｔｙｌｅ２９３　ｅｘ

ｐｒｅｓｓｉｏｎ ｍｅｄｉｕｍ （Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）に播種し、３７℃、８％CO_2インキュベーター内において９０ｒｐｍで一時間振とう培養した。Ｐｏｌｙｅｔｈｙｌｅｎｅｉｍｉｎｅ（Ｐｏｌｙｓｃｉｅｎｃｅ＃２４７６５）３．６ｍｇをＯｐｔｉ－Ｐｒｏ ＳＦＭ培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）２０ｍｌに溶解し、次にＰｕｒｅＬｉｎｋ ＨｉＰｕｒｅ Ｐｌａｓｍｉｄキット（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）を用いて調製したｐＥＦ１ＦＣＣＵ／Ｂ２７３Ｈ（０．４ｍｇ）及びｐＥＦ６ＫＣＬ／Ｂ２７３Ｌ（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、さらに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／Ｂ２７３ＨとｐＥＦ６ＫＣＬ／Ｂ２７３Ｌとの組合せによって取得されたキメラ抗体Ｂ２７３を「ｃＢ２７３」と命名した。

[0185] ２）－３－２ ｃＢ２７３の精製

上記２）－３－１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。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。さら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。その画分を脱塩カラム（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。

[0186]

実施例 3

[0187] ヒトキメラＢ２７３（ｃＢ２７３）抗体の活性測定（ｉｎ ｖｉｔｒｏ）

３）－１ ｃＢ２７３抗体のヒトＤＲ５細胞外領域選択的結合性の検討

ヒトＴＲＡＩＬ Ｒ１～Ｒ４及びマウスＴＲＡＩＬ Ｒ２細胞外領域蛋白質（Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ社製）に対するｃＢ２７３の結合性を以下に示すダイレクトＥＬＩＳＡ法により検討した。まず、ＴＲＡＩＬ Ｒｓの細胞外領域蛋白質をＰＢＳで１μｇ／ｍｌに希釈した溶液を、イムノプレート（Ｎｕｎｃ社製 ＃４４２４０４）に５０μｌ／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、ウェル中の液を除去し、ＰＢＳで一回洗浄した後、非特異的な蛋白質の吸着を抑えるため、３％ウシ胎児血清を含むＰＢＳを２００μｌ／ウェルで分注し、室温で１．５時間静置した。ウェル中の液を除去し、３％ウシ胎児血清を含むＰＢＳで希釈

したｃＢ２７３又は可溶性ヒトＴＲＡＩＬ（ＡＬＥＸＩＳ社製　＃ＡＬＸ－５２２－００３）を５０μｌ／ウェルで添加した。室温で１．５時間静置後、ＰＢＳを加えてからウェル中の液を除去し、ＰＢＳで２回ウェルを洗浄した。ｃＢ２７３抗体添加ウェルには３％ウシ胎児血清を含むＰＢＳで２５００倍に希釈したＧｏａｔ　ａｎｔｉ－Ｈｕｍａｎ　ＩｇＧ，Ｆ（ａｂ’）$_2$　ｆｒａｇｍｅｎｔ　ｓｐｅｃｉｆｉｃ，Ｐｅｒｏｘｉｄａｓｅ　Ｃｏｎｊｕｇａｔｅｄ（Ｊａｃｋｓｏｎ社製　＃１０９－０３５－０９７）を５０μｌ／ウェル、可溶性ＴＲＡＩＬ添加ウェルには２０００倍に希釈したＡｎｔｉ－ＦＬＡＧ　Ｍ２　ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ　ａｎｔｉｂｏｄｙ－Ｐｅｒｏｘｉｄａｓｅ　ｃｏｎｊｕｇａｔｅを５０μｌ／ウェルで添加し、室温で１時間静置した。ＰＢＳを加えてからウェル中の液を除去し、ＰＢＳで２回ウェルを洗浄した後、ＯＰＤ発色液を１００μｌ／ウェルで添加して発色させ、１Ｍ　ＨＣｌ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４９２ｎｍの吸光度を測定した。図２Ａ）はｃＢ２７３、図２Ｂ）は可溶性ＴＲＡＩＬの結果を示し、グラフは平均値±標準偏差（ｎ＝３）で示した。その結果、ｃＢ２７３はヒトＴＲＡＩＬ　Ｒ２細胞外領域に選択的に結合することが示された。

[0188] ３）－２　ｃＢ２７３抗体のＢｉａｃｏｒｅによる結合活性評価

３）－２－１　ヒトＤＲ５細胞外領域蛋白質の調製

３）－２－１－１　ＤＲ５細胞外領域蛋白質発現ベクターの作製

配列表の配列番号２３に示すヒトＤＲ５のアミノ酸番号１－１３０に示されるアミノ酸配列からなる領域（以下「ｓＤＲ５」と記す。）を発現するベクターを構築するため、ｓＤＲ５増幅用プライマーセット：

ＤＲ５　Ｎｄｅｆｗ：５’－ｇｔｇｇｃａｔａｔｇｇｃｔｃｔｇａｔｃａｃｃｃａａｃａａ－３’（配列表の配列番号２４）及び、

ＤＲ５　Ｘｈｏｒｖ：５’－ｃｇｃｃｔｃｇａｇｔｇａｔｔｃｔｔｔｇｔｇｇａｃａｃａ－３’（配列表の配列番号２５）、

のプライマーセットを用いてヒトＤＲ５細胞外領域をコードするｃＤＮＡを

鋳型にしてＰＣＲ反応を行った。得られたＰＣＲ産物をＮｄｅＩ及びＸｈｏＩで切断し、ｐＥＴ２１ｂ（＋）（Ｎｏｖａｇｅｎ社製）のＮｄｅＩ／ＸｈｏＩサイトにクローニングした（以下「ｐＥＴ２１ｂ（＋）－ｓＤＲ５」と略す。また、以下及び図中で「ｐＥＴ２１ｂ（＋）－ｓＤＲ５」によって発現する組換え蛋白質をｒｓＤＲ５と記す（配列表の配列番号２６）。）。

３）－２－１－２　ＤＲ５細胞外領域蛋白質（ｒｓＤＲ５）の作製

発現プラスミドｐＥＴ２１ｂ（＋）－ｓＤＲ５で大腸菌ＯｒｉｇａｍｉＢ（ＤＥ３）（Ｎｏｖａｇｅｎ社製）を形質転換し、１００μｇ／ｍｌのアンピシリン（Ｓｉｇｍａ社製）、１５μｇ／ｍｌのカナマイシン（Ｗａｋｏ社製）、を添加した２－ＹＴ培地で培養を行い、０．５ｍＭ　ＩＰＴＧ添加でＤＲ５部分蛋白質の発現誘導を行った。６０００ｒｐｍ、２０分間遠心して集菌し、結合バッファー（５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ　ＨＣｌ　ｐＨ７．５、３００ｍＭ　ＮａＣｌ）に懸濁した後、氷上で超音波破砕を行った。２５０００ｒｐｍ、２０分間遠心して、上清を回収し、Ｎｉ－ＮＴＡ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社製）に供与した。結合バッファーで洗浄した後に、溶出バッファー（５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ　ｐＨ７．５、３００ｍＭ　ＮａＣｌ、３００ｍＭ　Ｉｍｉｄａｚｏｌｅ）にて溶出した。溶出サンプルは、透析バッファー（５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ　ＨＣｌ　ｐＨ８．０、２０ｍＭ　ＮａＣｌ）で透析した後、ＭＯＮＯ　Ｑに供与し、溶出バッファー（５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ　ｐＨ８．０、１Ｍ　ＮａＣｌ）でグラジエント溶出させた。溶出サンプルは、ＰＢＳを溶媒としたゲル濾過カラムクロマトグラフィー（Ｓｕｐｅｒｄｅｘ　７５　１６／６０：ＧＥＨｅａｌｔｈｃａｒｅ　Ｂｉｏ－Ｓｃｉｅｎｃｅｓ社製）でさらに精製した。得られた組換え蛋白質の濃度はＵＶ２８０（モル吸光度定数；１４８５５）で測定した。

[0189]　３）－２－２　Ｂｉａｃｏｒｅによる結合活性測定

ｃＢ２７３抗体とｒｓＤＲ５の解離定数測定は、Ｂｉａｃｏｒｅ　３０００（ＧＥヘルスケアバイオサイエンス（株））を使用し、固定化した抗ヒトＩｇＧ（Ｆｃ）抗体に抗体を捕捉（キャプチャー）し、抗原をアナライトと

して測定するキャプチャー法にて行った。抗ヒトＩｇＧ（Ｆｃ）抗体（Ｈｕｍａｎ ａｎｔｉｂｏｄｙ ｃａｐｔｕｒｅ ｋｉｔ、ＧＥヘルスケアバイオサイエンス（株））は、センサーチップＣＭ５（ＢＩＡｃｏｒｅ，Ｉｎｃ．）へアミンカップリング法にて約８，０００ＲＵ共有結合させた。リファレンスセルにも同様に固定化した。ランニングバッファーとしてＨＢＳ－ＥＰ（１０ｍＭ ＨＥＰＥＳ ｐＨ７．４、０．１５Ｍ ＮａＣｌ，３ｍＭ ＥＤＴＡ、０．０５％Ｓｕｒｆａｃｔａｎｔ Ｐ２０）を用いた。抗ヒトＩｇＧ（Ｆｃ）抗体を固定化したチップ上に、５０ｎＭのｃＢ２７３抗体溶液を流速１０μｌ／分で６０秒間添加した後、ｒｓＤＲ５の希釈系列溶液（０．６３－２０ｎＭ）を流速３０μｌ／分で６０秒間添加し、引き続き３００秒間の解離相をモニターした。再生溶液として、３Ｍ塩化マグネシウムを流速１０μｌ／分で３０秒間添加した。データの解析には、分析ソフトウェア（ＢＩＡｅｖａｌｕａｔｉｏｎ ｓｏｆｔｗａｒｅ，ｖｅｒｓｉｏｎ ３．１）の１対１結合モデルを用いて、結合速度定数ｋｏｎ、解離速度定数ｋｏｆｆ及び解離定数（ＫＤ；ＫＤ＝ｋｏｆｆ／ｋｏｎ）を算出した。ｃＢ２７３抗体のＢｉａｃｏｒｅ測定結果を図３に示す。

[0190] ３）－３ ｃＢ２７３抗体のヒト癌細胞株に対するｉｎ ｖｉｔｒｏ殺細胞作用

ｃＢ２７３抗体の種々の癌細胞株に対する殺細胞作用を以下の方法で検討した。Ａ２７８０、ＳＫ－ＯＶ－３、ＳＫ－ＣＯ－１、Ｃａｏｖ－３、ＮＩＨ：ＯＶＣＡＲ－５（以上、ヒト卵巣癌株）、ＨＣＴ－１５、ＣＯＬＯ２０５、ＨＴ２９、ＳＷ４８０、ＳＷ６２０、ＤＬＤ－１、ＣＯＬＯ２０１、ＷｉＤｒ（以上、ヒト大腸癌株）、ＮＣＩ－Ｈ１９７５、ＮＣＩ－Ｈ２９２、ＮＣＩ－Ｈ４６０、ＮＣＩ－Ｈ３５８、（以上、ヒト肺癌株）、ＭＤＡ－ＭＢ－２３１、ＺＲ－７５－１（以上、ヒト乳癌株）をＡｍｅｒｉｃａｎＴｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ：ＡＴＣＣより購入した。これらの細胞株を１０％ウシ胎児血清（ハイクローン社製）を含む培地（以下培地）で

１×１０^{5}ｃｅｌｌｓ／ｍｌに調製して白色透明底９６穴マイクロプレート（コーニング社製）に５０μｌ／ウェルずつ播種した。ｃＢ２７３抗体を、１μｇ／ｍｌの２次抗体溶液（Ｇｏａｔ　ａｎｔｉ－ｈｕｍａｎ　ＩｇＧ　Ｆｃ：ＭＰ　Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌｓ、　ＬＬＣ．社製）で２００００ｎｇ／ｍｌに調製後、培地を用いて２０００、２００、２０、２ｎｇ／ｍｌの溶液を調製し、５０μｌずつ添加した（抗体最終濃度１００００、１０００、１００、１０、１ｎｇ／ｍｌ）。３７℃、５％CO_2の条件下でプレートを７２時間培養後、各ウェル中の生細胞由来のＡＴＰ量をＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ　Ｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｔ　Ｃｅｌｌ　Ｖｉａｂｉｌｉｔｙ　Ａｓｓａｙ　ｋｉｔ（Ｐｒｏｍｅｇａ社製　＃Ｇ７５７１）を用いて添付のプロトコールに従いルミノメーター（ベルトールド社製）にて測定した。培地と細胞懸濁液を添加したウェルを陰性コントロールウェルとし、培地のみを添加したウェルをバックグラウンドウェルとして、被験ウェルの細胞生存率を算出した。図４にｃＢ２７３抗体処理による由来癌種ごとの細胞生存率の平均値±標準誤差（ｎ＝３）を示した。ｃＢ２７３抗体はＳＫ－ＣＯ－１を除く細胞株に対し殺細胞活性を示した。

[0191] 種々の癌細胞株に対するｉｎ　ｖｉｔｒｏ殺細胞作用について、ＢｘＰＣ－３、ＭＩＡ　ＰａＣａ－２（以上、ヒト膵臓癌株）、Ａ２０５８、Ａ３７５（以上、ヒトメラノーマ株）、Ｕ－８７ＭＧ（ヒト神経膠芽種細胞株）、ＡＮ３ＣＡ（ヒト子宮内膜癌株）を対象に検討した。各細胞株を１０％ＦＢＳ含有培地で４．４ｘ１０^{4}細胞／ｍｌになるよう調製し、白色透明底９６穴マイクロプレート（コーニング社製）に４５μｌ／ウェルで添加し、３７℃、５％CO_2の条件下で一晩培養した。ｃＢ２７３抗体をＧｏａｔ　ａｎｔｉ－ｈｕｍａｎ　ＩｇＧ　Ｆｃ（ＭＰ　Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌｓ、ＬＬＣ．社製）と等濃度で混合後、ｃＢ２７３抗体の終濃度が１０，０００～１ｎｇ／ｍｌとなるように５μｌ／ウェルで添加し、３７℃、５％CO_2の条件下で２４時間培養した。各ウェル中の生細胞由来のＡＴＰ量をＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ　Ｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｔ　Ｃｅｌｌ　Ｖｉａｂｉｌｉｔｙ　Ａｓ

ｓａｙ　ｋｉｔ（Ｐｒｏｍｅｇａ社製　＃Ｇ７５７１）を用いて添付のプロトコールに従いルミノメーター（パーキンエルマー社製）にて測定した。各グラフは細胞生存率を平均値±標準偏差（ｎ＝３）で示している。その結果、ｃＢ２７３抗体は調べた全ての癌細胞株に対して殺細胞作用を示した（図５）。

[0192]

実施例 4

[0193] ｃＢ２７３抗体のエピトープの同定

４）－１　ｃＢ２７３　Ｆａｂフラグメントの作製

ｃＢ２７３はＰＢＳに透析した後、ＰＢＳで２ｍｇ/ｍｌに希釈し、１７ｍｌ調製した。ＰＢＳで０．１ｍＭに調製した、Ｃｙｓｔｅｉｎｅ（Ｓｉｇｍａ社製）を１．７ｍｌとＰＢＳで０．１ｍｇ/ｍｌに希釈したｐａｐａｉｎ（Ｓｉｇｍａ社製）を２．０４ｍｌ添加し、３７℃、５時間反応させた。５時間後、ＰＢＳで１２０ｍＭに溶解させたＮ－ｅｔｈｙｌｍａｌｅｉｍｉｄｅ（東京化成製）を６．３３ｍｌ添加して反応を停止させた。反応液は５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、２０ｍＭ　ＮａＣｌで平衡化させたＳｕｐｅｒｄｅｘ２００　２６/６０（ＧＥヘルスケア社製）に添加し、Ｆａｂフラグメントに相当するフラクション１４ｍｌを回収した。

