

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5153613号
(P5153613)

(45) 発行日 平成25年2月27日 (2013. 2. 27)

(24) 登録日 平成24年12月14日 (2012. 12. 14)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 P 21/08 (2006. 01)	C 1 2 P 21/08 Z N A
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 Z C C A
C O 7 K 16/46 (2006. 01)	C O 7 K 16/46
C O 7 K 16/18 (2006. 01)	C O 7 K 16/18

請求項の数 8 (全 192 頁)

(21) 出願番号	特願2008-502101 (P2008-502101)	(73) 特許権者	504333972
(86) (22) 出願日	平成18年3月17日 (2006. 3. 17)		メディミュン、エルエルシー
(65) 公表番号	特表2008-537876 (P2008-537876A)		アメリカ合衆国 20878 メリーラン
(43) 公表日	平成20年10月2日 (2008. 10. 2)		ド州、ゲイサーズバーグ、ワン メディミ
(86) 国際出願番号	PCT/US2006/009745		ューン ウエイ
(87) 国際公開番号	W02006/102095	(74) 代理人	100091096
(87) 国際公開日	平成18年9月28日 (2006. 9. 28)		弁理士 平木 祐輔
審査請求日	平成21年1月14日 (2009. 1. 14)	(74) 代理人	100118773
(31) 優先権主張番号	60/662, 945		弁理士 藤田 節
(32) 優先日	平成17年3月18日 (2005. 3. 18)	(74) 代理人	100122389
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 新井 栄一
(31) 優先権主張番号	60/675, 439	(74) 代理人	100111741
(32) 優先日	平成17年4月28日 (2005. 4. 28)		弁理士 田中 夏夫
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
前置審査			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗体のフレームワーク・シャッフル

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

抗原と免疫特異的に結合し、改善された融点 (T_m) を有するヒト化抗体を作製する方法であって、

(a) 改変された重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列をそれぞれ含む複数のポリヌクレオチド配列を合成するステップであって、前記ヌクレオチド配列は重鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより作製され、ただしここでの該CDRは前記抗原と免疫特異的に結合するドナー抗体重鎖可変領域由来でありかつ少なくとも1つの重鎖フレームワーク領域核酸配列はヒト重鎖フレームワーク領域をコードする複数の核酸配列を含むサブバンク由来である前記ステップ；

(b) 前記複数のポリヌクレオチド配列を細胞の集団中に導入し、かつドナー軽鎖可変領域、ヒト化軽鎖可変領域および改変された軽鎖可変領域からなる群より選択される軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド配列を該細胞中に導入するステップ、ただしここでのCDRはドナー抗体軽鎖可変領域由来である；

(c) 改変された重鎖可変領域および軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を発現させるステップ；

(d) 抗原と免疫特異的に結合する改変された抗体をスクリーニングするステップ；ならび

に

(e)改善された融点 (T_m) を有する改変された抗体をスクリーニングするステップであって、改善がドナー抗体と比較して T_m の約5℃～20℃の増加であるステップを含んでなる前記方法。

【請求項2】

抗原と免疫特異的に結合し、改善された融点 (T_m) を有するヒト化抗体を作製する方法であって、

(a) 改変された軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む複数のポリヌクレオチド配列を合成するステップであって、前記ヌクレオチド配列は軽鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより作製され、ただしここでの該CDRは前記抗原と免疫特異的に結合するドナー抗体軽鎖可変領域由来でありかつ少なくとも1つの軽鎖フレームワーク領域核酸配列はヒト軽鎖フレームワーク領域をコードする複数の核酸配列を含むサブバンク由来である前記ステップ；

(b) 前記複数のポリヌクレオチド配列を細胞の集団中に導入し、かつドナー重鎖可変領域、ヒト化重鎖可変領域および改変された重鎖可変領域からなる群より選択される重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド配列を該細胞中に導入するステップ、ただしここでのCDRはドナー抗体重鎖可変領域由来である；

(c) 改変された軽鎖可変領域および重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を発現させるステップ；

(d) 抗原と免疫特異的に結合する改変された抗体をスクリーニングするステップ；ならびに

(e)改善された融点 (T_m) を有する改変された抗体をスクリーニングするステップであって、前記改善がドナー抗体と比較して T_m の約5℃～20℃の増加であるステップを含んでなる前記方法。

【請求項3】

抗原と免疫特異的に結合し、改善された融点 (T_m) を有するヒト化抗体を作製する方法であって、

(a) 改変された重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列をそれぞれ含む複数のポリヌクレオチド配列を合成するステップであって、前記ヌクレオチド配列は重鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより作製され、ただしここでの該CDRは前記抗原と免疫特異的に結合するドナー抗体重鎖可変領域由来でありかつ少なくとも1つの重鎖フレームワーク領域核酸配列はヒト重鎖フレームワーク領域をコードする複数の核酸配列を含むサブバンク由来である前記ステップ；

(b) 改変された軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列をそれぞれ含む複数のポリヌクレオチド配列を合成するステップであって、前記ヌクレオチド配列は軽鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより作製され、ただしここでの該CDRは前記抗原と免疫特異的に結合するドナー抗体軽鎖可変領域由来でありかつ少なくとも1つの軽鎖フレームワーク領域核酸配列はヒト軽鎖フレームワーク領域をコードする複数の核酸配列を含むサブバンク由来である前記ステップ

(c) ステップ(a)および(b)で作製したポリヌクレオチド配列を細胞の集団中に導入するステップ；

(d) 改変された重鎖可変領域および改変された軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を発現させるステップ；

(e) 抗原と免疫特異的に結合する改変された抗体をスクリーニングするステップ；ならびに

(f) 改善された融点 (T_m) を有する改変された抗体をスクリーニングするステップであって、改善がドナー抗体と比較して T_m の約 $5^{\circ}\text{C} \sim 20^{\circ}\text{C}$ の増加であるステップ

を含んでなる前記方法。

【請求項 4】

抗原と免疫特異的に結合するドナー抗体の融点 (T_m) を改善する方法であって、

(a) 改変された重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列をそれぞれ含む複数のポリヌクレオチド配列を合成するステップであって、前記ヌクレオチド配列は重鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより作製され、ただしここでの該CDRは前記抗原と免疫特異的に結合する前記ドナー抗体重鎖可変領域由来でありかつ少なくとも1つの重鎖フレームワーク領域核酸配列はヒト重鎖フレームワーク領域をコードする複数の核酸配列を含むサブバンク由来である前記ステップ；

(b) 前記複数のポリヌクレオチド配列を細胞の集団中に導入しかつドナー軽鎖可変領域、改変された軽鎖可変領域およびヒト化軽鎖可変領域からなる群より選択される軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド配列を該細胞中に導入するステップ、ただしここでのCDRはドナー抗体軽鎖可変領域由来である；

(c) 改変された重鎖可変領域および軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を発現させるステップ；

(d) 抗原と免疫特異的に結合する改変された抗体をスクリーニングするステップ；ならびに

(e) 改善された融点 (T_m) を有する改変された抗体をスクリーニングするステップであって、該改善がドナー抗体と比較して T_m の約 $5^{\circ}\text{C} \sim 20^{\circ}\text{C}$ の増加であるステップ

を含んでなる前記方法。

【請求項 5】

抗原と免疫特異的に結合するドナー抗体の融点 (T_m) を改善する方法であって、

(a) 改変された軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列をそれぞれ含む複数のポリヌクレオチド配列を合成するステップであって、前記ヌクレオチド配列は軽鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより作製され、ただしここでの該CDRは前記抗原と免疫特異的に結合する前記ドナー抗体軽鎖可変領域由来でありかつ少なくとも1つの軽鎖フレームワーク領域核酸配列はヒト軽鎖フレームワーク領域をコードする複数の核酸配列を含むサブバンク由来である前記ステップ；

(b) 前記複数のポリヌクレオチド配列を細胞の集団中に導入しかつドナー重鎖可変領域；改変された重鎖可変領域；およびヒト化重鎖可変領域からなる群より選択される重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド配列を該細胞中に導入するステップ、ただしここでのCDRはドナー抗体重鎖可変領域由来である；

(c) 改変された軽鎖可変領域および重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を発現させるステップ；

(d) 抗原と免疫特異的に結合する改変された抗体をスクリーニングするステップ；ならびに

(e) 改善された融点 (T_m) を有する改変された抗体をスクリーニングするステップであって、前記改善がドナー抗体と比較して T_m の約 $5^{\circ}\text{C} \sim 20^{\circ}\text{C}$ の増加であるステップ

を含んでなる前記方法。

【請求項6】

抗原と免疫特異的に結合するドナー抗体の融点 (T_m) を改善する方法であって、
(a) 改変された重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列をそれぞれ含む複数のポリヌクレオチド配列を合成するステップであって、前記ヌクレオチド配列は重鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより作製され、ただしここでの該CDRは前記抗原と免疫特異的に結合する前記ドナー抗体重鎖可変領域由来でありかつ少なくとも1つの重鎖フレームワーク領域核酸配列はヒト重鎖フレームワーク領域をコードする複数の核酸配列を含むサブバンク由来である前記ステップ；
(b) 改変された軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列をそれぞれ含む複数のポリヌクレオチド配列を合成するステップであって、前記ヌクレオチド配列は軽鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより作製され、ただしここでの該CDRは前記抗原と免疫特異的に結合するドナー抗体軽鎖可変領域由来でありかつ少なくとも1つの軽鎖フレームワーク領域核酸配列はヒト軽鎖フレームワーク領域をコードする複数の核酸配列を含むサブバンク由来である前記ステップ
(c) ステップ(a)および(b)で作製したポリヌクレオチド配列を細胞の集団中に導入するステップ；
(d) 改変された重鎖可変領域および改変された軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を発現させるステップ；
(e) 抗原と免疫特異的に結合する改変された抗体をスクリーニングするステップ；ならびに
(f)改善された融点 (T_m) を有する改変された抗体をスクリーニングするステップであって、前記改善がドナー抗体と比較して T_m の約5℃～20℃の増加であるステップ
を含んでなる前記方法。

10

20

30

【請求項7】

前記フレームワーク領域サブバンクが、ヒト生殖細胞系列フレームワーク配列由来のフレームワーク領域および／または機能性ヒト抗体配列由来のフレームワーク領域を含む、請求項1～6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項8】

抗体が、配列番号1890または1892のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域、および、配列番号1891または1893のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含む、ヒトEphA2ポリペプチドに結合する抗体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

40

【0001】

1 発明の分野

本発明は、抗体の抗原に対する免疫特異性を保持したまま、抗体の免疫原性を弱めるために、抗体を再設計または再構成する方法に関する。特に、本発明は、フレームワーク領域のサブバンクから得られるフレームワーク領域にインフレームで融合したドナー抗体由来の相補性決定領域 (CDR) を含んでなるコンビナトリアルライブラリーを合成することによって、抗原に免疫特異的な抗体を作製する方法を提供する。本発明はまた、本発明の方法によって作製された抗体を提供する。

【背景技術】

【0002】

50

2 発明の背景

抗体は我々の免疫反応において極めて重要な役割を担っている。抗体はウイルスや細菌毒素を不活化することができ、また、補体系と様々なタイプの白血球を動員して、侵入してくる微生物や大型の寄生生物を死滅させるのに不可欠である。抗体はもっぱらBリンパ球によって数限りない形態で作られており、それぞれの形態が異なるアミノ酸配列を有し、異なる抗原結合部位をもっている。抗体は、まとめて免疫グロブリン (Ig) と呼ばれているが、血液中で最も豊富に存在するタンパク質成分の一つである。Albertsら, Molecular Biology of the Cell, 2nd ed., 1989, Garland Publishing, Inc.。

【0003】

典型的な抗体は、2本の同一の重(H)鎖(それぞれが約440アミノ酸を含む)と2本の同一の軽(L)鎖(それぞれが約220アミノ酸を含む)をもつY型分子である。4本の鎖は非共有結合と共有(ジスルフィド)結合との組み合わせにより同時に保持されている。パパインやペプシンのようなタンパク質分解酵素は、抗体分子を、異なる特性を示すフラグメントに分割することができる。パパインは分離した同一のFabフラグメント2本(それぞれが1つの抗原結合部位を保持する)とFcフラグメント1本をもたらす。ペプシンはF(ab')₂フラグメントを1本生成する。Albertsら, Molecular Biology of the Cell, 2nd ed., 1989, Garland Publishing, Inc.。

【0004】

L鎖とH鎖は双方ともそのアミノ末端に可変配列を有し、そのカルボキシル末端には定常配列を有する。L鎖は約110アミノ酸長の定常領域および同じサイズの可変領域を保持する。H鎖も約110アミノ酸長の可変領域を有するが、H鎖の定常領域はH鎖のクラスに応じて約330または440アミノ酸長である。Albertsら, Molecular Biology of the Cell, 2nd ed., 1989, Garland Publishing, Inc. pp 1019。

【0005】

可変領域の部分だけが抗原の結合に直接関与している。研究によって、L鎖とH鎖の両方の可変領域の多様性はほとんど、各鎖に含まれる3つの小さな超可変領域(相補性決定領域またはCDRとも呼ばれる)に限られることが示されている。可変領域の残りの部分は、フレームワーク領域(FR)として知られるもので、比較的变化しない。Albertsら, Molecular Biology of the Cell, 2nd ed., 1989, Garland Publishing, Inc. pp 1019-1020。

【0006】

天然の免疫グロブリンはアッセイや診断に使用されており、また、使用頻度は限られるものの治療にも用いられている。しかし、そのような用途、特に治療においては、天然の免疫グロブリンの多クローン性によって使用が妨げられている。特定の特異性を有するモノクローナル抗体の出現は治療用途の機会を増大させた。ところが、ほとんどのモノクローナル抗体は、宿主げっ歯動物を標的タンパク質で免疫し、続いて目的の抗体を産生するげっ歯動物の脾細胞をげっ歯動物のミエローマ細胞と融合することにより産生される。したがって、それらは本質的にげっ歯動物のタンパク質であり、そのままではヒトにおいて免疫原性があり、しばしばHAMA(Human Anti-Mouse Antibody: ヒト抗マウス抗体)応答と呼ばれる望ましくない免疫応答を誘起する。

【0007】

多くの研究グループが治療用抗体の免疫原性を弱めるための技術を開発している。慣習的には、ヒト鑄型をドナー抗体に対する相同性の程度によって選択する。すなわち、可変領域が非ヒト抗体に最も相同なヒト抗体をヒト化のための鑄型として使用する。その理論的根拠は、フレームワーク配列が抗原との相互作用のためにCDRをその正しい空間的方向付けで保持するように作用し、また、フレームワーク残基が時には抗原結合に関与することさえある、ということにある。こうして、選択したヒトフレームワーク配列がドナーのフレームワーク配列に最も類似している場合には、ヒト化抗体において親和性が保持される可能性が最大となろう。例えば、Winter(ヨーロッパ特許第0239400号)は、重鎖および軽鎖可変領域のそれぞれに由来する3つの相補性決定領域(CDR1、CDR2およびCDR3)を

グラフトするために、長いオリゴヌクレオチドを用いる部位特異的変異誘発によりヒト化抗体を作製することを提案した。この方法はうまくいくことが示されたが、ドナーCDRを支持する最良のヒト鋳型を選択するという可能性に限界がある。

【0008】

ヒト化抗体はその天然またはキメラ対応物よりもヒトにおいて免疫原性が少ないが、多くの研究グループは、CDRをグラフトさせたヒト化抗体は著しく低下した結合親和性を示しうること気づいている（例えば、Riechmannら, 1988, Nature 332:323-327）。例えば、Riechmannとその協同研究者は、CDR領域のみの転移はCDRグラフト産物において満足のいく抗原結合活性を得るのに十分ではなく、ヒト配列の27位のセリン残基を対応するラットフェニルアラニン残基に変換することも必要であることを見いだした。これらの結果は、効果的な抗原結合活性を得るためにはCDR領域の外側にあるヒト配列の残基の変更が必要でありうることを示した。それにしても、結合親和性はもとのモノクローナル抗体の親和性よりもまだかなり低いものであった。

10

【0009】

例えば、Queenら（米国特許第5,530,101号）は、マウスモノクローナル抗体（抗Tac MAb）のCDRを、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域および定常領域と結合させることによって、インターロイキン-2受容体に結合するヒト化抗体を作製することを記載した。ヒトフレームワーク領域は、抗Tac MAb配列との相同性が最大となるように選択された。さらに、コンピューターモデリングを用いることにより、CDRまたは抗原と相互作用しそうなフレームワークアミノ酸残基が同定され、これらの位置ではヒト化抗体においてマウスアミノ酸が使用された。得られたヒト化抗Tac抗体は、インターロイキン-2受容体(p55)に対する親和性が $3 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ であると報告されたが、この数値は依然としてマウスMAbの親和性の3分の1ほどにすぎなかった。

20

【0010】

他の研究グループは、可変領域のフレームワーク領域内の更なる位置（すなわち、可変領域のCDRおよび構造ループの外側の位置）における残基のアミノ酸同一性が満足のいく結合親和性を有するCDRグラフト産物を得るのに寄与しうることを同定した。例えば、米国特許第6,054,297号および第5,929,212号を参照されたい。しかしまだ、特定のCDRグラフト配置が目的の所与の抗体にいかにか有効であるかを前もって知ることは不可能である。

【0011】

Leung（米国特許出願公開第2003/0040606号）は、フレームワークパッチング（framework patching）手法を記載しており、この手法では、免疫グロブリンの可変領域をFR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3およびFR4の区画に分けて、非ヒト抗体とヒト抗体鋳型との相同性が最大となるように個々のFR配列を選択している。しかし、この手法は手間がかかり、最適なフレームワーク領域を簡単に同定することができない。

30

【0012】

治療上より効果的な抗体が開発されつつあり、また、それらはより有望な成果を収めつつあるので、投与抗体によって引き出された生体の免疫反応を抑制または排除することができることは重要である。したがって、抗体をヒト様にするための効率的かつ迅速な遺伝子工学的操作を可能にし、かつ／または、抗体をヒト化する際の労力の軽減を可能にする新しい手法は、多大な利益と医療的価値をもたらすだろう。

40

【0013】

本明細書中での文献の引用または考察は、それが本発明の先行技術であることを容認するものと解釈されるべきでない。

【発明の開示】

【0014】

3. 発明の概要

本発明は、一部には、（抗体の可変重鎖フレームワーク領域と可変軽鎖フレームワーク領域に対する）フレームワーク領域サブバンクの合成、ならびに、（ドナー抗体由来の相補性決定領域（CDR）とフレームワーク領域サブバンク由来のフレームワーク領域とを同

50

時にインフレームで融合することにより作製された可変鎖領域をもつ) 可変重鎖領域および/または可変軽鎖領域を含む抗体のコンビナトリアルライブラリーの合成に基づいている。フレームワーク領域サブバンクの作製によって、目的の抗原に対するそれらの免疫特異性だけでなく、目的の生物におけるそれらの免疫原性を容易にスクリーニングできる、迅速で手間のかからない抗体(定常領域を含むまたは含まない)のコンビナトリアルライブラリーの作製が可能になる。本発明で記載するライブラリー手法によって、アクセプターフレームワーク(例えば、ヒトフレームワーク)の効率的な選択および同定が可能である。フレームワーク領域サブバンクの作製に加えて、CDRのサブバンクを作製してフレームワーク領域サブバンクからのフレームワーク領域とランダムにインフレームで融合させることにより、抗体(定常領域を含むまたは含まない)のコンビナトリアルライブラリーを作製することができ、これらの抗体を、目的の抗原に対するそれらの免疫特異性、ならびに目的の生物におけるそれらの免疫原性をスクリーニングすることができる。本発明のコンビナトリアルライブラリー法は、本明細書では、ヒトで使用するヒト化抗体の作製について例証される。しかしながら、本発明のコンビナトリアルライブラリー法は、目的のいずれの生物で使用する抗体の作製にも容易に応用できる。

【0015】

本発明は、CDRをコードする核酸配列とフレームワーク領域をコードする核酸配列を同時にインフレームで融合することにより抗体(すなわち、ドナー抗体)を再設計(re-engineering)または再構成(re-shape)する方法であって、少なくとも1つのCDRはドナー抗体由来でありそして少なくとも1つのフレームワーク領域はフレームワーク領域のサブバンク(例えば、いくつかもしくは全ての公知のヒト生殖系列軽鎖FR1フレームワークをコードするサブバンク配列)由来である前記方法を提供する。再設計または再構成された抗体を作製する1つの方法を図13に詳しく示す。従って、本発明はまた、本発明の方法により作製された再設計または再構成された抗体も提供する。本発明の再設計または再構成された抗体はまた、本明細書において「改変された抗体」、「ヒト化抗体」、「フレームワークシャッフルした抗体」およびさらに簡単に「本発明の抗体」とも呼ばれる。本明細書で用いられる、1以上のCDRが由来する抗体はドナー抗体である。いくつかの実施形態において、本発明の再設計または再構成された抗体は少なくとも1個、または少なくとも2個、または少なくとも3個、または少なくとも4個、または少なくとも5個、または6個のドナー抗体由来のCDRを含む。いくつかの実施形態において、本発明の再設計または再構成された抗体は少なくとも1個、または少なくとも2個、または少なくとも3個、または少なくとも4個、または少なくとも5個、または少なくとも6個、または少なくとも7個、または8個のフレームワーク領域のサブバンク由来のフレームワークを含む。

【0016】

さらに、本発明はまた、CDRをコードする核酸配列とフレームワーク領域をコードする核酸配列を同時にインフレームで融合することにより新規の抗体を作製する方法であって、CDRをコードする配列は複数のドナー抗体に由来するかまたはランダムな配列でありそして少なくとも1つのフレームワーク領域はフレームワーク領域のサブバンク(例えば、いくつかまたは全ての公知のヒト軽鎖FR1フレームワークをコードする配列のサブバンク)に由来する前記方法も提供する。

【0017】

本発明の方法を利用して第1の生物種由来の再設計または再構成された抗体を作製することができ、再設計または再構成された抗体は第2の生物種において望ましくない免疫応答を惹起せず、かつ第1の生物種由来の抗体と実質的に同じかまたはより優れた抗原結合能力を保持する。従って本発明は、第1の生物種由来の1以上のCDRおよび第2の生物種由来の少なくとも1つのフレームワークを含む再設計または再構成された抗体を提供する。いくつかの実施形態において、本発明の再設計または再構成された抗体は少なくとも1個、または少なくとも2個、または少なくとも3個、または少なくとも4個、または少なくとも5個、または6個の第1の生物種由来のCDRを含む。いくつかの実施形態において、本発明の再設計または再構成された抗体は少なくとも1個、または少なくとも2個、または少

なくとも3個、または少なくとも4個、または少なくとも5個、少なくとも6個、少なくとも7個、または8個の第2の生物種由来のフレームワークを含む。特定の実施形態において、本発明の再設計または再構成された抗体は少なくとも1つの第2の生物種由来のフレームワークを含み、そのフレームワークは第1の生物種由来の抗体の対応するフレームワークに対して60%未満、または70%未満、または80%未満、または90%未満の相同性を有する（例えば、再設計または再構成された抗体の軽鎖FW1は第2の生物種由来であって、第1の生物種由来の抗体の軽鎖FW1に対して60%未満の相同性を有する）。

【0018】

本発明の方法を利用して第1の生物種由来の再設計または再構成された抗体を作製することができ、再設計または再構成された抗体は第1の生物種由来の抗体と比較して改善されたおよび／または改変された特性を有する。また本発明の方法を利用してドナー抗体を再設計または再構成することができ、再設計または再構成された抗体はドナー抗体と比較して改善されたおよび／または改変された特性を有する。本明細書に記載した方法により改善できる抗体の特性としては、限定されるものでないが、結合特性（例えば、 K_a 、 K_d 、 K_{on} 、 K_{off} などの抗体-抗原結合定数）、*in vivo*（例えば、血清半減期）および／または*in vitro*（例えば、有効期間）の抗体安定性、抗体の融点（ T_m ）（例えば、示差走査熱量測定（DSC）または他の当技術分野で公知の方法により測定した）、抗体のpI（例えば、等電点電気泳動（IEF）または他の当技術分野で公知の方法で測定した）、抗体溶解度（例えば、製薬上許容される担体、希釈剤または賦形剤中の溶解度）、エフェクター機能（例えば、抗体依存性細胞傷害活性（ADCC））および産生レベル（例えば、細胞からの抗体の収率）が挙げられる。本発明によれば、第2の生物種由来のフレームワーク領域の1以上のサブバンク由来のフレームワーク領域とインフレームで融合された第1の生物種由来の抗体のCDRを含むコンビナトリアルライブラリーを構築し、そして所望の改変されたおよび／または改善された抗体をスクリーニングすることができる。

【0019】

本発明はまた、本明細書に記載の核酸配列を含んでなる、含有する、または発現するように遺伝子操作された細胞も提供する。本発明は重鎖可変領域（例えば、ヒト化重鎖可変領域）を作製する方法を提供し、前記方法は本明細書に記載の細胞において重鎖可変領域（例えば、ヒト化重鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を発現するステップを含んでなる。本発明は、軽鎖可変領域（例えば、ヒト化軽鎖可変領域）を作製する方法を提供し、前記方法は本明細書に記載の細胞において軽鎖可変領域（例えば、ヒト化軽鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を発現するステップを含んでなる。本発明はまた、抗原と免疫特異的に結合する抗体（例えば、ヒト化抗体）を作製する方法も提供し、前記方法は本明細書に記載の細胞に含有されるヒト化抗体をコードする核酸配列を発現するステップを含んでなる。

【0020】

本発明は、本明細書に記載の方法により作製された再設計または再構成された抗体を提供する。特定の実施形態において、本発明は本明細書に記載の方法により作製されたヒト化抗体を提供する。別の実施形態において、本発明は、本明細書に記載の方法により作製された再設計または再構成（例えば、ヒト化）された抗体を提供し、該抗体は1以上の次の特性：結合特性、*in vivo*および／または*in vitro*安定性、融点（ T_m ）、pI、溶解度、エフェクター機能および産生レベルが改善および／または改変されている。本発明はまた、本明細書に記載の方法により作製された抗体および担体、希釈剤または賦形剤を含む組成物も提供する。特定の実施形態において、本発明は、本明細書に記載の方法により作製されたヒト化抗体および担体、希釈剤または賦形剤を含む組成物も提供する。好ましくは、本発明の組成物は意図する用途のための剤形の医薬組成物である。

【0021】

本発明は、可変軽鎖および可変重鎖の各フレームワーク領域のためのフレームワーク領域サブバンクを提供する。したがって、本発明は、それぞれの目的の生物種について、およびそれぞれのCDRの定義（例えば、KabatおよびChothia）について、可変軽鎖フレーム

10

20

30

40

50

ワーク領域1、可変軽鎖フレームワーク領域2、可変軽鎖フレームワーク領域3、および可変軽鎖フレームワーク領域4のフレームワーク領域サブバンクを提供する。本発明はまた、それぞれの目的の生物種のための、およびそれぞれのCDRの定義（例えば、KabatおよびChothia）のための、可変重鎖フレームワーク領域1、可変重鎖フレームワーク領域2、可変重鎖フレームワーク領域3、および可変重鎖フレームワーク領域4のフレームワーク領域サブバンクを提供する。フレームワーク領域サブバンクは生殖系列(germline)フレームワーク配列由来のフレームワーク領域および／または機能性抗体配列由来のフレームワーク領域を含みうる。フレームワーク領域サブバンクは、1以上の変異が導入されている、生殖系列フレームワーク配列由来のフレームワーク領域および／または機能性抗体配列由来のフレームワーク領域を含みうる。このフレームワーク領域サブバンクを使用すると、目的の抗原に対する免疫特異性だけでなく、目的の生物における免疫原性をスクリーニングすることができる抗体のコンビナトリアルライブラリーを容易に作製することができる。

10

【0022】

本発明は、可変軽鎖および可変重鎖の各CDRのためのCDRサブバンクを提供する。したがって、本発明は、それぞれの目的の生物種について、およびそれぞれのCDRの定義（例えば、KabatおよびChothia）について、可変軽鎖CDR1、可変軽鎖CDR2、および可変軽鎖CDR3のCDR領域サブバンクを提供する。本発明はまた、それぞれの目的の生物種について、およびそれぞれのCDRの定義（例えば、KabatおよびChothia）について、可変重鎖CDR1、可変重鎖CDR2、および可変重鎖CDR3のCDRサブバンクを提供する。CDRサブバンクは、目的の抗原と免疫特異的に結合する抗体の部分として同定されたCDRを含みうる。CDRサブバンクを使用すると、目的の抗原に対する免疫特異性だけでなく、目的の生物における免疫原性をスクリーニングすることができる抗体のコンビナトリアルライブラリーを容易に作製することができる。

20

【0023】

本発明は、重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列および／または軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を提供し、前記可変領域はドナー抗体由来のCDR1～3をフレームワーク領域サブバンク由来のフレームワーク領域1～4と同時にインフレームで融合することにより作製されたものである。いくつかの実施形態においては、ドナー抗体の重鎖および／または軽鎖可変領域に由来するCDRの1つ以上が、ドナー抗体の対応するCDRをコードする核酸配列に対して1以上の変異を含んでいる。本発明はまた、重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列および／または軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を提供し、前記可変領域はCDRサブバンク（好ましくは、目的の抗原と免疫特異的に結合するCDRのサブバンク）から得られたCDR1～3をフレームワーク領域サブバンクから得られたフレームワーク領域1～4と同時にインフレームで融合することにより作製されたものである。

30

【0024】

一実施形態において、本発明は、重鎖可変領域（例えば、ヒト化重鎖可変領域）をコードする第1のヌクレオチド配列を含む核酸配列であって、前記重鎖可変領域をコードする第1のヌクレオチド配列は、重鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、重鎖相補性決定領域（CDR）1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより作製されたものであり、前記CDRはドナー抗体の重鎖可変領域（例えば、非ヒトドナー抗体の重鎖可変領域）に由来し、少なくとも1つの重鎖フレームワーク領域は重鎖フレームワーク領域のサブバンク（例えば、ヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られたものである、前記核酸配列を提供する。この実施形態によれば、前記核酸配列はドナー軽鎖可変領域（例えば、非ヒトドナー軽鎖可変領域）をコードする第2のヌクレオチド配列をさらに含みうる。あるいはまた、この実施形態によれば、前記核酸配列は軽鎖可変領域（例えば、ヒト化軽鎖可変領域）をコードする第2

40

50

のヌクレオチド配列をさらに含み、前記軽鎖可変領域をコードする第2のヌクレオチド配列は、軽鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより作製されたものであり、前記CDRはドナー抗体の軽鎖可変領域（例えば、非ヒトドナー抗体の軽鎖可変領域）に由来し、少なくとも1つの軽鎖フレームワーク領域は軽鎖フレームワーク領域のサブバンク（例えば、ヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られたものである。

【0025】

別の実施形態において、本発明は、軽鎖可変領域（例えば、ヒト化軽鎖可変領域）をコードする第1のヌクレオチド配列を含む核酸配列であって、前記軽鎖可変領域をコードする第1のヌクレオチド配列は、軽鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより作製されたものであり、前記CDRはドナー抗体の軽鎖可変領域（例えば、非ヒトドナー抗体の軽鎖可変領域）に由来し、少なくとも1つの軽鎖フレームワーク領域は軽鎖フレームワーク領域のサブバンク（例えば、ヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られたものである、前記核酸配列を提供する。この実施形態によれば、前記核酸配列はドナー重鎖可変領域（例えば、非ヒトドナー重鎖可変領域）をコードする第2のヌクレオチド配列をさらに含む。

【0026】

別の実施形態において、本発明は、重鎖可変領域（例えば、ヒト化重鎖可変領域）をコードする第1のヌクレオチド配列を含む核酸配列であって、前記重鎖可変領域をコードする第1のヌクレオチド配列は、重鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより作製されたものであり、少なくとも1つのCDRはドナー抗体（例えば、非ヒトドナー抗体）由来の重鎖CDRのサブバンクから得られ、少なくとも1つの重鎖フレームワーク領域は重鎖フレームワーク領域のサブバンク（例えば、ヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られたものである、前記核酸配列を提供する。この実施形態によれば、前記核酸はドナー軽鎖可変領域（例えば、非ヒトドナー軽鎖可変領域）をコードする第2のヌクレオチド配列をさらに含み、前記軽鎖可変領域をコードする第2のヌクレオチド配列は、軽鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより作製されたものであり、前記CDRはドナー抗体の軽鎖可変領域（例えば、非ヒトドナー抗体の軽鎖可変領域）に由来するか、または少なくとも1つのCDRはドナー抗体（例えば、非ヒト抗体）由来の軽鎖CDRのサブバンクから得られたものであり、そして少なくとも1つの軽鎖フレームワーク領域は軽鎖フレームワーク領域のサブバンク（例えば、ヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られたものである。

【0027】

別の実施形態において、本発明は、軽鎖可変領域（例えば、ヒト化軽鎖可変領域）をコードする第1のヌクレオチド配列を含む核酸配列であって、前記軽鎖可変領域をコードする第1のヌクレオチド配列は、軽鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、軽鎖CD

10

20

30

40

50

R1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより作製されたものであり、少なくとも1つのCDRはドナー抗体（例えば、非ヒトドナー抗体）由来の軽鎖CDRのサブバンクから得られ、少なくとも1つの軽鎖フレームワーク領域は軽鎖フレームワーク領域のサブバンク（例えば、ヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られたものである、前記核酸配列を提供する。この実施形態によれば、前記核酸配列はドナー重鎖可変領域（例えば、非ヒトドナー重鎖可変領域）をコードする第2のヌクレオチド配列をさらに含む。あるいはまた、この実施形態によれば、前記核酸配列は重鎖可変領域（例えば、ヒト化重鎖可変領域）をコードする第2のヌクレオチド配列をさらに含み、前記重鎖可変領域をコードする第2のヌクレオチド配列は、重鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより作製されたものであり、前記CDRはドナー抗体の重鎖可変領域（例えば、非ヒトドナー抗体の重鎖可変領域）に由来し、少なくとも1つの重鎖フレームワーク領域は重鎖フレームワーク領域のサブバンク（例えば、ヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られたものである。

【0028】

本発明はまた、本明細書に記載の核酸配列を含む細胞、または該核酸配列を発現するように遺伝子操作された細胞を提供する。ある実施形態において、本発明は、重鎖可変領域（例えば、ヒト化重鎖可変領域）をコードする第1のヌクレオチド配列を含む第1の核酸配列を含有する細胞を提供し、前記細胞は、重鎖可変領域（例えば、ヒト化重鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を細胞に導入することを含む方法により作製されたものであり、前記核酸配列は、重鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより作製されたものであり、前記CDRはドナー抗体の重鎖可変領域（例えば、非ヒトドナー抗体の重鎖可変領域）に由来し、少なくとも1つの重鎖フレームワーク領域は重鎖フレームワーク領域のサブバンク（例えば、ヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られたものである。この実施形態によれば、前記細胞は軽鎖可変領域（例えば、ヒト化またはヒト軽鎖可変領域）をコードする第2のヌクレオチド配列を含む第2の核酸配列をさらに含む。

【0029】

別の実施形態において、本発明は、軽鎖可変領域（例えば、ヒト化軽鎖可変領域）をコードする第1のヌクレオチド配列を含む第1の核酸配列を含有する細胞を提供し、前記細胞は、軽鎖可変領域（例えば、ヒト化軽鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を細胞に導入することを含む方法により作製されたものであり、前記核酸配列は、軽鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより作製されたものであり、前記CDRはドナー抗体の軽鎖可変領域（例えば、非ヒトドナー抗体の軽鎖可変領域）に由来し、少なくとも1つの軽鎖フレームワーク領域は軽鎖フレームワーク領域のサブバンク（例えば、ヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られたものである。この実施形態によれば、前記細胞は重鎖可変領域（例えば、ヒト化またはヒト重鎖可変領域）をコードする第2のヌクレオチド配列を含む第2の核酸配列をさらに含む。

【0030】

別の実施形態において、本発明は、重鎖可変領域（例えば、ヒト化重鎖可変領域）をコ

ードする第1のヌクレオチド配列および軽鎖可変領域（例えば、ヒト化軽鎖可変領域）をコードする第2のヌクレオチド配列を含む核酸配列を含有する細胞を提供し、前記細胞は、(i)重鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより作製された、重鎖可変領域をコードする第1のヌクレオチド配列、および(ii)軽鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより作製された、軽鎖可変領域をコードする第2のヌクレオチド配列を含む核酸配列を細胞に導入する方法により作製されたものであり、重鎖可変領域のCDRはドナー抗体の重鎖可変領域（例えば、非ヒトドナー抗体の重鎖可変領域）に由来し、軽鎖可変領域のCDRはドナー抗体の軽鎖可変領域（例えば、非ヒトドナー抗体の軽鎖可変領域）に由来し、少なくとも1つの重鎖フレームワーク領域は重鎖フレームワーク領域のサブバンク（例えば、ヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られ、そして少なくとも1つの軽鎖フレームワーク領域は軽鎖フレームワーク領域のサブバンク（例えば、ヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られたものである。

10

【0031】

20

別の実施形態において、本発明は、重鎖可変領域（例えば、ヒト化重鎖可変領域）をコードする第1のヌクレオチド配列を含む第1の核酸配列を含有する細胞を提供し、前記細胞は、重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を細胞に導入することを含む方法により作製されたものであり、前記核酸配列は、重鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより作製されたものであり、少なくとも1つのCDRはドナー抗体（例えば、非ヒトドナー抗体）由来の重鎖CDRのサブバンクから得られ、少なくとも1つの重鎖フレームワーク領域は重鎖フレームワーク領域のサブバンク（例えば、ヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られたものである。この実施形態によれば、前記細胞は軽鎖可変領域（例えば、ヒト化またはヒト軽鎖可変領域）をコードする第2のヌクレオチド配列を含む第2の核酸配列をさらに含む。

30

【0032】

別の実施形態において、本発明は、軽鎖可変領域（例えば、ヒト化軽鎖可変領域）をコードする第1のヌクレオチド配列を含む第1の核酸配列を含有する細胞を提供し、前記細胞は、軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を細胞に導入することを含む方法により作製されたものであり、前記核酸配列は、軽鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより作製されたものであり、少なくとも1つのCDRはドナー抗体（例えば、非ヒトドナー抗体）由来の軽鎖CDRのサブバンクから得られ、少なくとも1つの軽鎖フレームワーク領域は軽鎖フレームワーク領域のサブバンク（例えば、ヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られたものである。この実施形態によれば、前記細胞は重鎖可変領域（例えば、ヒト化またはヒト重鎖可変領域）をコードする第2のヌクレオチド配列を含む第2の核酸配列をさらに含む。

40

【0033】

別の実施形態において、本発明は、重鎖可変領域（例えば、ヒト化重鎖可変領域）をコードする第1のヌクレオチド配列および軽鎖可変領域（例えば、ヒト化軽鎖可変領域）を

50

コードする第2のヌクレオチド配列を含む核酸配列を含有する細胞を提供し、前記細胞は、(i)重鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより作製された、重鎖可変領域をコードする第1のヌクレオチド配列、および(ii)軽鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより作製された、軽鎖可変領域をコードする第2のヌクレオチド配列を含む核酸配列を細胞に導入する方法により作製されたものであり、少なくとも1つの重鎖可変領域CDRはドナー抗体（例えば、非ヒトドナー抗体）由来の重鎖CDRのサブバンクから得られ、少なくとも1つの軽鎖可変領域CDRはドナー抗体（例えば、非ヒトドナー抗体）由来の軽鎖CDRのサブバンクから得られ、少なくとも1つの重鎖フレームワーク領域は重鎖フレームワーク領域のサブバンク（例えば、ヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られ、そして少なくとも1つの軽鎖フレームワーク領域は軽鎖フレームワーク領域のサブバンク（例えば、ヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られたものである。

10

【0034】

別の実施形態において、本発明は、重鎖可変領域（例えば、ヒト化重鎖可変領域）をコードする第1のヌクレオチド配列および軽鎖可変領域（例えば、ヒト化軽鎖可変領域）をコードする第2のヌクレオチド配列を含む核酸配列を含有する細胞を提供し、前記細胞は、(i)重鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより作製された、重鎖可変領域をコードする第1のヌクレオチド配列、および(ii)軽鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより作製された、軽鎖可変領域をコードする第2のヌクレオチド配列を含む核酸配列を細胞に導入する方法により作製されたものであり、重鎖可変領域CDRはドナー抗体の重鎖可変領域（例えば、非ヒトドナー抗体の重鎖可変領域）に由来し、少なくとも1つの軽鎖可変領域CDRはドナー抗体（例えば、非ヒトドナー抗体）由来の軽鎖CDRのサブバンクから得られ、少なくとも1つの重鎖フレームワーク領域は重鎖フレームワーク領域のサブバンク（例えば、ヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られ、そして少なくとも1つの軽鎖フレームワーク領域は軽鎖フレームワーク領域のサブバンク（例えば、ヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られたものである。

20

30

【0035】

別の実施形態において、本発明は、重鎖可変領域（例えば、ヒト化重鎖可変領域）をコードする第1のヌクレオチド配列および軽鎖可変領域（例えば、ヒト化軽鎖可変領域）をコードする第2のヌクレオチド配列を含む核酸配列を含有する細胞を提供し、前記細胞は、(i)重鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより作製された、重鎖可変領域をコードする第1のヌクレオチド配列、および(ii)軽鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域3をコ

40

50

ードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより作製された、軽鎖可変領域をコードする第2のヌクレオチド配列を含む核酸配列を細胞に導入する方法により作製されたものであり、少なくとも1つの重鎖可変領域CDRはドナー抗体（例えば、非ヒトドナー抗体）由来の重鎖CDRのサブバンクから得られ、軽鎖可変領域CDRはドナー抗体の軽鎖可変領域（例えば、非ヒトドナー抗体の軽鎖可変領域）に由来し、少なくとも1つの重鎖フレームワーク領域は重鎖フレームワーク領域のサブバンク（例えば、ヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られ、そして少なくとも1つの軽鎖フレームワーク領域は軽鎖フレームワーク領域のサブバンク（例えば、ヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られたものである。

10

【0036】

本発明は、抗原と免疫特異的に結合する抗体（例えば、ヒト化抗体）をコードする核酸配列を含有する細胞を提供し、前記細胞は、(a)重鎖可変領域（例えば、ヒト化重鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を細胞に導入すること、ただし、前記ヌクレオチド配列は、重鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより作製されたものであり、前記CDRはドナー抗体の重鎖可変領域（例えば、非ヒトドナー抗体の重鎖可変領域）に由来し、少なくとも1つの重鎖フレームワーク領域は重鎖フレームワーク領域のサブバンク（例えば、ヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られたものであること、および(b)軽鎖可変領域（例えば、ヒト化軽鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を細胞に導入すること、ただし、前記ヌクレオチド配列は、軽鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより作製されたものであり、前記CDRはドナー抗体の軽鎖可変領域（例えば、非ヒトドナー抗体の軽鎖可変領域）に由来し、少なくとも1つの軽鎖フレームワーク領域は軽鎖フレームワーク領域のサブバンク（例えば、ヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られたものであること、を含む方法によって作製されたものである。

20

30

【0037】

本発明は、抗原と免疫特異的に結合する抗体（例えば、ヒト化抗体）をコードする核酸配列を含有する細胞を提供し、前記細胞は、(a)重鎖可変領域（例えば、ヒト化重鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を細胞に導入すること、ただし、前記ヌクレオチド配列は、重鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより作製されたものであり、少なくとも1つのCDRはドナー抗体（例えば、非ヒトドナー抗体）由来の重鎖CDRのサブバンクから得られ、少なくとも1つの重鎖フレームワーク領域は重鎖フレームワーク領域のサブバンク（例えば、ヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られたものであること、および(b)軽鎖可変領域（例えば、ヒト化軽鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を細胞に導入すること、ただし、前記ヌクレオチド配列は、軽鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより作製されたものであり、前記CDRはドナー抗体の軽鎖可変領域（例えば、非ヒトドナー抗体の軽鎖可変領域）に由来し、少なくとも1つの軽鎖フレームワーク領域は軽

40

50

鎖フレームワーク領域のサブバンク（例えば、ヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られたものであること、を含む方法によって作製されたものである。

【0038】

本発明は、抗原と免疫特異的に結合する抗体（例えば、ヒト化抗体）をコードする核酸配列を含有する細胞を提供し、前記細胞は、(a)重鎖可変領域（例えば、ヒト化重鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を細胞に導入すること、ただし、前記ヌクレオチド配列は、重鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより作製されたものであり、少なくとも1つのCDRはドナー抗体（例えば、非ヒトドナー抗体）由来の重鎖CDRのサブバンクから得られ、少なくとも1つの重鎖フレームワーク領域は重鎖フレームワーク領域のサブバンク（例えば、ヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られたものであること、および(b)軽鎖可変領域（例えば、ヒト化軽鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を細胞に導入すること、ただし、前記ヌクレオチド配列は、軽鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより作製されたものであり、少なくとも1つのCDRはドナー抗体（例えば、非ヒトドナー抗体）由来の軽鎖CDRのサブバンクから得られ、少なくとも1つの軽鎖フレームワーク領域は軽鎖フレームワーク領域のサブバンク（例えば、ヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られたものであること、を含む方法によって作製されたものである。

【0039】

本発明は、抗原と免疫特異的に結合する抗体（例えば、ヒト化抗体）をコードする核酸配列を含有する細胞を提供し、前記細胞は、(a)重鎖可変領域（例えば、ヒト化重鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を細胞に導入すること、ただし、前記ヌクレオチド配列は、重鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより作製されたものであり、前記CDRはドナー抗体の重鎖可変領域（例えば、非ヒトドナー抗体の重鎖可変領域）に由来し、少なくとも1つの重鎖フレームワーク領域は重鎖フレームワーク領域のサブバンク（例えば、ヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られたものであること、および(b)軽鎖可変領域（例えば、ヒト化軽鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を細胞に導入すること、ただし、前記ヌクレオチド配列は、軽鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより作製されたものであり、少なくとも1つのCDRはドナー抗体（例えば、非ヒトドナー抗体）由来の軽鎖CDRのサブバンクから得られ、少なくとも1つの軽鎖フレームワーク領域は軽鎖フレームワーク領域のサブバンク（例えば、ヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られたものであること、を含む方法によって作製されたものである。

【0040】

本発明は、重鎖可変領域（例えば、ヒト化重鎖可変領域）を作製する方法を提供し、前記方法は、重鎖可変領域（例えば、ヒト化重鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を本明細書に記載の細胞において発現させることを含む。本発明は、軽鎖可変領域（例えば、ヒト化軽鎖可変領域）を作製する方法を提供し、前記方法は、軽鎖可変領域（例えば、

、ヒト化軽鎖可変領域)をコードするヌクレオチド配列を本明細書に記載の細胞において発現させることを含む。本発明はまた、抗原と免疫特異的に結合する抗体(例えば、ヒト化抗体)を作製する方法を提供し、前記方法は、本明細書に記載の細胞内に含まれるヒト化抗体をコードする核酸配列を発現させることを含む。

【0041】

ある実施形態において、本発明は、抗原と免疫特異的に結合する抗体(例えば、ヒト化抗体)を作製する方法を提供し、前記方法は、

- (a) 重鎖フレームワーク領域のサブバンクを作製すること、
- (b) ヒト化重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を合成すること、
ただし、前記ヌクレオチド配列は、重鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより作製されるものであり、前記CDRはドナー抗体の重鎖可変領域(例えば、非ヒトドナー抗体の重鎖可変領域)に由来し、少なくとも1つの重鎖フレームワーク領域は重鎖フレームワーク領域のサブバンク(例えば、ヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンク)から得られるものであること、
- (c) 前記核酸配列を、軽鎖可変領域(例えば、ヒト化またはヒト軽鎖可変領域)をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を含有する細胞に導入すること、
- (d) 重鎖可変領域(例えば、ヒト化重鎖可変領域)と軽鎖可変領域(例えば、ヒト化またはヒト軽鎖可変領域)をコードするヌクレオチド配列を発現させること、
を含んでなる。この実施形態によれば、前記方法は前記抗原と免疫特異的に結合する抗体(例えば、ヒト化抗体)をスクリーニングすることからなるステップ(e)をさらに含んでいてよい。

【0042】

別の実施形態において、本発明は、抗原と免疫特異的に結合する抗体(例えば、ヒト化抗体)を作製する方法を提供し、前記方法は、

- (a) 重鎖フレームワーク領域のサブバンクを作製すること、
- (b) 重鎖可変領域(例えば、ヒト化重鎖可変領域)をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を合成すること、ただし、前記ヌクレオチド配列は、重鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより作製されるものであり、少なくとも1つのCDRはドナー抗体(例えば、非ヒトドナー抗体)由来の重鎖CDRのサブバンクから得られ、少なくとも1つの重鎖フレームワーク領域は重鎖フレームワーク領域のサブバンク(例えば、ヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンク)から得られるものであること、
- (c) 前記核酸配列を、軽鎖可変領域(例えば、ヒト化またはヒト軽鎖可変領域)をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を含有する細胞に導入すること、
- (d) 重鎖可変領域(例えば、ヒト化重鎖可変領域)と軽鎖可変領域(例えば、ヒト化またはヒト軽鎖可変領域)をコードするヌクレオチド配列を発現させること、
を含んでなる。この実施形態によれば、前記方法は前記抗原と免疫特異的に結合する抗体(例えば、ヒト化抗体)をスクリーニングすることからなるステップ(e)をさらに含んでいてよい。

【0043】

別の実施形態において、本発明は、抗原と免疫特異的に結合する抗体(例えば、ヒト化抗体)を作製する方法を提供し、前記方法は、

- (a) 軽鎖フレームワーク領域のサブバンクを作製すること、
- (b) 軽鎖可変領域(例えば、ヒト化軽鎖可変領域)をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を合成すること、ただし、前記ヌクレオチド配列は、軽鎖フレームワーク領域1

をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより作製されるものであり、前記CDRはドナー抗体の軽鎖可変領域（例えば、非ヒトドナー抗体の軽鎖可変領域）に由来し、少なくとも1つの軽鎖フレームワーク領域は軽鎖フレームワーク領域のサブバンク（例えば、ヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られるものであること、

(c) 前記核酸配列を、重鎖可変領域（例えば、ヒト化またはヒト重鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を含有する細胞に導入すること、

(d) 重鎖可変領域（例えば、ヒト化重鎖可変領域）と軽鎖可変領域（例えば、ヒト化またはヒト軽鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を発現させること、

を含んでなる。この実施形態によれば、前記方法は前記抗原と免疫特異的に結合する抗体（例えば、ヒト化抗体）をスクリーニングすることからなるステップ(e)をさらに含んでいてよい。

【0044】

別の実施形態において、本発明は、抗原と免疫特異的に結合する抗体（例えば、ヒト化抗体）を作製する方法を提供し、前記方法は、

(a) 軽鎖フレームワーク領域のサブバンクを作製すること、

(b) 軽鎖可変領域（例えば、ヒト化軽鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を合成すること、ただし、前記ヌクレオチド配列は、軽鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより作製されるものであり、少なくとも1つのCDRはドナー抗体（例えば、非ヒトドナー抗体）由来の軽鎖CDRのサブバンクから得られ、少なくとも1つの軽鎖フレームワーク領域は軽鎖フレームワーク領域のサブバンク（例えば、ヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られるものであること、

(c) 前記核酸配列を、重鎖可変領域（例えば、ヒト化またはヒト重鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を含有する細胞に導入すること、

(d) 重鎖可変領域（例えば、ヒト化重鎖可変領域）と軽鎖可変領域（例えば、ヒト化またはヒト軽鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を発現させること、

を含んでなる。この実施形態によれば、前記方法は前記抗原と免疫特異的に結合する抗体（例えば、ヒト化抗体）をスクリーニングすることからなるステップ(e)をさらに含んでいてよい。

【0045】

別の実施形態において、本発明は、抗原と免疫特異的に結合する抗体（例えば、ヒト化抗体）を作製する方法を提供し、前記方法は、

(a) 軽鎖フレームワーク領域のサブバンクを作製すること、

(b) 重鎖フレームワーク領域のサブバンクを作製すること、

(c) 重鎖可変領域（例えば、ヒト化重鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を合成すること、ただし、前記ヌクレオチド配列は、重鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより作製されるものであり、前記CDRはドナー抗体の重鎖可変領域（例えば、非ヒトドナー抗体の重鎖可変領域）に由来し、少なくとも1つの重鎖フレームワーク領域は重鎖フレームワーク領域のサブバンク（例えば、ヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られるものであること、

(d) 軽鎖可変領域（例えば、ヒト化軽鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を合成すること、ただし、前記ヌクレオチド配列は、軽鎖フレームワーク領域1

10

20

30

40

50

をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより作製されるものであり、前記CDRはドナー抗体の軽鎖可変領域（例えば、非ヒトドナー抗体の軽鎖可変領域）に由来し、少なくとも1つの軽鎖フレームワーク領域は軽鎖フレームワーク領域のサブバンク（例えば、ヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られるものであること、

(e) 前記核酸配列を細胞に導入すること、

(f) 重鎖可変領域（例えば、ヒト化重鎖可変領域）と軽鎖可変領域（例えば、ヒト化軽鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を発現させること、

を含んでなる。この実施形態によれば、前記方法は前記抗原と免疫特異的に結合する抗体（例えば、ヒト化抗体）をスクリーニングすることからなるステップ(g)をさらに含んでいてよい。

【0046】

別の実施形態において、本発明は、抗原と免疫特異的に結合する抗体（例えば、ヒト化抗体）を作製する方法を提供し、前記方法は、

(a) 軽鎖フレームワーク領域のサブバンクを作製すること、

(b) 重鎖フレームワーク領域のサブバンクを作製すること、

(c) 重鎖可変領域（例えば、ヒト化重鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を合成すること、ただし、前記ヌクレオチド配列は、重鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより作製されるものであり、少なくとも1つのCDRはドナー抗体（例えば、非ヒトドナー抗体）由来の重鎖CDRのサブバンクから得られ、少なくとも1つの重鎖フレームワーク領域は重鎖フレームワーク領域のサブバンク（例えば、ヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られるものであること、

(d) 軽鎖可変領域（例えば、ヒト化軽鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を合成すること、ただし、前記ヌクレオチド配列は、軽鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより作製されるものであり、前記CDRはドナー抗体の軽鎖可変領域に由来し、少なくとも1つの軽鎖フレームワーク領域はヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られるものであること、

(e) 前記核酸配列を細胞に導入すること、

(f) 重鎖可変領域（例えば、ヒト化重鎖可変領域）と軽鎖可変領域（例えば、ヒト化軽鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を発現させること、

を含んでなる。この実施形態によれば、前記方法は前記抗原と免疫特異的に結合する抗体（例えば、ヒト化抗体）をスクリーニングすることからなるステップ(g)をさらに含んでいてよい。

【0047】

別の実施形態において、本発明は、抗原と免疫特異的に結合する抗体（例えば、ヒト化抗体）を作製する方法を提供し、前記方法は、

(a) 軽鎖フレームワーク領域のサブバンクを作製すること、

(b) 重鎖フレームワーク領域のサブバンクを作製すること、

(c) ヒト化重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を合成すること、ただし、前記ヌクレオチド配列は、重鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、重鎖CDR3を

10

20

30

40

50

コードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより作製されるものであり、前記CDRはドナー抗体の重鎖可変領域（例えば、非ヒトドナー抗体の重鎖可変領域）に由来し、少なくとも1つの重鎖フレームワーク領域は重鎖フレームワーク領域のサブバンク（例えば、ヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られるものであること、

(d) 軽鎖可変領域（例えば、ヒト化軽鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を合成すること、ただし、前記ヌクレオチド配列は、軽鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより作製されるものであり、少なくとも1つのCDRはドナー抗体（例えば、非ヒトドナー抗体）由来の軽鎖CDRのサブバンクから得られ、少なくとも1つの軽鎖フレームワーク領域は軽鎖フレームワーク領域のサブバンク（例えば、ヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られるものであること、

(e) 前記核酸配列を細胞に導入すること、

(f) 重鎖可変領域（例えば、ヒト化重鎖可変領域）と軽鎖可変領域（例えば、ヒト化軽鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を発現させること、

を含んでなる。この実施形態によれば、前記方法は前記抗原と免疫特異的に結合する抗体（例えば、ヒト化抗体）をスクリーニングすることからなるステップ(g)をさらに含んでいてよい。

【0048】

別の実施形態において、本発明は、抗原と免疫特異的に結合する抗体（例えば、ヒト化抗体）を作製する方法を提供し、前記方法は、

(a) 軽鎖フレームワーク領域のサブバンクを作製すること、

(b) 重鎖フレームワーク領域のサブバンクを作製すること、

(c) 重鎖可変領域（例えば、ヒト化重鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を合成すること、ただし、前記ヌクレオチド配列は、重鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより作製されるものであり、少なくとも1つのCDRはドナー抗体（例えば、非ヒトドナー抗体）由来の重鎖CDRのサブバンクから得られ、少なくとも1つの重鎖フレームワーク領域は重鎖フレームワーク領域のサブバンク（例えば、ヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られるものであること、

(d) 軽鎖可変領域（例えば、ヒト化軽鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を合成すること、ただし、前記ヌクレオチド配列は、軽鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより作製されるものであり、少なくとも1つのCDRはドナー抗体（例えば、非ヒトドナー抗体）由来の軽鎖CDRのサブバンクから得られ、少なくとも1つの軽鎖フレームワーク領域は軽鎖フレームワーク領域のサブバンク（例えば、ヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られるものであること、

(e) 前記核酸配列を細胞に導入すること、

(f) 重鎖可変領域（例えば、ヒト化重鎖可変領域）と軽鎖可変領域（例えば、ヒト化軽鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を発現させること、

を含んでなる。この実施形態によれば、前記方法は前記抗原と免疫特異的に結合する抗体（例えば、ヒト化抗体）をスクリーニングすることからなるステップ(g)をさらに含んでいてよい。

【0049】

別の実施形態において、本発明は、抗原と免疫特異的に結合する抗体（例えば、ヒト化抗体）を作製する方法を提供し、前記方法は、

- (a) 軽鎖フレームワーク領域のサブバンクを作製すること、
 - (b) 重鎖フレームワーク領域のサブバンクを作製すること、
 - (c) (i)重鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより作製された、重鎖可変領域（例えば、ヒト化重鎖可変領域）をコードする第1のヌクレオチド配列、および(ii)軽鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより作製された、軽鎖可変領域（例えば、ヒト化軽鎖可変領域）をコードする第2のヌクレオチド配列を含む核酸配列を合成することであり、重鎖可変領域のCDRはドナー抗体の重鎖可変領域（例えば、非ヒトドナー抗体の重鎖可変領域）に由来し、軽鎖可変領域のCDRはドナー抗体の軽鎖可変領域（例えば、非ヒトドナー抗体の軽鎖可変領域）に由来し、少なくとも1つの重鎖フレームワーク領域は重鎖フレームワーク領域のサブバンク（例えば、ヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られ、そして少なくとも1つの軽鎖フレームワーク領域は軽鎖フレームワーク領域のサブバンク（例えば、ヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られたものであること、
 - (d) 前記核酸配列を細胞に導入すること、
 - (e) 重鎖可変領域（例えば、ヒト化重鎖可変領域）と軽鎖可変領域（例えば、ヒト化軽鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を発現させること、
- を含んでなる。この実施形態によれば、前記方法は前記抗原と免疫特異的に結合する抗体（例えば、ヒト化抗体）をスクリーニングすることからなるステップ(f)をさらに含んでいてよい。

【0050】

本発明は、抗原と免疫特異的に結合するヒト化抗体を作製する方法を提供し、前記方法は、

- (a) 軽鎖フレームワーク領域のサブバンクを作製すること、
- (b) 重鎖フレームワーク領域のサブバンクを作製すること、
- (c) (i)重鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより作製された、ヒト化重鎖可変領域をコードする第1のヌクレオチド配列、および(ii)軽鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより作製された、ヒト化軽鎖可変領域をコードする第2のヌクレオチド配列を含む核酸配列を合成することであり、少なくとも1つの重鎖可変領域CDRは抗原と免疫特異的に結合するドナー抗体に由来の重鎖CDRのサブバンクから得られ、軽鎖可変領域CDRはドナー抗体の軽鎖可変領域に由来し、少なくとも1つの重鎖フレームワーク領域はヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られ、そして少なくとも1つの軽鎖フレームワーク領域はヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られたものであること、
- (d) 前記核酸配列を細胞に導入すること、
- (e) ヒト化重鎖可変領域とヒト化軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を発現させること、

を含んでなる。この実施形態によれば、前記方法は前記抗原と免疫特異的に結合する抗体（例えば、ヒト化抗体）をスクリーニングすることからなるステップ(f)をさらに含んでいてよい。

【0051】

本発明は、抗原と免疫特異的に結合するヒト化抗体を作製する方法を提供し、前記方法は、

- (a) 軽鎖フレームワーク領域のサブバンクを作製すること、
- (b) 重鎖フレームワーク領域のサブバンクを作製すること、
- (c) (i)重鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより作製された、ヒト化重鎖可変領域をコードする第1のヌクレオチド配列、および(ii)軽鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより作製された、ヒト化軽鎖可変領域をコードする第2のヌクレオチド配列を含む核酸配列を合成することであり、重鎖可変領域CDRはドナー抗体の重鎖可変領域に由来し、少なくとも1つの軽鎖可変領域CDRは抗原と免疫特異的に結合するドナー抗体に由来の軽鎖CDRのサブバンクから得られ、少なくとも1つの重鎖フレームワーク領域はヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られ、そして少なくとも1つの軽鎖フレームワーク領域はヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られたものであること、
- (d) 前記核酸配列を細胞に導入すること、
- (e) ヒト化重鎖可変領域とヒト化軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を発現させること、

を含んでなる。この実施形態によれば、前記方法は前記抗原と免疫特異的に結合する抗体（例えば、ヒト化抗体）をスクリーニングすることからなるステップ(f)をさらに含んでいてよい。

【0052】

別の実施形態において、本発明は、抗原と免疫特異的に結合する抗体（例えば、ヒト化抗体）を作製する方法を提供し、前記方法は、

- (a) 軽鎖フレームワーク領域のサブバンクを作製すること、
- (b) 重鎖フレームワーク領域のサブバンクを作製すること、
- (c) (i)重鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより作製された、重鎖可変領域（例えば、ヒト化重鎖可変領域）をコードする第1のヌクレオチド配列、および(ii)軽鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより作製された、軽鎖可変領域（例えば、ヒト化軽鎖可変領域）をコードする第2のヌクレオチド配列を含む核酸配列を合成することであり、少なくとも1つの重鎖可変領域CDRはドナー抗体（例えば、非ヒトドナー抗体）由来の重鎖CDRのサブバンクから得られ、少なくとも1つの軽鎖可変領域CDRはドナー抗体（例えば、非ヒトドナー抗体）由来の軽鎖CDRのサブバンクから得られ、少なくとも1つの重鎖フレームワーク領域は重鎖フレームワーク領域のサブバンク（例えば、ヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られ、そして少なくとも1つの軽鎖フレームワーク領域は軽鎖フレームワーク領域のサブバンク（例え

ば、ヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンク) から得られたものであること、
(d) 前記核酸配列を細胞に導入すること、
(e) 重鎖可変領域 (例えば、ヒト化重鎖可変領域) と軽鎖可変領域 (例えば、ヒト化軽鎖可変領域) をコードするヌクレオチド配列を発現させること、
を含んでなる。この実施形態によれば、前記方法は前記抗原と免疫特異的に結合する抗体 (例えば、ヒト化抗体) をスクリーニングすることからなるステップ(f)をさらに含んでいてよい。

【0053】

本発明はさらに、ドナー抗体と比較して改善および／または改変された特性をもつ抗体を作製する、本明細書に記載の方法の使用を包含する。本明細書に記載の方法により改善
10
できる抗体の特性としては、限定されるものでないが、結合特性 (例えば、 K_a 、 K_d 、 K_{on} 、 K_{off} などの抗体-抗原結合定数)、in vivo (例えば、血清半減期) および／または in vitro (例えば、有効期間) での抗体安定性、抗体の融点 (T_m) (例えば、示差走査熱量測定 (DSC) または他の当技術分野で公知の方法により測定した)、抗体の pI (例えば、等電点電気泳動 (IEF) または他の当技術分野で公知の方法で測定した)、抗体溶解度 (例えば、製薬上許容される担体、希釈剤または賦形剤中の溶解度)、エフェクター機能 (例えば、抗体依存性細胞傷害活性 (ADCC)) および産生レベル (例えば、細胞からの抗体の収率) が挙げられる。一実施形態においては、前記抗体の特性の1つ以上は、ドナー抗体と比較して、少なくとも1%、または少なくとも5%、または少なくとも10%、または少なくとも20%、または少なくとも30%、または少なくとも40%、または少なくとも50%、または少なくとも60%、または少なくとも70%、または少なくとも80%、または少なくとも90%、または少なくとも100%、または少なくとも150%、または少なくとも200%、または少なくとも500%だけ改善および／または改変される。別の実施形態においては、特性
20
の1つ以上は、ドナー抗体と比較して、少なくとも2倍だけ、または少なくとも3倍だけ、または少なくとも5倍だけ、または少なくとも10倍だけ、または少なくとも20倍だけ、または少なくとも50倍だけ、または少なくとも100倍だけ、または少なくとも200倍だけ、または少なくとも500倍だけ、または少なくとも1000倍だけ改善および／または改変される。これらの実施形態によれば、本明細書に記載の方法はさらに、所望の改善された特性を有する抗体 (例えば、ヒト化抗体) をスクリーニングするステップを含んでなる。

【0054】

本発明は、本明細書に記載する方法により作製された抗体を提供する。一実施形態では、本発明は、本明細書に記載する方法により作製されたヒト化抗体を提供する。本発明はまた、本明細書に記載する方法により作製された抗体、および担体、希釈剤または賦形剤を含有する組成物を提供する。別の実施形態では、本発明は、本明細書に記載の方法により作製されたヒト化抗体、および担体、希釈剤または賦形剤を含有する組成物を提供する。好ましくは、本発明の組成物はその意図した用途に適する剤形の医薬組成物である。

【0055】

本発明は、重鎖可変領域 (例えば、ヒト化重鎖可変領域) をコードするヌクレオチド配列を含む複数の核酸配列を提供し、前記重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列は、それぞれ、重鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸
40
配列、重鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより作製されたものであり、前記CDRはドナー抗体の重鎖可変領域 (例えば、非ヒト化ドナー抗体の重鎖可変領域) に由来し、少なくとも1つの重鎖フレームワーク領域は重鎖フレームワーク領域のサブバンク (例えば、ヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンク) から得られるものである。本発明はまた、重鎖可変領域 (例えば、ヒト化重鎖可変領域) をコードするヌクレオチド配列を含む複数の核酸配列を提供し、前記重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列は、それぞれ、重鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコー
50

ドする核酸配列、重鎖フレームワーク領域 3 をコードする核酸配列、重鎖 CDR3 をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域 4 をコードする核酸配列を同時に融合することにより作製されたものであり、少なくとも 1 つの CDR はドナー抗体（例えば、非ヒト化ドナー抗体）由来の重鎖 CDR のサブバンクから得られ、少なくとも 1 つの重鎖フレームワーク領域は重鎖フレームワーク領域のサブバンク（例えば、ヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られるものである。

【0056】

本発明は、軽鎖可変領域（例えば、ヒト化軽鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を含む複数の核酸配列を提供し、前記軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列は、それぞれ、軽鎖フレームワーク領域 1 をコードする核酸配列、軽鎖 CDR1 をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域 2 をコードする核酸配列、軽鎖 CDR2 をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域 3 をコードする核酸配列、軽鎖 CDR3 をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域 4 をコードする核酸配列を同時に融合することにより作製されたものであり、前記 CDR はドナー抗体の軽鎖可変領域（例えば、非ヒト化ドナー抗体の軽鎖可変領域）に由来し、少なくとも 1 つの軽鎖フレームワーク領域は軽鎖フレームワーク領域のサブバンク（例えば、ヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られるものである。本発明はまた、軽鎖可変領域（例えば、ヒト化軽鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を含む複数の核酸配列を提供し、前記軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列は、それぞれ、軽鎖フレームワーク領域 1 をコードする核酸配列、軽鎖 CDR1 をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域 2 をコードする核酸配列、軽鎖 CDR2 をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域 3 をコードする核酸配列、軽鎖 CDR3 をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域 4 をコードする核酸配列を同時に融合することにより作製されたものであり、少なくとも 1 つの CDR はドナー抗体（例えば、非ヒト化ドナー抗体）由来の軽鎖 CDR のサブバンクから得られ、少なくとも 1 つの軽鎖フレームワーク領域は軽鎖フレームワーク領域のサブバンク（例えば、ヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られるものである。

【0057】

本発明は、(i) 重鎖フレームワーク領域 1 をコードする核酸配列、重鎖 CDR1 をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域 2 をコードする核酸配列、重鎖 CDR2 をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域 3 をコードする核酸配列、重鎖 CDR3 をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域 4 をコードする核酸配列を同時に融合することによりそれぞれ作製された、重鎖可変領域（例えば、ヒト化重鎖可変領域）をコードする第 1 セットのヌクレオチド配列、および(ii) 軽鎖フレームワーク領域 1 をコードする核酸配列、軽鎖 CDR1 をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域 2 をコードする核酸配列、軽鎖 CDR2 をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域 3 をコードする核酸配列、軽鎖 CDR3 をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域 4 をコードする核酸配列を同時に融合することによりそれぞれ作製された、軽鎖可変領域（例えば、ヒト化軽鎖可変領域）をコードする第 2 セットのヌクレオチド配列、を含む複数の核酸配列を提供し、重鎖可変領域 CDR はドナー抗体の重鎖可変領域（例えば、非ヒトドナー抗体の重鎖可変領域）に由来し、軽鎖可変領域 CDR はドナー抗体の軽鎖可変領域（例えば、非ヒトドナー抗体の軽鎖可変領域）に由来し、少なくとも 1 つの重鎖フレームワーク領域は重鎖フレームワーク領域のサブバンク（例えば、ヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られ、そして少なくとも 1 つの軽鎖フレームワーク領域は軽鎖フレームワーク領域のサブバンク（例えば、ヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られるものである。

【0058】

本発明は、(i) 重鎖フレームワーク領域 1 をコードする核酸配列、重鎖 CDR1 をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域 2 をコードする核酸配列、重鎖 CDR2 をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域 3 をコードする核酸配列、重鎖 CDR3 をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域 4 をコードする核酸配列を同時に融合することによりそれぞれ作製された、重鎖可変領域（例えば、ヒト化重鎖可変領域）をコードする第 1 セ

10

20

30

40

50

ットのヌクレオチド配列、および(ii)軽鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することによりそれぞれ作製された、軽鎖可変領域(例えば、ヒト化軽鎖可変領域)をコードする第2セットのヌクレオチド配列、を含む複数の核酸配列を提供し、少なくとも1つの重鎖可変領域CDRはドナー抗体(例えば、非ヒトドナー抗体)由来の重鎖CDRのサブバンクから得られ、軽鎖可変領域CDRはドナー抗体の軽鎖可変領域(例えば、非ヒトドナー抗体の軽鎖可変領域)に由来し、少なくとも1つの重鎖フレームワーク領域は重鎖フレームワーク領域のサブバンク(例えば、ヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンク)から得られ、そして少なくとも1つの軽鎖フレームワーク領域は軽鎖フレームワーク領域のサブバンク(例えば、ヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンク)から得られるものである。

10

【0059】

本発明は、(i)重鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することによりそれぞれ作製された、重鎖可変領域(例えば、ヒト化重鎖可変領域)をコードする第1セットのヌクレオチド配列、および(ii)軽鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することによりそれぞれ作製された、軽鎖可変領域(例えば、ヒト化軽鎖可変領域)をコードする第2セットのヌクレオチド配列、を含む複数の核酸配列を提供し、重鎖可変領域CDRはドナー抗体の重鎖可変領域(例えば、非ヒトドナー抗体の重鎖可変領域)に由来し、少なくとも1つの軽鎖可変領域CDRはドナー抗体(例えば、非ヒトドナー抗体)由来の軽鎖CDRのサブバンクから得られ、少なくとも1つの重鎖フレームワーク領域は重鎖フレームワーク領域のサブバンク(例えば、ヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンク)から得られ、そして少なくとも1つの軽鎖フレームワーク領域は軽鎖フレームワーク領域のサブバンク(例えば、ヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンク)から得られるものである。

20

30

【0060】

本発明は、(i)重鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することによりそれぞれ作製された、重鎖可変領域(例えば、ヒト化重鎖可変領域)をコードする第1セットのヌクレオチド配列、および(ii)軽鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することによりそれぞれ作製された、軽鎖可変領域(例えば、ヒト化軽鎖可変領域)をコードする第2セットのヌクレオチド配列、を含む複数の核酸配列を提供し、少なくとも1つの重鎖可変領域CDRはドナー抗体(例えば、非ヒトドナー抗体)由来の重鎖CDRのサブバンクから得られ、少なくとも1つの軽鎖可変領域CDRはドナー抗体(例えば、非ヒトドナー抗体)由来の軽鎖CDRのサブバンクから得られ、少なくとも1つの重鎖フレームワーク領域は重鎖フレームワーク領域のサブバンク(例えば、ヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンク)から得られ、そして少なくとも1つの軽鎖フレームワーク領域は軽鎖フレームワーク領域のサブバンク(例えば、ヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンク)から

40

50

得られるものである。

【0061】

本発明は、本明細書に記載する核酸配列を含有する細胞の集団を提供する。ある実施形態では、本発明は、複数の重鎖可変領域（例えば、ヒト化重鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を含有する細胞の集団を提供し、前記細胞は、重鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することによりそれぞれ合成された、重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を細胞に導入することを含む方法により作製されたものであり、前記CDRはドナー抗体の重鎖可変領域（例えば、非ヒトドナー抗体の重鎖可変領域）に由来し、少なくとも1つの重鎖フレームワーク領域は重鎖フレームワーク領域のサブバンク（例えば、ヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られるものである。この実施形態によれば、前記細胞は軽鎖可変領域（例えば、ヒト化またはヒト軽鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列をさらに含んでいてもよい。

10

【0062】

別の実施形態において、本発明は、複数の重鎖可変領域（例えば、ヒト化重鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を含有する細胞の集団を提供し、前記細胞は、重鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することによりそれぞれ合成された、重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を細胞に導入することを含む方法により作製されたものであり、少なくとも1つのCDRはドナー抗体（例えば、非ヒトドナー抗体）に由来の重鎖CDRのサブバンクから得られ、少なくとも1つの重鎖フレームワーク領域は重鎖フレームワーク領域のサブバンク（例えば、ヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られるものである。この実施形態によれば、前記細胞は軽鎖可変領域（例えば、ヒト化またはヒト軽鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列をさらに含んでいてもよい。

20

30

【0063】

別の実施形態において、本発明は、複数の軽鎖可変領域（例えば、ヒト化軽鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を含有する細胞の集団を提供し、前記細胞は、軽鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することによりそれぞれ合成された、軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を細胞に導入することを含む方法により作製されたものであり、前記CDRはドナー抗体の軽鎖可変領域（例えば、非ヒトドナー抗体の軽鎖可変領域）に由来し、少なくとも1つの軽鎖フレームワーク領域は軽鎖フレームワーク領域のサブバンク（例えば、ヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られるものである。この実施形態によれば、前記細胞は重鎖可変領域（例えば、ヒト化またはヒト重鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列をさらに含んでいてもよい。

40

【0064】

別の実施形態において、本発明は、複数の軽鎖可変領域（例えば、ヒト化軽鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を含有する細胞の集団を提供し、前記細胞は、軽鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および

50

軽鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することによりそれぞれ合成された、軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を細胞に導入することを含む方法により作製されたものであり、少なくとも1つのCDRはドナー抗体（例えば、非ヒトドナー抗体）に由来の軽鎖CDRのサブバンクから得られ、少なくとも1つの軽鎖フレームワーク領域は軽鎖フレームワーク領域のサブバンク（例えば、ヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られるものである。この実施形態によれば、前記細胞は重鎖可変領域（例えば、ヒト化またはヒト重鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列をさらに含んでいてもよい。

【0065】

別の実施形態において、本発明は、複数の重鎖可変領域（例えば、ヒト化重鎖可変領域）および複数の軽鎖可変領域（例えば、ヒト化軽鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を含有する細胞の集団を提供し、前記細胞はそれぞれ、(i)重鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することによりそれぞれ合成された、重鎖可変領域をコードする第1セットのヌクレオチド配列、および(ii)軽鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することによりそれぞれ合成された、軽鎖可変領域をコードする第2セットのヌクレオチド配列、を含む核酸配列を細胞に導入することを含む方法により作製されたものであり、重鎖可変領域CDRはドナー抗体の重鎖可変領域（例えば、非ヒトドナー抗体の重鎖可変領域）に由来し、軽鎖可変領域CDRはドナー抗体の軽鎖可変領域（例えば、非ヒトドナー抗体の軽鎖可変領域）に由来し、少なくとも1つの重鎖フレームワーク領域は重鎖フレームワーク領域のサブバンク（例えば、ヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られ、そして少なくとも1つの軽鎖フレームワーク領域は軽鎖フレームワーク領域のサブバンク（例えば、ヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られるものである。

【0066】

別の実施形態において、本発明は、複数の重鎖可変領域（例えば、ヒト化重鎖可変領域）および複数の軽鎖可変領域（例えば、ヒト化軽鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を含有する細胞の集団を提供し、前記細胞はそれぞれ、(i)重鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することによりそれぞれ合成された、重鎖可変領域をコードする第1セットのヌクレオチド配列、および(ii)軽鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することによりそれぞれ合成された、軽鎖可変領域をコードする第2セットのヌクレオチド配列、を含む核酸配列を細胞に導入することを含む方法により作製されたものであり、少なくとも1つの重鎖可変領域CDRはドナー抗体（例えば、非ヒトドナー抗体）に由来の重鎖CDRのサブバンクから得られ、軽鎖可変領域CDRはドナー抗体の軽鎖可変領域（例えば、非ヒトドナー抗体の軽鎖可変領域）に由来し、少なくとも1つの重鎖フレームワーク領域は重鎖フレームワーク領域のサブバンク（例えば、ヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られ、そして少なくとも1つの軽鎖フレームワーク領域は軽鎖フレームワーク領域のサブバンク（例えば、ヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られるものである。

【0067】

別の実施形態において、本発明は、複数の重鎖可変領域（例えば、ヒト化重鎖可変領域）および複数の軽鎖可変領域（例えば、ヒト化軽鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を含有する細胞の集団を提供し、前記細胞はそれぞれ、(i)重鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することによりそれぞれ合成された、重鎖可変領域をコードする第1セットのヌクレオチド配列、および(ii)軽鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することによりそれぞれ合成された、軽鎖可変領域をコードする第2セットのヌクレオチド配列、を含む核酸配列を細胞に導入することを含む方法により作製されたものであり、重鎖可変領域CDRはドナー抗体の重鎖可変領域（例えば、非ヒトドナー抗体の重鎖可変領域）に由来し、少なくとも1つの軽鎖可変領域CDRはドナー抗体（例えば、非ヒトドナー抗体）に由来の軽鎖CDRのサブバンクから得られ、少なくとも1つの重鎖フレームワーク領域は重鎖フレームワーク領域のサブバンク（例えば、ヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られ、そして少なくとも1つの軽鎖フレームワーク領域は軽鎖フレームワーク領域のサブバンク（例えば、ヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られるものである。

10

20

【0068】

別の実施形態において、本発明は、複数の重鎖可変領域（例えば、ヒト化重鎖可変領域）および複数の軽鎖可変領域（例えば、ヒト化軽鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を含有する細胞の集団を提供し、前記細胞はそれぞれ、(i)重鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することによりそれぞれ合成された、重鎖可変領域をコードする第1セットのヌクレオチド配列、および(ii)軽鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することによりそれぞれ合成された、軽鎖可変領域をコードする第2セットのヌクレオチド配列、を含む核酸配列を細胞に導入することを含む方法により作製されたものであり、少なくとも1つの重鎖可変領域CDRはドナー抗体（例えば、非ヒトドナー抗体）に由来の重鎖CDRのサブバンクから得られ、少なくとも1つの軽鎖可変領域CDRはドナー抗体（例えば、非ヒトドナー抗体）に由来の軽鎖CDRのサブバンクから得られ、少なくとも1つの重鎖フレームワーク領域は重鎖フレームワーク領域のサブバンク（例えば、ヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られ、そして少なくとも1つの軽鎖フレームワーク領域は軽鎖フレームワーク領域のサブバンク（例えば、ヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られるものである。

30

40

【0069】

本発明は、抗原と免疫特異的に結合する抗体を同定する方法を提供し、前記方法は、本明細書に記載するように細胞において前記核酸配列を発現させ、抗原に対して少なくとも $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ 、少なくとも $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ 、少なくとも $1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ 、少なくとも $1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 、少なくとも $1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ またはそれ以上の親和性を有する抗体についてスクリーニングすることを含んでなる。特定の実施形態では、本発明は、抗原と免疫特異的に結合するヒト化抗体を同定する方法を提供し、前記方法は、本明細書に記載するように細胞において前記核酸配列を発現させ、抗原に対して少なくとも $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ 、少なくとも $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$

50

、少なくとも $1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ 、少なくとも $1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 、少なくとも $1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ またはそれ以上の親和性を有するヒト化抗体についてスクリーニングすることを含んでなる。本発明は本明細書に記載する方法によって同定された抗体を提供する。好ましい実施形態では、本発明は本明細書に記載する方法によって同定されたヒト化抗体を提供する。

【0070】

本発明によれば、本明細書に記載のように作製された抗体（例えば、ヒト化抗体）は軽鎖可変領域および／または重鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のように作製された抗体はさらに定常領域を含む。

【0071】

本発明は、ある成分（例えば、治療剤または薬物）に結合または融合させた本発明による抗体（例えば、ヒト化抗体）を提供する。本発明はまた、本発明に従って作製および／または同定された抗体、および担体、希釈剤または賦形剤を含有する組成物（例えば、医薬組成物）を提供する。ある特定の実施形態では、本発明は、本明細書に記載するヒト化抗体および担体、希釈剤または賦形剤を含有する組成物（例えば、医薬組成物）を提供する。本発明はまた、ある成分（例えば、治療剤または薬物）に結合または融合させた本発明に従って作製および／または同定された抗体、および担体、希釈剤または賦形剤を含有する組成物（例えば、医薬組成物）を提供する。ある特定の別の実施形態では、本発明は、ある成分（例えば、治療剤または薬物）に結合または融合させたヒト化抗体（またはそのフラグメント）、および担体、希釈剤または賦形剤を含有する組成物を提供する。本発明はさらに、疾患またはその症状を予防、治療、管理または軽減するための、本発明に従って作製および／または同定された抗体（例えば、ヒト化抗体）の単独または他の治療薬との組合せでの使用を提供する。

【0072】

本発明の医薬組成物は、疾患またはその1以上の症状の予防、管理、治療または軽減のために使用することができる。一実施形態において、本発明の医薬組成物は無菌であり、患者に投与する特定の方法に適した形態をしている。別の実施形態において、本発明の医薬組成物は実質的に内毒素を含まない。

【0073】

本発明はさらに、本発明の方法に従って作製および／または同定された1種以上の抗体（例えば、1種以上のヒト化抗体）を利用して、疾患を検出する、診断する、および／または疾患の進行をモニタリングする方法を提供する。

【0074】

本発明は、目的の生物種の抗体フレームワーク領域のサブバンクを含んでなるキットを提供する。本発明はまた、目的の生物種のCDRのサブバンクを含んでなるキットを提供する。本発明はまた、1つの対応するCDR（例えば、CDR1）にインフレームで融合された1つのフレームワーク領域（例えば、FR1）を含有するヌクレオチド配列を含む核酸のコンビナトリアルサブライブラリーを含んでなるキットを提供する。本発明はさらに、例えばFR1+CDR1+FR2+CDR2+FR3+CDR3+FR4のように、インフレームで融合された可変重鎖領域または可変軽鎖領域のフレームワーク領域とCDRを含有するヌクレオチド配列を含む核酸のコンビナトリアルライブラリーを含んでなるキットを提供する。

【0075】

いくつかの実施形態において、本発明は、ヒト免疫グロブリンフレームワーク領域のサブバンク、CDRのサブバンク、コンビナトリアルサブライブラリー、および／またはコンビナトリアルライブラリーを含んでなるキットを提供する。ある実施形態では、本発明は、可変軽鎖フレームワーク領域1、2、3および／または4（フレームワーク領域はKabatシステムに従って定義される）のフレームワーク領域サブバンクを含んでなるキットを提供する。別の実施形態では、本発明は、可変軽鎖フレームワーク領域1、2、3および／または4（フレームワーク領域はChothiaシステムに従って定義される）のフレームワーク領域サブバンクを含んでなるキットを提供する。別の実施形態では、本発明は、可変重鎖フレームワーク領域1、2、3および／または4（フレームワーク領域はKabatシス

テムに従って定義される)のフレームワーク領域サブバンクを含んでなるキットを提供する。別の実施形態では、本発明は、可変重鎖フレームワーク領域1、2、3および/または4(フレームワーク領域はChothiaシステムに従って定義される)のフレームワーク領域サブバンクを含んでなるキットを提供する。さらに別の実施形態では、本発明は、可変軽鎖フレームワーク領域と可変重鎖フレームワーク領域の両方のサブバンクを含んでなるキットを提供する。

【0076】

本発明はまた、本発明のヒト化抗体を含む1つ以上の容器を含んでなる医薬パックまたはキットを提供する。医薬パックまたはキットは、特定の疾患またはその症状の予防、治療、管理または軽減に有用な1種以上の他の予防薬もしくは治療薬をさらに含んでいてもよい。本発明はまた、本発明の医薬組成物の1種以上の成分を含む1つ以上の容器を含んでなる医薬パックまたはキットを提供する。場合により、そのような容器は、医薬品または生物学的製品の製造、使用または販売を取り締まる政府機関によって定められた形の通知書を伴っていてもよく、その通知書はヒトへの投与のために製造、使用または販売することの政府機関による承認を反映するものである。

