

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2006年5月4日 (04.05.2006)

PCT

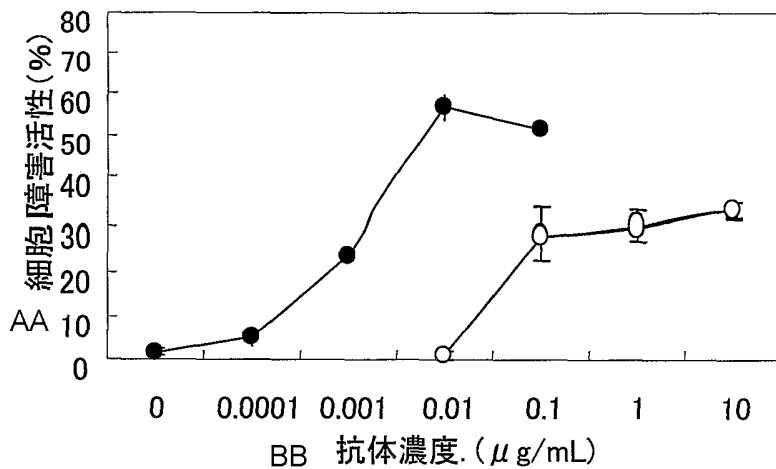
(10) 国際公開番号
WO 2006/046751 A1

- (51) 国際特許分類:
C07K 16/18 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *C12P 21/08* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2005/020057
- (22) 国際出願日: 2005年10月26日 (26.10.2005)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
 特願2004-311356
 2004年10月26日 (26.10.2004) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI)
- KAISHA) [JP/JP]; 〒1158543 東京都北区浮間五丁目5番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
 (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 中野 清孝 (NAKANO, Kiyotaka) [JP/JP]; 〒3004101 茨城県新治郡新治村永井153-2 中外製薬株式会社内 Ibaraki (JP). 周郷 泉 (SUGO, Izumi) [JP/JP]; 〒4128513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 杉本 正道 (SUGIMOTO, Masamichi) [JP/JP]; 〒2478530 神奈川県鎌倉市梶原200 中外製薬株式会社内 Kanagawa (JP). 石黒 敬弘 (ISHIGURO, Takahiro) [JP/JP]; 〒2478530 神奈川県鎌倉市梶原200 中外製薬株式会社内 Kanagawa (JP). 田中 めぐみ (TANAKA, Megumi) [JP/JP]; 〒4128513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内

[続葉有]

(54) Title: ANTI-GLYPICAN 3 ANTIBODY HAVING MODIFIED SUGAR CHAIN

(54) 発明の名称: 糖鎖改変抗グリピカン3抗体



AA...CYTOTOXIC ACTIVITY (%)

BB...ANTIBODY CONCENTRATION (μg/mL)

(57) Abstract: An anti-glypican 3 antibody having a modified sugar chain, more specifically, an anti-glypican 3 antibody lacking fucose. This anti-glypican 3 antibody can be produced by a method for producing an antibody with the sugar chain modification as described above wherein a nucleic acid encoding an anti-glypican 3 antibody is transferred into host cells with lowered ability to add fucose (for example, YB2/0 cells) or fucose transporter-deficient cells and then the host cells are cultured. Because of having a high cytotoxic activity, this anti-glypican 3 antibody having a modified sugar chain is useful as a cell growth inhibitor such as an anticancer agent.

(57) 要約: 糖鎖が改変された抗グリピカン3抗体、より具体的にはフコースが欠損した抗グリピカン3抗体が開示される。本発明の抗グリピカン3抗体は、上記の糖鎖が修飾された抗体の製造方法において、YB2/0細胞などのフコース付加能が低下した宿主細胞やフコーストランスポーター欠損細胞に抗グリピカン3抗体をコードする核酸を導入し、該宿主細胞を培養することにより製造することができる。本発明の糖鎖改変抗グリピカン3抗体は、高い細胞障害

[続葉有]

WO 2006/046751 A1



Shizuoka (JP). 飯島 成幸 (IIJIMA, Shigeyuki) [JP/JP];
〒4128513 静岡県御殿場市駒門 1 丁目 1 3 5 番地 中
外製薬株式会社内 Shizuoka (JP).

(74) 代理人: 大野 聖二, 外(OHNO, Seiji et al.); 〒1006036
東京都千代田区霞が関 3 丁目 2 番 5 号 霞が関ビル
3 6 階 大野総合法律事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が
可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,
BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR,
LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU,
SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT,
TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可
能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD,
SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY,
KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG,
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE,
IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

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。

明細書

糖鎖改変抗グリピカン3抗体

技術分野

- 5 本発明は、細胞障害活性、特に抗体依存性細胞傷害性（Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity ; ADCC）が増強された、グリピカン3抗原に対する抗体（抗グリピカン3抗体）およびその製造方法に関する。

背景技術

- 10 グリピカン3（GPC3）は、細胞表面上に存在するヘパラン硫酸プロテオグリカンのファミリーの1つであり、発生における細胞分裂や、癌細胞の増殖に関与している可能性があることが示唆されているが、その機能はまだよく解明されていない。

- 15 GPC3に結合するある種の抗体が、ADCC（抗体依存性細胞障害）活性およびCDC（補体依存性細胞障害）活性により細胞増殖抑制作用を有することが見いだされている（WO2003/000883）。また、GPC3が生体内で切断されて可溶性GPC3として血中に分泌され、これを検出する抗体を用いて癌の診断が可能であることが示唆されている（WO2004/022739、WO2003/100429、WO2004/018667）。

- 20 抗体の細胞傷害活性を利用した抗癌剤を開発する場合、用いられる抗体は高いADCC活性を有していることが好ましい為、GPC3を認識する抗体においても高い細胞傷害活性を有する抗GPC3抗体が望まれていた。

- 25 抗体のADCC活性を増強する方法としては、抗体の糖鎖を改変する方法が知られている。例えば、WO 99/54342には、抗体のグリコシル化を修飾することによりADCC活性を改良することが記載されている。また、WO 00/61739には、抗体の糖鎖におけるフコースの存否によりADCC活性を調節することが記載されている。WO 02/31140には、YB2/0細胞において抗体を産生せしめることにより、 α -1,6コアーフコースを含まない糖鎖を有する抗体を調製することが記載されている。WO 02/79255には、バイセクティングGlcNAcを有する糖鎖を有

する抗体が記載されている。しかしながら、糖鎖の修飾によって ADCC 活性が増強された抗グリピカン 3 抗体は知られていない。

従って、本発明は糖鎖組成の変化によって ADCC 活性が増強された抗グリピカン 3 抗体組成物およびその製造方法を提供しようとするものである。

5

発明の開示

本発明者は上記の課題を解決すべく種々検討した結果、グリピカン 3 をターゲットとした場合においても、 α -1,6 コアーフコース (α -1,6 core fucose) が欠損した糖鎖を有する抗体が高い細胞障害活性を有することを見出した。従って、本発明は、糖鎖組成が変化した抗グリピカン 3 抗体組成物、より具体的にはフコースが欠損した抗グリピカン 3 抗体の割合が増加した抗体組成物を提供する。本発明の糖鎖改変抗グリピカン 3 抗体組成物は、高い細胞障害活性を有しているので、抗癌剤などの細胞増殖抑制剤に有用である。

本発明はまた、上記の糖鎖が修飾された抗体の製造方法において、YB2/0 細胞などのフコース付加能が低下した宿主細胞に抗グリピカン 3 抗体をコードする核酸を導入し、該宿主細胞を培養することにより当該抗体を取得することを特徴とする、抗グリピカン 3 抗体組成物の製造方法を提供する。好ましくは、糖鎖へのフコース付加能が減少した細胞はフコーストランスポーター欠損細胞である。

20 図面の簡単な説明

図 1 は、N-グリコシル結合糖鎖の基本構造を示す。

図 2 は、各キメラ抗体の、ヒト PBMC を用い HepG2 を標的細胞とした場合の ADCC 活性を示す。

図 3 は、各キメラ抗体の、ヒト PBMC を用い HuH7 を標的細胞とした場合の ADCC 活性を示す。

図 4 は、各抗体の、ヒト PBMC を用い HuH-7 を標的細胞とした場合の ADCC 活性を示す。

図 5 は、FT-KO 細胞産生抗体 (a, b, c) および CHO 細胞産生の抗体から調製したアガラクトシル 2-AB 化糖鎖の順相 HPLC クロマトグラムを示す。

図6は、図5で示したピーク G(0)および G(0)-Fuc の推定構造を示す。

図7は、FT-KO細胞産生抗体(a)およびCHO細胞産生の抗体(b)についてDSC (示差走査熱量計) 測定チャートを示す。

5 発明の詳細な説明

本発明は、糖鎖組成が変化した抗グリピカン3抗体組成物を特徴とする。抗体の細胞障害活性の発現には、抗体に結合した糖鎖の構造が大きな影響を及ぼすことが知られている。抗体に結合する糖鎖には、抗体分子のアスパラギンの側鎖のN原子に結合するN-グリコシド結合糖鎖と、抗体分子のセリンまたはスレオニンの側鎖ヒドロキシル基に結合するO-グリコシル結合糖鎖があり、本発明においてフコースの存否が問題となるのはN-グリコシド結合糖鎖である。

抗体に結合するN-グリコシド結合糖鎖の基本構造を図1に示す。N-グリコシル結合糖鎖は図1のIgG基本糖鎖(1)および(3)に示すごとく、1個のマンノース(Man)と2個のN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)が β 1,4結合で結合した基本構造(コア)「-Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc-」を有し、この構造の右のGlcNAcを還元末端と称し、左側のManを非還元末端と称する。フコース(Fuc)が結合している場合、これは主として、還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位とが α 結合している。他方、図1のIgG基本糖鎖(2)に示す糖鎖においては、基本構造(コア)の非還元末端に、前記2個の糖鎖のほかに、1個のN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)が β 1,4結合により結合している。このN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)が、「バイセクテングN-アセチルグルコサミン」である。バイセクテングN-アセチルグルコサミンを有する糖鎖は、O-グリコシル結合糖鎖またはN-グリコシル結合糖鎖であり、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIII (GnTIII)により、N-アセチルグルコサミンを糖鎖に転移させることにより形成される。この酵素をコードする遺伝子は既にクローニングされており、そのアミノ酸配列およびそれをコードするDNAの塩基配列は記載されている(NCBIデータベース(ACCESSION D13789))。

本発明において、糖鎖組成が変化した抗体組成物(糖鎖改変抗体組成物)とは、

基準となる宿主細胞で産生される抗体組成物とは異なる糖鎖組成を有する抗体組成物のことをいう。

本発明において、糖鎖組成が変化したか否かは、基準となる宿主細胞で産生される抗体組成物を基準として判断することができる。基準となる抗体組成物と異なる糖鎖組成を有する抗体組成物の場合、その抗体組成物は糖鎖組成が変化した抗体組成物となる。

本発明において基準となる宿主細胞は CHO DG44 である。CHO DG44 は、例えばインビトロジェン社から入手することが可能である。

糖鎖組成が変化した抗体組成物の例としては 抗体組成物中のフコース（例えば、 α -1,6 コアーフコース(α -1,6core fucose)欠損抗体の割合が増加した抗体組成物や、抗体組成物中のバイセクティング (bisecting)N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)付加抗体の割合が増加した抗体組成物などを挙げるができる。

本発明の好ましい態様としては、フコース欠損抗体の割合が、基準となる抗体組成物と比較して高い抗体組成物を挙げるができる。

なお、抗体には複数のN-グリコシル糖鎖を有することもあるので、本発明のフコース欠損抗体には、フコースが全く付加していない抗体だけでなく、付加しているフコースの数が減少している抗体（少なくとも1つ以上の糖鎖においてフコースが付加されていない抗体）なども含まれる。

宿主細胞で糖鎖改変抗体を製造する場合、全て同一の糖鎖を有する均一な抗体を含有する組成物を得ることは困難なことが多い。従って、例えば、糖鎖組成が変化した抗体組成物がフコース欠損抗体の割合が増加した抗体組成物である場合、本発明の糖鎖組成が変化した抗体組成物にはフコースが欠損した抗体とフコース欠損していない抗体の両方が含まれることがあるが、フコースが欠損した抗体の割合が、基準となる宿主細胞で作製された抗体組成物よりも高い。本発明のフコース欠損抗体の割合が高い抗体組成物において、フコース欠損割合は特に限定されないが好ましくは20%以上、より好ましくは50%以上、さらに好ましくは90%以上である。

また、本発明のバイセクティングN-アセチルグルコサミン付加抗体の割合が高い抗体組成物において、バイセクティングN-アセチルグルコサミン付加抗体

の割合は特に限定されないが、好ましくは 20%以上、より好ましくは 50%以上、さらに好ましくは 90%以上である。

本発明の糖鎖組成が変化した抗グリピカン 3 抗体組成物は、当業者に公知の方法により得ることが可能である。

- 5 例えば、フコース欠損抗体は、 α -1,6 コアーフコース (α -1,6core fucose) を付加する能力を有しないかまたはその能力が低い宿主細胞中で抗グリピカン 3 抗体を発現させることにより製造することができる。

- 10 フコースを付加する能力を有しないまたはその能力が低い宿主細胞は特に限定されないが、例としては、フコース転移活性が欠損または低くなっている宿主細胞、ゴルジ体内のフコース濃度が低くなっている宿主細胞、などを挙げる事ができる。より具体的には、ラットミエローマ YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 細胞 (YB2/0 細胞と略される) (ATCC CRL 1662 として保存されている)、FTVIII ノックアウト CHO 細胞(WO 02/31140)、Lec13 細胞(WO03/035835)、フコーストランスポーター欠損細胞 (WO 2005/017155) などを挙げる事ができる。

- 15 フコーストランスポーター欠損細胞とは、フコーストランスポーターの存在量が正常細胞より少ないか、またはフコーストランスポーターの構造に変異を有することにより、フコーストランスポーターの機能が低下している細胞である。フコーストランスポーター欠損細胞としては、例えば、フコーストランスポーター遺伝子がノックアウトされている細胞 (以下、「FT-KO 細胞」と呼ぶ。)、フ
- 20 コーストランスポーター遺伝子の一部が欠損または変異している細胞、フコーストランスポーター遺伝子の発現系に欠陥を有する細胞などが挙げられる。チャイニーズハムスターのフコーストランスポーターをコードする遺伝子の塩基配列およびフコーストランスポーターのアミノ酸配列をそれぞれ配列番号 1 2 6 および 1 2 7 に示す。

- 25 また、配列番号 1 2 6 に示す塩基配列を利用して、RNAi 干渉 (RNA interference: RNAi) を用いても本発明のフコーストランスポーター欠損細胞を取得することができる。RNAi は二本鎖 RNA (dsRNA) を細胞内に導入した際に、その RNA 配列に対応する細胞内の mRNA が特異的に分解され、タンパク質として発現されなくなる現象をいう。RNAi の場合、通常、二本鎖 RNA が用

いられるが、特に限定されず、例えば、自己相補的な一本鎖 RNA 中で形成される二本鎖を用いることも可能である。二本鎖を形成する領域は、全ての領域において二本鎖を形成していてもよいし、一部の領域（例えば両末端又は片方の末端）が一本鎖になっていてもよい。RNAi に用いられるオリゴ RNA は、その長さは限定されない。本発明のオリゴ RNA の長さとしては、例えば、5~1000 塩基（二本鎖の場合には 5~1000 bp）であり、好ましくは 10~100 塩基（二本鎖の場合には 10~100 bp）であり、さらに好ましくは 15~25 塩基（二本鎖の場合には 15~25 bp）であり、特に好ましくは 19~23 塩基（二本鎖の場合には 19~23 bp）である。

- 10 上述のように RNAi 法は、ある遺伝子と相同な、センス RNA とアンチセンス RNA からなる二本鎖 RNA（double-strand RNA; dsRNA）が、その遺伝子の転写産物（mRNA）の相同部分を破壊する、という現象を利用した方法である。用いるフコーストランスポーター遺伝子の全長配列に対応する二本鎖 RNA を用いてもよいし、一部の配列に対応する短い（例えば、21~23 bp の）dsRNA
- 15 (small interfering RNA; siRNA)を用いてもよい。該二本鎖 RNA は、直接細胞に取り込ませてもよいし、二本鎖 RNA を産生するベクターを作製し、宿主細胞に導入して細胞内で二本鎖 RNA を産生させてもよい。例えば、本発明のフコーストランスポーターをコードする DNA の全部又は一部を逆向きの反復配列となるようにベクターに組み込み、該ベクターを宿主細胞に導入すればよい。RNAi
- 20 法は、Fire A. et al., Nature (1998), 391, 806-811、Montgomery M. K. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1998), 95, 15502-15507、Timmons L. et al., Nature (1998), 395, 854、Sánchez A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1999), 96, 5049-5054、Misquitta L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1999), 96, 1451-1456、Kennerdell J. R. et al., Cell (1998), 95, 1017-1026、Waterhouse P. M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1998), 95, 13959-13964、Wianny F. et al., Nature Cell Biol. (2000), 2, 70-75 等の記載に従って行うことができる。

RNAi 法等により取得されるフコーストランスポーター欠損細胞のスクリーニングはフコーストランスポーターの活性を指標に行ってもよいし、ウエスタンブロットティングやノーザンブロットティングによるフコーストランスポーター遺伝子

の転写、発現を指標にして行うこともできる。

- また、糖鎖にバイセクティング (bisecting) N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) が付加した抗体は、糖鎖にバイセクティング (bisecting) N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) 構造を形成する能力を有する宿主細胞中で抗グリピカン 3 抗体を発現させることにより製造することができる。

バイセクティング N-アセチルグルコサミンが付加した糖鎖を有する抗体の製造方法は既に公知である (WO 02/79255)。糖鎖にバイセクティング

- (bisecting) N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) 構造を形成する能力を有する宿主細胞は特に限定されず、例えば、GnTIII をコードする DNA を含んでなる発現ベクターを有する宿主細胞を用いることが可能である。従って、GnTIII をコードする DNA を含んでなる発現ベクターおよび抗グリピカン 3 抗体をコードする発現ベクターを有する宿主細胞を用いて、バイセクティング N-アセチルグルコサミンが付加した糖鎖を有する抗グリピカン 3 抗体を製造することができる。GnTIII をコードする DNA と抗グリピカン 3 抗体をコードする遺伝子は同一のベクター上に存在してもよいし、異なるベクター上に存在してもよい。

また、抗体組成物中のフコース欠損抗体またはバイセクティング N-アセチルグルコサミン付加抗体の割合を増加される他の方法として、フコース欠損抗体またはバイセクティング N-アセチルグルコサミン付加抗体を精製することにより組成物中のそれらの抗体の割合を増加させる方法を挙げることができる。

- 糖鎖の解析は当業者に公知の方法で行うことができる。例えば、抗体に N-Glycosidase F (Roche) 等を作用させ、糖鎖を抗体から遊離させる。その後、セルロースカートリッジを用いた固相抽出 (Shimizu Y. et al., Carbohydrate Research 332(2001), 381-388) による脱塩後に濃縮乾固し、2-アミノピリジンによる蛍光標識を行う (Kondo A. et al., Agricultural and Biological Chemistry 54:8(1990), 2169-2170)。得られた PA 化糖鎖を、セルロースカートリッジを用いた固相抽出により脱試薬した後遠心濃縮し、精製 PA 化糖鎖とする。その後、ODS カラムによる逆相 HPLC 分析を行うことにより測定することが可能である。また、PA 化糖鎖の調製を行った後、ODS カラムによる逆相 HPLC 分析およびアミンカラムによる順相 HPLC 分析を組み合わせた、二次元マッピングを実施