[0194] ４）－２　ｃＢ２７３　Ｆａｂフラグメント、ｒｓＤＲ５複合体試料の調製

ｃＢ２７３　ＦａｂフラグメントをＡｍｉｃｏｎＵｌｔｒａ１５　ＭＷＣＯ　１０Ｋ（ミリポア社製）で９．４６ｍｇ/ｍｌに濃縮し、ＡｍｉｃｏｎＵｌｔｒａ１５　ＭＷＣＯ　３Ｋ　で５．６ｍｇ/ｍｌに濃縮したｒｓＤＲ５を２ｍｌずつ混合し、２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ　ＨＣｌ、５０ｍＭ　ＮａＣｌで平衡化したＳｕｐｅｒｄｅｘ２００１６/６０に添加した。

複合体に相当する相当するフラクション８ｍｌを回収した。

[0195] ４）－３　ｃＢ２７３　ＦａｂフラグメントとｒｓＤＲ５複合体の結晶化と構造解析

得られたｒｓＤＲ５とｃＢ２７３　Ｆａｂの複合体を２５ｍｇ／ｍｌに濃縮し、結晶化に用いた。結晶化には蒸気拡散法を用いた。タンパク質溶液０．４５～１．０μｌに沈殿剤溶液（６～８％（ｗ／ｖ）　ｐｏｌｙｅｔｈｙｌｅｎｅ　ｇｌｙｃｏｌ　４０００、２０％（ｖ／ｖ）　ｉｓｏｐｒｏｐａｎｏｌ、０．１　Ｍ　ｌｉｔｈｉｕｍ　ｃｈｌｏｒｉｄｅ、０．１Ｍ　ｃｉｔｒａｔｅ　ｂｕｆｆｅｒ　（ｐＨ５．６））を等量加えた溶液を、０．４５ｍｌの沈殿剤溶液を入れた密閉容器に両溶液が触れ合わないように収め、２２℃で静置した。３日後に０．４ｍｍ×０．３ｍｍ×０．０３ｍｍの板状晶が得られた。

[0196] 得られた結晶を３０％（ｖ／ｖ）ｇｌｙｃｅｒｏｌを加えた沈殿剤溶液に浸し、続いて－１８０℃の窒素気流下で凍結した。高エネルギー加速器研究機構放射光科学研究施設のＢＬ１７Ａにて９５Ｋ窒素気流下でX線回折データを収集した。得られた回折像からソフトウェアＨＫＬ２０００（ＨＫＬ社製）を用いて回折強度を数値化し、結晶構造因子を求めた。結晶は単斜晶系で空間群はＣ２、結晶の単位格子はａ＝１５２．０Å、ｂ＝７５．５Å、ｃ＝１１６．３Å、β＝１１０．２°であった。

[0197] 得られた構造因子とＤＲ５（ＰＤＢコード：２Ｈ９Ｇ）及びＨｅｒｃｅｐｔｉｎのＦａｂ（ＰＤＢコード：１Ｎ８Ｚ）の三次元構造座標を用いて分子置換法を行い、位相を決定した。計算にはソフトウェアｐｈａｓｅｒ（ＣＣＰ４：Ｃｏｌｌａｂｏｒａｔｉｖｅ　Ｃｏｍｐｕｔａｔｉｏｎａｌ　Ｐｒｏｊｅｃｔ　Ｎｏ．　４）を使用した。結晶は非対称単位に２複合体を含んでいた。

[0198] ソフトウェアＣＮＸ（Ａｃｃｅｒｌｙｓ　Ｉｎｃ．）を用いて構造の精密化を行い、ソフトウェアｃｏｏｔを用いてモデルの修正を行った。この操作を繰り返し行い、２．１　Å分解能で最終のＲ値２５．０％、ｆｒｅｅ　Ｒ値２８．７％を得た。最終のモデルは２複合体から成り、ｃＢ２７３　ＦａｂのＬ鎖アミノ酸残基（２分子とも）１－２１８、Ｈ鎖アミノ酸残基（２分子とも）１－２２２、ＤＲ５の２分子のうち１分子はアミノ酸残基１８－９

２及び９８－１２７もう１分子はアミノ酸残基２１－９２及び９８－１２７、及び３２４個の水分子を含む。ＤＲ５のアミノ酸残基９３－９７、Ｎ末の１７あるいは２０残基、Ｃ末の６残基とＨｉｓタグ、及びｃＢ２７３　Ｆａｂ　Ｌ鎖のＣ末１残基、Ｈ鎖のＣ末５残基はそれぞれ電子密度が明瞭でなかったためモデル構築していない。ラマチャンドラン・プロットで確認したところ、許容されない領域にあるアミノ酸はＬ鎖のＶａｌ５６のみであり、このＶａｌ５６はＣＤＲのＬ２で特徴的に見られる構造を取っている。

[0199] 決定されたＤＲ５とｃＢ２７３　Ｆａｂの相互作用は、非対称単位中の２分子でほぼ同等であった。ｃＢ２７３　Ｆａｂから４Å以内にあるＤＲ５のアミノ酸残基（各アミノ酸残基の位置は配列番号２３に対応している）は以下の通りである：Ｇｌｙ２６、Ｉｌｅ３４、Ｇｌｕ３６、Ａｓｐ３７、Ｇｌｙ３８、Ａｓｐ５６、Ｌｅｕ５７、Ｌｅｕ５８、Ｐｈｅ５９、Ｌｅｕ６１、Ａｒｇ６２。図６に複合体全体のリボンモデルと表面を、また図７にＤＲ５とｃＢ２７３　ＦａｂのＨ鎖、Ｌ鎖との相互作用をそれぞれ示した。

[0200]

実施例 5

[0201] ｃＢ２７３抗体のヒト化（その１）

５）－１　Ｂ２７３のヒト化バージョン（ｈＢ２７３）の設計

５）－１－１　Ｂ２７３の可変領域の分子モデリング

Ｂ２７３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。ＰｒｏｔｅｉｎＤａｔａ Ｂａｎｋ（Ｎｕｃ．Ａｃｉｄ Ｒｅｓ．２８，２３５－２４２（２０００））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、上で決定されたＢ２７３の可変領域と比較した。結果として、１Ｔ６６が、Ｂ２７３の軽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。また、１ＸＩＷが、Ｂ２７３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、Ｂ２７３の軽鎖及び重鎖に対応する１Ｔ６６及び１ＸＩＷ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。Ｂ２７３のＣＤＲは、Ｔｈｏｒｎｔｏｎｅｔ
ａｌ．（Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２６３，８００－８１５，（１９９６））の分類に従って、ＣＤＲＬ１、ＣＤＲＬ２、ＣＤＲＬ３、ＣＤＲＨ１及びＣＤＲＨ２は、それぞれクラスター１６Ａ、７Ａ、９Ａ、１０Ａ、１０Ａに割り当てられた。ＣＤＲＨ３は、Ｈ３ルール（ＦＥＢＳｌｅｔｔｅｒ３９９，１－８（１９９６））を使用して、ｋ（１１）ーに分類された。次いで、それぞれのＣＤＲについての代表的なコンホメーションがフレームワークモデルに組み込まれた。

[0202] 最後に、エネルギーの点でＢ２７３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）を使用して行った。

[0203] ５）－１－２　ヒト化Ｂ２７３に対するアミノ酸配列の設計

ヒト化Ｂ２７３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。

[0204] Ｂ２７３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、ＨｕＭｃ３抗体がフレームワーク領域についての７６％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。ＨｕＭｃ３についてのフレームワーク領域のアミノ酸残基を、Ｂ２７３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Ｂ２７

３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、Ｑｕｅｅｎｅｔ 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Ｂ２７３配列を以下の実施例に記載されるように構築した。

[0205] ５）－１－２ Ｂ２７３軽鎖のヒト化

５）－１－２－１ ｈＢ２７３＿Ｌ１タイプ軽鎖：

配列表の配列番号１６に示されるｃＢ２７３軽鎖のアミノ酸番号２２（バリン）、２７（スレオニン）、３４（セリン）、３５（ロイシン）、３７（アスパラギン酸）、３８（グルタミン）、７０（リジン）、１０８（ロイシン）、１１０（イソロイシン）、１１２（フェニルアラニン）、１２５（グリシン）、１２９（ロイシン）をそれぞれイソロイシン、セリン、スレオニン、プロリン、グルタミン酸、プロリン、グルタミン、バリン、バリン、チロシン、プロリン、バリンに置き換えることを伴い設計されたヒト化Ｂ２７３軽鎖を「ｈＢ２７３＿Ｌ１タイプ軽鎖」と命名した。

[0206] ｈＢ２７３＿Ｌ１タイプ軽鎖をコードするヌクレオチド配列は、配列表の配列番号２７に記載されている。また、ｈＢ２７３＿Ｌ１タイプ軽鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号２８に記載されている。さらに、配列番号２７及び２８の配列は、図３２にも記載されている。

[0207] ５）－１－２－２ ｈＢ２７３＿Ｌ２タイプ軽鎖：

配列表の配列番号１６に示されるｃＢ２７３軽鎖のアミノ酸番号３７（アスパラギン酸）、３８（グルタミン）、１０８（ロイシン）、１１０（イソロイシン）、１２５（グリシン）、１２９（ロイシン）をそれぞれグルタミン酸、プロリン、バリン、バリン、プロリン、バリンに置き換えることを伴い設計されたヒト化Ｂ２７３軽鎖を「ｈＢ２７３＿Ｌ２タイプ軽鎖」と命名した。

[0208] ｈＢ２７３＿Ｌ２タイプ軽鎖をコードするヌクレオチド配列は、配列表の

配列番号２９に記載されている。また、ｈＢ２７３＿Ｌ２タイプ軽鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号３０に記載されている。さらに、配列番号２９及び３０の配列は、図３３にも記載されている。

[0209] ５）－１－２－３　ｈＢ２７３＿Ｌ３タイプ軽鎖：

配列表の配列番号１６に示されるｃＢ２７３軽鎖のアミノ酸番号３７（アスパラギン酸）、３８（グルタミン）、１０８（ロイシン）、１１０（イソロイシン）、１２９（ロイシン）をそれぞれグルタミン酸、プロリン、バリン、バリン、バリンに置き換えることを伴い設計されたヒト化Ｂ２７３軽鎖を「ｈＢ２７３＿Ｌ３タイプ軽鎖」と命名した。

[0210] ｈＢ２７３＿Ｌ３タイプ軽鎖をコードするヌクレオチド配列は、配列表の配列番号３１に記載されている。また、ｈＢ２７３＿Ｌ３タイプ軽鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号３２に記載されている。さらに、配列番号３１及び３２の配列は、図３４にも記載されている。

[0211] ５）－１－３　Ｂ２７３重鎖のヒト化

５）－１－３－１　ｈＢ２７３＿Ｈ１タイプ重鎖：

配列表の配列番号２０に示されるｃＢ２７３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）、３９（イソロイシン）、５６（メチオニン）、５７（リジン）、５９（セリン）、６０（ヒスチジン）、６２（リジン）、６３（セリン）、６７（イソロイシン）、８６（リジン）、８７（アラニン）、９５（セリン）、９６（スレオニン）、９９（ヒスチジン）、１０３（ロイシン）、１０６（スレオニン）、１１０（セリン）、１１４（フェニルアラニン）、１１６（グリシン）、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、バリン、バリン、アルギニン、アラニン、プロリン、メチオニン、グリシン、メチオニン、アルギニン、バリン、スレオニン、セリン、チロシン、セリン、アルギニン、スレオニン、チロシン、アラニン、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Ｂ２７３重鎖を「ｈＢ２７３＿Ｈ１タイプ重鎖」と命名

した。

[0212] ｈＢ２７３＿Ｈ１タイプ重鎖をコードするヌクレオチド配列は、配列表の配列番号３３に記載されている。また、ｈＢ２７３＿Ｈ１タイプ重鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号３４に記載されている。さらに、配列番号３３及び３４の配列は、図３５にも記載されている。

[0213] ５）－１－３－２ ｈＢ２７３＿Ｈ２タイプ重鎖：

配列表の配列番号２０に示されるｃＢ２７３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）、３９（イソロイシン）、６０（ヒスチジン）、６２（リジン）、９５（セリン）、９６（スレオニン）、９９（ヒスチジン）、１０３（ロイシン）、１０６（スレオニン）、１１０（セリン）、１１６（グリシン）、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、バリン、プロリン、メチオニン、スレオニン、セリン、チロシン、セリン、アルギニン、スレオニン、アラニン、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Ｂ２７３重鎖を「ｈＢ２７３＿Ｈ２タイプ重鎖」と命名した。

[0214] ｈＢ２７３＿Ｈ２タイプ重鎖をコードするヌクレオチド配列は、配列表の配列番号３５に記載されている。また、ｈＢ２７３＿Ｈ２タイプ重鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号３６に記載されている。さらに、配列番号３５及び３６の配列は、図３６にも記載されている。

[0215] ５）－１－３－３ ｈＢ２７３＿Ｈ３タイプ重鎖：

配列表の配列番号２０に示されるｃＢ２７３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）、３９（イソロイシン）、６０（ヒスチジン）、９５（セリン）、９６（スレオニン）、１０３（ロイシン）、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、バリン、プロリン、スレオニン、セリン、セリン、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Ｂ２７３重鎖を「ｈＢ２７３＿Ｈ３タイプ重鎖」と命名した。

[0216] ｈＢ２７３＿Ｈ３タイプ重鎖をコードするヌクレオチド配列は、配列表の配列番号３７に記載されている。また、ｈＢ２７３＿Ｈ３タイプ重鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号３８に記載されている。さらに、配列番号３７及び３８の配列は、図３７にも記載されている。

[0217] ５）－２ ｈＢ２７３＿Ｌ１、ｈＢ２７３＿Ｌ２、及びｈＢ２７３＿Ｌ３タイプ軽鎖発現ベクターの構築

配列番号２８のアミノ酸番号２１乃至１３４、配列番号３０のアミノ酸番号２１乃至１３４、及び配列番号３２のアミノ酸番号２１乃至１３４にそれぞれ示される、ｈＢ２７３＿Ｌ１、ｈＢ２７３＿Ｌ２、及びｈＢ２７３＿Ｌ３タイプ軽鎖可変領域をコードする遺伝子を含むＤＮＡを合成し（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、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、ｈＢ２７３＿Ｌ１、ｈＢ２７３＿Ｌ２、及びｈＢ２７３＿Ｌ３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／ｈＢ２７３＿Ｌ１」、「ｐＥＦ６ＫＣＬ／ｈＢ２７３＿Ｌ２」、及び「ｐＥＦ６ＫＣＬ／ｈＢ２７３＿Ｌ３」と命名した。

[0218] ５）－３ ｈＢ２７３＿Ｈ１、ｈＢ２７３＿Ｈ２、及びｈＢ２７３＿Ｈ３タイプ重鎖発現ベクターの構築

配列表の配列番号３４のアミノ酸番号２０乃至１４１、配列番号３６のアミノ酸番号２０乃至１４１、及び配列番号３８のアミノ酸番号２０乃至１４１にそれぞれ示される、ｈＢ２７３＿Ｈ１、ｈＢ２７３＿Ｈ２、及びｈＢ２７３＿Ｈ３タイプ重鎖可変領域をコードする遺伝子を含むＤＮＡを合成し（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、ｈＢ２７３＿Ｈ１、ｈＢ２７３＿Ｈ２、及びｈＢ２７３＿Ｈ３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／ｈＢ２７３＿Ｈ１」、「ｐＥＦ１ＦＣＣＵ／ｈＢ２７３＿Ｈ２」、及び「ｐＥＦ１ＦＣＣＵ／ｈＢ２７３＿Ｈ３」と命名した。

