

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3957765号  
(P3957765)

(45) 発行日 平成19年8月15日(2007.8.15)

(24) 登録日 平成19年5月18日(2007.5.18)

(51) Int.C1.

F 1

<b>C07K</b>	<b>16/22</b>	<b>(2006.01)</b>	C 07 K	16/22
<b>A61K</b>	<b>39/395</b>	<b>(2006.01)</b>	A 61 K	39/395
<b>A61P</b>	<b>27/02</b>	<b>(2006.01)</b>	A 61 K	39/395
<b>A61P</b>	<b>35/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A 61 K	39/395
<b>C12N</b>	<b>15/09</b>	<b>(2006.01)</b>	A 61 K	39/395

D  
E  
N  
T

請求項の数 32 (全 161 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号

特願平10-542922

(86) (22) 出願日

平成10年4月3日(1998.4.3)

(65) 公表番号

特表2001-509817(P2001-509817A)

(43) 公表日

平成13年7月24日(2001.7.24)

(86) 国際出願番号

PCT/US1998/006604

(87) 国際公開番号

W01998/045331

(87) 国際公開日

平成10年10月15日(1998.10.15)

審査請求日

平成12年8月25日(2000.8.25)

(31) 優先権主張番号

08/833,504

(32) 優先日

平成9年4月7日(1997.4.7)

(33) 優先権主張国

米国(US)

(31) 優先権主張番号

08/908,469

(32) 優先日

平成9年8月6日(1997.8.6)

(33) 優先権主張国

米国(US)

(73) 特許権者

ジェネンテク・インコーポレイテッド  
アメリカ合衆国、カリフォルニア 940  
80 サウス・サンフランシスコ、ディー  
エヌエイ・ウェイ 1

(74) 代理人

弁理士 青山 葉

(74) 代理人

弁理士 田村 恭生

(72) 発明者

バカ、マニュエル  
アメリカ合衆国 94404 カリフォルニア  
州フォスター・シティ、フォスター・シテ  
ィ・ブルバード 888 番、アパートメン  
ト・ナンバー・エイチ 3

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】抗VEGF抗体

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

以下の超可変領域アミノ酸配列： C D R H 1 ( G Y X<sub>1</sub> F T X<sub>2</sub> Y G M N、ここに、X<sub>1</sub>はTまたはDであり、X<sub>2</sub>は、NまたはHである：配列番号 130 )、 C D R H 2 ( W I N T Y T G E P T Y A A D F K R、配列番号 2 ) および C D R H 3 ( Y P X<sub>1</sub> Y Y G X<sub>2</sub> S H W Y F D V、ここに、X<sub>1</sub>はYまたはHであり、X<sub>2</sub>はSまたはTである：配列番号 131 ) を含む重鎖可変ドメイン、並びに以下の超可変領域アミノ酸配列： C D R L 1 ( S A S Q D I S N Y L N、配列番号 4 )、 C D R L 2 ( F T S S L H S、配列番号 5 ) および C D R L 3 ( Q Q Y S T V P W T、配列番号 6 ) を含む軽鎖可変ドメインを有している、約  $1 \times 10^{-8}$  M を超えない K<sub>d</sub> 値でヒト血管内皮細胞増殖因子(VEGF)と結合するヒト化抗VEGF抗体。

## 【請求項2】

約  $5 \times 10^{-9}$  M を超えない K<sub>d</sub> 値でヒト VEGF と結合する、請求項1記載のヒト化抗 VEGF 抗体。

## 【請求項3】

インビトロにおける内皮細胞の VEGF - 誘導増殖を阻害する、請求項1記載の E D<sub>50</sub> 値が 5 nM を超えないヒト化抗 VEGF 抗体。

## 【請求項4】

インビトロでの VEGF - 誘導血管形成を阻害する、請求項1記載のヒト化抗 VEGF 抗体。

10

**【請求項 5】**

A 6 7 3 インビボ腫瘍モデルにおいて、5 mg/kgで少なくとも50%の腫瘍の増殖を阻害する、請求項4のヒト化抗VEGF抗体。

**【請求項 6】**

前記CDRH1が、GYTFTNYGMN(配列番号1)のアミノ酸配列からなる、請求項1～5のいずれかに記載のヒト化抗VEGF抗体。

**【請求項 7】**

前記CDRH3が、YPHYYGS SHWYFDV(配列番号3)のアミノ酸配列からなる、請求項1～5のいずれかに記載のヒト化抗VEGF抗体。

**【請求項 8】**

前記CDRH1が、GYTFTNYGMN(配列番号1)のアミノ酸配列からなり、前記CDRH3が、YPHYYGS SHWYFDV(配列番号3)のアミノ酸配列からなる、請求項1～7のいずれかに記載のヒト化抗VEGF抗体。

**【請求項 9】**

配列番号7のアミノ酸配列を含んでなる重鎖可変ドメインを有する請求項8記載のヒト化抗VEGF抗体。

**【請求項 10】**

配列番号8のアミノ酸配列を含んでなる軽鎖可変ドメインを有する請求項1～9のいずれかに記載のヒト化抗VEGF抗体。

**【請求項 11】**

配列番号7のアミノ酸配列を含んでなる重鎖可変ドメインと配列番号8のアミノ酸配列を含んでなる軽鎖可変ドメインを有する、請求項1～8のいずれかに記載のヒト化抗VEGF抗体。

**【請求項 12】**

CDRH1がGYDFTHYGMN(配列番号128)のアミノ酸配列からなる、請求項1～5のいずれかに記載のヒト化抗VEGF抗体。

**【請求項 13】**

CDRH3がYPYYGTS HWYFDV(配列番号129)のアミノ酸配列からなる、請求項1～5のいずれかに記載のヒト化抗VEGF抗体。

**【請求項 14】**

配列番号127のアミノ酸配列を含んでなる重鎖可変ドメインを有する請求項1～5のいずれかに記載のヒト化抗VEGF抗体。

**【請求項 15】**

配列番号118のアミノ酸配列を含んでなる重鎖可変ドメインを有する請求項1～5のいずれかに記載のヒト化抗VEGF抗体。

**【請求項 16】**

さらに配列番号126のアミノ酸配列を含んでなる軽鎖可変ドメインを有する、請求項12～15のいずれかに記載のヒト化抗VEGF抗体。

**【請求項 17】**

さらに配列番号117のアミノ酸配列を含んでなる軽鎖可変ドメインを有する、請求項12～15のいずれかに記載のヒト化抗VEGF抗体。

**【請求項 18】**

配列番号117のアミノ酸配列を含んでなる軽鎖可変ドメインと配列番号118のアミノ酸配列を含んでなる重鎖可変ドメインを有する、請求項1～5のいずれかに記載のヒト化抗体VEGF抗体。

**【請求項 19】**

完全長の抗体である請求項1～18のいずれかに記載のヒト化抗VEGF抗体。

**【請求項 20】**

ヒトIgGである請求項19のヒト化抗VEGF抗体。

**【請求項 21】**

10

20

30

40

50

抗体フラグメントである請求項 1 ~ 18 のいずれかに記載のヒト化抗 VEGF 抗体。

【請求項 22】

Fab である請求項 21 の抗体フラグメント。

【請求項 23】

請求項 1 ~ 22 のいずれかに記載のヒト化抗 VEGF 抗体またはそのフラグメントと薬学的に許容し得る担体とを含む組成物。

【請求項 24】

請求項 1 の抗体をコードする単離された核酸。

【請求項 25】

請求項 24 の核酸を含有するベクター。 10

【請求項 26】

請求項 25 のベクターを含有する宿主細胞。

【請求項 27】

請求項 26 の宿主細胞を、核酸が発現されるように培養することを含む、ヒト化抗 VEGF 抗体の製造方法。

【請求項 28】

宿主細胞培養からヒト化抗 VEGF 抗体を回収することを更に含む請求項 27 の方法。

【請求項 29】

哺乳動物の VEGF 誘導血管形成の阻害に使用するための、請求項 1 ~ 22 のいずれかに記載のヒト化抗 VEGF 抗体またはそのフラグメントを含有する医薬組成物であって、該医薬組成物が治療上有効な量で該哺乳動物に投与され、該ヒト化抗 VEGF 抗体が約  $1 \times 10^{-8}$  M を超えない  $K_d$  値でヒト VEGF と結合する、医薬組成物。 20

【請求項 30】

哺乳動物がヒトである請求項 29 の医薬組成物。

【請求項 31】

哺乳動物が腫瘍を有する請求項 29 の医薬組成物。

【請求項 32】

哺乳動物がレチナール障害を有する請求項 29 の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

クロスリファレンス

本出願は、同時係属中の米国特許出願第 08 / 833504 号 (1997 年、4 月 7 日出願) の一部継続出願であり (この内容は本明細書の一部を構成する)、これに対し、35 U.S.C. § 120 のもとで優先権を主張するものである。 30

発明の背景

発明の分野

本発明は一般的に抗 VEGF 抗体、特に、ヒト化抗 VEGF 抗体および変異体抗 VEGF 抗体に関する。

関連先行技術の説明

種々の障害の病因に血管 (脈管) 形成が関与することは現在よく確立されている。これには固形癌、増殖性網膜症や加齢性斑紋変性 (age-related macular degeneration, AMD) のような眼内血管形成症候群、リューマチ性関節炎、および乾癬が含まれる (Folkmanら、J. Biol. Chem. 267:10931-10934 (1992), Klagsbrunら、Annu. Rev. Physiol. 53:217-239 (1991)、およびGarner A., Vascular diseases. In Pathobiology of ocular diseases. A dynamic approach. Garner A. Klintworth GK編、第 2 版、Marcel Dekker, NY, 1625-1710 (1994))。固形癌の場合は、血管新生により腫瘍細胞は正常細胞に比べて増殖が有利となり、増殖的自立性を得ることができる。したがって、腫瘍切片における微小血管密度と乳癌およびいくつかの他の腫瘍における患者の生存性との間に相関性が観察されている (Weidnerら、N Engl J Med 324:1-6 (1991), Horakら、Lancet 340: 1120-1124 (1992)、およびMacchiariniら、Lancet 340:145-146 (1992))。

血管形成の正の調節因子 (positive regulator) の探求により、aFGF、bFGF、T 50

G F - 、 T G F - 、 H G F 、 T N F - 、 アンギオゲニン、 I L - 8などを含む多くの候補が得られてきた (FolkmanらおよびKlagsbrunら)。今までに確認された負の調節因子には、トロンボスponジン (Goodら、 Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87:6624-6628 (1990) )、 16キロダルトンの、プロラクチンのN末端断片 (Clappら、 Endocrinology, 133: 1292-1299 (1993) )、 アンギオスタチン (O'Reillyら、 Cell, 79:315-328 (1994) )、 およびエンドスタチン (O'Reillyら、 Cell, 88:277-285 (1996) ) が含まれる。

最近数年間に行われた研究により、正常および異常な血管形成の調節における血管内皮成長因子 (V E G F) の重要な役割が確認された (Ferraraら、 Endocr. Rev. 18:4-25 (1997) )。単一 V E G F アレルが損失するだけで胎児に致死性をもたらすという事実は、この因子が血管系の発生および分化に代用できない役割を演じることを指摘するものである (Ferraraら)。さらに、 V E G F は腫瘍および眼内障害と関連した血管形成における重要なメディエーターであることがわかった (Ferraraら)。 V E G F mRNA は、試験したヒト腫瘍の大多数に過剰発現する (Berkmanら、 J Clin Invest 91:153-159 (1993) , Brownら、 Human Pathol. 26:86-91 (1995) , Brownら、 Cancer Res. 53:4727-4735 (1993) , Matternら、 Brit. J. Cancer. 73:931-934 (1996) 、 およびDvorakら、 Am. J. Pathol. 146:1029-1039 (1995) )。眼液中の V E G F 濃度も、糖尿病および他の虚血性網膜症の患者における血管の活発な増殖の存在との関連性が高い (Aielloら、 N. Engl. J. Med. 331:1480-1487 (1994) )。さらに、最近の研究は、 A M D 患者の脈絡膜の血管形成膜に V E G F が局在することを証明した (Lopezら、 Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 37:855-868 (1996) )。抗 V E G F 中和抗体は、ヌードマウスにおける種々のヒト腫瘍細胞系の増殖を抑制し (Kimら、 Nature 362:841-844 (1993) , Warrenら、 J. Clin. Invest. 95:1789-1979 (1995) , Borgstroemら、 Cancer Res. 56:4032-4039 (1996) 、 およびMelnykら、 Cancer Res. 56:921-924 (1996) )、虚血性網膜障害モデルにおける眼内血管形成も阻害する (Adamisら、 Arch. Ophthalmol. 114:66-71 (1996) )。抗体のヒト化については、 Binding, Methods: Comp. Meth. Enzy., 8:83-93 (1995) に概説されている。したがって、抗 V E G F モノクローナル抗体または他の V E G F 作用のインヒビターは 固形腫瘍および種々の眼内血管形成障害を治療するための有望な候補である。

#### 発明の要約

本出願は、 V E G F との強い結合親和性、 in vitroにおける内皮細胞の V E G F 誘導性増殖の阻害能、 および in vivoにおける V E G F 誘導性血管形成の阻害能を含む治療的に望ましい特徴を有するヒト化抗 V E G F 抗体および抗 V E G F 抗体変異体について記載している。

本明細書において好ましいヒト化抗 V E G F 抗体または種々の変異体抗 V E G F 抗体は、 約  $1 \times 10^{-8}$  M を超えない、 好ましくは約  $5 \times 10^{-9}$  M を超えない K<sub>d</sub> 値でヒト V E G F と結合する。さらに、ヒト化または変異体 V E G F 抗体は、 in vitroで内皮細胞の V E G F 誘導性増殖を阻害するための E D 50 値が約 5 mM を超えない値であってよい。本明細書において目的とする特定のヒト化または変異体抗 V E G F 抗体は、 抗体用量 5 mg / k g で、 A 6 7 3 in vivo腫瘍モデルにおける腫瘍増殖を少なくとも約 50 % 阻害するものである。

ある態様において、抗 V E G F 抗体は、重鎖可変ドメインが以下のアミノ酸配列を有する超可変領域を含む重および軽鎖可変ドメインを有する： C D R H 1 ( G Y X<sub>1</sub> F T X<sub>2</sub> Y G M N (ここで、 X<sub>1</sub> は T または D であり、 X<sub>2</sub> は N または H である) : 配列番号 130 ) 、 C D R H 2 ( W I N T Y T G E P T Y A A D F K R : 配列番号 2 ) 、 および C D R H 3 ( Y P X<sub>1</sub> Y Y G X<sub>2</sub> S H W Y F D V (ここで、 X<sub>1</sub> は Y または H であり、 X<sub>2</sub> は S または T である) : 配列番号 131 ) 。 例えは、重鎖可変ドメインは C D R H 1 ( G Y T F T N Y G M N : 配列番号 1 ) 、 C D R H 2 ( W I N T Y T G E P T Y A A D F K R : 配列番号 2 ) 、 および C D R H 3 ( Y P H Y Y G S S H W Y F D V : 配列番号 3 ) のアミノ酸配列を含んでいてよい。好ましくは、3つの重鎖超可変行域は、ヒトフレームワーク領域中に、 例えは、以下の式： F R 1 - C D R H 1 - F R 2 - C D R H 2 - F R 3 - C D R H 3 - F R 4 で示される隣接配列として提供される。

10

20

30

40

50

さらに、本発明はアミノ酸配列：

**EVQLVESGGGLVQPQGSLRLSCAASGYX<sub>1</sub>FTX<sub>2</sub>,YGMNWVRQAPGKGLEWVGWI  
NTYTGEPTYAADFKRRFTSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPX<sub>3</sub>YYG  
X<sub>4</sub>SHWYFDVWGQGTLTVSS**

(配列番号 127)

(ここで、 $X_1$ はTまたはDであり、 $X_2$ はNまたはHであり、 $X_3$ はYまたはHであり、 $X_4$ はSまたはTである)を含む抗VEGF抗体重鎖可変ドメインを提供する。ある特定の有用な重鎖ドメイン配列は実施例1のF(a b)-12ヒト化抗体のそれであり、配列番号7の重鎖可変ドメイン配列を含む。そのような好ましい重鎖可変ドメイン配列は、下記の好ましい軽鎖可変ドメイン配列、または他の軽鎖可変ドメイン配列と結合してよい(ただし、該抗体はヒトVEGFと結合するように製造される)。

本発明は上記重鎖可変ドメイン配列、または他の重鎖可変ドメイン配列と結合してよい好ましい軽鎖可変ドメイン配列も提供する(ただし、該抗体はヒトVEGFとの結合能を保持するように製造される)。例えば、該軽鎖可変ドメインは以下のアミノ酸配列を有する超可変領域を含んでいてよい：CDRL1(SASQDISNYLN：配列番号4)、CDRL2(FTSSLHS：配列番号5)、およびCDRL3(QQYSTVPWT：配列番号6)。好ましくは、3つの軽鎖超可変領域は、ヒトフレームワーク領域、例えば、以下の式：FR1-CDRL1-FR2-CDRL2-FR3-CDRL3-FR4で示される隣接配列として提供される。

ある態様において、本発明は、下記のアミノ酸配列を含むヒト化抗VEGF抗体軽鎖可変ドメインを提供する：

**DIQX,TQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLHS  
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKR**

(配列番号 126)

(ここで、 $X_1$ はMまたはLである)。ある特定の有用な軽鎖可変ドメイン配列は、実施例1のF(a b)-12ヒト化抗体のそれであり、配列番号8の軽鎖可変ドメイン配列を含む。

本発明は親抗VEGF抗体の変異体も提供し(該親抗体は好ましくはヒト化またはヒト抗VEGF抗体である)(ここで、変異体はヒトVEGFと結合する)、親抗VEGF抗体の重鎖または軽鎖可変ドメインの超可変領域にアミノ酸置換を含む。該変異体は、好ましくは抗VEGF抗体の1またはそれ以上の超可変領域中に1またはそれ以上の置換を有する。好ましくは該置換は親抗体の重鎖可変ドメイン中にある。例えば、該アミノ酸置換は、重鎖可変ドメインのCDRH1および/またはCDRH3中にあってよい。好ましくは、これら両超可変領域に置換が存在する。そのような「親和性が成熟した(matured)」変異体は、本明細書において、それが生じた親抗VEGF抗体より強くヒトVEGFと結合することがわかっている(すなわち、該変異体は親抗VEGF抗体より有意に低い $K_d$ 値を有する)。好ましくは、該変異体は、in vitroにおける内皮細胞のVEGF誘導性増殖を阻害するED50値が、抗VEGF抗体より少なくとも約10倍低く、好ましくは少なくとも約20倍低く、最も好ましくは約50倍低い。ある特に好ましい変異体は、アミノ酸配列：GYDFTHYGMN(配列番号128)を含むCDRH1、およびアミノ酸配列：YPYVYGTSHWYFDV(配列番号129)を含むCDRH3を有する、実施例3のY0317変異体である。これら超可変領域およびCDRH2は一般的にヒトフレームワーク領域中に提供され、例えば、配列番号118のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを生じる。そのような重鎖可変ドメイン配列は所望により、配列番号126のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、好ましくは、配列番号117の軽鎖可変ドメインアミノ酸配列と結合する。

10

20

30

40

50

該抗体の種々の形が本明細書から予期される。例えば、抗 V E G F 抗体は完全長の抗体（例えば、完全ヒト F c 領域を有する）、または抗体断片（例えば、F a b' または F ( a b' )<sub>2</sub>）であってよい。さらに、該抗体は、検出可能な標識で標識するか、固相上に固定化するか、そして / またはヘテロローガスな化合物（細胞毒性物質のような）と結合させてよい。

該抗体の診断的および治療的使用が予期される。ある診断的応用において、本発明は、V E G F タンパク質を含むと思われる試料を抗 V E G F 抗体に曝露し、該抗体の該試料への結合を測定することを含む V E G F タンパク質の存在を測定する方法を提供する。この使用のために、本発明は V E G F タンパク質を検出するための抗体と該抗体を使用するための指示書を含むキットを提供する。

さらに本発明は、該抗体をコードする単離された核酸、所望により、該ベクターで形質転換された宿主細胞によって認識される制御配列と操作可能に結合した該核酸を含むベクター、該ベクターを含む宿主細胞、該核酸が発現するように宿主細胞を培養し、所望により該宿主細胞培養から（例えば、宿主細胞培養地から）該抗体を回収することを含む該抗体の製造方法を提供する。本発明は抗 V E G F 抗体と医薬的に許容される担体または希釈剤を含む組成物も提供する。治療に用いる組成物は無菌であり、凍結乾燥してもよい。さらに、本発明は、腫瘍または網膜障害に罹患した哺乳動物の治療方法であって、該哺乳動物に対し治療的有効量の抗 V E G F 抗体を投与することを含む方法を提供する。

#### 【図面の簡単な説明】

図 1 A および 1 B は、m u M a b V E G F A . 4 . 6 . 1 の可変重ドメイン（配列番号 9）および軽ドメイン（配列番号 10）、ヒト化 F ( a b ) ( F ( a b ) - 1 2 ) の可変重ドメイン（配列番号 7）および軽ドメイン（配列番号 8）、およびヒトコンセンサスフレームワーク（重サブグループ III の h u m I I I （配列番号 11、軽サブグループ 1 の h u m 1 （配列番号 12））を示す。図 1 A は可変重ドメイン配列を一列に並べ、図 1 B は可変軽鎖ドメイン配列を一列に並べている。アスタリスクはヒト化 F ( a b ) - 1 2 とネズミ M a b 、または F ( a b ) - 1 2 とヒトフレームワークの相違を示す。相補性決定領域 C D R ）には下線を付している。

図 2 は、ヒト化 F ( a b ) - 1 2 V L および V H ドメインのモデルの帯状ダイアグラムを示す。V L ドメインは茶色で示し、C D R は黄褐色で示す。残基 L 4 6 の側鎖は黄色で示す。V H ドメインは紫色で、C D R は桃色で示す。ヒトからネズミに変化した V H 残基の側鎖は黄色で示す。

図 3 は、実施例 1 から得られるヒト化抗 V E G F F ( a b ) - 1 2 による V E G F 誘導性有糸分裂誘発の阻害を示す。ウシ副腎皮質由来毛細内皮細胞を、実施例 1 に記載のごとく 6 ウェルプレートに  $6 \times 10^3$  個 / ウェルの密度で摂取した。m u M A b V E G F A . 4 . 6 . 1 または r h u M A b V E G F ( I g G 1 ; F ( a b ) - 1 2 ) のいずれかを、示した濃度に加える。2 ~ 3 時間後、r h V E G F 1 6 5 を最終濃度 3 n g / m L に加える。5 または 6 日後、細胞をトリプシン処理し、算定する。示した値はデュプリケートで測定した平均である。平均からの変動は 10 % 以下である。

図 4 は、実施例 1 から得られるヒト化抗 V E G F F ( a b ) - 1 2 による in vivo における腫瘍増殖の阻害を示す。A 6 7 3 横紋筋肉腫細胞をマウス 1 匹につき  $2 \times 10^6$  個の密度で B A L B / c ヌードマウスに注射した。腫瘍細胞を摂取して 2 4 時間後から、動物の腹腔内に、1 週間に 2 回、コントロール M A b 、m u M A b V E G F A 4 . 6 . 1 、または r h u V E G F M A b ( I g G 1 ; F ( a b ) - 1 2 ) の注射を開始した。コントロール M a b の用量は 5 m g / k g であり、抗 V E G F M A b は示したごとく 0 . 5 または 5 m g / k g 投与した ( n = 1 0 ) 。腫瘍細胞を注射して 4 週後に、動物を安楽死させ、腫瘍を取り出し、計量した。\* A N O V A によるコントロール群と比較したときの有意差 ( P < 0 . 0 5 ) 。

図 5 A および 5 B は、それぞれ、実施例 2 から得られるネズミ抗体 A 4 . 6 . 1 ( V L は配列番号 1 0 、V H は配列番号 9 ) 、ヒト化 A 4 . 6 . 1 变異体 h u 2 . 0 ( V L は配列番号 1 3 、V H は配列番号 1 4 ) 、および h u 2 . 1 0 ( V L は配列番号 1 5 、V H は配

10

20

30

40

50

列番号 16) の軽および重可変ドメインのアミノ酸配列を示す。配列番号付けは、Kabat ら、Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版、Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD(1991)に従い、ミスマッチはアスタリスク(ネズミ A 4 . 6 . 1 対 h u 2 . 0 )またはピュレット(h u 2 . 0 対 h u 2 . 1 0 )で示す。変異体 h u 2 . 0 は、ヒト軽鎖サブグループ I コンセンサスフレームワーク(配列番号 12)および重鎖サブグループ III コンセンサスフレームワーク(配列番号 11)上に組み込んだネズミ抗体由来の CDR 配列(太字)のみを含む。h u 2 . 1 0 は、本明細書に記載のファージソーティング試験から得られたコンセンサスヒト化クローニングであった。

図 6 は、実施例 2 における無作為化の標的となるフレームワーク残基を示す。 10

図 7 は、ファージ上の Fab - p III 融合物の表面を表現するファージミッド構築物を示す。ファージミッドは M13 遺伝子 III コートタンパク質の部分と融合した抗体 A 4 . 6 . 1 の Fab 断片のヒト化バージョンをコードする。融合タンパク質は重鎖のカルボキシ末端で 1 グルタミン残基、次いで遺伝子 III タンパク質の C 末端領域(残基 249 - 406)と連結した Fab(sup E . col i) のアンバーコドンのサプレッションから)からなる。F<sup>+</sup> E . col iへの形質転換、次いで M13KO7 ヘルパー ファージによる重感染は、これらの少ない割合が融合タンパク質の 1 コピーを表現するファージミッド粒子を生じる。

図 8 A - E は、実施例 3 のファージ - 表現抗体ベクター pHMB4 - 19 - 1 . 6 のヌクレオチド配列(配列番号 99)、およびそれによりコードされるアミノ酸配列(配列番号 100 ~ 102)を示す。 20

図 9 A および 9 B は、それぞれ、実施例 1 の F(ab) - 12 と比較した、実施例 3 の親和性が成熟した抗 VEG 变異体の軽および重可変ドメインのアミノ酸配列の配置を示す(軽および重可変ドメイン、それぞれ配列番号 8 および 7)。CDR には下線を付しており、L、軽鎖、または H、重鎖および番号 1 - 3 で示す。残基には、Kabat 番号付け法とは反対に VL および VH ドメインに連続番号をつける。錫型分子、MB1 . 6(軽および重可変ドメイン、それぞれ配列番号 103 および 104)は变異体: H2305 . 6(軽および重可変ドメイン、それぞれ配列番号 105 および 106)、Y0101(軽および重可変ドメイン、それぞれ配列番号 107 および 108)、および Y0192(軽および重可変ドメイン、それぞれ配列番号 109 および 110)と共に示される。F(ab) - 12 との相違は影付ボックスで示す。 30

図 10 A および 10 B は、それぞれ、実施例 1 の F(ab) - 12 と比較した、実施例 3 から得られる親和性が成熟した抗 VEGF 变異体の軽および重可変ドメインのアミノ酸配列の配置を示す(軽および重可変ドメイン、それぞれ配列番号 8 および 7)。CDR には下線を付しており、L、軽鎖、または H、重鎖および番号 1 - 3 で示す。变異体は、Y0243 - 1(軽および重可変ドメイン、それぞれ配列番号 111 および 112)、Y0238 - 3(軽および重可変ドメイン、それぞれ配列番号 113 および 114)、Y0313 - 1(軽および重可変ドメイン、それぞれ配列番号 115 および 116)、および Y0317(軽および重可変ドメイン、それぞれ配列番号 117 および 118)で示される。F(ab) - 12 との相違は影付ボックスで示す。 40

図 11 は、実施例 1 から得られる完全長 F(ab) - 12、および变異体 Y0238 - 3、Y0192、および Y0313 - 1 に対する実施例 3 の HuVEC 活性アッセイの結果を示す。

図 12 は、実施例 1 からの完全長 F(ab) - 12(rhuMAb VEGF)、実施例 1 からの F(ab) - 12 の Fab 断片(rhuFab VEGF)、および実施例 3 からの親和性が成熟した Y0317 の Fab 断片(rhuFab VEGF(親和性成熟))による VEGF 誘導性有糸分裂誘発の阻害を示す。

#### 好みしい態様の詳細な説明

##### I . 定義

本明細書で用いている用語「ヒト VEGF」は、165 アミノ酸のヒト血管内皮細胞成長

因子、および関連 121-、189-、および 206- アミノ酸血管内皮細胞成長因子 (Leungら、*Science* 246:1306(1989)、および Houckら、*Mol. Endocrin.* 5:1806(1991) に記載)、およびこれら成長因子の天然のアレル形およびプロセス形を表す。

本発明は、1またはそれ以上の VEGF の生物活性、例えば、有糸分裂誘発または血管形成活性を阻害することができる抗 VEGF アンタゴニスト抗体を提供する。VEGF のアンタゴニストは、VEGF の細胞レセプターへの結合に干渉するか、VEGF により活性化された細胞を無能力にするかもしくは殺すか、または VEGF が細胞レセプターに結合した後の血管内皮細胞の活性化に干渉することにより作用する。VEGF アンタゴニストによる介入のそのようなすべての点は本発明の目的と等価であると考えられよう。

本明細書で用いている用語「VEGF レセプター」または「VEGFr」は、通常血管内皮細胞にみいだされる細胞表面レセプターである VEGF の細胞レセプター、および hVEGF との結合能を保持しているその変異体を表す。VEGF レセプターの 1 例は、チロシンキナーゼファミリーの貫膜レセプターである fms 様チロシンキナーゼ (f1t) である。DeVriesら、*Science* 255:989(1992), Shibuyaら、*Oncogene* 5:519(1990)。f1t レセプターは、チロシンキナーゼ活性を有する細胞外ドメイン、貫膜ドメイン、および細胞内ドメインを含む。細胞外ドメインは VEGF の結合に関与するが、細胞内ドメインはシグナル変換に関与する。VEGF レセプターの別の例は、f1k-1 レセプター (KDR とも呼ぶ) である。Matthewsら、*Proc. Nat. Acad. Sci.* 88:9026(1991), Termanら、*Oncogene* 6:1677(1991), Termanら、*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 187:1579(1992)。VEGF の f1t レセプターへの結合は、見かけの分子量が 205000 および 300000 ダルトンの少なくとも 2 つの高分子量コンプレックスの形成をもたらす。300000 ダルトンのコンプレックスは VEGF の 1 分子と結合したレセプター 2 分子を含む二量体であると考えられる。

本明細書で用いている用語「エピトープ A4.6.1」は、特記しない限り、Kimら、*Growth Factors* 7:53(1992) および Kimら、*Nature* 362:841(1993) に開示の A4.6.1 抗体と結合するヒト VEGF の領域を表す。

「治療（処置）」は、治療的処置および予防的もしくは抑制的方法の両方を表す。治療を要するもの（対象）には、すでに障害を有するものおよび障害を予防すべきものが含まれる。

治療を目的とする「哺乳動物」は、ヒト、およびイヌ、ウマ、ネコ、乳牛などのような家畜 (domestic and farm animals)、および動物園の、競技用、もしくはペット動物を含む哺乳動物として分類されるあらゆる動物を表す。

「抗体」 (Ab) および「免疫グロブリン」 (Ig) は同じ構造特性を有する糖タンパク質である。抗体は特異抗原との結合特異性を有するが、免疫グロブリンは抗体と抗原特異性を欠く他の抗体様分子の両方を含む。後者のポリペプチドは、例えば、リンパ系により低レベルで、またミエローマにより高レベルで產生される。

「天然抗体」および「天然免疫グロブリン」は、通常、2つの同じ軽 (L)鎖と2つの同じ重 (H)鎖からなる、約 150000 ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質である。各軽鎖は、1共有ジスルフィド結合により重鎖と結合しているが、ジスルフィド結合の数は異なる免疫グロブリンアイソタイプの重鎖間で異なる。各重および軽鎖は一定の間隔で鎖内ジスルフィド架橋も有する。各重鎖は 1 末端に可変ドメイン ( $V_H$ )、次いで多くの定常ドメインを有する。各軽鎖は 1 末端に可変ドメイン ( $V_L$ ) と他の末端に定常ドメインを有し、軽鎖の定常ドメインは重鎖の第一定常ドメインと一列に並んでおり、軽鎖可変ドメインは重鎖の可変ドメインと一列に並んでいる。特定のアミノ酸残基は、軽および重鎖可変ドメイン間にインターフェースを形成すると考えられている。

用語「可変(の)」は、可変ドメインのある部分の配列が抗体間で広範囲に異なる事実を表し、各特定抗体のその特定抗原に対する結合および特性において用いられる。しかしながら、可変性は抗体の可変ドメイン全体に均一に分布するわけではない。可変性は、軽鎖および重鎖可変ドメイン両方の超可変領域と呼ばれる 3 部分に集中している。可変ドメインのより高度に保存された部分はフレームワーク領域 (FR) と呼ばれる。天然の重および

10

20

30

40

50

軽鎖の可変ドメインはそれぞれ、大部分が - シート配置をとり、3つの超可変領域によって結合し、 - シート構造を繋ぎ、ある場合にはその一部を形成するループを形成する4つのFR（それぞれ、FR1、FR2、FR3、およびFR4）を含む。各鎖中の超可変領域はFRによって密接に隣接して結合し、他の鎖の超可変領域とともに抗体の抗原結合部位の形成に関与する（Kabatら、*Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版、Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD(1991), 647-669頁参照）。定常ドメインは抗体と抗原との結合に直接関与しないが、抗体依存性細胞毒性における抗体の関与といった種々のエフェクター機能を有する。

本明細書において用語「超可変領域」は、抗原との結合をもたらす抗体のアミノ酸残基を表す。超可変領域は「相補性決定領域」または「CDR」からのアミノ酸残基を含む（すなわち、軽鎖可変ドメインの残基24-34(L1)、50-56(L2)、および89-97(L3)、および重鎖可変ドメインの31-35(H1)、50-65(H2)、および95-102(H3)；Kabatら、*Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版、Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD(1991)）、および/または「超可変ループ」からのアミノ酸残基（すなわち、軽鎖可変ドメインの残基26-32(L1)、50-52(L2)、および91-96(L3)、および重鎖可変ドメインの26-32(H1)、53-55(H2)、および96-101(H3)；ChothiaおよびLesk J.Mol.Biol.196:901-917(1987)）を含む。「フレームワーク」または「FR」残基は、本明細書で定義した超可変領域残基以外の可変ドメイン残基である。

抗体のパパイン消化により「Fab」断片と呼ばれる、それぞれが1個の抗原結合部位を持った2つの同じ抗原結合断片と、容易に結晶することから名付けられた、残る「Fc」断片が生じる。ペプシン処理すると、2つの抗原結合部位を持ち、まだ抗原を架橋することができる $F(ab')_2$ 断片が生じる。

「Fv」は完全な抗原認識と抗原結合部位を含む最小抗体断片である。この領域は、1重鎖および1軽鎖可変ドメインが強く非共有結合した二量体からなる。この配置において、各可変ドメインの3つの超可変領域は $V_H$ - $V_L$ 二量体表面の抗原結合部位を限定するよう相互作用する。6つの超可変領域がまとまって抗体に抗原結合特異性をもたらす。しかしながら、1つの可変ドメイン（すなわち、抗原特異的な3つの超可変領域のみを含むFvの半分）でも、完全な結合部位より親和性は低いものの抗原を認識し、結合する能力を持っている。

Fab断片も軽鎖の定常ドメインと重鎖の第一定常ドメイン（CH1）を含む。Fab'断片は、抗体のヒンジ領域からの1またはそれ以上のシステインを含む重鎖CH1ドメインのカルボキシル末端に数個の残基が加わっていることがFab断片とは異なる。本明細書において、Fab'-SHは、定常ドメインのシステイン残基が遊離チオール基を保持するFab'を意味する。 $F(ab')_2$ 抗体断片は、間にヒンジシステインを有するFab'断片のペアとして本来生じる。抗体断片の他の化学カップリングも知られている。あらゆる脊椎動物種由来の抗体（免疫グロブリン）の「軽鎖」も、定常ドメインのアミノ酸配列に基づいてカッパ（ $\kappa$ ）およびラムダ（ $\lambda$ ）と呼ばれる明らかに異なる2タイプの1つに分類することができる。

重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に応じて、免疫グロブリンは異なるクラスに分類することができる。免疫グロブリンにはIgA、IgD、IgE、IgG、およびIgMの5つの主なクラスがあり、これらのいくつかはさらにサブクラス（アイソタイプ）、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、およびIgA2に分けることができよう。異なるクラスの免疫グロブリンに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれ、 $\kappa$ 、 $\lambda$ 、 $\gamma$ 、 $\alpha$ 、 $\mu$ と呼ばれる。異なるクラスの免疫グロブリンのサブユニット構造および三次元配置はよく知られている。

本明細書において用語「抗体」は、最も広い意味で用いられ、特に、モノクローナル抗体（完全長モノクローナル抗体を含む）、ポリクローナル抗体、多特異性抗体（例えば、二特異性抗体）、および所望の生物活性を有する抗体断片を含む。

10

20

30

40

50

「抗体断片」は、完全長抗体の部分、一般的にその抗原結合もしくは可変ドメインを含む。抗体断片の例には、F<sub>a b</sub>、F<sub>a b'</sub>、F(a b')<sub>2</sub>、およびF<sub>v</sub>断片、ディアボディ(diabody)、線状抗体、一本鎖抗体分子、および抗体断片から形成された多特異性抗体を含む。

本明細書において用語「モノクローナル抗体」は、実質的にホモローガスな抗体、すなわち、ポピュレーションを構成する個々の抗体が少量存在するかも知れない天然に生じ得る突然変異を除いて同一なポピュレーションから得られる抗体を表す。モノクローナル抗体は特異性が高く、单一抗原部位に対して誘導される。さらに、典型的には、異なる決定基(エピトープ)に対して誘導された異なる抗体を含む通常の(ポリクローナル)抗体調製物とは異なり、各モノクローナル抗体は抗原の単一決定基に対して誘導される。用語「モノクローナル」は、実質的にホモローガスな抗体のポピュレーションから得られる抗体の特性を表し、該抗体を何らかの特定の方法により製造する必要があるものと解釈してはならない。例えば、本発明にしたがって用いるモノクローナル抗体は、Kohlerら、Nature 256:495(1975)が最初に記載したハイブリドーマ法により製造するか、組換えDNA法(例えば、米国特許第4816567号参照)により製造することができよう。「モノクローナル抗体」は、例えば、Clacksonら、Nature 352:624-628(1991)およびMarksら、J.Mol.Biol.222:581-597(1991)に記載の技術を用いてファージ抗体ライブラリーから単離することもできよう。

本明細書においてモノクローナル抗体は、特に、重および/または軽鎖の部分が特定の種由来の抗体の対応する配列と同じかもしくはホモローガスであるか、または特定の抗体のクラスもしくはサブクラスに属するが、残りの鎖が別の種由来の抗体の対応する配列と同じかもしくはホモローガスであるかまたは別の抗体のクラスもしくはサブクラスに属する「キメラ」抗体、および所望の生物活性を有する、そのような抗体の断片(米国特許第4816567号、およびMorrisonら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81:6851-6855(1984)を含む。

非ヒト(例えばネズミ)抗体の「ヒト化」形は、非ヒト免疫グロブリン由来の配列を最小限に含むキメラ抗体である。主としてヒト化抗体は、レシピエントの超可変領域残基が所望の特異性、親和性、および能力を有する、マウス、ラット、ウサギ、またはヒト以外の靈長類といったヒト以外の種(ドナー抗体)由来の超可変領域残基により置換されているヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)である。場合によっては、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域(FR)残基が対応する非ヒト残基で置換される。さらに、ヒト化抗体はレシピエント抗体やドナー抗体中にみられない残基を含んでいてよい。これらの修飾は抗体の能力をさらに洗練させるためになされる。一般的に、ヒト化抗体は、超可変領域のすべてもしくは実質的にすべてが非ヒト免疫グロブリンのそれに対応しており、FRのすべてもしくは実質的にすべてがヒト免疫グロブリン配列のそれである、少なくとも一つ、典型的には2つの可変ドメインを実質的にすべて含むであろう。所望により、ヒト化抗体は免疫グロブリン定常領域(Fc)の部分、典型的にはヒト免疫グロブリンの部分も含むであろう。さらなる詳細は、Jonesら、Nature 321:522-525(1986),Reichmannら、Nature 332:323-329(1988)、およびPresta, Curr.Op.Struct.Biol.2:593-596(1992)参照。

