

(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 I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C O 7 K 16/22 (2006.01)

C O 7 K 16/22

C 1 2 P 21/08 (2006.01)

C 1 2 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) 国際出願番号 PCT/US2007/012939  
 (87) 国際公開番号 W02007/143090  
 (87) 国際公開日 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  
 アベオ 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ティールエイチ フロアー  
 (73) 特許権者 500570793  
 ゴーマ 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。

【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

る。

#### 【 0 0 0 2 】

##### 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 】

#### 【 0 0 0 3 】

##### 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、鎖及び鎖を含有している。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鎖であることが示唆されている。

10

#### 【 0 0 0 4 】

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されてきた。例えば、特許文献3を参照されたい。

20

#### 【 0 0 0 5 】

全ての抗体に共通する基本的構造を図1に模式図的に示した。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CH<sub>1</sub>、CH<sub>2</sub>及びCH<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

#### 【 0 0 0 6 】

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得ると考えられている。

40

#### 【 0 0 0 7 】

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 】

#### 【 0 0 0 8 】

【 特許文献 1 】 米国特許第 5 , 9 9 7 , 8 6 8 号明細書

50

【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

【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】

【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。

【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、

（a）構造CDR<sub>L1</sub>-CDR<sub>L2</sub>-CDR<sub>L3</sub>を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域であって、

（i）CDR<sub>L1</sub>が配列番号18（2B8）のアミノ酸配列を含み、

（ii）CDR<sub>L2</sub>が配列番号206（LRMR2B8LC）のアミノ酸配列を含み、及び

（iii）CDR<sub>L3</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に結合するための単一結合部位を規定するものとする結合蛋白質。

(項目2)

$CDR_{L1}$ 、 $CDR_{L2}$  及び  $CDR_{L3}$  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 ( $LR2B8LC$  軽鎖可変領域) 又は配列番号199 ( $LRMR2B8LC$  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 ( $LR2B8LC$  + カッパ定常 ( $km(3)$  アロタイプ) (対立遺伝子1)) 又は配列番号201 ( $LRMR2B8LC$  + カッパ定常 ( $km(3)$  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。

(項目6)

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、

(a) 構造  $CDR_{H1} - CDR_{H2} - CDR_{H3}$  を含む免疫グロブリン重鎖可変領域であって、

(i)  $CDR_{H1}$  が配列番号15 (2B8) のアミノ酸配列を含み、

(ii)  $CDR_{H2}$  が配列番号204 ( $LR2B8HC$ ) 及び配列番号205 ( $LRMR2B8HC$ ) からなる群から選ばれる配列を含み、及び

(iii)  $CDR_{H3}$  が配列番号17 (2B8) 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HGFに結合するための単一結合部位を規定するものとする結合蛋白質。

(項目7)

$CDR_{H1}$ 、 $CDR_{H2}$  及び  $CDR_{H3}$  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。

(項目9)

配列番号183 ( $LR2B8HC$  重鎖可変領域) 又は配列番号189 ( $LRMR2B8HC$  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 ( $LR2B8HC + IgG1$  定常 ( $G1m(3)$  アロタイプ) (対立遺伝子1)) 又は配列番号191 ( $LRMR2B8HC + IgG1$  定常 ( $G1m(3)$  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  $CDR_{L1} - CDR_{L2} - CDR_{L3}$  を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含み、

(i)  $CDR_{L1}$  が配列番号18 (2B8) のアミノ酸配列を含み、

(ii)  $CDR_{L2}$  が配列番号19 (2B8) 又は配列番号206 ( $LRMR2B8LC$ ) のアミノ酸配列を含み、及び

(iii)  $CDR_{L3}$  が配列番号20 (2B8) 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HGFに結合するための単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

(項目 13)

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 14)

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 15)

項目 13 又は 14 の核酸配列を含む発現ベクター。

(項目 16)

項目 15 の発現ベクターを含む宿主細胞。

10

(項目 17)

結合蛋白質を作製する方法であって、

(i) 項目 16 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

(ii) 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 18)

前記結合蛋白質が  $4.0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  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 19)

前記  $k_d$  が  $3.0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  以下である項目 18 の単離結合蛋白質。

(項目 20)

前記  $k_d$  が  $2.0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  以下である項目 19 の単離結合蛋白質。

(項目 21)

前記結合蛋白質が 20 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 22)

前記  $K_D$  が 10 pM 以下である項目 21 の単離結合蛋白質。

(項目 23)

前記  $K_D$  が 5 pM 以下である項目 22 の単離結合蛋白質。

30

(項目 24)

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 25)

前記腫瘍細胞がヒト腫瘍細胞である項目 24 の方法。

(項目 26)

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 27)

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 28)

前記哺乳動物がヒトである項目 26 又は 27 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】1 A 3、1 D 3、1 F 3、2 B 8、2 F 8、3 A 1 2、3 B 6 及び 3 D 1 1 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、C D R<sub>1</sub>、C D R<sub>2</sub> 及び C D R<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 F R 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 C D R<sub>1</sub>、C D R<sub>2</sub> 及び C D R<sub>3</sub> を示す模式図である。

【図 4】1 A 3、1 D 3、1 F 3、2 B 8、2 F 8、3 A 1 2、3 B 6 及び 3 D 1 1 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、C D R<sub>1</sub>、C D R<sub>2</sub> 及び C D R<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 F R 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 C D R<sub>1</sub>、C D R<sub>2</sub> 及び C D R<sub>3</sub> を示す模式図である。

【図 6】U 8 7 M G 異種移植モデルにおいて抗 H G F 抗体 1 D 3、1 F 3、1 A 3 及び 2 B 8 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 P B S、三角形は抗 H G F 抗体 1 A 3、X は抗 H G F 抗体 1 D 3、四角形は抗 H G F 抗体 1 F 3、丸は抗 H G F 抗体 2 B 8 を示す。

【図 7】U 1 1 8 異種移植モデルにおいて抗 H G F 抗体 1 D 3、1 F 3、1 A 3 及び 2 B 8 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 I g G、四角形は抗 H G F 抗体 1 F 3、三角形は抗 H G F 抗体 1 D 3、X は抗 H G F 抗体 1 A 3、丸は抗 H G F 抗体 2 B 8 に相当する。

【図 8】ヒト H G F とキメラ、キメラノヒト化又はヒト化 2 B 8 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プ鎖と I g G 1 重鎖との対が示されている。標準偏差 ( S T D E V ) 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】H u 2 B 8 がマウスモノクローナル抗体 2 B 8 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 2 B 8 を抗ヒト F c チップ上に捕捉した。次いで、H G F をこのヒト化又はキメラ 2 B 8 に結合させた。次に、マウス 2 B 8 又は対照抗体 ( ポリクローナルヤギ抗 H G F 抗体 ) の上記捕捉 H G F への結合能を測定した。その結果、ヒト化 2 B 8 抗体及びキメラ 2 B 8 はマウス 2 B 8 が H G F に結合するのを妨げた。白色棒はキメラ 2 B 8 抗体、灰色棒はヒト化 H u 2 B 8 抗体 ( カッパ可変領域 K v 1 - 3 9 . 1 及び重鎖可変領域 H v 5 - 5 1 . 1 )、黒色棒はヒト化 H u 2 B 8 抗体 ( カッパ可変領域 K v 3 - 1 5 . 1 及び重鎖可変領域 H v 5 - 5 1 . 1 ) を示す。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 4 】

本発明の一部は、H G F 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 H G F 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、H G F 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、H G F 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 C D R 配列を含有している。

【 0 0 1 5 】

こうした抗体は、その中和活性を考慮すると、H G F 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に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に結合するための単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Tyr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に結合するための単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

l uであり、X<sub>24</sub>がG l y、L e u、A r g又はT y rであり、X<sub>25</sub>がペプチド結合、A s p又はG l yであり、X<sub>26</sub>がペプチド結合又はG l yであり、X<sub>27</sub>がペプチド結合又はT y rであり、X<sub>28</sub>がペプチド結合、L e u又はT y rであり、X<sub>29</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>30</sub>がペプチド結合、A s p、G l y又はG l uであり、X<sub>31</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>32</sub>がペプチド結合、A l a、G l y、I l e又はT y rであり、X<sub>33</sub>がM e t又はP h eであり、X<sub>34</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。

#### 【0017】

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を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

#### 【0018】

一の実施態様として、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。

#### 【0019】

一の実施態様として、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。

#### 【0020】

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>L1</sub> - C D R<sub>L2</sub> - C D R<sub>L3</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に結合するための単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>L1</sub>は、配列番号8 ( 1 A 3 )、配列番号18 ( 2 B 8 )、配列番号28 ( 2 F 8 )、配列番号38 ( 3 B 6 )、配列番号48 ( 3 D 1 1 )、配列番号58 ( 1 D 3 )、配列番号68 ( 1 F 3 )及び配列番号78 ( 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>L2</sub>は、配列番号9 ( 1 A 3 )、配列番号19 ( 2 B 8 )、配列番号29 ( 2 F 8 )、配列番号39 ( 3 B 6 )、配列番号49 ( 3 D 1 1 )、配列番号59 ( 1 D 3 )、配列番号69 ( 1 F 3 )、配列番号79 ( 3 A 1 2 )及び配列番号206 ( 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>L3</sub>は、配列番号10 ( 1 A 3 )、配列番号20 ( 2 B 8 )、配列番号30 ( 2 F 8 )、配列番号40 ( 3 B 6 )、配列番号50 ( 3 D 1 1 )、配列番号60 ( 1 D 3 )、配列番号70 ( 1 F 3 )及び配列番号80 ( 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

30

#### 【0021】

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>L1</sub>、配列番号9 ( 1 A 3 )の配列を含むC D R<sub>L2</sub>及び配列番号10 ( 1 A 3 )を含むC D R<sub>L3</sub>を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む。

40

#### 【0022】

別の実施態様として、上記結合蛋白質は、配列番号18 ( 2 B 8 )の配列を含むC D R<sub>L1</sub>、配列番号19 ( 2 B 8 )又は配列番号206 ( L R M R 2 B 8 L C )の配列を含むC D R<sub>L2</sub>及び配列番号20 ( 2 B 8 )を含むC D R<sub>L3</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28 ( 2 F 8 )の配列を含むC D R<sub>L1</sub>、配列番号29 ( 2 F 8 )の配列を含むC D R<sub>L2</sub>及び配列番号30 ( 2 F 8 )を含むC D R<sub>L3</sub>を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む。

#### 【0023】

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】

20

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。

【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に結合するための単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(LRMR2B8HC)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

40

【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CDRH<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 (LR2B8HC) 又は配列番号 205 (LRMR2B8HC) の配列を含む CDR<sub>H2</sub> 及び配列番号 17 (2B8) を含む CDR<sub>H3</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 (2F8) の配列を含む CDR<sub>H1</sub>、配列番号 26 (2F8) の配列を含む CDR<sub>H2</sub> 及び配列番号 27 (2F8) を含む CDR<sub>H3</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 (3B6) の配列を含む CDR<sub>H1</sub>、配列番号 36 (3B6) 配列を含む CDR<sub>H2</sub> 及び配列番号 37 (3B6) を含む CDR<sub>H3</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 (3D11) の配列を含む CDR<sub>H1</sub>、配列番号 46 (3D11) 配列を含む CDR<sub>H2</sub> 及び配列番号 47 (3D11) を含む CDR<sub>H3</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 (1D3) の配列を含む CDR<sub>H1</sub>、配列番号 56 (1D3) 配列を含む CDR<sub>H2</sub> 及び配列番号 57 (1D3) を含む CDR<sub>H3</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 (1F3) の配列を含む CDR<sub>H1</sub>、配列番号 66 (1F3) 配列を含む CDR<sub>H2</sub> 及び配列番号 67 (1F3) を含む CDR<sub>H3</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 (3A12) の配列を含む CDR<sub>H1</sub>、配列番号 76 (3A12) 配列を含む CDR<sub>H2</sub> 及び配列番号 77 (3A12) を含む CDR<sub>H3</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>H1</sub>、CDR<sub>H2</sub> 及び CDR<sub>H3</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。

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 (1A3) の 20 乃至 141 番目残基、配列番号 12 (2B8) の 20 乃至 137 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 42 (3D11) の 20 乃至 132 番目残基、配列番号 52 (1D3) の 20 乃至 141 番目残基、配列番号 62 (1F3) の 20 乃至 141 番目残基及び配列番号 72 (3A12) 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 (1A3) の 21 乃至 127 番目残基、配列番号 14 (2B8) 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 44 (3D11) の 23 乃至 128 番目残基、配列番号 54 (1D3) の 21 乃至 127 番目残基、配列番号 64 (1F3) の 21 乃至 127 番目残基及び配列番号 74 (3A12) 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 (1A3) 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 (1A3) 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

## 【 0 0 4 1 】

一実施態様として、上記結合蛋白質は、配列番号 1 2 ( 2 B 8 ) の 2 0 乃至 1 3 7 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 1 4 ( 2 B 8 ) の 2 1 乃至 1 2 7 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。

## 【 0 0 4 2 】

別の実施態様として、上記結合蛋白質は、配列番号 2 2 ( 2 F 8 ) の 2 0 乃至 1 3 7 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 2 4 ( 2 F 8 ) の 2 0 乃至 1 3 1 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。

## 【 0 0 4 3 】

別の実施態様として、上記結合蛋白質は、配列番号 3 2 ( 3 B 6 ) の 2 0 乃至 1 3 9 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 3 4 ( 3 B 6 ) の 2 3 乃至 1 2 9 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

## 【 0 0 4 4 】

別の実施態様として、上記結合蛋白質は、配列番号 4 2 ( 3 D 1 1 ) の 2 0 乃至 1 3 2 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 4 ( 3 D 1 1 ) の 2 3 乃至 1 2 8 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。

## 【 0 0 4 5 】

別の実施態様として、上記結合蛋白質は、配列番号 5 2 ( 1 D 3 ) の 2 0 乃至 1 4 1 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 5 4 ( 1 D 3 ) の 2 1 乃至 1 2 7 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

## 【 0 0 4 6 】

別の実施態様として、上記結合蛋白質は、配列番号 6 2 ( 1 F 3 ) の 2 0 乃至 1 4 1 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 6 4 ( 1 F 3 ) の 2 1 乃至 1 2 7 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。

## 【 0 0 4 7 】

別の実施態様として、上記結合蛋白質は、配列番号 7 2 ( 3 A 1 2 ) の 2 0 乃至 1 4 1 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 7 4 ( 3 A 1 2 ) の 2 1 乃至 1 2 7 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。

## 【 0 0 4 8 】

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る。

30

## 【 0 0 4 9 】

別の態様として、本発明はヒト H G F 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 1 7 3 ( H u 2 B 8 K v 1 - 3 9 . 1 軽鎖可変領域 )、配列番号 1 7 9 ( H u 2 B 8 K v 3 - 1 5 . 1 軽鎖可変領域 )、配列番号 1 9 3 ( L R 2 B 8 L C 軽鎖可変領域 ) 及び配列番号 1 9 9 ( L R M R 2 B 8 L C 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 ( i i ) 配列番号 1 5 9 ( H u 2 B 8 H v 1 f . 1 重鎖可変領域 )、配列番号 1 6 5 ( H u 2 B 8 H v 5 a . 1 重鎖可変領域 )、配列番号 1 6 9 ( H u 2 B 8 H v 5 - 5 1 . 1 重鎖可変領域 )、配列番号 1 8 3 ( L R 2 B 8 H C 重鎖可変領域 ) 及び配列番号 1 8 9 ( L R M R 2 B 8 L C 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る。

40

## 【 0 0 5 0 】

別の態様として、本発明はヒト H G F 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 1 7 7 ( H u 2 B 8 K v 1 - 3 9 . 1 + カッパ定常 ( K m ( 3 ) アロタイプ ( 対立遺伝子 2 ) )、配列番号 1 8 1 ( H u 2 B 8 K v 3 - 1 5 . 1 + カッパ定常 ( K m ( 3 ) アロタイプ ( 対立遺伝子 2 ) )、配列番号 1 9 7 ( 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 ) ) 及び配列番号 2 0 1 ( 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 ) ) 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 ( LRMR2B8HC + 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る。

#### 【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( i i ) 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 : d i t h i o t h r e i t o l )、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のことをいう。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 $X_1X_2SerX_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}X_{15}$  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 $X_{16}X_{17}X_{18}X_{19}LeuX_{21}X_{22}$  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 $X_{23}X_{24}X_{25}X_{26}X_{27}X_{28}ProX_{30}Thr$  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。

30

40

#### 【0053】

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 $X_1TyrX_3X_4X_5$  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、 $X_5$ 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 $X_6$ Ile $X_8$  $X_9$ Gly $X_{11}$ Gly $X_{13}$  $X_{14}$  $X_{15}$ Tyr $X_{17}$  $X_{18}$  $X_{19}$  $X_{20}$ lys $X_{22}$ であって、アミノ酸 $X_6$ がLys、Gln又はTyrであり、 $X_8$ がGly、Ser又はTyrであり、 $X_9$ がPro又はSerであり、 $X_{11}$ がAsp、Gly又はSerであり、 $X_{13}$ がAsp又はSerであり、 $X_{14}$ がSer又はThrであり、 $X_{15}$ がAsn又はTyrであり、 $X_{17}$ がAsn又はProであり、 $X_{18}$ がAla、Asp、Gly又はGluであり、 $X_{19}$ がAsn、Met又はSerであり、 $X_{20}$ がPhe又はValであり、 $X_{22}$ 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 $X_{23}$  $X_{24}$  $X_{25}$  $X_{26}$  $X_{27}$  $X_{28}$  $X_{29}$  $X_{30}$  $X_{31}$  $X_{32}$  $X_{33}$ AspTyrであって、アミノ酸 $X_{23}$ がArg又はGlnであり、 $X_{24}$ がGly又はLeuであり、 $X_{25}$ がAsp、Gly又はペプチド結合であり、 $X_{26}$ がGly又はペプチド結合であり、 $X_{27}$ がペプチド結合又はTyrであり、 $X_{28}$ がLeu、ペプチド結合又はTyrであり、 $X_{29}$ がGly、Arg又はLeuであり、 $X_{30}$ がAsp、Gly又はGluであり、 $X_{31}$ がTyr、Arg又はAsnであり、 $X_{32}$ がAla、Gly又はTyrであり、 $X_{33}$ がMet又はPheであるものとする配列を含む。

#### 【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ができることも理解されよう。

#### 【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。

#### 【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。

#### 【0057】

10

20

30

40

50

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。

10

#### 【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単一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Kostelny et al. (1992年) J. IMMUNOL. 148: p. 1547 - 1553を参照されたい。

20

#### 【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55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。

30

#### 【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K<sub>d</sub>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K<sub>d</sub>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、100 pM以下又は20 pM以下又は10 pM以下又は5 pM以下のK<sub>D</sub>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、100 pM乃至5 pM又は20 pM乃至5 pM又は15 pM乃至10 pM又は20 pM乃至10 pM乃至15 pM乃至5 pMのK<sub>D</sub>でヒトHGFに結合することができる。特に明記しない限り、K<sub>D</sub>値は実施例6に記載した方法及び条件下で測定する。

40

#### 【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でより低いK<sub>d</sub>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5 pM未満のK<sub>d</sub>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

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7.0 nMとすることができる。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4 MBr-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、50 nM以下、好ましくは、45、40、35、30、25、20、15、10、5、1又は0.5 nM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(1.25 nM)c-Metリン酸化を2 nM以下のIC<sub>50</sub>(表8)で抑制する。

#### II. 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髓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、例えば骨髓腫細胞又は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

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髓腫細胞又は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。

### III. 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。

#### 【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。

#### 【0068】

ヒト化のための公知の一方法では、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、Morrisson, et al. (1984年) P R O C . N A T . A C A D . S C I . 81 : p . 6851 - 6855、Neuberger et al. (1984年) N A T U R E 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。

#### 【0069】

CDR移植と呼ばれる別の方法では、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) N A T U R E 321 : p . 522 - 525、Riechmann et al. (1988年) N A T U R E 332 : p . 323 - 327、Verhoeyen et al. (1988年) S C I E N C E 239 : p . 1534 - 1536並びにWinter (1998年) F E B S L E T T 430 : p . 92 - 94に記載されている。

#### 【0070】



「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 et al.)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(Vaccinex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、カロピオス・ファーマシューティカルズ社(Kalobios Pharmaceuticals, 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」ライブ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」ライブ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産生する。例えば、国際公開第98/24893号パンフレット(Jacobowitz 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

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。

10

#### IV. 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

20

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】

30

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。

40

【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」及び「治療」とは、哺乳動物、特にヒ

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で実施するように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。

#### 【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おり、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。

#### 【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(マック出版(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。

#### 【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

10

20

30

40

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、パーシパニ（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；スピン標識などのスピンプローブ；或いは、カラー粒子、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ができ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

40

【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】

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、固形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Diamandis 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。

10

#### 【0095】

上記標識結合蛋白質はインビボ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ことが企図されている。インビボ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- $^{99m}$  ( $^{99m}\text{Tc}$ ) が挙げられる。また、インビボイメージングにおいて有用な非放射性成分としては、インサイツ(insitu)でプロトン緩和を誘導するニトロキシドスピンラ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 $^{90}$  イットリウム ( $^{90}\text{Yt}$ )、 $^{131}$  ヨウ素 ( $^{131}\text{I}$ ) 及び $^{111}$  インジウム ( $^{111}\text{In}$ ) 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 $^{131}\text{I}$ 、 $^{111}\text{In}$  及び $^{99m}\text{Tc}$  で標識することができる。同様に、造影剤を調製し投与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。

20

30

#### 【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。

40

#### 【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

50

10

## 抗 h H G F モ ノ ク ロ ー ナ ル 抗 体 の 配 列 分 析

【 0 0 9 9 】

20

**【 0 1 0 0 】**

【 0 1 0 1 】

30

40

【 0 1 0 2 】

50

8)との混合物)及び3' I g G 1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。カップ鎖可変領域は、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' カップ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 (Agencourt 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IMG/TV-クエスト (Quest) ウェブサーバー (<http://imgt.cines.fr/textes/vquest>) 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. 1A3、1D3、1F3及び2B8カップ及びI g G 1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 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 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 I g G 1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 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 t a c c a g g a g a g t g g g a g a 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 I g G 1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カップ鎖の完全長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。

【 0 1 0 6 】

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/vquest/>）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。

【 0 1 0 7 】

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。

【 0 1 0 8 】

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）。

【 0 1 0 9 】

（ 1 ） 1 A 3 重鎖可変領域（配列番号 1 ）

【 0 1 1 0 】

【 化 1 】

```

1      atgaactttg ggctcagatt gattttcctt gtccttgttt taaaagggtg gaagtgtgaa
61     gtgcagctgg tggagtctgg gggaggctta gtgcagcctg gagggccct gaaactctcc
121    tgtgcagcct ctgaattcac tttagtaac tattacatgt ctggggtcgc ccagactcca
181    gagaagaggc tgcagtgggt cgcatacatt agtcctgggtg gtggtagctc ctactatcca
241    gccagtgtga agggctgatt caccatctcc agagacaatg ccaagaacac cctgtacctg
301    caaatgacga gtctgaagtc tgaggacaca gccatgtatt actgtgcaag acaaggggat
361    ggttactacg gggactatgc tatggactac tgggggtcaag gaacctcagt caccgtctcc
421    tcag

