

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2001年4月5日 (05.04.2001)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 01/23431 A1

(51) 国際特許分類7: C07K 16/18, 19/00, 14/55, C12N  
15/13, 15/62, 15/26, 5/10, C12P 21/08, A61K 39/395,  
A61P 35/00, G01N 33/566, 33/577

東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和醸酵工業株式会  
社 東京研究所内 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/06775

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,  
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,  
DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL,  
IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV,  
MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT,  
RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA,  
UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(22) 国際出願日: 2000年9月29日 (29.09.2000)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,  
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM,  
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許  
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,  
LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI,  
CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(30) 優先権データ:  
特願平11/278292 1999年9月30日 (30.09.1999) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 協和醸酵  
工業株式会社 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.)  
[JP/JP]; 〒100-8185 東京都千代田区大手町一丁目6番  
1号 Tokyo (JP).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

— 明細書とは別に規則13の2に基づいて提出された  
生物材料の寄託に関する表示。

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 花井陳雄 (HANAI,  
Nobuo) [JP/JP]. 中村和靖 (NAKAMURA, Kazuyasu)  
[JP/JP]. 丹羽倫平 (NIWA, Rinpei) [JP/JP]; 〒194-8533

2文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: DERIVATIVES OF ANTIBODY AGAINST GANGLIOSIDE GM2

(54) 発明の名称: ガングリオシドGM2に対する抗体の誘導体

(57) Abstract: Derivatives of an antibody against ganglioside GM2 (hereinafter referred to as GM2); fragments of the antibody against GM2; and diagnostics and remedies for cancer with the use of the above derivatives and antibody fragments.

(57) 要約:

本発明は、ガングリオシドGM2 (以下、GM2と表記する) に対する抗体の誘導体、  
およびGM2に対する抗体の断片、ならびに上記の誘導体および抗体断片を用いる癌  
の診断薬および治療薬に関する。

WO 01/23431 A1

## 明 細 書

## ガングリオシドGM2に対する抗体の誘導体

## 技術分野

本発明は、ガングリオシドGM2（以下、GM2と表記する）に対する抗体およびその抗体断片に関する。本発明は更に、上記の誘導体および抗体断片をコードするDNA配列に関する。本発明は、該DNA配列を含んでなる発現ベクター、および該発現ベクターにより形質転換された細胞に関する。本発明は更に、該形質転換細胞を用いた上記の誘導体および抗体断片の製造方法、ならびに上記の誘導体および抗体断片を用いる癌の診断薬および治療薬に関する。

## 背景技術

ハイブリドーマ法による抗体作製技術の確立により、ヒト以外の動物を免疫して、所望の抗原結合特異性を有する抗体を作製することが可能となった[ネイチャー(Nature), 256, 495 (1975)]。そして、抗体はその高い抗原結合活性、抗原結合特異性および物理的安定性から、ヒトの各種疾患の予防、診断および治療への応用が検討された。しかし、ヒト以外の動物の抗体、例えばマウス抗体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 : 以下、HAMAと表記する) が誘導されてしまう。誘導された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[ジャーナル・オブ・クリニカル・オンコロジー(J. Clin. Oncol.), 2, 881 (1984) ; ブラッド(Blood), 65, 1349 (1985) ; ジャーナル・オブ・ザ・ナショナル・キャンサー・インスティテュート(J. Natl. Cancer Inst.), 80, 932 (1988) ; プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 82, 1242 (1985)]、投与されたマウス抗体の血中からの消失を速め[ジャーナル・オブ・ニュークlear・メディシン(J. Nucl. Med.), 26, 1011 (1985) ; ブラッド(Blood), 65, 1349 (1985) ; ジャーナル・オブ・ザ・ナショナル・キャンサー・インスティテュート(J. Natl. Cancer Inst.), 80, 937 (1988)]、マウス抗体の治療効果を減じてしまうことが知られている[ザ・ジャーナル・オブ・イムノロジー(J. Immunol.), 135, 1530 (1985); キャンサー・リサーチ(Cancer Res.),

46, 6489 (1986)]。

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ヒト以外の動物の抗体をヒト型キメラ抗体或いはヒト型相補性決定領域 (Complementarity Determining Region : 以下、CDRと表記する) 移植抗体などのヒト化抗体にすることが試みられている。ヒト型キメラ抗体とは、抗体可変領域 (以下、V領域と表記する) がヒト以外の動物の抗体で、定常領域 (以下、C領域と表記する) がヒト抗体である抗体であり[プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 81, 6851 (1984)]、ヒト型CDR移植抗体とは、ヒト以外の動物の抗体のV領域中のCDRのアミノ酸配列をヒト抗体の適切な位置に移植した抗体である[ネイチャー(Nature), 321, 522 (1986)]。これらのヒト化抗体は、マウス抗体等のヒト以外の動物の抗体に比較してヒトへの臨床応用上、様々な利点を有している。例えば、免疫原性および血中での安定性に関しては、ヒト型キメラ抗体では、ヒトに投与した場合、マウス抗体に比べて血中半減期が約6倍伸びたことが報告されている[プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 86, 4220 (1989)]。ヒト型CDR移植抗体では、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4~5倍伸びたことが報告されている[ザ・ジャーナル・オブ・イムノロジー(J. Immunol.), 147, 1352 (1991)]。即ち、ヒト化抗体は、ヒト以外の動物の抗体に比べ、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。また、特に抗腫瘍抗体としての応用を考えた場合、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障害活性 (以下、CDC活性と表記する) や抗体依存性細胞障害活性 (以下、ADCC活性と表記する) 等の細胞障害活性の高さがその治療効果に重要であるが、こうした細胞障害活性に関しても、ヒトにおいてはヒト以外の動物の抗体のFc領域よりも、ヒト抗体のFc領域の方がヒト補体成分や、単核球、マクロファージ、NK細胞のFc受容体を細胞表面に有するヒトエフェクター細胞をより効率的に活性化できる為、より優れていることが報告されている。例えば、ガングリオシドGD2 (以下、GD2と表記する) に対するマウス抗体 (以下、抗GD2マウス抗体と表記する) は、ヒト抗体のFc領域を有するヒト型キメラ抗体 (以下、抗GD2キメラ抗体と表記する) に変換することにより、ヒトエフェクター細胞による腫瘍細胞障害活性が上昇することが

報告されており[ザ・ジャーナル・オブ・イムノロジー(J. Immunol.), 144, 1382 (1990)]、また、CAMPATH-1抗原に対するヒト型CDR移植抗体についても同様の結果が報告されている[ネイチャー(Nature), 332, 323 (1988)]。

以上の結果は、ヒトへの臨床応用に用いる抗体としては、ヒト化抗体の方がマウス抗体等のヒト以外の動物の抗体より望ましいことを明確に示している。

シアル酸を含有する糖脂質の一種であるガングリオシドは動物の細胞膜を構成しており、親水性側鎖である糖鎖と、疎水性側鎖であるスフィンゴシンおよび脂肪酸とから構成される分子である。ガングリオシドの種類と発現量は、細胞種、臓器種、動物種等によって異なることが知られている。更に細胞が癌化する過程においては、ガングリオシドの発現が量的および質的に変化を起すことも知られている[キャンサー・リサーチ(Cancer Res.), 45, 2405 (1985)]。特に、本発明で注目したGM2は、正常細胞にはごく微量にしか存在しないが、肺癌、メラノーマ、グリオーマ、ニューロblastoma等の癌細胞では多量に存在し[キャンサー・リサーチ(Cancer Res.), 45, 2405 (1985) ; プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 80, 5392 (1983) ; ジャーナル・オブ・ナショナル・キャンサー・インスティテュート(J. Natl. Cancer Inst.), 78, 45 (1987) ; キャンサー・リサーチ(Cancer Res.), 50, 7444 (1990)]、GM2に対する抗体(以下、抗GM2抗体と表記する)は、これらの癌の診断、治療に有用であると考えられている[ランセット(Lancet), I, 786 (1989)]。更に近年、GM2のメラノーマ治療におけるワクチンとしての有用性が示され、投与された患者血清中に高い抗GM2抗体価の上昇が観察されている[プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 92, 2805 (1995)]。また、サイトメガロウイルスの感染に伴って抗GM2抗体価の上昇が認められることも報告され[ジャーナル・オブ・ザ・ニューロロジカル・サイエンシズ(J. Neurological Sciences), 154, 14 (1998) ; アナルズ・オブ・ザ・ニューヨーク・アカデミー・オブ・サイエンシズ(Annals New York Academy Sciences), 845, 423 (1998)]、各種の細菌、ウイルス感染におけるGM2の役割が注目され、抗GM2抗体の各種感染症への適応も期待されている。

以上の観点から、本発明者らは抗GM2抗体のより効果的なヒトへの臨床応用を目的として、本発明者らが作製した抗GM2マウス抗体KM796(特開平6-205694)を基

に、マウス抗体と同等の活性を有するGM2に対するヒト化抗体（以下、抗GM2ヒト化抗体と表記する）の作製を試み、その結果、抗GM2ヒト型キメラ抗体（以下、抗GM2キメラ抗体と表記する）KM966および抗GM2ヒト型CDR移植抗体（以下、抗GM2CDR移植抗体と表記する）KM8969を作製している（特開平10-257893）。抗GM2キメラ抗体KM966および抗GM2CDR移植抗体KM8969は、抗GM2マウス抗体に比べヒトにおいて免疫原性が低下し、血中半減期が延長して長期間に渡る治療効果、更にはより強い細胞障害活性に基づく高い抗腫瘍効果が期待されている。

腫瘍に対するヒト化抗体は、上記の様にヒト抗体のFc領域を介した補体成分の結合、活性化に基づくCDC活性およびFc受容体との結合に基づくADCC活性等によって抗体単独の使用によっても治療効果が期待されているが、更に他の分子との併用により、その効果をより高めることが検討されている。例えば、それら分子の一つとしてサイトカインが用いられている。サイトカインは免疫反応における細胞間相互作用を司る種々の液性因子の総称である。ADCC活性は、単核球、マクロファージ、NK細胞のFc受容体を細胞表面に有するエフェクター細胞によって担われており[ザ・ジャーナル・オブ・イムノロジー(J. Immunol.), 138, 1992 (1987)]、種々のサイトカインはこれらのエフェクター細胞を活性化することから、ADCC活性を高める目的で、抗体と組み合わせて投与することが行われている。例えば、抗GD2キメラ抗体ch14.18に関しては、サイトカインであるヒトインターロイキン2（以下、hIL-2と表記する）或いはヒト顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子（以下、hGM-CSFと表記する）と組み合わせてヒトに投与することが行われた[キヤンサー(Cancer), 80, 317 (1997) ; キヤンサー・ジャーナル・フロム・サイエンティフィック・アメリカン(Cancer J. From Scientific American), 3, S121 (1997)]。しかし、これらの併用療法は、サイトカインの全身性の副作用から期待された程の効果は認められていない。そこで、サイトカインを標的組織のみに効率的に到達させるため、抗体分子とサイトカインを融合させた蛋白質が作製された。

hIL-2に関しては、抗GD2キメラ抗体ch14.18との融合蛋白質が遺伝子工学的に作製され、マウスを用いた実験でその抗腫瘍効果が抗GD2キメラ抗体ch14.18およびhIL-2の同時投与よりも優れていることが報告されている[プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 89, 1428 (1992) ; プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカ

デミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 91, 9626 (1994) ; キャンサー・イムノロジー・イムノセラピー(Cancer Immunol., Immunother.), 42, 88 (1996) ; ブラッド(Blood), 91, 1706 (1998)]。現在では、サイトカインに限らず他の蛋白質(トキシン、酵素等)、更には放射性同位元素、低分子の薬剤等を抗体に結合させた各種誘導体の作製も行われ、それらの臨床応用が検討されている[ニューイングランド・ジャーナル・オブ・メディシン(New Eng. J. Med.), 329, 459 (1993) ; アンチキャンサー・リサーチ(Anticancer Res.), 17, 1735 (1997) ; ブラッド(Blood), 78, 1173 (1991) ; ジャーナル・オブ・クリニカル・オンコロジー(J. Clin. Oncol.), 15, 723 (1997) ; バイオコンジュゲート・ケミストリー(Bioconjugate Chem.), 7, 606 (1997) ; キャンサー(Cancer), 61, 881 (1988) ; ジャパニーズ・ジャーナル・オブ・キャンサー・リサーチ(Jpn. J. Cancer Res.), 85, 167 (1994) ; アンチボディ・イムノコンジュゲーツ・アンド・ラディオファーマシューティカルズ(Antibody Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals), 3, 60 (1990) ; サージェリー(Surgery), 106, 533 (1989)]。これらの誘導体は、抗体分子の結合特異性に従って蛋白質(サイトカイン、トキシン、酵素等)、放射性同位元素、低分子の薬剤等を標的組織周辺に集積させることで、より効果的で副作用の少ない診断、治療を可能にすることが期待されている。抗GM2抗体に関しても、蛋白質(サイトカイン、トキシン、酵素等)、放射性同位元素、低分子の薬剤等を融合させた誘導体が作製できれば、抗体単独よりも更に高い診断、治療効果が期待されるが、現在までにこれら誘導体の作製の報告はない。

一方、最近の蛋白質工学、遺伝子工学の進歩により、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、一本鎖抗体(scFv) [サイエンス(Science), 242, 423 (1988)]、ジスルフィド安定化V領域(dsFv)断片[モレキュラー・イムノロジー(Molecular Immunol.), 32, 249 (1995)]等の、より分子量の小さい抗体断片の作製が可能となっている。これら抗体断片は、完全な抗体分子に比べ分子量が小さいため、標的組織への移行性に優れている[キャンサー・リサーチ(Cancer Res.), 52, 3402 (1992)]。これらの抗体断片についても、ヒトへの臨床応用の場合には、マウス抗体等のヒト以外の動物の抗体よりもヒト化抗体に由来する方がより望ましいと考えられる。

抗体断片に関しては、抗GD2マウス抗体由来の一本鎖抗体は作製されているが[

## 6

ハイブリドーマ(Hybridoma), 16, 335 (1997)], それ以外の抗体断片の作製の報告はなく、抗GM2抗体由来の抗体断片に関してはマウス抗体およびヒト化抗体に由来する抗体断片の作製の報告はない。従って、抗GM2ヒト化抗体に由来する断片が作製できれば、ヒトにおいて優れた標的組織移行性を有し、かつ、免疫原性が低下することが期待される。更に抗GM2抗体由来の断片についても、上記で述べた蛋白質(サイトカイン、トキシン、酵素等)、放射性同位元素、低分子の薬剤等を融合させた各種の誘導体が作製できれば、その治療効果がより高まることが期待される。

## 発明の開示

本発明ではこれまでに知られている抗GM2抗体の治療効果の増強を目的に、該抗体の抗体断片を作製した。更に、抗GM2抗体または該抗体断片と放射性同位元素、蛋白質または低分子の薬剤とを結合させた抗体の誘導体を作製した。具体的には、抗GM2CDR移植抗体KM8969のH鎖をコードするcDNAの3'末端にhIL-2をコードするcDNAを繋げたcDNAを構築し、該cDNAおよびKM8969のL鎖をコードするcDNAを動物細胞用発現ベクターにクローニングして抗GM2CDR移植抗体KM8969とhIL-2との融合蛋白質(以下、KM8969-hIL-2と表記する)の発現ベクターを構築した。該KM8969-hIL-2発現ベクターを動物細胞へ導入することによりKM8969-hIL-2を培養上清中に生産する形質転換クローンKM8969hIL2(FERM BP-6792)を作製した。形質転換クローンKM8969hIL2の培養上清よりKM8969-hIL-2を精製し、KM8969-hIL-2が抗GM2CDR移植抗体KM8969と同等の抗原結合活性、抗原結合特異性およびhIL-2依存性増殖を示す細胞株に対してhIL-2と同等の増殖支持活性を示すことを見出した。更にはヒト末梢血単核球画分を用いた細胞障害活性において抗GM2CDR移植抗体KM8969に比べ、KM8969-hIL-2の活性が増強されることを確認し、本発明を完成させた。

本発明は、以下の(1)~(75)に関する。

(1) ガングリオシドGM2に特異的に反応するモノクローナル抗体またはその抗体断片と、放射性同位元素、蛋白質または低分子の薬剤とを結合させた抗体の誘導体。

(2) ガングリオシドGM2に特異的に反応するモノクローナル抗体が、ハイブ

リドーマが産生する抗体、ヒト化抗体およびヒト抗体から選ばれる抗体である、上記（１）記載の抗体の誘導体。

（３）モノクローナル抗体のH鎖V領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号9、10および11で示されるアミノ酸配列を含む上記（１）または（２）記載の抗体の誘導体。

（４）モノクローナル抗体のL鎖V領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号12、13および14で示されるアミノ酸配列を含む上記（１）または（２）記載の抗体の誘導体。

（５）モノクローナル抗体の重鎖（H鎖）可変領域（V領域）のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号9、10および11、軽鎖（L鎖）V領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号12、13および14で示されるアミノ酸配列を含む上記（１）または（２）記載の抗体の誘導体。

（６）ハイブリドーマが産生する抗体がKM796（FERM BP-3340）である、上記（２）記載の抗体の誘導体。

（７）ヒト化抗体が、ヒト型キメラ抗体またはヒト型CDR移植抗体である、上記（２）記載の抗体の誘導体。

（８）ヒト型キメラ抗体が、ガングリオシドGM2に対するハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のアミノ酸配列を含む、上記（７）記載のヒト型キメラ抗体の誘導体。

（９）ヒト型キメラ抗体が、ガングリオシドGM2に対するハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域、ならびにヒト抗体のH鎖定常領域（C領域）およびL鎖C領域のアミノ酸配列を含む、上記（７）記載のヒト型キメラ抗体の誘導体。

（１０）H鎖V領域が配列番号7で示されるアミノ酸配列を含む、上記（８）または（９）記載のヒト型キメラ抗体の誘導体。

（１１）L鎖V領域が配列番号8で示されるアミノ酸配列を含む、上記（８）または（９）記載のヒト型キメラ抗体の誘導体。

（１２）H鎖V領域が配列番号7で示されるアミノ酸配列を含み、L鎖V領域が配列番号8で示されるアミノ酸配列を含む上記（８）または（９）記載のヒト型キメラ抗体の誘導体。



