

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5909442号
(P5909442)

(45) 発行日 平成28年4月26日 (2016. 4. 26)

(24) 登録日 平成28年4月1日 (2016. 4. 1)

(51) Int. Cl.

F I

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

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C O 7 K 16/28 (2006. 01)

C O 7 K 16/28

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

C 1 2 N 1/15

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

C 1 2 N 1/19

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

C 1 2 N 1/21

請求項の数 23 (全 103 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2012-510274 (P2012-510274)
 (86) (22) 出願日 平成22年5月11日 (2010. 5. 11)
 (65) 公表番号 特表2012-526530 (P2012-526530A)
 (43) 公表日 平成24年11月1日 (2012. 11. 1)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2010/056487
 (87) 国際公開番号 W02010/130751
 (87) 国際公開日 平成22年11月18日 (2010. 11. 18)
 審査請求日 平成25年5月2日 (2013. 5. 2)
 (31) 優先権主張番号 09006355. 3
 (32) 優先日 平成21年5月11日 (2009. 5. 11)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)
 (31) 優先権主張番号 09006474. 2
 (32) 優先日 平成21年5月13日 (2009. 5. 13)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

前置審査

(73) 特許権者 510129222
 ユー 3 ・ ファーマ ・ ゲーエムペーハー
 ドイツ ・ 8 2 1 5 2 ・ マルティンスリート
 ・ フラウンホーファーシュトラッセ ・ 2 2
 (74) 代理人 100113376
 弁理士 南条 雅裕
 (74) 代理人 100179394
 弁理士 瀬田 あや子
 (74) 代理人 100185384
 弁理士 伊波 興一朗
 (74) 代理人 100137811
 弁理士 原 秀貢人
 (72) 発明者 ペーター ・ ヴィルツ
 ドイツ ・ 8 2 1 3 1 ・ ガウティング ・ ブー
 ヘンドルファー ・ シュトラッセ ・ 1 4
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト化 A X L 抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

AXLの細胞外ドメインと結合し、AXL活性を少なくとも部分的に阻害するヒト化モノクローナル抗体であって、

配列番号41のアミノ酸配列を有する重鎖、及び配列番号19のアミノ酸配列を有する軽鎖

;

配列番号42のアミノ酸配列を有する重鎖、及び配列番号20のアミノ酸配列を有する軽鎖

;

配列番号44のアミノ酸配列を有する重鎖、及び配列番号22のアミノ酸配列を有する軽鎖

;

配列番号45のアミノ酸配列を有する重鎖、及び配列番号23のアミノ酸配列を有する軽鎖

;

配列番号46のアミノ酸配列を有する重鎖、及び配列番号24のアミノ酸配列を有する軽鎖

;

配列番号46のアミノ酸配列を有する重鎖、及び配列番号25のアミノ酸配列を有する軽鎖

;

配列番号46のアミノ酸配列を有する重鎖、及び配列番号26のアミノ酸配列を有する軽鎖

;

配列番号46のアミノ酸配列を有する重鎖、及び配列番号27のアミノ酸配列を有する軽鎖

;

配列番号46のアミノ酸配列を有する重鎖、及び配列番号28のアミノ酸配列を有する軽鎖
;
配列番号46のアミノ酸配列を有する重鎖、及び配列番号29のアミノ酸配列を有する軽鎖
;
配列番号46のアミノ酸配列を有する重鎖、及び配列番号30のアミノ酸配列を有する軽鎖
;
配列番号47のアミノ酸配列を有する重鎖、及び配列番号24のアミノ酸配列を有する軽鎖
;
配列番号47のアミノ酸配列を有する重鎖、及び配列番号25のアミノ酸配列を有する軽鎖
;
配列番号47のアミノ酸配列を有する重鎖、及び配列番号26のアミノ酸配列を有する軽鎖
;
配列番号47のアミノ酸配列を有する重鎖、及び配列番号27のアミノ酸配列を有する軽鎖
;
配列番号47のアミノ酸配列を有する重鎖、及び配列番号28のアミノ酸配列を有する軽鎖
;
配列番号47のアミノ酸配列を有する重鎖、及び配列番号29のアミノ酸配列を有する軽鎖
;
配列番号47のアミノ酸配列を有する重鎖、及び配列番号30のアミノ酸配列を有する軽鎖
;
配列番号48のアミノ酸配列を有する重鎖、及び配列番号24のアミノ酸配列を有する軽鎖
;
配列番号48のアミノ酸配列を有する重鎖、及び配列番号25のアミノ酸配列を有する軽鎖
;
配列番号48のアミノ酸配列を有する重鎖、及び配列番号26のアミノ酸配列を有する軽鎖
;
配列番号48のアミノ酸配列を有する重鎖、及び配列番号27のアミノ酸配列を有する軽鎖
;
配列番号48のアミノ酸配列を有する重鎖、及び配列番号28のアミノ酸配列を有する軽鎖
;
配列番号48のアミノ酸配列を有する重鎖、及び配列番号29のアミノ酸配列を有する軽鎖
;
配列番号48のアミノ酸配列を有する重鎖、及び配列番号30のアミノ酸配列を有する軽鎖
;
又は
配列番号81のアミノ酸配列を有する重鎖、及び配列番号74のアミノ酸配列を有する軽鎖
を含む、ヒト化モノクローナル抗体。

【請求項2】

h#11B7-T2、h#11B7-T3、h#11B7-T5、h#11B7-T6、h#11B7-T7、h#11B7-T8、h#11B7-T9、h#11B7-T10、h#11B7-T11、h#11B7-T12、h#11B7-T13、h#11B7-T14、h#11B7-T15、h#11B7-T16、h#11B7-T17、h#11B7-T18、h#11B7-T19、h#11B7-T20、h#11B7-T21、h#11B7-T22、h#11B7-T23、h#11B7-T24、h#11B7-T25、h#11B7-T26、h#11B7-T27およびh#11B7-T28からなる群から選択されるヒト化h#11B7抗体の群から選択される、請求項1に記載のヒト化モノクローナル抗体。

【請求項3】

AXLの細胞外ドメインと結合し、AXL活性を少なくとも部分的に阻害するヒト化モノクローナル抗体であって、

配列番号70のアミノ酸配列を有する重鎖、及び配列番号58のアミノ酸配列を有する軽鎖
;
配列番号71のアミノ酸配列を有する重鎖、及び配列番号59のアミノ酸配列を有する軽鎖
;
又は

配列番号72のアミノ酸配列を有する重鎖、及び配列番号60のアミノ酸配列を有する軽鎖を含む、ヒト化モノクローナル抗体。

【請求項 4】

h#11D5-T4、h#11D5-T5およびh#11D5-T6からなる群から選択されるヒト化h#11D5抗体の群から選択される、請求項3に記載のヒト化モノクローナル抗体。

【請求項 5】

AXL介在シグナル伝達、細胞増殖、血管新生、細胞移動、腫瘍転移、および/もしくはAXL介在抗アポトーシス、ならびに/またはAXL下流のシグナル伝達分子(複数の場合も有)のリガンド誘導性リン酸化を低減および/もしくは妨害する、請求項1~4のいずれか一項に記載のヒト化モノクローナル抗体。

10

【請求項 6】

AXL介在シグナル伝達が、AXLリン酸化である、請求項5に記載のヒト化モノクローナル抗体。

【請求項 7】

AXL下流のシグナル伝達分子(複数の場合も有)が、ERK1/2、AKT、GSK-3、TSC2、mTORおよびS6K1からなる群から選択される、請求項5または6に記載のヒト化モノクローナル抗体。

【請求項 8】

キメラ抗AXL抗体11B7(配列番号135、136)または11D5(配列番号137、138)のうちの1つに由来し、11B7または11D5の少なくとも1つの可変ドメインのフレームワーク領域において少なくとも1つの突然変異を含有する、請求項1~7のいずれか一項に記載のヒト化モノクローナル抗体。

20

【請求項 9】

単離核酸分子であって、

(a)請求項1から8のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体をコードする核酸配列、並びに

(b)(a)中の配列のいずれかと相補的な核酸配列からなる群から選択される核酸配列を有する、単離核酸分子。

30

【請求項 10】

請求項9に規定される核酸分子を含むベクター。

【請求項 11】

請求項10に記載のベクターを含む宿主。

【請求項 12】

請求項1から8のいずれか一項に記載のヒト化モノクローナル抗体を製造する方法であって、請求項11に記載の宿主から前記ポリペプチドを得るステップを含む方法。

【請求項 13】

請求項1から8のいずれか一項に記載のヒト化モノクローナル抗体か、請求項9に記載の核酸分子か、請求項10に記載のベクターか、請求項11に記載の宿主か、請求項12に記載の方法によって生成するポリペプチドかを含む医薬組成物。

40

【請求項 14】

過剰増殖性疾患を診断、予防または治療するための、請求項13に記載の医薬組成物。

【請求項 15】

過剰増殖性疾患が、AXLの発現、過剰発現および/または活動亢進と関係がある、請求項14に記載の医薬組成物。

【請求項 16】

過剰増殖性疾患が、乳癌、肺癌および他のAXL発現または過剰発現癌、および腫瘍転移の形成からなる群から選択される、請求項14又は15に記載の医薬組成物。

【請求項 17】

50

過剰増殖性疾患を診断、予防または治療するための、請求項1から8のいずれか一項に記載のヒト化モノクローナル抗体。

【請求項18】

過剰増殖性疾患の診断、予防または治療用の医薬組成物を製造するための、請求項1から8のいずれか一項に記載のヒト化モノクローナル抗体の使用。

【請求項19】

前記過剰増殖性疾患が、請求項15又は16に規定される過剰増殖性疾患である、請求項18に記載の使用。

【請求項20】

請求項1から8のいずれか一項に記載のヒト化モノクローナル抗体を含む、AXLの発現と関係がある状態の診断のための組成物であって、前記診断が、サンプルを請求項1から8のいずれか一項に記載の前記ヒト化モノクローナル抗体と接触させるステップ、およびAXLの存在を検出するステップを含む、組成物。

10

【請求項21】

前記状態が、請求項15又は16に規定される過剰増殖性疾患である、請求項20に記載の組成物。

【請求項22】

請求項1から8のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体、請求項9に記載の核酸分子、または請求項10に記載のベクターを含むキット。

【請求項23】

20

薬剤耐性癌の治療用の医薬組成物を製造するための請求項1から8のいずれか一項に記載のヒト化抗AXL抗体の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、AXL受容体型チロシンキナーゼの細胞外ドメインと結合し、AXL活性を少なくとも部分的に阻害するヒト化モノクローナル抗体に関する。

【背景技術】

【0002】

AXL(Ark、UFO、Tyro-7)受容体型チロシンキナーゼは、キナーゼのTyro-3ファミリーのメンバーであり、他のメンバーはMer(Eyk、Nyk、Tyro-12)およびSky(Rse、Tyro-3、Dtk、Etk、Brt、Tif)である。それは異好性リガンドGas6、抗凝血因子タンパク質Sと相同的である70-kDaタンパク質の結合によって活性化される。他の受容体型チロシンキナーゼとは対照的に、AXLチロシンリン酸化は同種結合によって誘導される可能性もある。AXLの活性化は、PI-3-キナーゼAkt/(Frankeら、Oncogene22:8983~8998頁、2003)およびRas/Erkおよび-カテニン/TCF(Goruppiら、Mol.Cell Biol.21:902~915頁、2001)のような他の主な経路を介したシグナル伝達をもたらす。

30

【0003】

AXLは脳、心臓、骨格筋、臓器被膜および幾つかの他の臓器の結合組織を含めた一定範囲の正常組織中、およびリンパ球ではなく単球中で弱く発現される。AXLによって誘導されるAktリン酸化は、線維芽細胞(Goruppiら、Mol Cell Biol 17:4442~4453頁、1997)、内皮細胞(Hasanbasicら、Am J Physiol Heart Circ Physiol、2004)、血管平滑筋細胞(Melargnoら、J.Mol.Cell Cardiol.37:881~887頁、2004)およびニューロン(Allenら、Mol. Endocrinol.13:191~201頁、1999)の生存中において記載されている。さらに、AXLは細胞接着および走化性において役割を果たす。AXLのノックアウトは、血小板インテグリンIIb3の低下した活性化の結果として、低下した血小板凝集安定化および血栓形成を示す。

40

【0004】

AXLの過剰発現は、様々な癌型、例えば乳癌(Mericら、Clin. Cancer Res.8:361~367頁、2002、Berclazら、Ann.Oncol.12:819~824頁、2001)、結腸(Chenら、Int.J.Cancer83:579~584頁、1999、Cravenら、Int.J.Cancer60:791~797頁、1995)、前立腺(Jacobら、Can

50

cer Detect.Prev.23:325～332頁、1999)、肺(Wimmelら、Eur J Cancer37:2264～2274頁、2001)、胃(Wuら、Anticancer Res22:1071～1078頁、2002)、卵巣(Sunら、Oncology66:450～457頁、2004)、子宮内膜(Sunら、Ann.Oncol.14:898～906頁、2003)、腎臓(Chungら、DN A Cell Biol. 22:533～540頁、2003)、肝細胞(Tsouら、Genomics50:331～340頁、1998)、甲状腺(Itoら、Thyroid12:971～975頁、2002、Itoら、Thyroid9:563～567頁、1999)、および食道癌(Nemotoら、1997)、さらにCML中(Janssenら、A novel putative tyrosine kinase receptor with oncogenic potential.Oncogene、6:2113～2120頁、1991、Braungerら、Oncogene14:2619～2631頁、1997、O'Bryanら、Mol Cell Biol 11:5016～5031頁、1991)、AML(Rochlitzら、Leukemia13:1352～1358頁、1999)、骨肉腫(Nakanoら、J.Biol.Chem.270:5702～5705頁、2003)、メラノーマ(van Ginkelら、Cancer Res64:128～134頁、2004)、ならびに頭頸部扁平上皮細胞癌(Greenら、Br J Cancer.2006 94:1446～594頁、2006)において実証されている。

10

【 0 0 0 5 】

さらに、非侵襲性細胞と比較して攻撃的な乳癌細胞系において上方制御される転移関連遺伝子として、AXLが同定されている。in vitroでは、AXL活性は移動および侵襲に必要とされることが分かり、かつこの活性は抗体処理によって阻害することができ(W004008147)。同様に、優性ネガティブ型のAXLの発現を介した(Vajkoczy、P.、ら、Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A.103:5799～5804頁、2005)、またはAXLのsiRNA介在型下方制御(Hollandら、Cancer Res.65: 9294～9303頁、2005)のいずれかによるin vivoでのAXL活性の排除は、ネズミ異種移植実験中で皮下および同所性細胞増殖を妨げた。

20

【 0 0 0 6 】

これまで、AXLと結合し生物活性を有する抗体が記載されている。例えば、既知の抗体の1つはAXL介在型細胞侵襲を低減することができ(W004008147)、別の抗体はAXL/リガンドの相互作用を低減することが報告されている。しかし、既知の抗体は全て、ポリクローナル抗体または非ヒト化モノクローナル抗体である。ポリクローナルまたはモノクローナルの非ヒト化抗体は、循環から速やかに除去され、通常は全身性炎症作用を引き起こし、それらを治療的投与に適さないものとする。

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 0 7 】

30

【 特許文献 1 】 W004008147

【 特許文献 2 】 EPA10239400

【 特許文献 3 】 W09007861

【 特許文献 4 】 米国特許第4,816,567号

【 特許文献 5 】 W092001047

【 特許文献 6 】 W092020791

【 特許文献 7 】 W093006213

【 特許文献 8 】 W093011236

【 特許文献 9 】 W093019172

【 特許文献 1 0 】 W095001438

40

【 特許文献 1 1 】 W095015388

【 特許文献 1 2 】 W08809344

【 特許文献 1 3 】 US4,946,778

【 特許文献 1 4 】 US5,260,203

【 特許文献 1 5 】 US5,091,513

【 特許文献 1 6 】 US5,455,030

【 特許文献 1 7 】 W00009560

【 特許文献 1 8 】 米国特許第5,827,690号

【 特許文献 1 9 】 米国特許第5,756,687号

【 特許文献 2 0 】 米国特許第5,750,172号

50

- 【特許文献 2 1】米国特許第5,741,957号
- 【非特許文献】
- 【0008】
- 【非特許文献 1】Frankeら、Oncogene22:8983～8998頁、2003
- 【非特許文献 2】Goruppiら、Mol.Cell Biol.21:902～915頁、2001
- 【非特許文献 3】Goruppiら、Mol Cell Biol 17:4442～4453頁、1997
- 【非特許文献 4】Hasanbasicら、Am J Physiol Heart Circ Physiol、2004
- 【非特許文献 5】Melaragnoら、J.Mol.Cell Cardiol.37:881～887頁、2004
- 【非特許文献 6】Allenら、Mol.Endocrinol.13:191～201頁、1999
- 【非特許文献 7】Mericiら、Clin. Cancer Res.8:361～367頁、2002 10
- 【非特許文献 8】Berclazら、Ann.Oncol.12:819～824頁、2001
- 【非特許文献 9】Chenら、Int.J.Cancer83:579～584頁、1999
- 【非特許文献 10】Cravenら、Int.J.Cancer60:791～797頁、1995
- 【非特許文献 11】Jacobら、Cancer Detect.Prev.23:325～332頁、1999
- 【非特許文献 12】Wimmelら、Eur J Cancer37:2264～2274頁、2001
- 【非特許文献 13】Wuら、Anticancer Res22:1071～1078頁、2002
- 【非特許文献 14】Sunら、Oncology66:450～457頁、2004
- 【非特許文献 15】Sunら、Ann.Oncol.14:898～906頁、2003
- 【非特許文献 16】Chungら、DNA Cell Biol. 22:533～540頁、2003
- 【非特許文献 17】Tsouら、Genomics50:331～340頁、1998 20
- 【非特許文献 18】Itoら、Thyroid12:971～975頁、2002
- 【非特許文献 19】Itoら、Thyroid9:563～567頁、1999
- 【非特許文献 20】Janssenら、A novel putative tyrosine kinase receptor with oncogenic potential.Oncogene、6:2113～2120頁、1991
- 【非特許文献 21】Braungerら、Oncogene14:2619～2631頁、1997
- 【非特許文献 22】O'Bryanら、Mol Cell Biol 11:5016～5031頁、1991
- 【非特許文献 23】Rochlitzら、Leukemia13:1352～1358頁、1999
- 【非特許文献 24】Nakanoら、J.Biol.Chem.270:5702～5705頁、2003
- 【非特許文献 25】van Ginkelら、Cancer Res64:128～134頁、2004
- 【非特許文献 26】Greenら、Br J Cancer.2006 94:1446～594頁、2006 30
- 【非特許文献 27】Vajkoczy、P.ら、Proc.Natl.Acad.Science U.S.A.103:5799～5804頁、2005
- 【非特許文献 28】Hollandら、Cancer Res.65: 9294～9303頁、2005
- 【非特許文献 29】HarlowおよびLane、「Antibodies、a Laboratory Manual」、CSH Press、Cold Spring Harbour、1988
- 【非特許文献 30】KarlinおよびAltschul、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、90、5873頁(1993)
- 【非特許文献 31】Methods in Enzymol.、183、63頁(1990)
- 【非特許文献 32】J. Mol. Biol.、215、403頁(1990)
- 【非特許文献 33】Jonesら、Nature、321 :522～525頁(1986) 40
- 【非特許文献 34】Riechmannら、Nature、332:323～327頁(1988)
- 【非特許文献 35】Verhoevenら、Science、239:1534～1536頁(1988)
- 【非特許文献 36】Wormstone、I.M.ら、Investigative Ophthalmology & Visual Science. (2002)、43 (7)、2301～2308頁
- 【非特許文献 37】Carmen、S.ら、Briefings in Functional Genomics and Proteomics (2002)、1 (2)、189～203頁
- 【非特許文献 38】Siriwardena、D.ら、Ophthalmology (2002)、109 (3)、427～431頁
- 【非特許文献 39】Nature Biotechnology (2005)、23 (9)、1105～1116頁
- 【非特許文献 40】Annu.Rev.Immunol (1994)、12、433～455頁
- 【非特許文献 41】Pluckthun、「The Pharmacology of Monoclonal Antibodies」、113 50

、RosenburgおよびMoore編、Springer Verlag、New York、269～315頁(1994)

【非特許文献42】Nature Biotechnology (2005)、23、1126～1136頁

【非特許文献43】Huston, J.S.ら、Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. (1988)、85、5879～5883頁

【非特許文献44】Ishidaら、Cloning Stem Cells 4:91～102頁、2002

【非特許文献45】Sambrookら、「Expression of cloned genes in E.coli」 in Molecular Cloning:A laboratory manual(1989)、Cold Spring Harbor Laboratory Press、New York、USA

【非特許文献46】Sambrook、Molecular Cloning A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory(2001、第三版)N.Y.

【非特許文献47】Urlaub, G. and Chasin, L.A.、Proc.Natl.Acad.Sci.、U.S.A.、(1980) 77、4126～4220頁

【非特許文献48】Gluzman, Y、Cell (1981) 23、175～182頁

【非特許文献49】Ausubel、Current Protocols in Molecular Biology、Green Publishing Associates and Wiley Interscience、N.Y.(1994)

【非特許文献50】Mouellic、Proc.Natl.Acad.Sci.USA、87(1990)、4712～4716頁、Joyn er、Gene Targeting、A Practical Approach、Oxford University Press

【非特許文献51】Scopes、「Protein Purification」、Springer-Verlag、N.Y.(1982)

【非特許文献52】Mandlerら、J.Natl.Cancer Inst.、92(19)、1549～1551頁(2000)

【非特許文献53】Liuら、Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.93:8618～8623頁(1996)

【非特許文献54】Doroninaら、Nat.Biotechnol.21:778～784頁(2003)

【非特許文献55】The Merck Manual of Diagnosis and Therapy、15th Ed.1987、1206～1228頁、Berkowら編、Rahway、N.J

【非特許文献56】Kabatら、「Sequences of Proteins of Immunological Interest」、第5版、NIH刊行物第91-3242号、1991

【非特許文献57】Norderhaugら、J. Immunol. Methods 204、1997

【非特許文献58】Neuberger、EMBO J. 2(8):1373～1381頁、1983

【非特許文献59】Kohfeld、FEBS、414巻(3)、557頁以下、1997

【非特許文献60】Methods in Enzymology、203、121～153頁(1991)

【非特許文献61】Nuc. Acid Res. 35、D301～D303頁(2007)

【非特許文献62】Thorntonら、J. Mol. Biol.、263、800～815頁(1996)

【非特許文献63】FEBS letters 399、1～8頁(1996)

【非特許文献64】Queenら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86、10029～10033頁(1989)

【非特許文献65】Nuc. Acid Res. 29、205～206頁(2001)

【非特許文献66】Nuc. Acid Res. 36、D25～D30頁(2007)

【非特許文献67】Hollandら、Cancer Res:65、9294～9303頁、2005

【非特許文献68】KorffおよびAugustin、J Cell Sci 112:3249～3258頁、1999

【非特許文献69】KorffおよびAugustin、Cell Biol 143:1341～1352頁、1998

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

したがってAXLの治療的可能性を考慮して、AXL介在シグナル伝達を有効かつ特異的に妨害し療法治療に適した、ヒト化モノクローナルAXL抗体、その抗体断片もしくは派生物(誘導体)の必要性は高い。

【課題を解決するための手段】

【0010】

したがって本発明の第一の態様は、AXL、特にヒトAXLの細胞外ドメインと結合し、AXL活性を少なくとも部分的に阻害する、その断片または派生物を含めたヒト化モノクローナル抗体に関する。

【0011】

本発明のヒト化抗体は、以下の性質:AXL介在シグナル伝達を低減または妨害する能力、AXLリン酸化を低減または妨害する能力、細胞増殖を低減または妨害する能力、血管新生を低減または妨害する能力、細胞移動を低減または妨害する能力、腫瘍転移を低減または妨害する能力、およびAXL介在抗アポトーシスを低減または阻害し、それによって例えば抗腫瘍薬を用いた治療に対する細胞の感度を高める能力の少なくとも1つまたは複数を有することが好ましい。

【0012】

本発明のとりわけ好ましい実施形態によれば、本明細書で説明するヒト化抗体は、ERK1/2、AKT、GSK-3、TSC2、mTORおよび/またはS6K1など、AXL下流のシグナル伝達分子のリガンド誘導性リン酸化を低減および/または妨害する能力を示す。

10

【0013】

さらに、本発明のヒト化抗体はAXL、特にヒトAXLに対する高い特異性を示すことができ、他のTyro-3ファミリーのメンバー、例えばMERおよび/またはSKYおよび/または哺乳動物非霊長類AXL、ネズミAXLなどは有意に認識しない。

【0014】

本明細書で使用される用語「活性」は、細胞の表現型、特に、それに限定されないが癌の表現型、例えば、アポトーシスの回避、増殖シグナルの自給自足化、細胞増殖、組織浸潤および/または転移、抗増殖シグナルに対する非感受性(抗アポトーシス)および/または持続的血管新生に影響を与えるAXLの生物機能を指す。

【0015】

20

用語「AXL介在シグナル伝達」は、AXLと第二のメッセンジャー分子の直接または間接相互作用によって誘発される、下流のシグナル伝達のような、第二のメッセンジャー経路の活性化を意味する。

【0016】

用語「AXLリン酸化」は、第二のAXLタンパク質(トランスリン酸化)またはタンパク質キナーゼ活性を有する別のタンパク質のいずれかによる、アミノ酸残基、好ましくはチロシン残基のリン酸化を指す。

【0017】

用語「細胞増殖」は、ヒト細胞、特に、それに限定されないがヒト癌細胞の再生の根底にある全てのAXL関連プロセスを指す。細胞増殖は、細胞DNAの複製、2つの等しい大きさの染色体群への複製DNAの分離、および細胞全体の物理的分離(細胞質分裂と呼ばれる)に貢献する、またはそれらをもたらす、好ましくはAXLリン酸化および/またはAXL介在シグナル伝達を含めた、AXLの非触媒または触媒活性によって刺激または介在され得る。

30

【0018】

用語「血管新生」は、既存の血管からの新たな血管、特に、それに限定されないが新たな腫瘍供給血管の増殖に貢献する全てのAXL関連プロセスを指す。これらのプロセスには、血管内皮細胞の増殖、生存、移動および発芽、周皮細胞の誘引および移動、および血管安定化のための基底膜形成、血管環流、または間質または新生腫瘍細胞による血管新生因子の分泌などの多数の細胞事象があり、好ましくはAXLリン酸化および/またはAXL介在シグナル伝達を含めた、AXLの非触媒または触媒活性によって刺激または介在され得る。

40

【0019】

用語「転移」は、癌細胞が原発性腫瘍から分散し、リンパ管および/または血管に浸透し、血流中を循環し、身体中の他の場所の正常組織中の遠方病巣において増殖するのを(転移)支援する全てのAXL関連プロセスを指す。特にそれは、転移の根底にあり、好ましくはAXLリン酸化および/またはAXL介在シグナル伝達を含めた、AXLの非触媒または触媒活性によって刺激または介在される、増殖、移動、固定非依存性、アポトーシスの回避、または血管新生因子の分泌などの腫瘍細胞の細胞事象を指す。

【0020】

用語「AXL介在抗アポトーシス」は、プログラムされた細胞死(アポトーシス)から、ヒト細胞、好ましくは、それに限定されないがヒト癌細胞を予防する、全てのAXL関連プロ

50

セスを指す。特にそれは、増殖因子離脱、低酸素症、化学療法剤または放射線への露出、Fas/Apo-1受容体介在シグナル伝達の開始を介したアポトーシスの誘導から、ヒト細胞、好ましくは、それに限定されないがヒト癌細胞を予防し、好ましくはAXLリン酸化および/またはAXL介在シグナル伝達を含めた、AXLの非触媒または触媒活性によって刺激または介在されるプロセスを指す。

【 0 0 2 1 】

本明細書では、用語「領域」および「ドメイン」が、互いと互換的である。

【 0 0 2 2 】

本明細書では、「11B7」および「11D5」と称する抗体を、それぞれ、「#11B7」および「#11D5」ともまた称しうる。

10

【 0 0 2 3 】

本発明の第2の態様によれば、本明細書で説明するヒト化抗体は、キメラ(ラット/ヒト)抗AXL抗体11B7 (その軽鎖および重鎖のアミノ酸配列が、それぞれ、配列番号135および136で表される)、11D5 (その軽鎖および重鎖のアミノ酸配列が、それぞれ、配列番号137、138で表される)、10D12、またはAXLの細胞外ドメイン上の同じエピトープを認識する抗体のうちの1つに由来する。ヒト化抗体は、11B7および11D5に由来することが特に好ましい。ヒト化抗体は、少なくとも1つの可変ドメインのフレームワーク領域において少なくとも1つの突然変異を含有することが好ましい。このような突然変異は、当業者に知られる、アミノ酸配列を改変する任意の方法により導入することができる。突然変異は、ヒトフレームワーク領域に保存されるアミノ酸により、11B7または11D5のフレームワーク領域内のアミノ酸を置換することが好ましい。例えば、IgBLASTなどのプログラムを使用する相同性モデリングなど、ヒトフレームワーク領域内の保存的アミノ酸またはコンセンサスアミノ酸を決定する方法は、当業者に知られている。別の好ましい実施形態によれば、本発明のヒト化抗体は、その少なくとも1つの可変ドメインのフレームワーク領域が、ヒトフレームワーク領域またはヒト化フレームワーク領域で置換されている抗AXL抗体、好ましくは抗AXL抗体11B7または11D5に由来する。

20

【 0 0 2 4 】

AXLに対する本発明の抗体の結合活性は、当業者によって知られている方法によって決定することができる。例えば、Biacoreを用いた表面プラズモン共鳴法、および/またはELISA(酵素結合免疫吸着アッセイ)、EIA(酵素イムノアッセイ)、RIA(ラジオイムノアッセイ)、または蛍光抗体技法、例えばFACSを使用して活性を決定することができる。

30

【 0 0 2 5 】

本発明のヒト化抗体は、ラット11B7または11D5など、ポリクローナルまたはモノクローナルの非ヒト化抗AXL抗体と比較した場合に、免疫原性が低いことが好ましい。当業者に知られる他の方法に加えて、免疫原性の低減は、ELISAベースのHAHAアッセイまたはHAMAアッセイ(ABL-America、Minnesota/LiSrarFish、Italy)により決定することができる。さらに、本発明の抗体は、血液循環から速やかに除去されず、患者へと投与しても、全身性の炎症作用を引き起こさないことが好ましい。

【 0 0 2 6 】

本発明の抗体は少なくとも1つの抗原結合部位、例えば1つまたは2つの抗原結合部位を有することができる。さらに抗体は、少なくとも1つの免疫グロブリン重鎖および少なくとも1つの免疫グロブリン軽鎖を含むことが好ましい。免疫グロブリン鎖は可変ドメイン、および場合によっては定常ドメインを含む。可変ドメインは、相補性決定領域(CDR)、例えばCDR1、CDR2および/またはCDR3領域、およびフレームワーク領域を含むことができる。用語「相補性決定領域(CDR)」は当技術分野で十分に定義されており(例えば、HarlowおよびLane、「Antibodies、a Laboratory Manual」、CSH Press、Cold Spring Harbour、1988を参照)、抗原と主に接触する抗体の可変領域内のアミノ酸の延長部分を指す。

40

【 0 0 2 7 】

さらなる実施形態によれば、本発明のヒト化抗体は、抗AXL抗体11B7に由来し、配列番号40～配列番号48からなる群から選択される重鎖アミノ酸配列、もしくは少なくともその

50

可変ドメイン、もしくはそれと少なくとも90%の配列同一性を有し、かつ、100%の配列同一性を有する可変領域と同等の、AxIに対する結合活性を有する可変領域を表すアミノ酸配列、

または配列番号80～配列番号82からなる群から選択される重鎖アミノ酸配列の可変ドメイン、それと少なくとも90%の配列同一性を有し、かつ、100%の配列同一性を有する可変領域と同等の、AxIに対する結合活性を有する可変領域を表すアミノ酸配列、

および/または配列番号18～配列番号30からなる群から選択される軽鎖アミノ酸配列、もしくは少なくともその可変ドメイン、もしくはそれと少なくとも90%の配列同一性を有し、かつ、100%の配列同一性を有する可変領域と同等の、AxIに対する結合活性を有する可変領域を表すアミノ酸配列、

10

または配列番号73～配列番号79からなる群から選択される軽鎖アミノ酸配列の可変ドメイン、もしくはそれと少なくとも90%の配列同一性を有し、かつ、100%の配列同一性を有する可変領域と同等の、AxIに対する結合活性を有する可変領域を表すアミノ酸配列、

またはAXLの細胞外ドメイン上の同じエピトープを認識するその断片を含みうる。本明細書による配列の説明は、下記の「配列の説明」および「配列表」で示す。

【0028】

別のさらなる実施形態によれば、本発明のヒト化抗体は、抗AXL抗体11B7に由来し、配列番号150および配列番号151からなる群から選択される重鎖アミノ酸配列、もしくは少なくともその可変ドメイン、もしくはそれと少なくとも90%の配列同一性を有し、かつ、100%の配列同一性を有する可変領域と同等の、AxIに対する結合活性を有する可変領域を表すアミノ酸配列、

20

および/または配列番号146および配列番号147からなる群から選択される軽鎖アミノ酸配列、もしくは少なくともその可変ドメイン、もしくはそれと少なくとも90%の配列同一性を有し、かつ、100%の配列同一性を有する可変領域と同等の、AxIに対する結合活性を有する可変領域を表すアミノ酸配列を含みうる。

【0029】

好ましい具体的な実施形態では、ヒト化h#11B7抗体が、h#11B7-T1、h#11B7-T2、h#11B7-T3、h#11B7-T4、h#11B7-T5、h#11B7-T6、h#11B7-T7、h#11B7-T8、h#11B7-T9、h#11B7-T10、h#11B7-T11、h#11B7-T12、h#11B7-T13、h#11B7-T14、h#11B7-T15、h#11B7-T16、h#11B7-T17、h#11B7-T18、h#11B7-T19、h#11B7-T20、h#11B7-T21、h#11B7-T22、h#11B7-T23、h#11B7-T24、h#11B7-T25、h#11B7-T26、およびh#11B7-T27からなる群から選択される。Table 1 (表2) (実施例10)は、本明細書において、特定のヒト化重鎖アミノ酸配列およびヒト化軽鎖アミノ酸配列のどの組合せにより、それぞれ、対応する発現ベクターのどの組合せにより上記のヒト化h#11B7抗体が特徴づけられるのかをまとめる。

30

【0030】

別の好ましい具体的な実施形態では、ヒト化h#11B7抗体が、h#11B7-T28抗体、h#11B7-T29抗体、h#11B7-T30抗体、およびh#11B7-T31抗体からなる群から選択される。Table 2 (表3) (実施例22)は、本明細書において、特定のヒト化重鎖アミノ酸配列およびヒト化軽鎖アミノ酸配列のどの組合せにより、それぞれ、対応する発現ベクターのどの組合せにより上記のヒト化h#11B7抗体が特徴づけられるのかをまとめる。

40

【0031】

ラット抗ヒトAxIモノクローナル抗体#11B7に由来するヒト化抗体は、前記ヒト化抗体が6つのCDRの全てならびにAxI抗原に対する結合活性を保持する限りにおいて、前出の節で例示した特定の抗体に限定されない。前記ヒト化抗体は、その重鎖においてCDRH₁ (SNYWG; 配列番号124)、CDRH₂ (YITYSGSTSYNPSLKS; 配列番号125)、およびCDRH₃ (TTFYY; 配列番号126)、その軽鎖においてCDRL₁ (RASQDIGNYLRL; 配列番号121)、CDRL₂ (GATNLAA; 配列番号122)、およびCDRL₃ (LQSKESPWT; 配列番号123)をそれぞれ保持する。

【0032】

さらなる実施形態によれば、本発明のヒト化抗体は、抗AXL抗体11D5に由来し、配列番号67～配列番号72からなる群から選択される重鎖アミノ酸配列、もしくは少なくともその

50

可変ドメイン、もしくはそれと少なくとも90%の配列同一性を有し、かつ、100%の配列同一性を有する可変領域と同等の、AxIに対する結合活性を有する可変領域を表すアミノ酸配列、

または配列番号114～配列番号120からなる群から選択される重鎖アミノ酸配列の可変ドメイン、それと少なくとも90%の配列同一性を有し、かつ、100%の配列同一性を有する可変領域と同等の、AxIに対する結合活性を有する可変領域を表すアミノ酸配列、

および/または配列番号55～配列番号60からなる群から選択される軽鎖アミノ酸配列、もしくは少なくともその可変ドメイン、もしくはそれと少なくとも90%の配列同一性を有し、かつ、100%の配列同一性を有する可変領域と同等の、AxIに対する結合活性を有する可変領域を表すアミノ酸配列、

または配列番号83～配列番号113からなる群から選択される軽鎖アミノ酸配列の可変ドメイン、もしくはそれと少なくとも90%の配列同一性を有し、かつ、100%の配列同一性を有する可変領域と同等の、AxIに対する結合活性を有する可変領域を表すアミノ酸配列、

またはAXLの細胞外ドメイン上の同じエピトープを認識するその断片を含む。

【0033】

好ましい具体的な実施形態では、ヒト化h#11D5抗体が、h#11D5-T1抗体、h#11D5-T2抗体、h#11D5-T3抗体、h#11D5-T4抗体、h#11D5-T5抗体、またはh#11D5-T6抗体からなる群から選択される。実施例11、12、および14は、特定のヒト化重鎖アミノ酸配列およびヒト化軽鎖アミノ酸配列のどの組合せにより、それぞれ、対応する発現ベクターのどの組合せにより上記のヒト化h#11D5抗体が特徴づけられるのかを示す。

【0034】

本発明の好ましい実施形態のうちの1つは、比較的高い熱変性中点(T_m)を有するヒト化抗体である。本発明では、ヒト化抗体のT_mが、少なくとも70℃、好ましくは少なくとも75℃、より好ましくは少なくとも78℃、なお好ましくは少なくとも80℃、さらになお好ましくは少なくとも82℃である。または、本発明では、ヒト化抗体のT_mが、その原抗体であるラット抗体もしくはキメラ抗体のT_mと同等であるが、その原抗体であるラット抗体もしくはキメラ抗体のT_mより、好ましくは少なくとも3℃高く、より好ましくは少なくとも6℃高く、なお好ましくは少なくとも8℃高く、さらになお好ましくは少なくとも10℃高い。このような好ましい、より好ましい、なお好ましい、またはさらになお好ましいヒト化抗体は、変性(アンフォールド)または不活性化する傾向が小さく、長期間にわたり安定的に保存されうる溶液製剤へと調製するのに適している。

【0035】

ラット抗ヒトAxIモノクローナル抗体h#11D5に由来するヒト化抗体は、前記ヒト化抗体が6つのCDRの全てならびにAxI抗原に対する結合活性を保持する限りにおいて、前出の節で例示した特定の抗体に限定されない。前記ヒト化抗体は、その重鎖においてCDRH₁ (SNYWG; 配列番号130)、CDRH₂ (HITNSGNTTYNPSLKS; 配列番号131)、およびCDRH₃ (GAFDY; 配列番号132)、その軽鎖においてCDRL₁ (RASQDIGNYLS; 配列番号127)、CDRL₂ (GAIKLAV; 配列番号128)、およびCDRL₃ (LQYIQFPLT; 配列番号129)をそれぞれ保持する。

【0036】

本発明の別の好ましい実施形態は、カルボキシ末端に近接するIgドメインのうちの1つ(NCBIタンパク質データベースの受託番号第P_30530号におけるアミノ酸番号129～220のアミノ酸残基: 配列番号139を含むドメイン; 図30A)に(特異的に)結合するかまたはこれを(特異的に)認識する抗体である。このような好ましい抗体は、ヒト化抗体に限定されず、ヒト抗体またはそれらのうちの1つの機能断片でありうる。このような好ましい抗体は、AxIが有する生物学的活性のうちの少なくとも1つを阻害することがより好ましい。

【0037】

本発明の(全)抗体は、例えば、実施例9～12で例示する通り、以下のステップ: その各々が可変領域および定常領域を含む挿入配列を有する重鎖発現ベクターおよび軽鎖発現ベクターを構築するステップと、前記ベクターを宿主細胞へと導入するステップと、前記細胞

10

20

30

40

50

を培養するステップと、前記培養物上清(条件培地)から抗体ポリペプチドを回収するステップとを実行することにより作製することができる。

【0038】

本明細書で使用する、2つのポリペプチド配列間の「配列同一性」は、その配列間で同一であるアミノ酸の割合を示す。所与の2つのポリペプチド配列間の「配列同一性」を決定する方法は、当業者に知られている。本発明の好ましいポリペプチド配列は、少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、なおより好ましくは少なくとも98%の配列同一性を有する。配列同一性は、例えば、KarlinおよびAltschul (Proc. Natl. Acad. Sci. USA、90、5873頁(1993))によるアルゴリズムであるBLAST、またはFASTA (Methods in Enzymol.、183、63頁(1990))により決定することができる。BLSTNまたはBLASTXと称するプログラムが利用可能である(J. Mol. Biol.、215、403頁(1990))。

10

【0039】

本発明の抗体は、IgA型、IgD型、IgE型、IgG型またはIgM型、好ましくは、それらに限定されないが、IgG1型、IgG2型、IgG3型、IgG4型、IgM1型およびIgM2型を含めた、IgG型またはIgM型でありうる。

【0040】

本発明の抗体は、好ましくは、当業者に知られる任意の適切な手段を使用する相同性モデリングにより設計することができる。さらに、11B7または11D5など、所与の抗体のヒト化形態は、キメラ化またはCDR移植など、当技術分野で知られる方法により生成させることができる。ヒト化抗体を作製するための代替法は当技術分野でよく知られており、例えば、EPA10239400およびWO9007861において説明されている。一般に、ヒト化抗体は、非ヒトである供給源に由来する1または複数のアミノ酸残基がその中に導入されている。これらの非ヒトアミノ酸残基は、「インポート」の変動ドメインから選択されることが典型的である。「インポート」残基と称することが多い。ヒト化は、例えば、Winterらの方法(Jonesら、Nature、321 :522~525頁(1986); Riechmannら、Nature、332:323~327頁(1988); Verhoevenら、Science、239:1534~1536頁(1988))に従い、非ヒト起源のCDRまたはCDR配列を、ヒト抗体の対応する配列に置換することにより実施することができる。したがって、このような「ヒト化」抗体は、完全ヒト可変ドメインのごく一部が、非ヒト種に由来する対応する配列で置換されているキメラ抗体(米国特許第4,816,567号)である。実際のヒト化抗体は、一部のCDR残基ならびにおそらくは一部のFR残基が、非ヒト抗体における類似の部位に由来する残基で置換されているヒト抗体であることが典型的である。

20

30

【0041】

ヒト抗体は、当業者によく知られる、ヒト抗体のファージディスプレイライブラリー(Wormstone, I.M.ら、Investigative Ophthalmology & Visual Science. (2002)、43 (7)、2301~2308頁; Carmen, S.ら、Briefings in Functional Genomics and Proteomics (2002)、1 (2)、189~203頁; Siriwardena, D.ら、Ophthalmology (2002)、109 (3)、427~431頁)に由来しうる。

【0042】

例えば、ヒト抗体の可変領域を、単鎖抗体scFvとして、ファージ表面上で発現させるステップと、抗原に結合するファージを選択するステップとを含むファージディスプレイ法を使用することができる(Nature Biotechnology (2005)、23 (9)、1105~1116頁)。

40

【0043】

選択されたファージの遺伝子を分析することにより、抗原に結合するヒト抗体の可変領域をコードするDNA配列を決定することができる。

【0044】

scFvのDNA配列を決定したら、前記配列を含む発現ベクターを構築し、前記ベクターを適切な宿主細胞へと導入して、前記抗体を発現させることにより、ヒト抗体を作製することができる(WO92001047、WO92020791、WO93006213、WO93011236、WO93019172、WO95001438、WO95015388ならびにAnnu.Rev.Immunol (1994)、12、433~455頁;およびNature Biotechnology (2005)、23 (9)、1105~1116頁)。

50

【 0 0 4 5 】

その作製方法に関わらず、それが、ヒトAxI抗原に対する結合活性、ならびに以下の6つのCDRの全て:それぞれ、その重鎖においてCDRH₁ (SNYWG;配列番号130)、CDRH₂ (HITNSGNT TYNPSLKS;配列番号131)、およびCDRH₃ (GAFDY;配列番号132)、その軽鎖においてCDRL₁ (R ASQDIGNYLS;配列番号127)、CDRL₂ (GAIKLAV;配列番号128)、およびCDRL₃ (LQYIQFPLT;配列番号129)を有する限りにおいて、代替的に、それが、ヒトAxI抗原に対する結合活性、ならびに以下の6つのCDRの全て:それぞれ、その重鎖においてCDRH₁ (SNYWG;配列番号124)、CDRH₂ (YITYSGSTSYNPSLKS;配列番号125)、およびCDRH₃ (TTFYY;配列番号126)、その軽鎖においてCDRL₁ (RASQDIGNYLR;配列番号121)、CDRL₂ (GATNLAA;配列番号122)、およびCDRL₃ (LQSKESPWT;配列番号123)を有する限りにおいて、任意のヒト抗体は、本発明の実施形態でありうる。

10

【 0 0 4 6 】

治療目的で、抗体は治療エフェクター基、例えば放射性基または細胞毒性基と結合させることが可能である。

【 0 0 4 7 】

診断目的で、抗体を標識することができる。適切な標識には、放射性標識、蛍光標識、または酵素標識がある。

【 0 0 4 8 】

前に論じたように、本発明の抗体は、例えばFv、Fab、Fab'およびF(ab')₂、ダイアボディ、ミニボディ、1つ以上の抗体の断片を含む二価または多価抗体、ならびに単鎖(scFv)を含めた、完全抗体以外の様々な形で存在することができる。例えばW08809344を参照。

20

【 0 0 4 9 】

本発明の抗体は、複数の抗原またはエピトープに対して特異的である、二重特異性抗体または多重特異性抗体でありうる。

【 0 0 5 0 】

scFvは、ポリペプチドリンカーを介して、免疫グロブリン重鎖の可変領域を、免疫グロブリン軽鎖の可変領域へと融合することにより得ることができる(Pluckthun、「The Pharmacology of Monoclonal Antibodies」、113、RosenburgおよびMoore編、Springer Verlag、New York、269~315頁(1994));ならびにNature Biotechnology (2005)、23、1126~1136頁)。BiscFvは、ポリペプチドリンカーを介して2つの異なるscFvを融合することにより得ることができる。

30

【 0 0 5 1 】

scFvを生成させる方法は、当業者によく知られている(US4,946,778、US5,260,203、US5,091,513、US5,455,030など)。2つの可変領域間のリンカーは、コンジュゲートを生成させないことが好ましい(Huston, J.S.ら、Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. (1988)、85、5879~5883頁)。scFvの免疫グロブリン重鎖可変領域ならびにscFvの免疫グロブリン軽鎖可変領域は、同一の抗体またはそれらの1つが他とは異なる2つの抗体に由来しうる。ポリペプチドリンカーは、例えば、12~19アミノ酸残基からなる単鎖ペプチドでありうる。

【 0 0 5 2 】

scFvをコードするDNAは、PCRにより生成させることができ、PCRは、免疫グロブリン重鎖可変領域または免疫グロブリン軽鎖可変領域の全長または一部をコードするDNA、ならびに両方の末端の各々に対応する2つのオリゴヌクレオチドを、それぞれ、鋳型およびプライマー対として使用してDNA断片を増幅するステップと、次いで、重鎖可変領域および軽鎖可変領域が、それぞれ、ポリペプチドリンカーの1つの末端および他の末端へと連結されるように設計されたプライマー対を使用して増幅するステップとを含む。

40

【 0 0 5 3 】

本説明の別の箇所では説明する通り、scFvを含めた抗体の機能断片は、前記scFvをコードするDNAを宿主細胞へと導入し、前記細胞を培養することにより作製することができる。

【 0 0 5 4 】

本発明の実施形態のうちの1つは、抗原に対して、単量体抗体より高度の親和性を有す

50

る多量体抗体である。前記多量体抗体のユニットは同じ場合もあり、1つのユニットが抗原の1つのエピトープに結合し、別のユニットが同じ抗原の異なるエピトープに結合する場合は、互いに異なる場合もある。多量体抗体を作製するには、IgG CH₃ドメインと2つの scFvとの結合、ストレプトアビジンとの結合、ならびにヘリックス-ターン-ヘリックスモチーフの導入を適用することができる。

【0055】

望む場合、本発明の抗体を重鎖および/または軽鎖の可変ドメインにおいて突然変異させて、抗体の結合性を変えることが可能である。例えば、1つまたは複数のCDR領域中に突然変異を施して、AXLに関する抗体のKdを増大または低下させること、または抗体の結合特異性を変えることが可能である。部位特異的突然変異誘発における技法は当技術分野でよく知られている。例えば、SambrookらおよびAusubelら上記を参照。さらに、生殖細胞と比較してAXL抗体の可変領域中で変化することが知られているアミノ酸残基において、突然変異を施すことができる。

【0056】

別の態様では、ヒト化に対する突然変異の他に、突然変異を1つまたは複数のフレームワーク領域中に導入することができる。フレームワーク領域または定常ドメイン中に突然変異を施して、AXL抗体の半減期を増大させることが可能である。例えばW00009560を参照。フレームワーク領域または定常ドメイン中に突然変異を施して、抗体の免疫原性を変えること、別の分子との共有または非共有結合用の部位を与えること、または補体結合などの性質を変えることも可能である。単鎖突然変異抗体中のフレームワーク領域、定常ドメインおよび可変領域の各々において突然変異を施すことができる。あるいは、単鎖突然変異抗体中のフレームワーク領域、可変領域または定常ドメインの1つのみにおいて突然変異を施すことができる。

【0057】

本発明の実施形態のうちの1つは、本発明の1つ以上の抗体を含むポリクローナル抗体である。

【0058】

本発明の一実施形態は、本発明の抗体またはその機能断片の化学修飾である。ポリマー(ポリエチレングリコールなど)などの分子を使用して、修飾抗体または修飾機能断片を生成させることができる。

【0059】

さらなる態様では、本発明によるヒト化抗体はエフェクター機能を有する定常ドメインを有する可能性があり、それによって細胞表面上の抗体、その抗体断片または派生物と結合したAXL発現細胞は免疫系機能によって攻撃される可能性がある。例えば、抗体は補体を固定し、補体依存性細胞障害(CDC)に関与することができる。さらに、抗体は単球およびナチュラルキラー(NK)細胞などのエフェクター細胞上のFc受容体と結合し、抗体依存性細胞毒性(ADCC)に関与することができる。

【0060】

他のさらなる態様では、本明細書に記載の抗体は、療法治療、好ましくは過剰増殖性疾患、心臓血管疾患、特にアテローム性動脈硬化症および血栓形成、糖尿病関連疾患、特に糸球体肥大または糖尿病性腎症、および特にAXLの発現、過剰発現または活動亢進と関係がある、それを伴う、またはそれによって引き起こされる障害の治療に適用可能である。過剰増殖性疾患は、AXLの発現、過剰発現または活動亢進と関係がある、それを伴う、またはそれによって引き起こされる障害、例えば乳癌、結腸癌、肺癌、腎臓癌、濾胞性リンパ腫、骨髄性白血病、皮膚癌/メラノーマ、グリア芽腫、卵巣癌、前立腺癌、膵臓癌、バレット食道および食道癌、胃癌、膀胱癌、子宮頸癌、肝臓癌、甲状腺癌、および頭頸部癌などの癌、または過形成および腫瘍性疾患または他のAXL発現もしくは過剰発現過剰増殖性疾患から選択されることが好ましい。

【0061】

本発明の抗体を、過剰増殖性疾患など、任意のAXL関連疾患の治療に適用する可能性は

10

20

30

40

50

、Axlのリガンド誘導性自己リン酸化；Aktおよびp42/44 MAPキナーゼのリガンド誘導性リン酸化など、Axlを介する下流のシグナル伝達に対する影響；癌細胞の移動または増殖；Axlを発現する細胞のリガンド誘導性移動またはリガンド誘導性増殖；組織または細胞の血管新生；ならびに異種移植マウスなど、非ヒト動物へと移植されたヒト癌またはヒト癌細胞の増殖または転移についての実験のほか、他の任意の前臨床/非臨床実験および臨床試験を含めた、in vitro、in vivo、またはex vivoの実験により実証するか、示すか、または示唆することができる。

【0062】

別の態様では、本発明の抗体は、前述の障害の1つを治療するための、抗腫瘍薬との同時投与に使用することができる。

【0063】

本明細書で使用する同時投与は、抗腫瘍薬、好ましくはアポトーシス誘導性抗腫瘍薬との、本発明の抗体の投与を含む。用語同時投与は、1つの組成物の形または2つ以上の異なる組成物の形での、本発明の抗体と抗腫瘍薬、好ましくはアポトーシス誘導性抗腫瘍薬の投与をさらに含む。同時投与は、同時(すなわち同じときに)または連続的に(すなわち一定間隔で)、本発明の抗体と抗腫瘍薬、好ましくはアポトーシス誘導性抗腫瘍薬を投与することを含む。

【0064】

本発明はさらに、本発明の抗体、その抗体断片または派生物をコードする核酸分子に関する。前に記載した抗体、その抗体断片または派生物をコードする本発明の核酸分子は、例えばDNA、cDNA、RNA、または合成によって生成したDNAもしくはRNA、または単独または組合せでこれらの核酸分子のいずれかを含む組換えによって生成したキメラ核酸分子であってよい。核酸分子は、遺伝子全体もしくはその相当部分またはその断片および派生物に対応するゲノムDNAであってもよい。ヌクレオチド配列は天然に存在するヌクレオチド配列に対応する可能性があり、1つまたは多数のヌクレオチド置換、欠失または付加を含有する可能性がある。本発明の特に好ましい実施形態では、核酸分子はcDNA分子である。

【0065】

さらなる態様によれば、本発明は、

(a)本発明によるモノクローナル抗体、その抗体断片もしくは派生物をコードする核酸配列、

(b)配列番号5～配列番号17、配列番号31～配列番号39、配列番号49～配列番号54、および配列番号60～配列番号66からなる群から選択される配列番号のうちの1つにおいて示される核酸配列、

(c)配列番号18～配列番号30、配列番号40～配列番号48、配列番号55～配列番号60、配列番号67～配列番号72、配列番号73～配列番号120、および配列番号121～132からなる群から選択されるポリペプチドをコードする核酸配列、

(d) (a)～(c)における配列のうちのいずれかと相補的な核酸、または

(e)ストリンジェントな条件下で(a)、(b)、(c)、または(d)にハイブリダイズすることが可能であり、かつ、それを含む抗体もしくはその機能断片がAXLの細胞外ドメインに結合するポリペプチドをコードする核酸配列、

(f)配列番号144および配列番号145、ならびに配列番号148および配列番号149からなる群から選択される配列番号のうちの1つにおいて示される核酸配列、

(g)配列番号146および配列番号147、ならびに配列番号150および配列番号151からなる群から選択されるポリペプチドをコードする核酸配列、

(h) (f)もしくは(g)における配列のうちのいずれかと相補的な核酸、または

(i)ストリンジェントな条件下で(f)、(g)、または(h)にハイブリダイズすることが可能であり、かつ、それを含む抗体もしくはその機能断片がAXLの細胞外ドメインに結合するポリペプチドをコードする核酸配列

からなる群から選択される単離核酸分子に関する。

【0066】

用語「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする」は、2つの核酸断片が、例えばSambrookら、「Expression of cloned genes in E.coli」 in Molecular Cloning: A laboratory manual(1989)、Cold Spring Harbor Laboratory Press、New York、USA中に記載された標準ハイブリダイゼーション条件下で、互いにハイブリダイズすることを意味する。このような条件は、例えば約45 での6.0×SSC中でのハイブリダイゼーション、次に50 で2.0×SSC、好ましくは65 で2.0×SSC、または50 で0.2×SSC、好ましくは65 で0.2×SSCを用いた洗浄ステップである。

【0067】

本発明はさらに、本発明の核酸分子を含むベクターに関する。前記ベクターは、例えばファージ、プラスミド、ウイルスまたはレトロウイルスベクターであってよい。レトロウイルスベクターは、複製可能または複製欠損である可能性がある。後者の場合、ウイルス増殖は一般に相補的宿主細胞中でのみ起こり得る。

