

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2006-25794

(P2006-25794A)

(43) 公開日 平成18年2月2日(2006.2.2)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 T	4 B O 6 4
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 C O 8 5
C O 7 K 16/28 (2006.01)	C O 7 K 16/28	4 H O 4 5
C O 7 K 16/46 (2006.01)	C O 7 K 16/46	
審査請求 有 請求項の数 8 O L (全 63 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2005-233093 (P2005-233093)	(71) 出願人	591032596
(22) 出願日	平成17年8月11日 (2005.8.11)		メルク パテント ゲゼルシャフト ミット
(62) 分割の表示	特願平7-523847の分割		ト ベシュレンクテル ハフトング
原出願日	平成7年3月16日 (1995.3.16)		Merck Patent Gesell
(31) 優先権主張番号	94104160.0		schaft mit beschræ
(32) 優先日	平成6年3月17日 (1994.3.17)		nkter Haftung
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		ドイツ連邦共和国 デー-64293 ダ
(31) 優先権主張番号	94118970.6		ルムシュタット フランクフルター シュ
(32) 優先日	平成6年12月2日 (1994.12.2)		トラーセ 250
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		Frankfurter Str. 25
		(74) 代理人	100123788
			弁理士 宮崎 昭夫
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗EGFR一本鎖Fvおよび抗EGFR抗体

(57) 【要約】

【課題】 免疫された哺乳動物、好ましくはマウスの細胞から構築されるファージ - 抗体ライブラリーから得られる新規の抗EGFR抗体およびそれら的一本鎖Fv (scFv) の提供。

【解決手段】 ファージ - 抗体ライブラリーから分離された一本鎖Fvの二つを、部分的にヒト化された全抗体分子を作出するために遺伝子操作した。これらキメラ抗EGFR抗体はヒト免疫グロブリンの定常部を含み、一本鎖Fvと同様にヒト腫瘍の診断および治療のための薬剤として使用することができる。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

免疫された哺乳動物に由来する細胞から構築されたファージ - 抗体ライブラリーから得られる抗 E G F R 一本鎖 F v。

【請求項 2】

免疫されたマウスの細胞から得られる請求項 1 に記載の抗体フラグメント。

【請求項 3】

以下の細胞、すなわち (1) リンパ節 (2) 脾臓、または (3) インビトロ免疫細胞から得られる請求項 1 または 2 に記載の抗体フラグメント。

【請求項 4】

重鎖および軽鎖の可変部が配列表の配列 I D 番号 1 ~ 3 2 に示される重鎖および軽鎖配列の一つから選択される D N A および / またはアミノ酸配列を含んでなることを特徴とする請求項 1、2 または 3 に記載の抗体フラグメント。

【請求項 5】

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の抗体フラグメントに由来する D N A 配列およびヒト免疫グロブリンの定常部に由来する D N A 配列から構築される抗 E G F R 抗体。

【請求項 6】

重鎖定常部がヒトガンマ - 1 鎖のアミノ酸配列を含み、軽鎖定常部がヒトカッパ鎖の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。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の抗 E G F R 一本鎖 F v の調製法であって、次のステップからなる。

(1) 免疫した哺乳動物細胞、好ましくはマウス細胞から R N A を分離する。

(2) 第 1 鎖 c D N A を合成する。

(3) 免疫した細胞からの c D N A の V_H および V_L 遺伝子を増幅する。

(4) 適当な制限部位とともに該遺伝子をファージミドベクターにクローニングする。

(5) 連結混合物を用いて原核細胞を形質転換させる。

(6) 精製 E G F R を用いて E G F R に対するファージ抗体に関してファージライブラリーをスクリーニングする。

(7) 所望の一本鎖 F v を宿主原核細胞、好ましくは大腸菌中で産生させる。

【請求項 8】

請求項 7 に記載の方法によって産生された抗 E G F R 抗体フラグメントの可変部をコードする D N A を、ヒト免疫グロブリンの定常部をコードするゲノム D N A を含む少なくとも一つの真核細胞発現ベクター中にクローニングして、真核細胞を該ベクターで形質転換して、抗体を発現させて分離することによってなる全抗 E G F R 抗体の調製法。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の抗 E G F R 抗体フラグメントまたは請求項 5 または 6 に記載の全抗 E G F R 抗体を含んでなる薬剤組成物。

【請求項 10】

腫瘍に対する薬物の製造または腫瘍成長の診断的探索および評価のための請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の抗 E G F R 抗体フラグメントまたは請求項 5 または 6 に記載の全抗 E G F R 抗体の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

技術分野

本発明は、新規の抗 E G F R 抗体および抗体フラグメント、好ましくは、免疫された哺乳動物、好ましくはマウスの細胞から構築されるファージ - 抗体ライブラリーから得られる一本鎖 F v (s c F v) に関する。ファージ - 抗体ライブラリーから分離された抗体フラグメントを操作して部分的にヒト化された全抗体分子を作出することができる。これら

10

20

30

40

50

キメラ抗EGFR抗体はヒト免疫グロブリンの定常部を含み、それらのフラグメントと同様にヒト腫瘍の診断および治療のための薬剤として使用することができる。

【0002】

さらに、本発明はファージ-抗体ライブラリーが、免疫哺乳動物からの抗体の分離方法として標準的なハイブリドーマ手法に較べてより多様に用い得る代替りの方法であることを示している。

【0003】

さらには、本発明は、黒色腫、神経膠腫または癌腫などの腫瘍の治療のための該抗体またはフラグメントからなる薬剤組成物に関する。該抗体またはフラグメントはまた、該腫瘍のインビトロまたはインビボでの探索および評価に関する診断的適用のために使用できる。

10

【背景技術】

【0004】

本明細書は、ここで次のように定義するいくつかの技術用語に関連している。

「FR」（フレームワーク領域）は、三つのCDRを支える軽鎖または重鎖可変部の四つのサブ領域を意味する。

「CDR」（相補性決定領域）は、超可変配列を含み、本来抗原との直接接触を起こす主な原因となるループ構造物を形成する軽鎖または重鎖可変部の三つのサブ領域を意味する。

「キメラ」または部分的にヒト化された抗体は、ヒト材料由来の定常部および非ヒト材料、例えばマウスに由来する可変部（CDRを含む）からなる抗体を意味する。

20

「ヒト化」または完全にヒト化された抗体は、CDRが非ヒト材料に由来するのに対して、ヒト材料由来の定常部およびFRからなる抗体を意味する。

「EGFR」および「EGFR」は、上皮増殖因子およびそのレセプターを意味する。

「PCR」は、ポリメラーゼ連鎖反応を意味する。

「scFv」は、抗体フラグメントである一本鎖Fvを意味する。

「VL」は、軽鎖可変部を意味する。

「V_L」は、カッパ軽鎖可変部を意味する。

「V_H」は、重鎖可変部を意味する。

PBSは、リン酸緩衝生理食塩水を意味する。

30

FCSは、ウシ胎児血清を意味する。

HBSは、ハンクスの平衡塩類溶液を意味する。

FITCは、フルオレセインイソチオシアネートを意味する。

MTCは、混合細胞培養を意味する。

発明の背景

上皮増殖因子（EGF）は、表皮および上皮細胞のマイトゲンであるポリペプチドホルモンである。EGFが感受性細胞と相互作用する場合、これは膜レセプター（EGFR）に結合する。EGFRは、約170kDの貫膜糖タンパク質であって、c-erb-Bプロトオンコジーン（癌原遺伝子）の遺伝子産物である。

40

【0005】

MAb425は、よく知られたヒトA431癌腫細胞系（ATCC CRL1555）に対してつくられたネズミモノクローナル抗体であって、ヒトEGFRの外側ドメインのポリペプチドエピトープに結合し、EGFの結合を阻害する。MAb425（ATCC HB 9629）は、インビトロで腫瘍細胞毒性を媒介し、インビトロで類表皮腫および結腸直腸癌腫由来の細胞系の腫瘍細胞増殖を抑制することが見出された（Rodeck et al., Cancer Res., 47, 3692, 1987）。MAb425のヒト化されたキメラは、WO 92/15683に開示されている。

【0006】

ここ数年の間に、機能的抗体フラグメントを大腸菌（E. coli）などの宿主原核細

50

胞中で産生し得る方法が記述された (Skerra and Plueckthun, Science, 240, 1033, 1988, Better et al., Science, 240, 1041, 1988)。これらにはFvフラグメントおよびFabフラグメントが含まれており、Fvフラグメントはとくに関心もたれる。一本鎖Fv(鎖中、V_LおよびV_H鎖は一緒に連結している)についてもまた、記述がある (Bird et al., Science, 242, 423, 1988, Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 5879, 1988)。

【0007】

ファージ-抗体ライブラリーは、免疫した動物からの抗体の分離におけるハイブリドーマ手法に別の手法を提供する。ハイブリドーマ法は、抗体を産生する細胞を不死化することによって行われる。ファージ-抗体手法は、抗体をコードする遺伝子を不死化することによって行われる (Winter, G. and Milstein, C., Nature, 349, 293, 1991)。ファージ-抗体手法において、抗体重鎖可変部 (V_H) および軽鎖可変部 (V_L) 遺伝子はPCR増幅され、可変部は無作為に組み合わされて、ファージ粒子の表面で抗体フラグメントとして発現されて、目的の抗原と結合する抗体についてファージ抗体のライブラリーをスクリーニングする。

10

【0008】

ハイブリドーマ手法は、動物の脾臓において強い免疫応答を生じさせることが可能な場合はマウスモノクローナル抗体の分離にきわめて良好な結果をもたらした。例えば、ヒト上皮細胞増殖因子レセプター (EGFR) に対するマウスMAbは、ヒトA431腫瘍細胞で腹腔内免疫したマウスの脾臓から分離された (Murthy et al., Arch. Biochem. Biophys., 252, 549, 1987)。ハイブリドーマ手法と比較した場合のファージ-抗体手法の考え得る利点は、出発材料としては本質的にいかなる材料からの抗体発現細胞でも用いることができ、多数の異なる抗体が迅速にスクリーニングされることである。ファージ-抗体手法の他の利点は、目的の抗体の可変部をコードする遺伝子はすでにクローニングされており、さらなる遺伝子操作のために直ちに入手できることである。

20

【0009】

ファージ-抗体ライブラリーから分離された抗破傷風トキソイドFabフラグメントを全抗体分子に変換したという一報告がある (Bender et al., Hum. Antibod. Hybridomas, 4, 74, 1993)。

30

【0010】

過去十年間、インビトロ免疫は、ヒトおよびネズミ系の双方からの多様な抗原に対するモノクローナル抗体 (mAb) を作出するための能動免疫の代わりに用いられてきた (例えば、Vaux, D. J. T., Heienius, . A. and Mellman, I., Nature, 336, 36, 1988, Gathuru, J. K. et al., J. Immunol. Methods, 137, 95, 1991, Borebaeck, C. A. K., Immunol. Today, 9, 355, 1988)。このアプローチの利点は、ごく少量の抗原しか要求されないことおよびこの方法がヒト・ハイブリドーマの作出にも適用されることである。しかし、インビトロ免疫後の低親和性IgM抗体の作出およびヒトリンパ球の不死化の困難さは、この手法に常に伴う問題となってきた。

40

【0011】

抗体を得る新たな方法は、重鎖および軽鎖可変部 (V_HおよびV_L) 領域の遺伝子のPCR増幅し、次いでこれらが無作為に組み換えてファージ提示ライブラリーとして発現する方法である (7-9)。抗体可変部遺伝子をクローニングされ、副コートタンパク質 (遺伝子3) に一本鎖Fvフラグメント (scFv) として融合された (10)。ファージ粒子はその表面に抗体フラグメントを提示し、抗体の結合性を用いて選別することによって選択することができる。この手法は、V遺伝子の無作為組み換えが天然のプロセスでは選択され得ない新しい特異性および親和性を有する新規の対合を産生する可能性があるとい

50

う利点を有する。

【0012】

さらに、そのようなアプローチによって、ネズミまたはヒト由来の天然のまたはインビトロ免疫されたリンパ球の使用が可能になる。

【0013】

ネズミB細胞インビトロ免疫およびハイブリドーマ手法によるEGFRに対するmAb取得の以前の試みでは、低親和性の交差反応抗体しか得られなかった。

【0014】

そのような欠点を改良するために、インビトロ免疫とそれに続くPCRクローニング手法との組み合わせが行われた。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0015】

したがって、本発明の目的は、EGFレセプターに対して高親和性を有し、上記および下記の有利な方法によって得られる抗体および抗体フラグメントを開発することである。

【課題を解決するための手段】

【0016】

発明の開示

本発明は、標準ハイブリドーマ手法(Murthy et al., Arch. Biochem. Biophys., 252, 549, 1987, Kettleborough et al., Protein Eng., 4, 773, 1991)によって分離されたマウスMAb(425)と三つの異なるファージ-抗体ライブラリーから分離されたマウス抗EGFR抗体とを比較する。ライブラリーは、免疫したマウスの脾臓からだけではなく免疫したマウスの排液リンパ節からおよびインビトロ免疫したマウス細胞からも調製した。ライブラリーから分離した二つの一本鎖Fv(scFv)を、ヒト定常部に連結したマウス可変部を有するキメラ全抗体分子の作出のために遺伝子操作した。

【0017】

詳細には、本発明は、免疫した哺乳動物、細胞、好ましくはマウスの好ましくは脾臓または排液リンパ節の細胞、またはインビトロ免疫した細胞から構築したファージ-抗体ライブラリーから得ることができる抗EGFR一本鎖Fvに関する。原則として、本発明はscFvに限定されることなく、FabまたはF(ab')₂などの他の抗EGFR抗体フラグメントまでにも及ぶ。

【0018】

本発明によるscFvのいくつかは、明確に定義されるDNAおよびアミノ酸配列を有する。したがって、本発明の他の目的は、重鎖および軽鎖の可変部が配列ID番号1~32、好ましくは第5~8図に示された重鎖および軽鎖配列の一つから選択されるDNAおよび/またはアミノ酸配列からなることを特徴とする一本鎖Fvフラグメントを提供することである。

【0019】

多くの場合、完全に機能する全抗体のみが診断および治療目的に使用し得ることから、一本鎖Fvからの可変部を全部、一部またはヒト化した抗EGFR抗体を形成するヒト免疫グロブリンの定常部と連結することは本発明の関心事である。

【0020】

したがって、本発明の一つの目的は、上記および下記に定義されたまたは請求の範囲に定義された抗体フラグメントに由来するDNA配列からおよびヒト免疫グロブリンの定常部に由来するDNA配列から構築される全抗EGFR抗体を提供することであって、これは好ましい実施態様として、重鎖が 鎖からなり軽鎖が 鎖のアミノ酸配列からなることを特徴とする。

【0021】

本発明によると、抗EGFRscFvはファージ-抗体ライブラリー手法によって分離

10

20

30

40

50

される。したがって、本発明は抗EGFR一本鎖Fvの調製法に関し、それは以下のステップからなる。

- (1) 免疫した哺乳動物細胞、好ましくはマウス細胞からRNAを分離する。
- (2) 第一鎖cDNAを合成する。
- (3) 免疫した細胞からのcDNAのV_HおよびV_L遺伝子を増幅する。
- (4) 適当な制限部位とともに該遺伝子をファージミドベクターにクローニングする。
- (5) 連結混合物を用いて原核細胞を形質転換させる。
- (6) 精製EGFRを用いてEGFRに対するファージ抗体に関してファージライブラリーをスクリーニングする。
- (7) 所望の一本鎖Fvを宿主原核細胞、好ましくは大腸菌中で産生させる。

10

【0022】

さらに、本発明の目的は、上記のようにしてまたは請求の範囲に定義したようにして産生された抗EGFR抗体フラグメントの可変部をコードするDNAを、ヒト免疫グロブリンの定常部をコードするゲノムDNAを含む少なくとも一つの真核細胞発現ベクター中にクローニングして、真核細胞を該ベクターで形質転換して、抗体を発現させて分離することによって全抗EGFR抗体を調製する方法を開示することである。

【0023】

抗EGFRscFv、とりわけ全抗EGFR抗体は、ヒト腫瘍の診断および治療において用いることができる。このように、本発明は上記および請求の範囲に定義したような抗EGFR一本鎖Fvまたは全抗EGFR抗体からなる薬剤組成物に関する。

20

【0024】

本発明の結果および利点は次のように要約される。

【0025】

新規のマウス抗EGFR抗体をファージ-抗体ライブラリーから分離した。新抗体は、少なくとも四つの異なるV_Hサブグループおよび四つの異なるV_Lサブグループで表された(Kabat et al., Sequences of proteins of immunological interest, 5th Eds., U.S. Dept. of Health and Human Services, Bethesda, 1991)。これらは、ハイブリドーマ手法を用いて分離したマウスMAbによって用いられる対合および配列とは異なった対合および配列を示した。マウス425MAbは、ファージ抗体には見られなかったV_H2bとV_L4対合を有する。FvL311DのV_Hは、最高の425V_Hに対して最高割合の一致(84.9%)を有した。主な相違はCDRにあった。scFvS42DのV_Lは425V_Lに対して最高割合の一致(83.2%)を有した。ここでも、主な相違はCDR、とくにCDR3にあった。本発明において、多様な新抗EGFR抗体がファージ-抗体ライブラリーから分離され、それら抗体は全て、425MAbによって認識されるものとは異なるEGFR上のエピトープを認識する少なくとも二つのscFvを有する425MAbと異なっている。これは、組み合わせのライブラリーから分離された抗体がハイブリドーマ手法によって分離されたものときわめて類似しているという以前の報告(Caton and Koprowski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 6450, 1990)と対照的である。

30

40

【0026】

三つのファージ-抗体ライブラリーのうち、高親和性抗体を得るために要求される選択ステップ回数および分離される高親和性抗体の多様性の点から最良のライブラリーは、排液リンパ節から作られたライブラリーであった。リンパ節はファージ-抗体ライブラリーの構築のためのRNA源として二つの理由で選択された。まず、以前の研究によって、高親和性IgG抗体を産生するB細胞は、腹膜を介して免疫した後の脾臓からよりも肉趾を介して免疫した後の膝窩リンパ節からの方がより高率で得られることが示された(Venn and Dresser, J. Immunol. Methods, 102, 95, 1987)。第二に、排液リンパ節はヒト抗腫瘍抗体の分離のための好適な材料であると考えられている。したがって、肉趾を介して免疫したマウスの膝窩リンパ節からのマウス抗

50

E G F R 抗体の分離は、乳ガン患者の腋窩リンパ節からのヒト抗 E G F R 抗体の分離のためのモデルであった。少量のリンパ節材料からの適切なサイズのライブラリーの調製およびそのライブラリーからの高親和性抗体の分離の可能性が示された。

【0027】

マウス抗 E G F R 抗体が三つのファージ - 抗体ライブラリーの全てから分離されたが、新たに分離された抗体のいずれかがハイブリドーマ手法を用いて分離したマウス 4 2 5 M A b よりもより高い親和性を有するという事は明らかにはされていない。最初の分析において、s c F v 由来のファージ抗体は 4 2 5 M A b から構築された s c F v よりもよく E G F R に結合したようであった (第 2 図)。

【0028】

キメラ全抗体分子を用いた他の実験において、キメラ抗体の一つ (S 4 2 D) はキメラ 4 2 5 抗体と等しい E G F R 親和性を示した。第二のキメラ抗体 (L 3 1 1 D) は、キメラ 4 2 5 抗体に較べて 4 分の 1 の低い親和性を有した (第 4 図)。S c F v を用いて得られた結合データは、おそらく s c F v 調製物がモノマーおよびダイマーの混合物を含み得ることから誤解を生む結果を示した (G r i f f i t h s e t a l . , E M B O J . , 1 2 , 7 2 5 , 1 9 9 3) 。これに対して、キメラ I g G 抗体がダイマーを形成することは予想されず、キメラ L 3 1 1 D および S 4 2 D 抗体は 2 価のモノマーキメラ I g G 抗体に予想される大きさを示した。しかし、4 2 5 , L 3 1 1 D および S 4 2 D s c F v のアフィニティー精製調製物の分析は、s c F v のこれら調製物はモノマー、ダイマーおよび他の多量体を含んでいなかったことを示した。さらに、モノマーおよび多量体の相対比はそれぞれの s c F v で異なっていた。4 2 5 s c F v は、最低のダイマーの割合を有した。予想されたように、ダイマーおよびとくにそれ以上の多量体はモノマーよりも精製 E G F R に対してより強い結合を示した。4 2 5 s c F v は、新たに分離された s c F v のいくつかに較べてダイマーになる傾向が弱いようである。

【0029】

ファージ粒子表面の抗体フラグメントの発現は所望の特異性を有する抗体の迅速な選択のための強力な方法の基礎を形成するが、ファージ抗体または抗体フラグメントそれ自体 (s c F v または F a b) のいずれも所望の最終産生物ではないようである。さらに、いかにしてファージライブラリーから分離されたマウス s c F v が全抗体分子に容易に変換し得るかが示されている。この場合、マウス可変部をヒト定常部と連結して、部分的にヒト化したキメラ抗体が作出された。