```

（ 2 ） 1 A 3 カッパ軽鎖可変領域（配列番号 3 ）

【 0 1 1 1 】

【 化 2 】

```

1      atgagtgtgc ccactcaggt cctgggggtg ctgctgctgt ggcttacaga tgccagatgt
61     gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgttt ctgtgggaga aactgtcacc
121    atcacatgtc gagcaagtga gaatatttat agtaatttag catggtatca gcagaaacag
181    ggaaaatctc ctgagctcct ggtctatgct gcaacaaact tagcagatgg tgtgcatca
241    aggttcagtg gcagtggatc aggcacacag ttitccctca agatcaacag cctgcagtct
301    gaagattttg ggacttatta ctgtcaacat ttttggggta ctccgtacac gttcggaggg
361    gggaccaagc tggaaataaa ac

```

（ 3 ） 2 B 8 重鎖可変領域（配列番号 1 1 ）

【 0 1 1 2 】



## 【化3】

1 atgggatgga gctatatcat cctctttttg gtagcaacag ctacagatgt ccaactcccag  
 61 gtccaactgc agcagcctgg ggctgaactg gtgaagcctg ggacttcagt gaagctgtcc  
 121 tgcaaggctt ctggctacac cttcaccacc tactggatgc actgggtgaa tcagaggcct  
 181 ggacaaggcc ttgagtggat tggagagatt aatcctacca acggtcatac taactacaat  
 241 gagaagtica agagcaaggc cacactgact gtagacaaat cctccagcac agcctacatg

## 【0113】

## 【化4】

10

301 caactcagca gcctgacatc tgaggactct gcgggtctatt actgtgcaag aaactatgtt  
 361 ggtagcatct ttgactactg gggccaaggc accactctca cagtctctc ag

(4) 2 B 8 カップ軽鎖可変領域 (配列番号 13)

## 【0114】

## 【化5】

1 atggaatcac agactctggt cttcatatcc atactgctct ggttatatgg tgctgatggg  
 61 aacattgtaa tgacccaatc tcccaaatcc atgtccatgt cagtaggaga gagggtcacc  
 121 ttgagctgca aggccagtga gaatgtgggt tcttatgtat cctggtatca acagaaacca  
 181 gcgcagtctc ctaaactgct gatatacggg gcatccaacc ggaacactgg ggtccccgat  
 241 cgttcacag gcagtggatc tgcaacagat ttcactctga ccatcagcag tgtgcgggct  
 301 gaagaccttg cagattatca ctgtgggcag agttacaact atccgtacac gttcggaggg  
 361 gggaccaggc tggaaataaa ac

20

(5) 2 F 8 重鎖可変領域 (配列番号 21)

## 【0115】

## 【化6】

1 atggaatgga gctgggtctt tctcttctc ctgtcaptaa ctgcagggtt ccactgccag  
 61 gtccagctga agcagtctgg agctgagctg gtgaggcctg ggacttcagt gaagatgtcc  
 121 tgcaaggctt ctggctacac cttcactacc tactatatac actgggtgaa tcagaggcct  
 181 ggacagggcc ttgagtggat tggaaagatt ggtcctggaa gtggtagtac ttactacaat  
 241 gagatgttca aagacaaggc cacattgact gtagacacat cctccagcac agcctacatg  
 301 cagctcagca gcctgacatc tgacgactct gcgggtctatt tctgtgcaag aaggggactg  
 361 ggacgtggct ttgactactg gggccaaggc accactctca cagtctctc ag

30

(6) 2 F 8 カップ軽鎖可変領域 (配列番号 23)

## 【0116】

## 【化7】

40

1 atggagacag acacaatcct gctatgggtg ctgctgctct gggttcagg ctccactggt  
 61 gacattgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt cctagggca gagggccacc  
 121 atctcctgca aggccagcca aagtgtgat tatgatggtg atagtatat caactggtac  
 181 caacagaaac caggacagcc acccaaagtc ctcatctatg ttgcatcaa tctagaatct  
 241 gggatcccag ccaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat  
 301 cctgtggagg aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc aaagtattga ggatcctccc  
 361 acgttcgggtg ctgggaccaa gctggagctg 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 ctgtatctt tctcttcctc ctgtcagtaa ctgaagggtg ccactcccag  
 61 gttcagctgc agcagctcgg ggctgaactg gtgaggcctg ggtcctcagt gaagatttcc  
 121 tgcaaggctt ctggctatgt attcagtagc tactggatga actgggtgaa gcagaggcct

【 0 1 1 8 】

【 化 9 】

181 ggacagggtc ttgagtggat tggacagatt tatcctggag atggtgatag taactacaat  
 241 ggaaacttca agggtaaagc cactactgact gcagacaaat cctccagtac agcctacatg  
 301 cagctcagca gcctaacatc tgaggactct gcggcttatt tctgtgcatc ccagctcggg  
 361 ctacgtgaga actactttga ctactggggc caaggcacca ctctcacagt ctctcag

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 tcagtttctt ggaatcttgt tgctctggtt tccaggtatc  
 61 aaatgtgaca tcaagatgac ccagctcca tcttccatgt atgcatctct aggagagaga  
 121 gtcacaatca cttgcaaggc gagtcaggac attaaaagct attaaagctg gttccagcag  
 181 aaaccaggga aatctcctaa gaccctgac tatcgtgtaa acagattggt agatggggtc  
 241 ccatcaaggt tcagiggcag tggatctggg caagattctt ctctcaccat caccagcctg  
 301 gagaatgaag atatgggaat ttattattgt ctacagtatg atgagtttcc 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 】

【 化 1 1 】

1 atggctgtcc cggctcgttt cctctgcctg gttgcaittc caagcttgtt cctgtcccag  
 61 gtacagctga aggagtcagg acctggcctg gtggcgccct cacagagcct gtccatcact  
 121 tgcactgtct ctgggttttc attaaccagc tatagtttac actgggttcg ccagcctcca  
 181 ggaaagggtc tggaatggct gggagtaata tgggctggtg gaaacacaaa ttataattcg  
 241 tctctcatgt ccagactgac catcaggaaa gacaactcca agagccaagt ttcttaaaa  
 301 atgaacagtc tgcaaaactga tgacacagcc atgtactact gtgccagaga gaggtttgct  
 361 tactggggcc aagggactct ggctactgtc tctgcag

30

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 1 2】

1 atggatttgc aagtcagat ttccagcttc ctgctaata gtcctcagt caaatatcc  
 61 agaggacaaa ttgtctcac ccagctcca gcaatcatgt ctgcatatcc aggggagaag  
 121 gtccatga cctgcagtgc cagctcaagt gtaagttaca tgcactggta ccagcagaag  
 181 tcaggcacct cccccaaaag atggatttat gacacatcca aactggcttc tggagtccct  
 241 gtctgcttca gtggcagtgg gtctgggacc tcttactccc tcacaatcag tagtatggag  
 301 gctgaagatg ctgccactta ttactgccag cagtggagta gtaaccact cacttccgt  
 361 gctgggacca agctggagct gaaac

10

( 1 1 ) 1 D 3 重鎖可変領域 ( 配列番号 5 1 )

## 【 0 1 2 2 】

## 【化 1 3】

1 atgaactttg ggctcagatt gatttccct gtcctgttt taaaagggtg gaagtgtgaa  
 61 gtgcagctgg tggagtctgg gggaggctta gtgcagcctg gagggccct gaaactctcc  
 121 tgtgcagcct ctggattcac ttccagtac tattacatgt ctgggttcg ccagactcca  
 181 gagaagaggc tggagtgggt cgcatacatt agtagtggtg gtggtagcac ctactatcca  
 241 gacagtgtga agggctgatt caccatctcc cgagacaatg ccaagaacac cctgtacctg  
 301 caaatgagca gtctgaagtc tgaggacaca gccatatatt actgtgtgag acaaggggat  
 361 ggttattacg gggactatgc tatggactac tgggtcaag gaacctcagt cactgtctcc  
 421 tcag

20

( 1 2 ) 1 D 3 カッパ軽鎖可変領域 ( 配列番号 5 3 )

## 【 0 1 2 3 】

## 【化 1 4】

1 atgagtgtgc ccactcaggt cctgggggtg ctgctgctgt ggcttacaga tgcagatgt  
 61 gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgtat ctgtgggaga aactgtcacc  
 121 atcacatgtc gaacaagtga gaataattac agtaatttag cgtgggtatca gcagaaacag  
 181 ggaaaatctc ctccagctct aatctatgt gcaacaaact tagcagatgg tgtgccatca  
 241 agggtcagtg gcagtggatc aggcacacag ttccctcca ggaatcaacag cctgcagctc  
 301 gaagattttg ggaggtatca ctgtcaacat ttgggggga ctccgtacac gttcggaggg  
 361 gggaccaaac tggaaataaa ac

30

( 1 3 ) 1 F 3 重鎖可変領域 ( 配列番号 6 1 )

## 【 0 1 2 4 】

## 【化 1 5】

1 atgaactttg ggctcagatt gatttccct gtcctgttt taaaagggtg gaagtgtgag  
 61 gtgcagctgg tggagtctgg gggaggctta gtgcagctg gagggccct gaaactctcc  
 121 tgtgcccct ctggattcac ttccagtaac tattcatgt ctgggttcg ccagactcca  
 181 gagaagaggc tggagtgggt cgcataatatt agtagtggtg gtggtagcac ctactatcca  
 241 gacagtgtga agggctgatt caccatctct agagacaatg ccaagaacac cctgtacctg  
 301 caaatgagca gtctgaagtc tgaggacaca gccatgtatt actgtgtgag acaaggggat  
 361 ggttactacg gggactatgc tatggactac tgggtcaag gaacctcagt caccgtctcc  
 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 ctgctgctgt ggcttacaga tgccagatgt  
 61     gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgtat ctgtgggaga aactgtcacc  
 121    atcacatgtc gagcaagtga gaatatattac agtaatttag catggtatca gcagaaacag

【 0 1 2 6 】

【 化 1 7 】

10

181    ggaaaatctc ctcagctcct ggtctatgat gcaacacact taccagatgg tgtgccatca  
 241    aggttcagtg gcagtggatc aggcacacag tttccctca agatcaacag cctgcagtct  
 301    gaagattttg ggagttatta ctgtcaacat tttggggta ctccgtacac gtttgagggg  
 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     atgaactttg ggctcagatt gattttcctt gtccttgttt taaaagggtgt gaagtgtgaa  
 61     gtgcagctgg tggagtctgg gggaggctta gtgcagcctg gagggtcctt gaaaatctcc  
 121    tgtgcagcct ctggatttac tticagtaac tattcatgt ctggggttcg ccagactcca  
 181    gagaagaggc tggagtgggt cgcatacatt agtagtggtg gtggtagcac ctactatcca  
 241    gacagtgtga agggtcgatt caccatctcc agagacaatg ccaagaacac cctgtacctg  
 301    caaatgaaca gtctgaagtc tgaggacaca gccatgtatt actgtgtaag acaaggagat  
 361    ggttactatg gggactatgc tatggactac tgggggtcaag 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 ctgctgctgt ggcttacaga tgccagatgt  
 61     gacatccaga tgactcagtc gccagcctcc ctatctgtat ctgtgggaga aactgtcacc  
 121    atcacatgtc gagcaagtga gaatatattac attaatattag catggtatca gcagaaacag  
 181    ggaaaatctc ctcagctcct ggtccatgct gcaacaaagt tagcagatgg tgtgccatca  
 241    aggttcagtg gcagtggatc aggcacacag tattccctca agatcaacag cctgcagtct  
 301    gaagattttg ggagttatta ctgtcaacat tttggggta ctccgtacac gttcggaggg  
 361    gggaccaaac tagaaataaa ac

40

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

【 0 1 2 9 】

## 【化 2 0】

1 ccaaaacgac acccccatct gtctatccac tggccctgg atctgtgcc caaactaact  
 61 ccatggtgac cctgggatgc ctggtcaagg gctatttccc tgagccagt acagtgcct  
 121 ggaactctgg atccctgtcc agcgggtgtc acaccttccc agctgtcctg gagtctgacc  
 181 tctacactct gacgagctca gtgactgtcc cctccagccc tcggcccagc gagaccgtca  
 241 cctgcaacgt tgcccacccg gccagcagca ccaagggtga caagaaaatt gtgccagggg  
 301 attgtggtg taagcctgc atatgtacag tcccagaagt atcatctgtc ttcatttcc  
 361 ccccaaagcc caaggatgtg ctcaccatta ctctgactcc taaggtcacg tgtgtgtgtg

10

## 【 0 1 3 0】

## 【化 2 1】

421 tagacatcag caaggatgat cccgagggtcc agttcagctg gttttagat gatgtggagg  
 481 tgcacacagc tcagacgcaa ccccgaggagg agcagttcaa cagcacttc cgctcagtea  
 541 gtgaacttcc catcatgcac caggactggc tcaatggcaa ggagttcaaa tgcagggtca  
 601 acagtgcagc ttccctgcc cccatcgaga aaaccatctc caaaaccaa ggcagaccga  
 661 aggtccaca ggtgtacacc attccacctc ccaaggagca gatggccaag gataaagtca  
 721 gtctgacctg catgataaca gacttcttcc ctgaagacat tactgtggag tggcagtgga  
 781 atgggcagcc agcggagAAC tacaagaaca ctgagccat catgaacag aatggctctt  
 841 acttctgcta cagcaagctc aatgtgcaga agagcaactg ggaggcagga aatacttca  
 901 cctgtctgt gttacatgag ggctgcaca accaccatac tgagaagagc ctctccact  
 961 ctctggtaa atga

20

( 1 8 ) 1 A 3、1 D 3、1 F 3 及び 2 B 8 ( A J 系マウス由来 ) について決定された  
 マウス I g G 1 重鎖定常領域 ( 配列番号 8 2 )

## 【 0 1 3 1】

## 【化 2 2】

```

1      ccaaaacgac acccccatct gtctatccac tggccctgg atctgtgcc caaactaact
61     ccatgggtgac cctgggatgc ctggtaagg gctatttccc tgagccagt acagtgcct
121    ggaactctgg atccctgtcc agcgggtgtc acacctccc agctgtcctg cagtctgacc
181    tctacactct gagcagctca gtgactgtcc cctccagcac ctggcccagc gagaccgtca
241    cctgcaacgt tggccacccg gccagcagca ccaagggtga caagaaaatt gtgcccaggg
301    attgtggtg taagccttgc atatgtacag tcccagaagt atcatctgtc tcatcttcc
361    ccccaaagcc caaggatgtg ctcaccatta ctctgactcc taaggtcacg tgtgtgtgg
421    tagacatcag caaggatgat cccgaggtcc agttcagctg gttttagat gatgtggagg
481    tgcacacagc tcagacgcaa ccccgaggag agcagttcaa cagcactttc cgctcagta
541    gtgaacttcc catcatgcac caggactggc tcaatggcaa ggagttcaaa tgcagggtca
601    acagtgcagc ttccctgccc cccatcgaga aaaccatctc caaaacaaa ggcagaccga
661    aggctccaca ggtgtacacc attccacctc ccaaggagca gatggccaag gataaagta
721    gtctgacctg catgataaca gacttcttcc ctgaagacat tactgtggag tggcagtga
781    atgggcagcc agcggagaac tacaagaaca ctacgcccac catggacaca gatggctctt
841    acttcttcta cagcaagctc aatgtgcaga agagcaactg ggaggcagga aatacttca
901    cctgctctgt gttacatgag ggctgcaca accaccatac tgagaagagc ctctccact
961    ctctggtaa atga

```

( 1 9 ) 対照マウスカッパ軽鎖定常領域 ( V 0 0 8 0 7 ) 並びに 1 D 3、1 F 3 及び 2 B 8 ( A J 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 8 3 )

## 【 0 1 3 2 】

## 【化 2 3】

```

1      gggctgatgc tgcaccaact gtatccatct tcccaccatc cagtgagcag ttaacatctg
61     gaggtgcctc agtcgtgtgc ttctgaaca acttctacc caaagacatc aatgtcaagt
121    ggaagattga tggcagtga cgaacaaatg gcgtcctgaa cagtgggact gatcaggaca
181    gcaaagacag cacctacagc atgagcagca cctcacgtt gaccaaggac gagtatgaac
241    gacataacag ctatacctgt gaggccactc acaagacatc aacttaccac attgtcaaga
301    gcttcaacag gaatgagtgt tag

```

( 2 0 ) 1 D 3、1 F 3 及び 2 B 8 に比し変更されたヌクレオチド ( 下線箇所 ) を 1 個含む 1 A 3 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 8 4 )