【0077】

本発明はまた、製造物品を提供する。

【0078】

3.1 技術用語

本明細書で使用される「アクセプター」および「アクセプター抗体」という用語は、1以上のフレームワーク領域のアミノ酸配列の、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、または少なくとも95%を与える、もしくはコードする、抗体または核酸配列を示す。いくつかの実施形態において、「アクセプター」という用語は、定常領域を与える、もしくはコードする、抗体または核酸配列を指す。特定の実施形態において、「アクセプター」という用語は、1以上のフレームワーク領域のアミノ酸配列の、少なくとも80%、または少なくとも85%、または少なくとも90%、または少なくとも95%を与える、もしくはコードする、ヒト抗体または核酸配列を指す。アクセプターフレームワーク領域および/またはアクセプター定常領域は、例えば、生殖系列抗体遺伝子、成熟抗体遺伝子、機能性抗体(例:当技術分野で知られている抗体、開発中の抗体、もしくは市販の抗体)に由来し、あるいはそれらから得ることができる。

【0079】

本明細書で使用される「抗体」という用語は、モノクローナル抗体、多特異性抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、ラクダ化抗体、キメラ抗体、一本鎖Fv(scFv)、一本鎖抗体、単ドメイン抗体、Fabフラグメント、F(ab)フラグメント、ジスルフィド結合Fv(dsFv)、抗イディオタイプ(抗Id)抗体、および前記のいずれかのエピトープ結合フラグメントを表す。詳細には、抗体は、免疫グロブリン分子、および免疫グロブリン分子の免疫学的に活性なフラグメント、すなわち抗原結合部位を含有する分子を包含する。免疫グロブリン分子は、いかなるタイプ(例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgAおよびIgY)、クラス(例えば、IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁およびIgA₂)、もしくはサブクラスのものであってもよい。

【0080】

典型的な抗体は、2つの軽鎖と組み合わされた2つの重鎖を含有する。全長の重鎖は約50 kDの大きさ(約446アミノ酸の長さ)であって、重鎖可変領域遺伝子(約116アミノ酸)および定常領域遺伝子によってコードされる。 α 、 γ (IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)、 δ 、 ϵ 、および μ 配列といった異なるアイソタイプの重鎖定常領域をコードする、異なる定常領域遺伝子が存在する。全長の軽鎖は約25kDの大きさ(約214アミノ酸の長さ)であって、軽鎖可変領域遺伝子(約110アミノ酸)および κ もしくは λ 定常領域遺伝子によってコードされる。軽鎖および/または重鎖の可変領域は抗原との結合を担っており、定常領域は抗体に特有のエフェクター機能を担う。

【0081】

本明細書で使用される「CDR」という用語は、抗体の可変配列内の相補性決定領域を指す。重鎖および軽鎖の可変領域のそれぞれに3つのCDRがあり、可変領域のそれぞれについてCDR1、CDR2およびCDR3と称される。これらのCDRの正確な境界は、異なるシステムに従ってそれぞれに定められている。Kabatにより記載された（Kabatら、Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, MD (1987)および(1991)) システムは、抗体のいずれの可変領域に対しても適用できる明白な残基ナンバリングシステムを与えるだけでなく、3つのCDRを定義する正確な残基の境界も提供する。これらのCDRはKabat CDRと称することができる。Chothiaおよび共同研究者ら（Chothia およびLesk, J. Mol. Biol. 196:901-917(1987)、ならびにChothiaら、Nature 342: 877-883 (1989)) は、Kabat CDR内の一定の小部分がアミノ酸配列レベルでは多大な多様性を有するにもかかわらず、ほとんど同一のペプチド主鎖立体構造をとることを見出した。こうした小部分はL1、L2およびL3、またはH1、H2およびH3と呼ばれ、「L」および「H」は軽鎖および重鎖領域をそれぞれ示す。これらの領域はChothia CDRと呼ばれ、これらはKabat CDRと部分的に重なる境界を有する。Kabat CDRと重複するCDRを定義する他の境界がPadlan (FASEB J. 9:133-139(1995)) およびMacCallum (J. Mol. Biol. 262(5): 732-45 (1996)) によって報告されている。さらに他のCDRの境界の定義が、厳密には前記システムの一つに従わないが、それでも、Kabat CDRと部分的に一致することが考えられる。ただしそうした境界の定義は、特定の残基もしくは残基群が、またはCDR全体であっても、抗原結合に有意な影響を与えないという予測もしくは実験結果を踏まえて、短縮、または延長される可能性がある。本明細書で使用方法は、前記システムのいずれかにしたがって定義されたCDRを用いることができるが、ただし、特定の実施形態はKabatまたはChothiaの定義によるCDRを使用する。

10

20

【0082】

本明細書で使用される場合、タンパク質性物質（例えば、抗体のような、タンパク質、ポリペプチドおよびペプチド）との関連での「誘導体」という用語は、アミノ酸残基の置換、欠失および／または付加によって変化したアミノ酸配列を含んでなるタンパク質性物質を表す。本明細書で使用される「誘導体」という用語はまた、タンパク質性物質に何らかの分子を共有結合することによって、修飾されたタンパク質性物質を指す。限定する意図はないが例を挙げると、抗体は、例えばグリコシル化、アセチル化、PEG化、リン酸化、アミド化、公知の保護基／ブロック基による誘導体化、タンパク質分解性切断、細胞リガンドもしくは他のタンパク質との結合などによって修飾することができる。タンパク質性物質の誘導体は、当業者に知られている技法を用いた化学修飾によって作製することができ、これには特異的な化学分解、アセチル化、ホルミル化、ツニカマイシンの代謝合成などを含めるがそれに限定されない。さらに、タンパク質性物質の誘導体は、1つまたは複数の非古典的アミノ酸を含有してもよい。タンパク質性物質の誘導体は、それが誘導される起源となったタンパク質性物質と同様もしくは同一の機能を有する。

30

【0083】

本明細書で使用される場合、「障害」および「疾患」という用語は、被験者の状態に対して相互交換可能に使用される。

【0084】

本明細書で使用される「ドナー抗体」という用語は、1以上のCDRを与える抗体を指す。特定の実施形態において、ドナー抗体は、フレームワーク領域の起源である抗体とは異なる生物種に由来する抗体である。ヒト化抗体との関連において、「ドナー抗体」という用語は、1以上のCDRを与える非ヒト抗体を指す。別の実施形態において、「ドナー抗体」はフレームワーク領域が由来するのと同じ生物種に由来してもよい。

40

【0085】

本明細書で使用される「有効な量」という用語は、疾患、または疾患の1以上の症状の、重症度および／または持続時間を軽減もしくは改善し、疾患の進行を妨げ、疾患の寛解をもたらす、疾患に伴う1以上の症状の再発、発生、発現もしくは進行を防ぎ、疾患を発見し、または別の治療（例えば、予防薬もしくは治療薬）の予防もしくは治療効果を増強

50

もしくは改善するのに十分な、治療のための量を指す。

【0086】

本明細書で使用される場合、「エピトープ」という用語は、動物において、好ましくは哺乳動物において、さらにもっとも好ましくはヒトにおいて、抗原性もしくは免疫原性を有する、ポリペプチドまたはタンパク質の断片を指す。免疫原性を有するエピトープは、動物において抗体応答を引き起こすポリペプチドもしくはタンパク質の断片である。抗原性を有するエピトープは、抗体が免疫特異的に結合するポリペプチドもしくはタンパク質の断片であって、当業者に周知の任意の方法によって、例えばイムノアッセイによって、測定される。抗原性エピトープは必ずしも免疫原性である必要はない。

【0087】

本明細書で使用される「融合タンパク質」という用語は、第1のタンパク質もしくはポリペプチドもしくは機能性断片、その類似体もしくは誘導体のアミノ酸配列と、異種タンパク質、ポリペプチドもしくはペプチド（すなわち、第1のタンパク質もしくは断片、その類似体もしくは誘導体とは異なる、第2のタンパク質もしくはポリペプチドもしくは断片、その類似体もしくは誘導体）のアミノ酸配列と、を含んでなるポリペプチドまたはタンパク質（抗体を含めるがそれに限定されない）を指す。ある実施形態において、融合タンパク質は、異種タンパク質、ポリペプチドもしくはペプチドと融合した予防薬または治療薬を含んでなる。この実施形態によれば、異種タンパク質、ポリペプチドもしくはペプチドは別のタイプの予防薬もしくは治療薬であってもよく、またはそうでなくてもよい。例えば、免疫調節性を有する2つの異なるタンパク質、ポリペプチドもしくはペプチドを融合させて1つの融合タンパク質を生成することができる。一実施形態において、融合タンパク質は、異種タンパク質、ポリペプチドもしくはペプチドと融合する前の元のタンパク質、ポリペプチドもしくはペプチドの活性に比べて向上した活性を保持する。

【0088】

本明細書で使用される「断片」という用語は、あるポリペプチドもしくはタンパク質のアミノ酸配列の、少なくとも5個連続するアミノ酸残基、少なくとも10個連続するアミノ酸残基、少なくとも15個連続するアミノ酸残基、少なくとも20個連続するアミノ酸残基、少なくとも25個連続するアミノ酸残基、少なくとも40個連続するアミノ酸残基、少なくとも50個連続するアミノ酸残基、少なくとも60個連続するアミノ酸残基、少なくとも70個連続するアミノ酸残基、少なくとも80個連続するアミノ酸残基、少なくとも90個連続するアミノ酸残基、少なくとも100個連続するアミノ酸残基、少なくとも125個連続するアミノ酸残基、少なくとも150個連続するアミノ酸残基、少なくとも175個連続するアミノ酸残基、少なくとも200個連続するアミノ酸残基、または少なくとも250個連続するアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含んでなる、もう一つのペプチドもしくはポリペプチド（抗体を含めるがそれに限定されない）を指す。特定の実施形態において、タンパク質もしくはポリペプチドの断片は、そのタンパク質もしくはポリペプチドの少なくとも1つの機能を保持している。

【0089】

本明細書で使用される「機能性断片」という用語は、第2の、別のポリペプチドもしくはタンパク質のアミノ酸配列の、少なくとも5個連続するアミノ酸残基、少なくとも10個連続するアミノ酸残基、少なくとも15個連続するアミノ酸残基、少なくとも20個連続するアミノ酸残基、少なくとも25個連続するアミノ酸残基、少なくとも40個連続するアミノ酸残基、少なくとも50個連続するアミノ酸残基、少なくとも60個連続するアミノ酸残基、少なくとも70個連続するアミノ酸残基、少なくとも80個連続するアミノ酸残基、少なくとも90個連続するアミノ酸残基、少なくとも100個連続するアミノ酸残基、少なくとも125個連続するアミノ酸残基、少なくとも150個連続するアミノ酸残基、少なくとも175個連続するアミノ酸残基、少なくとも200個連続するアミノ酸残基、または少なくとも250個連続するアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含んでなる、ペプチドもしくはポリペプチド（抗体を含めるがそれに限定されない）を指すが、この場合、前記のポリペプチドもしくはタンパク質は、第2の、別のポリペプチドもしくはタンパク質の少なくとも1つの機能を保持

する。特定の実施形態において、ポリペプチドもしくはタンパク質の断片は、そのタンパク質もしくはポリペプチドの機能を少なくとも2つ、3つ、4つ、または5つ保持する。特定の抗原と免疫特異的に結合する抗体の断片は、その抗原に免疫特異的に結合する能力を保持していることが好ましい。

【0090】

本明細書で使用される「フレームワーク」または「フレームワーク配列」という用語は、CDRを除いた可変領域の残りの配列を指す。CDR配列の正確な定義が、異なるシステムによって決定されるため、フレームワーク配列の意味するところもそれに相応して異なる解釈に従う。6個のCDR（軽鎖のCDR1、2および3、ならびに重鎖のCDR1、2および3）も、軽鎖および重鎖のフレームワーク領域をそれぞれ4つのサブ領域（FR1、FR2、FR3およびFR4）に分割するが、軽鎖と重鎖のそれぞれにおいてCDR1はFR1とFR2の間に位置し、CDR2はFR2とFR3の間、さらにCDR3はFR3およびFR4の間に位置する。FR1、FR2、FR3またはFR4のような特定のサブ領域を指定しないならば、フレームワーク領域は、一般に言及されるように、天然に存在する免疫グロブリン一本鎖の可変領域内のFRの組合せを表す。本明細書で使用される場合、FRは4つのサブ領域のうちの1つを表し、FRsはフレームワーク領域を構成する4つのサブ領域のうちの2つ以上を表す。一例として、表1～4はそれぞれ、κ軽鎖のFR1、2、3および4の生殖系列配列を記載する。表5～7はそれぞれ、Kabat定義による重鎖のFR1、2、および3の生殖系列配列を記載する。表8～10はそれぞれ、Chothia定義による重鎖のFR1、2、および3の生殖系列配列を記載する。表11は、重鎖のFR4の生殖系列配列を記載する。

10

20

【0091】

表1～65

表1～65に記載のそれぞれの配列の配列番号は、各表の第1列に示す。

【表 1】

表 1 軽鎖の FR1

1 GATGTTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTTGGACAGCCGGCCTCCATCTCCTGC
 2 GATGTTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTTGGACAGCCGGCCTCCATCTCCTGC
 3 GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCTGTCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGC
 4 GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGC
 5 GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCTGTCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGC
 6 GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCTCACCTGTACCCCTTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGC
 7 GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGC
 8 GAGATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCTTGTCTATCACCCCTGGAGAGCAGGCCCTCCATCTCCTGC
 9 GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCTCGCCTGTACCCCTTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTTC
 10 GAAATTGTGCTGACTCAGTCTCCAGACTTTCAGTCTGTGACTCCAAAGGAGAAAGTCACCATCACCTGC
 11 GATGTTGTGATGACACAGTCTCCAGCTTTCCTCTCTGTGACTCCAGGGGAGAAAGTCACCATCACCTGC
 12 GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGC
 13 GAAATTGTGCTGACTCAGTCTCCAGACTTTCAGTCTGTGACTCCAAAGGAGAAAGTCACCATCACCTGC
 14 GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGC
 15 GAAACGACACTCACGCAGTCTCCAGCATTATGTACGCGACTCCAGGAGACAAAGTCAACATCTCCTGC
 16 GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGT
 17 GCCATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGC
 18 GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGC
 19 AACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTGCCATGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGT
 20 GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGT
 21 GAAATAGTGATGATGACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGC
 22 GCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGC
 23 GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCTGTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGT
 24 GAAATAGTGATGACGAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGC
 25 GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGC
 26 GACATCCAGATGATCCAGTCTCCATCTTCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCAGTATCATTTGC
 27 GCCATCCGGATGACCCAGTCTCCATCTCCTCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGC
 28 GTCATCTGGATGACCCAGTCTCCATCCTTACTCTCTGCATCTACAGGAGACAGAGTCACCATCAGTTGT
 29 GCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGC
 30 GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGT
 31 GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGC
 32 GACATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTTCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGC
 33 GCCATCCGGATGACCCAGTCTCCATCCTCATTCTCTGCATCTACAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGT
 34 GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGC
 35 GACATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGC
 36 GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGC
 37 GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGC
 38 GACATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGC
 39 GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGC
 40 GAAATTGTAATGACACAGTCTCCACCACCCTGTCTTGTCTCCAGGGGAAAGAGTCACCCCTCTCCTGC
 41 GAAATTGTAATGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGC
 42 GAAATTGTGTTGACGAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGC
 43 GAAATTGTGTTGACGAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGC
 44 GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGGGCCACCATCAACTGC
 45 GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGC

46

GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGC

【表 2】

表 2 軽鎖の FR2

47 TGGTTTCAGCAGAGGCCAGGCCAATCTCCAAGGCGCCTAATTTAT
 48 TGGTTTCAGCAGAGGCCAGGCCAATCTCCAAGGCGCCTAATTTAT
 49 TGGTACCTGCAGAAAGCCAGGCCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTAT
 50 TGGTACCTGCAGAAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTAT
 51 TGGTACCTGCAGAAAGCCAGGCCAGCCTCCACAGCTCCTGATCTAT
 52 TGGCTTCAGCAGAGGCCAGGCCAGCCTCCAAGACTCCTAATTTAT
 53 TGGTACCTGCAGAAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTAT
 54 TGGTTTCTGCAGAAAGCCAGGCCAGTCTCCACACTCCTGATCTAT
 55 TGGCTTCAGCAGAGGCCAGGCCAGCCTCCAAGACTCCTAATTTAT
 56 TGGTACCAGCAGAAACCAGATCAGTCTCCAAAGCTCCTCATCAAG
 57 TGGTACCAGCAGAAACCAGATCAAGCCCCAAAGCTCCTCATCAAG
 58 TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGTTCCTAAGCTCCTGATCTAT
 59 TGGTACCAGCAGAAACCAGATCAGTCTCCAAAGCTCCTCATCAAG
 60 TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCGCCTGATCTAT
 61 TGGTACCAACAGAAACCAGGAGAAAGCTGCTATTTTCATTATTCAA
 62 TGGTTTCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGTCCCTGATCTAT
 63 TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTAT
 64 TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTAT
 65 TGGTTTCAGCAGAAACCAGGGAAAGTCCCTAAGCACCTGATCTAT
 66 TGGTATCAGCAGAAACCAGAGAAAGCCCCTAAGTCCCTGATCTAT
 67 TGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTAT
 68 TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCTCCTAAGCTCCTGATCTAT
 69 TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTAT
 70 TGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTAT
 71 TGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTAT
 72 TGGTATCTGCAGAAACCAGGGAAATCCCCTAAGCTCCTCCTCTAT
 73 TGGTATCAGCAAAAACCAGCAAAAGCCCCTAAGCTCCTCATCTAT
 74 TGGTATCAGCAAAAACCAGGGAAAGCCCCTGAGCTCCTGATCTAT
 75 TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCTCCTAAGCTCCTGATCTAT
 76 TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTAT
 77 TGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTAT
 78 TGGTATCAGCAAAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTAT
 79 TGGTATCAGCAAAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTAT
 80 TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTAT
 81 TGGTATCGGCAGAAACCAGGGAAAGTTCCTAAGCTCCTGATCTAT
 82 TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTAC
 83 TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTAT
 84 TGGTATCGGCAGAAACCAGGGAAAGTTCCTAAGCTCCTGATCTAT
 85 TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTAC
 86 TGGTATCAGCAGAAACCTGGCCAGGCGCCAGGCTCCTCATCTAT
 87 TGGTACCAGCAGAAACCTGGGCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTAT
 88 TGGTACCAGCAGAAACCTGGCCTGGCGCCAGGCTCCTCATCTAT
 89 TGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTAT
 90 TGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGCCTCCTAAGCTGCTCATTTAC
 91 TGGTACCTGCAGAAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTAT
 92 TGGTACCTGCAGAAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTAT

10

20

30

【表 3】

表 3 軽鎖の FR3

93	GGGGTCCCAGACAGATTTCAGCGGCAGTGGGTCAGGCACTGATTTCACTGAAAATCAGCAGGGTGGAGGCT	
	GAGGATGTTGGGGTTTATTACTGC	
94	GGGGTCCCAGACAGATTTCAGCGGCAGTGGGTCAGGCACTGATTTCACTGAAAATCAGCAGGGTGGAGGCT	
	GAGGATGTTGGGGTTTATTACTGC	
95	GGAGTGCCAGATAGGTTTCAGTGGCAGCGGGTCAGGGACAGATTTCACTGAAAATCAGCCGGGTGGAGGCT	
	GAGGATGTTGGGGTTTATTACTGA	10
96	GGGGTCCCTGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTTCACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCT	
	GAGGATGTTGGGGTTTATTACTGC	
97	GGAGTGCCAGATAGGTTTCAGTGGCAGCGGGTCAGGGACAGATTTCACTGAAAATCAGCCGGGTGGAGGCT	
	GAGGATGTTGGGGTTTATTACTGC	
98	GGGGTCCCAGACAGATTTCAGTGGCAGTGGGTCAGGGACAGATTTCACTGAAAATCAGCAGGGTGGAGGCT	
	GAGGATGTCGGGGTTTATTACTGC	
99	GGGGTCCCTGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTTCACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCT	
	GAGGATGTTGGGGTTTATTACTGC	
100	GGAGTGCCAGATAGGTTTCAGTGGCAGCGGGTCAGGGACAGATTTCACTGAAAATCAGCCGGGTGGAGGCT	
	GAGGATTTTGGAGTTTATTACTGC	20
101	GGGGTCCCAGACAGATTTCAGTGGCAGTGGGTCAGGGACAGATTTCACTGAAAATCAGCAGGGTGGAGGCT	
	GAGGATGTCGGGGTTTATTACTGC	
102	GGGGTCCCTCGAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCACCCTCACCATCAATAGCCTGGAAGCTG	
	AAGATGCTGCAACGTATTACTGT	
103	GGGGTCCCTCGAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTTACCATCAGTAGCCTGGAAGCTG	
	AAGATGCTGCAACATATTACTGT	
104	GGGGTCCCATCTCGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTG	
	AAGATGTTGCAACTTATTACTGT	
105	GGGGTCCCTCGAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCACCCTCACCATCAATAGCCTGGAAGCTG	
	AAGATGCTGCAACGTATTACTGT	30
106	GGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCCTCTCACAATCAGCAGCCTGCAGCCTG	
	AAGATTTTGCAACTTATTACTGT	
107	GGAATCCCACCTCGATTTCAGTGGCAGCGGGTATGGAACAGATTTTACCCTCACAATTAATAACATAGAATCTG	
	AGGATGCTGCATATTACTTCTGT	
108	GGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTG	
	AAGATTTTGCAACTTATTACTGC	
109	GGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGCACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTG	
	AAGATTTTGCAACTTATTACTGT	
110	GGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCCTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTG	
	ATGATTTTGCAACTTATTACTGC	40
111	GGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCCTCTCACAATCAGCAGCCTGCAGCCTG	
	AAGATTTTGCAACTTATTACTGT	
112	GGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTG	
	AAGATTTTGCAACTTATTACTGC	
113	GGCATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCCTGGGACAGAGTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGTCTG	
	AAGATTTTGCACTTTATTACTGT	

114
GGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTG
AAGATTTTGCAACTTATTACTGT
115
GGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACTATCAGCAGCCTGCAGCCTG
AAGATTTTGCAACTTACTATTGT
116
GGTATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGTCTG
AAGATTTTGCACTTTATTACTGT
117
GGCATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGCCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTG
AAGATTTTGCACTTTATTACTGT
118
GGGGTCTCATCGAGGTTTCAGTGGCAGGGGATCTGGGACGGATTTCACTCTCACCATCATCAGCCTGAAGCCTG
AAGATTTTGCACTTATTACTGT
119
GGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACGGATTACACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTG
AAGATTTTGCAACTTATTACTGT
120
GGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGTTGCCTGCAGTCTG
AAGATTTTGCAACTTATTACTGT
121
GGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTG
AAGATTTTGCAACTTATTACTGT
122
GGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTG
AAGATTTTGCAACTTACTATTGT
123
GGCATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTG
AAGATTTTGCACTTTATTACTGT
124
GGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCCTCTCACAATCAGCAGCCTGCAGCCTG
AAGATTTTGCAACTTATTACTGT
125
GGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCTGCCTGCAGTCTG
AAGATTTTGCAACTTATTACTGT
126
GGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTG
AAGATTTTGCAACTTACTACTGT
127
GGAGTCCCATCTCGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACTATCAGCAGCCTGCAGCCTG
AAGATGTTGCAACTTATTACGGT
128
GGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGAAAGTGGATCTGGGACAGATTTTACTTTTACCATCAGCAGCCTGCAGCCTG
AAGATATTGCAACATATTACTGT
129
GGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTG
AAGATTTTGCAACTTACTACTGT
130
GGAGTCCCATCTCGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACTATCAGCAGCCTGCAGCCTG
AAGATGTTGCAACTTATTACGGT
131
GGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGAAAGTGGATCTGGGACAGATTTTACTTTTACCATCAGCAGCCTGCAGCCTG
AAGATATTGCAACATATTACTGT
132
AGCATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTG
AAGATTTTGCACTTTATTACTGT
133
GGCATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTG
AAGATTTTGCACTTTATTACTGT
134
GGCATCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTG
AAGATTTTGCACTGTATTACTGT
135
GGCATCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTG
AAGATTTTGCACTGTATTACTGT

10

20

30

40

136
GGGGTCCCTGACCGATTTCAGTGGCAGCGGGTCTGGGACAGATTTCACCTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGGCTG
AAGATGTGGCAGTTTATTACTGT
137
GGAGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCAGGCACTGATTTCACACTGAAAATCAGCAGGGTGGAGGCT
GAGGATGTTGGAGTTTATTACTGC
138
GGAGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCAGGCACTGATTTCACACTGAAAATCAGCAGGGTGGAGGCT
GAGGATGTTGGAGTTTATTACTGC

【表 4】

表 4 軽鎖の FR4

10

139 TTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA
140 TTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA
141 TTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAA
142 TTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA
143 TTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAA

【表 5】

表 5 重鎖の FR1 (Kabat 定義)

144	CAGGTTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTTACC	
145	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACC	
146	CAGGTCCAGCTGGTACAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGTTTCCGGATACACCTCACT	10
147	CAGGTTTCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACC	
148	CAGATGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGACTGGGTCTCAGTGAAGGTTTCCTGCAAGGCTTCCGGATACACCTTCACC	
149	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTCCTGCAAGGCACTGGATACACCTTCACC	
150	CAAATGCAGCTGGTGCAGTCTGGGCCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGACCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATTCACCTTTACT	
151	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCAGC	20
152	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACC	
153	CAGGTCACCTTGAAGGAGTCTGGTCCTGTGCTGGTGAAACCCACAGAGACCCTCACGCTGACCTGCACCGTCTCTGGGTTCTCACTCAGC	
154	CAGATCACCTTGAAGGAGTCTGGTCCTACGCTGGTGAAACCCACACAGACCCTCACGCTGACCTGCACCTTCTCTGGGTTCTCACTCAGC	
155	CAGGTCACCTTGAGGGAGTCTGGTCCTGCGCTGGTGAAACCCACACAGACCCTCACACTGACCTGCACCTTCTCTGGGTTCTCACTCAGC	
156	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGT	30
157	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGT	
158	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTAAAGCCTGGGGGGTCCCTTAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGT	
159	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGT	
160	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACGGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTGAT	
161	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCAAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGT	40
162	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGC	
163	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGT	
164	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCACCTTCAGT	

165
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGATCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCT
CTGGATTACCTTCAGT

166
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTAGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCT
CTGGATTACCGTCAGT

167
GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGTCGTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCT
CTGGATTACCTTTGAT

168
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCT
CTGGATTACCTTCAGT

169
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCAGGGCGGTCCCTGAGACTCTCCTGTACAGCTT
CTGGATTACCTTTGGT

170
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGGCTTGATCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCT
CTGGGTTACCGTCAGT

171
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCT
CTGGATTACCTTCAGT

172
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGGCTTGATCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCT
CTGGGTTACCGTCAGT

173
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCT
CTGGATTACCTTTAGT

174
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCT
CTGGATTACCTTCAGT

175
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCT
CTGGGTTACCTTCAGT

176
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGGGGAGGCTTAGTTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCT
CTGGATTACCTTCAGT

177
GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCT
CTGGATTACCTTTGAT

178
CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGGGCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGACACCCTGTCCCTCACCTGCGCTGTCT
CTGGTTACTCCATCAGC

179
CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGGGCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTCACCTGTACTGTCT
CTGGTGGCTCCATCAGC

180
CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCGCTGTCT
ATGGTGGGTCTTCAGT

181
CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCCGGGGCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCT
CTGGTGGCTCCATCAGC

182
CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGGGCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCT
CTGGTGGCTCCATCAGT

183
CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGGGCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCT
CTGGTGGCTCCATCAGT

184
CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGGGCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCT
CTGGTGGCTCCGTACAGC

185
GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCCCGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGGT
TCTGGATACAGCTTTACC

186
CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGCAGACCCTCTCACTCACCTGTGCCATCT
CCGGGGACAGTGTCTCT

187
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCCATGAGGTGAAGCAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTT
CTGGTTACAGTTTACC

10

20

30

40

50

【表 6】

表 6 重鎖の FR2 (Kabat 定義)

188 TGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGA
 189 TGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGA
 190 TGGGTGCGACAGGCTCCTGGAAAAGGGCTTGAGTGGATGGGA
 191 TGGGTGCGCCAGGCCCGGACAAAGGGCTTGAGTGGATGGGA
 192 TGGGTGCGACAGGCCCGGACAAAGCGCTTGAGTGGATGGGA
 193 TGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGA
 194 TGGGTGCGACAGGCTCGTGGACAACGCCTTGAGTGGATAGGA
 195 TGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGA
 196 TGGGTGCGACAGGCCACTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGA
 197 TGGATCCGTCAGCCCCAGGGAAGGCCCTGGAGTGGCTTGCA
 198 TGGATCCGTCAGCCCCAGGAAAGGCCCTGGAGTGGCTTGCA
 199 TGGATCCGTCAGCCCCAGGGAAGGCCCTGGAGTGGCTTGCA
 200 TGGATCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTCA
 201 TGGGTCCGCCAAGCTACAGGAAAAGGTCTGGAGTGGGTCTCA
 202 TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGC
 203 TGGGCCCCGCAAGGCTCCAGGAAAGGGGCTGGAGTGGGTATCG
 204 TGGGTCCGCCAAGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCT
 205 TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCA
 206 TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCA
 207 TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCA
 208 TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCA
 209 TGGGTCCATCAGGCTCCAGGAAAGGGGCTGGAGTGGGTATCG
 210 TGGATCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCA
 211 TGGGTCCGTCAGCTCCGGGGAAGGGTCTGGAGTGGGTCTCT
 212 TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTCA
 213 TGGTTCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTAGGT
 214 TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCA
 215 TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGACTGGAATATGTTCA
 216 TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCA
 217 TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCC
 218 TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGC
 219 TGGGTCCGCCAGGCTTCCGGGAAAGGGCTGGAGTGGGTGGC
 220 TGGGTCCGCCAAGCTCCAGGGAAGGGGCTGGTGTGGGTCTCA
 221 TGGGTCCGCCAAGCTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGGTCTCA
 222 TGGATCCGGCAGCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGG
 223 TGGATCCGGCAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGG
 224 TGGATCCGGCAGCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGG
 225 TGGATCCGGCAGCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGG
 226 TGGATCCGGCAGCCCCGCCGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGG
 227 TGGATCCGGCAGCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGG
 228 TGGATCCGGCAGCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGG
 229 TGGGTGCGCCAGATGCCCGGGAAGGCCTGGAGTGGATGGGG
 230 TGGATCAGGCAGTCCCATCGAGAGGCCTTGAGTGGCTGGGA
 231 TGGGTGCCACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGA

10

20

30

【表 7】

表 7 重鎖の FR3 (Kabat 定義)

232	AGAGTCACCATGACCACAGACACATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCTGACGAC	
	ACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA	
233	AGGGTCACCATGACCAGGGACACGTCCATCAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGAC	
	ACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA	
234	AGAGTCACCATGACCGAGGACACATCTACAGACACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGAC	
	ACGGCCGTGTATTACTGTGCAACA	10
235	AGAGTCACCATGACCAGGGACACATCCGCGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGAC	
	ATGGCTGTGTATTACTGTGCGAGA	
236	AGAGTCACCATGACCAGGGACAGGTCTATGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGAC	
	ACAGCCATGTATTACTGTGCAAGA	
237	AGAGTCACCATGACCAGGGACACGTCCACGAGCACAGTCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGAC	
	ACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA	
238	AGAGTCACCATGACCAGGGACATGTCCACAAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCCGAGGAC	
	ACGGCCGTGTATTACTGTGCGGCA	
239	AGAGTCACGATTACCGCGGACAAAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGAC	
	ACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA	20
240	AGAGTCACCATGACCAGGAACACCTCCATAAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGAC	
	ACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA	
241	AGGCTCACCATCTCCAAGGACACCTCCAAAAGCCAGGTGGTCCTTACCATGACCAACATGGACCCTGTGGACA	
	CAGCCACATATTACTGTGCACGG	
242	AGGCTCACCATCACCAAGGACACCTCCAAAAACCAGGTGGTCCTTACAATGACCAACATGGACCCTGTGGAC	
	ACAGCCACATATTACTGTGCACAC	
243	AGGCTCACCATCTCCAAGGACACCTCCAAAAACCAGGTGGTCCTTACAATGACCAACATGGACCCTGTGGACA	
	CAGCCACGTATTATTGTGCACGG	
244	CGATTACCATCTCCAGGGACAACGCCAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGAC	
	ACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA	30
245	CGATTACCATCTCCAGAGAAAATGCCAAGAACTCCTTGTATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGGGGACA	
	CGGCTGTGTATTACTGTGCAAGA	
246	AGATTACCATCTCAAGAGATGATTCAAAAAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAAACCGAGGAC	
	ACAGCCGTGTATTACTGTACCACA	
247	CGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAGGAACCTCCCTGTATCTGCAAAGAAGACAGACGGAGAGCCGAGGAC	
	ATGGCTGTGTATTACTGTGTGAGA	
248	CGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCCGAGGAC	
	ACGGCCCTGTATCACTGTGCGAGA	
249	CGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGAC	
	ACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGA	40
250	CGGTTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGAC	
	ACGGCCGTATATTACTGTGCGAAA	
251	CGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGAC	
	ACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGA	
252	CGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGAC	
	ACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGA	

253
CGATTCATCATCTCCAGAGACAATTCCAGGAACACCCTGTATCTGCAAACGAATAGCCTGAGGGCCGAGGACA
CGGCTGTGTATTACTGTGTGAGA

254
AGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTTCAAATGAACAACCTGAGAGCTGAGGGCA
CGGCCGTGTATTACTGTGCCAGA

255
CGATTCACCATCTCCAGAGACAACAGCAAAAACTCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAACTGAGGAC
ACCGCCTTGTATTACTGTGCAAAA

256
CGATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGACGAGGAC
ACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGA

257
AGATTCACCATCTCAAGAGATGATTCCAAAAGCATCGCCTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAAACCGAGGAC 10
ACAGCCGTGTATTACTGTACTAGA

258
CGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACA
CGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA

259
AGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTTCAAATGGGCAGCCTGAGAGCTGAGGACA
TGGCTGTGTATTACTGTGCGAGA

260
CGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACA
CGGCTGTGTATTACTGTGCGAGA

261
CGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGAC
ACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGA

262
AGATTCACCATCTCAAGAGATGATTCAAAGAAGCTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAAACCGAGGAC 20
ACGGCCGTGTATTACTGTGCTAGA

263
AGGTTACCATCTCCAGAGATGATTCAAAGAACACGGCGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAAACCGAGGAC
ACGGCCGTGTATTACTGTACTAGA

264
CGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCCGAGGAC
ACGGCTGTGTATTACTGTGCAAGA

265
CGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGGACA
CGGCCTTGTATTACTGTGCAAAA

266
CGAGTCACCATGTCTAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGTGGACA 30
CGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA

267
CGAGTTACCATATCAGTAGACACGTCTAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACTGCCGCGGACA
CGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA

268
CGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGCGGACA
CGGCTGTGTATTACTGTGCGAGA

269
CGAGTCACCATATCCGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGCGAGACA
CGGCTGTGTATTACTGTGCGAGA

270
CGAGTCACCATGTCTAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGCGGACA
CGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA

271
CGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCTGCGGACA 40
CGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA

272
CGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCTGCGGACA
CGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA

273
CAGGTCACCATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTACCTGCAGTGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACA
CCGCCATGTATTACTGTGCGAGA

274
CGAATAACCATCAACCCAGACACATCCAAGAACCAGTTCTCCCTGCAGCTGAACTCTGTGACTCCCAGGAGACA
CGGCTGTGTATTACTGTGCAAGA

275
CGGTTTGTCTTCTCCATGGACACCTCTGCCAGCACAGCATACCTGCAGATCAGCAGCCTAAAGGCTGAGGACA
TGGCCATGTATTACTGTGCGAGA

10

20

30

40

50

【表 8】

表 8 重鎖の FR1 (Chothia 定義)

276	CAGGTTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTT	
CT		
277	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCT	
TCT		
278	CAGGTCCAGCTGGTACAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGTTT	
CC		10
279	CAGGTTTCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTCCTGCAAGGCTT	
CT		
280	CAGATGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGACTGGGTCCTCAGTGAAGGTTTCCTGCAAGGCTT	
CC		
281	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTCCTGCAAGGCA	
TCT		
282	CAAATGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGACCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTT	
CT		
283	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTT	
CT		20
284	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCT	
TCT		
285	CAGGTCACCTTGAAGGAGTCTGGTCCTGTGCTGGTGAAACCCACAGAGACCCTCACGCTGACCTGCACCGTCT	
CT		
286	CAGATCACCTTGAAGGAGTCTGGTCCTACGCTGGTGAAACCCACACAGACCCTCACGCTGACCTGCACCTTCT	
CT		
287	CAGGTCACCTTGAAGGAGTCTGGTCCTGCGCTGGTGAAACCCACACAGACCCTCACACTGACCTGCACCTTCT	
CT		
288	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCT	
CT		30
289	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCT	
CT		
290	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTAAAGCCTGGGGGGTCCCTTAGACTCTCCTGTGCAGCCT	
CT		
291	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCT	
CT		
292	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGTGTGGTACGGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCT	
CT		
293	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCCTGGTCAAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCT	
CT		40
294	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCT	
CT		
295	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCT	
CT		
296	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGT	
CT		

297
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGATCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCT
CT
298
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTAGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCT
CT
299
GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGTCGTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCT
CT
300
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCT
CT
301
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCAGGGCGGTCCCTGAGACTCTCCTGTACAGCTT 10
CT
302
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGGCTTGATCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCT
CT
303
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCT
CT
304
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGGCTTGATCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCT
CT
305
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCT
CT
306
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCT 20
CT
307
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCT
CT
308
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGGGGAGGCTTAGTTCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCT
CT
309
GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCT
CT
310
CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGACACCCTGTCCCTCACCTGCGCTGTCT 30
CT
311
CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTCACCTGTACTGTCT
CT
312
CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCGCTGTCT
AT
313
CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCT
CT
314
CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCT
CT
315
CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCT 40
CT
316
CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCT
CT
317
GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCCGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGGT
TCT
318
CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGCAGACCCTCTCACTCACCTGTGCCATCT
CC
319
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCCATGAGGTGAAGCAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTT
CT

【表 9】

表 9 重鎖の FR2 (Chothia 定義)

320 TATGGTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATC
 321 TACTATATGCACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATC
 322 TTATCCATGCACTGGGTGCGACAGGCTCCTGGAAAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGTTTT
 323 TATGCTATGCATTGGGTGCGCCAGGCCCCCGGACAAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGAGC
 324 CGCTACCTGCACTGGGTGCGACAGGCCCCCGGACAAAGCGCTTGAGTGGATGGGATGGATC
 325 TACTATATGCACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAATAATC
 326 TCTGCTATGCAGTGGGTGCGACAGGCTCGTGGACAACGCCTTGAGTGGATAGGATGGATC
 327 TATGCTATGCACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGGATC
 328 TATGATATCAACTGGGTGCGACAGGCCACTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATG
 329 ATGGGTGTGAGCTGGATCCGTCAGCCCCAGGGAAGGCCCTGGAGTGGCTTGACACATT
 330 GTGGGTGTGGGCTGGATCCGTCAGCCCCAGGGAAGGCCCTGGAGTGGCTTGCACTCATT
 331 ATGTGTGTGAGCTGGATCCGTCAGCCCCAGGGAAGGCCCTGGAGTGGCTTGCACTCATT
 332 TACTACATGAGCTGGATCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTTCATACATT
 333 TACGACATGCACTGGGTCCGCCAAGCTACAGGAAAAGGTCTGGAGTGGGTCTCAGCTATT
 334 GCCTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCGTATT
 335 AATGACATGAACTGGGCCCCGCAAGGCTCCAGGAAAGGGGCTGGAGTGGGTATCGGGTGT
 336 TATGGCATGAGCTGGGTCCGCCAAGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCTGGTATT
 337 TATAGCATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCATCCATT
 338 TATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATT
 339 TATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATA
 340 TATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATA
 341 AGTGACATGAACTGGGTCCATCAGGCTCCAGGAAAGGGGCTGGAGTGGGTATCGGGTGT
 342 AATGACATGAACTGGGTCCGCCAAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTATCGGGTGT
 343 TATACCATGCACTGGGTCCGTCAGGCTCCGGGGAAGGGTCTGGAGTGGGTCTCTCTATT
 344 TATAGCATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTCATACATT
 345 TATGCTATGAGCTGGTTCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTAGGTTTCATT
 346 AACTACATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGTTATT
 347 TATGCTATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGACTGGAATATGTTTCAGCTATT
 348 AACTACATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGTTATT
 349 TATTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAACATA
 350 CACTACATGGACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCGTACT
 351 TCTGCTATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCGGGGAAGGGCTGGAGTGGGTGGCCGTATT
 352 TACTGGATGCACTGGGTCCGCCAAGCTCCAGGGAAGGGGCTGGTGTGGGTCTCACGTATT
 353 TATGCCATGCACTGGGTCCGCCAAGCTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATT
 354 AACTGGTGGGGCTGGATCCGGCAGCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGTACATC
 355 TACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTACATC
 356 TACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGGAAATC
 357 TACTACTGGGGCTGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGAGTATC
 358 TACTACTGGAGCTGGATCCGGCAGCCCCCGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGCGTATC
 359 TACTACTGGAGCTGGATCCGGCAGCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGTATATC
 360 TACTACTGGAGCTGGATCCGGCAGCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGTATATC
 361 TACTGGATCGGCTGGGTGCGCCAGATGCCCGGGAAGGCCTGGAGTGGATGGGGATCATC
 362 GCTGCTTGAACTGGATCAGGCAGTCCCCATCGAGAGGCCTTGAGTGGCTGGGAAGGACA
 363 TATGGTATGAATTGGGTGCCACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGTTC

10

20

30

【表 10】

表 10 重鎖の FR3 (Chothia 定義)

364	ACAAACTATGCACAGAAGCTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGACACATCCACGAGCACAGCCTACATG	
	GAGCTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA	
365	ACAAACTATGCACAGAAGTTTCAGGGCAGGGTCACCATGACCAGGGACACGTCCATCAGCACAGCCTACATG	
	GAGCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA	
366	ACAACTTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCGAGGACACATCTACAGACACAGCCTACATG	
	GAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAACA	10
367	ACAAAATATTCACAGGAGTTCCAGGGCAGAGTCACCATTACCAGGGACACATCCGCGAGCACAGCCTACATG	
	GAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACATGGCTGTGTATTACTGTGCGAGA	
368	ACCAACTACGCACAGAAATTCAGGACAGAGTCACCATTACCAGGGACAGGTCTATGAGCACAGCCTACATG	
	GAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACAGCCATGTATTACTGTGCAAGA	
369	ACAAGCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCAGGGACACGTCCACGAGCACAGTCTACATG	
	GAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA	
370	ACAAACTACGCACAGAAGTTCCAGGAAAGAGTCACCATTACCAGGGACATGTCCACAAGCACAGCCTACATG	
	GAGCTGAGCAGCCTGAGATCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGGCA	
371	GCAAACTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTACATG	
	GAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA	20
372	ACAGGCTATGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCAGGAACACCTCCATAAGCACAGCCTACATG	
	GAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA	
373	AAATCCTACAGCACATCTCTGAAGAGCAGGCTCACCATCTCCAAGGACACCTCCAAAAGCCAGGTGGTCCTTA	
	CCATGACCAACATGGACCCTGTGGACACAGCCACATATTACTGTGCACGG	
374	AAGCGCTACAGCCCATCTCTGAAGAGCAGGCTCACCATCACCAAGGACACCTCCAAAAACCAGGTGGTCCTTA	
	CAATGACCAACATGGACCCTGTGGACACAGCCACATATTACTGTGCACAC	
375	AAATACTACAGCACATCTCTGAAGACCAGGCTCACCATCTCCAAGGACACCTCCAAAACCAGGTGGTCCTTA	
	CAATGACCAACATGGACCCTGTGGACACAGCCACGTATTATTGTGCACGG	
376	ATATACTACGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGGGACAACGCCAAGAACTCACTGTATCTGC	
	AAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA	30
377	ACATACTATCCAGGCTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGAAAATGCCAAGAACTCCTTGTATCTTC	
	AAATGAACAGCCTGAGAGCCGGGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCAAGA	
378	ACAGACTACGCTGCAECCGTGAAAGGCAGATTACCATCTCAAGAGATGATTCAAAAAACACGCTGTATCTGC	
	AAATGAACAGCCTGAAAACCGAGGACACAGCCGTGTATTACTGTACCACA	
379	ACGCACTATGTGGACTCCGTGAAGCGCCGATTATCATCTCCAGAGACAATTCCAGGAACTCCCTGTATCTGC	
	AAAAGAACAGACGGAGAGCCGAGGACATGGCTGTGTATTACTGTGTGAGA	
380	ACAGGTTATGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCCCTGTATCTGC	
	AAATGAACAGTCTGAGAGCCGAGGACACGGCCTTGTATCACTGTGCGAGA	
381	ATATACTACGCAGACTCAGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACTGTATCTGC	
	AAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGA	40
382	ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGTTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGC	
	AAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAA	
383	AAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGC	
	AAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGA	
384	AAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGC	
	AAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGA	

385
ACGCACTATGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTTCATCATCTCCAGAGACAATTCCAGGAACACCCTGTATCTGC
AAACGAATAGCCTGAGGGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGTGAGA
386
ACATACTACGCAGACTCCAGGAAGGGCAGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTTC
AAATGAACAACCTGAGAGCTGAGGGCACGGCCGTGTATTACTGTGCCAGA
387
ACATACTATGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTTCACCATCTCCAGAGACAACAGCAAAAACCTCCCTGTATCTGC
AAATGAACAGTCTGAGAACTGAGGACACCGCCTTGTATTACTGTGCAAAA
388
ATATACTACGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACTCACTGTATCTGC
AAATGAACAGCCTGAGAGACGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGA
389
ACAGAATACGCCGCGTCTGTGAAAGGCAGATTCACCATCTCAAGAGATGATTCCAAAAGCATCGCCTATCTGC
AAATGAACAGCCTGAAAACCGAGGACACAGCCGTGTATTACTGTACTAGA
390
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTTC
AAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA
391
ACATATTATGCAGACTCTGTGAAGGGCAGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTTC
AAATGGGCAGCCTGAGAGCTGAGGACATGGCTGTGTATTACTGTGCGAGA
392
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTTC
AAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGA
393
AAATACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACTGTATCTGC
AAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGA
394
ACAGAATACGCCGCGTCTGTGAAAGGCAGATTCACCATCTCAAGAGATGATTCAAAGAACTCACTGTATCTGC
AAATGAACAGCCTGAAAACCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCTAGA
395
ACAGCATATGCTGCGTCCGTGAAAGGCAGGTTTCACCATCTCCAGAGATGATTCAAAGAACACGGCGTATCTGC
AAATGAACAGCCTGAAAACCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTACTAGA
396
ACAAGCTACGCGGACTCCGTGAAGGGCCGATTTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGCTGTATCTG
CAAATGAACAGTCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCAAGA
397
ATAGGCTATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCCCTGTATCTGC
AAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGGACACGGCCCTTGTATTACTGTGCAAAA
398
ACCTACTACAACCCGTCCTCAAGAGTCGAGTCACCATGTGAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGA
AGCTGAGCTCTGTGACCGCCGTCGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA
399
ACCTACTACAACCCGTCCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCAGTAGACACGTCTAAGAACCAGTTCTCCCTGA
AGCTGAGCTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA
400
ACCAACTACAACCCGTCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGA
AGCTGAGCTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGA
401
ACCTACTACAACCCGTCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCCGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGA
AGCTGAGCTCTGTGACCGCCGACACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGA
402
ACCAACTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATGTGAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGA
AGCTGAGCTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA
403
ACCAACTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGA
AGCTGAGCTCTGTGACCGCTGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA
404
ACCAACTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGA
AGCTGAGCTCTGTGACCGCTGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA
405
ACCAGATACAGCCGTCCTTCCAAGGCCAGGTCACCATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTACCTGC
AGTGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCCATGTATTACTGTGCGAGA
406
AATGATTATGCAGTATCTGTGAAAAGTCGAATAACCATCAACCCAGACACATCCAAGAACCAGTTCTCCCTGC
AGCTGAACCTCTGTGACTCCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCAAGA
407
CCAACATATGCCAGGGCTTCACAGGACGGTTTGTCTTCTCCATGGACACCTCTGCCAGCACAGCATACTGC
AGATCAGCAGCCTAAAGGCTGAGGACATGGCCATGTATTACTGTGCGAGA

10

20

30

40

50

【表 1 1】

表 1 1 重鎖の FR4

```

408 TGGGGCCAGGGCACCCTGGTCACCGTCTCTCTCA
409 TGGGGCCGTGGCACCCTGGTCACCTGTCTCTCTCA
410 TGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTCTCA
411 TGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCTCTCA
412 TGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCTCTCA
413 TGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCTCTCA

```

【0 0 9 2】

10

本明細書で使用される「生殖系列抗体遺伝子」または「遺伝子断片」という用語は、特定の免疫グロブリンの発現のために遺伝子再構成および突然変異を招く成熟化プロセスを経ることのない、非リンパ系細胞によってコードされる免疫グロブリン配列を表す。（例えば、Shapiroら、Crit. Rev. Immunol. 22(3): 183-200 (2002); Marchalonisら、Adv. Exp. Med. Biol. 484: 13-30(2001)を参照されたい）。本発明のさまざまな実施形態によって与えられる利点の一つは、生殖系列抗体遺伝子が成熟抗体遺伝子よりも、その生物種において個体に特徴的な基本的アミノ酸配列構造を保存している可能性が高く、したがってその生物種において治療に使用する場合、外来起源由来として認識される可能性が低いという認識に由来する。

【0 0 9 3】

20

本明細書で使用される場合、「ヒト化抗体」という用語は、目的の抗原と免疫特異的に結合し、かつ実質的にヒト抗体のアミノ酸配列を有するフレームワーク（FR）領域と、実質的に非ヒト抗体のアミノ酸配列を有する相補性決定領域（CDR）とを含んでなる、抗体またはその変異体、誘導体、類似体もしくはフラグメントである。本明細書で使用される場合、CDRとの関連で「実質的に」という用語は、非ヒト抗体CDRのアミノ酸配列と、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を有するCDRを表す。ヒト化抗体は、少なくとも1つの、そして典型的には2つの可変ドメイン（Fab、Fab'、F(ab')₂、FabC、Fv）の実質的にすべてを含んでなるが、CDR領域のすべてまたは実質的にすべては、非ヒト免疫グロブリン（すなわちドナー抗体）のCDR領域に相当し、フレームワーク領域のすべてまたは実質的にすべては、ヒト免疫グロブリン配列のフレームワーク領域である。ある特定の実施形態において、ヒト化抗体は、免疫グロブリン定常領域（Fc）の少なくとも一部、典型的にはヒト免疫グロブリンの定常領域の一部も含んでなる。いくつかの実施形態において、ヒト化抗体は、軽鎖だけでなく、重鎖の少なくとも可変ドメインを含有する。ヒト化抗体はまた、重鎖のCH1、ヒンジ、CH2、CH3、およびCH4領域を包含してもよい。ある実施形態において、ヒト化抗体はヒト化軽鎖のみを含有する。ある実施形態において、ヒト化抗体はヒト化重鎖のみを含有する。特定の実施形態において、ヒト化抗体は、軽鎖のヒト化可変ドメイン、および／またはヒト化重鎖のみを含有する。

30

【0 0 9 4】

ヒト化抗体は、IgM、IgG、IgD、IgAおよびIgEを含むいかなる免疫グロブリンクラス、ならびにIgG1、IgG2、IgG3およびIgG4を含むがこれに限定されないいかなるアイソタイプからも、選択することができる。ヒト化抗体は、2つ以上のクラスもしくはアイソタイプからの配列を含んでいてもよく、特定の定常ドメインは、当業界でよく知られている技術を用いて、目的とするエフェクター機能を最適化するように選択することができる。

40

【0 0 9 5】

ヒト化抗体のフレームワークおよびCDR領域は、正確に親配列に一致する必要はなく、例えば、ドナー抗体CDRまたはアクセプターフレームワークは、少なくとも1つのアミノ酸残基の置換、挿入および／または欠失によって突然変異されていてもよく、その結果その部位のCDRまたはフレームワーク残基はドナー抗体にもアクセプターフレームワークにも一致しなくなる。しかしながら、このような突然変異は、広範囲にわたることはない。通

50

常、ヒト化抗体残基の少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%は、親のFRおよびCDR配列に一致する。

【0096】

本明細書で使用される「宿主細胞」という用語は、核酸分子でトランスフェクトされ、または形質転換された特定の対象細胞、およびそうした細胞の子孫もしくは潜在的な子孫を包含する。こうした細胞の子孫は、その後の世代において発生しうる、または核酸の宿主細胞ゲノムへの組み込みにおいて発生しうる突然変異または環境の影響のために、核酸分子でトランスフェクトされた親細胞と同一ではない可能性がある。

【0097】

本明細書で使用される場合、「抗原と免疫特異的に結合する」という表現および類似の表現は、ある抗原または断片には特異的に結合するが他の抗原には特異的に結合しない、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質（融合タンパク質および抗体を含めるが、それに限定されない）またはそれらのフラグメントを表す。抗原と免疫特異的に結合するペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質は、それより低い親和性で他の抗原と結合する可能性があり、例えばイムノアッセイ、BIAcore、または当技術分野で知られている他のアッセイ法によって測定される。抗原と免疫特異的に結合する抗体またはフラグメントは、関連抗原と交差反応性である可能性がある。ある抗原に免疫特異的に結合する抗体もしくはフラグメントは、他の抗原と交差反応しないことが好ましい。

【0098】

本明細書で使用される場合、タンパク質性物質（例えば、ペプチド、ポリペプチドまたは（融合タンパク質もしくは抗体といった）タンパク質）との関連において「単離された」という用語は、その物質の由来する細胞もしくは組織起源からの細胞性物質、もしくは混入タンパク質、ポリペプチド、ペプチドおよび抗体を実質的に含まない、または化学合成の場合には化学的前駆物質もしくは他の化学物質を実質的に含まない、タンパク質性物質を表す。「細胞性物質を実質的に含まない」という言い方は、タンパク質性物質が細胞（該細胞からタンパク質性物質が単離されるか、または組換えによって製造される）の細胞成分から分離されている、タンパク質性物質の調製物を包含する。したがって、細胞性物質を実質的に含まないタンパク質性物質は、（乾重量で）約30%、20%、10%、または5%未満の異種タンパク質、ポリペプチドもしくはペプチド（「混入タンパク質」とも称される）を有する、タンパク質性物質の調製物を包含する。タンパク質性物質が組換え技術によって製造される場合には、タンパク質性物質が培地も実質的に含まないことが好ましく、すなわち、培地は、タンパク質性物質の調製物の容量の約20%、10%、または5%未満を占める。タンパク質性物質が化学合成によって製造される場合には、それが化学的前駆物質もしくは他の化学物質を実質的に含まないことが好ましく、すなわち、そのタンパク質性物質の合成に関わる化学的前駆体もしくは他の化学物質から分離される。したがって、タンパク質性物質の調製物は、（乾重量で）約30%、20%、10%、5%未満の化学的前駆物質もしくはタンパク質性物質以外の化合物を有する。特定の実施形態において、本明細書に記載のタンパク質性物質は単離されている。別の実施形態において、本発明の抗体は単離されている。

【0099】

本明細書で使用される場合、核酸分子との関連において「単離された」という用語は、核酸分子の天然源中に存在する他の核酸分子から分離された核酸分子を表す。さらに、「単離された」核酸分子、例えばcDNA分子は、好ましくは、組換え技術による生成の場合には他の細胞性物質もしくは培地を実質的に含まず、化学合成の場合には化学的前駆物質もしくは化学物質を実質的に含まない。特定の実施形態において、核酸分子は単離されている。一実施形態において、本発明の抗体をコードする核酸分子は単離されている。本明細書で使用される場合、「実質的に含まない」という用語は、異なる核酸、ならびに、好ましくは、他の細胞性物質、培地、化学的前駆物質もしくは他の化学物質が（乾重量で）約30%、20%、10%、もしくは5%未満である、「単離された」核酸の調製物を指す。

【0100】

本明細書で使用される場合、「併用して」および「組み合わせて」という用語は、2つ以上の治療法（例えば2つ以上の予防薬および／または治療薬）を使用することを表す。

「併用して」という用語の使用は、治療（例えば、予防および／または治療薬）が被験者に施される順序を限定するものではない。第1の治療（例えば、第1の予防もしくは治療薬）を、被験者に第2の治療（例えば、第2の予防もしくは治療薬）を施す前に（例えば、5分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、12時間、24時間、48時間、72時間、96時間、1週間、2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、8週間、または12週間前に）、同時に、または後に（例えば、5分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、12時間、24時間、48時間、72時間、96時間、1週間、2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、8週間、または12週間後に）、施すことができる。

10

【0101】

本明細書で使用される「管理する」、「管理すること」、および「管理」は、被験者が治療（例えば、予防もしくは治療薬）から引き出す有益な効果を指すが、それは病気の治癒をもたらすものではない。ある特定の実施形態において、被験者は1以上の治療（例えば、1以上の予防もしくは治療薬）を受けて、病気が進行または悪化しないように、病気を「管理する」。

【0102】

本明細書で使用される「成熟抗体遺伝子」という用語は免疫グロブリンをコードする遺伝子配列を指し、この遺伝子配列は特定の免疫グロブリンを発現するよう成熟化プロセスを経た、例えば、B細胞のようなリンパ球において、ハイブリドーマにおいて、またはなんらかの抗体産生細胞において発現される。この用語は、こうした成熟遺伝子をコードする、成熟ゲノムDNA、cDNAおよび他の核酸配列を包含するが、これらの核酸配列は単離されており、かつ／または他の細胞型で発現するように組換え操作されている。成熟抗体遺伝子は、さまざまな変異および再構成を受けており、それによって成熟抗体遺伝子はリンパ球以外のあらゆる細胞においてコードされる抗体遺伝子と構造的に区別される。ヒト、齧歯類および他の多くの哺乳類における成熟抗体遺伝子は、抗体軽鎖の場合、VおよびJ遺伝子セグメントの融合によって、抗体重鎖の場合、V、DおよびJ遺伝子セグメントの融合によって形成される。多くの成熟抗体遺伝子は、融合後に点変異を獲得し、その変異のあるものは抗体タンパク質の特異的抗原に対する親和性を増大させる。

20

【0103】

本明細書で使用される「製薬上許容される」という用語は、連邦政府もしくは州政府の監督官庁に承認され、または米国薬局方、欧州薬局方、もしくは他の一般に認められた、動物に使用する、さらに特定するとヒトに使用する薬局方に記載されていることを表す。

30

【0104】

本明細書で使用される「予防する」、「予防すること」および「予防」は、治療（例えば、予防もしくは治療薬）、または併用治療（例えば、予防薬または治療薬の併用）を施した結果生じる、被験者における、疾患の発生もしくは発症の阻止、または疾患の1以上の症状の再発、発現、もしくは進行の防止を指す。

【0105】

本明細書で使用される「予防薬」という用語は、疾患、またはその1以上の症状を、予防するために使用することができる、何らかの作用物質を表す。ある実施形態において、「予防薬」という用語は、本発明の抗体を指す。別のある実施形態において、「予防薬」という用語は、本発明の抗体以外の作用物質を表す。好ましくは、予防薬は、疾患、またはその1以上の症状が発現、発生、進行および／または重症化しないようにする、またはそれを遅らせるために、有用であるとわかっている、またはすでに使用され、もしくは現在使用されている作用物質である。

40

【0106】

本明細書で使用される「予防上有効な量」は、疾患、または疾患の1以上の症状の発生、再発、もしくは発症の予防をもたらすのに十分な、または別の治療（例えば、予防薬）の予防効果を強め、もしくは改善するのに十分な、治療に関わる（例えば予防薬の）量を

50

表す。

【0107】

本明細書に使用される「プロトコル」という語句は、治療効果のある1以上の治療（例えば治療薬）を与え、投与の時期を決めるための投薬計画を指す。

【0108】

本明細書で使用される「副作用」という語句は、予防薬もしくは治療薬の望ましくない有害作用を包含する。副作用は常に望まれないが、望まれない作用が必ずしも有害であるとは限らない。治療（例えば、予防薬もしくは治療薬）に起因する有害作用は、有毒、不快または危険となることもある。

【0109】

本明細書で使用される「小分子」という用語および類似の用語は、ペプチド、ペプチドミメティック、アミノ酸、アミノ酸類似体、ポリヌクレオチド、ポリヌクレオチド類似体、ヌクレオチド、ヌクレオチド類似体、1モルあたり約10,000グラム未満の分子量を有する有機もしくは無機化合物（すなわち、ヘテロ有機化合物および有機金属化合物を含む）、1モルあたり約5,000グラム未満の分子量を有する有機もしくは無機化合物、1モルあたり約1,000グラム未満の分子量を有する有機もしくは無機化合物、1モルあたり約500グラム未満の分子量を有する有機もしくは無機化合物、ならびに塩、エステルおよび他の製薬上許容される形の前記物質を包含するがそれらに限定されない。

【0110】

本明細書で使用される「被験者」および「患者」という用語は、相互交換可能なものとして使用される。本明細書で使用される「被験者」という用語は、動物、好ましくは、非霊長類（例えば、ウシ、ブタ、ウマ、ネコ、イヌ、ラットおよびマウス）および霊長類（例えば、カニクイザル、チンパンジーといったサルおよびヒト）を含めた哺乳動物、ならびにもっとも好ましくはヒトを指す。ある実施形態において、被験者は、鳥類（例えば、ウズラ、ニワトリまたはシチメンチョウ）、家畜（例えば、ウシ、ウマ、ブタ、もしくはヒツジ）、愛玩動物（例えば、ネコ、イヌもしくはモルモット）、または実験動物（例えば、疾患のための動物モデル）といった、ヒト以外の動物である。特定の実施形態において、被験者はヒト（例えば、乳児、小児、成人、もしくは高齢者）である。

【0111】

本明細書で使用される「相乗的な」という用語は、なんらかの2つ以上の単独治療（例えば1以上の予防薬または治療薬）の効果を足し合わせるよりいっそう効果的な、治療法（例えば、予防薬もしくは治療薬）の組み合わせを指す。治療法の組み合わせ（例えば、予防薬もしくは治療薬の組み合わせ）による相乗効果は、疾患を有する被験者に対して、より少ない投与量、および／またはより少ない投与回数で1以上の治療法（例えば、1以上の予防薬または治療薬）を用いることを可能にする。少ない投与量の治療法（複数）（例えば、予防もしくは治療薬（複数））を利用できること、および／または、前記治療法をより少ない回数で投与できることは、被験者に前記治療を施すことに伴う毒性を、疾患の予防もしくは治療における前記治療法の有効性を減らすことなく、低下させる。加えて、相乗効果は、結果として、疾患の予防または治療において、治療法（例えば、予防薬もしくは治療薬）の有効性の向上をもたらすことができる。最終的に、治療法（例えば、予防薬もしくは治療薬）を組み合わせることによる相乗効果は、何らかの単独の治療法を使用することに付随する、有害なもしくは望まれない副作用を回避または低減することができる。

【0112】

本明細書で用いられる「治療薬」という用語は、疾患、または疾患の1以上の症状の、予防、治療、管理、または改善に用いることができる何らかの作用物質を表す。ある実施形態において、「治療薬」という用語は、本発明の抗体を指す。別の実施形態において、「治療薬」という用語は、本発明の抗体以外の作用物質を指す。好ましくは、治療薬は、疾患または疾患の1以上の症状の予防、治療、管理または改善のために有用であることがわかっている、または、これまで使用されてきた、もしくは現在使用されている作用物質

10

20

30

40

50

である。

【0113】

本明細書で使用される「治療に有効な量」という用語は、疾患の重篤度を下げ、疾患の持続期間を短くし、疾患の1以上の症状を改善し、疾患の進行を妨げ、疾患の寛解を引き起こし、または別の治療の治療効果を強め、もしくは改善するのに十分な、治療に関わる量を表す。

【0114】

本明細書で使用される「治療（法）」という用語は、疾患または疾患の1以上の症状の、予防、治療、管理、および／または改善に使用することができる、何らかのプロトコル、方法、および／または作用物質を表す。ある実施形態において、「治療（法）」という用語は、抗ウイルス治療、抗菌治療、抗真菌治療、抗癌剤、生物学的治療、支持療法、および／または他の、当業者、例えば医師のような医学の専門家に知られている、疾患または疾患の1以上の症状の、治療、管理、予防、または改善に有用な治療を指す。

【0115】

本明細書で使用される「治療する」、「治療」および「治療すること」という用語は、1以上の治療法を施すこと（1以上の予防薬または治療薬の投与を含めるが、それに限定されない）に起因する、疾患の進行、重症度、および／または持続期間の減少もしくは改善、または疾患の1以上の症状の改善を指す。

【0116】

4. 図面の簡単な説明

図面については後記する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0117】

5. 発明の詳細な説明

本発明は、CDRをコードする核酸配列を、フレームワーク領域をコードする核酸配列と同時にインフレームで融合することにより、抗体（すなわち、ドナー抗体）を再設計または再構成する方法であって、少なくとも1つのCDRはドナー抗体由来でありかつ少なくとも1つのフレームワーク領域はフレームワーク領域（例えば、いくつかのまたは全て公知のヒト生殖系列軽鎖FR1フレームワーク）のサブバンク由来である前記方法を提供する。再設計または再構成された抗体を作製する一方法を図13に詳しく示す。従って、本発明はまた、本発明の方法により作製された再設計または再構成された抗体も提供する。本発明の再設計または再構成された抗体はまた、本明細書において「改変された抗体」、「ヒト化抗体」、「フレームワークシャッフルした抗体」および単に「本発明の抗体」とも呼ばれる。本明細書で用いられるように、1以上のCDRが由来する抗体はドナー抗体である。いくつかの実施形態において、本発明の再設計または再構成された抗体は少なくとも1個、または少なくとも2個、または少なくとも3個、または少なくとも4個、または少なくとも5個、または少なくとも6個のドナー抗体由来のCDRを含む。いくつかの実施形態において、本発明の再設計または再構成された抗体は少なくとも1個、または少なくとも2個、または少なくとも3個、または少なくとも4個、または少なくとも5個、または少なくとも6個、または少なくとも7個、または少なくとも8個のフレームワーク領域のサブバンク由来のフレームワークを含む。

【0118】

さらに、本発明は、CDRをコードする核酸配列を、フレームワーク領域をコードする核酸配列と同時にインフレームで融合することにより、新規の抗体を作製する方法であって、CDRをコードする配列は複数のドナー抗体由来であるかまたはランダムな配列であり、そして少なくとも1つのフレームワーク領域はフレームワーク領域のサブバンク（例えば、いくつかのまたは全て公知のヒト生殖系列軽鎖FR1フレームワーク）由来である前記方法を提供する。

【0119】

本発明の方法を利用して第1の生物種由来の再設計または再構成された抗体を作製する

ことができ、再設計または再構成された抗体は第2の生物種において望ましくない免疫応答を惹起せずかつ再設計または再構成された抗体は第1の生物種由来の抗体と実質的に同じかまたより優れた抗原結合能力を保持する。従って、本発明は、1個以上の第1の生物種由来のCDRおよび少なくとも1個の第2の生物種由来のフレームワークを含む再設計または再構成された抗体を提供する。いくつかの実施形態において、本発明の再設計または再構成された抗体は、少なくとも1個、または少なくとも2個、または少なくとも3個、または少なくとも4個、または少なくとも5個、または少なくとも6個の第1の生物種由来のCDRを含む。いくつかの実施形態において、本発明の再設計または再構成された抗体は、少なくとも1個、または少なくとも2個、または少なくとも3個、または少なくとも4個、または少なくとも5個、または少なくとも6個、または少なくとも7個、または少なくとも8個の第2の生物種由来のフレームワークを含む。特定の実施形態において、本発明の再設計または再構成された抗体は、第1の生物種由来の抗体の対応するフレームワークと60%未満、または70%未満、または80%未満、または90%未満の相同性を有する第2の生物種由来の少なくとも1個のフレームワークを含む（例えば、再設計または再構成された抗体の軽鎖FW1は第2の生物種由来でありかつ第1の生物種由来の抗体の軽鎖FW1と60%未満相同的である）。

【0120】

本発明の方法を利用して第1の生物種由来の再設計または再構成された抗体を作製することができ、再設計または再構成された抗体は第1の生物種由来の抗体と比較して、改善および／または改変された特性を有する。また、本発明の方法を利用してドナー抗体を再設計または再構成することもでき、再設計または再構成された抗体はドナー抗体と比較して改善および／または改変された特性を有する。本明細書に記載の方法により改善できる抗体の特性としては、限定されるものでないが、結合特性（例えば、 K_a 、 K_d 、 K_{on} 、 K_{off} などの抗体-抗原結合定数）、*in vivo*（例えば、血清半減期）および／または*in vitro*（例えば、有効期間）での抗体安定性、抗体の融点（ T_m ）（例えば、示差走査熱量測定（DSC）または他の当技術分野で公知の方法により測定した）、抗体のpI（例えば、等電点電気泳動（IEF）または他の当技術分野で公知の方法で測定した）、抗体溶解度（例えば、製薬上許容される担体、希釈剤または賦形剤中の溶解度）、エフェクター機能（例えば、抗体依存性細胞傷害活性（ADCC））および産生レベル（例えば、細胞からの抗体の収率）が挙げられる。本発明によれば、第2の生物種由来のフレームワーク領域の1以上のサブバンクから得られるフレームワーク領域にインフレームで融合した第1の生物種由来の抗体のCDRを含んでなるコンビナトリアルライブラリーを構築して、所望の改変および／または改善された抗体をスクリーニングすることができる。

【0121】

本発明はまた、本明細書に記載の核酸配列を包含し、含有し、または発現するよう操作された細胞を提供する。本発明は、重鎖可変領域（例えば、ヒト化重鎖可変領域）を作製する方法であって、本明細書に記載の細胞において、重鎖可変領域（例えば、ヒト化重鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を発現させることを含んでなる前記方法を提供する。本発明は、軽鎖可変領域（例えば、ヒト化軽鎖可変領域）を作製する方法であって、本明細書に記載の細胞において、軽鎖可変領域（例えば、ヒト化軽鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を発現させることを含んでなる前記方法を提供する。本発明はまた、抗原と免疫特異的に結合する抗体（例えば、ヒト化抗体）を作製する方法であって、本明細書に記載の細胞に含まれるヒト化抗体をコードする核酸配列を発現させることを含んでなる前記方法を提供する。

【0122】

本発明は、本明細書に記載の方法によって作製された、再設計または再構成された抗体を提供する。特定の実施形態において、本発明は本明細書に記載の方法によって作製されたヒト化抗体を提供する。別の実施形態において、本発明は、本明細書に記載の方法によって作製された、再設計または再構成された（例えば、ヒト化された）抗体を提供し、その抗体は1以上の次の改善および／または改変された特性：結合特性、*in vivo*および／

またはin vitroでの安定性、融解温度 (T_m)、pI、溶解度、エフェクター機能および作製レベルを有する。本発明はまた、本明細書に記載の方法によって作製された抗体、および担体、希釈剤もしくは賦形剤を含んでなる組成物を提供する。特定の実施形態において、本発明は、本明細書に記載の方法によって作製されたヒト化抗体、ならびに担体、希釈剤もしくは賦形剤を含んでなる組成物を提供する。好ましくは、本発明の組成物は、その用途に合う剤形の医薬組成物である。

【0123】

限定する目的ではなく開示を明確にするために、本発明の詳細な説明は以下のサブセクションに分けられる：

(i)アクセプターフレームワーク領域の包括的バンクの構築

10

(ii)CDRの選択

(iii)コンビナトリアルサブライブラリーの構築

(iv)コンビナトリアルライブラリーの構築

(v)コンビナトリアルライブラリーの発現

(vi)再設計または再構成された抗体の選択

(vii)再設計または再構成された抗体の作製および特徴付け

(viii)抗体コンジュゲート

(ix)本発明の組成物の用途

(x)投与および製剤

(xi)投与量および投与回数

20

(xii)生物学的アッセイ

(xiii)キット

(xiv)製造物品

(xv)例示の実施形態

5.1 アクセプターフレームワーク領域の包括的バンクの構築

本発明にしたがって、1以上のアクセプター抗体（例えば、ヒト抗体）のフレームワーク領域（軽鎖のFR1、FR2、FR3、FR4、ならびに重鎖のFR1、FR2、FR3、FR4）をコードする核酸配列、およびドナー抗体の相補性決定領域（軽鎖のCDR1、CDR2、CDR3、ならびに重鎖のCDR1、CDR2、CDR3）をコードする核酸配列を同時に融合することによって、ドナー抗体（例えば、非ヒト抗体）の軽鎖可変領域および／または重鎖可変領域を改変する（例えばヒト化する）ことができる。好ましくは、改変された（例えば、ヒト化された）抗体軽鎖は、FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、およびFR4を含んでなる。改変された（例えば、ヒト化された）抗体重鎖は、FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、およびFR4を含んでなる。おのおののアクセプター（例えばヒト）フレームワーク領域（軽鎖のFR1、2、3、4、ならびに重鎖のFR1、2、3、4）は、軽鎖のFRサブバンク、および重鎖のFRサブバンクからそれぞれ作製することができる。アクセプター（例えば、ヒト）フレームワーク領域の包括的バンクは2つ以上のFRサブバンクを含んでなる。軽鎖FRサブバンクを作製する1つの方法を図13Aにさらに詳しく示す。同様な方法を重鎖FRサブバンクを作製するのに利用することができる。

30

【0124】

40

一実施形態において、FRサブバンクは、それぞれのヌクレオチド配列が特定のフレームワーク（例えば、軽鎖FR1）をコードする少なくとも2つの異なる核酸配列を含んでなる。別の実施形態において、FRサブバンクはそれぞれのヌクレオチド配列が特定のヒトフレームワーク（例えば、ヒト軽鎖FR1）をコードする少なくとも2つの異なる核酸配列を含んでなる。FRサブバンクは部分的フレームワークおよび／またはフレームワーク断片を含みうることを予期する。さらに、例えば、キメラフレームワークおよび変異したフレームワークなどの非天然のフレームワークがFRサブバンク中に存在しうることを予期する。

【0125】

5.1.1 軽鎖フレームワークのサブバンクの作製

軽鎖サブバンク1、2、3および4を構築するが、このサブバンク1は、ヌクレオチド配列

50

を含む複数の核酸配列を含んでなり、各ヌクレオチド配列は軽鎖FR1をコードする；サブバンク2はヌクレオチド配列を含む複数の核酸配列を含んでなり、各ヌクレオチド配列は軽鎖FR2をコードする；サブバンク3はヌクレオチド配列を含む複数の核酸配列を含んでなり、各ヌクレオチド配列は軽鎖FR3をコードする；ならびにサブバンク4はヌクレオチド配列を含む複数の核酸配列を含んでなり、各ヌクレオチド配列は軽鎖FR4をコードする。FR配列は、いずれの機能性ヒト抗体配列（例えば、当技術分野で知られている抗体、および／または市販の抗体）から得ても、もしくはそれに由来してもよい。いくつかの実施形態において、FR配列は機能性ヒト抗体配列（例えば、当技術分野で知られている抗体、および／または市販の抗体）から得るか、もしくはそれに由来する。いくつかの実施形態において、FR配列はヒト生殖系列軽鎖配列に由来する。ある実施形態において、サブバンクFR配列は、ヒト生殖系列κ鎖配列に由来する。別の実施形態において、サブバンクFR配列は、ヒト生殖系列λ鎖配列に由来する。サブバンクFR配列が非ヒト源（例えば、霊長類、げっ歯類）に由来しうることも予期する。

10

【0126】

限定ではなく一例として、下記は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を用いて4つの軽鎖FRサブバンクを作製する方法を説明するものであって、ヒト生殖系列κ鎖配列をテンプレートとして使用する。軽鎖FRサブバンク1、2および3（それぞれFR1、2、3をコードする）は、46のヒト生殖系列κ鎖配列（A1、A10、A11、A14、A17、A18、A9、A2、A20、A23、A26、A27、A3、A30、A5、A7、B2、B3、L1、L10、L11、L12、L14、L15、L16、L18、L19、L2、L20、L22、L23、L24、L25、L4/18a、L5、L6、L8、L9、O1、O11、O12、O14、O18、O2、O4およびO8）を包含する。Kawasakiら、2001, Eur. J. Immunol., 31: 1017-1028；SchableおよびZachau, 1993, Biol. Chem. Hoppe Seyler 374: 1001-1022；ならびに、Brensing-Kuppersら、1997, Gene 191: 173-181を参照されたい。配列はNCBIウェブサイト：www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/showGermline.cgi?organism=human&chainType=VK&seqType=nucleotideに取りまとめられている。軽鎖FRサブバンク4（FR4をコードする）は、5つのヒト生殖系列κ鎖配列（Jκ1、Jκ2、Jκ3、Jκ4およびJκ5）を包含する。Hieterら、1982, J. Biol. Chem. 257:1516-1522を参照されたい。配列はNCBIウェブサイト：www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/showGermline.cgi?organism=human&chainType=JK&seqType=nucleotideに取りまとめられている

20

限定ではなく一例として、軽鎖FR1サブバンクの構築は、表12および表13（すべて5'から3'の方向で表示され、名称に続いて配列を示す）に記載のオリゴヌクレオチドを用いたオーバーラップ伸長法によるポリメラーゼ連鎖反応によって行う。

30

【表 1 2】

表 1 2 軽鎖 FR1 フォワードプライマー (サブバンク 1 用)

414	FR1L1	GATGTTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCC	
415	FR1L2	GATGTTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCC	
416	FR1L3	GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCTCTGTCCGTCACCC	
417	FR1L4	GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCC	
418	FR1L5	GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCTCTGTCCGTCACCC	
419	FR1L6	GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCTCACCTGTCACCC	
420	FR1L7	GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCC	
421	FR1L8	GAGATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCTTGTCTATCACCC	
422	FR1L9	GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCTCGCTGTACCC	
423	FR1L10	GAAATTGTGCTGACTCAGTCTCCAGACTTTCAGTCTGTGACTC	10
424	FR1L11	GATGTTGTGATGACACAGTCTCCAGCTTTCCTCTCTGTGACTC	
425	FR1L12	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTG	
426	FR1L13	GAAATTGTGCTGACTCAGTCTCCAGACTTTCAGTCTGTGACTC	
427	FR1L14	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTG	
428	FR1L15	GAAACGACACTCACGCAGTCTCCAGCATTATGTCAGCGACTC	
429	FR1L16	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTGTCTGCATCTG	
430	FR1L17	GCCATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTG	
431	FR1L18	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTG	
432	FR1L19	AACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTGCCATGTCTGCATCTG	
433	FR1L20	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTGTCTGCATCTG	
434	FR1L21	GAAATAGTGATGATGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTC	
435	FR1L22	GCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTG	
436	FR1L23	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCTGTGTCTGCATCTG	20
437	FR1L24	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTC	
438	FR1L25	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTGTCTC	
439	FR1L26	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTTCCTGTCTGCATCTG	
440	FR1L27	GCCATCCGATGACCCAGTCTCCATTCTCCCTGTCTGCATCTG	
441	FR1L28	GTCATCTGGATGACCCAGTCTCCATCCTTACTCTCTGCATCTA	
442	FR1L29	GCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTG	
443	FR1L30	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGCATCTG	
444	FR1L31	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTGTCTC	
445	FR1L32	GACATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTTCTGTCTGCATCTG	
446	FR1L33	GCCATCCGATGACCCAGTCTCCATCCTCATTCTCTGCATCTA	
447	FR1L34	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTG	
448	FR1L35	GACATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTG	
449	FR1L36	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTG	
450	FR1L37	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTG	30
451	FR1L38	GACATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTG	
452	FR1L39	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTG	
453	FR1L40	GAAATTGTAATGACACAGTCTCCACCCACCCTGTCTTGTCTC	
454	FR1L41	GAAATTGTAATGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTGTCTC	
455	FR1L42	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTGTCTC	
456	FR1L43	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTGTCTC	
457	FR1L44	GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTC	
458	FR1L45	GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCC	
459	4FR1L46	GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCC	

【表 1 3】

表 1 3 軽鎖 FR1 リバースプライマー (サブバンク 1 用)

460	FR1L1'	GCAGGAGATGGAGGCCGGCTGTCCAAGGGTGACGGGCAGGGAGAGTG	
461	FR1L2'	GCAGGAGATGGAGGCCGGCTGTCCAAGGGTGACGGGCAGGGAGAGTG	
462	FR1L3'	GCAGGAGATGGAGGCCGGCTGTCCAAGGGTGACGGGCAGGGAGAGTG	
463	FR1L4'	GCAGGAGATGGAGGCCGGCTGTCCAAGGGTGACGGGCAGGGAGAGTG	
464	FR1L5'	GCAGGAGATGGAGGCCGGCTGTCCAAGGGTGACGGGCAGGGAGAGTG	
465	FR1L6'	GCAGGAGATGGAGGCCGGCTGTCCAAGGGTGACGGGCAGGGAGAGTG	
466	FR1L7'	GCAGGAGATGGAGGCCGGCTGTCCAAGGGTGACGGGCAGGGAGAGTG	
467	FR1L8'	GCAGGAGATGGAGGCCGGCTGTCCAAGGGTGATAGACAAGGAGAGTG	
468	FR1L9'	GAAGGAGATGGAGGCCGGCTGTCCAAGGGTGACAGGCGAGGAGAGTG	10
469	FR1L10'	GCAGGTGATGGTGACTTTCTCCTTTGGAGTCACAGACTGAAAGTCTG	
470	FR1L11'	GCAGGTGATGGTGACTTTCTCCCCTGGAGTCACAGAGAGGAAAGCTG	
471	FR1L12'	GCAAGTGATGGTGACTCTGTCTCCTACAGATGCAGACAGGGAGGATG	
472	FR1L13'	GCAGGTGATGGTGACTTTCTCCTTTGGAGTCACAGACTGAAAGTCTG	
473	FR1L14'	GCAAGTGATGGTGACTCTGTCTCCTACAGATGCAGACAGGGAGGATG	
474	FR1L15'	GCAGGAGATGGTGACTTTGTCTCCTGGAGTCGTGACATGAAGTCTG	
475	FR1L16'	ACAAGTGATGGTGACTCTGTCTCCTACAGATGCAGACAGTGAGGATG	
476	FR1L17'	GCAAGTGATGGTGACTCTGTCTCCTACAGATGCAGACAGGGAGGATG	
477	FR1L18'	GCAAGTGATGGTGACTCTGTCTCCTACAGATGCAGACAGGGTGAAG	
478	FR1L19'	ACAAGTGATGGTGACTCTGTCTCCTACAGATGCAGACATGGCAGATG	
479	FR1L20'	ACAAGTGATGGTGACTCTGTCTCCTACAGATGCAGACAGTGAGGATG	
480	FR1L21'	GCAGGAGAGGGTGGCTCTTTCCCCTGGAGACACAGACAGGGTGGCTG	
481	FR1L22'	GCAAGTGATGGTGACTCTGTCTCCTACAGATGCAGACAGGGAGGATG	
482	FR1L23'	ACAAGTGATGGTGACTCTGTCTCCTACAGATGCAGACACAGAAGATG	20
483	FR1L24'	GCAGGAGAGGGTGGCTCTTTCCCCTGGAGACACAGACAGGGTGGCTG	
484	FR1L25'	GCAGGAGAGGGTGGCTCTTTCCCCTGGAGACAAAGACAGGGTGGCTG	
485	FR1L26'	GCAATGATACTGACTCTGTCTCCTACAGATGCAGACAGGAAAGATG	
486	FR1L27'	GCAAGTGATGGTGACTCTGTCTCCTACAGATGCAGACAGGGAGAATG	
487	FR1L28'	ACAAGTGATGGTGACTCTGTCTCCTGTAGATGCAGAGAGTAAGGATG	
488	FR1L29'	GCAAGTGATGGTGACTCTGTCTCCTACAGATGCAGACAGGGAGGATG	
489	FR1L30'	ACAAGTGATGGTGACTCTGTCTCCTACAGATGCAGACACGGAAGATG	
490	FR1L31'	GCAGGAGAGGGTGGCTCTTTCCCCTGGAGACAAAGACAGGGTGGCTG	
491	FR1L32'	GCAAGTGATGGTGACTCTGTCTCCTACAGATGCAGACAGGAAGGATG	
492	FR1L33'	ACAAGTGATGGTGACTCTGTCTCCTGTAGATGCAGAGAATGAGGATG	
493	FR1L34'	GCAAGTGATGGTGACTCTGTCTCCTACAGATGCAGACAGGGAGGATG	
494	FR1L35'	GCAAGTGATGGTGACTCTGTCTCCTACAGATGCAGACAGGGAGGATG	
495	FR1L36'	GCAAGTGATGGTGACTCTGTCTCCTACAGATGCAGACAGGGAGGATG	
496	FR1L37'	GCAAGTGATGGTGACTCTGTCTCCTACAGATGCAGACAGGGAGGATG	30
497	FR1L38'	GCAAGTGATGGTGACTCTGTCTCCTACAGATGCAGACAGGGAGGATG	
498	FR1L39'	GCAAGTGATGGTGACTCTGTCTCCTACAGATGCAGACAGGGAGGATG	
499	FR1L40'	GCAGGAGAGGGTGGCTCTTTCCCCTGGAGACAAAGACAGGGTGGGTG	
500	FR1L41'	GCAGGAGAGGGTGGCTCTTTCCCCTGGAGACAAAGACAGGGTGGCTG	
501	FR1L42'	GCAGGAGAGGGTGGCTCTTTCCCCTGGAGACAAAGACAGGGTGGCTG	
502	FR1L43'	GCAGGAGAGGGTGGCTCTTTCCCCTGGAGACAAAGACAGGGTGGCTG	
503	FR1L44'	GCAGTTGATGGTGAGCCCTCTCGCCAGAGACACAGCCAGGGAGTCTG	
504	FR1L45'	GCAGGAGATGGAGGCCGGCTGTCCAAGGGTGACGGGCAGGGAGAGTG	
505	FR1L46'	GCAGGAGATGGAGGCCGGCTGTCCAAGGGTGACGGGCAGGGAGAGTG	