(13) H鎖V領域が配列番号7で示されるアミノ酸配列を含み、L鎖V領域が配列番号8で示されるアミノ酸配列を含む上記(8)または(9)記載のヒト型キメラ抗体KM966の誘導体。

(14) ヒト型CDR移植抗体が、ガングリオシドGM2に対するモノクローナル抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のCDRのアミノ酸配列を含む、上記(7)記載のヒト型CDR移植抗体の誘導体。

(15) ヒト型CDR移植抗体が、ガングリオシドGM2に対するモノクローナル抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のCDRとヒト抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のフレームワーク領域(FR)のアミノ酸配列を含む、上記(7)記載のヒト型CDR移植抗体の誘導体。

(16) ヒト型CDR移植抗体が、ガングリオシドGM2に対するモノクローナル抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のCDR、ヒト抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のFR、ならびにヒト抗体のH鎖C領域およびL鎖C領域のアミノ酸配列を含む、上記(7)記載のヒト型CDR移植抗体の誘導体。

(17) 抗体のH鎖V領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号9、10および11で示されるアミノ酸配列を含む、上記(14)～(16)のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体の誘導体。

(18) 抗体のL鎖V領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号12、13および14で示されるアミノ酸配列を含む、上記(14)～(16)のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体の誘導体。

(19) 抗体のH鎖V領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号9、10および11で示されるアミノ酸配列を含み、L鎖V領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号12、13および14で示されるアミノ酸配列を含む、上記(14)～(16)のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体の誘導体。

(20) 抗体のH鎖V領域が配列番号15で示されるアミノ酸配列を含む上記(14)～(16)のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体の誘導体。

(21) 抗体のL鎖V領域が配列番号16で示されるアミノ酸配列を含む上記(14)～(16)のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体の誘導体。

(22) 抗体のH鎖V領域が配列番号15で示されるアミノ酸配列を含み、L鎖V領域が配列番号16で示されるアミノ酸配列を含む上記(14)～(16)のいずれ

か1項に記載のヒト型CDR移植抗体の誘導体。

(23) 抗体のH鎖V領域が配列番号15で示されるアミノ酸配列を含み、L鎖V領域が配列番号16で示されるアミノ酸配列を含む上記(14)～(16)のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体KM8969の誘導体。

(24) 抗体断片が、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、一本鎖抗体(scFv)、ジスルフィド安定化V領域断片(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上記(1)記載の抗体断片の誘導体。

(25) 抗体断片が、ガングリオシドGM2に対するハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のアミノ酸配列を含む、上記(24)記載の抗体断片の誘導体。

(26) 抗体断片が、ガングリオシドGM2に対するハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域、ならびにヒト抗体のH鎖C領域およびL鎖C領域のアミノ酸配列を含む、上記(24)記載の抗体断片の誘導体。

(27) 抗体断片が、抗体のH鎖V領域が配列番号7で示されるアミノ酸配列を含む、上記(25)または(26)記載の抗体断片の誘導体。

(28) 抗体断片が、抗体のL鎖V領域が配列番号8で示されるアミノ酸配列を含む、上記(25)または(26)記載の抗体断片の誘導体。

(29) 抗体断片が、抗体のH鎖V領域が配列番号7で示されるアミノ酸配列を含み、抗体のL鎖V領域が配列番号8で示されるアミノ酸配列を含む、上記(25)または(26)記載の抗体断片の誘導体。

(30) 抗体断片が、抗体のH鎖V領域が配列番号7で示されるアミノ酸配列を含み、抗体のL鎖V領域が配列番号8で示されるアミノ酸配列を含む、上記(25)記載のハイブリドーマが産生する抗体KM796の抗体断片の誘導体。

(31) 抗体断片が、抗体のH鎖V領域が配列番号7で示されるアミノ酸配列を含み、抗体のL鎖V領域が配列番号8で示されるアミノ酸配列を含む、上記(26)記載のヒト型キメラ抗体KM966の抗体断片の誘導体。

(32) 抗体断片が、ガングリオシドGM2に対するヒト型CDR移植抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のアミノ酸配列を含む、上記(24)記載の抗体断片の誘導体。

(33) 抗体断片が、ガングリオシドGM2に対するヒト型CDR移植抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域、ならびにヒト抗体のH鎖C領域およびL鎖C領域のアミノ酸配列

を含む、上記（24）記載の抗体断片の誘導体。

（34） 抗体断片が、抗体のH鎖V領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号9、10および11で示されるアミノ酸配列を含む、上記（32）または（33）記載の抗体断片の誘導体。

（35） 抗体断片が、抗体のL鎖V領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号12、13および14で示されるアミノ酸配列を含む、上記（32）または（33）記載の抗体断片の誘導体。

（36） 抗体断片が、抗体のH鎖V領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号9、10および11で示されるアミノ酸配列を含み、L鎖V領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号12、13および14で示されるアミノ酸配列を含む、上記（32）または（33）記載の抗体断片の誘導体。

（37） 抗体断片が、抗体のH鎖V領域が配列番号15で示されるアミノ酸配列を含む、上記（32）または（33）記載の抗体断片の誘導体。

（38） 抗体断片が、抗体のL鎖V領域が配列番号16で示されるアミノ酸配列を含む、上記（32）または（33）記載の抗体断片の誘導体。

（39） 抗体断片が、抗体のH鎖V領域が配列番号15、抗体のL鎖V領域が配列番号16で示されるアミノ酸配列を含む、上記（32）または（33）記載の抗体断片の誘導体。

（40） 抗体断片が、抗体のH鎖V領域が配列番号15で示されるアミノ酸配列を含み、抗体のL鎖V領域が配列番号16で示されるアミノ酸配列を含む、上記（32）または（33）記載のヒト型CDR移植抗体KM8969の抗体断片の誘導体。

（41） 蛋白質がサイトカインである、上記（1）記載のモノクローナル抗体の誘導体またはその抗体断片の誘導体。

（42） サイトカインがヒトインターロイキン2（hIL-2）である上記（41）記載のモノクローナル抗体の誘導体またはその抗体断片の誘導体。

（43） 抗体のH鎖V領域とhIL-2との融合蛋白質が配列番号1記載のアミノ酸配列を有し、抗体のL鎖V領域が配列番号2記載のアミノ酸配列を有する上記（1）記載の抗体の誘導体。

（44） 抗体の誘導体が、ヒト型CDR移植抗体KM8969とhIL-2とからなる上記（41）～（43）のいずれか1項に記載の抗体の誘導体。

(45) 抗体の誘導体が、ヒト型CDR移植抗体KM8969とhIL-2とからなる上記(41)～(43)のいずれか1項に記載の抗体の誘導体KM8969-hIL-2。

(46) 上記(1)～(45)のいずれか1項に記載のガングリオシドGM2に特異的に反応するモノクローナル抗体の誘導体またはその抗体断片の誘導体をコードするDNA。

(47) 上記(46)に記載のDNAを含有する組換えベクター。

(48) 上記(47)に記載の組換えベクターを宿主細胞に導入して得られる形質転換株。

(49) 上記(45)に記載の誘導体を生産する形質転換株KM8969hIL2 (FERM BP-6792)。

(50) 上記(48)または(49)に記載の形質転換株を培地に培養し、培養物中に上記(1)～(45)のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体の誘導体またはその抗体断片の誘導体を生成蓄積させ、該培養物から該抗体の誘導体またはその抗体断片の誘導体を採取することを特徴とする製造方法。

(51) ガングリオシドGM2に特異的に反応する抗体断片。

(52) 抗体断片が、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、一本鎖抗体(scFv)、ジスルフィド安定化V領域断片(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上記(51)に記載の抗体断片。

(53) 抗体断片が、ガングリオシドGM2に対するハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のアミノ酸配列を含む、上記(51)に記載の抗体断片。

(54) 抗体断片が、ガングリオシドGM2に対するハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域、ならびにヒト抗体のH鎖C領域およびL鎖C領域のアミノ酸配列を含む、上記(51)に記載の抗体断片。

(55) 抗体断片が、抗体のH鎖V領域が配列番号7で示されるアミノ酸配列を含む、上記(53)または(54)に記載の抗体断片。

(56) 抗体断片が、抗体のL鎖V領域が配列番号8で示されるアミノ酸配列を含む、上記(53)または(54)に記載の抗体断片。

(57) 抗体断片が、抗体のH鎖V領域が配列番号7で示されるアミノ酸配列を含み、抗体のL鎖V領域が配列番号8で示されるアミノ酸配列を含む、上記(53)ま

たは（５４）記載の抗体断片。

（５８） 抗体断片が、抗体のH鎖V領域が配列番号7で示されるアミノ酸配列を含み、抗体のL鎖V領域が配列番号8で示されるアミノ酸配列を含む、上記（５３）記載のハイブリドーマが産生する抗体KM796の抗体断片。

（５９） 抗体断片が、抗体のH鎖V領域が配列番号7で示されるアミノ酸配列を含み、抗体のL鎖V領域が配列番号8で示されるアミノ酸配列を含む、上記（５３）または（５４）記載のヒト型キメラ抗体KM966の抗体断片。

（６０） 抗体断片が、ガングリオシドGM2に対するヒト型CDR移植抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のアミノ酸配列を含む、上記（５２）記載の抗体断片。

（６１） 抗体断片が、ガングリオシドGM2に対するヒト型CDR移植抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域、ならびにヒト抗体のH鎖C領域およびL鎖C領域のアミノ酸配列を含む、上記（５２）記載の抗体断片。

（６２） 抗体断片が、抗体のH鎖V領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号9、10および11で示されるアミノ酸配列を含む、上記（６０）または（６１）記載の抗体断片。

（６３） 抗体断片が、抗体のL鎖V領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号12、13および14で示されるアミノ酸配列を含む、上記（６０）または（６１）記載の抗体断片。

（６４） 抗体断片が、抗体のH鎖V領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号9、10および11で示されるアミノ酸配列を含み、L鎖V領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号12、13および14で示されるアミノ酸配列を含む、上記（６０）または（６１）記載の抗体断片。

（６５） 抗体断片が、抗体のH鎖V領域が配列番号15で示されるアミノ酸配列を含む、上記（６０）または（６１）記載の抗体断片。

（６６） 抗体断片が、抗体のL鎖V領域が配列番号16で示されるアミノ酸配列を含む、上記（６０）または（６１）記載の抗体断片。

（６７） 抗体断片が、抗体のH鎖V領域が配列番号15で示されるアミノ酸配列を含み、抗体のL鎖V領域が配列番号16で示されるアミノ酸配列を含む、上記（６０）または（６１）記載の抗体断片。

（６８） 抗体断片が、抗体のH鎖V領域が配列番号15で示されるアミノ酸配列を

含み、抗体のL鎖V領域が配列番号16で示されるアミノ酸配列を含む、上記（60）または（61）記載のヒト型CDR移植抗体KM8969の抗体断片。

（69） 上記（51）～（68）のいずれか1項に記載のガングリオシドGM2に特異的に反応する抗体断片をコードするDNA。

（70） 上記（69）記載のDNAを含有する組換えベクター。

（71） 上記（70）記載の組換えベクターを宿主細胞に導入して得られる形質転換株。

（72） 上記（71）記載の形質転換株を培地に培養し、培養物中に上記（52）～（68）のいずれか1項に記載の抗体断片を生成蓄積させ、該培養物から抗体断片を採取することを特徴とする抗体断片の製造方法。

（73） 上記（1）～（45）記載のモノクローナル抗体の誘導体およびその抗体断片の誘導体、ならびに上記（51）～（68）記載の抗体断片から選ばれる少なくとも1種からなる医薬。

（74） 上記（1）～（45）記載のモノクローナル抗体の誘導体およびその抗体断片の誘導体、ならびに上記（51）～（68）記載の抗体断片から選ばれる少なくとも1種を有効成分として含有する癌の治療薬。

（75） 上記（1）～（45）記載のモノクローナル抗体の誘導体およびその抗体断片の誘導体、ならびに上記（51）～（68）記載の抗体断片から選ばれる少なくとも1種を有効成分として含有する癌の診断薬。

本発明はGM2に特異的に反応するモノクローナル抗体またはその抗体断片と、放射性同位元素、蛋白質または低分子の薬剤とを結合させた抗体の誘導体に関する。

モノクローナル抗体としては、ハイブリドーマが産生する抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体などがあげられる。

ハイブリドーマとは、ヒト以外の哺乳動物に抗原を免疫して取得されたB細胞と、マウスなどに由来するミエローマ細胞とを細胞融合させて得られる、所望の抗原特異性を有したモノクローナル抗体を産生する細胞を意味する。

ヒト化抗体としては、ヒト型キメラ抗体およびヒト型CDR移植抗体などがあげられる。

ヒト型キメラ抗体は、ヒト以外の動物の抗体H鎖V領域（以下、HVまたはVHと表記する）および抗体L鎖V領域（以下、LVまたはVLと表記する）とヒト抗体のH鎖C

領域（以下、CHと表記する）およびヒト抗体のL鎖C領域（以下、CLと表記する）とからなる抗体を意味する。ヒト以外の動物としては、マウス、ラット、ハムスター、ラビット等、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。

本発明のヒト型キメラ抗体は、GM2に特異的に反応するモノクローナル抗体を生産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CHおよびヒト抗体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、該発現ベクターを動物細胞へ導入することにより発現させ、作製することができる。

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、更に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に属すればいかなるものでもよく、 $\kappa$ クラスあるいは $\lambda$ クラスのものを用いることができる。

抗GM2キメラ抗体の具体例としては、特開平6-205694に記載のKM966があげられる。

ヒト型CDR移植抗体は、ヒト以外の動物の抗体の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意味する。

本発明の抗GM2CDR移植抗体は、GM2に特異的に反応するヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLのCDR配列を任意のヒト抗体のVHおよびVLのCDR配列に移植したV領域をコードするcDNAを構築し、ヒト抗体のCHおよびヒト抗体の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CDR移植抗体発現ベクターを構築し、該発現ベクターを動物細胞へ導入することによりヒト型CDR移植抗体を発現させ、作製することができる。

本発明のヒト型CDR移植抗体の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、更に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、該ヒト型CDR移植抗体のCLとしては、hIgに属すればいかなるものでもよく、 $\kappa$ クラスあるいは $\lambda$ クラスのものを用いることができる。

抗GM2CDR移植抗体の具体例としては、特開平10-257893に記載のKM8969があげら

れる。

ヒト抗体は、元来、ヒト体内に天然に存在する抗体を意味するが、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等も含まれる。

ヒト体内に存在する抗体は、例えば、ヒト末梢血リンパ球を単離し、EBウイルス等を感染させ不死化、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、培養物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等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、更に遺伝子工学的手法により、2本の完全なH鎖および2本の完全なL鎖からなるヒト抗体分子へも変換することができる。

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、マウスES細胞へヒト抗体遺伝子を導入し、該ES細胞を他の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動物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、通常ヒト以外の哺乳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得、培養することで培養物中にヒト抗体を産生蓄積させることができる。

抗体断片としては、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、scFv、dsFv、CDRを含むペプチドなどがあげられる。

Fabは、IgGを蛋白質分解酵素パパイニ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。

本発明のFabは、GM2に特異的に反応する抗体を蛋白質分解酵素パパイニ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、Fabを作製することができる。

$F(ab')_2$ は、IgGを蛋白質分解酵素ペプシンで処理して得られる断片のうち（H鎖の234番目のアミノ酸残基で切断される）、Fabがヒンジ領域のジスルフィド結合を介して結合されたものよりやや大きい、分子量約10万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

本発明の $F(ab')_2$ は、GM2に特異的に反応する抗体を蛋白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。

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、GM2に特異的に反応する $F(ab')_2$ 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Fab'を発現させ、作製することができる。

scFvは、一本のVHと一本のVLとを適当なペプチドリンカー（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ポリペプチドを示す。本発明で使用されるscFvに含まれるVHおよびVLは、ハイブリドーマが産生する抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体のいずれをも用いることができる。

本発明のscFvは、GM2に特異的に反応する抗体の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scFvを発現させ、作製することができる。

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〔プロテイン・エンジニアリング(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に含まれるVHおよびVLはハイブリドーマが産生する抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体のいずれをも用いることができる。

本発明のdsFvは、GM2に特異的に反応する抗体の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、dsFvを作製することができる。

CDRを含むペプチドは、H鎖またはL鎖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、GM2に特異的に反応する抗体のVHおよびVLをコードするcDNAを取得した後、該cDNA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、CDRを含むペプチドを作製することができる。

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）等の化学合成法によって製造することもできる。

本発明の抗体の誘導体は、上述したGM2に特異的に反応する抗体または抗体断片のH鎖或いはL鎖のN末端側或いはC末端側、抗体または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抗体断片中の糖鎖に放射性同位元素、蛋白質、低分子の薬剤などを化学的手法〔抗体工学入門（金光修著 1994年（株）地人書館）〕により結合させることにより作製することができる。

また本発明の抗体の誘導体は、GM2に特異的に反応する抗体または抗体断片をコードするDNAと、結合させたい蛋白質をコードするDNAを連結させて発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを宿主細胞へ導入する遺伝子工学的手法によっても作製することができる。

放射性同位元素としては、<sup>131</sup>I、<sup>125</sup>I等があげられ、例えば、クロラミンT法等により、抗体に結合させることができる。

低分子の薬剤としては、ナイトロジェン・マスタード、サイクロフォスファミドなどのアルキル化剤、5-フルオロウラシル、メソトレキセートなどの代謝拮抗剤、ダウノマイシン、ブレオマイシン、マイトマイシンC、ダウノルピシン、ドキソルピシンなどの抗生物質、ピンクリスチン、ピンブラスチン、ビンデシンのような植物アルカロイド、タモキシフェン、デキサメタソンなどのホルモン剤

