

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2009-528828
(P2009-528828A)

(43) 公表日 平成21年8月13日(2009.8.13)

| (51) Int.Cl. | F 1 | | テーマコード (参考) |
|------------------------|--------------|---------|-------------|
| C 12 N 15/09 (2006.01) | C 12 N 15/00 | Z N A A | 4 B 0 2 4 |
| C 07 K 16/08 (2006.01) | C 07 K 16/08 | | 4 B 0 6 5 |
| C 12 N 5/10 (2006.01) | C 12 N 5/00 | B | 4 C 0 8 5 |
| C 12 N 1/15 (2006.01) | C 12 N 1/15 | | 4 H 0 4 5 |
| C 12 N 1/19 (2006.01) | C 12 N 1/19 | | |

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 92 頁) 最終頁に続く

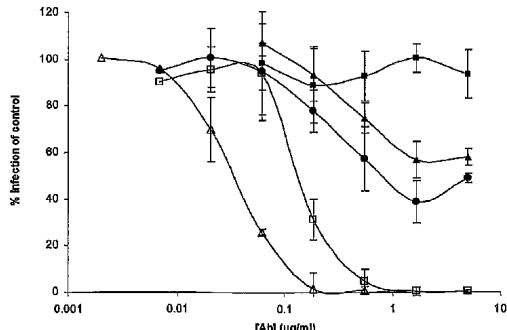
| | | | |
|---------------|------------------------------|----------|---|
| (21) 出願番号 | 特願2008-557594 (P2008-557594) | (71) 出願人 | 505257682 シムフォゲン・アクティーゼルスカブ S Y M P H O G E N A / S デンマーク、デコーー2800コンゲン ス・リングビー、ビグニング375、エレ クトロヴィトイ |
| (86) (22) 出願日 | 平成19年3月6日 (2007.3.6) | (74) 代理人 | 100081422 弁理士 田中 光雄 |
| (85) 翻訳文提出日 | 平成20年11月10日 (2008.11.10) | (74) 代理人 | 100084146 弁理士 山崎 宏 |
| (86) 國際出願番号 | PCT/DK2007/000113 | (74) 代理人 | 100116311 弁理士 元山 忠行 |
| (87) 國際公開番号 | W02007/101441 | (74) 代理人 | 100122301 弁理士 富田 憲史 |
| (87) 國際公開日 | 平成19年9月13日 (2007.9.13) | | |
| (31) 優先権主張番号 | PA200600324 | | |
| (32) 優先日 | 平成18年3月6日 (2006.3.6) | | |
| (33) 優先権主張国 | デンマーク(DK) | | |
| (31) 優先権主張番号 | 60/874,716 | | |
| (32) 優先日 | 平成18年12月14日 (2006.12.14) | | |
| (33) 優先権主張国 | 米国(US) | | |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】消化器多核体ウイルス感染症の治療のための組み換えポリクローナル抗体

(57) 【要約】

消化器多核体ウイルス(RSV)を標的とする新規ポリクローナル抗体、およびRSVと反応する新規な高親和性抗体が開示される。前記ポリクローナル抗体は、RSVタンパク質RおよびRSVタンパク質Gの両方と反応する抗体分子を含んでもよく、好ましくは、前記ポリクローナル抗体は、これらのタンパク質の様々なエピトープを標的とする。本発明の単一の抗体分子は、ピコモル範囲で低い解離定数を提供する親和性を示すことが示される。本発明の抗体を産生する方法ならびにRSV感染のためのそれらの使用方法もまた開示される。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

R S V サブタイプAおよびBを中和することができる抗 - R S V 組み換えポリクローナル抗体であって、前記ポリクローナル抗体が、少なくとも1種のR S V 外被タンパク質における少なくとも3種の異なるエピトープと一緒に特異的に結合する別個の抗体メンバーを含む、抗 - R S V 組み換えポリクローナル抗体。

【請求項 2】

前記ポリクローナル抗体が、少なくとも2種のR S V 外被タンパク質に対する特異的な反応性と一緒に提供する別個の抗体メンバーを含む、請求項1記載の抗 - R S V 組み換えポリクローナル抗体。

10

【請求項 3】

R S V 外被タンパク質が、R S V G タンパク質、R S V F タンパク質およびR S V S H タンパク質から選択される、請求項1または2記載の抗 - R S V 組み換えポリクローナル抗体。

【請求項 4】

抗 - 外被タンパク質の反応性が抗 - G および抗 - F 反応性であり、前記反応性が少なくとも2種の別個の抗 - G 抗体および少なくとも1種の別個の抗 - F 抗体により提供される、請求項1から3のうちのいずれか1項記載の抗 - R S V 組み換えポリクローナル抗体。

20

【請求項 5】

第1の抗 - G 抗体が、G - タンパク質における保存されたエピトープに特異的に結合でき、第2の抗 - G 抗体が、G - タンパク質システィンリッチドメイン (G C R R) に特異的に結合でき、ならびにF - 反応性が、抗原部位I、II、IV、V、VI、C、またはF1のうちの少なくとも1つに対して指向性である、請求項4記載の抗 - R S V 組み換えポリクローナル抗体。

【請求項 6】

少なくとも抗 - G 反応性の一部がC X 3 C モチーフに対して指向性である、請求項4または5記載の抗 - R S V 組み換えポリクローナル抗体。

30

【請求項 7】

抗 - G 反応性が、さらに少なくとも1種の株特異的なエピトープに対して指向性である、請求項4から6のうちのいずれか1項記載の抗 - R S V 組み換えポリクローナル抗体。

【請求項 8】

抗 - F 反応性が、少なくとも抗原部位IIおよび抗原部位IVに対して指向性である、請求項4から7のうちのいずれか1項記載の抗 - R S V 組み換えポリクローナル抗体。

【請求項 9】

抗 - 外被タンパク質の反応性が、請求項4から8に対して、または関して指向性であって、さらにS H タンパク質に対して指向性である、請求項1から8のうちのいずれか1項記載の抗 - R S V 組み換えポリクローナル抗体。

40

【請求項 10】

別個の抗体メンバーの組成物が、ドナーにおけるR S V 外被抗原に対する多様性、親和性および特異性に関する液性免疫応答を反映する、請求項1から9のうちのいずれか1項記載の抗 - R S V 組み換えポリクローナル抗体。

【請求項 11】

請求項1から10のうちのいずれか1項記載の抗 - R S V 組み換えポリクローナル抗体であって、別個の抗体が、R S V に対する液性免疫応答を上げた一人またはそれ以上のヒトドナーから得られた核酸配列によりコードされ、前記ポリクローナル抗体が、十分にヒト抗体であるポリクローナル抗体。

40

【請求項 12】

別個の抗体メンバーが、ドナーに元々存在するV_H およびV_L のペアから構成される、請求項10または11記載の抗 - R S V 組み換えポリクローナル抗体。

50

【請求項 13】

別個のメンバーが各々、表5に示されるV_HおよびV_Lのペアの群から選択されるCDR1、CDR2およびCDR3領域を含む、請求項1から12のうちのいずれか記載の抗-RSV組み換えポリクローナル抗体。

【請求項14】

請求項1から13のうちのいずれか1項記載の抗-RSV組み換えポリクローナル抗体および医薬上許容される賦形剤を活性成分として含む、医薬組成物。

【請求項15】

哺乳動物においてRSV感染に関連する1つまたはそれ以上の症状を予防、治療または改善する方法であって、前記哺乳動物に請求項1から13のうちのいずれか1項記載の抗-RSV組み換えポリクローナル抗体または請求項14記載の医薬組成物の有効量を投与することを含む方法。 10

【請求項16】

有効量が、体重kgあたり抗体100mgまたはそれ以下であり、例えば、体重kgあたり抗体90mgまたはそれ以下、80mgまたはそれ以下、70mgまたはそれ以下、60mgまたはそれ以下、50mgまたはそれ以下、40mgまたはそれ以下、30mgまたはそれ以下、20mgまたはそれ以下、10mgまたはそれ以下、9mgまたはそれ以下、8mgまたはそれ以下、7mgまたはそれ以下、6mgまたはそれ以下、5mgまたはそれ以下、4mgまたはそれ以下、3mgまたはそれ以下、2mgまたはそれ以下、1mgまたはそれ以下、0.9mgまたはそれ以下、0.8mgまたはそれ以下、0.7mgまたはそれ以下、0.6mgまたはそれ以下、0.5mgまたはそれ以下、0.4mgまたはそれ以下、0.3mgまたはそれ以下、0.2mgまたはそれ以下および0.1mgまたはそれ以下である、請求項15記載の方法。 20

【請求項17】

有効量が、少なくとも体重kgあたり抗体0.01mgであり、例えば、少なくとも0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8mgである、請求項15記載の方法。

【請求項18】

有効量が、体重kgあたり抗体0.1~20mgの間である、請求項15記載の方法。

【請求項19】

抗体が、年間あたり少なくとも1回投与され、例えば、年間あたり1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19回で投与される、請求項15~18のうちのいずれか1項に記載の方法。 30

【請求項20】

抗体が、RSV感染を誘引するリスクの高い年の間に一定間隔で投与される、請求項19記載の方法。

【請求項21】

一定間隔が、1週間、2週間、1ヶ月間、または2ヶ月間である、請求項20記載の方法。

【請求項22】

哺乳動物におけるRSV感染に関連した1つまたはそれ以上の症状の治療、改善または予防のための組成物の調製のための請求項1から13のうちのいずれか1項記載の抗-RSV組み換えポリクローナル抗体または請求項14記載の医薬組成物の使用。 40

【請求項23】

V_HおよびV_Lをコードするペア(pairs)のレパートリーを作成する方法であって、メンバーが、RSV感染から生じる液性免疫応答に関連する遺伝子のペアを反映するものであって、

a. RSVに感染したドナーまたはRSV感染から回復したドナーからリンパ球を含む細胞画分を提供し；

b. 任意選択的に、前記細胞画分からB細胞または血漿細胞を濃縮し；

c. 前記細胞画分由来の細胞を複数の容器に個々に分配することを含む、単離された单 50

一細胞の集団を得て；次いで

d . 前記単離された単一細胞に由来する鋳型を用いて、重複伸長(overlap extension) RT - PCR 法において、増幅させ、 V_H および V_L をコードするペアの連結を生じさせ；

e . 任意選択的に、連結した V_H および V_L をコードするペアのネスティド(nested) PCR を実施すること：

を含む方法。

【請求項 24】

請求項 1 から 13 のうちのいずれか 1 項記載の組み換えポリクローナル抗 - RSV 抗体を発現することができる、ポリクローナル細胞株。

10

【請求項 25】

個々の細胞が各々、単一の V_H および V_L をコードするペアを発現することができ、全体としてポリクローナル細胞株が V_H および V_L をコードするペアのコレクションを発現することができ、各 V_H および V_L をコードするペアが、抗 - RSV 抗体をコードする、ポリクローナル細胞株。

【請求項 26】

前記 V_H および V_L をコードするペアのコレクションが、請求項 23 の方法により作成される、請求項 25 記載のポリクローナル細胞株。

【請求項 27】

本明細書の表 5 に記載される抗体分子、あるいは前記抗体分子の特異的に結合するフラグメントまたは合成もしくは半合成抗体アナログから選択される単離ヒト抗 RSV - 抗体分子であって、前記結合するフラグメントまたはアナログが、少なくとも前記単離抗体分子の相補性決定領域(CDR)を含む単離ヒト抗 RSV - 抗体分子。

20

【請求項 28】

表 8 に記載された抗体に由来するか、あるいは配列番号：1 ~ 44 のうちの 1 つに含まれる重鎖 CDR アミノ酸配列および配列番号：1 ~ 44 から選択されるアミノ酸配列より 88 高い配列番号を有する付隨の軽鎖 CDR アミノ酸配列を含む、請求項 27 記載の抗体分子、フラグメントまたはアナログ。

【請求項 29】

ヒト抗体由来の Fab における CDR と同一である CDR を含み、前記 Fab は、物質輸送時の制限を避けるために非常に低い密度でセンサー表面上に固定された組み換え RSV G タンパク質を用いて、Biacore 3000において表面プラズモン共鳴分析を実施して測定する場合、500 nM またはそれ以下の RSV G タンパク質に対する解離定数 K_D を示す、単離された抗体分子、抗体フラグメントまたは合成もしくは半合成抗体アナログ。

30

【請求項 30】

K_D が、400 nM またはそれ以下であり、例えば、300 nM またはそれ以下、200 nM またはそれ以下、100 nM またはそれ以下、1 nM またはそれ以下であり、900 pM またはそれ以下、800 pM またはそれ以下、700 pM またはそれ以下、600 pM またはそれ以下、500 pM またはそれ以下、400 pM またはそれ以下、300 pM またはそれ以下、200 pM またはそれ以下、100 pM またはそれ以下、90 pM またはそれ以下、および 80 pM またはそれ以下である、請求項 29 記載の単離された抗体分子、抗体フラグメントまたは合成もしくは半合成抗体アナログ。

40

【請求項 31】

ヒト抗体由来の Fab における抗原結合部位に同一である抗原結合部位を含み、前記 Fab は、物質輸送時の制限を避けるために非常に低い密度でセンサー表面上に固定された組み換え RSV G タンパク質を用いて、Biacore 3000において表面プラズモン共鳴分析を実施して測定する場合、500 nM またはそれ以下の RSV F タンパク質に対する解離定数 K_D を示す、単離された抗体分子、抗体フラグメントまたは合成もしくは半合成抗体アナログ。

50

【請求項 3 2】

K_D が、 4 0 0 nM またはそれ以下であり、 例えば、 3 0 0 nM またはそれ以下、 2 0 0 nM またはそれ以下、 1 0 0 nM またはそれ以下、 1 nM またはそれ以下であり、 9 0 0 pM またはそれ以下、 8 0 0 pM またはそれ以下、 7 0 0 pM またはそれ以下、 6 0 0 pM またはそれ以下、 5 0 0 pM またはそれ以下、 4 0 0 pM またはそれ以下、 3 0 0 pM またはそれ以下、 2 0 0 pM またはそれ以下、 1 0 0 pM またはそれ以下、 9 0 pM またはそれ以下、 8 0 pM またはそれ以下、 7 0 pM またはそれ以下、 6 0 pM またはそれ以下、 5 0 pM またはそれ以下、 4 0 pM またはそれ以下、 3 0 pM またはそれ以下、 2 5 pM またはそれ以下、 2 0 pM またはそれ以下、 1 5 pM またはそれ以下、 1 0 pM またはそれ以下、 9 pM またはそれ以下、 8 pM またはそれ以下、 7 pM またはそれ以下、 6 pM またはそれ以下、 および 5 pM またはそれ以下である、 請求項 3 1 記載の単離された抗体分子、 抗体フラグメントまたは合成もしくは半合成抗体アナログ。

10

【請求項 3 3】

クローン番号 8 1 0、 8 1 8、 8 1 9、 8 2 4、 8 2 5、 8 2 7、 8 5 8 または 8 9 4 で產生されるヒト抗体の C D R を含む、 請求項 2 7 ~ 3 2 のうちのいずれか 1 項記載の抗体分子あるいは特異的に結合するフラグメントまたは合成もしくは半合成抗体アナログ。

20

【請求項 3 4】

医薬上許容される担体、 賦形剤、 ビヒクルまたは希釈液との混合において、 請求項 2 7 ~ 3 3 のうちのいずれか 1 項記載の抗体分子あるいは特異的に結合するフラグメントまたは合成もしくは半合成抗体アナログを含む抗体組成物。

20

【請求項 3 5】

請求項 2 7 ~ 3 3 のうちのいずれか 1 項記載の 2 種の別個の抗体分子および / または特異的に結合するフラグメントおよび / または合成もしくは半合成抗体アナログを含む、 請求項 3 4 記載の組成物。

30

【請求項 3 6】

請求項 2 7 ~ 3 3 のうちのいずれか 1 項記載の少なくとも 3 種の別個の抗体分子および / または特異的に結合するフラグメントおよび / または合成もしくは半合成抗体アナログを含み、かかる組成物が、 4、 5、 6、 7、 9、 1 0、 1 1、 1 2、 1 3、 1 5、 1 6、 1 7、 1 8、 1 9、 2 0、 2 1、 2 2、 2 3、 2 4、 2 5、 2 6、 2 7、 2 8、 2 9 または 3 0 種の別個の抗体分子および / またはフラグメントおよび / または合成もしくは半合成抗体アナログを含む、 請求項 3 4 記載の組成物。

30

【請求項 3 7】

R S V F タンパク質に結合する少なくとも 1 種の抗体分子、 フラグメントまたはアナログを含み、 R S V G タンパク質に結合する少なくとも 1 種の抗体分子、 フラグメントまたはアナログを含む、 請求項 3 4 ~ 3 6 のうちのいずれか 1 項記載の組成物。

40

【請求項 3 8】

請求項 2 7 ~ 3 3 のうちのいずれか 1 項で定義される少なくとも 1 種の C D R のアミノ酸配列をコードする、 単離核酸フラグメント。

【請求項 3 9】

少なくとも表 5 に記載されたクローンのうちの 1 つにより產生される抗体の C D R をコードする、 单離核酸フラグメント。

【請求項 4 0】

配列番号 : 1 ~ 4 4 のうちのいずれか 1 つに記載される重鎖アミノ酸配列の C D R 配列をコードする、 单離核酸フラグメント。

【請求項 4 1】

配列番号 : 8 9 ~ 1 3 2 のうちのいずれか 1 つに記載される軽鎖アミノ酸配列の C D R 配列をコードする、 单離核酸フラグメント。

【請求項 4 2】

配列番号 : 1 ~ 4 4 のうちのいずれか 1 つに記載される重鎖アミノ酸配列の C D R 配列および配列番号 : 1 ~ 4 4 から選択されるアミノ酸配列より 8 8 高い配列番号を有する付

50

隨の輕鎖 C D R アミノ酸配列をコードする、単離核酸フラグメント。

【請求項 4 3】

配列番号：45～88および／または133～176に含まれるコーディング配列を含む、請求項38～42のうちのいずれか1項記載の核酸フラグメント。

【請求項 4 4】

請求項38～43のうちのいずれか1項に記載の核酸フラグメントを含む、ベクター。

【請求項 4 5】

自律的に複製することができる、請求項44記載のベクター。

【請求項 4 6】

プラスミド、ファージ、コスミド、ミニ染色体、およびウイルスからなる群から選択される、請求項44または45記載のベクター。 10

【請求項 4 7】

5'～3'方向および作動可能な連結において、請求項38～43のうちのいずれか1項に記載の第1の核酸フラグメントの発現を促進するための少なくとも1つのプロモーターであって、必須なフレームワーク領域、任意選択でリーダーペプチドをコードする核酸配列、前記第1の核酸フラグメント、任意選択で定常領域をコードする核酸配列、および任意選択で第1の転写終結領域をコードする核酸配列と一緒に少なくとも1つの軽鎖C D Rをコードし、ならびに／あるいは

5'～3'方向および作動可能な連結において、請求項38～43のうちのいずれか1項に記載の第2の核酸フラグメントの発現を促進するための少なくとも1つのプロモーターであって、必須なフレームワーク領域、任意選択でリーダーペプチドをコードする核酸配列、前記第2の核酸フラグメント、任意選択で定常領域をコードする核酸配列、および任意選択で第2の転写終結領域をコードする核酸配列と一緒に少なくとも1つの重鎖C D Rをコードするもの 20

を含む、請求項44～46のうちのいずれか1項記載のベクター。

【請求項 4 8】

宿主細胞に導入される時に宿主細胞のゲノムに組み込まれる、請求項44～47のうちのいずれか1項記載のベクター。

【請求項 4 9】

請求項44～48のうちのいずれか1項のベクターを有する、形質転換細胞。 30

【請求項 5 0】

請求項44～48のうちのいずれか1項記載のベクターを有し、請求項38～43のうちのいずれか1項記載の核酸フラグメントを発現し、ならびに任意選択的にその表面上でその組み換え発現産物を分泌または保有する安定な細胞株。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、消化器多核体ウイルス感染症に関連した1つまたはそれ以上の症状の予防、治療または改善のための組み換えポリクローナル抗体に関する。本発明はまた、抗-R S V組み換えポリクローナル抗体（抗-R S V r p A b）を産生するポリクローナル発現細胞株に関する。さらに、本出願は、抗-R S V r p A bを含む診断上および薬理学的組成物ならびにR S V感染に関連する1つまたはそれ以上の症状の予防、治療または改善における使用を記載する。 40

【背景技術】

【0002】

消化器多核体ウイルス（R S V）は、幼児および小さな子供における下部呼吸器疾患の主な要因である。慢性肺疾患または先天性心臓疾患のごとく根本的な健康問題を抱える未成熟な幼児および子供は、R S V感染後の細気管支炎および肺炎などの重篤な病気に対して最も高いリスクを有する。最近、R S Vはまた、免疫不全の成人、特に骨髄移植被提供者、高齢者および肺疾患にかかっている人などの一定のリスクの高い成人において重要な

50

病変として認識されてきた。

【0003】

ヒトRSVは、パラミクソウイルス科ニューモウイルス属サブファミリーのメンバーであり、AおよびBサブタイプとして存在する。RSVは、外被性非分割型のマイナス鎖RNAウイルスである。ウイルスゲノムは、少なくとも11種のタンパク質をコードし、そのうちの3種が外被関連タンパク質、F(融合糖たんぱく質)、G(受容体-結合糖タンパク質)、およびSH(小疎水性タンパク質)である。外被タンパク質は、ウイルス表面上に存在し、ある程度まで感染した細胞の表面上にも存在する。Fタンパク質は、ウイルスと細胞膜の融合を促進し、それによりウイルスRNAの細胞質への侵入を可能にする。Fタンパク質は、2つのジスルフィド結合サブユニット、F₁とF₂からなり、574個のアミノ酸の不活性型N-グルコシル化前駆体のタンパク質分解性切断により產生される。Gタンパク質は、(ウイルス株に依存する)289~299個のアミノ酸のII型膜貫通糖タンパク質である。前駆形態は32kDaであり、N-およびO-連結オリゴ糖の付加により80~90kDaのタンパク質に成熟する。RSV Gタンパク質は、ビリオンの標的細胞への結合に関連する。Gタンパク質の膜-結合形態に加えて、短縮型の可溶性形態もまた產生される。この機能はウイルスと感染細胞から離れている免疫応答を再指令することが示唆される。さらに、Gタンパク質は、リンパ球の取り込みと同様に、ケモカインの修飾やサイトカインの発現のごとく多くの炎症性効果に関連することが示されている。SHタンパク質は64~65個のアミノ酸のタンパク質であり、精製されたRSV粒子の表面上に極めて低い量で存在するが、RSV感染細胞の表面上で豊富に発現される。SHタンパク質の機能は解明されていないが、ゴルジ複合体を介するウイルスタンパク質の輸送を補助しうる可能性がある(Rixon et al 2004, J.Gen.Viro.85:1153-1165)。GおよびFタンパク質の機能を阻害することは、RSV感染の予防に關係すると考えられている。

10

20

30

【0004】

RSV感染の予防と治療はこの数十年間大きく注目を浴びており、ワクチンの開発、抗ウイルス化合物(治療用に承認されたリバビリン)、アンチセンス薬物、RNA干渉(RNAi)技術および免疫グロブリンやモノクローナル抗体のごとき抗体産物を含む(Maggon and Barik, 2004, Rev.med.Viro.14:149-168で全て総説される)。これらの方法のなかで、静脈注射用免疫グロブリン、RSV-IVIG、およびモノクローナル抗体、パリビズマブはリスクの高い子供のRSV予防用に承認されている。

【0005】

しかしながら、RSV-IVIG(RespiGam)のごとき免疫グロブリン産物は、大量の注射を必要とする低い特異的活性のごとくいくつかの欠点を有することが知られ、前もっての集中的な治療のため静脈投与が限られる子供には困難である。さらに、バッヂ間の変動が伴う問題とともに、血清由来の免疫グロブリン産物からのウイルス疾患の伝染のリスクもまた存在する。したがって、正常なドナーの約8%のみがRSVを中和するのに十分高い抗体力価を示すことから、高力価RSV免疫グロブリン産生の要請に見合う十分なドナーを得ることは困難である。

40

【0006】

Fタンパク質またはGタンパク質に対するモノクローナル抗体は、インビトロにおける中和効果およびインビオにおける予防効果を有することが示してきた(例えば、Beeler and Coelingh 1989.J.Viro 163:2941-50; Garcia-Barreno et al 1989.J.Viro 63:925-32; Taylor et al 1984. Immunology 52: 137-142; Walsh et al 1984, Infection and Immunity 43:756-758; US 5,842,307およびUS 6,818,216)。今日、モノクローナル抗体パリビズマブはRSV-IVIGの使用から完全に取って代わった。中和アッセイは、パリビズマブおよびRSV-IVIGが、RSVサブタイプBに対して対等に作用する一方、パリビズマブがサブタイプAに対してより有效地に作用することを示す(Johnson et al 1997.J.Infect.Dis 176:1215-24)。しかしながら、パリビズマブおよびNumaxのごとく産物により示されるようなモノクローナル抗体の優れた中和および予防効果にもかかわ

50

らず、これらにはまた、RSVウイルスの性質による一定の欠点が付隨しうる。

【0007】

RSVには、2つの別個の抗原グループまたはサブタイプ、AおよびBが存在する。ほとんどのRSVタンパク質は、2つのサブグループ間で高度に保存され、Fタンパク質は91%のアミノ酸相同性を示す。しかしながら、Gタンパク質は、AおよびBサブグループ間で53%のみのアミノ酸相同性を有する広範な配列可変性を示す(Sullender 2000. Clin. Microbiol. Rev 13:1-15)。ほとんどのタンパク質はまた、Gタンパク質を除いて、アミノ酸レベルにおいて、サブグループA内で20%およびサブグループB内で9%まで相違するサブグループ内で限られた変動を示す。AおよびBのウイルスサブタイプは、異なる年の間で変化する相対頻度を伴って、多くのRSV伝染病で共循環する。それゆえ、モノクローナル抗体は、両方のサブタイプならびにサブタイプ内の変化を中和することができるよう慎重に選択されなければならない。10

【0008】

2つのRSVサブタイプとサブタイプ内の多様性の問題点に加えて、ヒトRSVは、ほとんどのRNAウイルスと同様に、選択圧の下で急速な変異を行う能力を有する。mAbを用いるインビトロにおけるRSVエスケープ変異体の選択がよく知られている(例えば、Garcia-Barreno et al 1989. J. Virol. 63:925-32)。重要なことに、最近、パリビズマブはインビボと同様にインビトロでもエスケープ変異体を選択し、その単離された変異体のいくつかはコットンラットにおけるパリビズマブ予防に完全に耐性であることが知見された(Zhao and Sullender 2005 J. Virol. 79:3962-8およびZhao et al 2004. J. Infect. Dis. 190:1941-6)。さらに、内在的にパリビズマブに耐性である野生型RSV株も存在し得、それは、パリビズマブの起源であるマウス抗体がある臨床分離株を中和することに失敗することにより示された(Beeler and Coelingh 1989. J. Virol. 63:2941-50)。その上、1つの明らかに耐性なウイルスもまた、免疫応答性コットンラットにおけるパリビズマブ予防後に同定された(Johnson et al 1997. J. Infect. Dis. 176:1215-24)。それゆえ、一定条件下において、エスケープ変異体が存在するか、または治療の結果として時間とともに発生しうることから、単独の单一特異性の抗体の使用は、RSV疾患の治療に適切または十分であり得ない。20

