

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4686634号  
(P4686634)

(45) 発行日 平成23年5月25日(2011.5.25)

(24) 登録日 平成23年2月18日(2011.2.18)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N 15/09	(2006.01)	C 12 N 15/00	Z N A A
C 07 K 16/22	(2006.01)	C 07 K 16/22	
C 12 P 21/08	(2006.01)	C 12 P 21/08	

請求項の数 4 (全 92 頁)

(21) 出願番号	特願2009-513295 (P2009-513295)
(86) (22) 出願日	平成19年6月1日 (2007.6.1)
(65) 公表番号	特表2009-539347 (P2009-539347A)
(43) 公表日	平成21年11月19日 (2009.11.19)
(86) 國際出願番号	PCT/US2007/012939
(87) 國際公開番号	W02007/143090
(87) 國際公開日	平成19年12月13日 (2007.12.13)
審査請求日	平成22年5月28日 (2010.5.28)
(31) 優先権主張番号	60/810,714
(32) 優先日	平成18年6月2日 (2006.6.2)
(33) 優先権主張国	米国(US)
(31) 優先権主張番号	60/860,509
(32) 優先日	平成18年11月21日 (2006.11.21)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	506070224 アペオ ファーマシューティカルズ、 インコーポレイテッド アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02139, ケンブリッジ, シドニー ストリート 75, 4ティーエイチ フロー
(73) 特許権者	ゾーマ テクノロジー リミテッド アメリカ合衆国 カリフォルニア 94710, パークレー, セブンス ストリート 2910
(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策

早期審査対象出願

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】肝細胞成長因子(HGF)結合蛋白質

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

配列番号199のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域、および、配列番号189のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域を含む、ヒト肝細胞成長因子(HGF)に結合する単離された抗体、または、該抗体の抗原結合フラグメント。

## 【請求項2】

配列番号201のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖配列、および、配列番号191のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖配列を含む、ヒト肝細胞成長因子(HGF)に結合する単離された抗体、または、該抗体の抗原結合フラグメント。

## 【請求項3】

モノクローナル抗体である、請求項1に記載の抗体。

10

## 【請求項4】

モノクローナル抗体である、請求項2に記載の抗体。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

関連する出願

本願は、2006年6月2日に出願された米国仮特許出願第60/810,714号、および2006年11月21日に出願された同第60/860,509号の利益およびそれらへの優先権を主張するものであり、それらの開示は本明細書中に参考として援用され

20

る。

#### 【0002】

##### 発明の分野

本発明の分野は、分子生物学、免疫学及び腫瘍学の分野である。より詳細には、この分野は、ヒト肝細胞成長因子（HGF）に結合する抗体系結合蛋白質の分野である。

#### 【背景技術】

#### 【0003】

##### 背景

分散因子（SF : Scatter Factor）とも呼ばれる肝細胞成長因子（HGF : Hepatocyte Growth Factor）は、主として間葉細胞により産生される多機能性ヘテロ二量体蛋白質であり、Metチロシンキナーゼ受容体を発現する細胞のエフェクタである（非特許文献1、非特許文献2）。ヒトMet受容体は「c-Met」とも呼ばれる。成熟HGFは2本のポリペプチド鎖、L鎖及びH鎖を含有している。公表された研究によれば、HGFのc-Met受容体結合ドメインを含有するのはL鎖であることが示唆されている。10

#### 【0004】

HGFは、その同族受容体に結合すると、多くの細胞活動を媒介する。HGF-Metシグナル伝達経路は、肝臓の再生、創傷治癒、神経再生、血管形成及び悪性腫瘍に関係している。例えば、非特許文献3、非特許文献4並びに特許文献1及び特許文献2を参照されたい。HGF活性が関係する各種の疾患、例えば、特定のHGF反応性癌、を治療するために、抗体を含む多くのHGF調節剤が研究者らにより開発してきた。例えば、特許文献3を参照されたい。20

#### 【0005】

全ての抗体に共通する基本的構造を図1に模式的に示した。抗体は4本のポリペプチド鎖を含有する多量体蛋白質である。これらのポリペプチド鎖のうちの2本は重鎖又はH鎖と呼ばれ、他の2本は軽鎖又はL鎖と呼ばれている。これら免疫グロブリン重鎖及び軽鎖は、鎖間ジスルフィド結合によって連結されている。免疫グロブリン重鎖同士も多くの鎖間ジスルフィド結合により連結されている。軽鎖が1箇所の可変領域（図1中のV<sub>L</sub>）と1箇所の定常領域（図1中のC<sub>L</sub>）とで構成されるのに対して、重鎖は1箇所の可変領域（図1中のV<sub>H</sub>）と少なくとも3箇所の定常領域（図1中のC<sub>H</sub><sub>1</sub>、C<sub>H</sub><sub>2</sub>及びC<sub>H</sub><sub>3</sub>）とで構成される。可変領域は抗体の特異性を決定し、定常領域は他の機能を有する。30

#### 【0006】

アミノ酸及び構造上の情報から、各可変領域は4箇所の比較的保存されたフレームワーク領域又はFRに隣接して存在する3箇所の超可変領域（相補性決定領域又はCDR（complementarity determining region）とも呼ばれる）を含むことが分かっている。CDR<sub>1</sub>、CDR<sub>2</sub>及びCDR<sub>3</sub>と称されるこれら3箇所のCDRは個々の抗体の結合特異性に関与している。抗体を診断剤及び治療剤として使用する場合には、通常、その標的分子に対して最も高い結合特異性及び親和性を有する抗体を作製することが望ましい。可変領域間の相違は、抗体の特異性及び親和性に対して大きな影響を与えると考えられている。40

#### 【0007】

特許文献4には、カポジ肉腫の治療における抗HGF抗体の使用について開示されている。同じように、特許文献5には、治療対象の患者に抗HGF抗体を投与して腫瘍における内因性HGFの血管形成促進能を妨げることによる腫瘍の治療について開示されている。最近になって、研究者らにより、HGFのL鎖に結合する抗体がHGF依存性腫瘍の患者に対して治療剤となる可能性を有するとの提案がなされている（非特許文献4）。

#### 【先行技術文献】

#### 【特許文献】

#### 【0008】

#### 【特許文献1】米国特許第5,997,868号明細書

【特許文献2】米国特許第5,707,624号明細書

【特許文献3】国際公開第2005/017107号パンフレット

【特許文献4】米国特許第5,707,624号明細書

【特許文献5】米国特許第5,997,868号明細書

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】Bottaro et al. (1991年) SCIENCE 251: p. 802-804

【非特許文献2】Rubin et al. (1993年) BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA 1155: p. 357-371

10

【非特許文献3】Cao et al. (2001年) PROC. NATL. ACAD. SCI. USA 98: p. 7443-7448

【非特許文献4】Burgess et al. (2006年) CANCER RES. 66: p. 1721-1729

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

それでもなお、治療剤及び診断剤として使用できるHGF調節剤がさらに求められている。

【課題を解決するための手段】

20

【0011】

発明の要旨

本発明の一部は、HGF、特にヒトHGFを特異的に結合する一群の結合蛋白質の発見に基づいている。これらの結合蛋白質は、HGFを特異的に結合する一群の抗体のCDRに基づく抗原（即ち、HGF）結合部位を含有する限りにおいて、抗体系である。このCDRは結合蛋白質のHGFに対する結合特異性をもたらす。こうした結合蛋白質は診断剤及び治療剤として使用することができる。治療剤として用いる場合、結合蛋白質は、レシピエント（例えば、ヒト）に投与した時にこの結合蛋白質に対する免疫反応を誘発するリスクを低減又は排除できるように設計（例えば、ヒト化）する。

結合蛋白質は、HGF活性を中和するので、治療剤として用いることができる。一部の実施態様として、この結合蛋白質は、HGFがその同族受容体c-Metに結合するのを妨げることによってHGF活性を中和する。別の実施態様として、この結合蛋白質は、HGFに結合してその生物活性を中和するが、HGFがc-Met受容体に結合するのを妨げない。HGFが癌細胞の成長及び増殖に関与しているので、この結合蛋白質は癌細胞の増殖を抑制するのに用いることができる。さらに、この結合蛋白質は、哺乳動物に投与すると、その哺乳動物における腫瘍の成長を抑制又は低減することができる。

30

【0012】

本発明は、例えば、以下の項目を提供する。

（項目1）

ヒト肝細胞成長因子（HGF）に結合する単離結合蛋白質であって、

40

（a）構造CDRL<sub>1</sub>-CDRL<sub>2</sub>-CDRL<sub>3</sub>を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域であって、

（i）CDRL<sub>1</sub>が配列番号18(2B8)のアミノ酸配列を含み、

（ii）CDRL<sub>2</sub>が配列番号206(LRMRL2B8LC)のアミノ酸配列を含み、及び

（iii）CDRL<sub>3</sub>が配列番号20(2B8)のアミノ酸配列を含むものとする免疫グロブリン軽鎖可変領域、並びに

（b）免疫グロブリン重鎖可変領域

を含み、該免疫グロブリン軽鎖可変領域及び該免疫グロブリン重鎖可変領域が共同してヒトHGFに結合するための单一結合部位を規定するものとする結合蛋白質。

50

## (項目 2 )

C D R<sub>L1</sub>、C D R<sub>L2</sub>及びC D R<sub>L3</sub>がヒト又はヒト化免疫グロブリンのフレームワーク領域間に挿入されている項目 1 の結合蛋白質。

## (項目 3 )

前記結合蛋白質が抗体又はその抗原結合断片である項目 1 又は 2 の結合蛋白質。

## (項目 4 )

配列番号 193 ( L R 2 B 8 L C 軽鎖可変領域) 又は配列番号 199 ( L R M R 2 B 8 L C 軽鎖可変領域) の免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む項目 1 乃至 3 のいずれか 1 項の単離結合蛋白質。

## (項目 5 )

配列番号 197 ( L R 2 B 8 L C + カッパ定常 ( k m ( 3 ) アロタイプ) ( 対立遺伝子 1 ) ) 又は配列番号 201 ( L R M R 2 B 8 L C + カッパ定常 ( k m ( 3 ) アロタイプ) ( 対立遺伝子 1 ) ) の免疫グロブリン軽鎖配列を含む項目 4 の単離結合蛋白質。

10

## (項目 6 )

ヒト肝細胞成長因子 ( H G F ) に結合する単離結合蛋白質であって、

( a ) 構造 C D R<sub>H1</sub> - C D R<sub>H2</sub> - C D R<sub>H3</sub> を含む免疫グロブリン重鎖可変領域であって、

( i ) C D R<sub>H1</sub> が配列番号 15 ( 2 B 8 ) のアミノ酸配列を含み、

( i i ) C D R<sub>H2</sub> が配列番号 204 ( L R 2 B 8 H C ) 及び配列番号 205 ( L R M R 2 B 8 H C ) からなる群から選ばれる配列を含み、及び

20

( i i i ) C D R<sub>H3</sub> が配列番号 17 ( 2 B 8 ) のアミノ酸配列を含むものとする免疫グロブリン重鎖可変領域、並びに

( b ) 免疫グロブリン軽鎖可変領域

を含み、該免疫グロブリン重鎖可変領域及び該免疫グロブリン軽鎖可変領域が共同してヒト H G F に結合するための单一結合部位を規定するものとする結合蛋白質。

## (項目 7 )

C D R<sub>H1</sub>、C D R<sub>H2</sub> 及び C D R<sub>H3</sub> がヒト又はヒト化免疫グロブリンの複数のフレームワーク領域間に挿入されている項目 6 の結合蛋白質。

## (項目 8 )

前記結合蛋白質が抗体又はその抗原結合断片である項目 7 の結合蛋白質。

30

## (項目 9 )

配列番号 183 ( L R 2 B 8 H C 重鎖可変領域) 又は配列番号 189 ( L R M R 2 B 8 H C 重鎖可変領域) の免疫グロブリン重鎖可変領域を含む項目 6 乃至 8 のいずれか 1 項の単離結合蛋白質。

## (項目 10 )

配列番号 187 ( L R 2 B 8 H C + I g G 1 定常 ( G 1 m ( 3 ) アロタイプ) ( 対立遺伝子 1 ) ) 又は配列番号 191 ( L R M R 2 B 8 H C + I g G 1 定常 ( G 1 m ( 3 ) アロタイプ) ( 対立遺伝子 1 ) ) の免疫グロブリン重鎖配列を含む項目 9 の単離結合蛋白質。

## (項目 11 )

さらに、構造 C D R<sub>L1</sub> - C D R<sub>L2</sub> - C D R<sub>L3</sub> を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含み、

40

( i ) C D R<sub>L1</sub> が配列番号 18 ( 2 B 8 ) のアミノ酸配列を含み、

( i i ) C D R<sub>L2</sub> が配列番号 19 ( 2 B 8 ) 又は配列番号 206 ( L R M R 2 B 8 L C ) のアミノ酸配列を含み、及び

( i i i ) C D R<sub>L3</sub> が配列番号 20 ( 2 B 8 ) のアミノ酸配列を含むものとし、該免疫グロブリン軽鎖可変領域及び前記免疫グロブリン重鎖可変領域が共同してヒト H G F に結合するための单一結合部位を規定するものとする項目 6 の単離結合蛋白質。

## (項目 12 )

前記抗体がモノクローナル抗体である項目 1、6 又は 11 のいずれか 1 項の結合蛋白質。

50

## (項目 1 3 )

項目 1 乃至 5 のいずれか 1 項の免疫グロブリン軽鎖可変領域をコードしているヌクレオチド配列を含む単離核酸。

## (項目 1 4 )

項目 6 乃至 10 のいずれか 1 項の免疫グロブリン重鎖可変領域をコードしているヌクレオチド配列を含む単離核酸。

## (項目 1 5 )

項目 1 3 又は 1 4 の核酸配列を含む発現ベクター。

## (項目 1 6 )

項目 1 5 の発現ベクターを含む宿主細胞。 10

## (項目 1 7 )

結合蛋白質を作製する方法であって、

( i ) 項目 1 6 の宿主細胞を該宿主細胞が前記免疫グロブリン軽鎖可変領域及び / 又は前記免疫グロブリン重鎖可変領域を発現するような条件下で増殖させ、及び

( i i ) 該免疫グロブリン軽鎖可変領域及び / 又は該免疫グロブリン重鎖可変領域を採取すること

を含む方法。

## (項目 1 8 )

前記結合蛋白質が  $4 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  以下の  $k_d$  でヒト肝細胞成長因子に結合する項目 1 乃至 11 のいずれか 1 項の単離結合蛋白質。 20

## (項目 1 9 )

前記  $k_d$  が  $3 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  以下である項目 1 8 の単離結合蛋白質。

## (項目 2 0 )

前記  $k_d$  が  $2 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  以下である項目 1 9 の単離結合蛋白質。

## (項目 2 1 )

前記結合蛋白質が  $20 \text{ pM}$  以下の  $K_D$  でヒト肝細胞成長因子に結合する項目 1 乃至 11 のいずれか 1 項の単離結合蛋白質。

## (項目 2 2 )

前記  $K_D$  が  $10 \text{ pM}$  以下である項目 2 1 の単離結合蛋白質。

## (項目 2 3 )

前記  $K_D$  が  $5 \text{ pM}$  以下である項目 2 2 の単離結合蛋白質。 30

## (項目 2 4 )

腫瘍細胞に有効量の項目 1 乃至 11 のいずれか 1 項の結合蛋白質を作用させて該腫瘍細胞の増殖を抑制又は低減させることを含む腫瘍細胞の増殖を抑制又は低減させる方法。

## (項目 2 5 )

前記腫瘍細胞がヒト腫瘍細胞である項目 2 4 の方法。

## (項目 2 6 )

哺乳動物において腫瘍成長を抑制又は低減させる方法であって、該哺乳動物に有効量の項目 1 乃至 11 のいずれか 1 項の結合蛋白質を作用させて該腫瘍細胞の増殖を抑制又は低減させることを含む方法。 40

## (項目 2 7 )

哺乳動物において腫瘍を治療する方法であって、有効量の項目 1 乃至 11 のいずれか 1 項の結合蛋白質を投与することを含む方法。

## (項目 2 8 )

前記哺乳動物がヒトである項目 2 6 又は 2 7 の方法。

本発明の以上その他の態様及び効果は、以下の図、詳細な説明及び特許請求の範囲を考慮すれば明瞭に理解されよう。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0013】

本発明は、以下の図面にてさらに完全な理解が可能となろう。 50

【図1】代表的な抗体を模式図化したものである。

【図2】1A3、1D3、1F3、2B8、2F8、3A12、3B6及び3D11で表した抗体の完全な免疫グロブリン重鎖可変領域を規定するアミノ酸配列を示す模式図である。各抗体のアミノ酸配列は全て相互に整列させてあり、シグナルペプチド、CDR<sub>1</sub>、CDR<sub>2</sub>及びCDR<sub>3</sub>を規定する領域は枠で囲んで識別されている。枠で囲んでない配列はFR配列を表す。

【図3】図2に示した免疫グロブリン重鎖可変領域配列のそれぞれのCDR<sub>1</sub>、CDR<sub>2</sub>及びCDR<sub>3</sub>を示す模式図である。

【図4】1A3、1D3、1F3、2B8、2F8、3A12、3B6及び3D11で表した抗体の完全な免疫グロブリン軽鎖可変領域を規定するアミノ酸配列を示す模式図である。各抗体のアミノ酸配列は全て相互に整列させてあり、シグナルペプチド、CDR<sub>1</sub>、CDR<sub>2</sub>及びCDR<sub>3</sub>を規定する領域は枠で囲んで識別されている。枠で囲んでない配列はFR配列を表す。

【図5】図4に示した免疫グロブリン軽鎖可変領域配列のそれぞれのCDR<sub>1</sub>、CDR<sub>2</sub>及びCDR<sub>3</sub>を示す模式図である。

【図6】U87MG異種移植モデルにおいて抗HGF抗体1D3、1F3、1A3及び2B8の腫瘍抑制活性を測定する実験からの結果をまとめたグラフである。菱形はPBS、三角形は抗HGF抗体1A3、Xは抗HGF抗体1D3、四角形は抗HGF抗体1F3、丸は抗HGF抗体2B8を示す。

【図7】U118異種移植モデルにおいて抗HGF抗体1D3、1F3、1A3及び2B8の腫瘍抑制活性を測定する実験からの結果をまとめたグラフである。菱形はIgG、四角形は抗HGF抗体1F3、三角形は抗HGF抗体1D3、Xは抗HGF抗体1A3、丸は抗HGF抗体2B8に相当する。

【図8】ヒトHGFとキメラ、キメラ／ヒト化又はヒト化2B8抗体との間の抗原結合親和性及び相互作用速度に関する表面プラスモン共鳴データをまとめた一覧表である。この表には試験したカッパ鎖とIgG1重鎖との対が示されている。標準偏差(STDEV)が示されている抗体は3回の独立した実験において解析したものである。

【図9】Hu2B8がマウスモノクローナル抗体2B8に対して互いに限定される抗原決定基に結合することを示す実験データをまとめた棒グラフである。ヒト化又はキメラ2B8を抗ヒトFcチップ上に捕捉した。次いで、HGFをこのヒト化又はキメラ2B8に結合させた。次に、マウス2B8又は対照抗体(ポリクロナールヤギ抗HGF抗体)の上記捕捉HGFへの結合能を測定した。その結果、ヒト化2B8抗体及びキメラ2B8はマウス2B8がHGFに結合するのを妨げた。白色棒はキメラ2B8抗体、灰色棒はヒト化Hu2B8抗体(カッパ可変領域Kv1-39.1及び重鎖可変領域Hv5-51.1)、黒色棒はヒト化Hu2B8抗体(カッパ可変領域Kv3-15.1及び重鎖可変領域Hv5-51.1)を示す。

#### 【発明を実施するための形態】

##### 【0014】

本発明の一部は、HGFを特異的に結合し、その活性を中和する一群の結合蛋白質、特にヒトHGFの発見に基づいている。こうした結合蛋白質は種々の診断的、治療的用途に使用することができる。この結合蛋白質は、HGFに結合し、その活性を中和する能力から選択された特定のモノクローナル抗体の抗原結合部位をベースとしている。具体的には、この結合蛋白質は、HGFに対する結合部位を共同して規定する免疫グロブリン可変領域CDR配列を含有している。

##### 【0015】

こうした抗体は、その中和活性を考慮すると、HGF反応性細胞、例えば、癌細胞の成長及び／又は増殖を調節するのに特に有用である。この結合蛋白質は、治療剤として用いる場合には、レシピエントに投与した時にこの蛋白質に対する免疫反応を誘発するリスクをできる限り少なくしたり排除することができるよう設計することができる。さらに、この結合蛋白質は、特定の用途に応じて、他の成分、例えば、検出可能な標識(例えば、

10

20

30

40

50

放射能標識)並びにエフェクタ分子(例えば、他の蛋白質及び低分子系治療剤)に結合させることができることが企図されている。本発明のこれらの特徴及び態様については、それぞれ以下でさらに詳細に論じる。

### I . HGFに結合する結合蛋白質

一態様として、本発明はヒトHGFに結合する単離結合蛋白質を提供する。この結合蛋白質は、(i) CDR<sub>L1</sub>-CDR<sub>L2</sub>-CDR<sub>L3</sub>の構造を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域及び(ii) 3箇所の相補性決定領域(CDR)を含む免疫グロブリン重鎖可変領域を含む。この場合、免疫グロブリン軽鎖可変領域及び免疫グロブリン重鎖可変領域はヒトHGFに結合するための单一結合部位を共同して規定するものとする。CDR<sub>L1</sub>は、アミノ酸配列X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>SerX<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub>X<sub>9</sub>X<sub>10</sub>X<sub>11</sub>X<sub>12</sub>X<sub>13</sub>X<sub>14</sub>X<sub>15</sub>であって、アミノ酸X<sub>1</sub>がArg、Lys又はSerであり、X<sub>2</sub>がAla又はThrであり、X<sub>4</sub>がGlu、Gln又はSerであり、X<sub>5</sub>がAsn、Asp又はSerであり、X<sub>6</sub>がIle又はValであり、X<sub>7</sub>がAsp、Lys、Ser、Val又はThrであり、X<sub>8</sub>がペプチド結合又はTyrであり、X<sub>9</sub>がペプチド結合又はAspであり、X<sub>10</sub>がペプチド結合又はGlyであり、X<sub>11</sub>がペプチド結合又はAsnであり、X<sub>12</sub>がペプチド結合、Ile又はSerであり、X<sub>13</sub>がAsn又はTyrであり、X<sub>14</sub>がIle、Leu、Met又はValであり、X<sub>15</sub>がAla、Asn、His又はSerであるものとするアミノ酸配列を含む。CDR<sub>L2</sub>は、アミノ酸配列X<sub>16</sub>X<sub>17</sub>X<sub>18</sub>X<sub>19</sub>X<sub>20</sub>X<sub>21</sub>X<sub>22</sub>であって、アミノ酸X<sub>16</sub>がAla、Asp、Arg、Gly又はValであり、X<sub>17</sub>がAla、Thr又はValであり、X<sub>18</sub>がAsn、Ser又はThrであり、X<sub>19</sub>がArg、Asn、Lys又はHisであり、X<sub>20</sub>がLeu又はArgであり、X<sub>21</sub>がAla、Asn、Glu、Val又はProであり、X<sub>22</sub>がAsp、Ser又はThrであるものとするアミノ酸配列を含む。CDR<sub>L3</sub>は、アミノ酸配列X<sub>23</sub>X<sub>24</sub>X<sub>25</sub>X<sub>26</sub>X<sub>27</sub>X<sub>28</sub>ProX<sub>30</sub>Thrであって、アミノ酸X<sub>23</sub>がLeu、Gly又はGlnであり、X<sub>24</sub>がHis又はGlnであり、X<sub>25</sub>がPhe、Ser、Trp又はTyrであり、X<sub>26</sub>がAsp、Ile、Ser、Trp又はTyrであり、X<sub>27</sub>がGly、Glu、Asn又はSerであり、X<sub>28</sub>がAsp、Asn、Phe、Thr又はTyrであり、X<sub>30</sub>がLeu、Phe、Pro又はTyrであるものとするアミノ酸配列を含む。

### 【0016】

別の態様として、本発明は、(i) CDR<sub>H1</sub>-CDR<sub>H2</sub>-CDR<sub>H3</sub>の構造を含む免疫グロブリン重鎖可変領域及び(ii) 3箇所の相補性決定領域(CDR)を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む、ヒトHGFに結合する単離結合蛋白質であって、これら免疫グロブリン軽鎖可変領域及び免疫グロブリン重鎖可変領域がヒトHGFに結合するための单一結合部位を共同して規定するものとする単離結合蛋白質を提供する。CDR<sub>H1</sub>は、アミノ酸配列X<sub>1</sub>TyrX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>であって、アミノ酸X<sub>1</sub>がAsp、Asn、Ser又はThrであり、X<sub>3</sub>がPhe、Ser、Trp又はTyrであり、X<sub>4</sub>がIle、Leu又はMetであり、X<sub>5</sub>がAsn、His又はSerであるものとするアミノ酸配列を含む。CDR<sub>H2</sub>は、アミノ酸配列X<sub>6</sub>IleX<sub>8</sub>X<sub>9</sub>X<sub>10</sub>X<sub>11</sub>GlyX<sub>13</sub>X<sub>14</sub>X<sub>15</sub>TyrX<sub>17</sub>X<sub>18</sub>X<sub>19</sub>X<sub>20</sub>X<sub>21</sub>X<sub>22</sub>であって、アミノ酸X<sub>6</sub>がLys、Gln、Glu、Val又はTyrであり、X<sub>8</sub>がAsn、Gly、Ser、Trp又はTyrであり、X<sub>9</sub>がAla、Pro又はSerであり、X<sub>10</sub>がGly又はThrであり、X<sub>11</sub>がペプチド結合、Asp、Asn、Gly又はSerであり、X<sub>13</sub>がAsp、Asn、His又はSerであり、X<sub>14</sub>がSer又はThrであり、X<sub>15</sub>がAsn又はTyrであり、X<sub>17</sub>がAsn又はProであり、X<sub>18</sub>がAla、Asp、Gly、Gln、Glu、Pro又はSerであり、X<sub>19</sub>がAsn、Lys、Met又はSerであり、X<sub>20</sub>がLeu、Phe又はValであり、X<sub>21</sub>がLys、Met又はGlnであり、X<sub>22</sub>がAsp、Gly又はSerであるものとするアミノ酸配列を含む。CDR<sub>H3</sub>は、アミノ酸配列X<sub>23</sub>X<sub>24</sub>X<sub>25</sub>X<sub>26</sub>X<sub>27</sub>X<sub>28</sub>X<sub>29</sub>X<sub>30</sub>X<sub>31</sub>X<sub>32</sub>X<sub>33</sub>X<sub>34</sub>Tyrであって、アミノ酸X<sub>23</sub>がArg、Asn、Gln又はG

10

20

30

40

50

l u であり、X<sub>2</sub><sub>4</sub> が G l y 、 L e u 、 A r g 又は T y r であり、X<sub>2</sub><sub>5</sub> がペプチド結合、A s p 又は G l y であり、X<sub>2</sub><sub>6</sub> がペプチド結合又は G l y であり、X<sub>2</sub><sub>7</sub> がペプチド結合又は T y r であり、X<sub>2</sub><sub>8</sub> がペプチド結合、L e u 又は T y r であり、X<sub>2</sub><sub>9</sub> がペプチド結合、G l y 、 L e u 、 A r g 又は V a l であり、X<sub>3</sub><sub>0</sub> がペプチド結合、A s p 、 G l y 又は G l u であり、X<sub>3</sub><sub>1</sub> がペプチド結合、A s n 、 A r g 、 S e r 又は T y r であり、X<sub>3</sub><sub>2</sub> がペプチド結合、A l a 、 G l y 、 I l e 又 T y r であり、X<sub>3</sub><sub>3</sub> が M e t 又は P h e であり、X<sub>3</sub><sub>4</sub> が A l a 又は A s p であるものとするアミノ酸配列を含む。

#### 【 0 0 1 7 】

上記結合蛋白質が上述の免疫グロブリン軽鎖及び免疫グロブリン重鎖の配列又はこれらの断片と共に含み得ることは理解されよう。さらに、上記結合蛋白質が完全な状態の抗体又はその抗原結合性断片或いは生合成抗体結合部位であってもよいことも理解されよう。  
10

#### 【 0 0 1 8 】

一部の実施態様として、上記の免疫グロブリン軽鎖及び免疫グロブリン重鎖の C D R 配列はフレームワーク領域 ( F R : f r a m e w o r k r e g i o n ) と共に挿入されている。

#### 【 0 0 1 9 】

一部の実施態様として、上記の免疫グロブリン軽鎖及び免疫グロブリン重鎖の C D R 配列は、複数のヒト又はヒト化フレームワーク領域間に挿入されている。

#### 【 0 0 2 0 】

別の態様として、本発明はヒト H G F に特異的に結合する単離結合蛋白質を提供する。この結合蛋白質は、( a ) C D R<sub>L</sub><sub>1</sub> - C D R<sub>L</sub><sub>2</sub> - C D R<sub>L</sub><sub>3</sub> の構造を有する免疫グロブリン軽鎖可変領域及び( b ) 免疫グロブリン重鎖可変領域を含む。この場合、免疫グロブリン軽鎖可変領域及び免疫グロブリン重鎖可変領域はヒト H G F に結合するための单一結合部位を共同して規定するものとする。上記 C D R<sub>L</sub><sub>1</sub> は、配列番号 8 ( 1 A 3 ) 、配列番号 1 8 ( 2 B 8 ) 、配列番号 2 8 ( 2 F 8 ) 、配列番号 3 8 ( 3 B 6 ) 、配列番号 4 8 ( 3 D 1 1 ) 、配列番号 5 8 ( 1 D 3 ) 、配列番号 6 8 ( 1 F 3 ) 及び配列番号 7 8 ( 3 A 1 2 ) からなる群から選ばれる配列を含む。上記 C D R<sub>L</sub><sub>2</sub> は、配列番号 9 ( 1 A 3 ) 、配列番号 1 9 ( 2 B 8 ) 、配列番号 2 9 ( 2 F 8 ) 、配列番号 3 9 ( 3 B 6 ) 、配列番号 4 9 ( 3 D 1 1 ) 、配列番号 5 9 ( 1 D 3 ) 、配列番号 6 9 ( 1 F 3 ) 、配列番号 7 9 ( 3 A 1 2 ) 及び配列番号 2 0 6 ( L R M R 2 B 8 L C ) からなる群から選ばれる配列を含む。上記 C D R<sub>L</sub><sub>3</sub> は、配列番号 1 0 ( 1 A 3 ) 、配列番号 2 0 ( 2 B 8 ) 、配列番号 3 0 ( 2 F 8 ) 、配列番号 4 0 ( 3 B 6 ) 、配列番号 5 0 ( 3 D 1 1 ) 、配列番号 6 0 ( 1 D 3 ) 、配列番号 7 0 ( 1 F 3 ) 及び配列番号 8 0 ( 3 A 1 2 ) からなる群から選ばれる配列を含む。本明細書及び特許請求の範囲の全体を通じて、特定の配列番号により示した配列の後に続けて、その特定の配列が由来する抗体を括弧内に示した。例えば、配列番号 8 ( 1 A 3 ) は、配列番号 8 の配列が抗体 1 A 3 に存在する配列に基づいていることを意味している。  
20

#### 【 0 0 2 1 】

一実施態様として、上記結合蛋白質は、配列番号 8 ( 1 A 3 ) の配列を含む C D R<sub>L</sub><sub>1</sub> 、配列番号 9 ( 1 A 3 ) の配列を含む C D R<sub>L</sub><sub>2</sub> 及び配列番号 1 0 ( 1 A 3 ) を含む C D R<sub>L</sub><sub>3</sub> を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む。  
40

#### 【 0 0 2 2 】

別の実施態様として、上記結合蛋白質は、配列番号 1 8 ( 2 B 8 ) の配列を含む C D R<sub>L</sub><sub>1</sub> 、配列番号 1 9 ( 2 B 8 ) 又は配列番号 2 0 6 ( L R M R 2 B 8 L C ) の配列を含む C D R<sub>L</sub><sub>2</sub> 及び配列番号 2 0 ( 2 B 8 ) を含む C D R<sub>L</sub><sub>3</sub> を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む。

別の実施態様として、上記結合蛋白質は、配列番号 2 8 ( 2 F 8 ) の配列を含む C D R<sub>L</sub><sub>1</sub> 、配列番号 2 9 ( 2 F 8 ) の配列を含む C D R<sub>L</sub><sub>2</sub> 及び配列番号 3 0 ( 2 F 8 ) を含む C D R<sub>L</sub><sub>3</sub> を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む。

#### 【 0 0 2 3 】

10

20

30

30

40

50

別の実施態様として、上記結合蛋白質は、配列番号38(3B6)の配列を含むCDRL<sub>1</sub>、配列番号39(3B6)配列を含むCDRL<sub>2</sub>及び配列番号40(3B6)を含むCDRL<sub>3</sub>を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む。

#### 【0024】

別の実施態様として、上記結合蛋白質は、配列番号48(3D11)の配列を含むCDRL<sub>1</sub>、配列番号49(3D11)配列を含むCDRL<sub>2</sub>及び配列番号50(3D11)を含むCDRL<sub>3</sub>を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む。

#### 【0025】

別の実施態様として、上記結合蛋白質は、配列番号58(1D3)の配列を含むCDRL<sub>1</sub>、配列番号59(1D3)配列を含むCDRL<sub>2</sub>及び配列番号60(1D3)を含むCDRL<sub>3</sub>を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む。 10

#### 【0026】

別の実施態様として、上記結合蛋白質は、配列番号68(1F3)の配列を含むCDRL<sub>1</sub>、配列番号69(1F3)配列を含むCDRL<sub>2</sub>及び配列番号70(1F3)を含むCDRL<sub>3</sub>を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む。

#### 【0027】

別の実施態様として、上記結合蛋白質は、配列番号78(3A12)の配列を含むCDRL<sub>1</sub>、配列番号79(3A12)配列を含むCDRL<sub>2</sub>及び配列番号80(3A12)を含むCDRL<sub>3</sub>を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む。

#### 【0028】

前記の各実施態様において、CDRL<sub>1</sub>、CDRL<sub>2</sub>及びCDRL<sub>3</sub>の配列は、ヒト又はヒト化免疫グロブリンのFR間に挿入されていることが好ましい。上記結合蛋白質を完全な状態の抗体又はその抗原結合性断片或いは生合成抗体結合部位とすることができることは理解されよう。 20

#### 【0029】

別の態様として、本発明はヒトHGFに結合する単離結合蛋白質を提供する。この結合蛋白質は、(a)CDRH<sub>1</sub>-CDRH<sub>2</sub>-CDRH<sub>3</sub>の構造を含む免疫グロブリン重鎖可変領域及び(b)免疫グロブリン軽鎖可変領域を含有する。この場合、これら免疫グロブリン重鎖可変領域及び免疫グロブリン軽鎖可変領域は、ヒトHGFに結合するための单一結合部位を共同して規定するものとする。上記CDRH<sub>1</sub>は、配列番号5(1A3)、配列番号15(2B8)、配列番号25(2F8)、配列番号35(3B6)、配列番号45(3D11)、配列番号55(1D3)、配列番号65(1F3)及び配列番号75(3A12)からなる群から選ばれる配列を含み、上記CDRH<sub>2</sub>は、配列番号6(1A3)、配列番号16(2B8)、配列番号26(2F8)、配列番号36(3B6)、配列番号46(3D11)、配列番号56(1D3)、配列番号66(1F3)、配列番号76(3A12)、配列番号202(Hu2B8 Hv1f.1)、配列番号203(Hu2B8 Hv5a.1又はHu2B8 Hv5-51.1)、配列番号204(LR2B8HC)及び配列番号205(LRM R2B8HC)からなる群から選ばれる配列を含み、上記CDRH<sub>3</sub>は、配列番号7(1A3)、配列番号17(2B8)、配列番号27(2F8)、配列番号37(3B6)、配列番号47(3D11)、配列番号57(1D3)、配列番号67(1F3)及び配列番号77(3A12)からなる群から選ばれる配列を含む。 30

#### 【0030】

一実施態様として、上記結合蛋白質は、配列番号5(1A3)の配列を含むCDRH<sub>1</sub>、配列番号6(1A3)の配列を含むCDRH<sub>2</sub>及び配列番号7(1A3)を含むCDRH<sub>3</sub>を含む免疫グロブリン重鎖可変領域を含む。

#### 【0031】

別の実施態様として、上記結合蛋白質は、配列番号15(2B8)の配列を含むCDRL<sub>1</sub>、配列番号16(2B8)、配列番号202(Hu2B8 Hv1f.1)、配列番号203(Hu2B8 Hv5a.1又はHu2B8 Hv5-51.1)、配列番号2 50

04 (L R 2 B 8 H C) 又は配列番号 205 (L R M R 2 B 8 H C) の配列を含む CDR<sub>H<sub>2</sub></sub> 及び配列番号 17 (2 B 8) を含む CDR<sub>H<sub>3</sub></sub> を含む免疫グロブリン重鎖可変領域を含む。

**【0032】**

別の実施態様として、上記結合蛋白質は、配列番号 25 (2 F 8) の配列を含む CDR<sub>H<sub>1</sub></sub>、配列番号 26 (2 F 8) の配列を含む CDR<sub>H<sub>2</sub></sub> 及び配列番号 27 (2 F 8) を含む CDR<sub>H<sub>3</sub></sub> を含む免疫グロブリン重鎖可変領域を含む。

**【0033】**

別の実施態様として、上記結合蛋白質は、配列番号 35 (3 B 6) の配列を含む CDR<sub>H<sub>1</sub></sub>、配列番号 36 (3 B 6) 配列を含む CDR<sub>H<sub>2</sub></sub> 及び配列番号 37 (3 B 6) を含む CDR<sub>H<sub>3</sub></sub> を含む免疫グロブリン重鎖可変領域を含む。 10

**【0034】**

別の実施態様として、上記結合蛋白質は、配列番号 45 (3 D 1 1) の配列を含む CDR<sub>H<sub>1</sub></sub>、配列番号 46 (3 D 1 1) 配列を含む CDR<sub>H<sub>2</sub></sub> 及び配列番号 47 (3 D 1 1) を含む CDR<sub>H<sub>3</sub></sub> を含む免疫グロブリン重鎖可変領域を含む。

**【0035】**

別の実施態様として、上記結合蛋白質は、配列番号 55 (1 D 3) の配列を含む CDR<sub>H<sub>1</sub></sub>、配列番号 56 (1 D 3) 配列を含む CDR<sub>H<sub>2</sub></sub> 及び配列番号 57 (1 D 3) を含む CDR<sub>H<sub>3</sub></sub> を含む免疫グロブリン重鎖可変領域を含む。

**【0036】**

別の実施態様として、上記結合蛋白質は、配列番号 65 (1 F 3) の配列を含む CDR<sub>H<sub>1</sub></sub>、配列番号 66 (1 F 3) 配列を含む CDR<sub>H<sub>2</sub></sub> 及び配列番号 67 (1 F 3) を含む CDR<sub>H<sub>3</sub></sub> を含む免疫グロブリン重鎖可変領域を含む。 20

**【0037】**

別の実施態様として、上記結合蛋白質は、配列番号 75 (3 A 1 2) の配列を含む CDR<sub>H<sub>1</sub></sub>、配列番号 76 (3 A 1 2) 配列を含む CDR<sub>H<sub>2</sub></sub> 及び配列番号 77 (3 A 1 2) を含む CDR<sub>H<sub>3</sub></sub> を含む免疫グロブリン重鎖可変領域を含む。

**【0038】**

前記の各実施態様において、CDR<sub>H<sub>1</sub></sub>、CDR<sub>H<sub>2</sub></sub> 及び CDR<sub>H<sub>3</sub></sub> の配列は、ヒト又はヒト化免疫グロブリンの FR 間に挿入されていることが好ましい。上記結合蛋白質を完全な状態の抗体又はその抗原結合性断片或いは生合成抗体結合部位とすることができるることは理解されよう。 30

**【0039】**

別の態様として、本発明はヒト HGF に結合する結合蛋白質を提供する。この結合蛋白質は、配列番号 2 (1 A 3) の 20 乃至 141 番目残基、配列番号 12 (2 B 8) の 20 乃至 137 番目残基、配列番号 22 (2 F 8) の 20 乃至 137 番目残基、配列番号 32 (3 B 6) の 20 乃至 139 番目残基、配列番号 42 (3 D 1 1) の 20 乃至 132 番目残基、配列番号 52 (1 D 3) の 20 乃至 141 番目残基、配列番号 62 (1 F 3) の 20 乃至 141 番目残基及び配列番号 72 (3 A 1 2) の 20 乃至 141 番目残基からなる群から選ばれる免疫グロブリン重鎖可変領域、並びに配列番号 4 (1 A 3) の 21 乃至 127 番目残基、配列番号 14 (2 B 8) の 21 乃至 127 番目残基、配列番号 24 (2 F 8) の 20 乃至 131 番目残基、配列番号 34 (3 B 6) の 23 乃至 129 番目残基、配列番号 44 (3 D 1 1) の 23 乃至 128 番目残基、配列番号 54 (1 D 3) の 21 乃至 127 番目残基、配列番号 64 (1 F 3) の 21 乃至 127 番目残基及び配列番号 74 (3 A 1 2) の 21 乃至 127 番目残基からなる群から選ばれる免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む。 40

**【0040】**

別の実施態様として、上記結合蛋白質は、配列番号 2 (1 A 3) の 20 乃至 141 番目残基のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域及び配列番号 4 (1 A 3) の 21 乃至 127 番目残基のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む。 50