【0030】

これらの結果は、免疫したマウスから種々の抗 E G F R 抗体フラグメントを分離するためにファージ抗体手法を用いることが可能であることを示している。所望の定常部を有する全抗体分子は、次いで抗体フラグメントから構築できる。ある場合には、マウスからのモノクローナル抗体を分離する方法としてハイブリドーマ手法がそれでも最良の方法であるかもしれない。高免疫原性の抗原が入手可能であって、一つまたは二、三の異なる抗 - 抗原抗体を産生する二、三のハイブリドーマ細胞系が適切である場合には、ファージ抗体手法を考慮する理由はほとんどないと思われる。しかし、肉趾注射などの特殊な免疫プロトコールが高親和性抗体を生じさせるために有利であるような場合または抗原上の多様なエピトープに対する多数の抗体が要求される場合またはきわめて微弱で、免疫原性もおそらくより低いエピトープに対する抗体が要求される場合には、ファージ抗体手法が最良の方法であり得る。また、抗体のさらなる遺伝子操作が予想される場合には、抗体遺伝子がすでにクローニングされているという点でファージ抗体手法が有利である。

【0031】

微粒子抗原を用いるインビトロ免疫と P C R - クローニング手法とを組み合わせる本アプローチは、E G F R と反応して他の抗原とは交差反応しない s c F v フラグメントをもたらした。ここで報告された免疫プロトコールは、可溶性ではなく膜小胞調製物である抗原提示および F C S を欠いた培養培地自体によって異なる。両方法は、抗原を抗原提示細胞に利用できるようにすることによってインビトロ免疫の効率を高める手段として報告さ

10

20

30

40

50

れている（例えば、Brams、P.、etal.、J. Immunol. Methods、98、11.1987）。

【0032】

MTCを用いて得られた結果は、インビトロ免疫プロセスを改良するためにリンホカイン源としてMTC上清の使用を提唱している以前の報告（例えば、Borrebaeck、C.A.K. and Moeller、S.A.、J. Immunol.、136、3710、1986、Moeller、S.A. and Borrebaeck、C.A.K.、Borrebaeck、C.A.K. (Eds.)、In Vitro Immunization in Hybridoma Technology、Elsevier Science Publishers B.V.、アムステルダム、1988、p. 3）と一致する。膜小胞調製物は、多くの異なる抗原決定基がそのような小胞に存在することから、ポリ抗原とみなされるべきである。この理由から、これら調製物があるレベルのポリクロール活性化を誘導することも考えられる。しかし、抗EGFR特異性応答は標準ポリクロール活性化剤処理によって得られる応答とは明らかに異なることから、本発明者らはこれを不適切と考えた。

10

【0033】

インビトロ免疫後にB細胞を不死化する代わりに、本発明者らは抗体V_HおよびV_L遺伝子を不死化する分子の方策を用いた。これらモノクロール抗体フラグメントを細菌中で発現して産生した。ファージ提示系は特異的抗原に対する抗体フラグメントを分離するための強力な方法である。抗体フラグメントとg3p被覆タンパク質間の終止コドンの存在によって、サブレッサーまたは非サブレッサー菌株を用いて溶解性scFvフラグメントとしての表面提示と分泌との間のスイッチが可能になる（Hoogenboom et al.、Nucl. Acids Res.、19、4133、1991）。

20

【0034】

インビトロ抗体刺激されたB細胞における特異的応答およびmRNAレベルの上昇によって、インビトロ免疫は抗原に対して高い特異性を有する抗体フラグメントの分離に寄与する。二回の選択プロセスの後、100%のクローンがEGFRの結合に関して陽性であった。これに対して、インビトロ免疫プロセスに由来するクローンでは、4回の選択の後初めて100%陽性であった（Kettleborough et al.、EP94104160、Eur. J. Immunol.、24、952、1994）。

30

【0035】

天然の未処理の抗体遺伝子からのファージ提示ライブラリーの使用によって免疫なしでまたはインビトロ免疫の後に特異的なヒト抗体フラグメントが作出されることも考えられる。このように、抗体フラグメントは細菌中で簡単、迅速、かつ経済的に直接産生される。

生物学的材料および一般的方法

本出願に記述の微生物、細胞系、プラスミド、ファージミド、プロモーター、耐性マーカー、複製開始点またはベクターの他のフラグメントは、市販されているかあるいは一般に入手可能である。とくに記載がない限り、これらは例として使用されるのみであって、本発明に必ずしも必須ではなく、それぞれ他の適当な手段および生物学的材料によって置き換えることができる。

40

【0036】

scFvのクローニングおよびscFvタンパク質の産生のために細菌宿主を好ましく用いる。これら宿主の例は大腸菌またはバチルス菌（Bacillus）である。

【0037】

例えばCOS、CHOまたは酵母のような真核細胞宿主は、本発明による全抗EGFR抗体の産生のために好ましい。

【0038】

本発明に必要な方法技術を以下に詳細に記述する。詳記されない他の方法技術は、当業

50

者によく知られた公知の標準法または引用された参考文献および特許出願明細書および標準的文献により詳細に記載されている方法技術である。

図面の簡単な説明

第1図は、ファージ-抗体ライブラリーから分離されたs c F vのアミノ酸配列を示す説明図である。(A)リンパ節ライブラリーからのs c F v。(B)脾臓ライブラリーからのs c F v。相補性決定領域(C D R)およびフレームワーク領域(F R)が示されている。

【0039】

第2図は、E G F Rへのs c F vの結合を示す説明図である。細菌培養上清中のs c F vの濃度を推定して、s c F vを精製E G F Rへの結合に関してE L I S Aによって試験した。(A)リンパ節ライブラリーからのs c F vライブラリー。(B)脾臓ライブラリーからのs c F v。P 1(陽性対照)はM A b 4 2 5由来のs c F vである。L 1およびS 1(陰性対照)はあらかじめ選択したリンパ節および脾臓ライブラリーからの非結合s c F vである。

10

【0040】

第3図は、哺乳動物細胞における発現のための可変部を再構築するために用いる中間ベクターの説明図である。(A) V_Hベクター。(B) V_Lベクター。

【0041】

第4図は、キメラ全抗体のE G F Rへの結合を示す説明図である。C O S細胞上清中の抗体の濃度をE L I S Aによって決定し、抗体を精製したE G F Rへの結合に関してE L I S Aによって試験した。

20

【0042】

第5図は、s c F v番号L 2 1 1 CのD N Aおよびアミノ酸配列を示す説明図である。(A)軽鎖。(B)重鎖。

【0043】

アミノ酸位置

(A) F R - 1 : 1 - 2 3 , C D R - 1 : 2 4 - 3 4 ,
F R - 2 : 3 5 - 4 9 , C D R - 2 : 5 0 - 5 6 ,
F R - 3 : 5 7 - 8 8 , C D R - 3 : 8 9 - 9 7 ,
F R - 4 : 9 8 - 1 0 9 .

30

(B) F R - 1 : 1 - 3 0 , C D R - 1 : 3 1 - 3 5
F R - 2 : 3 6 - 4 9 , C D R - 2 : 5 0 - 6 6 ,
F R - 3 : 6 7 - 9 8 , C D R - 3 : 9 9 - 1 0 8 ,
F R - 4 : 1 0 9 - 1 1 9 .

第6図は、s c F v番号L 2 1 2 BのD N Aおよびアミノ酸配列を示す説明図である。(A)軽鎖。(B)重鎖。

【0044】

アミノ酸位置

(A) F R - 1 : 1 - 2 3 , C D R - 1 : 2 4 - 3 8 ,
F R - 2 : 3 9 - 4 9 , C D R - 2 : 5 0 - 5 6 ,
F R - 3 : 5 7 - 8 8 , C D R - 3 : 8 9 - 9 7 ,
F R - 4 : 9 8 - 1 0 9 .

40

(B) F R - 1 : 1 - 3 0 , C D R - 1 : 3 1 - 3 5 ,
F R - 2 : 3 6 - 4 9 , C D R - 2 : 5 0 - 6 6 ,
F R - 3 : 6 7 - 9 8 , C D R - 3 : 9 9 - 1 0 8 ,
F R - 4 : 1 0 9 - 1 1 9 .

第7図は、s c F v番号L 3 1 1 DのD N Aおよびアミノ酸配列を示す説明図である。(A)軽鎖。(B)重鎖。

【0045】

50

FRおよびCDRのアミノ酸位置は、第6図のものに対応する。

【0046】

第8図は、scFv番号S4 2DのDNAおよびアミノ酸配列を示す説明図である。

(A) 軽鎖。(B) 重鎖。

【0047】

アミノ酸位置

(A) FR - 1 : 1 - 23 , CDR - 1 : 24 - 35 ,
FR - 2 : 36 - 50 , CDR - 2 : 51 - 57 ,
FR - 3 : 58 - 89 , CDR - 3 : 90 - 98 ,
FR - 4 : 99 - 110 .

(B) FR - 1 : 1 - 30 , CDR - 1 : 31 - 35 ,
FR - 2 : 36 - 49 , CDR - 2 : 50 - 66 ,
FR - 3 : 67 - 98 , CDR - 3 : 99 - 107 ,
FR - 4 : 108 - 118 .

10

第5～8図の配列は、また、本発明の開示の一部である添付配列表にも示す。

【発明を実施するための最良の形態】

【0048】

発明の詳細な説明

(1) フェージ - 抗体ライブラリーの構築およびスクリーニング

三つのフェージ - 抗体ライブラリーを、一つはヒト癌腫細胞系A431(8.8 × 10⁵個)を用いて免疫したマウスの脾臓から、一つは精製EGFR(6.5 × 10⁶個)を肉

5 鉦に免疫したマウスの膝窩リンパ節から、そして一つはA431小胞(1.1 × 10⁵個)を用いてインビトロ免疫したマウスリンパ球から構築した(A431小胞の構築およびインビトロ免疫の詳細は実施例1および2に記載されている)。選択に先立って、各ライブラリーからの少なくとも46個のクローンを能力範囲の多様性を決定するためにBstNIフィンガープリント法(Clackson et al., Nature, 352, 624, 1991)によって分析した。広範囲の切断パターンが観察された。さらに選択に先立って、各ライブラリーからの96個のクローンからのscFvを、EGFRへの結合に関してELISAによって試験した。

20

【0049】

脾臓およびリンパ節ライブラリーからのscFvのいずれもEGFRに結合しなかった。インビトロ免疫したライブラリーからのscFvの一つがEGFRに結合した。1回目の選択をEGFR被覆免疫チューブを用いて行った後、EGFR結合scFvの明らかな濃厚富化が、リンパ節ライブラリーおよびインビトロ免疫したライブラリーに関して観察された。第2回目の選択は、EGFR結合scFvが脾臓ライブラリーから検出される前に必要であった。3回目の選択までに、リンパ節からおよびインビトロ免疫ライブラリーからのscFvのほとんどがEGFRへの結合に関して陽性であった。脾臓ライブラリーを用いる4回目の選択の後、ほとんどのscFvがEGFRへの結合に関して陽性であった(表1)。

30

【0050】

40

【表 1】

表 1 各選択回後の E G F R 結合クローンの占める % 比率

	リンパ節 ライブラリー	脾臓 ライブラリー	インビトロ免疫細胞 ライブラリー
選択前	0	0	1
第 1 回	77	0	84
第 2 回	86	26	100
第 3 回	90	77	100
第 4 回	試験せず	97	試験せず

10

【 0 0 5 1 】

(2) E G F R 結合クローンの配列分析

各回の選択後、E G F R 結合クローンからの s c F v 挿入部分を B s t N I フィンガープリント法 (C l a c k s o n e t a l . , N a t u r e , 3 5 2 , 6 2 4 , 1 9 9 1) によって分析した。ある切断パターンに関して富化があったことが明確となった。異なる B s t N I フィンガープリントを有するクローンを、リンパ節ライブラリーの 2 回目および 3 回目の選択からおよび脾臓ライブラリーの 3 回目および 4 回目の選択から V_H および V_L の DNA 配列決定のために選択した。より高親和性抗体の存在が後の回において予想されることから、後の選択回からのクローンを分析した (C l a c k s o n e t a l . , 3 5 2 , 6 2 4 , 1 9 9 1) 。

20

リンパ節ライブラリーからの 16 個のクローンを配列決定して、6 個の異なる s c F v を得た (第 1 図)。このうち、5 個は、ユニークな V_H および V_L の対合であった。第 6 番目は、6 個のアミノ酸変異を有する、前述する V_H の変型であって、そのうちの 5 個はフレームワーク領域 (F R) 1 にあった。これら変異の二つは、縮退 V_H 1 B A C K S F I プライマー (H o o g e n b o o m e t a l . , N u c l . A c i d s R e s . , 1 9 , 4 1 3 3 , 1 9 9 1) の使用によるものとみなし得る。他は、P C R エラーの結果と考え得る。V_H は、V_H 2 b および V_H 3 d の二つのサブグループに分類され、V_L は V_L 3、V_L 4、V_L 5 および V_L 6 の四つのサブグループに分類される (K a b a t e t a l . , S e q u e n c e s o f P r o t e i n s o f I m m u n o l o g i c a l I n t e r e s t . 5 t h E d s . , U . S . D e p t . o f H e a l t h a n d H u m a n S e r v i c e s , B e t h e s d a , 1 9 9 1)。脾臓ライブラリーからの 10 個のクローンを配列決定して、四つの異なる s c F v を見出した。このうちの三つはユニークな V_H および V_L の対合であり、残りの一つは前出の対合と同様のものであって、V_H に二つだけのアミノ酸の変異があり、うち一つは相補性決定領域 (C D R) 2 にあり、V_L に二つのアミノ酸の変異を有する。サブグループへの分類によって、サブグループ V_H 2 a、V_H 2 c および V_H 3 d からの V_H およびサブグループ V_L 3 および V_L 4 からの V_L が明らかになった。リンパ節および脾臓ライブラリーから得られた s c F v を比較することによって、両ライブラリーに共通する s c F v は唯一、すなわち、s c F v L 3 1 0 A / s c F v S 4 1 0 H であることが明らかにされた (第 1 図)。このクローンは、E L I S A で試験した場合に E G F R に強く結合しているようであった。ライブラリー間の交差混入を除去するために充分の考慮を行ったが、強く結合している E G F R クローンのわずかな混入を全て除外することは難しい。しかし、B a l b / c マウスの同血統繁殖的性質を考慮すると、同一の s c F v が二つの異なるライブラリーから独立して生じたということは可能である。

30

40

【 0 0 5 2 】

(3) E G F R への親和性および結合特異性の分析

50

抗原への良好な結合およびDNA配列における多様性に基づいて、リンパ節および脾臓ライブラリーに由来するいくつかのscFvをさらなる分析のために選択した。これらscFvを、精製EGFRへの結合、非関連抗体への結合およびEGFRを発現したあるいはしなかった腫瘍細胞系への結合に関してELISAを用いて分析した。陽性対照として、scFvをマウス425MAbから調製した(P1)。陰性対照として、scFvをリンパ節および脾臓ライブラリーから選択に先立って分離したファージ抗体から調製した(それぞれL1およびS1)。scFvの濃度は、ウェスタンブロットにおいて試験するscFvの希釈率と既知濃度の精製scFvの希釈率とを比較することによって決定した。

【0053】

scFvの精製EGFRへの結合をELISAによって試験して、その結果をプロットした(第2図)。scFvをEGFRへの結合によってランクづけすることが可能であった。これらランクは実験間で再現性があった。もっとも強くEGFRに結合したscFvは、リンパ節ライブラリーからのL2 1CおよびL3 10Aおよび脾臓ライブラリーからのS4 10Hであった。上記したように、scFv L3 10AおよびS4 10Hは同一のDNA配列を有する。二つのアミノ酸変異をV_H中およびV_L中にそれぞれ有するscFv S4 10Hとよく似ているscFv(S4 5A)は、S4 10Hよりも常に低いランクを示した。これに対して、L2 12BとL3 11D間に観察された配列の違いは結合に顕著な影響を及ぼさないようであった。分離されたscFvのうち、L2 8CおよびL2 11Cの二つだけがscFv 425よりも結合性に劣るようであった。

10

20

【0054】

scFvのプラスチックおよび非関連のタンパク質パネル(卵白アルブミン、鶏卵リゾチーム、チトクロームc、グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ、CBAアルブミンおよびBSA)への結合をELISAによって試験した。いずれのscFvもバックグランド以上の変化を示さなかった。

【0055】

scFvの三つの腫瘍細胞系への結合をELISAによって試験した。細胞系A431およびMDAMB468は、それぞれ外陰部および胸部から分離されたEGFRを有する腫瘍細胞である。陰性対照として、ガングリオシドを有する黒色腫細胞系であるSK-MEL-23を用いた。試験した10個のscFvのうち、四つのみが精製EGFRおよびEGFRを有する腫瘍細胞の双方に結合した(第5~8図、L2 12B、L3 11D、L2 11CおよびS4 2D)。SK-MEL-23細胞への結合は検出されなかった。この驚くべき結果にはいくつかの説明が可能である。一つは、免疫、選択およびELISAに使用されたEGFRが分泌されたEGFR関連タンパク質であるということが考えられる(Weber et al., Scinece, 224, 294, 1984)。このタンパク質は追加の17個のアミノ酸をC末端に有する(Guenther et al., J. Biol. Chem., 265, 22082, 1990)。

30

【0056】

scFvをこの17個のアミノ酸からなるペプチドへの結合に関してELISAによって試験したが、結合は観察されなかった。分泌されたEGFR関連タンパク質と腫瘍細胞表面のEGFRとに、立体配座またはグリコシル化配糖体の点で相違があることが可能である。

40

(4) scFvに由来するキメラ全抗体

二つのscFv(L3 11DおよびS4 2D)を、全抗体分子への変換のために選択した。マウスV_HおよびV_LをコードするDNAを、免疫グロブリンリーダー配列およびスプライスドナーシグナルをコードするDNA配列を含む中間ベクター中にクローニングした(第3図)。V_H中間ベクター中にクローニング部位を位置するということは、V_Hの最初の基をアスパラギン酸からグルタミン酸に変えることを意味した。中間ベクターから、リーダーおよびスプライスドナー配列にここで連結されたV_HおよびV_Lを含むDNAフラグメントを、ヒトガンマ-1定常部またはヒト定常部のいずれかをコードするDN

50

Aを含む哺乳動物細胞発現ベクター中にクローニングした(Maeda et al., Hum. Antibod. Hybridomas, 2, 124, 1991)。それぞれのキメラ抗体のために、重鎖および軽鎖発現ベクターをCOS細胞中に共トランスフェクトさせた。陽性対照として、細胞をまたキメラ425抗体をコードする重鎖および軽鎖発現ベクターを用いて共トランスフェクトさせた(Kettleborough et al., Protein Eng., 4, 773, 1991)。培地を細胞から集めて、存在する抗体の濃度および抗体のEGFRへの結合能を決定するためにELISAによって分析した(第4図)。抗体への最高結合の50%を達成するために要求される抗体濃度を比較すると、キメラS42D抗体はキメラ425抗体と同等にEGFRに結合した。しかし、キメラL311D抗体はキメラ425抗体の約4分の1程度にしかEGFRと結合しなかつた。キメラ425抗体の親和性は競合結合分析によって $1.9 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ と決定された(Kettleborough et al., Protein Eng., 4, 773, 1991)。これらの結果は、scFvを分析した以前のデータがscFv S42DおよびL311Dの双方がscFv 425よりもEGFRによく結合したことを示したことから驚きであった(第2図)。キメラL311DおよびS42D抗体のブロテインA精製試料を、還元および非還元条件下でSDS-PAGEによって分析した。キメラL311DおよびS42D抗体をまた、A431およびSK-MEL-23細胞への結合に関してフローサイトメトリーによって試験した。両キメラ抗体はEGFR発現A431細胞によく結合し、EGFR陰性SK-MEL-23細胞には結合しなかつた。

10

20

(5) 治療および診断的使用

本発明の抗体フラグメントおよび全抗体は、治療のためにヒト患者に投与することができる。したがって、本発明の目的は、活性組成分として上記および請求の範囲に記載の少なくとも一つの抗体または抗体フラグメントを、一つまたはそれ以上の薬剤学的に容認し得る担体、賦形剤または希釈剤とともに含んでなる薬剤調製物を提供することである。

【0057】

通常、本発明の抗体は静脈注射によってまたは非経口的に投与される。一般に、抗体フラグメントの投与量は、所望の腫瘍抑制および腫瘍溶解効果が得られるに十分な範囲の量である。投与量は、患者の年齢、状態、性別、病気の程度によって異なり、 $0.1 \text{ mg/kg} \sim 200 \text{ mg/kg}$ 、好ましくは $0.1 \text{ mg/kg} \sim 100 \text{ mg/kg}$ / 用量の範囲で1日1回またはそれ以上を1日または数日間投与することができる。