[0219] ５）－４　ヒト化抗体の調製

５）－４－１　ヒト化抗体の生産

１．２×１０^{9}個の対数増殖期のＦｒｅｅＳｔｙｌｅ　２９３Ｆ細胞（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）を新鮮な１．２ＬのＦｒｅｅＳｔｙｌｅ２９３　ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　ｍｅｄｉｕｍ　（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ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（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）２０ｍｌに溶解し、次にＰｕｒｅＬｉｎｋ　ＨｉＰｕｒｅ　Ｐｌａｓｍｉｄキット（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）を用いて調製したＨ鎖発現ベクター（０．４ｍｇ）及びＬ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、さらに５分間放置した後にＦｒｅｅＳｔｙｌｅ　２９３Ｆ細胞に添加した。３時間後にＺ－ＶＡＤ－ＦＭＫ（ＰＥＰＴＩＤＥ　ＩＮＳＴＩＴＵＴＥ社）を１０μＭになるように添加し、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／ｈＢ２７３＿Ｈ１とｐＥＦ６ＫＣＬ／ｈＢ２７３＿Ｌ１との組合せによって取得されたｃＢ２７３のヒト化抗体を「ｈＢ２７３＿Ｈ１／ｈＢ２７３＿Ｌ１」、ｐＥＦ１ＦＣＣＵ／ｈＢ２７３＿Ｈ１とｐＥＦ６ＫＣＬ／ｈＢ２７３＿Ｌ２との組合せによって取得されたｃＢ２７３のヒト化抗体を「ｈＢ２７３＿Ｈ１／ｈＢ２７３＿Ｌ２」、ｐＥＦ１ＦＣＣＵ／ｈ

Ｂ２７３＿Ｈ１とｐＥＦ６ＫＣＬ／ｈＢ２７３＿Ｌ３との組合せによって取得されたｃＢ２７３のヒト化抗体を「ｈＢ２７３＿Ｈ１／ｈＢ２７３＿Ｌ３」、ｐＥＦ１ＦＣＣＵ／ｈＢ２７３＿Ｈ２とｐＥＦ６ＫＣＬ／ｈＢ２７３＿Ｌ１との組合せによって取得されたｃＢ２７３のヒト化抗体を「ｈＢ２７３＿Ｈ２／ｈＢ２７３＿Ｌ１」、ｐＥＦ１ＦＣＣＵ／ｈＢ２７３＿Ｈ２とｐＥＦ６ＫＣＬ／ｈＢ２７３＿Ｌ２との組合せによって取得されたｃＢ２７３のヒト化抗体を「ｈＢ２７３＿Ｈ２／ｈＢ２７３＿Ｌ２」、ｐＥＦ１ＦＣＣＵ／ｈＢ２７３＿Ｈ２とｐＥＦ６ＫＣＬ／ｈＢ２７３＿Ｌ３との組合せによって取得されたｃＢ２７３のヒト化抗体を「ｈＢ２７３＿Ｈ２／ｈＢ２７３＿Ｌ３」、ｐＥＦ１ＦＣＣＵ／ｈＢ２７３＿Ｈ３とｐＥＦ６ＫＣＬ／ｈＢ２７３＿Ｌ１との組合せによって取得されたｃＢ２７３のヒト化抗体を「ｈＢ２７３＿Ｈ３／ｈＢ２７３＿Ｌ１」、ｐＥＦ１ＦＣＣＵ／ｈＢ２７３＿Ｈ３とｐＥＦ６ＫＣＬ／ｈＢ２７３＿Ｌ２との組合せによって取得されたｃＢ２７３のヒト化抗体を「ｈＢ２７３＿Ｈ３／ｈＢ２７３＿Ｌ２」、ｐＥＦ１ＦＣＣＵ／ｈＢ２７３＿Ｈ３とｐＥＦ６ＫＣＬ／ｈＢ２７３＿Ｌ３との組合せによって取得されたｃＢ２７３のヒト化抗体を「ｈＢ２７３＿Ｈ３／ｈＢ２７３＿Ｌ３」と命名した。

[0220] ５）－４－２　ヒト化抗体の精製

上記５）－４－１）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。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。さら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。その画分を脱塩カラム（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。

[0221]

実施例 6

[0222] ヒト化Ｂ２７３（ｈＢ２７３）抗体の活性測定（その１）

６）－１ ｈＢ２７３抗体のＢｉａｃｏｒｅによる結合活性評価

ヒト化抗ＤＲ５抗体とｒｓＤＲ５の解離定数測定は、Ｂｉａｃｏｒｅ Ｔ１００（ＧＥヘルスケアバイオサイエンス（株））を使用し、固定化した抗ヒトＩｇＧ（Ｆｃ）抗体に抗体を捕捉（キャプチャー）し、抗原をアナライトとして測定するキャプチャー法にて行った。抗ヒトＩｇＧ（Ｆｃ）抗体（Ｈｕｍａｎ ａｎｔｉｂｏｄｙ ｃａｐｔｕｒｅ ｋｉｔ、ＧＥヘルスケアバイオサイエンス（株））は、センサーチップＣＭ５（ＢＩＡｃｏｒｅ，Ｉｎｃ．）へアミンカップリング法にて～１０，０００ＲＵ共有結合させた。リファレンスセルにも同様に固定化した。ランニングバッファーとしてＨＢＳ－ＥＰ（１０ｍＭ ＨＥＰＥＳ ｐＨ７．４、０．１５Ｍ ＮａＣｌ、３

ｍＭ　ＥＤＴＡ、０．０５％　Ｓｕｒｆａｃｔａｎｔ　Ｐ２０）を用いた。抗ヒトＩｇＧ（Ｆｃ）抗体を固定化したチップ上に、約２０ｎＭの抗体溶液を流速１０μｌ／分で６０秒間添加した後、ｒｓＤＲ５　の希釈系列溶液（３．１３－　５０ｎＭ）を流速３０μｌ／分で１２０秒間添加し、引き続き１８０秒間の解離相をモニターした。再生溶液として、３Ｍ　塩化マグネシウムを流速１０μｌ／分で３０秒間添加した。データの解析には、分析ソフトウェア（Ｂｉａｃｏｒｅ　Ｔ１００　Ｅｖａｌｕａｔｉｏｎ　ｓｏｆｔｗａｒｅ，　ｖｅｒｓｉｏｎ　２．０．１）の１対１結合モデルを用いて、結合速度定数ｋｏｎ、解離速度定数ｋｏｆｆ及び解離定数（ＫＤ；ＫＤ＝ｋｏｆｆ／ｋｏｎ）を算出した。９種類のヒト化ＤＲ５抗体のＢｉａｃｏｒｅ測定結果を図８に示す。

[0223]　６）－２　ｈＢ２７３抗体のヒト癌細胞株に対するｉｎ　ｖｉｔｒｏ殺細胞活性

５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣＬ(ｐＨ８．５)で５０μｇ／ｍｌに調製したＡｆｉｎｉＰｕｒｅ　Ｆ（ａｂ’）$_2$　ｆｒａｇｍｅｎｔ　Ｇｏａｔ　ａｎｔｉ－Ｈｕｍａｎ　ＩｇＧ　Ｆｃ　ｆｒａｇｍｅｎｔ　ｓｐｅｃｉｆｉｃ　（Ｊａｃｋｓｏｎ社製　＃１０９－００６－０９８）を９６穴マイクロプレート（コーニング社製）に４５μｌずつ分注し４℃で１晩静置した。ウェル内をＰＢＳで２回洗浄した後、５）－４－１で抗体を生産させた２９３F培養上清、精製したｃＢ２７３抗体（実施例２－３－２）、又は市販ヒトＩｇＧ（Ｊａｃｋｓｏｎ社製　＃００９－０００－００３）を１５０～１．５ｎｇ／ｍｌとなるように５０μｌ／ウェルで添加し、４℃で１晩静置した。各ウェルをＰＢＳで２回洗浄した後、１０％ＦＢＳ含有ＲＰＭＩ１６４０培地中４．０ｘ１０^{4}細胞／ｍｌになるよう調製したＪｕｒｋａｔ細胞を５０μｌ／ウェルで添加し、３７℃、５％CO_2の条件下で２３時間培養した。ＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ　Ｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｔ　Ｃｅｌｌ　Ｖｉａｂｉｌｉｔｙ　Ａｓｓａｙ　ｋｉｔ（Ｐｒｏｍｅｇａ社製　＃Ｇ７５７１）を用いて生細胞由来のＡＴＰ量を定量し、抗体液の代わりに培地を添加したウェルの値を１

００％としてｈＢ２７３抗体の殺細胞作用を評価した。その結果、図９に示すように、Ｂ２７３重鎖ヒト化に関しては、Ｈ１シリーズの抗体はＨ２やＨ３よりも殺細胞作用がやや弱い傾向が認められた。一方、Ｂ２７３軽鎖ヒト化に関しては、デザインしたＬ１、Ｌ２、Ｌ３のいずれの軽鎖を使用した場合においてもほぼ同程度の殺細胞作用を示しうることが明らかとなった。

[0224]

実施例 7

[0225] ｃＢ２７３抗体のヒト化（その２）

７）－１　Ｂ２７３のヒト化バージョン（ｈＢ２７３）の設計

７）－１－１　ヒト化Ｂ２７３に対するアミノ酸配列の設計

実施例５及び６に示すヒト化抗体の設計（その１）の結果を基に、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Ｂ２７３配列を以下の実施例に記載されるように構築した。

[0226] ７）－１－２　ヒト化Ｂ２７３に対するアミノ酸配列の設計

７）－１－２－１　ｈＢ２７３＿Ｈ１－１タイプ重鎖：

配列表の配列番号２０に示されるｃＢ２７３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）、３９（イソロイシン）、５７（リジン）、５９（セリン）、６０（ヒスチジン）、６２（リジン）、６３（セリン）、６７（イソロイシン）、８６（リジン）、８７（アラニン）、９５（セリン）、９６（スレオニン）、９９（ヒスチジン）、１０３（ロイシン）、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、バリン、アルギニン、アラニン、プロリン、メチオニン、グリシン、メチオニン、アルギニン、バリン、スレオニン、セリン、チロシン、セリン、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Ｂ２７３重鎖を「ｈＢ２７３＿Ｈ１－１タイプ重鎖」と命名した。

[0227] ｈＢ２７３＿Ｈ１－１タイプ重鎖をコードするヌクレオチド配列は、配列

表の配列番号３９に記載されている。また、ｈＢ２７３＿Ｈ１－１タイプ重鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号４０に記載されている。さらに、配列番号３９及び４０の配列は、図３８にも記載されている。

[0228] ７）－１－２－２　ｈＢ２７３＿Ｈ２－１タイプ重鎖：

配列表の配列番号２０に示されるｃＢ２７３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）、３９（イソロイシン）、６０（ヒスチジン）、６２（リジン）、９５（セリン）、９６（スレオニン）、９９（ヒスチジン）、１０３（ロイシン）、１０６（スレオニン）、１１０（セリン）、１１６（グリシン）、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、バリン、プロリン、メチオニン、スレオニン、セリン、チロシン、セリン、アルギニン、スレオニン、アラニン、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Ｂ２７３重鎖を「ｈＢ２７３－Ｈ２－１タイプ重鎖」と命名した。

[0229] ｈＢ２７３＿Ｈ２－１タイプ重鎖をコードするヌクレオチド配列は、配列表の配列番号４１に記載されている。また、ｈＢ２７３＿Ｈ２－１タイプ重鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号４２に記載されている。さらに、配列番号４１及び４２の配列は、図３９にも記載されている。

[0230] ７）－１－２－３　ｈＢ２７３＿Ｈ２－２タイプ重鎖：

配列表の配列番号２０に示されるｃＢ２７３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）、３９（イソロイシン）、６０（ヒスチジン）、６２（リジン）、９５（セリン）、９６（スレオニン）、１０３（ロイシン）、１０６（スレオニン）、１１０（セリン）、１１６（グリシン）、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、バリン、プロリン、メチオニン、スレオニン、セリン、セリン、アルギニン、スレオニン、アラニン、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Ｂ２７３重鎖を「ｈＢ２７３＿Ｈ２－２タイプ

重鎖」と命名した。

[0231] ｈＢ２７３＿Ｈ２－２タイプ重鎖をコードするヌクレオチド配列は、配列表の配列番号４３に記載されている。また、ｈＢ２７３＿Ｈ２－２タイプ重鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号４４に記載されている。さらに、配列番号４３及び４４の配列は、図４０にも記載されている。

[0232] ７）－１－２－４　ｈＢ２７３＿Ｈ２－３タイプ重鎖：

配列表の配列番号２０に示されるｃＢ２７３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）、３９（イソロイシン）、６０（ヒスチジン）、６２（リジン）、９５（セリン）、９６（スレオニン）、１０３（ロイシン）、１０６（スレオニン）、１１０（セリン）、１１６（グリシン）、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、バリン、プロリン、メチオニン、スレオニン、セリン、セリン、アルギニン、スレオニン、アラニン、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Ｂ２７３重鎖を「ｈＢ２７３＿Ｈ２－３タイプ重鎖」と命名した。

[0233] ｈＢ２７３＿Ｈ２－３タイプ重鎖をコードするヌクレオチド配列は、配列表の配列番号４５に記載されている。また、ｈＢ２７３＿Ｈ２－３タイプ重鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号４６に記載されている。さらに、配列番号４５及び４６の配列は、図４１にも記載されている。

[0234] ７）－１－２－５　ｈＢ２７３＿Ｈ２－４タイプ重鎖：

配列表の配列番号２０に示されるｃＢ２７３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）、３９（イソロイシン）、６０（ヒスチジン）、６２（リジン）、９５（セリン）、９６（スレオニン）、９９（ヒスチジン）、１０３（ロイシン）、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、バリン、プロリン、メチオニン、スレオニン、セリン、チロシン、セリン、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Ｂ２７３重鎖を「ｈＢ２７３__Ｈ２－４タイプ重鎖」と命名した。

[0235] ｈＢ２７３__Ｈ２－４タイプ重鎖をコードするヌクレオチド配列は、配列表の配列番号４７に記載されている。また、ｈＢ２７３__Ｈ２－４タイプ重鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号４８に記載されている。さらに、配列番号４７及び４８の配列は、図４２にも記載されている。

[0236] ７）－１－２－６ ｈＢ２７３__Ｈ２－５タイプ重鎖：

配列表の配列番号２０に示されるｃＢ２７３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）、３９（イソロイシン）、６０（ヒスチジン）、９５（セリン）、９６（スレオニン）、９９（ヒスチジン）、１０３（ロイシン）、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、バリン、プロリン、スレオニン、セリン、チロシン、セリン、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Ｂ２７３重鎖を「ｈＢ２７３__Ｈ２－５タイプ重鎖」と命名した。

[0237] ｈＢ２７３__Ｈ２－５タイプ重鎖をコードするヌクレオチド配列は、配列表の配列番号４９に記載されている。また、ｈＢ２７３__Ｈ２－５タイプ重鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号５０に記載されている。さらに、配列番号４９及び５０の配列は、図４３にも記載されている。

[0238] ７）－２ ｈＢ２７３__Ｈ１－１、ｈＢ２７３__Ｈ２－１、ｈＢ２７３__Ｈ２－２、ｈＢ２７３__Ｈ２－３、ｈＢ２７３__Ｈ２－４、及びｈＢ２７３__Ｈ２－５タイプ重鎖発現ベクターの構築

配列表の配列番号４０のアミノ酸番号２０乃至１４１、配列番号４２のアミノ酸番号２０乃至１４１、配列番号４４のアミノ酸番号２０乃至１４１、配列番号４６のアミノ酸番号２０乃至１４１、配列番号４８のアミノ酸番号２０乃至１４１、及び配列番号５０のアミノ酸番号２０乃至１４１にそれぞれ示される、ｈＢ２７３__Ｈ１、ｈＢ２７３__Ｈ２、及びｈＢ２７３__Ｈ３