【0009】

RSV-IIVI Gおよびパリビズマブの有用性に関するさらなる検討事項は、有効な治療に必要とされる用量である。RSV感染症のコットンラットモデルにおいて、肺のRSV複製を100倍まで減少させるのに $30\mu g / m l$ 以上の血清濃度が必要であることが示されている。RSV-IIVI Gにおいては、静脈に投与される月に $750 mg$ 総タンパク質/ kg の用量が、リスクの高い子供におけるRSV入院の頻度を減少させるのに有効である一方、パリビズマブにおいては、月に $15 mg / kg$ の筋肉内用量が有効であることが証明された。しかしながら、複数回にわたる静脈内または筋肉内の大用量の投与は、患者にとって不便であり、RSV感染症に対するリスクのある成人の広範なグループの予防および治療のためのこれらの産物の幅広い使用を妨げる。30

【0010】

したがって、ドナーの利用可能性に依存せず、サブタイプAおよびBを網羅する1種またはそれ以上のRSV抗原ならびにウイルス変異により生じるいずれかのエスケープ変異体に対して免疫特異的に結合し、高度に強力であり、改善された薬物動態学的プロファイルを有し、それゆえに総体として改善された治療プロファイルを示し、それによりより低頻度の投与および/またはより低用量の投与で足りる、抗体産物が必要である。40

【0011】

(貢献の開示)

それゆえ、本発明の目的は、極めて強力な代替的な抗-RSV免疫グロブリン産物であって、組み換えて產生され、消化器多核体ウイルスのサブタイプAおよびBに対して、ならびにエスケープ変異体の可能性を制限する主要な表面抗原のうちの少なくとも1つにおける複数のエピトープに対して、反応性を示す抗-RSV免疫グロブリン産物を提供する50

ことである。

【0012】

本発明はまた、新規のヒト抗-RSV抗体分子ならびにそれらの誘導体を提供することを目的とし、この抗体分子または誘導体は、既存のモノクローナル抗-RSV抗体および抗体誘導体を超えた改善された性質を示す。

【0013】

(本発明の説明)

RSVにおける複数のエピトープを標的とするポリクローナル抗体組成物の使用は、エスケープ変異体の発生を最小限にすることが期待され、多様性をもって自然界で循環するウイルスに対する保護をも提供することができる。血清由来のRSV-IVIGとは対照に、本発明のポリクローナル抗体は、非RSV抗原に結合する抗体分子を含まない。

10

【0014】

本発明は、ポリクローナル抗-RSV抗体を提供する。好ましくは、ポリクローナル抗-RSV抗体は、自然には抗体を産生しない細胞から得られる。かかる抗体は、組み換えポリクローナル抗体(rpAb)と呼ばれる。本発明の抗-RSV rpAbは、FまたはGタンパク質における複数のエピトープに対して指向性がある。特に、GおよびFタンパク質の両方における複数のエピトープにして指向性がある抗-RSV rpAbが好ましい。好ましくは、保存されたグループ、潜在的にサブタイプ-特異的グループおよび株-特異的グループに属するGタンパク質エピトープは、抗-RSV rpAbにより網羅される。さらに、第3の外被タンパク質、小分子疎水性(SH)タンパク質に対して反応性を有する抗体は、本発明の抗-RSV rpAbの望ましい構成要素である。

20

【0015】

さらに、本発明は、活性成分が抗-RSVポリクローナル抗体である医薬組成物、ならびにRSV感染症の予防、改善または治療のためのかかる組成物の使用を提供する。

【0016】

本発明は、RSVによる感染によって上昇された液性免疫応答を反映するための方法であって、かかる誘発した個体から元々のV_HおよびV_L遺伝子のペアを単離し、次いでこの元々のペアを維持する抗体を産生することによる方法をさらに提供する。

【0017】

(定義)

30

用語「抗体」は、血清の機能的な構成要素を記載し、多くの場合、分子のコレクション(抗体または免疫グロブリン)としてまたは1分子(抗体分子または免疫グロブリン分子)としてのどちらかで呼ばれる。抗体分子は、特異的な抗原性決定基(抗原または抗原性エピトープ)に結合または反応することができ、順に免疫学的なエフェクター機構の誘導を導きうる。個々の抗体分子は通常、单一特異性とされ、抗体分子の組成物は、モノクローナル(すなわち、同一の抗体分子からなる)またはポリクローナル(すなわち、同一の抗原におけるか、または別個の異なる抗原における同一または異なるエピトープと反応する異なる抗体分子からなる)であってもよい。各抗体分子は、その対応する抗原に特異的に結合することを可能にする固有の構造を有し、全ての自然の抗体分子は、2つの同一の軽鎖および2つの同一の重鎖の同一の全体基本構造を有する。抗体はまた、免疫グロブリンとして総称される。本明細書で用いられるような用語、抗体は、最も広い意味で用いられ、インタクト(intact)な抗体、キメラ化、ヒト化、完全なヒトのおよび単一鎖の抗体、ならびにFab、FvフラグメントまたはscFvフラグメントのごとき抗体の結合フラグメント、ならびに二量体IgA分子または五価IgGのごとき多量体型を網羅する。いくつかの例では、本出願は、用語「合成もしくは半合成抗体アナログ」を用い、それは、特に(RSV抗原への特異的な結合を示すことより)抗体の性質を示す天然に存在しない分子を意味し、天然に存在する抗体に由来するCDRを含み、-かかるアナログは、例えば、scFvフラグメント、二重特異性抗体などにより表されるが、例えば、本明細書で開示される抗-RSV抗体分子に由来するCDR(例、当該技術分野で周知の移植技術による)を含むように改良される表面上天然に存在する抗体-例えば、かかる抗体

40

50

アナログは、別の動物種の抗体分子に取り込まれている、あるいは同一種由来の異なる抗体アイソタイプもしくはクラスに取り込まれている、本明細書に開示される C D R を含みうる。

【 0 0 1 8 】

用語「抗 - R S V 組み換えポリクローナル抗体」または「抗 - R S V r p A b」は、組み換えで產生される多様な抗体分子の組成物であって、各メンバーが消化器多核体ウイルスにおける少なくとも 1 つのエピトープに結合することができ、全体としてのポリクローナル抗体が R S V を中和することができる抗体分子の組成物を記載する。好ましいのは、抗 - R S V r p A b 組成物は、 R S V サブタイプ A および B の両方を中和する。さらにより好ましいのは、抗 - R S V r p A b は、 G および F タンパク質に対する結合反応性をさらに含む。好ましいのは、組成物は、単一のポリクローナルを生成する細胞株から產生される。

10

【 0 0 1 9 】

用語「同種 V_H および V_L をコードするペア（ pair ）」は、同一細胞内に含まれるか、または由来する V_H および V_L をコードする配列の元々のペアを記載する。したがって、同種 V_H および V_L のペアは、かかる細胞が由来するドナーに元々存在する V_H および V_L のペアを表す。用語「 V_H および V_L をコードするペアから発現される抗体」は、抗体または抗体フラグメントが、 V_H および V_L をコードする配列を含むベクター、プラスミドまたは類似物から產生されることを示す。同種の V_H および V_L をコードするペアが、完全な抗体として、またはそれらの安定なフラグメントとして発現される場合、それらは、それらが由来する細胞で元々発現される抗体の結合親和性および特異性を維持する。同種ペアのライブラリーはまた、同種ペアのレパートリーまたはコレクションとも称され、個別に保存されるか、またはプールされうる。

20

【 0 0 2 0 】

用語「組み換えポリクローナル抗体の別個のメンバー」は、可変領域内の 1 つまたはそれ以上の鎖を含む組み換えポリクローナル抗体組成物の個々の抗体分子を表し、他のポリクローナルタンパク質の個々のメンバーと比較してアミノ酸配列の相違により特徴付けられる。これらの鎖は、特に、 C D R 1 、 C D R 2 および C D R 3 領域に局在される。

【 0 0 2 1 】

用語「エピトープ」は、一般に、動物、好ましくは、哺乳動物、最も好ましくは、ヒトにおける抗原性または免疫原性活性を有する大型分子の一部または大型分子の部分（例、抗原または抗原部位）を記載するのに用いられる。免疫原性活性を有するエピトープは、動物における抗体応答を誘導する大型分子の一部である。抗原性活性を有するエピトープは、当該技術分野でよく知られる方法のいずれかにより、例えば、本明細書に記載される免疫アッセイにより調べられるように、抗体が免疫特異的に結合する大型分子の一部である。抗原性エピトープは、必ずしも免疫原性である必要はない。抗原は、抗体または抗体フラグメントが免疫特異的に結合する物質、例えば、毒素、ウイルス、細菌、タンパク質または D N A である。抗原または抗原部位は、それらが非常に小さくない限り、多くの場合、 1 つより多くのエピトープを有し、免疫応答を活性化することができる。同一の抗原における異なるエピトープに結合する抗体は、それらがエピトープの局在に依存して、結合する抗原の活性を変化させる効果を示すことができる。抗原の活性部位におけるエピトープに結合する抗体は、抗原の機能を完全に妨害しうる一方、異なるエピトープに結合する別の抗体は、単独で抗原の活性に全くまたはほとんど効果を示し得ない。しかしながら、かかる抗体は、さらに補体を活性化し、それにより抗原の排除が起き、次いで同一の抗原の異なるエピトープに結合する 1 つまたはそれ以上の抗体と結合される場合に相乗効果を生じうる。本発明では、大型分子のエピトープの一部は、好ましくは R S V ポリペプチドの一部である。本発明の抗原は、好ましくは、抗体または抗体フラグメントが免疫特異的に結合する、 R S V 関連タンパク質、ポリペプチドまたはそれらのフラグメントである。 R S V 関連抗原はまた、抗体または抗体フラグメントが免疫特異的に結合する、 R S V ポリペプチドまたはそのフラグメントのアナログまたは誘導体であってもよい。

30

40

50

【 0 0 2 2 】

例えば、D N A、R N Aまたはタンパク質の配列に関連して用いられる用語「完全なヒト」は、9 8 から 1 0 0 % のヒト配列を記載する。

【 0 0 2 3 】

用語「免疫グロブリン」は、一般に、血液または血清中で見出される抗体の混合物の総称として用いられるが、他の起源に由来する抗体の混合物を表すのに用いられてもよい。

【 0 0 2 4 】

用語「液性免疫応答を反映する」は、ポリクローナル抗体に関して用いられる場合、個々の抗体メンバーをコードする核酸配列が、抗 - R S V 特異的抗体を產生する血漿細胞の発生頻度の上昇を伴うドナーに由来する抗体組成物を意味する。かかるドナーは、R S V 感染から回復したものであるか、R S V に感染した個体と密接な関係を示すものであるか、あるいはR S V ワクチン接種を受けたもののいずれかであってもよい (R S V ワクチンの例は、例えば、Maggon and Barik, 2004, Rev.med.Virol.14:149-168 を参照) 。感染または誘発によってドナー内で上昇した抗体の親和性および特異性を反映させるために、可変重鎖 (V_H) および可変軽鎖 (V_L) をコードする配列は、それらが単離される時に、ドナー内に元々存在する遺伝子のペアーや組合せ (同種のペアーや) で維持されるべきである。ドナーにおける液性免疫応答の多様性を反映するため、R S V に結合する抗体をコードする全ての配列は、スクリーニング手順に基づいて選択される。単離された配列は、可変領域、特に、C D R 領域の多様性に関して、または V_H および V_L ファミリーに関しても解析される。これらの解析に基づいて、R S V に結合する抗体の全体の多様性を表す同種ペアーやの集団が選択される。かかるポリクローナル抗体は、典型的に、少なくとも 5 、 1 0 、 2 0 、 3 0 、 4 0 、 5 0 、 1 0 0 、 1 0 0 0 または 1 0 ⁴ 個の別個のメンバーを有する。

10

20

30

40

【 0 0 2 5 】

組成物は、その投与が受容する患者により耐性化されうる場合、「薬理学的に許容される」と言われる - 同じことを、組成物の一部である賦形剤、ビヒクル、担体および希釈剤に適用する。

【 0 0 2 6 】

用語「ポリクローナル抗体」は、同一または異なる抗原における数種の特異的な抗原性決定基 / エピトープと結合するか、または反応することができる異なる (多様な) 抗体分子の組成物であって、組成物中のそれぞれ個々の抗体が特定のエピトープと反応することができる組成物を記載する。通常、ポリクローナル抗体の可変性は、いわゆるポリクローナル抗体の可変領域、特に C D R 1 、 C D R 2 および C D R 3 領域に位置される。本発明では、ポリクローナル抗体は、ポリクローナル細胞株からワンポットで產生されるか、または異なるポリクローナル抗体の混合物のどちらかであってもよい。モノクローナル抗体の混合物は、それらが個々のバッチ内で產生され、必ずしも、例えば、翻訳後修飾の相違を生じる同一の細胞株に由来しないことから、ほとんどポリクローナル抗体とは考えられない。しかしながら、モノクローナル抗体の混合物が、本発明のポリクローナル抗体として同一の抗原 / エピトープの範囲 (c o v e r a g e) を提供する場合、ポリクローナル抗体の等価物として考えられる。ポリクローナル抗体のメンバーが抗原 / 抗原部位 / エピトープに対して特異的に結合するか、または特異的な反応性を有すると記載する場合、本明細書では、結合定数が 1 0 0 n M 以下、好ましくは 1 0 n M 以下、さらにより好ましくは 1 n M 以下であることを意味する。

50

【 0 0 2 7 】

用語「組み換え抗体」は、発現ベクターでトランスフェクトされた細胞または細胞株から発現される抗体分子または数種類の分子を記載するのに用いられ、この発現ベクターは、自然界ではその細胞に付随していない抗体のコーディング配列を含む。組み換え抗体組成物中の抗体分子が多様であるか、または相違する場合、用語「組み換えポリクローナル抗体」または「r p A b 」は、ポリクローナル抗体の定義に従って適用する。

【 0 0 2 8 】

用語「組み換えポリクローナル細胞株」または「ポリクローナル細胞株」は、変異型の核酸配列のレパートリー（例、抗体をコードする核酸配列のレパートリー）でトランスフェクトされるタンパク質の混合物／集団を発現する細胞を意味し、変異型の核酸配列は、自然界ではトランスフェクトされた細胞に付随していない。好ましいのは、トランスフェクションは、組み換えポリクローナル細胞株と一緒に構成する個々の細胞が各々、目的の單一で別個の核酸配列の転写活性コピーを保持し、目的の組み換えポリクローナル抗体の1つのメンバーをコードするように行われる。さらにより好ましいのは、別個の核酸配列の單一コピーのみがゲノム中の特異的な部位に組み込まれる。組み換えポリクローナル細胞株を構成する細胞は、目的の別個の核酸配列の組み込まれるコピーを保持する能力について、例えば、抗生物質選択により選択される。かかるポリクローナル細胞株を構成することができる細胞は、例えば、細菌、真菌、酵母、昆虫細胞、植物細胞または哺乳動物細胞のごとき真核細胞、特に、CHO細胞、COS細胞、BHK細胞、骨髄腫細胞（例、Sp2/0細胞、NS0）、NIH 3T3、YB2/0のごとき不死化哺乳動物細胞株、ならびに、HeLa細胞、HEK293細胞、またはPER.C6のごとき不死化ヒト細胞でありうる。

10

【0029】

用語「 V_H および V_L のペアーをコードする配列」または「 V_H および V_L をコードする配列のペアー」は、各分子が、可変重鎖および可変軽鎖の発現をコードする配列を含む核酸分子を示し、これらは、適切なプロモーターおよび／またはIRES領域が存在し、配列に作動可能に連結される場合、核酸分子に由来する一組として発現されうる。核酸分子はまた、重鎖および／または軽鎖の定常領域の一部または完全な定常領域をコードし、適切なプロモーターおよび／またはIRES領域が存在し、配列に作動可能に連結される場合に、Fabフラグメント、全長抗体または他の抗体フラグメントが発現されてもよい。

20

【0030】

組み換えポリクローナル抗体は、投与される量が生理学的に有意である、例えば、動物またはヒトにおけるRSV感染を予防するか、または弱毒化する場合に、「治療上有効な量」で投与されることとされる。

【0031】

(図面の説明)

30

図1：(A) プロトタイプ株、Long (サブタイプA) および 18537 (サブタイプB) 由来の全体のGタンパク質のアミノ酸配列の並列比較。シグナル／膜貫通領域を点線で囲う。Cane et al 1991 J.Gen.Virology 72:2091-2096により同定されるようなアミノ酸 101～133 および 208～299 の間の2つの可変領域を下線で特定する。Gタンパク質の中心フラグメントは E.co1i で融合タンパク質として発現され、黒色で囲う。2つのアミノ酸配列を、配列番号：711 (サブタイプA) および配列番号：712 (サブタイプB) に記載する。(B) (A) に示される中心フラグメントの並列比較。13-a-a 保存領域および Gタンパク質システインリッチドメイン (GCCR) の局在を角括弧で示す。(両サブタイプ間で同一の) GCCR におけるジスルフィド架橋を四角角括弧で示す。2つのアミノ酸配列を配列番号：713 (サブタイプA) および配列番号：714 (サブタイプB) に記載する。

40

【0032】

図2：多重重複伸長RT-PCR (A) およびクローン化工程 (B) の模式的概要。(A) V_H および V_K 遺伝子ファミリー各々に特異的な2組のプライマー、CH+VH1-8 および VK1-6+CK1 を第一のPCR工程に用いた。 V_H または V_K プライマー間の相同領域は重複するPCR産物を生じる。第2工程において、この産物をネスティドPCRで増幅させる。プライマーはまた、クローン化を容易にする制限酵素の認識部位を含む。(B) 作成した同種の連結 V_H および V_K をコードするペアーをプールし、隣接するXbaI および NotI 制限部位の使用により哺乳動物IgG発現ベクターに挿入した。次いで、全長抗体の発現を促進するために、二方向性プロモーターを連結 V_H および V_K

50

をコードする配列間の A s c I - N h e I 制限酵素部位に挿入する。用いられる P C R プライマーを平行矢印により示す。C H 1 : 重鎖定常領域 1、C L : 定常領域、L C : 軽鎖；A b : 抗体；P 1 - P 2 : 二方向性プロモーター。

【0033】

図 3 : 哺乳動物全長抗体発現ベクター 00 - V P - 530 の模式図。ベクターは以下の構成要素を含む：A m p および A m p p r o = アンピシリン耐性遺伝子およびそのプロモーター。p U C 開始点 = p U C 複製開始点。P 1 = 軽鎖の発現を促進する哺乳動物プロモーター。P 2 = 重鎖の発現を促進する哺乳動物プロモーター。リーダー I G H V = ゲノムヒト重鎖リーダー。V H = 重鎖可変領域をコードする配列。I g G 1 = ゲノム免疫グロブリンアイソタイプ G 1 重鎖定常領域をコードする配列。ウサギ - グロブリン A = ウサギベータ - グロブリンポリ A 配列。カッパリーダー = マウスカッパリーダーをコードする配列。L C = 軽鎖をコードする配列の配列。S V 40 t e r m = サルウイルス 40 転写終結配列。F R T = F 1 p 認識標的部位。N e o = ネオマイシン耐性遺伝子。S V 40 p o l y A = サルウイルス 40 ポリ A シグナル配列。

10

【0034】

図 4 : ビアコア (B i a c o r e) 解析を用いてクローン 801 から得られた抗体 (A b 801) のエピトープ特異性の特徴付け。抗体 801 結合を、3 つの抗体、9c5 (2)、133-h (3) およびパリビズマブ (4) であって、各々、抗原部位 F 1、C および I I に結合する抗体を用いて、タンパク質 F への結合に関する対競合 (pair-wise competition) でテストした。対照の細胞は、競合しない A b 801 (1) のタンパク質 F への結合を示す。4 つの抗体の注入時間を矢印により示す。応答を相対的共鳴単位 (R U) で示す。長い両方向矢印は競合しない応答の大きさを示し、短い両方向矢印は 9c5 で阻害された応答の大きさを示す。

20

【0035】

図 5 : 図は、RSV サブタイプ A および B 株のインビトロ中和の結果である。抗 - F 抗体混合物の希釈物を、RSV long (グラフ A) および RSV B 1 (グラフ B) 株を中和する能力についてテストした。クローン 810、818、819、825 および 827 から得られた抗体混合物、抗 - F (I) を三角形 (△) として示し、クローン 735、800、810、818、819、825、827、863、880、884 および 894 から得られた抗体混合物、抗 - F (II) を四角形 (□) として示す。パリビズマブをダイヤモンド (◇) として示し、アイソタイプに適合する陰性コントロール (抗 - アカゲザル D) 抗体を円 (○) として示す。吸光度を 490 nm で測定し、RSV 複製と相関関係にある。

30

【0036】

図 6 : 図は、インビトロ RSV 融合阻害アッセイの結果である。抗体混合物の希釈物を、RSV B 1 株を中和する能力についてテストした。クローン 810、818、819、825、827、796、838841、856 および 888 から得られる抗体混合物、抗 - F (I) G を白抜きの四角形 (□) として示し、735、800、810、818、819、825、827、863、880、884、894、793、796、838、841、856 および 888 から得られる抗体混合物、抗 - F (II) G を、白抜きの三角形 (△) として示す。パリビズマブをダイヤモンド (◇) として示す。吸光度を 490 nm で測定し、RSV 複製と相関関係にある。

40

【0037】

図 7 : 図は、活性な補体の存在下で P R N T により測定されるごとく抗 - G 抗体クローニングの組み合わせによる RSV のインビトロ中和からの結果である。(表 8 に記載される) 個々の抗体組成物の希釈物を、ウサギ補体の存在下における RSV 株 Long とインキュベートし、その後、H E p - 2 細胞を感染させた。インキュベーション 24 時間後、感染の程度を、RSV 特異的血小板の免疫検出を用いて検出した。抗 - RSV r p A b 13 を白抜き三角形 (△) として、抗 - RSV r p A b 35 を三角形 (□) として、抗 - RSV r p A b 36 を四角形 (□) として、抗 - RSV r p A b 41 を円 (○) として

50

、ならびに抗-R S V r p A b 4 5 を白抜き四角形()として示す。データをコントロール±S Dと比較して%感染として表す。

【0038】

(発明の詳細な説明)

標的抗原およびポリクローナル抗体組成物

本発明のポリクローナル抗体は、同一の組成物中に多くの別個の抗体分子を含む。各分子は、R S V関連抗原に結合する能力に基づいて選択される。本発明のポリクローナル抗体は、ポリクローナル抗体組成物を構成する別個の抗体分子の集められた(c o m p i l e d)結合反応性に相当する結合反応性を含む。

【0039】

本発明の抗-R S Vポリクローナル抗体は、好ましくは、GおよびFタンパク質の両方に対する収集された結合反応性、より好ましくは、エスケープ変異体の発生のリスクを最小限にし、最も高い可能性のある中和能力を達成する複数のエピトープに対する集められた結合反応性を含む。中和抗体により認識される少なくとも5つの主要な抗原部位は、Fタンパク質において同定されている(Lopez et al 1998. J.Viro 72:6922-8)。全ての抗原部位はF₁鎖にマップされ、部位I、II、IV、VおよびVIを含み、部位IおよびIIは各々、BおよびAとも呼ばれる。部位IIは、N-末端分節のプロテアーゼ耐性領域に位置し、ならびに部位IV、VおよびVIは、タンパク質のシステインリッチ領域のC末端に位置する。部位Iは、このシステインクラスターの中央に位置する。Fタンパク質上のさらなる抗原部位は、アミノ酸位置241および242を含むエピトープF2が位置する部位Cである。さらに、F1と呼ばれる抗原部位に結合するモノクローナル抗体が存在し、F1はF1a、F1bおよびF1cと呼ばれるエピトープを含む。現在、この抗原部位は、Fタンパク質上の特定の部位にマップされていない。これらの部位/エピトープの大半は、広く中和抗体を生じるが、抗原部位Iに特異的ないくつかの抗体は、サブタイプA特異的であることが示されている。部位Iに結合する抗体はまた、ウイルス中和における限界効果を示す。バリビズマブにより認識されるエピトープは、アミノ酸位置272における選択されたエスケープ変異体の局在により判断されるような抗原部位IIに位置する(Zhao et al 2004 J. Infect. Dis 190:1941-6)。さらに、エピトープの3種のタイプがGタンパク質上で同定された：i) 全てのR S V株に存在する保存されたエピトープ、ii) 同一のサブタイプに属する全てのウイルスに存在するグループ特異的なエピトープ、ならびにiii) 同一のサブタイプに属する株のサブセットのみに存在する株特異的または可変性エピトープ。保存されたおよびグループ特異的なエピトープは、4つのシステイン(アミノ酸残基173、176、182および186)のクラスターならびに全てのヒトR S V单離体(isolate)間で同一配列の短いアミノ酸断片(残基164-176)を含むGタンパク質の中央部分にマップされている。システインクラスターは、位置173-183および176-182の間のジスルフィド結合により保持され、アミノ酸残基171-187の範囲であるGタンパク質システインリッチ領域(G C R R)の中央部を構成し、それによりG C R Rは、13個のアミノ酸保存領域と重複する。G糖タンパク質は、保護的免疫と疾病病因の両方の誘導に役割を果たすようである。例えば、マウスにおける研究は、G糖タンパク質が、IL-4、IL-5、IL-13および肺好酸球の産生により特徴付けられるT h 2 C D 4+ T細胞応答を調節することを示した。好酸球の補充と活性は、IL-4およびIL-5のごとき数種の因子により促進される。さらに、マウスの急性感染期間におけるR S V Gタンパク質の発現は、T h 1サイトカイン発現の減少(例、IL-2およびガンマインターフェロン)、ケモカインm R N A発現の変化(例、M I P - 1アルファ、M I P - 1ベータ、M I P - 2、I P - 10、M C P - 1)、ならびに感染した肺へのN K細胞輸送の減少により特徴付けられる改善された自然免疫応答に関連していた。特に、G C R Rは、自然炎症反応を調節し、それにより可能性としてR S Vクリアランスを遅延させることに重要な役割を果たすことが示された(Polack et al., 2005 PNAS 102:8996-9001)。G C R Rは、アミノ酸位置182から186にC X 3 Cモチーフを含む。R S Vに感染されたマウスにおける呼吸速度の減少は、

10

20

30

40

50

C X 3 C モチーフに対する抗体が呼吸速度の減少を無効にすることから、このモチーフに関連することが示された (Tripp et al. 2003 J.Viro. 77:6580-6584 および US 2004/0009177 (appl.no.10/420,387))。株特異的エピトープは、G タンパク質の外部ドメインにおけるシステインクラスターの可変領域 N 末端にマップされるが、好ましいのは、G ポリペプチドの可変 C 末端の 3 番目に位置される (Martinez et al. 1997 J.Gen.Viro. 78:2419-29)。図 1 は、Long 株 (サブタイプ A) および 18537 株 (サブタイプ B) 由来の G タンパク質の並列比較を表し、これは G タンパク質の多様な領域を示す。一般的に、モノクローナル抗 - G タンパク質抗体は、RSV 中和における限界的効果を有する。しかしながら、モノクローナル抗 - G 抗体の混合物がインビトロならびにインビボにおける RSV の中和を高めることが報告してきた (Walsh et al 1989 J.Gen.Viro. 70:2953-61 および Martinez and Melero 1998 J.Gen.Viro. 79:2215-20)。モノクローナル抗 - G 抗体を結合する最も大きな効果は、ウイルスの画分がまだ中和に耐性であっても、抗体が異なるエピトープに結合する時に明確に発揮される。さらに、異なるエピトープ特異性を有する 2 つの異なる抗 - F 抗体の組合せならびに 1 つの抗 - F と 1 つの抗 - G 特異的抗体の組合せは、RSV におけるインビトロ中和効果の上昇を示した (Anderson et al 1988 J.Viro. 62: 4232-4238)。モノクローナル抗体を混合することにより得られるいくつかの有利な点は、例えば、活性部位の阻害によるアンタゴニスト効果のごときモノクローナル抗体の個々の特性のためと考えられる。その他の効果は、今のところ理解されていない理由による相乗作用が考えられる。