することにより行うことも可能である。

本発明において糖鎖が改変される抗グリピカン3抗体は、グリピカン3に結合する抗体であれば特に限定されない。グリピカン3への結合は特異的であることが好ましい。本発明において好ましい抗グリピカン3抗体としては、以下の表1
5 に示されるCDR配列を有する抗体を挙げるができる。

表1

抗体	CDR	アミノ酸配列	配列番号
M13B3(H)	CDR1	NYAMS	5
	CDR2	AINNNGDDTYYLDTVKD	6
	CDR3	QGGAY	7
M3B8(H)	CDR1	TYGMGVG	8
	CDR2	NIWWYDAKYNSDLKS	9
	CDR3	MGLAWFAY	10
M11F1(H)	CDR1	IYGMGVG	11
	CDR2	NIWWNDDKYNSALKS	12
	CDR3	IGYFYFDY	13
M5B9(H)	CDR1	GYWMH	14
	CDR2	AIYPGNSDTNYNQKFKG	15
	CDR3	SGDLTGGLAY	16
M6B1(H)	CDR1	SYAMS	17
	CDR2	AINSNGGTTYYPDTMKD	18
	CDR3	HNGGYENYGWFAY	19
M10D2(H)	CDR1	SYWMH	20
	CDR2	EIDPSDSYTYYNQKFRG	21
	CDR3	SNLGDGHYRFPAPFY	22
L9G11(H)	CDR1	SYWMH	20
	CDR2	TIDPSDSETHYNLQFKD	23
	CDR3	GAFYSSYSYWAWFAY	24
GC33(H)	CDR1	DYEMH	25
	CDR2	ALDPKTGDTAYSQKFKG	26
	CDR3	FYSYTY	27
GC179(H)	CDR1	INAMN	28
	CDR2	RIRSESNNYATYYGDSVKD	29
	CDR3	EVTTSFAY	30
GC194(H)	CDR1	ASAMN	31
	CDR2	RIRSKSNNYAIYYADSVKD	32
	CDR3	DPGYGPNPWFAY	33
GC199(H)	CDR1	DYSMH	34
	CDR2	WINTETGEPTYADDFKG	35
	CDR3	LY	36

表1 (続き)

GC202(H)	CDR1	TYGMGVG	8
	CDR2	NIWWHDDKYNSALKS	37
	CDR3	IAPRYNKYEGFFAF	38
M13B3(L)	CDR1	KSSQSLLSDGKTYLN	39
	CDR2	LVSKLDS	40
	CDR3	WQGTHFPLT	41
M3B8(L)	CDR1	KASQDINNYLS	42
	CDR2	RANRLVD	43
	CDR3	LQCDEFPPWT	44
M11F1(L)	CDR1	RSSQSLVHSNGNTYLH	45
	CDR2	KVSNRFS	46
	CDR3	SQSTHVPWT	47
M5B9(L)	CDR1	RSSKSLHNSNGITYLY	48
	CDR2	QMSNLAS	49
	CDR3	AQNLELPYT	50
M6B1(L)	CDR1	KASQDINKNII	51
	CDR2	YTSTLQP	52
	CDR3	LQYDNLPRT	53
M10D2(L)	CDR1	RASHSISNFLH	54
	CDR2	YASQSIG	55
	CDR3	QQSNIWSLT	56
L9G11(L)	CDR1	RASESVEYYGTSLMQ	57
	CDR2	GASNVES	58
	CDR3	QQSRKVPYT	59
GC33(L)	CDR1	RSSQSLVHSNGNTYLH	45
	CDR2	KVSNRFS	46
	CDR3	SQNTHVPPT	60
GC179(L)	CDR1	KSSKSLHNSNGNTYLN	61
	CDR2	WMSNLAS	62
	CDR3	MQHIEYPFT	63
GC194(L)1	CDR1	RSSKSLHNSYDITYLY	64
	CDR2	QMSNLAS	49
	CDR3	AQNLELPPT	65
GC194(L)2	CDR1	SASSSVSYMY	66
	CDR2	DTSNLAS	67
	CDR3	QQWSSYPLT	68
GC199(L)	CDR1	KSSQSLLHSDGKTFLN	69
	CDR2	LVSRLDS	70
	CDR3	CQGTHFPRT	71
GC202(L)	CDR1	RSSQSIHNSNGNTYLE	72
	CDR2	KVSNRFS	46
	CDR3	FQGSHPWT	73

上記の表に記載のCDR配列を有する抗体は高い細胞障害活性を有する。上記の表に記載のCDR配列を有する抗体は、グリピカン3上のアミノ酸番号524-563のエピトープを認識する。アミノ酸番号524-563のエピトープを認識する抗体は細胞障害活性が高いので、本発明の抗グリピカン3抗体として好ましい。

本発明の1つの好ましい態様においては、本発明の糖鎖組成が変化した抗体組成物はADCC活性が増強していることを特徴とする。本発明においてADCC活性が増強しているか否かは、基準となる抗体組成物と比較して、該基準よりも高いADCC活性を示す場合にはADCC活性が増強されていると判断される。

ADCC活性の測定は当業者に公知の方法により行うことが可能であり、例えば、エフェクター細胞、標的細胞および抗グリピカン3抗体を混合し、ADCCの程度を調べることにより測定することができる。より具体的には、例えば、エフェクター細胞としてマウス脾細胞やヒト末梢血や骨髄から分離した単核球等を利用し、標的細胞としてはヒト肝細胞株HuH-7等のグリピカン3を発現するヒト株化細胞を用いる。標的細胞をあらかじめ ^{51}Cr により標識し、これに抗グリピカン3抗体を加えインキュベーションを行い、その後、標的細胞に対し適切な比のエフェクター細胞を加えインキュベーションを行う。インキュベーション後上清を採取し、上清中の放射活性をカウントすることによりADCC活性を測定することができる。

抗グリピカン3抗体

抗グリピカン3抗体の作製は当業者に公知の方法により行うことが可能である。すなわち、グリピカン3を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナルな抗体産生細胞をスクリーニングすることによって作製できる。具体的には、モノクローナル抗体を作製するには次のようにすればよい。まず、抗体取得の感作抗原として使用されるヒトグリピカン3を、Lage, H. et al., Gene 188 (1997), 151-156に開示されたグリピカン3 (MXR7) 遺伝子/アミノ酸配列を発現することによって得

る。すなわち、グリピカン3をコードする遺伝子配列を公知の発現ベクター系に挿入して適当な宿主細胞を形質転換させた後、その宿主細胞中または培養上清中から目的のヒトグリピカン3タンパク質を公知の方法で精製する。次に、この精製グリピカン3タンパク質を感作抗原として用いる。あるいは、グリピカン3の部分ペプチドを感作抗原として使用することもできる。この際、部分ペプチドはヒトグリピカン3のアミノ酸配列より化学合成により得ることができる。抗グリピカン3抗体がADCCの作用、CDCによる作用、増殖因子活性の阻害により細胞増殖抑制活性を阻害することから、また抗グリピカン3抗体に放射性同位元素、化学療法剤、細菌由来トキシン等の細胞傷害性物質を結合させることにより、細胞増殖を抑制し得ることから、本発明の抗グリピカン3抗体の認識するグリピカン3分子上のエピトープは特定のものに限定されず、グリピカン3分子上に存在するエピトープならばどのエピトープを認識してもよい。従って、本発明の抗グリピカン3抗体を作製するための抗原は、グリピカン3分子上に存在するエピトープを含む断片ならば、如何なる断片も用いることが可能である。

15 特に好ましい態様において、グリピカン3のアミノ酸番号524-563のエピトープを認識する抗体を取得する場合には、感作抗原としてアミノ酸番号524-563を含むペプチドを用いることができる。

感作抗原で免疫される哺乳動物としては、特に限定されるものではないが、細胞融合に使用する親細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましく、一般的にはげっ歯類の動物、例えば、マウス、ラット、ハムスター、あるいはウサギ、サル等が使用される。感作抗原を動物に免疫するには、公知の方法にしたがって行われる。例えば、一般的方法として、感作抗原を哺乳動物の腹腔内または皮下に注射することにより行われる。具体的には、感作抗原をPBS (Phosphate-Buffered Saline) や生理食塩水等で適当量に希釈、懸濁したものに所望により通常のアジュバント、例えばフロイント完全アジュバントを適量混合し、乳化後、哺乳動物に4-21日毎に数回投与する。また、感作抗原免疫時に適当な担体を使用することもできる。

25 このように哺乳動物を免疫し、血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを確認した後に、哺乳動物から免疫細胞を採取し、細胞融合に付されるが、好ましい免

疫細胞としては、特に脾細胞が挙げられる。前記免疫細胞と融合される他方の親細胞として、哺乳動物のミエローマ細胞を用いる。このミエローマ細胞は、公知の種々の細胞株、例えば、P3 (P3x63Ag8.653) (J. Immunol. (1979) 123, 1548-1550)、P3x63Ag8U.1 (Current Topics in Microbiology and Immunology (1978) 81, 1-7)、NS-1 (Kohler, G. and Milstein, C. Eur. J. Immunol. (1976) 6, 511-519)、MPC-11 (Margulies, D.H. et al., Cell (1976) 8, 405-415)、SP2/0 (Shulman, M. et al., Nature (1978) 276, 269-270)、FO (de St. Groth, S. F. et al., J. Immunol. Methods (1980) 35, 1-21)、S194 (Trowbridge, I. S. J. Exp. Med. (1978) 148, 313-323)、R210 (Galfre, G. et al., Nature (1979) 277, 131-133) 等が好適に使用される。前記免疫細胞とミエローマ細胞との細胞融合は、基本的には公知の方法、たとえば、ケーラーとミルステインらの方法 (Kohler, G. and Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73, 3-46) 等に準じて行うことができる。より具体的には、前記細胞融合は、例えば細胞融合促進剤の存在下に通常の栄養培養液中で実施される。融合促進剤としては、例えばポリエチレングリコール (PEG)、センダイウイルス (HVJ) 等が使用され、更に所望により融合効率を高めるためにジメチルスルホキシド等の補助剤を添加使用することもできる。免疫細胞とミエローマ細胞との使用割合は任意に設定することができる。例えば、ミエローマ細胞に対して免疫細胞を 1-10 倍とするのが好ましい。前記細胞融合に用いる培養液としては、例えば、前記ミエローマ細胞株の増殖に好適な RPMI1640 培養液、MEM 培養液、その他、この種の細胞培養に用いられる通常の培養液が使用可能であり、さらに、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を併用することもできる。細胞融合は、前記免疫細胞とミエローマ細胞との所定量を前記培養液中でよく混合し、予め 37°C 程度に加温した PEG 溶液 (例えば平均分子量 1000-6000 程度) を通常 30-60% (w/v) の濃度で添加し、混合することによって目的とする融合細胞 (ハイブリドーマ) を形成する。続いて、適当な培養液を逐次添加し、遠心して上清を除去する操作を繰り返すことによりハイブリドーマの生育に好ましくない細胞融合剤等を除去する。このようにして得られたハイブリドーマは、通常の選択培養液、例えば HAT 培養液 (ヒポキサンチン、アミノプテリンおよび

びチミジンを含む培養液)で培養することにより選択される。上記 HAT 培養液での培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞(非融合細胞)が死滅するのに十分な時間(通常、数日~数週間)継続する。ついで、通常の限界希釈法を実施し、目的とする抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングおよび単クローニングを行う。また、ヒト以外の動物に抗原を免疫して上記ハイブリドーマを得る他に、ヒトリンパ球を *in vitro* でグリピカン 3 に感作し、感作リンパ球をヒト由来の永久分裂能を有するミエローマ細胞と融合させ、グリピカン 3 への結合活性を有する所望のヒト抗体を得ることもできる(特公平 1-59878 号公報参照)。さらに、ヒト抗体遺伝子の全てのレパートリーを有するトランスジェニック動物に抗原となるグリピカン 3 を投与して抗グリピカン 3 抗体産生細胞を取得し、これを不死化させた細胞からグリピカン 3 に対するヒト抗体を取得してもよい(国際特許出願公開番号 WO 94/25585 号公報、WO 93/12227 号公報、WO 92/03918 号公報、WO 94/02602 号公報参照)。このようにして作製されるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、通常の培養液中で継代培養することが可能であり、また、液体窒素中で長期保存することが可能である。

組換え型抗体

本発明では、モノクローナル抗体として、抗体遺伝子をハイブリドーマからクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し、遺伝子組換え技術を用いて産生させた組換え型のものを用いる(例えば、Vandamme, A. M. et al., *Eur. J. Biochem.* (1990) 192, 767-775, 1990 参照)。具体的には、抗グリピカン 3 抗体を産生するハイブリドーマから、抗グリピカン 3 抗体の可変(V)領域をコードする mRNA を単離する。mRNA の単離は、公知の方法、例えば、グアニジン超遠心法(Chirgwin, J. M. et al., *Biochemistry* (1979) 18, 5294-5299)、AGPC 法(Chomczynski, P. et al., *Anal. Biochem.* (1987) 162, 156-159)等により行って全 RNA を調製し、mRNA Purification Kit (Pharmacia 製)等を使用して目的の mRNA を調製する。また、QuickPrep mRNA Purification Kit (Pharmacia 製)を用いることにより mRNA を直接調製することもできる。得られた mRNA から逆転写酵素を用いて抗体 V 領域の

cDNA を合成する。cDNA の合成は、AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit (生化学工業社製) 等を用いて行う。また、cDNA の合成および増幅を行うには、5'-Ampli FINDER RACE Kit (Clontech 製) および PCR を用いた 5'-RACE 法 (Frohman, M. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988) 85, 8998-9002、Belyavsky, A. et al., Nucleic Acids Res. (1989) 17, 2919-2932) 等を使用することができる。得られた PCR 産物から目的とする DNA 断片を精製し、ベクター DNA と連結する。さらに、これより組換えベクターを作製し、大腸菌等に導入してコロニーを選択して所望の組換えベクターを調製する。そして、目的とする DNA の塩基配列を公知の方法、例えば、ジデオキシヌクレオチドチェイターミネーション法等により確認する。目的とする抗グリピカン 3 抗体の V 領域をコードする DNA を得たのち、これを、所望の抗体定常領域 (C 領域) をコードする DNA を含有する発現ベクターへ組み込む。本発明で使用される抗グリピカン 3 抗体を製造するには、抗体遺伝子を発現制御領域、例えば、エンハンサー、プロモーターの制御のもとで発現するよう発現ベクターに組み込む。次に、この発現ベクターにより、宿主細胞を形質転換し、抗体を発現させる。抗体遺伝子の発現は、抗体重鎖 (H 鎖) または軽鎖 (L 鎖) をコードする DNA を別々に発現ベクターに組み込んで宿主細胞を同時形質転換させてもよいし、あるいは H 鎖および L 鎖をコードする DNA を単一の発現ベクターに組み込んで宿主細胞を形質転換させてもよい (WO 94/11523 号公報参照)。また、組換え型抗体の産生には上記宿主細胞だけではなく、トランスジェニック動物を使用することができる。例えば、抗体遺伝子を、乳汁中に固有に産生される蛋白質 (ヤギ B カゼインなど) をコードする遺伝子の途中に挿入して融合遺伝子として調製する。抗体遺伝子が挿入された融合遺伝子を含む DNA 断片をヤギの胚へ注入し、この胚を雌のヤギへ導入する。胚を受容したヤギから生まれるトランスジェニックヤギまたはその子孫が産生する乳汁から所望の抗体を得る。また、トランスジェニックヤギから産生される所望の抗体を含む乳汁量を増加させるために、適宜ホルモンをトランスジェニックヤギに使用してもよい (Ebert, K.M. et al., Bio/Technology (1994) 12, 699-702)。

改変抗体

本発明では、上記抗体のほかに、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺伝子組換え型抗体、例えば、キメラ抗体、ヒト型化 (Humanized) 抗体を使用できる。これらの改変抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。キメラ抗体は、前記のようにして得た抗体 V 領域をコードする DNA をヒト抗体 C 領域をコードする DNA と連結し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入し産生させることにより得られる。この既知の方法を用いて、本発明に有用なキメラ抗体を得ることができる。ヒト型化抗体は、再構成 (reshaped) ヒト抗体とも称され、これは、ヒト以外の哺乳動物、例えばマウス抗体の相補性決定領域 (CDR; complementarity determining region) をヒト抗体の相補性決定領域へ移植したものであり、その一般的な遺伝子組換え手法も知られている (欧州特許出願公開番号 EP 125023 号公報、WVO 96/02576 号公報参照)。具体的には、マウス抗体の CDR とヒト抗体のフレームワーク領域 (framework region ; FR) とを連結するように設計した DNA 配列を、CDR および FR 両方の末端領域にオーバーラップする部分を有するように作製した数個のオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いて PCR 法により合成する (WO98/13388 号公報に記載の方法を参照)。CDR を介して連結されるヒト抗体のフレームワーク領域は、相補性決定領域が良好な抗原結合部位を形成するものが選択される。必要に応じ、再構成ヒト抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成するように、抗体の可変領域におけるフレームワーク領域のアミノ酸を置換してもよい (Sato, K. et al., Cancer Res. (1993) 53, 851-856)。キメラ抗体およびヒト型化抗体の C 領域には、ヒト抗体のものが使用され、例えば H 鎖では、C_Y1、C_Y2、C_Y3、C_Y4 を、L 鎖では C_K、C_λ を使用することができる。また、抗体またはその産生の安定性を改善するために、ヒト抗体 C 領域を修飾してもよい。キメラ抗体は、ヒト以外の哺乳動物由来抗体の可変領域とヒト抗体由来の定常領域とからなる。一方、ヒト型化抗体は、ヒト以外の哺乳動物由来抗体の相補性決定領域と、ヒト抗体由来のフレームワーク領域および C 領域とからなる。ヒト型化抗体はヒト体内における抗原性が低下されているため、本発明の治療剤の有効成分として有用である。

抗体修飾物

本発明で使用される抗体は、抗体の全体分子に限られずグリピカン 3 に結合し、グリピカン 3 の活性を阻害する限り、抗体の断片またはその修飾物であってもよく、二価抗体も一価抗体も含まれる。例えば、抗体の断片としては、Fab、F
5 (ab)²、Fv、1 個の Fab と完全な Fc を有する Fab/c、または H 鎖若しくは L 鎖の Fv を適当なリンカーで連結させたシングルチェーン Fv (scFv) が挙げられる。具体的には、抗体を酵素、例えばパパイン、ペプシンで処理し抗体断片を生成させるか、または、これら抗体断片をコードする遺伝子を構築し、これを発
10 現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させる (例えば、Co, M.S. et al., *J. Immunol.* (1994) 152, 2968-2976、Better, M. & Horwitz, A. H. *Methods in Enzymology* (1989) 178, 476-496, Academic Press, Inc., Plueckthun, A. & Skerra, A. *Methods in Enzymology* (1989) 178, 476-496, Academic Press, Inc., Lamoyi, E., *Methods in Enzymology* (1989) 121, 652-
15 663、Rousseaux, J. et al., *Methods in Enzymology* (1989) 121, 663-669、Bird, R. E. et al., *TIBTECH* (1991) 9, 132-137 参照)。scFv は、抗体の H 鎖 V 領域と L 鎖 V 領域とを連結することにより得られる。この scFv において、H 鎖 V 領域と L 鎖 V 領域は、リンカー、好ましくはペプチドリリンカーを介して連結される (Huston, J. S. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1988) 85, 5879-
20 5883)。scFv における H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域は、本明細書に抗体として記載されたもののいずれの由来であってもよい。V 領域を連結するペプチドリリンカーとしては、例えばアミノ酸 12-19 残基からなる任意の一本鎖ペプチドが用いられる。scFv をコードする DNA は、前記抗体の H 鎖または H 鎖 V 領域をコードする DNA、および L 鎖または L 鎖 V 領域をコードする DNA のうち、
25 それらの配列のうちの全部または所望のアミノ酸配列をコードする DNA 部分を鋳型とし、その両端を規定するプライマー対を用いて PCR 法により増幅し、次いで、さらにペプチドリリンカー部分をコードする DNA、およびその両端が各々 H 鎖、L 鎖と連結されるように規定するプライマー対を組み合わせて増幅することにより得られる。また、一旦 scFv をコードする DNA が作製されると、それ