【0068】

本発明の核酸分子は、宿主中での増殖の選択可能マーカ含有するベクターと結合させることが可能である。一般に、プラスミドベクターを、リン酸カルシウム沈殿物または塩化ルビジウム沈殿物などの沈殿物中、または荷電脂質との複合体中、またはフラーレンなどの炭素系クラスターに導入する。ベクターがウイルスである場合、宿主細胞への施用前に適切なパッケージ細胞系を使用してin vitroでそれをパッケージすることができる。

【0069】

好ましくは、本発明のベクターは発現ベクターであり、この場合核酸分子は1つまたは複数の制御配列と作動可能に連結し、原核生物および/または真核生物宿主細胞中での転写および場合によっては発現を可能にする。前記核酸分子の発現は、核酸分子の転写、好ましくは翻訳可能なmRNAへの転写を含む。真核生物細胞、好ましくは哺乳動物細胞中での発現を確実にする制御エレメントは、当業者によく知られている。それらは通常、転写の開始を確実にする制御配列、および場合によっては転写の停止および転写産物の安定化を確実にするポリ-Aシグナルを含む。他の制御エレメントは、転写および翻訳エンハンサーを含むことができる。原核生物宿主細胞中での発現を可能にする考えられる制御エレメントは、例えば大腸菌(E.coli)におけるlac、trpまたはtacプロモーターを含み、真核生物宿主細胞中での発現を可能にする制御エレメントの例は、酵母におけるAOX1またはGAL1プロモーター、または哺乳動物および他の動物細胞におけるCMV-、SV40-、RSV-プロモーター(ラウス肉腫ウイルス)、CMV-エンハンサー、SV40-エンハンサーまたはグロブリンイントロンである。転写の開始を担うエレメント以外に、このような制御エレメントは、ポリヌクレオチドの下流にSV40-ポリ-A部位またはtk-ポリ-A部位などの、転写停止シグナル部位も含み得る。この文脈において、Okayama-BergのcDNA発現ベクターpcDV1(Pharmacia)、pCDM8、pRc/CMV、pcDNA1、pcDNA3(Invitrogen)またはpSPORT1(GIBCOBRL)などの、適切な発現ベクターが当技術分野で知られている。前記ベクターは、発現ベクターおよび/または遺伝子導入または標的ベクターであることが好ましい。レトロウイルス、ワクシニアウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、またはウシパピローマウイルスなどのウイルスに由来する発現ベクターは、標的細胞集団への本発明のポリヌクレオチドまたはベクターの送達に使用することができる。当業者によく知られている方法を使用して組換えウイルスベクターを構築することができる。例えば、Sambrook、Molecular Cloning A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory(2001、第三版)N.Y.およびAusubel、Current Protocols in Molecular Biology、Green Publishing Associates and Wiley Interscience、N.Y.(1994)中に記載された技法を参照。あるいは、本発明の核酸分子は、標的細胞への送達用のリボソームに再構築することができる。

【0070】

本発明はさらに、本発明のベクターを含む宿主に関する。前記宿主は、原核生物または真核生物細胞または非ヒトトランスジェニック動物であってよい。宿主中に存在する本発明のポリヌクレオチドまたはベクターは宿主のゲノムに組み込むことができる、またはそれは、染色体外に維持することができるかのいずれかである。この点において、本発明の

10

20

30

40

50

核酸分子は、「遺伝子標的化」および/または「遺伝子置換」、突然変異遺伝子の修復、または相同的組換えによる突然変異遺伝子の作製に使用することができることも理解される。例えば、Mouellic、Proc.Natl.Acad.Sci.USA、87(1990)、4712～4716頁、Joyner、Gene Targeting、A Practical Approach、Oxford University Pressを参照。

【0071】

宿主は、細菌、昆虫、真菌、植物、動物、哺乳動物または、好ましくはヒト細胞などの、任意の原核生物または真核生物細胞であってよい。好ましい真菌細胞は、例えばサッカロミセス属(genus *Saccharomyces*)の細胞、特にサッカロミセスセレビシエ種(species *S.cerevisiae*)の細胞である。用語「原核生物」は、本発明の変異体ポリペプチドの発現のためにポリヌクレオチドで形質転換またはトランスフェクトすることができる、全ての細菌を含むことを意味する。原核生物宿主は、グラム陰性菌およびグラム陽性菌、例えば大腸菌、ネズミチフス菌(*S.typhimurium*)、セラチアマルセッセンス(*Serratia marcescens*)および枯草菌(*Bacillus subtilis*)などを含むことができる。当業者に一般に知られている技法のいずれかを使用することによって、突然変異型の本発明の変異体ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを使用して、宿主を形質転換またはトランスフェクトすることができる。融合、作動可能に連結した遺伝子を調製し、および細菌または動物細胞中でそれらを発現させるための方法は当技術分野でよく知られている(Sambrook、Molecular Cloning A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory(2001、第三版)。その中に記載された遺伝子構築体および方法は、例えば原核生物宿主中での、本発明の変異体抗体、その抗体断片または派生物の発現に利用することができる。一般に、挿入核酸分子の有効な転写を容易にするプロモーター配列を含有する発現ベクターは、宿主と共に使用される。発現ベクターは、複製起点、プロモーター、およびターミネーター、ならびに形質転換細胞の表現型の選択を与えることができる特異的遺伝子を典型的には含有する。形質転換原核生物宿主を発酵槽中で増殖させ、当技術分野で知られている技法に従い培養して、最適な細胞増殖を達成することが可能である。本発明の抗体、その抗体断片または派生物は、次いで増殖培地、細胞溶解物、または細胞膜分画から単離することができる。微生物または他に発現された本発明の抗体、その抗体断片または派生物の単離および精製は、例えば調製クロマトグラフィー分離、およびモノクローナルまたはポリクローナル抗体の使用を含む分離などの免疫学的分離などの、任意の従来の手段によるものであってよい。

【0072】

本発明の好ましい実施形態では、宿主は細菌、真菌、植物、両生類または動物細胞である。好ましい動物細胞には、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞(CHO細胞、ATCC CCL-61)またはそのジヒドロ葉酸還元酵素欠損株(Urlaub, G. and Chasin, L.A., Proc.Natl.Acad.Sci., U.S.A., (1980) 77, 4126～4220頁)、ベビーハムスター腎臓(BHK)細胞、サル腎臓細胞(COS)(Gluzman, Y, Cell (1981) 23, 175～182頁およびATCC CRL-1650)、3T3細胞またはマウス線維芽細胞由来のNIH3T3細胞(ATCC No.CRL-1658)、NS0細胞およびヒト細胞を含めた幾つかの他の細胞系、例えばPer.C6があるが、それらに限定されない。別の好ましい実施形態では、前記動物細胞は昆虫細胞である。好ましい昆虫細胞には、SF9細胞系の細胞があるが、それらに限定されない。

【0073】

本発明のより好ましい実施形態では、前記宿主はヒト細胞またはヒト細胞系である。前記ヒト細胞には、ヒト胚腎臓細胞(HEK293、293T、293フリースタイル)があるが、それらに限定されない。さらに、前記ヒト細胞系には、HeLa細胞、ヒト肝細胞癌細胞(例えばHep G2)、A549細胞があるが、それらに限定されない。

【0074】

本発明は、本発明の抗体を産生するために使用することができる、1つまたは複数の本発明の核酸分子を含むトランスジェニック非ヒト動物も提供する。抗体はヤギ、ウシ、ウマ、ブタ、ラット、マウス、ウサギ、ハムスターまたは他の哺乳動物の組織または乳、血液もしくは尿などの体液において産生し、そこから回収することができる。例えば、米国

特許第5,827,690号、米国特許第5,756,687号、米国特許第5,750,172号、および米国特許第5,741,957号を参照。前に記載したように、ヒト免疫グロブリン遺伝子座を含む非ヒトトランスジェニック動物は、AXLまたはその一部分を用いた免疫処置によって生成することができる。

【0075】

本発明はさらに、抗体を調製するための方法であって、前記抗体の合成を可能にする条件下で本発明の宿主を培養するステップ、および前記培養物から前記抗体を回収するステップを含む方法に関する。

【0076】

形質転換宿主を発酵槽中で増殖させ、当技術分野で知られている技法に従い培養して、最適な細胞増殖を達成することが可能である。発現した後、本発明の完全抗体、それらの二量体、個々の軽鎖および重鎖、または他の免疫グロブリン型は、硫安沈殿法、親和性カラム、カラムクロマトグラフィー、ゲル電気泳動などを含めた、当技術分野の標準手順に従い精製することができる。Scopes、「Protein Purification」、Springer-Verlag、N.Y.(1982)を参照。本発明の抗体またはその対応する免疫グロブリン鎖は、次いで増殖培地、細胞溶解物、または細胞膜分画から単離することができる。例えば、微生物に発現された本発明の抗体または免疫グロブリン鎖の単離および精製は、例えば調製クロマトグラフィー分離、および例えば本発明の抗体の定常領域を対象とするモノクローナルまたはポリクローナル抗体の使用を含む分離などの免疫学的分離などの、任意の従来の手段によるものであってよい。

【0077】

本発明の抗体は、例えば薬剤標的化およびイメージング用途で、他の成分とさらに結合させることが可能であることは、当業者には明らかであろう。抗体または抗原の発現後に、結合部位とこのような結合を化学的に実施することができ、または結合産物をDNAレベルで本発明の抗体または抗原に工学処理することができる。次いでDNAを適切な宿主系中で発現させ、かつ必要な場合、発現したタンパク質を回収し復元させる。

【0078】

本発明の好ましい実施形態では、抗体を放射性同位体または毒性化学療法剤などのエフェクターと結合させる。これらの抗体結合体は、除去するための細胞、例えばAXLを発現する癌細胞を標的化する際に有用であることが好ましい。本発明の抗体/抗体断片と例えば放射性同位体の結合は、腫瘍治療に対する利点をもたらす。化学療法および他の形の癌治療とは異なり、放射性同位体-抗体の組合せの放射免疫治療または投与は、周囲の正常、健全組織に対して最小の損傷で癌細胞を直接標的化する。好ましい放射性同位体には例えば ^3H 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I がある。

【0079】

さらに、ゲルダナマイシン(Mandlerら、J.Natl.Cancer Inst.、92(19)、1549~51頁(2000)およびメイタンシン、例えばメイタンシノイド薬剤、DM1(Liuら、Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.93:8618~8623頁(1996)およびオーリスタチン-Eまたはモノメチルオーリスタチン-E(Doroninaら、Nat.Biotechnol.21:778~784頁(2003)またはカリケアミシト(calicheamicin)などの毒性化学療法剤と結合しているとき、本発明の抗体を使用して癌を治療することができる。酸性または還元条件下または特異的プロテアーゼへの露出で薬剤を放出する異なるリンカーは、この技術と共に利用される。本発明の抗体は、当技術分野で記載されるように結合させることが可能である。

【0080】

本発明の一実施形態は、本発明の抗体またはその機能断片の化学修飾である。ポリマー(ポリエチレングリコールなど)などの分子を使用して、修飾抗体または修飾機能断片を生成させることができる。

【0081】

本発明はさらに、本発明の抗体、核酸分子、ベクター、宿主、または本発明の方法によって得られる抗体を含む医薬組成物に関する。

【0082】

本明細書で使用する用語「組成物」は、少なくとも1つの本発明の化合物を含む。このような組成物は、医薬または診断用組成物であることが好ましい。

【0083】

前記医薬組成物は、薬剤として許容される担体および/または希釈剤を含むことが好ましい。本明細書で開示する医薬組成物は、AXLの発現、過剰発現または活動亢進と関係がある、それを伴う、またはそれによって引き起こされる障害、例えば過剰増殖性疾患、心臓血管疾患、特にアテローム性動脈硬化症および血栓形成、糖尿病関連疾患、特に糸球体肥大または糖尿病性腎症の治療に部分的に有用であり得る。前記障害は、癌、例えば乳癌、結腸癌、肺癌、腎臓癌、濾胞性リンパ腫、骨髄性白血病、皮膚癌/メラノーマ、グリア芽腫、卵巣癌、前立腺癌、膵臓癌、バレット食道および食道癌、胃癌、膀胱癌、子宮頸癌、肝臓癌、甲状腺癌、および頭頸部癌などの癌、または他の過形成および腫瘍性疾患または他のAXL発現もしくは過剰発現疾患だけには限られないが、これらを含む。

10

【0084】

本明細書の用語「活動亢進(hyperactivity)」は、負の調節の欠如および/または機能不全によって引き起こされる可能性がある、制御不能なAXLシグナル伝達を指す。例えば負の調節は、タンパク質の脱リン酸化、分解および/またはエンドサイトーシスを含む。さらに、制御不能なAXLシグナル伝達は、AXLアミノ酸配列の変化をもたらす、体細胞または生殖細胞のいずれかの遺伝子変化の結果であり得る。

【0085】

20

適切な医薬担体、賦形剤および/または希釈剤の例は当技術分野でよく知られており、リン酸緩衝生理食塩水溶液、水、油/水エマルジョンなどのエマルジョン、様々な型の湿潤剤、滅菌溶液などを含む。このような担体を含む組成物は、よく知られている従来の方法によって製剤化することができる。これらの医薬組成物は、適切な用量で対象に投与することができる。適切な組成物の投与は、異なる方法によって、例えば静脈内、腹腔内、皮下、筋肉内、局所、皮内、鼻腔内、または気管支内投与によって実施することができる。本発明の組成物は、例えば脳のような外部または内部標的部位への遺伝子送達によって、標的部位に直接投与することもできる。投薬レジメンは担当医および臨床学的要因によって決定され得る。医療分野においてよく知られているように、任意の一人の患者に関する投薬は、患者のサイズ、体表面積、年齢、投与する個々の化合物、性別、投与の時間および経路、一般的健康状態、および同時に投与される他の薬剤を含めた多くの要因に依存する。タンパク質性医薬活性物質は用量当たり1 μ g~100mg/体重1kgの量で存在する可能性があるが、しかしながら、特に前述の要因を考慮して、この例示的な範囲より下または上の用量が想定される。レジメンが持続注入である場合、それはさらに一分間当たり体重1kg当たり1pg~100mgの範囲でなければならない。

30

【0086】

定期評価によって進行をモニターすることができる。本発明の組成物は局所または全身に投与することができる。非経口投与用の調製物には、滅菌水性溶液または非水性溶液、懸濁液、およびエマルジョンがある。非水性溶媒の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油などの植物油、およびオレイン酸エチルなどの注射可能な有機エステルである。水性担体には、水、アルコール/水溶液、生理食塩水および緩衝培地を含むエマルジョンまたは懸濁液がある。非経口賦形薬には、塩化ナトリウム溶液、リンガーデキストロース、デキストロースおよび塩化ナトリウム、乳酸加リンガー液、または固定油がある。静脈内賦形薬には、液体および栄養補給剤、電解質補給剤(リンガーデキストロースに基づく補給剤など)などがある。例えば抗菌剤、抗酸化剤、キレート剤、および不活性ガスなどの、防腐剤および他の添加剤が存在してもよい。さらに、本発明の医薬組成物は、医薬組成物の意図する用途に応じてさらなる作用物質を含むことができる。

40

【0087】

医薬組成物は、例えば追加的な抗腫瘍薬、小分子阻害剤、抗腫瘍剤、化学療法剤または

50

それらの作用物質の組合せのような、少なくとも1つのさらなる活性作用物質を含むことが特に好ましい。

【0088】

本発明は、少なくとも1つのさらなる抗腫瘍薬と組合せた本発明のヒト化抗AXL抗体を含む、医薬組成物にも関する。前記組合せは、例えば異常な細胞増殖を阻害する際に有効である。

【0089】

多くの抗腫瘍薬が、現在当技術分野で知られている。一般にこの用語は、過剰増殖性障害を予防、軽減および/または治療することができる全ての作用物質を含む。一実施形態では、抗腫瘍薬は、抗体または免疫調節タンパク質だけには限られないがこれらを含めた、治療用タンパク質の群から選択される。別の実施形態では、抗腫瘍薬は、分裂阻害剤、キナーゼ阻害剤、アルキル化剤、代謝拮抗剤、挿入剤、抗生物質、増殖因子阻害剤、細胞周期阻害剤、酵素、トポイソメラーゼ阻害剤、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤、抗生存因子、生物反応修飾物質、抗ホルモン、例えば抗アンドロゲン、および抗血管新生剤からなる小分子阻害剤または化学療法剤の群から選択される。

【0090】

本明細書に示す抗体と組合せて使用することができる抗腫瘍薬の具体例には、例えばゲフィチニブ、ラパチニブ、サニチニブ、ペメトレキセド、ベバシスマブ、セツキシマブ、イマチニブ、トラスツマブ、アレムツマブ、リツキシマブ、エルロチニブ、ボルテゾミブなどがある。本明細書に記載し特許請求する組成物において使用する他の具体的な抗腫瘍薬には、例えばカペシタビン、ダウノルピシン、ダウノマイシン、ダクチノマイシン、ドキソルピシン、エピルピシン、イダルピシン、エソルピシン、プレオマイシン、マホスファミド、イフォスファミド、シトシンアラビノシド、ビス-クロロエチルニトロソウレア、ブサルファン、マイトマイシンC、アクチノマイシンD、ミトラマイシン、プレドニゾン、ヒドロキシprogesterone、テストステロン、タモキシフェン、ダカルバジン、プロカルバジン、ヘキサメチルメラミン、ペンタメチルメラミン、ミトキサントロン、アムサクリン、クロラムブシル、メチルシクロヘキシルニトロソウレア、ナイトロジェンマスタード、メルファラン、シクロホスファミド、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン(CA)、5-アザシチジン、ヒドロキシウレア、デオキシコフォルマイシン、4-ヒドロキシペルオキシシクロホスホルアミド、5-フルオロウラシル(5-FU)、5-フルオロデオキシウリジン(5-FUdR)、メトトレキセート(MTX)、コルヒシン、タキソール、ビンクリスチン、ビンブラスチン、エトポシド、トリメトレキセート、テニポシド、シスプラスチンおよびジエチルスチルベストロール(DES)などの化学療法剤がある。一般に、The Merck Manual of Diagnosis and Therapy、15th Ed.1987、1206~1228頁、Berkowら編、Rahway、N.Jを参照。特に好ましいのは、アポトーシスを誘導するような抗腫瘍薬である。

【0091】

本発明はまた、本発明の複数の抗体を含むポリクローナル抗体にも関する。

【0092】

記載したAXL抗体と共に使用するとき、このような抗腫瘍薬は、個別(例えば、5-FUおよび抗体)、連続的(例えば、一定期間の時間5-FUおよび抗体、次にMTXおよび抗体)、または1つまたは複数の他のこのような抗腫瘍薬との組合せで(例えば、5-FU、MTXおよび抗体、または5-FU、放射線治療剤および抗体)使用することができる。

【0093】

用語抗腫瘍薬は、例えば照射または放射線治療として治療手段も含むことができる。

【0094】

本発明の医薬組成物は人間医学において使用することが好ましいが、獣医学用途でも使用することができる。さらに本発明は、過剰増殖性疾患、心臓血管疾患、特にアテローム性動脈硬化症および血栓形成、糖尿病関連疾患、特に糸球体肥大または糖尿病性腎症、および特にAXLの発現、過剰発現または活動亢進と関係がある、それを伴う、またはそれによって引き起こされる障害の診断、予防または治療用の医薬組成物を調製するための、本

発明の抗体、本発明の核酸分子、ベクター、宿主、または本発明の方法によって得た抗体の使用に関する。

【0095】

前述の過剰増殖性疾患は、任意の新生組織形成、すなわち組織の任意の異常および/または制御不能な新たな増殖を含む。本明細書で使用する用語「組織の制御不能な新たな増殖」は、増殖制御の機能不全および/または消失に依存する可能性がある。過剰増殖性疾患は、腫瘍疾患および/または転移性または浸潤性癌などの癌を含む。

【0096】

本発明の使用の好ましい実施形態では、前記過剰増殖性疾患は、特に乳癌、結腸癌、肺癌、腎臓癌、濾胞性リンパ腫、骨髄性白血病、皮膚癌/メラノーマ、グリア芽腫、卵巣癌、前立腺癌、膵臓癌、バレット食道および食道癌、胃癌、膀胱癌、子宮頸癌、肝臓癌、甲状腺癌、および頭頸部癌などの癌、または過形成および腫瘍性疾患、または他のAXL発現もしくは過剰発現過剰増殖性疾患である。

【0097】

さらに別の実施形態では、本発明は、前述の障害の1つの治療用の抗腫瘍薬と同時投与するための医薬品を製造するための、本発明のヒト化抗AXL抗体の使用を言及する。

【0098】

さらなる好ましい実施形態によれば、本発明は、薬剤耐性癌の治療用の医薬組成物を製造するための、本発明のヒト化抗AXL抗体の使用を対象とする。

【0099】

さらに本発明は、本発明の抗体、本発明の核酸分子、ベクター、宿主、または本発明の方法によって得た抗体、および場合によっては薬剤として許容される担体を含む診断用組成物に関する。

【0100】

本発明の診断用組成物は、サンプルを本発明の抗体と接触させるステップ、およびサンプル中のAXLの存在を検出するステップを含む、異なる細胞、組織または別の適切なサンプル中の哺乳動物AXLの望ましくない発現、過剰発現または活動亢進の検出において有用である。したがって、本発明の診断用組成物は、過剰増殖性疾患の発症または疾患状態を評価するために使用することができる。

【0101】

さらに、AXLを発現する癌細胞などの悪性細胞を、本発明の抗体を用いて標的化することができる。したがって、本発明の抗体と結合した細胞は、補体系などの免疫系機能または細胞媒介性細胞障害によって攻撃され、それによって癌細胞の数を減らすまたは癌細胞を撲滅する可能性がある。これらの考慮事項は、転移および再発腫瘍の治療にも同様に当てはまる。

【0102】

本発明の別の態様では、本発明の抗体を標識基と結合させる。すでに上述したように、このような抗体は診断用途に特に適している。本明細書で使用する用語「標識基」は、検出可能なマーカー、例えば顕著なアビジンによって検出することができる放射標識アミノ酸またはビオチニル部分を指す。抗体などのポリペプチドおよび糖タンパク質を標識するための様々な方法は当技術分野で知られており、本発明を実施する際に使用することができる。適切な標識基の例には、以下の：放射性同位体または放射性核種(例えば ^3H 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I)、蛍光基(例えばFITC、ローダミン、ランタニドリン光体)、酵素基(例えばホースラディッシュペルオキシダーゼ、 α -ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ)、化学発光基、ビオチニル基、または二次レポーターによって認識される所定のポリペプチドエピトープ(例えば、ロイシンジッパー対配列、二次抗体の結合部位、金属結合ドメイン、エピトープタグ)があるが、それらに限定されない。

【0103】

特定の態様では、標識基を様々な長さのスペーサーアームによって結合させて、考えら

10

20

30

40

50

れる立体障害を減らすことが望ましい可能性がある。

【0104】

別の実施形態では、本発明は、AXL発現細胞の存在を評価する方法であって、本発明の抗体とそれらの/その表面上にAXLを有する疑いがある細胞または組織を接触させるステップを含む方法に関する。サンプル中のAXL発現を検出するのに適した方法は、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)または免疫組織化学法(IHC)であってよい。

【0105】

ELISAアッセイはマイクロタイタープレート形式で実施することができ、この場合、例えばマイクロタイタープレートのウェルはAXL抗体と吸着する。ウェルを洗い流し、乳タンパク質またはアルブミンなどのブロッキング剤で処理して、検体の非特異的吸着を妨げる。その後ウェルを試験サンプルで処理する。試験サンプルまたは標準を洗い流した後、例えばビオチンとの結合によって標識した二次AXL抗体でウェルを処理する。過剰な二次抗体を洗浄除去した後、例えばアビジン結合ホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)および適切な発色性基質を用いて標識を検出する。試験サンプル中のAXL抗原の濃度は、標準サンプルから開発した標準曲線との比較によって決定する。

【0106】

IHC用に、パラフィン包埋組織を使用することができ、この場合、組織は例えばキシレン中で最初に脱パラフィン処理し、次いで例えばエタノールで脱水し、蒸留水で洗い流す。ホルマリン固定およびパラフィン包埋によってマスキングした抗原性エピトープは、エピトープアンマスキング、酵素消化またはサポニンによって露出させることが可能である。エピトープアンマスキングのために、パラフィン切片を、スチーマー、水浴または電子レンジ中で20~40分間、例えば2NのHCl溶液(pH1.0)などのエピトープ回収溶液中で加熱することができる。酵素消化の場合、組織切片は例えばプロテイナーゼK、トリプシン、プロナーゼ、ペプシンなどの異なる酵素溶液中において37℃で10~30分間インキュベートすることができる。エピトープ回収溶液または過剰な酵素を洗い流した後、組織切片をブロッキングバッファーで処理して非特異的相互作用を予防する。一次AXL抗体は適切な濃度で加える。過剰な一次抗体を洗い流し、室温において10分間ペルオキシダーゼブロッキング溶液中で切片をインキュベートする。別の洗浄ステップ後、例えば酵素のアンカーとして働くことができる基で標識した二次標識抗体と共に、組織切片をインキュベートする。したがって例は、ストレプトアビジン結合ホースラディッシュペルオキシダーゼによって認識されるビオチン標識二次抗体である。抗体/酵素複合体の検出は、適切な発色性基質とのインキュベートによって実施する。

【0107】

他の実施形態では、本発明は、AXL機能を阻害する方法であって、抗体がAXL機能を阻害することができる条件下で、本発明の抗体とそれらの/その表面上にAXLを有する疑いがある細胞または組織を接触させるステップを含む方法に関する。接触はin vitroまたはin vivoであってよい。

【0108】

本発明はさらに、過剰増殖性疾患、心臓血管疾患、特にアテローム性動脈硬化症および血栓形成、糖尿病関連疾患、特に糸球体肥大または糖尿病性腎症を治療する方法であって、適切な用量の本発明の抗体、その抗体断片または派生物をそれを必要とする患者に投与するステップを含む方法に関する。過剰増殖性疾患は、AXLの発現、過剰発現または活動亢進と関係がある、それを伴う、またはそれによって引き起こされる障害、例えば乳癌、結腸癌、肺癌、腎臓癌、濾胞性リンパ腫、骨髄性白血病、皮膚癌/メラノーマ、グリア芽腫、卵巣癌、前立腺癌、膵臓癌、バレット食道および食道癌、胃癌、膀胱癌、子宮頸癌、肝臓癌、甲状腺癌、および頭頸部癌などの癌、または過形成および腫瘍性疾患、または他のAXL発現もしくは過剰発現過剰増殖性疾患から選択されることが好ましい。

【0109】

本発明の別の好ましい実施形態によれば、治療する癌は薬剤耐性癌であり、好ましくは上記の癌の群から選択される癌である。

【 0 1 1 0 】

本発明はさらに、疾患を治療する方法であって、本発明の抗体を哺乳動物に投与し、前記疾患がAXLの発現または活性の異常なレベルと直接的または間接的に関係がある方法に関する。

【 0 1 1 1 】

最後に本発明は、抗AXL抗体、好ましくは本発明の抗体、その抗体断片または派生物、前記構成要素をコードする核酸分子および/または本発明のベクターを含むキットに関する。

【 0 1 1 2 】

本明細書に開示する化合物を含む全ての実施形態は、医薬品を調製するために単一化合物または組合せとして使用することができる。

【図面の簡単な説明】

【 0 1 1 3 】

【図 1】h#11B7-T1L～h#11B7-T7Lと称する、ラット抗ヒトAXLモノクローナル抗体#11B7の軽鎖のヒト化可変領域のアミノ酸配列を説明する図である。

【図 2】h#11B7-T8L～h#11B7-T14Lと称する、ラット抗ヒトAXLモノクローナル抗体#11B7の軽鎖のヒト化可変領域のアミノ酸配列を説明する図である。

【図 3】h#11B7-T15L～h#11B7-T20Lと称する、ラット抗ヒトAXLモノクローナル抗体#11B7の軽鎖のヒト化可変領域のアミノ酸配列を説明する図である。

【図 4】h#11B7-T1H～h#11B7-T6Hと称する、ラット抗ヒトAXLモノクローナル抗体#11B7の重鎖のヒト化可変領域のアミノ酸配列を説明する図である。

【図 5】h#11B7-T7H～h#11B7-T12Hと称する、ラット抗ヒトAXLモノクローナル抗体#11B7の重鎖のヒト化可変領域のアミノ酸配列を説明する図である。

【図 6】h#11D5-T1L～h#11D5-T7Lと称する、ラット抗ヒトAXLモノクローナル抗体#11D5の軽鎖のヒト化可変領域のアミノ酸配列を説明する図である。

【図 7】h#11D5-T8L～h#11D5-T14Lと称する、ラット抗ヒトAXLモノクローナル抗体#11D5の軽鎖のヒト化可変領域のアミノ酸配列を説明する図である。

【図 8】h#11D5-T15L～h#11D5-T21Lと称する、ラット抗ヒトAXLモノクローナル抗体#11D5の軽鎖のヒト化可変領域のアミノ酸配列を説明する図である。

【図 9】h#11D5-T22L～h#11D5-T28Lと称する、ラット抗ヒトAXLモノクローナル抗体#11D5の軽鎖のヒト化可変領域のアミノ酸配列を説明する図である。

【図 10】h#11D5-T29L～h#11D5-T35Lと称する、ラット抗ヒトAXLモノクローナル抗体#11D5の軽鎖のヒト化可変領域のアミノ酸配列を説明する図である。

【図 11】h#11D5-T36Lおよびh#11D5-T37Lと称する、ラット抗ヒトAXLモノクローナル抗体#11D5の軽鎖のヒト化可変領域のアミノ酸配列を説明する図である。

【図 12】h#11D5-T1H～h#11D5-T7Hと称する、ラット抗ヒトAXLモノクローナル抗体#11D5の重鎖のヒト化可変領域のアミノ酸配列を説明する図である。

【図 13】h#11D5-T8H～h#11D5-T13Hと称する、ラット抗ヒトAXLモノクローナル抗体#11D5の重鎖のヒト化可変領域のアミノ酸配列を説明する図である。

【図 14 - 1】プライマーEFF1およびEfsmRのヌクレオチド配列、ヒトkappa鎖の分泌シグナル配列および定常領域ならびにポリ(A)付加シグナル配列を含む断片B、ヒトIgG1シグナル配列および定常ドメインを含むポリペプチドをコードするDMA断片、ならびにリーダー配列、ならびにラット抗ヒトAxIモノクローナル抗体11B7および11D5のCDRのアミノ酸配列、キメラ#11B7抗体の重鎖および軽鎖(IgG1/kappa)、キメラ#11D5抗体の重鎖および軽鎖(IgG1/kappa)、ならびにリーダー配列を説明する図である。

【図 14 - 2】プライマーEFF1およびEfsmRのヌクレオチド配列、ヒトkappa鎖の分泌シグナル配列および定常領域ならびにポリ(A)付加シグナル配列を含む断片B、ヒトIgG1シグナル配列および定常ドメインを含むポリペプチドをコードするDMA断片、ならびにリーダー配列、ならびにラット抗ヒトAxIモノクローナル抗体11B7および11D5のCDRのアミノ酸配列、キメラ#11B7抗体の重鎖および軽鎖(IgG1/kappa)、キメラ#11D5抗体の重鎖および軽鎖(I

10

20

30

40

50

gG1/kappa)、ならびにリーダー配列を説明する図である。

【図14-3】プライマー-EFF1およびEfsmRのヌクレオチド配列、ヒトkappa鎖の分泌シグナル配列および定常領域ならびにポリ(A)付加シグナル配列を含む断片B、ヒトIgG1シグナル配列および定常ドメインを含むポリペプチドをコードするDMA断片、ならびにリーダー配列、ならびにラット抗ヒトAxIモノクローナル抗体11B7および11D5のCDRのアミノ酸配列、キメラ#11B7抗体の重鎖および軽鎖(IgG1/kappa)、キメラ#11D5抗体の重鎖および軽鎖(IgG1/kappa)、ならびにリーダー配列を説明する図である。

【図14-4】プライマー-EFF1およびEfsmRのヌクレオチド配列、ヒトkappa鎖の分泌シグナル配列および定常領域ならびにポリ(A)付加シグナル配列を含む断片B、ヒトIgG1シグナル配列および定常ドメインを含むポリペプチドをコードするDMA断片、ならびにリーダー配列、ならびにラット抗ヒトAxIモノクローナル抗体11B7および11D5のCDRのアミノ酸配列、キメラ#11B7抗体の重鎖および軽鎖(IgG1/kappa)、キメラ#11D5抗体の重鎖および軽鎖(IgG1/kappa)、ならびにリーダー配列を説明する図である。

【図15】図15Aは、RatI-Mock線維芽細胞およびRatI-AXL cl.2線維芽細胞における細胞表面AXLのフローサイトメトリー分析を示す図である。それぞれpLXSNおよびpLXSN-hAXL エコトロフィックウイルスによるRatI線維芽細胞の感染によって生成させた、ポリクローナルRatI-MockおよびクローンRatI-AXL cl.2細胞を回収し、3μg/mlのマウス対照抗体72A1(左パネル)またはマウス抗AXL MAB154一次抗体(右パネル)およびPE結合抗マウス二次抗体で染色した。詳細に関しては本文参照。RatI-AXL cl.2細胞の染色は3桁の変化をもたらし、これらの細胞の表面上でのAXLの過剰発現を実証する。図15Bは、NIH3T3-Mock線維芽細胞およびNIH3T3-AXL cl.7線維芽細胞における細胞表面AXLのフローサイトメトリー分析を示す図である。それぞれpLXSNおよびpLXSN-AXLエコトロフィックウイルスによるNIH3T3線維芽細胞の感染によって生成させた、ポリクローナルNIH3T3-MockおよびクローンNIH3T3-AXL cl.7細胞を回収し、3μg/mlのマウス対照抗体72A1(左パネル)またはマウス抗AXL MAB154一次抗体(右パネル)およびPE結合抗マウス二次抗体で染色した。詳細に関しては本文参照。NIH3T3-AXL cl.7細胞の染色は2桁の変化をもたらし、これらの細胞の表面上でのAXLの過剰発現を実証する。

【図16】ヌードマウスにおけるヒト前立腺癌増殖に対するラット抗AXL抗体の影響を調べるための同所性異種移植モデルを示す図である。PC-3-LN前立腺癌細胞を、NMRI^{nu/nu}マウス前立腺内に同所移植した。動物を無作為に4群に分け、25mg/kgのアイソタイプ対照抗体1D5またはアンタゴニストラット抗AXL抗体11B7、ならびに40mg/kgのSutentまたは12.5mg/kgのTaxotereを与えた。治療期間中、同所増殖中のPC-3-LN腫瘍ならびに末梢転移の増殖を第15日、第23日、第29日、および第34日にin vivo生物発光イメージングによって週に一回モニタリングした。詳細に関しては本文参照。アイソタイプ対照抗体1D5と比較して、アンタゴニストラット抗AXL抗体11B7は、ヌードマウス中のPC-3-LN前立腺腫瘍の全体的増殖を低減した。

【図17】ヌードマウスにおけるヒト前立腺癌転移に対するラット抗AXL抗体の影響を調べるための同所性異種移植モデルを示す図である。PC-3-LN前立腺癌細胞を、NMRI^{nu/nu}マウスの前立腺内に同所移植した。動物を無作為に4群に分け、25mg/kgのアイソタイプ対照抗体1D5またはアンタゴニストラット抗AXL抗体11B7、ならびに40mg/kgのSutentまたは12.5mg/kgのTaxotereを与えた。解剖後、選択した器官(肝臓、脾臓、肺、大腿骨、および腰椎の一部)を回収し、生物発光イメージングによって転移の存在に関して分析した。詳細に関しては本文参照。アイソタイプ対照抗体1D5と比較して、本発明のアンタゴニストラット抗AXL抗体11B7は脾臓転移の発生を低減した。特に、この実験中の11B7の抗転移効果はSutentのそれより強かった。

【図18】ベクターpEF6KCLの構成を説明する図である。

【図19】ヒトAXL-Fcコーティングプレートを使用するELISAにより決定される、ラット抗ヒトAXLヒト化抗体h#11B7-T1~h#11B7-T6の結合活性を説明する図である。

【図20】ヒトAXL-Fcコーティングプレートを使用するELISAにより決定される、ラット抗ヒトAXLヒト化抗体h#11B7-T7~h#11B7-T13の結合活性を説明する図である。

10

20

30

40

50

【図 2 1】ヒトAXL-Fcコーティングプレートを使用するELISAにより決定される、ラット抗ヒトAXLヒト化抗体h#11B7-T14～h#11B7-T20の結合活性を説明する図である。

【図 2 2】ヒトAXL-Fcコーティングプレートを使用するELISAにより決定される、ラット抗ヒトAXLヒト化抗体h#11B7-T21～h#11B7-T27の結合活性を説明する図である。

【図 2 3】ヒトAXL-Fcコーティングプレートを使用するELISAにより決定される、ラット抗ヒトAXLヒト化抗体h#11D5-T1～h#11D5-T6の結合活性を説明する図である。

【図 2 4 - 1】(上パネルおよび下パネル):直接的タンパク質吸光度アッセイにより決定される、ラット抗ヒトAXLヒト化抗体h#11B7-T1～h#11B7-T27のタンパク質濃度を説明する図である。

【図 2 4 - 2】(上パネルおよび下パネル):直接的タンパク質吸光度アッセイにより決定される、ラット抗ヒトAXLヒト化抗体h#11B7-T1～h#11B7-T27のタンパク質濃度を説明する図である。

【図 2 5】直接的タンパク質吸光度アッセイにより決定される、ラット抗ヒトAXLヒト化抗体h# 11D5-T1～h# 11D5-T6のタンパク質濃度を説明する図である。

【図 2 6】ラット抗ヒトAXLモノクローナル抗体#11B7が結合する、ヒトAXL抗原上ドメインの決定を説明する図である。

【図 2 7】AxI受容体リン酸化に対するヒト化11B7抗AxI抗体の影響を調べるためのELISA実験を示す図である。Hs578T乳癌細胞(上)およびNCI-H292肺癌細胞(下)を飢餓状態にし、10 μg/mlのGammagard対照抗体、キメラ抗AxI mAb chm11B7 (IgG1/kappa)、ならびに本発明のヒト化抗AxI抗体h#11B7-T2、h#11B7-T3、h#11B7-T4、h#11B7-T5、およびh#11B7-T6 (T2～T6)と共にプレインキュベートし、次いで、400ng/mlのmGas6を伴うかまたは伴わずに、処理し、溶解させた。溶解物を抗ホスホチロシン抗体4G10コーティングMaxi-Sorp 96ウェルプレートに移し、次いでそれを洗浄し、0.125 μg/mlのビオチニル化ラット抗AxI抗体12B7、APコンジュゲートストレプトアビジン、およびAttoPhos基質溶液と共にインキュベートして、蛍光強度を捕集した。詳細に関しては本文参照。対応する非刺激細胞に対してGas6刺激細胞において低下するAxIチロシンのリン酸化レベルによって示されるように、キメラ抗AxI抗体chm11B7、ならびに本発明のヒト化抗AxI抗体h#11B7-T2、h#11B7-T3、h#11B7-T4、h#11B7-T5、およびh#11B7-T6は、Gammagard対照抗体と比較して、いずれの細胞系におけるGas6介在性AxI活性化も妨害または著明に低減することができた。

【図 2 8 - 1】図 2 8 A は、ERK1/2リン酸化に対するヒト化11B7抗AxI抗体の影響を調べるためのウェスタンブロット実験を示す図である。Hs578T乳癌細胞(上)およびNCI-H292肺癌細胞(下)を飢餓状態にし、10 μg/mlのGammagard対照抗体、キメラ抗AxI mAb chm11B7 (IgG1/kappa)、ならびに本発明のヒト化抗AxI抗体h#11B7-T2、h#11B7-T3、h#11B7-T4、h#11B7-T5、およびh#11B7-T6と共にプレインキュベートし、次いで、400ng/mlのmGas6を伴うかまたは伴わずに、処理し、溶解させた。SDS-PAGEにより全細胞溶解物を分離し、抗ホスホp44/42 MAPキナーゼ(Thr202/Tyr204)抗体を使用するウェスタンブロット法により分析した。その後、同じフィルターを、抗p44/42 MAPキナーゼ抗体により再プローブした。詳細に関しては本文参照。キメラ抗AxI抗体chm11B7、ならびに本発明のヒト化抗AxI抗体h#11B7-T2、h#11B7-T3、h#11B7-T4、h#11B7-T5、およびh#11B7-T6は、Gammagard対照抗体と比較して、Hs578T乳癌細胞における弱いGas6誘導性ERK1/2活性化の上昇を妨げた。しかし、この細胞系におけるベースのERK1/2活性化が高度であるため、対応する非刺激細胞に対してGas6刺激細胞において低下するERK1/2 Thr202/Tyr204のリン酸化レベルにより示されるこれらの効果は、比較的低度に過ぎないと考えられる。これに対して、NCI-H292肺癌細胞では、ERK1/2 Thr202/Tyr204リン酸化に対するキメラ抗AxI抗体chm11B7、ならびにヒト化抗AxI抗体h#11B7-T2、h#11B7-T3、h#11B7-T4、h#11B7-T5、またはh#11B7-T6の阻害効果が、はるかに明確に反映されている。図 2 8 B は、AKTリン酸化に対するヒト化11B7抗AxI抗体の影響を調べるためのウェスタンブロット実験を示す図である。Hs578T乳癌細胞(上)およびNCI-H292肺癌細胞(下)を飢餓状態にし、10 μg/mlのGammagard対照抗体、キメラ抗AxI mAb chm11B7 (IgG1/kappa)、または本発明のヒト化抗AxI抗体h#11B7-T2、h#11B7-T3、h#11B7-T4、h#11B7-T5、およびh#11B7-T6と共にプレインキュベートし、次いで、400n

10

20

30

40

50

g/mlのmGas6を伴うかまたは伴わずに、処理し、溶解させた。SDS-PAGEにより全細胞溶解物を分離し、抗AKT1/2/3抗体を使用するウェスタンブロット法により分析した。その後、同じフィルターを、抗ホスホAKT (Ser473)抗体により再プローブした。詳細に関しては本文参照。対応する非刺激細胞に対してGas6刺激細胞において低下するAKT Ser473のリン酸化レベルによって示されるように、キメラ抗AxI抗体chm11B7、ならびに本発明のヒト化抗AxI抗体h#11B7-T2、h#11B7-T3、h#11B7-T4、h#11B7-T5、およびh#11B7-T6は、Gammagard対照抗体と比較して、Hs578T乳癌細胞(上)およびNCI-H292肺癌細胞(下)におけるGas6誘導性AKT活性化を著明に低減することができた。

【図28-2】図28Cは、GSK-3 リン酸化に対するヒト化11B7抗AxI抗体の影響を調べるためのウェスタンブロット実験を示す図である。Hs578T乳癌細胞(上)およびNCI-H292肺癌細胞(下)を飢餓状態にし、10 µg/mlのGammagard対照抗体、キメラ抗AxI mAb chm11B7 (IgG1/kappa)、または本発明のヒト化抗AxI抗体h#11B7-T2、h#11B7-T3、h#11B7-T4、h#11B7-T5、およびh#11B7-T6と共にブレインキュベートし、次いで、400ng/mlのmGas6を伴うかまたは伴わずに、処理し、溶解させた。SDS-PAGEにより全細胞溶解物を分離し、抗ホスホGSK-3 (Ser9)抗体を使用するウェスタンブロット法により分析した。その後、同じフィルターを、抗GSK-3 抗体により再プローブした。詳細に関しては本文参照。対応する非刺激細胞に対してGas6刺激細胞において低下するGSK-3 Ser9のリン酸化レベルによって示されるように、キメラ抗AxI抗体chm11B7、ならびに本発明のヒト化抗AxI抗体h#11B7-T2、h#11B7-T3、h#11B7-T4、h#11B7-T5、およびh#11B7-T6は、Gammagard対照抗体と比較して、Hs578T乳癌細胞(上)およびNCI-H292肺癌細胞(下)におけるGas6誘導性GSK-3 活性化を著明に低減することができた。図28Dは、TCS2リン酸化に対するヒト化11B7抗AxI抗体の影響を調べるためのウェスタンブロット実験を示す図である。Hs578T乳癌細胞(上)およびNCI-H292肺癌細胞(下)を飢餓状態にし、10 µg/mlのGammagard対照抗体、キメラ抗AxI mAb chm11B7 (IgG1/kappa)、または本発明のヒト化抗AxI抗体h#11B7-T2、h#11B7-T3、h#11B7-T4、h#11B7-T5、およびh#11B7-T6と共にブレインキュベートし、次いで、400ng/mlのmGas6を伴うかまたは伴わずに、処理し、溶解させた。SDS-PAGEにより全細胞溶解物を分離し、抗TCS2抗体を使用するウェスタンブロット法により分析した。その後、同じフィルターを、抗ホスホTCS2 (Thr1462)により再プローブした。詳細に関しては本文参照。対応する非刺激細胞に対してGas6刺激細胞において低下するこのアミノ酸残基のリン酸化レベルによって示されるように、キメラ抗AxI抗体chm11B7、ならびに本発明のヒト化抗AxI抗体h#11B7-T2、h#11B7-T3、h#11B7-T4、h#11B7-T5、およびh#11B7-T6は、Gammagard対照抗体と比較して、Hs578T乳癌細胞(上)およびNCI-H292肺癌細胞(下)におけるGas6誘導性TCS2リン酸化を著明に低減することができた。

【図28-3】図28Eは、mTORリン酸化に対するヒト化11B7抗AxI抗体の影響を調べるためのウェスタンブロット実験を示す図である。Hs578T乳癌細胞(上)およびNCI-H292肺癌細胞(下)を飢餓状態にし、10 µg/mlのGammagard対照抗体、キメラ抗AxI mAb chm11B7 (IgG1/kappa)、または本発明のヒト化抗AxI抗体h#11B7-T2、h#11B7-T3、h#11B7-T4、h#11B7-T5、およびh#11B7-T6と共にブレインキュベートし、次いで、400ng/mlのmGas6を伴うかまたは伴わずに、処理し、溶解させた。SDS-PAGEにより全細胞溶解物を分離し、抗ホスホmTOR (Ser2448)抗体を使用するウェスタンブロット法により分析した。その後、同じフィルターを、抗mTOR抗体により再プローブした。詳細に関しては本文参照。Hs578T乳癌細胞における抗AxI抗体の阻害効果は比較的弱かった(上)。しかし、対応する非刺激細胞に対してGas6刺激細胞において低下するmTOR Ser2448のリン酸化レベルによって示されるように、キメラ抗AxI抗体chm11B7、ならびに本発明のヒト化抗AxI抗体h#11B7-T2、h#11B7-T3、h#11B7-T4、h#11B7-T5、およびh#11B7-T6は、Gammagard対照抗体と比較して、NCI-H292肺癌細胞におけるGas6誘導性mTOR活性化を妨げることができた(下)。図28Fは、S6K1リン酸化に対するヒト化11B7抗AxI抗体の影響を調べるためのウェスタンブロット実験を示す図である。Hs578T乳癌細胞(上)およびNCI-H292肺癌細胞(下)を飢餓状態にし、10 µg/mlのGammagard対照抗体、キメラ抗AxI mAb chm11B7 (IgG1/kappa)、または本発明のヒト化抗AxI抗体h#11B7-T2、h#11B7-T3、h#11B7-T4、h#11B7-T5、およびh#11B7-T6と共にブレイ

10

20

30

40

50

ンキュベートし、次いで、400ng/mlのmGas6を伴うかまたは伴わずに、処理し、溶解させた。SDS-PAGEにより全細胞溶解物を分離し、抗ホスホp70 S6キナーゼ1 (Thr421/Ser424) 抗体を使用するウェスタンブロット法により分析した。その後、同じフィルターを、抗-Aクチン抗体により再プロブした。詳細に関しては本文参照。対応する非刺激細胞に対してGas6刺激細胞において低下するS6K1 Thr421/Ser424のリン酸化レベルによって示されるように、キメラ抗AxI抗体chm11B7、ならびに本発明のヒト化抗AxI抗体h#11B7-T2、h#11B7-T3、h#11B7-T4、h#11B7-T5、およびh#11B7-T6は、Gammagard対照抗体と比較して、Hs578T乳癌細胞におけるGas6誘導性S6K1活性化に対してある阻害効果を示した(上)。しかし、NCI-H292肺癌細胞では、キメラ抗AxI抗体chm11B7、ならびに本発明のヒト化抗AxI抗体h#11B7-T2、h#11B7-T3、h#11B7-T4、h#11B7-T5、またはh#11B7-T6で前処理すると、S6K1 Thr421/Ser424のGas6誘導性リン酸化がより強力に低減され、したがって、S6K1 Thr421/Ser424のGas6誘導性活性化がより強力に低減されることを観察できた(下)。

【図29】AxI受容体リン酸化に対するヒト化11D5抗AxI抗体の影響を調べるためのELISA実験を示す図である。Hs578T乳癌細胞を飢餓状態にし、10 µg/mlのGammagard対照抗体、キメラ抗AxI mAb chm11D5 (IgG1/kappa)、ならびに本発明のヒト化抗AxI抗体h#11D5-T2、h#11D5-T3、h#11D5-T4、h#11D5-T5、およびh#11D5-T6と共にプレインキュベートし、次いで、400ng/mlのmGas6を伴うかまたは伴わずに、処理し、溶解させた。溶解物を抗ホスホチロシン抗体4G10コーティングMaxi-Sorp 96ウエルプレートに移し、次いでそれを洗浄し、0.125 µg/mlのピオチニル化ラット抗AxI抗体12B7、APコンジュゲートストレプトアビジン、およびAttoPhos基質溶液と共にインキュベートして、蛍光強度を捕集した。詳細に関しては本文参照。対応する非刺激細胞に対してGas6刺激細胞において低下するAxIチロシンのリン酸化レベルにより示されるように、キメラ抗AxI抗体chm11D5ならびに本発明のヒト化抗AxI抗体h#11D5-T2、h#11D5-T3、h#11D5-T4、h#11D5-T5、およびh#11D5-T6は、Gammagard対照抗体と比較して、Gas6介在性AxI活性化を阻害または著明に低減することができた。

【図30】図30Aは、NCBIタンパク質データベースの受託番号第P_30530号である、ヒトAxIのアミノ酸配列を示す図である。図30Bは、ラット抗ヒトAxIモノクローナル抗体11B7の軽鎖可変領域のアミノ酸配列を示す図である。図30Cは、ラット抗ヒトAxIモノクローナル抗体11B7の重鎖可変領域のアミノ酸配列を示す図である。図30Dは、ラット抗ヒトAxIモノクローナル抗体11D5の軽鎖可変領域のアミノ酸配列を示す図である。図30Eは、ラット抗ヒトAxIモノクローナル抗体11D5の重鎖可変領域のアミノ酸配列を示す図である。

【図31】AxIリン酸化に対するラットおよびキメラ抗AXL抗体の影響を比較するためのELISA実験の図である。CaSki子宮頸癌細胞を餓死させ、50ng/ml、100ng/ml、300ng/ml、750ng/ml、1 µg/ml、および10 µg/mlのラット抗AxI抗体11B7(A)またはキメラ抗AxI抗体ch11B7(B)とプレインキュベートし、400ng/mlのmGas6有りまたはなしで処理し、溶解させた。溶解物を抗ホスホチロシン抗体4G10コーティングMaxi-Sorp 96ウエルプレートに移した。その後、プレート洗浄し、0.5 µg/mlのピオチニル化ラット抗AxI抗体12B7、APコンジュゲートストレプトアビジン、およびAttoPhos基質溶液と共にインキュベートして、蛍光強度を捕集した。詳細に関しては本文参照。子宮頸癌細胞系CaSkiにおける相対的なAxIリン酸化の濃度依存的低減によって実証されるように、本発明のラット抗AxI抗体11B7 (A) および本発明のキメラ抗AxI抗体ch11B7 (B) は、受容体チロシンキナーゼAxIのリガンド介在性活性化を同程度に阻害することができた。

【図32-1】図32Aは、それぞれ、h#11B7-T15Lおよびh#11B7-T18Lと称する、ラット抗ヒトAXLモノクローナル抗体#11B7軽鎖のヒト化可変領域のアミノ酸配列を説明する図である。

【図32-2】図32Bは、それぞれ、h#11B7-T11Hおよびh#11B7-T12Hと称する、ラット抗ヒトAXLモノクローナル抗体#11B7重鎖のヒト化可変領域のアミノ酸配列を説明する図である。

【図33】ヒトAXL-Fcコーティングプレート(ELISA)を使用するELISAにより決定した、ラ

10

20

30

40

50

ット抗ヒトAXLヒト化抗体h#11B7-T28～h#11B7-T31の結合活性を説明する図である。

【図3 4】HPLCアッセイにより決定した、ラット抗ヒトAXLヒト化抗体h#11B7-T28～h#11B7-T31のタンパク質濃度を説明する図である(実施例24参照)。

【図3 5 - 1】示差走査熱量測定(DSC)によりなされる、ラット抗ヒトAXLヒト化抗体h#11B7-T1のT_mの決定を説明する図である。

【図3 5 - 2】示差走査熱量測定(DSC)によりなされる、ラット抗ヒトAXLヒト化抗体h#11B7-T2のT_mの決定を説明する図である。

【図3 5 - 3】示差走査熱量測定(DSC)によりなされる、ラット抗ヒトAXLヒト化抗体h#11B7-T3のT_mの決定を説明する図である。

【図3 5 - 4】示差走査熱量測定(DSC)によりなされる、ラット抗ヒトAXLヒト化抗体h#11B7-T4のT_mの決定を説明する図である。

10

【図3 5 - 5】示差走査熱量測定(DSC)によりなされる、ラット抗ヒトAXLヒト化抗体h#11B7-T5のT_mの決定を説明する図である。

【図3 5 - 6】示差走査熱量測定(DSC)によりなされる、ラット抗ヒトAXLヒト化抗体h#11B7-T6のT_mの決定を説明する図である。

【図3 5 - 7】示差走査熱量測定(DSC)によりなされる、ラット抗ヒトAXLヒト化抗体h#11B7-T7のT_mの決定を説明する図である。

【図3 5 - 8】示差走査熱量測定(DSC)によりなされる、ラット抗ヒトAXLヒト化抗体h#11B7-T8のT_mの決定を説明する図である。

【図3 5 - 9】示差走査熱量測定(DSC)によりなされる、ラット抗ヒトAXLヒト化抗体h#11B7-T9のT_mの決定を説明する図である。

20

【図3 5 - 10】示差走査熱量測定(DSC)によりなされる、ラット抗ヒトAXLヒト化抗体h#11B7-T10のT_mの決定を説明する図である。

【図3 5 - 11】示差走査熱量測定(DSC)によりなされる、ラット抗ヒトAXLヒト化抗体h#11B7-T11のT_mの決定を説明する図である。

【図3 5 - 12】示差走査熱量測定(DSC)によりなされる、ラット抗ヒトAXLヒト化抗体h#11B7-T12のT_mの決定を説明する図である。

【図3 5 - 13】示差走査熱量測定(DSC)によりなされる、ラット抗ヒトAXLヒト化抗体h#11B7-T13のT_mの決定を説明する図である。

【図3 5 - 14】示差走査熱量測定(DSC)によりなされる、ラット抗ヒトAXLヒト化抗体h#11B7-T14のT_mの決定を説明する図である。

30

【図3 5 - 15】示差走査熱量測定(DSC)によりなされる、ラット抗ヒトAXLヒト化抗体h#11B7-T15のT_mの決定を説明する図である。

【図3 5 - 16】示差走査熱量測定(DSC)によりなされる、ラット抗ヒトAXLヒト化抗体h#11B7-T16のT_mの決定を説明する図である。

【図3 5 - 17】示差走査熱量測定(DSC)によりなされる、ラット抗ヒトAXLヒト化抗体h#11B7-T17のT_mの決定を説明する図である。

【図3 5 - 18】示差走査熱量測定(DSC)によりなされる、ラット抗ヒトAXLヒト化抗体h#11B7-T18のT_mの決定を説明する図である。

【図3 5 - 19】示差走査熱量測定(DSC)によりなされる、ラット抗ヒトAXLヒト化抗体h#11B7-T19のT_mの決定を説明する図である。

40

【図3 5 - 20】示差走査熱量測定(DSC)によりなされる、ラット抗ヒトAXLヒト化抗体h#11B7-T20のT_mの決定を説明する図である。

【図3 5 - 21】示差走査熱量測定(DSC)によりなされる、ラット抗ヒトAXLヒト化抗体h#11B7-T21のT_mの決定を説明する図である。

【図3 5 - 22】示差走査熱量測定(DSC)によりなされる、ラット抗ヒトAXLヒト化抗体h#11B7-T22のT_mの決定を説明する図である。

【図3 5 - 23】示差走査熱量測定(DSC)によりなされる、ラット抗ヒトAXLヒト化抗体h#11B7-T23のT_mの決定を説明する図である。

【図3 5 - 24】示差走査熱量測定(DSC)によりなされる、ラット抗ヒトAXLヒト化抗体h#

50

11B7-T24のT_mの決定を説明する図である。

【図35-25】示差走査熱量測定(DSC)によりなされる、ラット抗ヒトAXLヒト化抗体h#11B7-T25のT_mの決定を説明する図である。

【図35-26】示差走査熱量測定(DSC)によりなされる、ラット抗ヒトAXLヒト化抗体h#11B7-T26のT_mの決定を説明する図である。

【図35-27】示差走査熱量測定(DSC)によりなされる、ラット抗ヒトAXLヒト化抗体h#11B7-T27のT_mの決定を説明する図である。

【図35-28】示差走査熱量測定(DSC)によりなされる、ラット抗ヒトAXLヒト化抗体h#11B7-T28のT_mの決定を説明する図である。

【図35-29】示差走査熱量測定(DSC)によりなされる、ラット抗ヒトAXLヒト化抗体h#11B7-T29のT_mの決定を説明する図である。

10

【図35-30】示差走査熱量測定(DSC)によりなされる、ラット抗ヒトAXLヒト化抗体h#11B7-T30のT_mの決定を説明する図である。

【図35-31】示差走査熱量測定(DSC)によりなされる、ラット抗ヒトAXLヒト化抗体h#11B7-T31のT_mの決定を説明する図である。

【図35-32】示差走査熱量測定(DSC)によりなされる、ラット抗ヒトAXLキメラh#11B7抗体のT_mの決定を説明する図である。

【図36】AXL受容体リン酸化に対するヒト化11B7抗AXL抗体の影響を調べるためのELISA実験の図である。Hs578T乳癌細胞(上)およびNCI-H292肺癌細胞(下)を餓死させ、抗体なしでまたは10 µg/mlのGammagard対照抗体ならびに本発明のヒト化抗AXL抗体11B7-T5、11B7-T6、11B7-T11、11B7-T23および11B7-T25とプレインキュベートし、400ng/mlのmGas6有りまたはなしで処理し、溶解した。溶解物は抗ホスホチロシン抗体4G10コーティングMaxi-Sorp96ウエルプレートに移し、次いでそれを洗浄し、0.125 µg/mlのビオチニル化ラット抗AXL抗体12B7、AP結合ストレプトアビジンおよびAttoPhos基質溶液と共にインキュベートして、蛍光強度を回収した。詳細に関しては本文参照。対応する非刺激細胞に対してGas6刺激細胞において低下するAxlのチロシンのリン酸化レベルによって示されるように、本発明のヒト化抗Axl抗体11B7-T5、11B7-T6、11B7-T11、11B7-T23、および11B7-T25は、いずれの細胞系においても、Gammagard対照抗体と比較してGas6介在性Axl活性化を著明に低減した。