10

20

30

40

50

【0040】

RSV 中和のメカニズムは複雑であり、完全に理解されていない。多くの異なるエピトープ、F および G タンパク質のみで同定された、保存されたサブタイプ特異的ならびに株特異的エピトープ、ならびにエスケープ変異体の潜在的な作成は、RSV 感染の予防に役割を果たしうる全ての中和メカニズムを定めるのに広範囲な抗体特異性が必要であることを示唆する。それゆえ、合理的な方法において、サブタイプ A および B の両方の RSV 株、ならびにエスケープ変異体および今日知られる RSV 株から生じる新しい株による RSV 感染を予防することができるモノクローナル抗体の混合物を選択することは非常に困難である。

【0041】

本発明の態様は、多くの多様性および広範な抗 - RSV 特異性を有するポリクローナル抗 - RSV 抗体を提供する。本発明のポリクローナル抗 - RSV 抗体は、产生時における利用可能なドナーに依存せず、バッチ間の変動は、ドナー由来の抗 - RSV 免疫グロブリン産物 (例、RSV I V I G) で観察されるものよりかなり小さい。本発明のポリクローナル抗 - RSV 抗体では、全ての個々の抗体メンバーは、RSV 関連抗原に結合することができ、前記ポリクローナル抗体は RSV サブタイプ A および B を中和することができる。ポリクローナル抗体の各々別個の抗体は、ポリクローナル抗体の他のメンバーのいずれかによっても結合されないエピトープに結合することが好ましい。本発明のポリクローナル抗 - RSV は、多価の手段で RSV 抗原に結合し、それは通常、結果として、相乗的な中和、マクロファージによる感染細胞の食作用の改善および感染細胞に対する抗体依存性細胞障害 (ADCC) の改良ならびに補体活性の上昇を生じる。さらに、本発明のポリクローナル抗体は、RSV I V I G の場合である非結合タンパク質により「希釈」されず、この場合、有効であるために 750 mg の合計タンパク質 / kg の用量が必要とされる。750 mg の合計タンパク質内における RSV 特異的抗体の割合は知られていないが、最大で 1 % より大きくなることはなく、恐らく 1 % より小さいと考えられる。したがって、パリビズマブのインビトロにおける効力が RSV I V I G の効力より 25 - 30 倍高いとされた場合 (Johnson et al 1997 J.Infect.Dis. 176:1215-24)、これは RSV I V I G の特異的活性の減少により相殺される。それゆえ、RSV - I V I G に含まれる免疫グロブリン分子のわずか 1 % が RSV に特異的である場合、RSV - I V I G ポリクローナル抗体の活性のある用量は、モノクローナル抗体パリビズマブの活性のある用量より低い、わずか 7.5 mg / kg である。

【 0 0 4 2 】

これらの理由により、本発明の組み換えポリクローナル R S V - 特異的抗体は、モノクローナル抗体より有意に高い能力であることが期待され、それゆえに、パリビズマブおよび R S V I V I G の有効な用量と比較して、より少ない用量の本発明のポリクローナル抗体で投与することが可能である。したがって、本発明のポリクローナル抗 - R S V 抗体はまた、リスクの高い患者、特に骨髄移植の被提供者、高齢者および慢性肺疾患にかかっている個体の予防および治療に適すると考えられる。本発明のポリクローナル抗 - R S V 抗体のさらなる有利な点は、個々の抗体メンバーの濃度がモノクローナル抗体の濃度より有意に低く（用いられる濃度が同一であったとしても）、したがって個々の抗体が治療上、個々の免疫系により外部物質として認識される可能性が低くなり、1つの個々の抗体が患者内の免疫応答により排除されるととも、残存する抗体メンバーが無傷であることから、ポリクローナル抗 - R S V 抗体の中和能力またはクリアランス速度に影響することはないようである。

10

【 0 0 4 3 】

本発明の具体例は、R S V サブタイプ A および B を中和することができる組み換えポリクローナル抗 - R S V 抗体であり、前記ポリクローナル抗体は、少なくとも1つの R S V 外被タンパク質における少なくとも3つの異なるエピトープに一緒に特異的に結合する別個の抗体メンバーを含む。好ましいのは、F タンパク質は、少なくとも3つの別個の抗体メンバーにより特異的に結合され、前記エピトープは、好ましくは異なる抗原部位に位置する。

20

【 0 0 4 4 】

本発明のさらなる具体例は、R S V サブタイプ A および B を中和することができる組み換えポリクローナル抗 - R S V 抗体であり、前記ポリクローナル抗体は、少なくとも2つの R S V 外被タンパク質に対する特異的反応性を一緒に提供する別個の抗体メンバーを含む。2つの外被タンパク質は、R S V G タンパク質、すなわち、R S V F タンパク質および R S V S H タンパク質から選択することができる。好ましくは、本発明のポリクローナル抗 - R S V 抗体は、抗 - G および抗 - F 反応性を含む。かかるポリクローナル抗体の抗 - G および抗 - F 反応性は、好ましくは、少なくとも2つの別個の抗 - G 抗体および少なくとも1つの別個の抗 - F 抗体からなる。好ましいのは、少なくとも3つの別個の抗体は、異なるエピトープに結合し、それにより少なくとも3つの異なるエピトープを網羅し、同時に抗体は、同様に R S V サブタイプ A およびサブタイプ B 株を中和することができる。より好ましい本発明のポリクローナル抗 - R S V 抗体の抗 - G および抗 - F 反応性は、以下に記載される抗 - G および抗 - F 反応性のいずれかの組合せからなる。最も好ましい本発明のポリクローナル抗 - R S V 抗体は、以下で言及される全ての抗原部位 / エピトープに対する抗 - G および抗 - F 反応性からなる。本発明のポリクローナル抗 - R S V 抗体に可能な最も広い特異性を得るために、1つまたはそれ以上の好ましい全ての抗原部位は、1つより多くの別個の抗体により網羅されることが望ましい。したがって、同一抗原または抗原部位における数種のエピトープが、本発明のポリクローナル抗体の別個のメンバーにより結合されることが好ましい。

30

【 0 0 4 5 】

本発明のポリクローナル抗 - R S V 抗体の抗 - G 反応性に関して、この反応性は、好ましくは、保存されたエピトープに対する指向性である。より好ましい抗 - G 反応性は、G - タンパク質上の保存されたエピトープに特異的に結合することができる第1の抗 - G 抗体、および G タンパク質ステインリッチ領域 (G C R R) に特異的に結合することができる第2の抗 - G 抗体からなる。ポリクローナル抗 - R S V 抗体は、好ましくは、少なくとも2つの別個の抗 - G タンパク質を含み、少なくとも1つの第1の抗体は、G タンパク質上の保存されたエピトープに特異的に結合することができ、少なくとも1つの第2の抗体は、サブタイプ A または B のどちらかを認識する異なる保存されたエピトープまたはグループ特異的エピトープに特異的に結合することができる。好ましくは、ポリクローナル抗体は、少なくとも3つの別個の抗 - G 抗体を含み、第1の抗体は、G - タンパク質上の

40

50

保存されたエピトープに特異的に結合することができ、第2の抗体は、サブタイプAのGタンパク質に特異的に結合することができ、第3の抗体は、サブタイプBのGタンパク質に特異的に結合することができる。Gタンパク質システインリッチ領域(G C R R)は、保存されたエピトープが位置する上流13アミノ酸領域およびグループ特異的エピトープが位置する領域と一部重複する。それゆえ、保存されたエピトープに特異的に結合することができる抗体ならびにグループ特異的な抗体は、それらが認識するエピトープがG C R Rに位置する場合にG C R Rに結合してもよい。好ましくは、保存されたエピトープまたは株特異的なエピトープへの結合により特徴付けられる別個の抗体のうちの少なくとも1つもまた、G C R Rを認識する。G C R RのC X 3 Cモチーフに結合する抗体は、ウイルス中和の観点から特に好ましい。しかしながら、C X 3 X Cモチーフに結合する抗体はまた、フラクタルカインおよび他のヒトC X 3 Cケモカインのごとく多くの他の関連しないヒト抗原に結合し、それゆえ、望ましくない副作用を產生することから、交差反応(例、実施例における一定の抗体について示されるように)についてかかる抗体をテストし、次いで適するモデル系で同一の抗体をテストする合理的方法が存在する。いずれにしても、副作用が存在しないか、ごく軽微であるか、または少なくとも許容されるかが確実性の程度で立証されうる前に、臨床試験において、本発明の抗体のごとき所定の医薬品をテストすることが必ず必要である。保存されたおよびグループ特異的な抗-G反応性に加えて、株特異的なエピトープに対して指向性のあるさらなる抗-G反応性もまた、本発明のポリクローナル抗-R S V抗体に含まれてもよい。ほとんどの多くの株特異的エピトープに対して指向性のある株特異的抗-G反応性は、5年以内にR S V感染を生じるウイルス株に存在することが好ましい。本発明では、株特異的エピトープは、限られた数のR S V株に存在するのみのエピトープとして理解される。グループ特異的および/または株特異的抗-G抗体の添加は、本発明の抗-R S V抗体に対してさらなる多様性を提供することができ、Gタンパク質の保存領域に対する反応性を有する抗体と結合される時に相乗作用を誘導しうる。好ましくは、本発明の抗-G抗体は、直接R S Vを中和し、ウイルスの細胞への進入を阻害し、細胞移動を防止し、炎症反応を抑制し、および/または多核体形成を予防する。

10

20

30

40

50

【0046】

本発明のポリクローナル抗-R S V抗体の抗-F反応性に関して、この反応性は、好ましくは、1つまたはそれ以上の抗原部位I、II、IV、V、VI、CまたはF1における少なくとも1つのエピトープに対して指向性がある。本発明のさらなる具体例では、少なくとも2つ、3つ、4つ、5つ、6つまたは全てのこれらの抗原部位/エピトープは、本発明のポリクローナル抗-R S V抗体における別個の抗体により網羅される。好ましくは、本発明の抗-F抗体は、直接R S Vを中和し、および/またはウイルスの細胞への進入を阻害し、および/または多核体形成を予防する。

【0047】

本発明のポリクローナル抗-R S V抗体組成物では、組成物は、Fタンパク質における全ての抗原部位を対して指向性のある結合反応性を含まず、抗原部位IIのエピトープに特異的に結合する少なくとも1つの別個の抗-F抗体が存在することが好ましい。より好ましいのは、部位II特異的な抗-F抗体は、抗体バリビズマブとして同一のエピトープまたは抗原部位に結合する。部位II - 特異的な抗体に加えて、1つまたはそれ以上の別個の部位IV - 特異的な抗-F抗体が望ましく、かかる抗体は、好ましくはR S V F 2 - 5として同一のエピトープに結合する。

【0048】

サブタイプ - 特異的な抗-F抗体はまた、当該技術分野で知られている。しかし、Fタンパク質が2つのサブタイプAおよびB間で91%のアミノ酸相同性を示すことから、サブタイプ - 特異的な抗-F抗体は、抗-G抗体におけるよりもより少ない。しかしながら、かかる株 - 特異的な抗-F抗体は、可能な限り広範な特異性を得ることを付与し、それゆえに本発明のポリクローナル抗-R S V抗体の望ましい構成要素である。

【0049】

上で言及された RSV G および F タンパク質抗原に加えて、RSV ウィルスは、第 3 の外被タンパク質である小分子疎水性 (SH) タンパク質を発現する。SH タンパク質由来のペプチドに対して上昇した過免疫血清は、インビトロで RSV を中和することができないことが示されてきた (Akerlind-Stopner et al 1993 J.Med.Viro.40:112-120)。しかしながら、タンパク質は主に感染した細胞で発現されることから、SH タンパク質に対する抗体は、融合の阻害における効果を示し、RSV 感染に対するインビオにおける保護に関連する可能性が考えられる。このことは、SH 遺伝子を欠失する RSV 株が上気道において 10 倍低い効率で複製するという事実により支持される (Bukreyev et al 1997 J.Viro.71:8973-82)。

【0050】

10

本発明のさらなる具体例は、RSV サブタイプ A および B を中和し、抗 - SH 反応性、および抗 - G もしくは抗 - F 反応性を含むことができるポリクローナル抗 - RSV 抗体である。SH タンパク質のアミノ酸 41 から 64 / 65 (サブタイプ A / B) までの範囲の C - 末端は、細胞表面上に露出される。したがって、この領域に局在するエピトープに対する抗 - SH 反応性が望ましい。SH タンパク質の C 末端は、サブタイプ A および B と異なり、それゆえに本発明のポリクローナル抗体におけるサブタイプ A および B の両方に対する抗 - SH 反応性を含むことが望ましい。この SH 反応性は、少なくとも 2 つの別個の抗 - SH 抗体により提供することができ、第 1 の抗体は、SH サブタイプ A に特異的に結合することができ、第 2 の抗体は、SH サブタイプ B に特異的に結合することができる。

【0051】

20

本発明の一の具体例では、ポリクローナル抗 - RSV 抗体は、SH サブタイプ A および / または B に対する特異的反応性ならびに G タンパク質に対する特異的反応性を含む。G タンパク質に対する反応性は、上に記載の反応性のいずれかからなりうる。

【0052】

代替的な具体例では、SH サブタイプ A および / または B に対する特異的な反応性は、上に記載される抗 - F 反応性のいずれかと組み合わされてポリクローナル抗 - RSV 抗体が構成されうる。

【0053】

30

本発明の好ましい具体例では、ポリクローナル抗 - RSV 抗体は、外被タンパク質、F 、G および SH の 3 つ全てに対する反応性を含む。

【0054】

本発明のポリクローナル抗 - RSV 抗体に含まれる反応性は、組合せが RSV サブタイプ A および B を中和することができる限り、表 1 に記載される抗原 / 抗原部位および / またはエピトープに対する特異的な結合反応性を有する別個の抗体のいずれか可能な組合せを構成してもよい。好ましくは、組合せは、少なくとも 2 つの RSV 外被タンパク質に対する反応性を含む。

【0055】

40

好ましくは、本発明によるポリクローナル抗体の個々の別個な抗体メンバーは、それら自身で中和および / または抗 - 炎症特性を有する。しかしながら、これらの特定の特性を持たない抗体もまた、例えば、補体活性を介して、RSV クリアランスに役割を果たしうる。

表 1 : RSV 関連抗原、抗原部位およびエピトープのまとめ

【表1】

| 抗原 | 抗原部位／エピトープ |
|---------|------------------------------------|
| Fタンパク質 | 抗原部位I |
| | 抗原部位II |
| | 抗原部位IV |
| | 抗原部位V |
| | 抗原部位VI |
| | 抗原部位C |
| | F1エピトープ |
| Gタンパク質 | 保存領域(a.a164-176) |
| | サブタイプA特異的 |
| | サブタイプB特異的 |
| | GCCR(a.a171-187) (保存されたおよび株特異的) |
| | CX3Cモチーフ(a.a182-186) |
| | 株特異的 |
| SHTンパク質 | サブタイプA |
| | サブタイプB |

【0056】

好ましくは、本発明のポリクローナル抗体は、抗体分子を自然に発現しないポリクローナル細胞株（組み換えポリクローナル抗体発現とも呼ばれる）由来の単一のバッチまたは数個のバッチとして產生される。モノクローナル抗体を混合することと比較して、組み換えポリクローナル抗体を產生することの有利な点の1つは、（単一のモノクローナル抗体を產生するのと同様のコストで）同時に無制限数の別個の抗体分子を產生する能力である。それゆえ、有意に最終産物のコストを増加させることなく、大量のRSV関連の抗原に対する反応性を有する抗体を含むことが可能である。特に、生物学では完全に理解されていないRSVと同様に複雑な標的に関しては、RSV単独に対して中和または保護することが示されていない個々の抗体は、他の抗体と結合される時に相乗作用を誘導しうる。それゆえ、ポリクローナル抗体組成物中に上に記載されるものに加えて、別個の抗体を含むことは有利な点であり得、わずかな判断基準は、個々の抗体がRSV関連抗原に結合する（例えば、RSV感染細胞への結合により評価される）ことである。好ましくは、上に記載される全てのポリクローナル抗-RSV抗体組成物は、組み換えポリクローナル抗-RSV抗体（抗-RSV r pAb）組成物である。

【0057】

関連抗原として実証されていないが、その可能性のあるRSV標的抗原に結合する潜在的に関連のある抗原を獲得するための1つの方法は、RSVに感染されたドナーの免疫応答（完全な免疫応答）により上昇した個々の抗体からなるポリクローナル抗体組成物を作成することである。RSVに対して完全な免疫応答を示す抗体を得るために加えて、RSV感染の保護、中和、および/または排除に特に関連する可能性のある抗原に結合する抗体に対する陽性選択が行われうる。さらに、RSVの保護、中和および/または排除に関連すると考えられる特定の抗原、抗原部位またはエピトープに対する抗体がドナーの完全な免疫応答において同定されない場合、かかる抗体は、特定の抗原（選択された免疫応答）を有するドナーの免疫付与/ワクチン接種により上昇されてもよい。一般的に、中和は、血小板の減少、マイクロ中和試験または融合阻害アッセイのごときインビトロ中和アッセイにより評価される（例、Johnson et al 1997 J.Infect.Dis 176:1215-24）。したがって、これらのアッセイのうちの1つにおいて有意な効果を示す抗体または抗体組成物は、陰性コントロールと比較した時に中和すると考えられる。保護は、一般的に、例えはコットンラットモデル（例、Johnson et al 1997 J.Infect.Dis 176:1215-24）またはマウスマodel（例、Taylor et al 1984 Immunology 52, 137-142およびMejias, et al 2005 A

10

20

30

40

50

ntimicrob Agents Chemother 49: 4700-4707) におけるインビトロ誘発実験により測定される。インビトロ誘発実験は、抗体がウイルス誘発前に投与される予防様式において、または抗体がウイルス誘発後に投与される治療として実施するか、あるいは両方の組合せとして実施することができる。

【0058】

本発明のポリクローナル抗体組成物は、RSV抗原に結合することができる抗体からなり得、このRSV抗原は必ずしも知られていないか、または必ずしも外被タンパク質ではない（抗体は感染細胞に結合するが、選択された抗原または抗原部位には結合しない）が、抗体は、例えば、RSV感染にかかっているか、またはRSV感染から回復する1つまたはそれ以上のドナーに由来する別個の抗体をコードする核酸配列を得ることにより、RSV感染後の完全な免疫応答から獲得される。第二に、同一の完全な免疫応答に由来する抗体は、特定の抗原、抗原部位および/またはエピトープに結合する能力に基づいて選択され、本発明のポリクローナル抗体に含まれうる。第三に、特定のRSV関連抗原で免疫付与/ワクチン接種され、それによりこれらのドナーで「選択された」免疫応答が上昇された1つまたはそれ以上のドナーから獲得されたV_HおよびV_Lペアからコードされる別個の抗体は、本発明のポリクローナル抗体組成物に含まれうる。したがって、本発明で言及される技術のいずれかに由来する抗体は、単一のポリクローナル抗体に結合されてもよい。好ましくは、本発明の抗体をコードする核酸は、ヒトドナーから得られ、産生された抗体は、完全なヒト抗体である。

10

【0059】

本発明のポリクローナル抗体組成物の背景にある動機は：仮に、RSVに感染したドナーが抗原に対する液性免疫応答を上げる場合、これらの抗体は、少なくともある程度まで、ウイルスのクリアランスに貢献し、それによりポリクローナル抗体産物中の包含にふさわしいようである。

20

【0060】

本発明のさらなる態様は、抗-RSV r p A bを產生することであって、別個の抗体メンバーの組成物は、RSV外被抗原に対する多様性、親和性および特異性に関して液性免疫応答を反映する。好ましくは、液性応答の反映は以下のうちの1つまたはそれ以上が満たされることを確認することにより立証される。i)かかる抗-RSV r p A b中の個々の抗体メンバーのV_HおよびV_L領域をコードする核酸配列が、例えばRSV感染後にRSVに対する液性免疫応答を上げたドナーに由来すること；ii)V_HおよびV_Lをコードする配列が、ドナーに存在するV_HおよびV_Lをコードする配列の元々のペアが維持されるようなドナーから単離されること；iii)r p A bの個々のメンバーをコードするV_HおよびV_Lのペアが、CDR領域が可能な限り多様であるように選択されること；あるいはiv)抗-RSV r p A bの個々のメンバーの特異性が、抗体組成物が哺乳動物における有意な抗体応答を導く抗原に一緒に結合するように選択されること。好ましくは、抗体組成物は、前記ドナーに由来する血清サンプル中で有意な抗体力価を生じる抗原、抗原部位および/またはエピトープに一緒に結合する。かかる抗原、抗原部位および/またはエピトープは、上記表1にまとめられるが、上に記載されるような未知の抗原、抗原部位および/またはエピトープならびに非外被抗原を構成してもよい。好ましくは、ドナーはヒトであり、ポリクローナル抗体は完全なヒト抗体である。

30

【0061】

本発明は、RSV関連抗原に対して結合特異性を有する全長の抗体、Fabフラグメントまたはその他の抗体フラグメントとして表すことができる一連のV_HおよびV_Lペアを同定した。特異的なV_HおよびV_Lペアは、実施例2における表5のクローン数により同定される。表5で同定されるようなV_HおよびV_Lペアを含む抗体は、好ましくは完全なヒト抗体である。しかしながら、望ましくは、キメラ化抗体もまた產生されてもよい。

40

【0062】

本発明の好ましい抗-RSV組み換えポリクローナル抗体は、表5に記載されるV_Hお

50

および V_L ペアーのグループから選択される重鎖および軽鎖 CDR1、CDR2 および CDR3 領域を含む別個のメンバーからなる。好ましくは、CDR 領域は、表 5 に示されるペアで維持され、望ましいフレームワークに組み込まれる。

【0063】

代替的に、第 1 クローンの重鎖由来の CDR 領域 (CDRH) は、第 2 クローンの軽鎖由来の CDR 領域 (CDRL) と結合される (V_H および V_L ペアーの組み換え (scrambling))。CDR 領域はまた、例えば、第 1 クローン由来の CDRL1 領域を第 2 クローン由来の CDRL2 および CDRL3 領域と結合することにより、軽鎖または重鎖内で組み換えられてもよい。かかる組み換えは、好ましくは同一抗原に結合するクローン間で行われる。本発明の CDR 領域はまた、例えば、点変異による親和性成熟を受けてもよい。

10

【0064】

可変重鎖および可変軽鎖をコードするペアーの単離および選択

抗-RSV 組み換えポリクローナル抗体組成物を作成するプロセスは、適する起源に由来する可変重鎖 (V_H) および可変軽鎖 (V_L) をコードし、それにより V_H および V_L をコードするペアーのレパートリーを作成する配列の単離に関する。一般的に、 V_H および V_L をコードする配列を得るために適する起源は、RSV に感染されたか、または RSV 感染から回復した動物またはヒトに由来するか、あるいは RSV 株またはかかる株に由来するタンパク質もしくは DNA で免疫付与 / ワクチン接種された動物またはヒトに由来する血液、脾臓または骨髄サンプルのごとき細胞画分を含むリンパ球である。好ましくは、画分を含むリンパ球は、ヒトまたはヒト免疫グロブリン遺伝子を有するトランスジェニック動物から採集される。細胞画分を含む採集されたリンパ球は、さらに特定のリンパ球集団、例えば、B リンパ球系列に由来する細胞を得るために濃縮されてもよい。好ましくは、濃縮は、例えば B 細胞、形質芽細胞および / または血漿細胞に対して系列特異的細胞表面マーカータンパク質の特性を利用する、磁気ビーズ細胞分離装置 (MACS) および / または蛍光標示式細胞分取器 (FACS) を用いて行われる。好ましくは、細胞画分を含むリンパ球は、B 細胞、形質芽細胞および / または血漿細胞に関して濃縮される。さらにより好ましくは、高い CD38 発現および中間体 CD19 および / または CD45 発現を有する細胞が血液から単離される。これらの細胞は時々、循環血漿細胞、初期血漿細胞または形質芽細胞と呼ばれる。簡潔にするため、本発明では、それらは他の用語が同じ意味で用いられるとしても単に血漿細胞と呼ぶ。

20

【0065】

V_H および V_L をコードする配列の単離は、 V_H および V_L をコードする配列がランダムにベクターに結合して V_H および V_L をコードする配列ペアーの組合せライブラリーを作成する従来の方法において行うことができる。しかしながら、本発明では、RSV 感染による液性免疫応答で產生される抗体の多様性、親和性および特異性を反映することが好ましい。このことは、ドナーに元々存在する V_H および V_L ペアーの維持に関連し、それにより配列が単離されるドナーから產生された抗体に元々存在する V_H および V_L ペアーに相当する可変重鎖 (V_H) および可変軽鎖 (V_L) をコードする各配列ペアーのレパートリーを生じる。これは V_H および V_L をコードする配列の同種ペアーとも呼ばれ、この抗体は同種抗体と称される。好ましくは、本発明の V_H および V_L をコードするペアー、組合せまたは同種は、ヒトドナーから得られ、それゆえ配列は完全にヒトのものである。

30

【0066】

V_H および V_L をコードする配列の同種ペアーを作成するためのいくつかの異なる方法が存在する。1つの方法は、リンパ球含有細胞画分から分離される单一細胞に由来する V_H および V_L をコードする配列の増幅と単離に関する。 V_H および V_L をコードする配列は、別々に増幅され、第二工程で組み合わされてもよく、あるいは、それらは増幅中に組み合わされてもよい (Coronella et al 2000 Nucleic Acids Res 28: E85; Babcock et al 1996 PNAS 93: 7843-7848 および WO 05/042774)。第 2 の方法は、細胞内 (in-cell) 増幅ならびに V_H および V_L をコードする配列の組合せに関する (Embleton et al

40

50

1992 Nucleic Acids Res 20: 3831-3837; Chapal et al 1997. BioTechniques 23: 518-524)。第3の方法は、溶血ブラークアッセイをV_HおよびV_LのcDNAクローニングと組み合わせる選択リンパ球抗体法(SLAM)である(Babcock et al 1996 PNAS 93:7843-7848)。ドナーにおけるV_HおよびV_L配列ペアの多様性を擬似するV_HおよびV_Lをコードする配列のペアのレパートリーを得るために、V_HおよびV_Lペアの組み換え(ランダムな組合せ)ができる限り生じないハイスループット法が好ましく、例えば(本明細書に援用される)WO 05/042774に記載される。

【0067】

本発明の好ましい具体例では、V_HおよびV_Lをコードするペアのレパートリーは、メンバーのペアがRSV感染から生じる液性免疫応答に関連する遺伝子のペアを反映し、工程i) RSVに感染したか、またはRSV感染から回復したドナーに由来するリンパ球含有細胞画分を提供し；ii)任意選択的に、前記細胞画分からB細胞または血漿細胞を濃縮し、；iii)前記細胞画分各々に由来する細胞を複数の容器に分配することを含む、単離された単一細胞の集団を得；iv)前記単離された単一細胞に由来する鑄型を用いて、多重重複伸長RT-PCR法において増幅し、V_HおよびV_Lをコードするペアの連結を生じさせ、次いでv)任意選択的に、連結されたV_HおよびV_Lをコードするペアのネスティド(nested)PCRを行うことを含む方法にしたがって作成される。好ましくは、単離された同種V_HおよびV_Lをコードするペアは、以下に記載されるようにスクリーニングの手法にかけられる。

【0068】

一度V_HおよびV_L配列のペアが作成されると、RSV関連抗原に対する結合反応性を有するV_HおよびV_Lペアをコードする配列を同定するスクリーニング手法が行われる。好ましくは、RSV関連抗原はRSV外被タンパク質、特にRSV Gタンパク質、RSV Fタンパク質およびRSV SHタンパク質である。V_HおよびV_L配列のペアが組み合わされる場合、スクリーニングの前に、RSVに結合する抗体フラグメントをコードするV_HおよびV_Lペアを濃縮するためにファージディスプレイ法を適用することができる。