## 【0041】

一実施態様として、上記結合蛋白質は、配列番号12(2B8)の20乃至137番目残基のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域及び配列番号14(2B8)の21乃至127番目残基のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む。

## 【0042】

別の実施態様として、上記結合蛋白質は、配列番号22(2F8)の20乃至137番目残基のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域及び配列番号24(2F8)の20乃至131番目残基のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む。

## 【0043】

別の実施態様として、上記結合蛋白質は、配列番号32(3B6)の20乃至139番目残基のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域及び配列番号34(3B6)の23乃至129番目残基のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む。 10

## 【0044】

別の実施態様として、上記結合蛋白質は、配列番号42(3D11)の20乃至132番目残基のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域及び配列番号44(3D11)の23乃至128番目残基のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む。

## 【0045】

別の実施態様として、上記結合蛋白質は、配列番号52(1D3)の20乃至141番目残基のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域及び配列番号54(1D3)の21乃至127番目残基のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む。 20

## 【0046】

別の実施態様として、上記結合蛋白質は、配列番号62(1F3)の20乃至141番目残基のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域及び配列番号64(1F3)の21乃至127番目残基のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む。

## 【0047】

別の実施態様として、上記結合蛋白質は、配列番号72(3A12)の20乃至141番目残基のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域及び配列番号74(3A12)の21乃至127番目の残基アミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む。

## 【0048】

前記の各実施態様において、結合蛋白質は完全な状態の抗体又はその抗原結合性断片或いは生合成抗体結合部位とすることができます。 30

## 【0049】

別の態様として、本発明はヒトHGFに結合する単離結合蛋白質を提供する。この結合蛋白質は、(i)配列番号173(Hu2B8 Kv1-39.1軽鎖可変領域)、配列番号179(Hu2B8 Kv3-15.1軽鎖可変領域)、配列番号193(LR2B8LC軽鎖可変領域)及び配列番号199(LRMRL2B8LC軽鎖可変領域)からなる群から選ばれる免疫グロブリン軽鎖可変領域、並びに(ii)配列番号159(Hu2B8 Hv1f.1重鎖可変領域)、配列番号165(Hu2B8 Hv5a.1重鎖可変領域)、配列番号169(Hu2B8 Hv5-51.1重鎖可変領域)、配列番号183(LR2B8HC重鎖可変領域)及び配列番号189(LRMRL2B8LC軽鎖可変領域)からなる群から選ばれる免疫グロブリン重鎖可変領域を含有する。上記結合蛋白質は、完全な状態の抗体又はその抗原結合性断片或いは生合成抗体結合部位とすることができます。 40

## 【0050】

別の態様として、本発明はヒトHGFに結合する単離結合蛋白質を提供する。この結合蛋白質は、(i)配列番号177(Hu2B8 Kv1-39.1+カッパ定常(Km(3)アロタイプ(対立遺伝子2))、配列番号181(Hu2B8 Kv3-15.1+カッパ定常(Km(3)アロタイプ(対立遺伝子2))、配列番号197(LR2B8LC+カッパ定常(Km(3)アロタイプ(対立遺伝子1))及び配列番号201(LRMRL2B8LC+カッパ定常(Km(3)アロタイプ(対立遺伝子1))からなる群から選 50

ばれる免疫グロブリン軽鎖、並びに( i i )配列番号163(Hu2B8 Hv1f.1 + IgG1定常(G1m(17,1)アロタイプ))、配列番号167(Hu2B8 Hv5a.1 + IgG1定常領域(G1m(17,1)アロタイプ))、配列番号171(Hu2B8 Hv5-51.1 + IgG1定常(G1m(17,1)アロタイプ))、配列番号187(LR2B8HC + IgG1定常(G1m(3)アロタイプ)(対立遺伝子1))及び配列番号191(LRM R2B8HC + IgG1定常(G1m(3)アロタイプ)(対立遺伝子1))からなる群から選ばれる免疫グロブリン重鎖を含む。上記結合蛋白質は、完全な状態の抗体又はその抗原結合性断片或いは生合成抗体結合部位とすることができます。

## 【0051】

10

別の態様として、本発明は還元型ヒトHGFに結合する単離結合蛋白質を提供する。この結合蛋白質は、(i)3箇所のCDRを含む免疫グロブリン軽鎖可変領域及び(ii)3箇所のCDRを含む免疫グロブリン重鎖可変領域を含む。これらのCDRは、通常FR間に挿入される。免疫グロブリン軽鎖及び免疫グロブリン重鎖のCDRは、還元型ヒトHGF、例えば、還元型HGFの鎖に結合する結合部位を共同して規定する。還元型HGFとは、鎖と鎖との間のジスルフィド結合を還元するのに十分な量の還元剤、例えば、ジチオスレイトール(DTT:dithiothreitol)、2-メルカプトエタノール又はグルタチオンで処理したHGFのことである。典型的な濃度としては、例えば、100mMのDTT及び5%の2-メルカプトエタノールが挙げられる。

## 【0052】

20

一部の実施態様として、上記結合蛋白質は、 $CDR_{L1}$ 、 $CDR_{L2}$ 及び $CDR_{L3}$ からなる群から選ばれる少なくとも1つのCDRを含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む。上記結合蛋白質は、任意選択的に、2つのCDR、例えば、 $CDR_{L1}$ と $CDR_{L2}$ 又は $CDR_{L1}$ と $CDR_{L3}$ 又は $CDR_{L1}$ と $CDR_{L3}$ を含む。上記結合蛋白質は、任意選択的に、3つのCDRの全て、即ち、 $CDR_{L1}$ 、 $CDR_{L2}$ 及び $CDR_{L3}$ を含む。 $CDR_{L1}$ は、アミノ酸配列 $X_1 X_2 Ser X_4 X_5 X_6 X_7 X_8 X_9 X_{10} X_{11} X_{12} X_{13} X_{14} X_{15}$ であって、アミノ酸 $X_1$ がArg又はLysであり、 $X_2$ がAla又はThrであり、 $X_4$ がGlu又はGlnであり、 $X_5$ がAsn、Ser又はAspであり、 $X_6$ がIle又はValであり、 $X_7$ が Tyr、Asp又はLysであり、 $X_8$ がペプチド結合又はTyrであり、 $X_9$ がペプチド結合又はAspであり、 $X_{10}$ がペプチド結合又はGlyであり、 $X_{11}$ がペプチド結合又はAsnであり、 $X_{12}$ がペプチド結合又はSerであり、 $X_{13}$ がAsn又はTyrであり、 $X_{14}$ がIle又はLeuであり、 $X_{15}$ がAla、Asn又はSerであるものとする配列を含む。 $CDR_{L2}$ は、アミノ酸配列 $X_{16} X_{17} X_{18} X_{19} Leu X_{21} X_{22}$ であって、アミノ酸 $X_{16}$ がAla、Asp、Val又はArgであり、 $X_{17}$ がAla又はValであり、 $X_{18}$ がAsn、Ser又はThrであり、 $X_{19}$ がArg、Asn又はHisであり、 $X_{21}$ がAla、Glu、Val又はProであり、 $X_{22}$ がAsp又はSerであるものとする配列を含む。 $CDR_{L3}$ は、アミノ酸配列 $X_{23} X_{24} X_{25} X_{26} X_{27} X_{28} Pro X_{30} Thr$ であって、アミノ酸 $X_{23}$ がLeu又はGlnであり、 $X_{24}$ がHis又はGlnであり、 $X_{25}$ がPhe、Ser又はTyrであり、 $X_{26}$ がAsp、Ile又はTrpであり、 $X_{27}$ がGly又はGluであり、 $X_{28}$ がAsp、Phe又はThrであり、 $X_{30}$ がPhe、Pro又はTyrであるものとする配列を含む。

## 【0053】

40

別の実施態様として、上記結合蛋白質は、 $CDR_{H1}$ 、 $CDR_{H2}$ 及び $CDR_{H3}$ からなる群から選ばれる少なくとも1つのCDRを含む免疫グロブリン重鎖可変領域を含む。上記結合蛋白質は、任意選択的に、2つのCDR、例えば、 $CDR_{H1}$ と $CDR_{H2}$ 又は $CDR_{H1}$ と $CDR_{H3}$ 又は $CDR_{H1}$ と $CDR_{H3}$ を含む。上記結合蛋白質は、任意選択的に、3つのCDRの全て、即ち、 $CDR_{H1}$ 、 $CDR_{H2}$ 及び $CDR_{H3}$ を含む。 $CDR_{H1}$ は、アミノ酸配列 $X_1 Tyr X_3 X_4 X_5$ であって、アミノ酸 $X_1$ がAsp、Asn、Ser又はThrであり、 $X_3$ がPhe、Trp又はTyrであり、 $X_4$ がIle

50

又はMetであり、X<sub>5</sub>がAsn、His又はSerであるものとする配列を含む。CDR<sub>H2</sub>は、アミノ酸配列X<sub>6</sub>IleX<sub>8</sub>X<sub>9</sub>GlyX<sub>11</sub>GlyX<sub>13</sub>X<sub>14</sub>X<sub>15</sub>TyrX<sub>17</sub>X<sub>18</sub>X<sub>19</sub>X<sub>20</sub>LysX<sub>22</sub>であって、アミノ酸X<sub>6</sub>がLys、Gln又はTyrであり、X<sub>8</sub>がGly、Ser又はTyrであり、X<sub>9</sub>がPro又はSerであり、X<sub>11</sub>がAsp、Gly又はSerであり、X<sub>13</sub>がAsp又はSerであり、X<sub>14</sub>がSer又はThrであり、X<sub>15</sub>がAsn又はTyrであり、X<sub>17</sub>がAsn又はProであり、X<sub>18</sub>がAla、Asp、Gly又はGluであり、X<sub>19</sub>がAsn、Met又はSerであり、X<sub>20</sub>がPhe又はValであり、X<sub>22</sub>がAsp又はGlyであるものとする配列を含む。CDR<sub>H3</sub>は、アミノ酸配列X<sub>23</sub>X<sub>24</sub>X<sub>25</sub>X<sub>26</sub>X<sub>27</sub>X<sub>28</sub>X<sub>29</sub>X<sub>30</sub>X<sub>31</sub>X<sub>32</sub>X<sub>33</sub>AspTyrであって、アミノ酸X<sub>23</sub>がArg又はGlnであり、X<sub>24</sub>がGly又はLeuであり、X<sub>25</sub>がAsp、Gly又はペプチド結合であり、X<sub>26</sub>がGly又はペプチド結合であり、X<sub>27</sub>がペプチド結合又はTyrであり、X<sub>28</sub>がLeu、ペプチド結合又はTyrであり、X<sub>29</sub>がGly、Arg又はLeuであり、X<sub>30</sub>がAsp、Gly又はGluであり、X<sub>31</sub>がTyr、Arg又はAsnであり、X<sub>32</sub>がAla、Gly又はTyrであり、X<sub>33</sub>がMet又はPheであるものとする配列を含む。  
10

#### 【0054】

上記結合蛋白質が上述の免疫グロブリン重鎖及び免疫グロブリン軽鎖の配列又はこれらの断片を含有し得ることは理解されよう。さらに、上記結合蛋白質は完全な状態の抗体又はその抗原結合性断片或いは生合成抗体結合部位とすることも理解されよう。  
20

#### 【0055】

一部の実施態様として、上記結合蛋白質は、(i)配列番号8(1A3)、配列番号28(2F8)、配列番号38(3B6)、配列番号58(1D3)及び配列番号68(1F3)からなる群から選ばれる配列を有するCDR<sub>L1</sub>、(ii)配列番号9(1A3)、配列番号29(2F8)、配列番号39(3B6)、配列番号59(1D3)及び配列番号69(1F3)からなる群から選ばれる配列を有するCDR<sub>L2</sub>並びに(iii)配列番号10(1A3)、配列番号30(2F8)、配列番号40(3B6)、配列番号60(1D3)及び配列番号70(1F3)からなる群から選ばれる配列を有するCDR<sub>L3</sub>を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む。これらのCDR配列はヒト又はヒト化FR間に挿入されていてもよい。他の実施態様として、上記結合蛋白質は、配列番号4(1A3)の21乃至127番目残基、配列番号24(2F8)の20乃至131番目残基、配列番号34(3B6)の23乃至129番目残基、配列番号54(1D3)の21乃至127番目残基及び配列番号64(1F3)の21乃至127番目残基からなる群から選ばれるアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む。  
30

#### 【0056】

一部の実施態様として、上記結合蛋白質は、(i)配列番号5(1A3)、配列番号25(2F8)、配列番号35(3B6)、配列番号55(1D3)及び配列番号65(1F3)からなる群から選ばれる配列を有するCDR<sub>H1</sub>、(ii)配列番号6(1A3)、配列番号26(2F8)、配列番号36(3B6)、配列番号56(1D3)及び配列番号66(1F3)からなる群から選ばれる配列を有するCDR<sub>H2</sub>並びに(iii)配列番号7(1A3)、配列番号27(2F8)、配列番号37(3B6)、配列番号57(1D3)及び配列番号67(1F3)からなる群から選ばれる配列を有するCDR<sub>H3</sub>を含む免疫グロブリン重鎖可変領域を含む。これらのCDR配列はヒト又はヒト化FR間に挿入されていてもよい。別の実施態様として、この免疫グロブリン重鎖可変領域は、配列番号2(1A3)の20乃至141番目残基、配列番号22(2F8)の20乃至137番目残基、配列番号32(3B6)の20乃至139番目残基、配列番号52(1D3)の20乃至141番目残基及び配列番号62(1F3)の20乃至141番目残基からなる群から選ばれるアミノ酸配列を含有する。  
40

#### 【0057】

別の態様として、本発明は、ヒトHGFに結合し、免疫グロブリン軽鎖可変領域及び免疫グロブリン重鎖可変領域を含む単離結合蛋白質を提供する。この単離結合蛋白質は、(i)配列番号24(2F8)の20乃至131番目残基の免疫グロブリン軽鎖可変領域及び配列番号22(2F8)の20乃至137番目残基の免疫グロブリン重鎖可変領域を有する抗体、(ii)配列番号34(3B6)の23乃至129番目残基の免疫グロブリン軽鎖可変領域及び配列番号32(3B6)の20乃至139番目残基の免疫グロブリン重鎖可変領域を有する抗体、並びに(iii)配列番号44(3D11)の23乃至128番目残基の免疫グロブリン軽鎖可変領域及び配列番号42(3D11)の20乃至132番目残基の免疫グロブリン重鎖可変領域を有する抗体からなる群から選ばれる少なくとも1種の対照抗体と、HGFへの結合に対して競合する。ある状況では、この結合蛋白質はこれらの対照抗体のうちの1種と同じHGFの抗原決定基に結合する。

#### 【0058】

上述の各結合蛋白質が完全な状態の抗体、例えばモノクローナル抗体であってもよいことは理解されよう。或いは、上記結合蛋白質は、抗体の抗原結合性断片であってもよく、又は生合成抗体結合部位であってもよい。抗体断片としては、Fab、Fab'、(Fab')<sub>2</sub>又はFv断片が挙げられる。このような抗体断片を作製するための技術は当業者に周知である。多くの生合成抗体結合部位が当該技術分野で周知であり、例えば、米国特許第5,476,786号明細書に記載されている单一Fv又はsFv分子が挙げられる。他の生合成抗体結合部位としては、二重特異性又は二機能性結合蛋白質、例えば、二重特異性又は二機能性抗体が挙げられ、これらは少なくとも2種の異なる抗原に結合する抗体又は抗体断片である。例えば、二重特異性結合蛋白質はHGF、例えばヒトHGFと別の対象とする抗原とに結合することができる。二重特異性抗体を作製するための方法は当該技術分野で周知であり、例えば、ハイブリドーマを融合させる方法又はFab'断片を連結させる方法が挙げられる。例えば、Song Sivilai et al.(1990年) CLIN. EXP. IMMUNOL. 79:p.315-325及びKostelný et al.(1992年) J. IMMUNOL. 148:p.1547-1553を参照されたい。

#### 【0059】

本発明の結合蛋白質は、561番目の位置にシステインからアルギニンへの置換及び555番目の位置にグリシンからグルタメートへの置換を含むhHGFに結合することができる。

#### 【0060】

別の態様として、本発明は、 $4.0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 以下、 $3.0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 以下又は $2.0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 以下のKdでヒトHGFに結合する単離結合蛋白質を提供する。これらの単離結合蛋白質は、 $5.0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 乃至 $0.5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 又は $4.0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 乃至 $1.0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 又は $3.0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 乃至 $1.5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ のKdでヒトHGFに結合することができる。別の態様として、本発明は、100pM以下又は20pM以下又は10pM以下又は5pM以下のKDでヒトHGFに結合する単離結合蛋白質を提供する。これらの単離結合蛋白質は、100pM乃至5pM又は20pM乃至5pM又は15pM乃至10pM又は20pM乃至10pM乃至15pM乃至5pMのKDでヒトHGFに結合することができる。特に明記しない限り、KD値は実施例6に記載した方法及び条件下で測定する。

#### 【0061】

別の態様として、本発明は、ヒトHGFに結合する単離結合蛋白質であって、この抗体が25よりも37よりも低いKDでヒトHGFに結合するものとする結合蛋白質を提供する。この結合蛋白質結合は、任意選択的に、37において5pM未満のKDでヒトHGFに結合する。

#### 【0062】

他の態様及び実施態様として、上記結合蛋白質は、hHGFがc-Metに結合するのを阻害することができる。例えば、上記結合蛋白質のIC<sub>50</sub>(最大阻害の50%)を来す

10

20

30

40

50

濃度)は、実施例7(a)に記載したプロトコルを用いて測定した場合、少なくとも約4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5及び7.0nMとすることができます。一部の他の実施態様として、上記結合蛋白質は、実施例7(b)に記載した方法を用いて4MBr-5細胞(ATCC、カタログ番号CCL208)におけるHGF-BrdUの取り込みを中和することができる。

#### 【0063】

上記結合蛋白質のIC<sub>50</sub>は、実施例7(b)に記載したプロトコルを用いて測定した場合、50nM以下、好ましくは、45、40、35、30、25、20、15、10、5、1又は0.5nM以下である。一部の他の実施態様として、上記結合蛋白質を用いて、実施例9に記載した測定法によるPC-3細胞(ATCC、マナサス、バージニア州、カタログ番号CCL1435)のHGF刺激c-Metリン酸化を抑制することができる。上記結合蛋白質は、実施例9に記載した測定法によるPC-3細胞におけるHGF刺激(1.25nM)c-Metリン酸化を2nM以下のIC<sub>50</sub>(表8)で抑制する。

#### I I . 結合蛋白質の作製

本発明の結合蛋白質は、当該技術分野で周知の手法を用いる種々の方法で作製することができる。例えば、軽鎖可変領域及び重鎖可変領域をコードしているDNA分子は、市販の合成機及び本明細書に示した配列情報を用いて、化学的に合成することができる。このような合成DNA分子を、例えば、定常領域コード配列、発現制御配列などの他の適切なヌクレオチド配列に結合させて所望の結合蛋白質をコードしている通常の遺伝子発現構築物を作製することができる。特定の遺伝子構築物の作製は当該技術分野では日常的な技術の範囲内にある。或いは、本明細書に示した配列は、本明細書に示した配列情報、又はハイブリドーマ細胞中のマウス抗体の重及び軽鎖をコードしている遺伝子に関する従来技術の配列情報に基づいた配列を有する合成核酸プローブを用いて、通常のハイブリダイゼーション技術又はPCR技術によりハイブリドーマからクローニングすることができる。このようなプローブの作製及び使用法は、当該技術分野では日常的な技術の範囲内にある。

#### 【0064】

この所望の結合蛋白質をコードしている核酸を発現ベクター中に導入(結合)して、これを、当該技術分野で周知の標準的な形質移入又は形質転換技術により宿主細胞中に導入することができる。典型的な宿主細胞としては、例えば、大腸菌細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO:Chinese hamster ovary)細胞、ヒーラ(HeLa)細胞、仔ハムスター腎(BHK:baby hamster kidney)細胞、サル腎細胞(COS)、ヒト肝細胞癌細胞(例えば、Hep G2)及び普通なら免疫グロブリンを産生しない骨髄腫細胞が挙げられる。形質移入させた宿主細胞は、この宿主細胞が対象とする遺伝子、例えば免疫グロブリン軽又は重鎖可変領域をコードしている遺伝子を発現するのを可能にする条件下で増殖させることができる。得られる発現産物は当該技術分野で周知の技術を用いて採取することができる。

#### 【0065】

特定の発現及び精製条件は、どんな発現系を用いるかによって異なるであろう。例えば、上記遺伝子を大腸菌で発現させる場合にはこれを先ず発現ベクター中にクローニングする。これは、好適な細菌プロモーター(例えばTrp又はTac)及びシグナル配列(例えばプロテインAのフラグメントB(FB)をコードしている配列)よりも下流に上記の設計遺伝子を配置することによって達成される。得られる発現融合蛋白質は、通常、細胞細胞質中の屈折体又は封入体に蓄積するので、フレンチプレス又は音波処理により細胞を破壊して採取することができる。次に、この屈折体を可溶化し、多くの他の組換え蛋白質について既に確立されている方法により発現蛋白質をリフォールディングし、切断する。

#### 【0066】

上記設計遺伝子を真核宿主細胞、例えば骨髄腫細胞又はCHO細胞で発現させる場合には、先ず、これを、好適な真核生物プロモータ、分泌シグナル、免疫グロブリンエンハンサ及び各種イントロンを含有する発現ベクター中に挿入する。この発現ベクターには、任意選択的に定常領域の全て又は一部をコードしている配列を含有させることができ、これ

10

20

30

40

50

によって重又は軽鎖の全体又は一部の発現が可能となる。上記遺伝子構築物は、確立されている形質移入プロトコルを用いて骨髄腫細胞又はCHO細胞中に形質移入することができる。このような形質移入細胞は、 $V_L$  又は $V_H$ 断片、 $V_L - V_H$  ヘテロ二量体、 $V_H - V_L$  又は $V_L - V_H$ 一本鎖ポリペプチド、完全な免疫グロブリン重又は軽鎖、或いはこれらの部分を発現することができ、これらは、それぞれ別の機能（例えば、細胞毒性）を有する蛋白質ドメインに結合させてもよい。

### I I I . 結合蛋白質に対する修飾

上記結合蛋白質を修飾してこの結合蛋白質の目的とする用途に応じて性能を最適化することができるることは理解されよう。例えば、結合蛋白質を治療剤として用いようとする場合、この結合蛋白質を修飾して対象レシピエントにおける免疫原性を低減することができる。或いは、又はさらに、結合蛋白質を別の蛋白質又はペプチド、例えば、成長因子、サイトカインもしくは細胞毒と融合又は結合させることができる。このような修飾は、当該技術分野で周知の通常の遺伝子操作技術を用いることで達成することができる。10

#### 【0067】

抗体及び抗体断片の抗原性を低減させるための種々の技術が当該技術分野において周知である。これらの技術を用いて本発明の結合蛋白質の抗原性を低減又は除去することができる。例えば、上記結合蛋白質をヒトに投与しようとする場合、この結合蛋白質を改良してヒトにおけるその抗原性を低減させることができが好ましい。このプロセスをヒト化と呼ぶことが多いが、このヒト化結合蛋白質は、それが由来する元の非ヒト化結合蛋白質と抗原に対する親和性が同じか実質的に同じであることが好ましい。20

#### 【0068】

ヒト化のための公知の一方では、ある種、例えばマウスからの抗体の免疫グロブリン定常領域を別の異なる種、例えばヒトからの免疫グロブリン定常領域で置換したキメラ蛋白質を作製する。この例では、得られる抗体はマウス-ヒトキメラであり、このキメラのヒト定常領域の配列は、原理的に、対応するマウスの配列よりも免疫原性が少ない。この種の抗体改良については、例えば、Morrison, et al. (1984年) PROC. NAT. ACADE. SCI. 81: p. 6851-6855、Neuberg et al. (1984年) NATURE 312: p. 604-608、並びに米国特許第6,893,625号明細書(Robinson)、同第5,500,362号明細書(Robinson)及び同第4,816,567号明細書(Cabilly)に記載されている。30

#### 【0069】

CDR移植と呼ばれる別の方では、対象とする抗体の軽及び重鎖可変領域のCDRを別の種からのフレームワーク(FR)中に移植する。例えば、マウスCDRをヒトFR配列中に移植することができる。一部の実施態様として、抗HGF抗体の軽及び重鎖可変領域のCDRをヒトFR又はコンセンサスヒトFR中に移植する。コンセンサスヒトFRを作製するためには、いく種かのヒト重鎖又は軽鎖アミノ酸配列からのFRを整列させてコンセンサスアミノ酸配列を特定する。CDR移植については、例えば、米国特許第7,022,500号明細書(Queen)、同第6,982,321号明細書(Winter)、同第6,180,370号明細書(Queen)、同第6,054,297号明細書(Carter)、同第5,693,762号明細書(Queen)、同第5,859,205号明細書(Adair)、同第5,693,761号明細書(Queen)、同第5,565,332号明細書(Hoogenboom)、同第5,585,089号明細書(Queen)及び同第5,530,101号明細書(Queen)、Jones et al. (1986年) NATURE 321: p. 522-525、Riechmann et al. (1988年) NATURE 332: p. 323-327、Verhoeven et al. (1988年) SCIENCE 239: p. 1534-1536並びにWinter (1998年) FEBS LETTER 430: p. 92-94に記載されている。40

#### 【0070】

10

20

30

40

50

「超ヒト化」と呼ばれる方法では、ヒトにおける免疫原性が低減又は除去されている抗体を別のタイプの移植によって作製する。超ヒト化法では、ヒトCDRのヒト化対象マウス抗体のCDRに対する構造的類似性に基づいて一組のヒト生殖細胞遺伝子からヒトFR配列を選択する。この方法については、例えば、米国特許第6,881,557号明細書(FOOT E)及びTan et al.(2002年)J. IMMUNOL. 169:p.1119-1125に記載されている。

#### 【0071】

免疫原性を低減する他の方法としては、ヒト化抗体を作製するための「再成形(reshaping)」、「超キメラ化」又は「ベニア化(veneering)/再表面化(resurfacing)」と呼ばれる技術が挙げられる。例えば、Vaswami et al.(1998年)ANNALS OF ALLERGY, ASTHMA, & IMMUNOL. 81:p.105、Roguska et al.(1996年)PROT. ENGINEER 9:p.895-904及び米国特許第6,072,035号明細書(Hardman)を参照されたい。ベニア化/再表面化法では、マウス抗体の表面接近可能アミノ酸残基をヒト抗体の同一位置により多くみられるアミノ酸残基によって置換する。このタイプの抗体再表面化については、例えば、米国特許第5,639,641号明細書(Pedersen)に記載されている。

#### 【0072】

マウス抗体をヒトにおける医学的用途に好適な構造に変換するための1つの典型的な方法は、ACTIVMAB(商標)技術(Vaccine社、ロチェスター、ニューヨーク州)と呼ばれ、これは哺乳動物細胞で抗体を発現させるためのワクシニアウイルス系ベクターを必要とする。免疫グロブリン重及び軽鎖の高レベルの組み合わせ多様性がもたらされると言われている。例えば、米国特許第6,706,477号明細書(Zauderer)、同第6,800,442号明細書(Zauderer)及び同第6,872,518号明細書(Zauderer)を参照されたい。

#### 【0073】

マウス抗体をヒトにおける用途に好適な構造に変換するための別の典型的な方法は、カロビオス・ファーマシューティカルズ社(Kalobios Pharmaceutical, Inc.) (パロアルト、カリフォルニア州)により商業的に実施されている技術である。この技術は、特許権のあるヒト「アクセプター」ライプラリを用いて抗体選択用の「抗原決定基に焦点を合わせた」ライプラリを作製するものである。

#### 【0074】

マウス抗体をヒトにおける医学的用途に好適な構造に修飾するための別の典型的な方法は、XOMA(米国)LLC社によって商業的に実施されているHUMAN ENGINEERING(商標)(HE(商標))技術である。例えば、国際公開第93/11794号パンフレット並びに米国特許第5,766,886号明細書、同第5,770,196号明細書、同第5,821,123号明細書及び同第5,869,619号明細書を参照されたい。

#### 【0075】

上記方法のいずれかを含む任意の適切な方法を用いて対象とする結合蛋白質のヒト免疫原性を低減又は除去することができる。

#### 【0076】

さらに、マウスにおいて完全にヒト型の抗体を作製することが可能である。この方法では、マウスの抗体産生遺伝子がヒト抗体産生遺伝子の実質的な部分で置換されている遺伝子導入マウスを用いてヒト型抗体を調製する。このようなマウスは、マウスの免疫グロブリン分子ではなく、ヒト型の免疫グロブリンを产生する。例えば、国際公開第98/24893号パンフレット(Jacobovitz et al.)及びMendez et al.(1997年)NATURE GENETICS 15:p.146-156を参照されたい。完全にヒト型の抗HGFモノクローナル抗体は、以下の方法を用いて作製することができる。ヒト型免疫グロブリン遺伝子を有する遺伝子導入マウスを対象と

10

20

30

30

40

50

する抗原、例えば HGF で免疫する。次いで、このマウスからマウスのリンパ細胞を得、これを脊髄系細胞株と融合させて不死化ハイブリドーマ細胞株を調製する。このハイブリドーマ細胞株をスクリーニングし、HGF に特異的な抗体を産生するハイブリドーマ細胞株を特定するための選択を行う。

#### 【0077】

本発明の結合蛋白質は、その目的とする用途に応じて他の分子と結合させることができる。例えば、結合蛋白質を治療剤として用いようとする場合、この結合蛋白質を別の作用物質、例えば、その治療を調節するか、それとも促進するエフェクター分子と結合させることができる。このエフェクターが非蛋白質系の作用物質、例えば、低分子薬剤、放射標識又は毒素である限り、この物質を標準的なインビトロ結合化学反応を用いて結合蛋白質に化学的に結合させることができる。一方、エフェクター分子が蛋白質又はペプチド、例えば、酵素、受容体、毒素、成長因子、サイトカイン又は他の免疫調節因子である場合、結合蛋白質は、インビトロ結合化学反応を用いてこのエフェクターに化学的に結合させることができ、或いは、融合蛋白質としてこのエフェクターに結合させることができる。融合蛋白質は、セクション II に記載したのと同様な技術を用いて構築し、発現させることができる。

#### I V . 結合蛋白質の用途

本明細書に記載した結合蛋白質は、診断剤又は治療剤として用いることができる。

#### 【0078】

##### (1) 治療的用途

本発明の結合蛋白質は、HGF の活性を中和するので、種々の治療的用途に用いることができる。例えば、本発明の結合蛋白質の一部は、過剰増殖性疾病又は疾患、例えば、各種形態の癌の予防又は治療に有用である。

#### 【0079】

上記結合蛋白質を用いることにより腫瘍細胞の増殖を抑制又は低減させることができる。このような方法では、腫瘍細胞に対して治療的有効量の上記結合蛋白質を作用させることによって腫瘍細胞の増殖を抑制又は低減させる。一部の実施態様として、上記結合蛋白質は、腫瘍細胞の増殖を少なくとも 50%、60%、70%、80%、90%、95% 又は 100% 抑制する。

#### 【0080】

一部の実施態様として、上記結合蛋白質を用いることにより、結合蛋白質が hHGF の c-Met への結合能を低減させることで腫瘍細胞の増殖を抑制又は低減させる。他の実施態様として、上記結合蛋白質を用いることにより、表 5 及び 6 において抗体 3B6 が示すように、この結合蛋白質が hHGF に結合するが、hHGF の c-Met への結合を実質的に抑制しない場合にも腫瘍細胞の増殖は抑制され、又は低下する。

#### 【0081】

さらに、上記結合蛋白質を用いることにより、哺乳動物における腫瘍の成長又は発症を抑制又は遅延させることができる。このような方法では、有効量の上記結合蛋白質を哺乳動物に投与することによってこの哺乳動物における腫瘍の成長を抑制又は遅延させる。従って、上記結合蛋白質を用いることによって、例えば、哺乳動物において腫瘍を治療することができる。この方法は哺乳動物に治療的有効量の上記結合蛋白質を投与するものである。上記結合蛋白質を単独又は別の医薬として有効な分子と併用して投与することにより腫瘍を治療することができる。

#### 【0082】

本発明の結合蛋白質は、種々の HGF 反応性疾患、例えば、肺癌、乳癌、大腸癌、前立腺癌、卵巣癌、頭頸部癌、卵巣癌、多発性骨髄腫、肝臓癌、胃癌、食道癌、腎癌、鼻咽腔癌、膀胱癌、中皮腫、黒色腫及びグリア芽細胞腫における HGF 反応性腫瘍細胞などの治療に用いることができる。

#### 【0083】

本明細書でいう「治療する」、「治療すること」と「治療」とは、哺乳動物、特にヒ

10

20

30

40

50

トにおける病態の治療のことを指し、(a)その病態が哺乳動物において、特に、その哺乳動物がその病態に罹患する素因を有するが、まだこれを有していないと診断されている場合に発生するのを予防すること、(b)その病態を抑制する、即ち、その発症を阻止すること、及び／又は(c)その病態を緩和すること、即ち、その病態を軽減させること含む。

#### 【0084】

一般に、活性成分の治療的有効量は、約0.1mg/kg乃至約100mg/kg、必要に応じて約1mg/kg乃至約100mg/kg、必要に応じて約1mg/kg乃至約10mg/kgの範囲となる。投与の量は、治療対象の疾患又は徴候の種類及び程度、特定の患者の全般的な健康状態、送達する結合蛋白質の相対的生物学的有効性、この結合蛋白質の剤型、製剤中の添加物の存在及び種類並びに投与経路などの変数によって決まることになる。所望の血液濃度又は組織濃度に急速に到達させるために、初期の投与用量を上記の上限を超えて増加させることができ、又は初期用量を最適用量より少なくすることができ、さらに、特定の状況に応じて治療の過程で初期用量を段階的に増加させることができる。ヒトにおける用量は、例えば、0.5mg/kg乃至20mg/kgで実施するようデザインされた通常の第I相用量増加試験において最適化することができる。投与頻度については、投与経路、投与量、治療対象の疾患状態などの要因によって変更することができる。典型的な投与頻度は、1日当たり1回、1週当たり1回、2週ごとに1回である。好ましい投与経路は全身性投与、例えば、静脈内注入である。モノクローナル抗体系薬剤の製剤化については当該技術分野では日常的な技術の範囲内にある。本発明の一部の実施態様として、上記結合蛋白質、例えばモノクローナル抗体は、凍結乾燥され、投与時に緩衝生理食塩水で元に戻される。10  
20

#### 【0085】

上記結合蛋白質は、単独又は他の医薬として有効な成分との併用で投与することができる。上記他の有効な成分、例えば、免疫調節剤はこの結合蛋白質と一緒に投与することができ、或いはこの結合蛋白質投与の前又は後で投与することができる。

#### 【0086】

治療的用途の上記結合蛋白質含有製剤としては、典型的には、上記結合蛋白質を医薬用として許容可能な担体と組み合わせたものが挙げられる。本明細書でいう「医薬用として許容可能な担体」とは、正しい医学的判断の範囲内で、妥当な利益／危険度比に見合って、過度の毒性、刺激、アレルギー応答又は問題もしくは合併症を伴うことなくヒトその他の動物の組織と接触させて用いるのに適している緩衝剤、担体及び賦形剤を意味する。この担体は、製剤のその他の成分と適合し、レシピエントに対して有害でないという意味で「許容可能」でなければならない。なお、医薬用として許容可能な担体は、医薬用としての投与に適合するありとあらゆる緩衝剤、溶媒、分散媒、被覆剤、等張性吸収遅延剤などを含むものとする。医薬として有効な物質のためのこのような媒体及び剤については当該技術分野では周知である。30

#### 【0087】

こうした製剤は、投与単位形態で適宜提示することができ、薬学分野で公知の方法のいずれかを含め、任意の適切な方法によって調製することができる。本発明の医薬組成物は、対象とする投与経路に適合するように製剤化する必要がある。投与経路としては、例えば、全身性投与又は非全身性投与、例えば、静脈内、皮内、吸入、経皮（局所）、経粘膜及び直腸投与が挙げられる。経口又は全身性投与に有用な液剤は、例えば、「Remington's Pharmaceutical Sciences」、第18版（Mack Publishing Company）1990年）に記載されている、医薬分野で公知の方法のいずれかによって調製することができる。40

#### 【0088】

経口投与に適した製剤は、所定量の上記結合蛋白質を含有する、注射液、カプセル剤、ゼラチンカプセル剤、サッシェ剤、錠剤、トローチ剤又は舐剤などの個々の単位体；粉末状又は顆粒状組成物；水性液体又は非水性液体の液剤又は懸濁剤；或いは水中油型乳剤又50

は油中水型乳剤の形をとることができる。

【0089】

全身性投与に適した製剤は、例えば、以下の成分、即ち、注射用水などの滅菌希釈液、食塩水、固定油類、ポリエチレングリコール類、グリセリン、プロピレングリコール又は他の合成溶媒；ベンジルアルコール又はメチルパラベンなどの抗菌剤；アスコルビン酸又は亜硫酸水素ナトリウムなどの抗酸化剤；エチレンジアミン四酢酸などのキレート化剤；酢酸塩、クエン酸塩又はリン酸塩などの緩衝剤及び塩化ナトリウム又はデキストロースなどの等張性調整用剤を含む。pHは塩酸又は水酸化ナトリウムなどの酸又は塩基で調整することができる。全身性投与用製剤は、アンプル、使い捨て注射器、或いはガラス又はプラスチック製多回投与用バイアルに封入することができる。

10

【0090】

一般的に言って、注射剤用途に適した組成物としては、水溶液（水溶性の場合）又は分散液、及び滅菌注射液又は分散液の即時調整用粉末が挙げられる。静脈内投与の場合、好適な担体としては、生理食塩水、静菌水、クレモフォア（Cremophor）ELTM（BASF社、パーシッpany（Parsippany）、ニュージャージー州）又はリン酸緩衝生理食塩水（PBS：phosphate buffered saline）が挙げられる。これは作製及び貯蔵の条件下で安定である必要があり、細菌、真菌などの微生物の汚染作用に対して保護される必要がある。上記担体は、例えば水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール及び液状ポリエチレングリコール）並びにこれらの適切な混合物を含む溶媒又は分散媒とすることができる。

20

【0091】

医薬製剤は滅菌されていることが好ましい。滅菌は、例えば、滅菌濾過膜を通す濾過によって達成することができる。組成物が凍結乾燥される場合、この方法を用いた滅菌は凍結乾燥及び再形成の前又は後に行うことができる。医薬組成物は、ひとたび製剤化すれば、例えば、溶液、懸濁液、ゲル、乳液、固体として、又は脱水もしくは凍結乾燥粉末としてバイアルに貯蔵することができる。

【0092】

(2) 診断用途

上記結合蛋白質を診断目的のためにインビトロ又はインビボで用いる場合はいつも、この結合蛋白質を検出可能な成分で直接又は間接に標識するのが通常である。この検出可能成分は、検出可能なシグナルを直接的又は間接的に発生することができる任意の成分とすることができる。例えば、この検出可能成分は、<sup>3</sup>水素（<sup>3</sup>H）、<sup>14</sup>炭素（<sup>14</sup>C）、<sup>32</sup>燐（<sup>32</sup>P）、<sup>35</sup>硫黄（<sup>35</sup>S）又は<sup>125</sup>ヨウ素（<sup>125</sup>I）などの放射性同位体；フルオレッセインイソチオシアネート、ローダミン又はルシフェリンなどの蛍光又は化学発光化合物；アルカリ性ホスファターゼ、ベータ-ガラクトシダーゼ又はホースラディッシュペルオキシダーゼなどの酵素；スピノ標識などのスピノプローブ；或いは、カラーパーティクル、例えばラテックスもしくは金粒子であってもよい。上記結合蛋白質を、例えば、Hunter et al. (1962年) NATURE 144: p. 945、David et al. (1974年) BIOCHEMISTRY 13: p. 1014、Pain et al. (1981年) J. IMMUNOL. METH. 40: p. 219及びNygren (1982年) J. HISTOCHEM. AND CYTOCHEM. 30: p. 407に記載されているような、当該技術分野において周知の多くの方法を用いて上記検出可能成分に結合させることは理解されよう。これらの標識は、例えば、目視により、又は分光光度計その他の検出器を用いて検出することができる。

30

【0093】

上記結合蛋白質は、当該技術分野で利用可能な広範囲の免疫測定技術において用いることができる。典型的な免疫測定法としては、例えば、サンドイッチ免疫測定法、競合免疫測定法、免疫組織化学的方法が挙げられる。

【0094】

40

50

サンドイッチ免疫測定法では、被分析物、即ち、対象とする抗原に結合する2種の抗体、例えば、固体担体上に固定化した1種と、溶液中に遊離し、検出可能成分で標識された1種とを用いる。抗原を含むサンプルをこの系に添加すると、抗原は、上記の固定化抗体及び標識抗体の両者に結合して担体の表面に「サンドイッチ」免疫複合体を形成する。結合しなかったサンプル成分及び過剰の標識抗体を洗い落とし、担体表面で蛋白質と複合体化した標識抗体の量を測定することにより上記複合体化蛋白質を検出する。或いは、上記の溶液中に遊離した抗体を、この遊離抗体に結合する検出可能成分で標識した第3の抗体によって検出することができる。免疫学的測定法のデザイン、理論及びプロトコルに関する詳細な総説は、Butt編、(1984年) PRACTICAL IMMUNOLOGY、マーセルデッカー社(Marcel Dekker)、ニューヨーク、Harlow et al.編(1988年) ANTIBODIES, A LABORATORY APPROACH、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリ(Cold Spring Harbor Laboratory)及びDiamond et al.編(1996年) IMMUNOASSAY、アカデミックプレス社(Academic Press)ボストンを含む多くの教科書に見出すことができる。