20

【図37】Akt-キナーゼリン酸化に対するヒト化11B7抗AXL抗体の影響を調べるためのELISA実験の図である。Hs578T乳癌細胞(上)およびNCI-H292肺癌細胞(下)を餓死させ、抗体なしでまたは10 µg/mlのGammagard対照抗体ならびに本発明のヒト化抗AXL抗体11B7-T5、11B7-T6、11B7-T11、11B7-T23および11B7-T25とプレインキュベートし、400ng/mlのmGas6有りまたはなしで処理し、ホルムアルデヒドで固定した。細胞を洗浄し、急冷し、抗ホスホ-Akt (Ser473)一次抗体、HRP結合抗ウサギ二次抗体およびテトラメチルベンジジン溶液と共にインキュベートして、吸光強度を測定した。詳細に関しては本文参照。対応する非刺激細胞に対してGas6刺激細胞において低下するAkt (Ser473)のリン酸化レベルによって示されるように、本発明のヒト化抗Axl抗体11B7-T5、11B7-T6、11B7-T11、11B7-T23、および11B7-T25は、いずれの細胞系においても、Gammagard対照抗体と比較してGas6介在性Aktキナーゼ活性化を阻害または低減することができた。

30

40

【図38】Axl受容体リン酸化に対するヒト化11B7抗Axl抗体の影響を調べるためのFACS分析を示す図である。Hs578T乳癌細胞を飢餓状態にし、表示の時間にわたり、抗体なしで、または10 µg/mlのGammagard対照抗体、ならびに本発明のヒト化抗Axl抗体11B7-T5、11B7-T6、11B7-T11、11B7-T23、および11B7-T25と共にインキュベートし、ホルムアルデヒドで固定した。細胞をラット抗Axl mAb 2A1一次抗体およびPE結合ロバ抗ラットIgG二次抗体で染色し、FACS分析にかけた。詳細に関しては本文参照。Hs578乳癌細胞を、ヒト化抗Axl抗体11B7-T5、11B7-T6、11B7-T11、11B7-T23、および11B7-T25で処理すると、Gammagard対照抗体とは対照的に、Axl受容体の内部化がもたらされた。各処理時間について、未処理サンプルと比べた抗Axl mAb処理サンプルの平均蛍光強度として定義される、%による相対Axl発現レベルを示す。

50

【図39-1】図39Aは、Gas6誘導性内皮細胞発芽に対するヒト化11B7抗AXL抗体の影響を調べるためのスフェロイドベースの細胞による血管新生アッセイの図である。VEGF-Aで前処理したHUVEC球状系細胞を3Dコラーゲンゲル中に包埋し、1 μ g/mlのヒトGas6で刺激し、示した濃度のGammagard対照抗体ならびに本発明のヒト化抗AXL抗体11B7-T5、11B7-T6、11B7-T11、11B7-T23および11B7-T25で24時間処理した。データ点あたり10個のランダムに選択した球状系細胞の累積発芽長の平均 \pm SEMを分析し(左図)、抗体による相対的阻害を決定した(右図)。IC₅₀曲線およびIC₅₀値の計算値の適合はGraphPadPrism4.03で実施した。詳細に関しては本文参照。

【図39-2】図39Bは、Gas6誘導性内皮細胞発芽に対するヒト化11B7抗AXL抗体の影響を調べるためのスフェロイドベースの細胞による血管新生アッセイの図である。VEGF-Aで前処理したHUVEC球状系細胞を3Dコラーゲンゲル中に包埋し、1 μ g/mlのヒトGas6で刺激し、示した濃度のGammagard対照抗体ならびに本発明のヒト化抗AXL抗体11B7-T5、11B7-T6、11B7-T11、11B7-T23および11B7-T25で24時間処理した。データ点あたり10個のランダムに選択した球状系細胞の累積発芽長の平均 \pm SEMを分析し(左図)、抗体による相対的阻害を決定した(右図)。IC₅₀曲線およびIC₅₀値の計算値の適合はGraphPadPrism4.03で実施した。詳細に関しては本文参照。

【実施例】

【0114】

(実施例1)

免疫原としてのAXL過剰発現Rat 1線維芽細胞の生成

全米バイオテクノロジー情報センター(NCBI)参照配列(NM_021913)に従うヒト受容体チロシンキナーゼAXL転写産物変異体1の完全長コード配列を、制限エンドヌクレアーゼEcoRIおよびSamHIの隣接認識エレメントを介してpLXSNにサブクローニングし、それによってレトロウイルス発現ベクターpLXSN-hAXLを生成した。

【0115】

ヒト受容体チロシンキナーゼAXLと特異的に結合する抗体を生成するために、ヒトAXLを安定的に過剰発現するRat 1線維芽細胞をレトロウイルス遺伝子導入によって生成した。簡潔には、3 \times 10⁵個のPhoenix-E細胞を60mmの培養皿に接種し、リン酸カルシウム法を使用して2 μ g/mlのpLXSNベクターまたはpLXSN-hAXLでトランスフェクトした。24時間後、培地を新たな培地に交換し、その中でPhoenix-E細胞を4時間インキュベートした。pLXSNまたはpLXSN-hAXLエコトロフィックウイルスを放出するPhoenix-E細胞の上清を採取し、Polybrene(4mg/ml;Aldrich)の存在下での3時間のサブコンフルエントRat 1細胞(6cm皿当たり2 \times 10⁵個の細胞)のインキュベーション用に使用した。同時に、Phoenix-E細胞を新たな培地で再度インキュベートし、それをさらに3時間後、Polybrene(4mg/ml;Aldrich)の存在下でのRat 1線維芽細胞の二次感染に使用した。同様に、三次感染サイクルを実施した。培地を交換した後、G418でのRat 1細胞の選択を開始した。通常、21日間の選択後に安定的クローンを得た。

【0116】

安定的クローンの一団を増殖させ、FACS分析によって膜局在ヒトAXLの発現を定量化した。詳細には、1 \times 10⁵個の細胞をPBS中10mM EDTAで採取し、FACSバッファー(PBS、3%FCS、0.4%アジド)で一回洗浄し、96ウエルの丸底プレートに接種した。細胞を3分間1,000rpmで遠心分離にかけて上清を除去し、マウス抗AXL一次抗体MAB154(R&D Systems、3 μ g/ml)と再懸濁した。細胞懸濁液を氷上で1時間インキュベートし、FACSバッファーで二回洗浄し、FACSバッファー中に1:50に希釈した100 μ l/ウエルのPE結合ロバ抗マウス二次抗体(Jackson)に再懸濁した。細胞懸濁液は氷上および暗所で30分間インキュベートし、FACSバッファーで二回洗浄し、Epics XL-MCLフローサイトメーター(Beckman Coulter)を使用して分析した。

【0117】

図15Aは、pLXSN空ベクターで安定的に感染したポリクローナルRat 1-Mock集団、およびpLXSN-hAXLで安定的に感染したRat 1-AXLcl.2のFACS分析を示し、この代表的なクローン

の細胞表面上でのAXLの過剰発現を実証する。

【0118】

さらに、実験目的に適した細胞モデル系を生成するために、AXLを安定的に過剰発現するNIH3T3線維芽細胞を、Rat 1に関して記載した手順と同様に生成した。簡潔には、 3×10^5 個のPhoenix-E細胞を60mmの培養皿に接種し、リン酸カルシウム法を使用して $2 \mu\text{g/ml}$ のpLXSNベクターまたはpLXSN-AXLcDNAでトランスフェクトした。24時間後、培地を新たな培地に交換し、その中でPhoenix-E細胞を4時間インキュベートした。pLXSNまたはpLXSN-hAXLエコトロフィックウイルスを放出するPhoenix-E細胞の上清を採取し、Polybrene(4mg/ml ; Aldrich)の存在下での3時間のサブコンフルエントNIH3T3細胞(6cm皿当たり 2×10^5 個の細胞)のインキュベーション用に使用した。同時に、Phoenix-E細胞を新たな培地で再度インキュベートし、それをさらに3時間後、Polybrene(4mg/ml ; Aldrich)の存在下でのNIH3T3線維芽細胞の二次感染に使用した。同様に、三次感染サイクルを実施した。培地を交換した後、G418でのNIH3T3細胞の選択を開始した。通常、21日間の選択後に安定的クローンを得た。

10

【0119】

安定的クローンの一団を増殖させ、FACS分析によって膜局在AXLの発現を定量化した。詳細には、 1×10^5 個の細胞をPBS中10mM EDTAで採取し、FACSバッファー(PBS、3%FCS、0.4%アジド)で一回洗浄し、96ウエルの丸底プレートに接種した。細胞を3分間1,000rpmで遠心分離にかけて上清を除去し、マウス抗AXL一次抗体MAB154(R&D Systems、 $3 \mu\text{g/ml}$)と再懸濁した。細胞懸濁液を氷上で1時間インキュベートし、FACSバッファーで二回洗浄し、FACSバッファー中に1:50に希釈した $100 \mu\text{l}$ /ウエルのPE結合ロバ抗マウス二次抗体(Jackson)に再懸濁した。細胞懸濁液は氷上および暗所で30分間インキュベートし、FACSバッファーで二回洗浄し、Epics XL-MCLフローサイトメーター(Beckman Coulter)を使用して分析した。

20

【0120】

図15Bは、pLXSN空ベクターで安定的に感染したポリクローナルNIH3T3-Mock集団、およびpLXSN-hAXLで安定的に感染したNIH3T3-AXLc1.7のFACS分析を示し、この代表的なクローンの細胞表面上でのAXLの過剰発現を実証する。

【0121】

(実施例2)

30

ラット抗AXLモノクローナル抗体の生成

モノクローナルラット抗AXL抗体を、Lou/CまたはLong Evansラットに腹膜内と皮下の両方にRat 1-AXLc1.2の約 10×10^6 個の凍結細胞を注射することによって産生した。8週間隔後、最終追加抗原刺激を融合前3日に腹膜内および皮下に与えた。ミエローマ細胞系P3X63-Ag8.653とラット免疫系脾臓細胞の融合は標準手順に従い実施し、105のハイブリドーマが生成した。2週間後、ハイブリドーマ由来の第一の上清を回収し、NIH3T3-AXLc1.7線維芽細胞とNIH3T3-Mock対照細胞の結合の一次FACSスクリーニングにおいて試験した。AXL結合に関して陽性であったクローンをさらに培養した。これらのクローンの50ml上清から、抗体を精製し、NIH3T3-AXLc1.7線維芽細胞とNIH3T3-Mock対照細胞上のAXLの特異的結合に関して再分析した。NIH3T3-Mock対照細胞ではなくNIH3T3-AXLc1.7線維芽細胞と特異的に結合する精製抗体をAkt-キナーゼリン酸化ELISAにおいてさらに試験して、かつアイソタイプを決定するためのELISAを実施した。ラット抗体の精製のために、上清を20分間5,000gで遠心分離にかけ、その後滅菌濾過した。 $500 \mu\text{l}$ のプロテインGセファロースFFを加え、スピニングホイール上で少なくとも1時間4℃でインキュベートした。セファロースを遠心分離にかけ、上清を捨て、プロテインGマトリクスはクエン酸バッファー(100mM)pH2.1を利用するタンパク質溶出の前にPBSで二回洗浄した。溶出分画は1MのトリスpH8.0を加えることによってすぐに中性pHに再度中和し、PBSで透析した。

40

【0122】

試験したオリゴクローナル抗体の中で、91個がNIH3T3-Mock対照細胞ではなくNIH3T3-AXLc1.7線維芽細胞と特異的に結合し、9個は同じ細胞中のGas6誘導型Aktリン酸化を阻害し

50

、一方71個はAktリン酸化を刺激した。4個のアンタゴニスト抗体(I11B7、I10D12、I6E7、およびI111D5、以下の実施例中ではそれぞれ11B7、10D12、6E7および11D5と呼ぶ)、2個のアゴニスト抗体(I11D7およびI112A1、以下の実施例中では11D7および2A1と呼ぶ)および1個の対照抗体(I111D5、以下の実施例中では1D5と呼ぶ)を冷凍保存およびサブクロニングした。

【 0 1 2 3 】

(実施例3)

抗AXL抗体の構造および特性

3.1. ラット抗体可変ドメインのヌクレオチド配列

ラット抗AXL抗体の可変ドメインをハイブリドーマ細胞からクローニングした。RNAはRNA抽出キットRNeasy(RNeasy midiキット、Qiagen)を利用して調製した。抗体遺伝子をコードするcDNAは、製造元の説明書に従い5' RACEキット(Invitrogen)を使用して調製した。

【 0 1 2 4 】

簡潔には、第1鎖cDNAを、遺伝子特異的GSP1プライマーおよびSuperScript (商標) II逆転写酵素を使用して全RNAから合成した。第1鎖cDNAの合成後、原型mRNA鋳型はRNase Mixを用いた処理によって除去する。次いで、ホモポリマー尾部をcDNAの3'末端に付加する。Taq DNAポリメラーゼ、cDNA分子内に位置する部位とアニーリングするネスト型の遺伝子特異的プライマー(GSP2)、ならびにキットと共に与えられたアンカープライマーを使用してPCR増幅を実施する。増幅後、5' RACE産物は配列決定用のpLXSN-ESKベクターにクローニングした。クローニングを容易にするために、アンカープライマー(AP)にはSalIの認識配列を組み入れ、GSP2プライマーにはXhoI部位を含有させた。

【 0 1 2 5 】

GSP1プライマー:

kappa_GSP1: GATGGATGCATTGGTGCAGC

新規_kappa_GSP1: atagatacagttggtgcagc

重鎖_GSP1: CAGGGTCACCATGGAGTTA

GSP2プライマー:

XhoI-hGSP2: CCGCTCGAGCGGGCCAGTGGATAGACAGATGG

XhoI-kGSP2: CCGCTCGAGCGGCCGTTTCAGCTCCAGCTTGG

【 0 1 2 6 】

ラット抗AXL mAbクローニング用のGSPプライマーの利用:

11B7:kappaGSP1; XhoI-kGSP2

重鎖GSP1; XhoI-hGSP2

10D12:kappa_GSP1、新規_kappa_GSP1; XhoI-kGSP2

重鎖GSP1; XhoI-hGSP2

11D5:新規_kappa_GSP1; XhoI-kGSP2

重鎖GSP1; XhoI-hGSP2

【 0 1 2 7 】

3.2. ラット抗AXL抗体可変ドメインのアミノ酸配列

ラット抗体可変ドメインの配列を、配列決定された遺伝子から翻訳して、pLXSN-ESKベクターへとクローニングした。所与のアミノ酸配列は、可変ドメインの1位で始まる。抗体とその標的との特異的結合に必要なとされる相補性決定領域(CDR)は、Kabat(Kabatら、「Sequences of Proteins of Immunological Interest」、第5版、NIH刊行物第91-3242号、1991)に従い定義される。Kabatの定義は、可変ドメインにおける配列のばらつきに基づく。抗体の抗AXL特異的CDR領域を、図14および配列番号121~配列番号132に列挙する。個々のCDRは以下の位置を包含する:

CDR-L1: 24-34

CDR-L2: 50-56

CDR-L3: 89-97

CDR-H1: 31-35b

10

20

30

40

50

CDR-H2: 50-65

CDR-H3: 95-102

【 0 1 2 8 】

ラット11B7抗体の軽鎖可変領域および重鎖可変領域のアミノ酸配列を、それぞれ、配列番号140および141で表す。ラット11B7抗体の軽鎖および重鎖のサブクラスは、それぞれ、kappa鎖およびIgG1鎖である。

【 0 1 2 9 】

ラット11D5抗体の軽鎖可変領域および重鎖可変領域のアミノ酸配列を、それぞれ、配列番号142および143で表す。ラット11D5抗体の軽鎖および重鎖のサブクラスは、それぞれ、kappa鎖およびIgG2a鎖である。

10

【 0 1 3 0 】

3.3. ラット抗体の発現および精製:

4.5g/Lのグルコース、1%のグルタミン、1%のピルビン酸塩、1%のPen/Strepを包含するDMEMを使用して、37℃、5~7% CO₂中のCelline CL 1000バイオリアクター(Integra Biosciences)内でハイブリドーマを培養した。FCSの補充は、栄養区画に1%のFCS、かつ、細胞区画に5%の低濃度IgG FCSとする。週に2回採取および培地交換を実施する。細胞増殖に応じて、1/1~>1/3に細胞を分割する。SDS-PAGE分析によって、週に1回増殖率を調べる。精製するまで上清は-20℃で保存する。週に1回、実験培養物のマイコプラズマ試験を実施する。

【 0 1 3 1 】

20

抗体は、Aekta Explorer 100システム(GE-Healthcare)を介し、プロテインAまたはGセファロースFF (GE-Healthcare)を使用して精製する。カラムは、各々の精製用に個別に充填する。カラムサイズは、各バッチ(通常50~500mg)の予測される増殖率およびサイズに合わせる。タンパク質含有溶液は、可能な限り常に氷上または4℃に保つ。滅菌バッファーおよび二回蒸留水を全プロセスに使用する。

【 0 1 3 2 】

上清を解凍し、50mMのトリスpH8.5で緩衝処理し、遠心分離にかけ、0.22 μmの膜を介して濾過し、カラムに充填する。8カラム体積(CV)の50mM PO₄、pH8.5での洗浄後、10CVの100mMのグリシン、pH3.3以内で抗体を溶出する。溶出分画は1/5の1MトリスpH8.0を加えることによってすぐに中性pHに再度緩衝させ(4ml溶出分画当たり1mlのトリス)、その後rSDS-PAGEによって透析した。純粋な抗体を有する分画をプールし、PBSに対して4℃で透析し、滅菌濾過する。

30

【 0 1 3 3 】

バッファースシステムの要件は、各々の抗体の個々の性質に従い調整する。特に、ラットIgG2a抗体11D5をプロテインG 4 FFマトリクス(GE-Healthcare)と結合させ、高塩条件(2MのNaCl)下で洗浄した。ラット抗体IgG1 11B7は、11D5の場合に従い、高塩条件下でrプロテインA (GE-Healthcare)により精製した。抗体の溶出はpH5.5で実施した。結合有効性を高めるには、ラット抗体を精製する流速を低速に保たなければならない。

【 0 1 3 4 】

第2の精製ステップとして、イオン交換クロマトグラフィー(個々の、適切な条件下)または調製用サイズ排除クロマトグラフィー(PBS、pH7.4)を実施することができる。

40

【 0 1 3 5 】

精製抗体の品質管理のための標準的なプロトコルは:

rSDS-PAGEゲル分析; クーマシー染色または銀染色

BCA試験(Pierce #23227のBCAタンパク質アッセイキット; #31233のラットIgG標準)

分析用サイズ排除クロマトグラフィー(Superdex 200 Tricorn 10/300 GL、250 μl中約250 mg; 0.5ml/分、Aekta Explorer 100)

エンドキシン試験(LAL; #US50-648UのCambrex QCL-1000 (登録商標) LALエンドポイント比色アッセイ)

細胞ベースの活性アッセイ(FACS結合アッセイ; pAkt; pAXL)

50

を包含する。

【0136】

精製抗体は、それらの安定性に応じ、pH7.4のPBS中、4 または-20 の滅菌条件下で保存する。

【0137】

得られたラット抗体のうちの1つである11B7を、実施例5、6、16に適用した。

【0138】

3.4. FACSスキッチャードによる抗体親和性の決定

ヒトAXL過剰発現NIH3T3細胞をPBS中10mM EDTAとのインキュベーションによって採取し、FACSバッファー (PBS pH7.4、3%のFCS、0.1%のNaN₃) 1ml当たりの細胞600万個で再懸濁させた。丸底マイクロタイタープレートにおいて、100 μ lの細胞懸濁液を、FACSバッファー中40 μ g/ml ~ 0.002 μ g/mlの濃度 (266および0.01nM) で、抗体11B7、11D5、ch11B7-IgG1、ch11B7-IgG2、ch11B7-IgG1またはch11D5-IgG2を含有する100 μ lの抗体溶液に添加した。抗体の結合は、氷上において2時間にわたって進行させた。次いで、ウエル当たり250 μ lのFACSバッファーで2回細胞を洗浄し、FACSバッファー中で1:50に希釈した200 μ lの二次抗体 (抗ラットPE; Jackson) に再懸濁させた。45分間のインキュベーション後、FACSバッファーでさらに2回細胞を洗浄し、FACS分析用の500ml PBSに再懸濁させた。分析はBeckman-Coulter FACS FC500で実施した。見かけの親和性定数K_{D app}を決定するために、平均蛍光と、これに対応する抗体濃度 ([M]) との比に対して、平均蛍光値をプロットした。直線の逆勾配から得られるK_{D app}の計算値を以下に挙げる。

【0139】

【表1】

クローン	KD 値(nM)
11B7	0.38
ch11B7-IgG1	0.6
11D5	0.81
Ch11D5-IgG1	0.4

【0140】

上記で列挙したKD値には、実施例4で得られるキメラ抗体のKD値が含まれる。

【0141】

(実施例4)

ラット抗AXL抗体のキメラ化:

ヒトkappa軽鎖遺伝子およびヒト重鎖IgG1/2遺伝子を、以下に記載するように、ヒトボランティアの末梢血単核細胞 (PBMC) からクローニングした:

【0142】

PBMCは全血液から調製した。血液は、室温でPBS/2mM EDTAおよび10U/mlヘパリン中で1/2.5に希釈し、ダイアフラムで覆った15mlのBiocoll溶液 [Biochrom製のBiocoll; #L6115] 上に積層させた (35ml/チューブ1本)。室温において400 \times gで30分間サンプルを遠心分離にかけ、血清 (約15ml) は廃棄した。PBMCを含有する界面は、パスツールピペットを使用して注意深く回収した。PBMCはPBS/2mM EDTA (1回目の洗浄は100ml、2回目の洗浄は50ml) 中で2回洗浄し、300 \times gで10分間遠心分離にかけた。細胞ペレットをRPMI/10%のFCS (25ml) に再懸濁させ、5.5 $\times 10^7$ 個のPBMCを得た。製造元の説明書に従いQiagen (#75142) 製のRNeasyキットを使用して、PBMCからRNAを調製した。精製したRNA (30 μ g) を、-80 でアリコートに保存した。

【0143】

製造元の説明書に従い、Superscript III逆転写酵素 (invitrogen#18080 ~ 93) を使用し、以下のプライマーを使用して、RT-PCRにより、単離したRNAから、抗体IgGガンマ1および2ならびにkappa鎖のcDNAを調製した:

1) RT-ガンマ: GCG TGT AGT GGT TGT GCA GAG

10

20

30

40

50

- 2) RT-ガンマ2: ggg ctt gcc ggc cgt g
 3) RT-kappa: TGG AAC TGA GGA GCA GGT GG
 4) 5' BIp: AGA TAA GCT TTG CTC AGC GTC CAC CAA GGG CCC ATC GGT
 5) 3' Bam (GAG): AGA TGG ATC CTC ATT TAC CCG GAG ACA GGG AGA G
 6) 5' Bsi: AGA TAA GCT TCG TAC GGT GGC TGC ACC ATC TGT CTT CAT
 7) 3' Bam (CTT): AGA TGG ATC CCT AAC ACT CTC CCC TGT TGA AGC TCT

【 0 1 4 4 】

100 μ Mでプライマーを溶解させた。RT-PCR反応は、それぞれ2ピコモルずつのオリゴRTおよびオリゴRTを使用することによって実施し、1 μ gのRNA、10mMのdNTP混合物を添加し、65 で5分間加熱した。4 μ lの第1鎖バッファー、1 μ lの0.1M DTT、1 μ lのRNase阻害剤(40U/ μ lのFermentas #E00311)および2 μ lのSuperscript III RTを添加し、混合し、50 で1時間インキュベートした後、熱不活性化ステップを70 で15分間行った。

【 0 1 4 5 】

2 μ lの第1鎖反応物を、Taqポリメラーゼ(Eurochrom #EME010001)を使用する第2ステップのPCRに使用して、抗体定常ドメインの二本鎖DNAを得た。以下のPCR設定を使用して鎖を増幅するのにプライマー5' BIpおよび3' Bam (GAG)を使用し、かつ、鎖定常領域を増幅するのに5' Bsiおよび3' Bam (CTT)を使用した。

鎖の増幅:

- 94 120秒間
 94 30秒間
 55 30秒間
 72 45秒間のサイクルを35回
 72 10分

鎖の増幅:

- 94 120秒間
 94 30秒間
 45 30秒間
 72 60秒間のサイクルを5回
 94 30秒間
 50 30秒間
 72 60秒間のサイクルを35回
 72 10分間

【 0 1 4 6 】

PCR産物をTAE緩衝2%アガロースゲル上で分析した。約350bpのkappa軽鎖の1つのバンドならびに約1000bpの重鎖 1および 2の1つのバンドを見出した。PCR産物は、製造元の説明書に従いQiagenゲル抽出キット(QIAGEN、#28784)によって精製した。PCR断片をpcDNA3ベクター(Invitrogen)のマルチクローニングサイトにクローニングするため、pcDNA3ベクターおよびPCR断片を、HindIII (5')およびBamHI (3')の制限エンドヌクレアーゼで消化した。制限部位はPCRプライマー内にコードされた。Qiagen PCR精製キット(QIAGEN; 28104)を使用して消化した断片を精製し、1鎖、2鎖、および鎖をコードするDNAをpcDNA3ベクターに連結し、16 で一晩T4 DNAリガーゼ反応を促進した。リガーゼは65 で10分間不活性化した。標準プロトコルを使用して、連結されたDNAプラスミドを、CaCl₂コンピテント大腸菌(E.coli)へと直接形質転換し、アンピシリン含有LBプレートへと播種した。37 で一晩インキュベーションした後、単一のコロニーを採取し、10 μ lのH₂O中に懸濁させ、PCRによってそれぞれの抗体鎖を保有するプラスミドの含有について確認した(5 μ lの懸濁細胞、Taqポリメラーゼ、1/2用のプライマー5BIPおよび3Bam (GAG)、ならびにコロニー用の5Bsiおよび3Bam (CTT)):

- 94 120秒間
 94 30秒間
 55 30秒間

72 60秒間のサイクルを35回

72 10分

【 0 1 4 7 】

サンプルはPCR産物用の1.5%アガロースゲル上で分析した。抗体遺伝子含有コロニーを選択して、5mlのLB/アンピシリン培地に接種した。37℃で一晩インキュベーションした後、大腸菌を採取し、Qiagen miniprepキット(QIAGEN; #12123)を使用してDNAを調製した。対照消化(HindIII、BamHI)は予測サイズで全ての鎖および鎖遺伝子挿入配列を示し、配列はMedigenomixでのDNA塩基配列決定によって確認した。

【 0 1 4 8 】

PCRによってpLXSN-ESKベクターからラット可変ドメインを増幅し、g1/g2 pcDNA3ベクターおよびk pcDNA3ベクターにクローニングしてキメラ完全長抗体を得た。VL可変ドメインは、5'端にHindIIIおよびBsmI部位、ならびに3'端にBsiWI部位を含有する、以下:

VL-11B7-5': AGA TAA GCT TGT GCA TTC CGA CAT CCA GAT GAC CCA GGC TCC

VL-11B7-3': AGA TCG TAC GTT TCA GCT CCA GCT TGG TGC CTC

VL-11D5-5': AGA TAA GCT TGT GCA TTC CGA CAT CCA GAT GAC CCA GTC TCC ATC

VL-11D5-3': AGA TCG TAC GTT TCA GCT TGG TCC CAG

のプライマーにより増幅した。

【 0 1 4 9 】

VH可変ドメインは、5'端にHindIIIおよびBsmI部位、ならびに3'端にBlnI部位を含有する、以下:

VH-11B7/11D5-5': AGA TAA GCT TGT GCA TTC CGA GGT GCA GCT TCA GGA GTC AGG

VH-11B7/11D5-3': AGA TGC TGA GCT GAC AGT GAC CAT GAC TCC TTG GCC

のプライマーにより増幅した。

【 0 1 5 0 】

軽鎖のBsiWIおよび重鎖のBlnIは、可変ドメイン遺伝子の3'端との直接的な融合を可能にする、定常領域の5'端における単一の部位である。

【 0 1 5 1 】

pLNOH2ベクター(Norderhaugら、J. Immunol. Methods 204、1997; Neuberger、EMBO J. 2(8):1373~8頁、1983)由来のリーダー配列である配列番号133と融合させるために、キメラ抗体鎖をコードする遺伝子を、組換え発現用のpCEPベクター系へとクローニングした。軽鎖遺伝子はpCEP4 (Invitrogen)内のNheI (5')~XhoI (3')へとクローニングし、重鎖遺伝子はpCEP-Pu内のKpnI (5')~XhoI (3')へとクローニングした(Kohfeld、FEBS、414巻(3)、557頁以下、1997)。

【 0 1 5 2 】

20×20cmのプレート上に播種したHEK293細胞を、一過性発現用の標準的なCaPO₄トランスフェクション法を使用して、軽鎖および重鎖遺伝子をコードする1μg/mlの各プラスミドとコトランスフェクトした。培養条件は、5%の低濃度IgG FCS、1%のピルビン酸塩、1%のグルタミン、1%のPen/Strepを含有するDMEM/F12高濃度グルコース培地中37℃、5%CO₂であった。トランスフェクションの24時間後に、培地を新たな培地に交換した。約3週間にわたり、2~3日毎に上清を回収した。ラット抗体の精製について説明したのと同様に、標準的なバッファー条件(ローディングバッファー: 50mMのトリス、pH=8.5; 洗浄バッファー: 50mMのPO₄、pH=8.5; 溶出バッファー: 100mMのグリシン、pH3.3)下で、1mlのHitrap rプロテインAカラム(GE-Healthcare)を利用して、約600mlの上清からキメラ抗体を精製した。

【 0 1 5 3 】

ラット11B7抗体に由来して得られるキメラ分子のうちの1つは、配列番号136 (図14)のアミノ酸配列により表されるヒトIgG1重鎖、ならびに配列番号135 (図14)のアミノ酸配列により表されるヒトkappa軽鎖からなる。

【 0 1 5 4 】

ラット11D5抗体に由来して得られるキメラ分子のうちの1つは、配列番号138 (図14)の

10

20

30

40

50

アミノ酸配列により表されるヒトIgG1重鎖、ならびに配列番号137 (図14)のアミノ酸配列により表されるヒトkappa軽鎖からなる。

【0155】

ch11B7-IgG1およびch11D5-IgG1と称する、これらのキメラ11B7抗体およびキメラ11D5抗体を、実施例3、13、14、および17～20に適用した。

【0156】

(実施例5)

本発明のラット抗AXL抗体はヌードマウス中のヒト前立腺癌増殖を低減する

治療用抗体の抗腫瘍有効性は、ヒト異種移植腫瘍試験において評価されることが多い。これらのモデル系では、ヒト腫瘍を免疫不全マウス中で異種移植片として増殖させ、腫瘍増殖阻害の程度によって治療有効性を測定する。この試験の目的は、本発明のアンタゴニストラット抗AXL抗体11B7が、ヌードマウス中のヒト前立腺癌細胞の腫瘍増殖に干渉するかどうか評価することであった。簡潔には、第0日に、7～8週齢のオスNMRI^{-nu/nu}マウス(およその重量:順化後30g)に、2l/分の酸素流量において1.5～2.0体積パーセントのイソフルランで麻酔をかけ、25μlのPBS中の 1×10^6 個のPC-3-LN細胞を前立腺中に同所に移植した。PC-3-LN細胞は、ルシフェラーゼ-ネオマイシン融合タンパク質をコードするレトロウイルスに感染したPC-3前立腺癌細胞系に由来する。したがって腫瘍増殖の発症および腫瘍増殖の進行は、in vivo生物発光イメージングによって測定可能であった。この目的のために、ルシフェリンをマウスに腹腔内(i.p.)注射して、NightOWL[®]LB981生物発光イメージングシステム(Berthold Technologies、ドイツ)を使用して注射後10分で発光を測定した。初回治療の前に、動物を無作為に分け、統計的検定を実施して、各10匹の動物の治療群中の開始腫瘍体積(平均、中央および標準偏差)の均一性を保証した。第8日に全ての治療を開始し、第34日まで続け、次に第35日に解剖した。25mg/kgの25mg/kgのアイソタイプ対照抗体1D5およびアンタゴニストラット抗AXL抗体11B7を、週に3回(月曜日、水曜日、金曜日)それぞれ群1および2の動物に腹腔内(i.p.)投与した。群3の動物には一日一回40mg/kgのSutentを経口(p.o.)投与した。群4の動物には4日間隔でそれぞれ12.5mg/kgのTaxotereを3回静脈内(i.v.)注射した。治療群の概要は以下に与える。

【0157】

図16は、この実験の代表的な結果を示す。アイソタイプ対照抗体1D5と比較して、本発明のアンタゴニストラット抗AXL抗体11B7は、ヌードマウス中のPC-3-LN前立腺腫瘍の全体的増殖を低減させた。

【0158】

(実施例6)

本発明のラット抗AXL抗体はヒト前立腺癌の転移を阻害する

「Rat anti-AXL antibodies of the invention reduce human prostate carcinoma growth in nude mice」で記載されたのと同じ実験において、他の器官へのPC-3-LN腫瘍細胞の再局在化(転移)を解剖後に分析して、本発明のアンタゴニストラット抗AXL抗体11B7の抗転移効果を評価した。この目的のために、選択した器官(肝臓、脾臓、肺、大腿骨、および腰椎の一部)を解剖後に回収し、均質化し、ルシフェリンを補充した。その後、NightOWL[®]LB981生物発光イメージングシステム(Berthold Technologies、ドイツ)を使用して発光を測定した。

【0159】

図17は、脾臓の分析に関するこの実験の結果を示す。アイソタイプ対照抗体1D5と比較して、本発明のアンタゴニストラット抗AXL抗体11B7は、脾臓転移の発生を低減した。特に、この実験中の11B7の抗転移効果はSutentのそれより強かった。肝臓、肺、大腿骨、および腰椎転移に関して同様の観察結果を得た。

【0160】

(実施例7)

ヒト化抗体の設計

7.1. #11B7のヒト化形の設計

10

20

30

40

50

7.1.1. #11B7可変ドメインの分子モデリング

当技術分野において相同性モデリングとして一般に知られる(Methods in Enzymology、203、121～153頁(1991))方法に従い、#11B7可変ドメインの分子モデリングを実施した。タンパク質データベースに登録されているヒト免疫グロブリン可変ドメインの一次配列(X線結晶構造に由来する三次元構造も入手可能である)(Nuc. Acid Res. 35、D301～D303頁(2007))を、#11B7の可変ドメインと比較し、これにより該一次配列を決定した。結果として、1JPTを、#11B7軽鎖可変ドメインに対して最も高度な配列相同性を有する可変ドメインとして選択した。さらに、1F8Tを、#11B7重鎖可変ドメインに対して最も高度な配列相同性を有する可変ドメインとして選択した。「フレームワークモデル」に基づき、#11B7の軽鎖および重鎖に対応する1JPTおよび1F8Tの座標を組み合わせることにより、フレームワークドメインの三次元構造を作成した。#11B7 CDRの場合、CDRL₁、CDRL₂、CDRL₃、CDRH₁、およびCDRH₂を、Thorntonら(J. Mol. Biol.、263、800～815頁(1996))の分類によるクラスター11A、7A、9A、10A、および9Aにそれぞれ割り当てた。H3規則(FEBS letters 399、1～8頁(1996))により、CDRH₃は、k(3)に分類した。続いて、各CDRの典型的な立体構造を、フレームワークモデルに組み込んだ。

【0161】

最後に、エネルギーとの関係で#11B7可変ドメインの可能な分子モデルを得るため、エネルギーの計算を実施して、不利な原子間接触を除外した。これらの手順は、市販のタンパク質三次元構造予測プログラムであるPrime、ならびに座標検索プログラムであるMacro Model (Schroedinger, LLC)を使用して実施した。

【0162】

7.1.2. ヒト化#11B7のアミノ酸配列の設計

ヒト化#11B7抗体は、当技術分野においてCDR移植(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86、10029～10033頁(1989))として一般に知られている方法により構築した。アクセプター抗体は、フレームワークドメインにおけるアミノ酸の相同性に基づき、2つの方法で選択した。

【0163】

#11B7フレームワークドメインの配列を、Kabatデータベース(Nuc. Acid Res. 29、205～206頁(2001))に登録されている、抗体アミノ酸配列に関与する全てのヒトフレームワークの配列と比較した。結果として、それらのフレームワークドメイン間における72%の配列相同性により、GM4672'CL抗体をアクセプターとして選択した。GM4672'CLにおけるフレームワークドメインのアミノ酸残基を、#11B7における対応するアミノ酸残基と共に配列決定して、それらの間で異なるアミノ酸が用いられている位置を同定した。#11B7の三次元モデルを使用してこれらの残基の位置を分析し、これによりこれらの残基を構築した。次いで、Queenら(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86、10029～10033頁(1989))により示される基準に従い、アクセプター上に移植されるドナー残基を選択した。

【0164】

#11B7フレームワークドメインの配列を、IgBLAST (Nuc. Acid Res. 36、D25～D30頁(2007))に登録されている全てのヒトフレームワークの配列と比較した。結果として、それらのフレームワークドメイン間における76%の配列同一性により、BAC01582をL鎖アクセプターとして選択した。それらのフレームワークドメイン間における66%の配列同一性により、AAF80028をH鎖アクセプターとして選択した。BAC01582のL鎖およびAAF80028のH鎖におけるフレームワークドメインのアミノ酸残基を、#11B7における対応するアミノ酸残基と共に配列決定して、それらの間で異なるアミノ酸が用いられている位置を同定した。#11B7の三次元モデルを使用してこれらの残基の位置を分析し、これによりこれらの残基を構築した。次いで、Queenら(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86、10029～10033頁(1989))により示される基準に従い、アクセプター上に移植されるドナー残基を選択した。

【0165】

全ての方法において、以下の実施例で説明する通り、一部の選択されたドナー残基をアクセプター抗体へと形質導入することにより、ヒト化#11B7配列を構築した。

【 0 1 6 6 】

7.1.3. #11B7軽鎖のヒト化(図1、2、および3)

7.1.3.1. h#11B7-T1L型軽鎖:

配列表(図30B)の配列番号140により表される#11B7軽鎖可変領域のアミノ酸番号7 (アラニン)、12 (プロリン)、15 (ロイシン)、36 (フェニルアラニン)、43 (セリン)、45 (アルギニン)、47 (メチオニン)、65 (セリン)、66 (アルギニン)、69 (セリン)、71 (チロシン)、72 (セリン)、73 (ロイシン)、79 (グルタミン酸)、80 (セリン)、83 (メチオニン)、85 (アスパラギン酸)、104 (ロイシン)、106 (ロイシン)、および109 (プロリン)を、セリン、セリン、バリン、チロシン、アラニン、リシン、ロイシン、トレオニン、グリシン、トレオニン、フェニルアラニン、トレオニン、フェニルアラニン、グルタミン、プロリン、フェニルアラニン、トレオニン、バリン、イソロイシン、およびトレオニンでそれぞれ置換することにより設計されるヒト化#11B7軽鎖可変領域を、「h#11B7-T1L」型軽鎖可変領域と名付けた。

10

【 0 1 6 7 】

7.1.3.2. h#11B7-T2L型軽鎖:

配列表(図30B)の配列番号140により表される#11B7軽鎖可変領域のアミノ酸番号7 (アラニン)、12 (プロリン)、15 (ロイシン)、43 (セリン)、45 (アルギニン)、65 (セリン)、66 (アルギニン)、69 (セリン)、72 (セリン)、73 (ロイシン)、79 (グルタミン酸)、80 (セリン)、83 (メチオニン)、85 (アスパラギン酸)、104 (ロイシン)、106 (ロイシン)、および109 (プロリン)を、セリン、セリン、バリン、アラニン、リシン、トレオニン、グリシン、トレオニン、トレオニン、フェニルアラニン、グルタミン、プロリン、フェニルアラニン、トレオニン、バリン、イソロイシン、およびトレオニンでそれぞれ置換することにより設計されるヒト化#11B7軽鎖可変領域を、「h#11B7-T2L」型軽鎖可変領域と名付けた。

20

【 0 1 6 8 】

7.1.3.3. h#11B7-T3L型軽鎖:

配列表(図30B)の配列番号140により表される#11B7軽鎖可変領域のアミノ酸番号7 (アラニン)、12 (プロリン)、15 (ロイシン)、43 (セリン)、45 (アルギニン)、72 (セリン)、79 (グルタミン酸)、80 (セリン)、83 (メチオニン)、85 (アスパラギン酸)、104 (ロイシン)、106 (ロイシン)、および109 (プロリン)を、セリン、セリン、バリン、アラニン、リシン、トレオニン、グルタミン、プロリン、フェニルアラニン、トレオニン、バリン、イソロイシン、およびトレオニンでそれぞれ置換することにより設計されるヒト化#11B7軽鎖可変領域を、「h#11B7-T3L」型軽鎖可変領域と名付けた。

30

【 0 1 6 9 】

7.1.3.4. h#11B7-T4L型軽鎖:

配列表(図30B)の配列番号140により表される#11B7軽鎖可変領域のアミノ酸番号7 (アラニン)、12 (プロリン)、15 (ロイシン)、36 (フェニルアラニン)、43 (セリン)、45 (アルギニン)、47 (メチオニン)、66 (アルギニン)、71 (チロシン)、72 (セリン)、79 (グルタミン酸)、80 (セリン)、83 (メチオニン)、85 (アスパラギン酸)、100 (グリシン)、106 (ロイシン)、および109 (プロリン)を、セリン、セリン、バリン、チロシン、アラニン、リシン、ロイシン、グリシン、フェニルアラニン、トレオニン、グルタミン、プロリン、フェニルアラニン、トレオニン、グルタミン、イソロイシン、およびトレオニンでそれぞれ置換することにより設計されるヒト化#11B7軽鎖可変領域を、「h#11B7-T4L」型軽鎖可変領域と名付けた。

40

【 0 1 7 0 】

7.1.3.5. h#11B7-T5L型軽鎖:

配列表(図30B)の配列番号140により表される#11B7軽鎖可変領域のアミノ酸番号7 (アラニン)、12 (プロリン)、15 (ロイシン)、43 (セリン)、45 (アルギニン)、66 (アルギニン)、72 (セリン)、79 (グルタミン酸)、80 (セリン)、83 (メチオニン)、85 (アスパラギン酸)、100 (グリシン)、106 (ロイシン)、および109 (プロリン)を、セリン、セリン

50

、バリン、アラニン、リシン、グリシン、トレオニン、グルタミン、プロリン、フェニルアラニン、トレオニン、グルタミン、イソロイシン、およびトレオニンで置換することにより設計されるヒト化#11B7軽鎖可変領域を、「h#11B7-T5L」型軽鎖可変領域と名付けた。

【0171】

7.1.3.6. h#11B7-T6L型軽鎖：

配列表(図30B)の配列番号140により表される#11B7軽鎖可変領域のアミノ酸番号7 (アラニン)、12 (プロリン)、15 (ロイシン)、43 (セリン)、45 (アルギニン)、66 (アルギニン)、72 (セリン)、79 (グルタミン酸)、80 (セリン)、83 (メチオニン)、85 (アスパラギン酸)、100 (グリシン)、104 (ロイシン)、106 (ロイシン)、および109 (プロリン)を、セリン、セリン、バリン、アラニン、リシン、グリシン、トレオニン、グルタミン、プロリン、フェニルアラニン、トレオニン、グルタミン、バリン、イソロイシン、およびトレオニンでそれぞれ置換することにより設計されるヒト化#11B7軽鎖可変領域を、「h#11B7-T6L」型軽鎖可変領域と名付けた。

【0172】

7.1.3.7. h#11B7-T7L型軽鎖：

配列表(図30B)の配列番号140により表される#11B7軽鎖可変領域のアミノ酸番号7 (アラニン)、12 (プロリン)、15 (ロイシン)、36 (フェニルアラニン)、43 (セリン)、45 (アルギニン)、66 (アルギニン)、72 (セリン)、79 (グルタミン酸)、80 (セリン)、83 (メチオニン)、85 (アスパラギン酸)、100 (グリシン)、104 (ロイシン)、106 (ロイシン)、および109 (プロリン)を、セリン、セリン、バリン、チロシン、アラニン、リシン、グリシン、トレオニン、グルタミン、プロリン、フェニルアラニン、トレオニン、グルタミン、バリン、イソロイシン、およびトレオニンでそれぞれ置換することにより設計されるヒト化#11B7軽鎖可変領域を、「h#11B7-T7L」型軽鎖可変領域と名付けた。

【0173】

7.1.3.8. h#11B7-T8L型軽鎖：

配列表(図30B)の配列番号140により表される#11B7軽鎖可変領域のアミノ酸番号7 (アラニン)、12 (プロリン)、15 (ロイシン)、43 (セリン)、45 (アルギニン)、47 (メチオニン)、66 (アルギニン)、72 (セリン)、79 (グルタミン酸)、80 (セリン)、83 (メチオニン)、85 (アスパラギン酸)、100 (グリシン)、104 (ロイシン)、106 (ロイシン)、および109 (プロリン)を、セリン、セリン、バリン、アラニン、リシン、ロイシン、グリシン、トレオニン、グルタミン、プロリン、フェニルアラニン、トレオニン、グルタミン、バリン、イソロイシン、およびトレオニンでそれぞれ置換することにより設計されるヒト化#11B7軽鎖可変領域を、「h#11B7-T8L」型軽鎖可変領域と名付けた。

【0174】

7.1.3.9. h#11B7-T9L型軽鎖：

配列表(図30B)の配列番号140により表される#11B7軽鎖可変領域のアミノ酸番号7 (アラニン)、12 (プロリン)、15 (ロイシン)、43 (セリン)、45 (アルギニン)、66 (アルギニン)、71 (チロシン)、72 (セリン)、79 (グルタミン酸)、80 (セリン)、83 (メチオニン)、85 (アスパラギン酸)、100 (グリシン)、104 (ロイシン)、106 (ロイシン)、および109 (プロリン)を、セリン、セリン、バリン、アラニン、リシン、グリシン、フェニルアラニン、トレオニン、グルタミン、プロリン、フェニルアラニン、トレオニン、グルタミン、バリン、イソロイシン、およびトレオニンでそれぞれ置換することにより設計されるヒト化#11B7軽鎖可変領域を、「h#11B7-T9L」型軽鎖可変領域と名付けた。

【0175】

7.1.3.10. h#11B7-T10L型軽鎖：

配列表(図30B)の配列番号140により表される#11B7軽鎖可変領域のアミノ酸番号7 (アラニン)、12 (プロリン)、15 (ロイシン)、36 (フェニルアラニン)、43 (セリン)、45 (アルギニン)、47 (メチオニン)、66 (アルギニン)、72 (セリン)、79 (グルタミン酸)、80 (セリン)、83 (メチオニン)、85 (アスパラギン酸)、100 (グリシン)、104 (ロイシン)、

10

20

30

40

50

106 (ロイシン)、および109 (プロリン)を、セリン、セリン、バリン、チロシン、アラニン、リシン、ロイシン、グリシン、トレオニン、グルタミン、プロリン、フェニルアラニン、トレオニン、グルタミン、バリン、イソロイシン、およびトレオニンでそれぞれ置換することにより設計されるヒト化#11B7軽鎖可変領域を、「h#11B7-T10L」型軽鎖可変領域と名付けた。

【 0 1 7 6 】

7.1.3.11. h#11B7-T11L型軽鎖:

配列表(図30B)の配列番号140により表される#11B7軽鎖可変領域のアミノ酸番号7 (アラニン)、12 (プロリン)、15 (ロイシン)、43 (セリン)、45 (アルギニン)、47 (メチオニン)、66 (アルギニン)、71 (チロシン)、72 (セリン)、79 (グルタミン酸)、80 (セリン)、83 (メチオニン)、85 (アスパラギン酸)、100 (グリシン)、104 (ロイシン)、106 (ロイシン)、および109 (プロリン)を、セリン、セリン、バリン、アラニン、リシン、ロイシン、グリシン、フェニルアラニン、トレオニン、グルタミン、プロリン、フェニルアラニン、トレオニン、グルタミン、バリン、イソロイシン、およびトレオニンで置換することにより設計されるヒト化#11B7軽鎖可変領域を、「h#11B7-T11L」型軽鎖可変領域と名付けた。

【 0 1 7 7 】

7.1.3.12. h#11B7-T12L型軽鎖:

配列表(図30B)の配列番号140により表される#11B7軽鎖可変領域のアミノ酸番号7 (アラニン)、12 (プロリン)、15 (ロイシン)、36 (フェニルアラニン)、43 (セリン)、45 (アルギニン)、66 (アルギニン)、71 (チロシン)、72 (セリン)、79 (グルタミン酸)、80 (セリン)、83 (メチオニン)、85 (アスパラギン酸)、100 (グリシン)、104 (ロイシン)、106 (ロイシン)、および109 (プロリン)を、セリン、セリン、バリン、チロシン、アラニン、リシン、グリシン、フェニルアラニン、トレオニン、グルタミン、プロリン、フェニルアラニン、トレオニン、グルタミン、バリン、イソロイシン、およびトレオニンでそれぞれ置換することにより設計されるヒト化#11B7軽鎖可変領域を、「h#11B7-T12L」型軽鎖可変領域と名付けた。

【 0 1 7 8 】

7.1.3.13. h#11B7-T13L型軽鎖:

配列表(図30B)の配列番号140により表される#11B7軽鎖可変領域のアミノ酸番号7 (アラニン)、12 (プロリン)、15 (ロイシン)、36 (フェニルアラニン)、43 (セリン)、45 (アルギニン)、47 (メチオニン)、66 (アルギニン)、71 (チロシン)、72 (セリン)、79 (グルタミン酸)、80 (セリン)、83 (メチオニン)、85 (アスパラギン酸)、100 (グリシン)、104 (ロイシン)、106 (ロイシン)、および109 (プロリン)を、セリン、セリン、バリン、チロシン、アラニン、リシン、ロイシン、グリシン、フェニルアラニン、トレオニン、グルタミン、プロリン、フェニルアラニン、トレオニン、グルタミン、バリン、イソロイシン、およびトレオニンでそれぞれ置換することにより設計されるヒト化#11B7軽鎖可変領域を、「h#11B7-T13L」型軽鎖可変領域と名付けた。

【 0 1 7 9 】

7.1.3.14. h#11B7-T14L型軽鎖:

配列表(図30B)の配列番号140により表される#11B7軽鎖可変領域のアミノ酸番号7 (アラニン)、12 (プロリン)、15 (ロイシン)、36 (フェニルアラニン)、43 (セリン)、45 (アルギニン)、66 (アルギニン)、72 (セリン)、79 (グルタミン酸)、80 (セリン)、83 (メチオニン)、85 (アスパラギン酸)、100 (グリシン)、106 (ロイシン)、および109 (プロリン)を、セリン、セリン、バリン、チロシン、アラニン、リシン、グリシン、トレオニン、グルタミン、プロリン、フェニルアラニン、トレオニン、グルタミン、イソロイシン、およびトレオニンでそれぞれ置換することにより設計されるヒト化#11B7軽鎖可変領域を、「h#11B7-T14L」型軽鎖可変領域と名付けた。

【 0 1 8 0 】

7.1.3.15. h#11B7-T15L型軽鎖:

配列表(図30B)の配列番号140により表される#11B7軽鎖可変領域のアミノ酸番号7 (アラニン)、12 (プロリン)、15 (ロイシン)、43 (セリン)、45 (アルギニン)、47 (メチオニン)、66 (アルギニン)、72 (セリン)、79 (グルタミン酸)、80 (セリン)、83 (メチオニン)、85 (アスパラギン酸)、100 (グリシン)、106 (ロイシン)、および109 (プロリン)を、セリン、セリン、バリン、アラニン、リシン、ロイシン、グリシン、トレオニン、グルタミン、プロリン、フェニルアラニン、トレオニン、グルタミン、イソロイシン、およびトレオニンでそれぞれ置換することにより設計されるヒト化#11B7軽鎖可変領域を、「h#11B7-T15L」型軽鎖可変領域と名付けた。

【0181】

7.1.3.16. h#11B7-T16L型軽鎖:

10

配列表(図30B)の配列番号140により表される#11B7軽鎖可変領域のアミノ酸番号7 (アラニン)、12 (プロリン)、15 (ロイシン)、43 (セリン)、45 (アルギニン)、66 (アルギニン)、71 (チロシン)、72 (セリン)、79 (グルタミン酸)、80 (セリン)、83 (メチオニン)、85 (アスパラギン酸)、100 (グリシン)、106 (ロイシン)、および109 (プロリン)を、セリン、セリン、バリン、アラニン、リシン、グリシン、フェニルアラニン、トレオニン、グルタミン、プロリン、フェニルアラニン、トレオニン、グルタミン、イソロイシン、およびトレオニンでそれぞれ置換することにより設計されるヒト化#11B7軽鎖可変領域を、「h#11B7-T16L」型軽鎖可変領域と名付けた。

【0182】

7.1.3.17. h#11B7-T17L型軽鎖:

20

配列表(図30B)の配列番号140により表される#11B7軽鎖可変領域のアミノ酸番号7 (アラニン)、12 (プロリン)、15 (ロイシン)、36 (フェニルアラニン)、43 (セリン)、45 (アルギニン)、47 (メチオニン)、66 (アルギニン)、72 (セリン)、79 (グルタミン酸)、80 (セリン)、83 (メチオニン)、85 (アスパラギン酸)、100 (グリシン)、106 (ロイシン)、および109 (プロリン)を、セリン、セリン、バリン、チロシン、アラニン、リシン、ロイシン、グリシン、トレオニン、グルタミン、プロリン、フェニルアラニン、トレオニン、グルタミン、イソロイシン、およびトレオニンでそれぞれ置換することにより設計されるヒト化#11B7軽鎖可変領域を、「h#11B7-T17L」型軽鎖可変領域と名付けた。

【0183】

7.1.3.18. h#11B7-T18L型軽鎖:

30

配列表(図30B)の配列番号140により表される#11B7軽鎖可変領域のアミノ酸番号7 (アラニン)、12 (プロリン)、15 (ロイシン)、43 (セリン)、45 (アルギニン)、47 (メチオニン)、66 (アルギニン)、71 (チロシン)、72 (セリン)、79 (グルタミン酸)、80 (セリン)、83 (メチオニン)、85 (アスパラギン酸)、100 (グリシン)、106 (ロイシン)、および109 (プロリン)を、セリン、セリン、バリン、アラニン、リシン、ロイシン、グリシン、フェニルアラニン、トレオニン、グルタミン、プロリン、フェニルアラニン、トレオニン、グルタミン、イソロイシン、およびトレオニンでそれぞれ置換することにより設計されるヒト化#11B7軽鎖可変領域を、「h#11B7-T18L」型軽鎖可変領域と名付けた。

【0184】

7.1.3.19. h#11B7-T19L型軽鎖:

40

配列表(図30B)の配列番号140により表される#11B7軽鎖可変領域のアミノ酸番号7 (アラニン)、12 (プロリン)、15 (ロイシン)、36 (フェニルアラニン)、43 (セリン)、45 (アルギニン)、66 (アルギニン)、71 (チロシン)、72 (セリン)、79 (グルタミン酸)、80 (セリン)、83 (メチオニン)、85 (アスパラギン酸)、100 (グリシン)、106 (ロイシン)、および109 (プロリン)を、セリン、セリン、バリン、チロシン、アラニン、リシン、グリシン、フェニルアラニン、トレオニン、グルタミン、プロリン、フェニルアラニン、トレオニン、グルタミン、イソロイシン、およびトレオニンでそれぞれ置換することにより設計されるヒト化#11B7軽鎖可変領域を、「h#11B7-T19L」型軽鎖可変領域と名付けた。

【0185】

7.1.3.20. h#11B7-T20L型軽鎖:

50

配列表(図30B)の配列番号140により表される#11B7軽鎖可変領域のアミノ酸番号7 (アラニン)、12 (プロリン)、15 (ロイシン)、36 (フェニルアラニン)、43 (セリン)、45 (アルギニン)、47 (メチオニン)、66 (アルギニン)、71 (チロシン)、72 (セリン)、79 (グルタミン酸)、80 (セリン)、83 (メチオニン)、85 (アスパラギン酸)、100 (グリシン)、106 (ロイシン)、および109 (プロリン)を、セリン、セリン、バリン、チロシン、アラニン、リシン、ロイシン、グリシン、フェニルアラニン、トレオニン、グルタミン、プロリン、フェニルアラニン、トレオニン、グルタミン、イソロイシン、およびトレオニンでそれぞれ置換することにより設計されるヒト化#11B7軽鎖可変領域を、「h#11B7-T20L」型軽鎖可変領域と名付けた。

【0186】

10

7.1.4. #11B7重鎖のヒト化(図4および5)

7.1.4.1. h#11B7-T1H型重鎖:

配列表(図30C)の配列番号141により表される#11B7重鎖可変領域のアミノ酸番号1 (グルタミン酸)、2 (バリン)、17 (セリン)、23 (セリン)、25 (トレオニン)、39 (リシン)、40 (フェニルアラニン)、43 (アスパラギン酸)、44 (リシン)、45 (メチオニン)、48 (メチオニン)、67 (イソロイシン)、68 (セリン)、70 (トレオニン)、71 (アルギニン)、79 (フェニルアラニン)、81 (グルタミン)、83 (アスパラギン)、87 (セリン)、88 (グルタミン酸)、92 (トレオニン)、107 (バリン)、および108 (メチオニン)を、グルタミン、イソロイシン、トレオニン、アラニン、セリン、グルタミン、プロリン、リシン、グリシン、ロイシン、イソロイシン、バリン、トレオニン、セリン、バリン、セリン、リシン、セリン、アラニン、アラニン、バリン、トレオニン、およびロイシンでそれぞれ置換することにより設計されるヒト化#11B7重鎖可変領域を、「h#11B7-T1H」型重鎖可変領域と名付けた。

20

【0187】

7.1.4.2. h#11B7-T2H型重鎖:

配列表(図30C)の配列番号141により表される#11B7重鎖可変領域のアミノ酸番号1 (グルタミン酸)、2 (バリン)、17 (セリン)、23 (セリン)、25 (トレオニン)、39 (リシン)、40 (フェニルアラニン)、43 (アスパラギン酸)、44 (リシン)、45 (メチオニン)、70 (トレオニン)、71 (アルギニン)、79 (フェニルアラニン)、81 (グルタミン)、83 (アスパラギン)、87 (セリン)、88 (グルタミン酸)、92 (トレオニン)、107 (バリン)、および108 (メチオニン)を、グルタミン、イソロイシン、トレオニン、アラニン、セリン、グルタミン、プロリン、リシン、グリシン、ロイシン、セリン、バリン、セリン、リシン、セリン、アラニン、アラニン、バリン、トレオニン、およびロイシンでそれぞれ置換することにより設計されるヒト化#11B7重鎖可変領域を、「h#11B7-T2H」型重鎖可変領域と名付けた。

30

【0188】

7.1.4.3. h#11B7-T3H型重鎖:

配列表(図30C)の配列番号141により表される#11B7重鎖可変領域のアミノ酸番号1 (グルタミン酸)、17 (セリン)、23 (セリン)、25 (トレオニン)、40 (フェニルアラニン)、44 (リシン)、45 (メチオニン)、79 (フェニルアラニン)、81 (グルタミン)、83 (アスパラギン)、87 (セリン)、88 (グルタミン酸)、92 (トレオニン)、107 (バリン)、および108 (メチオニン)を、グルタミン、トレオニン、アラニン、セリン、プロリン、グリシン、ロイシン、セリン、リシン、セリン、アラニン、アラニン、バリン、トレオニン、およびロイシンでそれぞれ置換することにより設計されるヒト化#11B7重鎖可変領域を、「h#11B7-T3H」型重鎖可変領域と名付けた。

40

【0189】

7.1.4.4. h#11B7-T4H型重鎖:

配列表(図30C)の配列番号141により表される#11B7重鎖可変領域のアミノ酸番号1 (グルタミン酸)、6 (グルタミン酸)、7 (セリン)、9 (プロリン)、12 (バリン)、16 (グルタミン)、17 (セリン)、23 (セリン)、25 (トレオニン)、39 (リシン)、40 (フェニルアラニ

50

ン)、43 (アスパラギン酸)、44 (リシン)、45 (メチオニン)、48 (メチオニン)、67 (イソロイシン)、68 (セリン)、70 (トレオニン)、79 (フェニルアラニン)、81 (グルタミン)、83 (アスパラギン)、87 (セリン)、88 (グルタミン酸)、92 (トレオニン)、107 (バリン)、および108 (メチオニン)を、グルタミン、グルタミン、トリプトファン、アラニン、ロイシン、グルタミン酸、トレオニン、トレオニン、セリン、グルタミン、プロリン、リシン、グリシン、ロイシン、イソロイシン、バリン、トレオニン、セリン、セリン、リシン、セリン、アラニン、アラニン、バリン、トレオニン、およびトレオニンでそれぞれ置換することにより設計されるヒト化#11B7重鎖可変領域を、「h#11B7-T4H」型重鎖可変領域と名付けた。

【0190】

10

7.1.4.5. h#11B7-T5H型重鎖:

配列表(図30C)の配列番号141により表される#11B7重鎖可変領域のアミノ酸番号1 (グルタミン酸)、6 (グルタミン酸)、7 (セリン)、9 (プロリン)、12 (バリン)、16 (グルタミン)、17 (セリン)、23 (セリン)、25 (トレオニン)、39 (リシン)、40 (フェニルアラニン)、43 (アスパラギン酸)、44 (リシン)、45 (メチオニン)、70 (トレオニン)、79 (フェニルアラニン)、81 (グルタミン)、83 (アスパラギン)、87 (セリン)、88 (グルタミン酸)、92 (トレオニン)、107 (バリン)、および108 (メチオニン)を、グルタミン、グルタミン、トリプトファン、アラニン、ロイシン、グルタミン酸、トレオニン、トレオニン、セリン、グルタミン、プロリン、リシン、グリシン、ロイシン、セリン、セリン、リシン、セリン、アラニン、アラニン、バリン、トレオニン、およびトレオニンでそれぞれ置換することにより設計されるヒト化#11B7重鎖可変領域を、「h#11B7-T5H」型重鎖可変領域と名付けた。

20

【0191】

7.1.4.6. h#11B7-T6H型重鎖:

配列表(図30C)の配列番号141により表される#11B7重鎖可変領域のアミノ酸1 (グルタミン酸)、16 (グルタミン)、17 (セリン)、23 (セリン)、25 (トレオニン)、39 (リシン)、40 (フェニルアラニン)、43 (アスパラギン酸)、44 (リシン)、45 (メチオニン)、70 (トレオニン)、79 (フェニルアラニン)、81 (グルタミン)、83 (アスパラギン)、87 (セリン)、88 (グルタミン酸)、92 (トレオニン)、107 (バリン)、および108 (メチオニン)を、グルタミン、グルタミン酸、トレオニン、トレオニン、セリン、グルタミン、プロリン、リシン、グリシン、ロイシン、セリン、セリン、リシン、セリン、アラニン、アラニン、バリン、トレオニン、およびロイシンでそれぞれ置換することにより設計されるヒト化#11B7重鎖可変領域を、「h#11B7-T6H」型重鎖可変領域と名付けた。

30

【0192】

7.1.4.7. h#11B7-T7H型重鎖:

配列表(図30C)の配列番号141により表される#11B7重鎖可変領域のアミノ酸番号1 (グルタミン酸)、16 (グルタミン)、17 (セリン)、23 (セリン)、25 (トレオニン)、39 (リシン)、40 (フェニルアラニン)、43 (アスパラギン酸)、44 (リシン)、45 (メチオニン)、48 (メチオニン)、67 (イソロイシン)、70 (トレオニン)、79 (フェニルアラニン)、81 (グルタミン)、83 (アスパラギン)、87 (セリン)、88 (グルタミン酸)、92 (トレオニン)、107 (バリン)、および108 (メチオニン)を、グルタミン、グルタミン酸、トレオニン、トレオニン、セリン、グルタミン、プロリン、リシン、グリシン、ロイシン、イソロイシン、バリン、セリン、セリン、リシン、セリン、アラニン、アラニン、バリン、トレオニン、およびロイシンでそれぞれ置換することにより設計されるヒト化#11B7重鎖可変領域を、「h#11B7-T7H」型重鎖可変領域と名付けた。

40

【0193】

7.1.4.8. h#11B7-T8H型重鎖:

配列表(図30C)の配列番号141により表される#11B7重鎖可変領域のアミノ酸番号1 (グルタミン酸)、16 (グルタミン)、17 (セリン)、23 (セリン)、25 (トレオニン)、39 (リシン)、40 (フェニルアラニン)、43 (アスパラギン酸)、44 (リシン)、45 (メチオニン)、6

50

8 (セリン)、70 (トレオニン)、79 (フェニルアラニン)、81 (グルタミン)、83 (アスパラギン)、87 (セリン)、88 (グルタミン酸)、92 (トレオニン)、107 (バリン)、および108 (メチオニン)を、グルタミン、グルタミン酸、トレオニン、トレオニン、セリン、グルタミン、プロリン、リシン、グリシン、ロイシン、トレオニン、セリン、セリン、リシン、セリン、アラニン、アラニン、バリン、トレオニン、およびロイシンでそれぞれ置換することにより設計されるヒト化#11B7重鎖可変領域を、「h#11B7-T8H」型重鎖可変領域と名付けた。

【 0 1 9 4 】

7.1.4.9. h#11B7-T9H型重鎖:

配列表(図30C)の配列番号141により表される#11B7重鎖可変領域のアミノ酸番号1 (グルタミン酸)、16 (グルタミン)、17 (セリン)、23 (セリン)、25 (トレオニン)、39 (リシン)、40 (フェニルアラニン)、43 (アスパラギン酸)、44 (リシン)、45 (メチオニン)、48 (メチオニン)、67 (イソロイシン)、68 (セリン)、70 (トレオニン)、79 (フェニルアラニン)、81 (グルタミン)、83 (アスパラギン)、87 (セリン)、88 (グルタミン酸)、92 (トレオニン)、107 (バリン)、および108 (メチオニン)を、グルタミン、グルタミン酸、トレオニン、トレオニン、セリン、グルタミン、プロリン、リシン、グリシン、ロイシン、イソロイシン、バリン、トレオニン、セリン、セリン、リシン、セリン、アラニン、アラニン、バリン、トレオニン、およびロイシンでそれぞれ置換することにより設計されるヒト化#11B7重鎖可変領域を、「h#11B7-T9H」型重鎖可変領域と名付けた。

【 0 1 9 5 】

7.1.4.10. h#11B7-T10H型重鎖:

配列表(図30C)の配列番号141により表される#11B7重鎖可変領域のアミノ酸番号1 (グルタミン酸)、6 (グルタミン酸)、7 (セリン)、9 (プロリン)、12 (バリン)、16 (グルタミン)、17 (セリン)、23 (セリン)、25 (トレオニン)、39 (リシン)、40 (フェニルアラニン)、43 (アスパラギン酸)、44 (リシン)、45 (メチオニン)、48 (メチオニン)、67 (イソロイシン)、70 (トレオニン)、79 (フェニルアラニン)、81 (グルタミン)、83 (アスパラギン)、87 (セリン)、88 (グルタミン酸)、92 (トレオニン)、107 (バリン)、および108 (メチオニン)を、グルタミン、グルタミン、トリプトファン、アラニン、ロイシン、グルタミン酸、トレオニン、トレオニン、セリン、グルタミン、プロリン、リシン、グリシン、ロイシン、イソロイシン、バリン、セリン、セリン、リシン、セリン、アラニン、アラニン、バリン、トレオニン、およびトレオニンでそれぞれ置換することにより設計されるヒト化#11B7重鎖可変領域を、「h#11B7-T10H」型重鎖可変領域と名付けた。

【 0 1 9 6 】

7.1.4.11. h#11B7-T11H型重鎖:

配列表(図30C)の配列番号141により表される#11B7重鎖可変領域のアミノ酸番号1 (グルタミン酸)、6 (グルタミン酸)、7 (セリン)、9 (プロリン)、12 (バリン)、16 (グルタミン)、17 (セリン)、23 (セリン)、25 (トレオニン)、39 (リシン)、40 (フェニルアラニン)、43 (アスパラギン酸)、44 (リシン)、45 (メチオニン)、68 (セリン)、70 (トレオニン)、79 (フェニルアラニン)、81 (グルタミン)、83 (アスパラギン)、87 (セリン)、88 (グルタミン酸)、92 (トレオニン)、107 (バリン)、および108 (メチオニン)を、グルタミン、グルタミン、トリプトファン、アラニン、ロイシン、グルタミン酸、トレオニン、トレオニン、セリン、グルタミン、プロリン、リシン、グリシン、ロイシン、トレオニン、セリン、セリン、リシン、セリン、アラニン、アラニン、バリン、トレオニン、およびトレオニンでそれぞれ置換することにより設計されるヒト化#11B7重鎖可変領域を、「h#11B7-T11H」型重鎖可変領域と名付けた。

【 0 1 9 7 】

7.1.4.12. h#11B7-T12H型重鎖:

配列表(図30C)の配列番号141により表される#11B7重鎖可変領域のアミノ酸番号1 (グルタミン酸)、6 (グルタミン酸)、7 (セリン)、9 (プロリン)、12 (バリン)、16 (グルタミン)、17 (セリン)、23 (セリン)、25 (トレオニン)、39 (リシン)、40 (フェニルアラニ

ン)、43 (アスパラギン酸)、44 (リシン)、45 (メチオニン)、48 (メチオニン)、67 (イソロイシン)、68 (セリン)、70 (トレオニン)、79 (フェニルアラニン)、81 (グルタミン)、83 (アスパラギン)、87 (セリン)、88 (グルタミン酸)、92 (トレオニン)、107 (バリン)、および108 (メチオニン)を、グルタミン、グルタミン、トリプトファン、アラニン、ロイシン、グルタミン酸、トレオニン、トレオニン、セリン、グルタミン、プロリン、リシン、グリシン、ロイシン、イソロイシン、バリン、トレオニン、セリン、セリン、リシン、セリン、アラニン、アラニン、バリン、トレオニン、およびトレオニンでそれぞれ置換することにより設計されるヒト化#11B7重鎖可変領域を、「h#11B7-T12H」型重鎖可変領域と名付けた。

【0198】

10

7.2. #11D5のヒト化形(バージョン)の設計

7.2.1. #11D5可変ドメインの分子モデリング

当技術分野において相同性モデリングとして一般に知られる(Methods in Enzymology、203、121~153頁(1991))方法に従い、#11D5可変ドメインの分子モデリングを実施した。タンパク質データベースに登録されているヒト免疫グロブリン可変ドメインの一次配列(X線結晶構造に由来する三次元構造も入手可能である)(Nuc. Acid Res. 35、D301~D303頁(2007))を、#11D5の可変ドメインと比較し、これにより該一次配列を決定した。結果として、1D5Iを、#11D5軽鎖可変ドメインに対して最も高度な配列相同性を有する可変ドメインとして選択した。さらに、10RSを、#11D5重鎖可変ドメインに対して最も高度な配列相同性を有する可変ドメインとして選択した。「フレームワークモデル」に基づき、#11D5の軽鎖および重鎖に対応する1D5Iおよび10RSの座標を組み合わせることにより、フレームワークドメインの三次元構造を作成した。#11D5 CDRの場合、CDRL₁、CDRL₂、CDRL₃、CDRH₁、およびCDRH₂を、Thorntonら(J. Mol. Biol.、263、800~815頁(1996))の分類によるクラスター11A、7A、9A、10A、および9Aにそれぞれ割り当てた。H3規則(FEBS letters 399、1~8頁(1996))により、CDRH₃は、k(3)に分類した。続いて、各CDRの典型的な立体構造を、フレームワークモデルに組み込んだ。

20

【0199】

最後に、エネルギーとの関係で#11D5可変ドメインの可能な分子モデルを得るため、エネルギーの計算を実施して、不利な原子間接触を除外した。これらの手順は、市販のタンパク質三次元構造予測プログラムであるPrime、ならびに座標検索プログラムであるMacro Model (Schroedinger, LLC)を使用して実施した。

30

【0200】

7.2.2. ヒト化#11D5のアミノ酸配列の設計

ヒト化#11D5抗体は、当技術分野においてCDR移植(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86、10029~10033頁(1989))として一般に知られている方法により構築した。アクセプター抗体は、フレームワークドメインにおけるアミノ酸の相同性に基づき、2つの方法で選択した。

【0201】

#11D5フレームワークドメインの配列を、Kabatデータベース(Nuc. Acid Res. 29、205~206頁(2001))に登録されている、抗体アミノ酸配列に関与する全てのヒトフレームワークの配列と比較した。結果として、それらのフレームワークドメイン間における70%の配列相同性により、T33-4'CL抗体をアクセプターとして選択した。T33-4'CLにおけるフレームワークドメインのアミノ酸残基を、#11D5における対応するアミノ酸残基と共に配列決定して、それらの間で異なるアミノ酸が用いられている位置を同定した。#11D5の三次元モデルを使用してこれらの残基の位置を分析し、これによりこれらの残基を構築した。次いで、Queenら(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86、10029~10033頁(1989))により示される基準に従い、アクセプター上に移植されるドナー残基を選択した。

40

【0202】

#11D5フレームワークドメインの配列を、IgBLAST (Nuc. Acid Res. 36、D25~D30頁(2007))に登録されている全てのヒトフレームワークの配列と比較した。結果として、それら

50

のフレームワークドメイン間における74%の配列同一性により、1603260BをL鎖アクセプターとして選択した。それらのフレームワークドメイン間における66%の配列同一性により、AAF80028をH鎖アクセプターとして選択した。1603260BのL鎖およびAAF80028のH鎖におけるフレームワークドメインのアミノ酸残基を、#11D5における対応するアミノ酸残基と共に配列決定して、それらの間で異なるアミノ酸が用いられている位置を同定した。#11D5の三次元モデルを使用してこれらの残基の位置を分析し、これによりこれらの残基を構築した。次いで、Queenら(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86、10029～10033頁(1989))により示される基準に従い、アクセプター上に移植されるドナー残基を選択した。

【0203】

全ての方法において、以下の実施例で説明する通り、一部の選択されたドナー残基をアクセプター抗体へと形質導入することにより、ヒト化#11D5配列を構築した。

【0204】

7.2.3. #11D5軽鎖のヒト化(図6、7、8、9、10および11)

7.2.3.1. h#11D5-T1L型軽鎖:

配列表(図30D)の配列番号142により表される#11D5軽鎖可変領域のアミノ酸番号2(イソロイシン)、11(メチオニン)、13(トレオニン)、15(ロイシン)、36(フェニルアラニン)、40(バリン)、43(セリン)、45(アルギニン)、46(アルギニン)、47(メチオニン)、66(アルギニン)、69(セリン)、71(チロシン)、72(セリン)、79(グルタミン酸)、80(セリン)、83(メチオニン)、85(イソロイシン)、100(セリン)、106(ロイシン)、および109(プロリン)を、バリン、ロイシン、アラニン、バリン、チロシン、プロリン、アラニン、リシン、ロイシン、ロイシン、グリシン、トレオニン、フェニルアラニン、トレオニン、グルタミン、プロリン、フェニルアラニン、トレオニン、グルタミン、イソロイシン、およびトレオニンでそれぞれ置換することにより設計されるヒト化#11D5軽鎖可変領域を、「h#11D5-T1L」型軽鎖可変領域と名付けた。

【0205】

7.2.3.2. h#11D5-T2L型軽鎖:

配列表(図30D)の配列番号142により表される#11D5軽鎖可変領域のアミノ酸番号11(メチオニン)、13(トレオニン)、15(ロイシン)、40(バリン)、43(セリン)、46(アルギニン)、66(アルギニン)、69(セリン)、72(セリン)、79(グルタミン酸)、80(セリン)、83(メチオニン)、85(イソロイシン)、100(セリン)、106(ロイシン)、および109(プロリン)を、ロイシン、アラニン、バリン、プロリン、アラニン、ロイシン、グリシン、トレオニン、トレオニン、グルタミン、プロリン、フェニルアラニン、トレオニン、グルタミン、イソロイシン、およびトレオニンでそれぞれ置換することにより設計されるヒト化#11D5軽鎖可変領域を、「h#11D5-T2L」型軽鎖可変領域と名付けた。

【0206】

7.2.3.3. h#11D5-T3L型軽鎖:

配列表(図30D)の配列番号142により表される#11D5軽鎖可変領域のアミノ酸番号11(メチオニン)、13(トレオニン)、15(ロイシン)、72(セリン)、79(グルタミン酸)、80(セリン)、83(メチオニン)、106(ロイシン)、および109(プロリン)を、ロイシン、アラニン、バリン、トレオニン、グルタミン、プロリン、フェニルアラニン、イソロイシン、およびトレオニンでそれぞれ置換することにより設計されるヒト化#11D5軽鎖可変領域を、「h#11D5-T3L」型軽鎖可変領域と名付けた。

【0207】

7.2.3.4. h#11D5-T4L型軽鎖:

配列表(図30D)の配列番号142により表される#11D5軽鎖可変領域のアミノ酸番号11(メチオニン)、13(トレオニン)、15(ロイシン)、36(フェニルアラニン)、40(バリン)、43(セリン)、45(アルギニン)、47(メチオニン)、66(アルギニン)、69(セリン)、70(アスパラギン酸)、71(チロシン)、72(セリン)、79(グルタミン酸)、80(セリン)、83(メチオニン)、85(イソロイシン)、100(セリン)、104(ロイシン)、106(ロイシン)、および109(プロリン)を、ロイシン、アラニン、バリン、チロシン、プロリン、アラニン

、リシン、ロイシン、グリシン、トレオニン、グルタミン酸、フェニルアラニン、トレオニン、グルタミン、プロリン、フェニルアラニン、トレオニン、グリシン、バリン、イソロイシン、およびトレオニンでそれぞれ置換することにより設計されるヒト化#11D5軽鎖可変領域を、「h#11D5-T4L」型軽鎖可変領域と名付けた。

【0208】

7.2.3.5. h#11D5-T5L型軽鎖:

配列表(図30D)の配列番号142により表される#11D5軽鎖可変領域のアミノ酸番号11 (メチオニン)、13 (トレオニン)、15 (ロイシン)、40 (バリン)、43 (セリン)、66 (アルギニン)、69 (セリン)、72 (セリン)、79 (グルタミン酸)、80 (セリン)、83 (メチオニン)、85 (イソロイシン)、100 (セリン)、104 (ロイシン)、106 (ロイシン)、および109 (プロリン)を、ロイシン、アラニン、バリン、プロリン、アラニン、グリシン、トレオニン、トレオニン、グルタミン、プロリン、フェニルアラニン、トレオニン、グリシン、バリン、イソロイシン、およびトレオニンでそれぞれ置換することにより設計されるヒト化#11D5軽鎖可変領域を、「h#11D5-T5L」型軽鎖可変領域と名付けた。

【0209】

7.2.3.6. h#11D5-T6L型軽鎖:

配列表(図30D)の配列番号142により表される#11D5軽鎖可変領域のアミノ酸番号11 (メチオニン)、13 (トレオニン)、15 (ロイシン)、40 (バリン)、43 (セリン)、66 (アルギニン)、69 (セリン)、72 (セリン)、79 (グルタミン酸)、80 (セリン)、83 (メチオニン)、85 (イソロイシン)、100 (セリン)、104 (ロイシン)、106 (ロイシン)、および109 (プロリン)を、ロイシン、アラニン、バリン、プロリン、アラニン、グリシン、トレオニン、トレオニン、グルタミン、プロリン、フェニルアラニン、トレオニン、グルタミン、バリン、イソロイシン、およびトレオニンでそれぞれ置換することにより設計されるヒト化#11D5軽鎖可変領域を、「h#11D5-T6L」型軽鎖可変領域と名付けた。

【0210】

7.2.3.7. h#11D5-T7L型軽鎖:

配列表(図30D)の配列番号142により表される#11D5軽鎖可変領域のアミノ酸番号11 (メチオニン)、13 (トレオニン)、15 (ロイシン)、36 (フェニルアラニン)、40 (バリン)、43 (セリン)、45 (アルギニン)、47 (メチオニン)、66 (アルギニン)、69 (セリン)、70 (アスパラギン酸)、71 (チロシン)、72 (セリン)、79 (グルタミン酸)、80 (セリン)、83 (メチオニン)、85 (イソロイシン)、100 (セリン)、104 (ロイシン)、106 (ロイシン)、および109 (プロリン)を、ロイシン、アラニン、バリン、チロシン、プロリン、アラニン、リシン、ロイシン、グリシン、トレオニン、グルタミン酸、フェニルアラニン、トレオニン、グルタミン、プロリン、フェニルアラニン、トレオニン、グルタミン、バリン、イソロイシン、およびトレオニンでそれぞれ置換することにより設計されるヒト化#11D5軽鎖可変領域を、「h#11D5-T7L」型軽鎖可変領域と名付けた。

【0211】

7.2.3.8. h#11D5-T8L型軽鎖:

配列表(図30D)の配列番号142により表される#11D5軽鎖可変領域のアミノ酸番号11 (メチオニン)、13 (トレオニン)、15 (ロイシン)、40 (バリン)、43 (セリン)、45 (アルギニン)、47 (メチオニン)、66 (アルギニン)、69 (セリン)、70 (アスパラギン酸)、71 (チロシン)、72 (セリン)、79 (グルタミン酸)、80 (セリン)、83 (メチオニン)、85 (イソロイシン)、100 (セリン)、104 (ロイシン)、106 (ロイシン)、および109 (プロリン)を、ロイシン、アラニン、バリン、プロリン、アラニン、リシン、ロイシン、グリシン、トレオニン、グルタミン酸、フェニルアラニン、トレオニン、グルタミン、プロリン、フェニルアラニン、トレオニン、グルタミン、バリン、イソロイシン、およびトレオニンでそれぞれ置換することにより設計されるヒト化#11D5軽鎖可変領域を、「h#11D5-T8L」型軽鎖可変領域と名付けた。

【0212】

7.2.3.9. h#11D5-T9L型軽鎖:

10

20

30

40

50

配列表(図30D)の配列番号142により表される#11D5軽鎖可変領域のアミノ酸番号11(メチオニン)、13(トレオニン)、15(ロイシン)、36(フェニルアラニン)、40(バリン)、43(セリン)、47(メチオニン)、66(アルギニン)、69(セリン)、70(アスパラギン酸)、71(チロシン)、72(セリン)、79(グルタミン酸)、80(セリン)、83(メチオニン)、85(イソロイシン)、100(セリン)、104(ロイシン)、106(ロイシン)、および109(プロリン)を、ロイシン、アラニン、バリン、チロシン、プロリン、アラニン、ロイシン、グリシン、トレオニン、グルタミン酸、フェニルアラニン、トレオニン、グルタミン、プロリン、フェニルアラニン、トレオニン、グルタミン、バリン、イソロイシン、およびトレオニンでそれぞれ置換することにより設計されるヒト化#11D5軽鎖可変領域を、「h#11D5-T9L」型軽鎖可変領域と名付けた。

10

【0213】

7.2.3.10. h#11D5-T10L型軽鎖:

配列表(図30D)の配列番号142により表される#11D5軽鎖可変領域のアミノ酸番号11(メチオニン)、13(トレオニン)、15(ロイシン)、36(フェニルアラニン)、40(バリン)、43(セリン)、45(アルギニン)、66(アルギニン)、69(セリン)、70(アスパラギン酸)、71(チロシン)、72(セリン)、79(グルタミン酸)、80(セリン)、83(メチオニン)、85(イソロイシン)、100(セリン)、104(ロイシン)、106(ロイシン)、および109(プロリン)を、ロイシン、アラニン、バリン、チロシン、プロリン、アラニン、リシン、グリシン、トレオニン、グルタミン酸、フェニルアラニン、トレオニン、グルタミン、プロリン、フェニルアラニン、トレオニン、グルタミン、バリン、イソロイシン、およびトレオニンでそれぞれ置換することにより設計されるヒト化#11D5軽鎖可変領域を、「h#11D5-T10L」型軽鎖可変領域と名付けた。

20

【0214】

7.2.3.11. h#11D5-T11L型軽鎖:

配列表(図30D)の配列番号142により表される#11D5軽鎖可変領域のアミノ酸番号11(メチオニン)、13(トレオニン)、15(ロイシン)、36(フェニルアラニン)、40(バリン)、43(セリン)、45(アルギニン)、47(メチオニン)、66(アルギニン)、69(セリン)、71(チロシン)、72(セリン)、79(グルタミン酸)、80(セリン)、83(メチオニン)、85(イソロイシン)、100(セリン)、104(ロイシン)、106(ロイシン)、および109(プロリン)を、ロイシン、アラニン、バリン、チロシン、プロリン、アラニン、リシン、ロイシン、グリシン、トレオニン、フェニルアラニン、トレオニン、グルタミン、プロリン、フェニルアラニン、トレオニン、グルタミン、バリン、イソロイシン、およびトレオニンでそれぞれ置換することにより設計されるヒト化#11D5軽鎖可変領域を、「h#11D5-T11L」型軽鎖可変領域と名付けた。

30

【0215】

7.2.3.12. h#11D5-T12L型軽鎖:

配列表(図30D)の配列番号142により表される#11D5軽鎖可変領域のアミノ酸番号11(メチオニン)、13(トレオニン)、15(ロイシン)、36(フェニルアラニン)、40(バリン)、43(セリン)、45(アルギニン)、47(メチオニン)、66(アルギニン)、69(セリン)、70(アスパラギン酸)、72(セリン)、79(グルタミン酸)、80(セリン)、83(メチオニン)、85(イソロイシン)、100(セリン)、104(ロイシン)、106(ロイシン)、および109(プロリン)を、ロイシン、アラニン、バリン、チロシン、プロリン、アラニン、リシン、ロイシン、グリシン、トレオニン、グルタミン酸、トレオニン、グルタミン、プロリン、フェニルアラニン、トレオニン、グルタミン、バリン、イソロイシン、およびトレオニンでそれぞれ置換することにより設計されるヒト化#11D5軽鎖可変領域を、「h#11D5-T12L」型軽鎖可変領域と名付けた。

40

【0216】

7.2.3.13. h#11D5-T13L型軽鎖:

配列表(図30D)の配列番号142により表される#11D5軽鎖可変領域のアミノ酸番号11(メチオニン)、13(トレオニン)、15(ロイシン)、40(バリン)、43(セリン)、47(メチオ

50

ニン)、66 (アルギニン)、69 (セリン)、70 (アスパラギン酸)、71 (チロシン)、72 (セリン)、79 (グルタミン酸)、80 (セリン)、83 (メチオニン)、85 (イソロイシン)、100 (セリン)、104 (ロイシン)、106 (ロイシン)、および109 (プロリン)を、ロイシン、アラニン、バリン、プロリン、アラニン、ロイシン、グリシン、トレオニン、グルタミン酸、フェニルアラニン、トレオニン、グルタミン、プロリン、フェニルアラニン、トレオニン、グルタミン、バリン、イソロイシン、およびトレオニンでそれぞれ置換することにより設計されるヒト化#11D5軽鎖可変領域を、「h#11D5-T13L」型軽鎖可変領域と名付けた。

【0217】

7.2.3.14. h#11D5-T14L型軽鎖:

配列表(図30D)の配列番号142により表される#11D5軽鎖可変領域のアミノ酸番号11 (メチオニン)、13 (トレオニン)、15 (ロイシン)、40 (バリン)、43 (セリン)、45 (アルギニン)、66 (アルギニン)、69 (セリン)、70 (アスパラギン酸)、71 (チロシン)、72 (セリン)、79 (グルタミン酸)、80 (セリン)、83 (メチオニン)、85 (イソロイシン)、100 (セリン)、104 (ロイシン)、106 (ロイシン)、および109 (プロリン)を、ロイシン、アラニン、バリン、プロリン、アラニン、リシン、グリシン、トレオニン、グルタミン酸、フェニルアラニン、トレオニン、グルタミン、プロリン、フェニルアラニン、トレオニン、グルタミン、バリン、イソロイシン、およびトレオニンでそれぞれ置換することにより設計されるヒト化#11D5軽鎖可変領域を、「h#11D5-T14L」型軽鎖可変領域と名付けた。

【0218】

7.2.3.15. h#11D5-T15L型軽鎖:

配列表(図30D)の配列番号142により表される#11D5軽鎖可変領域のアミノ酸番号11 (メチオニン)、13 (トレオニン)、15 (ロイシン)、40 (バリン)、43 (セリン)、45 (アルギニン)、47 (メチオニン)、66 (アルギニン)、69 (セリン)、71 (チロシン)、72 (セリン)、79 (グルタミン酸)、80 (セリン)、83 (メチオニン)、85 (イソロイシン)、100 (セリン)、104 (ロイシン)、106 (ロイシン)、および109 (プロリン)を、ロイシン、アラニン、バリン、プロリン、アラニン、リシン、ロイシン、グリシン、トレオニン、フェニルアラニン、トレオニン、グルタミン、プロリン、フェニルアラニン、トレオニン、グルタミン、バリン、イソロイシン、およびトレオニンでそれぞれ置換することにより設計されるヒト化#11D5軽鎖可変領域を、「h#11D5-T15L」型軽鎖可変領域と名付けた。

【0219】

7.2.3.16. h#11D5-T16L型軽鎖:

配列表(図30D)の配列番号142により表される#11D5軽鎖可変領域のアミノ酸番号11 (メチオニン)、13 (トレオニン)、15 (ロイシン)、40 (バリン)、43 (セリン)、45 (アルギニン)、47 (メチオニン)、66 (アルギニン)、69 (セリン)、70 (アスパラギン酸)、72 (セリン)、79 (グルタミン酸)、80 (セリン)、83 (メチオニン)、85 (イソロイシン)、100 (セリン)、104 (ロイシン)、106 (ロイシン)、および109 (プロリン)を、ロイシン、アラニン、バリン、プロリン、アラニン、リシン、ロイシン、グリシン、トレオニン、グルタミン酸、トレオニン、グルタミン、プロリン、フェニルアラニン、トレオニン、グルタミン、バリン、イソロイシン、およびトレオニンでそれぞれ置換することにより設計されるヒト化#11D5軽鎖可変領域を、「h#11D5-T16L」型軽鎖可変領域と名付けた。

【0220】

7.2.3.17. h#11D5-T17L型軽鎖:

配列表(図30D)の配列番号142により表される#11D5軽鎖可変領域のアミノ酸番号11 (メチオニン)、13 (トレオニン)、15 (ロイシン)、36 (フェニルアラニン)、40 (バリン)、43 (セリン)、66 (アルギニン)、69 (セリン)、70 (アスパラギン酸)、71 (チロシン)、72 (セリン)、79 (グルタミン酸)、80 (セリン)、83 (メチオニン)、85 (イソロイシン)、100 (セリン)、104 (ロイシン)、106 (ロイシン)、および109 (プロリン)を、ロイシン、アラニン、バリン、チロシン、プロリン、アラニン、グリシン、トレオニン、グルタミン酸、フェニルアラニン、トレオニン、グルタミン、プロリン、フェニルアラニン、トレオニン、グルタミン、バリン、イソロイシン、およびトレオニンでそれぞれ置換することにより設計されるヒト化#11D5軽鎖可変領域を、「h#11D5-T17L」型軽鎖可変領域と名付けた。

10

20

30

40

50

より設計されるヒト化#11D5軽鎖可変領域を、「h#11D5-T17L」型軽鎖可変領域と名付けた。

【0221】

7.2.3.18. h#11D5-T18L型軽鎖:

配列表(図30D)の配列番号142により表される#11D5軽鎖可変領域のアミノ酸番号11 (メチオニン)、13 (トレオニン)、15 (ロイシン)、36 (フェニルアラニン)、40 (バリン)、43 (セリン)、47 (メチオニン)、66 (アルギニン)、69 (セリン)、71 (チロシン)、72 (セリン)、79 (グルタミン酸)、80 (セリン)、83 (メチオニン)、85 (イソロイシン)、100 (セリン)、104 (ロイシン)、106 (ロイシン)、および109 (プロリン)を、ロイシン、アラニン、バリン、チロシン、プロリン、アラニン、ロイシン、グリシン、トレオニン、フェニルアラニン、トレオニン、グルタミン、プロリン、フェニルアラニン、トレオニン、グルタミン、バリン、イソロイシン、およびトレオニンでそれぞれ置換することにより設計されるヒト化#11D5軽鎖可変領域を、「h#11D5-T18L」型軽鎖可変領域と名付けた。

10

【0222】

7.2.3.19. h#11D5-T19L型軽鎖:

配列表(図30D)の配列番号142により表される#11D5軽鎖可変領域のアミノ酸番号11 (メチオニン)、13 (トレオニン)、15 (ロイシン)、36 (フェニルアラニン)、40 (バリン)、43 (セリン)、47 (メチオニン)、66 (アルギニン)、69 (セリン)、70 (アスパラギン酸)、72 (セリン)、79 (グルタミン酸)、80 (セリン)、83 (メチオニン)、85 (イソロイシン)、100 (セリン)、104 (ロイシン)、106 (ロイシン)、および109 (プロリン)を、ロイシン、アラニン、バリン、チロシン、プロリン、アラニン、ロイシン、グリシン、トレオニン、グルタミン酸、トレオニン、グルタミン、プロリン、フェニルアラニン、トレオニン、グルタミン、バリン、イソロイシン、およびトレオニンでそれぞれ置換することにより設計されるヒト化#11D5軽鎖可変領域を、「h#11D5-T19L」型軽鎖可変領域と名付けた。

20

【0223】

7.2.3.20. h#11D5-T20L型軽鎖:

配列表(図30D)の配列番号142により表される#11D5軽鎖可変領域のアミノ酸番号11 (メチオニン)、13 (トレオニン)、15 (ロイシン)、36 (フェニルアラニン)、40 (バリン)、43 (セリン)、45 (アルギニン)、66 (アルギニン)、69 (セリン)、71 (チロシン)、72 (セリン)、79 (グルタミン酸)、80 (セリン)、83 (メチオニン)、85 (イソロイシン)、100 (セリン)、104 (ロイシン)、106 (ロイシン)、および109 (プロリン)を、ロイシン、アラニン、バリン、チロシン、プロリン、アラニン、ロイシン、グリシン、トレオニン、フェニルアラニン、トレオニン、グルタミン、プロリン、フェニルアラニン、トレオニン、グルタミン、バリン、イソロイシン、およびトレオニンでそれぞれ置換することにより設計されるヒト化#11D5軽鎖可変領域を、「h#11D5-T20L」型軽鎖可変領域と名付けた。

30

【0224】

7.2.3.21. h#11D5-T21L型軽鎖:

配列表(図30D)の配列番号142により表される#11D5軽鎖可変領域のアミノ酸番号11 (メチオニン)、13 (トレオニン)、15 (ロイシン)、36 (フェニルアラニン)、40 (バリン)、43 (セリン)、45 (アルギニン)、66 (アルギニン)、69 (セリン)、70 (アスパラギン酸)、72 (セリン)、79 (グルタミン酸)、80 (セリン)、83 (メチオニン)、85 (イソロイシン)、100 (セリン)、104 (ロイシン)、106 (ロイシン)、および109 (プロリン)を、ロイシン、アラニン、バリン、チロシン、プロリン、アラニン、ロイシン、グリシン、トレオニン、グルタミン酸、トレオニン、グルタミン、プロリン、フェニルアラニン、トレオニン、グルタミン、バリン、イソロイシン、およびトレオニンでそれぞれ置換することにより設計されるヒト化#11D5軽鎖可変領域を、「h#11D5-T21L」型軽鎖可変領域と名付けた。

40

【0225】

7.2.3.22. h#11D5-T22L型軽鎖:

配列表(図30D)の配列番号142により表される#11D5軽鎖可変領域のアミノ酸番号11 (メチオニン)、13 (トレオニン)、15 (ロイシン)、36 (フェニルアラニン)、40 (バリン)、4

50

3 (セリン)、45 (アルギニン)、47 (メチオニン)、66 (アルギニン)、69 (セリン)、72 (セリン)、79 (グルタミン酸)、80 (セリン)、83 (メチオニン)、85 (イソロイシン)、100 (セリン)、104 (ロイシン)、106 (ロイシン)、および109 (プロリン)を、ロイシン、アラニン、バリン、チロシン、プロリン、アラニン、リシン、ロイシン、グリシン、トレオニン、トレオニン、グルタミン、プロリン、フェニルアラニン、トレオニン、グルタミン、バリン、イソロイシン、およびトレオニンでそれぞれ置換することにより設計されるヒト化#11D5軽鎖可変領域を、「h#11D5-T22L」型軽鎖可変領域と名付けた。

【 0 2 2 6 】

7.2.3.23. h#11D5-T23L型軽鎖:

配列表(図30D)の配列番号142により表される#11D5軽鎖可変領域のアミノ酸番号11 (メチオニン)、13 (トレオニン)、15 (ロイシン)、40 (バリン)、43 (セリン)、66 (アルギニン)、69 (セリン)、70 (アスパラギン酸)、71 (チロシン)、72 (セリン)、79 (グルタミン酸)、80 (セリン)、83 (メチオニン)、85 (イソロイシン)、100 (セリン)、104 (ロイシン)、106 (ロイシン)、および109 (プロリン)を、ロイシン、アラニン、バリン、プロリン、アラニン、グリシン、トレオニン、グルタミン酸、フェニルアラニン、トレオニン、グルタミン、プロリン、フェニルアラニン、トレオニン、グルタミン、バリン、イソロイシン、およびトレオニンでそれぞれ置換することにより設計されるヒト化#11D5軽鎖可変領域を、「h#11D5-T23L」型軽鎖可変領域と名付けた。

【 0 2 2 7 】

7.2.3.24. h#11D5-T24L型軽鎖:

配列表(図30D)の配列番号142により表される#11D5軽鎖可変領域のアミノ酸番号11 (メチオニン)、13 (トレオニン)、15 (ロイシン)、40 (バリン)、43 (セリン)、47 (メチオニン)、66 (アルギニン)、69 (セリン)、71 (チロシン)、72 (セリン)、79 (グルタミン酸)、80 (セリン)、83 (メチオニン)、85 (イソロイシン)、100 (セリン)、104 (ロイシン)、106 (ロイシン)、および109 (プロリン)を、ロイシン、アラニン、バリン、プロリン、アラニン、ロイシン、グリシン、トレオニン、フェニルアラニン、トレオニン、グルタミン、プロリン、フェニルアラニン、トレオニン、グルタミン、バリン、イソロイシン、およびトレオニンでそれぞれ置換することにより設計されるヒト化#11D5軽鎖可変領域を、「h#11D5-T24L」型軽鎖可変領域と名付けた。

【 0 2 2 8 】

7.2.3.25. h#11D5-T25L型軽鎖:

配列表(図30D)の配列番号142により表される#11D5軽鎖可変領域のアミノ酸番号11 (メチオニン)、13 (トレオニン)、15 (ロイシン)、40 (バリン)、43 (セリン)、47 (メチオニン)、66 (アルギニン)、69 (セリン)、70 (アスパラギン酸)、72 (セリン)、79 (グルタミン酸)、80 (セリン)、83 (メチオニン)、85 (イソロイシン)、100 (セリン)、104 (ロイシン)、106 (ロイシン)、および109 (プロリン)を、ロイシン、アラニン、バリン、プロリン、アラニン、ロイシン、グリシン、トレオニン、グルタミン酸、トレオニン、グルタミン、プロリン、フェニルアラニン、トレオニン、グルタミン、バリン、イソロイシン、およびトレオニンでそれぞれ置換することにより設計されるヒト化#11D5軽鎖可変領域を、「h#11D5-T25L」型軽鎖可変領域と名付けた。

【 0 2 2 9 】

7.2.3.26. h#11D5-T26L型軽鎖:

配列表(図30D)の配列番号142により表される#11D5軽鎖可変領域のアミノ酸番号11 (メチオニン)、13 (トレオニン)、15 (ロイシン)、40 (バリン)、43 (セリン)、45 (アルギニン)、66 (アルギニン)、69 (セリン)、71 (チロシン)、72 (セリン)、79 (グルタミン酸)、80 (セリン)、83 (メチオニン)、85 (イソロイシン)、100 (セリン)、104 (ロイシン)、106 (ロイシン)、および109 (プロリン)を、ロイシン、アラニン、バリン、プロリン、アラニン、リシン、グリシン、トレオニン、フェニルアラニン、トレオニン、グルタミン、プロリン、フェニルアラニン、トレオニン、グルタミン、バリン、イソロイシン、およびトレオニンでそれぞれ置換することにより設計されるヒト化#11D5軽鎖可変領域を

10

20

30

40

50

、「h#11D5-T26L」型軽鎖可変領域と名付けた。

【0230】

7.2.3.27. h#11D5-T27L型軽鎖：

配列表(図30D)の配列番号142により表される#11D5軽鎖可変領域のアミノ酸番号11 (メチオニン)、13 (トレオニン)、15 (ロイシン)、40 (バリン)、43 (セリン)、45 (アルギニン)、66 (アルギニン)、69 (セリン)、70 (アスパラギン酸)、72 (セリン)、79 (グルタミン酸)、80 (セリン)、83 (メチオニン)、85 (イソロイシン)、100 (セリン)、104 (ロイシン)、106 (ロイシン)、および109 (プロリン)を、ロイシン、アラニン、バリン、プロリン、アラニン、リシン、グリシン、トレオニン、グルタミン酸、トレオニン、グルタミン、プロリン、フェニルアラニン、トレオニン、グルタミン、バリン、イソロイシン、およびトレオニンでそれぞれ置換することにより設計されるヒト化#11D5軽鎖可変領域を、「h#11D5-T27L」型軽鎖可変領域と名付けた。

10

【0231】

7.2.3.28. h#11D5-T28L型軽鎖：

配列表(図30D)の配列番号142により表される#11D5軽鎖可変領域のアミノ酸番号11 (メチオニン)、13 (トレオニン)、15 (ロイシン)、40 (バリン)、43 (セリン)、45 (アルギニン)、47 (メチオニン)、66 (アルギニン)、69 (セリン)、72 (セリン)、79 (グルタミン酸)、80 (セリン)、83 (メチオニン)、85 (イソロイシン)、100 (セリン)、104 (ロイシン)、106 (ロイシン)、および109 (プロリン)を、ロイシン、アラニン、バリン、プロリン、アラニン、リシン、ロイシン、グリシン、トレオニン、トレオニン、グルタミン、プロリン、フェニルアラニン、トレオニン、グルタミン、バリン、イソロイシン、およびトレオニンでそれぞれ置換することにより設計されるヒト化#11D5軽鎖可変領域を、「h#11D5-T28L」型軽鎖可変領域と名付けた。

20

【0232】

7.2.3.29. h#11D5-T29L型軽鎖：

配列表(図30D)の配列番号142により表される#11D5軽鎖可変領域のアミノ酸番号11 (メチオニン)、13 (トレオニン)、15 (ロイシン)、36 (フェニルアラニン)、40 (バリン)、43 (セリン)、66 (アルギニン)、69 (セリン)、71 (チロシン)、72 (セリン)、79 (グルタミン酸)、80 (セリン)、83 (メチオニン)、85 (イソロイシン)、100 (セリン)、104 (ロイシン)、106 (ロイシン)、および109 (プロリン)を、ロイシン、アラニン、バリン、チロシン、プロリン、アラニン、グリシン、トレオニン、フェニルアラニン、トレオニン、グルタミン、プロリン、フェニルアラニン、トレオニン、グルタミン、バリン、イソロイシン、およびトレオニンでそれぞれ置換することにより設計されるヒト化#11D5軽鎖可変領域を、「h#11D5-T29L」型軽鎖可変領域と名付けた。

30

【0233】

7.2.3.30. h#11D5-T30L型軽鎖：

配列表(図30D)の配列番号142により表される#11D5軽鎖可変領域のアミノ酸番号11 (メチオニン)、13 (トレオニン)、15 (ロイシン)、36 (フェニルアラニン)、40 (バリン)、43 (セリン)、66 (アルギニン)、69 (セリン)、70 (アスパラギン酸)、72 (セリン)、79 (グルタミン酸)、80 (セリン)、83 (メチオニン)、85 (イソロイシン)、100 (セリン)、104 (ロイシン)、106 (ロイシン)、および109 (プロリン)を、ロイシン、アラニン、バリン、チロシン、プロリン、アラニン、グリシン、トレオニン、グルタミン酸、トレオニン、グルタミン、プロリン、フェニルアラニン、トレオニン、グルタミン、バリン、イソロイシン、およびトレオニンでそれぞれ置換することにより設計されるヒト化#11D5軽鎖可変領域を、「h#11D5-T30L」型軽鎖可変領域と名付けた。

40

【0234】

7.2.3.31. h#11D5-T31L型軽鎖：

配列表(図30D)の配列番号142により表される#11D5軽鎖可変領域のアミノ酸番号11 (メチオニン)、13 (トレオニン)、15 (ロイシン)、36 (フェニルアラニン)、40 (バリン)、43 (セリン)、47 (メチオニン)、66 (アルギニン)、69 (セリン)、72 (セリン)、79 (グル

50

タミン酸)、80 (セリン)、83 (メチオニン)、85 (イソロイシン)、100 (セリン)、104 (ロイシン)、106 (ロイシン)、および109 (プロリン)を、ロイシン、アラニン、バリン、チロシン、プロリン、アラニン、ロイシン、グリシン、トレオニン、トレオニン、グルタミン、プロリン、フェニルアラニン、トレオニン、グルタミン、バリン、イソロイシン、およびトレオニンでそれぞれ置換することにより設計されるヒト化#11D5軽鎖可変領域を、「h#11D5-T31L」型軽鎖可変領域と名付けた。

【0235】

7.2.3.32. h#11D5-T32L型軽鎖:

配列表(図30D)の配列番号142により表される#11D5軽鎖可変領域のアミノ酸番号11 (メチオニン)、13 (トレオニン)、15 (ロイシン)、36 (フェニルアラニン)、40 (バリン)、43 (セリン)、45 (アルギニン)、66 (アルギニン)、69 (セリン)、72 (セリン)、79 (グルタミン酸)、80 (セリン)、83 (メチオニン)、85 (イソロイシン)、100 (セリン)、104 (ロイシン)、106 (ロイシン)、および109 (プロリン)を、ロイシン、アラニン、バリン、チロシン、プロリン、アラニン、ロイシン、グリシン、トレオニン、トレオニン、グルタミン、プロリン、フェニルアラニン、トレオニン、グルタミン、バリン、イソロイシン、およびトレオニンでそれぞれ置換することにより設計されるヒト化#11D5軽鎖可変領域を、「h#11D5-T32L」型軽鎖可変領域と名付けた。

【0236】

7.2.3.33. h#11D5-T33L型軽鎖:

配列表(図30D)の配列番号142により表される#11D5軽鎖可変領域のアミノ酸番号11 (メチオニン)、13 (トレオニン)、15 (ロイシン)、40 (バリン)、43 (セリン)、66 (アルギニン)、69 (セリン)、71 (チロシン)、72 (セリン)、79 (グルタミン酸)、80 (セリン)、83 (メチオニン)、85 (イソロイシン)、100 (セリン)、104 (ロイシン)、106 (ロイシン)、および109 (プロリン)を、ロイシン、アラニン、バリン、プロリン、アラニン、グリシン、トレオニン、フェニルアラニン、トレオニン、グルタミン、プロリン、フェニルアラニン、トレオニン、グルタミン、バリン、イソロイシン、およびトレオニンでそれぞれ置換することにより設計されるヒト化#11D5軽鎖可変領域を、「h#11D5-T33L」型軽鎖可変領域と名付けた。

【0237】

7.2.3.34. h#11D5-T34L型軽鎖:

配列表(図30D)の配列番号142により表される#11D5軽鎖可変領域のアミノ酸番号11 (メチオニン)、13 (トレオニン)、15 (ロイシン)、40 (バリン)、43 (セリン)、66 (アルギニン)、69 (セリン)、70 (アスパラギン酸)、72 (セリン)、79 (グルタミン酸)、80 (セリン)、83 (メチオニン)、85 (イソロイシン)、100 (セリン)、104 (ロイシン)、106 (ロイシン)、および109 (プロリン)を、ロイシン、アラニン、バリン、プロリン、アラニン、グリシン、トレオニン、グルタミン酸、トレオニン、グルタミン、プロリン、フェニルアラニン、トレオニン、グルタミン、バリン、イソロイシン、およびトレオニンでそれぞれ置換することにより設計されるヒト化#11D5軽鎖可変領域を、「h#11D5-T34L」型軽鎖可変領域と名付けた。

【0238】

7.2.3.35. h#11D5-T35L型軽鎖:

配列表(図30D)の配列番号142により表される#11D5軽鎖可変領域のアミノ酸番号11 (メチオニン)、13 (トレオニン)、15 (ロイシン)、40 (バリン)、43 (セリン)、47 (メチオニン)、66 (アルギニン)、69 (セリン)、72 (セリン)、79 (グルタミン酸)、80 (セリン)、83 (メチオニン)、85 (イソロイシン)、100 (セリン)、104 (ロイシン)、106 (ロイシン)、および109 (プロリン)を、ロイシン、アラニン、バリン、プロリン、アラニン、ロイシン、グリシン、トレオニン、トレオニン、グルタミン、プロリン、フェニルアラニン、トレオニン、グルタミン、バリン、イソロイシン、およびトレオニンでそれぞれ置換することにより設計されるヒト化#11D5軽鎖可変領域を、「h#11D5-T35L」型軽鎖可変領域と名付けた。