【0069】

RSVによる感染により液性免疫応答時に產生される抗体の多様性、親和性および特異性を反映するために、本発明は、出来る限り最も広範な多様性を得るために、同種ペアのためのスクリーニング手法を発展させた。スクリーニングのために、同種V_HおよびV_Lをコードするペアのレパートリーは、適する宿主細胞にトランスフェクトされる細菌または哺乳動物のどちらかのスクリーニングベクターを用いて、抗体フラグメント(例、scFvもしくはFab)または全長抗体としてのどちらかで個々に発現される。Fab/抗体のレパートリーは、1つまたはそれ以上のRSV株のウイルス粒子に対する反応性について選択される。好ましくは、少なくとも2つの株、サブタイプAのうちの1つおよびサブタイプBのうちの1つが用いられる。サブタイプA株は、例えば、Long(ATCC VR-26)、A2(ATCC VR-1540)または最近のLong様サブタイプA分離株である。サブタイプB株は、例えば、18537(ATCC VR-1580)、B1(ATCC VR-1400)、9320(ATCC VR-955)または最近の18537様分離株である。同時に、Fab/抗体のレパートリーは、組み換えGタンパク質、組み換えFタンパク質およびRSV抗原に由来するペプチドのごとく選択された抗原に対して選択される。抗原ペプチドは、例えば、Gタンパク質保存領域(アミノ酸164-176)およびGタンパク質のシステインコア領域(サブタイプAならびにサブタイプB株のアミノ酸171-187)、ならびにSHタンパク質の細胞外領域(サブタイプAのアミノ酸42-64およびサブタイプBの42-65)から選択されうる。好ましくは、スクリーニング中のビーズまたはプレートにおける固定を容易にするために、ペプチドがビオチン化される。代替的な固定の方法が用いられてもよい。抗原は、RSVの生物学の知見および期待される中和および/または保護効果に基づいて選択され、これらの抗原に結合することができる可能性のある抗体が提供できる。このスクリーニング手法

10

20

30

40

50

は、同様にして組み合わせファージディスプレイライブラリーに適用されうる。スクリーニングに用いられる組み換え G および / または F タンパク質は、細菌、昆虫細胞、哺乳動物細胞または別の適切な発現系において発現されうる。G および / または F タンパク質は、(膜貫通領域のない) 可溶性タンパク質として発現されるか、または 3 番目のタンパク質に融合されるかのどちらかで安定性が上昇されてもよい。G および / または F タンパク質が融合タグと一緒に発現される場合、融合の相手方は、スクリーニング前に切り離されてもよい。好ましくは、サブタイプ A およびサブタイプ B の両方の典型例である G および / または F タンパク質は、スクリーニングのために発現され、用いられる。加えて、株特異的 G タンパク質もスクリーニングのために発現され、用いられる。上に記載される一次スクリーニングに加えて、選択された配列が擬陽性をコードしていないことを確実にするため、二次スクリーニングが実施されてもよい。二次スクリーニングでは、一次スクリーニングで同定した V_H および V_L ペアに結合する全ての RSV / 抗原が、ウイルス株および選択された抗原の両方に対して再度選択される。一般的に、免疫学的アッセイは、本発明で実施されるスクリーニングに適する。かかるアッセイは当該技術分野においてよく知られ、例えば、ELISPOTS、ELISA、FLISA、膜アッセイ(例、ウェスタンプロット)、フィルターを用いる解析、および FACS を構成する。前記アッセイは、前の濃縮工程がなくても V_H および V_L ペアをコードする配列から産生されるポリペプチドを利用して行うことができる。 V_H および V_L をコードするペアのレパートリーが同種ペアである事象では、例えば、ファージディスプレイによる濃縮は、スクリーニングの前には必要とされない。しかしながら、組み合わせライブラリーのスクリーニングでは、免疫アッセイは、好ましくは、ファージディスプレイ、リボソームディスプレイ、細菌表面ディスプレイ、酵母ディスプレイ、真核生物ウイルスディスプレイ、RNAディスプレイまたはコバレント(covalent)ディスプレイのごとき濃縮方法と組み合わせまたは濃縮方法の後に行われる(Fitz Gerald, K., 2000. Drug Discov. Today 5, 2 53-258にて総説される)。

10

20

30

40

【0070】

スクリーニングで選択された配列をコードする V_H および V_L ペアは、一般的に、配列決定(sequencing)にかけられ、可変領域の多様性に関して解析される。特に、CDR領域における多様性が興味深いが、 V_H および V_L ファミリーの発現もまた興味深い。これらの解析に基づいて、1つまたはそれ以上のドナーから単離された RSV 結合抗体の全体の多様性を表す V_H および V_L ペアをコードする配列が選択される。好ましくは、全ての CDR 領域(CDRH1、CDRH2、CDRH3 ならびに CDRL1、CDRL2 および CDRL3)に相違を持つ配列が選択される。異なる V_H および V_L ファミリーに属する1つまたはそれ以上の同一または非常に類似した CDR 領域を持つ配列が存在する場合、これらも選択される。好ましくは、少なくとも可変重鎖の CDR3 領域(CDRH3)は、選択された配列のペア間で異なる。潜在的に、 V_H および V_L 配列ペアの選択は、単に CDRH3 領域の可変性に基づくことができる。プライミングおよび配列の増幅中に、可変領域のフレームワーク領域、特に最初のフレームワーク領域において変異が生じうる。好ましくは、最初のフレームワーク領域で起きるエラーは、例えば、配列が完全なヒトであるようなドナーの配列に完全にまたは少なくとも 98% 対応することを確実にするために修復される。

【0071】

V_H および V_L ペアをコードする選択された配列のコレクションの全体の多様性が、RSV 感染に対する液性反応における遺伝子レベルで見られる多様性をよく表すことが確実である場合、選択された V_H および V_L をコードするペアのコレクションから発現される抗体の全体の特異性もまた、RSV 感染ドナーで産生される抗体の特異性を表すことが期待される。選択された V_H および V_L をコードするペアのコレクションから発現される抗体の特異性が、感染したドナーで上昇された抗体の特異性を表すかどうかの指標は、ウイルス株ならびにドナー血液のうちの選択された抗原に対する抗体力値を、選択された V_H および V_L をコードするペアのコレクションから発現される抗体の特異性と比較

50

することにより得ることができる。加えて、選択された V_H および V_L をコードするペアのコレクションから発現される抗体の特異性がさらに解析されうる。特異性の程度は、検出することができる結合反応性に対する異なる抗原の数に相関する。本発明のさらなる具体例では、選択された V_H および V_L をコードするペアのコレクションから発現される個々の抗体の特異性は、エピトープマッピングにより解析される。

【0072】

エピトープマッピングは、多くの方法により行われてもよく、それらは必ずしも相互に排斥しない。抗体クローンのエピトープ特異性をマップする1つの方法は、標的抗原の一次構造に由来する各種大きさのペプチドへの結合性を評価することである。かかるペプチドは、直鎖状および立体構造の両方であってもよく、ELISA、FLISAおよび表面プラズモン共鳴法(SPR、Biacore)を含む多くのアッセイ形式で用いられてよい。

10

【0073】

さらに、ペプチドは、例えば、標的抗原の細胞外領域または保存領域を表す利用可能な配列および構造データを用いて合理的に選択されてもよく、あるいは、ペプチドは、抗原の選択された部分または全てを表す重複するペプチドのパネルとして設計されてもよい(Meloen RH, Puijk WC, Schaaper WMM. Epitope mapping by PEPSCAN. In: Immunology Methods Manual. Ed Iwan Lefkovits 1997, Academic Press, pp 982-988)。

20

【0074】

1つまたはそれ以上のかかるペプチドを有する抗体クローンの特異的な反応性は、一般的にエピトープ特異性の指標である。しかしながら、ペプチドは、多くの場合、立体構造の欠如のため、および抗体とタンパク質で比較されるような抗体とタンパク質抗原間の相互作用の一般的に大きな埋もれた表面積のため、タンパク質性抗原に対して高まった抗体により認識されるエピトープの模倣性に乏しい。エピトープマッピングの第2の方法は、タンパク質抗原において直接的に特異性を定めることができ、従来のよく定められた抗体を用いてマスクする選択的エピトープによるものである。プロッキング後に抗原に対して2番目に結合する抗体の結合性の減少は、共有または重複エピトープの一般的な指標である。選択的なマスクによるエピトープマッピングは、多くの免疫アッセイにより行われてもよく、当該技術分野でよく知られるELISAおよびBiacoreを含むが、これらだけに限定されない(例、Ditzel et al. 1997 J.Mol.Biol. 267:684-695; Aldaz-Carroll et al. 2005 J.Viro. 79: 6260-6271)。抗-ウイルス抗体のエピトープ特異性を調べるためにさらに別の可能な方法は、抗体の存在下におけるウイルスエスケープ変異体の選択である。かかるエスケープ変異体からの目的遺伝子の配列決定は、一般に、抗体による認識に重要であって、エピトープ(の一部)を構成する抗原におけるアミノ酸を明らかにする。

30

【0075】

好ましくは、本発明の抗-RSV r pAbに含まれる個々のメンバーは、抗体組成物の特異性が共同で、RSVサブタイプAとBの両方、およびRSV関連抗原タンパク質FとG、ならびに好ましくはGを網羅するように選択される。

40

【0076】

選択された V_H および V_L をコードするペアに由来する組み換えポリクローナル抗体の產生

本発明のポリクローナル抗体は、1また数個のバイオリアクターまたはそれらの等価物中でポリクローナル発現細胞株から產生される。この方法の後に、抗-RSV r pAbは、そのプロセスの間に抗-RSV r pAbを構成する個々のメンバーを分離することなく、単一の調製物としてリアクターから精製することができる。ポリクローナル抗体が1つ以上のバイオリアクターで產生される場合、各バイオリアクターからの上澄み液は、精製前にプールされうるか、あるいは精製された抗-RSV r pAbは、各バイオリアクターから各々精製された上澄み液から得られた抗体をプールすることにより得られうる。

50

【0077】

組み換えポリクローナル抗体を產生する1つの方法は、WO 2004/061104およびWO 2006/007850 (PCT/DK2005/000501)に記載される(これらの文献は出典明示により本明細書に援用する)。本明細書に記載される方法は、抗体をコードする配列の各宿主細胞のゲノムへの部位特異的な組み込みを基にし、 V_H および V_L タンパク質鎖が、生成期間に元々のペアで維持されることを確実にする。さらに、部位特異的な組み込みは、位置効果を最小限にし、それゆえ、ポリクローナル細胞株における個々の細胞の増殖と発現の特性がきわめて類似することが期待される。一般に、前記方法は以下に関する: i) 1つまたはそれ以上のリコンビナーゼ認識部位を有する宿主細胞; ii) 宿主細胞に適合する少なくとも1つのリコンビナーゼ認識部位を有する発現ベクター; iii) 全長抗体または抗体フラグメントがベクターから発現されうるように、選択された V_H および V_L をコードするペアをスクリーニングベクターから発現ベクターに移すことによる発現ベクターコレクションの作成(かかる移行は、必ずしもスクリーニングベクターが発現ベクターと同一である必要はない); iv) 発現ベクターおよび宿主細胞のゲノム中のリコンビナーゼ認識部位をベクター中の認識部位と結合させることができ可能なリコンビナーゼをコードするベクターのコレクションによる宿主細胞のトランスフェクション; v) トランスフェクトされた宿主細胞からポリクローナル細胞株を得ること/作成すること、次いで vi) 前記ポリクローナル細胞株からポリクローナル抗体を発現させ、収集すること。

10

【0078】

好ましくは、CHO細胞、COS細胞、BHK細胞、骨髄腫細胞(例、Sp2/0またはNS0細胞)のごとき哺乳動物細胞、NIH3T3のごとき線維芽細胞、ならびにHeLa細胞、HEK293細胞、またはPER.C6のごとき不死化ヒト細胞が用いられる。しかしながら、植物細胞、昆虫細胞、酵母細胞、真菌、E.coliなどのごとく非哺乳動物の真核または原核細胞もまた用いられる。適する宿主細胞は、そのゲノム中に1つまたはそれ以上の適するリコンビナーゼ認識部位を含む。宿主細胞はまた、組み込み体を選択することができるために、組み込み部位に作動可能に連結される選択様式を含むべきである(すなわち、組み込み部位中に抗-RSV Ab発現ベクターまたは発現ベクターフラグメントの組み込まれたコピーを有している細胞)。ゲノム中の予定された位置にFRT部位を有する細胞の調製物は、例えば、US 5,677,177に記載された。好ましくは、宿主細胞は単一の組み込み部位のみを有し、その部位は組み込み体の高発現を可能にする部位(いわゆるホットスポット)に位置される。

20

【0079】

適する発現ベクターは、宿主細胞のリコンビナーゼ認識部位に適合する組み換え認識部位を含む。好ましくは、リコンビナーゼ認識部位は、宿主細胞の構築に用いられる選択遺伝子とは異なる適切な選択遺伝子に連結される。選択遺伝子は、当該技術分野においてよく知られ、グルタミン合成酵素遺伝子(GS)、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子(DHFR)、およびネオマイシンを含み、GSまたはDHFRは、挿入された V_H および V_L 配列の遺伝子増幅に用いられてもよい。ベクターはまた、ベクターの完全な組み込みの代わりに、抗体をコードする配列のリコンビナーゼ介在カセット交換(Recombinase-mediated cassette exchange; RMCE)を可能にする2つの異なるリコンビナーゼ認識部位を含んでもよい。RMCEは、Langer et al 2002. Nucleic Acids Res. 30, 3067-3077; Schlake and Bode 1994. Biochemistry 33, 12746-12751およびBelteki et al 2003. Nat.biotech. 21, 321-324に記載される。適するリコンビナーゼ認識部位は当該技術分野でよく知られ、FRT、loxおよびattP/attB部位を含む。好ましくは、組み込みベクターは、アイソタイプをコードするベクターであり、定常領域(好ましくはイントロンを含む)は、スクリーニングベクターからの V_H および V_L をコードするペアの移行前のベクターに存在する(あるいは、スクリーニングが全長抗体において行われる場合、定常領域はスクリーニングベクター中にすでに存在する)。ベクターに存在する定常領域は、全体の重鎖定常領域(CH₁からCH₃またはCH₄まで)であるか、抗体のFc部分をコードする定常領域(CH₂からCH₃またはCH₄まで)である。

30

40

50

H_4 まで)のどちらかであり得る。軽鎖カッパまたはラムダ定常領域はまた、移行前に存在してもよい。定常領域数の選択は、存在するとしても用いられるスクリーニングおよび移行システムに依存する。重鎖の定常領域は、アイソタイプ IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgM、IgDおよびIgEから選択することができる。好ましいアイソタイプは、IgG1および/またはIgG3である。さらに、抗-RSV抗体をコードする核酸の部位特異的な組み込みのための発現ベクターは、 V_H および V_L 鎖の各々の高レベル発現を指示する適切なプロモーターまたはその等価な配列を含む。図3は、発現ベクターを設計するための1つの可能な方法を示すが、他の多くの設計も可能である。

【0080】

10

スクリーニングベクターからの選択された V_H および V_L をコードするペアの移行は、各発現ベクター分子が1つの V_H および V_L をコードするペアを含むように、慣用的な制限酵素切断およびライゲーションにより行うことができる。好ましくは、 V_H および V_L をコードするペアは各々移行されるが、任意選択的に、まとめて移行されてもよい。全ての選択された V_H および V_L をコードするペアが発現ベクターに移行されると、発現ベクターのコレクションまたはライブラリーが得られる。移行の代替的な方法は、任意選択で用いられてもよい。スクリーニングベクターが発現ベクターと同一である場合、発現ベクターのライブラリーは、スクリーニング中に選択された V_H および V_L 配列ペアからなり、それらはスクリーニング/発現ベクター中に配置される。

【0081】

20

核酸配列を宿主細胞にトランスフェクトする方法は当該技術分野において周知である。部位特異的な組み込みを確実にするために、適切なリコンビナーゼが宿主細胞にも提供されるべきである。これは、好ましくはリコンビナーゼをコードするプラスミドの共トランスフェクションにより達成される。適切なリコンビナーゼは、例えば、F1p、Creまたはファージ C31インテグラーゼであり、対応するリコンビナーゼ認識部位を有する宿主細胞/ベクターシステムと一緒に用いられる。宿主細胞は、まとめてトランスフェクトされ得、それは、発現ベクターのライブラリーが1回の単一反応で細胞株にトランスフェクトされ、それによりポリクローナル細胞株を得ることを意味する。代替的に、発現ベクターのコレクションは、宿主細胞に個別にトランスフェクトされ、それにより個々の細胞株のコレクションを作成することができる(各細胞株は特定の特異性を有する抗体を產生する)。次いで、トランスフェクションにより作成された細胞株(各々またはポリクローナル)は、トランスフェクション前にまだこれらの特性を示さなかつた場合、部位特異的な組み込み体について選択され、懸濁液および血清を含まない培地で増殖させるのに用いられる。トランスフェクションが個別に実施された場合、個々の細胞株は、それらの増殖特性および抗体產生に関してさらに解析される。好ましくは、同様の増殖速度および抗体発現レベルを有する細胞株は、ポリクローナル細胞株の作成について選択される。次に、ポリクローナル細胞株は、個々の細胞株を所定の割合で混合することにより作成される。一般に、ポリクローナルマスター細胞バンク(pMCB)、ポリクローナルリサーチ細胞バンク(pRCB)および/またはポリクローナルワーキング細胞バンク(pWCB)がポリクローナル細胞株から構築される。ポリクローナル細胞株は、個々の細胞株を所定の割合で混合することにより作成される。ポリクローナル細胞株は、アンプルに分配され、それによりポリクローナルリサーチ細胞バンク(pRCB)またはマスター細胞バンク(pMCB)を作成し、ポリクローナルワーキング細胞バンク(pWCB)は、リサーチまたはマスター細胞バンクから細胞を増殖させることにより作成することができる。リサーチ細胞バンクは、主として概念研究の証拠のためのものであり、ポリクローナル細胞株は、マスター細胞バンクにおけるポリクローナル細胞株ほど多くの個々の抗体を含み得ない。通常、pMCBは、產生のためにpWCBを構築するためにさらに増殖させられる。pWCBが使い果たされると、pMCBからのアンプルが増殖させられて新しいpWCBを構築することができる。

【0082】

50

本発明の一の具体例は、本発明の組み換えポリクローナル抗-RSV抗体を発現することができるポリクローナル細胞株である。

【0083】

本発明のさらなる具体例は、各々個別の細胞が単一のV_HおよびV_Lをコードするペア-を発現することができるポリクローナル細胞株であって、前記ポリクローナル細胞株が、全体としてV_HおよびV_Lをコードするペア-のコレクションを発現することができ、各V_HおよびV_Lのペア-が抗-RSV抗体をコードする。好ましくは、V_HおよびV_Lをコードするペア-のコレクションは、本発明の方法により作成される同種ペア-である。

【0084】

本発明の組み換えポリクローナル抗体は、抗体の十分な発現が可能な期間、適切な培地中でpWC-Bからの1つのアンプルを培養することにより発現され、このポリクローナル細胞株は安定した状態を保つ（期間（window）はおよそ15日と50日の間である）。流加または灌流のごとき培養方法が用いられてもよい。組み換えポリクローナル抗体は、培地から得られ、慣用的な精製技術により精製される。イオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用およびゲルろ過のごとく後の精製工程と一緒にしたアフィニティークロマトグラフィーがIgGの精製によく用いられる。精製後、ポリクローナル抗体組成物中の全ての個々のメンバーの存在が、例えば、イオン交換クロマトグラフィーにより試験される。ポリクローナル抗体組成物の特徴付けは、WO 2006/007853 (PCT/DK2005/000504)（出典明示により本明細書に援用する）に詳細に記載される。

10

20

【0085】

組み換え宿主において抗体の混合物を発現させる代替的な方法は、WO 04/009618に記載される。この方法は、単一の細胞株に由来する同一の軽鎖に結合した異なる重鎖を有する抗体を生成する。この方法は、抗-RSV r pAbが組み合わせライブリーから產生される場合に適用してもよい。

【0086】

治療用組成物

本発明の別の態様は、活性成分として抗-RSV r pAbもしくは抗-RSV組み換えポリクローナルFabまたは別の抗-RSV組み換えポリクローナル抗体フラグメントを含む医薬組成物である。好ましくは、かかる組成物の活性成分は、本発明に記載されるような抗-RSV組み換えポリクローナル抗体である。かかる組成物は、RSV感染の予防および/または治療を目的とする。好ましくは、医薬組成物は、ヒト、家畜、またはペットに投与される。

30

【0087】

医薬組成物は、医薬上許容される賦形剤をさらに含む。

【0088】

抗-RSV r pAbまたはそのポリクローナルフラグメントは、单一用量形態において、医薬上許容される希釈剤、担体、または賦形剤内で投与されてもよい。慣用的な医薬上の実施が用いられることにより、RSVに感染した患者、またはRSVに感染するリスクの高いであろう患者に投与するのに適切な製剤または組成物が提供されてもよい。好ましい具体例では、投与は予防である。別の好ましい具体例では、投与は治療であり、RSV感染に関連する症状の発症後に投与されることを意味する。適切な投与経路が用いられてもよく、例えば、投与は、非経口、静脈内、動脈内、皮下、筋肉内、腹腔内、鼻腔内、エアロゾル、座剤、または経口投与であってもよい。例えば、医薬製剤は、液状溶液または懸濁液の形態であってもよく、経口投与用には、製剤は、錠剤、カプセル、チューインガムまたはペースト状の形態であってもよく、鼻腔内用には、粉末、点鼻剤、またはエアロゾルの形態であってもよい。

40

【0089】

本発明の医薬組成物は、例えば、従来の溶解、凍結乾燥、混合、顆粒化または調合プロセスを用いて、それ自体周知な手法で調製される。医薬組成物は、慣用的な製薬の実施に

50

従つて製剤化されてもよい(例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy (20th ed.), ed. A.R.Gennaro, 2000, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PAおよびEncyclopedia of Pharmaceutical Technology, eds.J.Swarbrick and J.C. Boylan, 1988-1999, Marcel Dekker, New York, NYを参照。)。

【0090】

好ましくは、活性成分の溶液もしくは懸濁液、特に等張水溶液もしくは懸濁液は、本発明の医薬組成物を調製するのに用いられる。活性成分のみまたは担体、例えば、マンニトールと一緒にになった活性成分を含む凍結乾燥された組成物の場合、かかる溶液もしくは懸濁液は、可能であるならば、使用前に產生されてもよい。医薬組成物は、滅菌されていてもよく、ならびに/あるいは賦形剤、例えば、保存剤、安定化剤、湿潤剤および/または乳化剤、可溶化剤、浸透圧を調節する塩および/または緩衝液を含んでいてもよく、例えば、慣用的な溶解または凍結乾燥プロセスを用いて、それ自身よく知られる手法で調製される。前記溶液もしくは懸濁液は、カルボキシメチルセルロースナトリウム、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルピロリドンまたはゼラチンのごとき粘度増加物質を含んでもよい。

10

【0091】

注入組成物は、滅菌状態下で慣用的な手法において調製される；同じく、組成物をアンプルまたはバイアルに導入し、容器を密閉することに適用する。

【0092】

経口投与のための医薬組成物は、活性成分を液体担体と一緒にすることにより、望ましくは生じた混合物を顆粒化し、次いで、所望または必要であるならば、適切な賦形剤を錠剤、ピル、またはカプセルへ添加した後、混合物を処理することにより得ることができ、セラック、糖またはその両方でコートされていてもよい。それらはまた、活性成分を一定量で拡散し、または解離されうるプラスティック担体に取り込まれることも可能である。

20

【0093】

医薬組成物は、約1%から約95%まで、好ましくは約20%から約90%までの活性成分を含む。本発明による医薬組成物は、例えば、アンプル、バイアル、座薬、錠剤、ピル、またはカプセルの形態のごとき単一用量の形態であってもよい。製剤は、治療上または予防上有効量(例、病態を予防、排除、または軽減する量)でヒトの個体に投与されることにより、病気または状態に対する治療が提供されうる。投与される治療剤の好ましい用量は、RSV感染の重症度、各患者の総体的な健康状態、化合物賦形剤の剤形、およびその投与経路のごとき変動するものに依存すると考えられる。

30

【0094】

本発明による組成物の治療上の使用

本発明による医薬組成物は、哺乳動物における病気の治療、改善または予防に用いられてもよい。本願の医薬組成物で治療または予防することができる状態は、RSVに感染した患者の治療、またはRSVに感染するリスクのある患者、特にRSVに感染する高いリスクを有する患者の予防、および治療を含む。高いリスクの患者は、例えば、幼児および小さい子供である。特に、慢性肺疾患または先天性心疾患のごとき問題を抱える未熟な幼児および子供は、RSV感染後に細気管支炎および肺炎のごとき深刻な病気に対して最も高いリスクを有する。また、免疫不全の成人、特に骨髄移植被提供者、高齢者および慢性肺疾患にかかっている患者のごとき高いリスクの成人は、好ましくは、本発明による医薬組成物による予防または治療上の処置を受けることができる。

40

【0095】

本発明の一の具体例は、哺乳動物におけるRSV感染に関連した1つまたはそれ以上の症状を予防、治療または改善する方法であって、前記哺乳動物に本発明の抗-RSV組み換えポリクローナル抗体の有効量を投与することを含む。

【0096】

本発明のさらなる具体例は、哺乳動物におけるRSV感染に関連した1つまたはそれ以上の症状の治療、改善または予防のための組成物の調製のための本発明の抗-RSV組み

50

換えポリクローナル抗体の使用である。

【0097】

好ましくは、上記具体例における哺乳動物は、ヒト、家畜またはペットである。

【0098】

さらなる具体例では、RSV感染に関連した1つまたはそれ以上の症状を予防、治療または改善する方法を受けさせる哺乳動物は、好ましくは40kgを超える体重を有する。

【0099】

対象がヒトである具体例では、好ましくは、未成熟な幼児、慢性肺疾患または先天性心疾患にかかっている子供である。代替的な具体例では、ヒトは、免疫不全の成人、特に骨髓移植被提供者、高齢者または慢性肺疾患にかかっている個体である。

10

【0100】

診断上の使用

本発明の別の具体例は、診断用キットを目的とする。本発明によるキットは、本発明に従って調製される抗-RSV r pAbを含み、このタンパク質は、検出可能な標識で標識されていてもよく、または非標識検出用に標識されていなくてもよい。キットは、RSVで感染された個体を同定するのに用いられてもよい。

【0101】

本発明の抗体分子およびそれに関連した態様

本明細書で開示される新規な抗体分子がそれら自体の権利において技術常識に貢献すると信じられることは特筆されるべきである。したがって、本発明はまた、本明細書で開示される抗体分子のいずれか1つならびにこれらの抗体のフラグメントおよびアナログに関連し、前記フラグメントまたはアナログは、少なくとも本明細書で開示される抗体のCDRを含む。

20

【0102】

例えば、ヒトのドナーから単離された完全なヒト抗体分子のいずれかは、抗原結合部位としては、公知の従来技術のモノクローナル抗体を超えた極めて高い改善された動力学的特性を示す結合部位を含むことが本発明者らにより見出された。それゆえ、本願の開示におけるポリクローナル抗体組成物に多くの着目がなされたとしても、本明細書で説明されるポリクローナル抗体の利用に関する全ての対象物はまた、本明細書で開示される単一の抗体分子のうちのいずれか1つに関連する。- すなわち、本発明のポリクローナル抗体組成物に関連する製剤化、用量、投与などに関する全ての開示は、本明細書で開示される個々の抗体分子、抗体フラグメントおよび抗体アナログ、好ましくはフレームワーク配列に準用する。