## 【 0 1 3 3 】

## 【化 2 4】

```

1      gggctgatgc tgcaccaact gtatccatct tcccaccatc cagtgagcag ttaacatctg
61     gaggtgcctc agtcgtgtgc ttctgaaca acttctacc caaagacatc aatgtcaagt
121    ggaagattga tggcagtga cgaacaaatg gcgtcctgaa cagtgggact gatcaggaca
181    gcaaagacag cacctacagc atgagcagca cctcatgtt gaccaaggac gagtatgaac
241    gacataacag ctatacctgt gaggccactc acaagacatc aacttaccac 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

10

20

30

40

50

チド、 $CDR_1$ 、 $CDR_2$  及び  $CDR_3$  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  $CDR_1$ 、 $CDR_2$  及び  $CDR_3$  配列を別々に整列させて示したものである。

【 0 1 3 4 】

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、 $CDR_1$ 、 $CDR_2$  及び  $CDR_3$  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  $CDR_1$ 、 $CDR_2$  及び  $CDR_3$  配列を別々に整列させて示したものである。

【 0 1 3 5 】

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ドダンス表を表 1 に示した。

【 0 1 3 6 】

【表 1 A】

表 1

配列番号	蛋白質又は核酸
1	重鎖可変領域 1 A 3 - 核酸
2	重鎖可変領域 1 A 3 - 蛋白質
3	軽 (カッパ) 鎖可変領域 1 A 3 - 核酸
4	軽 (カッパ) 鎖可変領域 1 A 3 - 蛋白質
5	重鎖 CDR <sub>1</sub> 1 A 3
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
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 2 B 8 - 核酸
12	重鎖可変領域 2 B 8 - 蛋白質
13	軽 (カッパ) 鎖可変領域 2 B 8 - 核酸
14	軽 (カッパ) 鎖可変領域 2 B 8 - 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 2 F 8 - 核酸
22	重鎖可変領域 2 F 8 - 蛋白質
23	軽 (カッパ) 鎖可変領域 2 F 8 - 核酸
24	軽 (カッパ) 鎖可変領域 2 F 8 - 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 3 B 6 - 核酸
32	重鎖可変領域 3 B 6 - 蛋白質
33	軽 (カッパ) 鎖可変領域 3 B 6 - 核酸
34	軽 (カッパ) 鎖可変領域 3 B 6 - 蛋白質
35	重鎖 CDR <sub>1</sub> 3B6
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 (カッパ) 鎖 CDR <sub>2</sub> 3B6
40	軽 (カッパ) 鎖 CDR <sub>3</sub> 3B6
41	重鎖可変領域 3 D 1 1 - 核酸
42	重鎖可変領域 3 D 1 1 - 蛋白質
43	軽 (カッパ) 鎖可変領域 3 D 1 1 - 核酸
44	軽 (カッパ) 鎖可変領域 3 D 1 1 - 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

【 0 1 3 7 】



【表 1 B】

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 1 D 3－核酸
52	重鎖可変領域 1 D 3－蛋白質
53	軽（カッパ）鎖可変領域 1 D 3－核酸
54	軽（カッパ）鎖可変領域 1 D 3－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 1 F 3－核酸
62	重鎖可変領域 1 F 3－蛋白質
63	軽（カッパ）鎖可変領域 1 F 3－核酸
64	軽（カッパ）鎖可変領域 1 F 3－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 3 A 1 2－核酸
72	重鎖可変領域 3 A 1 2－蛋白質
73	軽（カッパ）鎖可変領域 3 A 1 2－核酸
74	軽（カッパ）鎖可変領域 3 A 1 2－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

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 2 F 8、3 A 1 2、3 B 6 及び 3 D 1 1 の定常領域は配列決定を行わなかったが、これらが全て A J 系マウス由来の抗体であることから、配列決定した 1 D 3、1 F 3 及び 2 B 8 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つ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。

30

## 【 0 1 3 8 】

（ 1 ）完全長 1 A 3 重鎖配列（ 1 A 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 2 2 ）

40

## 【 0 1 3 9 】

## 【化 2 5】

1 atgaactttg ggctcagatt gattttcctt gtccctgttt taaaagggtg gaagtgtgaa  
 61 gtgcagctgg tggagctctg gggaggctta gtgcagcctg gagggtccct gaaactctcc  
 121 tgtgcagcct ctgaattcac ttccagtaac tattacatgt ctggggttcg ccagactcca  
 181 gagaagaggc tcagctgggt cgcatacatt agtctgtgtg gtggtagctc ctactatcca  
 241 gccagtgtga agggctcgatt caccatctcc agagacaatg ccaagaacac cctgtacctg  
 301 caaatgagca gtctgaagtc tgaggacaca gccatgtatt actgtgcaag acaaggggat  
 361 ggttactacg gggactatgc tatggactac tgggggtcaag gaacctcagt caccgtctcc  
 421 tcagccaaaa cgacaccccc atctgtctat ccactggccc ctggatctgc tgcccaact  
 481 aactccatgg tgacctggg atgcctgtgc aagggtatt tccctgagcc agtgacagtg  
 541 acctggaact ctggatccct gtccagcggg gtgcacacct tcccagctgt cctgcagtct  
 601 gacctctaca ctctgagcag ctccagtact gtccctcca gcacctggcc cagcgagacc  
 661 gtcacctgca acgttgcccc cccggccagc agcaccaagg tggacaagaa aattgtgccc  
 721 agggattgtg gttgtaagcc ttgcatatgt acagtccag aagtatcatc tgtcttcac  
 781 tcccccccaa agcccaagga tgtgtctacc attactctga ctccaaagt cactgtgtgt  
 841 gtggtagaca tcagcaagga tgatcccgag gtccagttca gctggtttgt agatgatgtg  
 901 gaggtgcaca cagctcagac gcaaccccgg gaggagcagt tcaacagcac tttccgctca  
 961 gtcagtgaac ttcccatcat gcaccaggac tggctcaatg gcaaggagt ccaatgcagg  
 1021 gtcaacagtg cagctttccc tgcccccatc gagaaaacca tctccaaaac caaaggcaga  
 1081 ccgaaggctc cacaggtgta caccattcca cctcccaagg agcagatggc caaggataaa  
 1141 gtcagtctga cctgcatgat aacagacttc ttcctgaag acattactgt ggagtggcag  
 1201 tggaaatgggc agccagcggg gaactacaag aacactcagc ccatcatgga cacagatggc  
 1261 tcttacttcg tctacagcaa gctcaatgtg cagaagagca actgggaggg aggaaatact  
 1321 ttcacctgct ctgtgttaca tgagggcctg cacaaccacc atactgagaa gaggctctcc  
 1381 cactctcctg gtaaatga

10

( 2 ) 完全長 1 A 3 重鎖配列 ( 1 A 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 2 3 )

20

## 【 0 1 4 0 】

## 【化 2 6】

1 evqlvesggg lvqpggslkl scaaseftfs nyymwvrrt pekrlqwvay ispgggssyy  
 61 pasvkgrfti srdnakntly lqmslksed tamyycarqg dgyygyamd ywggtstvtv  
 121 ssaktppsv yplapgsaaq tnsmtlglc vkgyfpepvt vtwnsgslss gvhtfpavllq  
 181 sdlytlsssv tvpsstwpse tvtcnvahpa sstkvdtkiv prdcgckpci ctvpevssvf  
 241 ifppkpkdvl titltpkvtc vvvdiskddp evqfswfvdd vevhtaqtqp reeqfnstfr  
 301 svselplmhq dwlngkefkf rvnsaafpap iektisktkg rpkapqvtyi pppkeqmakd  
 361 kvsltcmtdt ffpeditvew qwnngpaeny kntqpimtdt gsyfvyskln vqksnweagn  
 421 tftcslvheg lnhhhteksl shspgk

( 3 ) 完全長 1 A 3 軽鎖配列 ( 1 A 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 2 4 )

30

## 【 0 1 4 1 】

## 【化 2 7】

1 atgagtgtgc ccactcaggt cctgggggtt ctgctgctgt ggcttacaga tgccagatgt  
 61 gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgttt ctgtgggaga aactgtcacc  
 121 atcacatgtc gagcaagtga gaataatttat agtaatttag catgggtatca gcagaaacag  
 181 ggaaaatctc ctccagctcc ggtctatgct gcaacaaact tagcagatgg tgtgccatca  
 241 aggttcagtg gcagtggatc aggcacacag ttttccctca agatcaacag cctgcagtct  
 301 gaagattttg ggacttatta ctgtcaacat ttttggggta ctccgtacac gttcggaggg

## 【 0 1 4 2 】

## 【化 2 8】

361 gggaccaagc tggaaataaa acgggctgat gctgcaccaa ctgtatccat cttcccacca  
 421 tccagtgagc agttaacatc tggagggtgcc tcagtctgtg gcttcttgaa caactctctac  
 481 cccaaagaca tcaatgtcaa gtggaagatt gatggcagtg aacgacaaaa tggcgctcctg  
 541 aacagttgga ctgatcagga cagcaaagac agcacctaca gcatgagcag caccctcatg  
 601 ttgaccaagg acgagtatga acgacataac agctatacct gtgaggccac tcacaagaca  
 661 tcaacttcac ccattgtcaa gagcttcaac aggaatgagt gtttag

40

( 4 ) 完全長 1 A 3 軽鎖配列 ( 1 A 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 2 5 )

## 【 0 1 4 3 】

## 【化 2 9】

1 diqmtqspas lsvsvgetvt itcraseny snlawyqqkq gkspqllvya atnldagvps  
 61 rfsqsgsgtq fsklnslqs edfgtyycqh fwgtpytfgg gtleikrad aaptvsifpp  
 121 sseqltsgga svvcflnmfy pkdinvkwi dgserqngvl nswtdqdskd stysmsstim  
 181 ltkdeyerhn sytceathkt stspivksfn rnec

( 5 ) 完全長 2 B 8 重鎖配列 ( 2 B 8 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 2 6 )

## 【 0 1 4 4 】

## 【化 3 0】

1 atgggatgga gctatatcat cctctttttg gtagcaacag ctacagatgt ccactcccag  
 61 gtccaactgc agcagcctgg ggctgaactg gtgaagcctg ggacttcagt gaagctgtcc  
 121 tgcaaggctt ctggctacac cttcaccacc tactggatgc actgggtgaa tcagaggcct  
 181 ggacaaggcc ttgagtggat tggagagatt aatcctacca acggtcatat taactacaat  
 241 gagaagttca agagcaaggc cacactgact gtagacaaat cctccagcac agcctacatg  
 301 caactcagca gcctgacatg tgaggactct gcggtotatt actgtgcaag aaactatggt  
 361 ggtagcatct ttgactactg gggccaaggc accactctca cagtctcctc agccaaaacg  
 421 aaccccccat ctgtctatcc actggccctt ggatctgctg cccaaactaa ctccatgggtg  
 481 accctgggat gcctgggcaa gggctatttc cctgagccag tgacagtgcg ctggaactct  
 541 ggatccctgt ccagcgggtg gcacaccttc ccagctgtcc tgcagtctga cctctacact  
 601 ctgagcagct cagtgcactg cccctccagc acctggccca gcgagaccgt cacctgcaac  
 661 gttgcccacc cggccagcag caccaagggt gacaagaaaa ttgtgcccag ggattgtggt  
 721 gttaagcctt gcatagttac agtcccagaa gtatcatctg tcttcatctt cccccaaag  
 781 cccaaggatg tgctcaccat tactctgact cctaagggtc cgtgtgttgt ggtagacatc  
 841 agcaaggatg atccccaggt ccagttcagc tggttttag atgatgtgga ggtgcacaca  
 901 gctcagacgc aaccccggga ggagcagttc aacagcactt tccgctcagt cagtgaactt  
 961 cccatcatgc accaggactg gctcaatggc aaggagttca aatgcagggt caacagtgc  
 1021 gctttccctg ccccatcgga gaaaaccatc tccaaaacca aaggcagacc gaaggtcca  
 1081 caggtgtaca ccattccacc tccaaggag cagatggcca aggataaagt cagtctgacc  
 1141 tgcatgataa cagacttctt ccctgaagac attactgtgg agtggcagtg gaatgggcag  
 1201 ccagcggaga actacaagaa cactcagccc atcatggaca cagatggctc ttacttcgtc  
 1261 tacagcaagc tcaatgtgca gaagagcaac tgggaggcag gaaatacttt cacctgctct  
 1321 gtgttacatg agggcctgca caaccaccat actgagaaga gcctctccca ctctcctggt  
 1381 aaatga

10

20

( 6 ) 完全長 2 B 8 重鎖配列 ( 2 B 8 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 2 7 )

## 【 0 1 4 5 】

## 【化 3 1】

1 qvqlqqpgae lvkpgtsvkl sckasgytft tywmhwnqr pgqglewige inptnghtny  
 61 nekfkskatl tvdkssstay mqlssltsed savyycarny vgsifdywgq gttltvssak  
 121 ttpsvypla pgaaqtnsm vtlgclvkg fpepvtvtwn sgsllsgvht fpavlgdly  
 181 tlsssvtpps stwpsetvtc nvahpasstk vdkkivprdc gkpcictvp evssvfifpp  
 241 kpkdvltil tpkvtcvvvd iskddpevgf swfvddvevh taqtqpreeq fnstfrsvse

30

## 【 0 1 4 6 】

## 【化 3 2】

301 lpimhqdwln gkefkcrvns aafpapiekt isktkgrpka pqvytipppk eqmakdkvsl  
 361 tcmitdffe ditvewqwnq gpaenykntq pimtdgisyf vysklnvqks nweagntftc  
 421 svlhaglhn htekslshsp gk

40

( 7 ) 完全長 2 B 8 軽鎖配列 ( 2 B 8 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 2 8 )

## 【 0 1 4 7 】

## 【化 3 3】

```

1 atggaatcac agactctggt cttcatatcc atactgctct ggttatatgg tgctgatggg
61 aacattgtaa tgacccaatc tcccaaatcc atgtccatgt cagtaggaga gagggtcacc
121 ttgagctgca aggccagtga gaatgtgggt tcttatgtat cctgggtatca acagaaacca
181 gcgcagtctc cttaaactgct gatatacggg gcatccaacc ggaacactgg ggtccccgat
241 cgcttcacag gcagtggtatc tgcaacagat ttcaactctga ccatcagcag tgtgcgggct
301 gaagaccttg cagattatca ctgtgggcag agttacaact atccgtacac gttcggaggg
361 gggaccaggc tggaaataaa acgggctgat gctgcaccaa ctgtatccat cttcccacca
421 tccagtgaag agttaacatc tggagggtgc tcagtcgtgt gcttcttgaa caacttctac
481 cccaaagaca tcaatgtcaa gtggaagatt gatggcagtg aacgacaaaa tggcgtcctg
541 aacagttgga ctgatacagga cagcaaagac agcacctaca gcatgagcag caccctcagc
601 ttgaccaagg acgagtatga acgacataac agctatacct gtgaggccac tcacaagaca
661 tcaacttcac ccattgtcaa gagcttcaac aggaatgagt gttag

```

10

( 8 ) 完全長 2 B 8 軽鎖配列 ( 2 B 8 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 2 9 )

## 【 0 1 4 8 】

## 【化 3 4】

```

1 nivmtqspks mmsvsgervt lsckasenvv syvswyqqkp aqspklliyy asnrntgvpd
61 rftgsgsatd ftltissvra edladyhcgq synpytfgg gtrleikrad aaptvsifpp
121 sseqltsgga svvcflnnfy pkdinvkwil dgserqngvl nswtdqdskd stysmsstlt
181 ltkdeyerhn sytceathkt stspivksfn rnec

```

( 9 ) 完全長 2 F 8 重鎖配列 ( 2 F 8 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 3 0 )

20

## 【 0 1 4 9 】

## 【化 3 5】

```

1 atggaatgga gctgggtctt tctcttcttc ctgtcagtaa ctgcagggtg ccactgccag
61 gtccagctga agcagctctg agctgagctg gtgaggcctg ggacttcagt gaagatgtcc
121 tgcaaggctt ctggctacac cttaactacc tactatatac actgggtgaa tcagaggcct
181 ggacagggcc ttgagtggat tggaaagatt ggtcctggaa gtggtagtag ttactacaat
241 gagatgttca aagacaaggc cacattgact gtagacacat cctccagcac agcctacatg
301 cagctcagca gcctgacatc tgacgactct ggggtctatt tctgtgcaag aaggggactg
361 ggacgtggct ttgactactg gggccaaggc accactctca cagtctcttc agccaaaacg
421 acaccccat ctgtctatcc actggccctt ggatctgctg cccaaactaa ctccatgggtg
481 accctgggat gcctgggtcaa gggctatttc cctgagccag tgacagttag ctggaactct
541 ggatccctgt ccagcgggtg gcacaccttc ccagctgtcc tgagctctga cctctacact
601 ctgagcagct cagtgtactg cccctccagc acctggccca gcgagaccgt cactgcaac
661 gttgcccacc cggccagcag caccagggtg gacaagaaaa ttgtgcccag ggattgtggg
721 tgtaagcctt gcatagtgac agtcccagaa gtatcatctg tcttcatctt cccccaaag
781 cccaaggatg tgctcaccat tactctgact cctaagggtc cgtgtgttgt ggtagacatc
841 agcaaggatg atcccagggt ccagttcagc tgggtttgtg atgatgtgga ggtgcacaca
901 gctcagacgc aaccccgga ggagcagttc aacagcactt tccgctcagt cagtgaactt
961 cccatcatgc accaggactg gctcaatggc aaggagttca aatgcagggt caacagtgca
1021 gctttccctg ccccatcga gaaaaccatc tccaaaacca aaggcagacc gaaggctcca
1081 caggtgtaca ccattccacc tccaaggag cagatggcca aggataaagt cagtctgacc
1141 tgcattgataa cagacttctt ccctgaagac attactgtgg agtggcagtg gaatgggcag

```

30

## 【 0 1 5 0 】

## 【化 3 6】

40

```

1201 ccagcggaga actacaagaa cactcagccc atcatggaca cagatggctc ttacttcgtc
1261 tacagcaagc tcaatgtgca gaagagcaac tgggagggcag gaaatacttt cacctgctct
1321 gtgtttacatg agggcctgca caaccacat actgagaaga gcctctccca ctctcctggg
1381 aaatga

```

( 1 0 ) 完全長 2 F 8 重鎖配列 ( 2 F 8 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 3 1 )

## 【 0 1 5 1 】

## 【化 3 7】

```

1 qvqlkqsgae lvrpgtsvkm sckasgytft tyvihwvnr pgqglewigk igpgsgstyy
61 nemfkdkatl tvdtssstay mqlssltsdd savyfcarrg lgrgfdywgg gttltvssak
121 ttpssvyppla pgsaaqtnsm vtlgclvkgy fpepvtvtwn sgsllsgvht fpavqlqsdly
181 tlsssvtvpst stwpsetvtc nvahpasstk vdkkivprdc gckpcictvp evssvfifpp
241 kpkdvltilt tpkvtcvvvd iskddpevqf swfvddvevh taqtqpreeq fnstfrsvse
301 lpimhqdwln gkefkcrvns aafpapiekt isktkgrpka pqvytipppk eqmakdkvsl
361 tcmitdffpe ditvewqwnq gpaenykntq pimtdgtsyf vysklinvqs nweagntftc
421 svlheglhnh htekslshsp gk

```

( 1 1 ) 完全長 2 F 8 軽鎖配列 ( 2 F 8 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 3 2 )

10

【 0 1 5 2 】

## 【化 3 8】

```

1 atggagacag acacaatcct gctatgggtg ctgctgctct ggggtccagg ctccactggg
61 gacattgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc
121 atctcctgca aggccagcca aagtgttgat tatgatggta atagttatat caactgggtac
181 caacagaaac caggacagcc acccaaagtc ctcatctatg ttgcatccaa tctagaatct
241 gggatcccag ccaggttttag tggcagtggtg tctgggacag acttcaccct caacatccat
301 cctgtggagg aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc aaagtattga ggatccctcc
361 acgttcgggtg ctgggaccaa gctggagctg aaacgggctg atgctgcacc aactgtatcc
421 atcttcccac catccagtga gcagttaaca tctggaggtg cctcagtcgt gtgcttcttg
481 aacaacttct accccaaaga catcaatgtc aagtgggaaga ttgatggcag tgaacgacaa
541 aatggcgctc tgaacagttg gactgatcag gacagcaaag acagcaccta cagcatgagc
601 agcacccctc cgttgaccaa ggacgagtat gaacgacata acagctatac ctgtgaggcc
661 actcacaaga catcaacttc acccattgtc aagagcttca acaggaatga gtgttag

```

20

( 1 2 ) 完全長 2 F 8 軽鎖配列 ( 2 F 8 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 3 3 )

【 0 1 5 3 】

## 【化 3 9】

```

1 divltqspas lavslgqrat isckasqsvd ydgnsyinwy qqkpggppkv liyvasnles
61 giparfsgsg sgtdftlnih pveeedaaty ycqqsiedpp tfgagtklel kradaaptvs
121 ifppsseqlt sggasvvcfl nnfypkdiv kwkidgserq ngvlinswtdq dskdstysms
181 stltltkdey erhnsytcea thktstspiv ksfnrnec

```

( 1 3 ) 完全長 3 B 6 重鎖配列 ( 3 B 6 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 3 4 )

30

【 0 1 5 4 】

## 【化 4 0】

```

1 atggaatggc cttgtatctt tctcttctc ctgtcagtaa ctgaagggtg ccactcccag
61 gttcagctgc agcagtcctg ggctgaactg gtgaggcctg ggtcctcagt gaagatttcc
121 tgcaaggctt ctggctatgt attcagtagc tactggatga actgggtgaa gcagaggcct
181 ggacagggtc ttgagtggat tggacagatt tatcctggag atggtgatag taactacaat

```

【 0 1 5 5 】

## 【化 4 1】

241 ggaaacttca aggggtaaagc cacactgact gcagacaaat cctccagtac agcctacatg  
 301 cagctcagca gcctaacatc tgaggactct gcggtctatt tctgtgcac ccagctcggg  
 361 ctacttgaga actactttga ctactggggc caaggcacca ctctcacagt ctctcagcc  
 421 aaaacgacac ccccatctgt ctatccactg gccctggat ctgctgcca aactaactcc  
 481 atggtgaccc tgggatgcct ggtcaagggc tatttccctg agccagtgc agtgacctgg  
 541 aactctggat ccctgtccag cgggtgtgcac accttcccag ctgtcctgca gtctgacctc  
 601 tacactctga gcagctcagt gactgtcccc tccagcacct ggcccagcga gaccgtcacc  
 661 tgcaacgttg cccaccggc cagcagcacc aagggtggaca agaaaattgt gcccagggat  
 721 tgtggttgta agccttgcat atgtacagtc ccagaagtat catctgtctt catcttccc  
 781 ccaaagccca aggatgtgct caccattact ctgactccta aggtcacgtg tgtgtggta  
 841 gacatcagca aggatgatcc cgaggtccag ttcagctggt ttgtagatga tgtggaggtg  
 901 cacacagctc agacgcaacc cggggaggag cagttcaaca gcactttccg ctccagtcagt  
 961 gaacttccca tcatgcacca ggactggctc aatggcaagg agttcaaag cagggtcaac  
 1021 agtgcagctt tccctgcccc catcgagaaa accatctcca aaaccaagg cagaccgaag  
 1081 gctccacagg tgtacacat tccacctccc aaggagcaga tggccaagg taaagtcagt  
 1141 ctgacctgca tgataacaga cttcttccct gaagacatta ctgtggagt gcaagtgaat  
 1201 gggcagccag cggagaacta caagaacact cagcccatca tggacacaga tggctcttac  
 1261 ttcgtctaca gcaagctcaa tgtgcagaag agcaactggg aggcaggaaa tactttcacc  
 1321 tgctctgtgt tacatgaggg cctgcacaac caccatactg agaagagcct ctcccactct  
 1381 cctggtaaat ga

10

( 1 4 ) 完全長 3 B 6 重鎖配列 ( 3 B 6 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 3 5 )

【 0 1 5 6 】

【化 4 2】

20

1 qvqlqsggae lvrgssvki sckasgyvfs sywmnvwkqr pgqglewigq iypgdgdsny  
 61 ngnfkgkatl tadkssstay mqlssltted savyfcasql glrenyfdyw gqgttltvss  
 121 akttppsvyp lapgsaaqtn smvtlgclvk gyfpepvtvt wnsqslssgv htftpavlgsd  
 181 lytlsssvtv psstwpsetv tcnvhpas tkvdkkivpr dcgckpcict vpevssvfif  
 241 ppkpkdvlti tltpkvtcvv vdiskddpev qfswfvddve vhtagtqpre eqfnstfrsv  
 301 selpimhqdw lngkefkcrv nsaafpapie ktisktkgrp kapqvytipp pkeqmakdkv  
 361 sltcmtdff peditvewqw ngqpaenykn tqpimtdgfs yfvysklinvq ksnweagntf  
 421 tcsvlheglh nhhtekslsh spgk

( 1 5 ) 完全長 3 B 6 軽鎖配列 ( 3 B 6 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 3 6 )

【 0 1 5 7 】

【化 4 3】

30

1 ATGgacATGa ggaccocctgc tcagtttctt ggaatcttqt tgctctgggt tccaggtatc  
 61 aaatgtgaca tcaagatgac ccagtctcca tcttccatgt atgcattctt aggagagaga  
 121 gtcacaatca cttgcaaggc gactcaggac attaaaagct atttaagctg gttccagcag  
 181 aaaccaggga aatctcctaa gacctgatc tatcgtgtaa acagattggt agatggggtc  
 241 ccatcaaggt tcaagtggcag tggatctggg caagattctt ctctccacct caccagcctg  
 301 gagaatgaag atatgggaat ttattattgt ctacagtatg atgagtttcc gttcacgttc  
 361 ggaggggggga ccaagctgga aataaagcgg gctgatgctg caccaactgt attcatcttc  
 421 ccaccatcca gtgagcagtt aacatctgga ggtgcctcag tcgtgtgctt cttgaacaac  
 481 ttctaccca aagacatcaa tgtcaagtgg aagattgatg gcagtgaacg acaaaatggc  
 541 gtctgaaca gttggactga tcaggacagc aaagacagca cctacagcat gagcagcacc  
 601 ctcacgttga ccaaggacga gtatgaacga cataacagct atacctgtga ggccactcac  
 661 aagacatcaa cttcaccat tgtcaagagc ttcaacagga atgagtgtta g

40

( 1 6 ) 完全長 3 B 6 軽鎖配列 ( 3 B 6 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 3 7 )

【 0 1 5 8 】

【化 4 4】

1 dikmtqspss myaslgervt itckasqdik sylswfqgkp gkspktliyr vnrlvdgvps  
 61 rfsqsgsgqd ssltitslen edmglyyclq ydefpftfgg gtleikrad aaptvsifpp  
 121 sseqltsgga svvcflnnfy pkdinvkwki dgserqngvl nswtdqgskd stysmsstlt  
 181 ltkdeyerhn sytceathkt stspivksfn rne

( 1 7 ) 完全長 3 D 1 1 重鎖配列 ( 3 D 1 1 重鎖可変領域及び I g G 1 定常領域 ) をコ

50

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 3 8）

【 0 1 5 9 】

【 化 4 5 】

```

1  atggctgtcc cggtgctgtt cctctgcctg gttgcatttc caagctgtgt cctgtcccag
61  gtacagctga aggagtcagg acctggcctg gtggcgccct cacagagcct gtccatcact
121 tgcactgtct ctgggttttc attaaccagc tatagtttac actgggttcg ccagcctcca
181 ggaaagggtc tggaaatggct gggagtaata tgggctgggtg gaaacacaaa ttataattcg
241 tctctcatgt ccagactgac catcaggaaa gacaactcca agagccaagt tttcttaaaa
301 atgaacagtc tgcaaaactga tgacacagcc atgtactact gtgccagaga gagggttgct
361 tactggggcc aagggactct ggtcactgtc tctgcagcca aaacgacacc cccatctgtc
421 tatccactgg cccctggatc tgetgcccac actaaactcca tggtgaccct gggatgcctg
481 gtcaagggct atttccctga gccagtgaac gtgacctgga actctggatc cctgtccagc
541 ggtgtgcaca ccttcccagc tgtcctgcag tctgacctct acactctgag cagctcagtg
601 actgtccctt ccagcacctg gccagcgag accgtcacct gcaacgttgc ccaccggcc
661 agcagcacca aggtggacaa gaaaattgtg cccagggatt gtggttgtaa gccttgcata
721 tgtacagtcc cagaagtatc atctgtcttc atcttcccc caaagcccaa ggatgtgctc
781 accattactc tgactcctaa ggtcacgtgt gttgtggtag acatcagcaa gcatgatccc
841 gaggtccagt tcagctggtt tgtagatgat gtggagggtg acacagctca gacgcaaccc
901 cgggaggagc agttcaacag cactttccgc tcagtcagtg aacttcccat catgcaccag
961 gactggctca atggcaagga gttcaaatgc agggccaaca gtgcagcttt cctgtccccc
1021 atcgagaaaa ccatctccaa aaccaaaggc agaccgaagg ctccacaggt gtacaccatt
1081 ccacctcccc aggagcagat ggccaaggat aaagtcagtc tgacctgcat gataacagac
1141 tcttccctg aagacattac tgtggagtgg cagtggaatg ggcagccagc ggagaactac
1201 aagaacactc agcccatcat ggacacagat ggctcttact tegtctacag caagctcaat
1261 gtgcagaaga gcaactggga ggcaggaaat actttcacct gctctgtgtt acatgagggc
1321 ctgcacaacc accatactga gaagagcctc tccactctc ctggtaaatg a

```

10

（ 1 8 ）完全長 3 D 1 1 重鎖配列（ 3 D 1 1 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 3 9）

20

【 0 1 6 0 】

【 化 4 6 】