等の抗癌剤 [臨床腫瘍学 (日本臨床腫瘍研究会編 1996年 癌と化学療法社)]、またはヒドロコチゾン、プレドニゾンなどのステロイド剤、アスピリン、インドメタシンなどの非ステロイド剤、金チオマレート、ベニシラミンなどの免疫調節剤、サイクロフォスファミド、アザチオプリンなどの免疫抑制剤、マレイン酸クロルフェニラミン、クレマシチンのような抗ヒスタミン剤等の抗炎症剤 [炎症と抗炎症療法 昭和57年 医歯薬出版株式会社] などがあげられる。例えば、ダウノマイシンと抗体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ダウノマイシンと抗体のアミノ基間を結合させる方法、水溶性カルボジミドを介してダウノマイシン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。

蛋白質としては、免疫担当細胞を活性化するサイトカインが好適であり、例えば、hIL-2、hGM-CSF、ヒトマクロファージコロニー刺激因子 (以下、hM-CSFと表記する)、ヒトインターロイキン12 (以下、hIL-12と表記する) などがあげられる。また、癌細胞を直接障害するため、リシンやジフテリア毒素などの毒素を用いることができる。例えば、蛋白質との融合抗体については、抗体または抗体断片をコードするcDNAに蛋白質をコードするcDNAを連結させ、融合抗体をコードするDNAを構築し、該DNAを原核生物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、融合抗体を作製することができる。

抗GM2ヒト化抗体の誘導体の具体例としては、抗体のH鎖とhIL-2の融合蛋白質が配列番号1記載のアミノ酸配列を有し、抗体のL鎖V領域が配列番号2記載のアミノ酸配列を有する、抗GM2CDR移植抗体KM8969とhIL-2との融合蛋白質であるKM8969-hIL-2があげられる。

以下に、GM2に特異的に反応するヒト化抗体の作製方法、GM2に特異的に反応する抗体断片の作製方法およびGM2に特異的に反応する抗体の誘導体の作製方法について説明する。

## 1. ヒト化抗体の作製

### (1) ヒト化抗体発現用ベクターの構築

ヒト化抗体発現用ベクターとは、ヒト抗体のCHおよびCLをコードする遺伝子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をコードする遺伝子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。ヒト抗体のC領域は任意のヒト抗体のCHおよびCLであることができ、例えば、ヒト抗体のH鎖のIgG1サブクラスのC領域（以下、hC $\gamma$ 1と表記する）およびヒト抗体のL鎖の $\kappa$ クラスのC領域（以下、hC $\kappa$ と表記する）等があげられる。ヒト抗体のCHおよびCLをコードする遺伝子としてはエキソンとイントロンから成る染色体DNAを用いることができ、また、cDNAを用いることもできる。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[サイトテクノロジー(Cytotechnology), 3, 133 (1990)]、pAGE103[ジャーナル・オブ・バイオケミストリー(J. Biochem.), 101, 1307 (1987)]、pHSG274[ジーン(Gene), 27, 223 (1984)]、pKCR[プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 78, 1527 (1981)]、pSG1 $\beta$ d2-4[サイトテクノロジー(Cytotechnology), 4, 173 (1990)]等があげられる。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とエンハンサー[ジャーナル・オブ・バイオケミストリー(J. Biochem.), 101, 1307 (1987)]、モロニーマウス白血病ウイルスのLTRプロモーターとエンハンサー[バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ(Biochem. Biophys. Res. Commun.), 149, 960 (1987)]、免疫グロブリンH鎖のプロモーター[セル(Cell), 41, 479 (1985)]とエンハンサー[セル(Cell), 33, 717 (1983)]等があげられる。

ヒト化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或いは同一のベクター上に存在するタイプ（以下、タンデム型と表記する）のどちらでも用いることができるが、ヒト化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等の点からタンデム型のヒト化抗体発現用ベクターの方が好ましい[ジャーナル・オブ・イムノロジカル・メソッズ(J. Immunol. Methods), 167, 271 (1994)]。

構築したヒト化抗体発現用ベクターは、ヒト型キメラ抗体およびヒト型CDR移植抗体の動物細胞での発現に使用することができる。

(2) ヒト以外の動物の抗体のV領域をコードするcDNAの取得

ヒト以外の動物の抗体、例えば、マウス抗体のVHおよび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。

マウス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等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領域部分をプローブとして用い、VH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および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およびVLの全塩基配列を決定し、塩基配列よりVHおよびVLの全アミノ酸配列を推定する。

ヒト以外の動物としては、マウス、ラット、ハムスター、ラビット等、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ーントリフルオロ酢酸セシウム法[メソツズ・イン・エンザイモロジー(Methods in Enzymol.), 154, 3 (1987)]、また全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[モレキュラー・クローニング:ア・ラボラトリー・マニュアル(Molecular Cloning: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Lab. Press New York, 1989、以下、モレキュラー・クローニング:ア・ラボラトリー・マニュアルと表記する]等があげられる。また、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の合成およびcDNAライブラリー作製法としては、常法[モレキュラー・クローニング:ア・ラボラトリー・マニュアル;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(Current Protocols in Molecular Biology), Supplement 1-34、以下、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーと表記する]、或いは市販のキット、例えば、Super Script™ Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning (GIBCO BRL社製)やZAP-cDNA Synthesis Kit (Stratagene社製)を用いる方法等があげられる。

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[ストラテジーズ (Strategies), 5, 58 (1992)]、pBluescript II SK(+)[ヌクレイック・アシックス・リサーチ(Nucleic Acids Research), 17, 9494 (1989)]、λzap II (Stratagene社製)、λgt10、λgt11[DNA クローニング:ア・プラクティカル・アプローチ(DNA Cloning: A Practical Approach), I, 49 (1985)]、Lambda BlueMid (Clontech社製)、λExCell、pT7T3 18U (Pharmacia社製)、pcD2[モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー(Mol. Cell. Biol.), 3, 280 (1983)]およびpUC18[ジーン(Gene), 33, 103 (1985)]等が用いられる。

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、発現およ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' [ストラテジーズ(Strategies), 5, 81 (1992)]、C600[ジェネティックス(Genetics), 39, 440 (1954)]、Y1088、Y1090[サイエンス(Science), 222, 778 (1983)]、NM522[ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(J. Mol. Biol.), 166, 1 (1983)]、K802[ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(J. Mol. Biol.), 16, 118 (1966)]およびJM105[ジーン(Gene), 38, 275 (1985)]等が用いられる。

cDNAライブラリーからのヒト以外の動物の抗体のVHおよび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(モレキュラー・クローニング:ア・ラボラトリー・マニュアル)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;モレキュラー・クローニング:ア・ラボラトリー・マニュアル;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)によりVHおよびVLをコードするcDNAを調製することもできる。

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[プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad.

Sci. U.S.A.), 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。

決定した塩基配列からVHおよびVLの全アミノ酸配列を推定し、既知の抗体のVHおよびVLの全アミノ酸配列[シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト(Sequences of Proteins of Immunological Interest), US Dept. Health and Human Services, 1991、以下、シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレストと表記する]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およびVLの完全なアミノ酸配列をコードしているかを確認することができる。

### (3) ヒト以外の動物の抗体のV領域のアミノ酸配列の解析

分泌シグナル配列を含む抗体のVHおよびVLの完全なアミノ酸配列に関しては、既知の抗体のVHおよびVLの全アミノ酸配列(シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト)と比較することにより、分泌シグナル配列の長さおよび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およびVLの各CDRのアミノ酸配列についても、既知の抗体のVHおよびVLのアミノ酸配列(シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト)と比較することによって見出すことができる。

### (4) ヒト型キメラ抗体発現ベクターの構築

本項1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およびCLをコードする遺伝子上流に、ヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLをコードするcDNAをクローニングし、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、ヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLをコードするcDNAを、ヒト以外の動物の抗体VHおよびVLの3'末端側の塩基配列とヒト抗体のCHおよびCLの5'末端側の塩基配列とから成り、かつ適当な制限酵素の認識配列を両端に有する合成DNAとそれぞれ連結し、それぞれを本項1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およびCLをコードする遺伝子上流にそれらが適切な形で発現する様にクローニングし、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。

### (5) ヒト型CDR移植抗体のV領域をコードするcDNAの構築

ヒト型CDR移植抗体のVHおよび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、目的のヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLのCDRのアミノ酸配列を移植するヒト抗体のVHおよびVLのフレームワーク領域（以下、FRと表記する）のアミノ酸配列を選択する。ヒト抗体のVHおよびVLの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、いかなるものでも用いることができる。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VHおよびVLのFRのアミノ酸配列、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(シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト)等があげられるが、その中でも、十分な活性を有するヒト型CDR移植抗体を作製するためには、目的のヒト以外の動物の抗体のVHおよび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)を有するアミノ酸配列を選択することが望ましい。次に、選択したヒト抗体のVHおよびVLのFRのアミノ酸配列に目的のヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLのCDRのアミノ酸配列を移植し、ヒト型CDR移植抗体のVHおよびVLのアミノ酸配列を設計する。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(シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト)を考慮してDNA配列に変換し、ヒト型CDR移植抗体のVHおよびVLのアミノ酸配列をコードするDNA配列を設計する。設計したDNA配列に基づき、100塩基前後の長さから成る数本の合成DNAを合成し、それらを用いてPCR法を行う。この場合、PCRでの反応効率および合成可能な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。

また、両端に位置する合成DNAの5'末端に適切な制限酵素の認識配列を導入することで、本項1の(1)で構築したヒト化抗体発現用ベクターに容易にクローニングすることができる。PCR後、増幅産物をpBluescript SK(-) (Stratagene社製)等のプラスミドにクローニングし、本項1の(2)に記載の方法により、塩基配列を決定し、所望のヒト型CDR移植抗体のVHおよび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。

#### (6) ヒト型CDR移植抗体のV領域のアミノ酸配列の改変

ヒト型CDR移植抗体は、目的のヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLのCDRのみをヒト抗体のVHおよびVLのFRに移植しただけでは、その抗原結合活性は元のヒト以外の動物の抗体に比べて低下してしまうことが知られている[バイオテクノロジー(BIO/TECHNOLOGY), 9, 266 (1991)]。この原因としては、元のヒト以外の動物



の抗体のVHおよびVLでは、CDRのみならず、FRのいくつか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。そして、ヒト抗体のFRへのCDRの移植によりそれらアミノ酸残基が、ヒト抗体のFRの異なるアミノ酸残基へと変化するため、抗原結合活性が低下すると考えられている。この問題を解決するため、ヒト型CDR移植抗体では、ヒト抗体のVHおよび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、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、それらを元のヒト以外の動物の抗体のアミノ酸残基に改変し、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[バイオテクノロジー(BIO/TECHNOLOGY), 9, 266 (1991)]。ヒト型CDR移植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かが、最も重要な点であり、そのためにX線結晶解析[ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(J. Mol. Biol.), 112, 535 (1977)]或いはコンピューターモデリング[プロテイン・エンジニアリング(Protein Engineering), 7, 1501 (1994)]等による抗体の立体構造の構築および解析が行われている。これら抗体の立体構造の情報は、ヒト型CDR移植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型CDR移植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。

ヒト抗体のVHおよびVLのFRのアミノ酸残基の改変は、改変用合成DNAを用いて本項1の(5)に記載のPCR法を行うことにより、達成できる。PCR後の増幅産物について本項1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。

#### (7) ヒト型CDR移植抗体発現ベクターの構築

本項1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およびCLをコードする遺伝子上流に、本項1の(5)および(6)で構築したヒト型CDR移植抗体のVHおよびVLをコードするcDNAをクローニングし、ヒト型CDR移植抗体発現ベクターを構築することができる。

例えば、本項1の(5)および(6)でヒト型CDR移植抗体のVHおよび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1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およびCLをコードする遺伝子の上流にそれらが適切な形で発現する様にクローニングし、ヒト型CDR移植抗体発現ベクターを構築することができる。

#### (8) ヒト化抗体の一過性発現

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1の(4)および(7)に記載のヒト化抗体発現ベクター、或いはそれらを改変した発現ベクターを用いてヒト化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、ヒト化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[メソッズ・イン・ヌクレイック・アシッズ・リサーチ(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[メソッズ・イン・ヌクレイック・アシッズ・リサーチ(Methods in Nucleic Acids Res.), CRC press, 283 (1991)]、リポフェクション法[プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 84, 7413 (1987)]等があげられる。YB2/O細胞で発現させたヒト化抗体はADCC活性が高まるので好ましい。

発現ベクターの導入後、培養上清中のヒト化抗体の発現量および抗原結合活性は酵素免疫抗体法[以下、ELISA法と表記する; アンティボディズ: ア・ラボラトリー・マニュアル(Antibodies: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14, 1988、モノクローナル・アンティボディズ: プリンシプルス・アンド・プラクティス(Monoclonal Antibodies: Principles and Practice), Academic Press Limited, 1996]等により測定できる。

#### (9) ヒト化抗体の安定発現

本項1の(4)および(7)に記載のヒト化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ヒト化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2-257891、サイトテクノロジー(Cytotechnology), 3, 133 (1990)]等があげら

れる。

ヒト化抗体発現ベクターを導入する宿主細胞としては、ヒト化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)、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子 (以下、dhfrと表記する) が欠損したCHO細胞[プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 77, 4216 (1980)]、ラット YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20細胞 (ATCC CRL1662、以下、YB2/0細胞と表記する) 等があげられる。

発現ベクターの導入後、ヒト化抗体を安定に発現する形質転換株は、特開平2-257891に開示されている方法に従い、G418 sulfate (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 (日水製薬社製)、GIT培地 (日本製薬社製)、EX-CELL302培地 (JRH社製)、IMDM培地 (GIBCO BRL社製)、Hybridoma-SFM培地 (GIBCO BRL社製)、またはこれら培地に牛胎児血清 (以下、FBS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ヒト化抗体を発現蓄積させることができる。培養上清中のヒト化抗体の発現量および抗原結合活性はELISA法等により測定できる。また、形質転換株は、特開平2-257891に開示されている方法に従い、dhfr増幅系等を利用してヒト化抗体の発現量を上昇させることができる。

ヒト化抗体は、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[アンティボディズ:ア・ラボラトリー・マニュアル、モノクローナル・アンティボディズ:プリンシプルズ・アンド・プラクティス(Monoclonal Antibodies: Principles and Practice), Academic Press Limited, 1996、以下、モノクローナル・アンティボディズ(1996)と表記する]。また、その他に通常、蛋白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およ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。精製したヒト化抗体の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:ネイチャー (Nature), 227, 680 (1970)]やウエスタンブロットティング法[アンティボディズ:

ア・ラボラトリー・マニュアル、モノクローナル・アンティボディズ(1996)]等で測定することができる。

#### (10) ヒト化抗体の活性評価

精製したヒト化抗体の抗原との結合活性、培養癌細胞株に対する結合活性はELISA法および蛍光抗体法[キャンサー・イムノロジー・イムノセラピー(Cancer Immunol. Immunother.), 36, 373 (1993)]等により測定できる。抗原陽性培養癌細胞株に対する細胞障害活性は、CDC活性、ADCC活性等を測定し、評価することができる[キャンサー・イムノロジー・イムノセラピー(Cancer Immunol. Immunother.), 36, 373 (1993)]。

### 2. 抗体断片の作製

抗体断片は、本項1に記載のヒト化抗体または、ハイブリドーマが産生する抗体およびヒト抗体を元に遺伝子工学的な手法あるいは蛋白質化学的手法により、作製することができる。抗体断片としては、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fab'、scFv、dsFv、CDRを含むペプチド等があげられる。これらの抗体断片は蛋白質化学または遺伝子工学の手法を用いて作製することができる。

#### (1) Fabの作製

Fabは、IgGを蛋白質分解酵素パパインで処理することにより、作製することができる。パパインの処理後は、元の抗体がプロテインA結合性を有するIgGサブクラスであれば、プロテインAカラムに通すことで、IgG分子やFc断片と分離し、均一なFabとして回収することができる[モノクローナル・アンティボディズ：プリンシプルズ・アンド・プラクティス (Monoclonal Antibodies: Principles and Practice), third edition, 1995、以下、モノクローナル・アンティボディズ 第3版と表記する]。プロテインA結合性を持たないIgGサブクラスの抗体の場合には、イオン交換クロマトグラフィーにより、Fabは低塩濃度で溶出される画分中に回収することができる(モノクローナル・アンティボディズ 第3版)。また、Fabは、本項1の(2)および(5)に記載の抗体V領域をコードするDNAを、Fab発現用ベクターにクローニングし、Fab発現ベクターを作製し、該発現ベクターを宿主に導入することにより発現し、作製することができる。Fab発現用ベクターとしては、Fab用のDNAを組み込み発現できるものであればいかなるものも用いることができる。例えば、pIT106[サイエンス(Science), 240, 1041 (1988)]等があげられ

る。

宿主細胞としては真核生物、原核生物などいかなるものでも用いることができるが、大腸菌が好ましい。

Fab発現ベクターを適当な宿主細胞に導入し、封入体あるいはペリプラスマ層にFabを生成蓄積させることができる。封入体からは、通常蛋白質で用いられるリフォールディング法により、活性のあるFabとすることができ、また、ペリプラスマ層に発現させた場合は、培養上清中に活性を持ったFabが漏れ出る。リフォールディング後あるいは培養上清からは、抗原を結合させたカラムを用いることにより、均一なFabを精製することができる[アンティボディ・エンジニアリング, ア・プラクティカル・ガイド(Antibody Engineering, A Practical Guide), W. H. Freeman and Company, 1992]。

### (2) F(ab')<sub>2</sub>の作製

F(ab')<sub>2</sub>は、IgGを蛋白質分解酵素ペプシンで処理することにより、作製することができる。ペプシンの処理後は、Fabと同様の精製操作により、均一なF(ab')<sub>2</sub>として回収することができる(モノクローナル・アンティボディズ 第3版)。また、後述する本項2の(3)に記載のFab'をo-PDMやビスマレイミドヘキサン等のようなマレイミドで処理し、チオエーテル結合させる方法、DTNBで処理し、ジスルフィド結合させる方法によっても作製することができる[アンティボディ・エンジニアリング, ア・プラクティカル・アプローチ(Antibody Engineering, A Practical Approach), IRL PRESS, 1996、以下、アンティボディ・エンジニアリングと表記する]。