30

【0103】

したがって、本発明はまた、本明細書中の表5に記載される抗体分子から選択される単離ヒトRSV-抗体分子、あるいは前記単離抗体分子に特異的に結合するフラグメントまたは合成もしくは半合成抗体アナログであって、前記結合するフラグメントまたはアナログは、少なくとも前記単離抗体分子の相補性決定領域(CDR)を含むものに関連する。多くの場合、元々のヒト抗体の可変領域に由来するフレームワーク領域は、抗体の抗原特異性がCDRおよびフレームワーク領域の3D構成によることが知られるところから、フラグメントまたはアナログにも含まれる。

40

【0104】

用語「単離された抗体分子」は、天然の夾雑物から単離され、同一のアミノ酸配列(すなわち、同一の可変領域および定常領域)を示す別個の抗体コレクションを表すことが意図される。

【0105】

典型的に、抗体分子、フラグメントまたはアナログは、表8に記載される抗体に由来するか、あるいは、配列番号：1-44のうちの1つに含まれる重鎖CDRアミノ酸配列および配列番号：1-44から選択されるアミノ酸配列より88高い配列番号：を有する付随の軽鎖CDRアミノ酸配列を含む。このことは、抗体分子、フラグメントまたはアナロ

50

グが上に記載される 44 個のクローン以外の同一物から見出される可変領域の同種のペアーを含むことを意味する。

【0106】

上に記載されるように、多くの本抗体分子は、非常に高い親和性を示し、本発明はまた、ヒト抗体に由来する F_ab 中の CDR に同一の CDR を含む、単離された抗体分子、抗体フラグメントまたは合成もしくは半合成抗体アナログに関連し、前記 F_ab は、物質輸送時の制限を避けるために極めて低い密度でセンサー表面上に固定された組み換え RSV-G タンパク質を用いて、Biacore 3000において表面プラズモン共鳴分析を実施して測定した場合、500 nM またはそれ以下の RSV-G タンパク質の解離定数 K_D を示す。单離された抗体分子、抗体フラグメントまたは合成もしくは半合成抗体は、典型的に、400 nM またはそれ以下、例えば、300 nM またはそれ以下、200 nM またはそれ以下、100 nM またはそれ以下、1 nM またはそれ以下、900 pM またはそれ以下、800 pM またはそれ以下、700 pM またはそれ以下、600 pM またはそれ以下、500 pM またはそれ以下、400 pM またはそれ以下、300 pM またはそれ以下、200 pM またはそれ以下、100 pM またはそれ以下、90 pM またはそれ以下、および 80 pM またはそれ以下のときより低い K_D を示す。

【0107】

本発明の別の具体例は、ヒト抗体に由来する F_ab 中の抗原結合部位に同一の抗原結合部位を含む、単離された抗体分子、抗体フラグメントまたは合成もしくは半合成抗体アナログに関連し、前記 F_ab は、物質輸送時の制限を避けるために極めて低い密度でセンサー表面上に固定された組み換え RSV-G タンパク質を用いて、Biocore 3000において表面プラズモン共鳴分析を実施して測定した場合、500 nM またはそれ以下の RSV-F タンパク質の解離定数 K_D を示す。この单離された抗体、抗体フラグメントまたは合成もしくは半合成抗体は、典型的に、400 nM またはそれ以下、例えば、300 nM またはそれ以下、200 nM またはそれ以下、100 nM またはそれ以下、1 nM またはそれ以下、900 pM またはそれ以下、800 pM またはそれ以下、700 pM またはそれ以下、600 pM またはそれ以下、500 pM またはそれ以下、400 pM またはそれ以下、300 pM またはそれ以下、200 pM またはそれ以下、100 pM またはそれ以下、90 pM またはそれ以下、80 pM またはそれ以下、70 pM またはそれ以下、60 pM またはそれ以下、50 pM またはそれ以下、40 pM またはそれ以下、30 pM またはそれ以下、25 pM またはそれ以下、20 pM またはそれ以下、15 pM またはそれ以下、10 pM またはそれ以下、9 pM またはそれ以下、8 pM またはそれ以下、7 pM またはそれ以下、6 pM またはそれ以下、および 5 pM またはそれ以下のとき K_D を示す。

【0108】

特に有用な抗体分子または特異的に結合するフラグメントまたは合成もしくは半合成の抗体アナログは、クローン番号 810、818、819、824、825、827、858 または 894 で産生されるヒト抗体の CDR を含む。

【0109】

上に記載されるように、本発明のこれらの有用な抗体分子は、本発明のポリクローナル製剤と同一の方法および同一の適用で製剤化されてもよい。したがって、本発明は、医薬上許容される担体、賦形剤、ビヒクリルまたは希釈剤と混合した、このセクションで記載される抗体分子、特異的に結合するフラグメントまたは合成もしくは半合成の抗体アナログを含む抗体組成物に関する。組成物は、1つ以上の結合特異性を含んでもよく、例えば、2つの本発明の別個の抗体分子ならびに / あるいは本発明の特異的に結合するフラグメントおよび / または合成もしくは半合成の抗体アナログを含んでもよい。組成物は、少なくとも 3 つの別個の抗体分子および / または抗体フラグメントおよび / または合成もしくは半合成抗体アナログ、特に本発明の結合フラグメントまたは合成もしくは半合成の抗体アナログを含んでもよく、それゆえに 4、5、6、7、9、10、11、12、13、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、

10

20

30

40

50

29または30個の別個の抗体分子および／またはフラグメントおよび／または合成もしくは半合成抗体アナログを含む組成物を構成してもよい。

【0110】

特に目的とする組成物は、少なくとも1つのRSV-Fタンパク質に結合する本発明の抗体分子、フラグメントまたはアナログ、ならびに少なくとも1つのRSV-Gタンパク質に結合する本発明の抗体分子、フラグメントまたはアナログを含む。

【0111】

本発明の一部はまた、核酸フラグメントのごとく、本発明の抗体分子のうちの少なくとも1つの定義されたCDRのアミノ酸をコードする単離された核酸フラグメントであって、それは、少なくとも表5に記載されるクローニングのうちの1つにより産生される抗体のCDRをコードする。核酸フラグメントは、典型的にはDNAであるが、RNAでもあります。

10

【0112】

別の具体例は、配列番号：1-44のうちのいずれか1つに記載される重鎖アミノ酸配列のCDR配列をコードする、単離された核酸フラグメントであるか、あるいは、配列番号：89-132のうちのいずれか1つに記載される軽鎖アミノ酸配列のCDR配列をコードする、単離された核酸フラグメントである。本発明の好ましい核酸フラグメントは、配列番号：1-44のうちのいずれか1つに記載される重鎖アミノ酸配列のCDR配列をコードし、配列番号：1-44から選択されるアミノ酸配列より88高い配列番号：を有する付随する軽鎖CDRアミノ酸配列に記載される。このことは当然、核酸フラグメントが上で記載される44個のクローニング由来の同一物中に見出される可変領域の同種のペアーコードすることを意味する。それゆえ、核酸フラグメントは、配列番号：45-88および／または133-176に含まれるコーディング配列を含んでもよい。

20

【0113】

利便的に、核酸フラグメントがベクターに導入されても、本発明の一部となる。かかるベクターは、自律的に複製することができてもよく、典型的には、プラスミド、ファージ、コスミド、ミニ染色体、およびウイルスからなる群から選択される。

30

【0114】

本発明のベクターが発現ベクターである場合では、それは、好ましくは以下に概略を示す（参考・図3の典型的なベクター）：

-5' 3'方向および作動可能な連結において、上記に示される第1の核酸フラグメントの発現を促進するための少なくとも1つのプロモーターであって、それは、いずれかの必須なフレームワーク領域、任意選択でリーダーペプチドをコードする核酸配列、前記第1の核酸フラグメント、任意選択で抗体の定常領域をコードする核酸配列、ならびに任意選択で第1の転写終結領域をコードする核酸配列と一緒に少なくとも1つの軽鎖CDRをコードし、ならびに／あるいは

-5' 3'方向および作動可能な連結において、本発明の第2の核酸フラグメントの発現を促進するための少なくとも1つのプロモーターであって、それは、いずれかの必須なフレームワーク領域、任意選択でリーダーペプチドをコードする核酸配列、前記第2の核酸フラグメント、任意選択で抗体の定常領域をコードする核酸配列、ならびに任意選択で第2の転写終結領域をコードする核酸配列と一緒に少なくとも1つの重鎖CDRをコードする。

40

【0115】

かかるベクターは、安定に宿主細胞を形質転換することに用いることができ、次いで組み換え発現産物を得るために培養されうる場合に特に有用である。したがって、好ましいベクターは、宿主細胞に導入される時に、宿主細胞ゲノムに組み込まれるものである。

【0116】

したがって、本発明はまた、このセクションに記載される発明のベクターを保有する形質転換された細胞、ならびにこのベクターを保有し、このセクションに記載される本発明の核酸フラグメントを発現する安定な細胞株に関連する。形質転換された細胞および細胞

50

株の両方は、必要に応じて、その表面上の組み換え発現産物（すなわち、本発明の抗体分子、抗体フラグメントまたはアナログ）を分泌するか、または保有する。

【実施例 1】

【0117】

この実施例は、本発明を例示するために適用された方法を集めたものである。

【0118】

a. ドナー血液由来のラムダ-陰性の形質芽細胞の分別

末梢血単核細胞（PBM C）を、製造業者の説明書に従って Lymphoprep（Axis Shield）および勾配遠心分離を用いて、ドナーから採取した血液から単離した。単離した PBM C を、-150 °C で FCS；10% DMSO 中で凍結保存するか、または直接使用した。B 細胞画分を抗-CD19 抗体で標識し、磁気細胞分離（MACS）を用いて PBM C 画分から単離した。PBM C (1×10^6 細胞) を抗-CD19-FITC 抱合抗体（BD Pharmingen）と 4 °C で 20 分間インキュベートした。細胞を MACS 緩衝液（Miltenyi Biotech）で 2 回洗浄し、再懸濁させた。抗-FITC MicroBeads（Miltenyi Biotech）を、標識した細胞と混合し、4 °C で 15 分間インキュベートした。細胞-ビーズ懸濁液を LS MACS カラム（Miltenyi Biotech）にアプライする前に洗浄の手順を繰り返した。CD19 陽性細胞画分を、製造業者の説明書に従ってカラムから溶離し、FCS-10% DMSO 中で保存するか、または直接単一細胞を分別した。

10

【0119】

形質芽細胞を、CD19、CD38、および CD45 細胞表面タンパク質の発現プロファイルに基づいた蛍光表示式細胞分取器（FACS）により、CD19⁺ B 細胞画分から選択した。CD19 は、血漿細胞前駆体上でも発現される B-細胞マーカーである一方、CD38 は、形質芽細胞および血漿細胞上で強く発現される。形質芽細胞は、明らかに残りの CD19⁺ 細胞よりいくらか低い CD19 および CD45 の発現を示し、このことは別々の集団への分離を可能にする。細胞を FACS 緩衝液（PBS；1% BSA）で洗浄し、抗-CD19-FITC、抗-CD38-APC、抗-ラムダ-P E（BD Pharmingen）で 20 分間染色した。PCR の鑄型として供給できない細胞を排除するためにラムダ軽鎖染色を含めた（セクション c を参照）。染色された細胞を FACS 緩衝液で洗浄し、再懸濁させた。

20

【0120】

FACS 中の細胞の流速を約 200 イベント / 秒に設定し、細胞濃度を $5 \times 10^5 / \text{ml}$ にして高い血漿細胞レスキューを得た。以下のゲート設定を用いた。各ゲートは作成者の設定（daughter of the former）である。

30

【0121】

ゲート 1 : FSC / SSC ゲート。最も高い FSC を示すリンパ球集団を選択し、それにより生存細胞の分別を確実にした。

【0122】

ゲート 2 : SSc h / SSC w。このゲートは単一細胞の分別を確実にした。

40

【0123】

ゲート 3 : 形質芽細胞を表すイベントを CD38 高 / CD19 中間として CD38 / CD19 ドットプロットで表した。

【0124】

ゲート 4 : セクション c で記載される PCR 法のみがカッパ軽鎖を增幅するため、ラムダ-陰性イベントをラムダ / CD19 ドットプロットで表した。

【0125】

ゲート 3 の代替としてまたはゲート 3 に加えて、形質芽細胞を CD45 / CD38 ドットプロット中の CD38 高および CD45 中間として同定した。これは、抗-CD45-PerCP による細胞の染色を必要とする。

【0126】

50

これらの4つの基準を満たした得られた集団を、分別緩衝液を含む96 - ウエルPCRプレートに単一細胞に分別した（セクションcを参照）。前記細胞を含むプレートを-80で保存した。

【0127】

b . E L I S p o t

ELISpotを用いることにより、得られた細胞サンプル、すなわち、PBMC、MACS - 精製CD19⁺細胞、またはFACSで分別した形質芽細胞の集団において、抗-RSV抗体を発現する形質芽細胞の割合を評価した。ニトロセルロース表面を伴う96 - ウエルプレート（Millipore）を25μg/mlの不活性化RSV Long粒子（HyTest）溶液でコートした。ウェルをRPMI、2% 粉乳とのインキュベーションによりブロックし、4℃で約5時間静置し、続いて37℃で1時間インキュベートした。プレートを洗浄し、細胞サンプルをRPMI培地で各ウェルに添加し、続いて一般的な組織培養条件で24時間インキュベートした。分泌されたRSV - 特異的な抗体は、抗体産生細胞周辺の固定化されたウイルス粒子に結合する。細胞をPBS；0.01%

Tween 20で3回およびPBSで3回洗浄することにより取り除いた。HRP - 抱合抗 - ヒトIgG（H + L）（Caltag）およびHRP - 抱合抗 - ヒトIgA（Serotec）を加え、固定化された抗体と37℃で1時間反応させた。洗浄の手順を繰り返し、発色基質（N,N - DMF（ジ - メチルホルムアミド）中に可溶化された3 - アミノ - 9 - エチルカルバゾール）を添加した。発色をH₂Oの添加により4分後に停止させた。赤色スポットを抗原 - 特異的抗体 - 分泌細胞が局在する部位として同定した。

【0128】

c . 同種V_HおよびV_Lペアーの連結

V_HおよびV_Lをコードする配列の連結を、セクションaに記載されるように得られた単一細胞上で行い、V_HおよびV_Lをコードする配列の同種のペアーを容易にした。手法は、一工程（one-step）の多重重複伸長RT - PCRに続いてネスティドPCRに基づく二工程（two-step）PCR法を利用した。本実施例で用いられるプライマーミックスは、カッパ軽鎖のみを増幅する。しかしながら、ラムダ軽鎖を増幅することができるプライマーを任意選択で多重プライマーミックスおよびネスティドPCRプライマーミックスに添加することができた。ラムダプライマーを添加する場合、セクションaにおける分取の手法は、ラムダ陽性細胞が排除されないように用いられるべきである。同種V_HおよびV_L配列の連結のための原理を図2に示す。

【0129】

セクションaで產生された96 - ウエルPCRプレートを融解させ、分取した細胞を多重重複伸長RT - PCRの鑄型として供給した。単一細胞分取前に各ウェルに添加した分取緩衝液は、反応緩衝液（OneStep RT - PCR緩衝液；Qiagen）、RT - PCR用プライマー（表2を参照）およびRNase阻害剤（RNasin、Promega）を含有した。これにOneStep RT - PCR酵素ミックス（25×希釈率；Qiagen）およびdNTP（各200μM）を補充して20μlの反応体積で所定の最終濃度を得た。

【0130】

プレートを55℃で30分間インキュベートして各細胞からのRNA逆転写を可能にした。RT後、プレートを以下のPCRサイクルにかけた：94℃で10分、35×（94℃で40秒、60℃で40秒、72℃で5分）、72℃で10分。

【0131】

24個の96 - ウエルプレート用のPeel Seal Basketを備えるH20B ITサーマルサイクラー（ABgene）でPCR反応を実施してハイスループットを容易にした。PCRプレートをサイクリング後に-20℃で保存した。

【0132】

表2：RT - PCR多重重複伸長プライマーミックス

10

20

30

40

【表2】

| プライマー名 | 最終濃度. nM | 配列 | 配列番号: |
|--------|-------------|--|-------|
| VHセット | | | |
| CH-IgG | 0.2 | GACSGATGGGCCCTTGGTGG | 179 |
| CH-IgA | 0.2 | GAGTGGCTCCTGGGGGAAGA | 180 |
| VH-1 | 0.04 | TATTCCCATGGCGCGCCCAGRTGCAGCTGGTGCART | 181 |
| VH-2 | 0.04 | TATTCCCATGGCGCGCCSAGGTCCAGCTGGTRCACT | 182 |
| VH-3 | 0.04 | TATTCCCATGGCGCGCCCAGRTCACCTTGAAAGGAGT | 183 |
| VH-4 | 0.04 | TATTCCCATGGCGCGCCSAGGTGCAGCTGGTGGAG | 184 |
| VH-5 | 0.04 | TATTCCCATGGCGCGCCCAGGTGCAGCTACAGCAGT | 185 |
| VH-6 | 0.04 | TATTCCCATGGCGCGCCCAGSTGCAGCTGCAGGAGT | 186 |
| VH-7 | 0.04 | TATTCCCATGGCGCGCCGARGTGCAGCTGGTGCAGT | 187 |
| VH-8 | 0.04 | TATTCCCATGGCGCGCCSAGGTACAGCTGCAGCAGTC | 188 |
| LCセット | | | |
| CK1 | 0.2 | ATATATATGCGGCCGTTATTAACTCTCCCCTGTTG | 189 |
| VL-1 | 0.04 | GGCGCGCCATGGGAATAGCTAGCCGACATCCAGWTGACCCAGTCT | 190 |
| VL-2 | 0.04 | GGCGCGCCATGGGAATAGCTAGCCGATGTTGTGATGACTCAGTCT | 191 |
| VL-3 | 0.04 | GGCGCGCCATGGGAATAGCTAGCCGAAATTGTGWTGACRCAGTCT | 192 |
| VL-4 | 0.04 | GGCGCGCCATGGGAATAGCTAGCCGATAATTGTGATGACCCACACT | 193 |
| VL-5 | 0.04 | GGCGCGCCATGGGAATAGCTAGCCGAAACGACACTCACGCAGT | 194 |
| VL-6 | 0.04 | GGCGCGCCATGGGAATAGCTAGCCGAAATTGTGCTGACTCAGTCT | 195 |

10

20

30

40

W = A / T、 R = A / G、 S = G / C

【0133】

ネスティドPCR工程では、96 - ウェルプレートの各ウェル(20 - μ l反応物)に以下の混合物を調製して所定の最終濃度を得た: 1 × Fast Start 緩衝液(Roche)、dNTPミックス(各200 μ M)、ネスティドプライマーミックス(表3を参照)、Phusion DNAポリメラーゼ(0.08U; Finnzymes)およびFast Start High Fidelity Enzyme Blend(0.8U; Roche)。ネスティドPCRの鑄型として、1 μ lを多重重複伸長PCR反応物から移した。ネスティドPCRプレートを以下のPCRサイクルにかけた: 35 × (95で30秒、60で30秒、72で90秒)、72で10分。

【0134】

無作為に選択した反応物を1%アガロースゲル上で解析して約1070bpの重複伸長フラグメントの存在を確認した。

【0135】

さらにPCRフラグメントを処理するまでプレートを-20で保存した。

【0136】

表3: ネスティドプライマーのセット

【表3】

| プライマー名 | 最終濃度. nM | 配列 | 配列番号 |
|--------|-------------|--|------|
| CK2 | 0.2 | ACCGCCTCCACCAGGCGGCCGCTTATTAACACTCTCCCCTGTTGAAGCTCTT | 196 |
| PJ 1-2 | 0.2 | GGAGGGCGCTCGAGACGGTGACCAGGGTGCC | 197 |
| PJ 3 | 0.2 | GGAGGGCGCTCGAGACGGTGACCATTGTCCC | 198 |
| PJ 4-5 | 0.2 | GGAGGGCGCTCGAGACGGTGACCAGGGTTCC | 199 |
| PJ 6 | 0.2 | GGAGGGCGCTCGAGACGGTGACCAGGTGGTCCC | 200 |

10

【0137】

d . 同種 V_H および V_L をコードするペアのスクリーニングベクターへの挿入

R S V 粒子または抗原に対して結合特異性を有する抗体を同定するために、セクション c に記載されるように得られた V_H および V_L をコードする配列を全長抗体として発現させた。このことは、 V_H および V_L をコードするペアのレパートリーの発現ベクターへの挿入および宿主細胞への形質転換に関連した。

【0138】

連結された V_H および V_L をコードするペアを含む発現ベクターのレパートリーを作成するために、二工程クローニング法を採用した。統計的に、発現ベクターのレパートリーがスクリーニングレパートリーの作成に用いられる同種ペアの V_H および V_L PCR 産物の数より 10 倍多い組み換えプラスミドを含む場合、全てユニークな遺伝子ペアが表される可能性は 99 % である。それゆえ、400 個の重複伸長 V - 遺伝子フラグメントがセクション c で得られた場合、少なくとも 4000 個のクローンのレパートリーがスクリーニングにより作成された。

【0139】

簡単に説明すると、セクション c におけるネスティド PCR からの連結された V_H および V_L をコードするペアのレパートリーを、(他のドナーに由来するペアを混合することなく) プールした。PCR フラグメントを、PCR 産物の末端に導入された認識部位において Xba I および Not I DNA エンドヌクレアーゼを用いて切断した。一般的なライゲーションの方法により、切断および精製されたフラグメントを Xba I / Not I で消化した哺乳動物 IgG 発現ベクター(図 3)に結合させた。ライゲーション混合物を E. coli i にエレクトロポレーションし、適切な抗生物質を含む 2 × YT プレートに添加し、37 °C で一晩インキュベートした。増幅されたベクターのレパートリーを、一般的な DNA 精製方法 (Qiaegen) を用いて、プレートから回収した細胞から精製した。プロモーター - リーダーフラグメントの挿入のために、Asci および Nhe I エンドヌクレアーゼを用いる切断によりプラスミドを調製した。これらの酵素の制限部位は、 V_H および V_L をコードする遺伝子のペア間に局在した。ベクターの精製後に、Asci - Nhe I で消化された二方向性哺乳動物プロモーター - リーダーフラグメントを、一般的なライゲーション法により Asci および Nhe I 制限部位に挿入した。結合されたベクターを E. coli i 中で増幅させ、一般的な方法を用いてプラスミドを精製した。作成されたスクリーニングベクターのレパートリーを慣用的な手法により E. coli i に形質転換させた。得られたコロニーを 384 - ウェルマスター プレートに集め、保存した。アレイしたコロニー数は、インプットした PCR 産物の数を少なくとも 3 倍超え、それによりセクション c で得られた全てのユニークな V - 遺伝子ペアの存在について 95 % の可能性が与えられた。

【0140】

e . スクリーニング

セクション d で集められた細菌コロニーを、同様の 384 - ウェルプレート中の培地に播種し、一晩培養した。トランスフェクション用の DNA を細胞培養プレートの各ウェルから調製した。トランスフェクション前日に、384 - ウェルプレートに 20 μl 培地中

20

30

40

50

で3000細胞／ウェルにおいてCHO-F1p-In細胞(Invitrogen)を播種した。細胞を、製造業者の説明書に従ってFugene6(Roche)を用いてDNAとともにトランスフェクトさせた。2-3日間の培養後、スクリーニングに用いるため、全長抗体を含む上澄み液を収集し、保存した。

【0141】

Applied Biosystems 8200 F M A T (登録商標)システム、ホモジニアス(homogeneous)ビーズに基づいた可溶化キャプチャーFLISA(蛍光連結免疫吸着アッセイ)を用いてスクリーニングを行った(Swartzman et al 1999, Anal Biochem 271:143-151)。RSV抗原に由来するウイルス粒子、組み換えGタンパク質およびビオチン化ペプチドを含む多くの抗原をスクリーニングに使用した。ペプチドは、Gタンパク質の保存領域(アミノ酸164-176)とシステインコア領域(アミノ酸171-187、株Longおよび18537)およびSH-タンパク質の細胞外領域(A2株のアミノ酸42-64および18537株の42-65)に由來した。不活性化されたRSV株Longのウイルス粒子(HyTest)を、300μlのウイルスストック(タンパク質濃度:200μg/ml)と一緒に300μlの5%w/vビーズ(直径6.79μm、Spherotech Inc.)をインキュベートすることによりポリスチレンビーズ上に固定化させた。可溶性組み換えGタンパク質(18537株の配列のアミノ酸66-292)を同様に直接ポリスチレンビーズ上に固定化させた一方、ビオチン化されたペプチドを、前コートされたストレプトアビジンポリスチレンビーズ(直径6.0-8.0μm、Gerlinde Kisker)上で飽和濃度において補促させた。コート混合物を一晩インキュベートし、PBSで2回洗浄した。ビーズを、1%ウシ血清アルブミン(PBS/BSA)および5μlヤギ-抗-ヒトIgG Alexa 47抱合体(Molecular probes)を含む50mlのPBSで再懸濁した。再懸濁したコート混合物の10μlに、F M A T適合性の384-ウェルプレート中で20μlの抗体を含む上澄み液を添加し、約12時間インキュベートし、その後、各ウェル中のビーズ表面における蛍光を測定した。蛍光の強度がバックグラウンド基準を超えた少なくとも6つの標準偏差である場合、蛍光イベント(event)が陽性であると判断した。

【0142】

最初の当たりで生じたクローンを元々のマスタープレートから取り出し、新しいプレートに収集した。これらのクローンからDNAを単離し、V-遺伝子のDNA配列決定を行った。この配列を並列比較し、全てのユニークなクローンを選択した。

【0143】

選択されたクローンをさらに検証した。簡単に説明すると、 2×10^6 個のフリースタイル(Freestyle)293細胞(Invitrogen)を、製造業者の説明書に従って、2mlのフリースタイル培地(Invitrogen)中において、選択されたクローン由来の1.7μg DNAおよび0.3μgのpAdVantageプラスミド(Promega)でトランスフェクトした。2日後、上澄み液を、IgG発現について、ならびに一次スクリーニングに用いられる異なる抗原および組み換え精製Fタンパク質とE.coli産生のGタンパク質フラグメント(18537株配列のアミノ酸127-203)との反応性について、FLISAおよび/またはELISAによりテストした。抗体上澄み液を連続希釈でテストすることにより、抗原反応性によるクローンのランキングを可能にした。

【0144】

f. クローン修復

セクションcに記載されるような多重PCR法を用いると、高い相同意により、一定頻度のV-遺伝子ファミリー内および間のクロスプライミングが予想される。クロスプライミングは、免疫グロブリンフレームワーク中に天然に存在しないアミノ酸を導入し、いくつかの潜在的な結果、例えば、構造変化および免疫原性の増加をもたらし、それらは全て治療活性の減少を招く。

10

20

30

40

50

【0145】

これらの欠点を解消し、選択されたクローンが自然の液性免疫応答を反映することを確実にするために、かかるクロスプライミング変異をクローン修復（clone repair）と呼ばれるプロセスで修復した。

【0146】

クローン修復手順の第一工程では、 V_H 配列を、目的クローンの起源である V_H -遺伝子に対応する配列を含むプライマーセットでPCR増幅し、それによりクロスプライミングにより導入された変異のいずれかを修正した。PCRフラグメントをXba IおよびAsp C Iで消化し、慣用的なライゲーション手法を用いて、Xba I / Asp C Iで消化された哺乳動物発現ベクター（図3）に結合させた。結合したベクターをE. coli中で増幅させ、一般的な方法によりプラスミドを精製した。 V_H 配列の配列を決定して修正を確認し、ベクターをNhe I / Not Iで消化して軽鎖の挿入用に調製した。