【0 1 2 7】

PCRは、下記のオリゴヌクレオチドの組合せで実施する（全部で46組）：FR1L1/FR1L1'、FR1L2/FR1L2'、FR1L3/FR1L3'、FR1L4/FR1L4'、FR1L5/FR1L5'、FR1L6/FR1L6'、FR1L7/FR1L7'、FR1L8/FR1L8'、FR1L9/FR1L9'、FR1L10/FR1L10'、FR1L11/FR1L11'、FR1L12/FR1L12'、FR1L13/FR1L13'、FR1L14/FR1L14'、FR1L15/FR1L15'、FR1L16/FR1L16'、FR1L17/FR1L17'、FR1L18/FR1L18'、FR1L19/FR1L19'、FR1L20/FR1L20'、FR1L21/FR1L21'、FR1L22/FR1L22'、FR1L23/FR1L23'、FR1L24/FR1L24'、FR1L25/FR1L25'、FR1L26/FR1L26'、FR1L27/FR1L27'、FR1L28/FR1L28'、FR1L29/FR1L29'、FR1L30/FR1L30'、FR1L31/FR1L31'、FR1L32/FR1L32'、FR1L33/FR1L33'、FR1L34/FR1L34'、FR1L35/FR1L35'、FR1L36/FR1L36'、FR1L37/FR1L37'、FR1L38/FR1L38'、FR1L39/FR1L39'、FR1L40/FR1L40'、FR1L41/FR1L41'、FR1L42/FR1L42'、FR1L43/FR1L43'、FR1L44/FR1L44'、FR1L45/FR1L45'、およびFR1L46/FR1L46'。PCR産物のプールがサブバンク1となる。

【0 1 2 8】

限定ではなく一例として、軽鎖FR2サブバンクの構築は、表14および表15（すべて5'から3'の方向で表示され、名称に続いて配列を示す）に記載のオリゴヌクレオチドを用いたオーバーラップ伸長法によるポリメラーゼ連鎖反応によって行う。

【表14】

表14 軽鎖FR2 フォワードプライマー（サブバンク2用）

506	FR2L1	TGGTTTCAGCAGAGGCCAGGCCAATCTCCAA	
507	FR2L2	TGGTTTCAGCAGAGGCCAGGCCAATCTCCAA	
508	FR2L3	TGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAC	
509	FR2L4	TGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCAC	
510	FR2L5	TGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGCCTCCAC	10
511	FR2L6	TGGCTTCAGCAGAGGCCAGGCCAGCCTCCAA	
512	FR2L7	TGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCAC	
513	FR2L8	TGGTTTCTGCAGAAAGCCAGGCCAGTCTCCA	
514	FR2L9	TGGCTTCAGCAGAGGCCAGGCCAGCCTCCAA	
515	FR2L10	TGGTACCAGCAGAAACCAGATCAGTCTCCAA	
516	FR2L11	TGGTACCAGCAGAAACCAGATCAAGCCCCAA	
517	FR2L12	TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGTTCCTA	
518	FR2L13	TGGTACCAGCAGAAACCAGATCAGTCTCCAA	
519	FR2L14	TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCCTA	
520	FR2L15	TGGTACCAACAGAAACCAGGAGAAGCTGCTA	
521	FR2L16	TGGTTTCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCCTA	
522	FR2L17	TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCCTA	
523	FR2L18	TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCCTA	
524	FR2L19	TGGTTTCAGCAGAAACCAGGGAAAGTTCCTA	20
525	FR2L20	TGGTATCAGCAGAAACCAGAGAAAGCCCCCTA	
526	FR2L21	TGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCA	
527	FR2L22	TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCTCCTA	
528	FR2L23	TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCCTA	
529	FR2L24	TGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCA	
530	FR2L25	TGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCA	
531	FR2L26	TGGTATCTGCAGAAACCAGGGAAATCCCCTA	
532	FR2L27	TGGTATCAGCAAAAACCAGCAAAAAGCCCCCTA	
533	FR2L28	TGGTATCAGCAAAAACCAGGGAAAGCCCCCTG	
534	FR2L29	TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCTCCTA	
535	FR2L30	TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCCTA	
536	FR2L31	TGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCA	
537	FR2L32	TGGTATCAGCAAAAACCAGGGAAAGCCCCCTA	
538	FR2L33	TGGTATCAGCAAAAACCAGGGAAAGCCCCCTA	30
539	FR2L34	TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCCTA	
540	FR2L35	TGGTATCGGCAGAAACCAGGGAAAGTTCCTA	
541	FR2L36	TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCCTA	
542	FR2L37	TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCCTA	
543	FR2L38	TGGTATCGGCAGAAACCAGGGAAAGTTCCTA	
544	FR2L39	TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCCTA	
545	FR2L40	TGGTATCAGCAGAAACCTGGCCAGGCGCCCA	
546	FR2L41	TGGTACCAGCAGAAACCTGGGCAGGCTCCCA	
547	FR2L42	TGGTACCAGCAGAAACCTGGCCTGGCGCCCA	
548	FR2L43	TGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCA	
549	FR2L44	TGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGCCTCCTA	
550	FR2L45	TGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCAC	
551	FR2L46	TGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCAC	40

【表 1 5】

表 1 5 軽鎖 FR2 リバースプライマー (サブバンク 2 用)

552	FR2L1'	ATAAATTAGGCGCCTTGGAGATTGGCCTGGCCTCT
553	FR2L2'	ATAAATTAGGCGCCTTGGAGATTGGCCTGGCCTCT
554	FR2L3'	ATAGATCAGGAGCTGTGGAGACTGGCCTGGCTTCT
555	FR2L4'	ATAGATCAGGAGCTGTGGAGACTGGCCTGGCTTCT
556	FR2L5'	ATAGATCAGGAGCTGTGGAGGCTGGCCTGGCTTCT
557	FR2L6'	ATAAATTAGGAGTCTTGGAGGCTGGCCTGGCCTCT
558	FR2L7'	ATAGATCAGGAGCTGTGGAGACTGCCCTGGCTTCT
559	FR2L8'	ATAGATCAGGAGTGTGGAGACTGGCCTGGCTTCT
560	FR2L9'	ATAAATTAGGAGTCTTGGAGGCTGGCCTGGCCTCT
561	FR2L10'	CTTGATGAGGAGCTTTGGAGACTGATCTGGTTTCT
562	FR2L11'	CTTGATGAGGAGCTTTGGGGCTTGATCTGGTTTCT
563	FR2L12'	ATAGATCAGGAGCTTAGGAACCTTCCCTGGTTTCT
564	FR2L13'	CTTGATGAGGAGCTTTGGAGACTGATCTGGTTTCT
565	FR2L14'	ATAGATCAGGCGCTTAGGGGCTTCCCTGGTTTCT
566	FR2L15'	TTGAATAATGAAAATAGCAGCTTCTCCTGGTTTCT
567	FR2L16'	ATAGATCAGGGACTTAGGGGCTTCCCTGGTTTCT
568	FR2L17'	ATAGATCAGGAGCTTAGGGGCTTCCCTGGTTTCT
569	FR2L18'	ATAGATCAGGAGCTTAGGGGCTTCCCTGGTTTCT
570	FR2L19'	ATAGATCAGGTGCTTAGGGACTTCCCTGGTTTCT
571	FR2L20'	ATAGATCAGGGACTTAGGGGCTTCTCTGGTTTCT
572	FR2L21'	ATAGATGAGGAGCCTGGGAGCCTGGCCAGGTTTCT
573	FR2L22'	ATAGATCAGGAGCTTAGGAGCTTCCCTGGTTTCT
574	FR2L23'	ATAGATCAGGAGCTTAGGGGCTTCCCTGGTTTCT
575	FR2L24'	ATAGATGAGGAGCCTGGGAGCCTGGCCAGGTTTCT
576	FR2L25'	ATAGATGAGGAGCCTGGGAGCCTGGCCAGGTTTCT
577	FR2L26'	ATAGAGGAAGAGCTTAGGGGATTTCCCTGGTTTCT
578	FR2L27'	ATAGATGAAGAGCTTAGGGGCTTTGCTGGTTTTT
579	FR2L28'	ATAGATCAGGAGCTCAGGGGCTTCCCTGGTTTTT
580	FR2L29'	ATAGATCAGGAGCTTAGGAGCTTCCCTGGTTTCT
581	FR2L30'	ATAGATCAGGAGCTTAGGGGCTTCCCTGGTTTCT
582	FR2L31'	ATAGATGAGGAGCCTGGGAGCCTGGCCAGGTTTCT
583	FR2L32'	ATAGATCAGGAGCTTAGGGGCTTCCCTGGTTTTT
584	FR2L33'	ATAGATCAGGAGCTTAGGGGCTTCCCTGGTTTTT
585	FR2L34'	ATAGATCAGGAGCTTAGGGGCTTCCCTGGTTTCT
586	FR2L35'	ATAGATCAGGAGCTTAGGAACCTTCCCTGGTTTCT
587	FR2L36'	GTAGATCAGGAGCTTAGGGGCTTCCCTGGTTTCT
588	FR2L37'	ATAGATCAGGAGCTTAGGGGCTTCCCTGGTTTCT
589	FR2L38'	ATAGATCAGGAGCTTAGGAACCTTCCCTGGTTTCT
590	FR2L39'	GTAGATCAGGAGCTTAGGGGCTTCCCTGGTTTCT
591	FR2L40'	ATAGATGAGGAGCCTGGGCGCCTGGCCAGGTTTCT
592	FR2L41'	ATAGATGAGGAGCCTGGGAGCCTGCCAGGTTTCT
593	FR2L42'	ATAGATGAGGAGCCTGGGCGCCAGGCCAGGTTTCT
594	FR2L43'	ATAGATGAGGAGCCTGGGAGCCTGGCCAGGTTTCT
595	FR2L44'	GTAAATGAGCAGCTTAGGAGGCTGTCCTGGTTTCT
596	FR2L45'	ATAGATCAGGAGCTGTGGAGACTGCCCTGGCTTCT
597	FR2L46'	ATAGATCAGGAGCTGTGGAGACTGCCCTGGCTTCT

10

20

30

【0 1 2 9】

PCRは、下記のオリゴヌクレオチドの組合せで実施する（全部で46組）：FR2L1/FR2L1'、FR2L2/FR2L2'、FR2L3/FR2L3'、FR2L4/FR2L4'、FR2L5/FR2L5'、FR2L6/FR2L6'、FR2L7/FR2L7'、FR2L8/FR2L8'、FR2L9/FR2L9'、FR2L10/FR2L10'、FR2L11/FR2L11'、FR2L12/FR2L12'、FR2L13/FR2L13'、FR2L14/FR2L14'、FR2L15/FR2L15'、FR2L16/FR2L16'、FR2L17/FR2L17'、FR2L18/FR2L18'、FR2L19/FR2L19'、FR2L20/FR2L20'、FR2L21/FR2L21'、FR2L22/FR2L22'、FR2L23/FR2L23'、FR2L24/FR2L24'、FR2L25/FR2L25'、FR2L26/FR2L26'、FR2L27/FR2L27'、FR2L28/FR2L28'、FR2L29/FR2L29'、FR2L30/FR2L30'、FR2L31/FR2L31'、FR2L32/FR2L32'、FR2L33/FR2L33'、FR2L34/FR2L34'、FR2L35/FR2L35'、FR2L36/FR2L36'、FR2L37/FR2L37'、FR2L38/FR2L38'、FR2L39/FR2L39'、FR2L40/FR2L40'、FR2L41/FR2L41'、FR2L42/FR2L42'、FR2L43/FR2L43'、FR2L44/FR2L44'、FR2L45/FR2L45'、およびFR2L46/FR2L46'。PCR産物のプールがサブバンク2となる。

40

【0 1 3 0】

50

限定ではなく一例として、軽鎖FR3サブバンクの構築は、表16および表17（すべて5'から3'の方向で表示され、名称に続いて配列を示す）に記載のオリゴヌクレオチドを用いたオーバーラップ伸長法によるポリメラーゼ連鎖反応によって行う。

【表 16】

表 16 軽鎖 FR3 フォワードプライマー (サブバンク 3 用)

598	FR3L1	GGGGTCCCAGACAGATTCAGCGGCAGTGGGTCAGGCACTGATTTCACTGAAAATCAG	
599	FR3L2	GGGGTCCCAGACAGATTCAGCGGCAGTGGGTCAGGCACTGATTTCACTGAAAATCAG	
600	FR3L3	GGAGTGCCAGATAGGTTCACTGGCAGCGGGTCAGGGACAGATTTCACTGAAAATCAG	10
601	FR3L4	GGGGTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTTCACTGAAAATCAG	
602	FR3L5	GGAGTGCCAGATAGGTTCACTGGCAGCGGGTCAGGGACAGATTTCACTGAAAATCAG	
603	FR3L6	GGGGTCCCAGACAGATTCAGTGGCAGTGGGGCAGGGACAGATTTCACTGAAAATCAG	
604	FR3L7	GGGGTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTTCACTGAAAATCAG	
605	FR3L8	GGAGTGCCAGATAGGTTCACTGGCAGCGGGTCAGGGACAGATTTCACTGAAAATCAG	
606	FR3L9	GGGGTCCCAGACAGATTCAGTGGCAGTGGGGCAGGGACAGATTTCACTGAAAATCAG	
607	FR3L10	GGGGTCCCCTCGAGGTTCACTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTACCCCTCACCATCAA	20
608	FR3L11	GGGGTCCCCTCGAGGTTCACTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTACCTTTACCATCAG	
609	FR3L12	GGGGTCCCCTCGAGGTTCACTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAG	
610	FR3L13	GGGGTCCCCTCGAGGTTCACTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTACCCCTCACCATCAA	
611	FR3L14	GGGGTCCCCTCGAGGTTCACTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTACCCCTCACCATCAA	
612	FR3L15	GGAATCCCACCTCGATTCACTGGCAGCGGGTATGGAACAGATTTTACCCCTCACAATTAA	
613	FR3L16	GGGGTCCCCTCGAGGTTCACTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAG	
614	FR3L17	GGGGTCCCCTCGAGGTTCACTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAG	
615	FR3L18	GGGGTCCCCTCGAGGTTCACTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAG	30
616	FR3L19	GGGGTCCCCTCGAGGTTCACTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACAATCAG	
617	FR3L20	GGGGTCCCCTCGAGGTTCACTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAG	
618	FR3L21	GGCATCCCAGCCAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACTCTCACCATCAG	
619	FR3L22	GGGGTCCCCTCGAGGTTCACTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAG	
620	FR3L23	GGGGTCCCCTCGAGGTTCACTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAG	
621	FR3L24	GGTATCCCAGCCAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACTCTCACCATCAG	
622	FR3L25	GGCATCCCAGCCAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACTCTCACCATCAG	40
623	FR3L26	GGGGTCTCATCGAGGTTCACTGGCAGGGGATCTGGGACGGATTTCACTCTCACCATCAT	
624	FR3L27	GGGGTCCCCTCGAGGTTCACTGGCAGTGGATCTGGGACGGATTACCTCTCACCATCAG	
625	FR3L28	GGGGTCCCCTCGAGGTTCACTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAG	
626	FR3L29	GGGGTCCCCTCGAGGTTCACTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAG	
627	FR3L30	GGGGTCCCCTCGAGGTTCACTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAG	
628	FR3L31	GGCATCCCAGCCAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACTCTCACCATCAG	
629	FR3L32	GGGGTCCCCTCGAGGTTCACTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACAATCAG	50

630 FR3L33
GGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAG
631 FR3L34
GGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAG
632 FR3L35
GGAGTCCCATCTCGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACTATCAG
633 FR3L36
GGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGGAAGTGGATCTGGGACAGATTTTACTTTCACCATCAG
634 FR3L37
GGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAG
635 FR3L38
GGAGTCCCATCTCGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACTATCAG
636 FR3L39
GGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGGAAGTGGATCTGGGACAGATTTTACTTTCACCATCAG
637 FR3L40
AGCATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAG
638 FR3L41
GGCATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAG
639 FR3L42
GGCATCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAG
640 FR3L43
GGCATCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAG
641 FR3L44
GGGGTCCCTGACCGATTTCAGTGGCAGCGGGTCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAG
642 FR3L45
GGAGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAG
643 FR3L46
GGAGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAG

10

20

【表 17】

表 17 軽鎖 FR3 リバースプライマー (サブバンク 3 用)

644	FR3L1'	GCAGTAATAAACCCCAACATCCTCAGCCTCCACCCTGCTGATTTTCAGTGTGAAA	
645	FR3L2'	GCAGTAATAAACCCCAACATCCTCAGCCTCCACCCTGCTGATTTTCAGTGTGAAA	
646	FR3L3	TCAGTAATAAACCCCAACATCCTCAGCCTCCACCCTGCTGATTTTCAGTGTGAAA	
647	FR3L4'	GCAGTAATAAACCCCAACATCCTCAGCCTCCACTCTGCTGATTTTCAGTGTGAAA	
648	FR3L5'	GCAGTAATAAACCCCAACATCCTCAGCCTCCACCCTGCTGATTTTCAGTGTGAAA	
649	FR3L6'	GCAGTAATAAACCCCGACATCCTCAGCTTCCACCCTGCTGATTTTCAGTGTGAAA	
650	FR3L7'	GCAGTAATAAACCCCAACATCCTCAGCCTCCACTCTGCTGATTTTCAGTGTGAAA	
651	FR3L8'	GCAGTAATAAACTCCAAAATCCTCAGCCTCCACCCTGCTGATTTTCAGTGTGAAA	
652	FR3L9'	GCAGTAATAAACCCCGACATCCTCAGCTTCCACCCTGCTGATTTTCAGTGTGAAA	
653	FR3L10'	ACAGTAATACGTTGCAGCATCTTCAGCTTCCAGGCTATTGATGGTGAGGGTGAAA	10
654	FR3L11'	ACAGTAATATGTTGCAGCATCTTCAGCTTCCAGGCTACTGATGGTAAAGGTGAAA	
655	FR3L12'	ACAGTAATAAGTTGCAACATCTTCAGGCTGCAGGCTGCTGATGGTGAGAGTGAAA	
656	FR3L13'	ACAGTAATACGTTGCAGCATCTTCAGCTTCCAGGCTATTGATGGTGAGGGTGAAA	
657	FR3L14'	ACAGTAATAAGTTGCAAAATCTTCAGGCTGCAGGCTGCTGATTTGTGAGAGTGAAT	
658	FR3L15'	ACAGAAGTAATATGCAGCATCTTCAGATTCTATGTTATTAATTGAGGGTGAAA	
659	FR3L16'	GCAGTAATAAGTTGCAAAATCTTCAGGCTGCAGGCTGCTGATGGTGAGAGTGAAA	
660	FR3L17'	ACAGTAATAAGTTGCAAAATCTTCAGGCTGCAGGCTGCTGATGGTGAGAGTGAAA	
661	FR3L18'	GCAGTAATAAGTTGCAAAATCATCAGGCTGCAGGCTGCTGATGGTGAGAGTGAAT	
662	FR3L19'	ACAGTAATAAGTTGCAAAATCTTCAGGCTGCAGGCTGCTGATTTGTGAGAGTGAAT	
663	FR3L20'	GCAGTAATAAGTTGCAAAATCTTCAGGCTGCAGGCTGCTGATGGTGAGAGTGAAA	
664	FR3L21'	ACAGTAATAAACTGCAAAATCTTCAGACTGCAGGCTGCTGATGGTGAGAGTGAAC	
665	FR3L22'	ACAGTAATAAGTTGCAAAATCTTCAGGCTGCAGGCTGCTGATGGTGAGAGTGAAA	
666	FR3L23'	ACAATAGTAAGTTGCAAAATCTTCAGGCTGCAGGCTGCTGATAGTGAGAGTGAAA	
667	FR3L24'	ACAGTAATAAACTGCAAAATCTTCAGACTGCAGGCTGCTGATGGTGAGAGTGAAC	20
668	FR3L25'	ACAGTAATAAACTGCAAAATCTTCAGGCTCTAGGCTGCTGATGGTGAGAGTGAAG	
669	FR3L26'	ACAGTAATAAGCTGCAAAATCTTCAGGCTTCAGGCTGATGATGGTGAGAGTGAAA	
670	FR3L27'	ACAGTAATAAGTTGCAAAATCTTCAGGCTGCAGGCTGCTGATGGTGAGAGTGAAA	
671	FR3L28'	ACAGTAATAAGTTGCAAAATCTTCAGACTGCAGGCAACTGATGGTGAGAGTGAAA	
672	FR3L29'	ACAGTAATAAGTTGCAAAATCTTCAGGCTGCAGGCTGCTGATGGTGAGAGTGAAA	
673	FR3L30'	ACAATAGTAAGTTGCAAAATCTTCAGGCTGCAGGCTGCTGATGGTGAGAGTGAAA	
674	FR3L31'	ACAGTAATAAACTGCAAAATCTTCAGGCTCTAGGCTGCTGATGGTGAGAGTGAAG	
675	FR3L32'	ACAGTAATAAGTTGCAAAATCTTCAGGCTGCAGGCTGCTGATTTGTGAGAGTGAAT	
676	FR3L33'	ACAGTAATAAGTTGCAAAATCTTCAGACTGCAGGCACTGATGGTGAGAGTGAAA	
677	FR3L34'	ACAGTAGTAAGTTGCAAAATCTTCAGGTTGCAGACTGCTGATGGTGAGAGTGAAA	
678	FR3L35'	ACCGTAATAAGTTGCAACATCTTCAGGCTGCAGGCTGCTGATAGTGAGAGTGAAA	
679	FR3L36'	ACAGTAATATGTTGCAATATCTTCAGGCTGCAGGCTGCTGATGGTGAAAAGTAAAA	
680	FR3L37'	ACAGTAGTAAGTTGCAAAATCTTCAGGTTGCAGACTGCTGATGGTGAGAGTGAAA	
681	FR3L38'	ACCGTAATAAGTTGCAACATCTTCAGGCTGCAGGCTGCTGATAGTGAGAGTGAAA	
682	FR3L39'	ACAGTAATATGTTGCAATATCTTCAGGCTGCAGGCTGCTGATGGTGAAAAGTAAAA	30
683	FR3L40'	ACAGTAATAAACTGCAAAATCTTCAGGCTGCAGGCTGCTGATGGTGAGAGTGAAG	
684	FR3L41'	ACAGTAATAAACTGCAAAATCTTCAGGCTGCAGGCTGCTGATGGTGAGAGTGAAG	
685	FR3L42'	ACAGTAATACACTGCAAAATCTTCAGGCTCCAGTCTGCTGATGGTGAGAGTGAAG	
686	FR3L43'	ACAGTAATACACTGCAAAATCTTCAGGCTCCAGTCTGCTGATGGTGAGAGTGAAG	
687	FR3L44'	ACAGTAATAAACTGCCACATCTTCAGCCTGCAGGCTGCTGATGGTGAGAGTGAAA	
688	FR3L45'	GCAGTAATAAACTCCCAACATCCTCAGCCTCCACCCTGCTGATTTTCAGTGTGAAA	
689	FR3L46'	GCAGTAATAAACTCCAACATCCTCAGCCTCCACCCTGCTGATTTTCAGTGTGAAA	

【0131】

PCRは、下記のオリゴヌクレオチドの組合せで実施する（全部で46組）：FR3L1/FR3L1'、FR3L2/FR3L2'、FR3L3/FR3L3'、FR3L4/FR3L4'、FR3L5/FR3L5'、FR3L6/FR3L6'、FR3L7/FR3L7'、FR3L8/FR3L8'、FR3L9/FR3L9'、FR3L10/FR3L10'、FR3L11/FR3L11'、FR3L12/FR3L12'、FR3L13/FR3L13'、FR3L14/FR3L14'、FR3L15/FR3L15'、FR3L16/FR3L16'、FR3L17/FR3L17'、FR3L18/FR3L18'、FR3L19/FR3L19'、FR3L20/FR3L20'、FR3L21/FR3L21'、FR3L22/FR3L22'、FR3L23/FR3L23'、FR3L24/FR3L24'、FR3L25/FR3L25'、FR3L26/FR3L26'、FR3L27/FR3L27'、FR3L28/FR3L28'、FR3L29/FR3L29'、FR3L30/FR3L30'、FR3L31/FR3L31'、FR3L32/FR3L32'、FR3L33/FR3L33'、FR3L34/FR3L34'、FR3L35/FR3L35'、FR3L36/FR3L36'、FR3L37/FR3L37'、FR3L38/FR3L38'、FR3L39/FR3L39'、FR3L40/FR3L40'、FR3L41/FR3L41'、FR3L42/FR3L42'、FR3L43/FR3L43'、FR3L44/FR3L44'、FR3L45/FR3L45'、およびFR3L46/FR3L46'。PCR産物のプールがサブバンク3となる。

【0132】

限定ではなく一例として、軽鎖FR4サブバンクの構築は、表18および表19（すべて5'か

10

20

30

40

50

ら3'の方向で表示され、名称に続いて配列を示す)に記載のオリゴヌクレオチドを用いたオーバーラップ伸長法によるポリメラーゼ連鎖反応によって行う。

【表18】

表18 軽鎖FR4フォワードプライマー (サブバンク4用)

690	FR4L1	TTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA
691	FR4L2	TTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA
692	FR4L3	TTCGGCCCTGGGACCAAGTGGATATCAAA
693	FR4L4	TTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA
694	FR4L5	TTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAA

10

【表19】

表19 軽鎖FR4リバースプライマー (サブバンク4用)

695	FR4L1'	TTTGATTTCACCTTGGTCCCTTGGCCGAA
696	FR4L2'	TTTGATCTCCAGCTTGGTCCCCTGGCCAAA
697	FR4L3'	TTTGATATCCACTTGGTCCCAGGGCCGAA
698	FR4L4'	TTTGATCTCCACCTTGGTCCCTCCGCCGAA
699	FR4L5'	TTTAATCTCCAGTCGTGTCCCTTGGCCGAA

20

【0133】

PCRは、下記のオリゴヌクレオチドの組合せで実施する(全部で5組):FR4L1/FR4L1'、FR4L2/FR4L2'、FR4L3/FR4L3'、FR4L4/FR4L4'、またはFR4L5/FR4L5'。PCR産物のプールがサブバンク4となる。

【0134】

5.1.2 重鎖フレームワークのサブバンクの作製

いくつかの実施形態において、重鎖FRサブバンク5、6、7および11が構築されるが、サブバンク5は、それぞれが重鎖FR1をコードするヌクレオチド配列を含む複数の核酸配列を含んでなり；サブバンク6は、それぞれが重鎖FR2をコードするヌクレオチド配列を含む複数の核酸配列を含んでなり；サブバンク7はそれぞれが重鎖FR3をコードするヌクレオチド配列を含む複数の核酸配列を含んでなり；ならびにサブバンク11はそれぞれが重鎖FR4をコードするヌクレオチド配列を含む複数の核酸配列を含んでなり；前記において、重鎖FR1、FR2およびFR3は、CDR H1およびH2に関するKabatの定義にしたがって定義される。いくつかの実施形態において、FR配列は機能性ヒト抗体配列に由来する。他の実施形態において、FR配列はヒト生殖系列重鎖配列に由来する。

30

【0135】

限定ではなく例示として、下記は、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を用いて4つの重鎖FRサブバンクを作製する方法を説明するものであって、ヒト生殖系列重鎖配列をテンプレートとして使用する。重鎖FRサブバンク5、6および7(それぞれFR1、2、3をコードする)は、44個のヒト生殖系列重鎖配列(VH1-18、VH1-2、VH1-24、VH1-3、VH1-45、VH1-46、VH1-58、VH1-69、VH1-8、VH2-26、VH2-5、VH2-70、VH3-11、VH3-13、VH3-15、VH3-16、VH3-20、VH3-21、VH3-23、VH3-30、VH3-33、VH3-35、VH3-38、VH3-43、VH3-48、VH3-49、VH3-53、VH3-64、VH3-66、VH3-7、VH3-72、VH3-73、VH3-74、VH3-9、VH4-28、VH4-31、VH4-34、VH4-39、VH4-4、VH4-59、VH4-61、VH5-51、VH6-1およびVH7-81)を包含する。Matsudaら、1998, J. Exp. Med., 188: 1973-1975を参照されたい。配列はNCBIウェブサイト:www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/showGermline.cgi?organism=human&chainType=VH&seqType=nucleotideに取りまとめられている。重鎖FRサブバンク11(FR4をコードする)は、6個のヒト生殖系列重鎖配列(JH1、JH2、JH3、JH4、JH5およびJH6)を包含する。Ravetchら、1981, Cell 27(3 Pt 2):583-591を参照されたい。配列はNCBIウェブサイト:www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/showGermline.cgi?organism=human&chainType=VH&seqType=nucleot

40

50

ideに取りまとめられている。

【0136】

限定ではなく一例として、重鎖FR1サブバンク（Kabatの定義による）の構築は、表20および表21（すべて5'から3'の方向で表示され、名称に続いて配列を示す）に記載のオリゴヌクレオチドを用いたオーバーラップ伸長法によるポリメラーゼ連鎖反応によって行う。

【表 20】

表 20 重鎖 FR1 (Kabat 定義) フォワードプライマー (サブバンク 5 用)

700	FR1HK1	
	CAGGTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGT	
701	FR1HK2	
	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGT	
702	FR1HK3	
	CAGGTCCAGCTGGTACAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGT	
703	FR1HK4	
	CAGGTTCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGT	
704	FR1HK5	10
	CAGATGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGACTGGGTCTCAGTGAAGGT	
705	FR1HK6	
	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGT	
706	FR1HK7	
	CAAATGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGACCTCAGTGAAGGT	
707	FR1HK8	
	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCTCGGTGAAGGT	
708	FR1HK9	
	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGT	
709	FR1HK10	
	CAGGTCACCTGAAGGAGTCTGGTCTGTGCTGGTGAAACCCACAGAGACCCTCACGCT	
710	FR1HK11	
	CAGATCACCTGAAGGAGTCTGGTCTACGCTGGTGAAACCCACACAGACCCTCACGCT	
711	FR1HK12	20
	CAGGTCACCTGAGGGAGTCTGGTCTGCGCTGGTGAAACCCACACAGACCCTCACACT	
712	FR1HK13	
	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACT	
713	FR1HK14	
	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACT	
714	FR1HK15	
	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTAAAGCCTGGGGGGTCCCTTAGACT	
715	FR1HK16	
	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACT	
716	FR1HK17	
	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACGGCCTGGGGGGTCCCTGAGACT	
717	FR1HK18	
	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCAAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACT	
718	FR1HK19	
	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACT	
719	FR1HK20	30
	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACT	
720	FR1HK21	
	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACT	
721	FR1HK22	
	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGATCCCTGAGACT	
722	FR1HK23	
	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTAGGGGGTCCCTGAGACT	
723	FR1HK24	
	GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGTCTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACT	
724	FR1HK25	
	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACT	
725	FR1HK26	
	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCAGGGCGGTCCCTGAGACT	
726	FR1HK27	40
	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGGCTTGATCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACT	
727	FR1HK28	
	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACT	
728	FR1HK29	
	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGGCTTGATCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACT	
729	FR1HK30	
	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACT	
730	FR1HK31	
	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACT	
731	FR1HK32	
	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAAACT	

732 FRIHK33
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGGGGAGGCTTAGTTCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACT
733 FRIHK34
GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGACT
734 FRIHK35
CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGACACCCTGTCCCT
735 FRIHK36
CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCT
736 FRIHK37
CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCT
737 FRIHK38
CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCT
738 FRIHK39
CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCT
739 FRIHK40
CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCT
740 FRIHK41
CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCT
741 FRIHK42
GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCCGGGGAGTCTCTGAAGAT
742 FRIHK43
CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGCAGACCCTCTCACT
743 FRIHK44
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCCATGAGGTGAAGCAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGT

【表 2 1】

表 2 1 重鎖 FR1 (Kabat 定義) リバースプライマー (サブバンク 5 用)

744	FR1HK1'	GGTAAAGGTGTAACCCAGAAGCCTTGCAGGAGACCTTCACTGAGGCCCCAGGC	
745	FR1HK2'	GGTGAAGGTGTATCCAGAAGCCTTGCAGGAGACCTTCACTGAGGCCCCAGGC	
746	FR1HK3'	AGTGAGGGTGTATCCGGAACCTTGCAGGAGACCTTCACTGAGGCCCCAGGC	
747	FR1HK4'	AGTGAAGGTGTATCCAGAAGCCTTGCAGGAAACCTTCACTGAGGCCCCAGGC	
748	FR1HK5'	GGTGAAGGTGTATCCGGAAGCCTTGCAGGAAACCTTCACTGAGGACCCAGTC	
749	FR1HK6'	GGTGAAGGTGTATCCAGATGCCTTGCAGGAAACCTTCACTGAGGCCCCAGGC	
750	FR1HK7'	AGTAAAGGTGAATCCAGAAGCCTTGCAGGAGACCTTCACTGAGGCCCCAGGC	
751	FR1HK8'	GCTGAAGGTGCCTCCAGAAGCCTTGCAGGAGACCTTCACTGAGGACCCAGGC	
752	FR1HK9'	GGTGAAGGTGTATCCAGAAGCCTTGCAGGAGACCTTCACTGAGGCCCCAGGC	10
753	FR1HK10'	GCTGAGTGAGAACCCAGAGACGGTGCAGGTCAGCGTGAGGGTCTGTGTGGGT	
754	FR1HK11'	GCTGAGTGAGAACCCAGAGAAGGTGCAGGTCAGCGTGAGGGTCTGTGTGGGT	
755	FR1HK12'	GCTGAGTGAGAACCCAGAGAAGGTGCAGGTCAGGTGAGGTCTGTGTGGGT	
756	FR1HK13'	ACTGAAGGTGAATCCAGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCTTCCAGGC	
757	FR1HK14'	ACTGAAGGTGAATCCAGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCCCCAGGC	
758	FR1HK15'	ACTGAAAGTGAATCCAGAGGCTGCACAGGAGAGTCTAAGGGACCCCCAGGC	
759	FR1HK16'	ACTGAAGGTGAATCCAGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCCCCAGGC	
760	FR1HK17'	ATCAAAGGTGAATCCAGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCCCCAGGC	
761	FR1HK18'	ACTGAAGGTGAATCCAGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCCCCAGGC	
762	FR1HK19'	GCTAAAGGTGAATCCAGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCCCCAGGC	
763	FR1HK20'	ACTGAAGGTGAATCCAGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCTCCAGGC	
764	FR1HK21'	ACTGAAGGTGAATCCAGACGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCTCCAGGC	
765	FR1HK22'	ACTGAAGGTGAATCCAGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGATCCCCAGGC	
766	FR1HK23'	ACTGACGGTGAATCCAGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCCCCTAGGC	20
767	FR1HK24'	ATCAAAGGTGAATCCAGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCCCCAGGC	
768	FR1HK25'	ACTGAAGGTGAATCCAGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCCCCAGGC	
769	FR1HK26'	ACCAAAGGTGAATCCAGAAGCTGTACAGGAGAGTCTCAGGGACCGCCCTGGC	
770	FR1HK27'	ACTGACGGTGAACCCAGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCCCCAGGC	
771	FR1HK28'	ACTGAAGGTGAATCCAGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCCCCAGGC	
772	FR1HK29'	ACTGACGGTGAACCCAGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCCCCAGGC	
773	FR1HK30'	ACTAAAGGTGAATCCAGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCCCCAGGC	
774	FR1HK31'	ACTGAAGGTGAATCCAGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCTCCAGGC	
775	FR1HK32'	ACTGAAGGTGAACCCAGAGGCTGCACAGGAGAGTTTCAGGGACCCCCAGGC	
776	FR1HK33'	ACTGAAGGTGAATCCAGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCCCCAGGC	
777	FR1HK34'	ATCAAAGGTGAATCCAGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCTGCCAGGC	
778	FR1HK35'	GCTGATGGAGTAACCCAGAGACAGCGCAGGTGAGGGACAGGGTGTCCGAAGGC	
779	FR1HK36'	GCTGATGGAGCCACCAGAGACAGTACAGGTGAGGGACAGGGTCTGTGAAGGC	
780	FR1HK37'	ACTGAAGGACCCACCATAGACAGCGCAGGTGAGGGACAGGGTCTCCGAAGGC	
781	FR1HK38'	GCTGATGGAGCCACCAGAGACAGTGCAGGTGAGGGACAGGGTCTCCGAAGGC	30
782	FR1HK39'	ACTGATGGAGCCACCAGAGACAGTGCAGGTGAGGGACAGGGTCTCCGAAGGC	
783	FR1HK40'	ACTGATGGAGCCACCAGAGACAGTGCAGGTGAGGGACAGGGTCTCCGAAGGC	
784	FR1HK41'	GCTGACGGAGCCACCAGAGACAGTGCAGGTGAGGGACAGGGTCTCCGAAGGC	
785	FR1HK42'	GGTAAAGCTGTATCCAGAACCCTTACAGGAGATCTTCAGAGACTCCCCGGGC	
786	FR1HK43'	AGAGACACTGTCCCCGGAGATGGCACAGGTGAGTGAGAGGGTCTGCGAGGGC	
787	FR1HK44'	GGTGAAGCTGTAACCCAGAAGCCTTGCAGGAGACCTTCACTGAGGCCCCAGGC	

【0 1 3 7】

PCRは、下記のオリゴヌクレオチドの組合せで実施する（全部で44組）：FR1HK1/FR1HK1'、FR1HK2/FR1HK2'、FR1HK3/FR1HK3'、FR1HK4/FR1HK4'、FR1HK5/FR1HK5'、FR1HK6/FR1HK6'、FR1HK7/FR1HK7'、FR1HK8/FR1HK8'、FR1HK9/FR1HK9'、FR1HK10/FR1HK10'、FR1HK11/FR1HK11'、FR1HK12/FR1HK12'、FR1HK13/FR1HK13'、FR1HK14/FR1HK14'、FR1HK15/FR1HK15'、FR1HK16/FR1HK16'、FR1HK17/FR1HK17'、FR1HK18/FR1HK18'、FR1HK19/FR1HK19'、FR1HK20/FR1HK20'、FR1HK21/FR1HK21'、FR1HK22/FR1HK22'、FR1HK23/FR1HK23'、FR1HK24/FR1HK24'、FR1HK25/FR1HK25'、FR1HK26/FR1HK26'、FR1HK27/FR1HK27'、FR1HK28/FR1HK28'、FR1HK29/FR1HK29'、FR1HK30/FR1HK30'、FR1HK31/FR1HK31'、FR1HK32/FR1HK32'、FR1HK33/FR1HK33'、FR1HK34/FR1HK34'、FR1HK35/FR1HK35'、FR1HK36/FR1HK36'、FR1HK37/FR1HK37'、FR1HK38/FR1HK38'、FR1HK39/FR1HK39'、FR1HK40/FR1HK40'、FR1HK41/FR1HK41'、FR1HK42/FR1HK42'、FR1HK43/FR1HK43'、またはFR1HK44/FR1HK44'。PCR産物のプールがサブバンク5となる。

【0 1 3 8】

限定ではなく一例として、重鎖FR2サブバンク（Kabatの定義による）の構築は、表22お

よび表23（すべて5'から3'の方向で表示され、名称に続いて配列を示す）に記載のオリゴヌクレオチドを用いたオーバーラップ伸長法によるポリメラーゼ連鎖反応によって行う。

【表22】

表22 重鎖FR2（Kabat定義）フォワードプライマー（サブバンク6用）

788	FR2HK1	TGGGTGCGACAGGCCCCCTGGACAAGGGCTTG	
789	FR2HK2	TGGGTGCGACAGGCCCCCTGGACAAGGGCTTG	
790	FR2HK3	TGGGTGCGACAGGCTCCTGGAAAAGGGCTTG	
791	FR2HK4	TGGGTGCGCCAGGCCCCCGGACAAAGGCTTG	
792	FR2HK5	TGGGTGCGACAGGCCCCCGGACAAGCGCTTG	10
793	FR2HK6	TGGGTGCGACAGGCCCCCTGGACAAGGGCTTG	
794	FR2HK7	TGGGTGCGACAGGCTCGTGGACAACGCCTTG	
795	FR2HK8	TGGGTGCGACAGGCCCCCTGGACAAGGGCTTG	
796	FR2HK9	TGGGTGCGACAGGCCACTGGACAAGGGCTTG	
797	FR2HK10	TGGATCCGTCAGCCCCCAGGGAAGGCCCTGG	
798	FR2HK11	TGGATCCGTCAGCCCCCAGGGAAGGCCCTGG	
799	FR2HK12	TGGATCCGTCAGCCCCCAGGGAAGGCCCTGG	
800	FR2HK13	TGGATCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTTG	
801	FR2HK14	TGGGTCCGCCAAGCTACAGGAAAAGGTCTGG	
802	FR2HK15	TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTTG	
803	FR2HK16	TGGGCCCGCAAGGCTCCAGGAAAAGGGGCTTG	
804	FR2HK17	TGGGTCCGCCAAGCTCCAGGGAAGGGGCTTG	
805	FR2HK18	TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTTG	
806	FR2HK19	TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTTG	20
807	FR2HK20	TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTTG	
808	FR2HK21	TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTTG	
809	FR2HK22	TGGGTCCATCAGGCTCCAGGAAAAGGGGCTTG	
810	FR2HK23	TGGATCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTTG	
811	FR2HK24	TGGGTCCGTCAGCTCCGGGGAAGGGTCTTG	
812	FR2HK25	TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTTG	
813	FR2HK26	TGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTTG	
814	FR2HK27	TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTTG	
815	FR2HK28	TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGACTTG	
816	FR2HK29	TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTTG	
817	FR2HK30	TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTTG	
818	FR2HK31	TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTTG	
819	FR2HK32	TGGGTCCGCCAGGCTTCCGGGAAAGGGCTTG	
820	FR2HK33	TGGGTCCGCCAAGCTCCAGGGAAGGGGCTTG	30
821	FR2HK34	TGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCTTG	
522	FR2HK35	TGGATCCGGCAGCCCCCAGGGAAGGGACTTG	
823	FR2HK36	TGGATCCGCCAGCACCCAGGGAAGGGCCTTG	
824	FR2HK37	TGGATCCGCCAGCCCCCAGGGAAGGGGCTTG	
825	FR2HK38	TGGATCCGCCAGCCCCCAGGGAAGGGGCTTG	
826	FR2HK39	TGGATCCGGCAGCCCGCCGGAAGGGACTTG	
827	FR2HK40	TGGATCCGGCAGCCCCCAGGGAAGGGACTTG	
828	FR2HK41	TGGATCCGGCAGCCCCCAGGGAAGGGACTTG	
829	FR2HK42	TGGGTGCGCCAGATGCCCGGGAAGGCCTTG	
830	FR2HK43	TGGATCAGGCAGTCCCCATCGAGAGGCCTTG	
831	FR2HK44	TGGGTGCCACAGGCCCCCTGGACAAGGGCTTG	

【表 2 3】

表 2 3 重鎖 FR2 (Kabat 定義) リバースプライマー (サブバンク 6 用)

832	FR2HK1'	TCCCATCCACTCAAGCCCTTGTCCAGGGGCCT	
833	FR2HK2'	TCCCATCCACTCAAGCCCTTGTCCAGGGGCCT	
834	FR2HK3'	TCCCATCCACTCAAGCCCTTTTCCAGGAGCCT	
835	FR2HK4'	TCCCATCCACTCAAGCCCTTGTCCGGGGGCCT	
836	FR2HK5'	TCCCATCCACTCAAGCGCTTGTCCGGGGGCCT	
837	FR2HK6'	TCCCATCCACTCAAGCCCTTGTCCAGGGGCCT	
838	FR2HK7'	TCCTATCCACTCAAGGCGTTGTCCACGAGCCT	
839	FR2HK8'	TCCCATCCACTCAAGCCCTTGTCCAGGGGCCT	
840	FR2HK9'	TCCCATCCACTCAAGCCCTTGTCCAGTGGCCT	10
841	FR2HK10'	TGCAAGCCACTCCAGGGCCTTCCCTGGGGGCT	
842	FR2HK11'	TGCAAGCCACTCCAGGGCCTTTCCTGGGGGCT	
843	FR2HK12'	TGCAAGCCACTCCAGGGCCTTCCCTGGGGGCT	
844	FR2HK13'	TGAAACCCACTCCAGCCCTTCCCTGGAGCCT	
845	FR2HK14'	TGAGACCCACTCCAGACCTTTTCCTGTAGCTT	
846	FR2HK15'	GCCAACCCACTCCAGCCCTTCCCTGGAGCCT	
847	FR2HK16'	CGATACCCACTCCAGCCCTTTTCCTGGAGCCT	
848	FR2HK17'	AGAGACCCACTCCAGCCCTTCCCTGGAGCCT	
849	FR2HK18'	TGAGACCCACTCCAGCCCTTCCCTGGAGCCT	
850	FR2HK19'	TGAGACCCACTCCAGCCCTTCCCTGGAGCCT	
851	FR2HK20'	TGCCACCCACTCCAGCCCTTGCCTGGAGCCT	
852	FR2HK21'	TGCCACCCACTCCAGCCCTTGCCTGGAGCCT	
853	FR2HK22'	CGATACCCACTCCAGCCCTTTTCCTGGAGCCT	20
854	FR2HK23'	TGAGACCCACTCCAGCCCTTCCCTGGAGCCT	
855	FR2HK24'	AGAGACCCACTCCAGACCCTTCCCGGAGCCT	
856	FR2HK25'	TGAAACCCACTCCAGCCCTTCCCTGGAGCCT	
857	FR2HK26'	ACCTACCCACTCCAGCCCTTCCCTGGAGCCT	
858	FR2HK27'	TGAGACCCACTCCAGCCCTTCCCTGGAGCCT	
859	FR2HK28'	TGAAACATATTCCAGTCCCTTCCCTGGAGCCT	
860	FR2HK29'	TGAGACCCACTCCAGCCCTTCCCTGGAGCCT	
861	FR2HK30'	GGCCACCCACTCCAGCCCTTCCCTGGAGCCT	
862	FR2HK31'	GCCAACCCACTCCAGCCCTTCCCTGGAGCCT	
863	FR2HK32'	GCCAACCCACTCCAGCCCTTTCCCGGAAGCCT	
864	FR2HK33'	TGAGACCCACACCAGCCCTTCCCTGGAGCCT	
865	FR2HK34'	TGAGACCCACTCCAGGCCCTTCCCTGGAGCCT	
866	FR2HK35'	CCCAATCCACTCCAGTCCCTTCCCTGGGGGCT	
867	FR2HK36'	CCCAATCCACTCCAGGCCCTTCCCTGGGTGCT	
868	FR2HK37'	CCCAATCCACTCCAGGCCCTTCCCTGGGGGCT	30
869	FR2HK38'	CCCAATCCACTCCAGGCCCTTCCCTGGGGGCT	
870	FR2HK39'	CCCAATCCACTCCAGTCCCTTCCCGGCGGGCT	
871	FR2HK40'	CCCAATCCACTCCAGTCCCTTCCCTGGGGGCT	
872	FR2HK41'	CCCAATCCACTCCAGTCCCTTCCCTGGGGGCT	
873	FR2HK42'	CCCCATCCACTCCAGGCCCTTCCCGGGCATCT	
874	FR2HK43'	TCCAGCCACTCAAGCCCTCTCGATGGGGACT	
875	FR2HK44'	TCCCATCCACTCAAGCCCTTGTCCAGGGGCCT	

【0 1 3 9】

PCRは、下記のオリゴヌクレオチドの組合せで実施する（全部で44組）：FR2HK1/FR2HK1'、FR2HK2/FR2HK2'、FR2HK3/FR2HK3'、FR2HK4/FR2HK4'、FR2HK5/FR2HK5'、FR2HK6/FR2HK6'、FR2HK7/FR2HK7'、FR2HK8/FR2HK8'、FR2HK9/FR2HK9'、FR2HK10/FR2HK10'、FR2HK11/FR2HK11'、FR2HK12/FR2HK12'、FR2HK13/FR2HK13'、FR2HK14/FR2HK14'、FR2HK15/FR2HK15'、FR2HK16/FR2HK16'、FR2HK17/FR2HK17'、FR2HK18/FR2HK18'、FR2HK19/FR2HK19'、FR2HK20/FR2HK20'、FR2HK21/FR2HK21'、FR2HK22/FR2HK22'、FR2HK23/FR2HK23'、FR2HK24/FR2HK24'、FR2HK25/FR2HK25'、FR2HK26/FR2HK26'、FR2HK27/FR2HK27'、FR2HK28/FR2HK28'、FR2HK29/FR2HK29'、FR2HK30/FR2HK30'、FR2HK31/FR2HK31'、FR2HK32/FR2HK32'、FR2HK33/FR2HK33'、FR2HK34/FR2HK34'、FR2HK35/FR2HK35'、FR2HK36/FR2HK36'、FR2HK37/FR2HK37'、FR2HK38/FR2HK38'、FR2HK39/FR2HK39'、FR2HK40/FR2HK40'、FR2HK41/FR2HK41'、FR2HK42/FR2HK42'、FR2HK43/FR2HK43'、またはFR2HK44/FR2HK44'。PCR産物のプールがサブバンク6となる。

【0 1 4 0】

限定ではなく一例として、重鎖FR3サブバンク（Kabatの定義による）の構築は、表24および表25（すべて5'から3'の方向で表示され、名称に続いて配列を示す）に記載のオリゴヌクレオチドを用いたオーバーラップ伸長法によるポリメラーゼ連鎖反応によって行う。

【表 2 4】

表 2 4 重鎖 FR3（Kabat 定義）フォワードプライマー（サブバンク 7 用）

876	FR3HK1	AGAGTCACCATGACCACAGACACATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCTG	
877	FR3HK2	AGGGTCACCATGACCAGGGACACGTCCATCAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGGCTGAGATCTG	
878	FR3HK3	AGAGTCACCATGACCGAGGACACATCTACAGACACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTG	
879	FR3HK4	AGAGTCACCATGACCGAGGACACATCCGCGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTG	10
880	FR3HK5	AGAGTCACCATGACCGAGGACAGGTCTATGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTG	
881	FR3HK6	AGAGTCACCATGACCAGGGACACGTCCACGAGCACAGTCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTG	
882	FR3HK7	AGAGTCACCATGACCGAGGACATGTCCAAAAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTG	
883	FR3HK8	AGAGTCACGATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTG	
884	FR3HK9	AGAGTCACCATGACCAGGAACACCTCCATAAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTG	
885	FR3HK10	AGGCTCACCATCTCCAAGGACACCTCCAAAAGCCAGGTGGTCCTTACCATGACCAACATGGACCCTG	
886	FR3HK11	AGGTCACCATCTCCAAGGACACCTCCAAAAGCCAGGTGGTCCTTACAATGACCAACATGGACCCTG	
887	FR3HK12	AGGCTCACCATCTCCAAGGACACCTCCAAAAGCCAGGTGGTCCTTACAATGACCAACATGGACCCTG	
888	FR3HK13	CGATTACCATCTCCAGGGACAAACGCCAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCG	
889	FR3HK14	CGATTACCATCTCCAGAGAAAAATGCCAAGAACTCCTTGTATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCCG	
890	FR3HK15	AGATTACCATCTCAAGAGAGATTTCCAAAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCG	
891	FR3HK16	CGATTATCATCTCCAGAGACAATTCCAGGAACCTCCTGTATCTGCAAAGAAGACAGCGGAGAGCCG	
892	FR3HK17	CGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCCG	
893	FR3HK18	CGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCG	
894	FR3HK19	CGGTTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCG	
895	FR3HK20	CGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTG	20
896	FR3HK21	CGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCG	
897	FR3HK22	CGATTATCATCTCCAGAGACAATTCCAGGAACACCTGTATCTGCAAACGAATAGCCTGAGGGCCG	
898	FR3HK23	AGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAAAGAACACGCTGTATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCTG	
899	FR3HK24	CGATTACCATCTCCAGAGACAACAGCAAAAACCTCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAACTG	
900	FR3HK25	CGATTACCATCTCCAGAGACAATTGCCAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGACG	
901	FR3HK26	AGATTACCATCTCAAGAGATGATTCCAAAAGCATCGCCTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAAACCG	
902	FR3HK27	CGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAAAGAACACGCTGTATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCCG	
903	FR3HK28	AGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAAAGAACACGCTGTATCTTCAAATGGGAGCCTGAGAGCTG	
904	FR3HK29	CGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAAAGAACACGCTGTATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCTG	
905	FR3HK30	CGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCG	
906	FR3HK31	AGATTACCATCTCAAGAGATGATTCAAAGAACCTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAAACCG	
907	FR3HK32	AGGTTACCATCTCCAGAGATGATTCAAAGAACACGGCGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAAACCG	
908	FR3HK33	CGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCCG	
909	FR3HK34	CGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCTG	
910	FR3HK35	CGAGTCACCATGTGAGTAGACACGTCCAAAAGAACAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCG	
911	FR3HK36	CGAGTTACCATATCAGTAGACACGTCTAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACTGCCG	30
912	FR3HK37	CGAGTCACCATATCCGTAGACACGTCCAAAAGAACAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCG	
913	FR3HK38	CGAGTCACCATATCCGTAGACACGTCCAAAAGAACAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCG	
914	FR3HK39	CGAGTCACCATGTGAGTAGACACGTCCAAAAGAACAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCG	
915	FR3HK40	CGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAAAGAACAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCTG	
916	FR3HK41	CGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAAAGAACAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCTG	
917	FR3HK42	CAGGTCACCATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTACCTGCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCT	
918	FR3HK43	CGAATAACCATCAACCCAGACACATCCAAAAGAACAGTTCTCCCTGCAGCTGAACTCTGTGACTCCCG	
919	FR3HK44	CGGTTTGTCTCTCCATGGACACCTCTGCCAGCACAGCATACCTGCAGATCAGCAGCCTAAAGGCTG	

【表 2 5】

表 2 5 重鎖 FR3 (Kabat 定義) リバースプライマー (サブバンク 7 用)

920	FR3HK1'	TCTCGCACAGTAATACACGGCCGTGTCGTCAGATCTCAGGCTCCTCAGCT
921	FR3HK2'	TCTCGCACAGTAATACACGGCCGTGTCGTCAGATCTCAGCCTGCTCAGCT
922	FR3HK3'	TGTTGCACAGTAATACACGGCCGTGTCCTCAGATCTCAGGCTGCTCAGCT
923	FR3HK4'	TCTCGCACAGTAATACACAGCCATGTCCTCAGATCTCAGGCTGCTCAGCT
924	FR3HK5'	TCTTGCACAGTAATACATGGCTGTGTCCTCAGATCTCAGGCTGCTCAGCT
925	FR3HK6'	TCTCGCACAGTAATACACGGCCGTGTCCTCAGATCTCAGGCTGCTCAGCT
926	FR3HK7'	TGCCGCACAGTAATACACGGCCGTGTCCTCGGATCTCAGGCTGCTCAGCT
927	FR3HK8'	TCTCGCACAGTAATACACGGCCGTGTCCTCAGATCTCAGGCTGCTCAGCT
928	FR3HK9'	TCTCGCACAGTAATACACGGCCGTGTCCTCAGATCTCAGGCTGCTCAGCT
929	FR3HK10'	CCGTGCACAGTAATATGTGGCTGTGTCCACAGGGTCCATGTTGGTCATTG
930	FR3HK11'	GTGTGCACAGTAATATGTGGCTGTGTCCACAGGGTCCATGTTGGTCATTG
931	FR3HK12'	CCGTGCACAATAATACGTGGCTGTGTCCACAGGGTCCATGTTGGTCATTG
932	FR3HK13'	TCTCGCACAGTAATACACGGCCGTGTCCTCGGCTCTCAGGCTGTTTCATT
933	FR3HK14'	TCTTGCACAGTAATACACAGCCGTGTCCCGGCTCTCAGGCTGTTTCATT
934	FR3HK15'	TGTGGTACAGTAATACACGGCCGTGTGTCCTCGGTTTTTCAGGCTGTTTCATT
935	FR3HK16'	TCTCACACAGTAATACACAGCCATGTCCTCGGCTCTCCGTCTGTCTTTT
936	FR3HK17'	TCTCGCACAGTGATACAAGGCCGTGTCCTCGGCTCTCAGACTGTTTCATT
937	FR3HK18'	TCTCGCACAGTAATACACAGCCGTGTCCTCGGCTCTCAGGCTGTTTCATT
938	FR3HK19'	TTTCGCACAGTAATATACGGCCGTGTCCTCGGCTCTCAGGCTGTTTCATT
939	FR3HK20'	TCTCGCACAGTAATACACAGCCGTGTCCTCAGCTCTCAGGCTGTTTCATT
940	FR3HK21'	CTCGCACAGTAATACACAGCCGTGTCCTCGGCTCTCAGGCTGTTTCATT
941	FR3HK22'	TCTCACACAGTAATACACAGCCGTGTCCTCGGCCCTCAGGCTATTTCGTT
942	FR3HK23'	TCTGGCACAGTAATACACGGCCGTGCCCTCAGCTCAGCTGTGTTTCATT
943	FR3HK24'	TTTTGCACAGTAATACAAGGCCGTGTCCTCAGTTCTCAGACTGTTTCATT
944	FR3HK25'	TCTCGCACAGTAATACACAGCCGTGTCCTCGTCTCTCAGGCTGTTTCATT
945	FR3HK26'	TCTAGTACAGTAATACACGGCTGTGTCCTCGGTTTTTCAGGCTGTTTCATT
946	FR3HK27'	TCTCGCACAGTAATACACGGCCGTGTCCTCGGCTCTCAGGCTGTTTCATT
947	FR3HK28'	TCTCGCACAGTAATACACAGCCATGTCCTCAGCTCTCAGGCTGCCCATTT
948	FR3HK29'	TCTCGCACAGTAATACACAGCCGTGTCCTCAGCTCTCAGGCTGTTTCATT
949	FR3HK30'	TCTCGCACAGTAATACACAGCCGTGTCCTCGGCTCTCAGGCTGTTTCATT
950	FR3HK31'	TCTAGCACAGTAATACACGGCCGTGTCCTCGGTTTTTCAGGCTGTTTCATT
951	FR3HK32'	TCTAGTACAGTAATACACGGCCGTGTCCTCGGTTTTTCAGGCTGTTTCATT
952	FR3HK33'	TCTTGCACAGTAATACACAGCCGTGTCCTCGGCTCTCAGACTGTTTCATT
953	FR3HK34'	TTTTGCACAGTAATACAAGGCCGTGTCCTCAGCTCTCAGACTGTTTCATT
954	FR3HK35'	TCTCGCACAGTAATACACGGCCGTGTCCACGGCGGTACACAGAGCTCAGCT
955	FR3HK36'	TCTCGCACAGTAATACACGGCCGTGTCCGCGGCAGTCACAGAGCTCAGCT
956	FR3HK37'	TCTCGCACAGTAATACACAGCCGTGTCCGCGGCGGTACACAGAGCTCAGCT
957	FR3HK38'	TCTCGCACAGTAATACACAGCCGTGTCTGCGGCGGTACACAGAGCTCAGCT
958	FR3HK39'	TCTCGCACAGTAATACACGGCCGTGTCCGCGGCGGTACACAGAGCTCAGCT
959	FR3HK40'	TCTCGCACAGTAATACACGGCCGTGTCCGCGAGCGGTACACAGAGCTCAGCT
960	FR3HK41'	TCTCGCACAGTAATACACGGCCGTGTCCGCGAGCGGTACACAGAGCTCAGCT
961	FR3HK42'	TCTCGCACAGTAATACATGGCGGTGTCCGAGGCCTTCAGGCTGCTCCACT
962	FR3HK43'	TCTTGCACAGTAATACACAGCCGTGTCCTCGGGAGTCACAGAGTTCAGCT
963	FR3HK44'	TCTCGCACAGTAATACATGGCCATGTCCTCAGCCTTTAGGCTGCTGATCT

【0 1 4 1】

PCRは、下記のオリゴヌクレオチドの組合せで実施する（全部で44組）：FR3HK1/FR3HK1'、FR3HK2/FR3HK2'、FR3HK3/FR3HK3'、FR3HK4/FR3HK4'、FR3HK5/FR3HK5'、FR3HK6/FR3HK6'、FR3HK7/FR3HK7'、FR3HK8/FR3HK8'、FR3HK9/FR3HK9'、FR3HK10/FR3HK10'、FR3HK11/FR3HK11'、FR3HK12/FR3HK12'、FR3HK13/FR3HK13'、FR3HK14/FR3HK14'、FR3HK15/FR3HK15'、FR3HK16/FR3HK16'、FR3HK17/FR3HK17'、FR3HK18/FR3HK18'、FR3HK19/FR3HK19'、FR3HK20/FR3HK20'、FR3HK21/FR3HK21'、FR3HK22/FR3HK22'、FR3HK23/FR3HK23'、FR3HK24/FR3HK24'、FR3HK25/FR3HK25'、FR3HK26/FR3HK26'、FR3HK27/FR3HK27'、FR3HK28/FR3HK28'、FR3HK29/FR3HK29'、FR3HK30/FR3HK30'、FR3HK31/FR3HK31'、FR3HK32/FR3HK32'、FR3HK33/FR3HK33'、FR3HK34/FR3HK34'、FR3HK35/FR3HK35'、FR3HK36/FR3HK36'、FR3HK37/FR3HK37'、FR3HK38/FR3HK38'、FR3HK39/FR3HK39'、FR3HK40/FR3HK40'、FR3HK41/FR3HK41'、FR3HK42/FR3HK42'、FR3HK43/FR3HK43'、またはFR3HK44/FR3HK44'。PCR産物のプールがサブバンク7となる。

【0 1 4 2】

10

20

30

40

50

限定ではなく一例として、重鎖FR4サブバンクの構築は、表26および表27（すべて5'から3'の方向で表示され、名称に続いて配列を示す）に記載のオリゴヌクレオチドを用いたオーバーラップ伸長法によるポリメラーゼ連鎖反応によって行う。

【表 2 6】

表 2 6 重鎖 FR4 フォワードプライマー（サブバンク 11 用）

964	FR4H1	TGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTCTCCTCA	
965	FR4H2	TGGGGCCCGTGGCACCCCTGGTCACTGTCTCCTCA	
966	FR4H3	TGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCA	
967	FR4H4	TGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA	
968	FR4H5	TGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA	10
969	FR4H6	TGGGGGCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA	

【表 2 7】

表 2 7 重鎖 FR4 リバースプライマー（サブバンク 11 用）

970	FR4H1'	TGAGGAGACGGTGACCAGGGTGCCCTGGCCCCA	
971	FR4H2'	TGAGGAGACAGTGACCAGGGTGCCACGGCCCCA	
972	FR4H3'	TGAAGAGACGGTGACCATTTGTCCTTGGCCCCA	
973	FR4H4'	TGAGGAGACGGTGACCAGGGTTCCCTTGGCCCCA	
974	FR4H5'	TGAGGAGACGGTGACCAGGGTTCCCTTGGCCCCA	
975	FR4H6'	TGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCCTTGGCCCCA	20

【0 1 4 3】

PCRは、下記のオリゴヌクレオチドの組合せで実施する（全部で6組）：FR4H1/FR4H1'、FR4H2/FR4H2'、FR4H3/FR4H3'、FR4H4/FR4H4'、FR4H5/FR4H5' またはFR4H6/FR4H6'。PCR産物のプールがサブバンク11となる。

【0 1 4 4】

いくつかの実施形態において、重鎖FRサブバンク8、9、10および11が構築されるが、このサブバンク8は、そのそれぞれが重鎖FR1をコードする核酸配列を含んでなり；サブバンク9はそのそれぞれは重鎖FR2をコードする核酸配列を含んでなり；サブバンク10はそのそれぞれは重鎖FR3をコードする核酸配列を含んでなり；ならびにサブバンク11はそのそれぞれは重鎖FR4をそれぞれコードする核酸配列を含んでなり；重鎖FR1、FR2およびFR3は、CDR H1およびH2に関するChothiaの定義にしたがって定義される。いくつかの実施形態において、FR配列は機能性ヒト抗体配列に由来する。他の実施形態において、FR配列はヒト生殖系列重鎖配列に由来する。

【0 1 4 5】

限定ではなく例示として、下記は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を用いて4つの重鎖FRサブバンクを作製する方法を説明するものであって、ヒト生殖系列重鎖配列をテンプレートとして使用する。重鎖FRサブバンク8、9および10（それぞれFR1、2、3をコードする）は、44個のヒト生殖系列重鎖配列（VH1-18、VH1-2、VH1-24、VH1-3、VH1-45、VH1-46、VH1-58、VH1-69、VH1-8、VH2-26、VH2-5、VH2-70、VH3-11、VH3-13、VH3-15、VH3-16、VH3-20、VH3-21、VH3-23、VH3-30、VH3-33、VH3-35、VH3-38、VH3-43、VH3-48、VH3-49、VH3-53、VH3-64、VH3-66、VH3-7、VH3-72、VH3-73、VH3-74、VH3-9、VH4-28、VH4-31、VH4-34、VH4-39、VH4-4、VH4-59、VH4-61、VH5-51、VH6-1およびVH7-81）を包含する。Matsudara、1998、J. Exp. Med., 188: 1973-1975を参照されたい。配列はNCBIウェブサイト：www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/showGermline.cgi?organism=human&chainType=VH&seqType=nucleotideに取りまとめられている。重鎖FRサブバンク11（FR4をコードする）は、前記のサブバンク11と同じである。

【0 1 4 6】

限定ではなく一例として、重鎖FR1サブバンク（Chothiaの定義による）の構築は、表28および表29（すべて5'から3'の方向で表示され、名称に続いて配列を示す）に記載のオ

10

20

30

40

50

リボヌクレオチドを用いたオーバーラップ伸長法によるポリメラーゼ連鎖反応によって行う。

【表 2 8】

表 2 8 重鎖 FR1 (Chothia 定義) フォワードプライマー (サブバンク 8 用)

976	FR1HC1	CAGGTTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCA	
977	FR1HC2	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCA	
978	FR1HC3	CAGGTCCAGCTGGTACAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCA	
979	FR1HC4	CAGGTTTCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCA	
980	FR1HC5	CAGATGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGACTGGGTCCTCA	
981	FR1HC6	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCA	10
982	FR1HC7	CAAAATGCAGCTGGTGCAGTCTGGGCCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGACCTCA	
983	FR1HC8	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCG	
984	FR1HC9	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCA	
985	FR1HC10	CAGGTCACCTTGAAGGAGTCTGGTCCTGTGCTGGTGAACCCACAGAGACC	
986	FR1HC11	CAGATCACCTTGAAGGAGTCTGGTCCTACGCTGGTGAACCCACACAGACC	
987	FR1HC12	CAGGTCACCTTGAAGGAGTCTGGTCCTGCGCTGGTGAACCCACACAGACC	
988	FR1HC13	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCAAGCCTGGAGGGTCC	
989	FR1HC14	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCC	
990	FR1HC15	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTAAAGCCTGGGGGGTCC	
991	FR1HC16	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCC	
992	FR1HC17	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCC	
993	FR1HC18	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCAAGCCTGGGGGGTCC	
994	FR1HC19	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCC	
995	FR1HC20	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCC	20
996	FR1HC21	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCC	
997	FR1HC22	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGATCC	
998	FR1HC23	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTAGGGGGTCC	
999	FR1HC24	GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGTCTGGTACAGCCTGGGGGGTCC	
1000	FR1HC25	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCC	
1001	FR1HC26	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCAGGGCGGTCC	
1002	FR1HC27	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGGCTTGATCCAGCCTGGGGGGTCC	
1003	FR1HC28	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCC	
1004	FR1HC29	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGGCTTGATCCAGCCTGGGGGGTCC	
1005	FR1HC30	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCC	
1006	FR1HC31	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGAGGGTCC	
1007	FR1HC32	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCC	
1008	FR1HC33	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGGGGAGGCTTAGTTACAGCCTGGGGGGTCC	
1009	FR1HC34	GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGCAGGTCC	30
1010	FR1HC35	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACC	
1011	FR1HC36	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACC	
1012	FR1HC37	CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGGAGACC	
1013	FR1HC38	CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACC	
1014	FR1HC39	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACC	
1015	FR1HC40	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACC	
1016	FR1HC41	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACC	
1017	FR1HC42	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCCGGGGAGTCT	
1018	FR1HC43	CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAAGTCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGAGACC	
1019	FR1HC44	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCCATGAGGTGAAGCAGCCTGGGGCCTCA	

【表 2 9】

表 2 9 重鎖 FR1 (Chothia 定義) リバースプライマー (サブバンク 8 用)

1020	FR1HC1'	AGAAGCCTTGCAGGAGACCTTCACTGAGGCCCCAGGCTTCTTCAC
1021	FR1HC2'	AGAAGCCTTGCAGGAGACCTTCACTGAGGCCCCAGGCTTCTTCAC
1022	FR1HC3'	GGAAACCTTGCAGGAGACCTTCACTGAGGCCCCAGGCTTCTTCAC
1023	FR1HC4'	AGAAGCCTTGCAGGAAACCTTCACTGAGGCCCCAGGCTTCTTCAC
1024	FR1HC5'	GGAAGCCTTGCAGGAAACCTTCACTGAGGACCCAGTCTTCTTCAC
1025	FR1HC6'	AGATGCCTTGCAGGAAACCTTCACTGAGGCCCCAGGCTTCTTCAC
1026	FR1HC7'	AGAAGCCTTGCAGGAGACCTTCACTGAGGTCCCAGGCTTCTTCAC
1027	FR1HC8'	AGAAGCCTTGCAGGAGACCTTCACTGAGGACCCAGGCTTCTTCAC
1028	FR1HC9'	AGAAGCCTTGCAGGAGACCTTCACTGAGGCCCCAGGCTTCTTCAC
1029	FR1HC10'	AGAGACGGTGCAGGTGACGCTGAGGGTCTCTGTGGGTTTCACCAG
1030	FR1HC11'	AGAGAAGGTGCAGGTGACGCTGAGGGTCTGTGTGGGTTTCACCAG
1031	FR1HC12'	AGAGAAGGTGCAGGTGAGTGTGAGGGTCTGTGTGGGTTTCACCAG
1032	FR1HC13'	AGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCCCTCCAGGCTTGACCAA
1033	FR1HC14'	AGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCCCCCAGGCTGTACCAA
1034	FR1HC15'	AGAGGCTGCACAGGAGAGTCTAAGGGACCCCCCAGGCTTTACCAA
1035	FR1HC16'	AGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCCCCCAGGCTGTACCAA
1036	FR1HC17'	AGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCCCCCAGGCCGTACCA
1037	FR1HC18'	AGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCCCCCAGGCTTGACCAA
1038	FR1HC19'	AGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCCCCCAGGCTGTACCAA
1039	FR1HC20'	AGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCTCCAGGCTGGACCA
1040	FR1HC21'	AGACGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCTCCAGGCTGGACCA
1041	FR1HC22'	AGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGATCCCCCAGGCTGTACCAA
1042	FR1HC23'	AGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCCCCCAGGCTGTACCAA
1043	FR1HC24'	AGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCCCCCAGGCTGTACCA
1044	FR1HC25'	AGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCCCCCAGGCTGTACCAA
1045	FR1HC26'	AGAAGCTGTACAGGAGAGTCTCAGGGACCGCCCTGGCTGTACCAA
1046	FR1HC27'	AGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCCCCCAGGCTGGATCAA
1047	FR1HC28'	AGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCCCCCAGGCTGGACCAA
1048	FR1HC29'	AGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCCCCCAGGCTGGATCAA
1049	FR1HC30'	AGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCCCCCAGGCTGGACCAA
1050	FR1HC31'	AGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCTCCAGGCTGGACCAA
1051	FR1HC32'	AGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCCCCCAGGCTGGACCAA
1052	FR1HC33'	AGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCCCCCAGGCTGAACTAA
1053	FR1HC34'	AGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCTGCCAGGCTGTACCAA
1054	FR1HC35'	AGAGACAGCGCAGGTGAGGGACAGGGTGTCCGAAGGCTTCACCAG
1055	FR1HC36'	AGAGACAGTACAGGTGAGGGACAGGGTCTGTGAAGGCTTCACCAG
1056	FR1HC37'	ATAGACAGCGCAGGTGAGGGACAGGGTCTCCGAAGGCTTCAACAG
1057	FR1HC38'	AGAGACAGTGCAGGTGAGGGACAGGGTCTCCGAAGGCTTCACCAG
1058	FR1HC39'	AGAGACAGTGCAGGTGAGGGACAGGGTCTCCGAAGGCTTCACCAG
1059	FR1HC40'	AGAGACAGTGCAGGTGAGGGACAGGGTCTCCGAAGGCTTCACCAG
1060	FR1HC41'	AGAGACAGTGCAGGTGAGGGACAGGGTCTCCGAAGGCTTCACCAG
1061	FR1HC42'	AGAACCCTTACAGGAGATCTTCAGAGACTCCCCGGGCTTTTTCAC
1062	FR1HC43'	GGAGATGGCACAGGTGAGTGAGAGGGTCTGCGAGGGCTTCACCAG
1063	FR1HC44'	AGAAGCCTTGCAGGAGACCTTCACTGAGGCCCCAGGCTGCTTCAC

10

20

30

【0147】

PCRは、下記のオリゴヌクレオチドの組合せで実施する（全部で44組）：FR1HC1/FR1HC1'、FR1HC2/FR1HC2'、FR1HC3/FR1HC3'、FR1HC4/FR1HC4'、FR1HC5/FR1HC5'、FR1HC6/FR1HC6'、FR1HC7/FR1HC7'、FR1HC8/FR1HC8'、FR1HC9/FR1HC9'、FR1HC10/FR1HC10'、FR1HC11/FR1HC11'、FR1HC12/FR1HC12'、FR1HC13/FR1HC13'、FR1HC14/FR1HC14'、FR1HC15/FR1HC15'、FR1HC16/FR1HC16'、FR1HC17/FR1HC17'、FR1HC18/FR1HC18'、FR1HC19/FR1HC19'、FR1HC20/FR1HC20'、FR1HC21/FR1HC21'、FR1HC22/FR1HC22'、FR1HC23/FR1HC23'、FR1HC24/FR1HC24'、FR1HC25/FR1HC25'、FR1HC26/FR1HC26'、FR1HC27/FR1HC27'、FR1HC28/FR1HC28'、FR1HC29/FR1HC29'、FR1HC30/FR1HC30'、FR1HC31/FR1HC31'、FR1HC32/FR1HC32'、FR1HC33/FR1HC33'、FR1HC34/FR1HC34'、FR1HC35/FR1HC35'、FR1HC36/FR1HC36'、FR1HC37/FR1HC37'、FR1HC38/FR1HC38'、FR1HC39/FR1HC39'、FR1HC40/FR1HC40'、FR1HC41/FR1HC41'、FR1HC42/FR1HC42'、FR1HC43/FR1HC43'、またはFR1HC44/FR1HC44'。PCR産物のプールがサブバンク8となる。

40

【0148】

限定ではなく一例として、重鎖FR2サブバンク（Chothiaの定義による）の構築は、表30

50

および表31（すべて5'から3'の方向で表示され、名称に続いて配列を示す）に記載のオリゴヌクレオチドを用いたオーバーラップ伸長法によるポリメラーゼ連鎖反応によって行う。

【表 30】

表 30 重鎖 FR2 (Chothia 定義) フォワードプライマー (サブバンク 9 用)

1064	FR2HC1	TATGGTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCCCTGGACAAGGGCTT	
1065	FR2HC2	TACTATATGCACTGGGTGCGACAGGCCCCCTGGACAAGGGCTT	
1066	FR2HC3	TTATCCATGCACTGGGTGCGACAGGCTCCTGGAAAAGGGCTT	
1067	FR2HC4	TATGCTATGCATTGGGTGCGCCAGGCCCCCGGACAAAAGGCTT	
1068	FR2HC5	CGCTACCTGCACTGGGTGCGACAGGCCCCCGGACAAGCGCTT	10
1069	FR2HC6	TACTATATGCACTGGGTGCGACAGGCCCCCTGGACAAGGGCTT	
1070	FR2HC7	TCTGCTATGCAGTGGGTGCGACAGGCTCGTGGACAACGCCTT	
1071	FR2HC8	TATGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCCCTGGACAAGGGCTT	
1072	FR2HC9	TATGATATCAACTGGGTGCGACAGGCCACTGGACAAGGGCTT	
1073	FR2HC10	ATGGGTGTGAGCTGGATCCGTCAGCCCCCAGGGAAGGCCCTG	
1074	FR2HC11	GTGGGTGTGGGTGGATCCGTCAGCCCCCAGGGAAGGCCCTG	
1075	FR2HC12	ATGTGTGTGAGCTGGATCCGTCAGCCCCCAGGGAAGGCCCTG	
1076	FR2HC13	TACTACATGAGCTGGATCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTG	
1077	FR2HC14	TACGACATGCACTGGGTCCGCCAAGCTACAGGAAAAGGTCTG	
1078	FR2HC15	GCCTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTG	
1079	FR2HC16	AGTGACATGAACTGGGCCCGCAAGGCTCCAGGAAAAGGGGCTG	
1080	FR2HC17	TATGGCATGAGCTGGGTCCGCCAAGCTCCAGGGAAGGGGCTG	
1081	FR2HC18	TATAGCATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTG	
1082	FR2HC19	TATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTG	20
1083	FR2HC20	TATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTG	
1084	FR2HC21	TATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTG	
1085	FR2HC22	AGTGACATGAACTGGGTCCATCAGGCTCCAGGAAAAGGGGCTG	
1086	FR2HC23	AATGAGATGAGCTGGATCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTG	
1087	FR2HC24	TATACCATGCACTGGGTCCGTCAAGCTCCGGGGAAGGGTCTG	
1088	FR2HC25	TATAGCATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTG	
1089	FR2HC26	TATGCTATGAGCTGGGTCCGCCAAGCTCCAGGGAAGGGGCTG	
1090	FR2HC27	AACTACATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTG	
1091	FR2HC28	TATGCTATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGACTG	
1092	FR2HC29	AACTACATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTG	
1093	FR2HC30	TATTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTG	
1094	FR2HC31	CACTACATGGACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTG	
1095	FR2HC32	TCTGCTATGCACTGGGTCCGCCAGGCTTCCGGGAAAGGGCTG	
1096	FR2HC33	TACTGGATGCACTGGGTCCGCCAAGCTCCAGGGAAGGGGCTG	30
1097	FR2HC34	TATGCCATGCACTGGGTCCGCCAAGCTCCAGGGAAGGGCCTG	
1098	FR2HC35	AACTGGTGGGGCTGGATCCGGCAGCCCCCAGGGAAGGGACTG	
1099	FR2HC36	TACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCACCAGGGAAGGGCCTG	
1100	FR2HC37	TACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCCCCCAGGGAAGGGGCTG	
1101	FR2HC38	TACTACTGGGGCTGGATCCGCCAGCCCCCAGGGAAGGGGCTG	
1102	FR2HC39	TACTACTGGAGCTGGATCCGGCAGCCCCCGGGGAAGGGACTG	
1103	FR2HC40	TACTACTGGAGCTGGATCCGGCAGCCCCCAGGGAAGGGACTG	
1104	FR2HC41	TACTACTGGAGCTGGATCCGGCAGCCCCCAGGGAAGGGACTG	
1105	FR2HC42	TACTGGATCGGCTGGGTGCGCCAGATGCCCGGGAAAGGCCTG	
1106	FR2HC43	GCTGCTTGAACTGGATCAGGCAGTCCCCATCGAGAGGCCTT	
1107	FR2HC44	TATGGTATGAATTGGGTGCCACAGGCCCCCTGGACAAGGGCTT	

【表 3 1】

表 3 1 重鎖 FR2 (Chothia 定義) リバースプライマー (サブバンク 9 用)

1108	FR2HC1'	GATCCATCCCATCCACTCAAGCCCTTGTCCAGGGGCGCTG	
1109	FR2HC2'	GATCCATCCCATCCACTCAAGCCCTTGTCCAGGGGCGCTG	
1110	FR2HC3'	AAAACCTCCCATCCACTCAAGCCCTTTTCCAGGAGCCTG	
1111	FR2HC4'	GCTCCATCCCATCCACTCAAGCCCTTGTCCGGGGGCGCTG	
1112	FR2HC5'	GATCCATCCCATCCACTCAAGCGCTTGTCCGGGGGCGCTG	
1113	FR2HC6'	GATTATCCCATCCACTCAAGCCCTTGTCCAGGGGCGCTG	
1114	FR2HC7'	GATCCATCCTATCCACTCAAGGCGTTGTCCACGAGCCTG	
1115	FR2HC8'	GATCCCTCCCATCCACTCAAGCCCTTGTCCAGGGGCGCTG	10
1116	FR2HC9'	CATCCATCCCATCCACTCAAGCCCTTGTCCAGTGGCCTG	
1117	FR2HC10'	AATGTGTGCAAGCCACTCCAGGGCCTTCCCTGGGGGCGCTG	
1118	FR2HC11'	AATGAGTGCAAGCCACTCCAGGGCCTTCCCTGGGGGCGCTG	
1119	FR2HC12'	AATGAGTGCAAGCCACTCCAGGGCCTTCCCTGGGGGCGCTG	
1120	FR2HC13'	AATGTATGAAACCCACTCCAGCCCTTCCCTGGAGCCTG	
1121	FR2HC14'	AATAGCTGAGACCCACTCCAGACCTTTCCCTGTAGCTTG	
1122	FR2HC15'	AATACGGCCAACCCACTCCAGCCCTTCCCTGGAGCCTG	
1123	FR2HC16'	AACACCCGATACCCACTCCAGCCCTTCCCTGGAGCCTT	
1124	FR2HC17'	AATACCAGAGACCCACTCCAGCCCTTCCCTGGAGCCTT	
1125	FR2HC18'	AATGGATGAGACCCACTCCAGCCCTTCCCTGGAGCCTG	
1126	FR2HC19'	AATAGCTGAGACCCACTCCAGCCCTTCCCTGGAGCCTG	
1127	FR2HC20'	TATAACTGCCACCCACTCCAGCCCTTGCCTGGAGCCTG	
1128	FR2HC21'	TATAACTGCCACCCACTCCAGCCCTTGCCTGGAGCCTG	
1129	FR2HC22'	AACACCCGATACCCACTCCAGCCCTTCCCTGGAGCCTG	20
1130	FR2HC23'	AATGGATGAGACCCACTCCAGCCCTTCCCTGGAGCCTG	
1131	FR2HC24'	ATAAGAGAGACCCACTCCAGACCTTCCCCGGAGCTTG	
1132	FR2HC25'	AATGTATGAAACCCACTCCAGCCCTTCCCTGGAGCCTG	
1133	FR2HC26'	AATGAAACCTACCCACTCCAGCCCTTCCCTGGAGCCTG	
1134	FR2HC27'	AATAACTGAGACCCACTCCAGCCCTTCCCTGGAGCCTG	
1135	FR2HC28'	AATAGCTGAAACATATTCCAGTCCCTTCCCTGGAGCCTG	
1136	FR2HC29'	AATAACTGAGACCCACTCCAGCCCTTCCCTGGAGCCTG	
1137	FR2HC30'	TATGTTGGCCACCCACTCCAGCCCTTCCCTGGAGCCTG	
1138	FR2HC31'	AGTACGGCCAACCCACTCCAGCCCTTCCCTGGAGCCTG	
1139	FR2HC32'	AATACGGCCAACCCACTCCAGCCCTTCCCCGGAAGCCTG	
1140	FR2HC33'	AATACGTGAGACCCACACCCAGCCCTTCCCTGGAGCCTG	
1141	FR2HC34'	AATACCTGAGACCCACTCCAGCCCTTCCCTGGAGCCTG	
1142	FR2HC35'	GATGTACCCAATCCACTCCAGTCCCTTCCCTGGGGGCTG	
1143	FR2HC36'	GATGTACCCAATCCACTCCAGCCCTTCCCTGGGTGCTG	30
1144	FR2HC37'	GATTTCCCCAATCCACTCCAGCCCTTCCCTGGGGGCTG	
1145	FR2HC38'	GATACTCCCAATCCACTCCAGCCCTTCCCTGGGGGCTG	
1146	FR2HC39'	GATACGCCCAATCCACTCCAGTCCCTTCCCCGGCGGGCTG	
1147	FR2HC40'	GATATACCCAATCCACTCCAGTCCCTTCCCTGGGGGCTG	
1148	FR2HC41'	GATATACCCAATCCACTCCAGTCCCTTCCCTGGGGGCTG	
1149	FR2HC42'	GATGATCCCCATCCACTCCAGGCTTTCCCCGGGCATCTG	
1150	FR2HC43'	TGTCCTTCCCAGCCACTCAAGGCCTCTCGATGGGGACTG	
1151	FR2HC44'	GAACCATCCCATCCACTCAAGCCCTTGTCCAGGGGCGCTG	

