

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

WO2010/001908

発行日 平成23年12月22日 (2011. 12. 22)

(43) 国際公開日 平成22年1月7日 (2010. 1. 7)

| (51) Int. Cl. | F I | テーマコード (参考) |
|-----------------------------|-----------------|-----------------|
| C07K 16/28 (2006.01) | C07K 16/28 | 4B024 |
| C12N 15/09 (2006.01) | C12N 15/00 ZNAA | 4B064 |
| C12N 1/15 (2006.01) | C12N 1/15 | 4B065 |
| C12N 1/19 (2006.01) | C12N 1/19 | 4C085 |
| C12N 1/21 (2006.01) | C12N 1/21 | 4H045 |
| 審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 | | (全 80 頁) 最終頁に続く |

| | | | |
|--------------|------------------------------|----------|---|
| 出願番号 | 特願2010-519081 (P2010-519081) | (71) 出願人 | 000001029 協和発酵キリン株式会社 東京都千代田区大手町1丁目6番1号 |
| (21) 国際出願番号 | PCT/JP2009/061996 | (74) 代理人 | 100105647 弁理士 小栗 昌平 |
| (22) 国際出願日 | 平成21年6月30日 (2009. 6. 30) | (74) 代理人 | 100105474 弁理士 本多 弘徳 |
| (31) 優先権主張番号 | 特願2008-171353 (P2008-171353) | (74) 代理人 | 100108589 弁理士 市川 利光 |
| (32) 優先日 | 平成20年6月30日 (2008. 6. 30) | (74) 代理人 | 100129160 弁理士 古館 久丹子 |
| (33) 優先権主張国 | 日本国 (JP) | (72) 発明者 | 森 勝弘 東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和発酵キリン株式会社 研究推進部内 |
| | | 最終頁に続く | |

(54) 【発明の名称】 抗CD27抗体

(57) 【要約】

本発明は、ガラクトースが結合していないO結合型糖鎖を含むCD27を特異的に認識し、該細胞外領域に結合するモノクローナル抗体およびその使用方法を提供することにある。

本発明によれば、ガラクトースが結合していないO結合型糖鎖を含むCD27を特異的に認識し、該細胞外領域に結合するモノクローナル抗体または該抗体断片、該抗体を産生するハイブリドーマ、該抗体をコードするDNA、該DNAを含んでなるベクター、該ベクターを形質転換して得られる形質転換体、該ハイブリドーマまたは形質転換体を用いる抗体または該抗体断片の製造方法、ならびに該抗体または抗体断片を有効成分として含有してなるCD27が関与する疾患の診断薬または治療薬を提供することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ガラクトースが結合していないO結合型糖鎖を含む、CD27遺伝子によってコードされるポリペプチド（以下、CD27と記す）の細胞外領域を特異的に認識し、結合するモノクローナル抗体または該抗体断片。

【請求項 2】

O結合型糖鎖が結合した、CD27の細胞外領域のうち、ガラクトースが結合したO結合型糖鎖を含むCD27の細胞外領域は認識せず、ガラクトースが結合していないO結合型糖鎖を含むCD27の細胞外領域を認識し、結合するモノクローナル抗体または該抗体断片。

【請求項 3】

ガラクトースが結合していないO結合型糖鎖が、シアリルTn抗原またはTn抗原から選ばれる少なくとも1つのO結合型糖鎖である、請求項1または2に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

【請求項 4】

ガラクトースが結合していないO結合型糖鎖がTn抗原である、請求項3に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

【請求項 5】

モノクローナル抗体が、モノクローナル抗体KM4030と競合反応するモノクローナル抗体である請求項3または4に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

【請求項 6】

モノクローナル抗体が、モノクローナル抗体KM4030が結合するエピトープに結合するモノクローナル抗体である、請求項1～3のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

【請求項 7】

モノクローナル抗体が、受託番号FERM BP 10976として寄託されているハイブリドーマから生産されるモノクローナル抗体である、請求項1～6のいずれか1項に記載の抗体または抗体断片。

【請求項 8】

モノクローナル抗体が、遺伝子組換え抗体である、請求項1～6のいずれか1項に記載の抗体または該抗体断片。

【請求項 9】

遺伝子組換え抗体が、ヒト型キメラ抗体、ヒト化抗体およびヒト抗体から選ばれる抗体である、請求項8に記載の遺伝子組換え抗体または該抗体断片。

【請求項 10】

抗体断片が、Fab、Fab'、F(ab')₂、一本鎖抗体（scFv）、二量体化V領域（Diabody）、ジスルフィド安定化V領域（dsFv）およびCDRを含むペプチドから選ばれる抗体断片である請求項1～9のいずれか1項に記載の抗体断片。

【請求項 11】

請求項1～7のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ。

【請求項 12】

ハイブリドーマが、受託番号FERM BP 10976として寄託されているハイブリドーマである、請求項11に記載のハイブリドーマ。

【請求項 13】

請求項1～10のいずれか1項に記載の抗体または該抗体断片をコードするDNA。

【請求項 14】

請求項13に記載のDNAを含有する組換え体ベクター。

【請求項 15】

請求項14に記載の組換え体ベクターを宿主細胞に導入して得られる形質転換株。

【請求項 16】

請求項11または12に記載のハイブリドーマまたは請求項15に記載の形質転換株を培地に培

10

20

30

40

50

養し、培養物中に請求項1～10のいずれか1項に記載の抗体または該抗体断片を生成蓄積させ、該培養物から抗体または該抗体断片を採取することを特徴とする請求項1～10のいずれか1項に記載の抗体または該抗体断片の製造方法。

【請求項17】

請求項1～10のいずれか1項に記載の抗体または該抗体断片を用いる、ガラクトースが結合していないO結合型糖鎖を含むCD27の免疫学的検出または測定方法。

【請求項18】

請求項1～10のいずれか1項に記載の抗体または該抗体断片を用いる、ガラクトースが結合していないO結合型糖鎖を含むCD27の検出試薬。

【請求項19】

請求項1～10のいずれか1項に記載の抗体または該抗体断片を用いる、ガラクトースが結合していないO結合型糖鎖を含むCD27が関与する疾患の診断薬。

【請求項20】

ガラクトースが結合していないO結合型糖鎖を含むCD27が関与する疾患がIgA腎症である、請求項19に記載の診断薬。

【請求項21】

ガラクトースが結合していないO結合型糖鎖を含むCD27が関与する疾患が癌である、請求項19に記載の診断薬。

【請求項22】

請求項1～10のいずれか1項に記載の抗体または抗体断片を有効成分として含有する、ガラクトースが結合していないO結合型糖鎖を含むCD27が関与する疾患の治療薬。

【請求項23】

ガラクトースが結合していないO結合型糖鎖を含むCD27が関与する疾患がIgA腎症である、請求項22に記載の治療薬。

【請求項24】

ガラクトースが結合していないO結合型糖鎖を含むCD27が関与する疾患が、癌である、請求項22に記載の治療薬。

【請求項25】

請求項1～10のいずれか1項に記載の抗体または該抗体断片を用いて、ガラクトースが結合していないO結合型糖鎖を含むCD27が発現した細胞を検出または測定することを含む、ガラクトースが結合していないO結合型糖鎖を含むCD27が関与する疾患の診断方法。

【請求項26】

請求項1～10のいずれか1項に記載の抗体または該抗体断片を用いて、ガラクトースが結合していないO結合型糖鎖を含むCD27を検出または測定することを含む、ガラクトースが結合していないO結合型糖鎖を含むCD27が関与する疾患の診断方法。

【請求項27】

ガラクトースが結合していないO結合型糖鎖を含むCD27が関与する疾患がIgA腎症である、請求項25または26に記載の診断方法。

【請求項28】

ガラクトースが結合していないO結合型糖鎖を含むCD27が関与する疾患が癌である、請求項25または26に記載の診断方法。

【請求項29】

ガラクトースが結合していないO結合型糖鎖を含むCD27が関与する疾患の診断薬を製造するための、請求項1～10のいずれか1項に記載の抗体または該抗体断片の使用。

【請求項30】

ガラクトースが結合していないO結合型糖鎖を含むCD27が関与する疾患の治療薬を製造するための、請求項1～10のいずれか1項に記載の抗体または該抗体断片の使用。

【請求項31】

ガラクトースが結合していないO結合型糖鎖を含むCD27が関与する疾患がIgA腎症である、請求項29または30に記載の抗体または該抗体断片の使用。

10

20

30

40

50

【請求項32】

ガラクトースが結合していないO結合型糖鎖を含むCD27が関与する疾患が癌である、請求項29または30に記載の抗体または該抗体断片の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ガラクトースが結合していないO結合型糖鎖を含むCD27遺伝子によりコードされるポリペプチドを特異的に認識し、該細胞外領域に結合するモノクローナル抗体または該抗体断片、該抗体を産生するハイブリドーマ、該抗体をコードするDNA、該DNAを含んでなるベクター、該ベクターを形質転換して得られる形質転換体、該ハイブリドーマまたは形質転換体を用いる抗体または該抗体断片の製造方法、ならびに該抗体または抗体断片を用いる診断薬、または該抗体または抗体断片を有効成分として含有する治療薬に関する。

10

【背景技術】

【0002】

近年、種々の疾患の発症や病態の進行に伴い、その疾患や病態に関わる細胞が発現するタンパク質に付加された糖鎖構造に変化が起こる事例が報告されている。この事例のなかで代表的なものは、80%を超えるヒトの癌種において発現が認められるO結合型（セリンスレオニン型）糖鎖抗原の1つであるTn抗原と、このTn抗原にシアル酸が付加されたシアリルTn抗原の発現である（非特許文献2）。これらの糖鎖抗原は正常細胞にはほとんど発現が認められないことが知られており、癌特異的ワクチン療法の標的分子として医療に応用するための研究がなされている（非特許文献1）。これらの癌特異的な糖鎖抗原の発現は、生体内に存在する複雑な糖鎖生合成経路と糖鎖代謝経路を構成する酵素活性により制御されている。その一例として、癌細胞において、糖鎖生合成経路に関与するタンパク質をコードする遺伝子の発現様式が変化した結果、糖鎖生合成経路が途中で遮断される例などが知られている。Tn抗原は、正常細胞におけるO結合型糖鎖の生合成経路の中間産物として知られており、タンパク質アミノ酸配列中の特定のセリン（Ser）残基またはスレオニン（Thr）残基の側鎖に存在する水酸基に、Nアセチルガラクトサミン（GalNAc）が結合した構造である（GalNAc-Ser/Thr）。このTn抗原の非還元末端側に、コア1-3ガラクトース転移酵素（core1-3Gal T, T synthetase）の活性によってガラクトースが1分子転移されることにより、正常型のO結合型糖鎖（TF抗原など）の生合成が進行する。複数種の癌細胞株において、細胞内のコア1-3ガラクトース転移酵素の活性が低下した結果、糖鎖の生合成経路が遮断され、Tn抗原あるいはシアリルTn抗原が発現すると考えられている。癌細胞内でコア1-3ガラクトース転移酵素の活性が低下する機構は複雑であり、現在でも完全には解明されていない。しかし、その機構のひとつに、コア1-3ガラクトース転移酵素の活性発現に必要な特定のシャペロンタンパク質（Cosmc）をコードする遺伝子の変異した結果、細胞内のコア1-3ガラクトース転移酵素活性が大幅に低下する、という機構が推定されている（非特許文献6）。複数の癌種で共通してTn抗原の発現が認められることから、細胞内の糖鎖生合成経路や糖鎖代謝経路における異常は、その細胞内で発現する多くの異なる糖タンパク質に付加した糖鎖構造に共通した変化を生じさせる主たる原因と考えられている。

20

30

40

【0003】

糖鎖構造の変化と病態の進行が密接に関わっていることが知られている疾患の代表的は癌である。また、癌以外に糖鎖構造の変化と病態の進行が密接に関わっていることが知られている疾患として、IgA腎症が知られている。IgA腎症とは、免疫グロブリンの一種であるイムノグロブリンA（IgA）が腎系球体のメサンギウム領域に顆粒状に沈着した病理像が特徴的な慢性系球体腎炎であり、1968年にBergerによって初めて報告された（非特許文献2）。この疾患は、日本国内の慢性系球体腎炎患者数の約半数を占める代表的な腎炎である。IgA腎症と診断された患者の約4割はその後20年以内に末期腎不全に移行し、人工透析や腎移植を余儀なくされるといわれている。このようにIgA腎症は一般的に予後不良の疾

50

患として認識されているにもかかわらず、臨床で有効性が証明された治療法は未だ確立していない。IgA腎症の患者体内では、2種類のIgAアイソタイプ（IgA1とIgA2）のうち、主にIgA1が腎臓に沈着することが知られている。また、その沈着の原因のひとつとして、IgA2分子には無く、IgA1分子に存在するヒンジ領域に付加されたO結合型糖鎖の構造が、正常型からTn抗原あるいはシアリルTn抗原に変化していることが報告されている（非特許文献3、非特許文献4）。IgA1ヒンジ領域に付加したO結合型糖鎖からガラクトースが欠損してTn抗原あるいはシアリルTn抗原に変化するとIgA1分子の自己凝集能が亢進すること、ならびにIgA1分子の腎メサンギウム領域への沈着が亢進することが証明されている（非特許文献5）。さらに、IgA腎症患者から単離したIgA産生細胞において、Cosmcの発現量低下に起因したコア1-3ガラクトース転移酵素活性の低下が報告されている（非特許文献6）。すなわち、IgA腎症患者体内のIgA産生細胞では糖鎖生合成経路が途中で遮断された結果、正常型糖鎖を持つIgA1の産生ができなくなり、代わりに糖鎖不全型のIgA1が産生される。IgA腎症の発症機構のひとつとして、この糖鎖不全型IgA1が腎系球体に沈着した結果、炎症が惹起されるという機構が提唱されている。

10

【0004】

一般的にIgAは、血液中のB細胞、あるいは、B細胞から分化した形質細胞によって産生される。形質細胞は、B細胞分化の最終段階であり、二次リンパ組織、全身の粘膜組織、骨髄などに分布して大量の抗体を産生するが、IgAを産生する形質細胞は、主に粘膜組織に分布することが知られている。一方、二次リンパ組織の胚中心において、高親和性のIgA抗体産生能を獲得したB細胞クローンからは、メモリーB細胞あるいは、形質細胞が分化し、全身の標的臓器に分布して長期にわたり抗体を産生し続けることが知られている。しかしながら、IgA腎症の発症に關与する糖鎖不全IgAを産生する細胞が、B細胞分化過程のどの段階で発生するのか、また糖鎖不全IgAを産生するB細胞あるいは形質細胞が、体内のどの組織に分布するのかについては、明らかにされていない。

20

【0005】

B細胞あるいは形質細胞に発現する細胞膜表面分子として知られるタンパク質の中で、O結合型糖鎖が結合する分子の一つとして、CD27が知られている（非特許文献7）。CD27分子は、腫瘍壊死因子受容体（TNFR）スーパーファミリーに属する分子量が約55 kDaのI型膜タンパク質であり、2つの単量体がジスルフィド結合により連結したダイマーとして存在する（非特許文献8）。CD27は、形質細胞、B細胞の他にTリンパ球の一部に発現していることが知られているが、特にB細胞の分化過程において、メモリーB細胞および形質細胞へ分化する際に、発現が上昇することが知られている。これらの分化過程の細胞には、O結合型糖鎖が結合したCD27が発現していることが知られているが、糖鎖が結合するアミノ酸残基は明らかにされていない（非特許文献9）。CD27のリガンド分子としてはTNFファミリーのひとつであるCD70が知られている。CD70は、一部のB細胞あるいはT細胞に発現するCD27に結合し、細胞増殖シグナルを導入すること、あるいはB細胞の抗体産生を促すことが知られている（非特許文献10）。

30

【0006】

また、CD27は正常細胞だけではなく、いくつかの癌細胞において発現が亢進していることが知られている。CD27を発現している癌種としては、マンツル細胞リンパ腫、慢性リンパ性白血病、小リンパ性白血病、パーキットリンパ腫、濾胞性リンパ腫、モルトリンパ腫、びまん性大細胞リンパ腫、形質細胞腫、等、種々の非ホジキンリンパ腫が報告されている（非特許文献11）。多くの癌細胞では、先述のようにTn抗原またはシアリルTn抗原などの糖鎖を含む、糖鎖不全タンパク質を発現していることが知られている。

40

【0007】

CD27を特異的に認識する抗体としては、Sezary症候群患者から単離した白血病細胞を免疫することにより得られたS152抗体が報告されている（非特許文献8）。

S152抗体は、正常B細胞およびT細胞に対しても親和性を有することが示されている。これまでにガラクトースが結合していないO結合型糖鎖を含むCD27分子を特異的に認識するような抗体は知られていない。

50

一般に非ヒト抗体、例えばマウス抗体などをヒトに投与すると、異物として認識されることにより、ヒト体内にマウス抗体に対するヒト抗体 (Human Anti Mouse Antibody:HAMA) が誘導されることが知られている。HAMAは投与されたマウス抗体と反応し、副作用を引き起こしたり (非特許文献12~15)、マウス抗体の体内からの消失を速め (非特許文献16~18)、マウス抗体の治療効果を低下させてしまうことが知られている (非特許文献19、20)。

【0008】

これらの問題点を解決するため、遺伝子組換え技術を利用して非ヒト抗体からヒト型キメラ抗体やヒト化抗体の作製が試みられている。

ヒト化抗体は、マウス抗体などの非ヒト抗体と比較して、ヒトへの投与を行う上で、様々な利点を有している。例えば、サルを用いた実験でマウス抗体に比べ免疫原性が低下し、血中半減期が延長したことが報告されている (非特許文献21、非特許文献22)。すなわち、ヒト化抗体は、非ヒト抗体に比べ、ヒトにおいて副作用が少なく、その治療効果が長期間持続することが期待される。

【0009】

また、ヒト化抗体は、遺伝子組換え技術を利用して作製するため、様々な形態の分子として作製することができる。例えば、ヒト抗体の重鎖 (以下、H鎖と表記する) 定常領域 (以下、C領域と表記する) (H鎖C領域を、CHと表記する) として 1サブクラスを使用すれば、抗体依存性細胞傷害活性 (以下、ADCC活性と表記する) などのエフェクター機能の高いヒト化抗体を作製することができ (非特許文献23)、かつ、マウス抗体に比べ血中半減期の延長が期待される (非特許文献24)。特に体内からTn抗原型CD27陽性細胞を除去する治療においては、抗体を介してエフェクター細胞を標的細胞の近傍に集積させ、標的細胞を特異的に傷害するために、抗体のFc領域 (抗体重鎖のヒンジ領域以降の領域) を介した補体依存性細胞傷害活性 (以下、CDC活性と表記する) やADCC活性等の細胞傷害活性が重要である。ヒトの治療においては、細胞傷害活性を発揮させるために、ヒト型キメラ抗体、ヒト化抗体またはヒト化抗体を用いることが望ましい (非特許文献25、26)。

【0010】

さらに、ヒト化抗体は、最近のタンパク質工学、遺伝子工学の進歩により、Fab、Fab'、F(ab')₂、一本鎖抗体 (以下、scFvと表記する) (非特許文献27)、2量体化V領域断片 (以下、Diabodyと表記する) (非特許文献28)、ジスルフィド安定化V領域断片 (以下、dsFvと表記する) (非特許文献29)、CDRを含むペプチド (非特許文献30) などの、分子量の小さい抗体断片としても作製でき、これらの抗体断片は、完全な抗体分子に比べ、標的組織への移行性に優れている (非特許文献31)。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0011】

【非特許文献1】 Crit Rev Oncog.,6,57(1995)

【非特許文献2】 J Urol Nephrol.,74,694(1968)

【非特許文献3】 Clin Exp Immunol.,100,470(1995)

【非特許文献4】 J Am Soc Neph.,7,955(1996)

【非特許文献5】 Nephrol Dial Transplant.,17,50(2002)

【非特許文献6】 J Intern Med.,258,467(2005)

【非特許文献7】 Current Opinion in Immunology 17, 275 (2005)

【非特許文献8】 J Immunol.,141,21(1988)

【非特許文献9】 Eur J Immunol.,22,447(1992)

【非特許文献10】 Proc.Natl.Acad.Sci.,94.6346(1997)

【非特許文献11】 Leukemia and Lymphoma., 43,1855(2002)

【非特許文献12】 Hum.Pathol.,38,564(2007)

【非特許文献13】 Hum.Pathol.,36,886(2005)

【非特許文献14】 FEBS Lett.,579,6179(2005)

10

20

30

40

50

- 【非特許文献 1 5】Cancer Res.,65,7378(2005)
- 【非特許文献 1 6】Hum.Pathol.,36,886(2005)
- 【非特許文献 1 7】Oncogene,13,2328(2006)
- 【非特許文献 1 8】Virchows Arch.,448,52(2006)
- 【非特許文献 1 9】J.Immunol.,135,1530(1985)
- 【非特許文献 2 0】Cancer Res.,46,6489(1986)
- 【非特許文献 2 1】Cancer Res.,56,1118(1996)
- 【非特許文献 2 2】Immunol.,85,668(1995)
- 【非特許文献 2 3】Cancer Res.,56,1118(1996)
- 【非特許文献 2 4】Immunol.,85,668(1995)
- 【非特許文献 2 5】J.Immunol.,144,1382(1990)
- 【非特許文献 2 6】Nature,322,323(1988)
- 【非特許文献 2 7】Science,242,423(1988)
- 【非特許文献 2 8】Nature Biotechnol.,15,629(1997)
- 【非特許文献 2 9】Molecular Immunol.,32,249(1995)
- 【非特許文献 3 0】J.Biol.Chem.,271,2966(1996)
- 【非特許文献 3 1】Cancer Res.,52,3402(1992)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

本発明の目的はガラクトースが結合していない0結合型糖鎖を含むCD27を特異的に認識し、該細胞外領域に結合するモノクローナル抗体またはその使用方法を提供することにある。

【0013】

ガラクトースが結合していない0結合型糖鎖を含むCD27を特異的に認識し、該細胞外領域に結合するモノクローナル抗体またはその使用方法が求められている。

【課題を解決するための手段】

【0014】

本発明は、(1)～(32)に関する。

(1) ガラクトースが結合していない0結合型糖鎖を含む、CD27遺伝子によってコードされるポリペプチド(以下、CD27と記す)の細胞外領域を特異的に認識し、結合するモノクローナル抗体または該抗体断片。

(2) 0結合型糖鎖が結合した、CD27の細胞外領域のうち、ガラクトースが結合した0結合型糖鎖を含むCD27の細胞外領域は認識せず、ガラクトースが結合していない0結合型糖鎖を含むCD27の細胞外領域を認識し、結合するモノクローナル抗体または該抗体断片。

(3) ガラクトースが結合していない0結合型糖鎖が、シアリルTn抗原またはTn抗原から選ばれる少なくとも1つの0結合型糖鎖である、(1)または(2)に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

(4) ガラクトースが結合していない0結合型糖鎖がTn抗原である、(3)に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

(5) モノクローナル抗体が、ガラクトースが結合していない0結合型糖鎖を含むCD27の細胞外領域への結合において、モノクローナル抗体KM4030と競合反応するモノクローナル抗体である(3)または(4)に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

(6) モノクローナル抗体が、モノクローナル抗体KM4030が結合する、ガラクトースが結合していない0結合型糖鎖を含むCD27の細胞外領域に存在するエピトープに結合するモノクローナル抗体である、(1)～(3)のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

(7) モノクローナル抗体が、受託番号FERM BP 10976として寄託されているハイブリドーマから生産されるモノクローナル抗体である、(1)～(6)のいずれか1項に記載の抗体または抗体断片。

10

20

30

40

50

(8) モノクローナル抗体が、遺伝子組換え抗体である、(1) ~ (6) のいずれか1項に記載の抗体または該抗体断片。

(9) 遺伝子組換え抗体が、ヒト型キメラ抗体、ヒト化抗体およびヒト抗体から選ばれる抗体である、(8) に記載の遺伝子組換え抗体または該抗体断片。

(10) 抗体断片が、Fab、Fab'、F(ab')₂、一本鎖抗体(scFv)、二量体化V領域(Diabody)、ジスルフィド安定化V領域(dsFv) およびCDRを含むペプチドから選ばれる抗体断片である(1) ~ (9) のいずれか1項に記載の抗体断片。

(11) (1) ~ (7) のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ。

(12) ハイブリドーマが、受託番号FERM BP 10976として寄託されているハイブリドーマである、(11) に記載のハイブリドーマ。

(13) (1) ~ (10) のいずれか1項に記載の抗体または該抗体断片をコードするDNA。

(14) (13) に記載のDNAを含有する組換え体ベクター。

(15) (14) に記載の組換え体ベクターを宿主細胞に導入して得られる形質転換株。

(16) (11) または(12) に記載のハイブリドーマまたは(15) に記載の形質転換株を培地に培養し、培養物中に(1) ~ (10) のいずれか1項に記載の抗体または該抗体断片を生成蓄積させ、該培養物から抗体または該抗体断片を採取することを特徴とする(1) ~ (10) のいずれか1項に記載の抗体または該抗体断片の製造方法。

(17) (1) ~ (10) のいずれか1項に記載の抗体または該抗体断片を用いる、ガラクトースが結合していないO結合型糖鎖を含むCD27の免疫学的検出または測定方法。

(18) (1) ~ (10) のいずれか1項に記載の抗体または該抗体断片を用いる、ガラクトースが結合していないO結合型糖鎖を含むCD27の検出試薬。

(19) (1) ~ (10) のいずれか1項に記載の抗体または該抗体断片を用いる、ガラクトースが結合していないO結合型糖鎖を含むCD27が関与する疾患の診断薬。

(20) ガラクトースが結合していないO結合型糖鎖を含むCD27が関与する疾患がIgA腎症である、(19) に記載の診断薬。

(21) ガラクトースが結合していないO結合型糖鎖を含むCD27が関与する疾患が癌である、(19) に記載の診断薬。

(22) (1) ~ (10) のいずれか1項に記載の抗体または抗体断片を有効成分として含有する、ガラクトースが結合していないO結合型糖鎖を含むCD27が関与する疾患の治療薬。

(23) ガラクトースが結合していないO結合型糖鎖を含むCD27が関与する疾患がIgA腎症である、(22) に記載の治療薬。

(24) CD27遺伝子によりコードされるポリペプチドにガラクトースを欠失したO型糖鎖が結合した構造が関与する疾患が癌である、(22) に記載の治療薬。

(25) (1) ~ (10) のいずれか1項に記載の抗体または該抗体断片を用いてガラクトースが結合していないO結合型糖鎖を含むCD27が発現した細胞を検出または測定することを、ガラクトースが結合していないO結合型糖鎖を含むCD27が関与する疾患の診断方法。

(26) (1) ~ (10) のいずれか1項に記載の抗体または該抗体断片を用いてガラクトースが結合していないO結合型糖鎖を含むCD27を検出または測定することを、ガラクトースが結合していないO結合型糖鎖を含むCD27が関与する疾患の診断方法。

(27) ガラクトースが結合していないO結合型糖鎖を含むCD27が関与する疾患がIgA腎症である、(25) または(26) に記載の診断方法。

(28) ガラクトースが結合していないO結合型糖鎖を含むCD27が関与する疾患が癌である、(25) または(26) に記載の診断方法。

(29) ガラクトースが結合していないO結合型糖鎖を含むCD27が関与する疾患の診断薬を製造するための、(1) ~ (10) のいずれか1項に記載の抗体または該抗体断片の使用。

(30) ガラクトースが結合していないO結合型糖鎖を含むCD27が関与する疾患の治療薬を製造するための、(1) ~ (10) のいずれか1項に記載の抗体または該抗体断片の使用。

(31) ガラクトースが結合していないO結合型糖鎖を含むCD27が関与する疾患がIgA腎症で

10

20

30

40

50

ある、(29)または(30)に記載の抗体または該抗体断片の使用。

(32)ガラクトースが結合していない結合型糖鎖を含むCD27が関与する疾患が癌である、(29)または(30)に記載の抗体または該抗体断片の使用。

【発明の効果】

【0015】

本発明により、ガラクトースが結合していない結合型糖鎖を含む、CD27遺伝子によってコードされるポリペプチド(以下、CD27と記載する)の細胞外領域を特異的に認識し、該細胞外領域に結合するモノクローナル抗体を提供することができる。また、本発明により、ガラクトースが結合していない結合型糖鎖を含むCD27が関与する各種疾患の治療薬または診断薬を提供することができる。

10

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】ヒトCD27タンパク質コードするDNA配列を含む、プラスミドベクターpCR2.1 CD27の作製方法を示す。

【図2】ヒトCD27タンパク質の細胞外領域をコードするDNA配列を含む、プラスミドベクターpCR CD27axbの作製方法を示す。

【図3】ヒトIgG4定常領域のアミノ酸置換を行った変異型ヒトIgG4Fc領域を有するプラスミドベクターpBShC 4SPの作製方法を示す。

【図4】変異型ヒトIgG4Fc領域のDNA配列に制限酵素認識配列を挿入したDNA配列を含むプラスミドベクターpCR IgG4Fc BamHISallの作製方法を示す。

20

【図5】CD27 FcのDNA配列を挿入する、pKANTEX XhoI/Sallの作製方法を示す。

【図6】CD27 Fcタンパク質発現ベクターpKANTEX CD27 hIgG4Fcの作製方法を示す。

【図7】CHO/DG44細胞およびLec8細胞を宿主細胞として発現させたCD27 Fcタンパク質のSDS PAGE解析の結果を示す。左側は、メルカプトエタノールを添加していない還元状態、右側は、メルカプトエタノールを添加した還元状態を示す。いずれも、左からマーカー、Lec8細胞およびCHO/DG44細胞のフラクションを示す。

【図8】CHO/DG44細胞およびLec8細胞を宿主細胞として発現させたCD27 Fcタンパク質を、SDS PAGE解析(左側)またはウエスタンブロット(右側)の結果を示す。いずれも、左のレーンから、マーカー、CHO/DG44細胞およびLec8細胞のサンプルを示す。ウエスタンブロットは、抗RCAS1抗体22 1 1抗体を用いて染色を行った。

30

【図9】動物細胞発現用のCD27タンパク質をコードするDNAを含むプラスミドベクターpCR CD27 axcの作製方法を示す。

【図10】動物細胞発現ベクターpKANTEX CD27の作製方法を示す。

【図11】CD27発現CHO/DG44細胞、およびCD27発現Lec8細胞に対する、抗CD27モノクローナル抗体のフローサイトメーターの結果を示す。上段が、CD27/Lec8 4に対するヒストグラム、下段が、CD27/DG44 8に対するヒストグラムの結果を示す。いずれのヒストグラムも、縦軸が細胞数、横軸が蛍光強度を示す。

【図12】抗糖鎖不全CD27モノクローナル抗体KM4030およびKM4031の、Lec8細胞、CD27/Lec8 4細胞およびCD27/DG44 8細胞に対する結合活性を、蛍光細胞染色法を用いて測定した結果を示す。上段は、ABIセルラーディテクションシステムを用いた測定結果を示し、縦軸は蛍光強度、横軸は反応させた抗体を示す。下段は、フローサイトメーター(FCM)を用いた測定結果を示し、縦軸が平均蛍光強度、横軸が反応させた抗体を示す。

40

【図13】抗糖鎖不全CD27モノクローナル抗体KM4030およびKM4031の競合ELISAの結果を示す。上段は抗糖鎖不全CD27モノクローナル抗体KM4030の反応性、下段は抗糖鎖不全CD27モノクローナル抗体KM4031の反応性を示す。縦軸が細胞増殖、横軸が抗体濃度を示す。

【図14】抗糖鎖不全CD27モノクローナル抗体の遺伝子クローニング方法を示す。

【図15】抗糖鎖不全CD27キメラ抗体発現ベクターの造成方法を示す。

【図16】抗糖鎖不全CD27キメラ抗体発現ベクターの造成方法を示す。

【図17】抗糖鎖不全CD27キメラ抗体発現ベクターの造成方法を示す。

【図18】抗糖鎖不全CD27キメラ抗体発現ベクターの造成方法を示す。

50

【図19-1】各種抗糖鎖不全CD27キメラ抗体キメラ型KM4026()、キメラ型KM4028()、キメラ型KM4030()、キメラ型KM4031()、市販抗CD27抗体0323()および市販抗Tn抗体2211()の、CD27/Lec8 4細胞に対する結合活性を、フローサイトメーター(FCM)を用いて測定した結果を示す。縦軸は平均蛍光強度を、横軸は反応させた抗体の終濃度を示す。

【図19-2】各種抗糖鎖不全CD27キメラ抗体キメラ型KM4026()、キメラ型KM4028()、キメラ型KM4030()、キメラ型KM4031()、市販抗CD27抗体0323()および市販抗Tn抗体2211()の、CD27/DG44 4細胞に対する結合活性を、フローサイトメーター(FCM)を用いて測定した結果を示す。縦軸は平均蛍光強度を、横軸は反応させた抗体の終濃度を示す。

【図19-3】各種抗糖鎖不全CD27キメラ抗体キメラ型KM4026()、キメラ型KM4028()、キメラ型KM4030()、キメラ型KM4031()、市販抗CD27抗体0323()および市販抗Tn抗体2211()の、Lec8細胞に対する結合活性を、フローサイトメーター(FCM)を用いて測定した結果を示す。縦軸は平均蛍光強度を、横軸は反応させた抗体の終濃度を示す。

【図20】各種抗糖鎖不全CD27キメラ抗体キメラ型KM4026()、キメラ型KM4028()、キメラ型KM4030()およびキメラ型KM4031()の、CD27/Lec8 4細胞に対する抗体依存性細胞傷害活性(ADCC活性)を示す。縦軸は細胞傷害活性(%)を、横軸は各抗体の終濃度を示す。

【図21】各種抗糖鎖不全CD27キメラ抗体キメラ型KM4026、キメラ型KM402、キメラ型KM4030およびキメラ型KM4031のCD27/Lec8 4細胞に対する補体依存性細胞傷害活性(CDC活性)を示す。縦軸は細胞傷害活性(%)を、横軸は反応させた抗体を示す。

【図22】サルCD27タンパク質をコードするDNAを含むプラスミドベクターpCR mfCD27の造成方法を示す。

【図23】サルCD27タンパク質をコードするDNAを含むプラスミドベクターmfCD27Hisの造成方法を示す。

【図24】サルCD27発現ベクターpKANTEX mfCD27Hisの作製方法を示す。

【図25】各種抗糖鎖不全CD27キメラ抗体キメラ型KM4026、キメラ型KM402、キメラ型KM4030、キメラ型KM4031および市販抗CD27抗体0323の、カニクイザルCD27/Lec8細胞またはカニクイザルCD27/DG44細胞に対する結合活性を、フローサイトメーター(FCM)を用いて測定した結果を示す。縦軸は平均蛍光強度を、横軸は反応させた抗体を示す。

【図26】各種抗糖鎖不全CD27キメラ抗体キメラ型KM4026()、キメラ型KM4028()、キメラ型KM4030()およびキメラ型KM4031()の、カニクイザルCD27/Lec8細胞に対する抗体依存性細胞傷害活性(ADCC活性)を示す。縦軸は細胞傷害活性(%)を、横軸は各抗体の終濃度を示す。

【図27】各種抗糖鎖不全CD27キメラ抗体キメラ型KM4030の、カニクイザルCD27/Lec8細胞()もしくはヒトCD27/Lec8細胞()に対する抗体依存性細胞傷害活性(ADCC活性)を示す。縦軸は細胞傷害活性(%)を、横軸は各抗体の終濃度を示す。

【図28-1】各種抗糖鎖不全CD27抗体KM4026、KM402、KM4030およびKM4031の、糖鎖不全CD27 Fc(Tn抗原型CD27 Fcに対する結合のピアコアセンサーグラムを示す。縦軸はRU(Resonanceユニット)を、横軸は反応時間(s)を示す。