10

20

30

40

50

【 0 2 3 9 】

7.2.3.36. h#11D5-T36L型軽鎖:

配列表(図30D)の配列番号142により表される#11D5軽鎖可変領域のアミノ酸番号11 (メチオニン)、13 (トレオニン)、15 (ロイシン)、40 (バリン)、43 (セリン)、45 (アルギニン)、66 (アルギニン)、69 (セリン)、72 (セリン)、79 (グルタミン酸)、80 (セリン)、83 (メチオニン)、85 (イソロイシン)、100 (セリン)、104 (ロイシン)、106 (ロイシン)、および109 (プロリン)を、ロイシン、アラニン、バリン、プロリン、アラニン、リシン、グリシン、トレオニン、トレオニン、グルタミン、プロリン、フェニルアラニン、トレオニン、グルタミン、バリン、イソロイシン、およびトレオニンでそれぞれ置換することにより設計されるヒト化#11D5軽鎖可変領域を、「h#11D5-T36L」型軽鎖可変領域と名付けた。

10

【 0 2 4 0 】

7.2.3.37. h#11D5-T37L型軽鎖:

配列表(図30D)の配列番号142により表される#11D5軽鎖可変領域のアミノ酸番号11 (メチオニン)、13 (トレオニン)、15 (ロイシン)、36 (フェニルアラニン)、40 (バリン)、43 (セリン)、66 (アルギニン)、69 (セリン)、72 (セリン)、79 (グルタミン酸)、80 (セリン)、83 (メチオニン)、85 (イソロイシン)、100 (セリン)、104 (ロイシン)、106 (ロイシン)、および109 (プロリン)を、ロイシン、アラニン、バリン、チロシン、プロリン、アラニン、グリシン、トレオニン、トレオニン、グルタミン、プロリン、フェニルアラニン、トレオニン、グルタミン、バリン、イソロイシン、およびトレオニンでそれぞれ置換することにより設計されるヒト化#11D5軽鎖可変領域を、「h#11D5-T37L」型軽鎖可変領域と名付けた。

20

【 0 2 4 1 】

7.2.4. #11D5重鎖のヒト化(図12および13)

7.2.4.1. h#11D5-T1H型重鎖:

配列表(図30E)の配列番号143により表される#11D5重鎖可変領域のアミノ酸番号1 (グルタミン酸)、17 (セリン)、23 (セリン)、25 (トレオニン)、39 (リシン)、40 (フェニルアラニン)、43 (アスパラギン)、44 (リシン)、45 (メチオニン)、67 (イソロイシン)、68 (セリン)、71 (アルギニン)、75 (アルギニン)、79 (フェニルアラニン)、81 (グルタミン)、83 (アスパラギン)、87 (トレオニン)、88 (グルタミン酸)、92 (トレオニン)、107 (バリン)、および108 (メチオニン)を、グルタミン、トレオニン、トレオニン、セリン、グルタミン、プロリン、メチオニン、グリシン、ロイシン、バリン、トレオニン、バリン、グルタミン酸、セリン、リシン、セリン、プロリン、アラニン、バリン、トレオニン、およびロイシンでそれぞれ置換することにより設計されるヒト化#11D5重鎖可変領域を、「h#11D5-T1H」型重鎖可変領域と名付けた。

30

【 0 2 4 2 】

7.2.4.2. h#11D5-T2H型重鎖:

配列表(図30E)の配列番号143により表される#11D5重鎖可変領域のアミノ酸番号17 (セリン)、23 (セリン)、25 (トレオニン)、39 (リシン)、40 (フェニルアラニン)、43 (アスパラギン)、44 (リシン)、45 (メチオニン)、71 (アルギニン)、75 (アルギニン)、79 (フェニルアラニン)、81 (グルタミン)、83 (アスパラギン)、87 (トレオニン)、88 (グルタミン酸)、92 (トレオニン)、107 (バリン)、および108 (メチオニン)を、トレオニン、トレオニン、セリン、グルタミン、プロリン、メチオニン、グリシン、ロイシン、バリン、グルタミン酸、セリン、リシン、セリン、プロリン、アラニン、バリン、トレオニン、およびロイシンでそれぞれ置換することにより設計されるヒト化#11D5重鎖可変領域を、「h#11D5-T2H」型重鎖可変領域と名付けた。

40

【 0 2 4 3 】

7.2.4.3. h#11D5-T3H型重鎖:

配列表(図30E)の配列番号143により表される#11D5重鎖可変領域のアミノ酸番号17 (セリン)、23 (セリン)、25 (トレオニン)、75 (アルギニン)、79 (フェニルアラニン)、81

50

(グルタミン)、83 (アスパラギン)、87 (トレオニン)、88 (グルタミン酸)、92 (トレオニン)、107 (バリン)、および108 (メチオニン)を、トレオニン、トレオニン、セリン、リシン、セリン、リシン、セリン、プロリン、アラニン、バリン、トレオニン、およびロイシンでそれぞれ置換することにより設計されるヒト化#11D5重鎖可変領域を、「h#11D5-T3H」型重鎖可変領域と名付けた。

【 0 2 4 4 】

7.2.4.4. h#11D5-T4H型重鎖:

配列表(図30E)の配列番号143により表される#11D5重鎖可変領域のアミノ酸番号1 (グルタミン酸)、6 (グルタミン酸)、7 (セリン)、9 (プロリン)、12 (バリン)、16 (グルタミン)、17 (セリン)、23 (セリン)、25 (トレオニン)、39 (リシン)、40 (フェニルアラニン)、43 (アスパラギン)、44 (リシン)、45 (メチオニン)、67 (イソロイシン)、68 (セリン)、75 (アルギニン)、79 (フェニルアラニン)、81 (グルタミン)、83 (アスパラギン)、87 (トレオニン)、88 (グルタミン酸)、92 (トレオニン)、107 (バリン)、および108 (メチオニン)を、グルタミン、グルタミン、トリプトファン、アラニン、ロイシン、グルタミン酸、トレオニン、トレオニン、セリン、グルタミン、プロリン、リシン、グリシン、ロイシン、バリン、トレオニン、リシン、セリン、リシン、セリン、アラニン、アラニン、バリン、トレオニン、およびロイシンでそれぞれ置換することにより設計されるヒト化#11D5重鎖可変領域を、「h#11D5-T4H」型重鎖可変領域と名付けた。

【 0 2 4 5 】

7.2.4.5. h#11D5-T5H型重鎖:

配列表(図30E)の配列番号143により表される#11D5重鎖可変領域のアミノ酸番号6 (グルタミン酸)、7 (セリン)、9 (プロリン)、12 (バリン)、16 (グルタミン)、17 (セリン)、23 (セリン)、25 (トレオニン)、39 (リシン)、40 (フェニルアラニン)、43 (アスパラギン)、44 (リシン)、45 (メチオニン)、75 (アルギニン)、79 (フェニルアラニン)、81 (グルタミン)、83 (アスパラギン)、87 (トレオニン)、88 (グルタミン酸)、92 (トレオニン)、107 (バリン)、および108 (メチオニン)を、グルタミン、トリプトファン、アラニン、ロイシン、グルタミン酸、トレオニン、トレオニン、セリン、グルタミン、プロリン、リシン、グリシン、ロイシン、リシン、セリン、リシン、セリン、アラニン、アラニン、バリン、トレオニン、およびロイシンでそれぞれ置換することにより設計されるヒト化#11D5重鎖可変領域を、「h#11D5-T5H」型重鎖可変領域と名付けた。

【 0 2 4 6 】

7.2.4.6. h#11D5-T6H型重鎖:

配列表(図30E)の配列番号143により表される#11D5重鎖可変領域のアミノ酸番号16 (グルタミン)、17 (セリン)、23 (セリン)、25 (トレオニン)、39 (リシン)、40 (フェニルアラニン)、43 (アスパラギン)、44 (リシン)、45 (メチオニン)、75 (アルギニン)、79 (フェニルアラニン)、81 (グルタミン)、83 (アスパラギン)、87 (トレオニン)、88 (グルタミン酸)、92 (トレオニン)、107 (バリン)、および108 (メチオニン)を、グルタミン酸、トレオニン、トレオニン、セリン、グルタミン、プロリン、リシン、グリシン、ロイシン、リシン、セリン、リシン、セリン、アラニン、アラニン、バリン、トレオニン、およびロイシンでそれぞれ置換することにより設計されるヒト化#11D5重鎖可変領域を、「h#11D5-T6H」型重鎖可変領域と名付けた。

【 0 2 4 7 】

7.2.4.7. h#11D5-T7H型重鎖:

配列表(図30E)の配列番号143により表される#11D5重鎖可変領域のアミノ酸番号1 (グルタミン酸)、16 (グルタミン)、17 (セリン)、23 (セリン)、25 (トレオニン)、39 (リシン)、40 (フェニルアラニン)、43 (アスパラギン)、44 (リシン)、45 (メチオニン)、67 (イソロイシン)、68 (セリン)、75 (アルギニン)、79 (フェニルアラニン)、81 (グルタミン)、83 (アスパラギン)、87 (トレオニン)、88 (グルタミン酸)、92 (トレオニン)、107 (バリン)、および108 (メチオニン)を、グルタミン、グルタミン酸、トレオニン、トレオニン、セリン、グルタミン、プロリン、リシン、グリシン、ロイシン、バリン、トレ

10

20

30

40

50

オニン、リシン、セリン、リシン、セリン、アラニン、アラニン、バリン、トレオニン、およびロイシンでそれぞれ置換することにより設計されるヒト化#11D5重鎖可変領域を、「h#11D5-T7H」型重鎖可変領域と名付けた。

【 0 2 4 8 】

7.2.4.8. h#11D5-T8H型重鎖:

配列表(図30E)の配列番号143により表される#11D5重鎖可変領域のアミノ酸番号16 (グルタミン)、17 (セリン)、23 (セリン)、25 (トレオニン)、39 (リシン)、40 (フェニルアラニン)、43 (アスパラギン)、44 (リシン)、45 (メチオニン)、67 (イソロイシン)、68 (セリン)、75 (アルギニン)、79 (フェニルアラニン)、81 (グルタミン)、83 (アスパラギン)、87 (トレオニン)、88 (グルタミン酸)、92 (トレオニン)、107 (バリン)、および108 (メチオニン)を、グルタミン酸、トレオニン、トレオニン、セリン、グルタミン、プロリン、リシン、グリシン、ロイシン、バリン、トレオニン、リシン、セリン、リシン、セリン、アラニン、アラニン、バリン、トレオニン、およびロイシンでそれぞれ置換することにより設計されるヒト化#11D5重鎖可変領域を、「h#11D5-T8H」型重鎖可変領域と名付けた。

【 0 2 4 9 】

7.2.4.9. h#11D5-T9H型重鎖:

配列表(図30E)の配列番号143により表される#11D5重鎖可変領域のアミノ酸番号1 (グルタミン酸)、16 (グルタミン)、17 (セリン)、23 (セリン)、25 (トレオニン)、39 (リシン)、40 (フェニルアラニン)、43 (アスパラギン)、44 (リシン)、45 (メチオニン)、68 (セリン)、75 (アルギニン)、79 (フェニルアラニン)、81 (グルタミン)、83 (アスパラギン)、87 (トレオニン)、88 (グルタミン酸)、92 (トレオニン)、107 (バリン)、および108 (メチオニン)を、グルタミン、グルタミン酸、トレオニン、トレオニン、セリン、グルタミン、プロリン、リシン、グリシン、ロイシン、トレオニン、リシン、セリン、リシン、セリン、アラニン、アラニン、バリン、トレオニン、およびロイシンでそれぞれ置換することにより設計されるヒト化#11D5重鎖可変領域を、「h#11D5-T9H」型重鎖可変領域と名付けた。

【 0 2 5 0 】

7.2.4.10. h#11D5-T10H型重鎖:

配列表(図30E)の配列番号143により表される#11D5重鎖可変領域のアミノ酸番号1 (グルタミン酸)、16 (グルタミン)、17 (セリン)、23 (セリン)、25 (トレオニン)、39 (リシン)、40 (フェニルアラニン)、43 (アスパラギン)、44 (リシン)、45 (メチオニン)、67 (イソロイシン)、75 (アルギニン)、79 (フェニルアラニン)、81 (グルタミン)、83 (アスパラギン)、87 (トレオニン)、88 (グルタミン酸)、92 (トレオニン)、107 (バリン)、および108 (メチオニン)を、グルタミン、グルタミン酸、トレオニン、トレオニン、セリン、グルタミン、プロリン、リシン、グリシン、ロイシン、バリン、リシン、セリン、リシン、セリン、アラニン、アラニン、バリン、トレオニン、およびロイシンでそれぞれ置換することにより設計されるヒト化#11D5重鎖可変領域を、「h#11D5-T10H」型重鎖可変領域と名付けた。

【 0 2 5 1 】

7.2.4.11. h#11D5-T11H型重鎖:

配列表(図30E)の配列番号143により表される#11D5重鎖可変領域のアミノ酸番号16 (グルタミン)、17 (セリン)、23 (セリン)、25 (トレオニン)、39 (リシン)、40 (フェニルアラニン)、43 (アスパラギン)、44 (リシン)、45 (メチオニン)、68 (セリン)、75 (アルギニン)、79 (フェニルアラニン)、81 (グルタミン)、83 (アスパラギン)、87 (トレオニン)、88 (グルタミン酸)、92 (トレオニン)、107 (バリン)、および108 (メチオニン)を、グルタミン酸、トレオニン、トレオニン、セリン、グルタミン、プロリン、リシン、グリシン、ロイシン、トレオニン、リシン、セリン、リシン、セリン、アラニン、アラニン、バリン、トレオニン、およびロイシンでそれぞれ置換することにより設計されるヒト化#11D5重鎖可変領域を、「h#11D5-T11H」型重鎖可変領域と名付けた。

【 0 2 5 2 】

7.2.4.12. h#11D5-T12H型重鎖:

配列表(図30E)の配列番号143により表される#11D5重鎖可変領域のアミノ酸番号16 (グルタミン)、17 (セリン)、23 (セリン)、25 (トレオニン)、39 (リシン)、40 (フェニルアラニン)、43 (アスパラギン)、44 (リシン)、45 (メチオニン)、67 (イソロイシン)、75 (アルギニン)、79 (フェニルアラニン)、81 (グルタミン)、83 (アスパラギン)、87 (トレオニン)、88 (グルタミン酸)、92 (トレオニン)、107 (バリン)、および108 (メチオニン)を、グルタミン酸、トレオニン、トレオニン、セリン、グルタミン、プロリン、リシン、グリシン、ロイシン、バリン、リシン、セリン、リシン、セリン、アラニン、アラニン、バリン、トレオニン、およびロイシンでそれぞれ置換することにより設計されるヒト化#11D5重鎖可変領域を、「h#11D5-T12H」型重鎖可変領域と名付けた。

10

【 0 2 5 3 】

7.2.4.13. h#11D5-T13H型重鎖:

配列表(図30E)の配列番号143により表される#11D5重鎖可変領域のアミノ酸番号1 (グルタミン酸)、16 (グルタミン)、17 (セリン)、23 (セリン)、25 (トレオニン)、39 (リシン)、40 (フェニルアラニン)、43 (アスパラギン)、44 (リシン)、45 (メチオニン)、75 (アルギニン)、79 (フェニルアラニン)、81 (グルタミン)、83 (アスパラギン)、87 (トレオニン)、88 (グルタミン酸)、92 (トレオニン)、107 (バリン)、および108 (メチオニン)を、グルタミン、グルタミン酸、トレオニン、トレオニン、セリン、グルタミン、プロリン、リシン、グリシン、ロイシン、リシン、セリン、リシン、セリン、アラニン、アラニン、バリン、トレオニン、およびロイシンでそれぞれ置換することにより設計されるヒト化#11D5重鎖可変領域を、「h#11D5-T13H」型重鎖可変領域と名付けた。

20

【 0 2 5 4 】

(実施例8)

ヒト化抗体を発現させるための汎用ベクターの構築

8.1. ヒト化抗体軽鎖を発現させるためのベクターpEF6KCLの構築

鋳型としてのプラスミドpEF6/V5-His B (Invitrogen Corp.)と、以下のプライマー:

5'-ccacgcgcctgttagcggcgcatgaagc-3' (プライマー-EFF1: 配列番号1)、および

5'-aaacccgggagctttttgcaaaagcctagg-3' (プライマー-EFsmAR: 配列番号2)

とを使用してPCRを実施し、BGHpA (2174)の直後からSmaI (2958)までのDNA断片(f1の複製起点、ならびにSV40プロモーターおよびその起点を含有するDNA断片;以後、「断片A」と称する)を得た。

30

得られた断片Aを、オーバーラップPCRにより、ヒト 鎖分泌シグナル配列、ヒト 鎖定常領域、およびヒトポリ(A)付加シグナル配列をコードするDNA配列を含むDNA断片(配列番号3;以後、「断片B」と称する)へと連結した。断片Aを断片Bへと連結して得られたDNA断片(以後、「断片A+B」と称する)を、制限酵素KpnIおよびSmaIで消化し、制限酵素KpnIおよびSmaIであらかじめ消化したプラスミドpEF6/V5-His B (Invitrogen Corp.)へと連結し、シグナル配列、クローニング部位、ヒト 鎖定常領域コード配列、ならびにEF1プロモーターの下流にヒトポリ(A)付加シグナル配列を有するヒトL鎖発現プラスミド「pEF6KCL」(図19)を構築した。

40

【 0 2 5 5 】

8.2. ヒト化抗体重鎖を発現させるためのベクターpEF1/FCCU-1の構築

8.2.1. pEF1/KCLの構築

上記で説明した方法により得られたプラスミドpEF6KCLを、制限酵素KpnIおよびSmaIで消化した。結果として得られるDNA断片を、KpnIおよびSmaIであらかじめ消化したpEF1/myc-His B (Invitrogen Corp.)へと連結して、プラスミドpEF1/KCLを構築した。

【 0 2 5 6 】

8.2.2. pEF1/FCCU-1の構築

ヒトIgG1 (配列番号4)のシグナル配列および定常領域のアミノ酸配列をコードするDNA配列を含むDNA断片を、制限酵素NheIおよびPmeIで消化し、NheIおよびPmeIであらかじめ

50

消化したプラスミドpEF1/KCLへと連結し、シグナル配列、クローニング部位、ヒト重鎖定常領域コード配列、ならびにEF1プロモーターの下流にヒトポリ(A)付加シグナル配列を有するヒト重鎖発現プラスミドpEF1/FCCU-1を構築した。

【 0 2 5 7 】

(実施例9)

ラット抗ヒトAXLモノクローナル抗体#11B7のヒト化抗体遺伝子の作製

a) h#11B7-T1L、h#11B7-T2L、h#11B7-T3L、h#11B7-T4L、h#11B7-T5L、h#11B7-T6L、h#11B7-T7L、h#11B7-T8L、h#11B7-T9L、h#11B7-T10L、h#11B7-T11L、h#11B7-T12L、およびh#11B7-T13Lの軽鎖発現ベクターの構築

【 0 2 5 8 】

配列表の配列番号18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、または30それぞれのアミノ酸21～129により表されるh#11B7-T1L、h#11B7-T2L、h#11B7-T3L、h#11B7-T4L、h#11B7-T5L、h#11B7-T6L、h#11B7-T7L、h#11B7-T8L、h#11B7-T9L、h#11B7-T10L、h#11B7-T11L、h#11B7-T12Lまたはh#11B7-T13Lの軽鎖可変領域(図1および2)をコードする遺伝子を含む各DNAを、分泌シグナル配列と融合させて合成し(MBL Medical & Biological Laboratories Co., Ltd、Artificial Gene Synthesis Service)、制限酵素NheIおよびBsiWIで消化した。結果として得られるDNA断片を、制限酵素NheIおよびBsiWIであらかじめ消化した、ヒト化抗体軽鎖(pEF6KCL)を発現させるための汎用ベクターの部位へと個別に挿入し、これにより、h#11B7-T1L、h#11B7-T2L、h#11B7-T3L、h#11B7-T4L、h#11B7-T5L、h#11B7-T6L、h#11B7-T7L、h#11B7-T8L、h#11B7-T9L、h#11B7-T10L、h#11B7-T11L、h#11B7-T12L、およびh#11B7-T13Lの軽鎖発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターを、「pEF6KCL/h#11B7-T1L」、「pEF6KCL/h#11B7-T2L」、「pEF6KCL/h#11B7-T3L」、「pEF6KCL/h#11B7-T4L」、「pEF6KCL/h#11B7-T5L」、「pEF6KCL/h#11B7-T6L」、「pEF6KCL/h#11B7-T7L」、「pEF6KCL/h#11B7-T8L」、「pEF6KCL/h#11B7-T9L」、「pEF6KCL/h#11B7-T10L」、「pEF6KCL/h#11B7-T11L」、「pEF6KCL/h#11B7-T12L」、または「pEF6KCL/h#11B7-T13L」と名付け、各発現ベクターの挿入配列を、配列表の配列番号5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、または17のヌクレオチド配列によりそれぞれ表した。

【 0 2 5 9 】

b)h#11B7-T1H、h#11B7-T2H、h#11B7-T3H、h#11B7-T4H、h#11B7-T5H、h#11B7-T6H、h#11B7-T7H、h#11B7-T8H、およびh#11B7-T9Hの重鎖発現ベクターの構築

配列表の配列番号40、41、42、43、44、45、46、47、または48それぞれのアミノ酸20～132により表されるh#11B7-T1H、h#11B7-T2H、h#11B7-T3H、h#11B7-T4H、h#11B7-T5H、h#11B7-T6H、h#11B7-T7H、h#11B7-T8H、またはh#11B7-T9Hの重鎖可変領域(図4および5)をコードする遺伝子を含む各DNAを合成し(MBL Medical & Biological Laboratories Co., Ltd、Artificial Gene Synthesis Service)、制限酵素BlnIで消化した。結果として得られるDNA断片を、制限酵素BlnIであらかじめ消化した、ヒト化抗体重鎖を発現させるための汎用ベクター(pEF1/FCCU-1)の部位へと個別に挿入し、これにより、h#11B7-T1H、h#11B7-T2H、h#11B7-T3H、h#11B7-T4H、h#11B7-T5H、h#11B7-T6H、h#11B7-T7H、h#11B7-T8H、およびh#11B7-T9Hの重鎖発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターを、「pEF1/FCCU/h#11B7-T1H」、「pEF1/FCCU/h#11B7-T2H」、「pEF1/FCCU/h#11B7-T3H」、「pEF1/FCCU/h#11B7-T4H」、「pEF1/FCCU/h#11B7-T5H」、「pEF1/FCCU/h#11B7-T6H」、「pEF1/FCCU/h#11B7-T7H」、「pEF1/FCCU/h#11B7-T8H」、または「pEF1/FCCU/h#11B7-T9H」と名付け、各発現ベクターの挿入配列を、配列表の配列番号31、32、33、34、35、36、37、38、または39のヌクレオチド配列によりそれぞれ表した。

【 0 2 6 0 】

(実施例10)

ラット抗ヒトAXLモノクローナル抗体#11B7のヒト化抗体の調製

a)ヒト化抗体の作製

対数増殖期にあるFreeStyle 293-F細胞 1.5×10^8 個を、100mLの新鮮なFreeStyle 293発

10

20

30

40

50

現培地(Invitrogen Corp.)へと播種し、8% CO₂中37 のインキュベーターにおいて振とう(125rpm)培養した。1mgのポリエチレンジイミン(Polyscience #24765)を、4mLのOpti-Pro SFM培地(Invitrogen Corp.)中で溶解させ、室温で5分間静置した。PureLink HiPure Plasmidキット(Invitrogen Corp.)を使用して調製した重鎖発現プラスミド(0.05mg)および軽鎖発現プラスミド(0.15mg)を、4mLのOpti-Pro SFM培地(Invitrogen Corp.)中に懸濁させた。4mLの発現プラスミド/Opti-Pro SFM混合溶液を、4mLのポリエチレンジイミン/Opti-Pro SFM混合溶液へと添加し、これにより室温で5分間静置し、さらに室温で5分間静置した。次いで、8mLのポリエチレンジイミン/発現プラスミド/Opti-Pro SFM混合溶液を、FreeStyle 293-F細胞懸濁液へと添加し、振とう培養を継続した。8% CO₂中37 で7日間にわたる培養の後、培養物上清を回収した。

10

【0261】

b) ヒト化抗体の精製

前段a)で得られた培養物上清を、プロテインAアフィニティークラムクロマトグラフィーにより精製した。100mLの培養物上清を、キャップ付きの500mLフラスコに入れ、これに、PBSで平衡化した1mLのMabSelect SuRe (GE Healthcare Bio-science Ltd.)懸濁液(50%スラリー)を添加した。10 のインキュベーターにおいて100rpmで一晩にわたり混合物を撈拌した。FreeStyle 293-F細胞培養物上清/MabSelect SuRe懸濁液を、空の5mLのZeba Spinカラム(PIERCE)へと適用した。全樹脂をカラムに入れ、次いで、10mLの1M NaClで洗浄した。次いで、1mLの1Mアルギニン溶液(pH 4.0)をこれに適用し、抗体含有画分を回収した。この画分をCentrifugal Filter Device (Amicon Ultra-4; 分子量カットオフ: 50K; Millipore Corp.)へと添加した後、クエン酸バッファーで溶液を置換し、濃度を200 µLへと調整し、精製サンプルを調製した。

20

【0262】

pEF6KCL/h#11B7-T1LとpEF1/FCCU/h#11B7-T1Hとを組み合わせることにより得られるヒト化抗体#11B7を、「h#11B7-T1」と名付けた。

pEF6KCL/h#11B7-T2LとpEF1/FCCU/h#11B7-T2Hとを組み合わせることにより得られるヒト化抗体#11B7を、「h#11B7-T2」と名付けた。pEF6KCL/h#11B7-T3LとpEF1/FCCU/h#11B7-T3Hとを組み合わせることにより得られるヒト化抗体#11B7を、「h#11B7-T3」と名付けた。pEF6KCL/h#11B7-T4LとpEF1/FCCU/h#11B7-T4Hとを組み合わせることにより得られるヒト化抗体#11B7を、「h#11B7-T4」と名付けた。pEF6KCL/h#11B7-T5LとpEF1/FCCU/h#11B7-T5Hとを組み合わせることにより得られるヒト化抗体#11B7を、「h#11B7-T5」と名付けた。pEF6KCL/h#11B7-T6LとpEF1/FCCU/h#11B7-T6Hとを組み合わせることにより得られるヒト化抗体#11B7を、「h#11B7-T6」と名付けた。pEF6KCL/h#11B7-T7LとpEF1/FCCU/h#11B7-T7Hとを組み合わせることにより得られるヒト化抗体#11B7を、「h#11B7-T7」と名付けた。pEF6KCL/h#11B7-T8LとpEF1/FCCU/h#11B7-T7Hとを組み合わせることにより得られるヒト化抗体#11B7を、「h#11B7-T8」と名付けた。pEF6KCL/h#11B7-T9LとpEF1/FCCU/h#11B7-T7Hとを組み合わせることにより得られるヒト化抗体#11B7を、「h#11B7-T9」と名付けた。pEF6KCL/h#11B7-T10LとpEF1/FCCU/h#11B7-T7Hとを組み合わせることにより得られるヒト化抗体#11B7を、「h#11B7-T10」と名付けた。pEF6KCL/h#11B7-T11LとpEF1/FCCU/h#11B7-T7Hとを組み合わせることにより得られるヒト化抗体#11B7を、「h#11B7-T11」と名付けた。pEF6KCL/h#11B7-T12LとpEF1/FCCU/h#11B7-T7Hとを組み合わせることにより得られるヒト化抗体#11B7を、「h#11B7-T12」と名付けた。pEF6KCL/h#11B7-T13LとpEF1/FCCU/h#11B7-T7Hとを組み合わせることにより得られるヒト化抗体#11B7を、「h#11B7-T13」と名付けた。pEF6KCL/h#11B7-T7LとpEF1/FCCU/h#11B7-T8Hとを組み合わせることにより得られるヒト化抗体#11B7を、「h#11B7-T14」と名付けた。pEF6KCL/h#11B7-T8LとpEF1/FCCU/h#11B7-T8Hとを組み合わせることにより得られるヒト化抗体#11B7を、「h#11B7-T15」と名付けた。pEF6KCL/h#11B7-T9LとpEF1/FCCU/h#11B7-T8Hとを組み合わせることにより得られるヒト化抗体#11B7を、「h#11B7-T16」と名付けた。pEF6KCL/h#11B7-T10LとpEF1/FCCU/h#11B7-T8Hとを組み合わせることにより得られるヒト化抗体#11B7を、「h#11B7-T17」と名付けた。pEF6KCL/h#11B7-T11LとpEF1/FCCU/h#11B7-T8Hとを組み合わせることにより得られるヒト化抗体#11B7を

30

40

50

、「h#11B7-T18」と名付けた。pEF6KCL/h#11B7-T12LとpEF1/FCCU/h#11B7-T8Hとを組み合わせることにより得られるヒト化抗体#11B7を、「h#11B7-T19」と名付けた。pEF6KCL/h#11B7-T13LとpEF1/FCCU/h#11B7-T8Hとを組み合わせることにより得られるヒト化抗体#11B7を、「h#11B7-T20」と名付けた。pEF6KCL/h#11B7-T7LとpEF1/FCCU/h#11B7-T9Hとを組み合わせることにより得られるヒト化抗体#11B7を、「h#11B7-T21」と名付けた。pEF6KCL/h#11B7-T8LとpEF1/FCCU/h#11B7-T9Hとを組み合わせることにより得られるヒト化抗体#11B7を、「h#11B7-T22」と名付けた。pEF6KCL/h#11B7-T9LとpEF1/FCCU/h#11B7-T9Hとを組み合わせることにより得られるヒト化抗体#11B7を、「h#11B7-T23」と名付けた。pEF6KCL/h#11B7-T10LとpEF1/FCCU/h#11B7-T9Hとを組み合わせることにより得られるヒト化抗体#11B7を、「h#11B7-T24」と名付けた。pEF6KCL/h#11B7-T11LとpEF1/FCCU/h#11B7-T9Hとを組み合わせることにより得られるヒト化抗体#11B7を、「h#11B7-T25」と名付けた。pEF6KCL/h#11B7-T12LとpEF1/FCCU/h#11B7-T9Hとを組み合わせることにより得られるヒト化抗体#11B7を、「h#11B7-T26」と名付けた。

ならびにpEF6KCL/h#11B7-T13LとpEF1/FCCU/h#11B7-T9Hとを組み合わせることにより得られるヒト化抗体#11B7を、「h#11B7-T27」と名付けた。

【 0 2 6 3 】

【表 2】

Table 1

h#11B7	H プラスミド	L プラスミド
h#11B7-T□	pEF1/FCCU/h#11B7-T1H	pEF6KCL/h#11B7-T1L
h#11B7-T2	pEF1/FCCU/h#11B7-T2H	pEF6KCL/h#11B7-T2L
h#11B7-T3	pEF1/FCCU/h#11B7-T3H	pEF6KCL/h#11B7-T3L
h#11B7-T4	pEF1/FCCU/h#11B7-T4H	pEF6KCL/h#11B7-T4L
h#11B7-T5	pEF1/FCCU/h#11B7-T5H	pEF6KCL/h#11B7-T5L
h#11B7-T6	pEF1/FCCU/h#11B7-T6H	pEF6KCL/h#11B7-T6L
h#11B7-T7	pEF1/FCCU/h#11B7-T7H	pEF6KCL/h#11B7-T7L
h#11B7-T8	pEF1/FCCU/h#11B7-T7H	pEF6KCL/h#11B7-T8L
h#11B7-T9	pEF1/FCCU/h#11B7-T7H	pEF6KCL/h#11B7-T9L
h#11B7-T10	pEF1/FCCU/h#11B7-T7H	pEF6KCL/h#11B7-T10L
h#11B7-T11	pEF1/FCCU/h#11B7-T7H	pEF6KCL/h#11B7-T11L
h#11B7-T12	pEF1/FCCU/h#11B7-T7H	pEF6KCL/h#11B7-T12L
h#11B7-T13	pEF1/FCCU/h#11B7-T7H	pEF6KCL/h#11B7-T13L
h#11B7-T14	pEF1/FCCU/h#11B7-T8H	pEF6KCL/h#11B7-T7L
h#11B7-T15	pEF1/FCCU/h#11B7-T8H	pEF6KCL/h#11B7-T8L
h#11B7-T16	pEF1/FCCU/h#11B7-T8H	pEF6KCL/h#11B7-T9L
h#11B7-T17	pEF1/FCCU/h#11B7-T8H	pEF6KCL/h#11B7-T10L
h#11B7-T18	pEF1/FCCU/h#11B7-T8H	pEF6KCL/h#11B7-T11L
h#11B7-T19	pEF1/FCCU/h#11B7-T8H	pEF6KCL/h#11B7-T12L
h#11B7-T20	pEF1/FCCU/h#11B7-T8H	pEF6KCL/h#11B7-T13L
h#11B7-T21	pEF1/FCCU/h#11B7-T9H	pEF6KCL/h#11B7-T7L
h#11B7-T22	pEF1/FCCU/h#11B7-T9H	pEF6KCL/h#11B7-T8L
h#11B7-T23	pEF1/FCCU/h#11B7-T9H	pEF6KCL/h#11B7-T9L
h#11B7-T24	pEF1/FCCU/h#11B7-T9H	pEF6KCL/h#11B7-T10L
h#11B7-T25	pEF1/FCCU/h#11B7-T9H	pEF6KCL/h#11B7-T11L
h#11B7-T26	pEF1/FCCU/h#11B7-T9H	pEF6KCL/h#11B7-T12L
h#11B7-T27	pEF1/FCCU/h#11B7-T9H	pEF6KCL/h#11B7-T13L

【 0 2 6 4 】

(実施例11)

ラット抗ヒトAXLモノクローナル抗体#11D5のヒト化抗体遺伝子の作製

a) h#11D5-T1L、h#11D5-T2L、h#11D5-T3L、h#11D5-T4L、h#11D5-T5L、およびh#11D5-T6Lの軽鎖発現ベクターの構築

配列表の配列番号55、56、57、58、59、または60それぞれのアミノ酸21～129により表されるh#11D5-T1L、h#11D5-T2L、h#11D5-T3L、h#11D5-T4L、h#11D5-T5L、およびh#11D5-T6Lの軽鎖可変領域(図6)をコードする遺伝子を含有する各DNAを、分泌シグナル配列と融合させて合成し(MBL Medical & Biological Laboratories Co., Ltd、Artificial Gene Synthesis Service)、制限酵素NheIおよびBsiWIで消化した。結果として得られるDNA断片を、制限酵素NheIおよびBsiWIであらかじめ消化した、ヒト化抗体軽鎖を発現させるための汎用ベクター(pEF6KCL)の部位へと個別に挿入し、これにより、h#11D5-T1L、h#11D5-T2L、h#11D5-T3L、h#11D5-T4L、h#11D5-T5L、およびh#11D5-T6Lの軽鎖発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターを、「pEF6KCLh/h#11D5-T1L」、「pEF6KCLh/h#11D5-T2L」、「pEF6KCLh/h#11D5-T3L」、「pEF6KCLh/h#11D5-T4L」、「pEF6KCLh/h#11D5-T5L」、または「pEF6KCLh/h#11D5-T6L」と名付け、各発現ベクターの挿入配列を、配列表の配列番号49、50、51、52、53、または54のヌクレオチド配列によりそれぞれ表した。

【0265】

b) h#11D5-T1H、h#11D5-T2H、h#11D5-T3H、h#11D5-T4H、h#11D5-T5H、およびh#11D5-T6Hの重鎖発現ベクターの構築

配列表の配列番号67、68、69、70、71、または72それぞれのアミノ酸20～132により表されるh#11D5-T1H、h#11D5-T2H、h#11D5-T3H、h#11D5-T4H、h#11D5-T5H、およびh#11D5-T6Hの重鎖可変領域(図12)をコードする遺伝子を含有する各DNAを合成し(MBL Medical & Biological Laboratories Co., Ltd、Artificial Gene Synthesis Service)、制限酵素BlnIで消化した。結果として得られるDNA断片を、制限酵素BlnIであらかじめ消化した、ヒト化抗体重鎖を発現させるための汎用ベクター(pEF1/FCCU-1)の部位へと個別に挿入し、これにより、h#11D5-T1H、h#11D5-T2H、h#11D5-T3H、h#11D5-T4H、h#11D5-T5H、およびh#11D5-T6Hの重鎖発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターを、「pEF1/FCCU/h#11D5-T1H」、「pEF1/FCCU/h#11D5-T2H」、「pEF1/FCCU/h#11D5-T3H」、「pEF1/FCCU/h#11D5-T4H」、「pEF1/FCCU/h#11D5-T5H」、または「pEF1/FCCU/h#11D5-T6H」と名付け、各発現ベクターの挿入配列を、配列表の配列番号61、62、63、64、65、または66のヌクレオチド配列によりそれぞれ表した。

【0266】

(実施例12)

ラット抗ヒトAXLモノクローナル抗体#11D5のヒト化抗体の調製

a) ヒト化抗体の作製

対数増殖期にあるFreeStyle 293-F細胞 1.5×10^8 個を、100mLの新鮮なFreeStyle 293発現培地(Invitrogen Corp.)へと播種し、8% CO₂中37℃のインキュベーターにおいて振とう(125rpm)培養した。1mgのポリエチレンジイミン(Polyscience #24765)を、4mLのOpti-Pro SFM培地(Invitrogen Corp.)中で溶解させ、室温で5分間静置した。PureLink HiPure Plasmidキット(Invitrogen Corp.)を使用して調製した重鎖発現プラスミド(0.05mg)および軽鎖発現プラスミド(0.15mg)を、4mLのOpti-Pro SFM培地(Invitrogen Corp.)中に懸濁させた。4mLの発現プラスミド/Opti-Pro SFM混合溶液を、4mLのポリエチレンジイミン/Opti-Pro SFM混合溶液へと添加し、これにより室温で5分間静置し、さらに室温で5分間静置した。次いで、8mLのポリエチレンジイミン/発現プラスミド/Opti-Pro SFM混合溶液を、FreeStyle 293-F細胞懸濁液へと添加し、振とう培養を継続した。8% CO₂中37℃で7日間にわたる培養の後、培養物上清を回収した。

【0267】

b) ヒト化抗体の精製

前段a)で得られた培養物上清を、プロテインAアフィニティーカラムクロマトグラフィーにより精製した。100mLの培養物上清を、キャップ付きの500mLフラスコに入れ、これに、PBSで平衡化した1mLのMabSelect SuRe (GE Healthcare Bio-science Ltd.)懸濁液(50%

10

20

30

40

50

スラリー)を添加した。10 のインキュベーターにおいて100rpmで一晩にわたり混合物を攪拌した。FreeStyle 293-F細胞培養物上清/MabSelect SuRe懸濁液を、空の5mLのZeba Spinカラム(PIERCE)へと適用した。全樹脂をカラムに入れ、次いで、10mLの1M NaClで洗浄した。次いで、1mLの1Mアルギニン溶液(pH 4.0)をこれに適用し、抗体含有画分を回収した。この画分をCentrifugal Filter Device (Amicon Ultra-4;分子量カットオフ: 50K; Millipore Corp.)へと添加した後、クエン酸バッファーで溶液を置換し、濃縮した。最終容量を200 μ Lへと調整し、精製サンプルを調製した。

【0268】

pEF6KCL/h#11D5-T1LとpEF1/FCCU/h#11D5-T1Hとを組み合わせることにより得られるヒト化抗体#11D5を、「h#11D5-T1」と名付けた。pEF6KCL/h#11D5-T2LとpEF1/FCCU/h#11D5-T2Hとを組み合わせることにより得られるヒト化抗体#11D5を、「h#11D5-T2」と名付けた。pEF6KCL/h#11D5-T3LとpEF1/FCCU/h#11D5-T3Hとを組み合わせることにより得られるヒト化抗体#11D5を、「h#11D5-T3」と名付けた。pEF6KCL/h#11D5-T4LとpEF1/FCCU/h#11D5-T4Hとを組み合わせることにより得られるヒト化抗体#11D5を、「h#11D5-T4」と名付けた。pEF6KCL/h#11D5-T5LとpEF1/FCCU/h#11D5-T5Hとを組み合わせることにより得られるヒト化抗体#11D5を、「h#11D5-T5」と名付けた。ならびにpEF6KCL/h#11D5-T6LとpEF1/FCCU/h#11D5-T6Hとを組み合わせることにより得られるヒト化抗体#11D5を、「h#11D5-T6」と名付けた。

【0269】

(実施例13)

ヒトAXL-Fc融合タンパク質に対するラット抗ヒトAXLモノクローナル抗体#11B7のヒト化抗体の親和性の評価

以下に示す方法により、ヒトAXL-Fcに対するそれらの親和性について、ラット抗ヒトAXLモノクローナル抗体#11B7に由来するヒト化抗体h#11B7-T1~h#11B7-T27を評価した。ヒトAXL-Fc (R&D Systems製; #154-AL)を、PBSにより1 μ g/mlまで希釈した。次いで、溶液を、100 μ l/ウエルの量でImmuno Plate (Nalge Nunc International K.K.製; #437111)へと分注し、4 で一晩にわたり静置し、タンパク質を該プレートへと吸着させた。翌日、ウエルを、PBS-T溶液(PBSおよび0.05% (v/v) Tween 20)で5回洗浄した。次いで、PBSで5%まで希釈したスキムミルク(森永乳業株式会社製)を含有する溶液を、100 μ l/ウエルの量で分注し、室温で2時間にわたり静置した。ウエル内の溶液を除去し、PBS-T溶液で5回ウエルを洗浄した。次いで、実施例10で調製したラット抗ヒトAXLモノクローナル抗体#11B7の精製ヒト化抗体であるT1~T27を、0.5%スキムミルクを含有するPBS溶液により、1 μ g/ml~0.00256ng/ml(5倍希釈系列)の最終濃度で個別に希釈した。次いで、溶液を100 μ l/ウエルの量で分注し、室温で2時間にわたり静置した。この手順では、実施例15に従い各抗体濃度を決定した。PBS-T溶液で5回ウエルを洗浄した。次いで、TBS-T溶液(TBSおよび0.05% (v/v) Tween 20)で2500倍に希釈したアルカリホスファターゼコンジュゲートAffiniPureヤギ抗ヒトIgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.製; #109-055-097)を、100 μ l/ウエルの量で添加し、室温で1時間にわたり静置した。ウエル内の溶液を除去し、TBS-T溶液で5回ウエルを洗浄した。次いで、蛍光基質溶液(Roche Diagnostics K.K.製; #11681982001)を100 μ l/ウエルの量で添加し、蛍光反応を起こさせた。蛍光基質溶液を添加した15分後に、SpectraMax M5 (Molecular Devices Corp.製)を使用して、ヒトAXL-Fcを吸着させたプレート上の蛍光強度を測定した。結果として、ラット抗ヒトAXLモノクローナル抗体#11B7のヒト化抗体で検討した27個のサンプルのうち、#11B7-T1およびh#11B7-T4の結合活性が、ヒトキメラ抗体の結合活性より低いことが確認された。しかし、ヒトAXL-Fcタンパク質に対する他の25個のサンプルの結合活性は、抗体濃度依存的な形で、ヒトキメラ抗体の結合活性とほぼ同等であることが確認された(図19、20、21、および22)。

【0270】

(実施例14)

ヒトAXL-Fc融合タンパク質に対するラット抗ヒトAXLモノクローナル抗体#11D5のヒト化抗体の親和性の評価

以下に示す方法により、ヒトAXL-Fcに対するそれらの親和性について、ラット抗ヒトAX

10

20

30

40

50

Lモノクローナル抗体#11D5のヒト化抗体h#11D5-T1～h#11D5-T6を評価した。ヒトAXL-Fc (R&D Systems製; #154-AL)を、PBSにより1 µg/mlまで希釈した。次いで、溶液を、100 µl/ウエルの量でImmuno Plate (Nalge Nunc International K.K.製; #437111)へと分注し、4で一晩にわたり静置し、タンパク質を該プレートへと吸着させた。翌日、ウエルを、PBS-T溶液(PBSおよび0.05% (v/v) Tween 20)で5回洗浄した。次いで、PBSで5%まで希釈したスキムミルク(森永乳業株式会社製)を含有する溶液を、100 µl/ウエルの量で分注し、室温で2時間にわたり静置した。ウエル内の溶液を除去し、PBS-T溶液で5回ウエルを洗浄した。次いで、実施例12で調製したラット抗ヒトAXLモノクローナル抗体#11D5の精製ヒト化抗体であるT1～T6を、0.5%スキムミルクを含有するPBS溶液により、1 µg/ml～0.00256ng/ml (5倍希釈系列)の最終濃度で個別に希釈した。次いで、溶液を100 µl/ウエルの量で分注し、室温で2時間にわたり静置した。この手順では、実施例15に従い各抗体濃度を決定した。PBS-T溶液で5回ウエルを洗浄した。次いで、TBS-T溶液(TBSおよび0.05% (v/v) Tween 20)で2500倍に希釈したアルカリホスファターゼコンジュゲートAffiniPureヤギ抗ヒトIgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.製; #109-055-097)を、100 µl/ウエルの量で添加し、室温で1時間にわたり静置した。ウエル内の溶液を除去し、TBS-T溶液で5回ウエルを洗浄した。次いで、蛍光基質溶液(Roche Diagnostics K.K.製; #11681982001)を100 µl/ウエルの量で添加し、蛍光反応を起こさせた。蛍光基質溶液を添加した15分後に、SpectraMax M5 (Molecular Devices Corp.製)を使用して、ヒトAXL-Fcを吸着させたプレート上の蛍光強度を測定した。結果として、ラット抗ヒトAXLモノクローナル抗体#11D5のヒト化抗体で検討した6個のサンプルのうち、h#11D5-T4、h#11D5-T5、およびh#11D5-T6の結合活性が、抗体濃度依存的な形で、ヒトキメラ抗体の結合活性とほぼ同等であることが確認された(図23)。

【0271】

(実施例15)

ラット抗ヒトAXLモノクローナル抗体#11B7および#11D5のヒト化抗体についての吸収係数の計算および直接的タンパク質吸光度アッセイ

以下に示すプロトコルにより、ラット抗ヒトAXLモノクローナル抗体#11B7に由来するヒト化抗体h#11B7-T1～h#11B7-T27、ならびにラット抗ヒトAXLモノクローナル抗体#11D5に由来するヒト化抗体h#11D5-T1～h#11D5-T6のタンパク質濃度を決定した。MX5 Automated-S微量天秤(METTLER TOLEDO)を使用して、実施例10または12でそれぞれ調製したラット抗ヒトAXLモノクローナル抗体#11B7または#11D5の各ヒト化抗体を、その質量に応じて希釈した。室温で、水晶セルを使用するDU-7400 UV-可視分光光度計(Beckman Coulter, Inc.)により、各抗体の280nmにおける吸光度(Ab280)を測定した。吸収係数により、各抗体のタンパク質濃度を決定した。各抗体の吸収係数は、米国国立衛生研究所のウェブサイト(<http://iphilo.mailway.com/download.htm>)からダウンロードしうる、ソフトウェアSednterpを使用して決定した。結果を、図24 (h#11B7-T1～h#11B7-T14については上パネル; h#11B7-T15～h#11B7-T27については下パネル)および図25 (h#11D5-T1～h#11D5-T6について)に示す。

【0272】

(実施例16)

ラット抗ヒトAXLモノクローナル抗体#11B7の結合部位(エピトープ)の決定

a)ヒトAXLタンデムIGドメインの発現および精製

N末端Hisタグおよびトロンピン認識配列へと連結された、ヒトAXL IGドメイン(NCBIタンパク質データベース受託番号第P_30530号:配列番号139のアミノ酸26～220)を含むタンパク質をコードするDNAを、ベクターpDEST14 (Invitrogen Corp.;型番11801-016)に組み込んだ。このプラスミドにより、大腸菌Rosetta-gami B (DE3) (Novagen;型番71136-4)を形質転換し、TB培地(Invitrogen Corp.;型番22711-022)中で培養した。このようにして培養した細菌細胞を超音波により破壊し、遠心分離し、HisTrap HPカラム(GE Healthcare;型番17-5247-01)を使用して上清を精製した。溶出物をプールし、PD-10カラム(GE Healthcare;型番17-0851-01)により脱塩化し、次いで、トロンピン(Sigma-Aldrich;型番T-7009)

によりHisタグを切断した。次いで、分子量21kDaの1つのバンドが得られるまで、切断されたタンパク質を、MONO Q 5/50 GL (GE Healthcare; 型番17-5166-01)カラム、およびSuperdex 75 10/300カラム (GE Healthcare; 型番17-5174-01) にかけて。

【 0 2 7 3 】

b) ヒトAXLの単一IGドメインの発現および精製

N末端Hisタグおよび因子Xa認識配列へと連結された、ヒトAXL IGドメイン (NCBI タンパク質データベース受託番号第P_30530号のアミノ酸26～131および129～220) を含むタンパク質をコードするDNAを、ベクターpDEST14 (Invitrogen Corp.; 型番11801-016) に組み込んだ。このプラスミドにより、大腸菌Rosetta-gami B (DE3) (Novagen; 型番71136-4) を形質転換し、TB培地 (Invitrogen Corp.; 型番22711-022) 中で培養した。このようにして培養された細菌細胞を超音波により破壊し、遠心分離し、HisTrap HPカラム (GE Healthcare; 型番17-5247-01) を使用して上清を精製した。次いで、分子量11kDaの1つのバンドが得られるまで、Superdex 75 10/300カラム (GE Healthcare; 型番17-5174-01) を使用する電気泳動により、ヒトAXL IGドメインを精製した。

【 0 2 7 4 】

c) ラット抗ヒトAXLモノクローナル抗体#11B7に対するヒトAXL-IGドメインにおける結合部位 (エピトープ) の決定

以下の方法により、ラット抗ヒトAXLモノクローナル抗体#11B7に対するヒトAXL-IGドメインにおける結合部位 (エピトープ) を評価した。ヒトAXLにおける2つのIGドメイン (NHIS-hAXL26～131およびNHIS-hAXL129～220) のうちのいずれかを含有するペプチドと、ヒトAXLにおける2つのIGドメインの両方 (hAXL26～220) を含有するペプチドとを、PBSにより個別に1μg/mlまで希釈した。次いで、溶液を、100μl/ウエルの量でImmuno Plate (Nalge Nunc International K.K. 製; #437111) へと分注し、4℃で一晩にわたり静置し、タンパク質を該プレートへと吸着させた。翌日、ウエルを、PBS-T溶液 (PBSおよび0.05% (v/v) Tween 20) で5回洗浄した。次いで、PBSで5%まで希釈したスキムミルク (森永乳業株式会社製) を含有する溶液を、100μl/ウエルの量で分注し、室温で2時間にわたり静置した。ウエル内の溶液を除去し、PBS-T溶液で5回ウエルを洗浄した。ラット抗ヒトAXLモノクローナル抗体#11B7を、0.5%スキムミルクを含有するPBS溶液により、0.04μg/mlまで希釈した。次いで、溶液を100μl/ウエルの量で分注し、室温で2時間にわたり静置した。PBS-T溶液で5回ウエルを洗浄した。次いで、TBS-T溶液 (TBSおよび0.05% (v/v) Tween 20) で2500倍に希釈したアルカリホスファターゼコンジュゲートAffiniPureヤギ抗ヒトIgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. 製; #109-055-097) を、100μl/ウエルの量で添加し、室温で1時間にわたり静置した。ウエル内の溶液を除去し、TBS-T溶液で5回ウエルを洗浄した。次いで、蛍光基質溶液 (Roche Diagnostics K.K. 製; #11681982001) を100μl/ウエルの量で添加し、蛍光反応を起こさせた。蛍光基質溶液を添加した15分後に、SpectraMax M5 (Molecular Devices Corp. 製) を使用して、ヒトAXL-IGドメインを吸着させたプレート上の蛍光強度を測定した。ELISAの結果として、hAXL26～220およびNHIS-hAXL129～220だけが、結合活性を有することが確認された。したがって、ヒトAXLにおける2つのIGドメインのうちで、ラット抗ヒトAXLモノクローナル抗体#11B7のエピトープは、カルボキシ末端により近接するドメイン (NCBI タンパク質データベース受託番号第P_30530号: 配列番号139 (図30A) のアミノ酸番号129～220のアミノ酸残基を含むドメイン) であることが実証された (図26)。

【 0 2 7 5 】

(実施例17)

本発明のヒト化抗AXL抗体はin vitroでリガンド誘導性AXLリン酸化を阻害する

増殖停止特異的遺伝子6 (Gas6) によりコードされるタンパク質は、受容体チロシンキナーゼAXLの天然リガンドを表す。Gas6がAXLに結合すると、結果として受容体が活性化され、これは、受容体チロシンキナーゼリン酸化レベルの上昇により反映される。実施例17で説明する実験は、本発明のヒト化抗AXL抗体h#11B7-T2、h#11B7-T3、h#11B7-T4、h#11B7-T5、およびh#11B7-T6が、受容体チロシンキナーゼAXLのGas6介在性活性化を妨げる可能性

10

20

30

40

50

を対象とするように設定した。

【0276】

(実施例17.1)

ELISAにより決定される通り、本発明のヒト化抗AXL抗体はin vitroでリガンド誘導性AXLリン酸化を阻害する

ELISA実験を実施して、本発明のヒト化抗AXL抗体がリガンドGas6誘導性AXLリン酸化を阻害することができるかどうか調べた。簡潔には、第1日に、平底96ウエルプレートの通常増殖培地中にウエル当たり 3×10^4 個の細胞を播種した。翌日、増殖培地を無血清培地で置換して、一晚24時間にわたり細胞を飢餓状態にした。さらに一晚にわたり、 $2 \mu\text{g/ml}$ のPBSおよび4 で、マウス抗ホスホチロシン抗体4G10により、黒色Maxi-Sorp 96ウエルプレート(Nunc)をコーティングした。第3日に、4G10抗体溶液を除去し、室温において少なくとも4時間にわたり、PBS、0.5% BSAでMaxi-Sorpウエルをブロッキングした。平行して、細胞を、37 で3時間、 $10 \mu\text{g/ml}$ のGammagard対照抗体(Sigma)、キメラ抗AXL mAb #11B7、ならびにヒト化抗AXL抗体h#11B7-T2、h#11B7-T3、h#11B7-T4、h#11B7-T5、およびh#11B7-T6と共にプレインキュベートし、次いで、37 で15分間、 400ng/ml のGas6 (R&D Systems)を伴うかまたは伴わずに処理した。次いで、培地を除去し、氷上で30分間、ホスファターゼ阻害剤およびプロテアーゼ阻害剤(10mM の $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 、 1mM のフェニルメチルスルホニルフロリド、 1mM のオルトバナジウム酸、 1mM のNaF、および0.5%のアプロチニン)を補充した溶解バッファー(50mM のHEPES、 $\text{pH}7.5$ 、 150mM のNaCl、 1mM のEDTA、10%のグリセリン、および1%のTriton X-100)中で細胞を溶解させた。一方、ブロッキングバッファーを除去し、Maxi-Sorpプレートを洗浄バッファー(PBS、0.05%のTween 20)で6回洗浄した後に、溶解物を移動させて4 で一晚インキュベートした。第4日にプレートを洗浄バッファーで6回洗浄した後、室温中 $0.5 \mu\text{g/ml}$ のPBSで2時間、ウエルをビオチニル化ラット抗AXL抗体12B7と共にインキュベートした。プレートを洗浄バッファーで6回洗浄し、PBS中で1:4,000に希釈したAPコンジュゲートストレプトアビジン(Chemicon #SA110)を各ウエルに添加し、室温で30分間インキュベートした。その後、ウエルを洗浄バッファーで6回洗浄し、AttoPhos基質溶液(Roche #11681982)を添加した。Victorプレートリーダー(Perkin Elmer)を使用して、 430nm の励起波長および 580nm の発光波長において各ウエルの蛍光を捕集した。