#### 【0095】

上記標識結合蛋白質はインビオ造影剤として有用であり、これにより結合蛋白質はレシピエントの特定の対象組織を標的にしてこの造影剤を送達することができる企図されている。インビオイメージング用の好ましい遠隔検出可能成分としては、約6時間の半減期を有するガンマ放出体である放射性原子テクネチウム<sup>-99m</sup>(<sup>99m</sup>Tc)が挙げられる。また、インビオイメージングにおいて有用な非放射性成分としては、インサイト(in situ)でプロトン緩和を誘導するニトロキシドスピナーベル並びにランタニド及び遷移金属イオンが挙げられる。免疫イメージングの他に、標的とする細胞を破壊するために、複合体化放射性成分を標準的な放射免疫治療プロトコルで用いることができる。高線量放射免疫治療用の好ましいヌクレオチド類は、放射性原子<sup>90</sup>イットリウム(<sup>90</sup>Yt)、<sup>131</sup>ヨウ素(<sup>131</sup>I)及び<sup>111</sup>インジウム(<sup>111</sup>In)を含む。上記結合蛋白質は、イメージング分野で周知の結合技術を用いて<sup>131</sup>I、<sup>111</sup>In及び<sup>-99m</sup>Tcで標識することができる。同様に、造影剤を調製し投与する方法及びイメージを捕捉し処理する方法もイメージング分野において公知であるので、本明細書では詳しく論じない。同様に、抗体を利用した免疫療法を実施する方法も当該分野では公知である。例えば、米国特許第5,534,254号を参照されたい。

#### 【0096】

本説明の全体を通して、組成物が特定の成分を有する(having)、含む(including)又は含む(comprising)と記載されているところでは、組成物は、本質的にその列挙された成分からなる、又はこれらの成分からなることも企図されている。同様に、工程が特定の工程段階を有する(having)、含む(including)又は含む(comprising)と記載されているところでは、その工程は、また、本質的にその列挙された工程段階からなる、又はこれらの工程段階からなる。特に示さない限り、段階の順序又は特定の処置を行う順序は、本発明が実施可能である限り、重要ではない。さらに、特に断りのない限り、2つ以上の段階又は処置を同時に実施することができる。

#### 【実施例】

#### 【0097】

以下の実施例では、いくつかの抗hHGFモノクローナル抗体の作製及び特性化について検討する。

##### (実施例1)

##### 抗hHGFモノクローナル抗体の作製

この実施例ではいくつかの抗hHGFモノクローナル抗体の作製について説明する。

#### 【0098】

免疫化、融合及び一次スクリーニングについては、反復性複数部位免疫化(RIMMS)

10

20

30

40

50

: Repetitive Immunization Multiple Sites) プロトコルに従ってMBS社(ポートランド、メイン州)で行われた。AJマウス5匹及びBalb/cマウス5匹を組換えヒトHGF(R&Dシステムズ社(R&D Systems)、ミネアポリス、ミネソタ州、カタログ番号294-HGN-025)で免疫化した。酵素結合免疫測定法(ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay)で最も高い抗HGF活性を示す血清を有するマウス2匹を後の融合のために選んだ。該当するマウスから脾臓及びリンパ節を採取した。次いで、B細胞を採取し、骨髄腫細胞株と融合させた。融合産物は1枚以上のプレート上でほぼクローン性になるまで連続希釈した。得られた融合産物からの上清をELISAによりそのhHGFへの結合についてスクリーニングした。HGFに対する抗体を含むとみなされた上清は、さらに、以下の実施例で検討したようにして、インビオ機能試験により特性を明らかにした。1パネルのハイブリドーマを選択し、このハイブリドーマをサブクローニングして増やした。次いで、得られたモノクローナル抗体を標準的な条件下でプロテインA/G樹脂を用いるアフィニティーコロマトグラフィーにより精製した。

#### (実施例2)

##### 抗hHGFモノクローナル抗体の配列分析

この実施例では実施例1で作製した抗hHGFモノクローナル抗体のアイソタイプ及び配列の分析について説明する。

#### 【0099】

##### a. HGFマウスマノクローナル抗体アイソタイプの決定

各モノクローナル抗体の軽鎖タイプ及び重鎖アイソタイプについて、イソストリップマウスマノクローナル抗体アイソタイピングキット(IsoStrip Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit)を用い、そのメーカーの使用説明書(ロシュ・アプライド・サイエンス社(Roche Applied Science))に従って決定した。

#### 【0100】

全ての抗体は、カッパ免疫グロブリン軽鎖及びIgG1免疫グロブリン重鎖を含むように決定した。

#### 【0101】

##### b. 免疫グロブリン重及び軽鎖可変領域をコードしているヌクレオチド配列の決定

各モノクローナルハイブリドーマ細胞株から、RNeasyミニプレップ(Miniprep)キットを用い、そのメーカーの使用説明書(キヤゲン社(Qiagen)、ヴェンロ、オランダ)に従って全RNAを抽出した。BD SMART(商標)RACE cDNA增幅キットを用い、そのメーカーの使用説明書(クロントック社(Clontech))に従い、5'RACE(cDNA末端の迅速增幅(Rapid Amplification of cDNA Ends))のためのオリゴヌクレオチドプライマBD SMART II A(5'aagcagtggtatcaacgcagagtagccgg 3')(配列番号85)及び5'-RACE CDS Primer(5'tttttttttttttttttttttttvn 3'、但し、v=a, g又はc及びn=a, g, c又はt)(配列番号86)を用いて、完全長の第1鎖cDNAを作製した。

#### 【0102】

エキスパンドハイフィデリティ(Expand High-Fidelity)PCRシステム(ロシュ・アプライド・サイエンス社)を用い、そのメーカーの使用説明書に従ってPCR(Polymerase Chain Reaction(ポリメラーゼ連鎖反応))により上記カッパ及び重(IgG1)免疫グロブリン鎖の可変領域を増幅させた。重鎖可変領域は、5'オリゴヌクレオチドプライマ混合物ユニバーサルプライマミックスA(Universal Primer Mix A)(5'ctaatacgactcactataggc 3'(配列番号87)と5'ctaatacgactcactataggc 3'(配列番号88)を用いて、完全長の第1鎖cDNAを作製した。

10

20

30

40

50

8 )との混合物)及び3' IgG1定常領域特異的プライマ5' t a t g c a a g g c t t a c a a c c a c a 3' (配列番号89)又は5' g c c a g t g g a t a g a c a g a t g g g g g t g t c g 3' (配列番号90)を用いて増幅した。カッパ鎖可変領域は、5' オリゴヌクレオチドプライマ混合物ユニバーサルプライマミックスA及び3' カッパ定常領域特異的プライマ5' c t c a t t c c t g t t g a a g c t c t t g a c a a t 3' (配列番号91)又は5' c g a c t g a g g c a c c t c c a g a t g t t 3' (配列番号92)を用いて増幅した。

#### 【0103】

個々のPCR産物をアガロースゲル電気泳動により分画し、キアクイック・ゲル精製(Qiaquick Gel Purification)キットを用い、そのメーカーの使用説明書(キアゲン社)に従って精製した。次いで、トポイソメラーゼ利用クローニングキットTOPO TAクローニング(登録商標)キット(pCR(登録商標)2.1-TOPO(登録商標)ベクターを含む)を用い、そのメーカーの使用説明書(インビトロジェン社(Invitrogen)、カールズバッド、カリフォルニア州)に従って、これらのPCR産物をpCR2.1 TOPOプラスミド中にクローニングした後、標準的な形質転換技術を用いて細菌DH5に形質転換した。形質転換した細菌のクローンから単離したプラスミドDNAについて、アジェンコートバイオサイエンス社(Agentcourt Bioscience)のT7(5' T A A T A C G A C T C A C T A T A G G G 3') (配列番号93)、M13順方向プライマ(5' G T A A A A C G A C G G C C A G T 3') (配列番号94)及びM13逆方向プライマ(5' C A G G A A A C A G C T A T G A C C 3') (配列番号95)を用い、標準的なジデオキシDNA配列決定方法により配列を決定することにより可変領域配列の配列を特定した。ベクターNTI(Vector NTI)ソフトウェア(インビトロジェン社、カールズバッド、カリフォルニア州)及びIMGT/V-クエスト(Quest)ウェブサーバー(<http://imgt.cines.fr/textes/quest>)を用いてこれらの配列を解析し、可変領域の配列を同定、確認した。

#### 【0104】

c . 1 A 3、1 D 3、1 F 3 及び 2 B 8 カッパ及び IgG1鎖の免疫グロブリン重及び軽鎖定常領域の配列をコードしているヌクレオチド配列の決定

順方向プライマ5' g g g g a c a a g t t t g t a c a a a a a a g c a g g c t g c c a c c a t g a a c t t t g g g c t c a g a t t g a t t t c c 3' (下線箇所:開始コドン)(配列番号96)及び逆方向プライマ5' g g g g a c c a c t t t g t a c a a g a a a g c t g g g t t c a t t a c c a g g a g a g t g g g a g a g g 3' (下線箇所:停止コドン)(配列番号97)を用いて上記で作製したcDNAから、1A3、1D3及び1F3 IgG1鎖の完全長cDNAをPCRにより増幅させた。順方向プライマ5' g g g g a c a a g t t t g t a c a a a a a a g c a g g c t g c c a c c a t g g g a t g g a g c t a t a t c a t c c t c t t 3' (下線箇所:開始コドン)(配列番号98)及び逆方向プライマ5' g g g g a c c a c t t t g t a c a a g a a a g c t g g g t t c a t t a c c a g g a g a g t g g g a g a g g 3' (下線箇所:停止コドン)(配列番号99)を用いて上記で作製したcDNAから、2B8 IgG1鎖の完全長cDNAを増幅させた。

#### 【0105】

順方向プライマ5' g g g g a c a a g t t t g t a c a a a a a a g c a g g c t g c c a c c a t g g a a t c a c a g a c t c t g g t c t t c a t a 3' (下線箇所:開始コドン)(配列番号100)及び逆方向プライマ5' g g g g a c c a c t t t g t a c a a g a a a g c t g g g t c t a a c a c t c a t t c c t g t t g a a g c t c 3' (下線箇所:停止コドン)(配列番号101)を用いて2B8カッパ鎖の完全長cDNAを増幅させた。PCR断片をゲートウェイ(Gateway)BP組換え反応によりpDONR221(インビトロジェン社、カールズバッド、カリフォルニア州)中にクローニングし、標準的なジデオキシDNA配列決定方法を用いてアジェンコートバイオサイ

10

20

30

40

50

エンス社で配列決定することによりその定常領域の配列を同定し、さらに可変領域の配列を確認した。

## 【0106】

d. 配列の解析

可変領域（標準テキスト）は、IMGT/V-QUESTウェブサーバーソフトウェア（<http://imgt.cines.fr/textes/quest/>）を用いて同定した。シグナルペプチド配列は、同定した可変領域の上流にあるインフレーム開始コドン（ATG）の同定に基づいて予測した。シグナルペプチド配列を同定し、下記に下線で示した。

## 【0107】

10

各可変領域の最後のヌクレオチドは、可変／定常領域結合により生じる次のコドンの最初の塩基である。このヌクレオチドは、そのエキソンの一部であるので、可変領域に含まれる。以下に列挙した定常領域のアミノ酸配列にはこの結合コドンの翻訳が含まれる。

## 【0108】

完全な重鎖又はカッパ鎖抗体配列を作製するためには、下記の可変領域の配列をそのそれぞれの定常領域の配列と結合させる（下線箇所：シグナル配列）。

## 【0109】

(1) 1 A 3 重鎖可変領域（配列番号1）

## 【0110】

## 【化1】

20

```

1   atgaactttg ggctcagatt gattitccctt gtccttggtt taaaagggtgt gaagtgtgaa
61  gtgcagctgg tggagtctgg gggaggctta gtgcagccctg gagggtccct gaaactctcc
121 tgcgcgcctt ctgaattcac ttcatgtt cttgggttcg ccagactcca
181 gagaagagggc tgcaatgggtt cgccatacatt agtcctgggtg gtggtagctc ctactatcca
241 gccagggtgtga agggtcgatt caccatctcc agagacaatg ccaagaacac cctgtaccc
301 caaatgagca gtctgaagtc tgaggacaca gccatgtt actgtcaag acaagggat
361 gtttactacg gggactatgc tatggactac tgggtcaag gaacctcagt caccgtctcc
421 tcag

```

30

(2) 1 A 3 カッパ軽鎖可変領域（配列番号3）

## 【0111】

## 【化2】

```

1   atgatgttgtc ccactcaggt cctgggttg ctgcgtgtgt ggcttacaga tgccagatgt
61  gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgtt ctgtgggaga aactgtcacc
121 atcacatgtc gagcaagtga gaatatttat agtaatttag catggatca gcagaaacag
181 ggaaaatctc ctcaatgtt ggtctatgtt gcaacaaact tagcagatgg tgtccatca
241 aggttcagtg gcagtggatc aggacacacag tttccctca agatcaacac cctgcgtct
301 gaagattttg ggacttatta ctgtcaacat tttgggtta ctccgtacac gttcgagg
361 gggaccaacg tggaaataaa ac

```

40

(3) 2 B 8 重鎖可変領域（配列番号11）

## 【0112】

【化3】

1    atgggatgga gctatatcat cctcttttg gtagcaacag ctacagatgt ccactccag  
 61    gtccaactgc agcagcctgg ggctgaactg gtgaagcctg ggacttcagt gaagctgtcc  
 121    tgcaaggctt ctggctacac cttcaccacc tactggatgc actgggtgaa tcagaggcct  
 181    ggacaaggcc ttgagtgatg tggagagatt aatcctacca acggcataac taactacaat  
 241    gagaagttca agagcaaggc cacactgact gtagacaat cctccagcac agcctacatg

【0 1 1 3】

【化4】

10

301    caactcagca gcctgacatc tgaggactct gcggcttatt actgtgcaag aaactatgtt  
 361    ggttagcatct ttagactactg gggccaaggc accactctca cagtcctc ag  
 (4) 2 B 8 カッパ軽鎖可変領域（配列番号13）

【0 1 1 4】

【化5】

20

1    atggaatcac agactcttgtt ctccatatcc atactgctct ggttatatgg tgctgtatggg  
 61    aacattgtta tgacccaatc tcccaaattcc atgtccatgt cagtaggaga gagggtcacc  
 121    tttagctgca aggccatgtga gaaatgtggttt tcttatgtat cctggatca acagaaacca  
 181    ggcgcgtctc ctaaaactgtat gatatacggg gcatccaacc ggaacactgg ggtccccgat  
 241    cgcttcacag gcagtggatc tgcaacagat ttcaactctga ccatcagcag tgtgcggct  
 301    gaagaccttg cagattatca ctgtggcag agttacaact atccgtacac gttcggaggg  
 361    gggaccaggc tggaaataaa ac

(5) 2 F 8 重鎖可変領域（配列番号21）

【0 1 1 5】

【化6】

30

1    atggaatgga gctgggtctt tctcttcctc ctgtcagtaa ctgcagggtgt ccactgccag  
 61    gtccagctga agcagtcgtt agctgagctg gtgaggcctg ggacttcagt gaagatgtcc  
 121    tgcaaggctt ctggctacac cttcactacc tactatatac actgggtgaa tcagaggcct  
 181    ggacaggcc ttgagtgatg tggaaagatt ggtcctggaa gtggtagtac ttactacaat  
 241    gagatgtca aagacaaggc cacattgact gtagacacat cctccagcac agcctacatg  
 301    cagctcagca gcctgacatc tgacgactct gcggcttatt tctgtgcaag aaggggactg  
 361    ggacgtggct ttgactactg gggccaaggc accactctca cagtcctc ag

(6) 2 F 8 カッパ軽鎖可変領域（配列番号23）

【0 1 1 6】

【化7】

40

1    atggagacag acacaatccct gctatgggtg ctgctgctct gggtccagg ctccactgg  
 61    gacattgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctaggcga gagggccacc  
 121    atctcctgca aggccagcca aagtgttgat tatgtatggta atagttatata caactggatc  
 181    caacagaaac caggacagcc acccaaagtc ctcatctatg ttgcacatcaa tctagaatct  
 241    gggatcccag ccagggttag tggcagtggg tctggacag acttcaccct caacatccat  
 301    cctgtggagg aggaggatgc tgcaacccat tactgtcagc aaagtatgtaa ggtacccccc  
 361    acgttcggtg ctggaccaa gcggagctg aaac

(7) 3 B 6 重鎖可変領域（配列番号31）

50

【 0 1 1 7 】

【 化 8 】

1     atggaatggc cttgtatctt tctcttcctc ctgtcagtaa ctgaagggtgt ccactcccgag  
 61    gttcagctgc agcagtctgg ggctgaactg gtgaggcctg ggtcctcagt gaagatttcc  
 121   tgcaaggctt ctggctatgt attcagtagc tactggatga actgggtgaa gcagaggcct

【 0 1 1 8 】

【 化 9 】

181   ggacagggtc ttgagtggt tggacagatt tatccctggag atggtgatag taactacaat  
 241   ggaaacttca agggtaaagc cacactgact gcagacaaat cctccagtac agcctacatg  
 301   cagctcagca gcctaaccatc tgaggactct gcggcttatt tctgtgcattc ccagctcggg  
 361   ctacgtgaga actactttga ctactggggc caaggccacca ctctcacagt ctccctcag

10

( 8 ) 3 B 6 カッパ軽鎖可変領域（2個の可能な A T G 開始コドン（大文字））（配列番号 3 3 ）

【 0 1 1 9 】

【 化 1 0 】

1     ATGgacATGa ggaccctgc tcagttctt ggaatcttgt tgctctggtt tccaggtatc  
 61    aaatgtgaca tcaagatgac ccagtcctca tcttccatgt atgcacatctt aggagagaga  
 121   gtcacaatca ctgcacaggc gagtcaggac attaaaagct attaagctg gtccagcag  
 181   aaaccaggga aatctctaa gaccctgatc tatcgtgtaa acagattggt agatgggtc  
 241   ccatcaagggt tcagiggcag tggatctggg caagattttt ctctcaccat caccagcctg  
 301   gagaatgaag atatggaaat ttattattgt ctacagtgatg atgagttcc gttcacgttc  
 361   ggagggggga ccaagctgga aataaagc

20

( 9 ) 3 D 1 1 重鎖可変領域（配列番号 4 1 ）

【 0 1 2 0 】

30

【 化 1 1 】

1     atggctgtcc cgggtgtt cctctgcotc gtgtcatttc caagctgtgt cctgtcccgag  
 61    gtacagctga aggagtctgg acctggccctg gtggggccct cacagagccgttccatca  
 121   tgcactgtct ctgggttttc attaaccagc tatagttac actgggttcg ccagctccaa  
 181   ggaaagggtc tggaatggct gggagtaata tggctggtg gaaacacaaa ttataattcg  
 241   tctctcatgt ccagactgac catcaggaaa gacaactcca agagccaaat tttttaaaaa  
 301   atgaacagtc tgcaaactga tgacacagcc atgtactact gtgccagaga gaggtttgct  
 361   tactggggcc aaggactct ggtcactgtc tctgcag

40

( 1 0 ) 3 D 1 1 カッパ軽鎖可変領域（配列番号 4 3 ）

【 0 1 2 1 】

## 【化12】

1 atggatttc aactgcagat ttgcagctc ctgctaataca gtgcctcagt caaaatatcc  
 61 agaggacaaa ttgttctcac ccagtcctca gcaatcatgt ctgcataatcc aggggagaag  
 121 gtcaccatga ctgcagtgc cagtcagaatgt gtaaggataca tgcaactggta ccagcagaag  
 181 tcaggcacct cccccaaaag atggatttat gacacatcca aactggcttc tggagtccct  
 241 gctcgcttca gtggcagtgg gtctgggacc tcttactccc tcacaatcg tagtatggag  
 301 gctgaagatg ctgccactta ttactgccag cagtggagta gtaacccact cacgttcgg  
 361 gctgggacca agctggagct gaaac

10

(1 1) 1 D 3 重鎖可変領域（配列番号51）

## 【0122】

## 【化13】

1 atgaactttg ggctcagatt gatttccctt gtccttgttt taaaaggtgt gaagtgtgaa  
 61 gtcagctgg tggagtctgg gggaggctta gtgcagccctg gagggtccct gaaactctcc  
 121 tgtcggccct ctggattcac ttccatgtac tattacatgt ctgggttgc ccagactcca  
 181 gagaagaggc tggagtgggt cgccatcatt agtagtggtg gtggtagcac ctactatcca  
 241 gacagtgtga agggtcgatt caccatctcc cgagacaatg ccaagaacac cctgtacctg  
 301 caaatgagca gtctgaagtc tgaggacaca gccatattactgtgtgag acaagggat  
 361 ggttattacg gggactatgc tatggactac tgggtcaag gaaacctcagt catcgctcc  
 421 tcag

20

(1 2) 1 D 3 カッパ軽鎖可変領域（配列番号53）

## 【0123】

## 【化14】

1 atgagtgtgc ccactcaggt cctgggttg ctgcgtgtgt ggcttacaga tgtcagatgt  
 61 gacatccaga tgactcagtc tccagccctcc ctatctgtat ctgtgggaga aactgtcacc  
 121 atcacatgtc gaacaagtga gaataattac agtaatttag cgtggatca gcagaaacag  
 181 ggaaaatctc cttagctccat aatctatgtc gcaacaaact tagcagatgg tgtccatca  
 241 aggttcagtg gcagtggtc aggacacag ttccatca ggtcaacac cctgcagtc  
 301 gaagatttg ggaggttata ctgtcaacat ttgggggatccatc acgtggaggg  
 361 gggaccaaac tggaaataaa ac

30

(1 3) 1 F 3 重鎖可変領域（配列番号61）

## 【0124】

## 【化15】

1 atgaactttg ggctcagatt gatttccctt gtccttgttt taaaaggtgt gaagtgtgag  
 61 gtcagctgg tggagtctgg gggaggctta gtgcagctgt gagggtccct gaaactctcc  
 121 tgtcggccct ctggattcac ttccatgtac tattacatgt ctgggttgc ccagactcca  
 181 gagaagaggc tggagtgggt cgccatcatt agtagtggtg gtggtagcac ctactatcca  
 241 gacagtgtga agggtcgatt caccatctcc agagacaatg ccaagaacac cctgtacctg  
 301 caaatgagca gtctgaagtc tgaggacaca gccatgttactgtgtgag acaagggat  
 361 ggttattacg gggactatgc tatggactac tgggtcaag gaaacctcagt cacgttc  
 421 tcag

40

50

( 1 4 ) 1 F 3 カッパ軽鎖可変領域 ( 配列番号 6 3 )

【 0 1 2 5 】

【 化 1 6 】

1       atgagtgtgc ccactcaggt cctggggttg ctgctgtgt ggcttacaga tgccagatgt  
 61      gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgtat ctgtgggaga aactgtcacc  
 121     atcacatgtc gagcaagtga gaatatttac agtaatttag catggtatca gcagaaacag

【 0 1 2 6 】

【 化 1 7 】

10

181     gaaaaatctc ctcagctct ggtctatgtat gcaacacact taccagatgg tgtgccatca  
 241     aggttcagtg gcagtggatc aggacacacag tttccctca agatcaacag cctgcagtc  
 301     gaagattttg ggagtttata ctgtcaacat tttggggta ctccgtacac gttggaggg  
 361     gggaccagac tggaaattaa ac

( 1 5 ) 3 A 1 2 重鎖可変領域 ( 配列番号 7 1 )

【 0 1 2 7 】

【 化 1 8 】

20

1       atgaacttg ggctcagatt gattttcctt gtccttgttt taaaagggtgt gaagtgtgaa  
 61      gtcagctgg tggagtctgg gggaggctta gtgcagcctg gagggtccct gaaaatctcc  
 121     tgtcagcct ctggattttac ttcatgtat ttttgtcg ccagactcca  
 181     gagaagaggc tggagtgggt cgccatacatt agtagtggtg gtggtagcac ctactatcca  
 241     gacagtgtga agggtcgatt caccatctcc agagacaatg ccaagaacac cctgtacctg  
 301     caaatacataca gtcgttgc tgaggacaca gccatgtatt actgtgttac acaaggat  
 361     gttactatg gggactatgc tatggactac tgggtcaag gaacctcagt caccgtctcc  
 421     tcag

30

( 1 6 ) 3 A 1 2 カッパ軽鎖可変領域 ( 配列番号 7 3 )

【 0 1 2 8 】

【 化 1 9 】

1       atgagtgtgc ccactcaggt cctggggttg ctgctgtgt ggcttacaga tgccagatgt  
 61      gacatccaga tgactcagtc gccagcctcc ctatctgtat ctgtgggaga aactgtcacc  
 121     atcacatgtc gagcaagtga gaatatttac attaatttag catggtatca gcagaaacag  
 181     gaaaaatctc ctcagctct ggtccatgtat gcaacaaagt tagcagatgg tgtgccatca  
 241     aggttcagtg gcagtggatc aggacacacag tttccctca agatcaacag cctgcagtc  
 301     gaagattttg ggagtttata ctgtcaacat tttggggta ctccgtacac gttggaggg  
 361     gggaccacaaac tagaaataaa ac

40

( 1 7 ) 対照マウス IgG 1 重鎖定常領域 ( J 0 0 4 5 3 ) ( 配列番号 8 1 )

【 0 1 2 9 】

【化20】

1 ccaaaaacgac acccccacatct gtcttatccac tggccccctgg atctgtgtgcc caaactaact  
 61 ccatggtgac cctgggatgc ctggtcaagg gctattccc tgagccagtg acagtgacct  
 121 ggaactctgg atccctgtcc agcgggtgtgc acacccccc agctgtcctg gagtctgacc  
 181 tctacactct gagcagctca gtgactgtcc cctccagccc tcggcccage gagaccgtca  
 241 cctgcaacgt tgecccacccg gccagcagca ccaaggtgga caagaaaatt gtgcccaggg  
 301 atttgtggttg taaggcctgc atatgtacag tcccagaagt atcatctgtc ttcatcttcc  
 361 ccccaaagcc caaggatgtg ctcaccatta ctctgactcc taaggtcacg tgtgtgtgg

10

【0130】

【化21】

421 tagacatcag caaggatgat cccgagggtcc agttcagctg gttttagat gatgtggagg  
 481 tgcacacage tcagacgcaa ccccgggagg agcagtcaa cagcacittc cgctcagtca  
 541 gtgaacttcc catcatgcac caggactggc tcaatggcaa ggagttcaaa tgcagggtca  
 601 acagtgcage ttccctgc cccatcgaga aaaccatctc caaaacccaaa ggcagaccga  
 661 aggctccaca ggtgtacacc attccaccc ccaaggagca gatggccaag gataaagtca  
 721 gtctgacctg catgataaca gacttcttcc ctgaagacat tactgtggag tggcagtgga  
 781 atgggcagcc agcggagaac tacaagaaca ctcagccat catgaacacg aatggcttt  
 841 acttcgtcta cagcaagctc aatgtgcaga agagcaactg ggagggcagga aatactttca  
 901 cctgctctgt gttacatgag ggcctgcaca accaccatac tgagaagagc ctctcccact  
 961 ctccctggtaa atga

20

(18) 1A3、1D3、1F3及び2B8 (AJ系マウス由来)について決定された  
マウス IgG1重鎖定常領域 (配列番号82)

【0131】

## 【化22】

1 ccaaaaacgac acccccatct gtctatccac tggccctgg atctgtgcc caaaactaact  
 61 ccatggtgac cctggatgc ctggtaagg gctattccc tgagccatg acagtgacct  
 121 ggaactctgg atccctgtcc agcggtgtgc acaccctccc agetgtcctg cagtctgacc  
 181 tctacactt gaggcgtca gtgactgtcc cctccagcac ctggcccagc gagaccgtca  
 241 cctgcaacgt tgecccacccg gccagcagca ccaaggtgga caagaaaatt gtgcccaggg  
 301 atttgggttg taagccttgc atatgtacag tcccagaagt atcatctgtc ttcatcttcc  
 361 ccccaaagcc caaggatgtg ctcaccatata ctctgactcc taaggtaacg tgtgttgtgg 10  
 421 tagacatcg caaggatgtat cccgagggtcc agttcagctg ttgttagat gatgtggagg  
 481 tgcacacagc tcagacgca cccccggagg agcagttcaa cagcaacttc cgctcgtca  
 541 gtgaacttcc catcatgcac caggactggc tcaatggcaa ggagttcaaa tgcagggtca  
 601 acagtgcagc ttccctgcc cccatcgaga aaaccatctc caaaaaccaaa ggcagaccga  
 661 aggctccaca ggtgtacacc attcacccca ccaaggagca gatggccaag gataaaagtca  
 721 gtctgacccatgtataaca gacttcttcc ctgaagacat tactgtggag tggcagtggaa  
 781 atggcagcc agcggagaac tacaagaaca ctcagccat catggacaca gatggcttctt  
 841 acttcgtcta cagcaagctc aatgtcaga agagcaactg ggaggcagga aataacttca  
 901 cctgctctgt gttacatgag ggcctgcaca accaccatac tgagaagagc ctctccact  
 961 ctccctggtaa atga

(19) 対照マウスカッパ軽鎖定常領域 (V00807) 並びに 1D3、1F3 及び 2B8 (AJ 系マウス由来) について決定されたマウスカッパ軽鎖定常領域 (配列番号 83 )

## 【0132】

## 【化23】

1 gggctgatgc tgcaccaact gtatccatct tcccaccatc cagtggcag ttaacatctg 30  
 61 gaggtgcctc agtcgtgtgc ttcttgaaca acttctaccc caaagacatc aatgtcaagt  
 121 ggaagattga tggcagtgaa cgacaaaatg gcgtcctgaa cagttggact gatcaggaca  
 181 gcaaagacag cacctacagc atgagcagca ccctcacgtt gaccaaggac gatgtgaac  
 241 gacataacag ctataccgtt gaggccactc acaagacatc aacttcaccc attgtcaaga  
 301 gcttcaacag gaatgagtgt tag

(20) 1D3、1F3 及び 2B8 に比し変更されたヌクレオチド (下線箇所) を 1 個含む 1A3 について決定されたマウスカッパ軽鎖定常領域 (配列番号 84 )

## 【0133】

## 【化24】

1 gggctgatgc tgcaccaact gtatccatct tcccaccatc cagtggcag ttaacatctg  
 61 gaggtgcctc agtcgtgtgc ttcttgaaca acttctaccc caaagacatc aatgtcaagt  
 121 ggaagattga tggcagtgaa cgacaaaatg gcgtcctgaa cagttggact gatcaggaca  
 181 gcaaagacag cacctacagc atgagcagca ccctcacgtt gaccaaggac gatgtgaac  
 241 gacataacag ctataccgtt gaggccactc acaagacatc aacttcaccc attgtcaaga  
 301 gcttcaacag gaatgagtgt tag

実施例 1 で作製した抗体の免疫グロブリン重鎖可変領域を規定するアミノ酸配列は、いずれも図 2 に記載されている。これらの配列は全て相互に整列させてあり、シグナルペプ

チド、CDR<sub>1</sub>、CDR<sub>2</sub>及びCDR<sub>3</sub>を規定する配列は枠で囲んで識別されている。図3は、全ての抗体のCDR<sub>1</sub>、CDR<sub>2</sub>及びCDR<sub>3</sub>配列を別々に整列させて示したものである。

【0134】

実施例1で作製した全ての抗体の免疫グロブリン軽鎖可変領域を規定するアミノ酸配列は、いずれも図4に記載されている。これらの配列は全て相互に整列させてあり、シグナルペプチド、CDR<sub>1</sub>、CDR<sub>2</sub>及びCDR<sub>3</sub>を規定する配列は枠で囲んで識別されている。図5は、全ての抗体のCDR<sub>1</sub>、CDR<sub>2</sub>及びCDR<sub>3</sub>配列を別々に整列させて示したものである。

【0135】

便宜のため、本実施例で検討した抗体配列と配列表に示したものとの対応関係を示すコンコーダンス表を表1に示した。

【0136】

【表 1 A】

表 1

配列番号	蛋白質又は核酸	
1	重鎖可変領域 1A3 - 核酸	
2	重鎖可変領域 1A3 - 蛋白質	
3	軽(カッパ)鎖可変領域 1A3 - 核酸	
4	軽(カッパ)鎖可変領域 1A3 - 蛋白質	
5	重鎖 CDR <sub>1</sub> 1A3	
6	重鎖 CDR <sub>2</sub> 1A3	
7	重鎖 CDR <sub>3</sub> 1A3	
8	軽(カッパ)鎖 CDR <sub>1</sub> 1A3	10
9	軽(カッパ)鎖 CDR <sub>2</sub> 1A3	
10	軽(カッパ)鎖 CDR <sub>3</sub> 1A3	
11	重鎖可変領域 2B8 - 核酸	
12	重鎖可変領域 2B8 - 蛋白質	
13	軽(カッパ)鎖可変領域 2B8 - 核酸	
14	軽(カッパ)鎖可変領域 2B8 - 蛋白質	
15	重鎖 CDR <sub>1</sub> 2B8	
16	重鎖 CDR <sub>2</sub> 2B8	
17	重鎖 CDR <sub>3</sub> 2B8	
18	軽(カッパ)鎖 CDR <sub>1</sub> 2B8	
19	軽(カッパ)鎖 CDR <sub>2</sub> 2B8	
20	軽(カッパ)鎖 CDR <sub>3</sub> 2B8	
21	重鎖可変領域 2F8 - 核酸	20
22	重鎖可変領域 2F8 - 蛋白質	
23	軽(カッパ)鎖可変領域 2F8 - 核酸	
24	軽(カッパ)鎖可変領域 2F8 - 蛋白質	
25	重鎖 CDR <sub>1</sub> 2F8	
26	重鎖 CDR <sub>2</sub> 2F8	
27	重鎖 CDR <sub>3</sub> 2F8	
28	軽(カッパ)鎖 CDR <sub>1</sub> 2F8	
29	軽(カッパ)鎖 CDR <sub>2</sub> 2F8	
30	軽(カッパ)鎖 CDR <sub>3</sub> 2F8	
31	重鎖可変領域 3B6 - 核酸	
32	重鎖可変領域 3B6 - 蛋白質	
33	軽(カッパ)鎖可変領域 3B6 - 核酸	
34	軽(カッпа)鎖可変領域 3B6 - 蛋白質	
35	重鎖 CDR <sub>1</sub> 3B6	30
36	重鎖 CDR <sub>2</sub> 3B6	
37	重鎖 CDR <sub>3</sub> 3B6	
38	軽(カッパ)鎖 CDR <sub>1</sub> 3B6	
39	軽(カッпа)鎖 CDR <sub>2</sub> 3B6	
40	軽(カッпа)鎖 CDR <sub>3</sub> 3B6	
41	重鎖可変領域 3D11 - 核酸	
42	重鎖可変領域 3D11 - 蛋白質	
43	軽(カッпа)鎖可変領域 3D11 - 核酸	
44	軽(カッпа)鎖可変領域 3D11 - 蛋白質	
45	重鎖 CDR <sub>1</sub> 3D11	
46	重鎖 CDR <sub>2</sub> 3D11	
47	重鎖 CDR <sub>3</sub> 3D11	40

【0137】

【表1B】

配列番号	蛋白質又は核酸
48	軽(カッパ)鎖 CDR <sub>1</sub> 3D11
49	軽(カッパ)鎖 CDR <sub>2</sub> 3D11
50	軽(カッパ)鎖 CDR <sub>3</sub> 3D11
51	重鎖可変領域1D3-核酸
52	重鎖可変領域1D3-蛋白質
53	軽(カッパ)鎖可変領域1D3-核酸
54	軽(カッパ)鎖可変領域1D3-蛋白質
55	重鎖 CDR <sub>1</sub> 1D3
56	重鎖 CDR <sub>2</sub> 1D3
57	重鎖 CDR <sub>3</sub> 1D3
58	軽(カッパ)鎖 CDR <sub>1</sub> 1D3
59	軽(カッパ)鎖 CDR <sub>2</sub> 1D3
60	軽(カッパ)鎖 CDR <sub>3</sub> 1D3
61	重鎖可変領域1F3-核酸
62	重鎖可変領域1F3-蛋白質
63	軽(カッパ)鎖可変領域1F3-核酸
64	軽(カッパ)鎖可変領域1F3-蛋白質
65	重鎖 CDR <sub>1</sub> 1F3
66	重鎖 CDR <sub>2</sub> 1F3
67	重鎖 CDR <sub>3</sub> 1F3
68	軽(カッパ)鎖 CDR <sub>1</sub> 1F3
69	軽(カッパ)鎖 CDR <sub>2</sub> 1F3
70	軽(カッパ)鎖 CDR <sub>3</sub> 1F3
71	重鎖可変領域3A12-核酸
72	重鎖可変領域3A12-蛋白質
73	軽(カッパ)鎖可変領域3A12-核酸
74	軽(カッパ)鎖可変領域3A12-蛋白質
75	重鎖 CDR <sub>1</sub> 3A12
76	重鎖 CDR <sub>2</sub> 3A12
77	重鎖 CDR <sub>3</sub> 3A12
78	軽(カッパ)鎖 CDR <sub>1</sub> 3A12
79	軽(カッパ)鎖 CDR <sub>2</sub> 3A12
80	軽(カッパ)鎖 CDR <sub>3</sub> 3A12

10

20

30

また、便宜のため、下記の配列は、本実施例に記載した全ての抗体の実際の、又は企図された完全長の重及び軽鎖配列（即ち、可変領域及び定常領域の両者の配列を含む）を表したものである。マウス抗体2F8、3A12、3B6及び3D11の定常領域は配列決定を行わなかったが、これらが全てAJ系マウス由来の抗体であることから、配列決定した1D3、1F3及び2B8抗体と同一の定常領域配列を有すると推定されることは注目される。しかしながら、本明細書に記載した可変領域の配列を当業者に周知の他のいく種かの定常領域配列のそれぞれに結合させて活性のある完全長の免疫グロブリン重及び軽鎖を作製することができることは了解されよう。

## 【0138】

(1) 完全長1A3重鎖配列(1A3重鎖可変領域及びIgG1定常領域)をコードしている核酸配列(下線箇所:シグナル配列)(配列番号122)

40

## 【0139】

## 【化25】

```

1 atgaactttg ggctcagatt gattttcctt gtccttggtt taaaagggtgt gaagtgtgaa
61 gtgcagctgg tggagtcctgg gggaggctta gtgcaggctg gagggccctt gaaactctcc
121 tgtgcagecct ctgaattcac ttctcgttacac tattatgt cttgggttcg ccagactcca
181 gagaaggaggc tgccatgtgggt cgacatacatt agtcctgggt gtggtagctc ctactatcca
241 gcacgtgtga agggtcgatt caccatctcc agagacaatg ccaagaacac cctgtacctg
301 caaatgagca gtctgaagtc tgaggacaca gccatgtatt actgtgcaag acaagggat
361 gtttactacg gggactatgc tatggactac tggggcaag gaacctcgt caccgtctcc
421 tcagccaaaa cgacaccccc atctgtctat ccactggccc ctggatctgc tgcccaaact
481 aactccatgg tgaccctggg atgcctggtc aagggttatt tccctgagcc agtgcacagt
541 acctggaaact ctggatccct gtccagcggt gtgcacaccc tccctgatgt cctgcagtct
601 gacctctaca ctctgagcag ctctgtact gtcccttcca gcacctggcc cagcgagacc
661 gtcacccgtca acgttggcca cccggccagg agcacaagg tgacaagaa aatttgtgccc
721 agggattgtg tttgttaagcc ttgcataatgt acagtccctg aagttatcatc tgcgttcatc
781 ttccccccaa agcccaagga tggtgttccacc attactctga ctcttaaggt cacgtgtt
841 gtggtagaca tcagcaagga tgatccccggag gtccaggatca gtcgttggat agatgtgt
901 gaggtgcaca cagctcagac gcaacccccgg gaggaggcgt tcaacagcac tttccgtca
961 gtcagtgaac ttccatcat gcaccaggac tggctcaatg gcaaggagtt caaatgcagg
1021 gtcacacagt cagtttccc tgccccccatc gagaaaaacca tctccaaaac caaggcaga
1081 cccaaaggctc cacaggtgtt caccattcca cctcccaagg agcagatggc caaggataaa
1141 gtcagtctga cctgcatgtt aacagacttc ttccctgtt acattactgt ggagtggcag
1201 tggaaatgggc agccagcggg gaactacaag aacactcagc ccatcatggg cacagatggc
1261 tcttacttcg tctacagca gctcaatgtg cagaagagca actgggaggc aggaaataact
1321 ttccacctgct ctgtgttaca tgagggccctg cacaaccacc atactgagaa gaggctctcc
1381 cactctctgt gtaaatga

```

(2) 完全長1A3重鎖配列(1A3重鎖可変領域及びIgG1定常領域)を規定している蛋白質配列(シグナル配列含まず)(配列番号123)

10

## 【0140】

## 【化26】

```

1 evqlvesggg lvqpggs1kl scaaseftfs nyymswvrqt pekrlqvwvay ispgggssyy
61 pasvkgrfti srdnakntly lqmsslksed tamyycarqq dgyygdymd ywgqgtstvtv
121 ssakttppsv yplapgsaaq tnsmvtlgcl vkgyfpepvt vtwngslss gvhtfpav1q
181 sdlytlsssv tvpsstwpse tvtcnvhpa stkvdkkiv prdcgckpc1 ctvpervssvf
241 ifpppkpdv1 titltpkvtc vvvdkddp evqfswfvdd vevhtaqtqp reeqfnstfr
301 svslpimhq dwlngefkic rvnsaafpap iektisktkg rpkapqvyyti pppkeqmkd
361 kvs1tcmtd ffpeditvew qwngqpaeny kntqpmtdt gsyfvyskln vqksnweagn
421 tftcsvlheg lhnhhhteksl shspgk