【図28-2】各種抗糖鎖不全CD27抗体KM4026、KM402、KM4030およびKM4031の、(シアルルTn抗原型CD27 Fc)に対する結合のピアコアセンサーグラムを示す。縦軸はRU(Resonanceユニット)を、横軸は反応時間(s)を示す。

【発明を実施するための形態】

【0017】

本発明は、ガラクトースが結合していない結合型糖鎖を含む、CD27遺伝子によってコードされるポリペプチド(以下、CD27とも記載する)の細胞外領域を特異的に認識し、該細胞外領域に結合するモノクローナル抗体に関する。CD27遺伝子としては、CD27をコードする遺伝子であればいずれでもよいが、配列番号1で示される塩基配列を含む遺伝子がある。また、配列番号1で示される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件

10

20

30

40

50

下でハイブリダイズし、かつCD27の機能を有するポリペプチドをコードする遺伝子なども本発明のCD27遺伝子に包含される。

【0018】

ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAとは、配列番号1で示される塩基配列を有するDNAをプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブランク・ハイブリダイゼーション法、サザンブロット・ハイブリダイゼーション法、DNAマイクロアレイ法などにより得られるハイブリダイズ可能なDNAを意味し、具体的には、ハイブリダイズしたコロニーまたはブランク由来のDNA、もしくは該配列を有するPCR産物もしくはオリゴDNAを固定化したフィルターまたはスライドガラスを用いて、0.7~1.0 mol/Lの塩化ナトリウム存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1~2倍濃度のSSC溶液(1倍濃度のSSC溶液の組成は、150 mmol/L塩化ナトリウム、15 mmol/Lクエン酸ナトリウムを含む)を用い、65℃条件下でフィルターもしくはスライドガラスを洗浄することにより同定できるDNAをあげることができる。ハイブリダイゼーションは、[Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition(Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989)、Current Protocols in Molecular Biology(John Wiley & Sons,1987 1997)、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition(Oxford University Press, 1995)]などに記載されている方法に準じて行うことができる。ハイブリダイズ可能なDNAとしては、配列番号1で示される塩基配列と少なくとも60%以上の相同性を有するDNA、好ましくは80%以上の相同性を有するDNA、さらに好ましくは95%以上の相同性を有するDNAをあげることができる。

10

20

【0019】

真核生物のタンパク質をコードする遺伝子の塩基配列には、しばしば遺伝子の多型が認められる。本発明において用いられるCD27遺伝子には、遺伝子の多型によって塩基配列にわずかに変異を生じた遺伝子も包含される。

CD27としては、配列番号2で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号2で示されるアミノ酸配列において1つ以上のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列からなり、かつCD27の機能を有するポリペプチド、ならびに配列番号2で示されるアミノ酸配列と60%以上、好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつCD27の機能を有するポリペプチドなどがあげられる。

30

【0020】

配列番号2で示されるアミノ酸配列において1つ以上のアミノ酸が欠失、置換、または付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチドは、[Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition(Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989)、Current Protocols in Molecular Biology(John Wiley & Sons,1987 1997)、Nucleic Acids Research, 10,6487(1982)、Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 79,6409(1982)、Gene, 34,315(1985)、Nucleic Acids Research, 13,4431(1985)、Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 82,488(1985)]などに記載の部位特異的変異導入法を用いて、例えば配列番号2で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするDNAに部位特異的変異を導入することにより得ることができる。欠失、置換または付加されるアミノ酸の数は特に限定されないが、好ましくは1個~数十個、例えば、1~20個、より好ましくは1個~数個、例えば、1~5個のアミノ酸である。

40

【0021】

本発明に記載される相同性の数値は、特に明示した場合を除き、当業者に公知の相同性検索プログラムを用いて算出される数値であってよいが、塩基配列については、BLAST [J.Mol.Biol., 215,403 (1990)]においてデフォルトのパラメータを用いて算出される数値など、アミノ酸配列については、BLAST2[Nucleic Acids Res., 25,3389(1997);Genome Res., 7,649(1997);<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Education/BLASTinfo/information3.html>]においてデフォルトのパラメータを用いて算出される数値などがあげられる。

【0022】

デフォルトのパラメータとしては、G (Cost to open gap)が塩基配列の場合は5、アミ

50

ノ酸配列の場合は11、E (Cost to extend gap)が塩基配列の場合は2、アミノ酸配列の場合は1、-q (Penalty for nucleotide mismatch)が3、r (reward for nucleotide match)が1、-e (expect value)が10、W(wordsize)が塩基配列の場合は11残基、アミノ酸配列の場合は3残基、y (Dropoff(X)for blast extensions in bits)がblastnの場合は20、blastn以外のプログラムでは7、X (X dropoff value for gapped alignment in bits)が15およびZ (final X dropoff value for gapped alignment in bits)がblastnの場合は50、blastn以外のプログラムでは25である (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/html/blastcgihelp.html>)。

【0023】

配列番号2で示されるアミノ酸配列の部分配列からなるポリペプチドは、当業者に公知の方法によって作製することができ、例えば、配列番号2で示されるアミノ酸配列をコードするDNAの一部を欠失させ、これを含む発現ベクターを導入した形質転換体を培養することにより作製することができる。また、こうして作製されるポリペプチドまたはDNAに基づいて、上記と同様の方法により、配列番号2で示されるアミノ酸配列の部分配列において1以上のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチドを得ることができる。

10

【0024】

CD27の細胞外領域とは、文献 [The Journal of Immunology, 147, 3165(1991)]で予測されている細胞外ドメインの1~171番目に相当する領域等が挙げられる。

本発明において、ガラクトースが結合していない0結合型糖鎖を含むCD27遺伝子によってコードされるポリペプチドの細胞外領域とは、ガラクトースが結合していない0結合型糖鎖を含むCD27であればいずれのものでもよく、具体的には、ガラクトースが結合していない0結合型糖鎖を含む、配列番号1で示される塩基配列によってコードされるCD27の細胞外領域があげられる。

20

【0025】

0結合型糖鎖とは、タンパク質のセリン (Ser) またはスレオニン (Thr) のアミノ酸残基において、各アミノ酸側鎖に含まれるOH基を介して糖鎖が結合した構造をいう。0結合型糖鎖の中でも、ポリペプチド上におけるSerまたはThrアミノ酸側鎖のOH基に、Nアセチルガラクトサミン (GalNAc) が結合した0結合型糖鎖を、ムチン型糖鎖という。0結合型糖鎖の具体例としては、T抗原、シアリルT抗原、Tn抗原またはシアリルTn抗原などがあげられる (表1)。

30

【0026】

【表1】

| 糖鎖抗原名 | 糖鎖構造 |
|-------------------|---|
| Tn antigen | GalNAc1 α →Ser/Thr |
| Sialyl Tn antigen | NeuNAc α 2→6GalNAc1 α →Ser/Thr |
| T antigen | Gal β 1→3GalNAc1 α →Ser/Thr |
| Sialyl T antigen | NeuNAc α 2→3Gal β 1→3GalNAc1 α →Ser/Thr |

(NeuNAc: N-アセチルノイラミン酸)

【0027】

本発明において、ガラクトースが結合していない0結合型糖鎖とは、タンパク質のSerまたはThrのアミノ酸残基のOH基を介して結合したNアセチルガラクトサミン (GalNAc) に、ガラクトース (Gal) が結合していない0結合型糖鎖のことをいい、具体的には上記のTn抗原およびシアリルTn抗原があげられる。ガラクトースが結合していない0結合型糖鎖は、正常0結合型糖鎖の合成経路における中間体であり、通常、正常細胞における糖タンパク質には殆んど存在せず、癌や腎症などある特定の疾患において発現が確認される。

【0028】

以下、本発明において、ガラクトースが結合していない0結合型糖鎖を異常糖鎖、異常

50

糖鎖が結合したタンパク質を糖鎖不全タンパク質および異常糖鎖が結合したCD27を糖鎖不全CD27と記載することがある。

O結合型糖鎖が結合するポリペプチドにおけるアミノ酸残基としては、CD27タンパク質の細胞外領域のアミノ酸配列中のセリン (Ser) またはスレオニン (Thr) のアミノ酸残基が挙げられる。

【0029】

また、O結合型糖鎖が結合するポリペプチドにおけるアミノ酸残基は、O結合型糖鎖結合コンセンサス配列を、NetOGlyc3.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>) などの配列検索ソフトを用いて確認することができる。または、O結合型糖鎖を有する糖タンパク質のマスマスペクトルメトリー (MS) 解析を行うことで、具体的な糖鎖結合部位を特定することができる。

10

【0030】

本発明において、CD27タンパク質上のO結合型糖鎖が結合するポリペプチドにおけるアミノ酸残基としては、CD27タンパク質のアミノ酸配列のうち、いずれのSerまたはThr残基にもO結合型糖鎖が結合し得るが、好ましくは、配列番号2で表されるCD27タンパク質の、118番目Thr、127番目Ser、129番目Thr、132番目Ser、133番目Ser、137番目Ser、143番目Thr、149番目Ser、156番目Thr、162番目Thr、173番目Thr、175番目Serおよび176番目Thrから選ばれる少なくとも1つのアミノ酸残基からなる糖鎖結合部位があげられる。

【0031】

CD27タンパク質1分子あたりの細胞外領域に結合するO結合型糖鎖の数としては、少なくとも1つのSer残基またはThr残基にO結合型糖鎖が結合していればよく、O結合型糖鎖の数は限定されない。

20

本発明の、ガラクトースが結合していないO結合型糖鎖を含むCD27 (以下、糖鎖不全CD27と記載する) を発現した細胞を取得する方法としては、O結合型糖鎖合成プロセスにおいて、ポリペプチド上のSer/Thrに結合したNアセチルガラキサミン (GalNAc) にGalを付加する酵素、該酵素の活性に関与するタンパク質またはuridine 5' diphosphate galactose (UDP galactose) の輸送に関わるタンパク質などの活性を、低下または欠損させた細胞株にCD27をコードするDNAを導入することにより、糖鎖不全CD27発現細胞を作製することができる。また、正常O型糖鎖を含むCD27を発現する細胞に対して、シアリダーゼおよびガラクトシダーゼ等の糖鎖切断酵素を作用させることにより、ガラクトースの結合していないO結合型糖鎖を有するCD27発現細胞を作製することも可能である。

30

【0032】

ポリペプチド上におけるSerまたはThrに結合したGalNAcにGalを付加する酵素の具体例としては、1,3 galactosyl transferase [The Journal of Biological Chemistry, 277, 178 186(2002)]などがあげられる。また、ポリペプチド上におけるSerまたはThrに結合したGalNAcにGalを付加する酵素の活性に関与するタンパク質としては、該酵素のタンパク質フォールディングに関与するシャペロンであるCosmc [Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 99, 16613 16618(2002)]などがあげられる。

【0033】

IgA腎症の患者由来のCD27発現細胞は、ポリペプチド上のSer/Thrに結合したGalNAcにGalを付加する酵素、該酵素の活性に関与するタンパク質またはUDP galactoseの輸送に関わるタンパク質などのをコードするDNAに付加、欠失または置換などが生じることで酵素の活性が低下または欠損していることから、CD27発現細胞として利用することができる。

40

UDP galactoseの輸送に関わるタンパク質としては、UDP Galactose transporterなどがあげられる。UDP galactose transporterの活性が低下または欠損した細胞株としては、Lec8細胞 [Glycobiology, 1, 307 14(1991)]などがあげられる。

【0034】

本発明において、糖鎖不全CD27を発現した細胞としては、ヒト体内に内在的に存在する細胞、ヒト体内に内在的に存在する細胞から樹立された細胞株または遺伝子組換え技術に

50

より得られた細胞などがあげられる。好ましくは、上述のような、O結合型糖鎖合成プロセスにおいて、ポリペプチド上のSer/Thrに結合したGalNAcにGalを付加する酵素、該酵素の活性に關与するタンパク質またはUDP galactoseの輸送に關わるタンパク質などの活性を、低下または欠損した細胞株、同様な性質を有しヒト体内に内在的に存在する細胞などがあげられる。

【0035】

ヒト体内に内在的に存在する細胞としては、O結合型糖鎖合成プロセスにおいて、ポリペプチド上のSer/Thrに結合したGalNAcにGalを付加する酵素、該酵素の活性に關与するタンパク質またはUDP galactoseの輸送に關わるタンパク質などの活性が、低下または欠損した細胞株が好ましく、具体的にはIgA腎症患者体内あるいは癌患者体内においてCD27タンパク質が発現している細胞があげられ、例えば、バイオプシーなどで得られた免疫関連細胞あるいは腫瘍細胞のうちでCD27タンパク質が発現している細胞があげられる。

10

【0036】

遺伝子組換え技術により得られる細胞としては、O結合型糖鎖合成プロセスにおいて、ポリペプチド上のSer/Thrに結合したGalNAcにGalを付加する酵素、該酵素の活性に關与するタンパク質またはUDP galactoseの輸送に關わるタンパク質などの活性を、低下または欠損させた宿主細胞を作製し、目的のポリペプチドをコードするcDNAを含む発現ベクターを宿主細胞に導入することにより、糖鎖不全CD27を発現した細胞があげられる。

【0037】

宿主細胞としては、具体的にはUDP galactose transporterの活性が低下したLec8細胞、または 1,3 galactosyl transferaseまたは本酵素活性に關与するComsチャペロンタンパク質の異常により、酵素の活性が低下または欠損しているIgA腎症患者由来のIgA抗体発現細胞などがあげられる。

20

更に、糖鎖不全CD27タンパク質を作製する方法としては、上述のCD27発現細胞を用いて、糖鎖不全CD27タンパク質を発現、精製する方法などがあげられる。

【0038】

糖鎖不全CD27タンパク質を取得する方法としては、CD27タンパク質と他の物質との融合タンパク質として発現させ、精製することで取得することができる。CD27タンパク質と融合させる物質としては、抗体定常領域、抗体Fc領域、GSTタグ、ヒスチジンタグ（Hisタグともいう）またはMycタグなどのポリペプチドなどがあげられる。該融合タンパク質は、ProteinA、ニッケルカラム、特異的抗体カラムなどの、アフィニティーカラムを用いることにより分離精製することができる。

30

上述のようにして得られた糖鎖不全CD27細胞または糖鎖不全CD27に対して本発明のモノクローナル抗体または該抗体断片は結合活性を有する。

【0039】

本発明の抗体または該抗体断片が糖鎖不全CD27タンパク質に結合することは、例えば公知の免疫学的検出法、好適には蛍光細胞染色法等を用いて、特定の抗原を発現した細胞と特定抗原に対する抗体の結合性を確認する方法により確認することができる。また、公知の免疫学的検出法 [Monoclonal Antibodies Principles and practice, Third edition, Academic Press(1996)、Antibodies A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)、単クローン抗体実験マニュアル、講談社サイエンティフィック(1987)] などを組み合わせて確認することもできる。

40

【0040】

本発明におけるモノクローナル抗体としては、ハイブリドーマにより生産される抗体、および抗体遺伝子を含む発現ベクターで形質転換した形質転換体により生産される遺伝子組換え抗体をあげることができる。

ハイブリドーマは、例えば上記の糖鎖不全CD27を発現した細胞などを抗原として調製し、該抗原を免疫した動物より抗原特異性を有する抗体生産細胞を誘導し、さらに、該抗体生産細胞と骨髓腫細胞とを融合させることにより、調製することができる。該ハイブリドーマを培養するか、あるいは該ハイブリドーマ細胞を動物に投与して該動物を腹水癌化さ

50

せ、該培養液または腹水を分離、精製することにより糖鎖不全CD27抗体を取得することができる。

【0041】

抗原を免疫する動物としてはハイブリドーマを作製することが可能であれば、いかなるものも用いることができるが、マウス、ラット、ハムスター、ラビットなどが好適に用いられる。またこのような動物から抗体産生能を有する細胞を取得し、該細胞に *in vitro* で免疫を施した後に、骨髄腫細胞と融合して作製したハイブリドーマが生産する抗体なども本発明の抗体に包含される。

【0042】

モノクローナル抗体とは、単クローンの抗体産生細胞が分泌する抗体であり、ただ一つのエピトープ（抗原決定基ともいう）を認識し、モノクローナル抗体を構成するアミノ酸配列（1次構造）が均一である。

エピトープとは、モノクローナル抗体が認識し、結合する単一のアミノ酸配列、アミノ酸配列からなる立体構造、糖鎖が結合したアミノ酸配列および糖鎖が結合したアミノ酸配列からなる立体構造などがあげられる。本発明のモノクローナル抗体のエピトープとしては、糖鎖不全CD27タンパク質の立体構造があげられる。

【0043】

本発明のモノクローナル抗体としては、糖鎖不全CD27の細胞外領域を認識し、かつ結合するモノクローナル抗体であればいずれの抗体でもよいが、具体的にはモノクローナル抗体KM4026、KM4027、KM4028、KM4030およびKM4031などがあげられる。

より具体的には、ハイブリドーマKM4026により生産されたモノクローナル抗体KM4026、モノクローナル抗体KM4026と競合して糖鎖不全CD27の細胞外領域に結合するモノクローナル抗体、およびモノクローナル抗体KM4026が結合する糖鎖不全CD27細胞外領域に存在するエピトープに結合するモノクローナル抗体があげられる。

【0044】

本発明のモノクローナル抗体としては、ハイブリドーマKM4027により生産されたモノクローナル抗体KM4027、モノクローナル抗体KM4027と競合して糖鎖不全CD27の細胞外領域に結合するモノクローナル抗体、およびモノクローナル抗体KM4027が結合する糖鎖不全CD27細胞外領域に存在するエピトープに結合するモノクローナル抗体もあげられる。

本発明のモノクローナル抗体としては、ハイブリドーマKM4028により生産されたモノクローナル抗体KM4028、モノクローナル抗体KM4028と競合して糖鎖不全CD27の細胞外領域に結合するモノクローナル抗体、およびモノクローナル抗体KM4028が結合する糖鎖不全CD27細胞外領域に存在するエピトープに結合するモノクローナル抗体もあげられる。

【0045】

また、本発明のモノクローナル抗体としては、ハイブリドーマKM4030により生産されたモノクローナル抗体KM4030、モノクローナル抗体KM4030と競合して糖鎖不全CD27の細胞外領域に結合するモノクローナル抗体、およびモノクローナル抗体KM4030が結合する糖鎖不全CD27細胞外領域に存在するエピトープに結合するモノクローナル抗体もあげられる。

更に、本発明のモノクローナル抗体としては、ハイブリドーマKM4031により生産されたモノクローナル抗体KM4031、モノクローナル抗体KM4031と競合して糖鎖不全CD27の細胞外領域に結合するモノクローナル抗体、およびモノクローナル抗体KM4031が結合する糖鎖不全CD27細胞外領域に存在するエピトープに結合するモノクローナル抗体などがあげられる。

本発明のモノクローナル抗体と競合反応するモノクローナル抗体としては、具体的には上述のように各種モノクローナル抗体と糖鎖不全CD27の細胞外領域に存在するエピトープに対して競合反応を有するモノクローナル抗体があげられる。

また本発明のモノクローナル抗体が結合するエピトープに結合するモノクローナル抗体としては、具体的には上述のように各種モノクローナル抗体が認識する糖鎖不全CD27細胞外領域に存在するエピトープに結合するモノクローナル抗体があげられる。

【0046】

10

20

30

40

50

ハイブリドーマKM4030は平成20年6月5日付でブダペスト条約に基づき独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（305 8566 日本国 茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6）にFERM BP 10976として寄託されている。

遺伝子組換え抗体としては、ヒト型キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体または該抗体断片など、遺伝子組換え技術により製造される抗体を包含する。遺伝子組換え抗体において、抗原結合活性を有し、抗原性が低く、血中半減期が延長されたものは、治療薬として好ましい。

【0047】

ヒト型キメラ抗体は、非ヒト抗体の重鎖可変領域（以下、VHと表記する）および軽鎖可変領域（以下、VLと表記する）とヒト抗体の重鎖定常領域（以下、CHと表記する）および軽鎖定常領域（以下、CLと表記する）とからなる抗体をいう。

10

本発明のヒト型キメラ抗体は、以下のようにして製造することができる。すなわち、本発明の、糖鎖不全CD27を特異的に認識、かつ該細胞外領域に結合するモノクローナル抗体、もしくは糖鎖不全CD27を特異的に認識し、かつ該細胞外領域に結合するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマより、VHおよびVLをコードするcDNAを取得し、ヒト抗体のCHおよびCLをコードする遺伝子を有する動物細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築し、動物細胞へ導入して抗体を発現させて作製することができる。

【0048】

ヒト型キメラ抗体のCHとしては、ヒトイムノグロブリン（以下、hIgと表記する）に属すればいかなるものでもよいが、hIgGクラスのもの好適であり、さらにhIgGクラスに属するhIgG1、hIgG2、hIgG3、hIgG4といったサブクラスのいずれも用いることができる。また、ヒト型キメラ抗体のCLとしては、hIgに属すればいずれのものでもよく、クラスあるいはサブクラスのものを用いることができる。

20

【0049】

本発明のヒト型キメラ抗体としては、抗体のVHが配列番号25で表されるアミノ酸配列であり、かつ抗体のVLが配列番号35で表されるアミノ酸配列であるヒト型キメラ抗体、抗体のVHが配列番号26で表されるアミノ酸配列であり、かつ抗体のVLが配列番号36で表されるアミノ酸配列であるヒト型キメラ抗体、抗体のVHが配列番号27で表されるアミノ酸配列であり、かつ抗体のVLが配列番号37で表されるアミノ酸配列であるヒト型キメラ抗体、抗体のVHが配列番号28で表されるアミノ酸配列であり、かつ抗体のVLが配列番号38で表されるアミノ酸配列であるヒト型キメラ抗体および抗体のVHが配列番号29で表されるアミノ酸配列であり、かつ抗体のVLが配列番号39で表されるアミノ酸配列であるヒト型キメラ抗体があげられる。

30

【0050】

また、本発明のヒト型キメラ抗体としては、抗体のVHが配列番号40～42で表されるCDR1～3のアミノ酸配列を含むVHであり、かつ抗体のVLが配列番号43～45で表されるCDR1～3のアミノ酸配列を含むヒト型キメラ抗体、抗体のVHが配列番号46～48で表されるCDR1～3のアミノ酸配列を含むVHであり、かつ抗体のVLが配列番号49～51で表されるCDR1～3のアミノ酸配列を含むヒト型キメラ抗体、抗体のVHが配列番号52～54で表されるCDR1～3のアミノ酸配列を含むVHであり、かつ抗体のVLが配列番号55～57で表されるCDR1～3のアミノ酸配列を含むヒト型キメラ抗体、抗体のVHが配列番号58～60で表されるCDR1～3のアミノ酸配列を含むVHであり、かつ抗体のVLが配列番号61～63で表されるCDR1～3のアミノ酸配列を含むヒト型キメラ抗体、かつ抗体のVHが配列番号64～66で表されるCDR1～3のアミノ酸配列を含むVHであり、かつ抗体のVLが配列番号67～69で表されるCDR1～3のアミノ酸配列を含むヒト型キメラ抗体があげられる。

40

【0051】

ヒト化抗体は、非ヒト抗体のVHおよびVLのCDRのアミノ酸配列をヒト抗体のVHおよびVLの適切な位置に移植した抗体をいい、ヒト型CDR移植抗体、再構成抗体（reshaped antibody）ともいう。

50

本発明のヒト化抗体は、本発明の糖鎖不全CD27タンパク質を特異的に認識し、かつ該細胞外領域に結合するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマから産生される非ヒト抗体の、VHおよびVLのCDRのアミノ酸配列を、任意のヒト抗体のVHおよびVLのフレームワーク（以下、FRと記す）に移植した抗体可変領域（以下、V領域と記す）をコードするcDNAを構築し、ヒト抗体のCHおよびCLをコードする遺伝子を有する動物細胞用発現ベクターに、それぞれ挿入してヒト化抗体発現ベクターを構築し、動物細胞へ導入することにより発現させ、製造することができる。

【0052】

ヒト抗体のVHおよびVLのFRのアミノ酸配列は、ヒト抗体由来のVHおよびVLのFRのアミノ酸配列であれば、いかなるものでも用いることができる。例えば、Protein Data Bankなどのデータベースに登録されているヒト抗体のVHおよびVLのFRのアミノ酸配列、またはSequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991)などに記載の、ヒト抗体のVHおよびVLのFRの各サブグループの共通アミノ酸配列などが用いられる。

【0053】

ヒト化抗体のCHとしては、hIgに属すればいかなるものでもよいが、hIgGクラスのもの好適であり、さらにhIgGクラスに属するhIgG1、hIgG2、hIgG3、hIgG4といったサブクラスのいずれも用いることができる。また、ヒト化抗体のCLとしては、hIgに属すればいずれのものでもよく、クラスあるいはクラスのものを用いることができる。

本発明のヒト化抗体としては、抗体のVHのCDR1～3が配列番号40～42で表されるアミノ酸配列であり、かつ抗体のVLのCDR1～3が配列番号43～45で表されるアミノ酸配列であるヒト化抗体、抗体のVHのCDR1～3が配列番号46～48で表されるアミノ酸配列であり、かつ抗体のVLのCDR1～3が配列番号49～51で表されるアミノ酸配列であるヒト化抗体、抗体のVHのCDR1～3が配列番号52～54で表されるアミノ酸配列であり、かつ抗体のVLのCDR1～3が配列番号55～57で表されるアミノ酸配列であるヒト化抗体、抗体のVHのCDR1～3が配列番号58～60で表されるアミノ酸配列であり、かつ抗体のVLのCDR1～3が配列番号61～63で表されるアミノ酸配列であるヒト化抗体および抗体のVHのCDR1～3が配列番号64～66で表されるアミノ酸配列であり、かつ抗体のVLのCDR1～3が配列番号67～69で表されるアミノ酸配列であるヒト化抗体があげられる。

更に、本発明のヒト化抗体としては、具体的には以下に示すヒト化抗体があげられる。

【0054】

抗体のVHのアミノ酸配列については、抗体のVHが配列番号96で表されるアミノ酸配列、または配列番号96で表されるアミノ酸配列中の30番目のSer、48番目のVal、49番目のSer、77番目のAsn、93番目のVal、97番目のAlaおよび117番目のThrが、他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を有するヒト化抗体および/または抗体のVLのアミノ酸配列については、抗体のVLが配列番号97で表されるアミノ酸配列、または配列番号97で表されるアミノ酸配列中の21番目のIle、40番目のPro、58番目のVal、85番目のThr、および87番目のTyrが、他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸を有するヒト化抗体などがあげられるが、導入される改変の数に制限はない。

【0055】

例えば、以下に示すヒト化抗体が挙げられる。

抗体のVHが配列番号96で表されるアミノ酸配列中の30番目のSer、48番目のVal、49番目のSer、77番目のAsn、および97番目のAlaが、他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を有するヒト化抗体。

好ましくは抗体のVHが配列番号96で表されるアミノ酸配列中の48番目のVal、49番目のSer、および97番目のAlaが、他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を有するヒト化抗体。

【0056】

好ましくは抗体のVHが配列番号96で表されるアミノ酸配列中の30番目のSer、および97番目のAlaが、他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を有するヒト化抗体などがあ

げられる。

上記のアミノ酸改変の結果得られる抗体VHのアミノ酸配列としては、配列番号96で表されるアミノ酸配列中の30番目のSerをAsnに、48番目のValをIleに、49番目のSerをAlaに、77番目のAsnをGlyに、93番目のValをThrに、97番目のAlaをThrに、および117番目のThrをValに置換する改変から選ばれる少なくとも1つの改変が導入されたアミノ酸配列があげられる。

【 0 0 5 7 】

7個の改変が導入されたVHのアミノ酸配列としては、具体的には、配列番号96で表されるアミノ酸配列中の30番目のSerをAsnに、48番目のValをIleに、49番目のSerをAlaに、77番目のAsnをGlyに、93番目のValをThrに、97番目のAlaをThrに、および117番目のThrをValに置換したアミノ酸配列があげられる。

10

6個の改変が導入されたVHのアミノ酸配列としては、具体的には、配列番号96で表されるアミノ酸配列中の

30番目のSerをAsnに、48番目のValをIleに、49番目のSerをAlaに、77番目のAsnをGlyに、93番目のValをThrに、および97番目のAlaをThrに置換したアミノ酸配列、

30番目のSerをAsnに、48番目のValをIleに、49番目のSerをAlaに、77番目のAsnをGlyに、93番目のValをThrに、および117番目のThrをValに置換したアミノ酸配列、

30番目のSerをAsnに、48番目のValをIleに、49番目のSerをAlaに、77番目のAsnをGlyに、97番目のAlaをThrに、および117番目のThrをValに置換したアミノ酸配列、

30番目のSerをAsnに、48番目のValをIleに、49番目のSerをAlaに、93番目のValをThrに、97番目のAlaをThrに、および117番目のThrをValに置換したアミノ酸配列、

20

30番目のSerをAsnに、48番目のValをIleに、77番目のAsnをGlyに、93番目のValをThrに、97番目のAlaをThrに、および117番目のThrをValに置換したアミノ酸配列、

30番目のSerをAsnに、49番目のSerをAlaに、77番目のAsnをGlyに、93番目のValをThrに、97番目のAlaをThrに、および117番目のThrをValに置換したアミノ酸配列、

48番目のValをIleに、49番目のSerをAlaに、77番目のAsnをGlyに、93番目のValをThrに、97番目のAlaをThrに、および117番目のThrをValに置換したアミノ酸配列

などがあげられる。

【 0 0 5 8 】

5個の改変が導入されたVHのアミノ酸配列としては、具体的には、配列番号96で表されるアミノ酸配列中の

30

49番目のSerをAlaに、77番目のAsnをGlyに、93番目のValをThrに、97番目のAlaをThrに、および117番目のThrをValに置換したアミノ酸配列、

48番目のValをIleに、77番目のAsnをGlyに、93番目のValをThrに、97番目のAlaをThrに、および117番目のThrをValに置換したアミノ酸配列、

48番目のValをIleに、49番目のSerをAlaに、93番目のValをThrに、97番目のAlaをThrに、および117番目のThrをValに置換したアミノ酸配列、

48番目のValをIleに、49番目のSerをAlaに、77番目のAsnをGlyに、97番目のAlaをThrに、および117番目のThrをValに置換したアミノ酸配列、

48番目のValをIleに、49番目のSerをAlaに、77番目のAsnをGlyに、93番目のValをThrに、および117番目のThrをValに置換したアミノ酸配列、

40

48番目のValをIleに、49番目のSerをAlaに、77番目のAsnをGlyに、93番目のValをThrに、および97番目のAlaをThrに置換したアミノ酸配列、

30番目のSerをAsnに、77番目のAsnをGlyに、93番目のValをThrに、97番目のAlaをThrに、および117番目のThrをValに置換したアミノ酸配列、

30番目のSerをAsnに、49番目のSerをAlaに、93番目のValをThrに、97番目のAlaをThrに、および117番目のThrをValに置換したアミノ酸配列、

30番目のSerをAsnに、49番目のSerをAlaに、77番目のAsnをGlyに、97番目のAlaをThrに、および117番目のThrをValに置換したアミノ酸配列、

30番目のSerをAsnに、49番目のSerをAlaに、77番目のAsnをGlyに、93番目のValをThrに、

50

および117番目のThrをValに置換したアミノ酸配列、
 30番目のSerをAsnに、49番目のSerをAlaに、77番目のAsnをGlyに、93番目のValをThrに、
 および97番目のAlaをThrに置換したアミノ酸配列、
 30番目のSerをAsnに、48番目のValをIleに、93番目のValをThrに、97番目のAlaをThrに、
 および117番目のThrをValに置換したアミノ酸配列、
 30番目のSerをAsnに、48番目のValをIleに、77番目のAsnをGlyに、97番目のAlaをThrに、
 および117番目のThrをValに置換したアミノ酸配列、
 30番目のSerをAsnに、48番目のValをIleに、77番目のAsnをGlyに、93番目のValをThrに、
 および117番目のThrをValに置換したアミノ酸配列、
 30番目のSerをAsnに、48番目のValをIleに、77番目のAsnをGlyに、93番目のValをThrに、
 および97番目のAlaをThrに置換したアミノ酸配列、
 30番目のSerをAsnに、48番目のValをIleに、49番目のSerをAlaに、97番目のAlaをThrに、
 および117番目のThrをValに置換したアミノ酸配列、
 30番目のSerをAsnに、48番目のValをIleに、49番目のSerをAlaに、93番目のValをThrに、
 および117番目のThrをValに置換したアミノ酸配列、
 30番目のSerをAsnに、48番目のValをIleに、49番目のSerをAlaに、93番目のValをThrに、
 および97番目のAlaをThrに置換したアミノ酸配列、
 30番目のSerをAsnに、48番目のValをIleに、49番目のSerをAlaに、77番目のAsnをGlyに、
 および117番目のThrをValに置換したアミノ酸配列、
 30番目のSerをAsnに、48番目のValをIleに、49番目のSerをAlaに、77番目のAsnをGlyに、
 および97番目のAlaをThrに置換したアミノ酸配列、
 30番目のSerをAsnに、48番目のValをIleに、49番目のSerをAlaに、77番目のAsnをGlyに、
 および93番目のValをThrに置換したアミノ酸配列
 などがあげられる。