【0277】

図27は、Hs578T乳癌細胞についての、この実験の代表的な結果を示す。Gammagard対照抗体と比較して低下したAXLのチロシンのリン酸化レベルによって示されるように、キメラ抗AXL抗体#11B7、ならびに本発明のヒト化抗AXL抗体h#11B7-T2、h#11B7-T3、h#11B7-T4、h#11B7-T5、およびh#11B7-T6は、Hs578T乳癌細胞におけるGas6介在性AXL活性化を阻害または著明に低減することができた。AXLを過剰発現するNIH3T3-AXL cl. 7線維芽細胞、肺癌細胞系NCI-H292、メラノーマ細胞系C-8161のほか前立腺癌細胞系PC-3およびDU-145においても、同じ抗体パネル(the same panel of antibodies)に対する同様の影響を観察した。

【0278】

(実施例17.2)

ウェスタンブロット分析により決定される通り、本発明のヒト化抗AXL抗体はin vitroでリガンド誘導性AXLリン酸化を阻害する

さらに、ウェスタンブロット分析を実施して、ヒト化抗体が、リガンドGas6誘導性AXL活性化を妨げる能力を確認した。この目的で、第1日に、 1.5×10^6 個のHs578T乳癌細胞を10cm培養皿上に播種した。翌日、増殖培地を無血清培地で置換して、一晚24時間にわたり細胞を飢餓状態にした。第3日に、細胞を、37 で3時間、 $10 \mu\text{g/ml}$ のGammagard対照抗体(Sigma)、キメラ抗AXL mAb #11B7、ならびにヒト化抗AXL抗体h#11B7-T2、h#11B7-T3、h#11B7-T4、h#11B7-T5、およびh#11B7-T6と共にプレインキュベートし、次いで、37 で15分間、 400ng/ml のGas6 (R&D Systems)を伴うかまたは伴わずに処理した。その後、培地を除去し、氷上で30分間、ホスファターゼ阻害剤およびプロテアーゼ阻害剤(10mM の $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 、 1mM のフェニルメチルスルホニルフロリド、 1mM のオルトバナジウム酸、 1mM のNaF、および

0.5%のアプロチニン)を補充した1mlの溶解バッファー(50mMのHEPES、pH7.5、150mMのNaCl、1mMのEDTA、10%のグリセリン、および1%のTriton X-100)中で細胞を溶解させ、10,000 × gおよび4℃で10分間の遠心分離により細胞破砕物を除去した。免疫沈降のため、上清のタンパク質濃度を決定し、500 μgの全細胞溶解物を、回転ホイール上4℃で3時間、30 μlのプロテインA-セファロース懸濁液、ならびに1 μgのラット抗AXLモノクローナル抗体12B7と共にインキュベートした。0.7mlの冷却HNTGバッファー(20mMのHEPES、pH7.5、150mMのNaCl、0.1%のTriton X-100、10%のグリセロール、および10mMの $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$)で3回沈殿物を洗浄し、40 μlの3倍濃度SDS Laemmliサンプルバッファー中に懸濁させ、これを煮沸し、SDS PAGEにかけた。ウェスタンブロット分析のため、タンパク質をニトロセルロース膜へと移した。その後、NET-ゼラチンで膜をブロッキングし、マウスモノクローナル抗ホスホチロシン一次抗体4G10 (Upstate)と共に一晩インキュベートした。翌日、NET-ゼラチンで3回洗浄した後、膜をHRPコンジュゲート抗マウス二次抗体と共に室温で1時間インキュベートし、次いで、NET-ゼラチンによりさらに3回洗浄した。製造元の指示書(GE Healthcare)に従って化学発光検出キットを適用し、最後にフィルターをフィルム(Kodak)へと曝露した。その後、同じフィルターを、抗AXL抗体により再プローブした。

【0279】

図27は、この実験の代表的な結果を示す。Gammagard対照抗体と比較して低下したAXLのチロシンのリン酸化レベルによって示されるように、キメラ抗AXL抗体#11B7、ならびに本発明のヒト化抗AXL抗体h#11B7-T2、h#11B7-T3、h#11B7-T4、h#11B7-T5、およびh#11B7-T6は、Hs578T乳癌細胞におけるGas6誘導性AXL活性化を阻害または著明に低減することができた。

【0280】

(実施例18)

本発明のヒト化抗AXL抗体はin vitroでAXL下流のシグナル伝達分子のリガンド誘導性リン酸化を阻害する

受容体チロシンキナーゼAxlのGas6誘導性活性化は、Axl自体のチロシンリン酸化レベルの上昇により反映されるだけでなく、ERK1/2経路およびPKB/AKT経路を含め、下流のシグナル伝達カスケードの誘導とも関連する。したがって、本発明者らは、本発明のヒト化抗Axl抗体h#11B7-T2、h#11B7-T3、h#11B7-T4、h#11B7-T5、およびh#11B7-T6が、ERK1およびERK2ならびにAKTのGas6介在性活性化を妨げる可能性を対象とする実験を継続した。さらに、本発明者らは、Gas6により刺激されると、シグナル伝達分子GSK-3、TSC2、mTOR、およびS6K1のリン酸化状態が調節されることも見出し、このため、これらの分子に対する本発明のヒト化抗Axl抗体h#11B7-T2、h#11B7-T3、h#11B7-T4、h#11B7-T5、およびh#11B7-T6の阻害効果も調べた。

【0281】

(実施例18.1)

本発明のヒト化11B7抗Axl抗体はin vitroでリガンド誘導性ERK1/2リン酸化を阻害する

ウェスタンブロット分析を実施して、本発明のヒト化抗体が、Gas6誘導性ERK1/2活性化を妨げる可能性を有するかどうか調べた。Gas6介在性ERK1/2活性化は、その位置Thr202およびTyr204におけるリン酸化レベルの上昇により反映される。この目的で、第1日に、 5×10^6 個のHs578T乳癌細胞または 3×10^6 個のNCI-H292肺癌細胞を10cm培養皿上に播種した。翌日、増殖培地を無血清培地で置換して、一晩24時間にわたり細胞を飢餓状態にした。第3日に、細胞を、37℃で3時間、10 μg/mlのGammagard対照抗体(Baxter)、キメラ抗Axl mAb chm11B7、ならびにヒト化抗Axl抗体h#11B7-T2、h#11B7-T3、h#11B7-T4、h#11B7-T5、およびh#11B7-T6と共にプレインキュベートし、次いで、37℃で15分間、400ng/mlのGas6 (R&D Systems)を伴うかまたは伴わずに処理した。その後、培地を除去し、氷上で30分間、ホスファターゼ阻害剤およびプロテアーゼ阻害剤(10mMの $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 、1mMのフェニルメチルスルホニルフロリド、1mMのオルトバナジウム酸、1mMのNaF、および0.5%のアプロチニン)を補充した800 μlの溶解バッファー(50mMのHEPES、pH7.5、150mMのNaCl、1mMのEDTA、10%のグリセリン、および1%のTriton X-100)中で細胞を溶解させ、10,000 × gおよび4℃で10

分間の遠心分離により細胞破砕物を除去した。上清のタンパク質濃度を決定し、50 µgの全細胞溶解物を、3倍濃度SDS Laemmliサンプルバッファー中に懸濁させ、これを煮沸し、SDS PAGEにかけた。タンパク質を、ニトロセルロース膜へと移したら、NET-ゼラチンにより膜をブロッキングし、ウサギポリクローナル抗ホスホp44/42 MAPキナーゼ(Thr202/Tyr204)一次抗体(Cell Signaling Technologies; #9101)と共に一晩インキュベートした。翌日、NET-ゼラチンにより3回洗浄した後、膜をHRPコンジュゲート抗ウサギ二次抗体(Dianova; #111-036-045)と共に室温で1時間インキュベートし、次いで、NET-ゼラチンによりさらに3回洗浄した。製造元の指示書(GE Healthcare)に従って化学発光検出キットを適用し、最後にフィルターをフィルム(Kodak)へと曝露した。その後、同じフィルターを、抗p44/42 MAPキナーゼ抗体(Santa Cruz; K-23、#sc-153)により再プローブした。

10

【0282】

図28Aは、この実験の代表的な結果を示す。キメラ抗AxI抗体chm11B7、ならびに本発明のヒト化抗AxI抗体h#11B7-T2、h#11B7-T3、h#11B7-T4、h#11B7-T5、およびh#11B7-T6は、Gammagard対照抗体と比較して、Hs578T乳癌細胞における弱いGas6誘導性ERK1/2活性化の上昇を妨げた。しかし、この細胞系におけるベースのERK1/2活性化が高度であるため、対応する非刺激細胞に対してGas6刺激細胞において低下するERK1/2 Thr202/Tyr204リン酸化レベルにより示されるこれらの効果は、比較的低度に過ぎないと考えられる(上)。これに対して、NCI-H292肺癌細胞では、ERK1/2 Thr202/Tyr204リン酸化に対するキメラ抗AxI抗体chm11B7、ならびにヒト化抗AxI抗体h#11B7-T2、h#11B7-T3、h#11B7-T4、h#11B7-T5、またはh#11B7-T6の阻害効果が、はるかに明確に反映されている(下)。

20

【0283】

(実施例18.2)

本発明のヒト化11B7抗AxI抗体はin vitroでリガンド誘導性AKTリン酸化を阻害する

ウェスタンブロット分析を実施して、本発明のヒト化抗体が、Gas6誘導性AKT活性化を妨げる可能性を有するかどうか調べた。それにより、Gas6介在性AKT活性化は、その位置Ser473位におけるリン酸化レベルの上昇により反映される。この目的で、第1日に、 5×10^6 個のHs578T乳癌細胞または 3×10^6 個のNCI-H292肺癌細胞を10cm培養皿上に播種した。翌日、増殖培地を無血清培地で置換して、一晩24時間にわたり細胞を飢餓状態にした。第3日に、細胞を、37 °Cで3時間、10 µg/mlのGammagard対照抗体(Baxter)、キメラ抗AxI mAb chm11B7、ならびにヒト化抗AxI抗体h#11B7-T2、h#11B7-T3、h#11B7-T4、h#11B7-T5、およびh#11B7-T6と共にブレインキュベートし、次いで、37 °Cで15分間、400ng/mlのGas6 (R&D Systems)を伴うかまたは伴わずに処理した。その後、培地を除去し、氷上で30分間、ホスファターゼ阻害剤およびプロテアーゼ阻害剤(10mMの $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 、1mMのフェニルメチルスルホニルフロリド、1mMのオルトバナジウム酸、1mMのNaF、および0.5%のアプロチニン)を補充した800 µlの溶解バッファー(50mMのHEPES、pH7.5、150mMのNaCl、1mMのEDTA、10%のグリセリン、および1%のTriton X-100)中で細胞を溶解させ、10,000 × gおよび4 °Cで10分間の遠心分離により細胞破砕物を除去した。上清のタンパク質濃度を決定し、50 µgの全細胞溶解物を、3倍濃度SDS Laemmliサンプルバッファー中に懸濁させ、これを煮沸し、SDS PAGEにかけた。タンパク質を、ニトロセルロース膜へと移したら、NET-ゼラチンにより膜をブロッキングし、ウサギポリクローナル抗AKT1/2/3一次抗体(Cell Signaling Technologies; #9272)と共に一晩インキュベートした。翌日、NET-ゼラチンにより3回洗浄した後、膜をHRPコンジュゲート抗ウサギ二次抗体(Dianova; #111-036-045)と共に室温で1時間インキュベートし、次いで、NET-ゼラチンによりさらに3回洗浄した。製造元の指示書(GE Healthcare)に従って化学発光検出キットを適用し、最後にフィルターをフィルム(Kodak)へと曝露した。その後、同じフィルターを、抗ホスホAKT(Ser473)抗体(Cell Signaling Technologies; #9271)により再プローブした。

30

40

【0284】

図28Bは、この実験の代表的な結果を示す。対応する非刺激細胞に対してGas6刺激細胞において低下するAKT Ser473のリン酸化レベルによって示されるように、キメラ抗AxI抗体chm11B7、ならびに本発明のヒト化抗AxI抗体h#11B7-T2、h#11B7-T3、h#11B7-T4、h#11B

50

7-T5、およびh#11B7-T6は、Gammagard対照抗体と比較して、Hs578T乳癌細胞(上)およびNCI-H292肺癌細胞(下)におけるGas6誘導性AKT活性化を著明に低減することができた。

【0285】

(実施例18.3)

本発明のヒト化11B7抗Axl抗体はin vitroでリガンド誘導性GSK-3 リン酸化を阻害する

ウェスタンブロット分析を実施して、本発明のヒト化抗体が、Gas6誘導性GSK-3 活性化を妨げる可能性を有するかどうか調べた。Gas6誘導性GSK-3 活性化は、その位置Ser9位におけるリン酸化レベルの上昇により反映される。この目的で、第1日に、 5×10^6 個のHs578T乳癌細胞または 3×10^6 個のNCI-H292肺癌細胞を10cm培養皿上に播種した。翌日、増殖培地を無血清培地で置換して、一晚24時間にわたり細胞を飢餓状態にした。第3日に、細胞を、37 で3時間、10 μ g/mlのGammagard対照抗体(Baxter)、キメラ抗Axl mAb chm11B7、ならびにヒト化抗Axl抗体h#11B7-T2、h#11B7-T3、h#11B7-T4、h#11B7-T5、およびh#11B7-T6と共にブレインキュベートし、次いで、37 で15分間、400ng/mlのGas6 (R&D Systems)を伴うかまたは伴わずに処理した。その後、培地を除去し、氷上で30分間、ホスファターゼ阻害剤およびプロテアーゼ阻害剤(10mMの $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 、1mMのフェニルメチルスルホニルフロリド、1mMのオルトバナジウム酸、1mMのNaF、および0.5%のアプロチニン)を補充した800 μ lの溶解バッファー(50mMのHEPES、pH7.5、150mMのNaCl、1mMのEDTA、10%のグリセリン、および1%のTriton X-100)中で細胞を溶解させ、10,000 \times gおよび4 で10分間の遠心分離により細胞破砕物を除去した。上清のタンパク質濃度を決定し、50 μ gの全細胞溶解物を、3倍濃度SDS Laemmliサンプルバッファー中に懸濁させ、これを煮沸し、SDS PAGE にかけた。タンパク質を、ニトロセルロース膜へと移したら、NET-ゼラチンにより膜をブロッキングし、ウサギポリクローナル抗ホスホ-GSK-3 (Ser9)一次抗体(Cell Signaling Technologies; #9336)と共に一晚インキュベートした。翌日、NET-ゼラチンにより3回洗浄した後、膜をHRPコンジュゲート抗ウサギ二次抗体(Dianova; #111-036-045)と共に室温で1時間インキュベートし、次いで、NET-ゼラチンによりさらに3回洗浄した。製造元の指示書(GE Healthcare)に従って化学発光検出キットを適用し、最後にフィルターをフィルム(Kodak)へと曝露した。その後、同じフィルターを、抗GSK-3 抗体(Becton Dickinson; #610201)およびHRPコンジュゲート抗マウス二次抗体(Dianova; #315-036-045)により再プローブした。

【0286】

図28Cは、この実験の代表的な結果を示す。対応する非刺激細胞に対してGas6刺激細胞において低下するGSK-3 Ser9のリン酸化レベルによって示されるように、キメラ抗Axl抗体chm11B7、ならびに本発明のヒト化抗Axl抗体h#11B7-T2、h#11B7-T3、h#11B7-T4、h#11B7-T5、およびh#11B7-T6は、Gammagard対照抗体と比較して、Hs578T乳癌細胞(上)およびNCI-H292肺癌細胞(下)におけるGas6誘導性GSK-3 活性化を著明に低減することができた。

【0287】

(実施例18.4)

本発明のヒト化11B7抗Axl抗体はin vitroでリガンド誘導性TSC2リン酸化を阻害する

ウェスタンブロット分析を実施して、本発明のヒト化抗体が、そのアミノ酸残基Thr1462におけるGas6誘導性TSC2リン酸化およびPI3K/AKT介在性TSC2リン酸化を妨げる可能性を有するかどうか調べた。Thr1462におけるTSC2リン酸化は一般に、TSC複合体の腫瘍抑制機能の阻害と関連し、結果として、下流のmTOR経路の活性化の阻害と関連する。簡潔には、第1日に、 5×10^6 個のHs578T乳癌細胞または 3×10^6 個のNCI-H292肺癌細胞を10cm培養皿上に播種した。翌日、増殖培地を無血清培地で置換して、一晚24時間にわたり細胞を飢餓状態にした。第3日に、細胞を、37 で3時間、10 μ g/mlのGammagard対照抗体(Baxter)、キメラ抗Axl mAb chm11B7、ならびにヒト化抗Axl抗体h#11B7-T2、h#11B7-T3、h#11B7-T4、h#11B7-T5、およびh#11B7-T6と共にブレインキュベートし、次いで、37 で15分間、400ng/mlのGas6 (R&D Systems)を伴うかまたは伴わずに処理した。その後、培地を除去し、氷上で30分間、ホスファターゼ阻害剤およびプロテアーゼ阻害剤(10mMの $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 、1mMのフ

ェニルメチルスルホニルフロリド、1mMのオルトバナジウム酸、1mMのNaF、および0.5%のアプロチニン)を補充した800 μ lの溶解バッファー(50mMのHEPES、pH7.5、150mMのNaCl、1mMのEDTA、10%のグリセリン、および1%のTriton X-100)中で細胞を溶解させ、10,000 \times g および4 で10分間の遠心分離により細胞破砕物を除去した。上清のタンパク質濃度を決定し、50 μ gの全細胞溶解物を、3倍濃度SDS Laemmliサンプルバッファー中に懸濁させ、これを煮沸し、SDS PAGEにかけた。タンパク質を、ニトロセルロース膜へと移したら、NET-ゼラチンにより膜をブロッキングし、ウサギポリクローナル抗TSC2一次抗体(Cell Signaling Technologies; #3612)と共に一晩インキュベートした。翌日、NET-ゼラチンにより3回洗浄した後、膜をHRPコンジュゲート抗ウサギ二次抗体(Dianova; #111-036-045)と共に室温で1時間インキュベートし、次いで、NET-ゼラチンによりさらに3回洗浄した。製造元の指示書(GE Healthcare)に従って化学発光検出キットを適用し、最後にフィルターをフィルム(Kodak)へと曝露した。その後、同じフィルターを、抗ホスホTSC2(Thr1462)抗体(Cell Signaling Technologies; #3617)により再プローブした。

【0288】

図28Dは、この実験の代表的な結果を示す。対応する非刺激細胞に対してGas6刺激細胞において低下するこのアミノ酸残基のリン酸化レベルによって示されるように、キメラ抗AxI抗体chm11B7、ならびに本発明のヒト化抗AxI抗体h#11B7-T2、h#11B7-T3、h#11B7-T4、h#11B7-T5、およびh#11B7-T6は、Gammagard対照抗体と比較して、Hs578T乳癌細胞(上)およびNCI-H292肺癌細胞(下)におけるThr1462におけるGas6誘導性TSC2リン酸化を著明に低減することができた。

【0289】

(実施例18.5)

本発明のヒト化11B7抗AxI抗体はin vitroでリガンド誘導性mTORリン酸化を阻害する

TSC2リン酸化に対する効果を踏まえ、ウェスタンブロット分析を実施して、本発明のヒト化抗体がまた、Gas6誘導性mTOR活性化も妨げる可能性を有するかどうか調べた。Gas6存在性mTOR活性化は、その位置Ser2448位におけるリン酸化レベルの上昇により反映される。この目的で、第1日に、 5×10^6 個のHs578T乳癌細胞または 3×10^6 個のNCI-H292肺癌細胞を10cm培養皿上に播種した。翌日、増殖培地を無血清培地で置換して、一晩24時間にわたり細胞を飢餓状態にした。第3日に、細胞を、37 で3時間、10 μ g/mlのGammagard対照抗体(Baxter)、キメラ抗AxI mAb chm11B7、ならびにヒト化抗AxI抗体h#11B7-T2、h#11B7-T3、h#11B7-T4、h#11B7-T5、およびh#11B7-T6と共にブレインキュベートし、次いで、37 で15分間、400ng/mlのGas6 (R&D Systems)を伴うかまたは伴わずに処理した。その後、培地を除去し、氷上で30分間、ホスファターゼ阻害剤およびプロテアーゼ阻害剤(10mMの $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 、1mMのフェニルメチルスルホニルフロリド、1mMのオルトバナジウム酸、1mMのNaF、および0.5%のアプロチニン)を補充した800 μ lの溶解バッファー(50mMのHEPES、pH7.5、150mMのNaCl、1mMのEDTA、10%のグリセリン、および1%のTriton X-100)中で細胞を溶解させ、10,000 \times gおよび4 で10分間の遠心分離により細胞破砕物を除去した。上清のタンパク質濃度を決定し、50 μ gの全細胞溶解物を、3倍濃度SDS Laemmliサンプルバッファー中に懸濁させ、これを煮沸し、SDS PAGEにかけた。タンパク質を、ニトロセルロース膜へと移したら、NET-ゼラチンにより膜をブロッキングし、ウサギポリクローナル抗ホスホmTOR(Ser2448)一次抗体(Cell Signaling Technologies; #2971)と共に一晩インキュベートした。翌日、NET-ゼラチンにより3回洗浄した後、膜をHRPコンジュゲート抗ウサギ二次抗体(Dianova; #111-036-045)と共に室温で1時間インキュベートし、次いで、NET-ゼラチンによりさらに3回洗浄した。製造元の指示書(GE Healthcare)に従って化学発光検出キットを適用し、最後にフィルターをフィルム(Kodak)へと曝露した。その後、同じフィルターを、抗mTORキナーゼ抗体(Cell Signaling Technologies; #2972)により再プローブした。

【0290】

図28Eは、この実験の代表的な結果を示す。Hs578T乳癌細胞における抗AxI抗体の阻害効果は比較的弱かった(上)。しかし、対応する非刺激細胞に対してGas6刺激細胞において低下するmTOR Ser2448のリン酸化レベルによって示されるように、キメラ抗AxI抗体chm11B7

、ならびに本発明のヒト化抗AxI抗体h#11B7-T2、h#11B7-T3、h#11B7-T4、h#11B7-T5、およびh#11B7-T6は、Gammagard対照抗体と比較して、NCI-H292肺癌細胞におけるGas6誘導性mTOR活性化を妨げることができた(下)。

【0291】

(実施例18.6)

本発明のヒト化11B7抗AxI抗体はin vitroでリガンド誘導性S6K1リン酸化を阻害する

最後に、ウェスタンブロット分析を実施して、本発明のヒト化抗体が、Gas6誘導性S6K1活性化を妨げる可能性を有するかどうか調べた。Gas6介在性S6K1活性化は、その位置Thr421およびSer424におけるリン酸化レベルの上昇により反映される。この目的で、第1日に、 5×10^6 個のHs578T乳癌細胞または 3×10^6 個のNCI-H292肺癌細胞を10cm培養皿上に播種した。翌日、増殖培地を無血清培地で置換して、一晚24時間にわたり細胞を飢餓状態にした。第3日に、細胞を、37℃で3時間、10 µg/mlのGammagard対照抗体(Baxter)、キメラ抗AxI mAb chm11B7、ならびにヒト化抗AxI抗体h#11B7-T2、h#11B7-T3、h#11B7-T4、h#11B7-T5、およびh#11B7-T6と共にプレインキュベートし、次いで、37℃で15分間、400ng/mlのGas6 (R&D Systems)を伴うかまたは伴わずに処理した。その後、培地を除去し、氷上で30分間、ホスファターゼ阻害剤およびプロテアーゼ阻害剤(10mMの $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 、1mMのフェニルメチルスルホニルフロリド、1mMのオルトバナジウム酸、1mMのNaF、および0.5%のアプロチニン)を補充した800 µlの溶解バッファー(50mMのHEPES、pH7.5、150mMのNaCl、1mMのEDTA、10%のグリセリン、および1%のTriton X-100)中で細胞を溶解させ、10,000 × gおよび4℃で10分間の遠心分離により細胞破砕物を除去した。上清のタンパク質濃度を決定し、50 µgの全細胞溶解物を、3倍濃度SDS Laemmliサンプルバッファー中に懸濁させ、これを煮沸し、SDS PAGEにかけた。タンパク質を、ニトロセルロース膜へと移したら、NET-ゼラチンにより膜をブロッキングし、ウサギポリクローナル抗ホスホp70 S6キナーゼ1(Thr421/Ser424)一次抗体(Cell Signaling Technologies; #9204)と共に一晚インキュベートした。翌日、NET-ゼラチンにより3回洗浄した後、膜をHRPコンジュゲート抗ウサギ二次抗体(Dianova; #111-036-045)と共に室温で1時間インキュベートし、次いで、NET-ゼラチンによりさらに3回洗浄した。製造元の指示書(GE Healthcare)に従って化学発光検出キットを適用し、最後にフィルターをフィルム(Kodak)へと曝露した。その後、同じフィルターを、抗-アクチン抗体(Cell Signaling Technologies; #4967)により再プローブした。

【0292】

図28Fは、この実験の代表的な結果を示す。対応する非刺激細胞に対してGas6刺激細胞において低下するS6K1 Thr421/Ser424のリン酸化レベルによって示されるように、キメラ抗AxI抗体chm11B7、ならびに本発明のヒト化抗AxI抗体h#11B7-T2、h#11B7-T3、h#11B7-T4、h#11B7-T5、およびh#11B7-T6は、Gammagard対照抗体と比較して、Hs578T乳癌細胞におけるGas6誘導性S6K1活性化に対してある阻害効果を示した(上)。しかし、NCI-H292肺癌細胞では、キメラ抗AxI抗体chm11B7、ならびにヒト化抗AxI抗体h#11B7-T2、h#11B7-T3、h#11B7-T4、h#11B7-T5、またはh#11B7-T6で前処理すると、S6K1 Thr421/Ser424のGas6誘導性リン酸化がより強力に低減され、したがって、S6K1 Thr421/Ser424のGas6誘導性活性化がより強力に低減されることを観察できた(下)。

【0293】

(実施例19)

ELISAにより決定される通り、本発明のヒト化11D5抗AxI抗体はin vitroでリガンド誘導性AxIリン酸化を阻害する

ヒト化抗AxI mAbシリーズであるh#11B7-T2、h#11B7-T3、h#11B7-T4、h#11B7-T5、およびh#11B7-T6の特徴づけに加え、ELISA実験を実施して、本発明のヒト化抗AxI抗体h#11D5-T2、h#11D5-T3、h#11D5-T4、h#11D5-T5、およびh#11D5-T6が、受容体チロシンキナーゼAxIのGas6誘導性リン酸化を妨げ、したがって、受容体チロシンキナーゼAxIのGas6誘導性活性化を妨げる可能性を調べた。簡潔には、第1日に、平底96ウェルプレートの通常増殖培地中にウェル当たり 3×10^4 個のHs578T乳癌細胞を接種した。翌日、増殖培地を無血清培地で置換して、一晚24時間にわたり細胞を飢餓状態にした。さらに一晚にわたり、2 µg/ml

のPBSおよび4 で、マウス抗ホスホチロシン抗体4G10により、黒色Maxi-Sorp 96ウエルプレート(Nunc)をコーティングした。第3日に、4G10抗体溶液を除去し、室温において少なくとも4時間にわたり、ブロッキングバッファー(PBS、0.5% BSA)でMaxi-Sorpウエルをブロッキングした。平行して、細胞を、37 で3時間、10 μ g/mlのGammagard対照抗体(Baxter)、キメラ抗AxI mAb chm11D5、ならびにヒト化抗AxI抗体h#11D5-T2、h#11D5-T3、h#11D5-T4、h#11D5-T5、およびh#11D5-T6と共にプレインキュベートし、次いで、37 で15分間、400ng/mlのGas6 (R&D Systems)を伴うかまたは伴わずに処理した。次いで、培地を除去し、氷上で30分間、ホスファターゼ阻害剤およびプロテアーゼ阻害剤(10mMの $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 、1mMのフェニルメチルスルホニルフロリド、1mMのオルトバナジウム酸、1mMのNaF、および0.5%のアプロチニン)を補充した、ウエル当たり110 μ lの溶解バッファー(50mMのHEPES、pH7.5、150mMのNaCl、1mMのEDTA、10%のグリセリン、および1%のTriton X-100)中で細胞を溶解させた。一方、ブロッキングバッファーを除去し、Maxi-Sorpプレートを洗浄バッファー(PBS、0.05%のTween 20)で6回洗浄した後に、各ウエル100 μ lずつの溶解物を移動させて4 で一晩インキュベートした。第4日にプレートを洗浄バッファーで6回洗浄した後、ウエルを、室温で2時間、0.125 μ g/mlの希釈バッファー(20mMのトリス、50mMのNaCl、pH7.3、0.05% Tween 20、0.1% BSA)中のピオチニル化ラット抗AxI抗体12B7と共にインキュベートした。プレートを洗浄バッファーで6回洗浄し、希釈バッファー中で1:20000に希釈したAPコンジュゲートストレプトアビジン(Chemicon #SA110)を各ウエルに添加し、室温で30分間インキュベートした。その後、ウエルを洗浄バッファーで6回洗浄し、AttoPhos基質溶液(Roche #11681982)を添加した。SpectraMax-GeminiEMプレートリーダー(Molecular Devices)を使用して、430nmの励起波長および580nmの発光波長において各ウエルの蛍光を捕集した。

【0294】

図29は、この実験の代表的な結果を示す。対応する非刺激細胞に対してGas6刺激細胞において低下するAxIチロシンリン酸化レベルにより示されたように、キメラ抗AxI抗体chm11D5ならびに本発明のヒト化抗AxI抗体h#11D5-T2、h#11D5-T3、h#11D5-T4、h#11D5-T5、およびh#11D5-T6は、Gammagard対照抗体と比較して、Gas6介在性AxI活性化を阻害または著明に低減することができた。

【0295】

(実施例20)

本発明のラット抗AxI抗体およびキメラ抗AxI抗体はin vitroでリガンド誘導性AxIリン酸化を同程度に阻害する

ラット抗AxI抗体11B7および11D5のキメラ派生物を本発明の一部として生成させた(上記参照)。本発明のラット抗AxI抗体、ならびに本発明の対応するキメラ抗AxI抗体が、in vitroにおいてリガンドGas6介在性AxI活性化を同程度に阻害することができるかどうか調べるために、CaSki子宮頸癌細胞においてELISA実験を実施した。これにより、増大した受容体チロシンのリン酸化を介してGas6介在性AxI活性化を検出した。簡潔には、第1日に、平底96ウエルプレートの通常増殖培地中にウエル当たり 3×10^4 個の細胞を播種した。翌日、増殖培地を無血清培地で置換して、一晩24時間にわたり細胞を飢餓状態にした。さらに一晩にわたり、2 μ g/mlのPBSおよび4 で、マウス抗ホスホチロシン抗体4G10により、黒色Maxi-Sorp 96ウエルプレート(Nunc)をコーティングした。第3日に、4G10抗体溶液を除去し、室温において少なくとも4時間にわたり、PBS、0.5% BSAでMaxi-Sorpウエルをブロッキングした。平行して、細胞を、37 で1時間、50ng/ml、100ng/ml、300ng/ml、750ng/ml、1 μ g/ml、および10 μ g/mlのラット抗AxI抗体11B7またはキメラ抗AxI抗体ch11B7と共にプレインキュベートし、後に37 で10分間、400ng/mlのGas6 (R&D Systems)を伴うかまたは伴わずに処理した。次いで、培地を除去し、氷上で30分間、ホスファターゼ阻害剤およびプロテアーゼ阻害剤(10mMの $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 、1mMのフェニルメチルスルホニルフロリド、1mMのオルトバナジウム酸、1mMのNaF、および0.5%のアプロチニン)を補充した溶解バッファー(50mMのHEPES、pH7.5、150mMのNaCl、1mMのEDTA、10%のグリセリン、および1%のTriton X-100)中で細胞を溶解させた。一方、ブロッキングバッファーを除去し、Maxi-Sorpプレート

を洗浄バッファー(PBS、0.05%のTween 20)で6回洗浄した後に、溶解物を移動させて4 で一晩インキュベートした。第4日にプレートを洗浄バッファーで6回洗浄した後、室温中0.5 µg/mlのPBSで2時間、ウエルをビオチニル化ラット抗AxI抗体12B7と共にインキュベートした。プレートを洗浄バッファーで6回洗浄し、PBS中で1:4,000に希釈したAPコンジュゲートストレプトアビジン(Chemicon #SA110)を各ウエルに添加し、室温で30分間インキュベートした。その後、ウエルを洗浄バッファーで6回洗浄し、AttoPhos基質溶液(Roche #1681982)を添加した。Victorプレートリーダー(Perkin Elmer)を使用して、430nmの励起波長および580nmの発光波長において各ウエルの蛍光を捕集した。図31は、子宮頸癌細胞系CaSkiについての、この実験の代表的な結果を示す。相対的AxIリン酸化の濃度依存的な低減によって実証されるように、本発明のラット抗AxI抗体11B7 (A)、ならびに本発明のキメラ抗AxI抗体ch11B7 (B)は、受容体チロシンキナーゼAxIのリガンド誘導性活性化を同程度に阻害することができた。メラノーマ細胞系C-8161でも、同じ実験設定を適用して同等の効果を観察した。

10

【0296】

(実施例21)

ラット抗ヒトAXLモノクローナル抗体#11B7のヒト化抗体遺伝子の作製

a)h#11B7-T15Lおよびh#11B7-T18Lの軽鎖発現ベクターの構築

配列表の配列番号146または147それぞれのアミノ酸21~129により表される#11B7-T15Lまたはh#11B7-T18Lの軽鎖可変領域(図32A)をコードする遺伝子を含有する各DNAを、分泌シグナル配列と融合させて合成し(MBL Medical & Biological Laboratories Co., Ltd、Artificial Gene Synthesis Service)、制限酵素NheIおよびBsiWIで消化した。結果として得られるDNA断片を、制限酵素NheIおよびBsiWIであらかじめ消化した、ヒト化抗体軽鎖を発現させるための汎用ベクター(pEF6KCL)の部位へと個別に挿入し、これにより、h#11B7-T15Lおよびh#11B7-T18Lの軽鎖発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターを、「pEF6KCL/h#11B7-T15L」または「pEF6KCL/h#11B7-T18L」と名付け、各発現ベクターの挿入配列を、配列表の配列番号144または145のヌクレオチド配列によりそれぞれ表した。

20

【0297】

b)h#11B7-T11Hおよびh#11B7-T12Hの重鎖発現ベクターの構築

配列表の配列番号150または151それぞれのアミノ酸20~132により表されるh#11B7-T11Hおよびh#11B7-T12Hの重鎖可変領域(図32B)をコードする遺伝子を含有する各DNAを合成し(MBL Medical & Biological Laboratories Co., Ltd、Artificial Gene Synthesis Service)、制限酵素BlnIで消化した。結果として得られるDNA断片を、制限酵素BlnIであらかじめ消化した、ヒト化抗体重鎖を発現させるための汎用ベクター(pEF1/FCCU-1)の部位へと個別に挿入し、これによりh#11B7-T11Hおよびh#11B7-T12Hの重鎖発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターを、「pEF1/FCCU/h#11B7-T11H」または「pEF1/FCCU/h#11B7-T12H」と名付け、各発現ベクターの挿入配列を、配列表の配列番号148または149のヌクレオチド配列によりそれぞれ表した。

30

【0298】

(実施例22)

ラット抗ヒトAXLモノクローナル抗体#11B7のヒト化抗体の調製

a)ヒト化抗体の作製

実施例10のa)参照。

【0299】

b)ヒト化抗体の精製

前段a)で得られた培養物上清を、プロテインAアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。100mLの培養物上清を、キャップ付きの500mLフラスコに入れ、これに、PBSで平衡化した1mLのMabSelect SuRe (GE Healthcare Bio-science Ltd.)懸濁液(50%スラリー)を添加した。10 のインキュベーターにおいて100rpmで一晩にわたり混合物を攪拌した。FreeStyle 293-F細胞培養物上清/MabSelect SuRe懸濁液を、空の5mLのZeba Spinカラム(PIERCE)へと適用した。全樹脂をカラムに入れ、次いで、10mLの1M NaClで洗浄

40

50

した。次いで、1mLの1Mアルギニン溶液(pH 4.0)をこれに適用し、抗体含有画分を回収した。この画分をCentrifugal Filter Device (Amicon Ultra-4; 分子量カットオフ: 50K; Millipore Corp.)へと添加した後、クエン酸バッファーで溶液を置換し、濃度を200 μ Lへと調整し、精製サンプルを調製した。

【0300】

pEF6KCL/h#11B7-T15LとpEF1/FCCU/h#11B7-T11Hとを組み合わせることにより得られるヒト化抗体#11B7を、「h#11B7-T28」と名付けた。pEF6KCL/h#11B7-T18LとpEF1/FCCU/h#11B7-T11Hとを組み合わせることにより得られるヒト化抗体#11B7を、「h#11B7-T29」と名付けた。pEF6KCL/h#11B7-T15LとpEF1/FCCU/h#11B7-T12Hとを組み合わせることにより得られるヒト化抗体#11B7を、「h#11B7-T30」と名付けた。pEF6KCL/h#11B7-T18LとpEF1/FCCU/h#11B7-T12Hとを組み合わせることにより得られるヒト化抗体#11B7を、「h#11B7-T31」と名付けた。

【0301】

【表3】

Table 2

h#11B7	H プラスミド	L プラスミド
h#11B7-T28	pEF1/FCCU/h#11B7-T11H	pEF6KCL/h#11B7-T15L
h#11B7-T29	pEF1/FCCU/h#11B7-T11H	pEF6KCL/h#11B7-T18L
h#11B7-T30	pEF1/FCCU/h#11B7-T12H	pEF6KCL/h#11B7-T15L
h#11B7-T31	pEF1/FCCU/h#11B7-T12H	pEF6KCL/h#11B7-T18L

【0302】

(実施例23)

ヒトAXL-Fc融合タンパク質に対するラット抗ヒトAXLモノクローナル抗体#11B7のヒト化抗体の親和性の評価

以下に示す方法により、ヒトAXL-Fcに対するそれらの親和性について、ラット抗ヒトAXLモノクローナル抗体#11B7に由来するヒト化抗体h#11B7-T28～h#11B7-T31を評価した。ヒトAXL-Fc (R&D Systems製; #154-AL)を、PBSにより1 μ g/mlまで希釈した。次いで、溶液を、100 μ L/ウエルの量でImmuno Plate (Nalge Nunc International K.K.製; #437111)へと分注し、4℃で一晩にわたり静置し、タンパク質を該プレートへと吸着させた。翌日、ウエルを、PBS-T溶液(PBSおよび0.05% (v/v) Tween 20)で5回洗浄した。次いで、PBSで5%まで希釈したスキムミルク(森永乳業株式会社製)を含有する溶液を、100 μ L/ウエルの量で分注し、室温で2時間にわたり静置した。ウエル内の溶液を除去し、PBS-T溶液で5回ウエルを洗浄した。次いで、実施例10で調製したラット抗ヒトAXLモノクローナル抗体#11B7の精製ヒト化抗体であるT28～T31を、0.5%スキムミルクを含有するPBS溶液により、1 μ g/ml～0.00256ng/ml(5倍希釈系列)の最終濃度で個別に希釈した。次いで、溶液を100 μ L/ウエルの量で分注し、室温で2時間にわたり静置した。この手順では、実施例15に従い各抗体濃度を決定した。PBS-T溶液で5回ウエルを洗浄した。次いで、TBS-T溶液(TBSおよび0.05% (v/v) Tween 20)で2500倍に希釈したアルカリホスファターゼコンジュゲートAffini Pureヤギ抗ヒトIgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.製; #109-055-097)を、100 μ L/ウエルの量で添加し、室温で1時間にわたり静置した。ウエル内の溶液を除去し、TBS-T溶液で5回ウエルを洗浄した。次いで、蛍光基質溶液(Roche Diagnostics K.K.製; #11681982001)を100 μ L/ウエルの量で添加し、蛍光反応を起こさせた。蛍光基質溶液を添加した15分後に、SpectraMax M5 (Molecular Devices Corp.製)を使用して、ヒトAXL-Fcを吸着させたプレート上の蛍光強度を測定した。結果として、ラット抗ヒトAXLモノクローナル抗体h#11B7-T28～h#11B7-T31のヒト化抗体の結合活性が、抗体濃度依存的な形で、ヒトキメラ抗体の結合活性とほぼ同等であることが確認された(図19および33)。

【0303】

(実施例24)

ラット抗ヒトAXLモノクローナル抗体#11B7のヒト化抗体についてのHPLCアッセイ

以下に示すプロトコルにより、ラット抗ヒトAXLモノクローナル抗体#11B7に由来するヒト化抗体h#11B7-T28～h#11B7-T31のタンパク質濃度を決定した。各ヒト化抗体サンプルをサイズ排除カラム(Tosoh SW3000XL)へと注入し、IgG1型ヒト化抗ヒトDR5モノクローナル抗体であるチガツズマブのサンプルを基準物質として使用して、結果として得られる各抗体のHPLC (Agilent 1200 SL) ピーク面積および吸収係数により、タンパク質濃度を決定した。チガツズマブ抗体の基準サンプル濃度は、実施例15で説明した直接的吸収プロトコルにより決定した。結果を、図34にまとめる。

【0304】

(実施例25)

示差走査熱量測定(DSC)を使用するヒト化抗体の熱安定性の測定

10

抗体の特性を比較するための指標の一例には、抗体の安定性が含まれる。抗体の安定性の指標の例には、熱安定性が含まれる。

【0305】

熱変性中点(T_m)が低い抗体は、変性する可能性が高い。変性した抗体は、凝集する傾向が大きく、また、抗原性も増大すると考えられる。これに対し、T_mが高い抗体は、変性(アンフォールド)する、または不活性化する傾向が小さく、長期間にわたり安定的に保存しうる溶液製剤へと調製することができる。

【0306】

示差走査熱量測定器(DSC)は、タンパク質の相対的な構造安定性の優れた指標として用いられるT_mを迅速かつ正確に測定しうる装置である。DSCを使用してT_m値を測定することができ、これらの値を比較して、これにより、それらの間の熱安定性の差を決定することができる。

20

h#11B7-T2、h#11B7-T3、h#11B7-T4、h#11B7-T5、h#11B7-T6、h#11B7-T7、h#11B7-T8、h#11B7-T9、h#11B7-T10、h#11B7-T11、h#11B7-T12、h#11B7-T13、h#11B7-T14、h#11B7-T15、h#11B7-T16、h#11B7-T17、h#11B7-T18、h#11B7-T19、h#11B7-T20、h#11B7-T21、h#11B7-T22、h#11B7-T23、h#11B7-T24、h#11B7-T25、h#11B7-T26、h#11B7-T27、h#11B7-T28、h#11B7-T29、h#11B7-T30、h#11B7-T31、およびキメラ11B7を、それらの熱安定性について測定した。これらのサンプルを0.5mg/mLの濃度(CBS溶液)へと個別に調整し、それらの400 μLのアリコート、DSC測定におけるサンプル溶液として使用した。DSCの測定条件は、以下：初期温度：20℃、最終温度：100℃、および温度上昇速度：60℃/1時間、および濾過時間：10秒間の通りに設定した。CBSを基準溶液として使用した。MicroCal Inc.、US製のVP-Capillary DSC Platformを、DSC測定装置として使用した。サンプル溶液から得られる走査曲線から、ベースライン(基準溶液をサンプルセルにチャージすることにより得られる走査曲線)を差し引くことにより、ベースライン補正を行った。

30

【0307】

図35(1)は、h#11B7-T1のサーモグラムを示し；図35(2)は、h#11B7-T2のサーモグラムを示し；図35(3)は、h#11B7-T3のサーモグラムを示し；図35(4)は、h#11B7-T4のサーモグラムを示し；図35(5)は、h#11B7-T5のサーモグラムを示し；図35(6)は、h#11B7-T6のサーモグラムを示し；図35(7)は、h#11B7-T7のサーモグラムを示し；図35(8)は、h#11B7-T8のサーモグラムを示し；図35(9)は、h#11B7-T9のサーモグラムを示し；図35(10)は、h#11B7-T10のサーモグラムを示し；図35(11)は、h#11B7-T11のサーモグラムを示し；図35(12)は、h#11B7-T12のサーモグラムを示し；図35(13)は、h#11B7-T13のサーモグラムを示し；図35(14)は、h#11B7-T14のサーモグラムを示し；図35(15)は、h#11B7-T15のサーモグラムを示し；図35(16)は、h#11B7-T16のサーモグラムを示し；図35(17)は、h#11B7-T17のサーモグラムを示し；図35(18)は、h#11B7-T18のサーモグラムを示し；図35(19)は、h#11B7-T19のサーモグラムを示し；図35(20)は、h#11B7-T20のサーモグラムを示し；図35(21)は、h#11B7-T21のサーモグラムを示し；図35(22)は、h#11B7-T22のサーモグラムを示し；図35(23)は、h#11B7-T23のサーモグラムを示し；図35(24)は、h#11B7-T24のサーモグラムを示し；図35(25)は、h#11B7-T25のサーモグラムを示し；図35(26)は、h#11B7-T26のサーモグラムを示し；図35(27)は、h#11B7-T27のサーモグラムを示し；図35(28)は、h#11B7-T28のサーモグラムを示し；図35(29)

40

50

は、h#11B7-T29のサーモグラムを示し；図35(30)は、h#11B7-T30のサーモグラムを示し；図35(31)は、h#11B7-T31のサーモグラムを示し；図35(32)は、キメラh#11B7のサーモグラムを示す。

【0308】

この文脈では、全サーモグラムピークの最高値を、Fab領域の熱変性中点T_mとして定義する。測定の結果として、h#11B7-T1のT_mは71.6 であり；

h#11B7-T2のT_mは77.2 であり；h#11B7-T3のT_mは73.0 であり；h#11B7-T4のT_mは70.2 であり；h#11B7-T5のT_mは73.1 であり；h#11B7-T6のT_mは79.0 であり；h#11B7-T7のT_mは76.5

であり；h#11B7-T8のT_mは83.5 であり；h#11B7-T9のT_mは82.5 であり；h#11B7-T10のT_m

は77.4 であり；h#11B7-T11のT_mは83.5 であり；h#11B7-T12のT_mは76.6 であり；h#11B7-T13のT_mは77.6 であり；h#11B7-T14のT_mは75.8 であり；h#11B7-T15のT_mは83.1 であり；

h#11B7-T16のT_mは82.2 であり；h#11B7-T17のT_mは76.6 であり；h#11B7-T18のT_mは83.0

であり；h#11B7-T19のT_mは75.9 であり；h#11 B7-T20のT_mは76.9 であり；h#11B7-T21のT_m

は76.6 であり；h#11B7-T22のT_mは83.6 であり；h#11B7-T23のT_mは83.0 であり；h#11B7-T24のT_mは77.6 であり；h#11B7-T25のT_mは83.9 であり；h#11B7-T26のT_mは76.9 であり；

h#11B7-T27のT_mは77.9 であり；h#11B7-T28のT_mは77.4 であり；h#11B7-T29のT_mは77.4

であり；h#11B7-T30のT_mは77.8 であり；h#11B7-T31のT_mは77.9 であり；

キメラh#11B7のT_mは73.1 である。

【0309】

(実施例26)

ELISAにより決定される通り、本発明のヒト化11B7抗Axl抗体はin vitroでリガンド誘導性Axlリン酸化を阻害する

増殖停止特異的遺伝子6 (Gas6)によりコードされるタンパク質は、受容体チロシンキナーゼAxlの天然リガンドを表す。Gas6がAxlに結合すると、結果として受容体が活性化され、これは、受容体チロシンキナーゼリン酸化レベルの上昇により反映される。ELISA実験を実施して、本発明のヒト化抗Axl抗体11B7-T5および11B7-T6、ならびに11B7-T6の派生物11B7-T11、11B7-T23、および11B7-T25が、Gas6誘導性リン酸化を阻害し、したがって、受容体チロシンキナーゼAxlの活性化を阻害する可能性を調べた。

【0310】

簡潔には、第1日に、平底96ウエルプレートの通常増殖培地中にウエル当たり 3×10^4 個の細胞を播種した。翌日、増殖培地を無血清培地で置換して、一晚24時間にわたり細胞を飢餓状態にした。さらに一晚にわたり、2 μ g/mlのPBSおよび4 度、マウス抗ホスホチロシン抗体4G10により、黒色Maxi-Sorp 96ウエルプレート(Nunc)をコーティングした。第3日に、4G10抗体溶液を除去し、室温において少なくとも4時間にわたり、ブロッキングバッファー(PBS、0.5% BSA)でMaxi-Sorpウエルをブロッキングした。平行して、細胞を未処理のままにするか、または37 度1時間、10 μ g/mlのGammagard対照抗体(Baxter)、ならびにヒト化抗Axl抗体11B7-T5、11B7-T6、11B7-T11、11B7-T23、および11B7-T25と共にプレインキュベートし、次いで、37 度15分間、400ng/mlのGas6 (R&D Systems)を伴うかまたは伴わずに処理した。その後、培地を除去し、氷上で30分間、ホスファターゼ阻害剤およびプロテアーゼ阻害剤(10mMのNa₄P₂O₇、1mMのフェニルメチルスルホニルフロリド、1mMのオルトパナジウム酸、1mMのNaF、および0.5%のアプロチニン)を補充した、ウエル当たり10 μ lの溶解バッファー(50mMのHEPES、pH7.5、150mMのNaCl、1mMのEDTA、10%のグリセリン、および1%のTriton X-100)中で細胞を溶解させた。一方、ブロッキングバッファーを除去し、Maxi-Sorpプレートを洗浄バッファー(PBS、0.05%のTween 20)で6回洗浄した後に、各ウエル100 μ lずつの溶解物を移動させて4 度一晚インキュベートした。第4日にプレートを洗浄バッファーで6回洗浄した後、ウエルを、室温で2時間、0.125 μ g/mlの希釈バッファー(20mMのトリス、50mMのNaCl、pH7.3、0.05% Tween 20、0.1% BSA)中のピオチニル化ラット抗Axl抗体12B7と共にインキュベートした。プレートを洗浄バッファーで6回洗浄し、希釈バッファー中で1:20000に希釈したAPコンジュゲートストレプトアビジン(Chem icon #SA110)を各ウエルに添加し、室温で30分間インキュベートした。その後、ウエルを

洗浄バッファーで6回洗浄し、AttoPhos基質溶液(Roche #11681982)を添加した。SpectraMax-GeminiEMプレートリーダー(Molecular Devices)を使用して、430nmの励起波長および580nmの発光波長において各ウエルの蛍光を捕集した。

【0311】

図37は、Hs578T乳癌細胞(上)およびNCI-H292肺癌細胞(下)についての、この実験の代表的な結果を示す。対応する非刺激細胞に対してGas6刺激細胞において低下するAxIのチロシンのリン酸化レベルによって示されるように、本発明のヒト化抗AxI抗体11B7-T5、11B7-T6、11B7-T11、11B7-T23、および11B7-T25は、いずれの細胞系においても、Gammagard対照抗体と比較してGas6介在性AxI活性化を著明に低減した。

【0312】

(実施例27)

ELISAにより決定される通り、本発明のヒト化11B7抗AxI抗体はin vitroでリガンド誘導性Aktリン酸化を阻害する

さらに、ELISA実験を実施して、本発明のヒト化抗AxI抗体11B7-T5および11B7-T6、ならびに11B7-T6の派生物11B7-T11、11B7-T23、および11B7-T25が、リガンドGas6介在性Aktキナーゼ活性化を阻害することができるかどうか調べた。増大したタンパク質(Ser473)のリン酸化を介してGas6介在性Aktキナーゼ活性化を検出した。

【0313】

簡潔には、第1日に、平底96ウエルプレートのウエル当たり 2×10^4 個の細胞を播種した。翌日、通常増殖培地を無血清培地で置換して、36時間で細胞を飢餓状態にした。その後、細胞を未処理のまま置くか、または37℃で1時間、10 µg/mlのGammagard対照抗体(Baxter)、ならびにヒト化抗AxI抗体11B7-T5、11B7-T6、11B7-T11、11B7-T23、および11B7-T25と共にプレインキュベートし、次いで、37℃で15分間、400ng/mlのGas6 (R&D Systems)を伴うかまたは伴わずに処理した。培地を除去し、室温で30分間、PBS (pH7.5)中4%のホルムアルデヒドで細胞を固定した。ホルムアルデヒド溶液を除去し、洗浄バッファー(PBS、0.1% Tween 20)で2回細胞を洗浄した。洗浄バッファー中1%の H_2O_2 、0.1%の NaN_3 で細胞をクエンチングし室温で20分間インキュベートした。その後、クエンチング溶液を除去し、洗浄バッファーで2回細胞を洗浄し、室温で4時間、PBS、0.5% BSAで細胞をブロッキングした。PBS、0.5% BSA、5mM EDTA中で1:500に希釈した抗ホスホAkt (Ser473)一次抗体(ウサギポリクローナル抗体; Cell Signaling #9271)を添加し、4℃で一晩静置した。第4日に、抗体溶液を除去し、洗浄バッファーで3回プレートを洗浄した。PBS、0.5% BSA中で1:2500に希釈したHRPコンジュゲート抗ウサギ二次抗体(Dianova #111-036-045)を各ウエルに添加し、室温で1.5時間インキュベートした。洗浄バッファーで5分間ずつ3回、PBSで5分間ずつ2回、プレートを洗浄した。テトラメチルベンジジン(TMB; Calbiochem)を添加し、620nmでモニタリングリングした。100 µlの250nM HClを添加することにより反応を停止させ、Vmaxプレートリーダー(Thermo Lab Systems)を使用して、基準波長を620nmとする450nmで、吸光度を読み取った。

【0314】

図38は、Hs578T乳癌細胞(上)およびNCI-H292肺癌細胞(下)についての、この実験の代表的な結果を示す。対応する非刺激細胞に対してGas6刺激細胞において低下するAkt (Ser473)のリン酸化レベルによって示されるように、本発明のヒト化抗AxI抗体11B7-T5、11B7-T6、11B7-T11、11B7-T23、および11B7-T25は、いずれの細胞系においても、Gammagard対照抗体と比較してGas6介在性Aktキナーゼ活性化を阻害または低減することができた。

【0315】

(実施例28)

本発明のヒト化11B7抗AxI抗体はAxI受容体の内部化を誘導する

AxIは、上記で対象としたAkt経路を含めたAxI介在性シグナル伝達経路を介して、腫瘍細胞の移動および生存に影響を与える因子として同定された。したがって、受容体を内部化することによりAxIが細胞表面/細胞膜から効果的に除去されれば、細胞のシグナル伝達を軽減または抑制することができ、したがって、細胞の維持のほか、最終的には、腫瘍

10

20

30

40

50

の増殖および転移も軽減または抑制することができる。

【0316】

本発明のヒト化抗AxI抗体11B7-T5および11B7-T6、ならびに11B7-T6の派生物である11B7-T11、11B7-T23、および11B7-T25に、AxIのエンドサイトーシスの加速化を誘導することが可能であるかどうかを調べるため、細胞を、本発明のヒト化抗AxI抗体と共にインキュベートして2、4、6、および20時間後の細胞表面におけるAxI分子の相対量を比較した。

【0317】

簡潔には、第1日に、6ウェルディッシュの通常増殖培地中に 2×10^5 個の細胞を播種し、一晚増殖させた。翌日、培地を除去し、無血清培地で細胞を洗浄した。次いで、細胞を未処理のまま置くか、または4 で40分間、10mM HEPESを補充した無血清培地中10 μ g/mlのGammagard対照抗体(Baxter)、ならびにヒト化抗AxI抗体11B7-T5、11B7-T6、11B7-T11、11B7-T23、および11B7-T25と共にインキュベートした。その後、細胞を37 下に移して示された時間にわたり静置し、内部化を起こさせた。その後、10mM EDTAで細胞を脱離させ、100 μ lの洗浄バッファー(PBS、3% FCS)に再懸濁させた。続いて固定するために、細胞を十分に振とうしながら、PBS中2%のパラホルムアルデヒド100 μ lを滴下する形で添加した。室温で20分間のインキュベーション後、細胞を洗浄し、100 μ lの洗浄バッファーに再懸濁させ、全てのサンプルが回収されるまで冷蔵保存した。最後に細胞を染色してAxI発現レベルを得るため、サンプルを丸底96ウェルプレートへと移し、4 で1時間、洗浄バッファー中3 μ g/mlのラット抗AxI mAb 2A1と共にインキュベートした。洗浄バッファーで2回細胞を洗浄し、4 で60分間、1:100に希釈したロバ抗ラットIgG-PE二次抗体(Dianova)と共にインキュベートし、洗浄バッファーでさらに2回洗浄し、FACS (Beckman Coulter EPICS ; EXPO32)により分析した。