### (3) Fab'の作製

Fab'は、本項2の(2)に記載のF(ab')<sub>2</sub>をジチオスレイトール等の還元剤で処理して得ることができる。また、Fab'は、本項1の(2)および(5)に記載の抗体V領域をコードするDNAを、Fab'発現用ベクターにクローニングし、Fab'発現ベクターを作製し、該発現ベクターを宿主細胞に導入することにより発現し、作製することができる。

Fab'発現用ベクターとしては、Fab'用のDNAを組み込み発現できるものであればいかなるものも用いることができる。例えば、pAK19[バイオテクノロジー(BIO/TECHNOLOGY), 10, 163 (1992)]等があげられる。

宿主細胞としては、真核生物、原核生物などいかなるものも用いることができるが、大腸菌が好ましい。

Fab' 発現ベクターを適当な宿主細胞に導入し、封入体あるいはペリプラズマ層にFabを生成蓄積させることができる。封入体からは、通常蛋白質で用いられるリフォールディング法により、活性のあるFab' とすることができ、また、ペリプラズマ層に発現させた場合は、リゾチームによる部分消化、浸透圧ショック、ソニケーション等の処理により菌を破碎し、菌体外へ回収させることができる。リフォールディング後あるいは菌の破碎液からは、プロテインGカラム等を用いることにより、均一なFab' を精製することができる（アンティボディ・エンジニアリング）。

#### (4) scFvの作製

scFvは、本項1の(2)および(5)に記載の抗体V領域をコードするDNAを、scFv発現用ベクターにクローニングし、scFv発現ベクターを作製し、該発現ベクターを宿主細胞に導入することにより発現し、作製することができる。

scFv発現用ベクターとしては、scFvのDNAを組み込み発現できるものであればいかなるものも用いることができる。例えば、pCANTAB5E (Pharmacia社)、pHFA[Hum. Antibody Hybridoma, 5, 48 (1994)]等があげられる。

宿主細胞としては、真核生物、原核生物などいかなるものも用いることができるが、大腸菌が好ましい。

scFv発現ベクターを適当な宿主細胞に導入し、ヘルパーファージを感染させることで、ファージ表面にscFvがファージ表面蛋白質と融合した形で発現するファージを得ることができる。また、scFv発現ベクターを導入した大腸菌の封入体あるいはペリプラズマ層にscFvを生成蓄積させることができる。封入体からは、通常蛋白質で用いられるリフォールディング法により、活性のあるscFvとすることができ、また、ペリプラズマ層に発現させた場合は、リゾチームによる部分消化、浸透圧ショック、ソニケーション等の処理により菌を破碎し、菌体外へ回収することができる。リフォールディング後あるいは菌の破碎液からは、陽イオン交換クロマトグラフィー等を用いることにより、均一なscFvを精製することができる（アンティボディ・エンジニアリング）。

#### (5) dsFvの作製

dsFvは以下のように作製することができる。まず、本項1の(2)および(5)に記載の抗体VHおよびVLをコードするDNAの適当な位置に変異を導入し、コードするアミノ酸残基がシステインに置換されたDNAを作製する。作製した各DNAをdsFv発現用ベクターにクローニングし、VHおよびVL発現ベクターを作製し、該発現ベクターを宿主細胞に導入することにより発現し、作製することができる。

dsFv発現用ベクターとしては、dsFv用のDNAを組み込み発現できるものであればいかなるものも用いることができる。例えば、pULI9[プロテイン・エンジニアリング(Protein Engineering), 7, 697 (1994)]等があげられる。

宿主細胞としては、真核生物、原核生物などいかなるものも用いることができるが、大腸菌が好ましい。

VHおよびVL発現ベクターを適当な宿主細胞に導入し、封入体あるいはペリプラズマ層にdsFvを生成蓄積させることができる。封入体あるいはペリプラズマ層からVHおよびVLを得、混合し、通常蛋白質で用いられるリフォールディング法により、活性のあるdsFvとすることができる。リフォールディング後は、イオン交換クロマトグラフィーおよびゲル濾過等により、さらに精製することができる[プロテイン・エンジニアリング(Protein Engineering), 7, 697 (1994)]。

#### (6) CDRペプチドの作製

CDRを含むペプチドは、Fmoc法あるいはtBoc法等の化学合成法によって作製することができる。また、CDRを含むペプチドをコードするDNAを作製し、作製したDNAを適当な発現用ベクターにクローニングし、CDRペプチド発現ベクターを作製することができる。発現用ベクターとしては、CDRペプチドをコードするDNAを組み込み発現できるものであればいかなるものも用いることができる。例えば、pLEX (Invitrogen社)、pAX4a+ (Invitrogen社)等があげられる。

宿主細胞としては、真核生物、原核生物などいかなるものも用いることができるが、大腸菌が好ましい。

発現ベクターを適当な宿主細胞に導入し、封入体あるいはペリプラズマ層にCDRペプチドを生成蓄積させることができる。封入体あるいはペリプラズマ層からCDRペプチドを得、イオン交換クロマトグラフィーおよびゲル濾過等により、精製することができる[プロテイン・エンジニアリング(Protein Engineering), 7, 697 (1994)]。

### (7) 抗体断片の活性評価

得られた抗体断片の抗原との結合活性、培養癌細胞株に対する結合活性はELISA法および蛍光抗体法[キャンサー・イムノロジー・イムノセラピー(Cancer Immunol., Immunother.), 36, 373 (1993)]等により測定できる。

### (8) 抗体断片の使用方法

本発明の抗体断片は、ヒト由来の培養癌細胞株に発現しているGM2と特異的に結合するため、肺癌、悪性黒色腫、脳腫瘍、神経芽細胞腫等のヒト癌等の診断、治療において有用であると考えられる。抗体断片は、IgG分子に比べ、分子量が小さいため、ヒト体内において速い標的移行性を示すことが期待される。

本発明の抗体断片は、単独で投与することも可能ではあるが、通常は薬理学的に許容される一つあるいはそれ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等の非経口投与をあげることができ、蛋白質製剤の場合、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、テープ剤等があげられる。

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、顆粒剤等があげられる。

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、果糖等の糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール等のグリコール類、ごま油、オリーブ油、大豆油等の油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類等の防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミント等のフレーバー類等を添加剤として用いて製造できる。

カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等は、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニトール等の賦形剤、デンプン、アルギン酸ナトリウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルク等の滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、グリセリン等の



可塑剤等を添加剤として用いて製造できる。

非経口投与に適切な製剤としては、注射剤、座剤、噴霧剤等があげられる。

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等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等の担体を用いて調製される。

また、噴霧剤は該抗体断片そのもの、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等を用いて調製される。

担体として具体的には乳糖、グリセリン等が例示される。該抗体断片および用いる担体の性質により、エアロゾル、ドライパウダー等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。

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、体重等により異なるが、通常成人1日当たり10 $\mu$ g/kg $\sim$ 8mg/kgである。

### 3. 抗体の誘導体の作製 $\sim$ ヒト化抗体とサイトカインとの融合蛋白質の作製

#### (1) ヒト化抗体とサイトカインとの融合蛋白質をコードする遺伝子の構築

サイトカインをコードする遺伝子を適当な合成DNAを介して、ヒト化抗体のH鎖或いはL鎖をコードする遺伝子の5'末端或いは3'末端に連結することにより、ヒト化抗体とサイトカインとの融合蛋白質をコードする遺伝子を構築することができる。また、サイトカインをコードする遺伝子をPCR法で増幅する際に、増幅用プライマーの5'末端に適当な制限酵素の認識配列を導入し、ヒト化抗体のH鎖或いはL鎖をコードする遺伝子の5'末端或いは3'末端に連結することにより、ヒト化抗体とサイトカインとの融合蛋白質をコードする遺伝子を構築することができる。サイトカインをコードする遺伝子は、染色体DNA、cDNAのいずれも用いることができる。構築したヒト化抗体とサイトカインの融合蛋白質をコードする遺伝子については、本項1の(2)に記載の方法により、塩基配列を決定し、目的の配列であることを確認する。

#### (2) ヒト化抗体とサイトカインとの融合蛋白質の発現ベクターの構築

本項1の(4)および(7)に記載のヒト化抗体発現ベクター上のヒト化抗体のH鎖或いはL鎖をコードする遺伝子の一部またはすべてを、本項3の(1)に記載

載のヒト化抗体とサイトカインとの融合蛋白質をコードする遺伝子と置換することによって、ヒト化抗体とサイトカインとの融合蛋白質の発現ベクターを構築することができる。例えば、ヒト化抗体のH鎖のC末端にサイトカインが融合した融合蛋白質を作製する場合は、本項3の(1)において、ヒト化抗体のCHをコードする遺伝子の3'末端にサイトカインをコードする遺伝子を連結してヒト化抗体のCHとサイトカインとの融合蛋白質をコードする遺伝子を構築し、該遺伝子と本項1の(4)および(7)に記載のヒト化抗体発現ベクター上のヒト化抗体のCHをコードする遺伝子を置換することにより、発現ベクターを構築することができる。

#### (3) ヒト化抗体とサイトカインとの融合蛋白質の安定発現

本項3の(2)に記載のヒト化抗体とサイトカインとの融合蛋白質の発現ベクターを用いて本項1の(9)に記載した方法に従い、ヒト化抗体とサイトカインとの融合蛋白質の安定発現を行うことにより、ヒト化抗体とサイトカインとの融合蛋白質を安定に発現する形質転換株を得、その培養上清からヒト化抗体とサイトカインとの融合蛋白質を精製し、その分子量等を解析することができる。

#### (4) ヒト化抗体とサイトカインとの融合蛋白質の活性評価

精製したヒト化抗体とサイトカインとの融合蛋白質の活性のうち、ヒト化抗体部分の活性、すなわち抗原との結合活性、培養癌細胞株に対する結合活性はELISA法および蛍光抗体法等により測定できる。また、抗原陽性培養癌細胞株に対する細胞障害活性は、CDC活性、ADCC活性等を測定し、評価することができる。一方、サイトカイン部分の活性は、例えば、該サイトカインに対して濃度依存的な増殖を示す培養細胞株の増殖支持活性を指標に評価することができる[プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 91, 9626 (1994)]。

ヒト化抗体とサイトカインとの融合蛋白質は、例えば、GM2を発現している培養マウス癌細胞株を移植した野生型マウスに投与することで、その抗腫瘍効果を評価することができ、また、ヒト化抗体単独、サイトカイン単独或いはヒト化抗体とサイトカインの同時投与と比較することにより、生体内におけるより強い抗腫瘍効果を評価することができる[キャンサー・イムノロジー・イムノセラピー(Cancer Immunol., Immunother.), 42, 88 (1996)]。

#### (5) ヒト化抗体とサイトカインとの融合蛋白質の使用方法

本発明のヒト化抗体とサイトカインとの融合蛋白質は、ヒト由来の培養癌細胞株に発現しているGM2と特異的に結合し、かつCDC活性およびADCC活性等の細胞障害活性を示すため、肺癌、悪性黒色腫、脳腫瘍、神経芽細胞腫等のヒト癌等の診断、治療において有用であると考えられる。

ヒト化抗体は、ヒト以外の動物の抗体に比べ、ヒト抗体のアミノ酸配列に由来する部分がほとんどであるため、ヒト体内において強い抗腫瘍効果を示し、かつ免疫原性を示さず、その効果が長期間にわたり持続することが期待され、更に、融合させたサイトカイン部分の活性により、癌の近傍で免疫担当細胞を活性化できることから、ヒト化抗体単独、サイトカイン単独或いはヒト化抗体とサイトカインの同時投与等に比べ、より強い抗腫瘍効果が期待され、また、サイトカインの全身投与に比べ、副作用の低減が期待される。

本発明のヒト化抗体とサイトカインとの融合蛋白質は、単独で投与することも可能ではあるが、通常は薬理学的に許容される一つあるいはそれ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等の非経口投与をあげることができ、蛋白質製剤の場合、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、テープ剤等があげられる。

経口投与に適当な製剤としては、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等があげられる。

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、果糖等の糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール等のグリコール類、ごま油、オリーブ油、大豆油等の油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類等の防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミント等のフレーバー類等を添加剤として用いて製造できる。

カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等は、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニトール等の賦形剤、デンプン、アルギン酸ナトリウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグ

ネシウム、タルク等の滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、グリセリン等の可塑剤等を添加剤として用いて製造できる。

非経口投与に適切な製剤としては、注射剤、座剤、噴霧剤等があげられる。

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等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等の担体を用いて調製される。

また、噴霧剤は該融合蛋白質そのもの、ないしは受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ該融合蛋白質を微細な粒子として分散させ吸収を容易にさせる担体等を用いて調製される。

担体として具体的には乳糖、グリセリン等が例示される。該融合蛋白質および用いる担体の性質により、エアロゾル、ドライパウダー等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。

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、体重等により異なるが、通常成人1日当たり $10\mu\text{g}/\text{kg}\sim 8\text{mg}/\text{kg}$ である。

#### 図面の簡単な説明

第1図はプラスミドpBSA-Bの造成工程を示した図である。

第2図はプラスミドpBS $\Delta$ hC $\gamma$ 1-IL-2の造成工程を示した図である。

第3図はプラスミドpBShC $\gamma$ 1-IL-2の造成工程を示した図である。

第4図はプラスミドpKANTEX8969-hIL2の造成工程を示した図である。

第5図は精製した抗GM2CDR移植抗体KM8969と精製した融合蛋白質KM8969-hIL-2のSDS-PAGE (4~15%グラジエントゲルを使用)の電気泳動パターンを示した図である。左側が非還元条件、右側が還元条件でそれぞれ電気泳動を行った図である。レーン1が低分子量マーカー、2がKM8969、3がKM8969-hIL-2、4が低分子量マーカー、5がKM8969、6がKM8969-hIL-2の泳動パターンをそれぞれ示す。

第6図は精製した抗GM2CDR移植抗体KM8969と精製した融合蛋白質KM8969-hIL-2のGM2との結合活性を抗体濃度を変化させて測定した図である。縦軸はGM2との結合活性、横軸は抗体濃度をそれぞれ示す。○がKM8969、●がKM8969-hIL-2の活性

をそれぞれ示す。

第7図はhIL-2と精製した融合蛋白質KM8969-hIL-2のhIL-2依存性細胞CTLL-2に対する増殖支持活性を各蛋白質の濃度を変化させて測定した図である。縦軸は増殖支持活性、横軸は蛋白質濃度をそれぞれ示す。○がhIL-2、●がKM8969-hIL-2の活性をそれぞれ示す。

第8図は精製した抗GM2CDR移植抗体KM8969と精製した融合蛋白質KM8969-hIL-2によるヒトエフェクター細胞の活性化とそれに伴う細胞障害活性を測定した図である。縦軸は細胞障害活性、横軸は用いた蛋白質をそれぞれ示す。□がKM8969、■がKM8969-hIL-2の活性をそれぞれ示す。

発明を実施するための最良の形態

以下に、本発明の実施例を示すが、これにより本発明の範囲が限定されるものではない。

実施例1. 抗GM2ヒト化抗体とサイトカインとの融合蛋白質の作製

抗GM2ヒト化抗体とサイトカインとの融合蛋白質の具体例として、抗GM2CDR移植抗体KM8969とhIL-2の融合蛋白質であるKM8969-hIL-2を以下の様にして作製し、その活性評価を行った。

1. hC $\gamma$ 1とhIL-2との融合蛋白質をコードするcDNAの構築

(1) hC $\gamma$ 1のcDNAの3'末端の約65塩基と成熟型hIL-2の完全長cDNAから成るcDNAを有するプラスミドpBS $\Delta$ hC $\gamma$ 1-IL-2の構築

プラスミドpBluescript SK(-) (Stratagene社製) の3 $\mu$ gを10 $\mu$ lの10mMトリス-塩酸 (pH7.5)、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTTから成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素ApaI (宝酒造社製) を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10 $\mu$ lの20mMトリス-塩酸 (pH8.5)、10mM塩化マグネシウム、1mM DTTおよび100mM塩化カリウムから成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素BamHI (宝酒造社製) を加えて30°Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製) を用いて添付の説明書に従い、約2.95kbのApaI-BamHI断片を約2 $\mu$ g回収した。

次に、配列番号3、4に記載の塩基配列をそれぞれ有する合成DNAを自動DNA合成機 (380A、Applied Biosystems社製) を用いて合成した。得られた合成DNAの0.3

$\mu\text{g}$ ずつを $15\mu\text{l}$ の滅菌水に加え、 $65^\circ\text{C}$ で5分間加熱した。該反応液を室温にて30分間放置した後、 $2\mu\text{l}$ の10倍緩衝液[ $500\text{mM}$ トリス-塩酸( $\text{pH}7.6$ )、 $100\text{mM}$ 塩化マグネシウム、 $50\text{mM}$  DTT]と $2\mu\text{l}$ の $10\text{mM}$  ATPに加え、更に10単位のT4 Polynucleotide Kinase (宝酒造社製)を加えて $37^\circ\text{C}$ で30分間反応させ、5'末端をリン酸化した。

次に、上記で得られたプラスミドpBluescript SK(-)由来のApaI-BamHI断片 $0.1\mu\text{g}$ とリン酸化合成DNA $0.05\mu\text{g}$ を全量 $10\mu\text{l}$ の滅菌水に加え、DNA ligation Kit Ver.2 (宝酒造社製)を用いて使用説明書に従い、連結した。この様にして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌DH5 $\alpha$ 株 (Stratagene社製)を形質転換し、第1図に示したプラスミドpBSA-Bを得た。得られたプラスミドの $10\mu\text{g}$ を用い、AutoRead Sequencing Kit (Pharmacia社製)に添付の説明書に従って反応後、A.L.F. DNA Sequencer (Pharmacia社製)により電気泳動し、塩基配列を決定した結果、目的のDNAがクローニングされたプラスミドが得られたことを確認した。

次に、上記で得られたプラスミドpBSA-Bの $3\mu\text{g}$ を $10\mu\text{l}$ の $50\text{mM}$ トリス-塩酸 ( $\text{pH}7.5$ )、 $100\text{mM}$ 塩化ナトリウム、 $10\text{mM}$ 塩化マグネシウムおよび $1\text{mM}$  DTTから成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素EcoRI (宝酒造社製)を加えて $37^\circ\text{C}$ で1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、 $10\mu\text{l}$ の $33\text{mM}$ トリス-酢酸 ( $\text{pH}7.9$ )、 $66\text{mM}$ 酢酸カリウム、 $10\text{mM}$ 酢酸マグネシウム、 $0.5\text{mM}$  DTTおよび $100\mu\text{g/ml}$  BSAから成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素SmaI (宝酒造社製)を加えて $30^\circ\text{C}$ で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製)を用いて添付の説明書に従い、約 $3.00\text{kb}$ のEcoRI-SmaI断片を約 $2\mu\text{g}$ 回収した。

次に、成熟型hIL-2の完全長cDNAを含むプラスミドpILL4[アグリカルチュラル・アンド・バイオリジカル・ケミストリー(Agric. Biol. Chem.), 51, 1135 (1987)]を鋳型として、以下に示すPCRを行った。プラスミドpILL4の $1\text{ng}$ を $100\mu\text{l}$ の反応液(1倍濃度のEx Taq buffer(宝酒造社製)、 $200\mu\text{M}$  dNTPs、 $1.0\mu\text{M}$  rev1プライマー(配列番号5)、 $1.0\mu\text{M}$  fw2プライマー(配列番号6)および2.5単位のTaKaRa Ex Taq DNA polymerase(宝酒造社製))に加え、 $100\mu\text{l}$ の鉱油で覆い、DNAサーマルサイクラー (PJ480、PERKIN ELMER社製)にセットし、 $94^\circ\text{C}$ にて3分間反応後、 $96^\circ\text{C}$ にて30秒間、 $55^\circ\text{C}$ にて1分間、 $72^\circ\text{C}$ にて1分間のサイクルを30サイクル行い、最後に $72^\circ\text{C}$ にて7分間の反応を行った。該反応液をエタノール沈殿し、 $30\mu\text{l}$ の $50\text{mM}$ トリス-

塩酸 (pH7.5)、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTTから成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素EcoRI (宝酒造社製) を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10 $\mu$ lの33mMトリス-酢酸 (pH7.9)、66mM酢酸カリウム、10mM酢酸マグネシウム、0.5mM DTTおよび100 $\mu$ g/mlBSAから成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素SmaI (宝酒造社製) を加えて30°Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製) を用いて添付の説明書に従い、約0.41kbのEcoRI-SmaI断片を約1 $\mu$ g回収した。

次に、上記で得られたプラスミドpBSA-BのEcoRI-SmaI断片0.1 $\mu$ gと成熟型hIL-2の完全長cDNAのPCR産物のEcoRI-SmaI断片0.1 $\mu$ gを全量10 $\mu$ lの滅菌水に加え、DNA ligation Kit Ver.2 (宝酒造社製) を用いて使用説明書に従い、連結した。この様にして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌DH5 $\alpha$ 株を形質転換した。形質転換株の10個のクローンより各プラスミドDNAを調製し、AutoRead Sequencing Kit (Pharmacia社製) に添付の説明書に従って反応後、A.L.F. DNA Sequencer (Pharmacia社製) により電気泳動し、挿入されたcDNAの塩基配列を決定した結果、目的の塩基配列を有する第2図に示したプラスミドpBS $\Delta$ hC $\gamma$ 1-IL-2を得た。

(2) hC $\gamma$ 1の完全長cDNAと成熟型hIL-2の完全長cDNAから成るcDNAを有するプラスミドpBS $\Delta$ hC $\gamma$ 1-IL-2の構築

まず、特開平10-257893に記載のプラスミドpBS $\Delta$ hC $\gamma$ 1の3 $\mu$ gを10 $\mu$ lの10mMトリス-塩酸 (pH7.5)、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTTから成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素ApaI (宝酒造社製) を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10 $\mu$ lの50mMトリス-塩酸 (pH7.5)、10mM塩化マグネシウム、1mM DTTおよび100mM塩化ナトリウムから成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素EcoT22I (宝酒造社製) を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製) を用いて添付の説明書に従い、約0.92kbのApaI-EcoT22I断片を約1 $\mu$ g回収した。

次に、上記実施例1の1項(1)で得られたプラスミドpBS $\Delta$ hC $\gamma$ 1-IL-2の3 $\mu$ gを10 $\mu$ lの10mMトリス-塩酸 (pH7.5)、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTTから成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素ApaI (宝酒造社製) を加えて37°Cで1

時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10 $\mu$ lの50mMトリス-塩酸 (pH7.5)、10mM塩化マグネシウム、1mM DTTおよび100mM塩化ナトリウムから成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素EcoT22I (宝酒造社製) を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製) を用いて添付の説明書に従い、約3.40kbのApaI-EcoT22I断片を約2 $\mu$ g回収した。

次に、上記で得られたプラスミドpBShC $\gamma$ 1のApaI-EcoT22I断片0.1 $\mu$ gとプラスミドpBS $\Delta$ hC $\gamma$ 1-IL-2のApaI-EcoT22I断片0.1 $\mu$ gを全量10 $\mu$ lの滅菌水に加え、DNA ligation Kit Ver.2 (宝酒造社製) を用いて使用説明書に従い、連結した。この様にして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌DH5 $\alpha$ 株を形質転換し、第3図に示したプラスミドpBShC $\gamma$ 1-IL-2を得た。得られたプラスミドの10 $\mu$ gを用い、AutoRead Sequencing Kit (Pharmacia社製) に添付の説明書に従って反応後、A.L.F. DNA Sequencer (Pharmacia社製) により電気泳動し、挿入されたcDNAの塩基配列を決定した結果、目的の塩基配列を有するプラスミドが得られたことを確認した。

## 2. KM8969-hIL-2の動物細胞を用いた安定発現

### (1) KM8969-hIL-2の安定発現ベクターの構築

特開平10-257893に記載の抗GM2CDR移植抗体KM8969の安定発現ベクターpKANTEX796HM2Lm-28No.1と上記実施例1の1項(2)で得られたhC $\gamma$ 1とhIL-2との融合蛋白質をコードするcDNAを有するプラスミドpBShC $\gamma$ 1-IL-2を用いてKM8969-hIL-2の安定発現ベクターを以下の様にして構築した。

特開平10-257893に記載のプラスミドpKANTEX796HM2Lm-28No.1の3 $\mu$ gを10 $\mu$ lの10mMトリス-塩酸 (pH7.5)、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTTから成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素ApaI (宝酒造社製) を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10 $\mu$ lの20mMトリス-塩酸 (pH8.5)、10mM塩化マグネシウム、1mM DTTおよび100mM塩化カリウムから成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素BamHI (宝酒造社製) を加えて30°Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製) を用いて添付の説明書に従い、約12.57kbのApaI-BamHI断片を約2 $\mu$ g回収した。



次に、実施例1の1項(2)で得られたプラスミドpBShC $\gamma$ 1-IL-2の3 $\mu$ gを10 $\mu$ lの10mMトリス-塩酸(pH7.5)、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTTから成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素ApaI(宝酒造社製)を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10 $\mu$ lの20mMトリス-塩酸(pH8.5)、10mM塩化マグネシウム、1mM DTTおよび100mM塩化カリウムから成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素BamHI(宝酒造社製)を加えて30°Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、QIAquick Gel Extraction Kit(QIAGEN社製)を用いて添付の説明書に従い、約1.45kbのApaI-BamHI断片を約2 $\mu$ g回収した。

次に、上記で得られたプラスミドpKANTEX796HM2Lm-28No.1由来のApaI-BamHI断片0.1 $\mu$ gとプラスミドpBShC $\gamma$ 1-IL-2由来のApaI-BamHI断片0.1 $\mu$ gを全量10 $\mu$ lの滅菌水に加え、DNA ligation Kit Ver.2(宝酒造社製)を用いて使用説明書に従い、連結した。この様にして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌DH5 $\alpha$ 株を形質転換し、第4図に示したKM8969-hIL-2の安定発現ベクターpKANTEX8969-hIL2を得た。得られたプラスミドの10 $\mu$ gを用い、AutoRead Sequencing Kit(Pharmacia社製)に添付の説明書に従って反応後、A.L.F. DNA Sequencer(Pharmacia社製)により電気泳動し、塩基配列を決定した結果、目的のDNAがクローニングされたプラスミドが得られたことを確認した。

#### (2) KM8969-hIL-2の動物細胞での発現

上記実施例1の2項(1)で得られたKM8969-hIL-2の安定発現ベクターpKANTEX8969-hIL2を用いてKM8969-hIL-2の動物細胞での発現を以下の様にして行った。

発現ベクターpKANTEX8969-hIL2の4 $\mu$ gを $4 \times 10^6$ 細胞のラットミエローマ細胞株YB2/0細胞(ATCC CRL1662)へエレクトロポレーション法[サイトテクノロジー(Cytotechnology), 3, 133 (1990)]により導入後、40mlのRPMI640-FBS(10)(FBS(GIBCO BRL社製)を10%含むRPMI640培地)に懸濁し、96ウェルマイクロタイタープレート(住友ベークライト社製)に200 $\mu$ l/ウェルずつ分注した。5%CO<sub>2</sub>インキュベーター内で37°C、24時間培養した後、G418を0.5mg/mlになる様に添加して1~2週間培養した。G418耐性を示す形質転換株のコロニーが出現し、コンフルエントになったウェルより培養上清を回収し、上清中の抗GM2CDR移植抗体KM8969に由

来するGM2結合活性を実施例1の3項に示すELISA法により測定した。

培養上清中に抗GM2CDR移植抗体KM8969に由来するGM2結合活性が認められたウエルの形質転換株については、dhfr増幅系を利用して抗体発現量を増加させる目的で、G418を0.5mg/ml、dhfr産物のジヒドロ葉酸還元酵素（以下、DHFRと表記する）の阻害剤であるメソトレキセート（以下、MTXと表記する：SIGMA社製）を50nM含むRPMI1640-FBS(10)培地に1~2×10<sup>5</sup>細胞/mlになる様に懸濁し、24ウェルプレート（Greiner社製）に2mlずつ分注した。5%CO<sub>2</sub>インキュベーター内で37°Cで1~2週間培養して、50nM MTX耐性を示す形質転換株を誘導した。形質転換株がウェルにコンフルエントになった時点で培養上清中の抗GM2CDR移植抗体KM8969に由来するGM2結合活性を実施例1の3項に示すELISA法により測定した。培養上清中に抗GM2CDR移植抗体KM8969に由来するGM2結合活性が認められたウエルの形質転換株については、上記と同様の方法により、MTX濃度を100nM、200nMと順次上昇させ、最終的にG418を0.5mg/ml、MTXを200nMの濃度で含むRPMI1640-FBS(10)培地で増殖可能かつ、KM8969-hIL-2を高発現する形質転換株を得た。得られた形質転換株については、2回の限界希釈法による単一細胞化（クローン化）を行い、最終的に約6μg/10<sup>6</sup>細胞/24hrの発現量を示す形質転換細胞クローンKM8969hIL2を得た。なお、KM8969hIL2は平成11年7月22日付で、工業技術院生命工学工業技術研究所（日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号）にFERM BP-6792として寄託されている。

### （3）KM8969-hIL-2の培養上清からの精製

上記実施例1の2項（2）で得られたKM8969-hIL-2を発現する形質転換細胞クローンKM8969hIL2をG418を0.5mg/ml、MTXを200nMの濃度で含むGIT培地（日本製薬社製）に1~2×10<sup>5</sup>細胞/mlとなる様に懸濁し、175cm<sup>2</sup>フラスコ（Greiner社製）に200mlずつ分注した。5%CO<sub>2</sub>インキュベーター内で37°Cで5~7日間培養し、コンフルエントになった時点で培養上清を回収した。培養上清約4LよりProsep-A（Bioprocessing社製）カラムを用いて、添付の説明書に従い、約30mgのKM8969-hIL-2を精製した。得られたKM8969-hIL-2および抗GM2CDR移植抗体KM8969の約4μgを、公知の方法[ネイチャー(Nature), 227, 680 (1970)]に従って電気泳動し、分子量および製精度を調べた。その結果を第5図に示した。第5図に示した様に、精製したKM8969-hIL-2は、非還元条件下では分子量は約180Kdであり、還元条件下では約65Kdと約25Kdの2本のバンドが認められた。これらの分子量は、KM8969

—hIL-2のH鎖とhIL-2およびL鎖のcDNAの塩基配列から推定される分子量（H鎖とhIL-2：約65Kd、L鎖：約23Kd、分子全体：約176Kd）とほぼ一致し、抗体分子としての構造は、hIL-2の融合後においても保たれていることが確認された。

### 3. 抗体の各種ガングリオシドに対する結合活性の測定（ELISA法）

抗体の各種ガングリオシドに対する結合活性は以下の様にして測定した。

2nmolの各種ガングリオシドを10 $\mu$ gのジパルミトイルフォスファチジルコリン（SIGMA社製）と5 $\mu$ gのコレステロール（SIGMA社製）とを含む2mlのエタノール溶液に溶解した。該溶液の20 $\mu$ l（20pmol/ウェルとなる）または該溶液をエタノールで希釈した溶液の20 $\mu$ lを96ウェルのELISA用のプレート（Greiner社製）の各ウェルにそれぞれ分注し、風乾後、1%BSAを含むPBS（以下、1%BSA-PBSと表記する）を100 $\mu$ l/ウェルで加え、室温で1時間反応させて残存する活性基をブロックした。1%BSA-PBSを捨て、形質転換株の培養上清或いは精製した抗体の各種希釈溶液を50 $\mu$ l/ウェルで加え、室温で1時間反応させた。反応後、各ウェルを0.05%Tween20を含むPBS（以下、Tween-PBSと表記する）で洗浄後、1%BSA-PBSで3000倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒトIgG(H&L)抗体溶液（American Qualex社製）を二次抗体溶液として、50 $\mu$ l/ウェルで加え、室温で1時間反応させた。反応後、Tween-PBSで洗浄後、ABTS基質液[2,2'-アジノ-ビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)アンモニウム]の0.55gを1Lの0.1Mクエン酸緩衝液(pH4.2)に溶解し、使用直前に過酸化水素を1 $\mu$ l/mlで添加した溶液]を50 $\mu$ l/ウェルで加えて発色させ、415nmの吸光度（以下、OD415と表記する）を測定した。

### 4. KM8969-hIL-2の活性評価

#### (1) KM8969-hIL-2のGM2に対する反応性（ELISA法）

精製したKM8969-hIL-2のGM2（DIA-IATRON社製）に対する反応性を実施例1の3項に記載の方法に従い、測定した。第6図は、ELISA用のプレートの各ウェルに吸着させるGM2の量を20pmol/ウェルに固定し、添加する抗GM2CDR移植抗体KM8969およびKM8969-hIL-2の濃度を変化させて反応性を検討した結果である。第6図に示した様に、KM8969-hIL-2は抗GM2CDR移植抗体KM8969と同等以上のGM2に対する結合活性を有していることが示された。また、ELISA用のプレートの各ウェルに吸着させるガングリオシドの種類を変えて（吸着量：20pmol/ウェル）、一定濃度（10 $\mu$ g/ml）の抗GM2CDR移植抗体KM8969およびKM8969-hIL-2の反応性を検討した結

果、KM8969-hIL-2は抗GM2CDR移植抗体KM8969と同様にGM2に対して強く結合することを確認した。

### (2) KM8969-hIL-2のhIL-2活性の評価

精製したKM8969-hIL-2のhIL-2としての活性を以下に示す方法に従い、測定した。hIL-2に対して濃度依存的な増殖を示すマウスT細胞株CTLL-2 (ATCC TIB214) を $2 \times 10^5$ 細胞/mlの濃度でRPMI1640-FBS(10)培地に懸濁し、96ウェルマイクロタイタープレート (住友ベークライト社製) に50 $\mu$ l/ウェルずつ分注した。各ウェルにhIL-2 (R&D SYSTEMS社製) 或いは精製したKM8969-hIL-2をRPMI1640-FBS(10)培地で各種濃度に希釈した溶液の50 $\mu$ lを加え、5%CO<sub>2</sub>インキュベーター内で37°Cで30時間培養した。培養後、Cell Counting Kit (同仁化学研究所製) を用いて使用説明書に従い、生細胞数を測定した。その結果を第7図に示した。第7図に示した様に、KM8969-hIL-2はhIL-2と同程度のCTLL-2細胞の増殖支持活性を示した。以上の結果は、KM8969-hIL-2のhIL-2としての活性は抗GM2CDR移植抗体KM8969との融合後においても保たれていることを示している。

### (3) KM8969-hIL-2によるヒトエフェクター細胞の活性化と細胞障害活性の増強

KM8969-hIL-2のhIL-2部分によるヒトエフェクター細胞の活性化と、それに伴う細胞障害活性の増強を *in vitro* で評価するため、以下に示す方法に従い、細胞障害活性を測定した。

#### a. 標的細胞溶液の調製

RPMI1640-FBS(10)培地で培養したヒト小細胞肺癌培養細胞株SBC-3 (JCRB 0818) の $1 \times 10^6$ 細胞を調製し、放射性物質であるNa<sub>2</sub><sup>51</sup>CrO<sub>4</sub>を1.85MBq当量加えて37°Cで1時間反応させ、細胞を放射標識した。反応後、RPMI1640-FBS(10)培地で懸濁および遠心分離操作により3回洗浄し、培地に再懸濁し、4°Cで30分間氷中に放置して放射性物質を自然解離させた。遠心分離後、RPMI1640-FBS(10)培地を5ml加え、 $2 \times 10^5$ 細胞/mlに調製し、標的細胞溶液とした。

#### b. ヒトエフェクター細胞溶液の調製

健康人静脈血50mlを採取し、ヘパリンナトリウム (武田薬品工業社製) 0.5mlを加え穏やかに混ぜた。これをPolymorphprep (Nycomed Pharma AS社製) を用いて使用説明書に従い、遠心分離 (1500~1800g、30分間) して単核球層を分離した。RPMI1640-FBS(10)培地で3回遠心分離 (1500~1800g、5分間) して洗浄後、培