10

【0147】

第二工程では、完全な軽鎖を、目的クローンの起源である V_L -遺伝子に対応する配列を含むプライマーセットでPCR増幅し、それによりクロスプライミングにより導入された変異のいずれかを修正した。PCRフラグメントをNhe I / Not Iで消化し、上記で調製されたベクターを含む V_H に結合させた。ライゲーション産物をE. coliで増幅させ、一般的な方法により精製した。次いで、軽鎖の配列を決定して修正を確認した。

20

【0148】

選択されたクローンのカッパ定常領域が、セクションcに記載の遺伝子増幅中に導入された変異を含んだ場合、未変異の定常領域により置換された。これは、（定常領域を除いて増幅された）修復 V_L -遺伝子を、（別々のPCRで得られた）修正配列を伴う定常領域に繋ぐ重複PCRにおいて行った。全体の配列を増幅し、上に記載されるごときベクターを含む V_H にクローン化し、修復された軽鎖の配列を決定して修正を確認した。

20

【0149】

g. ポリクローナル細胞株の作成

組み換えポリクローナル抗体を产生するポリクローナル発現細胞株の作成は、単一の V_H および V_L 遺伝子配列に由来するユニークな抗体を各々発現する個々の発現細胞株の作成に関する複数-工程手順である。ポリクローナル細胞株は、個々の細胞株を混合し、混合物をアンプルに分配し、それによりポリクローナルリサーチ細胞バンク（pRCB）またはマスター細胞バンク（pMCB）を作成することにより得られ、ポリクローナルワーキング細胞バンク（pWCB）は、リサーチまたはマスター細胞バンクから細胞を増殖させることにより作成されうる。一般的に、pRCB由来のポリクローナル細胞株は、pWCBを作成することなく直接用いられる。

30

【0150】

ポリクローナル細胞株を作成するプロセスにおける各工程を以下に記載する。

【0151】

g-1 哺乳動物細胞株のトランスフェクションおよび選択

F1p - In CHO細胞株（Invitrogen）を開始細胞株として用いた。より均一な細胞株を得るために、親のF1p - In CHO細胞株を、希釈を制限してサブクローン化し、いくつかのクローンを選択し、増殖させた。増殖の具合に基づいて、1つのクローン、CHO - F1p - In（019）を開始細胞株として選択した。CHO - F1p - In（019）細胞を10%ウシ胎児血清（FCS）を含むHAM - F12中で接着細胞として培養した。

40

【0152】

セクションfで得た選択および修復された V_H および V_L をコードするペア-を各々含む各プラスミド調製物を、Fugene 6（Roche）を用いて、T175フラスコ中の $\sim 19 \times 10^6$ 個のCHO - F1p - In（019）細胞（より詳細については、WO 04/061104を参照）に、F1pリコンビナーゼをコードするプラスミドで共トランスフェクトした。細胞を24時間後にトリプシン処理し、2 - layer（1260 cm²）ce

50

11 factory (Nunc) に移した。トランスフェクション 48 時間後に添加した 500 µg / ml のジェネティシンの存在下で培養することにより、組み換え細胞株を選択した。約 2 週間後にクローニングが現れた。クローニングを数え、細胞をトリプシン処理し、その後、RSV 特異的な抗体のうちの 1 つを発現するクローニングのプールとして培養した。

【0153】

g - 2 血清を含まない懸濁培養への適応

接着した抗 - RSV 抗体を発現する細胞培養物各々をトリプシン処理し、遠心分離し、適切な無血清培地 (Excell 1302, JRH Biosciences; 500 µg / ml ジェネティシン、抗凝集剤 (1 : 250) および 4 mM L-グルタミン) 中に 1.15 × 10⁶ 細胞 / ml の入った別々の振盪フラスコ (250 ml) に移した。増殖と細胞形態を数週間にわたって経過観察した。4 - 6 週間後、細胞株は通常、30 時間より少ない倍加時間を有する良好かつ安定な増殖状態を示し、次いで用いた各細胞株を複数のアンプルに凍結保存した。

【0154】

適応中に発現された各抗体を、セクション i) に記載される方法を用いて上澄み液から精製した。精製された抗体を以下に記載されるごとく抗原特異性および生化学的特性の特徴付けに用いた。

【0155】

g - 3 細胞株の特徴付け

全ての各細胞株を抗体産生および増殖に関して特徴付けを行った。これを以下のアッセイで行った：

【0156】

産生：

各発現細胞株の組み換え抗体の産生を、カッパ特異的 ELISA による適応期間後に続けた。ELISA プレートを、炭酸緩衝液、pH 9.6 中のヤギ - 抗 - ヒト Fc 精製抗体 (Serotec) で一晩コートした。プレートを洗浄緩衝液 (PBS; 0.05% Tween 20) で 6 回洗浄し、2% スキムミルクを含む洗浄緩衝液中で 1 時間のインキュベーションによりブロックした。細胞培地の上澄み液を添加し、さらに 1 時間インキュベートした。プレートを洗浄緩衝液で 6 回洗浄し、二次抗体 (ヤギ - 抗 - ヒトカッパ HR P, Serotec) を添加し、インキュベーションを繰り返した。激しい洗浄後、ELISA を TMB 基質液で発色させ、H₂SO₄ の添加により反応を止めた。プレートを 450 nm で読み取った。

【0157】

さらに、細胞内染色を用いることにより、一般的な発現レベルならびに組み換え抗体の発現に関する細胞集団の均一性 (homogeneity) を調べた。5 × 10⁵ 個の細胞を、Cell Fix (BD-Biosciences) 中で 20 分間のインキュベーションによる固定の前に、冷 FACS 緩衝液 (PBS; 2% FCS) で洗浄した。細胞をペレット状にし、氷冷メタノールで 10 分間透過処理し、FACS 緩衝液で 2 回洗浄した。懸濁液に、蛍光タグをつけた抗体 (ヤギ F(ab')₂ フラグメント、抗 - ヒト IgG (H + L) - PE, Beckman Coulter) を添加した。20 分後、氷上で細胞を洗浄し、FACS 緩衝液で再懸濁し、次いで FACS 解析を行った。

【0158】

増殖：

細胞懸濁液のアリコットを 1 週間に 2 から 3 回取り、細胞数、細胞の大きさおよび生存率を Vi - Cell XR (Cell viability analyzer, Beckman Coulter) 解析により調べた。細胞培養の倍加時間を Vi - Cell 測定からの細胞数を用いて算出した。

【0159】

g - 4 各抗体の抗原特異性の特徴付け

よく特徴付けられた特性を有する抗 - RSV r pAb の作成を行うために、各々発現

10

20

30

40

50

される抗体の抗原およびエピトープ特異性を測定した。すでにセクションeに記載されるように、スクリーニング中に同定された抗体を、単一のRSV抗原（組み換えGタンパク質、組み換えまたは精製Fタンパク質）またはそのペプチドフラグメント（タンパク質G、サブタイプAおよびBの保存領域およびシステインコアモチーフ、ならびにSHタンパク質、サブタイプAおよびBの細胞外ドメイン）に対するそれらの結合特性をELISA、ELISAおよび表面プラズモン共鳴（SPR；Biacore）により測定することで確認した。エピトープ特異性を、よく特徴付けられた市販の抗体であって、そのうちのいくつかが表4に示される抗体との競合によるELISAにおいて調べた。必ずしも表4に示された全ての抗体を、本発明の各々の抗体の特徴付けに用いておらず、それらが結合する抗原、抗原部位および/またはエピトープに関して特徴付けられた潜在的な他の抗体または抗体フラグメントもまた用いられてもよい。簡単に説明すると、エピトープのプロッキングに用いられる抗体または抗体フラグメントを、過剰量、すなわち、実験的に調べられたように75%の最大結合を与える濃度の100倍（Ditzel et al., J.Mol.Biol.1997, 267:684-695）の固定化抗体（RSV Long粒子、HyTest）とインキュベートした。洗浄後、各抗体クローニングを、様々な濃度でブロックした抗原とインキュベートし、いずれかの結合したヒトIgGを、一般的なELISAプロトコルに従ってヤギ-抗-ヒトHRP抱合体（Serotec）を用いて検出した。エピトープ特異性を、プロッキングおよびプロービング（probing）の両方の（実験的に調べられた）飽和濃度を用いるBiacoreにおいて、異なる抗体クローニング間の対（pair-wise）競合によりさらに特徴付けした。直接アミンカップリング（Biacore）により固定化された精製FまたはGタンパク質を抗原として用いた。ELISA-およびBiacore-の両方に基づいたエピトープマッピングでは、エピトーププロッキング後の減少した結合を競合させていない結合と比較した。

【0160】

表4：抗-Fおよび抗-G抗体のエピトープマッピングのモノクローナル抗体

【表4】

| MAb/Fab | 抗原 | 抗原部位 | エピトープ(aa) | Ref. |
|---------|---------|-------|-----------------|---------|
| 131-2a | F | F1 | F1a | 1,2 |
| 9C5 | F | F1 | F1a | 5 |
| 92-11c | F | F1 | F1b | 1,2 |
| 102-10b | F | F1 | F1c | 1,2 |
| 133-1h | F | C | F2 | 1,2,3 |
| 130-8f | F | C | F2 (241/421) | 1,2,3,4 |
| 143-6c | F | A/II | F3 | 1,2,3 |
| パリビズマブ | F | A/II | (272) | 8 |
| 1153 | F | A/II | (262) | 3,4 |
| 1142 | F | A/II | | 3 |
| 1200 | F | A/II | (272) | 2,4 |
| 1214 | F | A/II | (276) | 3,4 |
| 1237 | F | A/II | (276) | 3,4 |
| 1129 | F | A/II | (275) | 3,4 |
| 1121 | F | A/II | | 3 |
| 1112 | F | B/I | (389) | 3,6 |
| 1269 | F | B/I | (389) | 3,6 |
| 1243 | F | C | (241/421) | 3,6 |
| Fab 19 | F | A/II | (266) | 7 |
| RSVF2-5 | F | IV | (429) | 4 |
| Mab19 | F | IV | (429) | 12 |
| 7.936 | F | V | (432-447) | 13 |
| 9.432 | F | VI | (436) | 13 |
| 63-10f | G (A) | G11 | GCRR (A171-187) | 1,2 |
| 130-6d | G (A) | G12 | (A174-214) | 1,2,9 |
| 131-2g | G (A+B) | G13 | (150-173) | 1,2,9 |
| 143-5a | G (A+B) | G5a | | 2 |
| L9 | G (A+B) | A1/B1 | 保存(164-176) | 14,15 |
| 8C5 | G | ND | | 5 |
| 1C2 | G (A) | ND | GCRR (A172-188) | 10,11 |
| 3F4 | G (A) | ND | | 10,11 |
| 4G4 | G (A) | ND | GCRR (A172-188) | 10,11 |

【0161】

欄「抗原」は、MAb / Fabにより結合されるRSV関連抗原を示し、サブタイプ特異性が知られている場合、これは()で示される。欄「エピトープ(aa)」は、MAb / Fabにより認識されるエピトープ名を示し、さらに、()では、RSVエスケープ変異体を生じるアミノ酸の位置、または結合が示されたペプチド / タンパク質が示される。

表4に示す参考文献(Ref.)の番号は、

- Anderson et al., J.Clin.Microbiol.1986, 23:475-480.
- Anderson et al., J.Virol.1988, 62:1232-4238.
- Beeler & van Wyke Coelingh, J.Virol.1989, 63:2941-2950.
- Cowe et al., JID 1998, 177:1073-1076.
- Sominina et al., Vestn Ross Akad Med Nauk 1995, 9:49-54.
- Collins et al., Fields Virology, p1313-1351.
- Crowe et al., Virology 1998, 252:373-375.

10

20

30

40

50

8. Zhao & Sullender, J.Virol.2004, 79:3962-3968.
9. Sullender, Virology 1995, 209:70-79.
10. Morgan et al., J.Gen.Virol.1987, 68:2781-2788.
11. McGill et al., J.Immunol.Methods 2005, 297:143-152.
12. Arbiza et al., J.Gen.Virol.1992, 73:2225-2234.
13. Lopez et al., J.Virol.1998, 72:6922-6928.
14. Walsh et al., J.Gen.Virol.1989, 70:2953-2961.
15. Walsh et al., J.Gen.Virol.1998, 79:479-487.

に対応する。

【0162】

さらに、抗体クローニングを、異なるRSV株（LongおよびB1）で感染させた咽頭上皮HEp-2細胞（ATCC CCL-23）への結合に関する特徴付けした。簡単に説明すると、HEp-2細胞を、無血清培地中で0.1pfu/細胞の割合においてRSV Long（ATCC番号VR-26）株またはRSV B1（ATCC番号VR-1400）株のどちらかで24時間（Long株）または48時間（B1株）感染させた。剥離および洗浄後、細胞を96-ウェルプレートに分注し、各抗-RSV抗体の希釈液（4pM-200μM）において37℃で1時間インキュベートした。細胞を1%ホルムアルデヒドで固定し、細胞表面結合抗体をヤギF(ab)2抗-ヒトIgG-Pエピトープ結合体（Beckman Coulter）との4℃で30分間のインキュベーションにより検出した。モック（mock）感染HEp-2細胞に対する結合を同様に解析した。タンパク質G特異的として選択されたクローニングもまた、組み換えヒトフラクトルキン（CX3CL1；R&D systems）との交差反応性についてELISAによりテストした。抗-ヒトCX3CL1/フラクトルキンモノクローナル抗体（R&D systems）を陽性コントロールとして用いた。

10

20

30

40

50

【0163】

g-5 各抗体の結合反応速度の特徴付け

本発明の抗体の動力学的解析を、物質移動の制限を避けるために極めて低い密度でセンサー表面上に固定された組み換え抗原を用いて、Biacore 3000（スウェーデン、ウプサラのBiacore AB）で表面プラズモン共鳴分析を用いて行った。ImmunoPure Fab調製キット（Pierce）を用いて各抗体クローニングから調製されたFabフラグメントを用いて解析を行った。簡単に説明すると、合計200共鳴単位（RU）の組み換えタンパク質Fまたは合計50RUの組み換えタンパク質Gを、製造業者の説明書に従ってアミンカップリングキット（Biacore）を用いてCM5チップ表面に抱合させた。Fabフラグメントを連続希釈でチップ表面上に注入し、固定化タンパク質を有するチップ上でテストされる時に25を超えるRU最大値を生じることのない最適化濃度で開始した。結合速度定数（ka）および解離定数（kd）を、BIA evaluation 4.1ソフトウェア（Biacore）における所定の1:1（Langmuir）結合および解離モデルを用いて全体的に評価した。

【0164】

Fabフラグメントにおける動力学的解析を行うことにより、実際に得られたデータがRSVタンパク質に対する結合親和性を反映することを確認した。完全な抗体を用いた場合、データは結合親和性を反映し、容易に抗体の結合特性と抗原との正確な形の意味のある測定に置き換えることができないであろう。

【0165】

g-6 各抗体の生化学的特性の特徴付け

不均一性（heterogeneity）は、抗体および組み換えタンパク質における共通の現象である。抗体の修飾は、典型的には、例えば、N-糖鎖付加、タンパク質分解フラグメント化、およびN-とC-末端不均一性のごとき翻訳後修飾が発現中に起き、大きさまたは帯電の不均一性を生じる。加えて、メチオニン酸化および脱アミド化のごとき修飾は、後の短期または長期保存中に生じうる。これらのパラメーターは、治療抗体でよ

く定められていることが必要となるため、それらは、ポリクローナル細胞株の作成前に解析された。

【0166】

精製された各抗体の特徴付け（セクションiを参照）に用いられる方法は、SDS-PAGE（還元と非還元状態）、弱陽イオン交換クロマトグラフィー（IEC）、サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）、およびRP-HPLC（還元と非還元状態）を含んだ。還元と非還元状態下におけるSDS-PAGE解析およびSECは、精製された抗体が微量のフラグメント化および凝集化された形態を伴い、実質的に無傷であることを示した。精製された抗体のIECプロファイル解析は、単一のピークを示すプロファイルまたは複数のピークを示すクロマトグラフを結果として生じ、これらはこれらの特定の抗体における帯電の不均一性を示す。IEC解析における複数のピークおよび/またはSDSゲルにおける軽もしくは重鎖の異常な移動、あるいは異常なRP-HPLCプロファイルを生じる抗体調製物を、N-末端の配列決定により無傷なN-末端について、およびオリゴ糖プロファイルの相違により引き起こされる不均一性について詳細に解析した。さらに、選択された抗体を、酵素処理およびその後のSDS-PAGE解析を用いて、可変鎖におけるN-糖鎖付加部位の存在について解析した。

10

【0167】

g-7 抗-RSV組み換えポリクローナル抗体産生のためのポリクローナル細胞株の樹立

樹立された発現細胞株のコレクションから、サブセットを選択して混合し、ポリクローナル細胞株およびポリクローナルリサーチ/マスター細胞バンク（pRCB/pMCB）を作成する。選択パラメーターを、ポリクローナル細胞株から產生されるポリクローナル抗体の使用、ならびに各細胞株の能力に従って定めることができる。一般的に以下のパラメーターを考慮する：

20

- ・細胞株の性質；ポリクローナル細胞株の安定性を最適化すること、21~30時間の倍加時間を有する各細胞株および1pg/細胞/日を超える抗体産生が好ましい。

- ・反応性；抗-RSV r pAbが反応性を示す抗原/抗原部位およびエピトープを慎重に考慮する。

- ・タンパク質化学；明確な生化学的性質を示す好ましい抗体が最終的な抗-RSV r pAbに含まれる。

30

【0168】

組み換え抗-RSV抗体を発現する選択された各細胞株を、振盪フラスコにおける無血清培地において37で融解し、増殖させて21~34時間の倍加時間の集団を示す各クローンの少なくとも 4×10^8 個の細胞とした。生存率は、好ましくは93%から96%までの範囲である。ポリクローナル細胞株を、各細胞株から 2×10^6 個の細胞を混合することにより調製する。ポリクローナル細胞株を、 5.6×10^7 個の細胞を含有する凍結アンプルに分け、凍結保存する。ポリクローナル細胞株を有するこのバイアルのコレクションをポリクローナルリサーチ/マスター細胞バンク（pRCB/pMCB）と名付け、ポリクローナルワーキング細胞バンク（pWCB）は、pRCB/pMCBから1つのアンプルを増殖させることにより、pRCB/pMCBのアンプルと同じ細胞密度を有する約200個のアンプルのポリクローナルワーキング細胞バンク（pWCB）を作出するために十分量の細胞とすることにより作成することができる。前記細胞バンクに由来する細胞をマイコプラズマおよび無菌性についてテストする。

40

【0169】

h. 組み換えポリクローナル抗-RSV抗体の発現

組み換えポリクローナル抗-RSV抗体のバッチを5リットルのバイオリアクター（ドイツ、メルツンゲンのB.Braun Biotech International）で产生する。簡単に説明すると、pRCBまたはpWCBに由来するバイアルを融解し、振盪フラスコ（Corning）中で増殖させる。播種した列の細胞を、G418および抗凝集剤を含むExCell302培地の中で37、5%CO₂で培養する。このバイオリアクターに、G418および

50

抗凝集剤を含まない3 lのExCell302培地中に懸濁させて 0.6×10^6 細胞/m^lで播種する。細胞数/生存細胞をCASYまたはViCell計数により毎日モニターする。50時間で2000m^lのExCell302培地を補充し、92時間後に37から32に温度を下げる。細胞培養上澄み液を164時間後に回収し、セクションiに記載されるごとく精製にかける。

【0170】

i. 各抗-RSV抗体およびポリクローナル抗-RSV抗体の精製

セクションg.g-2およびhに記載されるように発現される抗体、全てのIgG1アイソタイプを、MabSelect SUReカラム(プロテイン-A)を用いてアフィニティー精製した。各抗体が固定化されたプロテイン-AにpH7.4で相互作用し、一方で夾雑するタンパク質をカラムから洗浄した。次いで、結合した抗体を、pHを2.7まで下げるによりカラムから溶出した。280nmの吸光度測定から調べられた抗体を含む画分をプールし、G-25カラムを用いて5mM酢酸ナトリウム、150mM NaCl、pH5で緩衝液交換し、-20で保存した。

10

【0171】

j. インビトロ中和アッセイ

j-1 インビトロ使用のための活性なRSVの調製

ヒト咽頭上皮HEp-2細胞(ATCC CLL-23)を 1×10^7 細胞/フラスコで 175 cm^2 フラスコに播種した。細胞を、RSV Long(ATCC番号VR-26)、RSV B1(ATCC番号VR-1400)またはRSV B Wash/18537(Advanced Biotechnologies Inc.)のうちのいずれかで $0.1 \text{ pfu}/\text{細胞}$ の割合において3ml無血清培地中に感染させた。細胞を、37; 5%CO₂で2時間感染させ、続いて37m^lの完全MEM培地を添加した。細胞変性効果が観察されるまで細胞をインキュベートした。細胞を搔き取ることにより剥がし、培地と細胞を20秒間超音波処理し、一定分量にし、液体窒素で凍結させ、-80で保存した。

20

【0172】

j-2 プラーク減少中和試験(PRNT)

HEp-2細胞を 2×10^4 細胞/ウェルで96-ウェル培養プレート中に播種し、37; 5%CO₂で一晩インキュベートした。試験物質を無血清MEM中に希釈させ、補体(ウサギに由来する補体血清、Sigma)の非存在または存在下において37で30分間前インキュベートした。この混合物をHEp-2細胞の単層にアプライし、37; 5%CO₂で24時間インキュベートした。細胞を80%アセトン; 20%PBSで20分間固定した。洗浄後、ビオチン化されたヤギ抗-RSV抗体(AbD Serotec)を、1%BSAを含有するPBS中に添加し(1:200)、室温で1時間インキュベートした。洗浄後、HRP-アビジンを添加し、30分間インキュベートした。プラークを3-アミノ-9-エチルカルバゾール(AEC)基質との25分間(RSV Long)および45分間(RSV B1)のインキュベートにより発達させた。プラークをBioreader(Bio-Sys GmbH)でカウントした。力価の比較ができるように適用可能な場合には、EC₅₀値(プラーク数の50%の減少を引き起こすのに必要とされる有効濃度)を算出した。

30

40

【0173】

j-3 融合阻害アッセイ

融合阻害アッセイを、基本的に、RSVをテスト物質の添加前に感染させることを除いてプラーク減少中和アッセイと同様に行った。実際には、ウイルスを無血清培地でHEp-2細胞の単層に1.5時間添加した。

【0174】

上澄み液を除去し、試験物質を補体(ウサギ由来の補体血清、Sigma)の存在するまたは存在しない完全MEM培地に添加した。プレートを一晩インキュベートし、プラーク減少中和アッセイに関して上に記載されるように処理した。

【0175】

50

j - 4 マイクロ中和アッセイ

セクション j - 2 および j - 3 に記載される P R N T および融合阻害アッセイに加えて、R S V タンパク質の検出に基づくマイクロ中和アッセイを R S V 中和および融合阻害の測定に用いた。

【0176】

中和テストでは、試験物質を無血清 M E M で希釈し、R S V で 9 6 ウェル培養プレート中において室温で 30 分間前インキュベートした。トリプシン処理した H E p - 2 細胞を 1.5×10^4 細胞 / ウェルで添加し、37[°]C ; 5% C O₂ で 2 - 3 日間インキュベートした。細胞を洗浄し、80% アセトン； 20% P B S において 4[°]C で 15 分間固定し、乾燥させた。

10

【0177】

次いで、プレートを 0.5% ゼラチン含有の P B S 中において室温で 30 分間プロックし、0.5% ゼラチンおよび 0.5% Tween - 20 含有の P B S 中で 1 : 200 に希釈した R S V タンパク質に対するマウスモノクローナル抗体 (N C L - R S V 3、Novocastra) のプールにおいて室温で 2 時間染色した。洗浄後、0.5% ゼラチンおよび 0.5% Tween - 20 含有の P B S で 1 : 1000 に希釈したポリクローナルウサギ抗 - マウス免疫グロブリン H R P - 抱合体 (P 0 2 6 0；D a k o C y t o m a t i o n) を添加し、室温で 2 時間インキュベートした。プレートを洗浄し、オルト - フェニレンジアミンの添加により発色させた。H₂S O₄ の添加により反応を止め、プレートを E L I S A プレートリーダーで 490 nm を読み取った。

20

【0178】

融合阻害アッセイを、ウイルスが細胞に添加され、完全 M E M で希釈された試験物質が添加される前に 37[°]C ; 5% C O₂ で 1.5 時間インキュベートすることを除いて、基本的にマイクロ中和試験と同様に行つた。プレートを 37[°]C ; 5% C O₂ で 2 - 3 日間インキュベートし、上に記載のとおりに発色させた。

【0179】

k . インビオ保護アッセイ

k - 1 マウス誘発モデル

7 - 8 週齢の雌 B A L B / c マウスに、0.2 ml 抗体調製物を研究 - 1 日目に腹腔内に接種した。プラセボ処理マウスを同様に 0.1 ml P B S 緩衝液で腹腔内に接種した。研究 0 日目に、マウスに吸入イソフルオランを用いて麻酔をかけ、50 μl 中の 10^{-6} ~ 10^{-7} p f u の R S V 株 A 2 または細胞溶解物（偽の接種菌液）で鼻腔内に接種した。麻酔から完全に回復させて真っ直ぐに立たせると同時に、マウスに 30 秒接種菌液を吸引させた。

30

【0180】

誘発 5 日後、マウスを過剰量のペントバルビタールナトリウムで屠殺した。屠殺後、血清を調製するために腋窩脈管からの放血により血液を得た。肺を取り除き、滅菌した砂を用いて 2.5 ml 緩衝液中でホモジエナライズした。肺のホモジエナライズ物を遠心分離して砂と細胞破片を沈降させ、上澄み液を一定分量採取し、-70[°]C で保存した。

【0181】

ウイルス負荷を、逆転写酵素 (R T -) P C R を用いる肺サンプル中の R S V R N A コピー数の定量化により調べた。製造業者の説明書に従って、抽出システムを自動化した MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Kit (Roche Diagnostics) を用いて、肺のホモジエナライズサンプルから R N A を抽出した。W h i l e y ら (J. Clinical Microbiol. 2002, 40: 4418-22) により開示されるごとく R S V サブタイプ A の N 遺伝子に特異的なプライマーおよびフルオロフォア標識プローブによる Light Cycle 機器および試薬 (Roche Diagnostics) を用いて、single - tube リアル - タイム R T - P C R により、R S V R N A の検出を行つた。公知の R S V R N A コピー数を有するサンプルを同様に解析することにより標準曲線を作成した。

40

50

【0182】

肺組織サンプルにおける異なるサイトカインおよびケモカインのレベルを、齧歯類のmulti-analyte profile (MAP) を用いるRules-Based Medicine (テキサス州、オースティン) で市販される複数の免疫アッセイにより調べた。

【0183】

k - 2 コットンラット誘発モデル

6 - 8 週齢の雌コットンラット (*Sigmodon hispidus*) に、0 . 5 ml の抗体調製物またはプラセボ (PBS) を研究 - 1 日目に腹腔内に接種する。24 時間後、イソフルオランで早急に麻酔にかけ、 10^{-6} - 10^{-7} pfu のRSV株A2またはコントロール培地 (偽の接種菌液) の鼻腔内誘発を与える。総体積 100 μ l の接種菌液を投与し、両方の鼻腔に均等に分布させる。鼻腔内誘発の完了後、各ラットを最低 30 秒間真っ直ぐに立たせてから接種菌液を完全に吸気させる。誘発 5 日後、ペントバルビタールの致死性腹腔内注射により屠殺し、心臓穿刺により放血させる。血清サンプルを採取し、-80°で凍結し、各ラットを肺および鼻腔組織を除去するために無菌条件下で解剖する。組織サンプルをホモジエナイズし、上澄み液を -80°において一定分量で保存した。