「一本鎖F<sub>v</sub>」または「sF<sub>v</sub>」抗体断片は、一本のポリペプチド鎖中に存在する、抗体のV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>ドメインを含む。一般的に、F<sub>v</sub>ポリペプチドはさらにV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>ドメイン間にポリペプチドリンカーを含み、これによりsF<sub>v</sub>は抗原と結合するための所望の構造を形成することができる。sF<sub>v</sub>の総説については、Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol.113, RosenbergおよびMoore編、Springer-Verlag, New York, 269-315(1994)参照。

用語「ディアボディ」は、同じポリペプチド鎖(HV-VL)において軽鎖可変ドメイン(VL)と結合した重鎖可変ドメイン(VH)を含む、2つの抗原結合部位を有する小抗体断片を表す。同じ鎖上の2つのドメインをペアリングさせるには短すぎるリンカーを用いることにより、該ドメインを別の鎖と相補的なドメインと強制的にペアリングさせ、2つの抗原結合部位を生じさせる。ディアボディについては、例えば、EP404097、W093/11161、およびHollingerら、Proc.Natl. Acad.Sci.USA 90:6444-6448(1993)により完全に記

10

20

30

40

50

載されている。

本明細書において用語「線状抗体」は、Zapataら、Protein Eng.8(10): 1057-1062(1995)に記載の抗体を表す。簡単には、該抗体は抗原結合領域のペアを形成するタンデム F d 部分 (V<sub>H</sub> - C<sub>H</sub>1 - V<sub>H</sub> - C<sub>H</sub>1) のペアを含む。

本明細書において「変異体」抗 V E G F 抗体は、親抗体配列中の 1 またはそれ以上の残基の付加、欠失、および / または置換により、「親」抗 V E G F 抗体アミノ酸配列とはアミノ酸配列が異なる分子を表す。好ましい態様において、該変異体は親抗体の 1 またはそれ以上の超可変領域に 1 またはそれ以上のアミノ酸置換を含む。例えば、該変異体は親抗体の 1 またはそれ以上の超可変領域に少なくとも 1 個、例えば、約 1 ~ 約 10、好ましくは約 2 ~ 約 5 個の置換を含んでいてよい。通常、該変異体は親抗体重または軽鎖可変ドメイン配列 (例えば、配列番号 7 または 8 中の) と少なくとも 75%、より好ましくは少なくとも 80%、より好ましくは少なくとも 85%、より好ましくは少なくとも 90%、最も好ましくは少なくとも 95% のアミノ酸配列の同一性を有するアミノ酸配列を有するであろう。本明細書において、この配列の同一性または相同性は、必要であれば配列同一性パーセントが最大となるように配列を一列に並べ、ギャップを挿入した後の、親抗体残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセントで定義する。抗体配列への N 末端、C 末端、または内部伸長、欠失、もしくは挿入はいずれも配列の同一性または相同性に影響しないと解釈すべきである。該変異体はヒト V E G F との結合能を保持し、好ましくは親抗体より優れた特性を有する。例えば、該変異体は、より強い結合親和性を有し、内皮細胞の V E G F 誘導性増殖の阻害能が増大し、そして / または *in vivo* における V E G F 誘導性血管形成の阻害能が増大していくよい。そのような特徴を分析するには、例えば、抗 V E G F 抗体の構成は本明細書に開示した生物活性アッセイにおけるその活性に影響することがわかっているので、変異体の F a b 形を親抗体の F a b 形と比較するか、または変異体の完全長形と親抗体の完全長形を比較すべきである。本明細書において特に目的とする変異体抗体は、親抗体と比べて少なくとも約 10 倍、好ましくは少なくとも約 20 倍、最も好ましくは少なくとも約 50 倍生物活性が増大している変異抗体である。

本明細書において「親」抗体は、該変異体を製造するのに用いるアミノ酸配列によってコードされる。好ましくは、該親抗体はヒトフレームワーク領域と、もしあれば、ヒト抗体定常領域を有する。例えば、親抗体はヒト化またはヒト抗体であってよい。

「単離された」抗体は、天然環境の成分から同定され、分離および / または回収されたものである。天然環境の夾雑成分は、抗体の診断的または治療的使用と干渉する物質であり、これには酵素、ホルモン、および多のタンパク質または非タンパク質性溶質が含まれよう。好ましい態様において、該抗体は、(1) Lowry 法で測定して抗体の 95 重量 % 以上まで、好ましくは、99 重量 % 以上まで、(2) スピニングカップシーケネーターを用いて N 末端または内部アミノ酸配列の少なくとも 15 残基を得るのに十分な程度に、または(3) クマシープルーまたは好ましくは銀染色を用い、還元もしくは非還元条件下で SDS-PAGE により均質となるまで精製されるであろう。単離された抗体は、該抗体の天然環境の少なくとも 1 要素は存在しないであろうから、組換え細胞中のその場の抗体を含む。しかしながら、通常、単離された抗血合は少なくとも 1 つの精製工程により製造されよう。

本明細書において用語「タグ付エピトープ」は「エピトープタグ」と融合した抗 V E G F 抗体を表す。エピトープタグポリペプチドは、それに対する抗体を作ることができるエピトープを提供するのに十分な残基を有するが、V E G F 抗体の活性と干渉しないように十分短い。該エピトープタグは、好ましくは、それに対する抗体が他のエピトープと実質的に交差反応しないほど十分にユニークである。一般的に、適切なタグポリペプチドは少なくとも 6 アミノ酸残基、通常約 8 ~ 50 アミノ酸残基 (好ましくは約 9 ~ 30 残基) を有する。例には f 1 u H A タグポリペプチドおよびその抗体 1 2 C A 5 (Fieldら、Mol. Cell. Biol. 8:2159-2165(1988))、c - m y c タグ、およびそれに対する 8 F 9、3 C 7、6 E 1 0、G 4、B 7、および 9 E 1 0 抗体 (Evanら、Mol. Cell. Biol. 5(12):3610-3616(1985)、および Herpes Simplexウイルス糖タンパク質 D (g D) タグ、およびその抗体 (P

10

20

30

40

50

aborskyら、Protein Engineering 3(6):547-553(1990)が含まれる。ある態様において、エピトープタグは「サルベージレセプター結合エピトープ」である。本明細書において、用語「サルベージレセプター結合エピトープ」は、IgG分子のin vivoにおける血清半減期の増大をもたらすIgG分子（例えば、IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>、またはIgG<sub>4</sub>）のFc領域のエピトープを表す。

本明細書において、用語「細胞毒性物質」は、細胞の機能を阻害するか、抑制し、そして/または細胞を破壊する物質を表す。該用語は、放射性同位元素（例えば、I<sup>131</sup>、I<sup>125</sup>、Y<sup>90</sup>、およびRe<sup>186</sup>）、化学療法剤、および細菌、真菌、植物もしくは植物起源の酵素活性を有する毒素のような毒素、またはその断片を含むことを意図している。

「化学療法剤」は癌の治療に有用な化合物である。化学療法剤の例には、アドリアマイシン、ドキソルビシン、5-フルオロウラシル、シトシンアラビノシド（「Ara-C」）、シクロホスファミド、チオテパ、タキソテレ（Taxotere、ドセタキセル）、ブスルファン、サイトキシン、タキソール、メトトレキセート、シスプラチン、メルファラン、ビンプラスチン、ブレオマシン、エトポシド、イフオスファミド、マイトマイシンC、マイトキサントロン、ビンクレイスチン、ビノレルビン、カルボプラチン、テニポシド、ダウノマイシン、カルミノマイシン、アミノブテリン、ダクチノマイシン、マイトマイシン、エスペラマイシン（米国特許第4675187号参照）、メルファラン、および他の関連ナイトロジエンマスターが含まれる。

本明細書において用語「プロドラッグ」は、親薬剤に比べて腫瘍細胞に対する毒性が低い医薬的に活性な物質の前駆体または誘導体を表し、酵素的に活性化または変換されてより活性な親形になることができる。例えば、Wilman、「Prodrugs in Cancer Chemotherapy」Biochemical Society Transactions, 14, 375-382頁、第615回会議、Belfast(1986)、およびStellaら、「Prodrugs; A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery」, Directed Drug Delivery, Borchardtら編、247-267頁, Humana Press(1985)参照。本発明のプロドラッグには、限定されるモノではないが、ホスフェート含有プロドラッグ、チオホスフェート含有プロドラッグ、サルフェート含有プロドラッグ、ペプチド含有プロドラッグ、D-アミノ酸修飾プロドラッグ、グリコシリ化プロドラッグ、-ラクタム含有プロドラッグ、所望により置換されたフェノキシアセトアミド含有プロドラッグ、または所望により置換されたフェニルアセトアミド含有プロドラッグ、5-フルオロシトシン、およびより活性な無毒性薬剤に変換することができる他の5-フルオロウリジンプロドラッグを含む。本発明に用いるプロドラッグ形に誘導体化することができる細胞毒性薬剤の例には、限定されるものではないが、上記化学療法剤が含まれる。

本明細書において用語「標識」は抗体と直接または間接的に結合する検出可能な化合物または組成物を表す。標識は、それ自身が検出可能であるか（例えば、放射性同位元素標識、または蛍光標識）、または酵素標識の場合には検出可能な基質化合物または組成物の化学変化を触媒することができよう。

「固相」は、本発明の抗体を吸着することができる非水性マトリックスを意味する。本明細書に含まれる固相の例には、部分的または完全にガラス（例えば孔制御ガラス）、ポリサッカライド（例えばアガロース）、ポリアクリルアミド、ポリスチレン、ポリビニルアルコールおよびシリコンで形成されたものがある。ある態様では文脈に応じて、固相はアッセイプレートのウェルを、他では精製用カラム（例えばアフィニティクロマトグラフィカラム）を含むことができる。この用語には、米国特許第4275149号に記載のような分離した粒子の不連続な固相も含まれる。

「リポソーム」は、種々のタイプの脂質、リン脂質、および/または薬剤（本明細書に開示の抗VEGF抗体、および所望により化学療法剤のような）を哺乳動物に供給するのに有用な界面活性剤からなる小胞である。リポソームの成分は、通常、生物膜の脂質配置と同様に二重層を形成するよう配列する。「単離された」核酸分子は、同定され、抗体核酸の天然の供給源と通常結合している少なくとも1つの夾雑核酸分子から分離された核酸分子である。単離された核酸分子は天然にみいだされる形または配列(setting)以外のものである。したがって、単離された核酸分子は天然細胞に存在する核酸分子とは区別され

る。しかしながら、単離された核酸分子は、例えば天然の細胞とは異なる染色体位置にある、抗体を通常発現する細胞に含まれる核酸分子を含む。

用語「制御配列」は、特定の宿主生物中で操作可能に連結されたコード配列を発現するのに必要なDNA配列を表す。例えば、原核生物に適した制御配列にはプロモーター、所望によりオペレーター配列、およびリボソーム結合部位が含まれる。真核細胞はプロモーター、ポリアデニル化シグナル、およびエンハンサーを利用することが知られている。

核酸は、別の核酸配列と機能的関係に置かれているとき「操作可能に連結している」という。例えば、プレ配列のDNAまたは分泌リーダーは、それがポリペプチドの分泌に関するプレタンパク質として発現する場合、ポリペプチドのDNAと操作可能に連結しているか、プロモーターまたはエンハンサーは、それらが配列の転写に影響を及ぼす場合にコード配列と操作可能に連結しているか、またはリボソーム結合部位は、それが翻訳を促すように位置している場合にコード配列と操作可能に連結している。一般的に、「操作可能に連結している」とは、連結しているDNA配列が隣接しており、分泌リーダーの場合には隣接し、読み取り段階にあることを意味する。しかしながら、エンハンサーは隣接していてはならない。連結は好都合な制限部位で結合することにより達成される。そのような部位が存在しない場合は、合成オリゴヌクレオチドアダプターまたはリンカーを通常の方法に従って用いる。

本明細書において、用語「細胞」、「細胞系」、および「細胞培養」は置き換え可能に用いられ、すべてのそのような名称には子孫が含まれる。このように、用語「形質転換体」および「形質転換細胞」には、一次対象細胞とトランスファー数に関わらずそれらから誘導された培養を含む。すべての子孫は、意図的または偶然の突然変異によりDNA含量が正確に同じではないことがあることも理解される。最初の形質転換細胞についてスクリーニングされたのと同じ機能または生物活性を有する突然変異子孫も含まれる。異なる意味を意図する場合は文脈から明らかであろう。

### II. 本発明の実施方法

下記の実施例において、(a) VEGF抗原に対する強い結合親和性、(b) *in vitro*における内皮細胞のVEGF誘導性増殖を阻害する能力、および(c) *in vivo*におけるVEGF誘導性血管形成の阻害能を含む治療的観点から望ましい特性を有するヒト化および変異体抗VEGF抗体の製造方法を説明する。

抗体の親和性は、下記実施例に記載のごとく測定することができよう。好ましいヒト化または変異体抗体は、約 $1 \times 10^{-7}$  Mを超えない、好ましくは約 $1 \times 10^{-8}$  Mを超えない、最も好ましくは約 $5 \times 10^{-9}$  Mを超えないKd値でヒトVEGFと結合する抗体である。ヒトVEGFに対する強い結合親和性を有する抗体のほかに、治療的観点から他の有益な特性を有するヒト化または変異体抗体を選ぶことも好ましい。例えば、該抗体はVEGFに応じた内皮細胞増殖を阻害するものであつてよい。ある態様において、該抗体は、VEGFのほぼ最大有効濃度(3 ng / mL)に応じたウシ毛細血管内皮細胞増殖を阻害することができよう。好ましくは、該抗体の「内皮細胞増殖アッセイ」において内皮細胞のVEGF誘導性増殖を阻害するための有効用量50(E50)値は、約5 nMを超えず、好ましくは約1 nMを超えず、最も好ましくは約0.5 nMを超えず、すなわち、これらの濃度で該抗体は*in vitro*におけるVEGF誘導性内皮細胞増殖を50%阻害することができる。好ましい「内皮細胞増殖アッセイ」には、下記実施例1に実質的に記載のごとく、10%子ウシ血清、2 mMグルタミン、および抗生物質を添加した低グルコースDulbecco改良Eagle培地(DMEM)(GIBCO)(増殖培地)の存在下でウシ副腎皮質由来毛細血管内皮細胞を培養することを含む。この内皮細胞を、増殖培地を入れた6ウェルプレートに $6 \times 10^3$ 個の密度で接種する。次に、親抗VEGF抗体(コントロール)、ヒト化または変異体抗VEGF抗体を1~5000 ng / mLの範囲の濃度で加える。2~3時間後、精製VEGFを最終濃度3 ng / mLに加える。特異性のコントロールとして、各抗体を単独かまたは2 ng / mLのbFGFの存在下で、濃度5000 ng / mLで内皮細胞に加えてよい。5または6日後、細胞をトリプシンに曝露して分離し、Coulterカウンター(Coulter Electronics, Hialeah, FL)でカウントする。データは4パラメータ

10

20

30

40

50

—適合プログラム (KaleidaGraph) により分析することができよう。

好ましいヒト化または変異体抗 V E G F 抗体は、*in vitro*腫瘍抑制活性を有するものでもよい。例えば、該抗体は、ヌードマウスにおいてヒト A 6 7 3 横紋筋肉腫細胞または乳癌 M D A - M B - 4 3 5 細胞の増殖を抑制することができよう。*in vivo*腫瘍実験において、ヒト A 6 7 3 横紋筋肉腫細胞 (ACTT;CRL1598) または乳癌 M D A - M B - 4 3 5 細胞 (ACTTから入手可能) を、下記実施例 1 に記載のごとく 10 % ウシ胎児血清、2 mM グルタミン、および抗生物質を添加した D M E M / F 1 2 中で培養する。雌 B A L B / c ヌードマウス (6 ~ 10 週令) の背部に腫瘍細胞  $2 \times 10^6$  個 (容量 200  $\mu$ L) を皮下注射する。次に、動物をヒト化または変異体抗体、およびこのアッセイにおいて活性のないコントロール抗体で処理する。ヒト化または変異体抗 V E G F M A b は 0 . 5 および / または 10 5 mg / kg の用量で投与する。腫瘍細胞を接種して 24 時間後から各 M A b (容量 100  $\mu$ L) の 1 週間に 2 回の腹腔内投与を開始する。腫瘍のサイズを 1 週間間隔で測定する。腫瘍細胞を接種して 4 週間後に動物を安樂死させ、腫瘍を取り出し、重さを量る。統計分析は A N O V A により行うことができよう。好ましくは、この「*in vivo*腫瘍アッセイ」において該抗体は用量 5 mg / kg で、ヒト A 6 7 3 腫瘍細胞の増殖を約 50 ~ 100 %、好ましくは約 70 ~ 100 %、最も好ましくは約 80 ~ 100 % 阻害する。

好ましい態様において、ヒト化または変異体抗体は、ヒト患者に治療的有効量の抗体を投与しても免疫原性反応を誘導しない。免疫原性反応を誘導する場合は、好ましくは該反応は、該抗体がまだそれで治療される患者に治療的恩恵を与えるほどのものであろう。

ヒト化または変異体抗体は、ヒトにおける V E G F 誘導性血管形成を阻害する、例えば、ヒト腫瘍増殖を阻害し、そして / または網膜障害において眼内血管形成を阻害することができるものも好ましい。

好ましい抗体は、本明細書で定義した「エピトープ A 4 . 6 . 1」を結合する。目的とする抗体と結合するヒト V E G F のエピトープと結合する抗体 (例えば、A 4 . 6 . 1 抗体のヒト V E G F への結合をブロックするもの) をスクリーニングするには、Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Harlow および David Lane 編 (1988) に記載されているような常套的交差ブロッキングアッセイを実施することができる。あるいはまた、例えば、Champeら、J. Biol. Chem. 270:1388-1394 (1995) に記載のエピトープマッピングを実施し、抗体が目的とするエピトープと結合するかどうかを測定する。

本明細書において、好ましい態様の抗体は、式 : F R 1 - C D R H 1 - F R 2 - C D R H 2 - F R 3 - C D R H 3 - F R 4 (ここで、「F R 1 - 4」は 4 つのフレームワーク領域を表し、「C D R H 1 - 3」は抗 V E G F 抗体可変重ドメインの 3 つの超可変領域を表す) によって示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを有する。F R 1 - 4 は、下記実施例に記載のごとく「コンセンサス配列」(すなわち、ヒト免疫グロブリンの重または軽鎖のクラス、サブクラス、またはサブグループの最も共通したアミノ酸) から誘導されるか、または個々のヒト抗体フレームワーク領域もしくは異なるフレームワーク領域配列の結合物から誘導することができよう。多くのヒト抗体フレームワーク領域配列は、例えば Kabat ら (上記) に記載されている。ある好ましい態様において、可変重 F R は、Kabat ら (上記) に記載のごとくヒト免疫グロブリンサブグループのコンセンサス配列により提供される。好ましくは、ヒト免疫グロブリンサブグループはヒト重鎖サブグループ III (例えば配列番号 11 にあるような) である。好ましくは、ヒト可変重 F R 配列はその中に置換を有し、例えば、ヒト F R 残基は対応する非ヒト残基で置換されているが (「対応する非ヒト残基」は、ヒトおよび非ヒト配列を一列に並べる時に目的とするヒト残基と同じ Kabat 位置番号を有する非ヒト残基を意味する)、非ヒト残基による置換は必要でない。

例えば、対応する非ヒト残基以外の置換 F R 残基はファージ表示により選ぶことができよう (下記実施例 2 参照)。置換されていてよい可変重 F R 残基に例には、F R 残基番号 : 3 7 H、4 9 H、6 7 H、6 9 H、7 1 H、7 3 H、7 5 H、7 6 H、7 8 H、9 4 H (ここでは Kabat 残基番号付け法を用いた) のいずれか 1 つまたはそれ以上を含む。好ましくは、これら残基の少なくとも 2 つ、もしくは少なくとも 3 つ、または少なくとも 4 つが置換されている。F R 置換の特に好ましい組合せは、4 9 H、6 9 H、7 1 H、7 3 H、

10

20

30

40

50

76H、78H、および94Hである。

重鎖超可変領域に関して、これらは以下のアミノ酸配列を有することが好ましい：

C D R H 1

G Y X<sub>1</sub> X<sub>2</sub> X<sub>3</sub> X<sub>4</sub> Y G X<sub>5</sub> N (配列番号 119) (ここで、X<sub>1</sub>はD、T、またはEであるが好ましくはDまたはTであり、X<sub>2</sub>はF、W、またはYであるが好ましくはFであり、X<sub>3</sub>はT、Q、G、またはSであるが好ましくはTであり、X<sub>4</sub>はHまたはNであり、X<sub>5</sub>はMまたはIであるが好ましくはMである)。

C D R H 2

W I N T X<sub>1</sub> T G E P T Y A A D F K R (配列番号 120) (ここで、X<sub>1</sub>はYまたはWであるが好ましくはYである)。 10

C D R H 3

Y P X<sub>1</sub> Y X<sub>2</sub> X<sub>3</sub> X<sub>4</sub> X<sub>5</sub> H W Y F D V (配列番号 121) (ここで、X<sub>1</sub>はHまたはYであり、X<sub>2</sub>はY、R、K、I、T、E、またはWであるが好ましくはYであり、X<sub>3</sub>はG、N、A、D、Q、E、T、K、またはSであるが好ましくはGであり、X<sub>4</sub>はS、T、K、Q、N、R、A、E、またはGであるが好ましくはSまたはTであり、X<sub>5</sub>はSまたはGであるが好ましくはSである)。

所望により、重鎖可変ドメインは本明細書においてF R 3 中の（すなわち、の一部を構成する）「C D R 7」で示される（図9Bおよび10B参照）（ここで、C D R 7 は以下のアミノ酸配列を有してよい：

C D R 7

X<sub>1</sub> S X<sub>2</sub> D X<sub>3</sub> X<sub>4</sub> X<sub>5</sub> X<sub>6</sub> T X<sub>7</sub> (配列番号 122) (ここで、X<sub>1</sub>はF、I、V、L、またはAであるが好ましくはFであり、X<sub>2</sub>はA、L、V、またはIであるが好ましくはLであり、X<sub>3</sub>はT、V、またはKであるが好ましくはTであり、X<sub>4</sub>はSまたはWであるが好ましくはSであり、X<sub>5</sub>はSまたはKであるが好ましくはKであり、X<sub>6</sub>はNまたはSであるが好ましくはSであり、X<sub>7</sub>はV、A、L、またはIであるが好ましくはAである) )。

本明細書において好ましい態様の抗体は、式：F R 1 - C D R L 1 - F R 2 - C D R L 2 - F R 3 - C D R L 3 - F R 4 (ここで、「F R 1 - 4」は4つのフレームワーク領域を表し、「C D R L 1 - 3」は抗V E G F 抗体可変重ドメインの3つの超可変領域を表す)で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを有する。F R 1 - 4 は、下記の実施例に記載のごとく「コンセンサス配列」(すなわち、ヒト免疫グロブリンの重または軽鎖のクラス、サブクラス、またはサブグループの最も共通したアミノ酸)から誘導するか、または個々のヒト抗体フレームワーク領域もしくは異なるフレームワーク領域配列の組合せから誘導することができよう。ある好ましい態様において、可変軽F R はKabat(上記)に記載のごとくヒト免疫グロブリンサブグループのコンセンサス配列により提供される。好ましくは、ヒト免疫グロブリンサブグループはヒト 軽鎖サブグループI(例えば、配列番号 12 中)。

好ましくは、ヒト可変軽F R 配列はその中に置換を有するが(例えば、ここで、ヒトF R 残基は対応するマウス残基で置換されている)、非ヒト残基による置換は必要でない。置換されていてよい可変F R 残基の例には、F R 残基番号：4 L、4 6 L、および7 1 L(ここではKabat残基番号付け法を用いた)のいずれか1つまたはそれ以上を含む。好ましくは、4 6 Lのみが置換されている。別の態様において、4 Lおよび4 6 Lがともに置換されている。

C D R に關して、これらは以下のアミノ酸配列を有することが好ましい：

C D R L 1

X<sub>1</sub> A X<sub>2</sub> X<sub>3</sub> X<sub>4</sub> X<sub>5</sub> S N Y L N (配列番号 123) (ここで、X<sub>1</sub>はRまたはSであるが好ましくはSであり、X<sub>2</sub>はSまたはNであるが好ましくはSであり、X<sub>3</sub>はQまたはEであるが好ましくはQであり、X<sub>4</sub>はQまたはDであるが好ましくはDであり、X<sub>5</sub>はIまたはLであるが好ましくはIである)。

C D R L 2

10

20

30

40

50

F T S S L H S (配列番号124)。

C D R L 3

Q Q Y S X<sub>1</sub> X<sub>2</sub> P W T (配列番号125) (ここで、X<sub>1</sub>はT、A、またはNであるが好ましくはTであり、X<sub>2</sub>はVまたはTであるが好ましくはVである)。

好ましいヒト化抗V E G F抗体は、実施例1のF(a b)-12の重および/または軽可変ドメイン配列を有する抗体、および実施例3の変異体Y0317、Y0313-1、およびY0238-3を含む親和性成熟形のような該抗体の変異体であり、Y0317が好ましい変異体である。本明細書において目的とするヒト化抗V E G F抗体を製造する方法については以下に詳述する。

#### A. 抗体の製造

非ヒトV E G F抗体のヒト化方法、および抗V E G F抗体の変異体の製造方法は下記実施例に記載している。抗V E G F抗体をヒト化するには、非ヒト抗体出発物質を調製する。変異体を作製する親抗体を調製する。そのような非ヒト抗体出発物質および親抗体の作製方法の例は以下の項に記載する。

##### (i) 抗原の製造

抗体の製造に用いるV E G F抗原は、例えば完全V E G FまたはV E G F断片(例えば、「エピトープA4.6.1」を含むV E G F断片)であつてよい。抗体を製造するのに有用な他のV E G Fは当業者に明らかであろう。抗体を製造するのに用いるV E G F抗原は、好ましくは、例えばLeungら、Science 246: 1306(1989)、およびHouckら、Mol.Endocrin.5:1806(1991)に記載のヒトV E G Fである。

##### (ii) ポリクローナル抗体

ポリクローナル抗体は、関連抗原とアジュバントを複数回皮下(s c)または腹腔内(i p)注射することにより動物で生じさせるのが好ましい。二機能性または誘導化剤、例えば、マレイミドベンゾイルスルホスクシンイミドエステル(システイン残基を介して結合)、N-ヒドロキシスクシンイミド(リジン残基を介する)、グルタールアルデヒド、コハク酸無水物、S O C l<sub>2</sub>、またはR<sup>1</sup>-N=C=N-R(ここで、RおよびR<sup>1</sup>は異なるアルキル基である)を用い、関連抗原を、免疫する種に対して免疫原性であるタンパク質、例えば、キーホールリンペットヘモシアニン、血清アルブミン、ウシサイログロブリン、またはダイズトリプシンインヒビターと結合させるのに有用かも知れない。

例えば、タンパク質またはコンジュゲート100 μgまたは5 μg(それぞれウサギまたはマウスに対し)をフロインドの完全アジュバント3容量と混合し、該溶液を複数部位に皮内注射することにより、動物を抗原、免疫原性コンジュゲート、または誘導体で免疫する。1ヶ月後に、フロインドの完全アジュバント中の、最初の量の1/5~1/10のペプチドまたはコンジュゲートを複数箇所に皮下注射することにより動物にブースターをかける。7~14日後に動物から採血し、血清中の抗体価を測定する。抗体価がプラトーに達するまで動物にブースターをかける。好ましくは、別の架橋試薬を用いておよび/または異なるタンパク質と結合させた同じ抗原とのコンジュゲートを用いて動物にブースターをかけるのが好ましい。コンジュゲートは組換え細胞培養中でタンパク質融合物として作製することもできる。アラムのような凝集剤も免疫応答の増強に使用するのに適している。

##### (iii) モノクローナル抗体

モノクローナル抗体は、Kohlerら、Nature,256:495(1975)に最初に記載のハイブリドーマ法を用いて製造するか、または組換えDNA法(米国特許第4816567号)により製造することができよう。

ハイブリドーマ法において、マウス、またはハムスターもしくはマカーラザルのような他の適切な宿主動物を既述のごとく免疫し、免疫に用いたタンパク質と特異的に結合する抗体を産生するか、もしくは産生することができるリンパ球を誘導する。次に、ポリエチレングリコールのような適切な融合剤を用いてリンパ球をミエローマ細胞と融合させ、ハイブリドーマ細胞を形成する(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 59-103(Academic Press, 1986))。

10

20

30

40

50

このように作製したハイブリドーマ細胞を、好ましくは非融合の親ミエローマ細胞の成長または生存を阻害する1またはそれ以上の物質を含む、適切な培養液に接種し、増殖させる。例えば、親ミエローマ細胞が酵素ヒポキサンチングアミニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(H G P R TまたはH P R T)を欠く場合は、典型的には、該ハイブリドーマ用の培養液には、H G P R T - 欠損細胞の増殖を抑制する物質であるヒポキサンチン、アミノブテリン、およびチミジンを含むであろう(H A T 培地)。

好ましいミエローマ細胞は、効率的に融合し、選択した抗体産生細胞による抗体の安定した高レベルの産生を支持し、H A T 培地のような培地に感受性である。これらのうち、好ましいミエローマ細胞系は、Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USAから入手可能なM O P - 2 1 およびM . C . - 1 1 マウス腫瘍、およびAmerican Type Culture Collection, Rockville, Maryland USAから入手可能なS P - 2 またはX 6 3 - A g 8 - 6 5 3 細胞から誘導される細胞のようなネズミミエローマ系である。ヒトミエローマおよびマウス - ヒトヘテロミエローマ細胞系によるヒトモノクローナル抗体の製造も記載されている(Kozbor, J. Immunol., 133:3001(1984), Brodeurら、Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, 51-63(Marcel Dekker, Inc., New York, 1987))。

ハイブリドーマ細胞が増殖している培養液について、該抗原に対するモノクローナル抗体の産生をアッセイする。好ましくは、ハイブリドーマ細胞により産生されたモノクローナル抗体の結合特異性を、免疫沈降法、またはラジオイムノアッセイ(R I A)もしくは酵素免疫測定法(E L I S A)のようなin vitro結合アッセイにより測定する。20

モノクローナル抗体の結合親和性は、例えばMunsonら、Anal.Biochem., 107:220(1980)のScatchard分析により測定することができる。

所望の特異性、親和性、および/または活性の抗体を產生するハイブリドーマ細胞を同定し、次いで、該クローンを限界希釈法によりサブクローンし、標準的方法により増殖させることができよう(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 59-103(Academic Press, 1986))。この目的に適した培養液は、例えば、D - M E M またはR P M I - 1 6 4 0 培地を含む。さらに、ハイブリドーマ細胞はin vivoにおいて動物の腹水腫瘍として増殖することができよう。

サブクローンにより分泌されたモノクローナル抗体は、例えば、プロテインA - セファロース、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィ、ゲル電気泳動、透析、またはアフィニティクロマトグラフィのような通常の免疫グロブリン精製法により培養液、腹水、または血清から適切に分離される。30

モノクローナル抗体は、コードするDNAは通常の手順を用いて容易に単離し、配列決定することができる(例えば、モノクローナル抗体の重および軽鎖をコードする遺伝子と特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを用いることにより)。ハイブリドーマ細胞はDNAのような好ましい供給源として供給される。単離したら、DNAを発現ベクターに組み込み、次いでこれをE.coli細胞、シミアンC O S 細胞、チャイニーズハムスター卵巣(C H O)細胞、または別の方法では免疫グロブリンタンパク質を产生しないミエローマ細胞といった宿主細胞にトランスフェクションし、組換え宿主細胞中でモノクローナル抗体を合成させる。抗体の組換えによる製造については以下でより詳細に説明する。40

#### (iv) ヒト化およびアミノ酸配列変異体

以下の実施例1 - 2は、抗V E G F抗体のヒト化方法を記載する。ある態様において、これらのヒト化抗体のアミノ酸配列変異体を作成するのが望ましくあり得、特に、これらは、ヒト化抗体の結合親和性または他の生物学的性質を改善する。実施例3は、親抗体に比べて親和性が高められた抗V E G F抗体のアミノ酸配列変異体を作成する方法を記載する。

抗V E G F抗体のアミノ酸配列変異体は、適當なヌクレオチド変化を抗V E G F抗体のDNAに導入することにより、またはペプチド合成により製造する。そのような変異体には、例えば、本明細書中の実施例の抗V E G F抗体のアミノ酸配列内の残基からの欠失、50

および / またはそれらの残基への挿入、および / またはそれらの残基の置換が含まれる。最終構築物が所望の特性を有するならば、欠失、挿入、および置換のいずれかの組み合わせを最終構築物で達成させる。アミノ酸変化はまた、グリコシル化部位の数または位置を変化させるような、ヒト化または変異抗 V E G F 抗体の翻訳後プロセスも変え得る。

変異誘発に好ましい位置である抗 V E G F 抗体のある残基または領域の同定に有用な方法は、CunninghamおよびWells, Science, 244 : 1081 - 1085 (1989) により記載されているように、「アラニン走査型変異誘発」と呼ばれる。ここでは、標的残基の残基または基を同定して(例えば、arg、asp、his、lys、およびgluといったような荷電残基)、中性または陰性に荷電アミノ酸(最も好ましくは、アラニンまたはポリアラニン)で置換して、アミノ酸と V E G F 抗原との相互作用に影響を与える。次いで、さらなる変異体または他の変異体を置換部位に導入することにより、またはそれらを置換部位に代えて導入することにより、置換に対する機能的感受性を実証するこれらのアミノ酸の位置を正確にする。従って、アミノ酸配列の変異を導入する部位は予め決定しておくが、その変異の種類を本来は予め決定しておく必要はない。例えば、ある一定部位での変異の成果を分析するためには、ala走査またはランダム変異誘発を標的コドンまたは領域で行って、発現した抗 V E G F 抗体の変異体を所望の活性に関してスクリーニングする。アラニン走査型変異誘発を実施例 3 に記載する。10

アミノ酸配列挿入には、1つの残基から 100 またはそれ以上の残基を含むポリペプチドの範囲にわたるアミノおよび / またはカルボキシ末端融合、さらにはまた、単一または複数のアミノ酸残基の配列内挿入が含まれる。末端挿入の例には、N 末端メチオニル残基をもつ抗 V E G F 抗体、またはエピトープタグに融合した抗体が含まれる。抗 V E G F 抗体分子の他の挿入変異体には、抗体の血清半減期を増大させる酵素またはポリペプチドの抗 V E G F 抗体の N または C 末端への融合が含まれる(以下を参照)。20

別のタイプの変異体は、アミノ酸置換変異体である。これらの変異体は、抗 V E G F 抗体分子中の少なくとも 1 つのアミノ酸残基が除去されていて、違う残基がその場所に挿入されている。置換変異誘発に最も重要な部位には超可変領域が含まれるが、F R 変更もまた意図する。同型置換を「好ましい置換」という表題で表 1 に示す。そのような置換が生物学的活性に変化を及ぼすなら、表 1 において「例示的な置換」と称する、またはアミノ酸クラスについて以下にさらに記載する、より多くの実質的变化を導入して、生成物をスクリーニングするのがよい。30

表 1

元の残基	例示的な置換	好ましい置換
Ala (A)	val ; leu ; ile	val
Arg (R)	lys ; gln ; asn	lys
Asn (N)	gln ; his ; asp ; lys ; arg	gln
Asp (D)	glu ; asn	glu
Cys (C)	ser ; ala	ser
Gln (Q)	asn ; glu	asn
Glu (E)	asp ; gln	asp
Gly (G)	ala	ala
His (H)	asn ; gln ; lys ; arg	arg
Ile (I)	leu ; val ; met ; ala ; phe ; ノルロイシン	leu
Leu (L)	ノルロイシン ; ile ; val ; met ; ala ; phe	ile
Lys (K)	arg ; gln ; asn	arg
Met (M)	leu ; phe ; ile	leu
Phe (F)	leu ; val ; ile ; ala ; tyr	tyr
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr ; phe	tyr
Tyr (Y)	trp ; phe ; thr ; ser	phe
Val (V)	ile ; leu ; met ; phe ; ala ; ノルロイシン	leu

抗体の生物学的性質における実質的改変は、( a ) 例えば、イス形もしくはらせん形配座のような、置換領域におけるポリペプチド骨格の構造；( b ) 標的部位での分子の電荷もしくは疎水性；または( c ) 側鎖の巣を維持することに対するそれらの効果において著しく異なる置換を選択することにより成し遂げられる。天然に存在する残基を共通の側鎖の性質に基づいてグループに分ける。

- ( 1 ) 疎水性 : ノルロイシン、met、ala、val、leu、ile；
- ( 2 ) 中性の疎水性 : cys、ser、thr；
- ( 3 ) 酸性 : asp、glu；
- ( 4 ) 塩基性 : asn、gln、his、lys、arg；
- ( 5 ) 鎌の方向に影響を及ぼす残基 : gly、pro；および
- ( 6 ) 芳香族 : trp、tyr、phe。

非同型置換は、これらのクラスのうちの 1 つのメンバーを別のクラスに交換することを必然的に伴う。

ヒト化または変異抗 V E G F 抗体の適切な配座を維持するのに関与しないシステイン残基をいすれもまた、一般的には、セリンで置換して、その分子の酸化安定性を改善して、異常な架橋を防ぐこともできる。逆に、システイン結合を抗体に付加して、その安定性を改善することができる（特に、その抗体が F v フラグメントのような抗体フラグメントである場合）。

特に好ましいタイプの置換変異体は、親抗体（例えば、ヒト化またはヒト抗体）の 1 つまたはそれ以上の超可変領域の残基を含む。一般的には、さらなる開発のために選択される、その結果得られた変異体は、それを作成する親抗体に比べて改善された生物学的性質を有するであろう。そのような置換変異体を作成するための便利な方法は、ファージ表示を使用する親和性成熟である（本明細書中の実施例 3 を参照）。簡単に言えば、幾つかの超可変領域の部位（例えば、6 - 7 の部位）を変異させて、各々の部位で全ての可能なア

10

20

30

40

50

ミノ置換を生じさせる。このようにして作成した抗体の変異体を、各々の粒子内に詰め込まれたM13の遺伝子III産物への融合のような、纖維状ファージ粒子に由来する一価方法で表示する。次いで、そのファージで表示した変異体を、本明細書中に開示するそれらの生物学的活性（例えば、結合親和性）に関してスクリーニングする。改変に関して候補となる超可変領域の部位を同定するために、抗原結合に著しく寄与する同定された超可変領域の残基に対して、アラニン走査型変異誘発（実施例3を参照）を行うことができる。あるいはまた、または加えて、抗原-抗体複合体の結晶構造を分析して、抗体とヒトV<sub>E</sub>G<sub>F</sub>との間の接触点を同定するのが有利となり得る。そのような接触残基および隣接残基は、本明細書中で詳細に述べる技術による置換に関しての候補である。そのような変異体を作成したら、パネルの変異体を本明細書中に記載するスクリーニングにかけて、1つまたはそれ以上の関連したアッセイにおいて優れた性質をもつ抗体をさらなる開発のために選択するのがよい。

抗体の別のタイプのアミノ酸変異体は、その抗体の元のグリコシル化パターンを変える。変えるという語は、抗体中に見出される1つまたはそれ以上の炭水化物部分を欠失させること、および/または抗体中には存在しない1つまたはそれ以上のグリコシル化部位を付加することを意味する。

