

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6100199号
(P6100199)

(45) 発行日 平成29年3月22日(2017.3.22)

(24) 登録日 平成29年3月3日(2017.3.3)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C O 7 K 16/22 (2006.01)	C O 7 K 16/22
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21

請求項の数 20 外国語出願 (全 187 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-87194 (P2014-87194)	(73) 特許権者	502233344
(22) 出願日	平成26年4月21日(2014.4.21)		エスバテック - ア ノバルティス カ
(62) 分割の表示	特願2011-515049 (P2011-515049)		ンパニー エルエルシー
原出願日	平成21年6月25日(2009.6.25)		スイス国、シーエイチ-8952 シュリ
(65) 公開番号	特開2014-158491 (P2014-158491A)	(74) 代理人	100078282
(43) 公開日	平成26年9月4日(2014.9.4)		弁理士 山本 秀策
審査請求日	平成26年4月21日(2014.4.21)	(74) 代理人	100113413
(31) 優先権主張番号	61/075,697		弁理士 森下 夏樹
(32) 優先日	平成20年6月25日(2008.6.25)	(72) 発明者	レオナルド ボラス
(33) 優先権主張国	米国 (US)		スイス国 ツェーハー-8952 シュリ
(31) 優先権主張番号	61/075,692		ーレン, バンデンタルシュトラーセ 1
(32) 優先日	平成20年6月25日(2008.6.25)	(72) 発明者	デイビッド ウレヒ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		スイス国 ツェーハー-8708, マン
			ネドルフ, シュレイネルヴェーク 5
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 VEGFを阻害する安定かつ可溶性の抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ヒトVEGFを中和する、可変重鎖（VH）および可変軽鎖（VL）を含む組換えイムノバインダーであって、該VHが配列番号8、配列番号20、および配列番号32の配列として示されるCDRを含み、かつ該VLが配列番号43、配列番号55、および配列番号66の配列として示されるCDRを含み、該VHの重鎖可変領域フレームワーク配列が、配列番号169、配列番号170または配列番号171に少なくとも95%の同一性を有し、該VLの軽鎖可変領域フレームワーク配列が、配列番号167または配列番号168に少なくとも95%の同一性を有する、イムノバインダー。

【請求項2】

前記重鎖可変領域が、配列番号124、136、142、144、145および146～165からなる群より選択されるアミノ酸配列を含み、かつ、前記軽鎖可変領域が、配列番号92、98、103～105からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、請求項1に記載のイムノバインダー。

【請求項3】

配列番号178、配列番号179、または配列番号180に少なくとも95%の同一性を有する、請求項1に記載のイムノバインダーであって、前記VHが配列番号8、配列番号20、および配列番号32の配列として示されるCDRを含み、かつ前記VLが配列番号43、配列番号55、および配列番号66の配列として示されるCDRを含む、イムノバインダー。

10

20

【請求項 4】

前記重鎖可変領域が配列番号 164 のアミノ酸配列を含み、かつ前記軽鎖可変領域が配列番号 87 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載のイムノバインダー。

【請求項 5】

抗体、s c F v、F a b、または D a b である、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載のイムノバインダー。

【請求項 6】

請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載のイムノバインダー、および薬学的に許容される担体を含む組成物。

【請求項 7】

局所投与、経口投与、経鼻投与、直腸投与または非経口投与のために処方される、請求項 6 に記載の組成物。

【請求項 8】

眼内投与のために処方される、請求項 6 に記載の組成物。

【請求項 9】

請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載のイムノバインダーをコードしている、単離された核酸分子。

【請求項 10】

請求項 9 に記載の核酸分子を含む発現ベクター。

【請求項 11】

請求項 10 に記載の発現ベクターを含む宿主細胞。

【請求項 12】

ヒト V E G F 媒介性疾患の処置または予防のための医薬の製造における、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載のイムノバインダーの使用。

【請求項 13】

請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載のイムノバインダーを含む、ヒト V E G F 媒介性疾患を処置または予防するための組成物。

【請求項 14】

前記 V E G F 媒介性疾患が、加齢黄斑変性、新生血管形成緑内障、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、水晶体後線維増殖症、乳癌、肺癌、胃癌、食道癌、直腸結腸癌、肝臓癌、卵巣癌、卵巣男性胚細胞腫、子宮頸癌、子宮内膜癌、子宮内膜増殖症、子宮内膜症、線維肉腫、絨毛癌、頭部および頸部のがん、上咽頭癌、鼻咽腔癌、肝芽腫、カポジ肉腫、メラノーマ、皮膚癌、血管腫、血管芽細胞腫、脾臓癌、網膜芽細胞腫、星細胞腫、膠芽腫、神経鞘腫、乏突起膠腫、髄芽腫、神経芽細胞腫、横紋筋肉腫、骨原性肉腫、平滑筋肉腫、尿路癌、甲状腺癌、ウィルムス腫、腎細胞癌、前立腺癌、母斑症に付随する異常血管増殖、浮腫、メグズ症候群、慢性関節リウマチ、乾癬、ならびにアテローム性動脈硬化症からなる群より選択される、請求項 12 に記載の使用。

【請求項 15】

ヒトにおける V E G F 媒介性疾患の処置のための組成物であって、該組成物は、薬学的に許容される投薬形態で、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載のイムノバインダーを含み、そして該組成物は、局所的経路、筋肉内経路、腹腔内経路、脳脊髄内経路、皮下経路、関節内経路、滑膜内経路、鞘内経路、経口経路、または吸入経路により投与されることを特徴とする、組成物。

【請求項 16】

ヒトにおける V E G F 媒介性疾患の処置のための組成物であって、該組成物は、薬学的に許容される投薬形態で、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載のイムノバインダーを含み、そして該組成物は、眼内経路により投与されることを特徴とする、組成物。

【請求項 17】

前記 V E G F 媒介性疾患が、加齢黄斑変性、新生血管形成緑内障、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、水晶体後線維増殖症、乳癌、肺癌、胃癌、食道癌、直腸結腸癌、肝臓癌、卵

10

20

30

40

50

巣癌、卵巣男性胚細胞腫、子宮頸癌、子宮内膜癌、子宮内膜増殖症、子宮内膜症、線維肉腫、絨毛癌、頭部および頸部のがん、上咽頭癌、鼻咽腔癌、肝芽腫、カポジ肉腫、メラノーマ、皮膚癌、血管腫、血管芽細胞腫、睪臓癌、網膜芽細胞腫、星細胞腫、膠芽腫、神経鞘腫、乏突起膠腫、髄芽腫、神経芽細胞腫、横紋筋肉腫、骨原性肉腫、平滑筋肉腫、尿路癌、甲状腺癌、ウィルムス腫、腎細胞癌、前立腺癌、母斑症に付随する異常血管増殖、浮腫、メグズ症候群、慢性関節リウマチ、乾癬、ならびにアテローム性動脈硬化症からなる群より選択される、請求項13に記載の組成物。

【請求項18】

局所投与のための薬学的に許容される投薬形態の、請求項1～5のいずれか一項に記載のイムノバインダーを含む組成物。

10

【請求項19】

請求項1～5のいずれか一項に記載のイムノバインダーを含む、二重特異性分子。

【請求項20】

哺乳動物におけるVEGF媒介性疾患の処置のための組成物であって、該組成物は、薬学的に許容される投薬形態で、請求項1～5のいずれか一項に記載のイムノバインダー、または請求項9に記載の単離された核酸分子、または請求項10に記載の発現ベクター、または請求項6～8に記載の組成物を含み、そして該組成物は、局所的経路、眼内経路、筋肉内経路、腹腔内経路、脳脊髄内経路、皮下経路、関節内経路、滑膜内経路、鞘内経路、経口経路、または吸入経路により投与されることを特徴とする、組成物。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願)

この出願は、2008年6月25日に出願されたUS61/133,212、2008年6月25日に出願されたUS61/075,697、2009年2月24日に出願されたUS61/155,041、および、2008年6月25日に出願されたUS61/075,692への優先権を主張する。

【0002】

本明細書を通して引用される、あらゆる特許、特許出願、および参考文献の内容は、その全体が参照によって本明細書に援用される。

30

【背景技術】

【0003】

(発明の背景)

新脈管形成は、固形腫瘍、増殖性網膜症または加齢黄斑変性(AMD)などの眼内の新生血管形成症候群、慢性関節リウマチ、および乾癬を含めた様々な障害の病原に関係づけられる(非特許文献1;非特許文献2;および「Pathobiology of ocular disease. A dynamic approach.」Garner A、Klintworth G K編集、第2版、Marcel Dekker、NY、1625～1710頁(1994)におけるGarner A、Vascular diseases)。固形腫瘍では、新脈管形成および新しい脈管構造の増殖が腫瘍を生産させ、腫瘍切片における微小血管の密度と、乳がんおよび他のがんにおける患者の生存との間に相関が実証されている(非特許文献3;非特許文献4;および非特許文献5)。

40

【0004】

血管内皮増殖因子(VEGF)は、公知の新脈管形成および新生血管形成の制御因子であり、腫瘍および眼内の障害に付随する新生血管形成の主要なメディエータであることが示されている(非特許文献6)。VEGFのmRNAはヒトの腫瘍の多くにおいて過剰発現され、眼の流体におけるVEGFの濃度は、糖尿病患者および他の虚血関連の網膜症患者における血管の能動的増殖の存在に高度に相関する(非特許文献7;非特許文献8;非特許文献9;非特許文献10;およびDvorakら、Am J. Pathol.、146巻、1029～1039頁(1995年);Aielloら、N. Engl. J

50

. Med.、331巻、1480～1487頁(1994年))。さらに、最近の研究は、AMDに罹患している患者の脈絡膜新生血管膜における局在性VEGFの存在を示している(Lopezら、Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.、37巻、855～868頁(1996年))。抗VEGF中和抗体を用いて、ヌードマウスにおける様々なヒト腫瘍細胞系の増殖を抑制すること、また、虚血性網膜障害のモデルにおける眼内の新脈管形成を阻害することもできる(Kimら、Nature、362巻、841～844頁(1993年); Warrenら、J. Clin. Invest.、95巻、1789～1797頁(1995年); Borgstromら、Cancer Res.、56巻、4032～4039頁(1996年); およびMelnykら、Cancer Res.、56巻、921～924頁(1996年))(Adamisら、Arch. Ophthalmol.、114巻、66～71頁(1996年))。

10

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】Folkmanら、J. Biol. Chem.、1992年、267巻、10931～10934頁

【非特許文献2】Klagsbrunら、Annu. Rev. Physiol.、1991年、53巻、217～239頁

【非特許文献3】Weidnerら、N Engl J Med、1991年、324巻、1～6頁

20

【非特許文献4】Horakら、Lancet、1992年、340巻、1120～1124頁

【非特許文献5】Macchiaroniら、Lancet、1992年、340巻、145～146頁

【非特許文献6】Ferraraら、Endocr. Rev.、1997年、18巻、4～25頁

【非特許文献7】Berkmanら、J Clin Invest、1993年、91巻、153～159頁

【非特許文献8】Brownら、Human Pathol.、1995年、26巻、86～91頁

30

【非特許文献9】Brownら、Cancer Res.、1993年、53巻、4727～4735頁

【非特許文献10】Matternら、Brit. J. Cancer.、1996年、73巻、931～934頁

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

このように、固形腫瘍および様々な新生血管形成性の眼内疾患を処置するのに用いることができる抗VEGFモノクローナル抗体が必要とされている。

【課題を解決するための手段】

40

【0007】

(発明の概要)

本発明は、ウサギモノクローナル抗体からのCDRを含む、可溶性で安定な抗VEGFイムノバインダーを提供する。前記抗体は、VEGF媒介性障害の診断および／または処置のためにデザインされている。本発明の組換え抗体を発現するためのハイブリドーマ、核酸、ベクター、および宿主細胞、これらを単離するための方法、ならびに医薬における前記抗体の使用も開示する。

本発明は、例えば以下の項目を提供する。

(項目1)

可変重鎖(VH)かつ／または可変軽鎖(VL)を含む組換えイムノバインダーであっ

50

て、該イムノバインダーがヒト V E G F を中和しウサギ C D R を含む、イムノバインダー。

(項目 2)

キメラのイムノバインダーである、項目 1 に記載のイムノバインダー。

(項目 3)

ヒト化されている、前述の項目のいずれか一項に記載のイムノバインダー。

(項目 4)

配列番号 1 4、配列番号 2 6、配列番号 3 7、配列番号 4 9、配列番号 6 0、および配列番号 7 1 からなる群のコンセンサス配列に少なくとも 8 0 % の類似性を有する C D R を少なくとも 1 つ含む、前述の項目のいずれか一項に記載のイムノバインダー。

10

(項目 5)

配列番号 2、配列番号 3、配列番号 1 5、配列番号 2 7、配列番号 3 8、配列番号 5 0、および配列番号 6 1 からなる群の配列に少なくとも 8 0 % の類似性を有する C D R を少なくとも 1 つ含む、前述の項目のいずれか一項に記載のイムノバインダー。

(項目 6)

前記 V H が配列番号 2、配列番号 1 5、および配列番号 2 7 からなる群の C D R を含み、かつ／または前記 V L が配列番号 3 8、配列番号 5 0、および配列番号 6 1 からなる群の C D R を含む、項目 5 に記載のイムノバインダー。

(項目 7)

前記 V H が配列番号 3、配列番号 1 5、および配列番号 2 7 からなる群の C D R を含み、かつ／または前記 V L が配列番号 3 8、配列番号 5 0、および配列番号 6 1 からなる群の C D R を含む、項目 5 に記載のイムノバインダー。

20

(項目 8)

配列番号 4、配列番号 1 6、配列番号 2 8、配列番号 3 9、配列番号 5 1、および配列番号 6 2 からなる群の配列に少なくとも 8 0 % の類似性を有する C D R を少なくとも 1 つ含む、項目 1 から 4 のいずれか一項に記載のイムノバインダー。

(項目 9)

前記 V H が配列番号 4、配列番号 1 6、配列番号 2 8 からなる群の C D R を含み、かつ／または前記 V L が配列番号 3 9、配列番号 5 1、および配列番号 6 2 からなる群の C D R を含む、項目 8 に記載のイムノバインダー。

30

(項目 1 0)

配列番号 5、配列番号 1 7、配列番号 2 9、配列番号 4 0、配列番号 5 2、および配列番号 6 3 からなる群の配列に少なくとも 8 0 % の類似性を有する C D R を少なくとも 1 つ含む、項目 1 から 4 のいずれか一項に記載のイムノバインダー。

(項目 1 1)

前記 V H が配列番号 5、配列番号 1 7、配列番号 2 9 からなる群の C D R を含み、かつ／または前記 V L が配列番号 4 0、配列番号 5 2、および配列番号 6 3 からなる群の C D R を含む、項目 1 0 に記載のイムノバインダー。

(項目 1 2)

配列番号 6、配列番号 1 8、配列番号 3 0、配列番号 4 1、配列番号 5 3、および配列番号 6 4 からなる群の配列に少なくとも 8 0 % の類似性を有する C D R を少なくとも 1 つ含む、項目 1 から 4 のいずれか一項に記載のイムノバインダー。

40

(項目 1 3)

前記 V H が配列番号 6、配列番号 1 8、および配列番号 3 0 からなる群の C D R を含み、かつ／または前記 V L が配列番号 4 1、配列番号 5 3、および配列番号 6 4 からなる群の C D R を含む、項目 1 2 に記載のイムノバインダー。

(項目 1 4)

配列番号 7、配列番号 1 9、配列番号 3 1、配列番号 4 2、配列番号 5 4、および配列番号 6 5 からなる群の配列に少なくとも 8 0 % の類似性を有する C D R を少なくとも 1 つ含む、項目 1 から 4 のいずれか一項に記載のイムノバインダー。

50

(項目 15)

前記 V H が配列番号 7、配列番号 19、および配列番号 31 からなる群の C D R を含み、かつ／または前記 V L が配列番号 42、配列番号 54、および配列番号 65 からなる群の C D R を含む、項目 14 に記載のイムノバインダー。

(項目 16)

配列番号 8、配列番号 20、配列番号 32、配列番号 43、配列番号 55、および配列番号 66 からなる群の配列に少なくとも 80% の類似性を有する C D R を少なくとも 1 つ含む、項目 1 から 4 のいずれか一項に記載のイムノバインダー。

(項目 17)

前記 V H が配列番号 8、配列番号 20、および配列番号 32 からなる群の C D R を含み、かつ／または前記 V L が配列番号 43、配列番号 55、および配列番号 66 からなる群の C D R を含む、項目 16 に記載のイムノバインダー。

10

(項目 18)

配列番号 9、配列番号 21、配列番号 33、配列番号 44、配列番号 56、および配列番号 67 からなる群の配列に少なくとも 80% の類似性を有する C D R を少なくとも 1 つ含む、項目 1 から 4 のいずれか一項に記載のイムノバインダー。

(項目 19)

前記 V H が配列番号 9、配列番号 21、および配列番号 33 からなる群の C D R を含み、かつ／または前記 V L が配列番号 44、配列番号 56、および配列番号 67 からなる群の C D R を含む、項目 18 に記載のイムノバインダー。

20

(項目 20)

配列番号 10、配列番号 22、配列番号 34、配列番号 45、配列番号 57、および配列番号 68 からなる群の配列に少なくとも 80% の類似性を有する C D R を少なくとも 1 つ含む、項目 1 から 4 のいずれか一項に記載のイムノバインダー。

(項目 21)

前記 V H が配列番号 10、配列番号 22、および配列番号 34 からなる群の C D R を含み、かつ／または前記 V L が配列番号 45、配列番号 57、および配列番号 68 からなる群の C D R を含む、項目 20 に記載のイムノバインダー。

(項目 22)

配列番号 11、配列番号 13、配列番号 23、配列番号 25、配列番号 35、配列番号 46、配列番号 58、および配列番号 69 からなる群の配列に少なくとも 80% の類似性を有する C D R を少なくとも 1 つ含む、項目 1 から 4 のいずれか一項に記載のイムノバインダー。

30

(項目 23)

前記 V H が、(i) 配列番号 11、配列番号 23、および配列番号 35 からなる群、(i i) 配列番号 11、配列番号 25、および配列番号 35 からなる群、(i i i) 配列番号 13、配列番号 23、および配列番号 35 からなる群、または (i v) 配列番号 13、配列番号 25、および配列番号 35 からなる群の C D R を含む、項目 22 に記載のイムノバインダー。

(項目 24)

前記 V L が、配列番号 46、配列番号 58、および配列番号 69 からなる群の C D R を含む、項目 23 に記載のイムノバインダー。

40

(項目 25)

配列番号 12、配列番号 24、配列番号 36、配列番号 47、配列番号 48、配列番号 59、および配列番号 70 からなる群の配列に少なくとも 80% の類似性を有する C D R を少なくとも 1 つ含む、項目 1 から 4 のいずれか一項に記載のイムノバインダー。

(項目 26)

前記 V H が、配列番号 12、配列番号 24、および配列番号 36 からなる群の C D R を含み、かつ／または前記 V L が、(i) 配列番号 47、配列番号 59、および配列番号 70 からなる群の C D R、もしくは (i i) 配列番号 48、配列番号 59、および配列番号

50

70からなる群のCDRを含む、項目25に記載のイムノバインダー。

(項目27)

配列番号169の配列に少なくとも80%の配列同一性を有する重鎖可変領域可変領域フレームワーク配列を含む、前述の項目のいずれか一項に記載のイムノバインダー。

(項目28)

前記重鎖可変領域フレームワークが配列番号170または配列番号171である、項目27に記載のイムノバインダー。

(項目29)

AHオナンバリングシステムによる、前記重鎖可変領域の位置1、83、または87に欠失を有する、前述の項目のいずれか一項に記載のイムノバインダー。

10

(項目30)

AHオナンバリングシステムによる、前記重鎖可変領域における位置2、12、24、25、46、54、55、83、84、87、89、103、105、108、または144の少なくとも1つに置換を有する、前述の項目のいずれか一項に記載のイムノバインダー。

(項目31)

前記置換が、

(a) 位置2のグルタミン、

(b) 位置12のセリン、

(c) 位置24のスレオニン、

(d) 位置25のバリン、

(e) 位置46のロイシン、

(f) 位置54のチロシン、

(g) 位置55のイソロイシン、

(h) 位置83のアラニン、

(i) 位置84のアスパラギン、

(j) 位置87のアラニンまたはロイシン、

(k) 位置89のアラニンまたはロイシン、

(l) 位置103のセリンまたはスレオニン、

(m) 位置105のフェニルアラニン、

(n) 位置108のアルギニン、および

(o) 位置144のセリンまたはスレオニン

からなる群より選択される、項目30に記載のイムノバインダー。

(項目32)

配列番号167の配列に少なくとも85%の配列同一性を有する軽鎖可変領域フレームワーク配列を含む、前述の項目のいずれか一項に記載のイムノバインダー。

(項目33)

前記軽鎖可変領域フレームワークが配列番号167または配列番号168である、項目30に記載のイムノバインダー。

(項目34)

AHオナンバリングシステムによる、前記軽鎖可変領域の位置1、2、または15の少なくとも1つに置換を有する、前述の項目のいずれか一項に記載のイムノバインダー。

(項目35)

前記置換が、

(a) 位置1のアスパラギン酸、

(b) 位置2のバリン、

(c) 位置15のスレオニン

からなる群より選択される、項目34に記載のイムノバインダー。

(項目36)

配列番号107に少なくとも80%類似であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、およ

50

20

30

40

び／または配列番号 7 2 に少なくとも 8 0 % 類似である軽鎖可変領域を含む、項目 5 から 7、または 2 7 から 3 5 のいずれか一項に記載のイムノバインダー。

(項目 3 7)

配列番号 1 0 9 に少なくとも 8 0 % 類似であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および／または配列番号 7 3 に少なくとも 8 0 % 類似である軽鎖可変領域を含む、項目 8 から 9、または 2 7 から 3 5 のいずれか一項に記載のイムノバインダー。

(項目 3 8)

配列番号 1 1 0 に少なくとも 8 0 % 類似であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および／または配列番号 7 4 に少なくとも 8 0 % 類似である軽鎖可変領域を含む、項目 1 0 から 1 1、または 2 7 から 3 5 のいずれか一項に記載のイムノバインダー。

10

(項目 3 9)

配列番号 1 1 1 に少なくとも 8 0 % 類似であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および／または配列番号 7 5 に少なくとも 8 0 % 類似である軽鎖可変領域を含む、項目 1 2 から 1 3、または 2 7 から 3 5 のいずれか一項に記載のイムノバインダー。

(項目 4 0)

配列番号 1 1 2 に少なくとも 8 0 % 類似であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および／または配列番号 7 6 に少なくとも 8 0 % 類似である軽鎖可変領域を含む、項目 1 4 から 1 5、または 2 7 から 3 5 のいずれか一項に記載のイムノバインダー。

(項目 4 1)

配列番号 1 1 3 に少なくとも 8 0 % 類似であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および／または配列番号 7 7 に少なくとも 8 0 % 類似である軽鎖可変領域を含む、項目 1 6 から 1 7、または 2 7 から 3 5 のいずれか一項に記載のイムノバインダー。

20

(項目 4 2)

配列番号 1 7 8、配列番号 1 7 9、または配列番号 1 8 0 に少なくとも 8 0 % の同一性を有する、項目 4 1 に記載のイムノバインダー。

(項目 4 3)

配列番号 1 1 4 に少なくとも 8 0 % 類似であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および／または配列番号 7 8 に少なくとも 8 0 % 類似である軽鎖可変領域を含む、項目 1 8 から 1 9、または 2 7 から 3 5 のいずれか一項に記載のイムノバインダー。

(項目 4 4)

30

配列番号 1 1 5 に少なくとも 8 0 % 類似であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および／または配列番号 7 9 に少なくとも 8 0 % 類似である軽鎖可変領域を含む、項目 2 0 から 2 1、または 2 7 から 3 5 のいずれか一項に記載のイムノバインダー。

(項目 4 5)

配列番号 1 7 7 に少なくとも 8 0 % の同一性を有する、項目 4 4 に記載のイムノバインダー。

(項目 4 6)

配列番号 1 1 6 に少なくとも 8 0 % 類似であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および／または配列番号 8 0 に少なくとも 8 0 % 類似である軽鎖可変領域を含む、項目 2 2 から 2 4、または 2 7 から 3 5 のいずれか一項に記載のイムノバインダー。

40

(項目 4 7)

配列番号 1 1 7 に少なくとも 8 0 % 類似であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および／または配列番号 8 1 に少なくとも 8 0 % 類似である軽鎖可変領域を含む、項目 2 5 から 2 6、または 2 7 から 3 5 のいずれか一項に記載のイムノバインダー。

(項目 4 8)

配列番号 1 7 6 に少なくとも 8 0 % の同一性を有する、項目 4 7 に記載のイムノバインダー。

(項目 4 9)

前述の項目のいずれか一項に記載のイムノバインダーと、ヒト V E G F に対する結合を競合するイムノバインダー。

50

(項目 5 0)

前述の項目のいずれか一項に記載のイムノバインダーによって認識されるヒト V E G F 上のエピトープに対して、少なくとも 10^{-7} M^{-1} の親和性で結合するイムノバインダー。

(項目 5 1)

ヒトおよびラット／マウス V E G F に特異的に結合する、前述の項目のいずれか一項に記載のイムノバインダー。

(項目 5 2)

抗体、s c F v、F a b、または D a b である、前述の項目のいずれか一項に記載のイムノバインダー。

10

(項目 5 3)

前述の項目のいずれか一項に記載のイムノバインダー、および薬学的に許容される担体を含む組成物。

(項目 5 4)

前述の項目のいずれか一項に記載のイムノバインダーをコードしている、単離された核酸分子。

(項目 5 5)

項目 5 4 に記載の核酸分子を含む発現ベクター。

(項目 5 6)

項目 5 5 に記載の発現ベクターを含む宿主細胞。

20

(項目 5 7)

被験体が V E G F 媒介性疾患について処置されるように、前述の項目のいずれか一項に記載のイムノバインダーを前記被験体に投与することを含む、被験体におけるヒト V E G F 媒介性疾患を処置または予防する方法。

(項目 5 8)

前記イムノバインダーを局所的に投与する、項目 5 7 に記載の方法。

(項目 5 9)

前記 V E G F 媒介性疾患が、加齢黄斑変性、新生血管形成緑内障、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、水晶体後線維増殖症、乳癌、肺癌、胃癌、食道癌、直腸結腸癌、肝臓癌、卵巣癌、昏睡、卵巣男性胚細胞腫、子宮頸癌、子宮内膜癌、子宮内膜増殖症、子宮内膜症、線維肉腫、絨毛癌、頭部および頸部のがん、上咽頭癌、鼻咽腔癌、肝芽腫、カポジ肉腫、メラノーマ、皮膚癌、血管腫、海綿状血管腫、血管芽細胞腫、脾臓癌、網膜芽細胞腫、星細胞腫、膠芽腫、神経鞘腫、乏突起膠腫、髄芽腫、神経芽細胞腫、横紋筋肉腫、骨原性肉腫、平滑筋肉腫、尿路癌、甲状腺癌、ウィルムス腫、腎細胞癌、前立腺癌、母斑症に付随する異常血管増殖、浮腫（脳腫瘍に付随するものなど）、メグズ症候群、慢性関節リウマチ、乾癬、ならびにアテローム性動脈硬化症からなる群より選択される、項目 5 7 または 5 8 に記載の方法。

30

(項目 6 0)

配列番号 6 0 ～ 1 6 6、および配列番号 1 7 5 ～ 1 8 0 に記載するアミノ酸配列の任意の 1 つを含む抗体を生成するハイブリドーマ。

40

(項目 6 1)

ラット／マウスおよびヒトの V E G F、またはその部分と交差反応性であるイムノバインダーを産生、または同定するのに適する免疫原。

(項目 6 2)

配列番号 1 を有する、項目 6 1 に記載の免疫原。

(項目 6 3)

ラット／マウスおよびヒトの V E G F と交差反応性であるイムノバインダーを作製する方法であって、項目 6 1 に記載の免疫原を使用する、方法。

【図面の簡単な説明】

【0 0 0 8】

50

【図1a】図1は、Biacore (hVEGF165)を用いて、hVEGF₁₆₅と選択されたscFvとの結合動態を示すグラフである。図1aは、511maxに関して得られたデータ：Ka (1/Ms)：6.59E+05；SE (ka)：1.10E+03；kd (1/s)：4.40E-05；SE (kd)：6.30E-07；KD (M)：6.67E-11を示す。図1bは、578maxに関して得られたデータ：Ka (1/Ms)：7.00E+05；SE (ka)：1.40E+03；kd (1/s)：3.07E-04；SE (kd)：8.50E-07；KD (M)：4.39E-10を示す。

【図1b】図1は、Biacore (hVEGF165)を用いて、hVEGF₁₆₅と選択されたscFvとの結合動態を示すグラフである。図1aは、511maxに関して得られたデータ：Ka (1/Ms)：6.59E+05；SE (ka)：1.10E+03；kd (1/s)：4.40E-05；SE (kd)：6.30E-07；KD (M)：6.67E-11を示す。図1bは、578maxに関して得られたデータ：Ka (1/Ms)：7.00E+05；SE (ka)：1.40E+03；kd (1/s)：3.07E-04；SE (kd)：8.50E-07；KD (M)：4.39E-10を示す。

【図2a】図2は、ヒト、マウスおよびラットVEGFに対する578maxの結合動態を示すことにより種特異性を示すグラフである。図2aは、ヒトVEGF165に関して得られたデータ：Ka (1/Ms)：7.00E+05；SE (ka)：1.40E+03；kd (1/s)：3.07E-04；SE (kd)：8.50E-07；KD (M)：4.39E-10を示す。図2bは、マウスVEGF164に関して得られたデータ：Ka (1/Ms)：1.03E+06；SE (ka)：2.30E+03；kd (1/s)：4.40E-04；SE (kd)：9.40E-07；KD (M)：4.29E-10を示す。図2cは、ラットVEGF164に関して得られたデータ：Ka (1/Ms)：8.83E+05；SE (ka)：2.50E+03；kd (1/s)：5.28E-04；SE (kd)：1.20E-06；KD (M)：5.98E-10を示す。

【図2b】図2は、ヒト、マウスおよびラットVEGFに対する578maxの結合動態を示すことにより種特異性を示すグラフである。図2aは、ヒトVEGF165に関して得られたデータ：Ka (1/Ms)：7.00E+05；SE (ka)：1.40E+03；kd (1/s)：3.07E-04；SE (kd)：8.50E-07；KD (M)：4.39E-10を示す。図2bは、マウスVEGF164に関して得られたデータ：Ka (1/Ms)：1.03E+06；SE (ka)：2.30E+03；kd (1/s)：4.40E-04；SE (kd)：9.40E-07；KD (M)：4.29E-10を示す。図2cは、ラットVEGF164に関して得られたデータ：Ka (1/Ms)：8.83E+05；SE (ka)：2.50E+03；kd (1/s)：5.28E-04；SE (kd)：1.20E-06；KD (M)：5.98E-10を示す。

【図2c】図2は、ヒト、マウスおよびラットVEGFに対する578maxの結合動態を示すことにより種特異性を示すグラフである。図2aは、ヒトVEGF165に関して得られたデータ：Ka (1/Ms)：7.00E+05；SE (ka)：1.40E+03；kd (1/s)：3.07E-04；SE (kd)：8.50E-07；KD (M)：4.39E-10を示す。図2bは、マウスVEGF164に関して得られたデータ：Ka (1/Ms)：1.03E+06；SE (ka)：2.30E+03；kd (1/s)：4.40E-04；SE (kd)：9.40E-07；KD (M)：4.29E-10を示す。図2cは、ラットVEGF164に関して得られたデータ：Ka (1/Ms)：8.83E+05；SE (ka)：2.50E+03；kd (1/s)：5.28E-04；SE (kd)：1.20E-06；KD (M)：5.98E-10を示す。

【図3a】図3は、VEGFアイソフォーム (hVEGF121およびhVEGF110) に対する578maxの結合動態を示すグラフである。図3aは、ヒトVEGF165に関して得られたデータ：Ka (1/Ms)：7.00E+05；SE (ka)：1.4E+03；kd (1/s)：3.07E-04；SE (kd)：8.50E-07；KD

10

20

30

40

50

(M) : 4.39×10^{-10} を示す。図3bは、ヒトVEGF121に関して得られたデータ: $K_a (1/Ms) : 5.87 \times 10^5$; $SE(k_a) : 1.20 \times 10^3$; $k_d (1/s) : 5.58 \times 10^{-4}$; $SE(k_d) : 9.60 \times 10^{-7}$; $KD(M) : 9.50 \times 10^{-11}$ を示す。図3cは、ヒトVEGF110に関して得られたデータ: $K_a (1/Ms) : 5.23 \times 10^5$; $SE(k_a) : 1.30 \times 10^3$; $k_d (1/s) : 7.22 \times 10^{-4}$; $SE(k_d) : 8.10 \times 10^{-7}$; $KD(M) : 1.38 \times 10^{-9}$ を示す。

【図3b】図3は、VEGFアイソフォーム(hVEGF121およびhVEGF110)に対する578maxの結合動態を示すグラフである。図3aは、ヒトVEGF165に関して得られたデータ: $K_a (1/Ms) : 7.00 \times 10^5$; $SE(k_a) : 1.4 \times 10^3$; $k_d (1/s) : 3.07 \times 10^{-4}$; $SE(k_d) : 8.50 \times 10^{-7}$; $KD(M) : 4.39 \times 10^{-10}$ を示す。図3bは、ヒトVEGF121に関して得られたデータ: $K_a (1/Ms) : 5.87 \times 10^5$; $SE(k_a) : 1.20 \times 10^3$; $k_d (1/s) : 5.58 \times 10^{-4}$; $SE(k_d) : 9.60 \times 10^{-7}$; $KD(M) : 9.50 \times 10^{-11}$ を示す。図3cは、ヒトVEGF110に関して得られたデータ: $K_a (1/Ms) : 5.23 \times 10^5$; $SE(k_a) : 1.30 \times 10^3$; $k_d (1/s) : 7.22 \times 10^{-4}$; $SE(k_d) : 8.10 \times 10^{-7}$; $KD(M) : 1.38 \times 10^{-9}$ を示す。

【図4a】図4は、hVEGF165に対する578max、578minmaxおよび578wtの結合動態を表すグラフである。図4aは、578maxに関して得られたデータ: $K_a (1/Ms) : 7.00 \times 10^5$; $SE(k_a) : 1.40 \times 10^3$; $k_d (1/s) : 3.07 \times 10^{-4}$; $SE(k_d) : 8.50 \times 10^{-7}$; $KD(M) : 4.39 \times 10^{-10}$ を示す。図4bは、578minmaxに関して得られたデータ: $K_a (1/Ms) : 8.06 \times 10^5$; $SE(k_a) : 2.10 \times 10^3$; $k_d (1/s) : 5.04 \times 10^{-4}$; $SE(k_d) : 1.10 \times 10^{-6}$; $KD(M) : 6.25 \times 10^{-10}$ を示す。図4cは、578wt-Hisに関して得られたデータ: $K_a (1/Ms) : 8.45 \times 10^5$; $SE(k_a) : 1.60 \times 10^3$; $k_d (1/s) : 1.69 \times 10^{-4}$; $SE(k_d) : 7.60 \times 10^{-7}$; $KD(M) : 2.00 \times 10^{-10}$ を示す。

【図4b】図4は、hVEGF165に対する578max、578minmaxおよび578wtの結合動態を表すグラフである。図4aは、578maxに関して得られたデータ: $K_a (1/Ms) : 7.00 \times 10^5$; $SE(k_a) : 1.40 \times 10^3$; $k_d (1/s) : 3.07 \times 10^{-4}$; $SE(k_d) : 8.50 \times 10^{-7}$; $KD(M) : 4.39 \times 10^{-10}$ を示す。図4bは、578minmaxに関して得られたデータ: $K_a (1/Ms) : 8.06 \times 10^5$; $SE(k_a) : 2.10 \times 10^3$; $k_d (1/s) : 5.04 \times 10^{-4}$; $SE(k_d) : 1.10 \times 10^{-6}$; $KD(M) : 6.25 \times 10^{-10}$ を示す。図4cは、578wt-Hisに関して得られたデータ: $K_a (1/Ms) : 8.45 \times 10^5$; $SE(k_a) : 1.60 \times 10^3$; $k_d (1/s) : 1.69 \times 10^{-4}$; $SE(k_d) : 7.60 \times 10^{-7}$; $KD(M) : 2.00 \times 10^{-10}$ を示す。

【図4c】図4は、hVEGF165に対する578max、578minmaxおよび578wtの結合動態を表すグラフである。図4aは、578maxに関して得られたデータ: $K_a (1/Ms) : 7.00 \times 10^5$; $SE(k_a) : 1.40 \times 10^3$; $k_d (1/s) : 3.07 \times 10^{-4}$; $SE(k_d) : 8.50 \times 10^{-7}$; $KD(M) : 4.39 \times 10^{-10}$ を示す。図4bは、578minmaxに関して得られたデータ: $K_a (1/Ms) : 8.06 \times 10^5$; $SE(k_a) : 2.10 \times 10^3$; $k_d (1/s) : 5.04 \times 10^{-4}$; $SE(k_d) : 1.10 \times 10^{-6}$; $KD(M) : 6.25 \times 10^{-10}$ を示す。図4cは、578wt-Hisに関して得られたデータ: $K_a (1/Ms) : 8.45 \times 10^5$; $SE(k_a) : 1.60 \times 10^3$; $k_d (1/s) : 1.69 \times 10^{-4}$; $SE(k_d) : 7.60 \times 10^{-7}$; $KD(M) : 2.00 \times 10^{-10}$ を示す。

【図5】図5は、578max、578minmaxおよび578minmax_DHPの熱安定性を示すグラフである(FT-IRによって測定されるアンフォールディング)。図5a: 578minmax(ESBA903): $T_m = 71.1^\circ C$; 図5b: 578minmax_DHP(#961): $T_m = 70.2^\circ C$; 図5c: 578max(#8

10

20

30

40

50

21) : $T_m = 70.4^\circ\text{C}$.