- らを含有する発現ベクター、および該発現ベクターにより形質転換された宿主を常法に従って得ることができ、また、その宿主を用いることにより、常法に従って scFv を得ることができる。これら抗体の断片は、前記と同様にしてその遺伝子を取得し発現させ、宿主により産生させることができる。本発明における「抗体」にはこれらの抗体の断片も包含される。抗体の修飾物として、ポリエチレングリコール (PEG) 等の各種分子と結合した抗グリピカン抗体を使用することもできる。本発明における「抗体」にはこれらの抗体修飾物も包含される。このような抗体修飾物は、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。なお、抗体の修飾方法はこの分野においてすでに確立されている。
- 10 さらに、本発明で使用される抗体は、二重特異性抗体 (bispecific antibody) であってもよい。二重特異性抗体はグリピカン 3 分子上の異なるエピトープを認識する抗原結合部位を有する二重特異性抗体であってもよいし、一方の抗原結合部位がグリピカン 3 を認識し、他方の抗原結合部位が化学療法剤、細胞由来トキシン等の細胞傷害性物質を認識してもよい。この場合、グリピカン 3 を発現し
- 15 ている細胞に直接細胞傷害性物質を作用させ腫瘍細胞に特異的に傷害を与え、腫瘍細胞の増殖を抑えることが可能である。二重特異性抗体は 2 種類の抗体の HL 対を結合させて作製することもできるし、異なるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを融合させて二重特異性抗体産生融合細胞を作製し、得ることもできる。さらに、遺伝子工学的手法により二重特異性抗体を作製することも可能
- 20 である。

組換え型抗体または改変抗体の発現および産生

- 前記のように構築した抗体遺伝子は、公知の方法により発現させ、取得することができる。哺乳類細胞の場合、常用される有用なプロモーター、発現させる抗体遺伝子、その 3'側下流にポリ A シグナルを機能的に結合させて発現させることができる。例えばプロモーター/エンハンサーとしては、ヒトサイトメガロウイルス前期プロモーター/エンハンサー (human cytomegalovirus immediate early promoter/enhancer) を挙げることができる。また、その他に本発明で使用される抗体発現に使用できるプロモーター/エンハンサーとして、レトロウィ
- 25

ルス、ポリオーマウィルス、アデノウィルス、シミアンウィルス 40 (SV40) 等のウィルスプロモーター/エンハンサー、あるいはヒトエロンゲーションファクター1α (HEF1α) などの哺乳類細胞由来のプロモーター/エンハンサー等が挙げられる。SV40 プロモーター/エンハンサーを使用する場合は Mulligan らの方法 (Nature (1979) 277, 108) により、また、HEF1α プロモーター/エンハンサーを使用する場合は Mizushima らの方法 (Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322) により、容易に遺伝子発現を行うことができる。

本発明で使用される抗体の製造のためには、発現された抗体に糖鎖を付加する機能を有する任意の真核細胞発現系を使用することができる。真核細胞としては、例えば樹立された哺乳類細胞系、昆虫細胞系、真糸状菌細胞および酵母細胞などの動物細胞等が挙げられる。

好ましくは、本発明で使用される抗体は、哺乳類細胞、例えば CHO、COS、ミエローマ、BHK、Vero、HeLa 細胞中で発現される。次に、形質転換された宿主細胞を in vitro または in vivo で培養して目的とする抗体を産生させる。宿主細胞の培養は公知の方法に従い行う。例えば、培養液として、DMEM、MEM、RPMI1640、IMDM を使用することができ、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を併用することもできる。

抗体の分離、精製

前記のように発現、産生された抗体は、細胞、宿主動物から分離し均一にまで精製することができる。本発明で使用される抗体の分離、精製はアフィニティーカラムを用いて行うことができる。例えば、プロテイン A カラムを用いたカラムとして、Hyper D、POROS、Sephrose F.F. (Pharmacia 製) 等が挙げられる。その他、通常のタンパク質で使用されている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。例えば、上記アフィニティーカラム以外のクロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、透析等を適宜選択、組み合わせることにより、抗体を分離、精製することができる (Antibodies A Laboratory Manual. Ed Harlow, David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)。レクチンカラムを用いた所望の糖鎖を有する抗体の分離は当業者に公

知の方法により行うことができ、例えばWOO2/30954に記載の方法で行うことができる。

抗体の活性の確認

- 5 本発明で使用される抗体の抗原結合活性 (Antibodies A Laboratory Manual.Ed Harlow, David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)、リガンドレセプター結合阻害活性 (Harada, A. et al., International Immunology (1993) 5, 681-690) の測定には公知の手段を使用することができる。本発明で使用される抗グリピカン3抗体の抗原結合活性を測定する方法として、
- 10 ELISA (酵素結合免疫吸着検定法)、EIA (酵素免疫測定法)、RIA (放射免疫測定法) あるいは蛍光抗体法を用いることができる。例えば、酵素免疫測定法を用いる場合、グリピカン3をコーティングしたプレートに、抗グリピカン3抗体を含む試料、例えば、抗グリピカン3抗体産生細胞の培養上清や精製抗体を加える。アルカリフォスファターゼ等の酵素で標識した二次抗体を添加し、プレート
- 15 をインキュベートし、洗浄した後、p-ニトロフェニル燐酸などの酵素基質を加えて吸光度を測定することで抗原結合活性を評価することができる。

医薬組成物

- 20 本発明は、本発明の糖鎖組成が変化したグリピカン3抗体組成物を含む医薬組成物を提供する。

- 本発明の抗体組成物を含有する医薬組成物は癌などの細胞増殖に関連する疾患の治療および/または予防に有用であり、特に肝癌の治療および/または予防に有用である。本発明の抗体を医薬組成物として用いる場合には、当業者に公知の方法で製剤化することが可能である。例えば、水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤の注射剤の形で非経口的に使用できる。
- 25 例えば、薬理学上許容される担体もしくは媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、結合剤などと適宜組み合わせ、一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製剤化することが考えられる。こ

れら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

注射のための無菌組成物は注射用蒸留水のようなベヒクルを用いて通常の製剤実施に従って処方することができる。

- 5 注射用の水溶液としては、例えば生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液、例えばD-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウムが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えばアルコール、具体的にはエタノール、ポリアルコール、例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、非イオン性界面活性剤、例えばポリソルベート 80 (TM)、HCO-50 と併用してもよい。

- 10 油性液としてはゴマ油、大豆油があげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールと併用してもよい。また、緩衝剤、例えばリン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液、無痛化剤、例えば、塩酸プロカイン、安定剤、例えばベンジルアルコール、フェノール、酸化防止剤と配合してもよい。調製された
- 15 注射液は通常、適当なアンプルに充填させる。

投与は好ましくは非経口投与であり、具体的には、注射剤型、経鼻投与剤型、経肺投与剤型、経皮投与型などが挙げられる。注射剤型の例としては、例えば、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射などにより全身または局部的に投与することができる。

- 20 また、患者の年齢、症状により適宜投与方法を選択することができる。抗体または抗体をコードするポリヌクレオチドを含有する医薬組成物の投与量としては、例えば、一回につき体重 1kg あたり 0.0001mg から 1000mg の範囲で選ぶことが可能である。あるいは、例えば、患者あたり 0.001~100000mg/body の範囲で投与量を選ぶことができるが、これらの数値に必ずしも制限されるものではない。
- 25 投与量、投与方法は、患者の体重や年齢、症状などにより変動するが、当業者であれば適宜選択することが可能である。

本明細書において明示的に引用される全ての特許および参考文献の内容は全て本明細書の一部としてここに引用する。また、本出願が有する優先権主張の基礎となる出願である日本特許出願 2004-311356 号の明細書および図面に

記載の内容は全て本明細書の一部としてここに引用する。

実施例

以下に実施例により本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例
5 により限定されるものではない。

実施例 1

マウス抗ヒトグリピカン 3 抗体の作製

抗 GPC3 抗体作製のための免疫タンパク質として、C 末端側の疎水性領域
10 (564-580 アミノ酸) を欠損させた可溶性 GPC3 タンパク質を作製し、これを用いて免疫を行った。自己免疫疾患マウスである MRL/MpJ^{UmmCrj}-lpr/lpr マウス (以下、MRL/lpr マウス、日本チャールズ・リバーより購入) を免疫動物として用いた。7 週齢、もしくは 8 週齢より免疫を開始し、初回免疫には可溶性 GPC3 を 100 μ g/head となるように調製し、フロイント完全アジュバント
15 (FCA、ベクトンディッキンソン社) を用いてエマルジョン化したものを皮下に投与した。5 回免疫の後、最終免疫として 50 μ g/head となるように PBS に希釈し尾静脈内に投与した。最終免疫の 4 日後、脾臓細胞を摘出し、マウスミエローマ細胞 P3-X63Ag8U1 (P3U1、ATCC より購入) と 2:1 になるように混合し、PEG1500 (ロシュ・ダイアグノスティック社) を徐々に加える事により細胞融
20 合を行った。スクリーニングは可溶性 GPC3 コアタンパク質を固相化したイムノプレートを用いた ELISA により行った。陽性クローンについては限界希釈法によりモノクローン化した。その結果、GPC3 に対して強い結合活性を有する抗体を 11 クローン (M3C11、M13B3、M1E7、M3B8、M11F1、L9G11、M19B11、M6B1、M18D4、M5B9、M10D2) 取得した。

25 得られた抗 GPC3 抗体のうち、特に M11F1、M3B8 が強い CDC 活性を示したことから、M11F1、M3B8 のエピトープを含む GST 融合タンパク質である、グリピカン 3 の 524 番目の Ala から 563 番目の Lys までのペプチドと GST の融合タンパク質 (GC-3) を免疫原として、Balb/c (日本チャールズリバーより購入) 3 匹、MRL/lpr 3 匹に対して免疫を行った。初回免疫には GC-3 を 100 μ

- g/head となるように調製し、FCA を用いてエマルジョン化したものを皮下に投与した。2 週間後に 50 μ g/head となるように調製したものを FIA でエマルジョン化したものを皮下に投与した。5 回免疫の後、全マウスに対し最終免疫 (50 μ g/head) を尾静脈内に行い細胞融合を行った。スクリーニングは、C 末端側の疎水性領域 (564-580 アミノ酸) を欠損させた可溶型 GPC3 コアタンパク質を固相化したイムノプレートを用いた ELISA により行った。陽性クローンについては限界希釈法によりモノクローン化した。その結果、GPC3 に対して強い結合活性を有する抗体を 5 クローン (GC199、GC202、GC33、GC179、GC194) 取得した。
- 5
- 10 このようにして得られた抗体の H 鎖、L 鎖の可変領域を定法によりクローニングし、配列を決定した。さらに、既知の抗体のアミノ酸配列のデータベースと比較して相同性を調べることにより、CDR 領域を決定した。CDR 領域の配列は表 1 および 2 に示される。

15 実施例 2

抗 GPC3 抗体マウス-ヒトキメラ抗体の作製

- 抗 GPC3 抗体 GC33 の H 鎖および L 鎖可変領域配列をヒト IgG1 および κ 鎖定常領域配列に連結した。抗体の H 鎖可変領域の 5' 末端側塩基配列に相補的でコザック配列を有する合成オリゴヌクレオチドおよび NheI 部位を有する 3' 末端側塩基配列に相補的な合成オリゴヌクレオチドを用いて PCR を行い、得られた PCR 産物をヒト IgG1 定常領域が pBluescript KS+ベクター (東洋紡社) に挿入されている pB-CH ベクターにクローニングした。NheI 部位により、マウス H 鎖可変領域とヒト H 鎖 (γ 1 鎖) 定常領域が連結している。作製された H 鎖遺伝子断片を発現ベクター pCXND3 にクローニングした。また、抗体の L 鎖可変領域の 5' 末端側塩基配列に相補的でコザック配列を有する合成オリゴヌクレオチドおよび BsiWI 部位を有する 3' 末端側塩基配列に相補的な合成オリゴヌクレオチドを用いて PCR を行い、得られた PCR 産物をヒト κ 鎖定常領域が pBluescript KS+ベクター (東洋紡社) に挿入されている pB-CL ベクターにクローニングした。BsiWI 部位により、ヒト L 鎖可変領域と定常領域が連結し
- 20
- 25

ている。作製されたL鎖遺伝子断片を発現ベクターpUCAG クローニングした。本ベクターpUCAGは、pCXN (Niwa ら、Gene 1991;108:193-200) を制限酵素 BamHI で消化して得られる 2.6kbp の断片を pUC19 ベクター (東洋紡社) の制限酵素 BamHI 部位に連結し、クローニングしたベクターである。

- 5 抗 GPC3 マウス-ヒトキメラ抗体発現ベクターを作製するために、L鎖遺伝子断片が挿入された pUCAG ベクターを制限酵素 HindIII (宝酒造社) で消化して得られる遺伝子断片をH鎖遺伝子が挿入された pCXND3 の制限酵素 HindIII 切断部位に連結し、クローニングした。本プラスミドは動物細胞内でネオマイシン耐性遺伝子、DHFR 遺伝子、抗 GPC3 マウス-ヒトキメラ抗体遺伝子 (H鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号 3 に、L鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号 4 に示される。) を発現する。

実施例 3

低フコース型抗 GPC3 キメラ抗体の作製

- 5 宿主細胞として YB2/0 (ATCC, CRL-1662) を用い、10%FBS を含む RPMI1640 培地にて培養した。実施例 2 で作製した抗 GPC3 キメラ抗体発現ベクター 25 μ g を 7.5 \times 10⁶ / 0.75 mL PBS(-) の YB2/0 (ATCC CRT-1662) へ、エレクトロポレーション法で 1.4kV, 25 μ F の条件で導入した。室温にて 10 分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を、10%FBS を含む
- 0 RPMI1640 培地 40mL に懸濁した。同様の培地で 10 倍希釈溶液を作製し、96 ウェル培養用プレートに 100 μ l / ウェルで分注した。CO₂ インキュベーター (5%CO₂) で 24 時間培養後、Geneticin (Invitrogen 社) を 0.5mg/mL になるように添加して 2 週間培養した。抗ヒト IgG 抗体を用いたサンドイッチ
- 5 ELISA によりキメラ抗体高発現株のスクリーニングを実施し、定常発現株を樹立した。各抗 GPC3 マウス-ヒトキメラ抗体の精製は、Hi Trap ProteinG HP (Amersham 社) を用いて行った。

実施例 4

ヒト末梢血由来 PBMC を用いた ADCC 活性の測定

ヒト PBMC 溶液の調製

健康人よりヘパリン加採血した末梢血を、PBS(-)で2倍に希釈し、Ficoll-Paque™ PLUS (Amersham 社)に重層した。これを遠心 (500×g、30 分間、20℃) した後、単核球画分である中間層を分取した。3 回洗浄後、10%

- 5 FBS/RPMI に懸濁し、ヒト PBMC 溶液とした。

標的細胞の調製

10%FBS/RPMI1640 培地で培養した HepG2 細胞(ATCC)および HuH-7 細胞 (ヒューマンサイエンス研究資源バンク) を、Cell Dissociation Buffer (Invitrogen 社)を用いてディッシュから剥離し、96 ウェル U 字底プレート (Falcon)の各ウェルに 1×10^4 細胞/ウェルで分注し、1 日間培養した。培養後、5.55MBq の Cr-51 を加え、5%炭酸ガスインキュベータ中 37℃1 時間培養し、この細胞を培地で 1 回洗浄し、50 μ L の 10%FBS/RPMI1640 培地を加え標的細胞とした。

10

クロム遊離試験 (ADCC 活性)

- 15 標的細胞に各濃度に調製した抗体溶液 50 μ L を添加し、氷上で 15 分反応させた後に、ヒト PBMC 溶液 100 μ L (5×10^5 細胞/ウェル) を加え、5%炭酸ガスインキュベータ中 37℃4 時間培養し、培養後、プレートを遠心分離し、培養上清 100 μ L 中の放射活性をガンマカウンターで測定した。下式により特異的クロム遊離率を求めた。

- 20 特異的クロム遊離率(%)=(A-C)×100/(B-C)

A は各ウェルにおける放射活性(cpm)の平均値、B は標的細胞に 2% NP-40 水溶液(Nonidet P-40、Code No.252-23、ナカライテスク株式会社)を 100 μ L、10%FBS/RPMI 培地を 50 μ L 添加したウェルにおける放射活性(cpm)の平均値、C は標的細胞に 10%FBS/RPMI 培地を 150 μ L 添加したウェルにおける放射活

25 性(cpm)の平均値を示す。試験は三重に行い、ADCC 活性 (%) について平均値および標準偏差を算出した。

抗 GPC3 キメラ抗体のヒト PBMC を用いた ADCC 活性を図 2 および 3 に示す。図中、縦軸は細胞傷害活性 (%) を、横軸は添加した抗体の濃度 (μ g/mL) を示す。図 2 は標的細胞として HepG2 を用いた場合の、図 3 は HuH-7 を

- 用いた場合の結果を示す。白抜きは CHO 細胞産生キメラ GC33 抗体の活性を、黒塗りは YB2/0 産生キメラ GC33 抗体の活性をそれぞれ示す。低フコース型である YB2/0 産生 GC33 キメラ抗体は、CHO 細胞産生 GC33 キメラ抗体に比較して強い ADCC 活性を示したことより、糖鎖の改変によって抗 GPC3 抗体の
- 5 ADCC 活性が増強されることが明らかとなった。

実施例 5

抗体産生細胞の樹立

- SFMII (+)培地にハイグロマイシン B の最終濃度が 1 mg/ml になるように調
- 10 製し、フコーストランスポーター欠損株 (クローン名 3F2) を継代した。8 X 10⁶ 個の 3F2 を 0.8 mL のダルベッコリン酸緩衝液に懸濁した。細胞懸濁液に 25 μ g の抗体発現ベクター (参考実施例 1 及び 2) を加え、Gene Pulser Cuvette に細胞懸濁液を移した。氷上で 10 分間放置した後に、GENE-
- 15 PULSER II で 1.5 kV, 25 μ FD の条件で、エレクトロポレーション法によりベクターを細胞に導入した。ベクターを導入後、細胞を SFMII(+)培地 40 mL に懸濁して 96 穴平底プレート (イワキ社) に 100 μ l/ウェルで細胞を播きこんだ。プレートを CO₂ インキュベータ内で、24 時間、37°C で培養した後、Geneticin (インビトロジェン社、cat. 10131-027) を終濃度 0.5 mg/mL になるように添
- 20 加した。薬剤に耐性になった細胞の抗体産生量を測定し、ヒト化抗 GPC3 抗体産生細胞株をそれぞれ樹立した。