【 0 0 5 9 】

4個の改変が導入されたVHのアミノ酸配列としては、具体的には、配列番号96で表されるアミノ酸配列中の

77番目のAsnをGlyに、93番目のValをThrに、97番目のAlaをThrに、および117番目のThrを
 Valに置換したアミノ酸配列、
 49番目のSerをAlaに、93番目のValをThrに、97番目のAlaをThrに、および117番目のThrを
 Valに置換したアミノ酸配列、
 49番目のSerをAlaに、77番目のAsnをGlyに、97番目のAlaをThrに、および117番目のThrを
 Valに置換したアミノ酸配列、
 49番目のSerをAlaに、77番目のAsnをGlyに、93番目のValをThrに、および117番目のThrを
 Valに置換したアミノ酸配列、
 49番目のSerをAlaに、77番目のAsnをGlyに、93番目のValをThrに、および97番目のAlaをT
 hrに置換したアミノ酸配列、
 48番目のValをIleに、93番目のValをThrに、97番目のAlaをThrに、および117番目のThrを
 Valに置換したアミノ酸配列、
 48番目のValをIleに、77番目のAsnをGlyに、97番目のAlaをThrに、および117番目のThrを
 Valに置換したアミノ酸配列、
 48番目のValをIleに、77番目のAsnをGlyに、93番目のValをThrに、および117番目のThrを
 Valに置換したアミノ酸配列、
 48番目のValをIleに、77番目のAsnをGlyに、93番目のValをThrに、および97番目のAlaをT
 hrに置換したアミノ酸配列、
 48番目のValをIleに、49番目のSerをAlaに、97番目のAlaをThrに、および117番目のThrを
 Valに置換したアミノ酸配列、
 48番目のValをIleに、49番目のSerをAlaに、93番目のValをThrに、および117番目のThrを
 Valに置換したアミノ酸配列、
 48番目のValをIleに、49番目のSerをAlaに、93番目のValをThrに、および97番目のAlaをT

hrに置換したアミノ酸配列、
 48番目のValをIleに、49番目のSerをAlaに、77番目のAsnをGlyに、および117番目のThrを
 Valに置換したアミノ酸配列、
 48番目のValをIleに、49番目のSerをAlaに、77番目のAsnをGlyに、および97番目のAlaをT
 hrに置換したアミノ酸配列、
 48番目のValをIleに、49番目のSerをAlaに、77番目のAsnをGlyに、および93番目のValをT
 hrに置換したアミノ酸配列、
 30番目のSerをAsnに、93番目のValをThrに、97番目のAlaをThrに、および117番目のThrを
 Valに置換したアミノ酸配列、
 30番目のSerをAsnに、77番目のAsnをGlyに、97番目のAlaをThrに、および117番目のThrを 10
 Valに置換したアミノ酸配列、
 30番目のSerをAsnに、77番目のAsnをGlyに、93番目のValをThrに、および117番目のThrを
 Valに置換したアミノ酸配列、
 30番目のSerをAsnに、77番目のAsnをGlyに、93番目のValをThrに、および97番目のAlaをT
 hrに置換したアミノ酸配列、
 30番目のSerをAsnに、49番目のSerをAlaに、97番目のAlaをThrに、および117番目のThrを
 Valに置換したアミノ酸配列、
 30番目のSerをAsnに、49番目のSerをAlaに、93番目のValをThrに、および117番目のThrを
 Valに置換したアミノ酸配列、
 30番目のSerをAsnに、49番目のSerをAlaに、93番目のValをThrに、および97番目のAlaをT 20
 hrに置換したアミノ酸配列、
 30番目のSerをAsnに、49番目のSerをAlaに、77番目のAsnをGlyに、および117番目のThrを
 Valに置換したアミノ酸配列、
 30番目のSerをAsnに、49番目のSerをAlaに、77番目のAsnをGlyに、および97番目のAlaをT
 hrに置換したアミノ酸配列、
 30番目のSerをAsnに、49番目のSerをAlaに、77番目のAsnをGlyに、および93番目のValをT
 hrに置換したアミノ酸配列、
 30番目のSerをAsnに、48番目のValをIleに、97番目のAlaをThrに、および117番目のThrを
 Valに置換したアミノ酸配列、
 30番目のSerをAsnに、48番目のValをIleに、93番目のValをThrに、および117番目のThrを 30
 Valに置換したアミノ酸配列、
 30番目のSerをAsnに、48番目のValをIleに、93番目のValをThrに、および97番目のAlaをT
 hrに置換したアミノ酸配列、
 30番目のSerをAsnに、48番目のValをIleに、77番目のAsnをGlyに、および117番目のThrを
 Valに置換したアミノ酸配列、
 30番目のSerをAsnに、48番目のValをIleに、77番目のAsnをGlyに、および97番目のAlaをT
 hrに置換したアミノ酸配列、
 30番目のSerをAsnに、48番目のValをIleに、77番目のAsnをGlyに、および93番目のValをT
 hrに置換したアミノ酸配列、
 30番目のSerをAsnに、48番目のValをIleに、49番目のSerをAlaに、および117番目のThrを 40
 Valに置換したアミノ酸配列、
 30番目のSerをAsnに、48番目のValをIleに、49番目のSerをAlaに、および97番目のAlaをT
 hrに置換したアミノ酸配列、
 30番目のSerをAsnに、48番目のValをIleに、49番目のSerをAlaに、および93番目のValをT
 hrに置換したアミノ酸配列、
 30番目のSerをAsnに、48番目のValをIleに、49番目のSerをAlaに、および77番目のAsnをG
 lyに置換したアミノ酸配列
 などがあげられる。

3個の改変が導入されたVHのアミノ酸配列としては、具体的には、配列番号96で表され
 るアミノ酸配列中の

10

20

30

40

50

30番目のSerをAsnに、48番目のValをIleに、および49番目のSerをAlaに置換したアミノ酸配列、
30番目のSerをAsnに、48番目のValをIleに、および77番目のAsnをGlyに置換したアミノ酸配列、
30番目のSerをAsnに、48番目のValをIleに、および93番目のValをThrに置換したアミノ酸配列、
30番目のSerをAsnに、48番目のValをIleに、および97番目のAlaをThrに置換したアミノ酸配列、
30番目のSerをAsnに、48番目のValをIleに、および117番目のThrをValに置換したアミノ酸配列、
30番目のSerをAsnに、49番目のSerをAlaに、および77番目のAsnをGlyに置換したアミノ酸配列、
30番目のSerをAsnに、49番目のSerをAlaに、および93番目のValをThrに置換したアミノ酸配列、
30番目のSerをAsnに、49番目のSerをAlaに、および97番目のAlaをThrに置換したアミノ酸配列、
30番目のSerをAsnに、49番目のSerをAlaに、および117番目のThrをValに置換したアミノ酸配列、
30番目のSerをAsnに、77番目のAsnをGlyに、および93番目のValをThrに置換したアミノ酸配列、
30番目のSerをAsnに、77番目のAsnをGlyに、および97番目のAlaをThrに置換したアミノ酸配列、
30番目のSerをAsnに、77番目のAsnをGlyに、および117番目のThrをValに置換したアミノ酸配列、
30番目のSerをAsnに、93番目のValをThrに、および97番目のAlaをThrに置換したアミノ酸配列、
30番目のSerをAsnに、93番目のValをThrに、および117番目のThrをValに置換したアミノ酸配列、
30番目のSerをAsnに、97番目のAlaをThrに、および117番目のThrをValに置換したアミノ酸配列、
48番目のValをIleに、49番目のSerをAlaに、および77番目のAsnをGlyに置換したアミノ酸配列、
48番目のValをIleに、49番目のSerをAlaに、および93番目のValをThrに置換したアミノ酸配列、
48番目のValをIleに、49番目のSerをAlaに、および97番目のAlaをThrに置換したアミノ酸配列、
48番目のValをIleに、49番目のSerをAlaに、および117番目のThrをValに置換したアミノ酸配列、
48番目のValをIleに、77番目のAsnをGlyに、および93番目のValをThrに置換したアミノ酸配列、
48番目のValをIleに、77番目のAsnをGlyに、および97番目のAlaをThrに置換したアミノ酸配列、
48番目のValをIleに、77番目のAsnをGlyに、および117番目のThrをValに置換したアミノ酸配列、
48番目のValをIleに、93番目のValをThrに、および97番目のAlaをThrに置換したアミノ酸配列、
48番目のValをIleに、93番目のValをThrに、および117番目のThrをValに置換したアミノ酸配列、
48番目のValをIleに、97番目のAlaをThrに、および117番目のThrをValに置換したアミノ酸配列、

10

20

30

40

50

49番目のSerをAlaに、77番目のAsnをGlyに、および93番目のValをThrに置換したアミノ酸配列、
 49番目のSerをAlaに、77番目のAsnをGlyに、および97番目のAlaをThrに置換したアミノ酸配列、
 49番目のSerをAlaに、77番目のAsnをGlyに、および117番目のThrをValに置換したアミノ酸配列、
 49番目のSerをAlaに、93番目のValをThrに、および97番目のAlaをThrに置換したアミノ酸配列、
 49番目のSerをAlaに、93番目のValをThrに、および117番目のThrをValに置換したアミノ酸配列、
 49番目のSerをAlaに、97番目のAlaをThrに、および117番目のThrをValに置換したアミノ酸配列、
 77番目のAsnをGlyに、93番目のValをThrに、および97番目のAlaをThrに置換したアミノ酸配列、
 77番目のAsnをGlyに、93番目のValをThrに、および117番目のThrをValに置換したアミノ酸配列、
 77番目のAsnをGlyに、97番目のAlaをThrに、および117番目のThrをValに置換したアミノ酸配列、
 93番目のValをThrに、97番目のAlaをThrに、および117番目のThrをValに置換したアミノ酸配列
 などがあげられる。

10

20

【0060】

2個の改変が導入されたVHのアミノ酸配列としては、具体的には、配列番号96で表されるアミノ酸配列中の

30番目のSerをAsnに、および48番目のValをIleに置換したアミノ酸配列、
 30番目のSerをAsnに、および49番目のSerをAlaに置換したアミノ酸配列、
 30番目のSerをAsnに、および77番目のAsnをGlyに置換したアミノ酸配列、
 30番目のSerをAsnに、および93番目のValをThrに置換したアミノ酸配列、
 30番目のSerをAsnに、および97番目のAlaをThrに置換したアミノ酸配列、
 30番目のSerをAsnに、および117番目のThrをValに置換したアミノ酸配列、
 48番目のValをIleに、および49番目のSerをAlaに置換したアミノ酸配列、
 48番目のValをIleに、および77番目のAsnをGlyに置換したアミノ酸配列、
 48番目のValをIleに、および93番目のValをThrに置換したアミノ酸配列、
 48番目のValをIleに、および97番目のAlaをThrに置換したアミノ酸配列、
 48番目のValをIleに、および117番目のThrをValに置換したアミノ酸配列、
 49番目のSerをAlaに、および77番目のAsnをGlyに置換したアミノ酸配列、
 49番目のSerをAlaに、および93番目のValをThrに置換したアミノ酸配列、
 49番目のSerをAlaに、および97番目のAlaをThrに置換したアミノ酸配列、
 49番目のSerをAlaに、および117番目のThrをValに置換したアミノ酸配列、
 77番目のAsnをGlyに、および93番目のValをThrに置換したアミノ酸配列、
 77番目のAsnをGlyに、および97番目のAlaをThrに置換したアミノ酸配列、
 77番目のAsnをGlyに、および117番目のThrをValに置換したアミノ酸配列、
 93番目のValをThrに、および97番目のAlaをThrに置換したアミノ酸配列、
 93番目のValをThrに、および117番目のThrをValに置換したアミノ酸配列、
 97番目のAlaをThrに、および117番目のThrをValに置換したアミノ酸配列
 などがあげられる。

30

40

【0061】

1個の改変が導入されたVHのアミノ酸配列としては、具体的には、配列番号96で表されるアミノ酸配列中の

30番目のSerをAsnに置換したアミノ酸配列、48番目のValをIleに置換したアミノ酸配列、

50

49番目のSerをAlaに置換したアミノ酸配列、77番目のAsnをGlyに置換したアミノ酸配列、93番目のValをThrに置換したアミノ酸配列、97番目のAlaをThrに置換したアミノ酸配列、および117番目のThrをValに置換したアミノ酸配列、があげられる。

抗体のVLについては、例えば配列番号97で表されるアミノ酸配列中の21番目のIle、40番目のPro、58番目のVal、85番目のThr、および87番目のTyrが、他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列があげられる。

【0062】

好ましくは、配列番号97で表されるアミノ酸配列中の40番目のPro、58番目のVal、および87番目のTyrが、他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列があげられる。

10

上記のアミノ酸改変の結果得られるVLのアミノ酸配列としては、配列番号97で表されるアミノ酸配列中の21番目のIleをLeuに、40番目のProをLeuに、58番目のValをIleに、85番目のThrをAlaに、および87番目のTyrをPheに置換する改変から選ばれる少なくとも1つの改変が導入されたアミノ酸配列があげられる。

5個の改変が導入されたVLのアミノ酸配列としては、具体的には、配列番号97で表されるアミノ酸配列中の21番目のIleをLeuに、40番目のProをLeuに、58番目のValをIleに、85番目のThrをAlaに、および87番目のTyrをPheに置換したアミノ酸配列などがあげられる。

【0063】

4個の改変が導入されたVLのアミノ酸配列としては、具体的には、配列番号97で表されるアミノ酸配列中の

20

40番目のProをLeuに、58番目のValをIleに、85番目のThrをAlaに、および87番目のTyrをPheに置換したアミノ酸配列、

21番目のIleをLeuに、58番目のValをIleに、85番目のThrをAlaに、および87番目のTyrをPheに置換したアミノ酸配列、

21番目のIleをLeuに、40番目のProをLeuに、85番目のThrをAlaに、および87番目のTyrをPheに置換したアミノ酸配列、

21番目のIleをLeuに、40番目のProをLeuに、58番目のValをIleに、および87番目のTyrをPheに置換したアミノ酸配列、

21番目のIleをLeuに、40番目のProをLeuに、58番目のValをIleに、および85番目のThrをAlaに置換したアミノ酸配列

30

などがあげられる。

【0064】

3個の改変が導入されたVLのアミノ酸配列としては、具体的には、配列番号97で表されるアミノ酸配列中の

21番目のIleをLeuに、40番目のProをLeuに、および58番目のValをIleに置換したアミノ酸配列、

21番目のIleをLeuに、40番目のProをLeuに、および85番目のThrをAlaに置換したアミノ酸配列、

21番目のIleをLeuに、40番目のProをLeuに、および87番目のTyrをPheに置換したアミノ酸配列、

40

21番目のIleをLeuに、58番目のValをIleに、および85番目のThrをAlaに置換したアミノ酸配列、

21番目のIleをLeuに、58番目のValをIleに、および87番目のTyrをPheに置換したアミノ酸配列、

21番目のIleをLeuに、85番目のThrをAlaに、および87番目のTyrをPheに置換したアミノ酸配列、

40番目のProをLeuに、58番目のValをIleに、および85番目のThrをAlaに置換したアミノ酸配列、

40番目のProをLeuに、58番目のValをIleに、および87番目のTyrをPheに置換したアミノ酸

50

配列、

58番目のValをIleに、85番目のThrをAlaに、および87番目のTyrをPheに置換したアミノ酸配列

などがあげられる。

【0065】

2個の変更が導入されたVLのアミノ酸配列としては、具体的には、配列番号97で表されるアミノ酸配列中の

21番目のIleをLeuに、および40番目のProをLeuに置換したアミノ酸配列、

21番目のIleをLeuに、および58番目のValをIleに置換したアミノ酸配列、

21番目のIleをLeuに、および85番目のThrをAlaに置換したアミノ酸配列、

21番目のIleをLeuに、および87番目のTyrをPheに置換したアミノ酸配列、

40番目のProをLeuに、および58番目のValをIleに置換したアミノ酸配列、

40番目のProをLeuに、および85番目のThrをAlaに置換したアミノ酸配列、

40番目のProをLeuに、および87番目のTyrをPheに置換したアミノ酸配列、

58番目のValをIleに、および85番目のThrをAlaに置換したアミノ酸配列、

58番目のValをIleに、および87番目のTyrをPheに置換したアミノ酸配列、

85番目のThrをAlaに、および87番目のTyrをPheに置換したアミノ酸配列

などがあげられる。

【0066】

1個の変更が導入されたVLのアミノ酸配列としては、具体的には、配列番号97で表されるアミノ酸配列中の

21番目のIleをLeuに置換したアミノ酸配列、40番目のProをLeuに置換したアミノ酸配列、

58番目のValをIleに置換したアミノ酸配列、85番目のThrをAlaに置換したアミノ酸配列、

および87番目のTyrをPheに置換したアミノ酸配列、があげられる。

【0067】

また、本発明のヒト化抗体の具体例としては、可変領域のH鎖が配列番号96および/または可変領域のL鎖が配列番号97で表されるアミノ酸配列を有するヒト化抗体、可変領域のH鎖が配列番号101および/または可変領域のL鎖が配列番号97で表されるアミノ酸配列を有するヒト化抗体、可変領域のH鎖が配列番号103および/または可変領域のL鎖が配列番号97で表されるアミノ酸配列を有するヒト化抗体、可変領域のH鎖が配列番号105および/または可変領域のL鎖が配列番号97で表されるアミノ酸配列を有するヒト化抗体、および可変領域のH鎖が配列番号107および/または可変領域のL鎖が配列番号97で表されるアミノ酸配列を有するヒト化抗体などがあげられる。

ヒト抗体は、元来、ヒト体内に内在的に存在する抗体をいうが、最近の遺伝子工学的、細胞工学的、発生工学的な技術の進歩により作製されたヒト抗体ファージライブラリーおよびヒト抗体産生トランスジェニック動物から得られる抗体なども含まれる。

【0068】

ヒト体内に内在的に存在する抗体は、例えば、ヒト末梢血リンパ球を単離し、EBウイルスなどを感染させ不死化し、クローニングすることにより、該抗体を産生するリンパ球を培養でき、培養上清中より該抗体を精製することができる。

ヒト抗体ファージライブラリーは、ヒトB細胞から調製した抗体遺伝子をファージ遺伝子に挿入することによりFab、scFvなどの抗体断片をファージ表面に発現させたライブラリーである。該ライブラリーより、抗原を固定化した基質に対する結合活性を指標として所望の抗原結合活性を有する抗体断片を表面に発現しているファージを回収することができる。該抗体断片は、さらに、遺伝子工学的的手法により2本の完全なH鎖およびL鎖からなるヒト抗体分子へも変換することができる。

【0069】

ヒト抗体産生トランスジェニック動物は、ヒト抗体遺伝子が細胞内に組込まれた動物を意味する。具体的には、例えば、マウスES細胞へヒト抗体遺伝子を導入し、該ES細胞

10

20

30

40

50

をマウスの初期胚へ移植後、発生させることによりヒト抗体産生トランスジェニックマウスを作製することができる。ヒト抗体産生トランスジェニック動物からのヒト抗体の作製方法は、通常のヒト以外の動物で行われているハイブリドーマ作製方法によりヒト抗体産生ハイブリドーマを取得し、培養することで培養上清中にヒト抗体を産生蓄積させることができる。

【0070】

上述の抗体または抗体断片を構成するアミノ酸配列において、1つ以上のアミノ酸が欠失、付加、置換または挿入され、かつ上述の抗体またはその抗体断片と同様な活性を有する抗体またはその抗体断片も、本発明の抗体またはその抗体断片に包含される。

欠失、置換、挿入および/または付加されるアミノ酸の数は1個以上でありその数は特に限定されないが、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 79, 6409(1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci USA, 82, 488 (1985)等に記載の部位特異的変異導入法等の周知の技術により、欠失、置換もしくは付加できる程度の数である。例えば、1～数十個、好ましくは1～20個、より好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～5個である。

【0071】

上記の抗体のアミノ酸配列において1つ以上のアミノ酸残基が欠失、置換、挿入または付加されたとは、次のことを示す。同一配列中の任意、かつ1もしくは複数のアミノ酸配列中において、1または複数のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入または付加があることを意味する。また、欠失、置換、挿入または付加が同時に生じる場合もあり、置換、挿入または付加されるアミノ酸残基は天然型と非天然型いずれの場合もある。天然型アミノ酸残基としては、Lアラニン、Lアスパラギン、Lアスパラギン酸、Lグルタミン、Lグルタミン酸、グリシン、Lヒスチジン、Lイソロイシン、Lロイシン、Lリジン、Lメチオニン、Lフェニルアラニン、Lプロリン、Lセリン、Lスレオニン、Lトリプトファン、Lチロシン、LバリンおよびLシステインなどがあげられる。

【0072】

以下に、相互に置換可能なアミノ酸残基の好ましい例を示す。同一群に含まれるアミノ酸残基は相互に置換可能である。

A群：ロイシン、イソロイシン、ノルロイシン、バリン、ノルバリン、アラニン、2アミノブタン酸、メチオニン、Oメチルセリン、tブチルグリシン、tブチルアラニン、シクロヘキシルアラニン

B群：アスパラギン酸、グルタミン酸、イソアスパラギン酸、イソグルタミン酸、2アミノアジピン酸、2アミノスベリン酸

C群：アスパラギン、グルタミン

D群：リジン、アルギニン、オルニチン、2,4ジアミノブタン酸、2,3ジアミノプロピオン酸

E群：プロリン、3ヒドロキシプロリン、4ヒドロキシプロリン

F群：セリン、スレオニン、ホモセリン

G群：フェニルアラニン、チロシン

本抗体のエフェクター活性としては、ADCC活性、CDC活性、抗体依存性貪食活性 (antibody dependent cellular phagocytosis, ADCP)、オプソニン化効果などがあげられ、種々の方法で制御することができる。

【0073】

エフェクター活性を制御する方法としては、抗体のFc領域に結合した糖鎖を制御する方法、抗体のFc領域のアミノ酸残基をアミノ酸改変する方法などがあげられる。

抗体のFc領域に結合した糖鎖を制御する方法としては、IgG抗体の297番目の糖鎖を除去することでADCC、CDC活性を低下させる方法[Molecular Immunology, 32, 1311, (1995), WO2008/030564]、抗体のFc領域へのガラクトースの結合を低下させてCDC活性を低下させ

る方法などがあげられる。

【0074】

また、抗体のFc領域に結合した糖鎖を制御する方法としては、IgG抗体のFc領域の297番目のアスパラギンに結合したN結合型糖鎖において、糖鎖が結合している基部のNアセチルグルコサミン (GlcNAc) に、フコースが結合していない糖鎖を含む抗体を生産する方法 (US7,214,775、US6,946,292)、bisecting GlcNAcを結合させた糖鎖を含む抗体を生産させる方法[Nature Biotechnology, 17, 176, (1999)]、非還元末端に結合したガラクトース (Gal) を結合させた糖鎖を有する抗体を生産させる方法[Hum. Antibod. Hybridomas, 5, 143 151, (1994)]などの方法をあげることができる。

【0075】

抗体のFc領域のアミノ酸残基をアミノ酸改変する方法としては、抗体のFc領域のアミノ酸改変を行うことでエフェクター活性を制御する方法 (J.B.C., 277, 26733 26740, 2002、US6,737,056、US7,297,775、US2007/0020260、W02005/070963)、および抗体のFc領域の各サブクラス間のドメイン交換を行うことでエフェクター活性を制御する方法 (W02007/011041) などがあげられる。

【0076】

本発明の抗体断片としては、Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、diabody、dsFvなどがあげられる。

本発明の抗体断片としては、Fab、F(ab')₂、Fab'、scFv、diabody、dsFvおよびCDRを含むペプチドなどがあげられる。

Fabは、IgGをタンパク質分解酵素パパインで処理して得られる断片のうち (H鎖の224番目のアミノ酸残基で切断される)、H鎖のN末端側約半分とL鎖全体がジスルフィド結合で結合した分子量約5万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

【0077】

本発明のFabは、本発明の糖鎖不全CD27タンパク質を特異的に認識し、かつ該細胞外領域に結合するモノクローナル抗体をタンパク質分解酵素パパインで処理して得ることができる。または、該抗体のFabをコードするDNAを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、製造することができる。

【0078】

F(ab')₂は、IgGのヒンジ領域の2個のジスルフィド結合の下部を酵素ペプシンで分解して得られた、2つのFab領域がヒンジ部分で結合して構成された、分子量約10万の抗原結合活性を有するフラグメントである。

本発明のF(ab')₂は、本発明の糖鎖不全CD27タンパク質を特異的に認識し、かつ該細胞外領域に結合するモノクローナル抗体をタンパク質分解酵素ペプシンで処理して得ることができる。または、下記のFab'をチオエーテル結合あるいはジスルフィド結合させ、作製することができる。

【0079】

Fab'は、上記F(ab')₂のヒンジ領域のジスルフィド結合を切断した分子量約5万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

本発明のFab'は、本発明の糖鎖不全CD27タンパク質を特異的に認識し、かつ該細胞外領域に結合するF(ab')₂を還元剤ジチオスレイトール処理して得ることができる。または、該抗体のFab'断片をコードするDNAを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、製造することができる。

【0080】

scFvは、1本のVHと1本のVLとを適当なペプチドリinker (以下、Pと表記する) を用いて連結した、VH-P-VLないしはVL-P-VHポリペプチドで、抗原結合活性を有する抗体断片である。

本発明のscFvは、本発明の糖鎖不全CD27タンパク質を特異的に認識し、かつ該細胞外領

10

20

30

40

50

域に結合するモノクローナル抗体のVHおよびVLをコードするcDNAを取得し、scFvをコードするDNAを構築し、該DNAを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、製造することができる。

【0081】

diabodyは、scFvが二量体化した抗体断片で、二価の抗原結合活性を有する抗体断片である。二価の抗原結合活性は、同一であることもできるし、一方を異なる抗原結合活性とすることもできる。

本発明のdiabodyは、本発明の糖鎖不全CD27タンパク質を特異的に認識し、かつ該細胞外領域に結合するモノクローナル抗体を取得し、scFvをコードするDNAをPのアミノ酸配列の長さが8残基以下となるように構築し、該DNAを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、製造することができる。

10

【0082】

dsFvは、VHおよびVL中のそれぞれ1アミノ酸残基をシステイン残基に置換したポリペプチドを該システイン残基間のジスルフィド結合を介して結合させたものをいう。システイン残基に置換するアミノ酸残基はReiterらにより示された方法 [Protein Engineering, 7, 697(1994)] に従って、抗体の立体構造予測に基づいて選択することができる。

本発明のdsFvは、本発明の糖鎖不全CD27タンパク質を特異的に認識し、かつ該細胞外領域に結合するモノクローナル抗体のVHおよびVLをコードするcDNAを取得し、dsFvをコードするDNAを構築し、該DNAを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、製造することができる。

20

【0083】

CDRを含むペプチドは、VHまたはVLのCDRの少なくとも1領域以上を含んで構成される。複数のCDRを含むペプチドは、直接または適当なペプチドリンカーを介して結合させることができる。

本発明のCDRを含むペプチドは、本発明の糖鎖不全CD27タンパク質を特異的に認識し、かつ該細胞外領域に結合するモノクローナル抗体のVHおよびVLのCDRをコードするDNAを構築し、該DNAを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、製造することができる。

30

【0084】

また、CDRを含むペプチドは、Fmoc法（フルオレニルメチルオキシカルボニル法）、tBoc法（t-ブチルオキシカルボニル法）などの化学合成法によって製造することもできる。

本発明には、本発明の糖鎖不全CD27タンパク質を特異的に認識し、かつ該細胞外領域に結合するモノクローナル抗体または抗体断片に、薬剤、タンパク質、放射性同位元素などを化学的あるいは遺伝子工学的に結合させた抗体とのコンジュゲートを包含する。

【0085】

40

本発明のコンジュゲートは、本発明の糖鎖不全CD27タンパク質を特異的に認識し、かつ該細胞外領域に結合するモノクローナル抗体またはその抗体断片のH鎖あるいはL鎖のN末端側あるいはC末端側、抗体またはその抗体断片中の適当な置換基あるいは側鎖、さらには抗体またはその抗体断片中の糖鎖などに薬剤、タンパク質、放射性同位元素などを化学的手法 [抗体工学入門、金光修著、地人書館（1994）] により結合させることにより製造することができる。

【0086】

また、本発明の糖鎖不全CD27タンパク質を特異的に認識し、かつ該細胞外領域に結合するモノクローナル抗体またはその抗体断片をコードするDNAと、結合させたいタンパク質をコードするDNAを連結させて発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを、原核生物ある

50

いは真核生物の宿主細胞へ導入するという遺伝子工学的手法によっても製造することができる。

【 0 0 8 7 】

薬剤としては、化学療法剤、抗体医薬、免疫賦活剤、高分子の薬剤などがあげられる。

タンパク質としては、サイトカイン、増殖因子、毒素タンパク質などがあげられる。

さらに、抗体または該抗体断片に結合させる薬剤は、プロドラッグの形態でもよい。本発明におけるプロドラッグとは、腫瘍環境に存在する酵素などによって化学的な修飾を受け、癌細胞を傷害する作用を有する物質に変換される薬剤をいう。

【 0 0 8 8 】

化学療法剤としては、アルキル化剤、ニトロソウレア剤、代謝拮抗剤、抗癌性抗生物質、植物由来アルカロイド、トポイソメラーゼ阻害剤、ホルモン療法剤、ホルモン拮抗剤、アロマターゼ阻害剤、P糖蛋白阻害剤、白金錯体誘導体、M期阻害剤、キナーゼ阻害剤などのいかなる化学療法剤も包含される。化学療法剤としては、アミフォスチン（エチオール）、シスプラチン、ダカルバジン（DTIC）、ダクチノマイシン、メクロレタミン（ナイトロジェンマスタード）、ストレプトゾシン、シクロフォスファミド、イホスファミド、カルムスチン（BCNU）、ロムスチン（CCNU）、ドキシソルピシン（アドリアマイシン）、ドキシソルピシンリポ（ドキシル）、エピルピシン、ゲムシタピン（ゲムザール）、ダウノルピシン、ダウノルピシンリポ（ダウノゾーム）、プロカルバジン、マイトマイシン、シタラピン、エトポシド、メトトレキセート、5フルオロウラシル、フルオロウラシル、ピンブラスチン、ピンクリスチン、ブレオマイシン、ダウノマイシン、ペプロマイシン、エストラムスチン、パクリタキセル（タキソール）、ドセタキセル（タキソテア）、アルデスロイキン、アスパラギナーゼ、プスルファン、カルボプラチン、オキサリプラチン、ネダプラチン、クラドリピン、カンプトテシン、CPT 11、10 ヒドロキシ 7 エチル カンプトテシン（SN38）、フロクスウリジン、フルダラビン、ヒドロキシウレア、イホスファミド、イダルピシン、メスナ、イリノテカン、ノギテカン、ミトキサントロン、トポテカン、ロイプロリド、メゲストロール、メルファラン、メルカプトプリン、ヒドロキシカルバミド、プリカマイシン、ミトタン、ペガスパラガーゼ、ペントスタチン、ピボプロマン、ストレプトゾシン、タモキシフェン、ゴセレリン、リュープロレニン、フルタミド、テニボシド、テストラクトン、チオグアニン、チオテパ、ウラシルマスタード、ピノレルピン、クロラムブシル、ハイドロコチゾン、プレドニゾロン、メチルプレドニゾロン、ピンデシン、ニムスチン、セムスチン、カペシタピン、トムデックス、アザシチジン、UFT、オキサロプラチン、ゲフィチニブ（イレッサ）、イマチニブ（STI571）、エルロチニブ、Flt3 阻害剤、vascular endothelial growth facotr receptor（VEGFR）阻害剤、fibroblast g rowth factor receptor（FGFR）阻害剤、epidermal growth factor receptor（EGFR）阻害剤（イレッサ、タルセバなど）ラディシコール、17 アリルアミノ 17 デメトキシゲルダナマイシン、ラパマイシン、アムサクリン、オール - トランスレチノイン酸、サリドマイド、アナストロゾール、ファドロゾール、レトロゾール、エキセメスタン、金チオマレート、D - ペニシラミン、プシラミン、アザチオプリン、ミゾリピン、シクロスポリン、ラパマイシン、ヒドロコチゾン、ベキサロテン（ターグレチン）、タモキシフェン、デキサメタゾン、プロゲスチン類、エストロゲン類、アナストロゾール（アリミデックス）、ロイプリン、アスピリン、インドメタシン、セレコキシブ、アザチオプリン、ペニシラミン、金チオマレート、マレイン酸クロルフェニラミン、クロロフェニラミン、クレマシチン、レチノイン、ベキサロテン、砒素、ボルテゾミブ、アロプリノール、ゲムツズマブ、イブリツモマブチウキセタン、1 3 1 トシツテマブ、タルグレチン、オゾガミン、クラリスロマシン、ロイコボリン、イファスファミド、ケトコナゾール、アミノグルテチミド、スラミン、メトトレキセート、Maytansinoidおよびその誘導体、などがあげられる。

【 0 0 8 9 】

化学療法剤と抗体とを結合させる方法としては、グルタルアルデヒドを介して化学療法剤と抗体のアミノ基間を結合させる方法、水溶性カルボジイミドを介して化学療法剤のアミノ基と抗体のカルボキシル基を結合させる方法等があげられる。

抗体医薬としては、抗体の結合によりアポトーシスが誘導される抗原、腫瘍の病態形成に関わる抗原または免疫機能を調節する抗原、病変部位の血管新生に關与する抗原に対する抗体があげられる。

【 0 0 9 0 】

抗体の結合によりアポトーシスが誘導される抗原としては、Cluster of differentiation (以下、CDと記載する) 19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD37、CD53、CD72、CD73、CD74、CDw75、CDw76、CD77、CDw78、CD79a、CD79b、CD80 (B7.1)、CD81、CD82、CD83、CDw84、CD85、CD86 (B7.2)、human leukocyte antigen (HLA) Class II、EGFRなどがあげられる。

【 0 0 9 1 】

腫瘍の病態形成に関わる抗原または免疫機能を調節する抗原としては、CD4、CD40、CD40リガンド、B7ファミリー分子(CD80、CD86、CD274、B7 DC、B7 H2、B7 H3、B7 H4)、B7ファミリー分子のリガンド (CD28、CTLA 4、ICOS、PD 1、BTLA)、OX 40、OX 40リガンド、CD137、tumor necrosis factor (TNF) 受容体ファミリー分子(DR4、DR5、TNFR1、TNFR2)、TNF related apoptosis inducing ligand receptor (TRAIL)ファミリー分子、TRAILファミリー分子の受容体ファミリー (TRAIL R1、TRAIL R2、TRAIL R3、TRAIL R4)、receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANK)、RANKリガンド、CD25、葉酸受容体4、サイトカイン [interleukin 1 (以下、interleukinをILと記す)、IL 1、IL 4、IL 5、IL 6、IL 10、IL 13、transforming growth factor(TGF)、TNF等]、これらのサイトカインの受容体、ケモカイン (SLC、ELC、I 309、TARC、MDC、CTACK等)、これらのケモカインの受容体があげられる。

【 0 0 9 2 】

病変部位の血管新生を阻害する抗体の抗原としては、vascular endothelial growth factor (VEGF)、Angiopoietin、fibroblast growth factor (FGF)、EGF、platelet derived growth factor (PDGF)、insulin like growth factor (IGF)、erythropoietin (EPO)、TGF、IL 8、Ephrin、SDF 1など、およびこれらの受容体があげられる。

免疫賦活剤としては、イムノアジュバントとして知られている天然物でもよく、具体例としては、免疫を亢進する薬剤が、1,3 グルカン (レンチナン、シゾフィラン)、ガラクトシルセラミド (KRN7000)、菌体粉末 (ピシバニール、BCG)、菌体抽出物 (クレステン) があげられる。

【 0 0 9 3 】

高分子の薬剤としては、ポリエチレングリコール (以下、PEGと表記する)、アルブミン、デキストラン、ポリオキシエチレン、スチレンマレイン酸コポリマー、ポリビニルピロリドン、ピランコポリマー、ヒドロキシプロピルメタクリルアミドなどがあげられる。これらの高分子薬剤を抗体または抗体断片に結合させることにより、(1) 化学的、物理的あるいは生物学的な種々の因子に対する安定性の向上、(2) 血中半減期の顕著な延長、(3) 免疫原性の消失、抗体産生の抑制、などの効果が期待される [バイオコンジュゲート医薬品、廣川書店 (1993)]。例えば、PEGと抗体を結合させる方法としては、PEG化修飾試薬と反応させる方法などがあげられる [バイオコンジュゲート医薬品、廣川書店 (1993)]。PEG化修飾試薬としては、リジンの - アミノ基の修飾剤 (特開昭61 178926)、アスパラギン酸およびグルタミン酸のカルボキシル基の修飾剤 (特開昭56 23587)、アルギニンのグアニジノ基の修飾剤 (特開平2 117920) などがあげられる。

【 0 0 9 4 】

サイトカインまたは増殖因子としては、NK細胞、マクロファージ、好中球などの細胞を亢進するサイトカインまたは増殖因子であればいかなるものでもよいが、例えば、インターフェロン (以下、IFNと記す)、INF、INF、IL 2、IL 12、IL 15、IL 18、IL 21、IL 23、顆粒球刺激因子(G CSF)、顆粒球・マクロファージ刺激因子(GM CSF)、マクロファージ刺激因子(M CSF)などがあげられる。

【 0 0 9 5 】

毒素タンパク質としては、リシン、ジフテリアトキシン、ONTAKなどがあげられ、毒性

10

20

30

40

50

を調節するためにタンパク質に変異を導入したタンパク毒素も含まれる。

放射性同位元素としては、 ^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{90}Y 、 ^{64}Cu 、 ^{199}Tc 、 ^{77}Lu 、 ^{211}At 、 $\text{Re}186$ 、 $\text{Re}188$ 、 $\text{In}111$ 等があげられる。放射性同位元素は、クロラミンT法等によって抗体に直接結合させることができる。また、放射性同位元素をキレートする物質を抗体に結合させてもよい。キレート剤としては、methylbenzyl diethylene triamine pentaacetic acid (MX DTP A)などがあげられる。