抗体のグリコシル化は、典型的には、N結合型またはO結合型である。N結合型は、アスパラギン残基の側鎖への炭化水素部分の結合をいう。トリペプチド配列のアスパラギン-X-セリンおよびアスパラギン-X-トレオニン（Xは、プロリンを除き、いずれかのアミノ酸である。）は、アスパラギン側鎖への炭化水素部分の酵素結合に対する認識配列である。従って、ポリペプチド中のこれらのトリペプチド配列のいずれかの存在は、可能性のあるグリコシル化部位を作り出す。O結合型グリコシル化は、ヒドロキシアミノ酸、最も一般的には、セリンまたはトレオニンへの、糖であるN-アセチルガラクトサミン、ガラクトース、またはキシロースのうちの1つの結合をいうが、5-ヒドロキシプロリンまたは5-ヒドロキシリジンもまた使用することができる。

抗体へのグリコシル化部位の付加は、便利には、1つまたはそれ以上の上記の（N結合型グリコシル化部位に対する）トリペプチド配列を含むよう、アミノ酸配列を変えることにより成し遂げられる。その変更はまた、元の抗体の配列への（O結合型グリコシル化部位に対する）1つもしくはそれ以上のセリンもしくはトレオニン残基の付加、またはそれまでの置換によっても成され得る。

抗V<sub>E</sub>G<sub>F</sub>抗体のアミノ酸配列変異体をコードする核酸分子は、当業界で知られている様々な方法により製造する。これらの方には、限定されるものではないが、天然源からの単離（天然に存在するアミノ酸配列変異体の場合）、または抗V<sub>E</sub>G<sub>F</sub>抗体の初期に作成した変異体または非変異体種のオリゴヌクレオチドが媒介する（もしくは部位特異的）変異誘発、PCR変異誘発、およびカセット式変異誘発による製造が含まれる。

#### （v）ヒト抗体

ヒト化の他の方法として、ヒト抗体を作成することができる。例えば、現在、免疫化すると、内因性免疫グロブリン産生の不存在下に全レパートアのヒト抗体を產生することができるトランスジェニック動物（例えば、マウス）を作ることが可能である。例えば、キメラおよび生殖系変異マウスにおける抗体の重鎖接続領域（J<sub>H</sub>）遺伝子のホモ接合欠失は、内因性抗体産生の完全な阻害を引き起こすことが記載されている。そのような生殖系変異マウスにおけるヒト生殖系免疫グロブリン遺伝子アレイの転移は、抗原攻撃に対してヒト抗体の產生を引き起こすであろう。例えば、Jakobovitsら，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993)；Jakobovitsら，Nature, 362:255-258 (1993)；Brugermannら，Year in Immuno., 7:33 (1993)；並びに米国特許第5,591,669号、同第5,589,369号、および同第5,545,807号を参照。ヒト抗体はまた、ファージ表示ライブラリーから誘導することもできる（Hoogenboomら，J. Mol. Biol., 227:381 (1991)；Marksら，J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991)；並びに米国特許第5,565,332号および同第5,573,905号）。上に論じたように、ヒト抗体はまた、インビトロにおける活性化B細

10

20

30

40

50

胞により作成することもできる（米国特許第5,567,610号および同第5,229,275号を参照）。

(vi) 抗体フラグメント

ある態様において、ヒト化または変異抗VEGF抗体は、抗体フラグメントである。様々な技術が抗体フラグメントの产生に関して開発されている。伝統的には、これらのフラグメントを完全な抗体のタンパク質分解消化によって誘導した（例えば、Morimotoら、Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117(1992)およびBrennanら、Science 229:81(1985)を参照）。しかし、これらのフラグメントは、現在、組換え宿主細胞により直接产生することができる。例えば、Fab'-SHフラグメントをE. coliから直接回収し、化学的に結合させて、 $F(ab')_2$ フラグメントを形成することができる（Carterら、Bio/Technology 10:163-167(1992)）。別の態様において、ロイシンジッパーGCN4を使用して、 $F(ab')_2$ を形成し、 $F(ab')_2$ 分子の集合を促進する。別の方針により、Fv、Fab、または $F(ab')_2$ フラグメントを組換え宿主細胞培養から直接単離することができる。抗体フラグメントの产生のための他の技術は、当業者に明らかであろう。

(vii) 多重特異性抗体

幾つかの態様において、少なくとも2つの違うエピトープに対して結合特異性を有する、多重特異性（例えば、二重特異性）ヒト化または変異抗VEGF抗体を作成するのが望ましくあり得る。例示的な二重特異性抗体は、VEGFタンパク質の2つの違うエピトープに結合し得る。あるいはまた、VEGF発現細胞に対する細胞防御機構に焦点を合わせるよう、抗VEGFアームを、T細胞受容体分子（例えば、CD2もしくはCD3）のような白血球上のトリガーリング(triggering)分子、またはFc RI(CD64)、Fc RII(CD32)、およびFc RIII(CD16)といったような、IgGに対するFc受容体(FcR)に結合するアームと組み合わせてもよい。二重特異性抗体をまた使用して、VEGFを発現する細胞に細胞傷害性物質を局在化することもできる。これらの抗体は、VEGF結合アーム、および細胞傷害性物質（例えば、サポリン、抗インターフェロン、ビンカアルカロイド、リシンA鎖、メトトレキセート、または放射性同位体ハプテン）を結合するアームを有する。二重特異性抗体は、全長の抗体または抗体フラグメント（例えば、 $F(ab')_2$ 二重特異性抗体）として製造することができる。

二重特異性抗体を製造するための別の方針により、一対の抗体分子間の界面を操作して、組換え細胞培養から回収されるヘテロダイマーのパーセンテージを最大にすることができる。好みの界面は、抗体の定常ドメインのCH3ドメインの少なくとも部分を含んでなる。この方法では、一次抗体分子の界面に由来する1つまたはそれ以上の小さなアミノ酸側鎖をより大きな側鎖（例えば、チロシンまたはトリプトファン）で置換する。大きなアミノ酸側鎖をより小さな側鎖（例えば、アラニンまたはトレオニン）で置換することにより、その大きな側鎖と同一または同様の大きさの代償的な「空洞」が二次抗体分子の界面上に作り出される。このことは、ホモダイマーのような他の所望されていない最終生成物に対するヘテロダイマーの収率を増大させる機構を与える。1996年9月6日に発行されたWO96/27011を参照。

二重特異性抗体には、架橋または「ヘテロコンジュゲート」抗体が含まれる。例えば、ヘテロコンジュゲートでの抗体のうちの1つをアビシンに結合して、他方をビオチンに結合することができる。いずれかの便利な架橋方法を使用して、ヘテロコンジュゲート抗体を製造することができる。適切な架橋剤は当業界で周知であって、多くの架橋技術と共に、米国特許第4,676,980号に開示されている。

抗体フラグメントから二重特異性抗体を作成する技術もまた文献に記載されている。例えば、化学結合を使用して、二重特異性抗体を製造することができる。Brennanら、Science 229:81(1985)は、完全な抗体をタンパク質分解により切断して、 $F(ab')_2$ フラグメントを作成するという方法を記載している。これらのフラグメントをジチオール錯化剤である亜ヒ酸ナトリウムの存在下に還元し、隣接のジチオールを安定化して、分子間ジスルフィド形成を防ぐ。次いで、作成したFab'ブロックメントをチオニトロ

10

20

20

30

40

50

ベンゾエート( TNB )誘導体に転換する。次いで、その  $Fab'$  - TNB 誘導体のうちの 1 つをメルカプトエチルアミンでの還元により  $Fab'$  - チオールに再び転換し、等モル量の他の  $Fab'$  - TNB 誘導体と混合して、二重特異性抗体を形成する。產生した二重特異性抗体は、酵素の選択的固定化のための物質として使用することができる。またさらなる態様において、*E. coli*から直接回収した  $Fab'$  - SH フラグメントをインビトロにおいて化学的に結合させて、二重特異性抗体を形成することができる。Shalabyら, *J. Exp. Med.* 175 : 217 - 225 (1992)。

組換え細胞培養から直接、二重特異性抗体フラグメントを製造して単離するための様々な技術もまた記載されている。例えば、ロイシンジッパーを使用して、二重特異性抗体を產生している。Kostelnýら, *J. Immunol.* 148 (5) : 1547 - 1553 (1992)。Foss および Jun タンパク質に由来するロイシンジッパーペプチドを遺伝子融合により 2 つの違う抗体の  $Fab'$  部分に結合させた。その抗体ホモダイマーをヒンジ領域で還元して、モノマーを形成した後、再び酸化して、抗体ヘテロダイマーを形成した。この方法はまた、抗体ホモダイマーの產生にも利用することができる。Hollingerら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 : 6444 - 6448 (1993) により記載されている「ジアボディ(diabody)」技術は、二重特異性抗体フラグメントを製造するための他の機構を与えていている。そのフラグメントは、短すぎて同じ鎖上の 2 つのドメインの間を対にすることができないリンカーにより軽鎖可変ドメイン ( $V_L$ ) に結合した重鎖可変ドメイン ( $V_H$ ) を含んでなる。従って、1 つのフラグメントの  $V_H$  および  $V_L$  ドメインを別のフラグメントの相補的  $V_L$  および  $V_H$  ドメインと対にするようにし、それによって、2 つの抗原結合部位を形成する。一本鎖 Fv (sFv) ダイマーの使用により二重特異性抗体フラグメントを製造するための別な方法もまた報告されている。Gruberら, *J. Immunol.* 152 : 5368 (1994) を参照。あるいはまた、二重特異性抗体は、Zapataら, *Protein Eng.* 8 (10) : 1057 - 1062 (1995) に記載されているように製造した「線状抗体」であってもよい。

2 個以上の抗体を意図する。例えば、三重特異性抗体を製造することができる。Tuttら, *J. Immunol.* 147 : 60 (1991) を参照。

#### (viii) 他の改変

ヒト化または変異抗 VEGF 抗体の他の改変を意図する。例えば、癌を処置する際の抗体の有効性を高めるよう、エフェクター機能に関して本発明の抗体を改変するのが、例えば、望ましくあり得る。例えば、システイン残基を Fc 領域に導入し、それによって、この領域での鎖間ジスルフィド結合形成を可能とし得る。このようにして作成したホモダイマー抗体は、改善されたインターナリゼーション能力および / または増大された補体が媒介する細胞壊死および抗体依存性細胞傷害性 (ADCC) を有し得る。Caronら, *J. Exp. Med.* 176 : 1191 - 1195 (1992) および Shope, B., *J. Immunol.* 148 : 2918 - 2922 (1992) を参照。Wolffら, *Cancer Research* 53 : 2560 - 2565 (1993) に記載されているヘテロ二官能性架橋物質を使用して、高められた抗腫瘍活性をもつホモダイマー抗体をまた製造することもできる。あるいはまた、2 つの Fc 領域を有する抗体を操作することができ、それによって、高められた補体溶解および ADCC 能力を有し得る。Stevensonら, *Anti-Cancer Drug Design* 3 : 219 - 230 (1989) を参照。

本発明はまた、化学療法剤、毒素(例えば、細菌、真菌、植物もしくは動物起源の酵素的に活性な毒素、またはそのフラグメント)、または放射性同位体(すなわち、放射性コンジュゲート)といったような細胞傷害性物質にコンジュゲートした本明細書中に記載する抗体を含んでなるイムノコンジュゲートに関する。

そのようなイムノコンジュゲートの作成に有用な化学療法剤を上に記載している。使用することができる酵素的に活性な毒素およびそのフラグメントには、ジフテリア A 鎮、ジフテリア毒素の非結合活性フラグメント、(*Pseudomonas aeruginosa* に由来する) エンドトキシン A 鎮、リシン A 鎮、アブリン A 鎮、モデシン (modecin) A 鎮、 - サルシン (sarcin)、*Aleurites fordii* タンパク質、ジアンチン (dianthin) タンパク質、*Phytolaca*

10

20

30

40

50

americanaタンパク質（PAP I、PAP II、およびPAP-S）、モモルディカ・キャラントニア（momordica charantia）阻害剤、クルシン（curcin）、クロテン（crotin）、サパオナリア・オフィシナリス（sapaponaria officinalis）阻害剤、ゲロニン（gelonin）、マイトゲリン（mitogellin）、レストリクトシン（restrictocin）、フェノマイシン（phenomycin）、エノマイシン（enomycin）、およびトリコテセンズ（trichothecenes）が含まれる。様々な放射性核種を放射性コンジュゲートした抗VEGF抗体の产生に利用することができる。例には、<sup>212</sup>Bi、<sup>131</sup>I、<sup>131</sup>In、<sup>90</sup>Y、および<sup>186</sup>Reが含まれる。

N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオール)プロピオネート（SPDP）、イミノチオラン（iminothiolane）（IT）、イミドエステルの二官能性誘導体（例えば、ジメチル・アジピミデート（dimethyl adipimidate）HCL）、活性エステル（例えば、スペリン酸ジスクシンイミジル）、アルデヒド（例えば、グルタルアルデヒド）、ビス-アジド化合物（例えば、ビス（p-アジドベンゾイル）ヘキサンジアミン）、ビス-ジアゾニウム誘導体（例えば、ビス（p-ジアゾニウムベンゾイル）エチレンジアミン）、ジイソシアネート（例えば、トリエン2,6-ジイソシアネート）、およびビス-活性フッ素化合物（例えば、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン）といったような、様々な二官能性タンパク質カップリング剤を使用して、抗体および細胞傷害性物質のコンジュゲートを製造する。例えば、リシンイムノトキシンは、Vitettaら、Science 238:1098(1987)に記載されているように製造することができる。炭素-14で標識化した1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレントリアミンペント酢酸（MX-DTPA）は、抗体への放射性核種のコンジュゲーションに関する例示的なキレート化剤である。WO 94/11026を参照。

別の態様において、抗体を腫瘍の前標的化における利用のための「受容体」（例えば、ストレプトアビシン）にコンジュゲートさせ、ここで、その抗体-受容体コンジュゲートを患者に投与し、続いて、キレート化剤を使用して、結合していないコンジュゲートを循環から除去した後、細胞傷害性物質（例えば、放射性核種）にコンジュゲートしている「リガンド」（例えば、アビシン）を投与するのがよい。

本明細書中に開示する抗VEGF抗体はまた、イムノリポソームとして製剤化することもできる。Epsteinら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688(1985); Hwangら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4030(1980); 並びに米国特許第4,485,045号および同第4,544,545号に記載されているような、当業界で知られている方法により、その抗体を含むリポソームを製造する。高められた循環時間もつリポソームは、米国特許第5,013,556号に開示されている。

特に有用なリポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロール、およびPEGで誘導体化したホスファチジルエタノールアミン（PEG-PE）を含んでなる脂質組成物での逆相蒸発方法により作成することができる。リポソームを、定められた細孔径のフィルターを通して押出し、所望の直径をもつリポソームを得る。本発明の抗体のFab'フラグメントは、Martinら、J. Biol. Chem. 257:286-288(1982)に記載されているように、ジスルフィド交換反応によってリポソームにコンジュゲートすることができる。場合により、化学療法剤（例えば、Doxorubicin）をリポソーム内に含む。Gabizonら、J. National Cancer Inst. 81(19):1484(1989)を参照。

本発明の抗体はまた、その抗体を、プロドラッグ（例えば、ペプチジル化学療法剤、WO 81/01145を参照）を活性抗癌剤に転換するプロドラッグ活性化酵素にコンジュゲートさせることにより、AD EPTにおいて使用することもできる。例えば、WO 88/07378および米国特許第4,975,278号を参照。

AD EPTに有用なイムノコンジュゲートの酵素成分には、プロドラッグをそのより活性な細胞傷害性形態に転換するような方法で、それに作用することができるいずれかの酵素が含まれる。

本発明の方法において有用である酵素には、限定されるものではないが、ホスフェートを含むプロドラッグを遊離の薬物へと転換するのに有用なアルカリ性ホスファターゼ；スル

10

20

20

30

30

40

40

50

フェートを含むプロドラッグを遊離の薬物へと転換するのに有用なアリールスルファターゼ；無毒の5-フルオロシトシンを抗癌剤である5-フルオロウラシルへと転換するのに有用なシトシンデアミナーゼ；ペプチドを含むプロドラッグを遊離の薬物へと転換するのに有用な、セラチア(*serratia*)プロテアーゼ、サーモリシン、ズブチリシン、カルボキシペプチダーゼ、およびカテプシン(例えば、カテプシンBおよびL)といったようなプロテアーゼ；D-アミノ酸置換基を含むプロドラッグを転換するのに有用なD-アラニルカルボキシペプチダーゼ；グリコシリ化プロドラッグを遊離の薬物へと転換するのに有用な、-ガラクトシダーゼおよびノイラミダーゼといったような炭水化物を切断する酵素；-ラクタムで誘導体化した薬物を遊離の薬物へと転換するのに有用な-ラクタマーゼ；並びに各々、それらのアミン窒素のところをフェノキシアセチルまたはフェニルアセチル基で誘導体化した薬物を遊離の薬物へと転換するのに有用な、ペニシリンVアミダーゼまたはペニシリンGアミダーゼといったようなペニシリンアミダーゼが含まれる。あるいはまた、当業界ではまた「触媒抗体」としても知られている酵素活性をもつ抗体を使用して、本発明のプロドラッグを遊離の活性薬物に転換することができる(例えば、Massey, *Nature* 328: 457-458(1987)を参照)。抗体-触媒抗体コンジュゲートは、腫瘍細胞集団への触媒抗体の送達に関して本明細書中に記載するように製造することができる。

上に論じたヘテロ二官能性架橋試薬の使用のような、当業界でよく知られている技術により、本発明の酵素を抗VEGF抗体に共有結合させることができる。あるいはまた、当業界でよく知られている組換えDNA技術を使用して、本発明の酵素の少なくとも機能的に活性な部分に結合した、本発明の抗原の少なくとも抗原結合領域を含んでなる融合タンパク質を構築することができる(例えば、Neubergerら, *Nature* 312: 604-608(1984)を参照)。

本発明のある態様において、完全な抗体よりはむしろ、抗体フラグメントを使用して、例えば、腫瘍浸透を増大させるのが望ましくあり得る。この場合には、抗体フラグメントを改変して、その血清半減期を増大させるのが望ましくあり得る。このことは、例えば、抗体フラグメントへのサルベージ受容体結合エピトープの取込みにより(例えば、抗体フラグメント中の適当な領域の変異により、またはペプチドタグにエピトープを取り込んだ後、例えば、DNAまたはペプチド合成によって、抗体フラグメントに端または真中のところで融合させることにより)達成することができる。1996年10月17日に発行されたWO96/32478を参照。

そのサルベージ受容体結合エピトープは、一般的には、Fcドメインの1つまたは2つのループに由来する、いずれかの1つまたはそれ以上のアミノ酸残基を抗体フラグメントの類似(analogous)領域に転移させるという領域を構成する。さらにより好ましくは、Fcドメインの1つまたは2つのループに由来する、3つまたはそれ以上の残基を転移させる。またより好ましくは、そのエピトープを(例えば、IgGの)Fc領域のCH2ドメインから取って、その抗体のCH1、CH3、またはV<sub>H</sub>領域、または1つ以上のそのような領域に転移させる。あるいはまた、そのエピトープをFc領域のCH2ドメインから取って、その抗体フラグメントのC<sub>L</sub>領域もしくはV<sub>L</sub>領域、または両方に転移させる。

ある最も好ましい態様において、そのサルベージ受容体結合エピトープは、特に、その抗体フラグメントがFabまたはF(ab')<sub>2</sub>である場合、配列:PKNS S M I S N T P(配列番号17)を含んでなり、場合により、HQSLGTQ(配列番号18)、HQNLSDGK(配列番号19)、HQNI SDGK(配列番号20)、またはVISSHLGQ(配列番号21)よりなる群から選択される配列をさらに含んでなる。別の最も好ましい態様において、そのサルベージ受容体結合エピトープは、配列:HQNLSDGK(配列番号19)、HQNI SDGK(配列番号20)、またはVISSH LGQ(配列番号21)、および配列:PKNS S M I S N T P(配列番号17)を含むポリペプチドである。

ヒト化または変異抗VEGF抗体の共有結合による改変もまた、本発明の範囲内に含まれる。それらは、化学合成により、または適用できるならば、抗体の酵素もしくは化学切斷

10

20

30

40

50

により成され得る。他のタイプの抗体の改変は、抗体の標的化アミノ酸残基を、選択された側鎖またはNもしくはC末端残基と反応することできる有機誘導体化剤と反応させることにより分子に導入される。ポリペプチドの例示的な共有結合による改変は、米国特許第5,534,615号に記載されている（この米国特許に記載されている内容は、本発明の一部を具体的に構成する）。抗体の好ましいタイプの共有結合による改変は、米国特許第4,640,835号、同第4,496,689号、同第4,301,144号、同第4,670,417号、同第4,791,192号、または同第4,179,337号に示されている方法で、抗体を様々な非タンパク質性（nonproteinaceous）ポリマー（例えば、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、またはポリオキシアルキレン）のうちの1つに結合することを含んでなる。

10

#### B. ベクター、宿主細胞および組換方法

本発明はまた、ひと化または変異抗-V E G F抗体をコードする分離された核酸、ベクターおよび核酸を含む宿主細胞、および抗体産生のための組換技術を提供する。

抗体の組換体産生のために、これをコードする核酸を分離し、さらにクローニング（DNAの増幅）または発現のための複製可能なベクターに挿入する。別の態様において、この抗体は相同組換によって産生することができる。例えば、それは米国特許第5,204,244号に記載されており、ここに引用してこの明細書の記載とする。モノクローナル抗体をコードする抗体は容易に分離され、常套的手段を用いて配列決定することができる（例えば、この抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合し得るオリゴヌクレオチドプローブを用いることによって）。多くのベクターを利用することができます。一般的に、ベクター成分は下記のもの1つまたはそれ以上を含むが、これに限定されるものではない：シグナル配列、複製開始点、1つまたはそれ以上のマーカー遺伝子、エンハンサー成分、プロモーター、および転写終結点配列、例えば、1996年7月9日発行の米国特許第5,534,615号に記載されており、ここに引用してこの明細書の記載とする。

20

ここに記載のベクターのDNAをクローニングまたは発現するのに適した宿主細胞は原核生物、酵母、上記の高等真核細胞である。この目的のために適した原核細胞はグラム陰性またはグラム陽性微生物などの真生細菌、例えば、EscherichiaなどのEnterobacteriaceae、例えば、E. coli、Enterobacter、Erwinia、Klebsiella、Proteus、Salmonella、例えば、Salmonella typhimurium、Serratia、例えばSerratia marcescansおよびShigella、およびBacilli、例えばB. subtilisおよびB. licheniformis（例えば、1989年4月12日刊行のDD266,710に開示されたB. licheniformis 41P）、Pseudomonas、例えば、P. aeruginosaおよびStreptomycesなどである。好ましいE. coliクローニング宿主はE. coli 294（ATCC 31,446）であるが、E. coli B、E. coli X1776（ATCC 31,537）、およびE. coli W3110（ATCC 27,325）などの他の株も適している。これらの例は説明のためのものであり限定ではない。

30

原核生物に加えて、糸状菌または酵母などの真核細菌は抗-V E G F抗体コードベクターの適切なクローニングまたは発現宿主である。

Saccharomyces cerevisiaeまたは他の普通のパン酵母は下等真核宿主微生物のうち最も普通に用いられる。しかしながら、多数の他の属、種および株はここでは通常用いられ、有用である。例えば、Schizosaccharomyces pombe；K. lactis、K. fragilis（ATCC 12,424）、K. bulgaricus（ATCC 16,045）、K. wickeramii（ATCC 24,178）、K. waltii（ATCC 56,500）、K. drosophilae（ATCC 36,906）、K. thermotoleransおよびK. marxiamisなどのKluyveromyces宿主；Pichia pastoris（EP 183,070）；Candid；Trichoderma reesiae（EP 244,234）；Neurospora crassa；Schwanniomyces occidentalisなどのSchwanniomyces；および、例えば、Neurospora、Penicillium、Tolypocladiumなどの糸状菌およびA. nidulansおよびA. nigerなどのAspergillus宿主である。

40

グコシル化抗-V E G F抗体の発現に適した宿主細胞は多細胞生物から誘導される。無脊椎動物細胞の例には、植物および昆虫細胞が含まれる。多数のバキュロウイルス株および

50

変異体および *Spodoptera frugiperda* (イモムシ)、*Aedes aegypti* (カ)、*Aedes albopictus* (カ)、*Drosophila melanogaster* (ミバエ) および *Bombyx mori* などの宿主からの対応許容昆虫宿主細胞が確認されている。転写のための種々のウイルス株が一般に用いられており、例えば、*Autographa californica NPV* の L - 1 変異体および *Bombyx mori NPV* の Bm - 5 株であり、また、そのようなウイルスは本発明のここに記載のウイルスとして用いられ、特に、*Spodoptera frugiperda* 細胞の軽質移入のために用いられる。綿、トウモロコシ、ジャガイモ、大豆、ペチュニア、トマトおよびタバコの植物細胞培養物は宿主として用いることができる。

しかしながら、最も興味深いのは脊椎動物細胞であり、培養(組織培養)での脊椎動物細胞の増殖は常套的方法になっている。有用な哺乳動物宿主細胞株の例は、SV40 (COS-7、ATCC CRL 1651) によって形質転換されたサル腎臓 CV1 系；ひと胎児性腎臓系 (Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)、293 または懸濁培養物中生長のためにサブクローニングされた 293 細胞；幼若ハムスター腎臓細胞 (BHK, ATCC CCL 10)；チャイニーズハムスター卵巣細胞 - DHFR (CHO, Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980))；マウスセルトリ細胞 (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980))；サル腎臓細胞 (CV1 ATCC CCL 70)；アフリカミドリザル腎臓細胞 (VERO-76, ATCC CRL-1587)；ひと頸部癌細胞 (HELA, ATCC CCL 2)；イヌ腎臓細胞 (MDCK, ATCC CCL 34)；牡牛ネズミ肝臓細胞 (BRL 3A, ATCC CRL 1442)；ひと肺細胞 (WI38, ATCC CCL 75)；ひと肝臓細胞 (Hep G2, HB8065)；マウス乳腫癌 (MMT 060562, ATCC CCL 51)；TRI 細胞 (Matherら、Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982))；MRC-5 細胞；FS4 細胞；およびひと肝臓癌系 (Hep G2) である。10 20

宿主細胞は抗 - VEGF 抗体産生のための上記の発現またはクローニングベクターで形質転換され、プロモーター誘導、形質転換体選択、所望の配列をコードする遺伝子増幅に適するように修正された通常の栄養培地中で培養される。

本発明の抗 - VEGF 抗体産生のために用いられる宿主細胞は種々の培地中で培養される。Ham's F10 (Sigma)、最小必須培地 (MEM)、(Sigma)、RPMI-1640 (Sigma) およびダルベコ修正イーグル培地 ((D MEM)、Sigma) などの市販の培地は宿主細胞の培養に適している。さらに、Ham et al., Meth. Enz. 58:44 (1979)、Barnes et al., Anal. Biochem. 102:255 (1980)、米国特許第 4,767,704 号; 4,657,866 号; 4,927,762 号; 4,560,655 号；または 5,122,469 号；WO 90/03430；WO 87/00195；または米国特許 Re. 第 30,985 号記載の培地は宿主細胞の培養培地として用いることができる。これらの培地のいくつかには、必要ならば、ホルモンおよび / または他の成長因子 (インシュリン、トランスフェリンまたは上皮成長因子など)、塩類 (塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウムおよびリン酸塩など)、緩衝液類 (HEPES など) ヌクレオチド類 (アデノシンおよびチミジンなど) 抗生物質 (GENTAMYCIN<sup>TM</sup> 薬剤など)、微量成分 (通常 μモルの範囲の最終濃度で存在する無機化合物として定義)、およびグルコースまたは同等のエネルギー源が補充される。他の必要な補充物が当業者に知られている適当な濃度で含まれる。温度、pH などの培養条件は発現のために用いられた宿主細胞で既に用いられた条件であり、当業者に明らかである。30 40

組換技術を用いるとき、抗体は細胞内、細胞膜周辺腔中に產生されるか、または直接培地中に放出される。抗体が細胞内に產生されるならば、第 1 段階として、宿主細胞または融解フラグメントのいずれかの粒子状の細片が、例えば、遠心分離または限外濾過にて除去される。Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992) は *E. coli* の細胞膜周辺腔に分泌された抗体の分離方法を開示している。要約すれば、細胞ペーストを酢酸ナトリウム (pH 3.5)、EDTA およびフェニルメチルスルホニルフルオリド (PMSF) の存在下約 30 分以上浸漬する。細胞片は遠心分離で除去できる。抗体が培地中に分泌される場合は、発現系からの上清は一般に、最初市販の蛋白濃縮フィルター、例えば、アミコン

またはミルポアペリコン限外濾過ユニットによって濃縮される。PMSFなどの蛋白質分解酵素阻害剤を蛋白質分解阻害のために前の段階のどこかで添加してもよく、また、外来性の混入物の成長を阻害するために抗生物質を添加してもよい。

細胞から產生された抗体組成物は例えば、ヒドロキシルアバタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析およびアフィニティ・クロマトグラフィーを用いて精製することができ、アフィニティ・クロマトグラフィーが精製技術として好ましい。アフィニティリガンドとしてのプロテインAの適合性は、抗体中に存在するイムノグロブリンFcの種類および同位元素によって変化する。プロテインAはひと 1、2 または 4重鎖に基づく抗体の精製に用いることができる (Lindmark et al., J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983) )。プロテインGはすべてのマウス同位元素およびひと 3 に好ましい (Guss et al., E 10 MBO J. 5:1567-1575 (1986) )。アフィニティ・リガンドが結合するマトリックスは多くの場合アガロースであるが、他のマトリックスも使用することができる。調整された細孔ガラスまたはポリ(スチレンジビニル)ベンゼンなどの機械的に安定なマトリックスでは、アガロースがなし得るより、早い流速および短い処理時間が可能である。抗体がC<sub>H</sub>3ドメインを含む場合は、Bakerbond ABX<sup>TM</sup>樹脂 (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ) が精製に好適である。イオン交換カラムでの分離、エタノール沈殿、逆層HPLC、シリカクロマトグラフィー、アニオンまたはカチオン交換樹脂(アスパラギン酸カラム)上のヘパリソセファローズ<sup>TM</sup>クロマトグラフィー、等電点電気泳動、SDS-PAGE、硫酸アンモニウム沈殿などの蛋白質精製のための他の技術もまた、回収する抗体に応じて利用することができる。

何らかの予備的精製段階(複数あり)の後、当該抗体および混入物を、好ましくは低塩濃度(例えば、0-0.25M塩から)で、pH約2.5-4.5の溶出緩衝液を用いて、低pH疎水的相互作用クロマトグラフィーにかける。

### C. 医薬製剤

抗体の治療製剤は、任意の生理学的に許容され得る担体、賦形剤または安定剤とともに所望の精製度を有する抗体を混合して貯蔵のために、凍結乾燥製剤または水溶液の形態に製造される (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980) )。許容され得る担体、賦形剤または安定剤は、レシピエントにとって採用される投与量および濃度で無毒であり、リン酸塩、クエン酸塩および他の有機酸などの緩衝液；アスコルビン酸およびメチオニンを含む抗酸化剤；保存剤(オクタデシルジメチルベンジルアノニウムクロリド、ヘキサメトニウムクロリド、ベンザルコニウムクロリド、ベンゼトニウムクロリド、フェノール、ブチルまたはベンジルアルコールなど；メチルまたはプロピルパラベンなどのアルキルパラベン；カテコール、レゾルシノール、シクロヘキサンノール；3-ペンタノールおよびm-クレゾールなど)；低モル量(約10残基以下)ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、またはイムノグロブリンなどの蛋白質；ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニンまたはリジンなどのアミノ酸；グルコース、マンノース、またはデキストリンを含む单糖類、二糖類、および他の炭水化物；EDTAなどのキレート剤；スクロース、マンニトール、トレハロースまたはソルビトールなどの砂糖類；ナトリウムなどの塩形成対イオン；金属複合体(例えば、Zn-蛋白質複合体)；および/またはTWEEN<sup>TM</sup>、POLYURONICS<sup>TM</sup>またはポリエチレングリコール(PEG)などの非イオン界面活性剤を含む。

本発明の製剤は、治療される具体的な指示の必要性に応じて、1種以上の活性化合物を含むことができ、それらは好ましくは互いに悪影響を与えない補足的な活性を有するものである(下記F項参照)。そのような化合物は意図する目的に効果的な量で適切に組合されて含まれる。

有効成分は、例えば、コアセルベーション技術および界面重合などによって、例えば、それぞれヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチン-マイクロカプセルおよびポリ-(メチルメタアクリレート)マイクロカプセル中に封入され、コロイド薬剤送達システム(例えば、リポソーム、アルブミンマイクロスフィア、マイクロエマルジョン、ナノ-パーテ

10

20

30

40

50

イクルズおよびナノカプセル)またはマクロエマルジョン中封入することができる。このような技術はRemington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)に記載されている。

インビオ投与に用いられる製剤は滅菌する必要がある。これは滅菌濾過膜による濾過によって行うことができる。

徐放性製剤も製造することができる。徐放性製剤の適当な例としては、抗体を含む固体疎水性ポリマーの半透過性材料を含み、この材料は成形粒子、例えば、フィルムまたはマイクロカプセルの形態である。徐放性材料の例としては、ポリエステル、ヒドロゲル(例えば、ポリ(2-ヒドロキシエチル-メタアクリレート)またはポリ(ビニルアルコール))、ポリラクチド(米国特許第3,773,919号)、L-グルタミン酸およびエチル-L-グルタマートの共重合体、非分解性エチレン-ビニルアセテート、Lupron Depot<sup>TM</sup>(米国特許第5534615号に記載の乳酸-グリコール酸コポリマーおよびリウプロリドアセテートから構成される注射可能なマイクロスフィア)およびポリ-D-( - )-3-ヒドロキシラク酸などの分解性乳酸-グリコール酸コポリマーを挙げることができる。エチレン-ビニルアセテートおよび乳酸-グリコール酸などのポリマーは100日間にわたって分子を放出できるが、ある種のヒドロゲルはより短い時間で蛋白質を放出する。カプセル化された抗体は長時間体内にとどまるが、37で水分にさらされると、変性したり凝集したりすることがあり、生物学的活性を損失する。関連するメカニズムに従って安定化のための合理的な方法を案出することができる。例えば、凝集のメカニズムが、チオ-ジスルフィド相互交換による分子間S-S結合形成であることがわかれれば、スルフヒドリル残基の修飾、酸性溶液からの凍結乾燥、水分含有量の調節、適当な添加剤の使用、特異的なポリマー材料組成物の開発によって、安定化を図ることができる。10 20

#### D. 抗体の非治療的用途

本発明の抗体は、アフィニティ精製試剤として用いることができる。この方法では、抗体は当業者に公知の方法を用いてセファデックス樹脂またはろ紙などの固体相に固定化される。固定化された抗体を、精製すべきVEGF蛋白質(またはそのフラグメント)を含む試料と接触させ、ついで、固定化抗体に結合しているVEGF蛋白質以外の試料中のすべての物質を実質的に除去する適当な溶媒で、支持体を洗浄する。最後に、抗体からVEGF蛋白質を分離させる別の適当な溶媒、例えば、グリシン緩衝液、pH5.0、で支持体を洗浄する。30

抗-VEGF抗体はVEGF蛋白質の診断試験にも有用であり、例えば、具体的な細胞、組織、または血清中のVEGF蛋白質の発現を検出することができる。このような診断方法は癌診断に有用である。

診断に適用するために、具体的には抗体を検出可能な分子成分で標識する。一般に下記の群に分類できる多くの標識を用いる:

(a) 放射性同位元素:<sup>35</sup>S、<sup>14</sup>C、<sup>125</sup>I、<sup>3</sup>Hおよび<sup>131</sup>Iなど、抗体は、例えばCurrent Protocols in Immunology, Volumes 1 and 2, Coligan et al., Ed. Wiley-Interscience, New York, New York, Pubs. (1991)に記載の技術を用いて放射性同位元素で標識することができ、放射活性はシンチレーション計数器を用いて測定することができる。

(b) 蛍光標識:希土類キレート(ユーロピウムキレート)またはフルオレセインおよびその誘導体、ローダミンおよびその誘導体、ダンシル、リサミン、フィコエリスリンおよびテキサスレッドなど。蛍光標識は、例えば、Current Protocols in Immunology, supraに記載の技術を用いて抗体に結合させることができる。蛍光度は蛍光光度計を用いて定量することができる。40

(c) 種々の酵素-基質標識を用いることができ、米国特許第4,275,149号はこれらのいくつかの概説を記載している。酵素は一般に、色素生産性基質の化学変化を触媒し、これは種々の技術を用いて測定することができる。例えば、酵素は基質の色素変化を触媒し、これは、分光光度的に測定することができる。別法として、酵素は基質の蛍光または化学発光を変化させることができる。蛍光の変化を定量する技術は上記の通りである。化学発光基質は化学反応によって電気的に励起させられ、ついで(例えば、化学発光測50

定計を用いて) 測定可能な光を放出するか、または蛍光受容体にエネルギーを与える。酵素標識の例としてはルシフェラーゼ(例えば、ホタルルシフェラーゼおよび細菌性ルシフェラーゼ；米国特許第4,737,456号)、ルシフェリン、2,3-ジヒドロフラジンジオン、マレートデヒドログナーゼ、ウレアーゼ、西洋わさびペルオキシダーゼ(HRPO)などのペロキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、-ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、サッカリドオキシダーゼ(例えば、グルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼおよびグルコース-6-ホスファートデヒドログナーゼ)、複素環オキシダーゼ(ウリカーゼおよびキサンチンオキシダーゼなど)、ラクトペロキシダーゼ、マイクロペロキシダーゼなどが含まれる。酵素を抗体に結合させる技術はO'Sullivan et al., Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay, in Methods in Enzym. (ed J. Langone & H. Van Vunakis), Academic press, New York, 73:147-166(1981)に記載されている。  
10

酵素-基質の組合せの例は、例えば、

(i) 基質としてヒドロゲンペルオキシダーゼと西洋わさびペルオキシダーゼ(HRPO)、ここではヒドロゲンペルオキシダーゼは色素前駆体(例えば、オルトフェニレンジアミン(OPD)または3,3',5,5'-テトラメチルベンジジンヒドロクロリド(TMNB))を酸化し；

(ii) 色素生産性基質としてパラ-ニトロフェニルホスファートとアルカリホスファターゼ(AP)；および

(iii) -D-ガラクトシダーゼと、色素生産性基質(例えば、p-ニトロフェニル-D-ガラクトシダーゼ)または蛍光発生的基質、4-メチルウンベリフェリル--D-ガラクトシダーゼ  
20

が挙げられる。

多くの他の酵素-基質の組み合わせを当業者は利用することができる。これらの一般的な概説については、米国特許第4,275,149号および第4,318,980号参照。

標識は時には抗体と間接的に結合される。当業者はこれを実現するための種々の技術を知っている。例えば、抗体はビオチンと結合させることができ、上記の3種の広範なカテゴリーの標識物のいくつかはアビジンと結合させることができ、またその逆も可能である。ビオチンは選択的にアビジンに結合し、かくして、標識物は抗体と間接的に結合することができる。標識物と抗体の間接的結合を行うために、別法として、抗体は小さいハプテン(例えば、ジゴキシン)と結合し、上記の別の種類の標識物の1つが抗-ハプテン抗体(例えば、抗-ジゴキシン抗体)と結合する。かくして、標識物と抗体の間接的結合が実現される。  
30

本発明の別の態様では、抗-VEGF抗体は標識される必要がなく、その存在はVEGF抗体に結合している標識抗体を用いて検出され得る。

本発明の抗体は公知の試験方法、競合的結合試験法、直接および間接サンドイッチ法および免疫沈降試験法に用いられ得る。Zola, Monoclonal Antibodies:A Manual of Techniques, pp.147-158(CRC Press, Inc. 1987)