【0 1 4 9】

PCRは、下記のオリゴヌクレオチドの組合せで実施する（全部で44組）：FR2HC1/FR2HC1'、FR2HC2/FR2HC2'、FR2HC3/FR2HC3'、FR2HC4/FR2HC4'、FR2HC5/FR2HC5'、FR2HC6/FR2HC6'、FR2HC7/FR2HC7'、FR2HC8/FR2HC8'、FR2HC9/FR2HC9'、FR2HC10/FR2HC10'、FR2HC11/FR2HC11'、FR2HC12/FR2HC12'、FR2HC13/FR2HC13'、FR2HC14/FR2HC14'、FR2HC15/FR2HC15'、FR2HC16/FR2HC16'、FR2HC17/FR2HC17'、FR2HC18/FR2HC18'、FR2HC19/FR2HC19'、FR2HC20/FR2HC20'、FR2HC21/FR2HC21'、FR2HC22/FR2HC22'、FR2HC23/FR2HC23'、FR2HC24/FR2HC24'、FR2HC25/FR2HC25'、FR2HC26/FR2HC26'、FR2HC27/FR2HC27'、FR2HC28/FR2HC28'、FR2HC29/FR2HC29'、FR2HC30/FR2HC30'、FR2HC31/FR2HC31'、FR2HC32/FR2HC32'、FR2HC33/FR2HC33'、FR2HC34/FR2HC34'、FR2HC35/FR2HC35'、FR2HC36/FR2HC36'、FR2HC37/FR2HC37'、FR2HC38/FR2HC38'、FR2HC39/FR2HC39'、FR2HC40/FR2HC40'、FR2HC41/FR2HC41'、FR2HC42/FR2HC42'、FR2HC43/FR2HC43'、またはFR2HC44/FR2HC44'。PCR産物のプールがサブバンク9となる。

【0 1 5 0】

限定ではなく一例として、重鎖FR3サブバンク（Chothiaの定義による）の構築は、表32および表33（すべて5'から3'の方向で表示され、名称に続いて配列を示す）に記載のオリゴヌクレオチドを用いたオーバーラップ伸長法によるポリメラーゼ連鎖反応によって行う。

【表 3 2】

表 3 2 重鎖 FR3 (Chothia 定義) フォワードプライマー (サブバンク 10 用)

1152	FR3HC1	ACAAACTATGCACAGAAGCTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGACACATCCACGAGCACAGCCTACATGG	
1153	FR3HC2	ACAAACTATGCACAGAAGTTTCAGGGCAGGGTCACCATGACCAGGGACACGTCCATCAGCACAGCCTACATGG	
1154	FR3HC3	ACAATCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCGAGGACACATCTACAGACACAGCCTACATGG	
1155	FR3HC4	ACAAAAATATTCACAGGAGTTCCAGGGCAGAGTCACCATTACCAGGGACACATCCGCGAGCACAGCCTACATGG	
1156	FR3HC5	ACCAACTACGCACAGAAATTCAGGACAGAGTCACCATTACCAGGGACAGGTCTATGAGCACAGCCTACATGG	10
1157	FR3HC6	ACAAGCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCAGGGACACGTCCACGAGCACAGTCTACATGG	
1158	FR3HC7	ACAAACTACGCACAGAAGTTCCAGGAAAGAGTCACCATTACCAGGGACATGTCCACAAGCACAGCCTACATGG	
1159	FR3HC8	GCAAACTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTACATGG	
1160	FR3HC9	ACAGGCTATGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCAGGAACACCTCCATAAGCACAGCCTACATGG	
1161	FR3HC10	AAATCCTACAGCACATCTCTGAAGAGCAGGCTCACCATCTCCAAGGACACCTCCAAAAGCCAGGTGGTCTTA	
1162	FR3HC11	AAGCGCTACAGCCCATCTCTGAAGAGCAGGCTCACCATCACCAGGACACCTCCAAAAGCCAGGTGGTCTTA	
1163	FR3HC12	AAATACTACAGCACATCTCTGAAGACCAGGCTCACCATCTCCAAGGACACCTCCAAAAGCCAGGTGGTCTTA	
1164	FR3HC13	ATATACTACGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGGGACAACGCCAAGAACTCACTGTATCTGC	20
1165	FR3HC14	ACATACTATCCAGGCTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGAAAATGCCAAGAACTCCTTGTATCTTC	
1166	FR3HC15	ACAGACTACGCTGCACCCGTGAAAGGCAGATTACCATCTCAAGAGATGATTCAAAAAACACGCTGTATCTGC	
1167	FR3HC16	ACGCACTATGTGGACTCCGTGAAGCGCCGATTATCATCTCCAGAGACAATTCCAGGAACTCCCTGTATCTGC	
1168	FR3HC17	ACAGGTTATGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCCCTGTATCTGC	
1169	FR3HC18	ATATACTACGCAGACTCAGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACTGTATCTGC	
1170	FR3HC19	ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGC	
1171	FR3HC20	AAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGC	
1172	FR3HC21	AAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGC	
1173	FR3HC22	ACGCACTATGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTATCATCTCCAGAGACAATTCCAGGAAACACCTGTATCTGC	30
1174	FR3HC23	ACATACTACGCAGACTCCAGGAAGGGCAGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTTC	
1175	FR3HC24	ACATACTATGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACAGCAAAAACCTCCCTGTATCTGC	
1176	FR3HC25	ATATACTACGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACTCACTGTATCTGC	
1177	FR3HC26	ACAGAATACGCCGCGTCTGTGAAAGGCAGATTACCATCTCAAGAGATGATTCAAAAAGCATCGCCTATCTGC	
1178	FR3HC27	ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTTC	
1179	FR3HC28	ACATATTATGCAGACTCTGTGAAGGGCAGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTTC	
1180	FR3HC29	ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTTC	
1181	FR3HC30	AAATACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACTGTATCTGC	40
1182	FR3HC31	ACAGAATACGCCGCGTCTGTGAAAGGCAGATTACCATCTCAAGAGATGATTCAAGAAGCTCACTGTATCTGC	
1183	FR3HC32	ACAGCATATGCTGCGTCCGTGAAAGGCAGGTTACCATCTCCAGAGATGATTCAAGAAGACACGGCGTATCTGC	
1184	FR3HC33	ACAAGCTACGCGGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAACACGCTGTATCTGC	
1185	FR3HC34	ATAGGCTATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCCCTGTATCTGC	
1186	FR3HC35	ACCTACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATGTAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGA	
1187	FR3HC36	ACCTACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCAGTAGACACGTCTAAGAACCAGTTCTCCCTGA	

1188 FR3HC37
ACCAACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGA
1189 FR3HC38
ACCTACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCCGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGA
1190 FR3HC39
ACCAACTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATGTCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGA
1191 FR3HC40
ACCAACTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGA
1192 FR3HC41
ACCAACTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGA
1193 FR3HC42
ACCAACTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGA
1194 FR3HC43
ACCAACTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGA
1195 FR3HC44
AATGATTATGCAGTATCTGTGAAAAGTCGAATAACCATCAACCCAGACACATCCAAGAACCAGTTCTCCCTGC
CCAACATATGCCAGGGCTTCACAGGACGGTTTGTCTTCTCCATGGACACCTCTGCCAGCACAGCATACCTGC

【表 3 3】

表 3 3 重鎖 FR3 (Chothia 定義) リバースプライマー (サブバンク 10 用)

1196	FR3HC1'	
	TCTCGCACAGTAATACACGGCCGTGTCGTCAGATCTCAGGCTCCTCAGCTCCATGTAGGCTGTGCTCGTGG	
1197	FR3HC2'	
	TCTCGCACAGTAATACACGGCCGTGTCGTCAGATCTCAGCCTGCTCAGCTCCATGTAGGCTGTGCTGATGG	
1198	FR3HC3'	
	TGTTGCACAGTAATACACGGCCGTGTCCTCAGATCTCAGGCTGCTCAGCTCCATGTAGGCTGTGCTCTGTAG	
1199	FR3HC4'	
	TCTCGCACAGTAATACACAGCCATGTCCTCAGATCTCAGGCTGCTCAGCTCCATGTAGGCTGTGCTCGCGG	
1200	FR3HC5'	
	TCTTGCACAGTAATACATGGCTGTGTCCTCAGATCTCAGGCTGCTCAGCTCCATGTAGGCTGTGCTCATAG	10
1201	FR3HC6'	
	TCTCGCACAGTAATACACGGCCGTGTCCTCAGATCTCAGGCTGCTCAGCTCCATGTAGACTGTGCTCGTGG	
1202	FR3HC7'	
	TGCCGCACAGTAATACACGGCCGTGTCCTCGGATCTCAGGCTGCTCAGCTCCATGTAGGCTGTGCTTGTGG	
1203	FR3HC8'	
	TCTCGCACAGTAATACACGGCCGTGTCCTCAGATCTCAGGCTGCTCAGCTCCATGTAGGCTGTGCTCGTGG	
1204	FR3HC9'	
	TCTCGCACAGTAATACACGGCCGTGTCCTCAGATCTCAGGCTGCTCAGCTCCATGTAGGCTGTGCTTATGG	
1205	FR3HC10'	
	CCGTGCACAGTAATATGTGGCTGTGTCCACAGGGTCCATGTTGGTCATGGTAAGGACCACCTGGCTTTTGG	
1206	FR3HC11'	
	GTGTGCACAGTAATATGTGGCTGTGTCCACAGGGTCCATGTTGGTCATTGTAAGGACCACCTGGTTTTTGG	
1207	FR3HC12'	
	CCGTGCACAATAATACGTGGCTGTGTCCACAGGGTCCATGTTGGTCATTGTAAGGACCACCTGGTTTTTGG	
1208	FR3HC13'	
	TCTCGCACAGTAATACACGGCCGTGTCCTCGGCTCTCAGGCTGTTTCATTGTCAGATACAGTGAGTTCTTGG	20
1209	FR3HC14'	
	TCTTGCACAGTAATACACAGCCGTGTCCCGGCTCTCAGGCTGTTTCATTGTAAGATAACAAGGAGTTCTTGG	
1210	FR3HC15'	
	TGTGGTACAGTAATACACGGCTGTGTCCTCGGTTTTTCAGGCTGTTTCATTGTCAGATACAGCGTGTTTTTG	
1211	FR3HC16'	
	TCTCACACAGTAATACACAGCCATGTCCTCGGCTCTCCGTCTGTTCTTTGCAGATACAGGGAGTTCTCTGG	
1212	FR3HC17'	
	TCTCGCACAGTGATACAAGGCCGTGTCCTCGGCTCTCAGACTGTTTCATTGTCAGATACAGGGAGTTCTTGG	
1213	FR3HC18'	
	TCTCGCACAGTAATACACAGCCGTGTCCTCGGCTCTCAGGCTGTTTCATTGTCAGATACAGTGAGTTCTTGG	
1214	FR3HC19'	
	TTTCGCACAGTAATATACGGCCGTGTCCTCGGCTCTCAGGCTGTTTCATTGTCAGATACAGCGTGTCTTGG	
1215	FR3HC20'	
	TCTCGCACAGTAATACACAGCCGTGTCCTCAGCTCTCAGGCTGTTTCATTGTCAGATACAGCGTGTCTTGG	
1216	FR3HC21'	
	TCTCGCACAGTAATACACAGCCGTGTCCTCGGCTCTCAGGCTGTTTCATTGTCAGATACAGCGTGTCTTGG	
1217	FR3HC22'	
	TCTCACACAGTAATACACAGCCGTGTCCTCGGCCCTCAGGCTATTCGTTTGCAGATACAGGGTGTTCCTGG	30
1218	FR3HC23'	
	TCTGGCACAGTAATACACGGCCGTGCCCTCAGCTCTCAGGTTGTTTCATTGTAAGATAACAGCGTGTCTTGG	
1219	FR3HC24'	
	TTTTGCACAGTAATACAAGGCCGTGTCCTCAGTTCTCAGACTGTTTCATTGTCAGATACAGGGAGTTTTTGC	
1220	FR3HC25'	
	TCTCGCACAGTAATACACAGCCGTGTCCTCGTCTCTCAGGCTGTTTCATTGTCAGATACAGTGAGTTCTTGG	
1221	FR3HC26'	
	TCTAGTACAGTAATACACGGCTGTGTCCTCGGTTTTTCAGGCTGTTTCATTGTCAGATAGGCGATGCTTTTGG	
1222	FR3HC27'	
	TCTCGCACAGTAATACACGGCCGTGTCCTCGGCTCTCAGGCTGTTTCATTGTAAGATAACAGCGTGTCTTGG	
1223	FR3HC28'	
	TCTCGCACAGTAATACACAGCCATGTCCTCAGCTCTCAGGCTGCCCATTTGAAGATAACAGCGTGTCTTGG	
1224	FR3HC29'	
	TCTCGCACAGTAATACACAGCCGTGTCCTCAGCTCTCAGGCTGTTTCATTGTAAGATAACAGCGTGTCTTGG	
1225	FR3HC30'	
	TCTCGCACAGTAATACACAGCCGTGTCCTCGGCTCTCAGGCTGTTTCATTGTCAGATACAGTGAGTTCTTGG	40
1226	FR3HC31'	
	TCTAGCACAGTAATACACGGCCGTGTCCTCGGTTTTTCAGGCTGTTTCATTGTCAGATACAGTGAGTTCTTTG	
1227	FR3HC32'	
	TCTAGTACAGTAATACACGGCCGTGTCCTCGGTTTTTCAGGCTGTTTCATTGTCAGATACGCCGTGTCTTTG	
1228	FR3HC33'	
	TCTTGCACAGTAATACACAGCCGTGTCCTCGGCTCTCAGACTGTTTCATTGTCAGATACAGCGTGTCTTGG	
1229	FR3HC34'	
	TTTTGCACAGTAATACAAGGCCGTGTCCTCAGCTCTCAGACTGTTTCATTGTCAGATACAGGGAGTTCTTGG	
1230	FR3HC35'	
	TCTCGCACAGTAATACACGGCCGTGTCCACGGCGGTCACAGAGCTCAGCTTCAGGGAGAACTGGTTCTTGG	
1231	FR3HC36'	
	TCTCGCACAGTAATACACGGCCGTGTCCGGCGCAGTCACAGAGCTCAGCTTCAGGGAGAACTGGTTCTTAG	

1232 FR3HC37'
TCTCGCACAGTAATACACAGCCGTGTCCGCGCGGTCACAGAGCTCAGCTTCAGGGAGAACTGGTTCTTGG
1233 FR3HC38'
TCTCGCACAGTAATACACAGCCGTGTCTGCGCGGTCACAGAGCTCAGCTTCAGGGAGAACTGGTTCTTGG
1234 FR3HC39'
TCTCGCACAGTAATACACGGCCGTGTCCGCGCGGTCACAGAGCTCAGCTTCAGGGAGAACTGGTTCTTGG
1235 FR3HC40'
TCTCGCACAGTAATACACGGCCGTGTCCGCGAGCGGTCACAGAGCTCAGCTTCAGGGAGAACTGGTTCTTGG
1236 FR3HC41'
TCTCGCACAGTAATACACGGCCGTGTCCGCGAGCGGTCACAGAGCTCAGCTTCAGGGAGAACTGGTTCTTGG
1237 FR3HC42'
TCTCGCACAGTAATACATGGCGGTGTCCGAGGCCTTCAGGCTGCTCCACTGCAGGTAGGCGGTGCTGATGG
1238 FR3HC43'
TCTTGCACAGTAATACACAGCCGTGTCTCGGAGTACAGAGTTCAGCTGCAGGGAGAACTGGTTCTTGG
1239 FR3HC44'
TCTCGCACAGTAATACATGGCCATGTCTCAGCCTTTAGGCTGCTGATCTGCAGGTATGCTGTGCTGGCAG

10

【0151】

PCRは、下記のオリゴヌクレオチドの組合せで実施する（全部で44組）：FR3HC1/FR3HC1'、FR3HC2/FR3HC2'、FR3HC3/FR3HC3'、FR3HC4/FR3HC4'、FR3HC5/FR3HC5'、FR3HC6/FR3HC6'、FR3HC7/FR3HC7'、FR3HC8/FR3HC8'、FR3HC9/FR3HC9'、FR3HC10/FR3HC10'、FR3HC11/FR3HC11'、FR3HC12/FR3HC12'、FR3HC13/FR3HC13'、FR3HC14/FR3HC14'、FR3HC15/FR3HC15'、FR3HC16/FR3HC16'、FR3HC17/FR3HC17'、FR3HC18/FR3HC18'、FR3HC19/FR3HC19'、FR3HC20/FR3HC20'、FR3HC21/FR3HC21'、FR3HC22/FR3HC22'、FR3HC23/FR3HC23'、FR3HC24/FR3HC24'、FR3HC25/FR3HC25'、FR3HC26/FR3HC26'、FR3HC27/FR3HC27'、FR3HC28/FR3HC28'、FR3HC29/FR3HC29'、FR3HC30/FR3HC30'、FR3HC31/FR3HC31'、FR3HC32/FR3HC32'、FR3HC33/FR3HC33'、FR3HC34/FR3HC34'、FR3HC35/FR3HC35'、FR3HC36/FR3HC36'、FR3HC37/FR3HC37'、FR3HC38/FR3HC38'、FR3HC39/FR3HC39'、FR3HC40/FR3HC40'、FR3HC41/FR3HC41'、FR3HC42/FR3HC42'、FR3HC43/FR3HC43'、またはFR3HC44/FR3HC44'。PCR産物のプールがサブバンク10となる。

20

【0152】

5.2 CDRの選択

フレームワーク領域サブバンクの合成に加えて、CDRのサブバンクを作製し、フレームワーク領域サブバンクからのフレームワーク領域とランダムにインフレームで融合させて、目的の抗原に対する免疫特異性ならびに目的の生物における免疫原性についてスクリーニング可能な抗体のコンビナトリアルライブラリー（定常領域を含むもの、または含まないもの）を作製することができる。その際は、本発明のコンビナトリアルライブラリー法を、ヒトにおいて使用するためのヒト化抗体の作製について例示する。しかし、本発明のコンビナトリアルライブラリー法は、あらゆる目的の生物において使用するための抗体の作製に容易に適用可能である。

30

【0153】

本発明は、可変軽鎖および可変重鎖の各CDRについてのCDRサブバンクを提供する。一実施形態において、CDRサブバンクは少なくとも2つの異なる核酸配列を含んでなり、各核酸配列は特定のCDR（例えば、軽鎖CDR1）をコードする。したがって、本発明は、目的の各生物種のための、またCDRの各定義（例えばKabatおよびChothia）のための、可変軽鎖CDR1、可変軽鎖CDR2および可変軽鎖CDR3のCDR領域サブバンクを提供する。また、本発明は、目的の各生物種のための、またCDRの各定義（例えばKabatおよびChothia）のための、可変重鎖CDR1、可変重鎖CDR2および可変重鎖CDR3のCDRサブバンクも提供する。CDRサブバンクは、目的の抗原に免疫特異的に結合する抗体の一部として同定されたCDRを含みうる。あるいは、CDRサブバンクは目的の抗原に免疫特異的に結合する抗体の一部として同定されたCDRを含み、前記CDRが改変（例えば、突然変異）されていてもよい。場合により、CDRサブバンクが抗体に由来しない人工のCDR（例えば、ランダム化された核酸配列）を含んでもよい。このCDRサブバンクは、目的の抗原に対する免疫特異性ならびに目的の生物における免疫原性についてスクリーニング可能な抗体のコンビナトリアルライブラリーを合成するのに容易に使用できる。

40

50

【0154】

例えば、軽鎖CDRサブバンク12、13および14を構築することができ、CDRサブバンク12は、ヌクレオチド配列を含む複数の核酸配列を含んでなり、各ヌクレオチド配列がKabatシステムに従う軽鎖CDR1をコードしており；CDRサブバンク13は、ヌクレオチド配列を含む複数の核酸配列を含んでなり、各ヌクレオチド配列がKabatシステムに従う軽鎖CDR2をコードしており；CDRサブバンク14は、ヌクレオチド配列を含む複数の核酸配列を含んでなり、各ヌクレオチド配列がKabatシステムに従う軽鎖CDR3をコードしている。軽鎖CDRサブバンク15、16および17を構築することができ、CDRサブバンク15は、ヌクレオチド配列を含む複数の核酸配列を含んでなり、各ヌクレオチド配列がChothiaシステムに従う軽鎖CDR1をコードしており；CDRサブバンク16は、ヌクレオチド配列を含む複数の核酸配列を含んでなり、各ヌクレオチド配列がChothiaシステムに従う軽鎖CDR2をコードしており；CDRサブバンク17は、ヌクレオチド配列を含む複数の核酸配列を含んでなり、各ヌクレオチド配列がChothiaシステムに従う軽鎖CDR3をコードしている。

10

【0155】

重鎖CDRサブバンク18、19および20を構築することができ、CDRサブバンク18は、ヌクレオチド配列を含む複数の核酸配列を含んでなり、各ヌクレオチド配列はKabatシステムに従う重鎖CDR1をコードしており；CDRサブバンク19は、ヌクレオチド配列を含む複数の核酸配列を含んでなり、各ヌクレオチド配列はKabatシステムに従う重鎖CDR2をコードしており；CDRサブバンク20は、ヌクレオチド配列を含む複数の核酸配列を含んでなり、各ヌクレオチド配列はKabatシステムに従う重鎖CDR3をコードしている。重鎖CDRサブバンク21、22および23を構築することができ、CDRサブバンク21は、ヌクレオチド配列を含む複数の核酸配列を含んでなり、各ヌクレオチド配列はChothiaシステムに従う重鎖CDR1をコードしており；CDRサブバンク22は、ヌクレオチド配列を含む複数の核酸配列を含んでなり、各ヌクレオチド配列はChothiaシステムに従う重鎖CDR2をコードしており、CDRサブバンク23は、ヌクレオチド配列を含む複数の核酸配列を含んでなり、各ヌクレオチド配列はChothiaシステムに従う重鎖CDR3をコードしている。

20

【0156】

いくつかの実施形態において、CDR配列は、機能性抗体配列から誘導される。いくつかの実施形態において、CDR配列は、機能性抗体配列から誘導され、改変（例えば、突然変異）されていてもよい。いくつかの実施形態において、CDR配列は、少なくとも5個、少なくとも6個、少なくとも7個、少なくとも8個、少なくとも9個または少なくとも10個連続したヌクレオチド配列を含み、当業界で公知のいずれかの方法によって合成されるランダム配列である。CDRサブバンクを、コンビナトリアルサブライブラリーの構築に使用できる。あるいはまた、特に関心がもたれるCDRを選択して、コンビナトリアルサブライブラリーの構築に使用することができる（第5.3節を参照）。場合により、ランダム化CDR配列を選択し、次いでコンビナトリアルサブライブラリーの構築に使用することができる（第5.3節を参照）。

30

【0157】

5.3 コンビナトリアルサブライブラリーの構築

コンビナトリアルサブライブラリーは、CDR（例えば非ヒトCDR）を、FRサブバンクの対応するヒトフレームワーク領域とインフレームで融合することにより構築される。例えば、限定されるものでないが、コンビナトリアルサブライブラリー1は、サブバンク1を用いて、非ヒトCDRを対応するκ軽鎖ヒトフレームワーク領域とインフレームで融合させることにより構築され；コンビナトリアルサブライブラリー2は、サブバンク2を用いて、非ヒトCDRを対応するκ軽鎖ヒトフレームワーク領域とインフレームで融合させることにより構築され；コンビナトリアルサブライブラリー3は、サブバンク3を用いて、非ヒトCDRを対応するκ軽鎖ヒトフレームワーク領域とインフレームで融合させることにより構築され；コンビナトリアルサブライブラリー4は、サブバンク4を用いて、非ヒトCDRを対応するκ軽鎖ヒトフレームワーク領域とインフレームで融合させることにより構築され；コンビナトリアルサブライブラリー5、6および7は、それぞれサブバンク5、6およ

40

50

び7を用いて、非ヒトCDR（CDR H1およびH2についてのKabat定義）を対応する重鎖ヒトフレームワーク領域とインフレームで融合させることにより構築され；コンビナトリアルサブライブラリー8、9および10は、それぞれサブバンク8、9および10を用いて、非ヒトCDR（CDR H1およびH2についてのChothia定義）を対応する重鎖ヒトフレームワーク領域とインフレームで融合させることにより構築され；コンビナトリアルサブライブラリー11は、サブバンク11を用いて、非ヒトCDR H3（KabatおよびChothiaの定義）を対応するヒト重鎖フレームワーク領域とインフレームで融合させることにより構築される。いくつかの実施形態では、非ヒトCDRもまた、CDRライブラリーから選択することができる。CDRはまた、ヒトまたはヒト化抗体に由来してもよいしまたはいずれかの生物種に由来しないランダム配列であってもよいと考えている。さらに非ヒトフレームワークをサブライブラリーを構築するのに利用してもよいと考えている。

10

【0158】

コンビナトリアルサブライブラリーの構築は、当業界で公知のいずれの方法を用いても実施可能である。軽鎖コンビナトリアルサブライブラリーを構築する方法の一例をさらに詳しく図13Bに示す。同様な方法を利用して重鎖コンビナトリアルサブライブラリーを構築することができる。一実施形態において、コンビナトリアルサブライブラリーは、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を用いて（例えば、CDRとFWを重複するオリゴマーを用いることにより）構築される。別の実施形態において、コンビナトリアルサブライブラリーはCDRとFWの直接ライゲーションを用いて構築される。さらなる別の実施形態において、コンビナトリアルサブライブラリーは非確率的合成ライゲーション再アセンブリーを用いて構築されない。限定するものではないが、一例として、コンビナトリアルサブライブラリー1は、表34および表35のオリゴヌクレオチド（全て5'から3'の方向で示されており、名称の後ろに配列を示す）を用いるオーバーラップ伸長法によるポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を用いて構築される。配列中、K=GまたはT、M=AまたはC、R=AまたはG、S=CまたはG、W=AまたはT、そしてY=CまたはTである。

20

【表34】

表34 軽鎖FR1抗体特異的フォワードプライマー（サブライブラリー1用）

1240	AL1	GATGTTGTGATGACWCAGTCT
1241	AL2	GACATCCAGATGAYCCAGTCT
1242	AL3	GCCATCCAGWTGACCCAGTCT
1243	AL4	GAAATAGTGATGAYGCAGTCT
1244	AL5	GAAATTGTGTTGACRCAGTCT
1245	AL6	GAKATTGTGATGACCCAGACT
1246	AL7	GAAATTGTRMTGACWCAGTCT
1247	AL8	GAYATYGTGATGACYCAGTCT
1248	AL9	GAAACGACACTCACGCAGTCT
1249	AL10	GACATCCAGTTGACCCAGTCT
1250	AL11	AACATCCAGATGACCCAGTCT
1251	AL12	GCCATCCGGATGACCCAGTCT
1252	AL13	GTCATCTGGATGACCCAGTCT

30

【表 3 5】

表 3 5 軽鎖 FR1 抗体特異的リバースプライマー (サブライブラリー1 用)

1253	AL1'	[最初の 70%の CDR L1]-GCAGGAGATGGAGGCCGCTC
1254	AL2'	[最初の 70%の CDR L1]-GCAGGAGAGGGTGRCCTCTTC
1255	AL3'	[最初の 70%の CDR L1]-ACAASTGATGGTGACTCTGTC
1256	AL4'	[最初の 70%の CDR L1]-GAAGGAGATGGAGGCCGCTG
1257	AL5'	[最初の 70%の CDR L1]-GCAGGAGATGGAGGCCTGCTC
1258	AL6'	[最初の 70%の CDR L1]-GCAGGAGATGTTGACTTTGTC
1259	AL7'	[最初の 70%の CDR L1]-GCAGGTGATGGTGACTTTCTC
1260	AL8'	[最初の 70%の CDR L1]-GCAGTTGATGGTGGCCCTCTC
1261	AL9'	[最初の 70%の CDR L1]-GCAAGTGATGGTGACTCTGTC
1262	AL10'	[最初の 70%の CDR L1]-GCAAATGATACTGACTCTGTC

10

【0 1 5 9】

AL1～AL13をAL1'～AL10'と組み合わせて用い、テンプレートとしてサブバンク 1、または表1に記載される配列に対応するオリゴヌクレオチドのプールを用いてPCRを行う。これにより、コンビナトリアルサブライブラリー 1 が作製される (図13B)。

【0 1 6 0】

限定するものではないが、一例として、コンビナトリアルサブライブラリー 2 は、表36および表37のオリゴヌクレオチド (全て5'から3'の方向で示されており、名称の後ろに配列を示す) を用いるオーバーラップ伸長法によるポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を用い

20

【表 3 6】

表 3 6 軽鎖 FR2 抗体特異的フォワードプライマー (サブライブラリー2 用)

1263	BL1	[最後の 70%の CDR L1]-TGGYTTTCAGCAGAGGCCAGGC
1264	BL2	[最後の 70%の CDR L1]-TGGTACCTGCAGAAAGCCAGGS
1265	BL3	[最後の 70%の CDR L1]-TGGTATCRGCAGAAACCAGGG
1266	BL4	[最後の 70%の CDR L1]-TGGTACCARCAGAAACCAGGA
1267	BL5	[最後の 70%の CDR L1]-TGGTACCARCAGAAACCTGGC
1268	BL6	[最後の 70%の CDR L1]-TGGTAYCWGCAGAAACCWGGG
1269	BL7	[最後の 70%の CDR L1]-TGGTATCAGCARAAACCWGGS
1270	BL8	[最後の 70%の CDR L1]-TGGTAYCAGCARAAACCAG
1271	BL9	[最後の 70%の CDR L1]-TGGTTTCTGCAGAAAGCCAGG
1272	BL10	[最後の 70%の CDR L1]-TGGTTTCAGCAGAAACCAGGG

30

【表 3 7】

表 3 7 軽鎖 FR2 抗体特異的リバープライマー (サブライブラリー2用)

1273	BL1' [最初の 70%の CDR L2]-ATAGATCAGGAGCTGTGGAGR	
1274	BL2' [最初の 70%の CDR L2]-ATAGATCAGGAGCTTAGGRGC	
1275	BL3' [最初の 70%の CDR L2]-ATAGATGAGGAGCCTGGGMGC	
1276	BL4' [最初の 70%の CDR L2]-RTAGATCAGGMGCTTAGGGGC	
1277	BL5' [最初の 70%の CDR L2]-ATAGATCAGGWGCTTAGGRAC	
1278	BL6' [最初の 70%の CDR L2]-ATAGATGAAGAGCTTAGGGGC	
1279	BL7' [最初の 70%の CDR L2]-ATAAATTAGGAGTCTTGGAGG	
1280	BL8' [最初の 70%の CDR L2]-GTAAATGAGCAGCTTAGGAGG	10
1281	BL9' [最初の 70%の CDR L2]-ATAGATCAGGAGTGTGGAGAC	
1281	BL10' [最初の 70%の CDR L2]-ATAGATCAGGAGCTCAGGGGC	
1283	BL11' [最初の 70%の CDR L2]-ATAGATCAGGGACTTAGGGGC	
1284	BL12' [最初の 70%の CDR L2]-ATAGAGGAAGAGCTTAGGGGA	
1285	BL13' [最初の 70%の CDR L2]-CTTGATGAGGAGCTTGGAGA	
1286	BL14' [最初の 70%の CDR L2]-ATAAATTAGGCGCCTTGGAGA	
1287	BL15' [最初の 70%の CDR L2]-CTTGATGAGGAGCTTGGGGC	
1288	BL16' [最初の 70%の CDR L2]-TTGAATAATGAAAATAGCAGC	

【0 1 6 1】

BL1~BL10をBL1' ~BL16' と組み合わせて用い、サブバンク 2、または表 2 に記載される配列に対応するオリゴヌクレオチドのプールをテンプレートとして用いてPCRを行う。これにより、コンビナトリアルサブライブラリー 2 が作製される (図13B)。

【0 1 6 2】

限定するものではないが、一例として、コンビナトリアルサブライブラリー 3 は、表38および表39のオリゴヌクレオチド (全て 5' から 3' の方向で示されており、名称の後ろに配列を示す) を用いるオーバーラップ伸長法によるポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を用いて構築される。配列中、K=GまたはT、M=AまたはC、R=AまたはG、S=CまたはG、W=AまたはT、そしてY=CまたはTである。

【表 3 8】

表 3 8 軽鎖 FR3 抗体特異的フォワードプライマー (サブライブラリー3用)

1289	CL1 [最後の 70%の CDR L2]-GGGGTCCCAGACAGATTTCAGY	
1290	CL2 [最後の 70%の CDR L2]-GGGGTCCCATCAAGGTTTCAGY	
1291	CL3 [最後の 70%の CDR L2]-GGYATCCCAGCCAGGTTTCAGT	
1292	CL4 [最後の 70%の CDR L2]-GGRGTCCCWGACAGGTTTCAGT	
1293	CL5 [最後の 70%の CDR L2]-AGCATCCCAGCCAGGTTTCAGT	
1294	CL6 [最後の 70%の CDR L2]-GGGGTCCCCTCGAGGTTTCAGT	
1295	CL7 [最後の 70%の CDR L2]-GGAATCCCACCTCGATTTCAGT	
1296	CL8 [最後の 70%の CDR L2]-GGGGTCCCCTGACCGATTTCAGT	
1297	CL9 [最後の 70%の CDR L2]-GGCATCCCAGACAGGTTTCAGT	
1298	CL10 [最後の 70%の CDR L2]-GGGGTCTCATCGAGGTTTCAGT	
1299	CL11 [最後の 70%の CDR L2]-GGAGTGCCAGATAGGTTTCAGT	40

【表 3 9】

表 3 9 軽鎖 FR3 抗体特異的リバースプライマー (サブライブラリー3 用)

1300	CL1' [最初の 70%の CDR L3]-KCAGTAATAAACCCCAACATC
1301	CL2' [最初の 70%の CDR L3]-ACAGTAATAYGTTGCAGCATC
1302	CL3' [最初の 70%の CDR L3]-ACMGTAATAAGTTGCAACATC
1303	CL4' [最初の 70%の CDR L3]-RCAGTAATAAGTTGCAAAATC
1304	CL5' [最初の 70%の CDR L3]-ACAGTAATAARCTGCAAAATC
1305	CL6' [最初の 70%の CDR L3]-ACARTAGTAAGTTGCAAAATC
1306	CL7' [最初の 70%の CDR L3]-GCAGTAATAAACTCCAAMATC
1307	CL8' [最初の 70%の CDR L3]-GCAGTAATAAACCCCGACATC
1308	CL9' [最初の 70%の CDR L3]-ACAGAAGTAATATGCAGCATC
1309	CL10' [最初の 70%の CDR L3]-ACAGTAATATGTTGCAATATC
1310	CL11' [最初の 70%の CDR L3]-ACAGTAATACACTGCAAAATC
1311	CL12' [最初の 70%の CDR L3]-ACAGTAATAAACTGCCACATC

10

【0 1 6 3】

CL1~CL11をCL1' ~CL12' と組み合わせて用い、サブバンク 3、または表 3 に記載される配列に対応するオリゴヌクレオチドのプールをテンプレートとして用いてPCRを行う。これにより、コンビナトリアルサブライブラリー 3 が作製される (図13B)。

【0 1 6 4】

限定するものではないが、一例として、コンビナトリアルサブライブラリー 4 は、表40 および表41のオリゴヌクレオチド (全て5' から3' の方向で示されており、名称の後ろに配列を示す) を用いるオーバーラップ伸長法によるポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を用いて構築される。配列中、K=GまたはT、M=AまたはC、R=AまたはG、S=CまたはG、W=AまたはT、そしてY=CまたはTである。

20

【表 4 0】

表 4 0 軽鎖 FR4 抗体特異的フォワードプライマー (サブライブラリー4 用)

1312	DL1 [最後の 70%の CDR L3]-TTYGGCCARGGGACCAAGSTG
1313	DL2 [最後の 70%の CDR L3]-TTCGGCCAAGGGACACGACTG
1314	DL3 [最後の 70%の CDR L3]-TTCGGCCCTGGGACCAAAGTG
1315	DL4 [最後の 70%の CDR L3]-TTCGGCGGAGGGACCAAGGTG

30

【表 4 1】

表 4 1 軽鎖 FR4 抗体特異的リバースプライマー (サブライブラリー4 用)

1316	DL1'	TTTGATYTCCACCTTGGTCCC
1317	DL2'	TTTGATCTCCAGCTTGGTCCC
1318	DL3'	TTTGATATCCACTTGGTCCC
1319	DL4'	TTTAATCTCCAGTCGTGTCCC

40

【0 1 6 5】

DL1~DL4をDL1' ~DL4' と組み合わせて用い、サブバンク 4、または表 4 に記載される配列に対応するオリゴヌクレオチドのプールをテンプレートとして用いてPCRを行う。これにより、コンビナトリアルサブライブラリー 4 が作製される (図13B)。

【0 1 6 6】

限定するものではないが、一例として、コンビナトリアルサブライブラリー 5 は、表42 および表43のオリゴヌクレオチド (全て5' から3' の方向で示されており、名称の後ろに配列を示す) を用いるオーバーラップ伸長法によるポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を用いて構築される。配列中、K=GまたはT、M=AまたはC、R=AまたはG、S=CまたはG、W=AまたはT、そしてY=CまたはTである。

50

【表 4 2】

表 4 2 重鎖 FR1 (Kabat 定義) 抗体特異的フォワードプライマー (サブライブラリー5用)

1320	AH1	CAGGTCAGCTGGTGCAGTCT	10
1321	AH2	GAGGTGCAGCTGKTGGAGTCT	
1322	AH3	CAGSTGCAGCTGCAGGAGTCG	
1323	AH4	CAGGTCACCTTGARGGAGTCT	
1324	AH5	CARATGCAGCTGGTGCAGTCT	
1325	AH6	GARGTGCAGCTGGTGSAGTC	
1326	AH7	CAGATCACCTTGAAGGAGTCT	
1327	AH8	CAGGTSCAGCTGGTRSAGTCT	
1328	AH9	CAGGTACAGCTGCAGCAGTCA	
1329	AH10	CAGGTGCAGCTACAGCAGTGG	

【表 4 3】

表 4 3 重鎖 FR1 (Kabat 定義) 抗体特異的リバースプライマー (サブライブラリー5用)

1330	AHK1'	[最初の 70%の CDR H1]-RGTGAAGGTGTATCCAGAAGC	20
1331	AHK2'	[最初の 70%の CDR H1]-GCTGAGTGAGAACCCAGAGAM	
1332	AHK3'	[最初の 70%の CDR H1]-ACTGAARGTGAATCCAGAGGC	
1333	AHK4'	[最初の 70%の CDR H1]-ACTGACCGTGAAAYCCAGAGGC	
1334	AHK5'	[最初の 70%の CDR H1]-GCTGAYGGAGCCACCAGAGAC	
1335	AHK6'	[最初の 70%の CDR H1]-RGTAAGGTGWAWCCAGAAGC	
1336	AHK7'	[最初の 70%の CDR H1]-ACTRAAGGTGAAYCCAGAGGC	
1337	AHK8'	[最初の 70%の CDR H1]-GGTRAARCTGTAWCCAGAASC	
1338	AHK9'	[最初の 70%の CDR H1]-AYCAAAGGTGAATCCAGARGC	
1339	AHK10'	[最初の 70%の CDR H1]-RCTRAAGGTGAATCCAGASGC	
1340	AHK12	[最初の 70%の CDR H1]-GGTGAAGGTGTATCCRGAWGC	30
1341	AHK13'	[最初の 70%の CDR H1]-ACTGAAGGACCCACCATAGAC	
1342	AHK14'	[最初の 70%の CDR H1]-ACTGATGGAGCCACCAGAGAC	
1343	AHK15'	[最初の 70%の CDR H1]-GCTGATGGAGTAACCAGAGAC	
1344	AHK16	[最初の 70%の CDR H1]-AGTGAGGGTGTATCCGGAAC	
1345	AHK17'	[最初の 70%の CDR H1]-GCTGAAGGTGCCTCCAGAAGC	
1346	AHK18'	[最初の 70%の CDR H1]-AGAGACACTGTCCCCGAGAT	

【0 1 6 7】

AH1～AH10をAHK1'～AHK18'と組み合わせて用い、サブバンク 5、または表 5に記載される配列に対応するオリゴヌクレオチドのプールをテンプレートとして用いてPCRを行う。これにより、コンビナトリアルサブライブラリー 5が作製される。

【0 1 6 8】

限定するものではないが、一例として、コンビナトリアルサブライブラリー 6は、表44および表45のオリゴヌクレオチド（全て5'から3'の方向で示されており、名称の後ろに配列を示す）を用いるオーバーラップ伸長法によるポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を用いて構築される。配列中、K=GまたはT、M=AまたはC、R=AまたはG、S=CまたはG、W=AまたはT、そしてY=CまたはTである。

【表 4 4】

表 4 4 重鎖 FR2 (Kabat 定義) 抗体特異的フォワードプライマー (サブライブラリー6用)

1347	BHK1 [最後の 70%の CDR H1]-TGGGTGCGACAGGCYCCTGGA
1348	BHK2 [最後の 70%の CDR H1]-TGGGTGCGMCAGGCCCCCGGA
1349	BHK3 [最後の 70%の CDR H1]-TGGATCCGTCAGCCCCCAGGR
1350	BHK4 [最後の 70%の CDR H1]-TGGRTCCGCCAGGCTCCAGGG
1351	BHK5 [最後の 70%の CDR H1]-TGGATCCGSCAGCCCCCAGGG
1352	BHK6 [最後の 70%の CDR H1]-TGGGTCCGSCAAGCTCCAGGG
1353	BHK7 [最後の 70%の CDR H1]-TGGGTCCRTCARGCTCCRGGR
1354	BHK8 [最後の 70%の CDR H1]-TGGGTSCGMCARGCYACWGGA
1355	BHK9 [最後の 70%の CDR H1]-TGGKTCCGCCAGGCTCCAGGS
1356	BHK10 [最後の 70%の CDR H1]-TGGATCAGGCAGTCCCCATCG
1357	BHK11 [最後の 70%の CDR H1]-TGGGCCCCGCAAGGCTCCAGGA
1358	BHK12 [最後の 70%の CDR H1]-TGGATCCGCCAGCACCCAGGG
1359	BHK13 [最後の 70%の CDR H1]-TGGGTCCGCCAGGCTTCCGGG
1360	BHK14 [最後の 70%の CDR H1]-TGGGTGCGCCAGATGCCCGGG
1361	BHK15 [最後の 70%の CDR H1]-TGGGTGCGACAGGCTCGTGGA
1362	BHK16 [最後の 70%の CDR H1]-TGGATCCGGCAGCCCGCCGGG
1363	BHK17 [最後の 70%の CDR H1]-TGGGTGCCACAGGCCCTGGA

10

【表 4 5】

表 4 5 重鎖 FR2 (Kabat 定義) 抗体特異的リバースプライマー (サブライブラリー6用)

1364	BHK1' [最初の 70%の CDR H2]-TCCCATCCACTCAAGCCYTTG
1365	BHK2' [最初の 70%の CDR H2]-TCCCATCCACTCAAGCCTT
1366	BHK3' [最初の 70%の CDR H2]-WGAGACCCACTCCAGCCCCTT
1367	BHK4' [最初の 70%の CDR H2]-CCCAATCCACTCCAGKCCCTT
1368	BHK5' [最初の 70%の CDR H2]-TGAGACCCACTCCAGRCCCTT
1369	BHK6' [最初の 70%の CDR H2]-GCCAACCCACTCCAGCCCYTT
1370	BHK7' [最初の 70%の CDR H2]-KGCCACCCACTCCAGCCCCTT
1371	BHK8' [最初の 70%の CDR H2]-TCCCAGCCACTCAAGGCCTC
1372	BHK9' [最初の 70%の CDR H2]-CCCCATCCACTCCAGGCCTT
1373	BHK10' [最初の 70%の CDR H2]-TGARACCCACWCCAGCCCCTT
1374	BHK12' [最初の 70%の CDR H2]-MGAKACCCACTCCAGMCCCTT
1375	BHK13' [最初の 70%の CDR H2]-YCCMATCCACTCMAGCCCYTT
1376	BHK14' [最初の 70%の CDR H2]-TCCTATCCACTCAAGGCGTTG
1377	BHK15' [最初の 70%の CDR H2]-TGCAAGCCACTCCAGGGCCTT
1378	BHK16' [最初の 70%の CDR H2]-TGAAACATATTCCAGTCCCTT
1379	BHK17' [最初の 70%の CDR H2]-CGATACCCACTCCAGCCCCTT

30

【0169】

BHK1～BHK17をBHK1'～BHK17'と組み合わせて用い、サブバンク6、または表6に記載される配列に対応するオリゴヌクレオチドのプールをテンプレートとして用いてPCRを行う。これにより、コンビナトリアルサブライブラリー6が作製される。

40

【0170】

限定するものではないが、一例として、コンビナトリアルサブライブラリー7は、表46および表47のオリゴヌクレオチド（全て5'から3'の方向で示されており、名称の後ろに配列を示す）を用いるオーバーラップ伸長法によるポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を用いて構築される。配列中、K=GまたはT、M=AまたはC、R=AまたはG、S=CまたはG、W=AまたはT、そしてY=CまたはTである。

【表 4 6】

表 4 6 重鎖 FR3 (Kabat 定義) 抗体特異的フォワードプライマー (サブライブラリー7用)

1380	CHK1 [最後の 70%の CDR H2]-AGAGTCACCATGACCAGGRAC	
1381	CHK2 [最後の 70%の CDR H2]-AGGCTCACCATCWCCAAGGAC	
1382	CHK3 [最後の 70%の CDR H2]-CGAGTYACCATATCAGTAGAC	
1383	CHK4 [最後の 70%の CDR H2]-CGATTACCATCTCCAGRGAC	
1384	CHK5 [最後の 70%の CDR H2]-AGATTACCATCTCMAGAGA	
1385	CHK6 [最後の 70%の CDR H2]-MGGTTACCATCTCCAGAGA	
1386	CHK7 [最後の 70%の CDR H2]-CGATTCAVCATCTCCAGAGA	10
1387	CHK8 [最後の 70%の CDR H2]-CGAGTCACCATRTCMGTAGAC	
1388	CHK9 [最後の 70%の CDR H2]-AGRGTCACCATKACCAGGGAC	
1389	CHK10 [最後の 70%の CDR H2]-CAGGTCACCATCTCAGCCGAC	
1390	CHK11 [最後の 70%の CDR H2]-CGAATAACCATCAACCCAGAC	
1391	CHK12 [最後の 70%の CDR H2]-CGGTTTGTCTTCTCCATGGAC	
1392	CHK13 [最後の 70%の CDR H2]-AGAGTCACCATGACCGAGGAC	
1393	CHK14 [最後の 70%の CDR H2]-AGAGTCACGATTACCGCGGAC	
1394	CHK15 [最後の 70%の CDR H2]-AGAGTCACCATGACCACAGAC	

【表 4 7】

表 4 7 重鎖 FR3 (Kabat 定義) 抗体特異的リバースプライマー (サブライブラリー7用)

1395	CHK1' [最初の 70%の CDR H3]-TCTAGYACAGTAATACACGGC	
1396	CHK2' [最初の 70%の CDR H3]-TCTCGCACAGTAATACAYGGC	
1397	CHK3' [最初の 70%の CDR H3]-TCTYGCACAGTAATACACAGC	
1398	CHK4' [最初の 70%の CDR H3]-TGYYGCACAGTAATACACGGC	
1399	CHK5' [最初の 70%の CDR H3]-CCGTGCACARTAATAYGTGGC	
1400	CHK6' [最初の 70%の CDR H3]-TCTGGCACAGTAATACACGGC	
1401	CHK7' [最初の 70%の CDR H3]-TGTGGTACAGTAATACACGGC	
1402	CHK8' [最初の 70%の CDR H3]-TCTCGCACAGTGATACAAGGC	
1403	CHK9' [最初の 70%の CDR H3]-TTTTGCACAGTAATACAAGGC	
1404	CHK10' [最初の 70%の CDR H3]-TCTTGCACAGTAATACATGGC	
1405	CHK11' [最初の 70%の CDR H3]-GTGTGCACAGTAATATGTGGC	30
1406	CHK12' [最初の 70%の CDR H3]-TTTCGCACAGTAATATACGGC	
1407	CHK13' [最初の 70%の CDR H3]-TCTCACACAGTAATACACAGC	

【0 1 7 1】

CHK1～CHK15をCHK1'～CHK13'と組み合わせて用い、サブバンク7、または表7に記載される配列に対応するオリゴヌクレオチドのプールをテンプレートとして用いてPCRを行う。これにより、コンビナトリアルサブライブラリー7が作製される。

【0 1 7 2】

限定するものではないが、一例として、コンビナトリアルサブライブラリー8は、表48および表49のオリゴヌクレオチド（全て5'から3'の方向で示されており、名称の後ろに配列を示す）を用いるオーバーラップ伸長法によるポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を用いて構築される。配列中、K=GまたはT、M=AまたはC、R=AまたはG、S=CまたはG、W=AまたはT、そしてY=CまたはTである。

10

20

30

40

【表 4 8】

表 4 8 重鎖 FR1 (Chothia 定義) 抗体特異的フォワードプライマー (サブライブラリー 8 用)

1408	AH1	CAGGTCAGCTGGTGCAGTCT
1409	AH2	GAGGTGCAGCTGKTGGAGTCT
1410	AH3	CAGSTGCAGCTGCAGGAGTCG
1411	AH4	CAGGTCACCTTGARGGAGTCT
1412	AH5	CARATGCAGCTGGTGCAGTCT
1413	AH6	GARGTGCAGCTGGTGSAGTC
1414	AH7	CAGATCACCTTGAAGGAGTCT
1415	AH8	CAGGTSCAGCTGGTRSAGTCT
1416	AH9	CAGGTACAGCTGCAGCAGTCA
1417	AH10	CAGGTGCAGCTACAGCAGTGG

10

【表 4 9】

表 4 9 重鎖 FR1 (Chothia 定義) 抗体特異的リバースプライマー (サブライブラリー 8 用)

1418	AHC1'	[最初の 70% の CDR H1]- RGAARCCTTGCAGGAGACCTT
1419	AHC2'	[最初の 70% の CDR H1]- RGAAGCCTTGCAGGAAACCTT
1420	AHC3'	[最初の 70% の CDR H1]- AGATGCCTTGCAGGAAACCTT
1421	AHC4'	[最初の 70% の CDR H1]- AGAGAMGGTGCAGGTCAGCGT
1422	AHC5'	[最初の 70% の CDR H1]- AGASGCTGCACAGGAGAGTCT
1423	AHC6'	[最初の 70% の CDR H1]- AGAGACAGTRCAGGTGAGGGA
1424	AHC7'	[最初の 70% の CDR H1]- AKAGACAGCGCAGGTGAGGGA
1425	AHC8'	[最初の 70% の CDR H1]- AGAGAAGGTGCAGGTGAGTGT
1426	AHC9'	[最初の 70% の CDR H1]- AGAAGCTGTACAGGAGAGTCT
1427	AHC10'	[最初の 70% の CDR H1]- AGAGGCTGCACAGGAGAGTTT
1428	AHC12'	[最初の 70% の CDR H1]- AGAACCCTTACAGGAGATCTT
1429	AHC13'	[最初の 70% の CDR H1]- GGAGATGGCACAGGTGAGTGA

20

【0 1 7 3】

AH1～AH10をAHC1'～AHC13'と組み合わせて用い、サブバンク 8、または表 8 に記載される配列に対応するオリゴヌクレオチドのプールをテンプレートとして用いてPCRを行う。これにより、コンビナトリアルサブライブラリー 8 が作製される。

30

【0 1 7 4】

限定するものではないが、一例として、コンビナトリアルサブライブラリー 9 は、表 50 および表 51 のオリゴヌクレオチド (全て 5' から 3' の方向で示されており、名称の後ろに配列を示す) を用いるオーバーラップ伸長法によるポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を用いて構築される。配列中、K=GまたはT、M=AまたはC、R=AまたはG、S=CまたはG、W=AまたはT、そしてY=CまたはTである。

【表 5 0】

表 5 0 重鎖 FR2 (Chothia 定義) 抗体特異的フォワードプライマー (サブライブラリー9用)

1430	BHC1 [最後の 70%の CDR H1]-TATGGYATSAGCTGGGTGCGM	
1431	BHC2 [最後の 70%の CDR H1]-ATGKGTGTGAGCTGGATCCGT	
1432	BHC3 [最後の 70%の CDR H1]-TACTACTGGRGCTGGATCCGS	
1433	BHC4 [最後の 70%の CDR H1]-TATGCTATGCASTGGGTSCGM	
1434	BHC5 [最後の 70%の CDR H1]-TCTGCTATGCASTGGGTSCGM	
1435	BHC6 [最後の 70%の CDR H1]-TATGCTATGCAATGGGTSCGS	
1436	BHC7 [最後の 70%の CDR H1]-CGCTACCTGCACTGGGTGCGA	10
1437	BHC8 [最後の 70%の CDR H1]-TTATCCATGCACTGGGTGCGA	
1438	BHC9 [最後の 70%の CDR H1]-GCCTGGATGAGCTGGGTCCGC	
1439	BHC10 [最後の 70%の CDR H1]-GCTGCTTGGAAGTGGATCAGG	
1440	BHC11 [最後の 70%の CDR H1]-AATGAGATGAGCTGGATCCGC	
1441	BHC12 [最後の 70%の CDR H1]-AACTACATGAGCTGGGTCCGC	
1442	BHC13 [最後の 70%の CDR H1]-AACTGGTGGGGCTGGATCCGC	
1443	BHC14 [最後の 70%の CDR H1]-GTGGGTGTGGGCTGGATCCGT	
1444	BHC15 [最後の 70%の CDR H1]-CACTACATGGAAGTGGGTCCGC	
1445	BHC16 [最後の 70%の CDR H1]-AGTGACATGAACTGGGCCCCGC	
1446	BHC17 [最後の 70%の CDR H1]-AGTGACATGAACTGGGTCCAT	
1447	BHC18 [最後の 70%の CDR H1]-TATACCATGCACTGGGTCCGT	
1448	BHC19 [最後の 70%の CDR H1]-TATGCTATGCACTGGGTCCGC	20
1449	BHC20 [最後の 70%の CDR H1]-TATGCTATGAGCTGGGTCCGC	
1450	BHC21 [最後の 70%の CDR H1]-TATAGCATGAACTGGGTCCGC	
1451	BHC22 [最後の 70%の CDR H1]-TATGGCATGCACTGGGTCCGC	
1452	BHC23 [最後の 70%の CDR H1]-TATTGGATGAGCTGGGTCCGC	
1453	BHC24 [最後の 70%の CDR H1]-TACGACATGCACTGGGTCCGC	
1454	BHC25 [最後の 70%の CDR H1]-TACTACATGAGCTGGATCCGC	
1455	BHC26 [最後の 70%の CDR H1]-TACTGGATGCACTGGGTCCGC	
1456	BHC27 [最後の 70%の CDR H1]-TACTGGATCGGCTGGGTGCGC	
1457	BHC28 [最後の 70%の CDR H1]-TACTATATGCACTGGGTGCGA	
1458	BHC29 [最後の 70%の CDR H1]-TATGATATCAACTGGGTGCGA	
1459	BHC30 [最後の 70%の CDR H1]-TATGGTATGAATTGGGTGCCA	

【表 5 1】

表 5 1 重鎖 FR2 (Chothia 定義) 抗体特異的リバースプライマー (サブライブラリー9用)

1460	BHC1' [最初の 70%の CDR H2]-AATASCWGAGACCCACTCCAG	
1461	BHC2' [最初の 70%の CDR H2]-AATAASWGAGACCCACTCCAG	
1462	BHC3' [最初の 70%の CDR H2]-GMTCCATCCCATCCACTCAAG	
1463	BHC4' [最初の 70%の CDR H2]-GATACKCCCAATCCACTCCAG	
1464	BHC5' [最初の 70%の CDR H2]-GATRTACCCAATCCACTCCAG	
1465	BHC6' [最初の 70%の CDR H2]-AATGWGTGCAAGCCACTCCAG	
1466	BHC7' [最初の 70%の CDR H2]-AAYACCYGAKACCCACTCCAG	10
1467	BHC8' [最初の 70%の CDR H2]-AATGKATGARACCCACTCCAG	
1468	BHC9' [最初の 70%の CDR H2]-ARTACGGCCAACCCACTCCAG	
1469	BHC10' [最初の 70%の CDR H2]-AAAACCTCCCATCCACTCAAG	
1470	BHC12' [最初の 70%の CDR H2]-GATTATTTCCCATCCACTCAAG	
1471	BHC13' [最初の 70%の CDR H2]-GATCCATCCTATCCACTCAAG	
1472	BHC14' [最初の 70%の CDR H2]-GAACCATCCCATCCACTCAAG	
1473	BHC15' [最初の 70%の CDR H2]-GATCCCTCCCATCCACTCAAG	
1474	BHC16' [最初の 70%の CDR H2]-CATCCATCCCATCCACTCAAG	
1475	BHC17' [最初の 70%の CDR H2]-TGTCCCTTCCCAGCCACTCAAG	
1476	BHC18' [最初の 70%の CDR H2]-AATACGTGAGACCCACACCAG	
1477	BHC19' [最初の 70%の CDR H2]-AATAGCTGAAACATATTCCAG	
1478	BHC20' [最初の 70%の CDR H2]-GATTTCCCCCAATCCACTCCAG	20
1479	BHC21' [最初の 70%の CDR H2]-GATGATCCCCATCCACTCCAG	
1480	BHC22' [最初の 70%の CDR H2]-TATAACTGCCACCCACTCCAG	
1481	BHC23' [最初の 70%の CDR H2]-AATGAAACCTACCCACTCCAG	
1482	BHC24' [最初の 70%の CDR H2]-TATGTTGGCCACCCACTCCAG	

【0 1 7 5】

BHC1～BHC30をBHC1'～BHC24'と組み合わせて用い、サブバンク9、または表9に記載される配列に対応するオリゴヌクレオチドのプールをテンプレートとして用いてPCRを行う。これにより、コンビナトリアルサブライブラリー9が作製される。

【0 1 7 6】

限定するものではないが、一例として、コンビナトリアルサブライブラリー10は、表52および表53のオリゴヌクレオチド（全て5'から3'の方向で示されており、名称の後ろに配列を示す）を用いるオーバーラップ伸長法によるポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を用いて構築される。配列中、K=GまたはT、M=AまたはC、R=AまたはG、S=CまたはG、W=AまたはT、そしてY=CまたはTである。

10

20

30

【表 5 2】

表 5 2 重鎖 FR3 (Chothia 定義) 抗体特異的フォワードプライマー (サブライブラリー10用)

1483	CHC1	[最後の 70%の CDR H2]-ACCAACTACAACCCSTCCCTC	
1484	CHC2	[最後の 70%の CDR H2]-ATATACTACGCAGACTCWGTG	
1485	CHC3	[最後の 70%の CDR H2]-ACATACTAYGCAGACTCYGTG	
1486	CHC4	[最後の 70%の CDR H2]-ACMAACTACGCACAGAARTTC	
1487	CHC5	[最後の 70%の CDR H2]-ACAAACTATGCACAGAAGYT	
1488	CHC6	[最後の 70%の CDR H2]-ACARGCTAYGCACAGAAGTTC	
1489	CHC7	[最後の 70%の CDR H2]-AYAGGYTATGCRGACTCTGTG	10
1490	CHC8	[最後の 70%の CDR H2]-AAATMCTACAGCACATCTCTG	
1491	CHC9	[最後の 70%の CDR H2]-AAATACTATGTGGACTCTGTG	
1492	CHC10	[最後の 70%の CDR H2]-CCAACATATGCCCAGGGCTTC	
1493	CHC11	[最後の 70%の CDR H2]-GCAAACACTACGCACAGAAGTTC	
1494	CHC12	[最後の 70%の CDR H2]-AAATACTATGCAGACTCCGTG	
1495	CHC13	[最後の 70%の CDR H2]-AAGCGCTACAGCCCATCTCTG	
1496	CHC14	[最後の 70%の CDR H2]-AATGATTATGCAGTATCTGTG	
1497	CHC15	[最後の 70%の CDR H2]-ACCAGATACAGCCCGTCCCTC	
1498	CHC16	[最後の 70%の CDR H2]-ACAGAATACGCCGCGTCTGTG	
1499	CHC17	[最後の 70%の CDR H2]-ACGCACTATGCAGACTCTGTG	
1500	CHC18	[最後の 70%の CDR H2]-ACGCACTATGTGGACTCCGTG	
1501	CHC19	[最後の 70%の CDR H2]-ACAATCTACGCACAGAAGTTC	20
1502	CHC20	[最後の 70%の CDR H2]-ACAAAATATTCACAGGAGTTC	
1503	CHC21	[最後の 70%の CDR H2]-ACATACTACGCAGACTCCAGG	
1504	CHC22	[最後の 70%の CDR H2]-ACAAGCTACGCGGACTCCGTG	
1505	CHC23	[最後の 70%の CDR H2]-ACATATTATGCAGACTCTGTG	
1506	CHC24	[最後の 70%の CDR H2]-ACAGACTACGCTGCACCCGTG	
1507	CHC25	[最後の 70%の CDR H2]-ACAGCATATGCTGCGTCCGTG	
1508	CHC26	[最後の 70%の CDR H2]-ACATACTATCCAGGCTCCGTG	
1509	CHC27	[最後の 70%の CDR H2]-ACCTACTACAACCCGTCCCTC	

【表 5 3】

表 5 3 重鎖 FR3 (Chothia 定義) 抗体特異的リバースプライマー (サブライブラリー10用)

1510	CHC1'	[最初の 70%の CDR H3]- TSTYGCACAGTAATACACGGC	
1511	CHC2'	[最初の 70%の CDR H3]- TCTYGCACAGTAATACATGGC	
1512	CHC3'	[最初の 70%の CDR H3]- TCTAGYACAGTAATACACGGC	
1513	CHC4'	[最初の 70%の CDR H3]- CCGTGCACARTAATAYGTGGC	
1514	CHC5'	[最初の 70%の CDR H3]- TCTYGCACAGTAATACACAGC	
1515	CHC6'	[最初の 70%の CDR H3]- GTGTGCACAGTAATATGTGGC	
1516	CHC7'	[最初の 70%の CDR H3]- TGCCGCACAGTAATACACGGC	
1517	CHC8'	[最初の 70%の CDR H3]- TGTGGTACAGTAATACACGGC	
1518	CHC9'	[最初の 70%の CDR H3]- TCTCACACAGTAATACACAGC	
1519	CHC10'	[最初の 70%の CDR H3]- TCTCGCACAGTGATACAAGGC	40
1520	CHC11'	[最初の 70%の CDR H3]- TTTCGCACAGTAATATACGGC	
1521	CHC12'	[最初の 70%の CDR H3]- TCTGGCACAGTAATACACGGC	
1522	CHC13'	[最初の 70%の CDR H3]- TTTTGCACAGTAATACAAGGC	

【0 1 7 7】

CHC1～CHC27をCHC1'～CHC13'と組み合わせて用い、サブバンク10、または表10に記載される配列に対応するオリゴヌクレオチドのプールをテンプレートとして用いてPCRを行う。これにより、コンビナトリアルサブライブラリー10が作製される。

【0 1 7 8】

限定するものではないが、一例として、コンビナトリアルサブライブラリー11は、表54および表55のオリゴヌクレオチド（全て5'から3'の方向で示されており、名称の後ろに

10

20

30

40

50

配列を示す)を用いるオーバーラップ伸長法によるポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を用いて構築される。配列中、K=GまたはT、M=AまたはC、R=AまたはG、S=CまたはG、W=AまたはT、そしてY=CまたはTである。

【表 5 4】

表 5 4 重鎖 FR4 (Kabat および Chothia 定義) 抗体特異的フォワードプライマー (サブライブラリー11用)

1523	DH1	[最後の 70%の CDR H3]-TGGGGGCCARGGMACCCTGGTC
1524	DH2	[最後の 70%の CDR H3]-TGGGGGSCAAGGGACMAYGGTC
1525	DH3	[最後の 70%の CDR H3]-TGGGGGCCGTGGCACCCTGGTC

10

【表 5 5】

表 5 5 重鎖 FR4 (Kabat および Chothia 定義) 抗体特異的フォワードプライマー (サブライブラリー11用)

1526	DH1'	TGAGGAGACRG TGACCAGGGT
1527	DH2'	TGARGAGACGGTGACCR TKGT
1528	DH3'	TGAGGAGACGGTGACCAGGGT

【0 1 7 9】

20

DH1~DHC3をDH1'~DH3'と組み合わせて用い、サブバンク11、または表11に記載される配列に対応するオリゴヌクレオチドのプールをテンプレートとして用いてPCRを行う。これにより、コンビナトリアルサブライブラリー11が作製される。

【0 1 8 0】

当業者は、本発明の方法に用いる非ヒトフレームワークをコードする適当なプライマーを設計することができる。当業者はまた、本発明の方法に用いる改変されたおよび/またはランダムなCDRをコードする適当なプライマーを設計することもできる。

【0 1 8 1】

いくつかの実施形態において、CDR (例えば、非ヒトCDR) とサブバンクのフレームワーク (例えば、ヒトフレームワーク) との直接ライゲーションを用いて、9つのコンビナトリアルサブライブラリーを構築することができる。例えば、限定されるものでないが、コンビナトリアルサブライブラリー1'、2'および3'は、非ヒトCDR L1、L2およびL3 (一本鎖または二本鎖の形態) をそれぞれサブバンク1、2および3に直接ライゲーションさせることにより、別々に構築される。一実施形態では、その非ヒトCDR (L1、L2およびL3) は、一本鎖核酸である。別の実施形態では、その非ヒトCDR (L1、L2およびL3) は二本鎖核酸である。あるいはまた、コンビナトリアルサブライブラリー1'、2'および3'は、一本鎖(+)形態の非ヒトCDR (L1、L2およびL3) を、表1に示す核酸1~46、表2に示す核酸47~92および表3に示す核酸93~138とそれぞれ直接ライゲーションさせることにより得ることができる。

30

【0 1 8 2】

40

いくつかの実施形態において、コンビナトリアルサブライブラリー5'および6'は、非ヒトCDR H1およびH2 (一本鎖または二本鎖の形態であり、Kabatの定義に従うもの) をサブバンク5および6とそれぞれ直接ライゲーションさせることにより、別々に構築される。あるいはまた、サブライブラリー5'および6'は、非ヒトCDR H1およびH2 (Kabatの定義に従うものであり、一本鎖(+)形態のもの) を表5に示す核酸144~187および表6に示す188~231とそれぞれ直接ライゲーションさせることにより得てもよい。

【0 1 8 3】

いくつかの実施形態において、コンビナトリアルサブライブラリー8'および9'は、非ヒトCDR H1およびH2 (一本鎖形態であり、Chothiaの定義に従うもの) をサブバンク8および9とそれぞれ直接ライゲーションさせることにより、別々に構築される。あるいはまた

50

た、サブライブラリー8'および9'は、非ヒトCDR H1およびH2 (Chothiaの定義に従い、一本鎖形態(+))であるものを表8に示す核酸276~319および表9に示す320~363とそれぞれ直接ライゲーションさせることにより得てもよい。

【0184】

コンビナトリアルサブライブラリー11'および12'は、非ヒトCDR H3 (一本鎖または二本鎖の形態)をサブバンク7 (Kabatの定義)および10 (Chothiaの定義)にそれぞれ直接ライゲーションさせることにより、別々に得られる。あるいはまた、サブライブラリー11'および12'は、非ヒトCDR H3 (一本鎖(+))形態を表7に示す核酸232~275および表10に示す364~407とそれぞれ直接ライゲーションさせることにより得てもよい。

【0185】

DNA断片の直接ライゲーションは、標準的なプロトコルに従って行うことができる。次いで、ライゲーションしていない生成物からライゲーションしている生成物を精製/分離することができる。

【0186】

5.4 コンビナトリアルライブラリーの構築

コンビナトリアルライブラリーは、対応する可変軽鎖領域または可変重鎖領域のコンビナトリアルサブライブラリーを同時にアセンブルすることにより構築される。軽鎖可変領域コンビナトリアルライブラリーを構築するのに有用な方法の例は図13C~Dにさらに詳しく示されている。一実施形態において、コンビナトリアルライブラリーはポリメラーゼ連鎖反応(PCR) (例えば、オーバーラップ伸長により)を用いて構築される。別の実施形態において、コンビナトリアルライブラリーは直接ライゲーションにより構築される。さらに別の実施形態において、コンビナトリアルライブラリーは非確率的合成ライゲーション再アセンブリーを用いて構築されない。例えば、限定するものでないが、ヒトκ軽鎖生殖系列フレームワークのコンビナトリアルライブラリー (コンビネーションライブラリー1)は、後に記載するように、CDR中の重複領域を介してサブライブラリー1、2、3および4を同時にアセンブルすることにより構築できる (図13CおよびDも参照) ; ヒト重鎖生殖系列フレームワークの2つのコンビナトリアルライブラリー (1つはCDRのKabat定義についてのもの、コンビネーションライブラリー2 ; 1つはCDRのChothia定義についてのもの、コンビネーションライブラリー3)は、後に記載するように、CDR中の重複領域を介してサブライブラリー5、6、7、11 (Kabat定義) またはサブライブラリー8、9、10、11 (Chothia定義)を同時にアセンブルすることにより構築できる。

【0187】

一実施形態において、コンビナトリアルライブラリー1の構築は、表56および表57に示すオリゴヌクレオチド (全て5'から3'の方向で示されており、プライマー名の後ろに配列を示す)を用いたオーバーラップ伸長法によるポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を用いて行われる。

【表56】

表56 軽鎖フォワードプライマー (コンビナトリアルライブラリー1用)

1529	AL1	GATGTTGTGATGACWCAGTCT
1530	AL2	GACATCCAGATGAYCCAGTCT
1531	AL3	GCCATCCAGWTGACCCAGTCT
1532	AL4	GAAATAGTGATGAYGCAGTCT
1533	AL5	GAAATTGTGTGACRCAGTCT
1534	AL6	GAKATTGTGATGACCCAGACT
1535	AL7	GAAATTGTRMTGACWCAGTCT
1536	AL8	GAYATYGTGATGACYCAGTCT
1537	AL9	GAAACGACACTCACGCAGTCT
1538	AL10	GACATCCAGTTGACCCAGTCT
1539	AL11	AACATCCAGATGACCCAGTCT
1540	AL12	GCCATCCGGATGACCCAGTCT
1541	AL13	GTCATCTGGATGACCCAGTCT

10

20

30

40

50

【表 5 7】

表 5 7 軽鎖リバースプライマー（コンビナトリアルライブラリー1用）

1542	DL1'	TTTGATYTCACCTTGGTCCC
1543	DL2'	TTTGATCTCCAGCTTGGTCCC
1544	DL3'	TTTGATATCCACTTGGTCCC
1545	DL4'	TTTAATCTCCAGTCGTGTCCC

【0188】

AL1～AL13をDL1'～DL4'と組み合わせて、サブライブラリー1、2、3および4を同時に用いるかまたは表35～40のオリゴヌクレオチドを用いてならびに表1、2、3および4に記載の配列に対応するオリゴヌクレオチドのプールをテンプレートとして、PCRを行う。これにより、コンビナトリアルライブラリー1が作製される（図13C～D）。

10

【0189】

一実施形態において、コンビナトリアルライブラリー2および3の構築は、表58および表59（全て5'から3'の方向で示されており、名称の後ろに配列を示す）に示すオリゴヌクレオチドを用いたオーバーラップ伸長法によるポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を用いて行われる。

【表 5 8】

表 5 8 重鎖フォワードプライマー（コンビナトリアルライブラリー2および3、KabatおよびChotia定義用）

20

1546	AH1	CAGGTCAGCTGGTGCAGTCT
1547	AH2	GAGGTGCAGCTGKTGGAGTCT
1548	AH3	CAGSTGCAGCTGCAGGAGTCG
1549	AH4	CAGGTCACCTTGARGGAGTCT
1550	AH5	CARATGCAGCTGGTGCAGTCT
1551	AH6	GARGTGCAGCTGGTGSAGTC
1552	AH7	CAGATCACCTTGAAGGAGTCT
1553	AH8	CAGGTSCAGCTGGTRSAGTCT
1554	AH9	CAGGTACAGCTGCAGCAGTCA
1555	AH10	CAGGTGCAGCTACAGCAGTGG

30

【表 5 9】

表 5 9 重鎖リバースプライマー（コンビナトリアルライブラリー2および3、KabatおよびChotia定義用）

1556	DH1'	TGAGGAGACRGTGACCAGGGT
1557	DH2'	TGARGAGACGGTGACCRKGT
1558	DH3'	TGAGGAGACGGTGACCAGGGT

40

【0190】

AH1～AH10をDH1'～DH3'と組み合わせて、サブライブラリー5、6、7、11を同時に用いるかまたは表43～47および54に掲げたオリゴヌクレオチドを用いてならびに表5、6、7および11に記載の配列に対応するオリゴヌクレオチドのプールをテンプレートとしてPCRを行うか、あるいは、サブライブラリー8、9、10、11を用いるかまたは表49～54に掲げたオリゴヌクレオチドを用いてならびに表8、9、10および11に記載の配列に対応するオリゴヌクレオチドのプールを同時にテンプレートとして用いて、PCRを行う。これにより、それぞれコンビナトリアルライブラリー2または3が作製される。

【0191】

別の実施形態において、コンビナトリアルライブラリーは、直接ライゲーションにより

50

構築される。例えば、ヒトκ軽鎖生殖系列フレームワークのコンビナトリアルライブラリー（コンビネーションライブラリー1'）は、サブライブラリー1'、2'、3'およびサブバンク4（または核酸139～143、表4を参照）を同時に直接連続ライゲーションさせることにより構築される。これに続いて、表60および表61に記載されるオリゴヌクレオチドを用いたポリメラーゼ連鎖反応ステップを行う。ヒト重鎖生殖系列フレームワーク領域の2つのコンビナトリアルライブラリー（1つはCDRのKabat定義についてのもの、コンビネーションライブラリー2'；1つはCDRのChothia定義についてのもの、コンビネーションライブラリー3'）は、サブライブラリー5'、6'、IT、11'およびサブバンク11（Kabat定義）またはサブライブラリー8'、9'、12'およびサブバンク11（Chothia定義）を同時に、直接連続ライゲーションさせることにより構築される。あるいはまた、サブバンク11は、そのライゲーション反応において核酸408～413（表11を参照）と置き換えてもよい。これに続いて、表62および表63に記載されるオリゴヌクレオチドを用いたポリメラーゼ連鎖反応ステップを行う。

【表60】

表60 軽鎖フォワードプライマー（コンビナトリアルライブラリー1'用）

1559	AL1	GATGTTGTGATGACWCAGTCT
1560	AL2	GACATCCAGATGAYCCAGTCT
1561	AL3	GCCATCCAGWTGACCCAGTCT
1562	AL4	GAAATAGTGATGAYGCAGTCT
1563	AL5	GAAATTGTGTTGACRCAGTCT
1564	AL6	GAKATTGTGATGACCCAGACT
1565	AL7	GAAATTGTRMTGACWCAGTCT
1566	AL8	GAYATYGTGATGACYCAGTCT
1567	AL9	GAAACGACACTCACGCAGTCT
1568	AL10	GACATCCAGTTGACCCAGTCT
1569	AL11	AACATCCAGATGACCCAGTCT
1570	AL12	GCCATCCGGATGACCCAGTCT
1571	AL13	GTCATCTGGATGACCCAGTCT

【表61】

表61 軽鎖フォワードプライマー（コンビナトリアルライブラリー1'用）

1572	DL1'	TTTGATYTCCACCTTGGTCCC
1573	DL2'	TTTGATCTCCAGCTTGGTCCC
1574	DL3'	TTTGATATCCACTTGGTCCC
1575	DL4'	TTAATCTCCAGTCGTGTCCC

【0192】

AL1～AL13をDL1'～DL4'と組み合わせて用い、予め同時にライゲーションさせておいたサブライブラリー1'、2'、3'およびサブバンク4（または核酸139～143、表4を参照）をテンプレートとして用いてPCRを行う。これにより、コンビナトリアルライブラリー1'が作製される。

【表 6 2】

表 6 2 重鎖フォワードプライマー（コンビナトリアルライブラリー2'および3'、Kabat および Chothia 定義用）

1576	AH1	CAGGTCAGCTGGTGCAGTCT
1577	AH2	GAGGTGCAGCTGKTGGAGTCT
1578	AH3	CAGSTGCAGCTGCAGGAGTCG
1579	AH4	CAGGTCACCTTGARGGAGTCT
1580	AH5	CARATGCAGCTGGTGCAGTCT
1581	AH6	GARGTGCAGCTGGTGSAGTC
1582	AH7	CAGATCACCTTGAAGGAGTCT
1583	AH8	CAGGTSCAGCTGGTRSAGTCT
1584	AH9	CAGGTACAGCTGCAGCAGTCA
1585	AH10	CAGGTGCAGCTACAGCAGTGG

10

【表 6 3】

表 6 3 重鎖リバースプライマー（コンビナトリアルライブラリー2'および3'、Kabat および Chothia 定義用）

1586	DH1'	TGAGGAGACRGTGACCAGGGT
1587	DH2'	TGARGAGACGGTGACCRKTGT
1588	DH3'	TGAGGAGACGGTGACCAGGGT

20

【0 1 9 3】

AH1～AH10をDH1'～DH3'と組み合わせて用い、予め同時にライゲーションさせておいたサブライブラリー5'、6'、11'およびサブバンク11（または核酸265～270、表11を参照）または予め同時にライゲーションさせておいたサブライブラリー8'、9'、12'およびサブバンク11（または核酸265～270、表11を参照）をテンプレートとして用いてPCRを行う。これにより、それぞれコンビナトリアルライブラリー2'または3'が作製される。

【0 1 9 4】

本発明にしたがって構築されるフレームワーク領域のサブバンク、CDRのサブバンク、コンビナトリアルサブライブラリーおよびコンビナトリアルライブラリーは、その後の使用のために保存することができる。それらの核酸は、溶液中で、乾燥した滅菌凍結乾燥粉末として、または密閉容器に入った無水濃縮物として保存することができる。核酸を溶液中で保存しない場合、核酸は、その後の使用のために、（例えば水または食塩水で）適当な濃度に再調製してもよい。本発明のサブバンク、コンビナトリアルサブライブラリーおよびコンビナトリアルライブラリーは、好ましくは、核酸の量および濃度が表示されている容器内で2℃～8℃にて保存される。

30

【0 1 9 5】

5.5 コンビナトリアルライブラリーの発現

本発明に従って構築されるコンビナトリアルライブラリーは、当業界で公知のいずれの方法によっても発現させることができ、そのような方法としては、限定するものではないが、細菌発現系、哺乳動物発現系およびin vitroリボソームディスプレイ系が挙げられる。

40

【0 1 9 6】

ある特定の実施形態において、本発明は、コンビナトリアルライブラリーを発現させるためのファージベクターの使用を包含する。ファージベクターには、発現され提示されたタンパク質の非常に大きな集団をスクリーニングして、所望の結合活性をコードする1以上の特定のクローンを探し出す手段を提供する、という特別な利点がある。

【0 1 9 7】

抗体分子の大集団を発現させるためにファージディスプレイベクターを使用することは当業界では周知のことであり、本明細書で詳しく述べることはない。一般に、この方法に

50

は、ライブラリーの抗体種をクローニングし発現させるための繊維状ファージ（ファージミド）表面発現ベクター系の使用が含まれる。例えば、Kangら, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88:4363-4366 (1991); Barbasら, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88:7978-7982 (1991); Zebedeeら, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89:3175-3179 (1992); Kangら, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88:11120-11123 (1991); Barbasら, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89:4457-4461 (1992); Gramら, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89:3576-3580 (1992); Brinkmanら, J. Immunol. Methods 182:41-50 (1995); Amesら, J. Immunol. Methods 184:177-186 (1995); Kettleboroughら, Eur. J. Immunol. 24:952-958 (1994); Persicら, Gene 187 9-18 (1997); Burtonら, Advances in Immunology 57:191-280 (1994); PCT出願PCT/GB91/01134; PCT公開WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; ならびに米国特許第5,698,426号; 第5,223,409号; 第5,403,484号; 第5,580,717号; 第5,427,908号; 第5,750,753号; 第5,821,047号; 第5,571,698号; 第5,427,908号; 第5,516,637号; 第5,780,225号; 第5,658,727号; 第5,733,743号および第5,969,108号を参照されたい。

10

【0198】

本発明の特定のファージミドベクターは、アミノ末端からカルボキシ末端の方向に、(1)原核生物分泌シグナルドメイン、(2)免疫グロブリンの重鎖もしくは軽鎖可変領域を規定する異種ポリペプチド、および(3)繊維状ファージ膜固定ドメインを含む融合ポリペプチドをコードして発現することができるヌクレオチド配列を含む組換えDNA分子である。このベクターは、この融合ポリペプチドを発現させるための、原核生物制御配列などのDNA発現制御配列を含む。

20

【0199】

繊維状ファージ膜固定ドメインは、繊維状ファージ粒子のマトリックスに結合して融合ポリペプチドをファージ表面に組み込むことができるcpIIIまたはcpVIIIコートタンパク質のドメインであってもよい。

【0200】

このベクターの膜固定ドメインは、繊維状ファージM13、f1、fdおよび同等の繊維状ファージから得られる。具体的な膜固定ドメインは、遺伝子IIIおよび遺伝子VIIIによりコードされるコートタンパク質中に見られる(Ohkawaら, J. Biol. Chem., 256:9951-9958, 1981を参照)。繊維状ファージコートタンパク質の膜固定ドメインは、そのコートタンパク質のカルボキシ末端領域の一部であり、脂質二重層膜にわたる疎水性アミノ酸残基の領域と、通常は膜の細胞質面に見られ、膜から延びている荷電アミノ酸残基の領域とを含んでいる。繊維状ファージ粒子の構造、それらのコートタンパク質および粒子アセンブリの詳細な説明については、Rachedら, Microbiol. Rev., 50:401-427 (1986); およびModelら, "The Bacteriophages: Vol. 2", R. Calendar編. Plenum Publishing Co., p.p.375-456 (1988) による概説を参照されたい。

30

【0201】

分泌シグナルはタンパク質のリーダーペプチドドメインであり、これは該タンパク質をグラム陰性細菌のペリプラズム膜にターゲティングする。分泌シグナルの1つの例はpelB分泌シグナルである。(Betterら, Science, 240:1041-1043 (1988); Sastryら, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86:5728-5732 (1989); およびMullinaxら, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 87:8095-8099 (1990))。エルビニア・カロトバ(Erwinia carotova)由来の2つのpelB遺伝子産物変異体から得られる分泌シグナルドメインの推定アミノ酸残基配列は、Leiら, Nature, 331:543-546 (1988)に記載されている。本発明において有用な大腸菌由来の他の分泌シグナルポリペプチドドメインのアミノ酸残基配列は、Oliver, Escherichia coli and Salmonella Typhimurium, Neidhard, F. C. (編), American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1:56-69 (1987)に記載されるようなものである。

40

【0202】

DNA発現制御配列は、構造遺伝子産物を発現させるための1セットのDNA発現シグナルを

50

含み、その遺伝子に機能しうる形で連結された、周知の5'エレメントおよび3'エレメントを共に含む。5'制御配列は、転写開始のためのプロモーターと、上流の翻訳可能なDNA配列の5'末端に機能しうる形で連結されたりボソーム結合部位とを規定する。3'制御配列は、異種融合ポリペプチドとインフレームにかつ機能しうる形で連結された少なくとも1つの終結（停止）コドンとを規定する。

【0203】

ある特定の実施形態で、本発明で用いられるベクターは、原核生物由来の複製起点またはレプリコン、すなわち、それで形質転換された原核宿主細胞（細菌宿主細胞など）内で自律複製および組換えDNA分子の維持を染色体外で指令することができるDNA配列を含む。そのような複製起点は当業界では周知である。好ましい複製起点は、宿主生物内で効率的なものである。1つの考えられる宿主細胞は大腸菌である。Sambrookら, "Molecular Cloning: a Laboratory Manual", 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1989)を参照されたい。

10

【0204】

さらに、原核生物由来のレプリコンを含む実施形態は、次のような核酸も含むことができる。つまり、その核酸の発現が、形質転換された細菌宿主に、薬剤耐性のような選択上の利点を付与するものである。典型的な細菌の薬剤耐性遺伝子は、アンピシリン、テトラサイクリン、ネオマイシン／カナマイシンまたはクロラムフェニコールに対する耐性を付与するものである。また、ベクターは、典型的には、翻訳可能なDNA配列を挿入するための好都合な制限部位も含む。

20

【0205】

いくつかの実施形態では、ベクターは、可変重鎖領域をコードするヌクレオチド配列と可変軽鎖領域をコードするヌクレオチド配列のような、内部に含まれる2つのシストロンを共発現することができる。共発現は、さまざまな系において達成されており、したがって、2つの遺伝子産物の十分な相対量が産生されて機能性ヘテロダイマーのアセンブリおよび発現が可能であれば、どのような特定の設計にも限定される必要はない。

【0206】

いくつかの実施形態では、DNA発現ベクターは、ゲノムを被包している繊維状ファージ粒子の形態で、好都合に操作されるように設計される。この実施形態において、DNA発現ベクターはさらに、繊維状ファージの複製起点を規定するヌクレオチド配列を含み、その結果、該ベクターは、適切な遺伝的相補性が提示されると、一本鎖複製形態の繊維状ファージとして複製することができ、繊維状ファージ粒子内にパッケージングされるようになる。この特徴は、DNA発現ベクターがファージ粒子内にパッケージングされる能力を付与し、該粒子およびそこに含まれるベクターを、ファージ粒子の集団を構成する他の粒子からその後分離するのに役立つ。

30

【0207】

繊維状ファージ複製起点は、周知のように、複製開始部位、複製終結部位および複製により産生された複製形態のパッケージングのための部位を規定する、ファージゲノムの領域である（例えば、Raschedら, Microbiol. Rev., 50:401-427, 1986; およびHoriuchi, J. Mol. Biol., 188:215-223, 1986を参照されたい）。本発明で使用するための一般に使用される繊維状ファージ複製起点は、M13、f1またはfdファージの複製起点である（Shortら, Nucl. Acids Res., 16:7583-7600, 1988）。