【0096】

本発明においては、本発明で用いられる抗体と、1つ以上の他の薬剤とを組み合わせることで、または放射線照射とを組み合わせることもできる。他の薬剤としては、上述の化学療法剤、抗体医薬、免疫賦活剤、サイトカインまたは増殖因子などがあげられる。

10

放射線照射としては、X線、 γ 線などの光子（電磁波）照射、電子線、陽子線、重粒子線などの粒子線照射などが含まれる。

【0097】

組み合わせることで投与方法としては、本発明で用いられる抗体との同時投与でもよいし、また、本発明で用いられる抗体の投与と前後して投与しても構わない。

本発明の検出方法、定量方法、検出試薬、定量試薬または診断薬は、特定の標識体の本発明の抗体に標識して用いる方法があげられる。標識体としては、通常の免疫学的検出または測定法で用いられる標識体があげられ、アルカリフォスファターゼ、ペルオキシダーゼ、ルシフェラーゼなどの酵素、アクリジニウムエステル、ロフィンなどの発光物質、フルオレシニン・イソシアネート (FITC)、トリメチルローダミン (RITC) などの蛍光物質などがあげられる。

20

以下に、本発明の抗体の製造方法について、具体的に説明する。

【0098】

1. モノクローナル抗体の製造方法

(1) 抗原の調製

下記に記載の方法により、CD27全長またはその部分長をコードするcDNAを含む発現ベクターを、O結合型糖鎖合成プロセスにおいて、ポリペプチド上のSer/Thrに結合したGalNAcにGalを付加する酵素、該酵素の活性に関与する蛋白質またはUDP galactoseの輸送に関わるタンパク質などの活性が低下または欠損した酵母、昆虫細胞、動物細胞等に導入することにより、抗原となる糖鎖不全CD27もしくは糖鎖不全CD27を発現させた細胞を得ることができる。また、糖鎖不全CD27を細胞膜上または培養液中に多量に発現している各種ヒト由来培養細胞、ヒト組織などから、糖鎖不全CD27を精製して抗原を調製する方法、または糖鎖不全CD27の部分配列を有する合成ペプチドを調製し、抗原として用いることもできる。更に、糖鎖付加能のない大腸菌等の原核生物を用いて発現、精製したCD27に、試験管内で糖鎖を付加することで、糖鎖不全CD27を得ることができる。

30

【0099】

また、同様にして、正常なO結合型糖鎖合成プロセスを有する酵母、昆虫細胞、動物細胞等の宿主細胞に、CD27全長またはその部分長をコードするcDNAを含む発現ベクターを導入することで、正常なO結合型糖鎖を有するCD27を発現させた細胞を取得することができる。該細胞から正常なO結合型糖鎖を有するCD27タンパク質を精製することができる。

40

上述のようにして得られた、糖鎖不全CD27、正常O結合型糖鎖を有するCD27のタンパク質または発現細胞は、目的の抗体のスクリーニング、取得された抗体の抗原に対する反応性を確認するために、使用することができる。

【0100】

本発明で用いられるポリペプチドとしては、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)やCurrent Protocols IN

Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997)などに記載された方法等を用い、例えば以下の方法により、これを該ポリペプチドコードするDNAを宿主細胞中で発現させて、製造することができる。

50

【0101】

まず、全長ポリペプチドをコードするcDNAを適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換えベクターを作製する。この際もし必要であれば、全長cDNAをもとにしてポリペプチドをコードする部分を含む適当な長さのDNA断片を調製し、上記全長cDNAの代わりに該DNA断片を使用してもよい。次いで、該組換えベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより、ポリペプチドを生産する形質転換体を得ることができる。

【0102】

宿主細胞としては、大腸菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞等、O結合型糖鎖を付加する能力を有し、目的とする遺伝子を発現できるものであればいずれをも用いることができる。

発現ベクターとしては、使用する宿主細胞において自律複製可能又は染色体中への組込が可能で、ポリペプチドをコードするDNAを転写できる位置に適当なプロモーターを含有しているものが用いられる。

【0103】

大腸菌等の原核生物を宿主細胞として用いる場合には、本発明において用いられるポリペプチドをコードするDNAを含有してなる組換えベクターは、原核生物中で自律複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、本発明において用いられるDNA及び転写終結配列を含むベクターであることが好ましい。該組換えベクターは、さらに、プロモーターを制御する遺伝子を含んでいてもよい。

【0104】

発現ベクターとしては、例えば、pBTrp2、pBTac1、pBTac2(いずれもRoche Diagnostic社製)、pKK233 2(Pharmacia社製)、pSE280(Invitrogen社製)、pGEMEX 1(Promega社製)、pQE 8(QIAGEN社製)、pKYP10(特開昭58 110600)、pKYP200[Agricultural Biological Chemistry,48,669(1984)]、pLSA1[Agric.Biol.Chem.,53,277(1989)]、pGEL1[Proc.Natl.Acad.Sci.USA,82,4306(1985)]、pBluescript II SK()(Stratagene社製)、pTrs30[大腸菌 JM109/pTrs30(FERM BP 5407)より調製]、pTrs32[大腸菌 JM109/pTrs32(FERM BP 5408)より調製]、pGHA2[大腸菌 IGHA2(FERM BP 400)より調製、特開昭60 221091]、pGKA2[大腸菌 IGKA2(FERM BP 6798)より調製、特開昭60 221091]、pTerm2(US4686191,US4939094,US5160735)、pSupex、pUB110、pTP5、pC194、pEG400[J.Bacteriol.,172,2392(1990)]、pGEX(Pharmacia社製)、pETシステム(Novagen社製)、pME18S FL3等を挙げることができる。

【0105】

プロモーターとしては、使用する宿主細胞中で機能を発揮できるものであればいかなるものでもよい。例えば、trpプロモーター(Ptrp)、lacプロモーター、PLプロモーター、PRプロモーター、T7プロモーター等の、大腸菌やファージ等に由来するプロモーターを挙げることができる。また、Ptrpを2つ直列させたタンデムプロモーター、tacプロモーター、lac T7プロモーター、let Iプロモーター等のように、人為的に設計改変されたプロモーター等も用いることができる。

【0106】

また、上記組換えベクターとしては、リボソーム結合配列であるシャイン・ダルガルノ(Shine Dalgarno)配列と開始コドンとの間を適当な距離(例えば6~18塩基)に調節したプラスミドを用いることが好ましい。本発明において用いられるポリペプチドをコードするDNAの塩基配列においては、宿主内での発現に最適なコドンとなるように塩基を置換することができ、これにより、目的とするポリペプチドの生産率を向上させることができる。さらに、上記組換えベクターにおける遺伝子の発現には転写終結配列は必ずしも必要ではないが、構造遺伝子の直下に転写終結配列を配置することが好ましい。

【0107】

宿主細胞としては、エシェリヒア属等に属する微生物、例えば、大腸菌 XL1 Blue、大腸菌 XL2 Blue、大腸菌 DH1、大腸菌 MC1000、大腸菌 KY3276、大腸菌 W1485、大腸菌 JM109、大腸菌 HB101、大腸菌 No.49、大腸菌 W3110、大腸菌 NY49、大腸菌 DH5 等を挙げ

10

20

30

40

50

ることができる。

組換えベクターの導入方法としては、上記宿主細胞へDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、カルシウムイオンを用いる方法 [Proc.Natl.Acad.Sci.U SA,69,2110 (1972)]、Gene,17,107(1982)やMolecular&General Genetics,168,111 (1979) に記載の方法等を挙げるることができる。

【 0 1 0 8 】

動物細胞を宿主として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、pcDNA1、pcDM8 (フナコシ社より市販)、pAGE107 [特開平3 22979; Cytotechnology,3,133,(1990)]、p AS3 3 (特開平2 227075)、pCDM8 [Nature,329,840,(1987)]、pcDNA1/Amp (Invitrogen社製)、pcDNA3.1 (Invitrogen社製)、pREP4 (Invitrogen社製)、pAGE103 [J.Biochemistry,101,1307(1987)]、pAGE210、pME18SFL3、pKANTEX93 [W097/10354]などを挙げる
10
ことができる。

【 0 1 0 9 】

プロモーターとしては、動物細胞中で機能を発揮できるものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス (CMV) のIE (immediate early) 遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、SR プロモーター、モロニーマウス白血病ウイルス (moloney murine leukemia virus) のプロモーターおよびエンハンサー等を挙
20
げることができる。また、ヒトCMVのIE遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

【 0 1 1 0 】

宿主細胞としては、糖鎖合成経路のうちポリペプチド上のSer/Thrに結合したN アセチルガラクトサミン (GalNAc) にGalを付加する酵素、該酵素の活性に関与するタンパク質またはuridine 5' diphosphate galactose (UDP galactose) の輸送に関わるタンパク質などの活性を、低下または欠損させた細胞株であればいかなるものでもよい。具体的には、UDP galactose transporterが欠損したチャイニーズハムスター細胞 (CHO細胞) であるLe c8変異体[ACS Symp. Ser.128, 214 (1980)]があげられる。

【 0 1 1 1 】

更に、糖鎖合成経路に関連する酵素、輸送タンパク質の活性が欠損していない細胞であっても、UDP galactose transporter (別名UDP galactose translocator; UGALT) あるいは、core 1 synthase, glycoprotein n acetylgalactosamine 3 beta galactosyltransferase, (C1GALT1、別名core 1 beta 3 gal t, t synthase) あるいはC1GALT1 specific chaperone 1 (c1galt1c1、別名core 1 beta 3 galactosyltransferase specific molecular
30
chaperone (COSMC)、C1GALT2) などの酵素、輸送タンパク質の機能を、低下もしくは欠損させた細胞株を用いることができる。

【 0 1 1 2 】

糖鎖合成経路に関連する酵素、輸送タンパク質の活性が欠損していない細胞としては、たとえば (Namalwa) 細胞、サルの細胞であるCOS細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞であるCHO細胞、HBT5637 (特開昭63 299) 等が挙げられる。
40
そのような対象となる酵素群としては、などが挙げることができる。

遺伝子機能を低下させる方法としては、アンチセンス法、リボザイム法[Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 96, 1886 (1999)]、相同組換え法[Manipulating the Mouse Embryo A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994)、Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993)]、RNA DNA ologonucleotide (RDO) 法、RNA interference (RNAi) 法[Nature, 391, 80 6, (1998)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 15502, (1998)、Nature, 395, 854, (1998)]、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 5049, (1999)、Cell, 95, 1017, (1998)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 1451, (1999) roc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 13959, (19 98)、Nature Cell Biol., 2, 70, (2000)]、レトロウイルスを用いた方法、トランスポゾンを用いた方法[Nature Genetics, 25, 35, (2000)]等があげられる。
50

【0113】

ベクターの導入方法としては、動物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Cytotechnology,3,133(1990)]、リン酸カルシウム法 (特開平2 227075)、リポフェクション法 [Proc.Natl.Acad.Sci.USA,84,7413(1987)]などを挙げることができる。

遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)に記載されている方法等に準じて、分泌生産、融合タンパク質発現等を行うことができる。真核生物由来の細胞で発現させた場合には、糖あるいは糖鎖が付加されたポリペプチドを得ることができる。

【0114】

以上のようにして得られる形質転換体を培地に培養し、培養物中に該ポリペプチドを生成蓄積させ、該培養物から採取することにより、ポリペプチドを製造することができる。該形質転換体を培地に培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lacプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピル-Dチオガラクトピラノシド等を、trpプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸等を培地に添加してもよい。

【0115】

動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているRPMI1640培地 [The Journal of the American Medical Association,199,519(1967)]、EagleのMEM培地 [Science,122,501(1952)]、ダルベッコ改変MEM培地 [Virology,8,396(1959)]、199培地 [Proc.Soc.Exp.Biol.Med.,73,1 (1950)]又はこれら培地にFCS等を添加した培地等を用いることができる。培養は、通常pH6~8、30~40℃、5% CO₂存在下の条件下で1~7日間行う。また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0116】

上記のとおり、本発明において用いられるポリペプチドをコードするDNAを組み込んだ組換えベクターを保有する微生物、動物細胞等由来の形質転換体を、通常の培養方法に従って培養して該ポリペプチドを生成蓄積させ、該培養物より採取することにより、本発明において用いられるポリペプチドを製造することができる。

遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)に記載されている方法等に準じて、分泌生産、融合タンパク質発現等を行うことができる。

【0117】

ポリペプチドの生産方法としては、宿主細胞内に生産させる方法、宿主細胞外に分泌させる方法、及び宿主細胞外膜上に生産させる方法があり、使用する宿主細胞や、生産させるポリペプチドの構造を変えることにより、適切な方法を選択することができる。

ポリペプチドが宿主細胞内又は宿主細胞外膜上に生産される場合、ポールソンらの方法 [J. Biol.Chem.,264,17619(1989)]、ロウらの方法 [Proc.Natl.Acad.Sci.,USA,86,8227(1989)]、Genes Develop.,4,1288(1990)]、又は特開平05 336963、W094/23021等に記載の方法を用いることで、該遺伝子産物を宿主細胞外に分泌させることができる。

【0118】

また、特開平2 227075に記載されている方法に準じて、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子等を用いた遺伝子増幅系を利用して生産量を上昇させることもできる。

ポリペプチドは、例えば、以下のようにして単離・精製することができる。

ポリペプチドが細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後に細胞を遠心分離により回収し、水系緩衝液に懸濁後、超音波破碎機、フレンチプレス、マントンガウリンホ

10

20

30

40

50

モゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られる上清から、通常の酵素の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル（DEAE）-セファロース、DIAION HPA 75（三菱化学社製）等のレジンをを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S Sepharose FF（Pharmacia社製）等のレジンをを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンをを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独又は組み合わせて用い、精製標品を得ることができる。

【0119】

また、ポリペプチドが細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、同様に細胞を回収後破碎し、遠心分離を行うことにより、沈殿画分として該ポリペプチドの不溶体を回収する。回収した該ポリペプチドの不溶体をタンパク質変性剤で可溶化する。該可溶化液を希釈又は透析することにより、該ポリペプチドを正常な立体構造に戻した後、上記と同様の単離精製法によりポリペプチドの精製標品を得ることができる。

【0120】

また、本発明において用いられるポリペプチドは、Fmoc法（フルオレニルメチルオキシカルボニル法）、tBoc法（t-ブチルオキシカルボニル法）等の化学合成法によっても製造することができる。また、Advanced ChemTech社、パーキン・エルマー社、Pharmacia社、Protein Technology Instrument社、Synthecell Vega社、PerSeptive社、島津製作所等のペプチド合成機を利用して化学合成することもできる。

【0121】

（2）動物の免疫と抗体産生細胞の調製

3~20週令のマウス、ラットまたはハムスターに上記のように調製した抗原を免疫して、その動物の脾臓、リンパ節、末梢血中の抗体産生細胞を採取する。また、免疫原性が低く上記の動物で十分な抗体価の上昇が認められない場合には、CD27ノックアウト動物を被免疫動物として用いる方法もある。

【0122】

免疫は、動物の皮下あるいは静脈内あるいは腹腔内に、適当なアジュバント [例えば、フロイドの完全アジュバント（Complete Freund's Adjuvant）や水酸化アルミニウムゲルと百日咳菌ワクチンなど] とともに抗原を投与することにより行う。抗原が部分ペプチドである場合には、BSA（ウシ血清アルブミン）やKLH（Keyhole Limpet Hemocyanin）などのキャリアタンパク質とコンジュゲートを作製し、これを免疫原として用いる。

【0123】

抗原の投与は、1回目の投与の後1~2週間おきに5~10回行う。各投与後3~7日目に眼底静脈叢より採血し、その血清が抗原と反応することを酵素免疫測定法 [Antibodies A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988]などで調べる。免疫に用いた抗原に対し、その血清が十分な抗体価を示したマウス、ラットまたはハムスターを脾臓細胞の供給源として提供する。

【0124】

脾臓細胞と骨髄腫細胞の融合に供するにあたって、抗原物質の最終投与後3~7日目に、免疫したマウス、ラットまたはハムスターより脾臓を摘出し、脾臓細胞を採取する。脾臓をMEM培地（日水製薬社製）中で細断し、ピンセットでほぐし、遠心分離（1200rpm、5分間）した後、上清を捨て、トリス-塩化アンモニウム緩衝液（pH7.65）で1~2分間処理し赤血球を除去し、MEM培地で3回洗浄して融合用脾臓細胞として提供する。

【0125】

（3）骨髄腫細胞の調製

骨髄腫細胞としては、マウスから得られた株化細胞を使用する。たとえば、8-アザグアニン耐性マウス（BALB/c由来）骨髄腫細胞株P3 X63Ag8 U1（P3 U1） [Current Topics in Microbiology and Immunology, 18, 1 (1978)]、P3 NS1/1 Ag41 (NS 1) [European J. Im

10

20

30

40

50

munology,6,511(1976)]、 SP2/0 Ag14(SP 2)[Nature,276,269(1978)]、 P3 X63 Ag865 3(653) [J.Immunology,123,1548(1979)]、 P3 X63 Ag8(X63) [Nature, 256,495(1975)] などが用いられる。これらの細胞株は、 8 - アザグアニン培地 [RPMI 1640培地にグルタミン (1.5 mM) 、 2 - メルカプトエタノール (5×10^{-5} M)、 ジェンタマイシン (10 μ g/mL) および牛胎児血清 (FCS) を加えた培地 (以下、正常培地という。) に、さらに 8 - アザグアニン (15 μ g/mL) を加えた培地] で継代するが、細胞融合の3~4日前に正常培地に継代し、融合当日 2×10^7 個以上の細胞数を確保する。

【 0 1 2 6 】

(4) 細胞融合

前述した抗体産生細胞と骨髄腫細胞をMEM培地またはPBS (リン酸二ナトリウム1.83 g、リン酸一カリウム0.21 g、食塩7.65 g、蒸留水1リットル、pH7.2) でよく洗浄し、細胞数が、抗体産生細胞 : 骨髄腫細胞 = 5~10:1になるよう混合し、遠心分離 (1200 rpm、5分間) した後、上清を捨て、沈澱した細胞群をよくほぐした後、攪拌しながら、37 °C で、ポリエチレングライコール 1000 (PEG 1000) 2 g、MEM 2 mLおよびジメチルスルホキシド 0.7 mLの混液 0.2~1 mL/108 抗体産生細胞を加え、1~2分間毎にMEM培地1~2 mLを数回加えた後、MEM培地を加えて全量が50 mLになるようにする。遠心分離 (900 rpm、5分間) 後、上清を捨て、ゆるやかに細胞をほぐした後、メスピペットによる吸込み、吹出しでゆるやかに細胞をHAT培地 [正常培地にヒポキサンチン (10^{-4} mol/L)、チミジン (1.5×10^{-5} mol/L) およびアミノプテリン (4×10^{-7} mol/L) を加えた培地] 100 mL中に懸濁する。この懸濁液を96ウェル培養用プレートに100 μ L/ウェルずつ分注し、5% CO₂インキュベーター中、37 °C で7~14日間培養する。

【 0 1 2 7 】

培養後、培養上清の一部をとり後で述べるバインディングアッセイなどにより、本発明において用いられるポリペプチドを含む抗原に反応し、ポリペプチドを含まない抗原に反応しないものを選択する。

また、ついで、限界希釈法によりクローニングを2回繰り返す [1 回目は、HT培地 (HAT培地からアミノプテリンを除いた培地)、2回目は、正常培地を使用する]、安定して強い抗体価の認められたものをモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ株として選択する。

【 0 1 2 8 】

(5) モノクローナル抗体の調製

プリスタン処理 [2,6,10,14 テトラメチルペンタデカン (Pristane) 0.5 mLを腹腔内投与し、2週間飼育する] した8~10週令のマウスまたはヌードマウスに、(4) で得られた抗CD27モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞 $2 \times 10^5 \sim 5 \times 10^7$ 細胞/匹を腹腔内注射する。10~21日でハイブリドーマは腹水癌化する。このマウスから腹水を採取し、遠心分離 (3,000 rpm、5分間) して固形分を除去後、40~50 % 硫酸アンモニウムで塩析した後、カプリル酸沈殿法、DEAE - セファロースカラム、プロテインA - カラムあるいはゲル濾過カラムによる精製を行ない、IgGあるいは、IgM画分を集め、精製モノクローナル抗体とする。

【 0 1 2 9 】

抗体のサブクラスの設定は、サブクラスタイピングキットを用いて酵素免疫測定法により行う。蛋白量の定量は、ローリー法および280 nmでの吸光度より算出する。

(6) バインディングアッセイ

抗原としては、本項 (1) に記載の方法により、本発明において用いられるCD27ポリペプチドをコードするcDNAを含む発現ベクターを大腸菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞等に導入して得た遺伝子導入細胞やリコンビナントタンパク質、あるいはヒト組織から得た精製ポリペプチドや部分ペプチドを用いる。抗原が部分ペプチドである場合には、BSA (ウシ血清アルブミン) やKLH (Keyhole Limpet hemocyanin) などのキャリアタンパク質とコンジュゲートを作製して、これを用いる。

【 0 1 3 0 】

これら抗原を96ウェルプレートに分注し固相化した後、第1抗体として、被免疫動物血

清、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの培養上清もしくは精製抗体を分注して反応させる。PBSまたはPBS 0.05%Tweenで、よく洗浄した後、第2抗体としてビオチン、酵素、化学発光物質あるいは放射線化合物等で標識した抗イムノグロブリン抗体を分注して反応させる。PBS Tweenでよく洗浄した後、第2抗体の標識物質に応じた反応を行う。

【0131】

ガラクトースが結合していない結合型糖鎖を含むCD27を認識し、かつ該細胞外領域に結合するモノクローナル抗体と競合する抗体は、上述のバインディングアッセイ系に、被検抗体を添加して反応させることで取得できる。すなわち、被検抗体を加えた時にモノクローナル抗体の結合が阻害される抗体をスクリーニングすることにより、糖鎖不全CD27の細胞外領域への結合について、取得したモノクローナル抗体と競合するモノクローナル抗体を取得することができる。

10

【0132】

また、糖鎖不全CD27を認識し、かつ該細胞外領域に結合するモノクローナル抗体が認識するエピトープに結合する抗体は、上述のバインディングアッセイ系で取得された抗体のエピトープを同定し、同定したエピトープの、部分的な糖鎖結合ペプチド、またはエピトープの立体構造に擬態させた糖鎖結合ペプチド等を作製し、免疫することで、取得することができる。

【0133】

2. 遺伝子組換え抗体の作製

遺伝子組換え抗体の作製例として、以下にヒト型キメラ抗体およびヒト化抗体の作製方法を示す。

20

(1) 遺伝子組換え抗体発現用ベクターの構築

遺伝子組換え抗体発現用ベクターとは、ヒト抗体のCHおよびCLをコードするDNAが組み込まれた動物細胞用発現ベクターであり、動物細胞用発現ベクターにヒト抗体のCHおよびCLをコードするDNAをそれぞれクローニングすることにより構築することができる。

【0134】

ヒト抗体のC領域は任意のヒト抗体のCHおよびCLを用いることができる。例えば、ヒト抗体の1サブクラスのCHおよびクラスのCLなどがあげられる。ヒト抗体のCHおよびCLをコードするDNAとしてはエキソンとイントロンからなる染色体DNAを用いることも、cDNAを用いることもできるが、cDNAを用いるのが好ましい。動物細胞用発現ベクターとしては、ヒト抗体のC領域をコードする遺伝子を組み込み発現できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、pAGE107 [Cytotechnol.,3,133(1990)]、pAGE103 [J.Biochem.,101,1307(1987)]、pHSG274 [Gene,27,223(1984)]、pKCR [Proc.Natl.Acad.Sci.USA,78,1527(1981)]、pSG1bd2 4 [Cytotechnol.,4,173(1990)]、pSE1UK1Sed1 3 [Cytotechnol.,13,79(1993)]などがあげられる。動物細胞用発現ベクターに用いるプロモーターとエンハンサーとしては、SV40の初期プロモーター [J.Biochem.,101,1307(1987)]、モロニーマウス白血病ウイルスのLTR [Biochem.Biophys.Res.Commun.,149,960(1987)]、免疫グロブリンH鎖のプロモーター [Cell,41,479(1985)]とエンハンサー [Cell,33,717(1983)]などがあげられる。

30

40

【0135】

遺伝子組換え抗体発現用ベクターは、抗体H鎖およびL鎖が別々のベクター上に存在するタイプ、あるいは同一のベクター上に存在するタイプ(タンデム型)のどちらでも用いることができるが、遺伝子組換え抗体発現ベクターの構築の容易さ、動物細胞への導入の容易さ、動物細胞内での抗体H鎖およびL鎖の発現量のバランスが均衡するなどの点からタンデム型の遺伝子組換え抗体発現用ベクターの方が好ましい [J.Immunol.Methods,167,271(1994)]。タンデム型の遺伝子組換え抗体発現用ベクターとしては、pKANTEX93 [W097/10354]、pEE18 [Hybridoma,17,559(1998)]などがあげられる。

【0136】

(2) ヒト以外の動物由来の抗体のV領域をコードするcDNAの取得およびアミノ酸配列

50

の解析

非ヒト抗体のVH及びVLをコードするcDNAは以下の様にして取得することができる。

非ヒト抗体を産生するハイブリドーマ細胞よりmRNAを抽出し、cDNAを合成する。合成したcDNAをファージ或いはプラスミドなどのベクターにクローニングしてcDNAライブラリーを作製する。該ライブラリーより、マウス抗体のC領域部分或いはV領域部分をコードするDNAをプローブとして用い、VHまたはVLをコードするcDNAを有する組換えファージ或いは組換えプラスミドをそれぞれ単離する。組換えファージ或いは組換えプラスミド上の目的とするマウス抗体のVHまたはVLの全塩基配列をそれぞれ決定し、塩基配列よりVHまたはVLの全アミノ酸配列をそれぞれ推定する。

【 0 1 3 7 】

ヒト以外の動物としては、マウス、ラット、ハムスター、ラビットなどのハイブリドーマ細胞を作製することが可能であれば、いかなるものも用いることができる。

ハイブリドーマ細胞から全RNAを調製する方法としては、チオシアン酸グアニジン - トリフルオロ酢酸セシウム法 [Methods in Enzymol.,154,3(1987)] 等、またキットとしてはRNA easy kit (QIAGEN社製) 等が挙げられる。全RNAからmRNAを調製する方法としては、オリゴ (dT) 固定化セルロースカラム法 [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition(Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989)] 等、またキットとしてはOligoTM dT30<Super>mRNA Purification Kit (Takara社製) 等があげられる。ハイブリドーマ細胞からmRNAを調製するキットとしては、Fast Track mRNA Isolation Kit (Invitrogen社製)、Quick Prep mRNA Purification Kit (Pharmacia社製) 等があげられる。

cDNAの合成及びcDNAライブラリー作製法としては、常法 [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition(Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989) ; Current Protocols in Molecular Biology], Supplement 1 34], 或いは市販のキット、例えば、Super Script™ Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning(Invitrogen社製) やZAP cDNA Synthesis Kit(Stratagene社製) を用いる方法等があげられる。

【 0 1 3 8 】

cDNAライブラリーの作製の際、ハイブリドーマ細胞から抽出したmRNAを鋳型として合成したcDNAを組み込むベクターは、該cDNAを組み込めるベクターであればいかなるものでも用いることができる。例えば、ZAP Express[Strategies,5,58(1992)]、pBluescript II SK(+)[Nucleic Acids Research,17,9494(1989)], ZAPII (Stratagene社製)、gt10、gt11 [DNA Cloning:A Practical Approach,1,49(1985)]、Lambda BlueMid (Clontech社製)、ExCell、pT7T3 18U (Pharmacia社製)、pcD2 [Mol.Cell.Biol.,3,280 (1983)] 及びpUC18[Gene,33,103(1985)] 等が用いられる。

【 0 1 3 9 】

ファージ或いはプラスミドベクターにより構築されるcDNAライブラリーを導入する大腸菌としては該cDNAライブラリーを導入、発現及び維持できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、XL1 Blue MRF ' [Strategies,5,81(1992)], C600[Genetics,39,440(1954)], Y1088、Y1090[Science,222,778(1983)], NM522[J.Mol.Biol.,166,1(1983)], K802[J.Mol.Biol.,16,118(1966)]及びJM105[Gene,38,275(1985)]等が用いられる。

【 0 1 4 0 】

cDNAライブラリーからの非ヒト抗体のVHまたはVLをコードするcDNAクローンの選択法としては、アイソトープ或いは蛍光標識したプローブを用いたコロニー・ハイブリダイゼーション法或いはブランク・ハイブリダイゼーション法[Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition(Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989)]により選択することができる。また、プライマーを調製し、mRNAから合成したcDNA或いはcDNAライブラリーを鋳型として、Polymerase Chain Reaction [以下、PCR法と表記する ; Molecular Cloning,A Laboratory Manual, Second Edition、Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989);Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1 34] によりVHまたはVLをコ

10

20

30

40

50

ードするcDNAを調製することもできる。

【0141】

上記方法により選択されたcDNAを、適当な制限酵素等で切断後、pBluescript SK() (Stratagene社製) 等のプラスミドにクローニングし、通常用いられる塩基配列解析方法、例えば、サンガー (Sanger, F.) らのジデオキシ法 [Proc.Natl.Acad.Sci.USA,74,5463(1977)] 等の反応を行い、塩基配列自動分析装置、例えば、A.L.F.DNAシーケンサー (Pharmacia社製) 等を用いて解析することで該cDNAの塩基配列を決定することができる。

【0142】

決定した塩基配列からVH及びVLの全アミノ酸配列をそれぞれ推定し、既知の抗体のVH及びVLの全アミノ酸配列 [Sequences of Proteins of Immunological Interest,US Dept.Health and Human Services(1991)] と比較することにより、取得したcDNAが分泌シグナル配列を含む抗体のVH及びVLの完全なアミノ酸配列をコードしているかをそれぞれ確認することができる。分泌シグナル配列を含む抗体のVH及びVLの完全なアミノ酸配列に関しては、既知の抗体のVH及びVLの全アミノ酸配列 [Sequences of Proteins of Immunological Interest,US Dept.Health and Human Services(1991)] と比較することにより、分泌シグナル配列の長さ及びN末端アミノ酸配列を推定でき、更にはそれらが属するサブグループを知ることができる。また、VH及びVLの各CDRのアミノ酸配列についても、既知の抗体のVH及びVLのアミノ酸配列 [Sequences of Proteins of Immunological Interest,US Dept.Health and Human Services(1991)] と比較することによって見出すことができる。

【0143】

更にVH及びVLの完全なアミノ酸配列を用いて任意のデータベース、例えば、SWISS PROT やPIR Protein等に対してBLAST法 [J.Mol.Biol.,215,403(1990)] 等の配列の相同性検索を行い、用いるアミノ酸配列が新規なものであるかどうかを確認することができる。

(3) ヒト型キメラ抗体発現ベクターの構築

本項2の(1)に記載の遺伝子組換え抗体発現用ベクターのヒト抗体のCHまたはCLをコードするそれぞれの遺伝子の5'上流に、それぞれ非ヒト抗体のVHまたはVLをコードするcDNAをそれぞれクローニングし、ヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築することができる。例えば、非ヒト抗体のVHまたはVLをコードするcDNAの3'末端側と、ヒト抗体のCHまたはCLの5'末端側とを連結するために、連結部分の塩基配列が適切なアミノ酸をコードし、かつ適当な制限酵素認識配列になるように設計した、VHおよびVLのcDNAを作製する。作製されたVHおよびVLのcDNAを、それぞれを本項2の(1)に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体のCHまたはCLをコードするそれぞれの遺伝子の5'上流にそれらが適切な形で発現するようにそれぞれクローニングし、ヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築することができる。また、非ヒト抗体VHまたはVLをコードするcDNAを、適当な制限酵素の認識配列を両端に有する合成DNAを用いてPCR法によりそれぞれ増幅し、それぞれを本項2の(1)に記載の遺伝子組換え抗体発現用ベクターにクローニングすることもできる。

【0144】

(4) ヒト化抗体のV領域をコードするcDNAの構築

ヒト化抗体のVHまたはVLをコードするcDNAは、以下の様にして構築することができる。まず、非ヒト抗体のVHまたはVLのCDRのアミノ酸配列を移植するヒト抗体のVHまたはVLのフレームワーク領域 (以下、FRと表記する) のアミノ酸配列をそれぞれ選択する。選択するFRのアミノ酸配列としては、ヒト抗体由来のものであれば、いずれのものでも良い。例えば、Protein Data Bank等のデータベースに登録されているヒト抗体のFRのアミノ酸配列、ヒト抗体のFRの各サブグループの共通アミノ酸配列 [Sequences of Proteins of Immunological Interest,US Dept.Health and Human Services(1991)] 等があげられる。抗体の結合活性の低下を抑えるため、元の抗体のVHまたはVLのFRのアミノ酸配列とできるだけ高い相同性 (少なくとも60%以上) のFRのアミノ酸配列を選択する。次に、選択したヒト抗体のVHまたはVLのFRのアミノ酸配列に、もとの抗体のCDRのアミノ酸配列をそれぞれ移植し、ヒト化抗体のVHまたはVLのアミノ酸配列をそれぞれ設計する。設計したアミノ酸配列を抗体の遺伝子の塩基配列に見られるコドンの使用頻度 [Sequences of Proteins

of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services(1991)] を考慮してDNA配列に変換し、ヒト化抗体のVHまたはVLのアミノ酸配列をコードするDNA配列をそれぞれ設計する。設計したDNA配列に基づき、100塩基前後の長さからなる数本の合成DNAを合成し、それらを用いてPCR法を行う。この場合、PCRでの反応効率及び合成可能なDNAの長さから、H鎖、L鎖とも6本の合成DNAを設計することが好ましい。

【0145】

また、両端に位置する合成DNAの5'末端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、本項2の(1)で構築したヒト化抗体発現用ベクターに容易にヒト化抗体のVHまたはVLをコードするcDNAをクローニングすることができる。PCR反応後、増幅産物をpBluescript SK() (Stratagene社製)等のプラスミドにそれぞれクローニングし、本項2の(2)に記載の方法により、塩基配列を決定し、所望のヒト化抗体のVHまたはVLのアミノ酸配列をコードするDNA配列を有するプラスミドを取得する。

【0146】

(5) ヒト化抗体のV領域のアミノ酸配列の改変

ヒト化抗体は、非ヒト抗体のVH及びVLのCDRのみをヒト抗体のVH及びVLのFRに移植しただけでは、その抗原結合活性は元の非ヒト抗体に比べて低下してしまうことが知られている[BIO/TECHNOLOGY,9,266(1991)]。この原因としては、元の非ヒト抗体のVH及びVLでは、CDRだけでなく、FR内のアミノ酸残基が直接的或いは間接的に抗原結合活性に関与しているため、ヒト化により非ヒト抗体のFRのアミノ酸残基が、ヒト抗体のFRのアミノ酸残基に置換されると、結抗原合活性が低下してしまうと考えられている。この問題を解決するため、ヒト化抗体では、ヒト抗体のVH及びVLのFRのアミノ酸配列の中で、直接抗原との結合に関与しているアミノ酸残基、CDRのアミノ酸残基と相互作用するアミノ酸残基、および抗体の立体構造を維持し、間接的に抗原との結合に関与しているアミノ酸残基を同定し、それらのアミノ酸残基を元の非ヒト抗体のアミノ酸残基に置換することにより、低下した抗原結合活性を上昇させることが行われている[BIO/TECHNOLOGY,9,266(1991)]。ヒト化抗体の作製においては、それら抗原結合活性に関わるFRのアミノ酸残基を如何に効率よく同定するために、X線結晶解析[J. Mol. Biol., 112, 535(1977)]或いはコンピューターモデリング[Protein Engineering,7, 1501(1994)]等による抗体の立体構造の構築及び解析が行われている。これら抗体の立体構造の情報は、ヒト化抗体の作製に多くの有益な情報をもたらして来たが、その一方、あらゆる抗体に適応可能なヒト化抗体の作製法は未だ確立されておらず、現状ではそれぞれの抗体について数種の改変体を作製し、それぞれの抗原結合活性との相関を検討する等の種々の試行錯誤が必要である。