タイプ重鎖可変領域をコードする遺伝子を含むＤＮＡを合成し（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、ｈＢ２７３＿Ｈ１－１、ｈＢ２７３＿Ｈ２－１、ｈＢ２７３＿Ｈ２－２、ｈＢ２７３＿Ｈ２－３、ｈＢ２７３＿Ｈ２－４、及びｈＢ２７３＿Ｈ２－５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／ｈＢ２７３＿Ｈ１－１」、「ｐＥＦ１ＦＣＣＵ／ｈＢ２７３＿Ｈ２－１」、「ｐＥＦ１ＦＣＣＵ／ｈＢ２７３＿Ｈ２－２」、「ｐＥＦ１ＦＣＣＵ／ｈＢ２７３＿Ｈ２－３」、「ｐＥＦ１ＦＣＣＵ／ｈＢ２７３＿Ｈ２－４」、及び「ｐＥＦ１ＦＣＣＵ／ｈＢ２７３＿Ｈ２－５」と命名した。

[0239] ７）－３　ヒト化抗体の調製

７）－３－１　ヒト化抗体の生産

１．２×１０^{9}個の対数増殖期のＦｒｅｅＳｔｙｌｅ　２９３Ｆ細胞（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）を新鮮な１．２ＬのＦｒｅｅＳｔｙｌｅ２９３　ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　ｍｅｄｉｕｍ　（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）に播種し、３７℃、８％CO_2インキュベーター内において９０ｒｐｍで一時間振とう培養した。Ｐｏｌｙｅｔｈｙｌｅｎｅｉｍｉｎｅ（Ｐｏｌｙｓｃｉｅｎｃｅ　＃２４７６５）３．６ｍｇをＯｐｔｉ－Ｐｒｏ　ＳＦＭ培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）２０ｍｌに溶解し、次にＰｕｒｅＬｉｎｋ　ＨｉＰｕｒｅ　Ｐｌａｓｍｉｄキット（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）を用いて調製したＨ鎖発現ベクター（０．４ｍｇ）及びＬ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、さらに５分間放置した後にＦｒｅｅＳｔｙｌｅ　２９３Ｆ細胞に添加した。３時間後にＺ－ＶＡＤ－ＦＭＫ（ＰＥＰＴＩＤＥ　ＩＮＳＴＩＴＵＴＥ社）を１０μＭになるように添加し、３７℃、８％CO_2インキュベーターで７日間、９０ｒｐ

ｍ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。

[0240] ｐＥＦ１ＦＣＣＵ／ｈＢ２７３＿Ｈ１－１とｐＥＦ６ＫＣＬ／ｈＢ２７３＿Ｌ１との組合せによって取得されたｃＢ２７３のヒト化抗体を「ｈＢ２７３＿Ｈ１－１／ｈＢ２７３＿Ｌ１」、ｐＥＦ１ＦＣＣＵ／ｈＢ２７３＿Ｈ２－１とｐＥＦ６ＫＣＬ／ｈＢ２７３＿Ｌ１との組合せによって取得されたｃＢ２７３のヒト化抗体を「ｈＢ２７３＿Ｈ２－１／ｈＢ２７３＿Ｌ１」、ｐＥＦ１ＦＣＣＵ／ｈＢ２７３＿Ｈ２－２とｐＥＦ６ＫＣＬ／ｈＢ２７３＿Ｌ１との組合せによって取得されたｃＢ２７３のヒト化抗体を「ｈＢ２７３＿Ｈ２－２／ｈＢ２７３＿Ｌ１」、ｐＥＦ１ＦＣＣＵ／ｈＢ２７３＿Ｈ２－３とｐＥＦ６ＫＣＬ／ｈＢ２７３＿Ｌ１との組合せによって取得されたｃＢ２７３のヒト化抗体を「ｈＢ２７３＿Ｈ２－３／ｈＢ２７３＿Ｌ１」、ｐＥＦ１ＦＣＣＵ／ｈＢ２７３＿Ｈ２－４とｐＥＦ６ＫＣＬ／ｈＢ２７３＿Ｌ１との組合せによって取得されたｃＢ２７３のヒト化抗体を「ｈＢ２７３＿Ｈ２－４／ｈＢ２７３＿Ｌ１」、ｐＥＦ１ＦＣＣＵ／ｈＢ２７３＿Ｈ２－５とｐＥＦ６ＫＣＬ／ｈＢ２７３＿Ｌ１との組合せによって取得されたｃＢ２７３のヒト化抗体を「ｈＢ２７３＿Ｈ２－５／ｈＢ２７３＿Ｌ１」と命名した。

[0241] ７）－３－２　ヒト化抗体の精製

上記７）－３－１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（ｐＨ

４．０）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。さら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。その画分を脱塩カラム（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。

[0242]

実施例 8

[0243] ヒト化Ｂ２７３ （ｈＢ２７３）抗体の活性測定（その２）

８）－１ ｈＢ２７３抗体のＢｉａｃｏｒｅによる結合活性評価

ヒト化抗ＤＲ５抗体とｒｓＤＲ５の解離定数測定は、Ｂｉａｃｏｒｅ Ｔ１００ （ＧＥヘルスケアバイオサイエンス（株））を使用し、固定化した抗ヒトＩｇＧ（Ｆｃ）抗体に抗体を捕捉（キャプチャー）し、抗原をアナライトとして測定するキャプチャー法にて行った。抗ヒトＩｇＧ（Ｆｃ）抗体（Ｈｕｍａｎ ａｎｔｉｂｏｄｙ ｃａｐｔｕｒｅ ｋｉｔ、ＧＥヘルスケアバイオサイエンス（株））は、センサーチップＣＭ５（ＢＩＡｃｏｒｅ，Ｉｎｃ．）へアミンカップリング法にて～１０，０００ＲＵ共有結合させた。リファレンスセルにも同様に固定化した。ランニングバッファーとしてＨ

ＢＳ－ＥＰ （１０ｍＭ ＨＥＰＥＳ ｐＨ７．４、０．１５Ｍ ＮａＣｌ、 ３ｍＭ ＥＤＴＡ、 ０．０５％ Ｓｕｒｆａｃｔａｎｔ Ｐ２０）を用いた。抗ヒトＩｇＧ（Ｆｃ）抗体を固定化したチップ上に、約２０ｎＭの抗体溶液を流速１０μｌ／分で６０秒間添加した後、ｒｓＤＲ５ の希釈系列溶液（３．１３－ ５０ｎＭ）を流速３０μｌ／分で１２０秒間添加し、引き続き１８０秒間の解離相をモニターした。再生溶液として、３Ｍ 塩化マグネシウムを流速１０μｌ／分で３０秒間添加した。データの解析には、分析ソフトウェア（Ｂｉａｃｏｒｅ Ｔ１００ Ｅｖａｌｕａｔｉｏｎ ｓｏｆｔｗａｒｅ， ｖｅｒｓｉｏｎ ２．０．１）の１対１結合モデルを用いて、結合速度定数ｋｏｎ、解離速度定数ｋｏｆｆ及び解離定数（ＫＤ；ＫＤ＝ｋｏｆｆ／ｋｏｎ）を算出した。６種類のヒト化ＤＲ５抗体のＢｉａｃｏｒｅ測定結果を図１０に示す。

[0244] ８）－２ ｈＢ２７３抗体のヒト癌細胞株に対するｉｎ ｖｉｔｒｏ殺細胞活性

５０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣＬ(ｐＨ８．５)で５０μｇ／ｍｌに調製したＡｆｉｎｉＰｕｒｅ Ｆ（ａｂ’）$_2$ ｆｒａｇｍｅｎｔ Ｇｏａｔ ａｎｔｉ－Ｈｕｍａｎ ＩｇＧ Ｆｃ ｆｒａｇｍｅｎｔ ｓｐｅｃｉｆｉｃ （Ｊａｃｋｓｏｎ社製 ＃１０９－００６－０９８）を９６穴マイクロプレート（コーニング社製）に４５μｌずつ分注し４℃で１晩静置した。ウェル中をＰＢＳで２回洗浄した後、７）－３－１で抗体を生産させた２９３F培養上清を１５０～１．５ｎｇ／ｍｌとなるように５０μｌ／ウェルで添加し、４℃で１晩静置した。各ウェルをＰＢＳで２回洗浄した後、１０％ＦＢＳ含有ＲＰＭＩ１６４０培地中４．０ｘ１０^{4}細胞／ｍｌになるよう調製したＪｕｒｋａｔ細胞を５０μｌ／ウェルで添加し、３７℃、５％CO_2の条件下で２３時間培養した。ＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ Ｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｔ Ｃｅｌｌ Ｖｉａｂｉｌｉｔｙ Ａｓｓａｙ ｋｉｔ（Ｐｒｏｍｅｇａ社製 ＃Ｇ７５７１）を用いて生細胞由来のＡＴＰ量を定量し、抗体液の代わりに培地を添加したウェルの値を１００％としてｈＢ２７３抗体の殺細胞作用を評

価した。その結果、図１１に示すように、Ｂ２７３＿Ｈ１－１／Ｌ１抗体はデザインもとのＢ２７３＿Ｈ１／Ｌ１よりも殺細胞活性が強い傾向が認められた。一方、Ｂ２７３＿Ｈ２－１／Ｌ１～Ｂ２７３＿Ｈ２－５／Ｌ１はデザインもとのＢ２７３＿Ｈ２／Ｌ１と同程度の殺細胞作用を示した。

[0245]

実施例 9

[0246] ｃＢ２７３抗体ＣＤＲからのｄｅａｍｉｄａｔｉｏｎ　ｓｉｔｅ除去

９）－１　変異体の設計と発現ベクターの構築

９）－１－１　変異体の設計

一般に蛋白質のアスパラギン脱アミド化は、C末端側に隣接するアミノ酸との間で、環状コハク酸イミド遷移状態を形成して、進行する（Ｇｅｉｇｅｒ，Ｔ．ａｎｄ　Ｃｌａｒｋｅ，Ｓ．（１９８７）Ｄｅａｍｉｄａｔｉｏｎ，Ｉｓｏｍｅｒｉｚａｔｉｏｎ，ａｎｄ　ｒａｃｅｍｉｚａｔｉｏｎ　ａｔ　ａｓｐａｒａｇｉｎｙｌ　ａｎｄ　ａｓｐａｒｔｙｌ　ｒｅｓｉｄｕｅｓ　ｉｎ　ｐｅｐｔｉｄｅｓ．Ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄｅ－ｌｉｎｋｅｄ　ｒｅａｃｔｉｏｎｓ　ｔｈａｔ　ｃｏｎｔｒｉｂｕｔｅ　ｔｏ　ｐｒｏｔｅｉｎ　ｄｅｇｒａｄａｔｉｏｎ．Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６２，７８５－７９４）。環状コハク酸イミド遷移状態形成に律速となるのは隣接アミノ酸の側鎖の大きさであり、従って、もっとも脱アミド化が早いのは側鎖が最も小さなグリシンである。反対にＣ末端側隣接基を大きな側鎖を有するアミノ酸に置換することで、脱アミド化速度を抑制することが可能である。B273抗体はＬ鎖及びH鎖両方に脱アミド化されやすいＮ－Ｇ－（アスパラギン－グリシン）配列を有している。そこで、本発明者らは、隣接基を、グリシンから、より大きな側鎖を有する、リジン、フェニルアラニン、ロイシン、グルタミン酸に変更した点変異体を作製した。即ち、Ｈ鎖についてはＮ－Ｇ－（アスパラギン－グリシン）配列をＮ－Ｅ－（アスパラギン－グルタミン酸）配列に変異させたものを設計し、L鎖についてはＮ－Ｇ－（アスパラギン－グリシン）配列をＮ－Ｌ－（アスパラギン－ロイシン）配列、Ｎ－Ｆ

ー（アスパラギンーフェニルアラニン）配列、－Ｎ－Ｋ－（アスパラギンーリジン）配列、－Ｎ－Ｅ－（アスパラギンーグルタミン酸）配列にそれぞれ変異させたものを設計した。

[0247] ９）－１－２　ｈＢ２７３＿Ｌ１－ＮＥタイプ軽鎖発現ベクターの構築

実施例５で作製されたｈＢ２７３＿Ｌ１タイプ軽鎖発現ベクターのｐＥＦ６ＫＣＬ／ｈＢ２７３＿Ｌ１をテンプレートとして、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断片をプライマーセットＣを用いたＯｖｅｒｌａｐ　Ｅｘｔｅｎｓｉｏｎ　ＰＣＲにより結合した。得られたＤＮＡ断片から制限酵素ＮｈｅＩ及びＰｍｅＩで切り出されるＤＮＡ断片を、ヒト化抗体軽鎖発現汎用ベクター（ｐＥＦ６ＫＣＬ）を制限酵素ＮｈｅＩ及びＰｍｅＩで切断した箇所に挿入することにより、配列番号２８のアミノ酸番号５４のグリシンをグルタミン酸に置換したｈＢ２７３＿Ｌ１－ＮＥ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／ｈＢ２７３＿Ｌ１－ＮＥ」と命名した。

[0248] ｈＢ２７３＿Ｌ１－ＮＥタイプ軽鎖をコードするヌクレオチド配列は、配列表の配列番号５１に記載されている。また、ｈＢ２７３＿Ｌ１－ＮＥタイプ軽鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号５２に記載されている。さらに、配列番号５１及び５２の配列は、図４４にも記載されている。

プライマーセットＡ

５’－ａｇｇｔａａｇｃｔｔｇｃｔａｇｃｇｃｃａｃｃａｔｇｇｔｇｃｔｇｃ－３’（Ｌ－Ｆ１：配列表の配列番号５３）

５’－ｃｃａａｔｇｃａｇｇｔａａｇｔｇｔｔｃｔｃａｔｔｇｃｔａｔｇｇａｃｃａｇｔｇａｃｔｇ－３’（Ｌ－ＮＥ－Ｒ２：配列表の配列番号５４）

プライマーセットＢ

５’－ｃａｇｔｃａｃｔｇｇｔｃｃａｔａｇｃａａｔｇａｇａａｃａｃｔｔａｃｃｔｇｃａｔｔｇｇ－３’（Ｌ－ＮＥ－Ｆ２：配列表の配列番号５５）

５’－ｇｇａｔｇｃｃａｃｃｃｇｔｔｔａａａｃｇｇｇｃｃｃｃｔａａｃａ

ｃ－３’（Ｌ－Ｒ１：配列表の配列番号５６）

プライマーセットＣ

５’－ａｇｇｔａａｇｃｔｔｇｃｔａｇｃｇｃｃａｃｃａｔｇｇｔｇｃｔｇ

ｃ－３’（Ｌ－Ｆ１：配列表の配列番号５３）

５’－ｇｇａｔｇｃｃａｃｃｃｇｔｔｔａａａｃｇｇｇｃｃｃｃｔａａｃａ

ｃ－３’（Ｌ－Ｒ１：配列表の配列番号５６）

９）－１－３　ｈＢ２７３＿Ｌ１－ＮＦタイプ軽鎖発現ベクターの構築

実施例５で作製されたｈＢ２７３＿Ｌ１タイプ軽鎖発現ベクターのｐＥＦ６ＫＣＬ／ｈＢ２７３＿Ｌ１をテンプレートとして、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断片をプライマーセットＣを用いたＯｖｅｒｌａｐ　Ｅｘｔｅｎｓｉｏｎ　ＰＣＲにより結合した。得られたＤＮＡ断片から制限酵素ＮｈｅＩ及びＰｍｅＩで切り出されるＤＮＡ断片を、ヒト化抗体軽鎖発現汎用ベクター（ｐＥＦ６ＫＣＬ）を制限酵素ＮｈｅＩ及びＰｍｅＩで切断した箇所に挿入することにより、配列番号２８のアミノ酸番号５４のグリシンをフェニルアラニンに置換したｈＢ２７３＿Ｌ１－ＮＦ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／ｈＢ２７３＿Ｌ１－ＮＦ」と命名した。

[0249] ｈＢ２７３＿Ｌ１－ＮＦタイプ軽鎖をコードするヌクレオチド配列は、配列表の配列番号５７に記載されている。また、ｈＢ２７３＿Ｌ１－ＮＦタイプ軽鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号５８に記載されている。さらに、配列番号５７及び５８の配列は、図４５にも記載されている。

