(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第4934426号
(P4934426)

(45)発行日　平成24年5月16日(2012.5.16)　(24)登録日　平成24年2月24日(2012.2.24)

(51)Int.Cl.		F I		
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA
C12P 21/08	(2006.01)	C12P	21/08	
C07K 16/00	(2006.01)	C07K	16/00	
C07K 16/46	(2006.01)	C07K	16/46	
C12N 1/15	(2006.01)	C12N	1/15	

請求項の数 13　(全 181 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2006-524046 (P2006-524046)
(86)(22)出願日　平成16年8月18日 (2004.8.18)
(65)公表番号　特表2007-502622 (P2007-502622A)
(43)公表日　平成19年2月15日 (2007.2.15)
(86)国際出願番号　PCT/US2004/026953
(87)国際公開番号　WO2005/042743
(87)国際公開日　平成17年5月12日 (2005.5.12)
審査請求日　平成19年8月17日 (2007.8.17)
(31)優先権主張番号　60/496,367
(32)優先日　平成15年8月18日 (2003.8.18)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者　504333972
メディミューン，エルエルシー
アメリカ合衆国　２０８７８　メリーランド州，ゲイサーズバーグ，ワン　メディミューン　ウェイ
(74)代理人　100091096
弁理士　平木　祐輔
(74)代理人　100096183
弁理士　石井　貞次
(74)代理人　100118773
弁理士　藤田　節
(72)発明者　ダルーアクア，ウイリアム
アメリカ合衆国　２０８７８　メリーランド州，ゲイザーズバーク，チェスタータウン　ストリート　５６４

最終頁に続く

(54)【発明の名称】抗体のヒト化

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
以下の工程：
a）それぞれドナー抗体の重鎖相補性決定領域（CDR）CDR1、CDR2、CDR3をコードする核酸配列とヒト重鎖フレームワーク領域（FR）FR1、FR2、FR3及びFR4をコードする核酸配列とをインフレームで一緒に融合することによって作製された、重鎖可変領域ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列のコンビナトリアルライブラリーを合成すること、ただし少なくとも1つのFRは該ヒト重鎖フレームワーク領域をコードする複数の核酸配列を含む1以上のサブバンクに由来するものであること；
b）重鎖可変領域ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列のコンビナトリアルライブラリー及び軽鎖可変領域のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を細胞に導入すること；
c）重鎖可変領域ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列のコンビナトリアルライブラリー及び軽鎖可変領域のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を発現させること；
d）抗原と免疫特異的に結合するヒト化抗体をスクリーニングすること；並びに
e）抗原と結合するヒト化抗体を単離すること
を含むヒト化抗体を作製する方法。
【請求項２】
以下の工程：

a）それぞれドナー抗体の軽鎖CDR1、CDR2、CDR3をコードする核酸配列とヒト軽鎖FR1、FR2、FR3及びFR4をコードする核酸配列とをインフレームで一緒に融合することによって作製された、軽鎖可変領域ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列のコンビナトリアルライブラリーを合成すること、ただし少なくとも1つのFRは該ヒト軽鎖フレームワーク領域をコードする複数の核酸配列を含む1以上のサブバンクに由来するものであること；

b）軽鎖可変領域ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列のコンビナトリアルライブラリー及び重鎖可変領域のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を細胞に導入すること；

c）軽鎖可変領域ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列のコンビナトリアルライブラリー及び重鎖可変領域のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを発現させること；

d）抗原と免疫特異的に結合するヒト化抗体をスクリーニングすること；並びに

e）抗原と結合するヒト化抗体を単離すること

を含むヒト化抗体を作製する方法。

【請求項３】

以下の工程：

a）それぞれドナー抗体の重鎖CDR1、CDR2、CDR3をコードする核酸配列とヒト重鎖FR1、FR2、FR3及びFR4をコードする核酸配列とをインフレームで一緒に融合することによって作製された、重鎖可変領域ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列のコンビナトリアルライブラリーを合成すること、ただし少なくとも1つのFRは該ヒト重鎖フレームワーク領域をコードする複数の核酸配列を含む1以上のサブバンクに由来するものであること；

b）それぞれドナー抗体の軽鎖CDR1、CDR2、CDR3をコードする核酸配列とヒト軽鎖FR1、FR2、FR3及びFR4をコードする核酸配列とをインフレームで一緒に融合することによって作製された、軽鎖可変領域ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列のコンビナトリアルライブラリーを合成すること、ただし少なくとも1つのFRは該ヒト軽鎖フレームワーク領域をコードする複数の核酸配列を含む1以上のサブバンクに由来するものであること；

c）重鎖可変領域ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列のコンビナトリアルライブラリーと、軽鎖可変領域のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列のコンビナトリアルライブラリーとを細胞に導入すること；

d）重鎖可変領域ポリペプチド及び軽鎖可変領域のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列のコンビナトリアルライブラリーを発現させること；

e）抗原と免疫特異的に結合するヒト化抗体をスクリーニングすること；並びに

f）抗原と結合するヒト化抗体を単離すること、

を含むヒト化抗体を作製する方法。

【請求項４】

重鎖可変領域ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列のコンビナトリアルライブラリーの作製方法であって、各ポリヌクレオチド配列は、ドナー抗体の重鎖相補性決定領域（CDR）CDR1、CDR2、CDR3をコードする核酸配列とヒト重鎖フレームワーク領域（FR）FR1、FR2、FR3及びFR4をコードする核酸配列とをインフレームで一緒に融合させることにより作製され、少なくとも1つのFRが、該ヒト重鎖フレームワーク領域をコードする複数の核酸配列を含む1以上のサブバンクに由来する、上記方法。

【請求項５】

軽鎖可変領域ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列のコンビナトリアルライブラリーの作製方法であって、各ポリヌクレオチド配列は、ドナー抗体の軽鎖相補性決定領域（CDR）CDR1、CDR2、CDR3をコードする核酸配列とヒト軽鎖フレームワーク領域（FR）FR1、FR2、FR3及びFR4をコードする核酸配列とをインフレームで一緒に融合させることにより作製され、少なくとも1つのFRが、該ヒト軽鎖フレームワーク領域をコードする複

数の核酸配列を含む1以上のサブバンクに由来する、上記方法。
【請求項６】
以下のもの：
（ｉ）重鎖可変領域ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列の第1セットであって、該ポリヌクレオチド配列の第1セットはドナー抗体の重鎖相補性決定領域（CDR）CDR1、CDR2、CDR3をコードする核酸配列とヒト重鎖フレームワーク領域（FR）FR1、FR2、FR3及びFR4をコードする核酸配列とをインフレームで一緒に融合させることにより作製され、少なくとも1つのFRが、該ヒト重鎖フレームワーク領域をコードする複数の核酸配列を含む1以上のサブバンクに由来する、上記第1セット、並びに
（ｉｉ）軽鎖可変領域ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列の第2セットであって、該ポリヌクレオチド配列の第2セットはドナー抗体の軽鎖相補性決定領域（CDR）CDR1、CDR2、CDR3をコードする核酸配列とヒト軽鎖フレームワーク領域（FR）FR1、FR2、FR3及びFR4をコードする核酸配列とをインフレームで一緒に融合させることにより作製され、少なくとも1つのFRが、該ヒト軽鎖フレームワーク領域をコードする複数の核酸配列を含む1以上のサブバンクに由来する、上記第2セット
を含むコンビナトリアルライブラリーの作製方法。
【請求項７】
ヒトフレームワーク領域サブバンクがヒト生殖系列配列及び/又は機能的ヒト抗体由来のフレームワーク領域をコードする複数の核酸配列を含む、請求項1～6のいずれか1項に記載の方法。
【請求項８】
ヒトフレームワーク領域サブバンクが、1以上の突然変異が導入されたヒト生殖系列配列及び/又は機能的ヒト抗体由来のフレームワーク領域をコードする複数の核酸配列を含む、請求項1～6のいずれか1項に記載の方法。
【請求項９】
前記核酸配列がオーバーラップPCR又はライゲーションによってインフレームで一緒に融合される、請求項1～6のいずれか1項に記載の方法。
【請求項１０】
工程(a)の前に、ヒトフレームワーク領域をコードする複数の核酸配列を含む少なくとも1つのサブバンクを作製する工程をさらに含む、請求項1～6のいずれか1項に記載の方法。
【請求項１１】
各FRが1以上のサブバンクに由来する、請求項1～6のいずれか1項に記載の方法。
【請求項１２】
請求項4～6のいずれか1項に記載の方法により作製されたコンビナトリアルライブラリー。
【請求項１３】
請求項12に記載のコンビナトリアルライブラリーを含む細胞集団。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、抗体の抗原に対する免疫特異性を保持したまま、抗体の免疫原性を弱めるための、抗体の再設計または改造方法に関する。特に、本発明は、フレームワーク領域のサブバンクから得られるフレームワーク領域にin frame（フレーム内）融合したドナー抗体由来の相補性決定領域（CDR）を含んでなるコンビナトリアルライブラリーを合成することによって、抗原に免疫特異的な抗体を作製する方法を提供する。本発明はまた、本発明の方法によって作製された抗体を提供する。
【背景技術】
【０００２】
1．発明の背景

抗体は我々の免疫反応において極めて重要な役割を担っている。それらはウイルスや細菌毒素を不活化することができ、また、補体系と様々なタイプの白血球を動員して、侵入してくる微生物や大型の寄生生物を死滅させるのに不可欠である。抗体はもっぱらＢリンパ球によって数限りない形態で作られており、それぞれの形態が異なるアミノ酸配列を有し、異なる抗原結合部位をもっている。抗体は、まとめて免疫グロブリン（Ig）と呼ばれているが、血液中で最も豊富に存在するタンパク質成分の一つである。Albertsら，Molecular Biology of the Cell，2nd ed.，1989，Garland Publishing，Inc.。

【０００３】

典型的な抗体は、２本の同一の重（Ｈ）鎖（それぞれが約440アミノ酸を含む）と２本の同一の軽（Ｌ）鎖（それぞれが約220アミノ酸を含む）をもつＹ型分子である。４本の鎖は非共有結合と共有（ジスルフィド）結合との組み合わせにより一緒に保持されている。パパインやペプシンのようなタンパク質分解酵素は、抗体分子を、異なる特性を示すフラグメントに分割することができる。パパインは分離した同一のFabフラグメント２本（それぞれが１つの抗原結合部位を保持する）とFcフラグメント１本をもたらす。ペプシンは$F(ab')_2$フラグメントを１本生成する。Albertsら，Molecular Biology of the Cell，2nd ed.，1989，Garland Publishing，Inc.。

【０００４】

Ｌ鎖とＨ鎖は双方ともそのアミノ末端に可変配列を有し、そのカルボキシル末端には定常配列を有する。Ｌ鎖は約110アミノ酸長の定常領域と同じサイズの可変領域を保持する。Ｈ鎖も約110アミノ酸長の可変領域を有するが、Ｈ鎖の定常領域はＨ鎖のクラスに応じて約330または440アミノ酸長である。Albertsら，Molecular Biology of the Cell，2nd ed.，1989，Garland Publishing，Inc. pp 1019。

【０００５】

可変領域の部分だけが抗原の結合に直接関与している。研究によって、Ｌ鎖とＨ鎖の両方の可変領域の多様性はほとんど、各鎖に含まれる３つの小さな超可変領域（相補性決定領域またはCDRとも呼ばれる）に限られることが示されている。可変領域の残りの部分は、フレームワーク領域（FR）として知られるもので、比較的変化しない。Albertsら，Molecular Biology of the Cell，2nd ed.，1989，Garland Publishing，Inc. pp 1019-1020。

【０００６】

天然の免疫グロブリンはアッセイや診断に使用されており、また、使用頻度は限られるものの治療にも用いられている。しかし、そのような用途、特に治療においては、天然の免疫グロブリンの多クローン性によって使用が妨げられている。特定の特異性を有するモノクローナル抗体の出現は治療用途の機会を増大させた。ところが、ほとんどのモノクローナル抗体は、宿主げっ歯動物を標的タンパク質で免疫し、続いて対象の抗体を産生するげっ歯動物の脾細胞をげっ歯動物のミエローマ細胞と融合することにより産生される。したがって、それらは本質的にげっ歯動物のタンパク質であり、そのままではヒトにおいて免疫原性があり、しばしばHAMA（Human Anti-Mouse Antibody：ヒト抗マウス抗体）応答と呼ばれる望ましくない免疫応答を誘起させる。

【０００７】

多くのグループが治療用抗体の免疫原性を弱めるための技術を開発している。慣習的には、ドナー抗体に対する相同性の程度によってヒト鋳型を選択する。すなわち、可変領域が非ヒト抗体に最も相同なヒト抗体をヒト化のための鋳型として使用する。その理論は、フレームワーク配列が抗原との相互作用のためにCDRをその正しい空間的方向付けで保持するように作用し、また、フレームワーク残基が時には抗原結合に関与することさえある、ということにある。こうして、選択したヒトフレームワーク配列がドナーのフレームワーク配列に最も類似している場合には、ヒト化抗体において親和性が保持される可能性が最大となろう。例えば、Winter（ヨーロッパ特許第0239400号)は、重鎖および軽鎖可変領域のそれぞれに由来する３つの相補性決定領域（CDR1、CDR2およびCDR3）をグラフトするために、長いオリゴヌクレオチドを用いた部位特異的変異誘発によりヒト化抗体を作製す

ることを提案した。この方法はうまくいくことが示されたが、ドナーCDRを支持する最良のヒト鋳型を選択するという可能性に限界がある。

【０００８】

ヒト化抗体はその天然のまたはキメラな対応物よりもヒトにおいて免疫原性が少ないが、多くのグループは、CDRをグラフトさせたヒト化抗体は著しく低下した結合親和性を示しうることに気づいている（例えば、Riechmannら, 1988, Nature 3 32:323-327）。例えば、Riechmannとその仲間は、CDR領域のみの転移はCDRグラフト産物において満足のいく抗原結合活性を得るのに十分ではなく、ヒト配列の27位のセリン残基を対応するラットフェニルアラニン残基に変換することも必要である、ことを見いだした。これらの結果は、効果的な抗原結合活性を得るためにはCDR領域の外側にあるヒト配列の残基の変更が必要でありうることを示した。それにしても、結合親和性はもとのモノクローナル抗体の親和性よりもまだかなり低いものであった。

【０００９】

例えば、Queenら（米国特許第5,530,101号）は、マウスモノクローナル抗体（抗Tac MAb）のCDRを、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域および定常領域と結合させることによって、インターロイキン-2受容体に結合するヒト化抗体を作製することを記載した。ヒトフレームワーク領域は、抗Tac MAb配列との相同性が最大となるように選択された。さらに、コンピュータモデリングを用いることにより、CDRまたは抗原と相互作用しそうなフレームワークアミノ酸残基が同定され、これらの位置ではヒト化抗体においてマウスアミノ酸が使用された。得られたヒト化抗Tac抗体は、インターロイキン-2受容体(p55)に対する親和性が$3 \times 10^{9}\ M^{-1}$であると報告され、この数値は依然としてマウスMAbの親和性の３分の１ほどにすぎなかった。

【００１０】

他のグループは、アミノ酸残基の正体が満足のいく結合親和性を有するCDRグラフト産物の取得に寄与している、可変領域のフレームワーク領域内の更なる位置（すなわち、可変領域のCDRおよび構造ループの外側の位置）を同定した。例えば、米国特許第6,054,297号および第5,929,212号を参照されたい。しかしまだ、特定のCDRグラフト配置が対象となる所与の抗体にいかに有効であるかを前もって知ることは不可能である。

【００１１】

Leung（米国特許出願公開第US 2003/0040606号）は、フレームワークパッチング（framework patching）アプローチを記載しており、このアプローチでは、免疫グロブリンの可変領域をFR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3およびFR4に画定して、非ヒト抗体とヒト抗体鋳型との相同性が最大となるように個々のFR配列を選択している。しかし、このアプローチは手間がかかり、最適なフレームワーク領域を簡単に同定することができない。

【００１２】

治療上より効果的な抗体が開発されつつあり、また、それらはより有望な成果を収めつつあるので、投与抗体によって引き出された生体の免疫反応を抑制または排除することができることは重要である。したがって、抗体をヒト様にするための効率的かつ迅速な遺伝子工学的操作を可能にし、かつ/また、抗体をヒト化する際の労力の軽減を可能にする新しいアプローチは、多大な利益と医療的価値をもたらすだろう。

【００１３】

本明細書中での文献の引用または考察は、それが本発明の先行技術であることを容認するものと解釈されるべきでない。

【発明の開示】

【００１４】

2.　発明の概要

本発明は、一部には、抗体の可変重鎖フレームワーク領域と可変軽鎖フレームワーク領域のためのフレームワーク領域サブバンクの作製、ならびに、ドナー抗体由来の相補性決定領域（CDR）とフレームワーク領域サブバンク由来のフレームワーク領域とをin frameに一緒に融合することにより作製された、可変重鎖領域および/または可変軽鎖領域を含

む抗体のコンビナトリアルライブラリーの作製、に基づいている。フレームワーク領域サブバンクの作製は、迅速で手間のかからない、抗体（定常領域を含むまたは含まない）のコンビナトリアルライブラリーの作製を可能にし、これらの抗体は、対象の抗原に対するそれらの免疫特異性だけでなく、対象の生物におけるそれらの免疫原性を容易にスクリーニングすることができる。本発明で記載するライブラリーアプローチでは、アクセプターフレームワーク（例えば、ヒトフレームワーク）の効率的な選択および同定が可能である。フレームワーク領域サブバンクの作製に加えて、CDRのサブバンクを作製して、フレームワーク領域サブバンクからのフレームワーク領域とランダムにin frame融合させることにより、抗体（定常領域を含むまたは含まない）のコンビナトリアルライブラリーを作製することができ、これらの抗体は、対象の抗原に対するそれらの免疫特異性だけでなく、対象の生物におけるそれらの免疫原性を容易にスクリーニングすることができる。本発明のコンビナトリアルライブラリー法は、本明細書では、人間に使用するためのヒト化抗体の作製について例証される。しかしながら、本発明のコンビナトリアルライブラリー法は、どのような対象生物用の抗体の作製にも容易に応用することが可能である。

【００１５】

本発明は、可変軽鎖および可変重鎖の各フレームワーク領域のためのフレームワーク領域サブバンクを提供する。したがって、本発明は、それぞれの対象の生物種のための、およびそれぞれのCDRの定義（例えば、KabatおよびChothia）のための、可変軽鎖フレームワーク領域１、可変軽鎖フレームワーク領域２、可変軽鎖フレームワーク領域３、および可変軽鎖フレームワーク領域４のフレームワーク領域サブバンクを提供する。本発明はまた、それぞれの対象の生物種のための、およびそれぞれのCDRの定義（例えば、KabatおよびChothia）のための、可変重鎖フレームワーク領域１、可変重鎖フレームワーク領域２、可変重鎖フレームワーク領域３、および可変重鎖フレームワーク領域４のフレームワーク領域サブバンクを提供する。フレームワーク領域サブバンクは生殖系列(germline)フレームワーク配列由来のフレームワーク領域および/または機能性抗体配列由来のフレームワーク領域を含みうる。フレームワーク領域サブバンクは、１以上の変異が導入されている、生殖系列フレームワーク配列由来のフレームワーク領域および/または機能性抗体配列由来のフレームワーク領域を含みうる。このフレームワーク領域サブバンクを使用すると、対象の抗原に対する免疫特異性だけでなく、対象の生物における免疫原性をスクリーニングすることができる抗体のコンビナトリアルライブラリーを容易に作製することができる。

【００１６】

本発明は、可変軽鎖および可変重鎖の各CDRのためのCDRサブバンクを提供する。したがって、本発明は、それぞれの対象の生物種のための、およびそれぞれのCDRの定義（例えば、KabatおよびChothia）のための、可変軽鎖CDR1、可変軽鎖CDR2、および可変軽鎖CDR3のCDR領域サブバンクを提供する。本発明はまた、それぞれの対象の生物種のための、およびそれぞれのCDRの定義（例えば、KabatおよびChothia）のための、可変重鎖CDR1、可変重鎖CDR2、および可変重鎖CDR3のCDRサブバンクを提供する。CDRサブバンクは、対象の抗原と免疫特異的に結合する抗体の部分として同定されたCDRを含みうる。CDRサブバンクを使用すると、対象の抗原に対する免疫特異性だけでなく、対象の生物における免疫原性をスクリーニングすることができる抗体のコンビナトリアルライブラリーを容易に作製することができる。

【００１７】

本発明は、重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列および/または軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を提供し、ここで、前記可変領域はドナー抗体由来のCDR１～３をフレームワーク領域サブバンク由来のフレームワーク領域１～４と一緒にin frame融合することにより作製されたものである。いくつかの実施形態においては、ドナー抗体の重鎖および/または軽鎖可変領域に由来するCDRの１つ以上が、ドナー抗体の対応するCDRをコードする核酸配列に対して１以上の変異を含んでいる。本発明はまた、重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列および/または軽鎖可変領域をコードす

るヌクレオチド配列を含む核酸配列を提供し、ここで、前記可変領域はCDRサブバンク（好ましくは、対象の抗原と免疫特異的に結合するCDRのサブバンク）から得られたCDR１～３をフレームワーク領域サブバンクから得られたフレームワーク領域１～４と一緒にin frame融合することにより作製されたものである。

【００１８】

ある実施形態において、本発明は、重鎖可変領域（好ましくは、ヒト化重鎖可変領域）をコードする第１のヌクレオチド配列を含む核酸配列であって、前記重鎖可変領域をコードする第１のヌクレオチド配列は、重鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、重鎖相補性決定領域（CDR）１をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより作製されたものであり、その際、前記CDRはドナー抗体の重鎖可変領域（好ましくは、非ヒトドナー抗体の重鎖可変領域）に由来し、少なくとも１つの重鎖フレームワーク領域は重鎖フレームワーク領域のサブバンク（好ましくは、ヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られたものである、上記核酸配列を提供する。この実施形態によれば、前記核酸配列はドナー軽鎖可変領域（好ましくは、非ヒトドナー軽鎖可変領域）をコードする第２のヌクレオチド配列をさらに含みうる。あるいはまた、この実施形態によれば、前記核酸配列は軽鎖可変領域（好ましくは、ヒト化軽鎖可変領域）をコードする第２のヌクレオチド配列をさらに含み、前記軽鎖可変領域をコードする第２のヌクレオチド配列は、軽鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより作製されたものであり、その際、前記CDRはドナー抗体の軽鎖可変領域（好ましくは、非ヒトドナー抗体の軽鎖可変領域）に由来し、少なくとも１つの軽鎖フレームワーク領域は軽鎖フレームワーク領域のサブバンク（好ましくは、ヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られたものである。

【００１９】

別の実施形態において、本発明は、軽鎖可変領域（好ましくは、ヒト化軽鎖可変領域）をコードする第１のヌクレオチド配列を含む核酸配列であって、前記軽鎖可変領域をコードする第１のヌクレオチド配列は、軽鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより作製されたものであり、その際、前記CDRはドナー抗体の軽鎖可変領域（好ましくは、非ヒトドナー抗体の軽鎖可変領域）に由来し、少なくとも１つの軽鎖フレームワーク領域は軽鎖フレームワーク領域のサブバンク（好ましくは、ヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られたものである、上記核酸配列を提供する。この実施形態によれば、前記核酸配列はドナー重鎖可変領域（好ましくは、非ヒトドナー重鎖可変領域）をコードする第２のヌクレオチド配列をさらに含みうる。

【００２０】

別の実施形態において、本発明は、重鎖可変領域（好ましくは、ヒト化重鎖可変領域）をコードする第１のヌクレオチド配列を含む核酸配列であって、前記重鎖可変領域をコードする第１のヌクレオチド配列は、重鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより作製されたものであり、その際、少なくとも１つのCDRはドナー抗体（好ましくは、非ヒトドナー抗体）由来の重鎖CDRのサブバンクから得られ、少なくとも１つの重鎖フレームワーク領域は重鎖フレームワーク領域のサブバンク（好ましくは、ヒト

重鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られたものである、上記核酸配列を提供する。この実施形態によれば、前記核酸はドナー軽鎖可変領域（好ましくは、非ヒトドナー軽鎖可変領域）をコードする第２のヌクレオチド配列をさらに含みうる。あるいはまた、この実施形態によれば、前記核酸配列は軽鎖可変領域（好ましくは、ヒト化軽鎖可変領域）をコードする第２のヌクレオチド配列をさらに含み、前記軽鎖可変領域をコードする第２のヌクレオチド配列は、軽鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより作製されたものであり、その際、前記CDRはドナー抗体の軽鎖可変領域（好ましくは、非ヒトドナー抗体の軽鎖可変領域）に由来するか、または少なくとも１つのCDRはドナー抗体（好ましくは、非ヒト抗体）由来の軽鎖CDRのサブバンクから得られたものであり、そして少なくとも１つの軽鎖フレームワーク領域は軽鎖フレームワーク領域のサブバンク（好ましくは、ヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られたものである。

【００２１】

別の実施形態において、本発明は、軽鎖可変領域（好ましくは、ヒト化軽鎖可変領域）をコードする第１のヌクレオチド配列を含む核酸配列であって、前記軽鎖可変領域をコードする第１のヌクレオチド配列は、軽鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより作製されたものであり、その際、少なくとも１つのCDRはドナー抗体（好ましくは、非ヒトドナー抗体）由来の軽鎖CDRのサブバンクから得られ、少なくとも１つの軽鎖フレームワーク領域は軽鎖フレームワーク領域のサブバンク（好ましくは、ヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られたものである、上記核酸配列を提供する。この実施形態によれば、前記核酸配列はドナー重鎖可変領域（好ましくは、非ヒトドナー重鎖可変領域）をコードする第２のヌクレオチド配列をさらに含みうる。あるいはまた、この実施形態によれば、前記核酸配列は重鎖可変領域（好ましくは、ヒト化重鎖可変領域）をコードする第２のヌクレオチド配列をさらに含み、前記重鎖可変領域をコードする第２のヌクレオチド配列は、重鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより作製されたものであり、その際、前記CDRはドナー抗体の重鎖可変領域（好ましくは、非ヒトドナー抗体の重鎖可変領域）に由来し、少なくとも１つの重鎖フレームワーク領域は重鎖フレームワーク領域のサブバンク（好ましくは、ヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られたものである。

【００２２】

本発明はまた、本明細書に記載の核酸配列を含む細胞、または該核酸配列を発現するように遺伝子操作された細胞を提供する。ある実施形態において、本発明は、重鎖可変領域（好ましくは、ヒト化重鎖可変領域）をコードする第１のヌクレオチド配列を含む第１の核酸配列を含有する細胞を提供し、前記細胞は、重鎖可変領域（好ましくは、ヒト化重鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を細胞に導入することを含む方法により作製されたものであり、前記核酸配列は、重鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより作製されたものであり、その際、前記CDRはドナー抗体の重鎖可変領域（好ましくは、非ヒトドナー抗体の重鎖可変領域）に由来し、少なくとも

１つの重鎖フレームワーク領域は重鎖フレームワーク領域のサブバンク（好ましくは、ヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られたものである。この実施形態によれば、前記細胞は軽鎖可変領域（好ましくは、ヒト化またはヒト軽鎖可変領域）をコードする第２のヌクレオチド配列を含む第２の核酸配列をさらに含みうる。

【００２３】

別の実施形態において、本発明は、軽鎖可変領域（好ましくは、ヒト化軽鎖可変領域）をコードする第１のヌクレオチド配列を含む第１の核酸配列を含有する細胞を提供し、前記細胞は、軽鎖可変領域（好ましくは、ヒト化軽鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を細胞に導入することを含む方法により作製されたものであり、前記核酸配列は、軽鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより作製されたものであり、その際、前記CDRはドナー抗体の軽鎖可変領域（好ましくは、非ヒトドナー抗体の軽鎖可変領域）に由来し、少なくとも１つの軽鎖フレームワーク領域は軽鎖フレームワーク領域のサブバンク（好ましくは、ヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られたものである。この実施形態によれば、前記細胞は重鎖可変領域（好ましくは、ヒト化またはヒト重鎖可変領域）をコードする第２のヌクレオチド配列を含む第２の核酸配列をさらに含みうる。

【００２４】

別の実施形態において、本発明は、重鎖可変領域（好ましくは、ヒト化重鎖可変領域）をコードする第１のヌクレオチド配列および軽鎖可変領域（好ましくは、ヒト化軽鎖可変領域）をコードする第２のヌクレオチド配列を含む核酸配列を含有する細胞を提供し、前記細胞は、(i)重鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより作製された、重鎖可変領域をコードする第１のヌクレオチド配列、および(ii)軽鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより作製された、軽鎖可変領域をコードする第２のヌクレオチド配列を含む核酸配列を細胞に導入する方法により作製されたものであり、その際、重鎖可変領域のCDRはドナー抗体の重鎖可変領域（好ましくは、非ヒトドナー抗体の重鎖可変領域）に由来し、軽鎖可変領域のCDRはドナー抗体の軽鎖可変領域（好ましくは、非ヒトドナー抗体の軽鎖可変領域）に由来し、少なくとも１つの重鎖フレームワーク領域は重鎖フレームワーク領域のサブバンク（好ましくは、ヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られ、そして少なくとも１つの軽鎖フレームワーク領域は軽鎖フレームワーク領域のサブバンク（好ましくは、ヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られたものである。

【００２５】

別の実施形態において、本発明は、重鎖可変領域（好ましくは、ヒト化重鎖可変領域）をコードする第１のヌクレオチド配列を含む第１の核酸配列を含有する細胞を提供し、前記細胞は、重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を細胞に導入することを含む方法により作製されたものであり、前記核酸配列は、重鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより作製されたものであり、その際、少なくとも１つのCDRはドナー抗体（好ましくは、非ヒトドナー抗体）由来の重鎖CDRのサブバンク

から得られ、少なくとも１つの重鎖フレームワーク領域は重鎖フレームワーク領域のサブバンク（好ましくは、ヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られたものである。この実施形態によれば、前記細胞は軽鎖可変領域（好ましくは、ヒト化またはヒト軽鎖可変領域）をコードする第２のヌクレオチド配列を含む第２の核酸配列をさらに含みうる。

【００２６】

別の実施形態において、本発明は、軽鎖可変領域（好ましくは、ヒト化軽鎖可変領域）をコードする第１のヌクレオチド配列を含む第１の核酸配列を含有する細胞を提供し、前記細胞は、軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を細胞に導入することを含む方法により作製されたものであり、前記核酸配列は、軽鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより作製されたものであり、その際、少なくとも１つのCDRはドナー抗体（好ましくは、非ヒトドナー抗体）由来の軽鎖CDRのサブバンクから得られ、少なくとも１つの軽鎖フレームワーク領域は軽鎖フレームワーク領域のサブバンク（好ましくは、ヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られたものである。この実施形態によれば、前記細胞は重鎖可変領域（好ましくは、ヒト化またはヒト重鎖可変領域）をコードする第２のヌクレオチド配列を含む第２の核酸配列をさらに含みうる。

【００２７】

別の実施形態において、本発明は、重鎖可変領域（好ましくは、ヒト化重鎖可変領域）をコードする第１のヌクレオチド配列および軽鎖可変領域（好ましくは、ヒト化軽鎖可変領域）をコードする第２のヌクレオチド配列を含む核酸配列を含有する細胞を提供し、前記細胞は、(i)重鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより作製された、重鎖可変領域をコードする第１のヌクレオチド配列、および(ii)軽鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより作製された、軽鎖可変領域をコードする第２のヌクレオチド配列を含む核酸配列を細胞に導入する方法により作製されたものであり、ここで、少なくとも１つの重鎖可変領域CDRはドナー抗体（好ましくは、非ヒトドナー抗体）由来の重鎖CDRのサブバンクから得られ、少なくとも１つの軽鎖可変領域CDRはドナー抗体（好ましくは、非ヒトドナー抗体）由来の軽鎖CDRのサブバンクから得られ、少なくとも１つの重鎖フレームワーク領域は重鎖フレームワーク領域のサブバンク（好ましくは、ヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られ、そして少なくとも１つの軽鎖フレームワーク領域は軽鎖フレームワーク領域のサブバンク（好ましくは、ヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られたものである。

【００２８】

別の実施形態において、本発明は、重鎖可変領域（好ましくは、ヒト化重鎖可変領域）をコードする第１のヌクレオチド配列および軽鎖可変領域（好ましくは、ヒト化軽鎖可変領域）をコードする第２のヌクレオチド配列を含む核酸配列を含有する細胞を提供し、前記細胞は、(i)重鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより作製された、重鎖可変領域をコードする第１のヌクレオチド配列、および(ii)軽鎖フレーム

ワーク領域１をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより作製された、軽鎖可変領域をコードする第２のヌクレオチド配列を含む核酸配列を細胞に導入する方法により作製されたものであり、ここで、重鎖可変領域CDRはドナー抗体の重鎖可変領域（好ましくは、非ヒトドナー抗体の重鎖可変領域）に由来し、少なくとも１つの軽鎖可変領域CDRはドナー抗体（好ましくは、非ヒトドナー抗体）由来の軽鎖CDRのサブバンクから得られ、少なくとも１つの重鎖フレームワーク領域は重鎖フレームワーク領域のサブバンク（好ましくは、ヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られ、そして少なくとも１つの軽鎖フレームワーク領域は軽鎖フレームワーク領域のサブバンク（好ましくは、ヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られたものである。

【００２９】

別の実施形態において、本発明は、重鎖可変領域（好ましくは、ヒト化重鎖可変領域）をコードする第１のヌクレオチド配列および軽鎖可変領域（好ましくは、ヒト化軽鎖可変領域）をコードする第２のヌクレオチド配列を含む核酸配列を含有する細胞を提供し、前記細胞は、(i)重鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより作製された、重鎖可変領域をコードする第１のヌクレオチド配列、および(ii)軽鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより作製された、軽鎖可変領域をコードする第２のヌクレオチド配列を含む核酸配列を細胞に導入する方法により作製されたものであり、ここで、少なくとも１つの重鎖可変領域CDRはドナー抗体（好ましくは、非ヒトドナー抗体）由来の重鎖CDRのサブバンクから得られ、軽鎖可変領域CDRはドナー抗体の軽鎖可変領域（好ましくは、非ヒトドナー抗体の軽鎖可変領域）に由来し、少なくとも１つの重鎖フレームワーク領域は重鎖フレームワーク領域のサブバンク（好ましくは、ヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られ、そして少なくとも１つの軽鎖フレームワーク領域は軽鎖フレームワーク領域のサブバンク（好ましくは、ヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られたものである。

【００３０】

本発明は、抗原と免疫特異的に結合する抗体（好ましくは、ヒト化抗体）をコードする核酸配列を含有する細胞を提供し、前記細胞は、(a)重鎖可変領域（好ましくは、ヒト化重鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を細胞に導入すること、ただし、前記ヌクレオチド配列は、重鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより作製されたものであり、その際、前記CDRはドナー抗体の重鎖可変領域（好ましくは、非ヒトドナー抗体の重鎖可変領域）に由来し、少なくとも１つの重鎖フレームワーク領域は重鎖フレームワーク領域のサブバンク（好ましくは、ヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られたものであること、および(b)軽鎖可変領域（好ましくは、ヒト化軽鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を細胞に導入すること、ただし、前記ヌクレオチド配列は、軽鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列

を一緒に融合することにより作製されたものであり、その際、前記CDRはドナー抗体の軽鎖可変領域（好ましくは、非ヒトドナー抗体の軽鎖可変領域）に由来し、少なくとも１つの軽鎖フレームワーク領域は軽鎖フレームワーク領域のサブバンク（好ましくは、ヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られたものであること、を含む方法によって作製されたものである。

【００３１】

本発明は、抗原と免疫特異的に結合する抗体（好ましくは、ヒト化抗体）をコードする核酸配列を含有する細胞を提供し、前記細胞は、(a)重鎖可変領域（好ましくは、ヒト化重鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を細胞に導入すること、ただし、前記ヌクレオチド配列は、重鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより作製されたものであり、その際、少なくとも１つのCDRはドナー抗体（好ましくは、非ヒトドナー抗体）由来の重鎖CDRのサブバンクから得られ、少なくとも１つの重鎖フレームワーク領域は重鎖フレームワーク領域のサブバンク（好ましくは、ヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られたものであること、および(b)軽鎖可変領域（好ましくは、ヒト化軽鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を細胞に導入すること、ただし、前記ヌクレオチド配列は、軽鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより作製されたものであり、その際、前記CDRはドナー抗体の軽鎖可変領域（好ましくは、非ヒトドナー抗体の軽鎖可変領域）に由来し、少なくとも１つの軽鎖フレームワーク領域は軽鎖フレームワーク領域のサブバンク（好ましくは、ヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られたものであること、を含む方法によって作製されたものである。

【００３２】

本発明は、抗原と免疫特異的に結合する抗体（好ましくは、ヒト化抗体）をコードする核酸配列を含有する細胞を提供し、前記細胞は、(a)重鎖可変領域（好ましくは、ヒト化重鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を細胞に導入すること、ただし、前記ヌクレオチド配列は、重鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより作製されたものであり、その際、少なくとも１つのCDRはドナー抗体（好ましくは、非ヒトドナー抗体）由来の重鎖CDRのサブバンクから得られ、少なくとも１つの重鎖フレームワーク領域は重鎖フレームワーク領域のサブバンク（好ましくは、ヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られたものであること、および(b)軽鎖可変領域（好ましくは、ヒト化軽鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を細胞に導入すること、ただし、前記ヌクレオチド配列は、軽鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより作製されたものであり、その際、少なくとも１つのCDRはドナー抗体（好ましくは、非ヒトドナー抗体）由来の軽鎖CDRのサブバンクから得られ、少なくとも１つの軽鎖フレームワーク領域は軽鎖フレームワーク領域のサブバンク（好ましくは、ヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られたものであること、を含む方法によって作製されたものである。

【００３３】

本発明は、抗原と免疫特異的に結合する抗体（好ましくは、ヒト化抗体）をコードする核酸配列を含有する細胞を提供し、前記細胞は、(a)重鎖可変領域（好ましくは、ヒト化重鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を細胞に導入すること、ただし、前記ヌクレオチド配列は、重鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより作製されたものであり、その際、前記CDRはドナー抗体の重鎖可変領域（好ましくは、非ヒトドナー抗体の重鎖可変領域）に由来し、少なくとも１つの重鎖フレームワーク領域は重鎖フレームワーク領域のサブバンク（好ましくは、ヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られたものであること、および(b)軽鎖可変領域（好ましくは、ヒト化軽鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を細胞に導入すること、ただし、前記ヌクレオチド配列は、軽鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより作製されたものであり、その際、少なくとも１つのCDRはドナー抗体（好ましくは、非ヒトドナー抗体）由来の軽鎖CDRのサブバンクから得られ、少なくとも１つの軽鎖フレームワーク領域は軽鎖フレームワーク領域のサブバンク（好ましくは、ヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られたものであること、を含む方法によって作製されたものである。

【００３４】

本発明は、重鎖可変領域（好ましくは、ヒト化重鎖可変領域）を作製する方法を提供し、前記方法は、重鎖可変領域（好ましくは、ヒト化重鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を本明細書に記載の細胞において発現させることを含む。本発明は、軽鎖可変領域（好ましくは、ヒト化軽鎖可変領域）を作製する方法を提供し、前記方法は、軽鎖可変領域（好ましくは、ヒト化軽鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を本明細書に記載の細胞において発現させることを含む。本発明はまた、抗原と免疫特異的に結合する抗体（好ましくは、ヒト化抗体）を作製する方法を提供し、前記方法は、本明細書に記載の細胞内に含まれるヒト化抗体をコードする核酸配列を発現させることを含む。

【００３５】

ある実施形態において、本発明は、抗原と免疫特異的に結合する抗体（好ましくは、ヒト化抗体）を作製する方法を提供し、前記方法は、

(a) 重鎖フレームワーク領域のサブバンクを作製すること、

(b) ヒト化重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を合成すること、ただし、前記ヌクレオチド配列は、重鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより作製されるものであり、その際、前記CDRはドナー抗体の重鎖可変領域（好ましくは、非ヒトドナー抗体の重鎖可変領域）に由来し、少なくとも１つの重鎖フレームワーク領域は重鎖フレームワーク領域のサブバンク（好ましくは、ヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られるものであること、

(c) 前記核酸配列を、軽鎖可変領域（好ましくは、ヒト化またはヒト軽鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を含有する細胞に導入すること、

(d) 重鎖可変領域（好ましくは、ヒト化重鎖可変領域）と軽鎖可変領域（好ましくは、ヒト化またはヒト軽鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を発現させること、

を含んでなる。この実施形態によれば、前記方法は前記抗原と免疫特異的に結合する抗体（好ましくは、ヒト化抗体）をスクリーニングすることからなるステップ(e)をさらに含んでいてよい。

【００３６】
別の実施形態において、本発明は、抗原と免疫特異的に結合する抗体（好ましくは、ヒト化抗体）を作製する方法を提供し、前記方法は、
(a) 重鎖フレームワーク領域のサブバンクを作製すること、
(b) 重鎖可変領域（好ましくは、ヒト化重鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を合成すること、ただし、前記ヌクレオチド配列は、重鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより作製されるものであり、その際、少なくとも１つのCDRはドナー抗体（好ましくは、非ヒトドナー抗体）由来の重鎖CDRのサブバンクから得られ、少なくとも１つの重鎖フレームワーク領域は重鎖フレームワーク領域のサブバンク（好ましくは、ヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られるものであること、
(c) 前記核酸配列を、軽鎖可変領域（好ましくは、ヒト化またはヒト軽鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を含有する細胞に導入すること、
(d) 重鎖可変領域（好ましくは、ヒト化重鎖可変領域）と軽鎖可変領域（好ましくは、ヒト化またはヒト軽鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を発現させること、
を含んでなる。この実施形態によれば、前記方法は前記抗原と免疫特異的に結合する抗体（好ましくは、ヒト化抗体）をスクリーニングすることからなるステップ(e)をさらに含んでいてよい。
【００３７】
別の実施形態において、本発明は、抗原と免疫特異的に結合する抗体（好ましくは、ヒト化抗体）を作製する方法を提供し、前記方法は、
(a) 軽鎖フレームワーク領域のサブバンクを作製すること、
(b) 軽鎖可変領域（好ましくは、ヒト化軽鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を合成すること、ただし、前記ヌクレオチド配列は、軽鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより作製されるものであり、その際、前記CDRはドナー抗体の軽鎖可変領域（好ましくは、非ヒトドナー抗体の軽鎖可変領域）に由来し、少なくとも１つの軽鎖フレームワーク領域は軽鎖フレームワーク領域のサブバンク（好ましくは、ヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られるものであること、
(c) 前記核酸配列を、重鎖可変領域（好ましくは、ヒト化またはヒト重鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を含有する細胞に導入すること、
(d) 重鎖可変領域（好ましくは、ヒト化重鎖可変領域）と軽鎖可変領域（好ましくは、ヒト化またはヒト軽鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を発現させること、
を含んでなる。この実施形態によれば、前記方法は前記抗原と免疫特異的に結合する抗体（好ましくは、ヒト化抗体）をスクリーニングすることからなるステップ(e)をさらに含んでいてよい。
【００３８】
別の実施形態において、本発明は、抗原と免疫特異的に結合する抗体（好ましくは、ヒト化抗体）を作製する方法を提供し、前記方法は、
(a) 軽鎖フレームワーク領域のサブバンクを作製すること、
(b) 軽鎖可変領域（好ましくは、ヒト化軽鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を合成すること、ただし、前記ヌクレオチド配列は、軽鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域３

をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより作製されるものであり、その際、少なくとも１つのCDRはドナー抗体（好ましくは、非ヒトドナー抗体）由来の軽鎖CDRのサブバンクから得られ、少なくとも１つの軽鎖フレームワーク領域は軽鎖フレームワーク領域のサブバンク（好ましくは、ヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られるものであること、

(c) 前記核酸配列を、重鎖可変領域（好ましくは、ヒト化またはヒト重鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を含有する細胞に導入すること、

(d) 重鎖可変領域（好ましくは、ヒト化重鎖可変領域）と軽鎖可変領域（好ましくは、ヒト化またはヒト軽鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を発現させること、

を含んでなる。この実施形態によれば、前記方法は前記抗原と免疫特異的に結合する抗体（好ましくは、ヒト化抗体）をスクリーニングすることからなるステップ(e)をさらに含んでいてよい。

【００３９】

別の実施形態において、本発明は、抗原と免疫特異的に結合する抗体（好ましくは、ヒト化抗体）を作製する方法を提供し、前記方法は、

(a) 軽鎖フレームワーク領域のサブバンクを作製すること、

(b) 重鎖フレームワーク領域のサブバンクを作製すること、

(c) 重鎖可変領域（好ましくは、ヒト化重鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を合成すること、ただし、前記ヌクレオチド配列は、重鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより作製されるものであり、その際、前記CDRはドナー抗体の重鎖可変領域（好ましくは、非ヒトドナー抗体の重鎖可変領域）に由来し、少なくとも１つの重鎖フレームワーク領域は重鎖フレームワーク領域のサブバンク（好ましくは、ヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られるものであること、

(d) 軽鎖可変領域（好ましくは、ヒト化軽鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を合成すること、ただし、前記ヌクレオチド配列は、軽鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより作製されるものであり、その際、前記CDRはドナー抗体の軽鎖可変領域（好ましくは、非ヒトドナー抗体の軽鎖可変領域）に由来し、少なくとも１つの軽鎖フレームワーク領域は軽鎖フレームワーク領域のサブバンク（好ましくは、ヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られるものであること、

(e) 前記核酸配列を細胞に導入すること、

(f) 重鎖可変領域（好ましくは、ヒト化重鎖可変領域）と軽鎖可変領域（好ましくは、ヒト化軽鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を発現させること、

を含んでなる。この実施形態によれば、前記方法は前記抗原と免疫特異的に結合する抗体（好ましくは、ヒト化抗体）をスクリーニングすることからなるステップ(g)をさらに含んでいてよい。

【００４０】

別の実施形態において、本発明は、抗原と免疫特異的に結合する抗体（好ましくは、ヒト化抗体）を作製する方法を提供し、前記方法は、

(a) 軽鎖フレームワーク領域のサブバンクを作製すること、

(b) 重鎖フレームワーク領域のサブバンクを作製すること、

(c) 重鎖可変領域（好ましくは、ヒト化重鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配

列を含む核酸配列を合成すること、ただし、前記ヌクレオチド配列は、重鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより作製されるものであり、その際、少なくとも１つのCDRはドナー抗体（好ましくは、非ヒトドナー抗体）由来の重鎖CDRのサブバンクから得られ、少なくとも１つの重鎖フレームワーク領域は重鎖フレームワーク領域のサブバンク（好ましくは、ヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られるものであること、

(d) 軽鎖可変領域（好ましくは、ヒト化軽鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を合成すること、ただし、前記ヌクレオチド配列は、軽鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより作製されるものであり、その際、前記CDRはドナー抗体の軽鎖可変領域に由来し、少なくとも１つの軽鎖フレームワーク領域はヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られるものであること、

(e) 前記核酸配列を細胞に導入すること、

(f) 重鎖可変領域（好ましくは、ヒト化重鎖可変領域）と軽鎖可変領域（好ましくは、ヒト化軽鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を発現させること、

を含んでなる。この実施形態によれば、前記方法は前記抗原と免疫特異的に結合する抗体（好ましくは、ヒト化抗体）をスクリーニングすることからなるステップ(g)をさらに含んでいてよい。

【００４１】

別の実施形態において、本発明は、抗原と免疫特異的に結合する抗体（好ましくは、ヒト化抗体）を作製する方法を提供し、前記方法は、

(a) 軽鎖フレームワーク領域のサブバンクを作製すること、

(b) 重鎖フレームワーク領域のサブバンクを作製すること、

(c) ヒト化重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を合成すること、ただし、前記ヌクレオチド配列は、重鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより作製されるものであり、その際、前記CDRはドナー抗体の重鎖可変領域（好ましくは、非ヒトドナー抗体の重鎖可変領域）に由来し、少なくとも１つの重鎖フレームワーク領域は重鎖フレームワーク領域のサブバンク（好ましくは、ヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られるものであること、

(d) 軽鎖可変領域（好ましくは、ヒト化軽鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を合成すること、ただし、前記ヌクレオチド配列は、軽鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより作製されるものであり、その際、少なくとも１つのCDRはドナー抗体（好ましくは、非ヒトドナー抗体）由来の軽鎖CDRのサブバンクから得られ、少なくとも１つの軽鎖フレームワーク領域は軽鎖フレームワーク領域のサブバンク（好ましくは、ヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られるものであること、

(e) 前記核酸配列を細胞に導入すること、

(f) 重鎖可変領域（好ましくは、ヒト化重鎖可変領域）と軽鎖可変領域（好ましくは、ヒト化軽鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を発現させること、

を含んでなる。この実施形態によれば、前記方法は前記抗原と免疫特異的に結合する抗体（好ましくは、ヒト化抗体）をスクリーニングすることからなるステップ(g)をさらに含んでいてよい。

【００４２】

別の実施形態において、本発明は、抗原と免疫特異的に結合する抗体（好ましくは、ヒト化抗体）を作製する方法を提供し、前記方法は、

(a) 軽鎖フレームワーク領域のサブバンクを作製すること、

(b) 重鎖フレームワーク領域のサブバンクを作製すること、

(c) 重鎖可変領域（好ましくは、ヒト化重鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を合成すること、ただし、前記ヌクレオチド配列は、重鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより作製されるものであり、その際、少なくとも１つのCDRはドナー抗体（好ましくは、非ヒトドナー抗体）由来の重鎖CDRのサブバンクから得られ、少なくとも１つの重鎖フレームワーク領域は重鎖フレームワーク領域のサブバンク（好ましくは、ヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られるものであること、

(d) 軽鎖可変領域（好ましくは、ヒト化軽鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を合成すること、ただし、前記ヌクレオチド配列は、軽鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより作製されるものであり、その際、少なくとも１つのCDRはドナー抗体（好ましくは、非ヒトドナー抗体）由来の軽鎖CDRのサブバンクから得られ、少なくとも１つの軽鎖フレームワーク領域は軽鎖フレームワーク領域のサブバンク（好ましくは、ヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られるものであること、

(e) 前記核酸配列を細胞に導入すること、

(f) 重鎖可変領域（好ましくは、ヒト化重鎖可変領域）と軽鎖可変領域（好ましくは、ヒト化軽鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を発現させること、

を含んでなる。この実施形態によれば、前記方法は前記抗原と免疫特異的に結合する抗体（好ましくは、ヒト化抗体）をスクリーニングすることからなるステップ(g)をさらに含んでいてよい。

【００４３】

別の実施形態において、本発明は、抗原と免疫特異的に結合する抗体（好ましくは、ヒト化抗体）を作製する方法を提供し、前記方法は、

(a) 軽鎖フレームワーク領域のサブバンクを作製すること、

(b) 重鎖フレームワーク領域のサブバンクを作製すること、

(c) (i)重鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより作製された、重鎖可変領域（好ましくは、ヒト化重鎖可変領域）をコードする第１のヌクレオチド配列、および(ii)軽鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより作製された、軽鎖可変領域（好ましくは、ヒト化軽鎖可変領域）をコードする第２のヌクレオチド配列を含む核酸配列を合成すること、ここで、重鎖可変領域のCDRはドナー抗

体の重鎖可変領域（好ましくは、非ヒトドナー抗体の重鎖可変領域）に由来し、軽鎖可変領域のCDRはドナー抗体の軽鎖可変領域（好ましくは、非ヒトドナー抗体の軽鎖可変領域）に由来し、少なくとも１つの重鎖フレームワーク領域は重鎖フレームワーク領域のサブバンク（好ましくは、ヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られ、そして少なくとも１つの軽鎖フレームワーク領域は軽鎖フレームワーク領域のサブバンク（好ましくは、ヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られたものであること、

(d) 前記核酸配列を細胞に導入すること、

(e) 重鎖可変領域（好ましくは、ヒト化重鎖可変領域）と軽鎖可変領域（好ましくは、ヒト化軽鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を発現させること、

を含んでなる。この実施形態によれば、前記方法は前記抗原と免疫特異的に結合する抗体（好ましくは、ヒト化抗体）をスクリーニングすることからなるステップ(f)をさらに含んでいてよい。

【００４４】

本発明は、抗原と免疫特異的に結合するヒト化抗体を作製する方法を提供し、前記方法は、

(a) 軽鎖フレームワーク領域のサブバンクを作製すること、

(b) 重鎖フレームワーク領域のサブバンクを作製すること、

(c) (i)重鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより作製された、ヒト化重鎖可変領域をコードする第１のヌクレオチド配列、および(ii)軽鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより作製された、ヒト化軽鎖可変領域をコードする第２のヌクレオチド配列を含む核酸配列を合成すること、ここで、少なくとも１つの重鎖可変領域CDRは抗原と免疫特異的に結合するドナー抗体に由来の重鎖CDRのサブバンクから得られ、軽鎖可変領域CDRはドナー抗体の軽鎖可変領域に由来し、少なくとも１つの重鎖フレームワーク領域はヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られ、そして少なくとも１つの軽鎖フレームワーク領域はヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られたものであること、

(d) 前記核酸配列を細胞に導入すること、

(e) ヒト化重鎖可変領域とヒト化軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を発現させること、

を含んでなる。この実施形態によれば、前記方法は前記抗原と免疫特異的に結合する抗体（好ましくは、ヒト化抗体）をスクリーニングすることからなるステップ(f)をさらに含んでいてよい。

【００４５】

本発明は、抗原と免疫特異的に結合するヒト化抗体を作製する方法を提供し、前記方法は、

(a) 軽鎖フレームワーク領域のサブバンクを作製すること、

(b) 重鎖フレームワーク領域のサブバンクを作製すること、

(c) (i)重鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより作製された、ヒト化重鎖可変領域をコードする第１のヌクレオチド配列、および(ii)軽鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク

領域３をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより作製された、ヒト化軽鎖可変領域をコードする第２のヌクレオチド配列を含む核酸配列を合成すること、ここで、重鎖可変領域CDRはドナー抗体の重鎖可変領域に由来し、少なくとも１つの軽鎖可変領域CDRは抗原と免疫特異的に結合するドナー抗体に由来の軽鎖CDRのサブバンクから得られ、少なくとも１つの重鎖フレームワーク領域はヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られ、そして少なくとも１つの軽鎖フレームワーク領域はヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られたものであること、

(d) 前記核酸配列を細胞に導入すること、

(e) ヒト化重鎖可変領域とヒト化軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を発現させること、

を含んでなる。この実施形態によれば、前記方法は前記抗原と免疫特異的に結合する抗体（好ましくは、ヒト化抗体）をスクリーニングすることからなるステップ(f)をさらに含んでいてよい。

【００４６】

別の実施形態において、本発明は、抗原と免疫特異的に結合する抗体（好ましくは、ヒト化抗体）を作製する方法を提供し、前記方法は、

(a) 軽鎖フレームワーク領域のサブバンクを作製すること、

(b) 重鎖フレームワーク領域のサブバンクを作製すること、

(c) (i)重鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより作製された、重鎖可変領域（好ましくは、ヒト化重鎖可変領域）をコードする第１のヌクレオチド配列、および(ii)軽鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより作製された、軽鎖可変領域（好ましくは、ヒト化軽鎖可変領域）をコードする第２のヌクレオチド配列を含む核酸配列を合成すること、ここで、少なくとも１つの重鎖可変領域CDRはドナー抗体（好ましくは、非ヒトドナー抗体）由来の重鎖CDRのサブバンクから得られ、少なくとも１つの軽鎖可変領域CDRはドナー抗体（好ましくは、非ヒトドナー抗体）由来の軽鎖CDRのサブバンクから得られ、少なくとも１つの重鎖フレームワーク領域は重鎖フレームワーク領域のサブバンク（好ましくは、ヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られ、そして少なくとも１つの軽鎖フレームワーク領域は軽鎖フレームワーク領域のサブバンク（好ましくは、ヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られたものであること、

(d) 前記核酸配列を細胞に導入すること、

(e) 重鎖可変領域（好ましくは、ヒト化重鎖可変領域）と軽鎖可変領域（好ましくは、ヒト化軽鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を発現させること、

を含んでなる。この実施形態によれば、前記方法は前記抗原と免疫特異的に結合する抗体（好ましくは、ヒト化抗体）をスクリーニングすることからなるステップ(f)をさらに含んでいてよい。

【００４７】

本発明は、本明細書に記載する方法により作製された抗体を提供する。好ましい実施形態では、本発明は、本明細書に記載する方法により作製されたヒト化抗体を提供する。本発明はまた、本明細書に記載する方法により作製された抗体、および担体、希釈剤または賦形剤を含有する組成物を提供する。好ましい実施形態では、本発明は、本明細書に記載する方法により作製されたヒト化抗体、および担体、希釈剤または賦形剤を含有する組成物を提供する。好ましくは、本発明の組成物はその意図した用途に適する形態の医薬組成

物である。

【００４８】

本発明は、重鎖可変領域（好ましくは、ヒト化重鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を含む複数の核酸配列を提供し、前記重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列は、それぞれ、重鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより作製されたものであり、その際、前記CDRはドナー抗体の重鎖可変領域（好ましくは、非ヒト化ドナー抗体の重鎖可変領域）に由来し、少なくとも１つの重鎖フレームワーク領域は重鎖フレームワーク領域のサブバンク（好ましくは、ヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られるものである。本発明はまた、重鎖可変領域（好ましくは、ヒト化重鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を含む複数の核酸配列を提供し、前記重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列は、それぞれ、重鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより作製されたものであり、その際、少なくとも１つのCDRはドナー抗体（好ましくは、非ヒト化ドナー抗体）由来の重鎖CDRのサブバンクから得られ、少なくとも１つの重鎖フレームワーク領域は重鎖フレームワーク領域のサブバンク（好ましくは、ヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られるものである。

【００４９】

本発明は、軽鎖可変領域（好ましくは、ヒト化軽鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を含む複数の核酸配列を提供し、前記軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列は、それぞれ、軽鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより作製されたものであり、その際、前記CDRはドナー抗体の軽鎖可変領域（好ましくは、非ヒト化ドナー抗体の軽鎖可変領域）に由来し、少なくとも１つの軽鎖フレームワーク領域は軽鎖フレームワーク領域のサブバンク（好ましくは、ヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られるものである。本発明はまた、軽鎖可変領域（好ましくは、ヒト化軽鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を含む複数の核酸配列を提供し、前記軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列は、それぞれ、軽鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより作製されたものであり、その際、少なくとも１つのCDRはドナー抗体（好ましくは、非ヒト化ドナー抗体）由来の軽鎖CDRのサブバンクから得られ、少なくとも１つの軽鎖フレームワーク領域は軽鎖フレームワーク領域のサブバンク（好ましくは、ヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られるものである。

【００５０】

本発明は、(i)重鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することによりそれぞれ作製された、重鎖可変領域（好ましくは、ヒト化重鎖可変領域）をコードする第１セットのヌクレオチド配列、および(ii)軽鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、軽鎖

CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することによりそれぞれ作製された、軽鎖可変領域（好ましくは、ヒト化軽鎖可変領域）をコードする第２セットのヌクレオチド配列、を含む複数の核酸配列を提供し、ここで、重鎖可変領域CDRはドナー抗体の重鎖可変領域（好ましくは、非ヒトドナー抗体の重鎖可変領域）に由来し、軽鎖可変領域CDRはドナー抗体の軽鎖可変領域（好ましくは、非ヒトドナー抗体の軽鎖可変領域）に由来し、少なくとも１つの重鎖フレームワーク領域は重鎖フレームワーク領域のサブバンク（好ましくは、ヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られ、そして少なくとも１つの軽鎖フレームワーク領域は軽鎖フレームワーク領域のサブバンク（好ましくは、ヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られるものである。

【００５１】

本発明は、(i)重鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することによりそれぞれ作製された、重鎖可変領域（好ましくは、ヒト化重鎖可変領域）をコードする第１セットのヌクレオチド配列、および(ii)軽鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することによりそれぞれ作製された、軽鎖可変領域（好ましくは、ヒト化軽鎖可変領域）をコードする第２セットのヌクレオチド配列、を含む複数の核酸配列を提供し、ここで、少なくとも１つの重鎖可変領域CDRはドナー抗体（好ましくは、非ヒトドナー抗体）由来の重鎖CDRのサブバンクから得られ、軽鎖可変領域CDRはドナー抗体の軽鎖可変領域（好ましくは、非ヒトドナー抗体の軽鎖可変領域）に由来し、少なくとも１つの重鎖フレームワーク領域は重鎖フレームワーク領域のサブバンク（好ましくは、ヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られ、そして少なくとも１つの軽鎖フレームワーク領域は軽鎖フレームワーク領域のサブバンク（好ましくは、ヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られるものである。

【００５２】

本発明は、(i)重鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することによりそれぞれ作製された、重鎖可変領域（好ましくは、ヒト化重鎖可変領域）をコードする第１セットのヌクレオチド配列、および(ii)軽鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することによりそれぞれ作製された、軽鎖可変領域（好ましくは、ヒト化軽鎖可変領域）をコードする第２セットのヌクレオチド配列、を含む複数の核酸配列を提供し、ここで、重鎖可変領域CDRはドナー抗体の重鎖可変領域（好ましくは、非ヒトドナー抗体の重鎖可変領域）に由来し、少なくとも１つの軽鎖可変領域CDRはドナー抗体（好ましくは、非ヒトドナー抗体）由来の軽鎖CDRのサブバンクから得られ、少なくとも１つの重鎖フレームワーク領域は重鎖フレームワーク領域のサブバンク（好ましくは、ヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られ、そして少なくとも１つの軽鎖フレームワーク領域は軽鎖フレームワーク領域のサブバンク（好ましくは、ヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られるものである。

【００５３】

本発明は、(i)重鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードす

る核酸配列、重鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することによりそれぞれ作製された、重鎖可変領域（好ましくは、ヒト化重鎖可変領域）をコードする第１セットのヌクレオチド配列、および(ii)軽鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することによりそれぞれ作製された、軽鎖可変領域（好ましくは、ヒト化軽鎖可変領域）をコードする第２セットのヌクレオチド配列、を含む複数の核酸配列を提供し、ここで、少なくとも１つの重鎖可変領域CDRはドナー抗体（好ましくは、非ヒトドナー抗体）由来の重鎖CDRのサブバンクから得られ、少なくとも１つの軽鎖可変領域CDRはドナー抗体（好ましくは、非ヒトドナー抗体）由来の軽鎖CDRのサブバンクから得られ、少なくとも１つの重鎖フレームワーク領域は重鎖フレームワーク領域のサブバンク（好ましくは、ヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られ、そして少なくとも１つの軽鎖フレームワーク領域は軽鎖フレームワーク領域のサブバンク（好ましくは、ヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られるものである。

【００５４】

本発明は、本明細書に記載する核酸配列を含有する細胞の集団を提供する。ある実施形態では、本発明は、複数の重鎖可変領域（好ましくは、ヒト化重鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を含有する細胞の集団を提供し、前記細胞は、重鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することによりそれぞれ合成された、重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を細胞に導入することを含む方法により作製されたものであり、ここで、前記CDRはドナー抗体の重鎖可変領域（好ましくは、非ヒトドナー抗体の重鎖可変領域）に由来し、少なくとも１つの重鎖フレームワーク領域は重鎖フレームワーク領域のサブバンク（好ましくは、ヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られるものである。この実施形態によれば、前記細胞は軽鎖可変領域（好ましくは、ヒト化またはヒト軽鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列をさらに含んでいてもよい。

【００５５】

別の実施形態において、本発明は、複数の重鎖可変領域（好ましくは、ヒト化重鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を含有する細胞の集団を提供し、前記細胞は、重鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することによりそれぞれ合成された、重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を細胞に導入することを含む方法により作製されたものであり、ここで、少なくとも１つのCDRはドナー抗体（好ましくは、非ヒトドナー抗体）に由来の重鎖CDRのサブバンクから得られ、少なくとも１つの重鎖フレームワーク領域は重鎖フレームワーク領域のサブバンク（好ましくは、ヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られるものである。この実施形態によれば、前記細胞は軽鎖可変領域（好ましくは、ヒト化またはヒト軽鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列をさらに含んでいてもよい。

【００５６】

別の実施形態において、本発明は、複数の軽鎖可変領域（好ましくは、ヒト化軽鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を含有する細胞の集団を提供し、前記細胞は、軽鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸

配列、軽鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することによりそれぞれ合成された、軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を細胞に導入することを含む方法により作製されたものであり、ここで、前記CDRはドナー抗体の軽鎖可変領域（好ましくは、非ヒトドナー抗体の軽鎖可変領域）に由来し、少なくとも１つの軽鎖フレームワーク領域は軽鎖フレームワーク領域のサブバンク（好ましくは、ヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られるものである。この実施形態によれば、前記細胞は重鎖可変領域（好ましくは、ヒト化またはヒト重鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列をさらに含んでいてもよい。

【００５７】

別の実施形態において、本発明は、複数の軽鎖可変領域（好ましくは、ヒト化軽鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を含有する細胞の集団を提供し、前記細胞は、軽鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することによりそれぞれ合成された、軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を細胞に導入することを含む方法により作製されたものであり、ここで、少なくとも１つのCDRはドナー抗体（好ましくは、非ヒトドナー抗体）に由来の軽鎖CDRのサブバンクから得られ、少なくとも１つの軽鎖フレームワーク領域は軽鎖フレームワーク領域のサブバンク（好ましくは、ヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られるものである。この実施形態によれば、前記細胞は重鎖可変領域（好ましくは、ヒト化またはヒト重鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列をさらに含んでいてもよい。

【００５８】

別の実施形態において、本発明は、複数の重鎖可変領域（好ましくは、ヒト化重鎖可変領域）および複数の軽鎖可変領域（好ましくは、ヒト化軽鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を含有する細胞の集団を提供し、前記細胞はそれぞれ、(i)重鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することによりそれぞれ合成された、重鎖可変領域をコードする第１セットのヌクレオチド配列、および(ii)軽鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することによりそれぞれ合成された、軽鎖可変領域をコードする第２セットのヌクレオチド配列、を含む核酸配列を細胞に導入することを含む方法により作製されたものであり、ここで、重鎖可変領域CDRはドナー抗体の重鎖可変領域（好ましくは、非ヒトドナー抗体の重鎖可変領域）に由来し、軽鎖可変領域CDRはドナー抗体の軽鎖可変領域（好ましくは、非ヒトドナー抗体の軽鎖可変領域）に由来し、少なくとも１つの重鎖フレームワーク領域は重鎖フレームワーク領域のサブバンク（好ましくは、ヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られ、そして少なくとも１つの軽鎖フレームワーク領域は軽鎖フレームワーク領域のサブバンク（好ましくは、ヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られるものである。

【００５９】

別の実施形態において、本発明は、複数の重鎖可変領域（好ましくは、ヒト化重鎖可変領域）および複数の軽鎖可変領域（好ましくは、ヒト化軽鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を含有する細胞の集団を提供し、前記細胞はそれぞれ、(i)重鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖

フレームワーク領域２をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することによりそれぞれ合成された、重鎖可変領域をコードする第１セットのヌクレオチド配列、および(ii)軽鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することによりそれぞれ合成された、軽鎖可変領域をコードする第２セットのヌクレオチド配列、を含む核酸配列を細胞に導入することを含む方法により作製されたものであり、ここで、少なくとも１つの重鎖可変領域CDRはドナー抗体（好ましくは、非ヒトドナー抗体）に由来の重鎖CDRのサブバンクから得られ、軽鎖可変領域CDRはドナー抗体の軽鎖可変領域（好ましくは、非ヒトドナー抗体の軽鎖可変領域）に由来し、少なくとも１つの重鎖フレームワーク領域は重鎖フレームワーク領域のサブバンク（好ましくは、ヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られ、そして少なくとも１つの軽鎖フレームワーク領域は軽鎖フレームワーク領域のサブバンク（好ましくは、ヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られるものである。

【００６０】

別の実施形態において、本発明は、複数の重鎖可変領域（好ましくは、ヒト化重鎖可変領域）および複数の軽鎖可変領域（好ましくは、ヒト化軽鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を含有する細胞の集団を提供し、前記細胞はそれぞれ、(i)重鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することによりそれぞれ合成された、重鎖可変領域をコードする第１セットのヌクレオチド配列、および(ii)軽鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することによりそれぞれ合成された、軽鎖可変領域をコードする第２セットのヌクレオチド配列、を含む核酸配列を細胞に導入することを含む方法により作製されたものであり、ここで、重鎖可変領域CDRはドナー抗体の重鎖可変領域（好ましくは、非ヒトドナー抗体の重鎖可変領域）に由来し、少なくとも１つの軽鎖可変領域CDRはドナー抗体（好ましくは、非ヒトドナー抗体）に由来の軽鎖CDRのサブバンクから得られ、少なくとも１つの重鎖フレームワーク領域は重鎖フレームワーク領域のサブバンク（好ましくは、ヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られ、そして少なくとも１つの軽鎖フレームワーク領域は軽鎖フレームワーク領域のサブバンク（好ましくは、ヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られるものである。

【００６１】

別の実施形態において、本発明は、複数の重鎖可変領域（好ましくは、ヒト化重鎖可変領域）および複数の軽鎖可変領域（好ましくは、ヒト化軽鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を含有する細胞の集団を提供し、前記細胞はそれぞれ、(i)重鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することによりそれぞれ合成された、重鎖可変領域をコードする第１セットのヌクレオチド配列、および(ii)軽鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することによりそれぞれ合成された、軽鎖可変

領域をコードする第２セットのヌクレオチド配列、を含む核酸配列を細胞に導入することを含む方法により作製されたものであり、ここで、少なくとも１つの重鎖可変領域CDRはドナー抗体（好ましくは、非ヒトドナー抗体）に由来の重鎖CDRのサブバンクから得られ、少なくとも１つの軽鎖可変領域CDRはドナー抗体（好ましくは、非ヒトドナー抗体）に由来の軽鎖CDRのサブバンクから得られ、少なくとも１つの重鎖フレームワーク領域は重鎖フレームワーク領域のサブバンク（好ましくは、ヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られ、そして少なくとも１つの軽鎖フレームワーク領域は軽鎖フレームワーク領域のサブバンク（好ましくは、ヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンク）から得られるものである。

【００６２】

本発明は、抗原と免疫特異的に結合する抗体を同定する方法を提供し、前記方法は、本明細書に記載するように細胞において前記核酸配列を発現させ、抗原に対して少なくとも$1 \times 10^{6}\ M^{-1}$、少なくとも$1 \times 10^{7}\ M^{-1}$、少なくとも$1 \times 10^{8}\ M^{-1}$、少なくとも$1 \times 10^{9}\ M^{-1}$、少なくとも$1 \times 10^{10}\ M^{-1}$またはそれ以上の親和性を有する抗体についてスクリーニングすることを含んでなる。好ましい実施形態では、本発明は、抗原と免疫特異的に結合するヒト化抗体を同定する方法を提供し、前記方法は、本明細書に記載するように細胞において前記核酸配列を発現させ、抗原に対して少なくとも$1 \times 10^{6}\ M^{-1}$、少なくとも$1 \times 10^{7}\ M^{-1}$、少なくとも$1 \times 10^{8}\ M^{-1}$、少なくとも$1 \times 10^{9}\ M^{-1}$、少なくとも$1 \times 10^{10}\ M^{-1}$またはそれ以上の親和性を有するヒト化抗体についてスクリーニングすることを含んでなる。本発明は本明細書に記載する方法によって同定された抗体を提供する。好ましい実施形態では、本発明は本明細書に記載する方法によって同定されたヒト化抗体を提供する。

【００６３】

本発明によれば、本明細書に記載のように作製された抗体（例えば、ヒト化抗体）は軽鎖可変領域および/または重鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のように作製された抗体はさらに定常領域を含む。

【００６４】

本発明は、ある成分（例えば、治療剤または薬物）に結合または融合させた本発明による抗体（好ましくは、ヒト化抗体）を提供する。本発明はまた、本発明に従って作製および/または同定された抗体、および担体、希釈剤または賦形剤を含有する組成物（好ましくは、医薬組成物）を提供する。ある好ましい実施形態では、本発明は、本明細書に記載するヒト化抗体および担体、希釈剤または賦形剤を含有する組成物（好ましくは、医薬組成物）を提供する。本発明はまた、ある成分（例えば、治療剤または薬物）に結合または融合させた本発明に従って作製および/または同定された抗体、および担体、希釈剤または賦形剤を含有する組成物（好ましくは、医薬組成物）を提供する。ある好ましい実施形態では、本発明は、ある成分（例えば、治療剤または薬物）に結合または融合させたヒト化抗体（またはそのフラグメント）、および担体、希釈剤または賦形剤を含有する組成物を提供する。本発明はさらに、疾患またはその症状を予防、治療、管理または軽減するための、本発明に従って作製および/または同定された抗体（例えば、ヒト化抗体）の単独または他の治療薬との組合せでの使用を提供する。

【００６５】

本発明の医薬組成物は、疾患またはその１以上の症状の予防、管理、治療または軽減のために使用することができる。好ましくは、本発明の医薬組成物は無菌であり、患者に投与する特定の方法に適した形態をしている。

【００６６】

本発明はさらに、本発明の方法に従って作製および/または同定された１種以上の抗体（好ましくは、１種以上のヒト化抗体）を利用して、疾患を検出する、診断する、および/または疾患の進行をモニタリングする方法を提供する。

【００６７】

本発明は、対象となる生物種の抗体フレームワーク領域のサブバンクを含んでなるキットを提供する。本発明はまた、対象となる生物種のCDRのサブバンクを含んでなるキット

を提供する。本発明はまた、１つの対応するCDR（例えば、CDR1）にin frame融合された１つのフレームワーク領域（例えば、FR1）を含有するヌクレオチド配列を含む核酸のコンビナトリアルサブライブラリーを含んでなるキットを提供する。本発明はさらに、例えばFR1+CDR1+FR2+CDR2+FR3+CDR3+FR4のように、in frame融合された可変重鎖領域または可変軽鎖領域のフレームワーク領域とCDRを含有するヌクレオチド配列を含む核酸のコンビナトリアルライブラリーを含んでなるキットを提供する。

【００６８】

いくつかの好ましい実施形態において、本発明は、ヒト免疫グロブリンフレームワーク領域のサブバンク、CDRのサブバンク、コンビナトリアルサブライブラリー、および/またはコンビナトリアルライブラリーを含んでなるキットを提供する。ある実施形態では、本発明は、可変軽鎖フレームワーク領域１、２、３および/または４（ここで、フレームワーク領域はKabatシステムに従って定義される）のフレームワーク領域サブバンクを含んでなるキットを提供する。別の実施形態では、本発明は、可変軽鎖フレームワーク領域１、２、３および/または４（ここで、フレームワーク領域はChothiaシステムに従って定義される）のフレームワーク領域サブバンクを含んでなるキットを提供する。別の実施形態では、本発明は、可変重鎖フレームワーク領域１、２、３および/または４（ここで、フレームワーク領域はKabatシステムに従って定義される）のフレームワーク領域サブバンクを含んでなるキットを提供する。別の実施形態では、本発明は、可変重鎖フレームワーク領域１、２、３および/または４（ここで、フレームワーク領域はChothiaシステムに従って定義される）のフレームワーク領域サブバンクを含んでなるキットを提供する。さらに別の実施形態では、本発明は、可変軽鎖フレームワーク領域と可変重鎖フレームワーク領域の両方のサブバンクを含んでなるキットを提供する。

【００６９】

本発明はまた、本発明のヒト化抗体を含む１つ以上の容器を含んでなる医薬パックまたはキットを提供する。医薬パックまたはキットは、特定の疾患またはその症状の予防、治療、管理または軽減に有用な１種以上の他の予防薬もしくは治療薬をさらに含んでいてもよい。本発明はまた、本発明の医薬組成物の１種以上の成分を含む１つ以上の容器を含んでなる医薬パックまたはキットを提供する。場合により、そのような容器は、医薬品または生物学的製品の製造、使用または販売を取り締まる政府機関によって定められた形の通知書を伴っていてもよく、その通知書はヒトへの投与のために製造、使用または販売することの政府機関による承認を反映するものである。

【００７０】

本発明はまた、製造物品を提供する。

【００７１】

2.1　技術用語

本明細書で使用される「アクセプター」および「アクセプター抗体」という用語は、１以上のフレームワーク領域のアミノ酸配列の、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、または少なくとも95%を与える、もしくはコードする、抗体または核酸配列を示す。ある実施形態において、「アクセプター」という用語は、定常領域を与える、もしくはコードする、抗体または核酸配列を指す。具体的な実施形態において、「アクセプター」という用語は、１以上のフレームワーク領域のアミノ酸配列の、少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、少なくとも90%、または少なくとも95%を与える、もしくはコードする、ヒト抗体または核酸配列を指す。アクセプターフレームワーク領域および／またはアクセプター定常領域は、例えば、生殖系列抗体遺伝子、成熟抗体遺伝子、機能性抗体（例：当技術分野で知られている抗体、開発中の抗体、もしくは市販の抗体）に由来し、あるいはそれらから得ることができる。

【００７２】

本明細書で使用される「抗体」という用語は、モノクローナル抗体、多特異性抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、ラクダ化抗体、キメラ抗体、一本鎖Fv（scFv）、一本鎖抗体、単一ドメイン抗体、Fabフラグメント、F(ab)フラグメント、ジスルフィド結合Fv（dsFv）、抗

イディオタイプ（抗Id）抗体、および上記のいずれかのエピトープ結合フラグメントを表す。詳細には、抗体は、免疫グロブリン分子、および免疫グロブリン分子の免疫学的に活性なフラグメント、すなわち抗原結合部位を含有する分子を包含する。免疫グロブリン分子は、いかなるタイプ（例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgAおよびIgY）、クラス（例えば、IgG_1、IgG_2、IgG_3、IgG_4、IgA_1およびIgA_2）、もしくはサブクラスのものであってもよい。

【００７３】

典型的な抗体は、2つの軽鎖と組み合わされた2つの重鎖を含有する。全長の重鎖は約50kDの大きさ（約446アミノ酸の長さ）であって、重鎖可変領域遺伝子（約116アミノ酸）および定常領域遺伝子によってコードされる。α、γ（IgG1、IgG2、IgG3、IgG4）、δ、ε、およびμ配列といった異なるアイソタイプの重鎖定常領域をコードする、異なる定常領域遺伝子が存在する。全長の軽鎖は約25kDの大きさ（約214アミノ酸の長さ）であって、軽鎖可変領域遺伝子（約110アミノ酸）およびκもしくはλ定常領域遺伝子によってコードされる。軽鎖および／または重鎖の可変領域は抗原との結合を担っており、定常領域は抗体に特有のエフェクター機能を担う。

【００７４】

本明細書で使用される「CDR」という用語は、抗体の可変配列内の相補性決定領域を指す。重鎖および軽鎖の可変領域のそれぞれに3つのCDRがあり、可変領域のそれぞれについてCDR1、CDR2およびCDR3と称される。これらのCDRの正確な境界は、異なるシステムに従ってそれぞれに定められている。Kabatにより記載された（Kabatら、Sequences of Proteins of Immunological Interest（米国国立衛生研究所、ベセスダ、MD(1987)および(1991)））システムは、抗体のいずれの可変領域に対しても適用できる明白な残基ナンバリングシステムを与えるだけでなく、3つのCDRを定義する正確な残基の境界も提供する。これらのCDRはKabat CDRと称することができる。Chothiaおよび共同研究者ら（Chothia およびLesk, J. Mol. Biol. 196:901-917(1987)、ならびにChothiaら、Nature 342:877-883 (1989)）は、Kabat CDR内の一定の小部分がアミノ酸配列レベルでは多大な多様性を有するにもかかわらず、ほとんど同一のペプチド主鎖立体構造をとることを見出した。こうした小部分はL1、L2およびL3、またはH1、H2およびH3と呼ばれ、ここで「L」および「H」は軽鎖および重鎖領域をそれぞれ示す。これらの領域はChothia CDRと呼ばれ、これらはKabat CDRと部分的に重なる境界を有する。Kabat CDRと重複するCDRを定義する他の境界がPadlan（FASEB J. 9:133-139(1995)）およびMacCallum（J. Mol. Biol. 262(5): 732-45 (1996)）によって報告されている。さらに他のCDRの境界の定義が、厳密には上記システムの一つに従わないが、それでも、Kabat CDRと部分的に一致することが考えられる。ただしそうした境界の定義は、特定の残基もしくは残基群が、またはCDR全体であっても、抗原結合に有意な影響を与えないという予測もしくは実験結果を踏まえて、短縮、または延長される可能性がある。本明細書で使用する方法は、上記システムのいずれかにしたがって定義されたCDRを用いることができるが、ただし、好ましい実施形態はKabatまたはChothiaの定義によるCDRを使用する。

【００７５】

本明細書で使用される場合、タンパク質性物質（例えば、抗体のような、タンパク質、ポリペプチドおよびペプチド）との関連での「誘導体」という用語は、アミノ酸残基の置換、欠失および／または付加によって変化したアミノ酸配列を含んでなるタンパク質性物質を表す。本明細書で使用される「誘導体」という用語はまた、タンパク質性物質に何らかの分子を共有結合することによって、修飾されたタンパク質性物質を指す。限定する意図はないが例を挙げると、抗体は、例えばグリコシル化、アセチル化、PEG化、リン酸化、アミド化、公知の保護基／ブロック基による誘導体化、タンパク質分解性切断、細胞リガンドもしくは他のタンパク質との結合などによって修飾することができる。タンパク質性物質の誘導体は、当業者に知られている技法を用いた化学修飾によって作製することができ、これには特異的な化学分解、アセチル化、ホルミル化、ツニカマイシンの代謝合成などを含めるがそれに限定されない。さらに、タンパク質性物質の誘導体は、１つまたは

複数の非古典的アミノ酸を含有してもよい。タンパク質性物質の誘導体は、それが誘導される起源となったタンパク質性物質と同様もしくは同一の機能を有する。

【００７６】

本明細書で使用される場合、「障害」および「疾患」という用語は、被験者の状態に対して相互交換可能に使用される。

【００７７】

本明細書で使用される「ドナー抗体」という用語は、１以上のCDRを与える抗体を指す。好ましい実施形態において、ドナー抗体は、フレームワーク領域の起源である抗体とは異なる生物種に由来する抗体である。ヒト化抗体との関連において、「ドナー抗体」という用語は、１以上のCDRを与える非ヒト抗体を指す。

【００７８】

本明細書で使用される「有効な量」という用語は、疾患、または疾患の１以上の症状の、重症度および／または持続時間を軽減もしくは改善し、疾患の進行を妨げ、疾患の寛解をもたらし、疾患に伴う１以上の症状の再発、発生、発現もしくは進行を防ぎ、疾患を発見し、または別の治療（例えば、予防薬もしくは治療薬）の予防もしくは治療効果を増強もしくは改善するのに十分な、治療のための量を指す。

【００７９】

本明細書で使用される場合、「エピトープ」という用語は、動物において、好ましくは哺乳動物において、さらにもっとも好ましくはヒトにおいて、抗原性もしくは免疫原性を有する、ポリペプチドまたはタンパク質の断片を指す。免疫原性を有するエピトープは、動物において抗体応答を引き起こすポリペプチドもしくはタンパク質の断片である。抗原性を有するエピトープは、抗体が免疫特異的に結合するポリペプチドもしくはタンパク質の断片であって、当業者に周知の任意の方法によって、例えばイムノアッセイによって、測定される。抗原性エピトープは必ずしも免疫原性である必要はない。

【００８０】

本明細書で使用される「融合タンパク質」という用語は、第1のタンパク質もしくはポリペプチドもしくは機能性断片、その類似体もしくは誘導体のアミノ酸配列と、異種タンパク質、ポリペプチドもしくはペプチド（すなわち、第1のタンパク質もしくは断片、その類似体もしくは誘導体とは異なる、第2のタンパク質もしくはポリペプチドもしくは断片、その類似体もしくは誘導体）のアミノ酸配列と、を含んでなるポリペプチドまたはタンパク質（抗体を含めるがそれに限定されない）を指す。ある実施形態において、融合タンパク質は、異種タンパク質、ポリペプチドもしくはペプチドと融合した予防薬または治療薬を含んでなる。この実施形態によれば、異種タンパク質、ポリペプチドもしくはペプチドは別のタイプの予防薬もしくは治療薬であってもよく、またはそうでなくてもよい。例えば、免疫調節性を有する2つの異なるタンパク質、ポリペプチドもしくはペプチドを融合させて1つの融合タンパク質を生成することができる。好ましい実施形態において、融合タンパク質は、異種タンパク質、ポリペプチドもしくはペプチドと融合する前の元のタンパク質、ポリペプチドもしくはペプチドの活性に比べて向上した活性を保持する。

【００８１】

本明細書で使用される「断片」という用語は、あるポリペプチドもしくはタンパク質のアミノ酸配列の、少なくとも5個連続するアミノ酸残基、少なくとも10個連続するアミノ酸残基、少なくとも15個連続するアミノ酸残基、少なくとも20個連続するアミノ酸残基、少なくとも25個連続するアミノ酸残基、少なくとも40個連続するアミノ酸残基、少なくとも50個連続するアミノ酸残基、少なくとも60個連続するアミノ酸残基、少なくとも70個連続するアミノ酸残基、少なくとも80個連続するアミノ酸残基、少なくとも90個連続するアミノ酸残基、少なくとも100個連続するアミノ酸残基、少なくとも125個連続するアミノ酸残基、少なくとも150個連続するアミノ酸残基、少なくとも175個連続するアミノ酸残基、少なくとも200個連続するアミノ酸残基、または少なくとも250個連続するアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含んでなる、もう一つのペプチドもしくはポリペプチド（抗体を含めるがそれに限定されない）を指す。具体的な実施形態において、タンパク質もしくはポ

リペプチドの断片は、そのタンパク質もしくはポリペプチドの少なくとも1つの機能を保持している。

【００８２】

本明細書で使用される「機能性断片」という用語は、第2の、別のポリペプチドもしくはタンパク質のアミノ酸配列の、少なくとも5個連続するアミノ酸残基、少なくとも10個連続するアミノ酸残基、少なくとも15個連続するアミノ酸残基、少なくとも20個連続するアミノ酸残基、少なくとも25個連続するアミノ酸残基、少なくとも40個連続するアミノ酸残基、少なくとも50個連続するアミノ酸残基、少なくとも60個連続するアミノ酸残基、少なくとも70個連続するアミノ酸残基、少なくとも80個連続するアミノ酸残基、少なくとも90個連続するアミノ酸残基、少なくとも100個連続するアミノ酸残基、少なくとも125個連続するアミノ酸残基、少なくとも150個連続するアミノ酸残基、少なくとも175個連続するアミノ酸残基、少なくとも200個連続するアミノ酸残基、または少なくとも250個連続するアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含んでなる、ペプチドもしくはポリペプチド（抗体を含めるがそれに限定されない）を指すが、この場合、前記のポリペプチドもしくはタンパク質は、第2の、別のポリペプチドもしくはタンパク質の少なくとも1つの機能を保持する。具体的な実施形態において、ポリペプチドもしくはタンパク質の断片は、そのタンパク質もしくはポリペプチドの機能を少なくとも2つ、3つ、4つ、または5つ保持する。特定の抗原と免疫特異的に結合する抗体の断片は、その抗原に免疫特異的に結合する能力を保持していることが好ましい。

【００８３】

本明細書で使用される「フレームワーク」または「フレームワーク配列」という用語は、CDRを除いた可変領域の残りの配列を指す。CDR配列の正確な定義が、異なるシステムによって決定されうるため、フレームワーク配列の意味するところもそれに相応して異なる解釈に従う。6個のCDR（軽鎖のCDR1、2および3、ならびに重鎖のCDR1、2および3）も、軽鎖および重鎖のフレームワーク領域をそれぞれ4つのサブ領域（FR1、FR2、FR3およびFR4）に分割するが、軽鎖と重鎖のそれぞれにおいてCDR1はFR1とFR2の間に位置し、CDR2はFR2とFR3の間、さらにCDR3はFR3およびFR4の間に位置する。FR1、FR2、FR3またはFR4のような特定のサブ領域を指定しないならば、フレームワーク領域は、一般に言及されるように、天然に存在する免疫グロブリン一本鎖の可変領域内のFRの組合せを表す。本明細書で使用される場合、FRは4つのサブ領域のうちの1つを表し、FRsはフレームワーク領域を構成する4つのサブ領域のうちの2つ以上を表す。一例として、表1～4はそれぞれ、κ軽鎖のFR1、2、3および4の生殖系列配列を記載する。表5～7はそれぞれ、Kabat定義による重鎖のFR1、2、および3の生殖系列配列を記載する。表8～10はそれぞれ、Chothia定義による重鎖のFR1、2、および3の生殖系列配列を記載する。表11は、重鎖のFR4の生殖系列配列を記載する。

【００８４】

表1～65

表1～65に記載のそれぞれの配列の配列番号は、各表の第1列に示す。

【表１】

表 1. 軽鎖の FR1

1 GATGTTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCTTGGACAGCCGGCCTCCATCTCCTGC
2 GATGTTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCTTGGACAGCCGGCCTCCATCTCCTGC
3 GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCTCTGTCCGTCACCCCTGGACAGCCGGCCTCCATCTCCTGC
4 GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGC
5 GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCTCTGTCCGTCACCCCTGGACAGCCGGCCTCCATCTCCTGC
6 GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCTCACCTGTCACCCTTGGACAGCCGGCCTCCATCTCCTGC
7 GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGC
8 GAGATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCTTGTCTATCACCCCTGGAGAGCAGGCCTCCATCTCCTGC
9 GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCTCGCCTGTCACCCTTGGACAGCCGGCCTCCATCTCCTTC
10 GAAATTGTGCTGACTCAGTCTCCAGACTTTCAGTCTGTGACTCCAAAGGAGAAAGTCACCATCACCTGC
11 GATGTTGTGATGACACAGTCTCCAGCTTTCCTCTCTGTGACTCCAGGGGAGAAAGTCACCATCACCTGC
12 GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGC
13 GAAATTGTGCTGACTCAGTCTCCAGACTTTCAGTCTGTGACTCCAAAGGAGAAAGTCACCATCACCTGC
14 GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGC
15 GAAACGACACTCACGCAGTCTCCAGCATTCATGTCAGCGACTCCAGGAGACAAAGTCAACATCTCCTGC
16 GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGT
17 GCCATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGC
18 GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGC
19 AACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTGCCATGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGT
20 GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGT
21 GAAATAGTGATGATGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGC
22 GCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGC
23 GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCTGTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGT
24 GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGC
25 GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGC
26 GACATCCAGATGATCCAGTCTCCATCTTTCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCAGTATCATTTGC
27 GCCATCCGGATGACCCAGTCTCCATTCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGC
28 GTCATCTGGATGACCCAGTCTCCATCCTTACTCTCTGCATCTACAGGAGACAGAGTCACCATCAGTTGT
29 GCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGC
30 GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGT
31 GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGC
32 GACATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTTCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGC
33 GCCATCCGGATGACCCAGTCTCCATCCTCATTCTCTGCATCTACAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGT
34 GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGC
35 GACATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGC
36 GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGC
37 GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGC
38 GACATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGC
39 GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGC
40 GAAATTGTAATGACACAGTCTCCACCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGTCACCCTCTCCTGC

41 GAAATTGTAATGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGC
42 GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGC
43 GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGC
44 GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGGGCCACCATCAACTGC
45 GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGC
46 GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGC

【表２】

表 2. 軽鎖の FR2

47 TGGTTTCAGCAGAGGCCAGGCCAATCTCCAAGGCGCCTAATTTAT
48 TGGTTTCAGCAGAGGCCAGGCCAATCTCCAAGGCGCCTAATTTAT
49 TGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTAT
50 TGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTAT
51 TGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGCCTCCACAGCTCCTGATCTAT
52 TGGCTTCAGCAGAGGCCAGGCCAGCCTCCAAGACTCCTAATTTAT
53 TGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTAT
54 TGGTTTCTGCAGAAAGCCAGGCCAGTCTCCACACTCCTGATCTAT
55 TGGCTTCAGCAGAGGCCAGGCCAGCCTCCAAGACTCCTAATTTAT
56 TGGTACCAGCAGAAACCAGATCAGTCTCCAAAGCTCCTCATCAAG
57 TGGTACCAGCAGAAACCAGATCAAGCCCCAAAGCTCCTCATCAAG
58 TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGTTCCTAAGCTCCTGATCTAT
59 TGGTACCAGCAGAAACCAGATCAGTCTCCAAAGCTCCTCATCAAG
60 TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCGCCTGATCTAT
61 TGGTACCAACAGAAACCAGGAGAAGCTGCTATTTTCATTATTCAA
62 TGGTTTCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGTCCCTGATCTAT
63 TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTAT
64 TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTAT
65 TGGTTTCAGCAGAAACCAGGGAAAGTCCCTAAGCACCTGATCTAT
66 TGGTATCAGCAGAAACCAGAGAAAGCCCCTAAGTCCCTGATCTAT
67 TGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTAT
68 TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCTCCTAAGCTCCTGATCTAT
69 TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTAT
70 TGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTAT
71 TGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTAT
72 TGGTATCTGCAGAAACCAGGGAAATCCCCTAAGCTCTTCCTCTAT
73 TGGTATCAGCAAAAACCAGCAAAAGCCCCTAAGCTCTTCATCTAT
74 TGGTATCAGCAAAAACCAGGGAAAGCCCCTGAGCTCCTGATCTAT
75 TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCTCCTAAGCTCCTGATCTAT
76 TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTAT
77 TGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTAT
78 TGGTATCAGCAAAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTAT
79 TGGTATCAGCAAAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTAT
80 TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTAT
81 TGGTATCGGCAGAAACCAGGGAAAGTTCCTAAGCTCCTGATCTAT
82 TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTAC
83 TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTAT
84 TGGTATCGGCAGAAACCAGGGAAAGTTCCTAAGCTCCTGATCTAT
85 TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTAC
86 TGGTATCAGCAGAAACCTGGCCAGGCGCCCAGGCTCCTCATCTAT
87 TGGTACCAGCAGAAACCTGGGCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTAT

88 TGGTACCAGCAGAAACCTGGCCTGGCGCCCAGGCTCCTCATCTAT
89 TGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTAT
90 TGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGCCTCCTAAGCTGCTCATTTAC
91 TGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTAT
92 TGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTAT

【表３】

表 3. 軽鎖の FR3

93
GGGGTCCCAGACAGATTCAGCGGCAGTGGGTCAGGCACTGATTTCACACTGAAAATCAGCAGGGTGGAGGC
TGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGC

94
GGGGTCCCAGACAGATTCAGCGGCAGTGGGTCAGGCACTGATTTCACACTGAAAATCAGCAGGGTGGAGGC
TGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGC

95
GGAGTGCCAGATAGGTTCAGTGGCAGCGGGTCAGGGACAGATTTCACACTGAAAATCAGCCGGGTGGAGGC
TGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGA

96
GGGGTCCCTGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTTACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGC
TGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGC

97
GGAGTGCCAGATAGGTTCAGTGGCAGCGGGTCAGGGACAGATTTCACACTGAAAATCAGCCGGGTGGAGGC
TGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGC

98
GGGGTCCCAGACAGATTCAGTGGCAGTGGGGCAGGGACAGATTTCACACTGAAAATCAGCAGGGTGGAAGC
TGAGGATGTCGGGGTTTATTACTGC

99
GGGGTCCCTGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTTACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGC
TGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGC

100
GGAGTGCCAGATAGGTTCAGTGGCAGCGGGTCAGGGACAGATTTCACACTGAAAATCAGCCGGGTGGAGGC
TGAGGATTTTGGAGTTTATTACTGC

101
GGGGTCCCAGACAGATTCAGTGGCAGTGGGGCAGGGACAGATTTCACACTGAAAATCAGCAGGGTGGAAGC
TGAGGATGTCGGGGTTTATTACTGC

102
GGGGTCCCCTCGAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACCCTCACCATCAATAGCCTGGAAGCT
GAAGATGCTGCAACGTATTACTGT

103
GGGGTCCCCTCGAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACCTTTACCATCAGTAGCCTGGAAGCT
GAAGATGCTGCAACATATTACTGT

104
GGGGTCCCATCTCGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCT
GAAGATGTTGCAACTTATTACTGT

105
GGGGTCCCCTCGAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACCCTCACCATCAATAGCCTGGAAGCT
GAAGATGCTGCAACGTATTACTGT

106
GGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACAATCAGCAGCCTGCAGCCT
GAAGATTTTGCAACTTATTACTGT

107
GGAATCCCACCTCGATTCAGTGGCAGCGGGTATGGAACAGATTTTACCCTCACAATTAATAACATAGAATCT
GAGGATGCTGCATATTACTTCTGT

108
GGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCT
GAAGATTTTGCAACTTATTACTGC

109
GGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGCACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCT
GAAGATTTTGCAACTTATTACTGT

110
GGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCT
GATGATTTTGCAACTTATTACTGC

111
GGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACAATCAGCAGCCTGCAGCCT
GAAGATTTTGCAACTTATTACTGT

112
GGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCT
GAAGATTTTGCAACTTATTACTGC

113
GGCATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGTCT
GAAGATTTTGCAGTTTATTACTGT

114
GGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCT
GAAGATTTTGCAACTTATTACTGT

115
GGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACTATCAGCAGCCTGCAGCCT
GAAGATTTTGCAACTTACTATTGT

116
GGTATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGTCT
GAAGATTTTGCAGTTTATTACTGT

117
GGCATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGCCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCT
GAAGATTTTGCAGTTTATTACTGT

118
GGGGTCTCATCGAGGTTCAGTGGCAGGGGATCTGGGACGGATTTCACTCTCACCATCATCAGCCTGAAGCCT
GAAGATTTTGCAGCTTATTACTGT

119
GGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACGGATTACACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCT
GAAGATTTTGCAACTTATTACTGT

120
GGGGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGTTGCCTGCAGTCT
GAAGATTTTGCAACTTATTACTGT

121
GGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCT
GAAGATTTTGCAACTTATTACTGT

122
GGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCT
GAAGATTTTGCAACTTACTATTGT

123
GGCATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCT
GAAGATTTTGCAGTTTATTACTGT

124
GGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACAATCAGCAGCCTGCAGCCT
GAAGATTTTGCAACTTATTACTGT

125
GGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCTGCCTGCAGTCT
GAAGATTTTGCAACTTATTACTGT

126
GGGGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT
GAAGATTTTGCAACTTACTACTGT

127
GGAGTCCCATCTCGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACTATCAGCAGCCTGCAGCCT
GAAGATGTTGCAACTTATTACGGT

128
GGGGTCCCATCAAGGTTCAGTGGAAGTGGATCTGGGACAGATTTTACTTTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCT
GAAGATATTGCAACATATTACTGT

129
GGGGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT
GAAGATTTTGCAACTTACTACTGT

130
GGAGTCCCATCTCGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACTATCAGCAGCCTGCAGCCT
GAAGATGTTGCAACTTATTACGGT

131
GGGGTCCCATCAAGGTTCAGTGGAAGTGGATCTGGGACAGATTTTACTTTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCT
GAAGATATTGCAACATATTACTGT

132
AGCATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCT
GAAGATTTTGCAGTTTATTACTGT

133
GGCATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCT
GAAGATTTTGCAGTTTATTACTGT

134
GGCATCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCT
GAAGATTTTGCAGTGTATTACTGT

135
GGCATCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCT
GAAGATTTTGCAGTGTATTACTGT

136
GGGGTCCCTGACCGATTCAGTGGCAGCGGGTCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGGCT
GAAGATGTGGCAGTTTATTACTGT

137
GGAGTCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCAGGCACTGATTTCACACTGAAAATCAGCAGGGTGGAGGC
TGAGGATGTTGGAGTTTATTACTGC

138
GGAGTCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCAGGCACTGATTTCACACTGAAAATCAGCAGGGTGGAGGC
TGAGGATGTTGGAGTTTATTACTGC

【表４】

表 4. 軽鎖の FR4

139	TTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA
140	TTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA
141	TTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAA
142	TTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA
143	TTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAA

【表５】

表 5. 重鎖の FR1 (Kabat 定義)

144
CAGGTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCT
TCTGGTTACACCTTTACC

145
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGC
TTCTGGATACACCTTCACC

146
CAGGTCCAGCTGGTACAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGTT
TCCGGATACACCCTCACT

147
CAGGTTCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTCCTGCAAGGCT
TCTGGATACACCTTCACT

148
CAGATGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGACTGGGTCCTCAGTGAAGGTTTCCTGCAAGGCT
TCCGGATACACCTTCACC

149
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTCCTGCAAGGC
ATCTGGATACACCTTCACC

150
CAAATGCAGCTGGTGCAGTCTGGGCCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGACCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCT
TCTGGATTCACCTTTACT

151
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCT
TCTGGAGGCACCTTCAGC

152
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGC
TTCTGGATACACCTTCACC

153
CAGGTCACCTTGAAGGAGTCTGGTCCTGTGCTGGTGAAACCCACAGAGACCCTCACGCTGACCTGCACCGTC
TCTGGGTTCTCACTCAGC

154
CAGATCACCTTGAAGGAGTCTGGTCCTACGCTGGTGAAACCCACACAGACCCTCACGCTGACCTGCACCTTC
TCTGGGTTCTCACTCAGC

155
CAGGTCACCTTGAGGGAGTCTGGTCCTGCGCTGGTGAAACCCACACAGACCCTCACACTGACCTGCACCTTC
TCTGGGTTCTCACTCAGC

156
CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC
TCTGGATTCACCTTCAGT

157
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC
TCTGGATTCACCTTCAGT

158
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTAAAGCCTGGGGGGTCCCTTAGACTCTCCTGTGCAGCC
TCTGGATTCACTTTCAGT

159
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC
TCTGGATTCACCTTCAGT

160
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGTGTGGTACGGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC
TCTGGATTCACCTTTGAT

161
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCCTGGTCAAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC
TCTGGATTCACCTTCAGT

162
GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC
TCTGGATTCACCTTTAGC

163
CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC
TCTGGATTCACCTTCAGT

164
CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCG
TCTGGATTCACCTTCAGT

165
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGATCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC
TCTGGATTCACCTTCAGT

166
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTAGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC
TCTGGATTCACCGTCAGT

167
GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGTCGTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC
TCTGGATTCACCTTTGAT

168
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC
TCTGGATTCACCTTCAGT

169
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCAGGGCGGTCCCTGAGACTCTCCTGTACAGCT
TCTGGATTCACCTTTGGT

170
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGGCTTGATCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC
TCTGGGTTCACCGTCAGT

171
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC
TCTGGATTCACCTTCAGT

172
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGGCTTGATCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC
TCTGGGTTCACCGTCAGT

173
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC
TCTGGATTCACCTTTAGT

174
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC
TCTGGATTCACCTTCAGT

175
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCC
TCTGGGTTCACCTTCAGT

176
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGGGGAGGCTTAGTTCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC
TCTGGATTCACCTTCAGT

177
GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC
TCTGGATTCACCTTTGAT

178
CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGACACCCTGTCCCTCACCTGCGCTGTC
TCTGGTTACTCCATCAGC

179
CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTCACCTGTACTGTC
TCTGGTGGCTCCATCAGC

180
CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCGCTGTC
TATGGTGGGTCCTTCAGT

181
CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTC
TCTGGTGGCTCCATCAGC

182
CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTC
TCTGGTGGCTCCATCAGT

183
CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTC
TCTGGTGGCTCCATCAGT

184
CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTC
TCTGGTGGCTCCGTCAGC

185
GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCCGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGG
TTCTGGATACAGCTTTACC

186
CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGCAGACCCTCTCACTCACCTGTGCCATC
TCCGGGGACAGTGTCTCT

187
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCCATGAGGTGAAGCAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCT
TCTGGTTACAGTTTCACC

【表６】

表 6. 重鎖の FR2 (Kabat 定義)

188 TGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGA
189 TGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGA
190 TGGGTGCGACAGGCTCCTGGAAAAGGGCTTGAGTGGATGGGA
191 TGGGTGCGCCAGGCCCCCGGACAAAGGCTTGAGTGGATGGGA
192 TGGGTGCGACAGGCCCCCGGACAAGCGCTTGAGTGGATGGGA
193 TGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGA
194 TGGGTGCGACAGGCTCGTGGACAACGCCTTGAGTGGATAGGA
195 TGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGA
196 TGGGTGCGACAGGCCACTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGA
197 TGGATCCGTCAGCCCCCAGGGAAGGCCCTGGAGTGGCTTGCA
198 TGGATCCGTCAGCCCCCAGGAAAGGCCCTGGAGTGGCTTGCA
199 TGGATCCGTCAGCCCCCAGGGAAGGCCCTGGAGTGGCTTGCA
200 TGGATCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTTCA
201 TGGGTCCGCCAAGCTACAGGAAAAGGTCTGGAGTGGGTCTCA
202 TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTGGC
203 TGGGCCCGCAAGGCTCCAGGAAAGGGGCTGGAGTGGGTATCG
204 TGGGTCCGCCAAGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCT
205 TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCA
206 TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCA
207 TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCA
208 TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCA
209 TGGGTCCATCAGGCTCCAGGAAAGGGGCTGGAGTGGGTATCG
210 TGGATCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCA
211 TGGGTCCGTCAAGCTCCGGGGAAGGGTCTGGAGTGGGTCTCT
212 TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTTCA
213 TGGTTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTAGGT
214 TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCA
215 TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGACTGGAATATGTTTCA
216 TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCA
217 TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCC
218 TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTGGC
219 TGGGTCCGCCAGGCTTCCGGGAAAGGGCTGGAGTGGGTTGGC
220 TGGGTCCGCCAAGCTCCAGGGAAGGGGCTGGTGTGGGTCTCA
221 TGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGGTCTCA
222 TGGATCCGGCAGCCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGG
223 TGGATCCGCCAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGG
224 TGGATCCGCCAGCCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGG
225 TGGATCCGCCAGCCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGG
226 TGGATCCGGCAGCCCGCCGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGG
227 TGGATCCGGCAGCCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGG
228 TGGATCCGGCAGCCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGG

229 TGGGTGCGCCAGATGCCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGGG

230 TGGATCAGGCAGTCCCCATCGAGAGGCCTTGAGTGGCTGGGA

231 TGGGTGCCACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGA

【表７】

表 7. 重鎖の FR3 (Kabat 定義)

232
AGAGTCACCATGACCACAGACACATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCTGACGA
CACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA

233
AGGGTCACCATGACCAGGGACACGTCCATCAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGA
CACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA

234
AGAGTCACCATGACCGAGGACACATCTACAGACACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGA
CACGGCCGTGTATTACTGTGCAACA

235
AGAGTCACCATTACCAGGGACACATCCGCGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGA
CATGGCTGTGTATTACTGTGCGAGA

236
AGAGTCACCATTACCAGGGACAGGTCTATGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGA
CACAGCCATGTATTACTGTGCAAGA

237
AGAGTCACCATGACCAGGGACACGTCCACGAGCACAGTCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGA
CACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA

238
AGAGTCACCATTACCAGGGACATGTCCACAAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCCGAGGA
CACGGCCGTGTATTACTGTGCGGCA

239
AGAGTCACGATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGA
CACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA

240
AGAGTCACCATGACCAGGAACACCTCCATAAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGA
CACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA

241
AGGCTCACCATCTCCAAGGACACCTCCAAAAGCCAGGTGGTCCTTACCATGACCAACATGGACCCTGTGGAC
ACAGCCACATATTACTGTGCACGG

242
AGGCTCACCATCACCAAGGACACCTCCAAAAACCAGGTGGTCCTTACAATGACCAACATGGACCCTGTGGAC
ACAGCCACATATTACTGTGCACAC

243
AGGCTCACCATCTCCAAGGACACCTCCAAAAACCAGGTGGTCCTTACAATGACCAACATGGACCCTGTGGAC
ACAGCCACGTATTATTGTGCACGG

244
CGATTCACCATCTCCAGGGACAACGCCAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGA
CACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA

245
CGATTCACCATCTCCAGAGAAAATGCCAAGAACTCCTTGTATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGGGGAC
ACGGCTGTGTATTACTGTGCAAGA

246
AGATTCACCATCTCAAGAGATGATTCAAAAAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAAACCGAGGA
CACAGCCGTGTATTACTGTACCACA

247
CGATTCATCATCTCCAGAGACAATTCCAGGAACTCCCTGTATCTGCAAAAGAACAGACGGAGAGCCGAGGA
CATGGCTGTGTATTACTGTGTGAGA

248
CGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCCGAGGAC
ACGGCCTTGTATCACTGTGCGAGA

249
CGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGA
CACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGA

250
CGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGAC
ACGGCCGTATATTACTGTGCGAAA

251
CGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGAC
ACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGA

252
CGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGAC
ACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGA

253
CGATTCATCATCTCCAGAGACAATTCCAGGAACACCCTGTATCTGCAAACGAATAGCCTGAGGGCCGAGGAC
ACGGCTGTGTATTACTGTGTGAGA

254
AGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTTCAAATGAACAACCTGAGAGCTGAGGGC
ACGGCCGTGTATTACTGTGCCAGA

255
CGATTCACCATCTCCAGAGACAACAGCAAAAACTCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAACTGAGGAC
ACCGCCTTGTATTACTGTGCAAAA

256
CGATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGACGAGGA
CACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGA

257
AGATTCACCATCTCAAGAGATGATTCCAAAAGCATCGCCTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAAACCGAGGAC
ACAGCCGTGTATTACTGTACTAGA

258
CGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGAC
ACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA

259
AGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTTCAAATGGGCAGCCTGAGAGCTGAGGAC
ATGGCTGTGTATTACTGTGCGAGA

260
CGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGAC
ACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGA

261
CGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGA
CACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGA

262
AGATTCACCATCTCAAGAGATGATTCAAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAAACCGAGGAC
ACGGCCGTGTATTACTGTGCTAGA

263
AGGTTCACCATCTCCAGAGATGATTCAAAGAACACGGCGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAAACCGAGGA
CACGGCCGTGTATTACTGTACTAGA

264
CGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCCGAGGA
CACGGCTGTGTATTACTGTGCAAGA

265
CGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGGAC
ACGGCCTTGTATTACTGTGCAAAA

266
CGAGTCACCATGTCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGTGGAC
ACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA

267
CGAGTTACCATATCAGTAGACACGTCTAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACTGCCGCGGAC
ACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA

268
CGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGCGGAC
ACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGA

269
CGAGTCACCATATCCGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGCAGAC
ACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGA

270
CGAGTCACCATGTCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGCGGAC
ACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA

271
CGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCTGCGGAC
ACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA

272
CGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCTGCGGAC
ACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA

273
CAGGTCACCATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTACCTGCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGAC
ACCGCCATGTATTACTGTGCGAGA

274
CGAATAACCATCAACCCAGACACATCCAAGAACCAGTTCTCCCTGCAGCTGAACTCTGTGACTCCCGAGGAC
ACGGCTGTGTATTACTGTGCAAGA

275
CGGTTTGTCTTCTCCATGGACACCTCTGCCAGCACAGCATACCTGCAGATCAGCAGCCTAAAGGCTGAGGAC
ATGGCCATGTATTACTGTGCGAGA

【表８】

表 8. 重鎖の FR1 (Chothia 定義)

276
CAGGTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCT
TCT

277
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGC
TTCT

278
CAGGTCCAGCTGGTACAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGTT
TCC

279
CAGGTTCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTCCTGCAAGGCT
TCT

280
CAGATGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGACTGGGTCCTCAGTGAAGGTTTCCTGCAAGGCT
TCC

281
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTCCTGCAAGGC
ATCT

282
CAAATGCAGCTGGTGCAGTCTGGGCCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGACCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCT
TCT

283
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCT
TCT

284
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGC
TTCT

285
CAGGTCACCTTGAAGGAGTCTGGTCCTGTGCTGGTGAAACCCACAGAGACCCTCACGCTGACCTGCACCGTC
TCT

286
CAGATCACCTTGAAGGAGTCTGGTCCTACGCTGGTGAAACCCACACAGACCCTCACGCTGACCTGCACCTTC
TCT

287
CAGGTCACCTTGAGGGAGTCTGGTCCTGCGCTGGTGAAACCCACACAGACCCTCACACTGACCTGCACCTTC
TCT

288
CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC
TCT

289
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC
TCT

290
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTAAAGCCTGGGGGGTCCCTTAGACTCTCCTGTGCAGCC
TCT

291
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC
TCT

292
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGTGTGGTACGGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC
TCT

293
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCCTGGTCAAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC
TCT

294
GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC
TCT

295
CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC
TCT

296
CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCG
TCT

297
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGATCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC
TCT

298
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTAGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC
TCT

299
GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGTCGTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC
TCT

300
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC
TCT

301
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCAGGGCGGTCCCTGAGACTCTCCTGTACAGCT
TCT

302
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGGCTTGATCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC
TCT

303
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC
TCT

304
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGGCTTGATCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC
TCT

305
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC
TCT

306
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC
TCT

307
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCC
TCT

308
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGGGGAGGCTTAGTTCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC
TCT

309
GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC
TCT

310
CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGACACCCTGTCCCTCACCTGCGCTGTC
TCT

311
CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTCACCTGTACTGTC
TCT

312
CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCGCTGTC
TAT

313
CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTC
TCT

314
CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTC
TCT

315
CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTC
TCT

316
CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTC
TCT

317
GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCCGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGG
TTCT

318
CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGCAGACCCTCTCACTCACCTGTGCCATC
TCC

319
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCCATGAGGTGAAGCAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCT
TCT

【表９】

表 9. 重鎖の FR2 (Chothia 定義)

320 TATGGTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATC
321 TACTATATGCACTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATC
322 TTATCCATGCACTGGGTGCGACAGGCTCCTGGAAAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGTTTT
323 TATGCTATGCATTGGGTGCGCCAGGCCCCCGGACAAAGGCTTGAGTGGATGGGATGGAGC
324 CGCTACCTGCACTGGGTGCGACAGGCCCCCGGACAAGCGCTTGAGTGGATGGGATGGATC
325 TACTATATGCACTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAATAATC
326 TCTGCTATGCAGTGGGTGCGACAGGCTCGTGGACAACGCCTTGAGTGGATAGGATGGATC
327 TATGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGGATC
328 TATGATATCAACTGGGTGCGACAGGCCACTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATG
329 ATGGGTGTGAGCTGGATCCGTCAGCCCCCAGGGAAGGCCCTGGAGTGGCTTGCACACATT
330 GTGGGTGTGGGCTGGATCCGTCAGCCCCCAGGAAAGGCCCTGGAGTGGCTTGCACTCATT
331 ATGTGTGTGAGCTGGATCCGTCAGCCCCCAGGGAAGGCCCTGGAGTGGCTTGCACTCATT
332 TACTACATGAGCTGGATCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTTCATACATT
333 TACGACATGCACTGGGTCCGCCAAGCTACAGGAAAAGGTCTGGAGTGGGTCTCAGCTATT
334 GCCTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTGGCCGTATT
335 AGTGACATGAACTGGGCCCGCAAGGCTCCAGGAAAGGGGCTGGAGTGGGTATCGGGTGTT
336 TATGGCATGAGCTGGGTCCGCCAAGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCTGGTATT
337 TATAGCATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCATCCATT
338 TATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATT
339 TATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATA
340 TATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATA
341 AGTGACATGAACTGGGTCCATCAGGCTCCAGGAAAGGGGCTGGAGTGGGTATCGGGTGTT
342 AATGAGATGAGCTGGATCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCATCCATT
343 TATACCATGCACTGGGTCCGTCAAGCTCCGGGGAAGGGTCTGGAGTGGGTCTCTCTTATT
344 TATAGCATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTTCATACATT
345 TATGCTATGAGCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTAGGTTTCATT
346 AACTACATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGTTATT
347 TATGCTATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGACTGGAATATGTTTCAGCTATT
348 AACTACATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGTTATT
349 TATTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAACATA
350 CACTACATGGACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTGGCCGTACT
351 TCTGCTATGCACTGGGTCCGCCAGGCTTCCGGGAAAGGGCTGGAGTGGGTTGGCCGTATT
352 TACTGGATGCACTGGGTCCGCCAAGCTCCAGGGAAGGGGCTGGTGTGGGTCTCACGTATT
353 TATGCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATT
354 AACTGGTGGGGCTGGATCCGGCAGCCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGTACATC
355 TACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTACATC
356 TACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGGAAATC
357 TACTACTGGGGCTGGATCCGCCAGCCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGAGTATC
358 TACTACTGGAGCTGGATCCGGCAGCCCGCCGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGCGTATC
359 TACTACTGGAGCTGGATCCGGCAGCCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGTATATC
360 TACTACTGGAGCTGGATCCGGCAGCCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGTATATC

361 TACTGGATCGGCTGGGTGCGCCAGATGCCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGGGATCATC

362 GCTGCTTGGAACTGGATCAGGCAGTCCCCATCGAGAGGCCTTGAGTGGCTGGGAAGGACA

363 TATGGTATGAATTGGGTGCCACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGTTC

【表１０】

表 10. 重鎖の FR3 (Chothia 定義)

364
ACAAACTATGCACAGAAGCTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGACACATCCACGAGCACAGCCTACAT
GGAGCTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA

365
ACAAACTATGCACAGAAGTTTCAGGGCAGGGTCACCATGACCAGGGACACGTCCATCAGCACAGCCTACAT
GGAGCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA

366
ACAATCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCGAGGACACATCTACAGACACAGCCTACAT
GGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAACA

367
ACAAAATATTCACAGGAGTTCCAGGGCAGAGTCACCATTACCAGGGACACATCCGCGAGCACAGCCTACAT
GGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACATGGCTGTGTATTACTGTGCGAGA

368
ACCAACTACGCACAGAAATTCCAGGACAGAGTCACCATTACCAGGGACAGGTCTATGAGCACAGCCTACAT
GGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACAGCCATGTATTACTGTGCAAGA

369
ACAAGCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCAGGGACACGTCCACGAGCACAGTCTACAT
GGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA

370
ACAAACTACGCACAGAAGTTCCAGGAAAGAGTCACCATTACCAGGGACATGTCCACAAGCACAGCCTACAT
GGAGCTGAGCAGCCTGAGATCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGGCA

371
GCAAACTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTACAT
GGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA

372
ACAGGCTATGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCAGGAACACCTCCATAAGCACAGCCTACAT
GGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA

373
AAATCCTACAGCACATCTCTGAAGAGCAGGCTCACCATCTCCAAGGACACCTCCAAAAGCCAGGTGGTCCTT
ACCATGACCAACATGGACCCTGTGGACACAGCCACATATTACTGTGCACGG

374
AAGCGCTACAGCCCATCTCTGAAGAGCAGGCTCACCATCACCAAGGACACCTCCAAAAACCAGGTGGTCCTT
ACAATGACCAACATGGACCCTGTGGACACAGCCACATATTACTGTGCACAC

375
AAATACTACAGCACATCTCTGAAGACCAGGCTCACCATCTCCAAGGACACCTCCAAAAACCAGGTGGTCCTT
ACAATGACCAACATGGACCCTGTGGACACAGCCACGTATTATTGTGCACGG

376
ATATACTACGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGGGACAACGCCAAGAACTCACTGTATCTG
CAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA

377
ACATACTATCCAGGCTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGAAAATGCCAAGAACTCCTTGTATCTT
CAAATGAACAGCCTGAGAGCCGGGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCAAGA

378
ACAGACTACGCTGCACCCGTGAAAGGCAGATTCACCATCTCAAGAGATGATTCAAAAAACACGCTGTATCTG
CAAATGAACAGCCTGAAAACCGAGGACACAGCCGTGTATTACTGTACCACA

379
ACGCACTATGTGGACTCCGTGAAGCGCCGATTCATCATCTCCAGAGACAATTCCAGGAACTCCCTGTATCTG
CAAAAGAACAGACGGAGAGCCGAGGACATGGCTGTGTATTACTGTGTGAGA

380
ACAGGTTATGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCCCTGTATCTG
CAAATGAACAGTCTGAGAGCCGAGGACACGGCCTTGTATCACTGTGCGAGA

381
ATATACTACGCAGACTCAGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACTGTATCTG
CAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGA

382
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTG
CAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAA

383
AAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTG
CAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGA

384
AAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTG
CAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGA

385
ACGCACTATGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTCATCATCTCCAGAGACAATTCCAGGAACACCCTGTATCTG
CAAACGAATAGCCTGAGGGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGTGAGA

386
ACATACTACGCAGACTCCAGGAAGGGCAGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTT
CAAATGAACAACCTGAGAGCTGAGGGCACGGCCGTGTATTACTGTGCCAGA

387
ACATACTATGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACAGCAAAAACTCCCTGTATCTG
CAAATGAACAGTCTGAGAACTGAGGACACCGCCTTGTATTACTGTGCAAAA

388
ATATACTACGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACTCACTGTATCTG
CAAATGAACAGCCTGAGAGACGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGA

389
ACAGAATACGCCGCGTCTGTGAAAGGCAGATTCACCATCTCAAGAGATGATTCCAAAAGCATCGCCTATCTG
CAAATGAACAGCCTGAAAACCGAGGACACAGCCGTGTATTACTGTACTAGA

390
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTT
CAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA

391
ACATATTATGCAGACTCTGTGAAGGGCAGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTT
CAAATGGGCAGCCTGAGAGCTGAGGACATGGCTGTGTATTACTGTGCGAGA

392
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTT
CAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGA

393
AAATACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACTGTATCTG
CAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGA

394
ACAGAATACGCCGCGTCTGTGAAAGGCAGATTCACCATCTCAAGAGATGATTCAAAGAACTCACTGTATCTG
CAAATGAACAGCCTGAAAACCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCTAGA

395
ACAGCATATGCTGCGTCGGTGAAAGGCAGGTTCACCATCTCCAGAGATGATTCAAAGAACACGGCGTATCTG
CAAATGAACAGCCTGAAAACCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTACTAGA

396
ACAAGCTACGCGGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGCTGTATCTG
CAAATGAACAGTCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCAAGA

397
ATAGGCTATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCCCTGTATCTG
CAAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGGACACGGCCTTGTATTACTGTGCAAAA

398
ACCTACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATGTCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTG
AAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGTGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA

399
ACCTACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCAGTAGACACGTCTAAGAACCAGTTCTCCCTG
AAGCTGAGCTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA

400
ACCAACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTG
AAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGA

401
ACCTACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCCGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTG
AAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGCAGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGA

402
ACCAACTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATGTCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTG
AAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA

403
ACCAACTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTG
AAGCTGAGCTCTGTGACCGCTGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA

404
ACCAACTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTG
AAGCTGAGCTCTGTGACCGCTGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA

405
ACCAGATACAGCCCGTCCTTCCAAGGCCAGGTCACCATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTACCTG
CAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCCATGTATTACTGTGCGAGA

406
AATGATTATGCAGTATCTGTGAAAAGTCGAATAACCATCAACCCAGACACATCCAAGAACCAGTTCTCCCTG
CAGCTGAACTCTGTGACTCCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCAAGA

407
CCAACATATGCCCAGGGCTTCACAGGACGGTTTGTCTTCTCCATGGACACCTCTGCCAGCACAGCATACCTGC
AGATCAGCAGCCTAAAGGCTGAGGACATGGCCATGTATTACTGTGCGAGA

【表１１】

表 11. 重鎖の FR4

408	TGGGGCCAGGGCACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
409	TGGGGCCGTGGCACCCTGGTCACTGTCTCCTCA
410	TGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCA
411	TGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
412	TGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
413	TGGGGGCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

【００８５】

本明細書で使用される「生殖系列抗体遺伝子」または「遺伝子断片」という用語は、特定の免疫グロブリンの発現のために遺伝子再構成および突然変異を招く成熟化プロセスを経ることのない、非リンパ系細胞によってコードされる免疫グロブリン配列を表す。（例えば、Shapiroら、Crit. Rev. Immunol. 22(3): 183-200 (2002); Marchalonisら、Adv. Exp. Med. Biol. 484: 13-30(2001)を参照されたい）。本発明のさまざまな実施形態によって与えられる利点の一つは、生殖系列抗体遺伝子が成熟抗体遺伝子よりも、その生物種において個体に特徴的な基本的アミノ酸配列構造を保存している可能性が高く、したがってその生物種において治療に使用する場合、外来起源由来として認識される可能性が低いという認識に由来する。

【００８６】

本明細書で使用される場合、「ヒト化抗体」という用語は、対象となる抗原と免疫特異的に結合し、かつ実質的にヒト抗体のアミノ酸配列を有するフレームワーク（FR）領域と、実質的に非ヒト抗体のアミノ酸配列を有する相補性決定領域（CDR）とを含んでなる、抗体またはその変異体、誘導体、類似体もしくはフラグメントである。本明細書で使用される場合、CDRとの関連で「実質的に」という用語は、非ヒト抗体CDRのアミノ酸配列と、少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を有するCDRを表す。ヒト化抗体は、少なくとも1つの、そして典型的には2つの可変ドメイン（Fab、Fab’、$F(ab')_2$、

HabC、Fv）の実質的にすべてを含んでなるが、その場合、CDR領域のすべてまたは実質的にすべては、非ヒト免疫グロブリン（すなわちドナー抗体）のCDR領域に相当し、フレームワーク領域のすべてまたは実質的にすべては、ヒト免疫グロブリン配列のフレームワーク領域である。好ましくは、ヒト化抗体は、免疫グロブリン定常領域（Fc）の少なくとも一部、典型的にはヒト免疫グロブリンの定常領域の一部も含んでなる。ある実施形態において、ヒト化抗体は、軽鎖だけでなく、重鎖の少なくとも可変ドメインを含有する。ヒト化抗体はまた、重鎖のCH1、ヒンジ、CH2、CH3、およびCH4領域を包含してもよい。ある実施形態において、ヒト化抗体はヒト化軽鎖のみを含有する。ある実施形態において、ヒト化抗体はヒト化重鎖のみを含有する。特定の実施形態において、ヒト化抗体は、軽鎖のヒト化可変ドメイン、および／またはヒト化重鎖のみを含有する。

【００８７】

ヒト化抗体は、IgM、IgG、IgD、IgAおよびIgEを含むいかなる免疫グロブリンクラス、ならびにIgG_1、IgG_2、IgG_3およびIgG_4を含むがこれに限定されない、いかなるアイソタイプからも、選択することができる。ヒト化抗体は、2つ以上のクラスもしくはアイソタイプからの配列を含んでいてもよく、特定の定常ドメインは、当業界でよく知られている技術を用いて、目的とするエフェクター機能を最適化するように選択することができる。

【００８８】

ヒト化抗体のフレームワークおよびCDR領域は、正確に親配列に一致する必要はなく、例えば、ドナー抗体CDRまたはアクセプターフレームワークは、少なくとも1つのアミノ酸残基の置換、挿入および／または欠失によって突然変異されていてもよく、その結果その部位のCDRまたはフレームワーク残基はドナー抗体にもアクセプターフレームワークにも一致しなくなる。しかしながら、このような突然変異は、広範囲にわたることはない。通常、ヒト化抗体残基の少なくとも80％、好ましくは少なくとも85％、より好ましくは少なくとも90％、さらにもっとも好ましくは少なくとも95％は、親のFRおよびCDR配列に一致する。

【００８９】

本明細書で使用される「宿主細胞」という用語は、核酸分子でトランスフェクトされ、または形質転換された特定の対象細胞、およびそうした細胞の子孫もしくは潜在的な子孫を包含する。こうした細胞の子孫は、その後の世代において発生しうる、または核酸の宿主細胞ゲノムへの組み込みにおいて発生しうる突然変異または環境の影響のために、核酸分子でトランスフェクトされた親細胞と同一ではない可能性がある。

【００９０】

本明細書で使用される場合、「抗原と免疫特異的に結合する」という表現および類似の表現は、ある抗原または断片には特異的に結合するが他の抗原には特異的に結合しない、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質（融合タンパク質および抗体を含めるが、それに限定されない）またはそれらのフラグメントを表す。抗原と免疫特異的に結合するペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質は、それより低い親和性で他の抗原と結合する可能性があり、例えばイムノアッセイ、BIAcore、または当技術分野で知られている他のアッセイ法によって測定される。抗原と免疫特異的に結合する抗体またはフラグメントは、関連抗原と交差反応性である可能性がある。ある抗原に免疫特異的に結合する抗体もしくはフラグメントは、他の抗原と交差反応しないことが好ましい。

【００９１】

本明細書で使用される場合、タンパク質性物質（例えば、ペプチド、ポリペプチドまたは（融合タンパク質もしくは抗体といった）タンパク質）との関連において「単離された」という用語は、その物質の由来する細胞もしくは組織起源からの細胞性物質、もしくは混入タンパク質、ポリペプチド、ペプチドおよび抗体を実質的に含まない、または化学合成の場合には化学的前駆物質もしくは他の化学物質を実質的に含まない、タンパク質性物質を表す。「細胞性物質を実質的に含まない」という言い方は、タンパク質性物質が細胞（該細胞からタンパク質性物質が単離されるか、または組換えによって製造される）の細胞成分から分離されている、タンパク質性物質の調製物を包含する。したがって、細胞性

物質を実質的に含まないタンパク質性物質は、（乾重量で）約30％、20％、10％、または5％未満の異種タンパク質、ポリペプチドもしくはペプチド（「混入タンパク質」とも称される）を有する、タンパク質性物質の調製物を包含する。タンパク質性物質が組換え技術によって製造される場合には、タンパク質性物質が培地も実質的に含まないことが好ましく、すなわち、培地は、タンパク質性物質の調製物の容量の約20％、10％、または5％未満を占める。タンパク質性物質が化学合成によって製造される場合には、それが化学的前駆物質もしくは他の化学物質を実質的に含まないことが好ましく、すなわち、そのタンパク質性物質の合成に関わる化学的前駆体もしくは他の化学物質から分離される。したがって、タンパク質性物質の調製物は、（乾重量で）約30％、20％、10％、5％未満の化学的前駆物質もしくはタンパク質性物質以外の化合物を有する。具体的な実施形態において、本明細書に記載のタンパク質性物質は単離されている。好ましい実施形態において、本発明の抗体は単離されている。

【００９２】

本明細書で使用される場合、核酸分子との関連において「単離された」という用語は、核酸分子の天然源中に存在する他の核酸分子から分離された核酸分子を表す。さらに、「単離された」核酸分子、例えばcDNA分子は、好ましくは、組換え技術による生成の場合には他の細胞性物質もしくは培地を実質的に含まず、化学合成の場合には化学的前駆物質もしくは化学物質を実質的に含まない。具体的な実施形態において、核酸分子は単離されている。好ましい実施形態において、本発明の抗体をコードする核酸分子は単離されている。本明細書で使用される場合、「実質的に含まない」という用語は、異なる核酸、ならびに、好ましくは、他の細胞性物質、培地、化学的前駆物質もしくは他の化学物質が（乾重量で）約30％、20％、10％、もしくは5％未満である、「単離された」核酸の調製物を指す。

【００９３】

本明細書で使用される場合、「併用して」および「組み合わせて」という用語は、2つ以上の治療法（例えば2つ以上の予防薬および／または治療薬）を使用することを表す。「併用して」という用語の使用は、治療（例えば、予防および／または治療薬）が被験者に施される順序を限定するものではない。第１の治療（例えば、第１の予防もしくは治療薬）を、被験者に第２の治療（例えば、第２の予防もしくは治療薬）を施す前に（例えば、5分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、12時間、24時間、48時間、72時間、96時間、1週間、2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、8週間、または12週間前に）、同時に、または後に（例えば、5分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、12時間、24時間、48時間、72時間、96時間、1週間、2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、8週間、または12週間後に）、施すことができる。

【００９４】

本明細書で使用される「管理する」、「管理すること」、および「管理」は、被験者が治療（例えば、予防もしくは治療薬）から引き出す有益な効果を指すが、それは病気の治癒をもたらすものではない。ある特定の実施形態において、被験者は１以上の治療（例えば、１以上の予防もしくは治療薬）を受けて、病気が進行または悪化しないように、病気を「管理する」。

【００９５】

本明細書で使用される「成熟抗体遺伝子」という用語は、例えば、B細胞のようなリンパ球において、ハイブリドーマにおいて、または特定の免疫グロブリンを発現するよう成熟化プロセスを経た、なんらかの抗体産生細胞において発現される、免疫グロブリンをコードする遺伝子配列を指す。この用語は、こうした成熟遺伝子をコードする、成熟ゲノムDNA、cDNAおよび他の核酸配列を包含するが、これらの核酸配列は単離されており、かつ／または他の細胞型で発現するように組換え操作されている。成熟抗体遺伝子は、さまざまな変異および再構成を受けており、それによって成熟抗体遺伝子はリンパ球以外のあらゆる細胞においてコードされる抗体遺伝子と構造的に区別される。ヒト、齧歯類および他の多くの哺乳類における成熟抗体遺伝子は、抗体軽鎖の場合、VおよびJ遺伝子セグメント

の融合によって、抗体重鎖の場合は、V、DおよびJ遺伝子セグメントの融合によって形成される。多くの成熟抗体遺伝子は、融合後に点変異を獲得し、その変異のあるものは抗体タンパク質の特異的抗原に対する親和性を増大させる。

【００９６】

本明細書で使用される「製薬上許容される」という用語は、連邦政府もしくは州政府の監督官庁に承認され、または米国薬局方、欧州薬局方、もしくは他の一般に認められた、動物に使用する、さらに特定するとヒトに使用する薬局方に記載されていることを表す。

【００９７】

本明細書で使用される「予防する」、「予防すること」および「予防」は、治療（例えば、予防もしくは治療薬）、または併用治療（例えば、予防薬または治療薬の併用）を施した結果生じる、被験者における、疾患の発生もしくは発症の阻止、または疾患の１以上の症状の再発、発現、もしくは進行の防止を指す。

【００９８】

本明細書で使用される「予防薬」という用語は、疾患、またはその１以上の症状を、予防するために使用することができる、何らかの作用物質を表す。ある実施形態において、「予防薬」という用語は、本発明の抗体を指す。別のある実施形態において、「予防薬」という用語は、本発明の抗体以外の作用物質を表す。好ましくは、予防薬は、疾患、またはその１以上の症状が発現、発生、進行および／または重症化しないようにする、またはそれを遅らせるために、有用であるとわかっている、またはすでに使用され、もしくは現在使用されている作用物質である。

【００９９】

本明細書で使用される「予防上有効な量」は、疾患、または疾患の１以上の症状の発生、再発、もしくは発症の予防をもたらすのに十分な、または別の治療（例えば、予防薬）の予防効果を強め、もしくは改善するのに十分な、治療に関わる（例えば予防薬の）量を表す。

【０１００】

本明細書に使用される「プロトコル」という語句は、治療効果のある１以上の治療（例えば治療薬）を与え、投与の時期を決めるための投薬計画を指す。

【０１０１】

本明細書で使用される「副作用」という語句は、予防薬もしくは治療薬の望ましくない有害作用を包含する。副作用は常に望まれないが、望まれない作用が必ずしも有害であるとは限らない。治療（例えば、予防薬もしくは治療薬）に起因する有害作用は、有毒、不快または危険となることもある。

【０１０２】

本明細書で使用される「小分子」という用語および類似の用語は、ペプチド、ペプチドミメティク、アミノ酸、アミノ酸類似体、ポリヌクレオチド、ポリヌクレオチド類似体、ヌクレオチド、ヌクレオチド類似体、モルあたり約10,000グラム未満の分子量を有する有機もしくは無機化合物（すなわち、ヘテロ有機化合物および有機金属化合物を含む）、モルあたり約5,000グラム未満の分子量を有する有機もしくは無機化合物、モルあたり約1,000グラム未満の分子量を有する有機もしくは無機化合物、モルあたり約500グラム未満の分子量を有する有機もしくは無機化合物、ならびに塩、エステルおよび他の製薬上許容される形の前記物質を包含するがそれらに限定されない。

【０１０３】

本明細書で使用される「被験者」および「患者」という用語は、相互交換可能なものとして使用される。本明細書で使用される「被験者」という用語は、動物、好ましくは、非霊長類（例えば、ウシ、ブタ、ウマ、ネコ、イヌ、ラットおよびマウス）および霊長類（例えば、カニクイザル、チンパンジーといったサルおよびヒト）を含めた哺乳動物、ならびにもっとも好ましくはヒトを指す。ある実施形態において、被験者は、鳥類（例えば、ウズラ、ニワトリまたはシチメンチョウ）、家畜（例えば、ウシ、ウマ、ブタ、もしくはヒツジ）、愛玩動物（例えば、ネコ、イヌもしくはモルモット）、または実験動物（例え

ば、疾患のための動物モデル）といった、ヒト以外の動物である。好ましい実施形態において、被験者はヒト（例えば、乳児、小児、成人、もしくは高齢者）である。

【０１０４】

本明細書で使用される「相乗的な」という用語は、なんらかの2つ以上の単独治療（例えば１以上の予防薬または治療薬）の効果を足し合わせるよりいっそう効果的な、治療法（例えば、予防薬もしくは治療薬）の組み合わせを指す。治療法の組み合わせ（例えば、予防薬もしくは治療薬の組み合わせ）による相乗効果は、疾患を有する被験者に対して、より少ない投与量、および／またはより少ない投与回数で１以上の治療法（例えば、１以上の予防薬または治療薬）を用いることを可能にする。少ない投与量の治療法（複数）（例えば、予防もしくは治療薬（複数））を利用できること、および／または、前記治療法をより少ない回数で投与できることは、被験者に前記治療を施すことに伴う毒性を、疾患の予防もしくは治療における前記治療法の有効性を減らすことなく、低下させる。加えて、相乗効果は、結果として、疾患の予防または治療において、治療法（例えば、予防薬もしくは治療薬）の有効性の向上をもたらすことができる。最終的に、治療法（例えば、予防薬もしくは治療薬）を組み合わせることによる相乗効果は、何らかの単独の治療法を使用することに付随する、有害なもしくは望まれない副作用を回避または低減することができる。

【０１０５】

本明細書で用いられる「治療薬」という用語は、疾患、または疾患の１以上の症状の、予防、治療、管理、または改善に用いることができる何らかの作用物質を表す。ある実施形態において、「治療薬」という用語は、本発明の抗体を指す。別の実施形態において、「治療薬」という用語は、本発明の抗体以外の作用物質を指す。好ましくは、治療薬は、疾患または疾患の１以上の症状の予防、治療、管理または改善のために有用であることがわかっている、または、これまで使用されてきた、もしくは現在使用されている作用物質である。

【０１０６】

本明細書で使用される「治療に有効な量」という用語は、疾患の重篤度を下げ、疾患の持続期間を短くし、疾患の１以上の症状を改善し、疾患の進行を妨げ、疾患の寛解を引き起こし、または別の治療の治療効果を強め、もしくは改善するのに十分な、治療に関わる量を表す。

【０１０７】

本明細書で使用される「治療（法）」という用語は、疾患または疾患の１以上の症状の、予防、治療、管理、および／または改善に使用することができる、何らかのプロトコル、方法、および／または作用物質を表す。ある実施形態において、「治療（法）」という用語は、抗ウイルス治療、抗菌治療、抗真菌治療、抗癌剤、生物学的治療、支持療法、および／または他の、当業者、例えば医師のような医学の専門家に知られている、疾患または疾患の１以上の症状の、治療、管理、予防、または改善に有用な治療を指す。

【０１０８】

本明細書で使用される「治療する」、「治療」および「治療すること」という用語は、１以上の治療法を施すこと（１以上の予防薬または治療薬の投与を含めるが、それに限定されない）に起因する、疾患の進行、重症度、および／または持続期間の減少もしくは改善、または疾患の１以上の症状の改善を指す。

【０１０９】

3.2　図面の説明

図１．マウス抗ヒトEphA2モノクローナル抗体B233の重鎖および軽鎖の核酸およびタンパク質配列。Kabatによって定義されたCDR1、2および3の領域を枠で囲ってある。可変重鎖（V_H）および軽鎖（V_L）の完全なアミノ酸配列は、一文字表記によって与えられる。

【０１１０】

図２．フレームワークシャフリング(shuffling)ライブラリーのスクリーニング、および対応するFabフラグメントの発現に用いられるファージベクター。V_LおよびV_H遺伝子の

おのおのの、ストレプトアビジンで精製された一本鎖DNAを、遺伝子3リーダー／Cκおよび遺伝子3リーダー／Cγ1領域の相同性をそれぞれ利用して、ハイブリダイゼーション変異誘発によってベクターにアニールする。パリンドロームループ中のユニークXbal部位によって、親ベクターの除去が可能となる。そこでV_HおよびV_L遺伝子を、それぞれヒトκ1重鎖の第１の定常ドメインおよびヒトκ軽鎖の定常ドメインとin frameで発現させる。

【０１１１】

図３．ライブラリーAおよびBをスクリーニングした後単離された抗ヒトEphA2モノクローナル抗体B233の、クレームワークをシャフリングしたヒト化クローンのタンパク質配列。Kabatにより定義されたCDR1、2および3領域を枠で囲ってある。可変重鎖（V_H）および軽鎖（V_L）の完全なアミノ酸配列は、標準的な一文字表記で与えられる。

【０１１２】

図４．固定化されたヒトEphA2-Fc上での、Fab抽出物を用いたELISAタイトレーション。

【０１１３】

図５．フレームワークをシャフリングした抗体の配列解析。基準としてmAb B233を用いて、それぞれの個別の抗体フレームワークについてアミノ酸レベルでの同一性パーセントを計算した。

【０１１４】

発明の詳細な説明

本発明は、第１の生物種に由来する抗体を再設計もしくは改造する方法を提供するが、この場合、この再設計もしくは改造された抗体は第２の生物種において望ましくない免疫応答を引き起こすことなく、しかも第１の生物種に由来する抗体と実質的に同じ抗原結合能を保持する。本発明によれば、第２の生物種に由来するフレームワーク領域のバンクから得られたフレームワーク領域とin frameで融合された第１の生物種に由来する抗体のCDRを含んでなるコンビナトリアルライブラリを構築し、望ましい改変抗体を求めてスクリーニングすることができる。

【０１１５】

本発明はまた、本明細書に記載の核酸配列を包含し、含有し、または発現するよう操作された細胞を提供する。本発明は、重鎖可変領域（好ましくは、ヒト化重鎖可変領域）を作製する方法を提供するが、同方法は、本明細書に記載の細胞において、重鎖可変領域（好ましくは、ヒト化重鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を発現させることを含んでなる。本発明は、軽鎖可変領域（好ましくは、ヒト化軽鎖可変領域）を作製する方法を提供するが、同方法は、本明細書に記載の細胞において、軽鎖可変領域（好ましくは、ヒト化軽鎖可変領域）をコードするヌクレオチド配列を発現させることを含んでなる。本発明はまた、抗原と免疫特異的に結合する抗体（好ましくは、ヒト化抗体）を作製する方法を提供するが、同方法は、本明細書に記載の細胞に含まれる、ヒト化抗体をコードする核酸配列を発現させることを含んでなる。

【０１１６】

本発明は、本明細書に記載の方法によって作製された抗体を提供する。好ましい実施形態において、本発明は、本発明の方法によって作製されたヒト化抗体を提供する。本発明はまた、本明細書に記載の方法によって作製された抗体、および担体、希釈剤もしくは賦形剤を含んでなる組成物を提供する。好ましい実施形態において、本発明は、本明細書に記載の方法によって作製されたヒト化抗体、ならびに担体、希釈剤もしくは賦形剤を含んでなる組成物を提供する。好ましくは、本発明の組成物は、その用途に合う形の医薬組成物である。

【０１１７】

限定する目的ではなく開示を明確にするために、本発明の詳細な説明は以下のサブセクションに分けられる：

(i)アクセプターフレームワーク領域の包括的バンクの構築

(ii)CDRの選択

(iii)コンビナトリアルサブライブラリーの構築

(iv)コンビナトリアルライブラリーの構築
(v)コンビナトリアルライブラリの発現
(vi)ヒト化抗体の選択
(vii)ヒト化抗体の作製および特徴付け
(viii)抗体コンジュゲート
(ix)本発明の組成物の用途
(x)投与および製剤
(xi)投与量および投与回数
(xii)生物学的アッセイ
(xiii)キット
(xiv)製造物品

【０１１８】

2.2　アクセプターフレームワーク領域の包括的バンクの構築

本発明にしたがって、１以上のアクセプター抗体（例えば、ヒト抗体）のフレームワーク領域（軽鎖のFR1、FR2、FR3、FR4、ならびに重鎖のFR1、FR2、FR3、FR4）をコードする核酸配列、およびドナー抗体の相補性決定領域（軽鎖のCDR1、CDR2、CDR3、ならびに重鎖のCDR1、CDR2、CDR3）をコードする核酸配列を一緒に融合することによって、ドナー抗体（例えば、非ヒト抗体）の軽鎖可変領域および／または重鎖可変領域を改変する（例えばヒト化する）ことができる。好ましくは、改変された（例えば、ヒト化された）抗体軽鎖は、FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、およびFR4を含んでなる。改変された（例えば、ヒト化された）抗体重鎖は、FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、およびFR4を含んでなる。おのおののアクセプター（例えばヒト）フレームワーク領域（軽鎖のFR1、2、3、4、ならびに重鎖のFR1、2、3、4）は、軽鎖のFRサブバンク、および重鎖のFRサブバンクからそれぞれ作製することができる。アクセプター（例えば、ヒト）フレームワーク領域の包括的バンクは2つ以上のFRサブバンクを含んでなる。

【０１１９】

2.2.1　軽鎖フレームワークのサブバンクの作製

軽鎖サブバンク1、2、3および4を構築するが、このサブバンク1は、ヌクレオチド配列を含む複数の核酸配列を含んでなり、各ヌクレオチド配列は軽鎖FR1をコードする；サブバンク2はヌクレオチド配列を含む複数の核酸配列を含んでなり、各ヌクレオチド配列は軽鎖FR2をコードする；サブバンク3はヌクレオチド配列を含む複数の核酸配列を含んでなり、各ヌクレオチド配列は軽鎖FR3をコードする；ならびにサブバンク4はヌクレオチド配列を含む複数の核酸配列を含んでなり、各ヌクレオチド配列は軽鎖FR4をコードする。いくつかの実施形態において、FR配列は、機能性ヒト抗体配列（例えば、当技術分野で知られている抗体、および／または市販の抗体）から得られ、もしくは由来する。いくつかの実施形態において、FR配列はヒト生殖系列軽鎖配列に由来する。ある実施形態において、サブバンクFR配列は、ヒト生殖系列κ鎖配列に由来する。別の実施形態において、サブバンクFR配列は、ヒト生殖系列λ鎖配列に由来する。

【０１２０】

限定ではなく一例として、下記は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を用いて4つの軽鎖FRサブバンクを作製する方法を説明するものであって、ヒト生殖系列κ鎖配列をテンプレートとして使用する。軽鎖FRサブバンク1、2および3（それぞれFR1、2、3をコードする）は、46のヒト生殖系列κ鎖配列（A1、A10、A11、A14、A17、A18、A9、A2、A20、A23、A26、A27、A3、A30、A5、A7、B2、B3、L1、L10、L11、L12、L14、L15、L16、L18、L19、L2、L20、L22、L23、L24、L25、L4/18a、L5、L6、L8、L9、01、011、012、014、018、02、04および08）を包含する。Kawasakiら、2001、Eur. J. Immunol., 31: 1017-1028；SchableおよびZachau、1993、Biol. Chem. Hoppe Seyler 374: 1001-1022；ならびに、Brensing-Kuppersら、1997、Gene 191: 173-181を参照されたい。配列はNCBIウェブサイトに取りまとめられている：
www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/showGermline.cgi?organism=human&chainType=VK&seqTyp

e=nucleotide; これらはそれぞれその全体を参照することにより本明細書に含めるものとする。軽鎖FRサブバンク4（FR4をコードする）は、5つのヒト生殖系列κ鎖配列（Jκ1、Jκ2、Jκ3、Jκ4およびJκ5）を包含する。Hieterら、1982、J. Biol. Chem. 257:1516-1522を参照されたいが、これはその全体を参照することにより本明細書に含めるものとする。配列はNCBIウェブサイトに取りまとめられている：www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/showGermline.cgi?organism=human&chainType=VK&seqType=nucleotide; これはその全体を参照することにより本明細書に含めるものとする。

【０１２１】

限定ではなく一例として、軽鎖FR1サブバンクの構築は、表12および表13（すべて5’から3’の方向で表示され、名称に続いて配列を示す）に記載のオリゴヌクレオチドを用いたオーバーラップ伸長法によるポリメラーゼ連鎖反応によって行う。

【表１２】

表 12. 軽鎖 FR1 フォワードプライマー (サブバンク 1 用)

414	FR1L1	GATGTTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCC
415	FR1L2	GATGTTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCC
416	FR1L3	GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCTCTGTCCGTCACCC
417	FR1L4	GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCC
418	FR1L5	GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCTCTGTCCGTCACCC
419	FR1L6	GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCTCACCTGTCACCC
420	FR1L7	GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCC
421	FR1L8	GAGATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCTTGTCTATCACCC
422	FR1L9	GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCTCGCCTGTCACCC
423	FR1L10	GAAATTGTGCTGACTCAGTCTCCAGACTTTCAGTCTGTGACTC
424	FR1L11	GATGTTGTGATGACACAGTCTCCAGCTTTCCTCTCTGTGACTC
425	FR1L12	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTG
426	FR1L13	GAAATTGTGCTGACTCAGTCTCCAGACTTTCAGTCTGTGACTC
427	FR1L14	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTG
428	FR1L15	GAAACGACACTCACGCAGTCTCCAGCATTCATGTCAGCGACTC
429	FR1L16	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTGTCTGCATCTG
430	FR1L17	GCCATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTG
431	FR1L18	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTG
432	FR1L19	AACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTGCCATGTCTGCATCTG
433	FR1L20	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTGTCTGCATCTG
434	FR1L21	GAAATAGTGATGATGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTC
435	FR1L22	GCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTG
436	FR1L23	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCTGTGTCTGCATCTG
437	FR1L24	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTC
438	FR1L25	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTC
439	FR1L26	GACATCCAGATGATCCAGTCTCCATCTTTCCTGTCTGCATCTG
440	FR1L27	GCCATCCGGATGACCCAGTCTCCATTCTCCCTGTCTGCATCTG
441	FR1L28	GTCATCTGGATGACCCAGTCTCCATCCTTACTCTCTGCATCTA
442	FR1L29	GCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTG
443	FR1L30	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGCATCTG
444	FR1L31	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTC
445	FR1L32	GACATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTTCCTGTCTGCATCTG
446	FR1L33	GCCATCCGGATGACCCAGTCTCCATCCTCATTCTCTGCATCTA
447	FR1L34	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTG
448	FR1L35	GACATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTG
449	FR1L36	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTG
450	FR1L37	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTG
451	FR1L38	GACATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTG
452	FR1L39	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTG
453	FR1L40	GAAATTGTAATGACACAGTCTCCACCCACCCTGTCTTTGTCTC
454	FR1L41	GAAATTGTAATGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTC

455	FR1L42	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTC
456	FR1L43	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTC
457	FR1L44	GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTC
458	FR1L45	GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCC
459	4FR1L46	GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCC

【表１３】

表 13. 軽鎖 FR1 リバースプライマー (サブバンク 1 用)

460	FR1L1'	GCAGGAGATGGAGGCCGGCTGTCCAAGGGTGACGGGCAGGGAGAGTG
461	FR1L2'	GCAGGAGATGGAGGCCGGCTGTCCAAGGGTGACGGGCAGGGAGAGTG
462	FR1L3'	GCAGGAGATGGAGGCCGGCTGTCCAGGGGTGACGGACAGAGAGAGTG
463	FR1L4'	GCAGGAGATGGAGGCCGGCTCTCCAGGGGTGACGGGCAGGGAGAGTG
464	FR1L5'	GCAGGAGATGGAGGCCGGCTGTCCAGGGGTGACGGACAGAGAGAGTG
465	FR1L6'	GCAGGAGATGGAGGCCGGCTGTCCAAGGGTGACAGGTGAGGAGAGTG
466	FR1L7'	GCAGGAGATGGAGGCCGGCTCTCCAGGGGTGACGGGCAGGGAGAGTG
467	FR1L8'	GCAGGAGATGGAGGCCTGCTCTCCAGGGGTGATAGACAAGGAGAGTG
468	FR1L9'	GAAGGAGATGGAGGCCGGCTGTCCAAGGGTGACAGGCGAGGAGAGTG
469	FR1L10'	GCAGGTGATGGTGACTTTCTCCTTTGGAGTCACAGACTGAAAGTCTG
470	FR1L11'	GCAGGTGATGGTGACTTTCTCCCCTGGAGTCACAGAGAGGAAAGCTG
471	FR1L12'	GCAAGTGATGGTGACTCTGTCTCCTACAGATGCAGACAGGGAGGATG
472	FR1L13'	GCAGGTGATGGTGACTTTCTCCTTTGGAGTCACAGACTGAAAGTCTG
473	FR1L14'	GCAAGTGATGGTGACTCTGTCTCCTACAGATGCAGACAGGGAGGATG
474	FR1L15'	GCAGGAGATGTTGACTTTGTCTCCTGGAGTCGCTGACATGAATGCTG
475	FR1L16'	ACAAGTGATGGTGACTCTGTCTCCTACAGATGCAGACAGTGAGGATG
476	FR1L17'	GCAAGTGATGGTGACTCTGTCTCCTACAGATGCAGACAGGGAGGATG
477	FR1L18'	GCAAGTGATGGTGACTCTGTCTCCTACAGATGCAGACAGGGTGGAAG
478	FR1L19'	ACAAGTGATGGTGACTCTGTCTCCTACAGATGCAGACATGGCAGATG
479	FR1L20'	ACAAGTGATGGTGACTCTGTCTCCTACAGATGCAGACAGTGAGGATG
480	FR1L21'	GCAGGAGAGGGTGGCTCTTTCCCCTGGAGACACAGACAGGGTGGCTG
481	FR1L22'	GCAAGTGATGGTGACTCTGTCTCCTACAGATGCAGACAGGGAGGATG
482	FR1L23'	ACAAGTGATGGTGACTCTGTCTCCTACAGATGCAGACACAGAAGATG
483	FR1L24'	GCAGGAGAGGGTGGCTCTTTCCCCTGGAGACACAGACAGGGTGGCTG
484	FR1L25'	GCAGGAGAGGGTGGCTCTTTCCCCTGGAGACAAAGACAGGGTGGCTG
485	FR1L26'	GCAAATGATACTGACTCTGTCTCCTACAGATGCAGACAGGAAAGATG
486	FR1L27'	GCAAGTGATGGTGACTCTGTCTCCTACAGATGCAGACAGGGAGAATG
487	FR1L28'	ACAACTGATGGTGACTCTGTCTCCTGTAGATGCAGAGAGTAAGGATG
488	FR1L29'	GCAAGTGATGGTGACTCTGTCTCCTACAGATGCAGACAGGGAGGATG
489	FR1L30'	ACAAGTGATGGTGACTCTGTCTCCTACAGATGCAGACACGGAAGATG
490	FR1L31'	GCAGGAGAGGGTGGCTCTTTCCCCTGGAGACAAAGACAGGGTGGCTG
491	FR1L32'	GCAAGTGATGGTGACTCTGTCTCCTACAGATGCAGACAGGAAGGATG
492	FR1L33'	ACAAGTGATGGTGACTCTGTCTCCTGTAGATGCAGAGAATGAGGATG
493	FR1L34'	GCAAGTGATGGTGACTCTGTCTCCTACAGATGCAGACAGGGAGGATG
494	FR1L35'	GCAAGTGATGGTGACTCTGTCTCCTACAGATGCAGACAGGGAGGATG
495	FR1L36'	GCAAGTGATGGTGACTCTGTCTCCTACAGATGCAGACAGGGAGGATG

496	FR1L37'	GCAAGTGATGGTGACTCTGTCTCCTACAGATGCAGACAGGGAGGATG
497	FR1L38'	GCAAGTGATGGTGACTCTGTCTCCTACAGATGCAGACAGGGAGGATG
498	FR1L39'	GCAAGTGATGGTGACTCTGTCTCCTACAGATGCAGACAGGGAGGATG
499	FR1L40'	GCAGGAGAGGGTGACTCTTTCCCCTGGAGACAAAGACAGGGTGGGTG
500	FR1L41'	GCAGGAGAGGGTGGCTCTTTCCCCTGGAGACAAAGACAGGGTGGCTG
501	FR1L42'	GCAGGAGAGGGTGGCTCTTTCCCCTGGAGACAAAGACAGGGTGGCTG
502	FR1L43'	GCAGGAGAGGGTGGCTCTTTCCCCTGGAGACAAAGACAGGGTGCCTG
503	FR1L44'	GCAGTTGATGGTGGCCCTCTCGCCCAGAGACACAGCCAGGGAGTCTG
504	FR1L45'	GCAGGAGATGGAGGCCGGCTCTCCAGGGGTGACGGGCAGGGAGAGTG
505	FR1L46'	GCAGGAGATGGAGGCCGGCTCTCCAGGGGTGACGGGCAGGGAGAGTG

【０１２２】

PCRは、下記のオリゴヌクレオチドの組合せで実施する（全部で46組）：FR1L1/FR1L1’、FR1L2/FR1L2’、FR1L3/FR1L3’、FR1L4/FR1L4’、FR1L5/FR1L5’、FR1L6/FR1L6’、FR1L7/FR1L7’、FR1L8/FR1L8’、FR1L9/FR1L9’、FR1L10/FR1L10’、FR1L11/FR1L11’、FR1L12/FR1L12’、FR1L13/FR1L13’、FR1L14/FR1L14’、FR1L15/FR1L15’、FR1L16/FR1L16’、FR1L17/FR1L17’、FR1L18/FR1L18’、FR1L19/FR1L19’、FR1L20/FR1L20’、FR1L21/FR1L21’、FR1L22/FR1L22’、FR1L23/FR1L23’、FR1L24/FR1L24’、FR1L25/FR1L25’、FR1L26/FR1L26’、FR1L27/FR1L27’、FR1L28/FR1L28’、FR1L29/FR1L29’、FR1L30/FR1L30’、FR1L31/FR1L31’、FR1L32/FR1L32’、FR1L33/FR1L33’、FR1L34/FR1L34’、FR1L35/FR1L35’、FR1L36/FR1L36’、FR1L37/FR1L37’、FR1L38/FR1L38’、FR1L39/FR1L39’、FR1L40/FR1L40’、FR1L41/FR1L41’、FR1L42/FR1L42’、FR1L43/FR1L43’、FR1L44/FR1L44’、FR1L45/FR1L45’、およびFR1L46/FR1L46’。PCR産物のプールがサブバンク1となる。

【０１２３】

限定ではなく一例として、軽鎖FR2サブバンクの構築は、表14および表15（すべて5’から3’の方向で表示され、名称に続いて配列を示す）に記載のオリゴヌクレオチドを用いたオーバーラップ伸長法によるポリメラーゼ連鎖反応によって行う。

【表１４】

表 14. 軽鎖 FR2 フォワードプライマー (サブバンク 2 用)

506	FR2L1	TGGTTTCAGCAGAGGCCAGGCCAATCTCCAA
507	FR2L2	TGGTTTCAGCAGAGGCCAGGCCAATCTCCAA
508	FR2L3	TGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAC
509	FR2L4	TGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCAC
510	FR2L5	TGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGCCTCCAC
511	FR2L6	TGGCTTCAGCAGAGGCCAGGCCAGCCTCCAA
512	FR2L7	TGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCAC
513	FR2L8	TGGTTTCTGCAGAAAGCCAGGCCAGTCTCCA
514	FR2L9	TGGCTTCAGCAGAGGCCAGGCCAGCCTCCAA
515	FR2L10	TGGTACCAGCAGAAACCAGATCAGTCTCCAA
516	FR2L11	TGGTACCAGCAGAAACCAGATCAAGCCCCAA
517	FR2L12	TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGTTCCTA
518	FR2L13	TGGTACCAGCAGAAACCAGATCAGTCTCCAA
519	FR2L14	TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTA
520	FR2L15	TGGTACCAACAGAAACCAGGAGAAGCTGCTA
521	FR2L16	TGGTTTCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTA
522	FR2L17	TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTA
523	FR2L18	TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTA
524	FR2L19	TGGTTTCAGCAGAAACCAGGGAAAGTCCCTA
525	FR2L20	TGGTATCAGCAGAAACCAGAGAAAGCCCCTA
526	FR2L21	TGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCA
527	FR2L22	TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCTCCTA
528	FR2L23	TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTA
529	FR2L24	TGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCA
530	FR2L25	TGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCA
531	FR2L26	TGGTATCTGCAGAAACCAGGGAAATCCCCTA
532	FR2L27	TGGTATCAGCAAAAACCAGCAAAAGCCCCTA
533	FR2L28	TGGTATCAGCAAAAACCAGGGAAAGCCCCTG
534	FR2L29	TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCTCCTA

535	FR2L30	TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTA
536	FR2L31	TGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCA
537	FR2L32	TGGTATCAGCAAAAACCAGGGAAAGCCCCTA
538	FR2L33	TGGTATCAGCAAAAACCAGGGAAAGCCCCTA
539	FR2L34	TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTA
540	FR2L35	TGGTATCGGCAGAAACCAGGGAAAGTTCCTA
541	FR2L36	TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTA
542	FR2L37	TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTA
543	FR2L38	TGGTATCGGCAGAAACCAGGGAAAGTTCCTA
544	FR2L39	TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTA
545	FR2L40	TGGTATCAGCAGAAACCTGGCCAGGCGCCCA
546	FR2L41	TGGTACCAGCAGAAACCTGGGCAGGCTCCCA
547	FR2L42	TGGTACCAGCAGAAACCTGGCCTGGCGCCCA
548	FR2L43	TGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCA
549	FR2L44	TGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGCCTCCTA
550	FR2L45	TGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCAC
551	FR2L46	TGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCAC

【表１５】

表 15. 軽鎖 FR2 リバースプライマー (サブバンク 2 用)

552	FR2L1'	ATAAATTAGGCGCCTTGGAGATTGGCCTGGCCTCT
553	FR2L2'	ATAAATTAGGCGCCTTGGAGATTGGCCTGGCCTCT
554	FR2L3'	ATAGATCAGGAGCTGTGGAGACTGGCCTGGCTTCT
555	FR2L4'	ATAGATCAGGAGCTGTGGAGACTGCCCTGGCTTCT
556	FR2L5'	ATAGATCAGGAGCTGTGGAGGCTGGCCTGGCTTCT
557	FR2L6'	ATAAATTAGGAGTCTTGGAGGCTGGCCTGGCCTCT
558	FR2L7'	ATAGATCAGGAGCTGTGGAGACTGCCCTGGCTTCT
559	FR2L8'	ATAGATCAGGAGTGTGGAGACTGGCCTGGCTTTCT
560	FR2L9'	ATAAATTAGGAGTCTTGGAGGCTGGCCTGGCCTCT
561	FR2L10'	CTTGATGAGGAGCTTTGGAGACTGATCTGGTTTCT
562	FR2L11'	CTTGATGAGGAGCTTTGGGGCTTGATCTGGTTTCT
563	FR2L12'	ATAGATCAGGAGCTTAGGAACTTTCCCTGGTTTCT
564	FR2L13'	CTTGATGAGGAGCTTTGGAGACTGATCTGGTTTCT
565	FR2L14'	ATAGATCAGGCGCTTAGGGGCTTTCCCTGGTTTCT
566	FR2L15'	TTGAATAATGAAAATAGCAGCTTCTCCTGGTTTCT
567	FR2L16'	ATAGATCAGGGACTTAGGGGCTTTCCCTGGTTTCT
568	FR2L17'	ATAGATCAGGAGCTTAGGGGCTTTCCCTGGTTTCT
569	FR2L18'	ATAGATCAGGAGCTTAGGGGCTTTCCCTGGTTTCT
570	FR2L19'	ATAGATCAGGTGCTTAGGGACTTTCCCTGGTTTCT
571	FR2L20'	ATAGATCAGGGACTTAGGGGCTTTCTCTGGTTTCT
572	FR2L21'	ATAGATGAGGAGCCTGGGAGCCTGGCCAGGTTTCT
573	FR2L22'	ATAGATCAGGAGCTTAGGAGCTTTCCCTGGTTTCT
574	FR2L23'	ATAGATCAGGAGCTTAGGGGCTTTCCCTGGTTTCT
575	FR2L24'	ATAGATGAGGAGCCTGGGAGCCTGGCCAGGTTTCT

576	FR2L25'	ATAGATGAGGAGCCTGGGAGCCTGGCCAGGTTTCT
577	FR2L26'	ATAGAGGAAGAGCTTAGGGGATTTCCCTGGTTTCT
578	FR2L27'	ATAGATGAAGAGCTTAGGGGCTTTTGCTGGTTTTT
579	FR2L28'	ATAGATCAGGAGCTCAGGGGCTTTCCCTGGTTTTT
580	FR2L29'	ATAGATCAGGAGCTTAGGAGCTTTCCCTGGTTTCT
581	FR2L30'	ATAGATCAGGAGCTTAGGGGCTTTCCCTGGTTTCT
582	FR2L31'	ATAGATGAGGAGCCTGGGAGCCTGGCCAGGTTTCT
583	FR2L32'	ATAGATCAGGAGCTTAGGGGCTTTCCCTGGTTTTT
584	FR2L33'	ATAGATCAGGAGCTTAGGGGCTTTCCCTGGTTTTT
585	FR2L34'	ATAGATCAGGAGCTTAGGGGCTTTCCCTGGTTTCT
586	FR2L35'	ATAGATCAGGAGCTTAGGAACTTTCCCTGGTTTCT
587	FR2L36'	GTAGATCAGGAGCTTAGGGGCTTTCCCTGGTTTCT
588	FR2L37'	ATAGATCAGGAGCTTAGGGGCTTTCCCTGGTTTCT
589	FR2L38'	ATAGATCAGGAGCTTAGGAACTTTCCCTGGTTTCT
590	FR2L39'	GTAGATCAGGAGCTTAGGGGCTTTCCCTGGTTTCT
591	FR2L40'	ATAGATGAGGAGCCTGGGCGCCTGGCCAGGTTTCT
592	FR2L41'	ATAGATGAGGAGCCTGGGAGCCTGCCCAGGTTTCT
593	FR2L42'	ATAGATGAGGAGCCTGGGCGCCAGGCCAGGTTTCT
594	FR2L43'	ATAGATGAGGAGCCTGGGAGCCTGGCCAGGTTTCT
595	FR2L44'	GTAAATGAGCAGCTTAGGAGGCTGTCCTGGTTTCT
596	FR2L45'	ATAGATCAGGAGCTGTGGAGACTGCCCTGGCTTCT
597	FR2L46'	ATAGATCAGGAGCTGTGGAGACTGCCCTGGCTTCT

【０１２４】

PCRは、下記のオリゴヌクレオチドの組合せで実施する（全部で46組）：FR2L1/FR2L1'、FR2L2/FR2L2'、FR2L3/FR2L3'、FR2L4/FR2L4'、FR2L5/FR2L5'、FR2L6/FR2L6'、FR2L7/FR2L7'、FR2L8/FR2L8'、FR2L9/FR2L9'、FR2L10/FR2L10'、FR2L11/FR2L11'、FR2L12/FR2L12'、FR2L13/FR2L13'、FR2L14/FR2L14'、FR2L15/FR2L15'、FR2L16/FR2L16'、FR2L17/FR2L17'、FR2L18/FR2L18'、FR2L19/FR2L19'、FR2L20/FR2L20'、FR2L21/FR2L21'、FR2L22/FR2L22'、FR2L23/FR2L23'、FR2L24/FR2L24'、FR2L25/FR2L25'、FR2L26/FR2L26'、FR2L27/FR2L27'、FR2L28/FR2L28'、FR2L29/FR2L29'、FR2L30/FR2L30'、FR2L31/FR2L31'、FR2L32/FR2L32'、FR2L33/FR2L33'、FR2L34/FR2L34'、FR2L35/FR2L35'、FR2L36/FR2L36'、FR2L37/FR2L37'、FR2L38/FR2L38'、FR2L39/FR2L39'、FR2L40/FR2L40'、FR2L41/FR2L41'、FR2L42/FR2L42'、FR2L43/FR2L43'、FR2L44/FR2L44'、FR2L45/FR2L45'、およびFR2L46/FR2L46'。PCR産物のプールがサブバンク2となる。

【０１２５】

限定ではなく一例として、軽鎖FR3サブバンクの構築は、表16および表17（すべて5'から3'の方向で表示され、名称に続いて配列を示す）に記載のオリゴヌクレオチドを用いたオーバーラップ伸長法によるポリメラーゼ連鎖反応によって行う。

【表１６】

表 16. 軽鎖 FR3 フォワードプライマー (サブバンク 3 用)

598	FR3L1 GGGGTCCCAGACAGATTCAGCGGCAGTGGGTCAGGCACTGATTTCACACTGAAAATCAG
599	FR3L2 GGGGTCCCAGACAGATTCAGCGGCAGTGGGTCAGGCACTGATTTCACACTGAAAATCAG
600	FR3L3 GGAGTGCCAGATAGGTTCAGTGGCAGCGGGTCAGGGACAGATTTCACACTGAAAATCAG
601	FR3L4 GGGGTCCCTGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTTACACTGAAAATCAG
602	FR3L5 GGAGTGCCAGATAGGTTCAGTGGCAGCGGGTCAGGGACAGATTTCACACTGAAAATCAG
603	FR3L6 GGGGTCCCAGACAGATTCAGTGGCAGTGGGGCAGGGACAGATTTCACACTGAAAATCAG
604	FR3L7 GGGGTCCCTGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTTACACTGAAAATCAG
605	FR3L8 GGAGTGCCAGATAGGTTCAGTGGCAGCGGGTCAGGGACAGATTTCACACTGAAAATCAG
606	FR3L9 GGGGTCCCAGACAGATTCAGTGGCAGTGGGGCAGGGACAGATTTCACACTGAAAATCAG
607	FR3L10 GGGGTCCCCTCGAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACCCTCACCATCAA
608	FR3L11 GGGGTCCCCTCGAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACCTTTACCATCAG
609	FR3L12 GGGGTCCCATCTCGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAG
610	FR3L13 GGGGTCCCCTCGAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACCCTCACCATCAA
611	FR3L14 GGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACAATCAG
612	FR3L15 GGAATCCCACCTCGATTCAGTGGCAGCGGGTATGGAACAGATTTTACCCTCACAATTAA
613	FR3L16 GGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAG
614	FR3L17 GGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGCACAGATTTCACTCTCACCATCAG
615	FR3L18 GGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACCATCAG
616	FR3L19 GGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACAATCAG
617	FR3L20 GGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAG
618	FR3L21 GGCATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACTCTCACCATCAG
619	FR3L22 GGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAG
620	FR3L23 GGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACTATCAG
621	FR3L24 GGTATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACTCTCACCATCAG
622	FR3L25 GGCATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGCCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAG

623 FR3L26
GGGGTCTCATCGAGGTTCAGTGGCAGGGGATCTGGGACGGATTTCACTCTCACCATCAT

624 FR3L27
GGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACGGATTACACTCTCACCATCAG

625 FR3L28
GGGGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAG

626 FR3L29
GGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAG

627 FR3L30
GGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAG

628 FR3L31
GGCATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAG

629 FR3L32
GGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACAATCAG

630 FR3L33
GGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAG

631 FR3L34
GGGGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAG

632 FR3L35
GGAGTCCCATCTCGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACTATCAG

633 FR3L36
GGGGTCCCATCAAGGTTCAGTGGAAGTGGATCTGGGACAGATTTTACTTTCACCATCAG

634 FR3L37
GGGGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAG

635 FR3L38
GGAGTCCCATCTCGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACTATCAG

636 FR3L39
GGGGTCCCATCAAGGTTCAGTGGAAGTGGATCTGGGACAGATTTTACTTTCACCATCAG

637 FR3L40
AGCATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAG

638 FR3L41
GGCATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAG

639 FR3L42
GGCATCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAG

640 FR3L43
GGCATCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAG

641 FR3L44
GGGGTCCCTGACCGATTCAGTGGCAGCGGGTCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAG

642 FR3L45
GGAGTCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCAGGCACTGATTTCACACTGAAAATCAG

643 FR3L46
GGAGTCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCAGGCACTGATTTCACACTGAAAATCAG

【表１７】

表 17. 軽鎖 FR3 リバースプライマー (サブバンク 3 用)

644	FR3L1'	GCAGTAATAAACCCCAACATCCTCAGCCTCCACCCTGCTGATTTTCAGTGTGAAA
645	FR3L2'	GCAGTAATAAACCCCAACATCCTCAGCCTCCACCCTGCTGATTTTCAGTGTGAAA
646	FR3L3	TCAGTAATAAACCCCAACATCCTCAGCCTCCACCCGGCTGATTTTCAGTGTGAAA
647	FR3L4'	GCAGTAATAAACCCCAACATCCTCAGCCTCCACTCTGCTGATTTTCAGTGTAAAA
648	FR3L5'	GCAGTAATAAACCCCAACATCCTCAGCCTCCACCCGGCTGATTTTCAGTGTGAAA
649	FR3L6'	GCAGTAATAAACCCCGACATCCTCAGCTTCCACCCTGCTGATTTTCAGTGTGAAA
650	FR3L7'	GCAGTAATAAACCCCAACATCCTCAGCCTCCACTCTGCTGATTTTCAGTGTAAAA
651	FR3L8'	GCAGTAATAAACTCCAAAATCCTCAGCCTCCACCCGGCTGATTTTCAGTGTGAAA
652	FR3L9'	GCAGTAATAAACCCCGACATCCTCAGCTTCCACCCTGCTGATTTTCAGTGTGAAA
653	FR3L10'	ACAGTAATACGTTGCAGCATCTTCAGCTTCCAGGCTATTGATGGTGAGGGTGAAA
654	FR3L11'	ACAGTAATATGTTGCAGCATCTTCAGCTTCCAGGCTACTGATGGTAAAGGTGAAA
655	FR3L12'	ACAGTAATAAGTTGCAACATCTTCAGGCTGCAGGCTGCTGATGGTGAGAGTGAAA
656	FR3L13'	ACAGTAATACGTTGCAGCATCTTCAGCTTCCAGGCTATTGATGGTGAGGGTGAAA
657	FR3L14'	ACAGTAATAAGTTGCAAAATCTTCAGGCTGCAGGCTGCTGATTGTGAGAGTGAAT
658	FR3L15'	ACAGAAGTAATATGCAGCATCCTCAGATTCTATGTTATTAATTGTGAGGGTAAAA
659	FR3L16'	GCAGTAATAAGTTGCAAAATCTTCAGGCTGCAGGCTGCTGATGGTGAGAGTGAAA
660	FR3L17'	ACAGTAATAAGTTGCAAAATCTTCAGGCTGCAGGCTGCTGATGGTGAGAGTGAAA
661	FR3L18'	GCAGTAATAAGTTGCAAAATCATCAGGCTGCAGGCTGCTGATGGTGAGAGTGAAT
662	FR3L19'	ACAGTAATAAGTTGCAAAATCTTCAGGCTGCAGGCTGCTGATTGTGAGAGTGAAT
663	FR3L20'	GCAGTAATAAGTTGCAAAATCTTCAGGCTGCAGGCTGCTGATGGTGAGAGTGAAA
664	FR3L21'	ACAGTAATAAACTGCAAAATCTTCAGACTGCAGGCTGCTGATGGTGAGAGTGAAC
665	FR3L22'	ACAGTAATAAGTTGCAAAATCTTCAGGCTGCAGGCTGCTGATGGTGAGAGTGAAA
666	FR3L23'	ACAATAGTAAGTTGCAAAATCTTCAGGCTGCAGGCTGCTGATAGTGAGAGTGAAA
667	FR3L24'	ACAGTAATAAACTGCAAAATCTTCAGACTGCAGGCTGCTGATGGTGAGAGTGAAC
668	FR3L25'	ACAGTAATAAACTGCAAAATCTTCAGGCTCTAGGCTGCTGATGGTGAGAGTGAAG
669	FR3L26'	ACAGTAATAAGCTGCAAAATCTTCAGGCTTCAGGCTGATGATGGTGAGAGTGAAA
670	FR3L27'	ACAGTAATAAGTTGCAAAATCTTCAGGCTGCAGGCTGCTGATGGTGAGAGTGTAA
671	FR3L28'	ACAGTAATAAGTTGCAAAATCTTCAGACTGCAGGCAACTGATGGTGAGAGTGAAA
672	FR3L29'	ACAGTAATAAGTTGCAAAATCTTCAGGCTGCAGGCTGCTGATGGTGAGAGTGAAA
673	FR3L30'	ACAATAGTAAGTTGCAAAATCTTCAGGCTGCAGGCTGCTGATGGTGAGAGTGAAA
674	FR3L31'	ACAGTAATAAACTGCAAAATCTTCAGGCTCTAGGCTGCTGATGGTGAGAGTGAAG
675	FR3L32'	ACAGTAATAAGTTGCAAAATCTTCAGGCTGCAGGCTGCTGATTGTGAGAGTGAAT
676	FR3L33'	ACAGTAATAAGTTGCAAAATCTTCAGACTGCAGGCAGCTGATGGTGAGAGTGAAA
677	FR3L34'	ACAGTAGTAAGTTGCAAAATCTTCAGGTTGCAGACTGCTGATGGTGAGAGTGAAA
678	FR3L35'	ACCGTAATAAGTTGCAACATCTTCAGGCTGCAGGCTGCTGATAGTGAGAGTGAAA
679	FR3L36'	ACAGTAATATGTTGCAATATCTTCAGGCTGCAGGCTGCTGATGGTGAAAGTAAAA
680	FR3L37'	ACAGTAGTAAGTTGCAAAATCTTCAGGTTGCAGACTGCTGATGGTGAGAGTGAAA
681	FR3L38'	ACCGTAATAAGTTGCAACATCTTCAGGCTGCAGGCTGCTGATAGTGAGAGTGAAA
682	FR3L39'	ACAGTAATATGTTGCAATATCTTCAGGCTGCAGGCTGCTGATGGTGAAAGTAAAA
683	FR3L40'	ACAGTAATAAACTGCAAAATCTTCAGGCTGCAGGCTGCTGATGGTGAGAGTGAAG
684	FR3L41'	ACAGTAATAAACTGCAAAATCTTCAGGCTGCAGGCTGCTGATGGTGAGAGTGAAG

685	FR3L42'	ACAGTAATACACTGCAAAATCTTCAGGCTCCAGTCTGCTGATGGTGAGAGTGAAG
686	FR3L43'	ACAGTAATACACTGCAAAATCTTCAGGCTCCAGTCTGCTGATGGTGAGAGTGAAG
687	FR3L44'	ACAGTAATAAACTGCCACATCTTCAGCCTGCAGGCTGCTGATGGTGAGAGTGAAA
688	FR3L45'	GCAGTAATAAACTCCAACATCCTCAGCCTCCACCCTGCTGATTTTCAGTGTGAAA
689	FR3L46'	GCAGTAATAAACTCCAACATCCTCAGCCTCCACCCTGCTGATTTTCAGTGTGAAA

【０１２６】

PCRは、下記のオリゴヌクレオチドの組合せで実施する（全部で46組）：FR3L1/FR3L1'、FR3L2/FR3L2'、FR3L3/FR3L3'、FR3L4/FR3L4'、FR3L5/FR3L5'、FR3L6/FR3L6'、FR3L7/FR3L7'、FR3L8/FR3L8'、FR3L9/FR3L9'、FR3L10/FR3L10'、FR3L11/FR3L11'、FR3L12/FR3L12'、FR3L13/FR3L13'、FR3L14/FR3L14'、FR3L15/FR3L15'、FR3L16/FR3L16'、FR3L17/FR3L17'、FR3L18/FR3L18'、FR3L19/FR3L19'、FR3L20/FR3L20'、FR3L21/FR3L21'、FR3L22/FR3L22'、FR3L23/FR3L23'、FR3L24/FR3L24'、FR3L25/FR3L25'、FR3L26/FR3L26'、FR3L27/FR3L27'、FR3L28/FR3L28'、FR3L29/FR3L29'、FR3L30/FR3L30'、FR3L31/FR3L31'、FR3L32/FR3L32'、FR3L33/FR3L33'、FR3L34/FR3L34'、FR3L35/FR3L35'、FR3L36/FR3L36'、FR3L37/FR3L37'、FR3L38/FR3L38'、FR3L39/FR3L39'、FR3L40/FR3L40'、FR3L41/FR3L41'、FR3L42/FR3L42'、FR3L43/FR3L43'、FR3L44/FR3L44'、FR3L45/FR3L45'、およびFR3L46/FR3L46'。PCR産物のプールがサブバンク3となる。

【０１２７】

限定ではなく一例として、軽鎖FR4サブバンクの構築は、表18および表19（すべて5'から3'の方向で表示され、名称に続いて配列を示す）に記載のオリゴヌクレオチドを用いたオーバーラップ伸長法によるポリメラーゼ連鎖反応によって行う。

【表１８】

表 18. 軽鎖 FR4 フォワードプライマー (サブバンク 4 用)

690	FR4L1	TTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA
691	FR4L2	TTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA
692	FR4L3	TTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAA
693	FR4L4	TTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA
694	FR4L5	TTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAA

【表１９】

表 19. 軽鎖 FR4 リバースプライマー (サブバンク 4 用)

695	FR4L1'	TTTGATTTCCACCTTGGTCCCTTGGCCGAA
696	FR4L2'	TTTGATCTCCAGCTTGGTCCCCTGGCCAAA
697	FR4L3'	TTTGATATCCACTTTGGTCCCAGGGCCGAA
698	FR4L4'	TTTGATCTCCACCTTGGTCCCTCCGCCGAA
699	FR4L5'	TTTAATCTCCAGTCGTGTCCCTTGGCCGAA

【０１２８】

PCRは、下記のオリゴヌクレオチドの組合せで実施する（全部で5組）：FR4L1/FR4L1'、FR4L2/FR4L2'、FR4L3/FR4L3'、FR4L4/FR4L4'、またはFR4L5/FR4L5'。PCR産物のプールがサブバンク4となる。

【０１２９】

2.2.2 重鎖フレームワークのサブバンクの作製

いくつかの実施形態において、重鎖FRサブバンク5、6、7および11が構築されるが、サブバンク5は、ヌクレオチド配列を含む複数の核酸配列を含んでなり、それぞれのヌクレオチド配列は重鎖FR1をコードする；サブバンク6はヌクレオチド配列を含む複数の核酸配列を含んでなり、各ヌクレオチド配列は重鎖FR2をコードする；サブバンク7はヌクレオチド配列を含む複数の核酸配列を含んでなり、各ヌクレオチド配列は重鎖FR3をコードする；ならびにサブバンク11はヌクレオチド配列を含む複数の核酸配列を含んでなり、各ヌクレオチド配列は重鎖FR4をそれぞれコードする；前記において、重鎖FR1、FR2およびFR3は、CDR H1およびH2に関するKabatの定義にしたがって定義される。いくつかの実施形態において、FR配列は機能性ヒト抗体配列に由来する。他の実施形態において、FR配列はヒト生殖系列重鎖配列に由来する。

【０１３０】

限定ではなく例示として、下記は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を用いて4つの重鎖FRサブバンクを作製する方法を説明するものであって、ヒト生殖系列重鎖配列をテンプレートとして使用する。重鎖FRサブバンク5、6および7（それぞれFR1、2、3をコードする）は、44個のヒト生殖系列重鎖配列（VH1-18、VH1-2、VH1-24、VH1-3、VH1-45、VH1-46、VH1-58、VH1-69、VH1-8、VH2-26、VH2-5、VH2-70、VH3-11、VH3-13、VH3-15、VH3-16、VH3-20、VH3-21、VH3-23、VH3-30、VH3-33、VH3-35、VH3-38、VH3-43、VH3-48、VH3-49、VH3-53、VH3-64、VH3-66、VH3-7、VH3-72、VH3-73、VH3-74、VH3-9、VH4-28、VH4-31、VH4-34、VH4-39、VH4-4、VH4-59、VH4-61、VH5-51、VH6-1およびVH7-81）を包含する。Matsudaら、1998、J. Exp. Med., 188: 1973-1975を参照されたい。配列はNCBIウェブサイトに取りまとめられている：
www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/showGermline.cgi?organism=human&chainType=VH&seqType=nucleotide。重鎖FRサブバンク11（FR4をコードする）は、6個のヒト生殖系列重鎖配列（JH1、JH2、JH3、JH4、JH5およびJH6）を包含する。Ravetchら、1981、Cell 27(3 Pt 2):583-591を参照されたい。配列はNCBIウェブサイトに取りまとめられている：
www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/showGermline.cgi?organism=human&chainType=VH&seqType=nucleotide。

【０１３１】

限定ではなく一例として、重鎖FR1サブバンク（Kabatの定義による）の構築は、表20および表21（すべて5’から3’の方向で表示され、名称に続いて配列を示す）に記載のオリゴヌクレオチドを用いたオーバーラップ伸長法によるポリメラーゼ連鎖反応によって行う。

【表２０】

表 20. 重鎖 FR1 (Kabat 定義) フォワードプライマー (サブバンク 5 用):

700	FR1HK1 CAGGTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGT
701	FR1HK2 CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGT
702	FR1HK3 CAGGTCCAGCTGGTACAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGT
703	FR1HK4 CAGGTTCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGT
704	FR1HK5 CAGATGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGACTGGGTCCTCAGTGAAGGT
705	FR1HK6 CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGT
706	FR1HK7 CAAATGCAGCTGGTGCAGTCTGGGCCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGACCTCAGTGAAGGT
707	FR1HK8 CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCGGTGAAGGT
708	FR1HK9 CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGT
709	FR1HK10 CAGGTCACCTTGAAGGAGTCTGGTCCTGTGCTGGTGAAACCCACAGAGACCCTCACGCT
710	FR1HK11 CAGATCACCTTGAAGGAGTCTGGTCCTACGCTGGTGAAACCCACACAGACCCTCACGCT
711	FR1HK12 CAGGTCACCTTGAGGGAGTCTGGTCCTGCGCTGGTGAAACCCACACAGACCCTCACACT
712	FR1HK13 CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACT
713	FR1HK14 GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACT
714	FR1HK15 GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTAAAGCCTGGGGGGTCCCTTAGACT
715	FR1HK16 GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACT
716	FR1HK17 GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGTGTGGTACGGCCTGGGGGGTCCCTGAGACT
717	FR1HK18 GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCCTGGTCAAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACT
718	FR1HK19 GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACT
719	FR1HK20 CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACT
720	FR1HK21 CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACT
721	FR1HK22 GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGATCCCTGAGACT
722	FR1HK23 GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTAGGGGGTCCCTGAGACT
723	FR1HK24 GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGTCGTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACT
724	FR1HK25 GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACT

725 FR1HK26
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCAGGGCGGTCCCTGAGACT

726 FR1HK27
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGGCTTGATCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACT

727 FR1HK28
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACT

728 FR1HK29
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGGCTTGATCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACT

729 FR1HK30
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACT

730 FR1HK31
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACT

731 FR1HK32
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAAACT

732 FR1HK33
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGGGGAGGCTTAGTTCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACT

733 FR1HK34
GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGACT

734 FR1HK35
CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGACACCCTGTCCCT

735 FR1HK36
CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCT

736 FR1HK37
CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCT

737 FR1HK38
CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCT

738 FR1HK39
CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCT

739 FR1HK40
CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCT

740 FR1HK41
CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCT

741 FR1HK42
GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCCGGGGAGTCTCTGAAGAT

742 FR1HK43
CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGCAGACCCTCTCACT

743 FR1HK44
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCCATGAGGTGAAGCAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGT

【表２１】

表 21. 重鎖 FR1 (Kabat 定義) リバースプライマー (サブバンク 5 用):

744	FR1HK1'	GGTAAAGGTGTAACCAGAAGCCTTGCAGGAGACCTTCACTGAGGCCCCAGGC
745	FR1HK2'	GGTGAAGGTGTATCCAGAAGCCTTGCAGGAGACCTTCACTGAGGCCCCAGGC
746	FR1HK3'	AGTGAGGGTGTATCCGGAAACCTTGCAGGAGACCTTCACTGAGGCCCCAGGC
747	FR1HK4'	AGTGAAGGTGTATCCAGAAGCCTTGCAGGAAACCTTCACTGAGGCCCCAGGC
748	FR1HK5'	GGTGAAGGTGTATCCGGAAGCCTTGCAGGAAACCTTCACTGAGGACCCAGTC
749	FR1HK6'	GGTGAAGGTGTATCCAGATGCCTTGCAGGAAACCTTCACTGAGGCCCCAGGC
750	FR1HK7'	AGTAAAGGTGAATCCAGAAGCCTTGCAGGAGACCTTCACTGAGGTCCCAGGC
751	FR1HK8'	GCTGAAGGTGCCTCCAGAAGCCTTGCAGGAGACCTTCACCGAGGACCCAGGC
752	FR1HK9'	GGTGAAGGTGTATCCAGAAGCCTTGCAGGAGACCTTCACTGAGGCCCCAGGC
753	FR1HK10'	GCTGAGTGAGAACCCAGAGACGGTGCAGGTCAGCGTGAGGGTCTCTGTGGGT
754	FR1HK11'	GCTGAGTGAGAACCCAGAGAAGGTGCAGGTCAGCGTGAGGGTCTGTGTGGGT
755	FR1HK12'	GCTGAGTGAGAACCCAGAGAAGGTGCAGGTCAGTGTGAGGGTCTGTGTGGGT
756	FR1HK13'	ACTGAAGGTGAATCCAGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCCTCCAGGC
757	FR1HK14'	ACTGAAGGTGAATCCAGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCCCCCAGGC
758	FR1HK15'	ACTGAAAGTGAATCCAGAGGCTGCACAGGAGAGTCTAAGGGACCCCCCAGGC
759	FR1HK16'	ACTGAAGGTGAATCCAGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCCCCCAGGC
760	FR1HK17'	ATCAAAGGTGAATCCAGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCCCCCAGGC
761	FR1HK18'	ACTGAAGGTGAATCCAGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCCCCCAGGC
762	FR1HK19'	GCTAAAGGTGAATCCAGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCCCCCAGGC
763	FR1HK20'	ACTGAAGGTGAATCCAGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCTCCCAGGC
764	FR1HK21'	ACTGAAGGTGAATCCAGACGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCTCCCAGGC
765	FR1HK22'	ACTGAAGGTGAATCCAGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGATCCCCCAGGC
766	FR1HK23'	ACTGACGGTGAATCCAGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCCCCTAGGC
767	FR1HK24'	ATCAAAGGTGAATCCAGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCCCCCAGGC
768	FR1HK25'	ACTGAAGGTGAATCCAGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCCCCCAGGC
769	FR1HK26'	ACCAAAGGTGAATCCAGAAGCTGTACAGGAGAGTCTCAGGGACCGCCCTGGC
770	FR1HK27'	ACTGACGGTGAACCCAGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCCCCCAGGC
771	FR1HK28'	ACTGAAGGTGAATCCAGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCCCCCAGGC
772	FR1HK29'	ACTGACGGTGAACCCAGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCCCCCAGGC
773	FR1HK30'	ACTAAAGGTGAATCCAGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCCCCCAGGC
774	FR1HK31'	ACTGAAGGTGAATCCAGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCCTCCAGGC
775	FR1HK32'	ACTGAAGGTGAACCCAGAGGCTGCACAGGAGAGTTTCAGGGACCCCCCAGGC
776	FR1HK33'	ACTGAAGGTGAATCCAGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCCCCCAGGC
777	FR1HK34'	ATCAAAGGTGAATCCAGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCTGCCAGGC
778	FR1HK35'	GCTGATGGAGTAACCAGAGACAGCGCAGGTGAGGGACAGGGTGTCCGAAGGC
779	FR1HK36'	GCTGATGGAGCCACCAGAGACAGTACAGGTGAGGGACAGGGTCTGTGAAGGC
780	FR1HK37'	ACTGAAGGACCCACCATAGACAGCGCAGGTGAGGGACAGGGTCTCCGAAGGC
781	FR1HK38'	GCTGATGGAGCCACCAGAGACAGTGCAGGTGAGGGACAGGGTCTCCGAAGGC
782	FR1HK39'	ACTGATGGAGCCACCAGAGACAGTGCAGGTGAGGGACAGGGTCTCCGAAGGC
783	FR1HK40'	ACTGATGGAGCCACCAGAGACAGTGCAGGTGAGGGACAGGGTCTCCGAAGGC
784	FR1HK41'	GCTGACGGAGCCACCAGAGACAGTGCAGGTGAGGGACAGGGTCTCCGAAGGC

785	FR1HK42'	GGTAAAGCTGTATCCAGAACCCTTACAGGAGATCTTCAGAGACTCCCCGGGC
786	FR1HK43'	AGAGACACTGTCCCCGGAGATGGCACAGGTGAGTGAGAGGGTCTGCGAGGGC
787	FR1HK44'	GGTGAAACTGTAACCAGAAGCCTTGCAGGAGACCTTCACTGAGGCCCCAGGC

【０１３２】

PCRは、下記のオリゴヌクレオチドの組合せで実施する（全部で44組）：FR1HK1/FR1HK1'、FR1HK2/FR1HK2'、FR1HK3/FR1HK3'、FR1HK4/FR1HK4'、FR1HK5/FR1HK5'、FR1HK6/FR1HK6'、FR1HK7/FR1HK7'、FR1HK8/FR1HK8'、FR1HK9/FR1HK9'、FR1HK10/FR1HK10'、FR1HK11/FR1HK11'、FR1HK12/FR1HK12'、FR1HK13/FR1HK13'、FR1HK14/FR1HK14'、FR1HK15/FR1HK15'、FR1HK16/FR1HK16'、FR1HK17/FR1HK17'、FR1HK18/FR1HK18'、FR1HK19/FR1HK19'、FR1HK20/FR1HK20'、FR1HK21/FR1HK21'、FR1HK22/FR1HK22'、FR1HK23/FR1HK23'、FR1HK24/FR1HK24'、FR1HK25/FR1HK25'、FR1HK26/FR1HK26'、FR1HK27/FR1HK27'、FR1HK28/FR1HK28'、FR1HK29/FR1HK29'、FR1HK30/FR1HK30'、FR1HK31/FR1HK31'、FR1HK32/FR1HK32'、FR1HK33/FR1HK33'、FR1HK34/FR1HK34'、FR1HK35/FR1HK35'、FR1HK36/FR1HK36'、FR1HK37/FR1HK37'、FR1HK38/FR1HK38'、FR1HK39/FR1HK39'、FR1HK40/FR1HK40'、FR1HK41/FR1HK41'、FR1HK42/FR1HK42'、FR1HK43/FR1HK43'、またはFR1HK44/FR1HK44'。PCR産物のプールがサブバンク5となる。

【０１３３】

限定ではなく一例として、重鎖FR2サブバンク（Kabatの定義による）の構築は、表22および表23（すべて5'から3'の方向で表示され、名称に続いて配列を示す）に記載のオリゴヌクレオチドを用いたオーバーラップ伸長法によるポリメラーゼ連鎖反応によって行う。

【表２２】

表 22. 重鎖 FR2 (Kabat 定義) フォワードプライマー (サブバンク 6 用):

788	FR2HK1	TGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTG
789	FR2HK2	TGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTG
790	FR2HK3	TGGGTGCGACAGGCTCCTGGAAAAGGGCTTG
791	FR2HK4	TGGGTGCGCCAGGCCCCCGGACAAAGGCTTG
792	FR2HK5	TGGGTGCGACAGGCCCCCGGACAAGCGCTTG
793	FR2HK6	TGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTG
794	FR2HK7	TGGGTGCGACAGGCTCGTGGACAACGCCTTG
795	FR2HK8	TGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTG
796	FR2HK9	TGGGTGCGACAGGCCACTGGACAAGGGCTTG
797	FR2HK10	TGGATCCGTCAGCCCCCAGGGAAGGCCCTGG
798	FR2HK11	TGGATCCGTCAGCCCCCAGGAAAGGCCCTGG
799	FR2HK12	TGGATCCGTCAGCCCCCAGGGAAGGCCCTGG
800	FR2HK13	TGGATCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGG
801	FR2HK14	TGGGTCCGCCAAGCTACAGGAAAAGGTCTGG
802	FR2HK15	TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGG
803	FR2HK16	TGGGCCCGCAAGGCTCCAGGAAAGGGGCTGG
804	FR2HK17	TGGGTCCGCCAAGCTCCAGGGAAGGGGCTGG
805	FR2HK18	TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGG
806	FR2HK19	TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGG
807	FR2HK20	TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGG
808	FR2HK21	TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGG
809	FR2HK22	TGGGTCCATCAGGCTCCAGGAAAGGGGCTGG
810	FR2HK23	TGGATCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGG
811	FR2HK24	TGGGTCCGTCAAGCTCCGGGGAAGGGTCTGG
812	FR2HK25	TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGG
813	FR2HK26	TGGTTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGG
814	FR2HK27	TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGG
815	FR2HK28	TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGACTGG
816	FR2HK29	TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGG
817	FR2HK30	TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGG
818	FR2HK31	TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGG
819	FR2HK32	TGGGTCCGCCAGGCTTCCGGGAAAGGGCTGG
820	FR2HK33	TGGGTCCGCCAAGCTCCAGGGAAGGGGCTGG
821	FR2HK34	TGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCTGG
522	FR2HK35	TGGATCCGGCAGCCCCCAGGGAAGGGACTGG
823	FR2HK36	TGGATCCGCCAGCACCCAGGGAAGGGCCTGG
824	FR2HK37	TGGATCCGCCAGCCCCCAGGGAAGGGGCTGG
825	FR2HK38	TGGATCCGCCAGCCCCCAGGGAAGGGGCTGG
826	FR2HK39	TGGATCCGGCAGCCCGCCGGGAAGGGACTGG
827	FR2HK40	TGGATCCGGCAGCCCCCAGGGAAGGGACTGG
828	FR2HK41	TGGATCCGGCAGCCCCCAGGGAAGGGACTGG

829	FR2HK42	TGGGTGCGCCAGATGCCCGGGAAAGGCCTGG
830	FR2HK43	TGGATCAGGCAGTCCCCATCGAGAGGCCTTG
831	FR2HK44	TGGGTGCCACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTG

【表２３】

表 23. 重鎖 FR2 (Kabat 定義) リバースプライマー (サブバンク 6 用):

832	FR2HK1'	TCCCATCCACTCAAGCCCTTGTCCAGGGGCCT
833	FR2HK2'	TCCCATCCACTCAAGCCCTTGTCCAGGGGCCT
834	FR2HK3'	TCCCATCCACTCAAGCCCTTTTCCAGGAGCCT
835	FR2HK4'	TCCCATCCACTCAAGCCTTTGTCCGGGGGCCT
836	FR2HK5'	TCCCATCCACTCAAGCGCTTGTCCGGGGGCCT
837	FR2HK6'	TCCCATCCACTCAAGCCCTTGTCCAGGGGCCT
838	FR2HK7'	TCCTATCCACTCAAGGCGTTGTCCACGAGCCT
839	FR2HK8'	TCCCATCCACTCAAGCCCTTGTCCAGGGGCCT
840	FR2HK9'	TCCCATCCACTCAAGCCCTTGTCCAGTGGCCT
841	FR2HK10'	TGCAAGCCACTCCAGGGCCTTCCCTGGGGGCT
842	FR2HK11'	TGCAAGCCACTCCAGGGCCTTTCCTGGGGGCT
843	FR2HK12'	TGCAAGCCACTCCAGGGCCTTCCCTGGGGGCT
844	FR2HK13'	TGAAACCCACTCCAGCCCCTTCCCTGGAGCCT
845	FR2HK14'	TGAGACCCACTCCAGACCTTTTCCTGTAGCTT
846	FR2HK15'	GCCAACCCACTCCAGCCCCTTCCCTGGAGCCT
847	FR2HK16'	CGATACCCACTCCAGCCCCTTTCCTGGAGCCT
848	FR2HK17'	AGAGACCCACTCCAGCCCCTTCCCTGGAGCTT
849	FR2HK18'	TGAGACCCACTCCAGCCCCTTCCCTGGAGCCT
850	FR2HK19'	TGAGACCCACTCCAGCCCCTTCCCTGGAGCCT
851	FR2HK20'	TGCCACCCACTCCAGCCCCTTGCCTGGAGCCT
852	FR2HK21'	TGCCACCCACTCCAGCCCCTTGCCTGGAGCCT
853	FR2HK22'	CGATACCCACTCCAGCCCCTTTCCTGGAGCCT
854	FR2HK23'	TGAGACCCACTCCAGCCCCTTCCCTGGAGCCT
855	FR2HK24'	AGAGACCCACTCCAGACCCTTCCCCGGAGCTT
856	FR2HK25'	TGAAACCCACTCCAGCCCCTTCCCTGGAGCCT
857	FR2HK26'	ACCTACCCACTCCAGCCCCTTCCCTGGAGCCT
858	FR2HK27'	TGAGACCCACTCCAGCCCCTTCCCTGGAGCCT
859	FR2HK28'	TGAAACATATTCCAGTCCCTTCCCTGGAGCCT
860	FR2HK29'	TGAGACCCACTCCAGCCCCTTCCCTGGAGCCT
861	FR2HK30	GGCCACCCACTCCAGCCCCTTCCCTGGAGCCT
862	FR2HK31'	GCCAACCCACTCCAGCCCCTTCCCTGGAGCCT
863	FR2HK32'	GCCAACCCACTCCAGCCCTTTCCCGGAAGCCT
864	FR2HK33'	TGAGACCCACACCAGCCCCTTCCCTGGAGCTT
865	FR2HK34'	TGAGACCCACTCCAGGCCCTTCCCTGGAGCTT
866	FR2HK35'	CCCAATCCACTCCAGTCCCTTCCCTGGGGGCT
867	FR2HK36'	CCCAATCCACTCCAGGCCCTTCCCTGGGTGCT
868	FR2HK37'	CCCAATCCACTCCAGCCCCTTCCCTGGGGGCT
869	FR2HK38'	CCCAATCCACTCCAGCCCCTTCCCTGGGGGCT

870	FR2HK39'	CCCAATCCACTCCAGTCCCTTCCCGGCGGGCT
871	FR2HK40'	CCCAATCCACTCCAGTCCCTTCCCTGGGGGCT
872	FR2HK41'	CCCAATCCACTCCAGTCCCTTCCCTGGGGGCT
873	FR2HK42'	CCCCATCCACTCCAGGCCTTTCCCGGGCATCT
874	FR2HK43'	TCCCAGCCACTCAAGGCCTCTCGATGGGGACT
875	FR2HK44'	TCCCATCCACTCAAGCCCTTGTCCAGGGGCCT

【０１３４】

PCRは、下記のオリゴヌクレオチドの組合せで実施する（全部で44組）：FR2HK1/FR2HK1’、FR2HK2/FR2HK2’、FR2HK3/FR2HK3’、FR2HK4/FR2HK4’、FR2HK5/FR2HK5’、FR2HK6/FR2HK6’、FR2HK7/FR2HK7’、FR2HK8/FR2HK8’、FR2HK9/FR2HK9’、FR2HK10/FR2HK10’、FR2HK11/FR2HK11’、FR2HK12/FR2HK12’、FR2HK13/FR2HK13’、FR2HK14/FR2HK14’、FR2HK15/FR2HK15’、FR2HK16/FR2HK16’、FR2HK17/FR2HK17’、FR2HK18/FR2HK18’、FR2HK19/FR2HK19’、FR2HK20/FR2HK20’、FR2HK21/FR2HK21’、FR2HK22/FR2HK22’、FR2HK23/FR2HK23’、FR2HK24/FR2HK24’、FR2HK25/FR2HK25’、FR2HK26/FR2HK26’、FR2HK27/FR2HK27’、FR2HK28/FR2HK28’、FR2HK29/FR2HK29’、FR2HK30/FR2HK30’、FR2HK31/FR2HK31’、FR2HK32/FR2HK32’、FR2HK33/FR2HK33’、FR2HK34/FR2HK34’、FR2HK35/FR2HK35’、FR2HK36/FR2HK36’、FR2HK37/FR2HK37’、FR2HK38/FR2HK38’、FR2HK39/FR2HK39’、FR2HK40/FR2HK40’、FR2HK41/FR2HK41’、FR2HK42/FR2HK42’、FR2HK43/FR2HK43’、またはFR2HK44/FR2HK44’。PCR産物のプールがサブバンク6となる。

【０１３５】

限定ではなく一例として、重鎖FR3サブバンク（Kabatの定義による）の構築は、表24および表25（すべて5’から3’の方向で表示され、名称に続いて配列を示す）に記載のオリゴヌクレオチドを用いたオーバーラップ伸長法によるポリメラーゼ連鎖反応によって行う。

【表２４】

表 24. 重鎖 FR3 (Kabat 定義) フォワードプライマー (サブバンク 7 用):

876	FR3HK1	AGAGTCACCATGACCACAGACACATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCTG
877	FR3HK2	AGGGTCACCATGACCAGGGACACGTCCATCAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGGCTGAGATCTG
878	FR3HK3	AGAGTCACCATGACCGAGGACACATCTACAGACACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTG
879	FR3HK4	AGAGTCACCATTACCAGGGACACATCCGCGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTG
880	FR3HK5	AGAGTCACCATTACCAGGGACAGGTCTATGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTG
881	FR3HK6	AGAGTCACCATGACCAGGGACACGTCCACGAGCACAGTCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTG
882	FR3HK7	AGAGTCACCATTACCAGGGACATGTCCACAAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCCG
883	FR3HK8	AGAGTCACGATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTG
884	FR3HK9	AGAGTCACCATGACCAGGAACACCTCCATAAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTG
885	FR3HK10	AGGCTCACCATCTCCAAGGACACCTCCAAAAGCCAGGTGGTCCTTACCATGACCAACATGGACCCTG
886	FR3HK11	AGGCTCACCATCACCAAGGACACCTCCAAAAACCAGGTGGTCCTTACAATGACCAACATGGACCCTG
887	FR3HK12	AGGCTCACCATCTCCAAGGACACCTCCAAAAACCAGGTGGTCCTTACAATGACCAACATGGACCCTG
888	FR3HK13	CGATTCACCATCTCCAGGGACAACGCCAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCG
889	FR3HK14	CGATTCACCATCTCCAGAGAAAATGCCAAGAACTCCTTGTATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCCG
890	FR3HK15	AGATTCACCATCTCAAGAGATGATTCAAAAAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAAACCG
891	FR3HK16	CGATTCATCATCTCCAGAGACAATTCCAGGAACTCCCTGTATCTGCAAAAGAACAGACGGAGAGCCG
892	FR3HK17	CGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCCG
893	FR3HK18	CGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCG
894	FR3HK19	CGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCG
895	FR3HK20	CGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTG
896	FR3HK21	CGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCG
897	FR3HK22	CGATTCATCATCTCCAGAGACAATTCCAGGAACACCCTGTATCTGCAAACGAATAGCCTGAGGGCCG
898	FR3HK23	AGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTTCAAATGAACAACCTGAGAGCTG
899	FR3HK24	CGATTCACCATCTCCAGAGACAACAGCAAAAACTCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAACTG
900	FR3HK25	CGATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGACG
901	FR3HK26	AGATTCACCATCTCAAGAGATGATTCCAAAAGCATCGCCTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAAACCG
902	FR3HK27	CGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCCG
903	FR3HK28	AGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTTCAAATGGGCAGCCTGAGAGCTG
904	FR3HK29	CGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCTG
905	FR3HK30	CGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCG
906	FR3HK31	AGATTCACCATCTCAAGAGATGATTCAAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAAACCG
907	FR3HK32	AGGTTCACCATCTCCAGAGATGATTCAAAGAACACGGCGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAAACCG
908	FR3HK33	CGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCCG
909	FR3HK34	CGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCTG
910	FR3HK35	CGAGTCACCATGTCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCG
911	FR3HK36	CGAGTTACCATATCAGTAGACACGTCTAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACTGCCG
912	FR3HK37	CGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCG
913	FR3HK38	CGAGTCACCATATCCGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCG
914	FR3HK39	CGAGTCACCATGTCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCG
915	FR3HK40	CGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCTG
916	FR3HK41	CGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCTG
917	FR3HK42	CAGGTCACCATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTACCTGCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCT
918	FR3HK43	CGAATAACCATCAACCCAGACACATCCAAGAACCAGTTCTCCCTGCAGCTGAACTCTGTGACTCCCG
919	FR3HK44	CGGTTTGTCTTCTCCATGGACACCTCTGCCAGCACAGCATACCTGCAGATCAGCAGCCTAAAGGCTG

【表２５】

表 25. 重鎖 FR3 (Kabat 定義) リバースプライマー (サブバンク 7 用):

920	FR3HK1'	TCTCGCACAGTAATACACGGCCGTGTCGTCAGATCTCAGGCTCCTCAGCT
921	FR3HK2'	TCTCGCACAGTAATACACGGCCGTGTCGTCAGATCTCAGCCTGCTCAGCT
922	FR3HK3'	TGTTGCACAGTAATACACGGCCGTGTCCTCAGATCTCAGGCTGCTCAGCT
923	FR3HK4'	TCTCGCACAGTAATACACAGCCATGTCCTCAGATCTCAGGCTGCTCAGCT
924	FR3HK5'	TCTTGCACAGTAATACATGGCTGTGTCCTCAGATCTCAGGCTGCTCAGCT
925	FR3HK6'	TCTCGCACAGTAATACACGGCCGTGTCCTCAGATCTCAGGCTGCTCAGCT
926	FR3HK7'	TGCCGCACAGTAATACACGGCCGTGTCCTCGGATCTCAGGCTGCTCAGCT
927	FR3HK8'	TCTCGCACAGTAATACACGGCCGTGTCCTCAGATCTCAGGCTGCTCAGCT
928	FR3HK9'	TCTCGCACAGTAATACACGGCCGTGTCCTCAGATCTCAGGCTGCTCAGCT
929	FR3HK10'	CCGTGCACAGTAATATGTGGCTGTGTCCACAGGGTCCATGTTGGTCATGG
930	FR3HK11'	GTGTGCACAGTAATATGTGGCTGTGTCCACAGGGTCCATGTTGGTCATTG
931	FR3HK12'	CCGTGCACAATAATACGTGGCTGTGTCCACAGGGTCCATGTTGGTCATTG
932	FR3HK13'	TCTCGCACAGTAATACACGGCCGTGTCCTCGGCTCTCAGGCTGTTCATTT
933	FR3HK14'	TCTTGCACAGTAATACACAGCCGTGTCCCCGGCTCTCAGGCTGTTCATTT
934	FR3HK15'	TGTGGTACAGTAATACACGGCTGTGTCCTCGGTTTTCAGGCTGTTCATTT
935	FR3HK16'	TCTCACACAGTAATACACAGCCATGTCCTCGGCTCTCCGTCTGTTCTTTT
936	FR3HK17'	TCTCGCACAGTGATACAAGGCCGTGTCCTCGGCTCTCAGACTGTTCATTT
937	FR3HK18'	TCTCGCACAGTAATACACAGCCGTGTCCTCGGCTCTCAGGCTGTTCATTT
938	FR3HK19'	TTTCGCACAGTAATATACGGCCGTGTCCTCGGCTCTCAGGCTGTTCATTT
939	FR3HK20'	TCTCGCACAGTAATACACAGCCGTGTCCTCAGCTCTCAGGCTGTTCATTT
940	FR3HK21'	CTCGCACAGTAATACACAGCCGTGTCCTCGGCTCTCAGGCTGTTCATTT
941	FR3HK22'	TCTCACACAGTAATACACAGCCGTGTCCTCGGCCCTCAGGCTATTCGTTT
942	FR3HK23'	TCTGGCACAGTAATACACGGCCGTGCCCTCAGCTCTCAGGTTGTTCATTT
943	FR3HK24'	TTTTGCACAGTAATACAAGGCGGTGTCCTCAGTTCTCAGACTGTTCATTT
944	FR3HK25'	TCTCGCACAGTAATACACAGCCGTGTCCTCGTCTCTCAGGCTGTTCATTT
945	FR3HK26'	TCTAGTACAGTAATACACGGCTGTGTCCTCGGTTTTCAGGCTGTTCATTT
946	FR3HK27'	TCTCGCACAGTAATACACGGCCGTGTCCTCGGCTCTCAGGCTGTTCATTT
947	FR3HK28'	TCTCGCACAGTAATACACAGCCATGTCCTCAGCTCTCAGGCTGCCCATTT
948	FR3HK29'	TCTCGCACAGTAATACACAGCCGTGTCCTCAGCTCTCAGGCTGTTCATTT
949	FR3HK30'	TCTCGCACAGTAATACACAGCCGTGTCCTCGGCTCTCAGGCTGTTCATTT
950	FR3HK31'	TCTAGCACAGTAATACACGGCCGTGTCCTCGGTTTTCAGGCTGTTCATTT
951	FR3HK32'	TCTAGTACAGTAATACACGGCCGTGTCCTCGGTTTTCAGGCTGTTCATTT
952	FR3HK33'	TCTTGCACAGTAATACACAGCCGTGTCCTCGGCTCTCAGACTGTTCATTT

953	FR3HK34'	TTTTGCACAGTAATACAAGGCCGTGTCCTCAGCTCTCAGACTGTTCATTT
954	FR3HK35'	TCTCGCACAGTAATACACGGCCGTGTCCACGGCGGTCACAGAGCTCAGCT
955	FR3HK36'	TCTCGCACAGTAATACACGGCCGTGTCCGCGGCAGTCACAGAGCTCAGCT
956	FR3HK37'	TCTCGCACAGTAATACACAGCCGTGTCCGCGGCGGTCACAGAGCTCAGCT
957	FR3HK38'	TCTCGCACAGTAATACACAGCCGTGTCTGCGGCGGTCACAGAGCTCAGCT
958	FR3HK39'	TCTCGCACAGTAATACACGGCCGTGTCCGCGGCGGTCACAGAGCTCAGCT
959	FR3HK40'	TCTCGCACAGTAATACACGGCCGTGTCCGCAGCGGTCACAGAGCTCAGCT
960	FR3HK41'	TCTCGCACAGTAATACACGGCCGTGTCCGCAGCGGTCACAGAGCTCAGCT
961	FR3HK42'	TCTCGCACAGTAATACATGGCGGTGTCCGAGGCCTTCAGGCTGCTCCACT
962	FR3HK43'	TCTTGCACAGTAATACACAGCCGTGTCCTCGGGAGTCACAGAGTTCAGCT
963	FR3HK44'	TCTCGCACAGTAATACATGGCCATGTCCTCAGCCTTTAGGCTGCTGATCT

【０１３６】

PCRは、下記のオリゴヌクレオチドの組合せで実施する（全部で44組）：FR3HK1/FR3HK1'、FR3HK2/FR3HK2'、FR3HK3/FR3HK3'、FR3HK4/FR3HK4'、FR3HK5/FR3HK5'、FR3HK6/FR3HK6'、FR3HK7/FR3HK7'、FR3HK8/FR3HK8'、FR3HK9/FR3HK9'、FR3HK10/FR3HK10'、FR3HK11/FR3HK11'、FR3HK12/FR3HK12'、FR3HK13/FR3HK13'、FR3HK14/FR3HK14'、FR3HK15/FR3HK15'、FR3HK16/FR3HK16'、FR3HK17/FR3HK17'、FR3HK18/FR3HK18'、FR3HK19/FR3HK19'、FR3HK20/FR3HK20'、FR3HK21/FR3HK21'、FR3HK22/FR3HK22'、FR3HK23/FR3HK23'、FR3HK24/FR3HK24'、FR3HK25/FR3HK25'、FR3HK26/FR3HK26'、FR3HK27/FR3HK27'、FR3HK28/FR3HK28'、FR3HK29/FR3HK29'、FR3HK30/FR3HK30'、FR3HK31/FR3HK31'、FR3HK32/FR3HK32'、FR3HK33/FR3HK33'、FR3HK34/FR3HK34'、FR3HK35/FR3HK35'、FR3HK36/FR3HK36'、FR3HK37/FR3HK37'、FR3HK38/FR3HK38'、FR3HK39/FR3HK39'、FR3HK40/FR3HK40'、FR3HK41/FR3HK41'、FR3HK42/FR3HK42'、FR3HK43/FR3HK43'、またはFR3HK44/FR3HK44'。PCR産物のプールがサブバンク7となる。

【０１３７】

限定ではなく一例として、重鎖FR4サブバンクの構築は、表26および表27（すべて5'から3'の方向で表示され、名称に続いて配列を示す）に記載のオリゴヌクレオチドを用いたオーバーラップ伸長法によるポリメラーゼ連鎖反応によって行う。

【表２６】

表 26. 重鎖 FR4 フォワードプライマー (サブバンク 11 用):

964	FR4H1	TGGGGCCAGGGCACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
965	FR4H2	TGGGGCCGTGGCACCCTGGTCACTGTCTCCTCA
966	FR4H3	TGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCA
967	FR4H4	TGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
968	FR4H5	TGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
969	FR4H6	TGGGGGCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

【表２７】

表 27. 重鎖 FR4 リバースプライマー (サブバンク 11 用):

970	FR4H1'	TGAGGAGACGGTGACCAGGGTGCCCTGGCCCCA
971	FR4H2'	TGAGGAGACAGTGACCAGGGTGCCACGGCCCCA
972	FR4H3'	TGAAGAGACGGTGACCATTGTCCCTTGGCCCCA
973	FR4H4'	TGAGGAGACGGTGACCAGGGTTCCTTGGCCCCA
974	FR4H5'	TGAGGAGACGGTGACCAGGGTTCCTTGGCCCCA
975	FR4H6'	TGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCCTTGCCCCCA

【０１３８】

PCRは、下記のオリゴヌクレオチドの組合せで実施する（全部で6組）：FR4H1/FR4H1’、FR4H2/FR4H2’、FR4H3/FR4H3’、FR4H4/FR4H4’、FR4H5/FR4H5’またはFR4H6/FR4H6’。PCR産物のプールがサブバンク11となる。

【０１３９】

いくつかの実施形態において、重鎖FRサブバンク8、9、10および11が構築されるが、このサブバンク8は、核酸配列を含んでなり、そのそれぞれは重鎖FR1をコードする；サブバンク9は核酸配列を含んでなり、そのそれぞれは重鎖FR2をコードする；サブバンク10は核酸配列を含んでなり、その配列はそれぞれ重鎖FR3をコードする；ならびに、重鎖FR1、FR2およびFR3は、CDR H1およびH2に関するChothiaの定義にしたがって定義される。いくつかの実施形態において、FR配列は機能性ヒト抗体配列に由来する。他の実施形態において、FR配列はヒト生殖系列重鎖配列に由来する。

【０１４０】

限定ではなく例示として、下記は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を用いて4つの重鎖FRサブバンクを作製する方法を説明するものであって、ヒト生殖系列重鎖配列をテンプレートとして使用する。重鎖FRサブバンク8、9および10（それぞれFR1、2、3をコードする）は、44個のヒト生殖系列重鎖配列（VH1-18、VH1-2、VH1-24、VH1-3、VH1-45、VH1-46、VH1-58、VH1-69、VH1-8、VH2-26、VH2-5、VH2-70、VH3-11、VH3-13、VH3-15、VH3-16、VH3-20、VH3-21、VH3-23、VH3-30、VH3-33、VH3-35、VH3-38、VH3-43、VH3-48、VH3-49、VH3-53、VH3-64、VH3-66、VH3-7、VH3-72、VH3-73、VH3-74、VH3-9、VH4-28、VH4-31、VH4-34、VH4-39、VH4-4、VH4-59、VH4-61、VH5-51、VH6-1およびVH7-81）を包含する。Matsudaら、1998、J. Exp. Med., 188: 1973-1975を参照されたい。配列はNCBIウェブサイトに取りまとめられている：
www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/showGermline.cgi?organism=human&chainType=VH&seqType=nucleotide。重鎖FRサブバンク11（FR4をコードする）は、上記のサブバンク11と同じである。

【０１４１】

限定ではなく一例として、重鎖FR1サブバンク（Chothiaの定義による）の構築は、表28および表29（すべて5’から3’の方向で表示され、名称に続いて配列を示す）に記載のオリゴヌクレオチドを用いたオーバーラップ伸長法によるポリメラーゼ連鎖反応によって行う。

【表２８】

表 28. 重鎖 FR1 (Chothia 定義) フォワードプライマー (サブバンク 8 用):

976	FR1HC1	CAGGTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCA
977	FR1HC2	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCA
978	FR1HC3	CAGGTCCAGCTGGTACAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCA
979	FR1HC4	CAGGTTCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCA
980	FR1HC5	CAGATGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGACTGGGTCCTCA
981	FR1HC6	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCA
982	FR1HC7	CAAATGCAGCTGGTGCAGTCTGGGCCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGACCTCA
983	FR1HC8	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCG
984	FR1HC9	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCA
985	FR1HC10	CAGGTCACCTTGAAGGAGTCTGGTCCTGTGCTGGTGAAACCCACAGAGACC
986	FR1HC11	CAGATCACCTTGAAGGAGTCTGGTCCTACGCTGGTGAAACCCACACAGACC
987	FR1HC12	CAGGTCACCTTGAGGGAGTCTGGTCCTGCGCTGGTGAAACCCACACAGACC
988	FR1HC13	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCAAGCCTGGAGGGTCC
989	FR1HC14	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCC
990	FR1HC15	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTAAAGCCTGGGGGGTCC
991	FR1HC16	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCC
992	FR1HC17	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGTGTGGTACGGCCTGGGGGGTCC
993	FR1HC18	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCCTGGTCAAGCCTGGGGGGTCC
994	FR1HC19	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCC
995	FR1HC20	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCC
996	FR1HC21	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCC
997	FR1HC22	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGATCC
998	FR1HC23	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTAGGGGGTCC
999	FR1HC24	GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGTCGTGGTACAGCCTGGGGGGTCC
1000	FR1HC25	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCC
1001	FR1HC26	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCAGGGCGGTCC
1002	FR1HC27	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGGCTTGATCCAGCCTGGGGGGTCC
1003	FR1HC28	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCC
1004	FR1HC29	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGGCTTGATCCAGCCTGGGGGGTCC
1005	FR1HC30	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCC
1006	FR1HC31	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGAGGGTCC
1007	FR1HC32	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCC
1008	FR1HC33	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGGGGAGGCTTAGTTCAGCCTGGGGGGTCC
1009	FR1HC34	GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGCAGGTCC
1010	FR1HC35	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGACACC
1011	FR1HC36	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACC
1012	FR1HC37	CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGGAGACC
1013	FR1HC38	CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACC
1014	FR1HC39	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACC
1015	FR1HC40	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACC
1016	FR1HC41	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACC

1017	FR1HC42	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCCGGGGAGTCT
1018	FR1HC43	CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGCAGACC
1019	FR1HC44	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCCATGAGGTGAAGCAGCCTGGGGCCTCA

【表２９】

表 29. 重鎖 FR1 (Chothia 定義) リバースプライマー (サブバンク 8 用):

1020	FR1HC1'	AGAAGCCTTGCAGGAGACCTTCACTGAGGCCCCAGGCTTCTTCAC
1021	FR1HC2'	AGAAGCCTTGCAGGAGACCTTCACTGAGGCCCCAGGCTTCTTCAC
1022	FR1HC3'	GGAAACCTTGCAGGAGACCTTCACTGAGGCCCCAGGCTTCTTCAC
1023	FR1HC4'	AGAAGCCTTGCAGGAAACCTTCACTGAGGCCCCAGGCTTCTTCAC
1024	FR1HC5'	GGAAGCCTTGCAGGAAACCTTCACTGAGGACCCAGTCTTCTTCAC
1025	FR1HC6'	AGATGCCTTGCAGGAAACCTTCACTGAGGCCCCAGGCTTCTTCAC
1026	FR1HC7'	AGAAGCCTTGCAGGAGACCTTCACTGAGGTCCCAGGCTTCTTCAC
1027	FR1HC8'	AGAAGCCTTGCAGGAGACCTTCACCGAGGACCCAGGCTTCTTCAC
1028	FR1HC9'	AGAAGCCTTGCAGGAGACCTTCACTGAGGCCCCAGGCTTCTTCAC
1029	FR1HC10'	AGAGACGGTGCAGGTCAGCGTGAGGGTCTCTGTGGGTTTCACCAG
1030	FR1HC11'	AGAGAAGGTGCAGGTCAGCGTGAGGGTCTGTGTGGGTTTCACCAG
1031	FR1HC12'	AGAGAAGGTGCAGGTCAGTGTGAGGGTCTGTGTGGGTTTCACCAG
1032	FR1HC13'	AGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCCTCCAGGCTTGACCAA
1033	FR1HC14'	AGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCCCCCAGGCTGTACCAA
1034	FR1HC15'	AGAGGCTGCACAGGAGAGTCTAAGGGACCCCCCAGGCTTTACCAA
1035	FR1HC16'	AGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCCCCCAGGCTGTACCAA
1036	FR1HC17'	AGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCCCCCAGGCCGTACCAC
1037	FR1HC18'	AGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCCCCCAGGCTTGACCAG
1038	FR1HC19'	AGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCCCCCAGGCTGTACCAA
1039	FR1HC20'	AGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCTCCCAGGCTGGACCAC
1040	FR1HC21'	AGACGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCTCCCAGGCTGGACCAC
1041	FR1HC22'	AGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGATCCCCCAGGCTGTACCAA
1042	FR1HC23'	AGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCCCCTAGGCTGTACCAA
1043	FR1HC24'	AGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCCCCCAGGCTGTACCAC
1044	FR1HC25'	AGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCCCCCAGGCTGTACCAA
1045	FR1HC26'	AGAAGCTGTACAGGAGAGTCTCAGGGACCGCCCTGGCTGTACCAA
1046	FR1HC27'	AGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCCCCCAGGCTGGATCAA
1047	FR1HC28'	AGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCCCCCAGGCTGGACCAA
1048	FR1HC29'	AGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCCCCCAGGCTGGATCAA
1049	FR1HC30'	AGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCCCCCAGGCTGGACCAA
1050	FR1HC31'	AGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCCTCCAGGCTGGACCAA
1051	FR1HC32'	AGAGGCTGCACAGGAGAGTTTCAGGGACCCCCCAGGCTGGACCAA
1052	FR1HC33'	AGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCCCCCAGGCTGAACTAA
1053	FR1HC34'	AGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCTGCCAGGCTGTACCAA
1054	FR1HC35'	AGAGACAGCGCAGGTGAGGGACAGGGTGTCCGAAGGCTTCACCAG
1055	FR1HC36'	AGAGACAGTACAGGTGAGGGACAGGGTCTGTGAAGGCTTCACCAG
1056	FR1HC37'	ATAGACAGCGCAGGTGAGGGACAGGGTCTCCGAAGGCTTCAACAG
1057	FR1HC38'	AGAGACAGTGCAGGTGAGGGACAGGGTCTCCGAAGGCTTCACCAG

1058	FR1HC39'	AGAGACAGTGCAGGTGAGGGACAGGGTCTCCGAAGGCTTCACCAG
1059	FR1HC40'	AGAGACAGTGCAGGTGAGGGACAGGGTCTCCGAAGGCTTCACCAG
1060	FR1HC41'	AGAGACAGTGCAGGTGAGGGACAGGGTCTCCGAAGGCTTCACCAG
1061	FR1HC42'	AGAACCCTTACAGGAGATCTTCAGAGACTCCCCGGGCTTTTTCAC
1062	FR1HC43'	GGAGATGGCACAGGTGAGTGAGAGGGTCTGCGAGGGCTTCACCAG
1063	FR1HC44'	AGAAGCCTTGCAGGAGACCTTCACTGAGGCCCCAGGCTGCTTCAC

【０１４２】

PCRは、下記のオリゴヌクレオチドの組合せで実施する（全部で44組）：FR1HC1/FR1HC1'、FR1HC2/FR1HC2'、FR1HC3/FR1HC3'、FR1HC4/FR1HC4'、FR1HC5/FR1HC5'、FR1HC6/FR1HC6'、FR1HC7/FR1HC7'、FR1HC8/FR1HC8'、FR1HC9/FR1HC9'、FR1HC10/FR1HC10'、FR1HC11/FR1HC11'、FR1HC12/FR1HC12'、FR1HC13/FR1HC13'、FR1HC14/FR1HC14'、FR1HC15/FR1HC15'、FR1HC16/FR1HC16'、FR1HC17/FR1HC17'、FR1HC18/FR1HC18'、FR1HC19/FR1HC19'、FR1HC20/FR1HC20'、FR1HC21/FR1HC21'、FR1HC22/FR1HC22'、FR1HC23/FR1HC23'、FR1HC24/FR1HC24'、FR1HC25/FR1HC25'、FR1HC26/FR1HC26'、FR1HC27/FR1HC27'、FR1HC28/FR1HC28'、FR1HC29/FR1HC29'、FR1HC30/FR1HC30'、FR1HC31/FR1HC31'、FR1HC32/FR1HC32'、FR1HC33/FR1HC33'、FR1HC34/FR1HC34'、FR1HC35/FR1HC35'、FR1HC36/FR1HC36'、FR1HC37/FR1HC37'、FR1HC38/FR1HC38'、FR1HC39/FR1HC39'、FR1HC40/FR1HC40'、FR1HC41/FR1HC41'、FR1HC42/FR1HC42'、FR1HC43/FR1HC43'、またはFR1HC44/FR1HC44'。PCR産物のプールがサブバンク8となる。

【０１４３】

限定ではなく一例として、重鎖FR2サブバンク（Chothiaの定義による）の構築は、表30および表31（すべて5'から3'の方向で表示され、名称に続いて配列を示す）に記載のオリゴヌクレオチドを用いたオーバーラップ伸長法によるポリメラーゼ連鎖反応によって行う。

【表３０】

表 30. 重鎖 FR2 (Chothia 定義) フォワードプライマー (サブバンク 9 用):

1064	FR2HC1	TATGGTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTT
1065	FR2HC2	TACTATATGCACTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTT
1066	FR2HC3	TTATCCATGCACTGGGTGCGACAGGCTCCTGGAAAAGGGCTT
1067	FR2HC4	TATGCTATGCATTGGGTGCGCCAGGCCCCCGGACAAAGGCTT
1068	FR2HC5	CGCTACCTGCACTGGGTGCGACAGGCCCCCGGACAAGCGCTT
1069	FR2HC6	TACTATATGCACTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTT
1070	FR2HC7	TCTGCTATGCAGTGGGTGCGACAGGCTCGTGGACAACGCCTT
1071	FR2HC8	TATGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTT
1072	FR2HC9	TATGATATCAACTGGGTGCGACAGGCCACTGGACAAGGGCTT
1073	FR2HC10	ATGGGTGTGAGCTGGATCCGTCAGCCCCCAGGGAAGGCCCTG
1074	FR2HC11	GTGGGTGTGGGCTGGATCCGTCAGCCCCCAGGAAAGGCCCTG
1075	FR2HC12	ATGTGTGTGAGCTGGATCCGTCAGCCCCCAGGGAAGGCCCTG
1076	FR2HC13	TACTACATGAGCTGGATCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTG
1077	FR2HC14	TACGACATGCACTGGGTCCGCCAAGCTACAGGAAAAGGTCTG
1078	FR2HC15	GCCTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTG
1079	FR2HC16	AGTGACATGAACTGGGCCCGCAAGGCTCCAGGAAAGGGGCTG
1080	FR2HC17	TATGGCATGAGCTGGGTCCGCCAAGCTCCAGGGAAGGGGCTG
1081	FR2HC18	TATAGCATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTG
1082	FR2HC19	TATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTG
1083	FR2HC20	TATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTG
1084	FR2HC21	TATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTG
1085	FR2HC22	AGTGACATGAACTGGGTCCATCAGGCTCCAGGAAAGGGGCTG
1086	FR2HC23	AATGAGATGAGCTGGATCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTG
1087	FR2HC24	TATACCATGCACTGGGTCCGTCAAGCTCCGGGGAAGGGTCTG
1088	FR2HC25	TATAGCATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTG
1089	FR2HC26	TATGCTATGAGCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTG
1090	FR2HC27	AACTACATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTG
1091	FR2HC28	TATGCTATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGACTG
1092	FR2HC29	AACTACATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTG
1093	FR2HC30	TATTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTG
1094	FR2HC31	CACTACATGGACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTG
1095	FR2HC32	TCTGCTATGCACTGGGTCCGCCAGGCTTCCGGGAAAGGGCTG
1096	FR2HC33	TACTGGATGCACTGGGTCCGCCAAGCTCCAGGGAAGGGGCTG
1097	FR2HC34	TATGCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCTG
1098	FR2HC35	AACTGGTGGGGCTGGATCCGGCAGCCCCCAGGGAAGGGACTG
1099	FR2HC36	TACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCACCCAGGGAAGGGCCTG
1100	FR2HC37	TACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCCCCCAGGGAAGGGGCTG
1101	FR2HC38	TACTACTGGGGCTGGATCCGCCAGCCCCCAGGGAAGGGGCTG
1102	FR2HC39	TACTACTGGAGCTGGATCCGGCAGCCCGCCGGGAAGGGACTG
1103	FR2HC40	TACTACTGGAGCTGGATCCGGCAGCCCCCAGGGAAGGGACTG
1104	FR2HC41	TACTACTGGAGCTGGATCCGGCAGCCCCCAGGGAAGGGACTG

1105	FR2HC42	TACTGGATCGGCTGGGTGCGCCAGATGCCCGGGAAAGGCCTG
1106	FR2HC43	GCTGCTTGGAACTGGATCAGGCAGTCCCCATCGAGAGGCCTT
1107	FR2HC44	TATGGTATGAATTGGGTGCCACAGGCCCCTGGACAAGGGCTT

【表３１】

表 31. 重鎖 FR2 (Chothia 定義) リバースプライマー (サブバンク 9 用):

1108	FR2HC1'	GATCCATCCCATCCACTCAAGCCCTTGTCCAGGGGCCTG
1109	FR2HC2'	GATCCATCCCATCCACTCAAGCCCTTGTCCAGGGGCCTG
1110	FR2HC3'	AAAACCTCCCATCCACTCAAGCCCTTTTCCAGGAGCCTG
1111	FR2HC4'	GCTCCATCCCATCCACTCAAGCCTTTGTCCGGGGGCCTG
1112	FR2HC5'	GATCCATCCCATCCACTCAAGCGCTTGTCCGGGGGCCTG
1113	FR2HC6'	GATTATTCCCATCCACTCAAGCCCTTGTCCAGGGGCCTG
1114	FR2HC7'	GATCCATCCTATCCACTCAAGGCGTTGTCCACGAGCCTG
1115	FR2HC8'	GATCCCTCCCATCCACTCAAGCCCTTGTCCAGGGGCCTG
1116	FR2HC9'	CATCCATCCCATCCACTCAAGCCCTTGTCCAGTGGCCTG
1117	FR2HC10'	AATGTGTGCAAGCCACTCCAGGGCCTTCCCTGGGGGCTG
1118	FR2HC11'	AATGAGTGCAAGCCACTCCAGGGCCTTTCCTGGGGGCTG
1119	FR2HC12'	AATGAGTGCAAGCCACTCCAGGGCCTTCCCTGGGGGCTG
1120	FR2HC13'	AATGTATGAAACCCACTCCAGCCCCTTCCCTGGAGCCTG
1121	FR2HC14'	AATAGCTGAGACCCACTCCAGACCTTTTCCTGTAGCTTG
1122	FR2HC15'	AATACGGCCAACCCACTCCAGCCCCTTCCCTGGAGCCTG
1123	FR2HC16'	AACACCCGATACCCACTCCAGCCCCTTTCCTGGAGCCTT
1124	FR2HC17'	AATACCAGAGACCCACTCCAGCCCCTTCCCTGGAGCTTG
1125	FR2HC18'	AATGGATGAGACCCACTCCAGCCCCTTCCCTGGAGCCTG
1126	FR2HC19'	AATAGCTGAGACCCACTCCAGCCCCTTCCCTGGAGCCTG
1127	FR2HC20'	TATAACTGCCACCCACTCCAGCCCCTTGCCTGGAGCCTG
1128	FR2HC21'	TATAACTGCCACCCACTCCAGCCCCTTGCCTGGAGCCTG
1129	FR2HC22'	AACACCCGATACCCACTCCAGCCCCTTTCCTGGAGCCTG
1130	FR2HC23'	AATGGATGAGACCCACTCCAGCCCCTTCCCTGGAGCCTG
1131	FR2HC24'	ATAAGAGAGACCCACTCCAGACCCTTCCCCGGAGCTTG
1132	FR2HC25'	AATGTATGAAACCCACTCCAGCCCCTTCCCTGGAGCCTG
1133	FR2HC26'	AATGAAACCTACCCACTCCAGCCCCTTCCCTGGAGCCTG
1134	FR2HC27'	AATAACTGAGACCCACTCCAGCCCCTTCCCTGGAGCCTG
1135	FR2HC28'	AATAGCTGAAACATATTCCAGTCCCTTCCCTGGAGCCTG
1136	FR2HC29'	AATAACTGAGACCCACTCCAGCCCCTTCCCTGGAGCCTG
1137	FR2HC30'	TATGTTGGCCACCCACTCCAGCCCCTTCCCTGGAGCCTG
1138	FR2HC31'	AGTACGGCCAACCCACTCCAGCCCCTTCCCTGGAGCCTG
1139	FR2HC32'	AATACGGCCAACCCACTCCAGCCCTTTCCCGGAAGCCTG
1140	FR2HC33'	AATACGTGAGACCCACACCAGCCCCTTCCCTGGAGCTTG
1141	FR2HC34'	AATACCTGAGACCCACTCCAGGCCCTTCCCTGGAGCTTG
1142	FR2HC35'	GATGTACCCAATCCACTCCAGTCCCTTCCCTGGGGGCTG
1143	FR2HC36'	GATGTACCCAATCCACTCCAGGCCCTTCCCTGGGTGCTG
1144	FR2HC37'	GATTTCCCCAATCCACTCCAGCCCCTTCCCTGGGGGCTG
1145	FR2HC38'	GATACTCCCAATCCACTCCAGCCCCTTCCCTGGGGGCTG

1146	FR2HC39'	GATACGCCCAATCCACTCCAGTCCCTTCCCGGCGGGCTG
1147	FR2HC40'	GATATACCCAATCCACTCCAGTCCCTTCCCTGGGGGCTG
1148	FR2HC41'	GATATACCCAATCCACTCCAGTCCCTTCCCTGGGGGCTG
1149	FR2HC42'	GATGATCCCCATCCACTCCAGGCCTTTCCCGGGCATCTG
1150	FR2HC43'	TGTCCTTCCCAGCCACTCAAGGCCTCTCGATGGGGACTG
1151	FR2HC44'	GAACCATCCCATCCACTCAAGCCCTTGTCCAGGGGCCTG

【０１４４】

PCRは、下記のオリゴヌクレオチドの組合せで実施する（全部で44組）：FR2HC1/FR2HC1'、FR2HC2/FR2HC2'、FR2HC3/FR2HC3'、FR2HC4/FR2HC4'、FR2HC5/FR2HC5'、FR2HC6/FR2HC6'、FR2HC7/FR2HC7'、FR2HC8/FR2HC8'、FR2HC9/FR2HC9'、FR2HC10/FR2HC10'、FR2HC11/FR2HC11'、FR2HC12/FR2HC12'、FR2HC13/FR2HC13'、FR2HC14/FR2HC14'、FR2HC15/FR2HC15'、FR2HC16/FR2HC16'、FR2HC17/FR2HC17'、FR2HC18/FR2HC18'、FR2HC19/FR2HC19'、FR2HC20/FR2HC20'、FR2HC21/FR2HC21'、FR2HC22/FR2HC22'、FR2HC23/FR2HC23'、FR2HC24/FR2HC24'、FR2HC25/FR2HC25'、FR2HC26/FR2HC26'、FR2HC27/FR2HC27'、FR2HC28/FR2HC28'、FR2HC29/FR2HC29'、FR2HC30/FR2HC30'、FR2HC31/FR2HC31'、FR2HC32/FR2HC32'、FR2HC33/FR2HC33'、FR2HC34/FR2HC34'、FR2HC35/FR2HC35'、FR2HC36/FR2HC36'、FR2HC37/FR2HC37'、FR2HC38/FR2HC38'、FR2HC39/FR2HC39'、FR2HC40/FR2HC40'、FR2HC41/FR2HC41'、FR2HC42/FR2HC42'、FR2HC43/FR2HC43'、またはFR2HC44/FR2HC44'。PCR産物のプールがサブバンク9となる。

【０１４５】

限定ではなく一例として、重鎖FR3サブバンク（Chothiaの定義による）の構築は、表32および表33（すべて5'から3'の方向で表示され、名称に続いて配列を示す）に記載のオリゴヌクレオチドを用いたオーバーラップ伸長法によるポリメラーゼ連鎖反応によって行う。

【表３２】

表 32. 重鎖 FR3 (Chothia 定義) フォワードプライマー (サブバンク 10 用):

1152	FR3HC1	ACAAACTATGCACAGAAGCTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGACACATCCACGAGCACAGCCTACATGG
1153	FR3HC2	ACAAACTATGCACAGAAGTTTCAGGGCAGGGTCACCATGACCAGGGACACGTCCATCAGCACAGCCTACATGG
1154	FR3HC3	ACAATCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCGAGGACACATCTACAGACACAGCCTACATGG
1155	FR3HC4	ACAAAATATTCACAGGAGTTCCAGGGCAGAGTCACCATTACCAGGGACACATCCGCGAGCACAGCCTACATGG
1156	FR3HC5	ACCAACTACGCACAGAAATTCCAGGACAGAGTCACCATTACCAGGGACAGGTCTATGAGCACAGCCTACATGG
1157	FR3HC6	ACAAGCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCAGGGACACGTCCACGAGCACAGTCTACATGG
1158	FR3HC7	ACAAACTACGCACAGAAGTTCCAGGAAAGAGTCACCATTACCAGGGACATGTCCACAAGCACAGCCTACATGG
1159	FR3HC8	GCAAACTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTACATGG
1160	FR3HC9	ACAGGCTATGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCAGGAACACCTCCATAAGCACAGCCTACATGG
1161	FR3HC10	AAATCCTACAGCACATCTCTGAAGAGCAGGCTCACCATCTCCAAGGACACCTCCAAAAGCCAGGTGGTCCTTA
1162	FR3HC11	AAGCGCTACAGCCCATCTCTGAAGAGCAGGCTCACCATCACCAAGGACACCTCCAAAAACCAGGTGGTCCTTA
1163	FR3HC12	AAATACTACAGCACATCTCTGAAGACCAGGCTCACCATCTCCAAGGACACCTCCAAAAACCAGGTGGTCCTTA
1164	FR3HC13	ATATACTACGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGGGACAACGCCAAGAACTCACTGTATCTGC
1165	FR3HC14	ACATACTATCCAGGCTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGAAAATGCCAAGAACTCCTTGTATCTTC
1166	FR3HC15	ACAGACTACGCTGCACCCGTGAAAGGCAGATTCACCATCTCAAGAGATGATTCAAAAAACACGCTGTATCTGC
1167	FR3HC16	ACGCACTATGTGGACTCCGTGAAGCGCCGATTCATCATCTCCAGAGACAATTCCAGGAACTCCCTGTATCTGC
1168	FR3HC17	ACAGGTTATGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCCCTGTATCTGC
1169	FR3HC18	ATATACTACGCAGACTCAGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACTGTATCTGC
1170	FR3HC19	ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGC
1171	FR3HC20	AAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGC
1172	FR3HC21	AAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGC
1173	FR3HC22	ACGCACTATGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTCATCATCTCCAGAGACAATTCCAGGAACACCCTGTATCTGC
1174	FR3HC23	ACATACTACGCAGACTCCAGGAAGGGCAGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTTC
1175	FR3HC24	ACATACTATGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACAGCAAAAACTCCCTGTATCTGC
1176	FR3HC25	ATATACTACGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACTCACTGTATCTGC
1177	FR3HC26	ACAGAATACGCCGCGTCTGTGAAAGGCAGATTCACCATCTCAAGAGATGATTCCAAAAGCATCGCCTATCTGC
1178	FR3HC27	ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTTC

1179	FR3HC28	ACATATTATGCAGACTCTGTGAAGGGCAGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTTC
1180	FR3HC29	ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTTC
1181	FR3HC30	AAATACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACTGTATCTGC
1182	FR3HC31	ACAGAATACGCCGCGTCTGTGAAAGGCAGATTCACCATCTCAAGAGATGATTCAAAGAACTCACTGTATCTGC
1183	FR3HC32	ACAGCATATGCTGCGTCGGTGAAAGGCAGGTTCACCATCTCCAGAGATGATTCAAAGAACACGGCGTATCTGC
1184	FR3HC33	ACAAGCTACGCGGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGCTGTATCTGC
1185	FR3HC34	ATAGGCTATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCCCTGTATCTGC
1186	FR3HC35	ACCTACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATGTCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGA
1187	FR3HC36	ACCTACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCAGTAGACACGTCTAAGAACCAGTTCTCCCTGA
1188	FR3HC37	ACCAACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGA
1189	FR3HC38	ACCTACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCCGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGA
1190	FR3HC39	ACCAACTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATGTCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGA
1191	FR3HC40	ACCAACTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGA
1192	FR3HC41	ACCAACTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGA
1193	FR3HC42	ACCAGATACAGCCCGTCCTTCCAAGGCCAGGTCACCATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTACCTGC
1194	FR3HC43	AATGATTATGCAGTATCTGTGAAAAGTCGAATAACCATCAACCCAGACACATCCAAGAACCAGTTCTCCCTGC
1195	FR3HC44	CCAACATATGCCCAGGGCTTCACAGGACGGTTTGTCTTCTCCATGGACACCTCTGCCAGCACAGCATACCTGC

【表３３】

表 33. 重鎖 FR3 (Chothia 定義) リバースプライマー (サブバンク 10 用):

1196	FR3HC1'	TCTCGCACAGTAATACACGGCCGTGTCGTCAGATCTCAGGCTCCTCAGCTCCATGTAGGCTGTGCTCGTGG
1197	FR3HC2'	TCTCGCACAGTAATACACGGCCGTGTCGTCAGATCTCAGCCTGCTCAGCTCCATGTAGGCTGTGCTGATGG
1198	FR3HC3'	TGTTGCACAGTAATACACGGCCGTGTCCTCAGATCTCAGGCTGCTCAGCTCCATGTAGGCTGTGTCTGTAG
1199	FR3HC4'	TCTCGCACAGTAATACACAGCCATGTCCTCAGATCTCAGGCTGCTCAGCTCCATGTAGGCTGTGCTCGCGG
1200	FR3HC5'	TCTTGCACAGTAATACATGGCTGTGTCCTCAGATCTCAGGCTGCTCAGCTCCATGTAGGCTGTGCTCATAG
1201	FR3HC6'	TCTCGCACAGTAATACACGGCCGTGTCCTCAGATCTCAGGCTGCTCAGCTCCATGTAGACTGTGCTCGTGG
1202	FR3HC7'	TGCCGCACAGTAATACACGGCCGTGTCCTCGGATCTCAGGCTGCTCAGCTCCATGTAGGCTGTGCTTGTGG
1203	FR3HC8'	TCTCGCACAGTAATACACGGCCGTGTCCTCAGATCTCAGGCTGCTCAGCTCCATGTAGGCTGTGCTCGTGG
1204	FR3HC9'	TCTCGCACAGTAATACACGGCCGTGTCCTCAGATCTCAGGCTGCTCAGCTCCATGTAGGCTGTGCTTATGG
1205	FR3HC10'	CCGTGCACAGTAATATGTGGCTGTGTCCACAGGGTCCATGTTGGTCATGGTAAGGACCACCTGGCTTTTGG

1206 FR3HC11'
GTGTGCACAGTAATATGTGGCTGTGTCCACAGGGTCCATGTTGGTCATTGTAAGGACCACCTGGTTTTTGG

1207 FR3HC12'
CCGTGCACAATAATACGTGGCTGTGTCCACAGGGTCCATGTTGGTCATTGTAAGGACCACCTGGTTTTTGG

1208 FR3HC13'
TCTCGCACAGTAATACACGGCCGTGTCCTCGGCTCTCAGGCTGTTCATTTGCAGATACAGTGAGTTCTTGG

1209 FR3HC14'
TCTTGCACAGTAATACACAGCCGTGTCCCCGGCTCTCAGGCTGTTCATTTGAAGATACAAGGAGTTCTTGG

1210 FR3HC15'
TGTGGTACAGTAATACACGGCTGTGTCCTCGGTTTTCAGGCTGTTCATTTGCAGATACAGCGTGTTTTTTG

1211 FR3HC16'
TCTCACACAGTAATACACAGCCATGTCCTCGGCTCTCCGTCTGTTCTTTTGCAGATACAGGGAGTTCCTGG

1212 FR3HC17'
TCTCGCACAGTGATACAAGGCCGTGTCCTCGGCTCTCAGACTGTTCATTTGCAGATACAGGGAGTTCTTGG

1213 FR3HC18'
TCTCGCACAGTAATACACAGCCGTGTCCTCGGCTCTCAGGCTGTTCATTTGCAGATACAGTGAGTTCTTGG

1214 FR3HC19'
TTTCGCACAGTAATATACGGCCGTGTCCTCGGCTCTCAGGCTGTTCATTTGCAGATACAGCGTGTTCTTGG

1215 FR3HC20'
TCTCGCACAGTAATACACAGCCGTGTCCTCAGCTCTCAGGCTGTTCATTTGCAGATACAGCGTGTTCTTGG

1216 FR3HC21'
TCTCGCACAGTAATACACAGCCGTGTCCTCGGCTCTCAGGCTGTTCATTTGCAGATACAGCGTGTTCTTGG

1217 FR3HC22'
TCTCACACAGTAATACACAGCCGTGTCCTCGGCCCTCAGGCTATTCGTTTGCAGATACAGGGTGTTCCTGG

1218 FR3HC23'
TCTGGCACAGTAATACACGGCCGTGCCCTCAGCTCTCAGGTTGTTCATTTGAAGATACAGCGTGTTCTTGG

1219 FR3HC24'
TTTTGCACAGTAATACAAGGCGGTGTCCTCAGTTCTCAGACTGTTCATTTGCAGATACAGGGAGTTTTTGC

1220 FR3HC25'
TCTCGCACAGTAATACACAGCCGTGTCCTCGTCTCTCAGGCTGTTCATTTGCAGATACAGTGAGTTCTTGG

1221 FR3HC26'
TCTAGTACAGTAATACACGGCTGTGTCCTCGGTTTTCAGGCTGTTCATTTGCAGATAGGCGATGCTTTTGG

1222 FR3HC27'
TCTCGCACAGTAATACACGGCCGTGTCCTCGGCTCTCAGGCTGTTCATTTGAAGATACAGCGTGTTCTTGG

1223 FR3HC28'
TCTCGCACAGTAATACACAGCCATGTCCTCAGCTCTCAGGCTGCCCATTTGAAGATACAGCGTGTTCTTGG

1224 FR3HC29'
TCTCGCACAGTAATACACAGCCGTGTCCTCAGCTCTCAGGCTGTTCATTTGAAGATACAGCGTGTTCTTGG

1225 FR3HC30'
TCTCGCACAGTAATACACAGCCGTGTCCTCGGCTCTCAGGCTGTTCATTTGCAGATACAGTGAGTTCTTGG

1226 FR3HC31'
TCTAGCACAGTAATACACGGCCGTGTCCTCGGTTTTCAGGCTGTTCATTTGCAGATACAGTGAGTTCTTTG

1227 FR3HC32'
TCTAGTACAGTAATACACGGCCGTGTCCTCGGTTTTCAGGCTGTTCATTTGCAGATACGCCGTGTTCTTTG

1228 FR3HC33'
TCTTGCACAGTAATACACAGCCGTGTCCTCGGCTCTCAGACTGTTCATTTGCAGATACAGCGTGTTCTTGG

1229 FR3HC34'
TTTTGCACAGTAATACAAGGCCGTGTCCTCAGCTCTCAGACTGTTCATTTGCAGATACAGGGAGTTCTTGG

1230 FR3HC35'
TCTCGCACAGTAATACACGGCCGTGTCCACGGCGGTCACAGAGCTCAGCTTCAGGGAGAACTGGTTCTTGG

1231 FR3HC36'
TCTCGCACAGTAATACACGGCCGTGTCCGCGGCAGTCACAGAGCTCAGCTTCAGGGAGAACTGGTTCTTAG

1232 FR3HC37'
TCTCGCACAGTAATACACAGCCGTGTCCGCGGCGGTCACAGAGCTCAGCTTCAGGGAGAACTGGTTCTTGG

1233 FR3HC38'
TCTCGCACAGTAATACACAGCCGTGTCTGCGGCGGTCACAGAGCTCAGCTTCAGGGAGAACTGGTTCTTGG

1234 FR3HC39'
TCTCGCACAGTAATACACGGCCGTGTCCGCGGCGGTCACAGAGCTCAGCTTCAGGGAGAACTGGTTCTTGG

1235 FR3HC40'
TCTCGCACAGTAATACACGGCCGTGTCCGCAGCGGTCACAGAGCTCAGCTTCAGGGAGAACTGGTTCTTGG

1236	FR3HC41' TCTCGCACAGTAATACACGGCCGTGTCCGCAGCGGTCACAGAGCTCAGCTTCAGGGAGAACTGGTTCTTGG
1237	FR3HC42' TCTCGCACAGTAATACATGGCGGTGTCCGAGGCCTTCAGGCTGCTCCACTGCAGGTAGGCGGTGCTGATGG
1238	FR3HC43' TCTTGCACAGTAATACACAGCCGTGTCCTCGGGAGTCACAGAGTTCAGCTGCAGGGAGAACTGGTTCTTGG
1239	FR3HC44' TCTCGCACAGTAATACATGGCCATGTCCTCAGCCTTTAGGCTGCTGATCTGCAGGTATGCTGTGCTGGCAG

【０１４６】

PCRは、下記のオリゴヌクレオチドの組合せで実施する（全部で44組）：FR3HC1/FR3HC1’、FR3HC2/FR3HC2’、FR3HC3/FR3HC3’、FR3HC4/FR3HC4’、FR3HC5/FR3HC5’、FR3HC6/FR3HC6’、FR3HC7/FR3HC7’、FR3HC8/FR3HC8’、FR3HC9/FR3HC9’、FR3HC10/FR3HC10’、FR3HC11/FR3HC11’、FR3HC12/FR3HC12’、FR3HC13/FR3HC13’、FR3HC14/FR3HC14’、FR3HC15/FR3HC15’、FR3HC16/FR3HC16’、FR3HC17/FR3HC17’、FR3HC18/FR3HC18’、FR3HC19/FR3HC19’、FR3HC20/FR3HC20’、FR3HC21/FR3HC21’、FR3HC22/FR3HC22’、FR3HC23/FR3HC23’、FR3HC24/FR3HC24’、FR3HC25/FR3HC25’、FR3HC26/FR3HC26’、FR3HC27/FR3HC27’、FR3HC28/FR3HC28’、FR3HC29/FR3HC29’、FR3HC30/FR3HC30’、FR3HC31/FR3HC31’、FR3HC32/FR3HC32’、FR3HC33/FR3HC33’、FR3HC34/FR3HC34’、FR3HC35/FR3HC35’、FR3HC36/FR3HC36’、FR3HC37/FR3HC37’、FR3HC38/FR3HC38’、FR3HC39/FR3HC39’、FR3HC40/FR3HC40’、FR3HC41/FR3HC41’、FR3HC42/FR3HC42’、FR3HC43/FR3HC43’、またはFR3HC44/FR3HC44’。PCR産物のプールがサブバンク10となる。

【０１４７】

2.3　CDRの選択

フレームワーク領域サブバンクの合成に加えて、CDRのサブバンクを作製し、フレームワーク領域サブバンクからのフレームワーク領域とランダムにin frame融合させて、対象の抗原に対する免疫特異性ならびに対象の生物における免疫原性についてスクリーニング可能な抗体のコンビナトリアルライブラリー（定常領域を含むもの、または含まないもの）を作製することができる。ここでは、本発明のコンビナトリアルライブラリー法を、ヒトにおいて使用するためのヒト化抗体の作製について例示する。しかし、本発明のコンビナトリアルライブラリー法は、あらゆる対象生物において使用するための抗体の作製に容易に適用可能である。

【０１４８】

本発明は、可変軽鎖および可変重鎖の各CDRについてのCDRサブバンクを提供する。したがって、本発明は、対象とする各生物種のための、またCDRの各定義（例えばKabatおよびChothia）のための、可変軽鎖CDR1、可変軽鎖CDR2および可変軽鎖CDR3のCDR領域サブバンクを提供する。また、本発明は、対象とする各生物種のための、またCDRの各定義（例えばKabatおよびChothia）のための、可変重鎖CDR1、可変重鎖CDR2および可変重鎖CDR3のCDRサブバンクも提供する。CDRサブバンクは、対象の抗原に免疫特異的に結合する抗体の一部として同定されたCDRを含みうる。このCDRサブバンクは、対象の抗原に対する免疫特異性ならびに対象の生物における免疫原性についてスクリーニング可能な抗体のコンビナトリアルライブラリーを合成するのに容易に使用できる。

【０１４９】

例えば、軽鎖CDRサブバンク12、13および14を構築することができ、そこにおいて、CDRサブバンク12は、ヌクレオチド配列を含む複数の核酸配列を含んでなり、各ヌクレオチド配列がKabatシステムに従う軽鎖CDR1をコードしており；CDRサブバンク13は、ヌクレオチド配列を含む複数の核酸配列を含んでなり、各ヌクレオチド配列がKabatシステムに従う軽鎖CDR2をコードしており；CDRサブバンク14は、ヌクレオチド配列を含む複数の核酸配列を含んでなり、各ヌクレオチド配列がKabatシステムに従う軽鎖CDR3をコードしている

。軽鎖CDRサブバンク15、16および17を構築することができ、そこにおいて、CDRサブバンク15は、ヌクレオチド配列を含む複数の核酸配列を含んでなり、各ヌクレオチド配列がChothiaシステムに従う軽鎖CDR1をコードしており；CDRサブバンク16は、ヌクレオチド配列を含む複数の核酸配列を含んでなり、各ヌクレオチド配列がChothiaシステムに従う軽鎖CDR2をコードしており；CDRサブバンク17は、ヌクレオチド配列を含む複数の核酸配列を含んでなり、各ヌクレオチド配列がChothiaシステムに従う軽鎖CDR3をコードしている。

【０１５０】

重鎖CDRサブバンク18、19および20を構築することができ、そこにおいて、CDRサブバンク18は、ヌクレオチド配列を含む複数の核酸配列を含んでなり、各ヌクレオチド配列はKabatシステムに従う重鎖CDR1をコードしており；CDRサブバンク19は、ヌクレオチド配列を含む複数の核酸配列を含んでなり、各ヌクレオチド配列はKabatシステムに従う重鎖CDR2をコードしており；CDRサブバンク20は、ヌクレオチド配列を含む複数の核酸配列を含んでなり、各ヌクレオチド配列はKabatシステムに従う重鎖CDR3をコードしている。重鎖CDRサブバンク21、22および23を構築することができ、そこにおいて、CDRサブバンク21は、ヌクレオチド配列を含む複数の核酸配列を含んでなり、各ヌクレオチド配列はChothiaシステムに従う重鎖CDR1をコードしており；CDRサブバンク22は、ヌクレオチド配列を含む複数の核酸配列を含んでなり、各ヌクレオチド配列はChothiaシステムに従う重鎖CDR2をコードしており、CDRサブバンク23は、ヌクレオチド配列を含む複数の核酸配列を含んでなり、各ヌクレオチド配列はChothiaシステムに従う重鎖CDR3をコードしている。

【０１５１】

いくつかの実施形態において、CDR配列は、機能性抗体配列から誘導される。いくつかの実施形態において、CDR配列は、少なくとも５個、少なくとも６個、少なくとも７個、少なくとも８個、少なくとも９個または少なくとも10個連続したヌクレオチド配列を含み、当業界で公知のいずれかの方法によって合成されるランダム配列である。CDRサブバンクは、コンビナトリアルサブライブラリーの構築に使用できる。あるいはまた、特に関心がもたれるCDRを選択して、コンビナトリアルサブライブラリーの構築に使用してもよい（セクション5.3を参照）。

【０１５２】

2.4　コンビナトリアルサブライブラリーの構築

コンビナトリアルサブライブラリーは、非ヒトCDRを、FRサブバンクの対応するヒトフレームワーク領域とin frameに融合することにより構築される。例えば、コンビナトリアルサブライブラリー１は、サブバンク１を用いて、非ヒトCDRを対応するκ軽鎖ヒトフレームワーク領域とin frameに融合させることにより構築され；コンビナトリアルサブライブラリー２は、サブバンク２を用いて、非ヒトCDRを対応するκ軽鎖ヒトフレームワーク領域とin frameに融合させることにより構築され；コンビナトリアルサブライブラリー３は、サブバンク３を用いて、非ヒトCDRを対応するκ軽鎖ヒトフレームワーク領域とin frameに融合させることにより構築され；コンビナトリアルサブライブラリー４は、サブバンク４を用いて、非ヒトCDRを対応するκ軽鎖ヒトフレームワーク領域とin frameに融合させることにより構築され；コンビナトリアルサブライブラリー５、６および７は、それぞれサブバンク５、６および７を用いて、非ヒトCDR（CDR H1およびH2についてのKabat定義)を対応する重鎖ヒトフレームワーク領域とin frameに融合させることにより構築され；コンビナトリアルサブライブラリー８、９および10は、それぞれサブバンク８、９および10を用いて、非ヒトCDR（CDR H1およびH2についてのChothia定義）を対応する重鎖ヒトフレームワーク領域とin frameに融合させることにより構築され；コンビナトリアルサブライブラリー11は、サブバンク11を用いて、非ヒトCDR H3（KabatおよびChothiaの定義）を対応するヒト重鎖フレームワーク領域とin frameに融合させることにより構築される。いくつかの実施形態では、非ヒトCDRもまた、CDRライブラリーから選択することができる。

【０１５３】

コンビナトリアルサブライブラリーの構築は、当業界で公知のいずれの方法を用いても

実施可能である。限定するものではないが、その一例として、コンビナトリアルサブライブラリー１は、表34および表35のオリゴヌクレオチド（全て5’から3’の方向で示されており、名称の後ろに配列を示す）を用いるオーバーラップ伸長法によるポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を用いて構築される。配列中、K＝GまたはT、M＝AまたはC、R＝AまたはG、S＝CまたはG、W＝AまたはT、Y＝CまたはTである。

【表３４】

表 34. 軽鎖 FR1 抗体特異的フォワードプライマー (サブライブラリー1 用)

1240	AL1	GATGTTGTGATGACWCAGTCT
1241	AL2	GACATCCAGATGAYCCAGTCT
1242	AL3	GCCATCCAGWTGACCCAGTCT
1243	AL4	GAAATAGTGATGAYGCAGTCT
1244	AL5	GAAATTGTGTTGACRCAGTCT
1245	AL6	GAKATTGTGATGACCCAGACT
1246	AL7	GAAATTGTRMTGACWCAGTCT
1247	AL8	GAYATYGTGATGACYCAGTCT
1248	AL9	GAAACGACACTCACGCAGTCT
1249	AL10	GACATCCAGTTGACCCAGTCT
1250	AL11	AACATCCAGATGACCCAGTCT
1251	AL12	GCCATCCGGATGACCCAGTCT
1252	AL13	GTCATCTGGATGACCCAGTCT

【表３５】

表 35. 軽鎖 FR1 抗体特異的リバースプライマー (サブライブラリー1 用)

1253	AL1’	[CDR L1 の最初の 70%]-GCAGGAGATGGAGGCCGGCTS
1254	AL2’	[CDR L1 の最初の 70%]-GCAGGAGAGGGTGRCTCTTTC
1255	AL3’	[CDR L1 の最初の 70%]-ACAASTGATGGTGACTCTGTC
1256	AL4’	[CDR L1 の最初の 70%]-GAAGGAGATGGAGGCCGGCTG
1257	AL5’	[CDR L1 の最初の 70%]-GCAGGAGATGGAGGCCTGCTC
1258	AL6’	[CDR L1 の最初の 70%]-GCAGGAGATGTTGACTTTGTC
1259	AL7’	[CDR L1 の最初の 70%]-GCAGGTGATGGTGACTTTCTC
1260	AL8’	[CDR L1 の最初の 70%]-GCAGTTGATGGTGGCCCTCTC
1261	AL9’	[CDR L1 の最初の 70%]-GCAAGTGATGGTGACTCTGTC
1262	AL10’	[CDR L1 の最初の 70%]-GCAAATGATACTGACTCTGTC

【０１５４】

AL1～AL13をAL1'～AL10'と組み合わせて用い、テンプレートとしてサブバンク１、又は表１に記載する配列に対応するオリゴヌクレオチドのプールを用いてPCRを行う。これにより、コンビナトリアルサブライブラリー１が作製される。

【０１５５】

限定するものではないが、一例として、コンビナトリアルサブライブラリー２は、表36および表37のオリゴヌクレオチド（全て5’から3’の方向で示されており、名称の後ろに配列を示す）を用いるオーバーラップ伸長法によるポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を用いて構築される。配列中、K＝GまたはT、M＝AまたはC、R＝AまたはG、S＝CまたはG、W＝AまたはT、Y＝CまたはTである。

【表３６】

表 36. 軽鎖 FR2 抗体特異的フォワードプライマー (サブライブラリー2 用):

1263	BL1	[CDR L1 の最後の 70%]-TGGYTTCAGCAGAGGCCAGGC
1264	BL2	[CDR L1 の最後の 70%]-TGGTACCTGCAGAAGCCAGGS
1265	BL3	[CDR L1 の最後の 70%]-TGGTATCRGCAGAAACCAGGG
1266	BL4	[CDR L1 の最後の 70%]-TGGTACCARCAGAAACCAGGA
1267	BL5	[CDR L1 の最後の 70%]-TGGTACCARCAGAAACCTGGC
1268	BL6	[CDR L1 の最後の 70%]-TGGTAYCWGCAGAAACCWGGG
1269	BL7	[CDR L1 の最後の 70%]-TGGTATCAGCARAAACCWGGS
1270	BL8	[CDR L1 の最後の 70%]-TGGTAYCAGCARAAACCAG
1271	BL9	[CDR L1 の最後の 70%]-TGGTTTCTGCAGAAAGCCAGG
1272	BL10	[CDR L1 の最後の 70%]-TGGTTTCAGCAGAAACCAGGG

【表３７】

表 37. 軽鎖 FR2 抗体特異的リバースプライマー (サブライブラリー2 用)

1273	BL1'	[CDR L2 の最初の 70%]-ATAGATCAGGAGCTGTGGAGR
1274	BL2'	[CDR L2 の最初の 70%]-ATAGATCAGGAGCTTAGGRGC
1275	BL3'	[CDR L2 の最初の 70%]-ATAGATGAGGAGCCTGGGMGC
1276	BL4'	[CDR L2 の最初の 70%]-RTAGATCAGGMGCTTAGGGGC
1277	BL5'	[CDR L2 の最初の 70%]-ATAGATCAGGWGCTTAGGRAC
1278	BL6'	[CDR L2 の最初の 70%]-ATAGATGAAGAGCTTAGGGGC
1279	BL7'	[CDR L2 の最初の 70%]-ATAAATTAGGAGTCTTGGAGG
1280	BL8'	[CDR L2 の最初の 70%]-GTAAATGAGCAGCTTAGGAGG
1281	BL9'	[CDR L2 の最初の 70%]-ATAGATCAGGAGTGTGGAGAC
1281	BL10'	[CDR L2 の最初の 70%]-ATAGATCAGGAGCTCAGGGGC
1283	BL11'	[CDR L2 の最初の 70%]-ATAGATCAGGGACTTAGGGGC
1284	BL12'	[CDR L2 の最初の 70%]-ATAGAGGAAGAGCTTAGGGGA
1285	BL13'	[CDR L2 の最初の 70%]-CTTGATGAGGAGCTTTGGAGA
1286	BL14'	[CDR L2 の最初の 70%]-ATAAATTAGGCGCCTTGGAGA
1287	BL15'	[CDR L2 の最初の 70%]-CTTGATGAGGAGCTTTGGGGC
1288	BL16'	[CDR L2 の最初の 70%]-TTGAATAATGAAAATAGCAGC

【０１５６】

BL1～BL10をBL1'～BL16'と組み合わせて用い、テンプレートとしてサブバンク２、又は表２に記載する配列に対応するオリゴヌクレオチドのプールを用いてPCRを行う。これにより、コンビナトリアルサブライブラリー２が作製される。

【０１５７】

限定するものではないが、一例として、コンビナトリアルサブライブラリー３は、表38および表39のオリゴヌクレオチド（全て5'から3'の方向で示されており、名称の後ろに配列を示す）を用いるオーバーラップ伸長法によるポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を用いて構築される。配列中、K＝GまたはT、M＝AまたはC、R＝AまたはG、S＝CまたはG、W＝AまたはT、Y＝CまたはTである。

【表３８】

表 38. 軽鎖 FR3 抗体特異的フォワードプライマー (サブライブラリー3 用):

1289	CL1 [CDR L2 の最後の 70%]-GGGGTCCCAGACAGATTCAGY
1290	CL2 [CDR L2 の最後の 70%]-GGGGTCCCATCAAGGTTCAGY
1291	CL3 [CDR L2 の最後の 70%]-GGYATCCCAGCCAGGTTCAGT
1292	CL4 [CDR L2 の最後の 70%]-GGRGTCCCWGACAGGTTCAGT
1293	CL5 [CDR L2 の最後の 70%]-AGCATCCCAGCCAGGTTCAGT
1294	CL6 [CDR L2 の最後の 70%]-GGGGTCCCCTCGAGGTTCAGT
1295	CL7 [CDR L2 の最後の 70%]-GGAATCCCACCTCGATTCAGT
1296	CL8 [CDR L2 の最後の 70%]-GGGGTCCCTGACCGATTCAGT
1297	CL9 [CDR L2 の最後の 70%]-GGCATCCCAGACAGGTTCAGT
1298	CL10 [CDR L2 の最後の 70%]-GGGGTCTCATCGAGGTTCAGT
1299	CL11 [CDR L2 の最後の 70%]-GGAGTGCCAGATAGGTTCAGT

【表３９】

表 39. 軽鎖 FR3 抗体特異的リバースプライマー (サブライブラリー3 用)

1300	CL1' [CDR L3 の最初の 70%]-KCAGTAATAAACCCCAACATC
1301	CL2' [CDR L3 の最初の 70%]-ACAGTAATAYGTTGCAGCATC
1302	CL3' [CDR L3 の最初の 70%]-ACMGTAATAAGTTGCAACATC
1303	CL4' [CDR L3 の最初の 70%]-RCAGTAATAAGTTGCAAAATC
1304	CL5' [CDR L3 の最初の 70%]-ACAGTAATAARCTGCAAAATC
1305	CL6' [CDR L3 の最初の 70%]-ACARTAGTAAGTTGCAAAATC
1306	CL7' [CDR L3 の最初の 70%]-GCAGTAATAAACTCCAAMATC
1307	CL8' [CDR L3 の最初の 70%]-GCAGTAATAAACCCCGACATC
1308	CL9' [CDR L3 の最初の 70%]-ACAGAAGTAATATGCAGCATC
1309	CL10' [CDR L3 の最初の 70%]-ACAGTAATATGTTGCAATATC
1310	CL11' [CDR L3 の最初の 70%]-ACAGTAATACACTGCAAAATC
1311	CL12' [CDR L3 の最初の 70%]-ACAGTAATAAACTGCCACATC

【０１５８】

CL1～CL11をCL1'～CL12'と組み合わせて用い、テンプレートとしてサブバンク３、又は表３に記載する配列に対応するオリゴヌクレオチドのプールを用いてPCRを行う。これにより、コンビナトリアルサブライブラリー３が作製される。

【０１５９】

限定するものではないが、一例として、コンビナトリアルサブライブラリー４は、表40および表41のオリゴヌクレオチド（全て5'から3'の方向で示されており、名称の後ろに配列を示す）を用いるオーバーラップ伸長法によるポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を用いて構築される。配列中、K＝GまたはT、M＝AまたはC、R＝AまたはG、S＝CまたはG、W＝AまたはT、Y＝CまたはTである。

【表４０】

表 40. 軽鎖 FR4 抗体特異的フォワードプライマー (サブライブラリー4 用):

1312	DL1 [CDR L3 の最後の 70%]-TTYGGCCARGGGACCAAGSTG
1313	DL2 [CDR L3 の最後の 70%]-TTCGGCCAAGGGACACGACTG
1314	DL3 [CDR L3 の最後の 70%]-TTCGGCCCTGGGACCAAAGTG
1315	DL4 [CDR L3 の最後の 70%]-TTCGGCGGAGGGACCAAGGTG

【表４１】

表 41. 軽鎖 FR4 抗体特異的リバースプライマー (サブライブラリー4 用)

1316	DL1'	TTTGATYTCCACCTTGGTCCC
1317	DL2'	TTTGATCTCCAGCTTGGTCCC
1318	DL3'	TTTGATATCCACTTTGGTCCC
1319	DL4'	TTTAATCTCCAGTCGTGTCCC

【０１６０】

DL1～DL4をDL1'～DL14'と組み合わせて用い、テンプレートとしてサブバンク４、又は表４に記載する配列に対応するオリゴヌクレオチドのプールを用いてPCRを行う。これにより、コンビナトリアルサブライブラリー4が作製される。

【０１６１】

限定するものではないが、一例として、コンビナトリアルサブライブラリー５は、表42および表43のオリゴヌクレオチド（全て5’から3’の方向で示されており、名称の後ろに配列を示す）を用いるオーバーラップ伸長法によるポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を用いて構築される。配列中、K＝GまたはT、M＝AまたはC、R＝AまたはG、S＝CまたはG、W＝AまたはT、Y＝CまたはTである。

【表４２】

表 42. 重鎖 FR1 (Kabat 定義) 抗体特異的フォワードプライマー (サブライブラリー 5 用):

1320	AH1	CAGGTKCAGCTGGTGCAGTCT
1321	AH2	GAGGTGCAGCTGKTGGAGTCT
1322	AH3	CAGSTGCAGCTGCAGGAGTCG
1323	AH4	CAGGTCACCTTGARGGAGTCT
1324	AH5	CARATGCAGCTGGTGCAGTCT
1325	AH6	GARGTGCAGCTGGTGSAGTC
1326	AH7	CAGATCACCTTGAAGGAGTCT
1327	AH8	CAGGTSCAGCTGGTRSAGTCT
1328	AH9	CAGGTACAGCTGCAGCAGTCA
1329	AH10	CAGGTGCAGCTACAGCAGTGG

【表４３】

表 43. 重鎖 FR1 (Kabat 定義) 抗体特異的リバースプライマー (サブライブラリー5用):

1330	AHK1' [CDR H1 の最初の 70%]-RGTGAAGGTGTATCCAGAAGC
1331	AHK2' [CDR H1 の最初の 70%]-GCTGAGTGAGAACCCAGAGAM
1332	AHK3' [CDR H1 の最初の 70%]-ACTGAARGTGAATCCAGAGGC
1333	AHK4' [CDR H1 の最初の 70%]-ACTGACGGTGAAYCCAGAGGC
1334	AHK5' [CDR H1 の最初の 70%]-GCTGAYGGAGCCACCAGAGAC
1335	AHK6' [CDR H1 の最初の 70%]-RGTAAAGGTGWAWCCAGAAGC
1336	AHK7' [CDR H1 の最初の 70%]-ACTRAAGGTGAAYCCAGAGGC
1337	AHK8' [CDR H1 の最初の 70%]-GGTRAARCTGTAWCCAGAASC
1338	AHK9' [CDR H1 の最初の 70%]-AYCAAAGGTGAATCCAGARGC
1339	AHK10'[CDR H1 の最初の 70%]-RCTRAAGGTGAATCCAGASGC
1340	AHK12 [CDR H1 の最初の 70%]-GGTGAAGGTGTATCCRGAWGC
1341	AHK13'[CDR H1 の最初の 70%]-ACTGAAGGACCCACCATAGAC
1342	AHK14'[CDR H1 の最初の 70%]-ACTGATGGAGCCACCAGAGAC
1343	AHK15'[CDR H1 の最初の 70%]-GCTGATGGAGTAACCAGAGAC
1344	AHK16 [CDR H1 の最初の 70%]-AGTGAGGGTGTATCCGGAAAC
1345	AHK17'[CDR H1 の最初の 70%]-GCTGAAGGTGCCTCCAGAAGC
1346	AHK18'[CDR H1 の最初の 70%]-AGAGACACTGTCCCCGGAGAT

【０１６２】

AH1～AH10をAHK1'～AHK18'と組み合わせて用い、テンプレートとしてサブバンク５、又は表5に記載する配列に対応するオリゴヌクレオチドのプールを用いてPCRを行う。これにより、コンビナトリアルサブライブラリー5が作製される。

【０１６３】

限定するものではないが、一例として、コンビナトリアルサブライブラリー６は、表44および表45のオリゴヌクレオチド（全て5'から3'の方向で示されており、名称の後ろに配列を示す）を用いるオーバーラップ伸長法によるポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を用いて構築される。配列中、K＝GまたはT、M＝AまたはC、R＝AまたはG、S＝CまたはG、W＝AまたはT、Y＝CまたはTである。

【表４４】

表 44. 重鎖 FR2 (Kabat 定義) 抗体特異的フォワードプライマー (サブライブラリー6 用):

1347	BHK1 [CDR H1 の最後の 70%]-TGGGTGCGACAGGCYCCTGGA
1348	BHK2 [CDR H1 の最後の 70%]-TGGGTGCGMCAGGCCCCCGGA
1349	BHK3 [CDR H1 の最後の 70%]-TGGATCCGTCAGCCCCCAGGR
1350	BHK4 [CDR H1 の最後の 70%]-TGGRTCCGCCAGGCTCCAGGG
1351	BHK5 [CDR H1 の最後の 70%]-TGGATCCGSCAGCCCCCAGGG
1352	BHK6 [CDR H1 の最後の 70%]-TGGGTCCGSCAAGCTCCAGGG
1353	BHK7 [CDR H1 の最後の 70%]-TGGGTCCRTCARGCTCCRGGR
1354	BHK8 [CDR H1 の最後の 70%]-TGGGTSCGMCARGCYACWGGA
1355	BHK9 [CDR H1 の最後の 70%]-TGGKTCCGCCAGGCTCCAGGS
1356	BHK10 [CDR H1 の最後の 70%]-TGGATCAGGCAGTCCCCATCG
1357	BHK11 [CDR H1 の最後の 70%]-TGGGCCCGCAAGGCTCCAGGA
1358	BHK12 [CDR H1 の最後の 70%]-TGGATCCGCCAGCACCCAGGG
1359	BHK13 [CDR H1 の最後の 70%]-TGGGTCCGCCAGGCTTCCGGG
1360	BHK14 [CDR H1 の最後の 70%]-TGGGTGCGCCAGATGCCCGGG
1361	BHK15 [CDR H1 の最後の 70%]-TGGGTGCGACAGGCTCGTGGA
1362	BHK16 [CDR H1 の最後の 70%]-TGGATCCGGCAGCCCGCCGGG
1363	BHK17 [CDR H1 の最後の 70%]-TGGGTGCCACAGGCCCCTGGA

【表４５】

表 45. 重鎖 FR2 (Kabat 定義) 抗体特異的リバースプライマー (サブライブラリー6用):

1364	BHK1' [CDR H2 の最初の 70%]-TCCCATCCACTCAAGCCYTTG
1365	BHK2' [CDR H2 の最初の 70%]-TCCCATCCACTCAAGCSCTT
1366	BHK3' [CDR H2 の最初の 70%]-WGAGACCCACTCCAGCCCCTT
1367	BHK4' [CDR H2 の最初の 70%]-CCCAATCCACTCCAGKCCCTT
1368	BHK5' [CDR H2 の最初の 70%]-TGAGACCCACTCCAGRCCCTT
1369	BHK6' [CDR H2 の最初の 70%]-GCCAACCCACTCCAGCCCYTT
1370	BHK7' [CDR H2 の最初の 70%]-KGCCACCCACTCCAGCCCCTT
1371	BHK8' [CDR H2 の最初の 70%]-TCCCAGCCACTCAAGGCCTC
1372	BHK9' [CDR H2 の最初の 70%]-CCCCATCCACTCCAGGCCTT
1373	BHK10' [CDR H2 の最初の 70%]-TGARACCCACWCCAGCCCCTT
1374	BHK12' [CDR H2 の最初の 70%]-MGAKACCCACTCCAGMCCCTT
1375	BHK13' [CDR H2 の最初の 70%]-YCCMATCCACTCMAGCCCYTT
1376	BHK14' [CDR H2 の最初の 70%]-TCCTATCCACTCAAGGCGTTG
1377	BHK15' [CDR H2 の最初の 70%]-TGCAAGCCACTCCAGGGCCTT
1378	BHK16' [CDR H2 の最初の 70%]-TGAAACATATTCCAGTCCCTT
1379	BHK17' [CDR H2 の最初の 70%]-CGATACCCACTCCAGCCCCTT

【０１６４】

BHK1～BHK17をBHK1'～BHK17'と組み合わせて用い、テンプレートとしてサブバンク６、又は表6に記載する配列に対応するオリゴヌクレオチドのプールを用いてPCRを行う。これにより、コンビナトリアルサブライブラリー6が作製される。

【０１６５】

限定するものではないが、一例として、コンビナトリアルサブライブラリー７は、表46および表47のオリゴヌクレオチド（全て5'から3'の方向で示されており、名称の後ろに配列を示す）を用いるオーバーラップ伸長法によるポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を用いて構築される。配列中、K＝GまたはT、M＝AまたはC、R＝AまたはG、S＝CまたはG、W＝AまたはT、Y＝CまたはTである。

【表４６】

表 46. 重鎖 FR3 (Kabat 定義) 抗体特異的フォワードプライマー (サブライブラリー7用):

1380	CHK1 [CDR H2 の最後の 70%]-AGAGTCACCATGACCAGGRAC
1381	CHK2 [CDR H2 の最後の 70%]-AGGCTCACCATCWCCAAGGAC
1382	CHK3 [CDR H2 の最後の 70%]-CGAGTYACCATATCAGTAGAC
1383	CHK4 [CDR H2 の最後の 70%]-CGATTCACCATCTCCAGRGAC
1384	CHK5 [CDR H2 の最後の 70%]-AGATTCACCATCTCMAGAGA
1385	CHK6 [CDR H2 の最後の 70%]-MGGTTCACCATCTCCAGAGA
1386	CHK7 [CDR H2 の最後の 70%]-CGATTCAYCATCTCCAGAGA
1387	CHK8 [CDR H2 の最後の 70%]-CGAGTCACCATRTCMGTAGAC
1388	CHK9 [CDR H2 の最後の 70%]-AGRGTCACCATKACCAGGGAC
1389	CHK10 [CDR H2 の最後の 70%]-CAGGTCACCATCTCAGCCGAC
1390	CHK11 [CDR H2 の最後の 70%]-CGAATAACCATCAACCCAGAC
1391	CHK12 [CDR H2 の最後の 70%]-CGGTTTGTCTTCTCCATGGAC
1392	CHK13 [CDR H2 の最後の 70%]-AGAGTCACCATGACCGAGGAC
1393	CHK14 [CDR H2 の最後の 70%]-AGAGTCACGATTACCGCGGAC
1394	CHK15 [CDR H2 の最後の 70%]-AGAGTCACCATGACCACAGAC

【表４７】

表 47. 重鎖 FR3 (Kabat 定義) 抗体特異的リバースプライマー (サブライブラリー7用)

1395	CHK1' [CDR H3 の最初の 70%]-TCTAGYACAGTAATACACGGC
1396	CHK2' [CDR H3 の最初の 70%]-TCTCGCACAGTAATACAYGGC
1397	CHK3' [CDR H3 の最初の 70%]-TCTYGCACAGTAATACACAGC
1398	CHK4' [CDR H3 の最初の 70%]-TGYYGCACAGTAATACACGGC
1399	CHK5' [CDR H3 の最初の 70%]-CCGTGCACARTAATAYGTGGC
1400	CHK6' [CDR H3 の最初の 70%]-TCTGGCACAGTAATACACGGC
1401	CHK7' [CDR H3 の最初の 70%]-TGTGGTACAGTAATACACGGC
1402	CHK8' [CDR H3 の最初の 70%]-TCTCGCACAGTGATACAAGGC
1403	CHK9' [CDR H3 の最初の 70%]-TTTTGCACAGTAATACAAGGC
1404	CHK10' [CDR H3 の最初の 70%]-TCTTGCACAGTAATACATGGC
1405	CHK11' [CDR H3 の最初の 70%]-GTGTGCACAGTAATATGTGGC
1406	CHK12' [CDR H3 の最初の 70%]-TTTCGCACAGTAATATACGGC
1407	CHK13' [CDR H3 の最初の 70%]-TCTCACACAGTAATACACAGC

【０１６６】

CHK1～CHK15をCHK1'～CHK13'と組み合わせて用い、テンプレートとしてサブバンク７、又は表7に記載する配列に対応するオリゴヌクレオチドのプールを用いてPCRを行う。これにより、コンビナトリアルサブライブラリー7が作製される。

【０１６７】
限定するものではないが、一例として、コンビナトリアルサブライブラリー８は、表48および表49のオリゴヌクレオチド（全て5’から3’の方向で示されており、名称の後ろに配列を示す）を用いるオーバーラップ伸長法によるポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を用いて構築される。配列中、K＝GまたはT、M＝AまたはC、R＝AまたはG、S＝CまたはG、W＝AまたはT、Y＝CまたはTである。
【表４８】

表 48. 重鎖 FR1 (Chothia 定義) 抗体特異的フォワードプライマー (サブライブラリー8 用):

1408	AH1	CAGGTKCAGCTGGTGCAGTCT
1409	AH2	GAGGTGCAGCTGKTGGAGTCT
1410	AH3	CAGSTGCAGCTGCAGGAGTCG
1411	AH4	CAGGTCACCTTGARGGAGTCT
1412	AH5	CARATGCAGCTGGTGCAGTCT
1413	AH6	GARGTGCAGCTGGTGSAGTC
1414	AH7	CAGATCACCTTGAAGGAGTCT
1415	AH8	CAGGTSCAGCTGGTRSAGTCT
1416	AH9	CAGGTACAGCTGCAGCAGTCA
1417	AH10	CAGGTGCAGCTACAGCAGTGG

【表４９】

表 49. 重鎖 FR1 (Chothia 定義) 抗体特異的リバースプライマー (サブライブラリー8 用)

1418	AHC1’	[CDR H1 の最初の 70%]- RGAARCCTTGCAGGAGACCTT
1419	AHC2’	[CDR H1 の最初の 70%]- RGAAGCCTTGCAGGAAACCTT
1420	AHC3’	[CDR H1 の最初の 70%]- AGATGCCTTGCAGGAAACCTT
1421	AHC4’	[CDR H1 の最初の 70%]- AGAGAMGGTGCAGGTCAGCGT
1422	AHC5’	[CDR H1 の最初の 70%]- AGASGCTGCACAGGAGAGTCT
1423	AHC6’	[CDR H1 の最初の 70%]- AGAGACAGTRCAGGTGAGGGA
1424	AHC7’	[CDR H1 の最初の 70%]- AKAGACAGCGCAGGTGAGGGA
1425	AHC8’	[CDR H1 の最初の 70%]- AGAGAAGGTGCAGGTCAGTGT
1426	AHC9’	[CDR H1 の最初の 70%]- AGAAGCTGTACAGGAGAGTCT
1427	AHC10’	[CDR H1 の最初の 70%]- AGAGGCTGCACAGGAGAGTTT
1428	AHC12’	[CDR H1 の最初の 70%]- AGAACCCTTACAGGAGATCTT
1429	AHC13’	[CDR H1 の最初の 70%]- GGAGATGGCACAGGTGAGTGA

【０１６８】
AH1～AH10をAHC1'～AHC13'と組み合わせて用い、テンプレートとしてサブバンク８、又は表8に記載する配列に対応するオリゴヌクレオチドのプールを用いてPCRを行う。これにより、コンビナトリアルサブライブラリー8が作製される。
【０１６９】
限定するものではないが、一例として、コンビナトリアルサブライブラリー９は、表50および表51のオリゴヌクレオチド（全て5’から3’の方向で示されており、名称の後ろに

配列を示す）を用いるオーバーラップ伸長法によるポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を用いて構築される。配列中、K＝GまたはT、M＝AまたはC、R＝AまたはG、S＝CまたはG、W＝AまたはT、Y＝CまたはTである。

【表５０】

表 50. 重鎖 FR2 (Chothia 定義) 抗体特異的フォワードプライマー (サブライブラリー9 用):

1430	BHC1 [CDR H1 の最後の 70%]-TATGGYATSAGCTGGGTGCGM
1431	BHC2 [CDR H1 の最後の 70%]-ATGKGTGTGAGCTGGATCCGT
1432	BHC3 [CDR H1 の最後の 70%]-TACTACTGGRGCTGGATCCGS
1433	BHC4 [CDR H1 の最後の 70%]-TATGCYATSAGCTGGGTSCGM
1434	BHC5 [CDR H1 の最後の 70%]-TCTGCTATGCASTGGGTSCGM
1435	BHC6 [CDR H1 の最後の 70%]-TATGCYATGCAYTGGGTSCGS
1436	BHC7 [CDR H1 の最後の 70%]-CGCTACCTGCACTGGGTGCGA
1437	BHC8 [CDR H1 の最後の 70%]-TTATCCATGCACTGGGTGCGA
1438	BHC9 [CDR H1 の最後の 70%]-GCCTGGATGAGCTGGGTCCGC
1439	BHC10 [CDR H1 の最後の 70%]-GCTGCTTGGAACTGGATCAGG
1440	BHC11 [CDR H1 の最後の 70%]-AATGAGATGAGCTGGATCCGC
1441	BHC12 [CDR H1 の最後の 70%]-AACTACATGAGCTGGGTCCGC
1442	BHC13 [CDR H1 の最後の 70%]-AACTGGTGGGGCTGGATCCGG
1443	BHC14 [CDR H1 の最後の 70%]-GTGGGTGTGGGCTGGATCCGT
1444	BHC15 [CDR H1 の最後の 70%]-CACTACATGGACTGGGTCCGC
1445	BHC16 [CDR H1 の最後の 70%]-AGTGACATGAACTGGGCCCGC
1446	BHC17 [CDR H1 の最後の 70%]-AGTGACATGAACTGGGTCCAT
1447	BHC18 [CDR H1 の最後の 70%]-TATACCATGCACTGGGTCCGT
1448	BHC19 [CDR H1 の最後の 70%]-TATGCTATGCACTGGGTCCGC
1449	BHC20 [CDR H1 の最後の 70%]-TATGCTATGAGCTGGTTCCGC
1450	BHC21 [CDR H1 の最後の 70%]-TATAGCATGAACTGGGTCCGC
1451	BHC22 [CDR H1 の最後の 70%]-TATGGCATGCACTGGGTCCGC
1452	BHC23 [CDR H1 の最後の 70%]-TATTGGATGAGCTGGGTCCGC
1453	BHC24 [CDR H1 の最後の 70%]-TACGACATGCACTGGGTCCGC
1454	BHC25 [CDR H1 の最後の 70%]-TACTACATGAGCTGGATCCGC
1455	BHC26 [CDR H1 の最後の 70%]-TACTGGATGCACTGGGTCCGC
1456	BHC27 [CDR H1 の最後の 70%]-TACTGGATCGGCTGGGTGCGC
1457	BHC28 [CDR H1 の最後の 70%]-TACTATATGCACTGGGTGCGA
1458	BHC29 [CDR H1 の最後の 70%]-TATGATATCAACTGGGTGCGA
1459	BHC30 [CDR H1 の最後の 70%]-TATGGTATGAATTGGGTGCCA

【表５１】

表 51. 重鎖 FR2 (Chothia 定義) 抗体特異的リバースプライマー (サブライブラリー9用)

1460	BHC1' [First 70% of CDR H2 の最初の 70%]-AATASCWGAGACCCACTCCAG
1461	BHC2' [First 70% of CDR H2 の最初の 70%]-AATAASWGAGACCCACTCCAG
1462	BHC3' [CDR H2 の最初の 70%]-GMTCCATCCCATCCACTCAAG
1463	BHC4' [CDR H2 の最初の 70%]-GATACKCCCAATCCACTCCAG
1464	BHC5' [CDR H2 の最初の 70%]-GATRTACCCAATCCACTCCAG
1465	BHC6' [CDR H2 の最初の 70%]-AATGWGTGCAAGCCACTCCAG
1466	BHC7' [CDR H2 の最初の 70%]-AAYACCYGAKACCCACTCCAG
1467	BHC8' [CDR H2 の最初の 70%]-AATGKATGARACCCACTCCAG
1468	BHC9' [CDR H2 の最初の 70%]-ARTACGGCCAACCCACTCCAG
1469	BHC10' [CDR H2 の最初の 70%]-AAAACCTCCCATCCACTCAAG
1470	BHC12' [CDR H2 の最初の 70%]-GATTATTCCCATCCACTCAAG
1471	BHC13' [CDR H2 の最初の 70%]-GATCCATCCTATCCACTCAAG
1472	BHC14' [CDR H2 の最初の 70%]-GAACCATCCCATCCACTCAAG
1473	BHC15' [CDR H2 の最初の 70%]-GATCCCTCCCATCCACTCAAG
1474	BHC16' [CDR H2 の最初の 70%]-CATCCATCCCATCCACTCAAG
1475	BHC17' [CDR H2 の最初の 70%]-TGTCCTTCCCAGCCACTCAAG
1476	BHC18' [CDR H2 の最初の 70%]-AATACGTGAGACCCACACCAG
1477	BHC19' [CDR H2 の最初の 70%]-AATAGCTGAAACATATTCCAG
1478	BHC20' [CDR H2 の最初の 70%]-GATTTCCCCAATCCACTCCAG
1479	BHC21' [CDR H2 の最初の 70%]-GATGATCCCCATCCACTCCAG
1480	BHC22' [CDR H2 の最初の 70%]-TATAACTGCCACCCACTCCAG
1481	BHC23' [CDR H2 の最初の 70%]-AATGAAACCTACCCACTCCAG
1482	BHC24' [CDR H2 の最初の 70%]-TATGTTGGCCACCCACTCCAG

【０１７０】

BHC1～BHC30をBHC1'～BHC24'と組み合わせて用い、テンプレートとしてサブバンク９、又は表9に記載する配列に対応するオリゴヌクレオチドのプールを用いてPCRを行う。これにより、コンビナトリアルサブライブラリー9が作製される。

【０１７１】

限定するものではないが、一例として、コンビナトリアルサブライブラリー10は、表52および表53のオリゴヌクレオチド（全て5'から3'の方向で示されており、名称の後ろに配列を示す）を用いるオーバーラップ伸長法によるポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を用いて構築される。配列中、K＝GまたはT、M＝AまたはC、R＝AまたはG、S＝CまたはG、W＝AまたはT、Y＝CまたはTである。

【表５２】

表 52. 重鎖 FR3 (Chothia 定義) 抗体特異的フォワードプライマー (サブライブラリー10 用):

1483	CHC1	[CDR H2 の最後の 70%]-ACCAACTACAACCCSTCCCTC
1484	CHC2	[CDR H2 の最後の 70%]-ATATACTACGCAGACTCWGTG
1485	CHC3	[CDR H2 の最後の 70%]-ACATACTAYGCAGACTCYGTG
1486	CHC4	[CDR H2 の最後の 70%]-ACMAACTACGCACAGAARTTC
1487	CHC5	[CDR H2 の最後の 70%]-ACAAACTATGCACAGAAGYT
1488	CHC6	[CDR H2 の最後の 70%]-ACARGCTAYGCACAGAAGTTC
1489	CHC7	[CDR H2 の最後の 70%]-AYAGGYTATGCRGACTCTGTG
1490	CHC8	[CDR H2 の最後の 70%]-AAATMCTACAGCACATCTCTG
1491	CHC9	[CDR H2 の最後の 70%]-AAATACTATGTGGACTCTGTG
1492	CHC10	[CDR H2 の最後の 70%]-CCAACATATGCCCAGGGCTTC
1493	CHC11	[CDR H2 の最後の 70%]-GCAAACTACGCACAGAAGTTC
1494	CHC12	[CDR H2 の最後の 70%]-AAATACTATGCAGACTCCGTG
1495	CHC13	[CDR H2 の最後の 70%]-AAGCGCTACAGCCCATCTCTG
1496	CHC14	[CDR H2 の最後の 70%]-AATGATTATGCAGTATCTGTG
1497	CHC15	[CDR H2 の最後の 70%]-ACCAGATACAGCCCGTCCTTC
1498	CHC16	[CDR H2 の最後の 70%]-ACAGAATACGCCGCGTCTGTG
1499	CHC17	[CDR H2 の最後の 70%]-ACGCACTATGCAGACTCTGTG
1500	CHC18	[CDR H2 の最後の 70%]-ACGCACTATGTGGACTCCGTG
1501	CHC19	[CDR H2 の最後の 70%]-ACAATCTACGCACAGAAGTTC
1502	CHC20	[CDR H2 の最後の 70%]-ACAAAATATTCACAGGAGTTC
1503	CHC21	[CDR H2 の最後の 70%]-ACATACTACGCAGACTCCAGG
1504	CHC22	[CDR H2 の最後の 70%]-ACAAGCTACGCGGACTCCGTG
1505	CHC23	[CDR H2 の最後の 70%]-ACATATTATGCAGACTCTGTG
1506	CHC24	[CDR H2 の最後の 70%]-ACAGACTACGCTGCACCCGTG
1507	CHC25	[CDR H2 の最後の 70%]-ACAGCATATGCTGCGTCGGTG
1508	CHC26	[CDR H2 の最後の 70%]-ACATACTATCCAGGCTCCGTG
1509	CHC27	[CDR H2 の最後の 70%]-ACCTACTACAACCCGTCCCTC

【表５３】

表 53. 重鎖 FR3 (Chothia 定義) 抗体特異的リバースプライマー (サブライブラリー 10 用):

1510	CHC1'	[CDR H3 の最初の 70%]- TSTYGCACAGTAATACACGGC
1511	CHC2'	[CDR H3 の最初の 70%]- TCTYGCACAGTAATACATGGC
1512	CHC3'	[CDR H3 の最初の 70%]- TCTAGYACAGTAATACACGGC
1513	CHC4'	[CDR H3 の最初の 70%]- CCGTGCACARTAATAYGTGGC
1514	CHC5'	[CDR H3 の最初の 70%]- TCTYGCACAGTAATACACAGC
1515	CHC6'	[CDR H3 の最初の 70%]- GTGTGCACAGTAATATGTGGC
1516	CHC7'	[CDR H3 の最初の 70%]- TGCCGCACAGTAATACACGGC
1517	CHC8'	[CDR H3 の最初の 70%]- TGTGGTACAGTAATACACGGC
1518	CHC9'	[CDR H3 の最初の 70%]- TCTCACACAGTAATACACAGC
1519	CHC10'	[CDR H3 の最初の 70%]- TCTCGCACAGTGATACAAGGC
1520	CHC11'	[CDR H3 の最初の 70%]- TTTCGCACAGTAATATACGGC
1521	CHC12'	[CDR H3 の最初の 70%]- TCTGGCACAGTAATACACGGC
1522	CHC13'	[CDR H3 の最初の 70%]- TTTTGCACAGTAATACAAGGC

【０１７２】

CHC1～CHC27をCHC1'～CHC13'と組み合わせて用い、テンプレートとしてサブバンク10、又は表10に記載する配列に対応するオリゴヌクレオチドのプールを用いてPCRを行う。これにより、コンビナトリアルサブライブラリー10が作製される。

【０１７３】

限定するものではないが、一例として、コンビナトリアルサブライブラリー11は、表54および表55のオリゴヌクレオチド（全て5'から3'の方向で示されており、名称の後ろに配列を示す）を用いるオーバーラップ伸長法によるポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を用いて構築される。配列中、K＝GまたはT、M＝AまたはC、R＝AまたはG、S＝CまたはG、W＝AまたはT、Y＝CまたはTである。

【表５４】

表 54. 重鎖 FR4 (Kabat および Chothia 定義) 抗体特異的フォワードプライマー (サブライブラリー11 用):

1523	DH1	[CDR H3 の最後の 70%]-TGGGGCCARGGMACCCTGGTC
1524	DH2	[CDR H3 の最後の 70%]-TGGGGSCAAGGGACMAYGGTC
1525	DH3	[CDR H3 の最後の 70%]-TGGGGCCGTGGCACCCTGGTC

【表５５】

表 55. 重鎖 FR4 (Kabat および Chothia 定義) 抗体特異的リバースプライマー (サブライブラリー11 用)

1526	DH1'	TGAGGAGACRGTGACCAGGGT
1527	DH2'	TGARGAGACGGTGACCRTKGT
1528	DH3'	TGAGGAGACGGTGACCAGGGT

【０１７４】

DH1～DHC3をDH1'～DH3'と組み合わせて用い、テンプレートとしてサブバンク11、又は表11に記載する配列に対応するオリゴヌクレオチドのプールを用いてPCRを行う。これにより、コンビナトリアルサブライブラリー11が作製される。

【０１７５】

いくつかの実施形態において、非ヒトCDRとサブバンクのヒトフレームワークの直接ライゲーションを用いて、９つのコンビナトリアルサブライブラリーが構築できる。例えば、コンビナトリアルサブライブラリー1’、2’および3’は、非ヒトCDR L1、L2およびL3（一本鎖または二本鎖の形態）をそれぞれサブバンク１、２および３に直接ライゲーションさせることにより、別々に構築される。１つの実施形態では、その非ヒトCDR（L1、L2およびL3）は、一本鎖核酸である。別の実施形態では、その非ヒトCDR（L1、L2およびL3）は二本鎖核酸である。あるいはまた、コンビナトリアルサブライブラリー1’、2’および3’は、一本鎖（＋）形態の非ヒトCDR（L1、L2およびL3）を、表１に示す核酸１～46、表２に示す核酸47～92および表３に示す核酸93～138とそれぞれ直接ライゲーションさせることにより得ることができる。

【０１７６】

いくつかの実施形態において、コンビナトリアルサブライブラリー5'および6'は、非ヒトCDR H1およびH2（一本鎖または二本鎖の形態であり、Kabatの定義に従うもの）をサブバンク５および６とそれぞれ直接ライゲーションさせることにより、別々に構築される。あるいはまた、サブライブラリー5'および6'は、非ヒトCDR H1およびH2（Kabatの定義に従うものであり、一本鎖（＋）形態のもの）を表５に示す核酸144～187および表６に示す188～231とそれぞれ直接ライゲーションさせることにより得てもよい。

【０１７７】

いくつかの実施形態において、コンビナトリアルサブライブラリー8'および9'は、非ヒトCDR H1およびH2（一本鎖形態であり、Chothiaの定義に従うもの）をサブバンク８および９とそれぞれ直接ライゲーションさせることにより、別々に構築される。あるいはまた、サブライブラリー8'および9'は、非ヒトCDR H1およびH2（Chothiaの定義に従い、一本鎖形態（＋）であるもの）を表８に示す核酸276～319および表９に示す320～363とそれぞれ直接ライゲーションさせることにより得てもよい。

【０１７８】

コンビナトリアルサブライブラリー11'および12'は、非ヒトCDR H3（一本鎖または二本鎖の形態）をサブバンク７（Kabatの定義）および10（Chothiaの定義）にそれぞれ直接ライゲーションさせることにより、別々に得られる。あるいはまた、サブライブラリー11'および12'は、非ヒトCDR H3（一本鎖（＋）形態）を表７に示す核酸232～275および表10に示す364～407とそれぞれ直接ライゲーションさせることにより得てもよい。

【０１７９】

DNA断片の直接ライゲーションは、標準的なプロトコールに従って行うことができる。次いで、ライゲーションしていない生成物からライゲーションしている生成物を精製／分離することができる。

【０１８０】

2.5　コンビナトリアルライブラリーの構築

コンビナトリアルライブラリーは、対応する可変軽鎖領域または可変重鎖領域のコンビナトリアルライブラリーを一緒にアセンブルすることにより構築される。例えば、ヒトκ軽鎖生殖系列フレームワークのコンビナトリアルライブラリー（コンビネーションライブラリー１）は、後記に記載するように、CDR中の重複領域によってサブライブラリー１、２、３および４を一緒にアセンブルすることにより構築できる。ヒト重鎖生殖系列フレームワークの２つのコンビナトリアルライブラリー（１つはCDRのKabat定義についてのもの、コンビネーションライブラリー２；１つはCDRのChothia定義についてのもの、コンビネーションライブラリー３）は、後記に記載するように、CDR中の重複領域によってサブライブラリー５、６、７、11（Kabat定義）またはサブライブラリー８、９、10、11（Chothia定義）を一緒にアセンブルすることにより構築できる。

【０１８１】

１つの実施形態において、コンビナトリアルライブラリー１の構築は、表56および表57に示すオリゴヌクレオチド（全て5’から3’の方向で示されており、プライマー名の後ろに配列を示す）を用いたオーバーラップ伸長法によるポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を用いて行われる。

【表５６】

表 56. 軽鎖フォワードプライマー (コンビナトリアルライブラリー1 用):

1529	AL1	GATGTTGTGATGACWCAGTCT
1530	AL2	GACATCCAGATGAYCCAGTCT
1531	AL3	GCCATCCAGWTGACCCAGTCT
1532	AL4	GAAATAGTGATGAYGCAGTCT
1533	AL5	GAAATTGTGTTGACRCAGTCT
1534	AL6	GAKATTGTGATGACCCAGACT
1535	AL7	GAAATTGTRMTGACWCAGTCT
1536	AL8	GAYATYGTGATGACYCAGTCT
1537	AL9	GAAACGACACTCACGCAGTCT
1538	AL10	GACATCCAGTTGACCCAGTCT
1539	AL11	AACATCCAGATGACCCAGTCT
1540	AL12	GCCATCCGGATGACCCAGTCT
1541	AL13	GTCATCTGGATGACCCAGTCT

【表５７】

表 57. 軽鎖リバースプライマー (コンビナトリアルライブラリー1 用):

1542	DL1’	TTTGATYTCCACCTTGGTCCC
1543	DL2’	TTTGATCTCCAGCTTGGTCCC
1544	DL3’	TTTGATATCCACTTTGGTCCC
1545	DL4’	TTTAATCTCCAGTCGTGTCCC

【０１８２】

AL1～AL13をDL1'～DL4'と組み合わせて用い、テンプレートとしてサブライブラリー１、２、３および４を合わせて、または表35～40のオリゴヌクレオチドならびに表１、２、３および４に記載される配列に対応するオリゴヌクレオチドのプールを用いてPCRを行う。これにより、コンビナトリアルライブラリー１が作製される。

【０１８３】

１つの実施形態において、コンビナトリアルライブラリー２および３の構築は、表58お

よび表59（全て5’から3’の方向で示されており、名称の後ろに配列を示す）に示すオリゴヌクレオチドを用いたオーバーラップ伸長法によるポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を用いて行われる。

【表５８】

表 58. 重鎖フォワードプライマー (コンビナトリアルライブラリー2 および 3 用, Kabat および Chothia 定義):

1546	AH1	CAGGTKCAGCTGGTGCAGTCT
1547	AH2	GAGGTGCAGCTGKTGGAGTCT
1548	AH3	CAGSTGCAGCTGCAGGAGTCG
1549	AH4	CAGGTCACCTTGARGGAGTCT
1550	AH5	CARATGCAGCTGGTGCAGTCT
1551	AH6	GARGTGCAGCTGGTGSAGTC
1552	AH7	CAGATCACCTTGAAGGAGTCT
1553	AH8	CAGGTSCAGCTGGTRSAGTCT
1554	AH9	CAGGTACAGCTGCAGCAGTCA
1555	AH10	CAGGTGCAGCTACAGCAGTGG

【表５９】

表 59. 重鎖リバースプライマー (コンビナトリアルライブラリー2 および 3, Kabat および Chothia 定義):

1556	DH1’	TGAGGAGACRGTGACCAGGGT
1557	DH2’	TGARGAGACGGTGACCRTKGT
1558	DH3’	TGAGGAGACGGTGACCAGGGT

【０１８４】

AH1～AH10をDH1'～DH3'と組み合わせて用い、テンプレートとしてサブライブラリー５、６、７、11を合わせて、または表43～47、54に記載のオリゴヌクレオチドならびに表５、６、７、11に記載される配列に対応するオリゴヌクレオチドのプールを用いて、あるいはサブライブラリー８、９、10、11、または表49～54に記載のオリゴヌクレオチドならびに表８、９、10および11に示す配列に対応するオリゴヌクレオチドのプールを用いてPCRを行う。これにより、それぞれコンビナトリアルライブラリー２または３が作製される。

【０１８５】

別の実施形態において、コンビナトリアルライブラリーは、直接ライゲーションにより構築される。例えば、ヒトκ軽鎖生殖系列フレームワークのコンビナトリアルライブラリー（コンビネーションライブラリー1'）は、サブライブラリー1'、2'、3'およびサブバンク４（または核酸139～143、表４を参照）を一緒に直接連続ライゲーションさせることにより構築される。これに続いて、表60および表61に記載されるオリゴヌクレオチドを用いたポリメラーゼ連鎖反応ステップを行う。ヒト重鎖生殖系列フレームワーク領域の２つのコンビナトリアルライブラリー（１つはCDRのKabat定義についてのもの、コンビネーションライブラリー2'；１つはCDRのChothia定義についてのもの、コンビネーションライブラリー3'）は、サブライブラリー5'、6'、11'およびサブバンク11（Kabat定義）またはサブライブラリー8'、9'、12'およびサブバンク11（Chothia定義）を一緒に、直接連続ライゲーションさせることにより構築される。あるいはまた、サブバンク11は、そのライゲーション反応において核酸408～413（表11を参照）と置き換えてもよい。これに続いて、表62

および表63に記載されるオリゴヌクレオチドを用いたポリメラーゼ連鎖反応ステップを行う。

【０１８６】

AL1～AL13をDL1’～DL4’と組み合わせて用い、予め一緒にライゲーションさせておいたサブライブラリー1’、2’、3’およびサブバンク４（または核酸139～143、表４を参照）をテンプレートとして用いてPCRを行う。これにより、コンビナトリアルライブラリー1’が作製される。

【表６２】

表 62. 重鎖フォワードプライマー (コンビナトリアルライブラリー2'および3'用, Kabat および Chothia 定義):

1576	AH1	CAGGTKCAGCTGGTGCAGTCT
1577	AH2	GAGGTGCAGCTGKTGGAGTCT
1578	AH3	CAGSTGCAGCTGCAGGAGTCG
1579	AH4	CAGGTCACCTTGARGGAGTCT
1580	AH5	CARATGCAGCTGGTGCAGTCT
1581	AH6	GARGTGCAGCTGGTGSAGTC
1582	AH7	CAGATCACCTTGAAGGAGTCT
1583	AH8	CAGGTSCAGCTGGTRSAGTCT
1584	AH9	CAGGTACAGCTGCAGCAGTCA
1585	AH10	CAGGTGCAGCTACAGCAGTGG

【表６３】

表 63. 重鎖リバースプライマー (コンビナトリアルライブラリー2'および3'用, Kabat および Chothia 定義):

1586	DH1’	TGAGGAGACRGTGACCAGGGT
1587	DH2’	TGARGAGACGGTGACCRTKGT
1588	DH3’	TGAGGAGACGGTGACCAGGGT

【０１８７】

AH1～AH10をDH1'～DH3'と組み合わせて用い、予め一緒にライゲーションさせておいたサブライブラリー5'、6'、11'およびサブバンク11（または核酸408～413、表11を参照）または予め一緒にライゲーションさせておいたサブライブラリー8'、9'、12'およびサブバンク11（または核酸408～413、表11を参照）をテンプレートとして用いてPCRを行う。これにより、それぞれコンビナトリアルライブラリー2'または3'が作製される。

【０１８８】

本発明にしたがって構築されるフレームワーク領域のサブバンク、CDRのサブバンク、コンビナトリアルサブライブラリーおよびコンビナトリアルライブラリーは、その後の使用のために保存することができる。それらの核酸は、溶液中で、乾燥した滅菌凍結乾燥粉末として、または密閉容器に入った無水濃縮物として保存することができる。核酸を溶液中で保存しない場合、核酸は、その後の使用のために、（例えば水または食塩水で）適当な濃度に再調製してもよい。本発明のサブバンク、コンビナトリアルサブライブラリーおよびコンビナトリアルライブラリーは、好ましくは、核酸の量および濃度が表示されている容器内で２℃～８℃にて保存される。

【０１８９】

2.6　コンビナトリアルライブラリーの発現

本発明に従って構築されるコンビナトリアルライブラリーは、当業界で公知のいずれの方法によっても発現させることができ、そのような方法としては、限定するものではないが、細菌発現系、哺乳動物発現系およびin vitroリボソームディスプレイ系が挙げられる。

【０１９０】

好ましい実施形態において、本発明は、コンビナトリアルライブラリーを発現させるためのファージベクターの使用を包含する。ファージベクターには、発現され提示されたタンパク質の非常に大きな集団をスクリーニングして、所望の結合活性をコードする１以上の特定のクローンを探し出す手段を提供する、という特別な利点がある。

【０１９１】

抗体分子の大集団を発現させるためにファージディスプレイベクターを使用することは当業界では周知のことであり、本明細書で詳しく述べることはない。一般に、この方法には、ライブラリーの抗体種をクローニングし発現させるための繊維状ファージ（ファージミド）表面発現ベクター系の使用が含まれる。例えば、Kangら，Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88:4363-4366 (1991)；Barbasら，Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88:7978-7982 (1991)；Zebedeeら，Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89:3175-3179 (1992)；Kangら，Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88:11120-11123 (1991)；Barbasら，Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89:4457-4461 (1992)；Gramら，Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89:3576-3580 (1992)；Brinkmanら，J. Immunol. Methods 182:41-50 (1995)；Amesら，J. Immunol. Methods 184:177-186 (1995)；Kettleboroughら，Eur. J. Immunol. 24:952-958 (1994)；Persicら，Gene 187 9-18 (1997)；Burtonら，Advances in Immunology 57:191-280 (1994)；PCT出願PCT/GB91/01134号；PCT出願WO 90/02809号；WO 91/10737号；WO 92/01047号；WO 92/18619号；WO 93/11236号；WO 95/15982号；WO 95/20401号；ならびに米国特許第5,698,426号；第5,223,409号；第5,403,484号；第5,580,717号；第5,427,908号；第5,750,753号；第5,821,047号；第5,571,698号；第5,427,908号；第5,516,637号；第5,780,225号；第5,658,727号；第5,733,743号および第5,969,108号を参照されたい（それらは全て、参照することによりその全体を本明細書に含めるものとする）。

【０１９２】

本発明の１つの好ましいファージミドベクターは、アミノ末端からカルボキシ末端の方向に、(1)原核生物分泌シグナルドメイン、(2)免疫グロブリンの重鎖もしくは軽鎖可変領域を規定する異種ポリペプチド、および(3)繊維状ファージ膜固定ドメインを含む融合ポリペプチドをコードして発現することができるヌクレオチド配列を含む組換えDNA分子である。このベクターは、この融合ポリペプチドを発現させるためのDNA発現制御配列、好ましくは原核生物制御配列を含む。

【０１９３】

繊維状ファージ膜固定ドメインは、好ましくは、繊維状ファージ粒子のマトリックスに結合して融合ポリペプチドをファージ表面に組み込むことができるcpIIIまたはcpVIIIコートタンパク質のドメインである。

【０１９４】

このベクターの好ましい膜固定ドメインは、繊維状ファージM13、f1、fdおよび同等の繊維状ファージから得られる。好ましい膜固定ドメインは、遺伝子IIIおよび遺伝子VIIIによりコードされるコートタンパク質中に見られる（Ohkawaら，J. Biol. Chem., 256:9951-9958, 1981を参照）。繊維状ファージコートタンパク質の膜固定ドメインは、そのコートタンパク質のカルボキシ末端領域の一部であり、脂質二重層膜にわたる疎水性アミノ酸残基の領域と、通常は膜の細胞質面に見られ、膜から延びている荷電アミノ酸残基の領域とを含んでいる。繊維状ファージ粒子の構造、それらのコートタンパク質および粒子アセンブリの詳細な説明については、Rachedら，Microbiol. Rev., 50:401-427 (1986)；およびModelら，"The Bacteriophages: Vol. 2", R. Calendar編. Plenum Publishing Co., p.p.375-456 (1988) による概説を参照されたい。

【０１９５】

分泌シグナルはタンパク質のリーダーペプチドドメインであり、これは該タンパク質をグラム陰性細菌のペリプラズム膜にターゲティングする。１つの好ましい分泌シグナルはpelB分泌シグナルである。（Betterら，Science，240:1041-1043（1988）；Sastryら，Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86:5728-5732（1989）；およびMullinaxら，Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 87:8095-8099（1990））。エルビニア・カロトバ（Erwinia carotova）由来の２つのpelB遺伝子産物変異体から得られる分泌シグナルドメインの推定アミノ酸残基配列は、Leiら，Nature，331:543-546（1988)に記載されている。本発明において有用な大腸菌由来の他の分泌シグナルポリペプチドドメインのアミノ酸残基配列は、Oliver，Escherichia coli and Salmonella Typhimurium，Neidhard，F. C.（編），American Society for Microbiology，Washington，D.C.，1:56-69（1987)に記載されるようなものである。

【０１９６】

DNA発現制御配列は、構造遺伝子産物を発現させるための１セットのDNA発現シグナルを含み、その遺伝子に機能しうる形で連結された、周知のような5'エレメントおよび3'エレメントを共に含む。5'制御配列は、転写開始のためのプロモーターと、上流の翻訳可能なDNA配列の5’末端に機能しうる形で連結されたリボソーム結合部位とを規定する。3'制御配列は、異種融合ポリペプチドとin frameにかつ機能しうる形で連結された少なくとも１つの終結（停止）コドンを規定する。

【０１９７】

好ましい実施形態では、本発明で用いられるベクターは、原核生物由来の複製起点またはレプリコン、すなわち、それで形質転換された原核宿主細胞（細菌宿主細胞など）内での自律複製および組換えDNA分子の染色体外での維持を指令することができるDNA配列を含む。そのような複製起点は当業界では周知である。好ましい複製起点は、宿主生物内で効率的なものである。１つの好ましい宿主細胞は大腸菌である。Sambrookら，"Molecular Cloning: a Laboratory Manual"，第２版，Cold Spring Harbor Laboratory Press，New York（1989)を参照されたい。

【０１９８】

さらに、原核生物由来のレプリコンを含む実施形態は、次のような核酸も含むことができる。つまり、その核酸の発現が、形質転換された細菌宿主に、薬剤耐性のような選択上の利点を付与するものである。典型的な細菌の薬剤耐性遺伝子は、アンピシリン、テトラサイクリン、ネオマイシン／カナマイシンまたはクロラムフェニコールに対する耐性を付与するものである。また、ベクターは、典型的には、翻訳可能なDNA配列を挿入するための好都合な制限部位も含む。

【０１９９】

いくつかの実施形態では、ベクターは、可変重鎖領域をコードするヌクレオチド配列と可変軽鎖領域をコードするヌクレオチド配列のような、内部に含まれる２つのシストロンを共発現することができる。共発現は、さまざまな系において達成されており、したがって、２つの遺伝子産物の十分な相対量が産生されて機能性ヘテロダイマーのアセンブリおよび発現が可能であれば、どのような特定の設計にも限定される必要はない。

【０２００】

いくつかの実施形態では、DNA発現ベクターは、ゲノムを被包している繊維状ファージ粒子の形態で、好都合に操作されるように設計される。この実施形態において、DNA発現ベクターはさらに、繊維状ファージの複製起点を規定するヌクレオチド配列を含み、その結果、該ベクターは、適切な遺伝的相補性が提示されると、一本鎖複製形態の繊維状ファージとして複製することができ、繊維状ファージ粒子内にパッケージングされるようになる。この特徴は、DNA発現ベクターがファージ粒子内にパッケージングされる能力を付与し、該粒子およびそこに含まれるベクターを、ファージ粒子の集団を構成する他の粒子からその後分離するのに役立つ。

【０２０１】

繊維状ファージ複製起点は、周知のように、複製開始部位、複製終結部位および複製に

より産生された複製形態のパッケージングのための部位を規定する、ファージゲノムの領域である（例えば、Raschedら，Microbiol. Rev., 50:401-427, 1986；およびHoriuchi, J. Mol. Biol., 188:215-223, 1986を参照されたい）。本発明で使用するための好ましい繊維状ファージ複製起点は、M13、f1またはfdファージの複製起点である（Shortら，Nucl. Acids Res., 16:7583-7600, 1988）。

【０２０２】

ヘテロダイマー免疫グロブリン分子の作製方法は、一般に、(1)提示ベクターの大集団（それぞれがファージミド表面提示タンパク質上に提示された異なる推定上の結合部位を発現できる）を繊維状ファージ粒子に導入し、(2)繊維状ファージ粒子の表面にその提示タンパク質および結合部位を発現させ、(3)予め選択した抗原に対するファージ粒子のパンニングのようなアフィニティ技法を用いて、表面に発現されたファージ粒子を単離（スクリーニング）し、それにより予め選択した抗原と結合する結合部位を含む提示タンパク質を含む１種以上のファージミドを単離する、ことを含んでなる。

【０２０３】

対象の抗体結合部位を発現することができる特定のベクターの単離には、ファージミド提示タンパク質を発現できるジシストロン性発現ベクターを、繊維状ファージ遺伝子の発現およびファージ粒子のアセンブリを許容する宿主細胞に導入することが含まれる。典型的には、この宿主は大腸菌である。次いで、ヘルパーファージゲノムを、ファージミド発現ベクターを含む宿主細胞に導入して、ファージ粒子のアセンブリを可能にするのに必要な遺伝的相補性を与える。

【０２０４】

こうして得られた宿主細胞を培養して、導入されたファージ遺伝子と提示タンパク質遺伝子を発現させ、ファージ粒子をアセンブルさせて宿主細胞から脱離させる。次に、脱離したファージ粒子を宿主細胞培地から収集（回収）し、望ましい抗体結合特性についてスクリーニングする。典型的には、収集した粒子は、予め選択した抗原との結合について「パンニング」する。次に、強く結合する粒子を回収し、個々の種の粒子をクローン的に単離し、その抗原への結合についてさらにスクリーニングする。所望の抗原結合特異性の結合部位を産生するファージが選択される。

【０２０５】

ファージの選択後、そのファージからの抗体コード領域を単離して、抗体全体もしくは他の所望の抗原結合性フラグメントの作製のために使用し、そして所望の宿主細胞、例えば哺乳動物細胞、昆虫細胞、植物細胞、酵母、および細菌において発現させることができる。これについては後記で詳細に述べる。例えば、Fab、Fab'および$F(ab')_2$フラグメントを組換えにより作製するための技法を、国際公開WO 92/22324号；Mullinaxら，BioTechniques 12(6):864-869 (1992)；およびSawaiら，AJRI 34:26-34 (1995)；およびBetterら，Science 240:1041-1043 (1988)（これらの文献は参照することによりその全体を本明細書に含めるものとする）に開示されるような当業界で公知の方法と共に、用いることができる。一本鎖Fvおよび抗体の作製に使用される技法の例としては、米国特許第4,946,778号および同第5,258,498号；Hustonら，Methods in Enzymology 203:46-88 (1991)；Shuら，PNAS 90:7995-7999 (1993)；ならびにSkerraら，Science 240:1038-1040 (1988)に記載されるものが挙げられる。

【０２０６】

本発明はまた、本発明のベクターまたはヌクレオチド配列を含む宿主細胞を包含する。特定の実施形態において、その宿主細胞は大腸菌である。

【０２０７】

好ましい実施形態において、本発明のコンビナトリアルライブラリーは、M13系のファージベクターにクローニングされる。このベクターは、lacZプロモーターの制御下で、ヒトγ1重鎖の第１定常ドメインとヒトκ軽鎖の定常ドメインとを含むFabフラグメントの発現を可能にする。これは、Wu & An, 2003, Methods Mol. Biol., 207, 213-233；Wu, 2003, Methods Mol. Biol., 207, 197-212； およびKunkelら，1987, Methods Enzymol. 154

, 367-382（それらは全て、参照により全体が本明細書に組み入れられる）に記載されるようなハイブリダイゼーション変異誘発により行うことができる。簡単に述べると、クローニングしようとする重鎖および軽鎖に対応する精製されたマイナス鎖を、それぞれ１つのパリンドロームループを含む２つの領域にアニーリングさせる。それらのループは、ユニークなXbaI部位を含んでおり、この部位は、ヒトκ定常領域および第１のヒトγ1定常領域とそれぞれin frameに融合された、V_L鎖およびV_H鎖の両者を含むベクターの選択を可能にする（Wu & An, 2003, Methods Mol. Biol., 207, 213-233、Wu, 2003, Methods Mol. Biol., 207, 197-212）。次に、合成されたDNAを、Wu, 2003, Methods Mol. Biol., 207, 197-212び記載されるように、XL1-blue細菌叢上でのプラーク形成またはFabフラグメントの産生のために、XL1-blueにエレクトロポレーションする。

【０２０８】

本発明では、本発明のコンビナトリアルライブラリーを発現させるために、細菌／ファージ発現系に加えて、他の宿主－ベクター系も使用可能である。これらとしては、限定するものではないが、ベクターで形質転換した、あるいはウイルス（例えばワクシニアウイルス、アデノウイルス）を感染させた哺乳動物細胞系；ベクターで形質転換した、あるいはウイルス（例えばバキュロウイルス）を感染させた昆虫細胞系；酵母ベクターを含む酵母などの微生物；またはDNA、プラスミドDNAもしくはコスミドDNAで形質転換した細菌が挙げられる。例えば、Vermaら, J Immunol Methods. 216(1-2):165-81 (1998)（これは参照により本明細書に組み入れられる）を参照されたい。

【０２０９】

ベクターの発現エレメントは、その強度および特異性においてさまざまである。使用する宿主－ベクター系に応じて、多くの適切な転写および翻訳エレメントのいずれか１つを使用すればよい。好ましい態様において、本発明のコンビナトリアルライブラリーの各核酸は、適当な宿主内で、ヒト化重鎖および／または軽鎖あるいはヒト化重鎖および／または軽鎖の可変領域を発現する発現ベクターの一部である。特に、そのような核酸は、抗体のコード領域に機能しうる形で連結されたプロモーター（好ましくは異種プロモーター）を有しており、そのプロモーターは誘導性または構成性であり、場合によっては組織特異的である。（さらなる詳細については、セクション5.7を参照されたい。）別の特定の実施形態では、抗体コード配列および任意の他の所望配列が、ゲノム中の所望の部位での相同組換えを促進する領域によって挟まれており、かくして抗体コード核酸の染色体内発現をもたらす核酸分子を使用する（Koller and Smithies, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935；Zijlstraら, 1989, Nature 342:435-438）。

【０２１０】

また、上記コンビナトリアルライブラリーは、リボソーム提示系などのin vitro系を用いて発現させることも可能である（詳細については、セクション5.6を参照）。

【０２１１】

2.7　ヒト化抗体の選択

発現されたコンビナトリアルライブラリーは、当業界で公知のいずれかの方法を用いて、ドナー抗体によって認識される抗原への結合についてスクリーニングすることができる。好ましい実施形態において、それぞれセクション5.4および5.6に記載されるように構築され発現されたファージディスプレイライブラリーは、ドナー抗体によって認識される抗原への結合についてスクリーニングし、その抗原に対して有意な結合を示すV_Hおよび／またはV_Lドメインを発現するファージを、慣用のスクリーニング技法（例えば、Harlow, E., およびLane, D., 1988, 前掲、Gherardi, Eら 1990. J. Immunol. meth. 126 p61-68に記載されるもの）を用いてライブラリーから単離することができる。宿主細胞から脱離したファージ粒子を宿主細胞培地から収集（回収）し、望ましい抗体結合特性についてスクリーニングする。典型的には、収集した粒子を、予め選択した抗原との結合について「パンニング」する。次に、強く結合する粒子を回収し、個々の種の粒子をクローニングにより単離し、その抗原に対する結合についてさらにスクリーニングする。望ましい抗原結合特異性の結合部位を生じるファージを選択する。好ましくは、本発明のヒト化抗体は、対

象の抗原に対して少なくとも1×10^{6} M^{-1}、好ましくは少なくとも1×10^{7} M^{-1}、少なくとも1×10^{8} M^{-1}または少なくとも1×10^{9} M^{-1}の親和性を有する。

【０２１２】

好ましい実施形態において、ファージライブラリーは、まず、捕捉リフト（capture lift）と呼ばれる改良型プラークリフティングアッセイを用いてスクリーニングする。Watkinsら，1997，Anal．Biochem.，253:37-45を参照されたい。簡単に述べると、ファージ感染細菌を固形寒天叢上にプレートし、続いてFab特異的試薬（例えば抗Fab抗体）をコーティングしたニトロセルロースフィルターで覆う。ほぼ均一量のファージ発現Fabの捕捉を行った後、そのフィルターを、そのFabのKd値よりも実質的に低い濃度の所望の抗原-Ig融合タンパク質でプローブする。

【０２１３】

別の実施形態では、コンビナトリアルライブラリーを発現させ、リボソームディスプレイ系などのin vitro系を用いてスクリーニングする（例えば、Graddisら，Curr Pharm Biotechnol．3(4):285-97 (2002)；Hanes and Plucthau PNAS USA 94:4937-4942 (1997)；He，1999，J．Immunol．Methods，231:105；Jermutusら (1998) Current Opinion in Biotechnology，9:534-548（それらはそれぞれ、参照により本明細書に組み入れられる）を参照のこと）。リボソームディスプレイ系は、翻訳中のリボソームから抗体（もしくはそのフラグメント）またはmRNAのいずれも放出させることなく、抗体またはそのフラグメントのライブラリーをin vitroで翻訳することによって作動する。これはおそらく、終結コドンを欠失させ、かつリボソーム安定化バッファー系を用いることにより行われる。翻訳された抗体（もしくはそのフラグメント）はまた、新たに合成された抗体もしくはそのフラグメントがリボソームトンネルから容易に現れて独立して折りたたまれるように、C末端テザー（tether）ポリペプチド伸長を含む。折りたたまれた抗体もしくはそのフラグメントは、コグネイト抗原を用いてスクリーニングまたは捕捉できる。これによりmRNAの捕捉が可能になり、続いてin vitroで富化する。大腸菌およびウサギ網状赤血球系がリボソームディスプレイに一般的に使用される。

【０２１４】

当業界で公知の他の方法、例えばPROfusion（商標）（米国特許第6,281,344号，Phylos Inc.，Lexington，MA）、共有結合ディスプレイ（国際公開WO 9837186号，Actinova Ltd.，Cambridge，U.K.）も、本発明に従って使用可能である。

【０２１５】

別の実施形態では、抗原を固相支持体に結合させることができ、その支持体はペトリ皿、クロマトグラフィービーズ、磁性ビーズなどによって提供できる。本明細書中で用いられる「固相支持体」という用語は、特定のタイプの固相支持体に限定されるものではない。むしろ、多数の支持体が利用可能であり、当業者には公知である。固相支持体としては、シリカゲル、樹脂、誘導体化プラスチックフィルム、ガラスビーズ、コットン、プラスチクビーズ、ポリスチレンビーズ、アルミナゲル、および多糖類が挙げられる。好適な固相支持体は、目的とする最終用途および種々の合成プロトコルに対する適性に基づいて選択すればよい。例えば、ペプチド合成の場合、固相支持体は、p-メチルベンズヒドリルアミン（pMBHA）樹脂（Peptides International，Louisville，KY）、クロロメチルポリスチレン、ヒドロキシメチルポリスチレンおよびアミノメチルポリスチレンなどのポリスチレン類（例えば、Bachem Inc.，Peninsula Laboratories，etc.から入手されるPAM樹脂）、ポリ(ジメチルアクリルアミド)グラフト化スチレンコジビニルベンゼン（例えば、POLYHIPE樹脂、Aminotech，Canadaから入手)、ポリアミド樹脂（Peninsula Laboratoriesから入手）、ポリエチレングリコールでグラフト化したポリスチレン樹脂（例えば、TENTAGELまたはARGOGEL、Bayer，Tubingen，Germany）、ポリジメチルアクリルアミド樹脂（Milligen/Biosearch，Californiaから入手)、またはセファロース（Pharmacia，Sweden)などの樹脂とすることができる。

【０２１６】

次に、コンビナトリアルライブラリーを抗原上に通過させ、洗浄後、結合している個々

の抗体を保持し、場合によっては検出系により検出する。結合した集団のサンプルを徐々に高めたストリンジェント条件下で除去する場合には、各サンプルにおいて表される結合親和性が増大する。ストリンジェンシーを高めた条件は、例えば、浸漬時間を長くすること、または浸漬溶液のpHを変えること等によって達成できる。

【０２１７】

別の実施形態では、固相酵素免疫アッセイ（ELISA）を用いて、所望の結合活性を有する抗体についてスクリーニングする。ELISAには、抗原の調製、抗原によるマイクロタイタープレートのウェルのコーティング、ウェルに結合していない抗原の洗い流し、酵素基質などの検出可能な化合物（例えば、ホースラディッシュペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼ）にコンジュゲートさせた対象の抗体のウェルへの添加および一定期間にわたるインキュベーション、未結合抗体もしくは非特異的に結合した抗体の洗い流し、ならびに、抗原をコーティングしたウェルに特異的に結合している抗体の存在の検出が含まれる。ELISAにおいて、対象の抗体は、必ずしも検出可能な化合物にコンジュゲートさせる必要はない。その代わり、検出可能な化合物にコンジュゲートさせた二次抗体（対象の抗体を認識するもの）をウェルに添加すればよい。さらに、ウェルに抗原をコーティングする代わりに、抗体をウェルにコーティングしてもよい。この場合、検出可能な分子は、酵素基質などの検出可能な化合物（例えば、ホースラディッシュペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼ）にコンジュゲートさせた抗原ととすることができる。当業者であれば、検出されるシグナルが増大するように改変できるパラメーター、ならびに当業界で公知のELISAの他の可変要因について理解できるであろう。ELISAに関するさらなる考察については、例えば、Ausubelら編，1994，Current Protocols in Molecular Biology，Vol. I，John Wiley & Sons，Inc.，New York at 11.2.1を参照されたい。

【０２１８】

別の実施形態では、BIAcore反応速度解析を用いて、特定の抗原への本発明の抗体の結合onおよびoff速度（Kd）を求めることができる。BIAcore反応速度解析には、本発明の抗体が表面に固定されているチップへの抗原の結合および該チップからの解離を解析することが含まれる。Wuら，1999，J. Mol. Biol.，294:151-162（これは参照によりその全体が本明細書に組み入れられる）を参照されたい。簡単に述べると、抗原-Ig融合タンパク質を、酢酸ナトリウム中の抗原-Igを注入かることにより、(1-エチル-3-[3-ジメチルアミノプロピル]-カルボジイミド塩酸塩)およびN-ヒドロキシ-スクシンイミド活性化センサーチップCM5に固定する。抗原-Igは低密度で固定して、解離期中のFabの再結合を防止する。結合速度定数（Kon）を得るために、６つの異なるFab濃度での結合速度を一定流速にて測定する。解離速度定数（Koff）は、解離期を解析することにより得られる６つの測定値の平均である。センサーグラムは、BIAevaluation 3.0プログラムを用いて解析する。Kdは、Kd＝Koff/Konから算出する。残存するFabは、長期の解離により各測定後に除去する。さらに好ましい実施形態では、陽性プラークを拾い、低密度で再プレートし、再度スクリーニングする。

【０２１９】

別の実施形態では、抗体（scFvまたは、抗体フラグメントもしくはその変異体を含むまたはそれからなる他の分子を含む）の抗原への結合親和性、ならびに抗体－抗原相互作用のoff速度は、競合結合アッセイにより求めることができる。競合結合アッセイの一例は、徐々に増大させた量の未標識抗原の存在下で、標識抗原（例えば^{3}Hまたは^{121}I）を対象の抗体と共にインキュベートすること、ならびに、標識抗原に結合した抗体を検出することを含むラジオイムノアッセイである。本発明の抗体の親和性および結合off速度は、得られたデータからScatchardプロット解析により求めることができる。また、二次抗体との競合もラジオイムノアッセイを用いて測定することができる。この場合には、徐々に増大させた量の未標識二次抗体の存在下で、抗原を、標識化合物（例えば、^{3}Hまたは^{121}I）にコンジュゲートさせた本発明の抗体と共にインキュベートする。

【０２２０】

他のアッセイ、例えば、限定するものではないが、ウエスタンブロット、ラジオイムノ

アッセイ、ELISA（固相酵素免疫アッセイ）、サンドイッチイムノアッセイ、免疫沈降アッセイ、沈降素反応、ゲル拡散沈降反応、免疫拡散アッセイ、凝集アッセイ、補体結合アッセイ、蛍光イムノアッセイ、プロテインAイムノアッセイなどの技法を用いた競合的および非競合的アッセイ系を含むイムノアッセイを用いて、ヒト化抗体をスクリーニングしたり、その結合特異性をさらに特徴付けることも可能である。そのようなアッセイはルーチンであり、当業界で周知である（例えば、Ausubelら編，1994，Current Protocols in Molecular Biology，Vol．1，John Wiley & Sons，Inc．，New York（これは参照によりその全体が本明細書に組み入れられる）を参照）。代表的なイムノアッセイを以下で簡単に述べる（これは限定しようとするものではない）。

【０２２１】

好ましい実施形態において、ELISAは、捕捉リフトアッセイにより同定されたクローンを確認するために、Fabフラグメントを発現する細菌培養物から調製した上清の二次スクリーニングとして用いられる。２つのELISAを行うことができる：(1)定量ELISA：これは、本質的にWu，2003，Methods Mol．Biol．，207，197-212（これは参照によりその全体が本明細書に組み入れられる）に記載されるように行うことができる。簡単に述べると、抗ヒトFab ELISAにより濃度を測定できる： 96ウェルMaxisorp Immunoplateの個々のウェルに50ngのヤギ抗ヒトFab抗体をコーティングし、次にサンプル（上清に発現させたFab）または標準物質（ヒトIgG Fab）と共にインキュベートする。続いて、ヤギ抗ヒトκホースラディッシュペルオキシダーゼ（HRP）コンジュゲートと共にインキュベートを行う。HRP活性をTMB基質で検出し、反応を0.2MのH_2SO_4により停止させる。プレートを450nmで読み取る。次に、二次スクリーニングの次の段階のために、検出可能な量のFabを発現するクローンを選択する。(2)機能的ELISA：簡単に述べると、特定の抗原結合活性を抗原に基づくELISAにより測定する：96ウェルMaxisorp Immunoplateの個々のウェルに50ngの対象の抗原をコーティングし、1% BSA/0.1% Tween 20でブロックし、次にサンプル（上清発現Fab）と共にインキュベートする。続いて、ヤギ抗ヒトκホースラディッシュペルオキシダーゼ（HRP）コンジュゲートと共にインキュベートする。HRP活性をTMB基質で検出し、反応を0.2MのH_2SO_4により停止させる。プレートを450nmにて読み取る。

【０２２２】

免疫沈降プロトコルは、一般に、プロテインホスファターゼおよび／またはプロテアーゼインヒビター（例えば、EDTA、PMSF、159アプロチニン、バナジン酸ナトリウム）を補充したRIPAバッファー（１％のNP-40またはTriton X-100、１％デオキシコール酸ナトリウム、0.1%SDS、0.15M NaCl、0.01M リン酸ナトリウム、pH 7.2、１％Trasylol）などの溶解バッファー中で細胞集団を溶解させ、その細胞溶解物に対象の抗体を添加し、40℃にて一定期間(例えば４時間)にわたってインキュベートし、プロテインAおよび／またはプロテインGセファロースビーズを細胞溶解物に添加し、約１時間以上にわたり40℃にてインキュベートし、ビーズを溶解バッファー中で洗浄し、ビーズをSDS／サンプルバッファーに再懸濁することを含む。対象の抗体の、特定の抗原を免疫沈降させる能力は、例えば、ウエスタンブロット分析により評価することができる。当業者であれば、抗体と抗原の結合を増大させ、かつバックグラウンドを低減させるように変更可能なパラメーター（例えば、細胞溶解物をセファロースビーズで前もってクリアランスすること）について理解できるであろう。免疫沈降プロトコルについてのさらなる解説については、例えば、Ausubelら編，1994，Current Protocols in Molecular Biology，Vol．1，John Wiley & Sons，Inc．，New York，at 10．16．1を参照されたい。

【０２２３】

ウエスタンブロット分析は、一般に、タンパク質サンプルを調製すること、そのタンパク質サンプルをポリアクリルアミドゲル（例えば、抗原の分子量に応じて８％～20％のSDS-PAGE）で電気泳動すること、タンパク質サンプルをポリアクリルアミドゲルから膜（例えば、ニトロセルロース、PVDFまたはナイロン）に移行させること、膜をブロッキング溶液（例えば、３％BSAまたは脱脂乳を含むPBS）中でブロックすること、膜を洗浄バッファー（例えば、PBS Tween 20）中で洗浄すること、膜をブロッキングバッファーで希釈した

一次抗体（対象の抗体）でブロックすること、膜を洗浄バッファー中で洗浄すること、膜を、ブロッキングバッファーで希釈した酵素基質(例えば、ホースラディッシュペルオキシダーゼもしくはアルカリホスファターゼ)または放射性分子（例えば、^{12}Pまたは^{121}I）にコンジュゲートさせた二次抗体（一次抗体を認識するもの、例えば抗ヒト抗体）でブロックすること、膜を洗浄バッファーで洗浄すること、抗原の存在を検出することを含む。当業者であれば、シグナルを増大させ、かつバックグラウンドノイズを低減させるように変更可能なパラメーターについて理解できるであろう。ウエスタンブロットプロトコルに関するさらなる解説としては、例えば、Ausubelら編，1994，GinTent Protocols in Molecular Biology，Vol．1，John Wiley & Sons，Inc.，New York at 10.8.1を参照されたい。

【０２２４】

所望の抗原結合活性を有する改変型（例えばヒト化）抗体またはそのフラグメントをコードする核酸は、ABI300ゲノムアナライザを用いるジデオキシ塩基配列決定などの配列決定法により特性決定できる。上記で述べた、２部からなる二次ELISAスクリーニングなどの他のイムノアッセイを用いて、改変型（例えばヒト化）抗体を、特定の抗原への結合について、互いと、およびドナー抗体と比較することができる。

【０２２５】

2.8　ヒト化抗体の作製および特徴付け

所望の結合活性を有するヒト化抗体およびそのフラグメントをコードする１つ以上の核酸を選択したら、当業界で公知の標準的な技法によりその核酸を回収することができる。好ましい実施形態において、選択したファージ粒子を回収し、それを新たな細菌に感染させてから目的の核酸を回収する。

【０２２６】

所望の特異性または親和性を有するヒト化可変領域を含むタンパク質を提示するファージは、当業界で公知のいずれの方法によってもアフィニティマトリックスから溶出させることができる。１つの実施形態では、マトリックスに対してより良好な親和性を有するリガンドが用いられる。特定の実施形態では、対応する非ヒト化抗体が用いられる。別の実施形態では、抗原－抗体複合体に対して特異的ではない溶出方法が用いられる。

【０２２７】

温和な溶出方法は、ファージ抗体集団とビオチン化抗原との結合およびストレプトアビジン磁性ビーズとの結合を利用するものである。洗浄して未結合ファージを除去した後、ファージ抗体を溶出させ、これを用いて細胞に感染させ、選択したファージ抗体集団を得る。ビオチンと抗原分子との間のジスルフィド結合が、ジチオトレイトールによる温和な溶出を可能にする。１つの実施形態では、ビオチン化抗原は過剰に用いることができるが、抗原－抗体結合についての所望の解離定数と同じ濃度またはそれより低い濃度で用いてもよい。この方法は、高親和性抗体の選択に有利である（R．E．Hawkins，S．J．RussellおよびG．Winter J．Mol．Biol．226 889-896，1992）。また、抗体は、Hawkinsら，1992，（前掲）に記載されるように、抗原選択のために、より遅いoff速度を選択してもよい。ビオチン化抗原の濃度を徐々に低下させて、より高い親和性のファージ抗体を選択することができる。別法として、J．K．Scott & G．P．Smith (Science 249 386-390，1990)によって記載されるビオチン化抗体に対するペプチドファージの競合と同様の方法で、ファージ抗体を結合について競合させるために、ファージ抗体をビオチン化抗原よりも過剰にすることができる。

【０２２８】

別の実施形態では、高特異性プロテアーゼによる切断の認識部位を構成するアミノ酸をコードするヌクレオチド配列を、挿入した外来タンパク質（例えば抗体フラグメントをコードする核酸）と遺伝子IIIの残部の配列との間に導入することができる。そのような高特異性プロテアーゼの非限定的な例は、X因子およびトロンビンである。ファージをアフィニティマトリックスに結合させ、非特異的に結合しているファージおよび弱く結合しているファージを溶出して除去した後、前記切断部位での消化に適する条件下でカラムをプ

ロテーゼで洗浄することにより、強く結合しているファージを分離する。これにより、抗体フラグメントがファージ粒子から切断されて、ファージが溶出される。これらのファージは感染性であると予想される。何故ならば、プロテアーゼ部位だけが特異的に導入されたものであるはずだからである。次いで、強く結合するファージを、例えば大腸菌TG1細胞に感染させることによって回収できる。

【０２２９】

上記の方法の別法は、強く結合したpAbを保持しているアフィニティマトリックスを取り、例えばSDS溶液中で煮沸することによって、DNAを抽出することである。次に、抽出されたDNAを用いて、大腸菌宿主細胞を直接形質転換させるか、あるいは抗体コード配列を、例えば適切なプライマーを用いたPCRを用いて増幅し、次いでさらなる研究を行うための可溶性抗体として発現させるため、またはさらなる選択ラウンドを行うためのｐAbとして、ベクターに挿入することができる。

【０２３０】

別の実施形態では、ファージの集団を、少量の抗原を含むアフィニティマトリックスに結合させる。高親和性タンパク質を提示するファージと低親和性タンパク質を提示するファージとの間で、マトリックス上の抗原への結合に関して競合が起こる。高親和性タンパク質を提示するファージが主に結合し、低親和性タンパク質は洗い流される。次に、その高親和性タンパク質を、リガンドによる溶出またはファージをアフィニティマトリックスから溶出させる他の手順（国際公開WO92/01047号に、この手順が示されている）により回収する。

【０２３１】

ドナーCDRおよびヒト化フレームワークをコードする、回収された核酸は、それ自体として使用することも可能であるし、あるいは、それらを各ヒト鋳型の定常領域に結合させることによって完全な抗体分子の核酸を構築するのに使用することも可能である。抗体をコードする核酸が適切な宿主細胞系に導入されると、トランスフェクトされた細胞は、モノクローナル抗体の望ましい特性を全て有する抗体を分泌することができる。

【０２３２】

本発明の抗体分子、または抗体の重鎖もしくは軽鎖、またはそれらのフラグメント（好ましくは、重鎖もしくは軽鎖可変領域を含むもの）をコードする核酸が得られたら、この抗体分子を作製するためのベクターは、組換えDNA法により、当業界で周知の技法を用いて作製することができる。したがって、抗体をコードする核酸を発現させることによりタンパク質を調製する方法が本明細書に記載される。当業者に周知の方法を用いて、抗体コード配列ならびに適切な転写および翻訳シグナルを含む発現ベクターを構築することができる。これらの方法としては、例えば、in vitro組換えDNA法、合成法、およびin vivo遺伝子組換えが挙げられる。したがって、本発明は、プロモーターに機能しうる形で連結された、本発明の抗体分子、抗体の重鎖もしくは軽鎖、抗体の重鎖もしくは軽鎖可変ドメイン、またはそのフラグメント、または重鎖もしくは軽鎖CDRをコードするヌクレオチド配列を含む複製可能なベクターを提供する。特定の実施形態において、本発明の抗体分子、抗体の重鎖もしくは軽鎖、抗体の重鎖もしくは軽鎖可変ドメイン、そのフラグメント、または重鎖もしくは軽鎖CDRの発現は、構成性プロモーターにより調節される。別の実施形態では、本発明の抗体分子、抗体の重鎖もしくは軽鎖、抗体の重鎖もしくは軽鎖可変ドメイン、そのフラグメント、または重鎖もしくは軽鎖CDRの発現は、誘導性プロモーターにより調節される。別の実施形態では、本発明の抗体分子、抗体の重鎖もしくは軽鎖、抗体の重鎖もしくは軽鎖可変ドメイン、そのフラグメント、または重鎖もしくは軽鎖CDRの発現は、組織特異的プロモーターにより調節される。そのようなベクターはまた、抗体分子の定常領域をコードするヌクレオチド配列を含んでいてもよく（例えば、国際公開WO 86/05807号；国際公開WO 89/01036号；および米国特許第5,122,464号を参照）、抗体の可変ドメインは、重鎖全体、軽鎖全体または重鎖と軽鎖の両方を発現させるために、そのようなベクターにクローニングできる。

【０２３３】

この発現ベクターは、慣用の技法により宿主細胞に導入し、次にトランスフェクトされた細胞を慣用の技法により培養して、本発明の抗体を産生させる。したがって、本発明は、異種プロモーターに機能しうる形で連結された、本発明の抗体もしくはそのフラグメント、またはその重鎖もしくは軽鎖、それらの部分、または本発明の一本鎖抗体をコードするポリヌクレオチドを含む宿主細胞を包含する。二本鎖抗体を発現させるための好ましい実施形態において、後記で詳細に述べるように、免疫グロブリン分子全体を発現させるために、重鎖および軽鎖の双方をコードするベクターを宿主細胞内で共発現させることができる。

【０２３４】

好ましくは、改変抗体を産生させるために形質転換される細胞系は、リンパ系起源の不死化哺乳動物細胞系であり、例えば、限定するものではないが、ミエローマ、ハイブリドーマ、トリオーマまたはクアドローマ（quadroma）細胞系が挙げられる。また、この細胞系は、エプスタイン・バーウイルスなどのウイルスで形質転換することにより不死化されている正常なリンパ細胞(例えばＢ細胞)を含むことも可能である。最も好ましくは、この不死化細胞系は、ミエローマ細胞系またはその誘導物である。

【０２３５】

ミエローマ細胞系などの不死化リンパ細胞系の中には、正常な状態で、単離型の免疫グロブリン軽鎖または重鎖を分泌するものがあることが知られている。そうした細胞系がファージライブラリーから回収された核酸で形質転換される場合、その回収されたフラグメントを定常領域に再構成させることは必要でない。但し、これは、正常に分泌される鎖がファージライブラリーから回収された核酸によりコードされる免疫グロブリン鎖の可変ドメインに相補的である場合である。

【０２３６】

本発明の抗体の産生に用いられる細胞系は、好ましくは哺乳動物細胞系であるが、いずれの他の適切な細胞系も代わりに使用することが可能である。これらとしては、限定するものではないが、抗体コード配列を含む組換えバクテリオファージDNA、プラスミドDNAまたはコスミドDNA発現ベクターで形質転換させた細菌（例えば、大腸菌および枯草菌）；抗体コード配列を含む組換え酵母発現ベクターで形質転換させた酵母（例えば、サッカロミセス・ピチア（Saccharomyces Pichia）；抗体コード配列を含む組換えウイルス発現ベクター（例えば、バキュロウイルス）に感染させた昆虫細胞系；抗体コード配列を含む組換えウイルス発現ベクター（例えば、カリフラワーモザイクウイルス、CaMV；タバコモザイクウイルス、TMV）に感染させた、または抗体コード配列を含む組換えプラスミド発現ベクター（例えば、Tiプラスミド）で形質転換させた植物細胞系；哺乳動物細胞のゲノム由来のプロモーター（例えば、メタロチオネインプロモーター）もしくは哺乳動物ウイルスのゲノム由来のプロモーター（例えば、アデノウイルス後期プロモーター；ワクシニアウイルス7.5Kプロモーター）を含む組換え発現構築物を含む哺乳動物細胞系（例えば、COS、CHO、BHK、293、NS0および3T3細胞）などの微生物が挙げられる。好ましくは大腸菌などの細菌細胞、さらに好ましくは真核細胞（特に、組換え抗体分子全体を発現させるためのもの）が、組換え抗体分子の発現のために使用される。例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）などの哺乳動物細胞を、ヒト・サイトメガロウイルス由来の主な前初期遺伝子プロモーターエレメントなどのベクターと組み合わせたものが、有効な抗体の発現系である（Foeckingら，1986，Gene 45:101；およびCockettら，1990，Bio/Technology 8:2）。

【０２３７】

細菌系では、発現させようとする抗体分子の使用目的に応じて、いくつかの発現ベクターが有利に選択できる。例えば、抗体分子の医薬組成物の調製のために、そのようなタンパク質を大量に産生させようとする場合は、容易に精製される融合タンパク質産物の高レベルな発現を指令するベクターが望ましい。そのようなベクターとしては、限定するものではないが、大腸菌発現ベクターpUR278（Rutherら，1983，EMBO 12:1791）（抗体コード配列が個々に、lacZコード領域とin frameでベクターにライゲートされて、融合タンパク

質が産生できるようになっているもの）；pINベクター（Inouye & Inouye, 1985, Nucleic Acids Res. 13:3101-3109; Van Heeke & Schuster, 1989, J. Biol. Chem. 24:5503-5509）などが挙げられる。また、pGEXベクターも、外来ポリペプチドをグルタチオン5-トランスフェラーゼ（GST）との融合タンパク質として発現させるのに使用できる。一般に、そのような融合タンパク質は可溶性であり、マトリックスのグルタチオンアガロースビーズへの吸着および結合と、続いて行う遊離グルタチオンの存在下での溶出によって、溶解細胞から容易に精製できる。pGEXベクターは、トロンビンまたはXa因子プロテーゼ切断部位を含むことにより、クローニングした標的がGST成分から放出されるように設計されている。

【０２３８】

昆虫系では、オートグラファ・カリフォルニカ（Autographa californica）核多角体ウイルス（AcNPV）が、外来遺伝子を発現させるためのベクターとして使用される。このウイルスは、ヨトウガ（スポドプテラ・フルギペルダ（Spodoptera frugiperda））細胞内で増殖する。抗体コード配列は、ウイルスの非必須領域（例えば、ポリヘドリン遺伝子）に個々にクローニングでき、AcNPVプロモーター（例えばポリヘドリンプロモーター）の制御下におかれる。

【０２３９】

哺乳動物宿主細胞では、いくつかのウイルス系の発現系が使用できる。アデノウイルスが発現ベクターとして用いられる場合、対象の抗体コード配列は、アデノウイルス転写／翻訳制御複合体（例えば、後期プロモーターと３部構成（tripartite）リーダー配列）にライゲートすることができる。次に、このキメラ遺伝子を、in vitroまたはin vivo組換えによってアデノウイルスゲノムに挿入すればよい。ウイルスゲノムの非必須領域（例えば、領域ElまたはE3）への挿入により、生存可能で、しかも感染した宿主内で抗体分子を発現できる組換えウイルスが得られる（例えば、Logan & Shenk, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 8 1:355-359を参照）。また、挿入した抗体コード配列の効率的な翻訳のために、特定の開始シグナルが必要な場合もある。これらのシグナルとしては、ATG開始コドンおよび隣接配列が含まれる。さらに、この開始コドンは、挿入物全体の翻訳を確実にするために、対象のコード配列のリーディングフレームと読み枠が合っていなければならない。これらの外因性の翻訳制御シグナルおよび開始コドンは、さまざまな起源のものとすることができ、天然のものであっても合成されたものであってもよい。発現の効率は、適切な転写エンハンサーエレメント、転写ターミネーターなどを含めることによって増強できる（例えば、Bittnerら, 1987, Methods in Enzymol. 153:516-544を参照）。

【０２４０】

さらに、宿主細胞株としては、挿入配列の発現を調節するもの、または所望の特定の様式で核酸を修飾しプロセシングするものを選択することができる。そのようなタンパク質産物の修飾（例えば、グリコシル化）およびプロセシング（例えば、切断）は、そのタンパク質の機能にとって重要でありうる。さまざまな宿主細胞が、タンパク質および遺伝子産物の翻訳後プロセシングおよび修飾のための特徴的で特異的な機構を有している。発現される外来タンパク質の正確な修飾およびプロセシングが確実になるように、適切な細胞系または宿主系を選択する。この目的のためには、適切な一次転写産物のプロセシング、遺伝子産物のグリコシル化およびリン酸化のための細胞機構を有する真核宿主細胞が使用可能である。そのような哺乳動物宿主細胞としては、限定するものではないが、CHO、VERY、BHK、Hela、COS、MDCK、293、3T3、W138、BT483、Hs578T、HTB2、BT20およびT47D、NS0（免疫グロブリン鎖を内因的に産生しないマウス・ミエローマ細胞系）、CRL7030およびHsS78Bst細胞が挙げられる。

【０２４１】

組換えタンパク質を長期にわたって高収率で産生させるためには、安定な発現が好ましい。例えば、抗体分子を安定に発現する細胞系を遺伝子工学的に作製することができる。ウイルス性の複製起点を含む発現ベクターを用いずに、宿主細胞を、適切な発現制御エレメント（例えば、プロモーター、エンハンサー配列、転写ターミネーター、ポリアデニル

化部位など）によって制御されたDNAおよび選択マーカーで形質転換することができる。外来DNAを導入した後、遺伝子操作した細胞を富化培地中で１～２日間増殖させ、次いで選択培地に切り替える。組換えプラスミド内の選択マーカーは、選択に対する耐性を付与し、細胞がプラスミドをその染色体内に安定に組み込み、増殖してフォーカス（これは次にクローニングされて細胞系へと拡大できる）を形成できるようにする。この方法は、抗体分子を発現する細胞系の操作に有利に用いることができる。そのような操作した細胞系は、抗体分子と直接的または間接的に相互作用する組成物のスクリーニングおよび評価において特に有用となり得る。

【０２４２】

いくつかの選択系が使用でき、例えば、限定するものではないが、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ（Wiglerら，1977，Cell 11:223）、ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（Szybalska & Szybalski，1992，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:202）、およびアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（Lowyら，1980，Cell 22:8-17）遺伝子が、それぞれtk⁻細胞、hgprt⁻細胞またはaprt⁻細胞において使用できる。また、代謝拮抗物質耐性を次の遺伝子の選択基準として用いることが可能である：dhfr（メトトレキセートに対する耐性を付与する）（Wiglerら，1980，Natl. Acad. Sci. USA 77:357；O’Hareら，1981，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527）；gpt（ミコフェノール酸に対する耐性を付与する）（Mulligan & Berg，1981，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072）；neo（アミノグリコシドG-418に対する耐性を付与する）（WuおよびWu，1991，Biotherapy 3:87-95; Tolstoshev，1993，Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596；Mulligan，1993，Science 260:926-932；およびMorgan and Anderson，1993，Ann. Rev. Biochem. 62: 191-217; May，1993，TIB TECH 11(5):l55-2 15）；およびhygro（ハイグロマイシンに対する耐性を付与する）（Santerreら，1984，Gene 30:147）。組換えDNA法の技術分野において一般に知られている方法を、目的とする組換えクローンの選択にルーチンに適用することができ、そのような方法は、例えば、Ausubelら（編），Current Protocols in Molecular Biology，John Wiley & Sons，NY (1993)；Kriegler，Gene Transfer and Expression，A Laboratory Manual，Stockton Press，NY (1990)；およびChapters 12 and 13，Dracopoliら（編），Current Protocols in Human Genetics，John Wiley & Sons，NY (1994)；Colberre-Garapinら，1981，J. Mol. Biol. 150:1（これらは参照によりそれらの全体が本明細書に組み入れられるものとする）に記載されている。

【０２４３】

抗体分子の発現レベルは、ベクター増幅によって増大させることができる（概説としては、BebbingtonおよびHentschel，The use of vector based on gene amplification for the expressionof cloned genes in mammalian cells in DNA cloning，Vol.3. (Academic Press，New York，1987)を参照されたい）。抗体を発現するベクター内のマーカーが増幅可能である場合、宿主細胞培養物中に存在するインヒビターのレベルの増加により、そのマーカー遺伝子のコピー数が増加する。増幅した領域は抗体遺伝子と結合しているので、その抗体の産生もまた増加する（Crouseら，1983，Mol. Cell. Biol. 3:257）。

【０２４４】

宿主細胞は、本発明の２つの発現ベクター（第１のベクターは重鎖由来のポリペプチドをコードし、第２のベクターは軽鎖由来のポリペプチドをコードする）で共トランスフェクトすることができる。これら２つのベクターは、重鎖ポリペプチドと軽鎖ポリペプチドとを等しく発現させることができる同一の選択マーカーを含むことができる。あるいはまた、重鎖ポリペプチドおよび軽鎖ポリペプチドの双方をコードし、それらを発現することができる単一のベクターを使用することも可能である。そのような場合、有害な遊離重鎖が過剰になることを防止するために、軽鎖を重鎖の前に配置しなければならない（Proudfoot，1986，Nature 322:52；およびKohler，1980，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2 197）。重鎖および軽鎖のコード配列は、cDNAでもゲノムDNAでもよい。

【０２４５】

また、本発明の抗体は、トランスジェニック動物（例えば、トランスジェニックマウス

）に導入することもできる。例えば、Bruggemann, Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz). 49(3):203-8 (2001)；Bruggemann and Neuberger, Immunol. Today 8:391-7 (1996)（それらは各々、参照により本明細書に組み入れられる）を参照されたい。トランスジーン構築物または転座は、例えばプラスミドの組み立て、酵母人工染色体内でのクローニング、および染色体断片の使用によって得ることができる。トランスジェニック動物系統内での転座の組込みおよび維持は、卵母細胞への前核DNAの注入および胚性幹細胞を使用する種々のトランスフェクション法により達成できる。

【０２４６】

例えば、ヒト化重鎖および／または軽鎖あるいはヒト化重鎖および／または軽鎖可変領域をコードする核酸は、マウス胚性幹細胞へ無作為に導入してもよいし、相同組換えによって導入してもよい。マウス重鎖および軽鎖免疫グロブリン遺伝子は、相同組換えによりヒト化抗体をコードする核酸を導入することによって、別々にまたは同時に、非機能性にすることができる。特に、JH領域がホモ接合的に欠失すると、内因的な抗体産生が妨害される。改変した胚性幹細胞を増やして、胚盤胞にマイクロインジェクションして、キメラマウスを作製する。次に、このキメラマウスを交配させて、ヒト化抗体を発現するホモ接合型の子孫を作製する。

【０２４７】

本発明の抗体分子を組換え発現により産生させたら、それを、免疫グロブリン分子を精製するための当業界で公知のいずれかの方法、例えばクロマトグラフィー（例えばイオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー（特にプロテインAの後での特異的抗原に対する親和性により）、およびサイズカラムクロマトグラフィー）、遠心分離、差異的溶解度により、あるいはタンパク質を精製するための他の標準的な方法により精製することができる。さらに、本発明の抗体またはそのフラグメントは、精製しやすくするために、本明細書中で記載される、または当業界で公知の異種ポリペプチド配列に融合させることができる。

【０２４８】

2.9　抗体コンジュゲート

本発明は、１つ以上の成分（限定するものではないが、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、融合タンパク質、核酸分子、小分子、ミメティック物質、合成薬物、無機分子および有機分子を含む）にコンジュゲートまたは融合させた抗体またはそのフラグメントを包含する。

【０２４９】

本発明は、融合タンパク質を生成するように、異種タンパク質またはポリペプチド（またはその断片、好ましくは少なくとも10個、少なくとも20個、少なくとも30個、少なくとも40個、少なくとも50個、少なくとも60個、少なくとも70個、少なくとも80個、少なくとも90個または少なくとも100個のアミノ酸からなるポリペプチド）に組換えによって融合された、または化学的にコンジュゲートされた（共有結合および非共有結合によるコンジュゲーションを含む）抗体またはそのフラグメントを包含する。融合は、必ずしも直接的である必要はなく、リンカー配列を介して起こるものであってもよい。例えば、抗体は、その抗体を、特定の細胞表面受容体に特異的な抗体と融合またはコンジュゲートさせることにより、in vitroまたはin vivoで、異種ポリペプチドを特定の細胞型にターゲティングさせるのに使用することができる。異種ポリペプチドに融合またはコンジュゲートさせた抗体はまた、in vitroでのイムノアッセイおよび当業界で公知の方法を用いる精製方法において使用することもできる。例えば、国際公開WO 93/21232号；欧州特許EP439,095号；Naramuraら, 1994, Immunol. Lett. 39:91-99；米国特許第5,474,981号；Gilliesら, 1992, PNAS 89:1428-1432；およびFellら,1991, J. Immunol. 146:2446-2452（それらは参照によりそれらの全体が組み入れられるものとする）を参照されたい。

【０２５０】

本発明はさらに、抗体フラグメントに融合またはコンジュゲートさせた異種タンパク質、ペプチドまたはポリペプチドを含む組成物を包含する。例えば、異種ポリペプチドは、

Fabフラグメント、Fdフラグメント、Fvフラグメント、$F(ab)_2$フラグメント、VHドメイン、VLドメイン、VH CDR、VL CDR、またはそれらのフラグメントに融合またはコンジュゲートさせることができる。ポリペプチドを抗体部分へ融合またはコンジュゲートさせるための方法は、当業界では周知である。例えば、米国特許第5,336,603号、第5,622,929号、第5,359,046号、第5,349,053号、第5,447,851号および第5,112,946号；欧州特許EP 307,434号およびEP 367,166号；国際公開WO 96/04388号およびWO 91/06570号；Ashkenaziら, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 10535-10539；Zhengら, 1995, J. Immunol. 154:5590-5600; and Vilら, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:11337- 11341（それらの参照文献は参照によりそれらの全体が組み込まれるものとする）を参照されたい。

【０２５１】

遺伝子シャフリング、モチーフシャフリング、エキソンシャフリング、および／またはコドンシャフリングの技法（まとめて「DNAシャフリング」と呼ばれる）により、さらなる融合タンパク質を作製することが可能である。DNAシャッフリングを用いて、本発明の抗体またはそのフラグメントの活性を変化させることができる（例えば、より高い親和性とより低い解離速度を有する抗体またはそのフラグメント）。概略的には、米国特許第5,605,793号；第5,811,238号；第5,830,721号；第5,834,252号；および第5,837,458号、ならびにPattenら, 1997, Curr. Opinion Biotechnol. 8:724-33；Harayama, 1998, Trends Biotechnol. 16(2):76-82；Hansson,ら, 1999, J. Mol. Biol. 287:265-76；およびLorenzoおよびBlasco, 1998, Biotechniques 24(2):308- 313（これらの特許および刊行物は参照によりそれらの全体が本明細書に組み入れられるものとする）を参照されたい。抗体もしくはそのフラグメント、またはコードされた抗体もしくはそのフラグメントは、組換えを行う前に、誤りがちの（error-prone）PCR、ランダムヌクレオチド挿入または他の方法によるランダム変異誘発に供することにより変化させることができる。抗体または抗体フラグメントをコードするポリヌクレオチドの１以上の部分を、１種以上の異種分子の１以上の成分、モチーフ、区域、部分、ドメイン、断片などで組み換えることができる。

【０２５２】

さらに、抗体またはそのフラグメントは、精製しやすくするために、例えばペプチドなどのマーカー配列と融合させることも可能である。好ましい実施形態では、そのマーカーアミノ酸配列は、ヘキサヒスチジンペプチド、例えばpQEベクター（QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311）内に与えられるタグであり、ほかにもあるが、それらの多くは市販されている。Gentzら, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824に記載されるように、ヘキサヒスチジンは融合タンパク質の簡便な精製を可能にする。精製に有用な他のペプチドタグとしては、限定するものではないが、ヘマグルチニン「HA」タグ（インフルエンザ・ヘマグルチニンタンパク質由来のエピトープに対応するもの）（Wilsonら, 1984, Cell, 37:767）および「flag」タグが挙げられる。

【０２５３】

他の実施形態において、本発明の抗体またはそのフラグメント、類似体もしくは誘導体は、診断剤または検出可能な物質とコンジュゲートさせることができる。そのような抗体は、特定の治療薬の有効性の判定などの臨床試験法の一部として、疾患の発生または進行をモニタリングまたは予測するのに有用であり得る。そのような診断および検出は、抗体を検出可能な物質とカップリングさせることにより達成できる。検出可能な物質としては、限定するものではないが、以下のものが挙げられる：ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、β-ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンステラーゼなどの種々の酵素；ストレプトアビジンおよびアビジン／ビオチンなどの補欠分子団；ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロライドもしくはフィコエリトリンなどの蛍光物質；ルミノールなどの発光物質；ルシフェラーゼ、ルシフェリンおよびエクオリンなどの生物発光物質；ヨウ素（^{131}I、^{125}I、^{123}I、^{121}I）、炭素（^{14}C）、イオウ（^{35}S）、三重水素（^{3}H）、インジウム（^{115}In, ^{113}In、^{112}In、^{111}In）およびテクネチウム（^{99}Tc）、タリウム（^{201}Ti）、ガリウム（^{68}Ga、^{67}Ga）、パラジウム（^{103}Pd）

、モリブデン（^{99}Mo）、キセノン（^{133}Xe）、フッ素（^{18}F）、^{153}Sm、^{177}Lu、^{159}Gd、^{149}Pm、^{140}La、^{175}Yb、^{166}Ho、^{90}Y、^{47}Sc、^{186}Re、^{188}Re、^{142} Pr、^{105}Rh、^{97}Ru、^{68}Ge、^{57}Co、^{65}Zn、^{85}Sr、^{32}P、^{153}Gd、^{169}Yb、^{51}Cr、^{54}Mn、^{75}Se、^{113}Snおよび^{117}Tinなどの放射性物質；さまざまな陽電子放射断層法を用いる陽電子放射金属、非放射性常磁性金属イオン、ならびに放射性標識されたもしくは特定の放射性同位元素にコンジュゲートされた分子。

【０２５４】

本発明はさらに、治療成分にコンジュゲートさせた抗体またはそのフラグメントを包含する。抗体またはそのフラグメントは、細胞毒素（例えば細胞増殖抑制剤もしくは細胞破壊剤）、治療剤または放射性金属イオン（例えばα線放射体）などの治療成分にコンジュゲートさせることができる。細胞毒素または細胞傷害剤としては、細胞にとって有害であるあらゆる物質が含まれる。治療成分としては、限定するものではないが、以下のものが挙げられる：代謝拮抗物質（例えば、メトトレキセート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、5-フルオロウラシル、デカルバジン）、アルキル化剤(例えば、メクロレタミン、チオエパクロラムブシル（thioepa chlorambucil）、メルファラン、カルムスチン（BCNU）およびルムスチン（CCNU）、シクロトスファミド（cyclothosphamide）、ブスルファン、ジブロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンC、ならびにシスジクロロジアミン白金(II)（DDP）シスプラチン)、アントラサイクリン（例えば、ダウノルビシン（従来名はダウノマイシン）およびドキソルビシン）、抗生物質（例えば、ダクチノマイシン（従来名はアクチノマイシン）、ブレオマイシン、ミトラマイシンおよびアントラマイシン（AMC））、オーリスタチン分子（例えば、オーリスタチンPHE、ブリオスタチン１、およびソラスタチン（solastatin）10；Woykeら, Antimicrob. Agents Chemother. 46:3802-8 (2002)、Woykeら, Antimicrob. Agents Chemother. 45:3580-4 (2001)、Mohammadら, Anticancer Drugs 12:735-40 (2001)、Wallら, Biochem. Biophys. Res. Commun. 266:76-80 (1999)、Mohammadら, Int. J. Oncol. 15:367-72 (1999)（それらは全て、参照により本明細書に組み入れられるものとする）を参照されたい）、ホルモン（例えば、グルココルチコイド、プロゲステロン、アンドロゲンおよびエストロゲン）、DNA修復酵素阻害剤（例えば、エトポシドまたはトポテカン）、キナーゼ阻害剤（例えば、化合物ST1571、メシル酸イマチニブ（Kantarjianら, Clin Cancer Res. 8(7):2167-76 (2002)）、細胞傷害剤（例えば、パクリタキセル、サイトカラシンB、グラミシジンD、エチジウムブロミド、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラシンジオン（dihydroxy anthracin dione）、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロールおよびピューロマイシン、ならびにそれらの類似体または同族体）、ならびに、米国特許第6,245,759号、第6,399,633号、第6,383,790号、第6,335,156号、第6,271,242号、第6,242,196号、第6,218,410号、第6,218,372号、第6,057,300号、第6,034,053号、第5,985,877号、第5,958,769号、第5,925,376号、第5,922,844号、第5,911,995号、第5,872,223号、第5,863,904号、第5,840,745号、第5,728,868号、第5,648,239号、第5,587,459号に開示される化合物；ファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤（例えば、R115777、BMS-214662、および、例えば米国特許第6,458,935号、第6,451,812号、第6,440,974号、第6,436,960号、第6,432,959号、第6,420,387号、第6,414,145号、第6,410,541号、第6,410,539号、第6,403,581号、第6,399,615号、第6,387,905号、第6,372,747号、第6,369,034号、第6,362,188号、第6,342,765号、第6,342,487号、第6,300,501号、第6,268,363号、第6,265,422号、第6,248,756号、第6,239,140号、第6,232,338号、第6,228,865号、第6,228,856号、第6,225,322号、第6,218,406号、第6,211,193号、第6,187,786号、第6,169,096号、第6,159,984号、第6,143,766号、第6,133,303号、第6,127,366号、第6,124,465号、第6,124,295号、第6,103,723号、第6,093,737号、第6,090,948号、第6,080,870号、第6,077,853号、第6,071,935号、第6,066,738号、第6,063,930号、第6,054,466号、第6,051,582号、第6,051,574号および第6,040,305号に開示されるもの）、トポイソメ

ラーゼ阻害剤（例えば、カンプトテシン；イリノテカン；SN-38；トポテカン；9-アミノカンプトテシン；GG-211（GI 147211）；DX-8951f；IST-622；ルビテカン；ピラゾロアクリジン；XR-5000；サイントピン（saintopin）；UCE6；UCE1022；TAN-1518A；TAN-1518B；KT6006；KT6528；ED-110；NB-506；ED-110；NB-506；およびレベッカマイシン）；ブルガレイン（bulgarein）；Hoescht色素33342およびHoechst色素33258などのDNA副溝結合物質；ニチジン（nitidine）；ファガロニン（fagaronine）；エピベルベリン；コラリン（coralyne）；β-ラパコン；BC-4-1；ビホスホネート（例えば、アレンドロネート、シマドロネート、クロドロネート、チルドロネート、エチドロネート、イバンドロネート、ネリドロネート、オルパンドロネート（olpandronate）、リセドロネート、ピリドロネート（piridronate）、パミドロネート、ゾレンドロネート）、HMG-CoAレダクターゼ阻害剤（例えば、ロバスタチン、シムバスタチン、アトロバスタチン、プラバスタチン、フルバスタチン、スタチン、セリバスタチン、レスコール、リピトール（lupitor）、ロスバスタチンおよびアトロバスタチン）、ならびにそれらの薬学的に許容される塩、溶媒和物、包接体およびプロドラッグ（例えば、Rothenberg, M.L., Annals of Oncology 8:837-855(1997)；およびMoreau, P.,ら, J. Med. Chem. 41:1631-1640(1998)を参照されたい）、アンチセンスオリゴヌクレオチド（例えば、米国特許第6,277,832号、第5,998,596号、第5,885,834号、第5,734,033号および第5,618,709号に開示されるもの）、免疫調整物質（例えば、抗体およびサイトカイン）、抗体、ならびにアデノシンデアミナーゼ阻害剤（例えば、リン酸フルダラビンおよび2-クロロデオキシアデノシン）。

【０２５５】

さらに、抗体またはそのフラグメントは、所与の生物学的応答を改変させる治療成分または薬物成分とコンジュゲートさせることができる。治療成分および薬物成分は、古典的な化学治療剤に限定されると解釈されるべきでない。例えば、薬物成分は、所望の生物学的活性を有するタンパク質またはポリペプチドとすることができる。そのようなタンパク質としては、例えば、次のものが挙げられる：アブリン、リシンA、シュードモナス（pseudomonas）外毒素、コレラ毒素もしくはジフテリア毒素などの毒素；腫瘍壊死因子、α-インターフェロン、β-インターフェロン、神経成長因子、血小板由来成長因子、組織プラスミノーゲン活性化因子などのタンパク質；アポトーシス誘発剤（apoptotic agent）、例えば、TNF-α、TNF-β、AIM I（国際公開WO 97/33899号を参照）、AIM II（国際公開WO 97/34911号を参照）、Fasリガンド（Takahashiら, 1994, J. Immunol., 6:1567-1574）およびVEGI（国際公開WO 99/23105号を参照）；血栓症剤（thrombotic agent）もしくは抗血管新生剤（antiangiogenic agent）、例えば、アンジオスタチン、エンドスタチンもしくは凝集経路の成分（例えば、組織因子）；または生物学的応答調節物質、例えばリンホカイン（例えば、インターロイキン-1（「IL-1」）、インターロイキン-2（「IL-2」）、インターロイキン-6（「IL-6」）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（「GM-CSF」）および顆粒球コロニー刺激因子（「G-CSF」）、成長因子（例えば、成長ホルモン（「GH」）；または凝集剤、例えば、カルシウム、ビタミンK、組織因子（例えば、ハーゲマン（Hageman）因子（XII因子）、高分子キニノゲン（HMWK）、プレカリクレイン（PK）、凝集タンパク質-II因子（プロトロンビン）、V因子、XIIa因子、VIII因子、XIIIa因子、XI因子、XIa因子、IX因子、IXa因子、X因子、リン脂質、フィブリノーゲンのα鎖およびβ鎖由来のフィブリノペプチドAおよびB、フィブリンモノマー）。

【０２５６】

さらに、抗体は、α線放射体(例えば^{213}Bi)などの放射性金属イオンのような治療成分に、または放射性金属イオン（限定するものではないが、^{131}In、^{131}LU、^{131}Y、^{131}Ho、^{131}Smなど）をポリペプチドとコンジュゲートさせるのに有用な大環状キレート剤にコンジュゲートさせることができる。特定の実施形態では、その大環状キレート剤は、1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-N,N’,N’’,N’’’-四酢酸（DOTA）であり、これはリンカー分子を介して抗体に結合させることができる。そのようなリンカー分子は当業界で一般に知られており、Denardoら, 1998, Clin Cancer Res. 4(10):2483-90; Petersonら, 1999, Bioconjug. Chem. 10(4):553-7；およびZimmermanら, 1999, Nucl. Med. Biol. 26(8)

:943-50（それぞれ、参照によりそれらの全体が組み込まれるものとする）に記載されている。

【０２５７】

治療成分を抗体にコンジュゲートさせるための技法は周知であり、例えば、Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeldら（編）, p.p.243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985)のArnonら, “Monoclonal Antibodies or Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy”; Controlled Drug Delivery (第２版), Robinsonら（編）, p.p.623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987)のHellstromら, “Antibodies For Drug Delivery”; Monoclonal Antibodies 84: Biological And Clinical Applications, Pincheraら (編), p.p.475-506 (1985)のThorpe, “Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review”; Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwinら (編), p.p.303-16 (Academic Press 1985)の“Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy”；およびThorpeら, 1982, Immunol. Rev. 62:119-58に記載されている。

【０２５８】

あるいはまた、Segalにより米国特許第4,676,980号（これは参照によりその全体が本明細書に組み入れられる）に記載されるように、抗体を二次抗体にコンジュゲートさせて、抗体ヘテロコンジュゲートを形成させてもよい。

【０２５９】

抗体またはそのフラグメントにコンジュゲートされる治療成分または薬物は、被験者の特定の疾患に対して所望の予防効果または治療効果を達成するように選択すべきである。医師または他の医療従事者は、抗体またはそのフラグメントにコンジュゲートさせようとする治療成分または薬物を決定する際に、次のことを考慮すべきである：疾患の性質、疾患の重症度、および被験者の状態。

【０２６０】

また、抗体は、固相支持体に結合させることも可能であり、これはイムノアッセイまたは標的抗原の精製に特に有用である。そのような固相支持体としては、限定するものではないが、ガラス、セルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、またはポリプロピレンが挙げられる。

【０２６１】

2.10　本発明の抗体の用途

本発明は、対象の抗体を効率的にヒト化するための方法を提供する。本発明のヒト化抗体は、疾患またはその１つ以上の症状を治療、管理、予防または改善するために、単独で、または他の予防剤もしくは治療剤と組み合わせて使用することができる。

【０２６２】

本発明は、疾患の予防、管理、治療または改善方法であって、それを必要とする被験者に、１種以上の本発明の抗体を単独で、または本発明の抗体以外の１種以上の他の治療薬（例えば１種以上の予防剤もしくは治療剤）と組み合わせて投与することを含む上記方法を提供する。また、本発明は、１種以上の本発明の抗体と、本発明の抗体以外の１種以上の予防剤もしくは治療剤とを含む組成物、ならびに前記組成物を用いて疾患またはその１つ以上の症状を予防、管理、治療または改善する方法も提供する。治療剤または予防剤としては、限定するものではないが、小分子、合成薬物、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、核酸（例えばDNAおよびRNAヌクレオチド、限定するものではないが、アンチセンスヌクレオチド配列、三本鎖らせん構造体、RNAi、および生物学的に活性なタンパク質、ポリペプチドもしくはペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む）、抗体、合成もしくは天然の無機分子、ミメティック剤、および合成もしくは天然の有機分子が挙げられる。

【０２６３】

疾患またはその１つ以上の症状の予防、管理、治療または改善に有用であることが知られている、またはこれまで使用されてきたか現在使用されている治療剤であれば、いずれも、本発明にしたがって、本発明の抗体と組み合わせて使用することができる。疾患また

はその１つ以上の症状の予防、管理、治療または改善にこれまで使用されてきたか現在使用されている治療薬（または予防剤または治療剤）に関する情報については、例えば、Gilmanら，Goodman and Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics，第10版，McGraw-Hill，New York，2001；The Merck Manual of Diagnosis and Therapy，Berkow，M.D.ら（編），第17版，Merck Sharp & Dohme Research Laboratories，Rahway，NJ，1999；Cecil Textbook of Medicine，第20版，Bennett and Plum（編），W.B. Saunders，Philadelphia，1996を参照されたい。そのような薬剤の例としては、限定するものではないが、以下のものが挙げられる：免疫調整剤、抗炎症剤（例えば、アドレノコルチコイド、コルチコステロイド（例えば、ベクロメタゾン、ブデソニド、フルニソリド、フルチカゾン、トリアムシノロン、メチルプレドニソロン、プレドニソロン、プレドニソン、ヒドロコルチゾン）、グルココルチコイド、ステロイド、非ステロイド系抗炎症薬（例えば、アスピリン、イブプロフェン、ジクロフェナク、およびCOX-2阻害剤）、疼痛緩和剤、ロイコトリエンアンタゴニスト（例えば、モンテルカスト、メチルキサンチン、ザフィルルカストおよびジロイトン）、β2-アゴニスト（例えば、アルブテロール、ビテロール、フェノテロール、イソエタリン、メタプロテレノール、ピルブテロール、サルブタモール、テルブタリンホルメテロール、サルメテロール、およびサルブタモールテルブタリン）、抗コリン作動薬（例えば、臭化イプラトリピウムおよび臭化オキシトロピウム）、スルファサラジン、ペニシラミン、ダプソン、抗ヒスタミン剤、抗マラリア剤（例えば、ヒドロキシクロロキン）、抗ウイルス剤、ならびに抗生物質（例えば、ダクチノマイシン（従来名はアクチノマイシン）、ブレオマイシン、エリスロマイシン、ペニシリン、ミトラマイシン、およびアントラマイシン（AMC））。

【０２６４】

本発明のヒト化抗体は、特定の抗原に対して直接使用することができる。いくつかの実施形態において、本発明の抗体は、その抗体が結合する細胞の溶解を媒介することができるサブクラスまたはアイソタイプに属する。特定の実施形態において、本発明の抗体は、細胞表面タンパク質と複合化すると、ナチュラルキラー細胞またはマクロファージなどのエフェクター細胞を活性化することにより、血清補体を活性化しかつ／または抗体依存性細胞傷害性（ADCC）を媒介するサブクラスまたはアイソタイプに属する。

【０２６５】

抗体の生物学的活性は、その抗体分子の定常ドメインまたはFc領域によってかなり決定されることが知られている（UananueおよびBenacerraf，Textbook of Immunology，第２版，Williams & Wilkins，p. 218 (1984)）。これには、白血球によりもたらされる補体活性化能力および抗体依存性細胞傷害性（ADCC）を媒介する能力が含まれる。異なるクラスおよびサブクラスの抗体はこの点に関して異なり、同じサブクラス由来であるが異なる生物種由来の抗体もそうである。本発明によれば、所望の生物学的活性を有するクラスの抗体が調製される。これらの抗体の調製には、公知の技法による抗体定常ドメインの選択およびそれらのヒト化抗体での取込みが含まれる。例えば、IgG3クラスおよびlgG2aクラスのマウス免疫グロブリンは、コグネイト抗原を発現する標的細胞に結合すると、血清補体を活性化することができ、したがって、IgG3およびlgG2aエフェクター機能を取り込んだヒト化抗体は、特定の治療用途に望ましい。

【０２６６】

一般に、IgG_{2a}およびIgG_3サブクラス、ならびに場合によってはIgG_1サブクラスのマウス抗体はADCCを媒介することができ、またIgG_3、IgG_{2a}、およびIgMサブクラスの抗体は血清補体に結合してそれを活性化する。通常、補体の活性化には、少なくとも２つのIgG分子が標的細胞上で近接して結合する必要がある。しかし、IgM分子はたった１つの分子の結合で血清補体を活性化する。

【０２６７】

補体活性化および／またはADCCにより標的細胞の溶解を媒介する特性の抗体の能力は、アッセイすることができる。対象となる細胞を増殖させ、in vitroで標識する。抗体を、抗原－抗体複合体により活性化し得る血清補体または免疫細胞のいずれかと組み合わせて

、細胞培養物に添加する。標的細胞の細胞溶解は、溶解した細胞からの標識の放出により検出される。実際、抗体は、補体および／または免疫細胞の供給源として患者自身の血清を使用してスクリーニングすることができる。その後、in vitro試験において補体を活性化するかまたはADCCを媒介することができる抗体を、その特定の患者において治療に使用する。

【０２６８】

特定の用途ではIgM抗体を使用することが好ましい場合があるが、IgG分子は、それよりも小さいので、ある種のタイプの感染細胞にIgM分子よりも局在化させやすいかもしれない。

【０２６９】

いくつかの実施形態では、本発明の抗体は、患者を受動免疫するのに有用である。

【０２７０】

また、本発明の抗体は、被験者内または生物学的サンプル（例えば、細胞または組織）中での抗原の発現を検出／同定するためのin vivoまたはin vitro診断アッセイにおいて使用することも可能である。抗体、そのフラグメント、または抗体もしくはそのフラグメントを含む組成物の、診断アッセイにおける非限定的な使用例は、米国特許第6,392,020号；第6,156,498号；第6,136,526号；第6,048,528号；第6,015,555号；第5,833,988号；第5,811,310号；第8 5,652,114号；第5,604,126号；第5,484,704号；第5,346,687号；第5,318,892号；第5,273,743号；第5,182,107号；第5,122,447号；第5,080,883号；第5,057,313号；第4,910,133号；第4,816,402号；第4,742,000号；第4,724,213号；第4,724,212号；第4,624,846号；第4,623,627号；第4,618,486号；第4,176,174号（それらは全て、参照により本明細書に組み入れられる）に記載されている。抗原およびその抗体についての好適な診断アッセイは、使用する特定の抗体に依存する。非限定的な例は、ELISA、サンドイッチアッセイ、および立体構造阻害（steric inhibition）アッセイである。本発明の抗体を用いるin vivo診断アッセイでは、その抗体を、Ｘ線、コンピューター連動断層撮影（CT）、超音波、または磁気共鳴イメージング（MRI）などのイメージング法により検出することができる標識にコンジュゲートさせる。また、本発明の抗体は、抗原を組換え細胞培養物または天然の供給源からアフィニティ精製するのに使用することも可能である。

【０２７１】

2.11　投与および製剤

本発明は、疾患の診断、検出、またはモニタリングにおいて、疾患もしくはその１つ以上の症状の予防、治療、管理、または改善において、および／または研究において使用するための本発明の抗体を含む組成物を提供する。具体的な実施形態では、組成物は本発明の抗体を１種以上含んでなる。別の実施形態では、組成物は１種以上の本発明の抗体および本発明の抗体以外の１種以上の予防薬または治療薬を含んでなる。好ましくは、予防薬または治療薬は、疾患もしくはその１つ以上の症状の予防、治療、管理または改善において有用であることが知られているか、それらに用いられてきたかあるいは現在用いられているものである。これらの実施形態によれば、該組成物は担体、希釈剤または賦形剤をさらに含んでもよい。

【０２７２】

本発明の組成物としては、限定するものではないが、医薬組成物の製造に有用なバルク薬物組成物（例えば不純なまたは未滅菌の組成物）、および単位剤形の調製に用いることができる医薬組成物（すなわち、被験者または患者への投与に好適な組成物）が挙げられる。このような組成物は、予防もしくは治療に有効な量の、本明細書中に開示した予防薬および／または治療薬あるいはそれらの薬剤の組合せ、ならびに製薬上許容される担体を含んでなる。好ましくは、本発明の組成物は医薬組成物であり、有効量の１種以上の本発明の抗体、製薬上許容される担体、および場合によっては、有効量の別の予防薬もしくは治療薬を含んでなる。

【０２７３】

医薬組成物は経口投与剤形または非経口投与剤形として、即時放出または持続放出のために製剤化することができる。該組成物は医薬製剤に通常用いられる不活性な成分、例えば希釈剤、充填剤、崩壊剤、甘味料、滑沢剤および香料などを含むことができる。医薬組成物は好ましくは静脈内投与（ボーラス注射もしくは持続滴下のいずれかによる）のために、または移植したカプセルからの放出のために製剤化される。静脈内投与用の典型的な製剤には希釈剤として生理食塩水を用いる。

【０２７４】

本発明の抗体のFabまたはFab’部分もまた、治療用有効成分として用いることができる。これら抗体フラグメントの調製は当技術分野で周知である。

【０２７５】

本発明の組成物はまた、抗体を治療薬として投与しうるための臨床上の指示、投与量および投与スケジュール、ならびに／または患者への本発明の抗体の投与に対する禁忌を記載した印刷物を含むことができる。

【０２７６】

本発明の組成物としては、限定するものではないが、医薬組成物の製造に有用なバルク薬物組成物（例えば不純なまたは未滅菌の組成物）、および単位剤形の調製に用いることができる医薬組成物（すなわち、被験者または患者への投与に好適な組成物）が挙げられる。このような組成物は、予防もしくは治療に有効な量の、本明細書中に開示した予防薬および／または治療薬あるいはそれらの薬剤の組合せ、ならびに製薬上許容される担体を含んでなる。好ましくは、本発明の組成物は医薬組成物であり、有効量の１種以上の本発明の抗体、製薬上許容される担体、および場合によっては、有効量の別の予防薬もしくは治療薬を含んでなる。

【０２７７】

具体的な実施形態では、「製薬上許容される」との用語は、連邦政府もしくは州政府の監督官庁に承認された、または米国薬局方もしくは動物（特にヒト）での使用のための他の広く認識された薬局方に挙げられていることを意味する。「担体」との用語は、希釈剤、アジュバント（例えばフロイント・アジュバント（完全または不完全））、賦形剤またはビヒクル（それと共に治療薬を含有するかまたは投与する）を指す。そのような医薬用担体は、無菌液体（例えば水または油（例えば石油、動物、植物もしくは合成由来の、例えばピーナッツ油、大豆油、鉱物油、ゴマ油など））であってよい。医薬組成物を静脈内に投与するならば、水が好ましい担体である。生理食塩水ならびにデキストロースおよびグリセロール水溶液もまた、特に注射用溶液のために、液体担体として用いることができる。好適な製薬用賦形剤としては、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、コメ、小麦粉、チョーク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、タルク、塩化ナトリウム、乾燥スキムミルク、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノールなどが挙げられる。該組成物は、所望であれば、少量の湿潤剤もしくは乳化剤、またはpH緩衝剤を含むこともできる。これらの組成物は、溶液剤、懸濁液剤、乳濁液剤、錠剤、丸剤、カプセル剤、粉末剤、持続放出製剤などの剤形を採ることができる。

【０２７８】

一般的には、本発明の組成物の成分は、別々かまたは単位剤形に一緒に混合して、例えば凍結乾燥粉末もしくは水を含まない濃縮物として密閉容器（例えば活性薬剤の量を表示したアンプルもしくは小袋）中に供給する。組成物が点滴による投与のためのものである場合には、無菌医薬グレードの水または生理食塩水を含有する点滴瓶を用いて提示することができる。組成物を注射により投与する場合には、注射用の滅菌水または生理食塩水のアンプルを提示することができ、それにより投与前に成分を混合してもよい。

【０２７９】

本発明の組成物は、非荷電の、または塩の形態で製剤化することができる。製薬上許容される塩としては、例えば塩酸、リン酸、酢酸、シュウ酸、酒石酸などから誘導されるもののようなアニオンを用いて形成したもの、および例えばナトリウム、カリウム、アンモ

ニウム、カルシウム、水酸化第二鉄、イソプロピルアミン、トリエチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインなどのカチオンを用いて形成したものが挙げられる。

【０２８０】

種々の送達システムが公知であり、本発明の１以上の抗体、または本発明の１以上の抗体と、疾患もしくはその１以上の症状を予防、管理、治療または改善するのに有用な予防薬もしくは治療薬との組合せを投与するために用いることができる（例えば、リポソーム、微小粒子、マイクロカプセルへのカプセル化、抗体もしくは抗体フラグメントを発現可能な組換え細胞、受容体介在エンドサイトーシス（例えばWu および Wu, J. Biol. Chem. 262:4429-4432 (1987)を参照）、レトロウイルスその他のベクターの一部としての核酸の構築など）。本発明の予防薬または治療薬を投与する方法としては、限定するものではないが、非経口投与（例えば皮内、筋内、腹腔内、静脈内および皮下）、硬膜外投与、腫瘍内投与、および粘膜投与（例えば鼻腔内および口腔内経路）が挙げられる。さらに、例えば吸入器もしくは噴霧器を用い、エアロゾル化剤と共に製剤化することにより、肺内投与を用いることができる。例えば、米国特許第6,019,968号、同第5,985,320号、同第5,985,309号、同第5,934,272号、同第5,874,064号、同第5,855,913号、同第5,290,540号、および同第4,880,078号；ならびに、PCT 公開公報WO 92/19244号、同WO 97/32572号、同WO 97/44013号、同WO 98/31346号、および同WO 99/66903号を参照のこと（これらのそれぞれは、参照によりその全体が本明細書中に組み入れられる）。一実施形態では、本発明の抗体、組合せ治療剤、または本発明の組成物を、Alkermes AIR™ 肺内薬剤送達技術（Alkermes, Inc., Cambridge, MA）を用いて投与する。具体的な実施形態では、本発明の予防薬または治療薬を、筋内に、静脈内に、腫瘍内に、経口的に、鼻腔内に、肺内に、または皮下に投与する。予防薬または治療薬は、いずれの都合のよい経路によって投与してもよく、例えば点滴もしくはボーラス注射によって、上皮もしくは皮膚粘膜（例えば口腔粘膜、直腸および腸粘膜など）を介した吸収により投与してもよく、また他の生物学的活性薬剤と共に投与してもよい。投与は全身的でも局所的でもよい。

【０２８１】

具体的な実施形態では、本発明の予防薬または治療薬を、治療を必要とする部位に局所的に投与することが望ましく、これは例えば、限定するものではないが、局所注入（注射によって、またはインプラントによって（該インプラントは、メンブレンおよびマトリックス（例えばシラスティックメンブレン、ポリマー、繊維性マトリックス（例えばTissuel（登録商標））またはコラーゲンマトリックス）をはじめとする多孔性もしくは非多孔性材料によりなる））によって達成することができる。一実施形態では、本発明アンタゴニストの１以上の抗体の有効量を、疾患もしくはその症状を予防、治療、管理および／または改善するために被験者に対して罹患部位に局所的に投与する。別の実施形態では、本発明の１以上の抗体の有効量を、疾患またはその１以上の症状を予防、治療、管理、および／または改善するために、被験者に対して、本発明の抗体とは別の１以上の治療剤（例えば１以上の予防薬または治療薬）の有効量と組み合わせて罹患部位に局所的に投与する。

【０２８２】

別の実施形態では、予防薬または治療薬を、制御放出もしくは持続放出システムで送達することができる。一実施形態では、制御放出または持続放出を実現するためにポンプを用いてもよい（Langer, 上掲；Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:20；Buchwald ら, 1980, Surgery 88:507；Saudek ら, 1989, N. Engl. J. Med. 321:574 参照）。別の実施形態では、本発明の治療剤の制御放出または持続放出を実現するためにポリマー材料を用いることができる（例えば、Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (編), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974)；Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (編), Wiley, New York (1984)；Ranger および Peppas, 1983, J., Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61；Levyら, 1985, Science 228:190；Duringら, 1989, Ann. Neurol. 25:351；

Howardら，1989，J．Neurosurg．7 1:105；米国特許第5,679,377号；同第5,916,597号；同第5,912,015号；同第5,989,463号；同第5,128,326号；PCT 公開公報WO 99/15154号；および同WO 99/20253号を参照されたい）。持続放出製剤に用いるポリマーの例としては、限定するものではないが、ポリ（2-ヒドロキシエチルメタクリレート）、ポリ(メチルメタクリレート)、ポリ（アクリル酸）、ポリ（エチレンコビニルアセテート）、ポリ（メタクリル酸）、ポリグリコリド（PLG）、ポリ酸無水物、ポリ（N-ビニルピロリドン）、ポリ（ビニルアルコール）、ポリアクリルアミド、ポリ（エチレングリコール）、ポリラクチド（PLA）、ポリ（ラクチドコグリコリド）（PLGA）、およびポリオルトエステルが挙げられる。好ましい実施形態では、持続放出製剤に用いるポリマーは、不活性で、濾過の必要な不純物を含まず、保存において安定であり、無菌で、かつ生分解性である。また別の実施形態では、制御放出または持続放出システムを予防または治療の標的の近傍に配置し、したがって全身容量の一部しか必要としないようにすることができる（例えば、Goodson，Medical Applications of Controlled Release，上掲，vol．2，pp．115-138（1984）参照）。

【０２８３】

制御放出システムはLanger（1990，Science 249:1527-1533)による総説中で考察されている。当業者に公知のいずれの技術をも、本発明の１以上の治療薬を含んでなる持続放出製剤の製造に用いることができる。例えば、米国特許第4,526,938号、PCT公開公報WO 91/05548号、同WO 96/20698号、Ning ら，1996，“Intratumoral Radioimmunotheraphy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained Release Gel，” Radiotherapy & Oncology 39:179 189、Song ら，1995，“Antibody Mediated Lung Targeting of Long Circulating Emulsions，” PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372 397、Cleek ら，1997，“Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application，” Pro．Int’l．Symp．Control．Rel．Bioact．Mater．24:853 854、および Lam ら，1997，“Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery，” Proc．Int’l．Symp．Control Rel．Bioact．Mater．24:759 760 を参照されたい（これらのそれぞれは、参照によりその全体が本明細書中に組み入れられる）。

【０２８４】

具体的な実施形態では、本発明の組成物が予防薬または治療薬をコードする核酸である場合、該核酸は、それを適当な核酸発現ベクターの一部として構築し、それが細胞内に入るように投与することにより（例えばレトロウイルスベクターを用いることにより（米国特許第4,980,286号参照）、または直接注入により、または微小粒子衝撃（例えば遺伝子銃；Biolistic，Dupont）もしくは脂質、細胞表面受容体もしくはトランスフェクション試薬によるコーティングを用いることにより、または核に侵入することが知られているホメオボックス様ペプチドと連結して投与することにより（例えばJoliot ら，1991，Proc．Natl．Acad．Sci．USA 88:1864-1868参照））、それがコードする予防薬または治療薬の発現を促進するためにin vivo投与することができる。あるいはまた、核酸を細胞内に導入し、相同組換えによって発現のために宿主細胞DNA内に組み込むことができる。

【０２８５】

本発明の医薬組成物は、所望の投与経路に適合するように製剤化される。投与経路の例としては、限定するものではないが、非経口（例えば静脈内）、皮内、皮下、経口、鼻腔内（例えば吸入）、経皮（例えば局所）、経粘膜、および直腸投与が挙げられる。具体的な実施形態では、該組成物をヒトに対する静脈内、皮下、筋内、経口、鼻腔内、または局所投与に適合する医薬組成物として通常の方法に従って製剤化する。典型的には、静脈内投与のための組成物は無菌等張水性緩衝液中の溶液である。必要であれば、該組成物は可溶化剤および局所麻酔薬（例えば注射の部位での痛みを和らげるためのリグノカイン）を含有してもよい。

【０２８６】

本発明の組成物が局所的に投与するためのものであるならば、該組成物は軟膏、クリー

ム、経皮パッチ、ローション、ジェル、シャンプー、スプレー、エアロゾル、溶液、懸濁液の剤形、または当業者に周知の他の剤形で製剤化することができる。例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences and Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, 第19版, Mack Pub. Co., Easton, PA (1995) を参照のこと。非スプレー式局所用投与剤形のためには、局所適用に適合する担体もしくは１以上の賦形剤を含んでなり、好ましくは水より高い動的粘度を有する、粘性から半固体または固体形状を典型的に用いる。好適な製剤としては、限定するものではないが、溶液剤、懸濁液剤、乳濁液剤、クリーム剤、軟膏剤（ointment）、粉末剤、リニメント剤、軟膏（salve）などが挙げられ、それらは所望であれば、滅菌するかまたは、例えば浸透圧のような種々の性質に影響する補助剤（例えば保存剤、安定化剤、湿潤剤、緩衝剤もしくは塩）と混合する。他の好適な局所用投与剤形としては、スプレー用エアロゾル製剤が挙げられ、ここで有効成分（好ましくは固体または液体不活性担体と組み合わされている）は、加圧揮発性物質（例えばフレオンのような気体状噴射剤）と混合してつめるか、または搾り出し用容器中につめる。保湿剤または湿潤剤もまた、所望であれば医薬組成物および投与剤形に含めることができる。そのような付加的な成分の例は、当技術分野で周知である。

【０２８７】

本発明の方法が組成物の鼻腔内投与を含むものならば、組成物はエアロゾル剤形、スプレー、ミストまたは液滴の剤形で製剤化することができる。特に、本発明の使用のための予防薬または治療薬は、好適な噴射剤（例えば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素または他の好適なガス）を使用して、加圧容器または噴霧器からのエアロゾルスプレーの剤形で、都合よく送達することができる。加圧エアロゾルの場合、単位投与量は計量送達用のバルブを与えることにより測定することができる。吸入器または散布器での使用のためのカプセルまたはカートリッジ（例えばゼラチンによりなる）は、化合物と、好適な粉末状基材（例えばラクトースまたはデンプン）との粉末混合物を含有して製剤化することができる。

【０２８８】

本発明の方法が経口投与を含むものならば、組成物を錠剤、カプセル剤、カシェ剤、ゲルカップ剤、溶液剤、懸濁液剤などの剤形で、経口用に製剤化することができる。錠剤またはカプセル剤は、以下のもののような製薬上許容される賦形剤と共に通常の方法により調製することができる：結合剤（例えば、アルファ化トウモロコシデンプン、ポリビニルピロリドン、またはヒドロキシプロピルメチルセルロース）；充填剤（例えばラクトース、微結晶性セルロース、またはリン酸水素カルシウム）；滑沢剤（例えば、ステアリン酸マグネシウム、タルク、またはシリカ）；崩壊剤（例えば、ジャガイモデンプンまたはデンプングリコール酸ナトリウム）；または湿潤剤（例えば、ラウリル硫酸ナトリウム）。錠剤は、当技術分野で周知の方法でコーティングすることができる。経口投与用の液体製剤は、限定するものではないが、溶液、シロップもしくは懸濁液の剤形をとることができ、またはそれらは使用前に水もしくは他の好適なヒビクルで調製するための粉末製品として提示してもよい。そのような液体製剤は、以下のもののような製薬上許容される添加剤と共に、通常の方法を用いて調製することができる：懸濁化剤（例えば、ソルビトールシロップ、セルロース誘導体、または硬化食用脂）；乳化剤（例えば、レシチンまたはアラビアゴム）；非水性ビヒクル（例えば、アーモンド油、油エステル、エチルアルコール、または分留植物油）；および保存剤（例えば、p-ヒドロキシ安息香酸メチルもしくはプロピルまたはソルビン酸）。製剤はまた、緩衝塩、香料、着色料、および甘味料を適宜含有することができる。経口投与用の製剤は、好適には予防薬または治療薬の遅延放出、制御放出、または持続放出用に製剤化することができる。

【０２８９】

本発明の方法は、エアロゾル化剤と共に製剤化した組成物の、例えば吸入器または噴霧器を用いた肺内投与を含むことができる。例えば、米国特許第6,019,968号、同第5,985,320号、同第5,985,309号、同第5,934,272号、同第5,874,064号、同第5,855,913号、同第5,290,540号、および同第4,880,078号；並びにPCT公開公報WO 92/19244号、同WO 97/32572

号、同WO 97/44013号、同WO 98/31346号、および同WO 99/66903号を参照のこと（これらのそれぞれは、参照によりその全体が本明細書中に組み入れられる）。具体的な実施形態では、本発明の抗体、組合せ治療剤、および／または本発明の組成物を、Alkermes AIR™ 肺内薬剤送達技術（Alkermes, Inc., Cambridge, MA）を用いて投与する。

【０２９０】

本発明の方法は、注入による（例えばボーラス注射または連続注入による）非経口投与のために製剤化した組成物の投与を含んでもよい。注入のための製剤は、添加された保存料を含む単位剤形で（例えばアンプル中に、または複数用量容器中に）提示することができる。組成物は油性もしくは水性ビヒクル中の懸濁液、溶液またはエマルジョンのような剤形を採ることができ、また懸濁化剤、安定化剤および／または分散剤のような医薬用試薬を含有してもよい。あるいはまた、有効成分は使用前に好適なビヒクル（例えば、無菌で、発熱物質フリーの水）を用いて調製するための粉末形態であってもよい。

【０２９１】

本発明の方法はさらに、デポー製剤として製剤化した組成物の投与を含んでもよい。そのような長期作用製剤は、インプランテーション（例えば皮下、または筋内への）により、または筋内注射により投与してもよい。したがって、例えば、組成物を好適なポリマー性もしくは疎水性材料（例えば、許容される油中のエマルジョンとして）またはイオン交換樹脂と共に、あるいは難溶性誘導体として（例えば難溶性塩として）製剤化してもよい。

【０２９２】

本発明の方法は、中性または塩の形態で製剤化した組成物の投与を包含する。製薬上許容される塩としては、例えば塩酸、リン酸、酢酸、シュウ酸、酒石酸などから誘導されるもののようなアニオンを用いて形成したもの、および例えばナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、水酸化第二鉄、イソプロピルアミン、トリエチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインなどのカチオンを用いて形成したものが挙げられる。

【０２９３】

一般的には、組成物の成分は、別々かまたは単位剤形に一緒に混合して、例えば凍結乾燥粉末もしくは水を含まない濃縮物として、密閉容器（例えば活性薬剤の量を表示したアンプルもしくは小袋）中に供給する。投与の形式が点滴である場合には、無菌医薬グレードの水または生理食塩水を含有する点滴瓶を用いて組成物を提供することができる。投与の形式が注射である場合には、注射用の滅菌水または生理食塩水のアンプルを提供することができ、それにより投与前に成分を混合してもよい。

【０２９４】

特に、本発明はまた、本発明の予防薬もしくは治療薬、または医薬組成物が、薬剤の量を表示したアンプルまたは小袋のような密閉容器中に封入されていることを規定する。一実施形態では、本発明の１以上の予防薬もしくは治療薬、または医薬組成物を、密閉容器中の無菌凍結乾燥粉末もしくは水を含まない濃縮物として供給し、そして被験者への投与に適当な濃度にまで（例えば水または生理食塩水を用いて）再調製することができる。好ましくは、本発明の１以上の予防薬もしくは治療薬、または医薬組成物は、密閉容器中の無菌凍結乾燥粉末として、すくなくとも5mg、より好ましくは少なくとも10mg、少なくとも15mg、少なくとも25mg、少なくとも35mg、少なくとも45mg、少なくとも50mg、少なくとも75mg、または少なくとも100mgの単位投与量で供給される。凍結乾燥した本発明の予防薬もしくは治療薬または医薬組成物は、そのもともとの容器中で、２℃～８℃の間で保存しなければならず、また本発明の予防薬もしくは治療薬または医薬組成物は、再調製後１週間以内、好ましくは５日以内、72時間以内、48時間以内、24時間以内、12時間以内、６時間以内、５時間以内、３時間以内、または１時間以内に投与しなければならない。別の実施形態では、本発明の１以上の予防薬もしくは治療薬または医薬組成物は、薬剤の量および濃度を表示した密閉容器中に液状で供給される。好ましくは、投与される液状の組成物は、密閉容器中に、少なくとも0.25mg/ml、より好ましくは少なくとも0.5mg/ml、少な

くとも１mg/ml、少なくとも2.5mg/ml、少なくとも５mg/ml、少なくとも８mg/ml、少なくとも10mg/ml、少なくとも15mg/kg、少なくとも25mg/ml、少なくとも50mg/ml、少なくとも75mg/ml、または少なくとも100mg/mlで供給される。液状組成物はそのもともとの容器中で、２℃～８℃の間で保存しなければならない。

【０２９５】

一般的には、本発明の組成物の成分は、その組成物のレシピエントと同じ種に由来するか同じ種反応性である被験者から誘導したものである。したがって、好ましい実施形態では、治療または予防のためには、ヒト患者に対してはヒト抗体またはヒト化抗体を投与する。

【０２９６】

2.11.1　遺伝子治療

具体的な実施形態では、本発明の抗体または本発明の別の予防薬もしくは治療薬をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を、遺伝子治療によって疾患もしくはその１以上の症状を治療、予防、管理、または改善するために投与する。遺伝子治療とは、発現されるかまたは発現されうる核酸の、被験者への投与により行われる治療を指す。本発明のこの実施形態では、核酸は、それがコードする本発明の抗体または予防薬もしくは治療薬（予防効果もしくは治療効果を媒介する）をもたらす。

【０２９７】

当技術分野で利用可能な遺伝子治療のための方法のいずれをも、本発明に従って用いることができる。遺伝子治療の方法の一般的な総説としては、Goldspiel ら, 1993, Clinical Pharmacy 12:488-505；Wu および Wu, 1991, Biotherapy 3:87-95；Tolstoshev, 1993, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596；Mulligan, Science 260:926-932 (1993)；ならびに Morgan および Anderson, 1993, Ann. Rev. Biochem. 62:191-217；May, 1993, TIBTECH 11(5):155-215 を参照されたい。用いることのできる組換えDNA技術の分野で公知の方法は、Ausubel ら (編), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993)；および Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990) に記載されている。

【０２９８】

一実施形態では、本発明の方法は本発明の抗体または別の予防薬もしくは治療薬をコードする核酸配列を含んでなる組成物の投与を含み、該核酸は本発明の抗体、別の予防薬もしくは治療薬、またはそのフラグメントもしくはキメラタンパク質または重鎖もしくは軽鎖を、好適な宿主内で発現する発現ベクターの一部である。特に、そのような核酸は、抗体コード領域と機能的に連結されたプロモーター（好ましくは異種起源プロモーター）を有し、該プロモーターは誘導的または構成的であり、また場合によっては組織特異的である。別の実施形態では、本発明の抗体または別の予防薬もしくは治療薬のコード配列および他の所望の配列が、ゲノム中の所望の部位での相同組換えを促進する領域に連結されており、それにより抗体をコードする核酸の染色体内発現が可能になる状態で、核酸分子を用いる（Koller および Smithies, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935；Zijlstra ら, 1989, Nature 342:435-438）。具体的な実施形態では、発現される抗体または他の予防薬もしくは治療薬は一本鎖抗体であり；あるいはまた、核酸配列は本発明の抗体または別の予防薬もしくは治療薬の重鎖および軽鎖の両方、またはそれらのフラグメントをコードする配列を含む。

【０２９９】

被験者への核酸の送達は、直接的（この場合、被験者を核酸または核酸輸送ベクターに直接的に曝露させる）、または間接的（この場合、まずin vitroで核酸を用いて細胞を形質転換し、その後被験者に移植する）のいずれでもよい。これらの２つのアプローチは、それぞれin vivoまたはex vivo遺伝子治療として公知である。

【０３００】

具体的な実施形態では、核酸配列をin vivoで直接的に投与し、この場合にはそれが発現して、コードされた産物を産生する。これは、当技術分野で公知の多数の方法のいずれ

によっても実現することができ、例えばそれらを適当な核酸発現ベクターの一部として構築し、それを投与してそれらが細胞内に入るようにすることによって（例えば欠損または弱毒レトロウイルスもしくは他のウイルスベクターを用いた感染により（米国特許第4,980,286号参照）、または裸のDNAの直接注入により、または微小粒子衝撃（例えば遺伝子銃；Biolistic, Dupont）もしくは脂質、細胞表面受容体もしくはトランスフェクション試薬によるコーティング、リポソーム、微小粒子もしくはマイクロカプセルへのカプセル化を用いることにより、または核に侵入することが知られているペプチドと連結して投与することにより、受容体介在エンドサイトーシスに供されるリガンドと連結して投与することにより（例えば、Wu および Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432 参照）（この方法は受容体を特異的に発現する標的細胞型に対して用いることができる））行うことができる。別の実施形態では、核酸－リガンド複合体を形成させ、ここで該リガンドはエンドソームを阻害する融合性（fusogenic）ウイルスペプチドを含むものであり、それにより核酸がリソソーム性分解を回避できるようにすることができる。また別の実施形態では、特異的な受容体を標的化することにより、細胞特異的な取り込みおよび発現のために核酸をin vivoで標的化することができる（例えば、国際公開公報WO 92/06180号；同WO 92/22635号；同WO92/20316号；同WO93/14188号；および同WO 93/20221号を参照）。あるいはまた、核酸を細胞内に導入し、相同組換えによって、発現のために宿主細胞DNAに組み込むことができる（Koller および Smithies, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935；および Zijlstra ら, 1989, Nature 342:435-438）。

【０３０１】

具体的な実施形態では、本発明の抗体、別の予防薬もしくは治療薬、またはそれらのフラグメントをコードする核酸配列を含んでなるウイルスベクターを用いる。例えば、レトロウイルスベクターを用いることができる（Miller ら, 1993, Meth. Enzymol. 217:581-599 参照）。これらのレトロウイルスベクターは、ウイルスゲノムの適正なパッケージングおよび宿主細胞DNAへの組み込みのために必要なエレメントを含んでなる。遺伝子治療に用いるための本発明の抗体または別の予防薬もしくは治療薬をコードする核酸配列は、被験者への遺伝子の送達を容易にする１以上のベクター内にクローニングされる。レトロウイルスベクターについての詳細は、Boesen ら, 1994, Biotherapy 6:291-302 中に見出すことができ、これは、化学療法に対してより耐性な幹細胞を作製する目的で、造血幹細胞にmdr 1遺伝子を送達するためのレトロウイルスベクターの使用について記載している。遺伝子治療におけるレトロウイルスベクターの使用を例示している他の引用文献は、以下のものである：Clowes ら, 1994, J. Clin. Invest. 93:644-651；Klein ら, 1994, Blood 83:1467-1473；Salmons および Gunzberg, 1993, Human Gene Therapy 4:129-141；ならびに Grossman および Wilson, 1993, Curr. Opin. in Genetics and Devel. 3:110-114。

【０３０２】

アデノウイルスは、遺伝子治療に用いることができる他のウイルスベクターである。アデノウイルスは、呼吸器系上皮に対して遺伝子を送達するために特に関心が持たれる運搬体である。アデノウイルスは、自然界で呼吸器上皮に感染し、そこで軽い疾患を引き起こす。アデノウイルスに基づく送達システムの他の標的は、肝臓、中枢神経系、内皮細胞および筋肉である。アデノウイルスは、非分裂細胞に感染することができるという利点を有する。Kozarsky および Wilson, 1993, Current Opinion in Genetics and Development 3:499-503 には、アデノウイルスに基づく遺伝子治療についての総説が示されている。Bout ら, 1994, Human Gene Therapy 5:3-10 では、アカゲザルの呼吸器上皮に対して遺伝子を導入するためのアデノウイルスベクターの使用を実証している。遺伝子治療におけるアデノウイルスの使用の他の例は、以下の文献中に見出すことができる：Rosenfeld ら, 1991, Science 252:431-434；Rosenfeld ら, 1992, Cell 68:143-155；Mastrangeli ら, 1993, J. Clin. Invest. 91:225-234；PCT 公開公報 W094/12649号；およびWang ら, 1995, Gene Therapy 2:775-783。好ましい実施形態では、アデノウイルスベクターを用いる。

【０３０３】
アデノ随伴ウイルス（AAV）もまた、遺伝子治療での使用が提案されている（Walsh ら，1993，Proc．Soc．Exp．Biol．Med．204:289-300；および米国特許第5,436,146号）。
【０３０４】
遺伝子治療に対する別のアプローチは、エレクトロポレーション、リポフェクション、リン酸カルシウムを介したトランスフェクション、またはウイルス感染のような方法による組織培養物中の細胞への遺伝子の導入を含む。通常、導入の方法は、細胞への選択マーカーの導入を含む。細胞をその後、導入した遺伝子を取り込み、それを発現している細胞を単離するために選別にかける。そしてそれらの細胞を被験者に送達する。
【０３０５】
本実施形態では、核酸を細胞に導入し、その後結果として得られる組換え細胞のin vivoでの投与を行う。前記導入は、当技術分野で公知のいかなる方法を用いても行うことができ、そのような方法としては、限定するものではないが、トランスフェクション、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、核酸配列を含んでなるウイルスベクターまたはバクテリオファージベクターの感染、細胞融合、染色体仲介遺伝子導入、マイクロセル仲介遺伝子導入、スフェロプラスト融合などが挙げられる。細胞に外来性遺伝子を導入するための多数の技術が当技術分野で公知であり（例えば、Loeffler および Behr，1993，Meth．Enzymol．217:599-618；Cohen ら，1993，Meth．Enzymol．217:618-644；Clin．Pharma．Ther．29:69-92 (1985) 参照）、レシピエント細胞の不可欠な発達および生理的機能を阻害しないで、本発明に従って用いることができる。該技術は、細胞への核酸の安定な導入を可能にし、それにより核酸が細胞により発現可能となり、かつ好ましくは遺伝してその細胞の子孫によっても発現可能とならなければならない。
【０３０６】
結果として得られる組換え細胞を、当技術分野で公知の種々の方法によって被験者に送達することができる。組換え血液細胞（例えば造血幹細胞または前駆細胞）は、好ましくは静脈内に投与する。使用を予定する細胞の量は、限定するものではないが、所望の効果および患者の病状をはじめとするいくつかの要因に依存し、当業者が決定することができる。
【０３０７】
遺伝子治療の目的で核酸を導入しうる細胞は、いずれの利用可能な細胞をも包含し、そのような細胞としては、限定するものではないが、上皮細胞、内皮細胞、表皮ケラチン細胞、繊維芽細胞、筋細胞、肝細胞；血液細胞（例えばTリンパ球、Bリンパ球、単球、マクロファージ、好中球、好酸球、肥満細胞、巨核球、顆粒球）；種々の幹細胞または前駆細胞、特に造血幹細胞または前駆細胞（例えば骨髄、臍帯血、末梢血、胎児肝などから得られる）が挙げられる。好ましい実施形態では、遺伝子治療に用いる細胞は被験者の自己由来のものである。
【０３０８】
遺伝子治療に組換え細胞を用いる実施形態では、抗体またはそのフラグメントをコードする核酸配列を細胞内に導入し、それによりそれらを細胞もしくはその子孫により発現可能とし、そして組換え細胞を治療効果を求めてin vivo投与する。具体的な実施形態では、幹細胞または前駆細胞を用いる。単離およびin vitroでの維持が可能ないかなる幹細胞および／または前駆細胞も、潜在的には本発明のこの実施形態に従って用いうる（例えば、PCT 公開公報 WO 94/08598号；Stemple および Anderson，1992，Cell 7 1:973-985；Rheinwald，1980，Meth．Cell Bio．21A:229；ならびに Pittelkow および Scott，1986，Mayo Clinic Proc．61:771 参照）。
【０３０９】
具体的な実施形態では、遺伝子治療の目的で導入するための核酸は、適当な転写誘導因子の存在または不在を制御することにより核酸の発現を制御可能とする、コード領域に機能的に連結された誘導可能プロモーターを含んでなる。
【０３１０】

2.12　投与量および投与回数

疾患もしくはその１以上の症状の治療、管理、予防または改善に有効であろう本発明の予防薬もしくは治療薬または組成物の量は、標準的な臨床実務により決定することができる。投与回数および投与量は、投与する具体的な治療剤または治療剤群（例えば具体的な治療薬または予防薬）、障害、疾患もしくは病状の重症度、投与経路、同様に年齢、体重、応答、患者の免疫状態、および患者の過去の医療履歴に依存する、各患者に特異的な因子に応じて変わるであろう。例えば、疾患もしくはその１以上の症状の治療、予防、管理、または改善に有効であろう本発明の予防薬もしくは治療薬または組成物の投与量は、動物モデル（例えば本明細書中に開示されているかまたは当業者に公知の動物モデル）に対して組成物を投与することにより決定することができる。さらに、場合によっては適正な投与量の範囲の特定を助けるためにin vitroアッセイを用いてもよい。好適な処方は、そのような因子を考慮することにより、また例えば文献に報告され、Physician’s Desk Reference（第57版，2003）において推奨されている投与量に従って、当業者が選択することができる。

【０３１１】

本発明の予防および／または治療プロトコルの毒性および／または有効性は、細胞培養または実験動物において標準的な製薬上の手法によって測定することができ、例えばLD_{50}（集団の50％に対して致死的な用量）およびED_{50}（集団の50％で治療上有効な用量）を決定することにより、測定することができる。毒性作用と治療的作用との用量比が治療指数であり、これはLD_{50}／ED_{50}の比で表される。大きな治療指数を示す治療薬が好ましい。毒性副作用を示す治療薬を用いてもよいが、非感染細胞への起こりうるダメージを最小限にするために、そしてそれにより副作用を軽減するために、罹患組織の部位に対してそのような薬剤をターゲットする送達システムを設計することに留意すべきである。

【０３１２】

細胞培養アッセイおよび動物実験から得られるデータは、ヒトでの使用のための予防薬および／または治療薬の投与量の範囲を計画するのに用いることができる。そのような薬剤の投与量は、好ましくは毒性をほとんどまたは全く有しないED_{50}を含む循環濃度の一定範囲内にある。投与量は、用いる投与剤形および用いる投与経路に依存して、この範囲内で変化しうる。本発明の方法で用いるいかなる治療に対しても、治療上有効な用量は、細胞培養アッセイから、まず見積もることができる。細胞培養で決定したIC_{50}（すなわち、症状の最大半値阻害を実現する被験化合物の濃度）を含む循環血漿濃度範囲を実現するために、動物モデルにおいて用量を設定してもよい。そのような情報は、ヒトで有効な用量をより精密に決定するために用いることができる。血漿中レベルは、例えば高速液体クロマトグラフィーによって測定してもよい。

【０３１３】

ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、融合タンパク質、および抗体に関しては、患者に投与する投与量は、典型的には0.01mg/kg～100mg/kg 患者体重である。好ましくは、患者に投与する投与量は、0.1mg/kg～20mg/kg 患者体重、より好ましくは１mg/kg～10mg/kg 患者体重である。一般的に、ヒト抗体およびヒト化抗体は、外来性ポリペプチドに対する免疫応答による他の生物種由来の抗体よりも、ヒト体内で長い半減期を有する。したがって、ヒト抗体は多くの場合、より少ない投与量およびより少ない投与回数が可能である。

【０３１４】

小分子の代表的な用量としては、被験者体重のキログラム当たりミリグラムまたはマイクログラム量の小分子（例えば、約１マイクログラム／キログラム～約500ミリグラム／キログラム、約100マイクログラム／キログラム～約５ミリグラム／キログラム、または約１マイクログラム／キログラム～約50マイクログラム／キログラム）が挙げられる。

【０３１５】

予防薬または治療薬の投与量については、Physicians’ Desk Reference（第56版，2002）中に記載されている。

【０３１６】

2.13　生物学的アッセイ

本発明の抗体またはそのフラグメントは、当業者に周知の種々の方法で特性決定することができる。特に、本発明の抗体またはそのフラグメントは、抗原に免疫特異的に結合する能力についてアッセイする。そのようなアッセイは、溶液中で（例えば、Houghten, 1992, Bio/Techniques 13:412 421）、ビーズ上で（Lam, 1991, Nature 354:82 84）、チップ上で（Fodor, 1993, Nature 364:555 556）、細菌上で（米国特許第5,223,409号）、胞子上で（米国特許第5,571,698号；同第5,403,484号；および同第5,223,409号）、プラスミド上で（Cull ら, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:1865 1869）、またはファージ上で（Scott および Smith, 1990, Science 249:386 390；Cwirla ら, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6378 6382；および Felici, 1991, J. Mol. Biol. 222:301 310）行うことができる（これらの引用文献のそれぞれは、参照によりその全体が本明細書中に組み入れられる）。特定された抗体またはそのフラグメントは、その後特異性および親和性についてアッセイすることができる。

【０３１７】

本発明の抗体またはそのフラグメントは、特異的抗原への免疫特異的結合および他の抗原との交差反応性について、当技術分野で公知のいずれの方法を用いてアッセイしてもよい。免疫特異的結合および交差反応性を解析するために用いることができるイムノアッセイとしては、限定するものではないが、いくつか挙げると、例えばウエスタンブロット、ラジオイムノアッセイ、ELISA、「サンドイッチ」イムノアッセイ、免疫沈降アッセイ、沈降素反応、ゲル拡散沈降素反応、免疫拡散アッセイ、凝集アッセイ、補体結合アッセイ、イムノラジオメトリックアッセイ、蛍光イムノアッセイ、プロテインＡイムノアッセイのような技術を用いた、競合的および非競合的アッセイ系が挙げられる。そのようなアッセイは、当技術分野で通常行われ、かつ周知のものである（例えば、Ausubel ら編, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York を参照、参照によりその全体が本明細書中に組み入れられる）。代表的なイムノアッセイはセクション5.6に簡単に記載してある。

【０３１８】

本発明の抗体またはそのフラグメントはまた、宿主細胞の受容体に対する抗原の結合を阻害するその能力について、当業者に公知の技術を用いてアッセイすることもできる。例えば、ある受容体を発現している細胞を、リガンドのアンタゴニストである抗体もしくはそのフラグメントの存在下または不在下でその受容体に対するリガンドと接触させることができ、そして該抗体もしくはそのフラグメントがリガンドの結合を阻害する能力を、例えばフローサイトメトリーまたはシンチレーションアッセイによって測定することができる。リガンドまたは抗体もしくは抗体フラグメントは、リガンドとその受容体との相互作用の検出を可能とする、放射性標識（例えば^{32}P、^{35}S、および^{125}I）または蛍光標識（例えばフルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、フィコエリスリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、o-フタルアルデヒドおよびフルオレサミン）のような検出可能な化合物を用いて標識することができる。あるいはまた、抗体またはそのフラグメントがリガンドのその受容体への結合を阻害する能力は、無細胞アッセイにおいて測定することができる。例えば、リガンドを、該リガンドのアンタゴニストである抗体またはそのフラグメントと接触させることができ、そして抗体または抗体フラグメントがリガンドのその受容体への結合を阻害する能力を測定する。好ましくは、リガンドのアンタゴニストである抗体または抗体フラグメントを固相支持体上に固定し、そしてリガンドを検出可能な化合物で標識する。あるいはまた、リガンドを固相支持体上に固定し、抗体またはそのフラグメントを検出可能な化合物で標識する。リガンドは部分的に、もしくは完全に精製したもの（例えば、他のポリペプチドを部分的に、もしくは完全に含まない）であるか、または細胞溶解物の一部であってよい。あるいはまた、リガンドを当業者に周知の技術（例えば、ビオチン化キット, Pierce Chemicals; Rockford, IL）を用いてビオチン化することができる。

【０３１９】
本発明に従って構築され、および／または同定された抗体もしくはそのフラグメントを、細胞の生物学的活性を改変するその能力についてin vitroおよび／またはin vivoで試験することができる。そのような能力は、例えば抗原および遺伝子の発現を検出すること；細胞の増殖を検出すること；シグナル伝達分子（例えば、シグナル伝達因子およびキナーゼ）の活性化を検出すること；細胞のエフェクター機能を検出すること；または細胞の分化を検出することによって評価することができる。当業者に公知の技術を、これらの活性を測定するために用いることができる。例えば、細胞増殖は、^{3}H-チミジン取り込みアッセイおよびトリパンブルー細胞計数によりアッセイすることができる。抗原発現は、例えば、限定するものではないが、ウエスタンブロット、免疫組織化学、ラジオイムノアッセイ、ELISA、「サンドイッチ」イムノアッセイ、免疫沈降アッセイ、沈降素反応、ゲル拡散沈降素反応、免疫拡散アッセイ、凝集アッセイ、補体結合アッセイ、イムノラジオメトリックアッセイ、蛍光イムノアッセイ、プロテインＡイムノアッセイおよびFACS解析のような技術を用いた、競合的および非競合的アッセイ系をはじめとするイムノアッセイによってアッセイすることができる。シグナル伝達分子の活性化は、例えばキナーゼアッセイおよび電気泳動シフトアッセイ（EMSA）によってアッセイすることができる。

【０３２０】
本発明の抗体、そのフラグメント、または組成物は、ヒトでの使用に先立って、所望の治療的または予防的活性について、好ましくはin vitroで、その後in vivoで試験する。例えば、特定の医薬組成物の投与を指示するかどうか決定するのに用いることができるアッセイとしては細胞培養アッセイが挙げられ、そこでは患者組織サンプルを培養し、医薬組成物に曝露するかその他の方法によりそれと接触させ、そして組織サンプルへの当該組成物の作用を観察する。組織サンプルは、患者から生検により取得することができる。この試験により、それぞれの患者に対して治療上最も有効な治療剤（例えば予防薬または治療薬）の特定が可能になる。種々の具体的な実施形態において、特定の疾患に関与する細胞タイプの代表的な細胞を用いてin vitroアッセイを行って、本発明の医薬組成物がその細胞タイプに対して所望の作用を有するかを決定することが可能である。例えば、in vitroアッセイは、細胞株を用いて行うことができる。

【０３２１】
本発明の抗体、そのフラグメント、または組成物の末梢血リンパ球数への影響は、当業者に公知の標準的な技術を用いてモニタリング／評価することができる。被験者体内の末梢血リンパ球数は、例えば、当該被験者から末梢血サンプルを取得し、例えばFicoll-Hypaque（Pharmacia）勾配遠心を用いて血漿などの末梢血の他の成分からリンパ球を分離し、そしてトリパンブルーを用いてリンパ球を計数することにより測定することができる。被験者体内の末梢血T細胞数は、例えば、Ficoll-Hypaque（Pharmacia）勾配遠心を用いて血漿などの末梢血の他の成分からリンパ球を分離し、T細胞抗原に対する抗体（FITCまたはフィコエリトリンにコンジュゲートされている）を用いてT細胞を標識し、そしてFACSによってT細胞の数を計測することにより測定することができる。

【０３２２】
ウイルス感染もしくはその１以上の症状を治療、管理、予防、または改善するのに用いる本発明の抗体、フラグメント、もしくは組成物は、ウイルス複製を阻害するかまたはウイルス量を軽減するその能力について、in vitroアッセイで試験することができる。例えば、ウイルス複製は、例えばJohnson ら（1997, Journal of Infectious Diseases 176:1215-1224 176:1215-1224）により記載されているようなプラークアッセイによりアッセイすることができる。本発明の方法に従って投与する抗体またはそのフラグメントはまた、ウイルスポリペプチドの発現を阻害するかまたはダウンレギュレートするその能力についてもアッセイすることができる。限定するものではないが、ウエスタンブロット解析、ノーザンブロット解析、およびRT-PCRをはじめとする当業者に公知の技術を、ウイルスポリペプチドの発現を測定するのに用いることができる。

【０３２３】

細菌感染もしくはその１以上の症状を治療、管理、予防、または改善するのに用いる本発明の抗体、フラグメント、もしくは組成物は、当技術分野で周知のin vitroアッセイにおいて試験することができる。当技術分野で公知のin vitroアッセイはまた、治療剤に対する細菌の耐性の存在または発達を試験するのにも用いることができる。そのようなin vitroアッセイは、Gales ら，2002，Diag. Nicrobiol. Infect. Dis. 44(3):301-311；Hicks ら，2002，Clin. Microbiol. Infect. 8(11): 753-757；および Nicholson ら，2002，Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 44(1): 101-107 に記載されている。

【０３２４】

真菌感染もしくはその１以上の症状を治療、管理、予防、または改善するのに用いる本発明の抗体、フラグメント、もしくは組成物は、種々の真菌種に対する抗真菌活性について試験することができる。当技術分野で周知のいずれの標準的な抗真菌アッセイも、治療剤の抗真菌活性を評価するのに用いることができる。種々の真菌種に対する抗真菌作用を試験することができる。米国臨床検査標準化委員会（NCCLS）により推奨されている試験（National Committee for Clinical Laboratories Standards. 1995，Proposed Standard M27T. Villanova，Pa. 参照、その全ては参照によりその全体が本明細書中に組み入れられる）および当業者に公知の他の方法（Pfaller ら，1993，Infectious Dis. Clin. N. Am. 7: 435-444）を、治療剤の抗真菌作用を評価するために用いることができる。治療剤の抗真菌特性はまた、真菌溶解アッセイから、ならびに、とりわけ増殖阻害アッセイ、蛍光に基づく真菌生存率アッセイ、フローサイトメトリー解析、および当業者に公知の他の標準的なアッセイをはじめとする他の方法により、測定してもよい。

【０３２５】

例えば、治療剤の抗真菌活性は、当業者に周知のプロトコルを用いてマクロ希釈法および／またはミクロ希釈法により試験することができる（例えば、Clancy ら，1997 Journal of Clinical Microbiology，35(11): 2878-82；Ryder ら，1998，Antimicrobial Agents and Chemotherapy，42(5): 1057-61；U.S. 5,521,153；U.S. 5,883,120、U.S. 5,521,169 参照、これらの全ては参照によりその全体が本明細書中に組み入れられる）。簡単に述べると、真菌株を適当な液体培地中で培養し、用いる特定の真菌株に応じた適当な温度で、これもまた用いる特定の真菌株に応じた一定の時間、増殖させる。接種菌を光学測定により調製し、懸濁液の濁度を標準品（例えばMcFarland 標準）のものと比較する。接種菌の濁度への治療剤の作用を、目視により、または分光光度計により測定する。治療剤の最小阻害濃度（「MIC」）を決定する。ここで、MICとは、培養物の濁度を測定することにより計測される接種菌の可視的増殖を妨げるリード化合物の最低濃度と定義される。

【０３２６】

治療剤の抗真菌活性はまた、当業者に周知の比色アッセイを用いても測定することができる。治療剤の抗真菌活性を評価するのに用いることができる１つの代表的な比色アッセイは、Pfallerらにより記載されている（1994，Journal of Clinical Microbiology，32(8): 1993-6、参照によりその全体が本明細書中に組み入れられる；Tiballi ら，1995，Journal of Clinical Microbiology，33(4): 915-7 も参照）。このアッセイでは、酸化－還元指示薬（Alamar Biosciences，Inc.，Sacramento CA）を用いた比色終点を利用する。

【０３２７】

治療剤の抗真菌活性はまた、当業者に周知の光学測定アッセイを用いても測定することができる（例えば、Clancy ら，1997 Journal of Clinical Microbiology，35(11): 2878-82；Jahn ら，1995，Journal of Clinical Microbiology，33(3): 661-667 参照、これらのそれぞれは参照によりその全体が本明細書中に組み入れられる）。この光学測定アッセイは、3-(4,5-ジメチル-2-チアゾリル)-2,5,-ジフェニル-2H-テトラゾリウムブロミド（MTT）のホルマザンへの還元を介して生存真菌によるミトコンドリア呼吸を定量することに基づいている。このアッセイにより測定されるMICとは、光学密度の最初の急激な低下と関連した被験治療剤の最高濃度と定義される。一部の実施形態では、治療剤はマクロ希釈、ミクロ希釈およびMTTアッセイを並行して用いて抗真菌活性についてアッセイする

。

【０３２８】

さらに、当業者に公知のいかなるin vitroアッセイも、特定の疾患もしくはその１以上の症状に対する、本明細書中で開示される抗体治療剤の予防上および／または治療上の有用性を評価するのに用いることができる。

【０３２９】

本発明の抗体、組成物、または組合せ治療剤は、ヒトでの使用に先立って、好適な動物モデルシステムで試験することができる。そのような動物モデルシステムとしては、限定するものではないが、ラット、マウス、ニワトリ、ウシ、サル、ブタ、イヌ、ウサギなどが挙げられる。当技術分野で周知のいずれの動物系を用いてもよい。手順のいくつかの面は変更することができ、こうした面としては、限定するものではないが、治療剤を別々に投与するか混合して投与するかといった、治療剤（例えば予防薬および／または治療薬）の投与の時間的計画、および治療剤の投与回数が挙げられる。

【０３３０】

特定の疾患もしくはその１以上の症状を治療、管理、予防、または改善するための本発明の抗体、そのフラグメント、もしくは組成物の有効性を評価するのに、動物モデルを用いることができる。

【０３３１】

本発明の方法に従った抗体、組成物、または組合せ治療剤の投与を、特定の疾患の時間経過を、少なくとも25％、好ましくは少なくとも50％、少なくとも60％、少なくとも75％、少なくとも85％、少なくとも95％、または少なくとも99％減少させるその能力について試験することができる。本発明の抗体、組成物、または組合せ治療剤はまた、特定の疾患に罹患したヒトの生存期間を、少なくとも25％、好ましくは少なくとも50％、少なくとも60％、少なくとも75％、少なくとも85％、少なくとも95％、または少なくとも99％増加させるその能力についても試験することができる。さらに、本発明の抗体、組成物、または組合せ治療剤は、ウイルス性呼吸器感染症に罹患したヒトの入院期間を、少なくとも60％、好ましくは少なくとも75％、少なくとも85％、少なくとも95％、または少なくとも99％短縮させるその能力について試験することができる。当業者に公知の技術を、in vivoで本発明の抗体、組成物、または組合せ治療剤の機能を解析するのに用いることができる。

【０３３２】

さらに、特定の疾患もしくはその１以上の症状に対する、本明細書中で開示されている抗体、そのフラグメント、組成物、組合せ治療剤の予防上および／または治療上の有用性を評価するのに、当業者に公知のいかなるin vivoアッセイも用いることができる。

【０３３３】

本発明の予防および／または治療プロトコルの毒性および／または有効性は、細胞培養または実験動物において標準的な製薬上の手法によって測定することができ、例えばLD50（集団の50％に対して致死的な用量）およびED50（集団の50％で治療上有効な用量）を決定することにより、測定することができる。毒性作用と治療的効果との用量比が治療指数であり、これはLD50／ED50の比で表される。大きな治療指数を示す治療剤が好ましい。毒性副作用を示す治療剤を用いうるが、非感染細胞への起こりうるダメージを最小限にするために、そしてそれにより副作用を軽減するために、罹患組織の部位にそのような薬剤をターゲットする送達システムを設計することに留意すべきである。

【０３３４】

細胞培養アッセイおよび動物実験から得られるデータは、ヒトでの使用のための予防薬および／または治療薬の投与量の範囲を計画するのに用いることができる。そのような薬剤の投与量は、好ましくは毒性をほとんどまたは全く有しないED50を含む循環濃度の一定範囲内にある。投与量は、用いる投与剤形および用いる投与経路に依存して、この範囲内で変化しうる。本発明の方法で用いるいかなる治療剤に対しても、治療上有効用量は細胞培養アッセイから、まず見積もることができる。用量は、細胞培養で決定したIC50（すなわち、症状の最大半値阻害を実現する被験化合物の濃度）を含む循環血漿濃度範囲を実現

するために、動物モデルにおいて設定してもよい。そのような情報は、ヒトで有効な用量をより精密に決定するために用いることができる。血漿中レベルは、例えば高速液体クロマトグラフィーによって測定してもよい。

【０３３５】

2.14　キット

本発明は、対象の生物種の抗体フレームワーク領域のサブバンクを含んでなるキットを提供する。本発明はまた、対象の生物種のCDRのサブバンクを含んでなるキットを提供する。本発明はまた、ヌクレオチド配列を包含する複数の核酸配列を含むコンビナトリアルサブライブラリーを含んでなるキットであって、各ヌクレオチド配列が１つの対応するCDR（例えばCDR1）とin frameに融合された１つのフレームワーク領域（例えばFR1）をコードする、上記キットを提供する。本発明はさらに、ヌクレオチド配列を包含する複数の核酸配列を含むコンビナトリアルライブラリーを含んでなるキットであって、各ヌクレオチド配列がin frameに融合されたフレームワーク領域とCDR（例えばFR1＋CDR1＋FR2＋CDR2＋FR3＋CDR3＋FR4）をコードする、上記キットを提供する。

【０３３６】

一部の好ましい実施形態では、本発明はヒト免疫グロブリンフレームワーク領域のサブバンク、CDRのサブバンク、コンビナトリアルサブライブラリー、および／またはコンビナトリアルライブラリーを含んでなるキットを提供する。一実施形態では、本発明は、可変軽鎖フレームワーク領域１、２、３、および／または４に対するフレームワーク領域サブバンクを含んでなるキットであって、フレームワーク領域がKabatシステムにより定義される、上記キットを提供する。別の実施形態では、本発明は、可変軽鎖フレームワーク領域１、２、３、および／または４に対するフレームワーク領域サブバンクを含んでなるキットであって、フレームワーク領域がChothiaシステムにより定義される、上記キットを提供する。別の実施形態では、本発明は、可変重鎖フレームワーク領域１、２、３、および／または４に対するフレームワーク領域サブバンクを含んでなるキットであって、フレームワーク領域がKabatシステムにより定義される、上記キットを提供する。別の実施形態では、本発明は、可変重鎖フレームワーク領域１、２、３、および／または４に対するフレームワーク領域サブバンクを含んでなるキットであって、フレームワーク領域がChothiaシステムにより定義される、上記キットを提供する。また別の実施形態では、本発明は、軽鎖および重鎖フレームワークの両方のサブバンクを含んでなるキットを提供する。

【０３３７】

本発明はまた、本発明のヒト化抗体を入れた１以上の容器を含んでなる医薬パックまたはキットを提供する。医薬パックまたはキットは、特定の疾患の治療に有用な１以上の他の予防薬または治療薬をさらに含んでもよい。本発明はまた、本発明の医薬組成物の１以上の成分を入れた１以上の容器を含んでなる医薬パックまたはキットを提供する。場合によっては、そのような容器には、医薬もしくは生物学的製品の製造、使用または販売を規制する政府機関により定められた書式の注意書きであって、ヒトへの投与についての製造、使用または販売に関する該機関による認可を反映するものを添えることができる。

【０３３８】

2.15　製造物品

本発明はまた、梱包済みの、ラベルされた医薬品を包含する。本製品は、ガラスバイアルもしくは他の密閉容器のような所定の容器中の所定の単位剤形を含む。非経口投与に好適な投与剤形の場合、有効成分は無菌状態で、微粒子を含まない溶液としての投与に好適なものである。言い換えれば、本発明は、非経口投与用溶液および凍結乾燥粉末剤（いずれも無菌）の両者を包含し、後者は注入前の再調製に好適なものである。あるいはまた、単位剤形は、経口、経皮、局所または粘膜送達に好適な固体であってもよい。

【０３３９】

好ましい実施形態では、単位剤形は、静脈内、筋内または皮下送達に好適なものである。したがって、本発明は、各送達経路に好適な溶液（好ましくは無菌）を包含する。

【０３４０】
いかなる医薬品とも同様に、包装材料および容器は保存および輸送の間の製品の安定性を保護するために設計される。さらに、本発明の製品は、使用についての説明書、または問題となっている疾患もしくは障害を適切に予防または治療する方法について、医師、技術者または患者に説明する他の資料を含む。言い換えれば、製品は、限定するものではないが、実際の用量、モニタリング方法（例えば平均絶対リンパ球数、腫瘍細胞数、および腫瘍サイズをモニタリングする方法）および他のモニタリング情報をはじめとする投薬方式を指示または提案する説明書を含む。
【０３４１】
より具体的には、本発明は、包装材料（例えば箱、瓶、管、バイアル、容器、スプレー容器、吸入器、静脈内（ｉ.ｖ.）バッグ、袋など）；および前記包装材料中に含まれる医薬の少なくとも１つの単位剤形、を含んでなる製品を提供する。本発明はさらに、包装材料（例えば箱、瓶、管、バイアル、容器、スプレー容器、吸入器、静脈内（ｉ.ｖ.）バッグ、袋など）；および前記包装材料中に含まれる各医薬の少なくとも１つの単位剤形を含んでなる製品を提供する。
【０３４２】
具体的な実施形態では、製品は包装材料ならびに前記包装材料中に含まれる医薬および説明書を含んでなり、ここで前記医薬はヒト化抗体および製薬上許容される担体であり、前記説明書は特定の疾患を有する被験者を予防、治療または管理するための投薬方式を指示するものである。別の実施形態では、製品は包装材料ならびに前記包装材料中に含まれる医薬および説明書を含んでなり、ここで前記医薬はヒト化抗体、該ヒト化抗体とは異なる予防薬または治療薬および製薬上許容される担体であり、前記説明書は特定の疾患を有する被験者を予防、治療または管理するための投薬方式を指示するものである。別の実施形態では、製品は包装材料ならびに前記包装材料中に含まれる２種類の医薬および説明書を含んでなり、ここで前記１種類目の医薬はヒト化抗体および製薬上許容される担体であり、前記２種類目の医薬は該ヒト化抗体とは異なる予防薬または治療薬であり、前記説明書は特定の疾患を有する被験者を予防、治療または管理するための投薬方式を指示するものである。
【０３４３】
本発明は、本発明の方法により軽減または回避されうる副作用を、疾患に伴う１以上の症状の予防、治療または改善における使用のために製品に同梱される資料中に示すことを提案する。本発明の方法により軽減または回避されうる副作用としては、限定するものではないが、バイタルサインの異常（例えば発熱、頻脈、徐脈、高血圧、低血圧）、血液学的症状（例えば貧血、リンパ球減少、白血球減少、血小板減少）、頭痛、悪寒、めまい、吐き気、虚弱、背部痛、胸痛（例えば胸部圧迫感）、下痢、筋肉痛、痛み、かゆみ、乾癬、鼻炎、発汗、注射部位反応、および血管拡張が挙げられる。一部の治療剤は免疫抑制性でありうるので、長引く免疫抑制が、日和見感染をはじめとする感染症のリスクを増大させることはありうる。長引く持続性の免疫抑制はまた、あるタイプの癌の進行の増大したリスクももたらしうる。
【０３４４】
さらに、製品中に同梱される資料は、外来性タンパク質はアナフィラキシーまたはサイトカイン放出症候群をはじめとするアレルギー反応も引き起こす可能性があることを知らせることができる。該資料は、アレルギー反応は軽い掻痒性発疹として現れるだけかもしれないし、または紅皮症、スティーブン・ジョンソン症候群、脈管炎、もしくはアナフィラキシーのように重症でありうることを知らせるべきである。該資料はまた、アナフィラキシー反応（アナフィラキシー）は重篤な、ときには致死性の過敏性反応であることも知らせるべきである。アナフィラキシーをはじめとするアレルギー反応は、どんな外来性タンパク質を体内に注入したときにでも起こりうる。それらは蕁麻疹または発疹のような軽い徴候から、致死的な全身性反応にまで及んでいる。アナフィラキシー反応は、曝露のすぐ後に、多くの場合10分以内に起きる。患者は、知覚異常、低血圧、喉頭水腫、精神状態

の変化、顔部もしくは咽頭の血管性浮腫、気道閉塞、気管支痙攣、蕁麻疹および掻痒、血清病、関節炎、アレルギー性腎炎、糸球体腎炎、一過性関節炎、または好酸球増多症に見舞われうる。

【０３４５】

該資料はまた、サイトカイン放出症候群が急性の臨床症候群であり、ある種の活性化する抗T細胞抗体の投与と時間的に関連する、ことを示すことができる。サイトカイン放出症候群は、活性化リンパ球または単球によるサイトカインの放出に起因するとされている。サイトカイン放出症候群の臨床症状は、より頻繁に報告される、軽い自然治癒性の「風邪様」疾患から、報告される頻度の低い、重症の、生死に関わるショック様反応（重篤な心血管系、肺および中枢神経系症状を含みうる）にまでわたる。該症候群は、典型的には投与から約30～60分後に始まり（但しもっと後に起こることもある）、数時間続く。この症状の発生頻度および重症度は多くの場合、初回投与の場合に最も大きい。連続的な投与に従って、この症候群の発生頻度および重症度は減少する傾向にある。用量の増加または中断後の治療の再開は該症候群の再発をもたらすことがある。上述のように、本発明は本明細書中に記載した１以上の副作用を回避するかまたはそれを軽減させる治療法および予防法を包含する。

【０３４６】

2.16　典型的な実施形態

１．ヒト化重鎖可変領域をコードする第１のヌクレオチド配列を含む核酸配列であって、前記ヒト化重鎖可変領域をコードする第１のヌクレオチド配列は、重鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、重鎖相補性決定領域（CDR）１をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより作製されたものであり、その際、前記CDRはドナー抗体の重鎖可変領域に由来し、各重鎖フレームワーク領域はヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られるものである、上記核酸配列。

【０３４７】

２．ヒト化軽鎖可変領域をコードする第１のヌクレオチド配列を含む核酸配列であって、前記ヒト化軽鎖可変領域をコードする第１のヌクレオチド配列は、軽鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより作製されたものであり、その際、前記CDRはドナー抗体の軽鎖可変領域に由来し、各軽鎖フレームワーク領域はヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られるものである、上記核酸配列。

【０３４８】

３．ドナー軽鎖可変領域をコードする第２のヌクレオチド配列をさらに含む、実施形態１に記載の核酸配列。

【０３４９】

４．ヒト化軽鎖可変領域をコードする第２のヌクレオチド配列をさらに含み、前記ヒト化軽鎖可変領域をコードする第２のヌクレオチド配列は、軽鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより作製されたものであり、その際、前記CDRはドナー抗体の軽鎖可変領域に由来し、各軽鎖フレームワーク領域はヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られるものである、実施形態１に記載の核酸配列。

【０３５０】

５．ドナー重鎖可変領域をコードする第２のヌクレオチド配列をさらに含む、実施形態

２に記載の核酸配列。
【０３５１】
６．ドナー抗体の重鎖可変領域に由来する１以上のCDRが、ドナー抗体の対応するCDRをコードする核酸配列に対して１以上の変異を含む、実施形態１に記載の核酸配列。
【０３５２】
７．ドナー抗体の軽鎖可変領域に由来する１以上のCDRが、ドナー抗体の対応するCDRをコードする核酸配列に対して１以上の変異を含む、実施形態２に記載の核酸配列。
【０３５３】
８．ドナー抗体の軽鎖可変領域に由来する１以上のCDRが、ドナー抗体の対応するCDRをコードする核酸配列に対して１以上の変異を含む、実施形態４に記載の核酸配列。
【０３５４】
９．ヒト化重鎖可変領域をコードする第１のヌクレオチド配列を含む核酸配列であって、前記ヒト化重鎖可変領域をコードする第１のヌクレオチド配列は、重鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより作製されたものであり、その際、少なくとも１つのCDRはある抗原と免疫特異的に結合するドナー抗体由来の重鎖CDRのサブバンクから得られ、少なくとも１つの重鎖フレームワーク領域はヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られるものである、上記核酸配列。
【０３５５】
10．ヒト化軽鎖可変領域をコードする第１のヌクレオチド配列を含む核酸配列であって、前記ヒト化軽鎖可変領域をコードする第１のヌクレオチド配列は、軽鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより作製されたものであり、その際、少なくとも１つのCDRはある抗原と免疫特異的に結合するドナー抗体由来の軽鎖CDRのサブバンクから得られ、少なくとも１つの軽鎖フレームワーク領域はヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られるものである、上記核酸配列。
【０３５６】
11．ドナー軽鎖可変領域をコードする第２のヌクレオチド配列をさらに含む、実施形態９に記載の核酸。
【０３５７】
12．ヒト化軽鎖可変領域をコードする第２のヌクレオチド配列をさらに含み、前記ヒト化軽鎖可変領域をコードする第２のヌクレオチド配列は、軽鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより作製されたものであり、その際、前記CDRはドナー抗体の軽鎖可変領域に由来し、少なくとも１つの軽鎖フレームワーク領域はヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られるものである、実施形態９に記載の核酸配列。
【０３５８】
13．ヒト化軽鎖可変領域をコードする第２のヌクレオチド配列をさらに含み、前記ヒト化軽鎖可変領域をコードする第２のヌクレオチド配列は、軽鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより作製されたものであり、その際、少なくとも１

つのCDRはある抗原と免疫特異的に結合するドナー抗体由来の軽鎖CDRのサブバンクから得られ、少なくとも１つの軽鎖フレームワーク領域はヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られるものである、実施形態９に記載の核酸配列。

【０３５９】

14．ドナー重鎖可変領域をコードする第２のヌクレオチド配列をさらに含む、実施形態10に記載の核酸配列。

【０３６０】

15．ヒト化重鎖可変領域をコードする第２のヌクレオチド配列をさらに含み、前記ヒト化重鎖可変領域をコードする第２のヌクレオチド配列は、重鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより作製されたものであり、その際、前記CDRはドナー抗体の重鎖可変領域に由来し、少なくとも１つの重鎖フレームワーク領域はヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られるものである、実施形態10に記載の核酸配列。

【０３６１】

16．実施形態１に記載の核酸配列を含むように遺伝子操作された細胞。

【０３６２】

17．実施形態２に記載の核酸配列を含むように遺伝子操作された細胞。

【０３６３】

18．実施形態２に記載の核酸配列を含むようにさらに遺伝子操作された、実施形態16に記載の細胞。

【０３６４】

19．実施形態３に記載の核酸を含むように遺伝子操作された細胞。

【０３６５】

20．実施形態４に記載の核酸を含むように遺伝子操作された細胞。

【０３６６】

21．実施形態５に記載の核酸を含むように遺伝子操作された細胞。

【０３６７】

22．実施形態９に記載の核酸配列を含むように遺伝子操作された細胞。

【０３６８】

23．実施形態10に記載の核酸配列を含むように遺伝子操作された細胞。

【０３６９】

24．実施形態10に記載の核酸配列を含むようにさらに遺伝子操作された、実施形態22に記載の細胞。

【０３７０】

25．実施形態11に記載の核酸配列を含むように遺伝子操作された細胞。

【０３７１】

26．実施形態12に記載の核酸配列を含むように遺伝子操作された細胞。

【０３７２】

27．実施形態13に記載の核酸配列を含むように遺伝子操作された細胞。

【０３７３】

28．実施形態14に記載の核酸配列を含むように遺伝子操作された細胞。

【０３７４】

29．実施形態15に記載の核酸配列を含むように遺伝子操作された細胞。

【０３７５】

30．ヒト化重鎖可変領域をコードする第１のヌクレオチド配列を含む第１の核酸配列を含有する細胞であって、前記細胞は、重鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、重

鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより合成された、ヒト化重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を細胞に導入することを含む方法により作製されたものであり、その際、前記CDRはドナー抗体の重鎖可変領域に由来し、少なくとも１つの重鎖フレームワーク領域はヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られるものである、上記細胞。

【０３７６】

31. ヒト化軽鎖可変領域をコードする第１のヌクレオチド配列を含む第１の核酸配列を含有する細胞であって、前記細胞は、軽鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより合成された、ヒト化軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を細胞に導入することを含む方法により作製されたものであり、その際、前記CDRはドナー抗体の軽鎖可変領域に由来し、少なくとも１つの軽鎖フレームワーク領域はヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られるものである、上記細胞。

【０３７７】

32. ヒト化重鎖可変領域をコードする第１のヌクレオチド配列およびヒト化軽鎖可変領域をコードする第２のヌクレオチド配列を含む核酸配列を含有する細胞であって、前記細胞は、(i)重鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより合成された、ヒト化重鎖可変領域をコードする第１のヌクレオチド配列、および(ii)軽鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより合成された、ヒト化軽鎖可変領域をコードする第２のヌクレオチド配列、を含む核酸配列を細胞に導入することを含む方法により作製されたものであり、その際、重鎖可変領域のCDRはドナー抗体の重鎖可変領域に由来し、軽鎖可変領域のCDRはドナー抗体の軽鎖可変領域に由来し、少なくとも１つの重鎖フレームワーク領域はヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られ、そして少なくとも１つの軽鎖フレームワーク領域はヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られるものである、上記細胞。

【０３７８】

33. ヒト化重鎖可変領域をコードする第１のヌクレオチド配列を含む第１の核酸配列を含有する細胞であって、前記細胞は、重鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより合成された、ヒト化重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を細胞に導入することを含む方法により作製されたものであり、その際、少なくとも１つのCDRはある抗原と免疫特異的に結合するドナー抗体由来の重鎖CDRのサブバンクから得られ、また、少なくとも１つの重鎖フレームワーク領域はヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られるものである、上記細胞。

【０３７９】

34. ヒト化軽鎖可変領域をコードする第１のヌクレオチド配列を含む第１の核酸配列を含有する細胞であって、前記細胞は、軽鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、軽鎖CD

R3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより合成された、ヒト化軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を細胞に導入することを含む方法により作製されたものであり、その際、少なくとも１つのCDRはある抗原と免疫特異的に結合するドナー抗体由来の軽鎖CDRのサブバンクから得られ、また、少なくとも１つの軽鎖フレームワーク領域はヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られるものである、上記細胞。

【０３８０】

35. ヒト化重鎖可変領域をコードする第１のヌクレオチド配列およびヒト化軽鎖可変領域をコードする第２のヌクレオチド配列を含む核酸配列を含有する細胞であって、前記細胞は、(i)重鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより合成された、ヒト化重鎖可変領域をコードする第１のヌクレオチド配列、および(ii)軽鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより合成された、ヒト化軽鎖可変領域をコードする第２のヌクレオチド配列、を含む核酸配列を細胞に導入することを含む方法により作製されたものであり、その際、少なくとも１つの重鎖可変領域CDRはある抗原と免疫特異的に結合するドナー抗体由来の重鎖CDRのサブバンクから得られ、少なくとも１つの軽鎖可変領域CDRはある抗原と免疫特異的に結合するドナー抗体由来の軽鎖CDRのサブバンクから得られ、少なくとも１つの重鎖フレームワーク領域はヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られ、そして少なくとも１つの軽鎖フレームワーク領域はヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られるものである、上記細胞。

【０３８１】

36. ヒト化重鎖可変領域をコードする第１のヌクレオチド配列およびヒト化軽鎖可変領域をコードする第２のヌクレオチド配列を含む核酸配列を含有する細胞であって、前記細胞は、(i)重鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより合成された、ヒト化重鎖可変領域をコードする第１のヌクレオチド配列、および(ii)軽鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより合成された、ヒト化軽鎖可変領域をコードする第２のヌクレオチド配列、を含む核酸配列を細胞に導入することを含む方法により作製されたものであり、その際、前記重鎖可変領域CDRはドナー抗体の重鎖可変領域に由来し、少なくとも１つの軽鎖可変領域CDRはある抗原と免疫特異的に結合するドナー抗体由来の軽鎖CDRのサブバンクから得られ、少なくとも１つの重鎖フレームワーク領域はヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られ、そして少なくとも１つの軽鎖フレームワーク領域はヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られるものである、上記細胞。

【０３８２】

37. ヒト化重鎖可変領域をコードする第１のヌクレオチド配列およびヒト化軽鎖可変領域をコードする第２のヌクレオチド配列を含む核酸配列を含有する細胞であって、前記細胞は、(i)重鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、

および重鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより合成された、ヒト化重鎖可変領域をコードする第１のヌクレオチド配列、および(ii)軽鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより合成された、ヒト化軽鎖可変領域をコードする第２のヌクレオチド配列、を含む核酸配列を細胞に導入することを含む方法により作製されたものであり、その際、少なくとも１つの重鎖可変領域CDRはある抗原と免疫特異的に結合するドナー抗体由来の重鎖CDRのサブバンクから得られ、前記軽鎖可変領域CDRはドナー抗体の軽鎖可変領域に由来し、少なくとも１つの重鎖フレームワーク領域はヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られ、そして少なくとも１つの軽鎖フレームワーク領域はヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られるものである、上記細胞。

【０３８３】

38．ヒト化軽鎖可変領域をコードする第２のヌクレオチド配列を含む第２の核酸配列をさらに含有する、実施形態30に記載の細胞。

【０３８４】

39．軽鎖可変領域をコードする第２のヌクレオチド配列を含む第２の核酸配列をさらに含有する、実施形態30に記載の細胞。

【０３８５】

40．重鎖可変領域をコードする第２のヌクレオチド配列を含む第２の核酸配列をさらに含有する、実施形態31に記載の細胞。

【０３８６】

41．ヒト化軽鎖可変領域をコードする第２のヌクレオチド配列を含む第２の核酸配列をさらに含有する、実施形態33に記載の細胞。

【０３８７】

42．軽鎖可変領域をコードする第２のヌクレオチド配列を含む第２の核酸配列をさらに含有する、実施形態33に記載の細胞。

【０３８８】

43．重鎖可変領域をコードする第２のヌクレオチド配列を含む第２の核酸配列をさらに含有する、実施形態34に記載の細胞。

【０３８９】

44．ある抗原と免疫特異的に結合するヒト化抗体をコードする核酸配列を含有する細胞であって、下記のステップ：

(a)ヒト化重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を細胞に導入するステップ、ここで、前記第１のヌクレオチド配列は、重鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、重鎖相補性決定領域（CDR）１をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより合成されたものであり、その際、前記CDRはドナー抗体の重鎖可変領域に由来し、少なくとも１つの重鎖フレームワーク領域はヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られたものであること、

(b)ヒト化軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を細胞に導入するステップ、ここで、前記ヌクレオチド配列は、軽鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、軽鎖相補性決定領域（CDR）１をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより合成されたものであり、その際、前記CDRはドナー抗体の軽鎖可変領域に由来し、少なくとも１つの軽鎖フレームワーク領域はヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られたものであること、

を含む方法により作製される、上記細胞。

【０３９０】

45. ある抗原と免疫特異的に結合するヒト化抗体をコードする核酸配列を含有する細胞であって、下記のステップ：

(a)重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を細胞に導入するステップ、ここで、前記ヌクレオチド配列は、重鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより合成されたものであり、その際、少なくとも１つのCDRは抗原と免疫特異的に結合するドナー抗体由来の重鎖CDRのサブバンクから得られたものであり、少なくとも１つの重鎖フレームワーク領域はヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られたものであること、

(b)ヒト化軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を細胞に導入するステップ、ここで、前記ヌクレオチド配列は、軽鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより合成されたものであり、その際、前記CDRはドナー抗体の軽鎖可変領域に由来し、少なくとも１つの軽鎖フレームワーク領域はヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られたものであること、

を含む方法により作製される、上記細胞。

【０３９１】

46. ある抗原と免疫特異的に結合するヒト化抗体をコードする核酸配列を含有する細胞であって、下記のステップ：

(a)重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を細胞に導入するステップ、ここで、前記ヌクレオチド配列は、重鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより合成されたものであり、その際、少なくとも１つのCDRは抗原と免疫特異的に結合するドナー抗体由来の重鎖CDRのサブバンクから得られたものであり、また、少なくとも１つの重鎖フレームワーク領域はヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られたものであること、

(b)ヒト化軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を細胞に導入するステップ、ここで、前記ヌクレオチド配列は、軽鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより合成されたものであり、その際、少なくとも１つのCDRは抗原と免疫特異的に結合するドナー抗体由来の軽鎖CDRのサブバンクから得られたものであり、また、少なくとも１つの軽鎖フレームワーク領域はヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られたものであること、

を含む方法により作製される、上記細胞。

【０３９２】

47. ある抗原と免疫特異的に結合するヒト化抗体をコードする核酸配列を含有する細胞であって、下記のステップ：

(a)重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を細胞に導入するステップ、ここで、前記ヌクレオチド配列は、重鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、重鎖相補性決定領域（CDR）１をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域２を

コードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより合成されたものであり、その際、前記CDRはドナー抗体の重鎖可変領域に由来し、少なくとも１つの重鎖フレームワーク領域はヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られたものであること、

(b)ヒト化軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を細胞に導入するステップ、ここで、前記ヌクレオチド配列は、軽鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより合成されたものであり、その際、少なくとも１つのCDRは抗原と免疫特異的に結合するドナー抗体由来の軽鎖CDRのサブバンクから得られたものであり、また、少なくとも１つの軽鎖フレームワーク領域はヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られたものであること、

を含む方法により作製される、上記細胞。

【０３９３】

48．実施形態30または33に記載の細胞においてヒト化重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を発現させることを含んでなる、ヒト化重鎖可変領域を作製する方法。

【０３９４】

49．実施形態31または34に記載の細胞においてヒト化軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を発現させることを含んでなる、ヒト化軽鎖可変領域を作製する方法。

【０３９５】

50．実施形態32、35、36または37に記載の細胞においてヒト化重鎖可変領域をコードする第１のヌクレオチド配列およびヒト化軽鎖可変領域をコードする第２のヌクレオチド配列を含む核酸配列を発現させることを含んでなる、ヒト化抗体を作製する方法。

【０３９６】

51．実施形態44、45、46または47に記載の細胞中に含まれるヒト化抗体をコードする核酸配列を発現させることを含んでなる、抗原と免疫特異的に結合するヒト化抗体を作製する方法。

【０３９７】

52．ある抗原と免疫特異的に結合するヒト化抗体を作製する方法であって、下記のステップ：

(a)重鎖フレームワーク領域のサブバンクを作製するステップ、

(b)ヒト化重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を合成するステップ、ただし、前記ヌクレオチド配列は、重鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより合成され、その際、前記CDRはドナー抗体の重鎖可変領域に由来し、少なくとも１つの重鎖フレームワーク領域はヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られたものであること、

(c)前記核酸配列を、ヒト化軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を含有する細胞に導入するステップ、

(d)ヒト化重鎖可変領域およびヒト化軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を発現させるステップ、

を含んでなる上記方法。

【０３９８】

53．ある抗原と免疫特異的に結合するヒト化抗体を作製する方法であって、下記のステップ：

(a)重鎖フレームワーク領域のサブバンクを作製するステップ、

(b)ヒト化重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を合成するステップ、ただし、前記ヌクレオチド配列は、重鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより合成され、その際、少なくとも１つのCDRは抗原と免疫特異的に結合するドナー抗体由来の重鎖CDRのサブバンクから得られたものであり、また、少なくとも１つの重鎖フレームワーク領域はヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られたものであること、

(c)前記核酸配列を、ヒト化軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を含有する細胞に導入するステップ、

(d)ヒト化重鎖可変領域およびヒト化軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を発現させるステップ、

を含んでなる上記方法。

【０３９９】

54．ある抗原と免疫特異的に結合するヒト化抗体を作製する方法であって、下記のステップ：

(a)軽鎖フレームワーク領域のサブバンクを作製するステップ、

(b)ヒト化軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を合成するステップ、ただし、前記ヌクレオチド配列は、軽鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより合成され、その際、前記CDRはドナー抗体の軽鎖可変領域に由来し、少なくとも１つの軽鎖フレームワーク領域はヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られたものであること、

(c)前記核酸配列を、ヒト化重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を含有する細胞に導入するステップ、

(d)ヒト化重鎖可変領域およびヒト化軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を発現させるステップ、

を含んでなる上記方法。

【０４００】

55．ある抗原と免疫特異的に結合するヒト化抗体を作製する方法であって、下記のステップ：

(a)軽鎖フレームワーク領域のサブバンクを作製するステップ、

(b)ヒト化軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を合成するステップ、ただし、前記ヌクレオチド配列は、軽鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより合成され、その際、少なくとも１つのCDRは抗原と免疫特異的に結合するドナー抗体由来の軽鎖CDRのサブバンクから得られたものであり、また、少なくとも１つの軽鎖フレームワーク領域はヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られたものであること、

(c)前記核酸配列を、ヒト化重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を含有する細胞に導入するステップ、

(d)ヒト化重鎖可変領域およびヒト化軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を発現させるステップ、

を含んでなる上記方法。

【０４０１】

56. ある抗原と免疫特異的に結合するヒト化抗体を作製する方法であって、下記のステップ：
(a)軽鎖フレームワーク領域のサブバンクを作製するステップ、
(b)重鎖フレームワーク領域のサブバンクを作製するステップ、
(c)ヒト化重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を合成するステップ、ただし、前記ヌクレオチド配列は、重鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより合成され、その際、前記CDRはドナー抗体の重鎖可変領域に由来し、少なくとも１つの重鎖フレームワーク領域はヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られたものであること、
(d)ヒト化軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を合成するステップ、ただし、前記ヌクレオチド配列は、軽鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより合成され、その際、前記CDRはドナー抗体の軽鎖可変領域に由来し、少なくとも１つの軽鎖フレームワーク領域はヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られたものであること、
(e)前記核酸配列を細胞に導入するステップ、
(f)ヒト化重鎖可変領域およびヒト化軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を発現させるステップ、
を含んでなる上記方法。

【０４０２】

57. ある抗原と免疫特異的に結合するヒト化抗体を作製する方法であって、下記のステップ：
(a)軽鎖フレームワーク領域のサブバンクを作製するステップ、
(b)重鎖フレームワーク領域のサブバンクを作製するステップ、
(c)ヒト化重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を合成するステップ、ただし、前記ヌクレオチド配列は、重鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより合成され、その際、少なくとも１つのCDRは抗原と免疫特異的に結合するドナー抗体由来の重鎖CDRのサブバンクから得られたものであり、また、少なくとも１つの重鎖フレームワーク領域はヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られたものであること、
(d)ヒト化軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を合成するステップ、ただし、前記ヌクレオチド配列は、軽鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより合成され、その際、前記CDRはドナー抗体の軽鎖可変領域に由来し、少なくとも１つの軽鎖フレームワーク領域はヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られたものであること、
(e)前記核酸配列を細胞に導入するステップ、
(f)ヒト化重鎖可変領域およびヒト化軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を発現させるステップ、
を含んでなる上記方法。

【０４０３】
58．ある抗原と免疫特異的に結合するヒト化抗体を作製する方法であって、下記のステップ：
(a)軽鎖フレームワーク領域のサブバンクを作製するステップ、
(b)重鎖フレームワーク領域のサブバンクを作製するステップ、
(c)ヒト化重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を合成するステップ、ただし、前記ヌクレオチド配列は、重鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより合成され、その際、前記CDRはドナー抗体の重鎖可変領域に由来し、少なくとも１つの重鎖フレームワーク領域はヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られたものであること、
(d)ヒト化軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を合成するステップ、ただし、前記ヌクレオチド配列は、軽鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより合成され、その際、少なくとも１つのCDRは抗原と免疫特異的に結合するドナー抗体由来の軽鎖CDRのサブバンクから得られたものであり、また、少なくとも１つの軽鎖フレームワーク領域はヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られたものであること、
(e)前記核酸配列を細胞に導入するステップ、
(f)ヒト化重鎖可変領域およびヒト化軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を発現させるステップ、
を含んでなる上記方法。
【０４０４】
59．ある抗原と免疫特異的に結合するヒト化抗体を作製する方法であって、下記のステップ：
(a)軽鎖フレームワーク領域のサブバンクを作製するステップ、
(b)重鎖フレームワーク領域のサブバンクを作製するステップ、
(c)ヒト化重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を合成するステップ、ただし、前記ヌクレオチド配列は、重鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより合成され、その際、少なくとも１つのCDRは抗原と免疫特異的に結合するドナー抗体由来の重鎖CDRのサブバンクから得られたものであり、また、少なくとも１つの重鎖フレームワーク領域はヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られたものであること、
(d)ヒト化軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を合成するステップ、ただし、前記ヌクレオチド配列は、軽鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより合成され、その際、少なくとも１つのCDRは抗原と免疫特異的に結合するドナー抗体由来の軽鎖CDRのサブバンクから得られたものであり、また、少なくとも１つの軽鎖フレームワーク領域はヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られたものであること、
(e)前記核酸配列を細胞に導入するステップ、

(f)ヒト化重鎖可変領域およびヒト化軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を発現させるステップ、
を含んでなる上記方法。
【０４０５】
60．ある抗原と免疫特異的に結合するヒト化抗体を作製する方法であって、下記のステップ：
(a)軽鎖フレームワーク領域のサブバンクを作製するステップ、
(b)重鎖フレームワーク領域のサブバンクを作製するステップ、
(c)(i)重鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより合成された、ヒト化重鎖可変領域をコードする第１のヌクレオチド配列、および(ii)軽鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより合成された、ヒト化軽鎖可変領域をコードする第２のヌクレオチド配列、を含む核酸配列を合成するステップ、その際、重鎖可変領域のCDRはドナー抗体の重鎖可変領域に由来し、軽鎖可変領域のCDRはドナー抗体の軽鎖可変領域に由来し、少なくとも１つの重鎖フレームワーク領域はヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られ、そして少なくとも１つの軽鎖フレームワーク領域はヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られるものであること、
(d)前記核酸配列を細胞に導入するステップ、
(e)ヒト化重鎖可変領域およびヒト化軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を発現させるステップ、
を含んでなる上記方法。
【０４０６】
61．ある抗原と免疫特異的に結合するヒト化抗体を作製する方法であって、下記のステップ：
(a)軽鎖フレームワーク領域のサブバンクを作製するステップ、
(b)重鎖フレームワーク領域のサブバンクを作製するステップ、
(c)(i)重鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより合成された、ヒト化重鎖可変領域をコードする第１のヌクレオチド配列、および(ii)軽鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより合成された、ヒト化軽鎖可変領域をコードする第２のヌクレオチド配列、を含む核酸配列を合成するステップ、その際、少なくとも１つの重鎖可変領域CDRは抗原と免疫特異的に結合するドナー抗体由来の重鎖CDRのサブバンクから得られ、軽鎖可変領域CDRはドナー抗体の軽鎖可変領域に由来し、少なくとも１つの重鎖フレームワーク領域はヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られ、そして少なくとも１つの軽鎖フレームワーク領域はヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られるものであること、
(d)前記核酸配列を細胞に導入するステップ、
(e)ヒト化重鎖可変領域およびヒト化軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を発現させるステップ、
を含んでなる上記方法。

【０４０７】
62. ある抗原と免疫特異的に結合するヒト化抗体を作製する方法であって、下記のステップ：
(a)軽鎖フレームワーク領域のサブバンクを作製するステップ、
(b)重鎖フレームワーク領域のサブバンクを作製するステップ、
(c)(i)重鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより合成された、ヒト化重鎖可変領域をコードする第１のヌクレオチド配列、および(ii)軽鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより合成された、ヒト化軽鎖可変領域をコードする第２のヌクレオチド配列、を含む核酸配列を合成するステップ、その際、重鎖可変領域CDRはドナー抗体の重鎖可変領域に由来し、少なくとも１つの軽鎖可変領域CDRは抗原と免疫特異的に結合するドナー抗体由来の軽鎖CDRのサブバンクから得られ、少なくとも１つの重鎖フレームワーク領域はヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られ、そして少なくとも１つの軽鎖フレームワーク領域はヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られるものであること、
(d)前記核酸配列を細胞に導入するステップ、
(e)ヒト化重鎖可変領域およびヒト化軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を発現させるステップ、
を含んでなる上記方法。
【０４０８】
63. ある抗原と免疫特異的に結合するヒト化抗体を作製する方法であって、下記のステップ：
(a)軽鎖フレームワーク領域のサブバンクを作製するステップ、
(b)重鎖フレームワーク領域のサブバンクを作製するステップ、
(c)(i)重鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより合成された、ヒト化重鎖可変領域をコードする第１のヌクレオチド配列、および(ii)軽鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより合成された、ヒト化軽鎖可変領域をコードする第２のヌクレオチド配列、を含む核酸配列を合成するステップ、その際、少なくとも１つの重鎖可変領域CDRは抗原と免疫特異的に結合するドナー抗体由来の重鎖CDRのサブバンクから得られ、少なくとも１つの軽鎖可変領域CDRは抗原と免疫特異的に結合するドナー抗体由来の軽鎖CDRのサブバンクから得られ、少なくとも１つの重鎖フレームワーク領域はヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られ、そして少なくとも１つの軽鎖フレームワーク領域はヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られるものであること、
(d)前記核酸配列を細胞に導入するステップ、
(e)ヒト化重鎖可変領域およびヒト化軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を発現させるステップ、
を含んでなる上記方法。
【０４０９】

64. (e)抗原と免疫特異的に結合するヒト化抗体をスクリーニングするステップをさらに含む、実施形態52、53、54または55に記載の方法。

【０４１０】

65. (g)抗原と免疫特異的に結合するヒト化抗体をスクリーニングするステップをさらに含む、実施形態56、57、58または59に記載の方法。

【０４１１】

66. (f)抗原と免疫特異的に結合するヒト化抗体をスクリーニングするステップをさらに含む、実施形態60、61、62または63に記載の方法。

【０４１２】

67. 実施形態48に記載の方法により作製されたヒト化抗体。

【０４１３】

68. 実施形態49に記載の方法により作製されたヒト化抗体。

【０４１４】

69. 実施形態50に記載の方法により作製されたヒト化抗体。

【０４１５】

70. 実施形態51に記載の方法により作製されたヒト化抗体。

【０４１６】

71. 実施形態52～63のいずれか１つに記載の方法により作製されたヒト化抗体。

【０４１７】

72. 実施形態64に記載の方法により作製されたヒト化抗体。

【０４１８】

73. 実施形態65に記載の方法により作製されたヒト化抗体。

【０４１９】

74. 実施形態66に記載の方法により作製されたヒト化抗体。

【０４２０】

75. 実施形態67に記載のヒト化抗体および担体、希釈剤または賦形剤を含有する組成物。

【０４２１】

76. 実施形態68に記載のヒト化抗体および担体、希釈剤または賦形剤を含有する組成物。

【０４２２】

77. 実施形態69に記載のヒト化抗体および担体、希釈剤または賦形剤を含有する組成物。

【０４２３】

78. 実施形態70に記載のヒト化抗体および担体、希釈剤または賦形剤を含有する組成物。

【０４２４】

79. 実施形態71に記載のヒト化抗体および担体、希釈剤または賦形剤を含有する組成物。

【０４２５】

80. 実施形態72に記載のヒト化抗体および担体、希釈剤または賦形剤を含有する組成物。

【０４２６】

81. 実施形態73に記載のヒト化抗体および担体、希釈剤または賦形剤を含有する組成物。

【０４２７】

82. ヒト化重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む複数の核酸配列であって、前記ヒト化重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列は、それぞれ、重鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領

域３をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより作製されたものであり、その際、前記CDRはドナー抗体の重鎖可変領域に由来し、少なくとも１つの重鎖フレームワーク領域はヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られるものである、上記複数の核酸配列。

【０４２８】

83．ヒト化重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む複数の核酸配列であって、前記ヒト化重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列は、それぞれ、重鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより作製されたものであり、その際、少なくとも１つのCDRは抗原と免疫特異的に結合するドナー抗体由来の重鎖CDRのサブバンクから得られ、また、少なくとも１つの重鎖フレームワーク領域はヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られるものである、上記複数の核酸配列。

【０４２９】

84．ヒト化軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む複数の核酸配列であって、前記ヒト化軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列は、それぞれ、軽鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより作製されたものであり、その際、前記CDRはドナー抗体の軽鎖可変領域に由来し、少なくとも１つの軽鎖フレームワーク領域はヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られるものである、上記複数の核酸配列。

【０４３０】

85．ヒト化軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む複数の核酸配列であって、前記ヒト化軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列は、それぞれ、軽鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することにより作製されたものであり、その際、少なくとも１つのCDRは抗原と免疫特異的に結合するドナー抗体由来の軽鎖CDRのサブバンクから得られ、また、少なくとも１つの軽鎖フレームワーク領域はヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られるものである、上記複数の核酸配列。

【０４３１】

86．(i)重鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することによりそれぞれ合成された、ヒト化重鎖可変領域をコードする第１セットのヌクレオチド配列、および(ii)軽鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することによりそれぞれ合成された、ヒト化軽鎖可変領域をコードする第２セットのヌクレオチド配列、を含む複数の核酸配列であって、その際、前記重鎖可変領域CDRはドナー抗体の重鎖可変領域に由来し、前記軽鎖可変領域CDRはドナー抗体の軽鎖可変領域に由来し、少なくとも１つの重鎖フレームワーク領域はヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られ、そして少なくとも１つの軽鎖フレームワーク領域はヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンクから得ら

れるものである、上記複数の核酸配列。

【０４３２】

87．(i)重鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することによりそれぞれ合成された、ヒト化重鎖可変領域をコードする第１セットのヌクレオチド配列、および(ii)軽鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することによりそれぞれ合成された、ヒト化軽鎖可変領域をコードする第２セットのヌクレオチド配列、を含む複数の核酸配列であって、その際、少なくとも１つの重鎖可変領域CDRは抗原と免疫特異的に結合するドナー抗体由来の重鎖CDRのサブバンクから得られ、前記軽鎖可変領域CDRはドナー抗体の軽鎖可変領域に由来し、少なくとも１つの重鎖フレームワーク領域はヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られ、そして少なくとも１つの軽鎖フレームワーク領域はヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られるものである、上記複数の核酸配列。

【０４３３】

88．(i)重鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することによりそれぞれ合成された、ヒト化重鎖可変領域をコードする第１セットのヌクレオチド配列、および(ii)軽鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することによりそれぞれ合成された、ヒト化軽鎖可変領域をコードする第２セットのヌクレオチド配列、を含む複数の核酸配列であって、その際、前記重鎖可変領域CDRはドナー抗体の重鎖可変領域に由来し、少なくとも１つの軽鎖可変領域CDRは抗原と免疫特異的に結合するドナー抗体由来の軽鎖CDRのサブバンクから得られ、少なくとも１つの重鎖フレームワーク領域はヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られ、そして少なくとも１つの軽鎖フレームワーク領域はヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られるものである、上記複数の核酸配列。

【０４３４】

89．(i)重鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することによりそれぞれ合成された、ヒト化重鎖可変領域をコードする第１セットのヌクレオチド配列、および(ii)軽鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することによりそれぞれ合成された、ヒト化軽鎖可変領域をコードする第２セットのヌクレオチド配列、を含む複数の核酸配列であって、その際、少なくとも１つの重鎖可変領域CDRは抗原と免疫特異的に結合するドナー抗体由来の重鎖CDRのサブバンクから得られ、少なくとも１つの軽鎖可変領域CDRは抗原と免疫特異的に結合するドナー抗体由来の軽鎖CDRのサブバンクから得られ、少なくとも１つの重鎖フレームワーク領域はヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンクか

ら得られ、そして少なくとも１つの軽鎖フレームワーク領域はヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られるものである、上記複数の核酸配列。

【０４３５】

90. 複数のヒト化重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を含有する細胞の集団であって、前記細胞は、重鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することによりそれぞれ合成された、ヒト化重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を細胞に導入することを含む方法により作製されたものであり、ここで、前記CDRはドナー抗体の重鎖可変領域に由来し、少なくとも１つの重鎖フレームワーク領域はヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られるものである、上記細胞の集団。

【０４３６】

91. 複数のヒト化重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を含有する細胞の集団であって、前記細胞は、重鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することによりそれぞれ合成された、ヒト化重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を細胞に導入することを含む方法により作製されたものであり、ここで、少なくとも１つのCDRは抗原と免疫特異的に結合するドナー抗体由来の重鎖CDRのサブバンクから得られ、また、少なくとも１つの重鎖フレームワーク領域はヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られるものである、上記細胞の集団。

【０４３７】

92. 複数のヒト化軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を含有する細胞の集団であって、前記細胞は、軽鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することによりそれぞれ合成された、ヒト化軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を細胞に導入することを含む方法により作製されたものであり、ここで、前記CDRはドナー抗体の軽鎖可変領域に由来し、少なくとも１つの軽鎖フレームワーク領域はヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られるものである、上記細胞の集団。

【０４３８】

93. 複数のヒト化軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を含有する細胞の集団であって、前記細胞は、軽鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することによりそれぞれ合成された、ヒト化軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を細胞に導入することを含む方法により作製されたものであり、ここで、少なくとも１つのCDRは抗原と免疫特異的に結合するドナー抗体由来の軽鎖CDRのサブバンクから得られ、また、少なくとも１つの軽鎖フレームワーク領域はヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られるものである、上記細胞の集団。

【０４３９】

94. 前記細胞が軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列をさらに含む、実施形態90に記載の細胞。

【０４４０】

95. 前記細胞が軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列をさらに含む、実施形態91に記載の細胞。

【０４４１】

96. 前記細胞が軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列をさらに含む、実施形態92に記載の細胞。

【０４４２】

97. 前記細胞がヒト化軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列をさらに含む、実施形態93に記載の細胞。

【０４４３】

98. 複数のヒト化重鎖可変領域および複数のヒト化軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を含有する細胞の集団であって、前記細胞は、(i)重鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することによりそれぞれ合成された、ヒト化重鎖可変領域をコードする第１セットのヌクレオチド配列、および(ii)軽鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することによりそれぞれ合成された、ヒト化軽鎖可変領域をコードする第２セットのヌクレオチド配列、を含む核酸配列を細胞に導入することを含む方法により作製されたものであり、その際、前記重鎖可変領域CDRはドナー抗体の重鎖可変領域に由来し、前記軽鎖可変領域CDRはドナー抗体の軽鎖可変領域に由来し、少なくとも１つの重鎖フレームワーク領域はヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られ、そして少なくとも１つの軽鎖フレームワーク領域はヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られるものである、上記細胞の集団。

【０４４４】

99. 複数のヒト化重鎖可変領域および複数のヒト化軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を含有する細胞の集団であって、前記細胞は、(i)重鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することによりそれぞれ合成された、ヒト化重鎖可変領域をコードする第１セットのヌクレオチド配列、および(ii)軽鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することによりそれぞれ合成された、ヒト化軽鎖可変領域をコードする第２セットのヌクレオチド配列、を含む核酸配列を細胞に導入することを含む方法により作製されたものであり、その際、少なくとも１つの重鎖可変領域CDRは抗原と免疫特異的に結合するドナー抗体由来の重鎖CDRのサブバンクから得られ、前記軽鎖可変領域CDRはドナー抗体の軽鎖可変領域に由来し、少なくとも１つの重鎖フレームワーク領域はヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られ、そして少なくとも１つの軽鎖フレームワーク領域はヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られるものである、上記細胞の集団。

【０４４５】

100. 複数のヒト化重鎖可変領域および複数のヒト化軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を含有する細胞の集団であって、前記細胞は、(i)重鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク

領域３をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することによりそれぞれ合成された、ヒト化重鎖可変領域をコードする第１セットのヌクレオチド配列、および(ii)軽鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することによりそれぞれ合成された、ヒト化軽鎖可変領域をコードする第２セットのヌクレオチド配列、を含む核酸配列を細胞に導入することを含む方法により作製されたものであり、その際、前記重鎖可変領域CDRはドナー抗体の重鎖可変領域に由来し、少なくとも１つの軽鎖可変領域CDRは抗原と免疫特異的に結合するドナー抗体由来の軽鎖CDRのサブバンクから得られ、少なくとも１つの重鎖フレームワーク領域はヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られ、そして少なくとも１つの軽鎖フレームワーク領域はヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られるものである、上記細胞の集団。

【０４４６】

101．複数のヒト化重鎖可変領域および複数のヒト化軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を含有する細胞の集団であって、前記細胞は、(i)重鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、重鎖CDR1をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、重鎖CDR2をコードする核酸配列、重鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、重鎖CDR3をコードする核酸配列、および重鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することによりそれぞれ合成された、ヒト化重鎖可変領域をコードする第１セットのヌクレオチド配列、および(ii)軽鎖フレームワーク領域１をコードする核酸配列、軽鎖CDR1をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域２をコードする核酸配列、軽鎖CDR2をコードする核酸配列、軽鎖フレームワーク領域３をコードする核酸配列、軽鎖CDR3をコードする核酸配列、および軽鎖フレームワーク領域４をコードする核酸配列を一緒に融合することによりそれぞれ合成された、ヒト化軽鎖可変領域をコードする第２セットのヌクレオチド配列、を含む核酸配列を細胞に導入することを含む方法により作製されたものであり、その際、少なくとも１つの重鎖可変領域CDRは抗原と免疫特異的に結合するドナー抗体由来の重鎖CDRのサブバンクから得られ、少なくとも１つの軽鎖可変領域CDRは抗原と免疫特異的に結合するドナー抗体由来の軽鎖CDRのサブバンクから得られ、少なくとも１つの重鎖フレームワーク領域はヒト重鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られ、そして少なくとも１つの軽鎖フレームワーク領域はヒト軽鎖フレームワーク領域のサブバンクから得られるものである、上記細胞の集団。

【０４４７】

102．抗原と免疫特異的に結合するヒト化抗体を同定する方法であって、実施形態94、95、96または97に記載の細胞中の核酸配列を発現させ、前記抗原に対して$1 \times 10^{6}\ M^{-1}$以上の親和性を有するヒト化抗体をスクリーニングすることを含む、上記方法。

【０４４８】

103．抗原と免疫特異的に結合するヒト化抗体を同定する方法であって、実施形態98、99、100または101に記載の細胞中の核酸配列を発現させ、前記抗原に対して$1 \times 10^{6}\ M^{-1}$以上の親和性を有するヒト化抗体をスクリーニングすることを含む、上記方法。

【０４４９】

104．実施形態102に記載の方法により同定されたヒト化抗体。

【０４５０】

105．実施形態103に記載の方法により同定されたヒト化抗体。

【０４５１】

106．実施形態104に記載のヒト化抗体および担体、希釈剤または賦形剤を含有する組成物。

【０４５２】

107．実施形態105に記載のヒト化抗体および担体、希釈剤または賦形剤を含有する組

成物。
【実施例】
【０４５３】
5.0 実施例
試薬
全ての化学薬品は分析グレードのものを使用した。制限酵素とDNA改変酵素はNew England Biolabs, Inc. (Beverly, MA)から購入した。pfu DNAポリメラーゼとオリゴヌクレオチドはInvitrogen (Carlsbad, CA)から購入した。ヒトEphA2-Fc融合タンパク質（ヒトIgG1のFc部分と融合されたヒトEphA2からなる（Carles-Kinchら Cancer Res. 62: 2840-2847 (2002)）はヒト胚性腎(HEK) 293細胞において発現させ、標準的なプロトコルを用いてプロテインＧアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。ストレプトアビジン磁性ビーズはDynal (Lake Success, NY)から購入した。ヒトEphA2-Fcのビオチン化は、EZ-Link Sulfo-NHS-LC-ビオチン化キット(Pierce, Rockford, IL)を用いて製造業者の使用説明書に従って実施した。
【０４５４】
5.1 親モノクローナル抗体のクローニングおよび配列決定
ヒト受容体チロシンキナーゼEphA2に対するモノクローナル抗体(mAb)を分泌するマウスハイブリドーマ細胞株(B233)をMedImmune, Inc.から取得した（Kinchら Clin. Exp. Metastasis. 20:59-68 (2003)）。このマウスmAbを以後mAb B233という。mAb B233の可変重鎖(V_H)および軽鎖(V_L)遺伝子のクローニングおよび配列決定は、B233由来のメッセンジャーRNAをStraight A’s mRNA精製キット(Novagen, Madison, WI)を用いて製造業者の使用説明書に従って単離・精製した後で実施した。cDNAは第１鎖cDNA合成キット(Novagen, Madison, WI)を用いて製造業者が推奨するとおりに合成した。V_HおよびV_L遺伝子の増幅は、マウスIg-プライマーセット(Novagen, Madison, WI)からのIgGV_HおよびIgκV_Lオリゴヌクレオチドを用いて製造業者が提案するとおりに実施した。生産的増幅より得られるDNA断片は、Perfectly Bluntクローニングキット(Novagen, Madison, WI)を用いてpSTBlue-1にクローニングした。その後、ABI3000シークエンサー(Applied Biosystems, Foster City, CA)を使ってジデオキシチェーンターミネーション法(Sangerら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74: 5463-5467 (1977))により多数のV_HおよびV_Lクローンの配列決定を行った。mAb B233 V_L (V_L-233)およびV_H (V_H-233)遺伝子のコンセンサス配列を図１に示す。
【０４５５】
5.2 ヒトフレームワークの選択
ヒトフレームワーク遺伝子は公に利用可能な抗体生殖系列遺伝子のプールから選択した。より詳細には、これは、第１、第２および第３フレームワークについては46のヒト生殖系列κ鎖遺伝子 (A1, A10, A11, A14, A17, A18, A19, A2, A20, A23, A26, A27, A3, A30, A5, A7, B2, B3, L1, L10, L11, L12, L14, L15, L16, L18, L19, L2, L20, L22, L23, L24, L25, L4/18a, L5, L6, L8, L9, O1, O11, O12, O14, O18, O2, O4およびO8; K.F. Schableら, Biol. Chem. Hoppe Seyler 374:1001-1022, (1993); J. Brensing-Kuppersら, Gene 191:173-181(1997)) を含み、第４フレームワークについては５つのヒト生殖系列Ｊ配列 (Jκ1, Jκ2, Jκ3, Jκ4およびJκ5; P.A. Hieterら, J. Biol. Chem. 257:1516-1522 (1982)) を含んでいた。このライブラリーの重鎖部分は、第１、第２および第３フレームワークについては44のヒト生殖系列重鎖配列 (VH1-18, VH1-2, VH1-24, VH1-3, VH1-45, VH1-46, VH1-58, VH1-69, VH1-8, VH2-26, VH2-5, VH2-70, VH3-11, VH3-13, VH3-15, VH3-16, VH3-20, VH3-21, VH3-23, VH3-30, VH3-33, VH3-35, VH3-38, VH3-43, VH3-48, VH3-49, VH3-53, VH3-64, VH3-66, VH3-7, VH3-72, VH3-73, VH3-74, VH3-9, VH4-28, VH4-31, VH4-34, VH4-39, VH4-4, VH4-59, VH4-61, VH5-51, VH6-1およびVH7-8; F. Matsudaら, J. Exp. Med. 188:1973-1975 (1998)) を含み、第４フレームワークについては６つのヒト生殖系列Ｊ配列 (JH1, JH2, JH3, JH4, JH5およびJH6; J.V. Ravetchら, Cell 27(3 Pt 2): 583-591 (1981)) を含んでいた。
【０４５６】

5.3 フレームワークシャフル型 (shuffled) ライブラリーの構築

5.3.1 ライブラリーの説明

３つの主なフレームワークシャフル型ライブラリー（ライブラリーA、BおよびC）を構築した。ライブラリーAは、mAb B233の重鎖(V_H-233)と対合させた軽鎖フレームワークシャフル型サブライブラリー(V_L sub1)を含んでいた。ライブラリーBは、固定化したフレームワークシャフル型軽鎖V_L-12C8およびV_L-8G7と対合させた重鎖フレームワークシャフル型サブライブラリー(V_H sub1)を含んでいた（§5.4.1.1、§5.4.1.2および§5.4.1.3を参照のこと）。ライブラリーCは、重鎖フレームワークシャフル型サブライブラリー(V_H sub2)と対合させた軽鎖フレームワークシャフル型サブライブラリー(V_L sub2)を含んでいた。

【０４５７】

フレームワークシャフル型V_HおよびV_Lサブライブラリーの構築は、表１～７および11に示したオリゴヌクレオチドを用いて行った。より詳細には、表１～７および11に記載したオリゴヌクレオチドは、Kabat定義による軽鎖（κ）および重鎖のあらゆる公知のヒトフレームワーク生殖系列遺伝子の完全な配列をコードしている。表64および65に記載したオリゴヌクレオチドは、mAb B233のCDRの部分をコードしており、対応するヒト生殖系列フレームワークと重複している。表64に関しては、AL1～13とDL1U～4Uを除いて、各オリゴヌクレオチドは、mAb B233の１つのCDRの部分（下線）と１つのヒト生殖系列軽鎖フレームワークの部分（Kabat定義; Kabatら, Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Public Health Service, National Institutes of Health, Washington, DC, 1991）をコードしている。CDRL1、L2およびL3はそれぞれAL1U～10U/BL1～10、BL1U～16U/CL1～11およびCL1U～12U/DL1～4によってコードされる。オリゴヌクレオチドAL1～13はM13遺伝子3リーダー重複配列（太字）を含み、オリゴヌクレオチドDL1U～4UはCκ重複配列（太字）を含む。表65に関しては、AH1～10およびDH1U～3Uを除いて、各オリゴヌクレオチドは、mAb B233の１つのCDRの部分（下線）と１つのヒト生殖系列重鎖フレームワークの部分（Kabat定義）をコードしている。CDRH1、H2およびH3はそれぞれAH1U～17U/BH1～17、BH1U～16U/CH1～15およびCH1U～13U/DH1～3によってコードされる。オリゴヌクレオチドAH1～10はM13遺伝子3リーダー重複配列（太字）を含み、一方オリゴヌクレオチドDH1U～3UはCκ_1重複配列（太字）を含む。（K=GまたはT、M=AまたはC、R=AまたはG、S=CまたはG、W=AまたはT、およびY=CまたはT）。

【表６４】

表 64. mAb B233 軽鎖 CDR とヒト生殖系列軽鎖フレームワークとの融合のために用いたオリゴヌクレオチド

1589	AL1	5′-GGTCGTTCCATTTTACTCCCACTCCGATGTTGTGATGACWCAGTCT-3′
1590	AL2	5′-GGTCGTTCCATTTTACTCCCACTCCGACATCCAGATGAYCCAGTCT-3′
1591	AL3	5′-GGTCGTTCCATTTTACTCCCACTCCGCCATCCAGWTGACCCAGTCT-3′
1592	AL4	5′-GGTCGTTCCATTTTACTCCCACTCCGAAATAGTGATGAYGCAGTCT-3′
1593	AL5	5′-GGTCGTTCCATTTTACTCCCACTCCGAAATTGTGTTGACRCAGTCT-3′
1594	AL6	5′-GGTCGTTCCATTTTACTCCCACTCCGAKATTGTGATGACCCAGACT-3′
1595	AL7	5′-GGTCGTTCCATTTTACTCCCACTCCGAAATTGTRMTGACWCAGTCT-3′
1596	AL8	5′-GGTCGTTCCATTTTACTCCCACTCCGAYATYGTGATGACYCAGTCT-3′
1597	AL9	5′-GGTCGTTCCATTTTACTCCCACTCCGAAACGACACTCACGCAGTCT-3′
1598	AL10	5′-GGTCGTTCCATTTTACTCCCACTCCGACATCCAGTTGACCCAGTCT-3′
1599	AL11	5′-GGTCGTTCCATTTTACTCCCACTCCAACATCCAGATGACCCAGTCT-3′
1600	AL12	5′-GGTCGTTCCATTTTACTCCCACTCCGCCATCCGGATGACCCAGTCT-3′
1601	AL13	5′-GGTCGTTCCATTTTACTCCCACTCCGTCATCTGGATGACCCAGTCT-3′
1602	AL1Ü	5′-TAATACTTTGGCTGGCCCTGCAGGAGATGGAGGCCGGC-3′
1603	AL2Ü	5′-TAATACTTTGGCTGGCCCTGCAGGAGAGGGTGRCTCTTTC-3′
1604	AL3Ü	5′-TAATACTTTGGCTGGCCCTACAASTGATGGTGACTCTGTC-3′
1605	AL4Ü	5′-TAATACTTTGGCTGGCCCTGAAGGAGATGGAGGCCGGCTG-3′
1606	AL5Ü	5′-TAATACTTTGGCTGGCCCTGCAGGAGATGGAGGCCTGCTC-3′
1607	AL6Ü	5′-TAATACTTTGGCTGGCCCTGCAGGAGATGTTGACTTTGTC-3′
1608	AL7Ü	5′-TAATACTTTGGCTGGCCCTGCAGGTGATGGTGACTTTCTC-3′
1609	AL8Ü	5′-TAATACTTTGGCTGGCCCTGCAGTTGATGGTGGCCCTCTC-3′
1610	AL9Ü	5′-TAATACTTTGGCTGGCCCTGCAAGTGATGGTGACTCTGTC-3′
1611	AL10Ü	5′-TAATACTTTGGCTGGCCCTGCAAATGATACTGACTCTGTC-3′
1612	BL1	5′-CCAGCCAAAGTATTAGCAACAACCTACACTGGYTTCAGCAGAGGCCAGGC-3′
1613	BL2	5′-CCAGCCAAAGTATTAGCAACAACCTACACTGGTACCTGCAGAAGCCAGGS-3′
1614	BL3	5′-CCAGCCAAAGTATTAGCAACAACCTACACTGGTATCRGCAGAAACCAGGG-3′
1615	BL4	5′-CCAGCCAAAGTATTAGCAACAACCTACACTGGTACCARCAGAAACCAGGA-3′
1616	BL5	5′-CCAGCCAAAGTATTAGCAACAACCTACACTGGTACCARCAGAAACCTGGC-3′
1617	BL6	5′-CCAGCCAAAGTATTAGCAACAACCTACACTGGTAYCWGCAGAAACCWGGG-3′
1618	BL7	5′-CCAGCCAAAGTATTAGCAACAACCTACACTGGTATCAGCARAAACCWGGS-3′
1619	BL8	5′-CCAGCCAAAGTATTAGCAACAACCTACACTGGTAYCAGCARAAACCAG-3′
1620	BL9	5′-CCAGCCAAAGTATTAGCAACAACCTACACTGGTTTCTGCAGAAAGCCAGG-3′
1621	BL10	5′-CCAGCCAAAGTATTAGCAACAACCTACACTGGTTTCAGCAGAAACCAGGG-3′
1622	BL1Ü	5′-GATGGACTGGAAAACATAATAGATCAGGAGCTGTGGAG-3′
1623	BL2Ü	5′-GATGGACTGGAAAACATAATAGATCAGGAGCTTAGGRGC-3′
1624	BL3Ü	5′-GATGGACTGGAAAACATAATAGATGAGGAGCCTGGGMGC-3′
1625	BL4Ü	5′-GATGGACTGGAAAACATARTAGATCAGGMGCTTAGGGGC-3′
1626	BL5Ü	5′-GATGGACTGGAAAACATAATAGATCAGGWGCTTAGGRAC-3′
1627	BL6Ü	5′-GATGGACTGGAAAACATAATAGATGAAGAGCTTAGGGGC-3′
1628	BL7Ü	5′-GATGGACTGGAAAACATAATAAATTAGGAGTCTTGGAGG-3′
1629	BL8Ü	5′-GATGGACTGGAAAACATAGTAAATGAGCAGCTTAGGAGG-3′
1630	BL9Ü	5′-GATGGACTGGAAAACATAATAGATCAGGAGTGTGGAGAC-3′
1631	BL10Ü	5′-GATGGACTGGAAAACATAATAGATCAGGAGCTCAGGGGC-3′
1632	BL11Ü	5′-GATGGACTGGAAAACATAATAGATCAGGGACTTAGGGGC-3′
1633	BL12Ü	5′-GATGGACTGGAAAACATAATAGAGGAAGAGCTTAGGGGA-3′
1634	BL13Ü	5′-GATGGACTGGAAAACATACTTGATGAGGAGCTTTGGAGA-3′
1635	BL14Ü	5′-GATGGACTGGAAAACATAATAAATTAGGCGCCTTGGAGA-3′
1636	BL15Ü	5′-GATGGACTGGAAAACATACTTGATGAGGAGCTTTGGGGC-3′
1637	BL16Ü	5′-GATGGACTGGAAAACATATTGAATAATGAAAATAGCAGC-3′
1638	CL1	5′-GTTTTCCAGTCCATCTCTGGGGTCCCAGACAGATTCAGY-3′
1639	CL2	5′-GTTTTCCAGTCCATCTCTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGY-3′
1744	CL3	5′-GTTTTCCAGTCCATCTCTGGYATCCCAGCCAGGTTCAGT-3′
1745	CL4	5′-GTTTTCCAGTCCATCTCTGGRGTCCCWGACAGGTTCAGT-3′
1746	CL5	5′-GTTTTCCAGTCCATCTCTAGCATCCCAGCCAGGTTCAGT-3′
1747	CL6	5′-GTTTTCCAGTCCATCTCTGGGGTCCCCTCGAGGTTCAGT-3′
1748	CL7	5′-GTTTTCCAGTCCATCTCTGGAATCCCACCTCGATTCAGT-3′
1749	CL8	5′-GTTTTCCAGTCCATCTCTGGGGTCCCTGACCGATTCAGT-3′
1750	CL9	5′-GTTTTCCAGTCCATCTCTGGCATCCCAGACAGGTTCAGT-3′
1751	CL10	5′-GTTTTCCAGTCCATCTCTGGGGTCTCATCGAGGTTCAGT-3′
1752	CL11	5′-GTTTTCCAGTCCATCTCTGGAGTGCCAGATAGGTTCAGT-3′
1753	CL1Ü	5′-CCAGCTGTTACTCTGTTGKCAGTAATAAACCCCAACATC-3′
1754	CL2Ü	5′-CCAGCTGTTACTCTGTTGACAGTAATAYGTTGCAGCATC-3′

1755 CL3Ü 5′-CCAGCTGTTACTCTGTTGACMGTAATAAGTTGCAACATC-3′
1756 CL4Ü 5′-CCAGCTGTTACTCTGTTGRCAGTAATAAGTTGCAAAATC-3′
1757 CL5Ü 5′-CCAGCTGTTACTCTGTTGACAGTAATAARCTGCAAAATC-3′
1758 CL6Ü 5′-CCAGCTGTTACTCTGTTGACARTAGTAAGTTGCAAAATC-3′
1759 CL7Ü 5′-CCAGCTGTTACTCTGTTGGCAGTAATAAACTCCAAMATC-3′
1760 CL8Ü 5′-CCAGCTGTTACTCTGTTGGCAGTAATAAACCCCGACATC-3′
1761 CL9Ü 5′-CCAGCTGTTACTCTGTTGACAGAAGTAATATGCAGCATC-3′
1762 CL10Ü 5′-CCAGCTGTTACTCTGTTGACAGTAATATGTTGCAATATC-3′
1763 CL11Ü 5′-CCAGCTGTTACTCTGTTGACAGTAATACACTGCAAAATC-3′
1764 CL12Ü 5′-CCAGCTGTTACTCTGTTGACAGTAATAAACTGCCACATC-3′
1765 DL1 5′-CAGAGTAACAGCTGGCCGCTCACGTTYGGCCARGGGACCAAGSTG-3′
1766 DL2 5′-CAGAGTAACAGCTGGCCGCTCACGTTCGGCCAAGGGACACGACTG-3′
1767 DL3 5′-CAGAGTAACAGCTGGCCGCTCACGTTCGGCCCTGGGACCAAAGTG-3′
1768 DL4 5′-CAGAGTAACAGCTGGCCGCTCACGTTCGGCGGAGGGACCAAGGTG-3′
1769 DL1Ü 5′-GATGAAGACAGATGGTGCAGCCACAGTACGTTTGATYTCCACCTTGG-3′
1770 DL2Ü 5′-GATGAAGACAGATGGTGCAGCCACAGTACGTTTGATCTCCAGCTTGG-3′
1771 DL3Ü 5′-GATGAAGACAGATGGTGCAGCCACAGTACGTTTGATATCCACTTTGG-3′
1772 DL4Ü 5′-GATGAAGACAGATGGTGCAGCCACAGTACGTTTAATCTCCAGTCGTG-3′

【表６５】

表 65. mAb B233 重鎖 CDR とヒト生殖系列重鎖フレームワークとの融合のために用いたオリゴヌクレオチド

1640 AH1 5′-GCTGGTGGTGCCGTTCTATAGCCATAGCCAGGTKCAGCTGGTGCAGTCT-3′
1641 AH2 5′-GCTGGTGGTGCCGTTCTATAGCCATAGCGAGGTGCAGCTGKTGGAGTCT-3′
1642 AH3 5′-GCTGGTGGTGCCGTTCTATAGCCATAGCCAGSTGCAGCTGCAGGAGTCG-3′
1643 AH4 5′-GCTGGTGGTGCCGTTCTATAGCCATAGCCAGGTCACCTTGARGGAGTCT-3′
1644 AH5 5′-GCTGGTGGTGCCGTTCTATAGCCATAGCCARATGCAGCTGGTGCAGTCT-3′
1645 AH6 5′-GCTGGTGGTGCCGTTCTATAGCCATAGCGARGTGCAGCTGGTGSAGTC-3′
1646 AH7 5′-GCTGGTGGTGCCGTTCTATAGCCATAGCCAGATCACCTTGAAGGAGTCT-3′
1647 AH8 5′-GCTGGTGGTGCCGTTCTATAGCCATAGCCAGGTSCAGCTGGTRSAGTCT-3′
1648 AH9 5′-GCTGGTGGTGCCGTTCTATAGCCATAGCCAGGTACAGCTGCAGCAGTCA-3′
1649 AH10 5′-GCTGGTGGTGCCGTTCTATAGCCATAGCCAGGTGCAGCTACAGCAGTGG-3′
1650 AH1Ü 5′-GTTCATGGAGTAATCRGTGAAGGTGTATCCAGAAGC-3′
1651 AH2Ü 5′-GTTCATGGAGTAATCGCTGAGTGAGAACCCAGAGAM-3′
1652 AH3Ü 5′-GTTCATGGAGTAATCACTGAARGTGAATCCAGAGGC-3′
1653 AH4Ü 5′-GTTCATGGAGTAATCACTGACGGTGAAYCCAGAGGC-3′
1654 AH5Ü 5′-GTTCATGGAGTAATCGCTGAYGGAGCCACCAGAGAC-3′
1655 AH6Ü 5′-GTTCATGGAGTAATCRGTAAAGGTGWAWCCAGAAGC-3′
1656 AH7Ü 5′-GTTCATGGAGTAATCACTRAAGGTGAAYCCAGAGGC-3′
1657 AH8Ü 5′-GTTCATGGAGTAATCGGTRAARCTGTAWCCAGAASC-3′
1658 AH9Ü 5′-GTTCATGGAGTAATCAYCAAAGGTGAATCCAGARGC-3′
1659 AH10Ü 5′-GTTCATGGAGTAATCRCTRAAGGTGAATCCAGASGC-3′
1660 AH11Ü 5′-GTTCATGGAGTAATCGGTGAAGGTGTATCCRGAWGC-3′
1661 AH12Ü 5′-GTTCATGGAGTAATCACTGAAGGACCCACCATAGAC-3′
1662 AH13Ü 5′-GTTCATGGAGTAATCACTGATGGAGCCACCAGAGAC-3′
1663 AH14Ü 5′-GTTCATGGAGTAATCGCTGATGGAGTAACCAGAGAC-3′
1664 AH15Ü 5′-GTTCATGGAGTAATCAGTGAGGGTGTATCCGGAAAC-3′
1665 AH16Ü 5′-GTTCATGGAGTAATCGCTGAAGGTGCCTCCAGAAGC-3′
1666 AH17Ü 5′-GTTCATGGAGTAATCAGAGACACTGTCCCCGGAGAT-3′
1667 BH1 5′-GATTACTCCATGAACTGGGTGCGACAGGCYCCTGGA-3′
1668 BH2 5′-GATTACTCCATGAACTGGGTGCGMCAGGCCCCCGGA-3′
1669 BH3 5′-GATTACTCCATGAACTGGATCCGTCAGCCCCCAGGR-3′
1670 BH4 5′-GATTACTCCATGAACTGGRTCCGCCAGGCTCCAGGG-3′
1671 BH5 5′-GATTACTCCATGAACTGGATCCGSCAGCCCCCAGGG-3′
1672 BH6 5′-GATTACTCCATGAACTGGGTCCGSCAAGCTCCAGGG-3′
1673 BH7 5′-GATTACTCCATGAACTGGGTCCRTCARGCTCCRGGR-3′
1674 BH8 5′-GATTACTCCATGAACTGGGTSCGMCARGCYACWGGA-3′
1675 BH9 5′-GATTACTCCATGAACTGGKTCCGCCAGGCTCCAGGS-3′
1676 BH10 5′-GATTACTCCATGAACTGGATCAGGCAGTCCCCATCG-3′
1677 BH11 5′-GATTACTCCATGAACTGGGCCCGCAAGGCTCCAGGA-3′
1678 BH12 5′-GATTACTCCATGAACTGGATCCGCCAGCACCCAGGG-3′
1679 BH13 5′-GATTACTCCATGAACTGGGTCCGCCAGGCTTCCGGG-3′
1680 BH14 5′-GATTACTCCATGAACTGGGTGCGCCAGATGCCCGGG-3′
1681 BH15 5′-GATTACTCCATGAACTGGGTGCGACAGGCTCGTGGA-3′
1682 BH16 5′-GATTACTCCATGAACTGGATCCGGCAGCCCGCCGGG-3′
1683 BH17 5′-GATTACTCCATGAACTGGGTGCCACAGGCCCCTGGA-3′
1684 BH1Ü 5′-TGTGTAATCATTAGCTTTGTTTCTAATAAATCCCATCCACTCAAGCCYTTG-3′
1685 BH2Ü 5′-TGTTGTGTAATCATTAGCTTTGTTTCTAATAAATCCCATCCACTCAAGCSCTT-3′

1686 BH3Ü 5′-TGTTGTGTAATCATTAGCTTTGTTTCTAATAAAWGAGACCCACTCCAGCCCCTT-3′
1687 BH4Ü 5′-TGTTGTGTAATCATTAGCTTTGTTTCTAATAAACCCAATCCACTCCAGKCCCTT-3′
1688 BH5Ü 5′-TGTTGTGTAATCATTAGCTTTGTTTCTAATAAATGAGACCCACTCCAGRCCCTT-3′
1689 BH6Ü 5′-TGTTGTGTAATCATTAGCTTTGTTTCTAATAAAGCCAACCCACTCCAGCCCYTT-3′
1690 BH7Ü 5′-TGTTGTGTAATCATTAGCTTTGTTTCTAATAAAKGCCACCCACTCCAGCCCCTT-3′
1691 BH8Ü 5′-TGTTGTGTAATCATTAGCTTTGTTTCTAATAAATCCCAGCCACTCAAGGCCTC-3′
1692 BH9Ü 5′-TGTTGTGTAATCATTAGCTTTGTTTCTAATAAACCCCATCCACTCCAGGCCTT-3′
1693 BH10Ü 5′-TGTTGTGTAATCATTAGCTTTGTTTCTAATAAATGARACCCACWCCAGCCCCTT-3′
1694 BH11Ü 5′-TGTTGTGTAATCATTAGCTTTGTTTCTAATAAAMGAKACCCACTCCAGMCCCTT-3′
1695 BH12Ü 5′-TGTTGTGTAATCATTAGCTTTGTTTCTAATAAAYCCMATCCACTCMAGCCCYTT-3′
1696 1BH13Ü 5′-TGTTGTGTAATCATTAGCTTTGTTTCTAATAAATCCTATCCACTCAAGGCGTTG-3′
1697 BH14Ü 5′-TGTTGTGTAATCATTAGCTTTGTTTCTAATAAATGCAAGCCACTCCAGGGCCTT-3′
1698 BH15Ü 5′-TGTTGTGTAATCATTAGCTTTGTTTCTAATAAATGAAACATATTCCAGTCCCTT-3′
1699 BH16Ü 5′-TGTTGTGTAATCATTAGCTTTGTTTCTAATAAACGATACCCACTCCAGCCCCTT-3′
1700 CH1 5′-GCTAATGATTACACAACAGAGTACAGTGCATCTGTGAAGGGTAGAGTCACCATGACCAGGRAC-3′
1701 CH2 5′-GCTAATGATTACACAACAGAGTACAGTGCATCTGTGAAGGGTAGGCTCACCATCWCCAAGGAC-3′
1702 CH3 5′-GCTAATGATTACACAACAGAGTACAGTGCATCTGTGAAGGGTCGAGTYACCATATCAGTAGAC-3′
1703 CH4 5′-GCTAATGATTACACAACAGAGTACAGTGCATCTGTGAAGGGTCGATTCACCATCTCCAGRGAC-3′
1704 CH5 5′-GCTAATGATTACACAACAGAGTACAGTGCATCTGTGAAGGGTAGATTCACCATCTCMAGAGA-3′
1705 CH6 5′-GCTAATCATTACACAACAGAGTACAGTGCATCTGTGAAGGGTMGGTTCACCATCTCCAGAGA-3′
1706 CH7 5′-GCTAATGATTACACAACAGAGTACAGTGCATCTGTGAAGGGTCGATTCAYCATCTCCAGAGA-3′
1707 CH8 5′-GCTAATGATTACACAACAGAGTACAGTGCATCTGTGAAGGGTCGAGTCACCATRTCMGTAGAC-3′
1708 CH9 5′-GCTAATGATTACACAACAGAGTACAGTGCATCTGTGAAGGGTAGRGTCACCATKACCAGGGAC-3′
1709 CH10 5′-GCTAATGATTACACAACAGAGTACAGTGCATCTGTGAAGGGTCAGGTCACCATCTCAGCCGAC-3′
1710 CH11 5′-GCTAATGATTACACAACAGAGTACAGTGCATCTGTGAAGGGTCGAATAACCATCAACCCAGAC-3′
1711 CH12 5′-CTAATGATTACACAACAGAGTACAGTGCATCTGTGAAGGGTCGGTTTGTCTTCTCCATGGAC-3′
1712 CH13 5′-GCTAATGATTACACAACAGAGTACAGTGCATCTGTGAAGGGTAGAGTCACCATGACCGAGGAC-3′
1713 CH14 5′-GCTAATGATTACACAACAGAGTACAGTGCATCTGTGAAGGGTAGAGTCACGATTACCGCGGAC-3′
1714 CH15 5′-GCTAATGATTACACAACAGAGTACAGTGCATCTGTGAAGGGTAGAGTCACCATGACCACAGAC-3′
1715 CH1Ü 5′-GTCCATAGCATGATACCTAGGGTATCTAGYACAGTAATACACGGC-3′
1716 CH2Ü 5′-GTCCATAGCATGATACCTAGGGTATCTCGCACAGTAATACAYGGC-3′
1717 CH3Ü 5′-GTCCATAGCATGATACCTAGGGTATCTYGCACAGTAATACACAGC-3′
1718 CH4Ü 5′-GTCCATAGCATGATACCTAGGGTATGYYGCACAGTAATACACGGC-3′
1719 CH5Ü 5′-GTCCATAGCATGATACCTAGGGTACCGTGCACARTAATAYGTGGC-3′
1720 CH6Ü 5′-GTCCATAGCATGATACCTAGGGTATCTGGCACAGTAATACACGGC-3′
1721 CH7Ü 5′-GTCCATAGCATGATACCTAGGGTATGTGGTACAGTAATACACGGC-3′
1722 CH8Ü 5′-GTCCATAGCATGATACCTAGGGTATCTCGCACAGTGATACAAGGC-3′
1723 CH9Ü 5′-GTCCATAGCATGATACCTAGGGTATTTTGCACAGTAATACAAGGC-3′
1724 CH10Ü 5′-GTCCATAGCATGATACCTAGGGTATCTTGCACAGTAATACATGGC-3′
1725 CH11Ü 5′-GTCCATAGCATGATACCTAGGGTAGTGTGCACAGTAATATGTGGC-3′
1726 CH12Ü 5′-GTCCATAGCATGATACCTAGGGTATTTCGCACAGTAATATACGGC-3′
1727 CH13Ü 5′-GTCCATAGCATGATACCTAGGGTATCTCACACAGTAATACACAGC-3′
1728 DH1 5′-CCTAGGTATCATGCTATGGACTCCTGGGGCCARGGMACCCTGGTC-3′
1729 DH2 5′-CCTAGGTATCATGCTATGGACTCCTGGGGSCAAGGGACMAYGGTC-3′
1730 DH3 5′-CCTAGGTATCATGCTATGGACTCCTGGGGCCGTGGCACCCTGGTC-3′
1731 DH1Ü 5′-GGAAGACCGATGGGCCCTTGGTGGAGGCTGAGGAGACRGTGACCAGGGT-3′
1732 DH2Ü 5′-GGAAGACCGATGGGCCCTTGGTGGAGGCTGARGAGACGGTGACCRTKGT-3′
1733 DH3Ü 5′-GGAAGACCGATGGGCCCTTGGTGGAGGCTGAGGAGACGGTGACCAGGGT-3′

【０４５８】

5.3.2 V_HおよびV_Lサブライブラリーの構築

V_L subl1サブライブラリーは、オーバーラップ伸長によるポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を用いて順次アセンブルした。Hoら, Gene 77:51-59 (1989)。より詳細には、対応するドナーCDRの部分とin frame融合された個々のヒト生殖系列フレームワークを合成するために、次のオリゴヌクレオチドの組合せを用いて、いわゆる「中間体」PCRを行った：第１、第２、第３および第４フレームワークについて、それぞれAL1～13/AL1U～10U/1～46、BL1～10/BL1U～16U/47～92、CL1～11/CL1U～12U/93～138およびDL1～4/DL1U～4U/139～143。これは100μl容量中のpfu DNAポリメラーゼ(PCR SuperMix, Invitrogen)および約5 pmolのオリゴヌクレオチドAL1～13、AL1U～10U、BL1～10、BL1U～16U、CL1～11、CL1U～12U、DL1～4およびDL1U～4U、ならびに約100 pmolのオリゴヌクレオチド1～143を用いて実施した。PCRプログラムは、95℃で5分；94℃で1分、45℃で1分、72℃で1分を30サイクル、その後72℃で8分とした。次に、２回目のPCR（「アセンブリPCR」）を実施するために、100μl反応容量中のpfu DNAポリメラーゼ(PCR SuperMix, Invitrogen)、0.5～2μlずつの「中間体」PCR、25 pmolずつのオリゴヌクレオチドDL1U、DL2U、DL3U、DL4U (表64参照)および100 pmolのビオチン化オリゴヌクレオチド5’-GGTCGTTCCATTTTACTCCCAC-3’(配列番号1734)を使用した。アセンブリPCR プログラムは、95℃で5分；94℃で30秒、50℃で30秒

、72℃で45秒を30サイクル、その後72℃で8分とした。

【０４５９】

V_H sub1、V_H sub2およびV_L sub2フレームワークシャフル型サブライブラリーもオーバーラップ伸長によるPCRを用いて合成した。Hoら, Gene 77:51-59 (1989)。このフレームワークシャフル型V_HおよびV_L遺伝子の全in vitro合成は本質的に記載されるとおりに行った。Wuら, Methods Mol. Biol. 207: 213-233 (2003)。簡単に説明すると、最初のいわゆる「融合PCR」はpfu DNAポリメラーゼ (PCR SuperMix, Invitrogen)を用いて行った。V_H sub1の構築は、100μl反応容量中の約3～10 pmolの各オリゴヌクレオチド（表５、６、７、11および65に記載）を用いて実施した。V_H sub2の構築は、100μl反応容量中の約0.5 pmolの各オリゴヌクレオチド（表５、６、７、11および65に記載）を用いて実施した。V_L sub2の構築は、100μl反応容量中の約0.5 pmolの各オリゴヌクレオチド（表１、２、３、４および64に記載）を用いて実施した。それぞれのV_H sub1、V_H sub2およびV_L sub2サブライブラリーに関して、融合PCRプログラムは、95℃で1分；94℃で20秒、50℃で30秒、72℃で30秒を5サイクル；94℃で20秒、55℃で30秒、72℃で30秒を25サイクル、その後72℃で7分とした。続いて２回目のいわゆる「合成PCR」を行った。より詳細には、V_H sub1およびV_H sub2サブライブラリーは、100μl反応容量中のpfu DNAポリメラーゼ (PCR SuperMix, Invitrogen)、2～3 μlの対応する「融合PCR」、30 pmolずつのオリゴヌクレオチドDH1U、DH2U、DH3U (表65参照)、および100 pmolのビオチン化オリゴヌクレオチド5’-GCTGGTGGTGCCGTTCTATAGCC-3’(配列番号1735) を用いて合成した。V_L sub2サブライブラリーは、100μl反応容量中のpfu DNAポリメラーゼ(PCR SuperMix, Invitrogen)、3 μlの対応する「融合PCR」、25 pmolずつのオリゴヌクレオチドDL1U、DL2U、DL3U、DL4U (表64参照)、および100 pmolのビオチン化オリゴヌクレオチド5’-GGTCGTTCCATTTTACTCCCAC-3’(配列番号1734) を用いて合成した。それぞれのV_H sub1、V_H sub2およびV_L sub2サブライブラリーに関して、合成PCRプログラムは、94℃で5分；94℃で1分、45℃で1分、72℃で1分を30サイクル、その後72℃で8分とした。

【０４６０】

5.3.3 V_L-12C8およびV_L-8G7遺伝子の合成

ライブラリーB (V_L-12C8+V_L-8G7+V_H sub1)に関連して用いられる、V_L-12C8およびV_L-8G7軽鎖遺伝子は、それぞれ12C8for/12C8backおよび8G7for/8G7backのオリゴヌクレオチド組合せを用いて対応するV領域コード化M13ファージベクター（§§5.4.1.1、5.4.1.2、5.4.1.3参照）からPCRにより合成した（下記参照）。

【０４６１】

12C8for 5’-**GGTCGTTCCATTTTACTCCCACTCC**GCCATCCAGTTGACTCAGTCTCC-3’(ビオチン化) (配列番号 1736)

12C8back 5’-
GATGAAGACAGATGGTGCAGCCACAGTACGTTTGATCTCCAGCTTGGTCCCTCC-3’
(配列番号 1737)

8G7for 5’-**GGTCGTTCCATTTTACTCCCACTCC**GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAG-3’ (ビオチン化) (配列番号 1738)

8G7back 5’-
GATGAAGACAGATGGTGCAGCCACAGTACGTTTGATATCCACTTTGGTCCCTC-3’ (配列番号 1739)

【０４６２】
オリゴヌクレオチド12C8forおよび8G7forはM13遺伝子3リーダー重複配列（太字）を含む。オリゴヌクレオチド8G7backおよび12C8backはCκ重複配列（下線）を含む。
【０４６３】
5.3.4　V_H-233およびV_L-233遺伝子の合成
キメラFab陽性対照(V_H-233+V_L-233)またはライブラリーA（V_L sub1+V_H-233)との関連で用いられるV_H-233およびV_L-233重鎖および軽鎖遺伝子は、PCRでそれぞれ233Hfor/233Hbackおよび233Lfor/233Lbackオリゴヌクレオチド組合せを用いて、対応するpSTBlue-1（§ 5.1参照)ベクターから合成した（下記参照）。
【０４６４】

233Hfor 5'-
GCTGGTGGTGCCGTTCTATAGCCATAGCGAGGTGAAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAG-3' (ビオチン化) (配列番号 1740)

233Hback 5'-
GGAAGACCGATGGGCCCTTGGTGGAGGCTGAGGAGACGGTGACTGAGGTTCCTTG-3' (配列番号 1741)

233Lfor 5'-
GGTCGTTCCATTTTACTCCCACTCCGATATTGTGCTAACTCAGTCTCCAGCCACCCTG-3' (ビオチン化) (配列番号 1742)

233Lback 5'-
GATGAAGACAGATGGTGCAGCCACAGTACGTTTCAGCTCCAGCTTGGTCCCAGCACCG AACG-3' (配列番号 1743)

【０４６５】
オリゴヌクレオチド233Hforおよび233LforはM13遺伝子3リーダー重複配列（太字）を含む。オリゴヌクレオチド233HbackはCκ$_1$重複配列（下線）を含む。オリゴヌクレオチド233LbackはCκ重複配列（下線）を含む。
【０４６６】
5.3.5　ファージ発現ベクターへの各種V領域のクローニング
ライブラリーA、BおよびC、ならびにmAb B233のキメラFab型は、M13系ファージ発現ベクターにクローニングした。このベクターは、lacZプロモーターの制御下でヒトγ1重鎖の第1定常ドメインとヒトκ軽鎖の定常ドメインを含むFabフラグメントの発現を可能にする（図２）。クローニングは、ハイブリダイゼーション変異誘発（Kunkelら, Methods Enzymol. 154:367-382 (1987)）を用いて、Wuら, Methods Mol. Biol. 207: 213-233 (2003)に記載されるように行った。簡単に述べると、対象となる各種V領域に対応するマイナス一本鎖DNA（§5.3.2、§5.3.3および§5.3.4参照）を最終PCR産物からエタノール沈殿により精製したが、それに先だって、二本鎖PCR産物を水酸化ナトリウムにより解離させ、記載（H. Wuら, Methods Mol. Biol. 207: 213-233(2003); H. Wu, Methods Mol. Biol. 207: 197-212 (2003)）のとおりにストレプトアビジンコーティング磁性ビーズによりビオチン化鎖を除去した。等モル量の異なるマイナス鎖を次のように混合した：ライブラリーA、ライブラリーB、ライブラリーC、およびキメラFab 233を構築するために、それぞれV_H-233/V_L sub1、V_H sub1/V_L-8G7/V_L-12C8、V_H sub2/V_L sub2、およびV_H-233 /V_L-233。その後、これらの異なる混合物を、それぞれ１つのパリンドロームループを含む該ベクタ

ーの２つの領域に個別にアニールさせた。これらのループはユニークなXbaI部位を含み、これにより、ヒトκ定常領域および第１ヒトγ定常領域とそれぞれin frame融合されたV_L鎖とV_H鎖の両方を含むベクターの選択が可能となる。次に、合成されたDNAを、Wuら，Methods Mol. Biol. 207: 213-233 (2003)に記載されるように、XL1-Blue菌叢上でのプラーク形成またはFabフラグメントの生産のためにXL1-Blueにエレクトロポレーションした。

【０４６７】

5.4 ライブラリーのスクリーニング

5.4.1 一次スクリーニング

5.4.1.1 説明

一次スクリーニングはシングルポイントELISA (single point ELISA: SPE)からなり、これは、本質的にWuら，Methods Mol. Biol. 207: 213-233 (2003)に記載されるように、96深底ウェルプレートで増殖させて個々の組換えM13クローン（§5.3.5参照）を感染させた、1 mLの細菌培養物から調製したペリプラズム（周辺細胞質）抽出物を用いて行った。簡単に述べると、96ウェルMaxisorp Immunoplateの各ウェルに20～500 ngのヤギ抗ヒトFab抗体をコーティングし、3% BSA/PBSを用いて37℃で2時間ブロックし、その後サンプル（ペリプラズムに発現されたFab）と共に室温で１時間インキュベートした。次に、300 ng/ウェルのビオチン化ヒトEphA2-Fcを室温で１時間添加した。続いて、neutravidin-ホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)コンジュゲートと共に室温で40分間インキュベートした。HRP活性をテトラメチルベンジジン(TMB)基質により検出し、この反応を0.2 M H_2SO_4で停止させた。プレートを450 nmで読み取った。

【０４６８】

5.4.1.2 一次スクリーニングの結果

100 ngのヤギ抗ヒトFab捕捉試薬を用いてスクリーニングしたライブラリーAからの約500個のクローンのうち、14個が有意なシグナル（OD_{450}が0.2～0.6）を示した。これは、典型的には、無関係な抗体（MEDI-493; S. Johnsonら，J. Infect. Dis. 176: 1215-1224 (1997)）の対応するバックグラウンドシグナル（OD_{450}が0.1～0.4）を少なくとも1.3倍上回るシグナルに相当した。こうした条件下で、Fab 233は0.4～0.6のOD_{450}を示した。

【０４６９】

20 ngのヤギ抗ヒトFab捕捉試薬を用いてスクリーニングしたライブラリーAからの約200個のクローンのうち、４個が有意なシグナル（OD_{450}が0.2～0.4）を示した。これは、典型的には、無関係な抗体の対応するバックグラウンドシグナル（OD_{450}が0.1）を少なくとも２倍上回るシグナルに相当した。こうした条件下で、Fab 233は0.2～0.3のOD_{450}を示した。

【０４７０】

500 ngのヤギ抗ヒトFab捕捉試薬を用いてスクリーニングしたライブラリーAからの約750個のクローンのうち、16個が有意なシグナル（OD_{450}が0.1～0.7）を示した。これは、典型的には、無関係な抗体の対応するバックグラウンドシグナル（OD_{450}が0.06～0.2）を少なくとも1.3倍上回るシグナルに相当した。こうした条件下で、Fab 233は0.1～0.6のOD_{450}を示した。クローンV_H-233/V_L-12C8およびV_H-233/V_L-8G7が今回のスクリーニングから単離され、両方とも0.4のOD_{450}を示した（同プレートのバックグラウンドOD_{450}値はそれぞれ0.1および0.2であった；同プレートのFab 233 OD_{450}値はそれぞれ0.2および0.5であった）。

【０４７１】

500 ngのヤギ抗ヒトFab捕捉試薬を用いてスクリーニングしたライブラリーBからの約750個のクローンのうち、27個が有意なシグナル（OD_{450}が0.3～2.8）を示した。これは、典型的には、無関係な抗体の対応するバックグラウンドシグナル（OD_{450}が0.2～0.3）を少なくとも1.3倍上回るシグナルに相当した。こうした条件下で、V_H-233/V_L-12C8およびV_H-233/V_L-8G7は0.2～0.4のOD_{450}値を示した。クローンV_H-2G6/V_L-12C8、V_H-6H11/V_L-8G7およびV_H-7E8/V_L-8G7が今回のスクリーニングから単離され、それぞれ2.8、2.5および1.6のOD_{450}値を示した。（同プレートのバックグラウンドOD_{450}値はそれぞれ0.3、0.2および0.

2であった；同プレートのV_H-233/V_L-12C8 OD_{450}値はそれぞれ0.4、0.3および0.3であった；同プレートのV_H-233/V_L-8G7 OD_{450}値はそれぞれ0.4、0.3および0.3であった）。

【０４７２】

500 ngのヤギ抗ヒトFab捕捉試薬を用いてスクリーニングしたライブラリーCからの約1150個のクローンのうち、36個が有意なシグナル（OD_{450}が0.1～0.3）を示した。これは、典型的には、無関係な抗体の対応するバックグラウンドシグナル（OD_{450}が0.07～0.1）を少なくとも1.3倍上回るシグナルに相当した。こうした条件下で、Fab 233は0.1～0.2のOD_{450}を示した。

【０４７３】

5.4.1.3　陽性クローンの評価

まとめて、ライブラリーAからの９個のクローン、ライブラリーBからの７個のクローン、そしてライブラリーCからの０個のクローンが、第２の独立したシングルポイントELISAで、15 mLの細菌培養物から調製したペリプラズム抽出物と500 ngのヤギ抗ヒトFab捕捉試薬を用いて再確認された。詳細には、中でも最も高い［特異的OD_{450}/バックグラウンドOD_{450}］比（約15～50の範囲）を示した、ライブラリーAからの２個のクローン（V_H-233/V_L-12C8およびV_H-233/V_L-8G7）を、ABI3000 ゲノムアナライザを使ってジデオキシ塩基配列決定によりさらに特徴づけた。クローンV_H-233/V_L-12C8のDNA配列解析は、その重鎖が塩基104に単一塩基置換を含み、その結果として位置H35（Kabatナンバリング）に置換（NからS）が生じていることを明らかにした。この変異は、QuickChange XL 部位特異的変異誘発キット（Stratagene, La Jolla, CA）を用いて製造業者の使用説明書に従って修正された。この修正クローンV_H-233/V_L-12C8は、最大で約50（変異型V_H-233/V_L-12C8と類似）の［特異的OD_{450}/バックグラウンドOD_{450}］比を示し、EphA2-Fcとの結合を保持していた。部分的にヒト化されたクローンV_H-233/V_L-12C8およびV_H-233/V_L-8G7はその後、二次スクリーニングによるさらなる特徴付けのために選択された（§5.4.2参照）。V_L-12C8およびV_L-8G7の配列を図３に示す。上述したように、これら２つのヒト化軽鎖はその後ライブラリーBの設計に加えられた。中でも最も高い［特異的OD_{450}/バックグラウンドOD_{450}］比（約40）を示した、このライブラリーからの３個のクローンは、ジデオキシ塩基配列決定によりさらに特徴づけた。これは、３つの異なるヒト化重鎖（V_H-2G6、V_H-6H11およびV_H-7E8; 図３参照）の同定をもたらした。V_H-2G6、V_H-6H11およびV_H-7E8は、それぞれV_L-12C8、V_L-8G7およびV_L-8G7と対を形成することが分かった。これら３個の、十分にヒト化されたクローンはその後、二次スクリーニングによるさらなる特徴付けのために選択された（§5.4.2参照）。

【０４７４】

5.4.2　二次スクリーニング

5.4.2.1　説明

先に同定したヒト化クローン（§5.4.1.3参照）をさらに特徴付けるために、15 mLの細菌培養物から調製したペリプラズム抽出物中の発現されたFabフラグメントを用いて二次スクリーニングを実施した。より詳細には、２つのELISAを使用した：（i）機能的ELISA、ここでは、96ウェルMaxisorp Immunoplateの各ウェルに500 ngのヒトEphA2-Fcをコーティングして、3% BSA/PBSを用いて37℃で2時間ブロックした。次に、２倍連続希釈したサンプルを加え、室温で１時間インキュベートした。その後、ヤギ抗ヒトκホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)コンジュゲートとのインキュベーションを行った。HRP活性をTMB基質により検出し、0.2 M H_2SO_4で反応を停止させた。プレートを450 nmで読み取った；（ii）抗ヒトFab定量ELISA、これは本質的にWuら, Methods Mol. Biol. 207: 213-233 (2003)に記載されるとおりに実施した。簡単に説明すると、96ウェルImmulon Immunoplateの各ウェルに100 ngのヤギ抗ヒトFab抗体をコーティングし、次に２倍連続希釈したサンプル（1/25 希釈で開始）または標品（ヒトIgG Fab、500-3.91 ng/ml）と共にインキュベートした。その後、ヤギ抗ヒトκホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)コンジュゲートとのインキュベーションを行った。HRP活性をTMB基質により検出し、0.2 M H_2SO_4で反応を停止させた。プレートを450 nmで読み取った。

【０４７５】

5.4.2.2　二次スクリーニングの結果

２部の二次ELISAスクリーニングにより、ヒトEphA2との結合に関してFabクローンV_H-233/V_L-12C8、V_H-233/V_L-8G7、V_H-2G6/V_L-12C8、V_H-6H11/V_L-8G7およびV_H-7E8/V_L-8G7を互いに比較し、さらにmAb B233のキメラFab (V_H-233/V_L-233)と比較することができた。図４に示すように、全てのフレームワークシャフル型Fabは、mAb B233のキメラFabと比較して、ヒトEphA2との結合を保持している。興味深いことに、重鎖と軽鎖が両方ともヒト化されている一部のクローン（V_H-2G6/V_L-12C8およびV_H-7E8/V_L-8G7）は、同じ軽鎖のみがヒト化されているクローン（V_H-233/V_L-12C8およびV_H-233/V_L-8G7）よりも良好なヒトEphA2-Fcへの見かけの結合を示す。このことは、最適な抗原結合のために、所定のヒト化軽鎖との関連においてヒト化重鎖を特異的に選択するプロセスが存在することを示している。十分にヒト化された分子をさらに特徴付けるために、クローンV_H-2G6/V_L-12C8、V_H-6H11/V_L-8G7およびV_H-7E8/V_L-8G7、ならびにmAb B233のキメラ体（V_H-233/V_L-233）をその後クローニングして、全長ヒトIgG1として発現させた（§5.5参照）。

【０４７６】

5.5　ヒトIgG1型でのmAb B233の各種ヒト化型のクローニング、発現および精製

フレームワークシャフル型クローンV_H-2G6、V_H-6H11、V_H-7E8、V_L-12C8およびV_L-8G7の可変領域、ならびにV_H-233およびV_L-233の可変領域を、対応するV領域コード化M13ファージベクターから、pfu DNAポリメラーゼを用いてPCR増幅した。次いでそれらを、ヒトサイトメガロウイルス主要前初期(hCMVie)エンハンサー、プロモーターおよび5'-非翻訳領域をコードする哺乳動物発現ベクターに個々にクローニングした。M. Boshartら, Cell 41: 521-530 (1985)。この系では、ヒトγ鎖がヒトκ鎖と共に分泌される。S. Johnsonら, Infect. Dis. 176:1215-1224 (1997)。別個の構築物をヒト胚性腎(HEK)293細胞において一過性に発現させ、トランスフェクションの72時間後に回収した。分泌された可溶性ヒトIgG1は、直接1 mLのHiTrapプロテインAまたはプロテインGカラムで製造業者の使用説明書（APBiotech, Inc., Piscataway, NJ)に従って、馴らし培地から精製した。精製済みのヒトIgG1（典型的には、SDS-PAGEで判定して>95％の均一性）を2～13μg/ml(馴らし培地)の収量で回収し、リン酸緩衝溶液（PBS）に対して透析し、瞬間凍結して-70℃で貯蔵した。

【０４７７】

5.6　フレームワークシャフル型キメラおよびmAb B233 IgGのEphA2-Fcへの結合のBIAcore解析

可溶性V_H-2G6/V_L-12C8、V_H-6H11/V_L-8G7、V_H-7E8/V_L-8G7およびV_H-233/V_L-233 IgGと、ならびにmAb B233と、固定化EphA2-Fcとの相互作用は、表面プラズモン共鳴検出によりBIAcore 3000装置 (Pharmacia Biosensor, Uppsala, Sweden) を使ってモニターした。EphA2-Fcは、CM5センサーチップ (Pharmacia Biosensor) のデキストランマトリックスに、Amine Coupling Kitを用いて、記載される（B. Johnssonら, Anal. Biochem. 198: 268-277 (1991)）ように105～160 RUの表面密度でカップリングさせた。IgGは、0.15 M NaCl、3 mM EDTAおよび0.005% P20を含有する0.01 M HEPES pH 7.4中に希釈した。その後の希釈はすべて、同一のバッファーで行った。全ての結合実験は、一般的に100 nMから0.2 nMまでのIgG濃度を用いて75μL/minの流速で25℃にて行った。データを約25分間収集し、1M NaCl、50 mM NaOHの１分パルスを１回用いて表面を再生させた。また、IgGを非コーティングセル上にも流し、これらのブランク実験からのセンサーグラムを、EphA2-Fcをカップリングさせたチップを用いて得られたセンサーグラムから差し引いた。データは1:1 Langmuir結合モデルに適合させた。このアルゴリズムはk_{on}とk_{off}の両方を計算し、そこから見かけの平衡解離定数K_Dを２つの速度定数の比（k_{off} / k_{on}）として推論する。得られた値を表66に示す。

【表６６】

表 66. 各種 IgG のヒト EphA2-Fc への結合についての親和性測定 [a]

抗体	結合速度 (k_{on})[b] ($M^{-1}.s^{-1}$)	解離速度 (k_{off})[b] (s^{-1})	解離定数 (K_D)[c] (nM)
B233 (マウス)	2.8×10^5	1.1×10^{-4}	$0.4V_H$-
B233/V_L-B233 (キメラ)	2.4×10^5	8.0×10^{-5}	0.3
V_H-2G6/V_L-12C8 (ヒト化)	6.4×10^4	1.9×10^{-4}	3.0
V_H-6H11/V_L-8G7 (ヒト化)	9.6×10^4	1.8×10^{-4}	1.9
V_H-7E8/V_L-8G7 (ヒト化)	9.3×10^3	4.5×10^{-4}	48

[a]親和性測定は「方法の説明」に記載した BIAcore を用いて行った。 [b]反応速度パラメーターは 5～18 の個々の測定値の平均を表す。 [c]K_D は速度定数の比(k_{off}/k_{on})として計算した。

【０４７８】

5.7　フレームワークシャフル型変異体の解析

5.7.1　配列解析

全体的に、ヒトEphA2-Fcへの効率的な結合を支援する２つの特異なヒト化軽鎖（V_L-12C8およびV_L-8G7）と３つの特異なヒト化重鎖（V_H-2G6、V_H-6H11およびV_H-7E8）が見いだされた。ヒト化軽鎖V_L-8G7の無差別な性質は、２つの異なる重鎖（V_H-7E8およびV_H-6H11）との関係で生産的結合を媒介するその能力によって反映される。これらのヒト化変異体の全ては、対応するフレームワーク領域において高レベルのmAb B233に対する全体的アミノ酸同一性を示し、重鎖についてが76～83%、軽鎖についてが64～69%であった（図５）。このことは、高相同性のヒトフレームワークが親のキー残基を保持しているらしい、ということで説明できる。個々のフレームワークの解析は広範囲の相違を明らかにし、その相違は、V_L-12C8の第１フレームワークについての48%からV_H-2G6、V_H-6H11およびV_H-7E8の第４フレームワークについての91%までの範囲にわたる。

【０４７９】

興味深いことに、ヒト化重鎖V_H-7E8は、もっぱら、ヒトフレームワーク生殖系列配列との完全な一致を示すヒトフレームワークから成っていた（図５）。ヒト化重鎖V_H-6H11およびV_H-2G6は、関係が最も近いヒトフレームワーク生殖系列配列とのほぼ完全な一致を示す、それぞれ１つおよび２つのヒトフレームワークを含んでいた（図５）。相違は、鎖（V_H-2G6）あたり最大３個の残基となり、またフレームワーク（V_H-2G6の第１フレームワーク）あたり２個の残基となった。これらの相違は、関係が最も遠い他のヒトフレームワーク生殖系列配列には存在しないアミノ酸を決してコードしていなかった。かくして、論証上、これらのクローンも「十分にヒト化された」ということができる。ヒト化軽鎖V_L-12C8およびV_L-8G7は、関係が最も近いヒトフレームワーク生殖系列配列とのほぼ完全な一致を示す、それぞれ１つおよび３つのヒトフレームワークを含んでいた（図５）。相違の数は、鎖（V_L-8G7）あたり最大３個の残基となり、またフレームワーク（V_L-8G7の第１、第２および第４フレームワーク；V_L-12C8の第４フレームワーク）あたり１個の残基となった。しかし、ここでもまた、これらの位置の残基は、相同性が低い他のヒトフレームワーク配列にも見いだされた。したがって、これらの変異体も「十分にヒト化された」ということができる。これらの相違は我々のライブラリーには組み込まれなかったので、我々は、それらの起源がPCRの忠実度および/またはオリゴヌクレオチドの品質といった要因の組合せに起因していると考える。

【０４８０】

5.7.2　結合解析

mAb B233の軽鎖および重鎖が成功裏にヒト化された（ライブラリーAおよびB）２段階ヒト化方法によってのみ、我々がヒトEphA2-Fcへの結合を保持するヒト化クローンを単離できた、ということは全然価値がないことである。実際、軽鎖と重鎖の両方が同時にヒト化

された（ライブラリーC）ライブラリーのスクリーニングから、我々は、この抗原への検出可能な結合を示す分子を回収することができなかった。これはおそらく、最適状態に及ばないライブラリーの質、不完全なライブラリーのサンプリングおよび/またはライブラリーのタンパク質の非効率的な原核生物発現といった要因を反映している。我々は、より多数のクローンをスクリーニングすれば、ヒトEphA2への結合を保持するヒト化抗体フラグメントが同定されたであろう、と予想している。

【０４８１】

それらの同一の重鎖および軽鎖可変領域を考慮すれば予期されたように、親mAb B233とそのキメラ体IgGは事実上同一の解離定数を示した（それぞれK_D = 0.4および0.3 nM；表66）。ヒト化クローンV_H-6H11/V_L-8G7およびV_H-2G6/V_L-12C8は、ヒトIgG1型として発現させたとき、親mAb B233およびそのキメラ体に類似したヒトEphA2に対する結合活性を示した（それぞれK_D = 1.9および3.0 nM；表66）。これは、親mAb B233と比較して、それぞれ６倍および10倍という結合活性のわずかな低下に相当した。ヒト化クローンV_H-7E8/V_L-8G7は最も低い結合活性（K_D = 48 nM）を示し、これは親mAb B233と比較したとき160倍という大きな低下に相当した。EphA2-Fcへの結合強度に関して、ヒト化IgGクローンV_H-6H11/V_L-8G7、V_H-2G6/V_L-12C8およびV_H-7E8/V_L-8G7の、BIAcoreに基づくランキング（表66）が、それらのFab対応物を利用する、ELISAに基づくランキング（図４）と相違していた、ということは全然価値のないことである。これは、最低の結合活性を示した（表66）、がELISAタイトレーション（図４）では絶えず最高のシグナルを示したクローンV_H-7E8/V_L-8G7の場合に特に顕著である。我々は、この相違が何に起因するのかわからないが、それはアッセイのフォーマットおよび/または定量ELISAの不正確性に起因しうるらしいと考えている。あるいはまた、この不一致は親和性（図４において測定）と結合活性（表66において測定）の間の独特の、クローン特異的な相関関係を反映しているとも考えられる。事実、個々の２価結合性の測定は、対応する抗原結合部位の特定の空間的配置または局所的な抗原表面分布といった様々な要因に左右される（D.M. Crothersら, Immunochemistry 9: 341-357(1972); K.M. Mullerら, Anal. Biochem. 261: 49-158(1998)）。

【０４８２】

本出願は、2003年８月18日に出願された米国仮出願番号60/496,367（その開示内容を参照することによりそのまま本明細書に含めるものとする）の優先権を主張するものである。

【０４８３】

引用文献および均等物

本明細書中に引用された全ての文献は、個々の刊行物、特許または特許出願があらゆる目的のために参照することにより本明細書に組み入れられるように具体的かつ個別に示されているのと同程度に、あらゆる目的のためにその全体を参照することにより本明細書に含めるものとする。本発明の多くの修飾および変更が、その精神および範囲を逸脱することなく可能であるが、このことは当業者には明らかであろう。

【図面の簡単な説明】

【０４８４】

【図１】マウス抗ヒトEphA2モノクローナル抗体B233の重鎖および軽鎖の核酸およびタンパク質配列を示す。

【図２】フレームワークシャフリング(shuffling)ライブラリーのスクリーニング、および対応するFabフラグメントの発現に用いられるファージベクターを示す。

【図３】ライブラリーAおよびBをスクリーニングした後単離された抗ヒトEphA2モノクローナル抗体B233の、クレームワークシャフル型ヒト化クローンのタンパク質配列を示す。

【図４】固定化されたヒトEphA2-Fc上での、Fab抽出物を用いたELISAタイトレーションを示す。

【図５】フレームワークシャフル型抗体の配列解析を示す。

【図１】

V_H-233

5'GAGGTGAAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTCTCTGAGTCTCTCCTGTGCAGCTTCTGGATTCACC
TTCACTGATTACTCCATGAACTGGGTCCGCCAGCCTCCAGGGAAGGCACTTGAGTGGTTGGGTTTTATTAGAAACAAAGCTAATGA
TTACACAACAGAGTACAGTGCATCTGTGAAGGGTCGGTTCACCATCTCCAGAGATAATTCCCAAAGCATCCTCTATCTTCAAATGA
ATGCCCTGAGAGCTGAGGACAGTGCCACTTATTACTGTGTAAGATACCCTAGGTATCATGCTATGGACTCCTGGGGTCAAGGAACC
TCAGTCACCGTCTCCTCA3' （配列番号 1773)

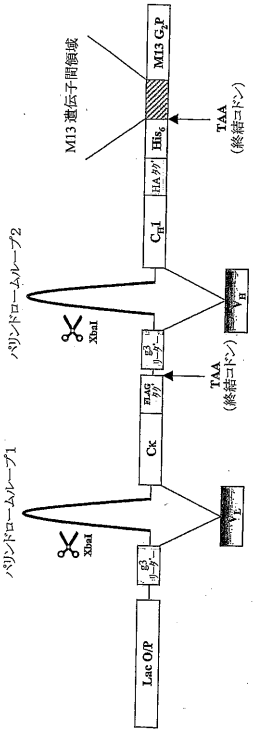
EVKLVESGGGLVQPGGSLSLSCAASGFTFTDYSMNWVRQPPGKALEWLGFIRNKANDYTTEYSASVKGRFTISRDNSQSILYLQMN
ALRAEDSATYYCVNYPRYHAMDSWGQGTSVTVSS （配列番号 1775)

V_L-233

5'GATATTGTGCTAACTCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGACTCCAGGAGATAGCGTCAATCTTTCCTGCAGGGCCAGCCAAAGT
ATTAGCAACAACCTACACTGGTATCAACAAAAATCACATGAGTCTCCAAGGCTTCTCATCAAGTATATGTTTCCAGTCCATCTCTGG
GATCCCCTCCAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCTCAGTATCAACAGTGTGGAGACTGAAGATTTTGGAATGT
ATTTCTGTCAACAGAGTAACAGCTGGCCGCTCACGTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA3' （配列番号 1774)

DIVLTQSPATLSVTPGDSVNLSCRASQSISNNLHWYQQKSHESPRLLIKYVFQSISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVETEDFGMY
FCQQSNSWPLTFGAGTKLELK （配列番号 1776)

【図２】



【図３】

重鎖

EVKLVESGGGLVQPGGSLSLSCAASGFTFTDYSMNWVRQPPGKALEWLGFIRNKANDYTTEYSASVKGRFTISRDNSQSILY 233
EVQLVESGGGVVRPGGSLRLSCAASGFTVSDYSMNWVRQAPGKGLEWIGFIRNKANDYTTEYSASVKGRFTISRDDSKNTLY 2G6
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYSMNWVRQAPGKGLEWVAFIRNKANDYTTEYSASVKGRFTISRDNSKNTLY 6H11
EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYSMNWVRQASGKGLEWVGFIRNKANDYTTEYSASVKGRFTISRDDSKNTLY 7E8

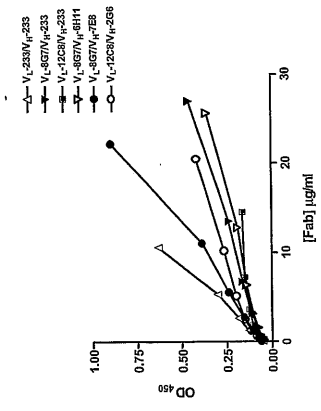
LQMNALRAEDSATYYCVNYPRYHAMDSWGQGTSVTVSS 233
LQMNSLKTEDTAVYYCTIYPRYHAMDSWGQGTMVTVSS 2G6 （配列番号 1777)
LQMNSLRAEDTAMYYCARYPRYHAMDSWGQGTLVTVSS 6H11 （配列番号 1778)
LQMNSLKTEDTAVYYCTIYPRYHAMDSWGQGTLVTVSS 7E8 （配列番号 1779)

軽鎖

DIVLTQSPATLSVTPGDSVNLSCRASQSISNNLHWYQQKSHESPRLLIKYVFQSISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVE 233
AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISNNLNWYLQKPGQSPQLLIYYVFQSISGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ 12C8
EIVLTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSISNNLHWYQQKPGKAPKSLIYYVFQSISGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLE 8G7

TEDFGMYFCQQSNSWPLTFGAGTKLELK 233
PEDFATYYCQQSNSWPLTFGGGTKLEIK 12C8 （配列番号 1780)
AEDAATYYCQQSNSWPLTFGGGTKVDIK 8G7 （配列番号 1781)

【図４】



【図５】

フレームワークシャフル型抗体の配列解析

抗体	mAb B233 との同一性(%) FR1[a]	FR2[a]	FR3[a]	FR4[a]	全体[b]	最も近いヒト V_H 生殖系列[c] FR1	FR2	FR3	FR4	最も近いヒト V_L 生殖系列[c] FR1	FR2	FR3	FR4
V_H-B233	100	100	100	100	100	VH3-48 [3][d]	VH3-72 [3][d,f]	VH3-33 [7][e]	JH3 [1]		N.A.		
V_H-2G6	80	79	66	91	76	VH3-20 [2]	VH3-72 [1][d,f]	VH3-15 [0]	JH3 [0]	-	N.A.		
V_H-6H11	90	71	78	91	83	VH3-48 [0][e]	VH3-30 [0][e]	VH3-33 [1][e]	JH4 [0]		N.A.		
V_H-7E8	87	71	66	91	77	VH3-21 [0][e]	VH3-73 [0]	VH3-15 [0]	JH4 [0]		N.A.		
V_L-B233	100	100	100	100	100		N.A			L2 [7][d,e,f]	A26 [4][e]	A26 [8][e,f]	Jκ2 [2]
V_L-12C8	48	60	72	80	64		N.A			L18 [0][e]	A18 [0][e,f]	L19 [0][e,f]	Jκ4 [1]
V_L-8G7	74	53	75	60	69		N.A.			L2 [1][e,f]	O2 [1][e,f]	A26 [0][e]	Jκ4 [1]

[a]アミノ酸レベルでの同一性は、基準として mAb B233 を用いて個々のフレームワークについて計算した。[b]アミノ酸レベルでの同一性は、基準として mAb B233 を用いて 4 つ全てを合わせたフレームワークについて計算した。[c]対応する抗体フレームワークに対して最高の相同性を有するヒト生殖系列フレームワーク。[d]個々のフレームワークについて、最も相同性の高いヒト生殖系列フレームワークと比較した時のアミノ酸の相違数をカッコ内に示す。[e]同様の相同性を示す、少なくとも 1 つの他の同ファミリーのヒト生殖系列フレームワークが存在する。[f]同様の相同性を示す、少なくとも 1 つの他の異なるファミリーのヒト生殖系列フレームワークが存在する。FR:フレームワーク。N.A.:適用できない。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI		
C12N	*1/19*	*(2006.01)*	C12N	1/19	
C12N	*1/21*	*(2006.01)*	C12N	1/21	
C12N	*5/10*	*(2006.01)*	C12N	5/00	101
C40B	*40/08*	*(2006.01)*	C40B	40/08	
C40B	*50/06*	*(2006.01)*	C40B	50/06	
C40B	*30/04*	*(2006.01)*	C40B	30/04	

(72)発明者 ダムシュローダー, メリッサ
アメリカ合衆国 ２０８７４ メリーランド州, ジャーマンタウン, スティープル コート ４３
(72)発明者 ウー, ヘレン
アメリカ合衆国 ２０８４１ メリーランド州, ボイズ, ハーベスト ムーン ロード １４４０５

審査官 伊達 利奈

(56)参考文献 国際公開第２００３／００２６０７（WO, Ａ１）
JOHNSON SYD, JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES, 米国, １９９７年, V176 N5, P1215-1224
Protein Engineering, 2000, Vol.13, No.5, pp.353-360
Journal of Experimental Medicine, 1998, Vol.188, No.11, pp.2151-2162
Immunology Today, 1993, Vol.14, No.6, pp.243-246
Journal of Biological Chemistry, 1996, Vol.271, No.37, pp.22611-22618
Proceedings of the National Academy of Sciences of USA, 1991, Vol.88, pp.11120-11123
CLACKSON T, NATURE, 英国, NATURE PUBLISHING GROUP, １９９１年 ８月１５日, V352, P624-628
WJ HARRIS C., ANTIBODY THERAPEUTICS, RG LANDES COMPANY, １９９５年, P85-110
Journal of Immunology, 2002, Vol.169, pp.1119-1125

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
C12N 15/00-15/90
C07K 16/00-16/46
C40B 30/00-30/10
C40B 50/06
PubMed