【0147】

ヒト抗体のVH及びVLのFRのアミノ酸残基は、改変用合成DNAを用いて本項2の(4)に記載のPCR法を行うことにより、改変させることができる。PCR後の増幅産物について本項2の(2)に記載の方法により、塩基配列を決定し、目的の改変が施されたことを確認する。

(6) ヒト化抗体発現ベクターの構築

本項2の(1)に記載の遺伝子組換え抗体発現用ベクターのヒト抗体のCHまたはCLをコードするそれぞれの遺伝子の上流に、構築した遺伝子組換え抗体のVHまたはVLをコードするcDNAをそれぞれクローニングし、ヒト化抗体発現ベクターを構築することができる。

【0148】

例えば、本項2の(4)及び(5)でヒト化抗体のVHまたはVLを構築する際に用いる合成DNAのうち、両端に位置する合成DNAの5'末端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、本項2の(1)に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体のCHまたはCLをコードするそれぞれの遺伝子の上流にそれらが適切な形で発現するようにそれぞれクローニングすることができる。

【0149】

(7) 遺伝子組換え抗体の一過性発現

作製した多種類のヒト化抗体の抗原結合活性を効率的に評価するために、本項2の(3)及び(6)に記載の遺伝子組換え抗体発現ベクター、或いはそれらを改変した発現ベク

ターを用いて遺伝子組換え抗体の一過性発現を行うことができる。発現ベクターを導入する宿主細胞としては、遺伝子組換え抗体を発現できる宿主細胞であれば、いかなる細胞でも用いることができるが、その発現量の高さから、COS 7細胞 (ATCC CRL1651) が一般に用いられる [Methods in Nucleic Acids Res.,CRC press,283(1991)]。COS 7細胞への発現ベクターの導入法としては、DEAE デキストラン法 [Methods in Nucleic Acids Res.,CRC press,283(1991)]、リポフェクション法 [Proc.Natl.Acad.Sci.USA,84,7413(1987)] 等があげられる。

【 0 1 5 0 】

発現ベクターの導入後、培養上清中の遺伝子組換え抗体の発現量及び抗原結合活性は酵素免疫抗体法 [以下、ELISA法と表記する ; Monoclonal Antibodies Principles and practice, Third edition,Academic Press(1996)、Antibodies A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory(1988)、単クローン抗体実験マニュアル、講談社サイエンティフィック(1987)] 等により測定できる。

【 0 1 5 1 】

(8) 遺伝子組換え抗体の安定発現

本項 2 の (3) 及び (6) に記載の遺伝子組換え抗体発現ベクターを適当な宿主細胞に導入することにより遺伝子組換え抗体を安定に発現する形質転換株を得ることができる。

宿主細胞への発現ベクターの導入法としては、エレクトロポレーション法 [特開平 2 25 7891、Cytotechnology,3,133(1990)] 等があげられる。

【 0 1 5 2 】

遺伝子組換え抗体発現ベクターを導入する宿主細胞としては、遺伝子組換え抗体を発現させることができる宿主細胞であれば、いかなる細胞でも用いることができる。例えば、マウス SP2/0 Ag14 細胞 (ATCC CRL1581)、マウス P3X63 Ag8.653 細胞 (ATCC CRL1580)、2 種類のチャイニーズハムスター卵巣細胞である CHO/dhFr 細胞 (ATCC CRL9096) 及び CHO/D G44 細胞 [Somatic Cell and Molecular Genetics, 12,555(1986)]、レクチン耐性を獲得した Lec13 [Somatic Cell and Molecular genetics,12,55(1986)]、1,6 フコース転移酵素遺伝子が欠損した CHO 細胞 (W005/35586、W002/31140)、ラット YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 細胞 (ATCC CRL1662) などがあげられる。

【 0 1 5 3 】

上記宿主細胞の他、細胞内糖ヌクレオチド GDP フコースの合成に關与する酵素などのタンパク質、N グリコシド結合複合型糖鎖の還元末端の N アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が結合する糖鎖修飾に關与する酵素などのタンパク質または細胞内糖ヌクレオチド GDP フコースのゴルジ体への輸送に關与するタンパク質などの活性が低下または欠失した宿主細胞、好ましくは W005/35586、W002/31140 等に記載の 1,6 フコース転移酵素遺伝子が欠損した CHO 細胞などを用いることもできる。

【 0 1 5 4 】

発現ベクターの導入後、遺伝子組換え抗体を安定に発現する形質転換株は、特開平 2 25 7891 に開示されている方法に従い、G418 硫酸塩 (以下、G418 と表記する : SIGMA 社製) 等の薬剤を含む動物細胞培養用培地で培養することにより選択できる。動物細胞培養用培地としては、RPMI1640 培地 (Invitrogen 社製)、GIT 培地 (日本製薬社製)、EX CELL301 培地 (JRH 社製)、IMDM 培地 (Invitrogen 社製)、Hybridoma SFM 培地 (Invitrogen 社製)、またはこれら培地に牛胎児血清 (以下、FCS と表記する) 等の各種添加物を添加した培地等を用いることができる。得られた形質転換株を培地中で培養することで培養上清中に遺伝子組換え抗体を発現蓄積させることができる。培養上清中の遺伝子組換え抗体の発現量及び抗原結合活性は ELISA 法等により測定できる。また、形質転換株は、特開平 2 25 7891 に開示されている方法に従い、DHFR 増幅系等を利用して遺伝子組換え抗体の発現量を上昇させることができる。

【 0 1 5 5 】

遺伝子組換え抗体は、形質転換株の培養上清よりプロテイン A カラムを用いて精製することができる [Monoclonal Antibodies Principles and practice, Third edition,Academi

10

20

30

40

50

c Press(1996)、Antibodies A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory(1988)]。また、その他に通常、タンパク質の精製で用いられる精製方法を使用することができる。例えば、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー及び限外濾過等を組み合わせて行い、精製することができる。精製した遺伝子組換え抗体のH鎖、L鎖或いは抗体分子全体の分子量は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 [以下、SDS PAGEと表記する : Nature, 227, 680(1970)] やウエスタンブロッティング法 [Monoclonal Antibodies Principles and practice,Third edition,Academic Press(1996)、Antibodies A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory(1988)] 等で測定することができる。

【 0 1 5 6 】

3 . 本発明の抗体または抗体断片の活性評価

精製した本発明の抗体または抗体断片の反応特異性は、下記のようにして評価することができる。

正常型糖鎖を発現する細胞、およびO結合型糖鎖合成プロセスにおいて、ポリペプチド上のSer/Thrに結合したGalNAcにGalを付加する酵素、該酵素の活性に参与するタンパク質またはuridine 5' diphosphate galactose (UDP galactose) の輸送に関わるタンパク質などの活性が、低下または欠損した細胞株を宿主として、CD27コードする塩基配列 (配列番号 1) を発現させたCD27発現細胞をそれぞれ作製することができる。このようにして、正常O結合型糖鎖を有するCD27を発現した細胞、糖鎖不全CD27を発現した細胞を作製し、それぞれのCD27を発現する細胞株と精製抗体との反応性を、ELISA法および蛍光抗体法 [Cancer Immunol.Immunother.,36,373(1993)] などで測定することができる。

【 0 1 5 7 】

また、CD27の細胞外ドメインを融合タンパク質などの可溶化体として上述の宿主細胞にそれぞれ発現させ、適切な条件下で精製することで、立体構造を保持したCD27可溶性タンパク質をそれぞれ調製することができる。融合タンパク質としては、CD27タンパク質を、抗体定常領域 (Fcともいう) 、GSTタグ、ヒスチジンタグ (Hisタグともいう) またはMycタグなどの別のポリペプチドと融合したものがあげられる。該融合タンパク質は、Protein A、ニッケルカラム、特異的抗体カラムなどの、アフィニティーカラムを用いることにより分離精製することができる。これら精製CD27可溶性タンパク質と精製抗体との反応性を、表面プラズモン共鳴 (SPR) を利用したBIAcore™、ELISA法や免疫沈降法等により測定することもできる [Monoclonal Antibodies Principles and practice,Third edition,Academic Press(1996)、Antibodies A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory(1988)] 。

【 0 1 5 8 】

糖鎖不全CD27を発現している培養細胞株に対する細胞傷害活性は、CDC活性、ADCC活性等を、公知の方法 [Cancer Immunol.Immunother.,36,373(1993)] で測定し、評価することができる。

4 . 本発明の糖鎖不全CD27を特異的に認識し、かつ該細胞外領域に結合するモノクローナル抗体またはその抗体断片を用いた疾患の診断方法

本発明の抗体または該抗体断片を用いて糖鎖不全CD27または該ポリペプチドが発現した細胞を検出または定量することにより、糖鎖不全CD27が関連する疾患を診断することができる。

【 0 1 5 9 】

糖鎖不全CD27が関与する疾患としては、生体内において糖鎖不全CD27ポリペプチドが発現している細胞が見出される疾患であればいかなるものも包含する。具体的にはIgA腎症あるいは癌があげられる。癌としては、B、T細胞分化過程由来の癌があげられ、具体的には、マントル細胞リンパ腫、慢性リンパ性白血病、小リンパ性白血病、パーキットリンパ腫、濾胞性リンパ腫、モルトリンパ腫、びまん性大細胞リンパ腫、形質細胞腫、等、種々の非ホジキンリンパ腫などがあげられる。

【 0 1 6 0 】

本発明において糖鎖不全CD27ポリペプチドを検出または測定する対象となる生体試料と

しては、組織細胞、血液、血漿、血清、腓液、尿、糞便、組織液、培養液など、該ポリペプチドを含む可能性のあるものであれば特に限定されない。

糖鎖不全CD27が関連する疾患のうち、例えばIgA腎症の診断は以下のようにして行うことができる。

【0161】

複数の健常者の生体から採取した生体試料について、本発明の抗体または該抗体断片、またはこれらの誘導体を用い、下記の免疫学的手法を用いて、糖鎖不全CD27ポリペプチドの検出または測定を行い、健常者の生体試料中の該ポリペプチドの発現量を確認する。被験者の生体試料中についても同様に該ポリペプチドの発現量を調べ、その発現量を健常者の発現量と比較する。被験者の該ポリペプチドの発現量が健常者と比較して増加している場合には、IgA腎症である、あるいは将来IgA腎症を発症する可能性が高いと診断することができる。

10

糖鎖不全CD27が関連する疾患のうち、例えば癌の診断は以下のようにして行うことができる。

【0162】

複数の健常者の生体から採取した生体試料について、本発明の抗体または該抗体断片、またはこれらの誘導体を用い、下記の免疫学的手法を用いて、糖鎖不全CD27の検出または測定を行い、健常者の生体試料中の該ポリペプチドの発現量を確認する。被験者の生体試料中についても同様に該ポリペプチドの発現量を調べ、その発現量を健常者の発現量と比較する。被験者の該ポリペプチドの発現量が健常者と比較して増加している場合には、癌が陽性であると診断することができる。

20

【0163】

本発明の抗体または該抗体断片、またはこれらの誘導体を含有する診断薬は、目的の診断方法に応じて、抗原抗体反応を行うための試薬、該反応の検出用試薬を含んでもよい。抗原抗体反応を行うための試薬としては、緩衝剤、塩などがあげられる。検出用試薬としては、抗体もしくは該抗体断片、またはこれらの誘導体、またはこれらの誘導体を認識する標識された二次抗体、標識物の基質など、通常の免疫学的検出または測定法に用いられる試薬があげられる。

【0164】

本発明において糖鎖不全CD27の量を検出または測定する方法としては、任意の公知の方法があげられる。例えば、免疫学的検出または測定方法などがあげられる。

30

免疫学的検出または測定方法とは、標識を施した抗原または抗体を用いて、抗体量または抗原量を検出または測定する方法である。免疫学的検出または測定方法としては、放射性物質標識免疫抗体法(RIA)、酵素免疫測定法(EIAまたはELISA)、蛍光免疫測定法(FIA)、発光免疫測定法(luminescent immunoassay)、ウエスタンブロット法および物理化学的手法(TIA、LAPIA、PCIA)などがあげられる。

【0165】

放射性物質標識免疫抗体法(RIA)としては、例えば、抗原または抗原を発現した細胞などに、本発明の抗体または該抗体断片を反応させ、さらに放射線標識を施した抗イムノグロブリン抗体または結合断片を反応させた後、シンチレーションカウンターなどで測定する方法があげられる。

40

酵素免疫測定法(EIAまたはELISA)としては、例えば、抗原または抗原を発現した細胞などに、本発明の抗体または該抗体断片を反応させ、さらに標識を施した抗イムノグロブリン抗体または結合断片を反応させた後、発色色素を吸光光度計で測定する方法があげられ、例えばサンドイッチELISA法などが用いられる。酵素免疫測定法で用いる標識体としては、前述のとおり、任意の公知(石川榮次ら編、酵素免疫測定法、医学書院)の酵素標識を用いることができる。例えば、アルカリフォスファターゼ標識、ペルオキシダーゼ標識、ルシフェラーゼ標識、ピオチン標識などを用いることができる。

【0166】

サンドイッチELISA法は、固相に抗体を結合させた後、検出または測定したい抗原をト

50

ラップさせ、トラップされた抗原に第2の抗体を反応させる方法である。該ELISA法では、検出または測定したい抗原を認識する抗体または抗体断片であって、抗原認識部位の異なる2種類の抗体を準備し、そのうち、一方の抗体または抗体断片を予めプレート（例えば、96ウェルプレート）に吸着させ、第2の抗体または抗体断片をFITCなどの蛍光物質、ペルオキシダーゼなどの酵素、ビオチンなどで標識しておく。上記の抗体が吸着したプレートに、生体内から分離された、細胞またはその破砕液、組織またはその破砕液、細胞培養上清、血清、胸水、腹水、眼液などを反応させた後、標識したモノクローナル抗体または抗体断片を反応させ、標識物質に応じた検出反応を行う。該方法により、被験サンプル中の抗原濃度を測定する場合には、濃度既知の抗原を段階的に希釈して作製した検量線より、被験サンプル中の抗原濃度を算出することができる。サンドイッチELISA法に用いる抗体としては、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体のいずれを用いてもよく、Fab、Fab'、F(ab)₂などの抗体フラグメントを用いてもよい。サンドイッチELISA法で用いる2種類の抗体の組み合わせとしては、異なるエピトープを認識するモノクローナル抗体または抗体断片の組み合わせでもよいし、ポリクローナル抗体とモノクローナル抗体または抗体断片の組み合わせでもよい。

10

【0167】

蛍光免疫測定法（FIA）としては、文献[Monoclonal Antibodies Principles and practice, Third edition, Academic Press(1996)；単クローン抗体実験マニュアル、講談社サイエンティフィック（1987）]などに記載された方法があげられる。蛍光免疫測定法で用いる標識体としては、前述のとおり、任意の公知（川生明著、蛍光抗体法、ソフトサイエンス社）の蛍光標識を用いることができる。例えば、FITC標識、RITC標識などを用いることができる。

20

【0168】

発光免疫測定法（luminescent immunoassay）としては、[Monoclonal Antibodies Principles and practice, Third edition, Academic Press(1996)、単クローン抗体実験マニュアル、講談社サイエンティフィック（1987）]などに記載された方法を用いて行うことができる。発光免疫測定法で用いる標識体としては、前述のとおり、任意の公知[今井一洋編、生物発光と化学発光、廣川書店；臨床検査42(1998)]の発光体標識があげられる。例えば、アクリジニウムエステル標識、ロフィン標識などを用いることができる。

30

【0169】

ウエスタンブロット法は、抗原または抗原を発現した細胞などをSDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動[Antibodies A Laboratory Manual(Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)]で分画した後、該ゲルをPVDF膜またはニトロセルロース膜にブロッティングし、該膜に抗原を認識する抗体または抗体断片を反応させ、さらにFITCなどの蛍光物質、ペルオキシダーゼなどの酵素標識、ビオチン標識などを施した抗マウスIgG抗体または結合断片を反応させた後、該標識を可視化することによって確認する方法である。ウエスタンブロット法の一例を以下に示す。

【0170】

配列番号2で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現している細胞や組織を溶解し、還元条件下でレーンあたりのタンパク量として0.1~30 μ gをSDS PAGE法により泳動する。泳動されたタンパク質をPVDF膜にトランスファーし1%BSAを含むPBS（以下、BSA-PBSと表記する）に室温で30分間反応させブロッティング操作を行う。ここで本発明のモノクローナル抗体を反応させ、0.05%のTween 20を含むPBS（以下、Tween PBSと表記する）で洗浄し、ペルオキシダーゼ標識したヤギ抗マウスIgGを室温で2時間反応させる。Tween PBSで洗浄し、ECLTM Western blotting detection reagents(Amersham社製)などを用いてモノクローナル抗体が結合したバンドを検出することにより、配列番号2で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを検出することができる。ウエスタンブロッティングでの検出に用いられる抗体としては、天然型の立体構造を保持していないポリペプチドに結合できる抗体が用いられる。

40

【0171】

50

物理化学的手法とは、具体的には、本発明の抗体または該抗体断片を用いて、抗原であるガラクトースを欠損したO型糖鎖を結合するCD27と本発明の抗体または該抗体断片とを結合させることにより凝集体を形成させて、この凝集体を検出することにより行う。この他に物理化学的手法としては、毛細管法、一次元免疫拡散法、免疫比濁法あるいはラテックス免疫比濁法等があげられる〔臨床検査法提要、金原出版、499(1998)〕。

【0172】

例えば、ラテックス免疫比濁法では、抗体または抗原を感作させた粒径0.1~1 μ m程度のポリスチレンラテックス等の担体を用い、対応する抗原あるいは抗体により抗原抗体反応を起こさせると、反応液中の散乱光は増加し、透過光は減少する。この変化を吸光度あるいは積分球濁度として検出することにより被験サンプル中の抗原濃度などを測定することができる。

10

【0173】

本発明の抗体または該抗体断片は、糖鎖不全CD27ポリペプチドの細胞外領域に結合できるため、該ポリペプチドが発現している細胞の検出に好適に用いられる。

該ポリペプチドが発現している細胞の検出には、公知の免疫学的検出法を用いることができるが、免疫沈降法、免疫細胞染色法、および免疫組織染色法などが、好ましく用いられる。また、FMAT8100HTSシステム（アプライドバイオシステム社製）を用いる蛍光抗体染色法なども用いることができる。

【0174】

免疫沈降法とは、該ポリペプチドを発現した細胞などを本発明のモノクローナル抗体または抗体断片と反応させた後、プロテインG・セファロースなどのイムノグロブリンに特異的な結合能を有する担体を加えて抗原抗体複合体を沈降させる方法である。あるいは以下のような方法によっても行うことができる。

20

ELISA用96ウェルプレートに上述した本発明の抗体または該抗体断片を固相化した後、BSA PBSによりブロッキングする。抗体が精製されていない状態の例えばハイブリドーマ株培養上清などの精製されていない状態である場合には、抗マウスイムノグロブリンあるいはラットイムノグロブリンまたはプロテインAあるいはGなどをあらかじめELISA用96ウェルプレートに固相化しBSA PBSでブロッキングした後、ハイブリドーマ株培養上清を分注して結合させる。BSA PBSを捨てPBSでよく洗浄した後、配列番号2で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現している細胞や組織の溶解液を反応させる。よく洗浄した後のプレートより免疫沈降物をSDS PAGE用サンプルバッファーで抽出し、上記のウエスタンブロットティングにより検出を行う。

30

【0175】

免疫細胞染色法および免疫組織染色法とは抗原を発現した細胞または組織などを、場合によっては抗体の通過性を良くするため界面活性剤やメタノールなどで処理した後、本発明の抗体を反応させ、さらにFITCなどの蛍光標識、ペルオキシダーゼなどの酵素標識、ピオチン標識などを施した抗イムノグロブリン抗体または結合断片を反応させた後、該標識を可視化し、顕微鏡にて顕鏡するか、あるいは蛍光標識の抗体と細胞を反応させ、フローサイトメーターにて解析する蛍光抗体染色法（フローサイトメトリー）である。例えば、文献〔Monoclonal Antibodies Principles and practice, Third edition, Academic Press(1996)、単クローン抗体実験マニュアル、講談社サイエンティフィック（1987）〕などに記載された方法を用いて行うことができる。特に、本発明の抗体または該抗体断片は、糖鎖不全CD27の細胞外領域に結合できるため、細胞膜上に天然型の立体構造を保持して発現しているCD27を検出するフローサイトメトリーの解析に好ましく用いられる。

40

【0176】

また、蛍光抗体染色法の原理を利用したFMAT8100HTSシステム（アプライドバイオシステム社製）を用いることにより、形成された抗体-抗原複合体と、抗体-抗原複合体の形成に関与していない遊離の抗体または抗原とを分離することなく、抗原量または抗体量を測定することができる。

5. 本発明の糖鎖不全CD27ポリペプチドを特異的に認識し、結合するモノクローナル抗

50

体または該抗体断片を用いた疾患の治療方法

本発明の糖鎖不全CD27ポリペプチドを特異的に認識し、かつ該細胞外領域に結合するモノクローナル抗体またはその抗体断片は、糖鎖不全CD27ポリペプチドが関与する疾患の治療に用いることができる。

【0177】

糖鎖不全CD27ポリペプチドが関与する疾患としては、生体内において該ポリペプチドを発現している細胞が見出される疾患であればいかなるものでもよく、例えば、IgA腎症や癌などがあげられる。

更に、IgA腎症を発症し、ネフローゼ症候群を呈する疾患や腎不全を呈するものも、疾患としてあげることができる。

【0178】

癌としては、造血器由来の腫瘍（血液癌ともいう）や上皮由来の固形癌があげられる。

血液癌としては、具体的に白血病、リンパ腫（Hodgkin lymphoma、non Hodgkin lymphoma）多発性骨髄腫などがあげられる。具体的なnon Hodgkin lymphomaとしては、マントル細胞リンパ腫、慢性リンパ性白血病、小リンパ性白血病、パーキットリンパ腫、濾胞性リンパ腫、モルトリンパ腫、びまん性大細胞リンパ腫、形質細胞腫などがあげられる。

【0179】

固形癌としては、具体的に乳癌、子宮癌、大腸癌、胃癌、卵巣癌、肺癌、腎臓癌、直腸癌、甲状腺癌、子宮頸癌、小腸癌、前立腺癌または膵臓癌などがあげられる。

本発明の治療剤としては、本発明の抗体または該抗体断片を有効成分とする癌の治療剤があげられる。ADCC活性やCDC活性などのエフェクター活性を有するがん治療剤、あるいはアポトーシス誘導作用による癌の治療剤等も、本発明の治療剤として包含される。

【0180】

本発明の抗体または該抗体断片は、細胞膜に発現している糖鎖不全CD27ポリペプチドを認識することができるので、生体内で存在する糖鎖不全CD27ポリペプチドを発現している細胞を認識することができる。従って、本発明の抗体または該抗体断片で、かつエフェクター活性を有する抗体または該抗体断片は、in vivoおよびin vitroにおいて、糖鎖不全CD27ポリペプチドを発現している細胞を傷害することができる。また、このような本発明の抗体または該抗体断片は、生体内の糖鎖不全CD27ポリペプチド発現細胞を傷害し、減少させることができるので、治療剤として特に有効に用いられる。

【0181】

本発明の抗体または該抗体断片、またはこれらの誘導体を含む治療剤は、有効成分としての該抗体もしくは該抗体断片、またはこれらの誘導体のみを含むものであってもよいが、通常は薬理的に許容される1以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが望ましい。

投与経路は、治療に際して最も効果的なものを使用するのが望ましく、経口投与、または口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内および静脈内などの非経口投与をあげることができ、抗体またはペプチド製剤の場合、望ましくは静脈内投与をあげることができる。投与形態としては、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、軟膏、テープ剤などがあげられる。

【0182】

経口投与に適切な製剤としては、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤などがあげられる。乳剤およびシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトール、果糖などの糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコールなどのグリコール類、ごま油、オリーブ油、大豆油などの油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類などの防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミントなどのフレーバー類などを添加剤として用いて製造できる。カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤などは、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニトールなどの賦形剤、デンプン、アルギン酸ナトリウムなどの崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルクなどの滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチンなどの結合剤、脂肪酸エステルなどの界面活性剤、グリセリンなどの

10

20

30

40

50

可塑剤などを添加剤として用いて製造できる。

【0183】

非経口投与に適切な製剤としては、注射剤、座剤、噴霧剤などがあげられる。注射剤は、塩溶液、ブドウ糖溶液、あるいは両者の混合物からなる担体などを用いて調製される。座剤はカカオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸などの担体を用いて調製される。また、噴霧剤は該抗体または抗体断片自体、ないしは受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ該抗体または抗体断片を微細な粒子として分散させ吸収を容易にさせる担体などを用いて調製される。担体として具体的には乳糖、グリセリンなどが例示される。該抗体または抗体断片および用いる担体の性質により、エアロゾル、ドライパウダーなどの製剤が可能である。また、これらの非経口剤においても経口剤で添加剤として例示した成分を添加することもできる。

10

【0184】

投与量または投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢、体重などにより異なるが、通常成人1日当たり10 μg/kg ~ 8 mg/kgである。

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

【実施例1】

【0185】

ガラクトースが結合していないO結合型糖鎖を含む可溶性CD27細胞外ドメインの作製（以下、糖鎖不全CD27と記載することもある）

20

（1）ヒトCD27遺伝子のクローニング

クロンテック社より購入したヒト末梢血由来cDNAライブラリーより、以下の手順でCD27をコードする遺伝子を単離した。1倍濃度のBD Advantage PCR緩衝液（クロンテック社製）および1倍濃度の添付dNTPを含む反応液にヒト末梢血単核球由来一本鎖cDNA 25 ng、0.2 μmol/L cd27fw（配列番号3）、0.2 μmol/L cd27809B（配列番号4）および1倍濃度のAdvantage 2 PCR polymerase Mix（クロンテック社製）を用いて、合計50 μLとし、PCR反応を行った。反応条件は98 15秒間、68 30秒間のサイクルを30サイクル行った。該反応液を2%アガロースゲル電気泳動で分離後、約1 kbpのPCR産物をTOPO TA Cloning Kit（インビトロジェン社製）を用いて添付の使用説明書に従ってpCR 2.1ベクターに挿入した。PCR増幅断片が挿入されたプラスミドを用いて大腸菌を形質転換し、各クローンから得られるプラスミドを調製し、DNA配列を確認した結果、配列番号1記載のDNA配列を有するpCR 2.1 CD27を取得した（図1）。

30

（2）ヒトCD27細胞外ドメインを有する遺伝子をクローン化したプラスミドの構築

次に以下に示すPCR反応を行うことによりC末端側に存在する膜貫通領域を除去したCD27をコードするcDNAの単離を行った。0.2 mmol/L dNTPs、1mmol/L塩化マグネシウムを含む反応液に、1ngのpCR 2.1 CD27、1 μmol/L CD27 A（配列番号5）、1 μmol/L CD27 B（配列番号6）および2.5単位のKOD polymerase（東洋紡社製）を用いて、合計50 μLとし、98 15秒間、68 30秒間のサイクルを25サイクルの条件でPCR反応を行った。該反応液を2%アガロースゲル電気泳動で分離後、約600 bpのPCR産物を、Zero Blunt PCR Cloning Kit（インビトロジェン社製）を用いて添付の使用説明書に従ってpCR Bluntベクターに導入した。本ヒトCD27細胞外ドメインを有する遺伝子をクローン化したプラスミドをpCRCD27a xbとした（図2）。

40

（3）変異型ヒトIgG4Fc領域を有するベクターpBShC 4SPの構築

WO97/10354に記載の野生型ヒトIgG4サブクラスのC領域をコードするcDNAを有するプラスミドpBShC 4を用いて、野生型ヒトIgG4サブクラスのC領域（ヒンジ領域）の108番目のSerがProに置換された変異型ヒトIgG4サブクラスのC領域を有するプラスミドpBShC 4SPを構築した。本改変を行うことによりIgGヒンジ領域を介した2量体形成が安定化することが知られている（モレキュラー・イムノロジー、30,105,1993）。鑄型としてプラスミドpBShC 4の1 ngを含む50 μLの反応液 [10mM Tris HCl (pH8.3)、50mM 塩化カリウム、1.5 mM塩化マグネシウム、0.001 % ゼラチン、200 μM dNTPs、0.5 μM Primer1（配列番号7

50

)、0.5 μ M Primer2 (配列番号8) および2unitsのTaKaRa Ex Taq DNA polymerase]を調製し、GeneAmp PCR system 9700 (パーキンエルマー社製)を用いて94にて2分間、55にて2分間、72にて2分間のサイクルを30サイクル行った。反応液をQIAquick PCR Purification Kit (キアゲン社製)を用いて添付の使用説明書に従い精製後、制限酵素EcoT141(タカラバイオ社製)で処理し、0.8%アガロースゲル電気泳動にて分離後、QIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン社製)を用いて添付の使用説明書に従い、増幅断片を回収した。プラスミドpBShC 4を制限酵素EcoT141で切断後、Alkaline phosphatase (タカラバイオ社製)処理により5'末端のリン酸を除去し、同様に0.8%アガロースゲル電気泳動にて分離後、QIAquick Gel Extraction Kitを用いて添付の使用説明書に従い、プラスミド断片を回収した。回収した増幅断片とプラスミドpBShC 4由来のプラスミド断片を連結し、目的のcDNAを含むプラスミドpBShC 4SPを構築した(図3)。

10

(4) ヒトIgG4Fcの部分配列を含むcDNAのクローニング

以下に示すPCR反応を行うことにより、5'末端に制限酵素BamHIサイト、3'末端にSalI制限酵素を有するヒトIgG4FcをコードするDNA断片を増幅した。0.2 mmol/L dNTPs、1mmol/L塩化マグネシウムを含む反応液に上記(3)で構築したpBShC 4SP 25 ng、1 μ mol/L g4A (配列番号9)、1 μ mol/L g4B (配列番号10) および2.5単位のKOD polymerase (東洋紡社製)を用いて、合計50 μ Lとし、PCR反応を行った。反応条件は98 15秒間、68 30秒間のサイクルを25サイクルで行った。該反応液を2%アガロースゲル電気泳動で分離後、約700 bpのPCR産物をZero Blunt PCR Cloning Kit (インビトロジェン社製)を用いて添付の使用説明書に従ってpCR Bluntベクターに導入した。本プラスミドをpCR IgG4Fc BamHI SalI (図4)とした。

20

(5) 動物細胞用発現ベクターpKANTEX XhoI/SalIの構築

W097/10354に記載されているヒト化抗体発現ベクターpKANTEX93を制限酵素XhoI (タカラバイオ社製) および制限酵素SalI (タカラバイオ社製)で消化後、0.8%アガロースゲル電気泳動で分離後、Gel Extraction Kit (キアゲン社製)を用いて約9.8 kbpのプラスミド断片を回収した。回収したDNA断片の5'および3'末端をDNA Ligation Kit (タカラバイオ社製)を用いて連結し、得られた組換えプラスミドDNAを用いて大腸菌DH5 株 (東洋紡績社製)を形質転換した。得られた複数のアンピシリン耐性コロニーより、QIAprep Spin Miniprep Kit (キアゲン社製)を用いて組換えプラスミドDNAを単離し、抗体L鎖の発現ユニットが除かれていることを制限酵素NotI (タカラバイオ社製) およびKpnI (タカラバイオ社製)消化により確認した。該プラスミドをpKANTEX XhoI/SalIと命名した(図5)。

30

(6) 可溶性CD27細胞外ドメイン発現プラスミドpKANTEX CD27IgG4Fcの作製

上記(2)で作製したpCR 2.1 CD27axbを、NotIおよびBamHIを用いて消化することにより得られる、約600bpの断片、および上記(3)で作製したpCR IgG4Fc BamHI SalIをBamHIおよびSalI消化して得られる約700 bpのDNA断片を、上記(5)で得られたpKANTEX XhoI/SalIをNotIおよびSalI消化して得られる約8.8 kbpのDNA断片に連結することにより、CD27 Fcを発現するためのプラスミドpKANTEX CD27IgG4Fcを得た(図6)。本プラスミドにコードされる可溶性CD27 Fc融合タンパク質(以下、CD27 Fcと記載することもある)の遺伝子配列を配列番号11に、アミノ酸配列を配列番号12に記載した。該発現ベクターを用いて形質転換した大腸菌を100 mLのLB培地に播種し、一晚培養を行った後に回収し、Qiafilter Plasmid midi kit (キアゲン社製)を用いて添付のプロトコールに従ってプラスミドを精製した。精製後、30 μ gのプラスミドベクターを制限酵素AatII消化により線状化した。線状化後、フェノール・クロロフォルム抽出、エタノール沈殿を行い、1/10濃度TEバッファ(1 mM Tris HCl, 0.1 mM EDTA)に溶解した後、DNA濃度を測定し、遺伝子導入に供した。

40

(7) CD27 Fcの発現

CHO/DG44細胞 (Somatic Cell and Molecular Genetics, 12, 555 (1986)、以下、DG44と記す)あるいはLec8細胞へのCD27 Fc発現プラスミドpKANTEX CD27IgG4Fcの導入は、エレクトロポレーション法[サイトテクノロジー, 3, 133 (1990)]に準じて、以下の手順

50

で行った。まず、基本培地[10 % ウシ胎児透析血清(インビトロージェン社)および50 μg/mL Gentamycin (ナカライテスク社) および1×HT supplement (インビトロージェン社製) を添加したIscove ' s Modified Dulbecco ' s Medium(インビトロージェン社)]で継代したDG44細胞を、K PBS緩衝液 [137 mmol/L KCl、2.7 mmol/L NaCl、8.1 mmol/L Na₂HPO₄、1.5 mmol/L KH₂PO₄、4.0 mmol/L MgCl₂] に懸濁して8×10⁶個/mLとし、細胞懸濁液を調製した。調製した細胞懸濁液200 μL (1.8×10⁶個) を上記(6) で調製した線状化プラスミドpKANTEXCD27IgG4Fc 10 μgと混和した。但しLec8細胞の継代は、1×HT supplement を添加しない基本培地(以下、HT 培地と記す)で行った。該細胞DNA混和液をGene Pulser Cuvette(電極間距離2 mm)(BIO RAD社)へ移した後、遺伝子導入装置Gene Pulser(BIO RAD社)を用いて、パルス電圧0.35 KV、電気容量250 μFの条件で遺伝子導入を行った。該細胞懸濁液を、HT 培地[10% ウシ胎児透析血清(インビトロージェン社製)および50 μg/mL Gentamycin (ナカライテスク社) を添加したIscove ' s Modified Dulbecco ' s Medium(インビトロージェン社製)]10 mLに混和し、75cm²接着細胞用フラスコ(グライナー社製)に播種し、37 °C、5% CO₂インキュベーター内で培養を行った。3日間培養した後、G418 (シグマ社製) を最終濃度が0.5 mg/mLになるように添加して、さらに10日間培養した。10日後、182cm²接着細胞用フラスコ(グライナー社製)に継代し、コンフルエントになるまで培養を続けた。コンフルエントになった時点で、無血清培地EXCELL301 (JRH Bioscience社製) に培地交換を行い、1週間培養後、培養上清を回収し、下記に記載の方法で精製を行った。