プライマーセットＡ

５’－ａｇｇｔａａｇｃｔｔｇｃｔａｇｃｇｃｃａｃｃａｔｇｇｔｇｃｔｇ

ｃ－３’（Ｌ－Ｆ１：配列表の配列番号５３）

５’－ｃｃａａｔｇｃａｇｇｔａａｇｔｇｔｔｇａａａｔｔｇｃｔａｔｇｇ

ａｃｃａｇｔｇａｃｔｇ－３’（Ｌ－ＮＦ－Ｒ２：配列表の配列番号５９）

プライマーセットＢ

５’－ｃａｇｔｃａｃｔｇｇｔｃｃａｔａｇｃａａｔｔｔｃａａｃａｃｔｔａｃｃｔｇｃａｔｔｇｇ－３’（Ｌ－ＮＦ－Ｆ２：配列表の配列番号６０）

５’－ｇｇａｔｇｃｃａｃｃｃｇｔｔｔａａａｃｇｇｇｃｃｃｃｔａａｃａｃ－３’（Ｌ－Ｒ１：配列表の配列番号５６）

プライマーセットＣ

５’－ａｇｇｔａａｇｃｔｔｇｃｔａｇｃｇｃｃａｃｃａｔｇｇｔｇｃｔｇｃ－３’（Ｌ－Ｆ１：配列表の配列番号５３）

５’－ｇｇａｔｇｃｃａｃｃｃｇｔｔｔａａａｃｇｇｇｃｃｃｃｔａａｃａｃ－３’（Ｌ－Ｒ１：配列表の配列番号５６）

９）－１－４　ｈＢ２７３＿Ｌ１－ＮＫタイプ軽鎖発現ベクターの構築

実施例５で作製されたｈＢ２７３＿Ｌ１タイプ軽鎖発現ベクターのｐＥＦ６ＫＣＬ／ｈＢ２７３＿Ｌ１をテンプレートとして、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断片をプライマーセットＣを用いたＯｖｅｒｌａｐ　Ｅｘｔｅｎｓｉｏｎ　ＰＣＲにより結合した。得られたＤＮＡ断片から制限酵素ＮｈｅＩ及びＰｍｅＩで切り出されるＤＮＡ断片を、ヒト化抗体軽鎖発現汎用ベクター（ｐＥＦ６ＫＣＬ）を制限酵素ＮｈｅＩ及びＰｍｅＩで切断した箇所に挿入することにより、配列番号２８のアミノ酸番号５４のグリシンをリジンに置換したｈＢ２７３＿Ｌ１－ＮＫ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／ｈＢ２７３＿Ｌ１－ＮＫ」と命名した。

[0250] ｈＢ２７３＿Ｌ１－ＮＫタイプ軽鎖をコードするヌクレオチド配列は、配列表の配列番号６１に記載されている。また、ｈＢ２７３＿Ｌ１－ＮＫタイプ軽鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号６２に記載されている。さらに、配列番号６１及び６２の配列は、図４６にも記載されている。

プライマーセットＡ

５’－ａｇｇｔａａｇｃｔｔｇｃｔａｇｃｇｃｃａｃｃａｔｇｇｔｇｃｔｇｃ－３’（Ｌ－Ｆ１：配列表の配列番号５３）

５’－ｃｃａａｔｇｃａｇｇｔａａｇｔｇｔｔｃｔｔａｔｔｇｃｔａｔｇｇａｃｃａｇｔｇａｃｔｇ－３’（Ｌ－ＮＫ－Ｒ２：配列表の配列番号６３）

プライマーセットＢ

５’－ｃａｇｔｃａｃｔｇｇｔｃｃａｔａｇｃａａｔａａｇａａｃａｃｔｔａｃｃｔｇｃａｔｔｇｇ－３’（Ｌ－ＮＫ－Ｆ２：配列表の配列番号６４）

５’－ｇｇａｔｇｃｃａｃｃｃｇｔｔｔａａａｃｇｇｇｃｃｃｃｔａａｃａｃ－３’（Ｌ－Ｒ１：配列表の配列番号５６）

プライマーセットＣ

５’－ａｇｇｔａａｇｃｔｔｇｃｔａｇｃｇｃｃａｃｃａｔｇｇｔｇｃｔｇｃ－３’（Ｌ－Ｆ１：配列表の配列番号５３）

５’－ｇｇａｔｇｃｃａｃｃｃｇｔｔｔａａａｃｇｇｇｃｃｃｃｔａａｃａｃ－３’（Ｌ－Ｒ１：配列表の配列番号５６）

９）－１－５　ｈＢ２７３＿Ｌ１－ＮＬタイプ軽鎖発現ベクターの構築

実施例５で作製されたｈＢ２７３＿Ｌ１タイプ軽鎖発現ベクターのｐＥＦ６ＫＣＬ／ｈＢ２７３＿Ｌ１をテンプレートとして、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断片をプライマーセットＣを用いたＯｖｅｒｌａｐ　Ｅｘｔｅｎｓｉｏｎ　ＰＣＲにより結合した。得られたＤＮＡ断片から制限酵素ＮｈｅＩ及びＰｍｅＩで切り出されるＤＮＡ断片を、ヒト化抗体軽鎖発現汎用ベクター（ｐＥＦ６ＫＣＬ）を制限酵素ＮｈｅＩ及びＰｍｅＩで切断した箇所に挿入することにより、配列番号２８のアミノ酸番号５４のグリシンをロイシンに置換したｈＢ２７３＿Ｌ１－ＮＬ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／ｈＢ２７３＿Ｌ１－ＮＬ」と命名した。

[0251] ｈＢ２７３＿Ｌ１－ＮＬタイプ軽鎖をコードするヌクレオチド配列は、配列表の配列番号６５に記載されている。また、ｈＢ２７３＿Ｌ１－ＮＬタイプ軽鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号６６に記載されている。さらに、配列番号６５及び６６の配列は、図４７にも記載されている。

プライマーセットＡ

５’－ａｇｇｔａａｇｃｔｔｇｃｔａｇｃｇｃｃａｃｃａｔｇｇｔｇｃｔｇｃ－３’（Ｌ－Ｆ１：配列表の配列番号５３）

５’－ｃｃａａｔｇｃａｇｇｔａａｇｔｇｔｔｃａｇａｔｔｇｃｔａｔｇｇａｃｃａｇｔｇａｃｔｇ－３’（Ｌ－ＮＬ－Ｒ２：配列表の配列番号６７）

プライマーセットＢ

５’－ｃａｇｔｃａｃｔｇｇｔｃｃａｔａｇｃａａｔｃｔｇａａｃａｃｔｔａｃｃｔｇｃａｔｔｇｇ－３’（Ｌ－ＮＬ－Ｆ２：配列表の配列番号６８）

５’－ｇｇａｔｇｃｃａｃｃｃｇｔｔｔａａａｃｇｇｇｃｃｃｃｔａａｃａｃ－３’（Ｌ－Ｒ１：配列表の配列番号５６）

プライマーセットＣ

５’－ａｇｇｔａａｇｃｔｔｇｃｔａｇｃｇｃｃａｃｃａｔｇｇｔｇｃｔｇｃ－３’（Ｌ－Ｆ１：配列表の配列番号５３）

５’－ｇｇａｔｇｃｃａｃｃｃｇｔｔｔａａａｃｇｇｇｃｃｃｃｔａａｃａｃ－３’（Ｌ－Ｒ１：配列表の配列番号５６）

９）－１－６　ｈＢ２７３＿Ｈ２－１－ＮＥタイプ重鎖発現ベクターの構築

実施例７で作製されたｈＢ２７３＿Ｈ２－１タイプ重鎖発現ベクターのｐＥＦ１ＦＣＣＵ／ｈＢ２７３＿Ｈ２－１をテンプレートとして、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断片をプライマーセットＣを用いたＯｖｅｒｌａｐ　Ｅｘｔｅｎｓｉｏｎ　ＰＣＲにより結合した。得られたＤＮＡ断片から制限酵素ＮｈｅＩ及びＰｍｅＩで切り出されるＤＮＡ断片を、ヒト化抗体軽鎖発現汎用ベクター（ｐＥＦ１ＦＣＣＵ）を制限酵素ＮｈｅＩ及びＰｍｅＩで切断した箇所に挿入することにより、配列番号４２のアミノ酸番号７５のグリシンをグルタミン酸に置換したｈＢ２７３＿Ｈ２－１－ＮＥ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／ｈＢ２７３＿Ｈ２－１－ＮＥ」と命名した。

[0252] ｈＢ２７３＿Ｈ２－１－ＮＥタイプ重鎖をコードするヌクレオチド配列は、配列表の配列番号６９に記載されている。また、ｈＢ２７３＿Ｈ２－１－ＮＥタイプ重鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号７０に記載されている。さらに、配列番号６９及び７０の配列は、図４８にも記載されている。

プライマーセットＡ

５’－ａｇｇｔａａｇｃｔｔｇｃｔａｇｃｇｃｃａｃｃａｔｇａａａｃａｃｃ－３’（Ｈ－Ｆ１：配列表の配列番号７１）

５’－ｃｔｇｇｔｔｇｔａｇａａｇｇｔｇｔｃｃｔｃｇｔｔｇｔａｇｇｇｇｔｔｇａａｃｃｇｇｃｃ－３’（Ｈ－ＮＥ－Ｒ２：配列表の配列番号７２）

プライマーセットＢ

５’－ｇｇｃｃｇｇｔｔｃａａｃｃｃｃｔａｃａａｃｇａｇｇａｃａｃｃｔｔｃｔａｃａａｃｃａｇ－３’（Ｈ－ＮＥ－Ｆ２：配列表の配列番号７３）

５’－ｇｇａｔｇｃｃａｃｃｃｇｔｔｔａａａｃｇｇｇｃｃｃｇａｔａｔｃｔｃ－３’（Ｈ－Ｒ１：配列表の配列番号７４）

プライマーセットＣ

５’－ａｇｇｔａａｇｃｔｔｇｃｔａｇｃｇｃｃａｃｃａｔｇａａａｃａｃｃ－３’（Ｈ－Ｆ１：配列表の配列番号７１）

５’－ｇｇａｔｇｃｃａｃｃｃｇｔｔｔａａａｃｇｇｇｃｃｃｇａｔａｔｃｔｃ－３’（Ｈ－Ｒ１：配列表の配列番号７４）

９）－２　ｈＢ２７３抗体ＣＤＲ改変体の調製

９）－２－１　ｈＢ２７３抗体ＣＤＲ改変体の生産

１．２×10^9個の対数増殖期のＦｒｅｅＳｔｙｌｅ　２９３Ｆ細胞（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）を新鮮な１．２ＬのＦｒｅｅＳｔｙｌｅ２９３　ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　ｍｅｄｉｕｍ　（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）に播種し、３７℃、８％CO_2インキュベーター内において９０ｒｐｍで一時間振とう培養した。Ｐｏｌｙｅｔｈｙｌｅｎｅｉｍｉｎｅ（Ｐｏｌｙｓｃｉｅｎｃｅ　＃２４７６５）３．６ｍｇをＯｐｔｉ－Ｐｒｏ　ＳＦＭ培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）２０ｍｌに溶解し、次にＰｕｒｅＬｉｎｋ　ＨｉＰｕｒｅ　Ｐ

ｌａｓｍｉｄキット（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）を用いて調製したＨ鎖発現ベクター（０．４ｍｇ）及びＬ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、さらに５分間放置した後にＦｒｅｅＳｔｙｌｅ　２９３Ｆ細胞に添加した。３時間後にＺ－ＶＡＤ－ＦＭＫ（ＰＥＰＴＩＤＥ　ＩＮＳＴＩＴＵＴＥ社）を１０μＭになるように添加し、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。

[0253] ｐＥＦ１ＦＣＣＵ／ｈＢ２７３＿Ｈ２－１－ＮＥとｐＥＦ６ＫＣＬ／ｈＢ２７３＿Ｌ１－ＮＥとの組合せによって取得されたｃＢ２７３のヒト化抗体を「ｈＢ２７３＿Ｈ２－１－ＮＥ／ｈＢ２７３＿Ｌ１－ＮＥ」、ｐＥＦ１ＦＣＣＵ／ｈＢ２７３＿Ｈ２－１－ＮＥとｐＥＦ６ＫＣＬ／ｈＢ２７３＿Ｌ１－ＮＦとの組合せによって取得されたｃＢ２７３のヒト化抗体を「ｈＢ２７３＿Ｈ２－１－ＮＥ／ｈＢ２７３＿Ｌ１－ＮＦ」、ｐＥＦ１ＦＣＣＵ／ｈＢ２７３＿Ｈ２－１－ＮＥとｐＥＦ６ＫＣＬ／ｈＢ２７３＿Ｌ１－ＮＫとの組合せによって取得されたｃＢ２７３のヒト化抗体を「ｈＢ２７３＿Ｈ２－１－ＮＥ／ｈＢ２７３＿Ｌ１－ＮＫ」、ｐＥＦ１ＦＣＣＵ／ｈＢ２７３＿Ｈ２－１－ＮＥとｐｐＥＦ６ＫＣＬ／ｈＢ２７３＿Ｌ１－ＮＬとの組合せによって取得されたｃＢ２７３のヒト化抗体を「ｈＢ２７３＿Ｈ２－１－ＮＥ／ｈＢ２７３＿Ｌ１－ＮＬ」と命名した。

[0254] ９）－２－２　ｈＢ２７３抗体ＣＤＲ改変体の精製

上記９）－２－１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。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。さら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。その画分を脱塩カラム（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。

[0255]

実施例 10

[0256] ｃＢ２７３抗体ＣＤＲ改変体の活性評価

１０）－１ ｈＢ２７３抗体ＣＤＲ改変体のＢｉａｃｏｒｅによる結合活性評価

ヒト化抗ＤＲ５抗体とｒｓＤＲ５の解離定数測定は、Ｂｉａｃｏｒｅ Ｔ１００ （ＧＥヘルスケアバイオサイエンス（株））を使用し、固定化した

抗ヒトＩｇＧ（Ｆｃ）抗体に抗体を捕捉（キャプチャー）し、抗原をアナライトとして測定するキャプチャー法にて行った。抗ヒトＩｇＧ（Ｆｃ）抗体（Ｈｕｍａｎ　ａｎｔｉｂｏｄｙ　ｃａｐｔｕｒｅ　ｋｉｔ、ＧＥヘルスケアバイオサイエンス（株））は、センサーチップＣＭ５（ＢＩＡｃｏｒｅ，Ｉｎｃ．）へアミンカップリング法にて～１０，０００ＲＵ共有結合させた。リファレンスセルにも同様に固定化した。ランニングバッファーとしてＨＢＳ－ＥＰ（１０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ　ｐＨ７．４、０．１５Ｍ　ＮａＣｌ、３ｍＭ　ＥＤＴＡ、０．０５％　Ｓｕｒｆａｃｔａｎｔ　Ｐ２０）を用いた。抗ヒトＩｇＧ（Ｆｃ）抗体を固定化したチップ上に、約２０ｎＭの抗体溶液を流速１０μｌ／分で６０秒間添加した後、ｒｓＤＲ５　の希釈系列溶液（３．１３－５０ｎＭ）を流速３０μｌ／分で１２０秒間添加し、引き続き１８０秒間の解離相をモニターした。再生溶液として、３Ｍ　塩化マグネシウムを流速１０μｌ／分で３０秒間添加した。データの解析には、分析ソフトウェア（Ｂｉａｃｏｒｅ　Ｔ１００　Ｅｖａｌｕａｔｉｏｎ　ｓｏｆｔｗａｒｅ，　ｖｅｒｓｉｏｎ　２．０．１）の１対１結合モデルを用いて、結合速度定数ｋｏｎ、解離速度定数ｋｏｆｆ及び解離定数（ＫＤ；ＫＤ＝ｋｏｆｆ／ｋｏｎ）を算出した。４種類のヒト化ＤＲ５抗体のＢｉａｃｏｒｅ測定結果を図１２に示す。