10

【0184】

組織サンプルにおけるウイルス負荷を、Vam Eldenらの方法 (J Clin Microbiol 2003, 41(9):4378-4381) に基づく Taq - Manリアル - タイムアッセイにより RSV RNA コピー数を定量化することで調べる。簡単に説明すると、製造業者の説明書に従って RNeasy (Qiagen) 法を用いて、肺のホモジエナイズしたサンプルから RNA を抽出する。抽出された RNA を cDNA に逆転写させ、次いで、RSVサブタイプ A の N 遺伝子に特異的なプライマーおよび標識プローブとともに Superscript III Platinum One Step Quantitative RT - PCR system (Invitrogen) を用いて PCR により増幅する。公知の RSV 濃度を有するサンプルを同様に解析して標準曲線を作成する。

20

【実施例 2】

【0185】

本実施例では、抗 - RSV 特異性を有する全長抗体として発現される同種 V_H および V_L ペアを含むクローンの単離、スクリーニング、選択および保存を例示した。

30

【0186】

ドナー

合計 89 人のドナーを、RSV の季節に従業者およびビィドゥビエ病院 (デンマーク) の小児科に入院した子供の両親の中から採用した。18 ml の最初の血液サンプルを採血し、CD19⁺ B 細胞を精製し (実施例 1、セクション a) 、ELISpot を用いて抗 - RSV 抗体の存在について検査し (実施例 1、セクション b) 、血漿細胞の発生頻度を FACS 解析により調べた。

【0187】

最初の血液サンプルのスクリーニング時に 11 人のドナーが陽性と見出され、これらのうちの 10 人から 450 ml の 2 回目の血液サンプルを採血した。形質芽細胞を実施例 1 のセクション a に従って単一細胞に分別した。ELISpot を CD19 陽性 B 細胞の画分について行った。

40

【0188】

2 回目の供血では、合計血漿細胞集団のうちの 0 . 2 および 0 . 6 % 間の RSV 特異的な血漿細胞 (IgG⁺ および IgA⁺) の ELISpot 頻度を有する 4 人のドナーを同定した。これらの頻度を、同種 V_H および V_L ペアのレパートリーの連結を促進するのに十分高いと考えた。

【0189】

同種 V_H および V_L をコードするペアの単離

50

抗体のレパートリーをコードする核酸を、5人のドナーに由来する単一細胞に分別された血漿細胞から多重重複伸長R T - P C R（実施例1、セクションc）により単離した。多重重複伸長R T - P C Rは、重鎖可変領域遺伝子フラグメント（V_H）および全長軽鎖（L C）の間に物理的連結を作出する。V_H増幅用に1つおよびL C増幅用に1つである2つのプライマーセットを用いることにより、全てのV_H-遺伝子ファミリーとカッパ軽鎖の抗体遺伝子を増幅するためにプロトコルを設計した。逆転写および多重重複伸長P C Rに統いて、連結された配列をネスティドプライマーのセットによる2番目のP C R増幅にかけた。

【0190】

各々のドナーについて個別に処理し、多重重複R T - P C Rにより1480から2450個の重複産物を作成した。各ドナーからの同種の連結したV_HおよびV_Lをコードするペアの作成したコレクションをプールし、実施例1のセクションd）に記載されるごとき哺乳動物I g G発現ベクター（図3）に組み込んだ。作成したレパートリーをE . c o l iに形質転換させ、20個の384-ウェルプレート中で一元管理し、保存した。レパートリーは、ドナーあたり 1×10^6 および 3.6×10^6 個の間のクローンで構成した。

10

【0191】

スクリーニング

I g G抗体を含む上澄み液を、マスタープレートに由来する細菌クローンから調製したD N Aで一過的にトランスフェクトしたC H O細胞から得た。上澄み液を実施例1、セクションeに記載されるごとく選択した。約600個の一次ヒット物を配列決定し、並列比較した。大部分は2つまたはそれ以上のメンバーのクラスターに収まったが、いわゆるシングルトンとして単離されたわずかなクローンも存在した。各クラスターおよびシングルトンに由来する代表的なクローンを、実施例1、セクションe）に記載されるごとき検証研究にかけた。多くの一次ヒット物を、不対システイン、潜在的なP C Rエラーである保存されていない変異、多重コドンの挿入および/または欠失、ならびに切断のごとき望まれていない配列の特徴のため、さらなる特徴付けから排斥した。

20

【0192】

合計85個のユニークなクローンが検証を通過した。これらを表5にまとめる。各クローン番号は、特定のV_HおよびV_Lペアを特定する。I G H VおよびI G K V遺伝子ファミリーは、各クローンについて示され、選択されたクローンのフレームワーク領域（F R）を特定する。各クローンから発現される抗体の相補性決定領域（C D R）のアミノ酸配列が示され、C D R H 1、C D R H 2、C D R H 3は、重鎖のC D R領域1、2および3を示し、C D R L 1、C D R L 2およびC D R L 3は、軽鎖のC D R領域1、2および3を示す。

30

【0193】

完全な可変重鎖および軽鎖配列は、表5の情報から定めることができる。

【0194】

表5の各欄についてのさらなる詳細を以下に記載する。

40

【0195】

I G H VおよびI G K V遺伝子ファミリー名を公式のH U G O / I M G T命名法（IMGT ; Lefranc & Lefranc, 2001, The Immunoglobulin FactsBook, Academic Press）に従つて割り当てた。番号付けと並列比較は、C h o t h i a (Al-Lazikani et al. 1997 J.Mol.Biol. 273:927-48)による。クローン809はC D R H 1の5'に対して2個のコドンの挿入を有し、伸長されたC D Rループに翻訳されうる。クローン831はC D R H 1の位置31に1個のコドンの欠失を有する。

【0196】

欄「A g」は、E L I S A、F L I S Aおよび/またはB i a c o r eにより調べられるごとく、命名されたクローンから産生される抗体により認識されるR S V関連抗原を示す。「+」は、クローンがR S V粒子および/またはR S V感染細胞に結合するが、抗原

50

が同定されていないことを示す。

【 0 1 9 7 】

欄「エピトープ」は、命名されたクローンから產生される抗体により認識される抗原部位またはエピトープを示す（表4および下記を参照）。「U」は、エピトープが知られていないことを示す。UCIおよびUCIIは、未知のクラスターIおよびIIを意味する。これらのクラスターに属する抗体は、類似の反応プロファイルを示すが、いまだ特定のエピトープに割り当てられていない。いくつかの抗体は、A&Cのごとく複合的なエピトープを認識する。（）に示されるエピトープはELISAのみで同定されている。

【 0 1 9 8 】

【表5】

| クローン | TGHV 遺伝子 | CDRH1 1abc2345 | CDRH2 012abc3456789012345 | CDRH3 234567890abcefgijklmn123 | TGRV 遺伝子 | CDRLL1 45678901abcdn1234 | CDRLL2 5 | CDRLL3 8 9 89012345ab678 | Ag | エビトープ |
|------|-------------|--------------------------------|------------------------------|-----------------------------------|--------------------|-----------------------------|---------------|--------------------------------|---------------|-------|
| 735 | 4-59 | D-YDVS NIN—YRENTINNPSELS | 9 6 | 9 0 | 0 | 3-11 | RASQSVNS—HLA | INTENRVT | CCORSNPPEALTF | F |
| 736 | 3-30 | T-YGMH FIRP—DGSTQDYDSVKG | CAKMDYCSRSVSYTYYGM—DW | RAQSQIN—HLN | 1-39 | RAQSQIN—HLN | GASTLQS | CCOSYRP—INF | F | A/I |
| 743 | 1-69 | T-YAHL RTIP—MEDIINVAAQKEFGQ | CAREGAGTINPAEDPYGM—DW | 2-28 | RSSQSVSS—YLA | LASNRS | CHSCLQT—PIE | G | Center. dom | |
| 744 | 1-2 | G-YYMS WINT—SSCETINVAQKEFGQ | CAREGAGTINPAEDPYGM—DW | 3-20 | RAQSQSVSS—YLA | GASSRAT | COOYDSH—SWTE | F | A/I | |
| 793 | 3-11 | D-YXMS YINR—GGTLYTIAADSVRG | CARGUILLATIVELGAF—DW | 1-39 | RAQSQITG—YLN | AASLQS | COOSYNT—LTIF | G | 保存 | |
| 794 | 1-18 | N-YGMN WINA—YNDITYVSPSLQG | CARSYRSQDILIGRYKGPBDVDFNW | 1-12 | RASEIJS—WLA | AASLQS | COOYNSTF—YTF | G | GCRA | |
| 795 | 4-30-4 | SGDYMS YIE—HSGCTYNNPSLKS | CARDYDFFPWGMNRYL—ALW | 3-20 | RASQSVSS—YLA | GASTGAV | COOGYRTP—YTF | F | UCI | |
| 796 | 3-30 | H-YGMH LISY—DGNVNVHYADSVKG | CAKDQVATDIAAAYTF—DW | 2-29 | RSSQBLIRS—DGKTFYL | EYSSRES | CMQELKR—RTF | G | 保存 | |
| 797 | 1-18 | R—EGIS WISA—DNGNTYTAQNQFD | CVRGGVITNEVYXXYGM—DW | 1-9 | RASQISS—YLA | AASLQS | COOYDFT—LTIF | G | GCRA | |
| 798 | 7-4-1 | S-YVWN WINT—NTGDPATAQDFIG | CAWFEEGLE—DW | 1-16 | RASQDINN—YLA | AASLQS | COOYKSLP—YTF | G | GCRA | |
| 799 | 3-30 | N-YGMH VISY—DGRNPKYFADSVKG | CARSGYQVWNLHGF—DW | 1-5 | RASQSVSS—WVA | EARNLSS | COOYHSQG—XTF | E | U | |
| 800 | 3-33 | D-YGMN VIWH—DGSNKVNTDSVKG | CARTTYEFENGYYF—DW | 1D-13 | RASQITD—SLA | AASLRES | COOYKSPL—ATE | F | F1 | |
| 801 | 3-33 | S-YAHM VIYY—EGSNMEYVADSVKG | CARKWLG4—DW | 2-28 | RSSQSLINS—NGNMYVD | IGSNRS | CMQALETP—LTE | F | F1 | |
| 802 | 3-48 | S-YEAM YIGP—GGSDIYIGDSVKG | CARAPGKVY—DW | 1-9 | RASQTSIS—YLA | VASTLES | COOYSKPL—PTF | F | U | |
| 803 | 4-30-4 | SGDYWS YIY—SSGSETTINASLKS | CARTGTLTYTGGEM—HW | 3-20 | RASQSVSS—YLA | GASTRAT | COOGGGG—LTE | F | U | |
| 804 | 3-64 | N-YAHM ATSF—DGSNTYVADSLKG | CARRGEGRFF—DW | 3-20 | RASQSVSS—YLA | AASLQS | COOYFSPL—YTF | F | F1 | |
| 805 | 4-59 | G—DEWS YIY—YRESTSYNNPSLKS | CAREGHSSGSDYXSEF—DW | 1-39 | RASQITG—YLN | GASTRAT | COOANSPL—HTF | F | (F1) | |
| 806 | 5-51 | S-YWIG IVYP—GDSPTTYSPSFOG | CVRGGCFCTATGYCAGHVE—DW | 3-20 | RASQISSG—YLA | GASHRAT | COOGSSL—WTF | + | U | |
| 808 | 2-70 | TRMSVS RID—WDDDKYXSTSLKT | CARIVFHFTSGSYVNPYM—DW | 1-39 | RASQTSIS—YLS | TASSLQS | COHSYNTP—YTF | F | (F1) | |
| 809 | 5-51 | FYSTWIG LIMP—ADSYTRYSPEFQG | CARRYDSGHE—HW | 3D-15 | RASQSVGS—KLA | GASTRAT | COOYNWNP—YTF | F | (F1) | |
| 810 | 1-69 | N—YAHN RITP—VEDNTYVADSVKG | CLRGTERGWIDGE—DW | 1D-17 | RASQITN—YLV | AASLQS | COJDNISP—YTF | F | A/I | |
| 811 | 1-46 | N—YYIH VINP—NGSSTTSHAKRFQD | CARQSVTGTGGDAWLTIDPAS—NTW | 4-1 | RSSETVLTSKNQSYIA | WASTRES | COOYFNTP—ETF | G | 保存 | |
| 812 | 1-69 | S—YSIS MILP—ISGSTTNAQKEFGQ | CARUTFESTSTLDEYYF—DW | 3-20 | RASQSVSS—YIA | GASSRAT | COQYGNSL—ETF | F | F1 | |
| 813 | 5-51 | S—YWIG LIYP—GDSPTRNESFOG | CYRGGYDINGHDKYAF—DW | 1-5 | RASQTSIS—WLA | KSSLLES | COHNTSYS—GTF | F | (F1) | |
| 814 | 3-30-3 | D—YAHM VISY—DANEKTAESVKG | CARAGESSMNEEVINYF—DW | 1-5 | RASQTSIS—RLA | DASSLES | COQYARDSP—WTF | G | 保存 | |
| 815 | 3-23 | T—YAMT VIRA—SGDSEITVADSVRG | CANTICARRYCSGDRCYGF—DW | 2-28 | RSSQSLILHS—DGRYVYD | LASNRS | CMQDHTP—WTF | G | U | |
| 817 | 3-30 | T—HGMM ITSL—DGKTHYVADSVKG | CAKDQGTTINAYEFTVTF—DW | 3-15 | WASOTIGS—NLA | GASTRAT | COOYKRNW—YTF | F | U | |
| 818 | 2-70 | AGEVGVS RID—WDDDKYXSTSLKT | CARIVFASSEYXLYL—DW | 3-19 | RASQTSIS—SLA | DASYRUT | COOYSYRA—LTE | F | B/I/F1 | |
| 819 | 4-30-4 | GADYYWS FLY—DGSSTYVNPESLRS | CARDLGYYGNSHSSYYGL—DW | 3-11 | RASQSVS—YLN | DASYRUT | COOZNSWPGLAE | F | A/I | |
| 822 | 5-51 | N—SWIG SIF—HSGTEHNPSELSK | CAROGRGF—DW | 1D-33 | QASQDID—SLN | DASNLER | COOYDLP—YTF | F | U | |
| 823 | 4-5 | SG-HFWG HIY—FEGNTVNNPSLKS | CARHGEGE—BHW | ID-33 | QASQDID—SLN | DASNLER | COHVNLPSFTE | + | U | |
| 824 | 4-59 | N—YYWG HIY—FEGNTVNNPSLKS | CARDSSNNPAGY—EDW | ID-13 | RPSQDIS—ALA | GASTLQS | COOYNTP—ETF | F | F1SC | |
| 825 | 1-18 | S—ANGIS WISA—SSGENKTAEKFQG | CARDGIGTIVYPSDAF—DW | 4-1 | KSS05VLYNNKRYLA | AASLHS | COOYXOTP—LTE | F | UCI | |
| 827 | 1-24 | A—LSKH FEDP—EDGDTGACKFQG | CATAVAAGNE—DW | 1-39 | RASQTSIS—YLA | AASLHS | COOYNTP—YTF | F | A&C/IV | |
| 828 | 1-3 | T—LNGH LINA—GNGTRESCRFQG | CARLATEAVNPF—DW | 1-5 | RASQTSIS—YLA | KESNLQS | COOYEND—WTF | F | A&C | |
| 829 | 2-70 | RANRVS RID—WDDDKYXSTSLKT | CARTGYDSSSEVLSRKYGL—DW | 1-39 | RASQTSIS—YLN | AASLHS | COHYSIR—ETE | F | U (F1) | |
| 830 | 1-18 | T—YGVIS WISA—YNGNTYXLCRLOG | CARDVGGSSSEVLSRKYGL—DW | 1-5 | RASQTSIS—ELA | KASSLES | COOYNSFP—YTF | G | GCRA | |
| 831 | 1-3 | —YAHM WINV—GNGQTKYSCRFQG | CARRASQYGEVYGNF—DW | 1-5 | RASQTSIS—WLA | DASTLES | COOYNLS—PTF | F | A/I | |
| 833 | 3-30 | Y—IGMH ALSY—DGSNKVQYADSVKG | CAKDQGGSNSNEVFRSRV—AFW | 1-12 | RANQDINN—YLA | GASKLOT | COOQRSFP—ETF | G | Center. dom | |
| 834 | 1-18 | T—YGMN WUSA—HNGNTYXAKKEHD | CVRGENEQQOLVGESEWF—DW | 1-12 | RASQTSK—RLA | GASSLOH | COOQRSFP—ETF | G | GCRA | |
| 835 | 1-18 | S—YGFIS WSSV—YNGNTYXAKKEHG | CARDRNVLILPAAPGGM—DW | 1-9 | RASQTSIS—YIA | AASLQS | COOQNSYP—RTE | G | GCRA | |
| 836 | 4-b | SG-RYNG STY—DSCNTYVNPESLKS | CARGSPICDAF—DW | 1-12 | RASQCTG—WLA | AASLQS | COOYSEFP—RTE | F | (A/I) | |
| 838 | 3-30 | T—EGMH VISY—DGENKTYVADSVKG | CAQCPYENNSGIVL—DW | 1-27 | RASQTSN—YIA | AASLQS | COQKNSAP—QTF | G | 保存 | |

表5：ユニーケで有効なクローン各々の配列および特異性のまとめ

【表6】

| IGKV | 遺伝子 | CDRH1 | CDRH2 | CDRH3 | CDRH4 | CDR1 | | CDR2 | | CDR3 | | CDR4 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------|-------|--------------------------------------|--|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------|--|--|---|---|----------------------------------|----------------------------------|-------------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|-----|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|-----|-----|------|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|-----|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---|
| | | | | | | 5 | 6 | 0 | 0 | 2 | 3 | 3 | 2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| γ | クローナー | 3-3 1ab2345 | 3-3 1ab2345 | 234567890abcedfghijklm12345 | 234567890abcedfghijklm123 | IGKV 遺伝子 | IGKV 遺伝子 | IGKV 遺伝子 | IGKV 遺伝子 | IGKV 遺伝子 | IGKV 遺伝子 | IGKV 遺伝子 | IGKV 遺伝子 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 839 | 3-30 | S-YEIH EISYH —DOGSKFTIDSKRG | CARDLGDTAWKNG CTREMSLNGVTEFGPI CVTFSDSTIAAETF CARGHYSSESSYDORDAE | DYW —DYW —DYW —DYW | DYN —DYN —DYN —DYN | 3-20 4-1 1-5 1-16 | RASDGVYSLA RASOTISN—SLA RASOTISN—SLA RASOTISN—SLA | DASRNAT RASTLES TISTLRS RASTLOS | WASTRAS KASTLES TISTLRS RASTLOS | COQNSP—WTF COQHSP—RTF COQHSF—ETF COQINTP—LTF | G G G G | GCRRA GCRRA GCRRA GCRRA | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 841 | 1-18 | S—YEIS R—YEIS N—SGVS S—IGTS | WISA—YNGNTYQAQKOG WISA—YNGNTYQAQKOG WISA—YNGNTYQAQKOG WISA—YNGNTYQAQKOG | DYN —DYN —DYN —DYN | DYN —DYN —DYN —DYN | 1-5 1-16 1-9 | RASOTISN—YLA RASOTISN—YLA RASOTISN—YLA RASOTISN—YLA | GASSRAT DASTLOS DASTLOS DASTLOS | COQYGSPP—ETF COQSYSP—YTF COQSYSP—YTF COQNYIS—PTF | F F F F | GCRRA GCRRA GCRRA GCRRA | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 842 | 1-18 | 843 | 1-18 | 844 | 1-18-2 | 845 | 1-18 | 846 | 4-61 | 847 | 3-73 | 850 | 1-3 | 851 | 1-18 | 852 | 1-69 | 853 | 5-51 | 855 | 1-18 | 856 | 1-18 | 857 | 3-23 | 858 | 1-69 | 859 | 3-33 | 861 | 3-30 | 863 | 3-23 | 865 | 1-18 | 866 | 1-18 | 867 | 1-69 | 868 | 4-5 | 869 | 3-30 | 870 | 4-59 | 871 | 3-33 | 874 | 3-30 | 876 | 3-23 | 878 | 2-5 | 880 | 3-30 | 881 | 3-48 | 884 | 1-3 | 885 | 4-6 | 886 | 3-30 | 887 | 2-70 | 888 | 4-39 | 889 | 1-18 | 890 | 1-46 | 891 | 3-30 | 892 | 4-33 | 893 | 3-30 | 894 | 3-33 | 895 | 4-6 | 896 | 1-46 | 897 | 2-70 | 898 | 3-15 | 899 | 3-30 | 900 | 4-33 | 901 | 3-30 | 902 | 4-6 | 903 | 1-5 | 904 | 1-5 | 905 | 1-46 | 906 | 1-5 | 907 | 1-5 | 908 | 1-5 | 909 | 1-5 | 910 | 1-5 | 911 | 1-5 | 912 | 1-5 | 913 | 1-5 | 914 | 1-5 | 915 | 1-5 | 916 | 1-5 | 917 | 1-5 | 918 | 1-5 | 919 | 1-5 | 920 | 1-5 | 921 | 1-5 | 922 | 1-5 | 923 | 1-5 | 924 | 1-5 | 925 | 1-5 | 926 | 1-5 | 927 | 1-5 | 928 | 1-5 | 929 | 1-5 | 930 | 1-5 | 931 | 1-5 | 932 | 1-5 | 933 | 1-5 | 934 | 1-5 | 935 | 1-5 | 936 | 1-5 | 937 | 1-5 | 938 | 1-5 | 939 | 1-5 | 940 | 1-5 | 941 | 1-5 | 942 | 1-5 | 943 | 1-5 | 944 | 1-5 | 945 | 1-5 | 946 | 1-5 | 947 | 1-5 | 948 | 1-5 | 949 | 1-5 | 950 | 1-5 | 951 | 1-5 | 952 | 1-5 | 953 | 1-5 | 954 | 1-5 | 955 | 1-5 | 956 | 1-5 | 957 | 1-5 | 958 | 1-5 | 959 | 1-5 | 960 | 1-5 | 961 | 1-5 | 962 | 1-5 | 963 | 1-5 | 964 | 1-5 | 965 | 1-5 | 966 | 1-5 | 967 | 1-5 | 968 | 1-5 | 969 | 1-5 | 970 | 1-5 | 971 | 1-5 | 972 | 1-5 | 973 | 1-5 | 974 | 1-5 | 975 | 1-5 | 976 | 1-5 | 977 | 1-5 | 978 | 1-5 | 979 | 1-5 | 980 | 1-5 | 981 | 1-5 | 982 | 1-5 | 983 | 1-5 | 984 | 1-5 | 985 | 1-5 | 986 | 1-5 | 987 | 1-5 | 988 | 1-5 | 989 | 1-5 | 990 | 1-5 | 991 | 1-5 | 992 | 1-5 | 993 | 1-5 | 994 | 1-5 | 995 | 1-5 | 996 | 1-5 | 997 | 1-5 | 998 | 1-5 | 999 | 1-5 | 900 | 1-5 | 901 | 1-5 | 902 | 1-5 | 903 | 1-5 | 904 | 1-5 | 905 | 1-5 | 906 | 1-5 | 907 | 1-5 | 908 | 1-5 | 909 | 1-5 | 910 | 1-5 | 911 | 1-5 | 912 | 1-5 | 913 | 1-5 | 914 | 1-5 | 915 | 1-5 | 916 | 1-5 | 917 | 1-5 | 918 | 1-5 | 919 | 1-5 | 920 | 1-5 | 921 | 1-5 | 922 | 1-5 | 923 | 1-5 | 924 | 1-5 | 925 | 1-5 | 926 | 1-5 | 927 | 1-5 | 928 | 1-5 | 929 | 1-5 | 930 | 1-5 | 931 | 1-5 | 932 | 1-5 | 933 | 1-5 | 934 | 1-5 | 935 | 1-5 | 936 | 1-5 | 937 | 1-5 | 938 | 1-5 | 939 | 1-5 | 940 | 1-5 | 941 | 1-5 | 942 | 1-5 | 943 | 1-5 | 944 | 1-5 | 945 | 1-5 | 946 | 1-5 | 947 | 1-5 | 948 | 1-5 | 949 | 1-5 | 950 | 1-5 | 951 | 1-5 | 952 | 1-5 | 953 | 1-5 | 954 | 1-5 | 955 | 1-5 | 956 | 1-5 | 957 | 1-5 | 958 | 1-5 | 959 | 1-5 | 960 | 1-5 | 961 | 1-5 | 962 | 1-5 | 963 | 1-5 | 964 | 1-5 | 965 | 1-5 | 966 | 1-5 | 967 | 1-5 | 968 | 1-5 | 969 | 1-5 | 970 | 1-5 | 971 | 1-5 | 972 | 1-5 | 973 | 1-5 | 974 | 1-5 | 975 | 1-5 | 976 | 1-5 | 977 | 1-5 | 978 | 1-5 | 979 | 1-5 | 980 | 1-5 | 981 | 1-5 | 982 | 1-5 | 983 | 1-5 | 984 | 1-5 | 985 | 1-5 | 986 | 1-5 | 987 | 1-5 | 988 | 1-5 | 989 | 1-5 | 990 | 1-5 | 991 | 1-5 | 992 | 1-5 | 993 | 1-5 | 994 | 1-5 | 995 | 1-5 | 996 | 1-5 | 997 | 1-5 | 998 | 1-5 | 999 | 1-5 | 900 | 1-5 | 901 | 1-5 | 902 | 1-5 | 903 | 1-5 | 904 | 1-5 | 905 | 1-5 | 906 | 1-5 | 907 | 1-5 | 908 | 1-5 | 909 | 1-5 | 910 | 1-5 | 911 | 1-5 | 912 | 1-5 | 913 | 1-5 | 914 | 1-5 | 915 | 1-5 | 916 | 1-5 | 917 | 1-5 | 918 | 1-5 | 919 | 1-5 | 920 | 1-5 | 921 | 1-5 | 922 | 1-5 | 923 | 1-5 | 924 | 1-5 | 925 | 1-5 | 926 | 1-5 | 927 | 1-5 | 928 | 1-5 | 929 | 1-5 | 930 | 1-5 | 931 | 1-5 | 932 | 1-5 | 933 | 1-5 | 934 | 1-5 | 935 | 1-5 | 936 | 1-5 | 937 | 1-5 | 938 | 1-5 | 939 | 1-5 | 940 | 1-5 | 941 | 1-5 | 942 | 1-5 | 943 | 1-5 | 944 | 1-5 | 945 | 1-5 | 946 | 1-5 | 947 | 1-5 | 948 | 1-5 | 949 | 1-5 | 950 | 1-5 | 951 | 1-5 | 952 | 1-5 | 953 | 1-5 | 954 | 1-5 | 955 | 1-5 | 956 | 1-5 | 957 | 1-5 | 958 | 1-5 | 959 | 1-5 | 960 | 1-5 | 961 | 1-5 | 962 | 1-5 | 963 | 1-5 | 964 | 1-5 | 965 | 1-5 | 966 | 1-5 | 967 | 1-5 | 968 | 1-5 | 969 | 1-5 | 970 | 1-5 | 971 | 1-5 | 972 | 1-5 | 973 | 1-5 | 974 | 1-5 | 975 | 1-5 | 976 | 1-5 | 977 | 1-5 | 978 | 1-5 | 979 | 1-5 | 980 | 1-5 | 981 | 1-5 | 982 | 1-5 | 983 | 1-5 | 984 | 1-5 | 985 | 1-5 | 986 | 1-5 | 987 | 1-5 | 988 | 1-5 | 989 | 1-5 | 990 | 1-5 | 991 | 1-5 | 992 | 1-5 | 993 | 1-5 | 994 | 1-5 | 995 | 1-5 | 996 | 1-5 | 997 | 1-5 | 998 | 1-5 | 999 | 1-5 | 900 | 1-5 | 901 | 1-5 | 902 | 1-5 | 903 | 1-5 | 904 | 1-5 | 905 | 1-5 | 906 | 1-5 | 907 | 1-5 | 908 | 1-5 | 909 | 1-5 | 910 | 1-5 | 911 | 1-5 | 912 | 1-5 | 913 | 1-5 | 914 | 1-5 | 915 | 1-5 | 916 | 1-5 | 917 | 1-5 | 918 | 1-5 | 919 | 1-5 | 920 | 1-5 | 921 | 1-5 | 922 | 1-5 | 923 | 1-5 | 924 | 1-5 | 925 | 1-5 | 926 | 1-5 | 927 | 1-5 | 928 | 1-5 | 929 | 1-5 | 930 | 1-5 | 931 | 1-5 | 932 | 1-5 | 933 | 1-5 | 934 | 1-5 | 935 | 1-5 | 936 | 1-5 | 937 | 1-5 | 938 | 1-5 | 939 | 1-5 | 940 | 1-5 | 941 | 1-5 | 942 | 1-5 | 943 | 1-5 | 944 | 1-5 | 945 | 1-5 | 946 | 1-5 | 947 | 1-5 | 948 | 1-5 | 949 | 1-5 | 950 | 1-5 | 951 | 1-5 | 952 | 1-5 | 953 | 1-5 | 954 | 1-5 | 955 | 1-5 | 956 | 1-5 | 957 | 1-5 | 958 | 1-5 | 959 | 1-5 | 960 | 1-5 | 961 | 1-5 | 962 | 1-5 | 963 | 1-5 | 964 | 1-5 | 965 | 1-5 | 966 | 1-5 | 967 | 1-5 | 968 | 1-5 | 969 | 1-5 | 970 | 1-5 | 971 | 1-5 | 972 | 1-5 | 973 | 1-5 | 974 | 1-5 | 975 | 1-5 | 976 | 1-5 | 977 | 1-5 | 978 | 1-5 | 979 | 1-5 | 980 | 1-5 | 981 | 1-5 | 982 | 1-5 | 983 | 1-5 | 984 | 1-5 | 985 | 1-5 | 986 | 1-5 | 987 | 1-5 | 988 | 1-5 | 989 | 1-5 | 990 | 1-5 | 991 | 1-5 | 992 | 1-5 | 993 | 1-5 | 994 | 1-5 | 995 | 1-5 | 996 | 1-5 | 997 | 1-5 | 998 | 1-5 | 999 | 1-5 | 900 | 1-5 | 901 | 1-5 | 902 | 1-5 | 903 | 1-5 | 904 | 1-5 | 905 | 1-5 | 906 | 1-5 | 907 | 1-5 | 908 | 1-5 | 909 | 1-5 | 910 | 1-5 | 911 | 1-5 | 912 | 1-5 | 913 | 1-5 | 914 | 1-5 | 915 | 1-5 | 916 | 1-5 | 917 | 1-5 | 918 | 1-5 | 919 | 1-5 | 920 | 1-5 | 921 | 1-5 | 922 | 1-5 | 923 | 1-5 | 924 | 1-5 | 925 | 1-5 | 926 | 1-5 | 927 | 1-5 | 928 | 1-5 | 929 | 1-5 | 930 | 1-5 | 931 | 1-5 | 932 | 1-5 | 933 | 1-5 | 934 | 1-5 | 935 | 1-5 | 936 | 1-5 | 937 | 1-5 | 938 | 1-5 | 939 | 1-5 | 940 | 1-5 | 941 | 1-5 | 942 | 1-5 | 943 | 1-5 | 944 | 1-5 | 945 | 1-5 | 946 | 1-5 | 947 | 1-5 | 948 | 1-5 | 949 | 1-5 | 950 | 1-5 | 951 | 1-5 | 952 | 1-5 | 953 | 1-5 | 954 | 1-5 | 955 | 1-5 | 956 | 1-5 | 957 | 1-5 | 958 | 1-5 | 959 | 1-5 | 960 | 1-5 | 961 | 1-5 | 962 | 1-5 | 963 | 1-5 | 964 | 1-5 | 965 | 1-5 | 966 | 1-5 | 967 | 1-5 | 968 | 1-5 | 969 | 1-5 | 970 | 1-5 | 971 | 1-5 | 972 | 1-5 | 973 | 1-5 | 974 | 1-5 | 975 | 1-5 | 976 | 1-5 | 977 | 1-5 | 978 | 1-5 | 979 | 1-5 | 980 | 1-5 | 981 | 1-5 | 982 | 1-5 | 983 | 1-5 | 984 | 1-5 | 985 | 1-5 | 986 | 1-5 | 987 | 1-5 | 988 | 1-5 | 989 | 1-5 | 990 | 1-5 | 991 | 1-5 | 992 | 1-5 | 993 | 1-5 | 994 | 1-5 | 995 | 1-5 | 996 | 1-5 | 997 | 1-5 | 998 | 1-5 | 999 | 1-5 | 900 | 1-5 | 901 | 1-5 | 902 | 1-5 | 903 | 1-5 | 904 | 1-5 | 905 | 1-5 | 906 | 1-5 | 907 | 1-5 | 908 | 1-5 | 909 | 1-5 | 910 | 1-5 | 911 | 1-5 | 912 | 1-5 | 913 | 1-5 | 914 | 1-5 | 915 | 1-5 | 916 | 1-5 | 917 | 1-5 | 918 | 1-5 | 919 | 1-5 | 920 | 1-5 | 921 | 1-5 | 922 | 1-5 | 923 | 1-5 | 924 | 1-5 | 925 | 1-5 | 926 | 1-5 | 927 | 1-5 | 928 | 1-5 | 929 | 1-5 | 930 | 1-5 | 931 | 1-5 | 932 | 1-5 | 933 | 1-5 | 934 | 1-5 | 935 | 1-5 | 936 | 1-5 | 937 | 1-5 | 938 | 1-5 | 939 | 1-5 | 940 | 1-5 | 941 | 1-5 | 942 | 1-5 | 943 | 1-5 | 944 | 1-5 | 945 | 1-5 | 946 | 1-5 | 947 | 1-5 | 948 | 1-5 | 949 | 1-5 | 950 | 1-5 | 951 | 1-5 | 952 | 1-5 | 953 | 1-5 | 954 | 1-5 | 955 | 1-5 | 956 | 1-5 | 957 | 1-5 | 958 | 1-5 | 959 | 1-5 | 960 | 1-5 | 961 | 1-5 | 962 | 1-5 | 963 | 1-5 | 964 | 1-5 | 965 | 1-5 | 966 | 1-5 | 967 | 1-5 | 968 | 1-5 | 969 | 1-5 | 970 | 1-5 | 971 | 1-5 | 972 | 1-5 | 973 | 1-5 | 974 | 1-5 | 975 | 1-5 | 976 | 1-5 | 977 | 1-5 | 978 | 1-5 | 979 | 1-5 | 980 | 1-5 | 981 | 1-5 | 982 | 1-5 | 983 | 1-5 | 984 | 1-5 | 985 | 1-5 | 986 | 1-5 | 987 | 1-5 | 988 | 1-5 | 989 | 1-5 | 990 | 1-5 | 991 | 1-5 | 992 | 1-5 | 993 | 1-5 | 994 | 1-5 | 995 | 1-5 | 996 | 1-5 | 997 | 1-5 | 998 | 1-5 | 999 | 1-5 | 900 | 1-5 | 901 | 1-5 | 902 | 1-5 | 903 | 1-5 | 904 | 1-5 | 905 | 1-5 | 906 | 1-5 | 907 | 1-5 | 908 | 1-5 | 909 | 1-5 | 910 | 1-5 | 911 | 1-5 | 912 | 1-5 | 913 | 1-5 | 914 | 1-5 | 915 | 1-5 | 916 | 1-5 | 917 | 1-5 | 918 | 1-5 | 919 | 1-5 | 920 | 1-5 | 921 | 1-5 | 922 | 1-5 | 923 | 1-5 | 924 | 1-5 | 925 | 1-5 | 926 | 1-5 | 927 | 1-5 | 928 | 1-5 | 9 |