40

【0208】

ヘテロダイマー免疫グロブリン分子の作製方法は、一般に、(1)提示ベクターの大集団（それぞれがファージミド表面提示タンパク質上に提示された異なる推定上の結合部位を発現できる）を繊維状ファージ粒子に導入し、(2)繊維状ファージ粒子の表面にその提示タンパク質および結合部位を発現させ、(3)予め選択した抗原に対するファージ粒子のパンニングのような親和性技法を用いて、表面に発現されたファージ粒子を単離（スクリーニング）し、それにより予め選択した抗原と結合する結合部位を含む提示タンパク質を含む1種以上のファージミドを単離する、ことを含んでなる。

50

【0209】

目的の抗体結合部位を発現することができる特定のベクターの単離には、ファージミド提示タンパク質を発現できるジシストロン性発現ベクターを、繊維状ファージ遺伝子の発現およびファージ粒子のアセンブリを許容する宿主細胞に導入することが含まれる。典型的には、この宿主は大腸菌である。次いで、ヘルパーファージゲノムを、ファージミド発現ベクターを含む宿主細胞に導入して、ファージ粒子のアセンブリを可能にするのに必要な遺伝的相補性を与える。

【0210】

こうして得られた宿主細胞を培養して、導入されたファージ遺伝子と提示タンパク質遺伝子を発現させ、ファージ粒子をアセンブルさせて宿主細胞から脱離させる。次に、脱離したファージ粒子を宿主細胞培地から収集（回収）し、望ましい抗体結合特性についてスクリーニングする。典型的には、収集した粒子は、予め選択した抗原との結合について「パンニング」する。次に、強く結合する粒子を回収し、個々の種の粒子をクローニング的に単離し、その抗原への結合についてさらにスクリーニングする。所望の抗原結合特異性の結合部位を産生するファージが選択される。

10

【0211】

ファージの選択後、そのファージからの抗体コード領域を単離して、抗体全体もしくは他の所望の抗原結合性フラグメントの作製のために使用し、そして所望の宿主細胞、例えば哺乳動物細胞、昆虫細胞、植物細胞、酵母、および細菌において発現させることができる。これについては後記で詳細に述べる。例えば、Fab、Fab'およびF(ab')₂フラグメントを組換えにより作製するための技法を、国際公開WO 92/22324；Mullinaxら、BioTechniques 12(6):864-869 (1992)；およびSawaiら、AJRI 34:26-34 (1995)；およびBetterら、Science 240:1041-1043 (1988)に開示されるような当業界で公知の方法と共に、用いることができる。一本鎖Fvおよび抗体の作製に使用される技法の例としては、米国特許第4,946,778号および第5,258,498号；Hustonら、Methods in Enzymology 203:46-88 (1991)；Shuら、PNAS 90:7995-7999 (1993)；ならびにSkerraら、Science 240:1038-1040 (1988)に記載されるものが挙げられる。

20

【0212】

本発明はまた、本発明のベクターまたはヌクレオチド配列を含む宿主細胞を包含する。特定の実施形態において、その宿主細胞は大腸菌である。

30

【0213】

特定の実施形態において、本発明のコンビナトリアルライブラリーは、M13系のファージベクターにクローニングされる。このベクターは、lacZプロモーターの制御下で、ヒトγ1重鎖の第1定常ドメインとヒトκ軽鎖の定常ドメインとを含むFabフラグメントの発現を可能にする。これは、Wu & An, 2003, Methods Mol. Biol., 207, 213-233；Wu, 2003, Methods Mol. Biol., 207, 197-212；およびKunkelら, 1987, Methods Enzymol. 154, 367-382に記載されるようなハイブリダイゼーション変異誘発により行うことができる。簡単に述べると、クローニングしようとする重鎖および軽鎖に対応する精製されたマイナス鎖を、それぞれ1つのパンドロームループを含む2つの領域にアニーリングさせる。それらのループは、ユニークなXbaI部位を含んでおり、この部位は、ヒトκ定常領域および第1のヒトγ1定常領域とそれぞれインフレームで融合された、V_L鎖およびV_H鎖の両者を含むベクターの選択を可能にする（Wu & An, 2003, Methods Mol. Biol., 207, 213-233；Wu, 2003, Methods Mol. Biol., 207, 197-212）。次に、合成されたDNAを、Wu, 2003, Methods Mol. Biol., 207, 197-212に記載されるように、XL1-blue細菌叢上でのプラーク形成またはFabフラグメントの産生のために、XL1-blueにエレクトロポレーションする。

40

【0214】

本発明では、本発明のコンビナトリアルライブラリーを発現させるために、細菌／ファージ発現系に加えて、他の宿主－ベクター系も使用可能である。これらとしては、限定するものではないが、ベクターで形質転換した、あるいはウイルス（例えばワクシニアウイ

50

ルス、アデノウイルス)を感染させた哺乳動物細胞系;ベクターで形質転換した、あるいはウイルス(例えばバキュロウイルス)を感染させた昆虫細胞系;酵母ベクターを含む酵母などの微生物;またはDNA、プラスミドDNAもしくはコスミドDNAで形質転換した細菌が挙げられる。例えば、Vermaら, J Immunol Methods. 216(1-2):165-81 (1998)を参照されたい。

【0215】

ベクターの発現エレメントは、その強度および特異性においてさまざまである。使用する宿主-ベクター系に応じて、多くの適切な転写および翻訳エレメントのいずれか1つを使用すればよい。1つの態様において、本発明のコンビナトリアルライブラリーの各核酸は、適当な宿主内で、ヒト化重鎖および/または軽鎖あるいはヒト化重鎖および/または軽鎖の変換領域を発現する発現ベクターの一部である。特に、そのような核酸は、抗体のコード領域に機能しうる形で連結されたプロモーター(しばしば、異種プロモーター)を有しており、そのプロモーターは誘導性または構成性であり、場合によっては組織特異的である。(さらなる詳細については、第5.7節を参照されたい。)別の特定の実施形態では、抗体コード配列および任意の他の所望配列が、ゲノム中の所望の部位での相同組換えを促進する領域によって挟まれており、かくして抗体コード核酸の染色体発現をもたらす核酸分子を使用する(Koller and Smithies, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935; Zijlstraら, 1989, Nature 342:435-438)

【0216】

また、前記コンビナトリアルライブラリーは、リボソーム提示系などのin vitro系を用いて発現させることも可能である(詳細については、第5.6節を参照)

【0217】

5.6 再設計または再構成された抗体の選択

発現されたコンビナトリアルライブラリーは、当業界で公知のいずれかの方法を用いて、ドナー抗体によって認識される抗原への結合についてスクリーニングすることができる。特定の実施形態において、それぞれ第5.4節および第5.7節に記載されるように構築され発現されたファージディスプレイライブラリーを、ドナー抗体によって認識される抗原への結合についてスクリーニングし、その抗原に対して有意な結合を示す V_H および/または V_L ドメインを発現するファージを、慣用のスクリーニング技法(例えば、Harlow, E., および Lane, D., 1988, 前掲、Gherardi, Eら 1990. J. Immunol. meth. 126 p61-68に記載されるもの)を用いてライブラリーから単離することができる。宿主細胞から脱離したファージ粒子を宿主細胞培地から収集(回収)し、望ましい抗体結合特性についてスクリーニングする。典型的には、収集した粒子を、予め選択した抗原との結合について「パンニング」する。次に、強く結合する粒子を回収し、個々の種の粒子をクローニングにより単離し、その抗原に対する結合についてさらにスクリーニングする。望ましい抗原結合特異性の結合部位を生じるファージを選択する。ある特定の実施形態において、本発明のヒト化抗体は、目的の抗原に対して少なくとも $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ 、少なくとも $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ 、少なくとも $1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ または少なくとも $1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ の親和性を有する。

【0218】

別の実施形態において、発現されたコンビナトリアルライブラリーは、ドナー抗体と比較して、改変された抗原に対する結合特性を有する V_H および/または V_L ドメインを発現するファージについてスクリーニングされる。さらに別の実施形態において、本発明のヒト化抗体は、ドナー抗体と比較して、改変された抗原に対する結合特性を有しうる。結合特性の例としては、限定されるものでないが、結合特異性、平衡解離定数(K_D)、解離速度および会合速度(それぞれ K_{off} および K_{on})、結合親和性および/またはアビディティ)が挙げられる。当業者であれば、ある特定の改変が多かれ少なかれ所望されることを理解するであろう。当技術分野では平衡解離定数(K_D)が k_{off}/k_{on} として定義されることは周知である。一般に、低 K_D の結合分子(例えば、抗体)は高 K_D の結合分子(例えば、抗体)より好ましいと理解されている。しかし、いくつかの事例では、 k_{on} または k_{off} の値が K_D の値より重要でありうる。当業者であれば、所与の抗体応用に対してどの動力学的パラメ

ーターが最も重要であるかを決定しうる。

【0219】

一実施形態において、本発明の改変された V_H および／または V_L ドメインまたはヒト化抗体を発現するファージの平衡解離定数 (K_D) は、ドナー抗体と比較して、少なくとも1%、または少なくとも5%、または少なくとも10%、または少なくとも20%、または少なくとも30%、または少なくとも40%、または少なくとも50%、または少なくとも60%、または少なくとも70%、または少なくとも80%、または少なくとも90%、または少なくとも100%、または少なくとも150%、または少なくとも200%、または少なくとも500%だけ低下する。別の実施形態において、本発明の改変された V_H および／または V_L ドメインまたはヒト化抗体を発現するファージの平衡解離定数 (K_D) は、ドナー抗体と比較して、少なくとも2~10倍だけ、または少なくとも5~50倍だけ、または少なくとも25~250倍だけ、または少なくとも100~500倍だけ、または少なくとも250~1000倍だけ低下する。さらに別の実施形態において、 V_H および／または V_L ドメインを発現するファージの平衡解離定数 (K_D) は、ドナー抗体と比較して、少なくとも2倍だけ、または少なくとも3倍だけ、または少なくとも5倍だけ、または少なくとも10倍だけ、または少なくとも20倍だけ、または少なくとも50倍だけ、または少なくとも100倍だけ、または少なくとも200倍だけ、または少なくとも500倍だけ、または少なくとも1000倍だけ低下する。

10

【0220】

別の実施形態において、本発明の改変された V_H および／または V_L ドメインまたはヒト化抗体を発現するファージの平衡解離定数 (K_D) は、ドナー抗体と比較して、少なくとも1%、または少なくとも5%、または少なくとも10%、または少なくとも20%、または少なくとも30%、または少なくとも40%、または少なくとも50%、または少なくとも60%、または少なくとも70%、または少なくとも80%、または少なくとも90%、または少なくとも100%、または少なくとも150%、または少なくとも200%、または少なくとも500%だけ増加する。さらなる別の実施形態において、改変された V_H および／または V_L ドメインを発現するファージの平衡解離定数 (K_D) は、ドナー抗体と比較して、少なくとも2~10倍だけ、または少なくとも5~50倍だけ、または少なくとも25~250倍だけ、または少なくとも100~500倍だけ、または少なくとも250~1000倍だけ増加する。なお別の実施形態において、本発明の改変された V_H および／または V_L ドメインまたはヒト化抗体を発現するファージの平衡解離定数 (K_D) は、ドナー抗体と比較して、少なくとも2倍だけ、または少なくとも3倍だけ、または少なくとも5倍だけ、または少なくとも10倍だけ、または少なくとも20倍だけ、または少なくとも50倍だけ、または少なくとも100倍だけ、または少なくとも200倍だけ、または少なくとも500倍だけ、または少なくとも1000倍だけ増加する。

20

30

【0221】

特定の実施形態において、ファージライブラリーは、まず、捕捉リフト (capture lift) と呼ばれる改良型プラークリフティングアッセイを用いてスクリーニングする。Watkinsら, 1997, Anal. Biochem., 253:37-45を参照されたい。簡単に述べると、ファージ感染細菌を固形寒天叢上にプレートし、続いてFab特異的試薬 (例えば抗Fab抗体) をコーティングしたニトロセルロースフィルターで覆う。ほぼ均一量のファージ発現Fabの捕捉を行った後、そのフィルターを、そのFabの K_d 値よりも実質的に低い濃度の所望の抗原-Ig融合タンパク質でプローブする。

40

【0222】

別の実施形態では、コンビナトリアルライブラリーを発現させ、リボソームディスプレイ系などのin vitro系を用いてスクリーニングする (例えば、Graddisら, Curr Pharm Biotechnol. 3(4):285-97 (2002); Hanes and Plutchau PNAS USA 94:4937-4942 (1997); He, 1999, J. Immunol. Methods, 231:105; Jermutusら (1998) Current Opinion in Biotechnology, 9:534-548。リボソームディスプレイ系は、翻訳中のリボソームから抗体 (もしくはそのフラグメント) またはmRNAのいずれも放出させることなく、抗体またはそのフラグメントのライブラリーをin vitroで翻訳することによって作動する。これはおそらく、終結コドンに欠失させ、かつリボソーム安定化バッファー系を用いることにより行われ

50

る。翻訳された抗体（もしくはそのフラグメント）はまた、新たに合成された抗体もしくはそのフラグメントがリボソームトンネルから容易に現れて独立して折りたたまれるように、C末端テザー（tether）ポリペプチド伸長を含む。折りたたまれた抗体もしくはそのフラグメントは、コグネイト抗原を用いてスクリーニングまたは捕捉できる。これによりmRNAの捕捉が可能になり、続いてin vitroで富化する。大腸菌およびウサギ網状赤血球系がリボソームディスプレイに一般的に使用される。

【0223】

当業界で公知の他の方法、例えばPROfusion（商標）（米国特許第6,281,344号、Phylos Inc., Lexington, MA）、共有結合ディスプレイ（国際公開WO 9837186, Actinova Ltd., Cambridge, U.K.）も、本発明に従って使用可能である。

10

【0224】

別の実施形態では、抗原を固相支持体に結合させることができ、その支持体はペトリ皿、クロマトグラフィービーズ、磁性ビーズなどによって提供できる。本明細書中で用いられる「固相支持体」という用語は、特定のタイプの固相支持体に限定されるものではない。むしろ、多数の支持体が利用可能であり、当業者には公知である。固相支持体としては、シリカゲル、樹脂、誘導体化プラスチックフィルム、ガラスビーズ、コットン、プラスチックビーズ、ポリスチレンビーズ、アルミナゲル、および多糖類が挙げられる。好適な固相支持体は、目的とする最終用途および種々の合成プロトコルに対する適性に基づいて選択すればよい。例えば、ペプチド合成の場合、固相支持体は、p-メチルベンズヒドリルアミン（pMBHA）樹脂（Peptides International, Louisville, KY）、クロロメチルポリスチレン、ヒドロキシメチルポリスチレンおよびアミノメチルポリスチレンなどのポリスチレン類（例えば、Bachem Inc., Peninsula Laboratories, etc.から入手されるPAM樹脂）、ポリ（ジメチルアクリルアミド）グラフト化スチレンコジビニルベンゼン（例えば、POLY HIPE樹脂、Aminotech, Canadaから入手）、ポリアミド樹脂（Peninsula Laboratoriesから入手）、ポリエチレングリコールでグラフト化したポリスチレン樹脂（例えば、TENTAGELまたはARGOGEL、Bayer, Tübingen, Germany）、ポリジメチルアクリルアミド樹脂（Milligen/Bioscience, Californiaから入手）、またはセファロース（Pharmacia, Sweden）などの樹脂とすることができる。

20

【0225】

次に、コンビナトリアルライブラリーを抗原上に通過させ、洗浄後、結合している個々の抗体を保持し、場合によっては検出系により検出する。結合した集団のサンプルを徐々に高めたストリンジェント条件下で除去する場合には、各サンプルにおいて表される結合親和性が増大する。ストリンジェンシーを高めた条件は、例えば、浸漬時間を長くすること、または浸漬溶液のpHを変えること等によって達成できる。

30

【0226】

別の実施形態では、固相酵素免疫アッセイ（ELISA）を用いて、所望の結合活性を有する抗体についてスクリーニングする。ELISAには、抗原の調製、抗原によるマイクロタイタープレートのウェルのコーティング、ウェルに結合していない抗原の洗い流し、酵素基質などの検出可能な化合物（例えば、ホースラディッシュペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼ）にコンジュゲートさせた目的の抗体のウェルへの添加および一定期間にわたるインキュベーション、未結合抗体もしくは非特異的に結合した抗体の洗い流し、ならびに、抗原をコーティングしたウェルに特異的に結合している抗体の存在の検出が含まれる。ELISAにおいて、目的の抗体は、必ずしも検出可能な化合物にコンジュゲートさせる必要はない。その代わりに、検出可能な化合物にコンジュゲートさせた二次抗体（目的の抗体を認識するもの）をウェルに添加すればよい。さらに、ウェルに抗原をコーティングする代わりに、抗体をウェルにコーティングしてもよい。この場合、検出可能な分子は、酵素基質などの検出可能な化合物（例えば、ホースラディッシュペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼ）にコンジュゲートさせた抗原とすることができる。当業者であれば、検出されるシグナルが増大するように改変できるパラメーター、ならびに当業界で公知のELISAの他の可変要因について理解できるであろう。ELISAに関するさらなる考察

40

50

については、例えば、Ausubelら編，1994，Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York at 11.2.1を参照されたい。

【0227】

別の実施形態では、BIAcore反応速度解析を用いて、特定の抗原への本発明の抗体の結合onおよびoff速度（ K_d ）を求めることができる。BIAcore反応速度解析には、本発明の抗体が表面に固定されているチップへの抗原の結合および該チップからの解離を解析することが含まれる。Wuら，1999，J. Mol. Biol., 294:151-162を参照されたい。簡単に述べると、酢酸ナトリウム中の抗原-Ig融合タンパク質を注入することにより、抗原-Igを、(1-エチル-3-[3-ジメチルアミノプロピル]-カルボジイミド塩酸塩)およびN-ヒドロキシ-スクシンイミド活性化センサーチップCM5に固定する。抗原-Igは低密度で固定して、解離期中のFabの再結合を防止する。結合速度定数（ K_{on} ）を得るために、6つの異なるFab濃度での結合速度を一定流速にて測定する。解離速度定数（ K_{off} ）は、解離期を解析することにより得られる6つの測定値の平均である。センサーグラムは、BIAevaluation 3.0プログラムを用いて解析する。 K_d は、 $K_d = K_{off}/K_{on}$ から算出する。残存するFabは、長期の解離により各測定後に除去する。一実施形態では、陽性プラークを拾い、低密度で再プレートし、再度スクリーニングする。

【0228】

別の実施形態では、抗体（scFvまたは、抗体フラグメントもしくはその変異体を含むまたはそれからなる他の分子を含む）の抗原への結合親和性、ならびに抗体-抗原相互作用のoff速度は、競合結合アッセイにより求めることができる。競合結合アッセイの一例は、徐々に増大させた量の未標識抗原の存在下で、標識抗原（例えば ^3H または ^{125}I ）を目的の抗体と共にインキュベートすること、ならびに、標識抗原に結合した抗体を検出することを含むラジオイムノアッセイである。本発明の抗体の親和性および結合off速度は、得られたデータからScatchardプロット解析により求めることができる。また、二次抗体との競合もラジオイムノアッセイを用いて測定することができる。この場合には、徐々に増大させた量の未標識二次抗体の存在下で、抗原を、標識化合物（例えば、 ^3H または ^{125}I ）にコンジュゲートさせた本発明の抗体と共にインキュベートする。

【0229】

他のアッセイ、例えば、限定するものではないが、ウエスタンブロット、ラジオイムノアッセイ、ELISA（酵素結合免疫吸着アッセイ）、サンドイッチイムノアッセイ、免疫沈降アッセイ、沈降素反応、ゲル拡散沈降反応、免疫拡散アッセイ、凝集アッセイ、補体結合アッセイ、蛍光イムノアッセイ、プロテインAイムノアッセイなどの技法を用いた競合的および非競合的アッセイ系を含むイムノアッセイを用いて、ヒト化抗体をスクリーニングしたり、その結合特異性をさらに特徴付けることも可能である。そのようなアッセイは日常的に行われており、当業界で周知である（例えば、Ausubelら編，1994，Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New Yorkを参照）。代表的なイムノアッセイを以下で簡単に述べる（これは限定しようとするものではない）。

【0230】

一実施形態において、ELISAは、Fabフラグメントを発現する細菌培養物から調製した上清の二次スクリーニングとして、捕捉リフトアッセイにより同定されたクローンを確認するために用いられる。2つのELISAを行うことができる：(1)定量ELISA：これは、本質的にWu，2003，Methods Mol. Biol., 207, 197-212に記載されるように行うことができる。簡単に述べると、抗ヒトFab ELISAにより濃度を測定できる：96ウェルMaxisorp Immunoplateの個々のウェルに50ngのヤギ抗ヒトFab抗体をコーティングし、次にサンプル（上清に発現させたFab）または標準物質（ヒトIgG Fab）と共にインキュベートする。続いて、ヤギ抗ヒト κ ホースラディッシュペルオキシダーゼ（HRP）コンジュゲートと共にインキュベートを行う。HRP活性をTMB基質で検出し、反応を0.2Mの H_2SO_4 により停止させる。プレートを450nmで読み取る。次に、二次スクリーニングの次の段階のために、検出可能な量のFabを発現するクローンを選択する。(2)機能的ELISA：簡単に述べると、特定の抗原

結合活性を抗原に基づくELISAにより測定する：96ウェルMaxisorp Immunoplateの個々のウェルに50ngの目的の抗原をコーティングし、1% BSA/0.1% Tween 20でブロックし、次にサンプル（上清発現Fab）と共にインキュベートする。続いて、ヤギ抗ヒトκホースラディッシュペルオキシダーゼ（HRP）コンジュゲートと共にインキュベートする。HRP活性をTMB基質で検出し、反応を0.2MのH₂SO₄により停止させる。プレートを450nmにて読み取る。

【0231】

免疫沈降プロトコルは、一般に、プロテインホスファターゼおよび／またはプロテアーゼインヒビター（例えば、EDTA、PMSF、159アプロチニン、バナジン酸ナトリウム）を補充したRIPAバッファー（1%のNP-40またはTriton X-100、1%デオキシコール酸ナトリウム、0.1%SDS、0.15M NaCl、0.01M リン酸ナトリウム、pH 7.2、1%Trasyllol）などの溶解バッファー中で細胞集団を溶解させ、その細胞溶解物に目的の抗体を添加し、40℃にて一定期間（例えば4時間）にわたってインキュベートし、プロテインAおよび／またはプロテインGセファロースビーズを細胞溶解物に添加し、約1時間以上にわたり40℃にてインキュベートし、ビーズを溶解バッファー中で洗浄し、ビーズをSDS／サンプルバッファーに再懸濁することを含む。目的の抗体の、特定の抗原を免疫沈降させる能力は、例えば、ウエスタンブロット分析により評価することができる。当業者であれば、抗体と抗原の結合を増大させ、かつバックグラウンドを低減させるように変更可能なパラメーター（例えば、細胞溶解物をセファロースビーズで前もってクリアランスすること）について理解できるであろう。免疫沈降プロトコルについてのさらなる解説については、例えば、Ausubelら編、1994、Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York, at 10.16.1を参照されたい。

【0232】

ウエスタンブロット分析は、一般に、タンパク質サンプルを調製すること、そのタンパク質サンプルをポリアクリルアミドゲル（例えば、抗原の分子量に応じて8%～20%のSDS-PAGE）で電気泳動すること、タンパク質サンプルをポリアクリルアミドゲルから膜（例えば、ニトロセルロース、PVDFまたはナイロン）に移行させること、膜をブロッキング溶液（例えば、3%BSAまたは脱脂乳を含むPBS）中でブロックすること、膜を洗浄バッファー（例えば、PBS Tween 20）中で洗浄すること、膜をブロッキングバッファーで希釈した一次抗体（目的の抗体）でブロックすること、膜を洗浄バッファー中で洗浄すること、膜を、ブロッキングバッファーで希釈した酵素基質（例えば、ホースラディッシュペルオキシダーゼもしくはアルカリホスファターゼ）または放射性分子（例えば、12Pまたは125I）にコンジュゲートさせた二次抗体（一次抗体を認識するもの、例えば抗ヒト抗体）でブロックすること、膜を洗浄バッファーで洗浄すること、抗原の存在を検出することを含む。当業者であれば、シグナルを増大させ、かつバックグラウンドノイズを低減させるように変更可能なパラメーターについて理解できるであろう。ウエスタンブロットプロトコルに関するさらなる解説としては、例えば、Ausubelら編、1994、Gintest Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York at 10.8.1を参照されたい。

【0233】

所望の抗原結合活性を有する改変型（例えばヒト化）抗体またはそのフラグメントをコードする核酸は、ABI300ゲノムアナライザを用いるジデオキシ塩基配列決定などの配列決定法により特性決定できる。前記で述べた、2部からなる二次ELISAスクリーニングなどの他のイムノアッセイを用いて、改変型（例えばヒト化）抗体を、特定の抗原への結合について、互いと、およびドナー抗体と比較することができる。

【0234】

抗体の可変領域（例えば、Fabドメイン）の融点（T_m）が変性および凝集にある役割を果たすことは公知である。一般により高いT_mはより優れた安定性およびより低い凝集と関がある。本発明者らが実証したように、本明細書に開示された方法により、ドナー抗体と比較して、改変されたFabドメインT_mをもつ改変された抗体を作製することができる。

従って、本発明は、ドナー抗体と比較して改変されたFabドメイン T_m を有する改変された抗体を提供する。さらに、ある特定の実施形態において、発現されたコンビナトリアルライブラリーを、ドナー抗体と比較して改変された T_m を有する V_H および／または V_L ドメインを発現するファージについてスクリーニングする。場合により、または、あるいは、本発明の方法により作製された、改変された（例えば、ヒト化）抗体またはそのフラグメントを、ドナー抗体と比較して改変された可変領域 T_m を有するものについてスクリーニングする。

【0235】

一実施形態において、改変された（例えば、ヒト化）抗体またはそれらのフラグメントは、約 1°C ～約 30°C 、または約 1°C ～ 20°C 、または約 1°C ～約 10°C 、または約 1°C ～約 5°C 増加した可変領域 T_m を有する。別の実施形態において、改変された（例えば、ヒト化）抗体またはそれらのフラグメントは、少なくとも約 1°C 、または少なくとも約 2°C 、または少なくとも約 3°C 、または少なくとも約 4°C 、または少なくとも約 5°C 、または少なくとも約 6°C 、または少なくとも約 7°C 、または少なくとも約 8°C 、または少なくとも約 9°C 、または少なくとも約 10°C 、または少なくとも約 11°C 、または少なくとも約 12°C 、または少なくとも約 13°C 、または少なくとも約 14°C 、または少なくとも約 15°C 、または少なくとも約 16°C 、または少なくとも約 17°C 、または少なくとも約 18°C 、または少なくとも約 19°C 、または少なくとも約 20°C 、または少なくとも約 25°C 、または少なくとも約 30°C 、またはそれ以上、増加した可変領域 T_m を有する。

【0236】

一実施形態において、改変された（例えば、ヒト化）抗体またはそれらのフラグメントは、約 1°C ～約 30°C 、または約 1°C ～ 20°C 、または約 1°C ～約 10°C 、または約 1°C ～約 5°C 低下した可変領域 T_m を有する。別の実施形態において、改変された（例えば、ヒト化）抗体またはそれらのフラグメントは、少なくとも約 1°C 、または少なくとも約 2°C 、または少なくとも約 3°C 、または少なくとも約 4°C 、または少なくとも約 5°C 、または少なくとも約 6°C 、または少なくとも約 7°C 、または少なくとも約 8°C 、または少なくとも約 9°C 、または少なくとも約 10°C 、または少なくとも約 11°C 、または少なくとも約 12°C 、または少なくとも約 13°C 、または少なくとも約 14°C 、または少なくとも約 15°C 、または少なくとも約 16°C 、または少なくとも約 17°C 、または少なくとも約 18°C 、または少なくとも約 19°C 、または少なくとも約 20°C 、または少なくとも約 25°C 、または少なくとも約 30°C 、またはそれ以上、低下した可変領域 T_m を有する。

【0237】

ある特定の実施形態において、 T_m は示差走査熱量測定（DSC）により決定される。特定の実施形態において、タンパク質ドメイン（例えば、およびFabドメインなどの抗体可変ドメイン）の T_m は、単離されたタンパク質ドメイン分子を用いて測定される。別の実施形態において、タンパク質ドメインの T_m は、無傷のタンパク質を含有するサンプルを用いて測定される。後者の場合、ドメインの T_m は、目的のドメインに対応するデータポイントだけを分析することによりタンパク質のデータから推定される。DSCを用いてタンパク質の変性を研究する方法は当技術分野で周知であり（例えば、Vermeer et al., 2000, Biophys. J. 78: 394-404; Vermeer et al., 2000, Biophys. J. 79: 2150-2154を参照）そして下記の実施例3に詳しく記載されている。

【0238】

DSCはタンパク質の個々のドメイン間の相互作用の微細なチューニングを検出することができる（Privalovら、1986, Methods Enzymol. 131: 4-51）。一実施形態において、DSC測定はSetaram Micro-DSC III（Setaram, Caluire, France）を用いて実施される。サンプルを熱量計の1mlサンプルセル中に置き、それに対して適当なブランク溶液を含有する1ml対照セルを置く。セルを4時間 25°C にて熱量計内で安定化した後に、最終温度まで選択した加熱速度にて加熱する。遷移温度とエンタルピーを、ソフトウェア（Setaram, Version 1.3）を用いて決定する。別の実施形態においては、DSC測定をVP-DSC（MicroCal, LLC）を用いて実施する。一実施形態においては、 $1.0^{\circ}\text{C}/\text{分}$ の走査速度と $25\sim 120^{\circ}\text{C}$ の温度範

囲を採用する。8秒のフィルター時間と5分間の走査前恒温設定を用いる。サンプルと対照セルの両方でバッファーにより複数のベースラインを試験し、熱平衡を確立した。サンプルのサーモグラムからベースラインを差し引いた後、データを濃度正規化し、そしてデコンボリューション関数を用いて適合させる。融点を製造業者の手順に従い、システムと共に補給されたOriginソフトウェアを用いて決定する。

【0239】

別の実施形態においては、 T_m 曲線を円二色性 (CD) 分光計を用いて取得する。IgGの二次構造の、温度および／または、例えばpHの関数としての変化を、CD分光計により研究することができる (Fasman, 1996, Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules. Plenum Press, New York)。この技法の利点は分光シグナルが周囲溶液の存在の影響を受けないこと、およびよく規定された手順を利用して様々な構造要素の参照スペクトルに基づいて二次構造を解明できることにある (de Jongh ら, 1994, Biochemistry. 33: 14521-14528)。二次構造要素の画分はCDスペクトルから得ることができる。一実施形態においては、CDスペクトルをJASCO分光旋光計、モデルJ-715 (JASCO International Co., Tokyo, Japan) により測定する。0.1cm光路長の石英キュベットを用いる。温度制御はJASCO PTC-348WI (JASCO International) 熱電対を用いて行う。温度走査は、選択した加熱速度にてPeltier熱電対を用いて0.2℃の分解能および16秒の時定数で記録する。遠紫外領域 (0.2nm分解能) における波長走査を、好適な走査速度で複数の走査を蓄積して取得する。

【0240】

熱 T_m 曲線はまた、分光法により測定することもできる。溶液中のタンパク質が加熱によって変性する場合、分子は凝集してその溶液は光をより強く散乱する。凝集によってサンプルの光透明度に変化が起こるので、規定した波長の可視光または紫外光の吸収の変化をモニタリングすることにより測定できる。さらなる別の実施形態においては、蛍光分光法を用いて T_m 曲線を得る。一実施形態においては、内因性タンパク質、例えば、内因性トリプトファン蛍光をモニタリングする。別の実施形態においては、蛍光プローブ分子をモニタリングする。蛍光分光実験を実施する方法は当業者に周知である。例えば、Bashford, C. L. ら, Spectrophotometry and Spectrofluorometry: A Practical Approach, pp. 91-114, IRL Press Ltd. (1987); Bell, J. E., Spectroscopy in Biochemistry, Vol. I, pp. 155-194, CRC Press (1981); Brand, L. ら, Ann. Rev. Biochem. 41: 843 (1972) を参照されたい。

【0241】

タンパク質の等電点 (pI) はポリペプチド担体が無電荷となるpHとして定義される。当技術分野では、溶液のpHがタンパク質の等電点 (pI) と等しいときに、タンパク質溶解度が最低であることは公知である。従って、所与のpH、例えば、pH 6に対するタンパク質の溶解度をそのpIに基づいて評価することが可能である。タンパク質のpIはまた、液製剤におけるタンパク質の粘度の良い指標でもある。高pIは (高濃度タンパク質製剤にとって特に重要な) 高溶解度および低粘度を示す。タンパク質のpIはまた、タンパク質の生体分布および非特異的毒性にもある役割を果たす。例えば、当技術分野では、組換え毒素のpIを低下させると非特異的毒性の低下と腎蓄積をもたらすことが公知である。あるいは、抗体のpIの増加は、抗体の細胞内および／または血管外局在を増加することが公知である。当業者は、特定の抗体に最も所望されるpI依存性の特性が何であるかを容易に決定できる。本発明者らが実証したように、本明細書に開示した方法は、ドナー抗体と比較して、改変されたpIをもつ改変された抗体を作製することができる。従って、本発明はドナー抗体と比較して、改変されたpIを有する改変された抗体を提供する。さらに、ある特定の実施形態においては、発現されたコンビナトリアルライブラリーを、 V_H および／または V_L ドメインを発現するファージについてスクリーニングし、前記 V_H および／または V_L ドメインはドナー抗体の同じドメインと比較して改変されたpIを有する。さらなる別の実施形態において、本発明のヒト化抗体はドナー抗体と比較して改変されたpIを有しうる。

【0242】

一実施形態において、改変された（例えば、ヒト化）抗体またはそれらのフラグメントは、ドナー抗体と比較して約0.1～約3.0だけ、または約0.1～約2.0だけ、または約0.1～約1.0だけ、または約0.1および0.5だけ増加したpIを有する。別の実施形態においては、改変された（例えば、ヒト化）抗体またはそれらのフラグメントは、ドナー抗体と比較して少なくとも約0.1だけ、少なくとも約0.2だけ、または、少なくとも0.3だけ、または、少なくとも0.4だけ、または、少なくとも0.5だけ、または、少なくとも0.6だけ、または、少なくとも0.7だけ、または、少なくとも0.8だけ、または、少なくとも0.9だけ、または、少なくとも1だけ、または、少なくとも1.2だけ、または、少なくとも1.4だけ、または、少なくとも1.6だけ、または、少なくとも1.8だけ、または少なくとも約2だけ、または、少なくとも2.2だけ、または、少なくとも2.4だけ、または、少なくとも2.6だけ、または、少なくとも2.8だけ、または少なくとも約3だけ、またはそれ以上増加したpIを有する。

10

【0243】

一実施形態において、改変された（例えば、ヒト化）抗体またはそれらのフラグメントは、ドナー抗体と比較して約0.1～約3.0だけ、または約0.1～約2.0だけ、または約0.1～約1.0だけ、または約0.1および0.5だけ低下したpIを有する。別の実施形態においては、改変された抗体（例えば、ヒト化）またはそれらのフラグメントは、ドナー抗体と比較して少なくとも約0.1だけ、少なくとも約0.2だけ、または、少なくとも0.3だけ、または、少なくとも0.4だけ、または、少なくとも0.5だけ、または、少なくとも0.6だけ、または、少なくとも0.7だけ、または、少なくとも0.8だけ、または、少なくとも0.9だけ、または、少なくとも1だけ、または、少なくとも1.2だけ、または、少なくとも1.4だけ、または、少なくとも1.6だけ、または、少なくとも1.8だけ、または少なくとも約2だけ、または、少なくとも2.2だけ、または、少なくとも2.4だけ、または、少なくとも2.6だけ、または、少なくとも2.8だけ、または少なくとも約3だけ、またはそれ以上低下したpIを有する。

20

【0244】

タンパク質のpIは、様々な方法により決定することができ、それらとしては、限定されるものでないが、等電点電気泳動および様々なコンピューターアルゴリズム（例えば、Bjellqvistら、1993、Electrophoresis 14:1023を参照）および下記実施例3で詳しく説明する方法が挙げられる。一実施形態において、pIは、multi temp 3 冷却浴再循環ユニットおよびEPS 3501 XL電力供給装置を備えたPharmacia Biotech Multiphor 2 電気泳動システムを用いて測定される。プレキャストしたアンフォリングル（Amersham Biosciences、pI範囲2.5～10）に5μgのタンパク質を供給する。広範囲pIマーカー標準（Amersham、pI範囲3～10、8μL）を用いてMabの相対的pIを決定する。電気泳動は1500 V、50 mAにて105分間行う。ゲルは、純水により1xに希釈したSigma固定溶液（5x）を用いて固定する。染色は一晩室温にてSimply Blue色素（Invitrogen）を用いて行う。脱染は25%エタノール、8%酢酸および67%純水からなる溶液を用いて行う。等電点はBio-Rad濃度計を用いて標準の校正曲線と比較して決定する。

30

【0245】

抗体の商業利用に関する厳しい制限はその大量生産にある。治療または商業上の可能性をもつ多数の抗体は高レベルで生産されず、従って内因的生産限界によって開発することができない。本発明者らが実証したように、本発明に開示した方法は、ドナー抗体と比較して改善された産生レベルをもつ改変された抗体を作製することができる。従って、本発明はドナー抗体と比較して改善された産生レベルをもつ改変された抗体を提供する。さらに、ある特定の実施形態においては、発現されたコンビナトリアルライブラリーを、ドナー抗体と比較して改善された産生レベルを有する V_H および／または V_L ドメインを発現するファージについてスクリーニングする。場合により、またはあるいは、本発明の方法により作製された改変された（例えば、ヒト化）抗体またはそれらのフラグメントを、ドナー抗体と比較して改善された産生レベルを有するものについてスクリーニングすることができる。さらなる別の実施形態において、本発明のヒト化抗体はドナー抗体と比較して改善

40

50

された産生レベルを有しうる。さらに別の実施形態においては、本発明の改善された産生レベルを有するヒト化抗体を（Kabatが記載した番号システムを利用して）位置40H、60H、および61Hのアミノ酸残基をアラニン、アラニンおよびアスパラギン酸により置換することにより、それぞれ米国特許公開第2006/0019342号に開示されているように、さらに改善することができる。

【0246】

特定の実施形態において、改変された抗体またはそれらのフラグメントの産生レベルは、同じ発現系を両方の抗体に対して使用した場合、ドナー抗体の発現と比較して、少なくとも1%、または少なくとも5%、または少なくとも10%、または少なくとも20%、または少なくとも30%、または少なくとも40%、または少なくとも50%、または少なくとも60%、または少なくとも70%、または少なくとも80%、または少なくとも90%、または少なくとも100%、または少なくとも150%、または少なくとも200%、または少なくとも500%だけ増加する。さらに別の実施形態においては、改変された抗体またはそれらのフラグメントの産生レベルは、同じ発現系を両方の抗体に対して使用した場合、ドナー抗体の発現と比較して、少なくとも2~10倍だけ、または少なくとも5~50倍だけ、または少なくとも25~250倍だけ、または少なくとも100~500倍だけ、または少なくとも250~1000倍だけ増加する。なお別の実施形態においては、改変された抗体またはそれらのフラグメントの産生レベルは、同じ発現系を両方の抗体に対して使用した場合、ドナー抗体またはそれらのフラグメントの発現と比較して、少なくとも2倍だけ、または少なくとも3倍だけ、または少なくとも5倍だけ、または少なくとも10倍だけ、または少なくとも20倍だけ、または少なくとも50倍だけ、または少なくとも100倍だけ、または少なくとも200倍だけ、または少なくとも500倍だけ、または少なくとも1000倍だけ増加する。

【0247】

5.7 再設計または再構成された抗体の作製および特徴付け

所望の結合活性を有するヒト化抗体およびそのフラグメントをコードする1つ以上の核酸を選択したら、当業界で公知の標準的な技法によりその核酸を回収することができる。一実施形態においては、選択したファージ粒子を回収してそれを新たな細菌に感染させ、その後目的の核酸を回収する。

【0248】

所望の特異性または親和性を有するヒト化可変領域を含むタンパク質を提示するファージは、当業界で公知のいずれの方法によってもアフィニティマトリックスから溶出させることができる。一実施形態では、マトリックスに対してより良好な親和性を有するリガンドが用いられる。特定の実施形態では、対応する非ヒト化抗体が用いられる。別の実施形態では、抗原-抗体複合体に対して特異的ではない溶出方法が用いられる。

【0249】

温和な溶出方法は、ファージ抗体集団とビオチン化抗原との結合およびストレプトアビジン磁性ビーズとの結合を利用するものである。洗浄して未結合ファージを除去した後、ファージ抗体を溶出させ、これを用いて細胞に感染させ、選択したファージ抗体集団を得る。ビオチンと抗原分子との間のジスルフィド結合が、ジチオトレイトールによる温和な溶出を可能にする。一実施形態では、ビオチン化抗原は過剰に用いることができるが、抗原-抗体結合についての所望の解離定数と同じ濃度またはそれより低い濃度で用いてもよい。この方法は、高親和性抗体の選択に有利である（R. E. Hawkins, S. J. RussellおよびG. Winter J. Mol. Biol. 226 889-896, 1992）。また、抗体は、Hawkinsら, 1992, (前掲)に記載されるように、抗原選択のために、より遅いoff速度を選択してもよい。ビオチン化抗原の濃度を徐々に低下させて、より高い親和性のファージ抗体を選択することができる。別法として、J. K. Scott & G. P. Smith (Science 249 386-390, 1990)によって記載されるビオチン化抗体に対するペプチドファージの競合と同様の方法で、ファージ抗体を結合について競合させるために、ファージ抗体をビオチン化抗原よりも過剰にすることができる。

【0250】

別の実施形態では、高特異性プロテアーゼによる切断の認識部位を構成するアミノ酸をコードするヌクレオチド配列を、挿入した外来タンパク質（例えば抗体フラグメントをコードする核酸）と遺伝子IIIの残部の配列との間に導入することができる。そのような高特異性プロテアーゼの非限定的な例は、X因子およびトロンピンである。ファージをアフィニティマトリックスに結合させ、非特異的に結合しているファージおよび弱く結合しているファージを溶出して除去した後、前記切断部位での消化に適する条件下でカラムをプロテアーゼで洗浄することにより、強く結合しているファージを分離する。これにより、抗体フラグメントがファージ粒子から切断されて、ファージが溶出される。これらのファージは感染性であると予想される。何故ならば、プロテアーゼ部位だけが特異的に導入されたものであるはずだからである。次いで、強く結合するファージを、例えば大腸菌TG1細胞に感染させることによって回収できる。

10

【0251】

前記の方法の別法は、強く結合したpAbを保持しているアフィニティマトリックスを取り、例えばSDS溶液中で煮沸することによって、DNAを抽出することである。次に、抽出されたDNAを用いて、大腸菌宿主細胞を直接形質転換させるか、あるいは抗体コード配列を、例えば適切なプライマーを用いたPCRを用いて増幅し、次いでさらなる研究を行うための可溶性抗体として発現させるため、またはさらなる選択ラウンドを行うためのpAbとして、ベクターに挿入することができる。

【0252】

別の実施形態では、ファージの集団を、少量の抗原を含むアフィニティマトリックスに結合させる。高親和性タンパク質を提示するファージと低親和性タンパク質を提示するファージとの間で、マトリックス上の抗原への結合に関して競合が起こる。高親和性タンパク質を提示するファージが主に結合し、低親和性タンパク質は洗い流される。次に、その高親和性タンパク質を、リガンドによる溶出またはファージをアフィニティマトリックスから溶出させる他の手順（国際公開W092/01047に、この手順が示されている）により回収する。

20

【0253】

ドナーCDRおよびヒト化フレームワークをコードする、回収された核酸は、それ自体として使用することも可能であるし、あるいは、それらを各ヒト鑄型の定常領域に結合させることによって完全な抗体分子の核酸を構築するのに使用することも可能である。抗体をコードする核酸が適切な宿主細胞系に導入されると、トランスフェクトされた細胞は、モノクローナル抗体の望ましい特性を全て有する抗体を分泌することができる。

30

【0254】

本発明の抗体分子、または抗体の重鎖もしくは軽鎖、またはそれらのフラグメント（例えば、重鎖もしくは軽鎖可変領域を含むもの）をコードする核酸が得られたら、この抗体分子を作製するためのベクターは、組換えDNA法により、当業界で周知の技法を用いて作製することができる。したがって、抗体をコードする核酸を発現させることによりタンパク質を調製する方法が本明細書に記載される。当業者に周知の方法を用いて、抗体コード配列ならびに適切な転写および翻訳シグナルを含む発現ベクターを構築することができる。これらの方法としては、例えば、*in vitro*組換えDNA法、合成法、および*in vivo*遺伝子組換えが挙げられる。したがって、本発明は、プロモーターに機能しうる形で連結された、本発明の抗体分子、抗体の重鎖もしくは軽鎖、抗体の重鎖もしくは軽鎖可変ドメイン、またはそのフラグメント、または重鎖もしくは軽鎖CDRをコードするヌクレオチド配列を含む複製可能なベクターを提供する。特定の実施形態において、本発明の抗体分子、抗体の重鎖もしくは軽鎖、抗体の重鎖もしくは軽鎖可変ドメイン、そのフラグメント、または重鎖もしくは軽鎖CDRの発現は、構成性プロモーターにより調節される。別の実施形態では、本発明の抗体分子、抗体の重鎖もしくは軽鎖、抗体の重鎖もしくは軽鎖可変ドメイン、そのフラグメント、または重鎖もしくは軽鎖CDRの発現は、誘導性プロモーターにより調節される。別の実施形態では、本発明の抗体分子、抗体の重鎖もしくは軽鎖、抗体の重鎖もしくは軽鎖可変ドメイン、そのフラグメント、または重鎖もしくは軽鎖CDRの発現は

40

50

、組織特異的プロモーターにより調節される。そのようなベクターはまた、抗体分子の定常領域をコードするヌクレオチド配列を含んでいてもよく（例えば、国際公開WO 86/05807；国際公開WO 89/01036；および米国特許第5,122,464号を参照）、抗体の可変ドメインを、重鎖全体、軽鎖全体または重鎖と軽鎖の両方を発現させるために、そのようなベクターにクローニングできる。

【0255】

この発現ベクターを慣用の技法により宿主細胞に導入し、次にトランスフェクトされた細胞を慣用の技法により培養して、本発明の抗体を産生させる。当業者は、抗体の軽鎖または重鎖をコードする核酸配列を含む別々のベクターを宿主中に同時にまたは逐次導入できることを理解する。あるいは、抗体の軽鎖と重鎖の両方をコードする核酸配列を含む単一ベクターを宿主細胞中に導入してもよい。したがって、本発明は、異種プロモーターに機能する形で連結された、本発明の抗体もしくはそのフラグメント、またはその重鎖もしくは軽鎖、それらの部分、または本発明の一本鎖抗体をコードするポリヌクレオチドを含む宿主細胞を包含する。二本鎖抗体を発現させるための特定の実施形態において、後に詳細に述べるように、免疫グロブリン分子全体を発現させるために、重鎖および軽鎖の双方をコードするベクターを宿主細胞内で共発現させることができる。

【0256】

一実施形態において、改変抗体を産生させるために形質転換される細胞系は、リンパ系起源の不死化哺乳動物細胞系であり、例えば、限定されるものではないが、ミエローマ、ハイブリドーマ、トリオーマまたはクアドローマ（quadroma）細胞系が挙げられる。また、この細胞系は、エプスタイン・バーウイルスなどのウイルスで形質転換することにより不死化されている正常なリンパ細胞（例えばB細胞）を含むことも可能である。特定の実施形態において、この不死化細胞系は、ミエローマ細胞系またはその誘導物である。

【0257】

ミエローマ細胞系などの不死化リンパ細胞系の中には、正常な状態で、単離型の免疫グロブリン軽鎖または重鎖を分泌するものがあることが知られている。そうした細胞系がファージライブラリーから回収された核酸で形質転換される場合、その回収されたフラグメントを定常領域に再構成させることは必要でない。但し、これは、正常に分泌される鎖がファージライブラリーから回収された核酸によりコードされる免疫グロブリン鎖の可変ドメインに相補的である場合である。

【0258】

本発明の抗体の産生に用いられる細胞系は、ある特定の実施形態において哺乳動物細胞系であるが、いずれの他の適切な細胞系も代わりに使用することが可能である。これらとしては、限定するものではないが、抗体コード配列を含有する組換えバクテリオファージDNA、プラスミドDNAまたはコスミドDNA発現ベクターで形質転換させた細菌（例えば、大腸菌および枯草菌）などの微生物；抗体コード配列を含有する組換え酵母発現ベクターで形質転換させた酵母（例えば、サッカロミセス・ピチア（*Saccharomyces Pichia*）；抗体コード配列を含有する組換えウイルス発現ベクター（例えば、バキュロウイルス）に感染させた昆虫細胞系；抗体コード配列を含有する組換えウイルス発現ベクター（例えば、カリフラワーモザイクウイルス、CaMV；タバコモザイクウイルス、TMV）に感染させた、または抗体コード配列を含有する組換えプラスミド発現ベクター（例えば、Tiプラスミド）で形質転換させた植物細胞系；または哺乳動物細胞のゲノム由来のプロモーター（例えば、メタロチオネインプロモーター）もしくは哺乳動物ウイルス由来のプロモーター（例えば、アデノウイルス後期プロモーター；ワクシニアウイルス7.5Kプロモーター）を含有する組換え発現構築物を保持する哺乳動物細胞系（例えば、COS、CHO、BHK、293、NSOおよび3T3細胞）が挙げられる。いくつかの実施形態において、大腸菌などの細菌細胞が組換え抗体分枝の発現のために使用される。別の実施形態において、真核細胞（特に、組換え抗体分子全体を発現させるためのもの）が、組換え抗体分子の発現のために使用される。例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）などの哺乳動物細胞を、ヒト・サイトメガロウイルス由来の主中間初期遺伝子プロモーターエレメント（major intermediate e

10

20

30

40

50

arly gene promoter element) などのベクターと組み合わせたものが、有効な抗体の発現系である (Foeckingら, 1986, Gene 45:101; およびCockettら, 1990, Bio/Technology 8:2)。

【0259】

細菌系では、発現させようとする抗体分子の使用目的に応じて、いくつかの発現ベクターが有利に選択できる。例えば、抗体分子の医薬組成物の調製のために、そのようなタンパク質を大量に産生させようとする場合は、容易に精製される融合タンパク質産物の高レベルな発現を指令するベクターが望ましい。そのようなベクターとしては、限定するものではないが、大腸菌発現ベクターpUR278 (Rutherら, 1983, EMBO 12:1791) (抗体コード配列が個々に、lacZコード領域とインフレームでベクターにライゲートされて、融合タンパク質が産生できるようになっているもの); pINベクター (Inouye & Inouye, 1985, Nucleic Acids Res. 13:3101-3109; Van Heeke & Schuster, 1989, J. Biol. Chem. 24:5503-5509) などが挙げられる。また、pGEXベクターも、外来ポリペプチドをグルタチオン5-トランスフェラーゼ (GST) との融合タンパク質として発現させるのに使用できる。一般に、そのような融合タンパク質は可溶性であり、マトリックスのグルタチオンアガロースビーズへの吸着および結合と、続いて行う遊離グルタチオンの存在下での溶出によって、溶解細胞から容易に精製できる。pGEXベクターは、トロンビンまたはXa因子プロテアーゼ切断部位を含むことにより、クローニングした標的がGST成分から放出されるように設計されている。

10

【0260】

昆虫系では、オートグラファ・カリフォルニカ (*Autographa californica*) 核多角体ウイルス (AcNPV) が、外来遺伝子を発現させるためのベクターとして使用される。このウイルスは、ヨトウガ (スポドプテラ・フルギペルダ (*Spodoptera frugiperda*)) 細胞内で増殖する。抗体コード配列は、ウイルスの非必須領域 (例えば、ポリヘドリン遺伝子) に個々にクローニングでき、AcNPVプロモーター (例えばポリヘドリンプロモーター) の制御下におかれる。

20

【0261】

哺乳動物宿主細胞では、いくつかのウイルス系の発現系が使用できる。アデノウイルスが発現ベクターとして用いられる場合、目的の抗体コード配列は、アデノウイルス転写/翻訳制御複合体 (例えば、後期プロモーターと3部構成 (tripartite) リーダー配列) にライゲートすることができる。次に、このキメラ遺伝子を、in vitroまたはin vivo組換えによってアデノウイルスゲノムに挿入すればよい。ウイルスゲノムの非必須領域 (例えば、領域EIまたはE3) への挿入により、生存可能で、しかも感染した宿主内で抗体分子を発現できる組換えウイルスが得られる (例えば、Logan & Shenk, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:355-359を参照)。また、挿入した抗体コード配列の効率的な翻訳のために、特定の開始シグナルが必要な場合もある。これらのシグナルとしては、ATG開始コドンおよび隣接配列が含まれる。さらに、この開始コドンは、挿入物全体の翻訳を確実にするために、所望のコード配列のリーディングフレームと読み枠が合っていなければならない。これらの外因性の翻訳制御シグナルおよび開始コドンは、さまざまな起源のものとすることができ、天然のものであっても合成されたものであってもよい。発現の効率は、適切な転写エンハンサーエレメント、転写ターミネーターなどを含めることによって増強できる (例えば、Bittnerら, 1987, Methods in Enzymol. 153:516-544を参照)。

30

40

【0262】

さらに、宿主細胞株としては、挿入配列の発現を調節するもの、または所望の特定の様式で核酸を修飾しプロセッシングするものを選択することができる。そのようなタンパク質産物の修飾 (例えば、グリコシル化) およびプロセッシング (例えば、切断) は、そのタンパク質の機能にとって重要でありうる。さまざまな宿主細胞が、タンパク質および遺伝子産物の翻訳後プロセッシングおよび修飾のための特徴的で特異的な機構を有している。発現される外来タンパク質の正確な修飾およびプロセッシングが確実になるように、適切な細胞系または宿主系を選択する。この目的のためには、適切な一次転写産物のプロセッシング、

50

遺伝子産物のグリコシル化およびリン酸化のための細胞機構を有する真核宿主細胞が使用可能である。そのような哺乳動物宿主細胞としては、限定するものではないが、CHO、VER Y、BHK、Hela、COS、MDCK、293、3T3、W138、BT483、Hs578T、HTB2、BT20およびT47D、NS 0（免疫グロブリン鎖を内因的に産生しないマウス・ミエローマ細胞系）、CRL7030およびHsS78Bst細胞が挙げられる。

【0263】

組換えタンパク質を長期にわたって高収率で産生させるためには、安定な発現が好ましい。例えば、抗体分子を安定に発現する細胞系を遺伝子工学的に作製することができる。ウイルス性の複製起点を含む発現ベクターを用いずに、宿主細胞を、適切な発現制御エレメント（例えば、プロモーター、エンハンサー配列、転写ターミネーター、ポリアダニル化部位など）によって制御されたDNAおよび選択マーカーで形質転換することができる。外来DNAを導入した後、遺伝子操作した細胞を富化培地中で1～2日間増殖させ、次いで選択培地に切り替える。組換えプラスミド内の選択マーカーは、選択に対する耐性を付与し、細胞がプラスミドをその染色体内に安定に組み込み、増殖してフォーカス（これは次にクローニングされて細胞系へと拡大できる）を形成できるようにする。この方法は、抗体分子を発現する細胞系の操作に有利に用いることができる。そのような操作した細胞系は、抗体分子と直接的または間接的に相互作用する組成物のスクリーニングおよび評価において特に有用となり得る。

【0264】

いくつかの選択系が使用でき、例えば、限定するものではないが、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ（Wiglerら, 1977, Cell 11:223）、ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（Szybalska & Szybalski, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:202）、およびアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（Lowyら, 1980, Cell 22:8-17）遺伝子が、それぞれtk-細胞、hgp^rt-細胞またはap^rt-細胞において使用できる。また、代謝拮抗物質耐性を次の遺伝子の選択基準として用いることが可能である：dhfr（メトトレキセートに対する耐性を付与する）（Wiglerら, 1980, Natl. Acad. Sci. USA 77:357；O'Hareら, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527）；gpt（ミコフェノール酸に対する耐性を付与する）（Mulligan & Berg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072）；neo（アミノグリコシドG-418に対する耐性を付与する）（WuおよびWu, 1991, Biotherapy 3:87-95；Tolstoshev, 1993, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596；Mulligan, 1993, Science 260:926-932；ならびにMorganおよびAnderson, 1993, Ann. Rev. Biochem. 62: 191-217；May, 1993, TIB TECH 11(5):155-215）；ならびにhygro（ハイグロマイシンに対する耐性を付与する）（Santerreら, 1984, Gene 30:147）。組換えDNA法の技術分野において一般に知られている方法を、目的とする組換えクロンの選択にルーチンに適用することができ、そのような方法は、例えば、Ausubelら（編）、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993)；Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990)；およびChapters 12 and 13, Dracopoliら（編）、Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY (1994)；Colberre-Garapinら, 1981, J. Mol. Biol. 150:1に記載されている。

【0265】

抗体分子の発現レベルは、ベクター増幅によって増大させることができる（概説としては、BebbingtonおよびHentschel, The use of vector based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Vol.3. (Academic Press, New York, 1987)を参照されたい）。抗体を発現するベクター内のマーカーが増幅可能である場合、宿主細胞培養物中に存在するインヒビターのレベルの増加により、そのマーカー遺伝子のコピー数が増加する。増幅した領域は抗体遺伝子と結合しているので、その抗体の産生もまた増加する（Crouseら, 1983, Mol. Cell. Biol. 3:257）。

【0266】

宿主細胞は、本発明の2つの発現ベクター（第1のベクターは重鎖由来のポリペプチド

10

20

30

40

50

をコードし、第2のベクターは軽鎖由来のポリペプチドをコードする)で共トランスフェクトすることができる。これら2つのベクターは、重鎖ポリペプチドと軽鎖ポリペプチドとを等しく発現させることができる同一の選択マーカーを含むことができる。あるいはまた、重鎖ポリペプチドおよび軽鎖ポリペプチドの双方をコードし、それらを発現することができる単一のベクターを使用することも可能である。そのような場合、有害な遊離重鎖が過剰になることを防止するために、軽鎖を重鎖の前に配置しなければならない(Proudfoot, 1986, Nature 322:52; およびKohler, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2 197)。重鎖および軽鎖のコード配列は、cDNAでもゲノムDNAでもよい。

【0267】

また、本発明の抗体は、トランスジェニック動物(例えば、トランスジェニックマウス)に導入することもできる。例えば、Bruggemann, Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz). 49(3):203-8 (2001); BruggemannおよびNeuberger, Immunol. Today 8:391-7 (1996)を参照されたい。トランスジーン構築物または転座は、例えばプラスミドの組み立て、酵母人工染色体内でのクローニング、および染色体断片の使用によって得ることができる。トランスジェニック動物系統内での転座の組み込みおよび維持は、卵母細胞への前核DNAの注入および胚性幹細胞を使用する種々のトランスフェクション法により達成できる。

【0268】

例えば、ヒト化重鎖および/または軽鎖あるいはヒト化重鎖および/または軽鎖可変領域をコードする核酸は、マウス胚性幹細胞ヘランダムに導入してもよいし、相同組換えによって導入してもよい。マウス重鎖および軽鎖免疫グロブリン遺伝子は、相同組換えによりヒト化抗体をコードする核酸を導入することによって、別々にまたは同時に、非機能性にするることができる。特に、JH領域がホモ接合的に欠失すると、内因的な抗体産生が妨害される。改変した胚性幹細胞を増やして、胚盤胞にマイクロインジェクションして、キメラマウスを作製する。次に、このキメラマウスを交配させて、ヒト化抗体を発現するホモ接合型の子孫を作製する。

【0269】

本発明の抗体分子を組換え発現により産生させたら、それを、免疫グロブリン分子を精製するための当業界で公知のいずれかの方法、例えばクロマトグラフィー(例えばイオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー(特にプロテインAの後での特異的抗原に対する親和性により)、およびサイズカラムクロマトグラフィー)、遠心分離、差異的溶解度により、あるいはタンパク質を精製するための他の標準的な方法により精製することができる。さらに、本発明の抗体またはそのフラグメントは、精製しやすくするために、本明細書中で記載される、または当業界で公知の異種ポリペプチド配列に融合させることができる。

【0270】

5.8 抗体コンジュゲート

本発明は、1つ以上の成分(限定するものではないが、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、融合タンパク質、核酸分子、小分子、ミメティック物質、合成薬物、無機分子および有機分子を含む)にコンジュゲートまたは融合させた抗体またはそのフラグメントを包含する。

【0271】

本発明は、融合タンパク質を生成するように、異種タンパク質またはポリペプチド(またはその断片、好ましくは少なくとも10個、少なくとも20個、少なくとも30個、少なくとも40個、少なくとも50個、少なくとも60個、少なくとも70個、少なくとも80個、少なくとも90個または少なくとも100個のアミノ酸からなるポリペプチド)に組換えによって融合された、または化学的にコンジュゲートされた(共有結合および非共有結合によるコンジュゲーションを含む)抗体またはそのフラグメントを包含する。融合は、必ずしも直接的である必要はなく、リンカー配列を介して起こるものであってもよい。例えば、抗体は、その抗体を、特定の細胞表面受容体に特異的な抗体と融合またはコンジュゲートさせることにより、in vitroまたはin vivoで、異種ポリペプチドを特定の細胞型にターゲティン

グさせるのに使用することができる。異種ポリペプチドに融合またはコンジュゲートさせた抗体はまた、*in vitro*でのイムノアッセイおよび当業界で公知の方法を用いる精製方法において使用することもできる。例えば、国際公開WO 93/21232；欧州特許EP439,095；Naramuraら, 1994, Immunol. Lett. 39:91-99；米国特許第5,474,981号；Gilliesら, 1992, PNAS 89:1428-1432；およびFellら, 1991, J. Immunol. 146:2446-2452を参照されたい。

【0272】

本発明はさらに、抗体フラグメントに融合またはコンジュゲートさせた異種タンパク質、ペプチドまたはポリペプチドを含む組成物を包含する。例えば、異種ポリペプチドは、Fabフラグメント、Fdフラグメント、Fvフラグメント、F(ab)₂フラグメント、VHドメイン、VLドメイン、VH CDR、VL CDR、またはそれらのフラグメントに融合またはコンジュゲートさせることができる。ポリペプチドを抗体部分へ融合またはコンジュゲートさせるための方法は、当業界では周知である。例えば、米国特許第5,336,603号、第5,622,929号、第5,359,046号、第5,349,053号、第5,447,851号および第5,112,946号；欧州特許EP 307,434およびEP 367,166；国際公開WO 96/04388およびWO 91/06570；Ashkenaziら, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 10535-10539；Zhengら, 1995, J. Immunol. 154:5590-5600；およびVilら, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:11337- 11341を参照されたい。

【0273】

遺伝子シャフリング、モチーフシャフリング、エキソンシャフリング、および／またはコドンシャフリングの技法（まとめて「DNAシャフリング」と呼ばれる）により、さらなる融合タンパク質を作製することが可能である。DNAシャッフリングを用いて、本発明の抗体またはそのフラグメントの活性を変化させることができる（例えば、より高い親和性とより低い解離速度を有する抗体またはそのフラグメント）。概略的には、米国特許第5,605,793号；第5,811,238号；第5,830,721号；第5,834,252号；および第5,837,458号、ならびにPattenら, 1997, Curr. Opin. Biotechnol. 8:724-33；Harayama, 1998, Trends Biotechnol. 16(2):76-82；Hansson, ら, 1999, J. Mol. Biol. 287:265-76；およびLorenzoおよびBlasco, 1998, Biotechniques 24(2):308-313を参照されたい。抗体もしくはそのフラグメント、またはコードされた抗体もしくはそのフラグメントは、組換えを行う前に、誤りがちの（error-prone）PCR、ランダムヌクレオチド挿入または他の方法によるランダム変異誘発に供することにより変化させることができる。抗体または抗体フラグメントをコードするポリヌクレオチドの1以上の部分を、1種以上の異種分子の1以上の成分、モチーフ、区域、部分、ドメイン、断片などで組み換えることができる。

【0274】

さらに、抗体またはそのフラグメントは、精製しやすくするために、例えばペプチドなどのマーカー配列と融合させることも可能である。特定の実施形態では、そのマーカーアミノ酸配列は、ヘキサヒスチジンペプチド、例えばpQEベクター（QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311）内に与えられるタグであり、ほかにもあるが、それらの多くは市販されている。Gentzら, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824に記載されるように、ヘキサヒスチジンは融合タンパク質の簡便な精製を可能にする。精製に有用な他のペプチドタグとしては、限定するものではないが、ヘマグルチニン「HA」タグ（インフルエンザ・ヘマグルチニンタンパク質由来のエピトープに対応するもの）（Wilsonら, 1984, Cell, 37:767）および「flag」タグが挙げられる。

【0275】

他の実施形態において、本発明の抗体またはそのフラグメント、類似体もしくは誘導体は、診断剤または検出可能な物質とコンジュゲートさせることができる。そのような抗体は、特定の治療薬の有効性の判定などの臨床試験法の一部として、疾患の発生または進行をモニタリングまたは予測するのに有用であり得る。そのような診断および検出は、抗体を検出可能な物質とカップリングさせることにより達成できる。検出可能な物質としては、限定するものではないが、以下のものが挙げられる：ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、β-ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼなどの種々の酵素；ストレプトアビジンおよびアビジン／ビオチンなどの補欠分子団；

ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロライドもしくはフィコエリトリンなどの蛍光物質；ルミノールなどの発光物質；ルシフェラーゼ、ルシフェリンおよびエクオリンなどの生物発光物質；ヨウ素 (^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{123}I 、 ^{121}I)、炭素 (^{14}C)、イオウ (^{35}S)、三重水素 (^3H)、インジウム (^{115}In 、 ^{113}In 、 ^{112}In 、 ^{111}In) およびテクネチウム (^{99}Tc)、タリウム (^{201}Ti)、ガリウム (^{68}Ga 、 ^{67}Ga)、パラジウム (^{103}Pd)、モリブデン (^{99}Mo)、キセノン (^{133}Xe)、フッ素 (^{18}F)、 ^{153}Sm 、 ^{177}Lu 、 ^{159}Gd 、 ^{149}Pm 、 ^{140}La 、 ^{175}Yb 、 ^{166}Ho 、 ^{90}Y 、 ^{47}Sc 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{142}Pr 、 ^{105}Rh 、 ^{97}Ru 、 ^{68}Ge 、 ^{57}Co 、 ^{65}Zn 、 ^{85}Sr 、 ^{32}P 、 ^{153}Gd 、 ^{169}Yb 、 ^{51}Cr 、 ^{54}Mn 、 ^{75}Se 、 ^{113}Sn 、および ^{117}Te などの放射性物質；さまざまな陽電子放射断層法を用いる陽電子放射金属、非放射性常磁性金属イオン、ならびに放射性標識されたもしくは特定の放射性同位元素にコンジュゲートされた分子。

10

【0276】

本発明はさらに、治療成分にコンジュゲートさせた抗体またはそのフラグメントを包含する。抗体またはそのフラグメントは、細胞毒素（例えば細胞増殖抑制剤もしくは細胞破壊剤）、治療剤または放射性金属イオン（例えば α 線放射体）などの治療成分にコンジュゲートさせることができる。細胞毒素または細胞傷害剤としては、細胞にとって有害であるあらゆる物質が含まれる。治療成分としては、限定するものではないが、以下のものが挙げられる：代謝拮抗物質（例えば、メトトレキセート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、5-フルオロウラシル、デカルバジン）、アルキル化剤（例えば、メクロレタミン、チオエパクロラムブシル (thioepa chlorambucil)、メルファラン、カルムスチン (BCNU) およびルムスチン (CCNU)、シクロトスファミド (cyclophosphamide)、ブスルファン、ジブロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンC、ならびにシスジクロロジアミン白金(II) (DDP) シスプラチン)、アントラサイクリン（例えば、ダウノルビシン（従来名はダウノマイシン）およびドキシソルビシン）、抗生物質（例えば、ダクチノマイシン（従来名はアクチノマイシン）、ブレオマイシン、ミトラマイシンおよびアントラマイシン (AMC)）、オーリスタチン分子（例えば、オーリスタチンPHE、プリオスタチン1、およびソラストアチン (solastatin) 10; Woykeら, Antimicrob. Agents Chemother. 46:3802-8 (2002)、Woykeら, Antimicrob. Agents Chemother. 45:3580-4 (2001)、Mohammadら, Anticancer Drugs 12:735-40 (2001)、Wallら, Biochem. Biophys. Res. Commun. 266:76-80 (1999)、Mohammadら, Int. J. Oncol. 15:367-72 (1999)、ホルモン（例えば、グルココルチコイド、プロゲステロン、アンドロゲンおよびエストロゲン）、DNA修復酵素阻害剤（例えば、エトポシドまたはトポテカン）、キナーゼ阻害剤（例えば、化合物ST1571、メシル酸イマチニブ (Kantarjianら, Clin Cancer Res. 8(7):2167-76 (2002))）、細胞傷害剤（例えば、パクリタキセル、サイトカラシンB、グラミシジンD、エチジウムブロミド、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン、ドキシソルビシン、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラシンジオン (dihydroxy anthracin dione)、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロールおよびピューロマイシン、ならびにそれらの類似体または同族体）、ならびに、米国特許第6,245,759号、第6,399,633号、第6,383,790号、第6,335,156号、第6,271,242号、第6,242,196号、第6,218,410号、第6,218,372号、第6,057,300号、第6,034,053号、第5,985,877号、第5,958,769号、第5,925,376号、第5,922,844号、第5,911,995号、第5,872,223号、第5,863,904号、第5,840,745号、第5,728,868号、第5,648,239号、第5,587,459号に開示される化合物；ファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤（例えば、R115777、BMS-214662、および、例えば米国特許第6,458,935号、第6,451,812号、第6,440,974号、第6,436,960号、第6,432,959号、第6,420,387号、第6,414,145号、第6,410,541号、第6,410,539号、第6,403,581号、第6,399,615号、第6,387,905号、第6,372,747号、第6,369,034号、第6,362,188号、第6,342,765号、第6,342,487号、第6,300,501号、第6,268,363号、第6,265,422号、第6,248,756号、第6,239,140号、第6,232,338号、

20

30

40

50

第6,228,865号、第6,228,856号、第6,225,322号、第6,218,406号、第6,211,193号、第6,187,786号、第6,169,096号、第6,159,984号、第6,143,766号、第6,133,303号、第6,127,366号、第6,124,465号、第6,124,295号、第6,103,723号、第6,093,737号、第6,090,948号、第6,080,870号、第6,077,853号、第6,071,935号、第6,066,738号、第6,063,930号、第6,054,466号、第6,051,582号、第6,051,574号および第6,040,305号に開示されるもの）、トポイソメラーゼ阻害剤（例えば、カンプトテシン；イリノテカン；SN-38；トポテカン；9-アミノカンプトテシン；GG-211（GI 147211）；DX-8951f；IST-622；ルビテカン；ピラゾロアクリジン；XR-5000；サイントピン（saintopin）；UCE6；UCE1022；TAN-1518A；TAN-1518B；KT6006；KT6528；ED-110；NB-506；ED-110；NB-506；およびレベッカマイシン）；ブルガレイン（bulgarein）；Hoescht色素33342およびHoechst色素33258などのDNA副溝結合物質；ニチジン（nitidine）；ファガロニン（fagaronine）；エピベルベリン；コラリン（coralyne）； β -ラパコン；BC-4-1；ビホスホネート（例えば、アレンドロネート、シマドロネート、クロドロネート、チルドロネート、エチドロネート、イバンドロネート、ネリドロネート、オルパンドロネート（olpandronate）、リセドロネート、ピリドロネート（piridronate）、パミドロネート、ゾレンドロネート）、HMG-CoAレダクターゼ阻害剤（例えば、ロバスタチン、シムバスタチン、アトロバスタチン、プラバスタチン、フルバスタチン、スタチン、セリバスタチン、レスコール、リピトール（lupitor）、ロスバスタチンおよびアトロバスタチン）、ならびにそれらの薬学的に許容される塩、溶媒和物、包接体およびプロドラッグ（例えば、Rothenberg, M.L., Annals of Oncology 8:837-855(1997)；およびMoreau, P.,ら, J. Med. Chem. 41:1631-1640(1998)を参照された））、アンチセンスオリゴヌクレオチド（例えば、米国特許第6,277,832号、第5,998,596号、第5,885,834号、第5,734,033号および第5,618,709号に開示されるもの）、免疫調節物質（例えば、抗体およびサイトカイン）、抗体、ならびにアデノシンデアミナーゼ阻害剤（例えば、リン酸フルダラビンおよび2-クロロデオキシアデノシン）。

【0277】

さらに、抗体またはそのフラグメントは、所与の生物学的応答を改変させる治療成分または薬物成分とコンジュゲートさせることができる。治療成分および薬物成分は、古典的な化学治療剤に限定されると解釈されるべきでない。例えば、薬物成分は、所望の生物学的活性を有するタンパク質またはポリペプチドとすることができる。そのようなタンパク質としては、例えば、次のものが挙げられる：アブリン、リシンA、シュードモナス（*pseudomonas*）外毒素、コレラ毒素もしくはジフテリア毒素などの毒素；腫瘍壊死因子、 α -インターフェロン、 β -インターフェロン、神経成長因子、血小板由来成長因子、組織プラスミノゲン活性化因子などのタンパク質；アポトーシス誘発剤（apoptotic agent）、例えば、TNF- α 、TNF- β 、AIM I（国際公開WO 97/33899を参照）、AIM II（国際公開WO 97/34911を参照）、Fasリガンド（Takahashiら, 1994, J. Immunol., 6:1567-1574）およびVEGI（国際公開WO 99/23105を参照）；血栓症剤（thrombotic agent）もしくは抗血管新生剤（antiangiogenic agent）、例えば、アンジオスタチン、エンドスタチンもしくは凝集経路の成分（例えば、組織因子）；または生物学的応答調節物質、例えばリンホカイン（例えば、インターロイキン-1（「IL-1」）、インターロイキン-2（「IL-2」）、インターロイキン-6（「IL-6」）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（「GM-CSF」）および顆粒球コロニー刺激因子（「G-CSF」）、成長因子（例えば、成長ホルモン（「GH」））；または凝集剤、例えば、カルシウム、ビタミンK、組織因子（例えば、ハーゲマン（Hageman）因子（XII因子）、高分子キニノゲン（HMWK）、プレカリクレイン（PK）、凝集タンパク質-II因子（プロトロンビン）、V因子、XIIa因子、VIII因子、XIIIa因子、XI因子、XIa因子、IX因子、IXa因子、X因子、リン脂質、フィブリノーゲンの α 鎖および β 鎖由来のフィブリノペプチドAおよびB、フィブリンモノマー）。

【0278】

さらに、抗体は、 α 線放射体（例えば ^{213}Bi ）などの放射性金属イオンのような治療成分に、または放射性金属イオン（限定するものではないが、 ^{131}In 、 ^{131}Lu 、 ^{131}Y 、 ^{131}Ho 、 ^{131}Sm など）をポリペプチドとコンジュゲートさせるのに有用な大環状キレート剤にコンジ

10

20

30

40

50

ュゲートさせることができる。ある特定の実施形態では、その大環状キレート剤は、1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-N,N',N'',N'''-四酢酸 (DOTA) であり、これはリンカー分子を介して抗体に結合させることができる。そのようなリンカー分子は当業界で一般に知られており、Denardoら, 1998, Clin Cancer Res. 4(10):2483-90; Petersonら, 1999, Bioconjug. Chem. 10(4):553-7; およびZimmermanら, 1999, Nucl. Med. Biol. 26(8):943-50に記載されている。

【0279】

治療成分を抗体にコンジュゲートさせるための技法は周知であり、例えば、Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeldら (編), p.p.243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985)のArnonら, 「癌治療におけるモノクローナル抗体または薬物の免疫ターゲティング (Monoclonal Antibodies or Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy)」; Controlled Drug Delivery (第2版), Robinsonら (編), p.p.623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987)のHellstromら, 「薬物送達用の抗体 (Antibodies For Drug Delivery)」; Monoclonal Antibodies 84: Biological And Clinical Applications, Pincheraら (編), p. p.475-506 (1985)のThorpe, 「癌治療における細胞傷害薬の抗体担体: 総括 (Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review)」; Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwinら (編), p.p.303-16 (Academic Press 1985)の「癌治療における、放射標識抗体の治療利用の分析、結果、および将来予測 (Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy)」; およびThorpeら, 1982, Immunol. Rev. 62:119-58に記載されている。

【0280】

あるいはまた、Segalにより米国特許第4,676,980号に記載されるように、抗体を二次抗体にコンジュゲートさせて、抗体ヘテロコンジュゲートを形成させてもよい。

【0281】

抗体またはそのフラグメントにコンジュゲートされる治療成分または薬物は、被験者の特定の疾患に対して所望の予防効果または治療効果を達成するように選択すべきである。医師または他の医療従事者は、抗体またはそのフラグメントにコンジュゲートさせようとする治療成分または薬物を決定する際に、次のことを考慮すべきである: 疾患の性質、疾患の重症度、および被験者の状態。

【0282】

また、抗体は、固相支持体に結合させることも可能であり、これはイムノアッセイまたは標的抗原の精製に特に有用である。そのような固相支持体としては、限定するものではないが、ガラス、セルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、またはポリプロピレンが挙げられる。

【0283】

5.9 本発明の抗体の用途

本発明は、目的の抗体を効率的にヒト化するための方法を提供する。本発明のヒト化抗体は、疾患またはその1つ以上の症状を治療、管理、予防または改善するために、単独で、または他の予防剤もしくは治療剤と組み合わせて使用することができる。

【0284】

本発明は、疾患の予防、管理、治療または改善方法であって、それを必要とする被験者に、1種以上の本発明の抗体を単独で、または本発明の抗体以外の1種以上の他の治療薬 (例えば1種以上の予防剤もしくは治療剤) と組み合わせて投与することを含む前記方法を提供する。また、本発明は、1種以上の本発明の抗体と、本発明の抗体以外の1種以上の予防剤もしくは治療剤とを含む組成物、ならびに前記組成物を用いて疾患またはその1つ以上の症状を予防、管理、治療または改善する方法も提供する。治療剤または予防剤としては、限定するものではないが、小分子、合成薬物、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、核酸 (例えばDNAおよびRNAヌクレオチド、限定するものではないが、アンチセンスヌクレオチド配列、三本鎖らせん構造体、RNAi、および生物学的に活性なタンパク質、ポ

リペプチドもしくはペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む)、抗体、合成もしくは天然の無機分子、ミメティック剤、および合成もしくは天然の有機分子が挙げられる。

【0285】

疾患またはその1つ以上の症状の予防、管理、治療または改善に有用であることが知られている、またはこれまで使用されてきたか現在使用されている治療剤であれば、いずれも、本発明にしたがって、本発明の抗体と組み合わせて使用することができる。疾患またはその1つ以上の症状の予防、管理、治療または改善にこれまで使用されてきたか現在使用されている治療薬（または予防剤または治療剤）に関する情報については、例えば、Gilmanら、Goodman and Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics, 第10版, McGraw-Hill, New York, 2001; The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, Berkow, M.D.ら (編), 第17版, Merck Sharp & Dohme Research Laboratories, Rahway, NJ, 1999; Cecil Textbook of Medicine, 第20版, Bennett and Plum (編), W.B. Saunders, Philadelphia, 1996を参照されたい。そのような薬剤の例としては、限定するものではないが、以下のものが挙げられる: 免疫調節剤、抗炎症剤 (例えば、アドレノコルチコイド、コルチコステロイド (例えば、ベクロメタゾン、ブデソニド、フルニソリド、フルチカゾン、トリアムシノロン、メチルプレドニソロン、プレドニソロン、プレドニソン、ヒドロコルチゾン)、グルココルチコイド、ステロイド、非ステロイド系抗炎症薬 (例えば、アスピリン、イブプロフェン、ジクロフェナク、およびCOX-2阻害剤)、疼痛緩和剤、ロイコトリエンアンタゴニスト (例えば、モンテルカスト、メチルキサンチン、ザフィルルカストおよびジロイトン)、 β 2-アゴニスト (例えば、アルブテロール、ビテロール、フェノテロール、イソエタリン、メタプロテレノール、ピルブテロール、サルブタモール、テルブタリンホルメテロール、サルメテロール、およびサルブタモールテルブタリン)、抗コリン作動薬 (例えば、臭化イプラトリピウムおよび臭化オキシトロピウム)、スルファサラジン、ペニシラミン、ダプソン、抗ヒスタミン剤、抗マラリア剤 (例えば、ヒドロキシクロロキン)、抗ウイルス剤、ならびに抗生物質 (例えば、ダクチノマイシン (従来名はアクチノマイシン)、ブレオマイシン、エリスロマイシン、ペニシリン、ミトラマイシン、およびアントラマイシン (AMC))。

【0286】

本発明のヒト化抗体は、特定の抗原に対して直接使用することができる。いくつかの実施形態において、本発明の抗体は、その抗体が結合する細胞の溶解を媒介することができるサブクラスまたはアイソタイプに属する。特定の実施形態において、本発明の抗体は、細胞表面タンパク質と複合化すると、血清補体を活性化するおよび/またはナチュラルキラー細胞またはマクロファージなどのエフェクター細胞を活性化することにより、抗体依存性細胞傷害性 (ADCC) を媒介するサブクラスまたはアイソタイプに属する。

【0287】

抗体の生物学的活性は、その抗体分子の定常ドメインまたはFc領域によって、かなりの程度、決定されることが知られている (UananeuおよびBenacerraf, Textbook of Immunology, 第2版, Williams & Wilkins, p. 218 (1984))。これには、白血球によりもたらされる補体活性化能力および抗体依存性細胞傷害性 (ADCC) を媒介する能力が含まれる。異なるクラスおよびサブクラスの抗体はこの点に関して異なり、同じサブクラス由来であるが異なる生物種由来の抗体もそうであるが; 本発明によれば、所望の生物学的活性を有するクラスの抗体が調製される。これらの抗体の調製には、公知の技法による抗体定常ドメインの選択およびそれらのヒト化抗体での取込みが含まれる。例えば、IgG3クラスおよびIgG2aクラスのマウス免疫グロブリンは、コグネイト抗原を発現する標的細胞に結合すると、血清補体を活性化することができ、したがって、IgG3およびIgG2aエフェクター機能を取り込んだヒト化抗体は、特定の治療用途に望ましい。

【0288】

一般に、IgG_{2a}およびIgG₃サブクラス、ならびに場合によってはIgG₁サブクラスのマウス抗体はADCCを媒介することができ、またIgG₃、IgG_{2a}、およびIgMサブクラスの抗体は血清補体に結合してそれを活性化する。通常、補体の活性化には、少なくとも2つのIgG分

子が標的細胞上で近接して結合する必要がある。しかし、IgM分子はたった1つの分子の結合で血清補体を活性化する。

【0289】

補体活性化および／またはADCCにより標的細胞の溶解を媒介するいずれかの特定の抗体の能力は、アッセイすることができる。目的の細胞を増殖させ、*in vitro*で標識する。抗体を、抗原-抗体複合体により活性化し得る血清補体または免疫細胞のいずれかと組み合わせ、細胞培養物に添加する。標的細胞の細胞溶解は、溶解した細胞からの標識の放出により検出される。実際、補体および／または免疫細胞の供給源として患者自身の血清を使用して、抗体をスクリーニングすることができる。その後、*in vitro*試験において補体を活性化するかまたはADCCを媒介することができる抗体を、その特定の患者において治療

10

【0290】

ある特定の用途ではIgM抗体を使用することが好ましい、しかし、IgG分子はより小さいので、ある特定のタイプの感染細胞にとってIgM分子より局在化させやすいかもしれない。

【0291】

いくつかの実施形態では、本発明の抗体は、患者を受動免疫するのに有用である。

【0292】

また、本発明の抗体は、被験者内または生物学的サンプル（例えば、細胞または組織）中での抗原の発現を検出／同定するための*in vivo*または*in vitro*診断アッセイにおいて使用することも可能である。抗体、そのフラグメント、または抗体もしくはそのフラグメントを含む組成物の、診断アッセイにおける非限定的な使用例は、米国特許第6,392,020号；第6,156,498号；第6,136,526号；第6,048,528号；第6,015,555号；第5,833,988号；第5,811,310号；第8,565,214号；第5,604,126号；第5,484,704号；第5,346,687号；第5,318,892号；第5,273,743号；第5,182,107号；第5,122,447号；第5,080,883号；第5,057,313号；第4,910,133号；第4,816,402号；第4,742,000号；第4,724,213号；第4,724,212号；第4,624,846号；第4,623,627号；第4,618,486号；第4,176,174号（それらは全て、参照により本明細書に組み入れられる）に記載されている。抗原およびその抗体についての好適な診断アッセイは、使用する特定の抗体に依存する。非限定的な例は、ELISA、サンドイッチアッセイ、および立体構造阻害（steric inhibition）アッセイである。本発明の抗体を用いる*in vivo*診断アッセイでは、その抗体を、X線、コンピューター連動断層撮影（CT）、超音波、または磁気共鳴イメージング（MRI）などのイメージング法により検出することができる標識にコンジュゲートさせる。また、本発明の抗体は、抗原を組換え細胞培養物または天然の供給源からアフィニティ精製するのに使用することも可能である。