競合的結合試験法は、限定量の抗体に対する結合について、被験試料分析物と競争する標識標準物の能力に依存するものである。被験試料中のVEGF蛋白質の量は抗体に結合している標準物の量に逆比例する。結合している標準物の量の測定を容易にするために、抗体は一般に、競合前に不溶化され、抗体に結合している標準物と分析物は都合よく、未結合のままの標準物と分析物から分離され得る。  
40

サンドイッチ法は2個の抗体の利用を含み、それぞれは、検出されるべき蛋白質の異なる免疫原性部分、またはエピトープに結合し得る。サンドイッチ法では、被験試料分析物は、固体支持体に固定化された第1の抗体に結合し、その後、第2の抗体が分析物に結合し、かくして、不溶性の3個の複合体を形成する。米国特許第4,376,110号参照。第2の抗体はそれ自体検出可能な分子成分で標識され得るか(直接サンドイッチ法)、または、検出可能な分子成分で標識されている抗-イムノグロブリン抗体を用いて測定され得る(間接サンドイッチ法)。例えば、サンドイッチ法の1種はELISA法であり、こ  
50

こでは検出可能な分子成分は酵素である。

免疫組織化学については、腫瘍試料は新鮮か、冷凍されているか、またはパラフィン中に包埋されており、例えば、ホルマリンなどの保存剤で固定することができる。

抗体はインビオ診断試験にも用いられる。一般に、抗体は放射性核種 ( $^{111}\text{In}$ 、 $^{99}\text{Tc}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{3}\text{H}$ 、 $^{32}\text{P}$  または  $^{35}\text{S}$  など) で標識されており、免疫シンチノグラフィーにより、癌部位を特定することができる。

#### E . 診断キット

便利さからいえば、本発明の抗体はキット、すなわち、診断試験を行うための指示書とともに予め定められた量の試剤の包装された組合せ、で提供することができる。抗体が酵素で標識されている場合は、キットは基質と酵素に必要な共同因子（例えば、検出可能な発色団または蛍光団を提供する基質前駆体）を含む。さらに、安定化剤、緩衝液（遮断緩衝液または溶解緩衝液）などの他の添加物を含んでいてもよい。種々の試剤の相対的な量は実質的に試験法を最適化する試剤の溶液濃度を提供するために大きく変化する。具体的には、試剤は、通常は凍結乾燥されている乾燥粉末として提供され、溶解時に試剤に適当な濃度になるように賦形剤を含む。

#### F . 抗体の治療的用途

治療的用途については、本発明の抗 - V E G F 抗体は、上記で検討した形態などの医薬的に許容され得る投与形態で、哺乳動物、好ましくはひと、に投与される。それらには、大量瞬時投与としてひとに静脈内、ある期間にわたる連続的点滴、筋肉内、腹腔内、脳脊髄内、皮下、関節内、滑膜内、くも膜下腔内、経口的、局所的、または吸入経路により投与されるものを含む。抗体はまた、腫瘍内、腫瘍周囲、病巣内、または病巣周囲経路より適切に投与され、局所および全身の治療効果を発揮する。例えば、卵巣腫瘍治療には、腹腔内経路は特に有効である。

疾患の予防および治療のために、抗体の適当な投与量は、上記で定義された治療されるべき疾患の種類、疾患の重篤性および疾患、抗体が予防的または治療的目的で投与されるかどうか、以前の治療、患者の病歴、抗体への応答および担当医の処方などにより変化する。抗体は一度にまたは一連の治療中に患者に適切に投与される。

抗 - V E G F 抗体は種々の腫瘍性または非腫瘍性疾患または障害の治療に有用である。治療可能な腫瘍および関連症状には、乳癌、肺癌、胃癌、食道癌、結腸直腸癌、肝臓癌、卵巣癌、きょう膜癌、男性胚腫、子宮頸癌、子宮体癌、子宮体過形成、子宮内膜症、線維肉腫、絨毛癌、頭部および頸部癌、上咽頭癌、喉頭癌、肝芽腫、カボジ肉腫、メラノーマ、皮膚癌、血管腫、空洞性血管腫、血管芽腫、脾臓癌、網膜芽細胞腫、星細胞腫、グリア芽細胞腫、シュワン細胞腫、乏突起細胞腫、髓芽腫、神経芽腫、横紋筋肉腫、骨原性肉腫、平滑筋肉腫、尿路腫、甲状腺腫、ウイルムス腫瘍、腎細胞腫、前立腺腫、母斑症関連異常性血管増殖症、浮腫（脳腫瘍と関連など）およびメイグ症候群が含まれる。

治療可能な非腫瘍症状には、関節リウマチ、乾癬、アテローム性動脈硬化症、未熟網膜症を含む糖尿病性および増殖性網膜症、水晶体後線維増殖症、新生血管緑内障、年齢関連性黄斑変性症、甲状腺過形成（グレイブス病を含む）、角膜および他の組織移植、慢性炎症、肺炎症、ネフローゼ症候群、子癇前症、腹水、心嚢貯留液（心外膜炎と関連する）、および胸水などが含まれる。

年齢関連性黄斑変性症（A M D）は老年世代の重篤な視覚損傷の主たる原因である。A M D の浸出性態様は脈絡叢の新血管新生および網膜色素上皮細胞剥離に特徴がある。脈絡叢の新血管新生は予後の劇的な悪化に関係する。本発明のV E G F 抗体はA M D の重篤性の軽減に特に有効なことが期待される。

疾患の種類および重篤性に従って、抗体の約  $1\text{ }\mu\text{g}/\text{kg}$  から約  $50\text{ }\mu\text{g}/\text{kg}$ （例えば、 $0.1 - 20\text{ mg}/\text{kg}$ ）が患者に対する最初の候補投与量であり、例えば、1回または数回に分けて、または連続的注入のいずれかにより投与される。典型的な1日または1週の投与量は約  $1\text{ }\mu\text{g}/\text{kg}$  から約  $20\text{ mg}/\text{kg}$  またはそれ以上であり、上記因子により変化する。数日またはそれより長くにわたる反復投与については、症状により、所望の疾患抑制の兆候が生じるまで治療がくり返される。しかし、他の投与計画も有効である。治療の経過は、通

10

20

30

40

50

常の技術および試験、例えば、X線撮影腫瘍画像により容易に観察される。

本発明の他の態様では、疾患の予防および治療における抗体の有効性は連続的に抗体を投与するか、それらの目的に有効な他の試剤、例えば、腫瘍壊死因子(TNF)、酸性または塩基性線維芽細胞成長因子(FGF)または肝細胞成長因子(HGF)の血管形成活性を阻害または中和し得る抗体、組織因子の血液凝固活性を阻害または中和し得る抗体、プロテインC、またはプロテインS(Esmon et al., 1991年2月21日に刊行されたPCT特許出願公開番号WO 91/01753)、HER2受容体に結合し得る抗体(Hudziak et al., 1989年7月27日に刊行されたPCT特許出願公開番号WO 89/06692参照)、または1またはそれ以上の常套的治療剤、例えば、アルキル化剤、葉酸アンタゴニスト、核酸代謝の代謝拮抗剤、抗生物質、ピリミジン類似体、5-フルオロウラシル、シスプラチニン、プリンヌクレオシド、アミン、アミノ酸、トリアゾールヌクレオシド、またはコルチコステロイドなどと組合せて投与される。このような他の試剤は投与される組成物中に含まれていてもよいし、別に投与することもできる。また、抗体は連続的に、または放射線照射または放射性物質などの何であれ放射線医学治療と組合せて適当に投与することもできる。

1つの態様において、腫瘍の血管新生は組み合わせ処置で治療する。抗体および1またはそれ以上の他の抗-VEGF抗体を、例えば、腫瘍の壊死またはもしあれば、その転移巣が診られることによって定められた治療的有効量を腫瘍患者に投与する。この治療はそれ以上の有利な効果が観察されなくなるか、臨床試験が腫瘍またはその転移巣の痕跡を示さなくなるまで継続される。TNFが投与されるとき、単独または、-、-、-インターフェロン、抗-HER2抗体、ヘレグリン(heregulin)、抗-ヘレグリン抗体、D-因子、インターロイキン-1(IL-1)、インターロイキン-2(IL-2)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)または、例えば、抗-プロテインC抗体、抗-プロテインS抗体、またはC4b結合蛋白質(Esmon et al., 1991年2月21日に刊行されたPCT特許出願公開番号WO 91/01753)などの腫瘍の微小血管凝集を促進する薬剤などの補助剤、または加熱または照射と組合せて投与される。

補助剤はその有効性が変化するから、常套手段で材料スクリーニングによって腫瘍に対する影響を比較するのが好ましい。抗-VEGF抗体およびTNFの投与は所望の臨床的效果が達成されるまで繰り返す。別法として、抗-VEGF抗体はTNFおよび、所望により、補助剤とともに投与される。固体腫瘍が四肢または他の全身循環から分離しやすい部位に発見された場合、ここに記載の治療剤が隔離された腫瘍または組織に投与される。他の態様において、抗-FGFまたは抗-PDGFB中和抗体などのFGFまたは血小板由来成長因子(PDGFB)アンタゴニストを、抗-VEGF抗体と組み合わせて患者に投与する。抗-VEGF抗体での治療は所望により、傷の治癒または望ましい血管新生の期間中継続される。

#### G. 製造部材

本発明の他の態様は、上記の疾患の処置に有用な材料を含む製造部材を提供する。製造部材は容器およびラベルを含む。適切な容器には、例えば、ピン、バイアル、シリング、および試験管が含まれる。容器は、ガラスまたはプラスチックなどの種々の材料から製造される。容器には、症状を処置するのに有効な組成物が入っており、無菌の出入口を有する(例えば、容器は静脈溶液袋であるか、または皮下注射針によって突き刺し可能な栓のあるバイアルであってもよい)。組成物中の活性薬剤は抗-VEGF抗体である。容器上またはそれに関連して、ラベルは、組成物が特定の症状の治療のために用いられる事を示す。製造部材はさらに、リン酸緩衝食塩水、リングル液およびブドウ糖溶液などの医薬的に許容され得る緩衝溶液を含む第2の容器を含んでいてもよい。さらに、他の緩衝液、希釈液、フィルター、針、注射筒および使用説明書とともに包装挿入物を含む、市場および使用者の立場から望ましい他の材料を含んでいてもよい。

#### 実施例1

この実施例は、治療上の観点から望ましい特性を有するヒト化抗VEGFの製造を記載する。

10

20

30

40

50

## 材料および方法

ネズミ A 4 . 6 . 1 M A b のクローニングおよびマウス - ヒトキメラ F a b の構築：  
ネズミ抗 V E G F M A b A 4 . 6 . 1 は、Kimら, Growth Factors 7:53 (1992) および Kimら, Nature 362:841 (1993) に以前記載された。全 R N A を、RNAsol ( T E L - T E S T ) を用いて、抗 V E G F M A b A 4 . 6 . 1 を産生するハイブリドーマ細胞から単離し、オリゴ - d T プライマーおよび SuperScript II システム ( G I B C O B R L , Gaithersburg, MD ) を用いて c D N A へ逆転写した。抗体の軽鎖および重鎖の N 末端アミノ酸配列に基づいて縮重オリゴヌクレオチドプライマープールを合成し、フォワードプライマーとして使用した。リバースプライマーは、ネズミ軽鎖サブグループ k V および重鎖サブグループ I I から得られたフレームワーク 4 配列に基づいた ( Kabat ら, Sequences of Proteins of Immunological Interest. 第 5 版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991) )。ポリメラーゼ連鎖反応 ( P C R ) 増幅の後、D N A 断片を T A クローニングベクター ( Invitrogen, San Diego, CA ) にライゲーションした。軽鎖および重鎖それぞれの 8 個のクローナンを配列決定した。軽鎖 V L ドメインのコンセンサス配列を有する 1 つのクローナンおよび重鎖 V H ドメインのコンセンサス配列を有する 1 つのクローナンを、ヒト C L および C H 1 ドメインを含む p E M X 1 ベクター ( Wether, J. Immunol. 157:4986-4995 (1996) ) にそれぞれサブクローニングし、マウス - ヒトキメラを作成した。このキメラ F ( a b ) は、アミノ酸 S e r H 1 1 3 でヒト C H 1 ドメインに融合した全ネズミ A 4 . 6 . 1 V H ドメインとアミノ酸 L y s L 1 0 7 でヒト C L ドメインに融合した全ネズミ A 4 . 6 . 1 V L ドメインから構成された。キメラ F ( a b ) の発現と精製は、ヒト化 F ( a b ) の発現と精製と同じであった。キメラ F ( a b ) を結合アッセイの標準として用いた。

ネズミおよびヒト化 F ( a b ) のコンピューターグラフィックスモデル： V L および V H ドメインの配列 ( 図 1 A および図 1 B ) を、ネズミ A 4 . 6 . 1 V L - V H ドメインのコンピュータグラフィックスモデルの構築に使用した。このモデルは、どのフレームワーク残基をヒト化抗体に導入すべきかを決めるために使用した。ヒト化 F ( a b ) のモデルも、ネズミフレームワーク残基の正確な選択を確かめるために構築した。モデルの構築は、以前に記載されたように行った ( Carter ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285-4289 (1992) および Eigenbrot ら, J. Mol. Biol. 229:969-995 (1993) )。

ヒト化 F ( a b ) の構築：突然変異誘発および E. coli における F ( a b ) の発現に使用したプラスミド p E M X 1 は、以前に記載された ( Werther ら, 前掲)。簡潔にいえば、このプラスミドには、コンセンサスヒト k サブグループ I 軽鎖 ( V L k I - C L ) およびコンセンサスヒトサブグループ I I I 重鎖 ( V H I I I - C H 1 ) をコードする D N A フラグメントとアルキルホスファターゼプロモーターが含まれている。 V L および V H のコンセンサス配列の使用は、以前に記載されている ( Carter ら, 前掲)。

ヒト化 A 4 . 6 . 1 の第 1 F ( a b ) 変異体、 F ( a b ) - 1 を構築するために、 p E M X 1 のデオキシリジン含有テンプレートで部位特異的突然変異誘発を行った ( Knolle ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488-492 (1985) )。Kabat ら, 前掲にしたがって 6 個の C D R をネズミ A 4 . 6 . 1 配列に変えた。したがって、 F ( a b ) - 1 は 6 つの完全なネズミ C D R 配列を有する完全なヒトフレームワーク ( V L k サブグループ I および V H サブグループ I I I ) から構成された。他のすべての F ( a b ) 変異体のためのプラスミドは、 F ( a b ) - 1 のプラスミドテンプレートから構築した。 2 本鎖および 1 本鎖 D N A を調製するために、プラスミドを E. coli X L - 1 B l u e 株 ( Stratagene, San Diego, CA ) へ形質転換した。各変異体について、軽鎖および重鎖をコードする D N A は、ジデオキシヌクレオチド法 ( Sequenase, U.S. Biochemical Corp. Cleveland, OH ) を用いて完全に配列決定した。プラスミドを、 M M 2 9 4 の誘導体である、 E. coli 1 6 C 9 株に形質転換し、 5 0 μ g / m L のカルベニシリンを含む Luria ブロスプレートに蒔き、タンパク質の発現について单一のコロニーを選択した。单一のコロニーは、 5 m L の Luria ブロス - 1 0 0 m g / m L カルベニシリン中で、 5 ~ 8 時間 3 7 ℃ にて培養した。この培養液 5 m L を、 5 0 0 m L の A P 5 - 5 0 μ g / m L カルベニシリンに加え、 4 L の Ba

10

20

20

30

40

40

50

ffled振盪フラスコ中 30 ℃ にて 20 時間培養した。AP5 培地は、以下よりなる：1. 5 g グルコース、11.0 g Hycase SF、0.6 g 酵母抽出物（保証）、0.19 g MgSO<sub>4</sub>（無水）、1.07 g NH<sub>4</sub>Cl、3.73 g KC1、1.2 g NaCl、120 mL の 1 M トリエタノールアミン（pH 7.4）を 1 L の水に溶解し、0.1 mM の Sealkeen フィルターで滅菌濾過する。1 L の遠心管中で細胞を 3000 × g で遠心し、上清を除いて細胞を回収した。1 時間凍結した後、ペレットを冷却した 10 mM Tris - 1 mM EDTA - 20% スクロース（pH 8.0）25 mL に再懸濁した。タンパク質分解を阻害するために 250 mL の 0.1 M ベンズアミジン（Sigma, St.Louis, MO）を加えた。氷上で穏やかに 3 時間攪拌した後、試料を 40,000 × g で 15 分間遠心した。次いで、上清を、10 mM Tris - 1 mM EDTA（pH 7.5）で平衡化したプロテイン G - セファロース CL - 4 B（Pharmacia, Uppsala, Sweden）カラム（ベッド体積 0.5 mL）に注いだ。カラムを 10 mL の 10 mM Tris - 1 mM EDTA（pH 7.5）で洗浄し、3 mL の 0.3 mM グリシン（pH 3.0）で溶出し、1.25 mL の 1 M Tris（pH 8.0）にとった。次いで、F(ab) を、Centricon - 30（Amicon, Beverly, MA）を使用して PBS に緩衝液交換し、最終体積 0.5 mL に濃縮した。すべての F(ab) の SDS-PAGE ゲルを行って純度を確かめ、各変異体の分子量をエレクトロスプレー質量分析により確かめた。

キメラおよびヒト化 IgG の構築および発現：キメラおよびヒト化された A4.6.1 のヒト IgG1 変異体（chIgG1 および huIgG1）の作製のために、適当なネズミまたはヒト化された VL および VH（F(ab) - 12、表 2）ドメインを、別個の、以前に記載された pRK ベクター（Eatonら, Biochemistry 25:8343-8347 (1986)）にサブクローニングした。各変異体の全軽鎖および全重鎖をコードする DNA をジデオキシヌクレオチド配列決定によって確かめた。

変異体の一過性発現のために、重鎖および軽鎖プラスミドを、高効率法（Gormanら, DNA Prot. Eng. Tech. 2:3-10 (1990)）を用いて、ヒト 293 細胞（Grahamら, J. Gen. Virol. 36: 59-74 (1977)）に同時トランスフェクトした。培地を血清不含培地に変え、5 日目まで毎日回収した。プロテイン A - セファロース CL - 4 B（Pharmacia）を用いて、プールした上清から抗体を精製した。溶出した抗体を、Centricon - 30（Amicon）を使用して PBS に緩衝液交換し、0.5 mL に濃縮し、Millipore-GV (Millipore, Bedford, MA) を用いて滅菌濾過し、4 ℃ にて保存した。

最終のヒト化 IgG1 変異体（rhumaMAbVEGF）の安定な発現のために、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞を、重鎖および軽鎖の両方を同時発現させるために設計したジストロニック（dicistronic）ベクター（Lucasら, Nucleic Acid Res. 24:1774-79 (1996)）によりトランスフェクトした。プラスミドを、L. Chasin（コロンビア大学）により開発された CHO - K1 DUXB11 細胞系の固有誘導体である DP12 細胞に、リポフェクションにより導入し、GHT 不含培地での生育について選択した（Chisholm, V. High efficiency gene transfer in mammalian cells. In: Glover, DM, Hames, B D. DNA Cloning 4. Mammalian systems. Oxford Univ. Press. Oxford pp 1-41 (1996)）。約 20 個の未増幅クローンをランダムに選択し、96 ウェルプレートに再び加えた。各コロニーの比特異的産生能力を ELISA を用いてモニターし、3 日後に各ウェルに蓄積した完全長のヒト IgG およびウェルあたりの生存細胞数の代理マーカーとしての蛍光染料 Calcien AM を定量した。これらのデータに基づいて、いくつかの未増幅クローンを、増加する濃度のメトトレキセートの存在下でさらに増幅するために選択した。10、50 および 100 nM メトトレキセートで生存した個々のクローンを選択して、産生能力スクリーニングのために 96 ウェルプレートに移した。再現的に高い特異的産生能力を示した 1 つのクローンを T - フラスコ中で増殖させ、攪拌培地に接種するために使用した。数回継代した後、懸濁液に順応させた細胞を、種々のホルモンとタンパク質加水分解物を添加した、GHT 含有、血清不含培地中で製造培地に接種するために使用した。rhumaMAb VEGF を含む回収した培養細胞液を、プロテイン A - セファロース CL - 4 B を用いて精製した。この工程後の純度は約 99 % であった。次いで、単一にするためイオン交換ク

10

20

30

40

50

ロマトグラフィー工程を用いて精製を行った。最終の精製された抗体の内毒素含量は、<0.10 e u / m g であった。

F ( a b ) および I g G 定量：F ( a b ) 分子を定量するため、E L I S A プレートを 50 mM の炭酸塩緩衝液 ( p H 9 . 6 ) 中、2  $\mu$  g / mL ヤギ抗ヒト I g G F a b ( Organon Teknika, Durham, NC ) で 1 晩 4 h にてコーティングし、P B S - 0 . 5 % ウシ血清アルブミン ( ブロッキング緩衝液 ) で室温にて 1 時間ブロックした。標準 ( 0 . 78 ~ 50 ng / mL ヒト F ( a b ) ) は、Chemicon ( Temecula, CA ) より購入した。P B S - 0 . 5 % ウシ血清アルブミン - 0 . 05 % ポリソルベート 20 ( アッセイ緩衝液 ) 中の試料の希釈列を、プレート上で 2 時間インキュベーションした。結合した F ( a b ) を、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識したヤギ抗ヒト I g G F ( a b ) ( Organon Teknika ) を使用し、次いで、3 , 3' , 5 , 5' - テトラメチルベンジジン ( Kirkegaard & Perry Laboratories, Geithersburg, MD ) を基質として検出した。プレートは工程の間で洗浄した。  
10

450 nm での吸収を、V max プレートリーダー ( Molecular Devices, Menlo Park, CA ) で読み取った。標準曲線を 4 パラメーター非線形回帰曲線適合プログラムを使用して適合させた。標準曲線の範囲に入ったデータ点を、試料の F ( a b ) 濃度の計算に使用した。完全長抗体の濃度は、捕捉用のヤギ抗ヒト I g G F c ( Cappei, Westchester, PA ) および検出用の西洋ワサビペルオキシダーゼ標識したヤギ抗ヒト F c ( Cappei ) を使用して測定した。ヒト I g G 1 ( Chemicon ) を標準として使用した。

V E G F 結合アッセイ：F ( a b ) の V E G F 結合活性を測定するため、E L I S A プレートを、ヒト I g G F c に対するウサギ F ( a b ' )<sub>2</sub> ( Jacson Immuno Research, West Grove, PA ) 2  $\mu$  g / mL でコーティングし、ブロッキング緩衝液 ( 上記 ) でブロックした。ブロッキング緩衝液中に 3 ng / mL の K D R - I g G ( Parkら, J. Biol. Chem. 269:25646-25645 ( 1994 ) ) を含む希釈状態の培地を、1 時間プレート上でインキュベーションした。標準 ( 6 . 9 ~ 440 ng / mL キメラ F ( a b ) ) および試料の 2 倍希釈列を、2 nM のビオチン化 V E G F と試験管中 1 時間インキュベーションした。次いで、試験管から溶液を E L I S A プレートに移し、1 時間インキュベーションした。洗浄後、K D R に結合したビオチン化 V E G F を西洋ワサビペルオキシダーゼ標識したストレプタビジン ( Zymed, South San Francisco, CA または Sigma, St. Louis, MO ) を使用し、次いで、3 , 3' , 5 , 5' - テトラメチルベンジジンを基質として検出した。滴定曲線を 4 パラメーター非線形回帰曲線適合プログラム ( KaleidaGraph, Synergy Software, Reading PA ) を使用して適合させた。標準の滴定曲線の吸収の中点に対応する F ( a b ) 変異体の濃度を計算した後、標準の滴定曲線の吸収の中点に対応する標準の濃度で割る。完完全長 I g G についてのアッセイは、アッセイ緩衝液が 10 % ヒト血清を含むこと以外は F ( a b ) についてのアッセイと同じであった。  
20

BIAcore<sup>TM</sup>バイオセンサーアッセイ：ヒト化およびキメラ F ( a b ) の V E G F 結合を、BIAcore<sup>TM</sup>バイオセンサー ( Karlssonら, Methods: A Comparison to Methods in Enzymology 6:97-108 ( 1994 ) ) を用いて比較した。F ( a b ) の濃度を、定量的アミノ酸解析により測定した。製造元 ( Pharmacia ) の説明書にしたがって、C M - 5 バイオセンサーチップに V E G F を 1 級アミン基を介してカップリングした。オフレート ( off-rate ) キネティックスは、F ( a b ) によりチップを飽和した後 ( 2  $\mu$  M F ( a b ) 35  $\mu$  L を流速 20  $\mu$  L / mL で ) 、緩衝液 ( P B S - 0 . 05 % ポリソルベート 20 ) に交換することにより測定した。0 ~ 4500 秒のデータ点を、オフレートキネッティック解析に使用した。解離速度定数 ( k<sub>off</sub> ) を時間に対する 1 n ( R<sub>0</sub> / R ) のプロットの傾きから求めた。ここで R<sub>0</sub> は、t = 0 におけるシグナルであり、R は各時間でのシグナルである。  
30

オンレート ( on-rate ) キネティックスは、F ( a b ) の 2 倍希釈系列 ( 0 . 0625 ~ 2 mM ) を使用して測定した。傾き K<sub>s</sub> は、ファルマシアバイオセンサーマニュアルに記載された BIAcore<sup>TM</sup> キネティックス評価ソフトウェアを使用して、各 F ( a b ) 濃度についての時間に対する 1 n ( - d R / d t ) のプロットから求めた。R は、時間 t におけるシグナルである。80 秒と、168、148、128、114、102、および 92 秒との間のデータを、それぞれ 0 . 0625 、 0 . 125 、 0 . 25 、 0 . 5 、 1 および 2 m  
40

MのF(a b)について使用した。会合速度定数( $k_{on}$ )を、K<sub>s</sub>対F(a b)濃度プロットの傾きから求めた。各サイクルの終わりで、50 mM H C l 5 μLを、20 μL/分の流速で注入してチップを再生することにより、結合したF(a b)を取り除いた。

内皮細胞増殖活性：ウシ副腎皮質由来毛細内皮細胞を、10%胎児血清、2 mMグルタミンおよび抗生物質を加えた低グルコースDulbecco修飾Eagle培地(DMEM)(GIBCO)(生育培地)の存在下に、本質的に以前に記載されたように(Leungら, Science 246:1306-1309(1989))培養した。マイトジェニックアッセイのために、内皮細胞を、6ウェルプレートに、生育培地中ウェルあたり $6 \times 10^3$ 細胞の密度で加えた。次いで、muM Ab VEGF A4.6.1またはrh muM Ab VEGFを、1~5000 ng/mLの範囲の濃度で加えた。2~3時間後、精製した、E. coli発現させたrh VEGF 165を加えて最終濃度3 ng/mLとした。特異性の対照として、各抗体を、内皮細胞に5000 ng/mLの濃度で、単独でまたは2 ng/mL bFGFの存在下に加えた。5または6日後、細胞をトリプシンにさらすことにより解離し、Coulterカウンター(Coulter Electronics, Hialeah, FL)により計数した。平均からの変動は、10%を越えなかつた。4パラメーター曲線適合プログラム(KaleidaGraph)によってデータを解析した。

インビボ腫瘍試験：ヒトA673横紋筋肉腫細胞

(ATCC; CRL 159)

8) を10%ウシ胎児血清、2 mM グルタミンおよび抗生物質を加えたDME

M/F12 (Kimら, Nature 362:841-844(1993)およびBorgstömら, Cancer Res.

20

56: 4032-4039(1996))

中で、以前に記載されたとおりに培養した。6~10週齢の雌性BALB/cヌードマウスに、 $2 \times 10^6$ の腫瘍細胞を背面部に200 μLの容量で皮下注射した。次いで、動物をmuM Ab VEGF A4.6.1、rh muM Ab VEGF、またはgp120タンパク質を標的とする対照MAb (Kimら, Nature 362:841(1993))で処置した。両方の抗VEGF MAbを、用量0.5および5 mg/kgで投与し、対照MAbは用量5 mg/kgで投与した。各MAbを100 μLの容量で週2回腹腔内投与し、腫瘍細胞接種後24時間後から開始した。各群を10匹で構成した。腫瘍の大きさを週ごとに計測した。腫瘍細胞接種後4週間目で、動物を安楽死させ、腫瘍を取り出して計量した。統計的解析をANOVAにより行った。

### 結果

ヒト化：ヒト重鎖サブグループIIおよび軽鎖サブグループk Iのコンセンサス配列をヒト化のためのフレームワークとして使用した(Kabatら, 前掲)(図1Aおよび図1B)。このフレームワークは、他のネズミ抗体のヒト化に都合良く使用されてきた(Wertherら, 前掲、Carterら, 前掲、Prestaら, J. Immunol. 151:2623-2632(1993); およびEigenbrotら, Proteins 18:49-62(1994))。CDR-H1は、残基H26-H35を含んでいた。他のCDRは、Kabatら, 前掲にしたがった。すべてのヒト化変異体を最初に作成し、E. coli内で発現したF(a b)として結合についてスクリーニングした。500 mL振盪フラスコからの典型的な収量は、0.1~0.4 mg F(a b)であった。

キメラF(a b)を結合アッセイの標準として使用した。初代変異体、F(a b)-1では、CDR残基はネズミ抗体からヒトフレームワークに転換されており、ネズミおよびヒト化されたF(a b)のモデルに基づけば、H49番の残基(ヒトではA1a)はネズミのG1yに変わっていた。さらに、キメラ重鎖/F(a b)-1軽鎖からなるF(a b)(F(a b)-2)、およびF(a b)-1重鎖/キメラ軽鎖からなるF(a b)(F(a b)-3)を作成し、結合について試験した。F(a b)-1は、キメラF(a b)から換算して1,000倍よりも大きな結合親和性を示した(表2)。F(a b)-2とF(a b)-3の結合親和性の比較は、結合を増強させるためにF(a b)-1 VHドメインのフレームワーク残基を変える必要があることを示唆した。

30

40

表2：ヒト化抗VEGF F(ab)変異体のVEGFへの結合<sup>a</sup>

変異体	テンプレート	変更 <sup>b</sup>	目的	EC50F(ab)-X		
				EC50キメラ F(ab) <sup>c</sup>		
				平均	S.D.	N
chim-F(ab)	キメラF(ab)			1.0		
F(ab)-1	ヒトFR		ストレートCDRスワップ AlaH49 <u>Gly</u>	>1350		2
F(ab)-2			キメラ軽鎖 F(ab)-1重鎖	>145		3
F(ab)-3			F(ab)-1軽鎖 キメラ重鎖	2.6	0.1	2
F(ab)-4	F(ab)-1	ArgH71 <u>Leu</u> AsnH73 <u>Thr</u>	CDR-H2コンーメーション フレームワーク	>295		3
F(ab)-5	F(ab)-4	LeuL46 <u>Val</u>	VL-VH界面	80.9	6.5	2
F(ab)-6	F(ab)-5	LeuH78 <u>Ala</u>	CDR-H1コンーメーション	36.4	4.2	2
F(ab)-7	F(ab)-5	IleH69 <u>Phe</u>	CDR-H2コンーメーション	45.2	2.3	2
F(ab)-8	F(ab)-5	IleH69 <u>Phe</u> LeuH78 <u>Ala</u>	CDR-H1コンーメーション CDR-H2コンーメーション	9.6	0.9	4
F(ab)-9	F(ab)-8	<u>Gly</u> H49Ala	CDR-H2コンーメーション	>150		2
F(ab)-10	F(ab)-8	AsnH76 <u>Ser</u>	フレームワーク	6.4	1.2	4
F(ab)-11	F(ab)-10	LysH75 <u>Ala</u>	フレームワーク	3.3	0.4	2
F(ab)-12	F(ab)-10	ArgH94 <u>Lys</u>	CDR-H3コンーメーション	1.6	0.6	4

<sup>a</sup> 抗VEGF F(ab)変異体をビオチン化VEGFとインキュベーションした後、KDR-IgG (Parkら、前掲) でコーティングしたELISAプレートに移した。

<sup>b</sup> ネズミの残基に下線を付した。残基の番号は、Kabatら、前掲にしたがった。

<sup>c</sup> 平均および標準偏差は、独立したアッセイの各々について計算した比率の平均である。キメラF(ab)についてのEC50は、 $0.049 \pm 0.013 \text{ mg/mL}$  ( $1.0 \text{ nM}$ ) であった。

F(ab)-4において、ヒトの残基H71およびH71を、それらが対応するネズミの残基にえることにより、結合は4倍改善された(表2)。ネズミおよびヒト化F(ab)のモデルの観察は、VL-VH界面で隠れ、CDR-H3と相互作用している残基L46は(表2)、CDR-H3のコンーメーションの決定および/またはVLとVHドメインの関係に対する影響のいずれかにおいて役割を担っているかもしれないということを示唆した。L46でヒトのLeuをネズミのValに交換したとき(F(ab)-5)、結合アフィニティーは、ほぼ4倍増加した(表2)。他の3つの隠れたフレームワーク残基: H49、H69およびH78を分子モデルに基づいて評価した。H69の位置は、CD

10

20

30

40

50

R - H 2 のコンフォメーションに影響を与えるが、H 7 8 の位置は C D R - H 1 のコンフォメーションを変え得る(図2)。それを個々にヒトからネズミの対応残基に変更したとき、結合は、それぞれの場合において(F(a b) - 6 および F(a b) - 7、表2)2倍改善された。両方を同時に変えたとき、結合における改善は8倍であった(F(a b) - 8、表2)。残基H 4 9 は元々、ネズミではG 1 yとして含まれていた。ヒトのコセンサス対応残基のA 1 aに変えたとき、結合は15倍減少した(F(a b) - 9、表2)。

F(a b) - 1 0 および F(a b) - 1 1 では、フレームワークループ3、即ちF R - 3 内の2つの残基をそれらのネズミの対応残基に変えた: A s n H 7 6 をネズミS e rへ(F(a b) - 1 0) および L y s H 7 5 をネズミA 1 aへ(F(a b) - 1 1)。両者とも結合における改善は比較的小さかった(表2)。最後に、H 9 4 の位置でヒートおよびネズミの配列は、A r g を有していることが最も多い(Kabatら、前掲)。F(a b) - 1 2 では、このA r g を、ネズミ抗体にみられるまれなL y s に変更したところ(図1A)、結合について得られた結果は、キメラF(a b)の2倍よりも小さかった(表2)。F(a b) - 1 2 もまた、B I A c o r e<sup>TM</sup>システム(Phamacia)を使用してキメラF(a b)と比較した。この技術を用いて、ヒト化F(a b) - 1 2 のK<sub>d</sub>は、より遅いk<sub>on</sub>とより速いk<sub>off</sub>のために、キメラF(a b)のK<sub>d</sub>と比較すると2倍弱かった(表3)。

表3 : BIAcore<sup>TM</sup>システム<sup>b</sup>を用いた抗VEGF F(ab)変異体のVEGFへの結合

合

変異体	結合した(F a b)の量(RU)	k <sub>off</sub> (s <sup>-1</sup> )	k <sub>on</sub> (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	K <sub>d</sub> (nM)
chim-F(ab) <sup>b</sup>	4250	5.9x10 <sup>-5</sup>	6.5x10 <sup>4</sup>	0.91
F(ab)-12	3740	6.3x10 <sup>-5</sup>	3.5x10 <sup>4</sup>	1.8

\* 2 μ g のF(ab)を2480RUの固定化したVEGFを含むチップに注いだときに、結合したF(ab)の量を、共鳴単位(RU)として、BIAcore<sup>TM</sup>システムを用いて測定した。Offレートキネティクス(k<sub>off</sub>)は、F(ab)でチップを飽和した後、緩衝液を交換した後の解離をモニターすることにより測定した。Onレートキネティクス(k<sub>on</sub>)は、F(ab)の2倍希釈液を用いて測定した。平衡解離定数K<sub>d</sub>は、k<sub>off</sub>/k<sub>on</sub>として計算した。

<sup>b</sup>chim-F(ab)は、ヒトCLおよびCH1重鎖に融合したネズミVLおよびVHドメインを有するキメラF(ab)である。

完全長m A b は、キメラF(a b)および変異体F(a b) - 1 2 のVLおよびVHドメインを、ヒトk軽鎖およびヒトIg G 1重鎖の定常領域に融合することにより構築した。完全長の12 Ig G 1(ヒトIg G 1に融合したF(a b) - 1 2)は、キメラIg G 1よりも1.7倍弱い結合を示した(表4)。12 - Ig G 1およびキメラIg G 1は、もとのネズミm A b A 4 . 6 . 1よりも若干弱く結合した(表4)。

10

20

30

40

表4：抗VEGF IgG変異体のVEGFへの結合<sup>a</sup>

IgG1/chIgG1 <sup>b</sup>			
変異体	平均	S.D.	N
chIgG1	1.0		2
murIgG1 <sup>c</sup>	0.759	0.001	2
12-IgG1 <sup>d</sup>	1.71	0.03	2

10

<sup>a</sup>抗VEGF IgG変異体をビオチン化VEGFとインキュベーションした後、KDR-IgGでコーティングしたELISAプレート (Parkら, (1994), 前掲) に移した。

<sup>b</sup>chIgG1は、ヒトCLおよびIgG1重鎖に融合したネズミVLおよびVHドメインを有するキメラIgGである；chIgG1に対するEC50は0.113±0.013 μg/mLであった(0.75nM)。

20

<sup>c</sup>murIgG1は、腹水から精製されたmuMAb VEGF A461である。

<sup>d</sup>12-IgG1は、ヒトCLおよびIgG1重鎖に融合したF(ab)-12VLおよびVHドメインである。

生物学的試験：rhumaMAb VEGFおよびmuMAb VEGF A4.6.1を、VEGFの近最大有効濃度(3ng/mL)に応答するウシ毛細内皮細胞増殖を阻害する能力について比較した。図3に示すように、2つのMAbは、力価および効力の両方において本質的に同等であった。EC50値は、それぞれ50±5ng/mLおよび48±8ng/mL(約0.3nM)であった。いずれの場合においても、500ng/mLの濃度(約3nM)で90%阻害が達成された。muMAb VEGF A4.6.1およびrhumaMAb VEGFのいずれも、基底のまたはbFGF刺激の毛細内皮細胞の増殖に対する効果は有しておらず、阻害がVEGFに対して特異的であることが確認された。

30

そのような同等性がインビボ系にもあてはまるのかどうかを決定するために、2つの抗体を、ヌードマウスにおいてヒトA673横紋筋肉腫細胞の増殖を抑制する能力について比較した。以前の試験では、muMAb VEGF A4.6.1は、この腫瘍モデルにおいて劇的な阻害効果を有することが示されている

(Kimら, Nature 362:841-844(1993)およびBorgstömら, Cancer Res. 56: 4032-4039(1996))。

40

図4に示されるように、試験した投与量の両方で(0.5および5mg/kg)、細胞接種後4週目の腫瘍重量の測定値により評価されるように、2つの抗体は腫瘍の増殖を顕著に抑制した。対照群と比較した腫瘍重量におけるこの減少は、muMAb VEGF A4.6.1で処置した動物において、各投与量でそれぞれ85%および93%であったのに対し、rhumaMAb VEGFで処置した動物では90%および95%であった。同様の結果が、乳癌細胞系MDA-MB435についても得られた。

#### 実施例2

この実施例では、アフィニティーベースでの選択による高アフィニティーフレームワーク

50

配列を同定するため、小セットのフレームワーク残基をランダム化し、線状ファージの表面において抗体分子の得られたライプラリーの1価ディスプレイにより、上記のネズミ抗V E G F 抗体 A 4 . 6 . 1 をヒト化した。