```

1  qvqlkesgpg lvapsqslsi tctvsgfslt syslhwvrrp pgkglewlgv iwaggntnyn
61  sslmsrltir kdnsksqvfl kmnslqtdtd amyycarerf aywgggtlvt vsaakttpps
121 vyplapgsaa qtnsmvtlgc lvkgyfpepv tvtwnsgsls sgvhtfpavl qsdlytlsss
181 vtvpsstwps etvtcnvahp asstkvdkki vprdcgckpc ictvpevssv fifppkpkdv
241 ltltltpkvt cvvvdiskdd pevqfswfvd dvehvtaqtq preeqfnstf rsvselpimh
301 qdwlngkefk crvnsaafpa piektisktk grpkapqvyt ippkpeqmak dkvsltcmi
361 dffpeditive wqwnqgpaen ykntqpimdt dgsyfvyskl nvqksnweag ntftcslvhe
421 glnhhhteks lshspgk

```

30

（ 1 9 ）完全長 3 D 1 1 軽鎖配列（ 3 D 1 1 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 0）

【 0 1 6 1 】

【 化 4 7 】

```

1  atggattttc aagtgcagat tttcagcttc ctgctaataca gtgcctcagt caaaatatcc
61  agaggacaaa ttgttctcac ccagtcctcca gcaatcatgt ctgcatatcc aggggagaag
121 gtcaccatga cctgcagtgc cagctcaagt gtaagttaca tgcactggta ccagcagaag
181 tcaggcacct ccccaaaaag atggatttat gacacatcca aactggcttc tggagtccct
241 gctcgcttca gtggcagtgg gtctgggacc tcttactccc tcacaatcag tagtatggag
301 gctgaagatg ctgccactta ttactgccag cagtggagta gtaaccact caggttcggg
361 gctgggacca agctggagct gaaacgggct gatgctgcac caactgtatc catcttccca
421 ccatccagtg agcagttaac atctggaggt gcctcagtcg tgtgcttctt gaacaacttc
481 taccacaaag acatcaatgt caagtggaaag attgatggca gtgaacgaca aaatggcgtc
541 ctgaacagtt ggactgatca ggacagcaaa gacagcacct acagcatgag cagcaccctc
601 acgttgacca aggacgagta tgaacgacat aacagctata cctgtgaggc cactcacaag
661 acatcaactt caccatttgt caagagcttc aacaggaatg agtggttag

```

40

（ 2 0 ）完全長 3 D 1 1 軽鎖配列（ 3 D 1 1 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 1）

【 0 1 6 2 】

## 【化 4 8】

1 givltqspai msaypgekv mtcsasssvs ymhwyqqksg tspkrwiydt sklasgvpar  
 61 fsgsgsgtsy sltissmeae daatyycqgw ssnpltfag tklelkrada aptvsifpps  
 121 seqltsggas vvcflnnfyp kdinvkwkid gserqngvln swtdqdsksd tysmsstltl  
 181 tkdeyerhns ytceathkts tspivksfnr nec

( 2 1 ) 完全長 1 D 3 重鎖配列 ( 1 D 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 2 )

## 【 0 1 6 3 】

## 【化 4 9】

1 atgaactttg ggctcagatt gatttttcctt gtccttggtt taaaagggtg gaagtgtgaa  
 61 gtgcagctgg tggagtctgg gggaggctta gtgcagcctg gagggtccct gaaactctcc  
 121 tgtgcagcct ctggattcac ttccagtgac tattacatgt cttgggttcg ccagactcca  
 181 gagaagaggc tggagtgggt cgcatacatt agtagtggtg gtggttagcac ctactatcca  
 241 gacagtgtga agggctcgatt caccatctcc cgagacaatg ccaagaacac cctgtacctg  
 301 caaatgagca gtctgaagtc tgaggacaca gccatatatt actgtgtgag acaaggggat  
 361 gggtattacg gggactatgc tatggactac tgggggtcaag gaacctcagt catcgtctcc  
 421 tcagccaaaa cgacaccccc atctgtctat ccactggccc ctggatctgc tgcccaaaact  
 481 aactccatgg tgacctggg atgcctgggc aagggtctatt tccctgagcc agtgacagtg  
 541 acctggaact ctggatccct gtccagcggg gtgcacacct tcccagctgt cctgcagctc  
 601 gacctctaca ctctgagcag ctccagtgact gtccctcca gcacctggc cagcgagacc  
 661 gtcacctgca acgttgccca cccggccagc agcaccaagg tggacaagaa aattgtgccc  
 721 agggattgtg gttgtaagcc ttgcatatgt acagtcccag aagtatcatc tgtcttcac  
 781 tcccccccaa agcccaagga tgtgtccacc attactctga ctcccaaggt cacgtgtgtt  
 841 gtggttagaca tcagcaagga tgatcccag gtccagttca gctgggttgt agatgatgtg  
 901 gagggtgcaca cagctcagac gcaaccccg gaggagcagt tcaacagcac tttccgctca  
 961 gtcagtgaac ttcccatcat gcaaccaggac tggctcaatg gcaaggagt ccaatgcagg  
 1021 gtcaacagtg cagctttccc tgcccccatc gagaaaacca tctccaaaac caaaggcaga  
 1081 ccgaaggctc cacagggtga caccattcca cctcccaagg agcagatggc caaggataaa  
 1141 gtcagtctga cctgcatgat aacagacttc tccctgaag acattactgt ggaagtggcag  
 1201 tgggaatgggc agccagcggg gaactacaag aacactcagc ccactatgga cagagatggc  
 1261 tcttacttcg tctacagcaa gctcaatgtg cagaagagca actggggaggc aggaaatact  
 1321 ttcacctgct ctgtgttaca tgagggcctg cacaaccacc atactgagaa gagcctctcc  
 1381 cactctcctg gtaaatga

10

20

( 2 2 ) 完全長 1 D 3 重鎖配列 ( 1 D 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 3 )

## 【 0 1 6 4 】

## 【化 5 0】

1 evqlvesggg lvqpggslkl scaasgftfs dyymwvrrt pekrlewvay issgggstyy  
 61 pdsvkgrfti srdnakntly lqmsslksed taiyycvrqg dgyygyamd ywgqgtsviv  
 121 ssakttppsv yplapgsaaq tnsmtlgl vkgyfpepvt vtwnsgslss gvhtfpavlg  
 181 sdlytlsssv tvpsstwpse tvtcnvahpa sstkvdkkiv prdcgckpci ctvpevssvf  
 241 ifppkpkdvl titltpkvtc vvvdiskddp evqfswfvdd vevhtaqtqp reeqinstfr  
 301 svselplmhq dwlngkefk rvnsaafpap iektisktkg rpkapqvyti pppkeqmakd  
 361 kvsitcmtd ffpeditvew qwnqcpaeny kntqpimtd gsyfvyskln vqksnweagn  
 421 tftcsvlheg lnhhteksl shspgk

30

( 2 3 ) 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 4 )

## 【 0 1 6 5 】

## 【化 5 1】

1 atgagtgtgc ccactcaggt cctgggggttg ctgctgctgt ggcttacaga tgtcagatgt  
 61 gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgtat ctgtgggaga aactgtcacc  
 121 atcacatgtc gaacaagtga gaatatctac agtaatttag cgtgggtatca gcagaaacag  
 181 ggaaaatctc ctccagctcct aatctatgct gcaacaaact tagcagatgg tgtgccatca  
 241 aggttcagtg gcagtggtatc aggcacacag tttccctca ggatcaacag cctgcagctc  
 301 gaagattttg ggaggtatta ctgtcaacat ttttggggga ctccgtacac gttcggaggg  
 361 gggaccaaac tggaaataaa acgggctgat gctgcaccaa ctgtatccat cttcccacca  
 421 tccagtggagc agttaacatc tggaggtgcc tcagtcgtgt gcttcttgaa caactctac  
 481 cccaaagaca tcaatgtcaa gtggaagatt gatggcagtg aacgacaaaa tggcgctcctg  
 541 aacagttgga ctgatcagga cagcaaagac agcactaca gcattgagcag caccctcacg  
 601 ttgaccaagg acgagtatga acgacataac agctatacct gtgaggccac tcacaagaca  
 661 tcaacttcac ccattgtcaa gagcttcaac aggaatgagt 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 fsrlrinslqs edfgryycqh fwgtpytfgg gtleikrad aaptvsifpp
121 sseqltsgga svvcflnnfy pkdinvkwki dgserqngvl nswtdqdskd stysmsstlt
181 ltkdeyerhnn sytceathkt stspivksfn rnec

```

( 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 )

【 0 1 6 7 】

【 化 5 3 】

```

1 atgaactttg ggctcagatt gattttcctt gtccttggtt taaaagggtgt gaagtgtgag
61 gtgcagctgg tggagctctg gggaggctta gtgcagctctg gagggtccct gaaactctcc
121 tgtgcggcct ctggattcac ttccagtaac tatttcatgt cttgggttcg ccagactcca
181 gagaagaggc tggagtggtt cgcataatatt agtagtggtg gtggtagcac ctactatcca
241 gacagtggtg agggctcgatt caccatctct agagacaatg ccaagaacac cctgtacctg
301 caaatgagca gtctgaagtc tgaggacaca gccatgtatt actgtgtaag ccaaggggat
361 gggtactacg gggactatgc tatggactac tggggtcaag gaacctcagt caccgtctcc

```

【 0 1 6 8 】

【 化 5 4 】

```

421 tcagccaaaa cgacaccccc atctgtctat ccactggccc ctggatctgc tgcccaaaact
481 aactccatgg tgaccctggg atgcctgggc aagggtctatt tccctgagcc agtgacagtg
541 acctggaact ctggatccct gtccagcggg gtgcacacct tccagctgt cctgcagtct
601 gacctctaca ctctgagcag ctccagtact gtccctcca gcacctggcc cagcgagacc
661 gtcacctgca acgttgccca cccggccagc agcaccaagg tggacaagaa aattgtgccc
721 agggattgtg gttgttaagcc ttgcatatgt acagtcccag aagtatcatc tgtcttcatc
781 tcccccccaa agcccaagga tgtgtctacc attactctga ctccaaagg cactgtgtgt
841 gtggttagaca tcagcaagga tgatcccgag gtccagttca gctgggttgt agatgatgtg
901 gaggtgcaca cagctcagac gcaaccccgg gaggagcagt tcaacagcac tttccgctca
961 gtcagtgaac tccccatcat gcaccaggac tggctcaatg gcaaggagtt caaatgcagg
1021 gtcaacagtg cagctttccc tgcccccatc gagaaaacca tctccaaaac caaaggcaga
1081 ccgaaggctc cacagggtga caccattcca cctcccaagg agcagatggc caaggataaa
1141 gtcagtctga cctgcatgat aacagacttc ttcctgaag acattactgt ggagtggcag
1201 tgggaatggc agccagcggg gaactacaag aacactcagc ccactcatga cacagatggc
1261 tcttacttcg tctacagcaa gctcaatgtg cagaagagca actgggaggc aggaaatact
1321 ttcacctgct ctgtgttaca tgagggcctg cacaaccacc atactgagaa gagcctctcc
1381 cactctcctg gtaaatga

```

( 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 nyfmswvrrt pekrlewvay issgggstyy
61 pdsvkgrfti srdnakntly lqmslksed tamyycvrrg dgyygyamd ywgqgtsvtv
121 ssakttppsv yplapgsaaq tnsmtlgcl vkgyfpepvt vtwnsgslss gvhtfpavlq
181 sdlytlsssv tvpsstwpse tvtcnvahpa sstkvdkkiv prdcgckpci ctvpevssvf
241 ifppkpkdvl titltpkvte vvvdiskddp evqfswfvdd vevhtagtqp reeqfnstfr
301 svselpimhq dwlngkefkc rvnsaafpap iektisktkg rpkapqvyti pppkegmakd
361 kvsiltcmtd ffpeditvew qwnqgpaeny kntqpimtdt gsyfvyskln vqksnweagn
421 tftcslvheg lnhhhteksl shspgk

```

( 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 5 6】

```

1 atgagtgtgc ccactcaggt cctgggggttg ctgctgctgt ggcttacaga tgccagatgt
61 gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgtat ctgtgggaga aactgtcacc
121 atcacatgtc gagcaagtga gaatatattac agtaatttag catggatatca gcagaaacag
181 ggaaaatctc ctcagctcct ggtctatgat gcaacacact taccagatgg tgtgccatca
241 aggttcagtg gcagtggatc aggcacacag ttttccctca agatcaacag cctgcagtct
301 gaagattttg ggagttatta ctgtcaacat ttttggggta ctccgtacac gtttggaggg
361 gggaccagac tggaaattaa acgggctgat gctgcaccaa ctgtatccat cttcccacca
421 tccagtgagc agttaacatc tggaggtgcc tcaagtcgtg gcttcttgaa caacttctac
481 cccaaagaca tcaatgtcaa gtggaagatt gatggcagtg aacgacaaaa tggcgctctg
541 aacagttgga ctgatcagga cagcaaagac agcacctaca gcatgagcag caccctcacg
601 ttgaccaagg acgagtatga acgacataac agctatacct gtgaggccac tcacaagaca
661 tcaacttcac ccattgtcaa gagcttcaac aggaatgagt gttag

```

10

( 2 8 ) 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 9 )

## 【 0 1 7 1 】

## 【化 5 7】

```

1 diqmtqspas lsvsvgetvt itcraseny snlawyqqkq gkspqllvyd athlpdgvps
61 rfsqsgsgtq fslkinslqs edfgyycqh fwgtpytfgg gtrleikrad aaptvsifpp
121 sseqltsgga svvcflnnfy pkdinvkwi dgserqngvl nswtdqgskd stymsstlt
181 ltkdeyerhn sytceathkt stspivksfn rnec

```

( 2 9 ) 完全長 3 A 1 2 重鎖配列 ( 3 A 1 2 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 5 0 )

20

## 【 0 1 7 2 】

## 【化 5 8】

```

1 atgaactttg ggctcagatt gattttcctt gtccttggtt taaaagggtg gaagtgtgaa
61 gtgcagctgg tggagtctgg gggaggctta gtgcagcctg gaggggtccct gaaaatctcc
121 tgtgcagcct ctggatttac tttcagtaac tatttcatgt cttgggttcg ccagactoca
181 gagaagaggc tggagtgggt cgcatacatt agtagtggtg gtggttagcac ctactatcca
241 gacagtgtga agggctgatt caccatctcc agagacaatg ccaagaacac cctgtacctg
301 caaatgaaca gtctgaagtc tgaggacaca gccatgtatt actgtgtaag acaaggagat
361 ggttactatg gggactatgc tatggactac tggggtcaag gaacctcagt caccgtctcc
421 tcagccaaaa cgacaccccc atctgtctat ccactggccc ctggatctgc tgcccaaaact
481 aactccatgg tgacctggg atgcctggtc aagggtctatt tccctgagcc agtgacagtg
541 acctggaact ctggatccct gtccagcgtg gtgcacacct tcccagctgt cctgcagtct
601 gacctctaca ctctgagcag ctcaagtact gtccctcca gacacctggc cagcgagacc
661 gtcacctgca acgttgccca ccgggcccag agcaccaagg tggacaagaa aattgtgccc
721 agggattgtg gttgtaagcc ttgcatatgt acagtcccag aagtatcatc tgtcttcatc
781 tcccccccaa agcccaagga tgtgctcacc attactctga ctctaaggt cacgtgtgtt
841 gtggttagaca tcagcaagga tgatccccag gtccagttca gctggtttgt agatgatgtg
901 gaggtgcaca cagctcagac gcaaccccg gaggagcagt tcaacagcac tttccgtcca
961 gtcagtgaac ttcccatcat gcaccaggac tggctcaatg gcaaggagt caaatgcagg
1021 gtcaacagtg cagcttcccc tgcccccatc gagaaaacca tctccaaaac caaaggcaga
1081 ccgaaggctc cacaggtgta caccattcca cctcccaagg agcagatggc caaggataaa
1141 gtcagtctga cctgcatgat aacagacttc ttccctgaag acattactgt ggagtggcag
1201 tgggaatggc agccagcgga gaactacaag aacactcagc ccatcatgga cacagatggc
1261 tcttacttcg tctacagcaa gctcaatgtg cagaagagca actgggagggc aggaaatact
1321 ttcacctgct ctgtgttaca tgagggcctg cacaaccacc atactgagaa gagcctctcc
1381 cactctcctg gtaaatga

```

30

( 3 0 ) 完全長 3 A 1 2 重鎖配列 ( 3 A 1 2 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 5 1 )

40

## 【 0 1 7 3 】

## 【化 5 9】

```

1 evqlvesggg lvqpggslki scaasgftfs nyfmswvrrt pekrlwvay issgggstyy
61 pdsvkgrfti srdnakntly lqmnslksed tamyycvrrg dgyygydyamd ywggtstvtv
121 ssaktppsv yplapgsaaq tnsmtlglc vkgyfpepvt vtwnsgslss gvhtfpavlg
181 sdlytlsssv tvpsstwpse tvtcnvahpa sstkvdkkiv prdcgckpci ctvpevssvf
241 ifppkpkdvl titltpkvtc vrvdiskddp evqfswfvdd vevhtaqtqp reeqfnstfr
301 svselpmhq dwlngkefkc rvnsaafpap iektisktkg rpkapqvyti pppkeqmakd
361 kvsltcmtd ffpeditvew qwnqgpaeny kntqpimtd gsyfvyyskln vqksnweagn
421 tftcslvhg lnhhteksl shspgk

```

50

( 3 1 ) 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 1 5 2 )

【 0 1 7 4 】

【 化 6 0 】

```

1 atgagtggtgc ccactcaggt cctgggggttg ctgctgctgt ggcttacaga tgccagatgt
61 gacatccaga tgactcagtc gccagcctcc ctatctgtat ctgtgggaga aactgtcacc
121 atcacatgtc gagcaagtga gaatatattac attaatattag catggtatca gcagaaacag
181 ggaaaatctc ctcagctcct ggtccatgct gcaacaaagt tagcagatgg tgtgccatca
241 aggttcagtg gcagtggatc aggcacacag tattccctca agatcaacag cctgcagtct
301 gaagattttg ggagttatta ctgtcaacat ttttggggta ctccgtacac gttcggaggg
361 gggaccaaac tagaaataaa acgggctgat gctgcaccaa ctgtatccat cttcccacca
421 tccagtgagc agttaacatc tggaggtgcc tcagtcgtgt gcttcttgaa caacttctac
481 cccaaagaca tcaatgtcaa gtggaagatt gatggcagtg aacgacaaaa tggcgctcctg
541 aacagttgga ctgatcagga cagcaaagac agcacctaca gcatgagcag caccctcacg
601 ttgaccaagg acgagtatga acgacataac agctatacct gtgaggccac tcacaagaca
661 tcaacttcac ccattgtcaa gagcttcaac aggaatgagt gtttag

```

10

( 3 2 ) 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 1 5 3 )

【 0 1 7 5 】

【 化 6 1 】