30

【0058】

非経口的投与のための調製物には、滅菌水溶液または非水溶液、懸濁液および乳濁液が含まれる。非水性溶媒の例としては、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油などの植物油、オレイン酸エチルなどの注射可能な有機エステルおよびこれらの目的に適した当業者に公知の他の溶媒があげられる。

【0059】

本発明の抗体は、生理学的に容認し得る担体を含む組成物において使用することができる。それら適当な担体の例としては、生理食塩水、PBS、リンゲル溶液または乳酸リンゲル溶液があげられる。保存剤および他の添加剤、例えば抗生物質、抗酸化剤およびキレート剤などを薬剤調製物に加えることも可能である。

40

【0060】

抗体(フラグメント)はまた、それらの細胞毒性を支持するために公知の方法によってIL-2などのサイトカインと抱合させることができる。

【0061】

本発明の薬剤調製物は、黒色腫、神経膠腫および癌腫、さらに循環系の腫瘍および固形腫瘍を含むあらゆる種類の腫瘍の治療に適している。

【0062】

診断目的のために、抗体は、例えば放射線不透過性染料と抱合させるかまたは放射線標

50

識することができる。好ましい標識法はロドゲン法 (l o d o g e n m e t h o d) である。好ましくは、診断目的の抗体は F (a b ')₂ または s c F v フラグメントとして投与される。これによってバックグランド差し引きが不要になるような優れた結果が得られる。

【実施例】

【0063】

[実施例 1] A 4 3 1 小胞

脱落膜小胞調製物を上記したように既述の方法 (C o h e n e t a l . , J . B i o l . C h e m . , 2 5 7 , 1 5 2 3 , 1 9 8 2 , Y e a t o n e t a l . , J . B i o l . C h e m . , 2 5 8 , 9 2 5 4 , 1 9 8 3) をいくらか修飾した方法によって得た。A 4 3 1 細胞を含む集密状態になったフラスコを、カルシウムおよびマグネシウムを含む P B S を用いて洗浄した。低張の P B S を加えてフラスコを 1 5 分間振盪した。次いで細胞を小胞化緩衝液 (1 0 0 m M N a C l , 5 0 m M N a₂ H P O₄ , 5 m M K C l , 0 . 5 m M M g S O₂ , p H 8 . 5) を用いて洗浄した。小胞化緩衝液を加えて、フラスコを室温および 3 7 °C で攪拌を続けた。次いで、緩衝液を金属スクリーンを通して氷中で 5 0 m l チューブに傾瀉して、1 5 0 × g で 4 °C で 5 分間遠心分離した。ペレットを除去して、上清を 3 9 , 0 0 0 r p m で 9 0 分間超遠心分離した。最終ペレットを 1 0 m M のヘプス緩衝液 (p H 7 . 4) に再懸濁させた。小胞からの E G F R を分析するために、試料を 9 容量のエタノールで沈殿させて、0 . 0 8 M トリス (p H 6 . 8) で再懸濁して、次いで、標準として M A b 4 2 5 を用いて、S D S - P A G E を行った。

【0064】

調製物のタンパク質含量を、標準物質として B S A を用いて 5 9 5 n m で測定する修飾クマシープラス法によって定量した。小胞からの E G F R を分析するために、試料を 9 容量のエタノールで沈殿させた (4 °C で一晩) 。ペレットをトリス (0 . 0 8 M , p H 6 . 8) を用いて再懸濁させて、次いで S D S - P A G E に供した (5 % スタッキングゲル、1 時間、3 5 m A ; 1 0 % 泳動ゲル、2 . 5 時間、4 0 m A) 。試料および標準物質について重複して行った。そのうちの一つをクマシーブルーで染色して、一方をニトロセルロースシート上ににじませて (1 2 V , 4 °C で 1 6 時間) 、マウス M A b 4 2 5 (抗 E G F R) およびアルカリホスファターゼと抱合させた抗マウス I g G 抗体で処理した。

【0065】

三つの培地をインビトロ免疫に用いた。培地 1 (M 1) 、培地 2 (M 2) および混合胸腺細胞培養培地 (M T C) である。M 1 は、5 0 m M 2 - メルカプトエタノールおよび 2 m M L - グルタミン (ギブコ) を添加した H L 1 (V e n t r e x L a b o r a t o r i e s , 米国) からなる。M 2 は、5 0 m M 2 - メルカプトエタノール、4 0 U / m l の I L - 2 (G e n z y m e) 、2 0 m g / m l アジュバントペプチド (シグマ) 、2 m M L - グルタミン、1 0 0 U / m l のペニシリン (ギブコ) 、1 0 0 m g / m l のストレプトマイシン (ギブコ) を添加した H L 1 からなる。4 % または 2 0 % の F C S (B i o l o g i c a l I n d u s t r i e s) を M 2 に加えた。M T C を V a u x (1) による記述のようにして調製した。簡単に述べると、3 週令の B a l b / c および C 5 7 / B L - 1 マウスの胸腺の単細胞懸濁液を、胸腺を滅菌 5 0 - メッシュスクリーンを加圧して通すことによって調製した。細胞懸濁液を集めて、H B S S 中で 2 回洗浄して、生細胞数をトリパンプルー排除試験によって決定した。次いで、胸腺細胞をそれぞれ 1 m l 当たり 2 . 5 × 1 0⁶ 個の胸腺細胞密度で 4 % F C S 、2 m M L - グルタミン、1 0 0 U / m l のペニシリンおよび 1 0 0 m g / m l のストレプトマイシンを含む H L 1 培地中で培養した。4 8 時間後、上清を回収して、0 . 2 2 m m のフィルターを通して濾過して、- 7 0 °C で保存した。

【0066】

非免疫 8 週令 B a l b / c マウス由来の脾臓細胞の懸濁液を胸腺細胞と同様にして得た。生存率をトリパンプルー排除試験によって決定した。

【0067】

10

20

30

40

50

【実施例2】 インビトロ免疫およびスクリーニング

インビトロ免疫において三つの培地を用いた。培地1 (M1)、培地2 (M2) および混合胸腺細胞培養培地 (MTC) である。M1は、50 mM 2-メルカプトエタノールおよび2 mM L-グルタミン (ギブコ) 添加 HL1 (Ventrex Laboratories、米国) からなる。M2は、50 mM 2-メルカプトエタノール、40 U/ml の IL-2 (Genzyme)、20 mg/ml アジュバントペプチド (シグマ)、2 mM L-グルタミン、100 U/ml のペニシリン (ギブコ)、100 mg/ml のストレプトマイシン (ギブコ) を添加した HL1 からなる。4% または 20% の FCS (Biological Industries) を M2 に加えた。MTC を Vaux (1) による記述のようにして調製した。簡単に述べると、3週令の Balb/c および C57/BL-1 マウスの胸腺の単細胞懸濁液を、胸腺を滅菌 50-メッシュスクリーンを加圧して通すことによって調製した。細胞懸濁液を集めて、HBSS 中で2回洗浄して、生細胞数をトリパンブルー排除試験によって決定した。次いで胸腺細胞をそれぞれ 1 ml 当たり 2.5×10^6 個の胸腺細胞密度で 4% FCS、2 mM L-グルタミン、100 U/ml のペニシリンおよび 100 mg/ml のストレプトマイシンを含む HL1 培地中で培養した。48時間後、上清を回収して、0.22 mm のフィルターを通して濾過して、-70 で保存した。

10

【0068】

非免疫8週令 Balb/c マウスからの脾臓細胞の懸濁液を胸腺細胞と同様にして得た。生存率をトリパンブルー排除試験によって決定した。

20

【0069】

3週令の Balb/c および C57/BL-1 マウスからの胸腺の単細胞懸濁液を、胸腺を滅菌 50-メッシュスクリーンを加圧して通すことによって得た。細胞懸濁液を集めて、HBSS 中で洗浄して、生細胞数をトリパンブルー排除試験によって決定した。次いで胸腺細胞をそれぞれ 1 ml 当たり 2.5×10^6 個の胸腺細胞密度で 4% FCS、2 mM L-グルタミン、100 U/ml のペニシリンおよび 100 mg/ml のストレプトマイシンを含む HL1 培地中で培養した。48時間後、上清を回収して、濾過して、保存した。

【0070】

非免疫8週令 Balb/c マウスからの脾臓細胞の懸濁液を胸腺細胞と同様にして得た。生存率をトリパンブルー排除試験によって決定した。

30

【0071】

インビトロ免疫を6ウェルプレート (Costar) 中で行った。3.5 ml の M1 培地 (50 μ M の 2-メルカプトエタノールおよび 2 mM L-グルタミン (ギブコ) を添加した HL1 培地 (Ventrex Laboratories、米国) からなる) 中に 10^7 個の脾臓細胞を含むウェルを、所望の濃度の EGFR を有する小胞とともにインキュベートした (37、5% CO₂)。EGFR を発現しない細胞からの小胞または PBS を対照ウェルに加えた。数時間後、4% または 10% の FCS (Biological Industries) を含む 3.5 ml の M2 培地 (50 μ M 2-メルカプトエタノール、40 U/ml の IL-2 (Genzyme)、20 μ g/ml アジュバントペプチド (シグマ)、2 mM の L-グルタミン、100 U/ml のペニシリン (ギブコ)、100 μ g/ml のストレプトマイシン (ギブコ) を添加した HL1 からなる) を各ウェルに加えた。いくつかの実験において、M2 を MTC 培地 (アジュバントペプチド (20 μ g/ml) および IL-2 (40 U/ml) を添加した混合胸腺細胞培養培地 (Vaux et al., 336, 36, 1988) に置き換えた (培養培地中の FCS、IL-2 および アジュバントペプチドの最終濃度は 50% 減少することを留意されたい)。細胞を同一条件で 72、96、120 または 144 時間インキュベートして、最終的に、細胞を特異的免疫グロブリンの存在に関して試験するか RNA 分離のために処理した。

40

【0072】

スクリーニングを精製抗原または A431 固定細胞を用いて行った。本質的には以前に

50

記述された方法 (Carroll et al., Hybridoma, 9, 81, 1990) をいくらか修飾した方法を用いた。簡単に述べると、滅菌 96 ウェルプレート (Nunc, Maxisorb) を精製 EGF R (2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、GD3 ガングリオシド (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) または RNase (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) の PBS 溶液で一晩被覆した。A431 細胞を抗原として用いた場合、細胞を 96 ウェルプレート中で集密状態になるまで培養して、0.1% のグルタルアルデヒドで固定した。インビトロ免疫されたリンパ球を洗浄して、2% FCS および 2 mM の L グルタミンを添加した HL1 培地中に 5×10^5 細胞 / ml に再懸濁させて、 1×10^5 個の細胞を各ウェルに加えて、48 時間インキュベートした (37、5% CO_2)。各グループとも 16 重複を行った。次いで 0.1% のツイーン 20 を含む PBS を用いて 5 回洗浄することによってリンパ球を除去した。特異的免疫グロブリンをペルオキシダーゼ標識したウサギ抗マウス免疫グロブリン (Dako) を用いて検出した (1 時間、37)。基質として、2, 2'-アジノ-ビス(3-エチルベンズ-チアゾリン-6-スルホン酸)-ジアンモニウム塩 (ABTS) (シグマ) のクエン酸塩-リン酸塩緩衝液溶液 (0.55 mg/ml) を用いた。

【0073】

[実施例 3] ライブラリー構築

三つのライブラリーを、A431 細胞で腹腔内免疫したマウスの脾臓から調製した RNA (Murthy et al., Arch. Biochem. Biophys., 252, 549, 1987)、精製 EGF R で肉腫に免疫したマウスの膝窩リンパ節から調製した RNA および A431 細胞でインビトロ免疫したマウス細胞から調製した RNA からそれぞれ構築した。第 1 鎖 cDNA を合成した。V_H および V_L 遺伝子を PCR 増幅して、組み立てた (Clackson et al., Nature, 352, 624, 1991)。PCR を用いて、NotI および SfiI 制限部位を追加して、scFv をファージミドベクター pHEN1 にクローニングした (Hoogenboom et al., Nucl. Acids Res., 4133, 19, 1991)。連結混合物を大腸菌に電気穿孔して、得られるコロニーを培地に掻き入れて、ライブラリーストックをつくった (Marks et al., J. Mol. Biol., 222, 581, 1991)。

【0074】

[実施例 4] ライブラリースクリーニング

ファージ抗体を、M13K07 ヘルパーファージ (Promega, Madison, ウィスコンシン) を用いてライブラリーから取り出した (Marks et al., J. Mol. Biol., 222, 581, 1991)。イムノチューブ (Nunc, Life Sciences, Paisley, 英国) を 4 ml の 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の EGF R の PBS 溶液で一晩被覆した。PBS で 3 回洗浄した後、チューブを 2% 粉乳を含む PBS (PBSPM) 中で 37 で少なくとも 1 時間インキュベートした。ファージ (10^{12} ~ 10^{13}) を 4 ml の PBSPM 中に再懸濁して、EGFR 被覆チューブ中で室温で 1 時間インキュベートした。チューブを PBS、0.1% ツイーンを用いて 20 回、PBS を用いて 20 回洗浄した。結合したファージを、1 ml の 0.1 M トリエチルアミン中で上下に混合しながら 10 分間インキュベートした後に溶出させた。溶出したファージを 0.5 ml の 1 M トリス塩酸 (pH 7.5) を加えて中和して、対数増殖期の大腸菌 TG1 細胞の感染に用いた。感染細胞をプレートにまいてコロニー形成させて、scFv の小規模誘導を示す個々のコロニーを拾いあげた。残りのコロニーを培地に掻き入れて、その液を用いて次の回のスクリーニングのためのファージを調製した。

【0075】

[実施例 5] scFv の産生および分析

可溶性 scFv を上述 (例えば、Kettleborough et al., 前出) のようにして大腸菌 HB2151 中で産生した。細菌培養上清中の scFv 濃度を、既知濃度の精製 scFv 調製物を標準として用いて推定した。上清を濾過して、アジ化ナトリウムを 0.1% 濃度で加えた。上清および標準液の一連希釈物をイモビロン-PVDF フ

フィルター (Millipore, Watford, 英国) 上に 96 ウェルマニホールドを用いて斑点づけした。フィルターをウェスタンブロット処理した (Towbin et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 76, 4350, 1979)。scFv を、C 末端目印に対する抗体 (9E10) (Munro and Pelham, Cell, 46, 291, 1986)、続いてペルオキシダーゼ抱合ヤギ抗マウス IgG および IgM 抗体 (Jackson ImmunoResearch Lab Inc., West Grove, ペンシルバニア) を用いて検出した。反応を、ECL システム (Amersham, Aylesbury, 英国) を用いて展開した。予めフラッシュをかけたラジオオートグラフをデンシトメーターを用いて走査した。標準曲線を作成して、上清中の scFv 濃度の推定に用いた。

10

【0076】

抗原結合 ELISA を、EGFR 被覆プレート (2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を用いて行った。scFv を含む上清を PBSM 中で希釈して、プレートに加えた。結合した scFv を上記のように 9E10 抗体を用いて検出した。また、上清を非関連タンパク質のパネルおよびプラスチックへの結合に関して試験した。ELISA プレートを、卵白アルブミン、卵リゾチーム、チトクローム c、グリセルアルデヒド 3 - リン酸ヒドロゲナーゼ、ネズミアルブミン (CBA 株) および BSA を用いて 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で一晩被覆した。2% 粉乳を含む非希釈上清を被覆プレートに二重に加えて、結合 scFv を上記のようにして検出した。

【0077】

細胞結合 ELISA を、腫瘍細胞系、A431 (ATCC CRL 1555)、MDA MB 468 (ATCC HTB 132) および SK-MEL-23 (陰性対照) を用いて行った。細胞を、ポリ-D-リジン処理した 96 ウェル組織培養トレイ (Nunc) 中で集密状態になるまで増殖させた。細胞を DMEM で洗浄して、2.5% BSA を含む PBS を用いて 37 で 2 時間ブロック処理した。吸引後、上清を 4% 粉乳を含む等量の 2xYT 培地とともに各ウェルに加えて、4 で 1 時間インキュベートした。結合した scFv を上記のようにして検出した。

20

【0078】

競合に基づく ELISA を、EGFR 被覆 ELISA プレートを 50 μl の精製 scFv (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) とともに 10 分間予備インキュベートすることによって行った。次いで、マウス MA b 425 (50 μl) を 3.13 ~ 200 ng/ml の濃度になるように加えた。インキュベートおよび洗浄の後、結合したマウス MA b 425 を、ペルオキシダーゼ抱合したヤギ抗マウス IgG および IgM 抗体を用いて検出した。

30

【0079】

[実施例 6] DNA 分析

BstNI フィンガープリント法のために、個々のクローンからの scFv 挿入物を PCR によって増幅させて、産物を BstNI で切断した (Clackson et al., Nature, 352, 624, 1991)。DNA をシンケナーゼキット (United States Biochemical, Cleveland, オハイオ) を用いて配列決定した。

40

【0080】

[実施例 7] scFv の精製

細菌培養上清を遠心分離および 0.2 μm フィルターを通す濾過によって清澄にした後、精製 EGFR (5 mg) をカップリングさせた 1 ml の臭化シアン - 活性化セファロース 4B (ファルマシア、ウプサラ、スウェーデン) カラム上に供した。カラムを 30 ml の PBS、次いで 5 ml の 0.2 M グリシン (pH 5.0) で洗浄した。scFv を 0.2 M グリシン / HCl (pH 2.8) で溶出した。溶出液を 10x PBS で中和した。タンパク質含有画分をプールして、緩衝液を限外濾過 (Amicon, Stonehouse, 英国) を用いて 1% BSA および 0.05% アジ化ナトリウムを含む PBS に交換した。

50

【0081】

[実施例8] 精製s c F vのF A C S分析

A 4 3 1細胞をトリプシン処理して、10% F C Sを含むD M E M中でインキュベートした。細胞を冷D M E Mで2回洗浄して、45 μ mスクリーンを通して濾過した。細胞(10⁶)を50 μ lのP B S、1% B S A中で精製s c F vとともに氷上で30分間インキュベートした。冷P B Sで2回洗浄した後、結合したs c F vを、50 μ lのF I T C - 抱合した9 E 1 0抗体(100 μ g / m l)を用いて検出した。氷上に30分間おいた後、細胞をP B Sで1回洗浄して、1%ホルムアルデヒドを含むP B S中で固定して、F A C S C A N (B e c t o n - D i c k i n s o n , C o w l e y、英国)を用いて分析した。

10

【0082】

[実施例9] 全キメラ抗体の構築、分析および発現

P s t IおよびB s t E I I部位を用いて、選択したs c F vのV HをコードするD N Aを、ヒト抗体H G 3 C Lに由来する真核細胞リーダー配列(R e c h a v i e t a l .、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A、8 0、8 5 5、1 9 8 3)およびスプライドナー部位を含む中間V_Hベクター中にサブクローニングした(第3図)。V_HをコードするD N Aを、P C Rプライマーを用いて中間V_Hベクターへの挿入のためにX h o IおよびS s t I部位を5' - および3' - 末端において組み入れるように改変した。

(V_H F o r : 5' - C C G T T T C A G C T C G A G C T T G G T C C C - 3')

20

V_H B a c k : 5' - G A C A T T G A G C T C A C C C A G T C T C C A - 3')

S s t I - X h o Iフラグメントを改変したヒトC A M P A T H - 1軽鎖(R i e c h m a n n e t a l .、N a t u r e、3 3 2、2 1、1 9 8 8)に由来する真核細胞リーダー配列およびスプライドナー部位を含む中間V_Hベクター中にクローニングした(第3図)。可変部プラス真核細胞フランキング領域をコードするD N Aを、ヒトガンマ-1定常部またはヒトカッパ定常部をコードするゲノムD N A(M a e d a e t a l .、H u m . A n t i b o d . H y b r i o d o m a s、2、1 2 4、1 9 9 1)を含む哺乳動物細胞発現ベクター中にH i n d I I I - B a m H Iフラグメントとしてクローニングした。重鎖および軽鎖発現ベクターを、C O S細胞に電気穿孔法で導入した。72時間後、培地を集めて、キメラ抗E G F R抗体をE L I S Aによって分析した(K e t t l e b o r o u g h e t a l .、P r o t e i n E n g .、4、7 7 3、1 9 9 1)。