#### 材料および方法

抗 V E G F ファージミドベクター p M B 4 - 1 9 の構築：ネズミ抗 V E G F M A b A 4 . 6 . 1 は実施例 1 に記載されている。ヒト化した A 4 . 6 . 1 の初代 F a b 変異体、 h u 2 . 0 は、ヒト V<sub>L</sub> I - C<sub>1</sub> 軽鎖およびヒト V<sub>H</sub> I I I - C<sub>H</sub> 1<sub>1</sub> 重鎖 F d フラグメントをコードするプラスミド p A K 2 ( Carterら , Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285-4289 ( 1992 ) ) のデオキシリジン含有テンプレートを用いて部位特異的突然変異誘発によって構築した。残基 26 ~ 35 を含む C D R - H 1 以外は、移植した A 4 . 6 . 1 C D R 配列は、Kabatら ( 前掲 ) の配列の定義にしたがって選択した。F a b コード配列をファージミドベクター p h G H a m g 3 ( Bassら , Proteins 8: 309-314 ( 1990 ) および Lowmanら , Biochemistry 30: 10832-10838 ( 1991 ) ) にサブクローンした。この構築物 p M B 4 - 1 9 は、M 1 3 遺伝子 I I I コートタンパク質のカルボキシル部分に精密に融合した重鎖の C 末端を有する、初代のヒト化された A 4 . 6 . 1 F a b 、 h u 2 . 0 をコードする。p M B 4 - 1 9 は、F a b フラグメントの1価ディスプレイのための以前に記載されたプラスミド p D H 1 8 8 ( Garrardら , Biochemistry 9: 1373-1377 ( 1991 ) ) と構造が類似している。p M B 4 - 1 9 と p D H 1 8 8 との間の顕著な違いには、より短かい M 1 3 遺伝子 I I I セグメント ( コドン 249 - 406 ) および抗体重鎖 F d フラグメントの直後のアンバー終止コドンの使用が含まれる。これは、E. coli の s u p E サプレッサー株における、分泌重鎖または重鎖 - 遺伝子 I I I 融合体両方の発現を可能する。  
20

ヒト化 A 4 . 6 . 1 F a b フラグメントの発現および精製：非サプレッサーの E. coli 株 34 B 8 を、ファージミド p M B 4 - 1 9 またはその変異体で形質転換した。単一のコロニーを 37 度、 50 μg / mL のカルベニシリンを含む 5 mL の 2 Y T 中で一晩培養した。培養液を、 20 μg / mL のカルベニシリンを含む A P 5 培地 ( Changら , Gene 55:1 89-196 ( 1987 ) ) 200 mL 中で希釈し、 30 度で 26 時間インキュベーションした。細胞を 4000 × g でペレットにし、 -20 度少なくとも 2 時間凍結した。次いで、細胞ペレットを、 1 mM EDTA を含む 10 mM Tris - HCl ( pH 7.6 ) 5 mL に再懸濁し、 4 度 90 分間振盪し、 10,000 × g で 15 分間遠心した。上清を 1 mL の streptococcal プロテイン G - セファロースカラム ( Pharmacia ) に注ぎ、 10 mM MES ( pH 5.5 ) 10 mL で洗浄した。結合した F a b フラグメントを 100 mM 酢酸 2.5 mL で溶出し、素早く 1 mM Tris - HCl ( pH 8.0 ) 0.75 mL で中和した。F a b 調製物を P B S へ緩衝液交換し、 Centricon-30 濃縮器 ( Amicon ) を用いて濃縮した。プロテイン G 精製後の典型的な F a b の収量は、約 1 mg / mL 培養液であった。精製した F a b 試料をエレクトロスプレー質量分析により特徴付け、濃度をアミノ酸解析により決定した。  
30

抗 V E G F F a b ファージミドライプラリーの構築：ヒト化 A 4 . 6 . 1 ファージミドライプラリーを、Kunkelら , Method Enzymol. 204:125-139 ( 1991 ) の方法にしたがって部位特異的突然変異誘発により構築した。V<sub>H</sub> コドン 24 、 37 、 67 および 93 で TAA 終止トリプレットを含む p M B 4 - 1 9 の誘導体を、突然変異誘発テンプレートとして使用するために調製した ( すべての配列の番号付けは Kabat ら , 前掲にしたがった ) 。この修飾は、野生型配列によるその後のバックグラウンド汚染を阻止するためのものであった。ランダム化のための標的とするコドンは 4 および 71 ( 軽鎖 ) および 24 、 37 、 67 、 69 、 71 、 73 、 75 、 76 、 78 、 93 および 94 ( 重鎖 ) であった。  
40

重鎖コドン 67 、 69 、 71 、 73 、 75 、 76 、 78 、 93 および 94 を、 1 つの突然変異誘発オリゴヌクレオチドでランダム化するために、 2 つの 126 マーのオリゴヌクレオチドを、テンプレートでアシストされた酵素的ライゲーションにより、 60 マーと 66 マーフラグメントから最初に前構築した。具体的には、 1.5 nmol の 5' リン酸化オリゴヌクレオチド 503 - 1

( 5'-GAT TTC AAA CGT CGT NYT ACT WTT TCT AGA GAC AAC

TCC AAA AAC ACA BYT TAC CTG CAG ATG AAC-3' (配列番号 22) )

または 5 0 3 - 2

( 5'-GAT TTC AAA CGT CGT NYT ACT WTT TCT TTA GAC ACC  
TCC GCA AGC ACA BYT TAC CTG CAG ATG AAC-3' (配列番号 23) )

を、 1 . 5 n m o l の 5 0 3 - 3

( 5'-AGC CTG CGC GCT GAG GAC ACT GCC GTC  
TAT TAC TGT DYA ARG TAC CCC CAC TAT TAT GGG-3' (配列番号 24) )

と混合した（ランダム化したコドンに下線を付した； N = A / G / T / C ; W = A / T ; B = G / T / C ; D = G / A / T ; R = A / G ; Y = C / T ）。次いで、 5 0 3 - 1 / 2 の 5 ' 末端および 5 0 3 - 3 の 3 ' 末端に対する相補配列を有する 1 . 5 n m o l のテンプレートオリゴヌクレオチド

( 5'-CTC AGC GCG CAG GCT GTT CAT CTG CAG GTA-3' (配列番号 25) )

を加えて、ライゲーションの連結点のそれぞれの末端にハイブリダイズさせた。Taqリガーゼ（New England Biolabsより得た熱安定性リガーゼ）および緩衝液を加え、反応混合物を、40回の熱処理サイクル（95 °C、1.25分；50 °C、5分）に付し、ライゲーションされた連結点とライゲーションされていない連結点の間でテンプレートオリゴヌクレオチドを循環させるようにした。生成物の126マーのオリゴヌクレオチドは、6%尿素/TBEポリアクリルアミドゲルにより精製して緩衝液中でポリアクリルアミドから抽出した。2つの126マー生成物を同比率で混合し、エタノール沈殿を行い、最後に10 mMのTris-HCl、1 mM EDTAに溶解した。混合された126マーのオリゴヌクレオチド生成物は、標識された504-1であった。

選択フレームワークコドン（V<sub>L</sub> 4、71；V<sub>H</sub> 24、37、67、69、71、73、75、76、93、94）のランダム化を2工程で行った。最初に、V<sub>L</sub>ランダム化を、修飾されたpMB4-19テンプレートの3つのさらなる誘導体を調製することにより達成した。軽鎖のフレームワークコドン4および71を、2つの突然変異誘発オリゴヌクレオチド

5'-GCT GAT ATC CAG TTG ACC CAG TCC CCG-3' (配列番号 26)

5'-TCT GGG ACG GAT TAC ACT CTG ACC ATC-3' (配列番号 27)

を使用して、個々にまたは一緒に置換した。デオキシリジン含有テンプレートを、これらの新たな誘導体のそれから調製した。もとのテンプレートとともに、これら4つの構築物は、4つの可能性のある軽鎖フレームワーク配列組合せのそれをコードした（表5）。

2つの126マーのオリゴヌクレオチド（上記参照）の混合物である、オリゴヌクレオチド504-1および

5'-CGT TTG TCC TGT GCA RYT TCT GGC TAT ACC TTC ACC AAC TAT GGT ATG

AAC TGG RTC CGT CAG GCC CCG GGT AAG-3' (配列番号 28)

を、いま上で記載した4つのテンプレートのそれぞれを使用して重鎖フレームワークコドンをランダム化するために使用した。4つのライプラリーを、E. coli XL-1 Blue細胞（Stratagene）中へエレクトロポレーションし、混合した。個々の形質転換体の総数は、> 1 . 2 × 10<sup>8</sup>であると推定され、ライプラリーのDNA配列の最大数の約1500倍よりも多かった。

線状ファージの表面における抗体フラグメントの機能的ディスプレイのために様々な系が開発されている。Winterら、Ann. Rev. Immunol. 12, 433 (1994)。これらは、M13バ

10

20

30

40

50

ケテリオファージの遺伝子 I I I または遺伝子 V I I I コートタンパク質のいずれか一方との融合物としての、 F a b または 1 本鎖 F v ( s c F v ) フラグメントのディスプレイを含む。ここで選択される系は、 F a b フラグメントが遺伝子 I I I 融合物として 1 値ディスプレイされている、 Garrard ら , Biochem. 9, 1373 ( 1991 ) に記載されたものと同様である ( 図 7 ) 。この系は、 2 つの顕著な特徴を有している。具体的には、 s c F v とは異なり、 F a b フラグメントは、その存在が、アビディティーエffect によって、最も強固な結合の選択が阻害し得る二量体種を形成する傾向を持たない。さらに、ディスプレイされたタンパク質の 1 値性によって、それがなければ各ファージミド粒子におけるタンパク質のマルチプルコピーの存在から生じ得るアビディティーエffect の第 2 の潜在的供給源が排除される。 Bass および Wells , Proteins 8:309 ( 1990 ) および Lowman ら , Biochemistry 30: 10 10832-10838 ( 1991 ) 。

ヒト化 A 4 . 6 . 1 F a b フラグメントをディスプレイしているファージミド粒子を、 E. coli X L - 1 B 1 u e 細胞中で増殖させた。簡潔にいえば、ランダム化された p M B 4 - 1 9 構築物を含む細胞を 50 μ g / mL のカルベニシリンおよび約  $10^{10}$  M 1 3 K O 7 ヘルパー・ファージ ( Vieira & Messing , ら , Method Enzymol. 153:3-11 ( 1987 ) を含む 2 5 mL の 2 Y T 培地 中で 37 ℃ に一晩培養した。ファージミドストックを、食塩水ポリエチレンギリコール溶液による沈殿によって培養上清から精製し、 100 μ L の PBS 中で再懸濁した ( 約  $10^{14}$  ファージミド / mL ) 。

ヒト化 A 4 . 6 . 1 F a b 変異体の選択 : 精製した V E G F <sub>121</sub> ( PBS 中 10 μ g / mL を 100 μ L ) を、マイクロタイタープレートウェル上に 4 にて一晩コーティングした。コーティング溶液を捨て、このウェルを、コーティングされていないウェルも一緒に 6 % スキムミルクで 1 時間ブロックし、 0 . 0 5 % T W E E N 2 0 <sup>TM</sup> ( 洗剤 ) を含む PBS で洗浄した。次いで、 0 . 1 % B S A および 0 . 0 5 % T W E E N 2 0 <sup>TM</sup> を含む 2 0 mM Tris ( pH 7 . 5 ) で 100 μ L に希釈したファージミドストック 10 μ L を、各ウェルに加えた。 2 時間後ウェルを洗浄し、結合したファージを 100 μ L の 0 . 1 M グリシン ( pH 2 . 0 ) で溶出し、 25 μ L の 1 M Tris ( pH 8 . 0 ) で中和した。このアリコートを、溶出したファージ数の滴定に使用した。 V E G F コートされたウェルから溶出した残りのファージを、次の選択サイクルに使用するために増殖させた。合計 8 回の選択を行った後、 20 個の独立したクローンを選択し配列決定した ( Sanger ら , Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74:5463-5467 ( 1977 ) ) 。

V E G F 結合アフィニティーの測定 : ヒト化 A 4 . 6 . 1 F a b 変異体の V E G F <sub>121</sub> への結合に関する、会合 (  $k_{on}$  ) および解離 (  $k_{off}$  ) 速度定数を、 Pharmacia BIACore 装置で表面プラズモン共鳴 ( Karlsson ら , J. Immun. Methods 145:229-240 ( 1991 ) ) によって測定した。 V E G F <sub>121</sub> を 1 級アミノ基を介してバイオセンサーチップに共有結合的に固定化した。ヒト化 A 4 . 6 . 1 F a b 変異体の結合は、 PBS / 0 . 0 5 % T W E E N 2 0 <sup>TM</sup> 中の F a b 溶液を、流速 20 μ L / 分の流速でチップに流すことによって測定した。各結合測定の後、残留した F a b は、 3 μ L / 分にて 5 μ L の 50 mM H C l 水溶液で洗浄することにより、固定化したリガンドから取り除いた。単純な 1 値結合モデルを用いて非線形回帰式 ( B I A 評価ソフトウェア v 2 . 0 ; ファルマシア ) により結合プロファイルを解析した。

## 結果

ヒト化 A 4 . 6 . 1 の構築 : A 4 . 6 . 1 由来の C D R がヒト V<sub>L</sub> I - V<sub>H</sub> I I I フレームワークに移植されている初代ヒト化 A 4 . 6 . 1 F a b フラグメントを構築した ( h u 2 . 0 、図 5 A および 5 B ) 。 h u 2 . 0 における他のすべての残基は、ヒト配列として維持された。この変異体の V E G F に対する結合は弱すぎて検出できなかった。他の弱く結合しているヒト化 A 4 . 6 . 1 変異体の相対的アフィニティーに基づいて、 h u 2 . 0 の結合についての  $K_D$  は  $> 7 \mu M$  であると評価した。これはネズミ A 4 . 6 . 1 からの未変化な V<sub>L</sub> および V<sub>H</sub> ドメインとヒトの定常ドメインとからなるキメラ F a b 構築物のアフィニティーである 1 . 6 nM とは対照的である。このように h u 2 . 0 の V E G F への結合はキメラ体と比べて少なくとも 4000 倍弱かった。

10

20

30

40

50

抗体ライブラリーの設計：本明細書に記載のヒトフレームワーク配列へのフレームワーク変更の群を表5および表6に示す。

表5：抗原結合に重要でランダム化の標的とした鍵フレームワーク残基

フレームワーク残基		ヒトV <sub>L</sub> I, V <sub>H</sub> III コンセンサス残基	ネズミA4.6.1 残基	ランダム化 <sup>a</sup>
V <sub>L</sub> :	4	Met	Met	Met, Leu
	71	Phe	Tyr	Phe, Tyr
	24	Ala	Ala	Ala, Val, Thr
	37	Val	Val	Val, Ile
	67	Phe	Phe	Phe, Val, Thr, Leu, Ile, Ala
	69	Ile	Phe	Ile, Phe
	71	Arg	Leu	Arg <sup>b</sup> , Leu <sup>b</sup>
	73	Asp	Thr	Asp <sup>b</sup> , Thr <sup>b</sup>
	75	Lys	Ala	Lys <sup>b</sup> , Ala <sup>b</sup>
	76	Asn	Ser	Asn <sup>b</sup> , Ser <sup>b</sup>
フレームワーク残基		ヒトV <sub>L</sub> I, V <sub>H</sub> III コンセンサス残基	ネズミA4.6.1 残基	ランダム化 <sup>a</sup>
V <sub>H</sub> :	78	Leu	Ala	Leu, Ala, Val, Phe
	93	Ala	Ala	Ala, Val, Leu, Ser, Thr
	94	Arg	Lys	Arg, Lys

<sup>a</sup> ファージミドライブラリーにおけるアミノ酸の多様性

<sup>b</sup> VHの71、73、75、76位をランダム化して全てネズミ（L71/T73/A75/S76）のまたは全てヒト（R71/D73/K75/N76）のVH III四分子（tetrad：テトラド）を得た。

ヒト化A4.6.1ファージミドライブラリーの設計における懸念は、ランダム化の標的とした残基が、V<sub>L</sub>とV<sub>H</sub>配列にまたがって広く分布しているということであった。合成スクレオチドの長さにおける制限があるために、これらフレームワークの位置のそれぞれにおける同時的ランダム化には多重のオリゴスクレオチドの使用が必要で、それによってのみ達成され得ることになった。しかし、オリゴスクレオチドの総数が増加するにつれて、突然変異誘発の効率（即ち、すべての突然変異誘発オリゴスクレオチドから得られる配列を挿入して得られた突然変異体の割合）が低下する。この問題を回避するために、2つの改良をライブラリー構築に導入した。第1に、可能なV<sub>L</sub>フレームワークのそれぞれをコードする4つの異なる突然変異誘発テンプレートを調製することである。これにより、軽鎖フレームワークの限定された多様性（4つの異なる配列のみ）を得るには簡単であったが、これは突然変異誘発法からのオリゴスクレオチド2種についての必要性を排除したという点で有益であった。第2に、第二に小さな合成断片を予め結合させて126塩基のオ

10

20

30

40

50

リゴヌクレオチドとした。これで短いオリゴヌクレオチド2個でなくて長いオリゴヌクレオチド1個を用いてVHのコドン67、69、71、73、75、76、93および94をランダム化できた。そこで最終的なランダム化突然変異誘発の戦略には異なる鋳型4個に同時にたった2個のオリゴヌクレオチドを採用した。

ヒト化A4.6.1Fabの強固な結合の選択：ヒト化A4.6.1Fabファージミドライプラリーから得られた変異体をそれでVEGFとの結合に基づいて選択した。VEGF被覆マイクロタイターブレートウェルと非被覆マイクロタイターブレートウェルとから溶離したファージの力値を比較することによって測定される機能的ファージミドの豊富化は7回目の親和性選択まで進行した。さらに1回区分した後、20個のクローンを配列決定してランダム化した各位置で選択された好適なフレームワーク残基を確認した。表6に示すこれらの結果は選択したクローンの中の強固な共通点を示した。クローン20個の中で10個はhu2.10と命名した同一のDNA配列を持っていた。hu2.10ではランダム化されたフレームワーク位置13個の中で8個の置換が選択されていた(VL:71; VH:37、71、73、75、76、78および94)。興味深いことに、VH37(Ile)残基および78(Val)残基はヒトのVHIII配列またはネズミA4.6.1配列のいずれにおいても選択されなかった。この結果はあるフレームワーク位置が標的とするヒトのおよび元のネズミのフレームワーク配列を超えて多様性を拡大することから利益が得られるかもしれないことを示唆する。

表6：ヒト化A4.6.1ファージミドのFabライプラリーから選択した配列

変異体	残基置換													
	VL		VH											
	4	71	24	37	67	69	71	73	75	76	78	93	94	
ネズミ A4.6.1	M	Y	A	V	F	F	L	T	A	S	A	A	K	
hu2.0 (CDR- グラフト)	M	E	A	V	F	I	R	N	K	N	L	A	R	
ファージ選択クローン：														
hu2.1(2)	-	Y	-	I	-	-	-	-	-	-	V	-	K	
hu2.2(2)	L	Y	-	I	-	-	-	-	-	-	V	-	K	
hu2.6(1)	L	-	-	I	T	-	L	T	A	S	V	-	K	
hu2.7(1)	L	-	-	I	-	-	-	-	-	-	V	-	K	
hu2.10(10)	-	Y	-	I	-	-	L	T	A	S	V	-	K	

注) hu2.0とネズミA4.6.1との間の相違点に下線を付した。ファージ選択した各配列について確認された同一クローン数を括弧内に示した。ファージ選択したクローンにおけるダッシュは、ヒトのVL κ I - VHIIIフレームワーク配列(すなわちhu2.0と同じ)の選択を示す。

解析した残り10個のクローンにある4つの他の独特なアミノ酸配列はhu2.1、hu2.2、hu2.6およびhu2.7であった。hu2.10に加え、これらクローンはすべて、VH37(Ile)、78(Val)、および94(Lys)において同一のフレームワーク置換を含んでいたが、24および93の位置でヒトVHIIIコンセンサス配列を維持していた。4つのクローンは、軽鎖コード配列を失なわれ、ファージELIS

10

20

30

40

50

A アッセイ (Cunninghamら, EMBO J. 13:2508-251 (1994)) で試験したとき VEGF に結合しなかった。このような人為的産物は選択サイクル数の減少によって、またはライブラリーを固相で増殖させることによって削減できことが多い。

ヒト化 A4.6.1 変異体の発現および結合アフィニティー： ファージ選択変異体 hu2.1, hu2.2, hu2.6, hu2.7 および hu2.10 を、振盪フラスコを使用して *E. coli*において発現させ、Fab フラグメントを、プロテイン G アフィニティーカラムクロマトグラフィーによりペリプラズム抽出物から精製した。これら 5 つのクローンの Fab の回収された収率は、0.2 (hu2.6) ~ 1.7 mg/L (hu2.1) に分布した。これら変異体のそれぞれの抗原 (VEGF) に対するアフィニティーを、BIAcore 装置 (実施例 7) で表面プラズモン共鳴によって測定した。この結合データの解析により、コンセンサスクローン hu2.10 は、試験した 5 つの変異体のうち VEGF に対して最も高いアフィニティーを有することが判明した。こうして、われわれの Fab ファージミドライブラリーは最も強固に結合するクローンを選択的に豊富化した。hu2.10 の算出された  $K_D$  は 55 nM であり、フレームワーク変化を含まない hu2.0 ( $K_D > 7 \mu M$ ) よりも少なくとも 125 倍強固であった。その他の選択した変異体 4 種は全て VEGF に対して最低  $K_D$  360 nM までの範囲の弱い結合を示した。hu2.6 の  $K_D$  、67 nM は hu2.10 のものよりも僅かに弱かったが、このクローンは配列決定された 20 クローンの中で 1 コピーが見出されたのみであったことは興味深い。これはこの変異体の可溶性変異体を発現する場合と同様に発現およびディスプレイのレベルが低いためかも知れない。しかしながら、発現速度が小さいがこの変異体はヒト化抗体として有用である。

表 7 : ヒト化 A4.6.1 Fab 変異体の VEGF 結合アフィニティー

変異体	$k_{on}$ M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> /10 <sup>4</sup>	$k_{off}$ 10 <sup>4</sup> s <sup>-1</sup>	$K_D$ nM	$K_D(A4.6.1)$ $K_D(mut)$
A4.6.1 キメラ hu2.0	5.4 ND	0.85 ND	1.6 >7000**	>4000
ファージ選択クローン：				
hu2.1	0.70	18	260	170
hu2.2	0.47	16	340	210
hu2.6	0.67	4.5	67	40
hu2.7	0.67	24	360	230
hu2.10	0.63	3.5	55	35
*hu2.10V	2.0	1.8	9.3	5.8

注) \*hu2.10V = VL に L e u 46 → V a 1 突然変異を持つ hu2.10。

Biacore 結合測定の誤差は ± 25% と推測される。

\*\*弱すぎて測定不能であって、下限の推測値である。

ヒト化変異体 hu2.10 の追加的な改良：最初のヒト化変異体に行った抗原親和性の大きな改良にも拘らず、hu2.10 の VEGF に対する結合はまだネズミ A4.6.1 VL ドメインおよび VH ドメインを含むキメラ Fab 断片より 35 倍も弱かった。このかなり大きい相違はヒト化フレームワークのさらなる最適化が追加的突然変異によって可能であることを示唆していた。Footnote ほか著、J. Mol. Biol. 196 卷：901 頁 (1992 年) が確認した補助的残基について、A4.6.1 フレームワークとヒト VL-I - VH II フレームワークとの間では VL46, VH2 および VH48 の残基

10

20

30

40

50

のみが相違していたが、われわれのファージミドライブラーではここはランダム化しなかった。ヒト化 A 4 . 6 . 1 F v 断片の分子モデルでは V L 4 6 は V L - V H 界面に存在しており、 C D R H 3 の立体配座に影響を与えることがあるかも知れないことが示された。さらにその上、多くの V L フレームワークではこのアミノ酸はほとんど常にロイシンである（ K a b a t ほか著、前出）が、 A 4 . 6 . 1 ではバリンである。そこで、 h u 2 . 1 0 を背景にしてこの位置で L e u → V a l 置換を行った。この新変異体 h u 2 . 1 0 V の結合機構を分析した結果 V E G F 結合の K D にさらに 6 倍の改善を示し、抗体 A 4 . 6 . 1 の V L 4 6 の位置におけるバリンの重要性が実証された。 h u 2 . 1 0 V の K D ( 9 . 3 n M ) はキメラの 6 倍以内となった。 V L 4 6 とは対照的に、 V H 2 または V H 4 8 のいずれか一方の、ネズミ A 4 . 6 . 1 に由来する対応する残基による置換に関しては、 h u 2 . 0 における結合アフィニティーの改善はみられなかった。

### 実施例 3

この実施例では、 C D R ランダム化、 1 個の F a b ファージディスプレイによるアフィニティー成熟、および成熟の追加的組合せを、ヒト化抗 V E G F 抗体のアフィニティーを増強させるために使用した。

ヒト化抗体 p Y 0 1 0 1 の構築：ファージディスプレイ抗体ベクター p h M B 4 - 1 9 - 1 . 6 ( 図 8 A - E 参照 ) を親として使用した。この構築物において、抗 V E G F は、先端が切り取られた g 3 p の N 末端に融合したその重鎖を有する F a b フラグメントとして発現する。軽鎖および重鎖の両方が、ペリプラズムへの分泌のための上流の s t I I シグナル配列を有する p h o A プロモーターの制御下にある。以下の表 8 に示したオリゴヌクレオチド H L - 2 4 2 、 H L - 2 4 3 、 H L - 2 4 5 、 H L - 2 4 6 、 H L - 2 5 4 、 H L - 2 5 6 、 H L - 2 5 7 を用い、部位突然変異誘発により C D R の外側の点突然変異を作製して、 V E G F に対するアフィニティーを改善した。

表 8 : 特異的突然変異のためのオリゴ

オリゴの番号	領域	置換／説明	配列
HL-242	VL	M4L	5'-GATATCCAGTTGACCCAGTCCCCG-3' (配列番号 29)
HL-243	VL	L46V	5'-GCTCCGAAAGTACTGATTAC-3' (配列番号 30)
HL-245	VH	CDR-7	5'-CGTCGTTCACTTTCTGCAGACACCT CCAGCAACACAGTATACTGCAGATG-3' (配列番号 31)
HL-246	VH	R98K	5'-CTATTACTGTGCAAAGTACCCCCAC-3' (配列番号 32)
HL-254	VL	Y71F	5'-GGGACGGATTCACTCTGACCATC-3' (配列番号 33)
HL-256	VH	I37V	5'-GGTATGAACCTGGGTCCGTCAGGCC- 3' (配列番号 34)
HL-257	VH	CDR-7 A72L S76K N77S	5'-CGTCGTTCACTTTCTTAGACACCT CCAAAAGCACAGCATACCTGCAGATGAA C-3' (配列番号 35)

得られた変異体を Y 0 1 0 1 と呼ぶ ( 図 9 A および 9 B ) 。

抗体ファージ - ライブラーの第 1 世代の構築：野生型配列による汚染を阻止するために、ランダム化のために標的化した部位で T A A 終止コドンを有するテンプレートを、調製

10

20

30

40

50

し、飽和突然変異誘発のための縮重NNSコドン（ここでNはA、G、CおよびTの混合に等しく、SはGおよびCの混合に等しい）を使用してオリゴヌクレオチドによる部位特異的突然変異誘発によりライブラリーの構築のために使用した。アフィニティー増強の可能な候補としてVL1およびVH3を選択した（図9Aおよび9B）。CDRのうち、2つのライブラリーをpY0101テンプレートから構築した。VL1は、終止テンプレートオリゴヌクレオチドHL-248およびHL-249（表9）並びにライブラリーオリゴヌクレオチドHL-258およびHL-259（表10）を使用して変異させた。同様に、3つのライブラリーを終止テンプレートオリゴヌクレオチドHL-250、HL-251およびHL-252（表9）、およびライブラリーオリゴヌクレオチドHL-260、HL-261およびHL-262（表10）を使用して、VH3について構築した。ライブラリーの構造を以下の表9および10にまとめる。

オリゴの番号	領域説明	配列
HL-248	VL1	5'-GGGTCACCATCACCTGCTAACGATAATAAA TAAAGCAACTATTAAACTGG-3' (配列番号36)
HL-249	VL1	5'-GCGCAAGTCAGGATATTAAATAATAATAAA TGGTATCAACAGAAACCAGG-3' (配列番号37)
HL-250	VH3	5'-GTCTATTACTGTGCAAAGTAATAACACTAATA AGGGAGCAGCCACTGG-3' (配列番号38)
HL-251	VH3	5'-GGTACCCCCACTATTATAATAATAATAATGG TATTTCGACGTCTGGGG-3' (配列番号39)
HL-252	VH3	5'-CACTATTATGGGAGCAGCCACTAATAATAATA AGTCTGGGTCAAGGAACCCTG-3' (配列番号40)
HL-263	VH1	5'-TCCTGTGCAGCTCTGGCTAATAATTCTAATA ATAAGGTATGAACGGGTCCG-3' (配列番号41)
HL-264	VH2	5'-GAATGGGTTGGATGGATTAACTAATAATAAG GTTAACCGACCTATGCTGCGG-3' (配列番号42)
YC-80	VH3	5'-CTGTGCAAAGTACCCGTAATATTAAATAATAAT AACACTGGTATTCGAC-3' (配列番号43)
YC-100	CDR7	5'-CGTTCACTTTCTTAAGACTAATCCAAATA AACAGCATAACCTGCAG-3' (配列番号44)
YC-102	VH2	5'-GAATGGGTTGGATGGATTAAATAATAATAAG GTGAACCGACCTATG-3' (配列番号45)

10

20

30

40

表10：ライプラリー構築のためのランダムオリゴ

オリゴの番号	領域説明	配列
HL-258	VL1	5'-GGGTACCATCACCTGCNNSGCANNNSNNNSNN SAGC AACTATTAAACTGG-3' (配列番号46)
HL-259	VL1	5'-GCGCAAGTCAGGATATTNNNSNNNSNNNSTG GTATCACAGAAACCAGG-3' (配列番号47)
HL-260	VH3	5'-GTCTATTACTGTCAAAGNNNNSCACNNNSNNSG GGAGCAGCCACTGG-3' (配列番号48)
HL-261	VH3	5'-TACCCCCACTATTATNNNSNNNSNNNSTGGTATT CGACGTCTGGGG-3' (配列番号49)
HL-262	VH3	5'-CACTATTATGGGAGCAGCCACNNNSNNNSNNSG TCTGGGTCAAGGAACCTG-3' (配列番号50)
HL-265	VH1	5'-TCCTGTGCAGCTCTGGCNNSNNSTCNNSNNSN NSGGTATGAACGGTCCG-3' (配列番号51)
HL-266	VH2	5'-GAATGGGTTGGATGGATTAAACNNNSNNNSNNSGTN NSCCGACCTATGCTGCGG-3' (配列番号52)
YC-81	VH3	5'-CTGTGCAAAGTACCCGNSTATNNNSNNNSNNNS CACTGGTATTCGAC-3' (配列番号53)
YC-101	CDR7	5'-CGTTCACTTTCTNNSGACNNSTCCAAANNSA CAGCATACTGCAG-3' (配列番号54)
YC-103	VH2	5'-GAATGGGTTGGATGGATTNNNSNNNSNNSGGTG AACCGACCTATG-3' (配列番号55)

ランダム突然変異誘発反応の生成物を X L - 1 B 1 u e E. coli 細胞 (Stratagene) 中にエレクトロポレーションし、M 1 3 K O 7 ヘルパー ファージで 15 ~ 16 時間培養することにより増幅した。カルベニシリンプレートでの最初の形質転換のブレーティングに基づいて、各ライプラリーの複雑度は、 $2 \times 10^7 \sim 1.5 \times 10^8$  と推定した。

イニシャルアフィニティー選択：選択の各ラウンドのために、約  $10^9 \sim 10^{10}$  のファージを、50 mM の炭酸塩緩衝液 (pH 9.6) 中の 2 μg / mL の V E G F (組換え；9 ~ 109 残基バージョン) でコートし、50 mM の炭酸塩緩衝液 (pH 9.6) 中の 5% インスタントミルクでブロックしたプレート (N u n c M a x s o r p 96 ウェル) に対する結合についてスクリーニングした。P B S 中、0.5% のウシ血清アルブミンおよび 0.5% T W E E N 2 0™ の存在下で室温で 1 ~ 2 時間結合させた後、ファージ溶液を除き、プレートを P B S / T W E E N 2 0™ (P B S 緩衝液中の 0.05% T W E E N 2 0™) で 10 回洗浄した。典型的には、低い解離速度を有するアフィニティー変異体を選択するために、プレートを P B S / T W E E N 2 0™ 緩衝液と、選択の各ラウンドを徐々に長くする時間 (選択の第 1 ラウンドの 0 分から第 9 ラウンドの 3 時間まで) でインキュベーションした。P B S / T W E E N 2 0™ 緩衝液を除いた後、残ったファージを 0.1 M H C l で溶出し、素早く 1 / 3 体積の 1 M の T r i s (pH 8.0) で中和した。X L - 1 B 1 u e E. coli 細胞 (Stratagene) を次の選択サイクルのために感染させることにより溶出したファージを増殖させた。

配列のデータは、両方の V L 1 ライプラリーが、第 8 / 第 9 ラウンドのソーティングの後

10

20

30

40

50

でさえ、ランダム化した部位において、異なった耐性のある様々なタイプの残基が残っていることが判明した。対照的に、VH3ライブラリーは、野生型の残基のみを維持するかまたは非常に保存的な置換を有していた。このことは、VL1がより溶媒にさらされており、結合界面の外側に位置していることを示唆するものである。対照的に、VH3は異なる側鎖の置換を劇的には示さなかったので、抗原結合に対して関係がより深いのであろう。

結合アフィニティーのファージ - E L I S A アッセイ：これらライブラリーのそれから、代表的なクローン（豊富（abundant）配列によって示されるクローン）を、ファージ - E L I S A アッセイにおいて、親のクローン pY0101 のアフィニティーと比較したこれらのアフィニティーについて分析した。このようなアッセイでは、ファージを最初に連続希釈して、後で一定に維持する機能的な飽和力値を測定し、VEGF の種々の濃度（初め 200 nM ~ 0 nM）とインキュベーションするために使用した。次いで、混合物を、VEGF (2 μg / mL) で予めコートしたプレートに移し、5 % のインスタントミルクでブロックし、室温で 1 時間平衡化した。次いで、ファージ溶液を除き、残った結合したファージを、西洋ワサビペルオキシダーゼをコンジュゲートしたヤギ抗ウサギと混合したウサギ抗ファージ抗体の溶液で検出した。1 時間室温でインキュベーションした後、プレートを発色物質、o-フェニレンジアミン（シグマ）で展開した。1 / 2 体積の 2.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を加えて反応を止めた。492 nm における工学密度を分光光度プレートリーダーで測定した。

これら 5 つのライブラリーから選択したクローンのすべてが、ファージ - E L I S A アッセイにおいて、野生型 pY0101 よりも弱いかまたは同様のアフィニティーを示したが、ライブラリー HL - 258 に由来する 1 つの特定の変異体 (pY0192) は、pY0101 に対して発現レベルまたはファージディスプレイにおいて明らかな有用性を示した（約 10 倍）。このクローンは、VLドメインにおいて突然変異 S24R、S26N、Q27E、D28Q および I29L を含んでいた（図 9A）。さらに、この変異体は、擬似の突然変異 M34I を VH に有することが分かった。この変異体は、pY0101 変異体と比較して VEGF に対する結合アフィニティーにおける有意な差異は示さなかった。ファージにおける Fab - ディスプレイおよびファージ - E L I S A アッセイのシグナル対ノイズ比を改善するために、VL1 での pY0192 における対応する置換を、CDRA1a 変異体および第 2 世代の抗 VEGF ライブラリーの両方の構成のためのテンプレートバックグラウンドに導入した。

抗 VEGF の CDR の A1a スキャンニング：CDR ドメインにおける各アミノ酸が寄与するエネルギー特性を決定し、ランダム化のための選択標的残基を改善するために、各残基をアラニンで置換することにより CDR ドメインをスクリーニングした。各 A1a 変異体を、特異的なアラニン置換をコードする合成オリゴヌクレオチドをによる部位特異的突然変異誘発を使用して構築した。A1a が野生型残基である場合は、Ser を置換して側鎖置換の効果を試験した。1 つの A1a 変異を有するファージクローンを、精製し、ファージ - E L I S A において上記のとおり分析した。A1a スキャンの結果は、様々な位置における A1a 置換が、pY0192 と比較して抗原結合アフィニティーにおいて、2 ~ > 150 倍の減少に分布する効果を有することを示した。さらに、VL1 ではなく VH3 が抗原結合に関与しているという以前の観察結果を確認した。CDRA1a スキャンの結果を以下の表 11 にまとめた。

表11：AlaスキャンFab変異体の相対的VEGFアフィニティー

残基 VL	IC50 (mut)	残基 VH	IC50 (mut)
	IC50 (wt)		IC50 (wt)
R24A	1	G26A	2
A25S	1	Y27A	34
N26A	1	T28A	1
E27A	1	F29A	16
Q28A	1	T30A	1
L29A	1	N31A	>150
S30A	2	Y32A	>150
N31A	2	G33A	6
Y32A	2	I34A	6
L33A	2	N35A	66
N34A	4		
		W50A	>150
F50A	1	I51A	4
T51A	1	N52A	>150
S52A	1	T53A	9
S53A	1	Y54A	9
L54A	1	T55A	4
H55A	1	G56A	1

10

残基 VL	IC50 (mut)	残基 VH	IC50 (mut)
	IC50 (wt)		IC50 (wt)
S56A	1	E57A	2
		P58A	1
Q89A	4	T59A	3
Q90A	3	Y60A	2
Y91A	14	A61S	1
S92A	1	A62S	1
T93A	1	D63A	1
V94A	2	F64A	1
P95A	3	K65A	1
W96A	>150	R66A	1
T97A	1		
		Y99A	>150
		P100A	38
		H101A	4
		Y102A	4

20

30

40

	Y103A	5
	G104A	2
	S105A	1
	S106A	>150
	H107A	2
	W108A	>150
	Y109A	19
	F110A	25
	D111A	2

10

すべての変異体は p Y 0 1 9 2 のバックグラウンドにある (" w t " ; 図 9 A - B 参照)。 I C 5 0 は、競合的ファージ - E L I S A アッセイにおいて決定した。

A 1 a 置換の最も大きい効果は、 C D R H 1 、 H 2 および H 3 においてみられ、 Y 2 7 A ( 3 4 倍のアフィニティーの減少 ) 、 N 3 1 A 、 Y 3 2 A 、 W 5 0 A 、 N 5 2 A 、 Y 9 9 A 、 S 1 0 6 A 、 および W 1 0 8 A ( それぞれ > 1 5 0 倍の減少 ) 、 N 3 5 A ( 6 6 倍の減少 ) 、 P 1 0 0 A ( 3 8 倍の減少 ) および F 1 1 0 A ( 2 5 倍の減少 ) を含んでいる。対照的に、 1 つの V L 置換、 W 9 6 A (> 1 5 0 倍の減少)のみが、結合アフィニティーに対し大きな影響を与えた。これらの結果は、 3 つの V H C D R が、 V E G F に対する F a b 結合の主要な大きな決定因子であり、 V L 3 からの寄与が若干あることを示している。

20

C D R 変異体ライブラリーの第 2 世代の設計：抗 V E G F バージョン Y 0 1 9 2 に存在する残基をランダム化する 2 つのさらなるライブラリーを結晶構造の観察に基づいて設計した。 V H 2 では、 V E G F との結合界面内に位置しているため、残基 5 2 ~ 5 5 をランダム化した。“ C D R 7 ”と呼ばれる F a b のさらなるドメイン ( 図 1 0 B 参照 ) も、このループにおけるいくつかの残基が、 V E G F と接触しないがその抗体の V H ループと接触してしまうので、ランダム化の標的とした。これらは、界面残基に対する 2 次効果によるアフィニティー改善のための可能性を秘めた残基を示した。残基 L 7 2 、 T 7 4 および S 7 7 を、この C D R ライブラリーにおいてランダム化した。