10

(8) CD27 Fcの精製

20

(7) で培養を行った培養上清を、3000rpm、4 °Cの条件で10分間の遠心分離を行い、上清を回収した後、0.22 μm孔径PES Membrane (旭テクノグラス社製) を用いて上清を濾過した。0.8cm径のカラムにMab Select(Amersham Pharmacia Biotech社製) 0.5 mLを充填し、精製水 3.0 mLおよび0.2 M ホウ酸 - 0.15 M NaCl緩衝液 (pH7.5) (以下、ホウ酸バッファーと記す) 3.0 mLを順次通塔した。さらに、0.1 M クエン酸緩衝液 (pH3.5) 2.0 mL およびホウ酸バッファー1.5 mLで順次洗浄することによって担体の平衡化を行った。次に、上記培養上清をカラムに通塔した後、ホウ酸バッファー3.0mLで洗浄した。洗浄後、0.1 Mクエン酸緩衝液 (pH 3.5) 1.25 mLを用いて担体に吸着した抗体の溶出を行った。溶出は250 μLづつ、5画分に分けて取得した。次に、得られた精製画分のSDS PAGE解析を行い、目的蛋白質の溶出が確認された画分をまとめ、PBSバッファーを用いて、4 °Cで一昼夜透析を行った。透析後、CD27 Fc溶液を回収し、0.22 μm孔径Millex GV (MILLIPORE社) を用いて滅菌濾過した後に、280nmの吸光度(OD280 nm)を吸光光度計 (SHIMADZU UV 1700) を用いて測定し、CD27 Fc濃度を算出した (OD280 nm=1.0で0.68 mg/mLと換算; M=134655, MW=92840より算出した)。各宿主細胞由来のCD27 Fc発現細胞、約300mLの無血清培養液上清から、Lec8由来CD27 Fcを3.6mg、CHO/DG44由来CD27 Fcを2.2mgを得た。それぞれのタンパク質について、溶出画分のSDS PAGEでの解析結果を図7に示す。

30

【0186】

その結果、還元条件下においては、DG44を宿主とした場合に、分子量約65 kDa、Lec8を宿主とした場合に分子量約48 kDaの位置にCD27 Fcが観察された。一方、非還元条件下においては、還元条件でみられたバンドの約2倍の分子量を示す位置に、それぞれのバンドが観察されたことから、CD27 Fcは2量体として存在していることが確認できた。

40

(9) 糖鎖構造の確認

上記(8) で精製したCD27 FcをPBSで10倍に希釈した溶液16 μLに、5倍濃度のSDSサンプルバッファー 4 μLを添加した後、90 °C、5分間処理したものをSDS PAGEに供した。電気泳動は5 % SDS ポリアクリルアミドゲルE PAGEL (ATTO社製, Cat. No. E T520L) を使用し、ATTOラピダス・ミニスラブ電気泳動槽で20 mA/枚の電流で、90 分間電気泳動した。PVDF膜 (Millipore Immobilon社製, Cat. No. IPVH304F0) への転写は、ATTOホライズプロットを使用し、180 mA、90分間の条件で行った。転写後の膜は10 % BSAを含むPBS (以下、10 % BSA PBSと表記する) に浸し、4 °Cで一晩静置することでブロッキングした。その後、1 % BSA PBSを用いて5 μg/mLに調製した、抗RCAS1抗体クローン22 1 1(MBL社

50

製, Cat.No. D060 3)を加え、室温2時間反応した。0.05 % Tween 20 PBS (和光純薬社製, Cat. No.167 11515) を用いて室温30分間洗浄した後、1 % BSA PBSにて2000倍希釈した2次抗体ペルオキシダーゼ標識ウサギ抗マウスIgGグロブリン (DAKO社製、Cat.No.P0 161) で室温1時間反応した。0.05% Tween 20 PBSを用い室温で30分間洗浄した後に、ECL Western blotting detection reagent (Amersham Pharmacia Biotech社製、Cat.No. RPN 2106) を用いて検出した。その結果を図8に示す。

【 0 1 8 7 】

SDS PAGE解析の結果から、DG44由来CD27 Fcの分子量は、Lec8由来CD27 Fcよりも分子量が大きく、DG44細胞とLec8細胞を宿主細胞とすることで、CD27 Fcに結合する糖鎖構造が異なることが明らかになった。

また、抗RCAS1抗体22 1 1は、O結合型糖鎖であるTn抗原を認識することが明らかにされており、抗Tn抗体として知られている[J.B.C., 278, 22998 23007, (2003)]。抗Tn抗体である抗RCAS 1抗体クローン22 1 1は、DG44由来CD27 Fcには全く結合しないが、Lec8由来のCD27 Fcには特異的に結合した。Lec8で生産したCD27 Fcには、ガラクトースが結合していないO型糖鎖であるTn抗原が、結合していることが確認された。

【 実施例 2 】

【 0 1 8 8 】

細胞膜上にCD27を発現するCHO細胞の造成

(1) CD27発現プラスミドpKANTEX CD27の構築

実施例 1 で作製したpCR 2.1 CD27より、遺伝子発現に不要なcDNA部分を除去したcDNA断片を、以下に示すPCR反応により作製した。

0.2mmol/L dNTPs、1mmol/L塩化マグネシウムを含む反応液に1ngのpCR 2.1 CD27、1 μmol/L CD27 A (配列番号5)、1 μmol/L CD27 C (配列番号13) および2.5単位のKOD polymerase (東洋紡社製) を用いて、合計50 μLとし、PCR反応を行った。反応条件は98 15秒間、68 30秒間のサイクルを25サイクルで行った。該反応液を2 % アガロースゲル電気泳動で分離後、約800 bpのPCR産物を、Zero Blunt PCR Cloning Kit (インビトロジェン社製) を用いて添付の使用説明書に従って、pCR Bluntベクターに導入し、配列番号1記載のDNA配列を有するpCR27axc取得した (図9)。次に、pCR27axcを制限酵素NotIおよび制限酵素SalIで消化して得られる約780bpのDNA断片を、実施例 1 で作製したpKANTEX XhoI/SalIを制限酵素NotIおよび制限酵素SalIで消化して得られる、約8.9 kbpのDNA断片に連結することにより、CD27を発現するためのプラスミドpKANTEX CD27を構築した (図10)。本プラスミドにコードされるCD27遺伝子配列を配列番号1に、該遺伝子から翻訳されるアミノ酸配列を配列番号2に示した。該発現ベクターを用いて形質転換した大腸菌を、100 mLのLB培地に播種し、一晚培養を行った。培養後に、菌体を回収し、Qiafilter Plasmid midi kit (キアゲン社製)を用いて添付のプロトコールに従ってプラスミドを精製した。精製後、30 μgのプラスミドベクターを制限酵素AatII消化により、線状化した。線状化後、フェノール・クロロフォルム抽出、エタノール沈殿を行い、1/10濃度TEバッファー (1mM Tris HCl, 0.1mM EDTA) に溶解した後、濃度を測定し、遺伝子導入を行った。

(2) CD27発現プラスミドpKANTEX CD27の導入

上記 (1) で作製したCD27発現プラスミドpKANTEX CD27を、Lec8細胞およびCHO/DG44細胞に、遺伝子導入することにより、CD27を発現するLec8細胞およびDG44細胞の樹立を行った。導入するプラスミドとしてpKANTEXCD27を用いる以外は実施例 1 に記載の方法で実施した。ただし、遺伝子導入後の細胞は、HT 培地30 mLに懸濁し、100 μL/ウェルとなるように3枚の96ウェルプレートに播種した。播種 2 日後に500 μg/mL G418を含む継代用培地に交換し、10日間培養を行った。10日後、50 nM MTX (Sigma aldrich社製) を含むHT 培地に交換し、MTX耐性株を取得した。Lec8株由来のCD27発現株をCD27/Lec8 4、一方、DG44細胞由来のCD27発現細胞をCD27/DG44 8と命名した。

(3) CD27発現細胞の確認

(2) で作製したCD27発現細胞のCD27発現を確認するため、フローサイトメーター (FCM) を用いて、下記のように解析を行った。

【 0 1 8 9 】

CD27発現細胞 $1 \sim 5 \times 10^5$ 個を15 mLチューブ（ベクトンディッキンソン社製）に分取し、遠心分離（1500 rpm、5分間）した後、上清を除いて、50 μ Lの1%牛血清アルブミンを含むPBS緩衝液[以下、1% BSA PBS（コージンバイオ社製）と記載する]に懸濁した。1次抗体として、PC5で標識された抗CD27マウスモノクローナル抗体（ベックマンコールター社製、Cat.No. 6607107）、あるいはPC5標識マウスIgG1アイソタイプコントロール（ベックマンコールター、Cat.No.6607012）を10 μ L添加し、氷温中で60分間反応させた。反応後、1 mLの1% BSA PBSで2回洗浄した後、500 μ Lの1% BSA PBSに細胞を懸濁し、フローサイトメーター（FCM）（ベクトンディッキンソン社製）で蛍光強度を測定した。

【 0 1 9 0 】

その結果を図11に示す。図11に示したように、CD27/Lec8 4およびCD27/DG44 8は、ほぼ同程度のCD27を細胞膜上に発現していることが確認された。

【 実施例 3 】

【 0 1 9 1 】

ガラクトースが結合していないO結合型糖鎖を含むCD27に対するモノクローナル抗体（以下、抗糖鎖不全CD27モノクローナル抗体と記す）の作製

(1) 免疫原の調製

実施例1で得られたLec8株生産CD27 Fc 50 μ gを、水酸化アルミニウムアジュバント（Antibodies A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, p99, 1988）2 mg および百日咳ワクチン（千葉県血清研究所製） 1×10^5 細胞とともに、4週令雌SDラット3匹に投与した。投与2週間後より、Lec8株生産CD27 Fc 50 μ gを1週間に1回、計3回投与した。尾静脈より部分採血し、得られた抗血清の結合活性を、ABI8200セルラーディテクションシステム（アプライドバイオ社製）または、フローサイトメーター（Cytomics FC500 MPL、ベックマンコールター社製）を用いた蛍光細胞染色法により測定し、十分な抗体価を示したマウスから最終免疫3日後に脾臓を摘出した。脾臓をMEM（Minimum Essential Medium）培地（日水製薬社製）中で細断し、ピンセットでほぐし、遠心分離（1200rpm、5分間）した。得られた沈殿画分にトリス - 塩化アンモニウム緩衝液（pH7.6）を添加し、1~2分間処理することにより赤血球を除去した。得られた沈殿画分（細胞画分）をMEM培地で3回洗浄し、細胞融合に用いた。

(2) バインディングELISA

バインディングELISAに用いる抗原には、実施例1で得られたLec8株生産CD27 FcおよびDG44細胞生産CD27 Fcをそれぞれ用いた。96ウェルのELISA用プレート（グライナー社）に、上記のCD27 Fcタンパク質を5 μ g/mL、50 μ L/ウェルで分注し、4℃で一晩放置して吸着させた。該プレートを洗浄後、1% BSA PBSを100 μ L/ウェルで加え、室温で1時間放置し、残っている活性基をブロックした。放置後、1% BSA PBSを捨て、該プレートに一次抗体として被免疫動物抗血清あるいはハイブリドーマ培養上清を50 μ L/ウェルで分注し、2時間放置した。該プレートを0.05% ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノラウレート〔ICI社商標Tween 20相当品：和光純薬社製〕PBS（以下Tween PBSと表記）で洗浄後、2次抗体としてペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ラットイムノグロブリン（Zymed社）を50 μ L/ウェル加えて室温、1時間放置した。該プレートをTween PBSで洗浄後、ABTS〔2.2 アジノビス（3エチルベンゾチアゾール6スルホン酸）アンモニウム〕基質液〔1 mmol/L ABTS - 0.1 mol/Lクエン酸バッファー（pH4.2）, 0.1% H_2O_2 〕を添加し、発色させOD415 nmの吸光度をプレートリーダー（Emax; Molecular Devices社）を用いて測定した。

(3) 蛍光細胞染色法（ABI8200セルラーディテクションシステム解析）

実施例2で作製したCD27/Lec8 4およびCD27/DG44 8をアッセイ用細胞として用いた。50 nM MTX および500 ng/mL G418を添加した継代用培地で継代したCD27/Lec8 4およびCD27/DG44 8を0.05% Trypsin溶液（Invitrogen社製）で剥離し、ABI8200用黒色96ウェルプレートに 1×10^4 個/100 μ L Medium/ウェルで播種し、1晩培養した。該プレートに一次抗体として被免疫ラット抗血清あるいはハイブリドーマ培養上清を10 μ L/ウェルで分注し、2次抗体としてALEXA647標識抗ラットイムノグロブリンG（H+L）（Invitrogen社製）を100

10

20

30

40

50

μL/ウェルで加えて、遮光下で4時間放置した。レーザー光633 He/Neで励起された650~685 nmの蛍光をABI8200セルラーディテクションシステム(アプライドバイオ社製)で測定した。

(4) 蛍光細胞染色法(フローサイトメーター解析)

実施例2で作製したCD27/Lec8 4およびCD27/DG44 8をアッセイ用細胞として用いた。50 nM MTX および500 μg/mL G418を添加したHT培地を用いて継代したCD27/Lec8 4およびCD27/DG44 8を、0.02% EDTA溶液(ナカライテスク社製)を用いて剥離した後、各細胞をPBSで洗浄した。洗浄後、 $1 \sim 5 \times 10^5$ 個の細胞を50 μLの1% BSA PBSに懸濁した後、1次抗体として被免疫ラット抗血清あるいはハイブリドーマ培養上清を50 μL/ウェルで分注し、氷温中で30分間反応させた。また、ネガティブコントロールとして、ウシ血清アルブミン、マウスIgG1アイソタイプコントロール(コスモバイオ社製)およびラットIgG2aアイソタイプコントロール(コスモバイオ社製)を、ポジティブコントロールとして、抗RCAS1抗体2211(MBL社製)および抗CD27マウスモノクローナル抗体(ベックマンコールター社製)を用いて、同時に反応させた。反応後、PBSを用いて遠心分離を2回行い細胞を洗浄し、2次抗体としてALEXA488標識抗ラットイムノグロブリンG(H+L)(Invitrogen社製)を、50 μL/ウェルで加えて氷温中、遮光下で30分間反応させた。再びPBSを用いて遠心分離を2回行い細胞を洗浄した後、500 μLの1% BSA PBSに懸濁してレーザー光488 nmアルゴンで励起される510~530 nmの蛍光をフローサイトメーター(ベックマンコールター社製、Cytomics FC500 MPL)で測定した。

(5) マウス骨髄腫細胞の調製

8-アザグアニン耐性マウス骨髄腫細胞株P3X63Ag8U.1(P3 U1:ATCCより購入)を正常培地(10% FCS RPMI培地)で培養し、細胞融合時に 2×10^7 個以上の細胞を確保し、細胞融合に親株として供した。

(6) ハイブリドーマの作製

上記(1)で得られたマウス脾臓細胞と上記(5)で得られた骨髄腫細胞とを、10:1になるよう混合し、遠心分離(250 × g, 5分間)した。得られた沈澱画分の細胞群をよくほぐした後、攪拌しながら、37°Cで、ポリエチレングリコール-1000(PEG 1000)1g、MEM培地1 mLおよびジメチルスルホキシド0.35 mLの混液を、108個のマウス脾臓細胞あたり0.5 mL加え、該懸濁液に1~2分間毎にMEM培地1 mLを数回加えた後、更にMEM培地を加えて全量が50 mLになるようにした。

【0192】

該懸濁液を遠心分離(900rpm、5分間)し、得られた沈澱画分の細胞をゆるやかにほぐした後、該細胞をメスピペットによる吸込み吸出して、ゆるやかにHAT培地[10% ウシ胎児血清添加RPMI培地にHAT Media Supplement(Invitrogen社製)を加えた培地]100 mL中に懸濁した。該懸濁液を96ウェル培養用プレートに200 μL/ウェルずつ分注し、5% CO₂インキュベーター中、37°Cで8~10日間培養した。培養後、培養上清を上記(3)および上記(4)に記載した蛍光細胞染色法を用いて、CD27/Lec8 4に反応し、CD27/DG44 8およびLec8細胞に反応しないウェルを選択し、そのウェルに含まれる細胞から、限界希釈法によるクローニングを2回行い、シングルセルクローンを取得した。

【0193】

その結果、糖鎖不全CD27に特異的に結合するモノクローナル抗体KM4030またはKM4031を産生するハイブリドーマKM4030およびKM4031を確立した(図12)。同様な方法によって、糖鎖不全CD27に特異的に反応するモノクローナル抗体KM4026、KM4027またはKM4028を産生するハイブリドーマKM4026、KM4027およびKM4028を確立した。

これら糖鎖不全CD27に特異的に結合するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、糖鎖合成経路に関連する酵素、輸送タンパク質の活性が欠損していないDG44株およびUDP galactose transporterの活性が低下または欠損しているLec8株を利用することで、正常糖鎖CD27および糖鎖不全CD27をそれぞれ発現させた組み換え細胞を作製し、正常糖鎖CD27発現細胞やLec8株には結合せず、糖鎖不全CD27発現細胞にのみに特異的に結合するモノクローナル抗体をスクリーニングすることが可能な系を考案し、約6000ウェル規模のス

クリーニングアッセイを行うことで取得した。

(7) モノクローナル抗体の精製

プリスタン処理した7週令ヌード雌マウス(ICR)に上記(6)で得られたハイブリドーマ株を $5 \sim 20 \times 10^6$ 細胞/匹を腹腔内注射した。10~21日後、ハイブリドーマが腹水癌化することにより腹水のたまったマウスから、腹水を採取(1~8 mL/匹)した。該腹水を、シリジフィルター(孔径 $5 \mu\text{m}$)を用いてろ過し、固形分を除去した。精製IgGモノクローナル抗体は、カプリル酸沈殿法[Antibodies A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory(1988)]により精製することにより取得した。モノクローナル抗体のサブクラスの決定は、サブクラスタイピングキット(rat monoclonal antibody isotyping kit, DSファーマバイオメディカル社製)を用いたバインディングELISAにより行った。その結果、各抗体のサブクラスは、抗糖鎖不全CD27モノクローナル抗体KM4026はラットIgG2aクラス、抗糖鎖不全CD27モノクローナル抗体KM4027はラットIgG2bクラス、抗糖鎖不全CD27モノクローナル抗体KM4028はラットIgG1クラス、抗糖鎖不全CD27モノクローナル抗体KM4030はラットIgG2aクラス、および抗糖鎖不全CD27モノクローナル抗体KM4031はラットIgG1クラス、であることが明らかになった。

10

【実施例4】

【0194】

抗糖鎖不全CD27特異的モノクローナル抗体の反応性の検討

下記に示す競合ELISA系を用いて、抗糖鎖不全CD27モノクローナル抗体KM4030およびKM4031の反応特異性の検討を行った。実施例1で得られたLec8株生産CD27 Fcを、 $5 \mu\text{g/mL}$ の濃度で、96ウェルのELISAプレート(グライナー社製)に、 $50 \mu\text{L}$ /ウェルで分注し、4で一晩放置して吸着させた。該プレートを洗浄後、1% BSA PBSを $200 \mu\text{L}$ /ウェルに加え室温で1時間放置し、残っている活性基をブロックした。放置後、1% BSA PBSを捨て、該プレートに一次抗体として、希釈した抗糖鎖不全CD27モノクローナル抗体KM4030精製抗体またはKM4031精製抗体を、 $50 \mu\text{L}$ /ウェルで分注した。同時に、結合競合物質として、Lec8生産CD27 Fcタンパク質、DG44生産CD27 Fcタンパク質あるいはヒトイムノグロブリンを、20、2、0.2、 $0.02 \mu\text{g/mL}$ の濃度で加え、抗体と結合競合物質とを共存させた。プレートを室温で2時間放置した後、0.05% ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレート[(ICI社商標Tween 20相当品:和光純薬社製)]PBS(以下Tween PBSと表記)で洗浄後、2次抗体としてペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ラットイムノグロブリン(Zymed社製)を、 $50 \mu\text{L}$ /ウェルで加えて、室温、1時間放置した。該プレートをTween PBSで洗浄後、ABTS[2,2-アジノピス(3-エチルベンゾチアゾール6-スルホン酸)アンモニウム]基質液[1 mmol/L ABTS - 0.1 mol/Lクエン酸バッファー(pH4.2), 0.1% H_2O_2]を添加し、発色させた後、OD415 nmの吸光度をプレートリーダー(Emax; Molecular Devices社)を用いて測定した。

20

30

【0195】

図13に、抗糖鎖不全CD27モノクローナル抗体KM4030およびKM4031の競合ELISAの結果を示す。その結果、DG44生産CD27 Fcおよびヒトイムノグロブリンは、抗糖鎖不全CD27モノクローナル抗体KM4030およびKM4031とTn抗原結合CD27 Fcの結合を阻害しなかったが、Tn抗原結合CD27 Fcは阻害すること明らかになった。また、抗糖鎖不全CD27モノクローナル抗体KM4026、KM4027およびKM4028に関しても、同様な結果が得られた。以上のことから、本発明の抗糖鎖不全CD27モノクローナル抗体KM4026、KM4027、KM4028、KM4030およびKM4031は、糖鎖不全CD27を特異的に認識していることが明らかになった。

40

【0196】

図28(A)及び(B)に、抗糖鎖不全CD27モノクローナル抗体KM4026、KM4027、KM4028、KM4030およびKM4031の、ピアコアによる抗糖鎖不全CD27キメラ抗体の糖鎖不全CD27 Fcへの結合活性を評価した結果を示す。結合活性の測定は、Biacore T100(GEヘルスケアバイオサイエンス社製)を使用し、表面プラズモン共鳴法(SPR法)を用いて行った。

抗ヒトIgG4抗体(Pharming社製)を、Amine Coupling Kit(ピアコア社製)を用い、添付プロトコールに従い、アミンカップリング法によりCM5センサーチップ(GEヘルスケア

50

バイオサイエンス社製)に固定化した。実施例 1 (7) で得られたDG44産生CD27 - Fcに対し、Prozyme Glyco Enzymatic Deglycosylation Kit (Prozyme社製)およびPro0 Link Extender Deglycosylation Plus (Prozyme社製)のシアリダーゼAもしくは (1 4)ガラクトシダーゼを用いて添付のプロトコールに従って糖鎖消化酵素処理を行った、Tn抗原型CD27 FcもしくはシアリルTn抗原型CD27 Fcを添加し、抗ヒトIgG4抗体を固定化したチップ上に200 250RU(resonanceユニット)になるようにキャプチャーさせた。その後、20000ng/mLから5段階に希釈した測定サンプル(抗糖鎖不全CD27モノクローナル抗体KM4026、KM4027、KM4028、KM4030およびKM4031)を30 μ L/minの流速でチップ上に流し、各濃度のセンサーグラムを取得し、装置添付の解析ソフトBiacore T100 Evaluation software (Biacore社製)を用いて解析した。

10

【 0 1 9 7 】

その結果、抗糖鎖不全CD27モノクローナル抗体は、Tn抗原型CD27 FcおよびシアリルTn抗原型CD27 Fcに対し結合活性を示すことが明らかとなった。以上のことから、本発明の抗糖鎖不全CD27モノクローナル抗体は、Tn抗原およびシアリルTn抗原に対し、いずれにも結合することが明らかとなった。

【 実施例 5 】

【 0 1 9 8 】

抗糖鎖不全CD27モノクローナル抗体の可変領域をコードするcDNAの単離、解析

(1) 抗糖鎖不全CD27モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞からのmRNAの調製

実施例 3 で取得した各ハイブリドーマKM4026、KM4027、KM4028、KM4030およびKM4031それぞれ、 $5 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$ 個の細胞より、RNAeasy Mini kit (QIAGEN社製)およびOligotexTM dT30<Super>mRNA Purification Kit (TaKaRa社製)を用いて、それぞれ添付の使用説明書に従い、各抗糖鎖不全CD27モノクローナル抗体のmRNAを調製した。

20

(2) 抗糖鎖不全CD27モノクローナル抗体のH鎖およびL鎖可変領域の遺伝子クローニング

実施例 5 (1) で取得したモノクローナル抗体のmRNAから、BD SMART RACE cDNA Amplification Kit (BD Biosciences社製)を用いて、添付の使用説明書に従ってcDNAを取得した。取得したcDNAを鋳型として、ラットIgG1に特異的なプライマー(配列番号14)、ラットIgG2aに特異的なプライマー(配列番号15)、ラットIgG2bに特異的なプライマー(配列番号16)、またはラットCH1特異的なプライマー(配列番号17)を用いて、それぞれPCR反応を行い、各抗体の重鎖可変領域(以下、VHと記す)のcDNA断片を増幅した。また抗体の各サブクラス特異的なプライマーの代わりにラットIg()特異的なプライマー(配列番号18)および(配列番号19)を用いてPCRを行い、各抗体の軽鎖可変領域(以下、VLと記す)のcDNA断片を増幅した。KM4026、KM4030、KM4031のVLおよびVHを増幅するためのPCR反応はAdvantage 2 PCR kit (Clontech社製)を用いて、KM4027、KM4028のVLおよびVHを増幅するためのPCR反応はKOD Plus Polymerase (東洋紡社製)を用いて、それぞれ添付の使用説明書に従って行った。

30

【 0 1 9 9 】

次に、クローニングして塩基配列を決定するため、取得したPCR産物をアガロースゲル電気泳動で分離後、KM4026、KM4030、KM4031由来PCR産物はTOPO TA Cloning Kit (インビトロジェン社製)を用いて、KM4027、KM4028由来PCR産物はZero Blunt TOPO PCR Cloning Kit for Sequeuncing (インビトロジェン社製)を用いて、添付の使用説明書に従ってpCRベクターに挿入した。PCR増幅断片が挿入されたプラスミドを用いて大腸菌を形質転換し、各クローンから得られるプラスミドを調製し、DNA配列を確認した。その結果、cDNAの5'末端に開始コドンと推定されるATG配列が存在する、完全長のVHのcDNAを含むプラスミドおよびVLのcDNAを含むプラスミドが取得された。クローニングの概略を図 1 4 に示した。

40

(3) 抗CD27モノクローナル抗体可変領域の遺伝子配列の解析

実施例 5 (2) で得られたプラスミドに含まれる、抗糖鎖不全CD27モノクローナル抗体KM4026、KM4027、KM4028、KM4030およびKM4031のVHの全塩基配列を配列番号20から配列番

50

号24に、該配列から推定されるシグナル配列を含んだVHの全アミノ酸配列を配列番号25から配列番号29に、またVLの全塩基配列を配列番号30から配列番号34に、該配列から推定されるシグナル配列を含んだVLの全アミノ酸配列を配列番号35から配列番号39にそれぞれ示した。

【0200】

また、各モノクローナル抗体のVHおよびVLのCDRを、既知の抗体のアミノ酸配列と比較することにより同定した。抗糖鎖不全CD27モノクローナル抗体KM4026のVHのCDR1、CDR2およびCDR3のアミノ酸配列を配列番号40、配列番号41および配列番号42に、VLのCDR1、CDR2およびCDR3のアミノ酸配列を配列番号43、配列番号44および配列番号45にそれぞれ示した。抗糖鎖不全CD27モノクローナル抗体KM4027のVHのCDR1、CDR2およびCDR3のアミノ酸配列を配列番号46、配列番号47および配列番号48に、VLのCDR1、CDR2およびCDR3のアミノ酸配列を配列番号49、配列番号50および配列番号51にそれぞれ示した。抗糖鎖不全CD27モノクローナル抗体KM4028のVHのCDR1、CDR2およびCDR3のアミノ酸配列を配列番号52、配列番号53および配列番号54に、VLのCDR1、CDR2およびCDR3のアミノ酸配列を配列番号55、配列番号56および配列番号57にそれぞれ示した。抗糖鎖不全CD27モノクローナル抗体KM4030のVHのCDR1、CDR2およびCDR3のアミノ酸配列を配列番号58、配列番号59および配列番号60に、VLのCDR1、CDR2およびCDR3のアミノ酸配列を配列番号61、配列番号62および配列番号63にそれぞれ示した。抗糖鎖不全CD27モノクローナル抗体KM4031のVHのCDR1、CDR2およびCDR3のアミノ酸配列を配列番号64、配列番号65および配列番号66に、VLのCDR1、CDR2およびCDR3のアミノ酸配列を配列番号67、配列番号68および配列番号69にそれぞれ示した。

【実施例6】

【0201】

抗糖鎖不全CD27キメラ抗体の作製

(1) 抗糖鎖不全CD27キメラ抗体発現ベクターの構築

本発明で作製するキメラ抗体は、実施例5(3)で得られた抗CD27ラットモノクローナル抗体の重鎖および軽鎖の可変領域に、US97/10354に開示されているヒトIgG1の重鎖定常領域およびヒトの軽鎖定常領域をそれぞれ連結したキメラ抗体である。方法としては、実施例5(3)で得られた各モノクローナル抗体のVLまたはVHが含まれているpCRベクターと、US97/10354に記載されているヒトIgG1の重鎖定常領域およびヒトの軽鎖定常領域が含まれる抗体発現ベクターpKANTEX93とを用いて、抗糖鎖不全CD27キメラ抗体発現ベクターを以下のようにして構築した(図15、図16、図17、図18)。

【0202】

KM4026、KM4027、KM4028、KM4030、KM4031のVLまたはVHが含まれるpCRベクターを鋳型として10 ng使用し、10×KOD Plusバッファーを2 μL、2 mmol/L dNTPを2 μL、25 mmol/Lの硫酸マグネシウムを1 μL、KOD Plus polymerase(東洋紡社製)を1 μL、各抗CD27モノクローナル抗体のVLおよびVHに特異的な10 μmol/Lのプライマーをそれぞれ1 μLずつ含む、全量20 μLからなる溶液を調製した。該調製溶液を用いて、94 °Cで5分間加熱後、94 °Cで1分間、68 °Cで2分間の反応を30サイクルのPCR反応を行った。KM4026のVLのプライマーは配列番号70および71、VHのプライマーは配列番号72および73、KM4027のVLのプライマーは配列番号74および75、VHのプライマーは配列番号76および77、KM4028のVLのプライマーは配列番号78および79、VHのプライマーは配列番号80および81、KM4030のVLのプライマーは配列番号82および83、VHのプライマーは配列番号84および85、KM4031のVLのプライマーは配列番号86および87、VHのプライマーは配列番号88および89に示す。

【0203】

それぞれのPCR反応産物は1%アガロースゲル電気泳動で分離後、特異的PCR増幅バンドを回収しZero Blunt TOPO PCR Cloning Kit for Sequencing(インビトロジェン社製)を用いて添付の使用説明書に従ってpCR Blunt TOPOベクターに挿入した。得られた各抗体のVLは、制限酵素EcoRI(New England Biolabs社製)およびBsiWI(New England Biolabs社製)を用いて消化し、VLのEcoRI BsiWI断片を取得した。また、各抗体のVHは、制限酵素Not I(New England Biolabs社製)およびApaI(New England Biolabs社製)を用いて消化し

、NotI Apal断片を取得した。

抗CD27モノクローナル抗体KM4026、KM4027、KM4028、KM4030、KM4031のVLの各EcoRI BsiWI断片と、pKANTEX93を制限酵素EcoRIおよびBsiWIで消化して得られるDNA断片を、Ligation High (東洋紡社製)を用いて添付の使用説明書に従って連結させた。連結されたDNA断片を用いて大腸菌DH5 (東洋紡社製)を形質転換し、各クローンから得られるプラスミドを調整し、BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (PEバイオシステムズ社製)を用いて添付の使用説明書に従って反応後、同社のシーケンサーABI PRISM3700により塩基配列を解析した。その結果、抗CD27モノクローナル抗体KM4026、KM4027、KM4028、KM4030、KM4031のVLをコードするcDNAが挿入された、pKANTEX93を取得した。続いて、抗CD27モノクローナル抗体KM4026、KM4027、KM4028、KM4030、KM4031のVHの各NotI Apal断片と、抗CD27モノクローナル抗体の各VLが挿入されたpKANTEX93を制限酵素NotIおよびApalで消化して得られるDNA断片を、Ligation High (東洋紡社製)を用いて添付の使用説明書に従って連結させた。連結されたDNA断片を用いて大腸菌DH5 (東洋紡社製)を形質転換し、各クローンから得られるプラスミドを調整し、BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (PEバイオシステムズ社製)を用いて添付の使用説明書に従って反応後、同社のシーケンサーABI PRISM3700により塩基配列を解析した。その結果、抗CD27モノクローナル抗体KM4026、KM4027、KM4028、KM4030、KM4031のVLおよびVHをコードするcDNAがそれぞれ挿入された、抗CD27キメラ抗体発現ベクターを取得した。

10

(2) 動物細胞を用いた抗糖鎖不全CD27キメラ抗体の発現

上記(1)で得られた抗糖鎖不全CD27キメラ抗体発現ベクターを用いて抗糖鎖不全CD27キメラ抗体の動物細胞での発現を、常法 [Antibody Engineering, A Practical Guide, W. H. Freeman and Company (1992)] により行い、抗糖鎖不全CD27キメラ抗体 (キメラ型KM4026、キメラ型KM4028、キメラ型KM4030およびキメラ型KM4031) を産生する形質転換株を取得した。発現させる動物細胞株としては、1,6フコシルトランスフェラーゼ (FUT8) の遺伝子をダブルノックアウトしたCHO/DG44細胞株 (以下、FUT8ノックアウトCHO細胞) を用いた。この宿主細胞株で発現させた抗体のN結合型複合型糖鎖のコア部分には、フコースが付加されないことが知られている (W02002/31140)。

20

(3) 精製キメラ抗体の取得

上記(2)で得られた形質転換株キメラ型KM4026、キメラ型KM4028、キメラ型KM4030およびキメラ型KM4031を、通常の培養法で培養した後、細胞懸濁液を回収し、3000 rpm、4時間の条件で20分間の遠心分離を行い、培養上清を回収した後、0.22 μm孔径Millex GVフィルターを通して濾過滅菌した。得られた培養上清から、実施例1(7)と同様の方法により、Mab Selectを用いて抗糖鎖不全CD27キメラ抗体キメラ型KM4026、キメラ型KM4028、キメラ型KM4030およびキメラ型KM4031を精製した。

30

(4) 抗糖鎖不全CD27キメラ抗体のフコース含量測定

W02002/31140に記載の方法に従い、各抗糖鎖不全CD27キメラ抗体のFc領域のN結合複合型糖鎖の還元末端に存在するNアセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合していない糖鎖の割合を調べた。結果を表2に示す。

【0204】

この結果から、実施例6(3)で作製したキメラ抗体にはフコースが付加していないことが明らかになった。

40

【0205】

【表2】

抗糖鎖不全CD27キメラ抗体のフコース含量

| | |
|------------|----|
| キメラ型KM4026 | 0% |
| キメラ型KM4028 | 0% |
| キメラ型KM4030 | 0% |
| キメラ型KM4031 | 0% |

【実施例 7】

【0206】

抗糖鎖不全CD27キメラ抗体の活性評価

以下の(1)から(3)では、実施例6で得られた抗糖鎖不全CD27キメラ抗体キメラ型KM4026、キメラ型KM4028、キメラ型KM4030およびキメラ型KM4031の活性評価を行った。