```

(3) 完全長1A3軽鎖配列(1A3カッパ可変領域及び定常領域)をコードしている核酸配列(下線箇所:シグナル配列)(配列番号124)

30

## 【0141】

## 【化27】

```

1 atgagttgtgc ccactcaggc cctgggggtt ctgtctgtgt ggcttacaga tgccagatgt
61 gacatccaga tgactcagtc tccagccctcc ctatctgttt ctgtgggaga aactgtcacc
121 atcacatgtc gagcaaggta gaatattttt agtaattttag catggatca gcagaaacag
181 ggaaaaatctc ctcagctctt ggtcttatgtt gcaacaaaact tagcagatgg tggccatca
241 aggttcaggta gcagtggttcc aggcacacag tttccctca agatcaacag cctgcagtct
301 gaagattttggacttattt ctgtcaacat ttttgggttac tccctacac gttcggagg

```

## 【0142】

40

## 【化28】

```

361 gggaccaagc tggaaataaa acgggctgat gctgcaccaa ctgtatccat cttccacca
421 tccagtggc agttaacatc tggaggtgcc tcagtcgtt gcttcttgc aaacttctac
481 cccaaagaca tcaatgtcaa gtggaaaggatt gatggcagtg aacgacaaaa tggcgccctg
541 aacagttggc ctgtcaggaa cagcaaaagac agcacctaca gcatgagcag caccctcatg
601 ttgaccaagg acgagttatgaa acgacataac agctataact gtgaggccac tcacaagaca
661 tcaacttcac ccattgtcaa gagcttcaac aggaatgagt gttag

```

(4) 完全長1A3軽鎖配列(1A3カッパ可変領域及び定常領域)を規定している蛋白質配列(シグナル配列含まず)(配列番号125)

## 【0143】

【化29】

```

1 diqmtqspas lsvsvgetvt itcraseniy snlawyqqkq gkspqllvya atnladgvps
61 rfsgsgsgtq fslkinslqs edfgtyycqh fwgtpytfgg gtleikrad aaptvsifpp
121 sseqltsgga svvcflnnfy pkdinvkwki dgserqngvl nswtdqdskd stysmsstlm
181 ltkdeyerhn sytceathkt stspivksfn rnec

```

(5) 完全長2B8重鎖配列(2B8重鎖可変領域及びIgG1定常領域)をコードしている核酸配列(下線箇所:シグナル配列)(配列番号126)

【0144】

【化30】

```

1 atggatgga gctatatcat ccttttttg gtaccaacag ctacagatgt ccactccag 10
61 gtccaactgc agcaggctgg ggctgaactg gtgaagcctg ggacttcagt gaagctgtcc
121 tgcaggctt ctggctacac cttcaccacc tactggatgc actgggtgaa tcagaggcct
181 ggacaaggcc ttgagtggat tggagagat aatcctacca acggctatac taactacaat
241 gagaagttca agagcaaggc cacatctact gtagacaaat cctccagcac agcctacatg
301 caactcagca gcctgacatc tgaggactct gcggctattt actgtcaag aaactatgtt
361 ggttagcatct ttgactactg gggcaaggc accactctca cagtcctc agccaaaacg
421 acaccccccatt ctgtctatcc actggccccct ggatctgctg cccaaactaa ctccatggtg
481 accctggat gcctggtaa gggctattt cctgagccag tgacagtgc ctggaaactct
541 ggatccctgt ccagcggtgt gcacacccctc ccagctgtcc tgcagtctga cctctacact
601 ctgagcagct cagtgactgt cccctccagc acctggccca gcgagaccgt caccgtcaac
661 gttgcccacc cggccagcag cacaagggtg gacaagaaaa ttgtgcccag ggattgtgg
721 tgtaagcctt gcatatgtac agtcccagaa gtatcatctg tcttcatctt ccccccaag
781 cccaaaggatg tgctcaccat tactctgact cctaaggtaa cgtgtgtgt gtagacatc
841 agcaaggatg atcccgaggc ccagttcagc tggttttag atgtgtgg ggtgcacaca
901 gctcagacgc aaccccgaaa ggagcagttc aacagcaactt tccgctcagt cagtgaacctt
961 cccatcatgc accaggactg gctcaatggc aaggagttca aatgcagggt caacagtgc
1021 gcttccctg ccccatatcga gaaaaccatc tccaaaccatc aaggcagacc gaaggctcca
1081 caggtgtaca ccattccacc tcccaaggag cagatggcca aggataaaatg cagtctgacc
1141 tgcatacatc cagacttctt ccctgaagac attactgtgg agtggcagtg gaatggcag
1201 ccagcggaga actacaagaa cactcagccc atcatggaca cagatggctc ttacttcgtc
1261 tacagcaagc tcaatgtca gaagagcaac tgggaggcag gaaataacttt caccgtctct
1321 gtgttacatg agggcctgca caaccaccat actgagaaga gcctctccca ctctctgg
1381 aaatga

```

(6) 完全長2B8重鎖配列(2B8重鎖可変領域及びIgG1定常領域)を規定している蛋白質配列(シグナル配列含まず)(配列番号127)

【0145】

【化31】

```

1 qvqlqqpgae lvkpgtsvk1 sckasgytft tywmhwvnqr pgqglewige inptnghny 30
61 nekfkskat1 tvdkssstay mqlssltsed savyyccarny vgsifdywgq gtltvssak
121 tppsvypla pgssaqtnsm vtlgclvkgy fpepvvtwn sgslssgvht fpavlqsdly
181 tlsssvtvps stwpsetvtc nvahpasstk vdkkivprdc gckpcictvp evssvfifpp
241 kpkdvltil1 tpkvtcvvvd iskddpevqf swfvddvevh taqtqpreeq fnstfrsvse

```

【0146】

【化32】

```

301 lpimhqdwl1 gkefkcrvns aafpapiekt isktkgrpka pqvytipppk egmakdkvsl
361 tcmidffpe ditvewqwng qpaenykntq pimdtdgsyf vysklnvqks nweagntftc
421 svlheglhn1 htekslshsp gk

```

(7) 完全長2B8軽鎖配列(2B8カッパ可変領域及び定常領域)をコードしている核酸配列(下線箇所:シグナル配列)(配列番号128)

【0147】

【化33】

```

1 atggaaatcac agactctggt ctccatatacc atactgctct gtttatatgg tgctgatggg
61 aacattgtaa tgacccaatc tcccaaatacc atgtccatgt cagtaggaga gagggtcacc
121 tttagctgca aggccagtga gaatgtgggt tcttatgtat cctgttatca acagaaaacca
181 ggcgagtctc ctaaaactgct gatatacggg gcatccaaacc ggaacactgg ggtccccat
241 cgcttcacag gcagtggatc tgcaacagat ttcaactctga ccatacgacag ttgcggggt
301 gaagaccttg cagattatca ctgtgggacag agttacaatc atccgtacac gttcggagg
361 gggaccaggc tggaaataaa acgggctgtat gctgcaccaa ctgtatccat ttcccacca
421 tccagtgacg agttaacatc tggaggtgcc tcagtcgtgt gcttctgaa caacttctac
481 cccaaagaca tcaatgtcaa gtggaaagatt gatggcgtgt aacgacaaaaa tggcgtcctg
541 aacagttgga ctgatcgaga cagcaaagac agcacatcaca gcatgacgac caccctcact
601 ttgaccaagg acgagttatga acgacataac agctataacct gtgaggccac tcacaagaca
661 tcaacttcad ccattgtcaa gagcttcaac aggaatgagt gttag

```

10

(8) 完全長2B8軽鎖配列(2B8カッパ可変領域及び定常領域)を規定している蛋白質配列(シグナル配列含まず)(配列番号129)

【0148】

【化34】

```

1 nivmtqspks msmsvgervt lsckasenvv syvswyqqkp aqspklliyg asnrntgvpd
61 rftgsgsattd ftltissvra edladyhcgq synypytfgg gtrleikrad aaptvsifpp
121 sseqltsgga svvcflnnfy pkdinvkwki dgserqngvl nswdqdskd stysmsstlt
181 ltkdeyerhn sytceathkt stspivksfn rnec

```

(9) 完全長2F8重鎖配列(2F8重鎖可変領域及びIgG1定常領域)をコードしている核酸配列(下線箇所:シグナル配列)(配列番号130)

【0149】

【化35】

```

1 atggaaatgga gctgggtctt tctttccctc ctgtcagtaa ctgcagggtgt ccactgccag
61 gtcagctga agcagtcgtt agctgagctg gtgaggcctg ggacttcagt gaagatgtcc
121 tgcaaggctt ctggctacac ttcaactacc tactatatac actgggtgaa tcagaggcct
181 ggacagggcc ttgagtggat tggaaagatt ggtcctgaa gtggtagtac ttactacaat
241 gagatgttca aagacaaggc cacattgact gttagacacat cctccagcac agcctacatg
301 cagctcagca gcctgacatc tgacgactct gcggtctatt tctgtcaag aaggggactg
361 ggacgtggct ttgactactg gggccaaggc accactctca cagtcctc agccaaaacg
421 acaccccccattt ctgtctatcc actggccctt ggatctgtgt cccaaactaa ctccatggtg
481 accctggat gcctggtcaa gggctatttc cctgagccag tgacagtgac ctggaaactct
541 ggatccctgt ccagcggtgt gcacacccctt ccagctgtcc tgcatctga cctctacatc
561 ctgagcagct cagttactgt cccctccagc acctggccca gcgagaccgt cacctgcaac
621 gttgcccacc cggccagcag caccaagggt gacaagaaaa ttgtgcccag ggattgtgg
721 tggaaaggctt gcatatgtac agtcccgaaat gatcatctg tcttcatctt ccccccacaa
781 cccaaaggatg tgctcaccat tactctgact cctaaggctca cgtgtgtgt ggttagacatc
841 agcaaggatg atcccgaggat ccagttcagc tggttttagt atgatgtgaa ggtgcacaca
901 gctcagacgc aaccccgaaa ggagcagttc aacagactt tccgctcagt cagtgaaactt
961 cccatcatgc accaggactg gctcaatggc aaggagttca aatgcagggt caacagtgca
1021 gcttccctg ccccccatega gaaaaccatc tccaaaacca aaggcagacc gaaggctcca
1081 caggtgtaca ccattccacc tcccaaggag cagatggcca aggataaaatg cagtcgtacc
1141 tgcataataa cagacttctt ccctgaagac attactgtgg agtggcgtgt gaaatggcag

```

30

【0150】

【化36】

40

```

1201 ccagcggaga actacaagaa cactcagccc atcatggaca cagatggctc ttacttcgtc
1261 tacagcaagc tcaatgtgca gaagagcaac tggaggcag gaaatacttt cacctgctct
1321 gtgttacatg agggcctgca caaccaccat actgagaaga gctctccca ctctcctgg
1381 aaatga

```

(10) 完全長2F8重鎖配列(2F8重鎖可変領域及びIgG1定常領域)を規定している蛋白質配列(シグナル配列含まず)(配列番号131)

【0151】

【化 3 7】

1 qvqlkqsgae lvrpgtsvkm sckasgytft tyyihwvnqr pgqglewigk igpgsgstyy  
61 nemfdkatl tvdtssstay mqllslltsdd savyfcarrg lgrgfdywqq gttltvssak  
121 ttpsvypla pgssaaqtntsm vtlgclvkgf fpepvvtwn sgslssgvht fpavlqsdly  
181 tlsssrtvps stwpsetvtc nvahpasstk vdkkivprdc gckpcictvp evssvfifpp  
241 kpkdvltil tpkvtcvvd iskddpevqf swfvddvevh taqtgpreeq fnstfrsves  
301 lpimhqdwlk gkefkcrvns aafpapiekt isktkgrpka pqvytipppk eqmakdkvs1  
361 tcmtdffpe ditvewqwgng qpaenykntq pimtdgsyf vysklnvqks nweagntfc  
421 svlheglhnk htekslshsp gk

(11) 完全長2F8軽鎖配列(2F8カップ可変領域及び定常領域)をコードしている核酸配列(下線箇所:シグナル配列)(配列番号132)

10

【 0 1 5 2 】

【化 3 8】

1	atggagacag	acacaatcct	gctatgggtg	ctgctgcct	gggttccagg	ctccactgg
61	gacattgtgc	tgacccaatc	tccagcttct	ttggctgtgt	ctctagggca	gagggccacc
121	atccctgca	aggccagcca	aagtgtttag	tatgatggta	atagttatat	caactggta
181	caacagaaac	caggacagcc	acccaaagtc	ctcatctatg	ttgcattccaa	tctagaatct
241	gggatcccag	ccaggtttag	tggcagtggg	tctgggacag	acttcaccct	caacatccat
301	cctgtggagg	aggaggatgc	tgcAACCTAT	tactgtcagc	aaagtattga	ggatccccc
361	acgttcgggt	ctgggaccaa	gctggagctg	aaacgggctg	atgttcgacc	aactgtatcc
421	atcttccccac	catcccgatg	gcagttaa	tctggaggtg	cctcagtcgt	gtgttcttg
481	aacaacttct	accccaaaga	catcaatgtc	aagtggaa	ttgtatggcag	tgaacgacaa
541	aatggcgtcc	tgaacagtt	gactgatcag	gacagcaaag	acagcaccta	cagcatgagc
601	agcaccctca	cggtgaccaa	ggacgagttat	gaacgacata	acagctatac	ctgtgaggcc
661	actcacaaga	catcaacttc	accattgtc	aagagctca	acaggaatga	gtgttag

20

(12) 完全長2F8軽鎖配列(2F8カッパ可変領域及び定常領域)を規定している蛋白質配列(シグナル配列含まず)(配列番号133)

[ 0 1 5 3 ]

【化 3 9】

1 divltqspas lavslgqrat isckasqsvd ydgnsyinwy qqkpgqppkv liiyvasnles  
61 giparfsgsg sgtdftlnih pveeedaaty ycqqsiedpp tfgagtklel kradaaptvs  
121 ifppsseqlt sggasvvcf1 nnfypkdinv kwkidgserq ngvlnswdq dskdstsysms  
181 stllltkdev erhnsytcea thktstspiv ksfnrnec

(13) 完全長3B6重鎖配列(3B6重鎖可変領域及びIgG1定常領域)をコードしている核酸配列(下線箇所:シグナル配列)(配列番号134)

30

[ 0 1 5 4 ]

【化 4 0】

```
 1 atggaatggc cttgtatctt tctcttcctc ctgtcagtaa ctgaaggtgt ccactccca  
61 gttcagctgc agcagctctgg ggctgaactg gtgaggcctg ggtcctcagt gaagatttcc  
121 tgcaaggctt ctggctatgt attcagtagc tactggatga actgggtgaa gcagaggcct  
181 ggacacagggtc ttgatgttggat tqgacagatc tatcctggag atggtgatag taactacaat
```

【 0 1 5 5 】

【化 4 1】

241 ggaaacttca agggtaaacgc cacactgact gcagacaat cctccagtag accctacatg  
301 cagctcagca gcctaaccatc tgaggactct gcggtctatt tctgtgcatt ccagctcggt  
361 ctacgtgaga actactttga ctactggggc caaggcacca ctctcacagt ctcccteagcc  
421 aaaacgacac cccccatctgt ctatccactg gcccctggat ctgctgccc aactaactcc  
481 atggtgaccc tgggatgcct ggtcaagggo tatttccttg agccagtgac agtgacctgg  
541 aactctggat ccctgtccag cggtgtcac accttcccag ctgtcctgca gtctgaccc  
601 tacactctga gcagctcagt gactgtcccc tccagcacct ggcccagcga gaccgtteacc  
661 tgcaacgttg cccaccggc cagcagcacc aaggtgacca aaaaaattgt gcccaggat  
721 tgggttgta agccttgcatt atgtacatgc ccagaagtat catctgttcat cattttcccc  
781 ccaaagccca aggatgtgct caccattact ctgactccta aggtcacgtg tgggttgta  
841 gacatcagca aggatgatcc cgagggtccag ttcaagctgg ttttagatga tggaggtg  
901 cacacagctc agacgcaacc cggggaggag cagttcaaca gcactttccg ctcagtgat  
961 gaacttccca tcatgcacca ggactggctc aatggcaagg agttcaaatg cagggtcaac  
1021 agtgcagctt tccctgcccc catcgagaaa accatctcca aaacccaaagg cagaccaag  
1081 gtcaccacagg tgtacaccat tccacctccc aaggagcaga tggccaagg taaagtcaagt  
1141 ctgacccatgca tgataacaga ctctttccct gaagacatta ctgtggagtg gcagtggaaat  
1201 gggcagccag cggagaacta caagaacact cagcccatca tggacacaga tggcttctac  
1261 ttgtcttaca gcaagctcaa tttgcagaaag agcaactggg aggcaggaaa tacttttacc  
1321 tttgtcttgc tcatgaggg cttgcaccaac caccataactg agaagagcct ctcccactct  
1381 ccttgtaaat qa

10

(14) 完全長3B6重鎖配列(3B6重鎖可変領域及びIgG1定常領域)を規定している蛋白質配列(シグナル配列含まず)(配列番号135)

( 0 1 5 6 )

【化 4 2】

20

1 qvqlqqsgae 1vrpgssvki sckasgyvfs sywmnnwvqqr pgqglewigq iypgdgdsny  
61 ngnfkqkatl tadtkssttay mqqlslltsed savyfcasql glrenyfdyw gggttltvss  
121 aktpbpsvyp lapgsaaqtn smvtlgclvk gyfpepvvt wnsgrlssgv ht.fpavlgasd  
181 lytlsssvtv psstwpsetv tcnvaahpass tkvdkkivpr dcgcckpcict vpevssvfif  
241 ppkpkdvlti tltpkvtcvv vdiskddpev qfswfvddve vhtaqtqpre eqfnstfrsv  
301 selpimhqdw lngkefkcrv nsaafpapie ktisktkgrp kapqvytipp pkeqmakdkv  
361 sltcmitdff peditvwewqf ngqpaenynkn tqpimtdgs yfvysklnvq ksnweagntf  
421 tcsvlheglh nhhtekslsh spgk

(15) 完全長3B6軽鎖配列(3B6カッパ可変領域及び定常領域)をコードしている核酸配列(下線箇所:シグナル配列)(配列番号136)

【 0 1 5 7 】

30

【化 4 3】

40

(16) 完全長3B6軽鎖配列(3B6カッパ可変領域及び定常領域)を規定している蛋白質配列(シグナル配列含まず)(配列番号137)

【 0 1 5 8 】

【化 4 4】

1 dikmtqspss myaslgervt itckasqdik sylswfqqkp gkspktliyr vnrlvdgvpss  
61 rfsgsgsgqdd ssititslen edmgiiyclq ydefpftfgg gtlkleikrad aaptvsifpp  
121 sseqltssga svvcflnnfy pkdinvkwki dgserqngvl nswtdqdskd stysmsstlt  
181 ltkdeverhn svtceathkt stspivksfn rnec

( 17 ) 完全長 3 D 1 1 重鎖配列 ( 3 D 1 1 重鎖可変領域及び Ig G 1 定常領域 ) を曰

50

コードしている核酸配列(下線箇所:シグナル配列)(配列番号138)

【0159】

【化45】

```

1 atggctgtcc cggtgctgtt cctctgcctg gttgcatttc caagctgtgt cctgtcccag
61 gtacagctga aggagtcagg acctggcctg gtggcgccct cacagagcct gtccatcaact
121 tgcactgtct ctgggttttc attaaccagc tatagttac actgggttcg ccagcctcca
181 gaaaagggtc tggaatggct gggagtaata tgggctggg gaaacacaaa ttataattcg
241 tctctcatgt ccagactgac catcaggaaa gacaactcca agagccaagt tttcttaaaa
301 atgaacagtc tgcaactgta tgacacagcc atgtactact gtgcagaga gaggtttgt
361 tactggggcc aaggactct ggtcaactgtc tctgcagcca aaacgacacc cccatctgtc
421 tatccactgg cccctggatc tgctgccccaa actaactcca tggtagccct gggatgcctg
481 gtcagggtct atttccctga gccagtgaca gtgacctgga actctggatc cctgtccagc
541 ggtgtgcaca ccttcccaactg tgcctgcag tctgacactt acactgttag cagctcagtg
601 actgtccccct ccagcacccgt gcccagcgag accgtcaccc gcaacgttgc ccaccggcc
661 agcagcacca aggtggacaa gaaaattgtg cccaggatt gtgggtgtaa gccttgacata
721 tgtacagtcc cagaaggatc atctgtcttc atcttcccccaa aagccccaa ggatgtgcctc
781 accattactc tgactcctaa ggtcacgtgt gttgtggtag acatcagcaa ggatgtatccc
841 gaggtccagt tcagctgggt ttagatgtat gtggaggtgc acacagctca gacgcaaccc
901 cgggaggagc agttcaacag cacttccgc tcagtcagtg aacttcccat catgcaccag
961 gactggctca atggcaagga gttcaaatgc agggtcaaca gtgcagctt ccctgcccccc
1021 atcgagaaaa ccatctccaa aaccaaaggc agaccgaagg ctccacaggt gtacaccatt
1081 ccacctccca aggagcagat ggcaaggat aaagtcaagtc tgacactgcata gataacagac
1141 ttcttccctg aagacattac tgtggagtgg cagtgaaatg ggcagccagc ggagaactac
1201 aagaacactc agccacatcat ggacacagat ggcttactact tgcgttacag caagctcaat
1261 gtgcagaaga gcaactggga ggcaggaaat acttccactt gtctgtt acatgagggc
1321 ctgcacaacc accataactgta gaagagcctc tcccaacttc ctggtaaatg a

```

10

(18) 完全長3D11重鎖配列(3D11重鎖可変領域及びIgG1定常領域)を規定している蛋白質配列(シグナル配列含まず)(配列番号139)

【0160】

【化46】

```

1 qvqlkesggp lvapsqslsi tctvsgfslt syslhvvrqp pgkglewlgv iwaggntnyn
61 ssimslrltir kdnsksqvfl kmnslqtdt amyyccarerf aywgqgtlvt vsaakttpp
121 vyplapgsaa qtnsmvtlge lvkgyfpepv tvtnsgsils sgvhtfpavl qsdlytlss
181 vtvpsstwps etvtcnvahp asstkvdkki vprdcgckpc ictvpevssv fifppkpkd
241 ltitltpkvt cvvvdiskdd pevfswfv dvevhtaqtq preeqfnstf rsvselpmh
301 qdwlingkefk crvnsaafpa piektisktk grpkapqvyt ipppkeqmak dkvsltcmi
361 dffpeditve wqwnqpaen ykntqpiimdt dgsyifvyskl nvqksnweag ntftcsvlhe
421 glhnhhtekls lshspgk

```

20

(19) 完全長3D11軽鎖配列(3D11カッパ可変領域及び定常領域)をコードしている核酸配列(下線箇所:シグナル配列)(配列番号140)

【0161】

【化47】

```

1 atggattttc aagtgcagat tttcaacttc ctgctaata gtcgcctcagg caaaaatatcc
61 agaggacaaa ttgttctcac ccagtcctca gcaatcatgt ctgcataatcc aggggagaag
121 gtcacccatga cctgcagtc cagtcaggat gtaagttaca tgcactggta ccagcagaag
181 tcagggcaccc ccccaaaaat atggattttat gacacatcca aactggcttc tggagtcct
241 gctcgcttca gtggcagtgg gtctgggacc tcttactccc tcacaatcag tagtatggag
301 gctgaagatg ctgccactta ttactgccag cagtgaggta gtaacccact cacgttcgt
361 gctgggacca agctggagct gaaacgggct gatgctgcac caactgttacatcttccca
421 ccatccagtg agcagttaac atctggaggc gcctcagtcg tgtgttctt gaacaacttc
481 taccggacaaa acatcaatgt caagtggaaat ttgtatggca gtgaacgaca aatggcgcc
541 ctgaacagtt ggactgatca ggacagcaaa gacagcacct acagcatgag cagcacccctc
601 acgttgacca aggacgagta tgaacgacat aacagctata cctgtgaggc cactcacaag
661 acatcaactt caccatgtt caagagctt aacaggaatg agtggtag

```

40

(20) 完全長3D11軽鎖配列(3D11カッパ可変領域及び定常領域)を規定している蛋白質配列(シグナル配列含まず)(配列番号141)

【0162】

【化48】

```

1 qivltqspai msaypgekvt mtcasasssvs ymhwyqqksg tspkrwiydt sklasgvpar
61 fsgsgsgtsy sliissmeae daatyyccqwg ssnpltfag tklelkrada aptvsifpps
121 seqltsggas vvcflnnfyp kdinvkwkid gserqngvln swtdqdskds tysmsstlti
181 tkdeyerhns ytceathkts tskipksfnr nec

```

(21) 完全長1D3重鎖配列(1D3重鎖可変領域及びIgG1定常領域)をコードしている核酸配列(下線箇所:シグナル配列)(配列番号142)

【0163】

【化49】

```

1 atgaactttg ggctcagatt gattttccct gtcccttgaaa taaaagggtgt gaagtgtgaa
61 gtgcagctgg tggagctgg gggaggctta gtgcagccgt gagggtccct gaaactctcc
121 tggcagccct ctggattcac tttcgtgtac tattacatgt cttgggtttag ccagactcca
181 gagaagagggc tggagtggtt cgccatacatt agtagtggtt gtggtagcac ctactatcca
241 gacagtgtga agggtcgatt caccatctcc cgagacaatgc ccaagaacac cctgtacctg
301 caaatgagca gtctgaagtc tgaggacaca gccatataatt actgtgtgag acaaggggat
361 ggttattacg gggactatgc tattgactac tggggtaaag gaaacctcagt catcgctcc
421 tcagccaaaa cgacaccccccc atctgtctat ccactggccc ctggatctgc tgcccaaact
481 aactccatgg tgaccctggg atgcctggc aagggttatt tccctgagcc agtgacagtg
541 acctggaact ctggatccct gtccagcggt gtgcacaccc tccagctgt cctgcagct
601 gacccctaca ctctgagcag ctcaagtact gtcccccgtt gcacccgtggcc cagcggagacc
661 gtcacccgtca acgttgcacccccc cccggccagc agcacccagg tggacaagaa aattgtgccc
721 agggatttgtt gttgtaaagcc ttgcataatgt acagttcccg aagtatcatc tgcatttcatc
781 ttccccccaa agcccaagga tggctcacc attactctga ctccaaaggt cacgtgtt
841 gtggtagaca tcagcaagga tgatccccgg gtccagttca gttttttgtt agatgtgtg
901 gaggtgcaca cagtcacagac gcaaccccg gaggaggcgt tcaacagcac tttccgtca
961 gtcagtgaaat ttcccatcat gcaccaggac tggctcaatgc gcaaggagtt caaatgcagg
1021 gtcacacgtg cagtttccc tgccccatc gaaaaacca tctccaaac caaaggcaga
1081 ccgaaggctc cacaggtgtt caccatccca cttcccaagg agcagatggc caaggataaa
1141 gtcagtcgtt cctgcattat aacagacttc ttccctgaag acattactgt ggagtggcag
1201 tggaaatggc agccagcgga gaactacaag aacactcagc ccatcatggc cacagatggc
1261 tcttacttcg tctacagcaa gctcaatgtt cagaagagca actgggagggc agggaaataact
1321 ttccacccgtt ctgtgttaca tgagggcctt cacaaccacc atactgagaa gagcctctcc
1381 cactcteetg gttaatgt

```

10

20

(22) 完全長1D3重鎖配列(1D3重鎖可変領域及びIgG1定常領域)を規定している蛋白質配列(シグナル配列含まず)(配列番号143)

【0164】

【化50】

```

1 evqlvesggg lvqpggsllkl scaasgftfs dyymswvrqt pekrlewway issgggsty
61 pdsvkgrfti srhnakntly lqmssllksed taiyycvrgg dgyygyamid ywgqgtstviv
121 ssakttppsv yplapgsaaq tnsmvtlgcl vkgyfpepvt vtnnsgslss gvhtfpavli
181 sdlytlsssv tvpsstwpsv tvtcnvahpa sstkvdkkiv prdcgckpcitvpevssvf
241 ifpppkpkdvl titltpkvtc vvvdiskddp evqfswfvdd vevhtaqtqp reeqfnstfr
301 svselpimhq dwlngkefkic rvnsaafpap iektisktkg rpkapqvtyi pppkeqmkd
361 kvslltcmtd ffpeditvew qwnqgpaaeny kntqpmtdt gsyfvyskln vqksnweagn
421 tftcsvlheg lhnhhhteksl shspgk

```

30

(23) 完全長1D3軽鎖配列(1D3カッパ可変領域及び定常領域)をコードしている核酸配列(下線箇所:シグナル配列)(配列番号144)

【0165】

【化51】

```

1 atgagtgtgc ccactcaggt cctgggggttgc ctgtgtgttggcttacaga tgcgtatgt
61 gacatccaga tgactcagtc tccagccctcc ctatctgtat ctgtgggaga aactgtcacc
121 atcacatgtc gaacaagtga gaatatttac agtaatttag cgtgttatca gcagaaaacag
181 gaaaaatctc ctcagctcct aatctatgtt gcaacaaact tagcagatgg tgcatttcatca
241 aggttcagtg gcagttggatc aggccacacag tttccctca ggatcaacag cctgcagct
301 gaagattttgc ggaggttata ctgtcaacat ttttggggga ctccgtacac gttcgaggg
361 gggaccaaac tggaaataaa acgggctgtat gctgcacccaa ctgttatccat cttccacca
421 tccagtcgtt agttaacatc tggaggttgc tcagtcgtt gcttcttgc aaacttctac
481 cccaaagaca tcaatgtca gttggaaatgtt gatggcgtt aacgacaaaaa tggcgccctg
541 aacagttggc ctgtatggc cagccaaagac agcacatcaca gcatgagcag caccctcacc
601 ttgaccaagg acgatgtatgc acgacataac agcttatccat gtgaggccac tcacaagaca
661 tcaacttcac ccattgtcaac gagcttcaac aggaatgtt gttag

```

40

50

( 2 4 ) 完全長 1 D 3 軽鎖配列 ( 1 D 3 カッパ可変領域及び定常領域 ) を規定している蛋白質配列 ( シグナル配列含まず ) ( 配列番号 1 4 5 )

【 0 1 6 6 】

【 化 5 2 】

```

1 diqmtqspas lsvsvgetvt itcrtseniy snlawyqqkq gkspqlliya atnladgvps
61 rfsqsgsgtq fslrinslqs edfgryycgh fwgtpytfgg gtleikrad aaptvsifpp
121 sseqltsgga svvcflnnfy pkdinvkwki dgserqngvl nswtdqdskd stysmsstlt
181 ltkdeyerhn sytceathkt stspivksfn rne

```

( 2 5 ) 完全長 1 F 3 重鎖配列 ( 1 F 3 重鎖可変領域及び I g G 1 定常領域 ) をコードしている核酸配列 ( 下線箇所 : シグナル配列 ) ( 配列番号 1 4 6 )

10

【 0 1 6 7 】

【 化 5 3 】

```

1 atgaactttg ggctcagatt gattttcatt gtccttgatt taaaagggtgt gaagtgtgag
61 gtgcagctgg tggagtctgg gggaggctta gtgcagtctg gagggccct gaaactctcc
121 tgtgcggcct ctggattcac tttcaac tatttcatgt cttgggttcc ccagactcca
181 gagaagaggc tggagtggtt cgccatataatt agtagtggtg gtggtagcac ctactatcca
241 gacagtgtga agggtcgatt caccatctt agagacaatg ccaagaacac cctgtacctg
301 caaatgagca gtctgaagtc tgaggacaca gccatgtatt actgtgtaa acaagggat
361 ggttactacg gggactatgc tatggactac tggttcaag gaacctcagt caccgtctcc

```

【 0 1 6 8 】

20

【 化 5 4 】

```

421 tcagccaaaa cgacaccccc atctgtctat ccactggccc ctggatctgc tgcccaaact
481 aactccatgg tgaccctggg atgcctggc aagggttatt tccctgagcc agtgacagtg
541 accttggact ctggatccct gtccagccgt gtgcacaccc tcccaagctgt cctgcagctt
601 gacctctaca ctctgagccag ctcagtactt gtcccttca gcacctggcc cagcgagacc
661 gtcacactgca acgttgcaca cccggccagc agcaccaagg tggacaagaa aatttgtccc
721 agggattgtg ttgttaagcc ttgcataatgt acagtcccag aagtatcatc tgtcttcate
781 ttcccccccaa agcccaagga tgtgtccacc attactctga ctccctaaggt cacgtgttt
841 gtggtagaca tcagcaagga tgatccccag gtccagttca gctgtttgt agatgtatgt
901 gaggtgcaca cagctccagc gcaaccccccgg gaggagcagt tcaacagcac ttccgccta
961 gtcagtaac ttcccatcat gcacccaggac tggctcaatg gcaaggagtt ccaaattgcagg
1021 gtcaacactg cagctttccc tgcccccattt gaaaaacca ttcacaaac caaaggcaga
1081 ccgaaggctc cacaggttta caccattcca cttcccaagg agcagatggc caaggataaa
1141 gtcagttca cctgcatgtat aacagacttc ttccctgaatg acattactgt ggagtggcag
1201 tggaatgggc agccagccga gaactacaag aacactcagc ccattatggc cacagatggc
1261 tcttacttcg tctacagccaa gctcaatgtg cagaagagca actgggaggc agggaaataact
1321 ttcacactgct ctgtttaca tgaggccctg cacaaccacc atactgagaa gagcctctcc
1381 cacttccttg gtaaatga

```

30

( 2 6 ) 完全長 1 F 3 重鎖配列 ( 1 F 3 重鎖可変領域及び I g G 1 定常領域 ) を規定している蛋白質配列 ( シグナル配列含まず ) ( 配列番号 1 4 7 )

【 0 1 6 9 】

【 化 5 5 】

```

1 evqlvesggg lvqsggslkl scaasgftfs nyfmswvrqt pekrlewway issggggstyy
61 pdsvkgrfti srnakntly lqmsslked tamyycvrqg dgyygdymd ywgqgtstv
121 ssakttppsv yplapgsaaq tnsmtlgcl vkgyppepvt vtwnsgslls gvhtfpav1q
181 sdlytlsssv tvpsstwpse tvtcnvahpa stkvdkkkiv prdcgckpc1 ctvpevssvf
241 ifpppkpdvl titltpkvtc vvvdiskddp evqfswfvdd vevhtaqtqp reeqfnstfr
301 svselpimhq dwlngkefkc rvnsaafpap iektisktkg rpkapqvtyi pppkeqmkd
361 kvsitcmtd ffpeditvwq qwngqpaeny kntqpmtds gsyfvyskln vqksnweagn
421 tftcsvlheg lhnhhteksl shspgk

```

40

( 2 7 ) 完全長 1 F 3 軽鎖配列 ( 1 F 3 カッパ可変領域及び定常領域 ) をコードしている核酸配列 ( 下線箇所 : シグナル配列 ) ( 配列番号 1 4 8 )

【 0 1 7 0 】

## 【化56】

```

1 atgagggtgtgc ccactcaggt cctggggttt ctgctgctgt ggcttacaga tgccagatgt
61 gacatccaga tgactcagtc tccagctcc ctatctgtat ctgtgggaga aactgtcacc
121 atcacatgtc gagcaagtga gaatatttac agtaatttag catgttatca gcagaaacag
181 gaaaaatctc ctcagctct ggtctatgtat gcaacacact taccagatgg tgtgccatca
241 aggttcagtg gcagtggtc aggacacacag tttccctca agatcaacag cttcgagct
301 gaagattttg ggagttatata ctgtcaacat tttggggta ctccgtacac gtttggaggg
361 gggaccagac tggaaattaa acgggctgat gctgcaccaa ctgtatccat cttccacca
421 tccagtgagc agttaacate tggaggtgcc tcagtcgtgt gcttcgttca caacttctac
481 cccaaagaca tcaatgtcaa gtggaaagatt gatggcagtg aacgacaaaaa tggcgtcctg
541 aacagttgga ctgatcagga cagcaaagac agcacctaca gcatgagcag caccctcagc
601 ttgaccaagg acgagttatga acgacataac agctataacct gtgaggccac tcacaagaca
661 tcaacttac ccattgtcaa gagcttcaac aggaatgagt gttag

```

10

(28) 完全長1F3軽鎖配列(1F3カッパ可変領域及び定常領域)を規定している蛋白質配列(シグナル配列含まず)(配列番号149)

## 【0171】

## 【化57】

```

1 diqmqtqspas lsvsvgetvt itcraseniy snlawyqqkq gkspqllyvd athlpdgvp
61 rfsqsgsgtq fslkinslqs edfgsyycqh fwgtpytfgg gtrleikrad aaptvsifpp
121 sseqltsqga svvcflnnfy pkdinvkwki dgserqngv1 nswtdqdskd stysmsstlt
181 ltkdeyerhn sytceathkt stspivksfn rnec

```

(29) 完全長3A12重鎖配列(3A12重鎖可変領域及びIgG1定常領域)をコードしている核酸配列(下線箇所:シグナル配列)(配列番号150)

20

## 【0172】

## 【化58】

```

1 atgaactttg ggctcagatt gattttcctt gtccttgttt taaaaggtgt gaagtgtgaa
61 gtgcagctgg tggagtcgtgg gggaggctt gtgcagctg gagggtccct gaaaatctcc
121 tggcagcct ctggattttac tttcagtaac tatttcattgt ctgggttccg ccagactcca
181 gagaagaggc tggagtggtt cgatcatacatt agtagtgggt gtgttagcac ctactatcca
241 gacagtgtga agggtcgatt caccatctcc agagacaatg ccaagaacac cttgtacact
301 caaatgaaca gtctgaagtc tgaggacaca gccatgtatt actgtgttaag acaaggagat
361 ggttactatg gggactatgc tattggactac tgggttcaag gAACCTCAGT caccgtctcc
421 tcagccaaaaa cgacaccccc atctgtctat ccactggccc ctgatctgc tgcccaact
481 aactccatgg tgaccctggg atgcctggc aagggttatt tccctgagcc agtgcacatg
541 accttggaaact ctggatccct gtccagcgggt gtgcacaccc tccagctgt cctgcagct
601 gacctctaca ctctgagcag ctcaagtact gtcccttcca gcacctggcc cagcgagacc
661 gtaacctgca acgttggcca cccggccagc agcaccaagg tggacaagaa aattgtgccc
721 aggatttgtt gttgttaagcc ttgcataatgt acagtcccg aagtatcatc tgcatttcattc
781 ttccccccaa agcccaagga tgcgttcacc attactctga ctcttaaggt cacgtgtt
841 gtggtagaca tcagcaagga tgatcccgag gtccagttca gctgggttgg agatgtatgt
901 gaggtgcaca cagctcagac gcaacccccc gaggagcgt tcaacagcac ttccgcctca
961 gtaagtgaac ttcccatcat gcacccaggac tggctcaatg gcaaggagtt caaatgcagg
1021 gtaaacagtg cagcttccc tgccccatc gagaaaaacca tctccaaaac caaaggcaga
1081 cccaggctc cacagggtgtt caccatttcca cttcccaagg agcagatggc caaggataaa
1141 gtaagtctga cctgcattat aacagacttc ttccctgttca acattactgt ggagtggcag
1201 tggaaatgggc agccagcgggaa gaaactacaag aacactcagc ccatcatggc cacagatggc
1261 tcttacttcg tctacagcaa gctcaatgtt cagaagagca actgggagggc agggaaataact
1321 ttcacctgtt ctgtgttaca tgagggcctt cacaaccacc atactgagaa gagcctctcc
1381 cactctccgt gttaatgtt

```

30

(30) 完全長3A12重鎖配列(3A12重鎖可変領域及びIgG1定常領域)を規定している蛋白質配列(シグナル配列含まず)(配列番号151)

40

## 【0173】

## 【化59】

```

1 evqlvesggg lvqpggslki scaasgftfs nyfmswvrqt pekrlewway issgggsty
61 pdsvkgrfti srnakntly lqmnslksed tamyycvrqq dgyygydyam d ywgqgtstv
121 ssakttppsv yplapgsaaq tnsmtlgcl vkgyppepv tvwnsgslss gvhtfpav1q
181 sdlytlsssv tvpsstwpse tvtcnvahpa sstkvdkkiv prdcgckpc1 ctvpevssvf
241 ifppkpkdvl titltpkvtc vvvdiskddp evqfswfvdd vevhtaqtqp reeqfnstfr
301 svselpimhq dwlngkefk c rvnasaafpap iektisktkg rpkapqvtyi pppkeqmkd
361 kvslltcmtd ffpeditvew qwnqgpae qntqpmtdt gsyfvyskln vqksnweagn
421 tftcsvlheg lnhhhteksl shspgk

```

50

(31) 完全長 3 A 1 2 軽鎖配列 (3 A 1 2 カッパ可変領域及び定常領域) をコードしている核酸配列 (下線箇所 : シグナル配列) (配列番号 152)