さらに、結晶構造に基づいて、元の C D R ライブラリーの 1 つを再構築して、 V H 1 C D R におけるアフィニティー変異に関する可能性を再試験した。新たな Y 0 1 9 2 バックグラウンドを用いて、残基 2 7 、 2 8 、 3 0 ~ 3 2 をランダム化した。

30

抗 V E G F ライブラリーの第 2 世代選択： A 1 a スキャンの結果並びに抗原 - 抗体 ( F ( a b ) - 1 2 ) 複合体の結晶構造に基づいて、 1 7 個のライブラリーの総数を p Y 0 1 9 2 テンプレートおよび終止テンプレートオリゴヌクレオチド ( ランダム化について標的化された部位での終止コドンをコードする ) Y C - 8 0 、 Y C - 1 0 0 、 Y C - 1 0 2 、 H L - 2 6 3 、 および H L - 2 6 4 ( 上記図 9 ) を用いて構築した。対応するランダム化オリゴヌクレオチド ( ランダム化について標的化した部位で N N S を用いる ) は、 Y C 8 1 、 Y C - 1 0 1 、 Y C - 1 0 3 、 H L - 2 6 5 、 および H L - 2 6 6 であった ( 上記表 1 0 ) 。得られた形質転換体によって、  $6 \times 10^7 \sim 5 \times 10^8$  の範囲に分布する複雑度のライブラリーが得られ、これはそのライブラリーが可能な変異体のすべてをカバーすることにおいて包括的なものであることを示唆した。ファージライブラリーを、以下の表 1 2 に記載した条件を用いて 7 ~ 8 回ソーティングした。

40

表12：Fab変異体の第2世代選択の条件

選択の回数	インキュベーション時間 (h r)	インキュベーション 溶液	インキュベーション 温度 (°C)
1	0	0	室温
2	1	ELISA buffer	室温
3	2	1 μM VEGF/ELISA	室温
4	18	1 μM VEGF/ELISA	室温
5	37	1 μM VEGF/ELISA	室温
6	室温で17時間／ 37°Cで30時間	1 μM VEGF/ELISA	室温／37°C
7	63	1 μM VEGF/ELISA	37°C
8	121	1 μM VEGF/ELISA	37°C

ELISA緩衝液は、PBS中、0.5%ウシ血清アルブミンおよび0.5%TWEEN 20<sup>TM</sup>を含有した。VEGFをインキュベーション緩衝液中でインキュベーションしてファージのプレートの表面でコートされたVEGFへの再結合を最小限にした。これらのライブラリーのソーティングにより、7～8回の選択でファージ豊富化物を得た。

第2世代クローンのファージ - ELISAアッセイ：8回の選択の後、各ライブリーから10～12個のクローンを、溶出したファージプールで感染させたE. coli(XL1)コロニーを含むカルベニシリン含有プレートから単離した。コロニーを単離してヘルパーファージで生育させてバックグラウンド決定のための1本鎖DNAを得た。より好ましいVEGFへの結合のために選択したCDR置換を、ファージミドクローンのDNA配列から推定した。選択したクローンのサンプリングを以下の表13に示す。

表13：第2世代Fab-ファージライブラリー由来の抗VEGF変異体のタンパク質配列

ライブラリーYC-81由来の変異体	
名称	VH3配列(残基9-111)
Y0238-1	YPYYRGTSHWYFD (配列番号56)
Y0238-2	YPYYINKSHWYFD (配列番号57)
Y0238-3	YPYYYGTSHWYFD (配列番号58)
Y0238-4	YPYYYNQSHWYFD (配列番号59)
Y0238-5	YPYYIAKSHWYFD (配列番号60)
Y0238-6	YPYYRDNSHWYFD (配列番号61)
Y0238-7	YPYYWGTSHWYFD (配列番号62)
Y0238-8	YPYYRQNASHWYFD (配列番号63)
Y0238-9	YPYYRQSSHWYFD (配列番号64)
Y0238-10	YPYYRNTSHWYFD (配列番号65)
Y0238-11	YPYYKNTSHWYFD (配列番号66)
Y0238-12	YPYYIERSHWYFD (配列番号67)
Y0228-21	YPYYRNASHWYFD (配列番号68)
Y0228-22	YPYYTTRSHWYFD (配列番号69)
Y0228-23	YPYYEGSSHWYFD (配列番号70)

10

20

30

Y0228-24	YPYYRQRGHWYFD (配列番号 7 1)	
Y0228-26	YPYYTGRSHWYFD (配列番号 7 2)	
Y0228-27	YPYYTNNTSHWYFD (配列番号 7 3)	
Y0228-28	YPYYRKGSHWYFD (配列番号 7 4)	
Y0228-29	YPYYTGSSHWHYFD (配列番号 7 5)	10
Y0228-30	YPYYRSGSHWYFD (配列番号 7 6)	
Y0229-20	YPYYTNRSHWYFD (配列番号 7 7)	
Y0229-21	YPYYRNSSHWHYFD (配列番号 7 8)	
Y0229-22	YPYYKESSHWYFD (配列番号 7 9)	
Y0229-23	YPYYRDASHWYFD (配列番号 8 0)	
Y0229-24	YPYYRQKGHWYFD (配列番号 8 1)	
Y0229-25	YPYYKGGSHWYFD (配列番号 8 2)	20
Y0229-26	YPYYYGASHWYFD (配列番号 8 3)	
Y0229-27	YPYYRGESHWYFD (配列番号 8 4)	
Y0229-28	YPYYRSTSHWYFD (配列番号 8 5)	
ライブラリーHL-265由来の変異体		
名称	VH 1 配列 (残基 26-35)	
Y0243-1	GYDFTHYGMN(5/10 クローン) (配列番号 8 6)	
Y0243-2	GYEFQHYGMN (配列番号 8 7)	30
Y0243-3	GYEFTHYGMN (配列番号 8 8)	
Y0243-4	GYDFGHYGMN (配列番号 8 9)	
Y0243-5	GYDFSHYGMN (配列番号 9 0)	
Y0243-6	GYEFSHYGMN (配列番号 9 1)	
ライブラリーYC-101由来の変異体		
名称	VH "CDR 7" 配列 (残基 70-79)	40
Y0244-1	FSVDVSKSTA (配列番号 9 2)	
Y0244-2	FSLDKSKSTA (配列番号 9 3)	
Y0244-3	FSLDVWKSTA (配列番号 9 4)	
Y0244-4	FSIDKSKSTA (配列番号 9 5)	

ランダム化した領域の配列はDNA配列から推定されるもののみを示す。

クローニングの数を、親クローニングととともに、ファージ-ELISAアッセイにおいて試験し、親クローニングと比べるとはっきりとした改善はみられなかった。これは、分析

を行った時間の長さによって説明されるだろう( < 3 時間)。

抗原結合における親クローニに対する改善を定量するために、いくつかの抗 V E G F 変異体の D N A を E. coli 34B8 株に形質転換し、F a b として発現させ、上記実施例 2 に記載のとおり、ペリプラズムショッケート(shockate)をプロテインGカラム(Pharmacia)に通した。

C D R 複合変異体：V E G F 結合アフィニティーを改善するために、異なる C D R において、ファージディスプレイによって見い出された変異体を組み合わせて、多重 C D R 突然変異体を作製した。具体的には、V H 1、V H 2 および V H 3 ライブラリーに由来する、最もアフィニティーが改善されたファージ変異体において同定された突然変異を、結合アフィニティーに対するそれらの寄与の能力を試験するために組み合わせた(表 14)。

10

表 14：組み合わせ CDR 抗 VEGF 変異体

名称	親クローニ	突然変異誘発オリゴ／説明	配列
Y0313-1	Y0243-1	YC-115 (VH3 : H101Y および S105)	5'-GCAAAGTACCCGTACTATTATGGGACGAGCCACTGGTATTTC-3' (配列番号 96)
Y0317	Y0313-1	YC-108 (野生型へ復帰した VL 1)	5'-GTCACCACATCACCTGCAGCGCAAGTCAGGATATTAGCAACTATTAAAC-3' (配列番号 97)
Y0313-3	Y0238-3	YC-116 (VH3; T105S)	5'-CCGTACTATTATGGGAGCACCCACTGGTATTTC-3' (配列番号 98)

表示した親ベクター由来の突然変異体を、部位特異的突然変異誘発により、示されたオリゴヌクレオチドから得られた突然変異体と組み合わせて、記載の組み合わせ変異体を得た。

バージョン Y0317 は、VL1 におけるバックグラウンド突然変異が除かれており、その配列が pY0101 のものに復帰していることを除いては、Y0312-1 と等しい。H101Y および S105T の突然変異の効果を、Y0238-3 由来の復帰突然変異体を構築することによって試験した。

BIAcore 解析：F a b フラグメントの V E G F 結合アフィニティーを、BIAcore-2000™ 表面プラズモン共鳴システム(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)を用いて計算した。バイオセンサーチップを、供給元(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)の指針にしたがって、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩(EDC)およびN-ヒドロキシサクシンイミド(NHS)を用いて、VEGF の共有結合カップリングのために活性化した。VEGF を 20 mM 酢酸ナトリウム(pH 4.8) 中で緩衝液交換し、約 50 μg / mL に希釈した。アリコート(35 μL)を、2 μL / 分の低流速で注入し、カップリングしたタンパク質の約 700 ~ 1400 応答単位(RU)を達成した。最後に、1 M のエタンールアミンをブロッキング剤として注入した。

キネティックスの測定については、F a b の 2 倍希釈液を、25、流速 10 μL / 分で PBS/TWEEN 20™ 緩衝液(リン酸緩衝食塩水中の 0.05% TWEEN 20™)に注入した。会合速度および解離速度を標準的なプロトコル(Karlssonら, J. Immun. Methods 145:229-240 (1991))を用いて計算した。表面プラズモン共鳴(SPR)測定から、平衡解離定数 Kd を、koff / kon として計算した。データを以下の表 15 に示す。

20

30

40

表15 : BIACore™より得られた Fab-VEGF結合のキネティクス

変異体	Kon ( $10^4/M/s$ )	koff ( $10^{-4}/s$ )	Kd (nM)	Kd (wt) / Kd (mut)
Y0244-1	3.4	2.7	8	3.6
Y0244-4	5.2	1.7	3.3	0.9
Y0243-1	6.7	0.45	0.7	4.1
Y0238-3	1.7	$\leq 0.04^*$	$\leq 0.2^*$	$\geq 14^*$
Y0238-7	1.5	$\leq 0.06^*$	$\leq 0.4^*$	$\geq 7.3^*$
Y0238-10	1.6	0.09	0.6	4.8
Y0238-5	0.8	0.08	0.9	3.2
Y0238-1	2.6	0.09	0.4	7.3
Y0313-1	3.5	$\leq 0.054^*$	$\leq 0.15^*$	$\geq 20^*$

10

20

表15 : BIACore™より得られた Fab-VEGF結合のキネティクス

Y0313-3	1.2	0.081	0.65	4.5
---------	-----	-------	------	-----

観察された解離速度は、オフレートがBIACoreによる検出限界に近づいているので、恐らくこれらの実験における真の解離速度の上限を反映しているのであろう。

表15におけるBIACore™データは、いくつかの変異によってアフィニティーがY0192よりも改善されたことを示している。例えば、突然変異T28DおよびN31Hの結果生じたCDRH1変異体、Y0243-1は、4.1倍増強されたアフィニティーを示した。変異体Y0238-3は、Y0192に対して少なくとも14倍の結合アフィニティーの改善を示した。両方のCDRH3突然変異体は、T105のSへの復帰（変異体Y0313-3）がY0238-3のアフィニティーを0.15nMから0.65nMに減少させたので、Y0238-3のアフィニティーの改善に寄与している（表15参照）。Y0192と比べてより大きなアフィニティーの増加は、CDRH1突然変異と組み合わせたCDRH3突然変異を含んでいたY0313-1にみられた。

VEGF阻害の細胞ベースアッセイ：A4.6.1抗VEGF抗体のいくつかのバージョンを、HuVECs（ヒト臍静脈内皮細胞）の増殖の誘発においてVEGF（組換えバージョン1-165）を拮抗するその能力について試験した。96ウェルプレートにウェルあたり1000HuVECsを加え、アッセイ培地（1.5%透析濾過したウシ胎児血清を加えたF12:DMEM50:50）中24時間固定した。細胞を誘発するために使用したVEGFの濃度は、最大のDNA合成の80%を刺激し得るVEGFの量を最初に滴定することにより決定した。固定した量（最終濃度0.2nM）のVEGF、および増加する濃度の抗VEGFFabまたはMAbを含む新しいアッセイ培地を加えた。40時間インキュベーションした後、DNA合成を三重水素化チミジンの取りこみによって測定した。細胞をウェルあたり[3H]-チミジン0.5μCiで24時間パルスし、TopCountガンマカウンターを使用する計測のために回収した。

結果（図11）は、Fab(ab)-12由来の完全長のIgGが、Fab形態よりもVEGF活性の阻害が有意に強いことを示している（ここではY0192を使用した）。しかし

30

40

50

、両方の変異体 Y 0 2 3 8 - 3 および Y 0 3 1 3 - 1 はいずれも、Y 0 1 9 2 F a b または F ( a b ) - 1 2 M A b のいずれかよりもさらに強い V E G F 活性の阻害を示した。F a b 形態を比較すると変異体 Y 0 3 1 3 - 1 は、野生型 F a b よりも > 3 0 倍もより強力であるようであった。このアッセイで使用した V E G F の量 ( 0 . 2 n M ) は、突然変異体の正確な I C 5 0 の測定を制限するかもしれない。例えば、突然変異体の結合アフィニティー ( K d ) は、実際は < 0 . 2 n M であり、この実験における I C 5 0 は、低い V E G F 濃度の条件下では、見かけ上高くなるようである。したがって結果は、アフィニティーが改善された変異体は、V E G F に対するアフィニティーが少なくとも 3 0 倍改善され、インピトロで V E G F 活性を効果的にブロックするという結論を支持している。Y 0 3 1 7 変異体は V L 1 配列の野生型への復帰においてのみ、Y 0 3 1 3 - 1 と異なっているので ( 図 10 A ) 、Y 0 3 1 7 は Y 3 1 3 - 1 と同様の活性を有すると予想される。  
変異体 Y 0 3 1 7 ( F a b ) および実施例 1 のヒト化変異体 F ( a b ) - 1 2 ( 完全長および F a b ) を、実施例 1 に記載したアッセイを使用して、V E G F の近最大有効濃度に応答したウシ毛細内皮細胞増殖を阻害する能力について比較した。図 12 に示したように、このアッセイにおいて、Y 0 3 1 7 は、F ( a b ) - 1 2 の完全長および F a b 形態よりも著しく効果的であった。Y 0 3 1 7 アフィニティー成熟した F a b は、このアッセイにおいて、F ( a b ) - 1 2 よりも少なくとも約 2 0 倍低い E D 5 0 値を示した。

## SEQUENCE LISTING

## (1) GENERAL INFORMATION:

(i) APPLICANT: ジェネンテク・インコーポレイテッド

(ii) TITLE OF INVENTION: 抗VEGF抗体 10

(iii) NUMBER OF SEQUENCES: 131

## (iv) COMPUTER READABLE FORM:

(A) MEDIUM TYPE: 3.5 inch, 1.44 Mb floppy disk

(B) COMPUTER: IBM PC compatible 20

(C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: WinPatin (Genentech)

## (v) CURRENT APPLICATION DATA:

APPLICATION NUMBER: JP 1998542922

FILE REFERENCE: 168103 30

FILING DATE: 03-APR-1998

## (vii) PRIOR APPLICATION DATA:

(A) APPLICATION NUMBER: US 08/833,504

(B) FILING DATE: 07-APR-1997 40

## (vii) PRIOR APPLICATION DATA:

(A) APPLICATION NUMBER: US 08/908,469

(B) FILING DATE: 06-AUG-1997

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:1:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 10 amino acids
- (B) TYPE: Amino Acid
- (D) TOPOLOGY: Linear

10

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:1:

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn

1                    5                    10

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:2:

20

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 17 amino acids
- (B) TYPE: Amino Acid
- (D) TOPOLOGY: Linear

30

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:2:

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe

1                    5                    10                    15

Lys Arg

40

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:3:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 14 amino acids
- (B) TYPE: Amino Acid
- (D) TOPOLOGY: Linear

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:3:

10

Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val

1                    5                    10

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:4:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

20

- (A) LENGTH: 11 amino acids
- (B) TYPE: Amino Acid
- (D) TOPOLOGY: Linear

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:4:

30

Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn

1                    5                    10

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:5:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

40

- (A) LENGTH: 7 amino acids
- (B) TYPE: Amino Acid
- (D) TOPOLOGY: Linear

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:5:

Phe Thr Ser Ser Leu His Ser

1

5

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:6:

10

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 9 amino acids
- (B) TYPE: Amino Acid
- (D) TOPOLOGY: Linear

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:6:

20

Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr

1

5

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:7:

30

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 123 amino acids
- (B) TYPE: Amino Acid
- (D) TOPOLOGY: Linear

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:7:

40

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly

1

5

10

15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr

20 25 30

Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

35 40 45

Glu Trp Val Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr

50 55 60

Ala Ala Asp Phe Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser

65 70 75

Lys Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp

80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser

95 100 105

Ser His Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

110 115 120

Val Ser Ser

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:8:

40

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 108 amino acids

(B) TYPE: Amino Acid

## (D) TOPOLOGY: Linear

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:8:

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val

1

5

10

15

10

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

20

25

30

Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys

35

40

45

20

Val Leu Ile Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser

50

55

60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile

65

70

75

30

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln

80

85

90

Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu

95

100

105

40

Ile Lys Arg

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:9:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 123 amino acids
- (B) TYPE: Amino Acid
- (D) TOPOLOGY: Linear

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:9:

10

Glu Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Gln Pro Gly

1

5

10

15

Glu Thr Val Arg Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr

20

25

30

20

Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

35

40

45

Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr

50

55

60

30

Ala Ala Asp Phe Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Glu Thr Ser

65

70

75

Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Ser Asn Leu Lys Asn Asp Asp

80

85

90

40

Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser

95

100

105

Ser His Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr

110

115

120

Val Ser Ser

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:10:<sup>10</sup>

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 108 amino acids
- (B) TYPE: Amino Acid
- (D) TOPOLOGY: Linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:10:<sup>20</sup>

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu

1

5

10

15

Gly Asp Arg Val Ile Ile Ser Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser<sup>30</sup>

20

25

30

Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys

35

40

45

Val Leu Ile Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser<sup>40</sup>

50

55

60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile

65

70

75

Ser Asn Leu Glu Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln

80 85 90

Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu

95 100 105

Ile Lys Arg

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:11:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 113 amino acids

20

(B) TYPE: Amino Acid

(D) TOPOLOGY: Linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:11:

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly

30

1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser

20 25 30

Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

40

35 40 45

Glu Trp Val Ser Val Ile Ser Gly Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr

50 55 60

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser

65 70 75

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp

80 85 90

10

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln

95 100 105

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

110 20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:12:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 108 amino acids

(B) TYPE: Amino Acid

30

(D) TOPOLOGY: Linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:12:

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val

1 5 10 15

40

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

20 25 30

Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys

35 40 45

Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile

65 70 75

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln

80 85 90

Tyr Asn Ser Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu

95 100 105

Ile Lys Arg

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:13:

30

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 107 amino acids
- (B) TYPE: Amino Acid
- (D) TOPOLOGY: Linear

40

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:13:

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val

1 5 10 15

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

20 25 30

Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys

35 40 45

Leu Leu Ile Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile

65 70 75

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln

80 85 90

Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu

95 100 105

Ile Lys

30

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:14:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 123 amino acids

40

(B) TYPE: Amino Acid

(D) TOPOLOGY: Linear

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:14:

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly

1

5

10

15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr

20

25

30

10

Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

35

40

45

Glu Trp Val Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr

50

55

60

20

Ala Ala Asp Phe Lys Arg Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser

65

70

75

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp

80

85

90

30

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser

95

100

105

Ser His Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

110

115

120

40

Val Ser Ser

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:15:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 107 amino acids
- (B) TYPE: Amino Acid
- (D) TOPOLOGY: Linear

10

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:15:

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val

1 5 10 15

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

20 25 30

20

Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys

35 40 45

Leu Leu Ile Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser

50 55 60

30

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile

65 70 75

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln

80 85 90

40

Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu

95 100 105

Ile Lys

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:16:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 123 amino acids
- (B) TYPE: Amino Acid
- (C) TOPOLOGY: Linear

10

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:16:

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly

20

1                       5                       10                       15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr

20                       25                       30

Asn Tyr Gly Met Asn Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

30

35                       40                       45

Glu Trp Val Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr

50                       55                       60

Ala Ala Asp Phe Lys Arg Arg Phe Thr Ile Ser Leu Asp Thr Ser

40

65                       70                       75

Ala Ser Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp

80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser

95 100 105

Ser His Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

110 115 120

10

Val Ser Ser

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:17:

20

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 11 amino acids
- (B) TYPE: Amino Acid
- (D) TOPOLOGY: Linear

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:17:

30

Pro Lys Asn Ser Ser Met Ile Ser Asn Thr Pro

1 5 10

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:18:

40

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 7 amino acids
- (B) TYPE: Amino Acid
- (D) TOPOLOGY: Linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:18:

His Gln Ser Leu Gly Thr Gln

1

5

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:19:

10

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 8 amino acids
- (B) TYPE: Amino Acid
- (D) TOPOLOGY: Linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:19:

20

His Gln Asn Leu Ser Asp Gly Lys

1

5

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:20:

30

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 8 amino acids
- (B) TYPE: Amino Acid
- (D) TOPOLOGY: Linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:20:

40

His Gln Asn Ile Ser Asp Gly Lys

1

5

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:21:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 8 amino acids
- (B) TYPE: Amino Acid
- (D) TOPOLOGY: Linear

10

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:21:

Val Ile Ser Ser His Leu Gly Gln

1 5

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:22:

20

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 66 base pairs
- (B) TYPE: Nucleic Acid
- (C) STRANDEDNESS: Single
- (D) TOPOLOGY: Linear

30

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:22:

GATTTCAAAC GTCGTNYTAC TWTTTCTAGA GACAACCTCCA AAAACACABY 50

40

TTACCTGCAG ATGAAC 66

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:23:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 66 base pairs
- (B) TYPE: Nucleic Acid
- (C) STRANDEDNESS: Single
- (D) TOPOLOGY: Linear

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:23:

10

GATTCAAAC GTCGTNYTAC TWTTTCTTTA GACACCTCCG CAAGCACABY 50

TTACCTGCAG ATGAAC 66

20

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:24:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 60 base pairs
- (B) TYPE: Nucleic Acid
- (C) STRANDEDNESS: Single
- (D) TOPOLOGY: Linear

30

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:24:

AGCCTGCGCG CTGAGGGACAC TGCCGTCTAT TACTGTDYAA RGTACCCCCA 50

40

CTATTATGGG 60

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:25:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 30 base pairs
- (B) TYPE: Nucleic Acid
- (C) STRANDEDNESS: Single
- (D) TOPOLOGY: Linear

10

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:25:

CTCAGCGCGC AGGCTGTTCA TCTGCAGGTA 30

20

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:26:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 27 base pairs
- (B) TYPE: Nucleic Acid
- (C) STRANDEDNESS: Single
- (D) TOPOLOGY: Linear

30

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:26:

GCTGATATCC AGTTGACCCA GTCCCCG 27

40

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:27:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 27 base pairs
- (B) TYPE: Nucleic Acid
- (C) STRANDEDNESS: Single
- (D) TOPOLOGY: Linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:27:

10

TCTGGGACGG ATTACACTCT GACCATC 27

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:28:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
- (A) LENGTH: 75 base pairs
  - (B) TYPE: Nucleic Acid
  - (C) STRANDEDNESS: Single
  - (D) TOPOLOGY: Linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:28:

30

CGTTTGTCCCT GTGCARYTTC TGGCTATAACC TTCACCAACT ATGGTATGAA 50

CTGGRTCCGT CAGGCCCGG GTAAG 75

40

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:29:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
- (A) LENGTH: 24 base pairs

- (B) TYPE: Nucleic Acid
- (C) STRANDEDNESS: Single
- (D) TOPOLOGY: Linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:29:

10

GATATCCAGT TGACCCAGTC CCCG 24

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:30:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
  - (A) LENGTH: 21 base pairs
  - (B) TYPE: Nucleic Acid
  - (C) STRANDEDNESS: Single
  - (D) TOPOLOGY: Linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:30:

20  
30

GCTCCGAAAG TACTGATT A C 21

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:31:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
  - (A) LENGTH: 54 base pairs
  - (B) TYPE: Nucleic Acid
  - (C) STRANDEDNESS: Single
  - (D) TOPOLOGY: Linear

40

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:31:

CGTCGTTCA CTTTTCTGC AGACACCTCC AGAACACAG TATACCTGCA 50

GATG 54

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:32:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 25 base pairs
- (B) TYPE: Nucleic Acid
- (C) STRANDEDNESS: Single
- (D) TOPOLOGY: Linear

20

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:32:

CTATTACTGT GCAAAGTACC CCCAC 25

30

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:33:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 24 base pairs
- (B) TYPE: Nucleic Acid
- (C) STRANDEDNESS: Single
- (D) TOPOLOGY: Linear

40

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:33:

GGGACGGATT TCACTCTGAC CATC 24

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:34:

10

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 26 base pairs
- (B) TYPE: Nucleic Acid
- (C) STRANDEDNESS: Single
- (D) TOPOLOGY: Linear

20

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:34:

GGTATGAACT GGGTCCGTCA GGCCCC 26

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:35:

30

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 57 base pairs
- (B) TYPE: Nucleic Acid
- (C) STRANDEDNESS: Single
- (D) TOPOLOGY: Linear

40

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:35:

CGTCGTTCA CTTTTCTTT AGACACCTCC AAAAGCACAG CATACTGCA 50

GATGAAC 57

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:36:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 53 base pairs
- (B) TYPE: Nucleic Acid
- (C) STRANDEDNESS: Single
- (D) TOPOLOGY: Linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:36:

GGGTCAACCAT CACCTGCTAA GCATAATAAT AATAAAGCAA CTATTAAAC 50

TGG 53

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:37:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 52 base pairs
- (B) TYPE: Nucleic Acid
- (C) STRANDEDNESS: Single
- (D) TOPOLOGY: Linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:37:

GGCTCAAGTCA GGATATTAA TAATAATAAT AATGGTATCA ACAGAAACCA 50

GG 52

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:38:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 48 base pairs
- (B) TYPE: Nucleic Acid
- (C) STRANDEDNESS: Single
- (D) TOPOLOGY: Linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:38:

GTCTATTACT GTGCAAAGTA ATAACACTAA TAAGGGAGCA GCCACTGG 48

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:39:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 49 base pairs
- (B) TYPE: Nucleic Acid
- (C) STRANDEDNESS: Single
- (D) TOPOLOGY: Linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:39:

GGTACCCCCA CTATTATCAA TAATAATAAT GGTATTCGA CGTCTGGGG 49

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:40:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 53 base pairs
- (B) TYPE: Nucleic Acid
- (C) STRANDEDNESS: Single
- (D) TOPOLOGY: Linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:40:

CACTATTATG GGAGCAGCCA CTAATAATAA TAAGTCTGGG TCAAGGAACC 50

CTG 53

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:41:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 53 base pairs
- (B) TYPE: Nucleic Acid
- (C) STRANDEDNESS: Single
- (D) TOPOLOGY: Linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:41:

TCCTGTGCAG CTTCTGGCTA ATAATTCTAA TAATAAGGTA TGAACTGGGT 50

CCG 53

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:42:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 52 base pairs
- (B) TYPE: Nucleic Acid
- (C) STRANDEDNESS: Single
- (D) TOPOLOGY: Linear

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:42:

GAATGGGTTG GATGGATTAA CTAATAATAA GGTTAACCGA CCTATGCTGC 50

GG 52

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:43:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 49 base pairs
- (B) TYPE: Nucleic Acid
- (C) STRANDEDNESS: Single
- (D) TOPOLOGY: Linear

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:43:

CTGTGCAAAG TACCGTAAT ATTAATAATA ATAACACTGG TATTCGAC 49

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:44:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 48 base pairs
- (B) TYPE: Nucleic Acid
- (C) STRANDEDNESS: Single
- (D) TOPOLOGY: Linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:44:

CGTTTCACTT TTTCTTAAGA CTAATCCAAA TAAACAGCAT ACCTGCAG 48

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:45:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 46 base pairs
- (B) TYPE: Nucleic Acid
- (C) STRANDEDNESS: Single
- (D) TOPOLOGY: Linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:45:

GAATGGGTTG GATGGATTAA ATAATAATAA GGTGAACCGA CCTATG 46

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:46:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 53 base pairs
- (B) TYPE: Nucleic Acid
- (C) STRANDEDNESS: Single
- (D) TOPOLOGY: Linear

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:46:

10

GGGTCAACCAT CACCTGCNNS GCANNSNNSN NSNNNSAGCAA CTATTTAAC 50

TGG 53

20

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:47:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 52 base pairs
- (B) TYPE: Nucleic Acid
- (C) STRANDEDNESS: Single
- (D) TOPOLOGY: Linear

30

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:47:

GCGCAAGTCA GGATATTNNS NNSNNNSNNSN NSTGGTATCA ACAGAAACCA 50

40

GG 52

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:48:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 48 base pairs
- (B) TYPE: Nucleic Acid
- (C) STRANDEDNESS: Single
- (D) TOPOLOGY: Linear

10

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:48:

GTCTATTACT GTGCAAAGNN SNNSCACNNS NNNSGGGAGCA GCCACTGG 48

20

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:49:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 47 base pairs
- (B) TYPE: Nucleic Acid
- (C) STRANDEDNESS: Single
- (D) TOPOLOGY: Linear

30

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:49:

TACCCCCACT ATTATNNNSNN SNNSNNNSTGG TATTCGACG TCTGGGG 47

40

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:50:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 54 base pairs
- (B) TYPE: Nucleic Acid
- (C) STRANDEDNESS: Single
- (D) TOPOLOGY: Linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:50:

10

CACTATTATG GGAGGCAGCCA CNNSNNSNNS NNSGTCTGGG GTCAAGGAAC 50

CCTG 54

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:51:

20

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
  - (A) LENGTH: 53 base pairs
  - (B) TYPE: Nucleic Acid
  - (C) STRANDEDNESS: Single
  - (D) TOPOLOGY: Linear

30

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:51:

TCCGTGCAAG CTTCTGGCNN SNNSTTCNN NSNNNSGGTA TGAACTGGGT 50

40

CCG 53

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:52:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 52 base pairs
- (B) TYPE: Nucleic Acid
- (C) STRANDEDNESS: Single
- (D) TOPOLOGY: Linear

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:52:

10

GAATGGGTTG GATGGATTAA CNNSNNSNNS GGTNNSCCGA CCTATGCTGC 50

GG 52

20

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:53:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 49 base pairs
- (B) TYPE: Nucleic Acid
- (C) STRANDEDNESS: Single
- (D) TOPOLOGY: Linear

30

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:53:

CTGTGCAAAG TACCCGNNST ATNNNSNNSN SNNSCACTGG TATTCGAC 49

40

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:54:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 48 base pairs
- (B) TYPE: Nucleic Acid
- (C) STRANDEDNESS: Single
- (D) TOPOLOGY: Linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:54:

10

CGTTTCACTT TTTCTNNSGA CNNSTCCAAA NNSACAGCAT ACCTGCAG 48

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:55:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
- (A) LENGTH: 46 base pairs
  - (B) TYPE: Nucleic Acid
  - (C) STRANDEDNESS: Single
  - (D) TOPOLOGY: Linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:55:

30

GAATGGGTTG GATGGATTNN SNNNSNNNS GGTGAACCGA CCTATG 46

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:56:

40

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
- (A) LENGTH: 13 amino acids
  - (B) TYPE: Amino Acid
  - (D) TOPOLOGY: Linear

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:56:

Tyr Pro Tyr Tyr Arg Gly Thr Ser His Trp Tyr Phe Asp

1

5

10

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:57:

10

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 13 amino acids
- (B) TYPE: Amino Acid
- (D) TOPOLOGY: Linear

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:57:

20

Tyr Pro Tyr Tyr Ile Asn Lys Ser His Trp Tyr Phe Asp

1

5

10

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:58:

30

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 13 amino acids
- (B) TYPE: Amino Acid
- (D) TOPOLOGY: Linear

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:58:

40

Tyr Pro Tyr Tyr Tyr Gly Thr Ser His Trp Tyr Phe Asp

1

5

10

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:59:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 13 amino acids
- (B) TYPE: Amino Acid
- (D) TOPOLOGY: Linear

10

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:59:

Tyr Pro Tyr Tyr Tyr Asn Gln Ser His Trp Tyr Phe Asp

1 5 10

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:60:

20

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 13 amino acids
- (B) TYPE: Amino Acid
- (D) TOPOLOGY: Linear

30

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:60:

Tyr Pro Tyr Tyr Ile Ala Lys Ser His Trp Tyr Phe Asp

1 5 10

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:61:

40

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 13 amino acids

(B) TYPE: Amino Acid

(D) TOPOLOGY: Linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:61:

Tyr Pro Tyr Tyr Arg Asp Asn Ser His Trp Tyr Phe Asp

1                   5                   10

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:62:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 13 amino acids

(B) TYPE: Amino Acid

(D) TOPOLOGY: Linear

20

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:62:

Tyr Pro Tyr Tyr Trp Gly Thr Ser His Trp Tyr Phe Asp

1                   5                   10

30

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:63:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 13 amino acids

(B) TYPE: Amino Acid

(D) TOPOLOGY: Linear

40

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:63:

Tyr Pro Tyr Tyr Arg Gln Asn Ser His Trp Tyr Phe Asp

1                   5                   10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:64:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 13 amino acids
- (B) TYPE: Amino Acid
- (D) TOPOLOGY: Linear

10

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:64:

Tyr Pro Tyr Tyr Arg Gln Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp

1                   5                   10

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:65:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 13 amino acids
- (B) TYPE: Amino Acid
- (D) TOPOLOGY: Linear

30

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:65:

Tyr Pro Tyr Tyr Arg Asn Thr Ser His Trp Tyr Phe Asp

1                   5                   10

40

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:66:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 13 amino acids
- (B) TYPE: Amino Acid
- (D) TOPOLOGY: Linear

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:66:

10

Tyr Pro Tyr Tyr Lys Asn Thr Ser His Trp Tyr Phe Asp

1                    5                    10

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:67:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

20

- (A) LENGTH: 13 amino acids
- (B) TYPE: Amino Acid
- (D) TOPOLOGY: Linear

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:67:

30

Tyr Pro Tyr Tyr Ile Glu Arg Ser His Trp Tyr Phe Asp

1                    5                    10

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:68:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

40

- (A) LENGTH: 13 amino acids
- (B) TYPE: Amino Acid
- (D) TOPOLOGY: Linear

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:68:

Tyr Pro Tyr Tyr Arg Asn Ala Ser His Trp Tyr Phe Asp

1

5

10

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:69:

10

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 13 amino acids
- (B) TYPE: Amino Acid
- (D) TOPOLOGY: Linear

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:69:

20

Tyr Pro Tyr Tyr Thr Thr Arg Ser His Trp Tyr Phe Asp

1

5

10

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:70:

30

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 13 amino acids
- (B) TYPE: Amino Acid
- (D) TOPOLOGY: Linear

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:70:

40

Tyr Pro Tyr Tyr Glu Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp

1

5

10

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:71:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 13 amino acids
- (B) TYPE: Amino Acid
- (D) TOPOLOGY: Linear

10

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:71:

Tyr Pro Tyr Tyr Arg Gln Arg Gly His Trp Tyr Phe Asp

1 5 10

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:72:

20

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 13 amino acids
- (B) TYPE: Amino Acid
- (D) TOPOLOGY: Linear

30

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:72:

Tyr Pro Tyr Tyr Thr Gly Arg Ser His Trp Tyr Phe Asp

1 5 10

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:73:

40

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 13 amino acids
- (B) TYPE: Amino Acid

(D) TOPOLOGY: Linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:73:

Tyr Pro Tyr Tyr Thr Asn Thr Ser His Trp Tyr Phe Asp

1

5

10

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:74:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 13 amino acids

(B) TYPE: Amino Acid

(D) TOPOLOGY: Linear

20

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:74:

Tyr Pro Tyr Tyr Arg Lys Gly Ser His Trp Tyr Phe Asp

1

5

10

30

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:75:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 13 amino acids

(B) TYPE: Amino Acid

(D) TOPOLOGY: Linear

40

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:75:

Tyr Pro Tyr Tyr Thr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp

1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:76:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 13 amino acids
- (B) TYPE: Amino Acid
- (D) TOPOLOGY: Linear

10

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:76:

Tyr Pro Tyr Tyr Arg Ser Gly Ser His Trp Tyr Phe Asp

1 5 10

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:77:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 13 amino acids
- (B) TYPE: Amino Acid
- (D) TOPOLOGY: Linear

30

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:77:

Tyr Pro Tyr Tyr Thr Asn Arg Ser His Trp Tyr Phe Asp

1 5 10

40

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:78:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 13 amino acids
- (B) TYPE: Amino Acid
- (D) TOPOLOGY: Linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:78:

Tyr Pro Tyr Tyr Arg Asn Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp  
1                       5                       10

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:79:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
  - (A) LENGTH: 13 amino acids
  - (B) TYPE: Amino Acid
  - (D) TOPOLOGY: Linear

20

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:79:

Tyr Pro Tyr Tyr Lys Glu Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp  
1                       5                       10

30

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:80:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
  - (A) LENGTH: 13 amino acids
  - (B) TYPE: Amino Acid
  - (D) TOPOLOGY: Linear

40

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:80:

Tyr Pro Tyr Tyr Arg Asp Ala Ser His Trp Tyr Phe Asp

1

5

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:81:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 13 amino acids
- (B) TYPE: Amino Acid
- (D) TOPOLOGY: Linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:81:

Tyr Pro Tyr Tyr Arg Gln Lys Gly His Trp Tyr Phe Asp

1

5

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:82:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 13 amino acids
- (B) TYPE: Amino Acid
- (D) TOPOLOGY: Linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:82:

Tyr Pro Tyr Tyr Lys Gly Gly Ser His Trp Tyr Phe Asp

1

5

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:83:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 13 amino acids
- (B) TYPE: Amino Acid
- (D) TOPOLOGY: Linear

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:83:

10

Tyr Pro Tyr Tyr Gly Ala Ser His Trp Tyr Phe Asp

1                    5                    10

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:84:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

20

- (A) LENGTH: 13 amino acids
- (B) TYPE: Amino Acid
- (D) TOPOLOGY: Linear

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:84:

30

Tyr Pro Tyr Tyr Arg Gly Glu Ser His Trp Tyr Phe Asp

1                    5                    10

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:85:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

40

- (A) LENGTH: 13 amino acids
- (B) TYPE: Amino Acid
- (D) TOPOLOGY: Linear

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:85:

Tyr Pro Tyr Tyr Arg Ser Thr Ser His Trp Tyr Phe Asp

1

5

10

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:86:

10

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 10 amino acids
- (B) TYPE: Amino Acid
- (D) TOPOLOGY: Linear

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:86:

20

Gly Tyr Asp Phe Thr His Tyr Gly Met Asn

1

5

10

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:87:

30

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 10 amino acids
- (B) TYPE: Amino Acid
- (D) TOPOLOGY: Linear

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:87:

40

Gly Tyr Glu Phe Gln His Tyr Gly Met Asn

1

5

10

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:88:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 10 amino acids
- (B) TYPE: Amino Acid
- (D) TOPOLOGY: Linear

10

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:88:

Gly Tyr Glu Phe Thr His Tyr Gly Met Asn

1                    5                    10

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:89:

20

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 10 amino acids
- (B) TYPE: Amino Acid
- (D) TOPOLOGY: Linear

30

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:89:

Gly Tyr Asp Phe Gly His Tyr Gly Met Asn

1                    5                    10

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:90:

40

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 10 amino acids

(B) TYPE: Amino Acid

(D) TOPOLOGY: Linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:90:

Gly Tyr Asp Phe Ser His Tyr Gly Met Asn

1

5

10

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:91:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 10 amino acids

(B) TYPE: Amino Acid

(D) TOPOLOGY: Linear

20

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:91:

Gly Tyr Glu Phe Ser His Tyr Gly Met Asn

1

5

10

30

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:92:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 10 amino acids

(B) TYPE: Amino Acid

(D) TOPOLOGY: Linear

40

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:92:

Phe Ser Val Asp Val Ser Lys Ser Thr Ala

1                   5                   10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:93:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 10 amino acids
- (B) TYPE: Amino Acid
- (D) TOPOLOGY: Linear

10

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:93:

Phe Ser Leu Asp Lys Ser Lys Ser Thr Ala

1                   5                   10

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:94:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 10 amino acids
- (B) TYPE: Amino Acid
- (D) TOPOLOGY: Linear

30

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:94:

Phe Ser Leu Asp Val Trp Lys Ser Thr Ala

1                   5                   10

40

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:95:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 10 amino acids
- (B) TYPE: Amino Acid
- (D) TOPOLOGY: Linear

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:95:

10

Phe Ser Ile Asp Lys Ser Lys Ser Thr Ala

1 5 10

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:96:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

20

- (A) LENGTH: 42 base pairs
- (B) TYPE: Nucleic Acid
- (C) STRANDEDNESS: Single
- (D) TOPOLOGY: Linear

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:96:

30

GCAAAGTACC CGTACTATTA TGGGACGAGC CACTGGTATT TC 42

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:97:

40

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 48 base pairs
- (B) TYPE: Nucleic Acid
- (C) STRANDEDNESS: Single

(D) TOPOLOGY: Linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:97:

GTCACCATCA CCTGCAGCGC AAGTCAGGAT ATTAGCAACT ATTTAAC 48

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:98:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 33 base pairs
- (B) TYPE: Nucleic Acid
- (C) STRANDEDNESS: Single
- (D) TOPOLOGY: Linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:98:

CCGTACTATT ATGGGAGCAG CCACTGGTAT TTC 33

30

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:99:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 6072 base pairs
- (B) TYPE: Nucleic Acid
- (C) STRANDEDNESS: Single
- (D) TOPOLOGY: Linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:99:

40

GAATTCAACT TCTCCATACT TTGGATAAGG AAATACAGAC ATGAAAATC 50

TCATTGCTGA GTTGTATTT AAGCTTGGA GATTATCGTC ACTGCAATGC 100

TTCGCAATAT GGCGAAAT GACCAACAGC GGTTGATTGA TCAGGTAGAG 150

GGGGCGCTGT ACGAGGTAAA GCCCGATGCC AGCATTCTG ACGACGATAAC 200

10

GGAGCTGCTG CGCGATTACG TAAAGAAGTT ATTGAAGCAT CCTCGTCAGT 250

AAAAAGTTAA TCTTTCAAC AGCTGTCATA AAGTGTAC CCGCGAGACT 300

TATAGTCGCT TTGTTTTAT TTTTAATGT ATTTGTAAC AGAATTGAG 350

20

CTCGGTACCC GGGGATCCTC TAGAGGTTGA GGTGATTTA TGAAAAAGAA 400

TATCGCATTG CTTCTGCAT CTATGTTCGT TTTTCTATT GCTACAAACG 450

CGTACGCTGA TATCCAGTTG ACCCAGTCCC CGAGCTCCCT GTCCGCCTCT 500

30

GTGGGCGATA GGGTCACCAT CACCTGCAGC GCAAGTCAGG ATATTAGCAA 550

CTATTAAAC TGGTATCAAC AGAAACCAGG AAAAGCTCCG AACTACTGA 600

TTTACTTCAC CTCCTCTCTC CACTCTGGAG TCCCTTCTCG CTTCTCTGGA 650

40

TCCGGTTCTG GGACGGATTA CACTCTGACC ATCAGCAGTC TGCAGCCAGA 700

AGACTTCGCA ACTTATTACT GTCAACAGTA TAGCACCGTG CCGTGGACGT 750

TTGGACAGGG TACCAAGGTG GAGATCAAAC GAACTGTGGC TGCACCATCT 800

GTCTTCATCT TCCCGCCATC TGATGAGCAG TTGAAATCTG GAACTGCTTC 850

TGTTGTGTGC CTGCTGAATA ACTTCTATCC CAGAGAGGCC AAAGTACAGT 900

10

GGAAGGTGGA TAACGCCCTC CAATCGGGTA ACTCCCAGGA GAGTGTACA 950

GAGCAGGACA GCAAGGACAG CACCTACAGC CTCAGCAGCA CCCTGACGCT 1000

GAGCAAAGCA GACTACGAGA AACACAAAGT CTACGCCTGC GAAGTCACCC 1050

20

ATCAGGGCCT GAGCTCGCCC GTCACAAAGA GCTTCAACAG GGGAGAGTGT 1100

TAAGCTGATC CTCTACGCCG GACGCATCGT GGCCCTAGTA CGCAACTAGT 1150

CGTAAAAAGG GTATCTAGAG GTTGAGGTGA TTTTATGAAA AAGAATATCG 1200

30

CATTTCTTCT TGCATCTATG TTCGTTTTT CTATTGCTAC AAACGCGTAC 1250

GCTGAGGTTC AGCTGGTGA GTCTGGCGGT GGCTGGTGC AGCCAGGGGG 1300

CTCACTCCGT TTGTCTGTG CAGCTTCTGG CTATACCTTC ACCAACTATG 1350

40

GTATGAACTG GATCCGTCAG GCCCCGGGT AAGGCCTGGA ATGGGTTGGA 1400

TGGATTAACA CCTATACCGG TGAACCGACC TATGCTGCGG ATTCAAACG 1450

TCGTTTACT ATATCTGCAG ACACCTCCAG CAACACAGTT TACCTGCAGA 1500

TGAACAGCCT GCGCGCTGAG GACACTGCCG TCTATTACTG TGCAAAGTAC 1550

CCGCACTATT ATGGGAGCAG CCACTGGTAT TTGACGTCT GGGGTCAAGG 1600

10

AACCCTGGTC ACCGTCTCCT CGGCCTCCAC CAAGGGCCA TCGGTCTTCC 1650

CCCTGGCACC CTCCCTCAAG AGCACCTCTG GGGGCACAGC GGCCCTGGC 1700

TGCCTGGTCA AGGACTACTT CCCCGAACCG GTGACGGTGT CGTGGAACTC 1750

20

AGGCGCCCTG ACCAGGGCG TGCACACCTT CCCGGCTGTC CTACAGTCCT 1800

CAGGACTCTA CTCCCTCAGC AGCGTGGTGA CCGTGCCCTC CAGCAGCTG 1850

GGCACCCAGA CCTACATCTG CAACGTGAAT CACAAGGCCA GCAACACCAA 1900

30

GGTCGACAAG AAAGTTGAGC CCAAATCTG TGACAAAAT CACCTCTAGA 1950

GTGGCGGTGG CTCTGGTCC GGTGATTTG ATTATGAAAA GATGGCAAAC 2000

GCTAATAAGG GGGCTATGAC CGAAAATGCC GATGAAAACG CGCTACAGTC 2050

40

TGACGCTAAA GGCAAACCTG ATTCTGTGCG TACTGATTAC GGTGCTGCTA 2100

TCGATGGTTT CATTGGTGAC GTTCCGGCC TTGCTAATGG TAATGGTGCT 2150

ACTGGTGATT TTGCTGGCTC TAATTCCCAA ATGGCTCAAG TCGGTGACGG 2200

TGATAATTCA CCTTTAATGA ATAATTCCG TCAATATTAA CCTTCCCTCC 2250

CTCAATCGGT TGAATGTCGC CCTTTGTCT TTAGCGCTGG TAAACCATAT 2300

GAATTTCTA TTGATTGTGA CAAAATAAAC TTATTCCGTG GTGTCTTGC 2350

10

GTTTCTTTA TATGTTGCCA CCTTTATGTA TGTATTTCT ACGTTGCTA 2400

ACATACTGCG TAATAAGGAG TCTTAATCAT GCCAGTTCTT TTGGCTAGCG 2450

CCGCCCTATA CCTTGCTCTGC CTCCCCGCGT TGCGTCGCGG TGCATGGAGC 2500

20

CGGGCCACCT CGACCTGAAT GGAAGCCGGC GGCACCTCGC TAACGGATTC 2550

ACCACTCCAA GAATTGGAGC CAATCAATTG TTGCGGAGAA CTGTGAATGC 2600

GCAAACCAAC CCTTGGCAGA ACATATCCAT CGCGTCCGCC ATCTCCAGCA 2650

30

GCCGCACGCG GCGCATCTCG GGCAGCGTTG GGTCTGGCC ACGGGTGCGC 2700

ATGATCGTGC TCCTGTCGTT GAGGACCCGG CTAGGCTGGC GGGGTTGCCT 2750

TACTGGTTAG CAGAATGAAT CACCGATACG CGAGCGAACG TGAAGCGACT 2800

40

GCTGCTGCAA AACGTCTGCG ACCTGAGCAA CAACATGAAT GGTCTTCGGT 2850

TTCCGTGTTT CGTAAAGTCT GGAAACGCGG AAGTCAGCGC CCTGCACCAT 2900

TATGTTCCGG ATCTGCATCG CAGGATGCTG CTGGCTACCC TGTGGAACAC 2950

CTACATCTGT ATTAACGAAG CGCTGGCATT GACCCTGAGT GATTTTCTC 3000

TGGTCCCGCC GCATCCATAC CGCCAGTTGT TTACCCCTCAC AACGTTCCAG 3050

10

TAACCGGGCA TGTTCATCAT CAGTAACCCG TATCGTGAGC ATCCTCTCTC 3100

GTTTCATCGG TATCATTACC CCCATGAACA GAAATTCCCC CTTACACGGA 3150

GGCATCAAGT GACCAAACAG GAAAAAACCG CCCTTAACAT GGCCCGCTTT 3200

20

ATCAGAAGCC AGACATTAAC GCTTCTGGAG AACTCAACG AGCTGGACGC 3250

GGATGAACAG GCAGACATCT GTGAATCGCT TCACGACCAC GCTGATGAGC 3300

TTTACCGCAG GATCCGGAAA TTGTAAACGT TAATATTTG TTAAAATTCG 3350

30

CGTTAAATT TTGTTAAATC AGCTCATTTC TTAACCAATA GGCGAAATC 3400

GGCAAAATCC CTTATAAATC AAAAGAATAG ACCGAGATAG GGTTGAGTGT 3450

TGTTCCAGTT TGGAAACAAGA GTCCACTATT AAAGAACGTG GACTCCAACG 3500

40

TCAAAGGGCG AAAAACCGTC TATCAGGGCT ATGGCCCACT ACGTGAACCA 3550

TCACCCCTAAT CAAGTTTTT GGGGTCGAGG TGCCGTAAAG CACTAAATCG 3600

GAACCCTAAA GGGAGCCCCC GATTTAGAGC TTGACGGGG AAGCCGGCGA 3650

ACGTGGCGAG AAAGGAAGGG AAGAAAGCGA AAGGAGCGGG CGCTAGGGCG 3700

CTGGCAAGTG TAGCGGTAC GCTGCGCGTA ACCACCACAC CCGCCGCGCT 3750

TAATGCGCCG CTACAGGGCG CGTCCGGATC CTGCCTCGCG CGTTTCGGTG 3800

10

ATGACGGTGA AAACCTCTGA CACATGCAGC TCCCGGAGAC GGTCACAGCT 3850

TGTCTGTAAG CGGATGCCGG GAGCAGACAA GCCCGTCAGG GCGCGTCAGC 3900

GGGTGTTGGC GGGTGTGGG GCGCAGCCAT GACCCAGTCA CGTAGCGATA 3950

20

GCGGAGTGTAA TACTGGCTTA ACTATGCGGC ATCAGAGCAG ATTGTACTGA 4000

GAGTGCACCA TATGCGGTGT GAAATACCGC ACAGATGCGT AAGGAGAAAA 4050

TACCGCATCA GGCGCTCTTC CGCTTCCTCG CTCACTGACT CGCTGCGCTC 4100

30

GGTCGTTCGG CTGCGCGAG CGGTATCAGC TCACTCAAAG GCGGTAATAC 4150

GGTTATCCAC AGAACATCAGGG GATAACGCAG GAAAGAACAT GTGAGCAAAA 4200

GGCCAGCAAA AGGCCAGGAA CCGTAAAAAG GCCCGTTGC TGGCGTTTT 4250

40

CCATAGGCTC CGCCCCCTG ACGAGCATCA CAAAAATCGA CGCTCAAGTC 4300

AGAGGTGGCG AAACCCGACA GGACTATAAA GATACCAGGC GTTTCCCCCT 4350

GGAAGCTCCC TCGTGCCTC TCCTGTTCCG ACCCTGCCGC TTACCGGATA 4400

CCTGTCCGCC TTTCTCCCTT CGGGAAGCGT GGCGCTTCT CATAGCTCAC 4450

GCTGTAGGTA TCTCAGTTCG GTGTAGGTG TGCGCTCAA GCTGGGCTGT 4500

10

GTGCACGAAC CCCCCGTTCA GCCCGACCGC TGCCCTTAT CCCGTAACTA 4550

TCGTCTTGAG TCCAACCCGG TAAGACACGA CTTATGCCA CTGGCAGCAG 4600

CCACTGGTAA CAGGATTAGC AGAGCGAGGT ATGTAGGCGG TGCTACAGAG 4650

20

TTCTTGAAGT GGTGGCCTAA CTACGGCTAC ACTAGAAGGA CAGTATTGAG 4700

TATCTGCGCT CTGCTGAAGC CAGTTACCTT CGGAAAAAGA GTTGGTAGCT 4750

CTTGATCCGG CAAACAAACC ACCGCTGGTA GCGGTGGTTT TTTTGTTCG 4800

30

AAGCAGCAGA TTACGCGCAG AAAAAAAGGA TCTCAAGAAG ATCCTTGAT 4850

CTTTCTACG GGGTCTGACG CTCAGTGGAA CGAAAATCA CGTTAAGGG 4900

TTTTGGTCAT GAGATTATCA AAAAGGATCT TCACCTAGAT CCTTTAAAT 4950

40

TAAAAATGAA GTTTAAATC AATCTAAAGT ATATATGAGT AAACTTGGTC 5000

TGACAGTTAC CAATGCTAA TCAGTGAGGC ACCTATCTCA GCGATCTGTC 5050

TATTCGTTCA ATCCATAGTT GCCTGACTCC CCGTCGTGTA GATAACTACG 5100

ATACGGGAGG GCTTACCATC TGGCCCCAGT GCTGCAATGA TACCGCGAGA 5150

CCCACGCTCA CCGGCTCCAG ATTTATCAGC AATAAACAG CCAGCCGAA 5200

GGGCCGAGCG CAGAAGTGGT CCTGCAACTT TATCCGCCTC CATCCAGTCT 5250

10

ATTAATTGTT GCCGGGAAGC TAGAGTAAGT AGTCGCCAG TTAATAGTTT 5300

GCGCAACGTT GTGCCATTG CTGCAGGCAT CGTGGTGTCA CGCTCGTCG 5350

TTGGTATGGC TTCATTCAGC TCCGGTTCCC AACGATCAAG GCGAGTTACA 5400

20

TGATCCCCCA TGTTGTGCAA AAAAGCGGTT AGCTCCTTCG GTCTCCGAT 5450

CGTTGTCAGA AGTAAGTTGG CCGCAGTGGT ATCACTCATG GTTATGGCAG 5500

CACTGCATAA TTCTCTTACT GTCATGCCAT CCGTAAGATG CTTTCTGTG 5550

30

ACTGGTGAGT ACTCAACCAA GTCATTCTGA GAATAGTGTG TGCGGCGACC 5600

GAGTTGCTCT TGCCCCGGCGT CAACACGGGA TAATACCGCG CCACATAGCA 5650

GAACTTAAA AGTGCTCATC ATTGGAAAAC GTTCTCGGG GCGAAAACTC 5700

40

TCAAGGATCT TACCGCTGTT GAGATCCAGT TCGATGTAAC CCACTCGTGC 5750

ACCCAAGTGA TCTTCAGCAT CTTTTACTTT CACCAGCGTT TCTGGGTGAG 5800

CAAAAACAGG AAGGCAAAAT GCCGCAAAAA AGGGAATAAG GGCGACACGG 5850

AAATGTTGAA TACTCATACT CTTCCCTTTT CAATATTATT GAAGCATTAA 5900

TCAGGGTTAT TGTCTCATGA GCGGATAACAT ATTTGAATGT ATTTAGAAAAA 5950

10

ATAAACAAAT AGGGGTTCCG CGCACATTTC CCCGAAAAGT GCCACCTGAC 6000

GTCTAAGAAA CCATTATTAT CATGACATTA ACCTATAAAA ATAGGCGTAT 6050

CACGAGGCC C TT CGT CTTC AA 6072

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:100:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 237 amino acids

(B) TYPE: Amino Acid

30

(D) TOPOLOGY: Linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:100:

Met Lys Lys Asn Ile Ala Phe Leu Leu Ala Ser Met Phe Val Phe

-23 -20 -15 -10 40

Ser Ile Ala Thr Asn Ala Tyr Ala Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser

~5 1 5

Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr

10	15	20
----	----	----

Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln

25	30	35
----	----	----

Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Phe Thr Ser<sup>10</sup>

40	45	50
----	----	----

Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser

55	60	65
----	----	----

Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp<sup>20</sup>

70	75	80
----	----	----

Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr

85	90	95
----	----	----

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala<sup>30</sup>

100	105	110
-----	-----	-----

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser

115	120	125
-----	-----	-----

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg<sup>40</sup>

130	135	140
-----	-----	-----

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly

145	150	155
-----	-----	-----

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr

160 165 170

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu

175 180 185

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser

190 195 200

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

205 210

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:101:

20

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 254 amino acids
- (B) TYPE: Amino Acid
- (D) TOPOLOGY: Linear

30

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:101:

Met Lys Lys Asn Ile Ala Phe Leu Leu Ala Ser Met Phe Val Phe

-23 -20 -15 -10

Ser Ile Ala Thr Asn Ala Tyr Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser

40

-5 1 5

Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys

(120)

JP 3957765 B2 2007.8.15

10

15

20

Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Ile

25

30

35

Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Trp Ile Asn

40

45

50

10

Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe Lys Arg Arg

55

60

65

Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Val Tyr Leu Gln

70

75

80

20

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85

90

95

Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val

100

105

110

30

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys

115

120

125

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser

130

135

140

40

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro

145

150

155

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly

160 165 170

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

175 180 185

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln<sup>10</sup>

190 195 200

Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val

205 210 215

Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Leu<sup>20</sup>

220 225 230

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:102:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 158 amino acids

30

(B) TYPE: Amino Acid

(D) TOPOLOGY: Linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:102:

Ser Gly Gly Ser Gly Ser Gly Asp Phe Asp Tyr Glu Lys Met

40

1 5 10 15

Ala Asn Ala Asn Lys Gly Ala Met Thr Glu Asn Ala Asp Glu Asn

20 25 30

Ala Leu Gln Ser Asp Ala Lys Gly Lys Leu Asp Ser Val Ala Thr

35 40 45

Asp Tyr Gly Ala Ala Ile Asp Gly Phe Ile Gly Asp Val Ser Gly

50 55 60

Leu Ala Asn Gly Asn Gly Ala Thr Gly Asp Phe Ala Gly Ser Asn

65 70 75

Ser Gln Met Ala Gln Val Gly Asp Gly Asp Asn Ser Pro Leu Met

80 85 90

Asn Asn Phe Arg Gln Tyr Leu Pro Ser Leu Pro Gln Ser Val Glu

95 100 105

Cys Arg Pro Phe Val Phe Ser Ala Gly Lys Pro Tyr Glu Phe Ser

110 115 120

Ile Asp Cys Asp Lys Ile Asn Leu Phe Arg Gly Val Phe Ala Phe

125 130 135

Leu Leu Tyr Val Ala Thr Phe Met Tyr Val Phe Ser Thr Phe Ala

140 145 150

Asn Ile Leu Arg Asn Lys Glu Ser

155

10

20

30

40

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:103:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 110 amino acids
- (B) TYPE: Amino Acid
- (D) TOPOLOGY: Linear

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:103:

10

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val

1 5 10 15

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

20 25 30

20

Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys

35 40 45

Leu Leu Ile Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser

50 55 60

30

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile

65 70 75

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln

80 85 90

40

Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu

95 100 105

Ile Lys Arg Thr Val

110

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:104:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 118 amino acids
- (B) TYPE: Amino Acid
- (C) TOPOLOGY: Linear

10

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:104:

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly

20

1                   5                   10                   15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr

20                   25                   30

Asn Tyr Gly Met Asn Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

30

35                   40                   45

Glu Trp Val Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr

50                   55                   60

Ala Ala Asp Phe Lys Arg Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser

40

65                   70                   75

Ser Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp

80                   85                   90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser

95

100

105

Ser His Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu

110

115

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:105:

10

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 110 amino acids
- (B) TYPE: Amino Acid
- (D) TOPOLOGY: Linear

20

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:105:

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val

1

5

10

15

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

30

20

25

30

Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys

35

40

45

Val Leu Ile Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser

40

50

55

60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile

(126)

JP 3957765 B2 2007.8.15

65

70

75

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln

80

85

90

Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu

95

100

105

10

Ile Lys Arg Thr Val

110

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:106:

20

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 118 amino acids

(B) TYPE: Amino Acid

(D) TOPOLOGY: Linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:106:

30

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly

1

5

10

15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr

20

25

30

40

Asn Tyr Gly Met Asn Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

35

40

45

Glu Trp Val Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr

50	55	60
----	----	----

Ala Ala Asp Phe Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Ala Asp Thr Ser

65	70	75
----	----	----

Ser Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp

80	85	90
----	----	----

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser

95	100	105
----	-----	-----

Ser His Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu

110	115
-----	-----

<sup>10</sup>

<sup>20</sup>

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:107:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 110 amino acids

<sup>30</sup>

(B) TYPE: Amino Acid

(D) TOPOLOGY: Linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:107:

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val

1	5	10	15
---	---	----	----

<sup>40</sup>

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

20	25	30
----	----	----

Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys

35 40 45

Val Leu Ile Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile

10  
65 70 75

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln

80 85 90

Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu

20  
95 100 105

Ile Lys Arg Thr Val

110

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:108:

30

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 118 amino acids
- (B) TYPE: Amino Acid
- (D) TOPOLOGY: Linear

40

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:108:

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly

1 5 10 15

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

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

10

Glu Trp Val Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr  
50 55 60

Ala Ala Asp Phe Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser  
65 70 75

20

Lys Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp  
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser  
95 100 105

30

Ser His Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
110 115

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:109:

40

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 110 amino acids
- (B) TYPE: Amino Acid
- (D) TOPOLOGY: Linear

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:109:

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val

1

5

10

15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Asn Glu Gln Leu Ser

20

25

30

10

Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys

35

40

45

Val Leu Ile Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser

50

55

60

20

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile

65

70

75

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln

80

85

90

30

Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu

95

100

105

Ile Lys Arg Thr Val

110

40

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:110:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 118 amino acids
- (B) TYPE: Amino Acid
- (D) TOPOLOGY: Linear

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:110:

10

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly

1

5

10

15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr

20 . 25 30

20

Asn Tyr Gly Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

35 40 45

Glu Trp Val Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr

50 55 60

30

Ala Ala Asp Phe Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser

65 70 75

Lys Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp

80 85 90

40

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser

95 100 105

Ser His Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu

110

115

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:111:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 110 amino acids

(B) TYPE: Amino Acid

(D) TOPOLOGY: Linear

10

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:111:

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val

1

5

10

15

20

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Asn Glu Gln Leu Ser

20

25

30

Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys

35

40

45

30

Val Leu Ile Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser

50

55

60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile

65

70

75

40

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln

80

85

90

Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu

95

100

105

Ile Lys Arg Thr Val

110

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:112:

10

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 118 amino acids
- (B) TYPE: Amino Acid
- (D) TOPOLOGY: Linear

20

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:112:

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly

1

5

10

15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Thr

30

20

25

30

His Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

35

40

45

Glu Trp Val Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr

40

50

55

60

Ala Ala Asp Phe Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser

65

70

75

Lys Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp

80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser

95 100 105

Ser His Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu

110 115

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:113:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 110 amino acids

20

(B) TYPE: Amino Acid

(D) TOPOLOGY: Linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:113:

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val

1 5 10 15

30

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Asn Glu Gln Leu Ser

20 25 30

Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys

35 40 45

40

Val Leu Ile Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser

(135)

JP 3957765 B2 2007.8.15

50

55

60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile

65

70

75

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln

80

85

90

10

Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu

95

100

105

Ile Lys Arg Thr Val

110

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:114:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 118 amino acids

(B) TYPE: Amino Acid

30

(D) TOPOLOGY: Linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:114:

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly

1

5

10

15

40

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr

20

25

30

Asn Tyr Gly Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

35 40 45

Glu Trp Val Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr

50 55 60

Ala Ala Asp Phe Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser<sup>10</sup>

65 70 75

Lys Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp

80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Tyr Pro Tyr Tyr Gly Thr

95 100 105

Ser His Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu

110 115

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:115:

30

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 110 amino acids
- (B) TYPE: Amino Acid
- (D) TOPOLOGY: Linear

40

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:115:

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val

1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Asn Glu Gln Leu Ser

20 25 30

Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys

35 40 45

Val Leu Ile Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser<sup>10</sup>

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile

65 70 75

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln<sup>20</sup>

80 85 90

Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu

95 100 105

Ile Lys Arg Thr Val<sup>30</sup>

110

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:116:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 118 amino acids<sup>40</sup>

(B) TYPE: Amino Acid

(D) TOPOLOGY: Linear

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:116:

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly

1

5

10

15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Thr

20

25

30

10

His Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

35

40

45

Glu Trp Val Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr

50

55

60

20

Ala Ala Asp Phe Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser

65

70

75

Lys Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp

80

85

90

30

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Tyr Pro Tyr Tyr Gly Thr

95

100

105

Ser His Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu

110

115

40

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:117:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 110 amino acids
- (B) TYPE: Amino Acid
- (D) TOPOLOGY: Linear

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:117:

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

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

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

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile  
65 70 75

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln  
80 85 90

Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu  
95 100 105

Ile Lys Arg Thr Val

110

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:118:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 118 amino acids
- (B) TYPE: Amino Acid
- (D) TOPOLOGY: Linear

10

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:118:

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly

1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Thr

20 25 30

20

His Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

35 40 45

Glu Trp Val Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr

50 55 60

30

Ala Ala Asp Phe Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser

65 70 75

Lys Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp

80 85 90

40

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Tyr Pro Tyr Tyr Gly Thr

95

100

105

Ser His Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu

110

115

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:119:

10

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 10 amino acids
- (B) TYPE: Amino Acid
- (D) TOPOLOGY: Linear

(ix) FEATURE:

20

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 3
- (C) IDENTIFICATION METHOD:
- (D) OTHER INFORMATION: Where the X at position 3 represents either Aspartic acid, Threonine or Glutamic acid

30

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 4
- (C) IDENTIFICATION METHOD:
- (D) OTHER INFORMATION: Where the X at position 4 represents either Phenylalanine, Tryptophan or Tyrosine

40

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 5

(C) IDENTIFICATION METHOD:

(D) OTHER INFORMATION: Where the X at position 5 represents either Threonine, Glutamine, Glycine or Serine

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: Modified-site

(B) LOCATION: 6

(C) IDENTIFICATION METHOD:

(D) OTHER INFORMATION: Where the X at position 6 is either Histidine or Asparagine

10

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: Modified-site

20

(B) LOCATION: 9

(C) IDENTIFICATION METHOD:

(D) OTHER INFORMATION: Where the X at position 9 represents either Methionine or Isoleucine

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:119:

30

Gly Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Gly Xaa Asn

1

5

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:120:

40

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 17 amino acids

(B) TYPE: Amino Acid

(D) TOPOLOGY: Linear

## (ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 5
- (C) IDENTIFICATION METHOD:
- (D) OTHER INFORMATION: Where the X at position 5 represents either Tyrosine or Tryptophan

10

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:120:

Trp Ile Asn Thr Xaa Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe

1 5 10 15

Lys Arg 20

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:121:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 14 amino acids
- (B) TYPE: Amino Acid
- (D) TOPOLOGY: Linear

30

## (ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 3
- (C) IDENTIFICATION METHOD:
- (D) OTHER INFORMATION: Where the X at position 3 represents either Histidine or Tyrosine

40

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: Modified-site

(B) LOCATION: 5

(C) IDENTIFICATION METHOD:

(D) OTHER INFORMATION: Where the X at position 5 represents either Tyrosine, Arginine, Lysine, Isoleucine, Threonine, Glutamic acid or Tryptophan

10

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: Modified-site

(B) LOCATION: 6

(C) IDENTIFICATION METHOD:

(D) OTHER INFORMATION: Where the X at position 6 represents either Glycine, Asparagine, Alanine, Aspartic acid, Glutamine, Glutamic acid, Threonine, Lysine or Serine

20

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: Modified-site

(B) LOCATION: 7

30

(C) IDENTIFICATION METHOD:

(D) OTHER INFORMATION: Where the X at position 7 represents either Serine, Threonine, Lysine, Glutamine, Asparagine, Arginine, Alanine, Glutamic acid or Glycine

(ix) FEATURE:

40

(A) NAME/KEY: Modified-site

(B) LOCATION: 8

(C) IDENTIFICATION METHOD:

(D) OTHER INFORMATION: Where the X at position 8 represents either Serine or Glycine

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:121:

Tyr Pro Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa His Trp Tyr Phe Asp Val

1                   5                   10

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:122:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 10 amino acids
- (B) TYPE: Amino Acid
- (D) TOPOLOGY: Linear

20

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site

- (B) LOCATION: 1

- (C) IDENTIFICATION METHOD:

30

(D) OTHER INFORMATION: Where the X at position 1 represents either Phenylalanine, Isoleucine, Valine, Leucine or Alanine

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site

- (B) LOCATION: 10

40

- (C) IDENTIFICATION METHOD:

(D) OTHER INFORMATION: Where the X at position 10 represents either Valine, Alanine, Leucine or Isoleucine

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 3
- (C) IDENTIFICATION METHOD:
- (D) OTHER INFORMATION: Where the X at position 3 represents either Alanine, Leucine, Valine or Isoleucine

10

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 5
- (C) IDENTIFICATION METHOD:
- (D) OTHER INFORMATION: Where the X at position 5 represents either Threonine, Valine or Lysine

20

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 6
- (C) IDENTIFICATION METHOD:
- (D) OTHER INFORMATION: Where the X at position 6 represents either Serine or Tryptophan

30

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 7
- (C) IDENTIFICATION METHOD:
- (D) OTHER INFORMATION: Where the X at position 7 represents either Serine or Lysine

40

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 8
- (C) IDENTIFICATION METHOD:
- (D) OTHER INFORMATION: Where the X at position 8 represents either Asparagine or Serine

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:122:

10

Xaa Ser Xaa Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Thr Xaa

1                    5                    10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:123:

20

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
  - (A) LENGTH: 11 amino acids
  - (B) TYPE: Amino Acid
  - (D) TOPOLOGY: Linear

(ix) FEATURE:

30

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 1
- (C) IDENTIFICATION METHOD:
- (D) OTHER INFORMATION: Where the X at position 1 represents either Arginine or Serine

40

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 3
- (C) IDENTIFICATION METHOD:

(D) OTHER INFORMATION: Where the X at position 3 represents either Serine or Asparagine

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: Modified-site

(B) LOCATION: 4

(C) IDENTIFICATION METHOD:

(D) OTHER INFORMATION: Where the X at position 4 represents either Glutamine or Glutamic acid

10

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: Modified-site

(B) LOCATION: 5

20

(C) IDENTIFICATION METHOD:

(D) OTHER INFORMATION: Where the X at position 5 represents either Glutamine or Aspartic acid

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: Modified-site

30

(B) LOCATION: 6

(C) IDENTIFICATION METHOD:

(D) OTHER INFORMATION: Where the X at position 6 represents either Isoleucine or Leucine

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:123:

40

Xaa Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Ser Asn Tyr Leu Asn

1

5

10

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:124:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 7 amino acids
- (B) TYPE: Amino Acid
- (D) TOPOLOGY: Linear

10

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:124:

Phe Thr Ser Ser Leu His Ser

1 5

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:125:

20

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 9 amino acids
- (B) TYPE: Amino Acid
- (D) TOPOLOGY: Linear

30

## (ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 5
- (C) IDENTIFICATION METHOD:
- (D) OTHER INFORMATION: Where the X at position 5 represents either Threonine, Alanine or Asparagine

40

## (ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 6

## (C) IDENTIFICATION METHOD:

(D) OTHER INFORMATION: Where the X at position 6 represents either Valine or Threonine

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:125:

Gln Gln Tyr Ser Xaa Xaa Pro Trp Thr  
1 5

10

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:126:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 108 amino acids  
(B) TYPE: Amino Acid  
(D) TOPOLOGY: Linear

20

## (ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site

- (B) LOCATION: 4

30

- (C) IDENTIFICATION METHOD:

(D) OTHER INFORMATION: Where the X at position 4 represents either Methionine or Leucine

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:126:

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

40

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

(151)

JP 3957765 B2 2007.8.15

20

25

30

Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys

35

40

45

Val Leu Ile Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser

50

55

60

10

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile

65

70

75

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln

80

85

90

20

Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu

95

100

105

Ile Lys Arg

30

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:127:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 123 amino acids

(B) TYPE: Amino Acid

40

(D) TOPOLOGY: Linear

## (ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: Modified-site

(B) LOCATION: 101  
(C) IDENTIFICATION METHOD:  
(D) OTHER INFORMATION: Where the X at position 101 represents either Tyrosine or Histidine

## (ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: Modified-site  
(B) LOCATION: 105  
(C) IDENTIFICATION METHOD:  
(D) OTHER INFORMATION: Where the X at position 105 represents either Serine or Threonine

## (ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: Modified-site  
(B) LOCATION: 28  
(C) IDENTIFICATION METHOD:  
(D) OTHER INFORMATION: Where the X at position 28 represents either Threonine or Aspartic acid

## (ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: Modified-site  
(B) LOCATION: 31  
(C) IDENTIFICATION METHOD:  
(D) OTHER INFORMATION: Where the X at position 31 represents either Asparagine or Histidine

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:127:

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly

1

5

10

15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Xaa Phe Thr

20

25

30

Xaa Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

35

40

45

10

Glu Trp Val Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr

50

55

60

Ala Ala Asp Phe Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser

65

70

75

20

Lys Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp

80

85

90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Tyr Pro Xaa Tyr Tyr Gly Xaa

95

100

105

30

Ser His Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

110

115

120

Val Ser Ser

40

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:128:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 10 amino acids
- (B) TYPE: Amino Acid
- (D) TOPOLOGY: Linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:128:

Gly Tyr Asp Phe Thr His Tyr Gly Met Asn

1                   5                   10

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:129:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 14 amino acids
- (B) TYPE: Amino Acid
- (D) TOPOLOGY: Linear

20

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:129:

Tyr Pro Tyr Tyr Tyr Gly Thr Ser His Trp Tyr Phe Asp Val

1                   5                   10

30

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:130:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 10 amino acids
- (B) TYPE: Amino Acid
- (D) TOPOLOGY: Linear

40

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 3
- (C) IDENTIFICATION METHOD:
- (D) OTHER INFORMATION: Where the X at position 3 represents either Threonine or Aspartic acid

10  
(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 6
- (C) IDENTIFICATION METHOD:
- (D) OTHER INFORMATION: Where the X at position 6 represents Asparagine or Histidine

20

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:130:

Gly Tyr Xaa Phe Thr Xaa Tyr Gly Met Asn

1                   5                   10

30  
(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:131:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
- (A) LENGTH: 14 amino acids
- (B) TYPE: Amino Acid
- (D) TOPOLOGY: Linear

40  
(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 3
- (C) IDENTIFICATION METHOD:

(D) OTHER INFORMATION: Where the X at position 3 represents either Tyrosine or Histidine

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: Modified-site

(B) LOCATION: 7

(C) IDENTIFICATION METHOD:

(D) OTHER INFORMATION: Where the X at position 7 represents either Serine or Threonine

10

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:131:

Tyr Pro Xaa Tyr Tyr Gly Xaa Ser His Trp Tyr Phe Asp Val

20

1 5 10

**【図1A】**

A4.6.1	1	10	20	30	40
	EIQQLVQSGPELQKQPGETVRISCKASGYTFTNYGMNWVKQA	*	*	*	*
F(ab)-12	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQA	*	*	*	*
humIII	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQA	*	*	*	*

A4.6.1	50	60	70	80
	PGKGLKWMGWINTYTGEPTYAADFKRRRTFSLETSASTAYL	*	*	*
F(ab)-12	PGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRRTFSLDPSKSTAYL	*	*	*
humIII	PGKGLEWVSVVISGDGGSTTYADSVKGRTVISRDNSKNTLYL	*	*	*

A4.6.1	abc	90	110
	QISNLKNDDTATYFCAKYPHYGGSSHWFDWGAGTTVTVSS	*	*
F(ab)-12	QMNSLRAEDTAVVYCAKYPHYGGSSHWFDWGQGTIVTVSS	*	*
humIII	QMNSLRAEDTAVYYCARG-----FDYWGQGTIVTVSS	*	*

(SEQ.ID NO:9)  
(SEQ.ID NO:7)  
(SEQ.ID NO:11)

**FIG.\_1A**

**【図1B】**

A4.6.1	1	10	20	30	40
	DIQMTQTSSLASLGDRVIISCSASQDISNLYLNWYQQKP	*	*	*	*
F(ab)-12	DIQMTQSPSSLASVGDRVTTITCSASQDISNLYLNWYQQKP	*	*	*	*
humK1	DIQMTQSPSSLASVGDRVTTITCRASQDISNLYLNWYQQKP	*	*	*	*

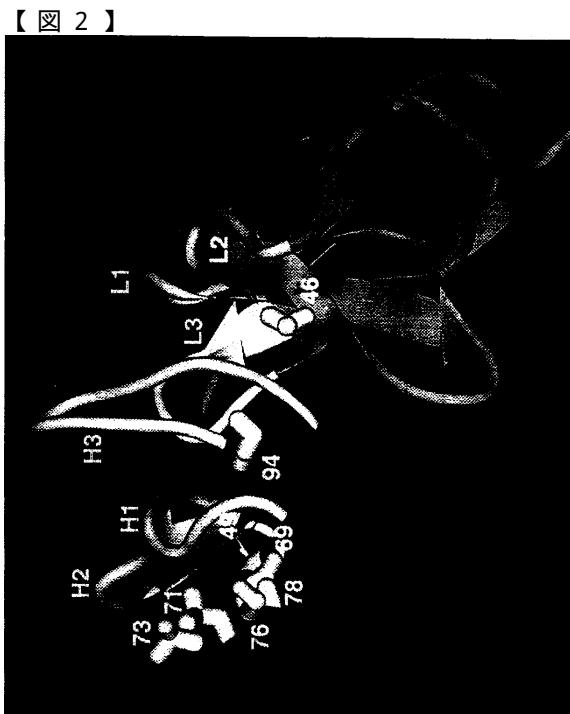
A4.6.1	50	60	70	80
	DGTVKVL <del>IYFTSSL</del> HSGVP <del>SRS</del> FGSGSGTDYSLTISNLEP	*	*	*
F(ab)-12	GKAPKVL <del>IYFTSSL</del> HSGVP <del>SRS</del> FGSGSGTDFTLTISLQP	*	*	*
humK1	GKAPKLLIYASSLES <del>GVPSR</del> FGSGSGTDFTLTISLQP	*	*	*

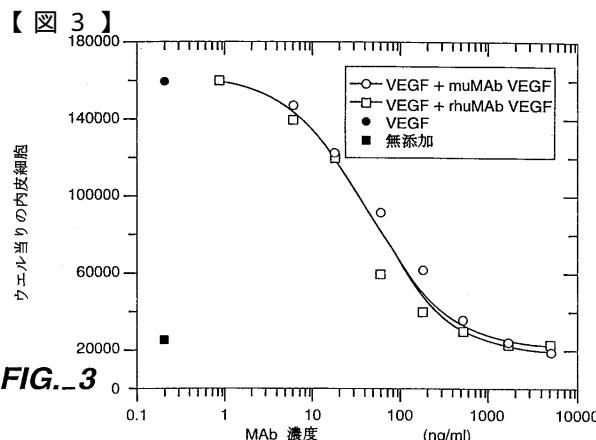
  

A4.6.1	90	100	
	EDIATYYC <del>QOY</del> STVPWTFGGGT <del>K</del> LEIKR	*	*
F(ab)-12	EDFATYYC <del>QOY</del> STVPWTFGQG <del>T</del> KVEIKR	*	*
humK1	EDFATYYC <del>QOY</del> NSLPWTFGQG <del>T</del> KVEIKR	*	*

(SEQ.ID NO:10)  
(SEQ.ID NO:8)  
(SEQ.ID NO:12)

**FIG.\_1B**



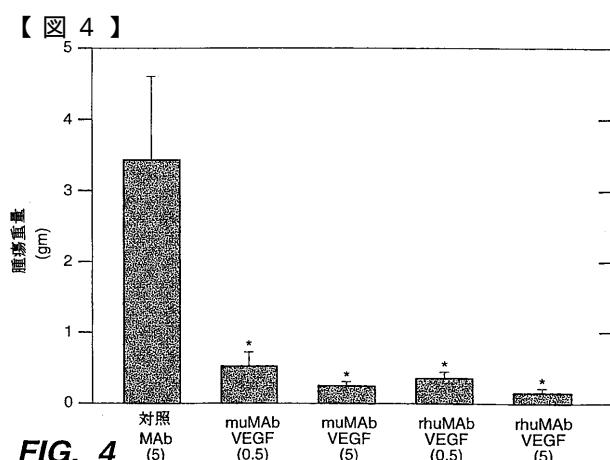
**FIG.-3**

**【図5A】**

A4.6.1 DIQMTQTSSLSASLGRVIIASCASQDISNYLNWYQQKE  
hu2.0 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKP  
hu2.10 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKF

A4.6.1 DGTVKVLITYFTSSLHSGVPSPRFSGSGSGTDSLTLISNLEP  
hu2.0 GAKPLLLIYFTSSLHSGVPSPRFSGSGSGTDSLTLISNLEP  
hu2.10 GAKPLLLIYFTSSLHSGVPSPRFSGSGSGTDSLTLISNLEP

A4.6.1 EDIATYYCQQYSTVPWTFGGGTKLEIK (SEQ.ID NO:10)  
hu2.0 EDFATYYCQQYSTVPWTFGGGTKVEIK (SEQ.ID NO:13)  
hu2.10 EDFATYYCQQYSTVPWTFGGGTKVEIK (SEQ.ID NO:15)

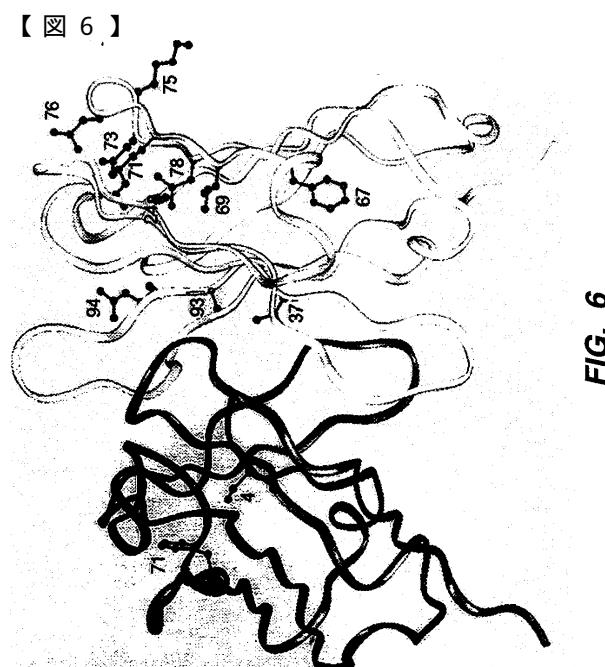
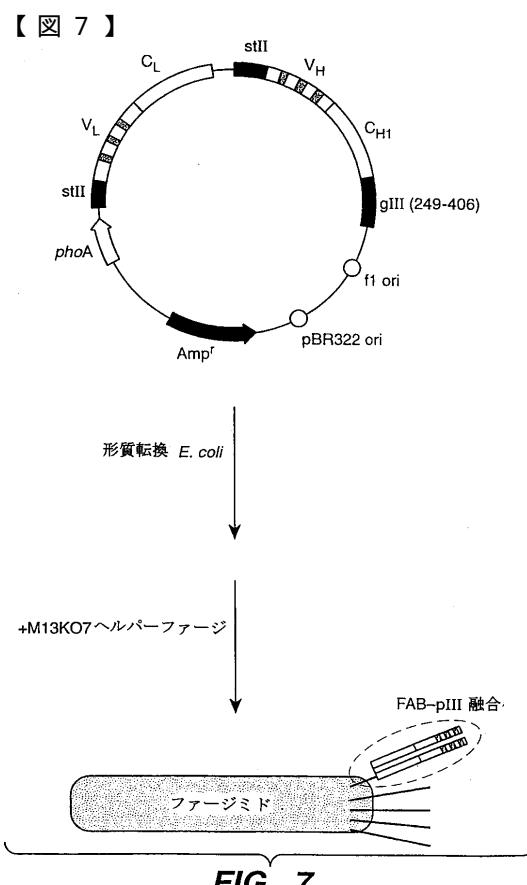
**FIG.-5A****FIG.-4**

**【図5B】**

A4.6.1 EIQLVQSGSPPELKQPGETVRISCKASGYTFTNYGMNWVKQA  
hu2.0 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQA  
hu2.10 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWIRQA

A4.6.1 PGKGLKWMGWINTYTGEPTYAADFKRRFTSLETSASTAVL  
hu2.0 PGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTISRDNSKNTLYL  
hu2.10 PGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTISLDTSASTVYL

A4.6.1 abc QISNLKNDDDTATYFCAKYPHYGGSSHWFDVWGAGTTVTVSS (SEQ.ID NO:9)  
hu2.0 QMNSLRAEDTAVVYCARYCAKYPHYGGSSHWFDVWGQGTLTVSS (SEQ.ID NO:14)  
hu2.10 QMNSLRAEDTAVVYCARYCAKYPHYGGSSHWFDVWGQGTLTVSS (SEQ.ID NO:16)

**FIG.-5B****FIG.-6****FIG.-7**

## 【図 8 A】

GAATTCAACT TCTCCATACT TTGGATAAGG AAATACAGAC ATGAAAATC TCATTGCTGA  
GTGTTTATTG AAGCTTGG GATTATCGTC ACTGCAATGC TTGCAATAT GCGGCAAAT  
GACCAACAGC GGGTGTGAGA TCAGGTAGAG GGGGCGCTGT AGCAGGTTAA GCGCGATGCC  
AGCATTCCTG ACGACGATAC GGAGCTGCTG CGCGATTAGC TAAAGAAGTT ATTGAAGCAT  
CCTCGTCAAGTAA TCTTTCAAC AGCTGTCATA AAGTGTGTCAG GCGGAGACT  
TATAGTCGCT TTGTTTAT TTTTAATG ATTGTAAC AGAAATTCGAG CTCGGTACCC  
GGGGATCCTC TAGAGGTTGA GGTGATTT ATG AAA AAG AAT ATC GCA TTT CTT  
Met Lys Asn Ile Ala Phe Leu -23 -20  
CTT GCA TCT ATG TTC GTT TTT TCT ATT GCT ACA AAC GCG TAC CCT GAT  
Leu Ala Ser Met Phe Val Phe Ser Ile Ala Thr Asn Ala Tyr Ala Asp  
-15 -10 -5 1 開始 stII シグナル配列  
ATC CAG TTG ACC CAG TCC CCG AGC TCC CTG TCC GCC TCT GTG GGC GAT  
Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp  
5 10 15  
AGG GTC ACC ACC TGC AGC GCA AGT CAG GAT ATT AGC AAC TAT TTA  
Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu  
20 25 30  
絶縁開始  
AAC TGG TAT CAA CAG AAA CCA GGA AAA GCT CCG AAA CTA CTG ATT TAC  
Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
35 40 45  
TTC ACC TCC TCT CTC CAC TCT GGA GTC CCT TCT CCC TTC TCT GGA TCC  
Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60 65  
GGT TCT GGG AGC GAT TAC CTG ACC ATC AGC AGT CTG CAG CCA GAA  
Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu  
70 75 80  
GAC TTC GCA ACT TAT TAC TGT CAA CAG TAT AGC ACC GTG CCG TGG AGC  
Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr  
85 90 95  
TTT GGA CAG GGT ACC AAG GTG GAG ATC AAA CGA ACT GTG GCT GCA CCA  
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro  
100 105 110  
TCT GTC TTC ATC TTC CCG CCA TCT GAT GAG CAG TTG AAA TCT GGA ACT  
Ser Val Phe Ile Phe Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr  
115 120 125  
GCT TCT GTT GTG TGC CTG CTG AAT AAC TTC TAT CCC AGA GAG GCC AAA  
Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys  
130 135 140 145  
145

FIG.\_8A

## 【図 8 B】

60 GTC CAG TGG AAG GTG GAT AAC GGC CTC CAA TCG GGT AAC TCC CAG GAG  
Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu 941  
120 150 155 160  
180 AGT GTC ACA GAG CAG GAC AGC AAG GAC AGC ACC TAC AGC CTC AGC AGC  
Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Ser Tyr Ser Thr Leu Ser Ser 989  
240 165 170 175  
300 ACC CTG ACG AAA GCA GAC TAC GAG AAA CAC AAA GTC TAC GCC  
Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala 1037  
360 180 185 190  
413 TGC GAA GTC ACC CAT CAG GGC CTG AGC TCG CCC GTC ACA AAG AGC TTC  
Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe 1085  
195 200 205  
461 AAC AGG GGA GAG TGT T AACCTGATCC TCTACGCCCG ACCGCATCGTG  
Asn Arg Gly Glu Cys O C\* (配列番号100) 1131  
210  
509 GCCCTAGTAC GCAACTAGTC GTAAAAAGGG TATCTAGAGG TTGAGGTGAT TTT ATG  
Met -23 1187  
557 AAA AAG AAT ATC GCA TTT CTT CTT GCA TCT ATG TTC GTT TTT TCT ATT  
Lys Asn Ile Ala Phe Leu Leu Ala Ser Met Phe Val Phe Ser Ile 1235  
-20 -15 -10  
605 GCT ACA AAC GCG TAC GCT GAG GTT CAG CTG GTG GAG TCT GGC GGT  
Ala Thr Asn Ala Tyr Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly 1283  
-5 1 5 10  
653 CTG GTG CAG CCA GGG GGC TCA CTC CGT TTG TCC TGT GCA GCT TCT GGC  
Leu Val Gln Pro Gly Gln Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly 1331  
15 20 25  
701 TAT ACC TTC ACC AAC TAT GGT ATG AAC TGG ATC CGT CAG GCC CCG GGT  
Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly 1379  
30 35 40  
749 AAG GGC CTG GAA TGG GTT GGA TGG ATT AAC ACC TAT ACC GGT GAA CCC  
Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro 1427  
45 50 55  
797 ACC TAT GCT GCG GAT TTC AAA CGT CGT TTT ACT ATA TCT GCA GAC ACC  
Thr Tyr Ala Ala Asp Phe Lys Arg Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr 1475  
60 65 70  
845 TCC AGC AAC ACA GTT TAC CTG CAG ATG AAC AGC CTG CGC GCT GAG GAC  
Ser Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp 1523  
75 80 85 90  
893 ACT GGC GTC TAT TAC TGT GCA AAG TAC CCG CAC TAT TAT GGG AGC AGC  
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser 1571  
95 100 105  
1619 TCC CTC CCT CAA TCG GTT GAA TGT CGC CCT TTT GTC TTT AGC GCT GGT  
Ser Leu Pro Gln Ser Val Glu Cys Arg Pro Phe Val Ala Gly 2291  
335 340 345  
1667 AAA CCA TAT GAA TTT TCT ATT GAT TGT GAC AAA ATA AAC TTA TTC CGT  
Lys Pro Tyr Glu Phe Ser Ile Asp Cys Asp Lys Ile Asn Leu Phe Arg 2339  
350 355 360  
1715 GGT GTC TTT GCG TTT CTT TTA TAT GGT GCC ACC TTT ATG TAT GTA TTT  
Gly Val Phe Ala Phe Leu Leu Tyr Val Ala Thr Phe Met Tyr Val Phe 2387  
365 370 375  
1763 TCT ACG TTT GCT AAC ATA CTG CGT AAT AAC GAG GGT TCT TAATCATGCC  
Ser Thr Phe Ala Asn Ile Leu Arg Asn Lys Glu Ser OC\* (配列番号102) 2433  
380 385 390  
1811 AGTTCTTTG GCTAGCGCCG CCCTATACCT TGTCGCTC CCGCGTTGC GTCGCGGTGC 2493  
終了 G3 プロテイン  
ATGGAGCCGG GCCACCTCGA CCTGAAATGGA AGCCGGCGGC ACCTCGCTAA CGGATTCACC 2553  
1859 ACTCCAAGAA TTGGAGCCAA TCAATTCTG CGGAGAACCTG TGATGCGCA AACCAACCC 2613  
TGGCAGACAA TATCCATCGC GTCCCCCATC TCCAGCAGGC GCACCGCGGC CATCTCCGGC 2673  
1907 AGCGTTGGGT CCTGGCCACG GGTGCGCATG ATCCGCTC TGTGTTGAG GACCCGGCTA 2733  
GGCTGGCGGG CTGCGCTTAC TGGTAGCG AATGATCAC CGATACGCGA CGCAAQGTGA 2793  
1955 AGCGACTGCT GCTGCAAACG GTCTGCGACC TGACAAACAA CATGAATGGT CTTCGGTTTC 2853  
CGTGTGCGTAA AGACTCTGGA AACCGGGAGA TCAGCGCCCT GCACCATAT TGTCCGGATC 2913  
2003 TGCATCGCAG GATGCTGCTG GCTACCTCTGTG GGAACACCTA CATCTGTATT AACGAAGCGC 2973  
TGGCATTGAC CTCGAGTGTGTT TTTCTCTGG TCCCGCCGCA TCCATACCGC CAGTTGTTA 3033  
CCCTCACAAC GTTCCAGTAA CGGGCATGT TCATCATCGA TAACCGTAT CGTGAGCATC 3093  
2051 CTCTCTCGTT TCATCGGTAT CATTACCCCC ATGAAACAGAA ATTCCCCCTT ACACGGAGGC 3153  
ATCAAGTGC AACACAGGA AAAACGCCCGC TTAACATGCC CGCGTTTAC AGAACGCCAGA 3213  
2099 CATTAAACGCT TCTGGAGAAA CTCAACGAGC TGACCGGGG TGACAGGCC GACATCTG 3273  
AATCGCTCA CGACCGACGCT GATGAGCTTT ACCCGACGAT CGCGAAATG TAAACGTTAA 3333  
2147 TATTTTGTTA AAATTCGCGT TAAATTTTG TTAAATCAGC TCATTTTTA ACCAATAGGC 3393  
CGAACATCGGC AAAATCCCTT ATAAATCAA AGAACAGAGC GAGATAGGGT TGAGTGTGT 3453  
2195 TCCAGTTGG AACAAAGAGTC CACTATTAA GAACGTGGAC TCCAAGCTCA AAGGGCAGA 3513  
AACCGTCTAT CAGGGCTATGCCACTAC TGAACCATCA CCCTAATCAA GTTCTTGG 3573  
2243 GTCGAGGTGC CGTAAAGCAC TAAATCGGAA CCCTAAAGGG AGCCCCCGAT TTAGAGCTTG 3633

FIG.\_8B

## 【図 8 C】

CAC TGG TAT TTC GAC GTC TGG GGT CAA GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC  
His Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser  
110 115 120  
TCG GCC TCC ACC AAG GGC CCA TCG GTC TTC CCC CTG GCA CCC TCC TCC  
Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser  
125 130 135  
AAG AGC ACC TCT GGG GGC ACA GCG GCC CTG GGC TGC CTG GTC AAG GAC  
Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp  
140 145 150  
TAC TTC CCC GAA CGG GTG AGC GTG TCG TGG AAC TCA GGC GCC CTC ACC  
Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr  
155 160 165 170  
AGC GGC GTG CAC ACC TTC CCG GCT GTC CTA CAG TCC TCA GGA CTC TAC  
Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr  
175 180 185  
TCC CTC AGC AGC GTG GTG ACC GTG CCC TCC AGC AGC TTG GGC ACC CAG  
Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Leu Gly Thr Gln  
190 195 200  
ACC TAC ATC TGC ACC GTG AAT AAC CAC CCC AGC AAC ACC AAG GTC GAC  
Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp  
205 210 215  
AAG AAA GTT GAG CCC AAA ACT TCT TGT GAC AAA ACT CAC CTC TAG AGT GGC  
Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Leu \* Ser Gly  
220 225 230 (断面番号101)  
GGT GGC TCT GGT TCC GGT GAT TAT GAA AAG ATG GCA AAC GCT  
Gly Ser Gly Ser Gly Asp Phe Asp Tyr Glu Lys Met Ala Asn Ala  
235 240 245 250  
AAT AAG GGG GCT ATG ACC GAA AAT GCC GAT GAA AAC GCG CTA CAG TCT  
Asn Lys Gly Ala Met Thr Glu Asn Ala Asp Glu Asn Ala Leu Gln Ser  
255 260 265  
g3p ドメイン  
GAC GCT AAA GGC AAA CTT GAT TCT GTC GCT ACT GAT TAC GGT GCT GCT  
Asp Ala Lys Gly Lys Leu Asp Ser Val Ala Thr Asp Tyr Gly Ala Ala  
270 275 280  
ATC GAT GGT TTC ATT GGT GAC GTT TCC GGC CTT GCT AAT GGT AAT GGT  
Ile Asp Gly Phe Ile Gly Asp Val Ser Gly Leu Ala Asn Gly Asn Gly  
285 290 295  
GCT ACT GGT GAT TTT GCT GGC TCT AAT TCC CAA ATG GCT CAA GTC GGT  
Ala Thr Gly Asp Phe Ala Gly Ser Asn Ser Gln Met Ala Glu Val Gly  
300 305 310  
GAC GGT GAT AAT TCA CCT TTA ATG AAT AAT TTC CGT CAA TAT TTA CCT  
Asp Gly Asp Asn Ser Pro Leu Met Asn Asn Phe Arg Gln Tyr Leu Pro  
315 320 325 330

FIG.\_8C

## 【図 8 D】

1619 TCC CTC CCT CAA TCG GTT GAA TGT CGC CCT TTT GTC TTT AGC GCT GGT  
Ser Leu Pro Gln Ser Val Glu Cys Arg Pro Phe Val Ala Gly 2291  
335 340 345  
1667 AAA CCA TAT GAA TTT TCT ATT GAT TGT GAC AAA ATA AAC TTA TTC CGT  
Lys Pro Tyr Glu Phe Ser Ile Asp Cys Asp Lys Ile Asn Leu Phe Arg 2339  
350 355 360  
1715 GGT GTC TTT GCG TTT CTT TTA TAT GGT GCC ACC TTT ATG TAT GTA TTT  
Gly Val Phe Ala Phe Leu Leu Tyr Val Ala Thr Phe Met Tyr Val Phe 2387  
365 370 375  
1763 TCT ACG TTT GCT AAC ATA CTG CGT AAT AAC GAG GGT TCT TAATCATGCC  
Ser Thr Phe Ala Asn Ile Leu Arg Asn Lys Glu Ser OC\* (配列番号102) 2433  
380 385 390  
1811 AGTTCTTTG GCTAGCGCCG CCCTATACCT TGTCGCTC CCGCGTTGC GTCGCGGTGC 2493  
終了 G3 プロテイン  
ATGGAGCCGG GCCACCTCGA CCTGAAATGGA AGCCGGCGGC ACCTCGCTAA CGGATTCACC 2553  
1859 ACTCCAAGAA TTGGAGCCAA TCAATTCTG CGGAGAACCTG TGATGCGCA AACCAACCC 2613  
TGGCAGACAA TATCCATCGC GTCCCCCATC TCCAGCAGGC GCACCGCGGC CATCTCCGGC 2673  
1907 AGCGTTGGGT CCTGGCCACG GGTGCGCATG ATCCGCTC TGTGTTGAG GACCCGGCTA 2733  
GGCTGGCGGG CTGCGCTTAC TGGTAGCG AATGATCAC CGATACGCGA CGCAAQGTGA 2793  
1955 AGCGACTGCT GCTGCAAACG GTCTGCGACC TGACAAACAA CATGAATGGT CTTCGGTTTC 2853  
CGTGTGCGTAA AGACTCTGGA AACCGGGAGA TCAGCGCCCT GCACCATAT TGTCCGGATC 2913  
2003 TGCATCGCAG GATGCTGCTG GCTACCTCTGTG GGAACACCTA CATCTGTATT AACGAAGCGC 2973  
TGGCATTGAC CTCGAGTGTGTT TTTCTCTGG TCCCGCCGCA TCCATACCGC CAGTTGTTA 3033  
CCCTCACAAC GTTCCAGTAA CGGGCATGT TCATCATCGA TAACCGTAT CGTGAGCATC 3093  
2051 CTCTCTCGTT TCATCGGTAT CATTACCCCC ATGAAACAGAA ATTCCCCCTT ACACGGAGGC 3153  
ATCAAGTGC AACACAGGA AAAACGCCCGC TTAACATGCC CGCGTTTAC AGAACGCCAGA 3213  
2099 CATTAAACGCT TCTGGAGAAA CTCAACGAGC TGACCGGGG TGACAGGCC GACATCTG 3273  
AATCGCTCA CGACCGACGCT GATGAGCTTT ACCCGACGAT CGCGAAATG TAAACGTTAA 3333  
2147 TATTTTGTTA AAATTCGCGT TAAATTTTG TTAAATCAGC TCATTTTTA ACCAATAGGC 3393  
CGAACATCGGC AAAATCCCTT ATAAATCAA AGAACAGAGC GAGATAGGGT TGAGTGTGT 3453  
2195 TCCAGTTGG AACAAAGAGTC CACTATTAA GAACGTGGAC TCCAAGCTCA AAGGGCAGA 3513  
AACCGTCTAT CAGGGCTATGCCACTAC TGAACCATCA CCCTAATCAA GTTCTTGG 3573  
2243 GTCGAGGTGC CGTAAAGCAC TAAATCGGAA CCCTAAAGGG AGCCCCCGAT TTAGAGCTTG 3633

FIG.\_8D

## 【図8E】

ACGGGAAAG CCGCGGAACG TGGCGAGAAA GGAAGGGAAAG AAAGCAGAAC GAGCGGGCGC 3693 AATTGTGCG GGGAAAGCTAG AGTAAGTAGT TCGCCAGTTA ATAGTTGCG CAACGTTGTT 5313  
 TAGGGCGCTG CCAACTGAG CGGTACCGCT GCGCGTAACC ACCCACCCCG CCCCGCTTAA 3753 GCCATTGCGT CAGGCATCGT CGGTGTCAGC TCGTCGTTTG GTATGGCTTC ATTCAGCTCC 5373  
 TGCGCCGCTA CAGGGCGCGT CGGGATCCCTG CCTCGCGCGT TTGGTGTGATG ACAGTAAAAA 3813 GGTTCCCAAC GATCAAGGG AGTTACATGA TCCCCCATG TGTCGAAAGA 5433  
 CCTCTGACAC ATGCACTGCC CGGAGACGGT CACAGCTTGT CTGTAAGCGG ATGCCGGGAG 3873 TCCCTCGGTC CTCCGATCGT TGTCAGAAGT AAGTTGGCC CGAGTGTATC ACTCATGGT 5493  
 CAGACAAAGCC CGTCAGGGC CGTCAGGGG TTGTCGGGG CAGCCATGAC 3933 ATGGCAGCAC TGCAATAATTC TCTTACTGTC ATGCCATCCG TAAGATGCTT TTCTGTGACT 5553  
 CCAGTCACGT AGCGATAGCG GAGTGTATAC TGCGCTTAAC TGCGGCATC AGAGCAGATT 3993 GGTGAGTACT CAACCAAGTC ATTCTGAGAA TAGTGTATGC GGCGACCGAG TTGCTCTTC 5613  
 GTACTGAGAG TGCACTATGATGCGTGAAG ATACCGACA GATCGCTAAG GAGAAAATAC 4053 CGCGCGTCAA CACGGGATAA TACCCGCCA CATAGCAGAA CTTTAAAAGT GCTCATCATT 5673  
 CGCATCAGGC GCTCTCCCG TTCCCTCGCTC ACTGACTGCG TGCGCTGGT CGTCGGCTG 4113 GGAAAACGTT CTTCGGGG AAAACTCTCA CGATCTTAC CGCTGTTGAG ATCCAGTTCC 5733  
 CGGAGGCGG TATCAGCTA CTCAAGGGT GTAAATACGGT TATCCACAGA ATCACGGGAT 4173 ATGTAACCCA CTGTCGACCC CAACCTGACTC TCACTGATCTT TTACTTAC CAGCTTCTC 5793  
 AACCGAGAA AGAACATGTG AGCAAAAGGC CAGCAAAGG CCAGGAACCG TAAAAGGCC 4233 GGGTGAGCAA AAACAGGAAG GCAAAATGCC GCAAAAAGG GAATAAGGGC GACACGGAA 5853  
 GCGTTGCTGG CGTTTTCTCA TAGGCTCCCG CCCCTGACG AGCATCACAA AAATCGACGC 4293 TGTTGAATAC TCATACTCTT CCTTTTCAA TATTATTGAA GCATTTATCA GGGTTATIGT 5913  
 TCAAGTCAGA GGTGGCAGA CCCGACAGGA CTATAAAGAT ACCAGGGT TCCCCCTGGA 4353 CTCATGAGCG GATACTATATT TGAATGATT TAGAAAATA AACAAATAGG GGTTCCGCGC 5973  
 AGCTCCCTCG TGCGCTCCTC TGTTCCGACCT CTGCCGCTTA CGGGATACCT GTCCGCGCTT 4413 ACATTTCCC GAAAAGTGCC ACCTGACGTC TAAGAACCA TTATTATCAT GACATTAACC 6033  
 CTCCCTTCGG GAAGCGTGGC GCTTTCTCAT AGCTCACGCT GTAGTGTATCT CAGTTCGGTG 4473 TATAAAAATA GGCCTATCAC GAGGCCCTT CGTCTCTAA (配列番号99) 6072  
 TAGTCGTTG GCTCCAAGCT GGGCTGTG CACGAAACCC CGCTTCAGCC CGACCGCTGC 4533  
 GCCTTATCCG GTAACTATCG TCTTGACTC AACCCGGTAA GACACGACTT ATGCCACTG 4593  
 GCAGCAGCCA CTGTTAACAG GATTAGCAGA GCGAGGATGAG TAGCGGTCG TACAGAGTT 4653  
 TTGAGTGGT GGCCTAACTA CGGCTACACT AGAAGGACAG TATTTGGTAT CTGCGCTCG 4713  
 CTGAAGCCG TTACCTTCGG AAAAGAGAGT GTAGTGTCTT GATCCGGCAA ACAACACC 4773  
 GCTGGTAGGG GTGTTTTTGTGTTT CAGCAGATTA CGCGAGAAA AAAAGGATCT 4833  
 CAAGAAGATC CTTTGATCTT TTCTACGGGG TCTGACGCTC AGTGGAACGA AAACTCACGT 4893  
 TAAGGGATTT TGTCATGAG ATTATCAAAA AGGATCTTC CCTAGATCTT TTTAAATTAA 4953  
 AAATGAAGTT TTAATCAAT CTAAAGTATA TATGAGTAAA CTTGGTCTGA CAGTTACCAA 5013  
 TGCTTAATCA GTGAGGCACC TATCTCAGGC ATCTGCTAT TTGTTCTCATC CATAGTTGCC 5073  
 TGACTCCCGC TCGTGTAGAT AACTACGATA CGGGAGGGT TACCATCTGG CCCCAGTGCT 5133  
 GCAATGATAC CGCGAGACCC ACGCTCACCG GCTCCAGATT TATCAGCAAT AAACAGCCA 5193  
 GCCCGAAGGG CGCAGCGCAG AAGTGGTCTC GCAACTTAT CGCCTCCAT CGAGTCTATT 5253

FIG.\_8E

FIG.\_8F

## 【図9A】

F(ab)-12	DIOMTQSPPS	LSASVGDRT	ITCSASQDIS	NYLNWYQQKP
MB1.6	DIQIUTQSPPS	LSASVGDRT	ITCSASODIS	NYLNWYQQKP
H2305.6	DIQIUTQSPPS	LSASVGDRT	ITCSASODIS	NYLNWYQQKP
Y0101	DIQIUTQSPPS	LSASVGDRT	ITCSASODIS	NYLNWYQQKP
Y0192	DIQIUTQSPPS	LSASVGDRT	ITCSASODIS	NYLNWYQQKP
	CDR-L1			
F(ab)-12	GKAPKVLIYF	TSSLHSGVPFS	RFSGSGSGTDF	FTLTISLQP
MB1.6	GKAPKVLIYF	TSSLHSGVPFS	RFSGSGSGTDF	FTLTISLQP
H2305.6	GKAPKVLIYF	TSSLHSGVPFS	RFSGSGSGTDF	FTLTISLQP
Y0101	GKAPKVLIYF	TSSLHSGVPFS	RFSGSGSGTDF	FTLTISLQP
Y0192	GKAPKVLIYF	TSSLHSGVPFS	RFSGSGSGTDF	FTLTISLQP
	CDR-L2			
F(ab)-12	EDFATYYCQQ	YSTVPWTFGQ	GTKVEIKRTV	(配列番号8)
MB1.6	EDFATYYCQQ	YSTVPWTFGQ	GTKVEIKRTV	(配列番号1 0 3)
H2305.6	EDFATYYCQQ	YSTVPWTFGQ	GTKVEIKRTV	(配列番号1 0 5)
Y0101	EDFATYYCQQ	YSTVPWTFGQ	GTKVEIKRTV	(配列番号1 0 7)
Y0192	EDFATYYCQQ	YSTVPWTFGQ	GTKVEIKRTV	(配列番号1 0 9)
	CDR-L3			

FIG.\_9A

## 【図10A】

F(ab)-12	DIQMTQSPPS	LSASVGDRT	ITCSASQDIS	NYLNWYQQKP
Y0243-1	DIQIUTQSPPS	LSASVGDRT	ITCRANEOLIS	NYLNWYQQKP
Y0238-3	DIQIUTQSPPS	LSASVGDRT	ITCRANEOLIS	NYLNWYQQKP
Y0313-1	DIQIUTQSPPS	LSASVGDRT	ITCRANEOLIS	NYLNWYQQKP
Y0317	DIQIUTQSPPS	LSASVGDRT	ITCSASODIS	NYLNWYQQKP
	CDR-L1			
F(ab)-12	GKAPKVLIYF	TSSLHSGVPFS	RFSGSGSGTDF	FTLTISLQP
Y0243-1	GKAPKVLIYF	TSSLHSGVPFS	RFSGSGSGTDF	FTLTISLQP
Y0238-3	GKAPKVLIYF	TSSLHSGVPFS	RFSGSGSGTDF	FTLTISLQP
Y0313-1	GKAPKVLIYF	TSSLHSGVPFS	RFSGSGSGTDF	FTLTISLQP
Y0317	GKAPKVLIYF	TSSLHSGVPFS	RFSGSGSGTDF	FTLTISLQP
	CDR-L2			
F(ab)-12	EDFATYYCQQ	YSTVPWTFGQ	GTKVEIKRTV	(配列番号8)
Y0243-1	EDFATYYCQQ	YSTVPWTFGQ	GTKVEIKRTV	(配列番号1 1 1)
Y0238-3	EDFATYYCQQ	YSTVPWTFGQ	GTKVEIKRTV	(配列番号1 1 3)
Y0313-1	EDFATYYCQQ	YSTVPWTFGQ	GTKVEIKRTV	(配列番号1 1 5)
Y0317	EDFATYYCQQ	YSTVPWTFGQ	GTKVEIKRTV	(配列番号1 1 7)
	CDR-L3			

FIG.\_10A

## 【図9B】

F(ab)-12	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGYTF	NYGMNNWVRQA
MB1.6	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGYTF	NYGMNNWVRQA
H2305.6	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGYTF	NYGMNNWVRQA
Y0101	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGYTF	NYGMNNWVRQA
Y0192	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGYTF	NYGMNNWVRQA
	CDR-H1			
F(ab)-12	PGKGLEWVGW	INTYTGEPTF	AADFKRRFTF	SLDTSKSTAY
MB1.6	PGKGLEWVGW	INTYTGEPTF	AADFKRRFTF	SADTSSNIVW
H2305.6	PGKGLEWVGW	INTYTGEPTF	AADFKRRFTF	SADTSSNIVW
Y0101	PGKGLEWVGW	INTYTGEPTF	AADFKRRFTF	SLDTSKSTAY
Y0192	PGKGLEWVGW	INTYTGEPTF	AADFKRRFTF	SLDTSKSTAY
	CDR-H2			
F(ab)-12	LQMNLSRAED	TAVYYCAKY	HYYGSSHWYF	DVWGQGTL
MB1.6	LQMNLSRAED	TAVYYCAKY	HYYGSSHWYF	DVWGQGTL
H2305.6	LQMNLSRAED	TAVYYCAKY	HYYGSSHWYF	DVWGQGTL
Y0101	LQMNLSRAED	TAVYYCAKY	HYYGSSHWYF	DVWGQGTL
Y0192	LQMNLSRAED	TAVYYCAKY	HYYGSSHWYF	DVWGQGTL
	CDR-H3			

FIG.\_9B

## 【図10B】

F(ab)-12	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGYTF	NYGMNNWVRQA
Y0243-1	EVOLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGYDFT	HYGMNNWVRQA
Y0238-3	EVOLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGYTF	HYGMNNWVRQA
Y0313-1	EVOLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGYDFT	HYGMNNWVRQA
Y0317	EVOLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGYDFT	HYGMNNWVRQA
	CDR-H1			
F(ab)-12	PGKGLEWVGW	INTYTGEPTF	AADFKRRFTF	SLDTSKSTAY
Y0243-1	PGKGLEWVGW	INTYTGEPTF	AADFKRRFTF	SLDTSKSTAY
Y0238-3	PGKGLEWVGW	INTYTGEPTF	AADFKRRFTF	SLDTSKSTAY
Y0313-1	PGKGLEWVGW	INTYTGEPTF	AADFKRRFTF	SLDTSKSTAY
Y0317	PGKGLEWVGW	INTYTGEPTF	AADFKRRFTF	SLDTSKSTAY
	CDR-H2			
F(ab)-12	LQMNLSRAED	TAVYYCAKY	HYYGSSHWYF	DVWGQGTL
Y0243-1	LQMNLSRAED	TAVYYCAKY	HYYGSSHWYF	DVWGQGTL
Y0238-3	LQMNLSRAED	TAVYYCAKY	HYYGSSHWYF	DVWGQGTL
Y0313-1	LQMNLSRAED	TAVYYCAKY	HYYGSSHWYF	DVWGQGTL
Y0317	LQMNLSRAED	TAVYYCAKY	HYYGSSHWYF	DVWGQGTL
	CDR-H3			

FIG.\_10B

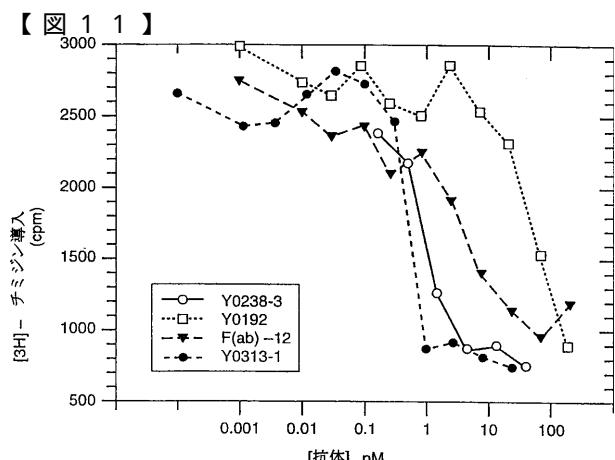


FIG.-11

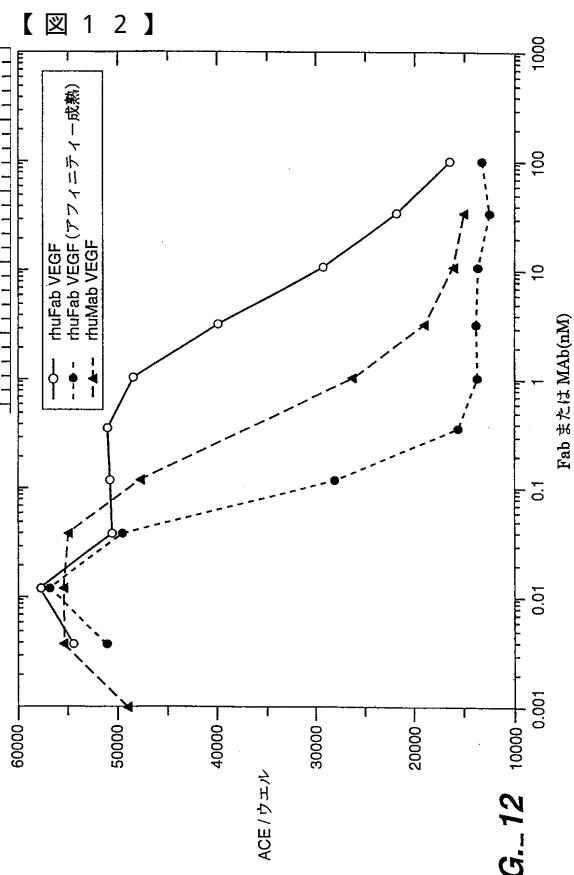


FIG.-12

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I
<b>C 12 N 5/10 (2006.01)</b>	A 6 1 P 27/02
<b>C 12 P 21/02 (2006.01)</b>	A 6 1 P 35/00
	C 12 N 15/00 ZNAA
	C 12 N 5/00 B
	C 12 P 21/02 C

(72)発明者 ウエルズ, ジェイムズ・エイ  
アメリカ合衆国94010カリフォルニア州バーリングейム、コロンバス・アベニュー1341番

(72)発明者 プレスター, レナード・ジー  
アメリカ合衆国94109カリフォルニア州サンフランシスコ、ゴー・ストリート1900番、アパートメント206

(72)発明者 ローマン, ヘンリー・ビー  
アメリカ合衆国94018カリフォルニア州エル・グラナダ、サン・ファン・アベニュー400番

(72)発明者 チェン, イボンヌ・マン-イエー<sup>1</sup>  
アメリカ合衆国94403カリフォルニア州サン・マテオ、オファレル・ストリート・ナンバー321、1951番

審査官 斎藤 真由美

(56)参考文献 特表平06-508267 (JP, A)  
The Journal of Biological Chemistry,, 1997年 4月18日, Vol.272, No.16,, p. 10678-10684  
NATURE, 1993年, Vol.362, p. 841-844

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 90  
C07K 14/00 - 16/46  
C12P 21/00 - 08  
C12N 1/00 - 9/99  
G01N 33/50 - 98  
C12Q 1/00 - 70  
PubMed, MEDLINE(STN)  
BIOSIS/WPI(DIALOG)  
GenBank/DDBJ/EMBL/GeneSeq  
UniProt/GeneSeq