20

30

【0293】

5.10 投与および製剤

本発明は、疾患の診断、検出、またはモニタリングにおいて、疾患もしくはその1つ以上の症状の予防、治療、管理、または改善において、および／または研究において使用するための本発明の抗体を含む組成物を提供する。特定の実施形態では、組成物は本発明の抗体を1種以上含んでなる。別の実施形態では、組成物は1種以上の本発明の抗体および本発明の抗体以外の1種以上の予防薬または治療薬を含んでなる。好ましくは、予防薬または治療薬は、疾患もしくはその1つ以上の症状の予防、治療、管理または改善において有用であることが知られているか、それらに用いられてきたかあるいは現在用いられているものである。これらの実施形態によれば、該組成物は担体、希釈剤または賦形剤をさらに含んでもよい。

40

【0294】

本発明の組成物としては、限定するものではないが、医薬組成物の製造に有用なバルク薬物組成物（例えば不純なまたは未滅菌の組成物）、および単位剤形の調製に用いることができる医薬組成物（すなわち、被験者または患者への投与に好適な組成物）が挙げられ

50

る。このような組成物は、予防もしくは治療に有効な量の、本明細書中に開示した予防薬および／または治療薬あるいはそれらの薬剤の組合せ、ならびに製薬上許容される担体を含んでなる。特定の実施形態において、本発明の組成物は医薬組成物であり、有効量の1種以上の本発明の抗体、製薬上許容される担体、および場合によっては、有効量の別の予防薬もしくは治療薬を含んでなる。

【0295】

医薬組成物は経口投与剤形または非経口投与剤形として、即時放出または持続放出のために製剤化することができる。該組成物は医薬製剤に通常用いられる不活性な成分、例えば希釈剤、充填剤、崩壊剤、甘味料、滑沢剤および香料などを含むことができる。ある特定の実施形態において、医薬組成物は静脈内投与（ボラス注射もしくは持続滴下のいずれかによる）のために、または移植したカプセルからの放出のために製剤化される。静脈内投与用の典型的な製剤には希釈剤として生理食塩水を用いる。

10

【0296】

本発明の抗体のFabまたはFab'部分もまた、治療用有効成分として用いることができる。これら抗体フラグメントの調製は当技術分野で周知である。

【0297】

本発明の組成物はまた、抗体を治療薬として投与しうるための臨床上の指示、投与量および投与スケジュール、ならびに／または患者への本発明の抗体の投与に対する禁忌を記載した印刷物を含むことができる。

【0298】

本発明の組成物としては、限定するものではないが、医薬組成物の製造に有用なバルク薬物組成物（例えば不純なまたは未滅菌の組成物）、および単位剤形の調製に用いることができる医薬組成物（すなわち、被験者または患者への投与に好適な組成物）が挙げられる。このような組成物は、予防もしくは治療に有効な量の、本明細書中に開示した予防薬および／または治療薬あるいはそれらの薬剤の組合せ、ならびに製薬上許容される担体を含んでなる。ある特定の実施形態において、本発明の組成物は医薬組成物であり、有効量の1種以上の本発明の抗体、製薬上許容される担体、および場合によっては、有効量の別の予防薬もしくは治療薬を含んでなる。

20

【0299】

特定の実施形態では、「製薬上許容される」との用語は、連邦政府もしくは州政府の監督官庁に承認された、または米国薬局方もしくは動物（特にヒト）での使用のための他の広く認識された薬局方に挙げられていることを意味する。「担体」との用語は、希釈剤、アジュバント（例えばフロイント・アジュバント（完全または不完全））、賦形剤またはビヒクル（それと共に治療薬を含有するかまたは投与する）を指す。そのような医薬用担体は、無菌液体（例えば水または油（例えば石油、動物、植物もしくは合成由来の、例えばピーナッツ油、大豆油、鉱物油、ゴマ油など））であってよい。医薬組成物を静脈内に投与するならば、水が好ましい担体である。生理食塩水ならびにデキストロースおよびグリセロール水溶液もまた、特に注射用溶液のために、液体担体として用いることができる。好適な製薬用賦形剤としては、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、コメ、小麦粉、チョーク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、タルク、塩化ナトリウム、乾燥スキムミルク、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノールなどが挙げられる。該組成物は、所望であれば、少量の湿潤剤もしくは乳化剤、またはpH緩衝剤を含むこともできる。これらの組成物は、溶液剤、懸濁液剤、乳濁液剤、錠剤、丸剤、カプセル剤、粉末剤、持続放出製剤などの剤形を採ることができる。

30

40

【0300】

一実施形態において、本発明の組成物は、実質的に内毒素および／または関係発熱物質を含まない、発熱物質非含有製剤である。内毒素には、微生物内に拘束されてその微生物が破壊されるかまたは死滅したときにだけ放出される毒素が含まれる。発熱物質にはまた、細菌およびその他の微生物の外膜由来の発熱性、熱安定物質（糖タンパク質）も含まれ

50

る。これらの物質は両方とも、ヒトに投与されると、発熱、低血圧およびショックを引き起こしうる。有害な影響を与える可能性があるので、たとえ少量の内毒素であっても、静脈内に投与される医薬溶液から除去しなければならない。米国食品医薬局（The Food & Drug Administration（FDA））は、体重1kg当たり1回1時間の静脈医薬施用において1投与当たり5内毒素ユニット（EU）の上限を設定している（The United States Pharmacopeial Convention、Pharmacopeial Forum 26（1）：223（2000））。抗体またはFc融合タンパク質の場合のように、治療タンパク質を体重1kg当たり数百または数千ミリグラムの量で投与する場合、痕跡量の有害および危険な内毒素であっても除去しなければならない。ある特定の実施形態において、組成物中の内毒素および発熱物質レベルは、10 EU/mg未満、または5 EU/mg未満、または1 EU/mg未満、または0.1 EU/mg未満、または0.01 EU/mg未満、または0.001 EU/mg未満である。

10

【0301】

in vivo投与に用いる場合、本発明の組成物は無菌でなければならない。本発明の組成物は、滅菌濾過、照射などを含む様々な滅菌法により無菌化することができる。一実施形態において、Fc可変タンパク質製剤は前滅菌した0.22ミクロンフィルターを用いて滅菌濾過される。注入用の無菌組成物は、“Remington： The Science & Practice of Pharmacy”，21st ed., Lippincott Williams & Wilkins,（2005）に記載される通常の製薬手順に従って製剤することができる。本明細書に開示されたような、本発明の抗体を含む製剤は、通常、凍結乾燥された剤形または溶液で貯蔵されうる。本発明の抗体を含む無菌組成物は、無菌のアクセスポートを有する容器（例えば、皮下組織注射針により貫通しうるストッパーなどの製剤の回収を可能にするアダプターを有する静脈バッグもしくはバイアル）内に置かれると考えている。

20

【0302】

一般的には、本発明の組成物の成分は、別々かまたは単位剤形に同時に混合して、例えば凍結乾燥粉末もしくは水を含まない濃縮物として密閉容器（例えば活性薬剤の量を表示したアンプルもしくは小袋）に入れて供給する。組成物が点滴による投与のためのものである場合には、無菌医薬グレードの水または生理食塩水を含有する点滴瓶を用いて提示することができる。組成物を注射により投与する場合には、注射用の滅菌水または生理食塩水のアンプルを提示することができ、それにより投与前に成分を混合してもよい。

【0303】

本発明の組成物は、中性の、または塩の形態で製剤化することができる。製薬上許容される塩としては、例えば塩酸、リン酸、酢酸、シュウ酸、酒石酸などから誘導されるもののようなアニオンを用いて形成したもの、および例えばナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、水酸化第二鉄、イソプロピルアミン、トリエチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインなどのカチオンを用いて形成したものが挙げられる。

30

【0304】

種々の送達システムが公知であり、本発明の1以上の抗体、または本発明の1以上の抗体と、疾患もしくはその1以上の症状を予防、管理、治療または改善するのに有用な予防薬もしくは治療薬との組合せを投与するために用いることができる（例えば、リポソーム、微小粒子、マイクロカプセルへのカプセル化、抗体もしくは抗体フラグメントを発現可能な組換え細胞、受容体介在エンドサイトーシス（例えばWuおよびWu, J. Biol. Chem. 262:4429-4432（1987）を参照）、レトロウイルスその他のベクターの一部としての核酸の構築など）。本発明の予防薬または治療薬を投与する方法としては、限定するものではないが、非経口投与（例えば皮内、筋内、腹腔内、静脈内および皮下）、硬膜外投与、腫瘍内投与、および粘膜投与（例えば鼻腔内および口腔内経路）が挙げられる。さらに、例えば吸入器もしくは噴霧器を用い、エアロゾル化剤と共に製剤化することにより、肺内投与を用いることができる。例えば、米国特許第6,019,968号、第5,985,320号、第5,985,309号、第5,934,272号、第5,874,064号、第5,855,913号、第5,290,540号、および第4,880,078号；ならびに、PCT 公開公報WO 92/19244、WO 97/32572、WO 97/44013、WO 98/31346、

40

50

およびWO 99/66903を参照のこと。一実施形態では、本発明の抗体、組合せ治療剤、または本発明の組成物を、Alkermes AIRTM 肺内薬剤送達技術 (Alkermes, Inc., Cambridge, MA) を用いて投与する。特定の実施形態では、本発明の予防薬または治療薬を、筋内に、静脈内に、腫瘍内に、経口的に、鼻腔内に、肺内に、または皮下に投与する。予防薬または治療薬は、いずれの都合のよい経路によって投与してもよく、例えば点滴もしくはボーラス注射によって、上皮もしくは皮膚粘膜 (例えば口腔粘膜、直腸および腸粘膜など) を介した吸収により投与してもよく、また他の生物学的活性薬剤と共に投与してもよい。投与は全身のでも局所的でもよい。

【0305】

特定の実施形態では、本発明の予防薬または治療薬を、治療を必要とする部位に局所的に投与することが望ましく、これは例えば、限定するものではないが、局所注入 (注射によって、またはインプラントによって (該インプラントは、メンブレンおよびマトリックス (例えばシラスティックメンブレン、ポリマー、繊維性マトリックス (例えばTissuel (登録商標)) またはコラーゲンマトリックス) をはじめとする多孔性もしくは非多孔性材料によりなる)) によって達成することができる。一実施形態では、本発明アンタゴニストの1以上の抗体の有効量を、疾患もしくはその症状を予防、治療、管理および/または改善するために被験者に対して罹患部位に局所的に投与する。別の実施形態では、本発明の1以上の抗体の有効量を、疾患またはその1以上の症状を予防、治療、管理、および/または改善するために、被験者に対して、本発明の抗体とは別の1以上の治療剤 (例えば1以上の予防薬または治療薬) の有効量と組み合わせて罹患部位に局所的に投与する。

【0306】

別の実施形態では、予防薬または治療薬を、制御放出もしくは持続放出システムで送達することができる。一実施形態では、制御放出または持続放出を実現するためにポンプを用いてもよい (Langer, 上掲; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:20; Buchwald ら, 1980, Surgery 88:507; Saudek ら, 1989, N. Engl. J. Med. 321:574 参照)。別の実施形態では、本発明の治療剤の制御放出または持続放出を実現するためにポリマー材料を用いることができる (例えば、Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (編), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (編), Wiley, New York (1984); Ranger および Peppas, 1983, J., Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61; Levy ら, 1985, Science 228:190; During ら, 1989, Ann. Neurol. 25:351; Howard ら, 1989, J. Neurosurg. 71:105; 米国特許第5,679,377号; 第5,916,597号; 第5,912,015号; 第5,989,463号; 第5,128,326号; PCT 公開公報WO 99/15154; およびWO 99/0253を参照されたい)。持続放出製剤に用いるポリマーの例としては、限定するものではないが、ポリ (2-ヒドロキシエチルメタクリレート)、ポリ (メチルメタクリレート)、ポリ (アクリル酸)、ポリ (エチレンコビニルアセテート)、ポリ (メタクリル酸)、ポリグリコリド (PLG)、ポリ酸無水物、ポリ (N-ビニルピロリドン)、ポリ (ビニルアルコール)、ポリアクリルアミド、ポリ (エチレングリコール)、ポリラクチド (PLA)、ポリ (ラクチドコグリコリド) (PLGA)、およびポリオルトエステルが挙げられる。特定の実施形態では、持続放出製剤に用いるポリマーは、不活性で、濾過の必要な不純物を含まず、保存において安定であり、無菌で、かつ生分解性である。また別の実施形態では、制御放出または持続放出システムを予防または治療の標的の近傍に配置し、したがって全身容量の一部しか必要としないようにすることができる (例えば、Goodson, Medical Applications of Controlled Release, 上掲, vol. 2, pp. 115-138 (1984) 参照)。

【0307】

制御放出システムはLanger (1990, Science 249:1527-1533) による総説中で考察されている。当業者に公知のいずれの技術をも、本発明の1以上の治療薬を含んでなる持続放出製剤の製造に用いることができる。例えば、米国特許第4,526,938号、PCT公開公報WO 91/05548、WO 96/20698、Ning ら, 1996, 「持続放出ゲルを用いる、ヒト大腸癌の腫瘍内放射免疫療法 (Intratumoral Radioimmunotherapy of a Human Colon Cancer Xenograft U

10

20

30

40

50

sing a Sustained Release Gel) 」, Radiotherapy & Oncology 39:179 189、Song ら, 1995, 「抗体が介在する長期循環エマルジョンの肺ターゲティング (Antibody Mediated Lung Targeting of Long Circulating Emulsions) 」, PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372 397、Cleek ら, 1997, 「心血管に応用するbFGF抗体のための生物分解性ポリマー (Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application) 」, Pro. Int 'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853 854、および Lam ら, 1997, 「局地送達のための、組換えヒト化モノクローナル抗体のマイクロカプセル化 (Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery) 」, Proc. Int 'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760 を参照されたい。

10

【0308】

特定の実施形態では、本発明の組成物が予防薬または治療薬をコードする核酸である場合、該核酸は、それを適当な核酸発現ベクターの一部として構築し、それが細胞内に入るように投与することにより（例えばレトロウイルスベクターを用いることにより（米国特許第4,980,286号参照）、または直接注入により、または微小粒子衝撃（例えば遺伝子銃；Biolistic、Dupont）もしくは脂質、細胞表面受容体もしくはトランスフェクション試薬によるコーティングを用いることにより、または核に侵入することが知られているホメオボックス様ペプチドと連結して投与することにより（例えばJoliot ら, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1864-1868参照））、それがコードする予防薬または治療薬の発現を促進するためにin vivo投与することができる。あるいはまた、核酸を細胞内に導入し、相同組換えによって発現のために宿主細胞DNA内に組み込むことができる。

20

【0309】

本発明の医薬組成物は、所望の投与経路に適合するように製剤化される。投与経路の例としては、限定するものではないが、非経口（例えば静脈内）、皮内、皮下、経口、鼻腔内（例えば吸入）、経皮（例えば局所）、経粘膜、および直腸投与が挙げられる。特定の実施形態では、該組成物をヒトに対する静脈内、皮下、筋内、経口、鼻腔内、または局所投与に適合する医薬組成物として通常の方法に従って製剤化する。典型的には、静脈内投与のための組成物は無菌等張水性緩衝液中の溶液である。必要であれば、該組成物は可溶化剤および局所麻酔薬（例えば注射の部位での痛みを和らげるためのリグノカイン）を含有してもよい。

30

【0310】

本発明の組成物が局所的に投与するためのものであるならば、該組成物は軟膏、クリーム、経皮パッチ、ローション、ジェル、シャンプー、スプレー、エアロゾル、溶液、懸濁液の剤形、または当業者に周知の他の剤形で製剤化することができる。例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences and Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, 第19版, Mack Pub. Co., Easton, PA (1995)を参照のこと。非スプレー式局所用投与剤形のためには、局所適用に適合する担体もしくは1以上の賦形剤を含んでなり、好ましくは水より高い動的粘度を有する、粘性から半固体または固体形状を典型的に用いる。好適な製剤としては、限定するものではないが、溶液剤、懸濁液剤、乳濁液剤、クリーム剤、軟膏剤 (ointment)、粉末剤、リニメント剤、軟膏 (salve) などが挙げられ、それらは所望であれば、滅菌するかまたは、例えば浸透圧のような種々の性質に影響する補助剤（例えば保存剤、安定化剤、湿潤剤、緩衝剤もしくは塩）と混合する。他の好適な局所用投与剤形としては、スプレー用エアロゾル製剤が挙げられ、その際有効成分（好ましくは固体または液体不活性担体と組み合わされている）は、加圧揮発性物質（例えばフレオンのような気体状噴射剤）と混合してつめるか、または搾り出し用容器中につめる。保湿剤または湿潤剤もまた、所望であれば医薬組成物および投与剤形に含めることができる。そのような付加的な成分の例は、当技術分野で周知である。

40

【0311】

本発明の方法が組成物の鼻腔内投与を含むものならば、組成物はエアロゾル剤形、スプレー、ミストまたは液滴の剤形で製剤化することができる。特に、本発明の使用のための

50

予防薬または治療薬は、好適な噴射剤（例えば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素または他の好適なガス）を使用して、加圧容器または噴霧器からのエアロゾルスプレーの剤形で、都合よく送達することができる。加圧エアロゾルの場合、単位投与量は計量送達用のバルブを与えることにより測定することができる。吸入器または散布器での使用のためのカプセルまたはカートリッジ（例えばゼラチンによりなる）は、化合物と、好適な粉末状基材（例えばラクトースまたはデンプン）との粉末混合物を含有して製剤化することができる。

【0312】

本発明の方法が経口投与を含むものならば、組成物を錠剤、カプセル剤、カシェ剤、ゲルカップ剤、溶液剤、懸濁液剤などの剤形で、経口用に製剤化することができる。錠剤またはカプセル剤は、以下のもののような製薬上許容される賦形剤と共に通常の方法により調製することができる：結合剤（例えば、アルファ化トウモロコシデンプン、ポリビニルピロリドン、またはヒドロキシプロピルメチルセルロース）；充填剤（例えばラクトース、微結晶性セルロース、またはリン酸水素カルシウム）；滑沢剤（例えば、ステアリン酸マグネシウム、タルク、またはシリカ）；崩壊剤（例えば、ジャガイモデンプンまたはデンプングリコール酸ナトリウム）；または湿潤剤（例えば、ラウリル硫酸ナトリウム）。錠剤は、当技術分野で周知の方法でコーティングすることができる。経口投与用の液体製剤は、限定するものではないが、溶液、シロップもしくは懸濁液の剤形をとることができる、またはそれらは使用前に水もしくは他の好適なビヒクルで調製するための乾燥製品として提示してもよい。そのような液体製剤は、以下のもののような製薬上許容される添加剤と共に、通常の方法を用いて調製することができる：懸濁化剤（例えば、ソルビトールシロップ、セルロース誘導体、または硬化食用脂）；乳化剤（例えば、レシチンまたはアラビアゴム）；非水性ビヒクル（例えば、アーモンド油、油エステル、エチルアルコール、または分留植物油）；および保存剤（例えば、p-ヒドロキシ安息香酸メチルもしくはプロピルまたはソルビン酸）。製剤はまた、緩衝塩、香料、着色料、および甘味料を適宜含有することができる。経口投与用の製剤は、好適には予防薬または治療薬の遅延放出、制御放出、または持続放出用に製剤化することができる。

【0313】

本発明の方法は、エアロゾル化剤と共に製剤化した組成物の、例えば吸入器または噴霧器を用いた肺内投与を含むことができる。例えば、米国特許第6,019,968号、第5,985,320号、第5,985,309号、第5,934,272号、第5,874,064号、第5,855,913号、第5,290,540号、および第4,880,078号；ならびにPCT公開公報WO 92/19244、WO 97/32572、WO 97/44013、WO 98/31346、およびWO 99/66903を参照のこと。具体的な実施形態では、本発明の抗体、組合せ治療剤、および／または本発明の組成物を、Alkermes AIRTM肺内薬剤送達技術（Alkermes, Inc., Cambridge, MA）を用いて投与する。

【0314】

本発明の方法は、注入による（例えばボーラス注射または連続注入による）非経口投与のために製剤化した組成物の投与を含んでもよい。注入のための製剤は、添加された保存料を含む単位剤形で（例えばアンプル中に、または複数用量容器中に）提示することができる。組成物は油性もしくは水性ビヒクル中の懸濁液、溶液またはエマルジョンのような剤形を採ることができ、また懸濁化剤、安定化剤および／または分散剤のような医薬用試薬を含有してもよい。あるいはまた、有効成分は使用前に好適なビヒクル（例えば、無菌で、発熱物質フリーの水）を用いて調製するための粉末形態であってもよい。

【0315】

本発明の方法はさらに、デポー製剤として製剤化した組成物の投与を含んでもよい。そのような長期作用製剤は、インプランテーション（例えば皮下、または筋内への）により、または筋内注射により投与してもよい。したがって、例えば、組成物を好適なポリマーもしくは疎水性材料（例えば、許容される油中のエマルジョンとして）またはイオン交換樹脂と共に、あるいは難溶性誘導体として（例えば難溶性塩として）製剤化してもよい。

10

20

30

40

50

【0316】

本発明の方法は、中性または塩の形態で製剤化した組成物の投与を包含する。製薬上許容される塩としては、例えば塩酸、リン酸、酢酸、シュウ酸、酒石酸などから誘導されるもののようなアニオンを用いて形成したもの、および例えばナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、水酸化第二鉄、イソプロピルアミン、トリエチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインなどのカチオンを用いて形成したものが挙げられる。

【0317】

一般的には、組成物の成分は、別々かまたは単位剤形に同時に混合して、例えば凍結乾燥粉末もしくは水を含まない濃縮物として、密閉容器（例えば活性薬剤の量を表示したアンプルもしくは小袋）中に供給する。投与の形式が点滴である場合には、無菌医薬グレードの水または生理食塩水を含有する点滴瓶を用いて組成物を提供することができる。投与の形式が注射である場合には、注射用の滅菌水または生理食塩水のアンプルを提供することができ、それにより投与前に成分を混合してもよい。

【0318】

特に、本発明はまた、薬剤の量を表示したアンプルまたは小袋のような密閉容器中に封入されている本発明の予防薬もしくは治療薬、または医薬組成物を提供する。一実施形態では、本発明の1以上の予防薬もしくは治療薬、または医薬組成物を、密閉容器中の無菌凍結乾燥粉末もしくは水を含まない濃縮物として供給し、そして被験者に投与のための適当な濃度にまで（例えば水または生理食塩水を用いて）再調製してもよい。ある特定の実施形態において、本発明の1以上の予防薬もしくは治療薬、または医薬組成物は、密閉容器中の無菌凍結乾燥粉末として、少なくとも5mg、少なくとも10mg、少なくとも15mg、少なくとも25mg、少なくとも35mg、少なくとも45mg、少なくとも50mg、少なくとも75mg、または少なくとも100mgの単位投与量で供給される。凍結乾燥した本発明の予防薬もしくは治療薬または医薬組成物は、そのもともとの容器中で、2℃～8℃の間で保存しなければならない。また本発明の予防薬もしくは治療薬または医薬組成物は、再調製後1週間以内、5日以内、72時間以内、48時間以内、24時間以内、12時間以内、6時間以内、5時間以内、3時間以内、または1時間以内に投与しなければならない。別の実施形態では、本発明の1以上の予防薬もしくは治療薬または医薬組成物は、薬剤の量および濃度を表示した密閉容器中に液状で供給される。ある特定の実施形態において、投与される液状の組成物は、密閉容器中に、少なくとも0.25mg/ml、少なくとも0.5mg/ml、少なくとも1mg/ml、少なくとも2.5mg/ml、少なくとも5mg/ml、少なくとも8mg/ml、少なくとも10mg/ml、少なくとも15mg/kg、少なくとも25mg/ml、少なくとも50mg/ml、少なくとも75mg/ml、または少なくとも100mg/mlで供給される。液状組成物はそのもともとの容器中で、2℃～8℃の間で保存しなければならない。

【0319】

一般的には、本発明の組成物の成分は、その組成物のレシピエントと同じ種に由来するか同じ種反応性である被験者から誘導したものである。したがって、特定の実施形態では、治療または予防のために、ヒト患者に対してはヒト抗体またはヒト化抗体を投与する。

【0320】

5.10.1 遺伝子治療

特定の実施形態では、本発明の抗体または本発明の別の予防薬もしくは治療薬をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を、遺伝子治療によって疾患もしくはその1以上の症状を治療、予防、管理、または改善するために投与する。遺伝子治療とは、発現されるかまたは発現されうる核酸の、被験者への投与により行われる治療を指す。本発明のこの実施形態では、核酸は、それがコードする本発明の抗体または予防薬もしくは治療薬（予防効果もしくは治療効果を媒介する）を産生する。

【0321】

当技術分野で利用可能な遺伝子治療のための方法のいずれをも、本発明に従って用いることができる。遺伝子治療の方法の一般的な総説としては、Goldspiel ら, 1993, Clinic

10

20

30

40

50

al Pharmacy 12:488-505 ; Wu および Wu, 1991, Biotherapy 3:87-95 ; Tolstoshev, 1993 , Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596 ; Mulligan, Science 260:926-932 (1993) ; ならびに Morgan および Anderson, 1993, Ann. Rev. Biochem. 62:191-217 ; May, 1993, TIBTECH 11(5):155-215 を参照されたい。用いることのできる組換えDNA技術の分野で公知の方法は、Ausubel ら (編), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993) ; および Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990) に記載されている。

【0322】

一実施形態では、本発明の方法は本発明の抗体または別の予防薬もしくは治療薬をコードする核酸配列を含んでなる組成物の投与を含み、前記核酸は本発明の抗体、別の予防薬もしくは治療薬、またはそのフラグメントもしくはキメラタンパク質または重鎖もしくは軽鎖を、好適な宿主内で発現する発現ベクターの一部である。特に、そのような核酸は、抗体コード領域と機能的に連結されたプロモーター（一般に異種起源プロモーター）を有し、該プロモーターは誘導的または構成的であり、また場合によっては組織特異的である。別の実施形態では、本発明の抗体または別の予防薬もしくは治療薬のコード配列および他の所望の配列は、ゲノム中の所望の部位での相同組換えを促進する領域に隣接しており、それにより抗体をコードする核酸の染色体発現が可能になる状態で、核酸分子を用いる (Koller および Smithies, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935 ; Zijlstra ら, 1989, Nature 342:435-438) 。特定の実施形態では、発現される抗体または他の予防薬もしくは治療薬は一本鎖抗体であり ; あるいは、核酸配列は本発明の抗体または別の予防薬もしくは治療薬の重鎖および軽鎖の両方、またはそれらのフラグメントをコードする配列を含む。

【0323】

被験者への核酸の送達は、直接的（この場合、被験者を核酸または核酸輸送ベクターに直接的に曝露させる）、または間接的（この場合、まずin vitroで核酸を用いて細胞を形質転換し、その後被験者に移植する）のいずれでもよい。これらの2つの手法は、それぞれin vivoまたはex vivo遺伝子治療として公知である。

【0324】

特定の実施形態では、核酸配列をin vivoで直接的に投与し、この場合にはそれが発現して、コードされた産物を産生する。これは、当技術分野で公知の多数の方法のいずれによっても実現することができ、例えばそれらを適当な核酸発現ベクターの一部として構築し、それを投与してそれらが細胞内に入るようにすることによって（例えば欠損または弱毒レトロウイルスもしくは他のウイルスベクターを用いた感染により（米国特許第4,980,286号参照）、または裸のDNAの直接注入により、または微小粒子衝撃（例えば遺伝子銃 ; Biolistic, Dupont）もしくは脂質、細胞表面受容体もしくはトランスフェクション試薬によるコーティング、リポソーム、微小粒子もしくはマイクロカプセルへのカプセル化を用いることにより、または核に侵入することが知られているペプチドと連結して投与することにより、受容体介在エンドサイトーシスに供されるリガンドと連結して投与することにより（例えば、WuおよびWu, 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432を参照）（この方法は受容体の特異的に発現する標的細胞型に対して用いることができる）行うことができる。別の実施形態では、核酸ーリガンド複合体を形成させ、該リガンドはエンドソームを崩壊する融合性 (fusogenic) ウイルスペプチドを含むものであり、それにより核酸がリソソーム性分解を回避できるようにすることができる。また別の実施形態では、特異的な受容体を標的化することにより、細胞特異的な取り込みおよび発現のために核酸をin vivoで標的化することができる（例えば、国際公開公報WO 92/06180 ; WO 92/22635 ; WO92/20316 ; WO93/14188 ; およびWO 93/20221を参照）。あるいはまた、核酸を細胞内に導入し、相同組換えによって、発現のために宿主細胞DNAに組み込むことができる (Koller および Smithies, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935 ; および Zijlstra ら, 1989, Nature 342:435-438) 。

【0325】

特定の実施形態では、本発明の抗体、別の予防薬もしくは治療薬、またはそれらのフラグメントをコードする核酸配列を含んでなるウイルスベクターを用いる。例えば、レトロウイルスベクターを用いることができる (Miller ら, 1993, Meth. Enzymol. 217:581-599 参照)。これらのレトロウイルスベクターは、ウイルスゲノムの適正なパッケージングおよび宿主細胞DNAへの組み込みのために必要なエレメントを含んでなる。遺伝子治療に用いるための本発明の抗体または別の予防薬もしくは治療薬をコードする核酸配列は、被験者への遺伝子の送達を容易にする1以上のベクター内にクローニングされる。レトロウイルスベクターについての詳細は、Boesen ら, 1994, Biotherapy 6:291-302 中に見出すことができ、これは、化学療法に対してより耐性な幹細胞を作製する目的で、造血幹細胞にmdr 1遺伝子を送達するためのレトロウイルスベクターの使用について記載している。10
遺伝子治療におけるレトロウイルスベクターの使用を例示している他の引用文献は、以下のものである: Clowes ら, 1994, J. Clin. Invest. 93:644-651; Klein ら, 1994, Blood 83:1467-1473; Salmons および Gunzberg, 1993, Human Gene Therapy 4:129-141; ならびに Grossman および Wilson, 1993, Curr. Opin. in Genetics and Devel. 3:110-114。

【0326】

アデノウイルスは、遺伝子治療に用いることができる他のウイルスベクターである。アデノウイルスは、呼吸器系上皮に対して遺伝子を送達するために特に関心が持たれる運搬体である。アデノウイルスは、自然界で呼吸器上皮に感染し、そこで軽い疾患を引き起こす。アデノウイルスに基づく送達システムの他の標的は、肝臓、中枢神経系、内皮細胞および筋肉である。アデノウイルスは、非分裂細胞に感染することができるという利点を有する。Kozarsky および Wilson, 1993, Current Opinion in Genetics and Development 3:499-503 には、アデノウイルスに基づく遺伝子治療についての総説が示されている。Bo 20
ut ら, 1994, Human Gene Therapy 5:3-10 では、アカゲザルの呼吸器上皮に対して遺伝子を導入するためのアデノウイルスベクターの使用を実証している。遺伝子治療におけるアデノウイルスの使用の他の例は、以下の文献中に見出すことができる: Rosenfeld ら, 1991, Science 252:431-434; Rosenfeld ら, 1992, Cell 68:143-155; Mastrangeli ら, 1993, J. Clin. Invest. 91:225-234; PCT 公開公報 W094/12649号; およびWang ら, 1995, Gene Therapy 2:775-783。特定の実施形態では、アデノウイルスベクターを用いる。

【0327】

アデノ随伴ウイルス (AAV) もまた、遺伝子治療での使用が提案されている (Walsh ら, 1993, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 204:289-300; および米国特許第5,436,146号)。

【0328】

遺伝子治療に対する別の手法は、エレクトロポレーション、リポフェクション、リン酸カルシウムを介したトランスフェクション、またはウイルス感染のような方法による組織培養物中の細胞への遺伝子の導入を含む。通常、導入の方法は、細胞への選択マーカーの導入を含む。細胞をその後、導入した遺伝子を取り込んでそれを発現している細胞を単離するために選別にかける。そしてそれらの細胞を被験者に送達する。

【0329】

本実施形態では、核酸を細胞に導入し、その後、得られる組換え細胞のin vivoでの投与を行う。前記導入は、当技術分野で公知のいかなる方法を用いても行うことができ、そのような方法としては、限定するものではないが、トランスフェクション、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、核酸配列を含んでなるウイルスベクターまたはバクテリオファージベクターの感染、細胞融合、染色体仲介遺伝子導入、マイクロセル仲介遺伝子導入、スフェロプラスト融合などが挙げられる。細胞に外来性遺伝子を導入するための多数の技術が当技術分野で公知であり (例えば、Loeffler および Behr, 1993, Meth. Enzymol. 217:599-618; Cohen ら, 1993, Meth. Enzymol. 217:618-644; Clin. Pharma. Ther. 29:69-92 (1985) 参照)、レシピエント細胞の不可欠な発達および生理的機能を阻害しなければ、本発明に従って用いることができる。該技術は、細胞への核酸の安定な導入を可能にし、それにより核酸が細胞により発現可能となり、かつ好ましくは遺伝し 40
50

てその細胞の子孫によっても発現可能とならなければならない。

【0330】

結果として得られる組換え細胞を、当技術分野で公知の種々の方法によって被験者に送達することができる。組換え血液細胞（例えば造血幹細胞または前駆細胞）は、静脈内に投与することができる。使用を予定する細胞の量は、限定するものではないが、所望の効果および患者の病状をはじめとするいくつかの要因に依存し、当業者が決定することができる。

【0331】

遺伝子治療の目的で核酸を導入しうる細胞は、いずれの利用可能な細胞をも包含し、そのような細胞としては、限定するものではないが、上皮細胞、内皮細胞、表皮ケラチン細胞、繊維芽細胞、筋細胞、肝細胞；血液細胞（例えばTリンパ球、Bリンパ球、単球、マクロファージ、好中球、好酸球、肥満細胞、巨核球、顆粒球）；種々の幹細胞または前駆細胞、特に造血幹細胞または前駆細胞（例えば骨髓、臍帯血、末梢血、胎児肝などから得られる）が挙げられる。特定の実施形態では、遺伝子治療に用いる細胞は被験者の自己由来のものである。

【0332】

遺伝子治療に組換え細胞を用いる実施形態では、抗体またはそのフラグメントをコードする核酸配列を細胞内に導入し、それによりそれらを細胞もしくはその子孫により発現可能とし、そして組換え細胞を治療効果を求めてin vivo投与する。特定の実施形態では、幹細胞または前駆細胞を用いる。単離およびin vitroでの維持が可能ないかなる幹細胞および／または前駆細胞も、潜在的には本発明のこの実施形態に従って用いうる（例えば、PCT 公開公報 WO 94/08598；Stemple および Anderson, 1992, Cell 71:973-985；Rheinwald, 1980, Meth. Cell Bio. 21A:229；ならびに Pittelkow および Scott, 1986, Mayo Clinic Proc. 61:771 参照）。

【0333】

特定の実施形態では、遺伝子治療の目的で導入するための核酸は、適当な転写誘導因子の存在または不在を制御することにより核酸の発現を制御可能とする、コード領域に機能的に連結された誘導可能プロモーターを含んでなる。

【0334】

5.11 投与量および投与回数

疾患もしくはその1以上の症状の治療、管理、予防または改善に有効でありうる本発明の予防薬もしくは治療薬または組成物の量は、標準的な臨床実務により決定することができる。投与回数および投与量は、投与する具体的な治療剤または治療剤群（例えば具体的な治療薬または予防薬）、障害、疾患もしくは病状の重症度、投与経路、同様に年齢、体重、応答、患者の免疫状態、および患者の過去の医療履歴に依存する、各患者に特異的な因子に応じて変わるであろう。例えば、疾患もしくはその1以上の症状の治療、予防、管理、または改善に有効でありうる本発明の予防薬もしくは治療薬または組成物の投与量は、動物モデル（例えば本明細書中に開示されているかまたは当業者に公知の動物モデル）に対して組成物を投与することにより決定することができる。さらに、場合によっては適正な投与量の範囲の特定を助けるためにin vitroアッセイを用いてもよい。好適な処方は、そのような因子を考慮することにより、また例えば文献に報告され、Physician's Desk Reference（第57版、2003）において推奨されている投与量に従って、当業者が選択することができる。

【0335】

本発明の予防および／または治療プロトコルの毒性および／または有効性は、細胞培養または実験動物において標準的な製薬上の手法によって測定することができ、例えばLD₅₀（集団の50%に対して致死的な用量）およびED₅₀（集団の50%で治療上有効な用量）を決定することにより、測定することができる。毒性作用と治療的作用との用量比が治療指数であり、これはLD₅₀/ED₅₀の比で表される。大きな治療指数を示す治療薬が好ましい。毒性副作用を示す治療薬を用いてもよいが、非感染細胞への起こりうるダメージを最小限に

するために、そしてそれにより副作用を軽減するために、罹患組織の部位に対してそのような薬剤をターゲットする送達システムを設計することに留意すべきである。

【0336】

細胞培養アッセイおよび動物実験から得られるデータは、ヒトでの使用のための予防薬および／または治療薬の投与量の範囲を計画するのに用いることができる。そのような薬剤の投与量は、好ましくは毒性をほとんどまたは全く有しないED₅₀を含む循環濃度の一定範囲内にある。投与量は、用いる投与剤形および用いる投与経路に依存して、この範囲内で変化しうる。本発明の方法で用いるいかなる治療に対しても、治療上有効な用量は、細胞培養アッセイから、まず見積もることができる。細胞培養で決定したIC₅₀（すなわち、症状の最大半値阻害を実現する被験化合物の濃度）を含む循環血漿濃度範囲を実現するために、動物モデルにおいて用量を設定してもよい。そのような情報は、ヒトで有効な用量をより精密に決定するために用いることができる。血漿中レベルは、例えば高速液体クロマトグラフィーによって測定してもよい。

10

【0337】

ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、融合タンパク質、および抗体に関しては、患者に投与する投与量は、典型的には0.01mg/kg～100mg/kg患者体重である。ある特定の実施形態において、患者に投与する投与量は、0.1mg/kg～20mg/kg 患者体重、または1mg/kg～10mg/kg患者体重である。一般的に、ヒト抗体およびヒト化抗体は、外来性ポリペプチドに対する免疫応答による他の生物種由来の抗体よりも、ヒト体内で長い半減期を有する。したがって、ヒト抗体は多くの場合、より少ない投与量およびより少ない投与回数が可能である。

20

【0338】

小分子の代表的な用量としては、被験者体重のキログラム当たりミリグラムまたはマイクログラム量の小分子（例えば、約1マイクログラム／キログラム～約500ミリグラム／キログラム、約100マイクログラム／キログラム～約5ミリグラム／キログラム、または約1マイクログラム／キログラム～約50マイクログラム／キログラム）が挙げられる。

【0339】

予防薬または治療薬の投与量については、Physicians' Desk Reference（第56版、2002）中に記載されている。

【0340】

30

5.12 生物学的アッセイ

本発明の抗体またはそのフラグメントは、当業者に周知の種々の方法で特徴付けることができる。特に、本発明の抗体またはそのフラグメントは、抗原に免疫特異的に結合する能力についてアッセイする。そのようなアッセイは、溶液中で（例えば、Houghten, 1992, Bio/Techniques 13:412 421）、ビーズ上で（Lam, 1991, Nature 354:82 84）、チップ上で（Fodor, 1993, Nature 364:555 556）、細菌上で（米国特許第5,223,409号）、胞子上で（米国特許第5,571,698号；第5,403,484号；および第5,223,409号）、プラスミド上で（Cull ら, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:1865 1869）、またはファージ上で（Scott および Smith, 1990, Science 249:386 390；Cwirla ら, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6378 6382；および Felici, 1991, J. Mol. Biol. 222:301 310）行うことができる。特定された抗体またはそのフラグメントは、その後、特異性および親和性についてアッセイすることができる。

40

【0341】

本発明の抗体またはそのフラグメントは、特異的抗原への免疫特異的結合および他の抗原との交差反応性について、当技術分野で公知のいずれの方法を用いてアッセイしてもよい。免疫特異的結合および交差反応性を解析するために用いることができるイムノアッセイとしては、限定されるものではないが、いくつか挙げると、例えばウエスタンブロット、ラジオイムノアッセイ、ELISA（酵素結合免疫吸着アッセイ）、「サンドイッチ」イムノアッセイ、免疫沈降アッセイ、沈降素反応、ゲル拡散沈降素反応、免疫拡散アッセイ、凝集アッセイ、補体結合アッセイ、イムノラジオメトリックアッセイ、蛍光イムノアッセ

50

イ、プロテインAイムノアッセイのような技術を用いた、競合的および非競合的アッセイ系が挙げられる。そのようなアッセイは、当技術分野で通常行われ、かつ周知のものである（例えば、Ausubelら編，1994，Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New Yorkを参照、）。例示のイムノアッセイは第5.6節に簡単に記載してある。

【0342】

本発明の抗体またはそのフラグメントはまた、宿主細胞の受容体に対する抗原の結合を阻害するその能力について、当業者に公知の技術を用いてアッセイすることもできる。例えば、ある受容体を発現している細胞を、リガンドのアンタゴニストである抗体もしくはそのフラグメントの存在下または不在下でその受容体に対するリガンドと接触させることができ、そして該抗体もしくはそのフラグメントがリガンドの結合を阻害する能力を、例えばフローサイトメトリーまたはシンチレーションアッセイによって測定することができる。リガンドまたは抗体もしくは抗体フラグメントは、リガンドとその受容体との相互作用の検出を可能とする、放射性標識（例えば、 ^{32}P 、 ^{35}S 、および ^{125}I ）または蛍光標識（例えばフルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、フィコエリスリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、o-フタルアルデヒドおよびフルオレサミン）のような検出可能な化合物を用いて標識することができる。あるいはまた、抗体またはそのフラグメントがリガンドのその受容体への結合を阻害する能力は、無細胞アッセイにおいて測定することができる。例えば、リガンドを、該リガンドのアンタゴニストである抗体またはそのフラグメントと接触させることができ、そして抗体または抗体フラグメントがリガンドのその受容体への結合を阻害する能力を測定する。好ましくは、リガンドのアンタゴニストである抗体または抗体フラグメントを固相支持体上に固定し、そしてリガンドを検出可能な化合物で標識する。あるいはまた、リガンドを固相支持体上に固定し、抗体またはそのフラグメントを検出可能な化合物で標識する。リガンドは部分的に、もしくは完全に精製したもの（例えば、他のポリペプチドを部分的に、もしくは完全に含まない）であるか、または細胞溶解物の一部であってよい。あるいはまた、リガンドを当業者に周知の技術（例えば、ビオチン化キット，Pierce Chemicals; Rockford, IL）を用いてビオチン化することができる。

【0343】

本発明に従って構築され、および／または同定された抗体もしくはそのフラグメントを、細胞の生物学的活性を改変するその能力についてin vitroおよび／またはin vivoで試験することができる。そのような能力は、例えば抗原および遺伝子の発現を検出すること；細胞の増殖を検出すること；シグナル伝達分子（例えば、シグナル伝達因子およびキナーゼ）の活性化を検出すること；細胞のエフェクター機能を検出すること；または細胞の分化を検出することによって評価することができる。当業者に公知の技術を、これらの活性を測定するために用いることができる。例えば、細胞増殖は、3H-チミジン取り込みアッセイおよびトリパンブルー細胞計数によりアッセイすることができる。抗原発現は、例えば、限定されるものではないが、ウェスタンブロット、免疫組織化学、ラジオイムノアッセイ、ELISA（酵素結合免疫吸着アッセイ）、「サンドイッチ」イムノアッセイ、免疫沈降アッセイ、沈降素反応、ゲル拡散沈降素反応、免疫拡散アッセイ、凝集アッセイ、補体結合アッセイ、イムノラジオメトリックアッセイ、蛍光イムノアッセイ、プロテインAイムノアッセイおよびFACS解析のような技術を用いた、競合的および非競合的アッセイ系をはじめとするイムノアッセイによってアッセイすることができる。シグナル伝達分子の活性化は、例えばキナーゼアッセイおよび電気泳動シフトアッセイ（EMSA）によってアッセイすることができる。

【0344】

本発明の抗体、そのフラグメント、または組成物は、ヒトでの使用に先立って、所望の治療的または予防的活性について、好ましくはin vitroで、その後in vivoで試験する。例えば、特定の医薬組成物の投与を指示するかどうか決定するのに用いることができるアッセイとしては細胞培養アッセイが挙げられ、そこでは患者組織サンプルを培養し、医薬

10

20

30

40

50

組成物に曝露するかその他の方法によりそれと接触させ、そして組織サンプルへの当該組成物の作用を観察する。組織サンプルは、患者から生検により取得することができる。この試験により、それぞれの患者に対して治療上最も有効な治療剤（例えば予防薬または治療薬）の特定が可能になる。種々の具体的な実施形態において、特定の疾患に關与する細胞タイプの代表的な細胞を用いてin vitroアッセイを行って、本発明の医薬組成物がその細胞タイプに対して所望の作用を有するかを決定することが可能である。例えば、in vitroアッセイは、細胞株を用いて行うことができる。

【0345】

本発明の抗体、そのフラグメント、または組成物の末梢血リンパ球数への影響は、当業者に公知の標準的な技術を用いてモニタリング／評価することができる。被験者体内の末梢血リンパ球数は、例えば、当該被験者から末梢血サンプルを取得し、例えばFicoll-Hypaque (Pharmacia) 勾配遠心を用いて血漿などの末梢血の他の成分からリンパ球を分離し、そしてトリパンプルを用いてリンパ球を計数することにより測定することができる。被験者体内の末梢血T細胞数は、例えば、Ficoll-Hypaque (Pharmacia) 勾配遠心を用いて血漿などの末梢血の他の成分からリンパ球を分離し、T細胞抗原に対する抗体（FITCまたはフィコエリトリンにコンジュゲートされている）を用いてT細胞を標識し、そしてFACSによってT細胞の数を計測することにより測定することができる。

【0346】

ウイルス感染もしくはその1以上の症状を治療、管理、予防、または改善するのに用いる本発明の抗体、フラグメント、もしくは組成物は、ウイルス複製を阻害するかまたはウイルス量を軽減するその能力について、in vitroアッセイで試験することができる。例えば、ウイルス複製は、例えばJohnsonら（1997, Journal of Infectious Diseases 176:1215-1224）により記載されているようなプラークアッセイによりアッセイすることができる。本発明の方法に従って投与する抗体またはそのフラグメントはまた、ウイルスポリペプチドの発現を阻害するかまたはダウンレギュレートするその能力についてもアッセイすることができる。限定するものではないが、ウエスタンブロット解析、ノーザンブロット解析、およびRT-PCRをはじめとする当業者に公知の技術を、ウイルスポリペプチドの発現を測定するのに用いることができる。

【0347】

細菌感染もしくはその1以上の症状を治療、管理、予防、または改善するのに用いる本発明の抗体、フラグメント、もしくは組成物は、当技術分野で周知のin vitroアッセイにおいて試験することができる。当技術分野で公知のin vitroアッセイはまた、治療剤に対する細菌の耐性の存在または発達を試験するのに用いることができる。そのようなin vitroアッセイは、Gales ら、2002, Diag. Microbiol. Infect. Dis. 44(3):301-311; Hicks ら、2002, Clin. Microbiol. Infect. 8(11): 753-757; およびNicholson ら、2002, Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 44(1): 101-107に記載されている。

【0348】

真菌感染もしくはその1以上の症状を治療、管理、予防、または改善するのに用いる本発明の抗体、フラグメント、もしくは組成物は、種々の真菌種に対する抗真菌活性について試験することができる。当技術分野で周知のいずれの標準的な抗真菌アッセイも、治療剤の抗真菌活性を評価するのに用いることができる。種々の真菌種に対する抗真菌作用を試験することができる。米国臨床検査標準化委員会（NCCLS）により推奨されている試験（National Committee for Clinical Laboratories Standards. 1995, Proposed Standard M27T. Villanova, Pa. 参照）および当業者に公知の他の方法（Pfaller ら、1993, Infectious Dis. Clin. N. Am. 7: 435-444）を、治療剤の抗真菌作用を評価するために用いることができる。治療剤の抗真菌特性はまた、真菌溶解アッセイから、ならびに、とりわけ増殖阻害アッセイ、蛍光に基づく真菌生存率アッセイ、フローサイトメトリー解析、および当業者に公知の他の標準的なアッセイをはじめとする他の方法により、測定してもよい。

【0349】

例えば、治療剤の抗真菌活性は、当業者に周知のプロトコルを用いてマクロ希釈法および／またはミクロ希釈法により試験することができる（例えば、Clancy ら, 1997 Journal of Clinical Microbiology, 35(11): 2878-82; Ryder ら, 1998, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 42(5): 1057-61; 米国特許第5,521,153号、第5,883,120号、第5,521,169号を参照）。簡単に述べると、真菌株を適当な液体培地中で培養し、用いる特定の真菌株に応じた適当な温度で、これもまた用いる特定の真菌株に応じた一定の時間、増殖させる。接種菌を光学測定により調製し、懸濁液の濁度を標準品（例えばMcFarland 標準）のものと比較する。接種菌の濁度への治療剤の作用を、目視により、または分光光度計により測定する。治療剤の最小阻害濃度（「MIC」）を決定する。MICとは、培養物の濁度を測定することにより計測される接種菌の可視的増殖を妨げるリード化合物の最低濃度と定義される。

10

【0350】

治療剤の抗真菌活性はまた、当業者に周知の比色アッセイを用いても測定することができる。治療剤の抗真菌活性を評価するのに用いることができる1つの代表的な比色アッセイは、Pfallerらにより記載されている（1994, Journal of Clinical Microbiology, 32(8): 1993-6; またTiballi ら, 1995, Journal of Clinical Microbiology, 33(4): 915-7 も参照されたい。このアッセイでは、酸化－還元指示薬（Alamar Biosciences, Inc., Sacramento CA）を用いた比色終点を利用する。

【0351】

治療剤の抗真菌活性はまた、当業者に周知の光学測定アッセイを用いても測定することができる（例えば、Clancy ら, 1997 Journal of Clinical Microbiology, 35(11): 2878-82; Jahn ら, 1995, Journal of Clinical Microbiology, 33(3): 661-667を参照）。この光学測定アッセイは、3-(4,5-ジメチル-2-チアゾリル)-2,5,-ジフェニル-2H-テトラゾリウムブロミド（MTT）のホルマザンへの還元を介して生存真菌によるミトコンドリア呼吸を定量することに基づいている。このアッセイにより測定されるMICとは、光学密度の最初の急激な低下と関連した被験治療剤の最高濃度と定義される。一部の実施形態では、治療剤はマクロ希釈、ミクロ希釈およびMTTアッセイを並行して用いて抗真菌活性についてアッセイする。

20

【0352】

さらに、当業者に公知のいかなるin vitroアッセイも、特定の疾患もしくはその1以上の症状に対する、本明細書中で開示される抗体治療剤の予防上および／または治療上の有用性を評価するのに用いることができる。

30

【0353】

本発明の抗体、組成物、または組合せ治療剤は、ヒトでの使用に先立って、好適な動物モデルシステムで試験することができる。そのような動物モデルシステムとしては、限定するものではないが、ラット、マウス、ニワトリ、ウシ、サル、ブタ、イヌ、ウサギなどが挙げられる。当技術分野で周知のいずれの動物系を用いてもよい。手順のいくつかの面は変更することができ、こうした面としては、限定するものではないが、治療剤を別々に投与するか混合して投与するかといった、治療剤（例えば予防薬および／または治療薬）の投与の時間的計画、および治療剤の投与回数が挙げられる。

40

【0354】

特定の疾患もしくはその1以上の症状を治療、管理、予防、または改善するための本発明の抗体、そのフラグメント、もしくは組成物の有効性を評価するのに、動物モデルを用いることができる。

【0355】

本発明の方法に従った抗体、組成物、または組合せ治療剤の投与を、特定の疾患の時間経過を、少なくとも25%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも75%、少なくとも85%、少なくとも95%、または少なくとも99%減少させるその能力について試験することができる。本発明の抗体、組成物、または組合せ治療剤はまた、特定の疾患に罹患したヒトの生存期間を、少なくとも25%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも75%

50

、少なくとも85%、少なくとも95%、または少なくとも99%増加させるその能力についても試験することができる。さらに、本発明の抗体、組成物、または組合せ治療剤は、ウイルス性呼吸器感染症に罹患したヒトの入院期間を、少なくとも60%、少なくとも75%、少なくとも85%、少なくとも95%、または少なくとも99%短縮させるその能力について試験することができる。当業者に公知の技術を、*in vivo*で本発明の抗体、組成物、または組合せ治療剤の機能を解析するのに用いることができる。

【0356】

さらに、特定の疾患もしくはその1以上の症状に対する、本明細書中で開示されている抗体、そのフラグメント、組成物、組合せ治療剤の予防上および／または治療上の有用性を評価するのに、当業者に公知のいかなる*in vivo*アッセイも用いることができる。

10

【0357】

本発明の予防および／または治療プロトコルの毒性および／または有効性は、細胞培養または実験動物において標準的な製薬上の手法によって測定することができ、例えばLD₅₀（集団の50%に対して致死的な用量）およびED₅₀（集団の50%で治療上有効な用量）を決定することにより、測定することができる。毒性作用と治療的効果との用量比が治療指数であり、これはLD₅₀／ED₅₀の比で表される。大きな治療指数を示す治療剤が好ましい。毒性副作用を示す治療剤を用いるが、非感染細胞への起こりうるダメージを最小限にするために、そしてそれにより副作用を軽減するために、罹患組織の部位にそのような薬剤をターゲットする送達システムを設計することに留意すべきである。

【0358】

20

細胞培養アッセイおよび動物実験から得られるデータは、ヒトでの使用のための予防薬および／または治療薬の投与量の範囲を計画するのに用いることができる。そのような薬剤の投与量は、好ましくは毒性をほとんどまたは全く有しないED₅₀を含む循環濃度の一定範囲内にある。投与量は、用いる投与剤形および用いる投与経路に依存して、この範囲内で変化しうる。本発明の方法で用いるいかなる治療剤に対しても、治療上有効用量は細胞培養アッセイから、まず見積もることができる。動物モデルにおいて、用量は細胞培養で決定したIC₅₀（すなわち、症状の最大半値阻害を実現する被験化合物の濃度）を含む循環血漿濃度範囲を実現するように設定することができる。そのような情報は、ヒトで有効な用量をより精密に決定するために用いることができる。血漿中レベルは、例えば高速液体クロマトグラフィーによって測定することができる。

30

【0359】

5.13 キット

本発明は、目的の生物種の抗体フレームワーク領域のサブバンクを含んでなるキットを提供する。本発明はまた、目的の生物種のCDRのサブバンクを含んでなるキットを提供する。本発明はまた、ヌクレオチド配列を包含する複数の核酸配列を含むコンビナトリアルサブライブラリーを含んでなるキットであって、各ヌクレオチド配列が1つの対応するCDR（例えばCDR1）とインフレームで融合された1つのフレームワーク領域（例えばFR1）をコードする、前記キットを提供する。本発明はさらに、ヌクレオチド配列を包含する複数の核酸配列を含むコンビナトリアルライブラリーを含んでなるキットであって、各ヌクレオチド配列がインフレームで融合されたフレームワーク領域とCDR（例えばFR1+CDR1+FR2+CDR2+FR3+CDR3+FR4）をコードする、前記キットを提供する。

40

【0360】

いくつかの実施形態において、本発明はヒト免疫グロブリンフレームワーク領域のサブバンク、CDRのサブバンク、コンビナトリアルサブライブラリー、および／またはコンビナトリアルライブラリーを含んでなるキットを提供する。一実施形態では、本発明は、可変軽鎖フレームワーク領域1、2、3、および／または4に対するフレームワーク領域サブバンクを含んでなるキットであって、フレームワーク領域がKabatシステムにより定義される、前記キットを提供する。別の実施形態では、本発明は、可変軽鎖フレームワーク領域1、2、3、および／または4に対するフレームワーク領域サブバンクを含んでなるキットであって、フレームワーク領域がChothiaシステムにより定義される、前記キット

50

を提供する。別の実施形態では、本発明は、可変重鎖フレームワーク領域 1、2、3、および／または 4 に対するフレームワーク領域サブバンクを含んでなるキットであって、フレームワーク領域が Kabat システムにより定義される、前記キットを提供する。別の実施形態では、本発明は、可変重鎖フレームワーク領域 1、2、3、および／または 4 に対するフレームワーク領域サブバンクを含んでなるキットであって、フレームワーク領域が Chothia システムにより定義される、前記キットを提供する。また別の実施形態では、本発明は、軽鎖および重鎖フレームワークの両方のサブバンクを含んでなるキットを提供する。

【0361】

本発明はまた、本発明のヒト化抗体を入れた 1 以上の容器を含んでなる医薬パックまたはキットを提供する。医薬パックまたはキットは、特定の疾患の治療に有用な 1 以上の他の予防薬または治療薬をさらに含んでもよい。本発明はまた、本発明の医薬組成物の 1 以上の成分を入れた 1 以上の容器を含んでなる医薬パックまたはキットを提供する。場合によっては、そのような容器には、医薬もしくは生物学的製品の製造、使用または販売を規制する政府機関により定められた書式の注意書きであって、ヒトへの投与についての製造、使用または販売に関する該機関による認可を反映するものを添えることができる

5.14 製造物品

本発明はまた、梱包済みの、ラベルされた医薬品を包含する。本製品は、ガラスバイアルもしくは他の密閉容器のような所定の容器中の所定の単位剤形を含む。非経口投与に好適な投与剤形の場合、有効成分は無菌状態で、微粒子を含まない溶液としての投与に好適なものである。言い換えれば、本発明は、非経口投与用溶液および凍結乾燥粉末剤（いずれも無菌）の両者を包含し、後者は注入前の再調製に好適なものである。あるいはまた、単位剤形は、経口、経皮、局所または粘膜送達に好適な固体であってもよい。

【0362】

特定の実施形態において、単位剤形は、静脈内、筋内または皮下送達に好適なものである。したがって、本発明は、各送達経路に好適な溶液（好ましくは無菌）を包含する。

【0363】

いかなる医薬品とも同様に、包装材料および容器は保存および輸送の間の製品の安定性を保護するために設計される。さらに、本発明の製品は、使用についての説明書、または問題となっている疾患もしくは障害を適切に予防または治療する方法について、医師、技術者または患者に説明する他の資料を含む。言い換えれば、製品は、限定するものではないが、実際の用量、モニタリング方法（例えば平均絶対リンパ球数、腫瘍細胞数、および腫瘍サイズをモニタリングする方法）および他のモニタリング情報をはじめとする投薬方式を指示または提案する説明書を含む。

【0364】

より具体的には、本発明は、包装材料（例えば箱、瓶、管、バイアル、容器、スプレー容器、吸入器、静脈内（i.v.）バッグ、袋など）；および前記包装材料中に含まれるある医薬の少なくとも 1 つの単位剤形、を含んでなる製品を提供する。本発明はさらに、包装材料（例えば箱、瓶、管、バイアル、容器、スプレー容器、吸入器、静脈内（i.v.）バッグ、袋など）；および前記包装材料中に含まれるそれぞれの医薬の少なくとも 1 つの単位剤形を含んでなる製品を提供する。

【0365】

特定の実施形態において、製品は包装材料ならびに前記包装材料中に含まれる医薬および説明書を含んでなり、前記医薬はヒト化抗体および製薬上許容される担体であり、前記説明書は特定の疾患を有する被験者を予防、治療または管理するための投薬方式を指示するものである。別の実施形態では、製品は包装材料ならびに前記包装材料中に含まれる医薬および説明書を含んでなり、前記医薬はヒト化抗体、該ヒト化抗体とは異なる予防薬または治療薬および製薬上許容される担体であり、前記説明書は特定の疾患を有する被験者を予防、治療または管理するための投薬方式を指示するものである。別の実施形態では、製品は包装材料ならびに前記包装材料中に含まれる 2 種類の医薬および説明書を含んでな

り、前記１種類目の医薬はヒト化抗体および製薬上許容される担体であり、前記２種類目の医薬は該ヒト化抗体とは異なる予防薬または治療薬であり、前記説明書は特定の疾患を有する被験者を予防、治療または管理するための投薬方式を指示するものである。

【０３６６】

本発明は、疾患に伴う１以上の症状を予防、治療または改善するために使用する製品に同梱される資料中に、本発明の方法により軽減または回避されうる副作用を示すことを提案する。本発明の方法により軽減または回避されうる副作用としては、限定するものではないが、バイタルサインの異常（例えば発熱、頻脈、徐脈、高血圧、低血圧）、血液学的症状（例えば貧血、リンパ球減少、白血球減少、血小板減少）、頭痛、悪寒、めまい、吐き気、虚弱、背部痛、胸痛（例えば胸部圧迫感）、下痢、筋肉痛、痛み、かゆみ、乾癬、鼻炎、発汗、注射部位反応、および血管拡張が挙げられる。一部の治療剤は免疫抑制性でありうるので、長引く免疫抑制が、日和見感染をはじめとする感染症のリスクを増大させることはありうる。長引く持続性の免疫抑制はまた、あるタイプの癌の進行の増大したりリスクももたらしうる。

【０３６７】

さらに、製品中に同梱される資料は、外来性タンパク質はアナフィラキシーまたはサイトカイン放出症候群をはじめとするアレルギー反応も引き起こす可能性があることを知らせることができる。該資料は、アレルギー反応は軽い掻痒性発疹として現れるだけかもしれないし、または紅皮症、スティーブンス・ジョンソン症候群、脈管炎、もしくはアナフィラキシーのように重症でありうることを知らせるべきである。該資料はまた、アナフィラキシー反応（アナフィラキシー）は重篤な、ときには致死性の過敏性反応であることも知らせるべきである。アナフィラキシーをはじめとするアレルギー反応は、どんな外来性タンパク質を体内に注入したときにでも起こりうる。それらは蕁麻疹または発疹のような軽い徴候から、致死的な全身性反応にまで及んでいる。アナフィラキシー反応は、曝露のすぐ後に、多くの場合１０分以内に起きる。患者は、知覚異常、低血圧、喉頭水腫、精神状態の変化、顔部もしくは咽頭の血管性浮腫、気道閉塞、気管支痙攣、蕁麻疹および掻痒、血清病、関節炎、アレルギー性腎炎、糸球体腎炎、一過性関節炎、または好酸球増多症に見舞われうる。

【０３６８】

該資料はまた、サイトカイン放出症候群が急性の臨床症候群であり、ある種の活性化する抗Ｔ細胞抗体の投与と時間的に関連することを示すことができる。サイトカイン放出症候群は、活性化リンパ球または単球によるサイトカインの放出に起因するとされている。サイトカイン放出症候群の臨床症状は、より頻繁に報告される、軽い自然治癒性の「風邪様」疾患から、報告される頻度の低い、重症の、生死に関わるショック様反応（重篤な心血管系、肺および中枢神経系症状を含みうる）にまでわたる。該症候群は、典型的には投与から約３０～６０分後に始まり（但しもっと後に起こることもある）、数時間続く。この症状の発生頻度および重症度は多くの場合、初回投与の場合に最も大きい。連続的な投与に従って、この症候群の発生頻度および重症度は減少する傾向にある。用量の増加または中断後の治療の再開は該症候群の再発をもたらすことがある。上述のように、本発明は本明細書中に記載した１以上の副作用を回避するかまたはそれを軽減させる治療法および予防法を包含する。

【０３６９】

5.15 特定の実施形態

１．ヒト化重鎖可変領域をコードする第１のヌクレオチド配列を含む核酸配列であって、前記ヒト化重鎖可変領域をコードする第１のヌクレオチド配列は、重鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、重鎖相補性決定領域（ＣＤＲ）１をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、重鎖ＣＤＲ２をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、重鎖ＣＤＲ３をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を同時に融合することにより作製されたものであり、前記ＣＤＲはドナー抗体の重鎖可変領域に由来し、各重鎖フレームワーク領域はヒト

重鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られるものである、前記核酸配列。

【0370】

2. ヒト化軽鎖可変領域をコードする第1のヌクレオチド配列を含む核酸配列であって、前記ヒト化軽鎖可変領域をコードする第1のヌクレオチド配列は、軽鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより作製されたものであり、前記CDRはドナー抗体の軽鎖可変領域に由来し、各軽鎖フレームワーク領域はヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られるものである、前記核酸配列。

10

【0371】

3. ドナー軽鎖可変領域をコードする第2のヌクレオチド配列をさらに含む、実施形態1に記載の核酸配列。

【0372】

4. ヒト化軽鎖可変領域をコードする第2のヌクレオチド配列をさらに含み、前記ヒト化軽鎖可変領域をコードする第2のヌクレオチド配列は、軽鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより作製されたものであり、前記CDRはドナー抗体の軽鎖可変領域に由来し、各軽鎖フレームワーク領域はヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られるものである、実施形態1に記載の核酸配列。

20

【0373】

5. ドナー重鎖可変領域をコードする第2のヌクレオチド配列をさらに含む、実施形態2に記載の核酸配列。

【0374】

6. ドナー抗体の重鎖可変領域に由来する1以上のCDRが、ドナー抗体の対応するCDRをコードする核酸配列に対して1以上の変異を含む、実施形態1に記載の核酸配列。

【0375】

7. ドナー抗体の軽鎖可変領域に由来する1以上のCDRが、ドナー抗体の対応するCDRをコードする核酸配列に対して1以上の変異を含む、実施形態2に記載の核酸配列。

30

【0376】

8. ドナー抗体の軽鎖可変領域に由来する1以上のCDRが、ドナー抗体の対応するCDRをコードする核酸配列に対して1以上の変異を含む、実施形態4に記載の核酸配列。

【0377】

9. ヒト化重鎖可変領域をコードする第1のヌクレオチド配列を含む核酸配列であって、前記ヒト化重鎖可変領域をコードする第1のヌクレオチド配列は、重鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより作製されたものであり、少なくとも1つのCDRはある抗原と免疫特異的に結合するドナー抗体由来の重鎖CDRのサブバンクから得られ、少なくとも1つの重鎖フレームワーク領域はヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られるものである、前記核酸配列。

40

【0378】

10. ヒト化軽鎖可変領域をコードする第1のヌクレオチド配列を含む核酸配列であって、前記ヒト化軽鎖可変領域をコードする第1のヌクレオチド配列は、軽鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域4を

50

コードする核酸配列を同時に融合することにより作製されたものであり、少なくとも1つのCDRはある抗原と免疫特異的に結合するドナー抗体由来の軽鎖CDRのサブバンクから得られ、少なくとも1つの軽鎖フレームワーク領域はヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られるものである、前記核酸配列。

【0379】

11. ドナー軽鎖可変領域をコードする第2のヌクレオチド配列をさらに含む、実施形態9に記載の核酸。

【0380】

12. ヒト化軽鎖可変領域をコードする第2のヌクレオチド配列をさらに含み、前記ヒト化軽鎖可変領域をコードする第2のヌクレオチド配列は、軽鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより作製されたものであり、前記CDRはドナー抗体の軽鎖可変領域に由来し、少なくとも1つの軽鎖フレームワーク領域はヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られるものである、実施形態9に記載の核酸配列。

10

【0381】

13. ヒト化軽鎖可変領域をコードする第2のヌクレオチド配列をさらに含み、前記ヒト化軽鎖可変領域をコードする第2のヌクレオチド配列は、軽鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより作製されたものであり、少なくとも1つのCDRはある抗原と免疫特異的に結合するドナー抗体由来の軽鎖CDRのサブバンクから得られ、少なくとも1つの軽鎖フレームワーク領域はヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られるものである、実施形態9に記載の核酸配列。

20

【0382】

14. ドナー重鎖可変領域をコードする第2のヌクレオチド配列をさらに含む、実施形態10に記載の核酸配列。

【0383】

15. ヒト化重鎖可変領域をコードする第2のヌクレオチド配列をさらに含み、前記ヒト化重鎖可変領域をコードする第2のヌクレオチド配列は、重鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより作製されたものであり、前記CDRはドナー抗体の重鎖可変領域に由来し、少なくとも1つの重鎖フレームワーク領域はヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られるものである、実施形態10に記載の核酸配列。

30

【0384】

16. 実施形態3の核酸配列がコードする抗体。

40

【0385】

17. 実施形態4の核酸配列がコードする抗体。

【0386】

18. 実施形態5の核酸配列がコードする抗体。

【0387】

19. 実施形態8の核酸配列がコードする抗体。

【0388】

20. 実施形態11の核酸配列がコードする抗体。

【0389】

21. 実施形態12の核酸配列がコードする抗体。

50

【0390】

22. 実施形態13の核酸配列がコードする抗体。

【0391】

23. 実施形態14の核酸配列がコードする抗体。

【0392】

24. 実施形態15の核酸配列がコードする抗体。

【0393】

25. 結合特性、安定性、融点 (T_m)、pI、溶解度、産生レベルまたはエフェクター機能からなる群より選択される1以上の改善された特性を有しかつ前記改善がドナー抗体と比較して約2%~500%であるかまたはドナー抗体と比較して約2倍~1000倍である、実施形態16~24のいずれかの抗体。

10

【0394】

26. ドナー抗体と比較して改善された結合特性を有しかつ前記改善がドナー抗体と比較して約1%~500%であるかまたはドナー抗体と比較して約2倍~1000倍である、実施形態16~24のいずれかの抗体。

【0395】

27. 改善された結合特性が抗原に対する抗体の平衡解離定数 (K_D) である、実施形態の抗体26。

【0396】

28. 改善された安定性を有し、かつ前記改善がドナー抗体と比較して約2%~500%であるかまたはドナー抗体と比較して約2倍~1000倍である、実施形態16~24のいずれかの抗体。

20

【0397】

29. 前記安定性がin vivo安定性またはin vitro安定性である、実施形態28の抗体。

【0398】

30. 前記抗体が改善された T_m を有しかつ前記改善がドナー抗体と比較して T_m の約1°C~20°Cの増加である、実施形態16~24のいずれかの抗体。

【0399】

31. 前記抗体が改善されたpIを有しかつ前記改善がドナー抗体と比較して約0.5~2.0の増加である、実施形態16~24のいずれかの抗体。

30

【0400】

32. 前記抗体が改善されたpIを有しかつ前記改善がドナー抗体と比較して約0.5~2.0の減少である、実施形態16~24のいずれかの抗体。

【0401】

33. 前記抗体が改善された産生レベルを有しかつ前記改善がドナー抗体と比較して約2%~500%であるかまたは約2倍~1000倍である、実施形態16~24のいずれかの抗体。

【0402】

34. 前記抗体が改善されたエフェクター機能を有しかつ前記改善がドナー抗体と比較して約2%~500%であるかまたは約2倍~1000倍である、実施形態16~24のいずれかの抗体。

【0403】

35. 前記エフェクター機能がADCCである、実施形態34の抗体。

40

【0404】

36. 前記エフェクター機能がCDCである、実施形態34の抗体。

【0405】

37. 実施形態1に記載の核酸配列を含むように遺伝子操作された細胞。

【0406】

38. 実施形態2に記載の核酸配列を含むように遺伝子操作された細胞。

【0407】

39. 実施形態2に記載の核酸配列を含むようにさらに遺伝子操作された、実施形態16に記載の細胞。

50

【0408】

40. 実施形態3に記載の核酸を含むように遺伝子操作された細胞。

【0409】

41. 実施形態4に記載の核酸を含むように遺伝子操作された細胞。

【0410】

42. 実施形態5に記載の核酸を含むように遺伝子操作された細胞。

【0411】

43. 実施形態9に記載の核酸配列を含むように遺伝子操作された細胞。

【0412】

44. 実施形態10に記載の核酸配列を含むように遺伝子操作された細胞。

10

【0413】

45. 実施形態10に記載の核酸配列を含むようにさらに遺伝子操作された、実施形態22に記載の細胞。

【0414】

46. 実施形態11に記載の核酸配列を含むように遺伝子操作された細胞。

【0415】

47. 実施形態12に記載の核酸配列を含むように遺伝子操作された細胞。

【0416】

48. 実施形態13に記載の核酸配列を含むように遺伝子操作された細胞。

【0417】

49. 実施形態14に記載の核酸配列を含むように遺伝子操作された細胞。

20

【0418】

50. 実施形態15に記載の核酸配列を含むように遺伝子操作された細胞。

【0419】

51. ヒト化重鎖可変領域をコードする第1のヌクレオチド配列を含む第1の核酸配列を含有する細胞であって、前記細胞は、重鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより合成された、ヒト化重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を細胞に導入することを含む方法により作製されたものであり、前記CDRはドナー抗体の重鎖可変領域に由来し、少なくとも1つの重鎖フレームワーク領域はヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られるものである、前記細胞。

30

【0420】

52. ヒト化軽鎖可変領域をコードする第1のヌクレオチド配列を含む第1の核酸配列を含有する細胞であって、前記細胞は、軽鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより合成された、ヒト化軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を細胞に導入することを含む方法により作製されたものであり、前記CDRはドナー抗体の軽鎖可変領域に由来し、少なくとも1つの軽鎖フレームワーク領域はヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られるものである、前記細胞。

40

【0421】

53. ヒト化重鎖可変領域をコードする第1のヌクレオチド配列およびヒト化軽鎖可変領域をコードする第2のヌクレオチド配列を含む核酸配列を含有する細胞であって、前記細胞は、(i)重鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより合成され

50

た、ヒト化重鎖可変領域をコードする第1のヌクレオチド配列、および(ii)軽鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより合成された、ヒト化軽鎖可変領域をコードする第2のヌクレオチド配列、を含む核酸配列を細胞に導入することを含む方法により作製されたものであり、重鎖可変領域のCDRはドナー抗体の重鎖可変領域に由来し、軽鎖可変領域のCDRはドナー抗体の軽鎖可変領域に由来し、少なくとも1つの重鎖フレームワーク領域はヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られ、そして少なくとも1つの軽鎖フレームワーク領域はヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られるものである、前記細胞。

10

【0422】

54. ヒト化重鎖可変領域をコードする第1のヌクレオチド配列を含む第1の核酸配列を含有する細胞であって、前記細胞は、重鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより合成された、ヒト化重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を細胞に導入することを含む方法により作製されたものであり、少なくとも1つのCDRはある抗原と免疫特異的に結合するドナー抗体由来の重鎖CDRのサブバンクから得られ、また、少なくとも1つの重鎖フレームワーク領域はヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られるものである、前記細胞。

20

【0423】

55. ヒト化軽鎖可変領域をコードする第1のヌクレオチド配列を含む第1の核酸配列を含有する細胞であって、前記細胞は、軽鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより合成された、ヒト化軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を細胞に導入することを含む方法により作製されたものであり、少なくとも1つのCDRはある抗原と免疫特異的に結合するドナー抗体由来の軽鎖CDRのサブバンクから得られ、また、少なくとも1つの軽鎖フレームワーク領域はヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られるものである、前記細胞。

30

【0424】

56. ヒト化重鎖可変領域をコードする第1のヌクレオチド配列およびヒト化軽鎖可変領域をコードする第2のヌクレオチド配列を含む核酸配列を含有する細胞であって、前記細胞は、(i)重鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより合成された、ヒト化重鎖可変領域をコードする第1のヌクレオチド配列、および(ii)軽鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより合成された、ヒト化軽鎖可変領域をコードする第2のヌクレオチド配列、を含む核酸配列を細胞に導入することを含む方法により作製されたものであり、少なくとも1つの重鎖可変領域CDRはある抗原と免疫特異的に結合するドナー抗体由来の重鎖CDRのサブバンクから得られ、少なくとも1つの軽鎖可変領域CDRはある抗原と免疫特異的に結合するドナー抗体由来の軽鎖CDRのサブバンクから得られ、少なくとも1つの重鎖フレームワーク領域はヒト重鎖フレームワーク領域の

40

50

サブバンクから得られ、そして少なくとも1つの軽鎖フレームワーク領域はヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られるものである、前記細胞。

【0425】

57. ヒト化重鎖可変領域をコードする第1のヌクレオチド配列およびヒト化軽鎖可変領域をコードする第2のヌクレオチド配列を含む核酸配列を含有する細胞であって、前記細胞は、(i)重鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより合成された、ヒト化重鎖可変領域をコードする第1のヌクレオチド配列、および(ii)軽鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより合成された、ヒト化軽鎖可変領域をコードする第2のヌクレオチド配列、を含む核酸配列を細胞に導入することを含む方法により作製されたものであり、前記重鎖可変領域CDRはドナー抗体の重鎖可変領域に由来し、少なくとも1つの軽鎖可変領域CDRはある抗原と免疫特異的に結合するドナー抗体由来の軽鎖CDRのサブバンクから得られ、少なくとも1つの重鎖フレームワーク領域はヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られ、そして少なくとも1つの軽鎖フレームワーク領域はヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られるものである、前記細胞。

【0426】

58. ヒト化重鎖可変領域をコードする第1のヌクレオチド配列およびヒト化軽鎖可変領域をコードする第2のヌクレオチド配列を含む核酸配列を含有する細胞であって、前記細胞は、(i)重鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより合成された、ヒト化重鎖可変領域をコードする第1のヌクレオチド配列、および(ii)軽鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより合成された、ヒト化軽鎖可変領域をコードする第2のヌクレオチド配列、を含む核酸配列を細胞に導入することを含む方法により作製されたものであり、少なくとも1つの重鎖可変領域CDRはある抗原と免疫特異的に結合するドナー抗体由来の重鎖CDRのサブバンクから得られ、前記軽鎖可変領域CDRはドナー抗体の軽鎖可変領域に由来し、少なくとも1つの重鎖フレームワーク領域はヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られ、そして少なくとも1つの軽鎖フレームワーク領域はヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られるものである、前記細胞。

【0427】

59. ヒト化軽鎖可変領域をコードする第2のヌクレオチド配列を含む第2の核酸配列をさらに含有する、実施形態51に記載の細胞。

【0428】

60. 軽鎖可変領域をコードする第2のヌクレオチド配列を含む第2の核酸配列をさらに含有する、実施形態51に記載の細胞。

【0429】

61. 重鎖可変領域をコードする第2のヌクレオチド配列を含む第2の核酸配列をさらに含有する、実施形態52に記載の細胞。

【0430】

10

20

30

40

50

62. ヒト化軽鎖可変領域をコードする第2のヌクレオチド配列を含む第2の核酸配列をさらに含有する、実施形態54に記載の細胞。

【0431】

63. 軽鎖可変領域をコードする第2のヌクレオチド配列を含む第2の核酸配列をさらに含有する、実施形態54に記載の細胞。

【0432】

64. 重鎖可変領域をコードする第2のヌクレオチド配列を含む第2の核酸配列をさらに含有する、実施形態55に記載の細胞。

【0433】

65. ある抗原と免疫特異的に結合するヒト化抗体をコードする核酸配列を含有する細胞であって、下記のステップ：

10

(a)ヒト化重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を細胞に導入するステップであって、前記第1のヌクレオチド配列は、重鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、重鎖相補性決定領域(CDR)1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより合成されたものであり、前記CDRはドナー抗体の重鎖可変領域に由来し、少なくとも1つの重鎖フレームワーク領域はヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られたものであるステップ、

(b)ヒト化軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を細胞に導入するステップであって、前記ヌクレオチド配列は、軽鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、軽鎖相補性決定領域(CDR)1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより合成されたものであり、前記CDRはドナー抗体の軽鎖可変領域に由来し、少なくとも1つの軽鎖フレームワーク領域はヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られたものであるステップ、
を含む方法により作製される、前記細胞。

20

【0434】

66. ある抗原と免疫特異的に結合するヒト化抗体をコードする核酸配列を含有する細胞であって、下記のステップ：

30

(a)重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を細胞に導入するステップであって、前記ヌクレオチド配列は、重鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより合成されたものであり、少なくとも1つのCDRは抗原と免疫特異的に結合するドナー抗体由来の重鎖CDRのサブバンクから得られたものであり、少なくとも1つの重鎖フレームワーク領域はヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られたものであるステップ、

40

(b)ヒト化軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を細胞に導入するステップであって、前記ヌクレオチド配列は、軽鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより合成されたものであり、前記CDRはドナー抗体の軽鎖可変領域に由来し、少なくとも1つの軽鎖フレームワーク領域はヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られたものであるステップ、
を含む方法により作製される、前記細胞。

【0435】

50

67. ある抗原と免疫特異的に結合するヒト化抗体をコードする核酸配列を含有する細胞であって、下記のステップ：

(a)重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を細胞に導入するステップであって、前記ヌクレオチド配列は、重鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより合成されたものであり、少なくとも1つのCDRは抗原と免疫特異的に結合するドナー抗体由来の重鎖CDRのサブバンクから得られたものであり、また、少なくとも1つの重鎖フレームワーク領域はヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られたものであるステップ、

10

(b)ヒト化軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を細胞に導入するステップであって、前記ヌクレオチド配列は、軽鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより合成されたものであり、少なくとも1つのCDRは抗原と免疫特異的に結合するドナー抗体由来の軽鎖CDRのサブバンクから得られたものであり、また、少なくとも1つの軽鎖フレームワーク領域はヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られたものであるステップ、

20

を含む方法により作製される、前記細胞。

【0436】

68. ある抗原と免疫特異的に結合するヒト化抗体をコードする核酸配列を含有する細胞であって、下記のステップ：

(a)重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を細胞に導入するステップであって、前記ヌクレオチド配列は、重鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、重鎖相補性決定領域(CDR)1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより合成されたものであり、前記CDRはドナー抗体の重鎖可変領域に由来し、少なくとも1つの重鎖フレームワーク領域はヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られたものであるステップ、

30

(b)ヒト化軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を細胞に導入するステップであって、前記ヌクレオチド配列は、軽鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより合成されたものであり、少なくとも1つのCDRは抗原と免疫特異的に結合するドナー抗体由来の軽鎖CDRのサブバンクから得られたものであり、また、少なくとも1つの軽鎖フレームワーク領域はヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られたものであるステップ、

40

を含む方法により作製される、前記細胞。

【0437】

69. 実施形態51または54に記載の細胞においてヒト化重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を発現させることを含んでなる、ヒト化重鎖可変領域を作製する方法。

【0438】

70. 実施形態52または55に記載の細胞においてヒト化軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を発現させることを含んでなる、ヒト化軽鎖可変領域を作製する方法。

【0439】

71. 実施形態53、54、57、58、59、60、61、62、63または64に記載の細胞においてヒト化

50

重鎖可変領域をコードする第1のヌクレオチド配列およびヒト化軽鎖可変領域をコードする第2のヌクレオチド配列を含む核酸配列を発現させることを含んでなる、ヒト化抗体を作製する方法。

【0440】

72. 実施形態65、66、67または68に記載の細胞中に含まれるヒト化抗体をコードする核酸配列を発現させることを含んでなる、抗原と免疫特異的に結合するヒト化抗体を作製する方法。

【0441】

73. ある抗原と免疫特異的に結合するヒト化抗体を作製する方法であって、下記のステップ：

10

- (a)重鎖フレームワーク領域のサブバンクを作製するステップ、
 - (b)ヒト化重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を合成するステップであって、ただし、前記ヌクレオチド配列は、重鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより合成され、前記CDRはドナー抗体の重鎖可変領域に由来し、少なくとも1つの重鎖フレームワーク領域はヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られたものであるステップ、
 - (c)前記核酸配列を、ヒト化軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を含有する細胞に導入するステップ、
 - (d)ヒト化重鎖可変領域およびヒト化軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を発現させるステップ、
- を含んでなる前記方法。

20

【0442】

74. ある抗原と免疫特異的に結合するヒト化抗体を作製する方法であって、下記のステップ：

- (a)重鎖フレームワーク領域のサブバンクを作製するステップ、
 - (b)ヒト化重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を合成するステップであって、ただし、前記ヌクレオチド配列は、重鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより合成され、少なくとも1つのCDRは抗原と免疫特異的に結合するドナー抗体由来の重鎖CDRのサブバンクから得られたものであり、また、少なくとも1つの重鎖フレームワーク領域はヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られたものであるステップ、
 - (c)前記核酸配列を、ヒト化軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を含有する細胞に導入するステップ、
 - (d)ヒト化重鎖可変領域およびヒト化軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を発現させるステップ、
- を含んでなる前記方法。

30

40

【0443】

75. ある抗原と免疫特異的に結合するヒト化抗体を作製する方法であって、下記のステップ：

- (a)軽鎖フレームワーク領域のサブバンクを作製するステップ、
- (b)ヒト化軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を合成するステップであって、ただし、前記ヌクレオチド配列は、軽鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列

50

、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより合成され、前記CDRはドナー抗体の軽鎖可変領域に由来し、少なくとも1つの軽鎖フレームワーク領域はヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られたものであるステップ、

(c)前記核酸配列を、ヒト化重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を含有する細胞に導入するステップ、

(d)ヒト化重鎖可変領域およびヒト化軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を発現させるステップ、

を含んでなる前記方法。

【0444】

76. ある抗原と免疫特異的に結合するヒト化抗体を作製する方法であって、下記のステップ：

(a)軽鎖フレームワーク領域のサブバンクを作製するステップ、

(b)ヒト化軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を合成するステップであって、ただし、前記ヌクレオチド配列は、軽鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより合成され、少なくとも1つのCDRは抗原と免疫特異的に結合するドナー抗体由来の軽鎖CDRのサブバンクから得られたものであり、また、少なくとも1つの軽鎖フレームワーク領域はヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られたものであるステップ、

(c)前記核酸配列を、ヒト化重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を含有する細胞に導入するステップ、

(d)ヒト化重鎖可変領域およびヒト化軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を発現させるステップ、を含んでなる前記方法。

【0445】

77. ある抗原と免疫特異的に結合するヒト化抗体を作製する方法であって、下記のステップ：

(a)軽鎖フレームワーク領域のサブバンクを作製するステップ、

(b)重鎖フレームワーク領域のサブバンクを作製するステップ、

(c)ヒト化重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を合成するステップであって、ただし、前記ヌクレオチド配列は、重鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより合成され、前記CDRはドナー抗体の重鎖可変領域に由来し、少なくとも1つの重鎖フレームワーク領域はヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られたものであるステップ、

(d)ヒト化軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を合成するステップであって、ただし、前記ヌクレオチド配列は、軽鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより合成され、前記CDRはドナー抗体の軽鎖可変領域に由来し、少なくとも1つの軽鎖フレームワーク領域はヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られたものであるステップ、