【0174】

【化60】

```

1 atqagtgtgc ccactcaagc cctggggttg ctgctgctgt ggcttacaga tgccaaatgt
61 gacatccaga tgactcagtc gccaggctcc ctagatgtat ctgtgggaga aactgtcacc
121 atcacatgtc gagcaagtgaa gaatatttac attaatttag catggatata gcagaaaacag
181 gaaaaaatcgtc ctcagctcgt ggtccatgtc gcaacaaatgg tagcagatgg tggccatca
241 aggttcagtg gcagtggtc aggccacacag tattccctca agatcaacag cctgcagtt
301 gaagattttg ggagttatata ctgtcaacat ttttggggta ctccgtacac gtteggaggg
361 gggacccaaac tagaaataaa acgggctgtat gttggccatca ctgtatccat ctteccacca
421 tccagtggc agttaacatc tggaggtgcc tcagtcgtgt gtttcttgc aaacttctac
481 cccaaagaca tcaatgtcaa gtggaaagatt gatggcagtg aacgacaaaaa tggcgctctg
541 aacagttgga ctgatcagga cagcaaagac agcacctaca gcatgagcag caccctcacg
601 ttgaccaagg acgagttatga acgacataac agctatacct gtgaggccac tcacaagaca
661 tcaacttcac ccattgtcaa gagttcaac aggaatgagt gttag

```

10

(32) 完全長 3 A 1 2 軽鎖配列 (3 A 1 2 カッパ可変領域及び定常領域) を規定している蛋白質配列 (シグナル配列含まず) (配列番号 153)

【0175】

【化61】

```

1 diqmtqspas lsvsvgetvt itcraseniy inlawyqqkq gkspqllvha atkladgvpss
61 rfsqsgsgtq yslkinslqs edfgsyyycqh fwgtpytfgg gtkleikrad aaptvsifpp
121 sseqltsgga svvcflnnfy pkdinvkwki dgserqngvl nswtdqdskd stysmsstlt
181 ltkdeyerhn sytceathkt stspivksfn rnec

```

20

便宜のため、本実施例で検討した抗体の完全長配列と配列表に示したものとの対応関係を示すコンコーダンス表を表2に示した。

【0176】

【表2A】

表2

配列番号	蛋白質又は核酸
122	1 A 3 重可変 + Ig G 1 定常 - 核酸
123	1 A 3 重可変 + Ig G 1 定常 - 蛋白質
124	1 A 3 軽可変 + 定常 - 核酸
125	1 A 3 軽可変 + 定常 - 蛋白質
126	2 B 8 重可変 + Ig G 1 定常 - 核酸
127	2 B 8 重可変 + Ig G 1 定常 - 蛋白質
128	2 B 8 軽可変 + 定常 - 核酸
129	2 B 8 軽可変 + 定常 - 蛋白質
130	2 F 8 重可変 + Ig G 1 定常 - 核酸
131	2 F 8 重可変 + Ig G 1 定常 - 蛋白質
132	2 F 8 軽可変 + 定常 - 核酸
133	2 F 8 軽可変 + 定常 - 蛋白質
134	3 B 6 重可変 + Ig G 1 定常 - 核酸
135	3 B 6 重可変 + Ig G 1 定常 - 蛋白質
136	3 B 6 軽可変 + 定常 - 核酸
137	3 B 6 軽可変 + 定常 - 蛋白質
138	3 D 1 1 重可変 + Ig G 1 定常 - 核酸
139	3 D 1 1 重可変 + Ig G 1 定常 - 蛋白質
140	3 D 1 1 軽可変 + 定常 - 核酸

30

【0177】

40

## 【表2B】

配列番号	蛋白質又は核酸
141	3D11軽可変+定常-蛋白質
142	1D3重可変+IgG1定常-核酸
143	1D3重可変+IgG1定常-蛋白質
144	1D3軽可変+定常-核酸
145	1D3軽可変+定常-蛋白質
146	1F3重可変+IgG1定常-核酸
147	1F3重可変+IgG1定常-蛋白質
148	1F3軽可変+定常-核酸
149	1F3軽可変+定常-蛋白質
150	3A12重可変+IgG1定常-核酸
151	3A12重可変+IgG1定常-蛋白質
152	3A12軽可変+定常-核酸
153	3A12軽可変+定常-蛋白質

10

## (実施例3)

## 各種組換えhHGF蛋白質の作製

本実施例では、実施例1及び実施例14で作製された抗体の特性を明らかにするために用いるいくつかの組換え蛋白質のクローニング及び発現について説明する。具体的には、本実施例では、組換えhHGF蛋白質、555番目の位置にグリシンからグルタメートへの置換を含む組換えhHGF蛋白質(G555E)、561番目の位置にシステインからアルギニンへの置換を含む組換えhHGF蛋白質(C561R)、マウスHGF配列内に配置されたヒトV495乃至L585HGF配列を含む組換えマウス-ヒト-マウス(mhm)キメラHGF蛋白質、マウスHGF配列内に配置されたヒトイ499乃至R566HGF配列を含む組換えmhmキメラHGF蛋白質及びマウスHGF配列内に配置されたヒトW507乃至L585HGF配列を含む組換えmhmキメラHGF蛋白質のクローニング及び発現について説明する。

20

## 【0178】

標準的な分子技術を用いて以下の発現構築物を作製し、得られたcDNA配列をDNA配列決定法によって確認した。

## 【0179】

30

a. hHGF-Fc

1回目のPCRでは、NotI部位を導入し、hHGFとhIgFcとの間に6×His標識をコードしている2本の重なり合うPCR断片を作製した。2回目に、これらの重なり合うPCR断片を鋳型としてhHGF-his-IgFcを増幅させた。得られた断片をNheI及びBamHIで消化し、pcDNA5/FRT(インビトロジエン社、#35-3014)中にクローニングした。次いで、インビトロジエン社のクローンID:IOH29794(ヒトHGF cDNA)からhHGFを増幅させた。その配列は、アクセシション番号NM\_000601.4としてNCBIに寄託されている配列に相当することが分かった。

## 【0180】

40

## (1) 5' hHGF NheI プライマー

## 【0181】

## 【化62】

ACTGGCTAGCATGTGGGTGACCAAACTCCT( 配列番号 102)

## (2) 3' hHGF NotI His 標識プライマー

## 【0182】

【化63】

GTGATGGTGATGGTATGGCGGCCGCATGACTGTGGTACCTTATATG

(配列番号103)

(3) 5' His Ig Fc プライマー

【0183】

【化64】

ACTGGCGGCCGCATCACCATACCACATCAC (配列番号104)

(4) 3' Ig Fc BamHI プライマー

10

【0184】

【化65】

ACTGGGATCCTCACTATTACCCGGGGACAG (配列番号105)

b. h H G F - F c G 5 5 5 E 及び h H G F - F c C 5 6 1 R

h H G F - F c 突然変異体 G 5 5 5 E 及び C 5 6 1 R は、クイックチェンジ (Quic  
k Change) II XL 部位特異的突然変異誘発キット (ストラタジーン社 (Stratagene)) をメーカーの使用説明書に従って用いた部位特異的突然変異誘発法により作製した。

【0185】

20

(1) h H G F - F c (G 5 5 5 E) センスプライマー

【0186】

【化66】

CATGATGTCCACGAAAGAGGAGATGAG (配列番号 106)

(2) h H G F - F c (G 5 5 5 E) アンチセンスプライマー

【0187】

【化67】

CTCATCTCCTTTCGTGGACATCATG (配列番号 107)

30

(3) h H G F - F c (C 5 6 1 R) センスプライマー

【0188】

【化68】

GGAAGAGGAGATGAGAACGCAAACAGGTTCTCAATG (配列番号 108)

(4) h H G F - F c (C 5 6 1 R) アンチセンスプライマー

【0189】

【化69】

CATTGAGAACCTGTTGCGTTCTCATCTCCTCTTCC (配列番号 109)

40

c. マウス - ヒト - マウスキメラ Fc

マウス - ヒト - マウスキメラ IgFc 構築物は、mHGF アルファ鎖 h H G F、ヒト H G F の鎖アミノ酸 V a l 4 9 5 乃至 L e u 5 8 5、及び mHGF C 末端 鎖とこれに続く 6 × His 標識及び IgG - Fc を含む。

【0190】

アミノ酸 V 4 9 5 乃至 L 5 8 5 をコードしているヒト H G F c D N A は、インビトロジェン社のクローン I D : I O H 2 9 7 9 4 (ヒト H G F c D N A) から増幅させた。その配列は、アクセション番号 NM\_000601.4 として N C B I に寄託されている配列に相当する。マウス H G F 配列は、インビトロジェン社製のスーパースクリプトワープステップ (Super Script One Step) R T - P C R キット (# 1

50

0928-034)をメーカーの使用説明書に従って用い、マウス肝の全RNA(クロントック社、#636603)からRT-PCRによって増幅させた。そのmHGF cDNA配列は、アセッション番号D10213.1としてNCBIに寄託されている配列に相当する。

## 【0191】

重なり合うPCRプライマーを用いて断片1、2及び3と称する3本の断片を作製し、連続回のPCR増幅でアニーリングした。最終産物をNheI及びNotIで切断し、p cDNA5/FRT IgGFc中にクローニングした。

## 【0192】

(1) mHGFアルファ鎖5'NheIの断片1プライマー

10

## 【0193】

## 【化70】

5'ATCGGCTAGCATGATGTGGGGACCAAAC ( 配列番号 110)

## 【0194】

## 【化71】

3' GAATCCCATTACAACCCGCAGTTGTTGTTGG ( 配列番号 111)

(2) hHGFベータ鎖aaV495乃至L585の断片2プライマー

## 【0195】

20

## 【化72】

5' CCAAAACAAAACAACACTGCGGGTTGTAATGGGATT ( 配列番号 112)

## 【0196】

## 【化73】

3' CAGGATTGCAGGTCGAGCAAGCTTCATTAAAACCAGATCT

( 配列番号 NO.113)

(3) mHGFベータ鎖C末端3'NotIの断片3プライマー

30

## 【0197】

## 【化74】

5' AGATCTGGTTTAATGAAGCTTGCTCGACCTGCAATCCTG ( 配列番号 114)

## 【0198】

## 【化75】

3' GTAATTGACATACAAGTTGTGCGGCCATCACCATCAC

( 配列番号 115)

40

d. hHGF及びmhmキメラの構築

hHGF及びmhmキメラ(V495乃至L585)をコードしているベクターであるp cDNA5/FRT hHGF及びp cDNA5/FRT-mhmキメラ(V495乃至L-L585)を、Fc標識を含ませずに、部位特異的突然変異誘発法により作製した。前記クイックチェンジII XL部位特異的突然変異誘発キット(ストラタジーン社)をメーカーの使用説明書に従って用い、上記6xHis標識の3'末端に停止コドンを導入した。突然変異誘発プライマーには、プライマー1:

## 【0199】

## 【化76】

CATCACCATCACCATCACTAAGCGGGTCTGGTGCCACG (配列番号 116)

及びプライマー2：

## 【0200】

## 【化77】

CGTGGCACCAGACCCGCTTAGTGATGGTGATGGTGATG (配列番号 117)

を含めた。

## 【0201】

さらに、前記クイックチェンジ I I - X L 部位特異的突然変異誘発キット（ストラタジーン社）をメーカーの使用説明書に従って用い、部位特異的突然変異誘発法により上記 p c D N A 5 / F R T - m h m ( V 4 9 5 乃至 L - L 5 8 5 ) 構築物から2種の別のm h m キメラを作製した。そのうちの1種のm h m 構築物はマウス配列間に配置されたh H G F のI 4 9 9 乃至 R 5 5 6 の領域を含んだ。もう一方のm h m 構築物は、マウス配列間に配置されたh H G F のW 5 0 7 乃至 L 5 8 5 の領域を含んだ。

10

## 【0202】

上記m h m キメラ ( I 4 9 9 乃至 R 5 5 6 ) の場合、適切なオリゴヌクレオチド配列を用いて、鋳型 p c D N A 5 / F R T - m h m キメラ ( V 4 9 5 乃至 L 5 8 5 ) 構築物中に、点突然変異D 5 5 8 E、C 5 6 1 R、V 5 6 4 I、V 5 6 7 I 及びM 5 8 3 L を順番に起こさせた。上記m h m キメラ ( W 5 0 7 乃至 L 5 8 5 ) の場合、適切なオリゴヌクレオチド配列を用いて、鋳型 p c D N A 5 / F R T - m h m キメラ ( V 4 9 5 乃至 L 5 8 5 ) 構築物中に、点突然変異Q 5 0 2 R、N 5 0 4 T 及びI 5 0 5 V を1ステップで導入した。

20

## 【0203】

得られたh H G F - F c 蛋白質のヌクレオチド配列は、シグナル配列 ( 1 乃至 9 3 番目ヌクレオチド ) 及びプロドメイン ( 9 4 乃至 1 6 2 番目ヌクレオチド ) を含めて、配列番号 1 1 8 として記載している。このh H G F - F c 蛋白質のアミノ酸配列は、配列番号 1 1 9 として記載している。

## 【0204】

30

得られたm h m ( V 4 9 5 - L 5 8 5 ) - F c キメラ蛋白質をコードしているヌクレオチド配列は、シグナル配列 ( 1 乃至 9 6 番目ヌクレオチド ) 及びプロドメイン ( 9 7 乃至 1 6 5 番目ヌクレオチド ) を含めて、配列番号 1 2 0 として記載している。このm h m ( V 4 9 5 - L 5 8 5 ) - F c キメラ蛋白質のアミノ酸配列は、配列番号 1 2 1 として記載している。

## 【0205】

得られたm h m ( V 4 9 5 - L 5 8 5 ) 構築物をコードしているヌクレオチド配列及びこの構築物を規定する蛋白質配列は、それぞれ配列番号 2 1 1 及び 2 1 2 として記載している。配列番号 2 1 1 で表される核酸配列は、シグナル配列 ( 1 乃至 9 6 番目ヌクレオチド ) 及びプロドメイン ( 9 7 乃至 1 6 5 番目ヌクレオチド ) を含み、配列番号 2 1 2 で表される蛋白質配列は、(シグナル配列又はプロドメインを含まない)活性蛋白質配列を含む。得られたm h m ( I 4 9 9 ~ R 5 5 6 ) 構築物をコードしているヌクレオチド配列及びこの構築物を規定する蛋白質配列は、それぞれ配列番号 2 1 3 及び 2 1 4 として記載している。配列番号 2 1 3 で表される核酸配列は、シグナル配列 ( 1 乃至 9 6 番目ヌクレオチド ) 及びプロドメイン ( 9 7 乃至 1 6 5 番目ヌクレオチド ) を含み、配列番号 2 1 4 で表される蛋白質配列は、(シグナル配列又はプロドメインを含まない)活性蛋白質配列を含む。得られたm h m ( W 5 0 7 ~ L 5 8 5 ) をコードしているヌクレオチド配列及びこの構築物を規定する蛋白質配列は、それぞれ配列番号 2 1 5 及び 2 1 6 として記載している。配列番号 2 1 5 で表される核酸配列は、シグナル配列 ( 1 乃至 9 6 番目ヌクレオチド ) 及びプロドメイン ( 9 7 乃至 1 6 5 番目ヌクレオチド ) を含み、配列番号 2 1 6 で表さ

40

50

れる蛋白質配列は、（シグナル配列又はプロドメインを含まない）活性蛋白質配列を含む。

### 【0206】

#### e. 蛋白質発現 (1) 細胞培養

C H O F I p I n 細胞（インビトロジエン社、カタログ番号 R 7 5 8 - 0 7 ）を F 1 2 K 培地（A T T C、カタログ番号 3 0 - 2 0 0 4 ）、1 0 % F C S（インビトロジエン社、カタログ番号 1 0 4 3 8 0 2 6 ）、1 % ペニシリン（1 0 , 0 0 0 単位 / m L ）/ ストレプトマイシン（1 0 , 0 0 0  $\mu$  g / m L ）（インビトロジエン社、カタログ番号 1 5 1 4 0 - 1 2 2 ）中、3 7 、5 % C O<sub>2</sub>、1 0 0  $\mu$  g / m L ゼオシン（Z e o c i n ）（インビトロジエン社、カタログ番号 R 2 5 0 - 0 1 ）の条件下で増殖させた。 10

### 【0207】

#### (2) 安定な C H O F I p I n 細胞株の作製

リポフェクタミン 2 0 0 0 （インビトロジエン社、カタログ番号 1 1 6 6 8 - 0 2 7 ）をそのメーカーの使用説明書に従って用い、発現プラスミド D N A p O G 4 4 及び p c D N A 5 / F R T を 9 : 1 の比率で用いて C H O F I p I n 宿主細胞に形質移入した。対照として、空の p c D N A 5 / F R T ベクター / p O G 4 4 及び p O G 4 4 プラスミド（インビトロジエン社、カタログ番号 3 5 - 3 0 1 8 ）単独を細胞に形質移入した。形質移入後 2 4 時間に、この細胞を分裂させ、4 8 時間後に、0 . 5 m g / m L のハイグロマイシン B（シグマ社（S i g m a ）、カタログ番号 H 0 6 5 4 - S P E C ）を細胞に添加した。F 1 2 K 、1 0 % F C S 、1 % ペニシリン / ストレプトマイシン、0 . 5 m g / m L ハイグロマイシン B 中で安定細胞の多クローニング選択を行った。 20

### 【0208】

#### (3) 安定な C H O F I p I n 細胞株における蛋白質発現

約 2 × 1 0<sup>6</sup> 個の細胞を 1 5 c m プレートに接種し、F 1 2 K ( A T C C 、カタログ番号 3 0 - 2 0 0 4 ) / D M E M 高グルコース（インビトロジエン社、カタログ番号 1 1 9 9 5 0 6 5 ）1 : 1 、5 % 超低 I g G F C S（インビトロジエン社、# 1 6 2 5 0 - 7 8 ）中、3 7 、5 % C O<sub>2</sub> で 5 乃至 6 日間増殖させた。上清を採取し、得られた蛋白質を E L I S A 及び表面プラスモン共鳴により分析した。

#### （実施例 4 ）

30

#### 抗 h H G F モノクローナル抗体の結合特性

実施例 1 で作製したモノクローナル抗体の特徴は、これらが h H G F 及び実施例 3 で作製した組換え H G F 蛋白質の一部に結合することができることにあった。

### 【0209】

B I A c o r e T 1 0 0 装置を用いて表面プラスモン共鳴によりこれらの抗体を分析することによって H G F 及び実施例 3 に記載した融合蛋白質の一部へのその結合能を評価した。各抗体は、標準的なカップリングプロトコルをメーカーの使用説明書に従って用いたアミンカップリング（B I A c o r e 、カタログ番号 B R - 1 0 0 0 - 5 0 ）によりカルボキシメチル化デキストラン C M 5 センサーチップ（B I A c o r e 、カタログ番号 B R - 1 0 0 6 - 6 8 ）上に固定化した。 40

### 【0210】

分析は、0 . 0 5 % 界面活性剤 P 2 0 ( B I A c o r e 、カタログ番号 R - 1 0 0 0 - 5 4 ) 、2 m g / m L の B S A ( E M D 社カタログ番号 2 9 3 0 ) 及び 1 0 m g / m L の C M - デキストランナトリウム塩（フルカ社（F l u k a ）、カタログ番号 8 6 5 2 4 ）を含有する P B S ( G I B C O 社、カタログ番号 1 4 0 4 0 - 1 3 3 ) を泳動用緩衝液として用い、2 5 で行った。種々の H G F 融合蛋白質を含む上清又は空のベクターを形質移入した細胞からの上清を各抗体上に 3 0  $\mu$  L / 分の流速で 3 分間注入した。その結果生じた結合は、注入終了後 3 0 秒のベースラインに対する共鳴単位（R U ）として求めた。結合は、泳動用緩衝液で希釈したヒト H G F ( R & D システムズ社 ( R & D S y s t e m s ) 、カタログ番号 2 9 4 - H G N - 0 2 5 ) と比較した。非特異的な結合は、同じア 50

ミニカップリング法を用いてマウス IgG (ロックランド社 (Rockland) 、カタログ番号 010-0102) を固定化した対照表面への結合を比較することにより測定した。

**【0211】**

以上の結果は表 3 にまとめた。

**【0212】**

**【表 3】**

表 3

抗体	rHGF (R&D Systems)	rmHGF (R&D Systems)	mhmキメラ (V495-L585)	ヒト HGF	G555E	C561R
1A3	結合	非結合	非結合	結合	結合	結合
1D3	結合	非結合	結合	結合	結合	結合
1F3	結合	結合	結合	結合	結合	結合
2B8	結合	非結合	結合	結合	結合	結合
2F8	結合	結合	非結合	結合	結合	結合
3A12	結合	非結合	非結合	結合	結合	結合
3B6	結合	非結合	非結合	結合	結合	結合
3D11	結合	非結合	非結合	結合	結合	結合

10

20

表 3 の結果から明らかなように、上記の各抗体は rHGF 及び精製ヒト HGF に結合する。さらに、これらの抗体は全て、点突然変異 G555E 及び C561R を含む hHGF に結合する。総じて、1F3 及び 2F8 を除く全ての抗体はマウス HGF に結合せず、このことから抗体 1A3、1D3、2B8、3A12、3B6 及び 3D11 がヒト HGF に特異的に結合することが明らかとなった。抗体 1D3、1F3 及び 2B8 がマウス - ヒト - マウスキメラに結合するのに対して、残りの抗体は結合しなかった。以上の結果から、抗体 1D3 及び 2B8 は、ヒト HGF の 495 乃至 585 番目残基に少なくとも部分的に結合することが分かる。抗体 1A3、3A12、3B6 及び 3D11 は、495 乃至 585 番目残基以外のヒト hHGF の部分に結合するように思われる。2F8 が hHGF 及び mHGF のいずれにも結合するように思われる所以、現在のところ、これがなぜ mhmキメラに結合しないのか不明である。

30

**(実施例 5)**

**抗 hHGF モノクローナル抗体の還元及び非還元 HGF への結合能**

本実施例では、実施例 1 で作製した抗 hHGF モノクローナル抗体の還元及び非還元 HGF への結合能について分析した。

**【0213】**

抗 HGF 血清の上記組換え hHGF との反応性を免疫プロット法によって評価した。NUPAGE サンプル還元緩衝液 (インビトロジェン社) を含む、又は含まない NUPAGE MOPS SDS 泳動用緩衝液 (インビトロジェン社) 中 8 μg の組換え hHGF 蛋白質を 4 乃至 12 % ビス - トリス 1.0 mm × 2 D ウェルゲル (インビトロジェン社、カールズバッド、カリリフォルニア州) で分画した。次いで、分画した蛋白質を標準的な手順によりニトロセルロース膜上に移した。このニトロセルロース膜を、0.1% Tween 20 (登録商標) 含有トリス緩衝食塩液 (TBS-T) に溶かした脱脂乳粉の 5 % 溶液でブロックした後、更なるブロックのために、ミニプロテアン II マルチスクリーン (Mini Protean II Multi-Screen) 装置 (バイオラッド社 (Bio-Rad)) に取り付けた。

40

**【0214】**

その結果得られた膜をマルチスクリーン装置上で精製抗体によりプローブした。精製抗体はブロッキング緩衝液で 5 μg / mL に希釈した。次いで、このニトロセルロース膜を装置から取り外し、ホースラディッシュペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG 抗体と共に

50

インキュベートした。得られた結果は表4に示した。表中、数字は結合の程度を示し、-は最も弱い(殆どあるいは全く結合しない)、3+は最も強い結合を表している。

### 【0215】

#### 【表4】

表4

抗体	還元 (作用時間: 3~5分)	非還元 (作用時間: 20秒)
1A3	2+	2+
1D3	2+	2+
1F3	2+	2+
2B8	-	1+
2F8	2+	2+
3A12	-	2+
3B6	3+	2+
3D11	-	3+

10

表4のデータから明らかなように、抗体は全て、非還元rhHGFに結合する。これに対し、モノクローナル抗体1A3、1D3、1F3、2F8及び3B6は還元rhHGFに結合したが、抗体2B8、3A12及び3D11は還元rhHGFに結合しなかった。

20

### (実施例6)

#### 結合親和性

実施例1で作製した各抗体のhHGFに対する結合親和性及び相互作用の速度を表面プラスモン共鳴によって測定した。

### 【0216】

ウサギ抗マウス免疫グロブリン(BIAcore、カタログ番号BR-1005-14)を、標準的なカップリングプロトコルをメーカーの使用説明書に従って用いたアミンカップリング(BIAcore、カタログ番号BR-1000-50)によりカルボキシメチル化デキストランCM5センサーチップ(BIAcore、カタログ番号BR-1006-68)上に固定化した。分析は、0.05%界面活性剤P20(BIAcore、カタログ番号R-1000-54)、2mg/mLのBSA(EMD社カタログ番号2930)及び10mg/mLのCM-デキストランナトリウム塩(フルカ社(Fukuda)、カタログ番号86524)を含有するPBS(GIBCO社、カタログ番号14040-133)を泳動用緩衝液として用い、25℃で行った。

30

### 【0217】

前記抗体は、個々のフローセル内で10μL/分の流速で捕捉した。各抗体が各サイクルで捕捉される約20RUの抗体を生じるための注入時間にはばらつきがあった。緩衝液、又は泳動用緩衝液で希釈したHGF(R&Dシステムズ社、カタログ番号294-HGN-025)を対照表面(捕捉抗体なし)及び活性表面(試験対象抗体あり)上に60μL/分で2分間順次注入した。解離相を濃度に応じて15又は90分間モニターした。その後、上記表面は、別のサイクルが開始される前に、pH1.7の10mMグリシン-HCl(BIAcore社、カタログ番号BR-1003-54)を60μL/分の流速で3分間注入して再生させた。試験したHGF濃度は0.46nM乃至7.5nMであった。

40

### 【0218】

速度論的パラメータは、対照値減算を含むBIAエバリュエーション(BIAevaluation)ソフトウェアの速度関数を用いて求めた。各抗体の速度論的パラメータk<sub>a</sub>(会合速度定数)、k<sub>d</sub>(解離速度定数)及びK<sub>D</sub>(平衡解離定数)を表5にまとめた。

### 【0219】

50

【表5】

表5

抗体	$k_a$ ( $1/\text{Ms}$ )	$\overline{SE}$ ( $k_a$ )	$k_d$ ( $1/\text{s}$ )	$\overline{SE}$ ( $k_d$ )	$K_D$ ( $\mu\text{M}$ )	SD
1A3	$1.7 \times 10^6$	$7.3 \times 10^4$	$5.2 \times 10^{-5}$	$8.4 \times 10^{-7}$	30.1	5.6
1D3	$1.7 \times 10^6$	$3.1 \times 10^4$	$8.2 \times 10^{-5}$	$1.7 \times 10^{-6}$	54.2	27.4
1F3	$1.5 \times 10^6$	$5.0 \times 10^4$	$2.6 \times 10^{-5}$	$6.6 \times 10^{-7}$	18.1	8.2
2B8	$1.6 \times 10^6$	$2.9 \times 10^4$	$2.1 \times 10^{-5}$	$1.4 \times 10^{-7}$	13.5	4.4
3A12	$1.6 \times 10^6$	$3.7 \times 10^4$	$1.6 \times 10^{-4}$	$1.6 \times 10^{-6}$	103.0	10.4
3B6	$2.0 \times 10^6$	$6.5 \times 10^4$	$3.9 \times 10^{-5}$	$3.2 \times 10^{-7}$	17.0	3.4

10

表5のデータから明らかなように、これらの抗体は、 $K_D$  値約 100  $\mu\text{M}$  以下、約 50  $\mu\text{M}$  以下又は約 20  $\mu\text{M}$  以下で hHGF に結合する。

#### (実施例7)

##### 抗 hHGF 抗体の中和活性

本実施例では、実施例1で作製した抗体について、(a) c-MetへのhHGFの結合を阻害し、(b) 4MBR-5細胞におけるBrdU取り込みのHGFによる促進を阻害する能力を特徴化した。

#### 【0220】

##### a. HGF - Met 結合阻害試験（中和試験）

20

上記抗体について、c-MetへのhHGF結合を阻害する能力をELISAにより試験した。

#### 【0221】

すなわち、ワラック96穴DELFIAアッセイプレート（ワラック社、カタログ番号 A A A N D - 0 0 0 1 ) を 6 . 2 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  HGF ( R & D システムズ社、カタログ番号 2 9 4 - H G N - 0 2 5 ) の炭酸コーティング緩衝液 ( 1 5 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 及び 3 4 mM NaHCO<sub>3</sub>、pH 9 . 0 ) 溶液 1 0 0  $\mu\text{L}$  により 4 で 1 6 時間コーティングした。次に、このプレートを室温で 1 時間 5 % 脱脂粉乳の PBS 溶液 2 0 0  $\mu\text{L}$  でブロックした。抗体は、別のプレートにおいて 5 % 脱脂粉乳の PBS 溶液に溶解した 2 nM の c-Met ( R & D システムズ社、カタログ番号 3 5 8 - M T / C F ) に検討対象の抗体を漸増濃度 ( 0 . 0 3 3 乃至 6 6 7 nM、3倍段階希釈 ) で加えることにより調製した。ウェル当たり 1 0 0  $\mu\text{L}$  のサンプルを上記アッセイプレートに移し、4 で一夜インキュベートした。次いで、このアッセイプレートを PBS - 0 . 1 % Tween 20 で 3 回洗浄した後、5 % 脱脂粉乳の PBS 溶液で調製した 1 0 0  $\mu\text{L}$  / ウェルの 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ピオチン化抗ヒト c-Met 抗体 ( R & D システムズ社、カタログ番号 B A F 3 5 8 ) 溶液と共に室温で 2 時間インキュベートした。

30

#### 【0222】

その後、上記で得られたプレートを PBS - 0 . 1 % Tween 20 で 3 回洗浄した後、DELFIAアッセイ緩衝液 ( ワラック社、カタログ番号 4 0 0 2 - 0 0 1 0 ) で 1 : 1 , 0 0 0 に希釈した Eu 標識ストレプトアビシン ( ワラック社、カタログ番号 1 2 4 4 - 3 6 0 ) と共に室温で 1 時間インキュベートした。その結果得られたプレートを DELFIA 洗浄液 ( ワラック社、カタログ番号 4 0 1 0 - 0 0 1 0 ) で 3 回洗浄した後、1 0 0  $\mu\text{L}$  / ウェルの DELFIA 強化溶液 ( ワラック社、# 4 0 0 1 - 0 0 1 0 ) と共に攪拌しながら室温で 1 5 分間インキュベートした。

40

#### 【0223】

上記プレートは、ユウロピウム法を用いるビクター<sup>3</sup>V 装置 ( パーキンエルマー社 ( Perkin Elmer ) ) で読み取らせた。IC<sub>50</sub> 値を算出し、表6にまとめた。

#### 【0224】

## 【表6】

表6

抗体	$IC_{50}$ (nM)	SD
1A3	5.65	0.91
1D3	4.43	2.27
1F3	6.57	0.28
2B8	5.57	1.19
2F8	5.36	0.88
3A12	5.26	2.11
3B6	-	-
3D11	5.66	2.75

10

以上の結果から明らかなように、3B6以外の全ての抗体（即ち、1D3、1A3、2B8、3A12、1F3、3D11及び2F8）は、c-MetへのHGFの結合を効率的に中和する。

## 【0225】

b. 4 MBr-5細胞におけるBrdU取り込みのHGFによる促進の中和

12.5nMのhHGF 10 $\mu$ Lを96穴組織培養マイクロタイプレート（コスター社（Costar）カタログ番号3903）の個々のウェルに分注した。次いで、6667、2222、740、247、82、27、9.1、3.0、1.0及び0.33nMの濃度に連続希釈した抗体10 $\mu$ Lを各ウェルに添加した。次に、このHGF抗体混合液を室温で30分間インキュベートした。F-12K(ATCC、30-2004)、15%FBS(ギブコ(Gibco)10438-026)、30ng/mLEGF(シグマ(Sigma)E9644)、1%ペニシリン/ストレプトマイシン(PS、ギブコ社カタログ番号15140-122)中で培養したサル気管支上皮細胞4MBr-5(ATCC、CCL208)をトリプシン(Trypsin)(ギブコ社カタログ番号25200-056)で解離させ、75,000個/mLの濃度でアッセイ培地(F-12K、2.5%FBS、1%PS)に再懸濁し、この細胞懸濁液80 $\mu$ Lを上記HGF抗体混合液に分注した。

20

## 【0226】

この細胞を37、5%CO<sub>2</sub>の条件下でインキュベートした。48時間後、100 $\mu$ M BrdU(ロシュ社(Roche)、カタログ番号1669915)を10 $\mu$ L添加した。72時間後、培地を除去し、プレートをヘアドライヤーで乾燥させた後、BrdU ELISAをメーカーの使用説明書(ロシュ社、カタログ番号1669915)に従って用いて処理した。

30

## 【0227】

発光シグナルは、シナジーHT(Synergy HT)プレートリーダー(バイオテック社(Bio-Tek))によって定量化した。このデータは、グラフパッドプリズム(Graph Pad Prism)(グラフパッドソフトウェア社(Graph Pad Software))において式 $y = \text{ボトム} + (\text{トップ} - \text{ボトム}) / (1 + 10^{(\text{log}(\text{EC}_{50} - x) * \text{ヒル勾配})})$ の可変勾配を有するS字形の用量反応に当てはめた。各実験は、2回ずつ、少なくとも3回繰り返した。表7にEC<sub>50</sub>の平均値を示した。

40

## 【0228】

【表7】

表7

抗体	IC <sub>50</sub> (nM)
1A3	4.69
1D3	4.99
1F3	1.94
2B8	1.41
2F8	19.24
3A12	30.30
3B6	36.08
3D11	51.12

10

表7の結果から明らかなように、抗体1A3、1D3、1F3、2B8、2F8、3A12、3B6及び3D11は全て、4MBr-5細胞のHGF誘発性増殖を抑制する。

#### (実施例8)

##### 抗hHGF抗体の抗散乱(Anti-Scatter)活性

本実施例では、実施例1で作製した抗体のHGF誘発性散乱活性を抑制する能力に関する特性化について説明する。HGFは、MDCK細胞(ATCC、マナッサス、バージニア州、カタログ番号CCL-34)においてクラスターの「散乱」(運動)を誘発する。

#### 【0229】

MDCK細胞は、10%ウシ胎仔血清(インビトロジエン社、カタログ番号10438026)及び1%ペニシリン-ストレプトマイシン(インビトロジエン社カタログ番号5140122)を含有するMEM(ATCC、マナッサス、バージニア州、カタログ番号30-2003)80μL中ウェル当たり $4 \times 10^3$ 個の密度で96穴Costar組織培養プレート(コーニング社(Corning Incorporated)、コーニング、ニューヨーク州、カタログ番号3595)に接種した。検討対象の各抗体は、10%ウシ胎仔血清及び1%ペニシリン-ストレプトマイシンを含有するMEMで6,667nMに希釈した。次いで、種々の抗体希釈液のそれぞれ、及び10%ウシ胎仔血清及び1%ペニシリン-ストレプトマイシンを含有し抗体を含まないMEMを別々に、10%ウシ胎仔血清及び1%ペニシリン-ストレプトマイシン並びに100ng/mlのHGF(R&Dシステムズ社、カタログ番号294-HGN-025)を含有する等容量のMEMと混合した。各抗体/HGF希釈液は、25度30分間インキュベートした。各抗体/HGF希釈液20μLを個別に個々のウェルに添加し、最終抗体濃度666.7nM及び最終HGF濃度10ng/mlを得た。次に、MDCK細胞を37、5%CO<sub>2</sub>で24時間インキュベートした。

20

#### 【0230】

24時間のインキュベーション後、MDCK細胞をウェル当たり100μLの氷冷PBS(インビトロジエン社カタログ番号14190144)で一度注意深く洗い、25度10分間揺動させながらウェル当たり100μLの氷冷メタノールで固定した。次いで、プレートを一度蒸留水で注意深く洗浄した。蒸留水に溶解した0.5%クリスタルバイオレット(シグマ社、セントルイス、ミズーリ州、カタログ番号C3886)及び50%エタノールからなる100μL容のクリスタルバイオレット溶液を各ウェルに添加し、細胞を揺動させながら25度20分間インキュベートした。

30

#### 【0231】

クリスタルバイオレット溶液による染色後、細胞を蒸留水で三度注意深く洗浄した。次に、各ウェルにPBSを添加してサンプルの乾燥を防いだ。ライカ(Leica)DMIIRB顕微鏡(ライカマイクロシステムズ社、ウェッツラー、ドイツ)、DC500カメラ(ライカマイクロシステムズ社、ウェッツラー、ドイツ)及びマグナファイア(MagnaFire)2.1Cソフトウェア(Optronics、ゴレタ、カリフォルニア)を用いて細胞を撮像し、サンプルを散乱レベルについて評価した。表8にその結果をまとめた。

40

50

【0232】

【表8】

表8

HGF誘発性MDCK細胞散乱の抑制		
抗体	実験1	実験2
1A3	++	+
1D3	++	++
1F3	+	+
2B8	+++	+++
2F8	+	+
3A12	-	-/+
3B6	++	++
3D11	-	-

- 抑制なし

+++ 極めて強くほぼ完全な抑制

++ 強い抑制

+ 検出可能な抑制

表8の結果から明らかなように、抗体2B8は、その他の抗体よりも多くのHGF誘発性散乱を抑制した。抗体1D3及び3B6は中間的なレベルの抑制を示し、抗体1A3は低乃至中間レベルの抑制を示し、抗体1F3及び2F8は低レベルの抑制を示し、抗体3A12及び3D11はほとんど或いは全く検出可能な抑制を示さなかった。

## (実施例9)

## HGF刺激c-Metリン酸化の阻害

本実施例では、実施例1で作製した抗体の、PC-3細胞におけるHGF刺激c-Metリン酸化を阻害する能力に関する特性化について説明する。HGFはPC-3細胞(ATCC番号CRL-1435)においてMetのリン酸化を誘発する。

【0233】

PC-3細胞は、10%ウシ胎仔血清(インビトロジエン社、カタログ番号10438026)及び1%ペニシリン-ストレプトマイシン(インビトロジエン社カタログ番号15140122)を含有するF-12K(ATCC、マナッサス、バージニア州、カタログ番号30-2004)100μL中ウェル当たり $4.5 \times 10^4$ 個の密度で96穴Coastal組織培養プレート(コーニング社カタログ番号3595)の個々のウェルに接種した。37°C、5%CO<sub>2</sub>で24時間培養後、培地を除去し、1%ペニシリン-ストレプトマイシンを含有する無血清F-12Kで細胞を一度洗った。次いで、細胞を1%ペニシリン-ストレプトマイシンを含有する無血清F-12K 100μL中で24時間インキュベートした。

【0234】

1%ペニシリン-ストレプトマイシンを含有する無血清F-12Kを用いて、検討対象の各抗体の10種の希釈液、即ち、6, 667nM、2, 222nM、741nM、247nM、82.3nM、27.4nM、9.1nM、3.0nM、1.0nM及び0.3nMの希釈液を調製した。各抗体希釈液、及び1%ペニシリン-ストレプトマイシンを含有するが抗体を含まない無血清F-12Kを別々に、1%ペニシリン-ストレプトマイシン及び500ng/mLのHGF(R&Dシステムズ社カタログ番号294-HGN-025)を含有する等容量の無血清F-12Kと混合した。次いで、これらの抗体/HGF希釈液を25°Cで30分間インキュベートした。これによりHGFの最終濃度は1.25nMとなった。

【0235】

その後、1%ペニシリン-ストレプトマイシンを含有する無血清F-12Kで上記P

10

20

30

40

50

C - 3 細胞を一度洗った。次に、この細胞に、1% ペニシリン - ストレプトマイシンを含有する無血清F - 12 Kを70 μL 添加した後、10 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>（シグマ社カタログ番号S 6 5 0 8）の1% ペニシリン - ストレプトマイシン含有無血清F - 12 K溶液10 μL を添加した。次いで、この細胞を37°、5% CO<sub>2</sub>で60分間インキュベートした。このインキュベーションの後、各抗体 / HGF 希釀液20 μL を別々に個別のウェルに添加し、最終HGF濃度50 ng / mL 並びに各抗体の最終濃度666.7 nM、222.2 nM、74.1 nM、24.7 nM、8.23 nM、2.74 nM、0.91 nM、0.30 nM、0.10 nM 及び0.03 nMを得た。次に、この細胞を37°、5% CO<sub>2</sub>で10分間インキュベートし、その時点後に培地 / 抗体 / HGF 混合物を除去してプレートを氷上に置いた。その後、細胞を、1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>を含有する100 μL / ウェルの氷冷PBS（インビトロジエン社カタログ番号14190144）で一度洗った。次いで、この細胞を、1% Omni Pur Triton X-100（ドイツメルク社（MERCK KGaA）、ダルムシュタット、ドイツ、カタログ番号9410）、50 mMトリス-HCl pH 8.0、100 mM NaCl、0.3 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>、1×プロテアーゼ阻害剤カクテル（シグマ社カタログ番号P 8 3 4 0）及び1×ホスファターゼ阻害剤カクテル2（シグマ社カタログ番号5 7 2 6）からなる100 μL / ウェルの氷冷溶解緩衝液中、4°で、30分間インキュベートした。

## 【0236】

ビオチニル化抗ヒトHGF-R（c-met）抗体（R&Dシステムズ社カタログ番号BAF 358）を、1%ウシ血清アルブミン（シグマ社カタログ番号A 2 1 5 3）を含有するDELFIAアッセイバッファー（Assay Buffer）（パーキンエルマー社（PerkinElmer）、トルク、フィンランド、カタログ番号4 0 0 2 - 0 0 1 0）で2 μg / mL の濃度に希釈し、黄色ストレプトアビシンマイクロタイトレーションプレート（パーキンエルマー社カタログ番号AAAND-0005）のウェル当たり50 μL のこの希釈液を添加した。次に、このプレートを揺動させながら25°で30分間抗体と共にインキュベートした。インキュベーション後、このプレートをDELFIA洗浄液（パーキンエルマー社カタログ番号4 0 1 0 - 0 0 1 0）で洗浄し、各種PC-3細胞溶解物のそれぞれ80 μL を別々に、洗浄したストレプトアビシンマイクロタイトレーションプレートの個々のウェルに添加した。

