

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3998419号

(P3998419)

(45) 発行日 平成19年10月24日(2007.10.24)

(24) 登録日 平成19年8月17日(2007.8.17)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 P 21/08 (2006.01)

C 1 2 P 21/08

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/00

A

C 1 2 N 15/02 (2006.01)

C 1 2 N 15/00

Z N A C

請求項の数 25 (全 186 頁)

(21) 出願番号 特願2000-542456 (P2000-542456)

(73) 特許権者 000003311

(86) (22) 出願日 平成11年4月2日(1999.4.2)

中外製薬株式会社

(86) 国際出願番号 PCT/JP1999/001768

東京都北区浮間5丁目5番1号

(87) 国際公開番号 W01999/051743

(74) 代理人 100077517

(87) 国際公開日 平成11年10月14日(1999.10.14)

弁理士 石田 敬

審査請求日 平成12年4月19日(2000.4.19)

(74) 代理人 100092624

審査番号 不服2003-17188 (P2003-17188/J1)

弁理士 鶴田 準一

審査請求日 平成15年9月4日(2003.9.4)

(74) 代理人 100087871

(31) 優先権主張番号 特願平10-91850

弁理士 福本 積

(32) 優先日 平成10年4月3日(1998.4.3)

(74) 代理人 100082898

(33) 優先権主張国 日本国(JP)

弁理士 西山 雅也

(74) 代理人 100081330

弁理士 樋口 外治

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト組織因子(TF)に対するヒト型化抗体およびヒト型化抗体の作製方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ヒトTFに対するマウスモノクローナル抗体のV領域相補性決定領域(CDR)及びヒト抗体V領域フレームワーク領域(FR)を含んで成るヒト型化V領域において、前記CDRが、次のアミノ酸配列：

H鎖CDR

H-CDR1：Asp Tyr Tyr Met His (配列番号：133)

H-CDR2：Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe
Gln Gly (配列番号：134)

H-CDR3：Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr (配列番号：135)

10

L鎖CDR

L-CDR1：Lys Ala Ser Gln Asp Ile Lys Ser Phe Leu Ser (配列番号：136)

L-CDR2：Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp (配列番号：137)

L-CDR3：Leu Gln His Gly Glu Ser Pro Tyr Thr (配列番号：138)

を有し、非変性TF、非還元下変性TF及び還元下変性TFと反応するヒト型化抗体を形成する、ヒト型化抗体V領域。

【請求項2】

前記FRにおいて、H鎖のFRが次のアミノ酸配列：

H-FR1：Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys (配列

20

番号：110)

H-FR2：次の配列 (1)～(3) のいずれか：

- (1) Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly (配列番号：111)
- (2) Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly (配列番号：112)
- (3) Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly (配列番号：113)

H-FR3：次の配列 (1)～(10) のいずれか：

- (1) Arg Ala Lys Leu Thr Ala Ala Thr Ser Ala Ser Ile Ala Tyr Leu Glu Phe Ser Ser Leu Thr Asn Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg (配列番号：114) 10
- (2) Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg (配列番号：115)
- (3) Arg Val Thr Met Leu Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg (配列番号：116)
- (4) Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg (配列番号：117) 20
- (5) Arg Val Ser Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Lys Ile Ala Tyr Met Glu Leu Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg (配列番号：118)
- (6) Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg (配列番号：119)
- (7) Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Glu Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Ser Cys Ala Arg (配列番号：120) 30
- (8) Arg Val Thr Met Ser Ala Asp Lys Ser Ser Ser Ala Ala Tyr Leu Gln Trp Thr Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Arg (配列番号：121)
- (9) Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Phe Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg (配列番号：122)
- (10) Arg Val Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ala Asn Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg (配列番号：123)

FR4：Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser (配列番号：124) 40

を有する、請求項 1 に記載のヒト型化抗体 V 領域。

【請求項 3】

前記ヒト型化抗体 V 領域の H 鎖 V 領域が、配列番号：30 (バージョン a)、配列番号：40 (バージョン b)、配列番号：42 (バージョン c)、配列番号：50 (バージョン d)、配列番号：52 (バージョン e)、配列番号：58 (バージョン f)、配列番号：60 (バージョン g)、配列番号：64 (バージョン h)、配列番号：70 (バージョン i)、配列番号：72 (バージョン j)、配列番号：76 (バージョン b1)、配列番号：78 (バージョン d1)、配列番号：82 (バージョン b3) 又は配列番号：84 (バージョン d3) に示すアミノ酸配列を有する、請求項 1 又は 2 に記載のヒト型化抗体 V 領域。

【請求項 4】

前記ヒト型化抗体 V 領域の H 鎖 V 領域が、配列番号：40（バージョン b）のアミノ酸配列を有する請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載のヒト型化抗体 V 領域。

【請求項 5】

前記ヒト型化抗体 V 領域の H 鎖 V 領域が、配列番号：70（バージョン i）のアミノ酸配列を有する、請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載のヒト型化抗体 V 領域。

【請求項 6】

前記 FR において、L 鎖の FR が次のアミノ酸配列：

L-FR1：Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys （配列番号：125）

10

L-FR2：次の配列（1）～（3）のいずれか：

（1）Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr （配列番号：126）

（2）Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile Tyr （配列番号：127）

（3）Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr （配列番号：128）

L-FR3：次の配列（1）～（3）のいずれか：

（1）Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
（配列番号：129）

20

（2）Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
（配列番号：130）

（3）Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys
（配列番号：131）

L-FR4：Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys （配列番号：132）

を有する、請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載のヒト型化抗体 V 領域。

【請求項 7】

30

前記ヒト型化抗体 V 領域の L 鎖 V 領域が、配列番号：93（バージョン a）、配列番号：99（バージョン b）、配列番号：101（バージョン c）、配列番号：107（バージョン b1）又は配列番号：109（バージョン b2）に示すアミノ酸配列を有する、請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載のヒト型化抗体 V 領域。

【請求項 8】

前記ヒト型化抗体 V 領域の L 鎖 V 領域が、配列番号：99（バージョン b）のアミノ酸配列を有する、請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載のヒト型化抗体 V 領域。

【請求項 9】

前記ヒト型化抗体 V 領域の L 鎖 V 領域が、配列番号：109（バージョン b2）に示すアミノ酸配列を有する、請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載のヒト型化抗体 V 領域。

40

【請求項 10】

請求項 1～9 のいずれか 1 項に記載のヒト型化 V 領域及びヒト抗体 C 領域を含んで成る、ヒト TF に対するヒト型化抗体。

【請求項 11】

前記ヒト抗体 C 領域の H 鎖 C 領域が、C γ 1、C γ 2、C γ 3又はC γ 4である、請求項10に記載のヒト型化抗体。

【請求項 12】

前記ヒト抗体 C 領域の L 鎖 C 領域が、C λ 又はC κ である、請求項10又は11記載のヒト型化抗体。

【請求項 13】

50

配列番号：40（バージョンb）のアミノ酸配列を含んでなるヒト型化H鎖及び配列番号：99（バージョンb）のアミノ酸配列を含んで成るヒト型化L鎖からなる、ヒトTFに対するヒト型化抗体。

【請求項14】

配列番号：70（バージョンi）のアミノ酸配列を含んでなるヒト型化H鎖及び配列番号：99（バージョンb）のアミノ酸配列を含んで成るヒト型化L鎖からなる、ヒトTFに対するヒト型化抗体。

【請求項15】

配列番号：70（バージョンi）のアミノ酸配列を含んでなるヒト型化H鎖及び配列番号109（バージョンb2）のアミノ酸配列を含んでなるヒト型化L鎖からなる、ヒトTFに対するヒト型化抗体。

10

【請求項16】

非変性TF、非還元下変性TF及び還元下変性TFと結合する、請求項10～15のいずれか1項に記載のヒト組織因子に対する抗体。

【請求項17】

解離定数（KD）が $1.09 \times 10^{-9} \sim 2.30 \times 10^{-8}$ [1/M]である、請求項1～15のいずれか1項に記載の抗体V領域又は抗体。

【請求項18】

請求項1～9のいずれか1項に記載のヒト型化抗体V領域のH鎖又端L鎖をコードするDNA。

20

【請求項19】

請求項10～15のいずれか1項に記載のヒト型化抗体のH領域又はL領域をコードするDNA。

【請求項20】

請求項18又は19に記載のヒト型化H鎖をコードするDNA及びL鎖をコードするDNAを、同一又は別々のベクターに含んで成る発現ベクター。

【請求項21】

前記ヒト型化H鎖をコードするDNAとL鎖をコードするDNAが、配列番号：40（バージョンb）のアミノ酸配列を含んでなるヒト型化H鎖をコードするDNAと配列番号：99（バージョンb）のアミノ酸配列を含んでなるヒト型L鎖をコードするDNAとである、請求項20に記載の発現ベクター。

30

【請求項22】

前記ヒト型化H鎖をコードするDNAとL鎖をコードするDNAが、配列番号：70（バージョンi）のアミノ酸配列を含んでなるヒト型化H鎖をコードするDNAと配列番号99（バージョンb）のアミノ酸配列を含んでなるヒト型化L鎖をコードするDNAとである、請求項20に記載の発現ベクター。

【請求項23】

前記ヒト型化H鎖をコードするDNAとL鎖をコードするDNAが、配列番号：70（バージョンi）のアミノ酸配列を含んでなるヒト型化H鎖をコードするDNAと配列番号：109（バージョンb2）のアミノ酸配列を含んでなるヒト型化L鎖をコードするDNAとである、請求項20に記載の発現ベクター。

40

【請求項24】

請求項20～23のいずれか1項に記載の発現ベクターにより形質転換された宿主。

【請求項25】

請求項24に記載の宿主を培養し、該培養物からヒト型化抗体を採取することを特徴とする、ヒトTFに対するヒト型化抗体の製造方法。

【発明の詳細な説明】

発明の分野

本発明は、ヒト組織因子（TF）に対するマウスモノクローナル抗体の可変領域（V領域）とヒト抗体の定常領域（C領域）とからなるヒト／マウスキメラ抗体、ヒトTFに対す

50

るマウスモノクローナル抗体の軽鎖（L鎖）V領域及び重鎖（H鎖）V領域の相捕性決定領域（CDR）がヒト抗体に移植されているヒト型化（humanized）抗体、該抗体のL鎖及びH鎖、並びに該抗体のL鎖又はH鎖を構成するV領域の断片に関する。本発明はさらに、ヒトTFに対するヒト型化抗体の作製方法に関する。

本発明はさらに、上記の抗体、特にそのV領域の断片をコードするDNA、及びV領域を含むL鎖又はH鎖をコードするDNAに関する。本発明はさらに、該DNAを含む組換えベクター、及び該ベクターにより形質転換された宿主に関する。

本発明はさらに、ヒトTFに対するキメラ抗体及びヒト型化抗体の製造方法に関する。本発明はさらに、ヒトTFに対するヒト型化抗体を有効成分として含む医薬組成物及び播種性血管内凝固症候群（DIC）治療薬に関する。

10

背景技術

組織因子（TF）は、細胞表面に発現される凝固第VII因子受容体であり、凝固第VII因子との複合体形成を通じて、凝固第IX因子およびX因子の活性化に不可欠な役割を担っており、血液凝固反応の実質的な開始因子と位置づけられている。

TFは血管を構成する線維芽細胞や平滑筋細胞などに発現されており、血管損傷の際に凝固系を活性化して止血機能を果たすことが知られている。

DICは、血管内での凝固系の活性化によって全身の主として細小血管内に血栓が多発する疾患である。血小板や凝固因子が消費されて低下することにより、血栓とは逆の現象である出血を生じることにも少なくない。また多発した微小血栓により重要臓器の微小循環不全をきたし、一旦発症すると不可逆的な機能障害を残すことも多く、DICの予後が不良となるため、重要な疾患と認識されている。

20

厚生省特定疾患血液凝固異常症調査研究班平成2年度および4年度の研究報告書から推定される基礎疾患の割合は、造血器悪性腫瘍が約30%、固形癌約20%、感染症約15%、産科的疾患約10%、肝疾患6%、ショック5%、心血管系疾患3%である。またDICの発症頻度は白血病が約15%、悪性リンパ種が6～7%と高く、固形癌では3%程度である。

これら種々の疾患に合併してDICは発症するが、その原因物質は共通であり、それがTFである。すなわち、急性白血病や悪性リンパ腫、固形癌においては腫瘍細胞のTFの生成・発現の異常亢進、感染症（特にグラム陰性菌性敗血症）においては単球・血管内皮細胞におけるTF産生・発現の亢進、劇症肝炎では壊死した肝組織からのTFの血中への流入、大動脈瘤・心臓瘤・巨大血管腫では血管内面でのTF形成、また産科的疾患（羊水栓塞・常位胎盤早期剥離）や手術・外傷・火傷においてもTFの血中への流入がDICの発症機序と考えられている。

30

原疾患（基礎疾患）の治療が第一であるが、実際にはこれが容易ではない。

現状のDIC治療法としては、抗凝固療法と補充療法が行われている。抗凝固療法の中心となっているのはヘパリン製剤（未分画ヘパリン、低分子ヘパリン）であり、合成蛋白分解酵素阻害剤（メシル酸ガベキサート、メシル酸ナファモスタット）や濃縮血漿製剤（アンチトロンビンIII、活性化プロテインC製剤）も用いられている。補充療法としては濃縮血小板血漿や新鮮凍結血漿（フィブリンの補給）、洗浄赤血球等がある。

しかし現状の治療薬では、有効性や副作用の面で十分に満足できるものではなく、DICからの完全離脱が出来ない場合がほとんどであることより、治療効果が高く副作用の少ない薬剤の使用が期待されている。

40

一方、新しいDIC治療の試みとしては、トロンボモジュリン製剤やヒルジン、抗PAF剤がある。TFPI（Tissue Factor Pathway Inhibitor）や、FXa選択的阻害剤が経口投与可能な抗凝固・抗血栓剤として注目を集めている。また、TFの活性を中和するものとして、WO88/07543には、マウス抗ヒトTFモノクローナル抗体が、WO96/40921には、ヒト型化抗ヒトTF抗体として開示されている。

マウス抗ヒトTFモノクローナル抗体は、DICに於いて主薬効に伴う出血傾向などを示さない安全で有効な治療薬となることが期待できる。しかしながら、マウスのモノクロー

50

ナル抗体はヒトにおいて高度に免疫原性（「抗原性」という場合もある）を有し、このため、ヒトにおけるマウスモノクローナル抗体の医学療法的価値は制限されている。例えば、マウス抗体をヒトに投与すると異物として代謝されうるので、ヒトにおけるマウス抗体の半減期は比較的短く、期待された効果を十分に発揮できない。さらに、投与したマウス抗体に対して発生するヒト抗マウス抗体（HAMA）は、血清病又は他のアレルギー反応など、患者にとって不都合で危険な免疫応答を惹起する。したがって、マウスモノクローナル抗体をヒトに頻回投与することはできない。

これらの問題を解決するため、非ヒト由来の抗体、例えばマウス由来のモノクローナル抗体の免疫原性を低減させる方法が開発された。その一つが、抗体の可変領域（V領域）はもとのマウスモノクローナル抗体に由来し、定常領域（C領域）は適当なヒト抗体に由来するキメラ抗体を作製する方法である。

10

得られるキメラ抗体はもとのマウス抗体の可変領域を完全な形で含有するので、もとのマウス抗体と同一の特異性をもって抗原に結合することが期待できる。さらに、キメラ抗体ではヒト以外に由来するアミノ酸配列の比率が実質的に減少しており、それ故にもとのマウス抗体に比べて免疫原性が低いと予想されるが、それでもなおマウス可変領域に対する免疫応答が生ずる可能性がある（LoBuglio, A., F. ら Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 4220-4224, 1989）。

マウス抗体の免疫原性を低減させるための第二の方法は一層複雑であるが、しかしマウス抗体の潜在的な免疫原性をさらに大幅に低下させることが期待される。この方法においては、マウス抗体の可変領域から相補性決定領域（complementarity determining region; CDR）のみをヒト可変領域に移植して「再構成」（reshaped）ヒト可変領域を作製する。ただし、必要によっては、再構成ヒト可変領域のCDRの構造をより一層もとのマウス抗体の構造に近づけるために、CDRを支持しているフレームワーク領域（FR）の一部のアミノ酸配列をマウス抗体の可変領域からヒト可変領域に移植する場合がある。次に、これらのヒト型化された再構成ヒト可変領域をヒト定常領域に連結する。最終的に再構成されたヒト型化抗体のヒト以外のアミノ酸配列に由来する部分は、CDR及び極く一部のFRのみである。CDRは超可変アミノ酸配列により構成されており、これらは種特異的配列を示さない。

20

ヒト型化抗体については、さらに、Riechmann, L. ら Nature, 332, 323-327, 1988; Verhoeye, M. ら Science, 239, 1534-1536, 1998; Kettleborough, C. A. ら Protein Engng., 4, 773-783, 1991; Maeda, H., Human Antibodies and Hybridoma, 2, 124-134, 1991; Gorman, S. D. ら Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 4181-4185, 1991; Tempest, P. R., Bio/Technology, 9, 266-271, 1991; Co, M. S. ら Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 2869-2873, 1991; Cater, P. ら Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 4285-4289, 1992; Co, M. S. ら J. Immunol., 148, 1149-1154, 1992; 及び Sato, K., ら Cancer Res., 53, 851-856, 1993を参照のこと。

30

40

従来のヒト型化技術では、フレームワーク領域（FR）の一部にマウス抗体の可変領域からヒト可変領域に移植されたアミノ酸配列を含む。そのため、ヒトにおいて治療薬として投与した場合に、可変領域のない数アミノ酸ではあるが、ヒトに存在しないアミノ酸配列を有する部位に対する抗体ができる危険性が存在する。この危険性を回避するために、第三のヒト型化技術を考案した。すなわち、三個のCDRの立体構造を保持するために必要な四個のFR（FR1～4）について、一つのFRを単位として、データベース上に存在するマウス抗体のFRと相同性の高いヒト抗体のFRを置換する方法である。この際、データベース上に存在するヒト抗体から数種類のFRを選択し、順次置換（shuffle）することにより活性の高いヒト型化抗体の作製を行う。

こうすることにより、可変領域の中でCDRを除くFRは、全てヒト抗体由来のアミノ酸

50

配列を有するヒト型化抗体を作製することが出来る。このため、マウスC D Rを担持するヒト型化抗体は、もはやヒトC D Rを含有するヒト抗体より強い免疫原性を有しないはずである。

前記のごとく、ヒト型化抗体は療法目的のために有用であると予想されるが、ヒト型化抗体の製造方法において任意の抗体に普遍的に適用し得る画一的な方法は存在せず、特定の抗原に対して十分な結合活性、中和活性を示すヒト型化抗体を作製するためには種々の工夫が必要である（例えば、S a t o, K. ら、C a n c e r R e s. , 53, 851-856, 1993を参照のこと）。

発明の開示

本発明は、ヒトT Fに対するマウスモノクローナル抗体の可変領域（V領域）とヒト抗体の定常領域（C領域）とからなるヒト／マウスキメラ抗体、ヒトT Fに対するマウスモノクローナル抗体の軽鎖（L鎖）V領域及び重鎖（H鎖）V領域の相補性決定領域がヒト抗体に移植されているヒト型化（humanized）抗体、該抗体のL鎖及びH鎖、並びに該抗体のL鎖又はH鎖を構成するV領域の断片を提供することを目的とする。本発明はさらに、ヒトT Fに対するヒト型化抗体の作製方法を提供することを目的とする。

本発明はさらに、上記の抗体、特にそのV領域の断片をコードするDNA、及びV領域の断片を含むL鎖又はH鎖をコードするDNAを提供することを目的とする。本発明はさらに、該DNAを含む組換えベクター、及び該ベクターにより形質転換された宿主を提供することを目的とする。本発明はさらに、ヒトT Fに対するヒト型化抗体を有効成分として含む医薬組成物及び播種性血管内凝固症候群（D I C）治療薬を提供することを目的とする。

本発明者らは、上記課題に基づいて鋭意研究を行った結果、ヒトT Fに対するマウスモノクローナル抗体のヒトにおける免疫原性が低減されている抗体を得ることに成功し、また、新しいヒト型化抗体の作製方法を開発し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、ヒト抗体のH鎖C領域、及びヒトT Fに対するマウスモノクローナル抗体のH鎖V領域の断片を含むキメラH鎖に関する。H鎖V領域としては、配列番号9で表されるアミノ酸配列を含むものが挙げられ、C領域としてはC γ 4領域のものが挙げられる。

さらに、本発明は、ヒト抗体のL鎖C領域、及びヒトT Fに対するマウスモノクローナル抗体のL鎖V領域の断片を含むキメラL鎖に関する。L鎖V領域としては、配列番号15で表されるアミノ酸配列を含むものが挙げられ、L鎖C領域としてはC κ 領域のものが挙げられる。

さらに、本発明は、前記キメラH鎖及びキメラL鎖を含む、ヒトT Fに対するヒトマウスキメラモノクローナル抗体に関する。

さらに、本発明は、ヒト抗体のH鎖V領域のフレームワーク領域（F R）1～4、及びヒトT Fに対するマウスモノクローナル抗体のH鎖V領域の相補性決定領域（C D R）1～3を含む、ヒト型化抗体のH鎖V領域の断片に関する。C D R 1～3としては、それぞれ配列番号133～135で表されるアミノ酸配列を含むものが挙げられる。ヒト抗体のH鎖V領域のF R 1としては、マウス抗体のH鎖V領域F R 1との相同性が40%以上のヒト抗体F R 1が挙げられ、F R 2としては、マウス抗体のH鎖V領域F R 2との相同性が40%以上のヒト抗体F R 2が挙げられ、F R 3としては、マウス抗体のH鎖V領域F R 3との相同性が40%以上のヒト抗体F R 3が挙げられ、F R 4としては、マウス抗体のH鎖V領域F R 4との相同性が40%以上のヒト抗体F R 4が挙げられる。

好ましくは、ヒト抗体のH鎖V領域のF R 1としては、マウス抗体のH鎖V領域F R 1との相同性が50%以上のヒト抗体F R 1が挙げられ、F R 2としては、マウス抗体のH鎖V領域F R 2との相同性が70%以上のヒト抗体F R 2が挙げられ、F R 3としては、マウス抗体のH鎖V領域F R 3との相同性が65%以上のヒト抗体F R 3が挙げられ、F R 4としては、マウス抗体のH鎖V領域F R 4との相同性が80%以上のヒト抗体F R 4が挙げられる。具体的な例としては、ヒト抗体のH鎖V領域のF R 1としては、ヒト抗体L 39130が挙げられ、F R 2としては、ヒト抗体L 39130、ヒト抗体P 01742

10

20

30

40

50

およびヒト抗体の Z 8 0 8 4 4 が挙げられ、F R 3 としては、ヒト抗体 L 3 9 1 3 0、ヒト抗体 Z 3 4 9 6 3、ヒト抗体 P 0 1 8 2 5、ヒト抗体 M 6 2 7 2 3、ヒト抗体 Z 8 0 8 4 4、ヒト抗体 L 0 4 3 4 5、ヒト抗体 S 7 8 3 2 2、ヒト抗体 Z 2 6 8 2 7、ヒト抗体 U 9 5 2 3 9 およびヒト抗体 L 0 3 1 4 7 が挙げられ、F R 4 としては、ヒト抗体 L 3 9 1 3 0 が挙げられる。

好ましい例としては、ヒト抗体の H 鎖 V 領域の F R 1 としては、ヒト抗体 L 3 9 1 3 0 が挙げられ、F R 2 としては、ヒト抗体 L 3 9 1 3 0、およびヒト抗体の Z 8 0 8 4 4 が挙げられ、F R 3 としては、ヒト抗体 Z 3 4 9 6 3、ヒト抗体 M 6 2 7 2 3 およびヒト抗体 U 9 5 2 3 9 が挙げられ、F R 4 としてヒト抗体 L 3 9 1 3 0 が挙げられる。さらに好ましい例としては、ヒト抗体の H 鎖 V 領域の F R 1 としては、ヒト抗体 L 3 9 1 3 0 が挙げられ、F R 2 としては、ヒト抗体 L 3 9 1 3 0 が挙げられ、F R 3 としては、ヒト抗体 Z 3 4 9 6 3 およびヒト抗体 U 9 5 2 3 9 が挙げられ、F R 4 としてヒト抗体 L 3 9 1 3 0 が挙げられる。

10

さらに、本発明は、フレームワーク領域中の番号として K a b a t の規定 (K a b a t, E. A. ら、US Dept. Health and Human Services, US Government Printing Offices, 1991) による。さらに、本発明は、配列番号 30、40、42、50、52、58、60、64、70、72、76、78、82、84 で表されるいずれかのアミノ酸配列を含む、ヒト型化抗体の H 鎖 V 領域の断片に関する。

さらに、本発明は、ヒト抗体の L 鎖 V 領域の F R 1 ~ 4、及びヒト T F に対するマウスモノクローナル抗体の L 鎖 V 領域の C D R 1 ~ 3 を含む、ヒト型化抗体の L 鎖 V 領域の断片に関する。C D R 1 ~ 3 としては、それぞれ配列番号 1 3 6 ~ 1 3 8 で表されるアミノ酸配列を含むものが挙げられる。ヒト抗体の L 鎖 V 領域の F R 1 としては、マウス抗体の L 鎖 V 領域 F R 1 との相同性が 40 % 以上のヒト抗体 F R 1 が挙げられ、F R 2 としては、マウス抗体の L 鎖 V 領域 F R 2 との相同性が 40 % 以上のヒト抗体 F R 2 が挙げられ、F R 3 としては、マウス抗体の L 鎖 V 領域 F R 3 との相同性が 40 % 以上のヒト抗体 F R 3 が挙げられ、F R 4 としては、マウス抗体の L 鎖 V 領域 F R 4 との相同性が 40 % 以上のヒト抗体 F R 4 が挙げられる。

20

好ましくは、ヒト抗体の L 鎖 V 領域の F R 1 としては、マウス抗体の L 鎖 V 領域 F R 1 との相同性が 75 % 以上のヒト抗体 F R 1 が挙げられ、F R 2 としては、マウス抗体の L 鎖 V 領域 F R 2 との相同性が 80 % 以上のヒト抗体 F R 2 が挙げられ、F R 3 としては、マウス抗体の L 鎖 V 領域 F R 3 との相同性が 70 % 以上のヒト抗体 F R 3 が挙げられ、F R 4 としては、マウス抗体の L 鎖 V 領域 F R 4 との相同性が 80 % 以上のヒト抗体 F R 4 が挙げられる。具体的な例としては、ヒト抗体の L 鎖 V 領域の F R 1 としては、ヒト抗体 Z 3 7 3 3 2 が挙げられ、F R 2 としては、ヒト抗体 Z 3 7 3 3 2 およびヒト抗体 X 9 3 6 2 5 が挙げられ、F R 3 としては、ヒト抗体 Z 3 7 3 3 2、ヒト抗体 S 6 8 6 9 9 および P 0 1 6 0 7 が挙げられ、F R 4 としてヒト抗体 Z 3 7 3 3 2 が挙げられる。さらに好ましい例としては、ヒト抗体の L 鎖 V 領域の F R 1 としては、ヒト抗体 Z 3 7 3 3 2 が挙げられ、F R 2 としては、ヒト抗体 X 9 3 6 2 5 が挙げられ、F R 3 としては、ヒト抗体 S 6 8 6 9 9 が挙げられ、F R 4 としてヒト抗体 Z 3 7 3 3 2 が挙げられる。

30

40

さらに、本発明は、フレームワーク領域中の番号として K a b a t の規定 (K a b a t, E. A. ら、US Dept. Health and Human Services, US Government Printing Offices, 1991) による。さらに、本発明は、配列番号 93、99、101、107 又は 109 で表されるアミノ酸配列を含む、ヒト型化抗体の L 鎖 V 領域の断片に関する。

さらに、本発明は、前記ヒト型化抗体の H 鎖 V 領域の断片及びヒト抗体の H 鎖 C 領域の断片を含む、ヒト T F に対するヒト型化抗体の H 鎖に関する。ここで、C 領域としては C_γ 4 領域、ヒト抗体由来の F R 1 ~ 4 としては、それぞれヒト抗体 L 3 9 1 3 0 (F R 1)、ヒト抗体 L 3 9 1 3 0 (F R 2)、ヒト抗体 Z 3 4 9 6 3 (F R 3) またはヒト抗体 U 9 5 2 3 9 (F R 3)、ヒト抗体 L 3 9 1 3 0 (F R 4) 由来のもの、そして C D R 1 ~

50

3としてはそれぞれ配列番号133～135で表されるアミノ酸配列を含むものが挙げられる。

さらに、本発明は、前記ヒト型化抗体のL鎖V領域の断片及びヒト抗体のL鎖C領域の断片を含む、ヒトTFに対するヒト型化抗体のL鎖に関する。ここで、C領域としてはCκ領域、ヒト抗体由来のFR1～4としては、それぞれヒト抗体Z37332 (FR1)、ヒト抗体X93625 (FR2)、ヒト抗体S68699 (FR3)、ヒト抗体Z37332 (FR4) 由来のもの、そしてCDR1～3としてはそれぞれ配列番号136～138で表されるアミノ酸配列を含むものが挙げられる。

さらに、本発明は、前記ヒト型化抗体のL鎖及びH鎖を含む、ヒトTFに対するヒト型化抗体に関する。

10

さらに、本発明は、ヒトTFに対するヒト型化抗体の作製方法に関する。ヒト型化の作製方法とは、H鎖またはL鎖の抗原認識部位であるCDR1～3の構造を支えるFR1～4の選択方法に関する。すなわち、各FRを一つの単位として、マウス抗体由来のFRと相溶性の高いヒト抗体のFRを複数選択し、そのFRを順次置換 (shuff le) して所望の活性を有するヒト型化抗体の作製方法に関する。

さらに詳しくは、本発明のヒト型化抗体の製造方法の一例においては、非ヒト由来の相補性決定領域 (CDR) 及び天然ヒト抗体由来のフレームワーク領域 (FR) を有する免疫原性を低減させた天然ヒト型化抗体の製造方法において、

(1) 目的とする抗原に対して反応性の非ヒトモノクローナル抗体を用意し、

(2) 前記(1)のモノクローナル抗体中のFRのアミノ酸配列に対して高い相溶性を有するヒト抗体を複数用意し、

20

(3) 前記(2)における1種類のヒト抗体の4個のFRを前記(1)の非ヒトモノクローナル抗体の対応するFRにより置換して第一のヒト型化抗体を作製し、

(4) 前記(3)において作製したヒト型化抗体の抗原への結合性又は抗原の生物活性を中和する能力を測定し、

(5) 前記(3)において作製したヒト型化抗体中の1～3個のFRを、(2)で用意したヒト抗体の内、(3)で使用したものとは異なるヒト抗体の対応するFRにより置換して第二のヒト型化抗体を作製し、

(6) 前記(5)で作製した第二のヒト型化抗体と前記(3)で得た第一のヒト型化抗体とを、抗原に対する結合性、又は抗原の生物活性を中和する能力について比較し、好都合な活性を示すヒト型化抗体を選択し、

30

(7) 前記(6)で選択されたヒト型化抗体について、前記(3)～(6)の段階を実施し、そして

(8) 前記(1)における非ヒトモノクローナル抗体と同等の活性を有するヒト型化抗体が得られるまで前記(3)～(6)の段階を反復する、ことを特徴とする。

ヒトTFに対する中和活性をある程度有するヒト型化抗体が得られれば、そのH鎖及びL鎖のV領域の特定のFRに対してさらに相溶性の検索を行い、さらに相溶性の高いヒト抗体を選択することが出来る。ここで得られたヒト抗体を上記の工程(2)の複数のヒト抗体群に加えて、さらに工程(3)～(6)を反復し、所望の活性を有するヒト型化抗体を得ることが出来る。

40

さらに、本発明は、ヒトTFに対するマウスモノクローナル抗体のH鎖V領域の断片又はL鎖V領域の断片をコードするDNAに関する。H鎖V領域の断片及びL鎖V領域の断片のアミノ酸配列及びDNAとしては、それぞれ配列番号9又は15で表される塩基配列を含むものが挙げられる。

さらに、本発明は、前記キメラH鎖又はキメラL鎖をコードするDNAに関する。該H鎖をコードするDNAとしては例えば配列番号9で表される塩基配列を含むものが挙げられ、該L鎖をコードするDNAとしては配列番号15で表される塩基配列を含むものが挙げられる。

さらに、本発明は、前記ヒト型化抗体のH鎖V領域の断片又はL鎖V領域の断片をコード

50

するDNAに関する。H鎖V領域の断片をコードするDNAとしては配列番号29、39、41、49、51、57、59、63、69、71、75、77、81又は83で表されるいずれかの塩基配列を含むものが挙げられ、L鎖V領域の断片をコードするDNAとしては配列番号92、98、100、106又は108で表される塩基配列を含むものが挙げられる。

さらに、本発明は、ヒト型化抗体のH鎖をコードするDNAに関する。

さらに、本発明は、配列番号30、40、42、50、52、58、60、64、70、72、76、78、82又は84で表されるいずれかのアミノ酸配列をコードするDNAを含む、ヒト型化抗体のH鎖DNAに関する。該DNAとしては、配列番号29、39、41、49、51、57、59、63、69、71、75、77、81又は83で表され

10

るいずれかの塩基配列を含むものが挙げられる。

さらに、本発明は、前記ヒト型化抗体のL鎖をコードするDNAに関する。

さらに、本発明は、配列番号93、99、101、107又は109で表されるアミノ酸配列をコードする、ヒト型化抗体のL鎖DNAである。該DNAとしては配列番号92、98、100、106又は108で表される塩基配列を含むものが挙げられる。

さらに、本発明は、前記いずれかのDNAを含む組換えベクターに関する。

さらに、本発明は、前記組換えベクターにより形質転換された形質転換体に関する。

さらに、本発明は、前記形質転換体を培養し、得られる培養物からヒトTFに対するキメラ抗体又はヒト型化抗体を採取することの特徴とするヒトTFに対するキメラ抗体又はヒト型化抗体の製造方法に関する。

20

さらに、本発明は、前記ヒト型化抗体を有効成分として含む医薬組成物又はDIC治療剤に関する。

発明の実施の形態

以下、本発明を詳細に説明する。

1. ヒトTFに対するマウスモノクローナル抗体の作製

TFに対するマウスモノクローナル抗体は、抗原で免疫した動物から得られる抗体産生細胞と、ミエローマ細胞との細胞融合によりハイブリドーマを調製し、得られるハイブリドーマからTF活性を特異的に阻害する抗体を産生するクローンを選択することにより調製される。

すなわち、ヒト胎盤より精製したTFを抗原として免疫したマウスの脾細胞をミエローマ細胞と融合させてハイブリドーマを作製した。ハイブリドーマのスクリーニングは、抗体のTFとの結合能はTF高発現細胞株J82を用いたCell-ELISAで、TFに対する中和能は凝固第X因子(Factor X:FX)の活性化に対する阻害活性を指標にした測定系で行った。その結果、TF/VIIa複合体のFX活性化を強く阻害する抗体6種を産生するハイブリドーマの樹立に成功した。

30

(1) 抗原の調製

動物の免疫に用いるTFとしては、組換えDNA法又は化学合成により調製したTFのアミノ酸配列の一部のペプチド、又はヒト胎盤由来のTFなどが挙げられる。例えば、Itoraの方法(Itota, T.らJ. Biochem. 114, 691-696, 1993)に準じて行い精製したヒト胎盤由来のTFを抗原として用いることができる。

40

得られたヒトTFは、アジュバントと混合し抗原として用いる。アジュバントとしては、フロイント完全アジュバント、フロイントの不完全アジュバント等が挙げられ、これらの何れのものでもよい。

(2) 免疫及び抗体産生細胞の採取

上記のようにして得られた抗原を非ヒト哺乳動物、例えばマウス、ラット、ウマ、サル、ウサギ、ヤギ、ヒツジなどの哺乳動物に投与する。免疫は、既存の方法であれば何れの方法をも用いることができるが、主として静脈内注射、皮下注射、腹腔内注射などにより行う。また、免疫の間隔は特に限定されず、数日から数週間間隔で、好ましくは4～21日間間隔で免疫する。

最終の免疫日から2～3日後に抗体産生細胞を採集する。抗体産生細胞としては、脾臓細

50

胞、リンパ節細胞、末梢血細胞が挙げられるが、一般に脾臓細胞が用いられる。抗原の免疫量は1回にマウス1匹当たり、0.1～100 μ gが用いられる。

(3) 抗体価の測定

免疫した動物の免疫応答レベルを確認し、また、細胞融合処理後の細胞から目的とするハイブリドーマを選択するため、免疫した動物の血中抗体価、又は抗体産生細胞の培養上清中の抗体価を測定する。

抗体検出の方法としては、公知技術、例えばEIA（エンザイムイムノアッセイ）、RIA（ラジオイムノアッセイ）、ELISA（酵素連結イムノソルベントアッセイ）等が挙げられる。

(4) 細胞融合

抗体産生細胞と融合させるミエローマ（骨髄腫）細胞として、マウス、ラット、ヒトなど種々の動物に由来し、当業者が一般に入手可能な株化細胞を使用する。使用する細胞株としては、薬剤抵抗性を有し、未融合の状態では選択培地（例えばHAT培地）で生存できず、融合した状態でのみ生存できる性質を有するものが用いられる。一般的に8-アザグアニン耐性株が用いられ、この細胞株は、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を欠損し、ヒポキサンチン・アミノプテリン・チミジン（HAT）培地に生育できないものである。

ミエローマ細胞は、既に公知の種々の細胞株、例えば、P3（P3x63Ag8.653）（J. Immunol., 123, 1548-1550, 1979）、P3x63Ag8.1（Current Topics in Microbiology and Immunology, 81, 1-7, 1978）、NS-1（Kohler, G. and Milstein, C., Eur. J. Immunol. 6, 511-519, 1976）、MPC-11（Margulies, D. H. Cell, 8, 405-415, 1976）、SP2/0（Shulman, M. Nature, 276, 269-270, 1978）、F0（de St. Groth, S. F. J. Immunol. Methods, 35, 1-21, 1980）、S194（Trowbridge, I. S., J. Exp. Med., 148, 313-323, 1978）、R210（Gallfre, G. Nature, 277, 131-133, 1979）等が好適に使用される。

抗体産生細胞は、脾臓細胞、リンパ節細胞などから得られる。すなわち、前記各種動物から脾臓、リンパ節等を摘出又は採取し、これら組織を破碎する。得られる破碎物をPBS、DMEM、RPMI 1640等の培地又は緩衝液に懸濁し、ステンレスメッシュ等で濾過後、遠心分離を行うことにより目的とする抗体産生細胞を調製する。

次に、上記ミエローマ細胞と抗体産生細胞とを細胞融合させる。

細胞融合は、MEM、DMEM、RPMI 1640培地などの動物細胞培養用培地中で、ミエローマ細胞と抗体産生細胞とを、混合比1:1～1:10で融合促進剤の存在下、30～37℃で1～15分間接触させることによって行われる。細胞融合を促進させるためには、平均分子量1,000～6,000のポリエチレングリコール、ポリビニルアルコール又はセンダイウイルスなどの融合促進剤や融合ウイルスを使用することができる。また、電気刺激（例えばエレクトロポレーション）を利用した市販の細胞融合装置を用いて抗体産生細胞とミエローマ細胞とを融合させることもできる。

(5) ハイブリドーマの選択及びクローニング

細胞融合処理後の細胞から目的とするハイブリドーマを選別する。その方法として、選択培地における細胞の選択的増殖を利用する方法等が挙げられる。すなわち、細胞懸濁液を適切な培地で希釈後、マイクロタイタープレート上にまき、各ウェルに選択培地（HAT培地など）を加え、以後適当に選択培地を交換して培養を行う。その結果、生育してくる細胞をハイブリドーマとして得ることができる。

ハイブリドーマのスクリーニングは、限界希釈法、蛍光励起セルソーター法等により行い、最終的にモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを取得する。

モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの選択は、種々の測定系を組み合わせて行うことができる。例えば、Cell-ELISAのごとき抗原認識測定系やFactor

10

20

30

40

50

Xa活性を指標としたTF中和活性測定系、血漿凝固阻害活性測定系のごとき中和活性測定系を組み合わせることで所望の活性を有するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを取得する。このようにして、例えば、ATR-2、ATR-3、ATR-4、ATR-5、ATR-7およびATR-8のごときモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを取得することが出来る。

(6) モノクローナル抗体の採取

取得したハイブリドーマからモノクローナル抗体を採取する方法としては、通常の細胞培養法や腹水形成法等が挙げられる。

細胞培養法においては、ハイブリドーマを10～20%ウシ胎児血清含有RPMI 1640培地、DMEM培地、又は無血清培地等の動物細胞培養培地中で、通常の培養条件（例えば37℃、5%CO₂濃度）で2～14日間培養し、その培養上清から抗体を取得する。

10

腹水形成法においては、ミエローマ細胞由来の哺乳動物と同種の動物の腹腔内にハイブリドーマを投与し、ハイブリドーマを大量に増殖させる。そして、1～4週間後に腹水又は血清を採取する。

上記抗体の採取方法において、抗体の精製が必要とされる場合は、硫酸塩析法、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーなどの公知の方法を適宜に選択して、又はこれらを組み合わせることにより精製する。

2. ヒトTFに対するマウスモノクローナル抗体のV領域をコードするDNAのクローニング

20

(i) mRNAの調製

ヒトTFに対するマウスモノクローナル抗体のH鎖およびL鎖V領域をコードするDNAのクローニングを行うため、回収されたハイブリドーマから公知の方法、例えばグアニジン超遠心法（Chirgwin, J. M. ら、Biochemistry, (1979), 18, 5294-5299）、AGPC法（Chomczynski, P ら（1987）, 162, 156-159）等により全RNAを調製し、mRNA Purification Kit（Pharmacia Biotech）に添付されたオリゴ（dT）-セルロース スパンカラム等によりmRNAを調製する。また、QuickPrep mRNA Purification Kit（Pharmacia Biotech）を用いることにより、全RNAの抽出操作を経ずに、mRNAの調製を行うこともできる。

30

(ii) cDNAの調製及び増幅

上記(i)で得たmRNAから、逆転写酵素を用いてL鎖及びH鎖のV領域におけるcDNAをそれぞれ合成する。cDNAの合成は、Oligo-dTプライマー又はL鎖C領域若しくはH鎖C領域とハイブリダイズする適当なプライマー（例えばキット添付のcDNA合成プライマー）を用いることが出来る。

cDNA合成反応は、前記mRNAとプライマーとを混合し、逆転写酵素の存在下で例えば52℃で30分の反応を行う。

cDNAの増幅は、L鎖及びH鎖ともに5'-AmplifINDER RACE kit（CLONTECH社）を用いた5'-RACE法（Frohman, M. A. らProc. Natl. Acad. USA 85, 8998-9002, 1988, Belyavsky, A. らNucleic Acids Res. 17, 2919-2932, 1989）に基づくPCR（ポリメラーゼ連鎖反応）にて行うことが出来る。すなわち、上記で合成した2本鎖cDNAの両端にcDNA adapterを連結し、H鎖V領域及びL鎖V領域の断片をコードするDNA（以下、L鎖V領域の断片をコードするDNAを「L鎖V領域のDNA」又は「L鎖V領域をコードするDNA」と略記することもある（H鎖V領域等についても同様））についてPCRを行う。

40

H鎖V領域のDNAを増幅するためのプライマーとして、例えば5'-側プライマーにはキット添付のAdapter primer 1と3'-側プライマーにはマウス抗体のH鎖定常領域MHC-G1プライマー（配列番号1）（ATR-2、ATR-3、ATR-

50

4 および ATR-5) (C γ 1 領域) あるいは MHC-G2a プライマー (配列番号 2) (ATR-7 および ATR-8) (C γ 2a 領域) (S. T. Jones ら, Biotechnology, 9, 88, 1991) を用いることが出来る。また、L 鎖 V 領域の DNA を増幅するためのプライマーとして、例えば 5' 側プライマーにはキット添付の Adapter primer 1 と 3' 側プライマーにはマウス抗体の L 鎖 κ 鎖定常領域 (C κ 領域) プライマー (例えば配列番号 3 で表される塩基配列を有する MKC プライマー) を用いることが出来る。

(iii) DNA の精製及び塩基配列の決定

PCR 産物について、公知手法に従ってアガロースゲル電気泳動を行い、目的とする DNA 断片を切り出した後、DNA の回収及び精製を行い、ベクター DNA に連結する。

DNA の精製は、フェノール及びクロロホルムで抽出するか (J. Sambrook, et al. "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)、市販のキット (例えば GENECLEAN II; BIO101) を用いて行われる。DNA 断片を保持するためのベクター DNA には公知のもの (例えば pUC19、Bluescript 等) を用いることができる。

前記 DNA と上記ベクター DNA とを、公知のライゲーションキット (宝酒造製) を用いて連結させ、組換えベクターを得る。次に、得られる組換えベクターを大腸菌 JM109 コンピテントセル (ニッポンジーン) 等に導入した後アンピシリン耐性コロニーを選抜し、公知方法に基づいてベクター DNA を調製する (J. Sambrook, et al. "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)。目的とする DNA の塩基配列は、上記ベクター DNA を制限酵素で消化した後、公知方法 (例えばジデオキシ法) により決定する (J. Sambrook, et al. "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)。本発明では、自動塩基配列決定装置 (DNA Sequencer 373A, Perkin-Elmer) を用いることができる。

(iv) 相補性決定領域 (CDR)

H 鎖 V 領域及び L 鎖 V 領域は、抗原結合部位を形成し、その全般の構造は互いに類似性を有している。すなわち、それぞれ 4 つのフレームワーク領域 (FR) 部分が、3 つの超可変領域、すなわち相補性決定領域 (CDR) により連結されている。FR のアミノ酸配列は比較的良好に保存されているが、一方、CDR 領域のアミノ酸配列の変異性は極めて高い (Kabat, E. A. ら、「Sequence of Proteins of Immunological Interest」US Dept. Health and Human Services, 1983)。

前記 4 個の FR の多くの部分は、 β -シート構造をとり、その結果 3 個の CDR はループを形成する。CDR は、ある場合には β -シート構造の一部を形成することもある。従って、3 個の CDR は FR によって相互に立体的に非常に近い位置に保持され、そして FR は対をなす領域の 3 個の CDR と共に抗原結合部位を形成する。

このような事実に基づき、ヒト TF に対するマウスモノクローナル抗体の可変領域のアミノ酸配列を Kabat らにより作成された抗体のアミノ酸配列のデータベース ([Sequence of Proteins of Immunological Interest] US Dept. Health and Human Services, 1983) にあてはめて、相同性を調べることにより CDR 領域を見いだすことが出来る。

CDR 領域の配列は、ヒト型化抗体を作製した際にヒト TF に対する結合活性及び中和活性が保持される範囲内であれば、挿入、置換又は欠失による改変体も本発明に含まれる。例えば、配列番号 133-138 の各 CDR 又は配列番号 139-141, 143-144, 145-147 及び 149-150 の V 領域中の各 CDR 領域との相同性が 90~100% の配列であるものが挙げられる。好ましくは、相同性が 95~100% の配列であるものが挙げられる。さらに好ましくは、相同性が 98~100% の配列であるものが挙

10

20

30

40

50

げられる。

3. キメラ抗体の発現ベクターの作製

マウスモノクローナル抗体のマウスL鎖（以下、抗体のL鎖又はH鎖を表す場合は、マウスについては「マウスL鎖」、ヒト抗体のH鎖については「ヒトH鎖」のように略記することもある。）及びH鎖V領域をコードするDNA断片がクローニングされれば、これらのマウスV領域をコードするDNAを、ヒト抗体定常領域をコードするDNAと連結して発現させることによってキメラ抗ヒトTF抗体が得られる。

キメラ抗体を作製するための基本的な方法は、クローン化されたcDNAに存在するマウスリーダー配列及びV領域配列を、哺乳類細胞の発現ベクター中にすでに存在するヒト抗体C領域をコードする配列に連結することを含んでなる。あるいは、クローン化されたcDNAに存在するマウスリーダー配列及びV領域配列をヒト抗体C領域をコードする配列に連結した後、哺乳類細胞発現ベクターに連結することを含んでなる。

ヒト抗体C領域の断片は、任意のヒト抗体のH鎖C領域及びヒト抗体のL鎖C領域のものとすることができ、例えばヒトH鎖のものについてはC γ 1、C γ 2、C γ 3又はC γ 4、及びL鎖のものについてはC λ 又はC κ を各々挙げることができる。

キメラ抗体の製造のためには、エンハンサー／プロモーター系のごとき発現制御領域のもとてマウスH鎖V領域及びヒトH鎖C領域をコードするDNAを含む発現ベクター、並びにエンハンサー／プロモーター系のごとき発現制御領域による制御のもとてマウスL鎖V領域及びヒトL鎖C領域をコードするDNAを含む単一の発現ベクター（例えば、WO94/11523参照）を作製する。次に、この発現ベクターにより哺乳類細胞のごとき宿主細胞を同時形質転換し、そして形質転換された細胞をインービトロ又はインービボで培養してキメラ抗体を製造する（例えば、WO91/16928参照）。単一の発現ベクターには、IgG1 κ 型抗体発現ベクターN5KG1（V）及びIgG4 κ 型抗体発現ベクターN5KG4Pを用いることができる。

（i）キメラ抗体H鎖の構築

キメラ抗体のH鎖発現ベクターは、マウスH鎖V領域をコードするcDNAを、ヒト抗体のH鎖C領域をコードするDNAを含む適当な発現ベクターに導入することにより得ることが出来る。H鎖C領域としては、例えばC γ 1、C γ 2、C γ 3又はC γ 4領域が挙げられる。

ここで、マウスH鎖V領域をコードするcDNAを発現ベクターに挿入するにあたり、PCR法により該cDNAに適当な塩基配列を導入することが出来る。例えば、該cDNAの5'-末端に適当な制限酵素の認識配列を有するように、そして転写効率をよくするため該cDNAの開始コドン直前にKozakコンセンサス配列（Kozak, M. et al., J. Mol. Biol., 196, 947-950, 1987）を有するように設計したPCRプライマー、及び、該cDNAの3'-末端に適当な制限酵素の認識配列を有するように設計したPCRプライマーを用いてPCRを行うことで、これら適当な塩基配列を発現ベクターに導入することができる。

こうして構築したマウスH鎖V領域をコードするcDNAを適当な制限酵素で処理した後、上記発現ベクターに挿入して、H鎖C領域（C γ 1あるいはC γ 4）をコードするDNAを含むキメラH鎖発現ベクターを構築する。

（ii）キメラ抗体L鎖 κ 鎖をコードするcDNAを含む発現ベクターの構築

キメラ抗体のL鎖発現ベクターは、マウスL鎖V領域をコードするcDNAを、ヒト抗体のL鎖C領域をコードするDNAを含む適当な発現ベクターに導入することにより得ることが出来る。L鎖C領域としては、例えばC κ 、C λ 領域が挙げられる。

マウスL鎖V領域をコードするcDNAを含む発現ベクターを構築するにあたり、PCR法により、該cDNAに適当な塩基配列を導入することが出来る。例えば、該cDNAの5'-末端に適当な制限酵素の認識配列を有するように、そして転写効率をよくするためのKozakコンセンサス配列を有するように設計したPCRプライマー、及び、3'-末端に適当な制限酵素の認識配列を有するように設計したPCRプライマーを用いてPCRを行うことで、これら適当な塩基配列を該cDNAに導入する。

こうして構築したマウスL鎖V領域をコードするcDNAを適当な制限酵素で処理した後、上記発現ベクターに挿入して、L鎖C領域（C κ 領域）をコードするDNAを含むキメラL鎖発現ベクターを構築する。

4. ヒト型化抗体の作製

(1) ヒト抗体との相同性検索

マウスモノクローナル抗体のCDRがヒト抗体に移植されているヒト型化抗体を作製するためには、マウスモノクローナル抗体のFRとヒト抗体のFRとの間に高い相同性が存在することが望ましい。従って、マウス抗ヒトTFモノクローナル抗体のH鎖及びL鎖のV領域を、Data Bankを用いて構造が解明されているすべての既知抗体のV領域と比較する。また、同時にKabatらにより、抗体のFRの長さ、アミノ酸の相同性等によって分類されたヒト抗体のサブグループ（HSG: Human subgroup）（Kabat, E. A. ら、US Dep. Health and Human Services, US Government Printing Offices, 1991）との比較を行う。

ヒトH鎖V領域の場合は、KabatらによるHSG分類により、HSG I～IIIに分類することが出来、例えば、マウス抗ヒトTFモノクローナル抗体ATR-5のH鎖V領域は、HSG Iのコンセンサス配列と67.8%のホモロジーを有する。一方、ヒトL鎖 κ 鎖V領域は、KabatらによるHSG分類により、HSG I～IVに分類することが出来、例えば、マウス抗ヒトTFモノクローナル抗体ATR-5のL鎖 κ 鎖V領域は、HSG Iのコンセンサス配列と72.3%のホモロジーを有する。

従来の技術によりマウス抗体をヒト型化する場合には、必要によっては、ヒト型化V領域のCDRの構造をより一層もとのマウス抗体の構造に近づけるために、CDRを支持しているマウス抗体のV領域のFRの一部のアミノ酸配列をヒトV領域のFRに移植する場合がある。しかしながら、マウス抗体のV領域FRのどのアミノ酸をヒト抗体V領域のFRに移植すべきかについては、一定の法則がない。従って、CDRの構造を保持するために必須のアミノ酸を特定することは、多くの努力を必要とする。

また、FRの一部にマウス抗体のV領域からヒトV領域に移植されたアミノ酸配列に対するヒト抗体ができる危険性が存在する。本発明では、ヒト型化した抗体に於いてCDRを除く全てのアミノ酸配列をヒト抗体由来のアミノ酸配列とするために、CDRの立体構造を保持するために必要な四個のFR（FR1～4）について、一つのFRを単位として、データベース上に存在するマウス抗体のFRと相同性の高いヒト抗体のFRを検索した。以下に、モノクローナル抗体ATR-5のH鎖及びL鎖のV領域の各FRについて、データベースと相同性検索した結果を示す。

表 1

FRのNo	アクセッションNo	マウス抗体H鎖V領域の それぞれのFRとのホモロ ジー (%)	配列番号	
H鎖FR1	L39130	53.0	110	
H鎖FR2	L39130	92.9	111	
	P01742	71.4	112	10
	Z80844	78.6	113	
H鎖FR3	L39130	62.5	114	
	Z34963	71.9	115	
	P01825	53.1	116	
	M62723	68.8	117	
	Z80844	68.8	118	20
	L04345	65.6	119	
	S78322	75.0	120	
	Z26827	56.3	121	
	U95239	65.6	122	
	L03147	65.6	123	
H鎖FR4	L39130	90.9	124	30

表 2

FRのNo	アクセッションNo	マウス抗体L鎖V領域の それぞれのFRとのホモロ ジー (%)	配列番号
L鎖FR1	Z37332	78.3	125
L鎖FR2	Z37332	80.0	126
	S65921	80.0	127
	X93625	80.0	128
L鎖FR3	Z37332	71.9	129
	S68699	75.0	130
	P01607	71.9	131
L鎖FR4	Z37332	90.0	132

(2) ヒト型化抗体V領域をコードするDNAの設計

ヒト型化抗体V領域をコードするDNAの設計における第一段階は、設計の基礎となるヒト抗体V領域の各FRを選択することである。また、FR shuffleにおいては、それぞれのFRにおいて、バラエティーの高いヒト抗体V領域FRを選択する必要がある。

本発明においては、モノクローナル抗体ATR-5に関しては、H鎖については、マウス抗体H鎖V領域全体と各FRとのホモロジー検索の結果から、FR2については3種類、FR3については10種類のヒト抗体V領域FRを選択した。L鎖については、マウス抗体L鎖V領域全体と各FRとのホモロジー検索の結果から、FR2については3種類、FR3については3種類のヒト抗体V領域FRを選択する事が出来る。

ヒト型化H鎖およびL鎖V領域ともに、第一のバージョン（バージョンa: ver. a）として、マウスモノクローナル抗体ATR-5のH鎖およびL鎖V領域とそれぞれホモロジーの高いヒト抗体H鎖およびL鎖V領域L39130とZ37332を選択する事が出来る。これらのヒト型化抗体を作製するに当たり、FR shuffleを容易に行えるように各CDR内部及びFRの適当な部位に、適当な制限酵素認識部位を設計する事が出来る。こうすることにより、いずれかのFRのみを容易に入れ替えることが可能になる。例えばヒト型化H鎖CDR1の制限酵素EcoT22I認識部位、CDR2の制限酵素BamHI認識部位、CDR3の制限酵素NcoI認識部位およびFR3の制限酵素XhoI認識部位、例えばヒト型化L鎖CDR1の制限酵素AflIII認識部位、CDR2の制限酵素SpeI認識部位、CDR3の制限酵素PstI認識部位およびFR3の制限酵素AccIII認識部位である。

このように設計したバージョンaを基にして、それぞれのFRについてFR shuffleを行い、所望の活性を有するヒト型化抗体を作製する事が出来る。

(3) ヒト型化抗体V領域の断片の作製

本発明のヒト型化抗体は、該抗体のC領域、及びV領域のFRがヒト抗体由来のものであり、V領域のCDRがマウス抗体由来のものである。本発明のヒト型化抗体のV領域の断片は、鋳型となるヒト抗体のDNA断片が入手可能ならば、PCR法によるCDR-グラフティングと呼ばれる手法により作製することができる。「CDR-グラフティング」とは、マウス由来のCDRをコードするDNA断片を作製し、これを鋳型となるヒト抗体のCDRと入れ換える手法をいう。

また、鑄型となるヒト抗体のDNA断片が入手できない場合は、データベースに登録されている塩基配列をDNA合成機で合成し、PCR法によりヒト型化抗体V領域を作製することができる。さらに、アミノ酸配列のみデータベースに登録されている場合は、そのアミノ酸配列を基に、Kabat, E. A. らの報告 (US Dep. Health and Human Services, US Government Printing Offices, 1991) している抗体のコドン使用頻度に基づいて、全塩基配列を類推することができる。この塩基配列をDNA合成機で合成し、PCR法によりヒト型化抗体V領域の断片を作製することができる。

(i) ヒト型化H鎖V領域をコードするDNA及び発現ベクターの構築

本発明では、ヒト型化抗体の鑄型とするヒト抗体のH鎖V領域をコードする遺伝子をデータベースから入手し、ヒト型化H鎖V領域をコードするDNAの全塩基配列をDNA合成機で合成し、PCR法により構築することが出来る。例えば、マウス抗ヒトTFモノクローナル抗体ATR-5のH鎖V領域と高い相同性（ホモロジー）を有するL39130をヒト型化H鎖V領域バージョン“a”として作製することが出来る。ヒト型化H鎖V領域バージョン“a”を作製するためには、例えば配列番号22～26に示す5本のプライマー及び配列番号27、28に示す2本の外部プライマーに分けて使用する。

CDRグラフティングプライマーhR5Hv1S（配列番号22）、hR5Hv2S（配列番号23）及びhR5Hv4S（配列番号24）はセンスDNA配列を有し、そしてCDRグラフティングプライマーhR5Hv3A（配列番号25）及びhR5Hv5A（配列番号26）はアンチセンスDNA配列を有し、そしてそれぞれプライマーの両端に18-35bpの相補的配列を有する。hR5Hv1SはKozakコンセンサス配列（Kozak, M, ら, J. Mol. Biol. 196, 947-950, 1987）およびSalI認識部位を有するように、またhR5Hv5AはNheI認識部位を有するように設計する。また外部プライマーhR5HvPrS（配列番号27）及びhR5HvPrA（配列番号28）はCDRグラフティングプライマーhR5Hv1S及びhR5Hv5Aとホモロジーを有する。

PCR法を用いて、5本のプライマーをアセンブリさせ完全長のcDNA合成し、さらに外部プライマーを加えDNAの増幅を行う。PCR法によるアセンブリとは、hR5Hv1S、hR5Hv2S、hR5Hv4S、hR5Hv3A及びhR5Hv5Aとがその相補的配列によりアニーリングし、完全長のヒト型化H鎖V領域のDNAが合成されることを指す。

ヒト抗体H鎖C領域は任意のヒトH鎖C領域であることができ、例えばヒトH鎖C γ 1、C γ 2、C γ 3又はC γ 4を挙げることができる。

前記のようにして構築したヒト型化抗体H鎖V領域のDNAは、任意のヒト抗体H鎖C領域、例えばヒトH鎖C領域C γ 1またはC γ 4のDNAと連結することができる。キメラ抗体H鎖の構築で述べたように、適当な制限酵素にて処理した後、エンハンサー／プロモーター系のごとき発現制御領域のもとでヒトH鎖C領域をコードするDNAと連結し、ヒト型化H鎖V領域及びヒトH鎖C領域のDNAを含む発現ベクターを作製する。

(ii) ヒト型化L鎖V領域をコードするDNA及び発現ベクターの構築

本発明では、H鎖V領域をコードするDNAの場合と同様、鑄型となるヒト抗体のL鎖V領域の遺伝子をデータベースから入手し、ヒト型化L鎖V領域をコードするDNAの全塩基配列をDNA合成機で合成し、PCR法により構築することが出来る。例えば、マウス抗ヒトTFモノクローナル抗体ATR-5のL鎖V領域と高い相同性（ホモロジー）を有するZ37332をヒト型化L鎖V領域バージョン“a”として作製することが出来る。ヒト型化L鎖V領域バージョン“a”を作製するためには、CDRグラフティングプライマーh5Lv1S（配列番号85）及びh5Lv4S（配列番号86）はセンスDNA配列を、CDRグラフティングプライマーh5Lv2A（配列番号87）、h5Lv3A（配列番号88）及びh5Lv5A（配列番号89）はアンチセンスDNA配列を有し、各プライマーの両端に20bpの相補的配列を有する。プライマーh5Lv1Sは、Kozakコンセンサス配列（Kozak, M, ら, J. Mol. Biol. 196, 947

10

20

30

40

50

ー 9 5 0 , 1 9 8 7) および制限酵素 B g l I I 認識部位を有するように、また h 5 L v 5 A は制限酵素 S p l I 認識部位を有するように設計する。また、外部プライマー h 5 L v S (配列番号 9 0) 及び h s L v A (配列番号 9 1) は C D R グラフティングプライマー h 5 L v 1 S 及び h 5 L v 5 A とホモロジーを有する。

ヒト型化 H 鎖 V 領域と同様に、P C R 法を用いて、5 本のプライマーをアセンブリさせ完全長の c D N A 合成し、さらに外部プライマーを加え D N A の増幅を行うことができる。

ヒト抗体 L 鎖 C 領域は任意のヒト L 鎖 C 領域であることができ、例えばヒト L 鎖 C λ や C κ を挙げることができる。

前記のようにして構築したヒト型化抗体 L 鎖 V 領域の D N A は、任意のヒト抗体 L 鎖 C 領域、例えばヒト L 鎖 C κ や C λ 領域のものと連結することができる。適当な制限酵素で処理した後、エンハンサー／プロモーター系のごとき発現制御領域のもとでヒト L 鎖 κ 鎖 C 領域をコードする D N A と連結し、ヒト型化 L 鎖 V 領域及びヒト L 鎖 κ 鎖 C 領域をコードする D N A を含む発現ベクターを作製する。

前記のようにして、ヒト型化抗体の V 領域断片が作製されても、該 V 領域断片が抗体としての活性 (抗原に対する結合活性、中和活性等) を有するか否かは必ずしも明らかではない。そのため、ヒト型化 H 鎖との組み合わせにより C O S - 7 のごとき動物細胞で発現させ、活性の有無を検討する必要がある。

(i i i) ヒト型化抗体の H 鎖及び L 鎖 V 領域の F R s h u f f l e

本発明者は、作製したヒト型化 H 鎖及び L 鎖 V 領域を含むヒト型化抗体を C O S - 7 のごとき動物細胞で一過性に発現させ、抗原結合活性及び中和活性について検討した結果、抗原結合活性及び中和活性を有するものの、キメラ抗体と比較して十分でないことがことが判明した。

本発明者は、ヒト型化 H 鎖及び L 鎖 V 領域の各 F R を順次 s h u f f l e することにより、この問題を解決する事が出来る。F R の s h u f f l e に用いるヒト抗体は、既存のデータベースより選択する事が出来る。選択したヒト抗体の F R は、データベースで明らかになっている塩基配列を基に、D N A 合成機により合成することが出来る。この際、前記のように、C D R もしくは F R に設計した制限酵素認識配列を付加することにより、上記で作製したヒト型化抗体の H 鎖及び L 鎖 V 領域の F R と、容易に s h u f f l e することが出来る。このようにして作製したヒト型化抗体の活性を調べることにより、所望する抗原結合活性並びに中和活性を有するヒト型化抗体を得ることが出来る。

例えば、ヒト型化抗体 V 領域 H 鎖 F R 3 をヒト抗体 Z 3 4 9 6 3 (G e n B a n k , B o r r e t z e n M . ら , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U . S . A . , 9 1 , 1 2 9 1 7 - 1 2 9 2 1 , 1 9 9 4) 由来の F R 3 に s h u f f l e する事が出来る。F R - シャッフリングプライマー F 3 R F F S (配列番号 3 5) および F 3 R F B S (配列番号 3 6) はセンス D N A 配列を有し、F 3 R F F A (配列番号 3 7) および F 3 R F B A (配列番号 3 8) はアンチセンス D N A 配列を有する。F R - シャッフリングプライマー F 3 R F F S 、 F 3 R F B S 、 F 3 R F F A 、 F 3 R F B A は D N A 合成機で合成することが出来る。

F 3 R F F S と F 3 R F F A 、 F 3 R F B S と F 3 R F B A をアニールさせ、それぞれ B a l I および X h o I 、 N c o I および X h o I で消化した。これらを B a l I および N c o I で消化することにより調製したプラスミド h A T R 5 H v a / C V I D E C (B a l I / N c o I) に導入し、塩基配列を確認することにより正しい配列を有するプラスミドを得ることが出来る。このようにして得られたヒト型化抗体 H 鎖を含むプラスミドを h A T R 5 H v b / C V I D E C と命名し、プラスミド h A T R 5 H v b / C V I D E C に含まれるヒト型化 H 鎖をバージョン “ b ” とする。その塩基配列および対応するアミノ酸配列を配列番号 3 9 に示し、バージョン “ b ” のアミノ酸配列を配列番号 4 0 に示す。

同様にして、データベースから選択した他のヒト抗体 V 領域 H 鎖および L 鎖由来の F R についても、ヒト型化抗体 V 領域 H 鎖及び L 鎖の F R と s h u f f l e することが出来る。

ヒト型化抗体の H 鎖 V 領域及び L 鎖 V 領域の F R を s h u f f l e するためのさらに好ましいヒト抗体を選択するためには、以下のようにして行うことが出来る。すなわち、ヒト

10

20

30

40

50

型化抗体H鎖バージョン“b”とキメラ抗体L鎖の組み合わせでは、キメラ抗体あるいはマウス抗体と同等の中和活性を有する。しかしながら、ヒト型化抗体H鎖バージョン“b”とヒト型化抗体L鎖バージョン“a”との組み合わせでは、キメラ抗体あるいはマウス抗体より中和活性が低下している。

このような場合に、FRをshuffl eするため候補とするヒト抗体を選択するためには、例えば、ヒト型化抗体H鎖バージョン“b”のFR3（アクセッションNo. 734963：配列番号115）に対する相同性検索を行い、この配列と相同性の高いヒト抗体を選択することが出来る。例えば、このようにして選択したヒト抗体H鎖V領域FR3では、U95239（配列番号122）やL03147（配列番号123）が挙げられる。このようにして作製したヒト型化抗体V領域H鎖のアミノ酸配列を表3及び表4に示し、そしてヒト型化抗体V領域L鎖のアミノ酸配列を表5に示す。

表 3

H 鎖 V 領域のアミノ酸配列

	FR1			CDR1	FR2	CDR2		
	1	2	3		4	5	6	
	123456789012345678901234567890	1234567890	12345	67890123456789	012A3456789012345			
L39130(a)	QVQLLESGAVLARPGTSVKISCKASCFNIK	DYYMH	WVKRPGQGLEWIG	CNDPANGHSMYDPK	FQG			
Z34963(b)	-----	-----	-----	-----	-----			
M30885(c)	-----	-----	-----	-----	-----			
M62723(d)	-----	-----	-----	-----	-----			
Z80844(e)	-----	-----	-----	-----	-----			
L04345(f)	-----	-----	-----	-----	-----			
S78322(g)	-----	-----	-----	-----	-----			
Z26827(h)	-----	-----	-----	-----	-----			
U95239(i)	-----	-----	-----	-----	-----			
L03147(j)	-----	-----	-----	-----	-----			
P01742(b1)	-----	-----	-----	-----R-A-----	M-----			
P01742(d1)	-----	-----	-----	-----R-A-----	M-----			
Z80844(b3)	-----	-----	-----	-----R-A-----				
Z80844(d3)	-----	-----	-----	-----R-A-----				

10

20

30

40

表 4

H鎖 V領域のアミノ酸配列 (続き)

	FR3			CDR3	FR4
	7	8	9	10	11
	67890123456789012ABC345678901234	56789012	34567890123	56789012	34567890123
L39130(a)	RAKLTAA	TSASIA	YLEFSS	LTNEDSA	VYYCAR DSGYAMDY WGQGT
Z34963(b)	-VTI--D--TNT--M-L--RS--T-I--				
M30885(c)	-VTMLVD--KNQFS-RL--V-AA-T--				
M62723(d)	-VTI--DE-T-T--M-L--RS--F--				
Z80844(e)	-VSI--DE-TK--M-LN--RS--T--F--				
L04345(f)	-VTI--DT-T-T--M-LR--RSD-T--				
S78322(g)	K-T--DE-S-T--MQL--RS--S--				
Z26827(h)	-VTMS-DK-S-A--QWT--KAS-T-I-F--				
U95239(i)	-VTI--D--T-TVFM-L--RS--T--				
L03147(j)	-VTF--D--NT--M-LR--RSA-T--				
P01742(b1)	-VTI--D--TNT--M-L--RS--T-I--				
P01742(d1)	-VTI--DE-T-T--M-L--RS--F--				
Z80844(b3)	-VTI--D--TNT--M-L--RS--T-I--				
Z80844(d3)	-VTI--DE-T-T--M-L--RS--F--				

表 5

L鎖V領域のアミノ酸配列

	FR1		CDR1		FR2	CDR2
	1	2	3	4	5	
	12345678901234567890123	45678901234	567890123456789	0123456		
Z37332(a)	DIQMTQSPSSLSASV	GDRVITC	KASQDIKSFLS	WYQQKPGKAPKLLIY	YATSLAD	
S68699(b)	-----	-----	-----	-----	-----	
P01607(c)	-----	-----	-----	-----	-----	
S65921(b1)	-----	-----	-----	-F-----S--T--	-----	
X93625(b2)	-----	-----	-----	-----E---S---	-----	

10

	FR3			CDR3	FR4
	6	7	8	9	10
	78901234567890123456789012345678	901234567	8901234567		
Z37332(a)	GVPSRFGSGSGSGTDF	TLTISSLQPEDFATYYC	LQHGESPYT	FGGGTKVEIK	
S68699(b)	-----Y-----	-----	-----	-----	
P01607(c)	-----Y-----	I-----	-----	-----	
S65921(b1)	-----Y-----	-----	-----	-----	
X93625(b2)	-----Y-----	-----	-----	-----	

20

30

前記のようにして構築したヒト型化抗体H鎖及びL鎖V領域各バージョンは、任意のヒト抗体H鎖C領域およびL鎖C領域、例えばそれぞれヒトH鎖C γ 4およびヒトL鎖C κ 領域のDNAと連結することができる。適当な制限酵素で処理した後、エンハンサー／プロモーター系のごとき発現制御領域のもとでヒトH鎖C γ 4およびヒトL鎖C κ 領域をコードするDNAと連結し、ヒト型化H鎖及びL鎖V領域各バージョンをコードするDNAと、それぞれヒトH鎖C γ 4及びヒトL鎖C κ 領域をコードするDNAとを含む発現ベクターを作製する。

また、前記のようにして構築したヒト型化抗体H鎖V領域及びヒトH鎖C領域をコードするDNAと、ヒト型化L鎖V領域及びヒトL鎖C領域をコードするDNAとを、単一の発現ベクター（例えば、WO 94／11523 参照）に導入し、そして該ベクターを用いて宿主細胞を形質転換し、次にこの形質転換された宿主をインービボ又はインービトロで培養して目的とするヒト型化抗体を生産させることができる。

40

5. キメラ抗体及びヒト型化抗体の製造

キメラ抗体又はヒト型化抗体を製造するためには、H鎖V領域及びH鎖C領域をコードするDNA、並びにL鎖V領域及びL鎖C領域をコードするDNAを単一ベクターに連結し、適当な宿主細胞を形質転換し、抗体を生産させることができる。すなわち、キメラ抗体の発現には、エンハンサー／プロモーター系のごとき発現制御領域による制御のもとで、クローニングされたcDNAに存在するマウスリーダー配列並びにマウスH鎖V領域及び

50

ヒトH鎖C領域をコードするDNAと、マウスリーダー配列並びにマウスL鎖V領域及びヒトL鎖C領域をコードするDNAとを単一の発現ベクター（例えば、WO94/11523参照）に導入する。

ヒト型化抗体の発現には、エンハンサー／プロモーター系のごとき発現制御領域による制御のもとで、ヒト型化H鎖V領域及びヒトH鎖C領域をコードするDNAと、ヒト型化L鎖V領域及びヒトL鎖C領域をコードするDNAとを単一の発現ベクター（例えば、WO94/11523参照）に導入する。そして、これらのベクターを用いて宿主細胞を形質転換し、次にこの形質転換された宿主をインービボ又はインービトロで培養して目的とするキメラ抗体又はヒト型化抗体を生産させる。

また、H鎖V領域およびL鎖V領域を含むそれぞれ2種類の発現ベクターを作製することが出来る。すなわち、キメラ抗体については、エンハンサー／プロモーター系のごとき発現制御領域による制御のもとでマウスH鎖V領域及びヒトH鎖C領域をコードするDNAを含む発現ベクター、並びにエンハンサー／プロモーター系のごとき発現制御領域のもとでマウスL鎖V領域及びヒトL鎖C領域をコードするDNAを含む発現ベクターを作製し、ヒト型化抗体については、エンハンサー／プロモーター系のごとき発現制御領域による制御のもとでヒト型化H鎖V領域及びヒトH鎖C領域をコードするDNAを含む発現ベクター、並びにエンハンサー／プロモーター系のごとき発現制御領域のもとでヒト型化L鎖V領域及びヒトL鎖C領域をコードするDNAを含む発現ベクターを作製する。

あるいはまた、キメラ抗体については、エンハンサー／プロモーター系のごとき発現制御領域による制御のもとで、マウスH鎖V領域及びヒトH鎖C領域をコードするDNA、並びにマウスL鎖V領域及びヒトL鎖C領域をコードするDNAを含んで成る発現ベクターを作製し、ヒト型化抗体については、エンハンサー／プロモーター系のごとき発現制御領域による制御のもとで、ヒト型化H鎖V領域及びヒトH鎖C領域をコードするDNA、並びにヒト型化L鎖V領域及びヒトL鎖C領域をコードするDNAを含んで成る発現ベクターを作製する。

次に、これらの発現ベクターにより哺乳類細胞のごとき宿主細胞を同時形質転換し、そして形質転換された細胞をインービトロ又はインービボで培養してキメラ抗体又はヒト型化抗体を製造する（例えば、WO91/16928参照）。

以上のようにして目的とするキメラ抗体又はヒト型化抗体をコードする遺伝子で形質転換した形質転換体を培養し、産生したキメラ抗体又はヒト型化抗体は、細胞内又は細胞外から分離し均一にまで精製することができる。

本発明の目的蛋白質であるキメラ抗体又はヒト型化抗体の分離・精製を、プロテインAアガロースカラムを用いて行うことができる。また、その他に、通常の蛋白質で用いられる分離・精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。例えば各種クロマトグラフィー、限外濾過、塩析、透析等を適宜選択、組合せれば、キメラ抗体又はヒト型化抗体は分離・精製することができる。

ヒトTFに対する本発明のキメラ抗体又はヒト型化抗体を製造するために、任意の発現系を使用することができる。例えば、真核細胞を用いる場合は動物細胞（例えば樹立された哺乳類細胞系）、真糸状菌細胞又は酵母細胞などが挙げられ、原核細胞を用いる場合は細菌細胞（例えば大腸菌細胞等）などを使用することができる。好ましくは、本発明のキメラ抗体又はヒト型化抗体は哺乳類細胞、例えばCOS細胞又はCHO細胞中で発現される。

これらの場合、哺乳類細胞での発現のために有用な常用のプロモーターを用いることができる。例えば、ヒト・サイトメガロウィルス前期（human cytomegalovirus immediate early；HCMV）プロモーターを使用するのが好ましい。HCMVプロモーターを含有する発現ベクターの例には、HCMV-VH-HCγ1，HCMV-VL-HCK等であって、pSV2neoに由来するもの（WO92-19759）が含まれる。

また、その他に、本発明のために用いることのできる哺乳動物細胞における遺伝子発現のプロモーターとしては、レトロウイルス、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、シミア

10

20

30

40

50

ンウイルス40 (SV40)などのウイルスプロモーターやヒト・ポリペプチド・チェーン・エロンゲーション・ファクター1 α (HEF-1 α)などの哺乳動物細胞由来のプロモーターを用いればよい。例えばSV40のプロモーターを使用する場合は、Mulliganらの方法 (Nature, 277, 108, 1979)、また、HEF-1 α プロモーターを使用する場合は、Mizushima, S. らの方法 (Nucleic Acids Research, 18, 5322, 1990)に従えば容易に実施することができる。

複製起原としては、SV40、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、牛パピローマウイルス (BPV) 等の由来のものを用いることができ、さらに宿主細胞系中での遺伝子コピー数増幅のため、発現ベクターは選択マーカーとして、ホスホトランスフェラーゼAPH (3') II又はI (neo) 遺伝子、チミジンキナーゼ (TK) 遺伝子、大腸菌キサンチン・グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Ecogpt) 遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) 遺伝子等を含むことができる。

6. キメラ抗体及びヒト型化抗体の抗原結合活性及び中和活性の評価

(1) ELISAによる抗体の濃度測定

得られた精製抗体の濃度の測定は、ELISAにより行うことができる。

抗体濃度測定のためのELISAプレートを次のようにして調製する。ELISA用96穴プレート (例えばMaxisorp, NUNC) の各穴を例えば1 μ g/mlの濃度に調製したヤギ抗ヒトIgG γ 抗体 (BioSource) 100 μ lを固相化する。

200 μ lの希釈バッファー (以下、DBと称する。例えば50mM Tris-HCl、1mM MgCl₂、0.1M NaCl、0.05% Tween20、0.02%

NaN₃、1%牛血清アルブミン (BSA)、pH7.2) でブロッキングの後、キメラ抗体、若しくはヒト型化抗体を発現させたCOS-7細胞若しくはCHO細胞の培養上清、又は精製キメラ抗体、若しくはヒト型化抗体を段階希釈して各穴に加える。次にアルカリフォスファターゼ結合ヤギ抗ヒトIgG抗体100 μ lを加え、1mg/mlの基質溶液 (Sigma104、p-ニトロフェニルリン酸、SIGMA) を加え、次に405/655nmでの吸光度をマイクロプレートリーダー (Bio Rad) で測定する。濃度測定のスタンダードとしてIgG4 κ (The Binding Site) を用いることができる。

(2) 抗原結合能の測定

抗原結合測定のためのCell ELISAプレートでは、次のようにして調製する。ヒト膀胱癌細胞J82 (ATCC HTB-1) を、細胞培養用96穴プレートの60穴に1 $\times$ 10⁶個の細胞数で播き込む。これをCO₂インキュベーターで1日培養し (10%の牛胎児血清 (GIBCO) を含むRPMI1640培地)、細胞を接着させる。培養液を捨て、300 μ lのPBSで各穴を2回洗浄する。4%のパラホルムアルデヒドを含むPBS (以下、PFA/PBSと称す) を各穴に100 μ l加え、氷上で10分間静置し、細胞を固相化する。

PFA/PBSを捨て、300 μ lのPBSで各穴を2回洗浄後、250 μ lのDBでブロッキングする。キメラ抗体またはヒト型化抗体を含む培養上清、あるいは精製したキメラ抗体またはヒト型化抗体をDBにて段階希釈して100 μ lを各穴に加え、室温にて2時間インキュベートしRBで洗浄後、DBで1000倍に希釈したアルカリフォスファターゼ結合ヤギ抗ヒトIgG γ 抗体 (Bio Source) 100 μ lを加える。室温にて1時間インキュベートしRBで洗浄ののち、基質溶液を加え、次に405/655nmでの吸光度をマイクロプレートリーダー (Bio-Rad) で測定する。

(3) 中和活性の測定

マウス抗体、キメラ抗体およびヒト型化抗体の中和活性は、ヒト胎盤由来トロンボプラスチン、Thromborel S (Behringwerke AG) によるファクターXa産生阻害活性を指標に測定する事が出来る。すなわち、1.25mg/mlのThromborel S 10 μ lと適当な濃度に希釈した抗体10 μ lに緩衝液 (5mMのCaCl₂、0.1%のBSAを含むTBS) 60 μ lを加え、96穴プレート中で室温

10

20

30

40

50

で1時間反応させる。

これに3.245 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のヒトファクターX（セルサス・ラボラトリーズ）および82.5 ng/ml のヒトファクターV I I a（エンザイム・リサーチ）をそれぞれ10 μl 加え、さらに室温で1時間反応させる。0.5MのEDTAを10 μl 加え、反応を停止させ、発色基質溶液を50 μl 加え、Microplate Reader（Bio Rad）で405/655 nm の吸光度を測定する。室温で1時間反応させ、再度405/655 nm の吸光度を測定する。抗体無添加の1時間の吸光度変化を100%の活性とし、それぞれの吸光度変化から残存活性（%）を算出することにより、中和活性を測定する。

発色基質溶液はテストチーム発色基質S-2222（Chromogenix）を添付文書に従い溶解し、精製水で2倍希釈した後、ポリブレン液（0.6 mg/ml ヘキサジメチリンブロマイド、SIGMA）と1:1で混和し調製する。

7. ヒト型化抗体と可溶性TFとの相互作用による反応速度論的解析

B I A C O R Eによって本発明の抗TF抗体のkinetics parameter、すなわち解離定数（KD）、解離速度定数（kdiss）及び結合速度定数（kass）を測定することができる。

組換え型Protein Gをセンサーチップに固相化し、これに抗体を結合させ、抗原として精製した組換え型TF（1-219にFLAGペプチドタグを付した可溶型TF）（以下、可溶型TFと称す）を用い、種々の濃度に調製した可溶型TFをアナライトとする。得られたセンサーグラムから、カイネティクスパラメーター（解離速度定数kdiss及び結合速度定数kass）を算出することによって解離定数を求めることができる。速度論的解析に関しては、「Kinetic analysis of monoclonal antibody-antigen interactions with a new biosensor based analytical system」（karlsson, R. et al. (1991) J. Immunol. Methods 145, 229-240.）などを参考にすることができる。

本発明の抗TF抗体は、解離定数（KD）が小さい値であるほど中和活性を有する点で好ましい。本発明の抗TF抗体において、KD値は 2.30×10^{-8} [1/M]以下であることが好ましく、 2.30×10^{-9} [1/M]以下であることがより好ましく、 1.17×10^{-9} [1/M]以下のものが最も好ましい。

また、KD値は解離速度定数（kdiss）及び結合速度定数（kass）の2つのパラメーターから決定される（ $KD = kdiss / kass$ ）。したがって、kdissの値が小さく、kassの値が大きければ、KD値が小さくなることは明らかである。

具体的には、本発明の抗TF抗体の場合、kdissの値が 9.52×10^{-3} [1/sec]以下であればよい。好ましくは、kdissの値が 9.52×10^{-4} [1/sec]以下であり、最も好ましくは 6.35×10^{-4} [1/sec]以下である。

一方、kassの値は 4.15×10^4 [1/M·sec]以上であればよい。好ましくは、kassの値が 4.15×10^5 [1/M·sec]以上であり、最も好ましくは 4.65×10^5 [1/M·sec]以上である。

さらに、kdissの値が 9.52×10^{-3} [1/sec]以下であり、かつ、kassの値が 4.15×10^4 [1/M·sec]以上の抗TF抗体も好ましい。

さらに具体的には、本発明の抗TF抗体は、KD値が $1.09 \times 10^{-10} \sim 2.30 \times 10^{-8}$ [1/M]の範囲であり、 $1.09 \times 10^{-9} \sim 2.30 \times 10^{-9}$ [1/M]のものが好ましく、 $1.09 \times 10^{-9} \sim 1.39 \times 10^{-9}$ [1/M]のものが最も好ましい。

また、kdiss値が $5.06 \times 10^{-4} \sim 9.52 \times 10^{-3}$ [1/sec]の範囲であり、 $5.06 \times 10^{-4} \sim 9.52 \times 10^{-4}$ [1/sec]のものが好ましく、 $5.06 \times 10^{-4} \sim 6.49 \times 10^{-4}$ [1/sec]のものが最も好ましい。

そしてkass値は、 $4.15 \times 10^4 \sim 5.44 \times 10^5$ [1/M·sec]の範囲であり、 $4.15 \times 10^5 \sim 5.44 \times 10^5$ [1/M·sec]のものが好ましく、4.

10

20

30

40

50

$6.5 \times 10^5 \sim 5.44 \times 10^5$ [$1/M \cdot sec$] のものが最も好ましい。

これらのKD値、kdiss値及びkass値は、BIACORE以外にもスキャッチャード解析、あるいはBIACOREなどの表面プラズモン共鳴センサー等により得ることができるが、BIACOREを用いて得ることが好ましい。

8. ヒト型化抗体のヒトTFへの反応性の測定

ドットプロットハイブリダイゼーション法によって、本発明のヒト型化抗体の非変性TF、非還元下変性TF、還元下変性TFへの反応性を検討することができる。

TFはヒト組織より精製したもの、もしくはCHO細胞の哺乳動物細胞で発現させ精製したもの等を用い、検討できる。また、変性剤には尿素の代わりにグアニジン塩酸塩やSDS等を用いることができ、還元剤にはDTTの代わりに2-メルカプトエタノールなどのSH還元試薬を用いることもできる。ヒト型化抗体の検出には様々な物質で標識された抗ヒトIgG抗体を用いることができる。ここでいう標識物質は例えば、放射性物質、ビオチン、FITC等の蛍光物質、ペルオキシダーゼやアルカリホスファターゼなどの酵素などである。本発明の抗TF抗体は、非変性TF、非還元下変性TFならびに還元下変性TFのいずれにも反応する。

10

9. ヒト型化抗体を有効成分として含む医薬組成物及びDIC治療剤

ヒトTFに対するヒト型化抗体の治療効果を確認するには、ヒト型化抗ヒトTF抗体を高DIC症状を呈した動物に投与し、DICの指標を測定することによりその治療効果を確認することができる。

本発明で使用される抗体は、ヒトTFに対するヒト型化された抗体である。この抗体は、ヒトTFに結合することにより、ヒトTFの活性を中和する抗体であり、特に、好ましくはヒト型化されたATR5抗体が挙げられる。ヒト型化ATR5抗体の作製方法は、実施例に記載されている。

20

本発明で使用される抗体は、塩析法、HPLC等を用いたゲル濾過法、プロテインAカラム等を用いたアフィニティークロマトグラフィー法等の通常の前製手段を組み合わせる高純度に精製することができる。このように精製された抗体は、放射免疫測定法(RIA)、酵素免疫測定法(EIA、ELISA)、あるいは蛍光抗体法(Immunofluorescence Analysis)等の通常の前疫学的手段により、高精度にヒトTFを認識することを確認できる。

本発明のTFに対するヒト型化抗体を有効成分として含む医薬組成物及びDIC治療剤は、非経口的に全身又は局所的に投与することができる。例えば、点滴などの静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射を選択することができる。患者の年齢、症状により適宜投与方法を選択することができる。有効投与量は、一回につき体重1kgあたり0.01mgから1000mgの範囲で選ばれる。あるいは、患者あたり10mg/body、好ましくは1~1000mg/bodyの投与量を選ぶことができる。

30

本発明のTFに対するヒト型化抗体を有効成分として含む医薬組成物及びDIC治療剤は、投与経路次第で医薬的に許容される担体や添加物を共に含むものであってもよい。このような担体及び添加物の例として、水、医薬的に許容される有機溶剤、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリル酸ナトリウム、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ペクチン、メチルセルロース、エチルセルロース、キサンタンガム、アラビアゴム、カゼイン、ゼラチン、寒天、ジグリセリン、グリセリン、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアリルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン(HSA)、マンニトール、フルビトール、ラクトース、医薬添加物として許容される界面活性剤などが挙げられる。使用される添加物は、本発明の剤形に応じて上記の中から適宜又は組み合わせる選択されるが、これらに限定されるものではない。

40

発明の効果

本発明により、ヒトTFに対するキメラ抗体およびヒト型化抗体ならびにヒト型化抗体の作製方法が提供される。これらの抗体は、ヒトにおける抗原性が低いことから、治療薬と

50

して有用である。

実施例

次に、実施例により、本発明をさらに具体的に説明する。

実施例 1. ヒトTFに対するマウスモノクローナル抗体のV領域をコードするDNAのクローニング

(1) mRNAの調製

ハイブリドーマATR-2、ATR-3、ATR-4、ATR-5 (IgG1κ)、ATR-7、及びATR-8 (IgG2aκ) からmRNAをQuick Prep mRNA Purification Kit (Pharmacia Biotech) を用いて調製した。キット添付の処方に従い、それぞれのハイブリドーマ細胞を抽出緩衝液で完全にホモジナイズし、オリゴ(dT)-セルローススパンカラムにてmRNAを精製し、エタノール沈殿を行った。mRNA沈殿物を溶出緩衝液に溶解した。 10

(2) マウス抗体V領域をコードする遺伝子のcDNAの作製及び増幅

(i) H鎖V領域cDNAのクローニング

ヒトTFに対するマウスモノクローナル抗体のH鎖V領域をコードする遺伝子のクローニングは、5'-RACE法(Frohman, M. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 8998-9002, 1988; Belyavsky, A. et al., Nucleic Acid Res. 17, 2919-2932, 1989)により行った。5'-RACE法にはMarathon cDNA Amplification Kit (CLONTECH) を用い、操作はキット添付の処方に従って行った。 20

前記のようにして調製したmRNA約1μgを鋳型として、キット添付のcDNA synthesis primerを加え、逆転写酵素と42℃、60分間反応させることによりcDNAへの逆転写を行った。これをDNAポリメラーゼI、DNAリガーゼ、RNaseHで16℃、1.5時間、T4 DNAポリメラーゼで16℃、45分間反応させることにより、2本鎖cDNAを合成した。2本鎖cDNAをフェノール及びクロロホルムで抽出し、エタノール沈殿により回収した。

T4 DNAリガーゼで16℃で一夜反応することにより、2本鎖cDNAの両端にcDNA アダプターを連結した。反応混合液は10mM Tricine-KOH (pH 8.5)、0.1mM EDTA溶液で50倍に希釈した。これを鋳型としてPCRによりH鎖V領域をコードする遺伝子を増幅させた。5'-側プライマーにはキット添付のアダプタープライマー1を、3'-側プライマーにはMHC-G1プライマー(配列番号1) (ATR-2、ATR-3、ATR-4及びATR-5) あるいはMHC-G2aプライマー(配列番号2) (ATR-7及びATR-8) (S. T. Jones, et al., Biotechnology, 9, 88-89, 1991)を使用した。 30

ATR-2、3、4及び5抗体H鎖V領域に対するPCR溶液は、100μl中に120mM Tris-HCl (pH 8.0)、10mM KCl、6mM (NH₄)₂SO₄、0.1% Triton X-100、0.001% BSA、0.2mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)、1mM MgCl₂、2.5ユニットのKOD DNAポリメラーゼ(東洋紡績)、30~50pmoleのアダプタープライマー1並びにMHC-G1プライマー、及びcDNAアダプターを連結したcDNAの反応混合物1~5μlを含有する。 40

PCRはいずれもDNA Thermal Cycler 480 (Perkin-Elmer)を用い、94℃にて30秒間、55℃にて30秒間、74℃にて1分間の温度サイクルで30回行った。

(ii) L鎖V領域cDNAのクローニング

ヒトTFに対するマウスモノクローナル抗体のL鎖V領域をコードする遺伝子のクローニングは、5'-RACE法(Frohman, M. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 8998-9002, 1988; Belyavsky, A. et al., Nucleic Acid Res. 17, 2919-293 50

2, 1989) により行った。5' - RACE法には Marathon cDNA Amplification Kit (CLONTECH) を用い、操作はキット添付の処方に従って行った。前記のようにして調製した mRNA 約 1 μ g を鋳型として cDNA 合成プライマーを加え、逆転写酵素と 42 $^{\circ}$ C、60 分間反応させることにより cDNA への逆転写を行った。

これを DNA ポリメラーゼ I、DNA リガーゼ、RNase H で 16 $^{\circ}$ C、1.5 時間、T4 DNA ポリメラーゼで 16 $^{\circ}$ C、45 分間反応させることにより、2 本鎖 cDNA を合成した。2 本鎖 cDNA をフェノール及びクロロホルムで抽出し、エタノール沈殿により回収した。T4 DNA リガーゼで 16 $^{\circ}$ C で一夜反応することにより、2 本鎖 cDNA の両端に cDNA アダプターを連結した。反応混合液は 10 mM Tricine-KOH (pH 8.5)、0.1 mM EDTA 溶液で 50 倍に希釈した。これを鋳型として PCR により L 鎖 V 領域をコードする遺伝子を増幅させた。5' 側プライマーにはアダプタープライマー 1 を、3' 側プライマーには MKC プライマー (配列番号 3) (S. T. Jones, et al., Biotechnology, 9, 88-89, 1991) を使用した。

10

PCR 溶液は、100 μ l 中に 120 mM Tris-HCl (pH 8.0)、10 mM KCl、6 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.1% Triton X-100、0.001% BSA、0.2 mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)、1 mM MgCl_2 、2.5 ユニットの KOD DNA ポリメラーゼ (東洋紡績)、30 ~ 50 pmol のアダプタープライマー 1 並びに MKC プライマー、及び cDNA ア

20

ダプターを連結した cDNA の反応混合物 1 μ l を含有する。PCR は DNA Thermal Cycler 480 (Perkin-Elmer) を用い、94 $^{\circ}$ C にて 30 秒間、55 $^{\circ}$ C にて 30 秒間、74 $^{\circ}$ C にて 1 分間の温度サイクルで 30 回行った。

(3) PCR 生成物の精製及び断片化

前記の PCR 反応混合液をフェノール及びクロロホルムで抽出し、増幅した DNA 断片をエタノール沈殿により回収した。DNA 断片を制限酵素 XmaI (New England Biolabs) により 37 $^{\circ}$ C で 1 時間消化した。XmaI 消化混合物を 2% から 3% の NuSieve GTG アガロース (FMC BioProducts) を用いたアガロースゲル電気泳動により分離し、H 鎖 V 領域として約 500 bp 長、L 鎖 V 領域として約 500 bp 長の DNA 断片を含有するアガロース片を切り出した。アガロース片をフェノール及びクロロホルムで抽出し、DNA 断片をエタノールで沈殿させた後、10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、1 mM EDTA 溶液 (以下、TE と称す) 10 μ l に溶解した。

30

上記のようにして調製したマウス H 鎖 V 領域及び L 鎖 V 領域をコードする遺伝子を含む XmaI 消化 DNA 断片と、XmaI で消化することにより調製した pUC19 プラスミドベクターとを DNA ライゲーションキット ver. 2 (宝酒造) を用い、添付の処方に従い 16 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させ連結した。

この連結混合物を大腸菌 JM109 コンピテント細胞 (ニッポンジーン) 100 μ l に加え、氷上で 30 分間、42 $^{\circ}$ C にて 1 分間静置した。

40

次いで 300 μ l の Hi-Competence Broth (ニッポンジーン) を加え 37 $^{\circ}$ C にて 1 時間インキュベートした後、100 μ g/ml アンピシリンを含む LB 寒天培地 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook, et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) (以下、LBA 寒天培地と称す) 上にこの大腸菌をまき、37 $^{\circ}$ C にて一夜インキュベートして大腸菌形質転換体を得た。

この形質転換体を 50 μ g/ml アンピシリンを含有する LB 培地 (以下、LBA 培地と称す) 3 ml あるいは 4 ml で 37 $^{\circ}$ C にて一夜培養し、菌体画分から QIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN) を用いてプラスミド DNA を調製し、塩基配列の決定を行った。

50

(4) マウス抗体V領域をコードする遺伝子の塩基配列決定

前記のプラスミド中のcDNAコード領域の塩基配列をDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer)を用い、DNA Sequencer 373A (Perkin-Elmer)により決定した。配列決定用プライマーとしてM13 Primer M4 (宝酒造) (配列番号4)及びM13 Primer RV (宝酒造) (配列番号5)を用い、両方向の塩基配列を確認することにより配列を決定した。

こうして得られたハイブリドーマATR-2、ATR-3、ATR-4、ATR-5、ATR-7及びATR-8に由来するマウスH鎖V領域をコードする遺伝子を含有するプラスミドをそれぞれATR-xHv/pUC19 (x=2、3、4、5、7又は8)と命名し、そしてL鎖V領域をコードする遺伝子を含有するプラスミドをそれぞれATR-xLv/pUC19 (x=2、3、4、5、7又は8)と命名した。プラスミドATR-xHv/pUC19 (x=2、3、4、5、7又は8)に含まれる各マウス抗体のH鎖V領域をコードする遺伝子の塩基配列 (対応するアミノ酸配列を含む) をそれぞれ配列番号6から11に、プラスミドATR-xLv/pUC19 (x=2、3、4、5、7又は8)に含まれる各マウス抗体のL鎖V領域をコードする遺伝子の塩基配列 (対応するアミノ酸配列を含む) をそれぞれ配列番号12から17に示す。

10

実施例2. キメラ抗体の構築

マウスATR-5抗体V領域をヒト抗体C領域に連結したキメラATR-5抗体を作製した。ATR-5抗体V領域をコードする遺伝子をヒト抗体C領域をコードする発現ベクターに連結することにより、キメラ抗体発現ベクターを構築した。

20

(1) キメラ抗体H鎖V領域の構築

ヒト抗体H鎖C領域をコードする発現ベクターに連結するために、ATR-5抗体H鎖V領域をPCR法により修飾した。5'-側プライマーch5HS (配列番号18)はV領域をコードするDNAの5'-末端にハイブリダイズし、且つKozakコンセンサス配列 (Kozak, M. et al., J. Mol. Biol., 196, 947-950, 1987) 及び制限酵素SalIの認識配列を有するように設計した。3'-側プライマーch5HA (配列番号19)はJ領域をコードするDNAの3'-末端にハイブリダイズし、且つ制限酵素NheIの認識配列を有するように設計した。

PCR溶液は、100 µl中に120 mM Tris-HCl (pH 8.0)、10 mM KCl、6 mM (NH₄)₂SO₄、0.1% Triton X-100、0.001% BSA、0.2 mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)、1 mM MgCl₂、2.5ユニットのKOD DNAポリメラーゼ (東洋紡績)、50 pmoleのch5HSプライマー並びにch5HAプライマー、及び鋳型DNAとして1 µlのプラスミドATR5Hv/pUC19を含有する。PCRはDNA Thermal Cycler 480 (Perkin-Elmer)を用い、94℃にて30秒間、55℃にて30秒間、74℃にて1分間の温度サイクルで30回行った。

30

PCR反応混合液をフェノール及びクロロホルムで抽出し、増幅したDNA断片をエタノール沈殿により回収した。DNA断片を制限酵素NheI (宝酒造)により37℃で1時間消化し、次いで制限酵素SalI (宝酒造)により37℃で1時間消化した。この消化混合物を3% NuSieve GTGアガロース (FMC BioProducts)を用いたアガロースゲル電気泳動により分離し、約450 bp長のDNA断片を含有するアガロース片を切り出した。アガロース片をフェノール及びクロロホルムで抽出し、DNA断片をエタノールで沈殿させた後、TE 20 µlに溶解した。

40

クローニングベクターには制限酵素NheI、SalI及びSplI、BglIIの認識配列を導入した改変pUC19ベクター (以下、CVIDECと称す)を用いた。上記のようにして調製したマウスH鎖V領域をコードする遺伝子断片とNheI及びSalIで消化することにより調製したCVIDECベクターをDNAライゲーションキットver. 2 (宝酒造)を用い、添付の処方に従い16℃で1時間反応させ連結した。

この連結混合物を大腸菌JM109コンピテント細胞 (ニッポンジーン) 100 µlに加

50

え、氷上で30分間、42℃にて1分間静置した。次いで300μlのHi-Competence Broth (ニッポンジーン)を加え37℃にて1時間インキュベートした後、100μg/ml LBA寒天培地上にこの大腸菌をまき、37℃にて一夜インキュベートして大腸菌形質転換体を得た。この形質転換体をLBA培地3mlで37℃にて一夜培養し、菌体画分からQIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN)を用いてプラスミドDNAを調製した。

プラスミド中のcDNAコード領域の塩基配列をDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer)を用い、DNA Sequencer 373A (Perkin-Elmer)により決定した。配列決定用プライマーとしてM13 Primer M4 (宝酒造)及びM13 Primer RV (宝酒造)を用い、両方向の塩基配列を確認することにより配列を決定した。このATR-5抗体H鎖V領域をコードする遺伝子を含む、5'-側にSalI認識配列及びKozakコンセンサス配列、3'-側にNheI認識配列を持つプラスミドをchATR5Hv/CVIDECと命名した。

(2) キメラ抗体L鎖V領域の構築

ヒト抗体L鎖C領域をコードする発現ベクターに連結するために、ATR-5抗体L鎖V領域をPCR法により修飾した。5'-側プライマーch5LS (配列番号20)はV領域をコードするDNAの5'-末端にハイブリダイズし、且つKozakコンセンサス配列 (Kozak, M, et al., J. Mol. Biol., 196, 947-950, 1987) 及び制限酵素BglIIの認識配列を有するように設計した。3'-側プライマーch5LA (配列番号21)はJ領域をコードするDNAの3'-末端にハイブリダイズし、且つ制限酵素SplIの認識配列を有するように設計した。

PCR溶液は、100μl中に120mM Tris-HCl (pH8.0)、10mM KCl、6mM (NH₄)₂SO₄、0.1% Triton X-100、0.001% BSA、0.2mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)、1mM MgCl₂、2.5ユニットのKOD DNAポリメラーゼ (東洋紡績)、50pmoleのch5LSプライマー並びにch5LAプライマー、及び鋳型DNAとして1μlのプラスミドATR5Lv/pUC19を含む。PCRはDNA Thermal Cycler 480 (Perkin-Elmer)を用い、94℃にて30秒間、55℃にて30秒間、74℃にて1分間の温度サイクルで30回行った。

PCR反応混合液をフェノール及びクロロホルムで抽出し、増幅したDNA断片をエタノール沈殿により回収した。DNA断片を制限酵素SplI (宝酒造)により37℃で1時間消化し、次いで制限酵素BglII (宝酒造)により37℃で1時間消化した。この消化混合物を3% NuSieve GTGアガロース (FMC BioProducts)を用いたアガロースゲル電気泳動により分離し、約400bp長のDNA断片を含むアガロース片を切り出した。アガロース片をフェノール及びクロロホルムで抽出し、DNA断片をエタノールで沈殿させた後、20μlのTEに溶解した。

上記のようにして調製したマウスL鎖V領域をコードする遺伝子断片とSplI及びBglIIで消化することにより調製したCVIDECベクターをDNAライゲーションキットver. 2 (宝酒造)を用い、添付の処方に従い16℃で1時間反応させ連結した。

この連結混合物を大腸菌JM109コンピテント細胞 (ニッポンジーン) 100μlに加え、氷上で30分間、42℃にて1分間静置した。次いで300μlのHi-Competence Broth (ニッポンジーン)を加え37℃にて1時間インキュベートした後、100μg/ml LBA寒天培地上にこの大腸菌をまき、37℃にて一夜インキュベートして大腸菌形質転換体を得た。この形質転換体をLBA培地3mlで37℃にて一夜培養し、菌体画分からQIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN)を用いてプラスミドDNAを調製した。

プラスミド中のcDNAコード領域の塩基配列をDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer)を用い、DNA Sequencer 373A (Perkin-Elmer)を用い、DNA Sequencer 373A (Perkin-Elmer)により決定した。

10

20

30

40

50

lmer) により決定した。配列決定用プライマーとしてM13 Primer M4 (宝酒造) 及びM13 Primer RV (宝酒造) を用い、両方向の塩基配列を確認することにより配列を決定した。このATR-5抗体L鎖V領域をコードする遺伝子を含
10 し、5'-側にBglII認識配列及びKozakコンセンサス配列、3'-側にSpI
I認識配列を持つプラスミドをchATR5Lv/CVIDECと命名した。

(3) キメラ抗体発現ベクターの構築

IDEC社より導入した抗体発現ベクターを用いてキメラ抗体発現ベクターを構築した。
ベクターにはIgG1型抗体発現ベクターN5KG1(V) 及びIgG4型抗体発現ベク
ターN5KG4Pを用いた。発現ベクターN5KG1(V) あるいはN5KG4Pのヒト
抗体H鎖C領域の直前にあるSalI-NheI部位にATR-5のH鎖V領域をコード
10 する遺伝子を、ヒト抗体L鎖C領域の直前にあるBglII-SpI部位にATR-5
のL鎖V領域をコードする遺伝子を連結することによって、キメラATR-5抗体発現ベ
クターを作製した。

(i) H鎖V領域の導入

プラスミドchATR5Hv/CVIDECを制限酵素NheI (宝酒造) により37℃
で3時間消化し、次いで制限酵素SalI (宝酒造) により37℃で3時間消化した。こ
の消化混合物を1.5% NuSieve GTGアガロース(FMC BioProducts) を用いたアガロースゲル電気泳動により分離し、約450bp長のDNA断片
20 を含有するアガロース片を切り出した。アガロース片をフェノール及びクロロホルムで抽
出し、DNA断片をエタノールで沈殿させた後、TE20µlに溶解した。

発現ベクターN5KG1(V) 及びN5KG4Pを制限酵素NheI (宝酒造) により37℃
で3時間消化し、次いで制限酵素SalI (宝酒造) により37℃で3時間消化した。
この消化混合物を1.5% NuSieve GTGアガロース(FMC BioProducts) を用いたアガロースゲル電気泳動により分離し、約9000bp長のDN
A断片を含有するアガロース片を切り出した。アガロース片をフェノール及びクロロホル
ムで抽出し、DNA断片をエタノールで沈殿させた後、TE60µlに溶解した。

上記のようにして調製したH鎖V領域をコードする遺伝子を含むSalI-NheI D
NA断片とSalI及びNheIで消化したN5KG1(V) あるいはN5KG4PをD
NAライゲーションキットver. 2 (宝酒造) を用い、添付の処方に従い16℃で1時
30 間反応させ連結した。

この連結混合物を大腸菌JM109コンピテント細胞(ニッポンジーン) 100µlに加
え、氷上で30分間、42℃にて1分間静置した。次いで300µlのHi-Compe
tence Broth (ニッポンジーン) を加え37℃にて1時間インキュベートした
後、100µg/ml LBA寒天培地上にこの大腸菌をまき、37℃にて一夜インキュ
ベートして大腸菌形質転換体を得た。この形質転換体をLBA培地3mlで37℃にて一
夜培養し、菌体画分からQIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN) を用いてプラスミドDNAを調製した。これらキメラATR-5抗体H鎖をコード
40 する遺伝子を含有するプラスミドをそれぞれchATR5Hv/N5KG1(V)、及び
chATR5Hv/N5KG4Pと命名した。

(ii) L鎖V領域の導入

プラスミドchATR5Lv/CVIDECを制限酵素BglII (宝酒造) 及びSpI
I (宝酒造) により37℃で1.5時間消化した。この消化混合物を1.5% NuS
ieve GTGアガロース(FMC BioProducts) を用いたアガロースゲル
電気泳動により分離し、約400bp長のDNA断片を含有するアガロース片を切り出し
た。アガロース片をフェノール及びクロロホルムで抽出し、DNA断片をエタノールで沈
殿させた後、20µlのTEに溶解した。

プラスミドchATR5Hv/N5KG1(V) 及びchATR5Hv/N5KG4Pを
制限酵素BglII (宝酒造) 及びSpI (宝酒造) により37℃で1.5時間消化し
た。この消化混合物を1.5% NuSieve GTGアガロース(FMC BioP
roducts) を用いたアガロースゲル電気泳動により分離し、約9400bp長のD
50

NA断片を含有するアガロース片を切り出した。アガロース片をフェノール及びクロロホルムで抽出し、DNA断片をエタノールで沈殿させた後、TE 20 μ l に溶解した。

上記のようにして調製したL鎖V領域をコードする遺伝子を含むSp1I-BglII DNA断片とSp1I及びBglIIで消化したchATR5Hv/N5KG1 (V) あるいはchATR5Hv/N5KG4PをDNAライゲーションキットver. 2 (宝酒造) を用い、添付の処方に従い16℃で1時間反応させ連結した。

この連結混合物を大腸菌JM109コンピテント細胞 (ニッポンジーン) 100 μ l に加え、氷上で30分間、42℃にて1分間静置した。次いで300 μ l のHi-Competence Broth (ニッポンジーン) を加え37℃にて1時間インキュベートした後、100 μ g/ml LBA寒天培地上にこの大腸菌をまき、37℃にて一夜インキュベートして大腸菌形質転換体を得た。この形質転換体を50 μ g/ml アンピシリンを含有する2×YT培地1lで37℃にて一夜培養し、菌体画分からPlasmid Maxi Kit (QIAGEN) を用いてプラスミドDNAを調製した。これらキメラATR-5抗体をコードする遺伝子を含有するプラスミドをそれぞれchATR5/N5KG1 (V)、chATR5/N5KG4Pと命名した。

(4) COS-7細胞へのトランスフェクション

キメラ抗体の抗原結合活性及び中和活性を評価するため、前記発現プラスミドをCOS-7細胞にトランスフェクションし、キメラ抗体を一過性に発現させた。

プラスミドchATR5/N5KG1 (V) あるいはchATR5/N5KG4PをGene Pulser装置 (Bio Rad) を用いてエレクトロポレーションによりCOS-7細胞に形質導入した。ダルベッコPBS (-) (以下、PBSと称す) 中に 1×10^7 細胞/mlの細胞濃度で懸濁されているCOS-7細胞0.78mlに、プラスミド50 μ gを加え、1,500V, 25 μ Fの静電容量にてパルスを与えた。

室温にて10分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を5%のUltra Low IgGウシ胎児血清 (GIBCO) を含有するDMEM培地 (GIBCO) に懸濁し、10cm培養皿を用いてCO₂ インキュベーターにて培養した。24時間の培養の後、培養上清を吸引除去し、新たに無血清培地HBCHO (アーバインサイエンティフィック) を加えた。さらに72時間の培養の後、培養上清を集め、遠心分離により細胞破片を除去した。

(5) 抗体の精製

COS-7細胞の培養上清からキメラ抗体を、rProtein A Sepharose Fast Flow (Pharmacia Biotech) を用いて以下のように精製した。

1mlのrProtein A Sepharose Fast Flowをカラムに充填し、10倍量のTBSを流すことによってカラムを平衡化した。平衡化したカラムにCOS-7細胞の培養上清をアプライした後、10倍量のTBSによってカラムを洗浄した。

次に、13.5mlの2.5mM HCl (pH3.0) を流すことによって吸着した抗体画分をカラムより溶出し、直ちに1.5mlの1M Tris-HCl (pH8.0) を加えることによって溶出液を中和した。

精製された抗体画分について、セントリプレップ100 (Amicon) を用いた限外濾過を2回行うことにより、150mM NaClを含む50mM Tris-HCl (pH7.6) (以下、TBSと称す) に溶媒を置換し、最終的に約1.5mlまで濃縮した。

(6) CHO安定産生細胞株の樹立

キメラ抗体の安定産生細胞株を樹立するため、CHO-S-SFMI無血清培地 (GIBCO) に馴化したCHO細胞 (DG44) に前記発現プラスミドを導入した。

プラスミドchATR5/N5KG1 (V) あるいはchATR5/N5KG4Pを制限酵素SspI (宝酒造) で切断して直鎖状DNAにし、フェノール及びクロロホルムで抽出の後、エタノール沈殿でDNAを回収した。直鎖状にしたプラスミドをGene Pu

10

20

30

40

50

laser装置 (Bio Rad) を用いてエレクトロポレーションによりDG44細胞に形質導入した。PBS中に 1×10^7 細胞/mlの細胞濃度で懸濁されているDG44細胞0.78mlに、プラスミド10 μ gを加え、1,500V、25 μ Fの静電容量にてパルスを与えた。

室温にて10分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞をヒポキサンチン・チミジン (GIBCO) を含有するCHO-S-SFMII培地 (GIBCO) に懸濁し、2枚の96穴プレート (Falcon) を用いてCO₂ インキュベーターにて培養した。培養開始翌日に、ヒポキサンチン・チミジン (GIBCO) 及び500 μ g/ml GENETICIN (G418 Sulfate, GIBCO) を含有するCHO-S-SFMII培地 (GIBCO) の選択培地に交換し、抗体遺伝子の導入された細胞を選択した。選択培地交換後、2週間前後に顕微鏡下で細胞を観察し、順調な細胞増殖が認められた後に、後述の抗体濃度測定ELISAにて抗体産生量を測定し、抗体産生量の多い細胞を選別した。

実施例3. ヒト型化抗体の構築

(1) ヒト型化抗体H鎖の構築

(i) ヒト型化H鎖バージョン“a”の構築

ヒト型化ATR-5抗体H鎖を、PCR法によるCDR-グラフティングにより作製した。ヒト抗体L39130 (DDBJ, Gao L. ら、未発表、1995) 由来のFRを有するヒト型化ATR-5抗体H鎖バージョン“a”の作製のために7個のPCRプライマーを使用した。CDR-グラフティングプライマーhR5Hv1S (配列番号22)、hR5Hv2S (配列番号23) 及びhR5Hv4S (配列番号24) はセンスDNA配列を有し、そしてCDRグラフティングプライマーhR5Hv3A (配列番号25) 及びhR5Hv5A (配列番号26) はアンチセンスDNA配列を有し、そしてそれぞれプライマーの両端に18-35bpの相補的配列を有する。

hR5Hv1SはKozakコンセンサス配列 (Kozak, M, ら、J. Mol. Biol. 196, 947-950, 1987) 及びSalI認識部位を有するように、またhR5Hv5AはNheI認識部位を有するように設計した。また外部プライマーhR5HvPrS (配列番号27) はCDRグラフティングプライマーhR5Hv1Sと、hR5HvPrA (配列番号28) はCDRグラフティングプライマーhR5Hv5Aとホモロジーを有する。

CDR-グラフティングプライマーhR5Hv1S、hR5Hv2S、hR5Hv3A、hR5Hv4S及びhR5Hv5A、ならびに外部プライマーhR5HvPrS及びhR5HvPrAはPharmacia Biotechにより合成及び精製された。

PCRは、KOD DNAポリメラーゼ (東洋紡績) を用い、98 μ l中に120mM Tris-HCl (pH8.0)、10mM KCl、6mM (NH₄)₂SO₄、0.1% Triton X-100、0.001% BSA、0.2mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)、1mM MgCl₂、2.5ユニットのKOD DNAポリメラーゼ (東洋紡績)、CDR-グラフティングプライマーhR5Hv1S、hR5Hv2S、hR5Hv3A、hR5Hv4S及びhR5Hv5Aをそれぞれ5pmoleを含む条件で添付緩衝液を使用して94℃にて30秒間、50℃にて1分間、72℃にて1分間の温度サイクルで5回行い、さらに100pmoleの外部プライマーhR5HvPrS及びhR5HvPrAを加え、100 μ lの系で同じ温度サイクルを25回行った。PCR法により増幅したDNA断片を2%のNuSieve GTGアガロース (FMC Bio. Products) を用いたアガロースゲル電気泳動により分離した。

約430bp長のDNA断片を含有するアガロース片を切り取り、3倍量 (ml/g) のTEを添加し、フェノール抽出、フェノール・クロロホルム抽出、クロロホルム抽出によりDNA断片を精製した。精製したDNAをエタノールで沈殿させた後、その3分の1量を水17 μ lに溶解した。得られたPCR反応混合物をNheI及びSalIで消化し、NheI及びSalIで消化することにより調製したプラスミドベクターCVIDECに、

10

20

30

40

50

DNAライゲーションキットver. 2（宝酒造）を用い添付の処方に従って反応させ連結した。

この連結混合物を大腸菌JM109コンピテント細胞（ニッポンジーン）100μlに加え、氷上で30分間、42℃にて1分間静置した。次いで300μlのHi-Competence Broth（ニッポンジーン）を加え37℃にて1時間インキュベートした後、100μg/ml LBA寒天培地上にこの大腸菌をまき、37℃にて一夜インキュベートして大腸菌形質転換体を得た。この形質転換体をLBA培地3mlで37℃にて一夜培養し、菌体画分からQIAprep Spin Plasmid Kit（QIAGEN）を用いてプラスミドDNAを調製した。

プラスミド中のcDNAコード領域の塩基配列をDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit（Perkin-Elmer）を用い、DNA Sequencer 373A（Perkin-Elmer）により決定した。配列決定用プライマーとしてM13 Primer M4（宝酒造）及びM13 Primer RV（宝酒造）を用い、両方向の塩基配列を確認することにより配列を決定した。

EcoT22I認識部位の前もしくは後に変異、欠失が認められたため、それぞれ正しい配列を有する断片を連結して再度CVIDECにサブクローニングし、塩基配列を決定した。正しい配列を有するプラスミドをhATR5Hva/CVIDECと命名した。プラスミドhATR5Hva/CVIDECに含まれるヒト型化H鎖バージョン“a”の塩基配列及び対応するアミノ酸配列を配列番号29に示す。また、バージョン“a”のアミノ酸配列を配列番号30に示す。

（ii）ヒト型化H鎖バージョン“b”及び“c”の構築バージョン“b”及び“c”をFR-シャッフリング法によってバージョン“a”のFR3を別のヒト抗体由来のFR3に置換し作製した。バージョン“b”ではFR3をヒト抗体234963（DDBJ、Borretzen M. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 91, 12917-12921, 1994）由来のものに置換するため、FR3をコードするDNAプライマーを4個作製した。FR-シャッフリングプライマーF3RFFS（配列番号31）及びF3RFB S（配列番号32）はセンスDNA配列を有し、F3RFFA（配列番号33）及びF3RFB A（配列番号34）はアンチセンスDNA配列を有する。

F3RFFSとF3RFFAは互いに相補的な配列を有し、両端にBali及びXhoIの認識配列を有する。バージョン“c”ではFR3をヒト抗体P01825（SWISS-PROT、Poljak R.J. ら, Biochemistry, 16, 3412-3420, 1977）由来のものに置換するため、FR3をコードするDNAプライマーを4個作製した。FR-シャッフリングベクターF3NMF S（配列番号35）及びF3NMB S（配列番号36）はセンスDNA配列を有し、F3NMF A（配列番号37）及びF3NMB A（配列番号38）はアンチセンスDNA配列を有する。F3RFB SとF3RFB Aは互いに相補的な配列を有し、両端にXhoI及びNcoIの認識配列を有する。

F3RFFS、F3RFB S、F3RFFA、F3RFB A、F3NMF S、F3NMB S、F3NMF A及びF3NMB AはPharmacia Biotechにより合成された。F3RFFSとF3RFFA、F3RFB SとF3RFB Aをアニールさせ、それぞれBali及びXhoI、NcoI及びXhoIで消化した。これらをBali及びNcoIで消化することにより調製したプラスミドhATR5Hva/CVIDEC（Bali/NcoI）に導入し、塩基配列を決定した。正しい配列を有するプラスミドをhATR5Hvb/CVIDECと命名した。プラスミドhATR5Hvb/CVIDECに含まれるヒト型化H鎖バージョン“b”の塩基配列及び対応するアミノ酸配列を配列番号39に示す。また、バージョン“b”のアミノ酸配列を配列番号40に示す。

F3NMF SとF3NMF A、F3NMB SとF3NMB Aをアニールさせ、それぞれBali及びXhoI、NcoI及びXhoIで消化した。これらをBali及びNcoI

で消化することにより調製したプラスミドhATR5Hva/CVIDEC (Bali/NcoI)に導入し、塩基配列を決定した。正しい配列を有するプラスミドをhATR5Hvc/CVIDECと命名した。プラスミドhATR5Hvc/CVIDECに含まれるヒト型化H鎖バージョン“c”の塩基配列及び対応するアミノ酸配列を配列番号41に示す。また、バージョン“c”のアミノ酸配列を配列番号42に示す。

(iii) ヒト型化H鎖バージョン“d”及び“e”の構築

バージョン“d”及び“e”をFR-シャッフリング法によってバージョン“a”のFR3を別のヒト抗体由来のFR3に置換し作製した。バージョン“d”ではFR3をヒト抗体M62723 (DDBJ, Pascual V. ら, J. Clin. Invest., 86, 1320-1328, 1990) 由来のものに置換するため、FR3をコードするDNAプライマーを4個作製した。FR-シャッフリングプライマーF3EPS (配列番号43) はセンスDNA配列を有し、F3EPA (配列番号44) はアンチセンスDNA配列を有し、プライマーの3'-末端は18bpの相補的配列を有する。

また外部プライマーF3PrS (配列番号45) 及びF3PrA (配列番号46) はFR-シャッフリングプライマーF3EPS及びF3EPAとホモロジーを有し、他のFR3のシャッフリングにも用いることができる。バージョン“e”ではFR3をヒト抗体Z80844 (DDBJ, Thomsett AR. ら, unpublished) 由来のものに置換するため、FR3をコードするDNAプライマーを2個作製した。FR-シャッフリングプライマーF3VHS (配列番号47) はセンスDNA配列を有し、F3VHA (配列番号48) はアンチセンスDNA配列を有し、プライマーの3'-末端は18bpの相補的配列を有する。F3EPS、F3EPA、F3PrS、F3PrA、F3VHS及びF3VHAはPharmacia Biotechにより合成された。

PCRは、KOD DNA Polymerase (東洋紡績) を用い、100µlの反応混合液に1µMのFR-シャッフリングプライマーF3EPSとF3EPA、又はF3VHSとF3VHAをそれぞれ5µl、0.2mMのdNTPs、1.0mMのMgCl₂、2.5UのKOD DNAポリメラーゼを含む条件で添付緩衝液を使用して94℃にて30秒間、50℃にて1分間、74℃にて1分間の温度サイクルで5回行い、さらに100pmoleの外部プライマーF3PrS及びF3PrAを加え、同じ温度サイクルを25回行った。

PCR法により増幅したDNA断片を2%のNuSieve GTGアガロース (FMC Bio. Products) を用いたアガロースゲル電気泳動により分離した。424bp長のDNA断片を含有するアガロース片を切り取り、3倍量 (ml/g) のTEを添加し、フェノール抽出、フェノール・クロロホルム抽出、クロロホルム抽出によりDNA断片を精製した。精製したDNAをエタノールで沈殿させた後、その3分の1量を水14µlに溶解した。得られたPCR反応混合物をBali及びNcoIで消化し、これらをBali及びNcoIで消化することにより調製したプラスミドhATR5Hva/CVIDEC (Bali/NcoI)に導入し、塩基配列を決定した。

正しい配列を有するプラスミドをhATR5Hvd/CVIDEC及びhATR5Hve/CVIDECと命名した。プラスミドhATR5Hvd/CVIDECに含まれるヒト型化H鎖バージョン“d”の塩基配列及び対応するアミノ酸配列を配列番号49に、バージョン“d”のアミノ酸配列を配列番号50に示す。また、プラスミドhATR5Hve/CVIDECに含まれるヒト型化H鎖バージョン“e”の塩基配列及び対応するアミノ酸配列を配列番号51に、バージョン“e”のアミノ酸配列を配列番号52に示す。

(iv) ヒト型化H鎖バージョン“f”及び“g”の構築

バージョン“f”及び“g”はFR-シャッフリング法によってバージョン“a”のFR3を別のヒト抗体由来のFR3に置換し作製した。バージョン“f”はヒト抗体L04345 (DDBJ, Hillson JL. ら, J. Exp. Med., 178, 331-336, 1993) 由来のFR3に、バージョン“g”はS78322 (DDBJ, Bejcek BE. ら, Cancer Res., 55, 2346-2351, 1995) 由来のFR3に置換するためFR3をコードするプライマーを2個ずつ合成した。バージ

10

20

30

40

50

ョン“f”のFR-シャッフリングプライマーF3SSS（配列番号53）はセンスDNA配列を有し、F3SSA（配列番号54）はアンチセンスDNA配列を有し、プライマーの3'-末端は18bpの相補的配列を有する。

バージョン“g”のFR-シャッフリングプライマーF3CDS（配列番号55）はセンスDNA配列を有し、F3CDA（配列番号56）はアンチセンスDNA配列を有し、プライマーの3'-末端は18bpの相補的配列を有する。F3SSS、F3SSA、F3CDS及びF3CDAはPharmacia Biotechにより合成及び精製された。PCRは、KOD DNAポリメラーゼ（東洋紡績）を用い、100µlの反応混合液に1µMのFR-シャッフリングプライマーF3SSS及びF3SSAもしくはF3CDS及びF3CDAをそれぞれ5µlずつ、0.2mMのdNTPs、1.0mMのMgCl₂、2.5UのKOD DNAポリメラーゼを含む条件で添付緩衝液を使用して94℃にて30秒間、50℃にて1分間、74℃にて1分間の温度サイクルで5回行い、さらに100pmoleの外部プライマーF3PrS及びF3PrAを加え、同じ温度サイクルを25回行った。

PCR法により増幅したDNA断片を2%のNuSieve GTGアガロース（FMC Bio. Products）を用いたアガロースゲル電気泳動により分離した。424bp長のDNA断片を含有するアガロース片を切り取り、3倍量（ml/g）のTEを添加し、フェノール抽出、フェノール・クロロホルム抽出、クロロホルム抽出によりDNA断片を精製した。精製したDNAをエタノールで沈殿させた後、その3分の1量を水14µlに溶解した。得られたPCR反応混合物をBali及びNcoIで消化し、これらをBali及びNcoIで消化することにより調製したプラスミドhATR5Hva/CVIDEC（Bali/NcoI）に導入し、塩基配列を決定した。

正しい配列を有するプラスミドをhATR5Hvf/CVIDEC及びhATR5Hvg/CVIDECと命名した。プラスミドhATR5Hvf/CVIDECに含まれるヒト型化H鎖バージョン“f”の塩基配列及び対応するアミノ酸配列ならびにバージョン“f”アミノ酸配列を配列番号57及び58に示す。また、プラスミドhATR5Hvg/CVIDECに含まれるヒト型化H鎖バージョン“g”の塩基配列及び対応するアミノ酸配列ならびにバージョン“g”のアミノ酸配列を配列番号59、60に示す。

（V） ヒト型化H鎖バージョン“h”の構築

バージョン“h”はFR-シャッフリング法によってバージョン“a”のFR3を別のヒト抗体由来のFR3に置換し作製した。バージョン“h”はヒト抗体Z26827（DDBJ、Van Der Stoepら、J. Exp. Med., 177, 99-107, 1993）由来のFR3に置換するためFR3をコードするプライマーを2個ずつ合成した。バージョン“h”のFR-シャッフリングプライマーF3ADS（配列番号61）はセンスDNA配列を有し、F3ADA（配列番号62）はアンチセンスDNA配列を有し、プライマーの3'-末端は18bpの相補的配列を有する。

F3ADS及びF3ADAはPharmacia Biotechにより合成及び精製された。PCRは、KOD DNAポリメラーゼ（東洋紡績）を用い、100µlの反応混合液に1µMのFR-シャッフリングプライマーF3ADS及びF3ADAをそれぞれ5µlずつ、0.2mMのdNTPs、1.0mMのMgCl₂、2.5UのKOD DNAポリメラーゼを含む条件で添付緩衝液を使用して94℃にて30秒間、50℃にて1分間、74℃にて1分間の温度サイクルで5回行い、さらに100pmoleの外部プライマーF3PrS及びF3PrAを加え、同じ温度サイクルを25回行った。PCR法により増幅したDNA断片を2%のNuSieve GTGアガロース（FMC Bio. Products）を用いたアガロースゲル電気泳動により分離した。

424bp長のDNA断片を含有するアガロース片を切り取り、3倍量（ml/g）のTEを添加し、フェノール抽出、フェノール・クロロホルム抽出、クロロホルム抽出によりDNA断片を精製した。精製したDNAをエタノールで沈殿させた後、その3分の1量を水14µlに溶解した。得られたPCR反応混合物をBali及びNcoIで消化し、これらをBali及びNcoIで消化することにより調製したプラスミドhATR5Hva/

10

20

30

40

50

CVIDE C (Ba l I / N c o I) に導入し、塩基配列を決定した。正しい配列を有するプラスミドをhA T R 5 H v h / C V I D E C と命名した。プラスミドhA T R 5 H v h / C V I D E C に含まれるヒト型化H鎖バージョン“h”の塩基配列及び対応するアミノ酸配列を配列番号63に示す。また、バージョン“h”のアミノ酸配列を配列番号64に示す。

(v i) ヒト型化H鎖バージョン“i”及び“j”の構築

バージョン“i”及び“j”はFR-シャッフリング法によってバージョン“a”のFR3を別のヒト抗体由来のFR3に置換し作製した。バージョン“i”はヒト抗体U95239 (DDBJ, Manheimer-Lory A.J., unpublished) 由来のFR3に、バージョン“j”はL03147 (DDBJ, Collet T.A. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 89, 10026-10030, 1992) 由来のFR3に置換するためFR3をコードするプライマーを2個ずつ合成した。バージョン“i”のFR-シャッフリングプライマーF3MMS (配列番号65) はセンスDNA配列を有し、F3MMA (配列番号66) はアンチセンスDNA配列を有し、プライマーの3'-末端は18bpの相補的配列を有する。

バージョン“j”のFR-シャッフリングプライマーF3BMS (配列番号67) はセンスDNA配列を有し、F3BMA (配列番号68) はアンチセンスDNA配列を有し、プライマーの3'-末端は18bpの相補的配列を有する。F3MMS、F3MMA、F3BMS及びF3BMAはPharmacia Biotechにより合成及び精製された。PCRは、Ampli Taq Gold (Perkin-Elmer) を用い、100 µl の反応混合液に1 µMのFR-シャッフリングプライマーF3MMSとF3MMA、又はF3BMSとF3BMAをそれぞれ5 µl ずつ、0.2 mMのdNTPs、1.5 mMのMgCl₂、2.5 UのAmpli Taq Goldを含む条件で添付緩衝液を使用して94℃にて30秒間、50℃にて1分間、74℃にて1分間の温度サイクルで5回行い、さらに100 pmoleの外部プライマーF3PrS及びF3PrAを加え、同じ温度サイクルを25回行った。

PCR法により増幅したDNA断片を2%のNu Sieve GTGアガロース (FMC Bio. Products) を用いたアガロースゲル電気泳動により分離した。424 bp長のDNA断片を含有するアガロース片を切り取り、3倍量 (ml/g) のTEを添加し、フェノール抽出、フェノール・クロロホルム抽出、クロロホルム抽出によりDNA断片を精製した。精製したDNAをエタノールで沈殿させた後、その3分の1量を水14 µlに溶解した。得られたPCR反応混合物をBa l I及びN c o Iで消化し、これらをBa l I及びN c o Iで消化することにより調製したプラスミドhA T R 5 H v a / C V I D E C (Ba l I / N c o I) に導入し、塩基配列を決定した。

正しい配列を有するプラスミドをhA T R 5 H v i / C V I D E C 及びhA T R 5 H v j / C V I D E C と命名した。プラスミドhA T R 5 H v i / C V I D E C に含まれるヒト型化H鎖バージョン“i”の塩基配列及び対応するアミノ酸配列ならびにバージョン“i”アミノ酸配列を配列番号69及び70に示す。また、プラスミドhA T R 5 H v j / C V I D E C に含まれるヒト型化H鎖バージョン“j”の塩基配列及び対応するアミノ酸配列ならびにバージョン“j”のアミノ酸配列を配列番号71及び72に示す。

(v i i) ヒト型化H鎖バージョン“b1”及び“d1”の構築

バージョン“b1”及び“d1”はFR-シャッフリング法によってバージョン“b”及び“d”のFR2を別のヒト抗体由来のFR2に置換し作製した。ヒト抗体P01742 (SWISS-PROT, Cunningham B.A. ら, Biochemistry, 9, 3161-3170, 1970) 由来のものに置換するため、FR2をコードするDNAプライマーを2個作製した。FR-シャッフリングベクターF2MPS (配列番号73) はセンスDNA配列を有し、F2MPA (配列番号74) はアンチセンスDNA配列を有する。また、互いに相補的な配列を有し、両端にはE c o T 2 2 I 及びBa l I の認識配列を有する。

F2MPS、F2MPAはPharmacia Biotechにより合成及び精製され

10

20

30

40

50

た。F2MPSとF2MPAをアニールさせ、EcoT22I及びBaliで消化した。これをEcoT22I及びBaliで消化することにより調製したプラスミドhATR5Hvb/CVIDEC (EcoT22I/Bali) 及びhATR5Hvd/CVIDEC (EcoT22I/Bali) に導入し、塩基配列を決定した。正しい配列を有するプラスミドをhATR5Hvb1/CVIDEC及びhATR5Hvd1/CVIDECと命名した。プラスミドhATR5Hvb1/CVIDECに含まれるヒト型化H鎖バージョン“b1”の塩基配列及び対応するアミノ酸配列ならびにバージョン“b1”アミノ酸配列を配列番号75及び76に示す。また、プラスミドhATR5Hvd1/CVIDECに含まれるヒト型化H鎖バージョン“d1”の塩基配列及び対応するアミノ酸配列ならびにバージョン“d1”のアミノ酸配列を配列番号77及び78に示す。

10

(viii) ヒト型化H鎖バージョン“b3”及び“d3”の構築
バージョン“b3”及び“d3”はFR-シャッフリング法によってバージョン“b”及び“d”のFR2を別のヒト抗体由来のFR2に置換し作製した。ヒト抗体Z80844 (DDBJ, Thomsett AR, unpublished) 由来のFR2に置換するため、FR2をコードするDNAプライマーを2個作製した。FR-シャッフリングベクターF2VHS (配列番号79) はセンスDNA配列を有し、F2VHA (配列番号80) はアンチセンスDNA配列を有する。また、互いに相補的な配列を有し、両端にはEcoT22I及びBaliの認識配列を有する。F2VHS、F2VHAはPharmacia Biotechに合成、精製を委託した。

F2VHSとF2VHAをアニールさせ、EcoT22I及びBaliで消化した。これをEcoT22I及びBaliで消化することにより調製したプラスミドhATR5Hvb/CVIDEC (EcoT22I/Bali) 及びhATR5Hvd/CVIDEC (EcoT22I/Bali) に導入し、塩基配列を決定した。正しい配列を有するプラスミドをhATR5Hvb3/CVIDEC及びhATR5Hvd3/CVIDECと命名した。プラスミドhATR5Hvb3/CVIDECに含まれるヒト型化H鎖バージョン“b3”の塩基配列及び対応するアミノ酸配列ならびにバージョン“b3”アミノ酸配列を配列番号81及び82に示す。また、プラスミドhATR5Hvd3/CVIDECに含まれるヒト型化H鎖バージョン“d3”の塩基配列及び対応するアミノ酸配列ならびにバージョン“d3”のアミノ酸配列を配列番号83及び84に示す。

20

(2) ヒト型化抗体L鎖V領域の構築

30

(i) バージョン“a”

ヒト型化ATR5抗体L鎖を、PCR法によるCDR-グラフティングにより作製した。ヒト抗体Z37332 (DDBJ, Wellschof Mら, J. Immunol. Methods, 179, 203-214, 1995) 由来のフレームワーク領域を有するヒト型化抗体L鎖 (バージョン“a”) の作製のために7本のPCRプライマーを使用した。

CDR-グラフティングプライマーh5Lv1S (配列番号85) 及びh5Lv4S (配列番号86) はセンスDNA配列を、CDRグラフティングプライマーh5Lv2A (配列番号87)、h5Lv3A (配列番号88) 及びh5Lv5A (配列番号89) はアンチセンスDNA配列を有し、各プライマーの両端に20bpの相補的な配列を有する。外部プライマーh5LvS (配列番号90) 及びh5LvA (配列番号91) はCDRグラフティングプライマーh5Lv1S及びh5Lv5Aとホモロジーを有する。CDR-グラフティングプライマーh5Lv1S、h5Lv4S、h5Lv2A、h5Lv3A、h5Lv5A、h5LvS及びh5LvAはPharmacia Biotechに合成、精製を委託した。

40

PCR溶液は、100µl中に120mM Tris-HCl (pH8.0)、10mM KCl、6mM (NH₄)₂SO₄、0.1% Triton X-100、0.001% BSA、0.2mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)、1mM MgCl₂、2.5ユニットのKOD DNAポリメラーゼ (東洋紡績)、5pmoleのCDRグラフティングプライマーh5Lv1S、h5Lv2A、h5Lv3

50

A、h5Lv4S、及びh5Lv5Aを含有する。

PCRはDNA Thermal Cycler 480 (Perkin-Elmer)を用い、94℃にて30秒間、50℃にて1分間、72℃にて1分間の温度サイクルを5回行うことにより、5本のCDRグラフトイングプライマーをアセンブルした。この反応混合液に100 pmolの外部プライマーh5LvS及びh5LvAを加え、94℃にて30秒間、52℃にて1分間、72℃にて1分間の温度サイクルを30回行うことにより、アセンブルしたDNA断片を増幅した。

PCR反応混合液を3% NuSieve GTGアガロース (FMC BioProducts)を用いたアガロースゲル電気泳動により分離し、約400 bp長のDNA断片を含有するアガロース片を切り出した。アガロース片をフェノール及びクロロホルムで抽出し、DNA断片をエタノール沈殿により回収した。回収したDNA断片を制限酵素SplI (宝酒造) 及びBglII (宝酒造)により37℃で4時間消化した。この消化混合物をフェノール及びクロロホルムで抽出し、DNA断片をエタノールで沈殿させた後、TE10 µlに溶解した。上記のようにして調製したヒト型化抗体L鎖V領域をコードする遺伝子を含むSplI-BglII DNA断片とSplI及びBglIIで消化することにより調製したCVIDECベクターをDNAライゲーションキットver. 2 (宝酒造)を用い、添付の処方に従い16℃で1時間反応させ連結した。

この連結混合物を大腸菌JM109コンピテント細胞 (ニッポンジーン) 100 µlに加え、氷上で30分間、42℃にて1分間静置した。次いで300 µlのHi-Competence Broth (ニッポンジーン)を加え37℃にて1時間インキュベートした後、100 µg/ml LBA寒天培地上にこの大腸菌をまき、37℃にて一夜インキュベートして大腸菌形質転換体を得た。この形質転換体をLBA培地3 mlで37℃にて一夜培養し、菌体画分からQIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN)を用いてプラスミドDNAを調製した。

プラスミド中のcDNAコード領域の塩基配列をDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer)を用い、DNA Sequencer 373A (Perkin-Elmer)により決定した。配列決定用プライマーとしてM13 Primer M4 (宝酒造) 及びM13 Primer RV (宝酒造)を用い、両方向の塩基配列を確認することにより配列を決定した。このヒト型化抗体L鎖V領域をコードする遺伝子を含有し、5'-側にBglII認識配列及びKozak配列、3'-側にSplI認識配列を持つプラスミドをhATR5LvA/CVIDECと命名した。ヒト型化L鎖バージョン“a”の塩基配列 (対応するアミノ酸を含む) を配列番号92に示す。また、バージョン“a”のアミノ酸配列を配列番号93に示す。

(ii) バージョン“b”及び“c”

バージョン“b”及び“c”を、バージョン“a”のFR3を置換 (FR-シャッフリング) することにより作製した。バージョン“b”にはヒト抗体S68699 (DDBJ、Hougs Lら, Exp. Clin. Immunogen et., 10, 141-151, 1993) 由来のFR3を、バージョン“c”にはヒト抗体P01607 (SWISS-PROT、Epp Oら, Biochemistry, 14, 4943-4952, 1975) 由来のFR3をそれぞれ使用した。

バージョン“b”のFR3をコードするプライマーF3SS (配列番号94) とF3SA (配列番号95)、あるいはバージョン“c”のFR3をコードするプライマーF3RS (配列番号96) とF3RA (配列番号97) は互いに相補的な配列を有し、両端に制限酵素KpnI及びPstIの認識配列を有する。F3SS、F3SA、F3RS、F3RAはPharmacia Biotechに合成、精製を委託した。各100 pmolのF3SSとF3SA、あるいはF3RSとF3RAを96℃にて2分間、50℃にて2分間処理することによりアニーリングさせ、2本鎖DNA断片を作製した。

これら2本鎖DNA断片を制限酵素KpnI (宝酒造)により37℃で1時間消化し、次いで制限酵素PstI (宝酒造)により37℃で1時間消化した。消化混合物をフェノール

10

20

30

40

50

ル及びクロロホルムで抽出し、DNA断片をエタノールで沈殿させた後、TEに溶解した。

プラスミドhATR5Lv a/CVIDECを制限酵素Kpn I（宝酒造）により37℃で1時間消化し、次いで制限酵素Pst I（宝酒造）により37℃で1時間消化した。消化混合物を1.5% NuSieve GTGアガロース（FMC BioProducts）を用いたアガロースゲル電気泳動により分離し、約3000bp長のDNA断片を含有するアガロース片を切り出した。アガロース片をフェノール及びクロロホルムで抽出し、DNA断片をエタノールで沈殿させた後、TEに溶解した。

上記のようにして調製したバージョン“b”あるいは“c”のFR3をコードするKpn I-Pst I DNA断片とKpn I及びPst Iで消化することによりFR3を除去したhATR5Lv a/CVIDECベクターをDNAライゲーションキットver. 2（宝酒造）を用い、添付の処方に従い16℃で1時間反応させ連結した。

この連結混合物を大腸菌JM109コンピテント細胞（ニッポンジーン）100μlに加え、氷上で30分間、42℃にて1分間静置した。次いで300μlのHi-Competence Broth（ニッポンジーン）を加え37℃にて1時間インキュベートした後、100μg/ml LBA寒天培地上にこの大腸菌をまき、37℃にて一夜インキュベートして大腸菌形質転換体を得た。この形質転換体をLBA培地3mlで37℃にて一夜培養し、菌体画分からQIAprep Spin Plasmid Kit（QIAGEN）を用いてプラスミドDNAを調製した。

プラスミド中のcDNAコード領域の塩基配列をDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit（Perkin-Elmer）を用い、DNA Sequencer 373A（Perkin-Elmer）により決定した。配列決定用プライマーとしてM13 Primer M4（宝酒造）及びM13 Primer RV（宝酒造）を用い、両方向の塩基配列を確認することにより配列を決定した。

これらヒト型化抗体L鎖バージョン“a”のFR3を置換したバージョン“b”あるいはバージョン“c”をコードする遺伝子を含有するプラスミドをそれぞれhATR5Lv b/CVIDEC、hATR5Lv c/CVIDECと命名した。プラスミドhATR5Lv b/CVIDECに含まれるヒト型化L鎖バージョン“b”の塩基配列及び対応するアミノ酸配列ならびにバージョン“b”アミノ酸配列を配列番号98、99に示す。また、プラスミドhATR5Lv c/CVIDECに含まれるヒト型化L鎖バージョン“c”の塩基配列及び対応するアミノ酸配列およびバージョン“c”のアミノ酸配列を配列番号100および101に示す。

（iii）バージョン“b1”及び“b2”

バージョン“b1”及び“b2”を、バージョン“b”のFR2を置換することにより作製した。バージョン“b1”にはヒト抗体S65921（DDBJ、Tonge DWら、Year Immunol., 7, 56-62, 1993）由来のFR2を、バージョン“b2”にはヒト抗体X93625（DDBJ、Cox JPら、Eur. J. Immunol., 24, 827-836, 1994）由来のFR2をそれぞれ使用した。

バージョン“b1”のFR2をコードするプライマーF2SS（配列番号102）とF2SA（配列番号103）、あるいはバージョン“b2”のFR2をコードするプライマーF2XS（配列番号104）とF2XA（配列番号105）は互いに相補的な配列を有し、両端に制限酵素Afl I I及びSpe Iの認識配列を有する。F2SS、F2SA、F2XS及びF2XAはPharmacia Biotechにより合成された。各100pmoleのF2SSとF2SA、あるいはF2XSとF2XAを96℃にて2分間、50℃にて2分間処理することによりアニーリングさせ、2本鎖DNA断片を作製した。

これら2本鎖DNA断片を制限酵素Afl I I（宝酒造）及びSpe I（宝酒造）により37℃で1時間消化した。消化混合物をフェノール及びクロロホルムで抽出し、DNA断片をエタノールで沈殿させた後、TEに溶解した。

プラスミドhATR5Lv b/CVIDECを制限酵素Afl I I（宝酒造）及びSpe I

10

20

30

40

50

I (宝酒造) により 37℃ で 1 時間消化した。消化混合物を 1.5% NuSieve GTG アガロース (FMC BioProducts) を用いたアガロースゲル電気泳動により分離し、約 3000bp 長の DNA 断片を含有するアガロース片を切り出した。アガロース片をフェノール及びクロロホルムで抽出し、DNA 断片をエタノールで沈殿させた後、TE に溶解した。

上記のようにして調製したバージョン “b1” あるいは “b2” の FR2 をコードする AflII-SpeI DNA 断片と AflII 及び SpeI で消化することにより FR2 を除去した hATR5Lv b/CVIDEC ベクターを DNA ライゲーションキット ver. 2 (宝酒造) を用い、添付の処方に従い 16℃ で 1 時間反応させ連結した。

この連結混合物を大腸菌 JM109 コンピテント細胞 (ニッポンジーン) 100 µl に加え、氷上で 30 分間、42℃ にて 1 分間静置した。次いで 300 µl の Hi-Competence Broth (ニッポンジーン) を加え 37℃ にて 1 時間インキュベートした後、100 µg/ml LBA 寒天培地上にこの大腸菌をまき、37℃ にて一夜インキュベートして大腸菌形質転換体を得た。この形質転換体を LBA 培地 4ml で 37℃ にて一夜培養し、菌体画分から QIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN) を用いてプラスミド DNA を調製した。

プラスミド中の cDNA コード領域の塩基配列を Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer) を用い、DNA Sequencer 373A (Perkin-Elmer) により決定した。配列決定用プライマーとして M13 Primer M4 (宝酒造) 及び M13 Primer RV (宝酒造) を用い、両方向の塩基配列を確認することにより配列を決定した。

これらヒト型化抗体 L 鎖バージョン “b” の FR2 を置換したバージョン “b1” あるいはバージョン “b2” をコードする遺伝子を含有するプラスミドをそれぞれ hATR5Lv b1/CVIDEC 及び hATR5Lv b2/CVIDEC と命名した。プラスミド hATR5Lv b1/CVIDEC に含まれるヒト型化 L 鎖バージョン “b1” の塩基配列及び対応するアミノ酸配列及びバージョン “b1” アミノ酸配列を配列番号 106 及び 107 に示す。また、プラスミド hATR5Lv b2/CVIDEC に含まれるヒト型化 L 鎖バージョン “b2” の塩基配列及び対応するアミノ酸配列及びバージョン “b2” のアミノ酸配列を配列番号 108 及び 109 に示す。

(3) ヒト型化抗体の発現ベクターの構築

(i) ヒト型化 H 鎖とキメラ L 鎖との組合せ

H 鎖 V 領域を含むプラスミド hATR5Hv a/CVIDEC を NheI 及び SalI で消化し、ヒト型化 H 鎖 V 領域の cDNA 断片を回収し、chATR-5 抗体発現プラスミドベクター、chATR5/N5KG4P を NheI 及び SalI にて消化することにより調製した chATR5/N5KG4P (SalI/NheI) に導入した。こうして作製したプラスミドを、hHv a-chLv/N5KG4P と命名した。

H 鎖 V 領域を含むプラスミド hATR5Hv b/CVIDEC を NheI 及び SalI で消化し、ヒト型化 H 鎖 V 領域の cDNA 断片を回収し、chATR-5 抗体発現プラスミドベクター、chATR5/N5KG4P を NheI 及び SalI にて消化することにより調製した chATR5/N5KG4P (SalI/NheI) に導入した。こうして作製したプラスミドを hHv b-chLv/N5KG4P と命名した。

H 鎖 V 領域を含むプラスミド hATR5Hv c/CVIDEC、hATR5Hv d/CVIDEC 及び hATR5Hv e/CVIDEC を NheI 及び SalI で消化し、ヒト型化 H 鎖 V 領域の cDNA 断片を回収し、chATR-5 抗体発現プラスミドベクター、chATR5/N5KG4P を NheI 及び SalI にて消化することにより調製した chATR5/N5KG4P (SalI/NheI) に導入した。こうして作製したプラスミドを hHv c-chLv/N5KG4P、hHv d-chLv/N5KG4P 及び hHv e-chLv/N5KG4P と命名した。

H 鎖 V 領域を含むプラスミド hATR5Hv f/CVIDEC 及び hATR5Hv h/C

10

20

30

40

50

V I D E C を N h e I 及び S a l I で消化し、ヒト型化H鎖V領域のc D N A断片を回収し、c h A T R - 5抗体発現プラスミドベクター、c h A T R 5 / N 5 K G 4 P を N h e I 及び S a l I にて消化することにより調製したc h A T R 5 / N 5 K G 4 P (S a l I / N h e I) に導入した。こうして作製したプラスミドをh H v f - c h L v / N 5 K G 4 P 及びh H v h - c h L v / N 5 K G 4 P と命名した。

H鎖V領域を含むプラスミドh A T R 5 H v i / C V I D E C 及びh A T R 5 H v j / C V I D E C を N h e I 及び S a l I で消化し、ヒト型化H鎖V領域のc D N A断片を回収し、c h A T R - 5抗体発現プラスミドベクター、c h A T R 5 / N 5 K G 4 P を N h e I 及び S a l I にて消化することにより調製したc h A T R 5 / N 5 K G 4 P (S a l I / N h e I) に導入した。こうして作製したプラスミドをh H v i - c h L v / N 5 K G 4 P 及びh H v j - c h L v / N 5 K G 4 P と命名した。

10

H鎖V領域を含むプラスミドh A T R 5 H v b 1 / C V I D E C 及びh A T R 5 H v d 1 / C V I D E C を N h e I 及び S a l I で消化し、ヒト型化H鎖V領域のc D N A断片を回収し、c h A T R - 5抗体発現プラスミドベクター、c h A T R 5 / N 5 K G 4 P を N h e I 及び S a l I にて消化することにより調製したc h A T R 5 / N 5 K G 4 P (S a l I / N h e I) に導入した。こうして作製したプラスミドをh H v b 1 - c h L v / N 5 K G 4 P 及びh H v d 1 - c h L v / N 5 K G 4 P と命名した。

(i i) ヒト型化し鎖とキメラH鎖との組み合わせ

抗体発現ベクターN 5 K G 4 P を用いて、キメラH鎖との組み合わせでヒト型化抗体を発現させることにより、ヒト型化L鎖の評価を行った。

20

プラスミドh A T R 5 L v a / C V I D E C 、 h A T R 5 L v b / C V I D E C 、 h A T R 5 L v c / C V I D E C 、 h A T R 5 L v b 1 / C V I D E C 、 h A T R 5 L v b 2 / C V I D E C を制限酵素B g l I I (宝酒造) 及びS p l I (宝酒造) により37℃で2～3時間消化した。消化混合物を1.5%または2% N u S i e v e G T G アガロース (F M C B i o P r o d u c t s) を用いたアガロースゲル電気泳動により分離し、約400bp長のDNA断片を含有するアガロース片を切り出した。アガロース片をフェノール及びクロロホルムで抽出し、DNA断片をエタノールで沈殿させた後、T E に溶解した。

これら各バージョンのヒト型化L鎖V領域をコードする遺伝子を含むS P l I - B g l I I DNA断片とS p l I 及びB g l I I で消化したc h A T R 5 H v / N 5 K G 4 P をDNAライゲーションキットv e r . 2 (宝酒造) を用い、添付の処方に従い16℃で1時間反応させ連結した。

30

連結混合物を大腸菌J M 1 0 9 コンピテント細胞 (ニッポンジーン) 100μl に加え、氷上で30分間、42℃にて1分間静置した。次いで300μl のH i - C o m p e t e n c e B r o t h (ニッポンジーン) を加え37℃にて1時間インキュベートした後、100μg/ml L B A 寒天培地上にこの大腸菌をまき、37℃にて一夜インキュベートして大腸菌形質転換体を得た。

この形質転換体をL B A 培地250ml または500ml で37℃にて一夜培養し、菌体画分からP l a s m i d M a x i K i t (Q I A G E N) を用いてプラスミドDNAを調製した。これらキメラH鎖とヒト型化L鎖をコードする遺伝子を導入したプラスミドをそれぞれc h H v - h L v a / N 5 K G 4 P 、 c h H v - h L v b / N 5 K G 4 P 、 c h H v - h L v c / N 5 K G 4 P 、 c h H v - h L v b 1 / N 5 K G 4 P 及びc h H v - h L v b 2 / N 5 K G 4 P と命名した。

40

(i i i) ヒト型化H鎖とヒト型化L鎖の組合せ

H鎖V領域を含むプラスミドh A T R 5 H v a / C V I D E C を N h e I 及び S a l I で消化し、ヒト型化H鎖V領域のc D N A断片を回収し、ヒト型化A T R - 5抗体L鎖バージョン“ a ” c D N A の配列を含むプラスミドc h H v - h L v a / N 5 K G 4 P を N h e I 及び S a l I にて消化することにより調製したh L v a / N 5 K G 4 P (S a l I / N h e I) に導入した。こうして作製したプラスミドをh H v a - h L v a / N 5 K G 4 P と命名した。

50

H鎖V領域を含むプラスミドhATR5Hvb/CVIDEC及びhATR5Hvc/CVIDECをNheI及びSalIで消化し、ヒト型化H鎖V領域のcDNA断片を回収し、ヒト型化ATR-5抗体L鎖バージョン“a”cDNAの配列を含むプラスミドchHv-hLva/N5KG4PをNheI及びSalIにて消化することにより調製したhLva/N5KG4P(SalI/NheI)に導入した。こうして作製したプラスミドをhHvb-hLva/N5KG4P及びhHvc-hLva/N5KG4Pと命名した。

H鎖V領域を含むプラスミドhATR5Hvb/CVIDEC、hATR5Hvd/CVIDEC及びhATR5Hve/CVIDECをNheI及びSalIで消化し、ヒト型化H鎖V領域のcDNA断片を回収し、ヒト型化ATR-5抗体L鎖バージョン“b”cDNAの配列を含むプラスミドchHv-hLvbn5KG4PをNheI及びSalIにて消化することにより調製したhLvbn5KG4P(SalI/NheI)に導入した。こうして作製したプラスミドをhHvb-hLvbn5KG4P、hHvd-hLvbn5KG4P及びhHve-hLvbn5KG4Pと命名した。

H鎖V領域を含むプラスミドhATR5Hvf/CVIDEC、hATR5Hvg/CVIDEC及びhATR5Hvh/CVIDECをNheI及びSalIで消化し、ヒト型化H鎖V領域のcDNA断片を回収し、ヒト型化ATR-5抗体L鎖バージョン“b”cDNAの配列を含むプラスミドchHv-hLvbn5KG4PをNheI及びSalIにて消化することにより調製したhLvbn5KG4P(SalI/NheI)に導入した。こうして作製したプラスミドをhHvf-hLvbn5KG4P、hHvg-hLvbn5KG4P及びhHvh-hLvbn5KG4Pと命名した。

H鎖V領域を含むプラスミドhATR5Hvi/CVIDEC及びhATR5Hvj/CVIDECをNheI及びSalIで消化し、ヒト型化H鎖V領域のcDNA断片を回収し、ヒト型化ATR-5抗体L鎖バージョン“b”cDNAの配列を含むプラスミドchHv-hLvbn5KG4PをNheI及びSalIにて消化することにより調製したhLvbn5KG4P(SalI/NheI)に導入した。こうして作製したプラスミドをhHvi-hLvbn5KG4P及びhHvj-hLvbn5KG4Pと命名した。

H鎖V領域を含むプラスミドhATR5Hvb1/CVIDEC及びhATR5Hvd1/CVIDECをNheI及びSalIで消化し、ヒト型化H鎖V領域のcDNA断片を回収し、ヒト型化ATR-5抗体L鎖バージョン“b”cDNAの配列を含むプラスミドchHv-hLvbn5KG4PをNheI及びSalIにて消化することにより調製したhLvbn5KG4P(SalI/NheI)に導入した。こうして作製したプラスミドをhHvb1-hLvbn5KG4P及びhHvd1-hLvbn5KG4Pと命名した。

H鎖V領域を含むプラスミドhATR5Hvb3/CVIDEC及びhATR5Hvd3/CVIDECをNheI及びSalIで消化し、ヒト型化H鎖V領域のcDNA断片を回収し、ヒト型化ATR-5抗体L鎖バージョン“b”cDNAの配列を含むプラスミドchHv-hLvbn5KG4PをNheI及びSalIにて消化することにより調製したhLvbn5KG4P(SalI/NheI)に導入した。こうして作製したプラスミドをhHvb3-hLvbn5KG4P及びhHvd3-hLvbn5KG4Pと命名した。

H鎖V領域を含むプラスミドhATR5Hvb/CVIDECをNheI及びSalIで消化し、ヒト型化H鎖V領域のcDNA断片を回収し、ヒト型化ATR-5抗体L鎖バージョン“b1”及び“b2”cDNAの配列を含むプラスミドchHv-hLvbn5KG4P及びchHv-hLvbn5KG4PをNheI及びSalIにて消化することにより調製したhLvbn5KG4P(SalI/NheI)及びhLvbn5KG4P(SalI/NheI)に導入した。こうして作製したプラスミドをhHvb-hLvbn5KG4P及びhHvb-hLvbn5KG4Pと命名した。

H鎖V領域を含むプラスミドhATR5Hvi/CVIDECをNheI及びSalIで

10

20

30

40

50

消化し、ヒト型化H鎖V領域のcDNA断片を回収し、ヒト型化ATR-5抗体L鎖バージョン“b1”及び“b2”cDNAの配列を含むプラスミドchHv-hLv b1/N5KG4P及びchHv-hLv b2/N5KG4PをNheI及びSalIにて消化することにより調製したhLv b1/N5KG4P (SalI/NheI) 及びhLv b2/N5KG4P (SalI/NheI) に導入した。こうして作製したプラスミドをhHvi-hLv b1/N5KG4P及びhHvi-hLv b2/N5KG4Pと命名した。

(4) COS-7細胞へのトランスフェクション

ヒト型化抗体の抗原結合活性及び中和活性を評価するため、前記発現プラスミドをCOS-7細胞で一過性に発現させた。

構築した発現プラスミドベクターをGene Pulser装置 (Bio-Rad) を用いてエレクトロポレーションによりCOS-7細胞に形質導入した。PBS中に 1×10^7 細胞/mlの細胞濃度で懸濁されているCOS-7細胞0.78mlに、プラスミド50µgあるいは20µgを加え、1,500V, 25µFの静電容量にてパルスを与えた。

室温にて10分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を5%のUltra Low IgGウシ胎児血清 (GIBCO) を含有するDMEM培地 (GIBCO) に懸濁し、10cm培養皿あるいは15cm培養皿を用いてCO₂ インキュベーターにて培養した。24時間の培養の後、培養上清を吸引除去し、新たに無血清培地HBCHO (アーバインサイエンティフィック) を加えた。さらに72時間もしくは96時間の培養の後、培養上清を集め、遠心分離により細胞破片を除去した。

(5) 抗体の精製

COS-7細胞の培養上清からの抗体の精製をAffiGel Protein A MAPS IIキット (Bio-Rad)、あるいはrProtein A Sepharose Fast Flow (Pharmacia Biotech) を用いて行った。AffiGel Protein A MAPS IIキットを用いた精製はキット添付の処方に従って行った。rProtein A Sepharose Fast Flowを用いた精製は以下のように行った。

1mlのrProtein A Sepharose Fast Flowをカラムに充填し、10倍量のTBSを流すことによってカラムを平衡化した。平衡化したカラムにCOS-7細胞の培養上清をアプライした後、10倍量のTBSによってカラムを洗浄した。次に13.5mlの2.5mM HCl (pH3.0) を流すことによって吸着した抗体画分をカラムより溶出した。1.5mlの1M Tris-HCl (pH8.0) を加えることによって溶出液を中和した。

精製された抗体画分について、セントリプレップ30もしくは100 (amicon) を用いた限外濾過を2~3回行うことにより、TBSに溶媒を置換し、最終的に約1.5mlまで濃縮した。

実施例4. 抗体の定量及び活性評価

(1) ELISAによる抗体濃度の測定

抗体濃度測定のためのELISAプレートを次のようにして調製した。ELISA用96穴プレート (Maxisorp, NUNC) の各穴を固相化バッファー (0.1M NaHCO₃、0.02% NaN₃、pH9.6) (以下、CBと称す) で1µg/mlの濃度に調製したヤギ抗ヒトIgGγ抗体 (BioSource) 100µlで固相化し、200µlの希釈バッファー (50mM Tris-HCl、1mM MgCl₂、0.1M NaCl、0.05% Tween20、0.02% NaN₃、1% ウシ血清アルブミン (BSA)、pH8.1) (以下DBと称す) でブロッキングの後、抗体を発現させたCOS-7細胞の培養上清あるいは精製抗体をDBにて段階希釈して各穴に加えた。

1時間室温にてインキュベートし0.05% Tween20を含むダルベッコPBS (以下RBと称す) で洗浄後、DBで1000倍に希釈したアルカリフォスファターゼ結合ヤギ抗ヒトIgGγ抗体 (BioSource) 100µlを加えた。1時間室温にてイン

キュベートしRBで洗浄の後、 1 mg/ml となるようにSigma 104 (p-ニトロフェニルリン酸、SIGMA)を基質バッファー(50 mM NaHCO_3 、 10 mM MgCl_2 、 $\text{pH } 9.8$)に溶解したもの(以下、基質溶液と称す)を加え、 $405/655\text{ nm}$ での吸光度をmicroplate reader (Bio Rad)で測定した。濃度測定のスランダーとしてIgG4κ (The Binding Site)を用いた。

(2) 抗原結合能の測定

抗原結合測定のためのCell ELISAプレートは、次のようにして調製した。細胞はヒト膀胱癌細胞J82 (ATCC HTB-1)を用いた。細胞培養用96穴プレートの60穴に 1×10^6 個のJ82細胞を播き込んだ。これを CO_2 インキュベーターで1日培養し(10%の牛胎児血清(GIBCO)を含むRPMI 1640培地)、細胞を接着させた。培養液を捨て、 $300\text{ }\mu\text{l}$ のPBSで各穴を2回洗浄した。4%のパラホルムアルデヒドを含むPBS(以下、PFA/PBSと称す)を各穴に $100\text{ }\mu\text{l}$ 加え、氷上で10分間静置し、細胞を固相化した。

PFA/PBSを捨て、 $300\text{ }\mu\text{l}$ のPBSで各穴を2回洗浄後、 $250\text{ }\mu\text{l}$ のDBでブロッキングした。培養上清あるいは精製抗体をDBにて段階希釈して $100\text{ }\mu\text{l}$ を各穴に加えた。室温にて2時間インキュベートしRBで洗浄後、DBで1000倍に希釈したアルカリフォスファターゼ結合ヤギ抗ヒトIgGγ抗体(Bio Source) $100\text{ }\mu\text{l}$ を加えた。室温にて1時間インキュベートしRBで洗浄のち、基質溶液を加え、次に $405/655\text{ nm}$ での吸光度をMicroplate Reader (Bio-Rad)で測定した。

(3) 中和活性の測定

マウス抗体、キメラ抗体及びヒト型化抗体の中和活性は、ヒト胎盤由来トロンボプラスチン、Thromborel S (Behringwerke AG)によるFactor Xa産生阻害活性を指標に測定した。すなわち、 1.25 mg/ml のThromborel S $10\text{ }\mu\text{l}$ と適当な濃度に希釈した抗体 $10\text{ }\mu\text{l}$ に緩衝液(5 mM CaCl_2 、0.1%のBSAを含むTBS) $60\text{ }\mu\text{l}$ を加え、96穴プレート中で室温で1時間反応させた。これに $3.245\text{ }\mu\text{g/ml}$ のヒトファクターX(セルサス・ラボラトリーズ)及び 82.5 ng/ml のヒトファクターVIIa(エンザイム・リサーチ)をそれぞれ $10\text{ }\mu\text{l}$ 加え、さらに室温で1時間反応させた。

0.5 M のEDTAを $10\text{ }\mu\text{l}$ 加え、反応を停止させた。これに発色基質溶液を $50\text{ }\mu\text{l}$ 加え、Microplate Reader (Bio Rad)で $405/655\text{ nm}$ の吸光度を測定した。室温で1時間反応させ、再度 $405/655\text{ nm}$ の吸光度を測定した。抗体無添加の1時間の吸光度変化を100%の活性とし、それぞれの吸光度変化から残存活性(%)を算出した。

発色基質溶液はテストチーム発色基質S-2222 (Chromogenix)を添付文書に従い溶解し、精製水で2倍希釈した後、ポリブレン液(0.6 mg/ml ヘキサジメチリンブロマイド、SIGMA)と1:1で混和し調製した。

(4) 活性の評価

(i) ヒト型化H鎖バージョン“a”とキメラL鎖との組合せ

ヒト型化H鎖バージョン“a”とキメラL鎖を組み合わせた抗体(a-ch)を作製し、cell ELISAにて抗原結合能を調べたところ、高濃度側で抗原に対する結合量が低下していた(図1)。FXa産生阻害による抗原中和能についても陽性対照のキメラ抗体(ch-ch)に比べて弱い活性であった(図2)。よってヒト型化H鎖はFR-シャッフリングによるバージョンアップを行うことにした。なお、ここで用いたキメラ抗体はCOS-7細胞で発現させ精製した抗体を用い評価したものである。

(ii) ヒト型化L鎖バージョン“a”とキメラH鎖との組合せ

ヒト型化L鎖バージョン“a”とキメラH鎖を組み合わせた抗体(ch-a)を作製し、cell ELISAにて抗原結合能を調べたところ、キメラ抗体と同等以上の抗原結合活性が認められた(図1)。一方、抗原中和能は陽性対照のキメラ抗体に比べて弱い活性

10

20

30

40

50

であった（図2）。よってヒト型化L鎖もFR-シャッフリングによるバージョンアップを行うことにした。なお、ここで用いたキメラ抗体はC O S-7細胞で発現させ精製した抗体を用い評価したものである。（i i i）ヒト型化H鎖バージョン“a”とヒト型化L鎖バージョン“a”との組合せ

ヒト型化H鎖バージョン“a”とヒト型化L鎖バージョン“a”を組み合わせた抗体（a-a）を作製し、c e l l E L I S Aにて抗原結合能を調べたところ、高濃度側で抗原に対する結合量が低下していた（図3）。F X a産生阻害による抗原中和能についても陽性対照のキメラ抗体に比べてかなり弱い活性であった（図4）。よってヒト型化H鎖及びL鎖のFR-シャッフリングによるバージョンアップを行うことにした。なお、ここで用いたキメラ抗体はC O S-7細胞で発現させ精製した抗体を用い評価したものである。

10

（i v）ヒト型化H鎖バージョン“b”、“c”及び“d”とキメラL鎖との組合せ

FR-シャッフリングによってバージョンアップしたヒト型化H鎖とキメラL鎖を組み合わせた抗体（それぞれ“b-c h”、“c-c h”、及び“d-c h”）を作製し、c e l l E L I S Aにて抗原結合能を調べたところ、“d-c h”はキメラ抗体と同等の抗原結合活性が認められ、“b-c h”及び“c-c h”はわずかに劣る抗原結合活性を示した（図5、6）。一方、抗原中和能は陽性対照のキメラ抗体に比べて、“b-c h”はほぼ同等、“d-c h”はわずかに弱い活性であった。またバージョン“c-c h”はキメラ抗体に比べかなり弱い活性であった（図7）。よってヒト型化H鎖バージョン“b”及び“d”がヒト型化H鎖で高い活性を示すと考えられるバージョンであった。

（v）ヒト型化H鎖バージョン“b”とヒト型化L鎖バージョン“a”との組合せ

20

FR-シャッフリングによってバージョンアップしたヒト型化H鎖バージョン“b”とヒト型化L鎖バージョン“a”を組み合わせた抗体（b-a）を作製し、c e l l E L I S Aにて抗原結合能を調べたところ、高濃度で抗原に対する結合量が低下していた（図5）。一方、抗原中和能は陽性対照のキメラ抗体に比べて、かなり弱い活性であった（図8）。よって“b-a”が“a-a”より高い活性を示すバージョンであった。なお、ここで用いたキメラ抗体はC O S-7細胞で発現させ精製した抗体を用い評価したものである。

（v i）ヒト型化L鎖バージョン“b”、“c”とキメラH鎖との組合せ

ヒト型化L鎖バージョン“b”及び“c”をキメラH鎖と組み合わせた抗体（それぞれ、“c h-b”、“c h-c”）を作製したところ、いずれの抗体も抗原結合能、抗原中和能ともにキメラ抗体と同等の活性を示した（図9及び10）。よってバージョン“b”及び“c”をヒト型化抗体L鎖の候補とした。マウス抗体由来のアミノ酸残基数が1つ少ないバージョン“b”の方がバージョン“c”より抗原性の点で優れていると考えられる。なお、ここで用いたキメラ抗体はC H O細胞D G 4 4で発現させ精製した抗体を用い評価したもので、これ以降の評価でもこの抗体を陽性対照に用いた。

30

（v i i）ヒト型化H鎖バージョン“b”とヒト型化L鎖バージョン“b”及び“c”との組合せ

ヒト型化H鎖バージョン“b”をヒト型化L鎖バージョン“b”及び“c”と組み合わせた抗体（それぞれ“b-b”及び“b-c”）を作製し、抗原結合能及び抗原中和能を測定した。いずれの抗体も抗原結合能、抗原中和能ともにキメラ抗体よりわずかに劣る活性を示した（図11及び12）。

40

（V i i i）ヒト型化H鎖バージョン“b”及び“d”とヒト型化L鎖バージョン“b”との組合せ

FR-シャッフリングによってバージョンアップしたヒト型化H鎖とヒト型化L鎖バージョン“b”を組み合わせた抗体（それぞれ“b-b”及び“d-b”）を作製し、c e l l E L I S Aにて抗原結合能を調べたところ、“d-b”はキメラ抗体と同等の抗原結合活性が認められ、“b-b”は高濃度でわずかに劣る抗原結合活性を示した（図13）。一方、抗原中和能は陽性対照のキメラ抗体に比べて、“b-b”はわずかに弱い活性で、“d-b”はキメラ抗体に比べかなり弱い活性であった（図14）。よって“b-b”は抗原活性中和能の高いバージョン、“d-b”は抗原結合能の高いバージョンであるこ

50

とが示された。

(i x) ヒト型化H鎖バージョン“ e ”とキメラL鎖及びヒト型化L鎖バージョン“ b ”との組合せ

ヒト型化L鎖バージョン“ e ”をキメラL鎖及びヒト型化バージョン“ b ”と組み合わせた抗体(それぞれ“ e - c h ”及び“ e - b ”)を作製したところ、“ e - c h ”の抗原結合能はキメラ抗体と同等の活性を示したが、“ e - b ”は抗体の発現量が非常に低く、且つ抗原結合能も殆ど喪失していた(図15)。また“ e - c h ”の抗原活性中和能はキメラ抗体に比べかなり弱い活性であった(図16)。よってH鎖バージョン“ e ”はL鎖バージョン“ b ”との組合せが悪いと考えられた。

(x) ヒト型化H鎖バージョン“ f ”、“ g ”及び“ h ”とヒト型化L鎖バージョン“ b ”との組合せ

ヒト型化H鎖バージョン“ f ”、“ g ”及び“ h ”をヒト型化L鎖バージョン“ b ”と組み合わせた抗体を(それぞれ“ f - b ”、“ g - b ”及び“ h - b ”)作製したところ、“ f - b ”及び“ h - b ”の抗体は抗体の発現量が非常に低かった。なお、バージョン“ f ”、“ h ”についてはキメラL鎖と組み合わせた抗体も作製したが、発現されなかった。“ g - b ”は低い濃度から飽和状態に達し、キメラ抗体より弱い抗原結合能を示した(図17)。“ g - b ”の抗原中和能は、キメラ抗体に比べかなり弱い活性であった(図18)。

(x i) ヒト型化H鎖バージョン“ b 1 ”及び“ d 1 ”とヒト型化L鎖バージョン“ b ”との組合せ

ヒト型化H鎖バージョン“ b 1 ”及び“ d 1 ”をヒト型化L鎖バージョン“ b ”と組み合わせた抗体を(それぞれ“ b 1 - b ”及び“ d 1 - b ”)作製したところ、ともに抗体は殆ど発現されなかった。なお、これらについてはキメラL鎖と組み合わせた抗体も作製したが、発現されなかった。

(X i i) ヒト型化H鎖バージョン“ b 3 ”及び“ d 3 ”とヒト型化L鎖バージョン“ b ”との組合せ

ヒト型化H鎖バージョン“ b 3 ”及び“ d 3 ”をヒト型化L鎖バージョン“ b ”と組み合わせた抗体を(それぞれ“ b 3 - b ”及び“ d 3 - b ”)作製したところ、“ d 3 - b ”の抗原結合能はキメラ抗体よりわずかに劣っており、“ b 3 - b ”の抗原結合能はさらに劣っていた(図19)。“ b 3 - b ”の抗原中和能は“ b - b ”より上回る活性を示したものの、キメラ抗体の活性には及ばず、“ d 3 - b ”は“ b - b ”と同程度の活性にとどまった(図20)。

(x i i i) ヒト型化H鎖バージョン“ i ”及び“ j ”とキメラL鎖及びヒト型化L鎖バージョン“ b ”との組合せ

ヒト型化H鎖バージョン“ i ”及び“ j ”をキメラL鎖と組み合わせた抗体(それぞれ“ i - c h ”及び“ j - c h ”)とヒト型化L鎖バージョン“ b ”と組み合わせた抗体(それぞれ“ i - b ”及び“ j - b ”)を作製し、抗原結合能及び抗原中和能を測定した。抗原結合能はいずれの抗体もキメラ抗体とほぼ同等の活性を示した(図21、22)。“ i - c h ”にはキメラ抗体の活性を上回る抗原中和能が認められ、“ j - c h ”の抗原中和能はキメラ抗体に比べかなり弱い活性であった(図23)。“ i - b ”はキメラ抗体と同等の活性が認められ、“ j - b ”はキメラ抗体に比べかなり弱い活性であった(図24)。

(x i v) ヒト型化L鎖バージョン“ b 1 ”及び“ b 2 ”

ヒト型化L鎖バージョン“ b 1 ”及び“ b 2 ”をキメラH鎖と組み合わせた抗体(それぞれ、“ c h - b 1 ”及び“ c h - b 2 ”)を作製したところ、いずれの抗体もキメラ抗体と同等の抗原結合能を示した(図25)。抗原中和能については、“ c h - b 1 ”ではキメラ抗体と同等の活性を示し、“ c h - b 2 ”では高濃度側でキメラ抗体を若干上回る活性が認められた(図26)。バージョン“ b 1 ”及び“ b 2 ”ともにヒト型化抗体L鎖の候補になり得るが、より強い活性を有するという点でバージョン“ b 2 ”の方が優れている。

10

20

30

40

50

(xv) ヒト型化H鎖バージョン“b”とヒト型化L鎖バージョン“b2”との組合せ
 ヒト型化H鎖バージョン“b”をヒト型化L鎖バージョン“b2”と組み合わせた抗体 (“b-b2”) を作製し、抗原結合能及び抗原中和能を測定した。抗原結合能はキメラ抗体よりわずかに劣っていた(図27)。抗原中和能は“b-b”の活性を上回ったものの、“i-b”の活性には及ばなかった(図28)。(xvi) ヒト型化H鎖バージョン“i”とヒト型化L鎖バージョン“b1”又は“b2”との組合せ
 ヒト型化H鎖バージョン“i”をヒト型化L鎖バージョン“b1”又は“b2”と組み合わせた抗体(それぞれ“i-b1”及び“i-b2”)を作製し、抗原結合能及び抗原中和能を測定した。“i-b2”の抗原結合能はキメラ抗体とほぼ同等で、“i-b1”はわずかに劣る程度であった(図29)。また、“i-b1”及び“i-b2”の抗原中和能はキメラ抗体や“i-b”を上回る活性を示し、“i-b2”>“i-b1”の順に強かった(図30)。

10

実施例5. CHO細胞産生ヒト型化抗体の作製及び活性評価

(1) CHO安定産生細胞株の樹立

ヒト型化抗体(b-b、i-b及びi-b2)の安定産生細胞株を樹立するため、無血清培地に馴化したCHO細胞(DG44)に抗体発現遺伝子ベクターを導入した。

プラスミドDNA、hHv b-hLv b/N5KG4P、hHv i-hLv b/N5KG4P及びhHv i-hLv b2/N5KG4Pを制限酵素SspI(宝酒造)で切断して直鎖状にし、フェノール及びクロロフォルム抽出した後、エタノール沈殿により精製した。エレクトロポレーション装置(Gene Pulser; Bio Rad)により、直鎖状にした発現遺伝子ベクターをDG44細胞に導入した。DG44細胞をPBSに 1×10^7 /mlの細胞密度で懸濁し、この懸濁液約0.8mlに前記のDNAを10もしくは50 μ gを加え、1,500V、25 μ Fの静電容量にてパルスを与えた。

20

室温にて10分間の回復期間の後、ヒポキサンチン-チミジン(GIBCO)(以下、HT)を含有するCHO-S-SFMI I培地に処理された細胞を懸濁し、2枚の96穴平底プレート(Falcon)に100 μ l/穴となるように播種し、CO₂インキュベーターにて培養した。培養開始8~9時間後にHT及び1mg/mlのGENETICIN(GIBCO)を含有するCHO-S-SFMI I培地を100 μ l/穴加え、500 μ g/mlのGENETICIN選択培地に変換し、抗体遺伝子の導入された細胞を選択した。3~4日に一度1/2量の培地を新鮮な培地と交換し、選択培地への変換から約2週間経過した時点で、その4~5日後に細胞の順調な増殖が観察された穴の培養上清の一部を回収した。この培養上清中に発現された抗体濃度を前述の抗体濃度測定ELISAにより測定し、抗体産生量の高い細胞を選出した。

30

(2) ヒト型化抗体の大量精製

前記のように選出したヒト型化抗体(“b-b”、“i-b”及び“i-b2”)発現DG44細胞株を2Lローラボトル(CONING)を用い、500ml/ボトルのCHO-S-SFMI I培地中で数日培養後、培養液を回収して新鮮なCHO-S-SFMI I培地を加え、再び培養した。培養液は遠心分離により細胞破片を除去し、0.22 μ mもしくは0.45 μ mのフィルターで濾過した。これを繰り返し、それぞれ全量約2Lの培養上清を得た。得られた培養上清をProtein Aアフィニティークラム(Poros)を接続したConSep LC100システム(ミリポア)にて抗体を精製した。

40

(3) ELISAによる抗体濃度の測定

抗体濃度測定のためのELISAプレートを次のようにして調製した。ELISA用96穴プレート(Maxisorp, NUNC)の各穴をCBで1 μ g/mlの濃度に調製したヤギ抗ヒトIgG γ 抗体(BioSource)100 μ lで固相化し、200 μ lのDBでブロッキングの後、抗体を発現させたCOS細胞の培養上清あるいは精製抗体をDBにて段階希釈して各穴に加えた。

1時間室温にてインキュベートしRBで洗浄後、DBで1000倍に希釈したアルカリフォスファターゼ結合ヤギ抗ヒトIgG γ 抗体(BioSource)100 μ lを加えた。1時間室温にてインキュベートしRBで洗浄の後、基質溶液を100 μ l加え、405

50

／655nmでの吸光度をmicroplate reader (Bio Rad) で測定した。濃度測定のスランダーとしてIgG4κ (The Binding Site) を用いた。

(4) 抗原結合能の測定

抗原結合測定のためのCell ELISAプレートでは、次のようにして調製した。細胞はヒト膀胱癌細胞J82 (ATCC HTB-1) を用いた。細胞培養用96穴プレートに 1×10^6 個のJ82細胞を播き込んだ。これをCO₂ インキュベーターで1日培養し(10%の牛胎児血清(GIBCO)を含むRPMI 1640培地)、細胞を接着させた。培養液を捨て、PBSで各穴を2回洗浄した。PFA/PBSを各穴に100μl加え、氷上で10分間静置し、細胞を固相化した。

PFA/PBSを捨て、300μlのPBSで各穴を2回洗浄後、250μlのDBでブロッキングした。精製抗体を上測定結果をもとに、DBにて10μg/mlより公比2で段階希釈して100μlを各穴に加えた。室温にて2時間インキュベートしRBで洗浄後、DBで1000倍に希釈したアルカリフォスファターゼ結合ヤギ抗ヒトIgGγ抗体 (BioSource) 100μlを加えた。室温にて1時間インキュベートしRBで洗浄ののち、基質溶液を100μl加え、次に405/655nmでの吸光度をMicroplate Reader (Bio-Rad) で測定した。

(5) TF中和活性(ファクターXa産生阻害活性)の測定

ヒト型化抗体のファクターXa産生阻害活性は、ヒト胎盤由来トロンボプラスチン、Thromborel S (Behringwerke AG) によるFactor Xa産生阻害活性を指標に測定した。すなわち、5mg/mlのThromborel S 10μlと抗体10μlに緩衝液(5mMのCaCl₂、0.1%のBSAを含むTBS) 60μlを加え、96穴プレート中で室温で1時間反応させた。抗体は緩衝液で200μg/mlより公比5で段階希釈した。

これに3.245μg/mlのヒトファクターX(セルサス・ラボラトリーズ)及び82.5ng/mlのヒトファクターVIIa(エンザイム・リサーチ)をそれぞれ10μl加え、さらに室温で45分間反応させた。0.5MのEDTAを10μl加え、反応を停止させた。これに発色基質溶液を50μl加え、Microplate Reader (Bio Rad) で405/655nmの吸光度を測定した。室温で30分間反応させ、再度405/655nmの吸光度を測定した。抗体無添加の30分間の吸光度変化を100%の活性とし、それぞれの吸光度変化から残存活性(%)を算出した。

発色基質溶液はテストチーム発色基質S-2222 (Chromogenix) を添付文書に従い溶解し、ポリブレン液(0.6mg/ml ヘキサジメチリンブロマイド、SIGMA)と1:1で混和し調製した。

(6) TF中和活性(ファクターX結合阻害活性)の測定

ヒト型化抗体のファクターX結合阻害活性は、ヒト胎盤由来トロンボプラスチン、Thromborel S (Behringwerke AG) を用い、予めTFとFactor VIIaの複合体を形成させ、その複合体のFactor Xa産生阻害活性を指標にファクターX結合阻害活性を測定した。すなわち、5mg/mlのThromborel S 10μlと82.5ng/mlのヒトFactor VIIa(エンザイム・リサーチ) 10μlに緩衝液(5mMのCaCl₂、0.1%のBSAを含むTBS) 60μlを加え、96穴プレート中で室温で予め1時間反応させた。

これに抗体溶液を10μl加え、室温で5分間反応させた後、3.245μg/mlのヒトFactor X(セルサス・ラボラトリーズ)を10μl加え、さらに室温で45分間反応させた。なお抗体は緩衝液で200μg/mlより公比2で段階希釈した。0.5MのEDTAを10μl加え、反応を停止させた。これに発色基質溶液を50μl加え、Microplate Reader (Bio Rad) で405/655nmの吸光度を測定した。室温で30分間反応させ、再度405/655nmの吸光度を測定した。抗体無添加の30分間の吸光度変化を100%の活性とし、それぞれの吸光度変化から残存活性(%)を算出した。

10

20

30

40

50

発色基質溶液はテストチーム発色基質S-2222 (Chromogenix) を添付文書に従い溶解し、ポリブレン液 (0.6 mg/ml ヘキサジメチリンブロマイド、SIGMA) と1:1で混和し調製した。

(7) TF中和活性 (血漿凝固阻害活性) の測定

ヒト型化抗体のTF中和活性 (血漿凝固阻害活性) はヒト胎盤由来トロンボプラスチン、Thromborel S (Behringwerke AG) を用いたプロトロンビン時間を指標に測定した。すなわち、サンプルカップにヒト血漿 (コスモ・バイオ) 100 μ l を入れ、これに様々な濃度に希釈した抗体を50 μ l 加え、37℃で3分間加温した。予め37℃に加温しておいた1.25 mg/ml のThromborel Sを50 μ l 加え、血漿凝固を開始させた。この凝固時間はAmelung CR-Aを接続したAmelung KC-10A (ともにエム・シー・メディカル) にて測定した。

抗体は80 μ g/ml より公比2で0.1%のBSAを含有するTBS (以下、BSA-TBS) にて段階希釈した。測定した抗体無添加の凝固時間を100%のTF血漿凝固活性とし、Thromborel Sの濃度と凝固時間をプロットした検量線により抗体を添加した際のそれぞれの凝固時間からTF残存活性を算出した。

検量線は様々なThromborel Sの濃度とその凝固時間を測定することにより作成した。適当に希釈したThromborel S、50 μ l に50 μ l のBSA-TBSを加え、37℃で3分間加温し、予め37℃に加温しておいたヒト血漿を100 μ l 加えて凝固を開始させ凝固時間を測定した。Thromborel Sは6.25 mg/ml より公比2で25 mMのCaCl₂を含むハンス緩衝液 (GIBCO) にて段階希釈した。横軸にThromborel S濃度、縦軸に凝固時間を両対数グラフにプロットし、これを検量線とした。

(8) 活性の評価

“b-b”、“i-b”及び“i-b2”のヒト型化抗体すべてはキメラ抗体と同等以上の活性を有していた (図31)。Factor Xa産生阻害活性、Factor X結合阻害活性及び血漿凝固阻害活性においても、ヒト型化抗体“b-b”、“i-b”及び“i-b2”はキメラ抗体と同等以上の活性を有しており、“i-b2”>“i-b”>“b-b”の順に活性が強かった (図32、33及び34)。

実施例6. BIACOREを用いたTFと抗TF抗体の相互作用における反応速度論的解析

BIACOREを用いて、抗原抗体反応の速度論的解析を行った。組換え型Protein Gをセンサーチップに固相化し、これに抗体を結合させた。抗原として精製した組換え型TF (1-219にFLAGペプチドタグを付した可溶型TF) (以下、可溶型TFと称す) を用い、種々の濃度に調製した可溶型TFをアナライトとした。得られたセンサーグラムから、カイネティクスパラメーター (解離速度定数 k_{dis} 及び結合速度定数 k_{as}) を算出した。速度論的解析に関して、「Kinetic analysis of monoclonal antibody-antigen interactions with a new biosensor based analytical system」(karlsson, R. et al. (1991) J. Immunol. Methods 145, 229-240.) を参考にした。

(1) センサーチップへのProtein Gの固相化

センサーチップCM5 (BIACORE) へProtein G (ZYMED) を固相化する。

ランニングバッファーとしてHBS-EP 緩衝液 (0.01 M HEPES pH7.4, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% ポリソルベート20 (v/v)) (BIACORE) を用い、流速は5 μ L/分とした。センサーチップCM5上のカルボキシメチルデキストランのカルボキシル基を100 μ Lの0.05 M N-ヒドロキシコハク酸イミド (NHS) / 0.2 M 塩酸N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド (EDC) のインジェクトにより活性化した。引き続き、10 μ Lの50 μ g/mL Protein Gをインジェクトし、これを3

10

20

30

40

50

回行って固相化した。Protein Gは10mg/mlになるように10mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.5)に溶解し、10mM酢酸ナトリウム緩衝液(pH4.0)にて50 μ g/mlに希釈し調製した。さらに100 μ Lの1.0Mエタノールアミン-塩酸(pH8.5)をインジェクトし、過剰の活性基をブロックした。これに10 μ Lの0.1Mグリシン-塩酸緩衝液(pH2.5)および10 μ Lの10mM塩酸をインジェクトし、非共有結合している物質を洗浄した。これを各フローセルについて行い、72nMのヒト型化抗TF抗体バージョン“ib2”を10 μ Lインジェクトし、約1000RU結合することを確認した。

(2) 固相化抗TF抗体とヒトTFとの相互作用

ヒトTFは、アミノ酸配列1-219のC末端にFLAGペプチドを連結させたものをCHO細胞にて発現させて精製した。これを可溶型ヒトTFとして用いた。

ランニングバッファーとしてHBS-EP緩衝液を用い、流速20 μ L/分で72nMの抗体溶液を10 μ Lインジェクトし、抗体を固相化した。抗体の希釈はHBS-EP緩衝液を用いて行った。これに各種濃度の可溶型ヒトTF溶液40 μ Lを流速30 μ L/分でインジェクトし、分析はインジェクトする80秒を結合相とし、その後HBS-EP緩衝液に切り替え、120秒の解離相とした。解離相終了後、10 μ Lの20mM塩酸をインジェクトすることにより、センサーチップを再生した。この結合・解離・再生を分析の1サイクルとし、各種抗体についてセンサーグラムを得た。なお、可溶型ヒトTF溶液はHBS-EP緩衝液を用い、250nM、125nM、62.5nM、31.3nM、15.6nM、7.81nM、3.91nMの濃度に調製した。また、ブランクには希釈に用いたHBS-EP緩衝液をインジェクトして得られたセンサーグラムを用いた。

以上のことをフローセルの1～3それぞれで行った。

(3) 相互作用の速度論的解析

目的のデータファイルを読み込み、目的の反応領域について、HBS-EP緩衝液のセンサーグラムをベースラインとして、重ね書きによる反応パターンの比較を行った。さらにカーブフィッティングによるカイネティクスパラメーター(結合速度定数 k_{ass} 及び解離速度定数 k_{diss})の算定を行うBIA CORE専用の解析アプリケーションソフトウェアである「BIAevaluation 2.1」(Pharmacia)を用いて、相互作用の速度論的解析を行った。なお、結合速度定数 k_{ass} を求める際には、解析モデルタイプ4を用いた(BIAevaluation 2.1 Software Handbook, A1～A5)。それぞれのフローセルから算出した値から、各種抗体のカイネティクスパラメーターを得た。結果(各フローセルから算出した値の平均値±標準偏差)を表6に示す。

表 6

キメラ及びヒト型化抗TF抗体のカイネティクスパラメーター($n = 3$)

	キメラ	b-b	i-b	i-b2
k_{diss} [$\times 10^{-4}$ 1/s]	5.06 $\pm$ 0.12	9.52 $\pm$ 0.22	6.49 $\pm$ 0.17	6.35 $\pm$ 0.15
k_{ass} [$\times 10^5$ 1/Ms]	4.65 $\pm$ 0.32	4.15 $\pm$ 0.27	4.67 $\pm$ 0.30	5.44 $\pm$ 0.36
KD [$\times 10^{-9}$ M]	1.09 $\pm$ 0.09	2.30 $\pm$ 0.15	1.39 $\pm$ 0.13	1.17 $\pm$ 0.11

実施例 7. ヒト型化抗TF抗体のヒトTFへの反応性の測定

ドットプロットハイブリダイゼーション法(「改訂版分子生物学研究のためのタンパク実験法」(羊土社)竹縄忠臣/編 p. 101)によって、非変性TF、非還元下変性TF

、還元下変性TFへの反応性を検討した。TFは細胞外領域にFLAGタグを付したものをCHO細胞にて発現させ、精製したもの（shTF）を用いた。shTFをそれぞれ次の3種の緩衝液（緩衝液A：10mM Tris-HCl, pH8.0；緩衝液B：10mM Tris-HCl, pH8.0, 8M 尿素；緩衝液C：10mM Tris-HCl, pH8.0, 8M 尿素, 5mM DTT）にて希釈した。緩衝液Aで処理したものは非変性TFであり、一方、非還元下変性TFは緩衝液Bで処理し、還元下変性TFは緩衝液Cで処理して調製した。それぞれのサンプルは室温で24時間処理した。処理後、ニトロセルロース膜（Bio-Rad）にサンプルをブロッティングした。サンプルを0.5μl、1μl及び2μl（3μg/ml）膜にブロットし、膜を風乾した。DB（50mM Tris-HCl, pH8.1, 0.15M NaCl, 1mM MgCl₂, 0.05%（v/v）Tween 20, 0.02%（w/v）NaN₃, 1%（w/v）BSA）でブロッキングした。膜をヒト型化抗TF抗体を含むDBもしくはDB（コントロール）で反応させた。0.05%（v/v）Tween 20を含むPBSで洗浄し、ペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgG抗体（DAKO）を含むDBで反応させた。0.05%（v/v）Tween 20を含むPBSで洗浄した後、ECL Western Blotting reagent（Amersham）で処理し、X線フィルムに30秒間暴露させた。

図35に示したようにキメラ型抗TF抗体及びヒト型化抗TF抗体（バージョン“bb” “ib”及び“ib2”）は非変性TF、非還元下変性TF、還元下変性TF全てに反応した。

実施例8. ラット急性DICモデルにおける抗血栓作用の確認

抗TF抗体の抗血栓作用について、ラットを用いたトロンボプラステン誘発DICモデルで確認した。すなわち、SD系雄性ラットにヒトトロンボプラステン溶液を40mg/kgの用量で3時間かけて静脈内に持続注入することでDICモデルを作製した。抗TF抗体（キメラおよびヒト型化抗TF抗体ib2）は各々0.2mg/kgの用量でトロンボプラステン溶液の注入開始5分前に静脈内投与した。トロンボプラステン溶液の持続注入終了15分後に腹部大動脈からクエン酸加血液を採取し、血小板数、活性化部分トロンボプラステン時間（aPTT）、フィブリノーゲン濃度（Fib）、可溶性フィブリンモノマー複合体（sFMC）濃度、トロンビン／アンチトロンビンIII複合体（TAT）濃度を測定した。

その結果、表7に示すように、トロンボプラスチンの持続注入により血小板数の減少、aPTTの延長、フィブリノーゲン濃度の減少、sFMCおよびTAT濃度の上昇が認められ、明らかな凝固亢進状態を呈した。これに対し、キメラおよびヒト型化抗TF抗体はともにこれらの変化をほぼ同様に強く抑制した。

この結果から、ヒト型化抗TF抗体は抗血栓薬として有用なことが示された。

表 7

測定項目	トロンボプラスチン非投与正常群	溶媒投与対照群	キメラ抗体投与群	ヒト型化抗体投与群
血小板数 ($\times 10^4/\text{mm}^3$)	115.5 $\pm$ 11.8	82.9 $\pm$ 14.3	100.7 $\pm$ 12.9	96.1 $\pm$ 13.3
aPTT(sec)	20.1 $\pm$ 1.1	36.2 $\pm$ 13.9	22.3 $\pm$ 0.7 ^{a)}	21.8 $\pm$ 1.3 ^{a)}
フィブリノーゲン濃度 (正常群を100%)	100.0 $\pm$ 4.2	64.8 $\pm$ 20.0	101.0 $\pm$ 6.6 ^{a)}	98.9 $\pm$ 5.7 ^{a)}
sFMC濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	74.2 $\pm$ 5.5	3517 $\pm$ 3645	129.9 $\pm$ 46.8 ^{a)}	66.5 $\pm$ 23.0 ^{a)}
TAT濃度 (ng/ml)	3.4 $\pm$ 0.6	29.6 $\pm$ 31.0	3.8 $\pm$ 0.7 ^{b)}	4.2 $\pm$ 0.9

(平均値 $\pm$ 標準偏差)

溶媒投与対照群に対する差の有意性：a) : $p < 0.01$, b) : $p < 0.05$

参考例 1. 抗TFモノクローナル抗体の作製

1. ヒトTFの精製

ヒト胎盤からのTFの精製は、Itoらの方法(Ito, T.らJ. Biochem. 114, 691-696, 1993)に準じて行った。すなわち、ヒト胎盤を10mM塩化ベンザミジン、1mMフッ化フェニルメチルスルフォニル、1mMジイソプロピルフルオロフォスフェートおよび0.02%アジ化ナトリウムを含むトリス緩衝生理食塩液(TBS, pH7.5)中でホモジナイズ後、沈殿を冷アセトンで脱脂し、得られた脱脂粉末を2% Triton X-100を含む上記緩衝液に懸濁してTFを可溶化した。

この上清からConcanavalin A-Sepharose 4Bカラム(Pharmacia)および抗TF抗体を結合させたSepharose 4Bカラム(Pharmacia)を用いてアフィニティークロマトグラフィーを行い、精製TFを得た。これを限外濾過膜(PM-10, Amicon)で濃縮し、精製標品として4℃で保存した。

精製標品中のTF含量は、市販の抗TFモノクローナル抗体(American Diagnostica)とポリクローナル抗体(American Diagnostica)を組合せたSandwich ELISAで、組換え型TFを標準にして定量した。

また精製標品の純度は、4-20%濃度勾配ポリアクリルアミドゲルを用いてSDS-PAGEしたものを銀染色することで確認した。

2. 免疫とハイブリドーマの作製

精製ヒトTF(約70 $\mu\text{g/ml}$)を等容量のFreundの完全アジュバント(Difco)と混合後、5週齢のBalb/c系雄性マウス(日本チャールスリバー)の腹部皮下に、TFとして10 μg /マウスとなるように免疫した。12, 18及び25日にはFreundの不完全アジュバントと混合したTFを5 μg /マウスとなるように皮下に追加免疫し、最終免疫として32日にPBSで希釈したTF溶液を5 μg /マウスで腹腔内投与した。

最終免疫の3日後に4匹のマウスから脾細胞を調製し、細胞数で1/5のマウスミエローマ細胞株P3U1とポリエチレングリコール法を用いて融合させた。融合細胞を10%ウシ胎仔血清を含むRPMI-1640培地(以下RPMI-培地とする)(Lifetechnologies)に懸濁し、96穴プレートに1匹のマウスにつき400穴(

10

20

30

40

50

約400個／穴)播種した。融合後、1, 2, 3, 5日目に培地の半量をHAT(大日本製薬)およびcondimed H1(Boehringer Mannheim GmbH)を含むRPMI-培地(以下HAT-培地とする)に交換することで、ハイブリドーマのHAT選択を行った。

下記のスクリーニング法で選択したハイブリドーマは2回の限界希釈を行うことでクローン化した。

限界希釈は、96穴プレート2枚に一穴あたり0.8個の細胞を播種した。検鏡により単一コロニーであることが確認できた穴について、下記に示したTF結合活性とTF中和活性の測定を行いクローンを選択した。得られたクローンはHAT-培地からRPMI-培地に馴化し、馴化による抗体産生能の低下が無いことを確認したうえで、再度限界希釈を行い、完全なクローン化を行った。以上の操作により、TF/ファクターVIIa複合体とファクターXとの結合を強く阻害する抗体6種(ATR-2, 3, 4, 5, 7及び8)を産生するハイブリドーマが樹立できた。

10

3. 腹水の作製および抗体の精製

樹立したハイブリドーマの腹水の作製は常法に従って行った。すなわち、*in vitro*で継代したハイブリドーマ 10^6 個を、あらかじめ鉱物油を2回腹腔内に投与しておいたBalb/c系雄性マウスの腹腔内に移植した。移植後1~2週目で腹部が肥大したマウスから腹水を回収した。

腹水からの抗体の精製は、Protein Aカラム(日本ガイシ)を装着したConSep LC100システム(Millipore)を用いて行った。

20

4. Cell-ELISA

TFを高発現することで知られているヒト膀胱癌由来細胞株J82(Fair D. S. ら、J. Biol. Chem., 262, 11692-11698, 1987)をATCCより導入し、RPMI-培地中、37℃、5%CO₂、100%湿度の条件で継代・維持した。

Cell-ELISA用プレートは、96穴プレートにJ82細胞を 10^5 個／穴の濃度で播種し、上記条件で1日培養後、培地を除いてリン酸緩衝生理食塩液(PBS)で2回洗浄し、4%パラホルムアルデヒド溶液(PFA)を加えて氷冷下で10分静置することで固定化することによって作製した。PFAを除去し、PBSで洗浄後、1%BSAおよび0.02%アジ化ナトリウムを含むTris緩衝液(Blocking緩衝液)を加えて、使用時まで4℃で保存した。

30

Cell-ELISAは以下のように行った。すなわち、上記のように作製したプレートからBlocking緩衝液を除去し、抗TF抗体溶液もしくはハイブリドーマ培養上清を加えて室温で1.5時間反応させた。0.05% Tween 20を含むPBSで洗浄後、アルカリフォスファターゼを結合したヤギ抗マウスIgG(H+L)(Zymed)を1時間反応させ、洗浄後、1mg/mlのp-ニトロフェニルホスフェート二ナトリウム(Sigma)を添加して1時間後に405nmにおける吸光度を測定することで、J82細胞に結合した抗TF抗体量を定量した。

5. ファクターXa活性を指標としたTF中和活性測定系

50μlの5mMCaCl₂および0.1%ウシ血清アルブミンを含むトリス緩衝生理食塩液(TBS: pH7.6)に10μlのヒト胎盤由来トロンボプラステン溶液(5mg/ml)(Thromborel S)(Boehringer)と10μlのファクターVIIa溶液(82.5ng/ml)(American Diagnostica)を添加し、室温で1時間反応させることでTF/Factor VIIa複合体を形成させた後、10μlの所定濃度に希釈した抗TF抗体溶液もしくはハイブリドーマ培養上清および10μlのFactor X溶液(3.245μg/ml)(Celsus Laboratoire)を添加して45分間反応させ、0.5M EDTAを10μl添加することで反応を止めた。ここに2mM S-2222溶液(第一化学薬品)を50μl添加し、30分間の405nmにおける吸光度変化をもってTFのFactor Xa産生活性とした。この方法では、TF/Factor VIIa複合体とFactor Xと

40

50

の結合を阻害する抗体の活性は測定できる。

6. 血漿凝固阻害活性測定系

市販の正常ヒト血漿（コージンバイオ）を用い、この100 μ lに適当に希釈した抗TF抗体溶液50 μ lを混和して37℃で3分間反応させた後、50 μ lのヒト胎盤由来トロンボプラスチン溶液（1.25 mg/ml）を添加し、血漿が凝固するまでの時間を血漿凝固時間測定装置（CR-A：Ame l u n g）で測定した。

7. 抗体のアイソタイプの決定

ハイブリドーマの培養上清もしくは精製抗体について、マウスモノクローナル抗体アイソタイプニングキット（Ame r s h a m社製）を用いて抗体のアイソタイプを確認し、結果を下に示した。

表 8

抗TFモノクローナル抗体のイムノグロブリンアイソタイプ

A T R - 2	I g G 1 , k
A T R - 3	I g G 1 , k
A T R - 4	I g G 1 , k
A T R - 5	I g G 1 , k
A T R - 7	I g G 2 a , k
A T R - 8	I g G 2 a , k

参考例 2. 可溶型ヒトTFの作製法

可溶型ヒトTF（shTF）は以下のように作製した。

ヒトTFの貫通領域（220番目のアミノ酸）以下をFLAGペプチドM2に置換したものをコードする遺伝子を、哺乳動物細胞用の発現ベクター（ネオマイシン耐性遺伝子、DHFR遺伝子を含む）に挿入し、CHO細胞に導入した。ヒトTFのcDNA配列はJames H. Morrisseyらの報告（Cell（1987）50, 129-135）を参考にした。この可溶型ヒトTFの遺伝子配列とアミノ酸配列を配列番号151に示した。G418により薬剤セレクションし、発現細胞を選抜し、さらにメトトレキサートで発現増幅をかけ、shTF発現細胞を樹立した。

この細胞を無血清培地CHO-S-SFMI I（GIBCO）で培養し、shTFを含む培養上清を得た。同容量の40 mM トリス塩酸緩衝液（pH 8.5）で2倍に希釈し、20 mM トリス塩酸緩衝液（pH 8.5）で平衡化したQ-Sepharose Fast Flowカラム（100 mL, Pharmacia Biotech）に添加し、0.1 M NaClを含む同緩衝液で洗浄後、NaClの濃度を0.3 Mとし、shTFをカラムから溶出した。得られたshTF画分に終濃度2.5 Mとなるように硫酸アンモニウムを加え、遠心操作（10,000 rpm、20分）により夾雑蛋白質を沈殿させた。上清をButyl TOYOPEARL（30 mL, TOSOH）に添加し、2.5 Mの硫酸アンモニウムを含む50 mM トリス塩酸緩衝液（pH 6.8）で洗浄した。50 mM トリス塩酸緩衝液（pH 6.8）中、硫酸アンモニウム濃度を2.5 Mから0 Mまで直線的に下げ、shTFを溶出させた。shTFを含むピーク画分をCentri-Prep 10（アミコン）で濃縮した。150 mM NaClを含む20 mM トリス塩酸緩衝液（pH 7.0）で平衡化したTSK gel G3000 SWGカラム（21.5 $\times$ 600 mm, TOSOH）に濃縮液を添加し、shTFのピーク画分を回収した。これを0.22 μ mのメンブランフィルターで濾過滅菌し、可溶型ヒトTF（shTF）とした。試料の吸光度280 nmのモル吸光係数を $\epsilon = 40,130$ 、分子量を43,210として、試料の濃度を算出した。

配列表フリーテキスト

配列表の< 2 2 3 >に記載した内容は次の通りである。

配列番号：1：プライマーMHC-G 1

配列番号：2：プライマーMHC-G 2 a

配列番号：3：プライマーMKC

配列番号：4：M 1 3プライマーM 4

配列番号：5：M 1 3プライマーRV

配列番号：6：抗-TFマウスモノクローナル抗体ATR-2のH鎖V領域のアミノ酸配列及びそれをコードする塩基配列

配列番号：7：抗-TFマウスモノクローナル抗体ATR-3のH鎖V領域のアミノ酸配列及びそれをコードする塩基配列

配列番号：8：抗-TFマウスモノクローナル抗体ATR-4のH鎖V領域のアミノ酸配列及びそれをコードする塩基配列

配列番号：9：抗-TFマウスモノクローナル抗体ATR-5のH鎖V領域のアミノ酸配列及びそれをコードする塩基配列

配列番号：10：抗-TFマウスモノクローナル抗体ATR-7のH鎖V領域のアミノ酸配列及びそれをコードする塩基配列

配列番号：11：抗-TFマウスモノクローナル抗体ATR-8のH鎖V領域のアミノ酸配列及びそれをコードする塩基配列

配列番号：12：抗-TFマウスモノクローナル抗体ATR-2のL鎖V領域のアミノ酸配列及びそれをコードする塩基配列

配列番号：13：抗-TFマウスモノクローナル抗体ATR-3のL鎖V領域のアミノ酸配列及びそれをコードする塩基配列

10

20

30

配列番号：14：抗-TFマウスモノクローナル抗体ATR-4の
L鎖V領域のアミノ酸配列及びそれをコードする
塩基配列

配列番号：15：抗-TFマウスモノクローナル抗体ATR-5の
L鎖V領域のアミノ酸配列及びそれをコードする
塩基配列

配列番号：16：抗-TFマウスモノクローナル抗体ATR-7の
L鎖V領域のアミノ酸配列及びそれをコードする
塩基配列

配列番号：17：抗-TFマウスモノクローナル抗体ATR-8の
L鎖V領域のアミノ酸配列及びそれをコードする
塩基配列

配列番号：18：プライマーch5HS

配列番号：19：プライマーch5HA

配列番号：20：プライマーch5LS

配列番号：21：プライマーch5LA

配列番号：22：CDRグラフィティングプライマーhRSHv1
S

配列番号：23：CDRグラフィティングプライマーhR5Hv2
8

配列番号：24：CDRグラフィティングプライマーhR5Hv4
S

配列番号：25：CDRグラフィティングプライマーhR5Hv3
A

配列番号：26：CDRグラフィティングプライマーhR5Hv5
A

配列番号：27：プライマーhR5HvPrS

配列番号：28：プライマーhRSHvPrA

配列番号：29：ヒト型化H鎖V領域バージョン“a”のアミノ酸

10

20

配列及びそれをコードする塩基配列

配列番号：30：ヒト型化H鎖V領域バージョン“a”のアミノ酸
配列

配列番号：31：FRシャッフリングプライマーF3RFFS

配列番号：32：FRシャッフリングプライマーF3RFBS

配列番号：33：FRシャッフリングプライマーF3RFFA

配列番号：34：FRシャッフリングプライマーF3RFBA

配列番号：35：FRシャッフリングプライマーF3NMFS

配列番号：36：FRシャッフリングプライマーF3NMBS

配列番号：37：FRシャッフリングプライマーF3NMFA

配列番号：38：FRシャッフリングプライマーF3NMBA

配列番号：39：ヒト型化H鎖V領域バージョン“b”のアミノ酸
配列及びそれをコードする塩基配列

配列番号：40：ヒト型化H鎖V領域バージョン“b”のアミノ酸
配列

配列番号：41：ヒト型化H鎖V領域バージョン“c”のアミノ酸
配列及びそれをコードする塩基配列

配列番号：42：ヒト型化H鎖V領域バージョン“c”のアミノ酸
配列

配列番号：43：FRシャッフリングプライマーF3EPS

配列番号：44：FRシャッフリングプライマーF3EPA

配列番号：45：プライマーF3PrS

配列番号：46：プライマーF3PrA

配列番号：47：FRシャッフリングプライマーF3vHS

配列番号：48：FRシャッフリングプライマーF3vHA

配列番号：49：ヒト型化H鎖V領域バージョン“d”のアミノ酸
配列及びそれをコードする塩基配列

配列番号：50：ヒト型化H鎖V領域バージョン“d”のアミノ酸
配列

10

20

配列番号：51：ヒト型化H鎖V領域バージョン“e”のアミノ酸
配列及びそれをコードする塩基配列

配列番号：52：ヒト型化H鎖V領域バージョン“e”のアミノ酸
配列

配列番号：53：FRシャッフリングプライマーF3SSS

配列番号：54：FRシャッフリングプライマーF3SSA

配列番号：55：FRシャッフリングプライマーF3CDS

配列番号：56：FRシャッフリングプライマーF3CDA

配列番号：57：ヒト型化H鎖V領域バージョン“f”のアミノ酸
配列及びそれをコードする塩基配列

配列番号：58：ヒト型化H鎖V領域バージョン“f”のアミノ酸
配列

配列番号：59：ヒト型化H鎖V領域バージョン“g”のアミノ酸
配列及びそれをコードする塩基配列

配列番号：60：ヒト型化H鎖V領域バージョン“g”のアミノ酸
配列

配列番号：61：FRシャッフリングプライマーF3ADS

配列番号：62：FRシャッフリングプライマーF3ADA

配列番号：63：ヒト型化H鎖V領域バージョン“h”のアミノ酸
配列及びそれをコードする塩基配列

配列番号：64：ヒト型化H鎖V領域バージョン“h”のアミノ酸
配列

配列番号：65：FRシャッフリングプライマーF3MMS

配列番号：66：FRシャッフリングプライマーF3MMA

配列番号：67：FRシャッフリングプライマーF3BMS

配列番号：68：FRシャッフリングプライマーF3BMA

配列番号：69：ヒト型化H鎖V領域バージョン“i”のアミノ酸
配列及びそれをコードする塩基配列

配列番号：70：ヒト型化H鎖V領域バージョン“i”のアミノ酸

10

20

配列

配列番号：71：ヒト型化H鎖V領域バージョン“j”のアミノ酸
配列及びそれをコードする塩基配列

配列番号：72：ヒト型化H鎖V領域バージョン“j”のアミノ酸
配列

配列番号：73：FRシャッフリングプライマーF2MPS

配列番号：74：FRシャッフリングプライマーF2MPA

配列番号：75：ヒト型化H鎖V領域バージョン“b1”のアミノ
酸配列及びそれをコードする塩基配列

配列番号：76：ヒト型化H鎖V領域バージョン“b1”のアミノ
酸配列

10

配列番号：77：ヒト型化H鎖V領域バージョン“d1”のアミノ
酸配列及びそれをコードする塩基配列

配列番号：78：ヒト型化H鎖V領域バージョン“d1”のアミノ
酸配列

配列番号：79：FRシャッフリングプライマーF2VHS

配列番号：80：FRシャッフリングプライマーF2VHA

配列番号：81：ヒト型化H鎖V領域バージョン“b3”のアミノ
酸配列及びそれをコードする塩基配列

配列番号：82：ヒト型化H鎖V領域バージョン“b3”のアミノ
酸配列

20

配列番号：83：ヒト型化H鎖V領域バージョン“d3”のアミノ
酸配列及びそれをコードする塩基配列

配列番号：84：ヒト型化H鎖V領域バージョン“d3”のアミノ
酸配列

配列番号：85：FRシャッフリングベクターLv1S

配列番号：86：FRシャッフリングベクターh5Lv4S

配列番号：87：FRシャッフリングベクターh5Lv2A

配列番号：88：FRシャッフリングベクターh5Lv3A

配列番号：89：FRシャッフリングプライマーh5Lv5A
配列番号：90：プライマーh5LvS
配列番号：91：プライマーh5LvA
配列番号：92：ヒト型化L鎖V領域バージョン“a”のアミノ酸
配列及びそれをコードする塩基配列
配列番号：93：ヒト型化L鎖V領域バージョン“a”のアミノ酸
配列
配列番号：94：FRシャッフリングプライマーF3SS
配列番号：95：FRシャッフリングプライマーF3SA
配列番号：96：FRシャッフリングプライマーF3RS
配列番号：97：FRシャッフリングプライマーF3RA
配列番号：98：ヒト型化L鎖V領域バージョン“b”のアミノ酸
配列及びそれをコードする塩基配列
配列番号：99：ヒト型化L鎖V領域バージョン“b”のアミノ酸
配列
配列番号：100：ヒト型化L鎖V領域バージョン“c”のアミノ
酸配列及びそれをコードする塩基配列
配列番号：101：ヒト型化L鎖V領域バージョン“c”のアミノ
酸配列
配列番号：102：FRシャッフリングプライマーF2SS
配列番号：103：FRシャッフリングプライマーF2SA
配列番号：104：FRシャッフリングプライマーF2XS
配列番号：105：FRシャッフリングプライマーF2XA
配列番号：106：ヒト型化L鎖V領域バージョン“b1”のアミ
ノ酸配列及びそれをコードする塩基配列
配列番号：107：ヒト型化L鎖V領域バージョン“b1”のアミ
ノ酸配列
配列番号：108：ヒト型化L鎖V領域バージョン“b2”のアミ
ノ酸配列及びそれをコードする塩基配列

10

20

- 配列番号：109：ヒト型化L鎖V領域バージョン“b2”のアミノ酸配列
- 配列番号：110：ヒト型化H鎖V領域全バージョンのFR1のアミノ酸配列
- 配列番号：111：ヒト型化H鎖V領域バージョン“a”～“j”のFR2のアミノ酸配列
- 配列番号：112：ヒト型化H鎖V領域バージョン“b1”及び“d1”のRF2のアミノ酸配列
- 配列番号：113：ヒト型化H鎖V領域バージョン“b3”及び“d3”のRF2のアミノ酸配列
- 配列番号：114：ヒト型化H鎖V領域バージョン“a”のFR3のアミノ酸配列
- 配列番号：115：ヒト型化H鎖V領域バージョン“b”，“b1”及び“b3”のFR3のアミノ酸配列
- 配列番号：116：ヒト型化H鎖V領域バージョン“c”のFR3のアミノ酸配列
- 配列番号：117：ヒト型化H鎖V領域バージョン“d”，“d1”及び“d3”のFR3のアミノ酸配列
- 配列番号：118：ヒト型化H鎖V領域バージョン“e”のFR3のアミノ酸配列
- 配列番号：119：ヒト型化H鎖V領域バージョン“f”のFR3のアミノ酸配列
- 配列番号：120：ヒト型化H鎖V領域バージョン“g”のFR3のアミノ酸配列
- 配列番号：121：ヒト型化H鎖V領域バージョン“h”のFR3のアミノ酸配列
- 配列番号：122：ヒト型化H鎖V領域バージョン“i”のFR3のアミノ酸配列
- 配列番号：123：ヒト型化H鎖V領域バージョン“j”のFR3

10

20

のアミノ酸配列

配列番号：124：ヒト型化H鎖V領域全バージョンのFR4のアミノ酸配列

配列番号：125：ヒト型化L鎖V領域全バージョンのFR1のアミノ酸配列

配列番号：126：ヒト型化L鎖V領域バージョン“a”，“b”及び“c”のFR2のアミノ酸配列

配列番号：127：ヒト型化L鎖V領域バージョン“b1”のFR2のアミノ酸配列

配列番号：128：ヒト型化L鎖V領域バージョン“b2”のFR2のアミノ酸配列

10

配列番号：129：ヒト型化L鎖V領域バージョン“a”のFR3のアミノ酸配列

配列番号：130：ヒト型化L鎖V領域バージョン“b”，“b1”、及び“b2”のFR3のアミノ酸配列

配列番号：131：ヒト型化L鎖V領域バージョン“c”のFR3のアミノ酸配列

配列番号：132：ヒト型化L鎖V領域全バージョンFR4のアミノ酸配列

配列番号：133：ヒト型化H鎖V領域全バージョンCDR1のアミノ酸配列

20

配列番号：134：ヒト型化H鎖V領域全バージョンのCDR2のアミノ酸配列

配列番号：135：ヒト型化H鎖V領域全バージョンのCDR3のアミノ酸配列

配列番号：136：ヒト型化L鎖V領域全バージョンのCDR1のアミノ酸配列

配列番号：137：ヒト型化L鎖V領域全バージョンのCDR2のアミノ酸配列

配列番号：138：ヒト型化L鎖V領域全バージョンのCDR3の
アミノ酸配列

配列番号：139：抗-TFマウスモノクローナル抗体ATR-2
のH鎖V領域のアミノ酸配列

配列番号：140：抗-TFマウスモノクローナル抗体ATR-3
のH鎖V領域のアミノ酸配列

配列番号：141：抗-TFマウスモノクローナル抗体ATR-4
のH鎖V領域のアミノ酸配列

配列番号：142：抗-TFマウスモノクローナル抗体ATR-5
のH鎖V領域のアミノ酸配列

配列番号：143：抗-TFマウスモノクローナル抗体ATR-7
のH鎖V領域のアミノ酸配列

配列番号：144：抗-TFマウスモノクローナル抗体ATR-8
のH鎖V領域のアミノ酸配列

配列番号：145：抗-TFマウスモノクローナル抗体ATR-2
のL鎖V領域のアミノ酸配列

配列番号：146：抗-TFマウスモノクローナル抗体ATR-3
のL鎖V領域のアミノ酸配列

配列番号：147：抗-TFマウスモノクローナル抗体ATR-4
のL鎖V領域のアミノ酸配列

配列番号：148：抗-TFマウスモノクローナル抗体ATR-5
のL鎖V領域のアミノ酸配列

配列番号：149：抗-TFマウスモノクローナル抗体ATR-7
のL鎖V領域のアミノ酸配列

配列番号：150：抗-TFマウスモノクローナル抗体ATR-8
のL鎖V領域のアミノ酸配列

配列番号：151：可溶型ヒトTFのアミノ酸配列及びそれをコード
する塩基配列

配列番号：152：可溶型ヒトTFのアミノ酸配列

10

20

【配列表】

30

SEQUENCE LISTING

<110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

<120> Humanized antibodies against human tissue factor (TF)
and process for production of the humanited antibodies

<130> G821

<150> JP 10-91850

10

<151> 1998-04-03

<160> 152

<210> 1

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Primer MHC-G1

<400> 1

ggatcccggg ccagtggata gacagatg

28

<210> 2

<211> 27

30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer MHC-G2a

<400> 2

ggatcccggg agtggataga ccgatgg

27

40

<210> 3

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer MKC

<400> 3

ggatcccggg tggatggtgg gaagatg

27

<210> 4

10

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> M13 Primer M4

<400> 4

gttttcccag tcacgac

17

20

<210> 5

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

30

<223> M13 Primer RV

<400> 5

caggaaacag ctatgac

17

<210> 6

<211> 411

<212> DNA

40

<213> Mouse

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)...(441)

<223> Nucleotide sequence coding for H chain V region of anti-
i-TF mouse monoclonal antibody ATR-2

10

<400> 6

atg gaa tgg agc tgg atc ttt ctc ttc ctc ctg tca gga act aca ggt 48

Met Glu Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Thr Gly

-15

-10

-5

gtc cac tct gag atc cag ctg cag cag tct gga cct gag ctg gtg aag 96

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

20

1

5

10

cct ggg gct tca gtg aag gta tcc tgc aag gct tct ggt tac tca ttc 144

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

15

20

25

act gac tac aac atg tac tgg gtg aag cag agc cat gga aag agc ctt 192

Thr Asp Tyr Asn Met Tyr Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu

30

30

35

40

45

gag tgg att gga tat att gat cct tac aat ggt ggt act atc tac aac 240

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

50

55

60

cag aag ttc aag ggc aag gcc aca ttg act gtt gac aag tcc tcc agc 288

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

40

65

70

75

aca gcc ttc atg cat ctc aac agc ctg aca tct gag gac tct gca gtc 336

Thr Ala Phe Met His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val

80

85

90

tat tac tgt gca aga gga ggg gaa ggg tac tac ttt gac tac tgg ggc 384

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Glu Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly

95

100

105

caa ggc acc act ctc aca gtc tcc tca 411

Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

110

115

<210> 7

<211> 411

<212> DNA

<213> Mouse

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)...(441)

<223> Nucleotide sequence coding for H chain V region of anti-TF mouse monoclonal antibody ATR-3

<400> 7

atg gaa tgg agc tgg atc ttt ctc ttc ctc ctg tca gga act aca ggt 48

Met Glu Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Thr Gly

-15

-10

-5

10

20

30

40

gtc cac tct gag atc cag ctg cag cag tct gga cct gag ctg gtg aag	96	
Val His Ser Glu Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys		
1 5 10		
cct ggg gct tca gtg aag gta tcc tgc aag gct tct ggt tac tca ttc	144	
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe		
15 20 25		
act gac tac aac atg tac tgg gtg aag cag agc cat gga aag agc ctt	192	10
Thr Asp Tyr Asn Met Tyr Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu		
30 35 40 45		
gag tgg att gga tat att gat cct tac aat ggt ggt act atc tac aac	240	
Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ile Tyr Asn		
50 55 60		20
cag aag ttc aag ggc aag gcc aca ttg act gtt gac aag tcc tcc agc	288	
Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser		
65 70 75		
aca gcc ttc atg cat ctc aac agc ctg aca tct gag gac tct gca gtc	336	
Thr Ala Phe Met His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val		
80 85 90		30
tat tac tgt gca aga gga ggg gaa ggg tac tac ttt gac tac tgg ggc	384	
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Glu Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly		
95 100 105		
caa ggc acc act ctc aca gtc tcc tca	411	
Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser		
110 115		40

<210> 8

<211> 408

<212> DNA

<213> Mouse

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

10

<222> (58)...(408)

<223> Nucleotide sequence coding for H chain V region of anti-
 i-TF mouse monoclonal antibody ATR-4

<400> 8

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg 48

Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly

20

-15

-10

-5

gtc aat tca gag gtt cag ctg cag cag tct ggg gct gag ctt gtg agg 96

Val Asn Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg

1

5

10

cca ggg gcc tta gtc aag ttg tcc tgc aaa gct tct ggc ttc aac att 144

Pro Gly Ala Leu Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile

30

15

20

25

aaa gac tac tat atg cac tgg gtg aag cag agg cct gaa cag ggc ctg 192

Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu

30

35

40

45

gag tgg att gga ttg att gat cct caa aat ggt aat act ata tat gac 240

Glu Trp Ile Gly Leu Ile Asp Pro Gln Asn Gly Asn Thr Ile Tyr Asp

40

50

55

60

ccg aag ttc cag ggc aag gcc agt ata aca gca gac aca tcc tcc aac 288

Pro Lys Phe Gln Gly Lys Ala Ser Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn

65

70

75

aca gcc tac ctg cag ctc agc agc ctg aca tct gag gac act gcc gtc 336

Thr Ala Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val

80

85

90

tat tac tgt gat aga gac tcg ggc tat gct atg gac tac tgg ggt caa 384

Tyr Tyr Cys Asp Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

95

100

105

gga acc tca gtc acc gtc tcc tca 408

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

110

115

<210> 9

<211> 408

<212> DNA

<213> Mouse

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)...(408)

<223> Nucleotide sequence coding for H chain V region of ant

i-TF mouse monoclonal antibody ATR-5

<400> 9

10

20

30

40

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg	48	
Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly		
-15 -10 -5		
gtc aat tca gag gtt cag ctg cag cag tct ggg act aac ctt gtg agg	96	
Val Asn Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr Asn Leu Val Arg		
1 5 10		
cca ggg gcc tta gtc aag ttg tcc tgc aaa ggt tct ggc ttc aac att	144	10
Pro Gly Ala Leu Val Lys Leu Ser Cys Lys Gly Ser Gly Phe Asn Ile		
15 20 25		
aaa gac tac tat atg cac tgg gtg aag cag agg cct gaa cag ggc ctg	192	
Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu		
30 35 40 45		20
gag tgg att gga ggg aat gat cct gcg aat ggt cat agt atg tat gac	240	
Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp		
50 55 60		
ccg aaa ttc cag ggc aag gcc agt ata aca gca gac aca tcc tcc aac	288	
Pro Lys Phe Gln Gly Lys Ala Ser Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn		
65 70 75		30
aca gcc tac ctg cag ctc agc agc ctg aca tct gag gac act gcc gtc	336	
Thr Ala Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val		
80 85 90		
tat ttc tgt gct aga gac tcg ggc tat gct atg gac tac tgg ggt caa	384	
Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln		
95 100 105		40
gga acc tca gtc acc gtc tcc tca	408	
Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser		
110 115		

<210> 10
 <211> 411
 <212> DNA
 <213> Mouse
 <220>
 <221> sig-peptide 10
 <222> (1)...(57)
 <220>
 <221> mat-peptide
 <222> (58)...(411)
 <223> Nucleotide sequence coding for H chain V region of anti-TF mouse monoclonal antibody ATR-7 20
 <400> 10
 atg gaa tgg agc tgg atc ttt ctc ttc ctc ctg tca gga act aca ggt 48
 Met Glu Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Thr Gly
 -15 -10 -5
 gtc cac tct gac atc cag ctg cag cag tct gga cct gag ctg gtg aag 96
 Val His Ser Asp Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys 30
 1 5 10
 cct ggg tct tca gtg aag gta tcc tgc aag gct tct ggt tac tca ttc 144
 Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
 15 20 25
 cct gac tac aac ata ttc tgg gtg aag cag agc cat gga aag agc ctt 192
 Pro Asp Tyr Asn Ile Phe Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu 40
 30 35 40 45

gag tgg att gga tat att gat cct tac act ggt ggt act ggc tac aac 240

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

50

55

60

cag aag ttc aac gac aag gcc aca ttg act gtt gac aag tcc tcc agc 288

Gln Lys Phe Asn Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser

65

70

75

aca gcc ttc atg cat ctc aac agc cta aca tct gag gac tct gca gtc 336

Thr Ala Phe Met His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val

80

85

90

tat tac tgt gca aga ggt ttc tac tat gat tac gac tgt tac tgg ggc 384

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Phe Tyr Tyr Asp Tyr Asp Cys Tyr Trp Gly

95

100

105

caa ggg act ctg gtc act gtc tct gca 411

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala

110

115

<210> 11

<211> 411

<212> DNA

<213> Mouse

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)...(411)

<223> Nucleotide sequence coding for H chain V region of anti-
i-TF mouse monoclonal antibody ATR-8

10

20

30

40

<400> 11

atg gaa tgg agc tgg atc ttt ctc ttc ctc ctg tca gga act aca ggt	48	
Met Glu Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Thr Gly		
-15 -10 -5		
gtc cac tct gac atc cag ctg cag cag tct gga cct gag ctg gtg aag	96	
Val His Ser Asp Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys		10
1 5 10		
cct ggg gct tca gtg aag gta tcc tgc aag gct tct ggt tac tca ttc	144	
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe		
15 20 25		
act gac tac aac ata ttc tgg gtg aag cag agc cat gga aag agc ctt	192	
Thr Asp Tyr Asn Ile Phe Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu		20
30 35 40 45		
gag tgg att gga tat att gat cct tac act ggt ggt act ggc tac aac	240	
Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Thr Gly Gly Thr Gly Tyr Asn		
50 55 60		
cag aag ttc aac gac aag gcc aca ttg act gtt gac aag tcc tcc agc	288	
Gln Lys Phe Asn Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser		30
65 70 75		
aca gcc ttc atg cat ctc aac agc ctg aca tct gag gac tct gca gtc	336	
Thr Ala Phe Met His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val		
80 85 90		
tat tac tgt gca aga ggt ttc tac tat gat tac gac tgt tac tgg ggc	384	
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Phe Tyr Tyr Asp Tyr Asp Cys Tyr Trp Gly		40
95 100 105		

caa ggg act ctg gtc act gtc tct gca 411

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala

110 115

<210> 12

<211> 375

<212> DNA

10

<213> Mouse

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(54)

<220>

<221> mat-peptide

20

<222> (55)...(375)

<223> Nucleotide sequence coding for L chain V region of anti-TF mouse monoclonal antibody ATR-2

<400> 12

atg ctc act cag ctc ctg gga tta ctg ctg ctc tgg ttt gca ggt ggt 48

Met Leu Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Phe Ala Gly Gly

30

-15

-10

-5

aaa tgt gac att cag atg acc cag tct cct gcc tcc cag tct gca tct 96

Lys Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Gln Ser Ala Ser

1

5

10

ctg gga gaa agt gtc acc atc aca tgc ctg gca agt cag acc att ggt 144

Leu Gly Glu Ser Val Thr Ile Thr Cys Leu Ala Ser Gln Thr Ile Gly

40

15

20

25

30

aca tgg tta gcc tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa tct cct cag gtc 192
 Thr Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Gln Val
 35 40 45
 ctg att tat gct gca acc agc ttg gca gat ggg gtc cca tca agg ttc 240
 Leu Ile Tyr Ala Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe
 50 55 60
 agt ggt agt gga tct ggc aca aaa ttt tct ttc aag atc agc agc cta 288
 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Lys Phe Ser Phe Lys Ile Ser Ser Leu
 65 70 75
 cag gct gaa gat ttt gta agt tat tac tgt caa caa ctt tac agt act 336
 Gln Ala Glu Asp Phe Val Ser Tyr Tyr Cys Gln Gln Leu Tyr Ser Thr
 80 85 90
 ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa 375
 Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 95 100 105
 <210> 13
 <211> 375
 <212> DNA
 <213> Mouse
 <220>
 <221> sig-peptide
 <222> (1)... (54)
 <220>
 <221> mat-peptide
 <222> (55)... (375)
 <223> Nucleotide sequence coding for L chain V region of anti-
 i-TF mouse monoclonal antibody ATR-3

10

20

30

40

<400> 13

atg ctc act cag ctc ctg gga tta ctg ctg ctc tgg ttt gca ggt ggt 48

Met Leu Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Phe Ala Gly Gly

-15

-10

-5

aaa tgt gac att cag atg acc cag tct cct gcc tcc cag tct gca tct 96

Lys Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Gln Ser Ala Ser

1

5

10

10

ctg gga gaa agt gtc acc atc aca tgc ctg gca agt cag acc att ggt 144

Leu Gly Glu Ser Val Thr Ile Thr Cys Leu Ala Ser Gln Thr Ile Gly

15

20

25

30

aca tgg tta gcc tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa tct cct cag gtc 192

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

35

40

45

20

ctg att tat gct gca acc agc ttg gca gat ggg gtc cca tca agg ttc 240

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

50

55

60

agt ggt agt gga tct ggc aca aaa ttt tct ttc aag atc agc agc cta 288

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Lys Phe Ser Phe Lys Ile Ser Ser Leu

65

70

75

30

cag gct gaa gat ttt gta agt tat tac tgt caa caa ctt tac agt act 336

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

80

85

90

ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa 375

Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

95

100

105

40

<210> 14

<211> 387

<212> DNA

<213> Mouse

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(66)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (67)...(387)

<223> Nucleotide sequence coding for L chain V region of anti-TF mouse monoclonal antibody ATR-4

<400> 14

atg gac atg agg gcc cct gct cag ttt ttt ggg atc ttg ttg ctc tgg 48

Met Asp Met Arg Ala Pro Ala Gln Phe Phe Gly Ile Leu Leu Leu Trp

-20

-15

-10

ttt cca ggt atc aga tgt gac atc aag atg acc cag tct cca tcc tcc 96

Phe Pro Gly Ile Arg Cys Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser

-5

1

5

10

atg tat gcc tcg ctg gga gag aga gtc act atc act tgc aag gcg agt 144

Met Tyr Ala Ser Leu Gly Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser

15

20

25

cag gac att aaa acc ttt tta agc tgg tac cag cag aaa cca tgg caa 192

Gln Asp Ile Lys Thr Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Trp Gln

30

35

40

tct cct aag acc ctg atc tat tat gca aca agc ttg gca gat ggg gtc 240

Ser Pro Lys Thr Leu Ile Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val

45

50

55

10

20

30

40

cca tca aga ttc agt ggc agt gga tct ggg caa gat tat tct cta acc 288

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr

60

65

70

atc agc agc ctg gag tct gac gat tca gca act tat tac tgt cta cag 336

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

75

80

85

90

cat ggt gag agc ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc aaa ctg gaa ata 384

His Gly Glu Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile

95

100

105

aaa

387

Lys

<210> 15

20

<211> 381

<212> DNA

<213> Mouse

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(60)

30

<220>

<221> mat-peptide

<222> (61)...(381)

<223> Nucleotide sequence coding for L chain V region of anti-TF mouse monoclonal antibody ATR-5

<400> 15

40

atg agg gcc cct gct cag ttt ttt ggg atc ttg ttg ctc tgg ttt cca 48

Met Arg Ala Pro Ala Gln Phe Phe Gly Ile Leu Leu Leu Trp Phe Pro

-20

-15

-10

-5

ggt atc aga tgt gac atc aag atg acc cag tct cca tcc tct atg tat	96	
Gly Ile Arg Cys Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr		
1 5 10		
gca tcg ctg gga gag aga gtc act atc act tgc aag gcg agt cag gac	144	
Ala Ser Leu Gly Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp		
15 20 25		
att aaa agc ttt tta agt tgg tac cag caa aaa cca tgg aaa tct cct	192	10
Ile Lys Ser Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Trp Lys Ser Pro		
30 35 40		
aag acc ctg atc tat tat gca aca agc ttg gca gat ggg gtc cca tca	240	
Lys Thr Leu Ile Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser		
45 50 55 60		20
aga ttc agt ggc agt gga tct ggg caa gat tat tct cta acc atc aac	288	
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Asn		
65 70 75		
aac ctg gag tct gac gat aca gca act tat tat tgt cta cag cat ggt	336	
Asn Leu Glu Ser Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly		
80 85 90		30
gag agc ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa	381	
Glu Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
95 100 105		

<210> 16

<211> 393

<212> DNA

<213> Mouse

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)...(394)

<223> Nucleotide sequence coding for L chain V region of anti-
 i-TF mouse monoclonal antibody ATR-7

10

<400> 16

atg agt cct gcc cag ttc ctg ttt ctg tta gtg ctc tgg att cgg gaa 48

Met Ser Pro Ala Gln Phe Leu Phe Leu Leu Val Leu Trp Ile Arg Glu

-15

-10

-5

atc aac ggt gat gtt gtg ctg acc cag act cca ctc act ttg tgc gtt 96

Ile Asn Gly Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val

20

1

5

10

acc att gga caa cca gcc tcc gtc tct tgc aag tca agt cag agc ctc 144

Thr Ile Gly Gln Pro Ala Ser Val Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu

15

20

25

tta gat agt gat gga aag aca tat ttg aat tgg ttg tta cag agg cca 192

Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro

30

30

35

40

45

ggc cag tct cca aag cgc ctg atc tat ctt gtg tct aaa ctg gac tct 240

Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser

50

55

60

gga gtc cct gac agg ttc act ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca 288

Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

40

65

70

75

ctg aaa atc agc aga glg gag gct gag gat ttg gga gtt tat tat tgt 336

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys

80

85

90

tgg caa gat aca cat ttt ccg gac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg 336

Trp Gln Asp Thr His Phe Pro Asp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu

95

100

105

gaa ata aaa

393

10

Glu Ile Lys

110

<210> 17

<211> 393

<212> DNA

20

<213> Mouse

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

30

<222> (58)...(393)

<223> Nucleotide sequence coding for L chain V region of anti-
i-TF mouse monoclonal antibody ATR-8

<400> 17

atg agt cct gcc cag ttc ctg ttt ctg tta gtg ctc tgg att cgg gat 48

Met Ser Pro Ala Gln Phe Leu Phe Leu Leu Val Leu Trp Ile Arg Asp

40

-15

-10

-5

atc aac ggt gat gtt gta ctg acc cag act cca ctc act ttg tgc gtt	96	
Ile Asn Gly Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val		
1 5 10		
acc att gga caa cca gcc tcc gtc tct tgc aag tca agt cag agc ctc	144	
Thr Ile Gly Gln Pro Ala Ser Val Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu		
15 20 25		10
tta gat agt gat gga aag aca tat ttg aat tgg ttg tta cag agg cca	192	
Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro		
30 35 40 45		
ggc cag tct cca aag cgc cta atc tat ctg gtg tct aaa ctg gac tct	240	
Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser		
50 55 60		20
gga gtc cct gac agg ttc act ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca	288	
Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr		
65 70 75		
ctg aaa atc agc aga gtg gag gct gag gat ttg gga gtt tat tat tgt	336	
Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys		
80 85 90		30
tgg caa gat aca cat ttt ccg gac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg	384	
Trp Gln Asp Thr His Phe Pro Asp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu		
95 100 105		
gaa ata aaa	393	
Glu Ile Lys		
110		40
<210> 18		
<211> 35		
<212> DNA		

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer ch5HS

<400> 18

gtctgtcgac ccacatgaa atgcagctgg gtcac 35

<210> 19

10

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer ch5HA

<400> 19

20

tgttgctagc tgaggagacg gtgactga 28

<210> 20

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

30

<223> Primer ch5LS

<400> 20

gtctagatct ccacatgag ggccctgct cagtt 35

<210> 21

<211> 28

<212> DNA

40

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer ch5LA

<400> 21
tggttcgtacg ttttatttcc agcttggt 28

<210> 22

<211> 104

<212> DNA

<213> Artificial Sequence 10

<220>

<223> CDR grafting primer hR5Hv1S

<400> 22
ttctgtcgac ccacatgaa atgcagctgg gtcattctt tcctgatggc agtggttaca 60
ggggttaact cacagggtgca gctgttggag tctggagctg tgct 104

<210> 23 20

<211> 108

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR grafting primer hR5Hv28

<400> 23 30
acagggtgcag ctgttggagt ctggagctgt gctggcaagg cctgggactt ccgtgaagat 60
ctcctgcaag gcttccggat tcaacattaa agactactat atgcattg 108

<210> 24

<211> 108

<212> DNA

<213> Artificial Sequence 40

<220>

<223> CDR grafting primer hR5Hv4S

<400> 24

gaatggccat agtatgtatg acccgaaatt ccagggcagg gccaaactga ctgcagccac 60
atccgccagt attgcctact tggagttctc gaggctgaca aatgagga 108

<210> 25

<211> 110

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> CDR grafting primer hR5Hv3A

<400> 25

tcatacatatc tatggccatt cgcaggatca ttcccaccaa tccattctag accctgtcca 60
ggcctctgtt ttacccaatg catatagtag tctttaatgt tgaatccgga 110

<210> 26

20

<211> 110

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR grafting primer hR5Hv5A

<400> 26

30

agaagctagc tgaggagacg gtgaccaggg tgccttggcc ccagtagtcc atggcatagc 60
ccgagtctct tgcacagtaa tagaccgcag aatcctcatt tgtcaggctc 110

<210> 27

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Primer hR5HvPrS

<400> 27

ttctgtcgac ccacatga

19

<210> 28

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

10

<223> Primer hR5HvPrA

<400> 28

agaagctagc tgaggagac

19

<210> 29

<211> 415

<212> DNA

20

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

30

<222> (58)...(415)

<223> Nucleotide sequence coding for version "a" of humanize
d H chain V region

<400> 29

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg 48

Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly

40

-15

-10

-5

ggt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg	96	
Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg		
1 5 10		
cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att	144	
Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile		
15 20 25		
aaa gac tac tat atg cat tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt cta	192	10
Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu		
30 35 40 45		
gaa tgg att ggt ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac	240	
Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp		
50 55 60		20
ccg aaa ttc cag ggc agg gcc aaa ctg act gca gcc aca tcc gcc agt	288	
Pro Lys Phe Gln Gly Arg Ala Lys Leu Thr Ala Ala Thr Ser Ala Ser		
65 70 75		
att gcc tac ttg gag ttc tcg agc ctg aca aat gag gat tct gcg gtc	336	
Ile Ala Tyr Leu Glu Phe Ser Ser Leu Thr Asn Glu Asp Ser Ala Val		
80 85 90		30
tat tac tgt gca aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa	384	
Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln		
95 100 105		
ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc	415	
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser		
110 115		40
<210> 30		
<211> 119		
<212> PRT		

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of version "a" of humanized H chain V region

<400> 30

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20 25 30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Ala Lys Leu Thr Ala Ala Thr Ser Ala Ser Ile Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Glu Phe Ser Ser Leu Thr Asn Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115

<210> 31

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3RFFS

10

20

30

40

<400> 31

ttcttggcca tagtatgtat gacccgaaa! tccagggccg agtcacaatc actgcagaca 60
 cateccagaa cacagcctac atggagctct cgagctctgag 100

<210> 32

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> FR Shuffling primer F3RFBS

<400> 32

ggagctctcg agtctgagat ctgaggacac agccatttat tactgtgcaa gagactcggg 60
 ctatgccatg gttct 75

20

<210> 33

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3RFFA

30

<400> 33

ctcagactcg agagctccat gtaggctgtg ttcgtggatg tgtctgcagt gattgtgact 60
 cggccctgga atttcgggtc atacatacta tggccaagaa 100

<210> 34

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> FR Shuffling primer F3RFBA

<400> 34

agaaccatgg catagcccg gtcctcttgca cagtaataaa tggctgtgtc ctcagatctc 60

agactcgaga gctcc 75

<210> 35

<211> 100

<212> DNA

10

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3NMFS

<400> 35

ttcttggcca tagtatgtat gacccgaaat tccagggccg agtcacaatg ctggtagaca 60

catccaagaa ccagttctcc ctgaggctct cgagtgtgac 100

20

<210> 36

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3NMBS

30

<400> 36

gaggctctcg agtgtgacag ccgcggacac agccgtatat tactgtgcaa gagactcggg 60

ctatgccatg gttct 75

<210> 37

<211> 100

<212> DNA

40

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3NMFA

<400> 37

gtcacactcg agagcctcag ggagaactgg ttcttggatg tgtctaccag cattgtgact 60
 cggccctgga atttcgggtc atacatacta tggccaagaa 100

<210> 38

<211> 75

<212> DNA

10

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3NMBA

<400> 38

agaacctgga catagcccgga gtcctcttgca cagtaataata cggctgtgtc cgcggctgtc 60
 acactcgaga gcctc 75

20

<210> 39

<211> 414

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

30

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)...(414)

<223> Nucleotide sequence coding for version "b" of humanize
 d H chain V region

40

<400> 39

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg	48	
Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly		
-15 -10 -5		
gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg	96	
Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg		
1 5 10		10
cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att	144	
Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile		
15 20 25		
aaa gac tac tat atg cat tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt cta	192	
Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu		
30 35 40 45		20
gaa tgg att ggt ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac	240	
Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp		
50 55 60		
ccg aaa ttc cag ggc cga gtc aca atc act gca gac aca tcc acg aac	288	
Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn		
65 70 75		30
aca gcc tac atg gag ctc tcg agt ctg aga tct gag gac aca gcc att	336	
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile		
80 85 90		
tat tac tgt gca aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa	384	
Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln		
95 100 105		40
ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc	414	
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser		
110 115		

<210> 40

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of version "b" of humanized H chain V region

10

<400> 40

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20 25 30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115

40

<210> 41

<211> 414

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

10

<222> (58)...(414)

<223> Nucleotide sequence coding for version "c" of humanized H chain V region

<400> 41

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg 48

Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly

20

-15

-10

-5

gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg 96

Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg

1

5

10

cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att 144

Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile

30

15

20

25

aaa gac tac tat atg cat tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt cta 192

Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu

30

35

40

45

gaa tgg att ggt ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac 240

Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp

40

50

55

60

ccg aaa ttc cag ggc cga gtc aca atg ctg gta gac aca tcc aag aac 288
 Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Leu Val Asp Thr Ser Lys Asn
 65 70 75
 cag ttc tcc ctg agg ctc tcg agt gtg aca gcc gcg gac aca gcc gta 336
 Gln Phe Ser Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val
 80 85 90
 tat tac tgt gca aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa 384
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 95 100 105
 ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc 414
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 110 115
 <210> 42
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Amino acid sequence of version "c" of humanized H chain V region 30
 <400> 42
 Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

10

20

30

40

Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe

50

55

60

Gln Gly Arg Val Thr Met Leu Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser

65

70

75

80

Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100

105

110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115

<210> 43

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3EPS

<400> 43

ttcttggcca tagtatgtat gacccgaaat tccagggcag agtcacgatt actgcggacg 60

aatccacgag cacagcctac atggagctct cgagtctgag 100

<210> 44

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3EPA

<400> 44

agaaccatgg catagcccga gtctctcgca cagaaatata cggccgagtc ctcagatctc 60

10

20

30

40

agactcgaga gctcc

75

<210> 45

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

10

<223> Primer F3PrS

<400> 45

ttcttggcca tagtatgtat

20

<210> 46

<211> 18

<212> DNA

20

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer F3PrA

<400> 46

agaacccatgg catagccc

18

<210> 47

30

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3vHS

<400> 47

40

ttcttggcca tagtatgtat gacccgaaat tccagggcag agtctcgatt accgcggacg 60

agtcaacgaa gatagcctac atggagctca acagctctgag

100

<210> 48

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3vHA

<400> 48

agaaccatgg catagccgga gtctctcgca cagaaataaa cggccgtgtc ctcagatctc 60

agactgttga gctcc 75

10

<210> 49

<211> 414

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)...(414)

<223> Nucleotide sequence coding for version "d" of humanize

d H chain V region

<400> 49

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg 48

Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly

-15

-10

-5

40

gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg 96

Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg

1

5

10

cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att 144

Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile

15

20

25

aaa gac tac tat atg cat tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt cta 192

Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu

30

35

40

45

gaa tgg att ggt ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac 240

Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp

50

55

60

ccg aaa ttc cag ggc aga gtc acg att act gcg gac gaa tcc acg agc 288

Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser

65

70

75

aca gcc tac atg gag ctc tcg agt ctg aga tct gag gac tcg gcc gta 336

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

80

85

90

tat ttc tgt gcg aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa 384

Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

95

100

105

ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc 414

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

110

115

<210> 50

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of version "d" of humanized H chai

10

20

30

40

n

<400> 50

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20 25 30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115

<210> 51

<211> 414

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

10

20

30

40

<222> (58)...(414)

<223> Nucleotide sequence coding for version "e" of humanized H chain V region

<400> 51

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg	48	
Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly		10
-15 -10 -5		
gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg	96	
Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg		
1 5 10		
cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att	144	
Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile		20
15 20 25		
aaa gac tac tat atg cat tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt cta	192	
Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu		
30 35 40 45		
gaa tgg att ggt ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac	240	
Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp		30
50 55 60		
ccg aaa ttc cag ggc aga gtc tcg att acc gcg gac gag tca acg aag	288	
Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Ser Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Lys		
65 70 75		
ata gcc tac atg gag ctg aac agt ctg aga tct gag gac acg gcc gtt	336	
Ile Ala Tyr Met Glu Leu Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val		40
80 85 90		

tat ttc tgt gcg aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa 384

Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

95

100

105

ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc

414

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

110

115

10

<210> 52

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of version "e" of humanized H chain V region

20

<400> 52

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr

1

5

10

15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20

25

30

30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35

40

45

Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe

50

55

60

Gln Gly Arg Val Ser Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Lys Ile Ala Tyr

65

70

75

80

40

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

85

90

95

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100

105

110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115

<210> 53

<211> 100

10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3SSS

<400> 53

ttcttggcca tagtatgtat gacccgaaat tccagggcag agtcacgatt accgcggaca 60

20

catccacgag cacagcctac atggagctca ggagcctgag 100

<210> 54

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

30

<223> FR Shuffling primer F3SSA

<400> 54

agaaccatgg catagcccgga gtcctctcgca cagtaataca cggccgtgtc gtcagatctc 60

aggctcctga gctcc 75

<210> 55

<211> 100

40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3CDS

<400> 55

ttcttggcca tagtatgtat gacccgaaat tccagggcaa agccactctg actgcagacg 60

aatcctccag cacagcctac atgcaactct cgagcctacg 100

<210> 56

<211> 75

10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3CDA

<400> 56

agaaccatgg catagcccgga gtctcttgca caagaataga ccgcagagtc ctcagatcgt 60

aggctcgaga gttgc 75

20

<210> 57

<211> 414

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

30

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)...(414)

<223> Nucleotide sequence coding for version "f" of humanize

40

d H chain V region

<400> 57

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg	48	
Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly		
-15 -10 -5		
gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg	96	
Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg		
1 5 10		10
cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att	144	
Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile		
15 20 25		
aaa gac tac tat atg cat tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt cta	192	
Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu		
30 35 40 45		20
gaa tgg att ggt ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac	240	
Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp		
50 55 60		
ccg aaa ttc cag ggc aga gtc acg att acc gcg gac aca tcc acg agc	288	
Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser		
65 70 75		30
aca gcc tac atg gag ctc agg agc ctg aga tct gac gac acg gcc gtg	336	
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val		
80 85 90		
tat tac tgt gcg aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa	384	
Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln		
95 100 105		40
ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc	414	
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser		
110 115		

<210> 58

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of version "f" of humanized H chain V region

10

<400> 58

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20 25 30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115

40

<210> 59

<211> 414

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

10

<222> (58)...(414)

<223> Nucleotide sequence coding for version "g" of humanized H chain V region

<400> 59

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg 48

Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly

20

-15

-10

-5

gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg 96

Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg

1

5

10

cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att 144

Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile

30

15

20

25

aaa gac tac tat atg cat tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt cta 192

Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu

30

35

40

45

gaa tgg att ggt ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac 240

Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp

40

50

55

60

ccg aaa ttc cag ggc aaa gcc act ctg act gca gac gaa tcc tcc agc 288

Pro Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Glu Ser Ser Ser

65

70

75

aca gcc tac atg caa ctc tcg agc cta cga tct gag gac tct gcg gtc 336

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

80

85

90

tat tct tgt gca aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa 384

Tyr Ser Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

95

100

105

ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc 414

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

110

115

<210> 60

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of version "g" of humanized H chain

n V region

<400> 60

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr

1

5

10

15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20

25

30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35

40

45

10

20

30

40

Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe

50

55

60

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

65

70

75

80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Ser Cys

85

90

95

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100

105

110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115

<210> 61

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3ADS

<400> 61

ttcttgccca tagtatgtat gacccgaaat tccagggccg cgtcacccatg tcagccgaca 60

agtcctccag cgccgcctat ttacagtgga ccagccttaa 100

<210> 62

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3ADA

<400> 62

agaacccatgg catagcccgga gtctctcgcg cagaaatata tggcgggtgtc cgaggcccta 60

10

20

30

40

aggctggtcc actgt

75

<210> 63

<211> 414

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

10

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)...(414)

<223> Nucleotide sequence coding for version "h" of humanize
d H chain

20

<400> 63

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg 48

Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly

-15

-10

-5

gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg 96

Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg

1

5

10

cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att 144

Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile

15

20

25

aaa gac tac tat atg cat tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt cta 192

Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu

30

35

40

45

40

gaa tgg att ggt ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac 240

Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp

50

55

60

ccg aaa ttc cag ggc cgc gtc acc atg tca gcc gac aag tcc tcc agc 288

Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Ser Ala Asp Lys Ser Ser Ser

65

70

75

gcc gcc tat tta cag tgg acc agc ctt aag gcc tcg gac acc gcc ata 336

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

80

85

90

tat ttc tgc gcg aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa 384

Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

95

100

105

ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc 414

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

110

115

<210> 64

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of version "h" of humanized H chain

n V region

<400> 64

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr

1

5

10

15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20

25

30

10

20

30

40

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35

40

45

Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe

50

55

60

Gln Gly Arg Val Thr Met Ser Ala Asp Lys Ser Ser Ser Ala Ala Tyr

65

70

75

80

Leu Gln Trp Thr Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Ile Tyr Phe Cys

85

90

95

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100

105

110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115

<210> 65

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3MMS

<400> 65

ttcttgcca tagtatgtat gacccgaaat tccagggcag agtcacgatt accgcggaca 60

catcgacgag cacagtcttc atggaactga gcagcctgag 100

<210> 66

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3MMA

10

20

30

40

<400> 66

agaaccatgg catagcccgga gtctctcgca cagtaataca cggccgtgtc ttcagatctc 60

aggctgctca gttcc 75

<210> 67

<211> 100

<212> DNA

10

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3BMS

<400> 67

ttcttggcca tagtatgtat gacccgaaat tccagggcag agtcaccttt accgcggaca 60

catccgcgaa cacagcctac atggagttag ggagcctcag 100

20

<210> 68

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3BMA

30

<400> 68

agaaccatgg catagcccgga gtctctcgca caataataaa cagccgtgtc tgcagatctg 60

aggctctctca actcc 75

<210> 69

<211> 414

<212> DNA

40

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)...(414)

<223> Nucleotide sequence coding for version "i" of humanized H chain V region

10

<400> 69

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg 48

Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly

-15

-10

-5

gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg 96

Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg

20

1

5

10

cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att 144

Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile

15

20

25

aaa gac tac tat atg cat tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt cta 192

Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu

30

30

35

40

45

gaa tgg att ggt ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac 240

Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp

50

55

60

ccg aaa ttc cag ggc aga gtc acg att acc gcg gac aca tcg acg agc 288

Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser

40

65

70

75

aca gtc ttc atg gaa ctg agc agc ctg aga tct gaa gac acg gcc gtg 336

Thr Val Phe Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val

80

85

90

tat tac tgt gcg aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa 384

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

95

100

105

ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc 414

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

110

115

<210> 70

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of version "I" of humanized H chain V region

<400> 70

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr

1

5

10

15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20

25

30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35

40

45

Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe

50

55

60

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

65

70

75

80

10

20

30

40

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

85

90

95

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100

105

110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115

10

<210> 71

<211> 414

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

20

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)...(414)

<223> Nucleotide sequence coding for version "j" of humanize

d H chain V region

30

<400> 71

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg 48

Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly

-15

-10

-5

gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg 96

Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg

40

1

5

10

cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att 144

Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile

15

20

25

aaa gac tac tat atg cat tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt cta 192

Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu

30

35

40

45

gaa tgg att ggt ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac 240

Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp

50

55

60

ccg aaa ttc cag ggc aga gtc acc ttt acc gcg gac aca tcc gcg aac 288

Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ala Asn

65

70

75

aca gcc tac atg gag ttg agg agc ctc aga tct gca gac acg gct gtt 336

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

80

85

90

tat tat tgt gcg aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa 384

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

95

100

105

ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc 414

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

110

115

<210> 72

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of version "j" of humanized H chai

10

20

30

40

n V region

<400> 72

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20 25 30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ala Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115

<210> 73

<211> 79

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR shuffling primer F2MPS

<400> 73

ttctatgcat tgggtgcgcc aggctccagg acagggcctg gagtggatgg gagggaatga 60

tcctgcgaat ggccattct 79

10

20

30

40

<210> 74

<211> 79

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR shuffling primer F2MPA

10

<400> 74

agaatggcca ttgcaggat cattccctcc catccactcc aggccctgtc ctggagcctg 60

gcgcacccaa tgcatagaa 79

<210> 75

<211> 414

<212> DNA

20

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

30

<222> (58)...(414)

<223> Nucleotide sequence coding for version "b1" of humanized H chain V region

<400> 75

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg 48

Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly 40

-15

-10

-5

ggt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg	96	
Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg		
1 5 10		
cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att	144	
Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile		
15 20 25		
aaa gac tac tat atg cat tgg gtg cgc cag gct cca gga cag ggc ctg	192	10
Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu		
30 35 40 45		
gag tgg atg gga ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac	240	
Glu Trp Met Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp		
50 55 60		20
ccg aaa ttc cag ggc cga gtc aca atc act gca gac aca tcc acg aac	288	
Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn		
65 70 75		
aca gcc tac atg gag ctc tcg agt ctg aga tct gag gac aca gcc att	336	
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile		
80 85 90		30
tat tac tgt gca aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa	384	
Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln		
95 100 105		
ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc	414	
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser		
110 115		40
<210> 76		
<211> 119		
<212> PRT		

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of version "b1" of humanized H chain in V region

<400> 76

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115

<210> 77

<211> 414

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

10

20

30

40

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)...(414)

<223> Nucleotide sequence coding for version "d1" of humaniz
ed H chain V region

10

<400> 77

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg 48

Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly

-15

-10

-5

gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg 96

Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg

20

1

5

10

cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att 144

Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile

15

20

25

aaa gac tac tat atg cat tgg gtg cgc cag gct cca gga cag ggc ctg 192

Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu

30

30

35

40

45

gag tgg atg gga ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac 240

Glu Trp Met Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp

50

55

60

ccg aaa ttc cag ggc aga gtc acg att act gcg gac gaa tcc acg agc 288

Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser

40

65

70

75

aca gcc tac atg gag ctc tcg agt ctg aga tct gag gac tcg gcc gta 336

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

80

85

90

tat ttc tgt gcg aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa 384

Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

95

100

105

ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc

414

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

110

115

<210> 78

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of version "d1" of humanized H cha
in V region

<400> 78

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr

1

5

10

15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20

25

30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35

40

45

Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe

50

55

60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65

70

75

80

10

20

30

40

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85

90

95

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100

105

110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115

10

<210> 79

<211> 79

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR shuffling primer F2VHS

20

<400> 79

ttctatgcat tgggtgcgac aggcccctgg acaaggcctt gagtggattg gagggaatga 60

tcctgcgaat ggccatctt 79

<210> 80

<211> 79

<212> DNA

30

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR shuffling primer F2VHA

<400> 80

aagatggcca ttcgcaggat catccctcc aatccactca agcccttgtc caggggcctg 60

tcgcacccaa tgcatagaa 79

40

<210> 81

<211> 414

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

10

<222> (58)...(414)

<223> Nucleotide sequence coding for version "b3" of humanized H chain V region

<400> 81

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg 48

Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly

20

-15

-10

-5

gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg 96

Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg

1

5

10

cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att 144

Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile

30

15

20

25

aaa gac tac tat atg cat tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt 192

Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu

30

35

40

45

gag tgg att gga ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac 240

Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp

40

50

55

60

ccg aaa ttc cag ggc cga gtc aca atc act gca gac aca tcc acg aac 288

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

65

70

75

aca gcc tac atg gag ctc tcg agt ctg aga tct gag gac aca gcc att 336

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile

80

85

90

tat tac tgt gca aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa 384

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

95

100

105

ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc 414

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

110

115

10

<210> 82

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of version "b3" of humanized H cha
in V region

30

<400> 82

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr

1

5

10

15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20

25

30

40

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35

40

45

Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe

50

55

60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr

65

70

75

80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

10

100

105

110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115

<210> 83

<211> 414

20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

30

<221> mat-peptide

<222> (58)...(414)

<223> Nucleotide sequence coding for version "d3" of humanized H chain V region

<400> 83

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg 48

40

Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly

-15

-10

-5

ggt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg	96
Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg	
1 5 10	
cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att	144
Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile	
15 20 25	
aaa gac tac tat atg cat tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt	192
Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu	
30 35 40 45	
gag tgg att gga ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac	240
Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp	
50 55 60	
ccg aaa ttc cag ggc aga gtc acg att act gcg gac gaa tcc acg agc	288
Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser	
65 70 75	
aca gcc tac atg gag ctc tcg agt ctg aga tct gag gac tcg gcc gta	336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val	
80 85 90	
tat ttc tgt gcg aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa	384
Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln	
95 100 105	
ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc	414
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser	
110 115	
<210> 84	
<211> 119	
<212> PRT	

$\langle 220 \rangle$

<400> 84

10

20 25 30

35 40 45

20

65 70 75 80

85 90 95

30

100 105 110

115

<210> 85

<211> 98

40

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR shuffling vector LvlS

<400> 85

gtctagatct ccaccatgag ggccctgct cagtttttg ggatcttgt gctctggtt 60
ccagggatcc gatgtgacat ccagatgacc cagtctcc 98

<210> 86

<211> 98

<212> DNA

10

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR shuffling vector h5Lv4S

<400> 86

ttggcagatg gggcccacac aaggttcagt ggctccgat ctggtaaccga ttccactctc 60
accatctcga gtctgcaacc tgaagatttt gcaactta 98

20

<210> 87

<211> 98

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR shuffling vector h5Lv2A

30

<400> 87

cttaagaagc tttaaatgtc ctgtgaggcc ttgcacgtga tggtagactct gtctcctaca 60
gatgcagaca gggaggatgg agactgggtc atctggat 98

<210> 88

<211> 98

<212> DNA

40

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR shuffling vector h5Lv3A

<400> 88

gatgggaccc catctgccaa actagtgtgca taatagatca ggagcttagg ggctttccct 60

ggttttctgct gataccaact taagaagctt ttaatgtc 98

<210> 89

<211> 94

<212> DNA

10

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR shuffling vector h5Lv5A

<400> 89

tgttcgtacg tttagatctcc accttgggtcc ctccgccgaa cgtgtacggg ctctcaccat 60

gctgcagaca gtagtaagtt gcaaaatctt cagg 94

20

<210> 90

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer h5LvS

30

<400> 90

gtctagatct ccaccatgag 20

<210> 91

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Primer h5LvA

<400> 91

tggtcgtacg ttgatctc

19

<210> 92

<211> 381

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

10

<221> sig-peptide

<222> (1)...(60)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (61)...(381)

<223> Nucleotide sequence coding for version "a" of humanize
d L chain V region

20

<400> 92

atg agg gcc cct gct cag ttt ttt ggg atc ttg ttg ctc tgg ttt cca 48

Met Arg Ala Pro Ala Gln Phe Phe Gly Ile Leu Leu Leu Trp Phe Pro

-20 -15 -10 -5

ggg atc cga tgt gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct 96

30

Gly Ile Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser

1 5 10

gca tct gta gga gac aga gtc acc atc acg tgc aag gcc tca cag gac 144

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

15 20 25

att aaa agc ttc tta agt tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct 192

40

Ile Lys Ser Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro

30 35 40

40

Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65

70

75

80

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

85

90

95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

10

<210> 94

<211> 77

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> FR shuffling primer F3SS

<400> 94

gtctggtacc gattacactc tcaccatctc gagcctccag cctgaagatt ttgcaactta 60

ctattgtctg cagaaca 77

<210> 95

30

<211> 77

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR shuffling primer F3SA

<400> 95

40

tgttctgcag acaatagtaa gttgcaaat cttcaggctg gaggctcgag atggtgagag 60

tgtaatcggc accagac 77

<210> 96

<211> 77

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR shuffling primer F3RS

<400> 96

gtctggtacc gattacactc tcaccaatctc ggcctccag cctgaagata ttgcaactta 60

ctattgtctg cagaaca 77

10

<210> 97

<211> 77

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR shuffling primer F3RA

<400> 97

tgttctgcag acaatagtaa gttgcaatat cttcaggctg gaggctcgag atggtgagag 60

tgtaatcggt accagac 77

20

<210> 98

<211> 381

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(60)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (61)...(381)

30

40

<223> Nucleotide sequence coding for version "b" of humanize
d L chain V region

<400> 98

atg agg gcc cct gct cag ttt ttt ggg atc ttg ttg ctc tgg ttt cca	48	
Met Arg Ala Pro Ala Gln Phe Phe Gly Ile Leu Leu Leu Trp Phe Pro		
-20 -15 -10 -5		
ggg atc cga tgt gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct	96	10
Gly Ile Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser		
1 5 10		
gca tct gta gga gac aga gtc acc atc acg tgc aag gcc tca cag gac	144	
Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp		
15 20 25		20
att aaa agc ttc tta agt tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct	192	
Ile Lys Ser Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro		
30 35 40		
aag ctc ctg atc tat tat gca act agt ttg gca gat ggg gtc cca tca	240	
Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser		
45 50 55 60		30
agg ttc agt ggc tcc gga tct ggt acc gat tac act ctc acc atc tcg	288	
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser		
65 70 75		
agc ctc cag cct gaa gat ttt gca act tac tat tgt ctg cag cat ggt	336	
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly		
80 85 90		40
gag agc ccg tac acg ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa	381	
Glu Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
95 100 105		

<210> 99

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of version "b" of humanized L chain V region

10

<400> 99

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Lys Ser Phe

20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 100

<211> 381

40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(60)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (61)...(381)

<223> Nucleotide sequence coding for version "c" of humanize
d L chain V region

10

<400> 100

atg agg gcc cct gct cag ttt ttt ggg atc ttg ttg ctc tgg ttt cca 48

Met Arg Ala Pro Ala Gln Phe Phe Gly Ile Leu Leu Leu Trp Phe Pro

-20 -15 -10 -5

ggg atc cga tgt gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct 96

Gly Ile Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser

1 5 10

gca tct gta gga gac aga gtc acc atc acg tgc aag gcc tca cag gac 144

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

15 20 25

att aaa agc ttc tta agt tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct 192

Ile Lys Ser Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro

30 35 40

aag ctc ctg atc tat tat gca act agt ttg gca gat ggg gtc cca tca 240

Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser

45 50 55 60

agg ttc agt ggc tcc gga tct ggt acc gat tac act ctc acc atc tcg 288

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

65 70 75

20

30

40

agc ctc cag cct gaa gat att gca act tac tat tgt ctg cag cat ggt 336

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly

80

85

90

gag agc ccg tac acg ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa 381

Glu Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

95

100

105

10

<210> 101

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of version "c" of humanized L chain V region

20

<400> 101

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

1

5

10

15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Lys Ser Phe

20

25

30

30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35

40

45

Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65

70

75

80

40

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly Glu Ser Pro Tyr

85

90

95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

<210> 102

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> FR shuffling primer F2SS

<400> 102

gtctcttaag ttggttcag cagaaaccag ggaaatctcc taagaccctg atctactatg 60

caactagtaa ca 72

<210> 103

20

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR shuffling primer F2SA

<400> 103

30

tgttactagt tgcatagtag atcagggctc taggagattt ccctgggttc tgctggaacc 60

aacttaagag ac 72

<210> 104

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> FR shuffling primer F2XS

<400> 104

gtctcttaag ttggtatcag cagaaaccag agaaagcccc taagtccttg atctattatg 60
 caactagtaa ca 72

<210> 105

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial Sequence 10

<220>

<223> FR shuffling primer F2XA

<400> 105

tggtactagt tgcataatag atcagggact taggggcttt ctctgggttc tgctgatacc 60
 aacttaagag ac 72

<210> 106 20

<211> 381

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(60) 30

<220>

<221> mat-peptide

<222> (61)...(381)

<223> Nucleotide sequence coding for version "b1" of humaniz
 ed L chain V region

<400> 106 40

atg agg gcc cct gct cag ttt ttt ggg atc ttg ttg ctc tgg ttt cca 48
 Met Arg Ala Pro Ala Gln Phe Phe Gly Ile Leu Leu Leu Trp Phe Pro
 -20 -15 -10 -5

ggg atc cga tgt gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct	96	
Gly Ile Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser		
1 5 10		
gca tct gta gga gac aga gtc acc atc acg tgc aag gcc tca cag gac	144	
Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp		
15 20 25		
att aaa agc ttc tta agt tgg ttc cag cag aaa cca ggg aaa tct cct	192	10
Ile Lys Ser Phe Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro		
30 35 40		
aag acc ctg atc tac tat gca act agt ttg gca gat ggg gtc cca tca	240	
Lys Thr Leu Ile Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser		
45 50 55 60		20
agg ttc agt ggc tcc gga tct ggt acc gat tac act ctc acc atc tgc	288	
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser		
65 70 75		
agc ctc cag cct gaa gat ttt gca act tac tat tgt ctg cag cat ggt	336	
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly		
80 85 90		30
gag agc ccg tac acg ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa	381	
Glu Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
95 100 105		
<210> 107		
<211> 107		
<212> PRT		40
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Amino acid sequence of version "b1" of humanized L cha		

in V region

<400> 107

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Lys Ser Phe

20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile

35 40 45

Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 108

<211> 381

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(60)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (61)...(381)

<223> Nucleotide sequence coding for version "b2" of humaniz

10

20

30

40

<400> 108

<210> 109

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of version "b2" of humanized L chain V region

10

<400> 109

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Lys Ser Phe

20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile

35 40 45

Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 110

<211> 30

<212> PRT

40

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of FR1 of all versions of humanize

d H chain V region

<400> 110

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr

5

10

15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys

20

25

30

10

<210> 111

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of FR2 of versions "a" to "j" of h
umanized H chain V region

20

<400> 111

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

5

10

<210> 112

<211> 14

30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of FR2 of versions "b1" and "d1" of
humanized H chain V region

<400> 112

40

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly

5

10

<210> 113

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of FR2 of versions "b3" and "d3" of humanized H chain V region

10

<400> 113

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

5

10

<210> 114

<211> 32

<212> PRT

20

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of FR3 of version "a" of humanized H chain V region

<400> 114

Arg Ala Lys Leu Thr Ala Ala Thr Ser Ala Ser Ile Ala Tyr Leu Glu

30

5

10

15

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

20

25

30

<210> 115

<211> 32

<212> PRT

40

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of FR3 of versions (b), (b1) and (

b3) of humanized H chain V region

<400> 115

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr Met Glu

5

10

15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg

20

25

30

10

<210> 116

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of FR3 of version "c" of humanized
H chain V region

20

<400> 116

Arg Val Thr Met Leu Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Arg

5

10

15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg

20

25

30

30

<210> 117

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of FR3 of versions "d", "d1" and "
d3" of humanized H chain V region

40

<400> 117

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu

5

10

15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg

20

25

30

<210> 118

<211> 32

10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of FR3 of version "e" of humanized
H chain V region

<400> 118

20

Arg Val Ser Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Lys Ile Ala Tyr Met Glu

5

10

15

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

20

25

30

<210> 119

<211> 32

30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of FR3 of version "f" of humanized
H chain V region

<400> 119

40

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu

5

10

15

Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg

20

25

30

<210> 120

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Amino acid sequence of FR3 of version "g" of humanized
H chain V region

<400> 120

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

5

10

15

20

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Ser Cys Ala Arg

20

25

30

<210> 121

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Amino acid sequence of FR3 of version "h" of humanized
H chain V region

<400> 121

Arg Val Thr Met Ser Ala Asp Lys Ser Ser Ser Ala Ala Tyr Leu Gln

5

10

15

40

Trp Thr Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Arg

20

25

30

<210> 122

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of FR3 of version "i" of humanized
H chain V region

10

<400> 122

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Phe Met Glu

5

10

15

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

20

25

30

<210> 123

20

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of FR3 of version "j" of humanized
H chain V region

30

<400> 123

Arg Val Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ala Asn Thr Ala Tyr Met Glu

5

10

15

Leu Arg Ser Leu Arg Ser Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg

20

25

30

<210> 124

40

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of FR4 of all versions of humanized H chain V region

<400> 124

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

5

10

10

<210> 125

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of FR1 of all versions of humanized L chain V region

20

<400> 125

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

5

10

15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys

20

30

<210> 126

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of FR2 of versions "a", "b" and "c" of humanized L chain V region

40

<400> 126

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

5

10

15

<210> 127

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Amino acid sequence of FR2 of version "b1" of humanize
d L chain V region

<400> 127

Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile Tyr

5

10

15

20

<210> 128

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of FR2 of version "b2" of humanize
d L chain V region

30

<400> 128

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr

5

10

15

<210> 129

<211> 32

40

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of FR3 of version "a" of humanized
L chain V region

<400> 129

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

5

10

15

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

20

25

30

10

<210> 130

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

20

<223> Amino acid sequence of FR3 of versions "b", "b1" and "
b2" of humanized L chain V region

<400> 130

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr

5

10

15

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

20

25

30

30

<210> 131

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

40

<223> Amino acid sequence of FR3 of version "c" of humanized
L chain V region

<400> 131

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr

5

10

15

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

20

25

30

<210> 132

<211> 10

10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of FR4 of all versions of humanize
d L chain V region

<400> 132

20

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

5

10

<210> 133

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Amino acid sequence of CDR1 of all versions of humaniz
ed H chain V region

<400> 133

Asp Tyr Tyr Met His

5

40

<210> 134

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of CDR2 of all versions of humanized H chain V region

<400> 134

Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe Gln

10

5

10

15

Gly

<210> 135

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Amino acid sequence of CDR3 of all versions of humanized H chain V region

<400> 135

Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr

5

30

<210> 136

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of CDR1 of all versions of humanized L chain V region

40

<400> 136

Lys Ala Ser Gln Asp Ile Lys Ser Phe Leu Ser

5

10

<210> 137

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Amino acid sequence of CDR2 of all versions of humanized L chain V region

<400> 137

Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp

5

20

<210> 138

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of CDR3 of all versions of humanized L chain V region

30

<400> 138

Leu Gln His Gly Glu Ser Pro Tyr Thr

5

<210> 139

<211> 118

40

<212> PRT

<213> Mouse

<220>

<223> Amino acid sequence of H chain V region of anti TF mouse monoclonal antibody ATR-2

<400> 139

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

5

10

15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr

10

20

25

30

Asn Met Tyr Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile

35

40

45

Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe

50

55

60

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

20

65

70

75

80

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

85

90

95

Ala Arg Gly Gly Glu Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100

105

110

Thr Leu Thr Val Ser Ser

30

115

<210> 140

<211> 118

<212> PRT

<213> Mouse

<220>

40

<223> Amino acid sequence of H chain V region of anti TF mouse monoclonal antibody ATR-3

<400> 140

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

5

10

15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr

20

25

30

Asn Met Tyr Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile

35

40

45

Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe

50

55

60

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

65

70

75

80

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

85

90

95

Ala Arg Gly Gly Glu Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100

105

110

Thr Leu Thr Val Ser Ser

115

<210> 141

<211> 117

<212> PRT

<213> Mouse

<220>

<223> Amino acid sequence of H chain V region of anti TF mouse monoclonal antibody ATR-4

<400> 141

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala

5

10

15

10

20

30

40

Leu Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20

25

30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35

40

45

Gly Leu Ile Asp Pro Gln Asn Gly Asn Thr Ile Tyr Asp Pro Lys Phe

50

55

60

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

65

70

75

80

Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Asp Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser

100

105

110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 142

<211> 117

<212> PRT

<213> Mouse

<220>

<223> Amino acid sequence of H chain V region of anti TF mouse monoclonal antibody ATR-5

<400> 142

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr Asn Leu Val Arg Pro Gly Ala

5

10

15

Leu Val Lys Leu Ser Cys Lys Gly Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20

25

30

10

20

30

40

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35

40

45

Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe

50

55

60

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

65

70

75

80

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

85

90

95

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser

100

105

110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 143

<211> 118

<212> PRT

<213> Mouse

<220>

<223> Amino acid sequence of H chain V region of anti TF mouse monoclonal antibody ATR-7

<400> 143

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

5

10

15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Pro Asp Tyr

20

25

30

Asn Ile Phe Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile

35

40

45

10

20

30

40

Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Thr Gly Gly Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe

50

55

60

Asn Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Phe

65

70

75

80

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

85

90

95

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

100

105

110

Leu Val Thr Val Ser Ala

115

<210> 144

<211> 118

<212> PRT

<213> Mouse

<220>

<223> Amino acid sequence of H chain V region of anti TF mouse monoclonal antibody ATR-8

<400> 144

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

5

10

15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr

20

25

30

Asn Ile Phe Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile

35

40

45

Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Thr Gly Gly Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe

50

55

60

10

20

30

40

40

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

85

90

95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100

105

<210> 146

<211> 107

10

<212> PRT

<213> Mouse

<220>

<223> Amino acid sequence of L chain V region of anti TF mouse monoclonal antibody ATR-3

<400> 146

20

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

5

10

15

Glu Ser Val Thr Ile Thr Cys Leu Ala Ser Gln Thr Ile Gly Thr Trp

20

25

30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Gln Val Leu Ile

35

40

45

30

Tyr Ala Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Lys Phe Ser Phe Lys Ile Ser Ser Leu Gln Ala

65

70

75

80

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

85

90

95

40

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100

105

<210> 147

<211> 107

<212> PRT

<213> Mouse

<220>

<223> Amino acid sequence of L chain V region of anti TF mouse monoclonal antibody ATR-4

10

<400> 147

Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr Ala Ser Leu Gly

5

10

15

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Lys Thr Phe

20

25

30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Trp Gln Ser Pro Lys Thr Leu Ile

35

40

45

20

Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser

65

70

75

80

Asp Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly Glu Ser Pro Tyr

85

90

95

30

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100

105

<210> 148

<211> 107

<212> PRT

40

<213> Mouse

<220>

<223> Amino acid sequence of L chain V region of anti TF mouse

se monoclonal antibody ATR-5

<400> 148

Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr Ala Ser Leu Gly

5 10 15

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Lys Ser Phe

20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Trp Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile

35 40 45

Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Asn Asn Leu Glu Ser

65 70 75 80

Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly Glu Ser Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 149

<211> 112

<212> PRT

<213> Mouse

<220>

<223> Amino acid sequence of L chain V region of anti TF mouse monoclonal antibody ATR-7

<400> 149

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

5 10 15

Gln Pro Ala Ser Val Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser

20

25

30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser

35

40

45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro

50

55

60

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

65

70

75

80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Asp

85

90

95

Thr His Phe Pro Asp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100

105

110

<210> 150

<211> 112

<212> PRT

<213> Mouse

<220>

<223> Amino acid sequence of L chain V region of anti TF mouse monoclonal antibody ATR-8

<400> 150

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

5

10

15

Gln Pro Ala Ser Val Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser

20

25

30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser

35

40

45

10

20

30

40

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro

50

55

60

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

65

70

75

80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Asp

85

90

95

Thr His Phe Pro Asp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100

105

110

<210> 151

<211> 780

<212> DNA

<213> Homosapiens

<220>

<223> DNA coding for soluble human TF

<400> 151

atg gag acc cct gcc tgg ccc cgg gtc ccg cgc ccc gag acc gcc gtc 48

Met Glu Thr Pro Ala Trp Pro Arg Val Pro Arg Pro Glu Thr Ala Val

-30

-25

-20

gct cgg acg ctc ctg ctc ggc tgg gtc ttc gcc cag gtg gcc ggc gct 96

Ala Arg Thr Leu Leu Leu Gly Trp Val Phe Ala Gln Val Ala Gly Ala

-15

-10

-5

-1

tca ggc act aca aat act gtg gca gca tat aat tta act tgg aaa tca 144

Ser Gly Thr Thr Asn Thr Val Ala Ala Tyr Asn Leu Thr Trp Lys Ser

1

5

10

15

act aat ttc aag aca att ttg gag tgg gaa ccc aaa ccc gtc aat caa 192

Thr Asn Phe Lys Thr Ile Leu Glu Trp Glu Pro Lys Pro Val Asn Gln

20

25

30

10

20

30

40

gtc tac act gtt caa ata agc act aag tca gga gat tgg aaa agc aaa	240	
Val Tyr Thr Val Gln Ile Ser Thr Lys Ser Gly Asp Trp Lys Ser Lys		
35 40 45		
tgc ttt tac aca aca gac aca gag tgt gac ctc acc gac gag att gtg	288	
Cys Phe Tyr Thr Thr Asp Thr Glu Cys Asp Leu Thr Asp Glu Ile Val		
50 55 60		
aag gat gtg aag cag acg tac ttg gca cgg gtc ttc tcc tac ccg gca	366	10
Lys Asp Val Lys Gln Thr Tyr Leu Ala Arg Val Phe Ser Tyr Pro Ala		
65 70 75 80		
ggg aat gtg gag agc acc ggt tct gct ggg gag cct ctg tat gag aac	384	
Gly Asn Val Glu Ser Thr Gly Ser Ala Gly Glu Pro Leu Tyr Glu Asn		
85 90 95		20
tcc cca gag ttc aca cct tac ctg gag aca aac ctc gga cag cca aca	432	
Ser Pro Glu Phe Thr Pro Tyr Leu Glu Thr Asn Leu Gly Gln Pro Thr		
100 105 110		
att cag agt ttt gaa cag gtg gga aca aaa gtg aat gtg acc gta gaa	480	
Ile Gln Ser Phe Glu Gln Val Gly Thr Lys Val Asn Val Thr Val Glu		
115 120 125		30
gat gaa cgg act tta gtc aga agg aac aac act ttc cta agc ctc cgg	528	
Asp Glu Arg Thr Leu Val Arg Arg Asn Asn Thr Phe Leu Ser Leu Arg		
130 135 140		
gat gtt ttt ggc aag gac tta att tat aca ctt tat tat tgg aaa tct	576	
Asp Val Phe Gly Lys Asp Leu Ile Tyr Thr Leu Tyr Tyr Trp Lys Ser		
145 150 155 160		40
tca agt tca gga aag aaa aca gcc aaa aca aac act aat gag ttt ttg	624	
Ser Ser Ser Gly Lys Lys Thr Ala Lys Thr Asn Thr Asn Glu Phe Leu		
165 170 175		

att gat gtg gat aaa gga gaa aac tac tgt ttc agt gtt caa gca gtg	672	
Ile Asp Val Asp Lys Gly Glu Asn Tyr Cys Phe Ser Val Gln Ala Val		
180 185 190		
att ccc tcc cga aca gtt aac cgg aag agt aca gac agc ccg gta gag	720	
Ile Pro Ser Arg Thr Val Asn Arg Lys Ser Thr Asp Ser Pro Val Glu		
195 200 205		
tgt atg ggc cag gag aaa ggg gaa ttc aga gaa gac tac aaa gac gat	768	10
Cys Met Gly Gln Glu Lys Gly Glu Phe Arg Glu Asp Tyr Lys Asp Asp		
210 215 220		
gac gat aaa taa	780	
Asp Asp Lys		
225		20
<210> 152		
<211> 259		
<212> PRT		
<220>		
<223> Amino acid sequence of soluble human TF		
<400> 152		30
Met Glu Thr Pro Ala Trp Pro Arg Val Pro Arg Pro Glu Thr Ala Val		
-30 -25 -20		
Ala Arg Thr Leu Leu Leu Gly Trp Val Phe Ala Gln Val Ala Gly Ala		
-15 -10 -5 -1		
Ser Gly Thr Thr Asn Thr Val Ala Ala Tyr Asn Leu Thr Trp Lys Ser		
1 5 10 15		40
Thr Asn Phe Lys Thr Ile Leu Glu Trp Glu Pro Lys Pro Val Asn Gln		
20 25 30		

Val Tyr Thr Val Gln Ile Ser Thr Lys Ser Gly Asp Trp Lys Ser Lys			
35	40	45	
Cys Phe Tyr Thr Thr Asp Thr Glu Cys Asp Leu Thr Asp Glu Ile Val			
50	55	60	
Lys Asp Val Lys Gln Thr Tyr Leu Ala Arg Val Phe Ser Tyr Pro Ala			
65	70	75	80
Gly Asn Val Glu Ser Thr Gly Ser Ala Gly Glu Pro Leu Tyr Glu Asn			10
85	90	95	
Ser Pro Glu Phe Thr Pro Tyr Leu Glu Thr Asn Leu Gly Gln Pro Thr			
100	105	110	
Ile Gln Ser Phe Glu Gln Val Gly Thr Lys Val Asn Val Thr Val Glu			
115	120	125	20
Asp Glu Arg Thr Leu Val Arg Arg Asn Asn Thr Phe Leu Ser Leu Arg			
130	135	140	
Asp Val Phe Gly Lys Asp Leu Ile Tyr Thr Leu Tyr Tyr Trp Lys Ser			
145	150	155	160
Ser Ser Ser Gly Lys Lys Thr Ala Lys Thr Asn Thr Asn Glu Phe Leu			
165	170	175	30
Ile Asp Val Asp Lys Gly Glu Asn Tyr Cys Phe Ser Val Gln Ala Val			
180	185	190	
Ile Pro Ser Arg Thr Val Asn Arg Lys Ser Thr Asp Ser Pro Val Glu			
195	200	205	
Cys Met Gly Gln Glu Lys Gly Glu Phe Arg Glu Asp Tyr Lys Asp Asp			
210	215	220	40
Asp Asp Lys			
225			

【図面の簡単な説明】

図1は、H鎖キメラ／L鎖キメラ抗体、H鎖ヒト型化αバージョン／L鎖キメラ抗体、及びH鎖キメラ／L鎖ヒト型化αバージョン抗体の抗原結合活性を比較したグラフである。
 図2は、H鎖キメラ／L鎖キメラ抗体、H鎖ヒト型化αバージョン／L鎖キメラ抗体、及びH鎖キメラ／L鎖ヒト型化αバージョン抗体の、ヒトTFに対する中和活性を比較した

グラフである。

図3は、H鎖キメラ／L鎖キメラ抗体、及びH鎖ヒト型化aバージョン／L鎖ヒト型化aバージョン抗体の抗原結合活性を比較したグラフである。

図4は、抗-TFマウスモノクローナル抗体ATR-5、H鎖キメラ／L鎖キメラ抗体、及びH鎖ヒト型化バージョンa／L鎖ヒト型化バージョンa抗体の、ヒトTFに対する中和活性を比較したグラフである。

図5は、H鎖キメラ／L鎖キメラ抗体、H鎖ヒト型化バージョンb／L鎖キメラ抗体、及びH鎖ヒト型化バージョンb／L鎖ヒト型化バージョンa抗体の抗原結合活性を比較したグラフである。

図6は、H鎖キメラ／L鎖キメラ抗体、H鎖ヒト型化バージョンc／L鎖キメラ抗体、及びH鎖ヒト型化バージョンd／L鎖キメラ抗体の抗原結合活性を測定したグラフである。

10

図7は、H鎖キメラ／L鎖キメラ抗体、H鎖ヒト型化バージョンb／L鎖キメラ抗体、H鎖ヒト型化バージョンc／L鎖キメラ抗体、H鎖ヒト型化バージョンd／L鎖キメラ抗体の、ヒトTFに対する中和活性を比較したグラフである。

図8は、H鎖キメラ／L鎖キメラ抗体、及びH鎖ヒト型化バージョンb／L鎖ヒト型化バージョンa抗体の、ヒトTFに対する中和活性を比較したグラフである。

図9は、H鎖キメラ／L鎖キメラ抗体、H鎖キメラ／L鎖ヒト型化バージョンb抗体、及びH鎖キメラ／L鎖ヒト型化バージョンc抗体の抗原結合活性を比較したグラフである。

図10は、H鎖キメラ／L鎖キメラ抗体、H鎖キメラ／L鎖ヒト型化バージョンb抗体、及びH鎖キメラ／L鎖ヒト型化バージョンc抗体の、ヒトTFに対する中和活性の比較を示すグラフである。

20

図11は、H鎖キメラ／L鎖キメラ抗体、H鎖ヒト型化バージョンb／L鎖ヒト型化バージョンb抗体、及びH鎖ヒト型化バージョンb／L鎖ヒト型化バージョンc抗体の抗原結合活性を比較したグラフである。

図12は、H鎖キメラ／L鎖キメラ抗体、H鎖ヒト型化バージョンb／L鎖ヒト型化バージョンb抗体、及びH鎖ヒト型化バージョンb／L鎖ヒト型化バージョンc抗体の、ヒトTFに対する中和活性を比較したグラフである。

図13は、H鎖キメラ／L鎖キメラ抗体、H鎖ヒト型化バージョンb／L鎖ヒト型化バージョンb抗体、及びH鎖ヒト型化バージョンd／L鎖ヒト型化バージョンb抗体の抗原結合活性を比較したグラフである。

30

図14は、H鎖キメラ／L鎖キメラ抗体、H鎖ヒト型化バージョンb／L鎖ヒト型化バージョンb抗体、及びH鎖ヒト型化バージョンd／L鎖ヒト型化バージョンb抗体の、ヒトTFに対する中和活性を比較したグラフである。

図15は、H鎖キメラ／L鎖キメラ抗体、H鎖ヒト型化バージョンe／L鎖キメラ抗体、及びH鎖ヒト型化バージョンe／L鎖ヒト型化バージョンb抗体の抗原結合活性を比較したグラフである。

図16は、H鎖キメラ／L鎖キメラ抗体、及びH鎖ヒト型化バージョンe／L鎖キメラ抗体の、ヒトTFに対する中和活性を比較したグラフである。

図17は、H鎖キメラ／L鎖キメラ抗体、及びH鎖ヒト型化バージョンg／L鎖ヒト型化バージョンb抗体の抗原結合活性を比較したグラフである。

40

図18は、H鎖キメラ／L鎖キメラ抗体、及びH鎖ヒト型化バージョンg／L鎖ヒト型化バージョンb抗体の、ヒトTFに対する中和活性を比較したグラフである。

図19は、H鎖キメラ／L鎖キメラ抗体、H鎖ヒト型化バージョンb3／L鎖ヒト型化バージョンb抗体、及びH鎖ヒト型化バージョンd3／L鎖ヒト型化バージョンb抗体の抗原結合活性を比較したグラフである。

図20は、H鎖キメラ／L鎖キメラ抗体、H鎖ヒト型化バージョンb3／L鎖ヒト型化バージョンb抗体、及びH鎖ヒト型化バージョンd3／L鎖ヒト型化バージョンb抗体の、ヒトTFに対する中和活性を比較したグラフである。

図21は、H鎖キメラ／L鎖キメラ抗体、H鎖ヒト型化バージョンi／L鎖キメラ抗体、及びH鎖ヒト型化バージョンj／L鎖キメラ抗体の抗原結合活性を比較したグラフである

50

。

図 2 2 は、H鎖キメラ／L鎖キメラ抗体、H鎖ヒト型化バージョン i／L鎖ヒト型化バージョン b 抗体、及び H鎖ヒト型化バージョン j／L鎖ヒト型化バージョン b 抗体の抗原結合活性を比較したグラフである。

図 2 3 は、H鎖キメラ／L鎖キメラ抗体、H鎖ヒト型化バージョン i／L鎖キメラ抗体、及び H鎖ヒト型化バージョン j／L鎖キメラ抗体の、ヒト T F に対する中和活性を比較したグラフである。

図 2 4 は、H鎖キメラ／L鎖キメラ抗体、H鎖ヒト型化バージョン b／L鎖ヒト型化バージョン b 抗体、H鎖ヒト型化バージョン i／L鎖ヒト型化バージョン b 抗体、及び H鎖ヒト型化バージョン j／L鎖ヒト型化バージョン b 抗体の、ヒト T F に対する中和活性を比較したグラフである。

10

図 2 5 は、H鎖キメラ／L鎖キメラ抗体、H鎖キメラ／L鎖ヒト型化バージョン b 1 抗体、及び H鎖キメラ／L鎖ヒト型化バージョン b 2 抗体の抗原結合活性を比較したグラフである。

図 2 6 は、H鎖キメラ／L鎖キメラ抗体、H鎖キメラ／L鎖ヒト型化バージョン b 1 抗体、及び H鎖キメラ／L鎖ヒト型化バージョン b 2 抗体の、ヒト T F に対する中和活性を比較したグラフである。

図 2 7 は、H鎖キメラ／L鎖キメラ抗体、H鎖ヒト型化バージョン b／L鎖ヒト型化バージョン b 2 抗体の抗原結合活性を比較したグラフである。

図 2 8 は、H鎖キメラ／L鎖キメラ抗体、H鎖ヒト型化バージョン i／L鎖ヒト型化バージョン b 抗体、H鎖ヒト型化バージョン b／L鎖ヒト型化バージョン b 抗体、及び H鎖ヒト型化バージョン b／L鎖ヒト型化バージョン b 2 抗体の、ヒト T F に対する中和活性を比較したグラフである。

20

図 2 9 は、H鎖キメラ／L鎖キメラ抗体、H鎖ヒト型化バージョン i／L鎖ヒト型化バージョン b 1 抗体、及び H鎖ヒト型化バージョン i／L鎖ヒト型化バージョン b 2 抗体の抗原結合活性を比較したグラフである。

図 3 0 は、H鎖キメラ／L鎖キメラ抗体、H鎖ヒト型化バージョン i／L鎖ヒト型化バージョン b 抗体、H鎖ヒト型化バージョン i／L鎖ヒト型化バージョン b 1 抗体、及び H鎖ヒト型化バージョン i／L鎖ヒト型化バージョン b 2 抗体の、ヒト T F に対する中和活性を比較したグラフである。

30

図 3 1 は、H鎖キメラ／L鎖キメラ抗体、H鎖ヒト型化バージョン b／L鎖ヒト型化バージョン b 抗体、H鎖ヒト型化バージョン i／L鎖ヒト型化バージョン b 抗体、及び H鎖ヒト型化バージョン i／L鎖ヒト型化バージョン b 2 抗体の抗原結合活性を比較したグラフである。

図 3 2 は、H鎖キメラ／L鎖キメラ抗体、H鎖ヒト型化バージョン b／L鎖ヒト型化バージョン b 抗体、H鎖ヒト型化バージョン i／L鎖ヒト型化バージョン b 抗体、及び H鎖ヒト型化バージョン i／L鎖ヒト型化バージョン b 2 抗体の、ヒト T F に対する中和活性（T F のファクター X a 産生阻害活性）を比較したグラフである。

図 3 3 は、H鎖キメラ／L鎖キメラ抗体、H鎖ヒト型化バージョン b／L鎖ヒト型化バージョン b 抗体、H鎖ヒト型化バージョン i／L鎖ヒト型化バージョン b 抗体、及び H鎖ヒト型化バージョン i／L鎖ヒト型化バージョン b 2 抗体の、ヒト T F に対する中和活性（ファクター X 結合阻害活性）を比較したグラフである。

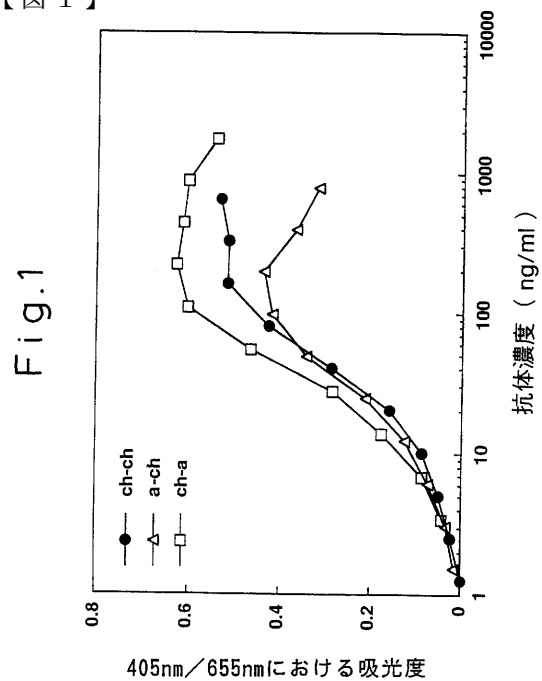
40

図 3 4 は、H鎖キメラ／L鎖キメラ抗体、H鎖ヒト型化バージョン b／L鎖ヒト型化バージョン b 抗体、H鎖ヒト型化バージョン i／L鎖ヒト型化バージョン b 抗体、及び H鎖ヒト型化バージョン i／L鎖ヒト型化バージョン b 2 抗体の、ヒト T F に対する中和活性（T F の血漿凝固阻害活性）を比較したグラフである。

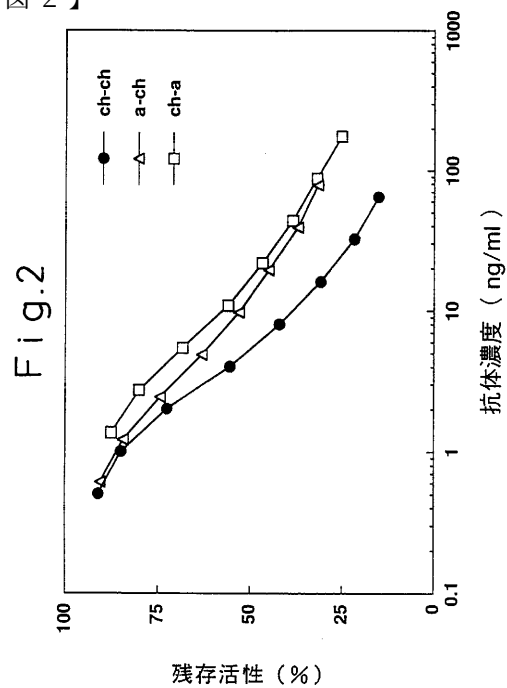
図 3 5 は、H鎖キメラ／L鎖キメラ抗体、H鎖ヒト型化バージョン b／L鎖ヒト型化バージョン b 抗体、H鎖ヒト型化バージョン i／L鎖ヒト型化バージョン b 抗体、H鎖ヒト型化バージョン i／L鎖ヒト型化バージョン b 2 抗体の各種条件で処理したヒト T F への反応性を比較した図である。

50

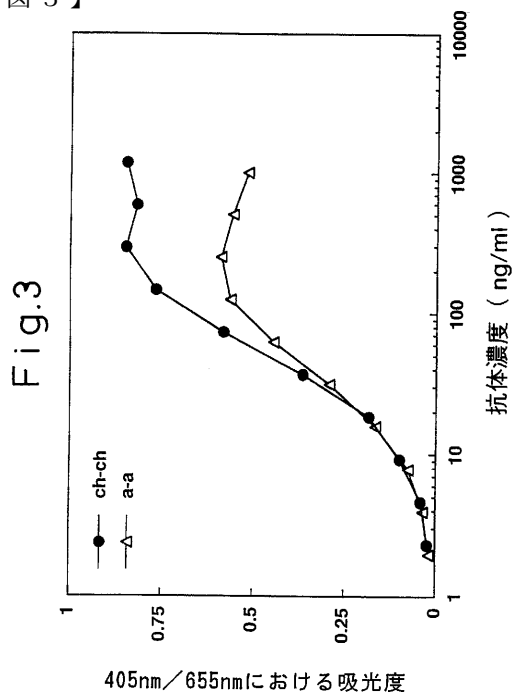
【図 1】



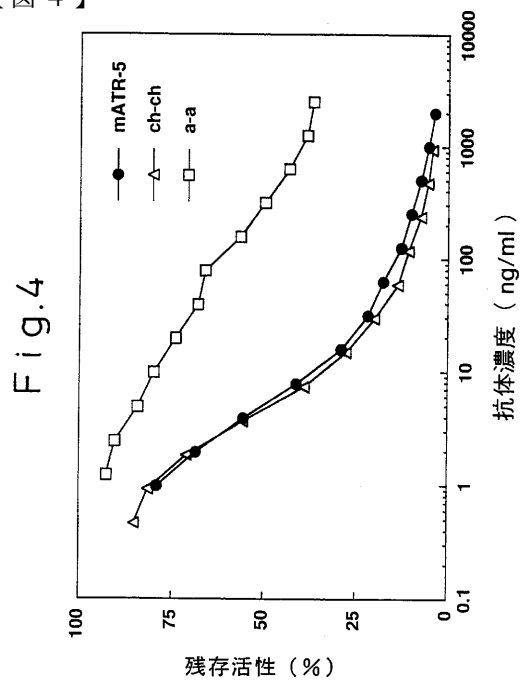
【図 2】



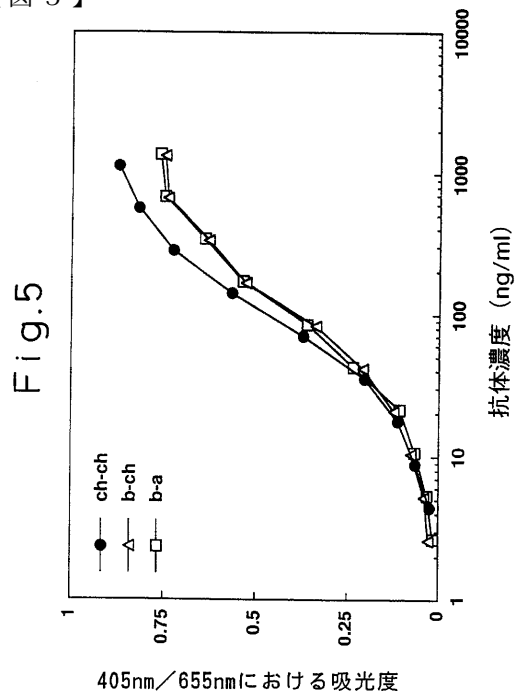
【図 3】



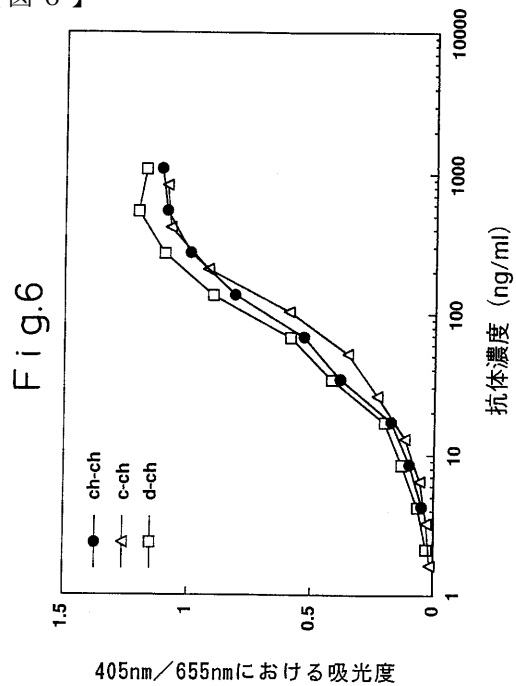
【図 4】



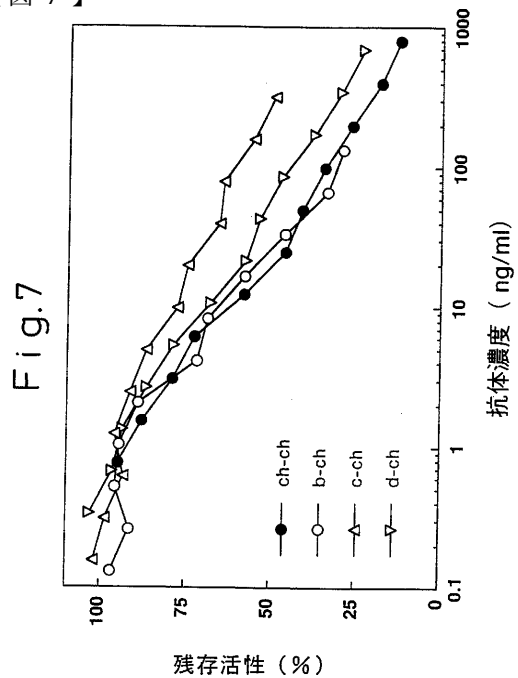
【図 5】



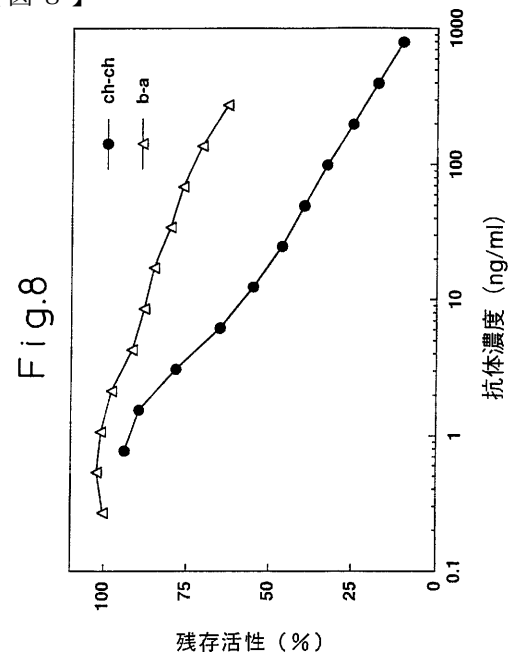
【図 6】



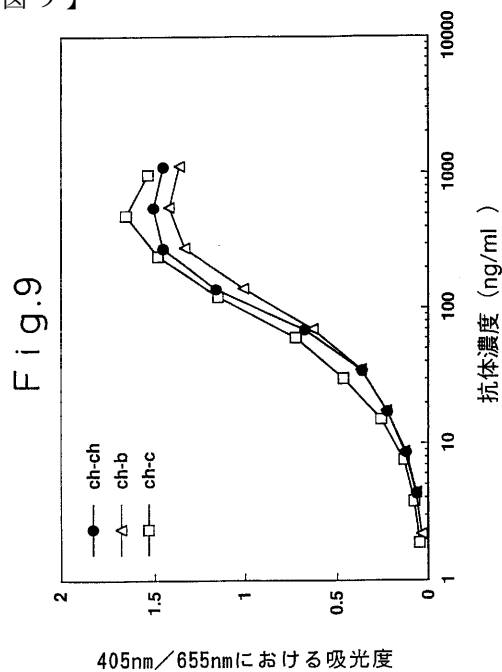
【図 7】



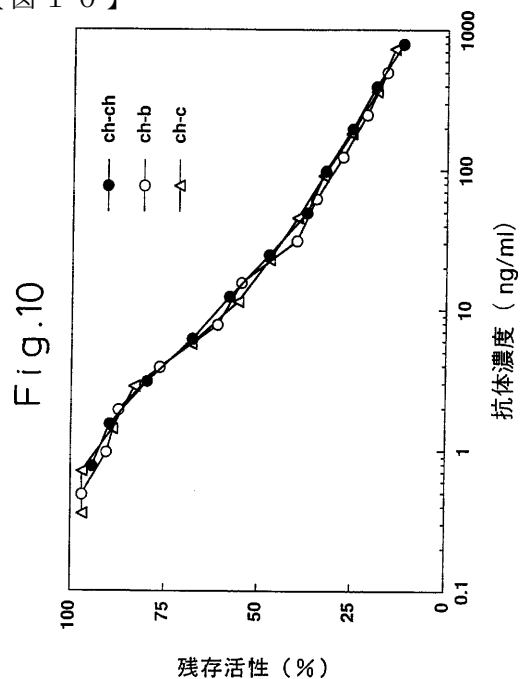
【図 8】



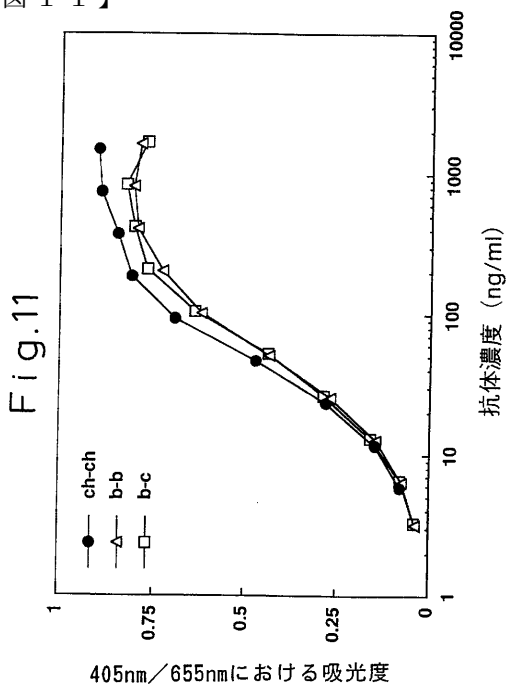
【図 9】



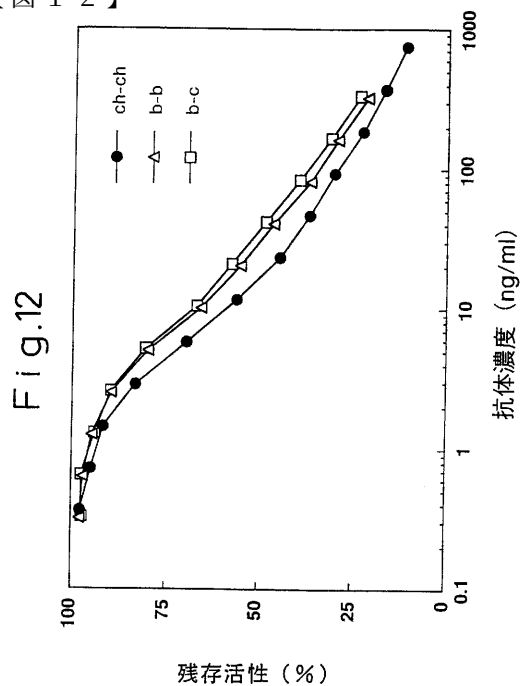
【図 10】



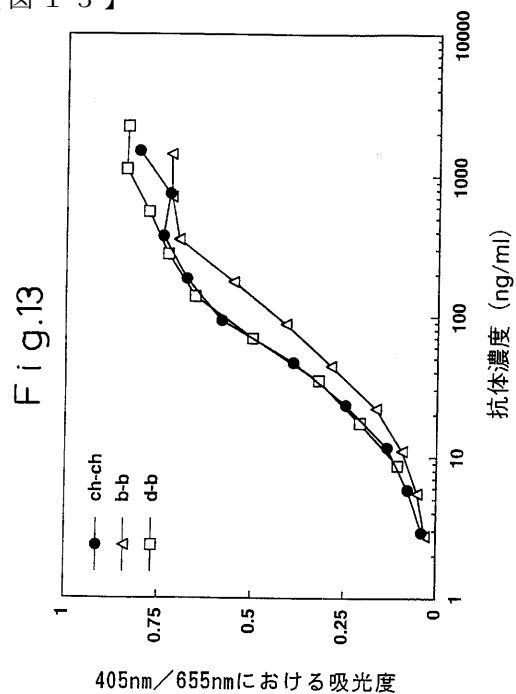
【図 11】



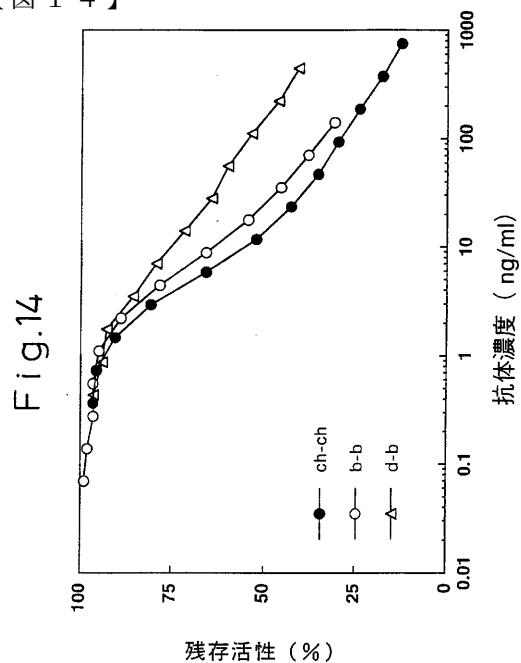
【図 12】



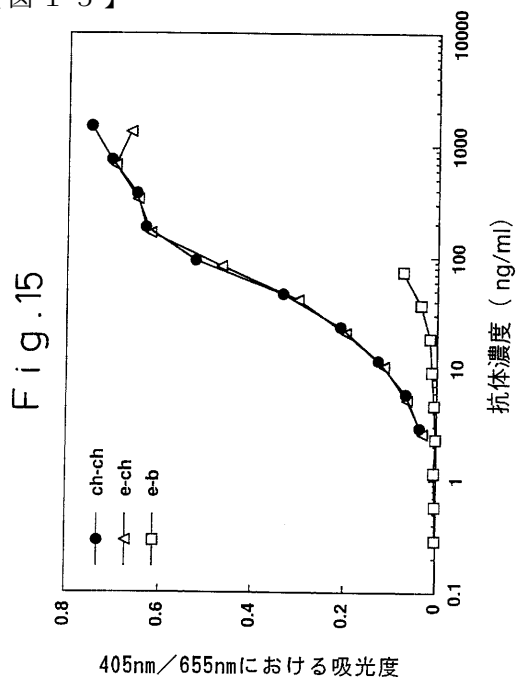
【図 1 3】



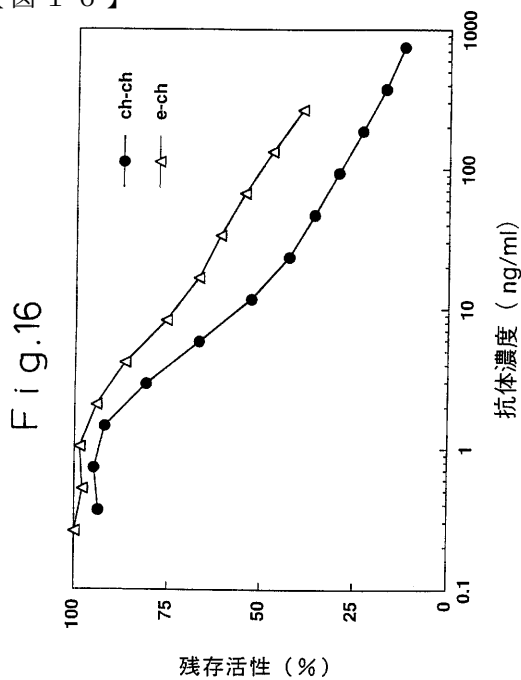
【図 1 4】



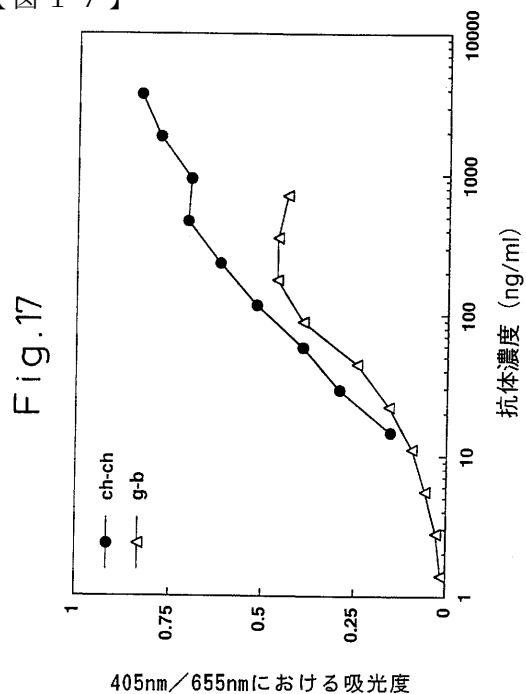
【図 1 5】



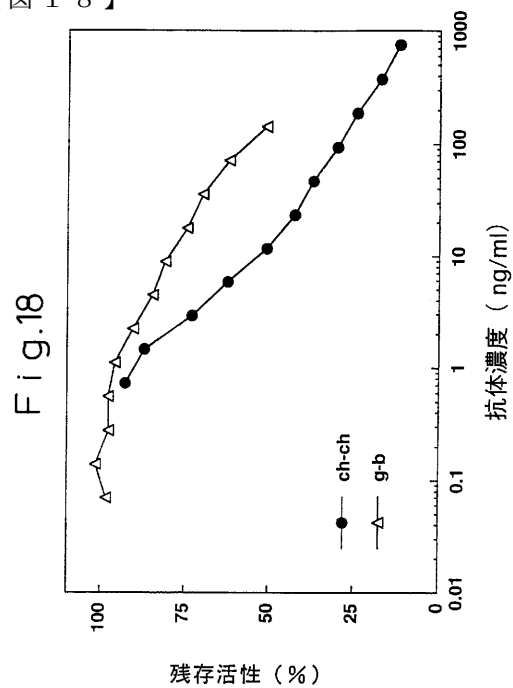
【図 1 6】



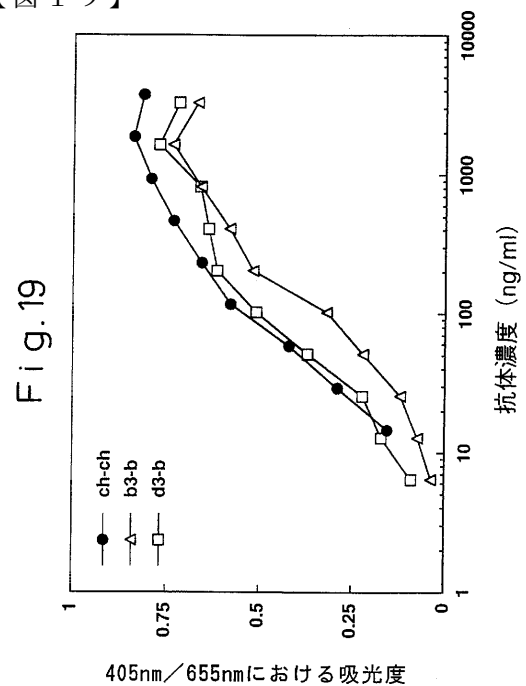
【図 17】



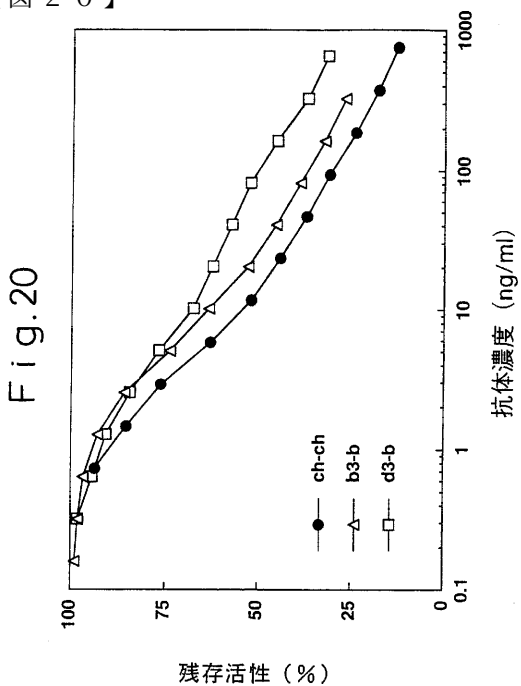
【図 18】



【図 19】

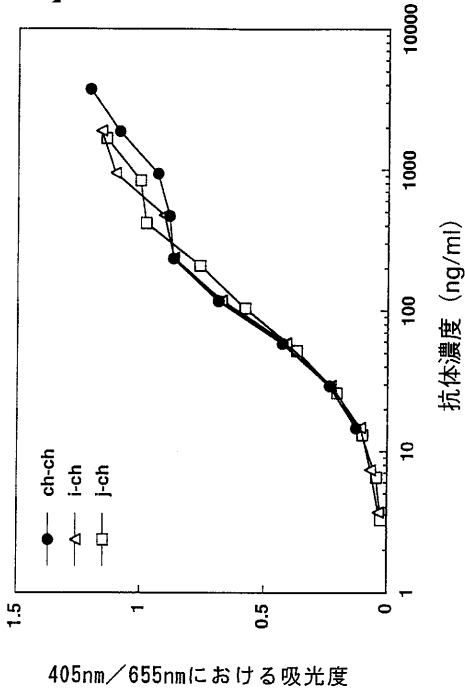


【図 20】



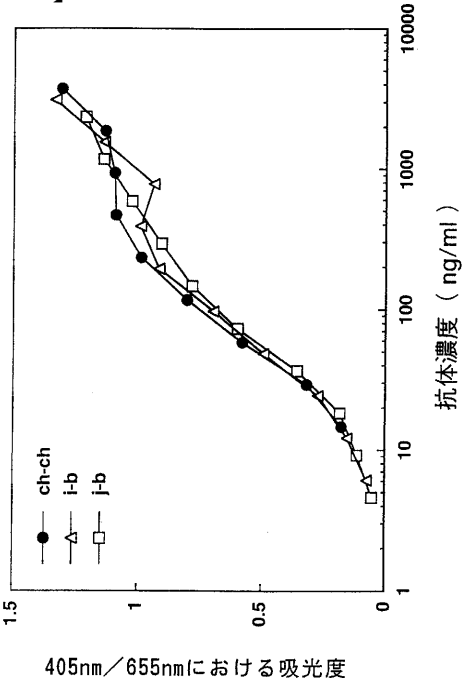
【図 2 1】

Fig.21



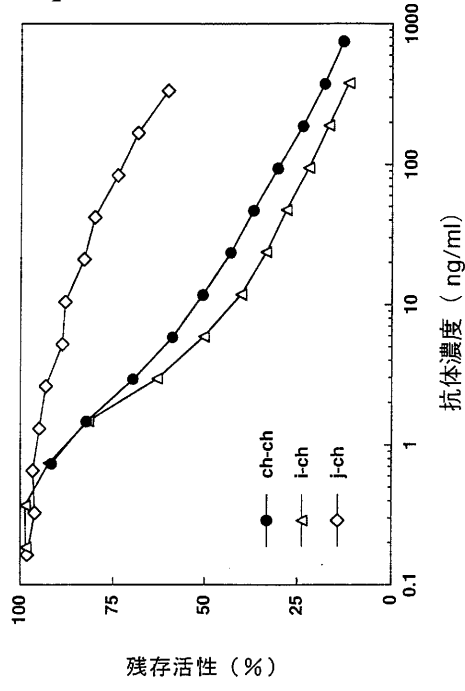
【図 2 2】

Fig.22



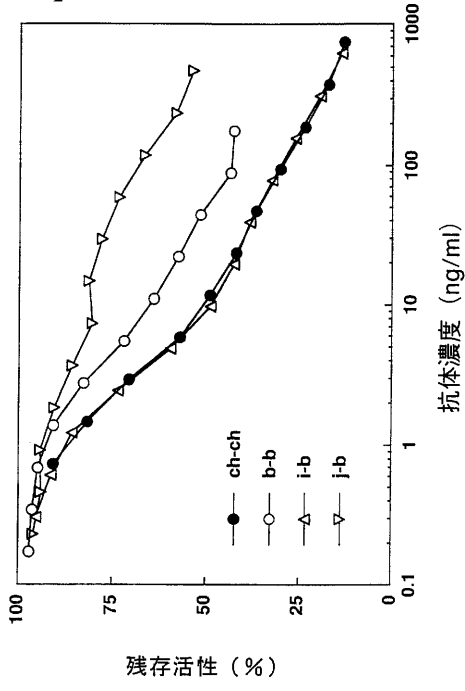
【図 2 3】

Fig.23

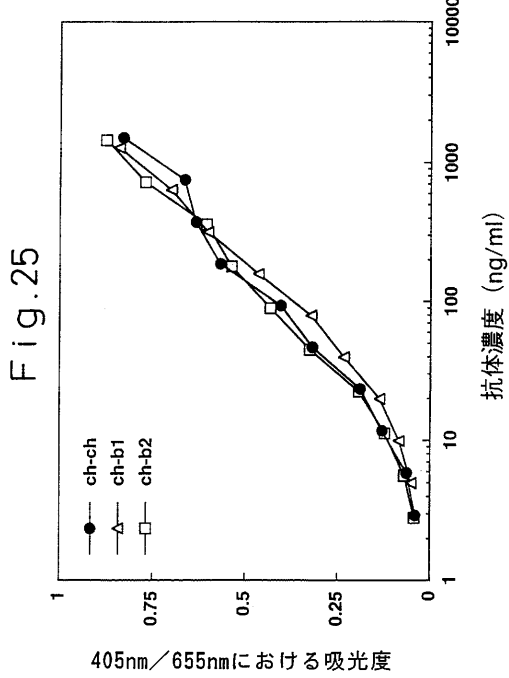


【図 2 4】

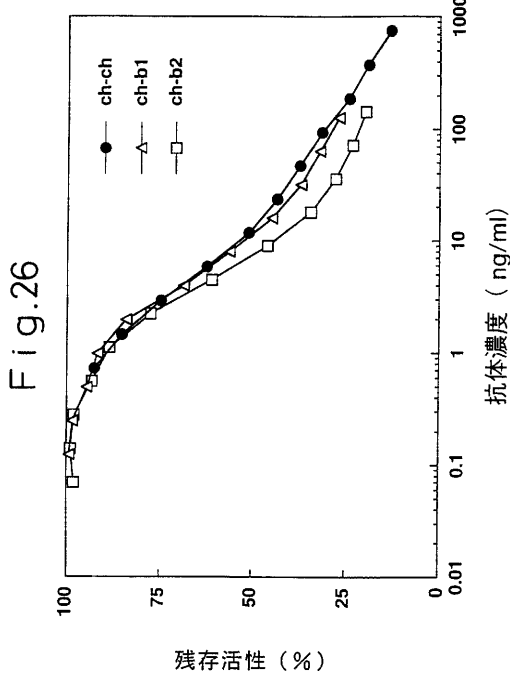
Fig.24



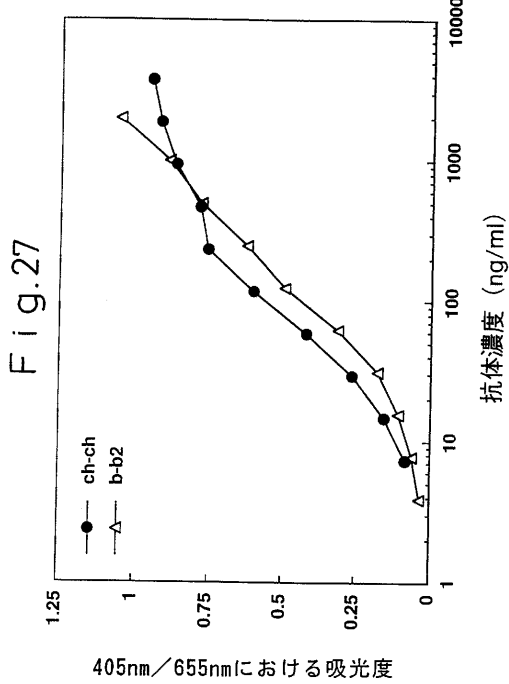
【図 2 5】



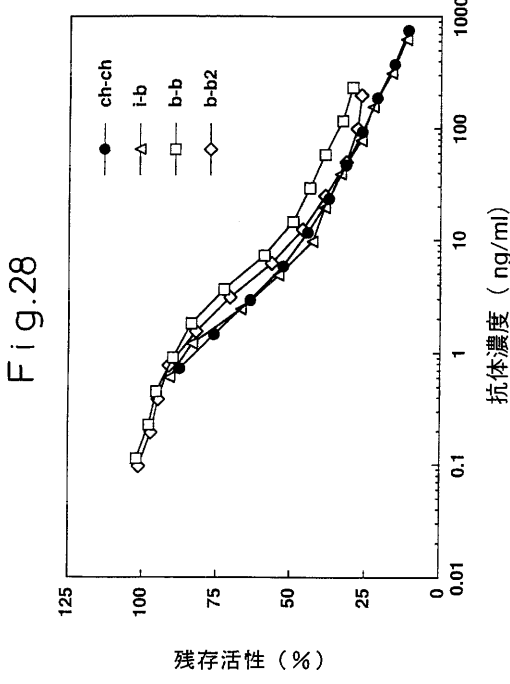
【図 2 6】



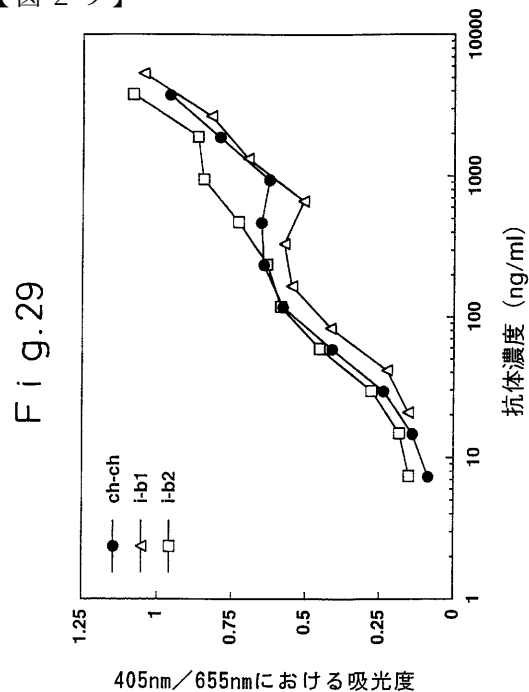
【図 2 7】



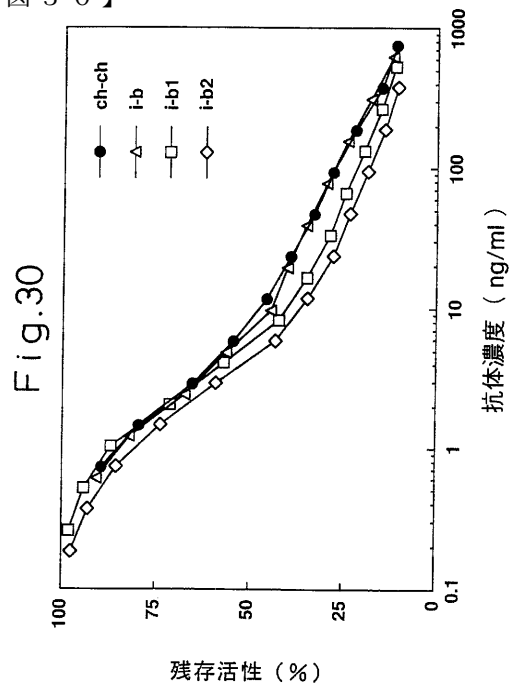
【図 2 8】



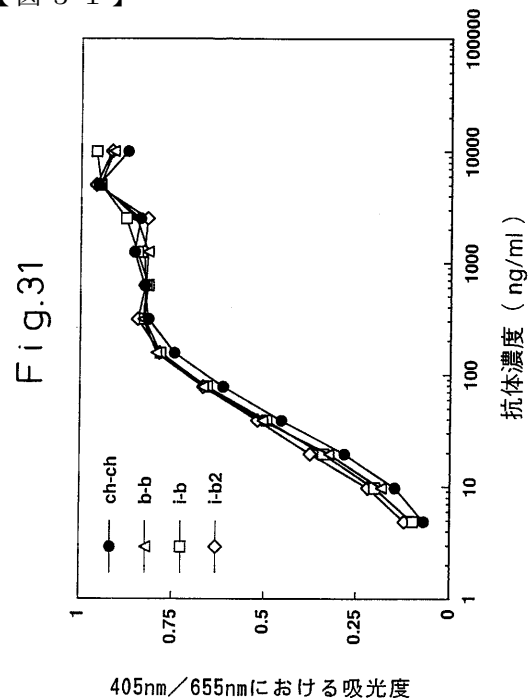
【図 29】



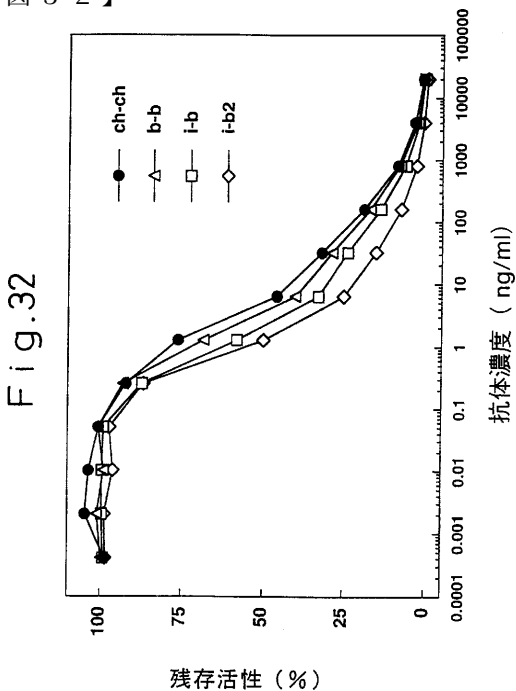
【図 30】



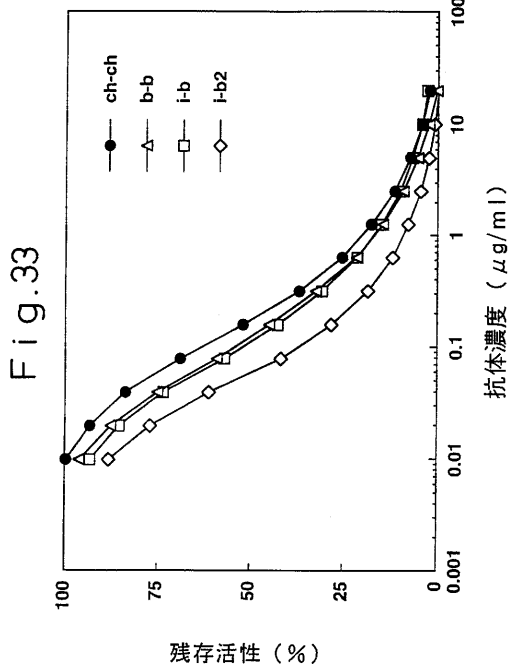
【図 31】



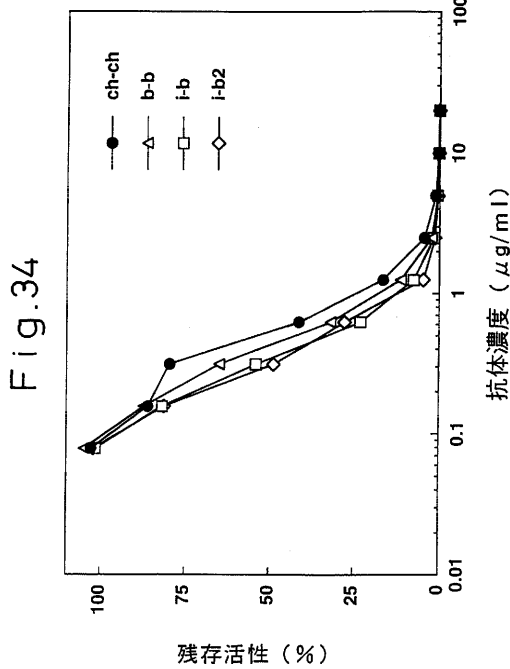
【図 32】



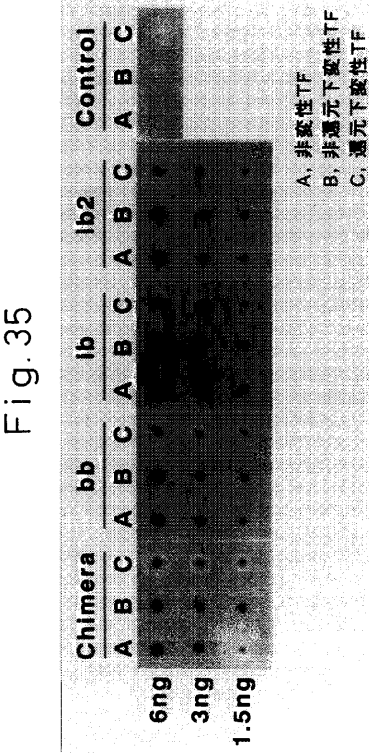
【図 3 3】



【図 3 4】



【図 3 5】



フロントページの続き

- (72)発明者 佐藤 功
静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内
- (72)発明者 安達 秀樹
静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内
- (72)発明者 藪田 尚弘
静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内

合議体

審判長 種村 慈樹

審判官 鈴木 恵理子

審判官 小暮 道明

- (56)参考文献 特表平1-503438 (JP, A)
国際公開第96/40921 (WO, A1)
医学のあゆみ (1993) Vol. 167, No. 5, p. 457-462

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K16/00-46

BIOSIS

WPI