実施例 6

抗体の精製

- 抗体発現株より培養上清を回収し、P-1 ポンプ (Pharmacia) を用いて
- 25 Hitrap rProtein A (Pharmacia CAT# 17-5080-01) にチャージした。結合バッファー (20mM Sodium phosphate (pH7.0)) にて洗浄後、溶出バッファー (0.1M Glycin-HCl (pH2.7)) で溶出した。溶出液は直ちに中和バッファー (1M Tris-HCl (pH9.0)) で中和した。DC protein assay (BIO-RAD CAT# 500-0111) により抗体の溶出面分を選択しプールした後、Centriprep-YM10 (Millipore CAT#

4304) にて 2 mL 程度まで濃縮した。次に、20 mM 酢酸バッファー、150 mM NaCl, (pH6.0)にて平衡化した Superdex200 26/60 (Pharmacia)を用いてゲルろ過により分離した。モノマー画分のピークを回収し、Centriprep-YM 10 にて濃縮後、MILLEX-GW 0.22 μ m Filter Unit (Millipore CAT# SLGV 013SL)を用いて Filtration した後、4°Cで保管した。精製された抗体の濃度は、280nm の吸光度を測定し、モル吸光計数から換算した。

実施例 7

FT-KO 細胞産生ヒト化抗 GPC3 抗体の in vitro ADCC 活性

- 10 FT-KO 細胞産生抗 GPC3 抗体のヒト PBMC を用いた in vitro ADCC 活性を図 4 に示す。方法は実施例 4 に記載の方法で行った。図中、縦軸は細胞傷害活性 (%) を、横軸は添加した抗体の濃度 (μ g/mL) を示す。標的細胞としては HuH-7 を用いた。白抜きは Wild Type の CHO 細胞産生抗 GPC3 抗体の活性を、黒塗りは FT-KO 細胞産生抗 GPC3 抗体の活性をそれぞれ示す。低フコース型である FT-KO 細胞産生抗 GPC3 抗体は、Wild Type の CHO 細胞産生抗 GPC3 抗体に比較して強い ADCC 活性を示した。このことにより FT-KO 細胞産生抗 GPC3 抗体では ADCC 活性が増強されることが明らかとなった。

実施例 8

20 FT-KO 細胞産生ヒト化抗 GPC3 抗体糖鎖の解析

1. 2-アミノベンズアミド標識糖鎖 (2-AB 化糖鎖) の調製

- 本発明の FT-KO 細胞産生抗体、及び対照試料として CHO 細胞産生の抗体に、N-Glycosidase F (Roche diagnostics)を作用させ、糖鎖を蛋白質から遊離させた (Weitzhandler M. et al., Journal of Pharmaceutical Sciences 83:12(1994), 1670-1675)。エタノールを用いた除タンパク質後 (Schenk B. et al., The Journal of Clinical Investigation 108:11(2001), 1687-1695)、濃縮乾固し、2-アミノピリジンによる蛍光標識を行った (Bigge J. C. et al., Analytical Biochemistry 230:2(1995), 229-238)。得られた 2-AB 化糖鎖を、セルロースカートリッジを用いた固相抽出により脱試薬した後遠心濃縮し、精製 2-AB 化糖鎖

とした。次に、 β -Galactosidase(生化学工業)を精製 2-AB 化糖鎖に作用させ、アガラクトシル 2-AB 化糖鎖とした。

2. アガラクトシル 2-AB 化糖鎖の順相 HPLC による分析

前項の方法で、本発明の FT-KO 細胞産生抗体、及び対照試料として CHO 細胞産生抗体についてアガラクトシル 2-AB 化糖鎖の調製を行った後、アミドカラム (東ソー製 TSKgel Amide-80) による順相 HPLC 分析を行い、クロマトグラムを比較した。CHO 細胞産生抗体では G(0)が主成分として存在しており、G(0)-Fuc はピーク面積比として 4%程度であった。一方、FT-KO 細胞産生抗体では G(0)-Fuc が主成分であり、いずれの産生株においてもピーク面積比として 90%以上存在していた (図 5 および表 2)。ピーク G(0)および G(0)-Fuc の推定構造を図 6 に示す。

表 2

アガラクトシル 2-AB 化糖鎖の順相 HPLC 分析から推定された各糖鎖の相対比

糖鎖名	CHO	FT-KO-a	FT-KO-b	FT-KO-c
G(0)-Fuc	4.0%	92.4%	92.5%	93.2%
G(0)	96.0%	7.6%	7.5%	6.8%

15

実施例 9

FT-KO 細胞産生ヒト抗 GPC3 抗体の熱安定性分析

1. DSC 測定用試料溶液の調製

200 mmol/L の塩化ナトリウムを含む 20 mol/L の酢酸ナトリウム緩衝溶液 (pH6.0) を透析外液とし、これに 700 μ g 相当量の抗体溶液を封入した透析膜を浸して一昼夜透析し、試料溶液とした。

2. DSC による熱変性温度測定

試料溶液およびリファレンス溶液 (透析外液) を十分に脱気した後、これらをそれぞれ熱量計セルに封入し 20°C での熱平衡化を十分に行った。次に DSC 走査を 20°C ~ 100°C で約 1K/分走査速度で行った。結果は、温度の関数としての変性ピークの頂点として表される (図 7)。本測定より、CHO 細胞産生抗体および FT-KO 細胞産生抗体における熱変性温度は同等であった。

25

参考実施例 1

GC33 のヒト化

公開されている Kabat Database (<ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/kabat/>)、
5 および ImMunoGeneTics Database (IMGT)より抗体の配列データを入手し、H鎖可変領域、L鎖可変領域に分けてホモロジー検索を行った。その結果、H鎖可変領域は DN13(Smithson ら、Mol Immunol. 1999 ; 36 : 113-124)と高い相同性を持つことが分かった。また、L鎖可変領域は Accession number
10 AB064105 の homo sapiens IGK mRNA for immunoglobulin kappa light chain VLJ region, partial cds, clone:K64 と高い相同性を持つことが分かった。また、L鎖のシグナル配列については AB064105 と相同性の高い Accession Number S40357 のシグナル配列を利用した。これらの抗体のフレームワーク領域(以下、FR)に相補性抗原決定領域 (以下、CDR) を移植したヒト化抗体を作製した。

具体的には、50 base 程度の合成オリゴ DNA を約 20 base 程度ハイブリダイズするように設計し、これらの合成オリゴ DNA を PCR 法によりアッセムブリ
15 させて各可変領域をコードする遺伝子を作製した。5' 端の合成オリゴ DNA の末端に挿入した HindIII 配列、および 3' 端の合成オリゴ DNA の末端に挿入した BamHI 配列で切断し、ヒト IgG1 定常領域がクローニングされた発現ベクター-HEFg γ 1、ヒト κ 鎖定常領域がクローニングされた発現ベクター-HEFg κ へ
20 クローニングした (Sato ら、Mol Immunol. 1994 ; 371-381) 。このようにして作製したヒト化 GC33 は H鎖、L鎖それぞれ ver.a と命名した。H鎖、L鎖ともに ver.a のヒト化 GC33 (ver.a / ver.a) はマウス GC33 可変領域の抗体
(mouse / mouse) と比較して結合活性が低かった。H鎖とL鎖についてマウス GC33 配列と ver.a 配列をキメラに組み合わせた抗体 (mouse / ver.a、ver.a /
25 mouse) を作製し結合活性を評価した結果、ver.a / mouse で結合活性の低下が認められ、アミノ酸置換による結合活性の低下は H鎖に起因する事が判明した。そこで、H鎖の改変体 ver.c、ver.f、ver.h、ver.i、ver.j、ver.k を作製した。全てのヒト化 GC33 はマウス GC33 可変領域を有するキメラ抗体と同等の結合活性を示した。ヒト化 GC33H鎖可変領域 ver.a、ver.c、ver.f、ver.h、ver.i、ver.j、

ver.k の塩基配列を配列番号 74、75、76、77、78、79、80 に、アミノ酸配列を配列番号 81、82、83、84、85、86、87 に示す。ヒト化 GC33L 鎖可変領域 ver.a の塩基配列を配列番号 88 に、アミノ酸配列を配列番号 89 に示す。ヒト化 GC33H 鎖可変領域 ver.i、ver.j、ver.k では、6 番目の

5 グルタミン酸がグルタミンに置換されているが、これらの抗体は熱安定性が顕著に増加していた。

参考実施例 2

ヒト化 GC33L 鎖の改変

10 蛋白質の脱アミド化については一次配列依存的な脱アミド化の反応速度定数が知られており、Asn-Gly が特に脱アミド化し易い配列として知られている

(Rocinson ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2001 ; 98 ; 944-949.)。配列番号 88 に示されるヒト化 GC33L 鎖 ver.a 可変領域の CDR1 内にある Asn33 については、一次配列が Asn-Gly であることから、脱アミド化が容易に起きやすい

15 配列である事が予想された。

Asn33 の脱アミド化による結合活性に対する影響を評価する為に、Asn33 を Asp に置換した改変抗体を作製した。点変異の導入には、Quick Change Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene 社) を使用した。すなわち、125 ng のセンスプライマー (CTT GTA CAC AGT GAC GGAAAC ACC TAT : 配列番号

20 124)、125 ng のアンチセンスプライマー (ATA GGT GTT TCC GTC ACT GTG TAC AAG : 配列番号 125)、5 μ L の 10x reaction buffer、1 μ L の dNTP mix、10 ng のヒト化 GC33L 鎖 ver.a がクローニングされた HEFg κ 、1 μ L の Pfu Turbo DNA Polymerase を含む 50 μ L の反応液を、95°C で 30 秒、55°C で 1 分、68°C で 9 分からなるサイクルを 12 回行った。その後制限酵素

25 DpnI を加え 37°C で 2 時間消化したものを添付の XL1-Blue コンピテント細胞に導入し形質転換体を得た。正しく変異の導入されたクローンについて、可変領域を切り出し、再度 HEFg κ へクローニングし直した。ヒト化 GC33H 鎖 ver.k がクローニングされた HEFg γ 1 と共に Fugene6 (Roche 社) を用いて COS7 細胞へ導入し一過性に発現させた培養上清を回収した。抗ヒト IgG 抗体を用いた

サンドイッチ ELISA により抗体濃度を定量し、可溶型 GPC3 コア蛋白質を固相化した ELISA により改変抗体の結合活性を評価した。Asn33 を Asp に置換した改変抗体 (N33D) では結合活性が消失しており、Asn33 で脱アミド化が起きた場合結合活性に与える影響は大きいと考えられた。

- 5 Asn33 の脱アミド化を抑制する方法として、Gly34 を他のアミノ酸に改変する方法が報告されている (WO03057881A1)。上記方法に従い、Quick Change Site-Directed Mutagenesis Kit を用い Cys、Met を除く他の 17 アミノ酸に置換した改変抗体 G34A、G34D、G34E、G34F、G34H、G34N、G34P、G34Q、G34I、G34K、G34L、G34V、G34W、G34Y、G34R、G34S、G34T
- 10 を作製し、COS 7 細胞一過性発現培養上清を用いて結合活性の評価を行った。その結果、Pro (G34P)、Val (G34V) 以外へのアミノ酸置換は結合活性を維持している事が判明した。

- 上述の改変抗体の軽鎖 CDR 1 のアミノ酸配列を、それぞれ配列番号 9 0 (G34A)、配列番号 9 1 (G34D)、配列番号 9 2 (G34E)、配列番号 9 3 (G34F)、配列番号 9 4 (G34H)、配列番号 9 5 (G34N)、配列番号 9 6 (G34T)、配列番号 9 7 (G34Q)、配列番号 9 8 (G34I)、配列番号 9 9 (G34K)、配列番号 1 0 0 (G34L)、配列番号 1 0 1 (G34S)、配列番号 1 0 2 (G34W)、配列番号 1 0 3 (G34Y)、配列番号 1 0 4 (G34R)、配列番号 1 0 5 (G34V)、配列番号 1 0 6 (G34P) に記載する。また、上述
- 20 の改変抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列を、それぞれ配列番号 1 0 7 (G34A)、配列番号 1 0 8 (G34D)、配列番号 1 0 9 (G34E)、配列番号 1 1 0 (G34F)、配列番号 1 1 1 (G34H)、配列番号 1 1 2 (G34N)、配列番号 1 1 3 (G34T)、配列番号 1 1 4 (G34Q)、配列番号 1 1 5 (G34I)、配列番号 1 1 6 (G34K)、配列番号 1 1 7 (G34L)、配列番号 1 1 8 (G34S)、配列番号 1 1 9 (G34W)、配列番号 1 2 0 (G34Y)、配列番号 1 2 1 (G34R)、配列番号 1 2 2 (G34V)、配列番号 1 2 3 (G34P) に記載する。
- 25

参考実施例 3

CHO 細胞におけるフコーストランスポーター遺伝子の破壊

1. ターゲッティングベクターの構築

(1) KO1 ベクターの作製

pcDNA3.1/Hygro (インビトロジェン社) より Hyg5-BH と Hyg3-NT のプライマーで PCR することによって、Hygromycin 耐性遺伝子 (Hygr) の開始コドンの 5' 側に BamH I サイトと TGCGC の配列を付加することで、フコーストランスポーター遺伝子の開始コドンの 5' 側と同じ配列にし、SV40 polyA 付加シグナルまでの領域を含む 3' 側には Not I サイトを付加して Hygr を抜き出した。

10 フォワードプライマー

Hyg5-BH 5' - GGA TCC TGC GCA TGAAAAAGC CTG AAC TCA CC -
3' (配列番号 1 2 8)

リバースプライマー

Hyg3-NT 5' - GCG GCC GCC TAT TCC TTT GCC CTC GGA CG -3'

15 (配列番号 1 2 9)

フコーストランスポーターのターゲッティングベクター ver.1 (以下、KO1 ベクターと称する) は pMC1DTA ベクター (Yagi T, Proc. Natl. Acad. Sci. USA vol.87, p9918-9922, 1990) に、フコーストランスポーターの 5' 側 (配列番号 1 2 6 に示す塩基配列の No.2,780 の Sma I から No.4,232 の BamH I)、3' 側 (No.4,284 から No.10,934 の Sac I まで)、及び Hygr フラグメントを各々挿入することで構築した。ベクターの特徴としては、Hygr にプロモーターが付加されていないことから、相同組み換えを起こしたときにフコーストランスポーターのプロモーターによって、Hygr が発現することとなる。しかしながら、相同組み換えによって 1 コピーのみベクターが細胞に導入されても、ハイグロマイシン B に対する耐性を獲得するほど Hygr が発現するとは限らない。なお、KO1 ベクターは Not I で切断して細胞に導入した。KO1 ベクターによって、フコーストランスポーターは開始コドンを含むエクソン 1 の 41 塩基対を欠損することになり、機能を失うものと考えられる。

(2) pBSK-pgk-1-Hygr の作製

pKJ2 ベクター (Popo H, Biochemical Genetics vol.28, p299-308, 1990) よりマウス pgk-1 遺伝子のプロモーターを EcoR I-Pst I によって切り出し、pBluescript(ストラタジーン社)の EcoR I-Pst I サイトにクローニングして pBSK-pgk-1 を作製した。Hygr は pcDNA3.1/Hygro より Hyg5-AV と Hyg3-BH のプライマーで PCR することによって、Hygr の 5' 側に EcoT22 I サイトと Kozak 配列を付加し、SV40 polyA 付加シグナルまでの領域を含む 3' 側には BamH I サイトを付加して Hygr を抜き出した。

フォワードプライマー

Hyg5-AV 5' - ATG CAT GCC ACC ATG AAA AAG CCT GAA CTC ACC -

10 3' (配列番号 1 3 0)

リバースプライマー

Hyg3-BH 5' - GGA TCC CAG GCT TTA CAC TTT ATG CTT C -3' (配列番号 1 3 1)

この Hygr (EcoT22 I-BamH I) フラグメントを pBSK-pgk-1 の Pst I-BamH I サイトに挿入し、pBSK-pgk-1-Hygr を作製した。

(3) KO2 ベクターの作製

フコーストランスポーターのターゲッティングベクター ver.2 (以下、KO2 ベクターと称する) は pMC1DT-A ベクターにフコーストランスポーターの 5' 側 (配列番号 1 2 6 に示す塩基配列) の No.2,780 の Sma I から No.4,232 の BamH I)、3' 側 (No.4,284 から No.10,934 の Sac I まで)、及び pgk-1-Hygr フラグメントを各々挿入することで構築した。KO1 ベクターと異なり、KO2 ベクターは Hygr に pgk-1 遺伝子のプロモーターが付加されていることから、相同組み換えによって 1 コピーのみベクターが細胞に導入されても、ハイグロマイシン B に対する耐性を獲得する。なお、KO2 ベクターは Not I で切断して細胞に導入した。KO2 ベクターによって、フコーストランスポーターは開始コドンを含むエクソン 1 の 46 塩基対を欠損することになり、機能を失うものと考えられる。

(4) pBSK-pgk-1-Puror の作製

pPUR ベクター (BD Biosciences 社) を Pst I と BamH I で切断し、切り出されたフラグメント (Puror) を pBSK-pgk-1 の Pst I-BamH I サイトに挿入し、

pBSK-pgk-1-Puror を作製した。

(5) KO3 ベクターの作製

- フコーストランスポーターのターゲッティングベクターver.3 (以下、KO3 ベクターと称する) は pMC1DT-A ベクターにフコーストランスポーターの 5' 側 (配列番号 1 2 6 に示す塩基配列の No.2,780 の Sma I から No.4,232 の BamH I)、3' 側 (No.4,284 から No.10,934 の Sac I まで)、及び pgk-1- Puror フラグメントを各々挿入することで構築した。なお、pgk-1- Puror の 3' 末端には、以下に示すスクリーニング用のプライマーが結合する配列を予め付加しておいた。なお、KO3 ベクターは Not I で切断して細胞に導入した。KO3 ベクターによつて、フコーストランスポーターは開始コドンを含むエクソン 1 の 46 塩基対を欠損することになり、機能を失うものと考えられる。

リバースプライマー

RSGR-A 5' - GCT GTC TGG AGT ACT GTG CAT CTG C -3' (配列番号 1 3 2)

- 15 以上の 3 種類のターゲッティングベクターを用いて、フコーストランスポーター遺伝子のノックアウトを試みた。

2. CHO 細胞へのベクターの導入

- CHO-S-SFMII HT (インビトロジェン社、cat 12052-098) に HT Supplement(100X) (インビトロジェン社 cat. 11067-030) とペニシリンストレプトマイシン (インビトロジェン社 cat. 15140-122) を CHO-S-SFMII HT の容量に対して、それぞれ 1/100 量を加えた。これを培養用の培地 (以下、SFMII (+) と称する) として CHO 細胞の DXB11 株を継代し、さらに遺伝子導入後の培養もこの SFMII (+) で行った。8 X 10⁶ 個の CHO 細胞を 0.8mL のダルベッコリン酸緩衝液 (以下、PBS と略す。インビトロジェン社 cat 14190-144) に懸濁した。細胞懸濁液に 30 μg のターゲッティングベクターを加え、Gene Pulser Cuvette(4mm) (バイオラッド社 cat. 1652088) に細胞懸濁液を移した。氷上で 10 分間放置した後に、GENE-PULSER II (バイオラッド社 code No. 340BR) で 1.5kV, 25 μFD の条件で、エレクトロポレーション法によりベクターを細胞に導入した。ベクターを導入後、細胞を 200ml の SFMII (+) 培地に懸濁

して 20 枚の 96 穴平底プレート（イワキ社 cat. 1860-096）に 100 μ l/ウェルで細胞を播きこんだ。プレートを CO₂ インキュベータ内で、24 時間、37°C で培養した後、薬剤を添加した。