(1) ビアコアによる抗糖鎖不全CD27キメラ抗体のヒト糖鎖不全CD27 Fcへの結合活性評価

抗糖鎖不全CD27キメラ抗体キメラ型KM4026、キメラ型KM4028、キメラ型KM4030のヒト糖鎖不全CD27 Fcに対する結合活性を反応速度論的に解析するため、表面プラズモン共鳴法 (SPR法) を用いて結合活性測定を行った。以下の操作は全てBiacore T100 (GEヘルスケアバイオサイエンス社製) を用いて行った。実施例1(7)で得られたLec8由来CD27 Fcを、アミンカップリング法によりCM5センサーチップ (GEヘルスケアバイオサイエンス社製) に固定化した。CD27 Fcを固定化したチップに9 μg/mLから3倍希釈で段階的に希釈して5濃度に調製した測定サンプル (キメラ型KM4026、キメラ型KM4028、キメラ型KM4030およびキメラ型KM4031) をシングルカインテックスの自動プログラムに従い低濃度から順に連続添加して測定した。装置添付の解析ソフトBiacore T100 Evaluation software (Biacore社製) を用い、Bivalent Analyteモデルで解析し、各抗体のヒト糖鎖不全CD27 Fcに対する結合速度定数 k_a 及び解離速度定数 k_d を算出した。

10

【0207】

その結果得られた各抗体の結合速度定数 k_a 1、解離速度定数 k_d 1および解離定数 K_D (k_d 1/ k_a 1) を表3に示した。

20

表3に示すように、キメラ型KM4026、キメラ型KM4028、キメラ型KM4030およびキメラ型KM4031はいずれも、ヒト糖鎖不全CD27 Fcに対し、 1×10^5 から 1×10^8 mol/Lの低いアフィニティを示した。

【0208】

【表3】

抗糖鎖不全 CD27 キメラ抗体のヒト糖鎖不全 CD27-Fc への結合活性

| 抗体 | k_a (1/Ms) | k_d (1/s) | K_D (mol/L) |
|--------------|--------------------|-----------------------|------------------------|
| キメラ型 KM 4026 | 1.8×10^5 | 83.1×10^{-4} | 46.65×10^{-9} |
| キメラ型 KM 4028 | 11.7×10^5 | 9.2×10^{-4} | 0.79×10^{-9} |
| キメラ型 KM 4030 | 2.9×10^5 | 3.4×10^{-4} | 1.07×10^{-9} |
| キメラ型 KM 4031 | 4.0×10^5 | 2.0×10^{-4} | 0.51×10^{-9} |

【0209】

(2) 蛍光細胞染色法 (フローサイトメーター解析) による抗糖鎖不全CD27キメラ抗体の反応特異性評価

実施例2と同様の方法で作製したCD27/DG44 4細胞、CD27/Lec8 4細胞およびLec8細胞をアッセイ用細胞として用いた。500 μg/mL G418添加HT培地を用いて継代したCD27/DG44 4および50 nmol/L MTX および500 μg/mL G418添加HT培地を用いて継代したCD27/Lec8 4を、0.02% EDTA溶液を用いて剥離した後、各細胞をPBSで洗浄した。洗浄後、 5×10^5 個の細胞を50 μLの1% BSA PBSに懸濁した後、1次抗体として抗糖鎖不全CD27キメラ抗体 (キメラ型KM4026、キメラ型KM4028、キメラ型KM4030およびキメラ型KM4031) を0.02、0.2、2および10 μg/mLに調製した抗体液を50 μL/ウェルで分注し、氷温中で1時間反応させた。ポジティブコントロールとして、抗Tn抗体である抗RCAS1マウス抗体22 1 1 (MBL社製) および抗CD27マウス抗体0323 (Santa Cruz biotechnology社製) を用いた。反応後、PBSを用いて遠心分離を2回行って細胞を洗浄し、2次抗体としてALEXA Fluoro 488標識抗ヒトイムノグロブリンG (H+L)、ALEXA Fluoro 488標識抗マウスイムノグロブリンG (H+L) もし

40

くはALEXA Fluoro 488標識抗ヒトイムノグロブリンM(μ)を、50μL/ウェルに加え、氷温、遮光下で30分間反応させた。再びPBSを用いて遠心分離を2回行い、細胞を洗浄した後、500μLの1% BSA PBSに懸濁してレーザー光488 nmアルゴンで励起される510~530 nmの蛍光をフローサイトメーター(ベックマンコールター社製、Cytomics FC500 MPL)で測定した。図19(A)~(C)に結果を示す。

【0210】

その結果、抗糖鎖不全CD27キメラ抗体はいずれも、Lec8細胞およびCD27/DG44 4細胞には結合しなかったが、糖鎖不全CD27を発現したCD27/Lec8 4細胞にのみ結合が認められた。

以上のことから、本発明の抗糖鎖不全CD27キメラ抗体キメラ型KM4026、キメラ型KM4028、キメラ型KM4030およびキメラ型KM4031は、細胞表面に発現している糖鎖不全CD27を特異的に認識していることが明らかになった。

(3) 抗糖鎖不全CD27キメラ抗体の抗体依存性細胞傷害活性(ADCC活性)の評価

実施例2で作製したCD27/Lec8 4細胞に対する抗糖鎖不全CD27キメラ抗体キメラ型KM4026、キメラ型KM4028、キメラ型KM4030およびキメラ型KM4031のADCC活性を、以下に示す方法に従って測定した。

(3) - 1 標的細胞懸濁液の調製

50 nmol/L MTX および500μg/mL G418添加HT培地を用いて継代したCD27/Lec8 4細胞を、0.02% EDTA溶液を用いて剥離した後、PBSで洗浄し、5%透析済みウシ胎児血清(dFBS)(インビトロジェン社製)を含むフェノールレッド不含有RPMI1640培地(インビトロジェン社製)(以下、ADCC用培地と記す)で洗浄し、同培地で至適濃度に調製して標的細胞懸濁液とした。

(3) - 2 エフェクター細胞懸濁液の調製

末梢血単核球(Peripheral blood mononuclear cell:PBMC)は、健常人末梢血から以下に示した方法により分離した。ヘパリンナトリウム注N「シミズ」(清水製薬社製)を0.5 mL加えたシリンジを用いて、健常人から健常人末梢血50 mLを採血した。15 mLチューブに3 mLずつ分注したモノ・ポリ分離溶液(DSファーマバイオメディカル社製)の上に、3.5 mLの採取した末梢血を静かに重層し、400×g、プレーキオフ、室温の条件で20分間遠心分離して、単核球層を分離した。こうして得られた単核球画分を、ADCC用培地を用いて2回洗浄し、同培地により至適な細胞数に調製してエフェクター細胞懸濁液とした。

(3) - 3 ADCC活性の測定

LDH Cytotoxic Test Wako(Wako社製)を用い、付属の説明書に従い以下の手順で測定した。

【0211】

96ウェルU底プレート(FALCON社製)の各ウェルに、各抗体を30μg/mLから10倍希釈で0.003μg/mLの濃度に希釈した抗体液を、50μL分注し、次に(3) - 1で調製した標的細胞懸濁液を 1×10^4 細胞/50μL/ウェルで分注し、最後に(3) - 2で調製したエフェクター細胞懸濁液を 2.5×10^5 細胞/50μL/ウェルで分注して全量を150μLとし、37°Cで4時間反応させた。よって、エフェクター細胞(E)と標的細胞(T)との比は25:1で実験を行った。ADCC活性は次式により求めた。結果を図20に示す。

(式)

$$\text{ADCC活性(\%)} = \left\{ \left([\text{検体の吸光度}] - [\text{標的細胞自然遊離の吸光度}] - [\text{エフェクター細胞自然遊離の吸光度}] \right) / \left([\text{標的細胞全遊離の吸光度}] - [\text{標的細胞自然遊離の吸光度}] \right) \right\} \times 100$$

その結果、抗体のFc領域のN結合複合型糖鎖にコアフコースが結合していない抗糖鎖不全CD27キメラ抗体キメラ型KM4026、キメラ型KM4028、キメラ型KM4030およびキメラ型KM4031はいずれも、CD27/Lec8 4細胞に対して、高いADCC活性を示した。

【0212】

以上のことから、本発明の抗糖鎖不全CD27キメラ抗体キメラ型KM4026、キメラ型KM4028

、キメラ型KM4030およびキメラ型KM4031はいずれも、糖鎖不全CD27を発現した細胞に対し、高いADCC活性を有することが明らかになった。

(4) 抗糖鎖不全CD27キメラ抗体の補体依存性細胞傷害活性(CDC活性)の評価

実施例2で作製したCD27/Lec8 4細胞に対する抗糖鎖不全CD27キメラ抗体キメラ型KM4026、キメラ型KM4028、キメラ型KM4030およびキメラ型KM4031のCDC活性を、以下に示す方法に従って測定した。

【0213】

CD27/Lec8 4細胞をPBSで洗浄後、10% dFBSを含むRPMI1640培地で洗浄し、同培地で至適濃度に調製して標的細胞懸濁液とした。1ウェル当たり 5×10^4 個となるよう、標的細胞懸濁液を96 well平底プレート(グライナー社製)に50 μ L/ウェルで分注し、更に、適当な濃度に調製した抗糖鎖不全CD27キメラ抗体溶液及びヒト補体(SIGMA社製)を添加し、全量150 μ L/ウェルに調製した。また、陰性対照として抗体を含まない反応ウェル(0%細胞傷害活性ウェル)、陽性対照として細胞を含まない反応ウェル(100%細胞傷害活性ウェル)をそれぞれ用意した。37 $^{\circ}$ C、5% CO₂インキュベーターにおいて2時間反応を行った。反応終了後、各反応ウェルに15 μ LのWST 1試薬(ロシュ社製)を加え、37 $^{\circ}$ Cで4時間程度反応させ、各ウェルにおける吸光度(OD450nm - OD690nm)をプレートリーダー(Emax)を用いて測定した。各ウェルの吸光度から、以下の式を用いてCDC活性(細胞傷害活性[%])を算出した。結果を図21に示す。

10

(式)

CDC活性(細胞傷害活性[%]) = { 1 - (反応ウェルの吸光度 - 100% Lysisウェルの吸光度) / (0% Lysisウェルの吸光度 - 100% Lysisウェルの吸光度) } \times 100

20

その結果、本発明で取得した抗糖鎖不全CD27キメラ抗体キメラ型KM4026、キメラ型KM4028、キメラ型KM4030およびキメラ型KM4031は、いずれもCDC活性を示した。

【実施例8】

【0214】

細胞膜上にカニクイザルCD27を発現するCHO細胞の造成

(1) カニクイザルCD27遺伝子のクローニング

カニクイザル末梢血由来RNAより、以下の手順でCD27をコードする遺伝子を単離した。カニクイザル末梢血よりTrizol(インビトロジェン社製)を用いて単離したRNAを鋳型として3.3 μ g使用し、SuperScriptIII first strandキット(インビトロジェン社製)に添付されたオリゴdTを1 μ L、dNTP Mixを1 μ L含む、全量5 μ Lから成る溶液を調製した。該調製した溶液を65 $^{\circ}$ Cで5分間反応後に氷上で1分間急冷したのち、SuperScriptIII first strandキットに添付された10 \times RTバッファーを2 μ L、DTTを2 μ L、RNase OUTを1 μ L、RTを1 μ L添加し、50 $^{\circ}$ Cで50分間逆転写反応を行った。反応後、85 $^{\circ}$ Cで5分間加熱し逆転写酵素を失活させたのち、SuperScriptIII first strandキットに添付されたRNase Hを1 μ L添加し、37 $^{\circ}$ Cで20分間反応させRNAを完全に分解した。本カニクイザル末梢血由来一本鎖cDNAは使用するまで20 $^{\circ}$ Cで保存した。

30

【0215】

上記で作製したカニクイザル末梢血由来一本鎖cDNAを鋳型として1.25 μ L使用し、10 \times KOD Plus バッファー2.5 μ L、2 mmol/L dNTPを2.5 μ L、25mmol/Lの硫酸マグネシウムを1 μ L、KOD Plus polymerase(東洋紡社製)を0.5 μ L、アカゲザルCD27の5'側非翻訳領域配列より設計したmfCD27 5'UTR(配列番号90)とアカゲザルCD27の3'側非翻訳領域配列より設計したmfCD27 3'UTR(配列番号91)をそれぞれ20 pmolずつ含む、全量25 μ Lからなる溶液を調製した。該調製溶液を用いて、94 $^{\circ}$ Cで5分間加熱後、94 $^{\circ}$ Cで30秒間、68 $^{\circ}$ Cで2分間の反応を30サイクルのPCR反応を行った。該反応液を1%アガロースゲル電気泳動で分離後、約800 bpのPCR産物をZero Blunt TOPO PCR Cloning Kit for Sequencing(インビトロジェン社製)を用いて添付の使用説明書に従ってpCR Blunt TOPOベクターに挿入した。PCR増幅断片が挿入されたベクターを用いて大腸菌DH5(東洋紡社製)を形質転換し、各クローンから得られるプラスミドを調整し、BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit(PEバイオシステムズ社製)を用いて添付の使用説明書に従って反応後、同社

40

50

のシーケンサーABI PRISM3700により塩基配列を解析した。その結果、カニクイザルCD27をコードするcDNA（配列番号92）がクローニングされたプラスミドpCR mfCD27を取得した（図22）。

（2）サルCD27発現プラスミドpKANTEX mfCD27Hisの構築

C末端にHisタグを付加したカニクイザルCD27発現ベクターpKANTEX mfCD27Hisを以下の方法にて作製した。

【0216】

pCR mfCD27を鋳型として10 ng使用し、10×KOD Plusバッファを5 μL、2 mmol/L dNTPを5 μL、25mmol/Lの硫酸マグネシウムを2 μL、KOD Plus polymerase（東洋紡社製）を1 μL、100 μmol/LのmfCD27toKAN 5（配列番号93）およびmfCD27HisKAN 3（配列番号94）を0.2 μLずつ含む、全量50 μLからなる溶液を調製した。該調製溶液を用いて、94 °Cで5分間加熱後、94 °Cで30秒間、68 °Cで2分間の反応を30サイクルのPCR反応を行った。該反応液を1%アガロースゲル電気泳動で分離後、約800 bpのPCR産物をZero Blunt TOPO PCR Cloning Kit for Sequencing（インビトロジェン社製）を用いて添付の使用説明書に従ってpCR Blunt TOPOベクターに挿入した。PCR増幅断片が挿入されたベクターを用いて大腸菌DH5（東洋紡社製）を形質転換し、各クローンから得られるプラスミドを調整し、BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit（PEバイオシステムズ社製）を用いて添付の使用説明書に従って反応後、同社のシーケンサーABI PRISM3700により塩基配列を解析した。その結果、C末端にHisタグが付加されたカニクイザルCD27をコードするcDNA（配列番号95）がクローニングされたプラスミドpCR mfCD27Hisを取得した（図23）。

【0217】

pCR mfCD27Hisを制限酵素NotIおよびSall（タカラバイオ社製）で消化して得られる約800 bpのDNA断片と、実施例2で作製したpKANTEX CD27を制限酵素NotIおよびSall（タカラバイオ社製）で消化して得られる約10 kbpのDNA断片を、Ligation High（東洋紡社製）を用いて添付の使用説明書に従って連結させた。連結されたDNA断片を用いて大腸菌DH5（東洋紡社製）を形質転換し、各クローンから得られるプラスミドを調整し、BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit（PEバイオシステムズ社製）を用いて添付の使用説明書に従って反応後、同社のシーケンサーABI PRISM3700により塩基配列を解析した。その結果、C末端にHisタグが付加されたカニクイザルCD27を発現するためのプラスミドpKANTEX mfCD27Hisを取得した（図24）。

【0218】

pKANTEX mfCD27Hisを用いて形質転換させたDH5（東洋紡社製）を200 mLのLB培地に播種し、一晚培養を行った。培養後に菌体を回収し、QIAfilter Plasmid Midi kit（キアゲン社製）を用いて添付の使用説明書に従ってプラスミドを精製した。精製したプラスミド50 μgを制限酵素AatII（New England Biolabs社製）消化により、線状化した。

（3）サルCD27発現プラスミドpKANTEX mfCD27Hisの導入

上記（2）で作製したカニクイザルCD27発現プラスミドpKANTEX mfCD27HisをLec8細胞およびCHO/DG44細胞に遺伝子導入することにより、カニクイザルCD27を発現するLec8細胞およびDG44細胞の樹立を行った。導入するプラスミドとしてpKANTEX mfCD27Hisを用いる以外は実施例1（6）に記載の方法で実施した。ただし、遺伝子導入後の細胞は、HT培地30 mLに懸濁し、100 μL/ウェルとなるように3枚の96ウェルプレートに播種した。播種1日後に500 μg/mL G418を含む継代用培地に交換し、10日間培養を行い、G418耐性クローン株を取得した。Lec8株由来のカニクイザルCD27発現株をカニクイザルCD27/Lec8細胞、一方、DG44細胞由来のカニクイザルCD27発現細胞をカニクイザルCD27/DG44細胞と記載する。

【実施例9】

【0219】

抗糖鎖不全CD27キメラ抗体のサルCD27蛋白質への交差反応性評価

実施例8で作製したカニクイザルCD27/DG44細胞、カニクイザルCD27/Lec8細胞をアッセイ細胞として用いた。

10

20

30

40

50

(1) 蛍光細胞染色法(フローサイトメーター解析)による抗糖鎖不全CD27キメラ抗体のサルCD27発現細胞への反応性評価

抗糖鎖不全CD27キメラ抗体キメラ型KM4026、キメラ型KM4028、キメラ型KM4030およびキメラ型KM4031のカニクイザルCD27発現細胞に対する結合活性を、以下の方法に従って測定した。

【0220】

500 μg/mL G418添加HT培地を用いて継代したカニクイザルCD27/DG44細胞およびカニクイザルCD27/Lec8細胞を、0.02% EDTA溶液を用いて剥離した後、各細胞をPBSで洗浄した。洗浄後、 5×10^5 個の細胞を50 μLの1% BSA PBSに懸濁した後、1次抗体として抗糖鎖不全CD27キメラ抗体(キメラ型KM4026、キメラ型KM4028、キメラ型KM4030およびキメラ型KM4031)を10 μg/mLに調製した抗体液を50 μL/ウェルで分注し、氷温中で1時間反応させた。ポジティブコントロールとして、抗CD27マウス抗体0323を用いた。反応後、PBSを用いて遠心分離を2回行って細胞を洗浄し、2次抗体としてALEXA Fluoro 488標識抗ヒトイムノグロブリンG(H+L)もしくはALEXA Fluoro 488標識抗マウスイムノグロブリンG(H+L)(いずれもBioLegend社製)を、50 μL/ウェルに加え、氷温、遮光下で30分間反応させた。再びPBSを用いて遠心分離を2回行い、細胞を洗浄した後、500 μLの1% BSA PBSに懸濁してレーザー光488 nmアルゴンで励起される510~530 nmの蛍光をフローサイトメーター(ベックマンコールター社製、Cytomics FC500 MPL)で測定した。図25に結果を示す。

【0221】

その結果、抗糖鎖不全CD27キメラ抗体キメラ型KM4030およびキメラ型KM4031は、糖鎖不全CD27を発現したカニクイザルCD27/Lec8細胞に反応することが明らかとなった。一方、抗糖鎖不全CD27キメラ抗体キメラ型KM4026およびキメラ型KM4028のカニクイザルCD27/Lec8細胞への反応性は軽微であった。また、抗糖鎖不全CD27キメラ抗体はいずれも、カニクイザルCD27/DG44細胞には結合しないことが確認された。

(2) 抗糖鎖不全CD27キメラ抗体のサルCD27発現細胞に対するADCC活性の評価

500 μg/mL G418添加HT培地を用いて継代したカニクイザルCD27/Lec8細胞を、0.02% EDTA溶液を用いて剥離した後、PBSで洗浄した後、ADCC用培地で洗浄して同培地で至適濃度に調製して標的細胞懸濁液とした。また、エフェクター細胞懸濁液の調製およびADCC活性の測定は、実施例7と同様の方法で行った。図26に結果を示す。

【0222】

その結果、抗糖鎖不全CD27キメラ抗体キメラ型KM4026、キメラ型KM4028、キメラ型KM4030およびキメラ型KM4031はいずれも、ガラクトースが結合していないO結合型糖鎖を含むカニクイザルCD27/Lec8細胞(糖鎖不全カニクイザルCD27細胞)に対してADCC活性を示した。

以上のことから、本発明の抗糖鎖不全CD27キメラ抗体キメラ型KM4026、キメラ型KM4028、キメラ型KM4030およびキメラ型KM4031はいずれも、糖鎖不全カニクイザルCD27細胞に交差反応性を示すことが明らかとなった。各抗糖鎖不全CD27キメラ抗体の糖鎖不全カニクイザルCD27に対する反応性には強弱が認められ、認識するエピトープの違いが示唆された。

【0223】

また、実施例2で作製したヒトCD27/Lec8細胞および実施例8で作製したカニクイザルCD27/Lec8細胞のうち、フローサイトメーター解析により細胞表面上のCD27発現量がほぼ同等であることを確認した細胞を用いて、抗糖鎖不全CD27キメラ抗体キメラ型KM4030のADCC活性を測定した。エフェクター細胞懸濁液は、同一健康人末梢血から調製した。図27に結果を示す。

【0224】

その結果、糖鎖不全CD27キメラ抗体キメラ型KM4030は、カニクイザルCD27/Lec8細胞とヒトCD27/Lec8細胞に対し、同等のADCC活性を示すことが示唆された。

【実施例10】

【0225】

ヒト化抗体の作製

(1) 抗糖鎖不全CD27ヒト化抗体のVHおよびVLのアミノ酸配列の設計

抗糖鎖不全CD27ヒト化抗体のVHのアミノ酸配列を以下のようにして設計した。

初めに、配列番号58,59および60でそれぞれ表される抗糖鎖不全CD27ラットモノクローナル抗体KM4030VHのCDR1~3のアミノ酸配列を移植するためのヒト抗体のVHのFRのアミノ酸配列を選択した。配列解析システムとしてGCG Package (Genetics Computer Group社製)を用いて、既存の蛋白質のアミノ酸データベースをBLASTP法(Nucleic Acid Res., 25, 3389 (1997))により抗糖鎖不全CD27ラットモノクローナル抗体KM4030と相同性の高いヒト抗体を検索した。相同性スコアと実際のアミノ酸配列の相同性を比較したところ、SWISSPROTデータベースアクセションナンバーBAH04525、The repertoire of neutralizing monoclonal antibodies against H3N2 influenza viruses in human (以下、BAH04525と称す)が83.9%を示し、最も相同性の高いヒト抗体であったため、この抗体のFRのアミノ酸配列を選択した。

10

【0226】

以上のようにして決定したヒト抗体のFRのアミノ酸配列の適切な位置に配列番号58~60で示した抗糖鎖不全CD27ラットモノクローナル抗体KM4030のVHのCDRのアミノ酸配列を移植した。このようにして、配列番号96で表される抗糖鎖不全CD27ヒト化抗体のVHのアミノ酸配列HV0を設計した。

次に、抗糖鎖不全CD27ヒト化抗体のVLのアミノ酸配列を以下のようにして設計した。

【0227】

配列番号61~63でそれぞれ表される抗糖鎖不全CD27ラットモノクローナル抗体KM4030VLのCDR1~3のアミノ酸配列を移植するためのヒト抗体のVLのFRのアミノ酸配列を選択した。カバットらは、既知の様々なヒト抗体のVLをそのアミノ酸配列の相同性からサブグループ(HSG I~IV)に分類し、それらのサブグループ毎に共通配列を報告している[Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services(1991)]。そこで、ヒト抗体のVLのサブグループI~IVの共通配列のFRのアミノ酸配列と抗糖鎖不全CD27ラット抗体KM4030のVLのFRのアミノ酸配列との相同性検索を実施した。

20

【0228】

相同性を検索した結果、HSGI、HSGII、HSGIII、およびHSGIVの相同性はそれぞれ86.3%、60.0%、73.8%、73.8%であった。従って、KM4030VLのFRのアミノ酸配列はサブグループIと最も高い相同性を有していた。

30

以上の結果から、ヒト抗体のVLのサブグループIの共通配列のFRのアミノ酸配列の適切な位置に抗糖鎖不全CD27ラットモノクローナル抗体KM4030のVLのCDRのアミノ酸配列を移植した。しかし、配列番号38に記載の抗糖鎖不全CD27ラットモノクローナル抗体KM4030のVLのアミノ酸配列中の124番目のLeuは、カバットらがあげるヒト抗体FRのアミノ酸配列の相当する部位において、最も使用される頻度が高いアミノ酸残基ではないが、比較的高い頻度で使用されるアミノ酸残基であるため、上記の抗糖鎖不全CD27ラットモノクローナル抗体KM4030のアミノ酸配列で認められるアミノ酸残基を用いることとした。このようにして、配列番号97で表される抗糖鎖不全CD27ヒト化抗体のVLのアミノ酸配列LV0を設計した。

【0229】

上記で設計した抗糖鎖不全CD27ヒト化抗体のVHのアミノ酸配列HV0およびVLのアミノ酸配列LV0は、選択したヒト抗体のFRのアミノ酸配列に抗糖鎖不全CD27ラットモノクローナル抗体KM4030のCDRのアミノ酸配列のみを移植した配列である。しかし、一般に、ヒト化抗体を作製する場合には、単なるヒト抗体のFRへのラット抗体のCDRのアミノ酸配列の移植のみでは結合活性が低下してしまうことが多い。このため、結合活性の低下を回避するため、CDRのアミノ酸配列の移植とともに、ヒト抗体とラット抗体で異なっているFRのアミノ酸残基のうち、結合活性に影響を与えると考えられるアミノ酸残基を改変することが行われている。そこで、本実施例でも、結合活性に影響を与えると考えられるFRのアミノ酸残基を以下のようにして同定した。

40

【0230】

50

まず、上記で設計した抗糖鎖不全CD27ヒト化抗体のVHのアミノ酸配列HV0およびVLのアミノ酸配列LV0よりなる抗体V領域（HV0LV0）の三次元構造をコンピューターモデリングの手法を用いて構築した。三次元構造座標作製および三次元構造の表示に関してはソフトウェアDiscovery Studio（Accelrys社製）を用いて添付の使用説明書に従い、行った。また、抗糖鎖不全CD27ラットモノクローナル抗体KM4030のV領域の三次元構造のコンピューターモデルも同様にして構築した。更に、HV0LV0のVHおよびVLのFRのアミノ酸配列の中で、抗糖鎖不全CD27ラット抗体KM4030と異なっているアミノ酸残基を選択し、抗糖鎖不全CD27ラットモノクローナル抗体KM4030のアミノ酸残基へ改変したアミノ酸配列を作製し、同様に三次元構造モデルを構築した。これら作製した抗糖鎖不全CD27ラットモノクローナル抗体KM4030、HV0LV0および改変体のV領域の三次元構造を比較し、抗体の結合活性に影響を与えると予測されるアミノ酸残基を同定した。

10

【0231】

その結果、HV0LV0のFRのアミノ酸残基の中で抗原結合部位の三次元構造を変化させ、抗体の結合活性に影響を与えると考えられるアミノ酸残基として、HV0では30番目のSer、48番目のVal、49番目のSer、77番目のAsn、93番目のVal、97番目のAlaおよび117番目のThrを、LV0では21番目のIle、40番目のPro、58番目のVal、85番目のThr、および87番目のTyrをそれぞれ選択した。これらの選択したアミノ酸残基のうち、少なくとも1つ以上のアミノ酸配列を抗糖鎖不全CD27ラットモノクローナル抗体KM4030の同じ部位に存在するアミノ酸残基へ改変し、様々な改変を有するヒト化抗体のVHおよびVLを設計した。具体的には、抗体VHについては、配列番号96で表されるアミノ酸配列の30番目のSerをAsnに、48番目のValをIleに、49番目のSerをAlaに、77番目のAsnをGlyに、93番目のValをThrに、97番目のAlaをThrに、および117番目のThrをValに置換するアミノ酸改変のうち、少なくとも1つの改変を導入した。また、VLについては、配列番号97で表されるアミノ酸配列の21番目のIleをLeuに、40番目のProをLeuに、58番目のValをIleに、85番目のThrをAlaに、および87番目のTyrをPheに置換するアミノ酸改変のうち、少なくとも1つの改変を導入した。

20

【0232】

HV0LV0のFRに存在する、少なくとも1つのアミノ酸残基を改変したHV2LV0、HV3LV0、HV5LV0、およびHV7LV0の可変領域のアミノ酸配列を設計し、H鎖可変領域HV2、HV3、HV5、およびHV7のアミノ酸配列を、それぞれ配列番号101、103、105、および107に示した。

(2) 抗糖鎖不全CD27ヒト化抗体の作製および評価

30

抗糖鎖不全CD27ヒト化抗体の可変領域のアミノ酸配列をコードするDNAは、抗糖鎖不全CD27ラットモノクローナル抗体KM4030のVHまたはVLのアミノ酸配列をコードするDNAで用いられているコドンを利用し、アミノ酸改変を行う場合は、哺乳動物細胞で高頻度で使用されるコドンを用いて、作製した。抗糖鎖不全CD27ヒト化抗体のHV0およびLV0のアミノ酸配列をコードするDNA配列を配列番号98、99にそれぞれ示し、またアミノ酸改変を行った可変領域HV2、HV3、HV5、およびHV7のアミノ酸配列をコードするDNA配列を、配列番号100、102、104、および106にそれぞれ示した。

【産業上の利用可能性】**【0233】**

本発明により、ガラクトースが結合していないO結合型糖鎖を含むCD27を特異的に認識し、該細胞外領域に結合するモノクローナル抗体または該抗体断片、該抗体を産生するハイブリドーマ、該抗体をコードするDNA、該DNAを含んでなるベクター、該ベクターを形質転換して得られる形質転換体、該ハイブリドーマまたは形質転換体を用いる抗体または該抗体断片の製造方法、ならびに該抗体または抗体断片を有効成分として含有してなるCD27が関与する疾患の診断薬または治療薬を提供することができる。

40

【受託番号】**【0234】**

IPOD FREM BP 10976

【配列表フリーテキスト】**【0235】**

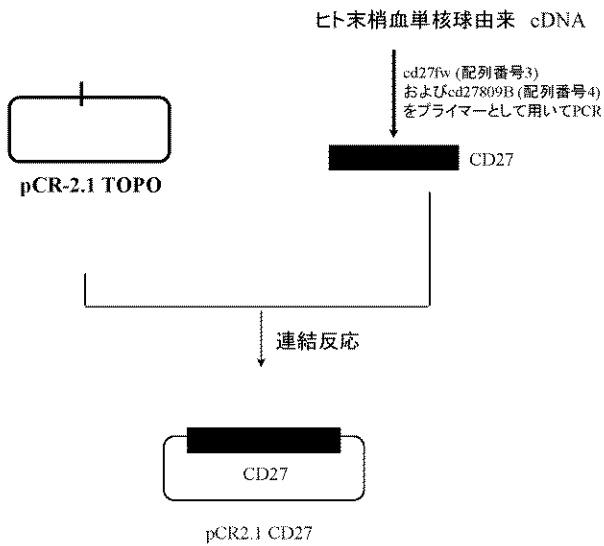
50

| | |
|---------------------------------------|----|
| 配列番号1 - ヒトCD27 DNA配列 | |
| 配列番号2 - ヒトCD27 アミノ酸配列 | |
| 配列番号3 - 人工配列の記載：CD27フォワードプライマー | |
| 配列番号4 - 人工配列の記載：CD27809B | |
| 配列番号5 - 人工配列の記載：CD27 Aプライマー | |
| 配列番号6 - 人工配列の記載：CD27 Bプライマー | |
| 配列番号7 - 人工配列の記載：プライマー1 | |
| 配列番号8 - 人工配列の記載：プライマー2 | |
| 配列番号9 - 人工配列の記載：g4Aプライマー | |
| 配列番号10 - 人工配列の記載：g4Bプライマー | 10 |
| 配列番号11 - 人工配列の記載：CD27 Fcタンパク質 DNA配列 | |
| 配列番号12 - 人工配列の記載：CD27 Fcタンパク質アミノ酸配列 | |
| 配列番号13 - 人工配列の記載：CD27 Cプライマー | |
| 配列番号14 - 人工配列の記載：ラットIgG1に特異的なプライマー | |
| 配列番号15 - 人工配列の記載：ラットIgG2aに特異的なプライマー | |
| 配列番号16 - 人工配列の記載：ラットIgG2bに特異的なプライマー | |
| 配列番号17 - 人工配列の記載：ラットCH1特異的なプライマー | |
| 配列番号18 - 人工配列の記載：ラットIg () 特異的プライマー 1 | |
| 配列番号19 - 人工配列の記載：ラットIg () 特異的プライマー 2 | |
| 配列番号20 - KM4026 VH 塩基配列 | 20 |
| 配列番号21 - KM4027 VH 塩基配列 | |
| 配列番号22 - KM4028 VH 塩基配列 | |
| 配列番号23 - KM4030 VH 塩基配列 | |
| 配列番号24 - KM4031 VH 塩基配列 | |
| 配列番号25 - KM4026 VH アミノ酸配列 | |
| 配列番号26 - KM4027 VH アミノ酸配列 | |
| 配列番号27 - KM4028 VH アミノ酸配列 | |
| 配列番号28 - KM4030 VH アミノ酸配列 | |
| 配列番号29 - KM4031 VH アミノ酸配列 | |
| 配列番号30 - KM4026 VL 塩基配列 | 30 |
| 配列番号31 - KM4027 VL 塩基配列 | |
| 配列番号32 - KM4028 VL 塩基配列 | |
| 配列番号33 - KM4030 VL 塩基配列 | |
| 配列番号34 - KM4031 VL 塩基配列 | |
| 配列番号35 - KM4026 VL アミノ酸配列 | |
| 配列番号36 - KM4027 VL アミノ酸配列 | |
| 配列番号37 - KM4028 VL アミノ酸配列 | |
| 配列番号38 - KM4030 VL アミノ酸配列 | |
| 配列番号39 - KM4031 VL アミノ酸配列 | |
| 配列番号40 - KM4026 VH CDR1 | 40 |
| 配列番号41 - KM4026 VH CDR2 | |
| 配列番号42 - KM4026 VH CDR3 | |
| 配列番号43 - KM4026 VL CDR1 | |
| 配列番号44 - KM4026 VL CDR2 | |
| 配列番号45 - KM4026 VL CDR3 | |
| 配列番号46 - KM4027 VH CDR1 | |
| 配列番号47 - KM4027 VH CDR2 | |
| 配列番号48 - KM4027 VH CDR3 | |
| 配列番号49 - KM4027 VL CDR1 | |
| 配列番号50 - KM4027 VL CDR2 | 50 |