【図6-1】図6は、30分間の熱ストレス（図6a： 50°C 、図6b： 60°C 、図6c： 70°C ）後の578誘導体の変性および沈殿を示すグラフである。

【図6-2】図6は、30分間の熱ストレス（図6a： 50°C 、図6b： 60°C 、図6c： 70°C ）後の578誘導体の変性および沈殿を示すグラフである。

【図7-1】図7は、578max、578minmaxおよび578minmax__DHPの溶解性を示すグラフである（硫酸アンモニウム沈殿により決定される）。図7a：578max（#821）。V50は27.24%であった。図7b：578minmax（ESBA903）。V50は、28.13であった。図7c：578minmax__DHP（#961）。V50は32.36%であった。

10

【図7-2】図7は、578max、578minmaxおよび578minmax__DHPの溶解性を示すグラフである（硫酸アンモニウム沈殿により決定される）。図7a：578max（#821）。V50は27.24%であった。図7b：578minmax（ESBA903）。V50は、28.13であった。図7c：578minmax__DHP（#961）。V50は32.36%であった。

【図8-1】図8は、能力を測定する方法として、HUVECアッセイと対比させてVEGFR2競合ELISAを示すグラフである。図8a：VEGFR2競合ELISAにおけるルセンチス（Lucentis）と511max（#802）との比較。ルセンチスの R^2 ：0.9417；ESBA802の R^2 ：0.9700。ルセンチスのEC50：7.137nM；#802のEC50：0.8221nM。図8b：VEGFR2競合ELISAにおけるルセンチスと578max（#821）との比較。図8c：HUVECアッセイにおけるルセンチスと511maxC-hisと534maxとの比較。ルセンチスの R^2 ：0.9399；EP511maxC-hisの R^2 ：0.9313、EP534maxの R^2 ：0.7391。ルセンチスのEC50：0.08825nM、511maxC-hisのEC50：0.7646nM、534maxのEC50：63.49nM。図8d：HUVECアッセイにおけるルセンチスと578minと578maxとの比較。ルセンチスの R^2 ：0.9419、EP578minの R^2 ：0.8886、EP578maxの R^2 ：0.9274。ルセンチスのEC50：0.1529nM、578minのEC50：1.528nM、578maxのEC50：0.1031nM。

20

30

【図8-2】図8は、能力を測定する方法として、HUVECアッセイと対比させてVEGFR2競合ELISAを示すグラフである。図8a：VEGFR2競合ELISAにおけるルセンチス（Lucentis）と511max（#802）との比較。ルセンチスの R^2 ：0.9417；ESBA802の R^2 ：0.9700。ルセンチスのEC50：7.137nM；#802のEC50：0.8221nM。図8b：VEGFR2競合ELISAにおけるルセンチスと578max（#821）との比較。図8c：HUVECアッセイにおけるルセンチスと511maxC-hisと534maxとの比較。ルセンチスの R^2 ：0.9399；EP511maxC-hisの R^2 ：0.9313、EP534maxの R^2 ：0.7391。ルセンチスのEC50：0.08825nM、511maxC-hisのEC50：0.7646nM、534maxのEC50：63.49nM。図8d：HUVECアッセイにおけるルセンチスと578minと578maxとの比較。ルセンチスの R^2 ：0.9419、EP578minの R^2 ：0.8886、EP578maxの R^2 ：0.9274。ルセンチスのEC50：0.1529nM、578minのEC50：1.528nM、578maxのEC50：0.1031nM。

40

【図9】図9は、hVEGF165によって誘導されるHUVEC増殖に対する578minmaxの効果を示すグラフである。アッセイのパラメータは、hVEGF165濃度：0.08nM（3ng/ml）；VEGFおよび試験アイテムを用いるインキュベーション：96hであった。EC50は、ルセンチスに関して0.08959nM、578minmaxに関して0.05516nMであり、 R^2 はルセンチスに関して0.90

50

66、578minmaxに関して0.9622であった。

【図10】図10は、マウスVEGF164およびラットVEGF164によって誘導されるHUVEC増殖に対する578minmaxの効果を示すグラフである。アッセイのパラメータは、マウスVEGF164濃度：0.08nM(3ng/ml)；ラットVEGF164濃度：0.3nM(11.3ng/ml)であった。両濃度は、VEGF誘導型HUVEC増殖に関するEC90で選択された；VEGFおよび試験アイテムを用いるインキュベーション：96h。図10aは、マウスVEGFに関して得られたデータを示す。EC50は、V1253に関して0.1196nM、578minmaxに関して0.06309nMであり、 R^2 は、ルセンチスに関して0.02744、V1253に関して0.9348、およびEP578minmaxに関して0.9767であった。ルセンチスは、マウスVEGFによって誘導されるHUVEC増殖を阻害しなかった。図10bは、ラットVEGFに関して得られたデータを示す。EC50は、V1253に関して1.597nM、578minmaxに関して0.06974nMであり、 R^2 は、V1253に関して0.7664、578minmaxに関して0.6635であった。

10

【図11】図11は、ヌードモルモットにおいてMilesアッセイを用いた効能試験を示す図である(パートI)。色素アラマブルー(almar blue)1を、ヌードモルモットに静脈内投与した。色素注射して1時間後、hVEGF(2.61nM)およびルセンチス、ESBA903または#802の前混合物2を、それぞれ動物3の皮膚に注射した。溶液を注射して1時間後、動物3を安楽死させ、裸皮を採取し、浄化し、入射および透過光を用いてデジタル撮影した。注射部位に溢出したエバンスブルー色素の面積を、ImageJを用いて評価し、用量-面積の保持をプロットした。

20

【図12a】図12は、ヌードモルモットにおいてMilesアッセイを用いた効能試験を示すグラフである(パートII)。図12aは、#803(511max)に関して得られた結果を示す。EC50は5.990nMであり、2.060~17.41nMの間の統計的な広がりを持ち、 R^2 は0.5800であった。図12bは、ESBA903(578minmax)に関して得られた結果を示す。EC50は3.989であり、1.456~10.93nMの間の統計的な広がりを持ち、 R^2 は0.3920であった。図12cは、ルセンチスに関する色素漏出の面積を示す。EC50は、曲線とあまりフィットしなかったため、ルセンチスに関して計算できなかった。

30

【図12b】図12は、ヌードモルモットにおいてMilesアッセイを用いた効能試験を示すグラフである(パートII)。図12aは、#803(511max)に関して得られた結果を示す。EC50は5.990nMであり、2.060~17.41nMの間の統計的な広がりを持ち、 R^2 は0.5800であった。図12bは、ESBA903(578minmax)に関して得られた結果を示す。EC50は3.989であり、1.456~10.93nMの間の統計的な広がりを持ち、 R^2 は0.3920であった。図12cは、ルセンチスに関する色素漏出の面積を示す。EC50は、曲線とあまりフィットしなかったため、ルセンチスに関して計算できなかった。

【図12c】図12は、ヌードモルモットにおいてMilesアッセイを用いた効能試験を示すグラフである(パートII)。図12aは、#803(511max)に関して得られた結果を示す。EC50は5.990nMであり、2.060~17.41nMの間の統計的な広がりを持ち、 R^2 は0.5800であった。図12bは、ESBA903(578minmax)に関して得られた結果を示す。EC50は3.989であり、1.456~10.93nMの間の統計的な広がりを持ち、 R^2 は0.3920であった。図12cは、ルセンチスに関する色素漏出の面積を示す。EC50は、曲線とあまりフィットしなかったため、ルセンチスに関して計算できなかった。

40

【図13a】図13は、ラットにおいて修正したmilesアッセイを用いた効能試験を示すグラフである(hVEGF165および578minmax(ESBA903)を前混合した)。図13aは、ラットにおけるVEGF誘導型網膜血管性漏出に対するアバスチン(Avastin)の抗透過性の効能-用量応答を示す。アバスチンは、hVEGF

50

誘導型網膜血管性透過性を阻害する。注射の前に前混合した。およそ等モル、3倍または10倍の過剰。 $*p < 0.05$ (VEGF対BSA)、 $**p < 0.05$ (アバスチン処置対VEGF)。図13bは、ラットにおけるVEGF誘導型網膜血管性漏出に対するESBA903の抗透過性の効能を示す。用量応答(前混合した、i.v.t)。ESBA903によるhVEGF誘導型網膜血管性透過性の完全な阻害。注射の前に前混合した。およそ等モル、3倍または10倍の過剰。 $*p < 0.05$ (VEGF対BSA)、 $**p < 0.05$ (ESBA903処置対VEGF)。

【図13b】図13は、ラットにおいて修正したmilesアッセイを用いた効能試験を示すグラフである(hVEGF165および578minmax(ESBA903)を前混合した)。図13aは、ラットにおけるVEGF誘導型網膜血管性漏出に対するアバスチン(Avastin)の抗透過性の効能—用量応答を示す。アバスチンは、hVEGF誘導型網膜血管性透過性を阻害する。注射の前に前混合した。およそ等モル、3倍または10倍の過剰。 $*p < 0.05$ (VEGF対BSA)、 $**p < 0.05$ (アバスチン処置対VEGF)。図13bは、ラットにおけるVEGF誘導型網膜血管性漏出に対するESBA903の抗透過性の効能を示す。用量応答(前混合した、i.v.t)。ESBA903によるhVEGF誘導型網膜血管性透過性の完全な阻害。注射の前に前混合した。およそ等モル、3倍または10倍の過剰。 $*p < 0.05$ (VEGF対BSA)、 $**p < 0.05$ (ESBA903処置対VEGF)。

【図14】図14は、ラットにおいて修正したmilesアッセイを用いた効能試験を示すグラフである(578minmax(ESBA903)の局所投与)。ラットにおけるVEGF誘導型網膜血管性漏出に対するAL-51287(ESBA903)の抗透過性の効能を、局所投与で試験した。5日間の前処置、ESBA903処方物10ng/mlを4液滴/日。 $*p < 0.05$ (VEGF対BSA)、 $**p < 0.05$ (VEGF対AL-51287)、 $***p = 0.060$ (AL-51287対AL-52667)、 $***$ (VEGF対AL-39324)； $p < 0.05$ (AL-39324対ビヒクル参照対照)。AL-51287：ESBA903；AL-52657：局所的なビヒクル参照対照；AL-39324：低分子RTKインヒビター。

【図15】図15は、本明細書で使用されるようなVHのCDR1の定義を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0009】

(詳細な説明)

本発明は、ウサギモノクローナル抗体からのCDRを含む、可溶性で安定な抗VEGFイムノバインダーを提供する。前記イムノバインダーは、VEGF媒介性障害の診断および/または処置のためにデザインされている。本発明の組換え抗体を発現するためのハイブリドーマ、核酸、ベクター、および宿主細胞、これらを単離するための方法、ならびに医薬における前記抗体の使用も開示する。

【0010】

(定義)

本発明がより容易に理解され得るために、ある種の用語を以下の通りに定義する。さらなる定義を、詳細な説明を通して記載する。

【0011】

「VEGF」という用語は、Leungら、Science、246巻、1306頁(1989年)、およびHouckら、Mol. Endocrin.、5巻、1806頁(1991年)によって記載されている通り、アミノ酸165個の血管内皮細胞増殖因子、ならびに関連の、アミノ酸121個、189個、および206個の血管内皮細胞増殖因子を、これら増殖因子の天然に存在している対立形質および加工型と併せて意味する。

【0012】

「VEGF受容体」または「VEGFr」という用語は、VEGFに対する細胞の受容体、通常、血管内皮細胞上に見られる細胞表面受容体、およびhVEGFに結合する能力

10

20

30

40

50

を保持しているその改変体を意味する。VEGF受容体の一例は、チロシンキナーゼファミリーにおける膜貫通型受容体であるfms様チロシンキナーゼ(flt)である。De Vriesら、Science、255巻、989頁(1992年)；Shibuyaら、Oncogene、5巻、519頁(1990年)。flt受容体は、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、およびチロシンキナーゼ活性を有する細胞内ドメインを含んでいる。細胞外ドメインはVEGFの結合に関与し、一方、細胞内ドメインはシグナル伝達に関与している。VEGF受容体の別の一例はflk-1受容体(KDRとも呼ばれる)である。Matthewsら、Proc. Nat. Acad. Sci.、88巻、9026頁(1991年)；Termanら、Oncogene、6巻、1677頁(1991年)；Termanら、Biochem. Biophys. Res. Commun.、187巻、1579頁(1992年)。VEGFがflt受容体に結合すると、205,000ダルトンおよび300,000ダルトンの見かけの分子量を有する、少なくとも2つの高分子量複合体の形成がもたらされる。300,000ダルトンの複合体は、VEGFの単一分子が結合した受容体分子を2個含むダイマーであると考えられている。

【0013】

本明細書で用いられる「ウサギ」という用語は、leporidae科に属する動物を意味する。

【0014】

本明細書で用いられる「抗体」という用語は「免疫グロブリン」の同義語である。本発明による抗体は、免疫グロブリン全体、または、単一可変ドメインであるFv(Skerra A. およびPluckthun, A. (1988年) Science、240巻、1038~41頁)、scFv(Bird, R. E. ら(1988年) Science、242巻423~26頁；Huston, J. S. ら(1988年) Proc. Natl. Acad. Sci. USA、85巻、5879~83頁)、Fab、(Fab')₂、もしくは当業者には周知の他のフラグメントなどの、免疫グロブリンの可変ドメインを少なくとも1つ含む免疫グロブリンのフラグメントであってよい。

【0015】

「CDR」という用語は、抗原の結合に主に寄与する抗体の可変ドメイン内の6つの超可変領域の1つを意味する。6つのCDRに対して最も一般的に用いられる定義の1つは、Kabata E. A. ら、(1991年) Sequences of protein of immunological interest.、NIH Publication、91~3242頁によって提供されたものである。本明細書で用いられるように、CDRのKabataの定義は、軽鎖可変ドメインのCDR1、CDR2、およびCDR3(CDR L1、CDR L2、CDR L3、またはL1、L2、L3)ならびに重鎖可変ドメインのCDR2およびCDR3(CDR H2、CDR H3、またはH2、H3)に対してのみあてはまる。しかし、本明細書で用いられる場合、重鎖可変ドメインのCDR1(CDR H1またはH1)は以下の残基によって定義される(Kabataナンバリング)：位置26で始まり位置36の前で終了する残基。これは、基本的には、KabataおよびChotiaにより異なって定義されるCDR H1の融合物である(説明のために図15も参照されたい)。

【0016】

本明細書で用いられる「抗体フレームワーク」またはあるときには「フレームワーク」のみという用語は、この可変ドメインの抗原結合性ループ(CDR)に対する骨格として働く、VLまたはVHいずれかの可変ドメインの部分を意味する。本質的に、これはCDRのない可変ドメインである。

【0017】

「単鎖抗体」、「単鎖Fv」、または「scFv」という用語は、リンカーによって連結されている抗体重鎖可変ドメイン(または領域；V_H)および抗体軽鎖可変ドメイン(または領域；V_L)を含む分子を意味するものとされる。このようなscFv分子は、一般構造：NH₂-V_L-リンカー-V_H-COOHまたはNH₂-V_H-リンカー-V_L

10

20

30

40

50

—COOHを有することができる。

【0018】

本明細書で用いられる「同一性」は、2つのポリペプチド間、分子間、または2つの核酸間でマッチする配列を意味する。比較された2つの配列の両方における位置が同じ塩基、または同じアミノ酸モノマーサブユニットによって占められている場合（例えば、各々の2つのDNA分子におけるある位置がアデニンによって占められている場合、または各々の2つのポリペプチドにおけるある位置がリジンによって占められている場合）、それぞれの分子はその位置で同一である。2つの配列間の「パーセント同一性」は、2つの配列が共有するマッチする位置（*matching position*）数を、比較する位置数によって除して100をかけた関数である。例えば、2つの配列における10個の位置のうち6個がマッチした場合、この2つの配列は60%の同一性を有する。一例として、DNA配列CTGACTとCAGGTTとは50%の同一性を共有する（全部で6個の位置のうち3個がマッチしている）。一般的に、2つの配列を、最大の同一性をもたらすように整列させた場合に比較が行われる。このようなアラインメントは、例えば、Alignプログラム（DNASTAR, Inc.）などのコンピュータプログラムによって便利に実行される、Needlemanら、（1970年）J. Mol. Biol.、48巻、443～453頁の方法を用いて提供され得る。2つのアミノ酸配列間のパーセント同一性は、PAM120ウェイト残基表、ギャップペナルティ12、およびギャップペナルティ4を用いて、ALIGNプログラム（バージョン2.0）中に組み入れられたE. MeyersおよびW. Millerのアルゴリズム（Comput. Appl. Biosci.、4巻11～17頁（1988年））を用いてやはり決定することができる。さらに、2つのアミノ酸配列間のパーセント同一性は、Blossum 62マトリックスまたはPAM250マトリックスのいずれか、およびギャップウェイト16、14、12、10、8、6、または4、およびペナルティ1、2、3、4、5、または6を用いて、GCGソフトウェアパッケージ（www.gcg.comにて入手可能）においてGAPプログラム中に組み入れられた、NeedlemanおよびWunsch（J. Mol. Biol.、48巻、444～453頁（1970年））のアルゴリズムを用いて決定され得る。

【0019】

「類似の」配列は、整列した場合に、同一および類似のアミノ酸残基を共有する配列であり、この場合、類似の残基は、整列した参照配列における対応するアミノ酸残基に対する保存的置換である。この点において、参照配列における残基の「保存的置換」は、対応する参照の残基に物理的または機能的に類似する残基、例えば、類似のサイズ、形状、電荷、化学的特性（共有結合または水素結合を形成する能力などを含む）を有する残基による置換である。したがって、「保存的置換改変」配列は、1つまたは複数の保存的置換が存在する点で、参照配列または野生型の配列とは異なるものである。2つの配列間の「パーセント類似性」は、2つの配列が共有するマッチする残基または保存的置換を含む位置の数を、比較する位置の数によって除して100をかけた関数である。例えば、2つの配列における10個の位置のうち6個がマッチし、10個の位置のうち2個が保存的置換を含んでいる場合、この2つの配列は80%ポジティブな類似性を有する。

【0020】

本明細書で用いられる「保存的配列改変」という用語は、アミノ酸配列を含む抗体の結合性の特徴にネガティブな影響を及ぼさず、またはそれを変更しないアミノ酸の改変を意味するものとされる。このような保存的配列改変には、ヌクレオチドおよびアミノ酸の置換、付加、および欠失が含まれる。例えば、改変は、部位特異的変異誘発およびPCR媒介性の変異誘発など、当該分野で公知の標準技術によって導入されてよい。アミノ酸の保存的置換には、アミノ酸残基が、類似の側鎖を有するアミノ酸残基で置換されるものが含まれる。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当該分野において定義されている。これらのファミリーとしては、塩基性側鎖を有するアミノ酸（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性の側鎖を有するアミノ酸（例えば、アスパラギン酸、グル

タミン酸)、無電荷の極性の側鎖を有するアミノ酸(例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン、トリプトファン)、無極性の側鎖を有するアミノ酸(例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン)、 β 分枝した側鎖を有するアミノ酸(例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン)、および芳香族側鎖を有するアミノ酸(例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン)が挙げられる。したがって、ヒト抗VEGF抗体における予測される非必須アミノ酸残基は、好ましくは、同一の側鎖のファミリーからの別のアミノ酸残基で置換される。抗原結合性を除去しない、ヌクレオチドおよびアミノ酸の保存的置換を同定する方法は当該分野において周知である(例えば、Brummelら、Biochem.、32巻、1180~1187頁(1993年); Kobayashiら、Protein Eng.、12巻(10):879~884頁(1999年); およびBurksら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、94巻、412~417頁(1997年)を参照されたい)。

10

【0021】

本明細書で用いられる「アミノ酸コンセンサス配列」は、少なくとも2つ、好ましくはそれを超える整列しているアミノ酸配列のマトリックスを用い、各位置の最も高頻度のアミノ酸残基を決定することが可能であるように、アラインメントにおけるギャップを可能にすることで産生することができるアミノ酸配列を意味する。コンセンサス配列は、各位置で最も高頻度に現れるアミノ酸を含む配列である。2つまたはそれを超えるアミノ酸が単一の位置で等しく現れる場合は、コンセンサス配列にはこれらのアミノ酸の両方または

20

【0022】

タンパク質のアミノ酸配列は、様々なレベルで分析することができる。例えば、保存または変動性は、単一残基レベルで、複数残基レベルで、ギャップを有する複数の残基などで表されてよい。残基は、同一の残基の保存を示すことがあり、またはクラスレベルで保存されることがある。アミノ酸のクラスの例としては、極性無電荷R群(セリン、スレオニン、アスパラギン、およびグルタミン)、正電荷R群(リジン、アルギニン、およびヒスチジン)、負電荷R群(グルタミン酸、およびアスパラギン酸)、疎水性R群(アラニン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、トリプトファン、バリン、およびチロシン)、ならびに特別なアミノ酸(システイン、グリシン、およびプロリン)が挙げられる。他のクラスは当業者には公知であり、構造決定または置換可能性を評価するための他のデータを用いて定義し得る。この意味において、置換可能なアミノ酸は、その位置で、置換され得、機能的保存を維持し得る、任意のアミノ酸を意味し得る。

30

【0023】

しかし、同じクラスのアミノ酸は、その生物物理学的特性によってある程度変動することがあることが理解される。例えば、ある種の疎水性R群(例えば、アラニン、セリン、またはスレオニン)は、他の疎水性R群(例えば、バリンまたはロイシン)よりも親水性である(すなわち、親水性が高いか、または疎水性が低い)ことが理解される。相対的な親水性または疎水性は、当該分野で認められている方法を用いて決定することができる(例えば、Roseら、Science、229巻、834~838頁(1985年)、およびCornetteら、J. Mol. Biol.、195巻、659~685頁(1987年)を参照されたい)。

40

【0024】

本明細書で用いられる通り、1つのアミノ酸配列(例えば、最初の V_H または V_L の配列)が1つまたは複数のさらなるアミノ酸配列(例えば、データベースにおける1つまたは複数の V_H または V_L の配列)と整列する場合、1つの配列(例えば、最初の V_H または V_L の配列)におけるアミノ酸の位置は、上記の1つまたは複数のさらなるアミノ酸配列における「対応する位置」と比較されてよい。本明細書で用いられる「対応する位置」は、配列を最適に整列した場合の、すなわち、最高のパーセント同一性またはパーセント類似性を達成するように配列を整列した場合の、比較される(1つまたは複数の)配列に

50

おける等しい位置を意味する。

【0025】

本明細書で用いられる「抗体データベース」という用語は、2つまたはそれを超える抗体のアミノ酸配列のコレクション（「多様な」配列）を意味し、典型的には、数十、数百、またはさらには数千の抗体のアミノ酸配列のコレクションを意味する。抗体データベースは、抗体のV_H領域、抗体のV_L領域、もしくはその両方のコレクションなどのアミノ酸配列を蓄えることができ、またはV_H領域およびV_L領域からなるscFv配列のコレクションを蓄えることができる。データベースを、検索可能なコンピュータプログラム内のコンピュータ上などの、検索可能な固定媒体中に蓄えるのが好ましい。一実施形態において、抗体データベースは、生殖系列の抗体配列を含むか、またはそれからなるデータベースである。別の一実施形態において、抗体データベースは、成熟（すなわち、発現された）抗体配列を含むか、またはそれからなるデータベースである（例えば、成熟抗体配列のKababのデータベース、例えば、KBDデータベース）。さらに別の一実施形態において、抗体データベースは、機能的に選択された配列（例えば、QCアッセイから選択された配列）を含むか、またはそれからなる。

10

【0026】

「イムノバインダー」という用語は、抗体の抗原結合部位の全てまたは一部分（例えば、重鎖および／または軽鎖の可変ドメインの全てまたは一部分）を含む分子を意味し、そのためイムノバインダーは、標的の抗原を特異的に認識する。イムノバインダーの非限定的な例としては、全長の免疫グロブリン分子およびscFv、および、これらに限定されないが、(i) V_L、V_H、C_L、およびC_H1ドメインからなる1価のフラグメントであるFabフラグメント、(ii) ヒンジ領域でジスルフィド架橋によって連結されている2つのFabフラグメントを含む2価のフラグメントであるF(ab')₂フラグメント、(iii) 本質的に、ヒンジ領域の部分を含むFabである、Fab'フラグメント(Fundamental Immunology (Paul編集、第3版、1993年)を参照されたい)、(iv) V_HおよびC_H1ドメインからなるFdフラグメント、(v) 抗体の単腕のV_LおよびV_HドメインからなるFvフラグメント、(vi) V_HもしくはV_LドメインからなるDabフラグメント(Wardら、(1989年) Nature、341巻、544～546頁)、Camelid抗体(Hamers-Castermanら、Nature、363巻、446～448頁(1993年)およびDumoulinら、Protein Science、11巻、500～515頁(2002年)を参照されたい)またはShark抗体(例えば、shark Ig-NARs Nanobodies (登録商標))などの単ドメイン抗体、ならびに(vii) 可変ドメインおよび2つの定常ドメインを含む重鎖領域であるナノボディ、を含む抗体フラグメントが挙げられる。

20

30

【0027】

本明細書で用いられる「機能特性」という用語は、例えば、ポリペプチドの製造上の特性または治療の効能を改善するために、改善(例えば、従来のポリペプチドに比べて)が望ましく、かつ／または当業者にとって有利であるポリペプチド(例えば、イムノバインダー)の特性である。一実施形態において、機能特性は安定性(例えば、熱安定性)である。別の一実施形態において、機能特性は溶解性(例えば、細胞性条件下の)である。さらに別の一実施形態において、機能特性は非凝集性である。なお別の一実施形態において、機能特性はタンパク質の発現(例えば、原核細胞における)である。さらに別の一実施形態において、機能特性は、対応する精製プロセスにおいて封入体を可溶化した後のリフォールディング効率である。ある実施形態において、抗原結合親和性は、改善に望ましい機能特性ではない。

40

【0028】

「エピトープ」または「抗原決定基」という用語は、免疫グロブリンまたは抗体が特異的に結合する抗原上の(例えば、VEGF上の)部位を意味する。エピトープは、典型的には、独特の空間的コンフォメーションにおける、少なくとも3、4、5、6、7、8、

50

9、10、11、12、13、14、または15個の連続または非連続のアミノ酸を含む。例えば、Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology、66巻、G. E. Morris編集(1996年)を参照されたい。

【0029】

「特異的結合」、「選択的結合」、「選択的に結合する」、および「特異的に結合する」という用語は、抗体が所定の抗原上のエピトープに結合することを意味する。典型的には、抗体は、約 10^{-8} M、約 10^{-9} M、もしくは約 10^{-10} M未満、またはそれよりさらに低いなどの、約 10^{-7} M未満の親和性(K_D)で結合する。

【0030】

「 K_D 」または「 K_d 」という用語は、特定の抗体-抗原相互作用の解離平衡定数を意味する。典型的には、本発明の抗体は、例えば、BIACORE機器において表面プラズモン共鳴(SPR)法を用いて決定するとき、約 10^{-8} M、約 10^{-9} M、もしくは約 10^{-10} M未満、またはそれよりさらに低いなどの、約 10^{-7} M未満の解離平衡定数(K_D)でVEGFに結合する。

【0031】

「VEGFを中和する」、「VEGFを阻害する」、および「VEGFをブロックする」という用語は交換可能に用いられ、VEGFがVEGFR-1および/またはVEGFR-2などの1つまたは複数のVEGF受容体と相互作用するのを防ぎ、例えば、シグナル伝達の誘発を防ぐ、本発明の抗体の能力を意味する。

【0032】

本明細書で用いられる「組換えイムノバインダー」は、組換えDNAからの発現によって生成されるイムノバインダーを意味する。

【0033】

本明細書で用いられる「キメラの」イムノバインダーは、特定の種に由来するか、または特定の抗体のクラスもしくはサブクラスに属する抗体における対応する配列に同一かまたは相同である、重鎖および/または軽鎖の部分を有し、一方(1つもしくは複数の)鎖の残りは、別の種に由来するか、または別の抗体のクラスもしくはサブクラスに属する抗体およびそのような抗体のフラグメントにおける対応する配列に同一かまたは相同である。本明細書で用いられるヒト化抗体は、キメラ抗体のサブセットである。

【0034】

本明細書で用いられる「ヒト化抗体」は、外来の抗原に対する免疫応答を回避するために組換えDNA技術を用いて合成されたイムノバインダーである。ヒト化は、外因性供給源のモノクローナル抗体の免疫原性を低減するために十分に確立されている技術である。これは、アクセプターフレームワーク、好ましくはヒトアクセプターフレームワークの選択、アクセプターフレームワーク中に挿入されるドナーのイムノバインダーからのCDRの程度、およびドナーのフレームワークからの残基のアクセプターフレームワーク中への置換に関連する。CDRをヒトアクセプターフレームワーク中に融合させるための一般的方法は、その全容が参照によって本明細書に援用されるWinterの米国特許第5,225,539号によって開示されている。その教示が参照によってその全容において援用される米国特許第6,407,213号は、ドナーのイムノバインダーからの置換が好ましいフレームワークの数々のアミノ酸位置を開示している。

【0035】

「核酸分子」という用語は、DNA分子およびRNA分子を意味する。核酸分子は一本鎖でも、または二本鎖でもよいが、二本鎖DNAが好ましい。核酸は、別の核酸配列と機能的関係において配置された場合、「作動可能に連結して」いる。例えば、プロモーターまたはエンハンサーがコード配列の転写に影響を及ぼす場合、その配列に作動可能に連結している。

【0036】

「ベクター」という用語は、連結している別の核酸を運搬することができる核酸分子を

10

20

30

40

50

意味する。ベクターの1タイプが「プラスミド」であり、これはその中にさらなるDNAセグメントをライゲーション (l i g a t e) することができる環状の二本鎖DNAのループを意味する。別のタイプのベクターはウイルスベクターであり、さらなるDNAセグメントをウイルスゲノム中にライゲーションすることができる。ある種のベクターは、導入される宿主細胞において、自律的に複製することができる (例えば、細菌の複製開始点を有する細菌ベクター、およびエピソード哺乳動物ベクター)。他のベクター (例えば、非エピソード哺乳動物ベクター) を、宿主細胞中への導入に際し宿主細胞のゲノム中に組み込むことができ、それによって、それらのベクターは宿主のゲノムと一緒に複製される。

【0037】

「宿主細胞」という用語は、その中に発現ベクターが導入されている細胞を意味する。宿主細胞としては、細菌細胞、微生物細胞、植物細胞、または動物細胞が挙げられ得る。形質転換を受けやすい細菌としては、*Escherichia coli* またはサルモネラ属の菌株などの腸内細菌科のメンバー、*Bacillus subtilis* などのバチルス属、肺炎球菌、連鎖球菌および *Haemophilus influenzae* が挙げられる。適切な微生物としては、*Saccharomyces cerevisiae* および *Pichia pastoris* が挙げられる。適切な動物宿主細胞系としては、CHO (チャイニーズハムスター卵巣細胞系) および NSO 細胞が挙げられる。

【0038】

「処置する (t r e a t)」、「処置する (t r e a t i n g)」、および「処置 (t r e a t m e n t)」という用語は、本明細書に記載する治療的手段または予防的手段を意味する。「処置 (t r e a t m e n t)」の方法は、障害または再発性の障害の1つまたは複数の症状を予防、治癒、遅延、症状の重症度の低減、または回復させるために、あるいは処置の非存在下で予想されるものを上回って被験体の生存を延長するために、処置を必要とする被験体、例えば、VEGF 媒介性障害を有する被験体またはそのような障害を最終的に得る可能性がある被験体に対する本発明の抗体の投与を使用する。

【0039】

「VEGF 媒介性障害」という用語は、症状もしくは疾患状態の発症、進行、または持続が VEGF の関与を必要とする任意の障害を意味する。例示的 VEGF 媒介性障害としては、それだけには限定されないが、加齢黄斑変性、新生血管形成緑内障、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、水晶体後線維増殖症、乳癌、肺癌、胃癌、食道癌、直腸結腸癌、肝臓癌、卵巣癌、昏睡、卵巣男性胚細胞腫、子宮頸癌、子宮内膜癌、子宮内膜増殖症、子宮内膜症、線維肉腫、絨毛癌、頭部および頸部のがん、鼻咽腔癌、喉頭癌、肝芽腫、カポジ肉腫、メラノーマ、皮膚癌、血管腫、海綿状血管腫、血管芽細胞腫、膵臓癌、網膜芽細胞腫、星細胞腫、膠芽腫、神経鞘腫、乏突起膠腫、髄芽腫、神経芽細胞腫、横紋筋肉腫、骨原性肉腫、平滑筋肉腫、尿路癌、甲状腺癌、ウィルムス腫、腎細胞癌、前立腺癌、母斑症に付随する異常血管増殖、浮腫 (脳腫瘍に付随するものなど)、メグズ症候群、慢性関節リウマチ、乾癬、ならびにアテローム性動脈硬化症が挙げられる。

【0040】

「有効用量 (d o s e)」、または「有効投与量 (d o s a g e)」という用語は、所望の効果を達成するのに、または少なくとも部分的に達成するのに十分な量を意味する。

「治療有効用量」という用語は、すでに疾患に罹患している患者における疾患およびその合併症を治すか、または少なくとも部分的に停止させるのに十分な量と定義される。この使用に有効な量は、処置する障害の重症度、および患者自身の免疫系の全体的状態による。

【0041】

「被験体」という用語は、任意のヒトまたは非ヒトの動物を意味する。例えば、本発明の方法および組成物を、VEGF 媒介性障害を有する被験体を処置するのに用いることができる。

【0042】

本明細書で用いられる「M i n - g r a f t」または「m i n」という用語は、ウサギ

10

20

30

40

50

の可変ドメインからのウサギCDRを、天然に存在するヒトアクセプターフレームワーク（FW1. 4、配列番号172）中に融合させることによって産生されたヒト化可変ドメインを意味する。フレームワーク領域における変更はなされない。フレームワーク自体は、望ましい機能特性（溶解性および安定性）について予め選択されたものである。

【0043】

本明細書で用いられる「Max-graft」または「max」という用語は、ウサギの可変ドメインからのウサギCDRを、「ウサギ化」、ヒトアクセプターフレームワークである「RabTor」中に（rFW1. 4、配列番号173）、またはrFW1. 4（v2）（配列番号174）と呼ばれるその誘導体中に融合させることによって産生されたヒト化可変ドメインを意味する。「RabTor」フレームワークは、推定可能前駆体配列において異なっている位置（例えば、体細胞の過剰変異中に変化し、したがって抗原の結合におそらく寄与する位置）以外のドナーのフレームワーク残基を融合させる必要なしに、実質的にあらゆるセットのウサギCDRを受け入れる普遍的に適用可能なフレームワークを産生する目的で、ウサギ可変ドメインの構造および安定性に概ね関与するフレームワーク位置に、保存されているウサギの残基を組み入れることによって（そうでなければ、他の種においてかなり可変である）調製されたものである。推定可能前駆体配列は、最も近いウサギの生殖系列の対応物と定義され、最も近い生殖系列の対応物が確立できなかった場合は、ウサギのサブグループのコンセンサス配列または高パーセント値の類似性を有するウサギ配列のコンセンサス配列であると定義される。

10

【0044】

本明細書で用いられる「Min-Max」または「minmax」という用語は、「Max-graft」の可変重鎖と組み合わせられた「Min-graft」の可変軽鎖を含むヒト化可変ドメインを意味する。

20

【0045】

本明細書で用いられる「Max-Min」または「maxmin」という用語は、「Min-graft」の可変重鎖と組み合わせられた「Max-graft」の可変軽鎖を含むヒト化可変ドメインを意味する。

【0046】

産生したイムノバインダーに対して様々な用語体系を用いた。これらは、数字（例えば、#578）によって通常同定される。EPまたはEpiなどの接頭辞を用いた場合は（例えば、Epi578と同一であるEP578）、それによって、同じイムノバインダーを示す。イムノバインダーに、接頭辞「ESBA」により識別される第2の名称を与えることがある。例えば、ESBA903は、578minmax、またはEP578minmax、またはEpi578minmaxと同じイムノバインダーを指す。

30

【0047】

別段の定義がなければ、本明細書で用いる技術用語および科学用語は全て、本発明が属する技術分野における通常の技術者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。本発明を実施または試験する上で、本明細書に記載したものと類似または等価の方法および材料を用いることができるが、適切な方法および材料を下に記載する。矛盾する場合には、定義を含めた本明細書が優先される。さらに、材料、方法、および実施例は例示にすぎず、限定することを意図しない。

40

【0048】

本発明の様々な態様を、以下のサブセクションにおいてさらに詳しく記載する。様々な実施形態、選択、および範囲を任意に組み合わせることが理解される。さらに、特定の実施形態によっては、選択された定義、実施形態、または範囲を適用しなくてもよい。

【0049】

（抗VEGFイムノバインダー）

一態様において、本発明は、VEGFに結合し、したがってインビボでVEGFの機能をブロックするのに適するイムノバインダーを提供する。これらイムノバインダーのCD

50

Rは、ヒトVEGFおよび／またはそのフラグメント（配列番号1）で免疫化したウサギから得たウサギ抗VEGFモノクローナル抗体に由来する。本発明者らの知る限りでは、モノクローナル抗VEGF抗体をウサギから得、詳しく特徴付けたのはこれが初めてである。驚くべきことに、親和性（Kd）が並はずれて高いことが見出された。

【0050】

ある実施形態において、本発明はCDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2、またはCDRL3のアミノ酸配列のうちの少なくとも1つを含む、VEGFに特異的に結合するイムノバインダーを提供する。本発明のイムノバインダーにおいて用いるための例示的CDRアミノ酸配列を、配列番号2～72（表1～6）、

【0051】

【表1】

表1. 本発明の抗VEGFイムノバインダーのCDR H1アミノ酸配列

配列識別名	CDR-H1	配列番号
60-11-4	GFPFSSGYWVC	2
60-11-6	GFSFSSGYWIC	3
435	GFSLNTNYWMC	4
453	GFSFSRSYYIY	5
375	GFSFTTDDYMC	6
610	GIDFSGAYYMG	7
578	GFSLTDYYMT	8
534	GFSLSYYMS	9
567	GFSLSDYMC	10
509	GFSLSSYYMC	11
511	GFSLNTYYMN	12
509maxII	GFSLSSYYMS	13
コンセンサス	GFSLSSGYMC	14

【0052】

10

20

30

【表 2 - 1】

表2. 本発明の抗VEGFイムノバイNDERのCDR H2アミノ酸配列

配列識別名	CDR-H2	配列番号
60	CIYAGSSGSTYYASWAKG	15
435	CMYTGSYNRAYYASWAKG	16
453	CIDAGSSGILVYANWAKG	17
375	CILAGDGSTYYANWAKG	18
610	YIDYDGDRYYASWAKG	19
578	FIDPDDDPYYATWAKG	20
534	IIGPGDYTDYASWAKG	21
567	CLDYFGSTDDASWAKG	22

【0053】

【表 2 - 2】

509	CLDYVGDTDYASWAKG	23
511	IIAPDDTTYASWAKS	24
509maxII	ILDYVGDTDYASWAKG	25
コンセンサス	CIDAGSDGDTYYASWAKG	26

【0054】

【表 3】

表3. 本発明の抗VEGFイムノバイNDERのCDR H3アミノ酸配列

配列識別名	CDR-H3	配列番号
60	GNNYYIYTDGGYAYAGLEL	27
435	GSNWYSDL	28
453	GDASYGVDSFMLPL	29
375	SDPASSWSFAL	30
610	SDYSSGWGTDI	31
578	GDHNSGWGLDI	32
534	GDDNSGWGED I	33
567	TDDSRGWGLNI	34
509	TDDSRGWGLNI	35
511	SGDTTAWGADI	36
コンセンサス	GDDSSGYTDGGYAYWGLDI	37

【 0 0 5 5 】

【 表 4 - 1 】

表4. 本発明の抗VEGFイムノバインダーのCDR L1アミノ酸配列

配列識別名	CDR-L1	配列番号
60	QASQSISSYLS	38
435	QASQSIGSSLA	39
453	QSSQSVWNNRLA	40

10

【 0 0 5 6 】

【 表 4 - 2 】

375	QASENINIWLS	41
610	QASQSISSWLS	42
578	QASEIIHSWLA	43
534	QASQSINIWLS	44
567	QADQSIYWLS	45
509	QASQNIRIWLS	46
511	QASQSINIWCS	47
511max	QASQSINIWLS	48
コンセンサス	QASQSININNWLS	49

20

【 0 0 5 7 】

30

【表 5】

表5. 本発明の抗VEGFイムノバイNDERのCDR L2アミノ酸配列

配列識別名	CDR-L2	配列番号
60	KASTLAS	50
435	TAANLAS	51
453	YASTLAS	52
375	QASKLAS	53
610	QASTLAS	54
578	LASTLAS	55
534	KESTLAS	56
567	KASTLES	57
509	KASTLES	58
511	RASTLAS	59
コンセンサス	KASTLAS	60

【0058】

【表 6】

表6. 本発明の抗VEGFイムノバイNDERのCDR L3アミノ酸配列

配列識別名	CDR-L3	配列番号
60	QSNYGGSSSDYGNP	61
435	QNFATSDTVT	62
453	AGGYSSTSDNT	63
375	QNNYSYNRYGAP	64
610	QNNYGFRSYGGA	65
578	QNVYLASTNGAN	66
534	QNNYDSGNGGFP	67
567	QNNAHYSTNGGT	68
509	QNNAHYSTNGGT	69
511	QANYAYSAGYGAA	70
コンセンサス	QNNYHYSSSTNGGT	71