(e)前記核酸配列を細胞に導入するステップ、

(f)ヒト化重鎖可変領域およびヒト化軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を発現させるステップ、を含んでなる前記方法。

10

20

30

40

50

【0446】

78. ある抗原と免疫特異的に結合するヒト化抗体を作製する方法であって、下記のステップ：

- (a) 軽鎖フレームワーク領域のサブバンクを作製するステップ、
 - (b) 重鎖フレームワーク領域のサブバンクを作製するステップ、
 - (c) ヒト化重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を合成するステップであって、ただし、前記ヌクレオチド配列は、重鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより合成され、少なくとも1つのCDRは抗原と免疫特異的に結合するドナー抗体由来の重鎖CDRのサブバンクから得られたものであり、また、少なくとも1つの重鎖フレームワーク領域はヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られたものであるステップ、
 - (d) ヒト化軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を合成するステップであって、ただし、前記ヌクレオチド配列は、軽鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより合成され、前記CDRはドナー抗体の軽鎖可変領域に由来し、少なくとも1つの軽鎖フレームワーク領域はヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られたものであるステップ、
 - (e) 前記核酸配列を細胞に導入するステップ、
 - (f) ヒト化重鎖可変領域およびヒト化軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を発現させるステップ、
- を含んでなる前記方法。

【0447】

79. ある抗原と免疫特異的に結合するヒト化抗体を作製する方法であって、下記のステップ：

- (a) 軽鎖フレームワーク領域のサブバンクを作製するステップ、
- (b) 重鎖フレームワーク領域のサブバンクを作製するステップ、
- (c) ヒト化重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を合成するステップであって、ただし、前記ヌクレオチド配列は、重鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより合成され、前記CDRはドナー抗体の重鎖可変領域に由来し、少なくとも1つの重鎖フレームワーク領域はヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られたものであるステップ、
- (d) ヒト化軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を合成するステップであって、ただし、前記ヌクレオチド配列は、軽鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより合成され、少なくとも1つのCDRは抗原と免疫特異的に結合するドナー抗体由来の軽鎖CDRのサブバンクから得られたものであり、また、少なくとも1つの軽鎖フレームワーク領域はヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られたものであるステップ、
- (e) 前記核酸配列を細胞に導入するステップ、
- (f) ヒト化重鎖可変領域およびヒト化軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を発現

させるステップ、
を含んでなる前記方法。

【0448】

80. ある抗原と免疫特異的に結合するヒト化抗体を作製する方法であって、下記のステップ：

- (a) 軽鎖フレームワーク領域のサブバンクを作製するステップ、
 - (b) 重鎖フレームワーク領域のサブバンクを作製するステップ、
 - (c) ヒト化重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を合成するステップであって、ただし、前記ヌクレオチド配列は、重鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより合成され、少なくとも1つのCDRは抗原と免疫特異的に結合するドナー抗体由来の重鎖CDRのサブバンクから得られたものであり、また、少なくとも1つの重鎖フレームワーク領域はヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られたものであるステップ、
 - (d) ヒト化軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を合成するステップであって、ただし、前記ヌクレオチド配列は、軽鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより合成され、少なくとも1つのCDRは抗原と免疫特異的に結合するドナー抗体由来の軽鎖CDRのサブバンクから得られたものであり、また、少なくとも1つの軽鎖フレームワーク領域はヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られたものであるステップ、
 - (e) 前記核酸配列を細胞に導入するステップ、
 - (f) ヒト化重鎖可変領域およびヒト化軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を発現させるステップ、
- を含んでなる前記方法。

【0449】

81. ある抗原と免疫特異的に結合するヒト化抗体を作製する方法であって、下記のステップ：

- (a) 軽鎖フレームワーク領域のサブバンクを作製するステップ、
- (b) 重鎖フレームワーク領域のサブバンクを作製するステップ、
- (c) (i) 重鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより合成された、ヒト化重鎖可変領域をコードする第1のヌクレオチド配列、および(ii) 軽鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより合成された、ヒト化軽鎖可変領域をコードする第2のヌクレオチド配列、を含む核酸配列を合成するステップであって、重鎖可変領域のCDRはドナー抗体の重鎖可変領域に由来し、軽鎖可変領域のCDRはドナー抗体の軽鎖可変領域に由来し、少なくとも1つの重鎖フレームワーク領域はヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られ、そして少なくとも1つの軽鎖フレームワーク領域はヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られるものであるステップ、
- (d) 前記核酸配列を細胞に導入するステップ、
- (e) ヒト化重鎖可変領域およびヒト化軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を発現

させるステップ、
を含んでなる前記方法。

【0450】

82. ある抗原と免疫特異的に結合するヒト化抗体を作製する方法であって、下記のステップ:

- (a) 軽鎖フレームワーク領域のサブバンクを作製するステップ、
 - (b) 重鎖フレームワーク領域のサブバンクを作製するステップ、
 - (c) (i) 重鎖フレームワーク領域 1 をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域 2 をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域 3 をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域 4 をコードする核酸配列を同時に融合することにより合成された、ヒト化重鎖可変領域をコードする第 1 のヌクレオチド配列、および(ii)軽鎖フレームワーク領域 1 をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域 2 をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域 3 をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域 4 をコードする核酸配列を同時に融合することにより合成された、ヒト化軽鎖可変領域をコードする第 2 のヌクレオチド配列、を含む核酸配列を合成するステップであって、少なくとも 1 つの重鎖可変領域CDRは抗原と免疫特異的に結合するドナー抗体由来の重鎖CDRのサブバンクから得られ、軽鎖可変領域CDRはドナー抗体の軽鎖可変領域に由来し、少なくとも 1 つの重鎖フレームワーク領域はヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られ、そして少なくとも 1 つの軽鎖フレームワーク領域はヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られるものであるステップ、
 - (d) 前記核酸配列を細胞に導入するステップ、
 - (e) ヒト化重鎖可変領域およびヒト化軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を発現させるステップ、
- を含んでなる前記方法。

【0451】

83. ある抗原と免疫特異的に結合するヒト化抗体を作製する方法であって、下記のステップ:

- (a) 軽鎖フレームワーク領域のサブバンクを作製するステップ、
 - (b) 重鎖フレームワーク領域のサブバンクを作製するステップ、
 - (c) (i) 重鎖フレームワーク領域 1 をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域 2 をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域 3 をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域 4 をコードする核酸配列を同時に融合することにより合成された、ヒト化重鎖可変領域をコードする第 1 のヌクレオチド配列、および(ii)軽鎖フレームワーク領域 1 をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域 2 をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域 3 をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域 4 をコードする核酸配列を同時に融合することにより合成された、ヒト化軽鎖可変領域をコードする第 2 のヌクレオチド配列、を含む核酸配列を合成するステップであって、重鎖可変領域CDRはドナー抗体の重鎖可変領域に由来し、少なくとも 1 つの軽鎖可変領域CDRは抗原と免疫特異的に結合するドナー抗体由来の軽鎖CDRのサブバンクから得られ、少なくとも 1 つの重鎖フレームワーク領域はヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られ、そして少なくとも 1 つの軽鎖フレームワーク領域はヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られるものであるステップ、
 - (d) 前記核酸配列を細胞に導入するステップ、
 - (e) ヒト化重鎖可変領域およびヒト化軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を発現させるステップ、
- を含んでなる前記方法。

【0452】

84. ある抗原と免疫特異的に結合するヒト化抗体を作製する方法であって、下記のステップ:

- (a) 軽鎖フレームワーク領域のサブバンクを作製するステップ、
 - (b) 重鎖フレームワーク領域のサブバンクを作製するステップ、
 - (c) (i) 重鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより合成された、ヒト化重鎖可変領域をコードする第1のヌクレオチド配列、および(ii) 軽鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより合成された、ヒト化軽鎖可変領域をコードする第2のヌクレオチド配列、を含む核酸配列を合成するステップであって、少なくとも1つの重鎖可変領域CDRは抗原と免疫特異的に結合するドナー抗体由来の重鎖CDRのサブバンクから得られ、少なくとも1つの軽鎖可変領域CDRは抗原と免疫特異的に結合するドナー抗体由来の軽鎖CDRのサブバンクから得られ、少なくとも1つの重鎖フレームワーク領域はヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られ、そして少なくとも1つの軽鎖フレームワーク領域はヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られるものであるステップ、
 - (d) 前記核酸配列を細胞に導入するステップ、
 - (e) ヒト化重鎖可変領域およびヒト化軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を発現させるステップ、
- を含んでなる前記方法。

【0453】

85. (e) 抗原と免疫特異的に結合するヒト化抗体をスクリーニングするステップをさらに含む、実施形態73、74、75または76に記載の方法。

【0454】

86. さらに、(e) 結合特性、安定性、融点 (T_m)、pI、溶解度、産生レベルまたはエフェクター機能からなる群より選択される1以上の改善された特性をもつヒト化抗体についてスクリーニングし、その際、前記改善がドナー抗体と比較して約1%~500%であるかまたはドナー抗体と比較して約2倍~1000倍であるステップを含んでなる、実施形態73、74、75または76の方法。

【0455】

87. さらに、(f) 結合特性、安定性、融点 (T_m)、pI、溶解度、産生レベルまたはエフェクター機能からなる群より選択される1以上の改善された特性をもつヒト化抗体についてスクリーニングし、その際、前記改善がドナー抗体と比較して約1%~500%であるかまたはドナー抗体と比較して約2倍~1000倍であるステップを含んでなる、実施形態85の方法

88. さらに、(g) 前記抗原と免疫特異的に結合するヒト化抗体についてスクリーニングするステップを含んでなる、実施形態79、80、81または82の方法。

【0456】

89. さらに、(g) 結合特性、安定性、融点 (T_m)、pI、溶解度、産生レベル または エフェクター機能からなる群より選択される1以上の特性をもつヒト化抗体についてスクリーニングするステップであって、前記改善がドナー抗体と比較して約1%~500%であるかまたはドナー抗体と比較して約2倍~1000倍であるステップを含んでなる、実施形態79、80、81または82の方法。

【0457】

90. さらに、(h) 結合特性、安定性、融点 (T_m)、pI、溶解度、産生レベルまたはエフェクター機能からなる群より選択される1以上の改善された特性をもつヒト化抗体について

スクリーニングするステップであって、前記改善がドナー抗体と比較して約1%~500%であるかまたはドナー抗体と比較して約2倍~1000倍であるステップを含んでなる実施形態88の方法。

【0458】

91. さらに、(f) 抗原と免疫特異的に結合するヒト化抗体についてスクリーニングするステップを含んでなる、実施形態85、86、87または88の方法。

【0459】

92. さらに、(f) 結合特性、安定性、融点 (T_m)、pI、溶解度、産生レベルまたはエフェクター機能からなる群より選択される1以上の改善された特性をもつヒト化抗体についてスクリーニングするステップであって、前記改善がドナー抗体と比較して約1%~500%であるかまたはドナー抗体と比較して約2倍~1000倍であるステップを含んでなる、実施形態85、86、87または88のいずれかの方法。

10

【0460】

93. さらに、(g) 結合特性、安定性、融点 (T_m)、pI、溶解度、産生レベルまたはエフェクター機能からなる群より選択される1以上の改善された特性をもつヒト化抗体についてスクリーニングするステップであって、前記改善がドナー抗体と比較して約1%~500%であるかまたはドナー抗体と比較して約2倍~1000倍であるステップを含んでなる実施形態91の方法。

【0461】

94. 実施形態69に記載の方法により作製されたヒト化抗体。

20

【0462】

95. 実施形態70に記載の方法により作製されたヒト化抗体。

【0463】

96. 実施形態71に記載の方法により作製されたヒト化抗体。

【0464】

97. 実施形態72に記載の方法により作製されたヒト化抗体。

【0465】

98. 実施形態73~84に記載の方法により作製されたヒト化抗体。

【0466】

99. 実施形態85に記載の方法により作製されたヒト化抗体。

30

【0467】

100. 実施形態86に記載の方法により作製されたヒト化抗体。

【0468】

101. 実施形態87に記載の方法により作製されたヒト化抗体。

【0469】

102. 実施形態88に記載の方法により作製されたヒト化抗体。

【0470】

103. 実施形態89に記載の方法により作製されたヒト化抗体。

【0471】

104. 実施形態90に記載の方法により作製されたヒト化抗体。

40

【0472】

105. 実施形態91に記載の方法により作製されたヒト化抗体。

【0473】

106. 実施形態92に記載の方法により作製されたヒト化抗体。

【0474】

107. 実施形態93に記載の方法により作製されたヒト化抗体。

【0475】

108. 実施形態94に記載のヒト化抗体および担体、希釈剤または賦形剤を含有する組成物。

【0476】

50

109. 実施形態95に記載のヒト化抗体および担体、希釈剤または賦形剤を含有する組成物。

【0477】

110. 実施形態96に記載のヒト化抗体および担体、希釈剤または賦形剤を含有する組成物。

【0478】

111. 実施形態97に記載のヒト化抗体および担体、希釈剤または賦形剤を含有する組成物。

【0479】

112. 実施形態98に記載のヒト化抗体および担体、希釈剤または賦形剤を含有する組成物。

10

【0480】

113. 実施形態99に記載のヒト化抗体および担体、希釈剤または賦形剤を含有する組成物。

【0481】

114. 実施形態100に記載のヒト化抗体および担体、希釈剤または賦形剤を含有する組成物。

【0482】

115. 実施形態101に記載のヒト化抗体および担体、希釈剤または賦形剤を含有する組成物。

20

【0483】

116. 実施形態102に記載のヒト化抗体および担体、希釈剤または賦形剤を含有する組成物。

【0484】

117. 実施形態103に記載のヒト化抗体および担体、希釈剤または賦形剤を含有する組成物。

【0485】

118. 実施形態104に記載のヒト化抗体および担体、希釈剤または賦形剤を含有する組成物。

【0486】

119. 実施形態105に記載のヒト化抗体および担体、希釈剤または賦形剤を含有する組成物。

30

【0487】

120. 実施形態106に記載のヒト化抗体および担体、希釈剤または賦形剤を含有する組成物。

【0488】

121. 実施形態107に記載のヒト化抗体および担体、希釈剤または賦形剤を含有する組成物。

【0489】

122. 複数のヒト化重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を含有する細胞の集団であって、前記細胞は、重鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することによりそれぞれ合成された、ヒト化重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を細胞に導入することを含む方法により作製されたものであり、前記CDRはドナー抗体の重鎖可変領域に由来し、少なくとも1つの重鎖フレームワーク領域はヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られるものである、前記細胞の集団。

40

【0490】

123. 複数のヒト化重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を含有す

50

る細胞の集団であって、前記細胞は、重鎖フレームワーク領域 1 をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域 2 をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域 3 をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域 4 をコードする核酸配列を同時に融合することによりそれぞれ合成された、ヒト化重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を細胞に導入することを含む方法により作製されたものであり、少なくとも 1 つの CDR は抗原と免疫特異的に結合するドナー抗体由来の重鎖 CDR のサブバンクから得られ、また、少なくとも 1 つの重鎖フレームワーク領域はヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られるものである、前記細胞の集団。

【0491】

10

124. 複数のヒト化軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を含有する細胞の集団であって、前記細胞は、軽鎖フレームワーク領域 1 をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域 2 をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域 3 をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域 4 をコードする核酸配列を同時に融合することによりそれぞれ合成された、ヒト化軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を細胞に導入することを含む方法により作製されたものであり、前記 CDR はドナー抗体の軽鎖可変領域に由来し、少なくとも 1 つの軽鎖フレームワーク領域はヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られるものである、前記細胞の集団。

【0492】

20

125. 複数のヒト化軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を含有する細胞の集団であって、前記細胞は、軽鎖フレームワーク領域 1 をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域 2 をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域 3 をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域 4 をコードする核酸配列を同時に融合することによりそれぞれ合成された、ヒト化軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を細胞に導入することを含む方法により作製されたものであり、少なくとも 1 つの CDR は抗原と免疫特異的に結合するドナー抗体由来の軽鎖 CDR のサブバンクから得られ、また、少なくとも 1 つの軽鎖フレームワーク領域はヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られるものである、前記細胞の集団。

30

【0493】

126. 前記細胞が軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列をさらに含む、実施形態122に記載の細胞。

【0494】

127. 前記細胞が軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列をさらに含む、実施形態123に記載の細胞。

【0495】

128. 前記細胞が軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列をさらに含む、実施形態124に記載の細胞。

【0496】

40

129. 前記細胞がヒト化軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列をさらに含む、実施形態125に記載の細胞。

【0497】

130. 複数のヒト化重鎖可変領域および複数のヒト化軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を含有する細胞の集団であって、前記細胞は、(i)重鎖フレームワーク領域 1 をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域 2 をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域 3 をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域 4 をコードする核酸配列を同時に融合することによりそれぞれ合成された、ヒト化重鎖可変領域をコードする第 1 セットのヌクレオチド配列、および(ii)軽鎖フレームワーク

50

領域1をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することによりそれぞれ合成された、ヒト化軽鎖可変領域をコードする第2セットのヌクレオチド配列、を含む核酸配列を細胞に導入することを含む方法により作製されたものであり、前記重鎖可変領域CDRはドナー抗体の重鎖可変領域に由来し、前記軽鎖可変領域CDRはドナー抗体の軽鎖可変領域に由来し、少なくとも1つの重鎖フレームワーク領域はヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られ、そして少なくとも1つの軽鎖フレームワーク領域はヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られるものである、前記細胞の集団。

10

【0498】

131. 複数のヒト化重鎖可変領域および複数のヒト化軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を含有する細胞の集団であって、前記細胞は、(i)重鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することによりそれぞれ合成された、ヒト化重鎖可変領域をコードする第1セットのヌクレオチド配列、および(ii)軽鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することによりそれぞれ合成された、ヒト化軽鎖可変領域をコードする第2セットのヌクレオチド配列、を含む核酸配列を細胞に導入することを含む方法により作製されたものであり、少なくとも1つの重鎖可変領域CDRは抗原と免疫特異的に結合するドナー抗体由来の重鎖CDRのサブバンクから得られ、前記軽鎖可変領域CDRはドナー抗体の軽鎖可変領域に由来し、少なくとも1つの重鎖フレームワーク領域はヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られ、そして少なくとも1つの軽鎖フレームワーク領域はヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られるものである、前記細胞の集団。

20

【0499】

132. 複数のヒト化重鎖可変領域および複数のヒト化軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を含有する細胞の集団であって、前記細胞は、(i)重鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することによりそれぞれ合成された、ヒト化重鎖可変領域をコードする第1セットのヌクレオチド配列、および(ii)軽鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することによりそれぞれ合成された、ヒト化軽鎖可変領域をコードする第2セットのヌクレオチド配列、を含む核酸配列を細胞に導入することを含む方法により作製されたものであり、前記重鎖可変領域CDRはドナー抗体の重鎖可変領域に由来し、少なくとも1つの軽鎖可変領域CDRは抗原と免疫特異的に結合するドナー抗体由来の軽鎖CDRのサブバンクから得られ、少なくとも1つの重鎖フレームワーク領域はヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られ、そして少なくとも1つの軽鎖フレームワーク領域はヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られるものである、前記細胞の集団。

30

40

【0500】

133. 複数のヒト化重鎖可変領域および複数のヒト化軽鎖可変領域をコードするヌクレオ

50

チド配列を含む核酸配列を含有する細胞の集団であって、前記細胞は、(i)重鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することによりそれぞれ合成された、ヒト化重鎖可変領域をコードする第1セットのヌクレオチド配列、および(ii)軽鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することによりそれぞれ合成された、ヒト化軽鎖可変領域をコードする第2セットのヌクレオチド配列、を含む核酸配列を細胞に導入することを含む方法により作製されたものであり、少なくとも1つの重鎖可変領域CDRは抗原と免疫特異的に結合するドナー抗体由来の重鎖CDRのサブバンクから得られ、少なくとも1つの軽鎖可変領域CDRは抗原と免疫特異的に結合するドナー抗体由来の軽鎖CDRのサブバンクから得られ、少なくとも1つの重鎖フレームワーク領域はヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られ、そして少なくとも1つの軽鎖フレームワーク領域はヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られるものである、前記細胞の集団。

10

【0501】

134. 抗原と免疫特異的に結合するヒト化抗体を同定する方法であって、実施形態126、127、128または129に記載の細胞中の核酸配列を発現させ、前記抗原に対して $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ 以上の親和性を有するヒト化抗体をスクリーニングすることを含む、前記方法。

20

【0502】

135. 抗原と免疫特異的に結合するヒト化抗体を同定する方法であって、実施形態130、131、132または133に記載の細胞中の核酸配列を発現させ、前記抗原に対して $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ 以上の親和性を有するヒト化抗体をスクリーニングすることを含む、前記方法。

【0503】

136. 抗原と免疫特異的に結合しかつ、ドナー抗体と比較して、結合特性、安定性、融点(T_m)、pI、溶解度、産生レベル または エフェクター機能からなる群より選択される1以上の改善された特性を有するヒト化抗体を同定する方法であって、

(i) 実施形態126、127、128、129、130、131、132または133の細胞において核酸配列を発現させるステップ、

30

(ii) 前記抗原に対して $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ 以上の親和性を有するヒト化抗体をスクリーニングするステップ、

(iii) ドナー抗体と比較して所望の改善された特性を有するヒト化抗体についてスクリーニングするステップ

を含んでなる前記方法。

【0504】

137. 前記改善された特性が結合特性であり、改善がドナー抗体と比較して約1%~500%であるかまたはドナー抗体と比較して約2倍~1000倍である、実施形態136の方法。

【0505】

40

138. 改善された結合特性が抗原に対する抗体の平衡解離定数(K_D)である、実施形態137の方法。

【0506】

139. 前記改善された結合特性が安定性であり、改善がドナー抗体と比較して約2%~500%であるかまたはドナー抗体と比較して約2倍~1000倍である、実施形態136の方法。

【0507】

140. 前記安定性がin vivo安定性またはin vitro安定性である、実施形態139の方法。

【0508】

141. 前記改善された特性が T_m であり、改善がドナー抗体と比較して T_m の約 1°C ~ 20°C の増加である、実施形態136の方法。

50

【0509】

142. 前記改善された特性がpIであり、改善がドナー抗体と比較してpIの約0.5～2.0の増加である、実施形態136の方法。

【0510】

143. 前記改善された特性がpIであり、改善がドナー抗体と比較してpIの約0.5～2.0の減少である、実施形態136の方法。

【0511】

144. 前記改善された特性が産生レベルであり、改善がドナー抗体と比較して約2%～500%であるかまたはドナー抗体と比較して2倍～1000倍である、実施形態136の方法。

【0512】

145. 前記改善された特性がエフェクター機能であり、改善がドナー抗体と比較して約2%～500%であるかまたはドナー抗体と比較して2倍～1000倍である、実施形態136の方法。

【0513】

146. 前記エフェクターがADCCである、実施形態145の方法。

【0514】

147. 前記エフェクターがCDCである、実施形態145の方法。

【0515】

148. 実施形態134の方法により同定されたヒト化抗体。

【0516】

149. 実施形態135の方法により同定されたヒト化抗体。

【0517】

150. 実施形態136の方法により同定されたヒト化抗体。

【0518】

151. 実施形態137の方法により同定されたヒト化抗体。

【0519】

152. 実施形態138の方法により同定されたヒト化抗体。

【0520】

153. 実施形態139の方法により同定されたヒト化抗体。

【0521】

154. 実施形態140の方法により同定されたヒト化抗体。

【0522】

155. 実施形態141の方法により同定されたヒト化抗体。

【0523】

156. 実施形態142の方法により同定されたヒト化抗体。

【0524】

157. 実施形態143の方法により同定されたヒト化抗体。

【0525】

158. 実施形態144の方法により同定されたヒト化抗体。

【0526】

159. 実施形態146の方法により同定されたヒト化抗体。

【0527】

160. 実施形態147の方法により同定されたヒト化抗体。

【0528】

161. 実施形態148のヒト化抗体、および担体、希釈剤または賦形剤を含む組成物。

【0529】

162. 実施形態149のヒト化抗体、および担体、希釈剤または賦形剤を含む組成物。

【0530】

163. 実施形態150のヒト化抗体、および担体、希釈剤または賦形剤を含む組成物。

【0531】

164. 実施形態151～160のいずれか1つのヒト化抗体、および担体、希釈剤または賦形剤を

10

20

30

40

50

含む組成物。

【0532】

165. 抗原と免疫特異的に結合するドナー抗体の1以上の特性を改善する方法であって、
(a) 改変された重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む第1の核酸配列を合成するステップであって、前記ヌクレオチド配列は重鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより作製され、少なくとも1つのCDRは前記抗原と免疫特異的に結合する前記ドナー抗体重鎖可変領域由来でありかつ少なくとも1つの重鎖フレームワーク領域はヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンク由来である前記ステップ；

10

(b) 前記第1の核酸配列を細胞中に導入しかつドナー軽鎖可変領域およびヒト化軽鎖可変領域からなる群より選択される軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む第2の核酸配列を該細胞中に導入するステップ；

(c) 改変された重鎖可変領域および軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を発現させるステップ；

(d) 抗原と免疫特異的に結合する改変された抗体をスクリーニングするステップ； および
(e) 平衡解離定数 (K_D) ; 安定性 ; 融点 (T_m) ; pI ; 溶解度 ; 産生レベル ; およびエフェクター機能からなる群より選択される1以上の改善された特性を有する改変された抗体をスクリーニングするステップであって、改善がドナー抗体と比較して約1%~500%であるかまたはドナー抗体と比較して2倍~1000倍であるステップ
を含んでなる前記方法。

20

【0533】

166. 抗原と免疫特異的に結合するドナー抗体の1以上の特性を改善する方法であって、
(a) 改変された軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む第1の核酸配列を合成するステップであって、前記第1のヌクレオチド配列は軽鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより作製され、少なくとも1つのCDRは前記抗原と免疫特異的に結合する前記ドナー抗体軽鎖可変領域由来でありかつ少なくとも1つの軽鎖フレームワーク領域はヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンク由来である前記ステップ；

30

(b) 前記第1の核酸配列を細胞中に導入しかつドナー重鎖可変領域およびヒト化重鎖可変領域からなる群より選択される重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む第2の核酸配列を該細胞中に導入するステップ；

(c) 改変された重鎖可変領域および軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を発現させるステップ；

(d) 抗原と免疫特異的に結合する改変された抗体をスクリーニングするステップ； および
(e) 平衡解離定数 (K_D) ; 安定性 ; 融点 (T_m) ; pI ; 溶解度 ; 産生レベル ; およびエフェクター機能からなる群より選択される1以上の改善された特性を有する改変された抗体をスクリーニングするステップであって、前記改善がドナー抗体と比較して約1%~500%であるかまたはドナー抗体と比較して2倍~1000倍であるステップ
を含んでなる前記方法。

40

【0534】

167. 抗原と免疫特異的に結合するドナー抗体の1以上の特性を改善する方法であって、
(a) 改変された重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を合成するステップであって、前記ヌクレオチド配列は重鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時

50

に融合することにより作製され、少なくとも1つのCDRは前記抗原と免疫特異的に結合する前記ドナー抗体重鎖可変領域由来でありかつ少なくとも1つの重鎖フレームワーク領域はヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンク由来である前記ステップ；

(b) 改変された軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を合成するステップであって、前記ヌクレオチド配列は軽鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、およびa軽鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより作製され、少なくとも1つのCDRは前記抗原と免疫特異的に結合するドナー抗体軽鎖可変領域由来でありかつ少なくとも1つの軽鎖フレームワーク領域はヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンク由来である前記ステップ

10

(c) ステップ(a)および(b)で作製した核酸配列を細胞中に導入するステップ；

(d) 改変された重鎖可変領域および改変された軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を発現させるステップ；

(e) 抗原と免疫特異的に結合する改変された抗体をスクリーニングするステップ； および
(f) 平衡解離定数 (K_D) ；安定性；融点 (T_m) ；pI；溶解度；産生レベル；およびエフェクター機能からなる群より選択される1以上の改善された特性を有する改変された抗体をスクリーニングするステップであって、改善がドナー抗体と比較して約1%～500%であるかまたはドナー抗体と比較して2倍～1000倍であるステップ

を含んでなる前記方法。

20

【0535】

168. 改善された結合特性が抗原に対する抗体の平衡解離定数 (K_D) である、実施形態165、166または167の方法。

【0536】

169. 前記改善された特性が安定性であり、改善がドナー抗体と比較して約2%～500%であるかまたはドナー抗体と比較して2倍～1000倍である、実施形態165、166または167の方法。

【0537】

170. 前記安定性がin vivo安定性またはin vitro安定性である、実施形態169の方法。

【0538】

171. 前記改善された特性が T_m であり、改善がドナー抗体と比較して T_m の約1℃～20℃の増加である、実施形態165、166または167の方法。

【0539】

172. 前記改善された特性がpIであり、改善がドナー抗体と比較してpIの約0.5～2.0の増加である、実施形態165、166または167の方法。

【0540】

173. 前記改善された特性がpIであり、改善がドナー抗体と比較してpIの約0.5～2.0の減少である、実施形態165、166または167の方法。

【0541】

174. 前記改善された特性が産生レベルであり、改善がドナー抗体と比較して約2%～500%であるかまたはドナー抗体と比較して2倍～1000倍である、実施形態165、166または167の方法。

40

【0542】

175. 前記改善された特性がエフェクター機能であり、改善がドナー抗体と比較して約2%～500%であるかまたはドナー抗体と比較して2倍～1000倍である、実施形態165、166または167の方法。

【0543】

176. 前記エフェクターがADCCである、実施形態175の方法。

【0544】

177. 前記エフェクターがCDCである、実施形態175の方法。

50

【0545】

178. 抗原と免疫特異的に結合するドナー抗体の結合親和性を改善する方法であって、
(a) 改変された重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む第1の核酸配列を合成するステップであって、前記ヌクレオチド配列は重鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより作製され、少なくとも1つのCDRは前記抗原と免疫特異的に結合する前記ドナー抗体重鎖可変領域由来でありかつ少なくとも1つの重鎖フレームワーク領域はヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンク由来である前記ステップ；
(b) 前記第1の核酸配列を細胞中に導入しかつドナー軽鎖可変領域およびヒト化軽鎖可変領域からなる群より選択される軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む第2の核酸配列を該細胞中に導入するステップ；
(c) 改変された重鎖可変領域および軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を発現させるステップ；
(d) 抗原と免疫特異的に結合する改変された抗体をスクリーニングするステップ； および
(e) 改善された結合特性を有する改変された抗体をスクリーニングするステップであって、改善がドナー抗体と比較して約1%~500%であるかまたはドナー抗体と比較して2倍~1000倍であるステップ
を含んでなる前記方法。

10

20

【0546】

179. 抗原と免疫特異的に結合するドナー抗体の結合親和性を改善する方法であって、
(a) 改変された軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む第1の核酸配列を合成するステップであって、前記ヌクレオチド配列は軽鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより作製され、少なくとも1つのCDRは前記抗原と免疫特異的に結合する前記ドナー抗体軽鎖可変領域由来でありかつ少なくとも1つの軽鎖フレームワーク領域はヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンク由来である前記ステップ；
(b) 前記第1の核酸配列を細胞中に導入しかつ前記ドナー重鎖可変領域およびヒト化重鎖可変領域からなる群より選択される重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む第2の核酸配列を該細胞中に導入するステップ；
(c) 改変された重鎖可変領域および軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を発現させるステップ；
(d) 抗原と免疫特異的に結合する改変された抗体をスクリーニングするステップ； および
(e) 改善された結合特性を有する改変された抗体をスクリーニングするステップであって、改善がドナー抗体と比較して約1%~500%であるかまたはドナー抗体と比較して2倍~1000倍であるステップ
を含んでなる前記方法。

30

40

【0547】

180. 抗原と免疫特異的に結合するドナー抗体の結合親和性を改善する方法であって、
(a) 改変された重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を合成するステップであって、前記ヌクレオチド配列は重鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより作製され、少なくとも1つのCDRは前記抗原と免疫特異的に結合するドナー抗体重鎖可変領域由来でありかつ少なくとも1つの重鎖フレームワーク領域はヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンク由来である前記ステップ；

50

(b) 改変された軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を合成するステップであって、前記ヌクレオチド配列は軽鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、およびa軽鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより作製され、少なくとも1つのCDRは前記抗原と免疫特異的に結合する前記ドナー抗体軽鎖可変領域由来でありかつ少なくとも1つの軽鎖フレームワーク領域はヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンク由来である前記ステップ

(c) ステップ(a)および(b)で作製した核酸配列を細胞中に導入するステップ；

(d) 改変された重鎖可変領域および改変された軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を発現させるステップ；

(e) 抗原と免疫特異的に結合する改変された抗体をスクリーニングするステップ； および
(f) 改善された結合特性を有する改変された抗体をスクリーニングするステップであって、改善がドナー抗体と比較して約1%～500%であるかまたはドナー抗体と比較して2倍～1000倍であるステップ

を含んでなる前記方法。

【0548】

181. 前記結合特性が抗原に対する抗体の平衡解離定数 (K_D) である、実施形態178、179または180の方法。

【0549】

182. 実施形態165～181のいずれか1つの方法により作製された抗体。

【0550】

183. 平衡解離定数 (K_D) ; 安定性、融点 (T_m) ; pI、溶解度；産生レベルおよびエフェクター機能からなる群より選択される1以上の改善された特性を有する、抗原と免疫特異的に結合する改変された抗体であって：改変された重鎖可変領域をコードする第1のヌクレオチド配列（重鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより作製され、少なくとも1つのCDRは免疫特異的に前記抗原と結合するドナー抗体重鎖可変領域由来でありかつ少なくとも1つの重鎖フレームワーク領域はヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンク由来である）および軽鎖可変領域をコードする第2のヌクレオチド配列を含んでなるヌクレオチド配列によりコードされ、改善がドナー抗体と比較して約1%～500%であるかまたはドナー抗体と比較して2倍～1000倍である前記抗体。

【0551】

184. 第2のヌクレオチド配列がドナー軽鎖可変領域、ヒト化軽鎖可変領域および改変された軽鎖可変領域からなる群より選択される軽鎖可変領域をコードする、実施形態183の改変された抗体。

【0552】

185. 平衡解離定数 (K_D) ; 安定性、融点 (T_m) ; pI、溶解度；産生レベルおよびエフェクター機能からなる群より選択される1以上の改善された特性を有する、抗原と免疫特異的に結合する改変された抗体であって：改変された軽鎖可変領域をコードする第1のヌクレオチド配列（軽鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより作製され、少なくとも1つのCDRは免疫特異的に前記抗原と結合するドナー抗体軽鎖可変領域由来でありかつ少なくとも1つの軽鎖フレームワーク領域はヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンク由来である）および重鎖可変領域をコードする第2のヌクレオチド配列を含んでなるヌクレオチド配列によりコードされ、改善がドナー抗体と比較して約1%～500%

10

20

30

40

50

であるかまたはドナー抗体と比較して2倍～1000倍である前記抗体。

【0553】

186. 第2のヌクレオチド配列がドナー重鎖可変領域、ヒト化重鎖可変領域および改変された重鎖可変領域からなる群より選択される重鎖可変領域をコードする、実施形態185の改変された抗体。

【0554】

187. 平衡解離定数 (K_D) ; 安定性、融点 (T_m) ; pI、溶解度 ; 産生レベルおよびエフェクター機能からなる群より選択される1以上の改善された特性を有する、抗原と免疫特異的に結合する改変された抗体であって :

(a) 改変された重鎖可変領域をコードする第1のヌクレオチド配列 (重鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより作製され、少なくとも1つのCDRは免疫特異的に前記抗原と結合するドナー抗体重鎖可変領域由来でありかつ少なくとも1つの重鎖フレームワーク領域はヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンク由来である) ; および

(b) 改変された軽鎖可変領域をコードする第2のヌクレオチド配列 (軽鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより作製され、少なくとも1つのCDRは免疫特異的に前記抗原と結合するドナー抗体軽鎖可変領域由来でありかつ少なくとも1つの軽鎖フレームワーク領域はヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンク由来である) を含んでなるヌクレオチド配列によりコードされ、改善がドナー抗体と比較して約1%～500%であるかまたはドナー抗体と比較して2倍～1000倍である前記抗体。

【0555】

188. 前記改善された特性が結合親和性である、実施形態183、184、185、186または187の改変された抗体。

【0556】

189. 改善された結合特性が抗原に対する抗体の平衡解離定数 (K_D) である、実施形態183の改変された抗体。

【0557】

190. 前記改善された特性が安定性である、実施形態183、184、185、186または187の改変された抗体。

【0558】

191. 前記安定性がin vivo安定性またはin vitro安定性である、実施形態190の改変された抗体。

【0559】

192. 前記改善された特性が T_m であり、改善はドナー抗体と比較して約1℃～20℃の T_m の増加である、実施形態183、184、185、186または187の改変された抗体。

【0560】

193. 前記改善された特性がpIであり、改善はドナー抗体と比較して約0.5～2.0のpIの増加である、実施形態183、184、185、186または187の改変された抗体。

【0561】

194. 前記改善された特性がpIであり、改善はドナー抗体と比較して約0.5～2.0のpIの減少である、実施形態183、184、185、186または187の改変された抗体。

【0562】

195. 前記改善された特性が産生レベルである、実施形態183、184、185、186または187の改変された抗体。

【0563】

196. 前記改善された特性がエフェクター機能である、実施形態183、184、185、186または187の改変された抗体。

【0564】

197. 前記エフェクター機能がADCCである実施形態196の方法。

【0565】

198. 前記エフェクター機能がCDCである実施形態196の方法。

【0566】

199. 抗原と免疫特異的に結合する改変された抗体であって、改変された重鎖可変領域をコードする第1のヌクレオチド配列（重鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより作製され、少なくとも1つのCDRは免疫特異的に前記抗原と結合するドナー抗体重鎖可変領域由来でありかつ少なくとも1つの重鎖フレームワーク領域は重鎖フレームワーク領域のサブバンク由来である）および軽鎖可変領域をコードする第2のヌクレオチド配列を含んでなるヌクレオチド配列によりコードされた前記抗体。

10

【0567】

200. 抗原と免疫特異的に結合する改変された抗体であって：改変された軽鎖可変領域をコードする第1のヌクレオチド配列（軽鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより作製され、少なくとも1つのCDRは免疫特異的に前記抗原と結合するドナー抗体軽鎖可変領域由来でありかつ少なくとも1つの軽鎖フレームワーク領域は軽鎖フレームワーク領域のサブバンク由来である）および重鎖可変領域をコードする第2のヌクレオチド配列を含んでなるヌクレオチド配列によりコードされた前記抗体。

20

【0568】

201. 抗原と免疫特異的に結合する改変された抗体であって、改変された重鎖可変領域をコードする第1のヌクレオチド配列（重鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより作製され、少なくとも1つのCDRは免疫特異的に前記抗原と結合するドナー抗体重鎖可変領域由来でありかつ少なくとも1つの重鎖フレームワーク領域は重鎖フレームワーク領域のサブバンク由来である）、および改変された軽鎖可変領域をコードする第2のヌクレオチド配列（軽鎖フレームワーク領域1をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域2をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域3をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域4をコードする核酸配列を同時に融合することにより作製され、少なくとも1つのCDRは免疫特異的に前記抗原と結合するドナー抗体軽鎖可変領域由来でありかつ少なくとも1つの軽鎖フレームワーク領域は軽鎖フレームワーク領域のサブバンク由来である）を含んでなるヌクレオチド配列によりコードされた前記抗体。

30

40

【0569】

202. 前記ドナー抗体はヒトでなくかつ少なくとも1つのフレームワーク領域のサブバンクはヒトのフレームワーク領域のサブバンクである、実施形態199、200または201の改変された抗体。

【0570】

203. ヒトのフレームワーク領域のサブバンク由来の少なくとも1つのフレームワーク領域は、対応するドナー抗体のフレームワークに対して60%未満、または70%未満、または80

50

%未満、または90%未満の相同性を有する、実施形態202の改変された抗体。

【0571】

204. 改変された抗体はドナー抗体と比較して同じかまたは改善された親和性で抗原と結合する、実施形態199、200、201、202または203のいずれかの改変された抗体。

【実施例】

【0572】

6. 実施例 1

試薬

全ての化学薬品は分析グレードのものを使用した。制限酵素とDNA改変酵素はNew England Biolabs, Inc. (Beverly, MA) から購入した。pfu DNAポリメラーゼとオリゴヌクレオチドはInvitrogen (Carlsbad, CA) から購入した。ヒトEphA2-Fc融合タンパク質 (ヒトIgG1のFc部分と融合されたヒトEphA2からなる; Carles-Kinchら Cancer Res. 62: 2840-2847 (2002)) はヒト胚性腎 (HEK) 293細胞において発現させ、標準的なプロトコルを用いてプロテインGアフィニティクロマトグラフィーにより精製した。ストレプトアビジン磁性ビーズはDynal (Lake Success, NY) から購入した。ヒトEphA2-Fcのビオチン化は、EZ-Link Sulfo-NHS-LC-ビオチン化キット (Pierce, Rockford, IL) を用いて製造業者の使用説明書に従って実施した。

【0573】

6.1 親モノクローナル抗体のクローニングおよび配列決定

ヒト受容体チロシンキナーゼEphA2に対するモノクローナル抗体(mAb)を分泌するマウスハイブリドーマ細胞株(B233)をMedImmune, Inc.から取得した (Kinchら Clin. Exp. Metastasis. 20:59-68 (2003))。このマウスmAbを以後mAb B233という。mAb B233の可変重鎖(V_H)および軽鎖(V_L)遺伝子のクローニングおよび配列決定は、B233由来のメッセンジャーRNAをStraight A's mRNA精製キット (Novagen, Madison, WI) を用いて製造業者の使用説明書に従って単離・精製した後で実施した。cDNAは第1鎖cDNA合成キット (Novagen, Madison, WI) を用いて製造業者が推奨するとおりに合成した。V_HおよびV_L遺伝子の増幅は、マウスIg-プライマーセット (Novagen, Madison, WI) からのIgG V_HおよびIgκ V_Lオリゴヌクレオチドを用いて製造業者が提案するとおりに実施した。産生増幅より得られるDNA断片は、Perfectly Bluntクローニングキット (Novagen, Madison, WI) を用いてpSTBlue-1にクローニングした。その後、ジデオキシシチエンターミネーション法 (Sangerら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74: 5463-5467 (1977)) により、ABI3000シーケンサー (Applied Biosystems, Foster City, CA) を使って、多数のV_HおよびV_Lクローンの配列決定を行った。mAb B233 V_L (V_L-233) およびV_H (V_H-233) 遺伝子のコンセンサス配列を図1に示す。

【0574】

6.2 ヒトフレームワークの選択

ヒトフレームワーク遺伝子は公的に利用可能な抗体生殖系列遺伝子のプールから選択した。さらに詳しく述べると、これは、第1、第2および第3フレームワークについては46のヒト生殖系列κ鎖遺伝子 (A1、A10、A11、A14、A17、A18、A19、A2、A20、A23、A26、A27、A3、A30、A5、A7、B2、B3、L1、L10、L11、L12、L14、L15、L16、L18、L19、L2、L20、L22、L23、L24、L25、L4/18a、L5、L6、L8、L9、O1、O11、O12、O14、O18、O2、O4およびO8; K.F. Schableら, Biol. Chem. Hoppe Seyler 374:1001-1022, (1993); J. Brensing-Kuppersら, Gene 191:173-181 (1997)) を含み、第4フレームワークについては5つのヒト生殖系列J配列 (Jκ1、Jκ2、Jκ3、Jκ4およびJκ5; P.A. Hieterら, J. Biol. Chem. 257:1516-1522 (1982)) を含んでいた。このライブラリーの重鎖部分は、第1、第2および第3フレームワークについては44のヒト生殖系列重鎖配列 (VH1-18、VH1-2、VH1-24、VH1-3、VH1-45、VH1-46、VH1-58、VH1-69、VH1-8、VH2-26、VH2-5、VH2-70、VH3-11、VH3-13、VH3-15、VH3-16、VH3-20、VH3-21、VH3-23、VH3-30、VH3-33、VH3-35、VH3-38、VH3-43、VH3-48、VH3-49、VH3-53、VH3-64、VH3-66、VH3-7、VH3-72、VH3-73、VH3-74、VH3-9、VH4-28、VH4-31、VH4-34、VH4-39、VH4-4、VH4-59、VH4-61、VH5-51、VH6-1およびVH7-

8; F. Matsudaら, J. Exp. Med. 188:1973-1975 (1998)) を含み、第4フレームワークについては6つのヒト生殖系列J配列 (JH1、JH2、JH3、JH4、JH5およびJH6; J.V. Ravetchら, Cell 27(3 Pt 2): 583-591 (1981)) を含んでいた。

【0575】

6.3 フレームワークシャッフルしたライブラリーの構築

6.3.1 ライブラリーの説明

3つの主なフレームワークシャッフルしたライブラリー (ライブラリーA、BおよびC) を構築した。ライブラリーAは、mAb B233の重鎖(V_H -233)と対合させた軽鎖フレームワークシャッフルしたサブライブラリー(V_L sub1)を含んでいた。ライブラリーBは、固定化したフレームワークシャッフルした軽鎖 V_L -12C8および V_L -8G7と対合させた重鎖フレームワークシャッフルしたサブライブラリー(V_H sub1)を含んでいた (6.4.1.1節、6.4.1.2節および6.4.1.3節を参照のこと)。ライブラリーCは、重鎖フレームワークシャッフルしたサブライブラリー(V_H sub2)と対合させた軽鎖フレームワークシャッフルしたサブライブラリー(V_L sub2)を含んでいた。

10

【0576】

フレームワークシャッフルした V_H および V_L サブライブラリーの構築は、表1～7および11に示したオリゴヌクレオチドを用いて行った。さらに詳しく述べると、表1～7および11に記載したオリゴヌクレオチドは、Kabat定義による軽鎖(κ)および重鎖のあらゆる公知のヒトフレームワーク生殖系列遺伝子の完全な配列をコードしている。表64および65に記載したオリゴヌクレオチドは、mAb B233のCDRの部分にコードしており、対応するヒト生殖系列フレームワークと重複している。表64に関しては、AL1～13とDL1U～4Uを除いて、各オリゴヌクレオチドは、mAb B233の1つのCDRの部分 (下線) と1つのヒト生殖系列軽鎖フレームワークの部分 (Kabat定義; Kabatら, Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Public Health Service, National Institutes of Health, Washington, DC, 1991) をコードしている。CDRL1、L2およびL3はそれぞれAL1U～10U/BL1～10、BL1U～16U/CL1～11およびCL1U～12U/DL1～4によってコードされる。オリゴヌクレオチドAL1～13はM13遺伝子3リーダー重複配列 (太字) を含み、オリゴヌクレオチドDL1U～4UはC κ 重複配列 (太字) を含む。表65に関しては、AH1～10およびDH1U～3Uを除いて、各オリゴヌクレオチドは、mAb B233の1つのCDRの部分 (下線) と1つのヒト生殖系列重鎖フレームワークの部分 (Kabat定義) をコードしている。CDRH1、H2およびH3はそれぞれAH1U～17U/BH1～17、BH1U～16U/CH1～15およびCH1U～13U/DH1～3によってコードされる。オリゴヌクレオチドAH1～10はM13遺伝子3リーダー重複配列 (太字) を含み、一方オリゴヌクレオチドDH1U～3UはC κ 1重複配列 (太字) を含む。(K=GまたはT、M=AまたはC、R=AまたはG、S=CまたはG、W=AまたはT、およびY=CまたはT)。

20

30

【表 6 4】

表 6 4 mAb B233 軽鎖 CDR のヒト生殖系列軽鎖フレームワークとの融合に用いたオリゴヌクレオチド

1589	AL1 5'-GGTCGTTCCATTTTACTCCCCTCCGATGTTGTGATGACWCAGTCT-3'
1590	AL2 5'-GGTCGTTCCATTTTACTCCCCTCCGACATCCAGATGAYCCAGTCT-3'
1591	AL3 5'-GGTCGTTCCATTTTACTCCCCTCCGCCATCCAGWTGACCCAGTCT-3'
1592	AL4 5'-GGTCGTTCCATTTTACTCCCCTCCGAAATAGTGATGAYGCAGTCT-3'
1593	AL5 5'-GGTCGTTCCATTTTACTCCCCTCCGAAATGTGTTGACRCAGTCT-3'
1594	AL6 5'-GGTCGTTCCATTTTACTCCCCTCCGAKATTGTGATGACCCAGACT-3'
1595	AL7 5'-GGTCGTTCCATTTTACTCCCCTCCGAAATGTRMTGACWCAGTCT-3'
1596	AL8 5'-GGTCGTTCCATTTTACTCCCCTCCGAYATYGTGATGACYCAGTCT-3'
1597	AL9 5'-GGTCGTTCCATTTTACTCCCCTCCGAAACGACACTCACGCAGTCT-3'
1598	AL10 5'-GGTCGTTCCATTTTACTCCCCTCCGACATCCAGTTGACCCAGTCT-3'
1599	AL11 5'-GGTCGTTCCATTTTACTCCCCTCCAACATCCAGATGACCCAGTCT-3'
1600	AL12 5'-GGTCGTTCCATTTTACTCCCCTCCGCCATCCGATGACCCAGTCT-3'
1601	AL13 5'-GGTCGTTCCATTTTACTCCCCTCCGTCATCTGGATGACCCAGTCT-3'
1602	AL1Ü 5'-TAATACTTTGGCTGGCCCTGCAGGAGATGGAGGCCGGC-3'
1603	AL2Ü 5'-TAATACTTTGGCTGGCCCTGCAGGAGAGGGTGRCTCTTTC-3'
1604	AL3Ü 5'-TAATACTTTGGCTGGCCCTACAATGATGGTGACTCTGTC-3'
1605	AL4Ü 5'-TAATACTTTGGCTGGCCCTGAAGGAGATGGAGGCCGGCTG-3'
1606	AL5Ü 5'-TAATACTTTGGCTGGCCCTGCAGGAGATGGAGGCCGTGCTC-3'
1607	AL6Ü 5'-TAATACTTTGGCTGGCCCTGCAGGAGATGTTGACTTTGTC-3'
1608	AL7Ü 5'-TAATACTTTGGCTGGCCCTGCAGGTGATGGTGACTTTCTC-3'
1609	AL8Ü 5'-TAATACTTTGGCTGGCCCTGCAGTTGATGGTGGCCCTCTC-3'
1610	AL9Ü 5'-TAATACTTTGGCTGGCCCTGCAAGTGATGGTGACTCTGTC-3'
1611	AL10Ü 5'-TAATACTTTGGCTGGCCCTGCAATGATACTGACTCTGTC-3'
1612	BL1 5'-CCAGCCAAAGTATTAGCAACAACCTACACTGGYTTGAGCAGAGGCCAGGC-3'
1613	BL2 5'-CCAGCCAAAGTATTAGCAACAACCTACACTGGTACCTGCAGAAGCCAGGS-3'
1614	BL3 5'-CCAGCCAAAGTATTAGCAACAACCTACACTGGTATCRGCAGAAACCAGGG-3'
1615	BL4 5'-CCAGCCAAAGTATTAGCAACAACCTACACTGGTACCARCAGAAACCAGGA-3'
1616	BL5 5'-CCAGCCAAAGTATTAGCAACAACCTACACTGGTACCARCAGAAACCTGGC-3'
1617	BL6 5'-CCAGCCAAAGTATTAGCAACAACCTACACTGGTAYCWGAGAAACCCWGG-3'
1618	BL7 5'-CCAGCCAAAGTATTAGCAACAACCTACACTGGTATCAGCARAAACCCWGS-3'
1619	BL8 5'-CCAGCCAAAGTATTAGCAACAACCTACACTGGTAYCAGCARAAACCCAG-3'
1620	BL9 5'-CCAGCCAAAGTATTAGCAACAACCTACACTGGTTTCTGCAGAAAGCCAGG-3'
1621	BL10 5'-CCAGCCAAAGTATTAGCAACAACCTACACTGGTTTCAGCAGAAACCCAGG-3'
1622	BL1Ü 5'-GATGGACTGGAAAACATAATAGATCAGGAGCTGTGGAG-3'
1623	BL2Ü 5'-GATGGACTGGAAAACATAATAGATCAGGAGCTTAGGRGC-3'
1624	BL3Ü 5'-GATGGACTGGAAAACATAATAGATGAGGAGCCTGGGMGC-3'
1625	BL4Ü 5'-GATGGACTGGAAAACATAATAGATCAGGMGCTTAGGGGC-3'
1626	BL5Ü 5'-GATGGACTGGAAAACATAATAGATCAGGWGCTTAGGRAC-3'
1627	BL6Ü 5'-GATGGACTGGAAAACATAATAGATGAGAGCTTAGGGGC-3'
1628	BL7Ü 5'-GATGGACTGGAAAACATAATAAATTAGGAGCTTTGGAGG-3'
1629	BL8Ü 5'-GATGGACTGGAAAACATAAGTAATGAGCAGCTTAGGAGG-3'
1630	BL9Ü 5'-GATGGACTGGAAAACATAATAGATCAGGAGTGTGGAGAC-3'
1631	BL10Ü 5'-GATGGACTGGAAAACATAATAGATCAGGAGCTCAGGGGC-3'
1632	BL11Ü 5'-GATGGACTGGAAAACATAATAGATCAGGGACTTAGGGGC-3'
1633	BL12Ü 5'-GATGGACTGGAAAACATAATAGAGGAAGAGCTTAGGGGA-3'
1634	BL13Ü 5'-GATGGACTGGAAAACATACTTGATGAGGAGCTTTGGAGA-3'
1635	BL14Ü 5'-GATGGACTGGAAAACATAATAAATTAGCGCCTTTGGAGA-3'
1636	BL15Ü 5'-GATGGACTGGAAAACATACTTGATGAGGAGCTTTGGGGC-3'
1637	BL16Ü 5'-GATGGACTGGAAAACATAATTGAATAATGAAAATAGCAGC-3'
1638	CL1 5'-GTTTTCCAGTCCATCTCTGGGGTCCCAGACAGATTCAGY-3'
1639	CL2 5'-GTTTTCCAGTCCATCTCTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGY-3'
1744	CL3 5'-GTTTTCCAGTCCATCTCTGGYATCCCAGCCAGGTTTCAGT-3'
1745	CL4 5'-GTTTTCCAGTCCATCTCTGGRGTCCWGCAGGTTTCAGT-3'
1746	CL5 5'-GTTTTCCAGTCCATCTCTAGCATCCCAGCCAGGTTTCAGT-3'
1747	CL6 5'-GTTTTCCAGTCCATCTCTGGGGTCCCCTCGAGGTTTCAGT-3'
1748	CL7 5'-GTTTTCCAGTCCATCTCTGGAATCCCACCTCGATTTCAGT-3'
1749	CL8 5'-GTTTTCCAGTCCATCTCTGGGGTCCCTGACCGATTTCAGT-3'
1750	CL9 5'-GTTTTCCAGTCCATCTCTGGCATCCCAGACAGGTTTCAGT-3'
1751	CL10 5'-GTTTTCCAGTCCATCTCTGGGGTCTCATCGAGGTTTCAGT-3'
1752	CL11 5'-GTTTTCCAGTCCATCTCTGGAGTGCCAGATAGGTTTCAGT-3'
1753	CL1Ü 5'-CCAGCTGTTACTCTGTTGRCAGTAATAAACCCCAACATC-3'
1754	CL2Ü 5'-CCAGCTGTTACTCTGTTGACAGTAATAYGTTGCAGCATC-3'
1755	CL3Ü 5'-CCAGCTGTTACTCTGTTGACMGTAATAAGTTGCAACATC-3'
1756	CL4Ü 5'-CCAGCTGTTACTCTGTTGRCAGTAATAAGTTGCAAAATC-3'

10

20

30

40

1757 CL5Ü 5' -CCAGCTGTTACTCTGTTGACAGTAATAARCTGCAAAATC-3'
1758 CL6Ü 5' -CCAGCTGTTACTCTGTTGACARTAGTAAGTTGCAAAATC-3'
1759 CL7Ü 5' -CCAGCTGTTACTCTGTTGGCAGTAATAAACTCCAAMATC-3'
1760 CL8Ü 5' -CCAGCTGTTACTCTGTTGGCAGTAATAACCCCGACATC-3'
1761 CL9Ü 5' -CCAGCTGTTACTCTGTTGACAGAAGTAATATGCAGCATC-3'
1762 CL10Ü 5' -CCAGCTGTTACTCTGTTGACAGTAATATGTTGCAATATC-3'
1763 CL11Ü 5' -CCAGCTGTTACTCTGTTGACAGTAATACTGCAAAATC-3'
1764 CL12Ü 5' -CCAGCTGTTACTCTGTTGACAGTAATAAACTGCCACATC-3'
1765 DL1 5' -CAGAGTAACAGCTGGCCGCTCACGTTYGGCCARGGGACCAAGSTG-3'
1766 DL2 5' -CAGAGTAACAGCTGGCCGCTCACGTTCCGCCAAGGGACACGACTG-3'
1767 DL3 5' -CAGAGTAACAGCTGGCCGCTCACGTTCCGCCCTGGGACCAAAGTG-3'
1768 DL4 5' -CAGAGTAACAGCTGGCCGCTCACGTTCCGCCGAGGGACCAAGGTG-3'
1769 DL1Ü 5' -GATGAAGACAGATGGTGCAGCCACAGTACGTTTGATYTCCACCTTGG-3'
1770 DL2Ü 5' -GATGAAGACAGATGGTGCAGCCACAGTACGTTTGATCTCCAGCTTGG-3'
1771 DL3Ü 5' -GATGAAGACAGATGGTGCAGCCACAGTACGTTTGATATCCACTTTGG-3'
1772 DL4Ü 5' -GATGAAGACAGATGGTGCAGCCACAGTACGTTTAATCTCCAGTCGTG-3'

【表 6 5】

表 6 5 mAb B233 重鎖 CDR のヒト生殖系列重鎖フレームワークとの融合に用いたオリゴヌクレオチド

1640	AH1 5'-GCTGGTGGTGCCGTTCTATAGCCATAGCCAGGTCAGCTGGTGCAGTCT-3'	
1641	AH2 5'-GCTGGTGGTGCCGTTCTATAGCCATAGCCAGGTCAGCTGKTGGAGTCT-3'	
1642	AH3 5'-GCTGGTGGTGCCGTTCTATAGCCATAGCCAGSTGCAGCTGCAGGAGTCT-3'	
1643	AH4 5'-GCTGGTGGTGCCGTTCTATAGCCATAGCCAGGTCACCTTGARGGAGTCT-3'	
1644	AH5 5'-GCTGGTGGTGCCGTTCTATAGCCATAGCCARATGCAGCTGGTGCAGTCT-3'	
1645	AH6 5'-GCTGGTGGTGCCGTTCTATAGCCATAGCCGARGTGCAGCTGGTGSAGTCT-3'	
1646	AH7 5'-GCTGGTGGTGCCGTTCTATAGCCATAGCCAGATCACCTTGAGGAGTCT-3'	
1647	AH8 5'-GCTGGTGGTGCCGTTCTATAGCCATAGCCAGGTSAGCTGGTGSAGTCT-3'	
1648	AH9 5'-GCTGGTGGTGCCGTTCTATAGCCATAGCCAGGTACAGCTGCAGCAGTCA-3'	
1649	AH10 5'-GCTGGTGGTGCCGTTCTATAGCCATAGCCAGGTACAGCTACAGCAGTGG-3'	
1650	AH1Ü 5'-GTTTCATGGAGTAATCRGTGAAGGTGTATCCAGAAGC-3'	
1651	AH2Ü 5'-GTTTCATGGAGTAATCGCTGAGTGAGAACCAGAGAM-3'	
1652	AH3Ü 5'-GTTTCATGGAGTAATCACTGAARGTGAATCCAGAGGC-3'	
1653	AH4Ü 5'-GTTTCATGGAGTAATCACTGACGGTGAAYCCAGAGGC-3'	
1654	AH5Ü 5'-GTTTCATGGAGTAATCGCTGAYGGAGCCACCAGAGAC-3'	
1655	AH6Ü 5'-GTTTCATGGAGTAATCRGTAAAGGTGWAWCCAGAAGC-3'	
1656	AH7Ü 5'-GTTTCATGGAGTAATCACTRAAGGTGAAYCCAGAGGC-3'	
1657	AH8Ü 5'-GTTTCATGGAGTAATCGGTRAARCTGTAWCCAGAASC-3'	
1658	AH9Ü 5'-GTTTCATGGAGTAATCAYCAAAGGTGAATCCAGARGC-3'	
1659	AH10Ü 5'-GTTTCATGGAGTAATCRCTRAAGGTGAATCCAGASGC-3'	
1660	AH11Ü 5'-GTTTCATGGAGTAATCGGTGAAGGTGTATCCRGAWGC-3'	
1661	AH12Ü 5'-GTTTCATGGAGTAATCACTGAAGGACCCACCATAGAC-3'	
1662	AH13Ü 5'-GTTTCATGGAGTAATCACTGATGGAGCCACCAGAGAC-3'	
1663	AH14Ü 5'-GTTTCATGGAGTAATCGCTGATGGAGTAACCAGAGAC-3'	
1664	AH15Ü 5'-GTTTCATGGAGTAATCAGTGAGGGTGTATCCGGAAC-3'	
1665	AH16Ü 5'-GTTTCATGGAGTAATCGCTGAAGGTGCCTCCAGAAGC-3'	
1666	AH17Ü 5'-GTTTCATGGAGTAATCAGAGACACTGTCCCCGGAGAT-3'	
1667	BH1 5'-GATTACTCCATGAAGTGGGTGCGACAGGCYCTTGA-3'	
1668	BH2 5'-GATTACTCCATGAAGTGGGTGCGMCAGGCCCCCGGA-3'	
1669	BH3 5'-GATTACTCCATGAAGTGGATCCGTCAGCCCCCAGGR-3'	
1670	BH4 5'-GATTACTCCATGAAGTGGTCCGCCAGGCTCCAGGG-3'	
1671	BH5 5'-GATTACTCCATGAAGTGGATCCGSCAGCCCCCAGGG-3'	
1672	BH6 5'-GATTACTCCATGAAGTGGTCCGSCAAGCTCCAGGG-3'	
1673	BH7 5'-GATTACTCCATGAAGTGGTCCRTCARGCTCCRGGR-3'	
1674	BH8 5'-GATTACTCCATGAAGTGGGTSCGMCARGCYACWGA-3'	
1675	BH9 5'-GATTACTCCATGAAGTGGKTCGCCAGGCTCCAGGS-3'	
1676	BH10 5'-GATTACTCCATGAAGTGGATCAGGCAGTCCCCATCG-3'	
1677	BH11 5'-GATTACTCCATGAAGTGGGCCCGCAAGGCTCCAGGA-3'	
1678	BH12 5'-GATTACTCCATGAAGTGGATCCGCCAGCACCAGGG-3'	
1679	BH13 5'-GATTACTCCATGAAGTGGTCCGCCAGGCTTCCGGG-3'	
1680	BH14 5'-GATTACTCCATGAAGTGGGTGCGCCAGATGCCCGGG-3'	
1681	BH15 5'-GATTACTCCATGAAGTGGGTGCGACAGGCTCGTGGA-3'	
1682	BH16 5'-GATTACTCCATGAAGTGGATCCGGCAGCCCCCGGG-3'	
1683	BH17 5'-GATTACTCCATGAAGTGGGTGCCACAGGCCCTTGA-3'	
1684	BH1Ü 5'-TGTGTGAATCATTAGCTTTGTTTCTAATAAAATCCCATCCACTCAAGCCYTTG-3'	
1685	BH2Ü 5'-TGTGTGTGAATCATTAGCTTTGTTTCTAATAAAATCCCATCCACTCAAGCSCTT-3'	
1686	BH3Ü 5'-TGTGTGTGAATCATTAGCTTTGTTTCTAATAAAWAGAGACCCACTCCAGCCCTT-3'	
1687	BH4Ü 5'-TGTGTGTGAATCATTAGCTTTGTTTCTAATAAAACCAATCCACTCCAGKCCCTT-3'	
1688	BH5Ü 5'-TGTGTGTGAATCATTAGCTTTGTTTCTAATAAAATGAGACCCACTCCAGRCCCTT-3'	
1689	BH6Ü 5'-TGTGTGTGAATCATTAGCTTTGTTTCTAATAAAAGCCAACCCACTCCAGCCCTT-3'	
1690	BH7Ü 5'-TGTGTGTGAATCATTAGCTTTGTTTCTAATAAAAGCCACCCACTCCAGCCCTT-3'	
1691	BH8Ü 5'-TGTGTGTGAATCATTAGCTTTGTTTCTAATAAAATCCAGCCACTCAAGGCCTC-3'	
1692	BH9Ü 5'-TGTGTGTGAATCATTAGCTTTGTTTCTAATAAAACCCCATCCACTCCAGGCCTT-3'	
1693	BH10Ü 5'-TGTGTGTGAATCATTAGCTTTGTTTCTAATAAAATGARACCCACWCCAGCCCTT-3'	
1694	BH11Ü 5'-TGTGTGTGAATCATTAGCTTTGTTTCTAATAAAMGAKACCCACTCCAGMCCCTT-3'	
1695	BH12Ü 5'-TGTGTGTGAATCATTAGCTTTGTTTCTAATAAAAYCCMATCCACTCMAGCCCTT-3'	
1696	1BH13Ü 5'-TGTGTGTGAATCATTAGCTTTGTTTCTAATAAAATCCTATCCACTCAAGGCGTTG-3'	
1697	BH14Ü 5'-TGTGTGTGAATCATTAGCTTTGTTTCTAATAAAATGCAAGCCACTCCAGGCCTT-3'	
1698	BH15Ü 5'-TGTGTGTGAATCATTAGCTTTGTTTCTAATAAAATGAAACATATCCAGTCCCTT-3'	
1699	BH16Ü 5'-TGTGTGTGAATCATTAGCTTTGTTTCTAATAAAACGATACCCACTCCAGCCCTT-3'	
1700	CH1 5'-GCTAATGATTACACAACAGAGTACAGTGCATCTGTGAAGGGTAGAGTACCATGACCAGGRAC-3'	
1701	CH2 5'-GCTAATGATTACACAACAGAGTACAGTGCATCTGTGAAGGGTAGGCTACCATCWCCAAGGAC-3'	
1702	CH3 5'-GCTAATGATTACACAACAGAGTACAGTGCATCTGTGAAGGGTCGAGTYACCATATCAGTAGAC-3'	
1703	CH4 5'-GCTAATGATTACACAACAGAGTACAGTGCATCTGTGAAGGGTCGATTACCATCTCCAGRGAC-3'	

10

20

30

40

1704 CH5 5'-GCTAATGATTACACAACAGAGTACAGTGCATCTGTGAAGGGTAGATTCACCATCTCMAGAGA-3'
 1705 CH6 5'-GCTAATGATTACACAACAGAGTACAGTGCATCTGTGAAGGGTMGGTTCACCATCTCCAGAGA-3'
 1706 CH7 5'-GCTAATGATTACACAACAGAGTACAGTGCATCTGTGAAGGGTCGATTTCAYCATCTCCAGAGA-3'
 1707 CH8 5'-GCTAATGATTACACAACAGAGTACAGTGCATCTGTGAAGGGTCGAGTCACCATCTCMGTAGAC-3'
 1708 CH9 5'-GCTAATGATTACACAACAGAGTACAGTGCATCTGTGAAGGGTAGRGTCACCATKACCAGGGAC-3'
 1709 CH10 5'-GCTAATGATTACACAACAGAGTACAGTGCATCTGTGAAGGGTCAGGTACCATCTCAGCCGAC-3'
 1710 CH11 5'-GCTAATGATTACACAACAGAGTACAGTGCATCTGTGAAGGGTCGAATAACCATCAACCCAGAC-3'
 1711 CH12 5'-CTAATGATTACACAACAGAGTACAGTGCATCTGTGAAGGGTCGGTTTGTCTTCTCCATGGAC-3'
 1712 CH13 5'-GCTAATGATTACACAACAGAGTACAGTGCATCTGTGAAGGGTAGAGTCACCATGACCGAGGAC-3'
 1713 CH14 5'-GCTAATGATTACACAACAGAGTACAGTGCATCTGTGAAGGGTAGAGTCACGATTACCGCGGAC-3'
 1714 CH15 5'-GCTAATGATTACACAACAGAGTACAGTGCATCTGTGAAGGGTAGAGTCACCATGACCAACAGAC-3'
 1715 CH1Ü 5'-GTCCATAGCATGATACCTAGGGTATCTAGYACAGTAATACACGGC-3'
 1716 CH2Ü 5'-GTCCATAGCATGATACCTAGGGTATCTCGCACAGTAATACAYGGC-3'
 1717 CH3Ü 5'-GTCCATAGCATGATACCTAGGGTATCTYGCACAGTAATACACAGC-3'
 1718 CH4Ü 5'-GTCCATAGCATGATACCTAGGGTATGYGACAGTAATACACGGC-3'
 1719 CH5Ü 5'-GTCCATAGCATGATACCTAGGGTACCGTGCACARTAAATAYGTGGC-3'
 1720 CH6Ü 5'-GTCCATAGCATGATACCTAGGGTATCTGGCACAGTAATACACGGC-3'
 1721 CH7Ü 5'-GTCCATAGCATGATACCTAGGGTATGTGGTACAGTAATACACGGC-3'
 1722 CH8Ü 5'-GTCCATAGCATGATACCTAGGGTATCTCGCACAGTATACAAAGGC-3'
 1723 CH9Ü 5'-GTCCATAGCATGATACCTAGGGTATTTTGCACAGTAATACAAAGGC-3'
 1724 CH10Ü 5'-GTCCATAGCATGATACCTAGGGTATCTTGCACAGTAATACATGGC-3'
 1725 CH11Ü 5'-GTCCATAGCATGATACCTAGGGTAGTGTGCACAGTAATATGTGGC-3'
 1726 CH12Ü 5'-GTCCATAGCATGATACCTAGGGTATTTTGCACAGTAATATACGGC-3'
 1727 CH13Ü 5'-GTCCATAGCATGATACCTAGGGTATCTCACACAGTAATACACAGC-3'
 1728 DH1 5'-CCTAGGTATCATGCTATGGACTCCTGGGGCCARGMACCCTGGTC-3'
 1729 DH2 5'-CCTAGGTATCATGCTATGGACTCCTGGGGSCAAGGGACMAYGGTC-3'
 1730 DH3 5'-CCTAGGTATCATGCTATGGACTCCTGGGGCCGTGGCACCCCTGGTC-3'
 1731 DH1Ü 5'-GGAAGACCGATGGGCCCTTGGTGGAGGCTGAGGAGACRGTGACCAGGGT-3'
 1732 DH2Ü 5'-GGAAGACCGATGGGCCCTTGGTGGAGGCTGARGAGACGGTGACCRTKGT-3'
 1733 DH3Ü 5'-GGAAGACCGATGGGCCCTTGGTGGAGGCTGAGGAGACGGTGACCAGGGT-3'

10

20

【0577】

6.3.2 V_HおよびV_Lサブライブラリーの構築

V_L sub1サブライブラリーは、オーバーラップ伸長によるポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を用いて順次アセンブルした。Hoら, Gene 77:51-59 (1989)。さらに詳しく述べると、対応するドナーCDRの部分とインフレームで融合された個々のヒト生殖系列フレームワークを合成するために、次のオリゴヌクレオチドの組合せを用いて、いわゆる「中間体」PCRを行った：第1、第2、第3および第4フレームワークについて、それぞれAL1~13/AL1U~10U/1~46、BL1~10/BL1U~16U/47~92、CL1~11/CL1U~12U/93~138およびDL1~4/DL1U~4U/139~143。これは100 µl容量中のpfu DNAポリメラーゼ(PCR SuperMix, Invitrogen)および約5 pmolのオリゴヌクレオチドAL1~13、AL1U~10U、BL1~10、BL1U~16U、CL1~11、CL1U~12U、DL1~4およびDL1U~4U、ならびに約100 pmolのオリゴヌクレオチド1~143を用いて実施した。PCRプログラムは、95℃で5分；94℃で1分、45℃で1分、72℃で1分を30サイクル、その後72℃で8分とした。次に、2回目のPCR（「アセンブリPCR」）を実施するために、100 µl反応容量中のpfu DNAポリメラーゼ(PCR SuperMix, Invitrogen)、0.5~2 µlずつの「中間体」PCR、25 pmolずつのオリゴヌクレオチドDL1U、DL2U、DL3U、DL4U（表64参照）および100 pmolのビオチン化オリゴヌクレオチド5'-GGTCGTTCCATTTTACTCCAC-3'（配列番号1734）を使用した。アセンブリPCR プログラムは、95℃で5分；94℃で30秒、50℃で30秒、72℃で45秒を30サイクル、その後72℃で8分とした。

30

40

【0578】

V_H sub1、V_H sub2およびV_L sub2フレームワークシャッフルしたサブライブラリーもオーバーラップ伸長によるPCRを用いて合成した。Hoら, Gene 77:51-59 (1989)。このフレームワークシャッフルしたV_HおよびV_L遺伝子の全in vitro合成は本質的に記載されたとおりに行った。Wuら, Methods Mol. Biol. 207: 213-233 (2003)。簡単に説明すると、最初のいわゆる「融合PCR」はpfu DNAポリメラーゼ(PCR SuperMix, Invitrogen)を用いて行った。V_H sub1の構築は、100 µl反応容量中の約3~10 pmolの各オリゴヌクレオチド（表5、6、7、11および65に記載）を用いて実施した。V_H sub2の構築は、100 µl反応容量中の約0.5 pmolの各オリゴヌクレオチド（表5、6、7、11および65に記載）を用いて実施した。V_L sub2の構築は、100 µl反応容量中の約0.5 pmolの各オリゴヌクレオチド（表

50

1、2、3、4および64に記載)を用いて実施した。それぞれの V_H sub1、 V_H sub2および V_L sub2サブライブラリーに関して、融合PCRプログラムは、95℃で1分；94℃で20秒、50℃で30秒、72℃で30秒を5サイクル；94℃で20秒、55℃で30秒、72℃で30秒を25サイクル、その後72℃で7分とした。続いて2回目のいわゆる「合成PCR」を行った。さらに詳しく述べると、 V_H sub1および V_H sub2サブライブラリーは、100 μ l反応容量中のpfu DNAポリメラーゼ (PCR SuperMix, Invitrogen)、2~3 μ lの対応する「融合PCR」、30pmolずつのオリゴヌクレオチドDH1U、DH2U、DH3U(表65参照)、および100pmolのビオチン化オリゴヌクレオチド5' -GCTGGTGGTGCCGTTCTATAGCC-3' (配列番号1735)を用いて合成した。 V_L sub2サブライブラリーは、100 μ l反応容量中のpfu DNAポリメラーゼ (PCR SuperMix, Invitrogen)、3 μ lの対応する「融合PCR」、25pmolずつのオリゴヌクレオチドDL1U、DL2U、DL3U、DL4U (表64参照)、および100pmolのビオチン化オリゴヌクレオチド5' -GGTCGTTCCATTTACTCCAC-3' (配列番号1734)を用いて合成した。それぞれの V_H sub1、 V_H sub2および V_L sub2サブライブラリーに関して、合成PCRプログラムは、94℃で5分；94℃で1分、45℃で1分、72℃で1分を30サイクル、その後72℃で8分とした。

【0579】

6.3.3 V_L -12C8および V_L -8G7遺伝子の合成

ライブラリーB (V_L -12C8+ V_L -8G7+ V_H sub1)に関連して用いられる、 V_L -12C8および V_L -8G7軽鎖遺伝子は、それぞれ12C8for/12C8backおよび8G7for/8G7backのオリゴヌクレオチド組合せを用いて対応するV領域コード化M13ファージベクター (6.4.1.1節、6.4.1.2節、6.4.1.3節参照) からPCRにより合成した (下記参照)。

【0580】

12C8for

5' -GGTCGTTCCATTTACTCCCACTCCGCCATCCAGTTGACTCAGTCTCC-3' (ビオチン化) (配列番号1736)

12C8back

5' -GATGAAGACAGATGGTGCAGCCACAGTACGTTTGATCTCCAGCTTGGTCCCTCC-3' (配列番号1737)

8G7for

5' -GGTCGTTCCATTTACTCCCACTCCGAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAG-3' (ビオチン化) (配列番号1738)

8G7back

5' -GATGAAGACAGATGGTGCAGCCACAGTACGTTTGATATCCACTTTGGTCCCTC-3' (配列番号1739)。

オリゴヌクレオチド12C8forおよび8G7forはM13遺伝子3リーダー重複配列 (太字) を含む。オリゴヌクレオチド8G7backおよび12C8backはC κ 重複配列 (下線) を含む。

【0581】

6.3.4 V_H -233および V_L -233遺伝子の合成

キメラFab陽性対照 (V_H -233+ V_L -233) またはライブラリーA (V_L sub1+ V_H -233) との関連で用いられる V_H -233および V_L -233重鎖および軽鎖遺伝子は、PCRでそれぞれ233Hfor/233Hbackおよび233Lfor/233Lbackオリゴヌクレオチド組合せを用いて、対応するpSTBlue-1 (6.1節参照) ベクターから合成した (下記参照)。

【0582】

233Hfor

5' -gctggtggtgccgttctatagccatagcGAGGTGAAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAG-3' (ビオチン化) (配列番号1740)

233Hback

5' -ggaagaccgatgggcccttggtggaggcTGAGGAGACGGTGACTGAGGTTTCCTTG-3' (配列番号1741)

233Lfor

5' -ggtcggttccattttactcccactccGATATTGTGCTAACTCAGTCTCCAGCCACCCTG-3' (ビオチン化) (配列番号1742)

233Lback

5' -gatgaagacagatggtgcagccacagtacgTTTCAGCTCCAGCTTGGTCCCAGCACCGAAGC-3' (配列番号1743)

号1743)

オリゴヌクレオチド233Hforおよび233LforはM13遺伝子3リーダー重複配列（太字）を含む。オリゴヌクレオチド233HbackはCκ1重複配列（下線）を含む。オリゴヌクレオチド233LbackはCκ重複配列（下線）を含む。

【0583】

6.3.5 各種V領域のファージ発現ベクターへのクローニング

ライブラリーA、BおよびC、ならびにmAb B233のキメラFabバージョンを、M13系ファージ発現ベクターにクローニングした。このベクターは、lacZプロモーターの制御下でヒトγ1重鎖の第1定常ドメインとヒトκ軽鎖の定常ドメインを含むFabフラグメントの発現を可能にする（図2）。クローニングは、ハイブリダイゼーション変異誘発（Kunkelら, Methods Enzymol. 154:367-382 (1987))を用いて、Wuら, Methods Mol. Biol. 207: 213-233 (2003)に記載されるように行った。簡単に述べると、二本鎖PCR産物を水酸化ナトリウムにより解離させ、ストレプトアビジンコーティング磁性ビーズによりビオチン化鎖を除去した後に、目的の各種V領域に対応するマイナスイボ鎖DNA（6.3.2節、6.3.3節および6.3.4節参照）を最終PCR産物からエタノール沈殿により精製した（H. Wuら, Methods Mol. Biol. 207: 213-233(2003); H. Wu, Methods Mol. Biol. 207: 197-212 (2003))。等モル量の異なる次のマイナスイボ鎖：V_H-233/V_L sub1、V_H sub1/V_L-8G7/V_L-12C8、V_H sub2/V_L sub2、およびV_H-233/V_L-233を混合して、それぞれライブラリーA、ライブラリーB、ライブラリーC、およびキメラFab 233を構築した。その後、これらの異なる混合物を、それぞれ1つのパリンδροームループを含む前記ベクターの2つの領域に個別にアニールさせた。これらのループはユニークなXbaI部位を含み、これにより、ヒトκ定常領域および第1ヒトγ定常領域とそれぞれインフレームで融合されたV_L鎖とV_H鎖の両方を含むベクターの選択が可能となる。次に、合成されたDNAを、Wuら, Methods Mol. Biol. 207: 213-233 (2003)に記載されるように、XL1-Blue菌叢上でのプラーク形成またはFabフラグメントの作製のためにXL1-Blueにエレクトロポレーションした。

【0584】

6.4 ライブラリーのスクリーニング

6.4.1 一次スクリーニング

6.4.1.1 説明

一次スクリーニングはシングルポイントELISA（SPE）からなり、これは、本質的にWuら, Methods Mol. Biol. 207: 213-233 (2003)に記載されるように、96深底ウェルプレートで増殖させて個々の組換えM13クローン（6.3.5節参照）を感染させた、1mLの細菌培養物から調製したペリプラズム（周辺細胞質）抽出物を用いて行った。簡単に述べると、96ウェルMaxisorp Immunoplateの各ウェルに20～500ngのヤギ抗ヒトFab抗体をコーティングし、3% BSA/PBSを用いて37℃で2時間ブロックし、その後サンプル（ペリプラズムに発現されたFab）と共に室温で1時間インキュベートした。次に、300ng/ウェルのビオチン化ヒトEphA2-Fcを室温で1時間添加した。続いて、ニュートラビジン-ホースラディッシュペルオキシダーゼ（HRP）コンジュゲートと共に室温で40分間インキュベートした。HRP活性をテトラメチルベンジジン（TMB）基質により検出し、この反応を0.2M H₂SO₄で停止させた。プレートを450nmで読み取った。

【0585】

6.4.2 一次スクリーニングの結果

100ngのヤギ抗ヒトFab捕捉試薬を用いてスクリーニングしたライブラリーAからの約500個のクローンのうち、14個が有意なシグナル（OD₄₅₀が0.2～0.6）を示した。これは、典型的には、無関係な抗体（MEDI-493; S. Johnsonら, J. Infect. Dis. 176: 1215-1224 (1997))の対応するバックグラウンドシグナル（OD₄₅₀が0.1～0.4）を少なくとも1.3倍上回るシグナルに相当した。こうした条件下で、Fab 233は0.4～0.6のOD₄₅₀を示した。

【0586】

20ngのヤギ抗ヒトFab捕捉試薬を用いてスクリーニングしたライブラリーAからの約200個のクローンのうち、4個が有意なシグナル（OD₄₅₀が0.2～0.4）を示した。これは、典

型的には、無関係な抗体の対応するバックグラウンドシグナル (OD_{450} が0.1) を少なくとも2倍上回るシグナルに相当した。こうした条件下で、Fab 233は0.2~0.3の OD_{450} を示した。

【0587】

500ngのヤギ抗ヒトFab捕捉試薬を用いてスクリーニングしたライブラリーAからの約750個のクローンのうち、16個が有意なシグナル (OD_{450} が0.1~0.7) を示した。これは、典型的には、無関係な抗体の対応するバックグラウンドシグナル (OD_{450} が0.06~0.2) を少なくとも1.3倍上回るシグナルに相当した。こうした条件下で、Fab 233は0.1~0.6の OD_{450} を示した。クローン V_H -233/ V_L -12C8および V_H -233/ V_L -8G7が今回のスクリーニングから単離され、両方とも0.4の OD_{450} を示した (同プレートのバックグラウンド OD_{450} 値はそれぞれ0.1および0.2であった; 同プレートのFab 233 OD_{450} 値はそれぞれ0.2および0.5であった)。

10

【0588】

500ngのヤギ抗ヒトFab捕捉試薬を用いてスクリーニングしたライブラリーBからの約750個のクローンのうち、27個が有意なシグナル (OD_{450} が0.3~2.8) を示した。これは、典型的には、無関係な抗体の対応するバックグラウンドシグナル (OD_{450} が0.2~0.3) を少なくとも1.3倍上回るシグナルに相当した。こうした条件下で、 V_H -233/ V_L -12C8および V_H -233/ V_L -8G7は0.2~0.4の OD_{450} 値を示した。クローン V_H -2G6/ V_L -12C8、 V_H -6H11/ V_L -8G7および V_H -7E8/ V_L -8G7が今回のスクリーニングから単離され、それぞれ2.8、2.5および1.6の OD_{450} 値を示した。(同プレートのバックグラウンド OD_{450} 値はそれぞれ0.3、0.2および0.2であった; 同プレートの V_H -233/ V_L -12C8 OD_{450} 値はそれぞれ0.4、0.3および0.3であった; 同プレートの V_H -233/ V_L -8G7 OD_{450} 値はそれぞれ0.4、0.3および0.3であった)。

20

【0589】

500 ngのヤギ抗ヒトFab捕捉試薬を用いてスクリーニングしたライブラリーCからの約1150個のクローンのうち、36個が有意なシグナル (OD_{450} が0.1~0.3) を示した。これは、典型的には、無関係な抗体の対応するバックグラウンドシグナル (OD_{450} が0.07~0.1) を少なくとも1.3倍上回るシグナルに相当した。こうした条件下で、Fab 233は0.1~0.2の OD_{450} を示した。

【0590】

6.4.1.3 陽性クローンの評価

30

まとめて、ライブラリーAからの9個のクローン、ライブラリーBからの7個のクローン、そしてライブラリーCからの0個のクローンが、第2の独立したシングルポイントELISAで、15mLの細菌培養物から調製したペリプラズム抽出物と500ngのヤギ抗ヒトFab捕捉試薬を用いて再確認された。詳細には、中でも最も高い [特異的 OD_{450} /バックグラウンド OD_{450}] 比 (約15~50の範囲) を示した、ライブラリーAからの2個のクローン (V_H -233/ V_L -12C8および V_H -233/ V_L -8G7) を、ABI3000ゲノムアナライザを使ってジデオキシ塩基配列決定によりさらに特徴づけた。クローン V_H -233/ V_L -12C8のDNA配列解析は、その重鎖が塩基104に単一塩基置換を含み、その結果として位置H35 (Kabatナンバリング) に置換 (NからS) が生じていることを明らかにした。この変異を、QuickChange XL部位特異的変異誘発キット (Stratagene, La Jolla, CA) を用いて製造業者の使用説明書に従って是正した。これは正クローン V_H -233/ V_L -12C8は、最大で約50 (変異型 V_H -233/ V_L -12C8と類似) の [特異的 OD_{450} /バックグラウンド OD_{450}] 比を示し、EphA2-Fcとの結合を保持していた。部分的にヒト化されたクローン V_H -233/ V_L -12C8および V_H -233/ V_L -8G7はその後、二次スクリーニングによるさらなる特徴付けのために選択した (6.4.2節参照)。 V_L -12C8および V_L -8G7の配列を図3に示す。上述したように、これら2つのヒト化軽鎖をその後、ライブラリーBの設計に加えた。中でも最も高い [特異的 OD_{450} /バックグラウンド OD_{450}] 比 (約40) を示した、このライブラリーからの3個のクローンを、ジデオキシ塩基配列決定によりさらに特徴付けた。これは、3つの異なるヒト化重鎖 (V_H -2G6、 V_H -6H11および V_H -7E8; 図3参照) の同定をもたらした。 V_H -2G6、 V_H -6H11および V_H -7E8は、それぞれ V_L -12C8、 V_L -8G7および V_L -8G7と対を形成することが分かった。次いでこれら3個の、十分にヒト化されたクロ