[0257] １０）－２　示差走査カロリメトリー（ＤＳＣ）を用いたヒト化抗ＤＲ５抗体及びその変異抗体の熱安定性測定

重示差走査カロリメトリー（ＤＳＣ）を用いた、熱安定性の測定を行なった。サンプルは０．５ｍｇ／ｍｌの濃度でＣＢＳ緩衝液（１０ｍＭクエン酸、１４０ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ６．０に調製）に溶解させ、４００μｌずつ試料溶液としてＤＳＣ測定に使用した。ＤＳＣ測定条件は、以下のように設定した。即ち、初期温度は２０℃、最終温度を１００℃とし、昇温速度を２００℃／１時間、フィルター時間２秒、フィードバックモードをＬｏｗとした。参照液はＣＢＳを使用した。全てのＤＳＣ測定装置としては、米国ＭｉｃｒｏＣａｌ社（現ＧＥヘルスケアバイオサイエンス（株））製ＶＰ－Ｃａ

ｐｉｌｌａｒｙ　ＤＳＣ　Ｐｌａｔｆｏｒｍを使用した。試料溶液から得られたスキャン曲線からベースライン（試料セルにも参照溶液を充填して得られたスキャン曲線）を差し引いてベースライン補正を行なった。サーモグラム全体のピークトップの温度値をＦａｂ領域の熱変性中点Ｔｍとした。４種類のヒト化ＤＲ５抗体のＤＳＣ測定結果を図１３に示す。

[0258] １０）－３　ｈＢ２７３抗体ＣＤＲ改変体のヒト癌細胞株に対するｉｎｖｉｔｒｏ殺細胞活性

５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣＬ(ｐＨ８．５)で５０μｇ／ｍｌに調製したＡｆｉｎｉＰｕｒｅ　Ｆ（ａｂ’）$_2$　ｆｒａｇｍｅｎｔ　Ｇｏａｔ　ａｎｔｉ－Ｈｕｍａｎ　ＩｇＧ　Ｆｃ　ｆｒａｇｍｅｎｔ　ｓｐｅｃｉｆｉｃ　（Ｊａｃｋｓｏｎ社製　＃１０９－００６－０９８）を９６穴マイクロプレート（コーニング社製）に４５μｌずつ分注し４℃で１晩静置した。ウェル内をＰＢＳで２回洗浄した後、９）－２－１で抗体を生産させた２９３F培養上清を１５０～１．５ｎｇ／ｍｌとなるように５０μｌ／ウェルで添加し、４℃で１晩静置した。各ウェルをＰＢＳで２回洗浄した後、１０％ＦＢＳ含有ＲＰＭＩ１６４０培地中４．０ｘ１０^{4}細胞／ｍｌになるよう調製したＪｕｒｋａｔ細胞を５０μｌ／ウェルで添加し、３７℃、５％CO_2の条件下で２３時間培養した。ＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ　Ｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｔ　Ｃｅｌｌ　Ｖｉａｂｉｌｉｔｙ　Ａｓｓａｙ　ｋｉｔ（Ｐｒｏｍｅｇａ社製　＃Ｇ７５７１）を用いて生細胞由来のＡＴＰ量を定量し、抗体液の代わりに培地を添加したウェルの値を１００％としてｈＢ２７３抗体の殺細胞作用を評価した。４種類のＣＤＲ改変抗体の殺細胞活性を図１４に示した。

[0259] １０）－４　ｈＢ２７３＿Ｈ２－１－ＮＥ／Ｌ１－ＮＫ抗体のヒト癌細胞株に対するｃａｓｐａｓｅ－３／７活性化作用及びｉｎ　ｖｉｔｒｏ殺細胞活性

ヒト大腸癌由来細胞株ＨＣＴ－１５又はヒト神経膠芽種細胞株Ｕ－８７ＭＧをそれぞれ１０％ＦＢＳ含有ＲＰＭＩ１６４０培地又は１０％ＦＢＳ含有ＭＥＭ（Ｍｉｎｉｍｕｍ　Ｅｓｓｅｎｔｉａｌ　Ｍｅｄｉｕｍ）培地で１．

１ｘ１０^{5}細胞／ｍｌになるよう調製し、白色透明底９６穴マイクロプレート（コーニング社製）に４５μｌ／ウェルで添加し、３７℃、５％CO_2の条件下で一晩培養した。ｈＢ２７３＿Ｈ２－１－ＮＥ／Ｌ１－ＮＫ抗体、ｃＢ２７３抗体又はヒトＩｇＧ（Ｊａｃｋｓｏｎ社製）をＡｆｉｎｉＰｕｒｅ　Ｇｏａｔ　ａｎｔｉ－ｈｕｍａｎ　ＩｇＧ　Ｆｃγ　ｆｒａｇｍｅｎｔ　ｓｐｅｃｉｆｉｃ（Ｊａｃｋｓｏｎ社製　＃１０９－００５－０９８）と等濃度で混合後、ｈＢ２７３＿Ｈ２－１－ＮＥ／Ｌ１－ＮＫ抗体、ｃＢ２７３抗体又はヒトＩｇＧの終濃度が１０，０００～０．１ｎｇ／ｍｌとなるように５μｌ／ウェルで添加し、３７℃、５％CO_2の条件下で４時間培養した。各ウェル中のＣａｓｐａｓｅ－３／７活性をＣａｓｐａｓｅ－Ｇｌｏ　３／７　Ａｓｓａｙ　ｋｉｔ（Ｐｒｏｍｅｇａ社製　＃Ｇ８０９３）を用いて添付のプロトコールに従い、室温で３０分インキュベーと後にルミノメーター（パーキンエルマー社製）にて測定し、抗体液の代わりに培地を添加したウェルの値を１００％としてｃａｓｐａｓｅ－３／７活性を評価した。また、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ殺細胞活性は、実施例３－３に示す方法に従い、抗体処理２４時間後のＡＴＰ量を測定することにより評価した。その結果、ｈＢ２７３＿Ｈ２－１－ＮＥ／Ｌ１－ＮＫ抗体はｃＢ２７３抗体と同程度のｃａｓｐａｓｅ－３／７活性化作用及び殺細胞作用を有することが明らかとなった（図１５）。

[0260]

実施例 11

[0261] ｃＢ２７３抗体のｉｎ　ｖｉｖｏ抗腫瘍効果

１１）－１　ｃＢ２７３抗体の抗腫瘍活性

１１）－１－１　ヒト大腸癌株ＣＯＬＯ　２０５移植ヌードマウスにおける抗腫瘍活性

２×１０^{6}ｃｅｌｌｓのヒト大腸癌株ＣＯＬＯ　２０５（ＡＴＣＣより購入）をヌードマウス（ＣＡｎＮ．Ｃｇ－Ｆｏｘｎ１^{nu}／ＣｒｌＣｒｌｊ、日本チャールス・リバーより購入）の腋窩部皮下に移植した。移植の７、１４、

２１日後にｃＢ２７３抗体を１、３、１０ｍｇ／ｋｇで担癌マウスの尾静脈内に投与した（ｎ＝１０）。移植腫瘍の長径及び短径を週２回、電子デジタルノギス（株式会社ミツトヨ製）を用いて測定し、以下に示す計算式により腫瘍体積を算出した。

[0262] 腫瘍体積（mm^3）＝１／２×短径^2（ｍｍ）×長径^2（ｍｍ）

結果を図１６に示した。ｃＢ２７３抗体投与群はすべての個体で腫瘍の完全縮退が認められた。

[0263] １１）－１－２　ヒト膵臓癌株ＭＩＡＰａＣａ－２移植ヌードマウスにおける抗腫瘍活性

３×10^6ｃｅｌｌｓのヒト膵臓癌株ＭＩＡＰａＣａ－２（ＡＴＣＣより購入）をヌードマウスの腋窩部皮下に移植した。移植の１１、１９、２６、３３日後にｃＢ２７３抗体を３、１０ｍｇ／ｋｇで担癌マウスの尾静脈内に投与した（ｎ＝１０）。上記と同様の方法で移植腫瘍の長径及び短径の測定し腫瘍体積の算出を行った。

[0264] 結果を図１７に示した。最終測定日である移植３９日後における腫瘍増殖抑制率は、３ｍｇ／ｋｇ投与群で７３．５％、１０ｍｇ／ｋｇ投与群で７７．４％であった。

[0265] １１）－１－３　ヒト神経膠芽種細胞株Ｕ－８７ＭＧ移植ヌードマウスにおける抗腫瘍活性

５×10^6ｃｅｌｌｓのヒト神経膠芽種細胞株Ｕ－８７ＭＧ（ＡＴＣＣより購入）をヌードマウスの腋窩部皮下に移植した。移植の４、１１、１８、２５日後にｃＢ２７３抗体を１，３，１０ｍｇ／ｋｇで担癌マウスの尾静脈内に投与した（ｎ＝１０）。上記と同様の方法で移植腫瘍の長径及び短径の測定し腫瘍体積の算出を行った。

[0266] 結果を図１８に示した。最終測定日である移植３２日後における腫瘍増殖抑制率は、１ｍｇ／ｋｇ投与群で９９．７％、３ｍｇ／ｋｇ投与群で９７．８％、１０ｍｇ／ｋｇ投与群で９８．０％であり、１ｍｇ／ｋｇ投与群で１０匹中２匹、３ｍｇ／ｋｇ投与群で１０匹中５匹、１０ｍｇ／ｋｇ投与群で

１０匹中３匹が腫瘍の完全縮退を示した。

[0267] １１）－１－４　ヒト肺癌株ＮＣＩ－Ｈ２１２２移植ヌードマウスにおける抗腫瘍活性（パクリタキセル＋カルボプラチン併用）

５×１０^{6}ｃｅｌｌｓのヒト肺癌株ＮＣＩ－Ｈ２１２２（ＡＴＣＣより購入）をヌードマウスの腋窩部皮下に移植した。移植の１３、２０日後にｃＢ２７３抗体を１０ｍｇ／ｋｇで担癌マウスの尾静脈内に投与した。パクリタキセルは６．２５ｍｇ/ｋｇとなるように移植の１３、１４、１５、１６、１７日後に皮下投与した。カルボプラチンは１００ｍｇ/ｋｇとなるように移植の１３日後に腹腔内投与した。（ｎ＝１０）。上記と同様の方法で移植腫瘍の長径及び短径の測定し腫瘍体積の算出を行った。

[0268] 結果を図１９に示した。最終測定日である移植４１日後における腫瘍増殖抑制率は、ｃＢ２７３抗体投与群で９９．６％、パクリタキセル、カルボプラチン併用投与群で１０．２％、ｃＢ２７３抗体、パクリタキセル、カルボプラチン併用投与群で９９．７％であった。

[0269] １１）－１－５　ヒト肺癌株ＮＣＩ－Ｈ４６０移植ヌードマウスにおける抗腫瘍活性（パクリタキセル＋カルボプラチン併用）

５×１０^{6}ｃｅｌｌｓのヒト肺癌株ＮＣＩ－Ｈ４６０（ＡＴＣＣより購入）をヌードマウスの腋窩部皮下に移植した。移植の６日後にｃＢ２７３抗体を１０ｍｇ／ｋｇで担癌マウスの腹腔内に投与した。パクリタキセルは６．２５ｍｇ/ｋｇとなるように移植の６、７、８、９、１０日後に皮下投与した。カルボプラチンは１００ｍｇ/ｋｇとなるように移植の６日後に腹腔内投与した。（ｎ＝１０）。上記と同様の方法で移植腫瘍の長径及び短径の測定し腫瘍体積の算出を行った。

[0270] 結果を図２０に示した。最終測定日である移植１６日後における腫瘍増殖抑制率は、ｃＢ２７３抗体投与群で４３．３％、パクリタキセル、カルボプラチン併用投与群で６６．４％、ｃＢ２７３抗体、パクリタキセル、カルボプラチン併用投与群で７９．６％であった。

[0271] １１）－１－６　ヒト大腸癌株ＤＬＤ－１移植ヌードマウスにおける抗腫

瘍活性（ＣＰＴ－１１併用）

５×１０^{6}ｃｅｌｌｓのヒト大腸癌株ＤＬＤ－１（ＡＴＣＣより購入）をヌードマウスの腋窩部皮下に移植した。移植の３５日後にｃＢ２７３抗体を１０ｍｇ／ｋｇで担癌マウスの腹腔内に投与した。ＣＰＴ－１１は８０ｍｇ/ｋｇとなるように移植の３５、４０、４３日後に腹腔内投与した（ｎ＝１０）。上記と同様の方法で移植腫瘍の長径及び短径の測定し腫瘍体積の算出を行った。

[0272] 結果を図２１に示した。最終測定日である移植５５日後における腫瘍増殖抑制率は、ｃＢ２７３抗体投与群で２５．９％、ＣＰＴ－１１投与群で２９．５％、ｃＢ２７３抗体、ＣＰＴ－１１併用投与群で７２．７％であった。

[0273] １１）－１－７　ヒト大腸癌株ＨＣＴ－１５移植ヌードマウスにおける抗腫瘍活性（ＣＰＴ－１１併用）

５×１０^{6}ｃｅｌｌｓのヒト大腸癌株ＨＣＴ－１５（ＡＴＣＣより購入）をヌードマウスの腋窩部皮下に移植した。移植の７日後にｃＢ２７３抗体を１０ｍｇ／ｋｇで担癌マウスの尾静脈内に投与した。ＣＰＴ－１１は８０ｍｇ/ｋｇとなるように移植の７，１０，１４日後に腹腔内投与した（ｎ＝１０）。上記と同様の方法で移植腫瘍の長径及び短径の測定し腫瘍体積の算出を行った。

[0274] 結果を図２２に示した。最終測定日である移植３１日後における腫瘍増殖抑制率は、ｃＢ２７３抗体投与群で５２．８％、ＣＰＴ－１１投与群で８３．５％、ｃＢ２７３抗体、ＣＰＴ－１１併用投与群で９７．８％であった。

[0275] １１）－１－８　ヒト大腸癌株ＨＣＴ－１１６移植ヌードマウスにおける抗腫瘍活性（ＣＰＴ－１１併用）

１×１０^{7}ｃｅｌｌｓのヒト大腸癌株ＨＣＴ－１１６（ＡＴＣＣより購入）をヌードマウスの腋窩部皮下に移植した。移植の７日後にｃＢ２７３抗体を１０ｍｇ／ｋｇで担癌マウスの尾静脈内に投与した。ＣＰＴ－１１は６５ｍｇ/ｋｇとなるように移植の７，１０，１４日後に腹腔内投与した（ｎ＝１０）。上記と同様の方法で移植腫瘍の長径及び短径の測定し腫瘍体積の算出を

行った。

[0276] 結果を図２３に示した。最終測定日である移植２８日後における腫瘍増殖抑制率は、ｃＢ２７３抗体投与群で１３．９％、ＣＰＴ－１１投与群で８９．８％、ｃＢ２７３抗体、ＣＰＴ－１１併用投与群で９９．７％であった。

[0277] １１）－１－９　ヒトメラノーマ株Ａ３７５移植ヌードマウスにおける抗腫瘍活性（ビンブラスチン併用）

２×１０^{6}ｃｅｌｌｓのヒトメラノーマ細胞株Ａ３７５（ＡＴＣＣより購入）をヌードマウスの腋窩部皮下に移植した。移植の１０，１７，２４日後にｃＢ２７３抗体を１０ｍｇ／ｋｇで担癌マウスの尾静脈内に投与した。ビンブラスチンは１０ｍｇ/ｋｇとなるように移植の１０日後に尾静脈投与した（ｎ＝１０）。上記と同様の方法で移植腫瘍の長径及び短径の測定し腫瘍体積の算出を行った。

[0278] 結果を図２４に示した。最終測定日である移植４６日後における腫瘍増殖抑制率は、ｃＢ２７３抗体投与群で５３．１％、ビンブラスチン投与群で４３．６％、ｃＢ２７３抗体とビンブラスチン併用投与群で１００％であり、ｃＢ２７３抗体とビンブラスチン併用投与群ですべての個体が腫瘍の完全縮退を示した。