30

【0083】

[実施例10] インビトロ免疫細胞に由来するs c F vの産生

以下に開示する方法は上記の方法をわずかに修飾したものである。免疫、ライブラリー構築およびスクリーニングは、実施例1~4に記述する。続くステップを以下に詳述する。

【0084】

プライマリーライブラリーおよび3回の選別に由来するクローンをスクリーニングした後、いくつかの単離アンピシリン耐性コロニーを選択した。ファージミドD N Aをアルカリ溶解によって調製して、非サプレッサー株の大腸菌H B 2 1 5 1に熱ショックによるトランスフェクションに用いた。コロニーを2 x T Y - A m p - G l u中に接種して、30で一晩増殖させた。その培養液5 m lを100 m g / m lのアンピシリンおよび0.1%のグルコースを含む2 x T Y液体培地50 m lの接種に用いて、37で1時間振盪しながら増殖させた(対数増殖期まで)。細胞を集めて、可溶性s c F vの発現をイソプロピル - D - チオガラクトピラノシド(I P T G)を最終濃度1 m Mになるように添加することによって誘導した(D e B e l l i s、D . a n d S c h w a r t z、I .、N u c l e i c A c i d s R e s .、1 8、1 3 1 1、1 9 9 0)。培養物を30で一晩振盪しながら増殖させた。s c F vを含む上清をとり、遠心分離および0.22 m mフィルターを通す濾過によって清澄にして、試験した。細菌培養上清をE G F Rへの結

40

50

合についてELISAによって記述された方法(Kettleborough et al., EP94104160, Eur. J. Immunol., 24, 952, 1994)にしたがって試験した。選択されたscFvフラグメントの特異性を、EGFR関連および非関連の種々のタンパク質および他の抗原およびプラスチックで被覆したプレートを用いてELISAによって調べた。用いた抗原は、RNase、BSA、OVA、GD₃、ガングリオシド、ビトロネクチンレセプター(VNR)、血小板糖タンパク質IIbIIIa(GPIIbIIIa)およびジシアリル-ラクト-N-テトラオース(DSLNT)であった。被覆は、各抗原の最適濃度で一晩行った。被覆したELISAプレートを、1.5%(w/v)脱脂乳PBS溶液を用いて37で1時間ブロックした。洗浄後、100μlのscFv上清をマイクロタイターウェルに加えて、37で2時間インキュベートした。結合したscFvを、抗c-myc抗体9E10(Myc1-9E10.2ハイブリッドからの使用済み培地)およびアルカリホスファターゼ抱合ウサギ抗マウス抗体(Dako)を用いて検出した。

【0085】

EGFRを有する三つの腫瘍細胞系、すなわちA431、MDAMB231ヒト乳腺癌腫(ATCC、HTB26)およびHT29ヒト結腸腺癌腫(ATCC、HTB38)、および一つの非発現性EGFR細胞系、WM164、を用いて、scFvの細胞上のEGFRへの結合能を中間FACS分析および非固定細胞を用いる免疫蛍光法によって試験した。間接免疫蛍光分析のために、細胞をテラサキプレートに入れて(2×10^4 個細胞/ウェル)、24時間培養した。次いで、細胞をscFvフラグメントを含む粗細菌培養上清20mlとともに室温で90分間インキュベートした。一次抗体(抗c-myc)および二次抗体とともに室温で60分間インキュベートした。二次抗体のFITC-抱合ウサギ抗マウス抗体(Dako)は1:20に希釈した。

【0086】

FACS分析のために、 5×10^5 個の細胞を1%BSAおよび0.1%アジ化ナトリウムを含むPBS(PBS-BSA)で洗浄して、50mlの粗細菌培養上清とともに4で20分間インキュベートした。冷PBS-BSAで2回洗浄した後、結合scFvを抗c-myc抗体およびPBS-BSA中で1:25に希釈したFITC-抱合ヤギ抗マウス抗体(Becton-Dickinson)を用いて検出した。ヨウ化プロピジウム(PI)を最終濃度5mg/mlになるように加えた。フローサイトメトリー分析を、空冷アルゴンレーザーを備えたEPICSプロフィールII中で行った。488nmの発振線(15mV)を励起に用いた。

【0087】

530nmバンドパスフィルターをFITC放出の収集に用い、625nmバンドパスフィルターをPI放出の収集に用いた。生細胞を前方および側部散布範囲にピットマップを設定することによっておよびPI染色細胞の排除によって選別した。

【0088】

プライマリーライブラリーと選択されたライブラリーの相違点を、クローニングしたフラグメントのPCR増幅(Guessow, D. Clackson, T., Nucleic Acids Res., 17, 4000, 1989)およびBstNI切断パターン(8)の分析によって決定した。いくつかのクローンをシークエナーゼキット(USB)を用いてジデオキシ鎖終結法(Sanger, F. et al., Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 74, 5463, 1977)によって配列決定した。

【0089】

粗細菌培養上清(10ml)を、12.5%ゲル使用のSDS-PAGEに供した。ウェスタンブロットを、本質的にはTowbin(Towbin et al., J. Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 76, 4350, 1979)による方法で行った。タンパク質を電気ブロッティングによってイモビロン-P(Millipore)またはニトロセルロース(Bio-Rad)に移した。ブロットを2%脱脂乳(w/v)を含むPBSによってブロックした。scFvフラグメントを、抗c-myc抗体(9

E10)、ペルオキシダーゼ-抱合抗マウス抗体(Jackson)および増強化学発光システム(ECL、Amersham)を用いて検出した。

【0090】

脱落膜小胞の定量分析によって、全タンパク質濃度2.5mg/mlのうち、わずかに10~14%、すなわち250~350ng/mlがEGFRに対応することが明らかになった(Sato et al., J. Natl. Cancer Inst., 21, 1601, 1989, Yeaton, R. et al., J. Biol. Chem., 258, 9254, 1983)。PAGE-SDSを用いる電気泳動分析とそれに続くクマシール染色によって、小胞がタンパク質のかなり複雑な混合物を含むことが示された。タンパク質分解は検出されなかった。ウェスタンブロット分析によって、本発明者らの実験条件下で、完全なEGFレセプター分子が膜小胞調製物中に存在することが明らかにされた。

10

【0091】

FCSおよびリンホカインの要求を決定するために、MTCおよび20%または4%のFCSを含むM2を比較した。EGFRおよびPBSを有する小胞を、それぞれ抗原と対照として用いた。脾臓細胞を6ウェルプレート中で抗原を添加してまたは添加せずにM1(無血清)中で3時間インキュベートした。次いで、MTCまたはM2を加えて、72、96、120または144時間後にA431固定細胞を用いてスクリーニングを行った。全実験において、回収された生細胞数は20~40%であって、公開された結果(Gavilondo-Cowley, J. et al., In Vitro Immunization in Hybridoma Technology, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, p. 131, 1988)と一致した。最高の特異的応答は、第4日にMTCを用いて得られた。一方、4%または20%(最終濃度は2%または10%)のFCSを含むM2は最高応答を第6日まで遅延させた(表2)。しかし、結果を特異的/非特異的応答比で表した場合に見られるように、MTCおよび10%FCSは非特異的応答をおそらくはポリクローナル活性化によって誘導した。さらなる分析のために、本発明者らは4%FCS添加M2および6日培養を用いることにした。

20

【0092】

小胞表面におけるEGFRの存在は、この抗原に対する応答を著しく増強した。上記と同様のプロトコールにおいて、発現および非発現EGFR細胞系からの小胞を比較した。リンパ球を小胞とともにM1中で3時間培養した。次いで、4%FCSを含むM2を加えた。6日後、各グループからのリンパ球を、EGFR、A431-固定細胞、RNaseまたはGD3で被覆した96ウェルプレート中で48時間培養した。予期されたように、これらの分析結果は応答の多特異性パターンを示した(表3)。EGFRに対する反応性は、EGFR発現小胞を抗原として用いた場合に吸光度として明らかに増加した。

30

【0093】

まとめると、これらの結果は、可変部のPCRクローニングに適するEGFRに対する免疫されたリンパ球のいくつかのプールを生じさせたインビトロ免疫の後に、未熟ではあるが測定可能な抗原依存性応答があったことを示唆する。

40

【0094】

1.1×10^5 個のクローンのライブラリーを、インビトロ免疫に由来するscFvフラグメントをpHEN1ファージミドにクローニングした後に得た。このライブラリーは、インビボ免疫によるさらに二つのライブラリーと平衡して得られた。これらファージライブラリーの構築については以前に記述がある(Kettleborough et al., EP94104160, Eur. J. Immunol., 24, 952, 1994)。

【0095】

EGFRに結合するscFvフラグメントを選択するために、ファージをEGFR被覆イムノチューブを用いて選別した。溶出したファージを大腸菌のSupE株の再感染に用

50

いた。全部で3回の選択を行った。それぞれの回において、抗原を含まないチューブの試験を平行して行い、バックグランドを算出した。1回目の選別において 1.5×10^{10} 個のファージ粒子をイムノチューブに供して、 6.6×10^4 個を被覆イムノチューブから溶出した。バックグランドからはわずかに200コロニーしか得られなかった。3回目の選別後では、 1×10^{11} ファージを供して、 5.6×10^{10} 個が溶出された。

【0096】

さらにs c F vフラグメントを特徴づけするために、発明者らはファージ集団から22クローンを、選別前、および各選別回後に選択した。

【0097】

ライブラリーの相違を、クローニングしたフラグメントのB s t N I切断パターンによって分析した。選別前、ライブラリーはきわめて相違しているようだった。最初の回の選別後に由来する結合クローンのフィンガープリントは、同一制限パターンを有するいくつかのグループの存在を示した。

10

【0098】

クローンを、それらの切断パターンに基づいて異なる選択回数のもので選んだ。DNA配列決定によって、選択クローンのほとんどにおいて異なる配列が存在することが明らかになった。

【0099】

クローン10D2、5D3、10E2、1B3、4B3および5E2の相補性決定領域(CDR)の長さおよび構成は異なっていた。ほとんどの違いは、 V_H および V_L 配列のCDR3において認められた。クローン5D3および1E3は、第3回目の選別に由来した。これらはELISAおよびフローサイトメトリーによる分析ではEGFRに強く結合し、同一の配列を有した。

20

【0100】

可溶性s c F vフラグメントを、IPTGの存在下での非サプレッサー大腸菌株HB2151の増殖によって得た。

【0101】

s c F v産生を確実にするために、個々のクローンからの細菌培養培地をゲル電気泳動によって分析した。ウェスタンブロット分析は、約35、000kDの明瞭なバンドを示した。

30

【0102】

EGFRへの結合活性を有するクローンを、ELISAで同定した。選択されたクローンの交差反応性を調べるために、異なる抗原を用いるELISAアッセイを行った。抗原(EGFR、RNaase、BSA、KLH、OVA、GD₃ガングリオシド、ビトロネクチンレセプター、血小板糖タンパク質IIbIIIaおよびジシアリル-ラクト-N-テトラオース)を最適濃度でELISAプレートに被覆した(表4)。非EGFR抗原への結合は検出されなかった。s c F vをまた、EGFRを有する三つの腫瘍細胞系(ヒト上皮性癌腫A431、ヒト乳腺腫MDAMB231およびヒト結腸腺腫HT29)への結合に関して試験した。WM164ヒト黒色腫非発現EGFRを陰性対照として用いた。腫瘍細胞系に結合したものを、非固定細胞を用いる間接免疫蛍光法によって試験して、FACS分析によって定量した。非固定細胞の使用によって、膜レセプターの天然構造が確かになる。陽性クローンは、A431細胞を用いて明瞭な蛍光を示した。EGFRを有する他の腫瘍細胞系の蛍光は、弱かった。陰性細胞系への結合は検出されなかった。結果は、フローサイトメトリーによって確認された。17の陽性クローンおよび三つの陰性クローンをA431、MDAMB231およびHT29細胞への結合に関してフローサイトメトリーによって分析した。WM164を陰性細胞系として用いた。

40

【0103】

425s c F v(P1クローン)を陽性対照として、クローニングベクター(HEN)を陰性対照として用いた。結果を表5に要約する。二つのクローン、4B2および5E2はELISAの分析でEGFRとの結合に関して陽性であったが、EGFR発現腫瘍細胞

50

系との結合に関しては陰性であった。

【0104】

【表2】

表2 異なる培地のインビトロ免疫への影響^{a)}

		A431に対するスクリーニング日数							
		3日目		4日目		5日目		6日目	
アッセイ	抗原	O.D. ^{c)}	比 ^{d)}	O.D.	比	O.D.	比	O.D.	比
1	小胞	0.393	2.11	0.801	3.76	0.784	3.90	0.951	10.3
	PBS	0.186		0.213		0.201		0.092	
2	小胞	0.527	2.50	0.852	1.76	0.863	2.75	1.168	3.94
	PBS	0.210		0.482		0.313		0.296	
3	小胞	0.763	1.48	1.169	2.01	1.089	2.07	1.115	1.91
	PBS	0.513		0.581		0.525		0.581	

10

【0105】

アッセイ1：M1プラスM2、4% FCS（最終FCS：2%）

アッセイ2：M1プラスM2、20% FCS（最終FCS：10%）

アッセイ3：A培地プラスMTC、4% FCS（最終FCS：2%）

20

a) BALB/cマウス脾臓細胞（ 10^7 ）を、3.5mlのM1中で、A431細胞由来の小胞またはPBSとともに6ウェルプレート中で3時間インキュベートした。その後、4%または20%のFCSを含むMTCまたはM2を3.5mlを加えて、プレートをインキュベートした。3、4、5または6日目に、インビトロ免疫したリンパ球を培養培地から除去して、HBSs中で洗浄して、小胞を除去して、固定A431細胞で被覆した96ウェルプレートにまいて、48時間インキュベートした。（方法を参照のこと）

b) 培養培地中におけるFCSの最終濃度

c) O.D. 405nmにおける吸光度。16ウェルの平均値を表す。

【0106】

d) 特異的応答（小胞を抗原として）/非特異的応答（PBSを抗原として）の比。

30

【0107】

【表3】

表3 インビトロ免疫後の応答の多特異性^{a)}

	抗原グループ	スクリーニング対象抗原			
		A431細胞	EGFR	GD3	RNase
アッセイ1	EGFR+	0.512 ^{b)}	0.326	0.140	0.249
	EGFR-	0.427	0.070	0.123	0.304
アッセイ2	EGFR+	1.430	0.730	0.233	0.670
	EGFR-	0.789	0.195	0.118	0.561

40

【0108】

a) リンパ球をEGFR発現小胞（EGFR+）またはEGFR非発現小胞（EGFR-）のいずれかを用いて、インビトロ免疫した。6日間のインキュベーションの後、細胞を培養液から除去して、上記の抗原に対して、スクリーニングした。

【0109】

b) 応答を吸光度（405nm）として表す。

【0110】

50

【表 4】

表 4 選択された s c F v フラグメントの種々の抗原に対する交差反応性^{a)}

抗原 ^{b)}	被覆 (mg/ml)	結果
EGFR	2.5	+
RNase	10	-
BSA	10	-
KLH	10	-
OVA	10	-
GD3 ガングリオシド	2	-
VNR	1	-
GP II b III a	1	-
DSLNT	5	-

10

【0111】

a) ELISA アッセイは、上述のように行った。

【0112】

b) ビトロネクチンレセプター (VNR) ; 血小板糖タンパク質 II b III a (GP II b III a) ; ジシアリル - ラクト - N - テトラオース (DSLNT)。

【0113】

20

【表 5】

表5 s c F v クロンの E G F R に対する反応性。

精製可溶性抗原を用いた E L I S A 法と、細胞系のサイトメトリー分析との対比結果。

クローン	腫瘍細胞系のサイトメトリー分析 ^(a) (任意の蛍光単位の平均値)				ELISA(O.D.)
	WM164	A431	MDAAMB231	HT29	EGFR
陽性					
7 H 1	1.5	112.9	16.4	2.6	1.2
4 B 2	1.2	5.3	4.2	0.6	2
1 0 D 2	1.5	145.3	36.3	4.8	2
1 2 D 2	1.8	129.5	29.3	5.7	2
5 E 2	1.4	2.5	7.1	0.5	1.8
8 E 2	1.5	134.5	47.7	5.1	1.9
5 F 2	1.3	146.3	40.6	5.7	1.9
1 1 H 2	1.9	152.2	25.3	2	1.9
1 B 3	0.6	105.1	36.4	5.2	>2
4 B 3	0.5	78	15.8	2.3	2
3 d 3	1.2	94.3	25.1	4.8	1.9
5 D 3	0.5	112	22.2	5.5	>2
4 F 3	0.4	110.3	32.3	6.2	>2
4 G 3	0.4	76.5	20.4	2	>2
1 E 3	0.4	118.4	33.8	5.1	2
3 H 3	0.6	76.5	33.7	4.2	>2
陰性					
5 F 1	2.4	2.3	3.6	1.8	0.2
7 G 1	1.4	10.2	4	2.8	0.2
1 H 1	0.5	5	4	0.75	0.2
対照 ^(b)					
H E N	0.4	4.1	3.7	1	0.2
P 1	0.6	85.5	21.3	2.5	1.9

10

20

30

【0114】

a) 上述するように、E G F R を有する三つの細胞系 (A 4 3 1、M D A A M B 2 3 1 および H T 2 9) および一つの非発現細胞系 (W M 1 6 4) を用いて、サイトメトリー分析によって s c F v の腫瘍細胞計への結合能のアッセイを行った。

【0115】

b) フラクメントのないベクター (H E N) および 4 2 5 M A b 由来の s c F V フラグメント (P I) を、それぞれ陰性および陽性対照として用いた。

【0116】

【表 8】

(ii)	MOLECULE TYPE: cDNA	
(iii)	HYPOTHETICAL: NO	
(iv)	ANTI-SENSE: NO	
(v)	FRAGMENT TYPE: N-terminal	
(vi)	ORIGINAL SOURCE:	
	(A) ORGANISM: mouse	
	(B) STRAIN: Balb/c	
	(D) DEVELOPMENTAL STAGE: adult	10
	(F) TISSUE TYPE: Lymph Node	
(vii)	IMMEDIATE SOURCE:	
	(B) CLONE: L2 11C (heavy chain)	
(ix)	FEATURE:	
	(A) NAME/KEY: CDS	
	(B) LOCATION:1..357	
(xi)	SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 3:	
CAG GTG CAA CTG CAG GAG TCA GGG CCT GAG CTG GTG AGG CCT GGG GCT	48	
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala		
110 115 120 125		20
TCA GTG AAG ATG TCC TGC AAG GCT TCA GGC TAT ACC TTC ACT ACC TAC	96	
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr		
130 135 140		
TGG ATA CAC TGG ATG AAA CAG AGG CCT GGA CAA GGC CTT CAG TGG ATT	144	
Trp Ile His Trp Met Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Gln Trp Ile		
145 150 155		
GGC ATG ATT GAT CCT TCC AAT AGT GAA ACT AGG TTA AAT CAG AAT TTC	192	
Gly Met Ile Asp Pro Ser Asn Ser Glu Thr Arg Leu Asn Gln Asn Phe		
160 165 170		
AGG GAC AAG GCC ACA TTG AGT GTA GAC AAA TCC TCC AAT AAA GCC TAC	240	
Arg Asp Lys Ala Thr Leu Ser Val Asp Lys Ser Ser Asn Lys Ala Tyr		30
175 180 185		
ATG CAG CTC AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCA ATC TAT TAC TGT	288	
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys		
190 195 200 205		
GCA AGA TGG GAC TAC GGT AGT GGC CAC TTT GAC TAC TGG GGC CAA GGG	336	
Ala Arg Trp Asp Tyr Gly Ser Gly His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly		
210 215 220		
ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA	357	
Thr Thr Val Thr Val Ser Ser		
225		40
(2)	INFORMATION FOR SEQ ID NO: 4:	
(i)	SEQUENCE CHARACTERISTICS:	
	(A) LENGTH: 119 amino acids	
	(B) TYPE: amino acid	
	(D) TOPOLOGY: linear	
(ii)	MOLECULE TYPE: protein	
(xi)	SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 4:	

【表 9】

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
 20 25 30
 Trp Ile His Trp Met Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Gln Trp Ile
 35 40 45
 Gly Met Ile Asp Pro Ser Asn Ser Glu Thr Arg Leu Asn Gln Asn Phe
 50 55 60
 Arg Asp Lys Ala Thr Leu Ser Val Asp Lys Ser Ser Asn Lys Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Trp Asp Tyr Gly Ser Gly His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 5:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 339 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

20

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(v) FRAGMENT TYPE: N-terminal

(vi) ORIGINAL SOURCE:

- (A) ORGANISM: mouse
 (B) STRAIN: Balb/c
 (D) DEVELOPMENTAL STAGE: adult
 (F) TISSUE TYPE: Lymph node

30

(vii) IMMEDIATE SOURCE:

- (B) CLONE: L2 12B (light chain)

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: CDS
 (B) LOCATION:1..339

40

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 5:

GAC ATT GAG CTC ACC CAG TCT CCA GCT TCT TTG GCT GTG TCT CTA GGG 48
 Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 120 125 130 135
 CAG AGG GCC ACC ATC TCC TGC AGA GCC AGC GAA AGT GTT GAT AAT TTT 96
 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Phe
 140 145 150