## 【0237】

上記のPC-3細胞溶解物を含むストレプトアビシンマイクロタイトレーションプレートを振盪しながら25°で60分間インキュベートした後、DELFIA洗浄溶液で洗浄した。この前もってPC-3細胞溶解物とインキュベートした洗浄ストレプトアビシンマイクロタイトレーションプレートの各ウェルに、1%ウシ血清アルブミンを含有するDELFIAアッセイバッファーで希釈した600 ng / mL DELFIA Eu-N1 P-tyr-100抗体（パーキンエルマー社、カタログ番号AD 0 1 5 9）溶液100 μL を添加した。次いで、このプレートを揺動させながら25°で60分間インキュベートした。最後に、このプレートをDELFIA洗浄溶液で洗浄した。次に、この洗浄ストレプトアビシンマイクロタイトレーションプレートの各ウェルにDELFIAエンハンスマントソリューション（Enhancement Solution）（パーキンエルマー社カタログ番号4 0 0 1 - 0 0 1 0）200 μL を添加し、プレートを暗所で振盪しながら25°で5分間インキュベートした。

## 【0238】

その後、ビクター3V（Victor 3V）リーダ（パーキンエルマー社）でユウロピウム（Europium）プロトコルを用いてシグナルを測定した。ウィンドウズ（登録商標）（Windows（登録商標））用プリズム（Prism）4（グラフパッドソフトウェア社（Graph Pad Software, Inc.））、サンディエゴ、カリリフォルニア州）及びS字形用量反応式を用いてEC<sub>50</sub>値を算出した。

## 【0239】

nM単位のEC<sub>50</sub>としてまとめた結果を表9に示した。

10

20

30

40

50

【0240】

【表9】

表9

抗体	2実験の平均	標準偏差
1A3	0.684	0.242
1D3	0.984	0.129
1F3	1.19	1.01
2B8	0.287	0.104
2F8	1.39	2.12
3A12	2.00	0.553
3B6	1.01	1.11
3D11	2.28	N/A

表9のデータから明らかなように、8種の抗体は全てPC-3細胞におけるHGF誘導性c-Metリン酸化の強力な阻害剤である。

(実施例10)

## U87MG異種移植モデルにおける腫瘍抑制

U87MG異種移植モデルを用い、本発明のマウスモノクローナル抗体の腫瘍増殖抑制能について試験した。U87MG細胞(ATCC)は、ダルベッコ改変イーグル培地(DMEM:Dulbecco's Modified Eagle medium)を10%ウシ胎仔血清、100単位/mLペニシリン及び100μg/mLストレプトマイシンと共に含む培地を用いた、5%CO<sub>2</sub>及び95%空気を含有する雰囲気中37°の培養で増殖させた。これらの細胞は、トリプシン-EDTAを用いて培養皿の壁から細胞を剥離することにより二次培養して維持した。

【0241】

ほぼコンフルエントの細胞をトリプシン処理により回収し、次いで、50%マトリゲル(Matrigel)(BDバイオサイエンシズ社(BD Biosciences)、カタログ番号356237)中の細胞5×10<sup>6</sup>個を、7週齢雌性ICR SCIDマウス(タコニックラボラトリー社(Taconic Labs))の肩甲骨間の上背部に皮下注射した。キャリパで腫瘍の長径(L)及び短径(W)(mm)を測定した。腫瘍容積(vol.)は、容積(mm<sup>3</sup>)=L×W<sup>2</sup>/2として計算した。腫瘍が約200mm<sup>3</sup>にまで成長した時に、担腫瘍マウスを1群10匹の5群に無作為化した。1群にはPBSを投与した。その他の4群のそれぞれには、抗体1A3、1D3、1F3又は2B8のうちの1種を投与した。抗体は全て、5用量の腹腔内注射により週2回1mg/kg体重を投与した。腫瘍容積及びマウス体重を週2回記録した。スチュードントのt-検定を用いて腫瘍成長の抑制を解析した。結果は図6及び表10にまとめた。

【0242】

【表10】

表10

抑制百分率		
2B8対PBS	93%	p=0.001
1A3対PBS	73%	p=0.0075
1D3対PBS	51%	p=0.075
1F3対PBS	60%	p=0.027

2B8投与群で部分的な退縮が達成された(図6)。1A3投与群及び1F3投与群では統計的に有意な成長抑制が認められた(表10)。1D3の場合、51%の腫瘍成長抑制(p値:0.075)が認められた。有意な体重減少は認められなかった。

(実施例11)

## U118異種移植モデルにおける腫瘍抑制

10

20

30

40

50

U 1 1 8 異種移植モデルを用い、抗体 1 A 3、1 D 3、1 F 3 及び 2 B 8 の腫瘍増殖抑制能について試験した。U 1 1 8 細胞 (ATCC) は、U 8 7 MG 細胞に関して（上記）実施例 1 0 に記載したのと同様にして増殖させた。

【0243】

使用マウスが 7 週齢雌性 N C r ヌードマウス（タコニック社）であること以外は上記実施例 1 0 に記載したのと同様にして皮下腫瘍を確立し、投与は、腫瘍が約 8 0 mm<sup>3</sup> にまで成長した時に開始した。U 8 7 MG モデルの場合と同様に、抗体は全て、4 用量の腹腔内注射により週 2 回 1 mg / kg 体重を投与した。腫瘍容積及びマウス体重を週 2 回記録した。スチューデントの t - 検定を用いて腫瘍成長の抑制を解析した。結果は図 7 及び表 1 1 にまとめた。

10

【0244】

【表 1 1】

表 1 1

抑制百分率		
2B8 対 IgG	75%	p=0.007
1A3 対 IgG	57%	p=0.01
1D3 対 IgG	47%	p=0.12
1F3 対 IgG	30%	p=0.39

2 B 8 投与群及び 1 A 3 投与群では統計的に有意な成長抑制が認められた（図 7）。1 F 3 群及び 1 D 3 群では中等度の腫瘍成長抑制が認められ、p 値は、本試験で統計的に有意であると定義した 0 . 0 5 未満であった（表 1 1）。有意な体重減少は認められなかつた。

20

（実施例 1 2）

マウスモノクローナル抗体のヒト化

本実施例では、マウス 2 B 8 抗体のヒト化及び得られるヒト化抗体の特性化について説明する。マウス 2 B 8 重及び軽鎖可変領域は 2 通りの方法で「ヒト化」した。

A . ヒト化の方法 1

第一の方法では、Hwang ほか（2005 年）METHODS 36 : p . 35 - 42、Tan ほか（2002 年）J. IMMUNOL. 169 : p . 1119 - 1125 及び米国特許第 6,881,557 号明細書に記載されている「超ヒト化」方法に基づいて、3 つのヒト化重鎖可変領域及び 2 つのヒト化カッパ軽鎖可変領域を設計した。

30

【0245】

各マウス 2 B 8 C D R について C D R の長さ及びアミノ酸組成に基づき、チョチア規定構造クラス（Chothia canonical structural class）を特定した。同じチョチア規定構造クラスの軽及び重鎖可変領域からなるヒト生殖細胞系可変領域は、国際免疫遺伝学情報システム（IMGT）ウェブサイトに記載されている既知ヒト生殖細胞系可変領域基準対立遺伝子（ワールドワイドウェブの imgt.cines.fr 及び biochem.unizh.ch/antibody/Sequences/index.html で入手可能）に基づいて確認した。同構造クラスのこれらヒト生殖細胞系可変領域は、C D R アミノ酸残基間の完全な同一性又は類似性を計算することによってマウス 2 B 8 可変領域と比較した。マウス 2 B 8 C D R 残基と最も高い同一性及び / 又は類似性を有するヒト生殖細胞系可変領域を C D R 移植用に選んだ。これらのヒト生殖細胞系可変領域のフレームワーク残基を保存する一方、マウス 2 B 8 C D R 残基は、マウス 2 B 8 C D R とヒト生殖細胞系 C D R との間で異なる対応するヒト生殖細胞系可変領域残基を置換するために用いた。次いで、2 B 8 マウス J 領域に最も類似したヒト J 領域を上記「超ヒト化」可変領域のカルボキシル末端に付加した。次に、この「超ヒト化」可変領域のアミノ末端にシグナル配列を付加し、これらのアミノ酸配列を核酸配列に変換した。

40

50

## 【0246】

この完全な可変領域核酸配列は、遺伝子合成 P C R 法 ( Y o u n g ほか ( 2 0 0 4 年 ) N U C L . A C I D S R E S . 3 2 : e 5 9 ) を用いて構築し、標準的な分子生物学的技術を使用して、(上記可変領域の下流にある)ヒト定常 Ig G 1 ( G 1 m ( 1 7 , 1 ) アロタイプ) 又はカッパ ( K m ( 3 ) アロタイプ ( 対立遺伝子 2 ) ) 領域を含む ( p c D N A 3 . 2 D E S T ( インビトロジエン社 ) を利用した ) 哺乳動物発現ベクター中にクローニングした。4 種の重鎖 Ig G 1 抗体 ( キメラ 2 B 8 及び 3 種のヒト化重鎖 ( H u 2 B 8 H v 1 - f . 1 、 H u 2 B 8 H v 5 - a . 1 及び H u 2 B 8 H v 5 - 5 1 . 1 ) ) の全てを 3 種のカッパ鎖抗体 ( キメラ 2 B 8 及び 2 種のヒト化軽鎖 ( H u 2 B 8 K v 1 - 3 9 . 1 及び H u 2 B 8 K v 3 - 1 5 . 1 ) ) の全てとの考えられる全ての組合せで発現させ、12 種の抗体蛋白質を作製した。次いで、これらキメラ、キメラ / ヒト化及びヒト化抗体のヒト H G F への結合を下記のようにして測定し、その結果を図 8 にまとめた。免疫グロブリン重鎖可変領域と免疫グロブリン軽鎖可変領域との考えられる全ての組合せはいずれも下記の表 12 A に記載した。

## 【0247】

## 【表 12 A】

表 12 A

重鎖可変領域	軽鎖可変領域
キメラ 2 B 8 (配列番号 12)	キメラ 2 B 8 (配列番号 14)
キメラ 2 B 8 (配列番号 12)	Hu2B8 Kv1-39.1 (配列番号 173)
キメラ 2 B 8 (配列番号 12)	Hu2B8 Kv3-15.1 (配列番号 179)
Hu2B8 Hv1-f.1 (配列番号 159)	キメラ 2 B 8 (配列番号 14)
Hu2B8 Hv1-f.1 (配列番号 159)	Hu2B8 Kv1-39.1 (配列番号 173)
Hu2B8 Hv1-f.1 (配列番号 159)	Hu2B8 Kv3-15.1 (配列番号 179)
Hu2B8 Hv5-a.1 (配列番号 165)	キメラ 2 B 8 (配列番号 14)
Hu2B8 Hv5-a.1 (配列番号 165)	Hu2B8 Kv1-39.1 (配列番号 173)
Hu2B8 Hv5-a.1 (配列番号 165)	Hu2B8 Kv3-15.1 (配列番号 179)
Hu2B8 Hv5-51.1 (配列番号 169)	キメラ 2 B 8 (配列番号 14)
Hu2B8 Hv5-51.1 (配列番号 169)	Hu2B8 Kv1-39.1 (配列番号 173)
Hu2B8 Hv5-51.1 (配列番号 169)	Hu2B8 Kv3-15.1 (配列番号 179)

10

20

30

免疫グロブリン重鎖と免疫グロブリン軽鎖とのえられる全ての組合せはいずれも下記の表 12 B に記載した。

## 【0248】

## 【表 12B】

表 12B

免疫グロブリン重鎖	免疫グロブリン軽鎖
キメラ 2B8 IgG1 (配列番号 155)	キメラ 2B8 カッパ (Km(3)) (配列番号 157)
キメラ 2B8 IgG1 (配列番号 155)	Hu2B8 Kv1-39.1 + カッパ定常 (Km(3)) アロタイプ (対立遺伝子 2) (配列番号 177)
キメラ 2B8 IgG1 (配列番号 155)	Hu2B8 Kv3-15.1 + カッパ定常 (Km(3)) アロタイプ (対立遺伝子 2) (配列番号 181)
Hu2B8 Hv1-f.1 + IgG1 定常 (G1M(17,1)) アロタイプ (配列番号 163)	キメラ 2B8 カッパ (Km(3)) (配列番号 157)
Hu2B8 Hv1-f.1 + IgG1 定常 (G1M(17,1)) アロタイプ (配列番号 163)	Hu2B8 Kv1-39.1 + カッパ定常 (Km(3)) アロタイプ (対立遺伝子 2) (配列番号 177)
Hu2B8 Hv1-f.1 + IgG1 定常 (G1M(17,1)) アロタイプ (配列番号 163)	Hu2B8 Kv3-15.1 + カッパ定常 (Km(3)) アロタイプ (対立遺伝子 2) (配列番号 181)
Hu2B8 Hv5-a.1 + IgG1 定常 (G1M(17,1)) アロタイプ (配列番号 167)	キメラ 2B8 カッパ (Km(3)) (配列番号 157)
Hu2B8 Hv5-a.1 + IgG1 定常 (G1M(17,1)) アロタイプ (配列番号 167)	Hu2B8 Kv1-39.1 + カッパ定常 (Km(3)) アロタイプ (対立遺伝子 2) (配列番号 177)
Hu2B8 Hv5-a.1 + IgG1 定常 (G1M(17,1)) アロタイプ (配列番号 167)	Hu2B8 Kv3-15.1 + カッパ定常 (Km(3)) アロタイプ (対立遺伝子 2) (配列番号 181)
Hu2B8 Hv5-51.1 + IgG1 定常 (G1M(17,1)) アロタイプ (配列番号 171)	キメラ 2B8 カッパ (Km(3)) (配列番号 157)
Hu2B8 Hv5-51.1 + IgG1 定常 (G1M(17,1)) アロタイプ (配列番号 171)	Hu2B8 Kv1-39.1 + カッパ定常 (Km(3)) アロタイプ (対立遺伝子 2) (配列番号 177)
Hu2B8 Hv5-51.1 + IgG1 定常 (G1M(17,1)) アロタイプ (配列番号 171)	Hu2B8 Kv3-15.1 + カッパ定常 (Km(3)) アロタイプ (対立遺伝子 2) (配列番号 181)

ヒト化可変領域を含む完全長免疫グロブリン重及び軽鎖を含む考えられる抗体構築物のうちの2種について下記の通り命名した。

## 【0249】

s h 2 B 8 - 9 ( G 1 m ( 1 7 , 1 ) ) = h u 2 B 8 H v 5 - 5 1 . 1 ( + I g G 30  
1 定常領域 ( G 1 m ( 1 7 , 1 ) アロタイプ ) ( 配列番号 171 ) プラス h u 2 B 8 K  
v 1 - 3 9 . 1 ( + カッパ定常領域 ( K m ( 3 ) アロタイプ ( 対立遺伝子 2 ) ) )  
( 配列番号 177 )

s h 2 B 8 - 1 2 ( G 1 m ( 1 7 , 1 ) ) = h u 2 B 8 H v 5 - 5 1 . 1 ( + I g  
G 1 定常領域 ( G 1 m ( 1 7 , 1 ) アロタイプ ) ) ( 配列番号 171 ) プラス h u 2 B 8  
K v 3 - 1 5 . 1 ( + カッパ定常領域 ( K m ( 3 ) アロタイプ ( 対立遺伝子 2 ) ) )  
) ( 配列番号 181 )

各ヒト化抗体をコードしている核酸配列及び各ヒト化抗体を規定する蛋白質配列を下記にまとめた。このセクションでは、各可変領域の最後のヌクレオチドは、可変 / 定常領域接合部によって生じる次のコドンの最初の塩基である。このヌクレオチドは、可変領域に含まれる。何故なら、これはそのエクソンの一部であるからである。下記に列挙した定常領域のアミノ酸配列はこの接合部コドンの翻訳物を含む。

## 【0250】

( 1 ) 完全長キメラ 2B8 重鎖 ( マウス可変領域及びヒト IgG1 定常領域 ) ( アロ  
タイプ G 1 m ( 1 7 , 1 ) ) をコードしている核酸配列 ( 下線 : シグナル配列 ) ( 配列番  
号 154 )

## 【0251】

## 【化78】

1 atgggatgga gctatatcat ccttttttgg tagcaacag ctacagatgt ccactccag  
 61 gtcacaactgc agcagccctgg ggctgaactg gtgaagcctg ggacttcagt gaagctgtcc  
 121 tgcaaggctt ctggctcacac cttcaccacc tächtggatgc actgggtgaa tcagaggcct  
 181 ggacaaggcc ttgagtggat tggagagatt aatcctacca acggtcatac taactacaat  
 241 gagaagttca agagcaaggg cacactgact gtagacaat cctccagcac agcctacatg  
 301 caactcagca gcctgacatc tgaggactct gcggtctatt actgtgcaag aaactatgtt  
 361 ggtagcatct ttgactactg gggccaaggc accactctca ccgtctcctc agcctccacc  
 421 aaggcccatt cggcttccc cctggcaccc tcctccaaga gcacctctgg gggcacagcg  
 481 gcctgggct gcctggtcaa ggactacttc cccgaacgg tgacggtg tc gtggactca  
 541 ggcgcctga ccagcggcgt gcacacccctc cccgctgtcc tacagtctc aggactctac  
 601 tccctcagca gctgttgtac cgtgcccctcc agcagctgg gcacccagac ctacatctgc  
 661 aacgtgaatc acaagcccaag caacaccaag gtggacaaga aagttgagcc caaatctgt  
 721 gacaaaactc acacatgccc accgtgcccc gcacctgaac tcctgggggg accgtcag  
 781 ttctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggctaca  
 841 tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggctca agttaactg gtacgtggac  
 901 ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaaag ccgcgggagg agcagttacaa cagcacgtac  
 961 cgtgtgttca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag  
 1021 tgcaggatct ccaacaaagc cctcccgagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaa  
 1081 gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat cccggatga gctgaccaag  
 1141 aaccaggatca gcctgacactg cctggtaaaa ggcttctatc ccagcgcacat cgcgtggag  
 1201 tggagagaca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgctccctgt gctggactcc  
 1261 gacggcttct ttttcctcta cagcaagctc accgtggaca agagcagggt gcagcagggg  
 1321 aacgttcttcatgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc  
 1381 ctctccctgt ctccggtaa atga

10

(2) 完全長キメラ2B8重鎖(キメラ2B8 IgG1(G1m(17,1))アロ  
 タイプ)を規定する蛋白質配列(シグナル配列なし)(配列番号155)

20

## 【0252】

## 【化79】

1 qvqlqqpgae lvkpgtsvkl sckasgytf tywmhwvnqr pgqglewige inptnghtry  
 61 nekfkskatl tvdkssstay mqlssltsed savyycarny vgsifdywgq gttltvssas  
 121 tkgpsvfpla psskstsggt aalgclvkdy fpepvtswn sgaltsgvht fpavlgssgl  
 181 yslssvvttvp ssslgtqtyi cnvhkpsnt kvdkkkvepk cdkthtcppc papellggps  
 241 vflfppkpkd tlmisrtpev tcvvvdvshe dpevkfnwyv dgvevhnakt kpreeqynst  
 301 yrvvsvltvl hqdwlngkey kckvsnkalp apiektiska kgqprepqvy tlppsrdelet  
 361 knqvslltclv kgfypsdiav ewesngopen nykttppvld sdgsfflysk ltvdksrwqq  
 421 gnvfscsvmh ealhnhytqk slsllspgk

30

(3) 完全長キメラ2B8軽鎖(マウス可変領域及びヒト定常領域)(キメラ2B8  
 カッパ(Km(3)))をコードしている核酸配列(下線:シグナル配列)(配列番号1  
 56)

## 【0253】

## 【化80】

1 atggaatcac agactctggc cttcatatcc atactgtct ggtttatatgg tgctgatggg  
 61 aacattgtaa tgacccaatc tcccaatcc atgtccatgt cagtaggaga gagggtcacc

## 【0254】

## 【化81】

121 ttgagctgca aggccagtga gaatgtgggt tcttatgtat cctggatca acagaaacca  
 181 ggcgcagtctc ctaaaactgtc gatatacggg gcatccaacc ggaacactgg ggtccccgt  
 241 cgcttcacagag gcagtggatc tgcaacagat ttcaactctga ccacatcgacag tgcggggct  
 301 gaagaccttgc agatattca ctgtggggcag agttacaact atccgtacac gttcggaggg  
 361 gggaccaggc tggaaataaaa acgaactgtg gctgcacccat ctgtcttcat ctteccgcaca  
 421 tctgtatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat  
 481 cccagagagg ccaaagtaca gtggaaagggt gataacgccc tccaatcggt taactccag  
 541 gagagtgtca cagagcagggc cagaaggac agcaccatcaca gcctcagcag caccctgacg  
 601 ctgagcaagc cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcaggc  
 661 ctgagctcgc ccgtcacaatc gagcttcaac aggggagagt gttga

40

(4) 完全長キメラ2B8軽鎖(キメラ2B8カッパ(Km(3)))を規定する蛋白質配列(シグナル配列なし)(配列番号157)

## 【0255】

50

## 【化82】

```

1 nivmtqspks msmsvgervt lsckasenvv syvswyqqkp aqspklliyg asnrntgvpd
61 rftgsgsatd ftltissvra edladyhcgq synypytfgg gtrleikrtv aapsvfifpp
121 sdeqlksgta svvc1nnfy preakvqwkv dnalqsgnsq esvteqdskd styslsstlt
181 lskadyekhk vyacevthqg lsspvtksfn rgec

```

(5) ヒト化 Hu2B8 Hv1-f. 1重鎖可変領域をコードしている核酸配列（  
下線：シグナル配列）（配列番号158）

【0256】

## 【化83】

```

1 atggactgca cctggaggat ctcctcttg gtggcagcag ctacaggcac ccacgccgag
61 gtccagctgg tacagtctgg ggctgaggtg aagaagcctg gggctacagt gaaaatctcc
121 tgcaagggtt ctggatacac cttcaccacc tactggatgc actgggtgca acaggcccct
181 ggaaaaggc tttagtggat gggagagatt aatcctacca acggcataac taactacaat
241 gagaagtcc agggcagagt caccataacc gcggacacgt ctacagacac agcctacatg
301 gagctgagca gcctgagatc tgaggacacg gccgtgtatt actgtgcaac aaactatgtt
361 ggttagcatct ttgactactg gggccaagga accctggtca ccgtctcc tc ag

```

10

(6) ヒト化 Hu2B8 Hv1-f. 1重鎖可変領域を規定する蛋白質配列（シグ  
ナル配列なし）（配列番号159）

20

【0257】

## 【化84】

```

1 evqlvqsgae vkkpgatvki sckvsgytft tywmhwvqqa pgklewmge inptnghny
61 nekfqgrvti tadtstdtay melsslrqed tavyycatny vgsifdywgq gtlvtvss

```

(7) ヒト IgG1重鎖定常領域（G1m(17,1)アロタイプ）をコードしてい  
る核酸配列（配列番号160）

【0258】

## 【化 8 5】

1 cctccaccaa gggccatcg gtctcccc tggcaccctc ctccaagagc acctctgggg  
 61 gcacagcggc cctgggctgc ctggtaagg actactccc cgaaccggtg acggtgtcgt  
 121 ggaactcagg cgcctgacc agcggcgtgc acacccccc ggctgtctca cagtcctcag  
 181 gactctactc ctcagcagc gtggtgaccg tgccctccag cagcttggc acccagacct  
 241 acatctgcaa cgtaatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaaa gttgagccca  
 301 aatcttgtga caaaaactcac acatgcccac cgtgccagc acctgaactc ctggggggac  
 361 cgtcagtcit cctctcccc caaaaaccca aggacaccct catgatctcc cgaccctg 10  
 421 aggtcacatg cgtgggtgt gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtcaag ttcaactgg  
 481 acgtggacgg cgtggagggtg cataatgcc aagacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca  
 541 gcacgtaccg tgtggcagc gtctcaccc tcctgcacca ggactggctg aatggcaagg  
 601 agtacaagtg caaggtctcc aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca  
 661 aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc cgggatgagc  
 721 tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacccgtcc tggtaaaagg ctctatccc agcgcacatcg  
 781 ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctccgtgc  
 841 tggactccga cggctccitc ttcccttaca gcaagctac cgtggacaag agcaggtggc  
 901 agcaggggaa cgtctctca tgctccgtga tgcataggc tctgcacaac cactacacgc 20  
 961 agaagagcct ctccctgtct ccgggtaaat ga

( 8 ) ヒト Ig G 1 重鎖定常領域 ( G 1 m ( 1 7 , 1 ) アロタイプ ) を規定する蛋白質配列 ( 配列番号 161 ) 最初のアミノ酸は、可変領域の最後のヌクレオチド及び Ig G 1 重鎖配列の初めの 2 個のヌクレオチドの翻訳物に由来する。

## 【0259】

## 【化 8 6】

1 astkgpsvfp lapsskstsg gtaalgclvk dyfpepvts wnsgaltsgv htfpavlqss  
 61 glyslssvvt vpssslgtqt yicnvnhkps ntkvdkkvep ksckthtcp pcpapelgg  
 121 psvflfppkp kdtlmisrtp evtcvvvdvs hedpevkfnw yvdgvevhna ktkpreeqyn  
 181 styrvvsvlt vlhqdwlngk eykckvsnka lpapiktis kakgqprepq vytlppsrde  
 241 ltknqvsitc lvkgfypsdi avewesngqp ennyktpv ldsdgsffly skltvdksrw  
 301 qqgnvfscsv mhealhnhyt qkslslspgk 30

( 9 ) 完全長重鎖ヒト化 Hu 2 B 8 Hv 1 f . 1 可変領域及びヒト Ig G 1 ( G 1 m ( 1 7 , 1 ) アロタイプ ) 重鎖定常領域をコードしている核酸配列 ( 下線 : シグナル配列 ) ( 配列番号 162 )

## 【0260】

## 【化87】

1 atggactgca cctggaggat cctcccttgcgtggcagcag ctacaggcac cacagccgag  
 61 gtccagctgg tacagtctgg ggctggaggtaagaaggctggctacagt gaaaatctcc  
 121 tgcaaggttt ctggatacac cttcaccacc tactggatgcactgggtgca acaggccc  
 181 gggaaagggc tttagtggatggagaggat aatcctacca acggtcatactaactacaat  
 241 gagaaggccc agggcagagt caccataacc gcggacacgt ctacagacac accctacatg  
 301 gagctgagca gcctgagatctgagacacg gccgtgtatt actgtgcaac aaactatgtt  
 361 ggtacatct ttgactactg gggccaagga accctggta ccgtctcc accctccacc  
 421 aaggccccat cggcttccc cctggcaccc tcctccaaga gcacctctgg gggcacagcg  
 481 gcccgggtgcgcctggtaa ggactacttc cccgaacccgg tgacgggtgtc gtggactca  
 541 ggcccccgtga ccagcggcgt gcacaccccttc ccggctgtcc tacagtctc aggactctac  
 601 tccctcagca gcgtgggtac cgtccccctcc accgttgg gcacccagac ctacatctgc  
 661 aacgtgaatc acaagccccag caacaccaag gtggacaaga aagtggagcc caaatcttg  
 721 gacaaaactc acacatggcc accgtgccccca gcacctgaaacccctgggggg accgtcagtc  
 781 ttcctcttcc ccccaaaacc caagacacc ctcatgatccccc tgagggtcaca  
 841 tgegtgggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgagggtca agttcaactg gtacgtggac  
 901 ggctggagg tgcataatgc caagaccaag ccgcggggagg agcgtacaa cagcacgtac  
 961 cgtgggtca gcgtcctcaccgtctgac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag  
 1021 tgcaagggtc ccaacaaagc cctccctggcc cccatcgaga aaaccatctc caagccaaa  
 1081 gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag  
 1141 aaccaggtaa gcctgacccctg cctggtaaaa ggcttctatccagcgacat cggcgtggag  
 1201 tggggagagca atgggcagcc ggagaacaaac tacaagacca cgcctccctg gctggactcc  
 1261 gacggctcttcttccatc cagcaagctc accgtggaca agagcagggtg gcagcagggg  
 1321 aacgtttcttcatgttcgt gatgtcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc  
 1381 ctctccctgt ctccggtaa atga

(10) 完全長重鎖ヒト化Hu2B8 Hv1f. 1可変領域及びヒトIgG1重鎖  
定常領域(G1m(17,1)アロタイプ)を規定する蛋白質配列(配列番号163)

10

## 【0261】

## 【化88】

1 evqlvgsgae vkkpgatvki sckvsgytft tywmhwvgqa pgkglewmge inptnghntny  
 61 nekfqgrvti tadtstdtay melsslrised tavyyccatny vgsifdywgq gtlvtvssas  
 121 tkgpsvfppla psskstsggt aalgcldky fpepvtswn sgaltsgvht fpavlkssgl  
 181 yslsasvvtvp ssslgqtgyi cnvnhkpsnt kvdkkvepks cdkthtcppc papellggps  
 241 vflfpppkd tlmlsrtpev tcvvvdvshe dpevkfnwv dgvevhnaakt kpreeqynst  
 301 yrvvsvltvihqdwlnkey kckvsnkalp apiektiska kgqprepqvy tlppsrdelet  
 361 knqvslltclv kgfypsdiav ewesngopen nykttppvld sdgsfflysk ltvdksrwqq  
 421 gnvfscsvmh ealhnhytqk slsispk

(11) ヒト化Hu2B8 Hv5a. 1重鎖可変領域をコードしている核酸配列(下線:シグナル配列)(配列番号164)

30

## 【0262】

## 【化89】

1 atgggtcaacccatcctcgcccttcctggcgtgttc tccaaaggagt ctgtgccgaa  
 61 gtgcagctgg tgcagtctgg agcagaggataaaaagccccggggatctctgaggatctcc  
 121 tgtaagggtt ctggatacag ctttaccacc tactggatgc actgggtgcgc ccagatgccc  
 181 gggaaaggcc tggagtgatggatggagat aatcctacca acggtcatactaactacaat

40

## 【0263】

## 【化90】

241 ccgtccctcc aaggccacgt caccatctca gctgacaagt ccatcagcac tgcctaccc  
 301 cagtggagca gcctgaaggccctggacacc gccatgtatt actgtgcgag aaactatgtt  
 361 ggtacatct ttgactactg gggccaagga accctggta ccgtctcc accctccacc

(12) ヒト化Hu2B8 Hv5a. 1重鎖可変領域を規定する蛋白質配列(配列番号165)

## 【0264】

50

## 【化91】

1 evqlvqsgae vkkpgeslri sckgsgysft tywmhwvrqm pgkglewmge inptnghny  
 61 npsfqghvti sadksistay lqwsslkasd tamyyccarny vgsifdywgq gtlvtvss

(13) 完全長ヒト化 Hu2B8 Hv5a. 1重鎖可変領域及びヒト IgG1 (G  
1m (17, 1) アロタイプ) 重鎖定常領域をコードしている核酸配列 (下線: シグナル  
 配列) (配列番号 166)

## 【0265】

## 【化92】

10

1 atggggtcaa ccgcacatcct cgcgccttcctc ctggctgttc tccaaaggagt ctgtccgaa  
 61 gtgcagctgg tgcagtctgg agcagaggtg aaaaagcccg gggagtctct gaggatctcc  
 121 tgttaagggtt ctggatacacag ctttaccacc tactggatgc actgggtgcg ccagatgcc  
 181 gggaaaggcc tggagtggat gggggagatt aatcctacca acggtcatac taactacaat  
 241 ccgtccttc aaggccacgt caccatctca gctgacaagt ccatcagcac tgccatccctg  
 301 cagtggagca gcctgaaggc ctccggacacc gccatgtatt actgtgcgag aaactatgtt  
 361 ggttagcatct ttgactactg gggccaagga accctggtca ccgtccttc agcctccacc  
 421 aaggggccat cggcttccc cctggcaccc tccctccaga gcacccctgg gggcacagcg  
 481 gcctctgggct gcctggtcaa ggactactc cccgaacccg tgacgggtgc gtggaaactca  
 541 ggccccccta ccagccgggt gcacacctc ccggctgtcc tacatcctc aggactctac  
 601 tccctcagca gcgtgggtgac cgtcccttc agcagcttg gcacccagac ctacatctgc  
 661 aacgtgaatc acaagccag caacaccaag gtggacaaga aagttgagcc caaatcttgt  
 721 gacaaaactc acacatggcc accgtgcccc gcacactgaa tcctgggggg accgtcagtc  
 781 ttccctttcc cccaaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca  
 841 tgcgtgggtt tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac  
 901 ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcggggagg agcagtacaa cagcacgtac  
 961 cgtgtggtca gcgtccctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag  
 1021 tgcacaggctt ccaacaaggc cctcccaagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa  
 1081 gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat cccgggatga gctgaccaag  
 1141 aaccaggctca gcctgactg cctggtaaaa ggcttctatc ccagcgcacat cgccgtggag  
 1201 tggagagca atgggcagcc ggagaacaaac tacaagacca cgcctccgt gctggactcc  
 1261 gacggctct tcttcctcta cagcaagctc accgtggaca agagcagggtg gcagcaggggg  
 1321 aacgtttctt catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc  
 1381 ctctccctgt ctccggtaa atga

20

(14) 完全長ヒト化 Hu2B8 Hv5a. 1重鎖可変領域及びヒト IgG1 (G  
1m (17, 1) アロタイプ) 重鎖定常領域を規定する蛋白質配列 (シグナル配列なし)

(配列番号 167)

30

## 【0266】

## 【化93】

1 evqlvqsgae vkkpgeslri sckgsgysft tywmhwvrqm pgkglewmge inptnghny  
 61 npsfqghvti sadksistay lqwsslkasd tamyyccarny vgsifdywgq gtlvtvssas  
 121 tkgpsvfpla psskstsggt aalgc1vkdy fpepvtswn sgaltsgvht fpavlgssgl  
 181 yslssvvtpv ssslgtqtyi cnvnhkpsnt kvdkkvepk cdkthtcppc papellggps  
 241 vflfppkpkd tlmisrtpev tcvvvdvshe dpevkfnwyv dgvevhnaakt kpreeqynst  
 301 yrvvsvltvl hqdwlingkey kckvsnkalp apiektiska kgqprepqvly tlppsrdeilt

## 【0267】

## 【化94】

40

361 knqvsltclv kgfypsdiav ewesngopen nykttppvld sdgsfflysk ltvdksrwqq  
 421 gnvfscsvmh ealhnhytqk sls1spgk

(15) ヒト化 Hu2B8 Hv5 - 51. 1重鎖可変領域をコードしている核酸配列  
 (下線: シグナル配列) (配列番号 168)

## 【0268】

## 【化95】

1 atgggtcaa ccgccatctt cgccttc ctggctgttc tccaaggagt ctgtgccgaa  
 61 gtgcagctgg tgcagtctgg agcagaggtaaaaaagcccg gggagtctct gaagatctcc  
 121 tgtaagggtt ctggataacag ctttaccacc tactggatgc actgggtgcg ccagatgcc  
 181 gggaaaggcc tggagtggaatgggagatt aatcctacca acggtcatac taactacaat  
 241 ccgtcctcc aaggccaggt caccatctca gctgacaagt ccatcagcac tgcctacctg  
 301 cagtggagca gcctgaaggc ctcgacacc gccatgtatt actgtgcgag aaactatgtt  
 361 ggttagcatct ttgactactg gggccaagg acccgttgc ccgtcctcc ag  
 ( 1 6 ) ヒト化 H u 2 B 8 H v 5 - 5 1 . 1 重鎖可変領域を規定する蛋白質配列 (シグナル配列なし) (配列番号 1 6 9 ) 10

## 【0269】

## 【化96】

1 evqlvqsgae vkkpgeslki sckgsgysft tywmhwvrqm pgkglewmge inptnghtny  
 61 npsfqgqvti sadksistay lqwsslkasd tamyycanry vgsifdywgq gtlvtvss

( 1 7 ) 完全長重鎖ヒト化 H u 2 B 8 H v 5 - 5 1 . 1 重鎖可変領域及びヒト Ig G 1 ( G 1 m ( 1 7 , 1 ) アロタイプ) 重鎖定常領域をコードしている核酸配列 (下線 : シグナル配列) (配列番号 1 7 0 ) 20

## 【0270】

## 【化97】

1 atgggtcaa ccgccatctt cgccttc ctggctgttc tccaaggagt ctgtgccgaa  
 61 gtgcagctgg tgcagtctgg agcagaggtaaaaaagcccg gggagtctct gaagatctcc  
 121 tgtaagggtt ctggataacag ctttaccacc tactggatgc actgggtgcg ccagatgcc  
 181 gggaaaggcc tggagtggaatgggagatt aatcctacca acggtcatac taactacaat  
 241 ccgtcctcc aaggccaggt caccatctca gctgacaagt ccatcagcac tgcctacctg  
 301 cagtggagca gcctgaaggc ctcgacacc gccatgtatt actgtgcgag aaactatgtt  
 361 ggttagcatct ttgactactg gggccaagg acccgttgc ccgtcctcc agcctccacc  
 421 aaggcccat cggttcc cctggcaccc tcttca aagag gcacctctgg gggccacac cg  
 481 gccctgg ct gcttgt caag gactact tc cccgaaccc gtacgg tgtgg aactca  
 541 ggccccc tga ccagccgg gcacac ttc cccgtgt tacat cctc aggactctac  
 601 tccctc aagca gctgg tgac cgtgc cctcc agcag tttgg gcaccc agac ctacat ctc  
 661 aacgt gaaat ccaagcc acaacacca ag tggaca aaga tttgag caaat cttgt  
 721 gacaaaact cacat gccc accgt gccc accac tcttgggggg accgt catgc  
 781 ttccttcc cccccaa aacc aggacacc ctcat gatct cccggacccc tgaggt ccaca  
 841 tgcgtgg tggacgt gag cacaa gcctgagg tca agttcaact gtacgtgg ac  
 901 ggcgtgg gagg tgcataat gca agacaaa gccgcggg agcgtacaa cagcacgtac  
 961 cgtgtgg tca gcttc ctcac cgtcctgcac caggact ggc taatgg caa ggat acaag  
 1021 tgcaagg tct cccacaa gcc tcc cccatcg ggaa aaccat ctc caaagccaa  
 1081 gggcagccc gaga accacca ggtgtacacc ctgccccat cccggat ggtgacca aag  
 1141 aaccagg tca gctgcac tcgttca agg tttctatc cccagcgac acat cccgtgg agg  
 1201 tgggagag catggcag cgg aacaac tacaag acca cgcctcc gctggact ccc  
 1261 gacggct cct tttcct tca gcaag ctc accgtgg aaca ggat gca gcgagg g

## 【0271】

## 【化98】

1321 aacgttct catgctcc gatgc aatg gatcaca accactac aac gcagaag agc  
 1381 ctctcc ctgt cccgg taa atga

( 1 8 ) 完全長重鎖ヒト化 H u 2 B 8 H v 5 - 5 1 . 1 重鎖可変領域及びヒト Ig G 1 ( G 1 m ( 1 7 , 1 ) アロタイプ) 重鎖定常領域を規定する蛋白質配列 (シグナル配列なし) (配列番号 1 7 1 )

## 【0272】

## 【化99】

```

1 evqlvqsgae vkkpgeslki sckgsgysft tywmhvvrqm pgkglewmgf inptnghtry
61 npsfqggvti sadksistay lqwsslkasd tamyyccarny vgsifdywgq gtlvtvssas
121 tkgpsvfpla psskstsgt aalgcldky fpepvtvswn sgaltsgvht fpav1qssgl
181 yslssvvttvp ssslgtqtyi cnvnhkpsnt kvdkkvepks cdkthtcppc papellggps
241 vflfppkpkd tlmisrtpev tcvvvdvshe dpevkfnwvv dgvevhnaakt kpreeqynst
301 yrsvsvltvl hqdwlngkey kckvsnkalp apiektiska kgqpqrepqvy tlppsrdeit
361 knqvslltclv kgfypsdiav ewesngqpen nykttppvld sdgsfflysk ltvdksrwqq
421 gnvfscsvmh ealhnhytqk sls1spgk

```

(19) ヒト化 H u 2 B 8 K v 1 - 3 9 . 1 カッパ鎖可変領域をコードしている核酸配列(下線:シグナル配列)(配列番号172)。考えられる2つの開始A T Gを大文字で示した。

10

## 【0273】

## 【化100】

```

1 ATGacATGa gggccccgc tcagctcctg gggctccgt tactctggct ccgagggtgcc
61 agatgtaca tccagatgac ccagtctcca tccctccctgt ctgcattctgt aggagacaga
121 gtcaccatca ctgcaggc cagtggaaat gtggttctt atgtatcctg gtatcaggcag
181 aaaccaggga aagccctaa gctcctgate tatggggcat ccaaccggaa cactgggtc
241 ccatcaaggt tcagtggcag tggatctggg acagatttca ctctcaccat cagcagtctg
301 caacctgaag atttgcaac ttactactgt gggcagagtt acaactatcc gtacacgtt
361 ggccaggggga ccaagctgga gatcaaac

```

20

(20) ヒト化 H u 2 B 8 K v 1 - 3 9 . 1 カッパ鎖可変領域を規定する蛋白質配列(シグナル配列なし)(配列番号173)

## 【0274】

## 【化101】

```

1 diqmtqspss lsasvgdrvt itckasenvv syvswyqqkp gkapklliyg asnrntgvps
61 rfsgsgsgtd ftltisslqp edfatyyccq synypytfqgq gtleik