[0279] １１）－２　ｃＢ２７３抗体とＣｏｎａｔｕｍｕｍａｂとの抗腫瘍活性の比較

１１）－２－１　Ｃｏｎａｔｕｍｕｍａｂの調製

ＣｏｎａｔｕｍｕｍａｂはＷＨＯ　Ｄｒｕｇ　Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ，Ｖｏｌ．２２，Ｎｏ．２，２００８，ｐ１２９－１３０に記載されている軽鎖、及び重鎖のアミノ酸配列をもとに作製した。

[0280] １１）－２－１－１　Ｃｏｎａｔｕｍｕｍａｂの軽鎖発現ベクターの構築

配列番号７６のアミノ酸番号２１乃至１３０に示される、Ｃｏｎａｔｕｍｕｍａｂの軽鎖可変領域をコードする遺伝子を含むＤＮＡを合成し（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、ヒト化抗体軽鎖発現汎用ベクター（ｐＥＦ６

ＫＣＬ）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、Ｃｏｎａｔｕｍｕｍａｂの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／Ｃｏｎａｔｕｍｕｍａｂ＿Ｌ」と命名した。

[0281] １１）－２－１－２　Ｃｏｎａｔｕｍｕｍａｂの重鎖発現ベクターの構築

配列表の配列番号７８のアミノ酸番号２０乃至１４１に示される、Ｃｏｎａｔｕｍｕｍａｂの重鎖可変領域をコードする遺伝子を含むＤＮＡを合成し（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、Ｃｏｎａｔｕｍｕｍａｂの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／Ｃｏｎａｔｕｍｕｍａｂ＿Ｈ」と命名した。

[0282] １１）－２－１－３　Ｃｏｎａｔｕｍｕｍａｂの生産

１．２×１０^{9}個の対数増殖期のＦｒｅｅＳｔｙｌｅ　２９３Ｆ細胞（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）を新鮮な１．２ＬのＦｒｅｅＳｔｙｌｅ２９３　ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　ｍｅｄｉｕｍ　（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）に播種し、３７℃、８％ＣＯ２インキュベーター内において９０ｒｐｍで一時間振とう培養した。Ｐｏｌｙｅｔｈｙｌｅｎｅｉｍｉｎｅ（Ｐｏｌｙｓｃｉｅｎｃｅ　＃２４７６５）３．６ｍｇをＯｐｔｉ－Ｐｒｏ　ＳＦＭ培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）２０ｍｌに溶解し、次にＰｕｒｅＬｉｎｋ　ＨｉＰｕｒｅ　Ｐｌａｓｍｉｄキット（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）を用いて調製したＨ鎖発現ベクターのｐＥＦ１ＦＣＣＵ／Ｃｏｎａｔｕｍｕｍａｂ＿Ｈ（０．４ｍｇ）及びＬ鎖発現ベクターのｐＥＦ６ＫＣＬ／Ｃｏｎａｔｕｍｕｍａｂ＿Ｌ（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、さらに５分間放置した後にＦｒｅｅＳｔｙｌｅ　２９３Ｆ細胞に添加した。３７℃、８％ＣＯ２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。

１１）－２－１－４　Ｃｏｎａｔｕｍｕｍａｂの精製

上記１１）－２－１－３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。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。さら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。その画分を脱塩カラム（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。

[0283] １１）－２－２　ヒト大腸癌株ＨＣＴ－１５移植ヌードマウスにおけるｃＢ２７３抗体とＣｏｎａｔｕｍｕｍａｂとの抗腫瘍活性の比較

１×１０^{7}ｃｅｌｌｓのヒト大腸癌株ＨＣＴ－１５（ＡＴＣＣより購入）をヌードマウスの腋窩部皮下に移植した。移植の６、１３、２０日後にｃＢ２７３抗体及びＣｏｎａｔｕｍｕｍａｂを３、１０、３０ｍｇ／ｋｇで担癌マウスの尾静脈内に投与した（ｎ＝１０）。上記と同様の方法で移植腫瘍の長径及び短径の測定し腫瘍体積の算出を行った。

[0284] 結果を図２５に示した。最終測定日である移植３０日後における腫瘍増殖抑制率は、ｃＢ２７３抗体の３ｍｇ/ｋｇ投与群で５７．９％、１０ｍｇ/ｋｇ投与群で５６．０％、３０ｍｇ/ｋｇ投与群で５３．６％、Ｃｏｎａｔｕｍｕｍａｂの３ｍｇ/ｋｇ投与群で２７．４％、１０ｍｇ/ｋｇ投与群で２６．９％、３０ｍｇ/ｋｇ投与群で２０．３％であった。

[0285] １１）－２－３　ヒト肺癌株ＮＣＩ－Ｈ１９７５移植ヌードマウスにおけるｃＢ２７３抗体とＣｏｎａｔｕｍｕｍａｂとの抗腫瘍活性の比較

３×１０^{6}ｃｅｌｌｓのヒト肺癌株ＮＣＩ－H１９７５（ＡＴＣＣより購入）をヌードマウスの腋窩部皮下に移植した。移植の１２、１９、２６日後にｃＢ２７３抗体及びＣｏｎａｔｕｍｕｍａｂを３、１０ｍｇ／ｋｇで担癌マウスの尾静脈内に投与した（ｎ＝１０）。上記と同様の方法で移植腫瘍の長径及び短径の測定し腫瘍体積の算出を行った。

[0286] 結果を図２６に示した。最終測定日である移植３２日後における腫瘍増殖抑制率は、ｃＢ２７３抗体の３ｍｇ/ｋｇ投与群で７１．５％、１０ｍｇ/ｋｇ投与群で７３．３％、Ｃｏｎａｔｕｍｕｍａｂの３ｍｇ/ｋｇ投与群で１３．５％、１０ｍｇ/ｋｇ投与群で１２．６％であった。

[0287]

実施例 12

[0288] ｈＢ２７３＿Ｈ２－１－ＮＥ／ｈＢ２７３＿Ｌ１－ＮＫ抗体のｉｎ　ｖｉ

ｖｏ抗腫瘍効果

１２）－１　ｈＢ２７３＿Ｈ２－１－ＮＥ／ｈＢ２７３＿Ｌ１－ＮＫ抗体のヒト大腸癌株ＣＯＬＯ２０５移植ヌードマウスにおける抗腫瘍活性

２×１０^{6}ｃｅｌｌｓのヒト大腸癌株ＣＯＬＯ２０５（ＡＴＣＣより購入）をヌードマウスの腋窩部皮下に移植した。移植の８、１５、２２日後にｈＢ２７３＿Ｈ２－１－ＮＥ／ｈＢ２７３＿Ｌ１－ＮＫ抗体及びｃＢ２７３抗体を０．３、３ｍｇ／ｋｇで担癌マウスの尾静脈内に投与した（ｎ＝１０）。上記と同様の方法で移植腫瘍の長径及び短径の測定し腫瘍体積の算出を行った。

[0289] 結果を図２７に示した。ｈＢ２７３＿Ｈ２－１－ＮＥ／ｈＢ２７３＿Ｌ１－ＮＫ抗体の３ｍｇ／ｋｇ投与群及びｃＢ２７３抗体の０．３ｍｇ／ｋｇ投与群はすべての個体で腫瘍の完全縮退が認められた。ｈＢ２７３＿Ｈ２－１－ＮＥ／ｈＢ２７３＿Ｌ１－ＮＫ抗体０．３ｍｇ／ｋｇ投与群の１０例中９例、及びｃＢ２７３抗体３ｍｇ／ｋｇ投与群の１０例中８例で腫瘍の完全縮退が認められた。

[0290]

実施例 13

[0291] ｈＢ２７３＿Ｈ２－１－ＮＥ／ｈＢ２７３＿Ｌ１－ＮＫ抗体のヒト癌細胞株に対するｉｎ ｖｉｔｒｏ殺細胞活性

ＮＣＩ－Ｎ８７、ＫＡＴＯＩＩＩ、ＳＮＵ－１６（以上、ヒト胃癌株）、Ｃａｋｉ－１、ＡＣＨＮ，７８６－Ｏ（以上ヒト腎臓癌株）、Ｈｅｐ３Ｂ、ＳＫ－ＨＥＰ－１、ＨｅｐＧ２（Ｃ３Ａ）（以上ヒト肝臓癌株）、ＨＴ－１０８０（ヒト線維肉腫株）は、ＡｍｅｒｉｃａｎＴｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ：ＡＴＣＣより購入した。ＧＣＩＹ（ヒト胃癌株）は、理化学研究所より購入した。ＨｕＨ－７（ヒト肝臓癌株）は、医薬基盤研究所より購入した。

[0292] 各種細胞株に対するｉｎ ｖｉｔｒｏ殺細胞活性を以下の方法で測定した。胃癌株、腎臓癌株、線維肉腫株については、適宜継代培養した細胞をトリパ

ンブルー染色法で計数後、１０％ウシ胎児血清（ハイクローン社製）を含む培地（以下培地）で１×１０^{5}ｃｅｌｌｓ／ｍｌに調製した。培地にｈＢ２７３＿Ｈ２－１－ＮＥ／ｈＢ２７３＿Ｌ１－ＮＫ抗体を２０μｇ／ｍｌ、２次抗体（ヤギ抗ヒトＩｇＧ抗体、エムピーバイオメディカルズ社製）を４０μｇ／ｍｌで混合した。さらに、培地を用いて希釈し、ｈＢ２７３＿Ｈ２－１－ＮＥ／ｈＢ２７３＿Ｌ１－ＮＫ抗体濃度が２０００、２００、２０、２ｎｇ／ｍｌ、となる溶液を調製した。透明９６穴マイクロプレート（コーニング社製）に各濃度の溶液を一群３連で５０μｌずつ添加し、細胞懸濁液を５０μｌ（５×１０^{3}ｃｅｌｌｓ）ずつ播種した（ｈＢ２７３＿Ｈ２－１－ＮＥ／ｈＢ２７３＿Ｌ１－ＮＫ抗体最終濃度１００００、１０００、１００、１０、１ｎｇ／ｍｌ）。

[0293] 肝臓癌株については、適宜継代培養した細胞をトリパンブルー染色法で計数後、培地で４×１０^{4}ｃｅｌｌｓ／ｍｌに調製した。培地にｈＢ２７３＿Ｈ２－１－ＮＥ／ｈＢ２７３＿Ｌ１－ＮＫ抗体を２ μｇ／ｍｌ、２次抗体を４ μｇ／ｍｌで混合した。さらに、培地を用いて、２００、２０、２、０．２、０．０２ｎｇ／ｍｌの溶液を調製した。黒色透明底９６穴マイクロプレート（コーニング社製）に各濃度の溶液を一群２連で５０μｌずつ添加し、細胞懸濁液を５０μｌ（２×１０^{3}ｃｅｌｌｓ）ずつ播種した（抗体最終濃度１０００、１００、１０、１、０．１、０．０１ｎｇ／ｍｌ）。

[0294] ３７℃、５％二酸化炭素存在下でプレートを７２時間培養し、各ウェルのＡＴＰ量を測定した。ＡＴＰ量測定にはルシフェラーゼ発光試薬（ＣｅｌｌＴｉｔｅｒＧｌｏ，プロメガ社製）を用い、添付のプロトコールに従って測定を行った。すなわち、細胞溶解成分と発光基質成分からなる試液をプレートの各ウェルに１００μｌずつ添加し、攪拌後、各ウェルの発光をルミノメーター（ベルトールド社製）にて測定した。胃癌株、腎臓癌株、線維肉腫株については、透明９６穴マイクロプレートより、白色９６穴マイクロプレート（コーニング社製）に１００μｌずつ試液を移してから発光測定を実施した。

[0295] 培地と細胞懸濁液を添加したウェルを陰性コントロールウェル、培地のみを添加したウェルをバックグラウンドウェルとして、被験ウェルの細胞生存率を以下の式により算出した。

[0296] 細胞生存率（％）＝（被験ウェルの発光強度 － バックグラウンドウェルの平均発光強度）／（陰性コントロールウェルの平均発光強度 － バックグラウンドウェルの平均発光強度）×１００

図５１に細胞株ごとの各抗体処理濃度における細胞生存率の平均値を示した。胃癌株、腎臓癌株、線維肉腫株については標準誤差をエラーバーで示した。ｈＢ２７３＿Ｈ２－１－ＮＥ／ｈＢ２７３＿Ｌ１－ＮＫ抗体は７８６－Ｏを除く細胞株に対して、細胞傷害活性を示した。

[0297]

実施例 14

[0298] ｈＢ２７３＿Ｈ２－１－ＮＥ／ｈＢ２７３＿Ｌ１－ＮＫ抗体と化学療法剤の併用によるｉｎ ｖｉｖｏ活性測定

１４）－１ ｈＢ２７３＿Ｈ２－１－ＮＥ／ｈＢ２７３＿Ｌ１－ＮＫ抗体と５－ＦＵの併用によるヒト大腸癌株ＨＣＴ－１５移植ヌードマウスにおける抗腫瘍活性、及びＣｏｎａｔｕｍｕｍａｂとの活性比較

１×１０^{7}ｃｅｌｌｓのヒト大腸癌株ＨＣＴ－１５（ＡＴＣＣより購入）をヌードマウス（ＣＡｎＮ．Ｃｇ－Ｆｏｘｎ１^{nu}／ＣｒｌＣｒｌｊ、日本チャールス・リバーより購入）の腋窩部皮下に移植した。移植の７、１４、２１日後にｈＢ２７３＿Ｈ２－１－ＮＥ／ｈＢ２７３＿Ｌ１－ＮＫ抗体又はＣｏｎａｔｕｍｕｍａｂを３ｍｇ／ｋｇで担癌マウスの尾静脈内に投与した。５－ＦＵは、移植７日後に１６０ｍｇ／ｋｇで尾静脈内投与した。実験はｎ＝６で実施した。移植腫瘍の長径及び短径を週２回、電子デジタルノギス（株式会社ミツトヨ製）を用いて測定し、以下に示す計算式により腫瘍体積を算出した。

[0299] 腫瘍体積（ｍｍ^{3}）＝１／２×短径^{2}（ｍｍ）×長径^{2}（ｍｍ）

結果を図５２に示した。最終測定日である移植２８日後における腫瘍増殖

抑制率は、ｈＢ２７３＿Ｈ２－１－ＮＥ／ｈＢ２７３＿Ｌ１－ＮＫ抗体投与群で６２％、Ｃｏｎａｔｕｍｕｍａｂ投与群で２７％、５－ＦＵ投与群で５４％、ｈＢ２７３＿Ｈ２－１－ＮＥ／ｈＢ２７３＿Ｌ１－ＮＫ抗体と５－ＦＵ併用群で９１％、Ｃｏｎａｔｕｍｕｍａｂと５－ＦＵ併用群で７８％であった。すなわち、ｈＢ２７３＿Ｈ２－１－ＮＥ／ｈＢ２７３＿Ｌ１－ＮＫ抗体と５－ＦＵの併用効果が認められ、さらに、ｈＢ２７３＿Ｈ２－１－ＮＥ／ｈＢ２７３＿Ｌ１－ＮＫ抗体と５－ＦＵ併用群は、Ｃｏｎａｔｕｍｕｍａｂと５－ＦＵ併用群よりも強い抗腫瘍活性を示した。

[0300] １４）－２　ｈＢ２７３＿Ｈ２－１－ＮＥ／ｈＢ２７３＿Ｌ１－ＮＫ抗体とパクリタキセルの併用によるヒト非小細胞肺癌株ＮＣＩ－Ｈ１９７５移植ヌードマウスにおける抗腫瘍活性、及びＣｏｎａｔｕｍｕｍａｂとの活性比較

３×１０^{6}ｃｅｌｌｓのヒト非小細胞肺癌株ＮＣＩ－Ｈ１９７５（ＡＴＣＣより購入）をヌードマウスの腋窩部皮下に移植した。移植の１１、１８、２５日後にｈＢ２７３＿Ｈ２－１－ＮＥ／ｈＢ２７３＿Ｌ１－ＮＫ抗体又はＣｏｎａｔｕｍｕｍａｂを３ｍｇ／ｋｇで担癌マウスの尾静脈内に投与した。パクリタキセルは、移植１１、１２、１３、１４日後に６．２５ｍｇ／ｋｇで担癌マウスの尾静脈内に投与した。実験はｎ＝６で実施した。上記と同様の方法で移植腫瘍の長径及び短径を測定し、腫瘍体積の算出を行った。