```

1 digmtqspas lsvsvgetvt itcraseny inlawyqqkq gkspqllvha atkladgvps
61 rfsqsgsgtg yslkinslqs edfsgsyycqh fwgtptytfgg gtleikrad aaptvsifpp
121 sseqltsgga svvcflnnfy pkdinvwki dgserqngvl nswtdqgskd stysmsstlt
181 ltkdeyerhn sytceathkt stspivksfn rne

```

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ドンス表を表 2 に示した。

【 0 1 7 6 】

【 表 2 A 】

表 2

配列番号	蛋白質又は核酸
122	1 A 3 重可変 + I g G 1 定常 - 核酸
123	1 A 3 重可変 + I g 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 + I g G 1 定常 - 核酸
127	2 B 8 重可変 + I g 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 + I g G 1 定常 - 核酸
131	2 F 8 重可変 + I g 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 + I g G 1 定常 - 核酸
135	3 B 6 重可変 + I g 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 + I g G 1 定常 - 核酸
139	3 D 1 1 重可変 + I g G 1 定常 - 蛋白質
140	3 D 1 1 軽可変 + 定常 - 核酸

30

40

【 0 1 7 7 】

【表 2 B】

配列番号	蛋白質又は核酸
141	3 D 1 1 軽可変+定常-蛋白質
142	1 D 3 重可変+I g G 1 定常-核酸
143	1 D 3 重可変+I g G 1 定常-蛋白質
144	1 D 3 軽可変+定常-核酸
145	1 D 3 軽可変+定常-蛋白質
146	1 F 3 重可変+I g G 1 定常-核酸
147	1 F 3 重可変+I g G 1 定常-蛋白質
148	1 F 3 軽可変+定常-核酸
149	1 F 3 軽可変+定常-蛋白質
150	3 A 1 2 重可変+I g G 1 定常-核酸
151	3 A 1 2 重可変+I g G 1 定常-蛋白質
152	3 A 1 2 軽可変+定常-核酸
153	3 A 1 2 軽可変+定常-蛋白質

10

## (実施例 3)

## 各種組換え h H G F 蛋白質の作製

本実施例では、実施例 1 及び実施例 1 4 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 h H G F 蛋白質、5 5 5 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 h H G F 蛋白質 (G 5 5 5 E)、5 6 1 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 h H G F 蛋白質 (C 5 6 1 R)、マウス H G F 配列内に配置されたヒト V 4 9 5 乃至 L 5 8 5 H G F 配列を含む組換えマウス - ヒト - マウス (m h m) キメラ H G F 蛋白質、マウス H G F 配列内に配置されたヒト I 4 9 9 乃至 R 5 6 6 H G F 配列を含む組換え m h m キメラ H G F 蛋白質及びマウス H G F 配列内に配置されたヒト W 5 0 7 乃至 L 5 8 5 H G F 配列を含む組換え m h m キメラ H G F 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 c D N A 配列を D N A 配列決定法によって確認した。

## 【0179】

a. h H G F - F c

1 回目の P C R では、N o t I 部位を導入し、h H G F と h I g F c との間に 6 × H i s 標識をコードしている 2 本の重なり合う P C R 断片を作製した。2 回目に、これらの重なり合う P C R 断片を鋳型として h H G F - h i s - I g F c を増幅させた。得られた断片を N h e I 及び B a m H I で消化し、p c D N A 5 / F R T (インビトロジェン社、# 3 5 - 3 0 1 4) 中にクローニングした。次いで、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 h H G F を増幅させた。その配列は、アクセッション番号 N M \_ 0 0 0 6 0 1 . 4 として N C B I に寄託されている配列に相当することが分かった。

## 【0180】

(1) 5' h H G F N h e I プライマー

## 【0181】

## 【化 6 2】

ACTGGCTAGCATGTGGGTGACCAAACTCCT ( 配列番号 102)

(2) 3' h H G F N o t I H i s 標識 プライマー

## 【0182】

40

【化 6 3】

GTGATGGTGATGGTGATGGCGGCCGCATGACTGTGGTACCTTATATG

(配列番号 103)

( 3 ) 5' His Ig F c プライマー

【 0 1 8 3 】

【化 6 4】

ACTGGCGGCCGCCATCACCATCACCATCAC (配列番号 104)

( 4 ) 3' Ig F c BamHI プライマー

【 0 1 8 4 】

【化 6 5】

ACTGGGATCCTCACTATTTACCCGGGGACAG (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 ( Q u i c k C h a n g e ) 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 ( S t r a t a g e n e ) ) 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。

【 0 1 8 5 】

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

【 0 1 8 6 】

【化 6 6】

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

【 0 1 8 7 】

【化 6 7】

CTCATCTCCTCTTTCGTGGACATCATG (配列番号 107)

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

【 0 1 8 8 】

【化 6 8】

GGAAGAGGAGATGAGAAACGCAAACAGGTTCTCAATG (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

【 0 1 8 9 】

【化 6 9】

CATTGAGAACCTGTTTGCGTTTCTCATCTCCTCTTCC ( 配列番号 109)

c . マウス - ヒト - マウスキメラ F c

マウス - ヒト - マウスキメラ I g F c 構築物は、m H G F 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 m H G F C 末端 鎖とこれに続く 6 x H i s 標識及び I g G - F c を含む。

【 0 1 9 0 】

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、アクセッション番号 N M \_ 0 0 0 6 0 1 . 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ンステップ ( S u p e r S c r i p t O n e S t e p ) R T - P C R キット ( # 1

10

20

30

40

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(クローンテック社、#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、pcDNA5/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'ATCGGCTAGCATGATGTGGGGGACCAAAC(配列番号 110)

【0194】

【化71】

3' GAATCCCATTTACAACCCGCAGTTGTTTTGTTTTGG(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' CCAAAACAAAACAACCTGCGGGTTGTAAATGGGATTC(配列番号 112)

【0196】

【化73】

3' CAGGATTGCAGGTCGAGCAAGCTTCATTAACCAAGATCT

(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' AGATCTGGTTTTAATGAAGCTTGCTCGACCTGCAATCCTG(配列番号 114)

【0198】

【化75】

3' GTAATTTTGACATACAAGTTGTGCGGCCGCCATCACCATCACCATCAC

(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pcDNA5/FRT-hHGF及びpcDNA5/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】

CGTGGCACCAAGACCCGCTTAGTGATGGTGATGGTGATG ( 配列番号 117)

を含めた。

【 0201】

10

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。

【 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

CHO FIPIn細胞(インビトロジェン社、カタログ番号R758-07)をF12K培地(ATTC、カタログ番号30-2004)、10%FCS(インビトロジェン社、カタログ番号10438026)、1%ペニシリン(10,000単位/mL)/ストレプトマイシン(10,000μg/mL)(インビトロジェン社、カタログ番号15140-122)中、37、5%CO<sub>2</sub>、100μg/mLゼオシン(Zeocin) (インビトロジェン社、カタログ番号R250-01)の条件下で増殖させた。

10

#### 【0207】

##### (2) 安定なCHO FIPIn細胞株の作製

リポフェクタミン2000(インビトロジェン社、カタログ番号11668-027)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DNA pOG44及びpcDNA5/FRTを9:1の比率で用いてCHO FIPIn宿主細胞に形質移入した。対照として、空のpcDNA5/FRTベクター/pOG44及びpOG44プラスミド(インビトロジェン社、カタログ番号35-3018)単独を細胞に形質移入した。形質移入後24時間に、この細胞を分裂させ、48時間後に、0.5mg/mLのハイグロマイシンB(シグマ社(Sigma)、カタログ番号H0654-SPEC)を細胞に添加した。F12K、10%FCS、1%ペニシリン/ストレプトマイシン、0.5mg/mLハイグロマイシンB中で安定細胞の多クローン性選択を行った。

20

#### 【0208】

##### (3) 安定なCHO FIPIn細胞株における蛋白質発現

約 $2 \times 10^6$ 個の細胞を15cmプレートに接種し、F12K(ATCC、カタログ番号30-2004)/DMEM高グルコース(インビトロジェン社、カタログ番号11995065)1:1、5%超低IGGFCS(インビトロジェン社、#16250-78)中、37、5%CO<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ELISA及び表面プラスモン共鳴により分析した。

##### (実施例4)

30

##### 抗hHGF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hHGF及び実施例3で作製した組換えHGF蛋白質の一部に結合することができることにあった。

#### 【0209】

BIAcore T100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HGF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(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。

40

#### 【0210】

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(Fluka)、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。種々のHGF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30μL/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30秒のベースラインに対する共鳴単位(RU)として求めた。結合は、泳動用緩衝液で希釈したヒトHGF(R&Dシステムズ社(R&D Systems)、カタログ番号294-HGN-025)と比較した。非特異的な結合は、同じア

50



ミン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	rhHGF (R&D Systems)	rhHGF (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

表3の結果から明らかなように、上記の各抗体はrhHGF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rhHGF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rhHGFの部分に結合するように思われる。2F8がrhHGF及びmHGFのいずれにも結合するように思われるので、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。

(実施例5)

抗rhHGF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rhHGF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rhHGFとの反応性を免疫ブ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8µgの組換えrhHGF蛋白質を4乃至12%ビス-トリス1.0mm×2Dウェルゲル(インビトロジェン社、カールズバッド、カリフォルニア州)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(TBST)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、ミニプロテインIIマルチスクリーン(Mini Protean II Multi-Screen)装置(バイオラッド社(BioRad))に取り付けた。

【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5µg/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

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+

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。

（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 Plasmon 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（Fluka）、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。

【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。

。

【0218】

速度論のパラメータは、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。各抗体の速度論のパラメータ $k_a$ （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5にまとめた。

【0219】

10

20

30

40

50

【表 5】

表 5

抗体	$k_a$ (1/Ms)	$SE(k_a)$	$k_d$ (1/s)	$SE(k_d)$	$K_D$ (pM)	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 pM 以下、約 50 pM 以下又は約 20 pM 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性化した。

【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 AAAND-0001) を  $6.25 \mu\text{g/mL}$  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 ( $15 \text{ mM Na}_2\text{CO}_3$  及び  $34 \text{ mM NaHCO}_3$ 、 $\text{pH} 9.0$ ) 溶液  $100 \mu\text{L}$  により 4 で 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 c-Met (R&D システムズ社、カタログ番号 358-MT/CF) に検討対象の抗体を漸増濃度 (0.033 乃至 667 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  $100 \mu\text{L}$  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  $100 \mu\text{L}$  / ウェルの  $2 \mu\text{g/mL}$  ビオチン化抗ヒト c-Met 抗体 (R&D システムズ社、カタログ番号 BAF358) 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、DELFLIA 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ジン (ワラック社、カタログ番号 1244-360) 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 DELFLIA 洗浄液 (ワラック社、カタログ番号 4010-0010) で 3 回洗浄した後、 $100 \mu\text{L}$  / ウェルの DELFLIA 強化溶液 (ワラック社、#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。

40

【0223】

上記プレートは、ユウロビウム法を用いるピクチャー<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 <sub>50</sub> (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

以上の結果から明らかなように、3 B 6 以外の全ての抗体（即ち、1 D 3、1 A 3、2 B 8、3 A 1 2、1 F 3、3 D 1 1 及び 2 F 8）は、c - M e t への H G F の結合を効率的に中和する。

## 【 0 2 2 5 】

b . 4 M B r - 5 細胞における B r d U 取り込みの H G F による促進の中和

1 2 . 5 n M の h H G F 1 0 μ L を 9 6 穴 組織培養マイクロタイタープレート（コストア社（C o s t a r）カタログ番号 3 9 0 3）の個々のウェルに分注した。次いで、6 6 6 7、2 2 2 2、7 4 0、2 4 7、8 2、2 7、9 . 1、3 . 0、1 . 0 及び 0 . 3 3 n M の濃度に連続希釈した抗体 1 0 μ L を各ウェルに添加した。次に、この H G F 抗体混合液を室温で 3 0 分間インキュベートした。F - 1 2 K（A T C C、3 0 - 2 0 0 4）、1 5 % F B S（ギブコ（G i b c o）1 0 4 3 8 - 0 2 6）、3 0 n g / m L E G F（シグマ（S i g m a）E 9 6 4 4）、1 % ペニシリン/ストレプトマイシン（P S、ギブコ社カタログ番号 1 5 1 4 0 - 1 2 2）中で培養したサル気管支上皮細胞 4 M B r - 5（A T C C、C C L 2 0 8）をトリプシン（T r y p s i n）（ギブコ社カタログ番号 2 5 2 0 0 - 0 5 6）で解離させ、7 5 , 0 0 0 個 / m L の濃度でアッセイ培地（F - 1 2 K、2 . 5 % F B S、1 % P S）に再懸濁し、この細胞懸濁液 8 0 μ L を上記 H G F 抗体混合液に分注した。

## 【 0 2 2 6 】

この細胞を 3 7 、5 % C O <sub>2</sub> の条件下でインキュベートした。4 8 時間後、1 0 0 μ M B r d U（ロシュ社（R o c h e）、カタログ番号 1 6 6 9 9 1 5）を 1 0 μ L 添加した。7 2 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、B r d U E L I S A をメーカーの使用説明書（ロシュ社、カタログ番号 1 6 6 9 9 1 5）に従って用いて処理した。

## 【 0 2 2 7 】

発光シグナルは、シナジー H T（S y n e r g y H T）プレートリーダー（バイオテック社（B i o - T e k））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（G r a p h P a d P r i s m）（グラフパッドソフトウェア社（G r a p h P a d S o f t w a r e））において式  $y = \text{ボトム} + (\text{トップ} - \text{ボトム}) / (1 + 10^{-(\log(\text{EC}_{50} - x) * \text{ヒル勾配}))}$  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 E C <sub>50</sub> の平均値を示した。

## 【 0 2 2 8 】

10

20

30

40

【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

表 7 の結果から明かなように、抗体 1 A 3、I D 3、1 F 3、2 B 8、2 F 8、3 A 1 2、3 B 6 及び 3 D 1 1 は全て、4 M B r - 5 細胞の H G F 誘発性増殖を抑制する。

( 実施例 8 )

抗 h H G F 抗体の抗散乱 ( A n t i - S c a t t e r ) 活性

本実施例では、実施例 1 で作製した抗体の H G F 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。H G F は、M D C K 細胞 ( A T C C、マナッサス、バージニア州、カタログ番号 C C L - 3 4 ) においてクラスターの「散乱」( 運動 ) を誘発する。

【 0 2 2 9 】

M D C K 細胞は、1 0 % ウシ胎仔血清 ( インビトロジェン社、カタログ番号 1 0 4 3 8 0 2 6 ) 及び 1 % ペニシリン - ストレプトマイシン ( インビトロジェン社カタログ番号 1 5 1 4 0 1 2 2 ) を含有する M E M ( A T C C、マナッサス、バージニア州、カタログ番号 3 0 - 2 0 0 3 ) 8 0  $\mu$  L 中ウェル当たり  $4 \times 10^3$  個の密度で 9 6 穴 C o s t a r 組織培養プレート ( コーニング社 ( C o r n i n g I n c o r p o r a t e d )、コーニング、ニューヨーク州、カタログ番号 3 5 9 5 ) に接種した。検討対象の各抗体は、1 0 % 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 M E M で 6 , 6 6 7 n M に希釈した。次いで、種々の抗体希釈液のそれぞれ、及び 1 0 % 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 M E M を別々に、1 0 % 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 1 0 0 n g / m l の 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 ) を含有する等容量の M E M と混合した。各抗体 / H G F 希釈液は、2 5 で 3 0 分間インキュベートした。各抗体 / H G F 希釈液 2 0  $\mu$  L を個別に個々のウェルに添加し、最終抗体濃度 6 6 6 . 7 n M 及び最終 H G F 濃度 1 0 n g / m l を得た。次に、M D C K 細胞を 3 7 、5 % C O <sub>2</sub> で 2 4 時間インキュベートした。

【 0 2 3 0 】

2 4 時間のインキュベーション後、M D C K 細胞をウェル当たり 1 0 0  $\mu$  L の氷冷 P B S ( インビトロジェン社カタログ番号 1 4 1 9 0 1 4 4 ) で一度注意深く洗い、2 5 で 1 0 分間揺動させながらウェル当たり 1 0 0  $\mu$  L 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 C 3 8 8 6 ) 及び 5 0 % エタノールからなる 1 0 0  $\mu$  L 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 2 5 で 2 0 分間インキュベートした。

【 0 2 3 1 】

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 P B S を添加してサンプルの乾燥を防いだ。ライカ ( L e i c a ) D M I R B 顕微鏡 ( ライカマイクロシステムズ社、ウェットラー、ドイツ )、D C 5 0 0 カメラ ( ライカマイクロシステムズ社、ウェットラー、ドイツ ) 及びマグナファイア ( M a g n a F i r e ) 2 . 1 C ソフトウェア ( O p t r o n i c s、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。

10

20

30

40

50

【 0 2 3 2 】

【 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 2 B 8 は、その他の抗体よりも多くの H G F 誘発性散乱を抑制した。抗体 1 D 3 及び 3 B 6 は中間的なレベルの抑制を示し、抗体 1 A 3 は低乃至中間レベルの抑制を示し、抗体 1 F 3 及び 2 F 8 は低レベルの抑制を示し、抗体 3 A 1 2 及び 3 D 1 1 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。

【 0 2 3 3 】

PC-3細胞は、10%ウシ胎仔血清(インビトロジェン社、カタログ番号10438026)及び1%ペニシリン-ストレプトマイシン(インビトロジェン社カタログ番号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4.5×10<sup>4</sup>個の密度で96穴Costar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℃、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。

【 0 2 3 4 】

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℃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。

【 0 2 3 5 】

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-12Kを70 $\mu$ L添加した後、10mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>（シグマ社カタログ番号S6508）の1% ペニシリン-ストレプトマイシン含有無血清F-12K溶液10 $\mu$ Lを添加した。次いで、この細胞を37 $^{\circ}$ C、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希釈液20 $\mu$ Lを別々に個別のウェルに添加し、最終HGF濃度50ng/mL並びに各抗体の最終濃度666.7nM、222.2nM、74.1nM、24.7nM、8.23nM、2.74nM、0.91nM、0.30nM、0.10nM及び0.03nMを得た。次に、この細胞を37 $^{\circ}$ C、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上面に置いた。その後、細胞を、1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>を含有する100 $\mu$ L/ウェルの氷冷PBS（インビトロジェン社カタログ番号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）、50mM トリス-HCl pH8.0、100mM NaCl、0.3mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>、1 $\times$ プロテアーゼ阻害剤カクテル（シグマ社カタログ番号P8340）及び1 $\times$ 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5726）からなる100 $\mu$ L/ウェルの氷冷溶解緩衝液中、4 $^{\circ}$ C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BAF358）を、1%ウシ血清アルブミン（シグマ社カタログ番号A2153）を含有するDELFIAアッセイバッファ（Assay Buffer）（パーキンエルマー社（PerkinElmer）、トゥルク、フィンランド、カタログ番号4002-0010）で2 $\mu$ g/mLの濃度に希釈し、黄色ストレプトアビジ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AAND-0005）のウェル当たり50 $\mu$ L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 $^{\circ}$ C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4010-0010）で洗浄し、各種PC-3細胞溶解物のそれぞれ80 $\mu$ Lを別々に、洗浄したストレプトアビジ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ジ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 $^{\circ}$ C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ジ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アッセイバッファで希釈した600ng/mL DELFIA Eu-N1 P-tyr-100抗体（パーキンエルマー社、カタログ番号AD0159）溶液100 $\mu$ Lを添加した。次いで、このプレートを揺動させながら25 $^{\circ}$ C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ジンマイクロタイトレーションプレートの各ウェルにDELFIAエンハンスメ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4001-0010）200 $\mu$ Lを添加し、プレートを暗所で振盪しながら25 $^{\circ}$ Cで5分間インキュベートした。

#### 【0238】

その後、ビクター3V（Victor 3V）リーダー（パーキンエルマー社）でユーロピウム（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（GraphPad Software, Inc.）、サンディエゴ、カリフォルニア州）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。

【 0 2 4 0 】

【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 P C - 3 細胞における H G F 誘導性 c - M e t リン酸化の強力な阻害剤である。

( 実施例 1 0 )

U 8 7 M G 異種移植モデルにおける腫瘍抑制

U 8 7 M G 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。U 8 7 M G 細胞 ( A T C C ) は、ダルベッコ改変イーグル培地 ( D M E M : D u l b e c c o ' s M o d i f i e d E a g l e m e d i u m ) を 1 0 % ウシ胎仔血清、1 0 0 単位 / m L ペニシリン及び 1 0 0  $\mu$  g / m L ストレプトマイシンと共に含む培地を用いた、5 % C O <sub>2</sub> 及び 9 5 % 空気を含有する雰囲気中 3 7 ° C の培養で増殖させた。これらの細胞は、トリプシン - E D T A 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。

【 0 2 4 1 】

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、5 0 % マトリゲル ( M a t r i g e l ) ( B D バイオサイエンス社 ( B D B i o s c i e n c e s ) 、カタログ番号 3 5 6 2 3 7 ) 中の細胞  $5 \times 10^6$  個を、7 週齢雌性 I C R S C I D マウス ( タコニックラボラトリー社 ( T a c o n i c L a b s ) ) 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 ) ( m m ) を測定した。腫瘍容積 ( v o l . ) は、容積 ( m m <sup>3</sup> ) =  $L \times W^2 / 2$  として計算した。腫瘍が約 2 0 0 m m <sup>3</sup> にまで成長した時に、担腫瘍マウスを 1 群 1 0 匹の 5 群に無作為化した。1 群には P B S を投与した。その他の 4 群のそれぞれには、抗体 1 A 3 、1 D 3 、1 F 3 又は 2 B 8 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 1 m g / k g 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 6 及び表 1 0 にまとめた。

【 0 2 4 2 】

【表 1 0】

表 1 0

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

2 B 8 投与群で部分的な退縮が達成された ( 図 6 ) 。1 A 3 投与群及び 1 F 3 投与群では統計的に有意な成長抑制が認められた ( 表 1 0 ) 。1 D 3 の場合、5 1 % の腫瘍成長抑制 ( p 値 : 0 . 0 7 5 ) 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 1 1 )

U 1 1 8 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 ( A T C C ) は、U 8 7 M G 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。

#### 【 0 2 4 3 】

使用マウスが 7 週齢雌性 N C r ノードマウス ( 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 m m <sup>3</sup> にまで成長した時に開始した。U 8 7 M G 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 m g / k g 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。

#### 【 0 2 4 4 】

#### 【 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った。

#### ( 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 重鎖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、H w a n g ほか ( 2 0 0 5 年 ) M E T H O D S 3 6 : p . 3 5 - 4 2、T a n ほか ( 2 0 0 2 年 ) J . I M M U N O L . 1 6 9 : p . 1 1 1 9 - 1 1 2 5 及び米国特許第 6 , 8 8 1 , 5 5 7 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。

#### 【 0 2 4 5 】

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 ( C h o t h i a c a n o n i c a l s t r u c t u r a l c l a s s ) を特定した。同じチョチア規定構造クラスの軽鎖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 ( I M G T ) 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](http://imgt.cines.fr) 及び [biochem.unizh.ch/antibody/Sequences/index.html](http://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 移植用にした。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。

10

20

30

40

50

## 【0246】

この完全な可変領域核酸配列は、遺伝子合成PCR法（Youngほか（2004年）NUCL. ACIDS RES. 32:e59）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IgG1（G1m（17,1）アロタイプ）又はカッパ（Km（3）アロタイプ（対立遺伝子2））領域を含む（pcDNA3.2DEST（インビトロジェン社）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IgG1抗体（キメラ2B8及び3種のヒト化重鎖（Hu2B8 Hv1-f.1、Hu2B8 Hv5-a.1及びHu2B8 Hv5-51.1））の全てを3種のカッパ鎖抗体（キメラ2B8及び2種のヒト化軽鎖（Hu2B8 Kv1-39.1及びHu2B8 Kv3-15.1））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HGF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12Aに記載した。

## 【0247】

## 【表12A】

表12A

重鎖可変領域	軽鎖可変領域
キメラ2B8（配列番号12）	キメラ2B8（配列番号14）
キメラ2B8（配列番号12）	Hu2B8 Kv1-39.1（配列番号173）
キメラ2B8（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2B8（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2B8（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2B8（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）

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

## 【0248】

【表 1 2 B】

表 1 2 B

免疫グロブリン重鎖	免疫グロブリン軽鎖
キメラ2B8 Ig G 1 (配列番号 155)	キメラ2B8 カッパ (Km(3)) (配列番号 157)
キメラ2B8 Ig G 1 (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 Ig G 1 (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 + Ig G 1 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 + Ig G 1 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 + Ig G 1 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 + Ig G 1 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 + Ig G 1 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 + Ig G 1 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 + Ig G 1 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 + Ig G 1 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 + Ig G 1 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】

sh2B8-9 (G1m(17,1)) = hu2B8 Hv5-51.1 (+ Ig G 1 定常領域 (G1m(17,1)) アロタイプ) (配列番号 171) プラス hu2B8 Kv1-39.1 (+ カッパ定常領域 (Km(3)) アロタイプ (対立遺伝子 2)) (配列番号 177)

sh2B8-12 (G1m(17,1)) = hu2B8 Hv5-51.1 (+ Ig G 1 定常領域 (G1m(17,1)) アロタイプ) (配列番号 171) プラス hu2B8 Kv3-15.1 (+ カッパ定常領域 (Km(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G1m(17,1))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】

10

20

30

40

## 【化 7 8】

```

1 atgggagtgga gctatatcat cctcttttttg gtagcaacag ctacagatgt ccactcccag
61 gtccaactgc agcagcctgg ggctgaactg gtgaagcctg ggacttcagt gaagctgtcc
121 tgcaaggctt ctgggtacac cttcaccacc tactggatgc actgggtgaa tcagaggcct
181 ggacaaggcc ttgagtggat tggagagatt aatcctacca acggtcatat taactacaat
241 gagaagttca agagcaaggc cacactgact gtagacaaat cctccagcac agcctacatg
301 caactcagca gcctgacatc tgaggactct gcggtctatt actgtgcaag aaactatgtt
361 ggtagcatct ttgactactg gggccaaggc accactctca ccgtctcttc agcctccacc
421 aagggcccat cgttcttccc cctggcaccc tctccaaga gcacctctgg gggcacagcg
481 gccctgggct gcctggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacggtgtc gtggaactca
541 ggcgccttga ccagcggcgt gcacaccttc ccggtgttcc tacagtcctc aggactctac
601 tccctcagca gcgtggtgac cgtgcctctc agcagcttgg gcaccacagc ctacatctgc
661 aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aagttgagcc caaatcttgt
721 gacaaaactc acacatgccc accgtgcccc gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc
781 ttctctcttc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca
841 tgcgtggttg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac
901 ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac
961 cgtgtggtca gcgtctctac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag
1021 tgcaagggtc ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa
1081 gggcagcccc gagaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag
1141 aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgcctcccg
1201 tgggagagca atgggcagcc ggagaacaa tacaagacca cgcctcccg gctggactcc
1261 gacggctctt tcttctctca cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg
1321 aacgtcttct gatgtccgt gatctgcaca accactacac gcagaagagc
1381 ctctccctgt ctccgggtaa atga

```

10

( 2 ) 完全長キメラ 2 B 8 重鎖 ( キメラ 2 B 8 I g G 1 ( G 1 m ( 1 7 , 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 1 5 5 )

20

## 【 0 2 5 2】

## 【化 7 9】

```

1 qvqlqppgae lvkpgtsvkl sckasgytft tywmhwnqr pggglewige inptnghtny
61 nekfkskatl tvdkssstay mqlssltted savvycarny vgsifdywgq gttltvssas
121 tkgpsvfpla psskstsggt aalgclvkd yfepvtvsw nsgaltsgvht fpavlgssgl
181 yslssvvtvp ssslgtqtyi cnvnhkpsnt kvdkkvepks cdkthtcpc papellggps
241 vflfppkpkd tlmisrtpev tcvvvdvshe dpevkfnwyv dgvevhnaht kpreeqynst
301 yrvsvltvl hqdwlngkey kckvsnkalp apiektiska kgpprepqvy tlpssrdelt
361 knqvsltclv kgfypsdiav ewesnggpen nykttpvld sdgsfflysk ltvdkarwqg
421 gnvfscsvmh ealhnhytqk slslspgk

```

( 3 ) 完全長キメラ 2 B 8 軽鎖 ( マウス可変領域及びヒト定常領域 ) ( キメラ 2 B 8  
カッパ ( K m ( 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  
5 6 )

30

## 【 0 2 5 3】

## 【化 8 0】

```

1 atggaatcac agactctggt cttcatatcc atactgctct gggtatatgg tgctgatggg
61 aacattgttaa tgaccaaatc tcccaaatcc atgtccatgt cagtaggaga gagggtcacc

```

## 【 0 2 5 4】

## 【化 8 1】

```

121 ttgagctgca aggcagtgga gaatgtggtt tcttatgtat cctgggtatca acagaaacca
181 gcgcagctct ctaaactgct gatatacggg gcatccaacc ggaacactgg ggtccccgat
241 cgcttcacag gcagtggtat tgcaacagat ttactctgca ccatcagcag tgtgcgggct
301 gaagaccttg cagattatca ctgtgggagc agttacaact atccgtacac gttcggaggg
361 gggaccaggg tggaaataaa acgaactgtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcca
421 tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgc tctgttgtgt gcctgctgaa taactcttat
481 ccagagaggg ccaaagtaca gtggaagggt gataacgccc tccaatcggg taactcccag
541 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg
601 ctgagcaaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc
661 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttga

```

40

( 4 ) 完全長キメラ 2 B 8 軽鎖 ( キメラ 2 B 8 カッパ ( K m ( 3 ) ) ) を規定する蛋  
白質配列 ( シグナル配列なし ) ( 配列番号 1 5 7 )

## 【 0 2 5 5】

50

## 【化 8 2】

1 nivmtqspks msmsvgervt lsckasenvv syvswyqqkp aqspklliyy asnrntgvpd  
 61 rftgsgsatd ftltissvra edladyhcgg synpytfgg gtrleikrtv aapsvfifpp  
 121 sdeqlkshta svvcilnnfy preakvqwkq dnalqsgnsq esvteqdskd styslsstlt  
 181 lskadyekhhk vyacevthqg lsspvtksfm rgec

( 5 ) ヒト化 H u 2 B 8 H v 1 - 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 1 5 8 )

## 【 0 2 5 6 】

## 【化 8 3】

1 atggactgca cctggaggat cctcctcttg gtggcagcag ctacaggcac ccagccgag  
 61 gtccagctgg tacagtctgg ggctgaggtg aagaagcctg gggctacagt gaaaatctcc  
 121 tgcaaggttt ctggatacac cttcaccacc tactggatgc actgggtgca acagcccct  
 181 ggaaaagggc ttgagtggat gggagagatt aatcctacca acggtcatac taactacaat  
 241 gagaagttcc agggcagagt caccataacc gcggacacgt ctacagacac agcctacatg  
 301 gagctgagca gcctgagatc tgaggacacg gccgtgtatt actgtgcaac aaactatgtt  
 361 ggtagcatct ttgactactg gggccaagga accctgggtc ccgtctcctc ag

10

( 6 ) ヒト化 H u 2 B 8 H v 1 - 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 1 5 9 )

20

## 【 0 2 5 7 】

## 【化 8 4】

1 evqlvqsgae vkkpgatvki sckvsgyftt tywmhwwqqa pgkglewmge inptnghtny  
 61 nekfqgrvti tadtstdtay melsslr sed tavyycatny vgsifdywgq gtlvtvss

( 7 ) ヒト I g G 1 重鎖定常領域 ( G 1 m ( 1 7 , 1 ) アロタイプ ) をコードしている核酸配列 ( 配列番号 1 6 0 )

## 【 0 2 5 8 】

## 【化 8 5】

1 cctccaccaa gggcccatcg gtctccccc tggcaccctc ctccaagagc acctctgggg  
 61 gcacagcggc cctgggctgc ctgggtcaagg actacttccc cgaaccgggtg acggtgtcgt  
 121 ggaactcagg cgccctgacc agcggcgtgc acacctccc ggctgtctta cagtctcag  
 181 gactctactc cctcagcagc gtgggtgaccg tgcctccag cagcttgggc acccagacct  
 241 acatctgcaa cgtgaatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaaa gttgagccca  
 301 aatcttgtga caaaactcac acatgccac cgtgccagc acctgaactc ctggggggac  
 361 cgtagctctt cctcttccc ccaaaacca aggacacct catgatctcc cggaccctg  
 421 aggtcacatg cgtgggtgtg gacgtgagcc acgaagacc tgaggtcaag ttcaactggt  
 481 acgtggacgg cgtggaggtg cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca  
 541 gcacgtaccg tgtgtcagc gtctcaccg tctgcacca ggactggctg aatggcaagg  
 601 agtacaagtg caaggtctcc aaaaagccc tccagcccc catcgagaaa accatctcca  
 661 aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacacct gccccatcc cgggatgagc  
 721 tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tggtaaagg ctctatccc agcgacatcg  
 781 ccgtggagtg ggagagcaat ggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtag  
 841 tggactccga cggctcttc ttctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc  
 901 agcaggggaa cgtcttctca tctccgtga tgcattgggc tctgcacaac cactacacgc  
 961 agaagagcct ctccctgtct ccgggtaaat ga

10

20

( 8 ) ヒト I g 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 1 6 1 ) 最初のアミノ酸は、可変領域の最後のヌクレオチド及び I g 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。

【 0 2 5 9 】

## 【化 8 6】

1 astkgpsvfp lapsskstsg gtaalgclvk dyfpepvtvs wnsaltsgv htfpavlqss  
 61 glyslssvvt vpssslgtqt yicnvnhkps ntkvdkkvep kscdkthtcp pcpapellgg  
 121 psvflfppkp kdtlmisrtp evtcvvvdvs hedpevkfnw yvdgvevhna ktkpreeqyn  
 181 styrvsvlt vlhqdwlngk eyckvsnka lpapiektis kakgqprepq vytlppsrd  
 241 ltknqvsitc lvkgfypsdi avewesngqp ennykttppv ldsdgsffly skltvdksrw  
 301 qqgnvfscsv mhealhnhyt qkslslspgk

30

( 9 ) 完全長重鎖ヒト化 H u 2 B 8 H v 1 f . 1 可変領域及びヒト I g 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 6 2 )

【 0 2 6 0 】

40

## 【化 8 7】

1 atggactgca cctggaggat cctcctcttg gtggcagcag ctacaggcac ccacgccgag  
 61 gtccagctgg tacagtctgg ggctgaggtg aagaagcctg gggctacagt gaaaatctcc  
 121 tgcaagggtt ctggatacac cttcaccacc tactggatgc actgggtgca acaggccctt  
 181 ggaaaagggc ttgagtggat gggagagatt aatcctacca acggtcatac taactacaat  
 241 gagaagttcc agggcagagt caccataacc gcggacacgt ctacagacac agcctacatg  
 301 gagctgagca gcctgagatc tgaggacacg gccgtgtatt actgtgcaac aaactatgtt  
 361 ggtagcatct ttgactactg gggccaagga accctgggtc ccgtctcctc agcctccacc  
 421 aagggeccat cggctctccc cctggcacc cctccaaga gcacctctgg ggcacagcgg  
 481 gccctgggct gcctgggtcaa ggactacttc ccggaaccgg tgacgggtgtc gtggaactca  
 541 gggeccctga ccagcggcgt gcacaccttc ccggctgtcc tacagtcttc aggactctac  
 601 tcctcagca gcgtggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcacccagac ctacatctgc  
 661 aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aagttgagcc caaatcttgt  
 721 gacaaaactc acacatgccc accgtgccca gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc  
 781 ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca  
 841 tgcgtgggtg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtactgtggc  
 901 ggctgggagg tgcataatgc caagacaaag ccgctggagg agcagtacaa cagcacgtac  
 961 cgtgtgggtc gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaa  
 1021 tgcaagggtc ccaacaaagc cctcccagcc gagaaaccac ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag  
 1081 gggcagcccc gagaaaccac ggtgtacacc ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag  
 1141 aaccaggtca gcctgacctg cctgggtcaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag  
 1201 tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgctcccggt gctggactcc  
 1261 gacggctcct tcttctctca cagcaagctc accgtggaca agagcagggt gcagcagggg  
 1321 aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc  
 1381 ctctccctgt ctccgggtaa atga

10

( 1 0 ) 完全長重鎖ヒト化 H u 2 B 8 H v 1 f . 1 可変領域及びヒト I g 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 1 6 3 )

20

## 【 0 2 6 1】

## 【化 8 8】

1 evqlvgsgae vkkpgatvki sckvsgytft tywmhvwqga pgkglewmge inptnghtny  
 61 nekfqgrvti tadtstdtay melsslrsed tavyycatny vgsifdywgq gtlvtvssas  
 121 tkqpsvfpla psskstsggt aalgclvkdy fpepvtvsw nsgaltsgvht fpavlqssgl  
 181 yslssvvtvp ssslgtqtyi cnvnhkpsnt kvdkkvepks cdkthtcppc papellggps  
 241 vflfpkpkd tlmisrtpev tcvvvdvshe dpevkfnwv dgvevhnakt kpreeqynst  
 301 yrvsvltvl hqdwlngkey kckvsnkalp apiektiska kgqprepqvy tlpssrdelt  
 361 knqvsltclv kgfypsdiav ewesngqpen nykttppvld sdgsfflysk ltvdksrwqg  
 421 gnvfscsvmh ealnhhytqk slslspgk

( 1 1 ) ヒト化 H u 2 B 8 H v 5 a . 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 1 6 4 )

30

## 【 0 2 6 2】

## 【化 8 9】

1 atggggtcaa ccgccatcct cgcctcctc ctggtgttc tccaaggagt ctgtgccgaa  
 61 gtgcagctgg tgcaagtctg agcagaggtg aaaaagcccg gggagtctct gaggatctcc  
 121 tgtaagggtt ctggatagag ctttaccacc tactggatgc actgggtgag ccagatgcc  
 181 gggaaaggcc tggagtggat gggggagatt aatcctacca acggtcatac taactacaat

40

## 【 0 2 6 3】

## 【化 9 0】

241 ccgtccttc aaggccagc caccatctca gctgacaagt ccatcagcac tgctacctg  
 301 cagtggagca gctgaaggc ctggacacc gccatgtatt actgtgagag aaactatgtt  
 361 ggtagcatct ttgactactg gggccaagga accctgggtc ccgtctcctc ag

( 1 2 ) ヒト化 H u 2 B 8 H v 5 a . 1 重鎖可変領域を規定する蛋白質配列 ( 配列番号 1 6 5 )

## 【 0 2 6 4】

50

【化 9 1】

1 evqlvqsgae vkkpgeslri sckgsgysft tywmhwvrqm pgkglewmge inptnghtny  
61 npsfqghvti sadksistay lqwsslkasd tamyycarny vgsifdywgq gtlvtvss

( 1 3 ) 完全長ヒト化 H u 2 B 8 H v 5 a . 1 重鎖可変領域及びヒト I g 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 6 6 )

【 0 2 6 5 】

【化 9 2】

10

```

1 atgggggtcaa cgcgcacccg cgcgcctcctc ctggtgtgttc tccaaggagt ctgtgcccga
61 gtgcagctgg tgcagctctgg agcagaggtg aaaaagcccg gggagtctct gaggatctcc
121 tgtaaggggt ctggatacag ctttaccacc tactggatgc actgggtgcg ccagatgcc
181 gggaaaggcc tggagtggat gggggagatt aatcctacca acggtcatat taactacaat
241 ccgtccctcc aaggccacgt caccatctca gctgacaagt ccatcagcac tgcctacctg
301 cagtggagca gcctgaaggc ctgggacacc gccatgtatt actgtgcgag aaactatgtt
361 ggtagcatct ttgactactg gggccaagga accctgggtc ccgtctcctc agcctccacc
421 aagggcccat cggctctccc cctggcaccc tccctccaaga gcacctctgg gggcacagcg
481 gccctgggct gcctgggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacggtgtc gtggaactca
541 ggcgcctcga ccagcggcgt gcacaccttc ccggtgtgtc tacagtcttc aggaactctac
601 tccctcagca gcgtgggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcaccocagac ctacatctgc
661 aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aagttgagcc caaatcttgt
721 gacaaaactc acacatgccc accgtgcccc gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc
781 ttctctctcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca
841 tgctgtgttg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac
901 ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcggggagg agcagtacaa cagcacgtac
961 cgtgtgtgtc gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag
1021 tgcaaggtct ccaacaaaag cctcccagcc cccatcgaga aaacctctc caaagccaaa
1081 gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag
1141 aaccaggtca gcctgacctg cctgggtcaa ggcttctatc ccagcgacat cgcctgggag
1201 tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc
1261 gacggctcct tcttctctca cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg
1321 aacgtctctc catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc
1381 ctctccctgt ctccgggtaa atga

```

20

( 1 4 ) 完全長ヒト化 H u 2 B 8 H v 5 a . 1 重鎖可変領域及びヒト I g 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 6 7 )

【 0 2 6 6 】

30

【化 9 3】

1 evqlvqsgae vkkpgeslri sckgsgysft tywmhwvrqm pgkglewmge inptnghtny  
61 npsfqghvti sadksistay lqwsslkasd tamyycarny vgsifdywgq gtlvtvssas  
121 tkgpsvfpla psskstsggt aalgclvkdy fpepvtvsw nsgaltsgvht fpavlgssgl  
181 yslssvvtvp ssslgtqtyi cnvnhkpsnt kvdkkvepks cdkthtcppc papellggps  
241 vflfppkpkd tlmisrtpev tcvvvdvshe dpevkfnwyv dgvevhnakt kpreeqynst  
301 yrvsvlvtvl hqdwlngkey kckvsnkalp apiektiska kgpprepqvy tlppsrldelt

【 0 2 6 7 】

【化 9 4】

40

361 knqvsltclv kgfypsdiav ewesngqpen nykttppvld sdgsfflysk ltvdksrwgq  
421 gnvfscsvmh ealhnhytqk slslspgk

( 1 5 ) ヒト化 H u 2 B 8 H v 5 - 5 1 . 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 1 6 8 )

【 0 2 6 8 】



【化 9 5】

1 atggggtcaa cgcctatcct cgcctcctc ctggctgttc tccaaggagt ctgtgccgaa  
 61 gtgcagctgg tgcagtctgg agcagagggtg aaaaagcccg gggagtctct gaagatctcc  
 121 tgtaagggtt ctggatacag ctttaccacc tactggatgc actgggtgog ccagatgccc  
 181 gggaaaggcc tggagtggat gggggagatt aatcctacca acggtcatac taactacaat  
 241 ccgtccttcc aaggccaggt caccatctca gctgacaagt ccatcagcac tgcctacctg  
 301 cagtggagca gcctgaaggc ctggacacc gccatgtatt actgtgcgag aaactatgtt  
 361 ggtagcatct ttgactactg gggccaagga accctgggtca ccgtctcctc ag

10

( 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 )

【 0 2 6 9 】

【化 9 6】

1 evqlvqsgae vkkpgeslki scksgsysft tywmhwwvrqm pgkglewmge inptnhtny  
 61 npsfqgqvti sadksistay lqwsslkasd tamyyccarny 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 I g 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

【 0 2 7 0 】

【化 9 7】

1 atggggtcaa cgcctatcct cgcctcctc ctggctgttc tccaaggagt ctgtgccgaa  
 61 gtgcagctgg tgcagtctgg agcagagggtg aaaaagcccg gggagtctct gaagatctcc  
 121 tgtaagggtt ctggatacag ctttaccacc tactggatgc actgggtgog ccagatgccc  
 181 gggaaaggcc tggagtggat gggggagatt aatcctacca acggtcatac taactacaat  
 241 ccgtccttcc aaggccaggt caccatctca gctgacaagt ccatcagcac tgcctacctg  
 301 cagtggagca gcctgaaggc ctggacacc gccatgtatt actgtgcgag aaactatgtt  
 361 ggtagcatct ttgactactg gggccaagga accctgggtca ccgtctcctc agcctccacc  
 421 aaggggcccat cgggtcttccc cctggcacc cctcccaaga gcacctctgg gggcacagcg  
 481 gccctgggct gcctgggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacggtgtc gtggaactca  
 541 ggcgccttga ccagcggcgt gcacaccttc ccggtgttcc tacagtcttc aggaactctac  
 601 tccctcagca cgtgtgtgac cgtgccttcc agcagcttgg gcacccagac ctacatctgc  
 661 aacgtgaatc acaagccag caacaccaag gtggacaaga aagttagacc caaatcttgt  
 721 gacaaaactc acacatgccc accgtgccc gcacctgaac tcttgggggg accgtcagtc  
 781 ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca  
 841 tgcgtgggtg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac  
 901 ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgctggagg agcagtacaa cagcacgtac  
 961 cgtgtgtgtc gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag  
 1021 tgcaagggtc ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaacctctc caaagccaaa  
 1081 gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag  
 1141 aaccaggtca gcctgacctg cctgggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgcctgggag  
 1201 tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctccctg gctggactcc  
 1261 gacggctcct tcttctctca cagcaagctc accgtggaca agagcagggt gcagcagggg

30

【 0 2 7 1 】

【化 9 8】

1321 aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc  
 1381 ctctccctgt ctccgggtaa atga

40

( 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 I g 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 )

【 0 2 7 2 】

## 【化 9 9】

1 evqlvqsgae vkkpgeslki sckgsgysft tywmhwvrgm pgkglewmge inptnghtny  
 61 npsfqqqvti sadksistay lqwsslkasd tamyycarny vgsifdywgq gtlvtvssas  
 121 tkgpsvfpla psskatsggt aalgclvkdy fpepvtvswm sgaltsgvht fpavlgssgl  
 181 yslssvvtvp ssslgtqtyi cnvnhkpsnt kvdkkvepks cdkthtcppc papellggps  
 241 vflfppkpkd tlmisrtpev tcvvvdvshe dpevkfnwyv dgvevhnakt kpreeqynst  
 301 yrvvsvltvl hgdwlngkey kckvsnkalp apiektiska kgqpprepqvy tlppsrdeit  
 361 knqvsiltclv kgfypsdiav ewesngqpen nykttppvld sdgsfflysk ltvdksrwqg  
 421 gnvfscsvmh ealhnhytgk slslspgk

( 1 9 ) 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 1 7 2 ) 。考えられる 2 つの開始 A T G を大文  
 字で示した。

【 0 2 7 3 】

【化 1 0 0】

1 ATGgacATGa ggggtccccgc tcagctcctg gggctcctgc tactctggct ccgaggtgcc  
 61 agatgtgaca tcagatgac ccagcttcca tcttccctgt ctgcattctg aggagacaga  
 121 gtcacatca cttgcaaggc cagtgagaat gtggtttctt atgtatcctg gtatcagcag  
 181 aaaccagga aagccccata gctcctgac taaggggcat ccaaccggaa cactgggggc  
 241 ccatcaaggt tcagtgagcag tggatctggg acagatttca ctctacacat cagcagctg  
 301 caacctgaag attttgcaac ttactactgt gggcagagtt acaactatcc gtacacgttt  
 361 ggccagggga ccaagctgga gatcaaac

( 2 0 ) 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 1 7 3 )

【 0 2 7 4 】

【化 1 0 1】

1 diqmtqspss lsasvdrvt itckasenvv syvswyqqkpk gkapklliyg asnrntgvps  
 61 rfsqsgsgtd fltisslqp edfatyycgq synpytfgq gtleik

( 2 1 ) ヒトカッパ鎖定常領域 ( K m ( 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 1 7 4 )

【 0 2 7 5 】

【化 1 0 2】

1 gaactgtggc tgcacatct gtctcatct tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg  
 61 gaactgcctc tgttgtgtgc ctgtgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt  
 121 ggaaggtgga taacgccctc caatcggtga actccagga gagtgtcaca gagcaggaca  
 181 gcaaggacag cactacagc ctcagcagca cctgacgct gagcaaagca gactacgaga

【 0 2 7 6 】

【化 1 0 3】

241 aacacaaagt ctacgcctgc gaagtcaccc atcagggcct gagctcgccc gtcacaaaga  
 301 gcttcaacag gggagagtggt tga

( 2 2 ) ヒトカッパ鎖定常領域 ( K m ( 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 1 7 5 )

【 0 2 7 7 】

10

20

30

40

50

【化 1 0 4】

1 rtvaapsvfi fppsdeqlks gtasvvciln nfypreakvq wkvdnalqsg nsqesvteqd  
61 skdstyslss titlskadye khkvacevt hqglsspvtk sfnrgec

( 2 3 ) 完全長ヒト化 H u 2 B 8 K v 1 - 3 9 . 1 軽鎖可変領域及びヒトカップ鎖  
定常領域 ( K m ( 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 1 7 6 )

【 0 2 7 8 】

【化 1 0 5】

10

1 atggacatga ggggtccccgc tcagctcctg gggctcctgc tactctggct ccgaggtgcc  
61 agatgtgaca tccagatgac ccagtctcca tcctccctgt ctgcatctgt aggagacaga  
121 gtcaccatca cttgcaaggc cagtggagaat gtggtttctt atgtatcctg gtatcagcag  
181 aaaccaggga aagcccctaa gctcctgata tatggggcat ccaaccggaa cactggggtc  
241 ccatcaaggt tcagtggcag tggatctggg acagatttca ctctcaccat cagcagtctg  
301 caacctgaag attttgcaac ttactactgt gggcagagtt acaactatcc gtacacgttt  
361 ggccaggsga ccaagctgga gatcaaacga actgtggctg caccatctgt ctcatcttc  
421 ccgcatctg atgagcagtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac  
481 ttctatccca gagaggcca agtacagtgg aaggtggata acgcctcca atcgggtaac  
541 tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc  
601 ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaaggtct acgcctgcga agtcacccat  
661 cagggcctga gctgcgccgt cacaagagc ttcaacaggg gagagtgtg a

( 2 4 ) 完全長ヒト化 H u 2 B 8 K v 1 - 3 9 . 1 軽鎖可変領域及びヒトカップ鎖  
定常領域 ( K m ( 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  
1 7 7 )

20

【 0 2 7 9 】

【化 1 0 6】

1 diqmtqspss lsasvgdrvt itckasenvv syvswyqqkp gkapklliyg asnrntgvps  
61 rfsqsgsgtd ftltisslqp edfatyycgq synpytfgq gtkleikrtv aapsvfifpp  
121 sdeqlksqta svvcilnnfy preakvqkwv dnalqsgnsq esvteqdsd styslsslt  
181 lskadyekhk vyacevthqg lsspvtksfn rgec

( 2 5 ) ヒト化 H u 2 B 8 K v 3 - 1 5 . 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 1 7 8 )

30

【 0 2 8 0 】

【化 1 0 7】

1 atggaagccc cagcgcagct tctctcctc ctgctactct ggctcccaga taccactgga  
61 gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc  
121 ctctctgca aggccagtga gaatgtggtt tcttatgtat cctggtacca gcagaaacct  
181 ggccaggctc ccaggctcct catctatggg gcatccaacc ggaacactgg tatccagcc

【 0 2 8 1 】

【化 1 0 8】

40

241 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagag ttactctca ccatcagcag cctgcagtct  
301 gaagattttg cagttatta ctgtgggcag agttacaact atccgtacac gtttggccag  
361 gggaaccaagc tggagatcaa ac

( 2 6 ) ヒト化 H u 2 B 8 K v 3 - 1 5 . 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 1 7 9 )

【 0 2 8 2 】

【化 1 0 9】

1 eivmtqspat lsvspgerat lsckasenvv syvswyqqkp gqaprlliyg asnrntgipa  
 61 rfsgsgsgte fltisslqs edfavyycgq synpytfgq gtleik

( 2 7 ) 完全長ヒト化 H u 2 B 8 K v 3 - 1 5 . 1 軽鎖可変領域及びヒトカップ鎖  
 定常領域 ( K m ( 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 1 8 0 )

【 0 2 8 3 】

【化 1 1 0】

```

1 atggaagccc cagcgagct tctcttcctc ctgctactct ggctcccaga taccactgga
61 gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc
121 ctctcctgca aggccagtga gaatgtggtt tcttatgtat cctggtacca gcagaaacct
181 ggccaggctc ccaggctcct catctatggg gcatccaacc ggaacactgg tatcccagcc
241 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagag ttcactctca ccatcagcag cctgcagtct
301 gaagattttg cagtttatta ctgtgggcag agttacaact atccgtacac gtttggccag
361 gggaccaagc tggagatcaa acgaactgtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcca
421 tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat
481 ccagagaggy ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag
541 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg
601 ctgagcāaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc
661 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttga

```

10

( 2 8 ) ヒト化 H u 2 B 8 K v 3 - 1 5 . 1 軽鎖可変領域及びヒトカップ鎖定常領  
 域 ( K m ( 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 1 8 1 )

20

【 0 2 8 4 】

【化 1 1 1】

```

1 eivmtqspat lsvspgerat lsckasenvv syvswyqqkp gqaprlliyg asnrntgipa
61 rfsgsgsgte fltisslqs edfavyycgq synpytfgq gtleikrtv aapsvfifpp
121 sdeqlksgta svvcilnnfy preakvqwkq dnalqsgnsq esvteqdskd styslsstlt
181 lskadyekhk vyacevthqg lsspvtksfm 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の対  
 応関係を示すコンコードンス表を表 1 3 に示した。

【 0 2 8 5 】

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) P R O T E I N E N G . 7 : p . 8 0 5 - 8 1 4 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 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 (K m ( 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 H G F 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

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。

【 0 2 8 7 】

( 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 1 8 2 )

【 0 2 8 8 】

【 化 1 1 2 】

1 atgggctggt catatattat tcctttctt gttgctaccg ctaccgatgt gcactctcaa  
61 gtccaactcg tacaaccagg cgctgaagtc gtaaaaccg gaacatctgt taaactctca  
121 tgcaaaagcct caggatacac ttccacaact tactggatgc attgggtcaa tcaagccccc  
181 ggacaaggcc tcgaatggat tggcgaaatt aacccaacta acggacatac taattataat  
241 gaaaaattta agggcaaagc tacactcacc gtcgataaat caacctctac agcttatatg  
301 gaactttcat cctgagatc agaagataca gccgtctact attgcgccag aaactacgta  
361 ggatcaatat tcgattactg gggtaaggc actctctca 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 1 8 3 )

20

【 0 2 8 9 】

【 化 1 1 3 】

1 qvqlvpgae vvkpgtsvkl sckasgytft tywmhwnqa pgqglewige inptnghtny  
61 nekfkqkatl tvdkststay melsslr sed tavyycarny vgsifdywgq gtlltvss

( 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 1 8 4 )

【 0 2 9 0 】

【化 1 1 4】

1 ccagcacaaa gggcccatcg gtcttcccc tggcacccctc ctccaagagc acctctgggg  
 61 gcacagcggc cctgggctgc ctggtcaagg actacttccc cgaaccggtg acgggtgctgt  
 121 ggaactcagg gcacctgacc agcggcgtgc acaccttccc ggctgtccta cagtcctcag  
 181 gactctactc cctcagcagc gtggtgaccg tgccctccag cagcttgggc acccagacct  
 241 acatctgcaa cgtgaatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaga gttgagccca  
 301 aatcttgtga caaaactcac acatgtccac cgtgccacgc acctgaactc ctggggggac  
 361 cgtcagtctt cctcttcccc caaaaacca aggacaccct catgatctcc cggaccctg  
 421 aggtcacatg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaagacc tgaggtaag ttaactggt  
 481 acgtggacgg cgtggaggig cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca  
 541 gcacgtaccg tgtggtcagc gtccctaccg tctgcacca ggactggctg aatggcaagg  
 601 agtacaagtg caaggtctcc aacaaagccc tccagcccc catcgagaaa accatctcca  
 661 aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacacct gccccatcc cgggaggaga  
 721 tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tggtaaaagg cttctatccc agcgacatcg  
 781 ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc  
 841 tggactccga cggtccttc ttctctata gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc  
 901 agcaggggaa cgtcttctca tgcctcgtga tgcatgaggc tctgcacaac cactacacgc  
 961 agaagagcct ctccctgtcc ccgggtaaat ga

10

20

(4) 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 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 I g 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。

【0 2 9 1】

【化 1 1 5】

1 astkgpsvfp lapsskstsg gtaalgclvk dyfpepvtvs wnsaltsgv htfpavlqss  
 61 glylssvvt vpssslgtqt yicvnhkps ntkvdkrvep kscdkthtcp pcpapellgg  
 121 psvflfppkp kdtlmisrtp evtcvvvdvs hedpevkfnw yvdgvevhna ktkpreeqyn

30

【0 2 9 2】

【化 1 1 6】

181 styrvsvlt vlhqdwlngk eyckvsnka lpapiektis kakgqprepq vytlppsree  
 241 mtknqvsltc lvkgfypsdi avewesngqp ennykttppv ldsdgsffly skltvdksw  
 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 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) (下線: シグナル配列) (配列番号 186)  
 )

【0 2 9 3】

【化 1 1 7】

```

1 atgggctggt catatattat tctctttctt gttgctaccg ctaccgatgt gcactctcaa
61 gtccaactcg tacaaccagg cgctgaagtc gtaaaaccgg gaacatctgt taaactctca
121 tgcaaaagcct caggatacac ttccacaact tactggatgc attgggtcaa tcaagccccc
181 ggacaaggcc tcgaatggat tggcgaaatt aaccacaacta acggacatac taattataat
241 gaaaaatttta agggcaagc tacactcacc gtcgataaat caacctctac agcttataatg
301 gaactttcat ccctgagatc agaagataca gccgtctact attgcgccag aaactacgta
361 ggatcaatat tcgattactg gggtcaggc actctctctca cagtccagctc agccagcaca
421 aagggcccat cggctctccc cctggcacc cctcccaaga gcacctctgg gggcacagcg
481 gccctgggct gcctgggtcaa ggactacttc ccgaaccgg tgacgggtgc gtggaactca
541 ggcgcctga ccagcggcgt gcacaccttc ccggctgtcc tacagtctc aggactctac
601 tccctcagca gcgtgggtgac cgtgcctcc agcagcttgg gcaccagac ctacatctgc
661 aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga gatttgagcc caaatcttgt
721 gacaaaactc acacatgtcc accgtgccc gcacctgaac tctgggggg accgtcagtc
781 ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcagtatct cccggacccc tgaggtcaca
841 tgcgtgggtg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac
901 ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac
961 cgtgtgggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaa
1021 tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaacatctc caaagccaaa
1081 gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggagga gatgaccaag
1141 aaccaggtca gcctgacctg cctgggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag
1201 tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgctcccggt gctggactcc
1261 gacggctcct tcttctctca tagcaagctc accgtggaca agagcagggt gcagcagggg
1321 aacgtcttct catgtccgt gatgcagtag gctctgcaca accactacac gcagaagagc
1381 ctctcctgt cccgggtaa 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 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 1 8 7 )

20

【 0 2 9 4 】

【化 1 1 8】

```

1 qvqlvppgae vvkpgtsvkl sckasgytft tywmhwnqa pggglewige inptnghtny
61 nekfkkgkatl tvdkststay melsslrstd tavyycarny vgsifdywgq gtlitvssas
121 tkqpsvfpla psskstsggt aalgclvkd yfepvtvsw nsgaltsgvht fpavlgssgl
181 yslssvvtvp ssslgtqti cnvnhkpsnt kvdkrvepks cdkthtcpc papellggps
241 vflfppkpkd tlmisrtpev tcvvvdvshe dpevkfnwyv dgvevhnaht kpreeqynst
301 yrvsvltvl hgdwlngkey kckvsnkalp apiektiska kgqprepqvy tlppsreemt
361 knqvsiltclv kgfypsdiav ewesngqpen nykttppvld sdgsfflysk ltvdksrwqq
421 gnvfscsvmh ealhnhytqk slslspgk

```

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 1 8 8 )

【 0 2 9 5 】

【化 1 1 9】

```

1 atgggttggg catatattat actctttctc gtagccaccg ccaccgacgt acactctcag
61 gtccaactcg tacaaccagg cgccgaagtc aagaaccagg gaacatcagt caaactctca
121 tgtaaagcaa gcggatacac ctltactact tattggatgc attgggtaag acaagccccc
181 ggacaaggac tcgaatggat aggcgaataa aatccacta atggacatac aaattataat
241 caaaaatttc aaggacgcgc tacactcacc gtcgataaat caacctcaac cgcatacatg
301 gaactcagct cctccgac cgaagacact gccgtttatt attgtgccag aaactatgta
361 ggatctattt tcgattactg gggacaagga acacttctca ccgtaagctc 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 1 8 9 )

【 0 2 9 6 】



【化 1 2 0】

1 qvqlvqpgae vkkpgtsvkl sckasgytft tywmhvwrra pgqglewige inptnghtny  
61 nqkfgratl tvdkststay melsslr sed tavyycarny vgsifdywgq gtlitvss

( 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 1 9 0 )

【 0 2 9 7 】

【化 1 2 1】

10

```

1  atgggttggt catatattat actctttctc gtagccaccg ccaccgacgt acactctcag
61  gttcaactcg tacaaccgg cgccgaagtc aagaaccag gaacatcagt caaactctca
121 tgtaaagcaa gcgatacac ctttactact tattggatgc attgggtaag acaagcccc
181 ggacaaggac tcgaatggat aggcgaata aatccacta atggacatac aaattataat
241 caaaaatttc aaggacgcgc tacactcacc gtcgataaat caacctcaac cgcatacatg
301 gaactcagct ccctccgatc cgaagacact gccgtttatt attgtgccag aaactatgta
361 ggatctatct tcgattactg gggacaagga acacttctca ccgtaagtc agccagcaca
421 aagggcccat cggctctccc cctggcacc tcctccaaga gcacctctgg gggcacagcg
481 gccctgggct gcctgggtcaa ggactacttc ccgaaccgg tgacgggtgtc gtggaactca
541 ggcgccttga ccagcggcgt gcacaccttc ccggctgtcc tacagtcttc aggactctac
601 tccctcagca gcgtggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcaaccagac ctacatctgc
661 aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga gaggtagacc caaatcttgt
721 gacaaaactc acacatgtcc accgtgccc gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc
781 ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca
841 tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgagggtc agttcaactg gtacgtggac
901 ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtaaca cagcacgtac
961 cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag
1021 tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa
1081 gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggagga gatgaccaag
1141 aaccaggtca gcctgacctg cctgggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgcctgggag
1201 tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccggt gctggactcc
1261 gacggctcct tcttcctcta tagcaagctc accgtggaca agagcagggt gcagcagggg
1321 aacgtcttct catgctccgt gatgctgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc
1381 ctctccctgt ccccggttaa atga

```

20

( 1 0 ) 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 1 9 1 )

30

【 0 2 9 8 】

【化 1 2 2】

```

1  qvqlvqpgae vkkpgtsvkl sckasgytft tywmhvwrra pgqglewige inptnghtny
61  nqkfgratl tvdkststay melsslr sed tavyycarny vgsifdywgq gtlitvssas
121 tkgpsvfpla psskstsggt aalgclvkd fpepvtvswn sgaltsgvht fpavlgssgl
181 yslssvvtvp ssslgtqtyi cnvnhkpsnt kvdkrvepks cdkthtccpc papellggps
241 vflfppkpkd tlmisrtpev tcvvvdvshe dpevkfnwyv dgvevhnakt kpreegynst
301 yrvsvlvtvl hqdwlngkey kckvsnkalp apiektiska kgqprepqvy tlppsreemt
361 knqvsltclv kgfypsdiav ewesngqpen nyktppvld sdgsfflysk ltvdksrwgq
421 gnvfscsvmh ealnhhytqk slslspgk

```

( 1 1 ) 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 1 9 2 )

40

【 0 2 9 9 】

【化 1 2 3】

1 atggaaagtc agacccttgt attcatctct attcttcttt ggttgatgg agcagacggc  
 61 gacattgtga tgaccaatc ccccgatagt atggccatga gtgtaggaga aagagtcacc  
 121 cttaattgca aagcctccga aaatgtcgtt tcatatgtgt ctgggtatca acaaaaaccc  
 181 ggccaatcac ccaaacttct catatacggc gcttcaaaca gaaacacagg cgttcccgac  
 241 agatttagtg gatccggatc agctacagat ttcacctta ccatcagttc agttcaagca  
 301 gaagacgttg cagactatca ttgcggacaa tcttataact acccttacac attcggacaa

( 1 2 ) 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 1 9 3 )

10

【 0 3 0 0 】

【化 1 2 4】

1 divmtqspds mamsvgervt lncasenvv syvswyqqkp gqspklliyy asnrntgvpd  
 61 rfsgsgsatd fltissvqa edvadyhcgq synpytfgq gtleik

( 1 3 ) ヒトカッパ鎖定常領域 ( K m ( 3 ) アロタイプ ) ( 対立遺伝子 1 ) をコードしている核酸配列 ( 配列番号 1 9 4 )

【 0 3 0 1 】

【化 1 2 5】

20

1 gtacgggtggc tgcaccatct gtcttcatct tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg  
 61 gaaatgcctc tgttggtgac ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt  
 121 ggaagggtgga taacgccctc caatcgggta actcccagga gagtgtcaca gagcaggaca  
 181 gcaaggacag cacctacagc ctacgacgca ccctgacgct gagcaaagca gactacgaga  
 241 aacacaaagt ctacgcctgc gaagtcaccc atcagggcct gagctcgccc gtcacaaaga  
 301 gcttcaacag gggagagtgt tag

( 1 4 ) ヒトカッパ鎖定常領域 ( K m ( 3 ) アロタイプ ) ( 対立遺伝子 1 ) を規定する蛋白質配列 ( 配列番号 1 9 5 ) 。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

【 0 3 0 2 】

【化 1 2 6】

1 rtvaapsvfi fppsdeqlks gtasvclln nfypreakvq wkvdnalqsg nsqesvteqd  
 61 skdstyslss titlskadye khkvacevt hqglsspvtk sfnrgec

( 1 5 ) 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 ) をコードしている核酸配列 ( 配列番号 1 9 6 )

40

【 0 3 0 3 】

【化 1 2 7】

1 atggaaagtc agacccttgt attcatctct atttctcttt ggttgatgg agcagacggc  
 61 gacattgtga tgaccctaac ccccgatagt atggccatga gtgtaggaga aagagtcacc  
 121 cttaattgca aagcctccga aaatgtcgtt tcataatgtgt cttggtatca acaaaaaccc  
 181 ggccaatcac ccaaacttct catatacggc gcttcaaaca gaaacacagg cgttcccgcac  
 241 agatttagtg gatccggatc agctacagat ttcacctta ccatcagttc agttcaagca  
 301 gaagacgttg cagactatca ttgcggacaa tcttataact acccttacac attcggacaa  
 361 ggaaccaaac tcgaaattaa acgtacggtg gctgcacat ctgtcttcac cttcccgcac  
 421 tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttggtg gcctgctgaa taacttctat  
 481 cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggt gataacgccc tccaatcggg taactcccag  
 541 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg  
 601 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc  
 661 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagctcaaac aggggagagt gtttag

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 1 9 7 )

【 0 3 0 4 】

【化 1 2 8】

1 divmtqspds mamsvgervt lnckasenvv syvswyqqkp gqspkliyg asnrntgvpd  
 61 rfsqsgsatd ftltissvqa edvadyhcgq synpytfgq gtleikrtv aapsvfifpp  
 121 sdeqlksqta svvcllnfy preakvqkw dnalqsgnsq esvteqdskd styslsstlt  
 181 lskadyekhk vyacevthqg lsspvtksfm rgeg

( 1 7 ) 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 1 9 8 )

20

【 0 3 0 5 】

【化 1 2 9】

1 atggaatccc aaacccctgt ttcatctct atccttctct ggctttatgg cgccgacgga  
 61 gacatcgtaa tgacacaatc cctgactct cttgctatga gcttggcgca acgagtaaca  
 121 cttaactgca aagcatccga aaatgtcgta tcttacgtat cctggtatca gcaaaaacct  
 181 ggtcaaaagc cttaaactct tatatatggt gcaagtaatc gtgaaagtgg cgtcccagac  
 241 agatttagcg gttcagggtc agcaactgac tttaactta caatttctag cgttcaggcc  
 301 gaagacgttg cagactatca ttgtggacaa tcttataact atccttatac tticggacaa  
 361 ggcactaaac ttgaaattaa ac

30

( 1 8 ) 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 1 9 9 )

【 0 3 0 6 】

【化 1 3 0】

1 divmtqspds lamslgervt lnckasenvv syvswyqqkp gqspkliyg asnresgvpd  
 61 rfsqsgsatd ftltissvqa edvadyhcgq synpytfgq gtleik

( 1 9 ) 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 ( K 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 2 0 0 )

40

【 0 3 0 7 】

## 【化 1 3 1】

```

1 atggaatccc aaacccttgt tttcatctct atccttctct ggctttatgg cgccgacgga
61 gacatcgtaa tgacacaatc ccctgactct cttgctatga gcttgggcga acgagtaaca
121 cttaactgca aagcatccga aaatgtcgta tcttacgtat cctgggtatca gcaaaaacct
181 ggtcaaaagtc ctaaaactct tatatatggt gcaagtaatc gtgaaagtgg cgtcccagac
241 agatttagcg gttcagggtc agcaactgac tttacactta caatttctag cgttcaggcc
301 gaagacgttg cagactatca ttgtggacaa tcttataact atccttatac tttcggacaa
361 ggcactaaac ttgaaattaa acgtaacgtg gctgcacccat ctgtcttcat cttcccgcga
421 tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgtgtgtg gcctgctgaa taacttctat
481 ccagagaggg ccaaagtaca gtggaagggt gataacgccc tccaatcggg taactcccag
541 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg
601 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc
661 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gtttag

```

10

( 2 0 ) 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 ( K m ( 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 2 0 1 )

## 【 0 3 0 8 】

## 【化 1 3 2】

```

1 divmtqspds lamslgervt lncasenvv syvswyqqkp gqspklliyy asnresgvpd
61 rfsqsgsatd ftltissvqa edvadyhcgq synpytfgq gtleikrtv aapsvfifpp
121 sdeqlkshta svvcllnfy preakvqwkv dnalqsgnsq esvteqgskd styslsstlt
181 lskadyekhk vyacevthgg lsspvtksfv 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ドランス表を表 1 4 に示した。

20

## 【 0 3 0 9 】

## 【表 1 4】

表 1 4

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 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 ) —核酸
185	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 ) —蛋白質
186	LR2B8HC + IgG1 定常領域 ( G 1 m ( 3 ) アロタイプ ) ( 対立遺伝子 1 ) —核酸
187	LR2B8HC + IgG1 定常領域 ( G 1 m ( 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 ( G 1 m ( 3 ) アロタイプ ) ( 対立遺伝子 1 ) —核酸
191	LRMR2B8HC + IgG1 定常 ( G 1 m ( 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 ( K m ( 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 ( K m ( 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 ( K m ( 3 ) アロタイプ ) ( 対立遺伝子 1 ) —核酸
197	LR2B8LC + カッパ鎖定常領域 ( K m ( 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 ( K m ( 3 ) アロタイプ ) ( 対立遺伝子 1 ) —核酸
201	LRMR2B8LC + カッパ鎖定常領域 ( K m ( 3 ) アロタイプ ) ( 対立遺伝子 1 ) —蛋白質

30

40

表 1 5 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 抗体の重鎖 C D R 配列 ( カバットの定義 ) をまとめたものである。

## 【 0 3 1 0 】

【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。

【 0 3 1 1 】

【表 16】

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

### 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)、209-005-098) 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、0.05%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)、2mg/mLの B S A (E M D 社カタログ番号 2930) 及び 10mg/mL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 86524) を含有する P B S (G I B C O 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。

【 0 3 1 2 】

前記抗体は、個々のフローセル上で 10  $\mu$  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 20 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 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  $60 \mu\text{L}$  / 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、 $\text{pH} 2.0$  の  $10 \text{ mM}$  グリシン - 塩酸 (BIAcore 社、カタログ番号 BR - 1003 - 55) 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  $1.88$ 、 $3.75$  及び  $7.5 \text{ nM}$  であった。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 (BIA 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。

#### 【0313】

図 8 にまとめた結果から、超ヒト化重鎖 (Hu2B8 Hv5a.1、Hu2B8 Hv5-51.1 又は Hu2B8 Hv1-f.1) 及び軽鎖 (Hu2B8 Kv1-39.1 又は Hu2B8 Kv3-15.1) の一部の組合せは、キメラ 2B8 (マウス可変領域及びヒト定常領域) 並びに 2B8 (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 T100 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 ImmunoResearch Labs)、209-005-098) 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 (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、 $0.05\%$  の界面活性剤 P20 (BIAcore、BR - 1000 - 54)、 $2 \text{ mg/mL}$  の BSA (EMD 社カタログ番号 2930) 及び  $10 \text{ mg/mL}$  の CM-デキストランナトリウム塩 (フルカ社 (Fluka)、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。

#### 【0314】

前記ヒト化抗体は、個々のフローセル上で  $30 \mu\text{L}$  / 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  $150 \text{ RU}$  の抗体を生じるための注入時間にはばらつきがあった。  $7.5 \mu\text{g/mL}$  の最終濃度に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) を上記捕捉ヒト化抗体上に  $30 \mu\text{L}$  / 分で 90 秒間注入した。HGF の結合を測定した後、続いてマウス 2B8 抗体又はヤギポリクロナール抗 HGF 抗体 (R&D システムズ社、AF294) を  $30 \mu\text{L}$  / 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、 $\text{pH} 2.0$  の  $10 \text{ mM}$  グリシン - 塩酸 (BIAcore 社、カタログ番号 BR - 1003 - 55) を  $60 \mu\text{L}$  / 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。

#### 【0315】

図 9 にまとめた結果から、ヒト化 2B8 抗体及びキメラ 2B8 抗体はいずれもマウス 2B8 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 2B8 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 13)

#### ヒト化 2B8 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、LR2B8LC 及び LRMR2B8L) 及び重鎖 (それぞれ、LR2B8HC 及び LRMR2B8HC) 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 2B8 変異体は、HEK293E 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。

## 【0316】

HE2B8-1 = LR2B8HC(+IgG1定常領域(G1m(3)アロタイプ(対立遺伝子1))(配列番号187)プラスLR2B8LC(+カッパ鎖定常領域(Km(3)アロタイプ(対立遺伝子1)))(配列番号197)

HE2B8-2 = LR2B8HC(+IgG1定常領域(G1m(3)アロタイプ(対立遺伝子1))(配列番号187)プラスLRMR2B8LC(+カッパ鎖定常領域(Km(3)アロタイプ(対立遺伝子1)))(配列番号201)

HE2B8-3 = LRMR2B8HC(+IgG1定常領域(G1m(3)アロタイプ(対立遺伝子1))(配列番号191)プラスLR2B8LC(+カッパ鎖定常領域(Km(3)アロタイプ(対立遺伝子1)))(配列番号197)

HE2B8-4 = LRMR2B8HC(+IgG1定常領域(G1m(3)アロタイプ(対立遺伝子1))(配列番号191)プラスLRMR2B8LC(+カッパ鎖定常領域(Km(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IS293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XOMA社の懸濁適応HEK293E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200mLを遠心分離し、新鮮培地40mLに再懸濁し、産生用インテグラ(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、PBS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Hu2B8\_\_Hv5-51.1+ヒトIgG1定常ドメイン(G1m(3)アロタイプ)cDNAをHindIII及びEcoRI制限部位を利用してpEE6.4(ロンザバイオロジックス社(Lonza Biologics)、パークシャー、英国)中にクローニングした。完全長Hu2B8\_\_Kv-39.1可変領域+ヒトカッパ鎖定常ドメインcDNA及び完全長Hu2B8\_\_Kv3-15.1可変領域+ヒトカッパ鎖定常ドメインcDNAをそれぞれ、HindIII及びEcoRI制限部位を利用してpEE14.4(ロンザバイオロジックス社)中にクローニングした。(pEE6.4内の)hCMV-MIEプロモーター+完全長Hu2B8\_\_Hv5-51.1+ヒトIgG1定常ドメイン(G1m(3)アロタイプ)cDNA+SV40ポリA断片をNotI/SalI消化により切り出し、どちらのカッパ鎖pEE14.4ベクター中にもNotI/SalI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】

sh2B8-9(G1m(3)) = hu2B8 Hv5-51.1(+IgG1定常領域(G1m(3)アロタイプ)(対立遺伝子2))(配列番号210)プラスhu2B8 Kv 1-39.1(+カッパ鎖定常領域(Km(3)アロタイプ(対立遺伝子2)))(配列番号177)

sh2B8-12(G1m(3)) = hu2B8 Hv5-51.1(+IgG1定常領域(G1m(3)アロタイプ)(対立遺伝子2))(配列番号210)プラスhu2B8 Kv 3-15.1(+カッパ鎖定常領域(Km(3)アロタイプ(対立遺伝子2)))(配列番号181)

上記ヒトIgG1重鎖定常領域G1m(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IgG1重鎖定常領域(G1m(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 gtcttcccc tggcacccctc ctccaagagc acctctgggg  
61 gcacagcggc cctgggctgc ctggtcaagg actacttccc cgaaccgggtg acggtgtcgt  
121 ggaactcagg cgccctgacc agcggcgctgc acaccttccc ggctgtccta cagtctcag  
181 gactctactc cctcagcagc gtgggtgaccg tgccctccag cagcttgggc acccagacct  
241 acatctgcaa cgtgaatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaga gttgagccca  
301 aaicttgtga caaaactcac acatgcccac cgtgcccagc acctgaacte ctggggggac

10

【0321】

【化134】

361 cgtcagtctt ccttcccc ccaaaacca aggacacct catgatctcc cggacccctg  
421 aggtcacatg cgtgggtgtg gacgtgagcc acgaagacc tgaggtcaag ttcaactggt  
481 acgtggacgg cgtggagggt cataatgcc agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca  
541 gcacgtaccg tgtggtcagc gtcctcaccg tctgcacca ggactggctg aatggcaagg  
601 agtacaagtg caaggtctcc aacaaagccc tccagcccc catcgagaag accatctcca  
661 aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacacct gccccatcc cgggaggaga  
721 tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tggtaaagg ctctatccc agcgacatcg  
781 ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgctc  
841 tggactccga cggtccttc ttctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc  
901 agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcagaggc tctgcacaac cactacacgc  
961 agaagagcct ctccctgtct cgggtaaat ga

20

（2） ヒト IgG 1 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 IgG 1 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 gtaalglvk dyfpepvtvs wnsaltsgv htfpavliqss  
61 glyslssvvt vpssslgtqt yicvnhkps ntkvdkrvep kscdkthtcp pcpapellgg  
121 psvflfppkp kdtlmisrtp evtcvvvdvs hedpevkfnw yvdgvevhna ktkpreeqyn  
181 styrvsvlt vlhqdwlngk eyckvsnka lpapiektis kakgqprepq vytlppsree  
241 mtknqvsltc lvkgfypsdi avewesngqp ennykttppv ldsdgsffly skltvdksrw  
301 qqgnvfscsv mhealhnhyt qkslsispkg

40

（3） ヒト化 Hu2B8 Hv5-51.1 重鎖可変領域及びヒト IgG 1 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 1 3 6】

```

1 atgggggtcaa cggccatcct cggcctcctc ctggetgttc tccaaggagt ctgtgccgaa
61 gtgcagctgg tgcagtctgg agcagaggtg aaaaagcccg gggagtctct gaagatctcc
121 tgttaagggtt ctggatacag ctttaccacc tactggatgc actgggtgcg ccagatgccc
181 gggaaaggcc tggagtggat gggggagatt aatcctacca acggtcatac taactacaat
241 ccgtccttcc aaggccaggt caccatctca gctgacaagt ccatcagcac tgcctacctg
301 cagtggagca gcctgaaggc ctcggacacc gccatgtatt actgtgcgag aaactatggt
361 ggtagcatct ttgactactg gggccaagga accctgggtc ccgtctctc agcctccacc
421 aagggcccat cgtcttccc cctggcacc tctccaaga gcacctctgg gggcacagcg
481 gccctgggtc gcctgggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacggtgtc gtggaaactca
541 ggcgcctga ccagcggcgt gcacaccttc cgggtgtcc tacagtctc aggactctac
601 tccctcagca gcgtgggtgac cgtgccctcc agcagcttg gcaccagac ctacatctgc
661 aacgtgaatc acaagccag caacaccaag gtggacaaga gagttagacc caaatcttgt

```

10

## 【 0 3 2 4】

## 【化 1 3 7】

```

721 gacaaaactc acacatgccc accgtgccc gcacctgaac tcttgggggg accgtcagtc
781 ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcctgatct cccggacccc tgaggtcaca
841 tgcgtgggtg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac
901 ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgaggag agcagtacaa cagcacgtac
961 cgtgtgggtc gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag
1021 tgcaagggtc ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga agaccatctc caaagccaaa
1081 gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccggaggga gatgaccaag
1141 aaccaggtca gcctgacctg cctgggtcaa ggcttctatc ccagcgacat cgcctggag
1201 tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgctcccggt gctggactcc
1261 gacggctcct tctcctcta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg
1321 aacgtcttct catgctcgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc
1381 ctctccctgt ctccgggtaa 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 2 1 0 )

## 【 0 3 2 5】

## 【化 1 3 8】

```

1 evqlvqsgae vkkpgeslki sckgsgysft tywmhwvrqm pgkglewmge inptnghtny
61 npsfqqgvti sadksistay lqwsslkasd tamyyccarny vgsifdywgq gtlvtvssas
121 tkgpsvfpla psskstsggt aalgclvkdy fpepvtvswm sgaltsgvht fpavqlqssgl
181 yslssvvtvp ssslgtqtyi cnvnhkpsnt kvdkrvepks cdkthtccppc papellggps
241 vflfpkpkd tlmisrtpev tcvvvdvshe dpevkfnwyv dgvevhnakt kpreegynst
301 yrvsvltvl hqdwlngkey kckvsnkalp apiektiska kgqprepqvy tlppsreemt
361 knqvsltlclv kgfypsdiav ewesngqpen nykttppvld sdgsfflysk ltvdksrwqq
421 gnvfscsvmh ealhnhytqk slslspgk

```

30

各二重発現ベクターを 2 9 3 T 細胞中に形質移入し、D M E M 1 0 % ウシ胎仔血清を用いて一過性に発現させた。形質移入後 4 8 時間に、無血清培地である、4 m M 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 ( I r v i n e S c i e n t i f i c ) 、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 1 0 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 . 4 5 μ m ) して 1 0 ~ 1 0 0 倍に濃縮した。抗体は、プロステッ

40

## ( 実施例 1 4 )

## ヒト化 2 B 8 変異体の結合特性

実施例 1 3 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。

## 【 0 3 2 6】

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

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 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。

#### 【 0 3 2 7 】

分析は、0.05%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 mg / mL の B S A (E M D 社カタログ番号 2 9 3 0 ) 及び 1 0 mg / mL 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、25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)	rhHGF (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 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 6 - 6 8 ) 上に固定化した。分析は、0.05%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 mg / mL 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、25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

/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10 mMグリシン-HCl (BIAcore社、カタログ番号BR-1003-54)を60  $\mu$ 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0.46 nM及び7.5 nM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】

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

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12 pM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。

【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2 mg/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。

【0334】

前記抗体は、個々のフローセル内で10  $\mu$ 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20 RU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60  $\mu$ L/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10 mMグリシン-HCl(BIAcore社、カタログ番号BR-1

003-54)を60 $\mu$ 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、pH1.7の10mMグリシン-HCl(BIAcore社、カタログ番号BR-1003-54)を60 $\mu$ 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0.46nM及び7.5nM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、生理的溫度(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性化した。

#### 【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DELTAアッセイプレート(ワラック社、カタログ番号AAND-0001)を6.25 $\mu$ g/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(15mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 及び34mM  $\text{NaHCO}_3$ 、pH9.0)溶液100 $\mu$ Lにより4で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 $\mu$ 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2nM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250nM、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 $\mu$ 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% Tween20で3回洗浄した後、DELTA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ジン(ワラック社、カタログ番号12

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にDELTA洗浄液(ワラック社、カタログ番号4010-0010)で3回洗浄した後、100 $\mu$ L/ウェルのDELTA強化溶液(ワラック社、#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)

ヒト化2B8変異体の抗散乱活性

40

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 2 B 8 と同程度に H G F 誘発性散乱を抑制した。

( 実施例 1 9 )

H G F 刺激 c - M e t リン酸化の阻害

表 1 7 の抗体を実施例 9 で説明した c - M e t 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。

## 【 0 3 4 3 】

## 【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、P C - 3 細胞において H G F 誘発性 c - M e t リン酸化の強力な阻害剤である。

( 実施例 2 0 )

U 8 7 M G 異種移植モデルにおける腫瘍抑制

U 8 7 M G 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。U 8 7 M G 細胞 ( A T C C ) は、ダルベッコ改変イーグル培地 ( D M E M : D u l b e c c o ' s M o d i f i e d E a g l e m e d i u m ) を 1 0 % ウシ胎仔血清、1 0 0 単位 / m L ペニシリン及び 1 0 0  $\mu$  g / m L ストレプトマイシンと共に含む培地を用いた、5 % C O <sub>2</sub> 及び 9 5 % 空気を含有する雰囲気中 3 7 の培養で増殖させた。これらの細胞は、トリプシン - E D T A 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。

【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 バイオサイエンス社 (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 ( $\text{mm}^3$ ) =  $L \times W^2 / 2$  として計算した。腫瘍が約  $200 \text{ mm}^3$  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  $0.25 \text{ mg/kg}$  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。

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 ノードマウス (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  $0.5 \text{ mg/kg}$  の以下の処置剤、即ち、PBS 溶媒対照、hu IgG 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。

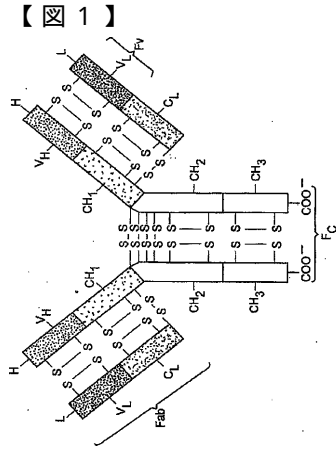
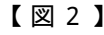


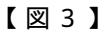
FIG. 1



完全重鎖可変領域アミノ酸整列

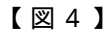
[illegible]

**FIG. 2**



抗体	CD31	CD29	CD33
1A3	LYN6S (配列番号 5)	Y15PG00002RATG (配列番号 6)	Q0800000 (配列番号 7)
2B8	TYN1 (配列番号 15)	ELNPG00001RATG (配列番号 26)	RG-----LSPG (配列番号 27)
2P8	TYN1 (配列番号 25)	ITGCG00001RATG (配列番号 26)	NY-----LSPG (配列番号 27)
3B6	SWN9 (配列番号 35)	Q1YED00000RATG (配列番号 36)	EC-----LSPG (配列番号 47)
3B7	SWN9 (配列番号 35)	Q1YED00000RATG (配列番号 36)	EC-----LSPG (配列番号 47)
3C12	SWN9 (配列番号 55)	Y15SG00001RATG (配列番号 66)	Q0800000 (配列番号 67)
3F3	NFYS (配列番号 65)	Y15SG00001RATG (配列番号 66)	Q0800000 (配列番号 67)
3L2	NFYS (配列番号 75)	Y15SG00001RATG (配列番号 76)	Q0800000 (配列番号 77)

FIG. 3



完全軽（カップ）鎖可変領域アミノ酸整列

[illegible]

**FIG. 4**



【図 5】

軽（カッパ）鎖CDRアミノ酸配列

抗体	CDR1	CDR2	CDR3
1A3	RASNTY----SNLA (配列番号 8)	RATLAD (配列番号 9)	QNEPTFTT (配列番号 10)
1D3	RTERNY----SNLA (配列番号 9)	RATLAD (配列番号 9)	QNEPTFTT (配列番号 10)
2B8	RASNTY----SYVS (配列番号 18)	QASNTT (配列番号 19)	QNEPTFTT (配列番号 10)
3D11	RASNTY----SYVS (配列番号 18)	QASNTT (配列番号 19)	QNEPTFTT (配列番号 10)
3F3	RASNTY----SYVS (配列番号 18)	QASNTT (配列番号 19)	QNEPTFTT (配列番号 10)
3F6	RASNTY----SYVS (配列番号 18)	QASNTT (配列番号 19)	QNEPTFTT (配列番号 10)
1F3	RASNTY----SYVS (配列番号 18)	QASNTT (配列番号 19)	QNEPTFTT (配列番号 10)
3A12	RASNTY----SYVS (配列番号 18)	QASNTT (配列番号 19)	QNEPTFTT (配列番号 10)

FIG. 5

【図 6】

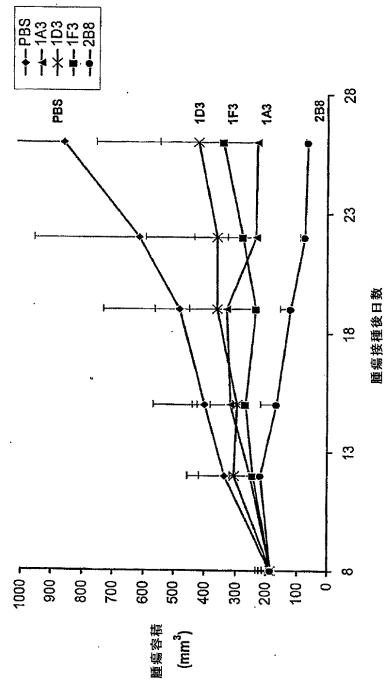


FIG. 6

【図 7】

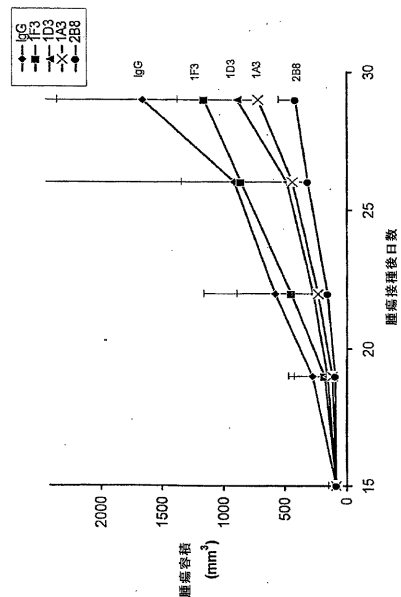


FIG. 7

【図 8】

カッパ鎖	重鎖	Ka (1/Ms)	STDEV	Kd (1/s)	STDEV	KD (pM)	STDEV
キメラ2B8	キメラ2B8	2.3x10 <sup>6</sup>		2.7x10 <sup>-6</sup>		11.8	
Hu2B8_Kv1-39.1	キメラ2B8	2.8x10 <sup>6</sup>		3.9x10 <sup>-6</sup>		13.6	
Hu2B8_Kv3-15.1	キメラ2B8	3.1x10 <sup>6</sup>		1.7x10 <sup>-6</sup>		5.5	
キメラ2B8	Hu2B8_Hv1-f.1	2.4x10 <sup>6</sup>		1.8x10 <sup>-6</sup>		662.5	
キメラ2B8	Hu2B8_Hv5-a.1	2.4x10 <sup>6</sup>		1.1x10 <sup>-6</sup>		4.4	
キメラ2B8	Hu2B8_Hv5-51.1	2.1x10 <sup>6</sup>		3.4x10 <sup>-6</sup>		16.3	
Hu2B8_Kv1-39.1	Hu2B8_Hv1-f.1	7.1x10 <sup>6</sup>		2.1x10 <sup>-6</sup>		294.0	
Hu2B8_Kv1-39.1	Hu2B8_Hv5-a.1	2.8x10 <sup>6</sup>		3.8x10 <sup>-6</sup>		14.7	
Hu2B8_Kv1-39.1	Hu2B8_Hv5-51.1	2.0x10 <sup>6</sup>		4.2x10 <sup>-6</sup>		8.1	5.3
Hu2B8_Kv3-15.1	Hu2B8_Hv1-f.1	7.8x10 <sup>6</sup>		3.7x10 <sup>-6</sup>		465.8	
Hu2B8_Kv3-15.1	Hu2B8_Hv5-a.1	2.2x10 <sup>6</sup>		5.9x10 <sup>-6</sup>		26.9	
Hu2B8_Kv3-15.1	Hu2B8_Hv5-51.1	1.9x10 <sup>6</sup>		4.7x10 <sup>-6</sup>		12.0	0.4

Fig. 8

【図 9】

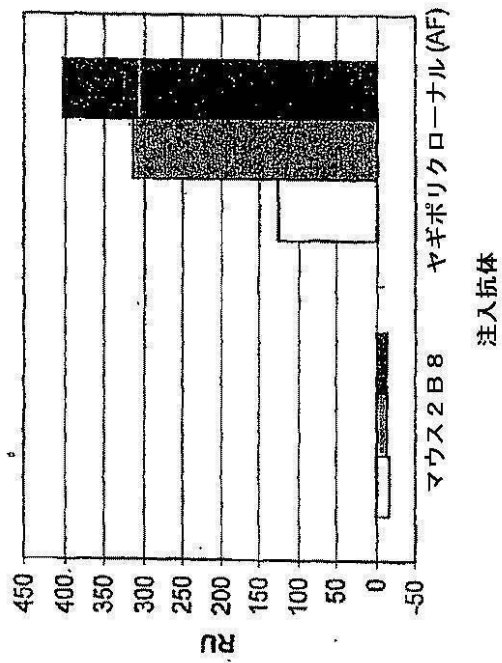


Fig. 9

【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partment 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, ウェスト ロックスベリー, ウィローディ  
ーアベニュー 73
- (72)発明者 エテマド-ギルバートソン, ビジャン  
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, クリスティン  
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 ホーウィッツ, アーノルド  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94577, サン リーンドロ, 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., D B名)

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

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