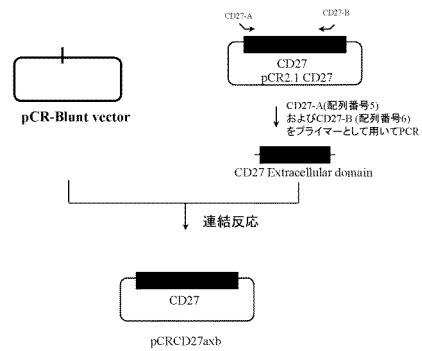
| | |
|---|----|
| 配列番号51 - KM4027 VL CDR3 | |
| 配列番号52 - KM4028 VH CDR1 | |
| 配列番号53 - KM4028 VH CDR2 | |
| 配列番号54 - KM4028 VH CDR3 | |
| 配列番号55 - KM4028 VL CDR1 | |
| 配列番号56 - KM4028 VL CDR2 | |
| 配列番号57 - KM4028 VL CDR3 | |
| 配列番号58 - KM4030 VH CDR1 | |
| 配列番号59 - KM4030 VH CDR2 | |
| 配列番号60 - KM4030 VH CDR3 | 10 |
| 配列番号61 - KM4030 VL CDR1 | |
| 配列番号62 - KM4030 VL CDR2 | |
| 配列番号63 - KM4030 VL CDR3 | |
| 配列番号64 - KM4031 VH CDR1 | |
| 配列番号65 - KM4031 VH CDR2 | |
| 配列番号66 - KM4030 VH CDR3 | |
| 配列番号67 - KM4031 VL CDR1 | |
| 配列番号68 - KM4031 VL CDR2 | |
| 配列番号69 - KM4031 VL CDR3 | |
| 配列番号70 - 人工配列の記載 : KM4026 VL キメラ プライマー1 | 20 |
| 配列番号71 - 人工配列の記載 : KM4026 VL キメラ プライマー2 | |
| 配列番号72 - 人工配列の記載 : KM4026 VH キメラ プライマー1 | |
| 配列番号73 - 人工配列の記載 : KM4026 VH キメラ プライマー2 | |
| 配列番号74 - 人工配列の記載 : KM4027 VL キメラ プライマー1 | |
| 配列番号75 - 人工配列の記載 : KM4027 VL キメラ プライマー2 | |
| 配列番号76 - 人工配列の記載 : KM4027 VH キメラ プライマー1 | |
| 配列番号77 - 人工配列の記載 : KM4027 VH キメラ プライマー2 | |
| 配列番号78 - 人工配列の記載 : KM4028 VL キメラ プライマー1 | |
| 配列番号79 - 人工配列の記載 : KM4028 VL キメラ プライマー2 | |
| 配列番号80 - 人工配列の記載 : KM4028 VH キメラ プライマー1 | 30 |
| 配列番号81 - 人工配列の記載 : KM4028 VH キメラ プライマー2 | |
| 配列番号82 - 人工配列の記載 : KM4030 VL キメラ プライマー1 | |
| 配列番号83 - 人工配列の記載 : KM4030 VL キメラ プライマー2 | |
| 配列番号84 - 人工配列の記載 : KM4030 VH キメラ プライマー1 | |
| 配列番号85 - 人工配列の記載 : KM4030 VH キメラ プライマー2 | |
| 配列番号86 - 人工配列の記載 : KM4031 VL キメラ プライマー1 | |
| 配列番号87 - 人工配列の記載 : KM4031 VL キメラ プライマー2 | |
| 配列番号88 - 人工配列の記載 : KM4031 VH キメラ プライマー1 | |
| 配列番号89 - 人工配列の記載 : KM4031 VH キメラ プライマー2 | |
| 配列番号90 - 人工配列の記載 : プライマー mfCD27 5UTR | 40 |
| 配列番号91 - 人工配列の記載 : プライマー mfCD27 3UTR | |
| 配列番号92 - カニクイザルCD27 cDNA配列 | |
| 配列番号93 - 人工配列の記載 : プライマー mfCD27toKAN 5 | |
| 配列番号94 - 人工配列の記載 : プライマー mfCD27HisKAN 3 | |
| 配列番号95 - 人工配列の記載 : Hisタグ付きカニクイザルCD27 cDNA配列 | |
| 配列番号96 - 人工配列の記載 : KM4030 HV0 アミノ酸配列 | |
| 配列番号97 - 人工配列の記載 : KM4030 LV0 アミノ酸配列 | |
| 配列番号98 - 人工配列の記載 : KM4030 HV0 塩基配列 | |
| 配列番号99 - 人工配列の記載 : KM4030 LV0 塩基配列 | |
| 配列番号100 - 人工配列の記載 : KM4030 HV2 塩基配列 | 50 |

- 配列番号101 - 人工配列の記載 : KM4030 HV2 アミノ酸配列
- 配列番号102 - 人工配列の記載 : KM4030 HV3 塩基配列
- 配列番号103 - 人工配列の記載 : KM4030 HV3 アミノ酸配列
- 配列番号104 - 人工配列の記載 : KM4030 HV5 塩基配列
- 配列番号105 - 人工配列の記載 : KM4030 HV5 アミノ酸配列
- 配列番号106 - 人工配列の記載 : KM4030 HV7 塩基配列
- 配列番号107 - 人工配列の記載 : KM4030 HV7 アミノ酸配列

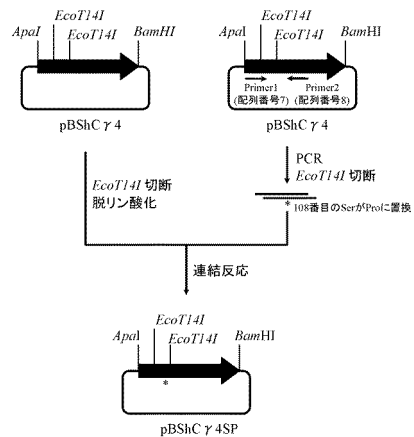
【 図 1 】



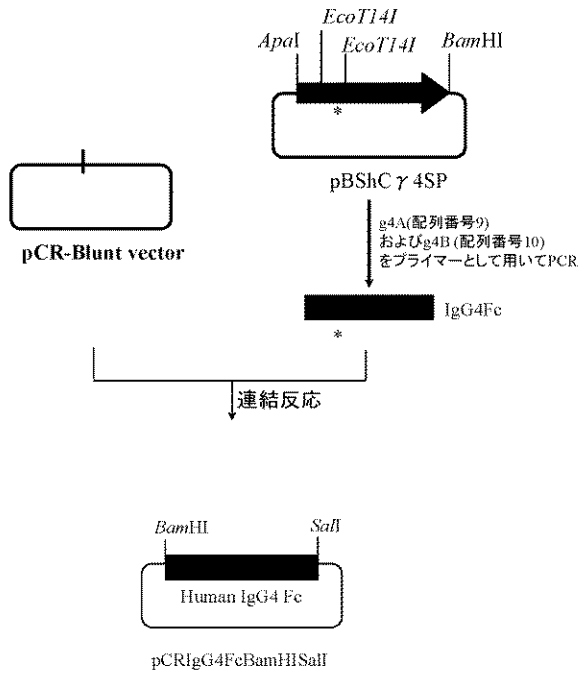
【 図 2 】



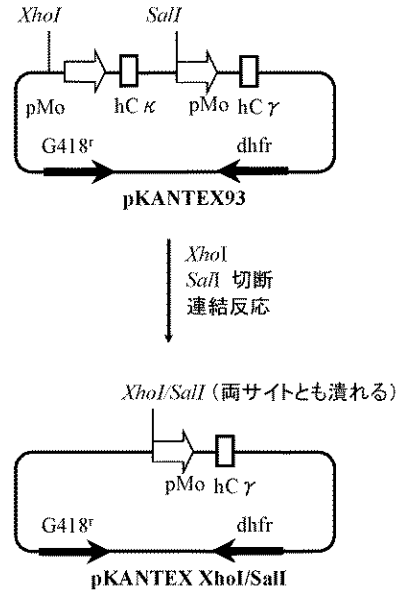
【 図 3 】



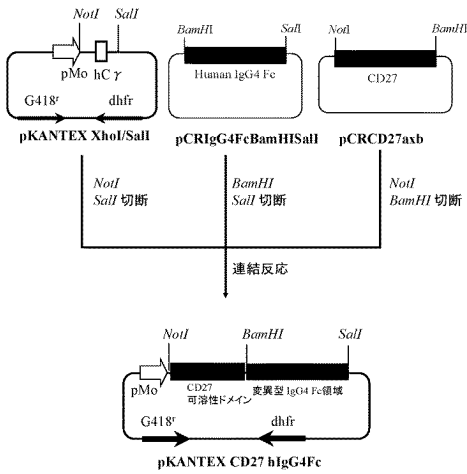
【 図 4 】



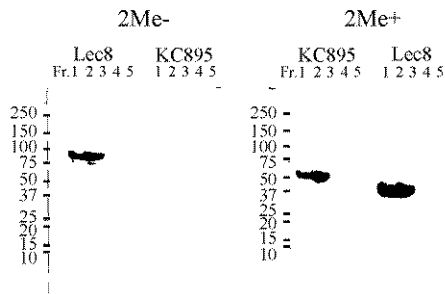
【 図 5 】



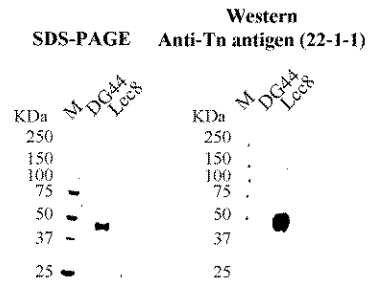
【 図 6 】



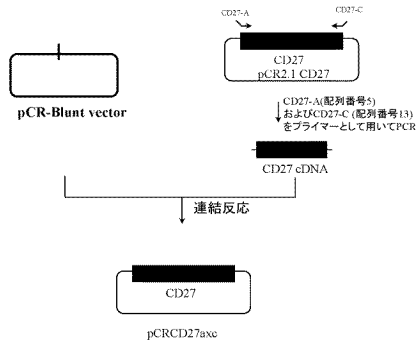
【 図 7 】



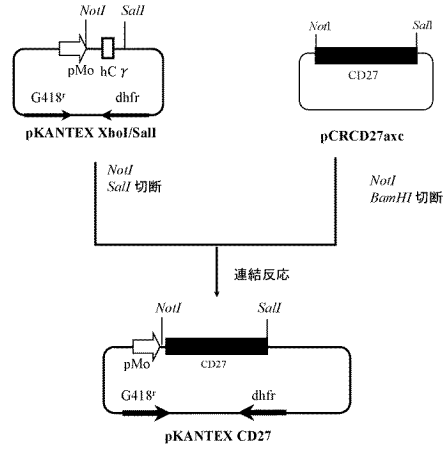
【 図 8 】



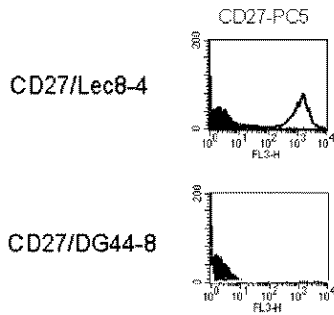
【 図 9 】



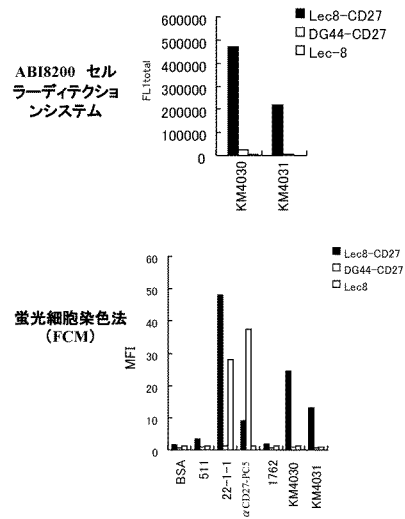
【 図 10 】



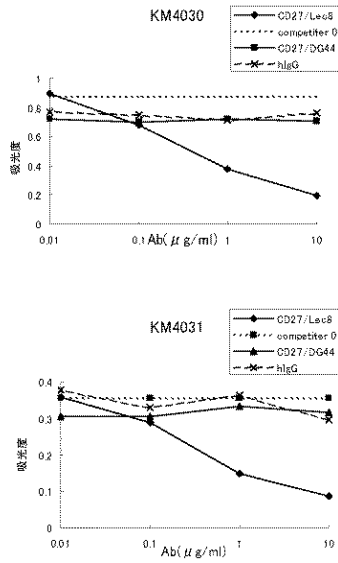
【 図 11 】



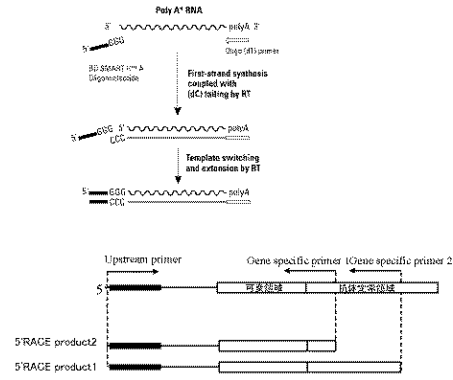
【 図 12 】



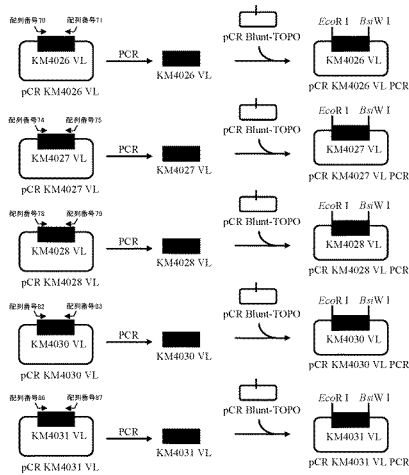
【 図 1 3 】



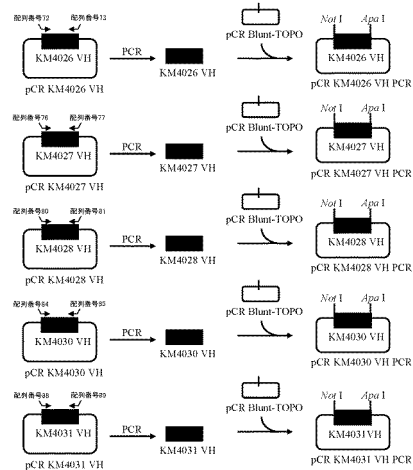
【 図 1 4 】



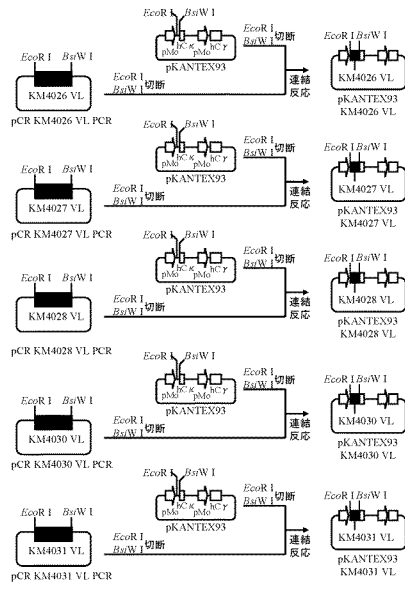
【 図 1 5 】



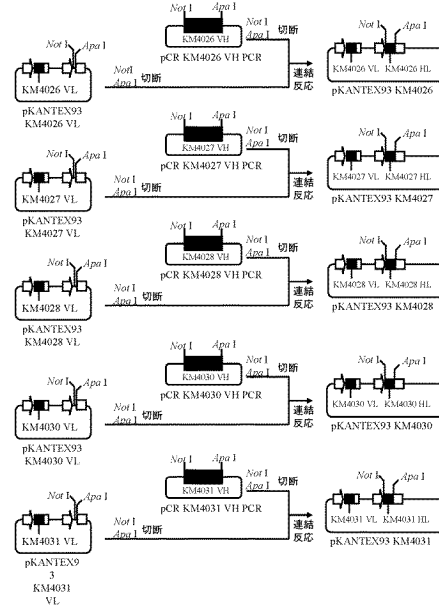
【 図 1 6 】



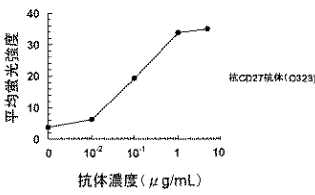
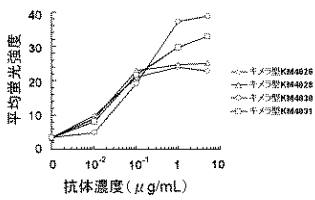
【 図 1 7 】



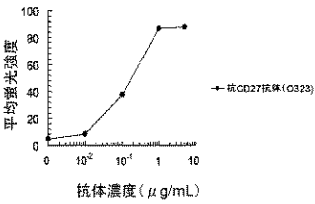
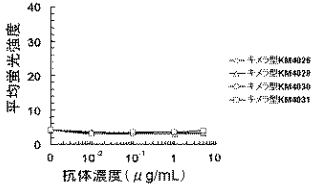
【 図 1 8 】



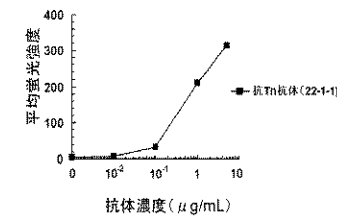
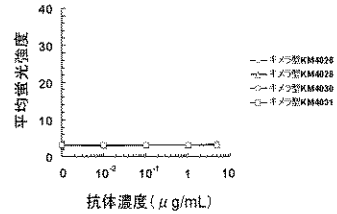
【 図 1 9 - 1 】



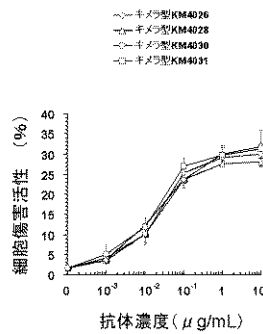
【 図 1 9 - 2 】



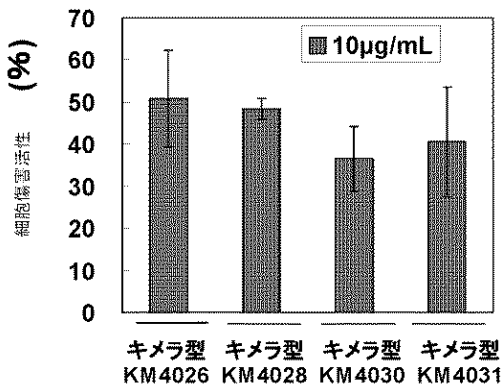
【 図 1 9 - 3 】



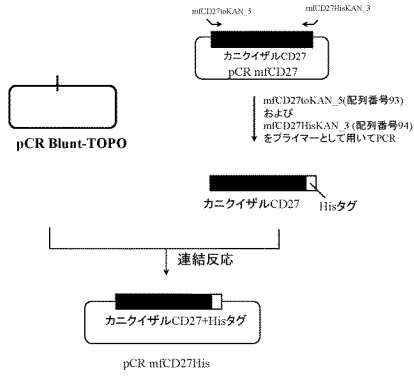
【 図 2 0 】



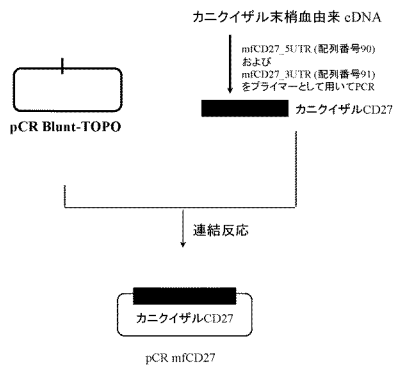
【 図 2 1 】



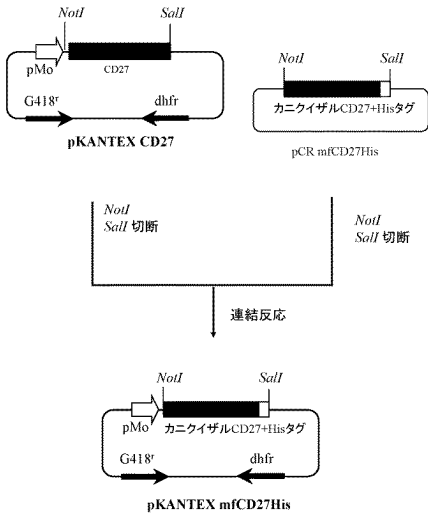
【 図 2 3 】



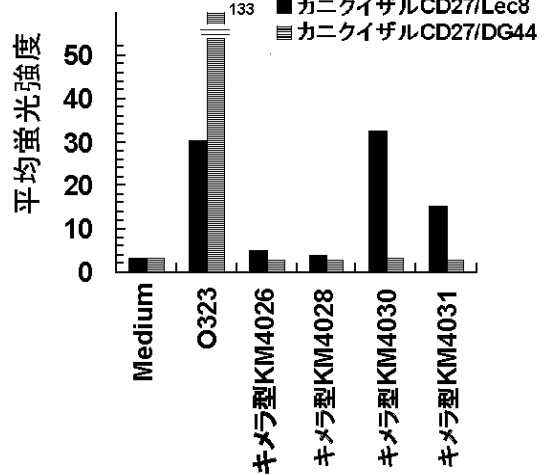
【 図 2 2 】



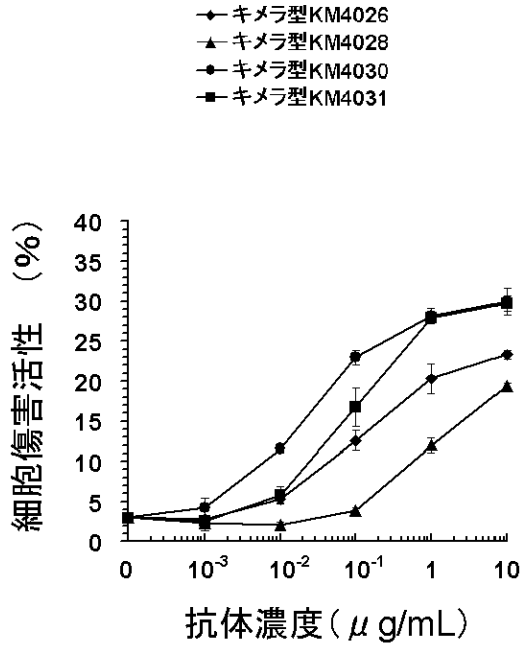
【 図 2 4 】



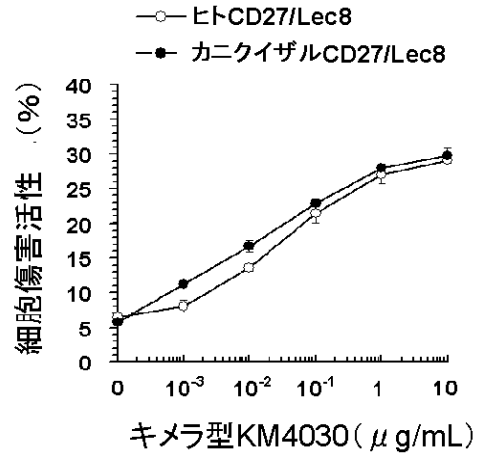
【 図 2 5 】



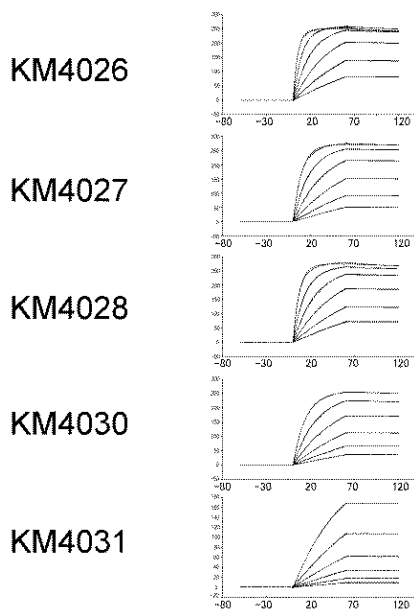
【 図 2 6 】



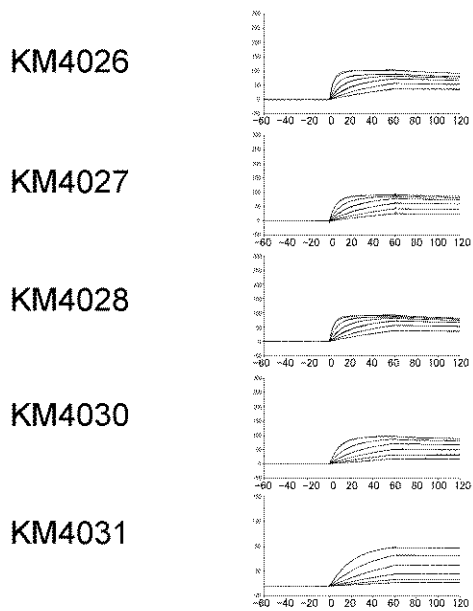
【 図 2 7 】



【 図 2 8 - 1 】



【 図 2 8 - 2 】



【配列表】

2010001908000001.app

【 国際調査報告 】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | International application No. PCT/JP2009/061996 |
|--|--|---|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07K16/28(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P13/12(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21 (2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)i, According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
| B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K16/28, A61K39/395, A61P13/12, A61P35/00, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N15/09, C12P21/08, G01N33/53 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2009 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2009 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2009 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), WPI, BIOSIS(STN), CAplus(STN), MEDLINE(STN) | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | Engelsberg A. et al., The golgi protein RCAS1 controls cell surface expression of tumor-associated O-linked glycan antigens., The Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(25), p.22998-23007 | 1-4, 8-11, 13-16, 19-24, 29-32 |
| Y | Loenen W. et al., The CD27 membrane receptor, a lymphocyte-specific member of the nerve growth factor receptor family, gives rise to a soluble form by protein processing that does not involve receptor endocytosis., Eur. J. Immunol., 1992, Vol.22, p.447-455 | 1-24, 29-32 |
| Y | Dong H. et al., CD148 and CD27 are expressed in B cell Lymphomas derived from both memory and naïve B cells., Leukemia and Lymphoma, 2002, Vol.43, p.1855-1858 | 1-24, 29-32 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex. | | |
| * Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family | | |
| Date of the actual completion of the international search 02 October, 2009 (02.10.09) | | Date of mailing of the international search report 13 October, 2009 (13.10.09) |
| Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office | | Authorized officer |
| Facsimile No. | | Telephone No. |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/061996

| C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|---|---|-----------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| A | Allen A. et al., Galactosylation of N- and O-linked carbohydrate moieties of IgA1 and IgG in IgA nephropathy., Clin. Exp. Immunol., 1995, Vol.100, p.470-474 | 1-24,29-32 |
| A | Hiki Y. et al., Association of asialo-galactosyl β 1-3 N-acetylgalactosamine on the hinge with a conformational instability of jacalin-reactive immunoglobulin A1 in immunoglobulin A nephropathy., Journal of the American Society of Nephrology, 1996, Vol.7, p.955-960 | 1-24,29-32 |
| A | WO 2007/079783 A1 (Institut Pasteur), 19 July, 2007 (19.07.07), & JP 2009-523137 A & EP 1808442 A1 & CA 2631582 A | 1-24,29-32 |
| A | Tarp M. et al., Identification of a novel cancer-specific immunodominant glycopeptide epitope in the MUC1 tandem repeat., Glycobiology, 2007, 17(2), 197-209 | 1-24,29-32 |
| A | Ju T. et al., Human tumor antigens Tn and sialyl Tn arise from mutations in Cosmc., Cancer Research, 2008.03.15, 68(6), p.1636-1646 | 1-24,29-32 |
| A | Foon K. et al., Colorectal cancer as a model for immunotherapy., Clinical Cancer Research, 1999, Vol.5, p.225-236 | 1-24,29-32 |
| A | Borst J. et al., CD27 and CD70 in T cell and B cell activation., Current Opinion in Immunology, 2005, Vol.17, p.275-281 | 1-24,29-32 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2009/061996

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
(International Patent Classification (IPC))

G01N33/53(2006.01)i

(According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/061996

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 25-28

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The inventions as set forth in the above claims relate to diagnostic methods to be practiced on the human body and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required to search.

2. Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest
the

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

| 国際調査報告 | | 国際出願番号 PCT/JP2009/061996 | | | | | | | | | |
|--|--|--|---------|-----------|------------|-------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|
| A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) | | | | | | | | | | | |
| Int.Cl. C07K16/28(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P13/12(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i | | | | | | | | | | | |
| B. 調査を行った分野 | | | | | | | | | | | |
| 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) | | | | | | | | | | | |
| Int.Cl. C07K16/28, A61K39/395, A61P13/12, A61P35/00, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N15/09, C12P21/08, G01N33/53 | | | | | | | | | | | |
| 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの | | | | | | | | | | | |
| <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2009年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2009年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2009年</td> </tr> </table> | | | | 日本国実用新案公報 | 1922-1996年 | 日本国公開実用新案公報 | 1971-2009年 | 日本国実用新案登録公報 | 1996-2009年 | 日本国登録実用新案公報 | 1994-2009年 |
| 日本国実用新案公報 | 1922-1996年 | | | | | | | | | | |
| 日本国公開実用新案公報 | 1971-2009年 | | | | | | | | | | |
| 日本国実用新案登録公報 | 1996-2009年 | | | | | | | | | | |
| 日本国登録実用新案公報 | 1994-2009年 | | | | | | | | | | |
| 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) | | | | | | | | | | | |
| JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), WPI, BIOSIS(STN), CPlus(STN), MEDLINE(STN) | | | | | | | | | | | |
| C. 関連すると認められる文献 | | | | | | | | | | | |
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求項の番号 | | | | | | | | | |
| X | Engelsberg A. et al., The golgi protein RCAS1 controls cell surface expression of tumor-associated O-linked glycan antigens., The Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(25), p. 22998-23007 | 1-4, 8-11, 13-16, 19-24, 29-32 | | | | | | | | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。 | | | | | | | | | | | |
| * 引用文献のカテゴリー | | の日の後に公表された文献 | | | | | | | | | |
| 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの | | 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの | | | | | | | | | |
| 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの | | 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの | | | | | | | | | |
| 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) | | 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの | | | | | | | | | |
| 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 | | 「&」同一パテントファミリー文献 | | | | | | | | | |
| 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願 | | | | | | | | | | | |
| 国際調査を完了した日 02.10.2009 | | 国際調査報告の発送日 13.10.2009 | | | | | | | | | |
| 国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号 | | 特許庁審査官 (権限のある職員) 滝口 尚良 | 4N 3846 | | | | | | | | |
| | | 電話番号 03-3581-1101 内線 3488 | | | | | | | | | |

| 国際調査報告 | | 国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 9 / 0 6 1 9 9 6 |
|-----------------------|--|--------------------------------------|
| C (続き) . 関連すると認められる文献 | | |
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求項の番号 |
| Y | Loenen W. et al., The CD27 membrane receptor, a lymphocyte-specific member of the nerve growth factor receptor family, gives rise to a soluble form by protein processing that does not involve receptor endocytosis., Eur. J. Immunol., 1992, Vol.22, p.447-455 | 1-24, 29-32 |
| Y | Dong H. et al., CD148 and CD27 are expressed in B cell Lymphomas derived from both memory and naïve B cells., Leukemia and Lymphoma, 2002, Vol.43, p.1855-1858 | 1-24, 29-32 |
| A | Allen A. et al., Galactosylation of N- and O-linked carbohydrate moieties of IgA1 and IgG in IgA nephropathy., Clin. Exp. Immunol., 1995, Vol.100, p.470-474 | 1-24, 29-32 |
| A | Hiki Y. et al., Association of asialo-galactosyl β 1-3 N-acetylgalactosamine on the hinge with a conformational instability of jacalin-reactive immunoglobulin A1 in immunoglobulin A nephropathy., Journal of the American Society of Nephrology, 1996, Vol.7, p.955-960 | 1-24, 29-32 |
| A | WO 2007/079783 A1 (Institut Pasteur) 2007.07.19, & JP 2009-523137 A & EP 1808442 A1 & CA 2631582 A | 1-24, 29-32 |
| A | Tarp M. et al., Identification of a novel cancer-specific immunodominant glycopeptide epitope in the MUC1 tandem repeat., Glycobiology, 2007, 17(2), 197-209 | 1-24, 29-32 |
| A | Ju T. et al., Human tumor antigens Tn and sialyl Tn arise from mutations in Cosmc., Cancer Research, 2008.03.15, 68(6), p.1636-1646 | 1-24, 29-32 |
| A | Foon K. et al., Colorectal cancer as a model for immunotherapy., Clinical Cancer Research, 1999, Vol.5, p.225-236 | 1-24, 29-32 |
| A | Borst J. et al., CD27 and CD70 in T cell and B cell activation., Current Opinion in Immunology, 2005, Vol.17, p.275-281 | 1-24, 29-32 |

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2009/061996

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求項 25-28 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
前記請求項に記載された発明は、人の身体の診断方法に係る発明であるから、国際調査を要しないものである。
2. 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるときの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

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 | |
| C 0 7 K 16/46 (2006.01) | C 0 7 K | 16/46 | |
| C 1 2 N 5/10 (2006.01) | C 1 2 N | 5/00 | 1 0 1 |
| G 0 1 N 33/53 (2006.01) | C 1 2 N | 5/00 | 1 0 2 |
| A 6 1 K 39/395 (2006.01) | G 0 1 N | 33/53 | V |
| A 6 1 P 35/00 (2006.01) | G 0 1 N | 33/53 | Y |
| A 6 1 P 13/12 (2006.01) | A 6 1 K | 39/395 | T |
| | A 6 1 P | 35/00 | |
| | A 6 1 P | 13/12 | |
| | A 6 1 K | 39/395 | N |
| | A 6 1 K | 39/395 | U |

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM), EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,SE,SI,S K,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW, BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,J P,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PE,PG ,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 檜浦 奈緒子

東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和発酵キリン株式会社 研究推進部内

(72)発明者 久保田 麗夫

東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和発酵キリン株式会社 研究推進部内

(72)発明者 古谷 安希子

東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和発酵キリン株式会社 研究推進部内

(72)発明者 神田 豊

東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和発酵キリン株式会社 研究推進部内

(72)発明者 佐藤 光男

東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和発酵キリン株式会社 研究推進部内

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA12 BA44 CA04 CA06 CA07 DA02 EA04 GA03 GA11

HA15

4B064 AG27 CA10 CA19 CA20 DA01 DA05 DA14

4B065 AA90X AA93Y AB01 AB05 AC14 BA02 CA25 CA44 CA46

4C085 AA14 AA19 BB01 BB12 CC02 CC23 DD63 EE01

4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 BA53 DA76 EA26 EA28 FA74

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

| | | | |
|-------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 抗CD27抗体 | | |
| 公开(公告)号 | JPWO2010001908A1 | 公开(公告)日 | 2011-12-22 |
| 申请号 | JP2010519081 | 申请日 | 2009-06-30 |
| 申请(专利权)人(译) | 协和発酵キリン株式会社 | | |
| [标]发明人 | 森勝弘 檜浦奈緒子 久保田麗夫 古谷安希子 神田豊 佐藤光男 | | |
| 发明人 | 森 勝弘 檜浦 奈緒子 久保田 麗夫 古谷 安希子 神田 豊 佐藤 光男 | | |
| IPC分类号 | C07K16/28 C12N15/09 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/08 C07K16/46 C12N5/10 G01N33/53 A61K39/395 A61P35/00 A61P13/12 | | |
| CPC分类号 | A61P13/12 A61P35/00 C07K16/2878 C07K2317/24 C07K2317/56 C07K2317/565 C07K2317/734 C07K2317/92 C12R1/91 G01N33/57484 G01N33/6863 G01N2333/70578 G01N2400/02 G01N2800/347 A61K39/395 | | |
| FI分类号 | C07K16/28 C12N15/00.ZNA.A C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/08 C07K16/46 C12N5/00.101 C12N5/00.102 G01N33/53.V G01N33/53.Y A61K39/395.T A61P35/00 A61P13/12 A61K39/395.N A61K39/395.U | | |
| F-TERM分类号 | 4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/BA44 4B024/CA04 4B024/CA06 4B024/CA07 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA03 4B024/GA11 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/DA01 4B064/DA05 4B064/DA14 4B065/AA90X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/AA14 4C085/AA19 4C085/BB01 4C085/BB12 4C085/CC02 4C085/CC23 4C085/DD63 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/BA53 4H045/DA76 4H045/EA26 4H045/EA28 4H045/FA74 | | |
| 优先权 | 2008171353 2008-06-30 JP | | |
| 其他公开文献 | JPWO2010001908A5 JP5425775B2 | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

本发明提供了一种特异性识别含有未连接半乳糖并结合至细胞外区域的O-连接糖链的CD27的单克隆抗体及其使用方法。根据本发明，一种单克隆抗体或其抗体片段，其特异性识别含有未结合半乳糖的O-连接糖链的CD27，并结合至细胞外区域，即产生该抗体的杂交瘤，该抗体 编码载体的DNA，含有该DNA的载体，通过转化载体获得的转化体，使用杂交瘤或转化体生产抗体或抗体片段的方法，以及抗体或抗体片段。可以提供包含作为活性成分的涉及CD27的疾病的诊断或治疗剂。