【表 1 0】

GGC	ATT	AGT	TTT	ATG	AAC	TGG	TTC	CAA	CAG	AAA	CCA	GGA	CAG	CCA	CCC	144
Gly	Ile	Ser	Phe	Met	Asn	Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro	
			155					160					165			
AAA	CTC	CTC	ATC	TAT	GGT	GCA	TCC	AAC	CAA	GGA	TCC	GGG	GTC	CCT	GCC	192
Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Asn	Gln	Gly	Ser	Gly	Val	Pro	Ala	
		170					175					180				
AGG	TTT	AGT	GGC	AGT	GGG	TCT	GGG	ACA	GAC	TTC	AGC	CTC	AAC	ATC	CAT	240
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Ser	Leu	Asn	Ile	His	
	185					190					195					
CCT	CTG	GAG	GAG	GAT	GAT	ACT	GCA	ATG	TAT	TTC	TGT	CAG	CAA	AGT	AAG	288
Pro	Leu	Glu	Glu	Asp	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Ser	Lys	
200					205				210						215	
GAG	GTT	CCG	CTC	ACG	TTC	GGT	GCT	GGG	ACC	AAG	CTG	GAA	ATA	AAA	CGG	336
Glu	Val	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	
				220					225					230		
GCG																339
Ala																

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 6:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 113 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear

- (ii) MOLECULE TYPE: protein
 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 6:

Asp	Ile	Glu	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Leu	Gly	
1				5					10					15		
Gln	Arg	Ala	Thr	Ile	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu	Ser	Val	Asp	Asn	Phe	
			20					25					30			
Gly	Ile	Ser	Phe	Met	Asn	Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro	
		35					40					45				
Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Asn	Gln	Gly	Ser	Gly	Val	Pro	Ala	
	50					55					60					
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Ser	Leu	Asn	Ile	His	
65					70				75						80	
Pro	Leu	Glu	Glu	Asp	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Ser	Lys	
				85					90					95		
Glu	Val	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	
			100					105					110			
Ala																

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 7:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 357 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

【 0 1 2 1 】

【表 1 1】

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(v) FRAGMENT TYPE: N-terminal

(vi) ORIGINAL SOURCE:
 (A) ORGANISM: mouse
 (B) STRAIN: Balb/c
 (D) DEVELOPMENTAL STAGE: adult
 (F) TISSUE TYPE: Lymph node 10

(vii) IMMEDIATE SOURCE:
 (B) CLONE: L2 12B (heavy chain)

(ix) FEATURE:
 (A) NAME/KEY: CDS
 (B) LOCATION:1..357

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 7:

CAG GTG CAG CTG CAG GAG TCT GGA CCT GAG CTG GTG AAG CCT GGG GCT	48	
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala		20
115 120 125		
TTA GTG AAG ATA TCC TGC AAG GCT TCT GGT TAC ACC TTC ACC AGC TAC	96	
Leu Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr		
130 135 140 145		
TGG ATG CAC TGG GTG AAG CAG AGG CCT GGA CAA GGC CTT GAG TGG ATC	144	
Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile		
150 155 160		
GGA GAG ATT GAT CCT TCT GAT AGT TAT ACT AAC TAC AAT CAA AAG TTC	192	
Gly Glu Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe		
165 170 175		
AAG GGC AAG GCC ACA TTG ACT GTA GAC AAA TCC TCC AAC ACA GCC TAC	240	30
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr		
180 185 190		
ATG CAG CTC AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCG GTC TAT TAC TGT	288	
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys		
195 200 205		
GCA AGA TCG GAC TAC GGT AGT AGC CAC TTT GAC TAC TGG GGC CAA GGG	336	
Ala Arg Ser Asp Tyr Gly Ser Ser His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly		
210 215 220 225		
ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA	357	
Thr Thr Val Thr Val Ser Ser		40
230		

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 8:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 119 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear

【 0 1 2 2 】

【表 1 2】

- (ii) MOLECULE TYPE: protein
 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 8:

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Leu Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Asp Tyr Gly Ser Ser His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

10

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 9:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 339 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: cDNA
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iv) ANTI-SENSE: NO
- (v) FRAGMENT TYPE: N-terminal
- (vi) ORIGINAL SOURCE:
 (A) ORGANISM: mouse
 (B) STRAIN: Balb/c
 (D) DEVELOPMENTAL STAGE: adult
 (F) TISSUE TYPE: Lymph node
- (vii) IMMEDIATE SOURCE:
 (B) CLONE: L3 11D (light chain)
- (ix) FEATURE:
 (A) NAME/KEY: CDS
 (B) LOCATION:1..339
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 9:

30

40

GAC ATT GAG CTC ACC CAG TCT CCA GCT TCT TTG GCT GTG TCT CTA GGG 48
 Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 120 125 130 135
 CAG AGG GCC ACC ATC TCC TGC CGA GCC AGC GAA AGT GTT GAT AAT TTT 96
 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Phe
 140 145 150 155

【 0 1 2 3】

【表 1 3】

GGC ATT AGT TTT ATG AAC TGG TTC CAA CAG AAA CCA GGA CAG CCA CCC	144
Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro	
155 160 165	
AAA CTC CTC ATC TAT GGT GCA TCC AAC CAA GGA TCC GGG GTC CCT GCC	192
Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ala	
170 175 180	
AGG TTT AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC AGC CTC AAC ATC CAT	240
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile His	
185 190 195	
CCT TTG GAG GAG GAT GAT ACT GCA ATG TAT TTC TGT CAG CAA AGT AAG	288
Pro Leu Glu Glu Asp Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys	
200 205 210 215	
GAG GTT CCG CTC ACG TTC GGT GCT GGG ACC AAG CTG GAG CTG AAA CGG	336
Glu Val Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg	
220 225 230	
GCG	339
Ala	

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 10:

20

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 113 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 10:

Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly	
1 5 10 15	
Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Phe	
20 25 30	
Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro	
35 40 45	
Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ala	
50 55 60	
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile His	
65 70 75 80	
Pro Leu Glu Glu Asp Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys	
85 90 95	
Glu Val Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg	
100 105 110	
Ala	

30

40

【 0 1 2 4】

【表 1 4】

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 11:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 357 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(v) FRAGMENT TYPE: N-terminal

- (vi) ORIGINAL SOURCE:
 (A) ORGANISM: mouse
 (B) STRAIN: Balb/c
 (D) DEVELOPMENTAL STAGE: adult
 (F) TISSUE TYPE: Lymph node

(vii) IMMEDIATE SOURCE:
 (B) CLONE: L3 11D (heavy chain)

- (ix) FEATURE:
 (A) NAME/KEY: CDS
 (B) LOCATION:1..357

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 11:

GAG	GTG	CAG	CTG	CAG	CAG	TCA	GGG	GCT	GAG	CTT	GTG	AAG	CCT	GGG	GCT	48
Glu	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala	
	115						120				125					
TCA	GTG	AAG	CTG	TCC	TGC	AAG	GCT	TCT	GGC	TAC	ACC	TTC	ACC	AGC	TAC	96
Ser	Val	Lys	Leu	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr	
	130				135					140					145	
TGG	ATG	CAC	TGG	GTG	AAG	CAG	AGG	CCT	GGA	CAA	GGC	CTT	GAG	TGG	ATC	144
Trp	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	
				150					155					160		
GGA	GAG	ATT	GAT	CCT	TCT	GAT	AGT	TAT	ACT	AAC	TAC	AAT	CAA	AAG	TTC	192
Gly	Glu	Ile	Asp	Pro	Ser	Asp	Ser	Tyr	Thr	Asn	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	
			165					170					175			
AAG	GGC	AAG	GCC	ACA	TTG	ACT	GTA	GAC	AAA	TCC	TCC	AGC	ACA	GCC	TAC	240
Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	
		180					185					190				
ATG	CAG	CTC	AGC	AGC	CTG	ACA	TCT	GAG	GAC	TCT	GCG	GTC	TAT	TAC	TGT	288
Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
	195					200					205					
GCA	AGA	TCG	GAC	TAC	GGT	AGT	AGC	CAC	TTT	GAC	TAC	TGG	GGC	CAA	GGG	336
Ala	Arg	Ser	Asp	Tyr	Gly	Ser	Ser	His	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	
	210				215					220					225	
ACC	ACG	GTC	ACC	GTC	TCC	TCA										357
Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser										
				230												

10

20

30

40

【 0 1 2 5 】

【表 1 6】

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 13:

GAC	ATT	GAG	CTC	ACC	CAG	TCT	CCA	ACC	ACC	ATG	GCT	GCA	TCT	CCC	GGG	48	
Asp	Ile	Glu	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Thr	Thr	Met	Ala	Ala	Ser	Pro	Gly		
120					125					130					135		
GAG	AAG	ATC	ACT	ATC	ACC	TGC	AGT	GCC	AGC	TCA	AGT	ATA	AGT	TCC	AAT	96	
Glu	Lys	Ile	Thr	Ile	Thr	Cys	Ser	Ala	Ser	Ser	Ser	Ile	Ser	Ser	Asn		
				140					145						150		
TAC	TTG	CAT	TGG	TAT	CAG	CAG	AAG	CCA	GGA	TTC	TCC	CCT	AAA	CTC	TTG	144	
Tyr	Leu	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Phe	Ser	Pro	Lys	Leu	Leu		10
			155					160						165			
ATT	TAT	AGG	ACA	TCC	AAT	CTG	GCT	TCT	GGA	GTC	CCA	GCT	CGC	TTC	AGT	192	
Ile	Tyr	Arg	Thr	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser		
		170					175						180				
GGC	AGT	GGG	TCT	GGG	ACC	TCT	TAC	TCT	CTC	ACA	ATT	GGC	ACC	ATG	GAG	240	
Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Ser	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Gly	Thr	Met	Glu		
	185					190					195						
GCT	GAA	GAT	GTT	GCC	ACT	TAC	TAC	TGC	CAG	CAG	GGT	AGT	AGT	ATA	CCA	288	
Ala	Glu	Asp	Val	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Gly	Ser	Ser	Ile	Pro		
200					205					210					215		
CGC	ACG	TTC	GGA	GGG	GGC	ACC	AAG	CTG	GAA	ATC	AAA	CGG				327	20
Arg	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg					
				220					225								

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 14:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 109 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 14:

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

【 0 1 2 7 】

【表 1 7】

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 15:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 354 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: cDNA
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iv) ANTI-SENSE: NO
- (v) FRAGMENT TYPE: N-terminal
- (vi) ORIGINAL SOURCE:
 (A) ORGANISM: mouse
 (B) STRAIN: Balb/c
 (D) DEVELOPMENTAL STAGE: adult
 (F) TISSUE TYPE: Lymph node
- (vii) IMMEDIATE SOURCE:
 (B) CLONE: S4 2D (heavy chain)
- (ix) FEATURE:
 (A) NAME/KEY: CDS
 (B) LOCATION:1..354

10

20

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 15:

GAG	GTC	AAG	CTG	CAG	CAG	TCA	GGA	CCT	GAG	CTG	GTA	AAG	CCT	GGG	GCT	48
Glu	Val	Lys	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala	
110				115					120					125		
TCA	GTG	AAG	ATG	TCC	TGC	AAG	GCT	TCT	GGA	TAC	GCA	TTC	ATA	AGT	TTT	96
Ser	Val	Lys	Met	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ala	Phe	Ile	Ser	Phe	
			130						135					140		
GTT	ATG	CAC	TGG	GTG	AAG	CAG	AAG	CCT	GGG	CAG	GGC	CTT	GAG	TGG	ATT	144
Val	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	
			145					150					155			
GGA	TTT	ATT	AAT	CCT	TAC	AAT	GAT	GGT	ACT	AAG	TAC	AAT	GAG	AAG	TTC	192
Gly	Phe	Ile	Asn	Pro	Tyr	Asn	Asp	Gly	Thr	Lys	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe	
		160					165					170				
AAA	GAC	AAG	GCC	ACA	CTG	ACT	TCA	GAC	AAA	TCC	TCC	AGC	ACA	GCC	TAC	240
Lys	Asp	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ser	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	
		175					180					185				
ATG	GAG	CTC	AGC	AGC	CTG	ACC	TCT	GAG	GAC	TCT	GCG	GTC	TAT	TAC	TGT	288
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
190					195				200						205	
GCA	AGT	GGG	GAT	TAC	GAC	AGG	GCT	ATG	GAC	TAC	TGG	GGC	CAA	GGG	ACC	336
Ala	Ser	Gly	Asp	Tyr	Asp	Arg	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	
			210						215					220		
ACG	GTC	ACC	GTC	TCC	TCA											354
Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser											
			225													

40

【 0 1 2 8 】

【表 19】

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 17:

GAG Glu 120	GTG Val	AAG Lys	CTG Leu	CAG Gln	GAG Glu	TCT Ser	GGG Gly	GGA Gly	GAC Asp	TTA Leu	GTG Val	AAG Lys	CCT Pro	GGA Gly	GGG Gly	48	
TCC Ser 135	CTG Leu	AAA Lys	CTC Leu	TCC Ser	TGT Cys	GCA Ala	GCC Ala	TCT Ser	GGA Gly	TTC Phe	ACT Thr	TTC Phe	AGT Ser	AGC Ser	TAT Tyr	96	
GGC Gly	ATG Met	TCT Ser	TGG Trp	GTT Val	CGG Arg	CAG Gln	ACT Thr	CCA Pro	GAC Asp	AAG Lys	AGG Arg	CTG Leu	GAG Glu	TCT Ser	GTC Val	144	10
GCA Ala	ACC Thr	ATT Ile	AGT Ser	AGT Ser	GGT Gly	GGT Gly	GCT Ala	TAC Tyr	ATC Ile	TAC Tyr	TAT Tyr	CCA Pro	GAC Asp	AGT Ser	GTG Val	192	
AAG Lys	GGG Gly	CGA Arg	TTC Phe	ACC Thr	ATC Ile	TCC Ser	AGA Arg	GAC Asp	AAT Asn	GCC Ala	AAG Lys	AAC Asn	ACC Thr	CTG Leu	TAC Tyr	240	
CTG Leu	CAA Gln	ATG Met	AGC Ser	AGT Ser	CTG Leu	AAG Lys	TCT Ser	GAG Glu	GAC Asp	ACA Thr	GCC Ala	ATG Met	TAT Tyr	TAC Tyr	TGT Cys	288	20
GCA Ala	AGA Arg	CTT Leu	GAA Glu	ACC Thr	GGG Gly	GAC Asp	TAT Tyr	GCT Ala	TTG Leu	GAC Asp	TAC Tyr	TGG Trp	GGC Gly	CAA Gln	GGG Gly	336	
ACC Thr	ACG Thr	GTC Val	ACC Thr	GTC Val	TCC Ser	TCA Ser	GGT Gly	GGC Gly	GGT Gly	GGC Gly	TCG Ser	GGC Gly	GGT Gly	GGT Gly	GGG Gly	384	
TCG Ser	GGT Gly	GGC Gly	GGC Gly	GGA Gly	TCT Ser	GAC Asp	ATT Ile	GAG Glu	CTC Leu	ACC Thr	CAG Gln	TCT Ser	CCA Pro	GCT Ala	TCT Ser	432	
TTG Leu	GCT Ala	GTC Val	TCT Ser	CTA Leu	GGG Gly	CAG Gln	AGG Arg	GCC Ala	ACC Thr	ATA Ile	TTC Phe	TGC Cys	AAG Lys	GAC Asp	AGC Ser	480	30
CAA Gln	AGT Ser	GTT Val	GAT Asp	TAT Tyr	GAT Asp	GGT Gly	GAT Asp	AGT Ser	TAT Tyr	ATG Met	AAC Asn	TGG Trp	TAC Tyr	CAA Gln	CAG Gln	528	
AAA Lys	CCA Pro	GGA Gly	CAG Gln	CCA Pro	CCC Pro	AAA Lys	CTC Leu	CTC Leu	ATC Ile	TAT Tyr	GCT Ala	CGA Arg	TCC Ser	AAT Asn	CTA Leu	576	
GAA Glu	TCT Ser	GGG Gly	GTC Val	CCT Pro	GCC Ala	AGG Arg	TTT Phe	AGT Ser	GGC Gly	AGT Ser	GGG Gly	TCT Ser	GGG Gly	ACA Thr	GAC Asp	624	
TTC Phe	AGC Ser	CTC Leu	AAC Asn	ATC Ile	CAT His	CCT Pro	GTG Val	GAG Glu	GAG Glu	GAT Asp	GAT Asp	ATT Ile	GCA Ala	ATG Met	TAT Tyr	672	40
TTC Phe	TGT Cys	CAG Gln	CAA Gln	AGT Ser	AGG Arg	AAG Lys	GTT Val	CCG Pro	TGG Trp	TCG Ser	TTC Phe	GGT Gly	GGA Gly	GGG Gly		717	

【 0 1 3 0 】

【表 2 1】

(iii)	HYPOTHETICAL:	NO														
(iv)	ANTI-SENSE:	NO														
(vi)	ORIGINAL SOURCE:															
	(A) ORGANISM:	mouse														
	(B) STRAIN:	Balb/c														
	(F) TISSUE TYPE:	splenocytes														
(vii)	IMMEDIATE SOURCE:															
	(B) CLONE:	10 D 2 (single-chain Fv, heavy and light chain plus linker)		10												
(ix)	FEATURE:															
	(A) NAME/KEY:	CDS														
	(B) LOCATION:	1..732														
(xi)	SEQUENCE DESCRIPTION:	SEQ ID NO: 19:														
GAG	GTG	CAG	CTG	CAG	CAG	TCT	GGG	GCT	GAA	CTG	GTG	AAG	CCT	GGG	GCT	48
Glu	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala	
240					245					250					255	
TCA	GTG	AAG	TTG	TCC	TGC	AAG	GCT	TCC	GGC	TAC	ACC	TTC	ACC	AGC	CAC	96
Ser	Val	Lys	Leu	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	His	
				260					265						270	20
TGG	ATG	CAC	TGG	GTG	AAG	CAG	AGG	GCT	GGA	CAA	GGC	CTT	GAG	TGG	ATC	144
Trp	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Ala	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	
			275					280						285		
GGA	GAG	TTT	AAT	CCC	AGC	AAC	GGC	CGT	ACT	AAC	TAC	AAT	GAG	AAA	TTC	192
Gly	Glu	Phe	Asn	Pro	Ser	Asn	Gly	Arg	Thr	Asn	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe	
		290					295					300				
AAG	AGC	AAG	GCC	ACA	CTG	ACT	GTA	GAC	AAA	TCC	TCC	AGC	ACA	GCC	TAC	240
Lys	Ser	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	
	305					310					315					
ATG	CAA	CTC	AGC	AGC	CTG	ACA	TCT	GAG	GAC	TCT	GCG	GTC	TAT	TAC	TGT	288
Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
320					325					330					335	30
GCC	AGT	CGG	GAC	TAT	GAT	TAC	GAC	GGA	CGG	TAC	TTT	GAC	TAC	TGG	GGC	336
Ala	Ser	Arg	Asp	Tyr	Asp	Tyr	Asp	Gly	Arg	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	
			340					345						350		
CAA	GGG	ACC	ACG	GTC	ACC	GTC	TCC	TCA	GGT	GGC	GGT	GGC	TCG	GGC	GGT	384
Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	
			355				360						365			
GGT	GGG	TCG	GGT	GGC	GGC	GGA	TCT	GAC	ATT	GAG	CTC	ACC	CAG	TCT	CCA	432
Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Glu	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	
		370					375					380				40
GCA	ATC	ATG	TCT	GCA	TCT	CCA	GGG	GAG	AAG	GTC	ACC	ATG	ACC	TGC	AGT	480
Ala	Ile	Met	Ser	Ala	Ser	Pro	Gly	Glu	Lys	Val	Thr	Met	Thr	Cys	Ser	
	385					390					395					
GCC	AGC	TCA	AGT	GTA	AGT	TAC	ATG	TAC	TGG	TAC	CAG	CAG	AAA	CCA	GGA	528
Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Tyr	Met	Tyr	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	
400					405				410						415	

【 0 1 3 2 】

【表 2 2】

TCC	TCC	CCC	AGA	CTC	CTG	ATT	TAT	GAC	ACA	TCC	AAC	CTG	GCT	TCT	GGA	576
Ser	Ser	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr	Asp	Thr	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	
				420					425					430		
GTC	CCT	GTT	CGC	TTC	AGT	GGC	AGT	GGG	TCT	GGG	ACC	TCT	TAC	TCT	CTC	624
Val	Pro	Val	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Ser	Tyr	Ser	Leu	
			435					440					445			
ACA	ATC	AGC	CGA	ATG	GAG	GCT	GAA	GAT	GCT	GCC	ACT	TAT	TAC	TGC	CAG	672
Thr	Ile	Ser	Arg	Met	Glu	Ala	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	
		450					455					460				
CAG	TGG	AGT	AGT	TAC	CCA	CCC	ATG	TAC	ACG	TTC	GGA	GGG	GGG	ACC	AAG	720
Gln	Trp	Ser	Ser	Tyr	Pro	Pro	Met	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	
	465					470					475					
CTG	GAA	ATA	AAA													732
Leu	Glu	Ile	Lys													
480																