40

50

ーンを選択して、二次スクリーニングによるさらなる特徴付けを行った（6.4.2節参照）。

【0591】

6.4.2 二次スクリーニング

6.4.2.1 説明

先に同定したヒト化クローン（6.4.1.3節参照）をさらに特徴付けるために、15 mLの細菌培養物から調製したペリプラズム抽出物中の発現されたFabフラグメントを用いて二次スクリーニングを実施した。さらに詳しく述べると、2つのELISAを使用した：(i) 機能的ELISA、ここで、96ウェルMaxisorp Immunoplateの各ウェルに500ngのヒトEphA2-Fcをコーティングして、3% BSA/PBSを用いて37°Cで2時間ブロックした。次に、2倍連続希釈したサンプルを加え、室温で1時間インキュベートした。その後、ヤギ抗ヒトκホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)コンジュゲートとのインキュベーションを行った。HRP活性をTMB基質により検出し、0.2M H₂SO₄で反応を停止させた。プレートを450nmで読み取った；(ii) 抗ヒトFab定量ELISA、これは本質的にWuら, *Methods Mol. Biol.* 207: 213-233 (2003)に記載されるとおりに実施した。簡単に説明すると、96ウェルImmulon Immunoplateの各ウェルに100ngのヤギ抗ヒトFab抗体をコーティングし、次に2倍連続希釈したサンプル（1/25希釈で開始）または標品（ヒトIgG Fab、500~3.91ng/ml）と共にインキュベートした。その後、ヤギ抗ヒトκホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)コンジュゲートとのインキュベーションを行った。HRP活性をTMB基質により検出し、0.2M H₂SO₄で反応を停止させた。プレートを450nmで読み取った。

【0592】

6.4.2.2 二次スクリーニングの結果

2部の二次ELISAスクリーニングにより、ヒトEphA2との結合に関してFabクローンV_H-233/V_L-12C8、V_H-233/V_L-8G7、V_H-2G6/V_L-12C8、V_H-6H11/V_L-8G7およびV_H-7E8/V_L-8G7を互いに比較し、さらにmAb B233のキメラFab（V_H-233/V_L-233）と比較することができた。図4に示すように、全てのフレームワークシャッフルしたFabは、mAb B233のキメラFabと比較して、ヒトEphA2との結合を保持している。興味深いことに、重鎖と軽鎖が両方ともヒト化されている一部のクローン（V_H-2G6/V_L-12C8およびV_H-7E8/V_L-8G7）は、同じ軽鎖のみがヒト化されているクローン（V_H-233/V_L-12C8およびV_H-233/V_L-8G7）よりも良好なヒトEphA2-Fcへの見かけの結合を示す。このことは、最適な抗原結合のために、所与のヒト化軽鎖との関係でヒト化重鎖を特異的に選択する方法が存在することを示している。十分にヒト化された分子をさらに特徴付けるために、クローンV_H-2G6/V_L-12C8、V_H-6H11/V_L-8G7およびV_H-7E8/V_L-8G7、ならびにmAb B233のキメラ体（V_H-233/V_L-233）をその後クローニングして、全長ヒトIgG1として発現させた（6.5節参照）。

【0593】

6.5 ヒトIgG1型でのmAb B233の各種ヒト化型のクローニング、発現および精製

フレームワークシャッフルしたクローンV_H-2G6、V_H-6H11、V_H-7E8、V_L-12C8およびV_L-8G7の可変領域、ならびにV_H-233およびV_L-233の可変領域を、対応するV領域コード化M13ファージベクターから、pfu DNAポリメラーゼを用いてPCR増幅した。次いでそれらを、ヒトサイトメガロウイルス主要前初期（hCMVie）エンハンサー、プロモーターおよび5'-非翻訳領域をコードする哺乳動物発現ベクターに個々にクローニングした。M. Boshartら, *Cell* 41:521-530 (1985)。この系では、ヒトγ鎖がヒトκ鎖と共に分泌される。S. Johnsonら, *Infect. Dis.* 176:1215-1224 (1997)。別個の構築物をヒト胚性腎（HEK）293細胞において一過性に発現させ、トランスフェクションの72時間後に回収した。分泌された可溶性ヒトIgG1は、直接1mLのHiTrapプロテインAまたはプロテインGカラムで製造業者の使用説明書（APBiotech, Inc., Piscataway, NJ）に従って、馴らし培地から精製した。精製済みのヒトIgG1（典型的には、SDS-PAGEで判定して>95%の均一性）を2~13 μg/ml（馴らし培地）の収量で回収し、リン酸緩衝溶液（PBS）に対して透析し、瞬間凍結して-70°Cで貯蔵した。

【0594】

6.6 フレームワークシャッフルしたキメラおよびmAb B233 IgGのEphA2-Fcへの結合のBIAcore解析

可溶性 V_H -2G6/ V_L -12C8、 V_H -6H11/ V_L -8G7、 V_H -7E8/ V_L -8G7および V_H -233/ V_L -233 IgGと、ならびにmAb B233と、固定化EphA2-Fcとの相互作用は、表面プラズモン共鳴検出によりBIAcore 3000装置 (Pharmacia Biosensor, Uppsala, Sweden) を使ってモニタリングした。EphA2-Fcは、CM5センサーチップ (Pharmacia Biosensor) のデキストランマトリックスに、Amine Coupling Kitを用いて、記載される (B. Johnssonら, Anal. Biochem. 198: 268-277 (1991)) ように105~160 RUの表面密度でカップリングさせた。IgGは、0.15M NaCl、3mM EDTAおよび0.005% P20を含有する0.01M HEPES pH 7.4中に希釈した。その後の希釈はすべて、同一のバッファーで行った。全ての結合実験は、一般的に100nMから0.2nMまでのIgG濃度を用いて75 μ L/minの流速で25°Cにて行った。データを約25分間収集し、1M NaCl、50mM NaOHの1分パルスを用いて表面を再生させた。また、IgGを非コーティングセル上にも流し、これらのブランク実験からのセンサーグラムを、EphA2-Fcをカップリングさせたチップを用いて得られたセンサーグラムから差し引いた。データは1:1 Langmuir結合モデルに適合させた。このアルゴリズムはkonとkoffの両方を計算し、そこから見かけの平衡解離定数 K_D を2つの速度定数の比 (k_{off} / k_{on}) として推論する。得られた値を表66に示す。

【表 6 6】

表 6 6 色々なIgGのヒト EphA2-Fc への結合に対する親和性測定値^a

抗体	会合速度(k_{on}) ^b ($M^{-1} \cdot s^{-1}$)	解離速度(k_{off}) ^b (s^{-1})	解離定数(K_D) ^c (nM)
B233 (マウス)	2.8×10^5	1.1×10^{-4}	0.4
V_H -B233/ V_L -B233 (キメラ)	2.4×10^5	8.0×10^{-5}	0.3
V_H -2G6/ V_L -12C8 (ヒト化)	6.4×10^4	1.9×10^{-4}	3.0
V_H -6H11/ V_L -8G7 (ヒト化)	9.6×10^4	1.8×10^{-4}	1.9
V_H -7E8/ V_L -8G7 (ヒト化)	9.3×10^3	4.5×10^{-4}	48

^a親和性測定値はBIAcoreにより、方法の説明で報じたように行った。^b動力学のパラメーターは5~18個の個々の測定値の平均を表す。^c K_D は速度定数の比 (k_{off}/k_{on}) として計算した。

【 0 5 9 5 】

6.7 発現収率

ヒト化抗体の発現レベルをキメラ抗体の発現レベルと次のように比較した。ヒト胚性腎 (HEK) 293細胞を、一過的に様々な抗体構築物により35mm、6ウェルディッシュ内でもリポフェクタミンと標準プロトコルを用いてトランスフェクトした。上清を2回、トランスフェクション後72および144時間に収穫した (それぞれ第1収穫物、第2収穫物と呼ぶ)。分泌された可溶性ヒトIgGを次いでELISAにより産生収率について試験した。具体的には、2回、3日間隔で採集したトランスフェクション上清 (前記参照) を、抗ヒトIgG ELISAを用いて抗体産生について試験した。ヤギ抗ヒトIgGをコートした96ウェルBiocoatプレート (BD Biosciences, San Jose, CA) の個々のウェルを、サンプル (上清) または標準 (ヒトIgG、0.5-100 ng/ml) と共にインキュベートし、次いでヤギ抗ヒトIgG抗体のホースラディッシュペルオキシダーゼコンジュゲートと共にインキュベートした。ペルオキシダーゼ活性を、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジンにより検出し、反応を0.2M H_2SO_4 で停止した。プレートを450nmにて読み取り、濃度を決定した。いくつかのトランスフェクションと収穫物に対する収率 (μ g/ml) を表67に示した。ヒト化抗体の精製後の平均回収率も示した。

【 0 5 9 6 】

これらのデータは、抗体の発現がヒト化によりフレームワークシャッフル手法を用いて改善できることを実証する。この方法により作製された3つのヒト化抗体のうちの2つは、

B233キメラIgGと比較して発現が改善されている。

【表 6 7】

表 6 7 哺乳動物細胞における抗体発現レベル

	トランスフェクション#1	トランスフェクション#2	トランスフェクション#3	トランスフェクション#4
	H1 ¹ H2 ¹	H1 H2	H1 H2	H1 H2
	μg/ml	μg/ml	μg/mg	μg/ml
B233 シリーズ：				
CHIM. B 233 ²	1.7-			
CHIM. B 233 ²	1.8-		1.7-2.3	
7E8	3.1-		4.3-7	
6H11	1.9-		1.8-3.3	
2G6	44.1-20.0	20.1-13.6	4.7-2.6	9.8-7.4

精製／回収データ：

6H1 1：ほぼ 2μg 精製タンパク質/ml 上清

7E8：ほぼ 5μg 精製タンパク質/ml 上清

2G6：7～13μg 精製タンパク質/ml 上清

¹H1＝一過性トランスフェクション第 1 収穫、H2＝一過性トランスフェクション第 2 収穫。

²キメラ B233 の 2 つの独立クローンに対応するデータ。

【 0 5 9 7 】

6.8 フレームワークシャッフルした変異体の解析

6.8.1 配列解析

全体で、ヒト EphA2-Fc への効率的な結合を支援する 2 つのユニークなヒト化軽鎖 (V_L-12C8 および V_L-8G7) と 3 つのユニークなヒト化重鎖 (V_H-2G6、V_H-6H11 および V_H-7E8) が見いだされた。ヒト化軽鎖 V_L-8G7 の無差別な性質は、2 つの異なる重鎖 (V_H-7E8 および V_H-6H11) との関係で作製結合を媒介するその能力によって強調される。これらのヒト化変異体は全て、対応するフレームワーク領域において高レベルの mAb B233 に対する全体的なアミノ酸同一性を示し、重鎖について 76～83%、軽鎖について 64～69% であった (図 5)。このことは、高相同性のヒトフレームワークが親のキー残基を保持しているらしい、ということとで説明できる。個々のフレームワークの解析は広範囲の相違を明らかにし、その相違は、V_L-12C8 の第 1 フレームワークについての 48% から V_H-2G6、V_H-6H11 および V_H-7E8 の第 4

【 0 5 9 8 】

興味深いことに、ヒト化重鎖 V_H-7E8 は、もっぱら、ヒトフレームワーク生殖系列配列との完全な一致を示すヒトフレームワークから成っていた (図 5)。ヒト化重鎖 V_H-6H11 および V_H-2G6 は、関係が最も近いヒトフレームワーク生殖系列配列とのほぼ完全な一致を示す、それぞれ 1 つおよび 2 つのヒトフレームワークを含んでいた (図 5)。相違は、鎖 (V_H-2G6) あたり最大 3 個の残基となり、またフレームワーク (V_H-2G6 の第 1 フレームワーク) あたり 2 個の残基となった。これらの相違は、他の最も関係が遠いヒトフレームワーク生殖系列配列にも存在しないアミノ酸をコードすることは決してなかった。従って、論証上、これらのクローンも「十分にヒト化された」ということができる。ヒト化軽鎖 V_L-12C8 および V_L-8G7 は、関係が最も近いヒトフレームワーク生殖系列配列とのほぼ完全な一致を示す、それぞれ 1 つおよび 3 つのヒトフレームワークを含んでいた (図 5)。相違の数は、鎖 (V_L-8G7) あたり最大 3 個の残基となり、またフレームワーク (V_L-8G7 の第 1、第 2 および第 4 フレームワーク；V_L-12C8 の第 4 フレームワーク) あたり 1 個の残基となった。しかし、ここでもまた、これらの位置の残基は、他の相同性が低いヒトフレームワーク配列中に見いだされた。したがって、これらの変異体も「十分にヒト化された」ということができる。これらの相違は本発明者らのライブラリーに組み込まれなかったので、本発明者らは、これらの起源は PCR の忠実度および／またはオリゴヌクレオチドの品質といった要因の組合せに帰すると考える。

【 0 5 9 9 】

6.8.2 結合解析

mAb B233の軽鎖および重鎖のヒト化に成功した2段階ヒト化方法（ライブラリーAおよびB）によって本発明者らがヒトEphA2-Fcとの結合を保持するヒト化クローンを単離できたということだけでは価値のないことである。実際、軽鎖と重鎖の両方を同時にヒト化したライブラリー（ライブラリーC）のスクリーニングによって、本発明者らは、この抗原と検出可能な結合を示す分子を回収できなかった。これはおそらく、最適状態に及ばないライブラリーの質、不完全なライブラリーのサンプリングおよび／またはライブラリーのタンパク質の非効率的な原核生物発現といった要因を反映している。本発明者らは、より多数のクローンをスクリーニングすれば、ヒトEphA2への結合を保持するヒト化抗体フラグメントが同定したであろうと予想する。

10

【0600】

それらの同一の重鎖および軽鎖可変領域を考慮すれば予想されるように、親mAb B233とそのキメラ体IgGは事実上同一の解離定数を示した（それぞれ $K_D=0.4$ および 0.3 nM ；表66）。ヒト化クローン $V_H\text{-}6H11/V_L\text{-}8G7$ および $V_H\text{-}2G6/V_L\text{-}12C8$ は、ヒトIgG1型として発現させたとき、親mAb B233およびそのキメラ体に類似したヒトEphA2に対するアビディティを示した（それぞれ $K_D=1.9$ および 3.0 nM ；表66）。これは、親mAb B233と比較して、それぞれ6倍および10倍というアビディティの小さい低下に相当した。ヒト化クローン $V_H\text{-}7E8/V_L\text{-}8G7$ は最も低いアビディティ（ $K_D=48\text{ nM}$ ）を示し、これは親mAb B233と比較したとき160倍という大きな低下に相当した。EphA2-Fcへの結合強度について言えば、ヒト化IgGクローン $V_H\text{-}6H11/V_L\text{-}8G7$ 、 $V_H\text{-}2G6/V_L\text{-}12C8$ および $V_H\text{-}7E8/V_L\text{-}8G7$ の、BIAcoreに基づくランキング（表66）が、それらのFab対応物を利用するELISAに基づくランキング（図4）と相違したということは、価値がないということである。これはクローン $V_H\text{-}7E8/V_L\text{-}8G7$ の場合に特に顕著であり、このクローンは最低のアビディティを示したが（表66）、それでもELISAタイトレーション（図4）では常に最高のシグナルを示した。本発明者らは、この相違が何に起因するのかわからないが、それはアッセイのフォーマットおよび／または定量ELISAの不正確性に起因しうるらしいと考えている。あるいはまた、この不一致は親和性（図4において測定した）とアビディティ（表66において測定）の間のユニークな、クローン特異的な相関関係を反映しているとも考えられる。事実、個々の2価結合性の測定は、対応する抗原結合部位の特定の空間的配置または局所的な抗原表面分布といった様々な要因に左右される（D.M. Crothersら, *Immunochemistry* 9: 341-357(1972); K.M. Mullerら, *Anal. Biochem.* 261: 49-158(1998)）。

20

30

【0601】

実施例2

試薬

全ての化学薬品は分析グレードのものを使用した。制限酵素とDNA改変酵素はNew England Biolabs, Inc. (Beverly, MA)から購入した。SuperMix pfu DNAポリメラーゼとオリゴヌクレオチドはInvitrogen (Carlsbad, CA)から購入した。pfu ultra DNA ポリメラーゼはStratagene (La Jolla, CA)から購入した。ヒトEphA2-Fc融合タンパク質（ヒトIgG1のFc部分と融合されたヒトEphA2からなる；Carles-Kinchら, *Cancer Res.* 62: 2840-2847 (2002)）はヒト胚性腎（HEK）293細胞において発現させ、標準的なプロトコルを用いて

40

プロテインGアフィニティクロマトグラフィにより精製した。ストレプトアビジン磁性ビーズはDynal (Lake Success, NY)から購入した。ヒトEphA2-Fcのビオチン化は、EZ-Link Sulfo-NHS-LC-ビオチン化キット（Pierce, Rockford, IL）を用いて製造業者の使用説明書に従って実施した。

【0602】

7.1 親モノクローナル抗体のクローニングおよび配列決定

ヒト受容体チロシンキナーゼEphA2に対するモノクローナル抗体（mAb）を分泌するマウスハイブリドーマ細胞株（Coffmanら, *Cancer Res.* 63:7907-7912 (2003)）をMedImmune, Inc.で作製した。このマウスmAbを以後EA2と呼ぶ（Coffmanら, *Cancer Res.* 63:7907-7912 (2003)）。mAb EA2の可変重鎖（ V_H ）および軽鎖（ V_L ）遺伝子のクローニングおよび

50

配列決定は、EA2分泌細胞株由来のメッセンジャーRNAをStraight AのmRNA精製キット (Novagen, Madison, WI) を用いて製造業者の使用説明書に従って単離・精製した後で実施した。cDNAは第1鎖cDNA合成キット (Novagen, Madison, WI) を用いて製造業者が推奨するとおりに合成した。 V_H および V_L 遺伝子の両方の増幅は、マウスIg-プライマーセット (Novagen, Madison, WI) からのIgGV_HおよびIgκV_Lオリゴヌクレオチドを用いて製造業者が提案するとおりに実施した。産生増幅より得られるDNA断片は、Perfectly Bluntクローニングキット (Novagen, Madison, WI) を用いてpSTBlue-1にクローニングした。その後、ジデオキシシチエンターミネーション法 (Sangerら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74: 5463-5467 (1977)) により、ABI3000シーケンサー (Applied Biosystems, Foster City, CA) を使って、多数の V_H および V_L クローンの配列決定を行った。mAb EA2 V_L (V_L -EA2) および V_H (V_H -EA2) 遺伝子の配列を図6に示す。

【0603】

7.2 ヒトフレームワークの選択

ヒトフレームワーク遺伝子を公的に利用できる抗体生殖系列遺伝子のプールから選択した。さらに詳しく述べると、これには、次が含まれた：

第1、第2および第3フレームワークについては46のヒト生殖系列κ鎖遺伝子：A1、A10、A11、A14、A17、A18、A19、A2、A20、A23、A26、A27、A3、A30、A5、A7、B2、B3、L1、L10、L11、L12、L14、L15、L16、L18、L19、L2、L20、L22、L23、L24、L25、L4/18a、L5、L6、L8、L9、O1、O11、O12、O14、O18、O2、O4およびO8 (Schableら, Biol. Chem. Hoppe Seyler 374: 1001-1022 (1993) ; Brensig-Kuppers ら, Gene 191: 173-181 (1997)) ;

第4フレームワークについては5つのヒト生殖系列Jκ配列：Jκ1、Jκ2、Jκ3、Jκ4およびJκ5 (Hieterら, J. Biol. Chem. 257: 1516-1522 (1982)) ;

第1、第2および第3フレームワークについては44のヒト生殖系列重鎖遺伝子：VH1-18、VH1-2、VH1-24、VH1-3、VH1-45、VH1-46、VH1-58、VH1-69、VH1-8、VH2-26、VH2-5、VH2-70、VH3-11、VH3-13、VH3-15、VH3-16、VH3-20、VH3-21、VH3-23、VH3-30、VH3-33、VH3-35、VH3-38、VH3-43、VH3-48、VH3-49、VH3-53、VH3-64、VH3-66、VH3-7、VH3-72、VH3-73、VH3-74、VH3-9、VH4-28、VH4-31、VH4-34、VH4-39、VH4-4、VH4-59、VH4-61、VH5-51、VH6-1およびVH7-81 (Matsuda ら, J. Exp. Med. 188: 1973-1975 (1998)) ;

第4フレームワークについては6つのヒト生殖系列JH配列：JH1、JH2、JH3、JH4、JH5およびJH6 (Ravetch ら, Cell 27: 583-591 (1981)) 。

【0604】

7.3 フレームワークシャッフルしたライブラリーの構築

7.3.1 ライブラリーの説明

1つの主フレームワークシャッフルしたライブラリー (ライブラリーD) を構築した。ライブラリーDは、軽鎖フレームワークシャッフルしたサブライブラリー (V_L sub3) と対合させた重鎖フレームワークシャッフルしたサブライブラリー (V_H sub3) を含んだ。フレームワークシャッフルした V_H および V_L サブライブラリーの構築は、表1〜7、11、68および69に示したオリゴヌクレオチドを用いて行った。さらに詳しく述べると、表1-7および11に記載のオリゴヌクレオチドは、それぞれKabat定義の軽鎖 (κ) および重鎖に対する全ての公知のヒトフレームワーク生殖系列遺伝子の完全配列をコードする。これらのオリゴヌクレオチドは「普遍的」であっていずれの目的の遺伝子のヒト化にも用いることができる。表68および69に記載のプライマーはmAb EA2のCDRの部分にコードし、対応するヒト生殖系列フレームワークと重複する。表68については、AL1EA2〜13EA2およびDL1UEA2〜4UEA2を除いて、それぞれのオリゴヌクレオチドはmAb EA2の1つのCDRの部分 (太字) と1つのヒト生殖系列軽鎖フレームワークの部分にコードする (Kabat定義 ; Kabatら, Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Public Health Service, National Institutes of Health, Washington, DC, 1991) 。CDRL1、L2およびL3は、それぞれ、AL1UEA2〜10UEA2/BL1EA2〜10EA2、BL1UEA2〜16UEA2/CL1EA2〜11EA2、およびCL1UEA2〜12UEA2/DL1EA2〜4EA2によりコードされる。オリゴヌクレオチドAL1EA2〜13EA2はM13遺伝子3リーダー重複配列 (下線部) を含有しそしてオリゴヌクレオチドDL1UEA2〜4UEA2はCκ重複配列 (

下線部)を含有する。K=GまたはT、M=AまたはC、R=AまたはG、S=CまたはG、W=AまたはTおよびY=CまたはTである。表69については、AH1EA2～10EA2およびDH1UEA2～3UEA2を除いて、それぞれのオリゴヌクレオチドはmAb EA2の1つのCDRの部分(太字)と1つのヒト生殖系列重鎖フレームワークの部分にコードする(Kabat定義)。CDRH1、H2およびH3は、それぞれAH1UEA2～17UEA2/BH1EA2～17EA2、BH1UEA2～16UEA2/CH1EA2～15EA2およびCH1UEA2～13UEA2/DH1EA2～3EA2によりコードされる。オリゴヌクレオチドAH1EA2～10EA2はM13遺伝子3リーダ重複配列(下線部)を含有するが、オリゴヌクレオチドDH1UEA2～3UEA2はC γ 1重複配列(下線部)を含有する。K=GまたはT、M=AまたはC、R=AまたはG、S=CまたはG、W=AまたはTおよびY=CまたはTである。

【表68】

10

表68 mAb EA2軽鎖CDRとヒト生殖系列軽鎖フレームワークとを融合するために用いたオリゴヌクレオチド

1782	AL1	EA2	5'- <u>ggtcggttccat</u> ttttactcccactccGATGTTGTGATGACWCAGTCT-3'
1783	AL2	EA2	5'- <u>ggtcggttccat</u> ttttactcccactccGACATCCAGATGAYCCAGTCT-3'
1784	AL3	EA2	5'- <u>ggtcggttccat</u> ttttactcccactccGCCATCCAGWTGACCCAGTCT-3'
1785	AL4	EA2	5'- <u>ggtcggttccat</u> ttttactcccactccGAAATAGTGATGAYGCAGTCT-3'
1786	AL5	EA2	5'- <u>ggtcggttccat</u> ttttactcccactccGAAATTGTGTTGACRCAGTCT-3'
1787	AL6	EA2	5'- <u>ggtcggttccat</u> ttttactcccactccGAKATTGTGATGACCCAGACT-3'
1788	AL7	EA2	5'- <u>ggtcggttccat</u> ttttactcccactccGAAATTGTRMTGACWCAGTCT-3'
1789	AL8	EA2	5'- <u>ggtcggttccat</u> ttttactcccactccGAYATYGTGATGACYCAGTCT-3'
1790	AL9	EA2	5'- <u>ggtcggttccat</u> ttttactcccactccGAAACGACACTCACGCAGTCT-3'
1791	AL10	EA2	5'- <u>ggtcggttccat</u> ttttactcccactccGACATCCAGTTGACCCAGTCT-3'
1792	AL11	EA2	5'- <u>ggtcggttccat</u> ttttactcccactccAACATCCAGATGACCCAGTCT-3'
1793	AL12	EA2	5'- <u>ggtcggttccat</u> ttttactcccactccGCCATCCGGATGACCCAGTCT-3'
1794	AL13	EA2	5'- <u>ggtcggttccat</u> ttttactcccactccGTCATCTGGATGACCCAGTCT-3'
1795	AL1Ü	EA2	5'-GCTTAAATAGTTATTAATGTCCTGACTCGCCTTGACGAGATGGAGGCCGGC-3'
1796	AL2Ü	EA2	5'-GCTTAAATAGTTATTAATGTCCTGACTCGCCTTGACGAGAGGGTGRCTCTTTC-3'
1797	AL3Ü	EA2	5'-GCTTAAATAGTTATTAATGTCCTGACTCGCCTTACAATGATGGTGACTCTGTC-3'
1798	AL4Ü	EA2	5'-GCTTAAATAGTTATTAATGTCCTGACTCGCCTTGAAGGAGATGGAGGCCGGCTG-3'
1799	AL5Ü	EA2	5'-GCTTAAATAGTTATTAATGTCCTGACTCGCCTTGACGAGATGGAGGCCGTGTC-3'
1800	AL6Ü	EA2	5'-GCTTAAATAGTTATTAATGTCCTGACTCGCCTTGACGAGATGTTGACTTTGTC-3'
1801	AL7Ü	EA2	5'-GCTTAAATAGTTATTAATGTCCTGACTCGCCTTGACGATGGTGACTTTCTC-3'
1802	AL8Ü	EA2	5'-GCTTAAATAGTTATTAATGTCCTGACTCGCCTTGACGTTGATGGTGCCCTCTC-3'
1803	AL9Ü	EA2	5'-GCTTAAATAGTTATTAATGTCCTGACTCGCCTTGCAAGTGATGGTGACTCTGTC-3'
1804	AL10Ü	EA2	5'-GCTTAAATAGTTATTAATGTCCTGACTCGCCTTGCAATGATACTGACTCTGTC-3'
1805	BL1	EA2	5'-AAGGCGAGTCAGGACATTAATAACTATTTAAGCTGGYTTTACGAGAGGCCAGGC-3'
1806	BL2	EA2	5'-AAGGCGAGTCAGGACATTAATAACTATTTAAGCTGGTACCTGCAGAGGCCAGGS-3'
1807	BL3	EA2	5'-AAGGCGAGTCAGGACATTAATAACTATTTAAGCTGGTATCRGCAGAAACCAGGG-3'
1808	BL4	EA2	5'-AAGGCGAGTCAGGACATTAATAACTATTTAAGCTGGTACCAACAGAAACCAGGA-3'
1809	BL5	EA2	5'-AAGGCGAGTCAGGACATTAATAACTATTTAAGCTGGTACCAACAGAAACCTGGC-3'
1810	BL6	EA2	5'-AAGGCGAGTCAGGACATTAATAACTATTTAAGCTGGTAYCWGCAGAAACCWGGG-3'
1811	BL7	EA2	5'-AAGGCGAGTCAGGACATTAATAACTATTTAAGCTGGTATCAGCARAAACCWGG-3'
1812	BL8	EA2	5'-AAGGCGAGTCAGGACATTAATAACTATTTAAGCTGGTAYCAGCARAAACCAG-3'
1813	BL9	EA2	5'-AAGGCGAGTCAGGACATTAATAACTATTTAAGCTGGTTTCTGCAGAAAGCCAGG-3'
1814	BL10	EA2	5'-AAGGCGAGTCAGGACATTAATAACTATTTAAGCTGGTTTACGAGAAACCAGGG-3'
1815	BL1Ü	EA2	5'-ATCTACCAATCTGTTTGCACGATAGATCAGGAGCTGTGGAG-3'
1816	BL2Ü	EA2	5'-ATCTACCAATCTGTTTGCACGATAGATCAGGAGCTTAGGRGC-3'
1817	BL3Ü	EA2	5'-ATCTACCAATCTGTTTGCACGATAGATGAGGAGCTTGGGMGC-3'
1818	BL4Ü	EA2	5'-ATCTACCAATCTGTTTGCACGRTAGATCAGGMGCTTAGGGGC-3'
1819	BL5Ü	EA2	5'-ATCTACCAATCTGTTTGCACGATAGATCAGGWGCTTAGGRAC-3'
1820	BL6Ü	EA2	5'-ATCTACCAATCTGTTTGCACGATAGATGAAGAGCTTAGGGGC-3'
1821	BL7Ü	EA2	5'-ATCTACCAATCTGTTTGCACGATAAATTAGGAGTCTTGGAGG-3'
1822	BL8Ü	EA2	5'-ATCTACCAATCTGTTTGCACGGTAAATGAGCAGCTTAGGAGG-3'
1823	BL9Ü	EA2	5'-ATCTACCAATCTGTTTGCACGATAGATCAGGAGTGTGGAGAC-3'
1824	BL10Ü	EA2	5'-ATCTACCAATCTGTTTGCACGATAGATCAGGAGCTCAGGGGC-3'
1825	BL11Ü	EA2	5'-ATCTACCAATCTGTTTGCACGATAGATCAGGGACTTAGGGGC-3'
1826	BL12Ü	EA2	5'-ATCTACCAATCTGTTTGCACGATAGAGGAAGAGCTTAGGGGA-3'
1827	BL13Ü	EA2	5'-ATCTACCAATCTGTTTGCACGCTTGATGAGGAGCTTGGAGA-3'
1828	BL14Ü	EA2	5'-ATCTACCAATCTGTTTGCACGATAAATTAGGCGCCTTGGAGA-3'
1829	BL15Ü	EA2	5'-ATCTACCAATCTGTTTGCACGCTTGATGAGGAGCTTGGGGC-3'
1830	BL16Ü	EA2	5'-ATCTACCAATCTGTTTGCACGTTGAATAATGAAATAGCAGC-3'
1831	CL1	EA2	CGTGCAACAGATTGGTAGATGGGGTCCAGACAGATTTCAGY

20

30

40

【表 6 9】

表 6 9 mAb EA2 軽鎖 CDR とヒト生殖系列重鎖フレームワークとを融合するために用いたオリゴヌクレオチド

1832	AH1	EA2	5'-GctggtggtgccgtttctatagccatagcCAGGTCAGCTGGTGCAGTCT-3'
1833	AH2	EA2	5'-GctggtggtgccgtttctatagccatagcCAGGTCAGCTGKTGGAGTCT-3'
1834	AH3	EA2	5'-GctggtggtgccgtttctatagccatagcCAGSTGCAGCTGCAGGAGTCT-3'
1835	AH4	EA2	5'-GctggtggtgccgtttctatagccatagcCAGGTACCTTGARGGAGTCT-3'
1836	AH5	EA2	5'-GctggtggtgccgtttctatagccatagcCARATGCAGCTGGTGCAGTCT-3'
1837	AH6	EA2	5'-GctggtggtgccgtttctatagccatagcCARGTGCAGCTGGTGSAGTC-3'
1838	AH7	EA2	5'-GctggtggtgccgtttctatagccatagcCAGATCACCTTGAAGGAGTCT-3'
1839	AH8	EA2	5'-GctggtggtgccgtttctatagccatagcCAGGTSAGCTGGTTSAGTCT-3'
1840	AH9	EA2	5'-GctggtggtgccgtttctatagccatagcCAGGTACAGCTGCAGCACTCA-3'
1841	AH10	EA2	5'-GctggtggtgccgtttctatagccatagcCAGGTGCAGCTACAGCAGTGG-3'
1842	AHK1U	EA2	5'-AGACATGGTATAGCTRGTAAGGTGTATCCAGAAGC-3'
1843	AHK2U	EA2	5'-AGACATGGTATAGCTGCTGAGTGAGAACCCAGAGAM-3'
1844	AHK3U	EA2	5'-AGACATGGTATAGCTACTGAARGTGAATCCAGAGGC-3'
1845	AHK4U	EA2	5'-AGACATGGTATAGCTACTGACGGTGAAYCCAGAGGC-3'
1846	AHK5U	EA2	5'-AGACATGGTATAGCTGCTGAYGGAGCCACCAGAGAC-3'
1847	AHK6U	EA2	5'-AGACATGGTATAGCTRGTAAGGTGAWCCAGAAGC-3'
1848	AHK7U	EA2	5'-AGACATGGTATAGCTACTRAAGGTGAAYCCAGAGGC-3'
1849	AHK8U	EA2	5'-AGACATGGTATAGCTGGTRAARCTGTAWCCAGAASC-3'
1850	AHK9U	EA2	5'-AGACATGGTATAGCTAYCAAAGGTGAATCCAGARGC-3'
1851	AHK10U	EA2	5'-AGACATGGTATAGCTRCTRAAGGTGAATCCAGASGC-3'
1852	AHK12U	EA2	5'-AGACATGGTATAGCTGGTGAAGGTGTATCCRGAWGC-3'
1853	AHK13U	EA2	5'-AGACATGGTATAGCTACTGAAGGACCCACCATAGAC-3'
1854	AHK14U	EA2	5'-AGACATGGTATAGCTACTGATGGAGCCACCAGAGAC-3'
1855	AHK15U	EA2	5'-AGACATGGTATAGCTGCTGATGGAGTAACCAGAGAC-3'
1856	AHK16U	EA2	5'-AGACATGGTATAGCTACTGAGGGTGTATCCGGAAAC-3'
1857	AHK17U	EA2	5'-AGACATGGTATAGCTGCTGAAGGTGCCTCCAGAAGC-3'
1858	AHK18U	EA2	5'-AGACATGGTATAGCTAGAGACACTGTCCCGGAGAT-3'
1859	BHK1	EA2	5'-AGCTATACCATGTCTTGGGTGCGACAGGCYCTTGG-3'
1860	BHK2	EA2	5'-AGCTATACCATGTCTTGGGTGCGMCAGGCCCGGGA-3'
1861	BHK3	EA2	5'-AGCTATACCATGTCTTGGATCCGTCAGCCCCAGGR-3'
1862	BHK4	EA2	5'-AGCTATACCATGTCTTGGRTCCGCCAGGCTCCAGGG-3'
1863	BHK5	EA2	5'-AGCTATACCATGTCTTGGATCCGSCAGCCCCAGGG-3'
1864	BHK6	EA2	5'-AGCTATACCATGTCTTGGGTCCGSCAAGCTCCAGGG-3'
1865	BHK7	EA2	5'-AGCTATACCATGTCTTGGGTCCRTCCAGCTCCRGGR-3'
1866	BHK8	EA2	5'-AGCTATACCATGTCTTGGGTSCGMCARGCYACWGA-3'
1867	BHK9	EA2	5'-AGCTATACCATGTCTTGGKTCCGCCAGGCTCCAGGS-3'
1868	BHK10	EA2	5'-AGCTATACCATGTCTTGGATCAGGCAGTCCCCATCG-3'
1869	BHK11	EA2	5'-AGCTATACCATGTCTTGGGCCCCAAGGCTCCAGGA-3'
1870	BHK12	EA2	5'-AGCTATACCATGTCTTGGATCCGCCAGCAGCCAGGG-3'
1871	BHK13	EA2	5'-AGCTATACCATGTCTTGGGTCCGCCAGGCTTCCGGG-3'
1872	BHK14	EA2	5'-AGCTATACCATGTCTTGGGTGCGCCAGATGCCCGGG-3'
1873	AGCTATACCATGTCTTGGGTGCGACAGGCTCGTGA, BHK15 EA2		
1874	AGCTATACCATGTCTTGGATCCGGCAGCCCGCCGGG, BHK16 EA2		
1875	AGCTATACCATGTCTTGGGTGCCACAGGCCCTTGA, BHK17 EA2		
1876	GGATAGTAGGTGTAAGTACCACCCTACTAATGGTTCCCATCCACTCAAGCCYTTG, BHK1U EA2		
1877	GGATAGTAGGTGTAAGTACCACCCTACTAATGGTTCCCATCCACTCAAGCSCTT, BHK2U EA2		
1878	GGATAGTAGGTGTAAGTACCACCCTACTAATGGTTGAGACCCACTCCAGCCCCTT, BHK3U EA2		
1879	GGATAGTAGGTGTAAGTACCACCCTACTAATGGTTCCCAATCCACTCCAGKCCCTT, BHK4U EA2		
1880	GGATAGTAGGTGTAAGTACCACCCTACTAATGGTTGAGACCCACTCCAGRCCCTT, BHK5U EA2		
1881	GGATAGTAGGTGTAAGTACCACCCTACTAATGGTTGCCAACCCACTCCAGCCYTT, BHK6U EA2		

【0605】

7.3.2 V_H および V_L サブライブラリーの構築

フレームワークシャッフルした V_H sub3 サブライブラリーをPCRを用いて重複伸長により合成した (Hoら, Gene 77: 51-59 (1989))。フレームワークシャッフルした V_H 遺伝子の全in vitro合成を本質的に記載の通り行った (Wu, Method Mol. Biol. 207: 197-212 (2003))。簡単に説明すると、第1のいわゆる「融合PCR」は、pfu DNAポリメラーゼ (PCR SuperMix, Invitrogen) および表5、6、7、11および69に記載のオリゴヌクレオチドのそれぞれのほぼ1pmolを用いて50~100 μ l 反応体積で行った。融合PCRプログラムは、94°Cで20秒、50°Cで30秒、72°Cで30秒を5サイクル、および94°Cで20秒、55°Cで30秒、72°Cで30秒を25サイクルから構成された。次いで第2のいわゆる「合成PCR」は、pfuウルトラDNAポリメラーゼ、「融合PCR」産物の2~4 μ l、オリゴヌクレオチドDH1UEA2、DH2UEA2、DH3UEA

10

20

30

40

50

2 (表69を参照) のそれぞれのほぼ30pmolおよびビオチン化オリゴヌクレオチド5'-GCTGGTGGTGGCGTTCTATAGCC-3' (配列番号1735) のほぼ100pmolを用いて50~100 μ l反応体積で行った。合成PCRプログラムは、94℃で20秒、50℃で30秒、72℃で30秒を5サイクル、および94℃で20秒、55℃で30秒、72℃で30秒を30サイクルから構成された。

【0606】

フレームワークシャッフルした V_L sub3サブライブラリーの構築を類似的方式で行った。さらに詳しく述べると、第1の「融合PCR」は、pfuウルトラDNAポリメラーゼ (Stratagene) および表1、2、3、4および68に記載のオリゴヌクレオチドのそれぞれのほぼ1pmolを用いて50~100 μ l反応体積で行った。融合PCRプログラムは、94℃で20秒、50℃で30秒、72℃で30秒を5サイクル、および94℃で20秒、55℃で30秒、72℃で30秒を25サイクルから構成された。次いで第2のいわゆる「合成PCR」は、pfuウルトラDNAポリメラーゼ、「融合PCR」産物の2~4 μ l、オリゴヌクレオチドDL1UEA2、DL2UEA2、DL3UEA2、DL4UEA2 (表68を参照) のそれぞれのほぼ30pmolおよびビオチン化オリゴヌクレオチド5'-GGTCGTTCCATTTTACTCCCAC-3' (配列番号1734) のほぼ100pmolを用いて50~100 μ l反応体積で行った。合成PCRプログラムは、94℃で20秒、50℃で30秒、72℃で30秒を5サイクル、および94℃で20秒、55℃で30秒、72℃で30秒を30サイクルから構成された。

【0607】

7.3.3 V_H -EA2および V_L -EA2遺伝子の合成

キメラFabポジティブ対照 (V_H -EA2+ V_L -EA2) として用いた V_H -EA2および V_L -EA2の重鎖および軽鎖遺伝子は、PCRにより、対応するpSTBlue-1ベクター (7.1節を参照) から、それぞれEA2Hfor/EA2HbackおよびEA2Lfor/EA2Lbackオリゴヌクレオチドの組合わせを用いて合成した。

【0608】

EA2Hfor: 5'-GCTGGTGGTGGCGTTCTATAGCCATAGCGACGTGAAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCT-3' (ビオチン化) (配列番号1882)

EA2Hback: 5'-GGAAGACCGATGGGCCCTTGGTGGAGGCTGCAGAGACAGTGACCAGAGTCCC-3' (配列番号1883)

EA2Lfor: 5'-GGTCGTTCCATTTTACTCCCACTCCGACATCAAGATGACCCAGTCTCCATCTTCC-3' (ビオチン化) (配列番号1884)

EA2Lback: 5'-GATGAAGACAGATGGTGCAGCCACAGTACGTTTTATTTCAGCTTGGTCCCCCTCCGAA-3' (配列番号1885)

オリゴヌクレオチドEA2HforおよびEA2LforはM13遺伝子3リーダー重複配列 (太字) を含有する。オリゴヌクレオチドEA2Hbackは γ 1重複配列 (下線) を含有する。オリゴヌクレオチドEA2Lbackは κ 重複配列 (下線) を含有する。

【0609】

7.3.4 各種V領域のファージ発現ベクターへのクローニング

ライブラリーD、ならびにmAb EA2のキメラFabバージョンを、M13系ファージ発現ベクターにクローニングした。このベクターは、lacZプロモーターの制御下でヒト γ 1重鎖の第1定常ドメインとヒト κ 軽鎖の定常ドメインを含むFabフラグメントの発現を可能にする (図2)。クローニングは、ハイブリダイゼーション変異誘発 (Kunkelら, Methods Enzymol. 154:367-382 (1987)) を用いて、Wuら, Methods Mol. Biol. 207: 213-233 (2003) に記載されるように行った。簡単に述べると、二本鎖PCR産物を水酸化ナトリウムにより解離させ、ストレプトアビジンコーティング磁性ビーズによりビオチン化鎖を除去した後に、目的の各種V領域に対応するマイナース本鎖DNA (7.3.2節、7.3.3節を参照) を最終PCR産物からエタノール沈殿により精製した (Wuら, Methods Mol. Biol. 207: 197-212 (2003); Wu, Methods Mol. Biol. 207: 213-233 (2003))。等モル量の次の異なるマイナース鎖: V_H -EA2/ V_L EA2および V_H sub3/ V_L sub3を混合して、それぞれキメラEA2およびライブラリーDを構築した。その後、これらの異なる混合物を、それぞれ1つのパンドロームループを含む前記ベクターの2つの領域に個別にアニールさせた。これらのループはユニークなXbaI部位を含み、これにより、消化された親テンプレートを用いて、ヒト κ 定常領域

および第1ヒト γ 定常領域とそれぞれインフレームで融合された V_L 鎖と V_H 鎖の両方を含有するベクターの選択が可能となる (Wu, Method Mol. Biol. 207: 197-212 (2003); Wu ら, Method Mol. Biol. 207: 213-233 (2003))。次に、合成されたDNAを、Wu ら, Methods Mol. Biol. 207: 213-233 (2003)に記載されるように、XL1-Blue菌叢上でのプラーク形成またはFabフラグメントの生産のためにXL1-Blueにエレクトロポレーションした。

【0610】

7.4 ライブラリーのスクリーニング

7.4.1 一次スクリーニング

7.4.1.1 説明

一次スクリーニングはシングルポイントELISA (SPE) からなり、これは、本質的にWu ら, Methods Mol. Biol. 207: 197-212 (2003)に記載されるように、96深底ウェルプレートで増殖させて個々の組換えM13クローン (7.3.5節を参照) を感染させた、1mLの細菌培養物から調製したペリプラズム (周辺細胞質) 抽出物を用いて行った。簡単に述べると、96ウェルMaxisorp Immunoplateの各ウェルに1 μ gのヤギ抗ヒトFab抗体をコーティングし、3% BSA/PBSを用いて37°Cで2時間ブロックし、その後サンプル (ペリプラズムに発現されたFab) と共に室温で2時間インキュベートした。次に、300~600ng/ウェルのビオチン化ヒトEphA2-Fcを室温で2時間添加した。続いて、ニュートラビジン-ホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) コンジュゲートと共に室温で40分間インキュベートした。HRP活性をテトラメチルベンジジン (TMB) 基質により検出し、この反応を0.2M H_2SO_4 で停止させた。プレートを450nmで読み取った。

【0611】

7.4.1.2 一次スクリーニングの結果

7.4.1.1節に記載のようにスクリーニングしたライブラリーDからの1200クローンのうち、1つの特定のクローン (以後、4H5と呼ぶ) は有意なシグナル ($OD_{450}=3$) を示した。これは、典型的には、無関係な抗体の対応するバックグラウンドシグナル ($OD_{450}=0.3$) を10倍超えるシグナルに対応した。これらの条件下で、Fab EA2も3の OD_{450} を示した。

【0612】

7.4.1.3 クローン4H5の評価

クローン4H5を、第2の、独立した、シングルポイントELISAで、15ml細菌培養から調製した周辺質抽出物 (Wu, Method Mol. Biol. 207: 197-212 (2003)) および1 μ g/ウェルのヤギ抗-ヒトFd捕捉試薬を用いて7.4.1.1節に記載の通り再確認した。これらの条件下で、クローン4H5はほぼ30 (EA2と類似) の[特異的 OD_{450} /バックグラウンド OD_{450}]比を示した。クローン4H5をさらに、ジデオキシヌクレオチド配列決定によりABI 3000ゲノムアナライザーを用いて特徴付けた (Sanger ら, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74: 5463-5467 (1977))。DNA配列分析は、その軽鎖CDR3が単一塩基置換 (GAGからGTGへ) を含有し、位置L93 (Kabat番号) にて置換 (EからVへ) をもたらすことを明らかにした。この突然変異を、QuickChange XL部位特異的変異誘発キット (Stratagene, La Jolla, CA) を用いて製造業者取扱説明書に従い是正した。

【0613】

7.4.1.4 「是正した」クローン4H5の評価

「是正した」クローン4H5をシングルポイントELISAで、45ml細菌培養から調製した周辺質抽出物 (Wu, Method Mol. Biol. 207: 197-212 (2003)) および1 μ g/ウェルのヤギ抗-ヒトFd捕捉試薬を用いて7.4.1.1節に記載の通り特徴付けた。これらの条件下で、「是正した」クローン4H5はほぼ11の[特異的 OD_{450} /バックグラウンド OD_{450}]比、クローン4H5はほぼ23の[特異的 OD_{450} /バックグラウンド OD_{450}]比、そしてEA2はほぼ15の[特異的 OD_{450} /バックグラウンド OD_{450}]比を示した。この結果は、「是正した」クローン4H5がEphA2-Fcと良い結合を保持することを示した。クローン4H5とそのCDRL3是正したバージョンを次に二次スクリーニングにより特徴付けた (7.4.2節を参照)。それらのマウス対応物 (EA2) とアラインメントした4H5とその是正したバージョンの配列を図7に示した。

【0614】

7.4.2 二次スクリーニング

7.4.2.1 説明

先に同定したヒト化クローン（7.4.1節を参照）をさらに特徴付けるために、45 ml細菌培養から調製した周辺質抽出物に発現されたFabフラグメント（Wu, 方法 Mol. Biol. 207: 197-212 (2003)）を用いて二次スクリーニングを行った。さらに詳しく述べると、2つのELISAを用いた：

(i)機能性ELISA（この場合、96ウエルMaxisorp Immunoplateの個々のウエルをほぼ500ngのヒトEphA2-Fcによりコートしかつ3%BSA/PBSにより2時間37℃にてブロックした）。2倍連続希釈したサンプルを次に加え、1時間室温にてインキュベートした。次いでヤギ抗-ヒトκホースラディッシュペルオキシダーゼ（HRP）コンジュゲートを用いてインキュベートした。HRP活性はTMB基質を用いて検出しそして反応を0.2M H₂SO₄を用いて停止した。プレートを450nmで読み取った；

(ii)抗-ヒト Fab定量ELISA（これは、本質的にWu, Method Mol. Biol. 207: 197-212 (2003)に記載の通り行った）。簡単に説明すると、96ウエルBIOcoatプレート（BD Biosciences, CA）の個々のウエルを、2倍連続希釈したサンプルまたは標準（ヒト IgG Fab、25-0.39 ng/ml）を用いてインキュベートした。次いでヤギ抗-ヒトκホースラディッシュペルオキシダーゼ（HRP）コンジュゲートを用いてインキュベートした。HRP活性はTMB基質を用いて検出しそして反応を0.2M H₂SO₄を用いて停止した。プレートを450nmで読み取った。

【0615】

7.4.2.2 二次スクリーニングの結果

7.4.2.1節に記載した2部の二次ELISAスクリーニングにより、Fabクローン4H5をそのCDRL3是正バージョンとお互いにおよびmAb EA2のキメラFabと、ヒトEphA2との結合について比較することが可能になる。図8に示すように、両方のフレームワークシャッフルしたFabは、mAb EA2のキメラFabと比較すると、より優れたヒトEphA2との結合を示す。そのバージョンと比較すると、クローン4H5がより優れたヒトEphA2との結合を示す事実は、CDRL3の変化が親和性増強効果を有することを示す。

【0616】

7.5 フレームワークシャッフルした変異体4H5の分析

7.5.1 配列分析

総合すると、1つのユニークなヒト化軽鎖（V_L-4H5）と1つのユニークなヒト化重鎖（V_H-4H5）は、お互いの組合せで、ヒトEphA2-Fcとの効率的な結合を支援することがわかった。このヒト化変異体は、mAb EA2に対して、軽鎖および重鎖について、それぞれ67~78%の範囲の高レベルの全体的なアミノ酸同一性を示した（図9）。これは、高相溶性ヒトフレームワークが親キー残基を保持するらしいと思われる事実により、部分的に説明する。個々のフレームワークの分析は、V_H-4H5の第2のフレームワークについての57%からV_H-4H5の第1のフレームワークについての83%にわたる広い範囲の相違を明らかにした。

【0617】

興味深いことに、ヒト化重鎖V_H-4H5はヒトフレームワーク生殖系列配列と完全にマッチする3つのヒトフレームワーク（第2、第3および第4）からなる（図9）。この鎖の第1フレームワークは、ほとんどの関係するヒトフレームワーク生殖系列配列とほぼ完全なマッチ（30残基のうちの29残基）を示した（図9）。従って、重鎖において相違はただ1つの残基だけであった。興味深いことに、この相違は、他の最も関係が遠いヒトフレームワーク生殖系列配列に見出されるアミノ酸をコードした。従って、論証上、この重鎖は全てヒト化されているといえることができる。ヒト化された軽鎖V_L-4H5はヒトフレームワーク生殖系列配列と完全にマッチする3つのヒトフレームワーク（第1、第2および第4）からなる（図9）。この鎖の第3フレームワークは、最も関係するヒトフレームワーク生殖系列配列とほぼ完全なマッチ（32残基のうちの30残基）を示した。従って、全体で、軽鎖において相違はただ2つの残基だけであった。しかし、ここでもまた、これらの位置は、他の相溶性の低いヒトフレームワーク配列中に見出され；それ故に、おそらく、この軽鎖も全て

ヒト化されていると言える。これらの相違は本発明者らのライブラリーに組み込まれていなかったもので、本発明者らはこれらの起源は、PCR忠実度および／または オリゴヌクレオチド品質といった要因の組合せに帰すると考える。

【0618】

ヒト化された鎖 V_H -4H5および V_L -4H5は両方とも、少なくとも2つの異なる生殖系列ファミリー由来の最初の3つのフレームワークに由来した（図9）。

【0619】

7.5.2 結合分析

本明細書に記載の事例においては、mAb EA2の軽鎖と重鎖とを同時にヒト化したワンステップヒト化プロセス（ライブラリーD）によって、キメラ分子と比較して、ヒトEphA2-Fcと有意に優れた結合を示す1つのヒト化クローンを同定することが可能になった。この手法はまた、ヒトEphA2-Fcとさらに優れた結合親和性をもつ1つのヒト化親和性成熟クローンを単離することも可能にする。

【0620】

7.5.2.1 ヒトIgG1フォーマットにおける、mAb EA2の様々なヒト化バージョンのクローニング、発現および精製

フレームワークシャッフルしたクローン4H5および「是正した」4H5の可変領域を、M13ファージベクターをコードする対応するV領域からpfu DNAポリメラーゼを用いてPCR増幅した（7.4.1.2節を参照）。次いでこれらを個々に、ヒトサイトメガロウイルス主最初期（hCMVie）エンハンサー、プロモーターおよび5'-非翻訳領域をコードする哺乳動物発現ベクター中にクローニングした（M. Boshart、ら、1985、Cell 41：521-530）。この系において、ヒト γ 1鎖はヒト κ 鎖とともに分泌される（S. Johnson、ら、1997、Infect. Dis. 176：1215-1224）。色々な構築物が一過的にHEK293細胞において発現され、そしてトランスフェクション後72および144時間に収穫される。分泌された可溶ヒトIgG1を、馴らし培地から直接、1ml HiTrapタンパク質Aまたはタンパク質Gカラムで、製造業者（APBiotec h、Inc.、Piscataway、NJ）の取扱説明書に従い精製した。精製したヒトIgG1（SDS-PAGEより判断して、典型的には>95%相同性）をリン酸緩衝化生理食塩水（PBS）に対して透析し、フラッシュ凍結して-70℃にて貯蔵した。

【0621】

7.5.2.2 フレームワークシャッフルしたおよびmAb EA2 IgGのEphA2-Fcとの結合のBIAcore分析

可溶 V_H -4H5/ V_L -4H5（または「4H5」）および V_H -4H5/ V_L -「是正した」4H5（または「是正した」4H5）IgGの、ならびにmAbEA2の、固定されたEphA2-Fcとの相互作用を、BIAcore 3000計器（Pharmacia Biosensor、Uppsala、Sweden）を用いて表面プラズモン共鳴検出によりモニタリングした。EphA2-Fcを、CM5センサーチップ（Pharmacia Biosensor）のデキストランマトリックスと、記載（B. Johnsson ら、1991、Anal. Biochem. 198：268-277）のようにアミンカップリングキットを用いて、ほぼ500 RUの表面密度にてカップリングした。IgGを、0.15M NaCl、3mM EDTAおよび0.005% P20を含有する0.01M HEPES pH 7.4で希釈した。全ての希釈は同じバッファーで行った。全ての結合実験は、25℃で、典型的には100 nM～0.2 nMのIgG濃度にて、75 μ L/minの流速で実施した；データはほぼ25分間採取し、そして2つの1M NaCl、50mM NaOHの30秒パルスを用いて表面を再生した。IgGを無コートのセル上にも流し、これらのブランク試験からのセンサーグラムをEphA2-Fc-カップリングチップについて得たセンサーグラムから差し引いた。データを1：1 Langmuir結合モデルに適合させた。このアルゴリズムは k_{on} および k_{off} の両方を計算し、これから、見かけの平衡解離定数、 K_D を2つの定数の比（ k_{off}/k_{on} ）として推論した。得た値を表70に示した。

【0622】

ヒト化クローン V_H -4H5/ V_L -4H5および V_H -4H5/ V_L -「是正した」4H5は、ヒトIgG1としてフォーマットすると、ヒトEphA2に対して親mAbEA2より優れたアビディティを示した（それぞれ K_D =67および1400pM；表70）。これは、親mAbEA2と比較すると、それぞれ90および4

倍のアビディティ増加に対応する。

【表 7 0】

表 7 0 色々な IgG のヒト EphA2-Fc^a に対する結合の親和性測定値

抗体	会合速度(k_{on}) ($M^{-1} \cdot s^{-1}$)	解離速度(k_{off}) (s^{-1})	解離定数(K_D) ^b (pM)
EA2 (マウス)	$5.17 \cdot 10^5$	$3.07 \cdot 10^{-3}$	5938
V _H -4H5/V _L -4H5	$9.8 \cdot 10^5$	$6.6 \cdot 10^{-5}$	67
「是正した」 4H5	$7.5 \cdot 10^5$	$1.05 \cdot 10^{-3}$	1400

^a親和性測定値は BIAcore により、方法の説明で報じたように行った。

^b K_D は、速度定数の比 (k_{off}/k_{on}) として計算した。

【 0 6 2 3 】

8. 実施例 3

抗体の可変ドメインの融点 (T_m) が変性および凝集にある役割を果たすことは公知である。一般に、より高い T_m はより優れた安定性とより低い凝集と相関がある。フレームワークシャッフルの方法は可変領域を改変するので、おそらく、フレームワークシャッフルした抗体の T_m が変化したのであろう。キメラ B233 およびフレームワークシャッフルした抗体の T_m は示差走査熱量計 (DSC) により VP-DSC (MicroCal, LLC) を用いて、 $1.0^\circ C/min$ の速度で温度、 $25 \sim 110^\circ C$ の温度範囲にわたり測定した。8 秒の濾過時間ならびに 15 分間の走査前恒温 (pre-scan thermostating) を採用した。サンプルを、Pierce 透析カセット (3.5kD) を用いて、10mM ヒスチジン-HCl、pH6 中に透析した。Mab 濃度は A_{280} により測定して 200-400 $\mu g/mL$ であった。融点は、そのシステムと共に供給された Origin ソフトウェアを用いて、製造業者の取扱説明者に従い決定した。簡単に説明すると、複数のベースラインは、サンプルおよび対照セルの両方にバッファーを流して熱平衡を確立して試験した。サンプルサーモグラムからベースラインを差し引いた後に、データを濃度正規化しそしてデコンボリューション関数を用いて適合させた。いくつかの抗体は、分子内のサブドメインから生じる複数のピークをもつ複雑なプロファイルを有するが、Fab ドメインの融点は無傷の抗体の DSC 走査で観察される最も大きいピークを作ることが公知である。この分析の目的で、最も大きいピークの温度を Fab の T_m として用いた。精製されたフラグメントとして分析すると、全ての全長 IgG を作製するために用いた Fc ドメインは 2 つの主要 T_m ピークをほぼ $67^\circ C$ および $83^\circ C$ に有する (図 10、上段左パネル)。しかし、これらのピークは、無傷の抗体を分析するとき、Fab ドメインが分子に与えるコンフォメーションと安定性の変化によって、若干シフトしうる。

【 0 6 2 4 】

キメラ EA2 の Fab ドメインは比較的高いほぼ $80^\circ C$ の T_m (図 10、上段右) を有し、そして T_m は、対応するフレームワークシャッフルした抗体 4H5 および是正した 4H5 ではほぼ $82^\circ C$ (それぞれ図 10 下段左および右パネル) に増加する。4H5 および是正した 4H5 に対する T_m の若干の $2^\circ C$ の増加は、キメラ EA2 の出発 T_m が既にかかなり高かった事実を反映しうる。キメラ B233 (図 11、上段左) の DSC 走査は、ほぼ $62^\circ C$ に Fab 部分の最も大きいピーク T_m をもつ複雑なプロファイルを有し、この T_m は分子の Fc 部分より有意に低い。Fab ピークの T_m は、フレームワークシャッフルした抗体 2G6、6H11 および 7E8 の 3 つの全てでほぼ $75^\circ C$ に著しく増加する (図 11 を参照、それぞれ上段右ならびに下段左および右パネル)。 T_m のシフトは、これらの抗体のそれぞれの安定性が有意に増加したことを表す。

【 0 6 2 5 】

抗体の pI は溶液中の抗体の溶解度および粘度にある役割を果たし、ならびに非特異的毒性および生体分布に影響を与えうる。従って、ある特定の臨床応用について、その結合特異性とは独立して、抗体の最適 pI が存在しうる。フレームワークシャッフルした抗体における pI 変化の程度を試験するために、キメラ EA2 および B233 ならびに全ての選択されたフレームワークシャッフルした抗体の pI を、生来の等電点ポリアクリルアミドゲル電気泳動

10

20

30

40

50

(IEF-PAGE) 分析により決定した。簡単に説明すると、プレキャスト・アンフォリンゲル (Amersham Biosciences、pI範囲3.5~9.5) に8 μ gのタンパク質を供給した。ゲルに供給する前に、タンパク質サンプルは10mMヒスチジン中、pHほぼ6で透析した。広範囲pIマーカー標準 (Amersham、pI範囲3~10、8 μ L) を用いてMabに対する相対的なpIを決定した。電気泳動を1500V、50mAにて105分間実施した。ゲルを45分間、純水で1xに希釈したSigma固定化溶液 (5x) を用いて固定した。染色は、一晩、室温にてSimply Blue 染色剤 (Invitrogen) を用いて実施した。脱染は、25%エタノール、8%酢酸および67%純水からなる溶液を用いて行った。等電点はQuantity One Imagingソフトウェアを付属するBio-Rad GS-800密度計を用いて決定した。図12に示した結果は、明らかに、抗体のpIがフレームワークシャッフルにより改変されうることを実証した。キメラ抗体EA2はほぼ8.9のpIを有する一方、フレームワークシャッフルした4H5および是正された4H5抗体は両方とも、より低いpI (それぞれほぼ8.3およびほぼ8.1) を有する。キメラB233については反対の状況が見られた。キメラB233のpIはほぼ8.0であり、フレームワークシャッフルした抗体のそれぞれは増加したpIを有した。6H1はほぼ8.9のpIを有し、2G6および7E8は両方ともほぼ8.75のpIを有する。

10

【0626】

興味深いことに、全てのフレームワークシャッフルした抗体は T_m の増加を示し、いくつか (B233由来の抗体) は増加したpIを有する一方、他のもの (EA2由来の抗体) は低下したpIを有した。同様に、B233由来の抗体の産生レベルはpIまたは T_m の変化と相関がなかった。

20

【0627】

以上記載したように、抗体の結合特性 (例えば、結合親和性)、産生レベル、 T_m およびpIは、記載したフレームワークシャッフルの方法により改変することができる。従って、適当な選択および/またはスクリーニング判定基準を応用することにより、1以上のこれらの抗体特性は、記載したフレームワークシャッフルの方法を用いて改変することができる。例えば、結合特異性に加えて、フレームワークシャッフルした抗体を、改変された結合特性、改善された産生レベル、所望の T_m またはある特定のpIを有する抗体についてスクリーニングすることができる。従って、フレームワークシャッフルを利用して、例えば、ヒト化プロセスの間に抗体の1以上の特性を最適化すること、または種の起源に関係なく現存ドナー抗体を最適化することができる。さらに、フレームワークシャッフルの方法を利用して、現存ヒト抗体から動物モデルで用いる「代理 (surrogate)」抗体を作製することができる。

30

【0628】

引用文献および均等物：

本発明の多くの修飾および変更が、その精神および範囲を逸脱することなく可能であるが、このことは当業者には明らかであろう。本明細書中に引用された全ての文献は、個々の刊行物、特許または特許出願があらゆる目的のために参照することにより本明細書に組み入れられるように具体的かつ個別に示されているのと同程度に、あらゆる目的のためにその全体を参照することにより本明細書に含めるものとする。さらに、米国特許出願第60/496,367号 (2003年8月18日出願)、米国特許出願第10/920,899号 (2004年8月18日出願)、米国特許出願第60/662,945号 (2005年3月18日出願) および米国特許出願第60/675,439号 (2005年4月28日出願) は、それぞれ参照によりその全てが組み入れられる。

40

【図面の簡単な説明】

【0629】

【図1】 マウス抗ヒトEphA2モノクローナル抗体B233の重鎖および軽鎖の核酸およびタンパク質配列を示す。Kabatによって定義されたCDR1、2および3の領域を枠で囲ってある。可変重鎖 (VH) および軽鎖 (VL) の完全なアミノ酸配列は、一文字表記によって与えられる。

【図2】 フレームワークシャッフル (shuffling) ライブラリーのスクリーニングおよび対応するFabフラグメントの発現に用いられるファージベクターを示す。VLおよびVH遺伝

50

子のおおのの、ストレプトアビジンで精製された一本鎖DNAを、遺伝子3リーダー/C κ および遺伝子3リーダー/C γ 1領域の相同性をそれぞれ利用して、ハイブリダイゼーション変異誘発によってベクターにアニールする。パリンδροームループ中のユニークXbaI部位によって、親ベクターの除去が可能となる。次いでV_HおよびV_L遺伝子を、それぞれヒト κ 1重鎖の第1の定常ドメインおよびヒト κ 軽鎖の定常ドメインとインフレームで発現させる。

【図3】ライブラリーAおよびBをスクリーニングした後に単離された、抗ヒトEphA2モノクローナル抗体B233のフレームワークをシャフリングしたヒト化クロンのタンパク質配列を示す。Kabatにより定義されたCDR1、2および3領域を枠で囲ってある。可変重鎖（V_H）および軽鎖（V_L）の完全なアミノ酸配列は、標準的な一文字表記で与えられる。

【図4】固定化されたヒトEphA2-Fc上での、Fab抽出物を用いたELISAタイトレーションを示す。

【図5】フレームワークをシャフリングした抗体の配列解析を示す。基準としてmAb B233を用いて、それぞれの個別の抗体フレームワークについてアミノ酸レベルでの同一性パーセントを計算した。

【図6】マウス抗ヒトEphA2モノクローナル抗体EA2の重鎖および軽鎖の核酸配列およびタンパク質配列を示す。Kabatが定義したCDR1、2および3領域を箱で囲んだ。可変重鎖（V_H）および可変軽鎖（V_L）の全アミノ酸配列を標準的一文字表記を用いて与えた。

【図7】ライブラリーDのスクリーニング後に単離した、フレームワークシャッフルし、ヒト化したクローン4H5のタンパク質配列を示す。そのCDRL3-是正されたバージョン（「是正された4H5」と名づけた）は、親mAb EA2のCDRL3と完全にマッチさせるにはL93（太字）位置の単一アミノ酸だけが異なる。Kabatが定義したCDR1、2および3領域を箱で囲んで。可変重鎖（V_H）および可変軽鎖（V_L）の全アミノ酸配列を標準的一文字表記を用いて与えた。

【図8】固定したヒトEphA2-Fc上のFab周辺質抽出物を用いるELISAタイトレーションを示す。

【図9】フレームワークシャッフルした抗体の配列解析を示す。アミノ酸レベルの百分率同一性を、それぞれの個々の抗体フレームワークについて、対照としてmAb EA2を用いて計算した。

【図10】キメラEA2およびフレームワークシャッフルした抗体のDSCサーモグラムを示す。上段左パネルは全ての抗体を構築するために用いた単離Fcドメインに対するDSC走査記録である。Fcドメインに対する2つの明確なピークがほぼ68℃およびほぼ83℃に見られる。上段右パネルは無傷のキメラEA2に対するDSC走査記録であり、FabドメインのT_mはほぼ80℃である。下段左および右パネルはそれぞれ4H5および是正した4H5のDSC走査記録であり、両方ともほぼ82℃である。

【図11】キメラB233およびフレームワークシャッフルした抗体のDSCサーモグラムを示す。上段左パネルはキメラB233のDSC走査記録であり、FabドメインのT_mはほぼ63℃である。フレームワークシャッフルした2G6、6H11および7E8のDSC走査記録をそれぞれ上段右、下段左および下段右パネルに示す。2G6、6H11および7E8のFabドメインのT_mはそれぞれほぼ75℃である。

【図12】キメラおよびフレームワークシャッフルした抗体の等電点電気泳動（IEF）ゲルを示す。この分析のためのそれぞれの抗体のpIは主バンドのpIである。EA2 -8.96、4H5 -8.29、是正した4H5 -8.09、B233 -8.0、6H11 - 8.88、2G6 -8.76 および 7E8 -8.75。

【図13A】軽鎖コンビナトリアルを構築する一方法の模式図を示す。図13Aは重複オリゴマーを用いるヒト軽鎖フレームワークのサブバンクを構築するための重複PCRの使用の詳細である。各フレームワークを表すオリゴマーのプール（1本鎖または2本鎖）をいくつかの応用のためのサブバンクとして利用することができる。

【図13B】軽鎖コンビナトリアルを構築する一方法の模式図を示す。図13Bは重複プライマーと図13Aで作製したサブバンクを用いる軽鎖可変領域フラグメントのコンビナトリアルサブバンクを構築するための重複PCRの使用の詳細である。各フレームワークを

10

20

30

40

50

表すオリゴマーのプールをサブバンクとして利用できるように注目されたい。

【図 1 3 C】軽鎖コンビナトリアルを構築する一方法の模式図を示す。図 1 3 Cは重複プライマーと図 1 3 Bで作製したサブライブラリーを用いる軽鎖可変領域のコンビナトリアルライブラリーを構築するための重複PCRの使用の詳細である。

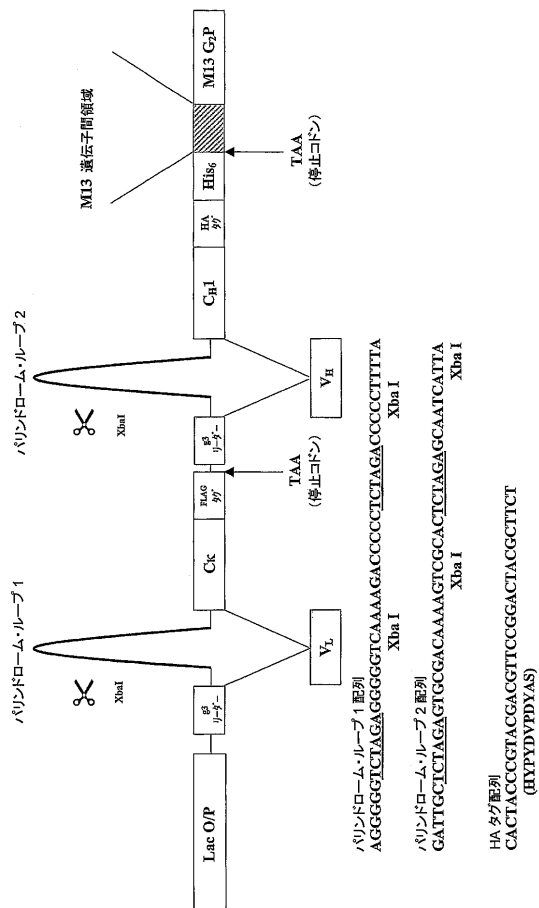
【図 1 3 D】軽鎖コンビナトリアルを構築する一方法の模式図を示す。図 1 3 Dは重複プライマーと各フレームワークを表すオリゴマーのプールを用いる軽鎖可変領域のコンビナトリアルライブラリーを構築するための重複PCRの使用の詳細である。フレームワークのサブバンクも、オリゴマーのプールの代わりに利用できるように注目されたい。これらのステップを繰り返して重鎖コンビナトリアルライブラリーを作製することもできる。ライブラリーを、適当な抗体可変領域（例えば、ドナー抗体可変領域、ヒト化抗体可変領域など）と同時にまたは対にして発現させて、スクリーニングおよび選択することもできる。

10

【図 1】

V_H-233
 5' GAGGTGAAGCTGGTGGAGTCTGGAGAGCGCTTGGTACAGCTGGGGGTTCTCGAGTCTCTCTGTGCAAGCTTCAGTTCACCTTCACCTGAT
 ACTCCATGAACCTGGGTCGCCAGCTCCAGGAGGCACTGAGTGGTGGGTTTATTTAGAAACAAGCTTAATGATTAACACACAGAGTACAGT
 CATCTGTGAAGGTTGGTTCCACCATCTCCAGATTAATCCCAAGATCTCTATCTTCAATGAATGCCCTGAGAGCTGAGGACAGTGGCCACT
 ATTACTGTGAAGTACCCCTAGGTATCATGCTATGAGACTCTGGGCTCAGGACCTCAGTCACCTCTCTCTCA3' (SEQ ID NO. 1773)
 EVKLVSGLVQPGGSLSCAASGFTTFIDYSMWVPPPKALEWLEFINKANDYTYEYASVYKRFITISRONSGSHIYIQNNALRAEDSATY
 YCVRFPRYHAMD³WGOGTSTVTS (SEQ ID NO. 1775)
 V_L-233
 5' GATATTTCTGCTCACTCTCCAGCCCTCTCTGTGACCTCAGAGATGAGGCTCAATCTTCTCTCAGGCCAGCCCAAGTATTAGCACA
 ACTTACCTGGTATCAACAAATACATAGAGTCTCCAGGCTTCTCATCAAGTATGTTTTCAGTCCATCTCTGGATCCCTCCAGGTTCACTG
 GCACTGGATCAGGACAGATTTCACTCTCAGTATCACTGAGTGTGAGGATGATTTGGAATGTATTTCTGTCAACAGAGTACACAGTGGCCG
 TCACGTTCTGGTCTGGACCAAGCTGAGCTGAAA3' (SEQ ID NO. 1774)
 DIVLTQSPATLSVTPGDSVNLSCRASQISNNILHWQKSHSPPELLIKVVFQISLSPFRSGSGTDFLTLSINSEVEDFGMYTCDOSSNHWL
 IFGAGTKLEK (SEQ ID NO. 1776)

【図 2】



【図 9】

フレームワークシャッフルした抗体の配列番号									
抗体	mAb EA2 との同一性 (%)				最も近い V _H 生体系列 ^a				最も近い V _L 生体系列 ^a
	FR1 ^b	FR2 ^a	FR3 ^a	FR4 ^a	FR1	FR2	FR3	FR4	
V _H -EA2	100	100	100	100	VH-21 [3] ^a	VH-33 [3] ^a	VH-74 [5]	JH4 [1]	N.A.
V _H -4H5	83	57	81	82	VH-23 [1]	VH-45 [0]	VH-21 [0] ^b	JH2 [0]	N.A.
V _L -EA2	100	100	100	100	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	L1 [5] ^a , L1 [2] ^a , L23 [7]
V _L -4H5	74	67	59	80	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	L1 [5] ^a , L2 [0] ^a , B2 [2], JH1 [0]

^a アミノ酸レベルの同一性は、それぞれの個々のフレームワークについて、mAb EA2 を参照に用いて計算した。^b アミノ酸レベルの同一性は、全ての 4 フレームワークを同時に、mAb EA2 を参照に用いて計算した。^c 対応する抗体フレームワークと最高の相関性をもつ生体系列フレームワーク。^d それぞれの個々のフレームワークについて、最も相関的な生体系列フレームワークと比較したアミノ酸相関の数を表内に示す。少なくとも 1 つの他の同じファミリー生体系列フレームワークが存在する。同じ相関性の数を示す。少なくとも 1 つの他の異なるファミリー生体系列フレームワークが存在する。FRフレームワーク、N.A. 利用できない。

【図 7】

Heavy chains

DVRLVESGGGLVKGSGSLKLSAASGFTFSYTMSSVQOTPEKRLNWVA[LISSGGFTTYTPDSVKG] EA2
QVOLLSEGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFSYTMSSVQAPGQALEWNGFTISSGGFTTYTPDSVKG] 4H5
QVOLLSEGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFSYTMSSVQAPGQALEWNGFTISSGGFTTYTPDSVKG] "corrected" 4H5

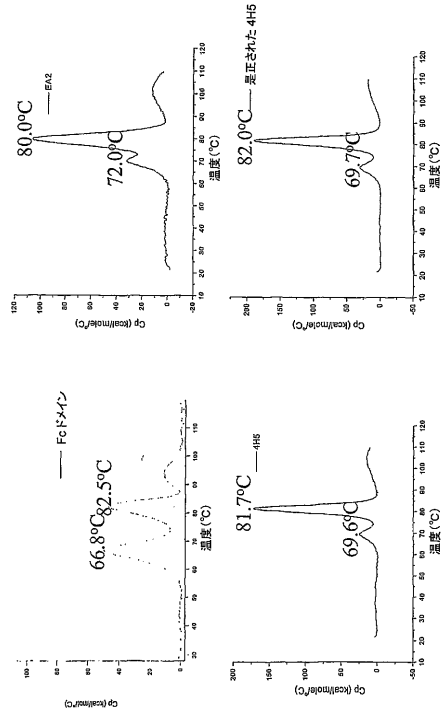
Light chains

RFTISRDNKNTLYLQNSSIKSSEDYMYCTCRA[LIFTYWGQGLTVTSSA] EA2 (SEQ ID NO. 1887)
RFTISRDNKNTLYLQNSSIKSSEDYMYCTCRA[LIFTYWGQGLTVTSSA] 4H5 (SEQ ID NO. 1890)
RFTISRDNKNTLYLQNSSIKSSEDYMYCTCRA[LIFTYWGQGLTVTSSA] "corrected" 4H5 (SEQ ID NO. 1892)

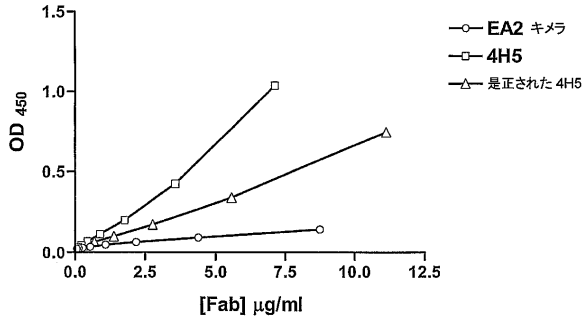
DIKMTQSPSSMYASISGERVTITCKASQDINNIVLSWFOQKFGKSPKTLIYFANRLVD] EA2
DIKMTQSPSSMYASISGERVTITCKASQDINNIVLSWFOQKFGKSPKTLIYFANRLVD] 4H5
DIKMTQSPSSMYASISGERVTITCKASQDINNIVLSWFOQKFGKSPKTLIYFANRLVD] "corrected" 4H5

GVPDRFSGSGSGDYSIPTISSEVEDMGIVYQCKYIDFFYTFGGGTLKLEIK EA2 (SEQ ID NO. 1889)
GVPDRFSGSGSGDYSIPTISSEVEDMGIVYQCKYIDFFYTFGGGTLKLEIK 4H5 (SEQ ID NO. 1891)
GVPDRFSGSGSGDYSIPTISSEVEDMGIVYQCKYIDFFYTFGGGTLKLEIK "corrected" 4H5 (SEQ ID NO. 1893)

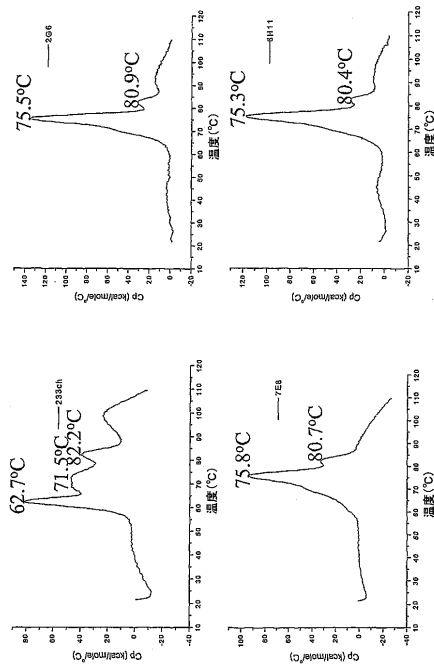
【図 10】



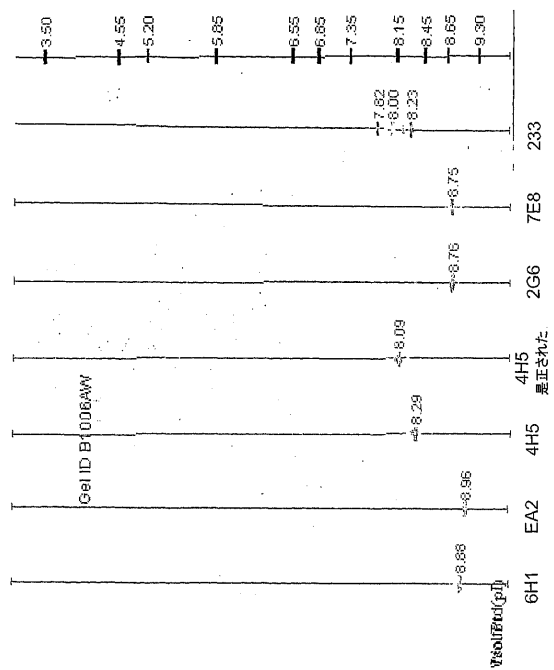
【図 8】



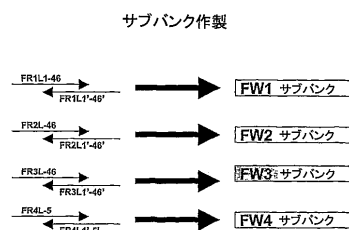
【図 1 1】



【図 1 2】



【図 1 3 A】

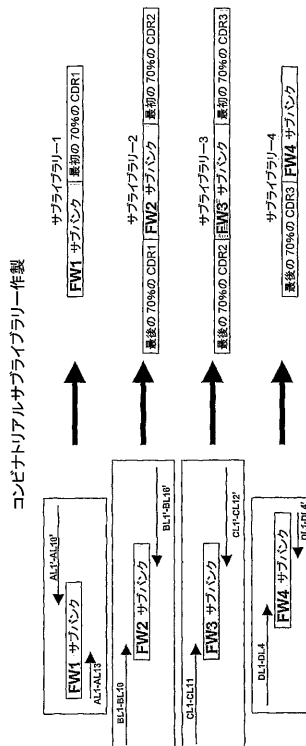


または、
以下を使用



ライブラリー構築のための、
各フレームワーク用オリゴヌクレオチド

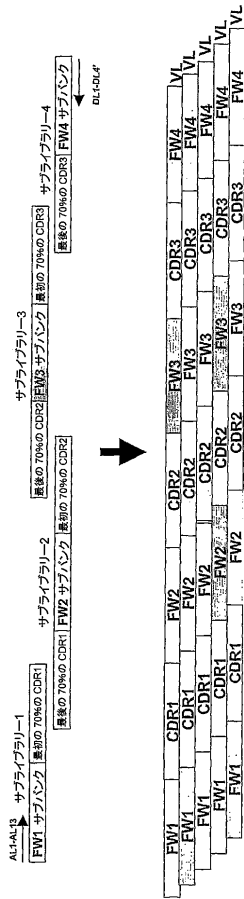
【図 1 3 B】



注意: 各フレームワーク用のオリゴヌクレオチドを
サブバンクとして用いることができる。

【図 1 3 C】

コンビナトリアルライブラリー作製(1)

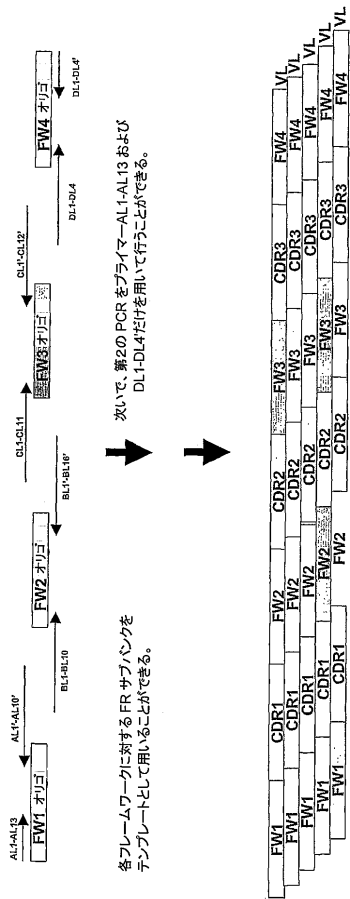


【配列表】

0005153613000001.app

【図 1 3 D】

コンビナトリアルライブラリー作製(2)



次いで、第2の PCR をプライマー-AL1-AL13 および DL1-DL4 だけを用いて行うことができる。

各フレームワークに対する FR サババンクを テンプレートとして用いることができる。

フロントページの続き

- (72)発明者 ウー, ヘレン
アメリカ合衆国 20841 メリーランド州, ボイズ, ハーベスト ムーン ロード 1440
5
- (72)発明者 ダル'アクア, ウィリアム
アメリカ合衆国 20878 メリーランド州, ゲイサーズバーグ, チェスタータウン ストリー
ト 564
- (72)発明者 ダムシュローダー, メリッサ
アメリカ合衆国 20874 メリーランド州, ジャーマンタウン, スティーブル コート 43

審査官 清水 晋治

- (56)参考文献 米国特許出願公開第2005/0048617 (US, A1)
Current opinion in structural biology. 1995, Vol.5, No.4, p.450-456
Journal of molecular biology. 1999, Vol.294, No.1, p.163-180
Protein science. 2002, Vol.11, No.3, p.500-515
Methods in molecular biology. 2003, Vol.207, p.197-212

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N 15/00-15/90
C07K 14/00-19/00
PubMed
SwissProt/PIR/GeneSeq
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq