

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5528246号
(P5528246)

(45) 発行日 平成26年6月25日 (2014. 6. 25)

(24) 登録日 平成26年4月25日 (2014. 4. 25)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C O 7 K 16/22 (2006. 01)

C O 7 K 16/22

C 1 2 N 1/15 (2006. 01)

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19 (2006. 01)

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21 (2006. 01)

C 1 2 N 1/21

請求項の数 18 (全 102 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2010-167648 (P2010-167648)
 (22) 出願日 平成22年7月26日 (2010. 7. 26)
 (62) 分割の表示 特願2009-513297 (P2009-513297)
 の分割
 原出願日 平成19年6月1日 (2007. 6. 1)
 (65) 公開番号 特開2010-246565 (P2010-246565A)
 (43) 公開日 平成22年11月4日 (2010. 11. 4)
 審査請求日 平成22年7月26日 (2010. 7. 26)
 (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, 461
 (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 02
 142, ケンブリッジ, イー. ケン
 ダル ストリート 650
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100062409
 弁理士 安村 高明
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹

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 1 6 9 のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む第 2 の単離された核酸と組み合わせて使用するための、配列番号 1 7 3 のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む第 1 の単離された核酸を含む組成物。

【請求項 2】

配列番号 1 7 3 のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む第 2 の単離された核酸と組み合わせて使用するための、配列番号 1 6 9 のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む第 1 の単離された核酸を含む組成物。

【請求項 3】

配列番号 1 7 1 のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖をコードするヌクレオチド配列を含む第 2 の単離された核酸と組み合わせて使用するための、配列番号 1 7 7 のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖をコードするヌクレオチド配列を含む第 1 の単離された核酸を含む組成物。

【請求項 4】

配列番号 1 7 7 のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖をコードするヌクレオチド配列を含む第 2 の単離された核酸と組み合わせて使用するための、配列番号 1 7 1 のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖をコードするヌクレオチド配列を含む第 1 の単離された

10

20

核酸を含む組成物。

【請求項 5】

配列番号 173 のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列、および配列番号 169 のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸であって、該免疫グロブリン軽鎖可変領域および該免疫グロブリン重鎖可変領域が一緒になってヒト肝細胞成長因子（HGF）に結合する、単離された核酸。

【請求項 6】

配列番号 177 のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖をコードするヌクレオチド配列、および配列番号 171 のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖をコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸であって、該免疫グロブリン軽鎖および該免疫グロブリン重鎖が一緒になってヒト肝細胞成長因子（HGF）に結合する、単離された核酸。

【請求項 7】

請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載の第 1 の核酸を含む、発現ベクター。

【請求項 8】

請求項 5 または 6 に記載の核酸を含む、発現ベクター。

【請求項 9】

請求項 7 または 8 に記載の発現ベクターを含む、宿主細胞。

【請求項 10】

配列番号 173 のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む第 1 の発現ベクターと、配列番号 169 のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む第 2 の発現ベクターとを含む宿主細胞。

【請求項 11】

配列番号 177 のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖をコードするヌクレオチド配列を含む第 1 の発現ベクターと、配列番号 171 のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖をコードするヌクレオチド配列を含む第 2 の発現ベクターとを含む宿主細胞。

【請求項 12】

免疫グロブリン軽鎖可変領域または免疫グロブリン軽鎖を含むポリペプチドを作製する方法であって、該方法は、以下：

（i）請求項 9～11 のいずれか 1 項に記載の宿主細胞を、該免疫グロブリン軽鎖可変領域または免疫グロブリン軽鎖を含むポリペプチドの発現を可能にする条件下で増殖させる工程；および

（i i）該免疫グロブリン軽鎖可変領域または免疫グロブリン軽鎖を含むポリペプチドを精製する工程
を包含し、該軽鎖可変領域または軽鎖が、配列番号 169 のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域と組み合わせて使用するためのものである、方法。

【請求項 13】

免疫グロブリン重鎖可変領域または免疫グロブリン重鎖を含むポリペプチドを作製する方法であって、該方法は、以下：

（i）請求項 9～11 のいずれか 1 項に記載の宿主細胞を、該免疫グロブリン重鎖可変領域または免疫グロブリン重鎖を含むポリペプチドの発現を可能にする条件下で増殖させる工程；および

（i i）該免疫グロブリン重鎖可変領域または免疫グロブリン重鎖を含むポリペプチドを精製する工程
を包含し、該重鎖可変領域または重鎖が、配列番号 173 のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域と組み合わせて使用するためのものである、方法。

【請求項 14】

ヒト肝細胞成長因子（HGF）に結合するモノクローナル抗体または該抗体の抗原結合フラグメントを作製する方法であって、該方法は、以下：

(i) 請求項 9～11 のいずれか 1 項に記載の宿主細胞を、前記免疫グロブリン重鎖可変領域または免疫グロブリン重鎖を含むポリペプチドと、前記免疫グロブリン軽鎖可変領域または免疫グロブリン軽鎖を含むポリペプチドの発現を可能にする条件下で増殖させ、それによって、該抗体または該抗体の抗原結合フラグメントを産生させる工程；および

(ii) 該抗体または該抗体の抗原結合フラグメントを精製する工程を含む、方法。

【請求項 15】

腫瘍細胞の増殖を抑制または低下させるための組成物であって、該組成物は、ヒト肝細胞成長因子 (HGF) に結合する抗体または該抗体の抗原結合フラグメントの、該腫瘍細胞の増殖を抑制または低下させるために有効な量を含み、該抗体は、以下：

(i) 配列番号 173 のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域；ならびに

(ii) 配列番号 169 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、組成物。

【請求項 16】

哺乳動物において腫瘍の成長を抑制または低減させるための組成物であって、該組成物は、ヒト肝細胞成長因子 (HGF) に結合する抗体または該抗体の抗原結合フラグメントの、該腫瘍の成長を抑制または低減させるために有効な量を含み、該抗体は、以下：

(i) 配列番号 173 のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域；ならびに

(ii) 配列番号 169 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、組成物。

【請求項 17】

哺乳動物において腫瘍を処置するための組成物であって、該組成物は、ヒト肝細胞成長因子 (HGF) に結合する抗体または該抗体の抗原結合フラグメントの、該腫瘍を処置するために有効な量を含み、該抗体は、以下：

(i) 配列番号 173 のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域；ならびに

(ii) 配列番号 169 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、組成物。

【請求項 18】

前記抗体が、配列番号 177 の免疫グロブリン軽鎖および配列番号 171 の免疫グロブリン重鎖または該抗体の抗原結合フラグメントを含む、請求項 15～17 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【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。

【0002】

発明の分野

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

【背景技術】

【0003】

背景

分散因子 (SF: Scatter Factor) と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-

10

20

30

40

50

Met」とも呼ばれる。成熟HGFは2本のポリペプチド鎖、 α 鎖及び β 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 α 鎖であることが示唆されている。

【0004】

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

10

【0005】

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_L)と1箇所の定常領域(図1中の C_L)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_H)と少なくとも3箇所の定常領域(図1中の CH_1 、 CH_2 及び CH_3)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。

【0006】

20

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。CDR₁、CDR₂及びCDR₃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。

【0007】

特許文献4には、カポジ肉腫の治療における抗HGF抗体の使用について開示されている。同じように、特許文献5には、治療対象の患者に抗HGF抗体を投与して腫瘍における内因性HGFの血管形成促進能を妨げることによる腫瘍の治療について開示されている。最近になって、研究者らにより、HGFの β 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)。

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

【特許文献1】米国特許第5,997,868号明細書

【特許文献2】米国特許第5,707,624号明細書

【特許文献3】国際公開第2005/017107号パンフレット

40

【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

50

【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

10

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。

20

【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_{L1}-CDR_{L2}-CDR_{L3}を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域であって、

30

（i）CDR_{L1}が、アミノ酸配列X₁X₂SerX₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂X₁₃X₁₄X₁₅であって、アミノ酸X₁がArg、Lys又はSerであり、X₂がAla又はThrであり、X₄がGlu、Gln又はSerであり、X₅がAsn、Asp又はSerであり、X₆がIle又はValであり、X₇がAsp、Lys、Ser、Val又はTyrであり、X₈がペプチド結合又はTyrであり、X₉がペプチド結合又はAspであり、X₁₀がペプチド結合又はGlyであり、X₁₁がペプチド結合又はAsnであり、X₁₂がペプチド結合、Ile又はSerであり、X₁₃がAsn又はTyrであり、X₁₄がIle、Leu、Met又はValであり、X₁₅がAla、Asn、His又はSerであるものとするアミノ酸配列を含み、

（ii）CDR_{L2}が、アミノ酸配列X₁₆X₁₇X₁₈X₁₉X₂₀X₂₁X₂₂であって、アミノ酸X₁₆がAla、Asp、Arg、Gly又はValであり、X₁₇がAla、Thr又はValであり、X₁₈がAsn、Ser又はThrであり、X₁₉がArg、Asn、Lys又はHisであり、X₂₀がLeu又はArgであり、X₂₁がAla、Asn、Glu、Val又はProであり、X₂₂がAsp、Ser又はThrであるものとするアミノ酸配列を含み、及び

40

（iii）CDR_{L3}が、アミノ酸配列X₂₃X₂₄X₂₅X₂₆X₂₇X₂₈ProX₃₀Thrであって、アミノ酸X₂₃がLeu、Gly又はGlnであり、X₂₄がHis又はGlnであり、X₂₅がPhe、Ser、Trp又はTyrであり、X₂₆がAsp、Ile、Ser、Trp又はTyrであり、X₂₇がGly、Glu、Asn又はSerであり、X₂₈がAsp、Asn、Phe、Thr又はTyrであり、X₃₀がL

50

e u、P h e、P r o又はT y rであるものとする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) 3箇所の相補性決定領域を含む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及び免疫グロブリン重鎖の相補性決定領域がヒトH G Fに
結合する結合部位を規定するものとする結合蛋白質。

(項目2)

ヒト肝細胞成長因子(H G F)に結合する単離結合蛋白質であって、

(a) 構造C D R_{H 1} - C D R_{H 2} - C D R_{H 3}を含む免疫グロブリン重鎖可変領域であって、

(i) C D R_{H 1}が、アミノ酸配列X₁T y rX₃X₄X₅であって、アミノ酸X₁が
A s p、A s n、S e r又はT h rであり、X₃がP h e、S e r、T r p又はT y rで
あり、X₄がI l e、L e u又はM e tであり、X₅がA s n、H i s又はS e rである
ものとするアミノ酸配列を含み、

(i i) C D R_{H 2}が、アミノ酸配列X₆I l eX₈X₉X₁₀X₁₁G l yX₁₃X₁₄X₁₅T y rX₁₇X₁₈X₁₉X₂₀X₂₁X₂₂であって、アミノ酸X₆がL y
s、G l n、G l u、V a l又はT y rであり、X₈がA s n、G l y、S e r、T r p
又はT y rであり、X₉がA l a、P r o又はS e rであり、X₁₀がG l y又はT h r
であり、X₁₁がペプチド結合、A s p、A s n、G l y又はS e rであり、X₁₃がA
s p、A s n、H i s又はS e rであり、X₁₄がS e r又はT h rであり、X₁₅がA
s n又はT y rであり、X₁₇がA s n又はP r oであり、X₁₈がA l a、A s p、G
l y、G l u、P r o又はS e rであり、X₁₉がA s n、L y s、M e t又はS e rで
あり、X₂₀がL e u、P h e又はV a lであり、X₂₁がL y s、M e t又はG l nで
あり、X₂₂がA s p、G l y又はS e rであるものとするアミノ酸配列を含み、及び

(i i i) C D R_{H 3}が、アミノ酸配列X₂₃X₂₄X₂₅X₂₆X₂₇X₂₈X₂₉
X₃₀X₃₁X₃₂X₃₃X₃₄T y rであって、アミノ酸X₂₃がA r g、A s n、G
l n又はG l uであり、X₂₄がG l y、L e u、A r g又はT y rであり、X₂₅がペ
プチド結合、A s p又はG l yであり、X₂₆がペプチド結合又はG l yであり、X₂₇
がペプチド結合又はT y rであり、X₂₈がペプチド結合、L e u又はT y rであり、X₂₉
がペプチド結合、G l y、L e u、A r g又はV a lであり、X₃₀がペプチド結合
、A s p、G l y又はG l uであり、X₃₁がペプチド結合、A s n、A r g、S e r又
はT y rであり、X₃₂がペプチド結合、A l a、G l y、I l e又はT y rであり、X₃₃
がM e t又はP h eであり、X₃₄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

ものとする免疫グロブリン重鎖可変領域、並びに

(b) 3箇所の相補性決定領域を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域
を含み、該免疫グロブリン軽鎖及び免疫グロブリン重鎖の相補性決定領域がヒトH G Fに
結合する結合部位を規定するものとする結合蛋白質。

(項目3)

該免疫グロブリン軽鎖可変領域が、構造C D R_{L 1} - C D R_{L 2} - C D R_{L 3}であって

(i) C D R_{L 1}が、アミノ酸配列X₁X₂S e rX₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂X₁₃X₁₄X₁₅であって、アミノ酸X₁がA r g、L y s又はS e rであ
り、X₂がA l a又はT h rであり、X₄がG l u、G l n又はS e rであり、X₅がA
s n、A s p又はS e rであり、X₆がI l e又はV a lであり、X₇がA s p、L y s
、S e r、V a l又はT y rであり、X₈がペプチド結合又はT y rであり、X₉がペ
プチド結合又はA s pであり、X₁₀がペプチド結合又はG l yであり、X₁₁がペプチド
結合又はA s nであり、X₁₂がペプチド結合、I l e又はS e rであり、X₁₃がA s
n又はT y rであり、X₁₄がI l e、L e u、M e t又はV a lであり、X₁₅がA l
a、A s n、H i s又はS e rであるものとするアミノ酸配列を含み、

(i i) C D R_{L 2}が、アミノ酸配列X₁₆X₁₇X₁₈X₁₉X₂₀X₂₁X₂₂で

10

20

30

40

50

あって、アミノ酸 X_{16} がAla、Asp、Arg、Gly又はValであり、 X_{17} がAla、Thr又はValであり、 X_{18} がAsn、Ser又はThrであり、 X_{19} がArg、Asn、Lys又はHisであり、 X_{20} がLeu又はArgであり、 X_{21} がAla、Asn、Glu、Val又はProであり、 X_{22} がAsp、Ser又はThrであるものとするアミノ酸配列を含み、及び

(iii) CDR_{L3}が、アミノ酸配列 $X_{23}X_{24}X_{25}X_{26}X_{27}X_{28}$ Pro X_{30} Thrであって、アミノ酸 X_{23} がLeu、Gly又はGlnであり、 X_{24} がHis又はGlnであり、 X_{25} がPhe、Ser、Trp又はTyrであり、 X_{26} がAsp、Ile、Ser、Trp又はTyrであり、 X_{27} がGly、Glu、Asn又はSerであり、 X_{28} がAsp、Asn、Phe、Thr又はTyrであり、 X_{30} がLeu、Phe、Pro又はTyrであるものとするアミノ酸配列を含む
10
ものとする構造を含む項目2の単離抗体。

(項目4)

前記相補性決定領域がフレームワーク領域間に挿入されている項目1、2又は3の結合蛋白質。

(項目5)

前記CDR配列が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項目4の結合蛋白質。

(項目6)

項目1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。
20

(項目7)

項目6のヌクレオチド配列を含む発現ベクター。

(項目8)

項目7の発現ベクターを含む宿主細胞。

(項目9)

結合蛋白質を作製する方法であって、

(a) 項目8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発現するような条件下で増殖させ、及び

(b) 該免疫グロブリン軽鎖可変領域を採取すること
30
を含む方法。

(項目10)

工程(b)の後、前記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共同してヒトHGFに結合するように、該軽鎖可変領域が該重鎖可変領域に共有結合される項目9の方法。

(項目11)

項目2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12)

項目11のヌクレオチド配列を含む発現ベクター。
40

(項目13)

項目12の発現ベクターを含む宿主細胞。

(項目14)

結合蛋白質作製する方法であって、

(a) 項目13の宿主細胞を該宿主細胞が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

(b) 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15)

工程(b)の後、前記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
50

がヒトHGFに結合する結合部位を共同して規定するように、該重鎖可変領域が該軽鎖可変領域に共有結合される項目14の方法。

(項目16)

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CDRL₁-CDRL₂-CDRL₃を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域であって、

(i) CDR_{L1}が、配列番号8(1A3)、配列番号18(2B8)、配列番号28(2F8)、配列番号38(3B6)、配列番号48(3D11)、配列番号58(1D3)、配列番号68(1F3)及び配列番号78(3A12)からなる群から選ばれる配列を含み、

10

(ii) CDR_{L2}が、配列番号9(1A3)、配列番号19(2B8)、配列番号29(2F8)、配列番号39(3B6)、配列番号49(3D11)、配列番号59(1D3)、配列番号69(1F3)及び配列番号79(3A12)からなる群から選ばれる配列を含み、及び

(iii) CDR_{L3}が、配列番号10(1A3)、配列番号20(2B8)、配列番号30(2F8)、配列番号40(3B6)、配列番号50(3D11)、配列番号60(1D3)、配列番号70(1F3)及び配列番号80(3A12)からなる群から選ばれる配列を含む

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

20

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17)

前記免疫グロブリン軽鎖可変領域が

(i) 配列番号8(1A3)の配列を含むCDRL₁、

(ii) 配列番号9(1A3)の配列を含むCDRL₂及び

(iii) 配列番号10(1A3)の配列を含むCDRL₃

を含む項目16の結合蛋白質。

(項目18)

前記免疫グロブリン軽鎖可変領域が

30

(i) 配列番号18(2B8)の配列を含むCDRL₁、

(ii) 配列番号19(2B8)の配列を含むCDRL₂及び

(iii) 配列番号20(2B8)の配列を含むCDRL₃

を含む項目16の結合蛋白質。

(項目19)

前記免疫グロブリン軽鎖可変領域が

(iv) 配列番号28(2F8)の配列を含むCDRL₁、

(v) 配列番号29(2F8)の配列を含むCDRL₂及び

(vi) 配列番号30(2F8)の配列を含むCDRL₃

を含む項目16の結合蛋白質。

40

(項目20)

前記免疫グロブリン軽鎖可変領域が

(i) 配列番号38(3B6)の配列を含むCDRL₁、

(ii) 配列番号39(3B6)の配列を含むCDRL₂及び

(iii) 配列番号40(3B6)の配列を含むCDRL₃

を含む項目16の結合蛋白質。

(項目21)

前記免疫グロブリン軽鎖可変領域が

(i) 配列番号48(3D11)の配列を含むCDRL₁、

(ii) 配列番号49(3D11)の配列を含むCDRL₂及び

50

(i i i) 配列番号 50 (3 D 1 1) の配列を含む C D R_{L 3} を含む項目 16 の結合蛋白質。

(項目 22)

前記免疫グロブリン軽鎖可変領域が

(i) 配列番号 58 (1 D 3) の配列を含む C D R_{L 1}、

(i i) 配列番号 59 (1 D 3) の配列を含む C D R_{L 2} 及び

(i i i) 配列番号 60 (1 D 3) の配列を含む C D R_{L 3}

を含む項目 16 の結合蛋白質。

(項目 23)

前記免疫グロブリン軽鎖可変領域が

(i) 配列番号 68 (1 F 3) の配列を含む C D R_{L 1}、

(i i) 配列番号 69 (1 F 3) の配列を含む C D R_{L 2} 及び

(i i i) 配列番号 70 (1 F 3) の配列を含む C D R_{L 3}

を含む項目 16 の結合蛋白質。

(項目 24)

前記免疫グロブリン軽鎖可変領域が

(i) 配列番号 78 (3 A 1 2) の配列を含む C D R_{L 1}、

(i i) 配列番号 79 (3 A 1 2) の配列を含む C D R_{L 2} 及び

(i i i) 配列番号 80 (3 A 1 2) の配列を含む C D R_{L 3}

を含む項目 16 の結合蛋白質。

(項目 25)

C D R_{L 1}、C D R_{L 2} 及び C D R_{L 3} 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る項目 16 の結合蛋白質。

(項目 26)

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 16 の結合蛋白質。

(項目 27)

前記結合蛋白質がモノクローナル抗体である項目 26 の結合蛋白質。

(項目 28)

ヒト肝細胞成長因子 (H G F) に結合する単離結合蛋白質であって、

(a) 構造 C D R_{H 1} - C D R_{H 2} - C D R_{H 3} を含む免疫グロブリン重鎖可変領域であって、

(i) C D R_{H 1} が、配列番号 5 (1 A 3)、配列番号 15 (2 B 8)、配列番号 25 (2 F 8)、配列番号 35 (3 B 6)、配列番号 45 (3 D 1 1)、配列番号 55 (1 D 3)、配列番号 65 (1 F 3) 及び配列番号 75 (3 A 1 2) からなる群から選ばれる配列を含み、

(i i) C D R_{H 2} が、配列番号 6 (1 A 3)、配列番号 16 (2 B 8)、配列番号 26 (2 F 8)、配列番号 36 (3 B 6)、配列番号 46 (3 D 1 1)、配列番号 56 (1 D 3)、配列番号 66 (1 F 3)、配列番号 76 (3 A 1 2)、配列番号 202 (H u 2 B 8 H v 1 f . 1) 及び配列番号 203 (H u 2 B 8 H v 5 a . 1 及び H u 2 B 8 H v 5 - 5 1 . 1) からなる群から選ばれる配列を含み、及び

(i i i) C D R_{H 3} が、配列番号 7 (1 A 3)、配列番号 17 (2 B 8)、配列番号 27 (2 F 8)、配列番号 37 (3 B 6)、配列番号 47 (3 D 1 1)、配列番号 57 (1 D 3)、配列番号 67 (1 F 3) 及び配列番号 77 (3 A 1 2) からなる群から選ばれる配列を含む

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免疫グロブリン軽鎖可変領域が共同してヒト H G F に結合するための結合部位を規定するものとする結合蛋白質。

(項目 29)

前記免疫グロブリン重鎖可変領域が

10

20

30

40

50

- (i) 配列番号 5 (1 A 3) の配列を含む C D R_{H 1}、
 - (i i) 配列番号 6 (1 A 3) の配列を含む C D R_{H 2} 及び
 - (i i i) 配列番号 7 (1 A 3) の配列を含む C D R_{H 3}
- を含む項目 2 8 の結合蛋白質。

(項目 3 0)

前記免疫グロブリン重鎖可変領域が

- (i) 配列番号 1 5 (2 B 8) の配列を含む C D R_{H 1}、
 - (i i) 配列番号 1 6 (2 B 8)、配列番号 2 0 2 (H u 2 B 8 H v 1 f. 1) 又は配列番号 2 0 3 (H u 2 B 8 H v 5 a. 1 及び H u 2 B 8 H v 5 - 5 1. 1) の配列を含む C D R_{H 2} 及び
 - (i i i) 配列番号 1 7 (2 B 8) の配列を含む C D R_{H 3}
- を含む項目 2 8 の結合蛋白質。

10

(項目 3 1)

前記免疫グロブリン重鎖可変領域が

- (i) 配列番号 2 5 (2 F 8) の配列を含む C D R_{H 1}、
 - (i i) 配列番号 2 6 (2 F 8) の配列を含む C D R_{H 2} 及び
 - (i i i) 配列番号 2 7 (2 F 8) の配列を含む C D R_{H 3}
- を含む項目 2 8 の結合蛋白質。

(項目 3 2)

前記免疫グロブリン重鎖可変領域が

- (i) 配列番号 3 5 (3 B 6) の配列を含む C D R_{H 1}、
 - (i i) 配列番号 3 6 (3 B 6) の配列を含む C D R_{H 2} 及び
 - (i i i) 配列番号 3 7 (3 B 6) の配列を含む C D R_{H 3}
- を含む項目 2 8 の結合蛋白質。

20

(項目 3 3)

前記免疫グロブリン重鎖可変領域が

- (i) 配列番号 4 5 (3 D 1 1) の配列を含む C D R_{H 1}、
 - (i i) 配列番号 4 6 (3 D 1 1) の配列を含む C D R_{H 2} 及び
 - (i i i) 配列番号 4 7 (3 D 1 1) の配列を含む C D R_{H 3}
- を含む項目 2 8 の結合蛋白質。

30

(項目 3 4)

前記免疫グロブリン重鎖可変領域が

- (i) 配列番号 5 5 (1 D 3) の配列を含む C D R_{H 1}、
 - (i i) 配列番号 5 6 (1 D 3) の配列を含む C D R_{H 2} 及び
 - (i i i) 配列番号 5 7 (1 D 3) の配列を含む C D R_{H 3}
- を含む項目 2 8 の結合蛋白質。

(項目 3 5)

前記免疫グロブリン重鎖可変領域が

- (i) 配列番号 6 5 (1 F 3) の配列を含む C D R_{H 1}、
 - (i i) 配列番号 6 6 (1 F 3) の配列を含む C D R_{H 2} 及び
 - (i i i) 配列番号 6 7 (1 F 3) の配列を含む C D R_{H 3}
- を含む項目 2 8 の結合蛋白質。

40

(項目 3 6)

前記免疫グロブリン重鎖可変領域が

- (i) 配列番号 7 5 (3 A 1 2) の配列を含む C D R_{H 1}、
 - (i i) 配列番号 7 6 (3 A 1 2) の配列を含む C D R_{H 2} 及び
 - (i i i) 配列番号 7 7 (3 A 1 2) の配列を含む C D R_{H 3}
- を含む項目 2 8 の結合蛋白質。

(項目 3 7)

C D R_{H 1}、C D R_{H 2} 及び C D R_{H 3} がヒト又はヒト化免疫のグロブリンのフレーム

50

ワーク領域間に挿入される項目 28 の結合蛋白質。

(項目 38)

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 28 の結合蛋白質。

(項目 39)

前記結合蛋白質がモノクローナル抗体である項目 38 の結合蛋白質。

(項目 40)

項目 16 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 41)

項目 40 の核酸配列を含む発現ベクター。

10

(項目 42)

項目 41 の発現ベクターを含む宿主細胞。

(項目 43)

結合蛋白質を作製する方法であって、

(a) 項目 42 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発現するような条件下で増殖させ、及び

(b) 該免疫グロブリン軽鎖可変領域を採取することを含む方法。

(項目 44)

工程 (b) の後、前記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ヒト HGF に共同して結合するように、該軽鎖可変領域が該重鎖可変領域に共有結合される項目 43 の方法。

20

(項目 45)

項目 28 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 46)

項目 45 の核酸配列を含む発現ベクター。

(項目 47)

項目 46 の発現ベクターを含む宿主細胞。

(項目 48)

30

結合蛋白質を作製する方法であって、

(a) 項目 47 の宿主細胞を該宿主細胞が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

(b) 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 49)

工程 (b) の後、前記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ヒト HGF に結合することができる結合部位を共同して規定するように、該重鎖可変領域が該軽鎖可変領域に共有結合される項目 48 の方法。

(項目 50)

40

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、配列番号 74 (3A12) の 21 乃至 127 番目残基、配列番号 173 (Hu2B8 Kv1-39, 1 カッパ鎖可変領域) 及び配列番号 179 (Hu2B8 Kv3-15, 1 カッパ鎖可変領域) 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

配列番号 2 (1A3) の 2 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 (3B

50

6) 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、配列番号 72 (3A12) の 20 乃至 141 番目残基、配列番号 159 (Hu2B8 Hv1f. 1重鎖可変領域)、配列番号 165 (Hu2B8 Hv5a. 1重鎖可変領域) 及び配列番号 169 (Hu2B8 Hv5-51. 1重鎖可変領域) 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む、ヒト肝細胞成長因子 (HGF) に結合する単離結合蛋白質。

(項目 51)

前記免疫グロブリン軽鎖可変領域が配列番号 4 (1A3) の 21 乃至 127 番目残基のアミノ酸配列を含み、前記免疫グロブリン重鎖可変領域が配列番号 2 (1A3) の 20 乃至 141 番目残基のアミノ酸配列を含む項目 50 の結合蛋白質。

10

(項目 52)

前記免疫グロブリン軽鎖可変領域が配列番号 14 (2B8) の 21 乃至 127 番目残基のアミノ酸配列を含み、前記免疫グロブリン重鎖可変領域が配列番号 12 (2B8) の 20 乃至 137 番目残基のアミノ酸配列を含む項目 50 の結合蛋白質。

(項目 53)

前記免疫グロブリン軽鎖可変領域が配列番号 24 (2F8) の 20 乃至 131 番目残基のアミノ酸配列を含み、前記免疫グロブリン重鎖可変領域が配列番号 22 (2F8) の 20 乃至 137 番目残基のアミノ酸配列を含む項目 50 の結合蛋白質。

(項目 54)

20

前記免疫グロブリン軽鎖可変領域が配列番号 34 (3B6) の 23 乃至 129 番目残基のアミノ酸配列を含み、前記免疫グロブリン重鎖可変領域が配列番号 32 (3B6) の 20 乃至 139 番目残基のアミノ酸配列を含む項目 50 の結合蛋白質。

(項目 55)

前記免疫グロブリン軽鎖可変領域が配列番号 44 (3D11) の 23 乃至 128 番目残基のアミノ酸配列を含み、前記免疫グロブリン重鎖可変領域が配列番号 42 (3D11) の 20 乃至 132 番目残基のアミノ酸配列を含む項目 50 の結合蛋白質。

(項目 56)

前記免疫グロブリン軽鎖可変領域が配列番号 54 (1D3) の 21 乃至 127 番目残基のアミノ酸配列を含み、前記免疫グロブリン重鎖可変領域が配列番号 52 (1D3) の 20 乃至 141 番目残基のアミノ酸配列を含む項目 50 の結合蛋白質。

30

(項目 57)

前記免疫グロブリン軽鎖可変領域が配列番号 64 (1F3) の 21 乃至 127 番目残基のアミノ酸配列を含み、前記免疫グロブリン重鎖可変領域が配列番号 62 (1F3) の 20 乃至 141 番目残基のアミノ酸配列を含む項目 50 の結合蛋白質。

(項目 58)

前記免疫グロブリン軽鎖可変領域が配列番号 74 (3A12) の 21 乃至 127 番目残基のアミノ酸配列を含み、前記免疫グロブリン重鎖可変領域が配列番号 72 (3A12) の 20 乃至 141 番目残基のアミノ酸配列を含む項目 50 の結合蛋白質。

(項目 59)

40

配列番号 173 (Hu2B8 Kv1-39. 1軽鎖可変領域) 及び配列番号 179 (Hu2B8 Kv3-15. 1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

配列番号 159 (Hu2B8 Hv1f. 1重鎖可変領域)、配列番号 165 (Hu2B8 Hv5a. 1重鎖可変領域) 及び配列番号 169 (Hu2B8 Hv5-51. 1重鎖可変領域) 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む、ヒト肝細胞成長因子 (HGF) に結合する単離結合蛋白質。

(項目 60)

配列番号 177 (Hu2B8 Kv1-39. 1+カッパ定常 (Km (3) アロタイプ (対立遺伝子 2)) 及び配列番号 181 (Hu2B8 Kv3-15. 1+カッパ定常 (

50

Km (3) アロタイプ (対立遺伝子2)) 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

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 (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)) 及び配列番号210 (Hu2B8 Hv5-51. 1+IgG1定常G1m (3) アロタイプ (対立遺伝子2)) からなる群から選ばれる免疫グロブリン重鎖可変領域

を含む、ヒト肝細胞成長因子 (HGF) に結合する単離結合蛋白質。

(項目61)

10

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50、59又は60の結合蛋白質。

(項目62)

前記抗体がモノクローナル抗体である項目61の結合蛋白質。

(項目63)

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、

(i) 3箇所の相補性決定領域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を含む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及び該免疫グロブリン重鎖の該相補性決定領域が還元型ヒトHGFに結合する結合部位を共同して規定するものとする結合蛋白質。

20

(項目64)

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63の結合蛋白質。

(項目65)

前記抗体がモノクローナル抗体である項目64の結合蛋白質。

(項目66)

前記相補性決定領域がフレームワーク領域間に挿入されている項目63の結合蛋白質。

(項目67)

前記免疫グロブリン重鎖がIgG1である項目63の結合蛋白質。

30

(項目68)

前記結合蛋白質が561番目の位置にシステインからアルギニンへの置換又は555番目の位置にグリシンからグルタメートへの置換を含むヒトHGFに結合する項目63の結合蛋白質。

(項目69)

前記結合蛋白質がヒトHGFのα鎖に結合する項目63の結合蛋白質。

(項目70)

前記免疫グロブリン軽鎖可変領域がCDRL₁、CDRL₂及びCDRL₃からなる群から選ばれる少なくとも1種の相補性決定領域 (CDR) を含み、

CDRL₁が、アミノ酸配列X₁X₂SerX₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂X₁₃X₁₄X₁₅であって、アミノ酸X₁がArg又はLysであり、X₂がAla又はThrであり、X₄がGlu又はGlnであり、X₅がAsn、Ser又はAspであり、X₆がIle又はValであり、X₇がTyr、Asp又はLysであり、X₈がペプチド結合又はTyrであり、X₉がペプチド結合又はAspであり、X₁₀がペプチド結合又はGlyであり、X₁₁がペプチド結合又はAsnであり、X₁₂がペプチド結合又はSerであり、X₁₃がAsn又はTyrであり、X₁₄がIle又はLeuであり、X₁₅がAla、Asn又はSerであるものとするアミノ酸配列を含むものとし、

40

CDRL₂が、アミノ酸配列X₁₆X₁₇X₁₈X₁₉LeuX₂₁X₂₂であって、アミノ酸X₁₆がAla、Asp、Val又はArgであり、X₁₇がAla又はVal

50

であり、X₁₈がAsn、Ser又はThrであり、X₁₉がArg、Asn又はHisであり、X₂₁がAla、Glu、Val又はProであり、X₂₂がAsp又はSerであるものとするアミノ酸配列を含むものとし、及び

CDR_{L3}が、アミノ酸配列X₂₃X₂₄X₂₅X₂₆X₂₇X₂₈ProX₃₀Thrであって、アミノ酸X₂₃がLeu又はGlnであり、X₂₄がHis又はGlnであり、X₂₅がPhe、Ser又はTyrであり、X₂₆がAsp、Ile又はTrpであり、X₂₇がGly又はGluであり、X₂₈がAsp、Phe又はThrであり、X₃₀がPhe、Pro又はTyrであるものとするアミノ酸配列を含むものとする
項目63の結合蛋白質。

(項目71)

10

前記免疫グロブリン重鎖可変領域が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種のCDRを含み、

CDR_{H1}が、アミノ酸配列X₁TyrX₃X₄X₅であって、アミノ酸X₁がAsp、Asn、Ser又はThrであり、X₃がPhe、Trp又はTyrであり、X₄がIle又はMetであり、X₅がAsn、His又はSerであるものとするアミノ酸配列を含むものとし、

CDR_{H2}が、アミノ酸配列X₆IleX₈X₉GlyX₁₁GlyX₁₃X₁₄X₁₅TyrX₁₇X₁₈X₁₉X₂₀LysX₂₂であって、アミノ酸X₆がLys、Gln又はTyrであり、X₈がGly、Ser又はTyrであり、X₉がPro又はSerであり、X₁₁がAsp、Gly又はSerであり、X₁₃がAsp又はSerであり、X₁₄がSer又はThrであり、X₁₅がAsn又はTyrであり、X₁₇がAsn又はProであり、X₁₈がAla、Asp、Gly又はGluであり、X₁₉がAsn、Met又はSerであり、X₂₀がPhe又はValであり、X₂₂がAsp又はGlyであるものとするアミノ酸配列を含むものとし、及び

20

CDR_{H3}が、アミノ酸配列X₂₃X₂₄X₂₅X₂₆X₂₇X₂₈X₂₉X₃₀X₃₁X₃₂X₃₃AspTyrであって、アミノ酸X₂₃がArg又はGlnであり、X₂₄がGly又はLeuであり、X₂₅がAsp、Gly又はペプチド結合であり、X₂₆がGly又はペプチド結合であり、X₂₇がペプチド結合又はTyrであり、X₂₈がLeu、ペプチド結合又はTyrであり、X₂₉がGly、Arg又はLeuであり、X₃₀がAsp、Gly又はGluであり、X₃₁がTyr、Arg又はAsnであり、X₃₂がAla、Gly又はTyrであり、X₃₃がMet又はPheであるものとするアミノ酸配列を含むものとする

30

項目63又は70の結合蛋白質。

(項目72)

前記免疫グロブリン軽鎖が

(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_{L1}、

(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_{L2}、

40

(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_{L3}
を含む項目70の結合蛋白質。

(項目73)

前記CDR配列が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項目72の結合蛋白質。

(項目74)

前記免疫グロブリン軽鎖可変領域が、配列番号4(1A3)の21乃至127番目残基

50

、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項目 72 の結合蛋白質。

(項目 75)

前記免疫グロブリン重鎖可変領域が

(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_{H1}、

(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_{H2}、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_{H3}を含む項目 71 の結合蛋白質。

(項目 76)

前記 CDR 配列が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項目 75 の結合蛋白質。

(項目 77)

前記免疫グロブリン重鎖可変領域が、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む項目 75 の結合蛋白質。

(項目 78)

項目 63、70、72 又は 74 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 79)

項目 78 の核酸配列を含む発現ベクター。

(項目 80)

項目 79 の発現ベクターを含む宿主細胞。

(項目 81)

項目 63、71、75 又は 77 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 82)

項目 81 の核酸配列を含む発現ベクター。

(項目 83)

項目 82 の発現ベクターを含む宿主細胞。

(項目 84)

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、該単離結合蛋白質が HGF への結合に対して

(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、及び

(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

10

20

30

40

50

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 種の対照抗体と競合するものとする結合蛋白質。

(項目 85)

前記結合蛋白質が前記対照抗体のうちの 1 種と同じ HGF の抗原決定基に結合する項目 84 の結合蛋白質。

(項目 86)

$4.0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 以下の k_d でヒト肝細胞成長因子 (HGF) に結合する単離結合蛋白質。

(項目 87)

前記 k_d が $3.0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 以下である項目 86 の結合蛋白質。

(項目 88)

前記 k_d が $2.0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 以下である項目 87 の結合蛋白質。

(項目 89)

20 pM 以下の K_D でヒト肝細胞成長因子 (HGF) に特異的に結合する単離結合蛋白質。

(項目 90)

前記 K_D が 10 pM 以下である項目 89 の結合蛋白質。

(項目 91)

前記 K_D が 5 pM 以下である項目 90 の結合蛋白質。

(項目 92)

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、前記抗体が 25℃ よりも 37℃ で、より低い K_D でヒト HGF に結合するものとする、結合蛋白質。

(項目 93)

前記結合蛋白質が 37℃ で 5 pM 未満の K_D を有する項目 92 の結合蛋白質。

(項目 94)

腫瘍細胞に対して有効量の項目 1、2、3、16、28、50、59、60、63、70、71、72、74、75、77、84、86 又は 89 の結合蛋白質を作用させて該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 95)

腫瘍細胞に対して有効量の、該細胞の増殖を抑制又は低減させる結合蛋白質を作用させることを含む、腫瘍細胞の増殖を抑制又は低減させる方法であって、該結合蛋白質がヒト HGF に特異的に結合するが、ヒト HGF の c-Met への結合能を実質的に低減させないものとする方法。

(項目 96)

前記結合蛋白質が項目 22、23、24、34、35、36、56、57、58、84、86 又は 89 の結合蛋白質を含む項目 95 の方法。

(項目 97)

前記腫瘍細胞がヒト腫瘍細胞である項目 94 又は 95 の方法。

(項目 98)

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、該哺乳動物に対して有効量の項目 1、2、3、16、28、50、59、60、63、84、86、89 又は 92 の結合蛋白質を作用させて該腫瘍の増殖を抑制又は低下させることを含む方法。

(項目 99)

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、2、3、16、28、50、59、60、63、84、86、89 又は 92 の結合蛋白質を投与することを含む方法。

(項目 100)

前記哺乳動物がヒトである項目 98 又は 99 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

10

20

30

40

50

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。

【図1】代表的な抗体を模式図化したものである。

【図2】1A3、1D3、1F3、2B8、2F8、3A12、3B6及び3D11で表した抗体の完全な免疫グロブリン重鎖可変領域を規定するアミノ酸配列を示す模式図である。各抗体のアミノ酸配列は全て相互に整列させてあり、シグナルペプチド、CDR₁、CDR₂及びCDR₃を規定する領域は枠で囲んで識別されている。枠で囲んでない配列はFR配列を表す。

10

【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CDR₁、CDR₂及びCDR₃を示す模式図である。

【図4】1A3、1D3、1F3、2B8、2F8、3A12、3B6及び3D11で表した抗体の完全な免疫グロブリン軽鎖可変領域を規定するアミノ酸配列を示す模式図である。各抗体のアミノ酸配列は全て相互に整列させてあり、シグナルペプチド、CDR₁、CDR₂及びCDR₃を規定する領域は枠で囲んで識別されている。枠で囲んでない配列はFR配列を表す。

【図5】図4に示した免疫グロブリン軽鎖可変領域配列のそれぞれのCDR₁、CDR₂及びCDR₃を示す模式図である。

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

20

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

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

30

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

40

【発明を実施するための形態】

【0014】

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

【0015】

こうした抗体は、その中和活性を考慮すると、HGF反応性細胞、例えば、癌細胞の成

50

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、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_{L1}—CDR_{L2}—CDR_{L3}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_{L1}は、アミノ酸配列X₁X₂SerX₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂X₁₃X₁₄X₁₅であって、アミノ酸X₁がArg、Lys又はSerであり、X₂がAla又はThrであり、X₄がGlu、Gln又はSerであり、X₅がAsn、Asp又はSerであり、X₆がIle又はValであり、X₇がAsp、Lys、Ser、Val又はTyrであり、X₈がペプチド結合又はTyrであり、X₉がペプチド結合又はAspであり、X₁₀がペプチド結合又はGlyであり、X₁₁がペプチド結合又はAsnであり、X₁₂がペプチド結合、Ile又はSerであり、X₁₃がAsn又はTyrであり、X₁₄がIle、Leu、Met又はValであり、X₁₅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_{L2}は、アミノ酸配列X₁₆X₁₇X₁₈X₁₉X₂₀X₂₁X₂₂であって、アミノ酸X₁₆がAla、Asp、Arg、Gly又はValであり、X₁₇がAla、Thr又はValであり、X₁₈がAsn、Ser又はThrであり、X₁₉がArg、Asn、Lys又はHisであり、X₂₀がLeu又はArgであり、X₂₁がAla、Asn、Glu、Val又はProであり、X₂₂がAsp、Ser又はThrであるものとするアミノ酸配列を含む。CDR_{L3}は、アミノ酸配列X₂₃X₂₄X₂₅X₂₆X₂₇X₂₈ProX₃₀Thrであって、アミノ酸X₂₃がLeu、Gly又はGlnであり、X₂₄がHis又はGlnであり、X₂₅がPhe、Ser、Trp又はTyrであり、X₂₆がAsp、Ile、Ser、Trp又はTyrであり、X₂₇がGly、Glu、Asn又はSerであり、X₂₈がAsp、Asn、Phe、Thr又はTyrであり、X₃₀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_{H1}—CDR_{H2}—CDR_{H3}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_{H1}は、アミノ酸配列X₁TyrX₃X₄X₅であって、アミノ酸X₁がAsp、Asn、Ser又はThrであり、X₃がPhe、Ser、Trp又はTyrであり、X₄がIle、Leu又はMetであり、X₅がAsn、His又はSerであるものとするアミノ酸配列を含む。CDR_{H2}は、アミノ酸配列X₆IleX₈X₉X₁₀X₁₁GlyX₁₃X₁₄X₁₅TyrX₁₇X₁₈X₁₉X₂₀X₂₁X₂₂であって、アミノ酸X₆がLys、Gln、Glu、Val又はTyrであり、X₈がAsn、Gly、Ser、Trp又はTyrであり、X₉がAla、Pro又はSerであり、X₁₀がGly又はThrであり、X₁₁がペプチド結合、Asp、Asn、Gly又はSerであり、X₁₃がAsp、Asn、His又はSerであり、X₁₄がSer又はThrであり、X₁₅がAsn又はTyrであり、X₁₇がAsn又はProであり、X₁₈がAla、Asp、Gly、Gln、Glu、Pro又はSerであり、X₁₉がAsn、Lys、Met又は

Serであり、X₂₀がLeu、Phe又はValであり、X₂₁がLys、Met又はGlnであり、X₂₂がAsp、Gly又はSerであるものとするアミノ酸配列を含む。CDR_{H3}は、アミノ酸配列X₂₃X₂₄X₂₅X₂₆X₂₇X₂₈X₂₉X₃₀X₃₁X₃₂X₃₃X₃₄Tyrであって、アミノ酸X₂₃がArg、Asn、Gln又はGluであり、X₂₄がGly、Leu、Arg又はTyrであり、X₂₅がペプチド結合、Asp又はGlyであり、X₂₆がペプチド結合又はGlyであり、X₂₇がペプチド結合又はTyrであり、X₂₈がペプチド結合、Leu又はTyrであり、X₂₉がペプチド結合、Gly、Leu、Arg又はValであり、X₃₀がペプチド結合、Asp、Gly又はGluであり、X₃₁がペプチド結合、Asn、Arg、Ser又はTyrであり、X₃₂がペプチド結合、Ala、Gly、Ile又はTyrであり、X₃₃がMet又はPheであり、X₃₄がAla又はAspであるものとするアミノ酸配列を含む。

10

【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。

【0018】

一部の実施態様として、上記の免疫グロブリン軽鎖及び免疫グロブリン重鎖のCDR配列はフレームワーク領域（FR：framework region）と共に挿入されている。

【0019】

20

一部の実施態様として、上記の免疫グロブリン軽鎖及び免疫グロブリン重鎖のCDR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HGF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）CDR_{L1}－CDR_{L2}－CDR_{L3}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CDR_{L1}は、配列番号8（1A3）、配列番号18（2B8）、配列番号28（2F8）、配列番号38（3B6）、配列番号48（3D11）、配列番号58（1D3）、配列番号68（1F3）及び配列番号78（3A12）からなる群から選ばれる配列を含む。上記CDR_{L2}は、配列番号9（1A3）、配列番号19（2B8）、配列番号29（2F8）、配列番号39（3B6）、配列番号49（3D11）、配列番号59（1D3）、配列番号69（1F3）、配列番号79（3A12）及び配列番号206（LRMR2B8LC）からなる群から選ばれる配列を含む。上記CDR_{L3}は、配列番号10（1A3）、配列番号20（2B8）、配列番号30（2F8）、配列番号40（3B6）、配列番号50（3D11）、配列番号60（1D3）、配列番号70（1F3）及び配列番号80（3A12）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（1A3）は、配列番号8の配列が抗体1A3に存在する配列に基づいていることを意味している。

30

40

【0021】

一実施態様として、上記結合蛋白質は、配列番号8（1A3）の配列を含むCDR_{L1}、配列番号9（1A3）の配列を含むCDR_{L2}及び配列番号10（1A3）を含むCDR_{L3}を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む。

【0022】

別の実施態様として、上記結合蛋白質は、配列番号18（2B8）の配列を含むCDR_{L1}、配列番号19（2B8）又は配列番号206（LRMR2B8LC）の配列を含むCDR_{L2}及び配列番号20（2B8）を含むCDR_{L3}を含む免疫グロブリン軽鎖可変

50

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(2F8)の配列を含むCDRL₁、配列番号29(2F8)の配列を含むCDRL₂及び配列番号30(2F8)を含むCDRL₃を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む。

【0023】

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CDRL₁、配列番号39(3B6)配列を含むCDRL₂及び配列番号40(3B6)を含むCDRL₃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CDRL₁、配列番号49(3D11)配列を含むCDRL₂及び配列番号50(3D11)を含むCDRL₃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CDRL₁、配列番号59(1D3)配列を含むCDRL₂及び配列番号60(1D3)を含むCDRL₃を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む。

【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CDRL₁、配列番号69(1F3)配列を含むCDRL₂及び配列番号70(1F3)を含むCDRL₃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CDRL₁、配列番号79(3A12)配列を含むCDRL₂及び配列番号80(3A12)を含むCDRL₃を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む。

【0028】

前記の各実施態様において、CDRL₁、CDRL₂及びCDRL₃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)CDRH₁-CDRH₂-CDRH₃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CDRH₁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CDRH₂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CDRH₃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。

【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CDRH₁

、

10

20

30

40

50

配列番号 6 (1 A 3) の配列を含む C D R_{H 2} 及び配列番号 7 (1 A 3) を含む C D R_{H 3} 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 (2 B 8) の配列を含む C D R_{H 1}、配列番号 16 (2 B 8)、配列番号 202 (H u 2 B 8 H v 1 f. 1)、配列番号 203 (H u 2 B 8 H v 5 a. 1 又は H u 2 B 8 H v 5 - 5 1. 1)、配列番号 204 (L R 2 B 8 H C) 又は配列番号 205 (L R M R 2 B 8 H C) の配列を含む C D R_{H 2} 及び配列番号 17 (2 B 8) を含む C D R_{H 3} を含む免疫グロブリン重鎖可変領域を含む。

【0032】

10

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

【0033】

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

【0034】

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

20

【0035】

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

【0036】

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

【0037】

30

別の実施態様として、上記結合蛋白質は、配列番号 75 (3 A 1 2) の配列を含む C D R_{H 1}、配列番号 76 (3 A 1 2) 配列を含む C D R_{H 2} 及び配列番号 77 (3 A 1 2) を含む C D R_{H 3} 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、C D R_{H 1}、C D R_{H 2} 及び C D R_{H 3} の配列は、ヒト又はヒト化免疫グロブリンの F R 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。

【0039】

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

40

50

3 A 1 2) の 2 1 乃至 1 2 7 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。

【0040】

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

【0041】

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。

10

【0042】

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。

【0043】

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。

【0044】

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。

20

【0045】

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。

【0046】

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。

30

【0047】

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。

【0048】

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

【0049】

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 H C 重鎖可変領域) 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

【0050】

50

別の態様として、本発明はヒトHGFに結合する単離結合蛋白質を提供する。この結合蛋白質は、(i) 配列番号177 (Hu2B8 Kv1-39. 1+カッパ定常 (Km (3) アロタイプ (対立遺伝子2)))、配列番号181 (Hu2B8 Kv3-15. 1+カッパ定常 (Km (3) アロタイプ (対立遺伝子2)))、配列番号197 (LR2B8LC+カッパ定常 (Km (3) アロタイプ (対立遺伝子1))) 及び配列番号201 (LRMR2B8LC+カッパ定常 (Km (3) アロタイプ (対立遺伝子1))) からなる群から選ばれる免疫グロブリン軽鎖、並びに(ii) 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】

別の態様として、本発明は還元型ヒトHGFに結合する単離結合蛋白質を提供する。この結合蛋白質は、(i) 3箇所のCDRを含む免疫グロブリン軽鎖可変領域及び(ii) 3箇所のCDRを含む免疫グロブリン重鎖可変領域を含む。これらのCDRは、通常FR間に挿入される。免疫グロブリン軽鎖及び免疫グロブリン重鎖のCDRは、還元型ヒトHGF、例えば、還元型HGFの α 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、 α 鎖と β 鎖との間のジスルフィド結合を還元するのに十分な量の還元剤、例えば、ジチオスレイトール (DTT: dithiothreitol)、2-メルカプトエタノール又はグルタチオンで処理したHGFのことをいう。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】

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

【0053】

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X₁TyrX₃X₄X₅であって、アミノ酸X₁がAsp、Asn、Ser又はThrであり、X₃がPhe、Trp又はTyrであり、X₄がIle又はMetであり、X₅がAsn、His又はSerであるものとする配列を含む。CDR_{H2}は、アミノ酸配列X₆IleX₈X₉GlyX₁₁GlyX₁₃X₁₄X₁₅TyrX₁₇X₁₈X₁₉X₂₀LysX₂₂であって、アミノ酸X₆がLys、Gln又はTyrであり、X₈がGly、Ser又はTyrであり、X₉がPro又はSerであり、X₁₁がAsp、Gly又はSerであり、X₁₃がAsp又はSerであり、X₁₄がSer又はThrであり、X₁₅がAsn又はTyrであり、X₁₇がAsn又はProであり、X₁₈がAla、Asp、Gly又はGluであり、X₁₉がAsn、Met又はSerであり、X₂₀がPhe又はValであり、X₂₂がAsp又はGlyであるものとする配列を含む。CDR_{H3}は、アミノ酸配列X₂₃X₂₄X₂₅X₂₆X₂₇X₂₈X₂₉X₃₀X₃₁X₃₂X₃₃AspTyrであって、アミノ酸X₂₃がArg又はGlnであり、X₂₄がGly又はLeuであり、X₂₅がAsp、Gly又はペプチド結合であり、X₂₆がGly又はペプチド結合であり、X₂₇がペプチド結合又はTyrであり、X₂₈がLeu、ペプチド結合又はTyrであり、X₂₉がGly、Arg又はLeuであり、X₃₀がAsp、Gly又はGluであり、X₃₁がTyr、Arg又はAsnであり、X₃₂がAla、Gly又はTyrであり、X₃₃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_{L1}、(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_{L2}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_{L3}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_{H1}、(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_{H2}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_{H3}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】

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

【0058】

上述の各結合蛋白質が完全な状態の抗体、例えばモノクローナル抗体であってもよいことは理解されよう。或いは、上記結合蛋白質は、抗体の抗原結合性断片であってもよく、又は生合成抗体結合部位であってもよい。抗体断片としては、Fab、Fab'、(Fab')₂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、Songsivilai et al. (1990年) CLIN. EXP. IMMUNOL. 79: p. 315-325及びKostelný et al. (1992年) J. IMMUNOL. 148: p. 1547-1553を参照されたい。

【0059】

本発明の結合蛋白質は、561番目の位置にシステインからアルギニンへの置換及び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。

【0060】

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

【0061】

別の態様として、本発明は、ヒトHGFに結合する単離結合蛋白質であって、この抗体

が25℃よりも37℃でより低いK_d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_d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IC₅₀（最大阻害の50%を来す濃度）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。

10

【0063】

上記結合蛋白質のIC₅₀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IC₅₀（表8）で抑制する。

I I. 結合蛋白質の作製

20

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。

30

【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。

40

【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

50

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。

10

I I I . 結合蛋白質に対する修飾

上記結合蛋白質を修飾してこの結合蛋白質の目的とする用途に応じて性能を最適化することができる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】

20

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、Morrison, 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。

30

【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、いくつ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 e

40

50

t al. (1986年) NATURE 321: p. 522-525、Riechmann et al. (1988年) NATURE 332: p. 323-327、Verhoeven et al. (1988年) SCIENCE 239: p. 1534-1536並びにWinter (1998年) FEBS LETT 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。

10

【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。

20

【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。

30

【0073】

マウス抗体をヒトにおける用途に好適な構造に変換するための別の典型的な方法は、カロビオス・ファーマシューティカルズ社 (Kalobios 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。

40

【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

50

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(Jacobovitz et al.)及びMendez et al. (1997年) NATURE GENETICS 15: p. 146-156を参照されたい。完全にヒト型の抗HGFモノクローナル抗体は、以下の方法を用いて作製することができる。ヒト型免疫グロブリン遺伝子を有する遺伝子導入マウスを対象とする抗原、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。

10

【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。

20

I V. 結合蛋白質の用途

本明細書に記載した結合蛋白質は、診断剤又は治療剤として用いることができる。

【0078】

(1) 治療的用途

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

【0079】

上記結合蛋白質を用いることにより腫瘍細胞の増殖を抑制又は低減させることができる。このような方法では、腫瘍細胞に対して治療的有效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。

30

【0080】

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

40

【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效量の上記結合蛋白質を投与するものである。上記結合蛋白質を単独又は別の医薬として有効な分子と併用して投与することにより腫瘍を治療することができる。

【0082】

50

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。

10

【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。さらに、特定の状況に応じて治療の過程で初期用量を段階的に増加させることができる。ヒトにおける用量は、例えば、0.5mg/kg乃至20mg/kgで実施するよう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。

20

【0085】

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

30

【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。

40

【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

50

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。

【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。

【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、³ 水素 (³ H)、¹⁴ 炭素 (¹⁴ C)、³² 燐 (³² P)、³⁵ 硫黄 (³⁵ S) 又は ¹²⁵ ヨウ素 (¹²⁵ 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、ベーター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。

【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】

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。

【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}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}Yt)、 131 ヨウ素 (^{131}I) 及び 111 インジウム (^{111}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}I 、 ^{111}In 及び ^{99m}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。

【0096】

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

【実施例】

【0097】

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

【 0 0 9 8 】

20

(实施例 2)

抗hHGFモノクローナル抗体の配列分析

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

【 0 0 9 9 】

a. HGFマウスモノクローナル抗体アイソタイプの決定

30

$$\begin{bmatrix} 0 & 1 & 0 & 0 \end{bmatrix}$$

全ての抗体は、カッパ免疫グロブリン軽鎖及び I g G 1 免疫グロブリン重鎖を含むように決定した。

【 0 1 0 1 】

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

40

【 0 1 0 2 】

50

ってPCR (Polymerase Chain Reaction (ポリメラーゼ連鎖反応)) により上記カッパ及び重 (IgG1) 免疫グロブリン鎖の可変領域を増幅させた。重鎖可変領域は、5'オリゴヌクレオチドプライマ混合物ユニバーサルプライマミックスA (Universal Primer Mix A) (5'ctaatacgactcactatagggcaagcagtggtatcaacgcagagt 3' (配列番号87) と5'ctaatacgactcactatagggc 3' (配列番号88) との混合物) 及び3' IgG1定常領域特異的プライマ5'tatgcaaggcttacaaccaca 3' (配列番号89) 又は5'gccagtggtatagacagattgggggtgtcg 3' (配列番号90) を用いて増幅した。カッパ鎖可変領域は、5'オリゴヌクレオチドプライマ混合物ユニバーサルプライマミックスA及び3' 10
カッパ定常領域特異的プライマ5'ctcattcctgttgaagctcttgacaaat 3' (配列番号91) 又は5'cgactgaggcacctccagatgtt 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 20
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'TAATACGACTCACTATAGGG 3') (配列番号93)、M13順方向プライマ (5'GTAAACGACGGCCAGT 3') (配列番号94) 及びM13逆方向プライマ (5'CAGGAACAGCTATGACC 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 T/Vークエスト (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。 30

【0104】

c. 1A3、1D3、1F3及び2B8カッパ及びIgG1鎖の免疫グロブリン重及び軽鎖定常領域の配列をコードしているヌクレオチド配列の決定

順方向プライマ5'ggggacaaagttttgtacaaaaaagcaggctgccaccatgaacttttgggctcagattgattttcc 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'ggggaccactttgtacaaagaaagctgggttcattttaccaggagagtgggagagg 3' (下線箇所: 停止コドン) (配列番号97) を用いて上記で作製したcDNAから、1A3、1D3及び1F3 IgG1鎖の完全長cDNAをPCRにより増幅させた。順方向プライマ5'ggggacaaagttttgtacaaaaaagcaggctgccaccatggggatggagctatatcatcctctttt 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'ggggaccactttgtacaaagaaagctgggttcattttaccaggagagtgggagagg 3' (下線箇所: 停止コドン) (配列番号99) を用いて上記で作製したcDNAから、2B8 IgG1鎖の完全長cDNAを増幅させた。 40

【0105】

順方向プライマ5'ggggacaaagttttgtacaaaaaagcaggctgccaccatggaatcacagactctggtcttcatat 3' (下線箇所: 50

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

【0106】

d. 配列の解析

可変領域 (標準テキスト) は、IMGT/V-QUESTウェブサーバーソフトウェア (<http://imgt.cines.fr/textes/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。

【0107】

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

【0108】

完全な重鎖又はカップ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)。

【0109】

(1) 1A3重鎖可変領域 (配列番号1)

【0110】

【化1】

```

1      atgaactttg ggctcagatt gattttcctt gtccttgttt taaaagggtg gaagtgtgaa
61     gtgcagctgg tggagtctgg gggaggctta gtgcagcctg gagggtcctt gaaactctcc
121    tgtgcagcct ctgaattcac ttccagtaac tattacatgt ctggggttcg ccagactcca
181    gagaagaggc tgcagtgggt cgatacatt agtcttggtg gtggtagctc ctactatcca
241    gccagtgtga agggctgatt caccatctcc agagacaatg ccaagaacac cctgtacctg
301    caaatgagca gtctgaagtc tgaggacaca gccatgtatt actgtgcaag acaaggggag
361    gggttactacg gggactatgc tatggactac tgggggtcaag gaacctcagt caccgtctcc
421    tcag

```

(2) 1A3カップ鎖軽鎖可変領域 (配列番号3)

【0111】

【化2】

```

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

```

(3) 2B8重鎖可変領域 (配列番号11)

【0112】

【化 3】

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 acggtcatal taactacaat
 241 gagaagtica agagcaaggc cacactgact gtagacaaat cctccagcac agcctacatg

【 0 1 1 3 】

【化 4】

10

301 caactcagca gcctgacatc tgaggactct gcggtctatt 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 1 3)

【 0 1 1 4 】

【化 5】

1 atggaatcac agactctggt cttcatatcc atactgctct ggttatatgg tgctgatggg
 61 aacattgtaa tgaccaatc tcccaaatcc atgtccatgt cagtaggaga gagggtcacc
 121 ttgagctgca aggccagtga gaatgtggtt tcttatgtat cctggatca acagaaacca
 181 gcgcagtctc ctaaactgct gatatacggg gcatccaacc ggaacactgg ggtccccgat
 241 cgcttcacag 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 2 1)

【 0 1 1 5 】

【化 6】

1 atggaatgga gctgggtctt tctcttcctc ctgtcactaa ctgcaggtgt ccactgccag
 61 gtccagctga agcagctcgg 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 gcggtctatt 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 2 3)

【 0 1 1 6 】

【化 7】

40

1 atggagacag acacaatcct gctatgggtg ctgctgctct gggttccagg ctccactggt
 61 gacattgtgc tgaccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc
 121 atctcctgca aggccagcca aagtgttgat tatgatggta atagttatat caactggtag
 181 caacagaaac caggacagcc acccaaagtc ctcatctatg ttgcatccaa tctagaatct
 241 gggatcccag ccagggttag tggcagtggtg tctgggacag acttcaccct caacatccat
 301 cctgtggagg aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc aaagtattga ggatcctccc
 361 acgttcggtg ctgggaccaa gctggagctg aaac

(7) 3 B 6 重鎖可変領域 (配列番号 3 1)

50

【 0 1 1 7 】

【化 8】

1 atggaatggc ctgtatctt tcttcttc cttcagtaa ctgaagggtt 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 atgggtgatag taactacaat
 241 ggaaacttca agggtaaagc cacactgact gcagacaaat cctccaglac agcctacatg
 301 cagctcagca gcctaacatc tgaggactct gcgggtctatt tctgtgcac ccagctcggg
 361 ctacgtgaga actactttga ctactggggc caaggcacca ctctcacagt ctctcag

10

(8) 3 B 6 カップ軽鎖可変領域 (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 tcttcatgt atgcatctct aggagagaga
 121 gtcacaatca cttgcaaggc gagtcaggac attaaaagct atttaagctg gttccagcag
 181 aaaccaggga aatctcctaa gaccctgac tatcgtgtaa acagattggt agatggggtc
 241 ccatcaagggt tcagiggcag tggatctggg caagattctt ctctcacat 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 cggctctgtt cctctcctg gtgcatttc 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 aaggagctct ggtcactgtc tctgcag

40

(1 0) 3 D 1 1 カップ軽鎖可変領域 (配列番号 4 3)

【 0 1 2 1 】

【化 1 2】

1 atggatttgc aagtcagat ttccagcttc ctgctaata gtcctcagt caaaatatcc
 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 cacttcgggt
 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 gatttccctt gtccttgtt 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 tggggtcaag 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 ttcccttca ggaatcaacag cctgcagctc
 301 gaagattttg ggaggtatca ctgtcaacat tttggggga 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 gatttccctt gtccttgtt 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 tggggtcaag gaacctcagt caccgtctcc
 421 tcag

40

50

(14) 1 F 3 カッパ軽鎖可変領域 (配列番号 63)

【0125】

【化16】

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

【0126】

【化17】

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

10

(15) 3 A 1 2 重鎖可変領域 (配列番号 71)

【0127】

【化18】

1 atgaactttg ggtcagatt gatttcctt gtccttgtt taaaagggtg gaagtgtgaa
 61 gtgcagctgg tggagtctgg gggaggctta gtgcagcctg gagggctcct gaaaatctcc
 121 tgtgcagcct ctggatttac tticagtaac tattcatgt ctggggttcg ccagactcca
 181 gagaagaggc tggagtgggt cgcatacatt agtagtggtg gtggtagcac ctactatcca
 241 gacagtgtga agggctgatt caccatctcc agagacaatg ccaagaacac cctgtacctg
 301 caaatgaaca gtctgaagtc tgaggacaca gccatgtatt actgtgtaag acaaggagat
 361 ggttactatg gggactatgc tatggactac tgggggtcaag gaacctcagt caccgtctcc
 421 tcag

20

30

(16) 3 A 1 2 カッパ軽鎖可変領域 (配列番号 73)

【0128】

【化19】

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

(17) 対照マウス I g G 1 重鎖定常領域 (J00453) (配列番号 81)

【0129】

【化 2 0】

1 ccaaaacgac acccccatct gtctatccac tggccctgg atctgctgcc caaactaact
 61 ccatggtgac cctgggatgc ctggtcaagg gctatttccc tgagccagtgc acagtgcact
 121 ggaactctgg atccctgtcc agcgggtgtgc acaccttccc agctgtcctg gagtctgacc
 181 tctacactct gacgagctca gtgactgtcc cctccagccc tcggcccagc gagaccgtca
 241 cctgcaacgt tgcccacccg gccagcagca ccaagggtgga caagaaaatt gtgccagggg
 301 attgtggtg taagccttgc atatgtacag tcccagaagt atcatctgtc ttcatttcc
 361 ccccaaagcc caaggatgtg ctcaccatta ctctgactcc taagggtcac gtgtgtgtgg

10

【 0 1 3 0】

【化 2 1】

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

20

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

【 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 tggccaccg gccagcagca ccaagggtga caagaaaatt gtgcccaggg
 301 attgtggtg taagcctgc atgtgtacag tcccagaagt atcatctgtc tcatcttcc
 361 ccccaaagcc caaggatgtg ctcaccatta ctctgactcc taaggtcacg tgtgtgtgg
 421 tagacatcag caaggatgat cccgaggtcc agttcagctg gttttagat gatgtggagg
 481 tgcacacagc tcagacgcaa cccggggagg agcagttcaa cagcactttc cgctcagtc
 541 gtgaacttcc catcatgcac caggactggc tcaatggcaa ggagttcaaa tgcagggtca
 601 acagtgcagc ttccctgccc cccatcgaga aaaccatctc caaaacaaa ggcagaccga
 661 aggtccaca ggtgtacacc attccacctc ccaaggagca gatggccaag gataaagtc
 721 gtctgacctg catgataaca gacttcttcc ctgaagacat tactgtggag tggcagtga
 781 atgggcagcc agcggagaac tacaagaaca ctacagccat catggacaca gatggctct
 841 acttcttca cagcaagctc aatgtgcaga agagcaactg ggaggcagga aatacttca
 901 cctgtctgt gttacatgag ggctgcaca accaccatac tgagaagagc ctctccact
 961 ctctggtaa atga

10

20

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

【0132】

【化 2 3】

1 gggctgatgc tgcaccaact gtatccatct tcccaccatc cagtgagcag ttaacatctg
 61 gaggtgcctc agtcgtgtgc ttttgaaca acttctacc caaagacatc aatgtcaagt
 121 ggaagattga tggcagtga cgacaaaatg gcgtcctgaa cagtggact gatcaggaca
 181 gcaaagacag cacctacagc atgagcagca cctcatggt gaccaaggac gagtatgaac
 241 gacataacag ctatacctgt gaggccactc acaagacatc aacttcccc attgtcaaga
 301 gcttcaacag gaatgagtgt tag

30

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

【0133】

【化 2 4】

1 gggctgatgc tgcaccaact gtatccatct tcccaccatc cagtgagcag ttaacatctg
 61 gaggtgcctc agtcgtgtgc ttttgaaca acttctacc caaagacatc aatgtcaagt
 121 ggaagattga tggcagtga cgacaaaatg gcgtcctgaa cagtggact gatcaggaca
 181 gcaaagacag cacctacagc atgagcagca cctcatggt gaccaaggac gagtatgaac
 241 gacataacag ctatacctgt gaggccactc acaagacatc aacttcccc attgtcaaga
 301 gcttcaacag gaatgagtgt tag

40

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

50

チド、CDR₁、CDR₂及びCDR₃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CDR₁、CDR₂及びCDR₃配列を別々に整列させて示したものである。

【0134】

実施例1で作製した全ての抗体の免疫グロブリン軽鎖可変領域を規定するアミノ酸配列は、いずれも図4に記載されている。これらの配列は全て相互に整列させてあり、シグナルペプチド、CDR₁、CDR₂及びCDR₃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CDR₁、CDR₂及びCDR₃配列を別々に整列させて示したものである。

【0135】

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

【0136】

【表 1 A】

表 1

配列番号	蛋白質又は核酸
1	重鎖可変領域 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 ₁ 1 A 3
6	重鎖 CDR ₂ 1A3
7	重鎖 CDR ₃ 1A3
8	軽 (カッパ) 鎖 CDR ₁ 1A3
9	軽 (カッパ) 鎖 CDR ₂ 1A3
10	軽 (カッパ) 鎖 CDR ₃ 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 ₁ 2B8
16	重鎖 CDR ₂ 2B8
17	重鎖 CDR ₃ 2B8
18	軽 (カッパ) 鎖 CDR ₁ 2B8
19	軽 (カッパ) 鎖 CDR ₂ 2B8
20	軽 (カッパ) 鎖 CDR ₃ 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 ₁ 2F8
26	重鎖 CDR ₂ 2F8
27	重鎖 CDR ₃ 2F8
28	軽 (カッパ) 鎖 CDR ₁ 2F8
29	軽 (カッパ) 鎖 CDR ₂ 2F8
30	軽 (カッパ) 鎖 CDR ₃ 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 ₁ 3B6
36	重鎖 CDR ₂ 3B6
37	重鎖 CDR ₃ 3B6
38	軽 (カッパ) 鎖 CDR ₁ 3B6
39	軽 (カッパ) 鎖 CDR ₂ 3B6
40	軽 (カッパ) 鎖 CDR ₃ 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 ₁ 3D11
46	重鎖 CDR ₂ 3D11
47	重鎖 CDR ₃ 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 ₁ 3D11
49	軽（カッパ）鎖 CDR ₂ 3D11
50	軽（カッパ）鎖 CDR ₃ 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 ₁ 1D3
56	重鎖 CDR ₂ 1D3
57	重鎖 CDR ₃ 1D3
58	軽（カッパ）鎖 CDR ₁ 1D3
59	軽（カッパ）鎖 CDR ₂ 1D3
60	軽（カッパ）鎖 CDR ₃ 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 ₁ 1F3
66	重鎖 CDR ₂ 1F3
67	重鎖 CDR ₃ 1F3
68	軽（カッパ）鎖 CDR ₁ 1F3
69	軽（カッパ）鎖 CDR ₂ 1F3
70	軽（カッパ）鎖 CDR ₃ 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 ₁ 3A12
76	重鎖 CDR ₂ 3A12
77	重鎖 CDR ₃ 3A12
78	軽（カッパ）鎖 CDR ₁ 3A12
79	軽（カッパ）鎖 CDR ₂ 3A12
80	軽（カッパ）鎖 CDR ₃ 3A12

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。

【0138】

（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）

【0139】

【化 2 5】

```

1 atgaactttg ggctcagatt gattttcctt gtcccttgtt taaaagggtg gaagtgtgaa
61 gtgcagctgg tggagctctg gggaggctta gtgcagcctg gagggctcct gaaactctcc
121 tgtgcagcct ctgaattcac ttccagtaac tattacatgt cttgggttcg ccagactcca
181 gagaagaggg tgcagtgggt cgcatacatt agtccctggg 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 atgcctggtc aagggtatt tccctgagcc agtgacagtg
541 acctggaact ctggatccct gtccagcggg gtgcacacct tcccagctgt cctgcagtct
601 gacctctaca ctctgagcag ctcagtgaact gtccctcca gcacctggcc cagcgagacc
661 gtcacctgca acgttgcccc cccggccagc agcaccaagg tggacaagaa aattgtgccc
721 agggattgtg gttgtaagcc ttgcatatgt acagtccag aagtatcatc tgtcttcac
781 ttccccccaa agccaagga tgtgctcacc 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 tgccccatc gagaaaacca tctccaaac caaaggcaga
1081 ccgaaggctc cacaggtgta caccattcca cctcccaagg agcagatggc caaggataaa
1141 gtcagtctga cctgcatgat aacagacttc ttcctgaag acattactgt ggagtggcag
1201 tggaaatggg agccagcggg gaactacaag aacactcagc ccatcatgga cacagatggc
1261 tcttacttcg tctacagcaa gctcaatgtg cagaagagca actgggaggc aggaaatact
1321 ttcacctgct ctgtgttaca tgagggcctg cacaaccacc atactgagaa gaggcctctc
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 nyymswvrt pekrlqwvay ispgggssyy
61 pasvkggrfti srdnakntly lqmslksed tamyycarqg dgyrygdyamd ywggtstvtv
121 ssaktppsv yplapgsaaq tnsmtlglcl vkgyfpepvt vtwnsgslss gvhtfpavlg
181 sdlytlsssv tvpsstwpse tvctcnvaha sstkvdtkiv prdcgckpci ctvpevssvf
241 ifppkpkdvl titltpkvtc vvdiskddp evqfswfvdd vevhtaqtqp reeqfnstfr
301 svselpimhq dwnlqkefkf rvnsaafpap iektisktkg rpkapqvtyi pppkegmakd
361 kvsiltcmtd ffpeditvew qwnqgpaeny kntqpimtdt gsyfvyskln vqksnweagn
421 tftcslvheg lnhhhteks1 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 gaatatattat agtaatttag catgggtatca gcagaaacag
181 ggaaaatctc ctcagctcct 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 fslkinslqs edfgtyycqh fwgtpytfgg gtleikkrad 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 ctggaaactct
 541 ggatccctgt ccagcgggtg gcacaccttc ccagctgtcc tgcagtctga cctctacact
 601 ctgagcagct cagtgcactg cccctccagc acctggccca gcgagaccgt cacctgcaac
 661 gttgcccacc cggccagcag caccaagggt gacaagaaaa ttgtgcccag ggattgtggt
 721 gttaagcctt gcataatgac agtcccagaa gtatcatctg tcttcatctt cccccaaag
 781 cccaaggatg tgctcaccat tactctgact cctaagggtc cgtgtgttgt ggtagacatc
 841 agcaaggatg atccccaggt ccagttcagc tgggttttag atgatgtgga ggtgcacaca
 901 gctcagacgc aaccccggga ggagcagttc aacagcactt tccgctcagt cagtgaactt
 961 cccatcatgc accaggactg gctcaatggc aaggagttca aatgcagggt caacagtgcg
 1021 gctttccctg ccccatcgga gaaaaccatc tccaaaacca aaggcagacc gaaggtcca
 1081 cagggtgtaca 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

(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 mqlssltted savyycarny vgsifdywgq gttltvssak
 121 ttpsvvypla pgaaqtnsm vtlgclvkgy fpepvtvtwn sgsllsgvht fpavlgdly
 181 tlsssvtpps stwpsetvtc nvahpasstk vdkkivprdc gkpcictvp evssvfifpp
 241 kpkdvltil tpkvtcvvvd iskddpevgf swfvddvevh taqtqpreeq fnstfrsvse

【0 1 4 6】

【化 3 2】

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

(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 agggcagtgga gaattgtggtt tcttatgtat cctgggtatca acagaaacca
181 gcgcagtctc ctaaactgct gatatacggg gcatccaacc ggaacactgg ggtccccgat
241 cgcttcacag gcagtggtatc tgcaacagat ttcactctga ccatcagcag tgtgcggggt
301 gaagaccttg cagattatca ctgtgggcag agttacaact atccgtacac gttcggaggg
361 gggaccagyc tggaaaataaa acgggctgat gctgcaccaa ctgtatccat cttcccacca
421 tccagtgaac agttaacatc tggagggtgc tcagtcgtgt gcttcttgaa caacttctac
481 cccaaagaca tcaatgtcaa gtggaagatt gatggcagtg aacgacaaaa tggcgtcctg
541 aacagttgga ctgatcagga 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 カップ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 mmsvgervt lsckasenvv syvswyqqkp aqspklliyy asnrntgvpd
61 rftgsgsatd ftiltissvra edladyhcgq synpytfgg gtrleikrad aaptvsifpp
121 sseqltsgga svvcflnnfy pkdinvkwki dgserqngvl nswtdqdskd stysmsstlt
181 ltkdeyerhm 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 ctgcaggtgt ccactgccag
61 gtccagctga agcagctctg agctgagctg gtgaggcctg ggacttcagt gaagatgtcc
121 tgcaaggctt ctggctacac cttcactacc tactatatac actgggtgaa tcagaggcct
181 ggacagggcc ttgagtggat tggaaagatt ggctcctgaa gtggtagtac ttactacaat
241 gagatgttca aagacaaggc cacattgact gtagacacat cctccagcac agcctacatg
301 cagctcagca gcctgacatc tgaogactct cgggtctatt tctgtgcaag aaggggactg
361 ggacgtggct ttgactactg gggccaaggc accactctca cagtctcctc agccaaaacg
421 acacccccat ctgtctatcc actggcccct ggatctgctg cccaaactaa ctccatggtg
481 accctgggat gcctgggcaa gggctatttc cctgagccag tgacagtgaac ctggaactct
541 ggatccctgt ccagcgggtg gcacaccttc ccagctgtcc tgagctctga cctctacact
601 ctgagcagct cagtgaactg cccctccagc acctggccca gcgagaccgt cacctgcaac
661 gttgcccacc cggccagcag caccaagggt gacaagaaaa ttgtgcccag ggattgtggt
721 tgtaagcctt gcatatgtac agtcccagaa gtatcatctg tcttcatctt cccccaaaag
781 cccaaggatg tgctcaccat tactctgact cctaagggtca cgtgtgttgt ggtagacatc
841 agcaaggatg atcccgaggt ccagttcagc tggttttagt atgatgtgga ggtgcacaca
901 gctcagacgc aaccccgagg ggagcagttc aacagcactt tccgctcagt cagtgaactt
961 cccatcatgc accaggactg gctcaatggc aaggagttca aatgcagggt caacagtgca
1021 gctttccctg ccccatcgga gaaaaccatc tccaaaacca aaggcagacc gaaggctcca
1081 cagggtgtaca ccattccacc tcccaaggag cagatggcca aggataaagt cagtctgacc
1141 tgcattgataa cagacttctt ccctgaagac attactgtgg agtggcagtg gaatgggcag

```

30

【0 1 5 0】

【化 3 6】

```

1201 ccagcggaga actacaagaa cactcagccc atcatggaca cagatggctc ttacttcgtc
1261 tacagcaagc tcaatgtgca gaagagcaac tgggaggcag gaaatacttt cacctgctct
1321 gtgttacatg agggcctgca caaccaccat actgagaaga gcctctccca ctctcctggg
1381 aatga

```

40

(10) 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 tyyihwvnqr pgqglewigk igpgsgstyy
61 nemfkdkatl tvdtssstay mqlssltsdd savyfcarrg lgrgfdywgq gttltvssak
121 ttpssvypla pgsaaqtnsm vtlgclvkgy fpepvtvtwn sgsllsgvht fpavlqsdly
181 tlsssvtvpv stwpsetvte nvahpasstk vdkkivprdc gckpcictvp evssvfifpp
241 kpkdvltitl tpkvtcvvvd iskddpevqf swfvddvevh taqtqpreeq fnstfrsvse
301 lpimhqdwln gkefkcrvns aafpapiect 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)

【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 caactggtac
181 caacagaaac caggacagcc acccaaagtc ctcatctatg ttgcatccaa tctagaatct
241 gggatcccag ccagggttag tggcagtggt tctgggacag acttcaccct caacatccat
301 cctgtggagg aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc aaagtattga ggatcctccc
361 acgttgcgtg ctgggaccaa gctggagctg aaacgggctg atgctgcacc aactgtatcc
421 atcttcccac catccagtga gcagttaaca tctggaggtg cctcagtcgt gtgcttcttg
481 aacaacttct accccaaaga catcaatgtc aagtggaaaga ttgatggcag tgaacgacaa
541 aatggcgctc tgaacagttg gactgatcag gacagcaaag acagcaccta cagcatgagc
601 agcacctca cgttgaccaa ggacgagtat gaacgacata acagctatac ctgtgaggcc
661 actcacaaga catcaacttc acccattgtc aagagcttca acaggaatga gtggttag

```

(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 pveedaaty ycqqsiedpp tfgagtklel kradaaptvs
121 ifppsseqlt sggasvvcfl nnfypkdiv kwkidgserq ngvlswtdq 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)

【0 1 5 4】

【化 4 0】

```

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

```

【0 1 5 5】

10

20

30

【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 agccagtga agtgacctgg
 541 aactctggat ccctgtccag cgggtgtgcac accttcccag ctgtcctgca gtctgacctc
 601 tacactctga gcagctcagt gactgtcccc tccagcacct ggcccagcga gaccgtcacc
 661 tgcaacgttg cccaccggc cagcagcacc aagggtggaca agaaaattgt gcccagggat
 721 tgtgggttga agccttgcat atgtacagtc ccagaagtat catctgtctt catcttccc
 781 ccaaagccca aggatgtgct caccattact ctgactccta aggtcacgtg tgttgggta
 841 gacatcagca aggatgatcc cgagggtccag ttcagctggt ttgtagatga tgtggagggtg
 901 cacacagctc agacgcaacc cggggaggag cagttcaaca gcactttccg ctccagtcagt
 961 gaacttccca tcatgcacca ggactggctc aatggcaagg agttcaaatg cagggtcaac
 1021 agtgcagctt tccctgcccc catcgagaaa accatctcca aaaccaagg cagaccgaag
 1081 gctccacagg tgtacacat tccacctccc aaggagcaga tggccaagg taaagtcagt
 1141 ctgacctgca tgataacaga cttcttccct gaagacatta ctgtggagt gacgtggaat
 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

(14) 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 lvrpgssvki sckasgyvfs sywmnvwkqr pgqglewigq iypgdgdsny
 61 ngnfkgkatl tadkssstay mqlssltted savyfcasql glrenyfdyw gqgttltvss
 121 akttppsvyp lapgsaaqtn smvtlglclvk 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

(15) 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 ggacccctgc 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 tcagtggcag tggatctggg caagattctt ctctcaccat caccagcctg
 301 gagaatgaag atatgggaat ttattattgt ctacagtatg atgagtttcc gttcacgttc
 361 ggagggggga ccaagctgga aataaagcgg gctgatgctg caccaactgt atccatcttc
 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

(16) 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

(17) 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 aggaagtcagg 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 tgggtgaccct gggatgcctg
481 gtcaagggct atttccctga gccagtgaca gtgacctgga actctggatc cctgtccagc
541 ggtgtgcaca ccttcccagc tgtcctgcag tctgacctct acactctgag cagctcagtg
601 actgtccctt ccagcacctg gccagcggag accgtcacct gcaacgttgc ccacccggcc
661 agcagcacca aggtggacaa gaaaattgtg cccagggatt gtggttgtaa gccttgcata
721 tgtacagtcc cagaagtatc atctgtcttc atcttccccc caaagcccaa ggatgtgctc
781 accattactc tgactcctaa ggtcacgtgt gttgtggtag acatcagcaa ggtgatccc
841 gaggtccagt tcagctgggt tgtagatgat gtggagggtg acacagctca gacgcaacc
901 cgggaggagc agttcaacag cactttccgc tcagtcatgt aacttcccat catgcaccag
961 gactggctca atggcaagga gttcaaatgc agggtaaca gtgcagcttt cctgtccccc
1021 atcgagaaaa ccatctccaa aaccaaaggc agaccgaagg ctccacaggt gtacaccatt
1081 ccacctcccc agagcagat ggccaaggat aaagtcagtc tgacctgcat gataacagac
1141 tctctccctg aagacattac tgtggagtgg cagtggatg 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 syslhwvrqp pgkglewlgv iwaggntnyn
61 sslmsrltir kdnsksqvfl kmnslqtdtd amyycarerf aywgqgtlvt vsaaktppps
121 vyplapgsaa qtnsmvtlgc lvkgyfpepv tvtwmsgsls sgvhtfpavl qsdlytlsss
181 vtvpsstwps etvtcnvahp asstkvdkki vprdcgckpc ictvpevssv fifppkpkdv
241 ltltltpkvt cvvvdiskdd pevqfswfvd dvehvtaqtq preeqfnstf rsvselpimh
301 qdwlngkefk crvnsaafpa piektisktk grpkapqvyt ipppkeqmak 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 ccagtctcca gcaatcatgt ctgcatatcc aggggagaaag
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  qivltqspai msaypgekv mtcsasssvs ymhwyqqksg tspkrwiydt sklasgvpar
61  fsgsgsgtsy sltissmeae daatyycqgw ssnpltfagag tklelkrada aptvsifpps
121 seqltsggas vvcflnnfyp kdinvkwkid gserqngvln swtdqdsksd tysmsstltl
181 tkdeyerhns ytceathkts tspivksfnr nec

```

(21) 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 ttccagtgcac 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 tggggtcaag 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 ctccagtgcac gtccctcca gcacctggc cagcgagacc
661 gtcacctgca acgttgccca cccggccagc agcaccaagg tggacaagaa aattgtgccc
721 agggattgtg gttgtaagcc ttgcatatgt acagtcccag aagtatcatc tgtcttcac
781 tcccccccaa agcccaagga tgtgctcacc attactctga ctccaaaggt cacgtgtgtt
841 gtggttagaca tcagcaagga tgatcccag gtccagttca gctgggttgt agatgatgtg
901 gagggtgcaca cagctcagac gcaacccccg gaggagcagt tcaacagcac tttccgctca
961 gtcagtgaac ttcccatcat gcaaccaggac tggctcaatg gcaaggagt caaatgcagg
1021 gtcaacagtg cagctttccc tgcccccatc gagaaaacca tctccaaaac caaaggcaga
1081 ccgaaggctc cacagggtga caccattcca cctcccaagg agcagatggc caaggataaa
1141 gtcagtctga cctgcattga aacagacttc tccctgaag acattactgt ggaagtggcag
1201 tgggaatgggc agccagcggg gaactacaag aacactcagc ccactatgga cagagatggc
1261 tcttacttcg tctacagcaa gctcaatgtg cagaagagca actgggagggc aggaaatact
1321 ttcacctgct ctgtgttaca tgagggcctg cacaaccacc atactgagaa gagcctctcc
1381 cactctcctg gtaaatga

```

(22) 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 dyymswvrrt pekrlewvay issgggstyy
61  pdsvkgrfti srdnakntly lqmsslksed taiyycvrqg dgyygyamd ywgqgtsviv
121 ssaktppsv yplapgsaaq tnsmtlgl vkgyfpepvt vtwnsgslss gvhtfpavlg
181 sdlytlsssv tvpsstwpse tvtcnvahpa sstkvdkiiv prdcgckpci ctvpevssvf
241 ifppkpkdvl titltpkvtc vvvdiskddp evqfswfvdd vevhtaqtqp reeqfnstfr
301 svselplmhq dwlngkefk rvnasaafpap iektisktkg rpkapqvtyi pppkeqmakd
361 kvsltcmtd ffpeditvew qwnqcpaeny kntqpmtdt gsyfvyskln vqksnweagn
421 tftcslvheg lnhhteksl shspgk

```

(23) 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 ctccagctcc aatctatgct gcaacaaact tagcagatgg tgtgccatca
241 aggttcagtg gcagtggtatc aggcacacag tttccctca ggatcaacag cctgcagctc
301 gaagattttg ggaggtatta ctgtcaacat ttttggggga ctccgtacac gttcggaggg
361 gggaccaaac tggaaataaa acgggctgat gctgcacca ctgtatccat cttcccacca
421 tccagtgagc agttaacatc tggagggtgcc tcagtcgtgt gcttcttgaa caactcttac
481 cccaaagaca tcaatgtcaa gtggaagatt gatggcagtg aacgacaaaa tggcgctcctg
541 aacagttgga ctgatcagga cagcaaagac agcactaca gcatgagcag caccctcacg
601 ttgaccaagg acgagtatga acgacataac agctatacct gtgaggccac tcacaagaca
661 tcaacttcac ccattgtcaa gagcttcaac aggaatgagt gttag

```

(24) 完全長1D3軽鎖配列(1D3カップ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145)

【0166】

【化52】

```

1 diqmtqspas lsvsvgetvt itcrtseniy snlawyqqkq gkspqlliya atnladgvps
61 rfsqsgsgtq fsrlrinslqs edfgryycqh fwgtpytfgg gtleikrad aaptvsifpp
121 sseqltsgga svvcflnnfy pkdinvkwki dgserqngvl nswtdqdskd stysmsstlt
181 ltkdeyerhn sytceathkt stspivksfn rnec

```

(25) 完全長1F3重鎖配列(1F3重鎖可変領域及びIgG1定常領域)をコード
 している核酸配列(下線箇所:シグナル配列)(配列番号146)

【0167】

【化53】

```

1 atgaactttg ggctcagatt gattttcctt gtccttgctt taaaagggtgt gaagtgtgag
61 gtgcagctgg tggagctctgg gggaggctta gtgcagctctg gagggtccct gaaactctcc
121 tgtgcggcct ctggattcac ttccagtaac tatttcatgt cttgggttcg ccagactcca
181 gagaagaggc tggagtggtg cgcataatatt agtagtggtg gtggtagcac ctactatcca
241 gacagtggtga agggtcgatt caccatctct agagacaatg ccaagaacac cctgtacctg
301 caaatgagca gtctgaagtc tgaggacaca gccatgtatt actgtgtaag ccaagggggat
361 gggtactacg gggactatgc tatggactac tggggctcaag gaacctcagt caccgtctcc

```

【0168】

【化54】

```

421 tcagccaaaa cgacaccccc atctgtctat ccactggccc ctggatctgc tgcccaaaact
481 aactccatgg tgaccctggg atgcctggtc aagggtctatt tccctgagcc agtgacagtg
541 acctggaact ctggatccct gtccagcggg gtgcacacct tccagctgt cctgcagctc
601 gacctctaca ctctgagcag ctccagtgact gtccctcca gcacctggcc cagcgagacc
661 gtcacctgca acgttgccca cccggccagc agcaccaagg tggacaagaa aattgtgccc
721 agggattgtg gttgtaagcc ttgcatatgt acagtcccag aagtatcatc tgtcttcatc
781 tcccccccaa agcccaaggga tgtgtctacc attactctga ctccaaagg cactgtgtgt
841 gtggtagaca tcagcaagga tgatcccgag gtccagttca gctgggttgt agatgatgtg
901 gaggtgcaca cagctcagac gcaaccccg 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 gtcagtgctga cctgcatgat aacagacttc ttcctgaag acattactgt ggagtggcag
1201 tgggaatggc agccagcga gaactacaag aacactcagc ccactatgga cacagatggc
1261 tcttacttcg tctacagcaa gctcaatgtg cagaagagca actgggaggc aggaaatact
1321 ttcacctgct ctgtgttaca tgagggcctg cacaaccacc atactgagaa gagcctctcc
1381 cactctcctg gtaaatga

```

(26) 完全長1F3重鎖配列(1F3重鎖可変領域及びIgG1定常領域)を規定し
 ている蛋白質配列(シグナル配列含まず)(配列番号147)

【0169】

【化55】

```

1 evqlvesggg lvqsggslkl scaasgftfs nyfmswvrrt pekrlewvay issgggstyy
61 pdsvkgrfti srdnakntly lqmslksed tamyycvrrg dgyygyamd ywgqgtsvtv
121 ssaktppsv 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 kntqpmtdt gsyfvyskln vqksnweagn
421 tftcslvheg lnhhhteksl shspgk

```

(27) 完全長1F3軽鎖配列(1F3カップ可変領域及び定常領域)をコードしてい
 る核酸配列(下線箇所:シグナル配列)(配列番号148)

【0170】

【化 5 6】

```

1 atgagtgtgc ccactcaggt cctgggggttg ctgctgctgt ggcttacaga tgccagatgt
61 gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgtat ctgtgggaga aactgtcacc
121 atcacatgtc gagcaagtga gaatatattac agtaatttag catggtatca 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 tggagggtgc tcaagtcgtg gcttcttgaa caactttcac
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

(28) 完全長 1 F 3 軽鎖配列 (1 F 3 カップ可変領域及び定常領域) を規定している
 蛋白質配列 (シグナル配列含まず) (配列番号 149)

【0171】

【化 5 7】

```

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

```

(29) 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 150)

20

【0172】

【化 5 8】

```

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

```

30

(30) 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 151)

40

【0173】

【化 5 9】

```

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

```

50

(31) 完全長3A12軽鎖配列(3A12カップ可変領域及び定常領域)をコードしている核酸配列(下線箇所:シグナル配列)(配列番号152)

【0174】

【化60】

```

1 atgagtgtgc ccactcaggt cctgggggtg ctgctgctgt ggcttacaga tgccagatgt
61 gacatccaga tgactcagtc gccagcctcc ctatctgtat ctgtgggaga aactgtcacc
121 atcacatgtc gagcaagtga gaattatttac attaatcttag catggtatca gcagaaacag
181 ggaaaatctc ctacagctcct 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

(32) 完全長3A12軽鎖配列(3A12カップ可変領域及び定常領域)を規定している蛋白質配列(シグナル配列含まず)(配列番号153)

【0175】

【化61】

```

1 digmtqspas lsvsvgetvt itcraseny inlawyqqkq gkspqllvha atkladgvps
61 rfsgsgsgtg yslkinslqs edfgsyycqh fwgtpytfgg gtleikrad aaptvsifpp
121 sseqltsgga svvcflnnfy pkdinvkwi dgserqngvl nswtdqgskd stysmsstlt
181 ltkdeyerhn sytceathkt stspivksfn rnec

```

20

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

【0176】

【表2A】

表2

配列番号	蛋白質又は核酸
122	1A3重可変+IgG1定常-核酸
123	1A3重可変+IgG1定常-蛋白質
124	1A3軽可変+定常-核酸
125	1A3軽可変+定常-蛋白質
126	2B8重可変+IgG1定常-核酸
127	2B8重可変+IgG1定常-蛋白質
128	2B8軽可変+定常-核酸
129	2B8軽可変+定常-蛋白質
130	2F8重可変+IgG1定常-核酸
131	2F8重可変+IgG1定常-蛋白質
132	2F8軽可変+定常-核酸
133	2F8軽可変+定常-蛋白質
134	3B6重可変+IgG1定常-核酸
135	3B6重可変+IgG1定常-蛋白質
136	3B6軽可変+定常-核酸
137	3B6軽可変+定常-蛋白質
138	3D11重可変+IgG1定常-核酸
139	3D11重可変+IgG1定常-蛋白質
140	3D11軽可変+定常-核酸

30

40

【0177】

【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

【0 1 7 8】

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。

【0 1 7 9】

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。

30

【0 1 8 0】

(1) 5' h H G F N h e I プライマー

【0 1 8 1】

【化 6 2】

ACTGGCTAGCATGTGGGTGACCAAACCTCCT (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

【0 1 8 2】

40

【化 6 3】

GTGATGGTGATGGTGATGGCGGCCGCATGACTGTGGTACCTTATATG

(配列番号 103)

(3) 5' His Ig Fc プライマー

【0183】

【化 6 4】

ACTGGCGGCCGCCATCACCATCACCATCAC (配列番号 104)

(4) 3' Ig Fc BamHI プライマー

【0184】

【化 6 5】

ACTGGGATCCTCACTATTTACCCGGGGACAG (配列番号 105)

b. hHGF-Fc G555E 及び hHGF-Fc C561R

hHGF-Fc 突然変異体 G555E 及び C561R は、クイックチェンジ (Quick Change) II XL 部位特異的突然変異誘発キット (ストラタジーン社 (Stratagene)) をメーカーの使用説明書に従って用いた部位特異的突然変異誘発法により作製した。

【0185】

(1) hHGF-Fc (G555E) センスプライマ

【0186】

【化 6 6】

CATGATGTCCACGAAAGAGGAGATGAG (配列番号 106)

(2) hHGF-Fc (G555E) アンチセンスプライマ

【0187】

【化 6 7】

CTCATCTCCTCTTTCGTGGACATCATG (配列番号 107)

(3) hHGF-Fc (C561R) センスプライマ

【0188】

【化 6 8】

GGAAGAGGAGATGAGAAACGCAAACAGGTTCTCAATG (配列番号 108)

(4) hHGF-Fc (C561R) アンチセンスプライマ

【0189】

【化 6 9】

CATTGAGAACCTGTTTGCGTTTCTCATCTCCTCTTCC (配列番号 109)

c. マウス-ヒト-マウスキメラ Fc

マウス-ヒト-マウスキメラ Ig Fc 構築物は、mHGF アルファ鎖 hHGF、ヒト HGF の β 鎖 アミノ酸 Val495 乃至 Leu585、及び mHGF C 末端 β 鎖とこれに続く 6×His 標識及び Ig G-Fc を含む。

【0190】

アミノ酸 V495 乃至 L585 をコードしているヒト HGF cDNA は、インビトロジェン社のクローン ID: IOH29794 (ヒト HGF cDNA) から増幅させた。その配列は、アクセッション番号 NM_000601.4 として NCBI に寄託されている配列に相当する。マウス HGF 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 (Super Script One Step) RT-PCR 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'AGATCTGGTTTTTAATGAAGCTTGCTCGACCTGCAATCCTG(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6×His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 7 6】

CATCACCATCACCATCACTAAGCGGGTCTGGTGCCACG (配列番号 116)

及びプライマー 2 :

【 0 2 0 0】

【化 7 7】

CGTGGCACCCAGACCCGCTTAGTGATGGTGATGGTGATG (配列番号 117)

を含めた。

【 0 2 0 1】

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 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。

【 0 2 0 2】

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

【 0 2 0 3】

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。

【 0 2 0 4】

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。

【 0 2 0 5】

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 F I p I n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%CO₂、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 F I p I n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 F I p I n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 F I p I n細胞株における蛋白質発現

約 2×10^6 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%CO₂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)

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。

30

【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 rHGF 及び精製ヒトHGF に結合する。さらに、これらの抗体は全て、点突然変異 G555E 及び C561R を含む hHGF に結合する。総じて、1F3 及び 2F8 を除く全ての抗体はマウスHGF に結合せず、このことから抗体 1A3、1D3、2B8、3A12、3B6 及び 3D11 がヒトHGF に特異的に結合することが明らかとなった。抗体 1D3、1F3 及び 2B8 がマウスーヒトーマウスキメラに結合するのに対して、残りの抗体は結合しなかった。以上の結果から、抗体 1D3 及び 2B8 は、ヒトHGF の 495 乃至 585 番目残基に少なくとも部分的に結合することが分かる。抗体 1A3、3A12、3B6 及び 3D11 は、495 乃至 585 番目残基以外のヒト hHGF の部分に結合するように思われる。2F8 が hHGF 及び mHGF のいずれにも結合するように思われるので、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 hHGF モノクローナル抗体の還元及び非還元 HGF への結合能

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

【0213】

抗HGF血清の上記組換え hHGF との反応性を免疫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 8 µg の組換え hHGF 蛋白質を 4 乃至 12 % ビスートリス 1.0 mm × 2 D ウェルゲル（インビトロジェン社、カールズバッド、カリフォルニア州）で分画した。次いで、分画した蛋白質を標準的な手順によりニトロセルロース膜上に移した。このニトロセルロース膜を、0.1 % Tween 20（登録商標）含有トリス緩衝食塩液（TBS-T）に溶かした脱脂乳粉の 5 % 溶液でブロックした後、更なるブロックのために、ミニプロテイン 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 5 µg/mL に希釈した。次いで、このニトロセルロース膜を装置から取り外し、ホースラディッシュペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG 抗体と共に

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 r h H G F に結合する。これに対し、モノクローナル抗体 1 A 3、1 D 3、1 F 3、2 F 8 及び 3 B 6 は還元 r h H G F に結合したが、抗体 2 B 8、3 A 1 2 及び 3 D 1 1 は還元 r h H G F 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 h H G F 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 (B I A c o r e、カタログ番号 B R - 1 0 0 5 - 1 4) 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 (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。分析は、0.05% 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 (EMD 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。

【0217】

前記抗体は、個々のフローセル内で 10 µL/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 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 60 µL/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 1.7 の 10 mM グリシン - H C l (B I A c o r e 社、カタログ番号 B R - 1 0 0 3 - 5 4) を 60 µL/分の流速で 3 分間注入して再生させた。試験した H G F 濃度は 0.46 nM 乃至 7.5 nM であった。

。

【0218】

速度論的パラメータは、対照値減算を含む B I A エバリュエーション (B I A e v a l u a t i o n) 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	1.7×10^6	7.3×10^4	5.2×10^{-5}	8.4×10^{-7}	30.1	5.6
1D3	1.7×10^6	3.1×10^4	8.2×10^{-5}	1.7×10^{-6}	54.2	27.4
1F3	1.5×10^6	5.0×10^4	2.6×10^{-5}	6.6×10^{-7}	18.1	8.2
2B8	1.6×10^6	2.9×10^4	2.1×10^{-5}	1.4×10^{-7}	13.5	4.4
3A12	1.6×10^6	3.7×10^4	1.6×10^{-4}	1.6×10^{-6}	103.0	10.4
3B6	2.0×10^6	6.5×10^4	3.9×10^{-5}	3.2×10^{-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 A A A N D - 0 0 0 1) を $6.25 \mu\text{g}/\text{mL}$ HGF (R&D システムズ社、カタログ番号 294-HGN-025) の炭酸コーティング緩衝液 (15mM Na_2CO_3 及び 34mM NaHCO_3 、 $\text{pH} 9.0$) 溶液 $100 \mu\text{L}$ により 4°C 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 667nM 、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°C 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 $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ 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、DEL F I A 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 DEL F I A 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 DEL F I A 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³ V 装置 (パーキンエルマー社 (Perkin Elmer)) で読み取らせた。IC₅₀ 値を算出し、表 6 にまとめた。

【0224】

【表 6】

表 6

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

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-Met への HGF の結合を効率的に中和する。

【0225】

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

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

【0226】

この細胞を 37℃、5% CO₂ の条件下でインキュベートした。48 時間後、100 μM B r d U（ロシュ社（R o c h e）、カタログ番号 1669915）を 10 μL 添加した。72 時間後、培地を除去し、プレートをヘアドライヤーで乾燥させた後、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 1669915）に従って用いて処理した。

【0227】

発光シグナルは、シナジー HT（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 $y = \text{ボトム} + (\text{トッパー} - \text{ボトム}) / (1 + 10^{-(\log(\text{EC}_{50} - x) * \text{ヒル勾配}))}$ 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 EC₅₀ の平均値を示した。

【0228】

10

20

30

40

【表 7】

表 7

抗体	IC ₅₀ (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 の結果から明らかなように、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 % ペニシリンー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 μ L 中ウェル当たり 4×10^3 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 % ペニシリンー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 % ペニシリンー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 % ペニシリンー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 $^{\circ}$ C 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 μ 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 $^{\circ}$ C、5 % C O ₂ 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 μ 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 $^{\circ}$ C で 1 0 分間揺動させながらウェル当たり 1 0 0 μ 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 μ 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 $^{\circ}$ C 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

【0232】

【表8】

表8

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

- 抑制なし

+++極めて強くほぼ完全な抑制

++ 強い抑制

+ 検出可能な抑制

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

(実施例9)

HGF刺激c-Metリン酸化の阻害

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

【0233】

PC-3細胞は、10%ウシ胎仔血清(インビトロジェン社、カタログ番号10438026)及び1%ペニシリンー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4.5×10⁴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%CO₂で24時間培養後、培地を除去し、1%ペニシリンー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%ペニシリンーストレプトマイシンを含有する無血清F-12K 100μL中で24時間インキュベートした。

【0234】

1%ペニシリンー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%ペニシリンー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%ペニシリンー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。

【0235】

その後、1%ペニシリンー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 μ L添加した後、10mM Na_3VO_4 (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 μ Lを添加した。次いで、この細胞を37℃、5% CO_2 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 μ Lを別々に個別のウェルに添加し、最終HGF濃度50 ng/mL並びに各抗体の最終濃度666.7 nM、222.2 nM、74.1 nM、24.7 nM、8.23 nM、2.74 nM、0.91 nM、0.30 nM、0.10 nM及び0.03 nMを得た。次に、この細胞を37℃、5% CO_2 で10分間インキュベートし、その時点後に培地/抗体/HGF混合物を除去してプレートを氷上に置いた。その後、細胞を、1mM Na_3VO_4 を含有する100 μ 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_3VO_4 、1×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×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 μ L/ウェルの氷冷溶解緩衝液中、4℃で、30分間インキュベートした。

【0236】

ビオチニル化抗ヒトHGF-R (c-met) 抗体 (R&Dシステムズ社カタログ番号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DEL F I A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 μ 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A A A N D - 0 0 0 5) のウェル当たり50 μ 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℃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DEL F I A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 μ 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℃で60分間インキュベートした後、DEL F I A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DEL F I Aアッセイバッファで希釈した600 ng/mL DEL F I A E u - N 1 P - t y r - 1 0 0 抗体 (パーキンエルマー社、カタログ番号A D 0 1 5 9) 溶液100 μ Lを添加した。次いで、このプレートを揺動させながら25℃で60分間インキュベートした。最後に、このプレートをDEL F I A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DEL F I A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 μ Lを添加し、プレートを暗所で振盪しながら25℃で5分間インキュベートした。

【0238】

その後、ビクター3V (Victor 3V) リーダ (パーキンエルマー社) でユーロピウム (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EC₅₀値を算出した。

【0239】

nM単位のEC₅₀としてまとめた結果を表9に示した。

【0240】

【表9】

表9

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

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

(実施例10)

U87MG異種移植モデルにおける腫瘍抑制

U87MG異種移植モデルを用い、本発明のマウスモノクローナル抗体の腫瘍増殖抑制能について試験した。U87MG細胞(ATCC)は、ダルベッコ改変イーグル培地(DMEM: Dulbecco's Modified Eagle medium)を10%ウシ胎仔血清、100単位/mLペニシリン及び100μg/mLストレプトマイシンと共に含む培地を用いた、5%CO₂及び95%空気を含有する雰囲気中37℃の培養で増殖させた。これらの細胞は、トリプシン-EDTAを用いて培養皿の壁から細胞を剥離することにより二次培養して維持した。

【0241】

ほぼコンフルエントの細胞をトリプシン処理により回収し、次いで、50%マトリゲル(Matrigel)(BDバイオサイエンス社(BD Biosciences)、カタログ番号356237)中の細胞 5×10^6 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(mm³)= $L \times W^2 / 2$ として計算した。腫瘍が約200mm³にまで成長した時に、担腫瘍マウスを1群10匹の5群に無作為化した。1群にはPBSを投与した。その他の4群のそれぞれには、抗体1A3、1D3、1F3又は2B8のうちの1種を投与した。抗体は全て、5用量の腹腔内注射により週2回1mg/kg体重を投与した。腫瘍容積及びマウス体重を週2回記録した。スチューデントの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10にまとめた。

【0242】

【表10】

表10

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

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

(実施例11)

U118異種移植モデルにおける腫瘍抑制

10

20

30

40

50

U 1 1 8 異種移植モデルを用い、抗体 1 A 3、1 D 3、1 F 3 及び 2 B 8 の腫瘍増殖抑制能について試験した。U 1 1 8 細胞 (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。

【0243】

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 80 mm^3 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 mg/kg 体重を投与した。腫瘍容積及びマウス体重を週 2 回記録した。スチューデントの t -検定を用いて腫瘍成長の抑制を解析した。結果は図 7 及び表 1 1 にまとめた。

【0244】

【表 1 1】

表 1 1

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

2 B 8 投与群及び 1 A 3 投与群では統計的に有意な成長抑制が認められた (図 7)。1 F 3 群及び 1 D 3 群では中等度の腫瘍成長抑制が認められ、 p 値は、本試験で統計的に有意であると定義した 0.05 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、Hwang ほか (2005 年) METHODS 36 : p. 35-42、Tan ほか (2002 年) J. IMMUNOL. 169 : p. 1119-1125 及び米国特許第 6,881,557 号明細書に記載されている「超ヒト化」方法に基づいて、3 つのヒト化重鎖可変領域及び 2 つのヒト化カッパ軽鎖可変領域を設計した。

【0245】

各マウス 2 B 8 CDR について CDR の長さ及びアミノ酸組成に基づき、チョチア規定構造クラス (Chothia canonical structural class) を特定した。同じチョチア規定構造クラスの軽及び重鎖可変領域からなるヒト生殖細胞系可変領域は、国際免疫遺伝学情報システム (IMGT) ウェブサイトに記載されている既知ヒト生殖細胞系可変領域基準対立遺伝子 (ワールドワイドウェブの imgt.cines.fr/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、CDR 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 CDR 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 CDR 移植用を選んだ。これらのヒト生殖細胞系可変領域のフレームワーク残基を保存する一方、マウス 2 B 8 CDR 残基は、マウス 2 B 8 CDR とヒト生殖細胞系 CDR 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。

【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】

s h 2 B 8 - 9 (G 1 m (17, 1)) = h u 2 B 8 H v 5 - 5 1. 1 (+ I g G 1 定常領域 (G 1 m (17, 1)) アロタイプ (配列番号 171) プラス h u 2 B 8 K v 1 - 3 9. 1 (+ カッパ定常領域 (K m (3)) アロタイプ (対立遺伝子 2))) (配列番号 177)

s h 2 B 8 - 1 2 (G 1 m (17, 1)) = h u 2 B 8 H v 5 - 5 1. 1 (+ I g G 1 定常領域 (G 1 m (17, 1)) アロタイプ (配列番号 171) プラス h u 2 B 8 K v 3 - 1 5. 1 (+ カッパ定常領域 (K m (3)) アロタイプ (対立遺伝子 2))) (配列番号 181)

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

【0250】

(1) 完全長キメラ2B8重鎖(マウス可変領域及びヒトIgG1定常領域)(アロタイプ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】

【化 7 8】

```

1 atgggatgga gctatatcat cctctttttg 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 tccctcaaaga gcacctctgg gggcacagcg
481 gccctgggct gcctggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacggtgtc gtggaactca
541 ggcgccttga ccagcggcgt gcacaccttc ccggtgttcc tacagtcctc aggactctac
601 tccctcagca gcgtggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcacccagac ctacatctgc
661 aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aagttgagcc caaatcttgt
721 gacaaaactc acacatgccc accgtgcccc gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc
781 ttctcttccc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca
841 tgcgtgggtg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac
901 ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac
961 cgtgtgggtc gcgtctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag
1021 tgcaagggtc ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa
1081 gggcagcccc gagaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag
1141 aaccaggtca gctgacctg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgcctcccg
1201 tgggagagca atgggcagcc ggagaacaa tacaagacca cgcctcccg gctggactcc
1261 gacggcttct tcttctctca cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg
1321 aacgtcttct gatgtccgt gctctgcaca 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 yfpepvtvswn sgaltsgvht fpavlgssgl
181 yslssvvtvp ssslgtqtyi cnvnhkpsnt kvdkkvepks cdkthtcppc papellggps
241 vflfppkpkd tlmisrtpev tcvvvdvshe dpevkfnwyv dgvevhnaht kpreeqynst
301 yrvsvltvl hqdwlngkey kckvsnkalp apiektiska kgpprepqvy tlpssrdelt
361 knqvsltclv kgfypsdiav ewesnggpen nykttppvld sdgsfflysk ltvdksrwqg
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 taacttctat
481 ccagagaggg ccaaagtaca gtggaagggt gataacgccc tccaatcggg taactcccag
541 gagagtggtc 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Hu2B8 Hv1-f. 1重鎖可変領域をコードしている核酸配列 (下線: シグナル配列) (配列番号158)

【0256】

【化 8 3】

1 atggactgca cctggaggat cctcctcttg gtggcagcag ctacaggcac ccacgccgag
 61 gtccagctgg tacagtctgg ggctgagggtg aagaagcctg gggctacagt gaaaatctcc
 121 tgcaaggttt ctggatacac cttcaccacc tactggatgc actgggtgca acagggccct
 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Hu2B8 Hv1-f. 1重鎖可変領域を規定する蛋白質配列 (シグナル配列なし) (配列番号159)

20

【0257】

【化 8 4】

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

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

【0258】

【化 8 5】

1 cctccaccaa gggcccatcg gtctccccc tggcaccctc ctccaagagc acctctgggg
 61 gcacagcggc cctgggctgc ctggtcaagg actactccc cgaaccgggtg acggtgtcgt
 121 ggaactcagg cgccctgacc agcggcgtgc acacctccc ggctgtctca cagtctcag
 181 gactctactc cctcagcagc gtggtgaccg tgcctccag cagcttgggc acccagacct
 241 acatctgcaa cgtgaatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaaa gttgagccca
 301 aatcttgtga caaaactcac acatgccac cgtgccaccg acctgaactc ctggggggac
 361 cgtagctctt cctctcccc ccaaaacca aggacaccct catgatctcc cggaccctg
 421 aggtcacatg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaagacc tgaggtcaag ttcaactggt
 481 acgtggacgg cgtggagggt cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca
 541 gcacgtaccg tgtggtcagc 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 cctcccgtgc
 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 mhealnhyt qkslsispkg

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 aaactatggt
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 tacagtccctc aggactctac
601 tcctcagca gcgtggtgac cgtgccctcc agcagcttg gacccagac ctacatctgc
661 aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aagttgagcc caaatcttgt
721 gacaaaactc acacatgccc accgtgccca gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc
781 ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca
841 tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtactgtggc
901 ggctgaggag tgcatatgac caagacaaaag ccgctggagg agcagtacaa cagcacgtac
961 cgtgtggtca 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 cgcctcccgt gctggactcc
1261 gacggctcct tcttctctca cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg
1321 aacgtcttct ctgctccgt gatgcagag gctctgcaca accactacac gcagaagagc
1381 ctctccctgt ctcgggtaa atga

```

10

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

20

【0261】

【化 8 8】

```

1 evqlvqsgae vkkpgatvki sckvsgytft tywmhvwqqa pgkglewmge inptnghtny
61 nekfqgrvti tadtstdtay melsslrsed tavyycatny vgsifdywgq gtlvtvssas
121 tkqpsvfpla psskstsggt aalgclvkdy fpepvtvswn sgaltsgvht fpavlqssgl
181 yslssvvtvp ssslgtqtyi cnvnhkpsnt kvdkkvepks cdkthtcppc papellggps
241 vflfpkpkd tlmisrtpev tcvvvdvshe dpevkfnwv dgvevhnakt kpreeqynst
301 yrvsvltvl hqdwlngkey kckvsnkalp apiektiska kgqprepqvy tlparsdelt
361 knqvsltclv kgfypsdiav ewesngqpen nykttpvld sdgsfflysk ltvdksrwqq
421 gnvfscsvmh ealnhhytqk slslspgk

```

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

30

【0262】

【化 8 9】

```

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

```

40

【0263】

【化 9 0】

```

241 ccgtcctcc aaggccacgt caccatctca gctgacaagt ccacagcac tgcctacctg
301 cagtggagca gccgaaggc ctggacacc gccatgtatt actgtgcgag aaactatgtt
361 ggtagcatct ttgactactg gggccaagga accctgggtc ccgtctcctc ag

```

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

【0264】

50

【化 9 1】

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

(13) 完全長ヒト化Hu2B8 Hv5a. 1重鎖可変領域及びヒトIgG1 (G1m (17, 1) アロタイプ) 重鎖定常領域をコードしている核酸配列 (下線: シグナル配列) (配列番号166)

【0265】

【化 9 2】

10

```

1 atgggggtcaa cgcgccatcct cgccctcctc ctggetgttc tccaaggagt ctgtgcccga
61 gtgcagctgg tgcagtcctg agcagaggtg aaaaagcccg gggagtctct gaggatctcc
121 tgtaagggtt ctggatacag ctttaccacc tactggatgc actgggtgcg ccagatgcc
181 gggaaaggcc tggagtggat gggggagatt aatcctacca acggtcatat taactacaat
241 ccgtccctcc aaggccacgt caccatctca gctgacaagt ccatcagcac tgcctacctg
301 cagtggagca gcctgaaggc ctccgacacc gccatgtatt actgtgcgag aaactatgtt
361 ggtagcatct ttgactactg gggccaagga accctgggtc ccgtctcctc agcctccacc
421 aagggcccat cggctctccc cctggcaccc tcctccaaga gcacctctgg gggcacagcg
481 gccctgggct gcctgggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacggtgtc gtggaactca
541 ggcgccttga ccagcggcgt gcacaccttc ccggctgtcc tacagtcttc aggactctac
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 ccaacaaaagc 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 aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc
1381 ctctccctgt ctccgggtaa atga

```

20

(14) 完全長ヒト化Hu2B8 Hv5a. 1重鎖可変領域及びヒトIgG1 (G1m (17, 1) アロタイプ) 重鎖定常領域を規定する蛋白質配列 (シグナル配列なし) (配列番号167)

30

【0266】

【化 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 papellgpps
241 vflfppkpkd tlmisrtpev tcvvvdvshe dpevkfnwyv dgvevhnakt kpreeqynst
301 yrvsvsltlv hqdwlngkey kckvsnkalp apiektiska kgpprepqvy tlppsrldelt

【0267】

【化 9 4】

40

361 knqvsltclv kgfypsdiav ewesngqpen nykttppvld sdgsfflysk ltvdksrwgq
421 gnvfscsvmh ealhnhytgk slslspgk

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

【0268】

【化 9 5】

1 atgggggtcaa 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 ccgtccttc aaggccaggt caccatctca gctgacaagt ccatcagcac tgcctacctg
 301 cagtggagca gcctgaaggc ctggacacc gccatgtatt actgtgcgag aaactatgtt
 361 ggtagcatct ttgactactg gggccaagga accctgggtca ccgtctcctc ag

10

(16) ヒト化Hu2B8 Hv5-51. 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169)

【0269】

【化 9 6】

1 evqlvqsgae vkkpgeslki sckgsgysft tywmhwwrqn pgkglewmge inptnhtny
 61 npsfqgqvti sadksistay lqwsslkasd tamyyccarny vgsifdywgq gtlvtvss

(17) 完全長重鎖ヒト化Hu2B8 Hv5-51. 1重鎖可変領域及びヒトIgG1 (G1m (17, 1) アロタイプ) 重鎖定常領域をコードしている核酸配列 (下線: シグナル配列) (配列番号170)

20

【0270】

【化 9 7】

1 atgggggtcaa 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 ccgtccttc 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 tgacgggtgc gtggaactca
 541 ggcgccttga ccagcggcgt gcacaccttc ccggctgtcc tacagtccctc aggaactctac
 601 tccctcagca cgtggttgac cgtgccttcc agcagcttgg gcacccagac ctacatctgc
 661 aacgtgaatc acaagccag caacaccaag gtggacaaga aagttagacc caaatcttgt
 721 gacaaaactc acacatgccc accgtgccc gcacctgaac tctgggggg accgtcagtc
 781 ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca
 841 tgcgtggttg tggacgtgag ccacgaagac cctgagggtca agttcaactg gtacgtggac
 901 ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac
 961 cgtgtgtgtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag
 1021 tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaacctctc caaagccaaa
 1081 gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag
 1141 aaccaggtca gcctgacctg cctgggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgcgtggag
 1201 tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctccctg gctggactcc
 1261 gacggctcct tcttctcta cagcaagctc accgtggaca agagcagggtg gcagcagggg

30

【0271】

【化 9 8】

1321 aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc
 1381 ctctccctgt ctccgggtaa atga

40

(18) 完全長重鎖ヒト化Hu2B8 Hv5-51. 1重鎖可変領域及びヒトIgG1 (G1m (17, 1) アロタイプ) 重鎖定常領域を規定する蛋白質配列 (シグナル配列なし) (配列番号171)

【0272】

【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 vflfpkpkd tlmisrtpev tcvvvdvshe dpevkfnwyv dgvevhnakt kpreeqynst
 301 yrvvsvltvl hgdwlngkey kckvsnkalp apiektiska kgqpprepqvy tlppsrdeit
 361 knqvsiltclv kgfypsdiav ewesngqpen nykttppvld sdgsfflysk ltvdksrwqg
 421 gnvfscsvmh ealhnhytgk slslspgk

(19) ヒト化Hu2B8 Kv1-39. 1 カッパ鎖可変領域をコードしている核
 酸配列 (下線: シグナル配列) (配列番号 172)。考えられる 2 つの開始 A T G を大文
 字で示した。

【0273】

【化100】

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

(20) ヒト化Hu2B8 Kv1-39. 1 カッパ鎖可変領域を規定する蛋白質配
 列 (シグナル配列なし) (配列番号 173)

【0274】

【化101】

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

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

【0275】

【化102】

1 gaactgtggc tgcaccatct gtcttcatct tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg
 61 gaactgcctc tgttgtgtgc ctgtgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt
 121 ggaaggtgga taacgccctc caatcgggta actcccagga gagtgtcaca gagcaggaca
 181 gcaaggacag cacctacagc ctcagcagca ccttgacgct gagcaaagca gactacgaga

【0276】

【化103】

241 aacacaaagt ctacgcctgc gaagtcaccc atcagggcct gagctcgccc gtcacaaaga
 301 gcttcaacag gggagagtggt tga

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

【0277】

10

20

30

40

50

【化 1 0 4】

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

(23) 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 ccagttctcca tcctccctgt ctgcatctgt aggagacaga
121 gtcaccatca cttgcaaggc cagtggagaat gtgggtttctt atgtatcctg gtatcagcag
181 aaaccaggga aagcccctaa gctcctgata tatggggcat ccaaccggaa cactggggtc
241 ccatcaaggt tcagtggcag tggatctggg acagatttca ctctcaccat cagcagctctg
301 caacctgaag attttgcaac ttactactgt gggcagagtt acaactatcc gtacacgttt
361 ggccaggsga ccaagctgga gatcaaacga actgtggctg caccatctgt ctcatcttc
421 ccgcatctg atgagcagtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac
481 ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg aaggtggata acgcctcca atcgggtaac
541 tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc
601 ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaaggtct acgcctgcga agtcacccat
661 cagggcctga gctcgccctg cacaagagc ttcaacaggg gagagtgtg a

(24) 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 preakvqwk v dnalqsgnsq esvteqdsd styslsslt
181 lskadyekhk vyacevthqg lsspvtksfn rgec

(25) 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 ggctccaga taccactgga
61 gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc
121 ctctcctgca aggcagtgga gaattgtggt tcttatgtat cctggtagca gcagaaacct
181 ggccaggctc ccaggctcct catctatggg gcattccaacc 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

(26) 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 rfsqsgsgte fltisslqs edfavyycgq synpytfgq gtleik

(27) 完全長ヒト化Hu2B8 Kv3-15. 1軽鎖可変領域及びヒトカッパ鎖
 定常領域 (Km (3) アロタイプ) (対立遺伝子2) をコードしている核酸配列 (下線:
 シグナル配列) (配列番号180)

【0283】

【化 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

(28) ヒト化Hu2B8 Kv3-15. 1軽鎖可変領域及びヒトカッパ鎖定常領
 域 (Km (3) アロタイプ) (対立遺伝子2) を規定する蛋白質配列 (シグナル配列なし
) (配列番号181)

20

【0284】

【化 1 1 1】

1 eivmtqspat lsvspgerat lsckasenvv syvswyqqkp gqaprlliyg asnrntgipa
 61 rfsqsgsgte fltisslqs edfavyycgq synpytfgq gtleikrtv aapsvfifpp
 121 sdeqlksgta svvcilnnfy preakvqwkvn 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との対
 応関係を示すコンコーダンス表を表13に示した。

【0285】

30

【表 13】

表 13

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

B. ヒト化の方法2

マウス2B8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、Studnickaほか(1994年) PROTEIN ENG. 7: p. 805-814に記載されている方法に基づくものである。重及びカッパヒト生殖細胞系可変領域のうち、マウス2B8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(LR2B8HCを作製)及びカッパ可変領域(LR2B8LC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(LRMR2B8HCを作製)及びカッパ可変領域(LRMR2B8LCを作製)において行った。上記2種のヒト型に設計された重鎖可変領域のカルボキシル末端にヒトIgG1重鎖定常領域(G1m(3)アロタイプ(対立遺伝子1))を付加し、2種のヒト型に設計された軽鎖可変領域のカルボキシル末端にヒトカッパ定常領域(Km(3)アロタイプ(対立遺伝子1))を付加して、ヒト型に設計された抗体鎖を作製した。先ず、遺伝子合成法によって各可変領域の核酸配列を合成した後、これに各ヒト定常領域の配列に付加した。これらのヒト型に設計された抗体を哺乳動物の蛋白質発現ベクター中にクローニングし、重鎖プラス軽鎖の考えられる4種の組合せの蛋白質を発現させた。キメラ、キメラ/ヒト化又はヒト化抗体のヒトHGFへの結合については、下記のように、従来の技術を用いて測定した。

【0286】

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

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

【0287】

(1) ヒト化LR2B8HC重鎖可変領域をコードしている核酸配列（下線：シグナル配列）（配列番号182）

【0288】

【化112】

```

1 atgggctggt catatattat tcctttctt gttgctaccg ctaccgatgt gcactctcaa
61 gtccaactcg tacaaccagg cgctgaagtc gtaaaaccgg gaacatctgt taaactctca
121 tgcaaagcct caggatacac ttccacaact tactggatgc attgggtcaa tcaagccccc
181 ggacaaggcc tcgaatggat tggcgaaatt aacccaacta acggacatac taattataat
241 gaaaaattta agggcaaagc tacactcacc gtcgataaat caacctctac agcttatatg
301 gaactttcat ccttgagatc agaagataca gccgtctact attgcgccag aaactacgta
361 ggatcaatat tcgattactg gggtaagggc actctctctca cagtcagctc ag

```

10

(2) ヒト化LR2B8HC重鎖可変領域を規定する蛋白質配列（シグナル配列なし）（配列番号183）

20

【0289】

【化113】

```

1 qvqlvpggae vvkpgtsvkl sckasgytft tywmhwnqqa pgqglewige inptnghtny
61 nekfkqkatl tvdkststay melsslrsed tavyycarny vgsifdywgq gtlltvss

```

(3) ヒトIgG1重鎖定常領域（G1m（3）アロタイプ）（対立遺伝子1）をコードしている核酸配列（配列番号184）

【0290】

【化 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 agcagggtggc
 901 agcaggggaa cgtcttctca tgetccgtga 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 yicnvnhkps ntkvdkrvep kscdkthtcp pcpapellgg
 121 psvflfppkp kdtlmisrtp evtcvvvdvs hedpevkfnw yvdgvevhna ktkpreeqyn

30

【0 2 9 2】

【化 1 1 6】

181 styrvvsvlt vlhqdwlngk eykckvsnka lpapiektis kakgpprepq vytlppsree
 241 mtknqvsltc lvkgfypsdi avewesngqp ennykthppv ldsdgsffly skltvdksrw
 301 qqgnvfscsv mhealhnhyt qkslslspgk

40

(5) 完全長重鎖ヒト化 L R 2 B 8 H C 重鎖可変領域及びヒト 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 tgcaaagcct caggatacac ttccacaact tactggatgc attgggtcaa tcaagccccc
181 ggacaaggcc tcgaatggat tggcgaaatt aaccacaacta acggacatac taattataat
241 gaaaaattta agggcaaagc tacactcacc gtcgataaat caacctctac agcttatatg
301 gaactttcat ccctgagatc agaagataca gccgtctact attgcgccag aaactacgta
361 ggatcaatat tcgattactg gggtcaggc actctcctca cagtcaagctc agccagcaca
421 aagggcccat cggctctccc cctggcacc cctccaaga gcacctctgg gggcacagcg
481 gccctgggct gcctgggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacgggtgc gtggaactca
541 ggcgcctga ccagcggcgt gcacaccttc cgggtgtcc tacagtctc aggactctac
601 tccctcagca gcgtgggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcaccagac ctacatctgc
661 aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga gatttgagcc caaatcttgt
721 gacaaaactc acacatgtcc accgtgccc gcacctgaac tctggggggg accgtcagtc
781 ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcattgatc cccggacccc tgaggtcaca
841 tgcgtgggtg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac
901 ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac
961 cgtgtgggtca gcgtccctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag
1021 tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa
1081 gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggagga gatgaccaag
1141 aaccaggtca gcctgacctg cctgggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag
1201 tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccg gctggactcc
1261 gacggctcct tcttctctca tagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg
1321 aacgtcttct catgtccgt gatgcattgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc
1381 ctctccctgt ccccggttaa atga

```

10

(6) 完全長重鎖ヒト化LR2B8HC重鎖可変領域及びヒトIgG1重鎖定常領域
(G1m(3)アロタイプ)(対立遺伝子1)を規定する蛋白質配列(シグナル配列なし)
(配列番号187)

20

【0294】

【化118】

```

1 qvqlvppgae vvkpgtsvkl sckasgyft tywmhwnqa pggglewige inptnghtny
61 nekfkkgkatl tvdkststay melsslrstd tavyycarny vgsifdywgq gtlltvssas
121 tkqpsvfpla psskstsggt aalgclvkd yfepvtvsw nsgaltsgvht fpavlgssgl
181 yslssvvtvp ssslgtqti cnvnhkpsnt kvdkrvepks cdkthtccpc 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LRMR2B8HC重鎖可変領域をコードしている核酸配列(下線:シグナル配列)(配列番号188)

【0295】

【化119】

```

1 atgggttgggt catatattat actctttctc gtagccaccg ccaccgacgt acactctcag
61 gtccaactcg tacaaccagg cgccgaagtc aagaaccagg gaacatcagt caaactctca
121 tgtaaagcaa gcggatacac ctltactact tattggatgc attgggtaag acaagccccc
181 ggacaaggac tcgaatggat aggcgaaata 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LRMR2B8HC重鎖可変領域を規定する蛋白質配列(シグナル配列なし)(配列番号189)

【0296】

【化 1 2 0】

1 qvqlvqpgae vkkpgtsvkl sckasgytft tywmhwvrqa 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 atggggttggt catatattat actotttctc gtagccaccg ccaccgacgt acactctcag
61 gttcaactcg tacaaccgg cgccgaagtc aagaaccag gaacatcagt caaactctca
121 tgtaaagcaa gcgatacac ctttactact tattggatgc attgggtaag acaagcccc
181 ggacaaggac tcgaatggat aggcgaata aatcccacta atggacatac aaattataat
241 caaaaatttc aaggacgagc tacactcacc gtcgataaat caacctcaac cgcatacatg
301 gaactcagct ccctccgac cgaagacact gccgtttatt attgtgccag aaactatgta
361 ggatctatct tcgattactg gggacaagga acacttctca ccgtaagctc agccagcaca
421 aagggcccat cggctctccc cctggcacc tcctccaaga gcacctctgg gggcacagcg
481 gccctgggct gcctggtcaa ggactacttc ccogaaccgg tgacggtgtc gtggaactca
541 ggcgccttga ccagcggcgt gcacaccttc ccggctgtcc tacagtcctc aggactctac
601 tccctcagca gcgtggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gacccagac ctacatctgc
661 aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga gaggtagacc caaatcttgt
721 gacaaaactc acacatgtcc accgtgcca gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc
781 tctctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca
841 tgcggtggtg tggacgtgag ccacgaagac cctgagggtc agttcaactg gtacgtggac
901 ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac
961 cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag
1021 tgcaaggctc ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa
1081 gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccac cccgggagga gatgaccaag
1141 aaccagggtc gcctgacctg cctgggtcaa ggcttctatc ccagcgacat cgcctggag
1201 tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccggt gctggactcc
1261 gacggctcct tcttctctta tagcaagctc accgtggaca agagcagggt gcagcagggg
1321 aacgtcttct catgctccgt gatgcagag gctctgcaca accactacac gcagaagagc
1381 ctctccctgt ccccggttaa atga

```

20

(10) 完全長重鎖ヒト化 L R M R 2 B 8 H C 重鎖可変領域及びヒト I g G 1 重鎖定常領域 (G 1 m (3) アロタイプ) (対立遺伝子 1) を規定する蛋白質配列 (シグナル配列なし) (配列番号 1 9 1)

30

【0 2 9 8】

【化 1 2 2】

```

1 qvqlvqpgae vkkpgtsvkl sckasgytft tywmhwvrqa 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 kgqprepgvy tlppsreemt
361 knqvsltclv kgfypsdiav ewesngqpen nykttppvld sdgsfflysk ltvdkstrwgq
421 gnvfscsvmh ealhnhytqk slslspgk

```

(11) ヒト化 L R 2 B 8 L C 軽鎖可変領域をコードしている核酸配列 (下線: シグナル配列) (配列番号 1 9 2)

40

【0 2 9 9】

【化 1 2 3】

1 atggaaagtc agacccttgt attcatctct attctctttt 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LR2B8LC軽鎖可変領域を規定する蛋白質配列（シグナル配列なし）（配列番号193）

10

【0300】

【化 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（Km（3）アロタイプ）（対立遺伝子1）をコードしている核酸配列（配列番号194）

【0301】

【化 1 2 5】

20

1 gtacgggtggc tgcacatct gtctcatct tccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg
 61 gaaactgcctc tgttgtgtgc ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt
 121 ggaagggtgga taacgccctc caatcgggta actcccagga gagtgtcaca gagcaggaca
 181 gcaaggacag cacctacagc ctacgacga 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（Km（3）アロタイプ）（対立遺伝子1）を規定する蛋白質配列（配列番号195）

30

【0302】

【化 1 2 6】

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

(1 5) 完全長LR2B8LC軽鎖可変領域及びヒトカッパ鎖定常領域（Km（3）アロタイプ）（対立遺伝子1）をコードしている核酸配列（配列番号196）

40

【0303】

【化 1 2 7】

1 atggaaagtc agacccttgt attcatctct attctctttt 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
 361 ggaaccaaac tcgaaattaa acgtacggtg 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 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc
 661 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gtttag

50

(16) 完全長LR2B8LC軽鎖可変領域及びヒトカッパ鎖定常領域 (Km (3) アロタイプ) (対立遺伝子1) をコードしている蛋白質配列 (配列番号197)

【0304】

【化128】

```

1 divmtqspds mamsvgervt lnckasenvv syvswyqqkp gqspklliyg asnrntgvpd
61 rfsgsgsatd ftltissvqa edvadyhcgq synpytfgq gtleikrtv aapsvfifpp
121 sdeqlkshta svvcllnnfy preakvqwk dnalqsgnsq esvteqdskd styslsstlt
181 lskadyekhk vyacevthgg lsspvtksfm rgec

```

(17) ヒト化LRMR2B8LC軽鎖可変領域をコードしている核酸配列 (下線: シグナル配列) (配列番号198)

【0305】

【化129】

```

1 atggaatccc aaacccttgt ttcatctct atccttctct ggctttatgg cgccgacgga
61 gacatcgtaa tgacacaatc ccctgactct cttgctatga gcttgggcga acgagtaaca
121 cttactgca aagcatccga aaatgtcgta tcttacgtat cctggtatca gcaaaaacct
181 ggtcaaagtc ctaacttct tatatatggg gcaagtaatc gtgaaagtgg cgtcccagac
241 agatttagcg gttcagggtc agcaactgac ttactacta caatttctag cgttcaggcc
301 gaagacgttg cagactatca ttgtggacaa tcttataact atccttatac ttccggacaa
361 ggcactaaac ttgaaattaa ac

```

(18) ヒト化LRMR2B8LC軽鎖可変領域を規定する蛋白質配列 (シグナル配列なし) (配列番号199)

【0306】

【化130】

```

1 divmtqspds lamslgervt lnckasenvv syvswyqqkp gqspklliyg asnresgvpd
61 rfsgsgsatd ftltissvqa edvadyhcgq synpytfgq gtleik

```

(19) 完全長ヒト化LRMR2B8LC軽鎖可変領域及びヒトカッパ鎖定常領域 (Km (3) アロタイプ) (対立遺伝子1) をコードしている核酸配列 (下線: シグナル配列) (配列番号200)

【0307】

【化131】

```

1 atggaatccc aaacccttgt ttcatctct atccttctct ggctttatgg cgccgacgga
61 gacatcgtaa tgacacaatc ccctgactct cttgctatga gcttgggcga acgagtaaca
121 cttactgca aagcatccga aaatgtcgta tcttacgtat cctggtatca gcaaaaacct
181 ggtcaaagtc ctaacttct tatatatggg gcaagtaatc gtgaaagtgg cgtcccagac
241 agatttagcg gttcagggtc agcaactgac ttactacta caatttctag cgttcaggcc
301 gaagacgttg cagactatca ttgtggacaa tcttataact atccttatac ttccggacaa
361 ggcactaaac ttgaaattaa acgtacgggtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcga
421 tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat
481 cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag
541 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg
601 ctgagcaaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc
661 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gtttag

```

(20) 完全長ヒト化LRMR2B8LC軽鎖可変領域及びヒトカッパ鎖定常領域 (Km (3) アロタイプ) (対立遺伝子1) を規定する蛋白質配列 (配列番号201)

【0308】

【化132】

```

1 divmtqspds lamslgervt lnckasenvv syvswyqqkp gqspklliyg asnresgvpd
61 rfsgsgsatd ftltissvqa edvadyhcgq synpytfgq gtleikrtv aapsvfifpp
121 sdeqlkshta svvcllnnfy preakvqwk dnalqsgnsq esvteqdskd styslsstlt
181 lskadyekhk vyacevthgg lsspvtksfm rgec

```

10

20

30

40

50

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。

【0309】

【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 IgG1 重鎖定常領域 (G1m(3) アロタイプ) (対立遺伝子 1) —核酸
185	ヒト IgG1 重鎖定常領域 (G1m(3) アロタイプ) (対立遺伝子 1) —蛋白質
186	LR2B8HC + IgG1 定常領域 (G1m(3) アロタイプ) (対立遺伝子 1) —核酸
187	LR2B8HC + IgG1 定常領域 (G1m(3) アロタイプ) (対立遺伝子 1) —蛋白質
188	LRMR2B8HC 重鎖可変領域—核酸
189	LRMR2B8HC 重鎖可変領域—蛋白質
190	LRMR2B8HC + IgG1 定常領域 (G1m(3) アロタイプ) (対立遺伝子 1) —核酸
191	LRMR2B8HC + IgG1 定常領域 (G1m(3) アロタイプ) (対立遺伝子 1) —蛋白質
192	LR2B8LC 軽鎖可変領域—核酸
193	LR2B8LC 軽鎖可変領域—蛋白質
194	ヒトカッパ鎖定常領域領域 (Km(3) アロタイプ) (対立遺伝子 1) —核酸
195	ヒトカッパ鎖定常領域領域 (Km(3) アロタイプ) (対立遺伝子 1) —蛋白質
196	LR2B8LC + カッパ鎖定常領域 (Km(3) アロタイプ) (対立遺伝子 1) —核酸
197	LR2B8LC + カッパ鎖定常領域 (Km(3) アロタイプ) (対立遺伝子 1) —蛋白質
198	LRMR2B8LC 軽鎖可変領域—核酸
199	LRMR2B8LC 軽鎖可変領域—蛋白質
200	LRMR2B8LC + カッパ鎖定常領域 (Km(3) アロタイプ) (対立遺伝子 1) —核酸
201	LRMR2B8LC + カッパ鎖定常領域 (Km(3) アロタイプ) (対立遺伝子 1) —蛋白質

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。

【0310】

【表 1 5】

表 1 5

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 1 6 は、以上の本実施例で説明したヒト化の方法 1 及びヒト化の方法 2 により作製したヒト化 2 B 8 抗体の軽鎖 C D R 配列 (カバット (K a b a t) の定義) をまとめたものである。

【0311】

【表 16】

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（B I A c o r e、カタログ番号BR-1005-34）上に固定化した。分析は、0.05%の界面活性剤P20（B I A c o r e、カタログ番号BR-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（F l u k a）、カタログ番号86524）を含有するPBS（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。

【0312】

前記抗体は、個々のフローセル上で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、pH2.0の10mMグリシン塩酸（B I A c o r e社、カタログ番号BR-1003-55）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1.88、3.75及び7.5nMであった。速度論的パラメータは、対照値減算を含むB I A エバリュエーション（B I A e v a l u a t i o n）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 (B I A c o r e、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 (B I A c o r e、BR-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 (F l u k a)、カタログ番号86524) を含有するPBS (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。

【0314】

前記ヒト化抗体は、個々のフローセル上で30μL/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150RUの抗体を生じるための注入時間にはばらつきがあった。7.5μg/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30μL/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30μL/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、pH2.0の10mMグリシン塩酸 (B I A c o r e社、カタログ番号BR-1003-55) を60μL/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

ヒトカップ及びガンマー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LRMR2BHC) 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 (Glm (3) アロタイプ (対立遺伝子1)) (配列番号187) プラスLR2B8LC (+カップ鎖定常領域 (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 (Glm (3) アロタイプ (対立遺伝子1)) (配列番号187) プラスLRMR2B8LC (+カップ鎖定常領域 (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 (Glm (3) アロタイプ (対立遺伝子1)) (配列番号191) プラスLR2B8LC (+カップ鎖定常領域 (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 (Glm (3) アロタイプ (対立遺伝子1)) (配列番号191) プラスLRMR2B8LC (+カップ鎖定常領域 (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（プロークム社）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+ヒトカップ鎖定常ドメインcDNA及び完全長Hu2B8__Kv3-15.1可変領域+ヒトカップ鎖定常ドメイン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、どちらのカップ鎖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。

10

【0318】

s h 2 B 8 - 9 (G 1 m (3)) = h u 2 B 8 H v 5 - 5 1 . 1 (+ I g G 1 定常領域 (G 1 m (3) アロタイプ) (対立遺伝子 2)) (配列番号 2 1 0) プラス h u 2 B 8 K v 1 - 3 9 . 1 (+ カップ鎖定常領域 (K m (3) アロタイプ (対立遺伝子 2))) (配列番号 1 7 7)

20

s h 2 B 8 - 1 2 (G 1 m (3)) = h u 2 B 8 H v 5 - 5 1 . 1 (+ I g G 1 定常領域 (G 1 m (3) アロタイプ) (対立遺伝子 2)) (配列番号 2 1 0) プラス h u 2 B 8 K v 3 - 1 5 . 1 (+ カップ鎖定常領域 (K m (3) アロタイプ (対立遺伝子 2))) (配列番号 1 8 1)

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）をコードしている核酸配列（配列番号207）。第1のアミノ酸は、可変領域の最後のヌクレオチドおよびIgG1重鎖配列の開始2ヌクレオチドの翻訳から得られる。

30

【0320】

【化133】

1 cctccaccaa gggcccatcg gtcttcccc tggcacccctc ctccaagagc acctctgggg
61 gcacagcggc cctgggctgc ctggtcaagg actacttccc cgaaccggtg acggtgtcgt
121 ggaactcagg gcacctgacc agcggcggtgc acaccttccc ggctgtccta cagtctcag
181 gactctactc cctcagcagc gtgggtgaccg tgccctccag cagcttgggc acccagacct
241 acatctgcaa cgtgaatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaga gttgagccca
301 aatcttgta caaaactcac acatgcccac cgtgcccagc acctgaactc ctgggggggac

40

【0321】

【化 1 3 4】

361 cgtcagctctt cctcttcccc ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc cggacccctg
 421 aggtcacatg cgtgggtgtg gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtaag ttcaactggt
 481 acgtggacgg cgtggagggtg cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca
 541 gcacgtaccg tgtggtcagc gtcctcaccg tctgcacca ggactggctg aatggcaagg
 601 agtacaagtg caaggtctcc aacaaagccc tccagcccc catcgagaag accatctcca
 661 aagccaaagg gcagcccccga gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc cgggaggaga
 721 tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tggtaaagg cttctatccc agcgacatcg
 781 ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgctg
 841 tggactcoga cggtctcttc ttctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc
 901 agcaggggaa cgtcttctca tgcctcgtga tgcattgaggc tctgcacaac cactacacgc
 961 agaagagcct ctccctgtct ccgggtaaat ga

10

(2) 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 2 0 8)

【0 3 2 2】

【化 1 3 5】

1 astkgpsvfp lapsskstsg gtaalglvk dyfpepvtvs wnsaltsgv htfpavilqss
 61 glyslssvvt vpssslgtqt yicnvnhkps 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

20

(3) 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 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 9)

【0 3 2 3】

【化 1 3 6】

1 atgggggtcaa ccgccatcct cgccctcctc ctggctgttc tccaaggagt ctgtgccgaa
 61 gtgcagctgg tgcagtctgg agcagagggtg aaaaagcccg gggagtctct gaagatctcc
 121 tgtaagggtt ctggatacag ctttaccacc tactggatgc actgggtgcg ccagatgccc
 181 gggaaaggcc tggagtggat gggggagatt aatcctacca acggtcatac taactacaat
 241 ccgtccttcc aaggccaggt caccatctca gctgacaagt ccatcagcac tgcctacctg
 301 cagtggagca gcctgaaggc ctggacacc gccatgtatt actgtgcgag aaactatggt
 361 ggtagcatct ttgactactg gggccaagga accctggtca ccgtctcctc agcctccacc
 421 aagggcccat cggctcttccc cctggcacc cctccaaga gcacctctgg gggcacagcg
 481 gccctgggct gcctgggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacgggtgc gtggaaactca
 541 ggcgccttga ccagcggcgt gcacaccttc ccggtgtcc tacagtctc aggactctac
 601 tccctcagca gcgtgggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcaccagac ctacatctgc
 661 aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga gaggttgagcc caaatcttgt

40

【0 3 2 4】

【化 1 3 7】

```

721 gacaaaactc acacatgccc accgtgcccc gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc
781 ttccctcttcc ccccaaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca
841 tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac
901 ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcggggagg agcagtacaa cagcacgtac
961 cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag
1021 tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga agaccatctc caaagccaaa
1081 gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggagga gatgaccaag
1141 aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag
1201 tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgctcccggt gctggactcc
1261 gacggctcct tcttctctta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg
1321 aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc
1381 ctctccctgt ctccgggtaa atga

```

10

(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 scksgsyst tywmhwvrqm pgkglewmge inptnghtny
61 npsfqqgvti sadksistay lqwsslkasd tammycarny vgsifdywgq gtlvtvssas
121 tkgpsvfpla psskstsggt aalgclvkdy fpepvtvswm sgaltsgvht fpavlgssgl
181 yslssvvtvp ssslgtqtyi cnvnhkpsnt kvdkrvepks cdkthtccppc papellggps
241 vflfpkpkd tlmisrtpev tcvvvdvshe dpevkfnwyv dgvevhnakt kpreegynst
301 yrvvsvltvl hqdwlngkey kckvsnkalp apiektiska kgpprepqvy tlppsreemt
361 knqvsiltclv kgfypsdiav ewesngqpen nykttppvld sdgsfflysk ltvdksrwgq
421 gnvfscsvmh ealnhhytgk slslspgk

```

20

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

30

(実施例 1 4)

ヒト化2B8変異体の結合特性

実施例13で作製したヒト化抗体の特徴は、hHGF及び実施例3で作製した組換えHGF蛋白質に結合することであった。

【 0 3 2 6 】

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

【 0 3 2 7 】

分析は、0.05%の界面活性剤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30 μL/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)

50

e m s)、カタログ番号294-HGN-025)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17にまとめた。

【0328】

【表17】

表17

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17の結果から明らかなように、ヒト化2B8系抗体はrhHGF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15)

ヒト化2B8変異体の結合親和性

表15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。

【0329】

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) 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。分析は、0.05%の界面活性剤P20 (BIAcore、カタログ番号BR-1000-54) 及び2mg/mLのBSA (EMD社カタログ番号2930) を含有するPBS (GIBCO社、カタログ番号14040-133) を用い、25℃で行った。

【0330】

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、pH2.2の10mMグリシン-HCl (BIAcore社、カタログ番号BR-1003-54) を60μL/分の流速で3分間注入して再生させた。試験したHGF濃度は0.46nM及び7.5nMであった。

【0331】

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

【0332】

【表 18】

表 18

抗体	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (pM)	SD
2B8	1.4×10^6	1.0×10^{-5}	7.3	-
HE2B8-1	2.2×10^6	1.4×10^{-5}	7.1	5.2
HE2B8-2	1.8×10^6	9.6×10^{-6}	5.2	2.7
HE2B8-3	2.0×10^6	4.1×10^{-6}	2.0	1.1
HE2B8-4	1.7×10^6	1.1×10^{-5}	6.5	1.3
sh2B8-9 (G1m(17,1))	2.0×10^6	1.7×10^{-5}	8.1	5.3
sh2B8-12 (G1m(17,1))	1.9×10^6	2.3×10^{-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ズ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 μ L/分の流速で捕捉した。各抗体が各サイクルで捕捉される約 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 μ 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-1003-54) を 60 μ 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 1.7 の 10 mM グリシン-HCl (BIAcore 社、カタログ番号 BR-1003-54) を 60 μ L/分の流速で 3 分間注入して再生させた。試験した HGF 濃度は 0.46 nM 及び 7.5 nM であった。

【0335】

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

【0336】

【表19】

表 19

抗体	温度 (°C)	$K_1(1/Ms)$	$K_2(1/s)$	$K_D(nM)$
2B8	25	1.6×10^6	2.1×10^{-5}	13.5
2B8	37	2.8×10^6	1.3×10^{-5}	4.5
HE2B8-4	25	2.0×10^6	1.2×10^{-5}	5.6
HE2B8-4	37	3.1×10^6	1.0×10^{-5}	3.3
sh2B8-9 (G1m(17,1))	25	2.0×10^6	1.7×10^{-5}	8.1
sh2B8-9 (G1m(3))	37	2.5×10^6	1.4×10^{-5}	5.8
sh2B8-12 (G1m(17,1))	25	1.9×10^6	2.3×10^{-5}	12.0
sh2B8-12 (G1m(3))	37	2.4×10^6	1.1×10^{-5}	4.8

予想どおり、会合速度定数は温度の上昇と共に増大した。意外なことに、解離定数は温度の対応する上昇と共に増大することはなかった。その結果、全体としての平衡解離定数 (K_D) は、生理的温度 (37°C) 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、ブラック 96 穴 DELFIA アッセイプレート (ブラック社、カタログ番号 A A A N D - 0 0 0 1) 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 Na_2CO_3 及び 34mM $NaHCO_3$ 、pH 9.0) 溶液 $100 \mu L$ により 4°C 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% Tween 20 で 3 回洗浄した後、DELFIA アッセイ緩衝液 (ブラック社、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 (ブラック社、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 DELFIA 洗浄液 (ブラック社、カタログ番号 4010-0010) で 3 回洗浄した後、 $100 \mu L$ /ウェルの DELFIA 強化溶液 (ブラック社、#4001-0010) と共に攪拌しながら室温で 15 分間インキュベートした。上記プレートは、ユウロピウム法を用いるビクター³ V 装置 (パーキンエルマー社) で読み取らせた。IC₅₀ 値はプリズム (Prism) を用いて算出した。

【0338】

得られた IC₅₀ 値を表 20 に示した。

【0339】

【表 2 0】

表 2 0

抗体	IC ₅₀ (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	-

10

この表 2 0 の結果から明らかなように、試験したヒト化抗体は c-M e t への H G F の結合を効率的に中和する。

【 0 3 4 0】

表 1 7 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 2 1 にまとめた。

【 0 3 4 1】

【表 2 1】

表 2 1

20

抗体	IC ₅₀ (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

この表 2 1 の結果から明らかなように、試験したヒト化抗体は全て 4 M B r - 5 細胞の H G F 誘発性増殖を抑制する。

30

(実施例 1 8)

ヒト化 2 B 8 変異体の抗散乱活性

表 1 7 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 2 2 にまとめた。

【 0 3 4 2】

【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 μ 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 ₂ 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 5×10^6 個を、7週齢雌性ICR SCIDマウス (タコニックラボラトリー社 (Taconic Labs)) の肩甲骨間の上背部に皮下注射した。キャリパで腫瘍の長径 (L) 及び短径 (W) (mm) を測定した。腫瘍容積 (vol.) は、容積 (mm^3) $= L \times W^2 / 2$ として計算した。腫瘍が約 200 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 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ヌードマウス (タコニックラボラトリー社) において前述のようにして実施した。各群 (1群10匹) には 0.5 mg/kg の以下の処置剤、即ち、PBS溶媒対照、huIgG対照、HE2B8-4又はsh2B8-9のうちの1種を投与した。処置剤は、最低でも5週間、週2回腹腔内投与した。各投与群は、腫瘍成長の抑制がsh2B8-9で113%、HE2B8-4で115%と同様な腫瘍退縮を示し、最低腫瘍成長遅延日数が30日であった。両投与とも有意な体重減少がなく、忍容性良好であった。

引用による組込み

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

30

【0347】

均等物

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

【図 1】

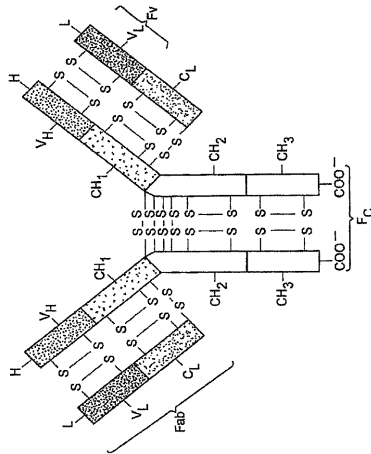


FIG. 1

【図 2】

完全重鎖可変領域アミノ酸配列

抗体	シグナルペプチド	CDRI	CDR2	CDR3
1A3	MTGRLPLPLVLEK	QSSLEKEDNTATYCAKQSTGTGVAND	WRQTPKRLQVAVTTPQSSSTFPAVIG	FTIRNNANNTIL
2B8	QSSLEKEDNTATYCAKQSTGTGVAND	WRQTPKRLQVAVTTPQSSSTFPAVIG	FTIRNNANNTIL	FTIRNNANNTIL
2B8	QSSLEKEDNTATYCAKQSTGTGVAND	WRQTPKRLQVAVTTPQSSSTFPAVIG	FTIRNNANNTIL	FTIRNNANNTIL
3B6	WRQTPKRLQVAVTTPQSSSTFPAVIG	FTIRNNANNTIL	FTIRNNANNTIL	FTIRNNANNTIL
3D11	WRQTPKRLQVAVTTPQSSSTFPAVIG	FTIRNNANNTIL	FTIRNNANNTIL	FTIRNNANNTIL
1D3	WRQTPKRLQVAVTTPQSSSTFPAVIG	FTIRNNANNTIL	FTIRNNANNTIL	FTIRNNANNTIL
1F3	WRQTPKRLQVAVTTPQSSSTFPAVIG	FTIRNNANNTIL	FTIRNNANNTIL	FTIRNNANNTIL
3A12	WRQTPKRLQVAVTTPQSSSTFPAVIG	FTIRNNANNTIL	FTIRNNANNTIL	FTIRNNANNTIL
(1A3 cont.)	QSSLEKEDNTATYCAKQSTGTGVAND	WRQTPKRLQVAVTTPQSSSTFPAVIG	FTIRNNANNTIL	FTIRNNANNTIL
(2B8 cont.)	QSSLEKEDNTATYCAKQSTGTGVAND	WRQTPKRLQVAVTTPQSSSTFPAVIG	FTIRNNANNTIL	FTIRNNANNTIL
(3B6 cont.)	WRQTPKRLQVAVTTPQSSSTFPAVIG	FTIRNNANNTIL	FTIRNNANNTIL	FTIRNNANNTIL
(3D11 cont.)	WRQTPKRLQVAVTTPQSSSTFPAVIG	FTIRNNANNTIL	FTIRNNANNTIL	FTIRNNANNTIL
(1D3 cont.)	WRQTPKRLQVAVTTPQSSSTFPAVIG	FTIRNNANNTIL	FTIRNNANNTIL	FTIRNNANNTIL
(1F3 cont.)	WRQTPKRLQVAVTTPQSSSTFPAVIG	FTIRNNANNTIL	FTIRNNANNTIL	FTIRNNANNTIL
(3A12 cont.)	WRQTPKRLQVAVTTPQSSSTFPAVIG	FTIRNNANNTIL	FTIRNNANNTIL	FTIRNNANNTIL

FIG. 2

【図 3】

重鎖 CDR アミノ酸配列

抗体	CDRI	CDR2	CDR3
1A3	MTGRLPLPLVLEK	QSSLEKEDNTATYCAKQSTGTGVAND	WRQTPKRLQVAVTTPQSSSTFPAVIG
2B8	QSSLEKEDNTATYCAKQSTGTGVAND	WRQTPKRLQVAVTTPQSSSTFPAVIG	FTIRNNANNTIL
2B8	QSSLEKEDNTATYCAKQSTGTGVAND	WRQTPKRLQVAVTTPQSSSTFPAVIG	FTIRNNANNTIL
3B6	WRQTPKRLQVAVTTPQSSSTFPAVIG	FTIRNNANNTIL	FTIRNNANNTIL
3D11	WRQTPKRLQVAVTTPQSSSTFPAVIG	FTIRNNANNTIL	FTIRNNANNTIL
1D3	WRQTPKRLQVAVTTPQSSSTFPAVIG	FTIRNNANNTIL	FTIRNNANNTIL
1F3	WRQTPKRLQVAVTTPQSSSTFPAVIG	FTIRNNANNTIL	FTIRNNANNTIL
3A12	WRQTPKRLQVAVTTPQSSSTFPAVIG	FTIRNNANNTIL	FTIRNNANNTIL

FIG. 3

【図 4】

完全軽 (カッパ) 鎖可変領域アミノ酸配列

抗体	シグナルペプチド	CDRI	CDR2	CDR3
1A3	MTGRLPLPLVLEK	QSSLEKEDNTATYCAKQSTGTGVAND	WRQTPKRLQVAVTTPQSSSTFPAVIG	FTIRNNANNTIL
2B8	QSSLEKEDNTATYCAKQSTGTGVAND	WRQTPKRLQVAVTTPQSSSTFPAVIG	FTIRNNANNTIL	FTIRNNANNTIL
2B8	QSSLEKEDNTATYCAKQSTGTGVAND	WRQTPKRLQVAVTTPQSSSTFPAVIG	FTIRNNANNTIL	FTIRNNANNTIL
3B6	WRQTPKRLQVAVTTPQSSSTFPAVIG	FTIRNNANNTIL	FTIRNNANNTIL	FTIRNNANNTIL
3D11	WRQTPKRLQVAVTTPQSSSTFPAVIG	FTIRNNANNTIL	FTIRNNANNTIL	FTIRNNANNTIL
1D3	WRQTPKRLQVAVTTPQSSSTFPAVIG	FTIRNNANNTIL	FTIRNNANNTIL	FTIRNNANNTIL
1F3	WRQTPKRLQVAVTTPQSSSTFPAVIG	FTIRNNANNTIL	FTIRNNANNTIL	FTIRNNANNTIL
3A12	WRQTPKRLQVAVTTPQSSSTFPAVIG	FTIRNNANNTIL	FTIRNNANNTIL	FTIRNNANNTIL
(1A3 cont.)	QSSLEKEDNTATYCAKQSTGTGVAND	WRQTPKRLQVAVTTPQSSSTFPAVIG	FTIRNNANNTIL	FTIRNNANNTIL
(2B8 cont.)	QSSLEKEDNTATYCAKQSTGTGVAND	WRQTPKRLQVAVTTPQSSSTFPAVIG	FTIRNNANNTIL	FTIRNNANNTIL
(3B6 cont.)	WRQTPKRLQVAVTTPQSSSTFPAVIG	FTIRNNANNTIL	FTIRNNANNTIL	FTIRNNANNTIL
(3D11 cont.)	WRQTPKRLQVAVTTPQSSSTFPAVIG	FTIRNNANNTIL	FTIRNNANNTIL	FTIRNNANNTIL
(1D3 cont.)	WRQTPKRLQVAVTTPQSSSTFPAVIG	FTIRNNANNTIL	FTIRNNANNTIL	FTIRNNANNTIL
(1F3 cont.)	WRQTPKRLQVAVTTPQSSSTFPAVIG	FTIRNNANNTIL	FTIRNNANNTIL	FTIRNNANNTIL
(3A12 cont.)	WRQTPKRLQVAVTTPQSSSTFPAVIG	FTIRNNANNTIL	FTIRNNANNTIL	FTIRNNANNTIL

FIG. 4

【図 5】

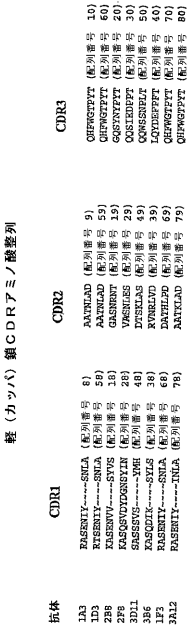


FIG. 5

【図 6】

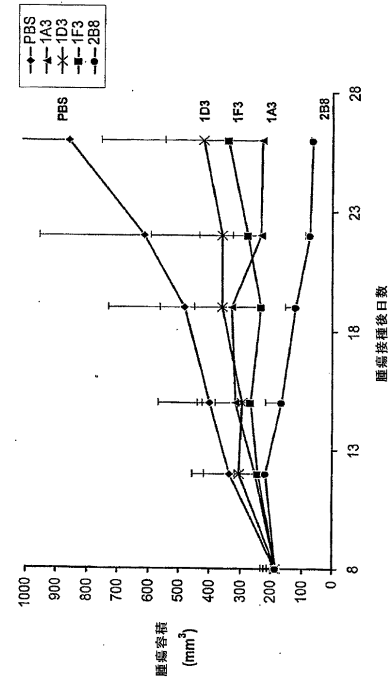


FIG. 6

【図 7】

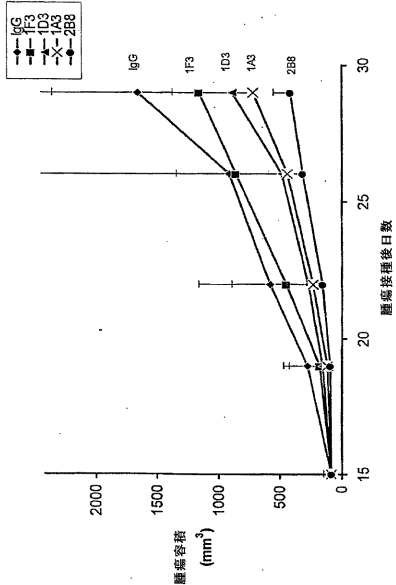


FIG. 7

【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 ⁶		2.7x10 ⁻⁶		11.8	
Hu2B8_Kv1-39.1	キメラ2B8	2.8x10 ⁶		3.9x10 ⁻⁶		13.6	
Hu2B8_Kv3-15.1	キメラ2B8	3.1x10 ⁶		1.7x10 ⁻⁶		5.5	
キメラ2B8	Hu2B8_Hv1-f.1	2.4x10 ⁶		1.8x10 ⁻⁶		662.5	
キメラ2B8	Hu2B8_Hv5-a.1	2.4x10 ⁶		1.1x10 ⁻⁶		4.4	
キメラ2B8	Hu2B8_Hv5-51.1	2.1x10 ⁶		3.4x10 ⁻⁶		16.3	
Hu2B8_Kv1-39.1	Hu2B8_Hv1-f.1	7.1x10 ⁶		2.1x10 ⁻⁶		294.0	
Hu2B8_Kv1-39.1	Hu2B8_Hv5-a.1	2.8x10 ⁶		3.8x10 ⁻⁶		14.7	
Hu2B8_Kv1-39.1	Hu2B8_Hv5-51.1	2.0x10 ⁶		4.2x10 ⁻⁶		8.1	5.3
Hu2B8_Kv3-15.1	Hu2B8_Hv1-f.1	7.8x10 ⁶		3.7x10 ⁻⁶		465.8	
Hu2B8_Kv3-15.1	Hu2B8_Hv5-a.1	2.2x10 ⁶		5.9x10 ⁻⁶		26.9	
Hu2B8_Kv3-15.1	Hu2B8_Hv5-51.1	1.9x10 ⁶		4.7x10 ⁻⁶		12.0	0.4

Fig. 8

【図 9】

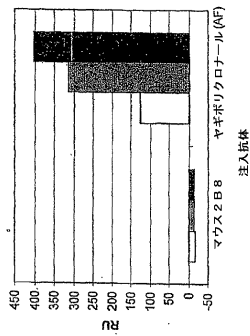


Fig. 9

【配列表】

0005528246000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 0 1
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 P 21/08
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K 39/395 D
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00

(72)発明者 ハン メイ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 4 6, ブルックライン, エグモント ストリート
2 0, アパートメント 5

(72)発明者 エス. カーク ライト
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 5 3, ウォルサム, ハートウェル ストリート
2 4

(72)発明者 ウィリアム エム. ウィンストン ジュニア
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 1 7 5 2, マールバラ, スプーンヒル アベニュー
1 0 0

(72)発明者 リン プレオー
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 3 1, ロスリンデール, デール ストリート 7
1

(72)発明者 リン チェ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 3 2, ウェスト ロックスベリー, ウィローディ
ーアベニュー 7 3

(72)発明者 ビジャン エテマドーギルバートソン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 3 0, ジャマイカ プレイン, センター ストリ
ート 8 0 2

(72)発明者 クリスティン クヌーエル
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 1 7 6 0, ナティック, ハーバード ストリート エ
クステンション 5 8

(72)発明者 ジェノ ギュリス
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 1 8 9 0, ウィンチェスター, スワントン ストリ
ート 1 7 1, ユニット ナンバー 5

審査官 池上 文緒

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

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C 1 2 N 1 5/00-1 5/9 0
C 0 7 K 1 6/2 2
PubMed
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)