【0318】

図38における代表的なデータは、Hs578T乳癌細胞を、ヒト化抗AxI抗体11B7-T5、11B7-T6、11B7-T11、11B7-T23、および11B7-T25で処理すると、AxI受容体の内部化がもたらされたが、Gammagard対照抗体は影響を及ぼさなかったことを実証する。各処理時間について、未処理サンプルと比べた抗AxI mAb処理サンプルの平均蛍光強度として定義される、%による相対AxI発現レベルを示す。

【0319】

(実施例29)

本発明のヒト化抗AxI抗体はin vitroでスフェロイドベースの細胞による血管新生を阻害する

AxIは、in vitroでの内皮細胞の移動、増殖、および管形成を含めた多数の血管新生挙動の重要なレギュレーターである(Hollandら、Cancer Res:65、9294 ~ 9303頁、2005)。したがって、本発明のヒト化抗AxI抗体11B7-T5および11B7-T6、ならびに11B7-T6の派生物である11B7-T11、11B7-T23、および11B7-T25を、HUVECスフェロイドによるGas6誘導性血管発芽に対する阻害効果について調べた。これらの実験は、公開されている元のプロトコル(KorffおよびAugustin、J Cell Sci 112:3249 ~ 58頁、1999)を改変して進めた。

【0320】

簡潔には、懸滴(a hanging drop)中でVEGF-A [25ng/ml]と混ぜ合わせた500個のヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)をプラスチック皿にピペティングして、一晚にわたりスフェロイドを凝集させることによって、説明された通りに(KorffおよびAugustin、J Cell Biol 143:1341 ~ 52頁、1998)スフェロイドを調製した。次いで50個のHUVECスフェロイドを0.9mlのコラーゲン溶液中に播種し(2mg/ml)、24ウェルプレートの個々のウェルにピペティングして重合させた。30分後、10倍に濃縮した希釈標準溶液100 μ lをピペティングすることにより、ヒトGAS6 (R&D Systems)と併せて、Gammagard対照抗体(Baxter)、またはヒト化抗AxI抗体11B7-T5、11B7-T6、11B7-T11、11B7-T23、および11B7-T25の濃度を低下させながら(1×10^{-6} M、 3×10^{-7} M、 1×10^{-7} M、 3×10^{-8} M、 1×10^{-8} M、 3×10^{-9} M、 1×10^{-10} M)、重合化させたゲルの上に添加した(ヒトGAS6の最終濃度: 1 μ g/ml)。プレートを37 で24時間インキュベートし、4%のRoti-Histofix (Roth、Karlsruhe、Germany)を添加するこ

とによって固定した。HUVECスフェロイドの発芽強度は、倒立顕微鏡ならびにデジタルイメージングソフトウェアであるAnalysis3.2 (Soft Imaging System, Muenster, Germany) を使用して、スフェロイド1個当たりの累積発芽長を決定する画像解析システムによって定量化した。無作為に選択したスフェロイド10個の累積発芽長の平均を、個々のデータ点として分析した。

【 0 3 2 1 】

図39は、この実験の代表的な結果を示す。

【 配列表フリーテキスト 】

【 0 3 2 2 】

配列番号1は、プライマー-EFF1と称する、断片Aを増幅するプライマーのヌクレオチド配列である。 10

配列番号2は、プライマー-EFsmARと称する、断片Aを増幅するプライマーのヌクレオチド配列である。

配列番号3は、ヒトkappa鎖の分泌シグナル配列および定常領域、ならびにポリ(A)を付加するためのシグナル配列を含む、断片Bのヌクレオチド配列である。

配列番号4は、ヒトIgG1のシグナル配列および定常領域のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含むDNA断片のヌクレオチド配列である。

配列番号5は、シグナル配列(1~60)、可変領域(61~387)、定常領域(388~702)である、h#11B7-T1Lのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列である。 20

配列番号6は、シグナル配列(1~60)、可変領域(61~387)、定常領域(388~702)である、h#11B7-T2Lのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列である。

配列番号7は、シグナル配列(1~60)、可変領域(61~387)、定常領域(388~702)である、h#11B7-T3Lのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列である。

配列番号8は、シグナル配列(1~60)、可変領域(61~387)、定常領域(388~702)である、h#11B7-T4Lのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列である。

配列番号9は、シグナル配列(1~60)、可変領域(61~387)、定常領域(388~702)である、h#11B7-T5Lのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列である。

配列番号10は、シグナル配列(1~60)、可変領域(61~387)、定常領域(388~702)である、h#11B7-T6Lのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列である。

配列番号11は、シグナル配列(1~60)、可変領域(61~387)、定常領域(388~702)である、h#11B7-T7Lのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列である。 30

配列番号12は、シグナル配列(1~60)、可変領域(61~387)、定常領域(388~702)である、h#11B7-T8Lのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列である。

配列番号13は、シグナル配列(1~60)、可変領域(61~387)、定常領域(388~702)である、h#11B7-T9Lのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列である。

配列番号14は、シグナル配列(1~60)、可変領域(61~387)、定常領域(388~702)である、h#11B7-T10Lのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列である。

配列番号15は、シグナル配列(1~60)、可変領域(61~387)、定常領域(388~702)である、h#11B7-T11Lのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列である。

配列番号16は、シグナル配列(1~60)、可変領域(61~387)、定常領域(388~702)である、h#11B7-T12Lのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列である。 40

配列番号17は、シグナル配列(1~60)、可変領域(61~387)、定常領域(388~702)である、h#11B7-T13Lのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列である。

配列番号18は、シグナル配列(1~20)、可変領域(21~129)、定常領域(130~234)である、h#11B7-T1Lのアミノ酸配列である。

配列番号19は、シグナル配列(1~20)、可変領域(21~129)、定常領域(130~234)である、h#11B7-T2Lのアミノ酸配列である。

配列番号20は、シグナル配列(1~20)、可変領域(21~129)、定常領域(130~234)である、h#11B7-T3Lのアミノ酸配列である。

配列番号21は、シグナル配列(1~20)、可変領域(21~129)、定常領域(130~234)である 50

[illegible]

- 、h#11B7-T7Hのアミノ酸配列である。
- 配列番号47は、シグナル配列(1~19)、可変領域(20~132)、定常領域(133~462)である
- 、h#11B7-T8Hのアミノ酸配列である。
- 配列番号48は、シグナル配列(1~19)、可変領域(20~132)、定常領域(133~462)である
- 、h#11B7-T9Hのアミノ酸配列である。
- 配列番号49は、シグナル配列(1~60)、可変領域(61~387)、定常領域(388~702)である
- 、h#11D5-T1Lのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列である。
- 配列番号50は、シグナル配列(1~60)、可変領域(61~387)、定常領域(388~702)である
- 、h#11D5-T2Lのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列である。
- 配列番号51は、シグナル配列(1~60)、可変領域(61~387)、定常領域(388~702)である 10
- 、h#11D5-T3Lのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列である。
- 配列番号52は、シグナル配列(1~60)、可変領域(61~387)、定常領域(388~702)である
- 、h#11D5-T4Lのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列である。
- 配列番号53は、シグナル配列(1~60)、可変領域(61~387)、定常領域(388~702)である
- 、h#11D5-T5Lのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列である。
- 配列番号54は、シグナル配列(1~60)、可変領域(61~387)、定常領域(388~702)である
- 、h#11D5-T6Lのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列である。
- 配列番号55は、シグナル配列(1~20)、可変領域(21~129)、定常領域(130~234)である
- 、h#11D5-T1Lのアミノ酸配列である。
- 配列番号56は、シグナル配列(1~20)、可変領域(21~129)、定常領域(130~234)である 20
- 、h#11D5-T2Lのアミノ酸配列である。
- 配列番号57は、シグナル配列(1~20)、可変領域(21~129)、定常領域(130~234)である
- 、h#11D5-T3Lのアミノ酸配列である。
- 配列番号58は、シグナル配列(1~20)、可変領域(21~129)、定常領域(130~234)である
- 、h#11D5-T4Lのアミノ酸配列である。
- 配列番号59は、シグナル配列(1~20)、可変領域(21~129)、定常領域(130~234)である
- 、h#11D5-T5Lのアミノ酸配列である。
- 配列番号60は、シグナル配列(1~20)、可変領域(21~129)、定常領域(130~234)である
- 、h#11D5-T6Lのアミノ酸配列である。
- 配列番号61は、シグナル配列(1~57)、可変領域(58~396)、定常領域(297~1386)である 30
- 、h#11D5-T1Hのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列である。
- 配列番号62は、シグナル配列(1~57)、可変領域(58~396)、定常領域(297~1386)である
- 、h#11D5-T2Hのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列である。
- 配列番号63は、シグナル配列(1~57)、可変領域(58~396)、定常領域(297~1386)である
- 、h#11D5-T3Hのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列である。
- 配列番号64は、シグナル配列(1~57)、可変領域(58~396)、定常領域(297~1386)である
- 、h#11D5-T4Hのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列である。
- 配列番号65は、シグナル配列(1~57)、可変領域(58~396)、定常領域(297~1386)である
- 、h#11D5-T5Hのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列である。
- 配列番号66は、シグナル配列(1~57)、可変領域(58~396)、定常領域(297~1386)である 40
- 、h#11D5-T6Hのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列である。
- 配列番号67は、シグナル配列(1~19)、可変領域(20~132)、定常領域(133~462)である
- 、h#11D5-T1Hのアミノ酸配列である。
- 配列番号68は、シグナル配列(1~19)、可変領域(20~132)、定常領域(133~462)である
- 、h#11D5-T2Hのアミノ酸配列である。
- 配列番号69は、シグナル配列(1~19)、可変領域(20~132)、定常領域(133~462)である
- 、h#11D5-T3Hのアミノ酸配列である。
- 配列番号70は、シグナル配列(1~19)、可変領域(20~132)、定常領域(133~462)である
- 、h#11D5-T4Hのアミノ酸配列である。
- 配列番号71は、シグナル配列(1~19)、可変領域(20~132)、定常領域(133~462)である 50

配列番号119は、可変領域である、h#11D5-T12Hのアミノ酸配列である

50

配列番号120は、可変領域である、h#11D5-T13Hのアミノ酸配列である。

配列番号121は、11B7軽鎖CDRL4のアミノ酸配列である。

配列番号122は、11B7軽鎖CDRL5のアミノ酸配列である。

配列番号123は、11B7軽鎖CDRL6のアミノ酸配列である。

配列番号124は、11B7重鎖CDRH1のアミノ酸配列である。

配列番号125は、11B7重鎖CDRH2のアミノ酸配列である。

配列番号126は、11B7重鎖CDRH3のアミノ酸配列である。

配列番号127は、11D5軽鎖CDRL4のアミノ酸配列である。

配列番号128は、11D5軽鎖CDRL5のアミノ酸配列である。

配列番号129は、11D5軽鎖CDRL6のアミノ酸配列である。

10

配列番号130は、11D5重鎖CDRH1のアミノ酸配列である。

配列番号131は、11D5重鎖CDRH2のアミノ酸配列である。

配列番号132は、11D5重鎖CDRH3のアミノ酸配列である。

配列番号133は、リーダー配列のヌクレオチド配列である。

配列番号134は、リーダー配列のアミノ酸配列である。

配列番号135は、#11B7キメラ軽鎖のアミノ酸配列である。

配列番号136は、#11B7キメラ重鎖のアミノ酸配列である。

配列番号137は、#11D5キメラ軽鎖のアミノ酸配列である。

配列番号138は、#11D5キメラ重鎖のアミノ酸配列である。

配列番号139は、図30Aでも説明される、NCBIタンパク質データベース受託番号第P_30530号である、ヒトAxIのアミノ酸配列である。

20

配列番号140は、図30Bでも説明され、#11B7キメラ軽鎖(配列番号135)のアミノ酸1~108からなるアミノ酸配列と同一である、ラット抗ヒトAxIモノクローナル抗体である11B7の軽鎖可変領域のアミノ酸配列である。

配列番号141は、図30Cでも説明され、#11B7キメラ重鎖(配列番号136)のアミノ酸1~113からなるアミノ酸配列と同一である、ラット抗ヒトAxIモノクローナル抗体である11B7の重鎖可変領域のアミノ酸配列である。

配列番号142は、図30Dでも説明され、#11D5キメラ軽鎖(配列番号137)のアミノ酸1~108からなるアミノ酸配列と同一である、ラット抗ヒトAxIモノクローナル抗体である11D5の軽鎖可変領域のアミノ酸配列である。

30

配列番号143は、図30Eでも説明され、#11D5キメラ重鎖(配列番号138)のアミノ酸1~113からなるアミノ酸配列と同一である、ラット抗ヒトAxIモノクローナル抗体である11D5の重鎖可変領域のアミノ酸配列である。

配列番号144は、シグナル配列(1~60)、可変領域(61~387)、定常領域(388~702)である、h#11B7-T15Lのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列である。

配列番号145は、シグナル配列(1~60)、可変領域(61~387)、定常領域(388~702)である、h#11B7-T18Lのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列である。

配列番号146は、シグナル配列(1~20)、可変領域(21~129)、定常領域(130~234)である、h#11B7-T15Lのアミノ酸配列である。

配列番号147は、シグナル配列(1~20)、可変領域(21~129)、定常領域(130~234)である、h#11B7-T18Lのアミノ酸配列である。

40

配列番号148は、シグナル配列(1~57)、可変領域(58~396)、定常領域(397~1386)である、h#11B7-T11Hのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列である。

配列番号149は、シグナル配列(1~57)、可変領域(58~396)、定常領域(397~1386)である、h#11B7-T12Hのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列である。

配列番号150は、シグナル配列(1~19)、可変領域(20~132)、定常領域(133~462)である、h#11B7-T11Hのアミノ酸配列である。

配列番号151は、シグナル配列(1~19)、可変領域(20~132)、定常領域(133~462)である、h#11B7-T12Hのアミノ酸配列である。

【図 1】

Figure 1

h#11B7-T1L
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIGNYLRWYQQKPGKAPKLLI
SGATNLAAGVPSRFRSGSGSDYTLTISLQPEDFATYYCLQSKESPW
TFGGGTKVEIKRT

h#11B7-T2L
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIGNYLRWFQQKPGKAPKLM
SGATNLAAGVPSRFRSGSGSDYTLTISLQPEDFATYYCLQSKESPW
TFGGGTKVEIKRT

h#11B7-T3L
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIGNYLRWFQQKPGKAPKLM
SGATNLAAGVPSRFRSGSGSDYTLTISLQPEDFATYYCLQSKESPW
TFGGGTKVEIKRT

h#11B7-T4L
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIGNYLRWYQQKPGKAPKLLI
SGATNLAAGVPSRFRSGSGSDYTLTISLQPEDFATYYCLQSKESPW
TFGGGTKLEIKRT

h#11B7-T5L
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIGNYLRWFQQKPGKAPKLM
SGATNLAAGVPSRFRSGSGSDYTLTISLQPEDFATYYCLQSKESPW
TFGGGTKLEIKRT

h#11B7-T6L
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIGNYLRWFQQKPGKAPKLM
SGATNLAAGVPSRFRSGSGSDYTLTISLQPEDFATYYCLQSKESPW
TFGGGTKVEIKRT

h#11B7-T7L
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIGNYLRWYQQKPGKAPKLM
SGATNLAAGVPSRFRSGSGSDYTLTISLQPEDFATYYCLQSKESPW
TFGGGTKVEIKRT

【図 2】

Figure 2

h#11B7-T8L
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIGNYLRWFQQKPGKAPKLLI
SGATNLAAGVPSRFRSGSGSDYTLTISLQPEDFATYYCLQSKESPW
TFGGGTKVEIKRT

h#11B7-T9L
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIGNYLRWFQQKPGKAPKLM
SGATNLAAGVPSRFRSGSGSDYTLTISLQPEDFATYYCLQSKESPW
TFGGGTKVEIKRT

h#11B7-T10L
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIGNYLRWYQQKPGKAPKLLI
SGATNLAAGVPSRFRSGSGSDYTLTISLQPEDFATYYCLQSKESPW
TFGGGTKVEIKRT

h#11B7-T11L
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIGNYLRWFQQKPGKAPKLLI
SGATNLAAGVPSRFRSGSGSDYTLTISLQPEDFATYYCLQSKESPW
TFGGGTKVEIKRT

h#11B7-T12L
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIGNYLRWYQQKPGKAPKLM
SGATNLAAGVPSRFRSGSGSDYTLTISLQPEDFATYYCLQSKESPW
TFGGGTKVEIKRT

h#11B7-T13L
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIGNYLRWYQQKPGKAPKLLI
SGATNLAAGVPSRFRSGSGSDYTLTISLQPEDFATYYCLQSKESPW
TFGGGTKVEIKRT

h#11B7-T14L
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIGNYLRWYQQKPGKAPKLM
SGATNLAAGVPSRFRSGSGSDYTLTISLQPEDFATYYCLQSKESPW
TFGGGTKLEIKRT

【図 3】

Figure 3

h#11B7-T15L
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIGNYLRWFQQKPGKAPKLLI
SGATNLAAGVPSRFRSGSGSDYTLTISLQPEDFATYYCLQSKESPW
TFGGGTKLEIKRT

h#11B7-T16L
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIGNYLRWFQQKPGKAPKLM
SGATNLAAGVPSRFRSGSGSDYTLTISLQPEDFATYYCLQSKESPW
TFGGGTKLEIKRT

h#11B7-T17L
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIGNYLRWYQQKPGKAPKLLI
SGATNLAAGVPSRFRSGSGSDYTLTISLQPEDFATYYCLQSKESPW
TFGGGTKLEIKRT

h#11B7-T18L
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIGNYLRWFQQKPGKAPKLLI
SGATNLAAGVPSRFRSGSGSDYTLTISLQPEDFATYYCLQSKESPW
TFGGGTKLEIKRT

h#11B7-T19L
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIGNYLRWYQQKPGKAPKLM
SGATNLAAGVPSRFRSGSGSDYTLTISLQPEDFATYYCLQSKESPW
TFGGGTKLEIKRT

h#11B7-T20L
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIGNYLRWYQQKPGKAPKLLI
SGATNLAAGVPSRFRSGSGSDYTLTISLQPEDFATYYCLQSKESPW
TFGGGTKLEIKRT

【図 4】

Figure 4

h#11B7-T1H
QIQLQESGPGLVKPSQTLSLTCAVSGYSITSNYWGWIRQPPGKGLEWI
GYITYSGSTSYNPSLKRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCA
ITTFYYWGQGLTVTVSS

h#11B7-T2H
QIQLQESGPGLVKPSQTLSLTCAVSGYSITSNYWGWIRQPPGKGLEWM
GYITYSGSTSYNPSLKRISISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCA
ITTFYYWGQGLTVTVSS

h#11B7-T3H
QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCAVSGYSITSNYWGWIRKPPGDGLEWM
GYITYSGSTSYNPSLKRVTISRDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCA
ITTFYYWGQGLTVTVSS

h#11B7-T4H
QVQLQWAGAGLLKPSSETLSLTCTVSGYSITSNYWGWIRQPPGKGLEWI
GYITYSGSTSYNPSLKRVTISRDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCA
ITTFYYWGQGLTVTVSS

h#11B7-T5H
QVQLQWAGAGLLKPSSETLSLTCTVSGYSITSNYWGWIRQPPGKGLEWM
GYITYSGSTSYNPSLKRISISRDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCA
ITTFYYWGQGLTVTVSS

h#11B7-T6H
QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGYSITSNYWGWIRQPPGKGLEWM
GYITYSGSTSYNPSLKRISISRDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCA
ITTFYYWGQGLTVTVSS

【 図 5 】

Figure 5

h#11B7-T7H
QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGYSITSNYWGWIRQPPGKGLEWI
GYITYSGSTSYNPSLKSRSVISRDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCA
ITTFYYWGQGTTLTVSS

h#11B7-T8H
QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGYSITSNYWGWIRQPPGKGLEWM
GYITYSGSTSYNPSLKSRTISRDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCA
ITTFYYWGQGTTLTVSS

h#11B7-T9H
QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGYSITSNYWGWIRQPPGKGLEWI
GYITYSGSTSYNPSLKSRTISRDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCA
ITTFYYWGQGTTLTVSS

h#11B7-T10H
QVQLQWAGAGLLKPSSETLSLTCTVSGYSITSNYWGWIRQPPGKGLEWI
GYITYSGSTSYNPSLKSRSVISRDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCA
ITTFYYWGQGTTLTVSS

h#11B7-T11H
QVQLQWAGAGLLKPSSETLSLTCTVSGYSITSNYWGWIRQPPGKGLEWM
GYITYSGSTSYNPSLKSRTISRDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCA
ITTFYYWGQGTTLTVSS

h#11B7-T12H
QVQLQWAGAGLLKPSSETLSLTCTVSGYSITSNYWGWIRQPPGKGLEWI
GYITYSGSTSYNPSLKSRTISRDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCA
ITTFYYWGQGTTLTVSS

【 図 7 】

Figure 7

h#11D5-T8L
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIGNYLSWFQQKPGKAPKRLI
YGAIKLAVGVPSRFRSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQYIQFPL
TFGQGTKVEIKRT

h#11D5-T9L
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIGNYLSWFQQKPGKAPRRLI
YGAIKLAVGVPSRFRSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQYIQFPL
TFGQGTKVEIKRT

h#11D5-T10L
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIGNYLSWFQQKPGKAPKRMI
YGAIKLAVGVPSRFRSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQYIQFPL
TFGQGTKVEIKRT

h#11D5-T11L
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIGNYLSWFQQKPGKAPRRLI
YGAIKLAVGVPSRFRSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQYIQFPL
TFGQGTKVEIKRT

h#11D5-T12L
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIGNYLSWFQQKPGKAPRRLI
YGAIKLAVGVPSRFRSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQYIQFPL
TFGQGTKVEIKRT

h#11D5-T13L
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIGNYLSWFQQKPGKAPRRLI
YGAIKLAVGVPSRFRSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQYIQFPL
TFGQGTKVEIKRT

h#11D5-T14L
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIGNYLSWFQQKPGKAPKRMI
YGAIKLAVGVPSRFRSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQYIQFPL
TFGQGTKVEIKRT

【 図 6 】

Figure 6

h#11D5-T1L
DVQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIGNYLSWFQQKPGKAPKLLI
YGAIKLAVGVPSRFRSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQYIQFPL
TFGQGTKLEIKRT

h#11D5-T2L
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIGNYLSWFQQKPGKAPRLMI
YGAIKLAVGVPSRFRSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQYIQFPL
TFGQGTKLEIKRT

h#11D5-T3L
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIGNYLSWFQQKVGKSPRRMI
YGAIKLAVGVPSRFRSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQYIQFPL
TFGSGTKLEIKRT

h#11D5-T4L
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIGNYLSWFQQKPGKAPRRLI
YGAIKLAVGVPSRFRSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQYIQFPL
TFGGGTVKEIKRT

h#11D5-T5L
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIGNYLSWFQQKPGKAPRRMI
YGAIKLAVGVPSRFRSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQYIQFPL
TFGGGTVKEIKRT

h#11D5-T6L
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIGNYLSWFQQKPGKAPRRMI
YGAIKLAVGVPSRFRSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQYIQFPL
TFGQGTKVEIKRT

h#11D5-T7L
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIGNYLSWFQQKPGKAPRRLI
YGAIKLAVGVPSRFRSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQYIQFPL
TFGQGTKVEIKRT

【 図 8 】

Figure 8

h#11D5-T15L
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIGNYLSWFQQKPGKAPKRLI
YGAIKLAVGVPSRFRSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQYIQFPL
TFGQGTKVEIKRT

h#11D5-T16L
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIGNYLSWFQQKPGKAPKRLI
YGAIKLAVGVPSRFRSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQYIQFPL
TFGQGTKVEIKRT

h#11D5-T17L
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIGNYLSWFQQKPGKAPRRMI
YGAIKLAVGVPSRFRSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQYIQFPL
TFGQGTKVEIKRT

h#11D5-T18L
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIGNYLSWFQQKPGKAPRRLI
YGAIKLAVGVPSRFRSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQYIQFPL
TFGQGTKVEIKRT

h#11D5-T19L
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIGNYLSWFQQKPGKAPRRLI
YGAIKLAVGVPSRFRSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQYIQFPL
TFGQGTKVEIKRT

h#11D5-T20L
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIGNYLSWFQQKPGKAPKRMI
YGAIKLAVGVPSRFRSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQYIQFPL
TFGQGTKVEIKRT

h#11D5-T21L
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIGNYLSWFQQKPGKAPKRMI
YGAIKLAVGVPSRFRSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQYIQFPL
TFGQGTKVEIKRT

【図 9】

Figure 9

h#11D5-T22L
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIGNYLSWFQQKPGKAPKRLI
YGAIKLAVGVPSRFRSGSGSDTYTLTISSLQPEDFATYYCLQYIQFPL
TFGQGTKVEIKRT

h#11D5-T23L
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIGNYLSWFQQKPGKAPRRMI
YGAIKLAVGVPSRFRSGSGSDTYTLTISSLQPEDFATYYCLQYIQFPL
TFGQGTKVEIKRT

h#11D5-T24L
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIGNYLSWFQQKPGKAPRRLI
YGAIKLAVGVPSRFRSGSGSDTYTLTISSLQPEDFATYYCLQYIQFPL
TFGQGTKVEIKRT

h#11D5-T25L
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIGNYLSWFQQKPGKAPRRMI
YGAIKLAVGVPSRFRSGSGSDTYTLTISSLQPEDFATYYCLQYIQFPL
TFGQGTKVEIKRT

h#11D5-T26L
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIGNYLSWFQQKPGKAPRRMI
YGAIKLAVGVPSRFRSGSGSDTYTLTISSLQPEDFATYYCLQYIQFPL
TFGQGTKVEIKRT

h#11D5-T27L
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIGNYLSWFQQKPGKAPRRMI
YGAIKLAVGVPSRFRSGSGSDTYTLTISSLQPEDFATYYCLQYIQFPL
TFGQGTKVEIKRT

h#11D5-T28L
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIGNYLSWFQQKPGKAPRRLI
YGAIKLAVGVPSRFRSGSGSDTYTLTISSLQPEDFATYYCLQYIQFPL
TFGQGTKVEIKRT

【図 12】

Figure 12

h#11D5-T1H
QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSITSNYWGWIQPPGKGLEWI
GHITNSGNTTYPNPSLKSRVTISRDTSENQFSLKLSSTVTAADTAVYYCA
KGAFDYWGQGLTVTVSS

h#11D5-T2H
EVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSITSNYWGWIQPPGKGLEWI
GHITNSGNTTYPNPSLKSRVTISRDTSENQFSLKLSSTVTAADTAVYYCA
KGAFDYWGQGLTVTVSS

h#11D5-T3H
EVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSITSNYWGWIQPPGKGLEWI
GHITNSGNTTYPNPSLKSRVTISRDTSENQFSLKLSSTVTAADTAVYYCA
KGAFDYWGQGLTVTVSS

h#11D5-T4H
QVQLQWAGALLKPSSETLSLTCTVSGYSITSNYWGWIQPPGKGLEWI
GHITNSGNTTYPNPSLKSRVTISRDTSENQFSLKLSSTVTAADTAVYYCA
KGAFDYWGQGLTVTVSS

h#11D5-T5H
EVQLQWAGALLKPSSETLSLTCTVSGYSITSNYWGWIQPPGKGLEWI
GHITNSGNTTYPNPSLKSRVTISRDTSENQFSLKLSSTVTAADTAVYYCA
KGAFDYWGQGLTVTVSS

h#11D5-T6H
EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGYSITSNYWGWIQPPGKGLEWI
GHITNSGNTTYPNPSLKSRVTISRDTSENQFSLKLSSTVTAADTAVYYCA
KGAFDYWGQGLTVTVSS

h#11D5-T7H
QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGYSITSNYWGWIQPPGKGLEWI
GHITNSGNTTYPNPSLKSRVTISRDTSENQFSLKLSSTVTAADTAVYYCA
KGAFDYWGQGLTVTVSS

【図 10】

Figure 10

h#11D5-T29L
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIGNYLSWFQQKPGKAPRRMI
YGAIKLAVGVPSRFRSGSGSDTYTLTISSLQPEDFATYYCLQYIQFPL
TFGQGTKVEIKRT

h#11D5-T30L
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIGNYLSWFQQKPGKAPRRMI
YGAIKLAVGVPSRFRSGSGSDTYTLTISSLQPEDFATYYCLQYIQFPL
TFGQGTKVEIKRT

h#11D5-T31L
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIGNYLSWFQQKPGKAPRRLI
YGAIKLAVGVPSRFRSGSGSDTYTLTISSLQPEDFATYYCLQYIQFPL
TFGQGTKVEIKRT

h#11D5-T32L
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIGNYLSWFQQKPGKAPRRMI
YGAIKLAVGVPSRFRSGSGSDTYTLTISSLQPEDFATYYCLQYIQFPL
TFGQGTKVEIKRT

h#11D5-T33L
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIGNYLSWFQQKPGKAPRRMI
YGAIKLAVGVPSRFRSGSGSDTYTLTISSLQPEDFATYYCLQYIQFPL
TFGQGTKVEIKRT

h#11D5-T34L
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIGNYLSWFQQKPGKAPRRMI
YGAIKLAVGVPSRFRSGSGSDTYTLTISSLQPEDFATYYCLQYIQFPL
TFGQGTKVEIKRT

h#11D5-T35L
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIGNYLSWFQQKPGKAPRRLI
YGAIKLAVGVPSRFRSGSGSDTYTLTISSLQPEDFATYYCLQYIQFPL
TFGQGTKVEIKRT

【図 11】

Figure 11

h#11D5-T36L
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIGNYLSWFQQKPGKAPRRMI
YGAIKLAVGVPSRFRSGSGSDTYTLTISSLQPEDFATYYCLQYIQFPL
TFGQGTKVEIKRT

h#11D5-T37L
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIGNYLSWFQQKPGKAPRRMI
YGAIKLAVGVPSRFRSGSGSDTYTLTISSLQPEDFATYYCLQYIQFPL
TFGQGTKVEIKRT

【図 13】

Figure 13

h#11D5-T8H
EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGYSITSNYWGWIQPPGKGLEWI
GHITNSGNTTYPNPSLKSRVTISRDTSENQFSLKLSSTVTAADTAVYYCA
KGAFDYWGQGLTVTVSS

h#11D5-T9H
QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGYSITSNYWGWIQPPGKGLEWI
GHITNSGNTTYPNPSLKSRVTISRDTSENQFSLKLSSTVTAADTAVYYCA
KGAFDYWGQGLTVTVSS

h#11D5-T10H
QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGYSITSNYWGWIQPPGKGLEWI
GHITNSGNTTYPNPSLKSRVTISRDTSENQFSLKLSSTVTAADTAVYYCA
KGAFDYWGQGLTVTVSS

h#11D5-T11H
EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGYSITSNYWGWIQPPGKGLEWI
GHITNSGNTTYPNPSLKSRVTISRDTSENQFSLKLSSTVTAADTAVYYCA
KGAFDYWGQGLTVTVSS

h#11D5-T12H
EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGYSITSNYWGWIQPPGKGLEWI
GHITNSGNTTYPNPSLKSRVTISRDTSENQFSLKLSSTVTAADTAVYYCA
KGAFDYWGQGLTVTVSS

h#11D5-T13H
QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGYSITSNYWGWIQPPGKGLEWI
GHITNSGNTTYPNPSLKSRVTISRDTSENQFSLKLSSTVTAADTAVYYCA
KGAFDYWGQGLTVTVSS

【 図 1 4 - 2 】

图 14-2

抗体	CDR	配列
11B7 軽鎖		L4 RASQDIGNYLK

11B7 輕鎖	L5	GATNLAA
11B7 輕鎖	L6	LQSKESPWT
11B7 重鎖	H1	SNYWG
11B7 重鎖	H2	YITYSGSTSYNPSLK
11B7 重鎖	H3	----TTFYY

11D5 輕鎖 L4 RASQDIGNYLS

11D5 輕鎖	L5 GAIKLAV
11D5 輕鎖	L6 LQYIQFP

11D5 重鎖 H1 SNYWG

11D5 重鎖 H2 HITNSGNTTYNPSLKS

11D5 重鎖 H3 ----GAFDY

リーダ配列

ヌクレオチド配列

1 ATGGGTGACAATGACATCCACTTTGCCTTTCTCTCCACAGG TGTGCATTCC 52

アミノ酸配列

【 図 1 4 - 4 】

图 14-4

T	Y	N	S	W	G	W	R	K	F	P	G	N	D	K	E	R	N	I	Q	G	H	F	I	T	N	G	S	N	V	T		
E	N	P	P	L	K	R	A	S	A	P	R	D	D	S	K	A	R	R	G	Q	T	V	L	L	V	C	S	S	A	K	T	
Y	S	T	P	S	F	P	L	P	I	K	A	S	S	L	L	K	G	G	T	H	C	A	F	I	G	A	S	S	V	A	T	
E	K	F	L	N	G	V	P	K	F	V	K	K	P	K	L	D	L	K	D	L	K	R	V	W	Q	G	S	H	E	R	N	
F	L	N	G	V	P	K	F	V	K	F	V	K	K	P	K	L	D	L	K	D	L	K	R	V	W	Q	G	S	H	E	R	
N	D	P	P	S	H	E	S	T	A	L	E	S	T	A	L	E	S	T	A	L	E	S	T	A	L	E	S	T	A	L	E	S
S	T	A	L	E	S	T	A	L	E	S	T	A	L	E	S	T	A	L	E	S	T	A	L	E	S	T	A	L	E	S	T	A
P	S	H	E	S	T	A	L	E	S	T	A	L	E	S	T	A	L	E	S	T	A	L	E	S	T	A	L	E	S	T	A	L
S	H	E	S	T	A	L	E	S	T	A	L	E	S	T	A	L	E	S	T	A	L	E	S	T	A	L	E	S	T	A	L	E
T	T	Y	N	S	W	G	W	R	K	F	P	G	N	D	K	E	R	N	I	Q	G	H	F	I	T	N	G	S	N	V	T	
T	T	Y	N	S	W	G	W	R	K	F	P	G	N	D	K	E	R	N	I	Q	G	H	F	I	T	N	G	S	N	V	T	
T	T	Y	N	S	W	G	W	R	K	F	P	G	N	D	K	E	R	N	I	Q	G	H	F	I	T	N	G	S	N	V	T	
T	T	Y	N	S	W	G	W	R	K	F	P	G	N	D	K	E	R	N	I	Q	G	H	F	I	T	N	G	S	N	V	T	
T	T	Y	N	S	W	G	W	R	K	F	P	G	N	D	K	E	R	N	I	Q	G	H	F	I	T	N	G	S	N	V	T	
T	T	Y	N	S	W	G	W	R	K	F	P	G	N	D	K	E	R	N	I	Q	G	H	F	I	T	N	G	S	N	V	T	
T	T	Y	N	S	W	G	W	R	K	F	P	G	N	D	K	E	R	N	I	Q	G	H	F	I	T	N	G	S	N	V	T	
T	T	Y	N	S	W	G	W	R	K	F	P	G	N	D	K	E	R	N	I	Q	G	H	F	I	T	N	G	S	N	V	T	
T	T	Y	N	S	W	G	W	R	K	F	P	G	N	D	K	E	R	N	I	Q	G	H	F	I	T	N	G	S	N	V	T	
T	T	Y	N	S	W	G	W	R	K	F	P	G	N	D	K	E	R	N	I	Q	G	H	F	I	T	N	G	S	N	V	T	
T	T	Y	N	S	W	G	W	R	K	F	P	G	N	D	K	E	R	N	I	Q	G	H	F	I	T	N	G	S	N	V	T	
T	T	Y	N	S	W	G	W	R	K	F	P	G	N	D	K	E	R	N	I	Q	G	H	F	I	T	N	G	S	N	V	T	
T	T	Y	N	S	W	G	W	R	K	F	P	G	N	D	K	E	R	N	I	Q	G	H	F	I	T	N	G	S	N	V	T	
T	T	Y	N	S	W	G	W	R	K	F	P	G	N	D	K	E	R	N	I	Q	G	H	F	I	T	N	G	S	N	V	T	
T	T	Y	N	S	W	G	W	R	K	F	P	G	N	D	K	E	R	N	I	Q	G	H	F	I	T	N	G	S	N	V	T	
T	T	Y	N	S	W	G	W	R	K	F	P	G	N</																			

#11B7 キメラ軽鎖

D	Q	M	L	Y	P	A	S	S	A	T	V	I
G	W	T	R	R	R	K	G	S	S	A	G	D
P	C	F	S	S	P	V	L	K	L	E	V	V
C	Q	W	R	F	E	D	N	L	T	F	N	S
R	F	F	S	S	P	V	L	K	L	E	V	S
I	Y	Q	R	R	F	E	D	N	L	T	F	S
Q	W	T	R	R	F	E	D	N	L	T	F	S
L	P	C	F	S	S	P	V	L	K	L	E	V
Y	P	A	S	S	A	T	V	I	D	G	P	C
A	S	T	V	I	D	G	P	C	F	S	S	P
T	V	I	D	G	P	C	F	S	S	P	V	L
V	L	K	L	E	V	S	S	A	T	V	I	D
S	S	A	T	V	I	D	G	P	C	F	S	S
S	S	A	T	V	I	D	G	P	C	F	S	S
A	S	T	V	I	D	G	P	C	F	S	S	P
T	V	I	D	G	P	C	F	S	S	P	V	L
V	L	K	L	E	V	S	S	A	T	V	I	D
I	D	G	P	C	F	S	S	A	T	V	I	D
D	G	P	C	F	S	S	A	T	V	I	D	G
G	P	C	F	S	S	A	T	V	I	D	G	P
P	C	F	S	S	A	T	V	I	D	G	P	C
C	F	S	S	A	T	V	I	D	G	P	C	F
F	S	S	A	T	V	I	D	G	P	C	F	S
S	S	A	T	V	I	D	G	P	C	F	S	S
A	S	T	V	I	D	G	P	C	F	S	S	P
T	V	I	D	G	P	C	F	S	S	A	T	V
V	L	K	L	E	V	S	S	A	T	V	I	D
I	D	G	P	C	F	S	S	A	T	V	I	D
D	G	P	C	F	S	S	A	T	V	I	D	G
G	P	C	F	S	S	A	T	V	I	D	G	P
P	C	F	S	S	A	T	V	I	D	G	P	C
C	F	S	S	A	T	V	I	D	G	P	C	F
F	S	S	A	T	V	I	D	G	P	C	F	S
S	S	A	T	V	I	D	G	P	C	F	S	S
A	S	T	V	I	D	G	P	C	F	S	S	P
T	V	I	D	G	P	C	F	S	S	A	T	V
V	L	K	L	E	V	S	S	A	T	V	I	D
I	D	G	P	C	F	S	S	A	T	V	I	D
D	G	P	C	F	S	S	A	T	V	I	D	G
G	P	C	F	S	S	A	T	V	I	D	G	P
P	C	F	S	S	A	T	V	I	D	G	P	C
C	F	S	S	A	T	V	I	D	G	P	C	F
F	S	S	A	T	V	I	D	G	P	C	F	S
S	S	A	T	V	I	D	G	P	C	F	S	S
A	S	T	V	I	D	G	P	C	F	S	S	P
T	V	I	D	G	P	C	F	S	S	A	T	V
V	L	K	L	E	V	S	S	A	T	V	I	D
I	D	G	P	C	F	S	S	A	T	V	I	D
D	G	P	C	F	S	S	A	T	V	I	D	G
G	P	C	F	S	S	A	T	V	I	D	G	P
P	C	F	S	S	A	T	V	I	D	G	P	C
C	F	S	S	A	T	V	I	D	G	P	C	F
F	S	S	A	T	V	I	D	G	P	C	F	S
S	S	A	T	V	I	D	G	P	C	F	S	S
A	S	T	V	I	D	G	P	C	F	S	S	P
T	V	I	D	G	P	C	F	S	S	A	T	V
V	L	K	L	E	V	S	S	A	T	V	I	D
I	D	G	P	C	F	S	S	A	T	V	I	D
D	G	P	C</									

#11B7 キメラ重鎖

[illegible]

#11D5 キメラ軽鎖

[illegible]

#11D5 キメラ重鎖

EVQLQESGPGGLVKPSQSLSLTCSTGYSI

ラット 11B7 軽鎖可変領域

DIQMTQAPSSLPASLGDRVTTICRASQDIGNYLRWFQKPKGKSPRLMISGA
TNLAAGVPSRFSGSRSGSDYSLTISSLESEDMADYYCLQSKESPWTFGGG
TKLELKR

ラット 11B7 重鎖可変領域

EVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVTGYSITSNYWGWIRKFPDGDKMEWMG
YITYSGSTSYNPSLKSRSITRDTSKNQFFLQLNSVTSEDTATYYCAITTFYY
WGQGVMTVSS

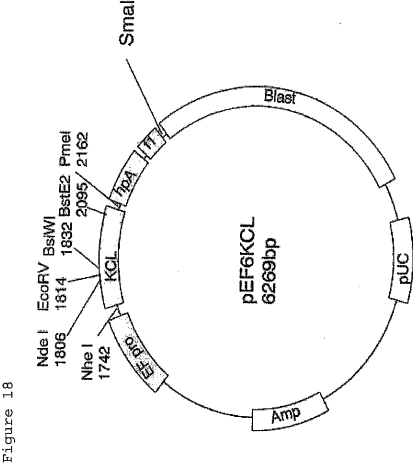
ラット 11D5 軽鎖可変領域

DIQMTQSPSSMSTSLGDRVITICRASQDIGNYLSWFQKQVKGKSPRRMIYG
AIKLAVGVPSRFSGRSGDYSLTISSESDMAIYYCLQYIQFPLTFGSGT
KLELKR

ラット 11D5 重鎖可変領域

EVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVTGYSITSNYWGWIRKFPGNKMEWIGH
ITNSGNTTYPNPSLKSRIISRDTSRNQFFLQLNSVTTEDTATYYCAKGAFDY
WGQGVMVTYSS

【図 18】



【図 24 - 1】

図 24、上パネル

	Ab280	希釈率	タンパク質濃度 (mg/mL)	吸収係数 (Ab280/mg/mL)
T1	0.30	1	0.20	1.538
T2	0.41	2.5	0.66	1.537
T3	0.68	1	0.44	1.535
T4	0.50	2	0.62	1.611
T5	0.36	2.9	0.65	1.61
T6	0.51	2	0.67	1.535
T7	0.98	11	6.9	1.556
T8	0.78	10.1	5.1	1.556
T9	0.62	22.5	9.5	1.516
T10	1.17	10.2	7.7	1.557
T11	0.71	20.4	0.6	1.516
T12	0.59	10.0	3.9	1.536
T13	0.22	26.4	3.8	1.536
T14	0.80	10.6	5.5	1.555

【図 24 - 2】

図 24、下パネル

	Ab280	希釈率	タンパク質濃度 (mg/mL)	吸収係数 (Ab280/mg/mL)
T15	0.66	11.0	4.7	1.535
T16	0.56	20.9	7.8	1.515
T17	0.99	10.7	7.0	1.515
T18	0.46	24.3	7.4	1.515
T19	0.68	10.8	4.8	1.535
T20	0.64	10.4	4.3	1.535
T21	0.60	11.5	4.4	1.556
T22	0.45	11.5	3.4	1.536
T23	0.98	10.6	6.8	1.515
T24	0.62	10.8	4.3	1.556
T25	0.93	10.7	6.6	1.516
T26	0.65	10.5	4.4	1.536
T27	0.73	10.8	5.2	1.536

【図 25】

図 25

	Ab280	希釈率	タンパク質濃度 (mg/mL)	吸収係数 (Ab280/mg/mL)
T1	0.55	14.4	5.5	1.437
T2	0.70	10.3	5.0	1.438
T3	0.56	3.9	1.5	1.432
T4	0.60	4.0	1.6	1.514
T5	0.43	4.1	1.2	1.513
T6	0.83	5.0	2.9	1.437

【図 30】

図 30

図 30A (NCBI タンパク質データベースの登録番号 P_30530 号)

MGRVFLAWCLALCGWACMAFRGTQAEESPFVGNPNITGARGLTGTLRCQLQVQGEFPEVHW
LRDGGILELADSTQTQVPLGEDEQDDWIVVSQRLRITSLQLSDTGQYQCLVFLGHQTFVSQPG
YVGLLEGLPYFLEEPEDRTVAANTPFNLSCQAQGFPEFVDLLWLQDAVPLATAPGHGPORSLSH
VPLGKNTSSFSCEAHNAKGVTTSTRATITVLPPQFRLHLVSRQTELEVAVTPTGLSGIYPL
THCTLQAVLSDDGMIQAGEPDPEEPLTSQAQSVPPHQLRLGSLHPTTPYHIRVACTSSQGP
SSWTHWLPVETPEGVPLGPPENISATRNGSQAFVHWQEPRAPIQGTLLGYRLAYQQQDTPEV
LMDIGLRQEVTLQDGSVSNLTVCAAYTAAGDGFWSLFVPLEAWRPGEAQFVHQLVKEP
STPAFSWPWWYVLLGAVVAAACVLILALFLVHRKKETRYGEVFEPTVERGELVVRYRVKRS
YSRRTTEATLNSLIGSEELKEKLRDVMVDRHKVALGKTLGEGEFGAVMEGQLNQDDSLKVA
VTKMKIAICTRSELEDFLSEAVCMKEFDHFNVMRLIGVCFQSSERESFPAPVVILFFMKHGD
LHSLFLYSRLGDPVYLPQMLVKFMADIAGMEYLSKTRFIHRDLAARNCLNENMSVCVA
DFGLSKKIYNGDYIRQRIAKMPVKWIAIESLADRVYTSKSDVWSFGVTMWEIATRGQTFYP
GVENSEIYDYLRLQGNRLKQPADCLDGLYALMSRCWELNPQDRFSTELREDLENTLKALPPA
QEPDEILYVNMDEGGGYPEPPGAAGADPPTQDPKDCSCLTAAEVHPAGRYVLCPTTFS
PAQPADRGSPAAPFGQEDGA

図 30B (配列番号 140)

DIQMTQAPSSLPASLGDRVTITCRASQDIGNYLSWFQKPKGSPRLMISGATNLAAGVPSRF
SGSRSGSDYSLTISSESDMADYICLQSKESPTTFGGGKLELKR

図 30C (配列番号 141)

EVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVTGYSITSNYGWIRKFPDKMEWMGYIITSGSTSYNPS
LKSRIISIRDTSKNQFFLQLNSVTSEDATYYCAITTFYYWGQGMVTVSS

図 30D (配列番号 142)

DIQMTQSPSSMSTSLGDRVTITCRASQDIGNYLSWFQKVGKSPRRMIYGAIKLAVGVPSRF
SGSRSGSDYSLTISSESDMAYIYCLQIQIFPLTFGSGTKLELKR

図 30E (配列番号 143)

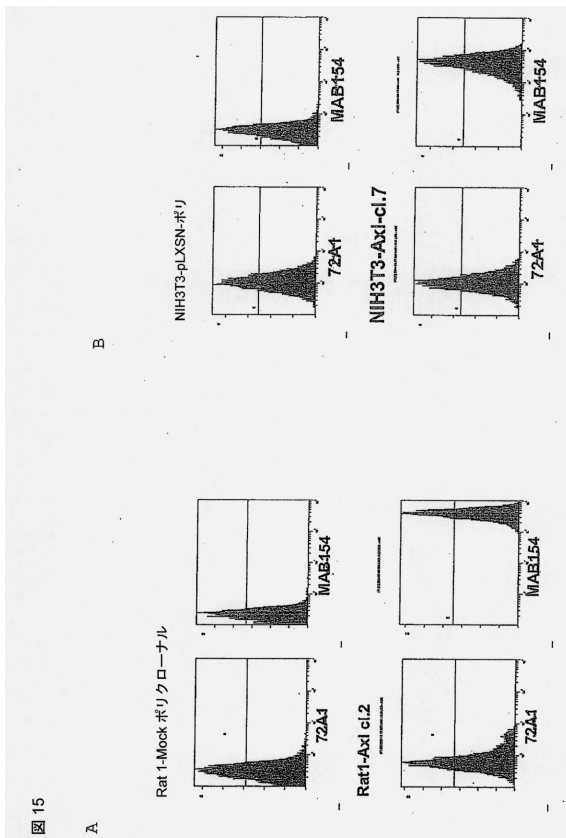
EVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVTGYSITSNYGWIRKFPGNMMEWIGHITNSGNTTNP
LKSRIISIRDTSRNQFFLQLNSVTEDATYYCAKGAFDYWGQGMVTVSS

【図 34】

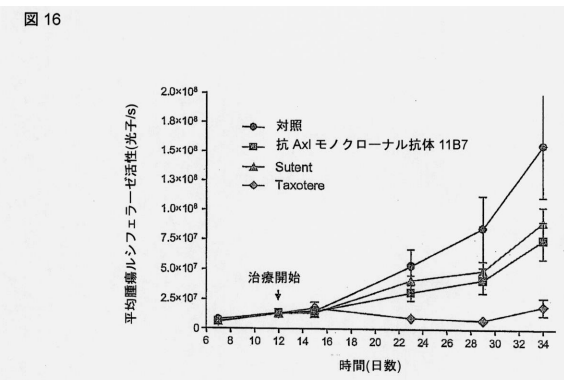
図 34

	吸収係数(Ab280/mg/mL)	タンパク質濃度(mg/mL)
h#11B7-T28	1.610	0.9
h#11B7-T29	1.590	2.5
h#11B7-T30	1.611	0.5
h#11B7-T31	1.590	1.3