3. ノックアウトの第一段階

- 5 KO1 ベクター、もしくは KO2 ベクターをそれぞれ CHO 細胞に導入し、ベクター導入から 24 時間後にハイグロマイシン B（インビトロジェン社 cat. 10687-010）による選抜を行った。ハイグロマイシン B は 0.3mg/ml になるように SFMII(+) に溶解し、100 μ l/ウェル添加した。

4. PCR による相同組み換え体のスクリーニング

10 (1) PCR 用のサンプルの調整

相同組み換え体は PCR 法によってスクリーニングした。スクリーニングで用いる CHO 細胞は 96 穴平底プレートで培養し、培養上清除去後に細胞溶解用の緩衝液を 50 μ l/ウェル加えて 55°C、2 時間加温し、続いて 95°C、15 分加熱することで、プロティナーゼ K を失活させて PCR の鋳型とした。細胞溶解用の緩衝液は、1 ウェルあたり 10 X LA 緩衝液 II (タカラ社 LA Taq に添付) 5 μ l、15 10% NP-40（ロッシュ社 cat. 1 332 473） 2.5 μ l、プロティナーゼ K (20mg/ml、タカラ社 cat. 9033) 4 μ l、及び蒸留水（ナカライテスク社 cat. 36421-35） 38.5 μ l で構成されている。

(2) PCR の条件

- 20 PCR 反応混合物は上記の PCR サンプル 1 μ l、10 X LA 緩衝液 II 5 μ l、MgCl₂ (25mM) 5 μ l、dNTP(2.5mM) 5 μ l、プライマー（各 10 μ M） 2 μ l、LA Taq(5 IU/ μ l cat.RR002B) 0.5 μ l、及び蒸留水 29.5 μ l(全 50 μ l) とした。KO1 ベクターを導入した細胞のスクリーニングには、TP-F4 と THygro-R1、KO2 ベクターを導入した細胞のスクリーニングには、TP-F4 と THygro-F1 を PCR プライマーに用いた。
- 25

KO1 ベクターを導入した細胞の PCR は、95°C にて 1 分間の前加熱、95°C にて 30 秒間、60°C にて 30 秒間、及び 60°C にて 2 分間の増幅サイクル 40 サイクル、並びに 72°C にて 7 分の複加熱とした。KO2 ベクターを導入した細胞のスクリーニングには 95°C にて 1 分間の前加熱、95°C にて 30 秒間、及び 70°C にて 3

分間の増幅サイクル 40 サイクル、並びに 70°C にて 7 分の複加熱とした。

プライマーは以下の通りで、相同組み換えを起こした細胞のサンプルでは、KO1 ベクターでは、約 1.6kb、KO2 ベクターでは約 2.0kb の DNA が増幅される。プライマーは TP-F4 がベクターの外側で、かつ 5' 側のフコーストランス

5 ポーターのゲノム領域に設定し、THygro-F1、及び THygro-R1 はベクター内の Hygr の中に設定した。

フォワードプライマー (KO1, KO2)

TP-F4 5' -GGA ATG CAG CTT CCT CAA GGG ACT CGC -3'
(配列番号 1 3 3)

10 リバースプライマー(KO1)

THygro-R1 5' -TGC ATC AGG TCG GAG ACG CTG TCG AAC -3' (配列番号 1 3 4)

リバースプライマー(KO2)

15 THygro-F1 5' -GCA CTC GTC CGA GGG CAA AGG AAT
AGC -3' (配列番号 1 3 5)

5. PCR スクリーニング結果

KO1 ベクターを導入した細胞は 918 個を解析し、そのうち相同組み換え体と考えられる細胞は 1 個であった (相同組み換え効率は約 0.1%)。また、KO2 ベクターを導入した細胞は 537 個を解析し、そのうち相同組み換え体と考えられる細胞は 17 個であった (相同組み換え効率は約 3.2%)。

20

6. サザンブロット解析

さらに、サザンブロット法によっても確認を行った。培養した細胞から定法に従ってゲノム DNA を 10 μg 調整し、サザンブロットを行った。配列番号 1 2 6 に示す塩基配列の No.2,113-No.2,500 の領域から、以下の二種類のプライマー

25 を用いて PCR 法により 387bp のプローブを調整し、これをサザンブロット法による確認に用いた。ゲノム DNA は Bgl II で切断した。

フォワードプライマー

Bgl-F : 5' -TGT GCT GGG AAT TGA ACC CAG GAC -3' (配列番号 1 3 6)

リバースプライマー

Bgl-R : 5' - CTA CTT GTC TGT GCT TTC TTC C -3' (配列番号 1 3 7)

- Bgl II による切断によって、フコーストランスポーターの染色体からは約 3.0kb、KO1 ベクターで相同組み換えを起こした染色体からは約 4.6kb、KO2
- 5 ベクターで相同組み換えを起こした染色体からは約 5.0kb のバンドがそれぞれ出現する。KO1 ベクター、及び KO2 ベクターによって相同組み換えを起こした細胞のそれぞれ 1、7 種類を実験に用いた。KO1 ベクターで唯一獲得された細胞は 5C1 と名づけたが、その後の解析により複数の細胞集団から構成されることが明らかになったので、限界希釈によってクローン化し、その後の実験に用いる
- 10 ことにした。また、KO2 ベクターで獲得された細胞の一つを 6E2 と名付けた。

7. ノックアウトの第二段階

- KO1 ベクター、及び KO2 ベクターによって相同組み換えが成功した細胞に対し、3 種類のベクターを用いて、フコーストランスポーター遺伝子が完全に欠損した細胞株の樹立を試みた。ベクターと細胞の組み合わせは、以下の通りである。
- 15 方法 1. KO2 ベクターと 5C1 細胞 (KO1)、方法 2. KO2 ベクターと 6E2 細胞 (KO2)、方法 3. KO3 ベクターと 6E2 細胞 (KO2)。ベクターをそれぞれの細胞に導入し、ベクター導入から 24 時間後にハイグロマイシン B、ピューロマイシン (ナカライテスク社、cat.29455-12) による選抜を開始した。ハイグロマイシン B は方法 1 では最終濃度が 1mg/ml、方法 2 では最終濃度が 7mg/ml になるよ
- 20 うにした。さらに方法 3 では、ハイグロマイシン B の最終濃度が 0.15mg/ml、ピューロマイシンの最終濃度が 8 µg/ml になるように添加した。

8. PCR による相同組み換え体のスクリーニング

- サンプルの調整は前述の通り。方法 1 に関するスクリーニングは、前述の KO1 ベクター、及び KO2 ベクターで相同組み換えを起こした細胞を検出する
- 25 PCR を両方行った。方法 2 に関しては、下記の PCR プライマーを設計した。配列番号 1 2 6 に示す塩基配列の No.3,924-3,950 の領域に TPS-F1 を、No.4,248-4,274 に SHygro-R1 を設定した。この PCR プライマーによって、KO2 ベクターにより欠損するフコーストランスポーターの遺伝子領域の 350bp が増幅される。従って、方法 2 における PCR スクリーニングにおいては、

350bp が増幅されないものを、フコーストランスポーター遺伝子が完全に欠損した細胞とみなすことにした。PCR の条件は、95℃にて1分間の前加熱、95℃にて30秒間、70℃にて1分間の増幅サイクル35サイクル、並びに70℃にて7分の複加熱とした。

5 フォワードプライマー

TPS-F1 : 5' - CTC GAC TCG TCC CTA TTA GGC AAC AGC -3' (配列番号138)

リバースプライマー

SHygro-R1 : 5' - TCA GAG GCA GTG GAG CCT CCA GTC AGC -3' (配列番号139)

方法3に関しては、フォワードプライマーに TP-F4、リバースプライマーに RSGR-A を用いた。PCR の条件は、95℃にて1分間の前加熱、95℃にて30秒間、60℃にて30秒間、72℃にて2分間の増幅サイクル35サイクル、並びに72℃にて7分の複加熱とした。KO3ベクターによって相同組み換えを起こした細胞のサンプルでは、約1.6kbのDNAが増幅される。このPCRでKO3ベクターによって相同組み換えを起こした細胞を検出するとともに、KO2ベクターでの相同組み換えが残っていることも確認した。

9. PCR スクリーニング結果

方法1では616個を解析し、そのうち相同組み換え体と考えられる細胞は18個であった(相同組み換え効率は2.9%)。方法2では524個を解析し、そのうち相同組み換え体と考えられる細胞は2個であった(相同組み換え効率は約0.4%)。さらに、方法3では382個を解析し、そのうち相同組み換え体と考えられる細胞は7個であった(相同組み換え効率は約1.8%)。

10. サザンプロット解析

前述の方法に準じて解析を行った。その結果、解析できた細胞のうち、フコーストランスポーターの遺伝子が完全に欠損している細胞を1つ見出した。第一段階のノックアウトでは、PCRとサザンプロットの解析結果が一致したが、この第二段階のノックアウトでは、一致しなかった。この原因としては、1. 例えば、方法1でKO1、KO2のそれぞれ単独で相同組み換えを起こした細胞が混在

している、2. フコーストランスポーター遺伝子が一对 (2 遺伝子) ではなく複数対 (あるいは3 遺伝子以上) 存在する、3. 第一段階のノックアウトが成功した細胞株を培養していると、継代中に残ったフコーストランスポーター遺伝子がコピー数を増やすことなどの可能性が考えられた。

5 11. フコースの発現解析

さらに、PCR で相同組み換え体と判断された 26 の細胞におけるフコースの発現を解析した。5 μ g/mL の *Lens culinaris* Agglutinin, FITC Conjugate (ベクターラボラトリー社 cat. FL-1041)、2.5% の FBS、0.02% のアジ化ナトリウムを含む PBS (以下、FACS 溶解液と称する) 100 μ l で 1×10^6 個の細胞を氷冷中で 10 1 時間染色した。その後、FACS 溶解液で細胞を 3 回洗浄して FACSCalibur (ベクトンディッキンソン社) で測定を行った。その結果、サザンプロット解析でフコーストランスポーターの遺伝子が完全に欠損していると判断された細胞のみ、フコースの発現が低下していることが明らかになった。

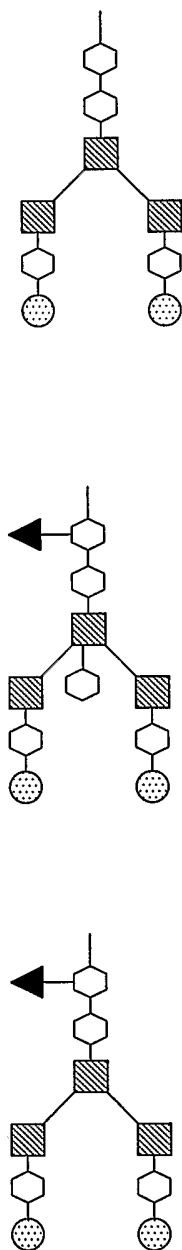
以上の結果より以下のことが判明した。

15 フコーストランスポーターの遺伝子が完全に欠失している細胞は 1 株しかなく、スクリーニングした数が 616 個であったことを考えると、相同組み換えの頻度は約 0.16% と低い結果になった。第二段階のノックアウトで、PCR とサザンプロットの解析結果が一致しなかった理由は、前述のようにいくつか考えられるが、方法 3 においては、2 種類の薬剤で選抜しているため、得られた細胞株が KO2
20 ベクター、KO3 ベクターのそれぞれ単独で相同組み換えを起こした細胞が混在しているとは考えられない。また、その他の PCR で相同組み換えを起こしたと判断された細胞株もすべて、複数の細胞集団から構成されているとは考えにくい。前述のようにフコーストランスポーター遺伝子が 3 以上存在した場合には、細胞におけるターゲティングは格段に難しくなり、KO1 ベクターのような Hygr
25 が発現しにくいものを使用し、なおかつ数多くのスクリーニングを行わないと相同組み換え体を得られないものと考えられた。

請求の範囲

1. 糖鎖組成が変化した抗グリピカン3抗体組成物。
2. 抗体依存性細胞傷害性 (Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity ;
- 5 ADCC) が増強されていることを特徴とする請求項1に記載の抗体組成物。
3. 前記抗体組成物中の抗体がモノクローナル抗体である、請求項1または2に記載の抗体組成物。
4. 糖鎖組成の変化が、フコースが欠損した抗体の割合の増加であることを特徴とする請求項1～3のいずれか1項に記載の抗体組成物。
- 10 5. 抗グリピカン3抗体をコードする遺伝子が導入され、かつ糖鎖へのフコース付加能が減少した細胞を用いることを特徴とする、抗グリピカン3抗体の製造方法。
6. 糖鎖へのフコース付加能が減少した細胞がフコーストランスポーター欠損細胞である、請求項5に記載の抗グリピカン3抗体の製造方法。
- 15 7. 以下の工程を含む抗グリピカン3抗体の製造方法：
(a)抗グリピカン3抗体をコードする遺伝子を糖鎖へのフコース付加能が減少した細胞に導入する工程、
(b)該細胞を培養する工程。
8. 請求項1～4のいずれかに記載の抗体組成物を有効成分として含む抗癌剤。

IgG基本糖鎖(1) IgG基本糖鎖(2) IgG基本糖鎖(3)