に記載する。

【0059】

一実施形態において、本発明は、配列番号14、配列番号26、配列番号37、配列番号49、配列番号60、および配列番号71からなる群のコンセンサス配列に、少なくとも75%の類似性、好ましくは少なくとも75%の同一性、より好ましくは少なくとも8

10

20

30

40

50

0%、85%、90%、95%、さらにより好ましくは100%の同一性を有するCDRを少なくとも1つ含むイムノバインダーを提供する。好ましくは、前記イムノバインダーのVHは、配列番号14、配列番号26、および配列番号37からなる群のCDRを含み、かつ／または前記イムノバインダーのVLのCDRは、配列番号49、配列番号60、および配列番号71からなる群のCDRを含む。好ましくは、CDRは、配列番号2から配列番号13、配列番号15から配列番号25、配列番号27から配列番号36、配列番号38から配列番号48、配列番号50から配列番号59、および配列番号61から配列番号70からなる群より選択される。

【0060】

別の一実施形態において、本発明は、配列番号2、配列番号3、配列番号15、配列番号27、配列番号38、配列番号50、および配列番号61からなる群の配列に、少なくとも75%の類似性、好ましくは少なくとも75%の同一性、より好ましくは少なくとも80%、85%、90%、95%、さらにより好ましくは100%の同一性を有するCDRを少なくとも1つ含むイムノバインダーを提供する。好ましくは、前記イムノバインダーのVHは、配列番号2、配列番号15、および配列番号27からなる群のCDRを含み、かつ／または前記イムノバインダーのVLのCDRは、配列番号38、配列番号50、および配列番号61からなる群のCDRを含む。別の一実施形態において、前記イムノバインダーのVHは、配列番号3、配列番号15、および配列番号27からなる群のCDRを含み、かつ／または前記イムノバインダーのVLのCDRは、配列番号38、配列番号50、および配列番号61からなる群のCDRを含む。

【0061】

別の一実施形態において、本発明は、配列番号4、配列番号16、配列番号28、配列番号39、配列番号51、および配列番号62からなる群の配列に、少なくとも75%の類似性、好ましくは少なくとも75%の同一性、より好ましくは少なくとも80%、85%、90%、95%、さらにより好ましくは100%の同一性を有するCDRを少なくとも1つ含むイムノバインダーを提供する。好ましくは、前記イムノバインダーのVHは、配列番号4、配列番号16、配列番号28からなる群のCDRを含み、かつ／または前記イムノバインダーのVLのCDRは、配列番号39、配列番号51、および配列番号62からなる群のCDRを含む。

【0062】

別の一実施形態において、本発明は、配列番号5、配列番号17、配列番号29、配列番号40、配列番号52、および配列番号63からなる群の配列に、少なくとも75%の類似性、好ましくは少なくとも75%の同一性、より好ましくは少なくとも80%、85%、90%、95%、さらにより好ましくは100%の同一性を有するCDRを少なくとも1つ含むイムノバインダーを提供する。好ましくは、前記イムノバインダーのVHは、配列番号5、配列番号17、配列番号29からなる群のCDRを含み、かつ／または前記イムノバインダーのVLのCDRは、配列番号40、配列番号52、および配列番号63からなる群のCDRを含む。

【0063】

別の一実施形態において、本発明は、配列番号6、配列番号18、配列番号30、配列番号41、配列番号53、および配列番号64からなる群の配列に、少なくとも75%の類似性、好ましくは少なくとも75%の同一性、より好ましくは少なくとも80%、85%、90%、95%、さらにより好ましくは100%の同一性を有するCDRを少なくとも1つ含むイムノバインダーを提供する。好ましくは、前記イムノバインダーのVHは、配列番号6、配列番号18、および配列番号30からなる群のCDRを含み、かつ／または前記イムノバインダーのVLのCDRは、配列番号41、配列番号53、および配列番号64からなる群のCDRを含む。

【0064】

別の一実施形態において、本発明は、配列番号7、配列番号19、配列番号31、配列番号42、配列番号54、および配列番号65からなる群の配列に、少なくとも75%の

類似性、好ましくは少なくとも75%の同一性、より好ましくは少なくとも80%、85%、90%、95%、さらにより好ましくは100%の同一性を有するCDRを少なくとも1つ含むイムノバインダーを提供する。好ましくは、前記イムノバインダーのVHは、配列番号7、配列番号19、および配列番号31からなる群のCDRを含み、かつ／または前記イムノバインダーのVLのCDRは、配列番号42、配列番号54、および配列番号65からなる群のCDRを含む。

【0065】

別の一実施形態において、本発明は、配列番号8、配列番号20、配列番号32、配列番号43、配列番号55、および配列番号66からなる群の配列に、少なくとも75%の類似性、好ましくは少なくとも75%の同一性、より好ましくは少なくとも80%、85%、90%、95%、さらにより好ましくは100%の同一性を有するCDRを少なくとも1つ含むイムノバインダーを提供する。好ましくは、前記イムノバインダーのVHは、配列番号8、配列番号20、および配列番号32からなる群のCDRを含み、かつ／または前記イムノバインダーのVLのCDRは、配列番号43、配列番号55、および配列番号66からなる群のCDRを含む。

10

【0066】

別の一実施形態において、本発明は、配列番号9、配列番号21、配列番号33、配列番号44、配列番号56、および配列番号67からなる群の配列に、少なくとも75%の類似性、好ましくは少なくとも75%の同一性、より好ましくは少なくとも80%、85%、90%、95%、さらにより好ましくは100%の同一性を有するCDRを少なくとも1つ含むイムノバインダーを提供する。好ましくは、前記イムノバインダーのVHは、配列番号9、配列番号21、および配列番号33からなる群のCDRを含み、かつ／または前記イムノバインダーのVLのCDRは、配列番号44、配列番号56、および配列番号67からなる群のCDRを含む。

20

【0067】

別の一実施形態において、本発明は、配列番号10、配列番号22、配列番号34、配列番号45、配列番号57、および配列番号68からなる群の配列に、少なくとも75%の類似性、好ましくは少なくとも75%の同一性、より好ましくは少なくとも80%、85%、90%、95%、さらにより好ましくは100%の同一性を有するCDRを少なくとも1つ含むイムノバインダーを提供する。好ましくは、前記イムノバインダーのVHは、配列番号10、配列番号22、および配列番号34からなる群のCDRを含み、かつ／または前記イムノバインダーのVLのCDRは、配列番号45、配列番号57、および配列番号68からなる群のCDRを含む。

30

【0068】

別の一実施形態において、本発明は、配列番号11、配列番号13、配列番号23、配列番号25、配列番号35、配列番号46、配列番号58、および配列番号69からなる群の配列に、少なくとも75%の類似性、好ましくは少なくとも75%の同一性、より好ましくは少なくとも80%、85%、90%、95%、さらにより好ましくは100%の同一性を有するCDRを少なくとも1つ含むイムノバインダーを提供する。好ましくは、前記イムノバインダーのVHは、配列番号11、配列番号23、および配列番号35からなる群のCDRを含み、かつ／または前記イムノバインダーのVLのCDRは、配列番号46、配列番号58、および配列番号69からなる群のCDRを含む。あるいは、前記イムノバインダーのVHは、配列番号13、配列番号25、および配列番号35からなる群のCDRを含み、かつ／または前記イムノバインダーのVLのCDRは、配列番号46、配列番号58、および配列番号69からなる群のCDRを含む。

40

【0069】

別の一実施形態において、本発明は、配列番号12、配列番号24、配列番号36、配列番号47、配列番号48、配列番号59、および配列番号70からなる群の配列に、少なくとも75%の類似性、好ましくは少なくとも75%の同一性、より好ましくは少なくとも80%、85%、90%、95%、さらにより好ましくは100%の同一性を有する

50

C D Rを少なくとも1つ含むイムノバインダーを提供する。好ましくは、前記イムノバインダーのV Hは、配列番号1 2、配列番号2 4、および配列番号3 6からなる群のC D Rを含む。さらに、またはあるいは、前記イムノバインダーのV Lは、配列番号4 7、配列番号4 8、配列番号5 9、および配列番号7 0からなる群の、例えば、配列番号4 7、配列番号5 9、および配列番号7 0；または配列番号4 8、配列番号5 9、および配列番号7 0のC D Rを含む。

【0070】

非常に好ましい一実施形態において、本明細書に開示するイムノバインダーはヒトV E G Fを中和し、ラット／マウスのV E G Fまたはその部分と交差反応性である。

【0071】

イムノバインダーは、C D Rを収容することができる抗体または任意の代替の結合性骨格を含むことができる。配列番号2～72に記載するC D Rは、当該分野で認められている任意の方法を用いて、任意の適切な結合性骨格上に融合させることができる（例えば、R i e c h m a n n, L. ら、(1998年) N a t u r e、332巻、323～327頁；J o n e s, P. ら(1986年) N a t u r e、321巻、522～525；Q u e e n, C. ら(1989年) P r o c. N a t l. A c a d. S c i. U. S. A.、86巻、10029～10033頁；W i n t e rへの米国特許第5, 225, 539号、ならびにQ u e e nらへの米国特許第5, 530, 101号、同第5, 585, 089号、同第5, 693, 762号、および同第6, 180, 370号を参照されたい）。しかし、本明細書に開示するイムノバインダーは、ヒト化され、したがって治療的適用に適することが好ましい。

【0072】

抗体の場合、配列番号2～72に記載したウサギC D Rを、任意の種からの任意の抗体のフレームワーク領域中に融合させてもよい。しかし、いわゆる「品質管理」スクリーニング(W O O 1 4 8 0 1 7)において同定されるフレームワークを含む抗体または抗体の誘導体は、一般的に高い安定性および／または溶解性を特徴としており、したがってヒトV E G Fの中和など細胞外の適用の状況においても有用であり得ることが以前に見出されている。さらに、これらV L (可変軽鎖) およびV H (可変重鎖) の可溶かつ安定なフレームワークの1つの特定の組合せが、ウサギC D Rを収容するのにとりわけ適することもさらに見出された。したがって、一実施形態において、配列番号2～72に記載するC D Rを、E P 1 4 7 9 6 9 4に開示される「品質管理」スクリーニングに由来するヒト抗体フレームワーク中に融合させる。本発明において用いるための例示的フレームワークのアミノ酸配列を、配列番号172から174に記載する。驚くべきことに、前記フレームワークまたはその誘導体中に融合させる際に、多様なウサギC D Rのループコンフォメーションが、ドナーのフレームワークの配列とほとんど独立に、完全に維持され得ることが見出された。さらに、前記フレームワークまたは様々なウサギC D Rを含むその誘導体は、ウサギの野生型単鎖とは反対に良好に発現され、かつ生成され、そして、依然としてオリジナルのドナーのウサギ抗体の親和性をほとんど完全に保持する。

【0073】

したがって、好ましい一実施形態において、本明細書に開示するC D Rおよび／またはC D Rモチーフは、配列番号169の配列に少なくとも80%の配列同一性、より好ましくは少なくとも85%、90%、95%、さらにより好ましくは100%の同一性を有する重鎖可変領域フレームワーク配列において存在する。好ましい一実施形態において、重鎖可変領域フレームワーク配列は、配列番号170または配列番号171を含む。

【0074】

好ましい一実施形態において、本明細書に開示するC D Rおよび／またはC D Rモチーフは、配列番号167の配列に少なくとも85%の配列同一性、より好ましくは少なくとも90%、95%、さらにより好ましくは100%の同一性を有する軽鎖可変領域フレームワーク配列において存在し、軽鎖可変領域フレームワーク配列は、より好ましくは配列番号167または配列番号168を含む。

【0075】

ウサギ抗体において、CDRは、抗体フレームワークにおけるシステイン残基にジスルフィド連結するシステイン残基を含むことがある。したがって、上記のことは、システイン残基を含むウサギCDRを非ウサギのフレームワーク領域中に融合させて、例えば、ジスルフィド連結によりウサギCDRの安定化を促進するための変異誘発によって非ウサギのフレームワーク中にシステイン残基を導入する場合に、必要であり得る。

【0076】

他の実施形態において、本発明は、VLまたはVHのアミノ酸配列のうちの少なくとも1つを含む、VEGFに特異的に結合するイムノバインダーを提供する。本発明のイムノバインダーにおいて用いるための例示的VHまたはVLのアミノ酸配列を、それぞれ配列番号72～106および配列番号107～166に記載する。

10

【0077】

好ましい一実施形態において、本発明は、配列番号107、配列番号108、配列番号118、配列番号119、配列番号130、および配列番号131（それぞれVH60-11-4、VH60-11-6、VH60-11-4min、VH60-11-6min、VH60-11-4max、およびVH60-11-6max）からなる群より選択される配列に少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、90%、95%、最も好ましくは100%の同一性を有するVH、

ならびに／または配列番号72、配列番号82、および配列番号93（それぞれVL60、VL60min、VL60max）からなる群より選択される配列に少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、90%、95%、最も好ましくは100%の同一性を有するVLを含むイムノバインダーを提供する。

20

【0078】

別の好ましい一実施形態において、本発明は、配列番号109、配列番号120、および配列番号132（それぞれVH435、VH435min、およびVH435max）からなる群より選択される配列に少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、90%、95%、最も好ましくは100%の同一性を有するVH、

ならびに／または配列番号73、配列番号83、および配列番号94（それぞれVL435、VL435min、およびVL435max）からなる群より選択される配列に少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、90%、95%、最も好ましくは100%の同一性を有するVLを含むイムノバインダーを提供する。

30

【0079】

好ましくは、前記イムノバインダーは、配列番号175（435max）に少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、90%、95%、最も好ましくは100%の同一性を有する。

【0080】

別の好ましい一実施形態において、本発明は、配列番号110、配列番号121、および配列番号133（それぞれVH453、VH453min、およびVH453max）からなる群より選択される配列に少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、90%、95%、最も好ましくは100%の同一性を有するVH、

40

ならびに／または配列番号74、配列番号84、および配列番号95（それぞれVL453、VL453min、およびVL453max）からなる群より選択される配列に少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、90%、95%、最も好ましくは100%の同一性を有するVLを含むイムノバインダーを提供する。

【0081】

別の好ましい一実施形態において、本発明は、配列番号111、配列番号122、および配列番号134（それぞれVH375、VH375min、およびVH375max）からなる群より選択される配列に少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、90%、95%、最も好ましくは100%の同一性を有するVH、

ならびに／または配列番号75、配列番号85、および配列番号96（それぞれVL3

50

75、VL375min、およびVL375max) からなる群より選択される配列に少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、90%、95%、最も好ましくは100%の同一性を有するVLを含むイムノバインダーを提供する。

【0082】

別の好ましい一実施形態において、本発明は、配列番号112、配列番号123、および配列番号135 (それぞれVH610、VH610min、およびVH610max) からなる群より選択される配列に少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、90%、95%、最も好ましくは100%の同一性を有するVH、

ならびに／または配列番号76、配列番号86、および配列番号97 (それぞれVL610、VL610min、およびVL610max) からなる群より選択される配列に少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、90%、95%、最も好ましくは100%の同一性を有するVLを含むイムノバインダーを提供する。

10

【0083】

別の好ましい一実施形態において、本発明は、配列番号113、配列番号124、配列番号129、配列番号136、配列番号142、配列番号144、配列番号146、配列番号147、配列番号148、配列番号149、配列番号150、配列番号151、配列番号152、配列番号153、配列番号154、配列番号155、配列番号156、配列番号157、配列番号158、配列番号159、配列番号160、配列番号161、配列番号162、配列番号163、配列番号164、配列番号165、および配列番号166 (VH578およびその改変体) からなる群より選択される配列に少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、90%、95%、最も好ましくは100%の同一性を有するVH、

20

ならびに／または配列番号77、配列番号87、配列番号92、配列番号98、配列番号103、配列番号104、および配列番号105 (VL578およびその改変体) からなる群より選択される配列に少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、90%、95%、最も好ましくは100%の同一性を有するVLを含むイムノバインダーを提供する。

【0084】

好ましくは、前記イムノバインダーは、配列番号178 (578min)、配列番号179 (578max)、または配列番号180 (578minmax) に少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、90%、95%、最も好ましくは100%の同一性を有する。

30

【0085】

別の好ましい一実施形態において、本発明は、配列番号114、配列番号125、および配列番号137 (それぞれVH534、VH534min、およびVH534max) からなる群より選択される配列に少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、90%、95%、最も好ましくは100%の同一性を有するVH、

ならびに／または配列番号78、配列番号88、および配列番号99 (それぞれVL534、VL534min、およびVL534max) からなる群より選択される配列に少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、90%、95%、最も好ましくは100%の同一性を有するVLを含むイムノバインダーを提供する。

40

【0086】

別の好ましい一実施形態において、本発明は、配列番号115、配列番号126、配列番号138、および配列番号143 (それぞれVH567、VH567min、およびVH567max) からなる群より選択される配列に少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、90%、95%、最も好ましくは100%の同一性を有するVH、

ならびに／または配列番号79、配列番号89、および配列番号100 (それぞれVL567、VL567min、およびVL567max) からなる群より選択される配列に少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、90%、95%、最も好ましくは100%の同一性を有するVLを含むイムノバインダーを提供する。

50

【0087】

好ましくは、前記イムノバインダーは、配列番号177 (567min) に少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、90%、95%、最も好ましくは100%の同一性を有する。

【0088】

別の好ましい一実施形態において、本発明は、配列番号116、配列番号127、配列番号139、および配列番号140 (それぞれVH509、VH509min、VH509max、およびVH509maxII) からなる群より選択される配列に少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、90%、95%、最も好ましくは100%の同一性を有するVH、

10

ならびに／または配列番号80、配列番号90、および配列番号101 (それぞれVL509、VL509min、およびVL509max) からなる群より選択される配列に少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、90%、95%、最も好ましくは100%の同一性を有するVLを含むイムノバインダーを提供する。

【0089】

別の好ましい一実施形態において、本発明は、配列番号117、配列番号128、配列番号141、および配列番号145 (それぞれVH511、VH511min、VH511max、およびVH511maxDHP) からなる群より選択される配列に少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、90%、95%、最も好ましくは100%の同一性を有するVH、

20

ならびに／または配列番号81、配列番号91、配列番号102、および配列番号106 (それぞれVL511、VL511min、VL511max、およびVL511minC41L) からなる群より選択される配列に少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、90%、95%、最も好ましくは100%の同一性を有するVLを含むイムノバインダーを提供する。

【0090】

好ましくは、前記イムノバインダーは、配列番号176 (511__max) に少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、90%、95%、最も好ましくは100%の同一性を有する。

【0091】

30

ある実施形態において、本発明は、配列番号2～166、および配列番号175～180に記載するアミノ酸配列に実質的な類似性を有するアミノ酸配列を含む、VEGFに特異的に結合するイムノバインダーをさらに提供し、イムノバインダーは、本発明の抗VEGFイムノバインダーの所望の機能特性を本質的に保持、または改善する。好ましい類似性パーセント値としては、それだけには限定されないが、少なくとも50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、または95%の同一性が挙げられる。

【0092】

ある実施形態において、本発明は、配列番号2～166、および配列番号175～180に記載するアミノ酸配列に実質的に同一であるアミノ酸配列を含む、VEGFに特異的に結合するイムノバインダーをさらに提供し、イムノバインダーは、本発明の抗VEGFイムノバインダーの所望の機能特性を保持、または改善する。好ましい同一性パーセント値としては、それだけには限定されないが、少なくとも50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、または95%の同一性が挙げられる。

40

【0093】

ある実施形態において、本発明は、配列番号2～166、および配列番号175～180に記載するアミノ酸配列に対して保存的置換を有するアミノ酸配列を含む、VEGFに特異的に結合するイムノバインダーをさらに提供し、イムノバインダーは、本発明の抗VEGFイムノバインダーの所望の機能特性を保持、または改善する。

【0094】

いくつかの実施形態において、本発明は、ヒトVEGFに特異的に結合し、他の種のV

50

VEGF分子、例えば、マウスVEGF、ラットVEGF、ウサギVEGF、またはモルモットVEGFと交差反応するイムノバインダーを提供する。特定の一実施形態において、抗VEGFイムノバインダーは、ヒトおよびラット／マウスのVEGFに特異的に結合することができる。

【0095】

いくつかの実施形態において、本発明は、ヒトVEGFに特異的に結合し、他の種のVEGF分子、例えば、マウスVEGF、ラットVEGF、ウサギVEGF、またはモルモットVEGFと交差反応しないイムノバインダーを提供する。

【0096】

いくつかの実施形態において、本発明は、ヒトVEGFに特異的に結合するイムノバインダーを提供し、イムノバインダーはアフィニティ成熟している。

【0097】

一実施形態において、本発明の抗体および抗体フラグメントは、単鎖抗体 (scFv) またはFabフラグメントである。scFv抗体の場合、選択されたVLドメインは、柔軟なリンカーによっていずれかの配向において選択されたVHドメインに連結することができる。適切な最先端のリンカーはGGGGSの繰返しアミノ酸配列またはその改変体からなる。本発明の好ましい一実施形態において、配列番号181に記載するアミノ酸配列の (GGGGS)₄ リンカーは、繰返し1～3回の改変体以外は、やはり可能である (Holligerら (1993年) Proc. Natl. Acad. Sci. USA、90巻、6444～6448頁)。本発明に用いることができる他のリンカーは、Alfthanら (1995年)、Protein Eng.、8巻、725～731頁、Choiら (2001年)、Eur. J. Immunol.、31巻、94～106頁、Huら (1996年)、Cancer Res.、56巻、3055～3061、Kipriyanovら (1999年)、J. Mol. Biol.、293巻、41～56頁、およびRooversら (2001年)、Cancer Immunol. Immunother.、50巻、51～59頁によって記載されている。配置は、VL—リンカー—VHまたはVH—リンカー—VLのいずれかであってよく、前者の配向が好ましいものである。しかし、VHまたはVLの単一のドメインの抗体も企図される。Fabフラグメントの場合、選択される軽鎖可変ドメインVLがヒトIgκ鎖の定常領域に融合しており、一方、適切な重鎖可変ドメインVHがヒトIgGの最初の (N末端の) 定常ドメインCH1に融合している。定常ドメインのC末端に、または可変ドメインもしくは定常ドメインの他の部位に、鎖間ジスルフィド架橋が形成することがある。あるいは、2本の鎖が柔軟なリンカーによってやはり連結され、単鎖Fab抗体を生じることもある。

【0098】

本発明の抗体または抗体誘導体は、 10^{-14} Mから 10^{-5} Mの範囲の解離定数 K_d でヒトVEGFに対する親和性を有することができる。本発明の好ましい一実施形態において、 K_d は ≤ 1 nMである。抗原に対する抗体の親和性は、適切な方法 (Fundamental Immunology、Paul, W. E. 編集、Raven Press、New York、NY (1992)におけるBerzofskyら、「Antibody-Antigen Interactions」; Kuby, J. Immunology、W. H. Freeman and Company、New York、NY) およびそこに記載される方法を用いて実験的に決定することができる。

【0099】

Epitomics社は、ウサギモノクローナル抗体である抗VEGF抗体を販売している (VEGF (C末端) Rabbit Antibody、カタログ番号1909-1)。前記抗体は、ヒトVEGFのC末端上の残基に対するものであり、したがってVEGFを中和することができない。それゆえ、前記抗体は治療的適用に適さない。さらに、前記モノクローナルIgGはヒト化抗体ではなく、全長の天然ウサギ免疫グロブリンである。さらに、この抗体は天然型のVEGFを認識しないことが示された。

【0100】

(VEGF上の同じエピトープに結合するイムノバインダー)

別の一態様において、本発明は、配列番号2～211に記載するアミノ酸配列の任意の1つを含む抗体によって認識されるVEGF上のエピトープに結合する抗体を提供する。このような抗体は、それだけには限定されないがELISAを含む標準のVEGF結合アッセイにおいて、配列番号2～211に記載するアミノ酸配列の任意の1つまたは複数を含む抗体と交差競合(cross-compete)するその能力に基づいて同定され得る。試験抗体が、配列番号2～211に記載するアミノ酸配列の任意の1つまたは複数を含む抗体のヒトVEGFに対する結合を阻害する能力は、試験抗体が交差競合することができ、したがって配列番号2～211に記載するアミノ酸配列の任意の1つまたは複数を含む抗体としてヒトVEGF上の重複するエピトープと相互作用することを実証している。

10

【0101】

さらに、またはあるいは、このような抗体は、これらが同じペプチドの免疫原に結合するか否かを決定するための標準のエピトープマッピング技術を用いて同定することもできる。それだけには限定されないが、NMR、X線結晶学、コンピュータベースのモデリング、またはタンパク質断層撮影法を含めた構造モデリング技術をやはり用いて、抗体/VEGF相互作用に対する正確な分子の決定基をさらに定義してもよい(Banyayら、2004、ASSAY and Drug Development Technologies (2)、5巻、516～567頁)。実際、VEGFの結晶構造は解明されており、VEGF結合に關与する表面のアミノ酸残基は公知である(Fuhrら、2006年、J. Biol. Chem.、281巻、6625～6631頁)。したがって、当該分野において入手できるペプチド免疫原のアミノ酸配列およびVEGFの構造上の知識を考慮すると、配列番号2～211に記載するアミノ酸配列の任意の1つまたは複数を含む抗体によって認識されるVEGF上のエピトープに結合する抗体を同定することは、十分に当該分野の技術範囲内である。

20

【0102】

いくつかの実施形態において、配列番号2～211に記載するアミノ酸配列の任意の1つまたは複数を含む抗体によって認識されるVEGF上のエピトープに結合する抗体は、少なくとも $10^7 M^{-1}$ 、例えば、少なくとも $10^7 M^{-1}$ 、少なくとも $10^8 M^{-1}$ 、少なくとも $10^9 M^{-1}$ 、少なくとも $10^{10} M^{-1}$ 、少なくとも $10^{11} M^{-1}$ 、少なくとも $10^{12} M^{-1}$ 、または少なくとも $10^{13} M^{-1}$ の親和性でVEGFに結合する。

30

【0103】

いくつかの実施形態において、配列番号2～211に記載するアミノ酸配列の任意の1つまたは複数を含む抗体によって認識されるVEGF上のエピトープに結合する抗体は、ヒトVEGFに特異的に結合し、他の種のVEGF分子、例えば、マウスVEGF、ラットVEGF、ウサギVEGF、またはモルモットVEGFと交差反応しない。

【0104】

いくつかの実施形態において、配列番号2～211に記載するアミノ酸配列の任意の1つまたは複数を含む抗体によって認識されるVEGF上のエピトープに結合する抗体は、他の種のVEGF分子、例えば、マウスVEGF、ラットVEGF、またはウサギVEGFと交差反応する。

40

【0105】

(最適化された改変体)

本発明の抗体を、機能特性の増強に対して、例えば、溶解性および/または安定性の増強に対してさらに最適化してよい。

【0106】

ある実施形態において、本発明の抗体を、本明細書に参照によって援用される、「Sequence Based Engineering and Optimization of Single Chain Antibodies」という名称の、2008

50

年3月12日出願のPCT出願PCT/EP2008/001958に開示されている「機能的コンセンサス」方法論に従って最適化する。例えば、本発明のVEGFイムノバインダーを、機能的に選択されたscFvのデータベースと比較してVEGFイムノバインダーにおける対応する（1つまたは複数の）位置よりも変動性への耐性が大きいまたは小さいアミノ酸残基の位置を同定することができ、それによって、このように同定された残基の（1つまたは複数の）位置が、安定性および／または溶解性などの機能性を改善するように操作するのに適することがあることを指摘している。

【0107】

置換のための例示的フレームワーク位置は、「Methods of Modifying Antibodies, and Modified Antibodies with Improved Functional Properties」という名称の、2008年6月25日出願の、PCT出願PCT/CH2008/000285、および「Sequence Based Engineering and Optimization of Single Chain Antibodies」という名称の、2008年6月25日出願のPCT出願PCT/CH2008/000284に記載されている。例えば、以下の置換の1つまたは複数の、本発明のイムノバインダーの重鎖可変領域におけるアミノ酸の位置に導入することができる（以下に列挙する各アミノ酸位置に対してAhoナンバリングが参照される）：

（a）アミノ酸位置1のQまたはE；

（b）アミノ酸位置6のQまたはE；

（c）アミノ酸位置7の、T、S、またはA、より好ましくはTまたはA、さらにより好ましくはT；

（d）アミノ酸位置10の、A、T、P、V、またはD、より好ましくはT、P、V、またはD、

（e）アミノ酸位置12の、LまたはV、より好ましくはL、

（f）アミノ酸位置13の、V、R、Q、M、またはK、より好ましくはV、R、Q、またはM；

（g）アミノ酸位置14の、R、M、E、Q、またはK、より好ましくはR、M、EまたはQ、さらにより好ましくはRまたはE；

（h）アミノ酸位置19の、LまたはV、より好ましくはL；

（i）アミノ酸位置20の、R、T、K、またはN、より好ましくはR、T、またはN、さらにより好ましくはN；

（j）アミノ酸位置21の、I、F、L、またはV、より好ましくはI、F、またはL、さらにより好ましくはIまたはL；

（k）アミノ酸位置45の、RまたはK、より好ましくはK；

（l）アミノ酸位置47の、T、P、V、AまたはR、より好ましくはT、P、V、またはR、さらにより好ましくはR；

（m）アミノ酸位置50の、K、Q、H、またはE、より好ましくはK、H、またはE、さらにより好ましくはK；

（n）アミノ酸位置55の、MまたはI、より好ましくはI；

（o）アミノ酸位置77の、KまたはR、より好ましくはK；

（p）アミノ酸位置78の、A、V、L、またはI、より好ましくはA、L、またはI、さらにより好ましくはA；

（q）アミノ酸位置82の、E、R、T、またはA、より好ましくはE、T、またはA、さらにより好ましくはE；

（r）アミノ酸位置86の、T、S、I、またはL、より好ましくはT、S、またはL、さらにより好ましくはT；

（s）アミノ酸位置87の、D、S、N、またはG、より好ましくはD、N、またはG、さらにより好ましくはN；

（t）アミノ酸位置89の、A、V、L、またはF、より好ましくはA、V、またはF、

10

20

30

40

50

さらにより好ましくはV；

(u) アミノ酸位置90の、F、S、H、D、またはY、より好ましくはF、S、H、またはD；

(v) アミノ酸位置92の、D、Q、またはE、より好ましくはDまたはQ、さらにより好ましくはD；

(w) アミノ酸位置95の、G、N、T、またはS、より好ましくはG、N、またはT、さらにより好ましくはG；

(x) アミノ酸位置98の、T、A、P、F、またはS、より好ましくはT、A、P、またはF、さらにより好ましくはF；

(y) アミノ酸位置103の、R、Q、V、I、M、F、またはL、より好ましくはR、Q、I、M、F、またはL、さらにより好ましくはY、さらにより好ましくはL；および

(z) アミノ酸位置107の、N、S、またはA、より好ましくはNまたはS、さらにより好ましくはN。

【0108】

さらに、またはあるいは、以下の置換の1つまたは複数を、本発明のイムノバインダーの軽鎖可変領域中に導入することができる：

(a a) アミノ酸位置1の、Q、D、L、E、S、またはI、より好ましくはL、E、S、またはI、さらにより好ましくはLまたはE；

(b b) アミノ酸位置2の、S、A、Y、I、P、またはT、より好ましくはA、Y、I、P、またはT、さらにより好ましくはPまたはT；

(c c) アミノ酸位置3の、Q、V、T、またはI、より好ましくはV、T、またはI、さらにより好ましくはVまたはT；

(d d) アミノ酸位置4の、V、L、I、またはM、より好ましくはVまたはL；

(e e) アミノ酸位置7の、S、E、またはP、より好ましくはSまたはE、さらにより好ましくはS；

(f f) アミノ酸位置10の、TまたはI、より好ましくはI；

(g g) アミノ酸位置11の、AまたはV、より好ましくはA；

(h h) アミノ酸位置12の、SまたはY、より好ましくはY；

(i i) アミノ酸位置14の、T、S、またはA、より好ましくはTまたはS、さらにより好ましくはT；

(j j) アミノ酸位置18の、SまたはR、より好ましくはS；

(k k) アミノ酸位置20の、TまたはR、より好ましくはR；

(l l) アミノ酸位置24の、RまたはQ、より好ましくはQ；

(m m) アミノ酸位置46の、HまたはQ、より好ましくはH；

(n n) アミノ酸位置47の、K、R、またはI、より好ましくはRまたはI、さらにより好ましくはR；

(o o) アミノ酸位置50の、R、Q、K、E、T、またはM、より好ましくはQ、K、E、TまたはM；

(p p) アミノ酸位置53の、K、T、S、N、Q、またはP、より好ましくはT、S、N、Q、またはP；

(q q) アミノ酸位置56の、IまたはM、より好ましくはM；

(r r) アミノ酸位置57の、H、S、F、またはY、より好ましくはH、S、またはF；

(s s) アミノ酸位置74の、I、V、またはT、より好ましくはVまたはT、R、さらにより好ましくはT；

(t t) アミノ酸位置82の、R、Q、またはK、より好ましくはRまたはQ、さらにより好ましくはR；

(u u) アミノ酸位置91の、LまたはF、より好ましくはF；

(v v) アミノ酸位置92の、G、D、T、またはA、より好ましくはG、D、またはT、さらにより好ましくはT；

10

20

30

40

50

(xx) アミノ酸位置94の、SまたはN、より好ましくはN；

(yy) アミノ酸位置101の、F、Y、またはS、より好ましくはYまたはS、さらにより好ましくはS；および

(zz) アミノ酸位置103の、D、F、H、E、L、A、T、V、S、G、またはI、より好ましくはH、E、L、A、T、V、S、G、またはI、さらにより好ましくはAまたはV。

【0109】

AHオナンバリングシステムは、Honegger, A. および Pluckthun, A.、(2001年) J. Mol. Biol.、309巻、657～670頁にさらに記載されている。あるいは、Kabatra (Kabata, E. A. ら (1991)、Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、U. S. Department of Health and Human Services、NIH Publication、第91～3242) にさらに記載されているKabataナンバリングシステムを用いてもよい。抗体の重鎖および軽鎖の変換領域におけるアミノ酸残基の位置を同定するのに用いられる2つの異なるナンバリングシステムのための変換表は、A. Honegger、J. Mol. Biol.、309巻(2001年) 657～670頁に提供されている。

【0110】

他の実施形態において、本発明のイムノバインダーは、「Solubility Optimization of Immunobinders」という名称の、2008年6月25日出願の、米国仮出願第61/075,692号に記載されている、溶解性および/または安定性を増強する変異を1つまたは複数含んでいる。ある好ましい実施形態において、イムノバインダーは、12、103、および144(AHオナンバリング慣例)からなる重鎖アミノ酸位置の群より選択されるアミノ酸位置に溶解性を増強する変異を含んでいる。好ましい一実施形態において、イムノバインダーは、(a) 重鎖アミノ酸位置12のセリン(S)；(b) 重鎖アミノ酸位置103のセリン(S)またはスレオニン(T)；および(c) 重鎖アミノ酸位置144のセリン(S)またはスレオニン(T)からなる群より選択される置換を1つまたは複数含んでいる。別の一実施形態において、イムノバインダーは、以下の置換：(a) 重鎖アミノ酸位置12のセリン(S)；(b) 重鎖アミノ酸位置103のセリン(S)またはスレオニン(T)；および(c) 重鎖アミノ酸位置144のセリン(S)またはスレオニン(T)を含んでいる。

【0111】

(ウサギ抗VEGF抗体を発現するハイブリドーマ)

別の一態様において、本発明は、配列番号72～81、および配列番号107～117に記載するアミノ酸配列の任意の1つまたは複数を含むモノクローナル抗体を発現するハイブリドーマを提供する。ウサギB細胞からハイブリドーマを産生するための方法は当該分野では周知であり、例えば、米国特許出願第2005/0033031号に開示されている。

【0112】

(抗VEGFイムノバインダーの生成)

本発明の抗体または抗体誘導体を、組換え遺伝学の技術分野における日常的な技術を用いて産生してもよい。ポリペプチドの配列を知り、それをコードするcDNAを遺伝子合成によって産生することができる(www.genscript.com)。これらのcDNAを適切なベクタープラスミド中にクローニングすることができる。VLドメインおよび/またはVHドメインをコードするDNAを得た後は、例えば、変異誘発プライマーを用いたPCRにより、部位特異的変異誘発を行って様々な誘導体を得ることができる。最良の「開始」配列を、VLおよび/またはVH配列における所望の変化の数に応じて選択することができる。

【0113】

CDRをフレームワーク領域中に組み入れるかまたは融合させるための方法は、例えば

Riechmann, L. ら、(1998年) Nature、332巻、323～327; Jones, P. ら(1986年) Nature、321巻、522～525頁; Queen, C. ら(1989年) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.、86巻、10029～10033頁; Winterへの米国特許第5, 225, 539号、ならびにQueenらへの米国特許第5, 530, 101号、同第5, 585, 089号、同第5, 693, 762号、および同第6, 180, 370号に記載されているもの、ならびに「Humanization of Rabbit Antibodies Using Universal Antibody Frameworks」という名称の、2008年6月25日出願の、米国仮出願第61/075, 697号に開示されているものを含む。

10

【0114】

当業者には周知の標準のクローニング技術および変異誘発技術を用いて、Fabフラグメントを生成するために、リンカーを付着し、ドメインをシャッフルし、または融合物を構築してよい。本発明の一般的方法を開示する基本的プロトコルは、Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Sambrook & Russell、第3版、2001年)、およびCurrent Protocols in Molecular Biology (Ausubelら、1999年)に記載されている。

【0115】

scFvポリペプチドをコードする遺伝子を内部に持つDNA配列、またはFabフラグメントの場合はVL-C κ およびVH-CH1融合物に対する2つの遺伝子を含む2つの別々の遺伝子またはバイシストロン性オペロンのいずれかをコードするDNA配列が、適切な発現ベクターに、好ましくは誘導プロモーターを伴う発現ベクターにクローニングされる。各遺伝子の前には翻訳を確実にする好適なリボゾーム結合部位が存在するように、注意を払わなければならない。本発明の抗体は、開示した配列からなるのではなく、開示した配列を含むことが理解される。例えば、クローニングの戦略は、構築物が、N末端に1つまたは少数のさらなる残基を有する抗体から作られることを必要とし得る。具体的には、開始コドンに由来するメチオニンが翻訳後に切断されなかった場合、最終のタンパク質中に存在することがある。scFv抗体についてのほとんどの構築物は、N末端にさらなるアラニンを生じる。本発明の好ましい一実施形態において、E. coliにおけるペリプラズムの発現についての発現ベクターが選択される(Kreber、1997年)。前記ベクターは、切断可能なシグナル配列の前にプロモーターを含む。次いで、抗体ペプチドについてのコード配列を、インフレーム(in frame)で切断可能なシグナル配列に融合する。これにより、シグナル配列が切断される細菌のペリプラズムへの、発現されたポリペプチドのターゲティングが可能になる。次いで、抗体はフォールディングされる。Fabフラグメントの場合は、VL-C κ およびVH-CH1融合物のペプチドの両方が移行シグナルに連結していなければならない。ペプチドがペリプラズムに到達した後、C末端のシステインでS-S共有結合が形成される。抗体の細胞質内発現が好ましい場合、前記抗体は通常、封入体から高収率で得ることができ、封入体は他の細胞フラグメントおよびタンパク質から容易に分離され得る。この場合、封入体は、例えば塩酸 Guanidinium (GndHCl) などの変性剤中に可溶化され、次いで当業者には周知の還元手順によってリフォールディングされる。