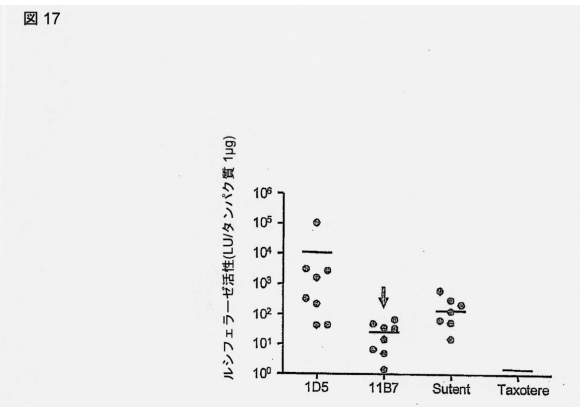
【図 15】



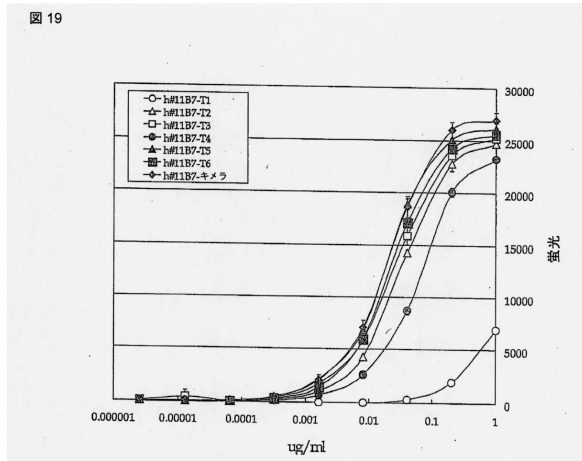
【図 16】



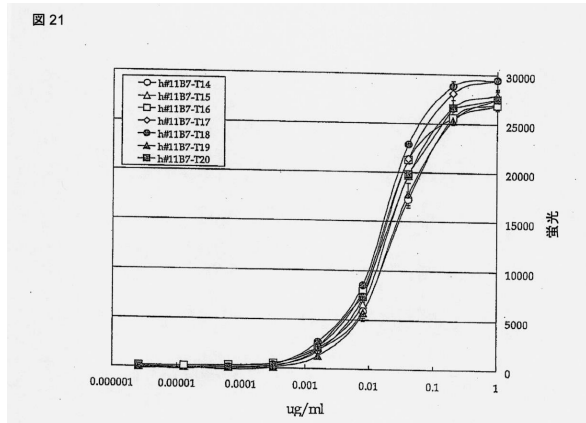
【図 17】



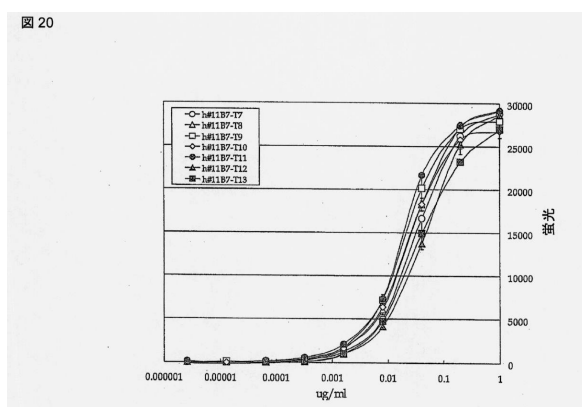
【図 19】



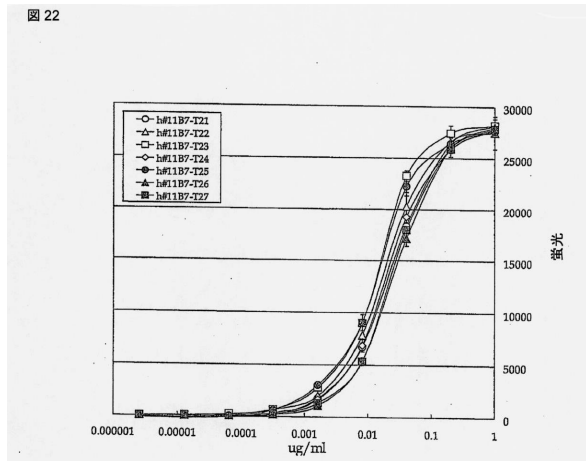
【図 21】



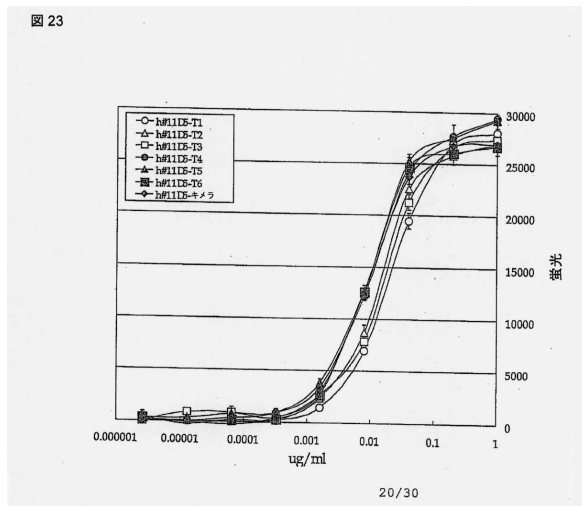
【図 20】



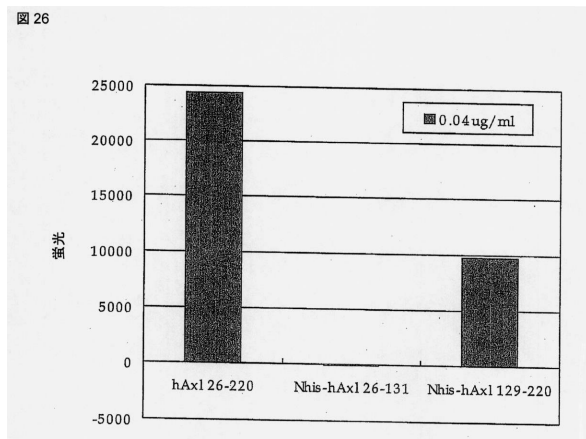
【図 22】



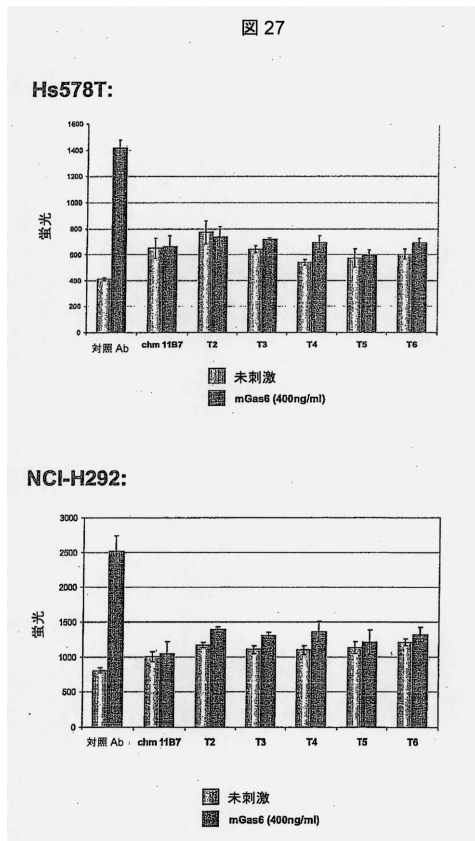
【図 23】



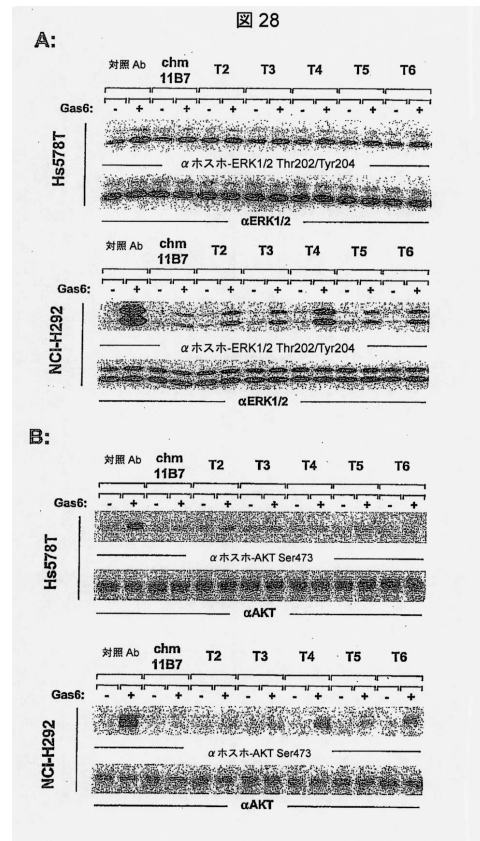
【図 26】



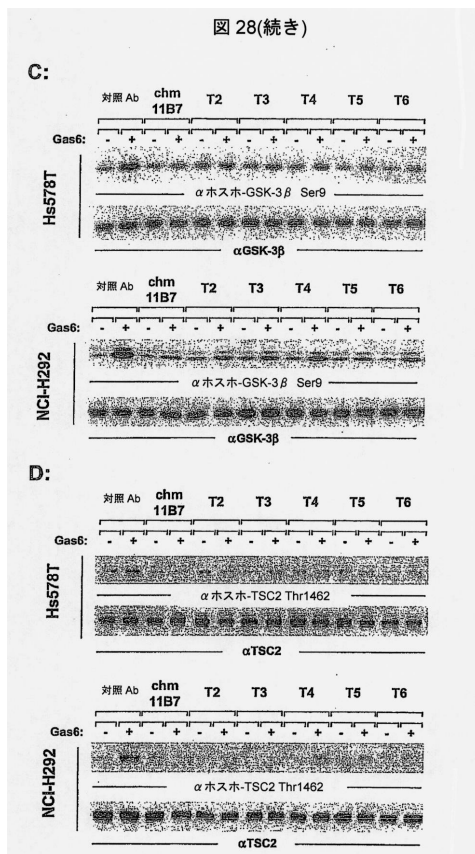
【図 27】



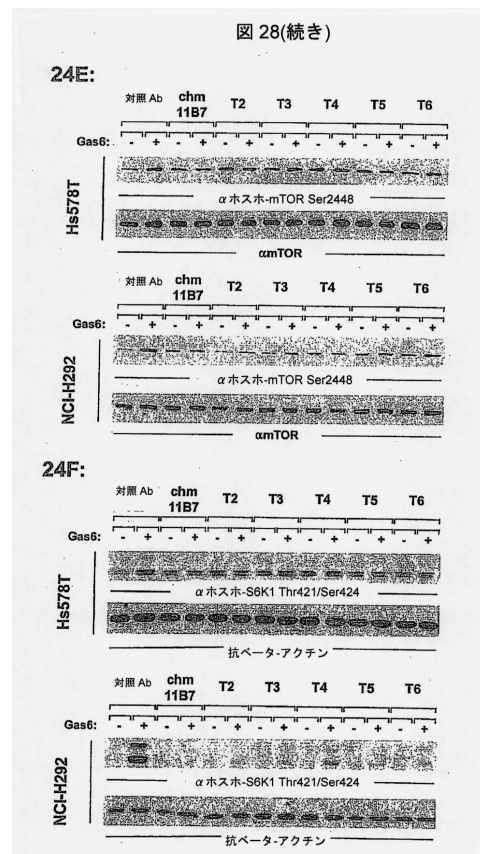
【図 28 - 1】



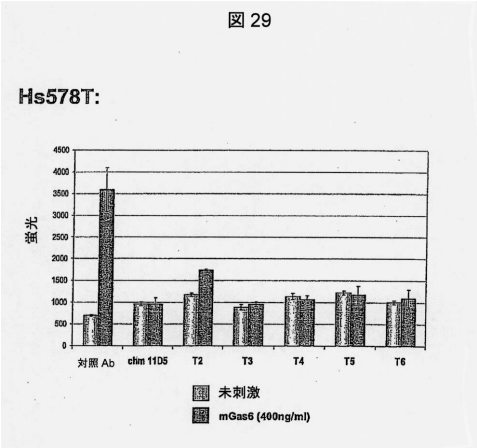
【図 28 - 2】



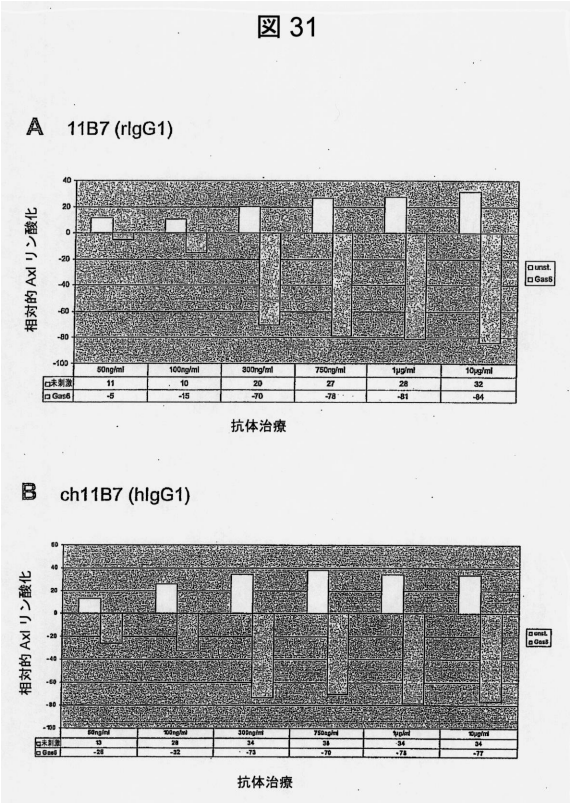
【図 28 - 3】



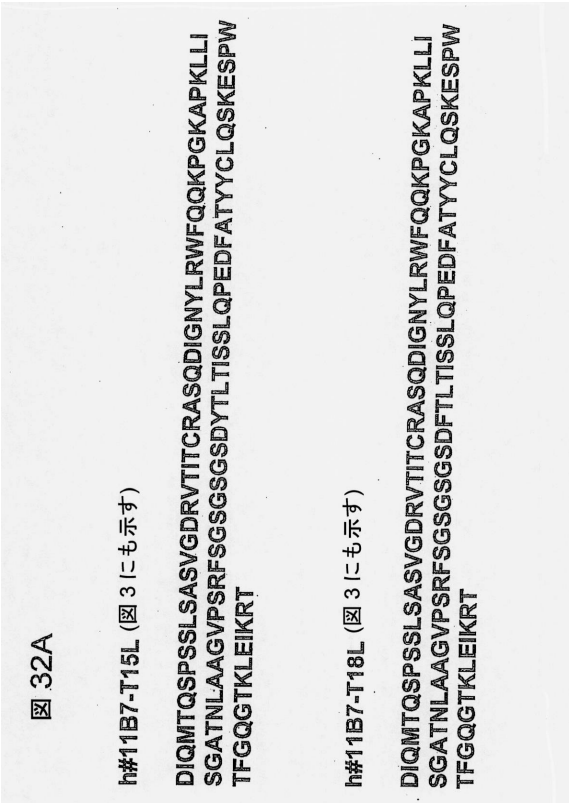
【 図 2 9 】



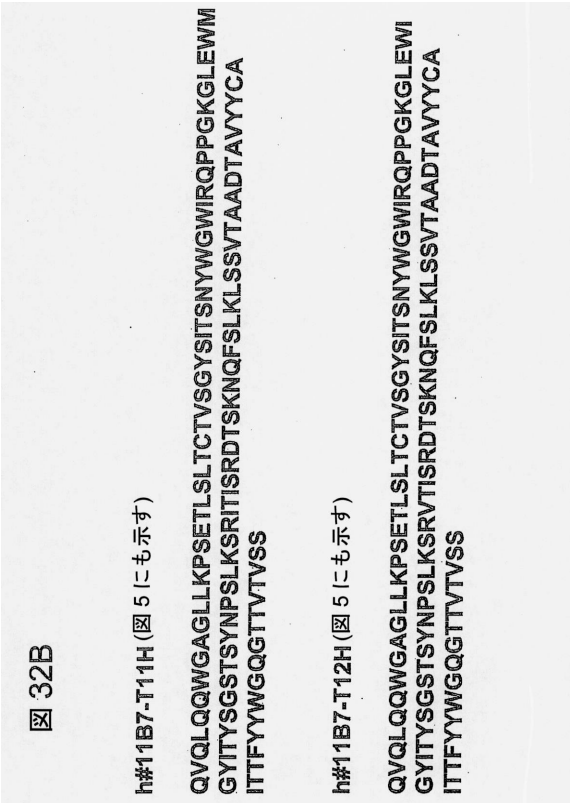
【 図 3 1 】



【 図 3 2 - 1 】

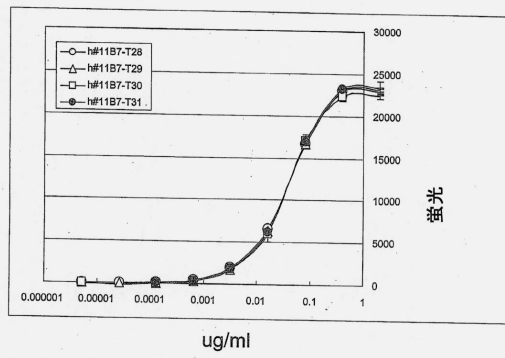


【 図 3 2 - 2 】



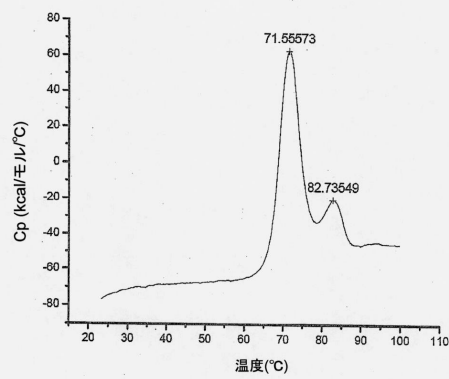
【図 3 3】

図 33



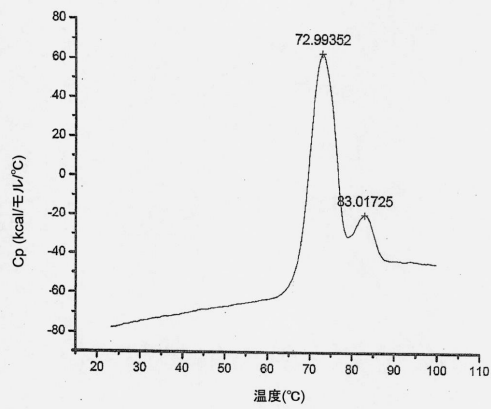
【図 3 5 - 1】

図 35 (1). h#11B7-T1



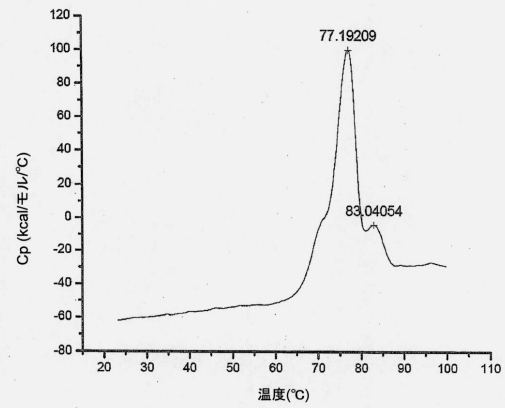
【図 3 5 - 3】

図 35 (3). h#11B7-T3



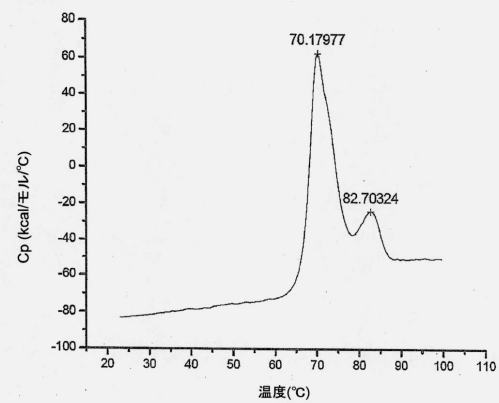
【図 3 5 - 2】

図 35 (2). h#11B7-T2

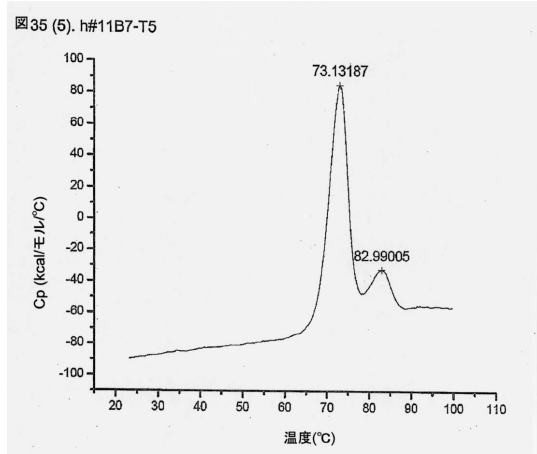


【図 3 5 - 4】

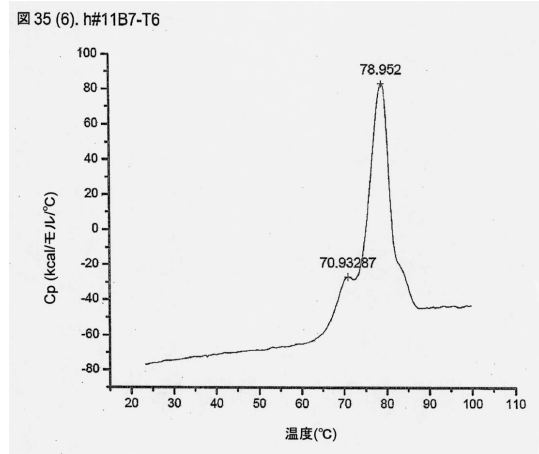
図 35 (4). h#11B7-T4



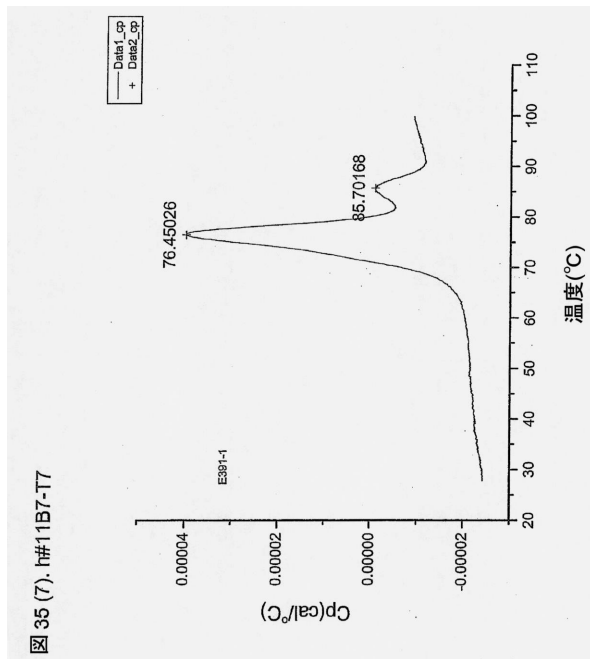
【図 3 5 - 5】



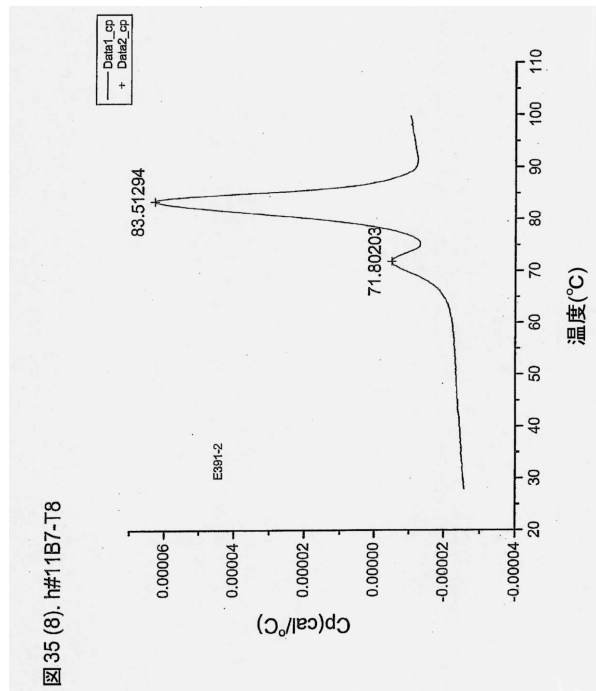
【図 3 5 - 6】



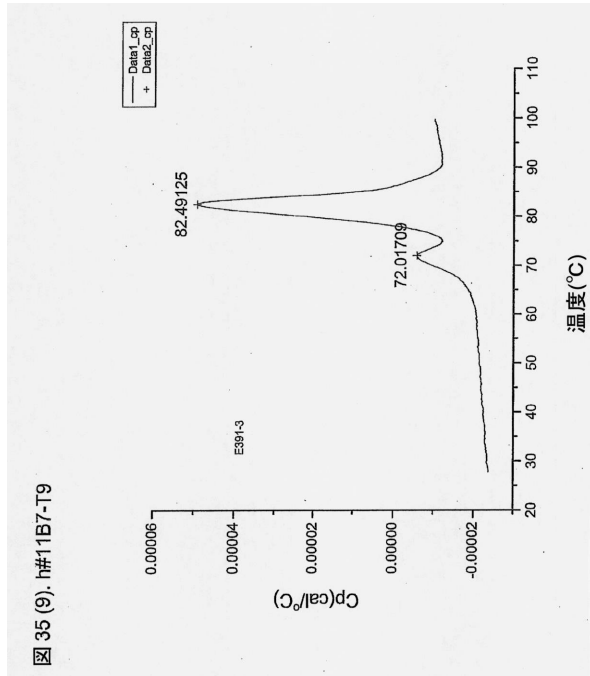
【図 3 5 - 7】



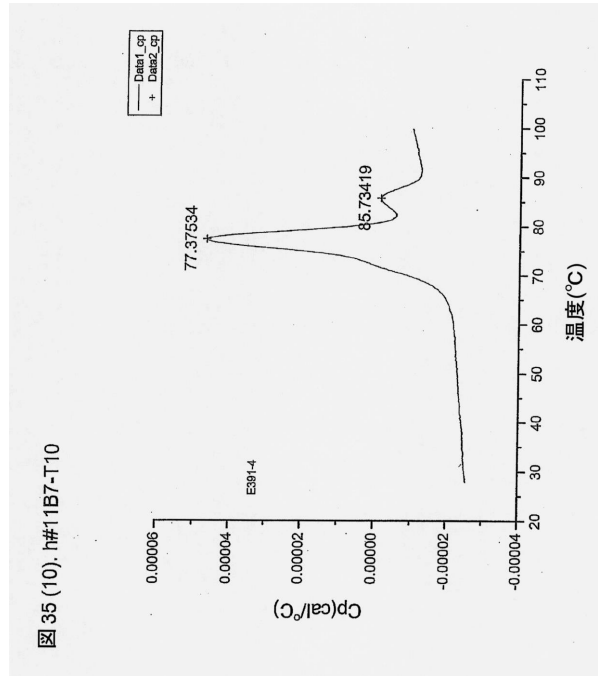
【図 3 5 - 8】



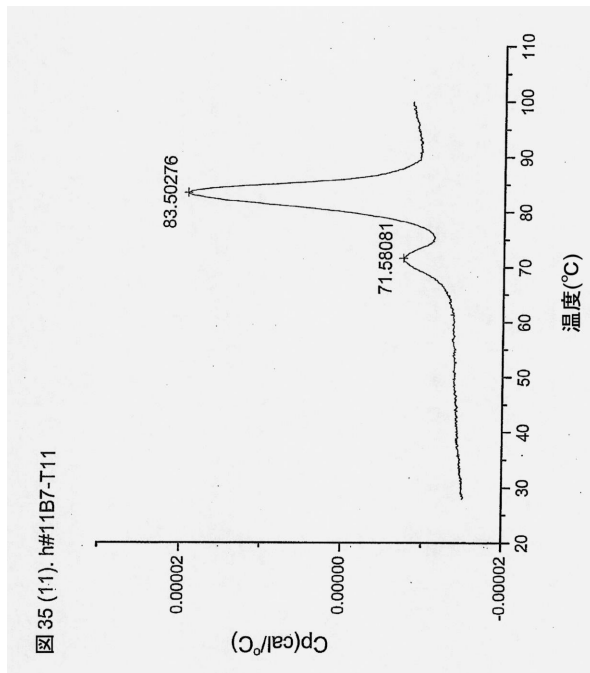
【 図 3 5 - 9 】



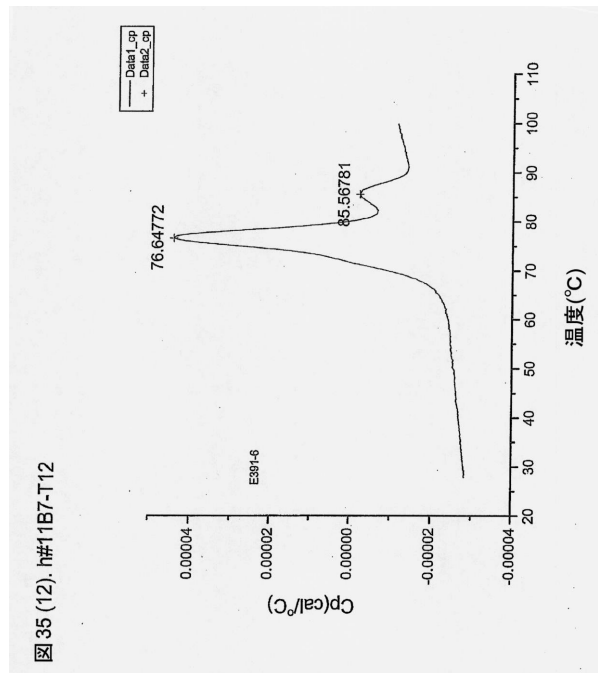
【 図 3 5 - 1 0 】



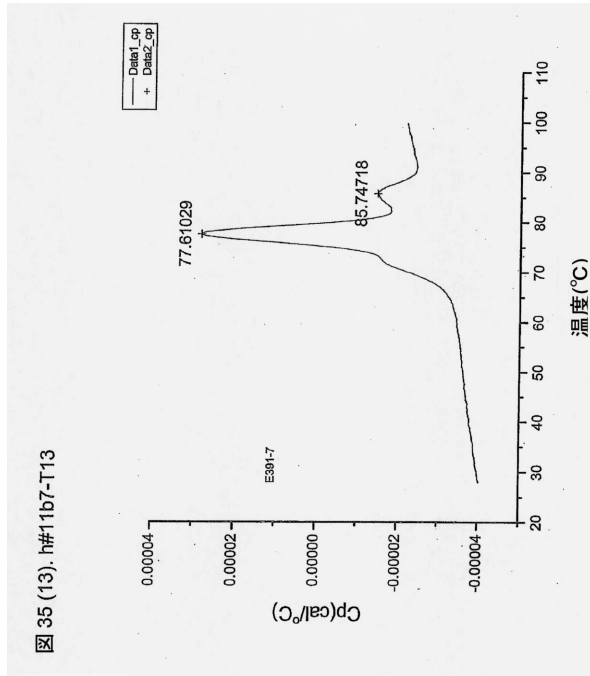
【 図 3 5 - 1 1 】



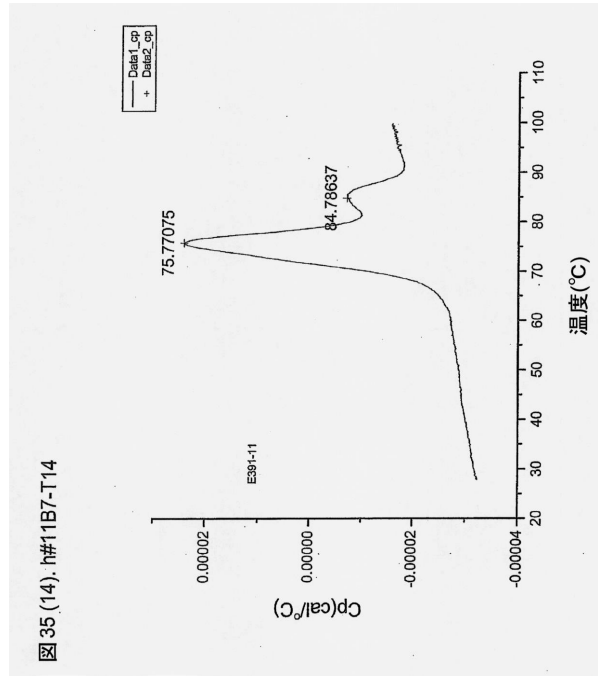
【 図 3 5 - 1 2 】



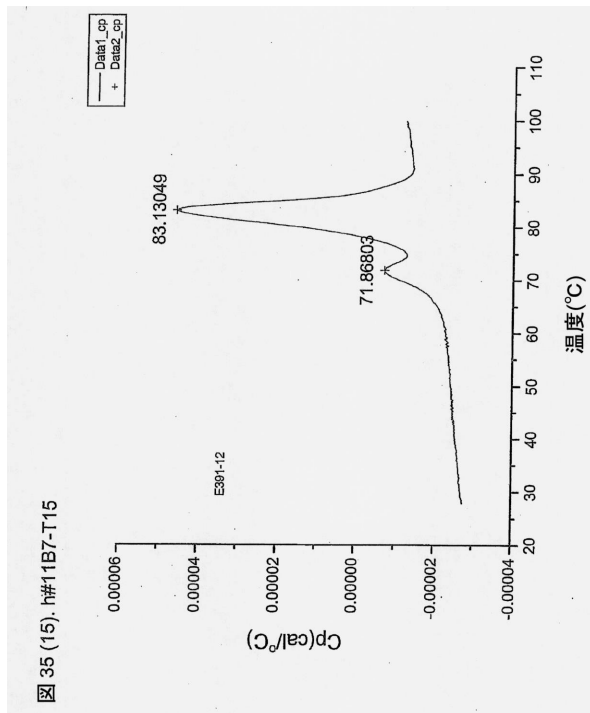
【 図 3 5 - 1 3 】



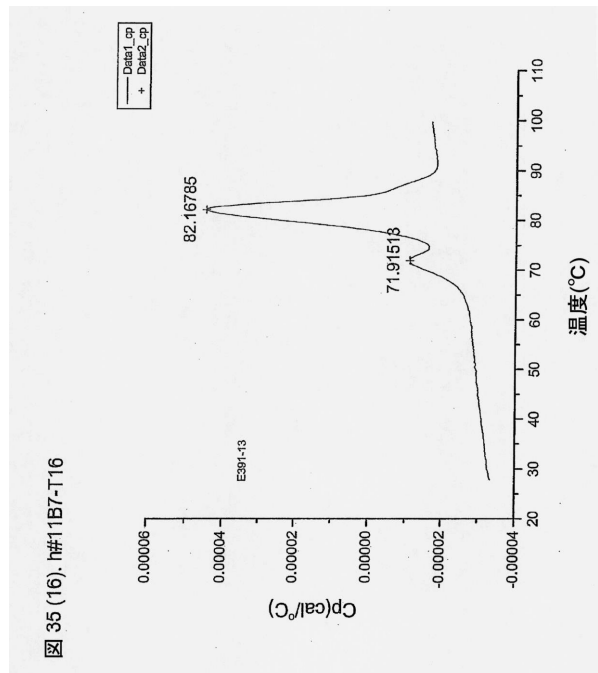
【 図 3 5 - 1 4 】



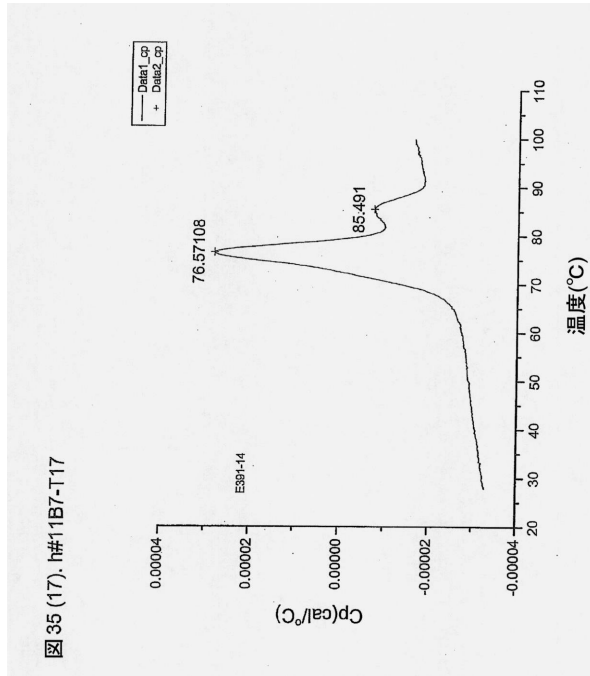
【 図 3 5 - 1 5 】



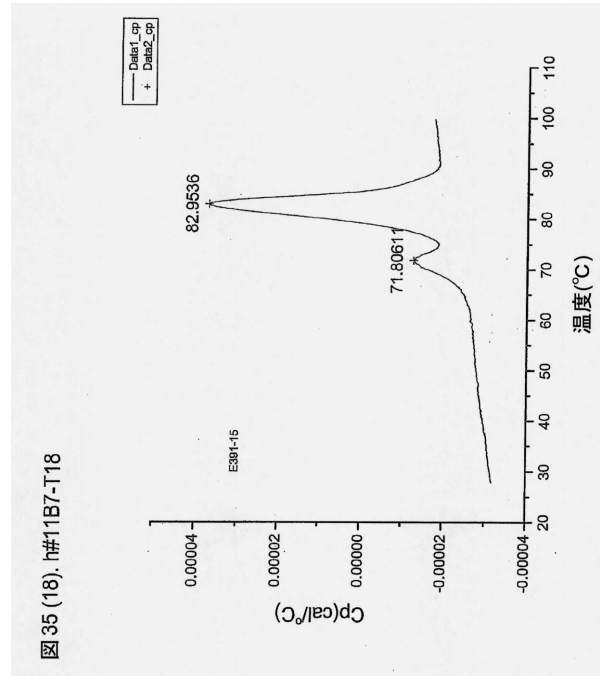
【 図 3 5 - 1 6 】



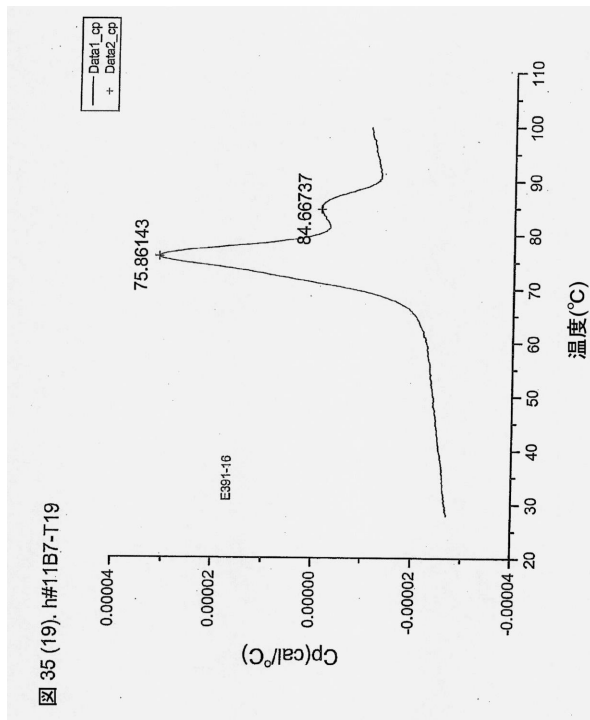
【 図 3 5 - 1 7 】



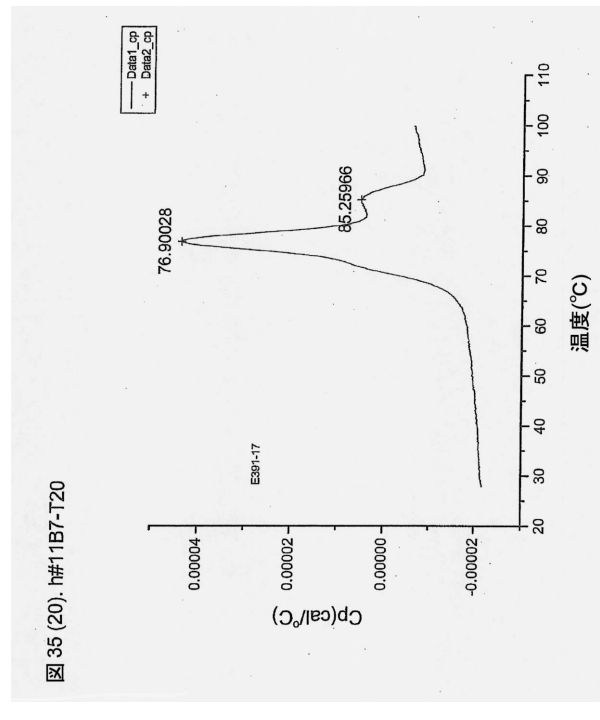
【 図 3 5 - 1 8 】



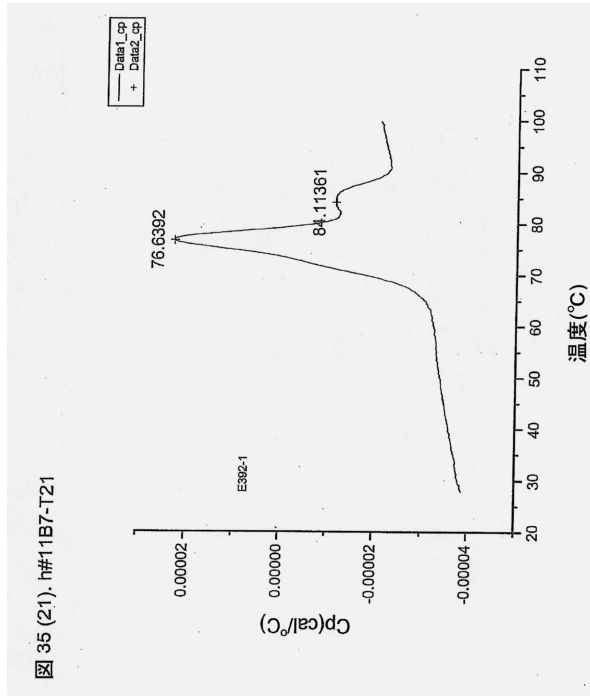
【 図 3 5 - 1 9 】



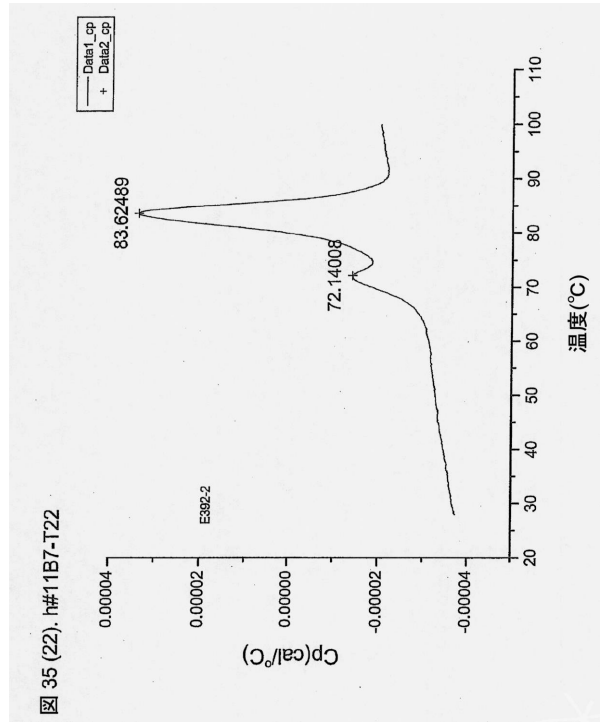
【 図 3 5 - 2 0 】



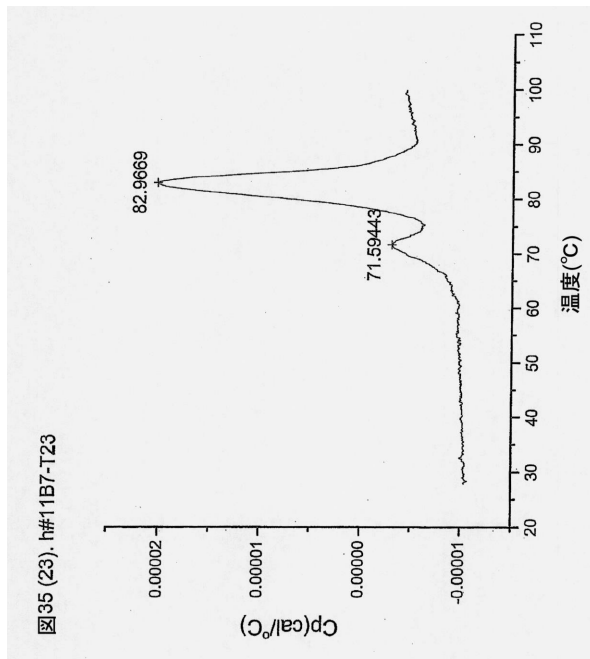
【 図 3 5 - 2 1 】



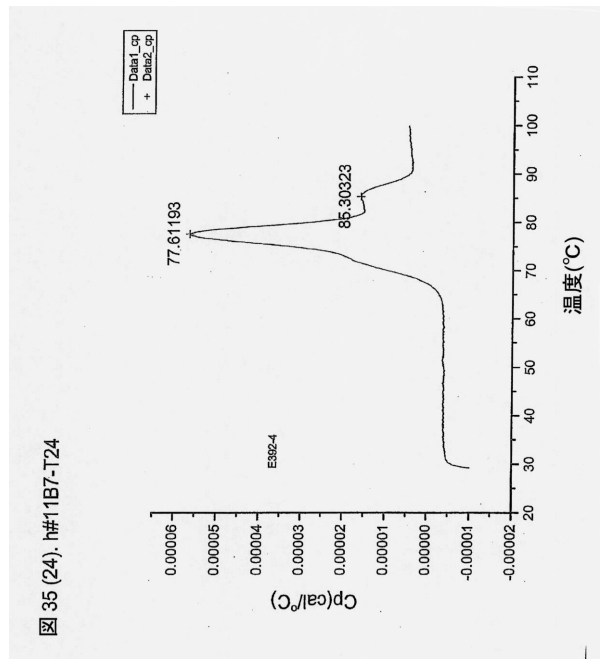
【 図 3 5 - 2 2 】



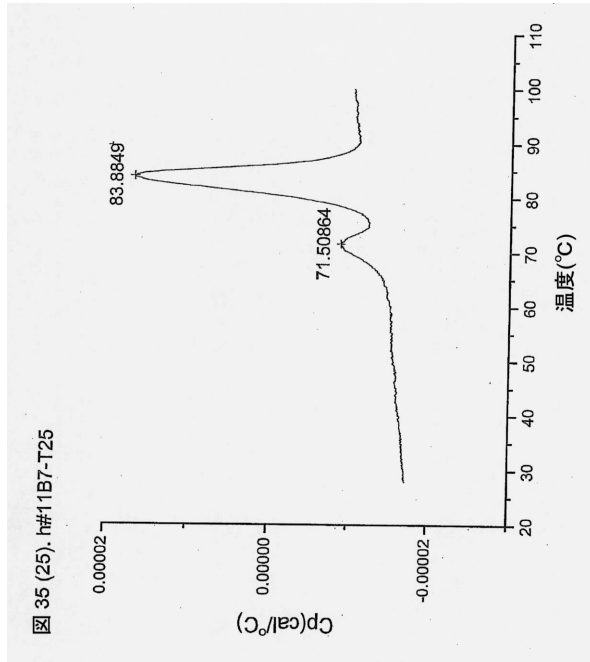
【 図 3 5 - 2 3 】



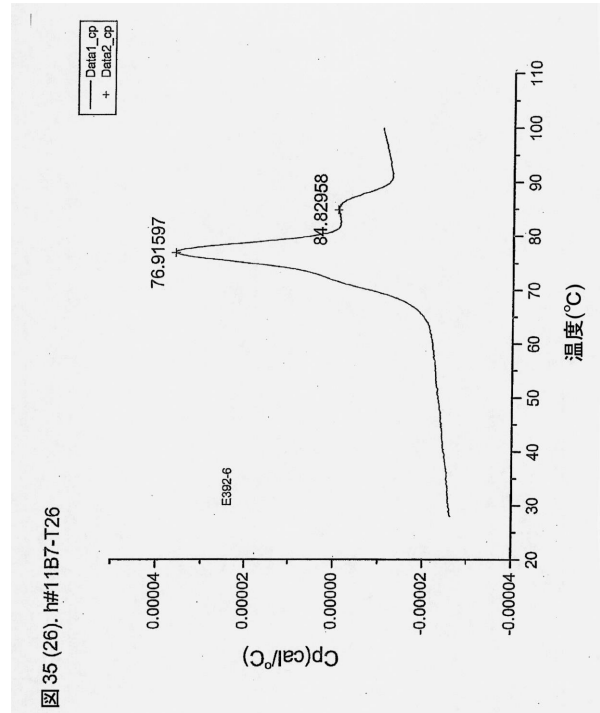
【 図 3 5 - 2 4 】



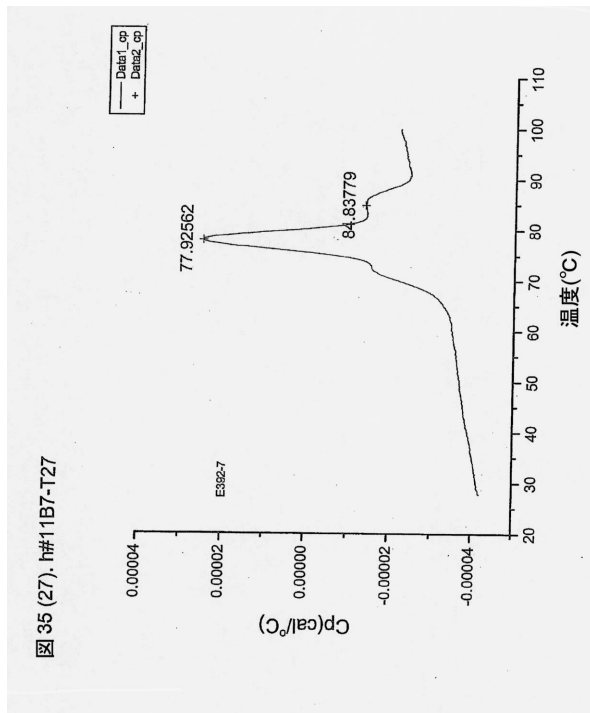
【 図 3 5 - 2 5 】



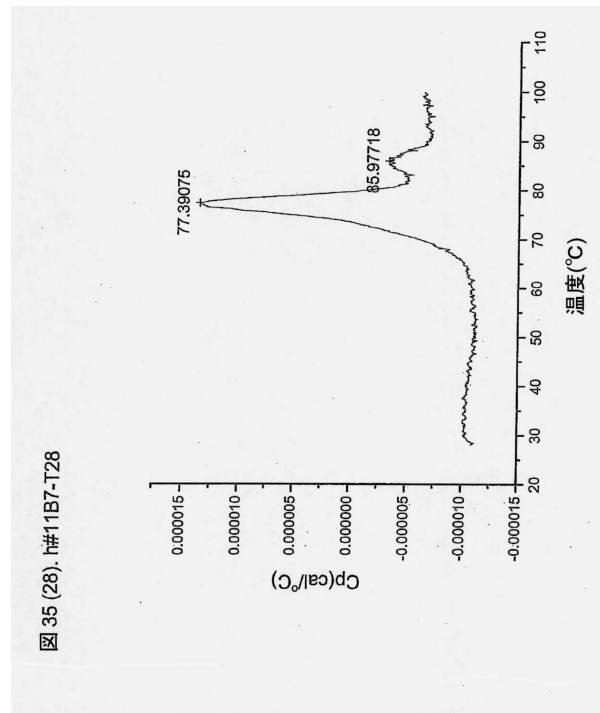
【 図 3 5 - 2 6 】



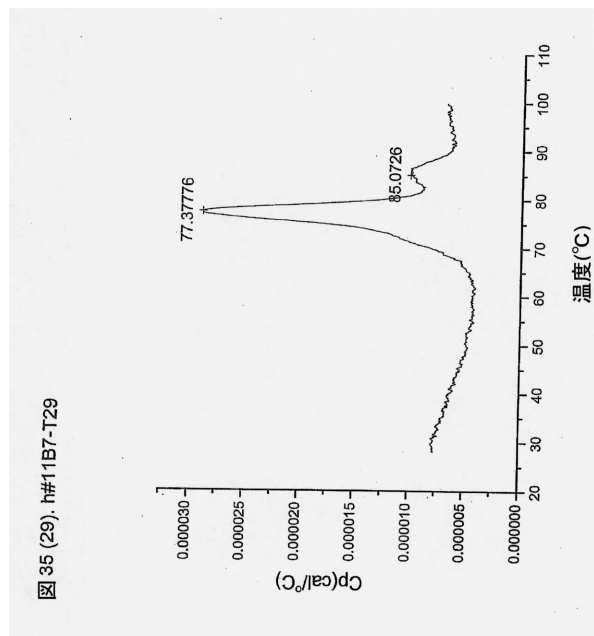
【 図 3 5 - 2 7 】



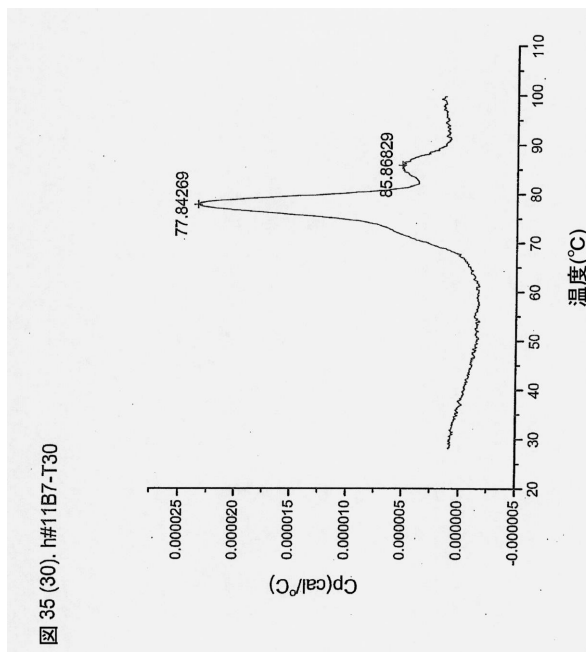
【 図 3 5 - 2 8 】



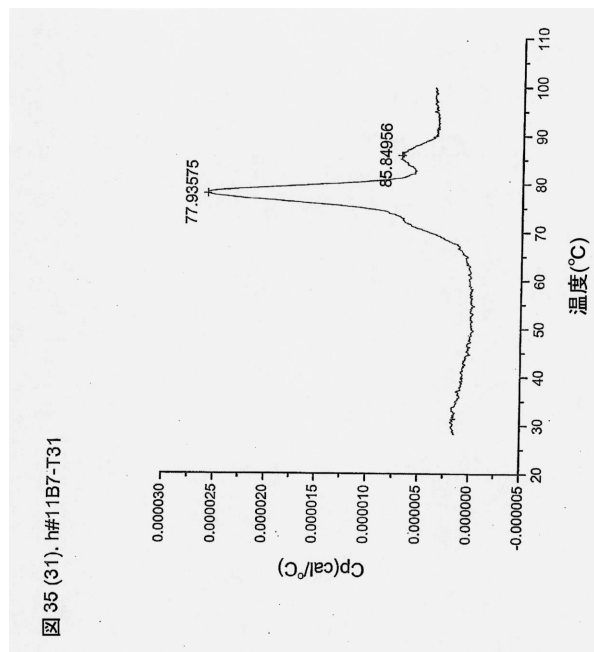
【 図 3 5 - 2 9 】



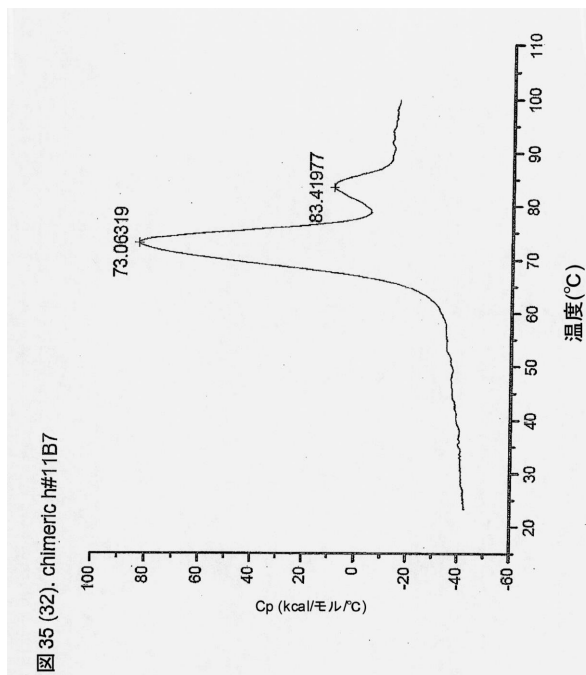
【 図 3 5 - 3 0 】



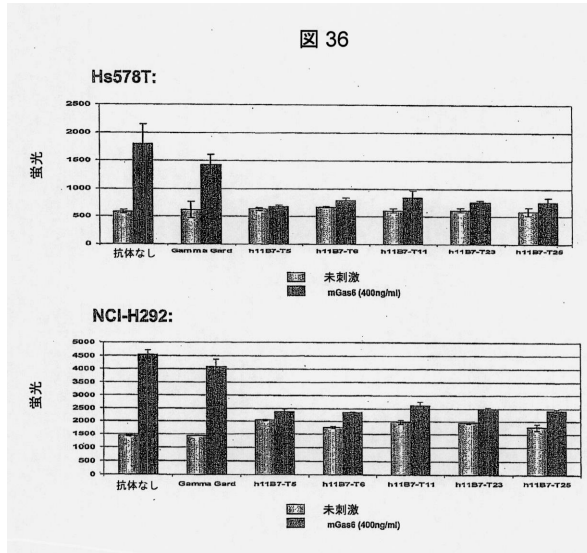
【 図 3 5 - 3 1 】



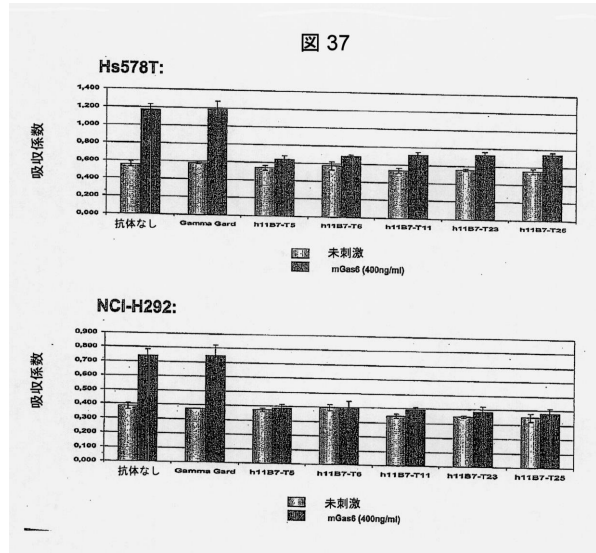
【 図 3 5 - 3 2 】



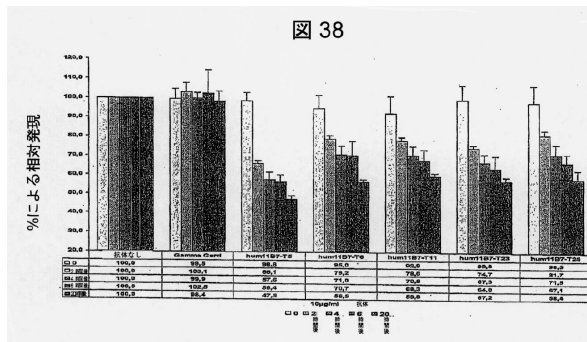
【図 36】



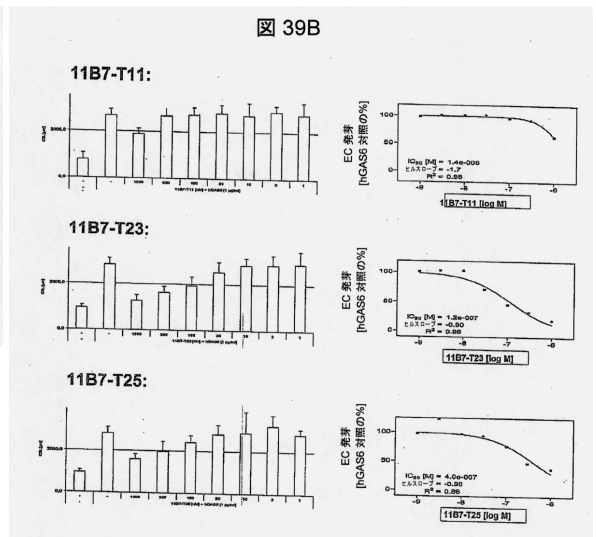
【図 37】



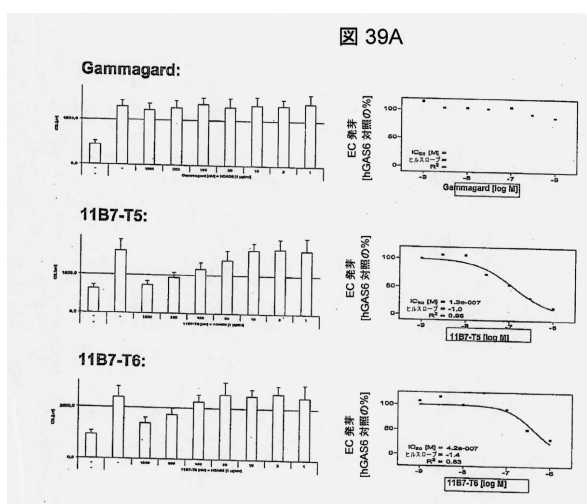
【図 38】



【図 39 - 2】



【図 39 - 1】



【配列表】

0005909442000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N 5/10
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 P 21/08
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K 39/395 N
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1
A 6 1 P	35/04	(2006.01)	A 6 1 P 35/04
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K 48/00

(72)発明者 イェンス・ルーエ
ドイツ・82152・マルティンスリート・ケプラーヴェーク・8

(72)発明者 滝沢 剛
東京都品川区広町1-2-58 第一三共株式会社エクスプラナトリ－リサーチラボラトリーズア
イ

(72)発明者 高山 知子
東京都品川区広町1-2-58 第一三共株式会社エクスプラナトリ－リサーチラボラトリーズア
イ

審査官 一宮 里枝

(56)参考文献 特表2005-532805(JP,A)
米国特許第05468634(US,A)
特表2011-505120(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 15/
C 0 7 K 16/
C 1 2 P 21/
A 6 1 K 39/
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
UniProt/GeneSeq
SwissProt/GeneSeq