```

30

(21) ヒトカッパ鎖定常領域(Km(3)アロタイプ)(対立遺伝子2)をコードしている核酸配列(配列番号174)

## 【0275】

## 【化102】

```

1 gaactgtggc tgccaccatct gtcttcatct tcccggccatc tgatgaggcag ttgaaatctg
61 gaactgcctc tgggtgtgc ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt
121 ggaagggtgga taacgcctc caatcggtta actcccagga gagtgtcaca gagcaggaca
181 gcaaggacag cacctacagc cttagcagca ccctgacgct gagcaaagca gactacgaga

```

40

## 【0276】

## 【化103】

```

241 aacacaaagt ctacgcctgc gaagtcaccc atcaggccct gagctgccc gtcacaaaga
301 gctcaacag gggagagtg tga

```

(22) ヒトカッパ鎖定常領域(Km(3)アロタイプ)(対立遺伝子2)を規定する蛋白質配列(配列番号175)

## 【0277】

50

【化104】

1 rtvaapsvfi fppsdeqlks gtasvvclln nfypreakvq wkvdnalqsg nsqesvteqd  
61 skdstyslss titlskadye khkvyyacevt hqglsspvtk sfnrgec

(23) 完全長ヒト化 Hu2B8 Kv1-39. 1 軽鎖可変領域及びヒトカッパ鎖  
定常領域 (Km(3)アロタイプ) (対立遺伝子2)をコードしている核酸配列 (下線:  
シグナル配列) (配列番号176)

【0278】

【化105】

10

1 atggacatga gggccccgc tcagctcctg gggctcctgc tactctggct ccgagggtgcc  
61 agatgtgaca tccagatgac ccagtcctca tcctccctgt ctgcattctgt aggagacaga  
121 gtcaccatca cttgcaaggc cagtgagaat gtggtttctt atgtatcctg gtatcagcag  
181 aaaccaggga aagcccctaa gtcctgatc tatggggcat ccaacccgaa cactggggtc  
241 ccatcaagggt tcagtgccag tggatctggg acagattca ctctcaccat cagcagtc  
301 caacctaagat tttttgcac ttactactgt gggcagagtt acaactatcc gtacacgttt  
361 ggccaggggga ccaagctgga gatcaaacga actgtggctg caccatctgt cttcatcttc  
421 ccccatctg atgagcaggta gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac  
481 ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg aaggtggata acgcctcca atcgggtaac  
541 tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc  
601 ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaaggctc acgcctgcga agtcacccat  
661 caggcctga gctcgccgt cacaagcgc ttcaacaggg gagagtgtt a

(24) 完全長ヒト化 Hu2B8 Kv1-39. 1 軽鎖可変領域及びヒトカッパ鎖  
定常領域 (Km(3)アロタイプ) (対立遺伝子1)を規定する蛋白質配列 (配列番号  
177)

20

【0279】

【化106】

1 digmtqspss lsasvgdrv itckasenvv syvswyqqkp gkapklliyg asnrrntgvps  
61 rfsqsgsgtfd ftltisslqp edfatyyccq synypytfqq gtlkleikrtv aapsvfifpp  
121 sdeqlkspta svvclnnfy preakvqwkv dnalqsgnsq esvteqdskd styslsstlt  
181 lskadyekhk vyacevthgg lsspvtksfn rgec

(25) ヒト化 Hu2B8 Kv3-15. 1 軽鎖可変領域をコードしている核酸配  
列 (下線: シグナル配列) (配列番号178)

30

【0280】

【化107】

1 atgaaagccc cagcgcagct tcttcctc ctgctactct ggctcccaga taccactgga  
61 gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccaggggaa aagagccacc  
121 ctctcctgca aggccagtga gaatgtgggt tcttatgtat cctggtagcca gcagaaacct  
181 ggccaggctc ccaggctct catctatggg gcatccaacc ggaacactgg tatcccagcc

【0281】

【化108】

40

241 aggttcagtgc cagtggttc tgggacagag ttcaactctca ccatcagcag cctgcagtc  
301 gaagattttgc agtttattat ctgtggccag agttacaact atccgtacac gtttggccag  
361 gggaccaagc tggagatcaa ac

(26) ヒト化 Hu2B8 Kv3-15. 1 軽鎖可変領域を規定する蛋白質配列 (シグナル配列なし) (配列番号179)

【0282】

## 【化109】

1 eivmtqspat lsvspgerat lsckasenvv syvswyqqkp gqaprlliyg asnrntgipa  
 61 rfsgsgsgte ftiltisslqs edfavyyycgq synypytfqgq gtkleik

(27) 完全長ヒト化 Hu2B8 Kv3-15.1 軽鎖可変領域及びヒトカッパ鎖定常領域 (Km(3)アロタイプ) (対立遺伝子2) をコードしている核酸配列 (下線: シグナル配列) (配列番号180)

## 【0283】

## 【化110】

1 atgaaagccc cagcgcgact tcttttcctc ctgcgtactct ggctcccaaga taccactggaa  
 61 gaaatagtga tgacgcgatc tccagccacc ctgtctgtgt ctccaggggaa aagagccacc  
 121 ctctcctgca aggcccagtga gaatgtggtt tcttatgtat cctggatcca gcagaaaacct  
 181 ggccaggctc ccaggctc catctatggg gcatccaacc ggaacactgg tatccccagcc  
 241 aggttcagtgc aggtgggtc tgggacagag ttcactctca ccatcagcag cctgcagtct  
 301 gaagattttg cagtttataa ctgtggcag agttacaact atccgtacac gtttggccag  
 361 gggaccaagc tggagatcaa acgaactgtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcca  
 421 tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat  
 481 cccagagagg ccaaagtaca gtggaaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccg  
 541 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg  
 601 ctgagcääag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtac ccattcaggc  
 661 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagttcaac aggggagagt gttga

10

(28) ヒト化 Hu2B8 Kv3-15.1 軽鎖可変領域及びヒトカッパ鎖定常領域 (Km(3)アロタイプ) (対立遺伝子2) を規定する蛋白質配列 (シグナル配列なし) (配列番号181)

20

## 【0284】

## 【化111】

1 eivmtqspat lsvspgerat lsckasenvv syvswyqqkp gqaprlliyg asnrntgipa  
 61 rfsgsgsgte ftiltisslqs edfavyyycgq synypytfqgq gtkleikrtv aapsvfifpp  
 121 sdeqlksgta svvc1lnnfy preakvqwkv dnalqsgnsq esvteqdskd styslsstlt  
 181 lskadyekhk vyacevthqg lsspvtksfn rgec

便宜のため、このセクションで説明した抗体の完全長配列と配列表に示したものとの対応関係を示すコンコーダンス表を表13に示した。

## 【0285】

30

【表 13】

表 13

配列番号	蛋白質又は核酸
154	キメラ 2B8 IgG1 (G1m(17,1)) - 核酸
155	キメラ 2B8 IgG1 (G1m(17,1)) - 蛋白質
156	キメラ 2B8 カッパ (Km(3)) - 核酸
157	キメラ 2B8 カッパ (Km(3)) - 蛋白質
158	Hu2B8 Hv1f.1 重鎖可変領域 - 核酸
159	Hu2B8 Hv1f.1 重鎖可変領域 - 蛋白質
160	ヒト IgG1 重鎖定常領域 (G1m(17,1)) アロタイプ - 核酸
161	ヒト IgG1 重鎖定常領域 (G1m(17,1)) アロタイプ - 蛋白質
162	Hu2B8 Hv1f.1 + IgG1 定常 (G1m(17,1) アロタイプ) - 核酸
163	Hu2B8 Hv1f.1 + IgG1 定常 (G1m(17,1) アロタイプ) - 蛋白質
164	Hu2B8 Hv5a.1 重鎖可変領域 - 核酸
165	Hu2B8 Hv5a.1 重鎖可変領域 - 蛋白質
166	Hu2B8 Hv5a.1 + IgG1 定常 (G1m(17,1) アロタイプ) - 核酸
167	Hu2B8 Hv5a.1 + IgG1 定常 (G1m(17,1) アロタイプ) - 蛋白質
168	Hu2B8 Hv5-51.1 重鎖可変領域 - 核酸
169	Hu2B8 Hv5-51.1 重鎖可変領域 - 蛋白質
170	Hu2B8 Hv5-51.1 + IgG1 定常 (G1m(17,1) アロタイプ) - 核酸
171	Hu2B8 Hv5-51.1 + IgG1 定常 (G1m(17,1) アロタイプ) - 蛋白質
172	Hu2B8 Kv1-39.1 カッパ鎖可変領域 - 核酸
173	Hu2B8 Kv1-39.1 カッパ鎖可変領域 - 蛋白質
174	ヒトカッパ鎖定常領域 (Km(3) アロタイプ) (対立遺伝子 2) - 核酸
175	ヒトカッパ鎖定常領域 (Km(3) アロタイプ) (対立遺伝子 2) - 蛋白質
176	Hu2B8 Kv1-39.1 + カッパ定常 (Km(3) アロタイプ) (対立遺伝子 2) - 核酸
177	Hu2B8 Kv1-39.1 + カッパ定常 (Km(3) アロタイプ) (対立遺伝子 2) - 蛋白質
178	Hu2B8 Kv3-15.1 カッパ鎖可変領域 - 核酸
179	Hu2B8 Kv3-15.1 カッパ鎖可変領域 - 蛋白質
180	Hu2B8 Kv3-15.1 + カッパ定常 (Km(3) アロタイプ) (対立遺伝子 2) - 核酸
181	Hu2B8 Kv3-15.1 + カッパ定常 (Km(3) アロタイプ) (対立遺伝子 2) - 蛋白質

## B . ヒト化の方法 2

マウス 2 B 8 抗体の免疫原性を低減させるのに用いる第二のヒト化方法は、S t u d n i c k a ほか (1994年) PROTEIN ENG. 7 : p. 805 - 814 に記載されている方法に基づくものである。重及びカッパヒト生殖細胞系可変領域のうち、マウス 2 B 8 のものに (アミノ酸レベルで) 最も一致する領域を特定した。マウスとヒトとの間で異なる残基は、そのような変化が結合又は免疫原性に影響すると思われるリスクに応じてヒトの配列に変換した。低リスク残基 (即ち、変化があっても、抗原結合に影響しないと考えられ、免疫原性を生じる可能性も少ない残基) は、ヒトアミノ酸への変更を重鎖可変領域 (L R 2 B 8 H C を作製) 及びカッパ可変領域 (L R 2 B 8 L C を作製) において行った。さらに、低リスク及び中間リスク残基 (即ち、変化があると、抗原結合に影響する可能性が若干高いが、免疫原性を生じる可能性も少ない残基) は、ヒトアミノ酸への変更を重鎖可変領域 (L R M R 2 B 8 H C を作製) 及びカッパ可変領域 (L R M R 2 B 8 L C を作製) において行った。上記 2 種のヒト型に設計された重鎖可変領域のカルボキシル末端にヒト IgG1 重鎖定常領域 (G1m(3) アロタイプ (対立遺伝子 1)) を付加し、2 種のヒト型に設計された軽鎖可変領域のカルボキシル末端にヒトカッパ定常領域 (Km(3) アロタイプ (対立遺伝子 1)) を付加して、ヒト型に設計された抗体鎖を作製した。先ず、遺伝子合成法によって各可変領域の核酸配列を合成した後、これに各ヒト定常領域の配列に付加した。これらのヒト型に設計された抗体を哺乳動物の蛋白質発現ベクター中にクローニングし、重鎖プラス軽鎖の考えられる 4 種の組合せの蛋白質を発現させた。キメラ、キメラ / ヒト化又はヒト化抗体のヒト HGF への結合については、下記のように、従来の技術を用いて測定した。

## 【0286】

各ヒト化抗体をコードしている核酸配列及び各ヒト化抗体を規定する蛋白質配列を下記にまとめた。このセクションでは、各可変領域の最後のヌクレオチドは、可変 / 定常領域

10

20

30

40

50

接合部によって生じる次のコドンの最初の塩基である。このヌクレオチドは、可変領域に含まれる。何故なら、これはそのエクソンの一部であるからである。下記に列挙した定常領域のアミノ酸配列はこの接合部コドンの翻訳物を含む。

【0287】

(1) ヒト化 L R 2 B 8 H C 重鎖可変領域をコードしている核酸配列（下線：シグナル配列）（配列番号 182）

【0288】

【化112】

```

1 atgggcttgt catatatatt tcictttctt gttgctaccg ctaccgatgt gcactctcaa
61 gtccaaactcg tacaaccagg cgctgaagtc gtaaaaaccccg gaacatctgt taaactctca
121 tgcaaaggct caggatacac tttcacaact tactggatgc attgggtcaa tcaagcccc
181 ggacaaggcc tcgaatggat tggcgaaatt aacccaacta acggacatac taattataat
241 gaaaaattta agggcaaagc tacactcacc gtcgataaat caacctctac agcttatatg
301 gaacitcat ccctgagatc agaagataca gccgtctact attgcgccag aaactacgta
361 ggatcaatat tcgattactg gggtaaggc actctcctca cagtcagctc ag

```

10

(2) ヒト化 L R 2 B 8 H C 重鎖可変領域を規定する蛋白質配列（シグナル配列なし）（配列番号 183）

20

【0289】

【化113】

```

1 qvqlvqpgae vvkgptsvkl sckasgytf tywmhwvnqa pgqglewige inptnghtny
61 nekfkgkati tvdkststay melsslrssed tavyyccarny vgsifdywgq gtltvss

```

(3) ヒト I g G 1 重鎖定常領域（G 1 m (3) アロタイプ）（対立遺伝子 1）をコードしている核酸配列（配列番号 184）

【0290】

## 【化114】

1 ccagcacaaa gggcccatcg gcttcccccc tggcacccctc ctccaaggagc acctctgggg  
 61 gcacagcggc cctgggctgc ctggtaagg actacttcggc cgaaccgggtg acggtgtcgt  
 121 ggaactcagg cgccctgacc agcggcgtgc acaccctccc ggctgtccca cagtcctcag  
 181 gactctactc cctcagcagc gtggtgaccg tgccctccag cagcttgggc acccagacat  
 241 acatctgcaa cgtgaatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaga gttgagccca  
 301 aatcttgta caaaaactcac acatgtccac cgtgcccagc acctgaactc ctggggggac  
 361 cgtcagtcctt cctcttcccc caaaaaccca aggacaccct catgatctcc cggaccctg 10  
 421 aggtcacatg cgtgggttg gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtcaag ttcaactgg  
 481 acgtggacgg cgtggagggtg cataatgccca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca  
 541 gcacgtaccg tgtggtcagc gtctcaccc tgctgcacca ggactggctg aatggcaagg  
 601 agtacaagtg caaggtctcc aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaaa accatctcca  
 661 aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc cgggaggaga  
 721 tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tggtaaaagg ctctatccc agcgacatcg  
 781 ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctccgtgc  
 841 tggactccga cggctccitc ttccctata gcaagtcac cgtggacaag agcaggtggc  
 901 agcaggggaa cgtctctca tgctccgtga tgcattgggc tctgcacaac cactacacgc 20  
 961 agaagagcct ctccctgtcc ccgggtaaat ga

(4) ヒト IgG1重鎖定常領域(G1m(3)アロタイプ)(対立遺伝子1又は2)を規定する蛋白質配列(配列番号185)。最初のアミノ酸は、可変領域の最後のヌクレオチド及びIgG1重鎖配列の初めの2個のヌクレオチドの翻訳物に由来する。

## 【0291】

## 【化115】

1 astkgpsvfp lapsskstsg gtaalgcivk dyfpepvts wnsgaltsgv htfpavlqss  
 61 glyslssvvt vpssslgtqt yicnvnhkps ntkvdkrvep ksckthtcp pcpapeillgg  
 121 psvflfppkp kdtilmisrtp evtcvvvdvs hedpevkfnw yvdgvevhna ktkpreeqyn 30

## 【0292】

## 【化116】

181 styrvvsvlt vlhqdwlngk eykckvsnka lpapiektis kakgqppepq vytlppsree  
 241 mtknqvsitc lvkgfypsdi avewesngqp ennyktppv ldsdgsffly skltvdksrw  
 301 qqgnvfscsv mhealhnhyt qkslslspgk 40

(5) 完全長重鎖ヒト化L R 2 B 8 H C重鎖可変領域及びヒトIgG1重鎖定常領域(G1m(3)アロタイプ)(対立遺伝子1)(下線:シグナル配列)(配列番号186)

## 【0293】

【化117】

1 atgggctggc catatattat tcttttctt gttgttaccg ctaccgatgt gcactctcaa  
 61 gtcactcg tacaaccagg cgctgaagtc gtaaaaacccg gaacatctgt taaactctca  
 121 tgcaaaaggct caggatacac ttccacaact tactggatgc attgggtcaa tcaagcccc  
 181 ggacaaggcc tcgaatggat tggcgaaatt aacccaacta acggacatac taattataat  
 241 gaaaaattta agggcaaagc tacactcacc gtggataat caacctctac agcttataat  
 301 gaactttcat ccctgagatc agaagataca gcccgttactt attgcgcggaa aaactacgta  
 361 ggatcaatat tcgattactg gggtaaggc actcttcctca cagttagtc agccagcaca  
 421 aaggggcccat cggcttccccc cctggcaccc tcctccaaga gcacccctgg gggcacacg  
 481 gcccgggct gcctggtcaa ggactacttc cccgaacccg tgacgggttc gtggactca  
 541 ggcgcctga ccagcggcgt gcacacccctc cccggctgtcc tacagtctc aggactctac  
 601 tccctcagca gctgggtgac cgtgcctcc agcagcttgg gcacccagac ctacatctgc  
 661 aacgtgaatc acaagcccg caacaccaag gtggacaaga gagttgagcc caaatcttg  
 721 gacaaaactc acacatgtcc accgtgcccc gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc  
 781 ttctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatc cccggacccc tgaggtcaca  
 841 tgcgtgggg tggacgtgag ccacgaagac cctgagggtca agttcaactg gtacgtggac  
 901 ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcggggagg agcagtacaa cagcacgtac  
 961 cgtgtggtca gcgtccctc cgtctgtc caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag  
 1021 tgcagggtct ccaacaaaggc cctcccgacc cccatcgaga aaacatctc caaagccaaa  
 1081 gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcggccat cccggggagg gatgaccaag  
 1141 aaccaggtaa gcctgacccctt cctggtaaaa ggcttctatc ccagcgacat cggcgtggag  
 1201 tggagagca atggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctccgt gctggactcc  
 1261 gacggctct tcttcctcta tagcaagctc accgtggaca agacgggtg gcagcagggg  
 1321 aacgtttctt catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc  
 1381 ctctccctgt ccccggtaa atga

10

(6) 完全長重鎖ヒト化 L R 2 B 8 H C 重鎖可変領域及びヒト Ig G 1 重鎖定常領域  
 (G 1 m (3) アロタイプ) (対立遺伝子 1) を規定する蛋白質配列 (シグナル配列なし)  
 ) (配列番号 187)

20

【0294】

【化118】

1 qvqlvqpgae vvkpgtsvkl sckasgytf tywmhvvnqa pgqglewige inptnghny  
 61 nekfkgkatl tvdkststay melsslrssed tavyyccarny vgsifdywgq gtl1tvssas  
 121 tkgpsvfpla psskstsggt aalgclvky fpepvttvswn sgaltsgvht fpavltqssgl  
 181 yslssvvttvp ssslgtqtyi cnvnhkpsnt kvdkrvepk cdkthtcppc papellggps  
 241 vflfpkpkd tlmisrtpev tcvvvdvshe dpevkfnwv dgvevhnaakt kpreeqynst  
 301 yrvvsvltvlp hqdwlnkey kckvsnkalp apiektiska kgqppepqvy tlppsreemt  
 361 knqvsltclv kgfypsdiav ewesngqpen nykttppvld sdgsfflysk ltvdksrwqq  
 421 gnvfscsvmh ealhnhytqk sls1spgk

30

(7) ヒト化 L R M R 2 B 8 H C 重鎖可変領域をコードしている核酸配列 (下線 : シ  
 グナル配列) (配列番号 188)

【0295】

【化119】

1 atgggttgtt catatattat actctttctc gttagccaccc ccacccgacgt acactctcag  
 61 gttcaactcg tacaaccagg cgccgaaagtc aagaaaccag gaacatctgt caaactctca  
 121 tgtaaagcaa gcggatacac cttaactact tattggatgc attgggttaag acaagcccc  
 181 ggacaaggac tcgaatggat aggcgaaata aatcccacta atggacatac aaattataat  
 241 caaaaatttc aaggacgcgc tacactcacc gtggataat caacctcaac cgcatacatg  
 301 gaactctgtt ccctccgatc cgaagacact gccgttattt attgtgccag aaactatgt  
 361 ggatctttt tcgattactg gggacaagga acactctca cggtaagctc ag

40

(8) ヒト化 L R M R 2 B 8 H C 重鎖可変領域を規定する蛋白質配列 (シグナル配列  
 なし) (配列番号 189)

【0296】

## 【化120】

1 qvqlvqpgae vkkpgtsvkl sckasgytf tywmhwvrqa pgqglewige inptnghny  
 61 nqkfqgratl tvdkststay melsslrssed tavyyccarny vgsifdywgq glltvss

(9) 完全長重鎖ヒト化 L R M R 2 B 8 H C 重鎖可変領域及びヒト I g G 1 重鎖定常領域 (G 1 m (3) アロタイプ) (対立遺伝子1) をコードしている核酸配列 (下線: シグナル配列) (配列番号 190)

## 【0297】

## 【化121】

10

1 atgggttggt catatatattat acttttctc gtagccacccg ccaccgacgt acactctcag  
 61 gttcaactcg tacaacccgg cgccgaagtc aagaaaaccag gaacatcagt caaactctca  
 121 tgtaaagcaa gcggatacac cttaactact tattggatgc attgggtaag acaaggcccc  
 181 ggacaaggac tcgaatggat aggccaaata aatcccacta atggacatac aaattataat  
 241 caaaaatttc aaggacgcgc tacactcacc gtcgataaat caacctaacc cgcatacatg  
 301 gaactcagct ccctccgatc cgaagacact gcccgttatt atttgccag aaactatgt  
 361 ggatctatt tcgattact gggacaagga acacttctca ccgtaaagctc agccagcaca  
 421 aaggccccat cggcttccc cctggcaccc tcctccaaga gcacctctgg gggcacagcg  
 481 gcccgggct gcctggtcaaa ggacttccccc cccgaaccgg tgacgggtgc gtggaaactca  
 541 ggcccccgtga ccagcggcgt gcacacccctc cccgctgtcc tagacttcc accactctac  
 601 tccctcagca gcgtggtgac cgtgccctcc accgttgg gcaccaggac ctacatctgc  
 661 aacgtgaatc acaagcccg caacaccaag gtggacaaga gagttgagcc caaatcttgt  
 721 gacaaaactc acacatgtcc accgtgccccca gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc  
 781 ttccctttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatc cccggacccc tgaggtcaca  
 841 tgcgtggtg tggacgtgag ccacaagac cctgagggtca agttcaactg gtacgtggac  
 901 ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac  
 961 cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag  
 1021 tgcaaggctc ccaacaaagc cctcccaagcc cccatcgaga aaaccatctc caaaggccaa  
 1081 gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat cccgggagga gatgaccaag  
 1141 aaccagggtca gcctgacccctg cctggtaaaa ggcttctatc ccaggacat cgcgggtggag  
 1201 tgggagagca atgggcagcc ggagaacaaac tacaagacca cgcctccctg gctggactcc  
 1261 gacggtccct tcttcctcta tagcaagctc accgtggaca agagcagggtg gcagcagggg  
 1321 aacgttctc catgctccgt gatgcatgag gtcctgcaca accactacac gcagaagagc  
 1381 ctctccctgt ccccggtaa atga

20

(10) 完全長重鎖ヒト化 L R M R 2 B 8 H C 重鎖可変領域及びヒト I g G 1 重鎖定常領域 (G 1 m (3) アロタイプ) (対立遺伝子1) を規定する蛋白質配列 (シグナル配列なし) (配列番号 191)

30

## 【0298】

## 【化122】

1 qvqlvqpgae vkkpgtsvkl sckasgytf tywmhwvrqa pgqglewige inptnghny  
 61 nqkfqgratl tvdkststay melsslrssed tavyyccarny vgsifdywgq glltvssas  
 121 tkgpsvfpla psskstsggt aalgc1vkdy fpepvtswn sgaltsgvht fpavlgssgl  
 181 yslssvvtpv ssslgtqtyi cnvnhkpsnt kvdkrvepk cdkthtcppc papellggps  
 241 vflfpppkpd tlmisrtpev tcvvvdvshe dpevkfnwyv dgvevhnaakt kpreeqynst  
 301 yrvvsvltvl hqdwlngkey kckvsnkalp apiektiska kgqpqrepqvy tlppsreemt  
 361 knqvslltclv kgfypsdiav ewesngopen nykttppvld sdgsfflysk ltvdksrwqq  
 421 gnvfscsvmh ealhnhytqk sls1spgk

40

(11) ヒト化 L R 2 B 8 L C 軽鎖可変領域をコードしている核酸配列 (下線: シグナル配列) (配列番号 192)

## 【0299】

## 【化123】

1 atggaaagtc agaccttgt attcattct attttt ggttatgg gccgacggc  
 61 gacattgtga tgacccaatc ccccgatagt atggccatga gtgttaggaga aagagtacc  
 121 ctaattgca aagctccga aaatgtcgtt tcatatgtgt ctggatca aaaaaacc  
 181 ggcaatcac ccaaacttc catatacggc gctcaaaca gaaacacagg cgtcccgac  
 241 agatttg gatccggatc agtcacagat ttaccctta ccatcgttc agttcaagca  
 301 gaagacgttg cagactatca ttgcggacaa tcttataact accttacac attcggacaa

(12) ヒト化 L R 2 B 8 L C 軽鎖可変領域を規定する蛋白質配列（シグナル配列なし）（配列番号193） 10

## 【0300】

## 【化124】

1 divmtqspds mamsvgervt lnckasenvv syvswyqqkp gqspklliyg asnrntgvpd  
 61 rfsgsgsatz ftltissvqa edvadyhcgq synypytfqg gtleik

(13) ヒトカッパ鎖定常領域（Km(3)アロタイプ）（対立遺伝子1）をコードしている核酸配列（配列番号194）

## 【0301】

## 【化125】 20

1 gtacggtggc tgcaccatct gtttcatct tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg  
 61 gaactgctc tgttgtgc ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt  
 121 ggaaggtgga tacgccct caatcgggta actcccagga gagtgtcaca gagcaggaca  
 181 gcaaggacag cacctacag ctcagcaga ccctgacgct gagcaaagca gactacgaga  
 241 aacacaaaagt ctacgcctgc gaagtcaccc atcagggcc tagctcgcccc gtcacaaaaga  
 301 gcttcaacag gggagagtgt tag

(14) ヒトカッパ鎖定常領域（Km(3)アロタイプ）（対立遺伝子1）を規定する蛋白質配列（配列番号195）。最初のアミノ酸は、可変領域の最後のヌクレオチドおよび 軽鎖配列の開始2ヌクレオチドの翻訳物に由来する。 30

## 【0302】

## 【化126】

1 rtvaapsvfi fppsdeqlks gtasvvclln nfypreakvq wkvdnalqsg nsqesvteqd  
 61 skdstyslss titlskadye khkvyacevt hqglsspvtk sfnrgec

(15) 完全長 L R 2 B 8 L C 軽鎖可変領域及びヒトカッパ鎖定常領域（Km(3)アロタイプ）（対立遺伝子1）をコードしている核酸配列（配列番号196）

## 【0303】 40

【化 1 2 7】

```
1 atggaaaagtc agacccttgt attcatctct attcttcttt ggttgtatgg agcagacggc
 61 gacatttgtga tgacccaatc ccccgatagt atggccatga gttaggaga aagagtccacc
121 cttaaattgca aaggctccga aaatgtcggt tcataatgtgt ctggatcatca aaaaaaaaccc
181 ggc当地atcac ccaaacttct catatacggc gcttcaaaca gaaacacagg cgttcccgac
241 agatttagtg gatccggatc agtacagat ttcaccctta ccatcagttc agttcaagca
301 gaagacgttg cagactatca ttgcggacaa tottataact accottacac attcggacaa
361 ggaacccaaac tcgaaattaa acgtacggtg gctgoaccat ctgtcttcat cttcccgcca
421 tctgtatggc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttggt gtctgctgaa taacttcat
481 cccagagagg ccaaagtaca gtggaaagggtg gataacgccc tccaaatcgaaa taactcccgag
541 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg
601 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacggct gcgaaatgcac ccatcaggc
661 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagttcaac agggggagagt gttag
```

10

( 1 6 ) 完全長 L R 2 B 8 L C 軽鎖可変領域及びヒトカッパ鎖定常領域 ( K m ( 3 ) )

アロタイプ) (対立遺伝子 1) をコードしている蛋白質配列 (配列番号 197)

【 0 3 0 4 】

【化 1 2 8】

1 divmtqspds mamsvgervt lnckasenvv syvswyqqkp gqspklliyg asnrntgvpd  
61 rfsfgsgsatz ftltissvqa edvadyhcqg synypytfqg gtkleikrtv aapsvfifpp  
121 sdeqlksgt a svvclnnfy preakvqwkv dnalqsgnsq esvtteqdskd styslsstlt  
181 lskadyekhk vyacevhqg lssptksfn rgec

(17) ヒト化 L R M R 2 B 8 L C 軽鎖可変領域をコードしている核酸配列(下線:

シグナル配列) (配列番号 198)

20

【 0 3 0 5 】

【化 1 2 9】

1 atggaatccc aaacccttgt ttcatctct atccttcctt ggctttatgg cgccgacgg  
61 gacatcgtaa tgacacaatac ccctgactct ctgttatga gcttggcga acgagtaaca  
121 cttaaactgca aagcatccga aaatgtcgta tcttacgtat ccttgtatca gcaaaaacct  
181 ggtcaaagtc ctaaaactct tatatatatggt gcaaggtaatc gtgaaagtgg cgtccccagac  
241 agatttagcg gttcagggttc agcaactgac tttacactta caatttctag cgttcaggcc  
301 gaagacgttg cagactatca ttggggacaa tcttataact atccttataac ttggggacaa  
361 ggcactaaac ttgaaattaa ac

30

( 18 ) ヒト化 L R M R 2 B 8 L C 軽鎖可変領域を規定する蛋白質配列 ( シグナル配列なし ) ( 配列番号 199 )

【 0 3 0 6 】

【化 1 3 0】

1 divmtqspds lamslgervt lnckasenvv syvswyqqkp gqspklliyg asnresgvpd

61 rfsgsgsatt fltissvqa edvadyhcgq synypytfqg gtkleik

( 19 ) 完全長ヒト化 L R M R 2 B 8 L C 軽鎖可変領域及びヒトカッパ鎖定常領域(  $\times m$  ( 3 ) アロタイプ) ( 対立遺伝子 1 ) をコードしている核酸配列 ( 下線 : シグナル配列 ) ( 配列番号 200 )

40

## 【化131】

```

1 atggaaatccc aaacccttgc tttcatctct atccttctct ggcttatgg cgccgacgga
61 gacatcgtaa tgacacaatc ccctgactct cttgtatgaa gcttggcga acgagtaaca
121 cttaaactgca aagcatccga aaatgtcgta tttacgtat cctggatca gcaaaaaccc
181 ggtcaaagtcc taaacttct tatatatgggt gcaagatatc gtgaaagtgg cgtccccagac
241 agatttagcg gttcagggtc agcaactgac ttacactta caatttctag cgttcaggcc
301 gaagacgttg cagactatca ttgtggacaa tcttataact atccttatac tttcgacaa
361 ggcactaaac ttgaaattaa acgtacggtg gctgcacca ctgtcttcat cttcccgcca
421 tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgac tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat
481 cccagagagg ccaaagtaca gtggaaagggtg gataacgccc tccaaatcgaa taactccca
541 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg
601 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgccc gcgaagtcac ccatcaggcc
661 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag

```

10

(20) 完全長ヒト化 L R M R 2 B 8 L C 軽鎖可変領域及びヒトカッパ鎖定常領域 (Km(3)アロタイプ) (対立遺伝子1) を規定する蛋白質配列 (配列番号201)

## 【0308】

## 【化132】

```

1 divmtqspds lamslgervt lnckasenvv syvswyqqkp qqspklliyg asnresgvpd
61 rfsgsgsatd ftlissvqa edvadyhcgq synypytfqg gtlkleikrtv aapsvfifpp
121 sdeqlkspta svvcclnnfy preakvqwkv dnalqsgnsq esvteqdskd styslsstlt
181 lskadyekhk vyacevthqg lsspvtksfn rgec

```

便宜のため、このセクションで説明した抗体の完全長配列と配列表に示したものとの対応関係を示すコンコーダンス表を表14に示した。 20

## 【0309】

## 【表14】

表14

配列番号	蛋白質又は核酸
182	LR2B8HC 重鎖可変領域-核酸
183	LR2B8HC 重鎖可変領域-蛋白質
184	ヒト Ig G1 重鎖定常領域 (G1m(3)アロタイプ) (対立遺伝子1) -核酸
185	ヒト Ig G1 重鎖定常領域 (G1m(3)アロタイプ) (対立遺伝子1) -蛋白質
186	LR2B8HC + IgG1 定常領域(G1m(3)アロタイプ) (対立遺伝子1) -核酸
187	LR2B8HC + IgG1 定常領域(G1m(3)アロタイプ) (対立遺伝子1) -蛋白質
188	LRMR2B8HC 重鎖可変領域-核酸
189	LRMR2B8HC 重鎖可変領域-蛋白質
190	LRMR2B8HC + IgG1 定常 (G1m(3)アロタイプ) (対立遺伝子1) -核酸
191	LRMR2B8HC + IgG1 定常 (G1m(3)アロタイプ) (対立遺伝子1) -蛋白質
192	LR2B8LC 軽鎖可変領域-核酸
193	LR2B8LC 軽鎖可変領域-蛋白質
194	ヒトカッパ鎖定常領域領域 (Km(3)アロタイプ) (対立遺伝子1) -核酸
195	ヒトカッパ鎖定常領域領域 (Km(3)アロタイプ) (対立遺伝子1) -蛋白質
196	LR2B8LC + カッパ鎖定常領域 (Km(3)アロタイプ) (対立遺伝子1) -核酸
197	LR2B8LC + カッパ鎖定常領域 (Km(3)アロタイプ) (対立遺伝子1) -蛋白質
198	LRMR2B8LC 軽鎖可変領域-核酸
199	LRMR2B8LC 軽鎖可変領域-蛋白質
200	LRMR2B8LC + カッパ鎖定常領域 (Km(3)アロタイプ) (対立遺伝子1) -核酸
201	LRMR2B8LC + カッパ鎖定常領域 (Km(3)アロタイプ) (対立遺伝子1) -蛋白質

30

40

表15は、以上の本実施例で説明したヒト化の方法1及びヒト化の方法2により作製したヒト化2B8抗体の重鎖CDR配列(カバットの定義)をまとめたものである。

## 【0310】

## 【表 15】

表 15

抗体	CDR1	CDR2	CDR3	完全長重鎖可変領域
マウス 2 B 8 重鎖	TYWMH (配列番号 15)	EINPTNGHTNYNEKFKS (配列番号 16)	NYVGSIFDY (配列番号 17)	配列番号 12
Hu2B8 Hv1f.1	TYWMH (配列番号 15)	EINPTNGHTNYNEKFQG (配列番号 202)	NYVGSIFDY (配列番号 17)	配列番号 159
Hu2B8 Hv5a.1	TYWMH (配列番号 15)	EINPTNGHTNYNPSFQG (配列番号 203)	NYVGSIFDY (配列番号 17)	配列番号 165
Hu2B8 Hv5-51.1	TYWMH (配列番号 15)	EINPTNGHTNYNPSFQG (配列番号 203)	NYVGSIFDY (配列番号 17)	配列番号 169
LR2B8HC	TYWMH (配列番号 15)	EINPTNGHTNYNEKFKG (配列番号 204)	NYVGSIFDY (配列番号 17)	配列番号 183
LRMR2B8HC	TYWMH (配列番号 15)	EINPTNGHTNYNQKFQG (配列番号 205)	NYVGSIFDY (配列番号 17)	配列番号 189

表 16 は、以上の本実施例で説明したヒト化の方法 1 及びヒト化の方法 2 により作製したヒト化 2 B 8 抗体の軽鎖 C D R 配列（カバット（K a b a t）の定義）をまとめたものである。

## 【0311】

## 【表 16】

10

20

表 16

抗体	CDR1	CDR2	CDR3	完全長軽鎖可変領域
マウス 2 B 8 軽鎖	KASENVVSYVS (配列番号 18)	GASNRNT (配列番号 19)	GQSYNYPYT (配列番号 20)	配列番号 14
Hu2B8 Kv1-39.1	KASENVVSYVS (配列番号 18)	GASNRNT (配列番号 19)	GQSYNYPYT (配列番号 20)	配列番号 173
Hu2B8 Kv3-15.1	KASENVVSYVS (配列番号 18)	GASNRNT (配列番号 19)	GQSYNYPYT (配列番号 20)	配列番号 179
LR2B8LC	KASENVVSYVS (配列番号 18)	GASNRNT (配列番号 19)	GQSYNYPYT (配列番号 20)	配列番号 193
LRMR2B8LC	KASENVVSYVS (配列番号 18)	GASNRES (配列番号 206)	GQSYNYPYT (配列番号 20)	配列番号 199

30

## C . ヒト化 2 B 8 抗体の結合親和性

B I A c o r e T 1 0 0 装置を用いて表面プラスモン共鳴法により抗原結合親和性及び相互作用の速度を評価した。マウス抗ヒト免疫グロブリン（ジャクソン・イムノリサーチ・ラボラトリーズ社（J a c k s o n I m m u n o R e s e a r c h L a b s）、2 0 9 - 0 0 5 - 0 9 8）は、標準的なカップリングプロトコルをメーカーの推奨事項に従って用いたアミンカップリング（B I A c o r e、カタログ番号 B R - 1 0 0 0 - 5 0）によりカルボキシメチル化デキストラン C M 4 センサーチップ（B I A c o r e、カタログ番号 B R - 1 0 0 5 - 3 4）上に固定化した。分析は、0 . 0 5 % の界面活性剤 P 2 0（B I A c o r e、カタログ番号 B R - 1 0 0 0 - 5 4）、2 m g / m L の B S A（E M D 社カタログ番号 2 9 3 0）及び1 0 m g / m L の C M - デキストランナトリウム塩（フルカ社（F l u k a）、カタログ番号 8 6 5 2 4）を含有する P B S（G I B C O 社、カタログ番号 1 4 0 4 0 - 1 3 3）を泳動用緩衝液として用い、2 5 °で行った。

40

## 【0312】

前記抗体は、個々のフローセル上で1 0 μ L / 分の流速で捕捉した。各抗体が各サイクルで捕捉される約2 0 R U の抗体を生じるための注入時間にはばらつきがあった。緩衝液又は泳動用緩衝液で希釈した H G F（R & D システムズ社、カタログ番号 2 9 4 - H G N

50

- 0 2 5 ) を対照表面 ( 捕捉抗体なし ) 及び活性表面 ( 試験対象抗体あり ) 上に 6 0  $\mu$  L / 分で 2 分間順次注入した。解離相を濃度に応じて 1 5 又は 9 0 分間モニターした。その後、上記表面は、別のサイクルが開始される前に、 pH 2 . 0 の 1 0 mM グリシン - 塩酸 ( BIACore 社、カタログ番号 BR - 1 0 0 3 - 5 5 ) を 6 0  $\mu$  L / 分の流速で 3 分間注入して再生させた。試験した HGF 濃度は 1 . 8 8 、 3 . 7 5 及び 7 . 5 nM であった。速度論的パラメータは、対照値減算を含む BIACore パラメータ ( BIACore Evaluation ) ソフトウェアの速度関数を用いて求めた。各抗体の速度論的パラメータ  $k_a$  ( 会合速度定数 ) 、  $k_d$  ( 解離速度定数 ) 及び  $K_D$  ( 平衡解離定数 ) を図 8 にまとめた。

## 【 0 3 1 3 】

10

図 8 にまとめた結果から、超ヒト化重鎖 ( Hu 2 B 8 Hv 5 a . 1 、 Hu 2 B 8 Hv 5 - 5 1 . 1 又は Hu 2 B 8 Hv 1 - f . 1 ) 及び軽鎖 ( Hu 2 B 8 Kv 1 - 3 9 . 1 又は Hu 2 B 8 Kv 3 - 1 5 . 1 ) の一部の組合せは、キメラ 2 B 8 ( マウス可変領域及びヒト定常領域 ) 並びに 2 B 8 ( 表 5 ) と同様な HGF との結合親和性 (  $K_D$  ) を保持することが分かる。

## D. 相互排他的結合

HGF への相互排他的結合について BIACore T 1 0 0 装置を用いて表面プラスモン共鳴により評価した。マウス抗ヒト免疫グロブリン ( ジャクソン・イムノリサーチ・ラボラトリーズ社 ( Jackson Immuno Research Labs ) 、 2 0 9 - 0 0 5 - 0 9 8 ) は、標準的なカップリングプロトコルをメーカーの推奨事項に従つて用いたアミンカップリング ( BIACore 、カタログ番号 BR - 1 0 0 0 - 5 0 ) によりカルボキシメチル化デキストラン CM 5 センサーチップ ( BIACore 、カタログ番号 BR - 1 0 0 6 - 6 8 ) 上に固定化した。分析は、 0 . 0 5 % の界面活性剤 P 2 0 ( BIACore 、 BR - 1 0 0 0 - 5 4 ) 、 2 mg / mL の BSA ( EMD 社カタログ番号 2 9 3 0 ) 及び 1 0 mg / mL の CM - デキストランナトリウム塩 ( フルカ社 ( Fullka ) 、カタログ番号 8 6 5 2 4 ) を含有する PBS ( Gibco 社、カタログ番号 1 4 0 4 0 - 1 3 3 ) を泳動用緩衝液として用い、 2 5 °C で行った。