20

30

40

【0116】

scFvまたはFabポリペプチドを発現するプラスミドを、適切な宿主、好ましくは細菌、酵母、または哺乳動物の細胞、最も好ましくは適切なE. coli菌株(例えば、ペリプラズムの発現についてJM83、または封入体中の発現についてBL21)の中に導入する。ポリペプチドを、ペリプラズムまたは封入体のいずれかから収集し、当業者には公知の、イオン交換クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、および/またはゲルろ過などの標準技術を用いて精製してよい。

【0117】

50

本発明の抗体または抗体誘導体を、収率、溶解性、およびインビトロの安定性に関して特徴付けることができる。VEGFに対する、好ましくはヒトVEGFに対する結合能を、WO 97 29 131に記載されている通り、組換えヒトVEGFを用いて、インビトロでELISAまたは表面プラズモン共鳴法(BIACore)によって試験することができ、表面プラズモン共鳴法はまた、 K_{off} 速度定数の決定を可能にし、これは好ましくは $10^{-3} s^{-1}$ 未満であるべきである。 $\leq 10 nM$ の K_d 値が好ましい。

【0118】

ヒトVEGFに対する強力な結合親和性を有する抗体の他に、治療上の観点からの他の有益な特性を有する抗VEGF抗体を選択することも望ましい。例えば、抗体は、VEGFに応答したHUVEC細胞の増殖を阻害するものであってもよい(実施例3を参照されたい)。一実施形態において、抗体は、ほぼ最大の有効濃度のVEGF(0.08 nM)に応答したHUVEC細胞の増殖を阻害することができ得る。好ましくは、抗体は、この「内皮細胞増殖アッセイ」における内皮細胞のVEGF誘導型増殖を阻害するのに約5 nM以下、好ましくは約1 nM以下、好ましくは約1 nM以下、好ましくは約0.5 nM以下、最も好ましくは約0.06 nM以下の有効用量50(ED50)値を有し、すなわち、これらの濃度で抗体は、インビトロでVEGF誘導型内皮細胞の増殖を、例えば50%以上阻害することができる。

【0119】

(二重特異性分子)

別の一態様において、本発明は、本発明の抗VEGF抗体またはそのフラグメントを含む二重特異性分子を特徴としている。本発明の抗体、またはその抗原結合部分を、誘導体化し、または別のペプチドまたはタンパク質などの別の機能性分子(例えば、別の抗体もしくは受容体に対するリガンド)に連結して、少なくとも2つの異なる結合部位または標的分子に結合する二重特異性分子を産生することができる。本発明の抗体を、誘導体化するか、または2つ以上の他の機能性分子に連結して、3つ以上の異なる結合部位および/または標的分子に結合する多重特異的分子を産生することができ、このような多重特異的分子は、本明細書で用いられる「二重特異性分子」という用語によって包含されることも意図される。本発明の二重特異性分子を作り出すには、本発明の抗体を、別の抗体、抗体フラグメント、腫瘍特異的もしくは病原体特異的な抗原、ペプチド、または結合性模倣物(binding mimetic)などの1つまたは複数の他の結合性分子に、二重特異性分子が生じるように、(例えば、化学的カップリング、遺伝子融合、非共有性の会合、またはその他によって)機能的に連結してよい。したがって、本発明は、VEGFに対する特異性を有する少なくとも1つの第1の結合性分子、および1つまたは複数のさらなる標的エピトープに対する特異性を有する第2の結合性分子を含む二重特異性分子を含む。

【0120】

一実施形態において、本発明の二重特異性分子は、少なくとも1つの抗体、またはその抗体フラグメント(例えば、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、または単鎖Fvを含む)に対する結合特異性を含む。抗体は、その内容が参照によって明示的に援用されるLadnerら、米国特許第4,946,778号に記載されているように、軽鎖または重鎖のダイマー、またはそれらの任意の最小のフラグメント(Fvもしくは単鎖の構築物など)であってもよい。

【0121】

ヒトモノクローナル抗体が好ましいが、本発明の二重特異性分子に用いることができる他の抗体は、マウス、キメラ、およびヒト化モノクローナル抗体である。

【0122】

本発明の二重特異性分子を、当該分野では公知の方法を用いて、構成成分の結合特異性を結合体化することによって調製することができる。例えば、二重特異性分子の各結合特異性を別々に産生し、次いで相互に結合体化してよい。結合特異性がタンパク質またはペプチドである場合、様々なカップリング剤またはクロスリンク剤を共有性の結合体化に用

10

20

30

40

50

いることができる。クロスリンク剤の例としては、プロテインA、カルボジイミド、N-スクシンイミジル-S-アセチル-L-チオアセテート (SATA)、5, 5'-ジチオビス (2-ニトロ安息香酸) (DNFB)、o-フェニレンジマレイミド (oPDM)、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ) プロピオネート (SPDP)、およびスルホスクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル) シクロヘキサノー-1-カルボキシレート (スルホ-SMCC) が挙げられる (例えば、Karpovskiyら、(1984年) J. Exp. Med.、160巻、1686頁; Liu, MAら (1985年) Proc. Natl. Acad. Sci. USA、82巻、8648頁を参照されたい)。他の方法としては、Paulus (1985年) Behring Inst. Mitt.、78巻、118~132号; Brennanら (1985年) Science、229巻、81~83頁、およびGlennieら (1987年) J. Immunol.、139巻、2367~2375頁に記載されているものが挙げられる。好ましい結合体化剤 (conjugating agent) はSATAおよびスルホ-SMCCであり、両方ともPierce Chemical Co. (Rockford, IL) から入手できる。

【0123】

結合特異性が抗体である場合、これらは、例えば、2本の重鎖のC末端ヒンジ領域または他の部位によって (天然に存在しているものであれ、人工的に導入されたものであれ)、スルフヒドリル結合を介して結合体化されてよい。とりわけ好ましい一実施形態において、ヒンジ領域を、奇数個、好ましくは1個のスルフヒドリル残基を含むように修飾した後、結合体化する。

【0124】

あるいは、両方の結合特異性を同じベクター中にコードさせ、同じ宿主細胞中で発現、会合させてもよい。この方法は、二重特異性分子が、mAb×mAb、mAb×Fab、Fab×F(ab')₂、またはリガンド×Fab融合タンパク質である場合にとりわけ有用である。本発明の二重特異性分子は、1つの単鎖抗体および結合決定基を含む単鎖分子、または2つの結合決定基を含む単鎖の二重特異性分子であってよい。二重特異性分子は、少なくとも2つの単鎖分子を含んでいてよい。さらに、二重特異性分子は、第1の標的に特異的に結合するscFvであってよく、この場合、前記scFvのVHおよびVLは、第2の標的に対して特異的結合をもたらすドメインを含む柔軟なリンカーで連結されている。適切なリンカーは、米国仮出願第60/937, 820号に記載されている。二重特異性分子を調製するための方法は、例えば、米国特許第5, 260, 203号、米国特許第5, 455, 030号、米国特許第4, 881, 175号、米国特許第5, 132, 405号、米国特許第5, 091, 513号、米国特許第5, 476, 786号、米国特許第5, 013, 653号、米国特許第5, 258, 498号、および米国特許第5, 482, 858号に記載されている。

【0125】

二重特異性分子の、それらの特異的な標的に対する結合は、例えば、酵素結合免疫ソルベント検定法 (ELISA)、ラジオイムノアッセイ (RIA)、FACS分析、生物検定 (例えば、増殖阻害) または免疫ブロットアッセイによって確認することができる。これらの各アッセイは、一般的に、目的の複合体に特異的な標識した試薬 (例えば、抗体) を用いることによって、特に目的とするタンパク質-抗体複合体の存在を検出するものである。例えば、VEGF-抗体複合体を、例えば、抗体-VEGF複合体を認識し、特異的に結合する、酵素が連結した抗体または抗体フラグメントを用いて検出することができる。あるいは、複合体を、様々な他の任意のイムノアッセイを用いて検出することができる。例えば、抗体は、放射性標識されていてよく、ラジオイムノアッセイ (RIA) において用いられてよい (例えば、参照によって本明細書に援用される、Weintroub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, 1986

年3月を参照されたい)。放射性同位元素を、 γ 線計数器、もしくはシンチレーションカウンターの使用などの手段によって、またはオートラジオグラフィーによって検出することができる。

【0126】

(イムノコンジュゲート)

別の一態様において、本発明は、細胞毒、薬物(例えば、免疫抑制薬)、または放射性毒などの治療用部分に結合体化している、抗VEGF抗体、またはそのフラグメントを特色としている。このような結合体を、本明細書において「イムノコンジュゲート」と呼ぶ。1つまたは複数の細胞毒を含むイムノコンジュゲートを「免疫毒素」と呼ぶ。細胞毒または細胞毒性剤には、細胞にとって有害な(例えば、死滅させる)あらゆる薬剤が含まれる。例としては、タキソール、サイトカラシンB、グラミシジンD、エチジウムブロマイド、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、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、グルココルチコイド、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、ならびにこれらの類似体または同族体が挙げられる。治療剤としては、例えば、代謝拮抗薬(例えば、メトトレキサート、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、ダカルバジン(decarbazine)、アルキル化薬(例えば、メクロレタミン、チオテパ(thioepa)、クロラムブシル、メルファラン、カルムスチン(BSNU)、およびロムスチン(CCNU)、シクロホスファミド(cyclophosphamide)、ブスルファン、ジプロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンC、およびシス-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(以前のダウノマイシン)およびドキソルビシン)、抗生物質(例えば、ダクチノマイシン(以前のアクチノマイシン)、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))、ならびに抗有糸分裂剤(例えば、ビンクリスチンおよびビンブラスチン)がやはり挙げられる。

【0127】

本発明の抗体に結合体化することができる治療用細胞毒の他の好ましい例としては、デュオカルマイシン、カリケアマイシン、メイタンシン、およびオーリスタチン、ならびにこれらの誘導体が挙げられる。カリケアマイシン抗体結合体の一例は市販されている(MylotargTM, Wyeth-Ayerst)。

【0128】

細胞毒を、当該分野で利用可能なリンカー技術を用いて、本発明の抗体に結合体化することができる。細胞毒を抗体に結合体化するのに用いられているリンカーのタイプの例としては、それだけには限定されないが、ヒドラゾン、チオエーテル、エステル、ジスルフィド、およびペプチド含有のリンカーが含まれる。リンカーは、例えば、リソソーム区画内の低pHによる切断を受けやすいもの、またはカテプシン(例えば、カテプシンB、C、D)など、腫瘍組織において優先的に発現されるプロテアーゼなどの、プロテアーゼによる切断を受けやすいものが選択され得る。

【0129】

細胞毒、リンカーのタイプ、および治療剤を抗体に結合体化するための方法のさらなる考察に関して、Saito, G. ら、(2003年) Adv. Drug Deliv. Rev., 55巻、199~215頁; Trail, P. A. ら、(2003年) Cancer Immunol. Immunother., 52巻、328~337頁; Payne, G. (2003年) Cancer Cell, 3巻、207~212頁; Allen, T. M. (2002年) Nat. Rev. Cancer 2巻、750~763頁; Pastan, I. および Kreitman, R. J., (2002年) Curr. Opin. Investig. Drugs, 3巻、1089~1091頁; Senter, P. D. および Springer, C. J. (

10

20

30

40

50

2001年) Adv. Drug Deliv. Rev.、53巻、247～264頁も参照されたい。

【0130】

本発明の抗体は、また、放射性同位元素に結合体化して、ラジオイムノコンジュゲート (radioimmunoconjugate) とも呼ばれる、細胞毒性の放射性医薬品を産生することもできる。診断に、または治療に用いるための抗体に結合体化することができる放射性同位元素の例としては、それだけには限定されないが、ヨウ素¹³¹、インジウム¹¹¹、イットリウム⁹⁰、およびルテチウム¹⁷⁷が挙げられる。ラジオイムノコンジュゲートを調製するための方法は、当該分野において確立されている。ラジオイムノコンジュゲートの例は ZevalinTM (IDEC Pharmaceuticals) および BexxarTM (Corixa Pharmaceuticals) を含めて市販されており、本発明の抗体を用いてラジオイムノコンジュゲートを調製するのに同様の方法を用いることができる。

10

【0131】

本発明の抗体結合体を用いて、所与の生物学的応答を調節することができ、薬物部分は古典的な化学療法剤に限定されると解釈してはならない。例えば、薬物部分は、所望の生物活性を有するタンパク質またはポリペプチドであってよい。このようなタンパク質としては、例えば、酵素的に活性な毒素、またはその活性なフラグメント、例えば、アブリン、リシンA、シュードモナスの体外毒素、もしくはジフテリア毒素；腫瘍壊死因子もしくはインターフェロン- γ などのタンパク質；または生物学的応答調節物質、例えば、リンホカイン、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」)、顆粒球コロニー刺激因子 (「G-CSF」)、もしくは他の成長因子が挙げられ得る。

20

【0132】

このような治療部分を抗体に結合体化するための技術は周知であり、例えば、Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy、Reisfeldら (編集)、243～56頁、(Alan R. Liss, Inc. 1985)における、Arnon ら、「Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy」；Controlled Drug Delivery (第2版)、Robinson ら (編集)、623～53頁 (Marcel Dekker, Inc.、1987年)における、Hellstromら、「Antibodies For Drug Delivery」；Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications、Pincheraら (編集)、475～506頁 (1985年)における、Thorpe、「Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review」；Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy、Baldwinら (編集)、303～16頁 (Academic Press 1985年)における、「Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy」、およびThorpeら、「The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates」、Immunol. Rev.、62巻、119～58頁 (1982年)を参照されたい。

30

40

【0133】

(抗VEGF抗体の使用)

治療的適用のために、本発明の抗VEGF抗体は、哺乳動物、好ましくはヒトに、局所

50

的、眼内、筋肉内、腹腔内、脳脊髄内、皮下、関節内、滑膜内、鞘内、経口または吸入経路によって、ボラスとしてかまたはある期間にわたる持続的注入によって、ヒトに静脈内投与できる形態を含む、本明細書で議論される形態などの、薬学的に許容される投薬形態で投与する。抗体はまた、腫瘍内、腫瘍周囲（peritumoral）、病巣内または病変周囲（perilesional）の経路によって適切に投与され、局所性および全身性治療効果をもたらす。腹腔内経路は、例えば卵巣腫瘍の処置において、特に有用であると期待される。

【0134】

疾患を予防または処置するための、抗体の適切な投与量は、上で定義したように、処置する疾患のタイプ、疾患の重症度および経過、抗体を予防または治療のどちらの目的で投与するか、以前の治療、患者の病歴および抗体への応答、ならびに主治医の自由裁量に依存する。抗体は、1回でまたは一連の処置にわたって適切に患者に投与する。

10

【0135】

抗VEGF抗体は、本明細書で記載されるようなVEGF媒介性疾患の処置に有用である。例えば、加齢黄斑変性（AMD）は、高齢者集団における深刻な視力喪失の主な原因である。AMDの滲出性形態は、脈絡膜新生血管形成および網膜色素上皮細胞剥離を特徴とする。脈絡膜新生血管形成は、予後の劇的な悪化に関連するため、本発明のVEGF抗体は、AMDの重症度の低下に特に有用である。この治療の進行は、検眼鏡検査（ophthalmoscopy）、眼底顕微鏡および眼のコンピュータ断層撮影法を含む従来の技法によって、容易にモニターされる。

20

【0136】

FDAが認可した、ルセンチスを用いる使用に適する全ての用量およびレジメンを考慮している。他の用量およびレジメンは、2008年6月25日に出願された、名称「Improved Immunobinder Formulations And Methods For Administration」の米国仮出願第61/075,641号および米国仮出願第61/058,504号に記載され、本明細書に明示的に援用される。

【0137】

本発明の別の実施形態により、疾患の予防または処置における抗体の有効性は、抗体を連続的に投与することによって、またはそれらの目的に有効である別の薬剤、例えば、腫瘍壊死因子（TNF）、酸性もしくは塩基性線維芽細胞増殖因子（FGF）または肝細胞増殖因子（HGF）の新脈管形成活性を阻害または中和できる抗体、組織因子、プロテインCまたはプロテインSの血液凝固活性を阻害または中和できる抗体（1991年2月21日に公開された、EsmonらのPCT特許出願WO91/01753を参照されたい）、HER2受容体に結合できる抗体（1989年7月27日に公開された、HudzikらのPCT特許出願WO89/06692を参照されたい）、または例えばアルキル化剤、光血液凝固剤（ペルテポルフィンなど）、葉酸拮抗剤、核酸代謝の代謝拮抗薬、抗生物質、ピリミジン類似体、5-フルオロウラシル、シスプラチン、プリンヌクレオシド、アミン、アミノ酸、トリアゾールヌクレオシドもしくはコルチコステロイドなどの1つまたは複数の従来の治療剤などと抗体とを組み合わせる投与することによって改善することができる。かかる他の薬剤は、投与する組成物中に存在し得、または別々に投与することができる。また、放射性物質の照射または投与を含んだとしても、抗体は、連続的または放射線学的処置と組み合わせる投与に適切に投与される。

30

40

【0138】

本発明の抗体は、親和性精製剤として使用することができる。このプロセスにおいて、抗体は、当該分野で周知の方法を用いて、セファデックス樹脂または濾紙のような固相上に固定化する。固定化した抗体を、VEGFタンパク質（またはそのフラグメント）を含む試料と接触させて精製し、その後、担体を適切な溶媒で洗浄し、これにより固定化した抗体に結合するVEGFタンパク質以外の、試料中の実質的に全ての物質が除去される。最後に、担体をpH5.0のグリシン緩衝液などの別の適切な溶媒で洗浄し、これにより

50

抗体から V E G F タンパク質が放出される。

【0139】

抗 V E G F 抗体はまた、V E G F タンパク質の診断アッセイ、例えば特定の細胞、組織または血清中でのその発現を検出するのにも有用な場合がある。かかる診断方法は、がんの診断に有用な場合がある。

【0140】

診断的適用のために、抗体は、一般的に検出可能な部分により標識される。非常に多くの標識が利用でき、それらは概して次のカテゴリーに分類することができる：

(a) ^{111}In 、 ^{99}Tc 、 ^{14}C 、 ^{131}I 、 ^{125}I 、 ^3H 、 ^{32}P または ^{35}S などの放射性同位元素。抗体は、例えば *Current Protocols in Immunology*、1 および 2 巻、Coligen ら編、Wiley-Interscience、New York、N. Y.、Pubs. (1991 年) に記載の技法を用いて、放射性同位元素により標識でき、放射活性は、シンチレーション計数器を用いて測定することができる。

【0141】

(b) 希土類キレート (ユーロピウムキレート) またはフルオレセインおよびその誘導体、ローダミンおよびその誘導体、ダンシル、リサミン、フィコエリトリンおよびテキサスレッドなどの蛍光標識を利用することができる。蛍光標識は、例えば上記の *Current Protocols in Immunology* に開示されている技法を用いて、抗体と結合体化することができる。蛍光は、蛍光計を用いて定量化することができる。

【0142】

(c) 様々な酵素-基質標識を利用でき、米国特許第 4, 275, 149 号ではこれらのいくつかの概説が提供されている。酵素は、一般的に、様々な技法を用いて測定できる、色素形成基質の化学変化を触媒する。例えば、酵素は、分光光度的に測定できる、基質における色の変化を触媒することができる。あるいは、酵素は、基質の蛍光または化学発光を変えることができる。蛍光における変化を定量化するための技法は、上に記載されている。化学発光基質は、化学反応によって電子的に励起状態になり、次いで (例えば、ケミルミノメーター (chemiluminometer) を用いて) 測定できる光を放射し得、または蛍光アクセプターにエネルギーを供与する。酵素標識の例としては、ルシフェラーゼ (例えば、ホタルルシフェラーゼおよび細菌ルシフェラーゼ；米国特許第 4, 737, 456 号)、ルシフェリン、2, 3-ジヒドロフタラジンジオン、リンゴ酸脱水素酵素、ウレアーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRPO) などのペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ベータガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、糖類酸化酵素 (例えば、グルコース酸化酵素、ガラクトース酸化酵素およびグルコース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼ)、複素環酸化酵素 (ウリカーゼおよびキサンチン酸化酵素など)、ラクトペルオキシダーゼ、マイクロペルオキシダーゼなどが挙げられる。酵素を抗体に結合体化するための技法は、O' Sullivan ら、*Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay*、*Methods in Enzym.* (J. Langone & H. Van Vunakis 編)、Academic press、New York、73 巻：147~166 頁 (1981 年) に記載されている。酵素-基質の組合せの例としては、例えば：

(i) 西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRPO) と、基質としての水素ペルオキシダーゼであり、水素ペルオキシダーゼが、色素前駆体 (例えば、オルトフェニレンジアミン (OPD) または 3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン塩酸塩 (TMB)) を酸化、

(ii) アルカリホスファターゼ (AP) と、色素形成基質としてのパラ-ニトロフェニルホスフェート、および

(iii) ベーター-D-ガラクトシダーゼ (ベーター-D-Gal) と色素形成基質 (例えば、P-ニトロフェニル-ベーター-D-ガラクトシダーゼ) または蛍光発生基質 4-メ

10

20

30

40

50

チルウンベリフェリルーベーターD-ガラクトシダーゼ、が挙げられる。

【0143】

本発明の別の実施形態では、抗VEGF抗体を標識する必要はなく、その存在は、VEGF抗体に結合する標識抗体を使用して検出することができる。

【0144】

本発明の抗体には、競合的結合アッセイ、直接および間接的サンドイッチアッセイおよび免疫沈降アッセイなどの任意の公知のアッセイ方法も採用することができる。Zola、Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques、147～158頁(CRC Press、Inc. 1987年)。

【0145】

競合的結合アッセイは、制限された量の抗体と結合するために試験試料分析物と競合する、標識した標準物質の能力に依存する。試験試料中のVEGFタンパク質の量は、抗体と結合状態になる標準物質の量に反比例する。結合状態になる標準物質の量の決定を容易にするために、抗体を、一般的に競合の前または後に不溶化し、抗体に結合する標準物質および分析物を、結合しないままの標準物質および分析物から都合良く分離できるようにする。

【0146】

サンドイッチアッセイは、検出されるタンパク質の異なる免疫原性部分またはエピトープにそれぞれが結合できる2つの抗体の使用を含む。サンドイッチアッセイでは、試験試料分析物は、固体担体上に固定化する第1抗体によって結合され、その後、第2抗体が分析物に結合し、したがって不溶性の3部分の複合体が形成される。例えば、米国特許第4,376,110号を参照されたい。第2抗体は、それ自体、検出可能な部分で標識でき(直接的サンドイッチアッセイ)、検出可能な部分で標識される抗免疫グロブリン抗体を使用して測定することもできる(間接的サンドイッチアッセイ)。例えば、サンドイッチアッセイの1種にELISAアッセイがあり、これは検出可能な部分が酵素の場合である。

【0147】

免疫組織化学に関しては、腫瘍試料は新鮮または凍結であってよく、例えば、パラフィン中に包埋し、例えばホルマリンなどの保存剤で固定してもよい。

【0148】

抗体は、インビボの診断アッセイに使用することもできる。一般的に、抗体は、放射性核種(^{111}In 、 ^{99}Tc 、 ^{14}C 、 ^{131}I 、 ^{125}I 、 ^3H 、 ^{32}P または ^{35}S など)で標識し、免疫シンチグラフィ(immunoscintigraphy)を使用して腫瘍の場所を突き止められるようにする。

【0149】

本発明の抗体は、キット、すなわち診断アッセイを行うための説明書と所定量の試薬をパッケージした組合せで提供され得る。抗体が酵素で標識される場合、キットには酵素に必要な基質および補因子が含まれる(例えば、検出可能な発色団またはフルオロフォアをもたらす基質前駆体)。さらに、安定剤、緩衝液(例えば、ブロック緩衝液または溶解緩衝液)などの他の添加剤を含むことができる。様々な試薬の相対量は、幅広く変えることができ、アッセイの感度を実質的に最適にする、溶液中の試薬の濃度を可能にする。特に試薬は、通常、凍結乾燥した乾燥粉末として提供でき、溶解状態で適切な濃度を有する試薬溶液をもたらす賦形剤を含む。

【0150】

(薬学的調製物)

1つの態様では、本発明は、VEGF媒介性疾患の処置のための抗VEGF抗体を含む薬学的処方物を提供する。用語「薬学的処方物」とは、明白に有効である抗体または抗体誘導体の生物活性を可能にするような形態であり、処方物を投与した被験体に毒性のある追加の成分を含まない調製物をいう。「薬学的に許容される」賦形剤(ビヒクル、添加剤)とは、被験体である哺乳動物に合理的に投与し、採用する活性成分の有効用量を実現で

10

20

30

40

50

きるものである。

【0151】

「安定的な」処方物とは、処方物中の抗体または抗体誘導体が、保存に際しその物理的安定性および／または化学的安定性および／または生物活性を本質的に保持するものである。タンパク質の安定性を測定するための様々な分析技法は、当該分野で入手でき、例えば、Peptide and Protein Drug Delivery、247～301頁、Vincent Lee編、Marcel Dekker, Inc.、New York、N. Y.、Publ. (1991年)、およびJones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10巻: 29～90頁(1993年)に概説されている。安定性は、選択した期間の間、選択した温度で測定することができる。好ましくは、処方物は、少なくとも1週間、室温(約30℃)または40℃で安定、および／または少なくとも3カ月から2年間、約2～8℃で安定である。その上、処方物は、好ましくは、処方物の凍結(例えば-70℃まで)および解凍の後も安定である。

10

【0152】

色および／または透明さの視覚的検査で、あるいはUV光散乱またはサイズ排除クロマトグラフィー、または当該分野で承認されている他の適切な方法によって測定したときに、凝集、分解、沈殿および／または変性に対する、定義された公開の水準を満たす場合、抗体または抗体誘導体は、薬学的処方物において「その物理的安定性を保持する」。

【0153】

抗体または抗体誘導体は、所与の時間での化学的安定性が、タンパク質が以下に定義されるようなその生物活性をなおも保持すると考えられるほどであれば、薬学的処方物において「その化学的安定性を保持する」。化学的安定性は、化学変化したタンパク質の形態を検出および定量化することによって評価することができる。化学変化は、例えば、サイズ排除クロマトグラフィー、SDS-PAGEおよび／またはマトリックス支援レーザー脱離イオン化／飛行時間型質量分析(MALDI/TOF MS)を用いて評価できる、サイズ修正(例えばクリッピング(clipping))に関わり得る。他のタイプの化学変化には、例えばイオン交換クロマトグラフィーによって評価できる電荷変化(例えば、脱アミドに起因して起こる)が挙げられる。

20

【0154】

抗体または抗体誘導体は、所与の時間での抗体の生物活性が、例えば、薬学的処方物が抗原結合アッセイで決定されるように調製したときに示される生物活性の、約10%以内(アッセイのエラー内)であれば、薬学的処方物において「その生物活性を保持する」。抗体に関する他の「生物活性」アッセイは、本明細書で以下に詳しく述べる。

30

【0155】

「等張」とは、目的の処方物が、本質的にヒト血液と同じ浸透圧を有することを意味する。等張処方物は、一般的に約250から350 mOsmの浸透圧を有する。等張性は、例えば、蒸気圧またはアイスフリージング型浸透圧計を用いて測定することができる。

【0156】

「ポリオール」は、複数のヒドロキシル基を有する物質であり、糖(還元および非還元糖)、糖アルコールおよび糖酸が挙げられる。本明細書における好ましいポリオールは、約600 kD未満(例えば、約120から約400 kDの範囲)の分子量を有する。「還元糖」とは、金属イオンを還元できる、またはタンパク質中のリジンおよび他のアミノ基と共有結合的に反応できるヘミアセタール基を含むものであり、「非還元糖」とは、還元糖のこれらの特性をもたないものである。還元糖の例は、フルクトース、マンノース、マルトース、ラクトース、アラビノース、キシロース、リボース、ラムノース、ガラクトースおよびグルコースである。非還元糖には、スクロース、トレハロース、ソルボース、メレジトースおよびラフィノースが挙げられる。マンニトール、キシリトール、エリスリトール、トレイトール、ソルビトールおよびグリセロールは、糖アルコールの例である。糖酸について、これには、L-グルコネートおよびその金属塩が挙げられる。処方物が凍結-解凍に対して安定であることが望まれる場合、ポリオールは、好ましくは処方物中の抗

40

50

体が不安定になるような凍結温度（例えば -20°C ）での結晶化をしないものである。スクロースおよびトレハロースなどの非還元糖は、本明細書において好ましいポリオールであり、トレハロースの優れた溶液安定性の理由から、スクロースよりトレハロースが好ましい。

【0157】

本明細書で使用する時、「緩衝液」とは、酸-塩基の結合体化成分の作用によるpHの変化に耐える緩衝溶液をいう。本発明の緩衝液は、約4.5から約8.0、好ましくは約5.5から約7の範囲のpHを有する。この範囲でpHを制御する緩衝液の例には、酢酸塩（例えば酢酸ナトリウム）、コハク酸塩（コハク酸ナトリウムなど）、グルコン酸塩、ヒスチジン、クエン酸塩および他の有機酸の緩衝液が挙げられる。凍結-解凍に対して安定的な処方物が望まれる場合、緩衝液は、好ましくはホスフェートではない。

10

【0158】

薬理的な意味において、本発明に関連して、抗体または抗体誘導体の「治療有効量」とは、抗体または抗体誘導体が有効である処置に関して、障害の予防または処置に有効な量をいう。「疾患/障害」とは、抗体または抗体誘導体を用いた処置により利益を得る任意の状態である。これには、哺乳動物を問題の障害にかからせる病理学的状態を含む、慢性および急性の障害または疾患が含まれる。

【0159】

「保存剤」とは、処方物中に含まれ得、本質的にそこで細菌の作用を減少できる化合物であり、したがって、例えばマルチユーズ（multi-use）の処方物の製造を容易にすることができる。可能性のある保存剤の例には、オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド、ヘキサメトニウムクロリド、ベンザルコニウムクロリド（アルキル基が長鎖の化合物であるアルキルベンジルジメチルアンモニウムクロリドの混合物）、およびベンゼトニウムクロリドが挙げられる。保存剤の他のタイプには、フェノール、ブチルおよびベンジルアルコールなどの芳香族アルコール、メチルまたはプロピルパラベンなどのアルキルパラベン、カテコール、レゾルシノール、シクロヘキサノール、3-ペンタノールならびにm-クレゾールが挙げられる。本明細書における最も好ましい保存剤は、ベンジルアルコールである。

20

【0160】

本発明はまた、生理学的に許容される少なくとも1つの担体または賦形剤と一緒に、1つまたは複数の抗体または抗体誘導体化合物を含む薬学的組成物も提供する。薬学的組成物は、例えば、1つまたは複数の水、緩衝液（例えば、中性緩衝生理食塩水またはホスフェート緩衝生理食塩水）、エタノール、鉱油、植物油、ジメチルスルホキシド、炭水化物（例えば、グルコース、マンノース、スクロースまたはデキストラン）、マンニトール、タンパク質、アジュバント、ポリペプチド、またはグリシンなどのアミノ酸、抗酸化剤、EDTAもしくはグルタチオンなどのキレート剤、および/または保存剤を含むことができる。上述のように、他の活性成分を、（必ずしも必要ではないが）本明細書で提供される薬学的組成物中に含めることができる。

30

【0161】

担体は、しばしば化合物の安定性または生物学的利用能を制御する目的のため、患者に投与する前に、抗体または抗体誘導体に関連し得る物質である。かかる処方物内部で使用するための担体は、一般的に生体適合性を有し、生分解性も有し得る。担体には、例えば、血清アルブミン（例えばヒトまたはウシ）、卵アルブミン、ペプチド、ポリリジンなどの一価または多価分子、およびアミノデキストランなどの多糖類およびポリアミドアミンが挙げられる。担体はまた、例えば、ポリラクテート、ポリグリコレート、ポリ（ラクチド-コ-グリコリド）、ポリアクリレート、ラテックス、デンプン、セルロースまたはデキストランを含む、ビーズおよびマイクロ粒子（microparticle）などの固体担体物質も含む。担体は、共有結合（直接的またはリンカー基を介してのいずれか）、非共有結合の相互作用または混合を含む、様々な方法において化合物を有し得る。

40

【0162】

50

薬学的組成物は、例えば、局所、眼内、経口、経鼻、直腸または非経口投与を含む、任意の適切な投与方式に関して処方することができる。ある種の実施形態では、例えば点眼薬としての局所使用に適切な形態の組成物が好ましい。他の形態には、例えば、丸剤、錠剤、トローチ、ロゼンジ、水性もしくは油性懸濁物、分散性粉末もしくは顆粒、エマルジョン、硬もしくは軟カプセル、またはシロップもしくはエリキシル剤が挙げられる。さらなる他の実施形態内では、本明細書で提供される組成物は、凍結乾燥物として処方することができる。本明細書で使用されるような非経口という用語は、皮下、皮内、血管内（例えば静脈内）、筋肉内、脊髄、頭骸内、くも膜下腔内および腹腔内注射、ならびに任意の類似の注射または注入技法を含む。

【0163】

薬学的組成物は、使用するビヒクルおよび濃度に依存して、モジュレータがビヒクル中に懸濁または溶解されている、無菌注射可能な水性または油性懸濁物として調製することができる。かかる組成物は、適切な分散剤、加湿剤および／または上述のものなどの懸濁剤を使用する公知の技術に従って処方することができる。採用できる許容されるビヒクルおよび溶媒には、水、1，3-ブタンジオール、リンゲル液および等張食塩水がある。さらに、無菌の固定油は、溶媒または懸濁ビヒクルとして採用することができる。この目的のために、合成のモノまたはジグリセリドを含む、刺激の少ない任意の固定油を採用することができる。さらに、オレイン酸などの脂肪酸を、注射可能な組成物の調製に使用でき、局所麻酔剤などのアジュバント、保存剤および／または緩衝剤を、ビヒクル中に溶解することができる。

【0164】

薬学的組成物は、持続放出处方物（すなわち、投与後にモジュレータの徐放をもたらすカプセルなどの処方物）として処方することができる。かかる処方物は、一般的に周知の技術を用いて調製でき、例えば、経口、直腸もしくは皮下移植によって、または所望の標的部位に移植することによって投与することができる。かかる処方物内で使用するための担体は、生体適合性を有し、生分解性も有し得て、好ましくは、処方物が比較的一定レベルのモジュレータ放出を可能にする。持続放出处方物内に含まれる抗体または抗体誘導体の量は、例えば、移植の部位、放出の速度および期待される持続期間、ならびに処置または予防する疾患／障害の特性によって決まる。

【0165】

本明細書で提供される抗体または抗体誘導体は、一般的に、検出可能な程度にVEGFに結合し、VEGF媒介性疾患／障害を予防または阻害するのに十分な、体液（例えば、血液、血漿、血清、CSF、滑液、リンパ、細胞間質液、涙または尿）中の濃度に達する量で投与する。用量は、本明細書に記載のような認識できる患者の利益をもたらすとき、有効であると考えられる。好ましい全身の用量は、1日につき、体重1キログラムにつき約0.1mgから約140mg（1日につき患者1人につき約0.5mgから約7g）の範囲であり、経口での用量は、一般的に静脈内での用量より約5～20倍多い。担体物質と組み合わせて単回投薬形態を産出できる抗体または抗体誘導体の量は、処置される受容者（host）および特定の投与様式によって変化する。投薬単位形態には、一般的に約1mgから約500mgの間の活性成分が含まれる。

【0166】

薬学的組成物は、VEGFに向けられる抗体または抗体誘導体に応答する状態を処置するためにパッケージすることができる。パッケージされた薬学的組成物は、本明細書に記載のような少なくとも1つの抗体または抗体誘導体の有効量を保持する容器、および患者への投与後に、1つの抗体または抗体誘導体に応答する疾患／障害を処置するために含有組成物を使用することを示す説明書（例えばラベル）を含むことができる。

【0167】

本発明の抗体または抗体誘導体は、化学的に修飾することもできる。好ましい修飾基は、例えば、場合によって置換した直鎖もしくは分岐鎖ポリアルケン、ポリアルケニレンもしくはポリオキシアルキレンポリマー、または分岐したかもしくは分岐していない多糖類

10

20

30

40

50

などのポリマーである。かかるエフェクター基は、インビボでの抗体の半減期を長くすることができる。合成ポリマーの特定の例には、場合によって置換した直鎖または分岐鎖ポリ(エチレングリコール)(PEG)、ポリ(プロピレングリコール)、ポリ(ビニルアルコール)またはその誘導体が挙げられる。天然に存在する特定のポリマーには、ラクトース、アミロース、デキストラン、グリコゲンまたはその誘導体が挙げられる。ポリマーのサイズは、所望のように変化できるが、一般的に平均分子量は500Daから50000Daの範囲である。局所適用のために、抗体を組織に浸透するようにデザインする場合、ポリマーの好ましい分子量は、約5000Daである。ポリマー分子は、抗体、特に、WO0194585に記載のように、共有結合的に連結するヒンジペプチドを介して、Fabフラグメントの重鎖のC末端部に付着することができる。PEG部分の付着に関しては、「Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnological and Biomedical Applications」、1992年、J. Milton Harris(編)、Plenum Press、New York、および「Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences」、1998年、M. Aslam and A. Dent、Grove Publishers、New Yorkを参照されたい。

10

【0168】

上記のように目的の抗体または抗体誘導体を調製した後、それを含む薬学的処方物を調製する。処方される抗体は、事前の凍結乾燥に供さず、本明細書で目的の処方物は、水性処方物である。好ましくは、処方物中の抗体または抗体誘導体は、scFvなどの抗体フラグメントである。処方物中に存在する抗体の治療有効量は、例えば、所望の用量体積および投与様式(複数可)を考慮に入れて決定する。約0.1mg/mlから約50mg/ml、好ましくは約0.5mg/mlから約40mg/ml、および最も好ましくは約10mg/mlから約20mg/mlが、処方物中の典型的な抗体濃度である。

20

【0169】

水性処方物は、pH緩衝溶液中の抗体または抗体誘導体を含めて調製する。本発明の緩衝液は、約4.5から約8.0、好ましくは約5.5から約7の範囲のpHを有する。この範囲内でpHを制御する緩衝液の例には、酢酸塩(例えば酢酸ナトリウム)、コハク酸塩(コハク酸ナトリウムなど)、グルコン酸塩、ヒスチジン、クエン酸塩および他の有機酸の緩衝液が挙げられる。緩衝液の濃度は、約1mMから約50mM、好ましくは約5mMから約30mMであってよく、例えば緩衝液および処方物の所望の等張性によって決めることができる。

30

【0170】

トニシファイアー(tonicifier)として働き、抗体を安定化できるポリオールは、処方物中に含まれる。好ましい実施形態では、抗体または抗体誘導体の沈殿を引き起こし得て、および/または低pHで酸化を引き起こし得るため、処方物は塩化ナトリウムなどの塩をトニシファイ量(tonicifying amount)で含まない。好ましい実施形態では、ポリオールは、スクロースまたはトレハロースなどの非還元糖である。ポリオールは、処方物の所望の等張性に対して変化できる量で処方物中に添加する。好ましくは、水性処方物は等張であり、この場合、処方物中の適切なポリオール濃度は、例えば、約1%から約15%w/vの範囲、好ましくは約2%から約10%w/vの範囲である。しかし、高張性または低張性処方物も適切であり得る。添加するポリオールの量も、ポリオールの分子量に対して変えることができる。例えば、二糖(トレハロースなど)と比較して、より少量の単糖(例えばマンニトール)を添加することができる。

40

【0171】

界面活性剤も、抗体または抗体誘導体処方物に添加する。典型的な界面活性剤には、ポリソルベート(例えば、ポリソルベート20、80など)またはポロキサマー(例えばポロキサマー188)などの非イオン性界面活性剤が挙げられる。添加する界面活性剤の量は、処方した抗体/抗体誘導体の凝集を減少させ、および/または処方物中の粒子の形成

50

を最小化し、および／または吸着を低下させるほどの量である。例えば、界面活性剤は、約0.001%から約0.5%、好ましくは約0.005%から約0.2%、および最も好ましくは約0.01%から約0.1%の量で処方物中に存在し得る。

【0172】

1つの実施形態では、処方物は、上記で同定した薬剤（すなわち、抗体または抗体誘導体、緩衝液、ポリオールおよび界面活性剤）を含み、本質的に、ベンジルアルコール、フェノール、m-クレゾール、クロロブタノールおよび塩化ベンゼトニウムなどの1つまたは複数の保存剤を含まない。別の実施形態では、特に処方物が複数用量の処方物である場合、保存剤を処方物中に含むことができる。保存剤の濃度は、約0.1%から約2%、最も好ましくは約0.5%から約1%の範囲であってよい。Remington's Pharmaceutical Sciences 第21版、Osol, A. 編（2006年）に記載のものなどの、1つまたは複数の他の薬学的に許容される担体、賦形剤または安定剤を、それらが処方物の所望の特徴に悪影響を及ぼさないという条件で、処方物中に含めることができる。許容される担体、賦形剤または安定剤は、採用する投与量および濃度でレシipientに毒性がなく、追加の緩衝剤、共溶媒、アスコルビン酸およびメチオニンを含む抗酸化剤、EDTAなどのキレート剤、金属錯体（例えばZn-タンパク質複合体）、ポリエステルなどの生分解性ポリマー、ならびに／またはナトリウムなどの塩形成対イオンを含む。

10

【0173】

インビボの投与に使用する処方物は、無菌でなければならない。これは、処方物を調製する前または後に、無菌ろ過膜を通する過によって容易に成し遂げられる。

20

【0174】

処方物は、抗体を用いる処置が必要な哺乳動物、好ましくはヒトに、筋肉内、腹腔内、脳脊髄内（intracerebrospinal）、皮下、関節内、滑膜内、鞘内、経口、局所または吸入経路による、ボーラスとしてかまたはある期間にわたる持続的注入による静脈内投与などの公知の方法に従って投与する。好ましい実施形態では、処方物は、眼表面への点眼薬の局所適用によって、哺乳動物に投与する。かかる目的のために、処方物は、例えば点眼薬アプリケーションャーを用いて適用することができる。

【0175】

抗体の適切な投与量（「治療有効量」）は、例えば、処置する病状、病状の重症度および経過、抗体を予防または治療のどちらの目的で投与するか、以前の治療、患者の病歴および抗体への応答、使用する抗体のタイプ、ならびに主治医の自由裁量によって決まる。抗体または抗体誘導体は、1回または1連の処置にわたって患者に適切に投与し、診断以降の任意の時間に患者に投与することができる。抗体または抗体誘導体は、単独の処置としてか、または問題とする病状の処置に有用な他の薬物もしくは治療と併せて投与することができる。

30

【0176】

一般的な提案として、投与する抗体または抗体誘導体の治療有効量は、1回投与かまたは複数回投与かは別にして、患者の体重に対して約0.1から約50mg/kgの範囲となり、使用する抗体の典型的な範囲は、例えば、毎日の投与で約0.3から約20mg/kg、より好ましくは約0.3から約15mg/kgとなる。しかし、他の投薬レジメンも有用であり得る。この治療の進行は、従来の技法によって容易にモニターされる。

40

【0177】

FDAが認可した、ルセンチスを用いる使用に適する用量およびレジメンを考慮している。

【0178】

他の用量およびレジメンは、2008年6月25日に出願された、名称「Improved Immunobinder Formulations And Methods For Administration」の米国仮出願第61/075,641号に記載され、本明細書に明示的に援用される。

50

【0179】

(製造品)

本発明の別の実施形態では、本発明の水性薬学的処方物を保持する容器を含む、製造品が提供され、その使用に関する説明書が場合によって提供される。適切な容器には、例えば、ボトル、小瓶、点眼薬アプリケーションおよび注射器が挙げられる。容器は、ガラスまたはプラスチックなどの様々な材料から形成することができる。典型的な容器は、3～20 ccの単回使用のガラスまたはプラスチックの小瓶である。あるいは、複数用量処方物用に、容器は3～100 ccのガラス小瓶であってよい。容器は処方物を保持し、容器上のラベルにより、または容器に付随したラベルにより、使用に関する指示を示すことができる。製造品は、商業および使用者の視点から望まれる他の物質をさらに含むことができ、これには、他の緩衝液、希釈液、フィルタ、針、注射器、および使用に関する説明のついた添付文書が挙げられる。

10

【実施例】

【0180】

(例示)

本開示を、さらに限定するものと解釈すべきではない以下の実施例によってさらに説明する。全ての図ならびにこの出願全体にわたって引用される全ての文献、特許および公開された特許出願の内容は、それらの全体が参照により本明細書に明示的に援用される。

【0181】

実施例全体にわたり、特に明記しない限り、以下の材料および方法を使用した。

20

【0182】

(一般的な材料および方法)

一般的に、本発明の実施では、特に示さない限り、化学、分子生物学、組換えDNA技術、免疫学（特に、例えば抗体技術）の従来技法、およびポリペプチド調製の標準技法を採用する。例えば、Sambrook、FritschおよびManiatis、Molecular Cloning: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989年); Antibody Engineering Protocols (Methods in Molecular Biology)、510、Paul, S.、Humana Press (1996年); Antibody Engineering: A Practical Approach (Practical Approach Series、169)、McCafferty編、Irl Pr (1996年); Antibodies: A Laboratory Manual、Harlowら、C. S. H. L. Press, Pub. (1999年); および Current Protocols in Molecular Biology、Ausubelら編、John Wiley & Sons (1992年)を参照されたい。

30

【0183】

(熱安定性の測定)

減衰全反射フーリエ変換IR (FTIR-ATR) スペクトルを、Tensor BrukerにおけるFT-IR Bio-ATRセルを使用して、様々な単鎖および誘導体分子に関して入手した。分子を、3 mg/mlまで濃縮し、PBS (pH 6.5) に対して4℃で一晩中透析し、緩衝液のフロースルー (flow through) をブランクとして採取した。変性プロファイルを、5℃ステップ (25から95℃) の広範な温度で分子を熱チャレンジ (challenge) することによって入手した。全てのスペクトルの操作は、OPUSソフトウェアを用いて行った。主な緩衝液および一過性の雰囲気 (CO₂ およびH₂O) のバックグラウンドは、タンパク質スペクトルから差し引いた。結果のタンパク質スペクトルを、次いでベースライン補正し、タンパク質アミドIスペクトルを、期待される領域における最大幅の分解可能なピークの幅から決定した。第2の誘導体スペクトルを、平滑関数による3次多項式関数を用いて、アミドIバンドスペクトルに関して入手した。タンパク質構造における変化を、3つの低度測定に関して0%の変性、

40

50

および3つの高度測定に関して100%変性と仮定する、初期カーブフィット (curve-fit) 計算についての直線検定曲線を用いて、アミドIの第2誘導体分析によって、推定した。変性プロファイルを、ボルツマンシグモイドモデル (Boltzmann sigmoidal model) に適用する変量毎の熱アンフォールディング転移 (TM) の中間点を概算するのに使用した。

【0184】

(溶解性の測定)

様々なscFv分子の相対的な溶解性を、硫酸アンモニウムの存在下でタンパク質の凝集および沈殿を増強させた後、測定した。硫酸アンモニウムを水溶液中のタンパク質に添加し、塩-タンパク質の最終混合物における飽和を5%増加させた。動的な範囲における沈殿を実験的に決定し、飽和間隔は、最終混合物において2.5%の飽和間隔までこの範囲で減少した。硫酸アンモニウムの添加後、試料を静かに混合し、6000rpmで30分遠心分離した。上清中に残ったタンパク質を、硫酸アンモニウムの飽和のパーセント毎に回収した。溶解曲線を、NanoDropTM1000 Spectrophotometerを使用するUV-VIS測定により、上清中のタンパク質濃度を測定することによって決定した。上清中に残った可溶性タンパク質の測定を正規化し、ボルツマンシグモイドモデルに適用する変量毎の相対的な溶解性の中間点を推定するのに使用した。

10

【0185】

(短期間の安定性試験)

scFv分子を、可溶性凝集物および分解産物の存在に関して、40℃で2週間インキュベートした後、調べた。10mg/mlの濃度のタンパク質を、広範なpH(3.5、4.5、5.5、6.5、7.0、7.5および8.5)のPBSに対して4℃で一晩中透析した。標準緩衝液PBS(pH6.5)中の同じ濃度の対照分子を、2週間の間-80℃で保管した。SDS-PAGEによる分解のバンドの決定は、t=0およびt=14d時点で行い、可溶性凝集物をSEC-HPLCにおいて評価した。40℃で2週間後、残った活性の決定を、Biacoreを使用して行った。

20

【0186】

(実施例1)

(抗VEGF抗体を産生するための免疫化戦略)

この実施例では、新規の抗原性VEGF由来のペプチドを使用し、ヒト、マウスおよびウサギVEGFAを認識できる抗体を産生させた免疫化戦略を記載する。

30

【0187】

Genentechで行ったアラニンスキャニング変異誘発試験から、VEGFRとの高親和性の相互作用に重要なVEGFAの残基が公知である(Fuh, G.ら, (2006年) J. Biol. Chem. 281巻, 6625~6631頁)。受容体結合部位は、おそらくコンフォメーションエピトープを表すが、ほとんどの重要な残基は、成熟VEGFAの最初の10個のアミノ酸上のアルファヘリックス上にある。

【0188】

ウサギVEGFAは、ヒトの配列と比較したときに、アルファヘリックス中に3つのアミノ酸変化を含み、対照的にマウスVEGFAは、この領域においてヒトと同一である。したがって、マウス-ヒト交差反応性抗体の産出のために、ウサギは、免疫化のための適切な種を示す。さらに、ウサギの免疫化は、マウスの免疫化より高い親和性を有するAbを導くことができる。

40

【0189】

上記の概要のように、VEGFAのN末端アルファヘリックス上の残基との相互作用は、VEGFR1との結合に最も重大のようである。したがって、このアミノ酸10個の長さの範囲は、免疫化のためのエピトープとして使用することができる。あるいは、全長VEGFAを注射できるが、VEGFA上の他のペプチド範囲はより免疫原性が高く、したがって、中和抗体を引き起こす見込みが少なくなる。この仮説は、両方ともVEGFAのC末端の近くに位置する2つの異なるペプチドが、JohnsonおよびWolfの方法

50

により予測されるように潜在的に免疫原性があるという事実によって支持される。この方法は、N末端のアルファヘリックスに関してごくわずかな免疫原性潜在力を予測する。したがって、アルファヘリックスのみを構成するペプチドを用いる免疫化は、全長VEGFAを用いる免疫化より直接的であり得る。強い免疫応答を引き出す可能性は、ペプチドとキーホールリンペットヘモシアニン（Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH)）との融合または化学的カップリングによってさらに高めることができる。

【0190】

4つの免疫化戦略を以下のように行った。

- A. コンフォメーションバインダーを得る可能性を高めるための、全長ヒトVEGFA₁₆₅を用いるウサギのプレ免疫化（pre-immunization）。aa長16-KFM_DVYQ_RSY_CHP-28（下線：受容体相互作用、二重下線、ウサギにおける不一致、Cysは結晶構造によるジスルフィド結合に関与する）由来のペプチドでの第2追加免疫。ペプチド配列中に含まれるCysは、KLHとのカップリングに使用できるので、したがって、遊離Cysとして露出しない。最終ペプチドは、KFMDVYQRSY-Cys-KLHと思われる。
- B. コンフォメーションバインダーを得る可能性を高めるための、全長VEGFA₁₆₅を用いるマウスのプレ免疫化。aa長16-KFM_DVYQ_RSY_CHP-28（Cysは、結晶構造によるジスルフィド結合に関与する）由来のペプチドでの第2追加免疫。ペプチド配列中に含まれるCysは、KLHとのカップリングに使用できるので、したがって、遊離Cysとして露出しない。最終ペプチドは、以下と思われる：KFMDVYQRSY-Cys-KLH。
- C. aa長16-KFM_DVYQ_RSY_CHP-28（最終ペプチド：KFMDVYQRSY-Cys-KLH）由来のペプチドを用いるウサギ/マウスのプレ免疫化。コンフォメーションバインダーを得る可能性を高めるための、全長VEGFA₁₆₅を用いる第2追加免疫。
- D. ウサギにおける全長VEGFA₁₆₅を用いる免疫化。

【0191】

（実施例2）

（CDR融合およびモノクローナルウサギ抗VEGF抗体の機能的ヒト化）

（ウサギCDRの融合）

ヒトではないドナーの抗体と最大の配列相同性を共有するヒト抗体アクセプターのフレームワークを採用する、伝統的なヒト化方法とは異なり、ウサギCDRを、フレームワークFW1.4（配列番号172）に融合させてMin-graftをもたらしたか、または「ウサギ化」フレームワークrFW1.4（配列番号173）もしくはその改変体rFW1.4（v2）（配列番号174）に融合させてMax-graftをもたらした。両フレームワークは、所望の機能特性（溶解性および安定性）、多種多様なウサギCDRを収容する構造適合性、およびウサギの可変ドメインのコンセンサス配列との妥当な相同性に関して、第一に選択した。フレームワークrFW1.4は、FW1.4の誘導体であり、ウサギCDRの実質的に任意のセットに対して、普遍的なアクセプターのフレームワークとして役立てる狙いでさらに操作した。安定かつ可溶性フレームワーク配列FW1.4は、ウサギ抗体と高い相同性を示すが、利用できる最も相同性の高い配列ではない。

【0192】

（結合に潜在的に関係する残基の同定）

ウサギの各可変ドメイン配列に関して、最も近いウサギの生殖系列対応物を同定した。最も近い生殖系列が確立できなかった場合、配列は、サブグループのコンセンサスまたは高いパーセント値の類似性を有するウサギの配列のコンセンサスに対して比較した。稀なフレームワークの残基は、起こり得る体細胞過剰変異の結果であって、したがって抗原の結合に関与すると考えた。結果として、かかる残基は、アクセプターフレームワークrFW1.4またはrFW1.4（v2）上に融合させて、Max-graftをもたらすため

のものと考えた。特に、抗原の直接的な接触に潜在的に関係するか、またはV LおよびV Hの配置に影響する残基を融合させた。さらにC D R構造に影響すると記載された残基を、必要であれば置換した。C D RをF W 1. 4 (M i n - g r a f t) 上に融合させたとき、フレームワークは置換しなかった。例えば、5 7 8 m i n m a xを産出するために、r F W 1. 4の残基V H 9 4 (H 9 4)を、ドナー配列中の対応する残基に変異させた。ウサギ抗体5 7 8は、H 9 4にG l yを含み、一方、最も相同性の高い生殖系列およびウサギのコンセンサスの両方は、位置H 9 4にA r gを含む。G l yは、他のアミノ酸には見られない並外れた柔軟性(正の ϕ 角度)を有する。これは、主鎖のねじれ角度における役割、および活性に関連するループコンフォメーションの強い影響の可能性を示唆する。本明細書で開示されるようなM a x - g r a f tを得るために融合させたフレームワークの位置のさらなる例は、r F W 1. 4、r F W 1. 4 (v 2)および本明細書で提供される目的のs c F v配列のフレームワーク領域の配列をアラインメントすることによって同定することができる。当該分野で公知のウェブツールを、例えば前記目的のために使用することができる(例えば、<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>で2009年6月23日に利用できるようなC l u s t a l W、または<http://bioinfo.genotoul.fr/multalin>で2009年6月23日に利用できるようなM u l t i A l i n)。r F W 1. 4およびr F W 1. 4 (v 2)が同じ残基を含み、目的のs c F vが異なる残基を明らかにする、全てのフレームワークの位置は、M a x - g r a f tを得るために融合させたフレームワークの位置である。

【0193】

(ドメインのシャッフル)

M i n - g r a f tの可変軽鎖を、M a x - g r a f tの可変重鎖と組み合わせて、生物物理学的特性(溶解性および安定性)および活性に関して最適な組合せを同定した。

【0194】

(s c F vのクローニングおよび発現)

本明細書で記載および特徴付けされるs c F vを、以下のように産生した。ヒト化V L配列(配列番号8 2~1 0 6)を、配列番号1 8 1のリンカーを介して、ヒト化V H配列(配列番号1 1 8~1 6 6)に連結させ、以下の配向のs c F v: N H₂-V L-リンカー-V H-C O O Hを産出した。多くの場合、様々なs c F vをコードするDNA配列を、サービス会社E n t e l e c h o n G m b H (www.entelechon.com)で新規に合成した。結果のDNA挿入物を、s c F vのDNA配列の5'および3'末端にそれぞれ導入したN c o IおよびH i n d I I Iの制限酵素認識部位を介して、細菌発現ベクターp G M P 0 0 2にクローニングした。V LドメインのDNA配列とV HドメインのDNA配列との間に、B a m H I制限酵素認識部位が位置する。いくつかの場合、s c F vをコードするDNAを新規に合成せず、s c F v発現構築物を、ドメインシャッフルによってクローニングした。したがって、N c o IおよびB a m H I制限酵素認識部位を介して、V Lドメインを切り出して新しい構築物に導入し、B a m H IおよびH i n d I I I制限酵素認識部位を介して、V Hドメインを切り出して新しい構築物に導入した。他の場合、点変異を、先端技術のアッセンブルP C R (a s s e m b l i n g P C R)方法を用いて、V Hおよび/またはV Lドメインに導入した。G M P 0 0 2のクローニングは、W O 2 0 0 8 0 0 6 2 3 5の実施例1に記載されている。s c F vの産生は、W O 2 0 0 8 0 0 6 2 3 5の実施例1に記載のE S B A 1 0 5に関して類似的に行った。

【0195】

(実施例3)

(抗V E G F s c F vのB i a c o r e結合分析)

この実施例では、s c F vのB i a c o r e結合能を試験し、結合親和性を、B I A c o r e^{T M}-T 1 0 0による、典型的な表面プラズモン共鳴法を用いて測定した。この実施例および後の実施例において、これらのs c F v候補による結合を試験したV E G Fタンパク質には、精製したE s c h e r i c h i a c o l i発現の組換えヒトV E G F₁

65 (Pepr oTech EC Ltd.)、組換えヒトVEGF₁₂₁ (Pepr oTech EC Ltd.)、組換えヒトVEGF₁₁₀ (ESBATech AG)、組換えマウスVEGF₁₆₄ (Pepr oTech EC Ltd.)、組換えラットVEGF₁₆₄ (Biovision)、組換えウサギVEGF₁₁₀ (ESBATech AG)、および組換えヒトPLGF (Pepr oTech EC Ltd.)が含まれる。表面プラズモン共鳴実験のために、カルボキシメチル化デキストランのバイオセンサーチップ (CM4、GE Healthcare) を、供給業者の説明書に従って、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドヒドロクロリドおよびN-ヒドロキシスクシンイミドを用いて活性化した。上記に例示された6つの異なる各VEGF形態を、標準的なアミンカップリング手順を用いて、CM4センサーチップ上の4つの異なるフローセルのうちの1つにカップリングさせた。カップリングおよびブロッキングの後、これらの固定化したVEGF分子により得られた応答の範囲は、hVEGF₁₆₅ 10 に関しては約250~500応答単位 (RU)、hVEGF₁₁₀、hVEGF₁₂₁、マウスVEGF₁₆₄、ラットVEGF₁₆₄ およびウサギVEGF₁₁₀ に関しては約200RU、ならびにPLGFに関しては約400RUであった。タンパク質をブロッキングの前に固定化しなかったことを除き、各チップの第4のフローセルを同様に処理し、フローセルをインラインの参照として使用した。HBS-EP緩衝液 (0.01MのHEPES、pH7.4または5、0.15MのNaCl、3mMのEDTA、0.005%界面活性剤P20) 中の抗VEGF_{scFv} の様々な濃度 (例えば、90nM、30nM、10nM、3.33nM、1.11nM、0.37nM、0.12nMおよび0.04nM) を、5分間、30μl/分の流速でフローセルに注入した。CM4チップ上のVEGFからの抗VEGF_{scFv} の解離を、25℃で10分間進行させた。インライン参照のセル補正に続いて緩衝液試料を差し引いた後、センサーグラム (sensor gram) を各抗VEGF_{scFv} 試料に関して作成した。見かけの解離速度定数 (k_d)、見かけの会合速度定数 (k_a)、および見かけの解離平衡定数 (K_D) を、BIAcoreT100評価ソフトウェアバージョン1.1を用いて、1対1のLangmuir結合モデル (one-to-one Langmuir binding model) を使用して計算した。

【0196】

1つの典型的な結果として、いくつかの主要な抗VEGF_{scFv} 候補を表7に列挙し、hVEGF₁₆₅ とのそれらの結合親和性を示す。VEGFR競合ELISAおよび/またはHUVECアッセイを使用して測定し、後の実施例に記載される、VEGFインヒビターとしてのそれらの能力も、表7に示す。いくつかの典型的な主要候補、例えば、511maxおよび578maxのhVEGF₁₆₅ への結合に関する動態曲線を図1に図示する。それらの親和性定数 (k_d、k_aおよびK_D) も決定した。いくつかの主要な候補は、異なる供給源の様々なVEGFタンパク質への結合における種特異性も示す。例えば、結合相手としてマウスおよびラットVEGF₁₆₄ を用いて、pH5で測定したいくつかの親和性データを表8aおよびbに示す。典型的な主要scFv候補である578minmaxは、マウスおよびラットVEGF₁₆₄ との結合において、pH5で5.76E-10Mおよび7.48E-10MのK_Dをそれぞれ有し (表8aおよびb)、pH 40 7.4で2.73E-11および2.19E-11を有する (データは示していない)。この種特異性は、578minmaxとヒト、マウスまたはラットVEGFタンパク質との間の結合に関する動態曲線および親和性データにおいて、図4にさらに図示する。

【0197】

異なる生物由来のVEGFとの結合における種特異性に加えて、多くの主要なscFv候補はまた、様々なVEGFアイソフォームに対しても区別される結合親和性を示す。例えば、ヒトVEGF₁₆₅、VEGF₁₂₁ およびVEGF₁₁₀ とのいくつかのscFv候補の結合に関して、pH5.0で測定した親和性データを表9で比較する。いくつかの実験では、PIGFタンパク質も、これらのscFv候補との結合能をもたない負の対照として使用した。また、例として、578MaxとVEGFアイソフォームとの間の結 50

合に関して、区別される動態曲線および親和性データを図3に図示する。

【0198】

本発明は、上述の主要な抗VEGF_scFv候補に由来する誘導体も開示する。表10に列挙するような候補578および511のいくつかの主要な誘導体を、それらの親和性および能力に関して例示する(pH5.0で測定した)。この実験では、Biacore測定を、hVEGF₁₆₅に対するこれらの誘導体の親和性に関して使用し、一方でhVEGFR2競合ELISAおよび/またはHUVECアッセイを、VEGFを阻害するそれらの能力を定義するために使用した(表10)。3つの誘導体、578max、578minmaxおよび578wt-Hisを、hVEGF₁₆₅との結合に関するそれらの動態曲線および親和性データにおいて図4にさらに例示する。

10

【0199】

主要な候補の誘導体に関して、それらの生物物理学的特徴を決定し、図5~7および表11に例示した。これらの特徴には、表11に例示のように、FTIRによって決定されるT_m、60℃で30分間インキュベーションした後のβシートまたはタンパク質損失パーセント、硫酸アンモニウム沈殿によって決定される溶解性、産生プロセス中のリフォールディング収率、およびE.coliでの発現レベルが含まれる。3つの誘導体、578max、578minmaxおよび578minmax-DHPを、FTIRによって測定された、異なる温度に対するそれらのアンフォールディング曲線におけるそれらの熱安定性に関して、特徴付けした(図5)。

【0200】

20

【表 7 - 1】

ID	タンパク質 番号	hVEGR2競合ELISAの 相対的活性 (EC50 _{ルセンテイス} [nM]/ EC50 _{試験} [nM])	hVEGR1競合ELISAの 相対的活性 (EC50 _{ルセンテイス} [nM]/ EC50 _{試験} [nM])	HUVECアッセイにおける 相対的活性 (EC50 _{ルセンテイス} [nM]/ EC50 _{試験} [nM])
375-min	857	0.3	ND	ND
375-max	873	0.6	ND	ND
509-min	854	1.0	2.9	ND
509-max	855	4.1	13	0.003
509-maxII	856	0.6	0.09	0.0009
511-min	801	4.9	0.7	0.0011
511-max	802	8.7	8	0.0179
534-min C- His	807	0.1	ND	ND
534-max	793	1.1	ND	0.0014
567-min	884	9.7	14.9/57	ND
567-max	874	4.1	15.7/ 54.5	0.0086
578-min	820	4.1	4.8	0.1001
578-max	821	9.6	35.5/ 51.6	1.483
610-min	882	0.1	ND	ND
610-max	883	0.4	ND	ND
435-min	944	0.03	ND	ND
435-max	945	7.6	0.00039	ND

(次頁に続く)

【 0 2 0 1】

【表 7 - 2】

ID	Biacore測定 (pH 5)				Biacore測定 (pH 7.4)			
	hVEGF ₁₆₅				hVEGF ₁₆₅			
	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)		ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	
375-min	9.27E+05	5.01E-03	5.41E-09		> E+08	3.86E+00	NA	
375-max	2.44E+06	6.55E-03	2.68E-09		5.09E+07	2.42E-01	4.74E-09	
509-min	6.23E+05	1.14E-03	1.82E-09		3.52E+06	1.08E-02	3.06E-09	
509-max	2.26E+06	2.72E-03	1.21E-09		1.42E+06	5.37E-04	3.78E-10	
509-maxII	8.38E+05	2.82E-03	3.37E-09		7.59E+06	1.98E-02	2.61E-09	
511-min	5.05E+05	1.28E-03	2.53E-09		6.75E+05	8.85E-04	1.31E-09	
511-max	6.59E+05	4.40E-05	6.67E-11		8.00E+05	6.85E-05	8.56E-11	
534-min C-His	2.71E+05	9.21E-03	3.41E-08		ND	ND	ND	
534-max	1.88E+06	1.73E-02	9.21E-09		1.06E+06	2.62E-03	2.47E-09	
567-min	2.01E+06	4.61E-04	2.30E-10		1.11E+06	7.00E-04	6.31E-10	
567-max	1.20E+06	2.26E-04	1.88E-10		1.17E+06	1.67E-04	1.43E-10	
578-min	1.14E+06	1.03E-02	9.01E-09		1.11E+06	2.02E-04	1.81E-10	
578-max	7.00E+05	3.07E-04	4.39E-10		1.58E+06	3.76E-05	2.37E-11	
610-min	2.51E+05	2.65E-03	1.06E-08		結合しない	結合	結合	
610-max	5.09E+05	6.01E-04	1.18E-09		> E+08	3.57E+01	しない	
435-min	結合しない	結合しない	結合しない		4.95E+05	1.43E-02	NA	
435-max	1.67E+05	7.55E-04	4.53E-09		1.13E+06	1.04E-04	2.89E-08	
							9.22E-11	

(表7、続き)

【 0 2 0 2 】

10

20

30

【表 8 - 1】

表 8a: 選択された主要な候補の種特異性 (マウスおよびラット VEGF164)

ID	タンパク質 番号	マウス VEGF ₁₆₄			ラット VEGF		
		ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
509-min	854	6.14E+05	1.00E-03	1.63E-09	3.51E+05	8.44E-04	2.41E-09
509-max	855	4.09E+06	5.90E-03	1.45E-09	3.90E+06	6.45E-03	1.65E-09
509-maxII	856	3.47E+07	6.01E-02	1.73E-09	1.47E+07	2.66E-02	1.81E-09
511-min	801	6.25E+05	1.03E-03	1.64E-09	5.50E+05	1.12E-03	2.04E-09
511-max	802	7.53E+05	4.61E-05	6.13E-11	6.26E+05	6.63E-05	1.06E-10
567-min	884	2.06E+06	3.50E-04	1.70E-10	1.72E+06	4.80E-04	2.79E-10
567-max	874	1.64E+06	1.52E-04	9.29E-11	1.36E+06	2.03E-04	1.49E-10
578-min	820	1.40E+06	1.51E-02	1.07E-08	1.70E+06	1.82E-02	1.07E-08
578-max	821	1.03E+06	4.40E-04	4.29E-10	8.83E+05	5.28E-04	5.98E-10

表 8b: 選択された開発候補の種特異性

ID	タンパク質 番号	Biacore 測定 マウス VEGF ₁₆₄			相対値 マウス VEGF ₁₆₄	
		ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	$\frac{h_{VEGF165}/kd_{mv}}{EGF164}$ (kd)	$\frac{b_{VEGF165}/Kd_m}{VEGF164}$ (Kd)
578minmax	903	1,14E+06	6,57E-04	5,67E-10	0,8	1,1
578 minmax FW1.4:DHP	961	1,10E+06	6,69E-04	6,08E-10	0,6	0,9
578minmaxT84N V89L	1008	1,23E+06	1,88E-03	1,53E-09	1,0	1,0
578min max T84N V89L DHP	1017	1,47E+06	2,16E-03	1,46E-09	1,4	1,8

【 0 2 0 3 】

10

20

30

【表 8 - 2】

(続き)

ID	タンパク質 番号	Biacore測定 フラット VEGF ₁₆₄			相対値 マウス VEGF ₁₆₄	
		ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	$\frac{h_{VEGF16s}/kd_{mv}}{EGF164}$ (kd)	$\frac{h_{VEGF16s}/Kd_m}{VEGF164}$ (Kd)
578minmax	903	8,58E+05	6,41E-04	7,48E-10	0,8	0,8
578 minmax FW1.4:DHP	961	8,00E+05	6,76E-04	8,45E-10	0,6	0,7
578minmaxT84N_V89L	1008	8,02E+05	1,52E-03	1,89E-09	1,2	0,8
578min_max T84N_V89L_DHP	1017	1,04E+05	1,90E-03	1,82E-09	1,6	1,5

【 0 2 0 4】

10

20

30

【表 9 - 1】

表9: 選択された主要候補とVEGFアイソフォームとの結合(ヒトVEGF121およびhVEGF110)

ID	タンパク質 番号	hVEGF ₁₆₅			hVEGF ₁₁₀		
		ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
509-min	854	6.23E+05	1.14E-03	1.82E-09	2.87E+05	4.74E-04	1.65E-09
509-max	855	2.26E+06	2.72E-03	1.21E-09	6.48E+05	2.35E-04	3.63E-10
509-maxII	856	8.38E+05	2.82E-03	3.37E-09	9.01E+05	1.33E-03	1.48E-09
511-min	801	5.05E+05	1.28E-03	2.53E-09	6.19E+05	8.98E-04	1.45E-09
511-max	802	6.59E+05	4.40E-05	6.67E-11	4.05E+05	7.96E-05	1.97E-10
567-min	884	2.01E+06	4.61E-04	2.30E-10	1.52E+06	3.82E-05	2.51E-11
567-max	874	1.20E+06	2.26E-04	1.88E-10	1.00E+06	3.27E-05	3.27E-11

【 0 2 0 5】

10

20

30

【表 9 - 2】

578-min	820	1.14E+06	1.03E-02	9.01E-09	9.15E+05	1.04E-02	1.14E-08
578-max	821	7.00E+05	3.07E-04	4.39E-10	5.23E+05	7.22E-04	1.38E-09

(続き)

ID	hVEGF ₁₂₁			PIGF
	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	
509-min	3.54E+05	4.53E-04	1.28E-09	結合しない
509-max	7.42E+05	2.49E-04	3.35E-10	結合しない
509-maxII	8.97E+05	1.23E-03	1.37E-09	結合しない
511-min	7.78E+05	9.63E-04	1.24E-09	結合しない
511-max	4.67E+05	9.97E-05	2.14E-10	結合しない
567-min	1.89E+06	4.54E-05	2.41E-11	結合しない
567-max	1.13E+06	5.76E-05	5.11E-11	結合しない
578-min	9.61E+05	8.80E-03	9.16E-09	結合しない
578-max	5.87E+05	5.58E-04	9.50E-10	結合しない

10

20

30

【 0 2 0 6 】

【表 10 - 1】

表10: 主要な誘導体(578および511)の親和性および能力の概観

ID	タンパク 質番号	hVEGR2競 合ELISAの 相対的活性 (EC50 _{ルゼンテイス} [nM] /EC50 _{試験} [nM])	HUVECアッセイ における相対的 活性 (EC50 _{ルゼンテイス} [nM] /EC50 _{試験} [nM]) hVEGF	Biacore 測定 hVEGF ₁₆₅		
				ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
578 野生型 C-His	798	ND	ND	8.34E+05	1.69E-04	2.00E-10
578-min	820	4.1	0.1001	1.14E+06	1.03E-02	9.01E-09
578-max	821	9.6	0.94/1.0/1.2/1.2 (新セットアップ)	7.00E+05	3.07E-04	4.39E-10
578-max FW1.4_DHP	960	ND	ND	9.30E+05	2.48E-04	2.66E-10
578-minmax	903	8.4	1.6/1.4 (新セットアップ)	8.06E+05	5.04E-04	6.25E-10
578minmax FW1.4_DHP	961	16.5	0.78/1.9	7.11E+05	4.09E-04	5.76E-10
578-max-min	902	6.5	ND	1.35E+06	8.83E-03	6.55E-09
578min_max T84N	991	ND	ND	7.21E+05	7.00E-04	9.71E-10
578min_max V89A	978	ND	ND	5.09E+05	6.12E-04	1.20E-09
578min_max V89L	980	ND	ND	8.75E+05	1.87E-03	2.13E-09
578min_max	1008	8.4	ND	1.13E+06	1.80E-03	1.59E-09
T84N_V89L	1009	7.5	ND	8.01E+05	4.93E-04	6.15E-10
578min_max	1017	ND	ND	ND	ND	ND
T84N_V89L_DHP		ND	ND	ND	ND	ND
578min_max		ND	ND	ND	ND	ND

【 0 2 0 7 】

10

20

30

【表 10 - 2】

T84N_V89A_DHP						
578max synth FW opt	950	ND	ND	1.35E+06	5.86E-04	4.33E-10
578min_max_synthFW	997	7.2	ND	1.23E+06	9.89E-04	8.03E-10
578max_min_synthFW	990	ND	ND	1.55E+06	5.31E-03	3.42E-09
578min_max_FW1.	1016	ND	ND	7.08E+05	7.02E-04	9.91E-10
synth						
511-min	801	4.9	0.0011	5.05E+05	1.28E-03	2.53E-09
511-max	802	8.7	0.0179	6.59E+05	4.40E-05	6.67E-11
511min_max	904	5.4	ND	3.66E+05	1.02E-04	2.78E-10
511max_min	905	ND	ND	5.11E+05	7.54E-04	1.48E-09

【 0 2 0 8 】

10

20

30

【表 1 1 - 1】

表 11: 主要な誘導体 (578および511) の生物物理学的特徴付けの概観

ID	タンパク質 番号	Bio-ATR での T_M [°C]	β シート損失 % (Aqaspec 60°C)	タンパク質損失% (60°Cでの沈殿)
578-min	820	66.85	ND	ND
578-max	821	70.36	-1.93%	16.20%
578-max FW1.4_DHP	960	ND	ND	ND
578-minmax	903	71.12	-0.52%	10.99%
578minmax FW1.4_DHP	961	70.18	-0.15%	14.82%
578-max-min	902	ND	ND	ND
578min_max T84N	991	70.78	0.11%	20.30%
578min_max V89A	978	63.23	-2.28%	48.22%
578min_max V89L	980	68.15	-0.79%	38.99%
578min_max				
T84N_V89L	1008	69	-0.80%	28.30%
578min_max				
T84N_V89A	1009	ND	ND	ND
578min_max				
T84N_V89L_DHP	1017	67.8	ND	ND
578min_max				
T84N_V89A_DHP	1080	66.3	ND	ND
578max synth FW opt	950	63.62	54.06%	97.85%
578min_max synth FW	997	63.25	50.89%	98.02%

【 0 2 0 9】

10

20

30

【表 1 1 - 2】

578max_min_synthFW	990	ND	ND	ND
578min_max FW1. synth	1016	65.7	-0.20%	21.30%
511-min	801	ND	ND	ND
511-max	802	70.5	-1.53%	4.50%
511min_max	904	ND	ND	ND
511max_min	905	ND	ND	ND
567min	884	54	100.00%	100.00%

(続き)

ID	硫酸アンモニウム沈殿による溶解性 [$\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$ 飽和 % における EC_{50}]	産生: リファオールディング収率 [mg/L]	E. coliにおける 発現レベル [任意単位]
578-min	ND	1.5	++
578-max	27.24	12.5	+
578-max FW1.4 DHP	ND	11.6	+
578-minmax	28.13	23.93	+++
FW1.4 DHP	32.36	50.5	+++
578-max-min	ND	4.5	+
578min_max T84N	ND	7.5	+++
578min_max V89A	ND	16	+++
578min_max V89L	ND	30	+++
578min_max T84N_V89L	27.88	24	+++
578min_max T84N_V89A	ND	22	+++

【 0 2 1 0 】

10

20

30

【表 1 1 - 3】

578min_max	30.80	36	++
T84N_V89L_DHP			++
578min_max	30.70	30	++
T84N_V89A_DHP			++
578max synthFW opt	28.30	19.4	++
578min_max_synthFW	30.05	24	++
578max_min_synthFW	ND	0.5	++
578min_max_FW1.			++
synth	25.10	28	++
511-min	ND	13.5	++
511-max	8.62	6.47	++
511min_max	ND	3.75	++
511max_min	ND	7	++
567min	20.70	16.5	++

いくつかの誘導体を、図 6 に掲載のように、30 分間の熱ストレス（例えば、50℃、60℃または70℃下）後のそれらの変性および沈殿に関して比較した。

【0 2 1 1】

【表 1 2 - 1】

表12a: 50℃で30分間インキュベーションした後の抗VEGFバインダー

試料名	β シート %	Nanodrop (mg/ml)
950	100,8	81,2
978	100,9	85,1
980	99,9	100,3
991	99,4	99,2
802	100,4	96,7
821	100,6	93,5
903	99,5	99,4
961	98,7	101,7
997	99,9	76,39

10

表12a: 60℃で30分間インキュベーションした後の抗VEGFバインダー

試料名	β シート %	Nanodrop (mg/ml)
950	45,9	2
978	102,3	52
980	100,8	61
991	99,9	80
802	101,5	96
821	101,9	84
903	100,5	89
961	100,1	85
997	49,1	2

20

30

【 0 2 1 2】

【表 1 2 - 2】

表12a: 70℃で30分間インキュベーションした後の抗VEGFバインダー

試料名	β シート %	Nanodrop (mg/ml)
950	43,1	1,0
978	13,4	2,7
980	4,5	0,2
991	21,5	1,4
802	100,4	80,8
821	58,4	3,3
903	81,9	0,7
961	46,3	1,1
997	0,0	0,3

40

578max、578minmaxおよび578minmax_DHPを、硫酸アンモニウム沈殿によって決定された、それらの溶解性に関してさらに例示した。図7のように、

50

硫酸アンモニウムの様々な濃度下におけるこれらの誘導体の可溶性タンパク質のパーセントを比較した。

【0213】

(実施例4)

(VEGF受容体ブロッキングアッセイ)

本発明で開示される抗VEGF s c F v候補またはそれらの誘導体に関して、実施例3におけるVEGFへのそれらの結合親和性に加えて、VEGFインヒビターとしてのそれらの能力も測定した。それらの能力を測定するための方法には、例えば、この実施例で例示されるようなVEGFR競合ELISA、およびHUVECアッセイが挙げられる(図8)。

10

【0214】

VEGFR競合ELISAアッセイには、例えば、VEGFR2受容体ブロッキングアッセイおよびVEGFR1受容体ブロッキングアッセイが挙げられる。VEGFR2受容体ブロッキングアッセイのために、ヒトVEGF₁₆₅を、PBS中に0.05 µg/mlで、96穴Maxisorp ELISAプレート(Nunc)上にコートし、0.1%BSAおよび0.2%Tween20(PBST)を含むPBSを用いてブロッキングした。ヒトIgG₁の6×ヒスチジンタグ付Fcと融合したヒトVEGFR2の細胞外ドメインのアミノ酸残基1~764個からなる、組換えヒトVEGFR2/Fcキメラ(R&D Systems Inc.)500 ng/mlを、PBST中で3倍で連続希釈した抗VEGF s c F vと、まずインキュベートした。室温で30~60分インキュベーションした後、混合物を、ヒトVEGF₁₆₅を固定化したプレートに移し、90分間インキュベートした。VEGFR2/Fcキメラと固定化したVEGF₁₆₅との結合を、西洋ワサビペルオキシダーゼにカップリングさせたヤギ(Fab₂)抗ヒトIgG Fcγ(Jackson ImmunoResearch)に続いて基質(BM Blue POD基質、Roche Diagnostics)を用いて検出した。450 nmでの光学密度(OD_{450 nm})を、Sunriseマイクロプレートリーダー(Tecan)を用いて測定した。データを、4パラメータロジックカーブフィットを用いて分析し、EC₅₀値を、s c F vの用量-応答曲線から計算した。VEGFR2受容体ブロッキングアッセイによって測定された、主要な候補またはそれらの誘導体の典型的な能力を、表7および9に列挙する。

20

30

【0215】

VEGFR1受容体ブロッキングアッセイのために、ヒトVEGF₁₆₅を、PBS中に0.0125 µg/mlで、96穴Maxisorp ELISAプレート(Nunc)上にコートし、0.4%BSAおよび0.1%Tween20を含むPBSを用いてブロッキングした。ヒトIgG₁の6×ヒスチジンタグ付Fcと融合したヒトVEGFR1の細胞外ドメインのアミノ酸残基1~687個からなる、組換えヒトVEGFR1/Fcキメラ(R&D Systems Inc.)100 ng/mlを、PBST中で3倍で連続希釈した抗VEGF s c F vと、まずインキュベートした。室温で30~60分インキュベーションした後、混合物を、ヒトVEGF₁₆₅が固定化されたプレートに移し、90分間インキュベートした。VEGFR1/Fcキメラと固定化したVEGF₁₆₅との結合を、西洋ワサビペルオキシダーゼにカップリングさせたヤギ(Fab₂)抗ヒトIgG Fcγ(Jackson ImmunoResearch)に続いて基質(BM Blue POD基質、Roche Diagnostics)を用いて検出した。450 nmでの光学密度(OD_{450 nm})を、Sunriseマイクロプレートリーダー(Tecan)を用いて測定した。データを上記のように分析し、EC₅₀値を、s c F vの用量-応答曲線から計算した。VEGFR1受容体ブロッキングアッセイによって測定された、主要な候補の典型的な能力を、表7に列挙する。

40

【0216】

(実施例5)

(VEGF阻害のHUVECアッセイ)

50

この実施例では、開示された、VEGFインヒビターとしての抗VEGF s c F v 候補またはそれらの誘導体の能力を測定する別の方法として、HUVECアッセイを例示する。

【0217】

数人のドナーからプールしたヒト臍静脈内皮細胞 (HUVEC) (Promocell) を、2 継代から 14 継代で使用した。細胞を、0.4% ECGS/H、2% ウシ胎仔血清、0.1 ng/ml の上皮増殖因子、1 µg/ml のヒドロコルチゾン、1 ng/ml の塩基性線維芽細胞因子および 1% ペニシリン/ストレプトマイシン (Gibco) を含む、50 µl の完全内皮細胞増殖培地 (ECGM) (Promocell) 中で、100 0 個/穴で細胞を播種した。7 から 8 時間後、50 µl の飢餓培地 (熱不活性化した 0.5% FCS および 1% ペニシリン/ストレプトマイシンを含むサプリメントなしの ECGM) を細胞に添加し、細胞を 15 から 16 時間、飢餓状態にさせた。3 倍で連続希釈した抗VEGF s c F v (0.023~150 nM)、および組換えヒトVEGF₁₆₅ (0.08 nM)、組換えマウスVEGF₁₆₄ (0.08 nM) または組換えラットVEGF₁₆₄ (0.3 nM) の 1 つを飢餓培地中に調製し、室温で 30~60 分間プレインキュベートした。異なる濃度のVEGFを、それらの異なる相対的な生物活性を補うために使用した。準最大 (submaximal) のVEGF誘導型増殖を刺激する濃度 (EC₉₀) を使用した。混合物 100 µl を、HUVEC 懸濁物を含む 96 穴組織培養プレートに添加し、37°C/5% CO₂ の加湿した (humified) インキュベータ中で 4 日間インキュベートした。20 µl/穴の WST-1 細胞増殖試薬 (Roche) を添加した後、Sunrise マイクロプレートリーダー (Tecan) を用いて、HUVEC の増殖を 450 nm (参照波長として 620 nm を使用した) での吸光度を測定することによって評価した。データを、4 パラメータロジスティックカーブフィットを用いて分析し、50% のHUVEC増殖を阻害するのに必要な抗VEGF s c F v の濃度 (EC₅₀) を、阻害曲線から導き出した。

【0218】

HUVECアッセイによって測定された、主要な候補またはそれらの誘導体の典型的な能力を、表7に列挙する。さらに、主要な候補の1つの誘導体、578 minmax による hVEGF₁₆₅ 誘導型HUVEC増殖の阻害を、図9に例示する。hVEGF₁₆₅ 誘導型細胞増殖を阻害するための 578 minmax の EC₅₀ は、0.06 nM と決定される (図9)。VEGFインヒビターとしての 578 minmax の能力は、ルセンチスと比較して約 1.6 倍優れている。578 minmax による、マウスまたはラットVEGF₁₆₄ 誘導型HUVEC増殖の阻害も、図10に例示する。マウスおよびラットVEGF₁₆₄ 誘導型細胞増殖を阻害するための 578 minmax の EC₅₀ は、それぞれ 0.06 nM および 0.07 nM である (図10)。したがって、マウスおよびラットVEGFは、典型的な誘導体 (578 minmax) による阻害に関して、ヒトVEGFと等力である。また、この実験では、ルセンチスは、齧歯動物のVEGFにより誘導される増殖を阻害しない。

【0219】

(実施例6)

(無毛モルモットにおける hVEGF₁₆₅ 誘導型血管性透過への抗VEGF s c F v の効果)

この実施例では、ヒトVEGF₁₆₅ 誘導型血管性透過への抗VEGF s c F v の効果を、Miles アッセイを用いてモルモットにおいて評価した。1 匹の動物につき 30 箇所の適用部位を、耐久性マーカーを用いて雄性的無毛モルモットの背側上にマークした。処置日に、全身麻酔の下、1% エバンスブルー色素溶液 1 ml を、各動物に静脈内投与した。色素注射して 1 時間後、2.61 nM の組換えヒトVEGF₁₆₅ (Peprrotech EC Ltd.) および様々な濃度の抗VEGF s c F v (0 nM、0.085 nM、0.256 nM、0.767 nM、2.3 nM、6.9 nM、20.7 nM、62.1 nM; 試験アイテムにつき n=7 の動物) を含む試験溶液 0.1 ml を、背側上の

マークに3連で注射した（試験アイテムの濃度につき3注射）。PBSの注射を、全動物における負の対照として供給した。追加の対照として、6.9 nMのルセンチス（Novartis）を全動物において注射した。

【0220】

試験溶液を注射して1時間後、動物を安楽死させ、裸皮を採取し、浄化し、入射および透過光を用いてデジタル撮影した。注射部位に溢出したエバンスブルー色素の面積を、ImageJを用いて評価した。各動物に関して、色素漏出の面積に対する抗VEGF scFv濃度を、4パラメータロジスティックカーブフィットを用いて分析した。50%血管性漏出を阻害するのに必要な抗VEGF scFvの濃度（EC₅₀）を、阻害曲線から導き出した。

10

【0221】

実験プロトコルを図11に例示する。また、hVEGFの阻害におけるscFv候補、ESBA903（578 minmax）および802（511 max）の効能を図11に図示し、血管系から皮膚に漏出したエバンスブルー色素を含む面積の種々のサイズによって表した。903および802に関する効能データを図12に示す。6.9 nMで、903および802は、試験した全動物において、ルセンチスと比較して、VEGFの誘導による皮膚への血管性漏出に対してより強い阻害を示した（図12）。

【0222】

（実施例7）

（ラットにおけるhVEGF₁₆₅誘導型網膜血管性漏出に対する局所的抗VEGF scFv処置の効果）

20

この実験では、578 minmaxの局所的効能を、修正したMilesアッセイを用いて実証する。これらの修正には、例えば、scFvの硝子体内注射および局所適用を用いる前混合試験が含まれる。

【0223】

前混合した異なる濃度の抗VEGF scFv（VEGFより10、3および1倍のモル過剰）とVEGF（500 ng）とを、単回硝子体内注射により適用した。アバスチン（Roche）（VEGFより10、3および1倍のモル過剰）を、正の対照として使用した。578 minmax用のビヒクル（クエン酸緩衝液、クエン酸ナトリウム20 mM、NaCl 112.5 mM、pH 7）を、負の対照として使用した。図13に図示されるように、hVEGF₁₆₅との前混合は、578 minmax（ESBA903）を促進させ、hVEGF誘導型網膜血管性透過を完全に阻害した。この実験では、578 minmax（ESBA903）の阻害効果は、アバスチンと比較して、より顕著であった。

30

【0224】

局所適用のために、VEGF刺激の5日前に、成体のSprague-Dawleyラットに、1日4回（4液滴/日）両側局所投薬により、578 minmax（1% = 10 mg/ml）を与えた（灌流の日（6日目）まで）。578 minmax用のビヒクル（局所投薬）およびAlcon RTKi（10 mg/kg/d、経口強制栄養）を、負および正の対照として使用した。5日目に、ラットを麻酔し、それらの瞳孔を散大させる。全動物に、両眼中に、hrVEGF 500 ng（10 μl）の硝子体内注射を与える。VEGFを注射して24時間後、3%エバンスブルー色素の静脈内注入を、全身麻酔中に全動物において行う。色素を90分間循環させた後、ラットを安楽死させる。血液試料を取り、次いでラットを無菌生理食塩水で灌流し、次いで各ラットの両眼をすぐに摘出し、手術用顕微鏡を用いて網膜を収集する。網膜および血漿試料に関して、60 μlの上清を、620/740 nmで分光光度計を用いてエバンスブルー色素の吸光度（ABS）を測定するために使用する。色素吸光度によって測定されるような、血液/網膜のバリアの崩壊およびその後の網膜血管性透過を、正味のABS/湿重量/血漿ABSの平均±s.e.m.として計算する。P ≤ 0.05が有意と考えられる一元配置ANOVAを、処置手段の間の全体的な差を決定するのに使用する。図14に例示されるように、578 minmax（903）の局所投与（5日間の前処置、1日につき4液滴）により、hVEGF誘

40

50

導型網膜血管性透過が有意に阻害された。これは、眼内疾患の処置に有用な、局所的に有効な抗体を実証する最初のものである。

【0225】

(等価物)

前述の記載を考慮して、本発明の多くの修正および代替の実施形態が、当業者に明らかである。したがって、この記載は、単なる例示として解釈すべきであり、本発明を実施するのに最良の様式を当業者に教示するためのものである。構造の詳細は、本発明の精神から逸脱することなく実質的に変えることができ、添付の特許請求の範囲内となる全ての修正の独占的使用権を保有する。本発明は、添付の特許請求の範囲および法律の適用可能な規則によって要求される程度にのみ制限されるものであると意図する。

10

【0226】

特許、特許出願、文献、書籍、論文、論述、ウェブページ、図および／または添付書類を含む、この出願に引用された全文献および類似物は、かかる文献および類似物の書式に関わらず、参照によりそれらの全体が明示的に援用される。援用された文献および類似物の1つまたは複数が、定義された用語、用語の使用法、記載された技法または同様のものを含む本明細書と異なるか相反する場合には、本明細書が優先される。

【0227】

本明細書で使用される節の見出しは、単に組織化のためのものであり、記載された主題を限定するものと決して解釈すべきではない。

【0228】

20

本発明は、様々な実施形態および実施例と併せて記載されているが、本教示がかかる実施形態または実施例に限定されるという意図はない。それどころか、当業者に理解されるように、本発明は、様々な代替、修正および等価物を包含する。

【0229】

特許請求の範囲は、その趣旨を述べない限り、記載された順番または要素に限定されると読むべきではない。形態および詳細の様々な変更は、添付の特許請求の範囲から逸脱することなく、行うことができると理解すべきである。したがって、以下の特許請求の範囲およびその等価物の範囲および精神内となる全実施形態が特許請求される。

【0230】

(配列表)

30

【0231】

【数 1】

配列番号 :1
 ペプチド免疫原
 KFMDVYQRSYC

VL 配列 :

配列番号 72: 60

EVVMAQTPASVEAAVGGTVTIKCQASQSISSYLSWYQQKPGQPPKLLIYKASTLASGVPSRFGSRS
 GTEYTLTISDLECADAAATYYCQSNYGGSSDYGNPFGGGTEAVVK

10

配列番号 73: 435

AFELTQTPSSVEAAVGGTVTIKCQASQSIGSSLAWYQQKPGQRPKLLIYTAANLASGVPSRFRGSRSG
 AAFTLTISDLECADAAATYYCQNFATSDTVTFGGGTEVVVT

配列番号 74: 453

AVVLTQTPSPVSAAVGGTVSISCQSSQSVWNNRLAWFQQKSGQPPKLLIYASTLASGVPSRFGK
 SGSGTEFTLTISDVQCDDAAATYYCAGGYSTSDNTFGGGTEVVVK

配列番号 75: 375

DIVMTQTPASVEATVGGTITINCQASENINIWLSWYQQKPGQPPKLLIYQASKLASGVPSRFGSGS
 GTQFTLTISDLECADAAATYYCQNNYSYNYGAPFGGGTEVVVK

20

配列番号 76: 610

DVVMTPASVSEPVGGTVTIKCQASQSISSWLSWYQQKPGQPPKLLIYQASTLASGVPPRSSGSG
 SGTEYTLTISDLECADAAATYFCQNNYGRSYGGAFFGGGTEVVVK

配列番号 77: 578

DVVMTPSSVSAAVGDTVINCQASEIIHSWLAWYQQKPGQPPKLLIYLASTLASGVPSRFGSGS
 GTQFTLTISDLECADAAIYYCQNVYLASTNGANFGGGTEVVVK

配列番号 78: 534

DVVMTPSSVSAAVGDTVTIKCQASQSINIWLSWYQQKSGQPPKLLVYKESTLASGVPSRFRGSG
 SGTQFTLTISDLECADAAATYYCQNNYDSGNGFPFGGGTEVVVK

30

配列番号 79: 567

DVVMTPSSVSAAVGDTVINCQADQSIYIWLWYQQKPGQPPKLLIYKASTLESVPSRFGSGS
 GTQFTLTISDLECADAAATYYCQNNAHYSTNGGTFGGGTEVVVK

配列番号 80: 509

DVVMTPSSVSAAVGDTVTIKCQASQNIRIWLWYQQKPGQPPKLLIYKASTLESVPSRFGSGS
 GTEFTLTISDLECADAAATYYCQNNAHYSTNGGTFGGGTEVVVK

【 0 2 3 2 】

40

【数 2】

配列番号 81: 511

EVVMTQTPASVEAAVGGTVTIKCQASQSINIWCWYQQKPGHPPKLLIYRASTLASGVSSRFKSGSG
GTEFTLTISDLECAATYYCQANYAYSAGYGAAFGGGTEVVK

配列番号 82: 60min

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQSISSYLSWYQQKPGKAPKLLIYKASTLASGVPSRFSGSGGA
EFTLTISLQPDDEFATYYCQSNYGGSSDYGNPFGQGTKLTVLG

配列番号 83: 435min

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQSIGSSLAWYQQKPGKAPKLLIYTAANLASGVPSRFSGSGSG
AEFTLTISLQPDDEFATYYCQNFATSDTVTFGQGTKLTVLG

10

配列番号 84: 453min

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQSSQSVWNNRLAWYQQKPGKAPKLLIYASTLASGVPSRFSGS
GSGAEFTLTISLQPDDEFATYYCAGGYSSTSDNTFGQGTKLTVLG

配列番号 85: 375min

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASENINIWLSWYQQKPGKAPKLLIYQASKLASGVPSRFSGSGSG
AEFTLTISLQPDDEFATYYCQNNYSYNRYGAPFGQGTKLTVLG

配列番号 86: 610min

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQSISSWLSWYQQKPGKAPKLLIYQASTLASGVPSRFSGSGSG
AEFTLTISLQPDDEFATYYCQNNYGRSYGGAFGQGTKLTVLG

20

配列番号 87: 578min

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASEIIHSLAWYQQKPGKAPKLLIYLASTLASGVPSRFSGSGSGA
EFTLTISLQPDDEFATYYCQNVYLASTNGANFGQGTKLTVLG

配列番号 88: 534min

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQSINIWLSWYQQKPGKAPKLLIYKESTLASGVPSRFSGSGSGA
EFTLTISLQPDDEFATYYCQNNYDSGNGFPFGQGTKLTVLG

30

配列番号 89: 567min

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQADQSIYIWSWYQQKPGKAPKLLIYKASTLESVPSRFSGSGSGA
EFTLTISLQPDDEFATYYCQNNAHYSTNGGTFGQGTKLTVLG

配列番号 90: 509min

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQNIRIWSWYQQKPGKAPKLLIYKASTLESVPSRFSGSGSG
AEFTLTISLQPDDEFATYYCQNNAHYSTNGGTFGQGTKLTVLG

配列番号 91: 511min

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQSINIWCWYQQKPGKAPKLLIYRASTLASGVPSRFSGSGSG
AEFTLTISLQPDDEFATYYCQANYAYSAGYGAAFGQGTKLTVLG

40

【 0 2 3 3 】

【数 3】

配列番号 92: 578min_Pref subst

EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCQASEIIHSLAWYQQKPGKAPKLLISLASTLASGVPSRFSGSGSGT
DFTFTISLQPEDFAVYYCQNVYLASTNGANFGQGGTKVEIKR

配列番号 93: 60max

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQSISSYLSWYQQKPGKAPKLLIYKASTLASGVPSRFSGSGSGT
EFTLTISLQPDDEFATYYCQSNYGGSSDYGNPFGQGTKLTVLG

配列番号 94: 435max

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIKCCQASQSIGSSSLAWYQQKPGKAPKLLIYTAANLASGVPSRFSGSGSG
AEFTLTISLQPDDEFATYYCQNFATSDTVTFGQGTKLTVLG

10

配列番号 95: 453max

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQSSQSVWNNNRLAWYQQKPGKAPKLLIYASTLASGVPSRFSGS
GSGTEFTLTISLQPDDEFATYYCAGGYSTSDNTFGQGTKLTVLG

配列番号 96: 375max

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASENINIWLSWYQQKPGKAPKLLIYQASKLASGVPSRFSGSGSG
TQFTLTISLQPDDEFATYYCQNNYSYNRYGAPFGQGTKLTVLG

配列番号 97: 610max

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQSISSWLSWYQQKPGKAPKLLIYQASTLASGVPSRFSGSGSG
TEFTLTISLQPDDEFATYYCQNNYGRSYGGAFGQGTKLTVLG

20

配列番号 98: 578max

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASEIIHSLAWYQQKPGKAPKLLIYLASTLASGVPSRFSGSGSGT
QFTLTISLQPDDEFATYYCQNVYLASTNGANFGQGGTKLTVLG

配列番号 99: 534max

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQSINIWLSWYQQKPGKAPKLLIYKESTLASGVPSRFSGSGSGT
EFTLTISLQPDDEFATYYCQNNYDSGNGFPFGQGTKLTVLG

30

配列番号 100: 567max

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQADQSIYIWLWYQQKPGKAPKLLIYKASTLESQVPSRFSGSGSGT
QFTLTISLQPDDEFATYYCQNNAHYSTNGGTFGQGTKLTVLG

配列番号 101: 509max

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQNIWLSWYQQKPGKAPKLLIYKASTLESQVPSRFSGSGSGT
EFTLTISLQPDDEFATYYCQNNAHYSTNGGTFGQGTKLTVLG

配列番号 102: 511max

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQSINIWLSWYQQKPGKAPKLLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGT
EFTLTISLQPDDEFATYYCQANYAYSAGYGAAFGQGTKLTVLG

40

【 0 2 3 4 】

【数 4】

配列番号 103: 578max_Pref subst

EIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASEIIHSWLAWYQQRPKGKAPKLLISLASTLASGVPSRFSGSGSGT
QFTFTISSLPEDFAVYYCQNVYLASTNGANFGQGTKVEIKR

配列番号 104: 578min VL: E1D

DIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASEIIHSWLAWYQQKPGKAPKLLIYLASTLASGVPSRFSGSGSGA
EFTLTISSLPDDFATYYCQNVYLASTNGANFGQGTKLTVLG

配列番号 105: 578min VL: I2V

EVVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASEIIHSWLAWYQQKPGKAPKLLIYLASTLASGVPSRFSGSGSG
AEFTLTISSLPDDFATYYCQNVYLASTNGANFGQGTKLTVLG

10

配列番号 106: 511min VL: C41L

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQSIWLSWYQQKPGKAPKLLIYRASTLASGVPSRFSGSGSG
AEFTLTISSLPDDFATYYCQANYAYSAGYGAAGQGQTKLTVLG

VH 配列 :

配列番号 107: 60-11-4

QSLEESGGDLVKPGASLTLTCTASGFPSGGYWVCWVRQAPGKGLEWIACIYAGSSGSTYYASWAK
GRFTISKTSSSTTVTLQMTSLTAADTATYFCARGNNYYIYTDGGYAYAGLELWGPGLVTVSS

20

配列番号 108: 60-11-6

QSLEESGGDLVKPGASLTLTCTASGFPSGGYWICWVRQAPGKGLEWIACIYAGSSGSTYYASWAKG
RFTISKTSSSTTVTLQMTSLTAADTATYFCARGNNYYIYTDGGYAYAGLELWGPGLVTVSS

配列番号 109: 435

QSLEESGGDLVQPGASLTLTCKVSGFSLNTNYWMCWVRQAPGKGLEWIGCMYTGSYNRAYYASW
AKGRFTSSKTSSSTTVTLEMTSLTAADTATYFCAKGSNWYSDLWGPGLTVTVSS

配列番号 110: 453

QERLVESGGGLVQPEGSLTLTCKASGFSFSRYYIYWVRQAPGKGLEWIACIDAGSSGILVYANWAK
GRFTISKTSSSTTVTLQMTSLTAADTATYFCARGDASYGVDSFMLPLWGPGLTVTVSS

30

配列番号 111: 375

QSLEESGGGLVQPEGSLTLTCKASGFSFTTDDYMCWVRQAPGKGLEWIGCILAGDGSTYYANWAK
GRFTGSKTSSSTTVDLKMTGLTAADTATYFCARSDPASSWSFALWGPGLTVTVSS

配列番号 112: 610

QSLEESGGRLVTPGTPLTLCTASGIDFSGAYYMGWVRQAPGKGLEWIGYIDYDGDYYASWAKG
RFTISKTSTTVDLKITSPTTEDTATYFCARSDYSSGWGTDIWGPGLTVTVSL

配列番号 113: 578

40

【 0 2 3 5 】

【数 5】

QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTASGFSLTDDYYMTWVRLAPGKGLEYGFDPPDDPPYYATWAKGRF
TISRTSTTVNLKMTSPTTEDTATYFCAGGDHNSGWGLDIWGPGLTVTVSL

配列番号 114: 534

QSLEESGGRLVTPGTPLTLTCTASGFSLSYYYMSWVRQAPGKGLEWIGIIGPGDYTDYASWAKGRFT
ISKSTTTVDLKITSPPTEDTATYFCGRGDDNSGWGEDIWGPGLTVTVSL

配列番号 115: 567

QSVEESGGRLVTPGAPLTLTCSVSGFSLSDYYMCWVRQAPGKGLQWIGCLDYFGSTDDASWAKGR
FTISKSTAVDLKITSPPTEDTATYFCARTDDSRGWGLNIWGPGLTVTVSL

10

配列番号 116: 509

QSLEESGGRLVTPGTPLTLTCTASGFSLSYYMCWVRQAPGKGLEWIGCLDYVGDTDYASWAKGRF
TISKASTTVDLKITSLTTEDTATYFCARTDDSRGWGLNIWGPGLTVTVSL

配列番号 117: 511

QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFSLNTYYMNWVRQAPGKGLEWIGIIPDDTTYASWAKSRST
ITRDTNENTVTLKMTSLTTEDTATYFCARSGDTTAWGADIWGPGLTVTVSL

配列番号 118: 60-11-4min

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFPFSSGYWVCWVRQAPGKGLEWVSCIYAGSSGSTYYASW
AKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGNNYYIYTDGGYAYAGLELWGQGTLTVTVSS

20

配列番号 119: 60-11-6min

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSGYWICWVRQAPGKGLEWVSCIYAGSSGSTYYASW
AKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGNNYYIYTDGGYAYAGLELWGQGTLTVTVSS

配列番号 120: 435min

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLNTNYWMCWVRQAPGKGLEWVSCMYTGSYNRAYYA
SWAKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGSNWYSDLWGQGTLTVTVSS

配列番号 121: 453min

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSRYYIYWVRQAPGKGLEWVSCIDAGSSGILVYANWA
KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGDSYGVDSFMLPLWGQGTLTVTVSS

30

配列番号 122: 375min

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFTTDDYMCWVRQAPGKGLEWVSCILAGDGSTYYANW
AKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSDPASSWSFALWGQGTLTVTVSS

配列番号 123: 610min

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIDFSGAYYMGWVRQAPGKGLEWVSYIDYDGDYRYASWA
KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSDYSSGWGTDIWGQGTLTVTVSS

40

配列番号 124: 578min

【 0 2 3 6 】

【数 6】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTDDYYMTWVRQAPGKGLEWVSFIDPDDDPYYATWAK
GRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGDHNSGWGLDIWGQGLTVTVSS

配列番号 125: 534min

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSYYMSWVRQAPGKGLEWVSIIGPGDYTDYASWAKG
RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGDDNSGWGEDIWGQGLTVTVSS

配列番号 126: 567min

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSYYMCWVRQAPGKGLEWVSCLDYFGSTDDASWAK
GRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKTDDSRGWGLNIWGQGLTVTVSS

10

配列番号 127: 509min

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSYYMCWVRQAPGKGLEWVSCLDYVGDYTDYASWAK
GRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKTDDSRGWGLNIWGQGLTVTVSS

配列番号 128: 511min

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLNTYYMNWVRQAPGKGLEWVSHAPDDTTYASWAKS
RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSGDTTAWGADIWGQGLTVTVSS

配列番号 129: 578min_Pref subst

substQVQLVQTGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTDDYYMTWVRQAPGKGLEWVSFIDPDDDPYY
ATWAKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTALYYCAKGDHNSGWGLDIWGQGLTVTVSS

20

配列番号 130: 60-11-4max

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFPSGGYWCWVRQAPGKGLEWVGCIYAGSSGSTYYASW
AKGRFTISKDT SKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARGNNYYIYTDGGYAYAGLELWGQGLTVTVSS

配列番号 131: 60-11-6max

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSSGGYWCWVRQAPGKGLEWVGCIYAGSSGSTYYASW
AKGRFTISKDT SKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARGNNYYIYTDGGYAYAGLELWGQGLTVTVSS

配列番号 132: 435max

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCKVSGFSLNTNYWMCWVRQAPGKGLEWVGCMYTGSYNRAYYA
SWAKGRFTSSKDT SKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGSNWYSDLWGQGLTVTVSS

30

配列番号 133: 453max

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCKASGFSFSRYYIYWVRQAPGKGLEWVGCIYAGSSGILVYANWA
KGRFTISKDT SKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARGDASYGVDSFMLPLWGQGLTVTVSS

配列番号 134: 375max

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCKASGFSFTTDDYMCWVRQAPGKGLEWVGCIYAGDGSTYYANW
AKGRFTGSKDT SKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARSDPASSWSFALWGQGLTVTVSS

40

配列番号 135: 610max

【 0 2 3 7 】

【数 7】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGIDFSGAYYMGWVRQAPGKGLEWVGIDYDGGDRYYASWA
KGRFTISKDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARSDYSSGWGTDIWGQGTLTVSS

配列番号 136: 578max

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLTDDYYMTWVRQAPGKGLEWVGFDIPDDDPYYATWA
KGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAGGDHNSGWGLDIWGQGTLTVSS

配列番号 137: 534max

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSYYMSWVRQAPGKGLEWVGIIIGPGDYTDYASWAKG
RFTISKDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARGDDNSGWGEDIWGQGTLTVSS

10

配列番号 138: 567max

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSVSGFSLDYIMCWVRQAPGKGLEWVGCLDYFGSTDDASWAK
GRFTISKDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARTDDSRGWGLNIWGQGTLTVSS

配列番号 139: 509max

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSYYMCWVRQAPGKGLEWVGCLDYVGDYTDYASWAK
GRFTISKDASKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARTDDSRGWGLNIWGQGTLTVSS

配列番号 140: 509maxII

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSYYMSWVRQAPGKGLEWVGILDYVGDYTDYASWAKG
RFTISKDASKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARTDDSRGWGLNIWGQGTLTVSS

20

配列番号 141: 511max

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTVSGFSLNTYYMNWVRQAPGKGLEWVGIIAPDDTTYASWAKS
RSTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGDTTAWGADIWGQGTLTVSS

配列番号 142: 578max_Pref subst

substQVQLVQTGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLTDDYYMTWVRQAPGKGLEWVGFDIPDDDPYY
ATWAKGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTATYYCAGGDHNSGWGLDIWGQGTLTVSS

配列番号 143: 567minDHP

EVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCAASGFSLSDYIMCWVRQAPGKGLEWVSCLDYFGSTDDASWAK
GRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTATYYCAKTDDSRGWGLNIWGQGTTTVSS

30

配列番号 144: 578maxDHP

EVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCTASGFSLTDDYYMTWVRQAPGKGLEWVGFDIPDDDPYYATWA
KGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTATYYCAGGDHNSGWGLDIWGQGTTTVSS

配列番号 145: 511maxDHP

EVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCTVSGFSLNTYYMNWVRQAPGKGLEWVGIIAPDDTTYASWAKS
RSTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTATYYCARSGDTTAWGADIWGQGTTTVSS

40

配列番号 146: 578max_Pref subst_DHP

【 0 2 3 8 】

【数 8】

QVQLVQTGGGSGVQPGGSLRLSCTASGFSLTDDYYMTWVRQAPGKGLEWVGFIDPDDDPYYATWA
KGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTATYYCAGGDHNSGWGLDIWGQGTTVTSS

配列番号 147: 578max VH: E1_

VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLTDDYYMTWVRQAPGKGLEWVGFIDPDDDPYYATWAK
GRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAGGDHNSGWGLDIWGQGLTVTVSS

配列番号 148: 578max VH: V2Q

EQQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLTDDYYMTWVRQAPGKGLEWVGFIDPDDDPYYATWA
KGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAGGDHNSGWGLDIWGQGLTVTVSS

10

配列番号 149: 578max VH: Q46L

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLTDDYYMTWVRLAPGKGLEWVGFIDPDDDPYYATWAK
GRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAGGDHNSGWGLDIWGQGLTVTVSS

配列番号 150: 578max VH: W54Y

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLTDDYYMTWVRQAPGKGLEWVGFIDPDDDPYYATWAK
GRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAGGDHNSGWGLDIWGQGLTVTVSS

配列番号 151: 578max VH: V55I

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLTDDYYMTWVRQAPGKGLEWVGFIDPDDDPYYATWAK
GRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAGGDHNSGWGLDIWGQGLTVTVSS

20

配列番号 152: 578max VH: D83A

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLTDDYYMTWVRQAPGKGLEWVGFIDPDDDPYYATWA
KGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAGGDHNSGWGLDIWGQGLTVTVSS

配列番号 153: 578max VH: N87A

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLTDDYYMTWVRQAPGKGLEWVGFIDPDDDPYYATWA
KGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAGGDHNSGWGLDIWGQGLTVTVSS

配列番号 154: 578max VH: Y105F

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLTDDYYMTWVRQAPGKGLEWVGFIDPDDDPYYATWA
KGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAGGDHNSGWGLDIWGQGLTVTVSS

30

配列番号 155: 578max VH: D83_

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLTDDYYMTWVRQAPGKGLEWVGFIDPDDDPYYATWA
KGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAGGDHNSGWGLDIWGQGLTVTVSS

配列番号 156: 578max VH: N87_

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLTDDYYMTWVRQAPGKGLEWVGFIDPDDDPYYATWA
KGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAGGDHNSGWGLDIWGQGLTVTVSS

40

配列番号 157: 578max VH: T84N

【 0 2 3 9 】

【数 9】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLTDYYYMTWVRQAPGKGLEWVGFIDPDDDPYYATWA
KGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAGGDHNSGWGLDIWGQGT LTVVSS

配列番号 158: 578max VH: V89L

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLTDYYYMTWVRQAPGKGLEWVGFIDPDDDPYYATWA
KGRFTISRDT SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAGGDHNSGWGLDIWGQGT LTVVSS

配列番号 159: 578max VH: V89A

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLTDYYYMTWVRQAPGKGLEWVGFIDPDDDPYYATWA
KGRFTISRDT SKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAGGDHNSGWGLDIWGQGT LTVVSS

10

配列番号 160: 578maxDHP VH: T84N

EVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCTASGFSLTDYYYMTWVRQAPGKGLEWVGFIDPDDDPYYATWA
KGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTATYYCAGGDHNSGWGLDIWGQGT TTVVSS

配列番号 161: 578maxDHP VH: V89L

EVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCTASGFSLTDYYYMTWVRQAPGKGLEWVGFIDPDDDPYYATWA
KGRFTISRDT SKNTLYLQMNSLRAEDTATYYCAGGDHNSGWGLDIWGQGT TTVVSS

配列番号 162: 578maxDHP VH: V89A

EVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCTASGFSLTDYYYMTWVRQAPGKGLEWVGFIDPDDDPYYATWA
KGRFTISRDT SKNTAYLQMNSLRAEDTATYYCAGGDHNSGWGLDIWGQGT TTVVSS

20

配列番号 163: 578max VH: T84N, V89A

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLTDYYYMTWVRQAPGKGLEWVGFIDPDDDPYYATWA
KGRFTISRDN SKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAGGDHNSGWGLDIWGQGT LTVVSS

配列番号 164: 578max VH: T84N, V89L

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLTDYYYMTWVRQAPGKGLEWVGFIDPDDDPYYATWA
KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAGGDHNSGWGLDIWGQGT LTVVSS

配列番号 165: 578maxDHP VH: T84N, V89A

EVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCTASGFSLTDYYYMTWVRQAPGKGLEWVGFIDPDDDPYYATWA
KGRFTISRDN SKNTAYLQMNSLRAEDTATYYCAGGDHNSGWGLDIWGQGT TTVVSS

30

配列番号 166: 578maxDHP VH: T84N, V89L

EVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCTASGFSLTDYYYMTWVRQAPGKGLEWVGFIDPDDDPYYATWA
KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTATYYCAGGDHNSGWGLDIWGQGT TTVVSS

フレームワーク配列(X残基はCDR挿入部位であり、任意の天然に存在するアミノ酸であり得る。
少なくとも3アミノ酸から50アミノ酸までが存在し得る)：

配列番号 167: 可変軽鎖 FW1.4 および rFW1.4

40

【 0 2 4 0 】

【数 1 0】

EIVMTQSPSTLSASVGDRVITC(X)_{n=3-50} WYQQKPGKAPKLLIY(X)_{n=3-50}
 GVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDFFATYYC(X)_{n=3-50} FGQGTKLT VLG

配列番号 168: 可変軽鎖 rFW1.4 変体 2 (v2)

EIVMTQSPSTLSASVGDRVITC(X)_{n=3-50} WYQQKPGKAPKLLIY(X)_{n=3-50}
 GVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDFFATYYC(X)_{n=3-50} FGQGTKLT VLG

配列番号 169: 可変重鎖 FW1.4

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS(X)_{n=3-50} WVRQAPGKGLEWVS(X)_{n=3-50}
 RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK(X)_{n=3-50} WGQGTL VTVSS

10

配列番号 170: 可変重鎖 rFW1.4

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTAS(X)_{n=3-50} WVRQAPGKGLEWVG(X)_{n=3-50}
 RFTISRDT SKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAR(X)_{n=3-50} WGQGT LV TVS

配列番号 171: 可変重鎖 rFW1.4 変体 2 (v2)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTVS(X)_{n=3-50} WVRQAPGKGLEWVG(X)_{n=3-50}
 RFTISKDT SKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAR(X)_{n=3-50} WGQGT LV TVSS

ScFvフレームワーク配列 :

20

配列番号 172: FW1.4

EIVMTQSPSTLSASVGDRVITC(X)_{n=3-50} WYQQKPGKAPKLLIY(X)_{n=3-50}
 GVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDFFATYYC(X)_{n=3-50} FGQGTKLT VLG
 GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS(X)_{n=3-50}
 WVRQAPGKGLEWVS(X)_{n=3-50} RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK(X)_{n=3-50}
 WGQGT LV TVSS

配列番号 173: rFW1.4

EIVMTQSPSTLSASVGDRVITC(X)_{n=3-50} WYQQKPGKAPKLLIY(X)_{n=3-50}
 GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFFATYYC(X)_{n=3-50} FGQGTKLT VLG
 GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTAS(X)_{n=3-50}
 WVRQAPGKGLEWVG(X)_{n=3-50} RFTISRDT SKNTVYLQMNS LRAEDTAVYYCAR(X)_{n=3-50}
 WGQGT LV TVSS

30

配列番号 174: rFW1.4 変体 2 (v2)

EIVMTQSPSTLSASVGDRVITC(X)_{n=3-50} WYQQKPGKAPKLLIY(X)_{n=3-50}
 GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFFATYYC(X)_{n=3-50} FGQGTKLT VLG
 GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTVS(X)_{n=3-50}
 WVRQAPGKGLEWVG(X)_{n=3-50} RFTISKDT SKNTVYLQMNSLR AEDTAVYYCAR(X)_{n=3-50}
 WGQGT LV TVSS

【 0 2 4 1 】

40

ScFv 抗 VEGF 配列：

EIVMTQSPSTLSASVGRVITTCQASQSIGSSLAWYQQKPGKAPKLLIYTAANLASGVPSRFSGSRSG
AEFTLTISSLQPDDEFATYYCQNFATSDTVTFGQGTKLVLGGGGGSGGGGSGGGGSEVQL
VESGGGLVQPGGSLRLSCKASGFSLNTNYWMCWVRQAPGKGLEWVVGCMYTGSYNRAYYASWA
KGRFTSSKDTSKNTVYVLMNSLRAEDTAVYYCAKGSNWYSDLWGQGTLVTVSS

10

20

30

EIVMTQSPSTLSASVGDRIITCQASEIIHSLAWYQQKPGKAPKLLIYLASTLASGVPSRFSGSGSGT
 QFTLTISLQPDFAITYCQNVYLASTNGANFGQGTKLTVLGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQ
 LVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLTDYYMTWVRQAPGKGLEWVGFDPPDDPPYYATWAKGRF
 TISRDTSKNTVYLQMNSLR AEDTAVYYCAGGDHNSGWGLDIWGQGTIVTVSS

EIVMTQSPSTLSASVGDRIITCAASEIIHSWLAWYQQKPKGAPKLLIYLASTLASGVPSPRFSGSGSGA
 EFTLTISLQPDDEFATYYCQNVYLASTNGANFGQGTKLTVLGSGGGSGGGSGGGSGGGGSEVQ
 LVEGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLTDYYMTWVRQAPGKLEWVGFDPDDPYATWAKGRF
 TISRDTSKNTVYLMNSLR AEDTAVYYCAGGDHNSGWGLDIWGQGTIVTVSS

GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS

【化 1】

SEQUENCE LISTING

<110> ESBATEch AG

<120> Stable and soluble antibodies inhibiting VEGF

<130> VEGF binders

<140> Us61/133,212

<141> 2008-06-25

<160> 180

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg Ser Tyr Cys
 1 5 10

<210> 2

<211> 11

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> CDR stemming from rabbit antibody

<400> 2

Gly Phe Pro Phe Ser Ser Gly Tyr Trp Val Cys
 1 5 10

<210> 3

<211> 11

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> CDR stemming from rabbit antibody

<400> 3

Gly Phe Ser Phe Ser Ser Gly Tyr Trp Ile Cys
 1 5 10

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> CDR stemming from rabbit antibody

<400> 4

Gly Phe Ser Leu Asn Thr Asn Tyr Trp Met Cys
 1 5 10

<210> 5

【化 2】

<211> 11
 <212> PRT
 <213> Unknown

 <220>
 <223> CDR stemming from rabbit antibody

 <400> 5
 Gly Phe Ser Phe Ser Arg Ser Tyr Tyr Ile Tyr
 1 5 10

<210> 6
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Unknown

 <220>
 <223> CDR stemming from rabbit antibody

 <400> 6
 Gly Phe Ser Phe Thr Thr Thr Asp Tyr Met Cys
 1 5 10

<210> 7
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Unknown

 <220>
 <223> CDR stemming from rabbit antibody

 <400> 7
 Gly Ile Asp Phe Ser Gly Ala Tyr Tyr Met Gly
 1 5 10

<210> 8
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Unknown

 <220>
 <223> CDR stemming from rabbit antibody

 <400> 8
 Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr Tyr Tyr Met Thr
 1 5 10

<210> 9
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Unknown

 <220>
 <223> CDR stemming from rabbit antibody

 <400> 9
 Gly Phe Ser Leu Ser Tyr Tyr Tyr Met Ser
 1 5 10

10

20

30

40

【化 3】

<210> 10
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Unknown

<220>
 <223> CDR stemming from rabbit antibody
 <400> 10

Gly Phe Ser Leu Ser Asp Tyr Tyr Met Cys
 1 5 10

10

<210> 11
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Unknown

<220>
 <223> CDR stemming from rabbit antibody
 <400> 11

Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Tyr Met Cys
 1 5 10

<210> 12
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Unknown

20

<220>
 <223> CDR stemming from rabbit antibody
 <400> 12

Gly Phe Ser Leu Asn Thr Tyr Tyr Met Asn
 1 5 10

<210> 13
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Unknown

30

<220>
 <223> CDR stemming from rabbit antibody
 <400> 13

Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Tyr Met Ser
 1 5 10

<210> 14
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Unknown

40

<220>
 <223> CDR stemming from rabbit antibody
 <400> 14

Gly Phe Ser Leu Ser Ser Gly Tyr Tyr Met Cys
 1 5 10

【化 4】

<210> 15
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Unknown

<220>
 <223> CDR stemming from rabbit antibody

<400> 15

Cys Ile Tyr Ala Gly Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala
 1 5 10 15

10

Lys Gly

<210> 16
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Unknown

<220>
 <223> CDR stemming from rabbit antibody

<400> 16

Cys Met Tyr Thr Gly Ser Tyr Asn Arg Ala Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala
 1 5 10 15

20

Lys Gly

<210> 17
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Unknown

<220>
 <223> CDR stemming from rabbit antibody

<400> 17

30

Cys Ile Asp Ala Gly Ser Ser Gly Ile Leu Val Tyr Ala Asn Trp Ala
 1 5 10 15

Lys Gly

<210> 18
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Unknown

<220>
 <223> CDR stemming from rabbit antibody

40

<400> 18

Cys Ile Leu Ala Gly Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala Lys
 1 5 10 15

【化 5】

Gly

<210> 19
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Unknown

<220>
 <223> CDR stemming from rabbit antibody

<400> 19

10

Tyr Ile Asp Tyr Asp Gly Asp Arg Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
 1 5 10 15

<210> 20
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Unknown

<220>
 <223> CDR stemming from rabbit antibody

<400> 20

20

Phe Ile Asp Pro Asp Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala Lys Gly
 1 5 10 15

<210> 21
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Unknown

<220>
 <223> CDR stemming from rabbit antibody

<400> 21

Ile Ile Gly Pro Gly Asp Tyr Thr Asp Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
 1 5 10 15

30

<210> 22
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Unknown

<220>
 <223> CDR stemming from rabbit antibody

<400> 22

Cys Leu Asp Tyr Phe Gly Ser Thr Asp Asp Ala Ser Trp Ala Lys Gly
 1 5 10 15

40

<210> 23
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> artifical sequence

<400> 23

Cys Leu Asp Tyr Val Gly Asp Thr Asp Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
 1 5 10 15

【化 6】

<210> 24
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Unknown

<220>
 <223> CDR stemming from rabbit antibody

<400> 24

Ile Ile Ala Pro Asp Asp Thr Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Ser
 1 5 10 15

10

<210> 25
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Unknown

<220>
 <223> CDR stemming from rabbit antibody

<400> 25

Ile Leu Asp Tyr Val Gly Asp Thr Asp Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
 1 5 10 15

<210> 26
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Unknown

20

<220>
 <223> CDR stemming from rabbit antibody

<400> 26

Cys Ile Asp Ala Gly Ser Asp Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala
 1 5 10 15

Lys Gly

30

<210> 27
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Unknown

<220>
 <223> CDR stemming from rabbit antibody

<400> 27

Gly Asn Asn Tyr Tyr Ile Tyr Thr Asp Gly Gly Tyr Ala Tyr Ala Gly
 1 5 10 15

Leu Glu Leu

40

<210> 28
 <211> 8
 <212> PRT

【化 7】

<213> Unknown

<220>

<223> CDR stemming from rabbit antibody

<400> 28

Gly Ser Asn Trp Tyr Ser Asp Leu
1 5

<210> 29

<211> 14

<212> PRT

<213> Unknown

10

<220>

<223> CDR stemming from rabbit antibody

<400> 29

Gly Asp Ala Ser Tyr Gly Val Asp Ser Phe Met Leu Pro Leu
1 5 10

<210> 30

<211> 11

<212> PRT

<213> Unknown

20

<220>

<223> CDR stemming from rabbit antibody

<400> 30

Ser Asp Pro Ala Ser Ser Trp Ser Phe Ala Leu
1 5 10

<210> 31

<211> 11

<212> PRT

<213> Unknown

30

<220>

<223> CDR stemming from rabbit antibody

<400> 31

Ser Asp Tyr Ser Ser Gly Trp Gly Thr Asp Ile
1 5 10

<210> 32

<211> 11

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> CDR stemming from rabbit antibody

40

<400> 32

Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile
1 5 10

<210> 33

<211> 11

【化 8】

<212> PRT
<213> Unknown

<220>
<223> CDR stemming from rabbit antibody

<400> 33

Gly Asp Asp Asn Ser Gly Trp Gly Glu Asp Ile
1 5 10

<210> 34
<211> 11
<212> PRT
<213> Unknown

10

<220>
<223> CDR stemming from rabbit antibody

<400> 34

Thr Asp Asp Ser Arg Gly Trp Gly Leu Asn Ile
1 5 10

<210> 35
<211> 11
<212> PRT
<213> Unknown

20

<220>
<223> CDR stemming from rabbit antibody

<400> 35

Thr Asp Asp Ser Arg Gly Trp Gly Leu Asn Ile
1 5 10

<210> 36
<211> 11
<212> PRT
<213> Unknown

30

<220>
<223> CDR stemming from rabbit antibody

<400> 36

Ser Gly Asp Thr Thr Ala Trp Gly Ala Asp Ile
1 5 10

<210> 37
<211> 19
<212> PRT
<213> Unknown

<220>
<223> CDR stemming from rabbit antibody

40

<400> 37

Gly Asp Asp Ser Ser Gly Tyr Thr Asp Gly Gly Tyr Ala Tyr Trp Gly
1 5 10 15

Leu Asp Ile

【化 9】

<210> 38
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Unknown

<220>
 <223> CDR stemming from rabbit antibody

<400> 38

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Ser
 1 5 10

10

<210> 39
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Unknown

<220>
 <223> CDR stemming from rabbit antibody

<400> 39

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser Leu Ala
 1 5 10

<210> 40
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Unknown

20

<220>
 <223> CDR stemming from rabbit antibody

<400> 40

Gln Ser Ser Gln Ser Val Trp Asn Asn Asn Arg Leu Ala
 1 5 10

<210> 41
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Unknown

30

<220>
 <223> CDR stemming from rabbit antibody

<400> 41

Gln Ala Ser Glu Asn Ile Asn Ile Trp Leu Ser
 1 5 10

<210> 42
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Unknown

40

<220>
 <223> CDR stemming from rabbit antibody

<400> 42

【化 1 0】

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp Leu Ser
 1 5 10

<210> 43
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Unknown

<220>
 <223> CDR stemming from rabbit antibody

<400> 43

10

Gln Ala Ser Glu Ile Ile His Ser Trp Leu Ala
 1 5 10

<210> 44
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Unknown

<220>
 <223> CDR stemming from rabbit antibody

<400> 44

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Asn Ile Trp Leu Ser
 1 5 10

20

<210> 45
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Unknown

<220>
 <223> CDR stemming from rabbit antibody

<400> 45

Gln Ala Asp Gln Ser Ile Tyr Ile Trp Leu Ser
 1 5 10

30

<210> 46
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Unknown

<220>
 <223> CDR stemming from rabbit antibody

<400> 46

Gln Ala Ser Gln Asn Ile Arg Ile Trp Leu Ser
 1 5 10

40

<210> 47
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Unknown

<220>
 <223> CDR stemming from rabbit antibody

<400> 47

【化 1 1】

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Asn Ile Trp Cys Ser
 1 5 10

<210> 48
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Unknown

<220>
 <223> CDR stemming from rabbit antibody

<400> 48

10

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Asn Ile Trp Leu Ser
 1 5 10

<210> 49
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Unknown

<220>
 <223> CDR stemming from rabbit antibody

<400> 49

20

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Asn Ile Asn Asn Trp Leu Ser
 1 5 10

<210> 50
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Unknown

<220>
 <223> CDR stemming from rabbit antibody

<400> 50

Lys Ala Ser Thr Leu Ala Ser
 1 5

30

<210> 51
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Unknown

<220>
 <223> CDR stemming from rabbit antibody

<400> 51

Thr Ala Ala Asn Leu Ala Ser
 1 5

40

<210> 52
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Unknown

<220>
 <223> CDR stemming from rabbit antibody

【化 1 2】

<400> 52

Tyr Ala Ser Thr Leu Ala Ser
 1 5

<210> 53

<211> 7

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> CDR stemming from rabbit antibody

10

<400> 53

Gln Ala Ser Lys Leu Ala Ser
 1 5

<210> 54

<211> 7

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> CDR stemming from rabbit antibody

20

<400> 54

Gln Ala Ser Thr Leu Ala Ser
 1 5

<210> 55

<211> 7

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> CDR stemming from rabbit antibody

<400> 55

Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser
 1 5

30

<210> 56

<211> 7

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> CDR stemming from rabbit antibody

<400> 56

Lys Glu Ser Thr Leu Ala Ser
 1 5

40

<210> 57

<211> 7

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> CDR stemming from rabbit antibody

【化 1 3】

<400> 57

Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser
1 5

<210> 58

<211> 7

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> CDR stemming from rabbit antibody

10

<400> 58

Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser
1 5

<210> 59

<211> 7

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> CDR stemming from rabbit antibody

20

<400> 59

Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser
1 5

<210> 60

<211> 7

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> CDR stemming from rabbit antibody

<400> 60

Lys Ala Ser Thr Leu Ala Ser
1 5

30

<210> 61

<211> 14

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> CDR stemming from rabbit antibody

<400> 61

Gln Ser Asn Tyr Gly Gly Ser Ser Ser Asp Tyr Gly Asn Pro
1 5 10

40

<210> 62

<211> 10

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

【化 1 4】

<223> CDR stemming from rabbit antibody

<400> 62

Gln Asn Phe Ala Thr Ser Asp Thr Val Thr
 1 5 10

<210> 63

<211> 11

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> CDR stemming from rabbit antibody

<400> 63

Ala Gly Gly Tyr Ser Ser Thr Ser Asp Asn Thr
 1 5 10

<210> 64

<211> 12

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> CDR stemming from rabbit antibody

<400> 64

Gln Asn Asn Tyr Ser Tyr Asn Arg Tyr Gly Ala Pro
 1 5 10

<210> 65

<211> 12

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> CDR stemming from rabbit antibody

<400> 65

Gln Asn Asn Tyr Gly Phe Arg Ser Tyr Gly Gly Ala
 1 5 10

<210> 66

<211> 12

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> CDR stemming from rabbit antibody

<400> 66

Gln Asn Val Tyr Leu Ala Ser Thr Asn Gly Ala Asn
 1 5 10

<210> 67

<211> 12

<212> PRT

<213> Unknown

【化 1 5】

<220>

<223> CDR stemming from rabbit antibody

<400> 67

Gln Asn Asn Tyr Asp Ser Gly Asn Asn Gly Phe Pro
 1 5 10

<210> 68

<211> 12

<212> PRT

<213> Unknown

10

<220>

<223> CDR stemming from rabbit antibody

<400> 68

Gln Asn Asn Ala His Tyr Ser Thr Asn Gly Gly Thr
 1 5 10

<210> 69

<211> 12

<212> PRT

<213> Unknown

20

<220>

<223> CDR stemming from rabbit antibody

<400> 69

Gln Asn Asn Ala His Tyr Ser Thr Asn Gly Gly Thr
 1 5 10

<210> 70

<211> 13

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> CDR stemming from rabbit antibody

<400> 70

30

Gln Ala Asn Tyr Ala Tyr Ser Ala Gly Tyr Gly Ala Ala
 1 5 10

<210> 71

<211> 14

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> CDR stemming from rabbit antibody

<400> 71

40

Gln Asn Asn Tyr His Tyr Ser Ser Ser Thr Asn Gly Gly Thr
 1 5 10

<210> 72

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

【化 1 6】

<220>

<223> recombinant scFv - VL sequence

<400> 72

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

Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

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

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

Ser Arg Ser Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu Cys
65 70 75 80

Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser Asn Tyr Gly Gly Ser Ser
85 90 95

Ser Asp Tyr Gly Asn Pro Phe Gly Gly Gly Thr Glu Ala Val Val Lys
100 105 110

<210> 73

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> recombinant scFv - VL sequence

<400> 73

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

Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser
20 25 30

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

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

Ser Arg Ser Gly Ala Ala Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu Cys
65 70 75 80

Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Phe Ala Thr Ser Asp Thr
85 90 95

Val Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Thr

【化 1 7】

100 105

<210> 74
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> recombinant scFv - VL sequence

<400> 74

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

Gly Thr Val Ser Ile Ser Cys Gln Ser Ser Gln Ser Val Trp Asn Asn
 20 25 30

Asn Arg Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Ser Gly Gln Pro Pro Lys Leu
 35 40 45

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

Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Val 20
 65 70 75 80

Gln Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly Gly Tyr Ser Ser
 85 90 95

Thr Ser Asp Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
 100 105 110

<210> 75
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence 30

<220>
 <223> recombinant scFv - VL sequence

<400> 75

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

Gly Thr Ile Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Glu Asn Ile Asn Ile Trp
 20 25 30

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

Tyr Gln Ala Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu Cys
 65 70 75 80

【化 1 8】

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

Tyr Gly Ala Pro Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
100 105 110

<210> 76
<211> 110
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> recombinant scFv - VL sequence

<400> 76

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser Val Ser Glu Pro Val Gly
1 5 10 15

Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp
20 25 30

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

Tyr Gln Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Pro Arg Ser Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu Cys
65 70 75 80

Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Asn Asn Tyr Gly Phe Arg Ser
85 90 95

Tyr Gly Gly Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
100 105 110

<210> 77
<211> 110
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> recombinant scFv - VL sequence

<400> 77

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

Asp Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Glu Ile Ile His Ser Trp
20 25 30

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

【化 1 9】

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

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu Cys
65 70 75 80

Ala Asp Ala Ala Ile Tyr Tyr Cys Gln Asn Val Tyr Leu Ala Ser Thr
85 90 95

Asn Gly Ala Asn Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
100 105 110

10

<210> 78
<211> 110
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> recombinant scFv - VL sequence

<400> 78

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

20

Asp Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Asn Ile Trp
20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Val
35 40 45

Tyr Lys Glu Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Arg Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu Cys
65 70 75 80

30

Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Asn Tyr Asp Ser Gly Asn
85 90 95

Asn Gly Phe Pro Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
100 105 110

<210> 79
<211> 110
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> recombinant scFv - VL sequence

<400> 79

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

40

【化 2 0】

Asp Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Asp Gln Ser Ile Tyr Ile Trp ...
 20 25 30

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

Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu Cys
 65 70 75 80

10

Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Asn Ala His Tyr Ser Thr
 85 90 95

Asn Gly Gly Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
 100 105 110

<210> 80
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

20

<220>
 <223> recombinant scFv - VL sequence

<400> 80

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

Asp Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Asn Ile Arg Ile Trp
 20 25 30

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

30

Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu Cys
 65 70 75 80

Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Asn Ala His Tyr Ser Thr
 85 90 95

Asn Gly Gly Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
 100 105 110

40

<210> 81
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> recombinant scFv - VL sequence

【化 2 1】

<400> 81

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

Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Asn Ile Trp
20 25 30

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

Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Lys Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu Cys
65 70 75 80

Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ala Asn Tyr Ala Tyr Ser Ala
85 90 95

Gly Tyr Gly Ala Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
100 105 110

<210> 82

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> recombinant scFv - VL sequence

<400> 82

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

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser Asn Tyr Gly Gly Ser Ser
85 90 95

Ser Asp Tyr Gly Asn Pro Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

【化 2 2】

Gly

<210> 83
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> recombinant scFv - VL sequence

<400> 83

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

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser
 20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Phe Ala Thr Ser Asp Thr
 85 90 95

Val Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105

<210> 84
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> recombinant scFv - VL sequence

<400> 84

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

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ser Ser Gln Ser Val Trp Asn Asn
 20 25 30

Asn Arg Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
 Page 22

10

20

30

40

65 70 75 80

Thr Ser Asp Asn Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<220>
<223> recombinant scFv - VL sequence
<400> 85

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Asn Ile Asn Ile Trp
20 25 30

Tyr Gln Ala Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Asn Tyr Ser Tyr Asn Arg
85 90 95

```
<210> 86
<211> 111
<212> PRT
<213> artifical sequence
```

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

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

Tyr Gln Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

60

10

20

30

40

Page 24

【化 2 5】

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

Tyr Lys Glu Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Asn Tyr Asp Ser Gly Asn
 85 90 95

10

Asn Gly Phe Pro Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

<210> 89

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> recombinant scFv - VL sequence

<400> 89

20

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

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

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

Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

30

Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Asn Ala His Tyr Ser Thr
 85 90 95

Asn Gly Gly Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

<210> 90

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> recombinant scFv - VL sequence

<400> 90

40

【化 2 6】

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asn Ile Arg Ile Trp
 20 25 30
 Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly 10
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Asn Ala His Tyr Ser Thr
 85 90 95
 Asn Gly Gly Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110
 <210> 91 20
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> recombinant scFv - VL sequence
 <400> 91
 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Asn Ile Trp
 20 25 30 30
 Cys Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ala Asn Tyr Ala Tyr Ser Ala
 85 90 95 40
 Gly Tyr Gly Ala Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110
 <210> 92
 <211> 111

【化 2 7】

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> recombinant scFv - VL sequence

<400> 92

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Ile Ile His Ser Trp
 20 25 30

10

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

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

20

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

<210> 93

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> recombinant scFv - VL sequence

<400> 93

30

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

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

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

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

40

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

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser Asn Tyr Gly Gly Ser Ser
 85 90 95

【化 2 8】

Ser Asp Tyr Gly Asn Pro Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

Gly

<210> 94
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> recombinant scFv - VL sequence

<400> 94

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

Asp Arg Val Ile Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser
 20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Phe Ala Thr Ser Asp Thr
 85 90 95

Val Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105

<210> 95
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> recombinant scFv - VL sequence

<400> 95

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

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ser Ser Gln Ser Val Trp Asn Asn
 20 25 30

Asn Arg Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

【化 2 9】

Leu. Ile Tyr Tyr Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe ...
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
 65 70 75 80

Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly Gly Tyr Ser Ser
 85 90 95

Thr Ser Asp Asn Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

10

<210> 96
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> recombinant scFv - VL sequence

<400> 96

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

20

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Asn Ile Asn Ile Trp
 20 25 30

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

Tyr Gln Ala Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

30

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Asn Tyr Ser Tyr Asn Arg
 85 90 95

Tyr Gly Ala Pro Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

<210> 97
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> recombinant scFv - VL sequence

<400> 97

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

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp

40

Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
40 45

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

Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
70 75 80

Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Asn Tyr Gly Phe Arg Ser
85 90 95

Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

10

20

30

40

Page 30

【化 3 1】

<400> 99

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

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Asn Ile Trp
20 25 30

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

Tyr Lys Glu Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Asn Tyr Asp Ser Gly Asn
85 90 95

Asn Gly Phe Pro Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 100

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> recombinant scFv - VL sequence

<400> 100

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

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

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

Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Asn Ala His Tyr Ser Thr
85 90 95

Asn Gly Gly Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 101

【化 3 2】

<211> 111
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> recombinant scFv - VL sequence

<400> 101

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

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asn Ile Arg Ile Trp
 20 25 30

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

Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Asn Ala His Tyr Ser Thr
 85 90 95

Asn Gly Gly Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

<210> 102
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> recombinant scFv - VL sequence

<400> 102

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

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Asn Ile Trp
 20 25 30

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

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

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

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ala Asn Tyr Ala Tyr Ser Ala
 85 90 95

【化 3 3】

Gly Tyr Gly Ala Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

<210> 103
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> recombinant scFv - VL sequence

<400> 103

10

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Ile Ile His Ser Trp
 20 25 30

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

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

20

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

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

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

<210> 104
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

30

<220>
 <223> recombinant scFv - VL sequence

<400> 104

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

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Ile Ile His Ser Trp
 20 25 30

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

40

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

【化 3 4】

Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Val Tyr Leu Ala Ser Thr
85 90 95

Asn Gly Ala Asn Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 105

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> recombinant scFv - VL sequence

<400> 105

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

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Ile Ile His Ser Trp
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Val Tyr Leu Ala Ser Thr
85 90 95

Asn Gly Ala Asn Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 106

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> recombinant scFv - VL sequence

<400> 106

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

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Asn Ile Trp
20 25 30

【化 3 5】

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

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

Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ala Asn Tyr Ala Tyr Ser Ala
 85 90 95

10

Gly Tyr Gly Ala Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

<210> 107

<211> 128

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> recombinant scFv - VH sequence

<400> 107

20

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

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Pro Phe Ser Ser Gly Tyr
 20 25 30

Trp Val Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Ala Cys Ile Tyr Ala Gly Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp
 50 55 60

30

Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Thr Thr Val Thr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Asn Asn Tyr Tyr Ile Tyr Thr Asp Gly Gly Tyr Ala Tyr
 100 105 110

Ala Gly Leu Glu Leu Trp Gly Pro Gly Ile Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

40

<210> 108

<211> 128

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> recombinant scFv - VH sequence

【化 3 6】

<400> 108

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

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Ser Gly Tyr
20 25 30

Trp Ile Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Ala Cys Ile Tyr Ala Gly Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp
50 55 60

Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Thr Thr Val Thr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Asn Asn Tyr Tyr Ile Tyr Thr Asp Gly Gly Tyr Ala Tyr
100 105 110

Ala Gly Leu Glu Leu Trp Gly Pro Gly Ile Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 109

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> recombinant scFv - VH sequence

<400> 109

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

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

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

Gly Cys Met Tyr Thr Gly Ser Tyr Asn Arg Ala Tyr Tyr Ala Ser Trp
50 55 60

Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ser Ser Lys Thr Ser Ser Thr Thr Val Thr
65 70 75 80

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

【化 3 7】

Ala Lys Gly Ser Asn Trp Tyr Ser Asp Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 110
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

10

<220>
 <223> recombinant scFv - VH sequence

<400> 110

Gln Glu Arg Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Glu Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Thr Leu Thr Cys Lys Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Arg Ser
 20 25 30

Tyr Tyr Ile Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45

20

Ile Ala Cys Ile Asp Ala Gly Ser Ser Gly Ile Leu Val Tyr Ala Asn
 50 55 60

Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Thr Thr Val
 65 70 75 80

Thr Leu Gln Met Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe
 85 90 95

Cys Ala Arg Gly Asp Ala Ser Tyr Gly Val Asp Ser Phe Met Leu Pro
 100 105 110

30

Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 111
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> recombinant scFv - VH sequence

<400> 111

40

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

Leu Thr Leu Thr Cys Lys Ala Ser Gly Phe Ser Phe Thr Thr Thr Asp
 20 25 30

Tyr Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

45

10

20

30

40

【化 3 9】

<220>

<223> recombinant scFv - VH sequence

<400> 113

Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr Tyr
20 25 30

Tyr Met Thr Trp Val Arg Leu Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile
35 40 45

Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Thr Ser Thr Thr Val Asn Leu Lys Met
65 70 75 80

Thr Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Gly Gly
85 90 95

Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile Trp Gly Pro Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Leu
115

<210> 114

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> recombinant scFv - VH sequence

<400> 114

Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Tyr Tyr Tyr
20 25 30

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

Ile Ile Gly Pro Gly Asp Tyr Thr Asp Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
50 55 60

Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Ile Thr
65 70 75 80

Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Gly Arg Gly Asp

【化 4 0】

Asp Asn Ser Gly Trp Gly Glu Asp Ile Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val
 100 105 110

Thr Val Ser Leu
 115

<210> 115
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> recombinant scFv - VH sequence

<400> 115

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

Leu Thr Leu Thr Cys Ser Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asp Tyr Tyr
 20 25 30

Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Gln Trp Ile Gly
 35 40 45

Cys Leu Asp Tyr Phe Gly Ser Thr Asp Asp Ala Ser Trp Ala Lys Gly
 50 55 60

Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Ala Val Asp Leu Lys Ile Thr
 65 70 75 80

Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Thr Asp
 85 90 95

Asp Ser Arg Gly Trp Gly Leu Asn Ile Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val
 100 105 110

Thr Val Ser Leu
 115

<210> 116
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> recombinant scFv - VH sequence

<400> 116

Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
 1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Tyr
 20 25 30

10

20

30

40

【化 4 1】

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

Cys Leu Asp Tyr Val Gly Asp Thr Asp Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
 50 55 60

Arg Phe Thr Ile Ser Lys Ala Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Ile Thr
 65 70 75 80

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

Asp Ser Arg Gly Trp Gly Leu Asn Ile Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val
 100 105 110

Thr Val Ser Leu
 115

<210> 117
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> recombinant scFv - VH sequence

<400> 117

Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
 1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Asn Thr Tyr Tyr
 20 25 30

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

Ile Ile Ala Pro Asp Asp Thr Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Ser
 50 55 60

Arg Ser Thr Ile Thr Arg Asp Thr Asn Glu Asn Thr Val Thr Leu Lys
 65 70 75 80

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

Ser Gly Asp Thr Thr Ala Trp Gly Ala Asp Ile Trp Gly Pro Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Leu
 115

<210> 118

【化 4 2】

<211> 130
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> recombinant scFv - VH sequence
 <400> 118

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Pro Phe Ser Ser Gly
 20 25 30

Tyr Trp Val Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45

Val Ser Cys Ile Tyr Ala Gly Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser
 50 55 60

Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80

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

Tyr Cys Ala Lys Gly Asn Asn Tyr Tyr Ile Tyr Thr Asp Gly Gly Tyr
 100 105 110

Ala Tyr Ala Gly Leu Glu Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 115 120 125

Ser Ser
 130

<210> 119
 <211> 130
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> recombinant scFv - VH sequence
 <400> 119

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Ser Gly
 20 25 30

Tyr Trp Ile Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45

Val Ser Cys Ile Tyr Ala Gly Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser
 50 55 60

【化 4 3】

Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80

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

Tyr Cys Ala Lys Gly Asn Asn Tyr Tyr Ile Tyr Thr Asp Gly Gly Tyr
100 105 110

Ala Tyr Ala Gly Leu Glu Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
115 120 125

10

Ser Ser
130

<210> 120

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> recombinant scFv - VH sequence

<400> 120

20

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Asn Thr Asn
20 25 30

Tyr Trp Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Val Ser Cys Met Tyr Thr Gly Ser Tyr Asn Arg Ala Tyr Tyr Ala Ser
50 55 60

30

Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80

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

Tyr Cys Ala Lys Gly Ser Asn Trp Tyr Ser Asp Leu Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

40

<210> 121

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

【化 4 4】

<220>
 <223> recombinant scFv - VH sequence

<400> 121

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Arg Ser
 20 25 30

Tyr Tyr Ile Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45

Val Ser Cys Ile Asp Ala Gly Ser Ser Gly Ile Leu Val Tyr Ala Asn
 50 55 60

Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80

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

Tyr Cys Ala Lys Gly Asp Ala Ser Tyr Gly Val Asp Ser Phe Met Leu
 100 105 110

Pro Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 122
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> recombinant scFv - VH sequence

<400> 122

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Thr Thr Thr
 20 25 30

Asp Tyr Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45

Val Ser Cys Ile Leu Ala Gly Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asn Trp
 50 55 60

Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu
 65 70 75 80

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

【化 4 5】

Cys Ala Lys Ser Asp Pro Ala Ser Ser Trp Ser Phe Ala Leu Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 123
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

10

<220>
 <223> recombinant scFv - VH sequence

<400> 123

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Asp Phe Ser Gly Ala
 20 25 30

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

20

Val Ser Tyr Ile Asp Tyr Asp Gly Asp Arg Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Lys Ser Asp Tyr Ser Ser Gly Trp Gly Thr Asp Ile Trp Gly Gln
 100 105 110

30

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 124
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> recombinant scFv - VH sequence

<400> 124

40

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr
 20 25 30

【化 4 6】

Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45

Val Ser Phe Ile Asp Pro Asp Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

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

10

Ala Lys Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 125
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

20

<220>
 <223> recombinant scFv - VH sequence

<400> 125

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Tyr Tyr
 20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

30

Ser Ile Ile Gly Pro Gly Asp Tyr Thr Asp Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80

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

Lys Gly Asp Asp Asn Ser Gly Trp Gly Glu Asp Ile Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

40

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 126
 <211> 119

【化 4 7】

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> recombinant scFv - VH sequence

<400> 126

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asp Tyr
 20 25 30

10

Tyr Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Cys Leu Asp Tyr Phe Gly Ser Thr Asp Asp Ala Ser Trp Ala Lys
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80

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

20

Lys Thr Asp Asp Ser Arg Gly Trp Gly Leu Asn Ile Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 127

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> recombinant scFv - VH sequence

<400> 127

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr
 20 25 30

Tyr Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

40

Ser Cys Leu Asp Tyr Val Gly Asp Thr Asp Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80

【化 4 8】

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

Lys Thr Asp Asp Ser Arg Gly Trp Gly Leu Asn Ile Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 128

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> recombinant scFv - VH sequence

<400> 128

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Asn Thr Tyr
 20 25 30

Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ile Ile Ala Pro Asp Asp Thr Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
 50 55 60

Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80

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

Lys Ser Gly Asp Thr Thr Ala Trp Gly Ala Asp Ile Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 129

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> recombinant scFv - VH sequence

<400> 129

Gln Val Gln Leu Val Gln Thr Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

10

20

30

40

【化 4 9】

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr
 20 25 30

Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45

Val Ser Phe Ile Asp Pro Asp Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
 65 70 75 80

10

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

Ala Lys Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 130

20

<211> 130

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> recombinant scFv - VH sequence

<400> 130

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Pro Phe Ser Ser Gly
 20 25 30

30

Tyr Trp Val Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45

Val Gly Cys Ile Tyr Ala Gly Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser
 50 55 60

Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80

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

40

Tyr Cys Ala Arg Gly Asn Asn Tyr Tyr Ile Tyr Thr Asp Gly Gly Tyr
 100 105 110

Ala Tyr Ala Gly Leu Glu Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 115 120 125

【化 5 0】

Ser Ser
130

<210> 131
 <211> 130
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> recombinant scFv - VH sequence

<400> 131

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Ser Gly
 20 25 30

Tyr Trp Ile Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45

Val Gly Cys Ile Tyr Ala Gly Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser
 50 55 60

Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80

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

Tyr Cys Ala Arg Gly Asn Asn Tyr Tyr Ile Tyr Thr Asp Gly Gly Tyr
 100 105 110

Ala Tyr Ala Gly Leu Glu Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 115 120 125

Ser Ser
130

<210> 132
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> recombinant scFv - VH sequence

<400> 132

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Val Ser Gly Phe Ser Leu Asn Thr Asn
 20 25 30

【化 5 1】

Tyr Trp Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45

Val Gly Cys Met Tyr Thr Gly Ser Tyr Asn Arg Ala Tyr Tyr Ala Ser
 50 55 60

Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ser Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80

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

Tyr Cys Ala Lys Gly Ser Asn Trp Tyr Ser Asp Leu Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 133

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> recombinant scFv - VH sequence

<400> 133

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Arg Ser
 20 25 30

Tyr Tyr Ile Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45

Val Gly Cys Ile Asp Ala Gly Ser Ser Gly Ile Leu Val Tyr Ala Asn
 50 55 60

Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80

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

Tyr Cys Ala Arg Gly Asp Ala Ser Tyr Gly Val Asp Ser Phe Met Leu
 100 105 110

Pro Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 134

<211> 121

<212> PRT

【化 5 2】

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> recombinant scFv - VH sequence

<400> 134

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Ser Phe Thr Thr Thr
20 25 30

Asp Tyr Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Val Gly Cys Ile Leu Ala Gly Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asn Trp
50 55 60

Ala Lys Gly Arg Phe Thr Gly Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val
65 70 75 80

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

Cys Ala Arg Ser Asp Pro Ala Ser Ser Trp Ser Phe Ala Leu Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 135

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> recombinant scFv - VH sequence

<400> 135

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Ile Asp Phe Ser Gly Ala
20 25 30

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

Val Gly Tyr Ile Asp Tyr Asp Gly Asp Arg Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

Page 53

40

【化 5 4】

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

10

<210> 138
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

20

<220>
 <223> recombinant scFv - VH sequence
 <400> 138

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

30

40

【化 5 5】

<210> 139
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> recombinant scFv - VH sequence

<400> 139

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr
 20 25 30

Tyr Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Gly Cys Leu Asp Tyr Val Gly Asp Thr Asp Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Ala Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
 65 70 75 80

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

Arg Thr Asp Asp Ser Arg Gly Trp Gly Leu Asn Ile Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 140
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> recombinant scFv - VH sequence

<400> 140

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr
 20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Gly Ile Leu Asp Tyr Val Gly Asp Thr Asp Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Ala Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu

【化 5 6】

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

Arg Thr Asp Asp Ser Arg Gly Trp Gly Leu Asn Ile Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 141

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> recombinant scFv - VH sequence

<400> 141

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Asn Thr Tyr
 20 25 30

Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Gly Ile Ile Ala Pro Asp Asp Thr Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
 50 55 60

Ser Arg Ser Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
 65 70 75 80

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

Arg Ser Gly Asp Thr Thr Ala Trp Gly Ala Asp Ile Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 142

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> recombinant scFv - VH sequence

<400> 142

Gln Val Gln Leu Val Gln Thr Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

10

20

30

40

【化 5 7】

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
 Val Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90
 Ala Gly Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

10

<210> 143
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

20

<220>
 <223> recombinant scFv - VH sequence
 <400> 143

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

30

40

【化 5 8】

115

<210> 144
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> recombinant scFv - VH sequence

<400> 144

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr
 20 25 30

Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45

Val Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Gly Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 145
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> recombinant scFv - VH sequence

<400> 145

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Asn Thr Tyr
 20 25 30

Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Gly Ile Ile Ala Pro Asp Asp Thr Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
 50 55 60

10

20

30

40

【化 5 9】

Ser Arg Ser Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80

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

Arg Ser Gly Asp Thr Thr Ala Trp Gly Ala Asp Ile Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

10

<210> 146
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> recombinant scFv - VH sequence

<400> 146

Gln Val Gln Leu Val Gln Thr Gly Gly Gly Ser Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

20

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr
20 25 30

Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Val Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

30

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

Ala Gly Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 147
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

40

<220>
<223> recombinant scFv - VH sequence

<400> 147

【化 6 0】

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

Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr Tyr
20 25 30

Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala Lys
50 55 60

10

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80

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

Gly Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

20

<210> 148

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> recombinant scFv - VH sequence

<400> 148

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

30

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr
20 25 30

Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Val Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

40

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

Ala Gly Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile Trp Gly Gln
100 105 110

【化 6 1】

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 149
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> recombinant scFv - VH sequence

<400> 149

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr
20 25 30

Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Leu Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Val Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

Ala Gly Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 150
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> recombinant scFv - VH sequence

<400> 150

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr
20 25 30

Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr
35 40 45

【化 6 2】

Val Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Gly Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile Trp Gly Gln
 100 105 110

10

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 151

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> recombinant scFv - VH sequence

<400> 151

20

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr
 20 25 30

Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45

Ile Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala
 50 55 60

30

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Gly Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

40

<210> 152

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

【化 6 3】

<223> recombinant scFv - VH sequence

<400> 152

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr
20 25 30

Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Val Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Ala Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

Ala Gly Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 153

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> recombinant scFv - VH sequence

<400> 153

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr
20 25 30

Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Val Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Ala Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

【化 6 4】

Ala Gly Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 154
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> recombinant scFv - VH sequence

<400> 154

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr
 20 25 30

Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45

Val Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Gly Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 155
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> recombinant scFv - VH sequence

<400> 155

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr
 20 25 30

【化 6 5】

Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45

Val Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
 65 70 75 80

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

Gly Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 156

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> recombinant scFv - VH sequence

<400> 156

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr
 20 25 30

Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45

Val Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Thr Val Tyr Leu
 65 70 75 80

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

Gly Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 157

<211> 120

<212> PRT

【化 6 6】

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> recombinant scFv - VH sequence

<400> 157

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr
20 25 30

Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Val Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

Ala Gly Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 158

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> recombinant scFv - VH sequence

<400> 158

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr
20 25 30

Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Val Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Gly Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> recombinant scFv - VH sequence

<400> 159

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr
20 25 30

20

Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Val Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

30

Ala Gly Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 160

$\langle 211 \rangle$	120
-----------------------	-----

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> recombinant scFv - VH sequence

40

<400> 160

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr

【化 6 8】

20 25 30
 Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
 Val Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Gly Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 161
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> recombinant scFv - VH sequence
 <400> 161
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
 Val Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Gly Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

10

20

30

40

【化 6 9】

<210> 162
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> recombinant scFv - yH sequence

<400> 162

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr
 20 25 30

Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45

Val Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Gly Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 163
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> recombinant scFv - VH sequence

<400> 163

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr
 20 25 30

Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45

Val Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 Page 69

10

20

30

40

10

20

30

40

Page 70

【化 7 1】

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr
 20 25 30

Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45

Val Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

10

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

Ala Gly Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 166

20

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> recombinant scFv - VH sequence

<400> 166

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr
 20 25 30

30

Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45

Val Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

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

40

Ala Gly Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

【化 7 2】

115 120

<210> 167
 <211> 381
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> recombinant scFv - VL acceptor sequence

<220>
 <221> CDR
 <222> (24)..(123)
 <223> At least 3 and up to 50 amino acids can be present

<220>
 <221> CDR
 <222> (139)..(238)
 <223> At least 3 and up to 50 amino acids can be present

<220>
 <221> CDR
 <222> (271)..(370)
 <223> At least 3 and up to 50 amino acids can be present

<400> 167

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

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 20 25 30

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 35 40 45

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 50 55 60

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 65 70 75 80

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 85 90 95

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 100 105 110

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Tyr Gln Gln Lys
 115 120 125

Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 130 135 140

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 145 150 155 160

【化 7 3】

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 165 170 175
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 180 185 190
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 195 200 205
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 210 215 220
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Val
 225 230 235 240
 Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr
 245 250 255
 Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Xaa Xaa
 260 265 270
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 275 280 285
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 290 295 300
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 305 310 315 320
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 325 330 335
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 340 345 350
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 355 360 365
 Xaa Xaa Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 370 375 380

10

20

30

<210> 168
 <211> 381
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

40

<220>
 <223> recombinant scFv - VL acceptor sequence

<220>
 <221> CDR
 <222> (24)..(123)
 <223> At least 3 and up to 50 amino acids can be present

【化 7 4】

<220>
 <221> CDR
 <222> (139)..(238)
 <223> At least 3 and up to 50 amino acids can be present

<220>
 <221> CDR
 <222> (271)..(370)
 <223> At least 3 and up to 50 amino acids can be present

<400> 168

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

10

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 20 25 30

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 35 40 45

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 50 55 60

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 65 70 75 80

20

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 85 90 95

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 100 105 110

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Tyr Gln Gln Lys
 115 120 125

Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 130 135 140

30

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 145 150 155 160

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 165 170 175

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 180 185 190

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 195 200 205

40

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 210 215 220

【化 7 5】

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Val
225 230 235 240
Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr
245 250 255
Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Xaa Xaa
260 265 270
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
275 280 285
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
290 295 300
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
305 310 315 320
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
325 330 335
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
340 345 350
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
355 360 365
Xaa Xaa Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
370 375 380
<210> 169
<211> 382
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> recombinant scFv - VH acceptor sequence
<220>
<221> CDR
<222> (26)..(125)
<223> At least 3 and up to 50 amino acids can be present.
<220>
<221> CDR
<222> (140)..(239)
<223> At least 3 and up to 50 amino acids can be present.
<220>
<221> CDR
<222> (272)..(371)
<223> At least 3 and up to 50 amino acids can be present.
<400> 169
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

10

20

30

40

【化 7 6】

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 20 25 30
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 35 40 45
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 50 55 60
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 65 70 75 80
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 85 90 95
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 100 105 110
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Val Arg
 115 120 125
 Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 130 135 140
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 145 150 155 160
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 165 170 175
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 180 185 190
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 195 200 205
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 210 215 220
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg
 225 230 235 240
 Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met
 245 250 255
 Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Xaa
 260 265 270
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 275 280 285

10

20

30

40

【化 7 7】

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 290 295 300

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 305 310 315 320

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 325 330 335

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 340 345 350

10

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 355 360 365

Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 370 375 380

<210> 170
 <211> 381
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

20

<220>
 <223> recombinant scFv - VH acceptor sequence

<220>
 <221> CDR
 <222> (26)..(125)
 <223> At least 3 and up to 50 amino acids can be present.

<220>
 <221> CDR
 <222> (140)..(239)
 <223> At least 3 and up to 50 amino acids can be present.

<220>
 <221> CDR
 <222> (272)..(371)
 <223> At least 3 and up to 50 amino acids can be present.

30

<400> 170

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 20 25 30

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 35 40 45

40

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 50 55 60

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 65 70 75 80

【化 7 8】

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
85 90 95

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
100 105 110

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Val Arg
115 120 125

Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
130 135 140

10

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
145 150 155 160

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
165 170 175

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
180 185 190

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
195 200 205

20

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
210 215 220

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
225 230 235 240

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met
245 250 255

Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa
260 265 270

30

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
275 280 285

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
290 295 300

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
305 310 315 320

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
325 330 335

40

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
340 345 350

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa ...

355 360 365

Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
370 375 380

<210>	171
<211>	382
<212>	PRT
<213>	Artificial Sequence

<220>
<223> recombinant scFv - VH acceptor sequence

<220>
<221> CDR
<222> (26)..(125)
<223> At least 3 and up to 50 amino acids can be present.

<220>
<221> CDR
<222> (140)..(239)
<223> At least 3 and up to 50 amino acids can be present.

<220>
<221> CDR
<222> (272)..(371)
<223> At least 3 and up to 50 amino acids can be present.

<400> 171

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Val Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
50 55 60

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
65 70 75 80

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
85 90 95

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Val Arg
115 120 125

Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
130 135 140

【化 8 0】

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
145 150 155 160

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
165 170 175

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
180 185 190

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
195 200 205

10

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
210 215 220

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg
225 230 235 240

Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met
245 250 255

Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa
260 265 270

20

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
275 280 285

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
290 295 300

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
305 310 315 320

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
325 330 335

30

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
340 345 350

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
355 360 365

Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
370 375 380

<210> 172
<211> 783
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> recombinant scFv - acceptor sequence

40

【化 8 1】

<220>
 <221> CDR
 <222> (24)..(123)
 <223> At least 3 and up to 50 amino acids can be present.

<220>
 <221> CDR
 <222> (139)..(238)
 <223> At least 3 and up to 50 amino acids can be present.

<220>
 <221> CDR
 <222> (271)..(370)
 <223> At least 3 and up to 50 amino acids can be present.

10

<220>
 <221> CDR
 <222> (427)..(526)
 <223> At least 3 and up to 50 amino acids can be present.

<220>
 <221> CDR
 <222> (541)..(640)
 <223> At least 3 and up to 50 amino acids can be present.

<220>
 <221> CDR
 <222> (673)..(772)
 <223> At least 3 and up to 50 amino acids can be present.

20

<400> 172

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

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 20 25 30

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 35 40 45

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 50 55 60

30

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 65 70 75 80

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 85 90 95

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 100 105 110

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Tyr Gln Gln Lys
 115 120 125

40

Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 130 135 140

【化 8 2】

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 145 150 155 160

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 165 170 175

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 180 185 190

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 195 200 205

10

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 210 215 220

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Val
 225 230 235 240

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr
 245 250 255

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Xaa Xaa
 260 265 270

20

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 275 280 285

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 290 295 300

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 305 310 315 320

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 325 330 335

30

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 340 345 350

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 355 360 365

Xaa Xaa Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly
 370 375 380

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 385 390 395 400

40

Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 405 410 415

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 Page 82

【化 8 3】

420 425 430
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 435 440 445
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 450 455 460
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 465 470 475 480
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 485 490 495
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 500 505 510
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Val
 515 520 525
 Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Xaa Xaa Xaa Xaa
 530 535 540
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 545 550 555 560
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 565 570 575
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 580 585 590
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 595 600 605
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 610 615 620
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 625 630 635 640
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
 645 650 655
 Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys
 660 665 670
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 675 680 685
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 690 695 700

10

20

30

40

【化 8 4】

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 705 710 715 720

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 725 730 735

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 740 745 750

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 755 760 765

10

Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 770 775 780

<210> 173
 <211> 783
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> recombinant scFv - acceptor sequence

20

<220>
 <221> CDR
 <222> (24)..(123)
 <223> At least 3 and up to 50 amino acids can be present.

<220>
 <221> CDR
 <222> (139)..(238)
 <223> At least 3 and up to 50 amino acids can be present.

<220>
 <221> CDR
 <222> (271)..(370)
 <223> At least 3 and up to 50 amino acids can be present.

30

<220>
 <221> CDR
 <222> (427)..(526)
 <223> At least 3 and up to 50 amino acids can be present.

<220>
 <221> CDR
 <222> (541)..(640)
 <223> At least 3 and up to 50 amino acids can be present.

<220>
 <221> CDR
 <222> (673)..(772)
 <223> At least 3 and up to 50 amino acids can be present.

<400> 173

40

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

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 20 25 30

【化 8 5】

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 35 40 45

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 50 55 60

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 65 70 75 80

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 85 90 95

10

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 100 105 110

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Tyr Gln Gln Lys
 115 120 125

Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 130 135 140

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 145 150 155 160

20

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 165 170 175

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 180 185 190

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 195 200 205

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 210 215 220

30

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Val
 225 230 235 240

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr
 245 250 255

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Xaa Xaa
 260 265 270

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 275 280 285

40

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 290 295 300

【化 8 6】

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 305 310 315 320

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 325 330 335

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 340 345 350

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 355 360 365

Xaa Xaa Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly
 370 375 380

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 385 390 395 400

Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 405 410 415

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 420 425 430

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 435 440 445

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 450 455 460

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 465 470 475 480

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 485 490 495

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 500 505 510

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Val
 515 520 525

Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Xaa Xaa Xaa Xaa
 530 535 540

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 545 550 555 560

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 565 570 575

10

20

30

40

【化 8 7】

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
580 585 590

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
595 600 605

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
610 615 620

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
625 630 635 640

10

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
645 650 655

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
660 665 670

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
675 680 685

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
690 695 700

20

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
705 710 715 720

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
725 730 735

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
740 745 750

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
755 760 765

30

Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
770 775 780

<210> 174

<211> 783

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> recombinant scFv - acceptor sequence

40

<220>

<221> CDR

<222> (24)..(123)

<223> At least 3 and up to 50 amino acids can be present.

<220>

<221> CDR

<222> (139)..(238)

【化 8 8】

<223> At least 3 and up to 50 amino acids can be present.

<220>

<221> CDR

<222> (271)..(370)

<223> At least 3 and up to 50 amino acids can be present.

<220>

<221> CDR

<222> (427)..(526)

<223> At least 3 and up to 50 amino acids can be present.

<220>

<221> CDR

<222> (541)..(640)

<223> At least 3 and up to 50 amino acids can be present.

<220>

<221> CDR

<222> (673)..(772)

<223> At least 3 and up to 50 amino acids can be present.

<400> 174

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

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 20 25 30

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 35 40 45

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 50 55 60

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 65 70 75 80

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 85 90 95

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 100 105 110

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Tyr Gln Gln Lys
 115 120 125

Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 130 135 140

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 145 150 155 160

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 165 170 175

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

【化 8 9】

180 185 190
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 195 200 205
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 210 215 220
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Val
 225 230 235 240
 Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr
 245 250 255
 Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Xaa Xaa
 260 265 270
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 275 280 285
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 290 295 300
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 305 310 315 320
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 325 330 335
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 340 345 350
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 355 360 365
 Xaa Xaa Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly
 370 375 380
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 385 390 395 400
 Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 405 410 415
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Val Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 420 425 430
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 435 440 445
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 450 455 460

10

20

30

40

【化 9 0】

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
465 470 475 480

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
485 490 495

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
500 505 510

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Val
515 520 525

10

Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Xaa Xaa Xaa Xaa
530 535 540

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
545 550 555 560

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
565 570 575

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
580 585 590

20

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
595 600 605

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
610 615 620

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
625 630 635 640

Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
645 650 655

30

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
660 665 670

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
675 680 685

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
690 695 700

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
705 710 715 720

40

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
725 730 735

【化 9 1】

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 740 745 750

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 755 760 765

Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 770 775 780

<210> 175
 <211> 248
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

10

<220>
 <223> recombinant scFv

<400> 175

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

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser
 20 25 30

20

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

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

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

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Phe Ala Thr Ser Asp Thr
 85 90 95

30

Val Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly
 100 105 110

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 115 120 125

Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 130 135 140

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Ser Leu Asn Thr
 145 150 155 160

40

Asn Tyr Trp Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 165 170 175

Trp Val Gly Cys Met Tyr Thr Gly Ser Tyr Asn Arg Ala Tyr Tyr Ala
 180 185 190

【化 9 2】

Ser Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ser Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn
195 200 205

Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
210 215 220

Tyr Tyr Cys Ala Lys Gly Ser Asn Trp Tyr Ser Asp Leu Trp Gly Gln
225 230 235 240

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
245

10

<210> 176
<211> 251
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> recombinant scFv

<400> 176

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

20

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Asn Ile Trp
20 25 30

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

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

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

30

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ala Asn Tyr Ala Tyr Ser Ala
85 90 95

Gly Tyr Gly Ala Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
130 135 140

40

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser
145 150 155 160

Leu Asn Thr Tyr Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
Page 92

【化 9 3】

165 170 175
 Leu Glu Trp Val Gly Ile Ile Ala Pro Asp Asp Thr Thr Tyr Tyr Ala
 180 185 190
 Ser Trp Ala Lys Ser Arg Ser Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn
 195 200 205
 Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 210 215 220
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Asp Thr Thr Ala Trp Gly Ala Asp Ile
 225 230 235 240
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 245 250

<210> 177
 <211> 250
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> recombinant scFv
 <400> 177

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

【化 9 4】

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu
145 150 155 160

Ser Asp Tyr Tyr Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
165 170 175

Glu Trp Val Ser Cys Leu Asp Tyr Phe Gly Ser Thr Asp Asp Ala Ser
180 185 190

Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
195 200 205

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
210 215 220

Tyr Cys Ala Lys Thr Asp Asp Ser Arg Gly Trp Gly Leu Asn Ile Trp
225 230 235 240

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
245 250

<210> 178

<211> 251

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> recombinant scFv

<400> 178

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

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Ile Ile His Ser Trp
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Val Tyr Leu Ala Ser Thr
85 90 95

Asn Gly Ala Asn Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
115 120 125

【化 9 5】

Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 130 135 140
 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu
 145 150 155
 Thr Asp Tyr Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
 165 170 175
 Leu Glu Trp Val Ser Phe Ile Asp Pro Asp Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala
 180 185 190
 Thr Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
 195 200 205
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 210 215 220
 Tyr Tyr Cys Ala Lys Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile
 225 230 235 240
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 245 250
 <210> 179
 <211> 251
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> recombinant scFv
 <400> 179
 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Ile Ile His Ser Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Val Tyr Leu Ala Ser Thr
 85 90 95
 Asn Gly Ala Asn Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly
 100 105 110

10

20

30

40

【化 9 6】

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 115 120 125

Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 130 135 140

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu
 145 150 155 160

Thr Asp Tyr Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
 165 170 175

10

Leu Glu Trp Val Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala
 180 185 190

Thr Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn
 195 200 205

Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 210 215 220

Tyr Tyr Cys Ala Gly Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile
 225 230 235 240

20

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 245 250

<210> 180
 <211> 251
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> recombinant scFv

<400> 180

30

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

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Ile Ile His Ser Trp
 20 25 30

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

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

40

Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Val Tyr Leu Ala Ser Thr
 Page 96

【化 9 7】

85 90 95
 Asn Gly Ala Asn Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly
 100 105 110
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 115 120 125
 Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 130 135 140
 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu
 145 150 155 160
 Thr Asp Tyr Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
 165 170 175
 Leu Glu Trp Val Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala
 180 185 190
 Thr Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn
 195 200 205
 Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 210 215 220
 Tyr Tyr Cys Ala Gly Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile
 225 230 235 240
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 245 250

10

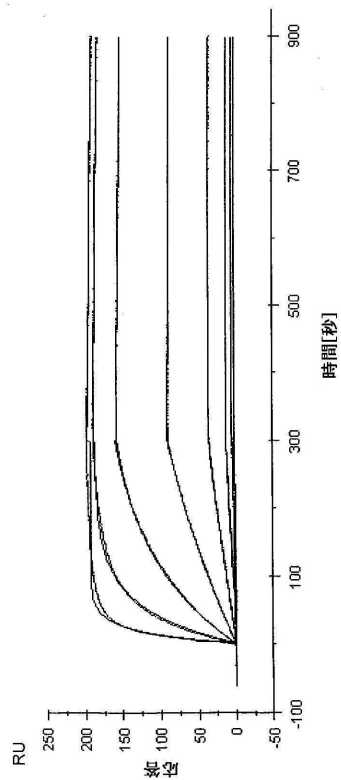
20

30

40

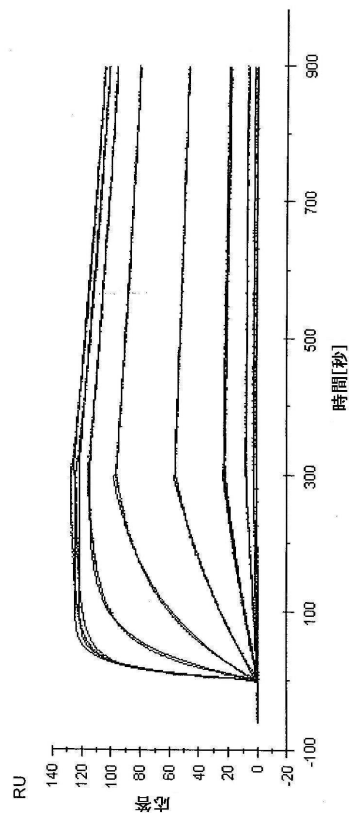
【図 1 a】

Fig. 1a



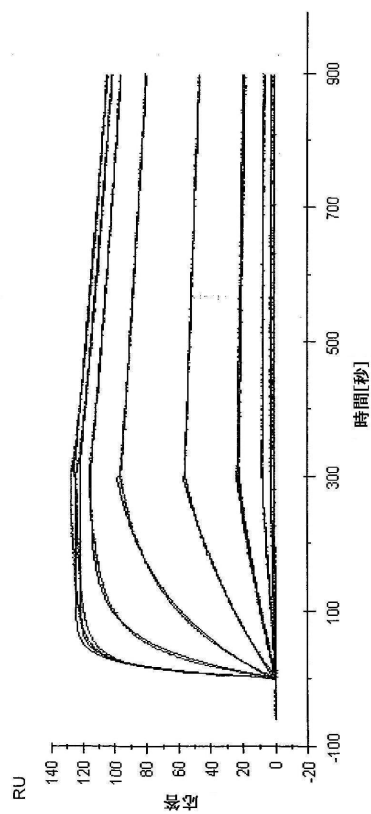
【図 1 b】

Fig. 1b



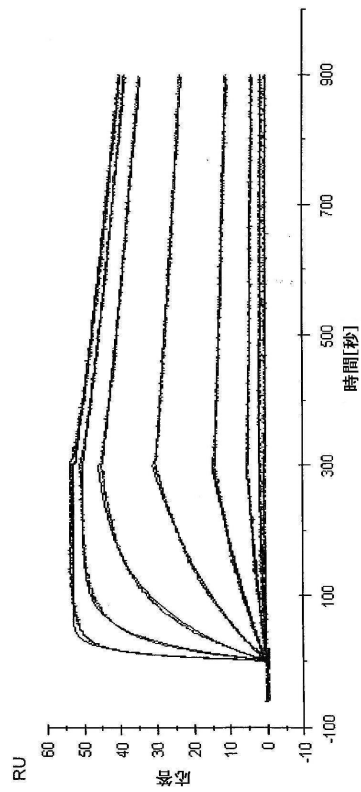
【図 2 a】

Fig. 2a



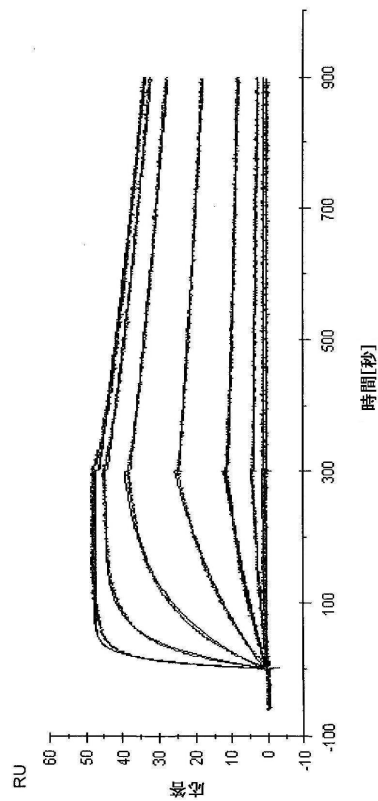
【図 2 b】

Fig. 2b



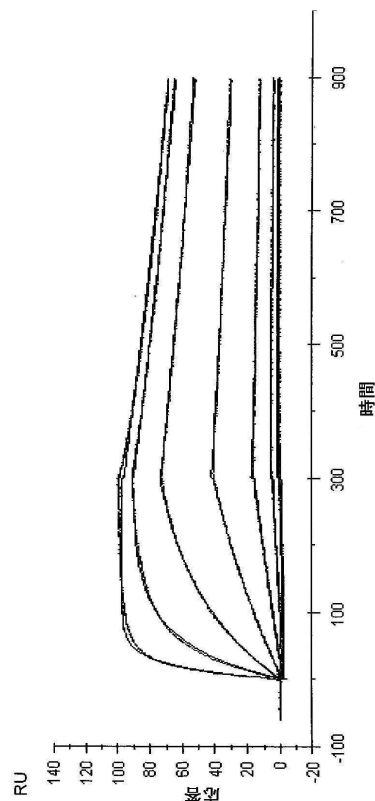
【図 2 c】

Fig. 2c



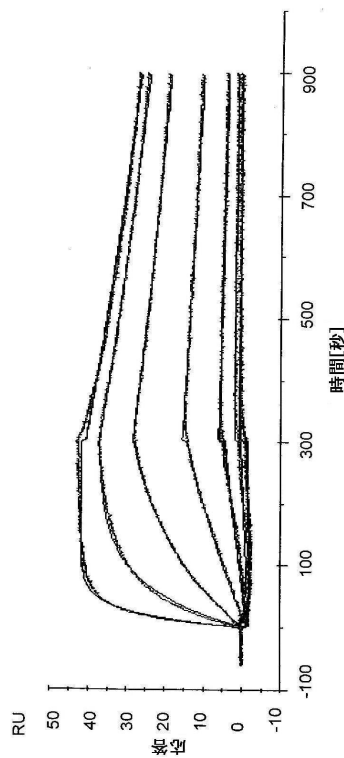
【図 3 a】

Fig. 3a



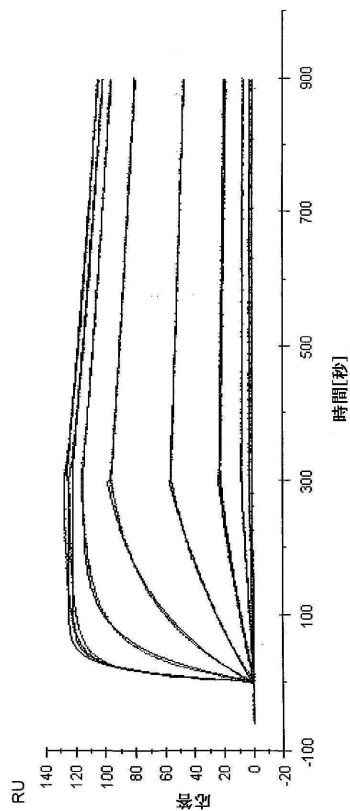
【図 3 b】

Fig. 3b

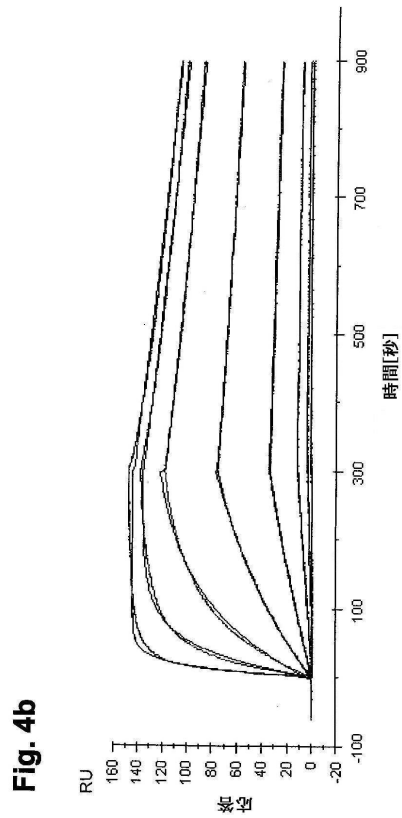


【図 4 a】

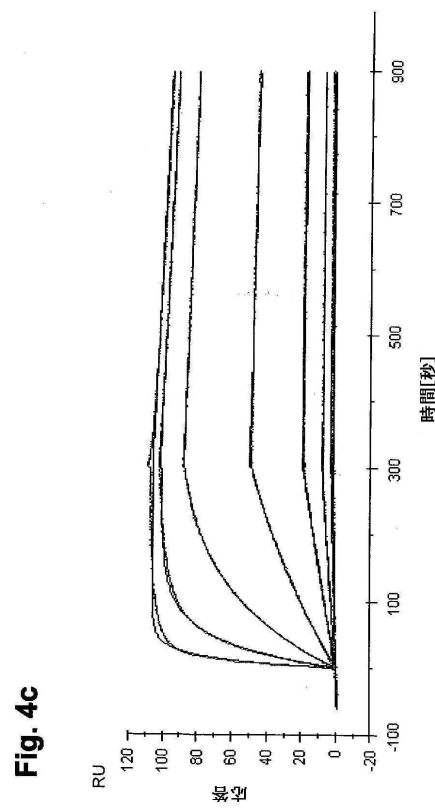
Fig. 4a



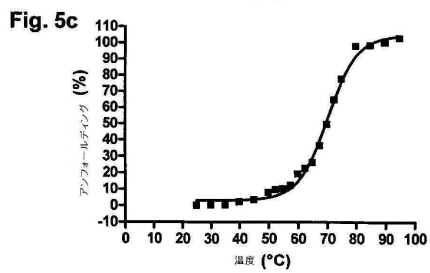
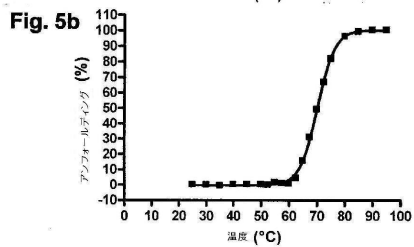
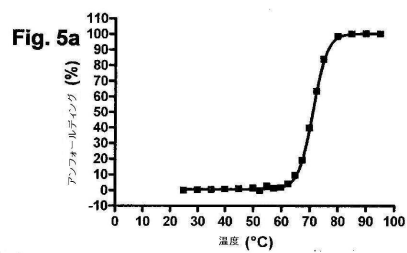
【図 4 b】



【図 4 c】



【図 5】



【図 6 - 1】

Fig. 6a

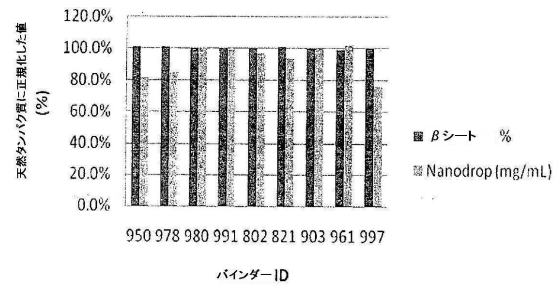
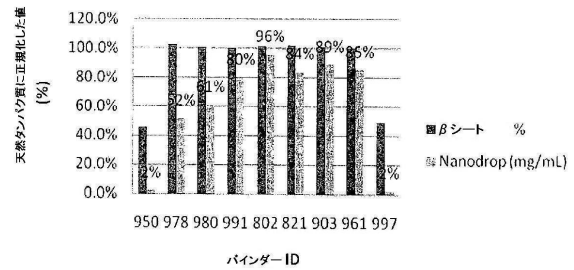
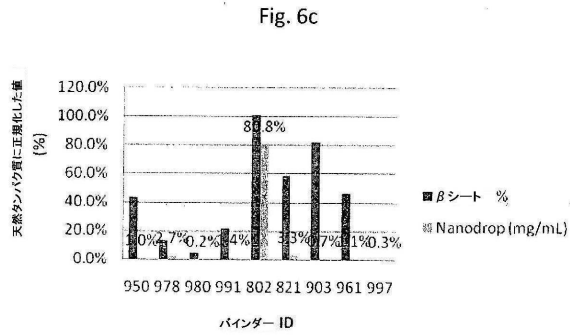


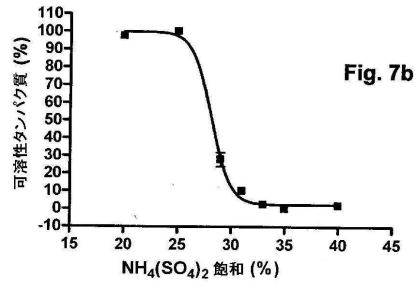
Fig. 6b



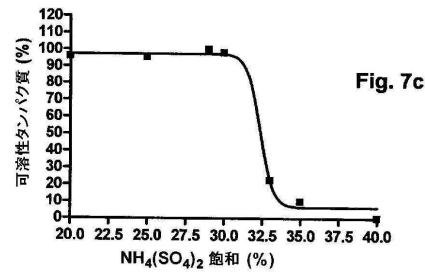
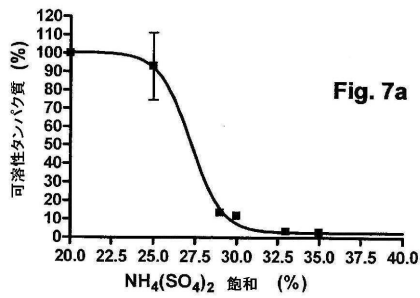
【図 6 - 2】



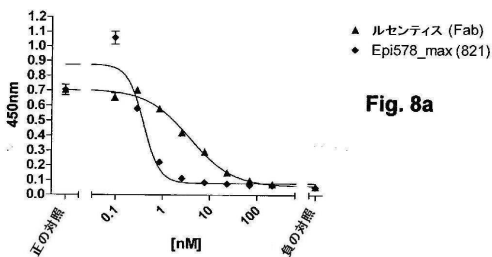
【図 7 - 2】



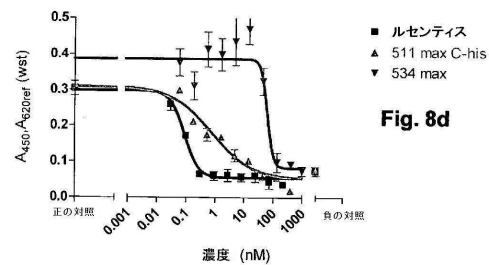
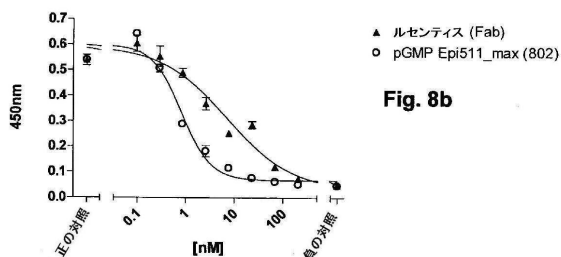
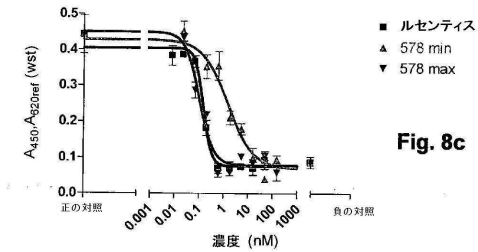
【図 7 - 1】



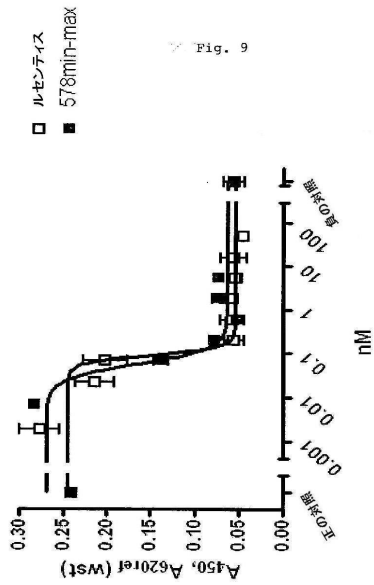
【図 8 - 1】



【図 8 - 2】



【図 9】



【図 10】

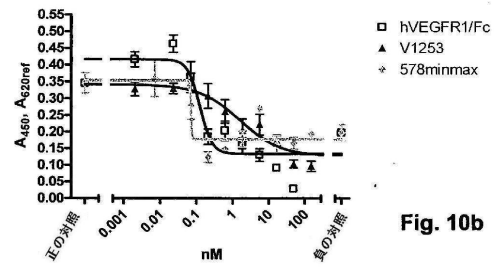
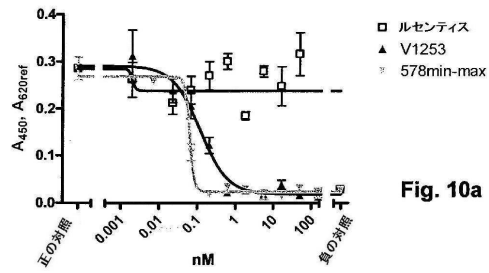


Fig. 10

【図 11】

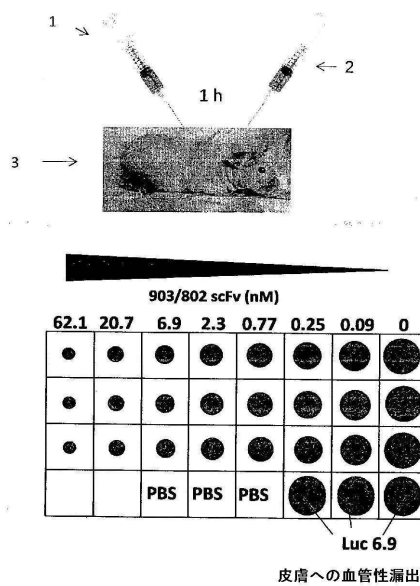
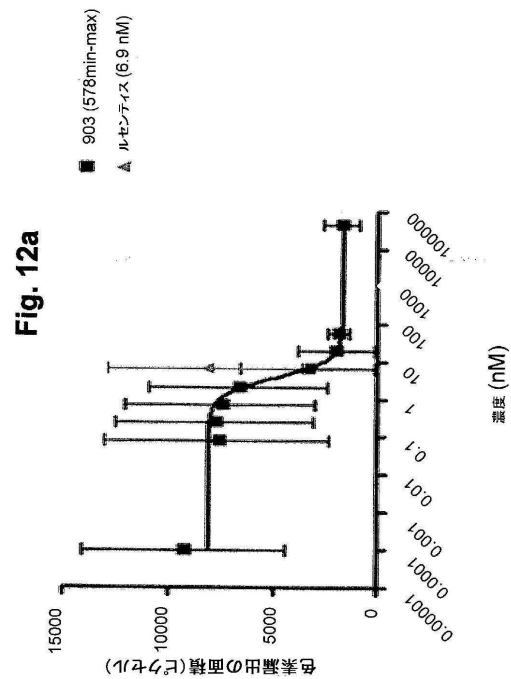
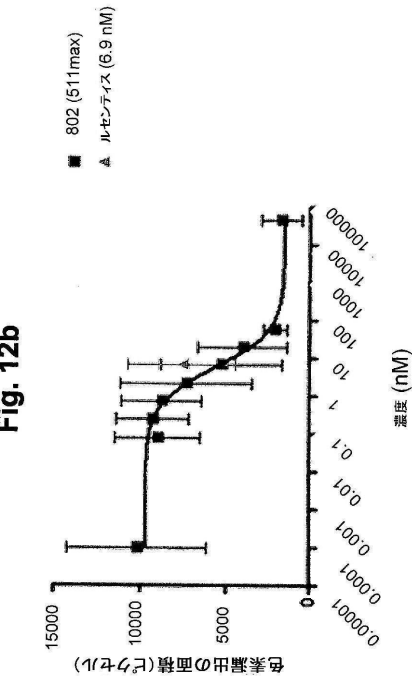


Fig. 11

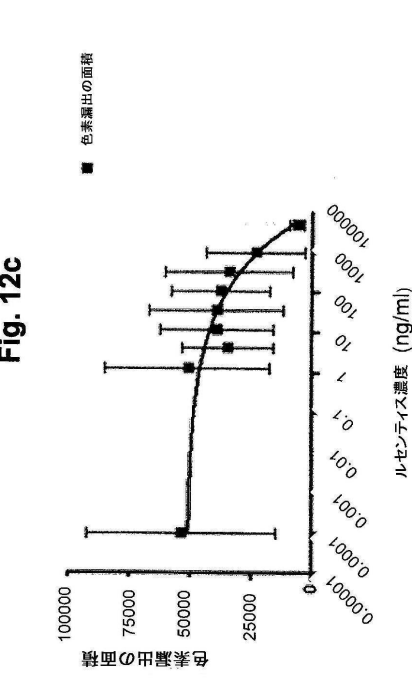
【図 12 a】



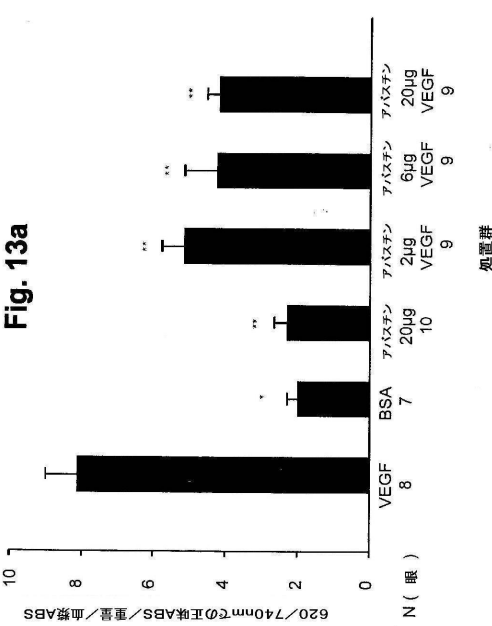
【図 1 2 b】



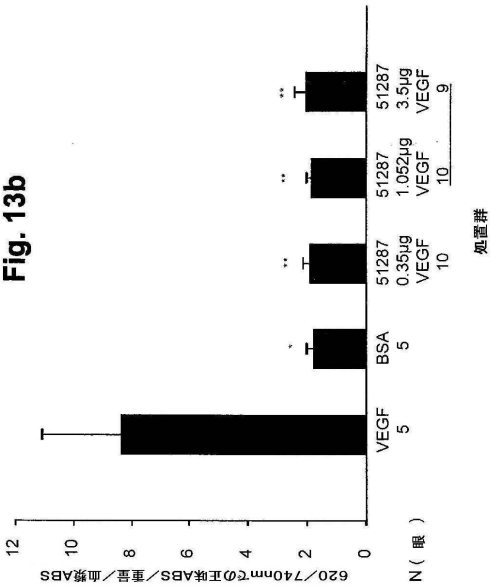
【図 1 2 c】



【図 1 3 a】



【図 1 3 b】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N 5/10
C 0 7 K	16/46	(2006.01)	C 0 7 K 16/46
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K 39/395 N
A 6 1 P	9/10	(2006.01)	A 6 1 P 9/10 1 0 1
A 6 1 P	17/06	(2006.01)	A 6 1 P 17/06
A 6 1 P	27/02	(2006.01)	A 6 1 P 27/02
A 6 1 P	27/06	(2006.01)	A 6 1 P 27/06
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P 29/00 1 0 1
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 P 21/08

(31)優先権主張番号 61/133,212

(32)優先日 平成20年6月25日(2008.6.25)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 61/155,041

(32)優先日 平成21年2月24日(2009.2.24)

(33)優先権主張国 米国(US)

前置審査

(72)発明者 ティー ガンデ

スイス国 ツェーハー 8 0 0 5, チューリッヒ, オットーシュトラッセ 1 5

審査官 名和 大輔

(56)参考文献 特表2007-520991(JP, A)

特表2003-527334(JP, A)

特表2008-518619(JP, A)

J. Cancer Res. Clin. Oncol., 1998, 124(11), pp.615-620

Biochem. Biophys. Res. Commun., 2001, 281(2), pp.562-568

Angle Orthod., 2005, 75(5), pp.797-804

J. Biol. Chem., 2000, 275(46), pp.36073-36078

J. Biol. Chem., 2000, 275(18), pp.13668-13676

Am. J. Clin. Pathol., 2005, 124(2), pp.295-302

J. Vet. Diagn. Invest., 2005, 17(4), pp.346-350

J. Biol. Chem., 2006, 281(10), pp.6625-6631

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 5 /

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / M E D L I N E / B I O S I S / W P I D S (S T N)