○ GlcNAc

▲ フコース

● ガラクトース

■ マンノース

図1

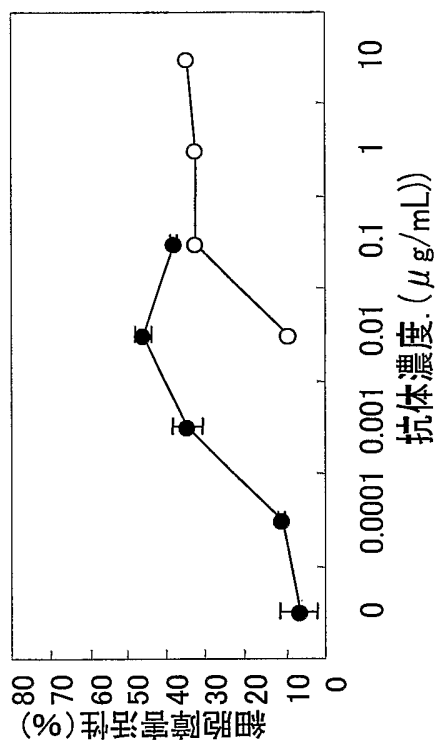


図2

3/7

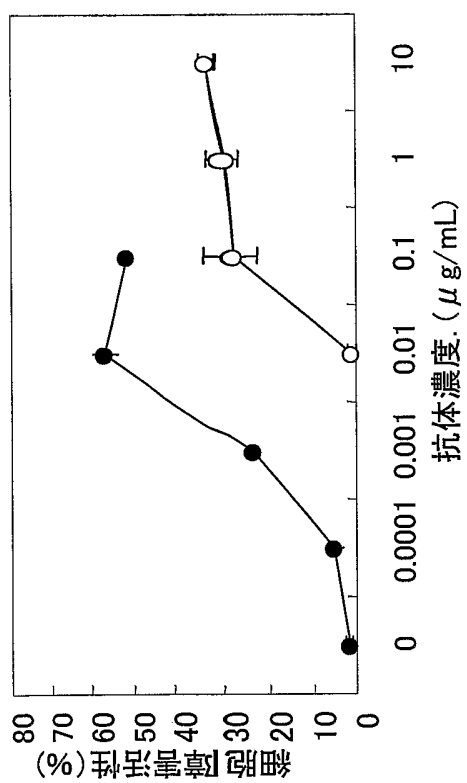


図3

4/7

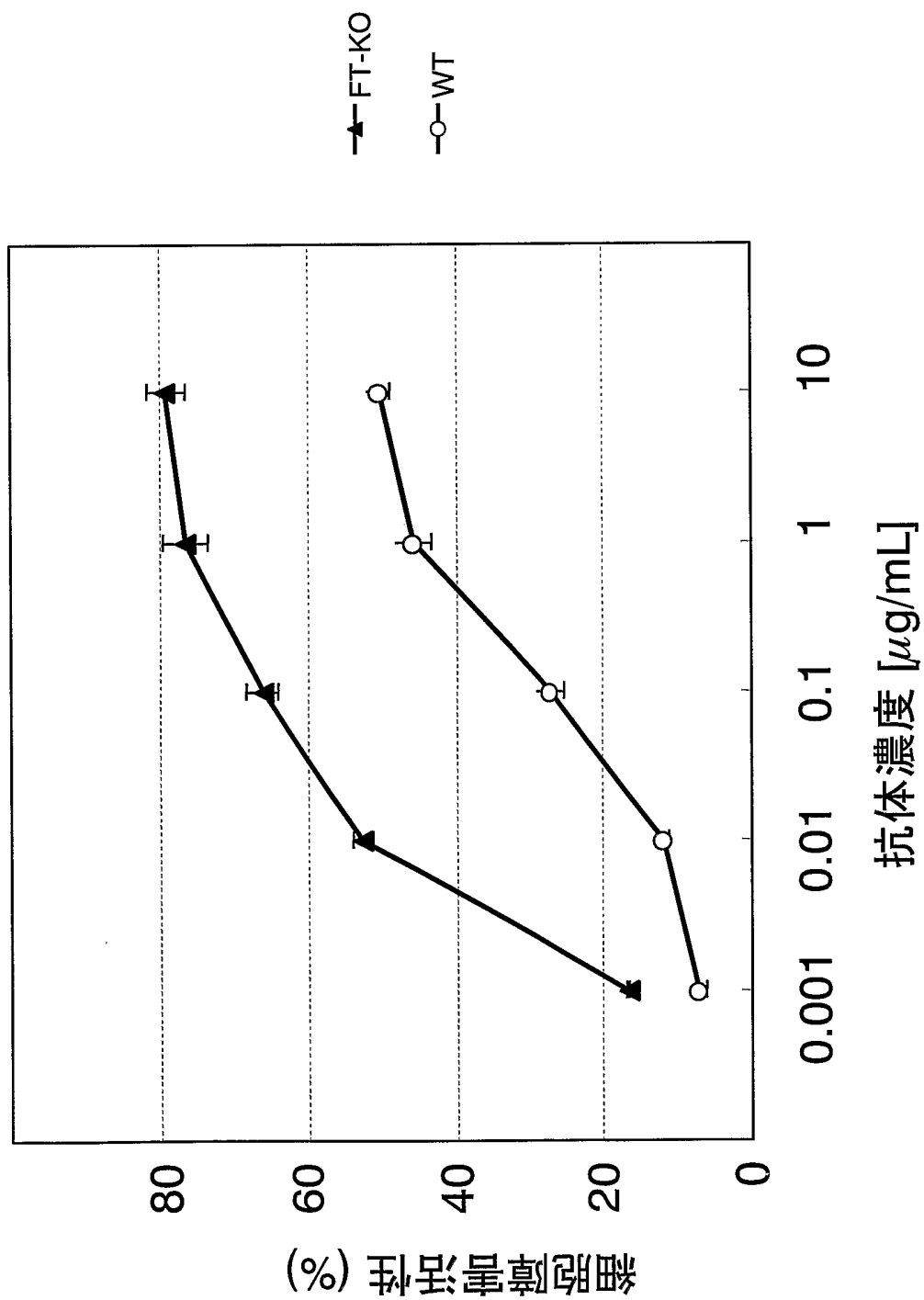


図4

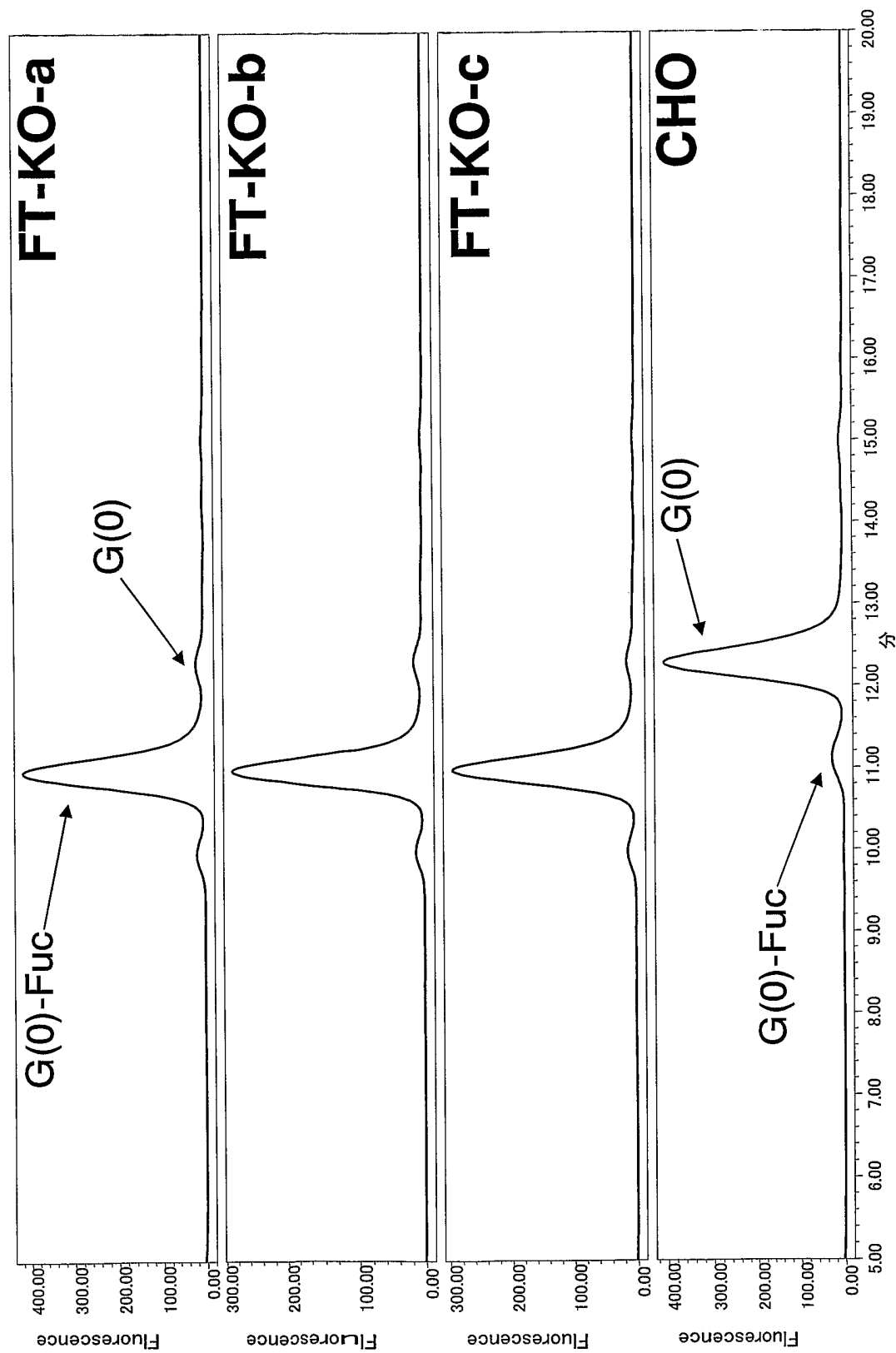
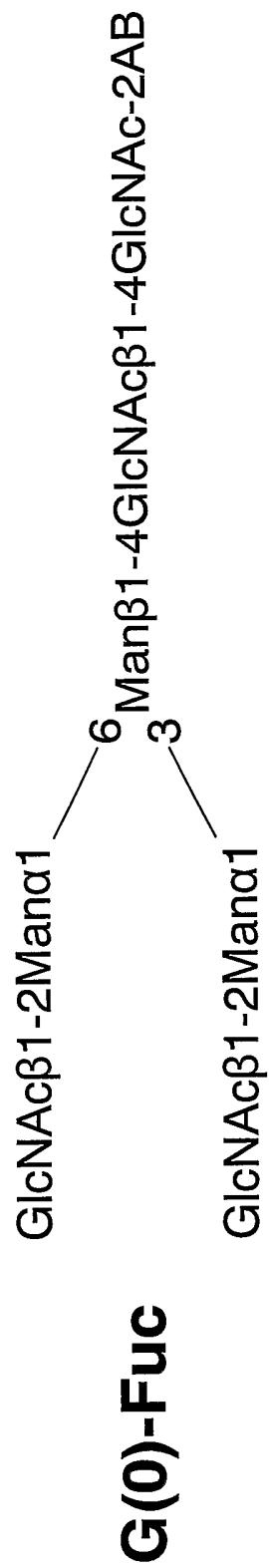
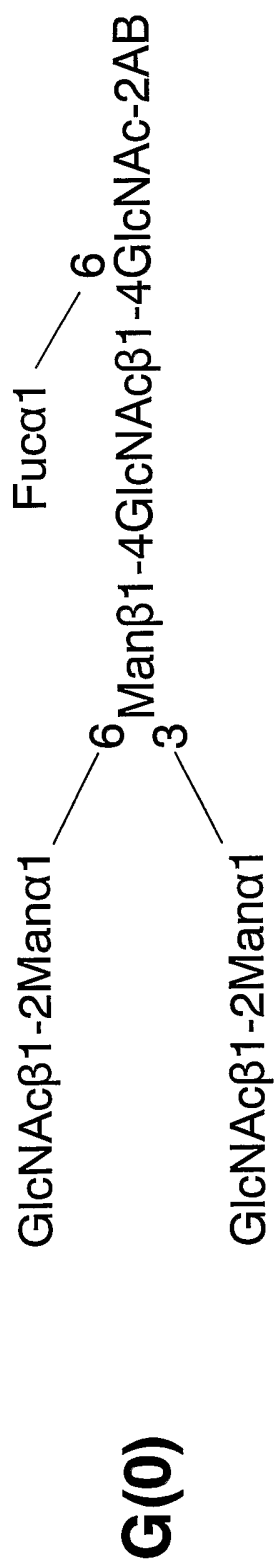


図5

6/7



6

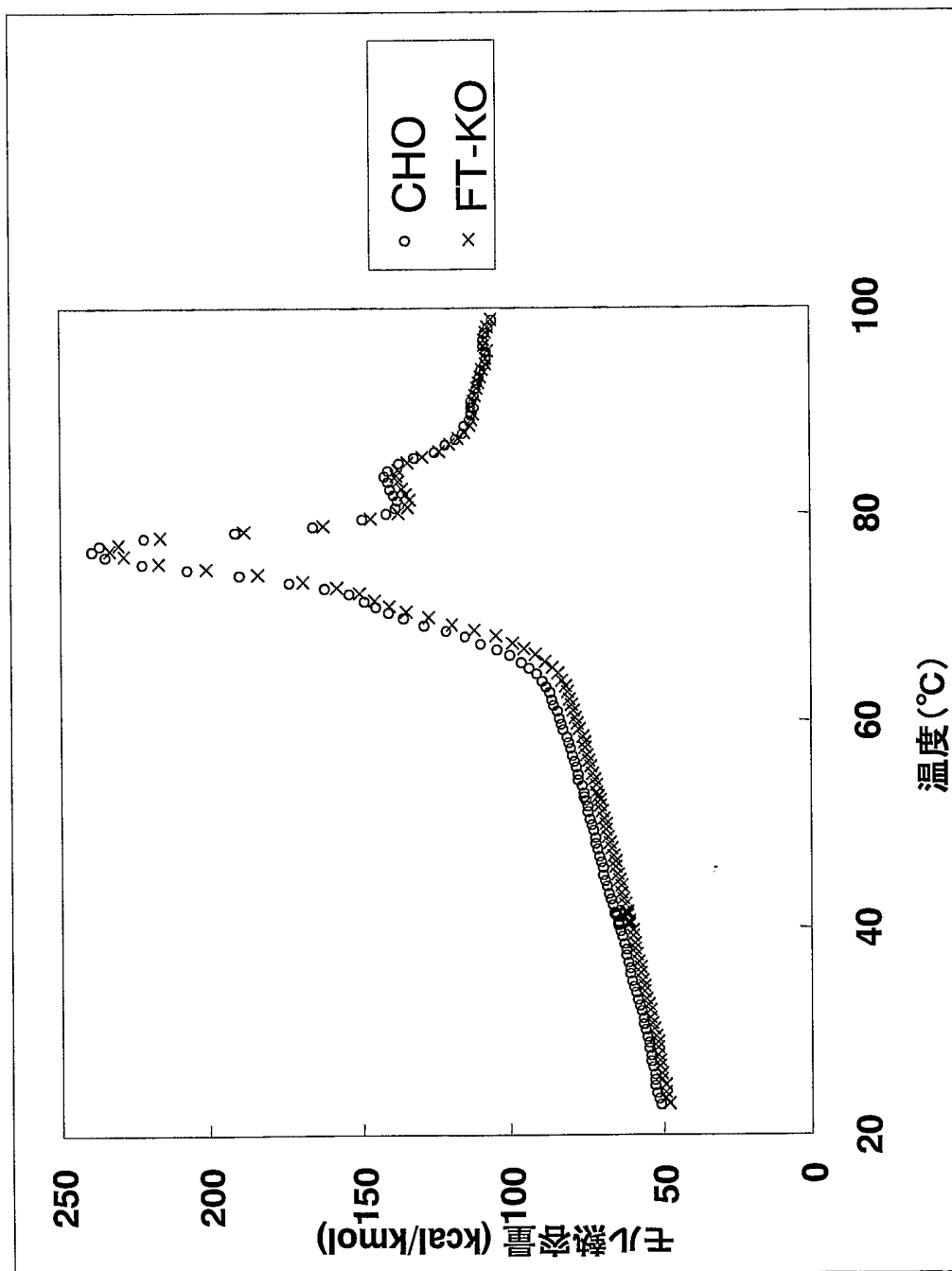


図7

SEQUENCE LISTING

<110> Chugai Seiyaku Kabushiki Kaisha
 <120> Anti-Glypican 3 Antibodies with Modified Sugars
 <130> PCG-9012WO
 <150> JP 2004-311356
 <151> 2004-10-26
 <160> 139
 <170> PatentIn version 3.1
 <210> 1
 <211> 1743
 <212> DNA
 <213> homo sapiens
 <400> 1

atggccggga	ccgtgcgcac	cgcgtgcttg	gtggtggcga	tgctgctcag	cttggacttc	60
ccgggacagg	cgcagccccc	gccgccgccg	ccggacgcca	cctgtcacca	agtcgcctcc	120
ttcttccaga	gactgcagcc	cggactcaag	tgggtgccag	aaactcccgt	gccaggatca	180
gatttgcaag	tatgtctccc	taagggccca	acatgctgct	caagaaagat	ggaagaaaaa	240
taccaactaa	cagcacgatt	gaacatggaa	cagctgcttc	agtctgcaag	tatggagctc	300
aagttcttaa	ttattcagaa	tgctgcggtt	ttccaagagg	cotttgaaat	tgttgttcgc	360
catgccaaga	actacaccaa	tgccatgttc	aagaacaact	acccaagcct	gactccacaa	420
gcttttgagt	ttgtgggtga	atthttcaca	gatgtgtctc	tctacatctt	gggttctgac	480
atcaatgtag	atgacatggt	caatgaattg	tttgacagcc	tgtttccagt	catctatacc	540
cagctaata	accaggcct	gcctgattca	gccttgaca	tcaatgagtg	cctccgagga	600
gcaagacgtg	acctgaaagt	atthgggaat	ttccccaa	gc	ttattatgac	660
aaagtcactg	aagtcactag	gatcttctct	caggctctga	atcttggaat	tgaagtgate	720
aacacaactg	atcacctgaa	gttcagtaag	gactgtggcc	gaatgctcac	cagaatgtgg	780
tactgctctt	actgccaggg	actgatgatg	gttaaacctt	gtggcggtta	ctgcaatgtg	840
gtcatgcaag	gctgtatggc	agggtgggtg	gagattgaca	agtactggag	agaatacatt	900
ctgtcccttg	aagaacttgt	gaatggcatg	tacagaatct	atgacatgga	gaacgtactg	960
cttggctctt	tttcaacaat	ccatgattct	atccagtatg	tccagaagaa	tgcaggaaag	1020
ctgaccacca	ctattggcaa	gttatgtgcc	cattctcaac	aacgccaata	tagatctgct	1080
tattatctctg	aagatctctt	tattgacaag	aaagtattaa	aagttgctca	tgtagaacat	1140
gaagaaacct	tatccagccg	aagaagggaa	ctaattcaga	agttgaagtc	tttcatcagc	1200
ttctatagtg	ctttgcctgg	ctacatctgc	agccatagcc	ctgtggcgga	aaacgacacc	1260
ctttgctgga	atggacaaga	actcgtggag	agatacagcc	aaaaggcagc	aaggaatgga	1320
atgaaaaacc	agttcaatct	ccatgagctg	aaaatgaagg	gccctgagcc	agtggctcag	1380
caaattattg	acaaactgaa	gcacattaac	cagctcctga	gaacctatgc	tatgccccaa	1440
ggtagagttc	tggataaaaa	cctggatgag	gaaggggttg	aaagtggaga	ctgcgggtgat	1500
gatgaagatg	agtgcaattg	aggctctggt	gatggaatga	taaaagtgaa	gaatcagctc	1560
ogcttctctg	cagaactggc	ctatgatctg	gatgtggatg	atgagcctgg	aaacagtcag	1620
caggcaactc	cgaaggacaa	cgagataagc	acctttcaca	acctogggaa	cgttcattcc	1680
ccgctgaagc	ttctcaccag	catggccatc	tcggtgggtg	gcttctctct	cctggtgcac	1740

tga 1743

<210> 2

<211> 580

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 2

Met Ala Gly Thr Val Arg Thr Ala Cys Leu Val Val Ala Met Leu Leu
 1 5 10 15

Ser Leu Asp Phe Pro Gly Gln Ala Gln Pro Pro Pro Pro Pro Pro Asp
 20 25 30

Ala Thr Cys His Gln Val Arg Ser Phe Phe Gln Arg Leu Gln Pro Gly
 35 40 45

Leu Lys Trp Val Pro Glu Thr Pro Val Pro Gly Ser Asp Leu Gln Val
 50 55 60

Cys Leu Pro Lys Gly Pro Thr Cys Cys Ser Arg Lys Met Glu Glu Lys
 65 70 75 80

Tyr Gln Leu Thr Ala Arg Leu Asn Met Glu Gln Leu Leu Gln Ser Ala
 85 90 95

Ser Met Glu Leu Lys Phe Leu Ile Ile Gln Asn Ala Ala Val Phe Gln
 100 105 110

Glu Ala Phe Glu Ile Val Val Arg His Ala Lys Asn Tyr Thr Asn Ala
 115 120 125

Met Phe Lys Asn Asn Tyr Pro Ser Leu Thr Pro Gln Ala Phe Glu Phe
 130 135 140

Val Gly Glu Phe Phe Thr Asp Val Ser Leu Tyr Ile Leu Gly Ser Asp
 145 150 155 160

Ile Asn Val Asp Asp Met Val Asn Glu Leu Phe Asp Ser Leu Phe Pro
 165 170 175

Val Ile Tyr Thr Gln Leu Met Asn Pro Gly Leu Pro Asp Ser Ala Leu
 180 185 190

Asp Ile Asn Glu Cys Leu Arg Gly Ala Arg Arg Asp Leu Lys Val Phe
 195 200 205

Gly Asn Phe Pro Lys Leu Ile Met Thr Gln Val Ser Lys Ser Leu Gln
 210 215 220

Val Thr Arg Ile Phe Leu Gln Ala Leu Asn Leu Gly Ile Glu Val Ile
 225 230 235 240

Asn Thr Thr Asp His Leu Lys Phe Ser Lys Asp Cys Gly Arg Met Leu
 245 250 255

Thr Arg Met Trp Tyr Cys Ser Tyr Cys Gln Gly Leu Met Met Val Lys
 260 265 270

Pro Cys Gly Gly Tyr Cys Asn Val Val Met Gln Gly Cys Met Ala Gly
 275 280 285

Val Val Glu Ile Asp Lys Tyr Trp Arg Glu Tyr Ile Leu Ser Leu Glu
 290 295 300
 Glu Leu Val Asn Gly Met Tyr Arg Ile Tyr Asp Met Glu Asn Val Leu
 305 310 315 320
 Leu Gly Leu Phe Ser Thr Ile His Asp Ser Ile Gln Tyr Val Gln Lys
 325 330 335
 Asn Ala Gly Lys Leu Thr Thr Thr Ile Gly Lys Leu Cys Ala His Ser
 340 345 350
 Gln Gln Arg Gln Tyr Arg Ser Ala Tyr Tyr Pro Glu Asp Leu Phe Ile
 355 360 365
 Asp Lys Lys Val Leu Lys Val Ala His Val Glu His Glu Glu Thr Leu
 370 375 380
 Ser Ser Arg Arg Arg Glu Leu Ile Gln Lys Leu Lys Ser Phe Ile Ser
 385 390 395 400
 Phe Tyr Ser Ala Leu Pro Gly Tyr Ile Cys Ser His Ser Pro Val Ala
 405 410 415
 Glu Asn Asp Thr Leu Cys Trp Asn Gly Gln Glu Leu Val Glu Arg Tyr
 420 425 430
 Ser Gln Lys Ala Ala Arg Asn Gly Met Lys Asn Gln Phe Asn Leu His
 435 440 445
 Glu Leu Lys Met Lys Gly Pro Glu Pro Val Val Ser Gln Ile Ile Asp
 450 455 460
 Lys Leu Lys His Ile Asn Gln Leu Leu Arg Thr Met Ser Met Pro Lys
 465 470 475 480
 Gly Arg Val Leu Asp Lys Asn Leu Asp Glu Glu Gly Phe Glu Ser Gly
 485 490 495
 Asp Cys Gly Asp Asp Glu Asp Glu Cys Ile Gly Gly Ser Gly Asp Gly
 500 505 510
 Met Ile Lys Val Lys Asn Gln Leu Arg Phe Leu Ala Glu Leu Ala Tyr
 515 520 525
 Asp Leu Asp Val Asp Asp Ala Pro Gly Asn Ser Gln Gln Ala Thr Pro
 530 535 540
 Lys Asp Asn Glu Ile Ser Thr Phe His Asn Leu Gly Asn Val His Ser
 545 550 555 560
 Pro Leu Lys Leu Leu Thr Ser Met Ala Ile Ser Val Val Cys Phe Phe
 565 570 575
 Phe Leu Val His
 580

<210> 3

<211> 115

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 3

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

<210> 4

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

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

<210> 5

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 5

Asn Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 6

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 6

Ala Ile Asn Asn Asn Gly Asp Asp Thr Tyr Tyr Leu Asp Thr Val Lys

1

5

10

15

Asp

<210> 7

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 7

Gln Gly Gly Ala Tyr

1

5

<210> 8

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 8

Thr Tyr Gly Met Gly Val Gly

1

5

<210> 9

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 9

Asn Ile Trp Trp Tyr Asp Ala Lys Tyr Tyr Asn Ser Asp Leu Lys Ser

1

5

10

15

<210> 10

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 10

Met Gly Leu Ala Trp Phe Ala Tyr

1

5

<210> 11

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 11

Ile Tyr Gly Met Gly Val Gly

1 5

<210> 12

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 12

Asn Ile Trp Trp Asn Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 13

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 13

Ile Gly Tyr Phe Tyr Phe Asp Tyr

1 5

<210> 14

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 14

Gly Tyr Trp Met His

1 5

<210> 15

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 15

Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 16

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 16

Ser Gly Asp Leu Thr Gly Gly Leu Ala Tyr

1 5 10

<210> 17

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 17

Ser Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 18

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 18

Ala Ile Asn Ser Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Met Lys

1 5 10 15

Asp

<210> 19

<211> 13

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 19

His Asn Gly Gly Tyr Glu Asn Tyr Gly Trp Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 20

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 20

Ser Tyr Trp Met His

1 5

<210> 21

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 21

Glu Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Tyr Tyr Asn Gln Lys Phe Arg

1 5 10 15

Gly

<210> 22

<211> 15

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 22

Ser Asn Leu Gly Asp Gly His Tyr Arg Phe Pro Ala Phe Pro Tyr

1 5 10 15

<210> 23

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 23

Thr Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn Leu Gln Phe Lys

1 5 10 15

Asp

<210> 24

<211> 15

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 24

Gly Ala Phe Tyr Ser Ser Tyr Ser Tyr Trp Ala Trp Phe Ala Tyr

1 5 10 15

<210> 25

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 25

Asp Tyr Glu Met His

1 5

<210> 26

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 26

Ala Leu Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 27

<211> 6

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 27

Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr

1 5

<210> 28

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 28

Ile Asn Ala Met Asn

1 5

<210> 29

<211> 19

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 29

Arg Ile Arg Ser Glu Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Gly Asp Ser

1 5 10 15

Val Lys Asp

<210> 30

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 30

Glu Val Thr Thr Ser Phe Ala Tyr

1 5

<210> 31

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 31

Ala Ser Ala Met Asn

1 5

<210> 32

<211> 19

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 32

Arg Ile Arg Ser Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser

1 5 10 15

Val Lys Asp

<210> 33

<211> 12

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 33

Asp Pro Gly Tyr Tyr Gly Asn Pro Trp Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 34

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 34

Asp Tyr Ser Met His

1 5

<210> 35

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 35

Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 36

<211> 2

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 36

Leu Tyr

1

<210> 37

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 37

Asn Ile Trp Trp His Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 38

<211> 14

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 38

Ile Ala Pro Arg Tyr Asn Lys Tyr Glu Gly Phe Phe Ala Phe

1 5 10

<210> 39

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 39

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn

1 5 10 15

<210> 40

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 40

Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser

1 5

<210> 41

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 41

Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Leu Thr

1 5

<210> 42

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 42

Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr Leu Ser

1 5 10

<210> 43

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 43

Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp

1 5

<210> 44

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 44

Leu Gln Cys Asp Glu Phe Pro Pro Trp Thr

1 5 10

<210> 45

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 45

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His

1 5 10 15

<210> 46

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 46

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 47

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 47

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr

1 5

<210> 48

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 48

Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr

1 5 10 15

<210> 49

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 49

Gln Met Ser Asn Leu Ala Ser

1 5

<210> 50

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 50

Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Tyr Thr

1 5

<210> 51

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 51

Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Lys Asn Ile Ile

1 5 10

<210> 52

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 52

Tyr Thr Ser Thr Leu Gln Pro

1 5

<210> 53

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 53

Leu Gln Tyr Asp Asn Leu Pro Arg Thr

1 5

<210> 54

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 54

Arg Ala Ser His Ser Ile Ser Asn Phe Leu His

1 5 10

<210> 55

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 55

Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser

1 5

<210> 56

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 56

Gln Gln Ser Asn Ile Trp Ser Leu Thr

1 5

<210> 57

<211> 15

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 57

Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Tyr Tyr Gly Thr Ser Leu Met Gln

1 5 10 15

<210> 58

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 58

Gly Ala Ser Asn Val Glu Ser

1 5

<210> 59

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 59

Gln Gln Ser Arg Lys Val Pro Tyr Thr

1 5

<210> 60

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 60

Ser Gln Asn Thr His Val Pro Pro Thr

1 5

<210> 61

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 61

Lys Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Asn

1 5 10 15

<210> 62

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 62

Trp Met Ser Asn Leu Ala Ser

1 5

<210> 63

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 63

Met Gln His Ile Glu Tyr Pro Phe Thr

1 5

<210> 64

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 64

Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Tyr Asp Ile Thr Tyr Leu Tyr

1 5 10 15

<210> 65

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 65

Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Pro Thr

1 5

<210> 66

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 66

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr

1 5 10

<210> 67

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 67

Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser

1 5

<210> 68

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 68

Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Leu Thr

1 5

<210> 69

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 69

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asp Gly Lys Thr Phe Leu Asn

1 5 10 15

<210> 70

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 70

Leu Val Ser Arg Leu Asp Ser

1 5

<210> 71

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 71

Cys Gln Gly Thr His Phe Pro Arg Thr

1 5

<210> 72

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 72

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu

1 5 10 15

<210> 73

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 73

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Trp Thr

1 5

<210> 74

<211> 345

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mouse-human chimeric antibody H chain

<400> 74

caggtgcagc tggaggagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcttgcaagg cttctggata caccttcacc gactatgaaa tgcactgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggagct cttgatccta aaactggtga tactgcctac 180
 agtcagaagt tcaagggcag agtcacgatt accgoggacg aatccacgag cacagcctac 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagattctac 300
 tcctatactt actggggcca ggaaccctg gtcaccgtct cctca 345

<210> 75

<211> 345

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mouse-human chimeric antibody H chain

<400> 75

caggtgcagc tggaggagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcctgcaagg cttctggata caccttcacc gactatgaaa tgcactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggagct cttgatccta aaactggtga tactgcctac 180
 agtcagaagt tcaagggcag agtcacgctg accgoggacg aatccacgag cacagcctac 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtac aagattctac 300
 tcctatactt actggggcca ggaaccctg gtcaccgtct cctca 345

<210> 76

<211> 345

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mouse-human chimeric antibody H chain

<400> 76

caggtgcagc tggaggagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcctgcaagg cttctggata caccttcacc gactatgaaa tgcactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggagct cttgatccta aaactggtga tactgcctac 180
 agtcagaagt tcaagggcag agtcacgctg accgoggaca aatccacgag cacagcctac 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtac aagattctac 300
 tcctatactt actggggcca ggaaccctg gtcaccgtct cctca 345

<210> 77

<211> 345

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mouse-human chimeric antibody H chain

<400> 77

caggtgcagc tggaggagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcctgcaagg cttctggata caccttcacc gactatgaaa tgcactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggagct cttgatccta aaactggtga tactgcctac 180
 agtcagaagt tcaagggcag agtcacgctg accgoggaca aatccacgag cacagcctac 240
 atggagctga gcagcctgac atctgaggac acggccgtgt attactgtac aagattctac 300

tcctatactt actggggcca ggaaccctg gtcaccgtct cctca 345
<210> 78
<211> 345
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Mouse-human chimeric antibody H chain
<400> 78
caggtgcagc tgggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctggata caccttcacc gactatgaaa tgcactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggagct cttgatccta aaactgggtga tactgcctac 180
agtcagaagt tcaagggcag agtcacgctg accgcggacg aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtac aagattctac 300
tcctatactt actggggcca ggaaccctg gtcaccgtct cctca 345
<210> 79
<211> 345
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Mouse-human chimeric antibody H chain
<400> 79
caggtgcagc tgggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctggata caccttcacc gactatgaaa tgcactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggagct cttgatccta aaactgggtga tactgcctac 180
agtcagaagt tcaagggcag agtcacgctg accgcggaca aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtac aagattctac 300
tcctatactt actggggcca ggaaccctg gtcaccgtct cctca 345
<210> 80
<211> 345
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Mouse-human chimeric antibody H chain
<400> 80
caggtgcagc tgggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctggata caccttcacc gactatgaaa tgcactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggagct cttgatccta aaactgggtga tactgcctac 180
agtcagaagt tcaagggcag agtcacgctg accgcggaca aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgac atctgaggac acggccgtgt attactgtac aagattctac 300
tcctatactt actggggcca ggaaccctg gtcaccgtct cctca 345
<210> 81
<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mouse-human chimeric antibody H chain

<400> 81

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

<210> 82

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mouse-human chimeric antibody H chain

<400> 82

Gln Val Gln Leu Val Glu 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
 Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Ala Leu Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 83

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mouse-human chimeric antibody H chain

<400> 83

Gln Val Gln Leu Val Glu 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
 Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Ala Leu Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 84

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mouse-human chimeric antibody H chain

<400> 84

Gln Val Gln Leu Val Glu 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
 Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Ala Leu Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 85

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mouse-human chimeric antibody H chain

<400> 85

Gln 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

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

Gly Ala Leu Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 86

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mouse-human chimeric antibody H chain

<400> 86

Gln 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

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

Gly Ala Leu Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser

115

<210> 87

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mouse-human chimeric antibody H chain

<400> 87

Gln 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
 Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Ala Leu Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser

115

<210> 88

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mouse-human chimeric antibody L chain

<400> 88

gatgttgatga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgta cccctggaga gccggcctcc 60
 atctcctgca gatctagtca gagccttgta cacagtaatg gaaacaccta tttacattgg 120

tacctgcaga agccagggca gtctccacag ctctgatct ataaagtttc caaccgattt 180
 tctgggggtcc ctgacagggtt cagtggcagt ggatcaggca cagattttac actgaaaatc 240
 agcagagtgg aggctgagga tgttgggggtt tattactgct ctcaaaatac acatgttcct 300
 cctacgtttg gccaggggac caagctggag atcaaa 336

<210> 89

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mouse-human chimeric antibody L chain

<400> 89

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

<210> 90

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutant antibody L chain

<400> 90

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Ala Asn Thr Tyr Leu His
 1 5 10 15

<210> 91

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutant antibody L chain

<400> 91

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Asp Asn Thr Tyr Leu His

1 5 10 15
<210> 92
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> mutant antibody L chain
<400> 92
Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Glu Asn Thr Tyr Leu His
1 5 10 15
<210> 93
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> mutant antibody L chain
<400> 93
Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Phe Asn Thr Tyr Leu His
1 5 10 15
<210> 94
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> mutant antibody L chain
<400> 94
Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn His Asn Thr Tyr Leu His
1 5 10 15
<210> 95
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> mutant antibody L chain
<400> 95
Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Asn Asn Thr Tyr Leu His
1 5 10 15
<210> 96
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>

<223> mutant antibody L chain

<400> 96

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Thr Asn Thr Tyr Leu His

1 5 10 15

<210> 97

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutant antibody L chain

<400> 97

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gln Asn Thr Tyr Leu His

1 5 10 15

<210> 98

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutant antibody L chain

<400> 98

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Ile Asn Thr Tyr Leu His

1 5 10 15

<210> 99

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutant antibody L chain

<400> 99

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Lys Asn Thr Tyr Leu His

1 5 10 15

<210> 100

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutant antibody L chain

<400> 100

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Leu Asn Thr Tyr Leu His

1 5 10 15

<210> 101

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutant antibody L chain

<400> 101

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Ser Asn Thr Tyr Leu His
1 5 10 15

<210> 102

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutant antibody L chain

<400> 102

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Trp Asn Thr Tyr Leu His
1 5 10 15

<210> 103

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutant antibody L chain

<400> 103

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Tyr Asn Thr Tyr Leu His
1 5 10 15

<210> 104

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutant antibody L chain

<400> 104

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Arg Asn Thr Tyr Leu His
1 5 10 15

<210> 105

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutant antibody L chain

<400> 105

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Val Asn Thr Tyr Leu His

1 5 10 15
 <210> 106
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> mutant antibody L chain
 <400> 106
 Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Pro Asn Thr Tyr Leu His
 1 5 10 15
 <210> 107
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> mutant antibody L chain
 <400> 107
 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30
 Asn Ala Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn
 85 90 95
 Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 <210> 108
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> mutant antibody L chain
 <400> 108
 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30

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

<210> 109

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutant antibody L chain

<400> 109

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

<210> 110

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutant antibody L chain

<400> 110

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30

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

<210> 111

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutant antibody L chain

<400> 111

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

<210> 112

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutant antibody L chain

<400> 112

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30

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

<210> 113

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutant antibody L chain

<400> 113

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

<210> 114

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutant antibody L chain

<400> 114

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30

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

<210> 115

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutant antibody L chain

<400> 115

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

<210> 116

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutant antibody L chain

<400> 116

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30

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

<210> 117

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutant antibody L chain

<400> 117

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

<210> 118

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutant antibody L chain

<400> 118

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30

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

<210> 119

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutant antibody L chain

<400> 119

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

<210> 120

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutant antibody L chain

<400> 120

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30

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

<210> 121

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutant antibody L chain

<400> 121

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

<210> 122

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutant antibody L chain

<400> 122

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30

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

<210> 123

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutant antibody L chain

<400> 123

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

<210> 124

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 124

cttgtacaca gtgacggaaa cacctat

27

<210> 125

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 3

ataggtgttt ccgtcactgt gtacaag

27

<210> 126

<211> 10939

<212> DNA

<213> *Cricetulus griseus*

<400> 126

gagctcaatt aaccctcact aaagggagtc gactcgatcc tttacagaaa acttgcaaac 60
cctcttgag tagaaaagta gtagtatctg acacaagtat cagcaaatg caaacttctc 120
cccatcccca gaaaaccatt ataaaaaccc ccatatctta tgccaactg tagtgatata 180
ttatztatga tttattaaaa cttgcttaag gattcagaaa gcaaagtcag ccttaagcta 240
tagagaccag gcagtcagtg gtggtacaca cctttaatcc caggactcag gattaagaag 300
tagacggacc tctgttagtt caagtctacc attacctaca caagagtga gagtaaccga 360
tctcatgcct ttgatcccag cagctgggat catgtgcatt caatcccagc attcgggagt 420
tatataagac aggagcaagg tctcagagct ggcattcatt ctccagccac attgaggata 480
ggaaaacatt gaagtgtcag gatgctgagg agaggcagca gtttgaggtt tggtagaacc 540
aggatcacct tttggtctga ggtagagtaa gaactgtggc tggctgcttt gcttttctga 600
tcttcagctt gaagcttgaa ctccaatatt tgtctctggg tctattatta tcatgttaca 660
cctaacttta aagctgattt acgcaagaca gttgtaggty gaccttctt toctgccac 720
cagttcccaa ataactgaca cggagactca atattaatta taaatgattg gttaatagct 780
cagtcttggt actggctaac tcttacattt taaattaact catttccatc cctttaactg 840
ctgccatgtg gttcatggct tgttcaagtc ctgcttcttc tgtctctggc tggtagatgcc 900
tctggttctg ccctttatcc cagaattctc ctagtctggc tctcctgccc agctataggc 960
cagtcagctg tttattaacc aatgagaata atacatattt atagtgtaca aagattgctc 1020
ctcaacacc aattttttat gtgcaacctg agaactctgga ctcatgccc tcatgttgc 1080
agaggcggca cccttaacca ctaagccacc tttctagccc tgttgctttt gttttttgag 1140
acaggttoca ctatgtagcc caggctggcc tcaaactgac cattctcctg cctaaacctc 1200
ccgaacactg gaattatagt caaggcctac ctgccctggc attttcacac ttttatctcc 1260
tggctgagtc cattgacttt aactcatca aggttgaacc agttggagtt taattacagt 1320
gccaatgca ctgaatccca cataatcaaa caacttcaag gaagcaaaaa accagttttt 1380
cctgaagatc aatgtcagct tgctgattc agaatagacc cccgaaaaaa ggcaaatgct 1440
tgataaccaa tttcttctta ttgttcaatc ccctgctgct gtgtgtaage tctgagaaa 1500
ggacagtaag gggacattca tgatoagaga aagagcccca actcccccc cagcccacc 1560
cccacctgt ccacagtctg ttggtttggg ttccccctgg ctgacacca gaaatcacia 1620
cataatcacc taggtcactg taacaagttc ctttctggaa aatgctacaa atgataattg 1680
taacatgagt aatgaataat gcctggagtc caactccctt gtgaccagc aatgttttcc 1740
gtgggtgctc ccttcccag ctgcaggcct gacatgtacc ttaaaaagcc tcccctggag 1800
gacagaattt tgtgggtact atagtgtct cacaataact tcccctaata cccttaacta 1860
gttaccataa ataacatgca gccctgggtg aggcacacag ggtccaatg tacagcttct 1920

cagacactgc aggaaccttc ctctcctaataat gcagcactgg tctcttcagg ctggacagca 1980
ggaacccata ccaactccaat cctagtgtgg agtagagctg tctacgaaaa ccagcagatc 2040
tatagctaaa tgtgtttcaa ttttatgctt tgacaaattg tactgacccc acccccaccc 2100
cttccccctt gctgtgctgg gaattgaacc caggaccttg tgcattgccag gcaagtactc 2160
taacactgag ctatagcccc aatctttcat ccaagtctct atgtgtgcc acactcgtct 2220
tttattttga gacaaaagg tttattttg agataaggct tcaactatgtt gccttgactt 2280
tttttttttt ttttttttga acttttgacc ttctacctc agctgagact acaagtcttt 2340
taccatcagg cccggctgat ggtaaaataa cagtatttga aatagttaa acacatcatc 2400
ttaatggtca accacacaat ttccgaaatg ttgctggctc agtctggggc aaacctgtcc 2460
gccccacat tgggtctagg aagaaagcac agacaagtag ccctcccagc tcaggagtaa 2520
aagacctgga ggggggtggc cacttcggctc aagttcacgg gatggggagg ggtaccctcc 2580
tccagtagtg gtggtatttg gcagttcctc caccgacgcc ctctggaagc acctgcttgg 2640
accgcaaag ccaggaatgc agcttctca agggactcgc cagcgagggt aacaggacag 2700
aggcgtccca agagggctgg ggcggaagg ggaagacagg gtcggcctta gatagggcaa 2760
aggccttct ggctgtgttc ccgggtaac cgcacccacca cgcctggagc ccgacgtggc 2820
gagcgatggg gacagcgagc aggaagtcgt actggggagg gcccgtagc agatgcagcc 2880
gagggcggcg ctgccaggta caccgaggg caccgcgggg gtgagcgcca ggtccctgaa 2940
ccagccaggc ctccagagcc gactccggcg gaccgacggg acgttctgga atgggaaggg 3000
atccgggaca ccgaattgct gcattgaggg gctcagaggt tctgatgtgg gactccagaa 3060
agggttttat ctaccggagg tgatgtgact tccggcctct ggaagtgtctg ttggagtctc 3120
tgggaccttg ggtcctctcg actaggttg gaaggggtga aataggggta gggagaaagg 3180
agaggactgc agcaatgtct tcccgaacga cctgggttcg ggaggggtcg aaggacaagg 3240
ggctgttgtg ggggggtctc agacgcggag ggggtgtatt ctattttctg ggaagatggt 3300
gtcgatgcac ttgaccaagt ctatgcgac tgaagaggct aggggaaagc acagtgcagag 3360
aggatggtgg agggagtggc agaacccttc cagaaactgg gagaggctct agcacctgca 3420
acccttccc tggcctccgg ggagtccag aagagggcag gaccatggac acaggtgcat 3480
tcgtgccggc gogctccggc ctggcgaagg tgcgcgctct tggaggccgc gggagggcca 3540
gacgcgcgc cggagagctg gccctttaag gctaccggga ggcgtgtcag gaaatgcgcc 3600
ctgagcccgc ccctcccga acgcggccc agacctggca agctgagacg gaactcggaa 3660
ctagcactcg gctcggggcc tcgggtgagg cttgcgccc ccatgccctct gtcattgccc 3720
ctcgggcccgc ctccctgaac ctccgtgacc gccctgcagt cctccctccc ccccttcgac 3780
tcggcggggcg cttccggggg ctcccgcagc ccgcccctca cgtagcccac acctccctct 3840
cggcgtcccg cttcccacgc ggtcccgcag ctgtttttc ctctccacc ctgcccttct 3900
gtccctctcc cttcctttct cccctcgact cgtccctatt aggcaacagc ccctgtggtc 3960
cagccggcca tggctgtcaa ggctcacacc cttagctagg ccccttcctc cttccctggg 4020
tcttgtctca tgaccccctg ccccgccgg gagcgagcgc gatgtggagc agtgccctctg 4080
gcaagcagaa cttcaccxaa gccatgtgac aattgaaggc tgtaccccga gaccctaaca 4140
tcttggagcc ctgtagacca gggagtgtct ctggcctgg ggtgacctag ctcttotacc 4200
accatgaaca gggcccctct gaagcggctc aggatcctgc gcatggcgct gactggaggc 4260
tccactgcct ctgaggaggc agatgaagac agcaggaaca agccgttct gctcggggcg 4320
ctgcagatcg cgtgtgtcgt ctctctctac tgggtcacct ccatctccat ggtattoctc 4380
aacaagtacc tgctggacag cccctccctg cagctggata ccctatctt cgtcactttc 4440

taccaatgcc tggtagcctc tctgctgtgc aagggcctca gcactctggc cacctgctgc 4500
cctggcaccg ttgacttccc caccctgaac ctggacctta aggtggcccg cagcgtgctg 4560
ccactgtcgg tagtcttcoat tggcatgata agtttcaata acctctgcoct caagtacgta 4620
ggggtggcoct tctacaacgt ggggcgctcg ctcaccaccg tgttcaatgt gcttctgtcc 4680
tacctgctgc tcaaacagac cacttccttc tatgccctgc tcacatgtgg catcatcatt 4740
ggtgagtggg gcccgggggc tgtgggagca ggatgggcat cgaactgaag ccctaaaggt 4800
caacactgta ggtaccttta ctactgtcc caggtccctt gcacacagcag ttacaggaag 4860
agccctgtag aaaacaaata acttccttat ggtcattcaa caagttaggg acccagccag 4920
ggtgaaaata atgttagcag caactacagc aaagatggct ctgccactt gcacgattaa 4980
aatgtgccag gtactcagat ctaagcattg gatccacatt aactcaacta atccctatta 5040
caaggtaaaa tatatccgaa ttttacagag ggaaaaccaa ggcacagaga ggctaagtag 5100
cttgaccagg atcacacagc taataatcac tgacatagct gggatttaaa cataagcagt 5160
tacctccata gatcacacta tgaccacat gccactgttc cttctcaaga gttccaggat 5220
cctgtctgtc cagttctctt taaagaggac aacacatctg acattgctac cttgaggtaa 5280
catttgaaat agtggtaga catatgtttt aagttttatt cttacttttt atgtgtgtgt 5340
gtttgggggg ccaccacagt gtatgggtgg agataagggg acaacttaag aattggtcct 5400
ttctcccacc acatgggtgc tgaggtctga actcaggtca tcaggattgg cacaaatccc 5460
tttaccact gagccatttc actggtccaa tatatgtgtg cttttaagag gctttaacta 5520
ttttcccaga tgtgaatgtc ctgctgatca ttatcccctt ttaccgggaa gccctctggg 5580
aggtgccatc cctgtggtcg tctgcataca aatggggaaa ctgcaactca gagaaacaag 5640
gctacttgcc agggcccac aagtaagata ggctgggatg ccacccaga ctggccacac 5700
tccttggcct gtgcttcaag ccagtttact ttgttctgc ccattggaag ttagcatggt 5760
gcagtcaaac acaataacta caggccaaaa gtgcttttaa attaaagtca gatgaacttt 5820
taaacaatcca gagctcctca actgcaggag ttacaacctg attctgcaac catctttgca 5880
gtgcccggta gtcatatgta gctagaggct cttggctagg acagcatgtg ttaggaaca 5940
tctggccctg agatcattga attgagtgac tgctgggtga caaagaccaa ggcacccgtt 6000
ccctgagagt cctgggcaag cagcaatgtg accttcattt gtacctactc aggttcttta 6060
tctgtcctgt ttgacctact tagtctcctc tgggtctca gaggccagg ctgggtactc 6120
tggatgtcag gatcaggcca atgcgcacat ctgccctaga aatgtcccc tggttgagca 6180
gctcctgaat ccatcggtaa agggctctgga ccaggaggga gtcagataaa aagctgacag 6240
cactggggga ctccatgggg aactcccacc tgccccaca catccatcct aagagaactg 6300
gtattccttg tttctcttt gtccctacaag gcaccctggg atcccacttc agtctcccag 6360
ccttgccagg gttagagggc atgagcctcc ttgtggggaa tttagatgca agaaggtaca 6420
gtcactagag aacctgagct cagatcccca aagtaaccag tacctgatag tgaggcagct 6480
gagaaccgca gcagcctgcc tgagtggctg aactctgctg cctccggaac tggccccaac 6540
tgttgggtct cctcttctt cctcctgtga gggagggcc atctctgata agtctgtgtg 6600
ggactctaga gtagggagga ggaggagcaa tctaagcagg ccttaactgag aagtccttgc 6660
tggcatgtgg ctgcctgagg agtacagact gggaacacc atttgaaatga gtaaggtttt 6720
tcctgaaggc catggggagc cacggaggaa aatcatttta gttacaagac aaagagtaga 6780
ttggtaaca tgggagcaag gacatggccc caattttcat agatgaagga aattggaact 6840
cagagaggtt aagtaacttc tcccaaatag ctcagcttca aaatcacaga acagtcagag 6900
tctagatctc tctgatgcct gtgatggtcc tgccattcca tgttgctgat ccctgtggca 6960

tca~~g~~taagcc tctac~~c~~ttgt g~~g~~aatgcag gatc~~t~~aaatg aagagaggaa gtgctggccc 7020
catg~~c~~tgtgg tctg~~g~~aaagc tatgcaggct ctttgagcag agagtg~~a~~ccc acaagtgaat 7080
agag~~t~~cctat gagactcaaa gcaacatcca cccttaagca gctc~~t~~aacca aatgctcaca 7140
ctgag~~g~~gagc caaagccaag ttagagtcc~~t~~ gtgcttgccc aagg~~t~~cactt tgcctggccc 7200
tcct~~c~~tata gcacccgtgt tatc~~t~~tatag ccctcattac agtgattaca attataatta 7260
gagag~~g~~taac agggccacac tgtccttaca cattcccctg ctagattgta gctgggagag 7320
ggg~~g~~agatgt aggtggctgg gggagtggga gggaagatgc agat~~t~~ttcat tctgggctct 7380
actcc~~c~~tcag ccatt~~t~~tttg gtgtgggagt tagactttgg atatgttgat gatgaggtaa 7440
ggg~~c~~acaga acagtctgaa ctgtggtatc agaatcctgt ccctctccct ctctcctcat 7500
ccct~~c~~ttcac cttgtcactc ctctgtctgc tacagg~~t~~ggt ttctggctgg gtatagacca 7560
agag~~g~~gagct gagggc~~a~~ccc tgtccctcat aggcaccatc ttcgggg~~t~~gc tggccagcct 7620
ctg~~c~~tctcc ctcaatgcca tctatac~~a~~aa gaaggtgctc ccagcag~~t~~gg acaacagcat 7680
ctgg~~c~~gccta acctctata acaatgtcaa tg~~c~~ctgtgtg ctcttcttgc ccctgatggt 7740
tetg~~c~~tgggt gagctccgtg ccctccttga ctttgctcat ctgtacag~~t~~g cccacttctg 7800
gctca~~t~~gatg acgctgggtg gcctcttcgg ctttgccatt ggctatgtga caggactgca 7860
gatca~~a~~attc accagtcccc tgaccac~~a~~aa tgtatcag~~g~~c acagccaagg cctgtg~~c~~gca 7920
gacag~~t~~gctg gccgtgctct actatgaaga gactaagagc ttcctgtggt ggacaagcaa 7980
cctga~~t~~gg~~t~~g ctgggtggct cctcagccta tacctgggtc aggggctggg agatgcagaa 8040
gacccaagag gaccccagct ccaaagaggg tgagaagagt gctattgggg tgtgagcttc 8100
ttcag~~g~~gacc tgggactgaa cccaagtggg gcctacacag cactgaaggc ttcccatgga 8160
gctag~~c~~cagt gtggccctga gcaatactgt ttacatcctc cttggaatat gatc~~t~~aagag 8220
gagccag~~g~~gt ctttcctggt aatgtcagaa agctg~~c~~caaa tctcctgtct gcccatctt 8280
gtttt~~g~~ggaa aaccctacca ggaatggcac ccctacctgc ctctcctag agcctgtcta 8340
cctccat~~a~~tc atctctgggg ttgggaccag ctgcagcctt aaggggctgg attgatgaag 8400
tgatg~~t~~cttc tacacaaggg agatgggtt~~g~~ tgatcccact aattgaaggg atttgggtga 8460
ccccac~~a~~cct ctgggatcca gggcaggtag agtagtagct taggtgctat taacatcagg 8520
aacac~~c~~tcag cctgcctttg aaggg~~a~~agtg ggagcttggc caagggagga aatggccatt 8580
ctg~~c~~ctctt cagtgtggat gagtatggca gacctgttca tggcagctgc accctgggg~~t~~ 8640
ggctgataag aaaacattca cctctgcatt tcatat~~t~~tgc agctctagaa cgggggagag 8700
ccacacatct tttacgggtt aagtagggtg atgagctcct ccgcag~~t~~ccc taaccccagc 8760
tttac~~c~~tgcc tggcttccct tggcccagct acctagctgt actccctt~~c~~ tgtactcttc 8820
tcttc~~c~~ccgt catggcctcc cccaacacct ccatctgcag gcaggaagtg gagtccactt 8880
gtaac~~c~~ctctg ttcccatgac agagccctt~~t~~ gaatacctga acccctcatg acagtaagag 8940
acattatgt tctctggggc tggggtgaa ggagcccact ggttctcact tagcctatct 9000
ggct~~c~~ctgtc acaaaaaaaaa aaaaagaaaa aaaaaaagca taaaccaagt tactaagaac 9060
agaag~~t~~tgg~~t~~ ttataacg~~t~~t ctggggcagc aaagcccaga tgaagggacc catcgaccct 9120
ctctgtccat atcctcatgc tgcagaagta caggcaagct cctttaagcc tcatatagga 9180
acactagcct cactcatgag ggttttactc catgacctgt caacctcaaa gccttcaaca 9240
tgaggactcc aacgtaaatt tggggacaga agcactcaga ccatacccca gcaccacacc 9300
ctcctaacct cagggtagct gtcattctcc tagtctcctc tcttgggcct ttagaacccc 9360
cattt~~c~~cttg gggtaatgtc tgatgttttt gtccctgtca taaaagatg gagagactgt 9420
gtcca~~g~~cctt tgattcctac ttctacaat ccaggttct aatgaagttt gtggggcctg 9480

atgccctgag ttgtatgtga ttttaataata aaaagcaag atacagcatg tgtgtggact 9540
 gaggtagggc cacagggatc taaaagccaa gtgtgagggg acccagctac agcaggcagc 9600
 atcctgagcc tggaatctct toaggacaag aattctccat atacctacct actctgggga 9660
 gtaggtggcc agagttcaag cttcccttag taaccaactac cactggctgt gctcttactg 9720
 aaggcagaca tggcactgag tgctgtccat ctgtcactca tctccacagc cattcctaata 9780
 gtgtgggggtg ggagccatca ccaaaccoca ttttcagata aggacacagg ctgagagagg 9840
 cttgtgtgga gaaaagtagc agcagaattc agagagctgg gtctcctgca gcacctgga 9900
 ctgccagcag ccacagtgtc tgtcacacag cacatactca aaagaatgcc agccccctca 9960
 gcctagagtg cctggccttt ctttcagatg aggaagaggg tcaaagctgt tagcttggcc 10020
 accatatgac cacatacatg accaacagct ttagggaggg aggattactg tggctcccag 10080
 cctgagaggt gggacacca aatgtattag gtcttgaat cagggtgac cttgtgattc 10140
 agtactcct accagaatgc tggggaatgg ggtatgcaaaa ggcaaaggag gctttctaag 10200
 gtgtgggtga agataggcat ttctgcttcc atgtacacct gtgagcagag taggaaggcc 10260
 ctgtggagaa tatatcccac aaaccagtag cccttctctgg cagtgggtga atactgccac 10320
 cctatacccc tatgcaaggc cagtagaacc acccaacca caacatctag agaaattaca 10380
 ggtcatotta agcctctaaa ttgtggagaa actcgacatg cgcacgattc ctaacctgct 10440
 agcctagggg gcgggggtgga taatttaagg aaactggggg ttcttataga atcggaggct 10500
 ccatgaagtc accctgacaa gagtcagca atagccagca gcagtggcta ctcctaagcc 10560
 tccagacaga gcacctgtg aatgtacctt atctcacat ctgggtgtct atagggtgga 10620
 ctgggtcaga tgtcaccag gccattgcaa tgggccctta gccccatggg gtgttgggat 10680
 agcagccaag cagctccat gctgagatac tgcctgcagt agactgatgg ataagaaaac 10740
 aaggccaaa atgttttctt tccagacttg atctttcttt gttcaaaaat gctgttttcc 10800
 cttaaacttg ccaaaccoca ttgttttgca gtgtgaggaaa ataaggcata gaaagattaa 10860
 aggaagtttc tgaggttaca gagcaaagta ctggcttcac ctgaaataga cagggtgtgcc 10920
 ctgatcctga tttgagctc 10939

<210> 127

<211> 352

<212> PRT

<213> *Cricetulus griseus*

<400> 127

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

Leu Asp Leu Lys Val Ala Arg Ser Val Leu Pro Leu Ser Val Val Phe
 100 105 110
 Ile Gly Met Ile Ser Phe Asn Asn Leu Cys Leu Lys Tyr Val Gly Val
 115 120 125
 Ala Phe Tyr Asn Val Gly Arg Ser Leu Thr Thr Val Phe Asn Val Leu
 130 135 140
 Leu Ser Tyr Leu Leu Leu Lys Gln Thr Thr Ser Phe Tyr Ala Leu Leu
 145 150 155 160
 Thr Cys Gly Ile Ile Ile Gly Gly Phe Trp Leu Gly Ile Asp Gln Glu
 165 170 175
 Gly Ala Glu Gly Thr Leu Ser Leu Ile Gly Thr Ile Phe Gly Val Leu
 180 185 190
 Ala Ser Leu Cys Val Ser Leu Asn Ala Ile Tyr Thr Lys Lys Val Leu
 195 200 205
 Pro Ala Val Asp Asn Ser Ile Trp Arg Leu Thr Phe Tyr Asn Asn Val
 210 215 220
 Asn Ala Cys Val Leu Phe Leu Pro Leu Met Val Leu Leu Gly Glu Leu
 225 230 235 240
 Arg Ala Leu Leu Asp Phe Ala His Leu Tyr Ser Ala His Phe Trp Leu
 245 250 255
 Met Met Thr Leu Gly Gly Leu Phe Gly Phe Ala Ile Gly Tyr Val Thr
 260 265 270
 Gly Leu Gln Ile Lys Phe Thr Ser Pro Leu Thr His Asn Val Ser Gly
 275 280 285
 Thr Ala Lys Ala Cys Ala Gln Thr Val Leu Ala Val Leu Tyr Tyr Glu
 290 295 300
 Glu Thr Lys Ser Phe Leu Trp Trp Thr Ser Asn Leu Met Val Leu Gly
 305 310 315 320
 Gly Ser Ser Ala Tyr Thr Trp Val Arg Gly Trp Glu Met Gln Lys Thr
 325 330 335
 Gln Glu Asp Pro Ser Ser Lys Glu Gly Glu Lys Ser Ala Ile Gly Val
 340 345 350

<210> 128

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 128

ggatcctgcg catgaaaaag cctgaactca cc

32

<210> 129

<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer
<400> 129
gcggccgcct attcctttgc cctgggacg 29
<210> 130
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer
<400> 130
atgcatgccca ccatgaaaaa gctgaaactc acc 33
<210> 131
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer
<400> 131
ggatcccagg ctttacactt tatgcttc 28
<210> 132
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer
<400> 132
gctgtctgga gtactgtgca tctgc 25
<210> 133
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer
<400> 133
ggaatgcagc ttctcaagg gactcgc 27
<210> 134
<211> 27
<212> DNA

<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer
<400> 134
tgcacacaggt cggagacgct gtcgaac 27
<210> 135
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer
<400> 135
gcactcgtcc gagggcaaag gaatagc 27
<210> 136
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer
<400> 136
tgtgctggga attgaacca ggac 24
<210> 137
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer
<400> 137
ctacttgtct gtgctttctt cc 22
<210> 138
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer
<400> 138
ctcgactcgt ccctattagg caacagc 27
<210> 139
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 139

tcagaggcag tggagcctcc agtcagc

27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/020057

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K16/18(2006.01), **A61K39/395**(2006.01), **A61P35/00**(2006.01), **C12N15/09**(2006.01), **C12P21/08**(2006.01)

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)

C07K16/18(2006.01), **A61K39/395**(2006.01), **A61P35/00**(2006.01), **C12N15/09**(2006.01), **C12P21/08**(2006.01)

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)
BIOSIS/WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2004/022739 A1 (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), 18 March, 2004 (18.03.04), Full text & EP 1541680 A1	1-8
Y	WO 03/000883 A1 (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), 03 January, 2003 (03.01.03), Full text & EP 1411118 A1 & US 2004/236080 A1	1-8
Y	WO 02/31140 A1 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 18 April, 2002 (18.04.02), Full text & EP 1331266 A1	1-8

Further documents are listed in the continuation of Box C. 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	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"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
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"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
17 January, 2006 (17.01.06)

Date of mailing of the international search report
24 January, 2006 (24.01.06)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/020057

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 00/61739 A1 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 19 October, 2000 (19.10.00), Full text & EP 1176195 A1 & US 2005/272916 A1	1-8

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C07K16/18 (2006.01), A61K39/395 (2006.01), A61P35/00 (2006.01), C12N15/09 (2006.01), C12P21/08 (2006.01)

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. C07K16/18 (2006.01), A61K39/395 (2006.01), A61P35/00 (2006.01), C12N15/09 (2006.01), C12P21/08 (2006.01)

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

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)

BIOSIS/WPI(DIALOG)

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 請求の範囲の番号
Y	WO 2004/022739 A1 (中外製薬株式会社) 2004.03.18, 全文 & EP 1541680 A1	1-8
Y	WO 03/000883 A1 (中外製薬株式会社) 2003.01.03, 全文 & EP 1411118 A1 & US 2004/236080 A1	1-8
Y	WO 02/31140 A1 (協和発酵工業株式会社) 2002.04.18, 全文 & EP 1331266 A1	1-8

C欄の続きにも文献が列挙されている。

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

- 「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
- 「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
- 「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)
- 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献
- 「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
- 「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
- 「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
- 「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日
17.01.2006

国際調査報告の発送日
24.01.2006

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁 (ISA/J P)
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)
松田 芳子
電話番号 03-3581-1101 内線 3488

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	WO 00/61739 A1 (協和発酵工業株式会社) 2000.10.19, 全文 & EP 1176195 A1 & US 2005/272916 A1	1-8