20

## 【 0 3 1 4 】

30

前記ヒト化抗体は、個々のフローセル上で 3 0  $\mu$  L / 分の流速で捕捉した。各抗体が各サイクルで捕捉される約 1 5 0 R U の抗体を生じるための注入時間にはばらつきがあった。 7 . 5  $\mu$  g / mL の最終濃度に泳動用緩衝液で希釈した HGF ( R & D Systems 社、カタログ番号 2 9 4 - HGN - 0 2 5 ) を上記捕捉ヒト化抗体上に 3 0  $\mu$  L / 分で 9 0 秒間注入した。 HGF の結合を測定した後、続いてマウス 2 B 8 抗体又はヤギポリクローナル抗 HGF 抗体 ( R & D Systems 社、 AF 2 9 4 ) を 3 0  $\mu$  L / 分で 3 分間注入した。その後、上記表面は、別の抗体が試験される前に、 pH 2 . 0 の 1 0 mM グリシン - 塩酸 ( BIACore 社、カタログ番号 BR - 1 0 0 3 - 5 5 ) を 6 0  $\mu$  L / 分の流速で 3 分間注入して再生させた。得られた結果は図 9 にまとめた。

## 【 0 3 1 5 】

40

図 9 にまとめた結果から、ヒト化 2 B 8 抗体及びキメラ 2 B 8 抗体はいずれもマウス 2 B 8 が HGF に結合するのを妨げることが分かる。以上の結果は、ヒト化抗体がそれでもなお元の 2 B 8 抗体と同じ HGF 抗原決定基に結合することを証明している。

## ( 実施例 1 3 )

## ヒト化 2 B 8 変異体の作製

## a. ヒューマン・エンジニアード ( 商標 ) 抗体

ヒトカッパ及びガンマ - 1 定常領域モジュールを含む XOMA 社の一過性抗体発現ベクター中に、コドン - 及び発現適正化低リスク及び低プラス中等度リスクヒューマン・エンジニアード軽鎖 ( それぞれ、 LR 2 B 8 LC 及び LR M R 2 B 8 L ) 及び重鎖 ( それぞれ、 LR 2 B 8 HC 及び LR M R 2 B HC ) をインフェーズでクローニングした。これら 4 種のヒューマン・エンジニアード 2 B 8 変異体は、 HEK 2 9 3 E 細胞への一過性形質移入によって作製した。以下の 4 種の抗体を作製した。

50

## 【0316】

H E 2 B 8 - 1 = L R 2 B 8 H C (+ I g G 1 定常領域 (G 1 m (3) アロタイプ (対立遺伝子1)) (配列番号187) プラス L R 2 B 8 L C (+ カッパ鎖定常領域 (K m (3) アロタイプ (対立遺伝子1))) (配列番号197)

H E 2 B 8 - 2 = L R 2 B 8 H C (+ I g G 1 定常領域 (G 1 m (3) アロタイプ (対立遺伝子1)) (配列番号187) プラス L R M R 2 B 8 L C (+ カッパ鎖定常領域 (K m (3) アロタイプ (対立遺伝子1))) (配列番号201)

H E 2 B 8 - 3 = L R M R 2 B 8 H C (+ I g G 1 定常領域 (G 1 m (3) アロタイプ (対立遺伝子1)) (配列番号191) プラス L R 2 B 8 L C (+ カッパ鎖定常領域 (K m (3) アロタイプ (対立遺伝子1))) (配列番号197)

H E 2 B 8 - 4 = L R M R 2 B 8 H C (+ I g G 1 定常領域 (G 1 m (3) アロタイプ (対立遺伝子1)) (配列番号191) プラス L R M R 2 B 8 L C (+ カッパ鎖定常領域 (K m (3) アロタイプ (対立遺伝子1))) (配列番号201)

これら軽及び重鎖は、2リットルの振盪フラスコを用いて I S 2 9 3 培地（アーバイン・サイエンティフィック社、アーバイン、カリフォルニア州）中で増殖させた X O M A 社の懸濁適応 H E K 2 9 3 E 細胞中に同時形質移入した。振盪フラスコでの24時間の形質移入後、形質移入細胞 2 0 0 m L を遠心分離し、新鮮培地 4 0 m L に再懸濁し、產生用インテグラ (Integra) フラスコ（ウィルソン・ウォルフ・マニュファクチャリング社 (Wilson Wolf Manufacturing Inc.)、ミネソタ州）に移した。数日間のインキュベーション後、細胞懸濁液をインテグラフラスコから取り出し、遠心分離して培養上清を残した。この培養上清中の抗体をプロテインAスピンカラム（プロ-ケム社）で精製し、P B S に対して透析し、濃縮して除菌した。

## 【0317】

b. スーパーヒューマナイズド (SUPERHUMANIZED) (商標) 抗体

完全長 H u 2 B 8 \_ H v 5 - 5 1 . 1 + ヒト I g G 1 定常ドメイン (G 1 m (3) アロタイプ) cDNA を H i n d I I I 及び E c o R I 制限部位を利用して p E E 6 . 4 (ロンザバイオロジックス社 (Lonza Biologics)、バークシャー、英国) 中にクローニングした。完全長 H u 2 B 8 \_ K v - 3 9 . 1 可変領域 + ヒトカッパ鎖定常ドメイン cDNA 及び完全長 H u 2 B 8 \_ K v 3 - 1 5 . 1 可変領域 + ヒトカッパ鎖定常ドメイン cDNA をそれぞれ、 H i n d I I I 及び E c o R I 制限部位を利用して p E E 1 4 . 4 (ロンザバイオロジックス社) 中にクローニングした。(p E E 6 . 4 内の) h C M V - M I E プロモーター + 完全長 H u 2 B 8 \_ H v 5 - 5 1 . 1 + ヒト I g G 1 定常ドメイン (G 1 m (3) アロタイプ) cDNA + S V 4 0 ポリ A 断片を N o t I / S a l I 消化により切り出し、どちらのカッパ鎖 p E E 1 4 . 4 ベクター中にも N o t I / S a l I 部位から挿入することにより、それぞれ重及び軽鎖を同時に発現する2種の発現ベクターを作り、以下の抗体を作製した。

## 【0318】

s h 2 B 8 - 9 (G 1 m (3)) = h u 2 B 8 H v 5 - 5 1 . 1 (+ I g G 1 定常領域 (G 1 m (3) アロタイプ) (対立遺伝子2)) (配列番号210) プラス h u 2 B 8 K v 1 - 3 9 . 1 (+ カッパ鎖定常領域 (K m (3) アロタイプ (対立遺伝子2))) (配列番号177)

s h 2 B 8 - 1 2 (G 1 m (3)) = h u 2 B 8 H v 5 - 5 1 . 1 (+ I g G 1 定常領域 (G 1 m (3) アロタイプ) (対立遺伝子2)) (配列番号210) プラス h u 2 B 8 K v 3 - 1 5 . 1 (+ カッパ鎖定常領域 (K m (3) アロタイプ (対立遺伝子2))) (配列番号181)

上記ヒト I g G 1 重鎖定常領域 G 1 m (3) アロタイプ (対立遺伝子2) 及び上記各完全長重鎖配列をコードしている核酸配列並びにこれらを規定する蛋白質配列を以下に記載した。軽鎖の配列は実施例12に記載したのと同じであった。

## 【0319】

(1) ヒト I g G 1 重鎖定常領域 (G 1 m (3) アロタイプ) (対立遺伝子2) をコ

10

20

30

40

50

ードしている核酸配列（配列番号 207）。

【0320】

【化133】

```

1 cctccaccaa gggcccatcg gcttcccc tggcaccctc ctccaagagc acctctgggg
61 gcacagcggc cctggctgc ctggtaagg actacttccc cgaaccggtg acgggtcggt
121 ggaactcagg cgccctgacc agcggcgtgc acacccccc ggctgtccta cagtccatcag
181 gactctactc cctcagcage gttgtgaccg tgccctccag cagcttggc acccagacct
241 acatctgcaa cgtgaatcac aagccagca acaccaaggt ggacaagaga gttgagccca
301 aatcttgtga caaaaactcac acatgccac cgtgeccagc acctgaactc ctggggggac

```

10

【0321】

【化134】

```

361 cgtcagtctt cctttcccc caaaaaccca aggacaccct catgatctcc eggaccctg
421 aggtcacatg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtaag ttcaactgg
481 acgtggacgg cgtggaggtg cataatgcc aagacaagcc gggggaggag cagtacaaca
541 gcaacgttccg tgggtcagc gtccctcaccc tcctgcacca ggactggctg aatgcaagg
601 agtacaagtg caaggtctcc aacaaagccc tcccaagccccc catgagaag accatctcca
661 aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc cgggaggaga
721 tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgccc tggtaaagg cttctatccc agcgacatcg
781 ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccggtgc
841 tggactccga cggcccttc ttctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcagggtggc
901 agcaggggaa cgtttctca tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac cactacacgc
961 agaagagccct ctccctgtct cccggtaaat ga

```

20

（2）ヒト IgG1重鎖定常領域（G1m(3)アロタイプ）（対立遺伝子1又は2）を規定する蛋白質配列（配列番号208）。最初のアミノ酸は、可変領域の最後のヌクレオチドおよびIgG1重鎖配列の開始2ヌクレオチドの翻訳物に由来する。

30

【0322】

【化135】

```

1 astkgpsvfp lapsskstsg gtaalgclvk dyfpepvts wnsgaltsgv htfpavlqss
61 glyslssvvt vpssslgtqt yicnvnhkps ntkvdkrvep kscdkthtcp pcrapellgg
121 psvflfppkp kdtilmisrtp evtcvvvdvs hedpevkfhw yvdgvevhna ktkpreeqyn
181 styrvvsvlt vlhqdwlngk eykckvsnka lpapiektis kakgqprepq vytlppsree
241 mtknqvsitc lvkgfypsdi avewesngqp ennyktppv ldsdgsffly skltvdksrw
301 qqgnvfscsv mhealhnhyt qkslslspgk

```

40

（3）ヒト化Hu2B8-Hv5-51.1重鎖可変領域及びヒトIgG1重鎖定常領域G1m(3)アロタイプ（対立遺伝子2）を含む完全長鎖をコードしている核酸配列（下線：シグナル配列）（配列番号209）

【0323】

## 【化136】

```

1 atggggtcaa ccgcacatct cgccttcctc ctggctgttc tccaaggagt ctgtgccgaa
61 gtgcagctgg tgcaactgg agcagaggtg aaaaagcccg gggagtctct gaagatctcc
121 tgtaagggtt ctggatacacg ctttaccacc tactggatgc actgggtgcg ccagatgcc
181 gggaaaggcc tggagtgatg ggggagatt aatcctacca acggtcatac taactacaat
241 ccgtccttcc aaggccaggt caccatctca gctgacaagt ccatcagcac tgcctacatcg
301 cagtgagca gcctgaaggc ctcggacacc gccatgtatt actgtgcgag aaactatgtt
361 ggttagcatct ttgactactg gggccaagga accctggtca cctgcaccc tcctccaaga gcaccctctgg gggcacagcg
421 aaggcccatt cggtcttcc cctggcacc ctcctccaaga gcaccctctgg gggcacagcg
481 gccctgggct gcctggtcaa ggactactc cccgaaccgg tgacgggtgtc gtggactca
541 ggcgcctgaa ccagcggcgt gcacaccc tcggctgtcc tacagtctc aggactctac
601 tccctcagca gcgtggtgac cgtgcctcc agcagcttgg gcacccagac ctacatctgc
661 aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga gagttgagcc caaatcttgt

```

10

## 【0324】

## 【化137】

```

721 gacaaaactc acacatgccc accgtgccc gcacactgaac tcctgggggg accgtcagtc
781 ttcccttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca
841 tgcgtgggtgg tggacgttag ccacgaagac cctgagggtca agttcaactg gtacgtggac
901 ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaaag cgcggggagg agcagtacaa cagcacgtac
961 cgtgtggtca gcgtcctcact cgtcctgac caggaactggc tgaatggcaa ggagtacaag
1021 tgcaagggtct ccaacaaaagg cctcccaagcc cccatcgaga agaccatctc caaagccaaa
1081 gggcagcccc gagaaccaca ggttacacc ctggcccccatt cccggggagg gatgaccaag
1141 aaccagggtca gcctgacactg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag
1201 tggagagaca atggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcttccctgt gctggactcc
1261 gacggctctt tcttcctcta cagaagctc accgtggaca agagcagggtg gcagcagggg
1321 aacgttctt catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc
1381 ctctccctgt ctccggtaa atga

```

20

(4) ヒト化H u 2 B 8 H v 5 - 5 1 . 1 及びヒトI g G 1 重鎖定常領域G 1 m (3) アロタイプ(対立遺伝子2)を含む完全長鎖を規定する蛋白質配列(シグナル配列なし)(配列番号210)

## 【0325】

## 【化138】

```

1 evqlvqsgae vkkpgeslki sckgsgysft tywmhwvrqm pgkglewmge inptnghtry
61 npsfqggvti sadksistay lqwsslkasd tamycarny vgsifdywgq gtlvtvssas
121 tkgpsvfpla psskstsggt aalgolvdy fpepvttvswm sgaltsgvht fpavlgssgl
181 yslssvvrtvp ssslgtqtyi cnvnhkpsnt kvdkrvepk cdkthtcppc papellggps
241 vflfpkpkd tlmisrtpev tcvvvdvshe dpevkfnwyy dgvevhnaakt kpreeqynst
301 yrvvsvltvl hqdwlngkey kckvsnkalp apiektiska kgqppepqvy tippsreemt
361 knqvslltclv kgfypsdiav ewesngopen nykttppvld sdgsfflysk ltvdksrwqq
421 gnvfscsvmh ealhnhytqk slsllspgk

```

30

各二重発現ベクターを293T細胞中に形質移入し、D M E M 10%ウシ胎仔血清を用いて一過性に発現させた。形質移入後48時間に、無血清培地である、4mMのL-グルタミンを含有するI S G R O(商標)(アーバイン・サイエンティフィック社(Irvine Scientific)、サンタアナ、カリフォルニア州)で細胞を洗浄した後、これで置換した。上清を10日間毎日採取し、新鮮培地で置換した。この培養上清を遠心分離し、濾過(0.45μm)して10~100倍に濃縮した。抗体は、プロステップ(ProSep)vA樹脂(ミリポア社(Millipore))で精製し、P B Sに40に対して透析し、除菌した。

## (実施例14)

## ヒト化2B8変異体の結合特性

実施例13で作製したヒト化抗体の特徴は、h H G F 及び実施例3で作製した組換えH G F 蛋白質に結合できることであった。

## 【0326】

B I A c o r e T 1 0 0 装置を用いて表面プラスモン共鳴によりこれらの抗体を分析することによってH G F 及び実施例3に記載した融合蛋白質へのその結合能を評価した。各抗体は、標準的なカップリングプロトコルをメーカーの使用説明書に従って用いたアミ

40

50

ンカップリング( B I A c o r e 、カタログ番号 B R - 1 0 0 0 - 5 0 )によりカルボキシメチル化デキストラン CM 5 センサーチップ( B I A c o r e 、カタログ番号 B R - 1 0 0 6 - 6 8 )上に固定化した。

【 0 3 2 7 】

分析は、0 . 0 5 %の界面活性剤 P 2 0 ( B I A c o r e 、カタログ番号 R - 1 0 0 0 - 5 4 )、2 m g / m L の B S A ( E M D 社カタログ番号 2 9 3 0 )及び1 0 m g / m L の C M - デキストランナトリウム塩(フルカ社( F l u k a )、カタログ番号 8 6 5 2 4 )を含有する P B S ( G I B C O 社、カタログ番号 1 4 0 4 0 - 1 3 3 )を泳動用緩衝液として用い、2 5 で行った。種々の H G F 融合蛋白質を含む上清又は空のベクターを形質移入した細胞からの上清を各抗体上に3 0  $\mu$  L / 分の流速で3 分間注入した。その結果生じた結合は、注入終了後3 0 秒のベースラインに対する共鳴単位( R U )として求めた。結合は、泳動用緩衝液で希釈したヒト H G F ( R & D システムズ社( R & D S y s t e m s )、カタログ番号 2 9 4 - H G N - 0 2 5 )と比較した。非特異的な結合は、対照表面への結合を比較することにより測定した。得られた結果は表 1 7 にまとめた。

【 0 3 2 8 】

【表 1 7 】

表 1 7

抗体	rhHGF (R&D Systems)	rmHGF (R&D Systems)	MHMキメラ (495-585)	MHMキメラ (507-585)	MHMキメラ (499-556)
2B8	結合	非結合	結合	結合	結合
HE2B8-1	結合	非結合	結合	結合	結合
HE2B8-2	結合	非結合	結合	結合	結合
HE2B8-3	結合	非結合	結合	結合	結合
HE2B8-4	結合	非結合	結合	結合	結合
sh2B8-9 (G1m(3))	結合	非結合	結合	結合	結合
sh2B8-12 (G1m(3))	結合	非結合	結合	結合	結合

表 1 7 の結果から明らかなように、ヒト化 2 B 8 系抗体は r h H G F 及び 3 種のマウス - ヒト - マウスキメラ抗体の全てに結合する。

( 実施例 1 5 )

ヒト化 2 B 8 変異体の結合親和性

表 1 5 に示した抗体の結合親和性及び相互作用の速度を表面プラスモン共鳴によって測定した。

【 0 3 2 9 】

マウス抗ヒト免疫グロブリン( ジャクソン・ラボラトリーズ社( J a c k s o n L a b s )、2 0 9 - 0 0 5 )は、標準的なカップリングプロトコルをメーカーの使用説明書に従って用いたアミンカップリング( B I A c o r e 、カタログ番号 B R - 1 0 0 0 - 5 0 )によりカルボキシメチル化デキストラン CM 4 センサーチップ( B I A c o r e 、カタログ番号 B R - 1 0 0 6 - 6 8 )上に固定化した。分析は、0 . 0 5 %の界面活性剤 P 2 0 ( B I A c o r e 、カタログ番号 B R - 1 0 0 0 - 5 4 )及び2 m g / m L の B S A ( E M D 社カタログ番号 2 9 3 0 )を含有する P B S ( G I B C O 社、カタログ番号 1 4 0 4 0 - 1 3 3 )を用い、2 5 で行った。

【 0 3 3 0 】

前記抗体は、個々のフローセル内で1 0  $\mu$  L / 分の流速で捕捉した。各抗体が各サイクルで捕捉される約 2 0 R U の抗体を生じるための注入時間にはばらつきがあった。緩衝液又は泳動用緩衝液で希釈した H G F ( R & D システムズ社、カタログ番号 2 9 4 - H G N - 0 2 5 )を対照表面( 捕捉抗体なし )及び活性表面( 試験対象抗体あり )上に6 0  $\mu$  L

10

20

30

40

50

/分で2分間順次注入した。解離相を濃度に応じて15又は90分間モニターした。その後、上記表面は、別のサイクルが開始される前に、pH 2.2の10mMグリシン-HCl (BIAcore社、カタログ番号BR-1003-54)を60μL/分の流速で3分間注入して再生させた。試験したHGF濃度は0.46nM及び7.5nMであった。

### 【0331】

速度論的パラメータは、対照値減算を含むBIAエバリュエーション(商標)ソフトウェアの速度関数を用いて求めた。各抗体の速度論的パラメータ $k_a$ (会合速度定数)、 $k_d$ (解離速度定数)及び $K_D$ (平衡解離定数)を表18にまとめた。

### 【0332】

【表18】

10

表18

抗体	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	$K_D$ (pM)	SD
2B8	$1.4 \times 10^6$	$1.0 \times 10^{-5}$	7.3	-
HE2B8-1	$2.2 \times 10^6$	$1.4 \times 10^{-5}$	7.1	5.2
HE2B8-2	$1.8 \times 10^6$	$9.6 \times 10^{-6}$	5.2	2.7
HE2B8-3	$2.0 \times 10^6$	$4.1 \times 10^{-6}$	2.0	1.1
HE2B8-4	$1.7 \times 10^6$	$1.1 \times 10^{-5}$	6.5	1.3
sh2B8-9 (G1m(17,1))	$2.0 \times 10^6$	$1.7 \times 10^{-5}$	8.1	5.3
sh2B8-12 (G1m(17,1))	$1.9 \times 10^6$	$2.3 \times 10^{-5}$	12	0.4

20

これらのデータから、これらのヒト化抗体は速い会合速度( $k_a$ )、極めて遅い解離速度( $k_d$ )及び極めて高い親和性( $K_D$ )を有することが分かる。具体的には、これらの抗体は2.0乃至12pMの範囲の親和性を有する。

### (実施例16)

#### 25及び37における結合親和性の比較

抗体HE2B8-4、sh2B8-9、sh2B8-12及びマウス2B8の結合親和性及び相互作用の速度を種々の条件下で表面プラスモン共鳴により測定した。

30

### 【0333】

マウス抗ヒト免疫グロブリン(ジャクソン・ラボラトリーズ社(Jackson Labs)、209-005)又はウサギ抗マウス免疫グロブリン(BIAcore、カタログ番号BR-1005-14)は、標準的なカップリングプロトコルをメーカーの使用説明書に従って用いたアミンカップリング(BIAcore、カタログ番号BR-1000-50)によりカルボキシメチル化デキストランCM4センサーチップ(BIAcore、カタログ番号BR-1006-68)上に固定化した。sh2B8-9及びsh2B8-12についての25における測定の場合、CM5センサーチップ(BIAcore、カタログ番号BR-1006-68)を用いた。これらの分析は、0.05%の界面活性剤P20(BIAcore、カタログ番号BR-1000-54)及び2mg/mLのBSA(EMD社カタログ番号2930)を含有するPBS(GIBCO社、カタログ番号14040-133)を泳動用緩衝液として用い、25及び37で行った。

40

### 【0334】

前記抗体は、個々のフローセル内で10μL/分の流速で捕捉した。各抗体が各サイクルで捕捉される約20RUの抗体を生じるための注入時間にはばらつきがあった。緩衝液又は泳動用緩衝液で希釈したHGF(R&Dシステムズ社、カタログ番号294-HGN-025)を対照表面(捕捉抗体なし)及び活性表面(試験対象抗体あり)上に60μL/分で2分間順次注入した。解離相を濃度に応じて15又は90分間モニターした。その後、マウス抗ヒト免疫グロブリンセンサーチップの表面は、別のサイクルが開始される前に、pH 2.2の10mMグリシン-HCl(BIAcore社、カタログ番号BR-1

50

003-54) を  $60 \mu\text{L}$  / 分の流速で 3 分間注入して再生させた。ウサギ抗マウスグロブリンセンサーチップの表面は、別のサイクルが開始される前に、pH 1.7 の 10 mM グリシン - HCl (BIAcore社、カタログ番号 BR-1003-54) を  $60 \mu\text{L}$  / 分の流速で 3 分間注入して再生させた。試験した HGF 濃度は 0.46 nM 及び 7.5 nM であった。

#### 【0335】

速度論的パラメータは、対照値減算を含む BIAエバリュエーションソフトウェアの速度関数を用いて求めた。各抗体の速度論的パラメータ  $k_a$  (会合速度定数)、 $k_d$  (解離速度定数) 及び  $K_D$  (平衡解離定数) を下記の表 19 にまとめた。

#### 【0336】

#### 【表 19】

表 19

抗体	温度 (°C)	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	$K_D$ (pM)
2B8	25	$1.6 \times 10^6$	$2.1 \times 10^{-5}$	13.5
2B8	37	$2.8 \times 10^6$	$1.3 \times 10^{-5}$	4.5
HE2B8-4	25	$2.0 \times 10^6$	$1.2 \times 10^{-5}$	5.6
HE2B8-4	37	$3.1 \times 10^6$	$1.0 \times 10^{-5}$	3.3
sh2B8-9 (G1m(17,1))	25	$2.0 \times 10^6$	$1.7 \times 10^{-5}$	8.1
sh2B8-9 (G1m(3))	37	$2.5 \times 10^6$	$1.4 \times 10^{-5}$	5.8
sh2B8-12 (G1m(17,1))	25	$1.9 \times 10^6$	$2.3 \times 10^{-5}$	12.0
sh2B8-12 (G1m(3))	37	$2.4 \times 10^6$	$1.1 \times 10^{-5}$	4.8

予想どおり、会合速度定数は温度の上昇と共に増大した。意外なことに、解離定数は温度の対応する上昇と共に増大することはなかった。その結果、全体としての平衡解離定数 ( $K_D$ ) は、生理的温度 (37) で約 1.4 乃至 3 倍小さい (高い親和性) ものであった。

#### (実施例 17)

##### ヒト化 2B8 変異体の中和活性

実施例 14 で作製した抗体について、(a) c-Met への hHGF の結合を阻害し、(b) 4MBr-5 細胞における BrdU 取り込みの HGF による促進を阻害する能力を特徴化した。

#### 【0337】

HGF - Met 結合阻害試験 (中和試験) は以下のようにして実施した。c-Met への hHGF の結合を阻害する抗体の能力については ELISA により試験した。すなわち、ワラック 96 穴 DELFIA アッセイプレート (ワラック社、カタログ番号 A A A N D - 0001) を  $6.25 \mu\text{g} / \text{mL}$  HGF (R&Dシステムズ社、カタログ番号 294-HGN-025) の炭酸コーティング緩衝液 (15 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 及び 34 mM NaHCO<sub>3</sub>、pH 9.0) 溶液  $100 \mu\text{L}$  により 4 度 16 時間コーティングした。次に、このプレートを室温で 1 時間 5% 脱脂粉乳の PBS 溶液  $200 \mu\text{L}$  でブロックした。抗体は、別のプレートにおいて 5% 脱脂粉乳の PBS 溶液に溶解した 2 nM のビオチニル化 c-Met に検討対象の抗体を漸増濃度 (0.033 乃至 250 nM、2 倍段階希釈) で加えることにより調製した。c-Met (R&Dシステムズ社、カタログ番号 358-MT/CF) のビオチニル化は、10:1 のビオチン / c-Met 比でメーカーの使用説明書に従って行う (ピアス社 (Pierce)、カタログ番号 21335)。ウェル当たり  $100 \mu\text{L}$  のサンプルを上記アッセイプレートに移し、室温で 2 時間インキュベートした。次いで、上記で得られたプレートを PBS - 0.1% Tween 20 で 3 回洗浄した後、DELFIA アッセイ緩衝液 (ワラック社、カタログ番号 4002-0010) で 1:1, 000 に希釈した Eu 標識ストレプトアビシン (ワラック社、カタログ番号 12

10

20

30

40

50

44-360)と共に室温で1時間インキュベートした。その結果得られたプレートをDELFIA洗浄液(ブラック社、カタログ番号4010-0010)で3回洗浄した後、100μL/ウェルのDELFIA強化溶液(ブラック社、#4001-0010)と共に攪拌しながら室温で15分間インキュベートした。上記プレートは、ユウロピウム法を用いるピクター<sup>3</sup>V装置(パーキンエルマー社)で読み取らせた。IC<sub>50</sub>値はプリズム(Prism)を用いて算出した。

## 【0338】

得られたIC<sub>50</sub>値を表20に示した。

## 【0339】

## 【表20】

10

表20

抗体	IC <sub>50</sub> (nM)	SD
2B8	9.2	1.2
HE2B8-1	6.0	1.2
HE2B8-2	5.7	1.1
HE2B8-3	5.9	1.1
HE2B8-4	6.5	1.2
sh2B8-9 (G1m(3))	4.2	-
sh2B8-12 (G1m(3))	6.8	-

20

この表20の結果から明らかなように、試験したヒト化抗体はc-MetへのHGFの結合を効率的に中和する。

## 【0340】

表17の抗体は、実施例7(b)で説明した細胞増殖アッセイにおいても試験した。その結果は下記の表21にまとめた。

## 【0341】

## 【表21】

表21

抗体	IC <sub>50</sub> (nM)	SD
2B8	0.86	0.35
HE2B8-1	0.47	0.15
HE2B8-2	0.66	0.13
HE2B8-3	0.55	0.28
HE2B8-4	0.58	0.26
sh2B8-9 (G1m(3))	0.52	0.11
sh2B8-12 (G1m(3))	0.81	0.22

30

この表21の結果から明らかなように、試験したヒト化抗体は全て4MBr-5細胞のHGF誘発性増殖を抑制する。

## (実施例18)

40

## ヒト化2B8変異体の抗散乱活性

表17の抗体を実施例8で説明した抗散乱アッセイにおいて試験した。その結果を下記の表22にまとめた。

## 【0342】

## 【表 2 2】

表 2 2

HGF 誘発性細胞散乱の抑制		
抗体	実験 1	実験 2
2B8	++	++
HE2B8-1	++	++
HE2B8-2	++	++
HE2B8-3	++	++
HE2B8-4	++	++
sh2B8-9 (G1m(3))	++	++
sh2B8-12 (G1m(3))	++	++

- 抑制なし

+++ 極めて強くほぼ完全な抑制

++ 強い抑制

+ 検出可能な抑制

表 2 2 の結果から明らかなように、試験したヒト化抗体は全て、マウスモノクローナル抗体 2B8 と同程度に HGF 誘発性散乱を抑制した。 20

(実施例 19)

## HGF 刺激 c-Met リン酸化の阻害

表 1 7 の抗体を実施例 9 で説明した c-Met リン酸化アッセイにおいて試験した。その結果を下記の表 2 3 にまとめた。

【0343】

## 【表 2 3】

表 2 3

抗体	2 実験の平均	標準偏差
2B8	0.91	0.02
he2B8-1	0.80	0.04
he2B8-2	0.88	0.15
he2B8-3	0.79	0.05
he2B8-4	0.75	0.14
sh2B8-9 (G1m(3))	0.93	0.03
sh2B8-12 (G1m(3))	0.81	0.07

表 2 3 の結果から明らかなように、試験したヒト化抗体は、PC-3 細胞において HGF 誘発性 c-Met リン酸化の強力な阻害剤である。 40

(実施例 20)

## U87 MG 異種移植モデルにおける腫瘍抑制

U87 MG 異種移植モデルを用い、本発明のヒト化モノクローナル抗体の腫瘍増殖抑制能について試験した。 U87 MG 細胞 (ATCC) は、ダルベッコ改変イーグル培地 (D MEM : Dulbecco's Modified Eagle medium) を 10 % ウシ胎仔血清、100 単位 / mL ペニシリン及び 100 µg / mL ストレプトマイシンと共に含む培地を用いた、5% CO<sub>2</sub> 及び 95% 空気を含有する雰囲気中 37° の培養で増殖させた。これらの細胞は、トリプシン - EDTA を用いて培養皿の壁から細胞を剥離 50

することにより二次培養して維持した。

#### 【0344】

コンフルエントに近い細胞をトリプシン処理により回収し、次いで、50%マトリゲル（Matrigel）（BDバイオサイエンシズ社（BD Biosciences）、カタログ番号356237）中の細胞 $5 \times 10^6$ 個を、7週齢雌性ICR SCIDマウス（タコニックラボラトリー社（Taconic Labs））の肩甲骨間の上背部に皮下注射した。キャリパで腫瘍の長径（L）及び短径（W）（mm）を測定した。腫瘍容積（vol.）は、容積（mm<sup>3</sup>）= L × W<sup>2</sup> / 2として計算した。腫瘍が約200mm<sup>3</sup>にまで成長した時に、担腫瘍マウスを1群10匹の5群に無作為化した。1群にはPBSを投与し、1群にはヒトIgG対照を投与した。その他の4群のそれぞれには、ヒト化抗体（HE2B8-1、HE2B8-2、HE2B8-3及びHE2B8-4）のうちの1種を投与した。抗体は全て、5用量の腹腔内注射により週2回0.25mg/kg体重を投与した。腫瘍容積及びマウス体重を週2回記録した。スチューデントのt-検定を用いて腫瘍成長の抑制を解析した。10

#### 【0345】

試験したヒト化抗体はインビボで活性があった。HE2B8-1では57%の腫瘍成長抑制（p値：0.02）、HE2B8-2では61%の腫瘍成長抑制（p値：0.02）、HE2B8-3では85%の腫瘍成長抑制（p値：0.0004）、HE2B8-4では74%の腫瘍成長抑制（p値：0.001）が認められた。有意な体重減少は認められなかった。20

#### 【0346】

その後の実験は、側腹部に接種された皮下U87MG腫瘍を有する雌性NCRヌードマウス（タコニックラボラトリー社）において前述のようにして実施した。各群（1群10匹）には0.5mg/kgの以下の処置剤、即ち、PBS溶媒対照、huIgG対照、HE2B8-4又はsh2B8-9のうちの1種を投与した。処置剤は、最低でも5週間、週2回腹腔内投与した。各投与群は、腫瘍成長の抑制がsh2B8-9で113%、HE2B8-4で115%と同様な腫瘍退縮を示し、最低腫瘍成長遅延日数が30日であった。両投与とも有意な体重減少がなく、忍容性良好であった。

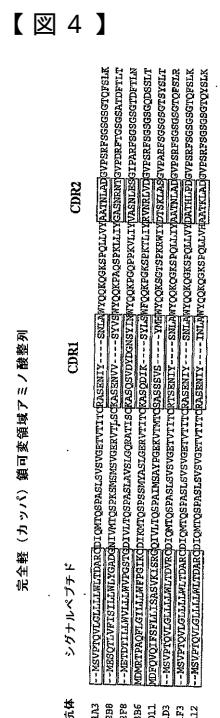
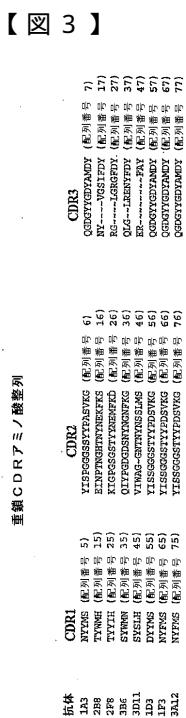
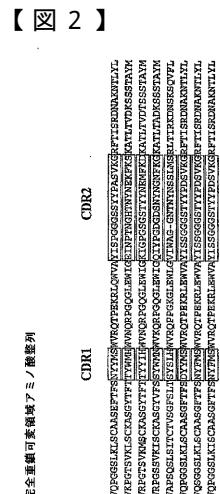
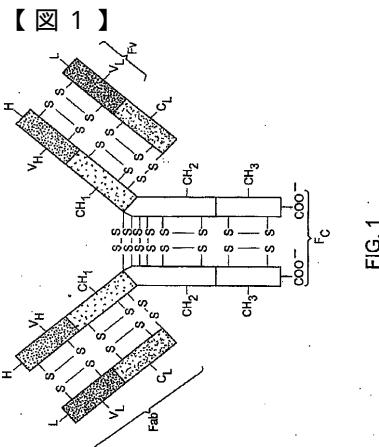
引用による組込み

本明細書で触れた特許文献及び科学論文のそれぞれの開示内容はその全体があらゆる目的で引用により組み込まれている。30

#### 【0347】

##### 均等物

本発明は、当該発明の精神または主要な特徴から逸脱することなく、他のさまざまな形式で実施することができる。そのため、前述の実施態様はあらゆる点で単なる例示にすぎず、本明細書に記載された発明に対して限定的に解釈してはならない。従って、本発明の範囲は、特許請求の範囲によって示すものであり、明細書の本文によって拘束されるものではない。また、特許請求の範囲の記載内容と同等の範囲に含まれる変形もしくは変更は、すべて本発明の範囲内のものである。



【図5】

絆(カシバ)鎖CDRアミノ酸整列

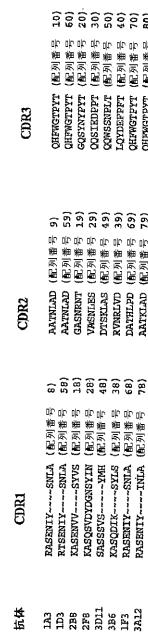


FIG. 5

【図7】

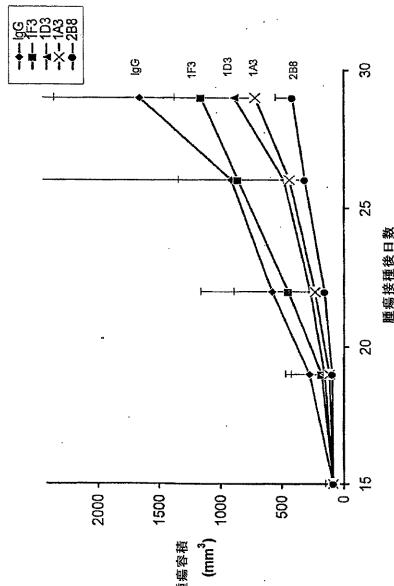


FIG. 7

【図8】

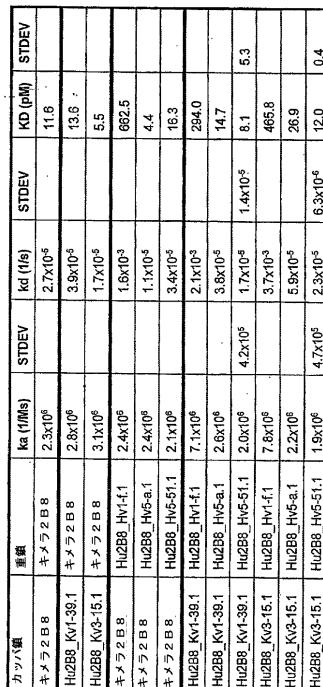


Fig. 8

【図6】

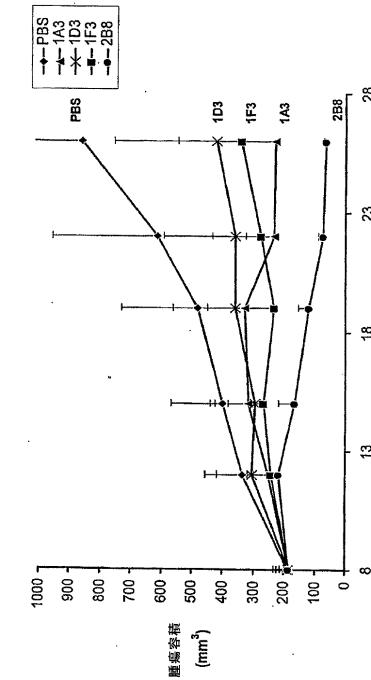


FIG. 6

【図9】

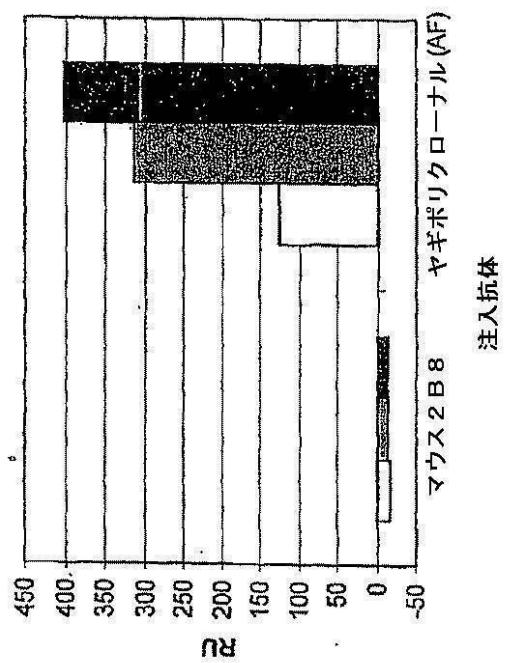


Fig. 9

【配列表】

0004686634000001.app

---

フロントページの続き

(74)代理人 100062409  
弁理士 安村 高明

(74)代理人 100113413  
弁理士 森下 夏樹

(72)発明者 ウィンストン, ウィリアム エム.  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01752, マールバラ, スプーンヒル アベニュー  
100

(72)発明者 ライト, エス. カーク  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02453, ウォルサム, ハートウェル ストリート  
24

(72)発明者 ハン, メイ  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02446, ブルックライン, エグモント ストリート  
20, アパートメント 5

(72)発明者 ブレオー, リン  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02131, ロスリンデール, デール ストリート 7  
1

(72)発明者 リン, チエ  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02132, ウエスト ロックスベリー, ウィローーディ  
ーン アベニュー 73

(72)発明者 エテマド - ギルバートソン, ビジアン  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02130, ジャマイカ プレーン, センター ストリ  
ート 802

(72)発明者 クヌーエル, クリストイン  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01760, ナティック, ハーバード ストリート エ  
クステンション 58

(72)発明者 ギュリス, ジェノ  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01890, ウィンチェスター, スワントン ストリ  
ート 171, ユニット ナンバー5

(72)発明者 ホーウィツ, アーノルド  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94577, サン リンドロ, レークビュー ドライブ  
2720

審査官 佐々木 大輔

(56)参考文献 米国特許出願公開第2005/0118643(US, A1)  
米国特許出願公開第2003/0039649(US, A1)  
米国特許第05707624(US, A)  
米国特許第05997868(US, A)  
米国特許第06432406(US, B1)  
Methods, 2005, Vol.36, pp.35-42  
Cancer Research, 2006.02, Vol.66, No.3, pp.1721-1729  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2001, Vol.98, No.13, pp.7443-7448  
J. Pathology, 1998, Vol.185, pp.298-302

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/09  
C07K 16/22  
C12P 21/08

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)  
MEDLINE/CAplus/BIOSIS/WPIDS(STN)  
REGISTRY(STN)  
UniProt/GeneSeq