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 20:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 244 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(D) TOPOLOGY: linear

20

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 20:

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser His
 20 25 30
 Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Ala Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Phe Asn Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ser Arg Asp Tyr Asp Tyr Asp Gly Arg Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 115 120 125
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro
 130 135 140
 Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser
 145 150 155 160
 Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 165 170 175

30

40

【表 2 3】

Ser Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly
 180 185 190

Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu
 195 200 205

Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
 210 215 220

Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Pro Met Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
 225 230 235 240

Leu Glu Ile Lys

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 21:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 732 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: cDNA
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iv) ANTI-SENSE: NO
- (v) FRAGMENT TYPE: N-terminal
- (vi) ORIGINAL SOURCE:
 (A) ORGANISM: mouse
 (B) STRAIN: Balb/c
 (F) TISSUE TYPE: splenocytes
- (vii) IMMEDIATE SOURCE:
 (B) CLONE: 3 D 3 (single-chain Fv, heavy and light chain plus linker)
- (ix) FEATURE:
 (A) NAME/KEY: CDS
 (B) LOCATION:1..732
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 21:

20

30

GAG GTC CAA CTG CAG CAG TCA GGG GCT GAA CTG GTG AAG CCT GGG GCT 48
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 245 250 255 260

TCA GTG AAG TTG TCC TGC AAG GCT TCC GGC TAC ACC TTC ACC AGC CAC 96
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser His
 265 270 275

TGG ATG CAC TGG GTG AAG CAG AGG GCT GGA CAA GGC CTT GAG TGG ATC 144
 Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Ala Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 280 285 290

GGA GAG TTT AAT CCC AGC AAC GGC CGT ACT AAC TAC AAT GAG AAA ATC 192
 Gly Glu Phe Asn Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Ile
 295 300 305

AAG AGC AAG GCC ACA CTG ACT GTA GAC AAA TCC TCC AGC ACA GCC TAC 240
 Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 310 315 320

40

【 0 1 3 4】

【表 2 4】

ATG CAA CTC AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCG GTC TAT TAC TGT	288
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys	
325 330 335 340	
GCC AGT CGG GAC TAT GAT TAC GAC GGA CGG TAC TTT GAC TAC TGG GGC	336
Ala Ser Arg Asp Tyr Asp Tyr Asp Gly Arg Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly	
345 350 355	
CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA GGT GGC GGT GGC TCG GGC GGT	384
Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly	
360 365 370	
GGT GGG TCG GGT GGC GGC GGA TCT GAC ATT GAG CTC ACC CAG TCT CCA	432
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro	
375 380 385	
ACA ATC ATG TCT GCA TCT CCA GGG GAG AAG GTC ACC ATG ACC TGC AGT	480
Thr Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser	
390 395 400	
GAC AGC TCA AGT GTA AGT TAC ATG TAC TGG TAC CAG CAG AAG ACA GGA	528
Asp Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Thr Gly	
405 410 415 420	
TCC TCC CCC AGA CTC CTG ATT TAT GAC ACA TCC AAC CTG GCT TCT GGA	576
Ser Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly	
425 430 435	
GTC CCT GTT CGC TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACC TCT TAC TCT CTC	624
Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu	
440 445 450	
ACA ATC AGC CGA ATG GAG GCT GAA GAT GCT GCC ACT TAT TAC TGC CAG	672
Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln	
455 460 465	
CAG TGG AGT AGT TAC CCA CCC ATG TAC ACG TTC GGA GGG GGG ACC AAG	720
Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Pro Met Tyr Thr Phe Gly Gly Thr Lys	
470 475 480	
CTG GAA ATA AAA	732
Leu Glu Ile Lys	
485	

10

20

30

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 22:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 244 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear

- (ii) MOLECULE TYPE: protein
 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 22:

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

40

【表 2 5】

Gly Glu Phe Asn Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Ile
 50 55 60

Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Ser Arg Asp Tyr Asp Tyr Asp Gly Arg Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 115 120 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro
 130 135 140

Thr Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser
 145 150 155 160

Asp Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Thr Gly
 165 170 175

Ser Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly
 180 185 190

Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu
 195 200 205

Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
 210 215 220

Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Pro Met Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
 225 230 235 240

Leu Glu Ile Lys

10

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 23:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 738 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: cDNA
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iv) ANTI-SENSE: NO
- (v) FRAGMENT TYPE: N-terminal
- (vi) ORIGINAL SOURCE:
 (A) ORGANISM: mouse
 (B) STRAIN: Balb/c
 (F) TISSUE TYPE: splenocytes
- (vii) IMMEDIATE SOURCE:
 (B) CLONE: 1 E 3 (single-chain Fv, heavy and light chain plus linker)

30

40

【 0 1 3 6 】

【表 2 6】

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: CDS

(B) LOCATION:1..738

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 23:

GAG Glu 245	GTG Val	CAG Gln	CTG Leu	CAG Gln	CAG Gln	TCT Ser	GGG Gly	GCT Ala	GAA Glu	CTG Leu	GTG Val	AAG Lys	CCT Pro	GGG Gly	GCT Ala	48	
TCA Ser	GTG Val	AAG Lys	TTG Leu	TCC Ser	TGC Cys	AAG Lys	GCT Ala	TCC Ser	GGC Gly	TAC Tyr	ACC Thr	TTC Phe	ACC Thr	AGC Ser	CAC His	96	10
TGG Trp	ATG Met	CAC His	TGG Trp	GTG Val	AAG Lys	CAG Gln	AGG Arg	GCT Ala	GGA Gly	CAA Gln	GGC Gly	CTT Leu	GAG Glu	TGG Trp	ATC Ile	144	
GGA Gly	GAG Glu	TTT Phe	AAT Asn	CCC Pro	AGC Ser	AAC Asn	GGC Gly	CGT Arg	ACT Thr	AAC Asn	TAC Tyr	AAT Asn	GAG Glu	AAA Lys	TTC Phe	192	
AAG Lys	AGC Ser	AAG Lys	GCC Ala	ACA Thr	CTG Leu	ACT Thr	GTA Val	GAC Asp	AAA Lys	TCC Ser	TCC Ser	AGC Ser	ACA Thr	GCT Ala	TAC Tyr	240	
ATG Met	CAA Gln	CTC Leu	AGC Ser	AGC Ser	CTG Leu	ACA Thr	TCT Ser	GAG Glu	GAC Asp	TCT Ser	GCG Ala	GTC Val	TAT Tyr	TAC Tyr	TGT Cys	288	20
GCC Ala	AGT Ser	CGG Arg	GAC Asp	TAT Tyr	GAT Asp	TAC Tyr	GAC Asp	GGA Gly	CGG Arg	TAC Tyr	TTT Phe	GAC Asp	TAC Tyr	TGG Trp	GGC Gly	336	
CAA Gln	GGG Gly	ACC Thr	ACG Thr	GTC Val	ACC Thr	GTC Val	TCC Ser	TCA Ser	GGT Gly	GGC Gly	GGT Gly	GGC Gly	TCG Ser	GGC Gly	GGT Gly	384	
GGT Gly	GGG Gly	TCG Ser	GGT Gly	GGC Gly	GGC Gly	GGA Gly	TCT Ser	GGA Gly	TCT Ser	GAC Asp	ATT Ile	GAG Glu	CTC Leu	ACC Thr	CAG Gln	432	30
TCT Ser	CCA Pro	ACA Thr	ATC Ile	ATG Met	TCT Ser	GCA Ala	TCT Ser	CCA Pro	GGG Gly	GAG Glu	AAG Lys	GTC Val	ACC Thr	ATG Met	ACC Thr	480	
TGC Cys	AGT Ser	GAC Asp	AGC Ser	TCA Ser	AGT Ser	GTA Val	AGT Ser	TAC Tyr	ATG Met	TAC Tyr	TGG Trp	TAC Tyr	CAG Gln	CAG Gln	AAG Lys	528	
CCA Pro	GGA Gly	TCC Ser	TCC Ser	CCC Pro	AGA Arg	CTC Leu	CTG Leu	ATT Ile	TAT Tyr	GAC Asp	ACA Thr	TCC Ser	AAC Asn	CTG Leu	GCT Ala	576	
TCT Ser	GGA Gly	GTC Val	CCT Pro	GTT Val	CGC Arg	TTC Phe	AGT Ser	GGC Gly	AGT Ser	GGG Gly	TCT Ser	GGG Gly	ACC Thr	TCT Ser	TAC Tyr	624	40
TCT Ser	CTC Leu	ACA Thr	ATC Ile	AGC Ser	CGA Arg	ATG Met	GAG Glu	GCT Ala	GAA Glu	GAT Asp	GCT Ala	GCC Ala	ACT Thr	TAT Tyr	TAC Tyr	672	
TGC Cys	CAG Gln	CAG Gln	TGG Trp	AGT Ser	AGT Ser	TAC Tyr	CCA Pro	CCC Pro	ATG Met	TAC Tyr	ACG Thr	TTC Phe	GGA Gly	GGG Gly	GGG Gly	720	

【 0 1 3 7 】

【表 2 8】

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 25:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 726 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(v) FRAGMENT TYPE: N-terminal

(vi) ORIGINAL SOURCE:

- (A) ORGANISM: mouse
 (B) STRAIN: Balb/c
 (F) TISSUE TYPE: splenocytes

(vii) IMMEDIATE SOURCE:

- (B) CLONE: 5 F 1 (single-chain Fv, heavy, light chain, linker)

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: CDS
 (B) LOCATION:1..726

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 25:

CAG GTG AAA CTG CAG GAG TCT GGG GCT GAA CTG GTG AAG CCT GGG GCT	48
Gln Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala	
250 255 260	
TCA GTG AAG TTG TCC TGC AAG GCT TCC GGC TAC ACC TTC ACC AGC CAC	96
Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser His	
265 270 275	
TGG ATG CAC TGG GTG AAG CAG AGG GCT GGA CAA GGC CTT GAG TGG ATC	144
Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Ala Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile	
280 285 290	
GGA GAG ATT AAT CCC AGA ACG GCG CCT ACT AAC TAC AAT GAG AAA TTC	192
Gly Glu Ile Asn Pro Arg Thr Ala Pro Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe	
295 300 305 310	
AAG AGC AAG GCC ACA CTG ACT GTA GAC AAA TCC TCC AGC ACA GCC TAC	240
Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr	
315 320 325	
ATG CAA CTC AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCG GTC TAT TAC TGT	288
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys	
330 335 340	
GCC AGT CGG GAC TAT GAT TAC GAC GGA CGG TAC TTT GAC TAC TGG GGC	336
Ala Ser Arg Asp Tyr Asp Tyr Asp Gly Arg Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly	
345 350 355	
CAA GGG ACA ACG GTC ACC GTC TCC TCA GGT GGC GGT GGC TCG GGC GGT	384
Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly	
360 365 370	

【表 2 9】

GGT Gly 375	GGG Gly	TCG Ser	GGT Gly	GGC Gly	GGC Gly	GGA Gly	TCT Ser	GAC Asp	ATT Ile	GAG Glu	CTC Leu	ACC Thr	CAG Gln	TCT Ser	CCA Pro	432	
ACA Thr	ATC Ile	ATG Met	TCT Ser	GCA Ala 395	TCT Ser	CCA Pro	GGG Gly	GAG Glu	AAG Lys 400	GTC Val	ACC Thr	ATG Met	ACC Thr	TGC Cys	AGT Ser	480	
GAC Asp	AGC Ser	TCA Ser	AGT Ser 410	GTA Val	AGT Ser	TAC Tyr	ACG Thr	TAC Tyr 415	TGG Trp	TAC Tyr	CAG Gln	CAG Gln	AAG Lys 420	ACA Thr	GGA Gly	528	10
TCC Ser	TCC Ser	CCC Pro	AGA Arg 425	CTC Leu	CTG Leu	ATT Ile	TAT Tyr 430	GAC Asp	ACA Thr	TCC Ser	AAC Asn	CTG Leu	GCT Ala 435	TCT Ser	GGA Gly	576	
GTC Val	CCT Pro 440	GTT Val	CGC Arg	TTC Phe	AGT Ser	GGC Gly 445	AGT Ser	GGG Gly	TCT Ser	GGG Gly	ACC Thr 450	TCT Ser	TAC Tyr	TCT Ser	CTC Leu	624	
ACA Thr 455	ATC Ile	AGC Ser	CGA Arg	ATG Met	GAG Glu 460	GCT Ala	GAA Glu	GAT Asp	GCT Ala 465	GCC Ala	ACT Thr	TAT Tyr	TAC Tyr	TGC Cys	CAG Gln 470	672	
CAG Gln	TGG Trp	AGT Ser	AGT Ser	TAC Tyr 475	CCG Pro	CTC Leu	ACG Thr	TTC Phe	GGT Gly 480	GCT Ala	GGG Gly	ACC Thr	AAG Lys	CTG Leu 485	GAA Glu	720	20
ATA Ile	AAA Lys															726	

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 26:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 242 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear

- (ii) MOLECULE TYPE: protein
 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 26:

Gln 1	Val	Lys	Leu	Gln 5	Glu	Ser	Gly	Ala	Glu 10	Leu	Val	Lys	Pro	Gly 15	Ala	
Ser	Val	Lys	Leu 20	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser 25	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr 30	Ser	His	
Trp	Met	His 35	Trp	Val	Lys	Gln	Arg 40	Ala	Gly	Gln	Gly	Leu 45	Glu	Trp	Ile	
Gly	Glu 50	Ile	Asn	Pro	Arg	Thr 55	Ala	Pro	Thr	Asn	Tyr 60	Asn	Glu	Lys	Phe	
Lys 65	Ser	Lys	Ala	Thr	Leu 70	Thr	Val	Asp	Lys	Ser 75	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr 80	
Met	Gln	Leu	Ser	Ser 85	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp 90	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr 95	Cys	
Ala	Ser	Arg	Asp 100	Tyr	Asp	Tyr	Asp	Gly 105	Arg	Tyr	Phe	Asp	Tyr 110	Trp	Gly	

【 0 1 4 0 】

【表 3 0】

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 115 120 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro
 130 135 140

Thr Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser
 145 150 155 160

Asp Ser Ser Ser Val Ser Tyr Thr Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Thr Gly
 165 170 175

Ser Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly
 180 185 190

Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu
 195 200 205

Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
 210 215 220

Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu
 225 230 235 240

Ile Lys

10

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 27:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 726 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: cDNA
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iv) ANTI-SENSE: NO
- (v) FRAGMENT TYPE: N-terminal
- (vi) ORIGINAL SOURCE:
 (A) ORGANISM: mouse
 (B) STRAIN: Balb/c
 (F) TISSUE TYPE: splenocytes
- (vii) IMMEDIATE SOURCE:
 (A) LIBRARY: 7 G 1 (single-chain Fv, heavy, light chain,
 linker)
- (ix) FEATURE:
 (A) NAME/KEY: CDS
 (B) LOCATION:1..726
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 27:

30

40

GAG GTC AAG CTG CAG CAG TCA GGG GCT GAA CTG GTG AAG CCT GGG GCT 48
 Glu Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 245 250 255

TCA GTG AAG TTG TCC TGC AAG GCT TCC GGC TAC ACC TTC ACC AGC CAC 96
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser His
 260 265 270

【表 3 1】

TTG	GAT	CAC	TGG	GTG	AAG	CAG	AGG	GGC	TGG	CAA	GGC	CTT	GAG	TGG	ATC	144	
Leu	Asp	His	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Gly	Trp	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile		
275					280					285					290		
GGA	CAG	TTT	AAT	CCC	AGC	AAC	GGC	CGT	ACT	AAC	TAC	AAT	GAG	AAA	TTC	192	
Gly	Gln	Phe	Asn	Pro	Ser	Asn	Gly	Arg	Thr	Asn	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe		
				295					300					305			
AAG	AGC	AAG	GCC	ACA	CTG	ACT	GTA	GAC	AAA	TCC	TCC	AGC	ACA	GCC	TAC	240	
Lys	Ser	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr		
			310					315					320				
ATC	GAA	CTC	AGC	AGC	CTG	ACA	TCT	GAG	GAC	TGC	TCG	GTC	TAT	TAC	TGT	288	10
Ile	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Cys	Ser	Val	Tyr	Tyr	Cys		
		325					330					335					
GCC	AGT	CGG	GAC	TAT	GAT	TAC	GAC	GGA	CGG	TAC	TTT	GAC	TAC	TGG	GGC	336	
Ala	Ser	Arg	Asp	Tyr	Asp	Tyr	Asp	Gly	Arg	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly		
	340					345					350						
CAA	GGG	ACC	ACG	GTC	ACC	GTC	TCC	TCA	GGT	GGC	GGT	GGC	TCG	GGC	GGT	384	
Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly		
	355				360					365					370		
GGT	GGG	TCG	GGT	GGC	GGC	GGA	TCT	GAC	ATT	GAG	CTC	ACC	CAG	TCT	CCA	432	20
Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Glu	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro		
				375				380						385			
ACA	ATC	ATG	TCT	GCA	TCT	CCA	GGG	GAG	AAG	GTC	ACC	ATG	ACC	TGC	AGT	480	
Thr	Ile	Met	Ser	Ala	Ser	Pro	Gly	Glu	Lys	Val	Thr	Met	Thr	Cys	Ser		
			390					395					400				
GAC	AGC	TCA	AGT	GTA	AGT	TAC	ATG	TAC	TGG	TAC	CAG	CAG	AAG	ACA	GGA	528	
Asp	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Tyr	Met	Tyr	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Thr	Gly		
		405				410						415					
TCC	TCC	CCC	AGA	CTT	CTG	ATT	TAT	GAC	ACA	TCC	AAC	CTG	GCT	TCT	GGA	576	
Ser	Ser	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr	Asp	Thr	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly		
		420				425					430						
GTC	CCT	GTT	CGC	TTC	AGT	GGC	AGT	GGG	TCT	GGG	ACC	TCT	TAC	TCT	CTC	624	30
Val	Pro	Val	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Ser	Tyr	Ser	Leu		
		435			440				445						450		
ACA	ATC	AGC	CGA	ATG	GAG	GCT	GAA	GAT	GCT	GCC	ACT	TAT	TAC	TGC	CAG	672	
Thr	Ile	Ser	Arg	Met	Glu	Ala	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln		
				455				460						465			
CAG	TGG	AGT	AGT	TAC	CCG	CTC	ACG	TTC	GGT	GCT	GGG	ACC	AAG	CTG	GAA	720	
Gln	Trp	Ser	Ser	Tyr	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu		
			470					475					480				
ATA	AAA															726	
Ile	Lys																

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 28:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 242 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear

【 0 1 4 2 】

【表 3 2】

(ii) MOLECULE TYPE: protein
 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 28:

Glu Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser His
 20 25 30
 Leu Asp His Trp Val Lys Gln Arg Gly Trp Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45 10
 Gly Gln Phe Asn Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Ile Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Cys Ser Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ser Arg Asp Tyr Asp Tyr Asp Gly Arg Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 115 120 125 20
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro
 130 135 140
 Thr Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser
 145 150 155 160
 Asp Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Thr Gly
 165 170 175
 Ser Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly
 180 185 190
 Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu
 195 200 205 30
 Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
 210 215 220
 Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu
 225 230 235 240
 Ile Lys

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 29:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 726 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

【 0 1 4 3 】

【表 3 3】

(iv)	ANTI-SENSE: NO															
(v)	FRAGMENT TYPE: N-terminal															
(vi)	ORIGINAL SOURCE:															
	(A) ORGANISM: mouse															
	(B) STRAIN: Balb/c															
	(D) DEVELOPMENTAL STAGE: adult															
	(F) TISSUE TYPE: splenocytes															
(vii)	IMMEDIATE SOURCE:															
	(B) CLONE: 11 H 1 (single-chain Fv, heavy and light chain plus linker)		10													
(ix)	FEATURE:															
	(A) NAME/KEY: CDS															
	(B) LOCATION:1..726															
(xi)	SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 29:															
GAG	GTC	AAG	CTG	CAG	CAG	TCA	GGG	GCT	GAA	CTG	GTG	AAG	CCT	GGG	GCT	48
Glu	Val	Lys	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala	
		245					250					255				
TCA	GTG	AAG	TTG	TCC	TGC	AAG	GCT	TCC	GGC	TAC	ACC	TTC	ACC	AGC	CAC	96
Ser	Val	Lys	Leu	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	His	20
	260					265					270					
TGG	ATG	CAC	TGG	GTG	AAG	CAG	AGG	GCT	GGA	CAA	GGC	TTG	GAG	TGG	ATC	144
Trp	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Ala	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	
	275				280					285					290	
GGA	GAG	TTT	AAT	CCC	AGC	AAC	GGC	CGT	ACT	AAC	TAC	AAT	GAG	AAA	TTC	192
Gly	Glu	Phe	Asn	Pro	Ser	Asn	Gly	Arg	Thr	Asn	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe	
			295						300					305		
AAG	AGC	AAG	GCC	ACA	CTG	ACT	GTA	GAC	AAA	TCC	TCC	AGC	ACA	GCC	TAC	240
Lys	Ser	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	
			310					315					320			30
ATG	CAA	CTC	AGC	AGC	CTG	ACA	TCT	GAG	GAC	TCT	GCG	GTC	TAT	TAC	TGT	288
Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
		325					330					335				
GCC	AGT	CGG	GAC	TAT	GAT	TAC	GAC	GGA	CGG	TAC	TTT	GAC	TAC	TGG	GGC	336
Ala	Ser	Arg	Asp	Tyr	Asp	Tyr	Asp	Gly	Arg	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	
	340				345						350					
CAA	GGG	ACC	ACG	GTC	ACC	GTC	TCC	TCA	GGT	GGC	GGT	GGC	TCG	GGC	GGT	384
Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	
	355				360					365					370	
GGT	GGG	TCG	GGT	GGC	GGC	GGA	TCT	GAC	ATT	GAG	CTC	ACC	CAG	TCT	CCA	432
Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Glu	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	
			375						380					385		40
TCA	ATC	ATG	TCT	GCA	TCT	CCA	GGG	GAG	AAG	GTC	ACC	ATG	ACC	TGC	AGT	480
Ser	Ile	Met	Ser	Ala	Ser	Pro	Gly	Glu	Lys	Val	Thr	Met	Thr	Cys	Ser	
			390					395					400			
GAC	AGC	TCA	AGT	GTA	AGT	TAC	ATG	TAC	TGG	TAC	CAG	CAG	AAG	ACA	GGA	528
Asp	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Tyr	Met	Tyr	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Thr	Gly	
		405					410					415				