[0301] 結果を図５３に示した。最終測定日である移植３２日後における腫瘍増殖抑制率は、ｈＢ２７３＿Ｈ２－１－ＮＥ／ｈＢ２７３＿Ｌ１－ＮＫ抗体投与群で６６％、Ｃｏｎａｔｕｍｕｍａｂ投与群で４０％、パクリタキセル投与群で４９％、ｈＢ２７３＿Ｈ２－１－ＮＥ／ｈＢ２７３＿Ｌ１－ＮＫ抗体とパクリタキセル併用群で９１％、Ｃｏｎａｔｕｍｕｍａｂとパクリタキセル併用群で７９％であった。すなわち、ｈＢ２７３＿Ｈ２－１－ＮＥ／ｈＢ２７３＿Ｌ１－ＮＫ抗体とパクリタキセルの併用効果が認められ、さらに、ｈＢ２７３＿Ｈ２－１－ＮＥ／ｈＢ２７３＿Ｌ１－ＮＫ抗体とパクリタキセル併用群は、Ｃｏｎａｔｕｍｕｍａｂとパクリタキセル併用群よりも強い抗腫

瘍活性を示した。

請求の範囲

[請求項1] 重鎖配列が、CDRH1、CDRH2、CDRH3を有する可変領域を含み、前記CDRH1は配列番号８２に示されるアミノ酸配列からなり、前記CDRH2は配列番号８３又は８９に示されるいずれか一つのアミノ酸配列からなり、前記CDRH3は、配列番号８４に示されるアミノ酸配列からなること；及び

軽鎖配列がCDRL1、CDRL2、CDRL3を有する可変領域を含み、前記CDRL1は配列番号７９、８５、８６、８７又は８８に示されるいずれか一つのアミノ酸配列からなり、前記CDRL2は配列番号８０に示されるアミノ酸配列からなり、前記CDRL3は、配列番号８１に示されるアミノ酸配列からなること；

を特徴とする抗体又は該抗体の機能性断片。

[請求項2] 配列番号２０に示されるアミノ酸配列の２０乃至１４１番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域配列及び配列番号１６に示されるアミノ酸配列の２１乃至１３４番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域配列を含むことを特徴とする請求項１に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

[請求項3] キメラ抗体であることを特徴とする、請求項１又は２に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

[請求項4] 配列番号２０に示されるアミノ酸配列の２０乃至４７１番目のアミノ酸残基からなる重鎖配列及び配列番号１６に示されるアミノ酸配列の２１乃至２３９番目のアミノ酸残基からなる軽鎖配列からなることを特徴とする請求項３に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

[請求項5] ヒト化されていることを特徴とする、請求項１に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

[請求項6] 抗体又は該抗体の機能性断片であって、

（ａ）以下のアミノ酸配列からなる群から選択される重鎖可変領域配列：

ａ１）　配列番号４２に示されるアミノ酸配列の２０乃至１４１番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列；

ａ２）　配列番号７０に示されるアミノ酸配列の２０乃至１４１番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列；

ａ３）　ａ１）又はａ２）から選択されるアミノ酸配列と少なくとも９５％の相同性を持つアミノ酸配列；

ａ４）　ａ１）又はａ２）から選択されるアミノ酸配列と少なくとも９９％の相同性を持つアミノ酸配列；

ａ５）　ａ１）乃至ａ２）から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列に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；及び

（ｂ）以下のアミノ酸配列からなる群から選択される軽鎖可変領域配列：

ｂ１）　配列番号２８に示されるアミノ酸配列の２１乃至１３４番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列；

ｂ２）　配列番号５２に示されるアミノ酸配列の２１乃至１３４番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列；

ｂ３）　配列番号５８に示されるアミノ酸配列の２１乃至１３４番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列；

ｂ４）　配列番号６２に示されるアミノ酸配列の２１乃至１３４番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列；

ｂ５）　配列番号６６に示されるアミノ酸配列の２１乃至１３４番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列；

ｂ６）　ｂ１）乃至ａ５）から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列と少なくとも９５％の相同性を持つアミノ酸配列；

ｂ７）　ｂ１）乃至ｂ５）から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列と少なくとも９９％の相同性を持つアミノ酸配列；

ｂ８）　ｂ１）乃至５）から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列

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；

を含むことを特徴とする、請求項５に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

［請求項7］ 配列番号４２に示されるアミノ酸配列の２０乃至１４１番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域配列及び配列番号２８に示されるアミノ酸配列の２１乃至１３４番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域配列を含むことを特徴とする請求項６に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

［請求項8］ 配列番号７０に示されるアミノ酸配列の２０乃至１４１番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域配列及び配列番号５２に示されるアミノ酸配列の２１乃至１３４番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域配列を含むことを特徴とする請求項６に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

［請求項9］ 配列番号７０に示されるアミノ酸配列の２０乃至１４１番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域配列及び配列番号５８に示されるアミノ酸配列の２１乃至１３４番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域配列を含むことを特徴とする請求項６に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

［請求項10］ 配列番号７０に示されるアミノ酸配列の２０乃至１４１番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域配列及び配列番号６２に示されるアミノ酸配列の２１乃至１３４番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域配列を含むことを特徴とする請求項６に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

［請求項11］ 配列番号７０に示されるアミノ酸配列の２０乃至１４１番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域配列及び配列番号６６に示されるアミノ酸配列の２１乃至１３４番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域配列を含むことを特徴とする請求項６に記載の抗体又は該抗体の機能性

断片。

[請求項12] 配列番号４２に示されるアミノ酸配列の２０乃至４７１番目のアミノ酸残基からなる重鎖配列及び配列番号２８に示されるアミノ酸配列の２１乃至２３９番目のアミノ酸残基からなる軽鎖配列からなることを特徴とする請求項６に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

[請求項13] 配列番号７０に示されるアミノ酸配列の２０乃至４７１番目のアミノ酸残基からなる重鎖配列及び配列番号５２に示されるアミノ酸配列の２１乃至２３９番目のアミノ酸残基からなる軽鎖配列からなることを特徴とする請求項６に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

[請求項14] 配列番号７０に示されるアミノ酸配列の２０乃至４７１番目のアミノ酸残基からなる重鎖配列及び配列番号５８に示されるアミノ酸配列の２１乃至２３９番目のアミノ酸残基からなる軽鎖配列からなることを特徴とする請求項６に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

[請求項15] 配列番号７０に示されるアミノ酸配列の２０乃至４７１番目のアミノ酸残基からなる重鎖配列及び配列番号６２に示されるアミノ酸配列の２１乃至２３９番目のアミノ酸残基からなる軽鎖配列からなることを特徴とする請求項６に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

[請求項16] 配列番号７０に示されるアミノ酸配列の２０乃至４７１番目のアミノ酸残基からなる重鎖配列及び配列番号６６に示されるアミノ酸配列の２１乃至２３９番目のアミノ酸残基からなる軽鎖配列からなることを特徴とする請求項６に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

[請求項17] 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１６のいずれか一つに記載の抗体の機能性断片。

[請求項18] 請求項１乃至１７のいずれか一つに記載の抗体又は該抗体の機能性断片の少なくともいずれか一つを含有することを特徴とする、医薬組成物。

[請求項19] 癌の治療及び／又は予防のための医薬組成物であることを特徴とする、請求項１８に記載の医薬組成物。

[請求項20] 請求項１乃至１７に記載の抗体又は該抗体の機能性断片の少なくともいずれか一つ、並びに、ｐａｃｌｉｔａｘｅｌ、ｃａｒｂｏｐｌａｔｉｎ、ＣＰＴ－１１、又はｖｉｎｂｌａｓｔｉｎからなる群から選択される少なくともいずれか一つを含有することを特徴とする、癌の治療及び／又は予防のための医薬組成物。

[請求項21] 癌が、肺癌、前立腺癌、甲状腺癌、胃癌、肝臓癌、卵巣癌、大腸癌、乳癌、膵臓癌、子宮癌、メラノーマ、神経膠芽腫及び血球癌からなる群から選択される、請求項１９又は２０に記載の医薬組成物。

[請求項22] 請求項１乃至１７に記載の抗体又は該抗体の機能性断片の少なくともいずれか一つを投与することを特徴とする、癌の治療及び／又は予防方法。

[請求項23] 請求項１乃至１７に記載の抗体又は該抗体の機能性断片の少なくともいずれか一つ、並びに、ｐａｃｌｉｔａｘｅｌ、ｃａｒｂｏｐｌａｔｉｎ、ＣＰＴ－１１、ｖｉｎｂｌａｓｔｉｎ及び５－ＦＵからなる群から選択される少なくともいずれか一つを同時又は連続して投与することを特徴とする、癌の治療及び／又は予防方法。

[請求項24] 癌が、肺癌、前立腺癌、甲状腺癌、胃癌、肝臓癌、卵巣癌、大腸癌、乳癌、膵臓癌、腎臓癌、子宮癌、メラノーマ、繊維肉腫、神経膠芽腫及び血球癌からなる群から選択される、請求項２２又は２３に記載の治療及び／又は予防方法。

[請求項25] 請求項２、４又は６乃至１６のいずれか一つに記載の抗体をコードするポリヌクレオチド。

[請求項26] 請求項２５に記載のポリヌクレオチドであって、配列番号１９に示されるヌクレオチド配列の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及び配列番号１５に示されるヌクレオチド配列の６１乃至４０２番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列を含むことを特徴とするポリヌクレオチド。

[請求項27] 請求項２５に記載のポリヌクレオチドであって、配列番号１９に示さ

れるヌクレオチド配列の５８乃至１４１３番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列及び配列番号１５に示されるヌクレオチド配列の６１乃至７１７番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列を含むことを特徴とするポリヌクレオチド。

［請求項28］ 請求項２５に記載のポリヌクレオチドであって、

（ａ）以下のヌクレオチド配列からなる群から選択されるポリヌクレオチド：

ａ１） 配列番号４１に示されるヌクレオチド配列の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；

ａ２） 配列番号６９に示されるヌクレオチド配列の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；

ａ３） ａ１）又はａ２）から選択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するポリヌクレオチドが保有するヌクレオチド配列；

ａ４） ａ１）又はａ２）から選択されるヌクレオチド配列に１乃至数個のアミノ酸残基が置換、欠失又は付加されたヌクレオチド配列；及び

（ｂ）以下のヌクレオチド配列からなる群から選択されるポリヌクレオチド：

ｂ１） 配列番号２７に示されるヌクレオチド配列の６１乃至４０２番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列；

ｂ２） 配列番号５１に示されるヌクレオチド配列の６１乃至４０２番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列；

ｂ３） 配列番号５７に示されるヌクレオチド配列の６１乃至４０２番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列；

ｂ４） 配列番号６１に示されるヌクレオチド配列の６１乃至４０２番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列；

ｂ５）　配列番号６５に示されるヌクレオチド配列の６１乃至４０２番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列；

ｂ６）　ｂ１）乃至ｂ５）から選択されるいずれか一つ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保有するヌクレオチド配列；

ｂ７）　ｂ１）乃至ｂ５）から選択されるいずれか一つのヌクレオチド配列に１乃至数個のヌクレオチドが置換、欠失又は付加されたヌクレオチド配列；

を含むことを特徴とするポリヌクレオチド。

［請求項29］　配列番号４１に示されるヌクレオチド配列の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からなるポリヌクレオチド及び配列番号２７に示されるヌクレオチド配列の６１乃至４０２番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドを含むことを特徴とする請求項２８に記載のポリヌクレオチド。

［請求項30］　配列番号６９に示されるヌクレオチド配列の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からなるポリヌクレオチド及び配列番号５１に示されるヌクレオチド配列の６１乃至４０２番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドを含むことを特徴とする請求項２８に記載のポリヌクレオチド。

［請求項31］　配列番号６９に示されるヌクレオチド配列の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からなるポリヌクレオチド及び配列番号５７に示されるヌクレオチド配列の６１乃至４０２番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドを含むことを特徴とする請求項２８に記載のポリヌクレオチド。

［請求項32］　配列番号６９に示されるヌクレオチド配列の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からなるポリヌクレオチド及び配列番号６１に示されるヌクレオチド配列の６１乃至４０２番目のヌ

クレオチドからなるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドを含むことを特徴とする請求項２８に記載のポリヌクレオチド。

[請求項33] 配列番号６９に示されるヌクレオチド配列の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からなるポリヌクレオチド及び配列番号６５に示されるヌクレオチド配列の６１乃至４０２番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドを含むことを特徴とする請求項２８に記載のポリヌクレオチド。

[請求項34] 配列番号４１に示されるヌクレオチド配列の５８乃至１４１３番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド及び配列番号２７に示されるヌクレオチド配列の６１乃至７１７番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドを含むことを特徴とする請求項２８に記載のポリヌクレオチド。

[請求項35] 配列番号６９に示されるヌクレオチド配列の５８乃至１４１３番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド及び配列番号５１に示されるヌクレオチド配列の６１乃至７１７番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドを含むことを特徴とする請求項２８に記載のポリヌクレオチド。

[請求項36] 配列番号６９に示されるヌクレオチド配列の５８乃至１４１３番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド及び配列番号５７に示されるヌクレオチド配列の６１乃至７１７番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドを含むことを特徴とする請求項２８に記載のポリヌクレオチド。

[請求項37] 配列番号６９に示されるヌクレオチド配列の５８乃至１４１３番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド及び配列番号６１に示されるヌクレオチド配列の６１乃至７１７番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドを含むことを特徴とする請求項２８に記載のポリヌクレオチド。

[請求項38] 配列番号６９に示されるヌクレオチド配列の５８乃至１４１３番目の

ヌクレオチドからなるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド及び配列番号６５に示されるヌクレオチド配列の６１乃至７１７番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドを含むことを特徴とする請求項２８に記載のポリヌクレオチド。

［請求項39］ 請求項２５乃至３８に記載のいずれか一つのポリヌクレオチドを含むベクター。

［請求項40］ 請求項２５乃至３８に記載のいずれか一つのポリヌクレオチドを含む形質転換宿主細胞。

［請求項41］ 請求項３９に記載のベクターを含む形質転換宿主細胞。

［請求項42］ 請求項４０又は４１に記載の宿主細胞を培養し、培養産物から抗体を精製する工程を含む請求項２、４又は６乃至１６に記載の抗体の生産方法。

［請求項43］ 配列番号２０に示されるアミノ酸配列の２０乃至４７１番目のアミノ酸残基からなる重鎖配列及び配列番号１６に示されるアミノ酸配列の２１乃至２３９番目のアミノ酸残基からなる軽鎖配列からなる抗体と同じエピトープに結合することを特徴とする抗体又は該抗体の機能性断片。

［請求項44］ 配列番号２０に示されるアミノ酸配列の２０乃至４７１番目のアミノ酸残基からなる重鎖配列及び配列番号１６に示されるアミノ酸配列の２１乃至２３９番目のアミノ酸残基からなる軽鎖配列からなる抗体と競合することを特徴とする抗体又は該抗体の機能性断片。

［請求項45］ Ｐａｐａｉｎ消化によって調製されたＦａｂフラグメントが、配列番号２３に記載の組換え蛋白質の２６番目のグリシン残基、３４番目のイソロイシン残基、３６番目のグルタミン酸残基、３７番目のアスパラギン酸残基、３８番目のグリシン残基、５６番目のアスパラギン酸残基、５７番目のロイシン残基、５８番目のロイシン残基、５９番目のフェニルアラニン残基、６１番目のロイシン残基及び６２番目のアルギニン残基と４Å以内の距離で隣接していることを特徴とする、請

求項４３又は４４に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

［請求項46］ 配列番号２３に記載の組換え蛋白質を構成する各アミノ酸残基とＦａｂフラグメント間の距離を、Ｘ線回折データを用いた複合体構造解析によって決定することを特徴とする、請求項４５に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。