地を用いて $5 \times 10^5$ 細胞/mlの各密度に再懸濁し、ヒトエフェクター細胞溶液とした。

c. ヒトエフェクター細胞の活性化

96ウェルU字底プレート（Falcon社製）の各ウェルにb.で調製したエフェクター細胞溶液100 $\mu$ lを分注した（ $5 \times 10^4$ 細胞/ウェル）。さらにKM8969或いはKM8969-hIL-2を各最終濃度11.1nMとなる様に50 $\mu$ lずつ添加し、37°C、5%CO<sub>2</sub>インキュベーター内で24時間反応させた。

d. 細胞障害活性の測定

c.で用意したプレートの各ウェルにa.で調製した標的細胞溶液の50 $\mu$ l（ $1 \times 10^4$ 細胞/ウェル）を添加した。この時、エフェクター細胞と標的細胞の比は5:1となる。37°Cで4時間反応後、プレートを遠心分離し、上清の<sup>51</sup>Cr量を $\gamma$ -カウンターにて測定した。自然解離<sup>51</sup>Cr量は、エフェクター細胞溶液、抗体溶液の代わりに培地のみを用いて上記と同様の操作を行い、上清の<sup>51</sup>Cr量を測定することにより求めた。全解離<sup>51</sup>Cr量は、抗体溶液の代わりに培地のみを、エフェクター細胞溶液の代わりに5規定水酸化ナトリウムを添加し、上記と同様の操作を行い、上清の<sup>51</sup>Cr量を測定することにより求めた。細胞障害活性は下式により求めた。

$$\text{ADCC活性 (\%)} = \frac{\text{検体上清中の}^{51}\text{Cr量} - \text{自然解離}^{51}\text{Cr量}}{\text{全解離}^{51}\text{Cr量} - \text{自然解離}^{51}\text{Cr量}} \times 100$$

その結果を第8図に示した。第8図に示した様に、KM8969-hIL-2はKM8969よりも強い細胞障害活性を誘導することが明らかとなった。本結果は、KM8969-hIL-2を用いてヒトエフェクター細胞を活性化でき、細胞障害活性が増強されることを示したものであり、ヒトへの臨床応用においても同様の効果が期待できることを示唆する結果である。

産業上の利用可能性

本発明により、GM2に特異的に反応する抗体の誘導體が提供される。

「配列表フリーテキスト」

配列番号 3 ー人工配列の説明：合成DNA

配列番号 4 ー人工配列の説明：合成DNA

配列番号 5 ー人工配列の説明：合成DNA

配列番号 6 ー人工配列の説明：合成DNA

## 請 求 の 範 囲

1 ガングリオシドGM2に特異的に反応するモノクローナル抗体またはその抗体断片と、放射性同位元素、蛋白質または低分子の薬剤とを結合させた抗体の誘導体。

2 ガングリオシドGM2に特異的に反応するモノクローナル抗体が、ハイブリドーマが産生する抗体、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1記載の抗体の誘導体。

3 モノクローナル抗体のH鎖V領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号9、10および11で示されるアミノ酸配列を含む請求項1または2記載の抗体の誘導体。

4 モノクローナル抗体のL鎖V領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号12、13および14で示されるアミノ酸配列を含む請求項1または2記載の抗体の誘導体。

5 モノクローナル抗体の重鎖（H鎖）可変領域（V領域）のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号9、10および11、軽鎖（L鎖）V領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号12、13および14で示されるアミノ酸配列を含む請求項1または2記載の抗体の誘導体。

6 ハイブリドーマが産生する抗体がKM796（FERM BP-3340）である、請求項2記載の抗体の誘導体。

7 ヒト化抗体が、ヒト型キメラ抗体またはヒト型CDR移植抗体である、請求項2記載の抗体の誘導体。

8 ヒト型キメラ抗体が、ガングリオシドGM2に対するハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のアミノ酸配列を含む、請求項7記載のヒト型キメラ抗体の誘導体。

9 ヒト型キメラ抗体が、ガングリオシドGM2に対するハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域、ならびにヒト抗体のH鎖定常領域（C領域）およびL鎖C領域のアミノ酸配列を含む、請求項7記載のヒト型キメラ抗体の誘導体。

10 H鎖V領域が配列番号7で示されるアミノ酸配列を含む、請求項8または9記

載のヒト型キメラ抗体の誘導体。

1 1 L鎖V領域が配列番号8で示されるアミノ酸配列を含む、請求項8または9記載のヒト型キメラ抗体の誘導体。

1 2 H鎖V領域が配列番号7で示されるアミノ酸配列を含み、L鎖V領域が配列番号8で示されるアミノ酸配列を含む請求項8または9記載のヒト型キメラ抗体の誘導体。

1 3 H鎖V領域が配列番号7で示されるアミノ酸配列を含み、L鎖V領域が配列番号8で示されるアミノ酸配列を含む請求項8または9記載のヒト型キメラ抗体KM966の誘導体。

1 4 ヒト型CDR移植抗体が、ガングリオシドGM2に対するモノクローナル抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のCDRのアミノ酸配列を含む、請求項7記載のヒト型CDR移植抗体の誘導体。

1 5 ヒト型CDR移植抗体が、ガングリオシドGM2に対するモノクローナル抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のCDRとヒト抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のフレームワーク領域 (FR) のアミノ酸配列を含む、請求項7記載のヒト型CDR移植抗体の誘導体。

1 6 ヒト型CDR移植抗体が、ガングリオシドGM2に対するモノクローナル抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のCDR、ヒト抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のFR、ならびにヒト抗体のH鎖C領域およびL鎖C領域のアミノ酸配列を含む、請求項7記載のヒト型CDR移植抗体の誘導体。

1 7 抗体のH鎖V領域のCDR 1、CDR2およびCDR 3 がそれぞれ配列番号9、10および11で示されるアミノ酸配列を含む、請求項14～16のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体の誘導体。

1 8 抗体のL鎖V領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号12、13および14で示されるアミノ酸配列を含む、請求項14～16のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体の誘導体。

1 9 抗体のH鎖V領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号9、10および11で示されるアミノ酸配列を含み、L鎖V領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号12、13および14で示されるアミノ酸配列を含む、請求項14～16のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体の誘導体。



- 2 0 抗体のH鎖V領域が配列番号15で示されるアミノ酸配列を含む請求項1 4～1 6のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体の誘導体。
- 2 1 抗体のL鎖V領域が配列番号16で示されるアミノ酸配列を含む請求項1 4～1 6のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体の誘導体。
- 2 2 抗体のH鎖V領域が配列番号15で示されるアミノ酸配列を含み、L鎖V領域が配列番号16で示されるアミノ酸配列を含む請求項1 4～1 6のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体の誘導体。
- 2 3 抗体のH鎖V領域が配列番号15で示されるアミノ酸配列を含み、L鎖V領域が配列番号16で示されるアミノ酸配列を含む請求項1 4～1 6のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体KM8969の誘導体。
- 2 4 抗体断片が、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、一本鎖抗体(scFv)、ジスルフィド安定化V領域断片(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 記載の抗体断片の誘導体。
- 2 5 抗体断片が、ガングリオシドGM2に対するハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のアミノ酸配列を含む、請求項2 4 記載の抗体断片の誘導体。
- 2 6 抗体断片が、ガングリオシドGM2に対するハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域、ならびにヒト抗体のH鎖C領域およびL鎖C領域のアミノ酸配列を含む、請求項2 4 記載の抗体断片の誘導体。
- 2 7 抗体断片が、抗体のH鎖V領域が配列番号7で示されるアミノ酸配列を含む、請求項2 5 または2 6 記載の抗体断片の誘導体。
- 2 8 抗体断片が、抗体のL鎖V領域が配列番号8で示されるアミノ酸配列を含む、請求項2 5 または2 6 記載の抗体断片の誘導体。
- 2 9 抗体断片が、抗体のH鎖V領域が配列番号7で示されるアミノ酸配列を含み、抗体のL鎖V領域が配列番号8で示されるアミノ酸配列を含む、請求項2 5 または2 6 記載の抗体断片の誘導体。
- 3 0 抗体断片が、抗体のH鎖V領域が配列番号7で示されるアミノ酸配列を含み、抗体のL鎖V領域が配列番号8で示されるアミノ酸配列を含む、請求項2 5 記載のハイブリドーマが産生する抗体KM796の抗体断片の誘導体。
- 3 1 抗体断片が、抗体のH鎖V領域が配列番号7で示されるアミノ酸配列を含み、

抗体のL鎖V領域が配列番号8で示されるアミノ酸配列を含む、請求項26記載のヒト型キメラ抗体KM966の抗体断片の誘導体。

32 抗体断片が、ガングリオシドGM2に対するヒト型CDR移植抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のアミノ酸配列を含む、請求項24記載の抗体断片の誘導体。

33 抗体断片が、ガングリオシドGM2に対するヒト型CDR移植抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域、ならびにヒト抗体のH鎖C領域およびL鎖C領域のアミノ酸配列を含む、請求項24記載の抗体断片の誘導体。

34 抗体断片が、抗体のH鎖V領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号9、10および11で示されるアミノ酸配列を含む、請求項32または33記載の抗体断片の誘導体。

35 抗体断片が、抗体のL鎖V領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号12、13および14で示されるアミノ酸配列を含む、請求項32または33記載の抗体断片の誘導体。

36 抗体断片が、抗体のH鎖V領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号9、10および11で示されるアミノ酸配列を含み、L鎖V領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号12、13および14で示されるアミノ酸配列を含む、請求項32または33記載の抗体断片の誘導体。

37 抗体断片が、抗体のH鎖V領域が配列番号15で示されるアミノ酸配列を含む、請求項32または33記載の抗体断片の誘導体。

38 抗体断片が、抗体のL鎖V領域が配列番号16で示されるアミノ酸配列を含む、請求項32または33記載の抗体断片の誘導体。

39 抗体断片が、抗体のH鎖V領域が配列番号15、抗体のL鎖V領域が配列番号16で示されるアミノ酸配列を含む、請求項32または33記載の抗体断片の誘導体。

40 抗体断片が、抗体のH鎖V領域が配列番号15で示されるアミノ酸配列を含み、抗体のL鎖V領域が配列番号16で示されるアミノ酸配列を含む、請求項32または33記載のヒト型CDR移植抗体KM8969の抗体断片の誘導体。

41 蛋白質がサイトカインである、請求項1記載のモノクローナル抗体の誘導体またはその抗体断片の誘導体。

42 サイトカインがヒトインターロイキン2 (hIL-2) である請求項41記載のモノクローナル抗体の誘導体またはその抗体断片の誘導体。

- 4 3 抗体のH鎖V領域とhIL-2との融合蛋白質が配列番号1記載のアミノ酸配列を有し、抗体のL鎖V領域が配列番号2記載のアミノ酸配列を有する請求項1記載の抗体の誘導体。
- 4 4 抗体の誘導体が、ヒト型CDR移植抗体KM8969とhIL-2とからなる請求項4 1～4 3のいずれか1項に記載の抗体の誘導体。
- 4 5 抗体の誘導体が、ヒト型CDR移植抗体KM8969とhIL-2とからなる請求項4 1～4 3のいずれか1項に記載の抗体の誘導体KM8969-hIL-2。
- 4 6 請求項1～4 5のいずれか1項に記載のガングリオシドGM2に特異的に反応するモノクローナル抗体の誘導体またはその抗体断片の誘導体をコードするDNA。
- 4 7 請求項4 6記載のDNAを含有する組換えベクター。
- 4 8 請求項4 7記載の組換えベクターを宿主細胞に導入して得られる形質転換株。
- 4 9 請求項4 5記載の誘導体を生産する形質転換株KM8969hIL2 (FERM BP-6792)。
- 5 0 請求項4 8または4 9記載の形質転換株を培地に培養し、培養物中に請求項1～4 5のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体の誘導体またはその抗体断片の誘導体を生成蓄積させ、該培養物から該抗体の誘導体またはその抗体断片の誘導体を採取することを特徴とする製造方法。
- 5 1 ガングリオシドGM2に特異的に反応する抗体断片。
- 5 2 抗体断片が、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、一本鎖抗体(scFv)、ジスルフィド安定化V領域断片(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5 1記載の抗体断片。
- 5 3 抗体断片が、ガングリオシドGM2に対するハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のアミノ酸配列を含む、請求項5 1記載の抗体断片。
- 5 4 抗体断片が、ガングリオシドGM2に対するハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域、ならびにヒト抗体のH鎖C領域およびL鎖C領域のアミノ酸配列を含む、請求項5 1記載の抗体断片。
- 5 5 抗体断片が、抗体のH鎖V領域が配列番号7で示されるアミノ酸配列を含む、

請求項53または54記載の抗体断片。

56 抗体断片が、抗体のL鎖V領域が配列番号8で示されるアミノ酸配列を含む、請求項53または54記載の抗体断片。

57 抗体断片が、抗体のH鎖V領域が配列番号7で示されるアミノ酸配列を含み、抗体のL鎖V領域が配列番号8で示されるアミノ酸配列を含む、請求項53または54記載の抗体断片。

58 抗体断片が、抗体のH鎖V領域が配列番号7で示されるアミノ酸配列を含み、抗体のL鎖V領域が配列番号8で示されるアミノ酸配列を含む、請求項53記載のハイブリドーマが産生する抗体KM796の抗体断片。

59 抗体断片が、抗体のH鎖V領域が配列番号7で示されるアミノ酸配列を含み、抗体のL鎖V領域が配列番号8で示されるアミノ酸配列を含む、請求項53または54記載のヒト型キメラ抗体KM966の抗体断片。

60 抗体断片が、ガングリオシドGM2に対するヒト型CDR移植抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のアミノ酸配列を含む、請求項52記載の抗体断片。

61 抗体断片が、ガングリオシドGM2に対するヒト型CDR移植抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域、ならびにヒト抗体のH鎖C領域およびL鎖C領域のアミノ酸配列を含む、請求項52記載の抗体断片。

62 抗体断片が、抗体のH鎖V領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号9、10および11で示されるアミノ酸配列を含む、請求項60または61記載の抗体断片。

63 抗体断片が、抗体のL鎖V領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号12、13および14で示されるアミノ酸配列を含む、請求項60または61記載の抗体断片。

64 抗体断片が、抗体のH鎖V領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号9、10および11で示されるアミノ酸配列を含み、L鎖V領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号12、13および14で示されるアミノ酸配列を含む、請求項60または61記載の抗体断片。

65 抗体断片が、抗体のH鎖V領域が配列番号15で示されるアミノ酸配列を含む、請求項60または61記載の抗体断片。

66 抗体断片が、抗体のL鎖V領域が配列番号16で示されるアミノ酸配列を含む、

請求項 6 0 または 6 1 記載の抗体断片。

6 7 抗体断片が、抗体のH鎖V領域が配列番号15で示されるアミノ酸配列を含み、抗体のL鎖V領域が配列番号16で示されるアミノ酸配列を含む、請求項 6 0 または 6 1 記載の抗体断片。

6 8 抗体断片が、抗体のH鎖V領域が配列番号15で示されるアミノ酸配列を含み、抗体のL鎖V領域が配列番号16で示されるアミノ酸配列を含む、請求項 6 0 または 6 1 記載のヒト型CDR移植抗体KM8969の抗体断片。

6 9 請求項 5 1 ～ 6 8 のいずれか 1 項に記載のガングリオシドGM2に特異的に反応する抗体断片をコードするDNA。

7 0 請求項 6 9 記載のDNAを含有する組換えベクター。

7 1 請求項 7 0 記載の組換えベクターを宿主細胞に導入して得られる形質転換株。

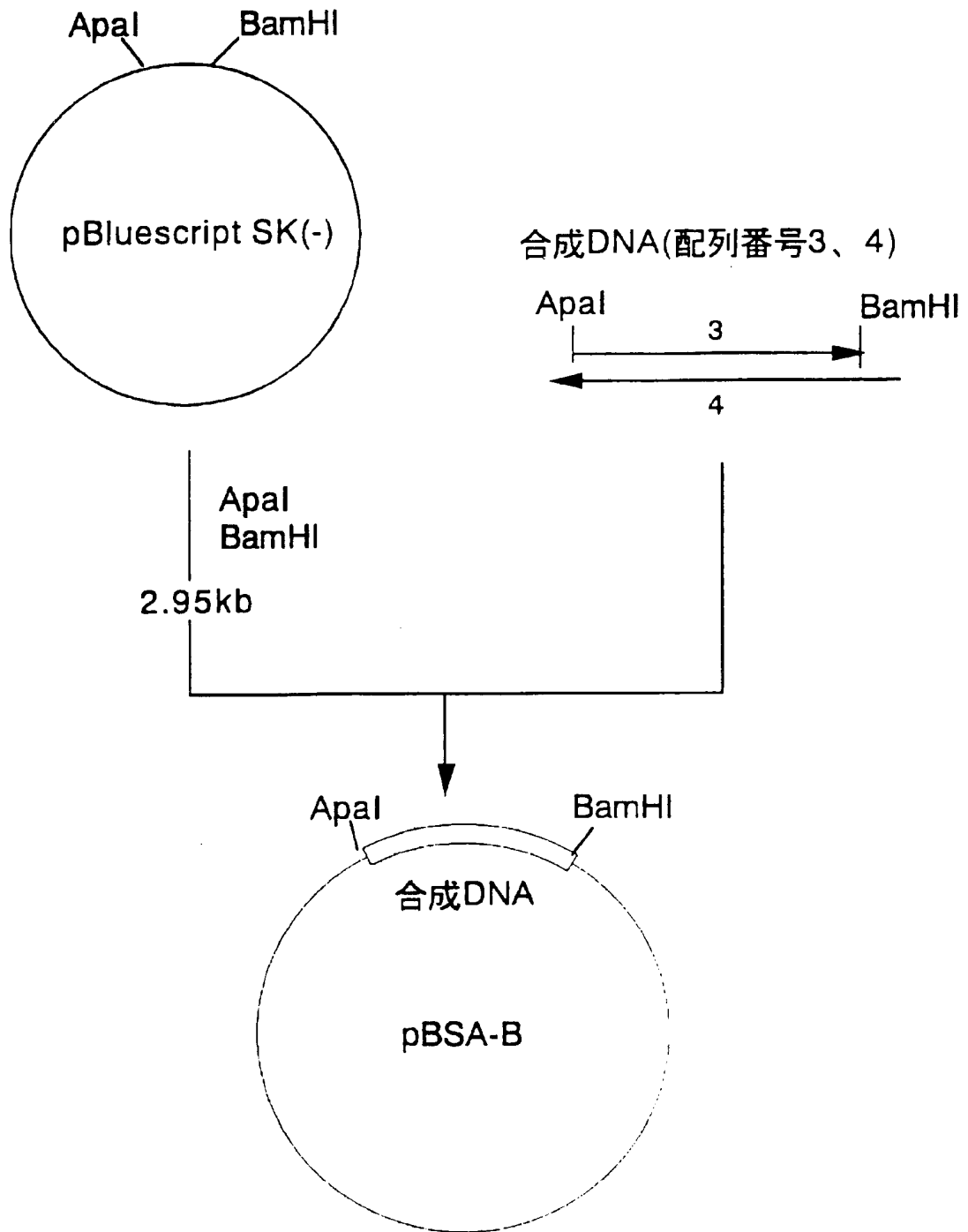
7 2 請求項 7 1 記載の形質転換株を培地に培養し、培養物中に請求項 5 2 ～ 6 8 のいずれか 1 項に記載の抗体断片を生成蓄積させ、該培養物から抗体断片を採取することを特徴とする抗体断片の製造方法。