【表 3 4】

TCC	TCC	CCC	AGA	CTC	CTG	ATT	TAT	GAC	ACA	TCC	AAC	CTG	GCT	TCT	GGA	576
Ser	Ser	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr	Asp	Thr	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	
	420					425					430					
GTC	CCT	GTT	CGC	TTC	AGT	GGC	AGT	GGG	TCT	GGG	ACC	TCT	TAC	TCT	CTC	624
Val	Pro	Val	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Ser	Tyr	Ser	Leu	
	435				440					445					450	
ACA	ATC	AGC	CGA	ATG	GAG	GCT	GAA	GAT	GCT	GCC	ACT	TAT	TAC	TGC	CAG	672
Thr	Ile	Ser	Arg	Met	Glu	Ala	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	
				455					460					465		
CAG	TGG	AGT	AGT	TAC	CCA	CAC	ACG	TTC	GGT	GCT	GGG	ACC	AAG	CTG	GAA	720
Gln	Trp	Ser	Ser	Tyr	Pro	His	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	
			470					475					480			
ATA	AAA															726
Ile	Lys															

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 30:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 242 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(D) TOPOLOGY: linear

20

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 30:

Glu	Val	Lys	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala	
1				5					10					15		
Ser	Val	Lys	Leu	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	His	
			20					25					30			
Trp	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Ala	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	
		35					40					45				
Gly	Glu	Phe	Asn	Pro	Ser	Asn	Gly	Arg	Thr	Asn	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe	
	50					55					60					
Lys	Ser	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	
	65				70					75					80	
Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
				85					90					95		
Ala	Ser	Arg	Asp	Tyr	Asp	Tyr	Asp	Gly	Arg	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	
			100					105					110			
Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	
		115					120					125				
Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Glu	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	
	130					135					140					
Ser	Ile	Met	Ser	Ala	Ser	Pro	Gly	Glu	Lys	Val	Thr	Met	Thr	Cys	Ser	
	145				150					155					160	
Asp	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Tyr	Met	Tyr	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Thr	Gly	
				165					170					175		

30

40

【表 3 5】

Ser Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly
 180 185 190

Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu
 195 200 205

Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
 210 215 220

Gln Trp Ser Ser Tyr Pro His Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu
 225 230 235 240

Ile Lys

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 31:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 732 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: cDNA
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iv) ANTI-SENSE: NO
- (v) FRAGMENT TYPE: N-terminal
- (vi) ORIGINAL SOURCE:
 (A) ORGANISM: mouse
 (B) STRAIN: Balb/c
 (F) TISSUE TYPE: splenocytes
- (vii) IMMEDIATE SOURCE:
 (B) CLONE: 1 A 1 (single-chain Fv, heavy and light chain plus linker)
- (ix) FEATURE:
 (A) NAME/KEY: CDS
 (B) LOCATION:1..732

20

30

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 31:

GAG GTG CAG CTG CAG CAG TCT GGG GCT GAA CTG GTG AAG CCT GGG GCT 48
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 245 250 255

TCA GTG AAG TTG TCC TGC AAG GCT TCC GGC TAC ACC TTC ACC AGC CAC 96
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser His
 260 265 270

TGG ATG CAC TGG GTG AAG CAG AGG GCT GGA CAA GGC CTT GAG TGG ATC 144
 Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Ala Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile 40
 275 280 285 290

GGA GAG TTT AAT CCC AGC AAC GGC CGT ACT AAC TAC AAT GAG AAA TTC 192
 Gly Glu Phe Asn Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 295 300 305

AAG AGC AAG GCC ACA CTG ACT GTA GAC AAA TCC TCC AGC ACA GCT TAC 240
 Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 310 315 320

【 0 1 4 6 】

【表 3 6】

ATG	CAA	CTC	AGC	AGC	CTG	ACA	TCT	GAG	GAC	TCT	GCG	GTC	TAT	TAC	TGT	288	
Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys		
		325						330				335					
GCC	AGT	CGG	GAC	TAT	GAT	TAC	GAC	GGA	CGG	TAC	TTT	GAC	TAC	TGG	GCC	336	
Ala	Ser	Arg	Asp	Tyr	Asp	Tyr	Asp	Gly	Arg	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly		
	340					345					350						
CAA	GGG	ACC	ACG	GTC	ACC	GTC	TCC	TCA	GGT	GGC	GGT	GGC	TCG	GGC	GGT	384	
Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly		10
	355				360					365					370		
GGT	GGG	TCG	GGT	GGC	GGC	GGA	TCT	GAC	ATT	GAG	CTC	ACC	CAG	TCT	CCA	432	
Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Glu	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro		
				375					380					385			
ACA	ATC	ATG	TCT	GCA	TCT	CCA	GGG	GAG	AAG	GTC	ACC	ATG	ACC	TGC	AGT	480	
Thr	Ile	Met	Ser	Ala	Ser	Pro	Gly	Glu	Lys	Val	Thr	Met	Thr	Cys	Ser		
			390					395					400				
GAC	AGC	TCA	AGT	GTA	AGT	TAC	ATG	TAC	TGG	TAC	CAG	CAG	AAG	ACA	GGA	528	
Asp	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Tyr	Met	Tyr	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Thr	Gly		
		405				410						415					
TCC	TCC	CCC	AGA	CTC	CTG	ATT	TAT	GAC	ACA	TCC	AAC	CTG	GCT	TCT	GGA	576	20
Ser	Ser	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr	Asp	Thr	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly		
	420					425					430						
GTC	CCT	GTT	CGC	TTC	AGT	GGC	AGT	GGG	TCT	GGG	ACC	TCT	TAC	TCT	CTC	624	
Val	Pro	Val	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Ser	Tyr	Ser	Leu		
	435				440					445					450		
ACA	ATC	AGC	CGA	ATG	GAG	GCT	GAA	GAT	GCT	GCC	ACT	TAT	TAC	TGC	CAG	672	
Thr	Ile	Ser	Arg	Met	Glu	Ala	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln		
				455					460					465			
CAG	TGG	AGT	AGT	TAC	CCA	CCC	ATG	TAC	ACG	TTC	GGA	GGG	GGG	ACA	AAG	720	
Gln	Trp	Ser	Ser	Tyr	Pro	Pro	Met	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys		
			470					475					480				30
TTG	GAA	ATA	AAA													732	
Leu	Glu	Ile	Lys														
		485															

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 32:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 244 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 32:

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser His
 20 25 30

Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Ala Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

【 0 1 4 7 】

【表 3 7】

Gly Glu Phe Asn Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Arg Asp Tyr Asp Tyr Asp Gly Arg Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
115 120 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro
130 135 140

Thr Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser
145 150 155 160

Asp Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Thr Gly
165 170 175

Ser Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly
180 185 190

Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu
195 200 205

Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
210 215 220

Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Pro Met Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
225 230 235 240

Leu Glu Ile Lys

10

20

30

40

50

【図面の簡単な説明】

【0148】

【図1-A】第1図は、ファージ-抗体ライブラリーから分離されたs c F vのアミノ酸配列を示す説明図である。(A)リンパ節ライブラリーからのs c F v。(B)脾臓ライブラリーからのs c F v。相補性決定領域(CDR)およびフレームワーク領域(FR)が示されている。

【図1-B】第1図は、ファージ-抗体ライブラリーから分離されたs c F vのアミノ酸配列を示す説明図である。(A)リンパ節ライブラリーからのs c F v。(B)脾臓ライブラリーからのs c F v。相補性決定領域(CDR)およびフレームワーク領域(FR)が示されている。

【図2】第2図は、EGFRへのs c F vの結合を示す説明図である。細菌培養上清中のs c F vの濃度を推定して、s c F vを精製EGFRへの結合に関してELISAによって試験した。(A)リンパ節ライブラリーからのs c F vライブラリー。(B)脾臓ライブラリーからのs c F v。P1(陽性対照)はMAb 425由来のs c F vである。L1およびS1(陰性対照)はあらかじめ選択したリンパ節および脾臓ライブラリーからの非結合s c F vである。

【図3】第3図は、哺乳動物細胞における発現のための可変部を再構築するために用いる中間ベクターの説明図である。(A)V_Hベクター。(B)V_Lベクター。

【図4】第4図は、キメラ全抗体のEGFRへの結合を示す説明図である。COS細胞上清中の抗体の濃度をELISAによって決定し、抗体を精製したEGFRへの結合に関し

て E L I S A によって試験した。

【図5】第5図は、s c F v 番号 L 2 1 1 C の D N A およびアミノ酸配列を示す説明図である。(A)軽鎖。(B)重鎖。

【図6】第6図は、s c F v 番号 L 2 1 2 B の D N A およびアミノ酸配列を示す説明図である。(A)軽鎖。(B)重鎖。

【図7】第7図は、s c F v 番号 L 3 1 1 D の D N A およびアミノ酸配列を示す説明図である。(A)軽鎖。(B)重鎖。

【0149】

F R および C D R のアミノ酸位置は、第6図のものに対応する。

【図8】第8図は、s c F v 番号 S 4 2 D の D N A およびアミノ酸配列を示す説明図である。(A)軽鎖。(B)重鎖。

【図1 - A】

VH:

scFv	FR 1	CDR 1	FR 2
L3 11D	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFT	SYWMH	WVKQRPGQGLEWIG
L2 12B	QVQLQESGPELVKPGALVKISCKASGYTFT	SYWMH	WVKQRPGQGLEWIG
L3 10A	QVKLQESGGDLVKPGGSLKLSKAASGFTFS	SYGMS	WVRQTPDKRLESVA
L2 1C	EVKLQSGAELVRPEASVKLSCKTSGYIFT	NYWIH	WVKQRSQGQLEWIA
L2 8C	QVQLQESGAELVRPGASVKLSCKTSGYIFT	NYWIH	WVKQRSQGQLEWIA
L2 11C	QVQLQESGPELVKPGASVKMSCKASGYTFT	TYWIH	WMKQRPGQGLEWIG

scFv	CDR 2	FR 3
L3 11D	EIDPDSYTYNQNQFKFG	KATLTVDKSSSTAYMQLSLSLTSSEDSAVYYCAR
L2 12B	EIDPDSYTYNQNQFKFG	KATLTVDKSSNTAYMQLSLSLTSSEDSAVYYCAR
L3 10A	TISSGGAYIYYPDSVKVG	RFTISRDNKNTLYLQMSSLKSEDTAMYYCAR
L2 1C	RIYPGNSTYINQFKFG	KATLTADKSSSTAYMQLSLSLTSSEDSAVYFCAR
L2 8C	KDLSWNGSYINEKFKG	KATLTADKSSSTAYMQLSLSLTSSEDSAVYFCAR
L2 11C	MIDPSNSETRLNQNFRD	KATLSVDKSSNKAYMQLSLSLTSSEDSAVYYCAR

scFv	CDR 3	FR 4
L3 11D	SDYGSSHFDY	WGQGTITVTVSS
L2 12B	SDYGSSHFDY	WGQGTITVTVSS
L3 10A	LETGDYALDY	WGQGTITVTVSS
L2 1C	STSDSLPYWYFDV	WGQGTITVTVSS
L2 8C	STSDSLPYWYFDV	WGQGTITVTVSS
L2 11C	WDYGSCHFDDY	WGQGTITVTVSS

VK:

scFv	FR 1	CDR 1	FR 2
L3 11D	DIELTQSPASLAVSLGQRATISC	RASESVDFNGISFMN	WFQQKPGQPPKLLIY
L2 12B	DIELTQSPASLAVSLGQRATISC	RASESVDFNGISFMN	WFQQKPGQPPKLLIY
L3 10A	DIELTQSPASLAVSLGQRATISC	RASESVEYGTSLMQ	WFQQKPGQPPKLLIY
L2 1C	DIELTQSPITLSTSPGKVTITC	RATLGVSYMH	WYQQKPGSPKPLWIY
L2 8C	DIELTQSPAIMASPGKVTITC	SASSSVSYMH	WFQQKPGTSPKPLWIY
L2 11C	DIELTQSPASLAASVGETVITC	RASENIYYSLA	WYQQKPGKSPQLLIY

scFv	CDR 2	FR 3
L3 11D	GASNQGS	GVPARFSGSGSGTDFSLNIHPLEEDDTAMYFC
L2 12B	GASNQGS	GVPARFSGSGSGTDFSLNIHPLEEDDTAMYFC
L3 10A	AASNVES	GVPARFSGSGSGTDFSLNIHPVEEDDIAMYFC
L2 1C	ATSNLAS	GVPARFSGSGSGTDFSLNIHPVEEDAATYYC
L2 8C	STSNLAS	GVPARFSGSGSGTDFSLNIHPVEEDAATYYC
L2 11C	SASALED	GVPARFSGSGSGTDFSLNIHPVEEDDTAMYFC

scFv	CDR 3	FR 4
L3 11D	QQSKEVPLT	FGAGTKLEIKRA
L2 12B	QQSKEVPLT	FGAGTKLEIKRA
L3 10A	QQSRKVPWT	FGGGTKLEIKRA
L2 1C	QQWISNPPT	FGGGTKLEIKRA
L2 8C	QQRNSYPHT	FGAGTKLEIKRA
L2 11C	KQTYDVPWT	FGGGTKLEIKRA

【図1 - B】

VH:

scFv	FR 1	CDR 1	FR 2
S4 2D	EVKLQSGPELVKPGASVKMSCKASGYAFI	SFVMH	WVKQKPGQGLEWIG
S4 10H	EVKLQESGGDLVKPGGSLKLSKAASGFTFS	SYGMS	WVRQTPDKRLESVA
S4 5A	EVKLQESGGDSVKPGGSLKLSKAASGFTFS	SYGMS	WVRQTPDKRLESVA
S3 12D	EVKLQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIK	DTYMH	WVKQRPEQGLEWIG

scFv	CDR 2	FR 3
S4 2D	FINPYNIGTKYNEKFKD	KATLTSKSSSTAYMELSLTSSEDSAVYYCAS
S4 10H	TISSGGAYIYYPDSVKVG	RFTISRDNKNTLYLQMSSLKSEDTAMYYCAR
S4 5A	TISSGGAYIYYPDSVKVG	RFTISRDNKNTLYLQMSSLKSEDTAMYYCAR
S3 12D	RIDPANGNTKYPKFDQ	RASITADTSSNTAYLQSLTSSEDTAVYYCAS

scFv	CDR 3	FR 4
S4 2D	GDYDRAMDY	WGQGTITVTVSS
S4 10H	LETGDYALDY	WGQGTITVTVSS
S4 5A	LETGDYAMDY	WGQGTITVTVSS
S3 12D	DYGYEAWFAY	WGQGTITVTVSS

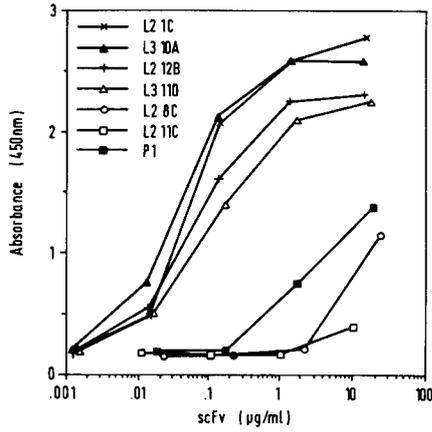
VK:

scFv	FR 1	CDR 1	FR 2
S4 2D	DIELTQSPITMAASPGKIIITC	SASSISSNYLH	WYQQKPGFSPKLLIY
S4 10H	DIELTQSPASLAVSLGQRATISC	RASESVEYGTSLMQ	WYQQKPGQAPKLLIY
S4 5A	DIELTQSPASLAVSLGQRATISC	RASESVEYGTSLMQ	WYQQKPGQPPKLLIY
S3 12D	DIELTQSPASLAVSLGQRATISC	RASESVDFNGISFMN	WYQQKPGQPPKLLIY

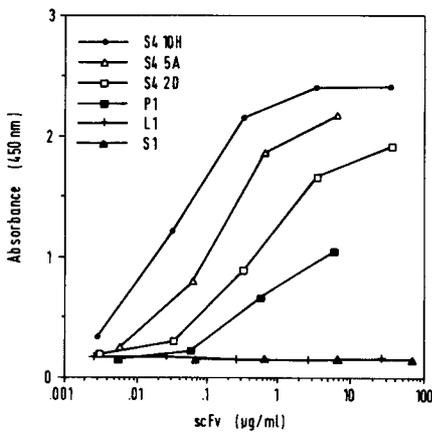
scFv	CDR 2	FR 3
S4 2D	RTSNLAS	GVPARFSGSGSGTDFSLNIHPVEEDAATYYC
S4 10H	AASNVES	EVPARFSGSGSGTDFSLNIHPVEEDDIAMYFC
S4 5A	AASNVES	GVPARFSGSGSGTDFSLNIHPVEEDDIAMYFC
S3 12D	AASNQGS	GVPARFSGSGSGTDFSLNIHPVEEDDTAMYFC

scFv	CDR 3	FR 4
S4 2D	QQGSSIPRT	FGGGTKLEIKRA
S4 10H	QQSRKVPWT	FGGGTKLEIKRA
S4 5A	QQSRKVPWT	FGGGTKLEIKRA
S3 12D	QQSKEVPLT	FGGGTKLEIKRA

【 2 】

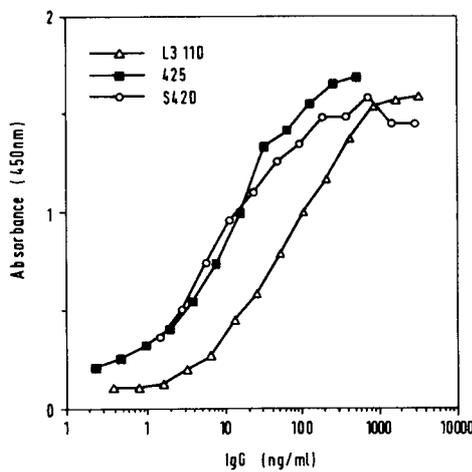


A)

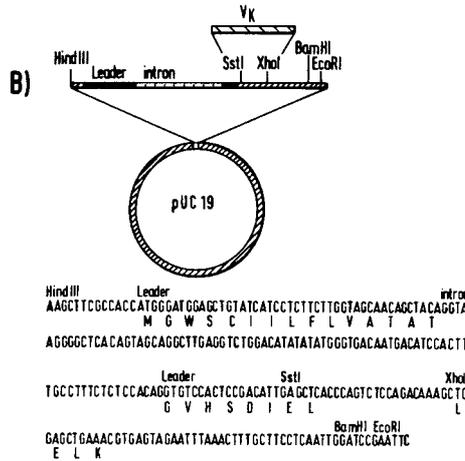
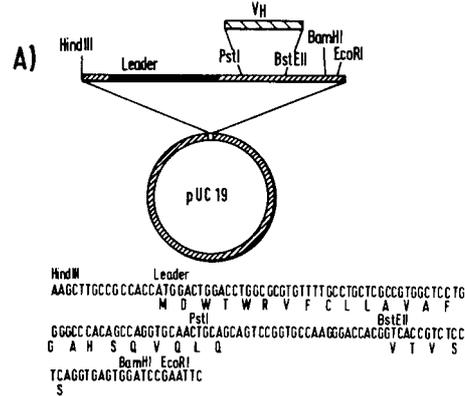


B)

【 4 】



【 3 】



【 5 】

(A)

GAC ATT GAG CTC ACC CAG TCT CCA GCC TCC CTG GCT GCA TCT GTG GGA	48
Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Ala Ser Val Gly	1 5 10 15
GAA ACT GTC ACC ATC ACA TGT CGA GCA AGT GAG AAC ATT TAC TAT AGT	96
Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Tyr Ser	20 25 30
TTA GCA TGG TAT CAG CAG AAG CAA GGG AAA TCT CCT CAG CTC CTG ATC	144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile	35 40 45
TAT AGT GCA AGC GCC TTG GAA GAT GGT GTC CCA TCG AGG TTC AGT GGC	192
Tyr Ser Ala Ser Ala Leu Glu Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly	50 55 60
AGT GGA TCT GGG ACA CAG TAT TCT TTA AAG ATC AAC AAC ATG CAG CCT	240
Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Asn Met Gln Pro	65 70 75 80
GAA GAT ACC GCT ACT TAC TTC TGT AAA CAG ACT TAT GAC GTT CCG TGG	288
Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Lys Gln Thr Tyr Asp Val Pro Trp	85 90 95
ACG TTC GGT GGA GGG ACC AAG CTG GAA ATA AAA CGG GCG	327
Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala	100 105

(B)

CAG GTG CAA CTG CAG GAG TCA GGG CCT GAG CTG GTG AGG CCT GGG GCT	48
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala	1 5 10 15
TCA CTG AAG ATG TCC TGC AAG GCT TCA GGC TAT ACC TTC ACT ACC TAC	96
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr	20 25 30
TGG ATA CAC TGG ATG AAA CAG AGG CCT GGA CAA GGC CTT CAG TGG ATT	144
Trp Ile His Trp Met Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Gln Trp Ile	35 40 45
GGC ATG ATT GAT CCT TCC AAT AGT GAA ACT AGG TTA AAT CAG AAT TTC	192
Gly Met Ile Asp Pro Ser Asn Ser Glu Thr Arg Leu Asn Gln Asn Phe	50 55 60
AGG GAC AAG GGC ACA TTG AGT GTA GAC AAA TCC TCC AAT AAA GCC TAC	240
Arg Asp Lys Ala Thr Leu Ser Val Asp Lys Ser Ser Asn Lys Ala Tyr	65 70 75 80
ATG CAG CTC AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCA ATC TAT TAC TGT	288
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys	85 90 95
GCA AGA TGG GAC TAC GGT AGT GGC CAC TTT GAC TAC TGG GGC CAA GGG	336
Ala Arg Trp Asp Tyr Gly Ser Gly His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly	100 105 110
ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA	357
Thr Thr Val Thr Val Ser Ser	115

【 6 】

(A)

GAC ATT GAG CTC ACC CAG TCT CCA GCT TCT TTG GCT GTG TCT CTA GGG 48
 Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly 1 5 10 15

CAG AGG GCC ACC ATC TCC TGC AGA GCC AGC GAA AGT GTT GAT AAT TTT 96
 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Phe 20 25 30

GGC ATT AGT TTT ATG AAC TGG TTC CAA CAG AAA CCA GGA CAG CCA CCC 144
 Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro 35 40 45

AAA CTC CTC ATC TAT GGT GCA TCC AAC CAA GGA TCC GGG GTC CCT GCC 192
 Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ala 50 55 60

AGG TTT AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC AGC CTC AAC ATC CAT 240
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile His 65 70 75 80

CCT CTG GAG GAG GAT GAT ACT GCA ATG TAT TTC TGT CAG CAA AGT AAG 288
 Pro Leu Glu Glu Asp Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys 85 90 95

GAG GTT CCG CTC ACG TTC GGT GCT GGG ACC AAG CTG GAA ATA AAA CGG 336
 Glu Val Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg 100 105 110

CGG 339
 Ala

(B)

CAG GTG CAG CTG CAG GAG TCT GGA CCT GAG CTG GTG AAG CCT GGG GCT 48
 Gln Val Gln Leu Leu Gln Glu Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala 1 5 10 15

TTA GTG AAG ATA TCC TGC AAG GCT TCT GGT TAC ACC TTC ACC AGC TAC 96
 Leu Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr 20 25 30

TGG ATG CAC TGG GTG AAG CAG AGG CCT GGA CAA GGC CTT GAG TGG ATC 144
 Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile 35 40 45

GGG GAG ATT GAT CCT TCT GAT AGT TAT ACT AAC TAC AAT CAA AAG TTC 192
 Gly Glu Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe 50 55 60

AAG GGC AAG GCC ACA TTG ACT GTA GAC AAA TCC TCC AAC ACA GCC TAC 240
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr 65 70 75 80

ATG CAG CTC AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCG GTC TAT TAC TGT 288
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys 85 90 95

GCA AGA TCG GAC TAC GGT AGT AGC CAC TTT GAC TAC TGG GGC CAA GGG 336
 Ala Arg Ser Asp Tyr Gly Ser Ser His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly 100 105 110

ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA 357
 Thr Thr Val Thr Val Ser Ser 115

【 7 】

(A)

GAC ATT GAG CTC ACC CAG TCT CCA GCT TCT TTG GCT GTG TCT CTA GGG 48
 Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly 1 5 10 15

CAG AGG GCC ACC ATC TCC TGC CGA GCC AGC GAA AGT GTT GAT AAT TTT 96
 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Phe 20 25 30

GGC ATT AGT TTT ATG AAC TGG TTC CAA CAG AAA CCA GGA CAG CCA CCC 144
 Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro 35 40 45

AAA CTC CTC ATC TAT GGT GCA TCC AAC CAA GGA TCC GGG GTC CCT GCC 192
 Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ala 50 55 60

AGG TTT AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC AGC CTC AAC ATC CAT 240
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile His 65 70 75 80

CCT TTG GAG GAG GAT GAT ACT GCA ATG TAT TTC TGT CAG CAA AGT AAG 288
 Pro Leu Glu Glu Asp Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys 85 90 95

GAG GTT CCG CTC ACG TTC GGT GCT GGG ACC AAG CTG GAG CTG AAA CGG 336
 Glu Val Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg 100 105 110

CGG 339
 Ala

(B)

GAG GTG CAG CTG CAG CAG TCA GGG GCT GAG CTT GTG AAG CCT GGG GCT 48
 Glu Val Gln Leu Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala 1 5 10 15

TCA GTG AAG CTG TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAC ACC TTC ACC AGC TAC 96
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr 20 25 30

TGG ATG CAC TGG GTG AAG CAG AGG CCT GGA CAA GGC CTT GAG TGG ATC 144
 Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile 35 40 45

GGG GAG ATT GAT CCT TCT GAT AGT TAT ACT AAC TAC AAT CAA AAG TTC 192
 Gly Glu Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe 50 55 60

AAG GGC AAG GCC ACA TTG ACT GTA GAC AAA TCC TCC AAC ACA GCC TAC 240
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr 65 70 75 80

ATG CAG CTC AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCG GTC TAT TAC TGT 288
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys 85 90 95

GCA AGA TCG GAC TAC GGT AGT AGC CAC TTT GAC TAC TGG GGC CAA GGG 336
 Ala Arg Ser Asp Tyr Gly Ser Ser His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly 100 105 110

ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA 357
 Thr Thr Val Thr Val Ser Ser 115

【 8 】

(A)

GAC ATT GAG CTC ACC CAG TCT CCA ACC ACC ATG GCT GCA TCT CCC GGG 48
 Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Thr Thr Met Ala Ala Ser Pro Gly 1 5 10 15

GAG AAG ATC ACT ATC ACC TGC AGT GCC AGC TCA AGT ATA AGT TCC AAT 96
 Glu Lys Ile Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ile Ser Ser Asn 20 25 30

TAC TTG CAT TGG TAT CAG CAG AAG CCA GGA TTC TCC CCT AAA CTC TTG 144
 Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Phe Ser Pro Lys Leu Leu 35 40 45

ATT TAT AGG ACA TCC AAT CTG GCT TCT GGA GTC CCA GCT CGC TTC AGT 192
 Ile Tyr Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser 50 55 60

GGC AGT GGG TCT GGG ACC TCT TAC TCT CTC ACA ATT GGC ACC ATG GAG 240
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Gly Thr Met Glu 65 70 75 80

GCT GAA GAT GTT GCC ACT TAC TAC TGC CAG CAG GGT AGT AGT ATA CCA 288
 Ala Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ser Ser Ile Pro 85 90 95

CGC ACG TTC GGA GGG GGC ACC AAG CTG GAA ATC AAA CGG 327
 Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg 100 105

(B)

GAG CTC AAG CTG CAG CAG TCA GGA CCT GAG CTG GTA AAG CCT GGG GCT 48
 Glu Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala 1 5 10 15

TCA GTG AAG ATG TCC TGC AAG GCT TCT GGA TAC GCA TTC ATA AGT TTT 96
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ile Ser Phe 20 25 30

GTT ATG CAC TGG GTG AAG CAG AAG CCT GGG CAG GGC CTT GAG TGG ATT 144
 Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile 35 40 45

GGA TTT ATT AAT CCT TAC AAT GAT GGT ACT AAG TAC AAT GAG AAG TTC 192
 Gly Phe Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Gln Lys Phe 50 55 60

AAA GAC AAG GCC ACA CTG ACT TCA GAC AAA TCC TCC AGC ACA GCC TAC 240
 Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr 65 70 75 80

ATG GAG CTC AGC AGC CTG ACC TCT GAG GAC TCT GCG GTC TAT TAC TGT 288
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys 85 90 95

GCA AGT GGG GAT TAC GAC AGG GCT ATG GAC TAC TGG GGC CAA GGG ACC 336
 Ala Ser Gly Asp Tyr Asp Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr 100 105 110

ACG GTC ACC GTC TCC TCA 354
 Thr Val Thr Val Ser Ser 115

【配列表】

2006025794000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成17年8月11日(2005.8.11)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

免疫されたマウス細胞より単離されたRNAから構築されたファージ-抗体ライブラリーから得られる抗EGFR一本鎖Fvであって、

前記免疫されたマウス細胞は、ヒト癌腫細胞系A431(ATCC CRL1555)、A431細胞由来の脱落膜小胞、精製ヒトEGFRからなる抗原群から選択される免疫原を用いる免疫により調製されており、但し、mAb425の産生能を有するマウス細胞以外のマウス細胞であり、

前記抗EGFR一本鎖Fvは、重鎖および軽鎖の可変部を含んでなり、

(i) 該一本鎖Fvは、下記(b)と(d)からなる群から選択され、

(b) L3 11D: 配列ID番号: 10に記載される軽鎖の可変部と配列ID番号: 12に記載される重鎖の可変部とからなる一本鎖Fv;

(d) S4 2D: 配列ID番号: 14に記載される軽鎖の可変部と配列ID番号: 16に記載される重鎖の可変部とからなる一本鎖Fv;

(ii) 該一本鎖Fvは、精製されたEGFRと、EGFRを有する腫瘍細胞系A431およびMDA MB468とは結合し、EGFR陰性の黒色腫細胞系SK-MEL-23とは結合せず、

(iii) 該一本鎖Fvは、mAb425由来の一本鎖Fvよりも、精製されたEGFRとの結合能に優れている

ことを特徴とする抗体フラグメント。

【請求項2】

請求項1に記載される抗EGFR一本鎖FvをコードするDNA分子であって、

該抗EGFR一本鎖Fvの重鎖および軽鎖の可変部のアミノ酸配列をコードする塩基配列は、下記(b)と(d)からなる群から選択されている

(b) L3 11D: 配列ID番号: 9に記載される軽鎖の可変部をコードする塩基配列と、配列ID番号: 11に記載される重鎖の可変部をコードする塩基配列とを含んでなる配列;

(d) S4 2D: 配列ID番号: 13に記載される軽鎖の可変部をコードする塩基配列と、配列ID番号: 15に記載される重鎖の可変部をコードする塩基配列とを含んでなる配列;

ことを特徴とするDNA分子。

【請求項3】

ヒトEGFRに対して特異的な反応性を有する、抗EGFRキメラ全抗体であって、

該キメラ全抗体は、EGFRを発現しているA431細胞とは結合し、EGFR陰性の黒色腫細胞系SK-MEL-23とは結合せず、

前記キメラ全抗体は、下記(b)と(d)からなる群から選択される、重鎖および軽鎖の可変部が、

(b) L3 11D: 配列ID番号: 10に記載される軽鎖の可変部と配列ID番号: 12に記載される重鎖の可変部;

(d) S4 2D: 配列ID番号: 14に記載される軽鎖の可変部と配列ID番号: 16に記載される重鎖の可変部;

ヒト免疫グロブリン由来の重鎖および軽鎖の定常部に、それぞれ連結されている、部分的ヒト化全抗体分子である

ことを特徴とする抗EGFRキメラ全抗体。

【請求項4】

重鎖定常部がヒトガンマ-1鎖のアミノ酸配列を含み、軽鎖定常部がヒトカッパ鎖のアミノ酸配列を含む

ことを特徴とする請求項3に記載の抗EGFRキメラ全抗体。

【請求項5】

請求項1に記載の抗EGFR一本鎖Fvの調製法であって、次の工程：

(1) ヒト癌腫細胞系A431(ATCC CRL1555)、A431細胞由来の脱落膜小胞、精製ヒトEGFRからなる抗原群から選択される免疫原を用いる免疫により調製されており、但し、mAb425の産生能を有するマウス細胞以外のマウス細胞である、免疫されたマウス細胞からRNAを分離する；

(2) 前記分離されたRNAに基づき、第1鎖cDNAを合成する；

(3) 該免疫されたマウス細胞由来のcDNA中の、V_HおよびV_L遺伝子を増幅する；

(4) 適当な制限部位とともに、前記V_HおよびV_L遺伝子をファージミド・ベクターにクローニングする；

(5) 前記工程(4)により得られる連結混合物を用いて、原核細胞を形質転換させて、ファージライブラリーを構築する；

(6) 精製EGFRを用いて、EGFRに対するファージ抗体に関して、該ファージライブラリーをスクリーニングし、EGFRに対するファージ抗体をコードしているクローンを選択する；ならびに

(7) 該工程(6)で選択されるクローンの遺伝子を宿主原核細胞中で発現させ、所望の一本鎖Fvを産生させる；

を含む

ことを特徴とする調製法。

【請求項6】

請求項3に記載のヒトEGFRに対して特異的な反応性を有する、抗EGFRキメラ全抗体の調製法であって、次の工程：

(1) 下記(b)と(d)からなる群から選択される、重鎖および軽鎖の可変部をコードするDNAを調製する；

(b) L3 11D：配列ID番号：10に記載される軽鎖の可変部と配列ID番号：12に記載される重鎖の可変部；

(d) S4 2D：配列ID番号：14に記載される軽鎖の可変部と配列ID番号：16に記載される重鎖の可変部；

(2) 前記重鎖および軽鎖の可変部をコードするDNAを、ヒト免疫グロブリンの定常部をコードするゲノムDNAを含む少なくとも一つの真核細胞発現ベクター中にクローニングして、前記重鎖および軽鎖の可変部を、ヒト免疫グロブリンの重鎖および軽鎖の定常部とがそれぞれ連結されてなる、キメラ型重鎖および軽鎖をコードする遺伝子を含む真核細胞発現ベクターを構築する；ならびに

(3) 該工程(2)で得られるキメラ型重鎖および軽鎖をコードする遺伝子を含む真核細胞発現ベクターで、真核細胞を形質転換し、該形質転換された真核細胞中で該キメラ全抗体を発現させて、分離する；

を含む

ことを特徴とする調製法。

【請求項7】

請求項1に記載の抗EGFR一本鎖Fv、あるいは請求項3または4に記載の抗EGFRキメラ全抗体を、薬理的有効量で、薬剤学的に容認される担体、賦形剤、または希釈剤とともに含んでなる、ヒトEGFR発現腫瘍の診断、または治療用途の薬剤組成物。

【請求項8】

請求項 1 に記載の抗 E G F R 一本鎖 F v、あるいは請求項 3 または 4 に記載の抗 E G F R キメラ全抗体を、ヒト E G F R 発現腫瘍の診断、または治療用途の薬剤組成物の製造において、薬理的有効量で含有される、該腫瘍細胞上に発現される E G F R と結合可能な抗体成分として使用する方法。

フロントページの続き

(51) Int. Cl. F I テーマコード(参考)
C 1 2 P 21/08 (2006.01) C 1 2 P 21/08

- (74)代理人 100106138
 弁理士 石橋 政幸
- (74)代理人 100120628
 弁理士 岩田 慎一
- (74)代理人 100127454
 弁理士 緒方 雅昭
- (72)発明者 ケトルボロー、エー・キャスリン
 イギリス国 ダブリュデー 2 5 イーユー ワットフォード ミルトン ストリート 2 8
- (72)発明者 ベンディーグ、マリー エム.
 イギリス国 エヌダブリュ 6 1 ティーエックス ロンドン ウェスト ハンプステッド ソレン
 ト ロード 6 4
- (72)発明者 アンセル、キース エイチ.
 イギリス国 エーエル 9 5 デーキュー ハットフィールド ザ ライド 6 7
- (72)発明者 ギュッソー、デトレフ
 イギリス国 エヌダブリュ 3 7 デージー ロンドン ハンプステッド フログナル レーン 1
 7
- (72)発明者 アダン、ハウメ
 スペイン国 マタロ プホル 2 8
- (72)発明者 ミットハンス、フランセスク
 スペイン国 0 8 7 0 0 イグアラダ 4 0 2 ア プハダス 7 8
- (72)発明者 ロセリュ、エリザベト
 スペイン国 0 8 0 0 8 バルセロナ エンリケ グラナドス 4 3
- (72)発明者 プラスコ、フランセスク
 スペイン国 0 8 9 6 0 サント フスト デスベルン プラサ ベルダゲル 1
- (72)発明者 ピラウツ、ハウメ
 スペイン国 0 8 0 3 0 バルセロナ エーメ・キンティ マリョフレ 2

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA43 CA02 DA06 EA03 EA04 GA11 HA03
 4B064 AG27 CA02 CA10 CA19 CC24 CE03 CE12 DA05 DA14
 4C085 AA14 BB01 BB07 CC07 CC08 CC21 CC31 DD62 EE01
 4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA76 EA28 EA51 FA74 GA15
 GA26

专利名称(译)	ant-egfr单链fv和Anti-egfr抗体		
公开(公告)号	JP2006025794A	公开(公告)日	2006-02-02
申请号	JP2005233093	申请日	2005-08-11
申请(专利权)人(译)	默克专利GESELLSCHAFT手套Beshurenkuteru Hafutongu		
[标]发明人	ケトルボローエーキャスリン ベンディーグマリーエム アンセルキースエイチ ギュッソーデトレフ アダンハウメ ミットハンスフランセスク ロセリュエリザベト プラスコフランセスク ピラウツハウメ		
发明人	ケトルボロー、エー.キャスリン ベンディーグ、マリー エム. アンセル、キース エイチ. ギュッソー、デトレフ アダン、ハウメ ミットハンス、フランセスク ロセリュ、エリザベト プラスコ、フランセスク ピラウツ、ハウメ		
IPC分类号	C12N15/09 A61K39/395 A61P35/00 C07K16/28 C07K16/46 C12P21/08 G01N33/53 A61K38/00 C07K16/00 C12N15/13 C12P21/02 C12R1/19 G01N33/563		
CPC分类号	C07K16/00 A61K38/00 C07K16/2863 C07K2319/00		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K39/395.T A61P35/00 C07K16/28 C07K16/46 C12P21/08 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA43 4B024/CA02 4B024/DA06 4B024/EA03 4B024/EA04 4B024 /GA11 4B024/HA03 4B064/AG27 4B064/CA02 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/CE03 4B064/CE12 4B064/DA05 4B064/DA14 4C085/AA14 4C085/BB01 4C085/BB07 4C085/CC07 4C085 /CC08 4C085/CC21 4C085/CC31 4C085/DD62 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA28 4H045/EA51 4H045/FA74 4H045/GA15 4H045 /GA26		
代理人(译)	宫崎昭雄 岩田慎一 绪方明		
优先权	1994104160 1994-03-17 EP 1994118970 1994-12-02 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供新的抗EGFR抗体和其单链Fv（scFv），其可以从免疫的哺乳动物，优选小鼠的细胞构建的噬菌体 - 抗体文库中获得。解决方案：从噬菌体 - 抗体文库中分离出的两个单链Fv经基因工程改造，可产生部分人源化的完整抗体分子。这些嵌合抗EGFR抗体含有人免疫球蛋白的恒定区，并且可以与单链Fv一起用作人肿瘤的诊断和治疗剂。 Ž

表1 各選択回後のEGFR結合クローンの占める%比率

	リンパ節 ライブラリー	脾臓 ライブラリー	インビトロ免疫細胞 ライブラリー
選択前	0	0	1
第1回	77	0	84
第2回	86	26	100
第3回	90	77	100
第4回	試験せず	97	試験せず