7 3 請求項 1 ～ 4 5 記載のモノクローナル抗体の誘導体およびその抗体断片の誘導体、ならびに請求項 5 1 ～ 6 8 記載の抗体断片から選ばれる少なくとも 1 種からなる医薬。

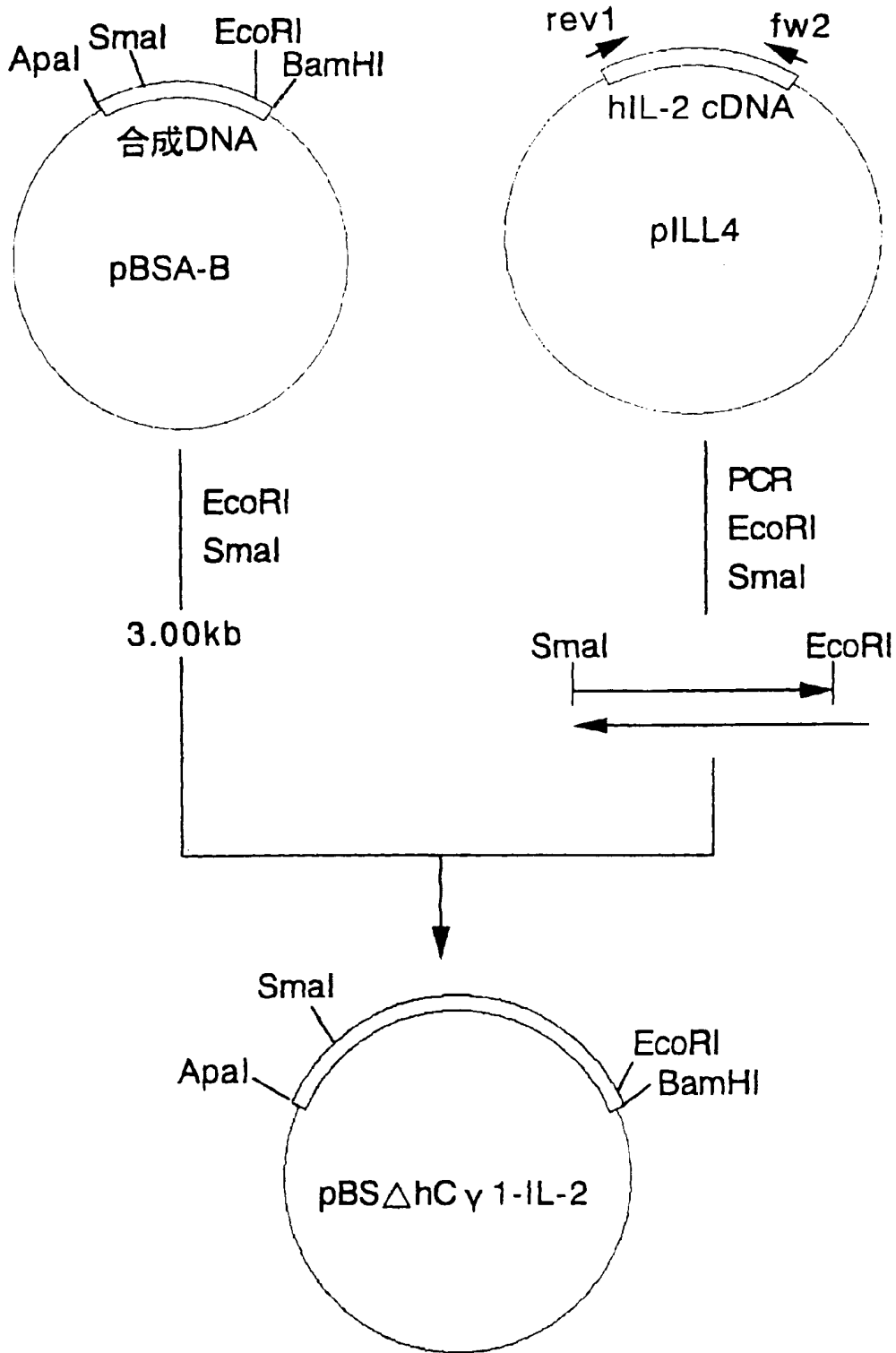
7 4 請求項 1 ～ 4 5 記載のモノクローナル抗体の誘導体およびその抗体断片の誘導体、ならびに請求項 5 1 ～ 6 8 記載の抗体断片から選ばれる少なくとも 1 種を有効成分として含有する癌の治療薬。

7 5 請求項 1 ～ 4 5 記載のモノクローナル抗体の誘導体およびその抗体断片の誘導体、ならびに請求項 5 1 ～ 6 8 記載の抗体断片から選ばれる少なくとも 1 種を有効成分として含有する癌の診断薬。

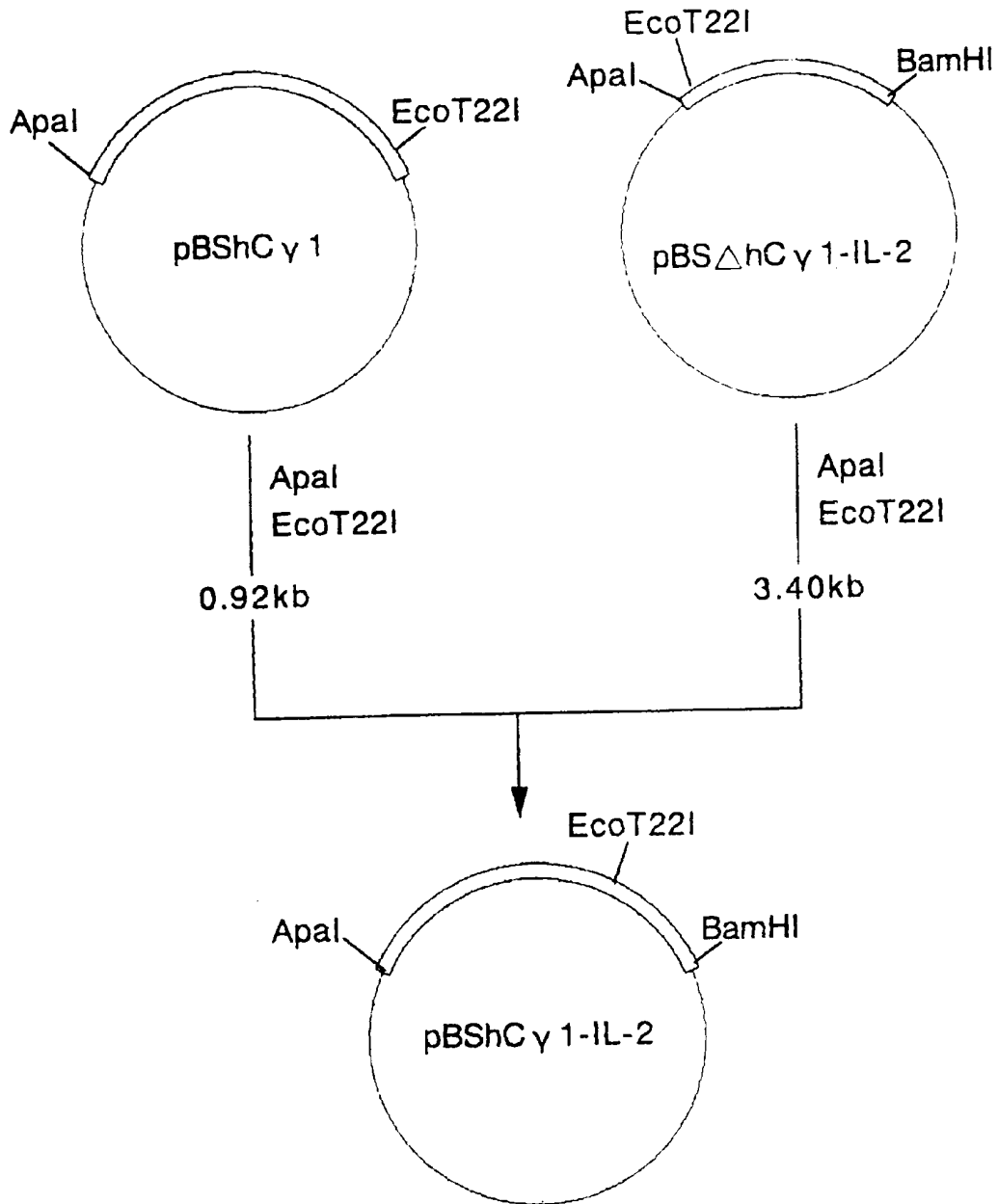
第 1 図



第 2 図

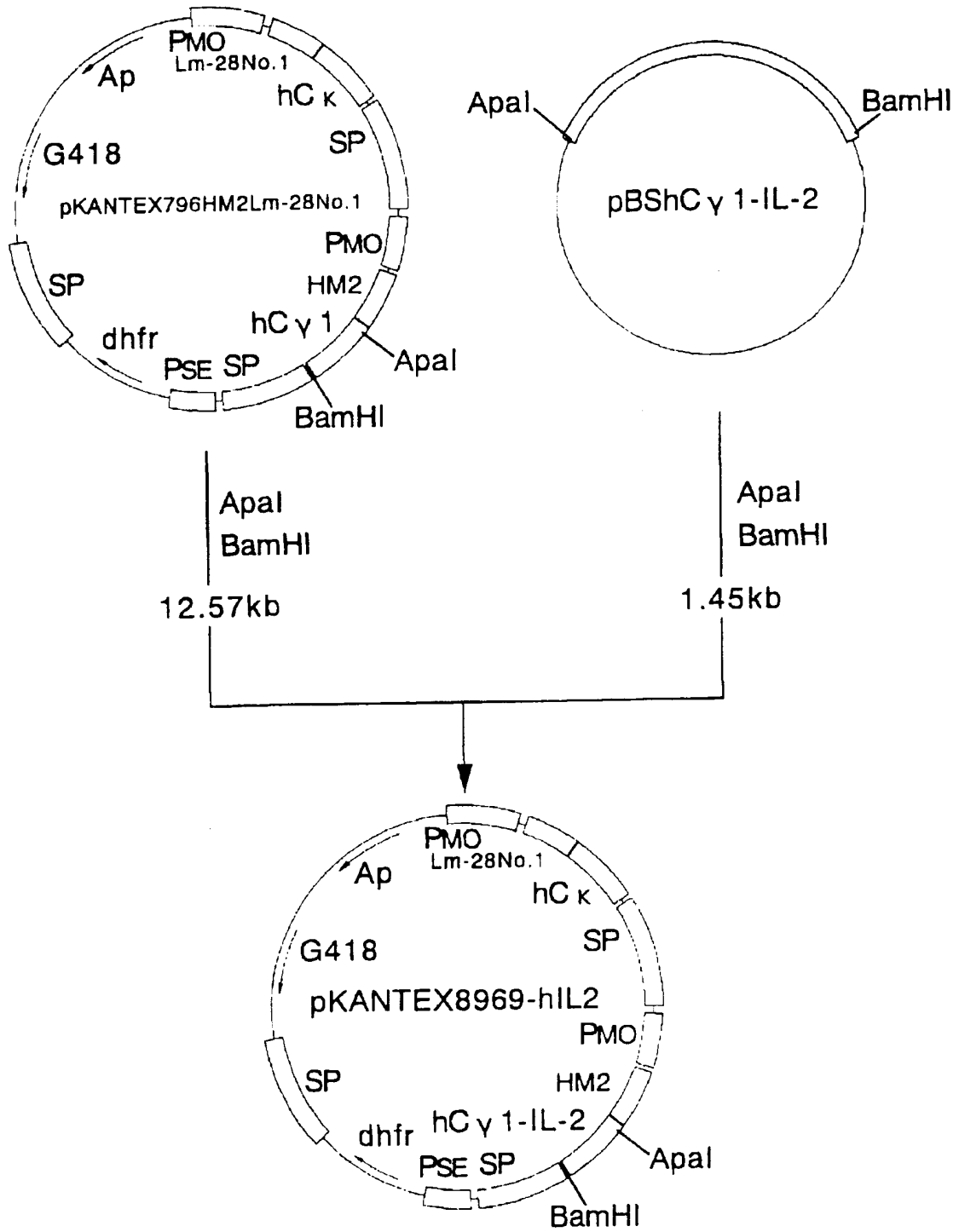


第 3 図

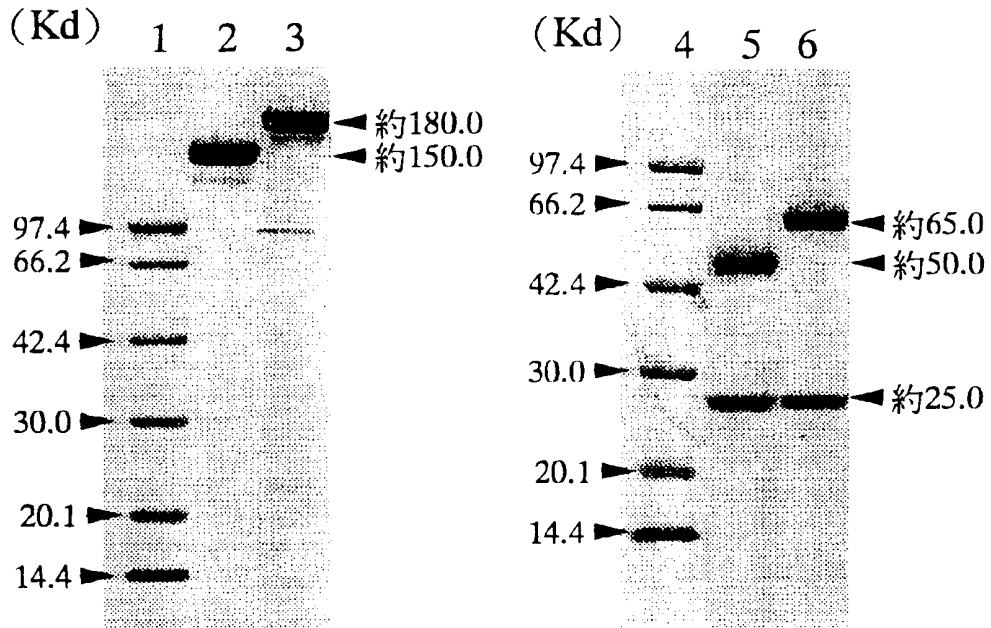




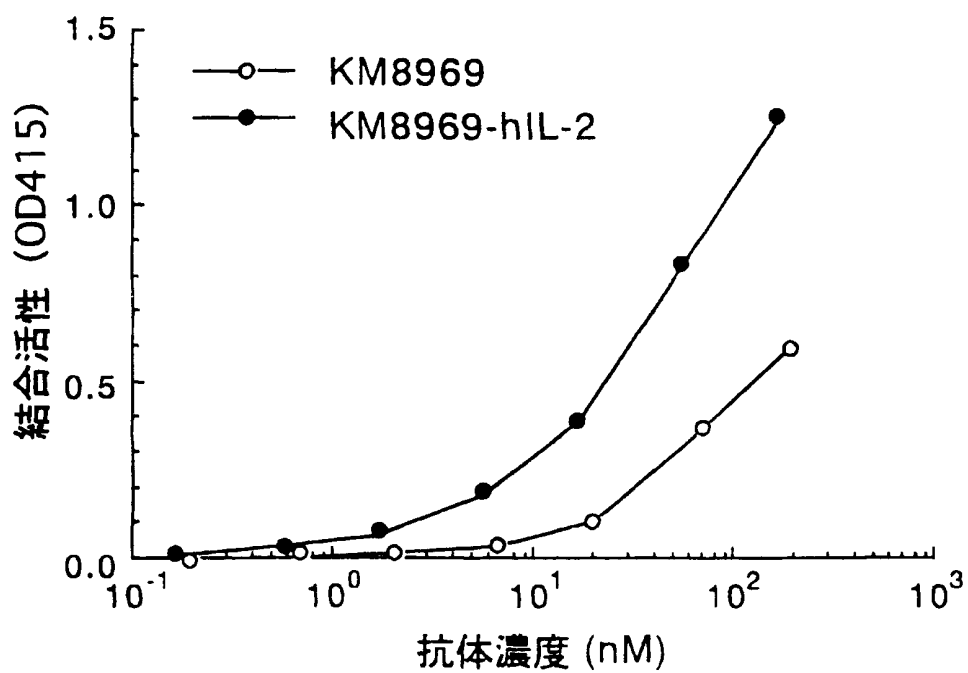
第 4 図



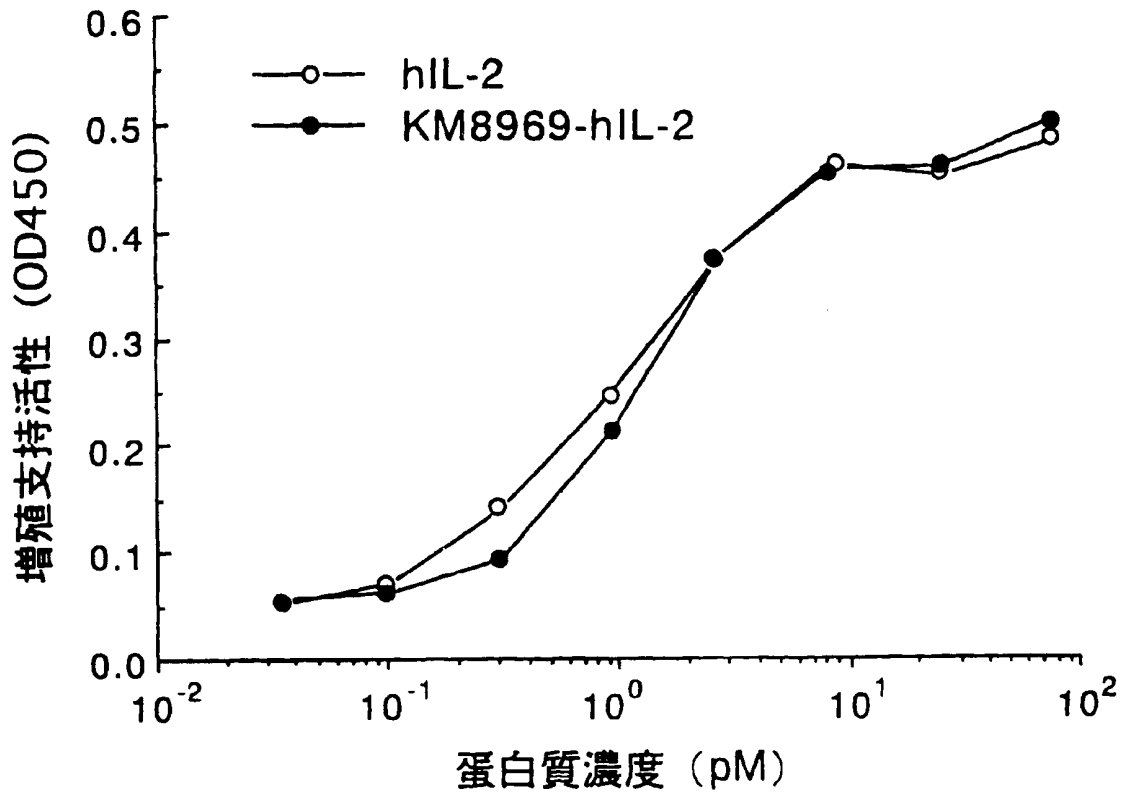
第 5 図



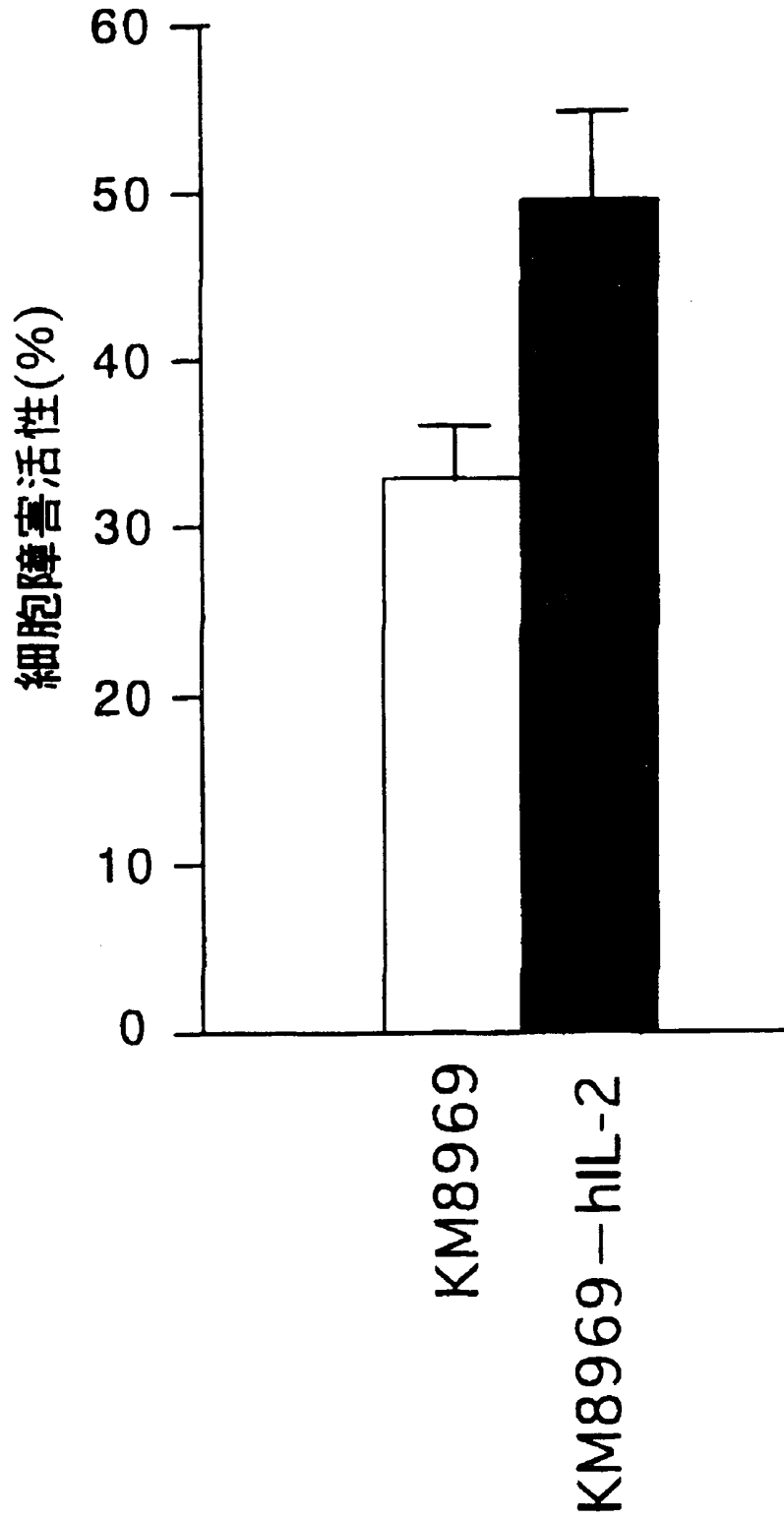
第 6 図



第 7 図



第 8 図



配 列 表

SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD

<120> Anti-GM2 antibody derivative

<130>11240W01

<140>

<141>

<150>H11-278292

<151>1999-09-30

<160> 16

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 583

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 1

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1

5

10

15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr



180	185	190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys		
195	200	205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp		
210	215	220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly		
225	230	235
240		
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile		
	245	250
		255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu		
	260	265
		270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His		
	275	280
		285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg		
	290	295
		300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys		
	305	310
		315
		320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu		
	325	330
		335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr		

4 / 14

340	345	350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu		
355	360	365
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp		
370	375	380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val		
385	390	400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp		
405	410	415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His		
420	425	430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro		
435	440	445
Gly Lys Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu		
450	455	460
Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn		
465	470	475
Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met		
485	490	495
Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu		



5 / 14

500 505 510

Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe  
 515 520 525

His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu  
 530 535 540

Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu  
 545 550 555 560

Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln  
 565 570 575

Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr  
 580

<210> 2

<211> 213

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 2

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Pro Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
 20 25 30

6 / 14

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Trp Ile Tyr  
 35 40 45

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Leu Gln Pro Glu  
 65 70 75 80

Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Tyr Thr  
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro  
 100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr  
 115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys  
 130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu  
 145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser  
 165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala  
 180 185 190

7 / 14

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe  
 195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys  
 210

<210> 3

<211> 76

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 3

catgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc ctctccctgt ctcccggggg 60  
 agaattcatt gatcag 76

<210> 4

<211> 85

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 4

gatcctgate aatgaattct cccccgggag acagggagag gctcttctgc gtgtagtggt 60  
 tgtgcagagc ctcatgcatg gggcc 85

<210> 5

8 / 14

&lt;211&gt; 37

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

&lt;400&gt; 5

gtctcccggg aaagcaccta ctagtagttc tacaaag

37

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 38

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

&lt;400&gt; 6

ccctgatcaa tgaattcaag tcagtggtga gatgatgc

38

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 120

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 7

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

1

5

10

15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

20

25

30

9 / 14

Asn Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Asn Asn Gly Gly Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60

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

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

Ala Thr Tyr Gly His Tyr Tyr Gly Tyr Met Phe Ala Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
 115 120

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 107

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 8

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly  
 1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
 20 25 30

10 / 14

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr  
                   35                                  40                                  45

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
           50                                  55                                  60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu  
   65                                  70                                  75                                  80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Tyr Thr  
                                   85                                  90                                  95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
                   100                                  105

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 9

Asp Tyr Asn Met Asp

1                                  5

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 10

11 / 14

Tyr Ile Tyr Pro Asn Asn Gly Gly Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Ser  
1 5 10 15

<210> 11

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 11

Tyr Gly His Tyr Tyr Gly Tyr Met Phe Ala Tyr  
1 5 10

<210> 12

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 12

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His  
1 5 10

<210> 13

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 13

12 / 14

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser

1 5

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 14

Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Tyr Thr

1 5

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 120

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 15

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

20 25 30

Asn Met Asp Trp Val Lys Gln Ser Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Asn Asn Gly Gly Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60







**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
PCT/JP00/06775

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
Int.Cl<sup>7</sup> C07K 16/18, C07K 19/00, C07K 14/55, C12N 15/13, C12N 15/62, C12N 15/26, C12N 5/10, C12P 21/08, A61K 39/395, A61P 35/00, G01N 33/566, G01N 33/577

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C07K 16/18, C07K 19/00, C07K 14/55, C12N 15/13, C12N 15/62, C12N 15/26, C12N 5/10, C12P 21/08, A61K 39/395, A61P 35/00, G01N 33/566, G01N 33/577

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
WPI (DIALOG) , BIOSIS (DIALOG) , MEDLINE (STN) , JICST FILE (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP, 882794, A2 (KYOWA HAKKO KOGYO KK), 09 December, 1998 (09.12.98) & JP, 10-257893, A & AU, 9859420, A & CA, 2226400, A	1-75
X	EP, 598998, A2 (KYOWA HAKKO KOGYO KK), 01 June, 1994 (01.06.94) & JP, 6-205694, A & AU, 9346181, A & CA, 2105618, A & US, 5830470, A	1-75
Y	JP, 4-1138, A (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.), 06 January, 1992 (06.01.92) (Family: none)	1-40, 46-50, 73-75
Y	GILLIES, S. D. et al., "Antibody-targeted interleukin 2 stimulates T-cell killing of autologous tumor cells", Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) Vol.89, No.4, pp.1428-1432	1-50, 73-75
Y	SABZEVARI, H. et al., "A recombinant antibody-interleukin 2 fusion protein suppresses growth of hepatic human neuroblastoma metastases in severe combined	1-50, 73-75

Further documents are listed in the continuation of Box C.  See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 30 November, 2000 (30.11.00)	Date of mailing of the international search report 12 December, 2000 (12.12.00)
---	--

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/06775

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	immunodeficiency mice", Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1994) Vol.91, No.20, pp.9626-9630  SABZEVARI, H. et al., "Natural killer cell-mediated eradication of neuroblastoma metastases to bone marrow by targeted interleukin-2 therapy", Blood (1998) Vol.91, No.5, pp.1706-1715	1-50,73-75

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/06775

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 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.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
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 II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

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

1. Claims 1 to 50 and claims 73 to 75 partly pertain to antibody derivatives wherein a monoclonal antibody specific to ganglioside GM2 or an antibody fragment thereof is bonded to a radioisotope, a protein or a low-molecular weight drug.
2. Claims 51 to 72 and claims 73 to 75 partly pertain to antibody fragments reacting specifically with ganglioside GM2.

Namely, there is no matter common to all of these claims. Therefore, the groups 1 and 2 of inventions as described above are not considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

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 an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
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 additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

<p>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))</p> <p style="text-align: center;">Int. Cl<sup>7</sup> C07K 16/18, C07K 19/00, C07K 14/55, C12N 15/13, C12N 15/62, C12N 15/26, C12N 5/10, C12P 21/08, A61K 39/395, A61P 35/00, G01N 33/566, G01N 33/577</p>														
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))</p> <p style="text-align: center;">Int. Cl<sup>7</sup> C07K 16/18, C07K 19/00, C07K 14/55, C12N 15/13, C12N 15/62, C12N 15/26, C12N 5/10, C12P 21/08, A61K 39/395, A61P 35/00, G01N 33/566, G01N 33/577</p>														
<p>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</p>														
<p>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)</p> <p style="text-align: center;">WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), MEDLINE (STN), JICSTファイル (JOIS)</p>														
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1" style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width:10%; padding: 5px;">引用文献の カテゴリー*</th> <th style="width:70%; padding: 5px;">引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示</th> <th style="width:20%; padding: 5px;">関連する 請求の範囲の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">X</td> <td style="padding: 5px;">EP, 882794, A2 (KYOWA HAKKO KOGYO KK) 9. 12月. 1998 (09. 12. 98) &amp; JP, 10-257893, A &amp; AU, 9859420, A &amp; CA, 2226400, A</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">1-75</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">X</td> <td style="padding: 5px;">EP, 598998, A2 (KYOWA HAKKO KOGYO KK) 1. 6月. 1994 (01. 06. 94) &amp; JP, 6-205694, A &amp; AU, 9346181, A &amp; CA, 2105618, A &amp; US, 5830470, A</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">1-75</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">Y</td> <td style="padding: 5px;">JP, 4-1138, A (協和醗酵工業株式会社) 6. 1月. 1992 (06. 01. 92) (ファミリーなし)</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">1-40, 46-50, 73-75</td> </tr> </tbody> </table>			引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	X	EP, 882794, A2 (KYOWA HAKKO KOGYO KK) 9. 12月. 1998 (09. 12. 98) & JP, 10-257893, A & AU, 9859420, A & CA, 2226400, A	1-75	X	EP, 598998, A2 (KYOWA HAKKO KOGYO KK) 1. 6月. 1994 (01. 06. 94) & JP, 6-205694, A & AU, 9346181, A & CA, 2105618, A & US, 5830470, A	1-75	Y	JP, 4-1138, A (協和醗酵工業株式会社) 6. 1月. 1992 (06. 01. 92) (ファミリーなし)	1-40, 46-50, 73-75
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号												
X	EP, 882794, A2 (KYOWA HAKKO KOGYO KK) 9. 12月. 1998 (09. 12. 98) & JP, 10-257893, A & AU, 9859420, A & CA, 2226400, A	1-75												
X	EP, 598998, A2 (KYOWA HAKKO KOGYO KK) 1. 6月. 1994 (01. 06. 94) & JP, 6-205694, A & AU, 9346181, A & CA, 2105618, A & US, 5830470, A	1-75												
Y	JP, 4-1138, A (協和醗酵工業株式会社) 6. 1月. 1992 (06. 01. 92) (ファミリーなし)	1-40, 46-50, 73-75												
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <span style="margin-left: 100px;"><input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</span></p>														
<table style="width:100%;"> <tr> <td style="width:50%; vertical-align: top; padding: 5px;"> <p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>「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</p> <p>「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</p> <p>「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)</p> <p>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</p> </td> <td style="width:50%; vertical-align: top; padding: 5px;"> <p>の日の後に公表された文献</p> <p>「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</p> <p>「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</p> <p>「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</p> <p>「&amp;」 同一パテントファミリー文献</p> </td> </tr> </table>			<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>「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</p> <p>「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</p> <p>「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)</p> <p>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</p>	<p>の日の後に公表された文献</p> <p>「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</p> <p>「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</p> <p>「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</p> <p>「&amp;」 同一パテントファミリー文献</p>										
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>「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</p> <p>「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</p> <p>「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)</p> <p>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</p>	<p>の日の後に公表された文献</p> <p>「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</p> <p>「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</p> <p>「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</p> <p>「&amp;」 同一パテントファミリー文献</p>													
<p>国際調査を完了した日</p> <p style="text-align: center;">30. 11. 00</p>	<p>国際調査報告の発送日</p> <p style="text-align: center; font-size: 1.2em;">12.12.00</p>													
<p>国際調査機関の名称及びあて先</p> <p style="text-align: center;">日本国特許庁 (ISA/JP)</p> <p style="text-align: center;">郵便番号 100-8915</p> <p style="text-align: center;">東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>	<p>特許庁審査官 (権限のある職員)</p> <p style="text-align: center;">高堀 栄二</p>	<table border="1" style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width:20%; text-align: center;">4 B</td> <td style="width:80%; text-align: center;">9 2 8 1</td> </tr> </table>	4 B	9 2 8 1										
4 B	9 2 8 1													
<p>電話番号 03-3581-1101 内線 3448</p>														

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	GILLIES, S. D. et al. "Antibody-targeted interleukin 2 stimulates T-cell killing of autologous tumor cells", Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) Vol. 89, No. 4, p. 1428-1432	1-50, 73-75
Y	SABZEVARI, H. et al. "A recombinant antibody-interleukin 2 fusion protein suppresses growth of hepatic human neuroblastoma metastases in severe combined immunodeficiency mice", Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1994) Vol. 91, No. 20, p. 9626-9630	1-50, 73-75
Y	SABZEVARI, H. et al. "Natural killer cell-mediated eradication of neuroblastoma metastases to bone marrow by targeted interleukin-2 therapy", Blood (1998) Vol. 91, No. 5, p. 1706-1715	1-50, 73-75

## 第I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.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ 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、
2.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ 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.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ 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II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. 請求の範囲1-50、73-75の一部は、ガングリオシドGM2に特異的なモノクローナル抗体又はその抗体断片と、放射性同位元素、蛋白質又は低分子の薬剤とを結合させた抗体の誘導体に関するものである。
2. 請求の範囲51-72、73-75の一部は、ガングリオシドGM2に特異的に反応する抗体断片に関するものである。

上記請求の範囲の全てに共通の事項はなく、上記1~2の発明群が単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であるとは認められない。

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の範囲について作成した。
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の範囲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の範囲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の範囲について作成した。

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なかった。