【 0 2 0 0 】

CDRH1と名付けられた欄における上段から下段までのアミノ酸配列は、配列番号：201-285と同じ順番で記載される。

【 0 2 0 1 】

C D R H 2 と名付けられた欄における上段から下段までのアミノ酸配列は、配列番号：2 8 6 - 3 7 0 と同じ順番で記載される。

【 0 2 0 2 】

C D R H 3 と名付けられた欄における上段から下段までのアミノ酸配列は、配列番号：3 7 1 - 4 5 5 と同じ順番で記載される。

【 0 2 0 3 】

C D R L 1 と名付けられた欄における上段から下段までのアミノ酸配列は、配列番号：4 5 6 - 5 4 0 と同じ順番で記載される。

【 0 2 0 4 】

C D R L 2 と名付けられた欄における上段から下段までのアミノ酸配列は、配列番号：5 4 1 - 6 2 5 と同じ順番で記載される。 10

【 0 2 0 5 】

C D R L 3 と名付けられた欄における上段から下段までのアミノ酸配列は、配列番号：6 2 6 - 7 1 0 と同じ順番で記載される。

【 0 2 0 6 】

抗原特異性の特徴付け

検証期間に、クローンの抗原特異性を、ウイルス粒子、可溶性 G および F タンパク質ならびに G タンパク質のフラグメントに対する結合性によりある程度まで調べた。

【 0 2 0 7 】

抗 - F 反応性を有するクローンにおいては、さらに、抗原部位、可能ならば各クローンにより結合されるエピトープを調べるために、クローンから発現される各抗体の特異性を測定した（実施例 1、セクション g - 4 を参照）。図 4 は、B i a c o r e 解析を用いて、クローン 8 0 1 から得られた抗体のエピトープ特異性の特徴付けを示す。解析は、タンパク質 F が、抗体 8 0 1 の B i a c o r e 細胞への注入前に 1 3 3 - 1 h またはパリビズマブ（抗原部位 C および I I 各々）により阻害される場合、高い抗体 8 0 1 結合性が検出できることを示す。競合した 8 0 1 抗体の結合性は、競合しない 8 0 1 抗体の結合性と比較してわずかに減少する。しかしながら、この減少は非常に低いため、結合部位の直接競合より立体構造の障害による可能性が高い。抗体 8 0 1 の B i a c o r e 細胞への注入前の 9 c 5 抗体（抗原部位 F 1 ）を有するタンパク質 F の阻害は、F タンパク質への抗体 8 0 1 結合性のほぼ完全な阻害を示す。それゆえ、抗体 8 0 1 は F 1 部位、またはそれに非常に近い部位でタンパク質 F に結合することとなる。 20 30

【 0 2 0 8 】

抗 - G 反応性を有するクローンにおいては、さらに、各抗体が G タンパク質の中心ドメイン、保存領域、または G C R R に結合するかどうか、また、エピトープが保存またはサブタイプ特異的であるかを調べるために、クローンから発現される各抗体の特異性を測定した。このことは、以下の G タンパク質フラグメントを用いる E L I S A および / または F L I S A により行った：

G (B) : (D G 4 4 C H O 細胞で発現される) R S V 株 1 8 5 3 7 に由来する残基 6 6 - 2 9 2

G (B) フラグメント : (E . c o l i で発現される) R S V 株 1 8 5 3 7 に由来する残基 1 2 7 - 2 0 3 40

G C R R A : (選択的に形成されたシステイン架橋を伴って合成される) R S V 株 L o n g に由来する残基 1 7 1 - 1 8 7

G C R R B : (選択的に形成されたシステイン架橋を伴って合成される) R S V 株 1 8 5 3 7 に由来する残基 1 7 1 - 1 8 7

G 保存 : 残基 1 6 4 - 1 7 6

【 0 2 0 9 】

さらなるエピトープ解析を、実施例 1、セクション g - 4 に記載されるごとき競合アッセイにより抗 - G 反応性クローンにおいても行った。

【 0 2 1 0 】

さらに、実施例1、セクションeに記載されるごときスクリーニング手法で同定されたクローンのうちの1つは、SH特異的な抗体を産生する。加えて、多くのクローンは、1つまたはそれ以上の試験されたRSV株に結合するが、抗原は調べられなかった。

【0211】

全ての検証されたクローンにおける抗原特異性に関するデータを表5にまとめる。検証されたクローンはいずれもヒト咽頭上皮細胞に結合せず、試験されたG-特異的クローン(793、816、835、841、853、855、856、および888)のいずれもまたヒトフラクタルカイン(CX3CL1)に結合しなかった。

【0212】

結合反応速度の特徴付け

組み換えRSV抗原に関する結合親和性を、番号付けした抗体クローンにおける表面プラズモン共鳴により調べた。全長抗体の酵素切断により調製されたFabフラグメントで解析を行った。ピコモルからナノモル範囲における K_D 値を有する多くの高親和性抗体クローンについてのデータを表6に表す。市販されているパリビズマブ(Synagis)から得たFabフラグメントを対照として同様に解析した。

【0213】

表6：選択されたクローンの動力学的結合定数および親和性

【表7】

| Fabクローン (抗原) | k_{on} ($10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) | k_{off} (10^{-5} 1/s) | $t_{1/2}$ (min) | K_D (pM) |
|-----------------|--|--|--------------------|---------------|
| 735 (F) | 4.07 | 9.18 | 130 | 226 |
| 810 (F) | 17.40 | 34.80 | 33 | 200 |
| 818 (F) | 1.92 | 2.20 | 530 | 115 |
| 817 (F) | 0.92 | 7.54 | 150 | 820 |
| 819 (F) | 3.56 | 4.99 | 230 | 140 |
| 825 (F) | 7.72 | 15.00 | 77 | 195 |
| 858 (F) | 4.97 | 0.34 | 3400 | 7 |
| 831 (F) | 3.72 | 42 | 28 | 1130 |
| 796 (G) | 8.33 | 40.3 | 28.67 | 480 |
| 811 (G) | 4.98 | 17.1 | 68 | 340 |
| 816 (G) | 20.20 | 17.80 | 65 | 90 |
| 838 (G) | 2.64 | 5.06 | 230 | 190 |
| 853 (G) | 17.7 | 140 | 8.25 | 790 |
| 859 (G) | 3.8 | 4.63 | 250 | 120 |
| Synagis (F) | 2.00 | 75.70 | 15 | 3780 |

【0214】

表5におけるクローン番号735、736、744、793、795、796、799、800、801、804、810、811、812、814、816、817、818、819、824、825、827、828、829、830、831、835、838、841、853、855、856、857、858、859、861、863、868、870、871、880、881、884、885、886、888、894および955に対応する47個のユニークな同種 V_H および V_L をコードするペアのサブセットを、単一の V_H および V_L 遺伝子配列からユニークな抗体をそれぞれ発現する安定な個々の発現細胞株の作成のために選択した。44個の選択されたクローン(上記に同定された828、885、および955を除く)の全配列(DNAおよび推定アミノ酸)を配列番号：1-176に示す。

【0215】

44個のクローンを、配列番号：1-44に記載される以下の V_H 配列を産生すること

10

20

30

40

50

により特徴付けする：

【0216】

クローン番号735：

QVQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSNGA|GDYDWSW|RQSPGKGLEW|GN|NYRGNTNYNPSLKSRTMSLRTSTMQFSL
KLSSATAADTAVYYCARDVGYGGGQYFAMDVWSPGTTVTVSS

【0217】

クローン番号736：

QVQLVESGGVVQPGSRLSCTASGFTFSTYGMHWVRQAPGKGLEWVAF|RVDGSTQDYVDSVKGRFT|SRDNSKNMVY
VQMNSLRVEDTAVYYCAKDMDDYYGSRSYSVTYYGMDVWGQGTTVTVSS

【0218】

クローン番号744：

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFSGYMMHWVRQAPGQGLEWMG|NTSSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTS|STAH
MELRRLRSDDTAVYYCAREDGTMGTNSWYGWFDPWGQGTLTVSS

【0219】

クローン番号793：

QVQLVESGGGLVKPGSRLSCAASGFPGDYYMSW|RQAPGKGLEWVAY|NRGGTT|YYADSVKGRFT|SRDNAKNSLF
LQMNSLRAGDTALYYCARGL|LALPTATVELGAFD|WGQGTMVTVSS

【0220】

クローン番号795：

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGAS|SSGDYYWSW|RQSPRKGLEW|GY|FHSGTYYNPSLKSRAV|SLDTSKNQF
SLRLTSVTAADTAVYYCARDVDDFPVWGMNRYLALWGRGTLTVSS

【0221】

クローン番号796：

QVQLVESGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSHFGMHWVRQVPGKGLEWVA||SYDGNNVHYADSVKGRFT|SRDNSKNTLF
LQMNSLRDDDTGVYYCAKDDVATDLAAYYYFDVWGRGTLTVSS

【0222】

クローン番号799：

QVQLVESGGVVQPGRSLRLSCAASGFNFNNYGMHWVRQAPGKGLEWVAV|SYDGRNKYFADSVKGRFI|SRDDSRNTVF
LQMNSLRVEDTAVYYCARGSVQVWLHLGLFDNWGQGTLTVSS

【0223】

クローン番号800：

QVQLVESGGAVVQPGRSLRLSCEVSGFSFSDYGMNWVRQPGKGLEWVAV|WHDGSNKNYLDSVKGRFTSRDNSKNTLF
LQMNSLRAEDTAVYYCARTPYEFWSGYYFDFWGQGTLTVSS

【0224】

クローン番号801：

QVQLVESGGVVQPGRSLRLSCAASGFNFNSYAMHWVRQAPGKGLEWVAV|YYEGSNEYADSVKGRFT|SRDNSKNTLY
LQMDSLRAEDTAVYYCARKWLGMDFWGQGTLTVSS

【0225】

クローン番号804：

EVQLVESGGGLVRPGSRLSCSASGFTFSNYAMHWVRQAPGKRLEYVSATSTDGGSTYYADSLKGTF|SRDNSKNTLY
LQMSSLSTEDTA|YYCARRFWGFGNFFDYWGRGTLTVSS

【0226】

クローン番号810：

QVQLVQSGAEVKKSGSSVKVSCRASGGTFGNYA|NWVRQAPGQGLEWVGR|PVFDTTNYAQKFQGRVT|TADRSTNTA|MQLSSLRPQDTAMYCLRGSTRGWDTGFD|WGQGTMVTVSS

【0227】

クローン番号811：

QVQLVQSGAVVETPGASVKVSKASGY|FGNYY|HWVRQAPGQGLEWMAV|NPNGGTTSAQKFQDR|TVTRDTSTTVY
LEVDSLNRSEDTATYYCARQRSVTGGFDAWLL|PDASNTWGQGTMVTVSS

【0228】

10

20

30

40

50

クローン番号 8 1 2 :

QVQLVQSGAEMKKPGSSVKVSCKASGGSFSSYS I SWVRQAPGRGLEWVMILPISGTTNYAQTFQGRVI I SADTSTSTAY
MELTSLTSEDTAVYFCARVFREFSTLDPYYFDYWQGTLTVSS

【 0 2 2 9 】

クローン番号 8 1 4 :

QVQLVESGGGVQPGKSVRLSCVGSGFRLMDYAMHWVRQAPGKGLDWAVI SYDGANEYYAESVKGRFTVSRDNSDNTLY
LQMKSRLRAEDTAVYFCARAGRSMNEEVIMYFDNWGLGTLTVSS

【 0 2 3 0 】

クローン番号 8 1 6 :

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCVASGFTFSTYAMTWVRQAPGKGLEWVSI RASGDSEI YADSVRGRFTI SRDNSKNTVF 10
LQMDSLVEDTAVYFCANIGQRRYCSGDHCYGHFDYWQGTLTVSS

【 0 2 3 1 】

クローン番号 8 1 7 :

QVQLVESGGGVQPGRSLRLSCAASGFGFNTHGMHWVRQAPGKGLEWLSI ISLDGI KTHYADSVKGRFTI SRDNSKNTVF
LQLSGLRPEDTAVYYCAKDHIGGTNAYFEWTVPFDGWGQGTLTVSS

【 0 2 3 2 】

クローン番号 8 1 8 :

QVTLRESGPBVKPTETLTLCAFSGFSLNAGRGVWSI RQPPGQAPEWLARI DWDDDKAFRTSLKTRLSI SKDSSKNQV
VLTLSNMDPADTATYYCARTQVFASGGYYLYYLDHWGQGTLTVSS

【 0 2 3 3 】

クローン番号 8 1 9 :

QVQLQESGPLVKPSQTLSLTCTVSSGAISGADYYWSWI RQPPGKGLEWVGFII YDSGSTYYNPSLRSRVTISIDTSKKQF
SLKLTSVTAADTAVYYCARDLGYYGGNSYSHSYYYGLDVWGRGTTVTVSS

【 0 2 3 4 】

クローン番号 8 2 4 :

QVQLQESGPLVKPSETLSLTCTVSGGSIGNYYWGWI RQPPGKGLEWIGHI YFGGNTNYNPSLQSRVTISVDTSRNQFSL
KLNSVTAADTAVYYCARDSSNWPAGYEDWGQGTLTVSS

【 0 2 3 5 】

クローン番号 8 2 5 :

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTFITSNGLSWVRQAPGQGFELGWISASSGNKKYAPKFQGRVTLTTDISTSTAY 30
MELRSLSRSDDTAVYYCAKDGGTYVPYSDAFDFWGQGTMVTVSS

【 0 2 3 6 】

クローン番号 8 2 7 :

QVQLVQSGAEVKKPGASVKSCRVSHTFTALSKHWMRQGPGGLEWMGFFDPEDGDTGYAQKFQGRVTMTEDTATGTAY
MELSSLTSDDTAVYYCATVAAAGNFNDNWGQGTLTVSS

【 0 2 3 7 】

クローン番号 8 2 9 :

QVTLKESGPALVKATQTLTCTFSGFSLSRNRMSVSWI RQPPGKALEWLARI DWDDDKFYNTSLQTRLTI SKDTSKNQV
VLTMTNMDPVDTATYYCARTGI YDSSGYYLYYFDYWQGTLTVSS

【 0 2 3 8 】

クローン番号 8 3 0 :

QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFITTYGVSWVRQAPGQGLEWMWI SAYNGNTYYLQKLQGRVTMTTDSTSTAY
MELRGLRSDDTAMYCARDRVGGSSSEVLSRAKNYGLDVWQGTTVTVSS

【 0 2 3 9 】

クローン番号 8 3 1 :

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASANIFTYAMHWVRQAPGQRLEWMWI NVNGQTKYSQRFQGRVTI TRDTSATTAYM
ELSTLRSEDTAVYYCARRASQYGEVYGNYFDYWQGTLTVSS

【 0 2 4 0 】

クローン番号 8 3 5 :

QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFISYGFWSVRQAPGQGLEWMGWSSVYNGDTNYAQKFHGRVNMTTDSTNTAY 50

MELRGLRSDDTAVYFCARDNVVLLPAAPFGGMDVWGQGTMVTVSS

【 0 2 4 1 】

クローン番号 8 3 8 :

QVQLVESGGVVQPGTSRLSCAASGFTSTFGMHWVRQAPGKGLEWVAVI SYDGNKKYYADSVKGRFT I SRDNSKNTLY
LQVNSLRVEDTAVYYCAAQTPYFNESSGLVPDWGQGTLTVSS

【 0 2 4 2 】

クローン番号 8 4 1 :

QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTF I SFG I SWVRQAPGQGLEWMGW I SAYNGNTDYAQLQDRVTMTRDTATSTAY
LELRSLSKASDDTAVYYCTRDESMLRGVTEGFGP I DYWGQGTLTVSS

【 0 2 4 3 】

クローン番号 8 5 3 :

EVQLVQSGAEVKPGQSLK I SCKTSGY I FTNYW I GWVRQRPGKGLEWMGV I FPADSDARYSPSFQGQVT I SADKS I GTAY
LQWSSLKASDTA I YYCARPKYYFDSSGQFSEMYYFDFWGQGTLTVSS

【 0 2 4 4 】

クローン番号 8 5 5 :

QVQLVQSGPEVKPGASVKVSCKASGYVLNYAFSWVRQAPGQGLEWLW I SGSGNNTYYAEKFQGRVTMTTDSTSTAY
MELRSLSRSDDTAVYFCARDLLRSTYFDYWQGTLTVSS

【 0 2 4 5 】

クローン番号 8 5 6 :

QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFSNYGFSWVRQAPGRGLEWMGW I SAYNGNTYYAQNLQGRVTMTTDSTTTAY
MVLRSLSRSDDTAMYYCARDGNTAGVDMWSRDGFD I WGQGTMVTVSS

【 0 2 4 6 】

クローン番号 8 5 7 :

EVQLLESGGGLVQPGGPLRLSCVASGFSFSSYAMNW I RLAPGKGLEWVSG I SGSGGSTYYGDSVKGRFT I SRDNSKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAKEPWID I VVASV I SPYYYDGMDVWGQGTTTVSS

【 0 2 4 7 】

クローン番号 8 5 8 :

QVQLVQSGAEVKPGSSVKVSCKASGGSFDGYT I SWLRQAPGQGLEWMGRVVPTLGFPNYAQKFQGRVTVTADRSTNTAY
LELSRLTSEDTAVYYCARMNLGSHSGRPGFDMWGQGTLTVSS

【 0 2 4 8 】

クローン番号 8 5 9 :

QVQLVESGGVVQPGRSLRLSCAVSGSSFSKYG I HWVRQAPGKGLEWVAVI SYDGSKKYFTDSVKGRFT I ARDNSQNTVF
LQMNSLRAEDTAVYYCATGGGVNVTSDVEHSSLGYWGLGTLTVSS

【 0 2 4 9 】

クローン番号 8 6 1 :

QVQLVESGGVVQPGGSLRLSCAASGFTSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAF I WNDGSNKYYADSVKGRFT I SRDNSKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCVKDEVYDSSGYYLYYFDSWGQGTLTVSS

【 0 2 5 0 】

クローン番号 8 6 3 :

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSSYTMWSVRQAPGKGLEWVSS I SASTVLTYYADSVKGRFT I SRDNSKNTLY
LQMSSLRAEDTAVYYCAKDYDFWSGYPGQYWFFDLWGRGTLTVSS

【 0 2 5 1 】

クローン番号 8 6 8 :

QVQLQESGPGLVTPSETLSVTCTVSNYS I DNAYYWG I RQPPGKGLEWIGS I HHSGSAYNSSLKSRAT I S IDTSKNQFS
LNLRSVTAADTAVYYCARDT I LTFGEPHWFDPWGQGTLTVSS

【 0 2 5 2 】

クローン番号 8 7 0 :

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGDS I SNYYWSW I RQPPGKGLEWIGE I SNTWSTNPNPSLKSRVT I SLMPKNQLSL
KLSSVTAADTAVYYCARGLFYDSGGYYLFYFQHWGQGTLTVSS

【 0 2 5 3 】

10

20

30

40

50

クローン番号 871 :

QVQLVESGGVVQPGRSRLRVSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDDSNKQYGDVKGRFTISRDNSKSTLY
LQMDSLVEDTAVYYCARASEYSISWRHRGVLDYWGQGTLTVSS

【0254】

クローン番号 880 :

QITLKESGPTLVRPTQTLTCTFSGFSLSTSCLGVGWIRQPPGKALEWLALVDWDDDRYRPSLKSRLTVTKDTSKNQV
VLTMTNMDPVDTATYYCAHSAYTSSGYYLQYFHHWGPGLTVSS

【0255】

クローン番号 881 :

EVQLVESGGVVQPGSRLSCEVSGFTFNSYEMTWVRQAPGKGLEWVSHIGNSGSMIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLY
LQMNSLRVEDTAVYYCARSDDSSGYYLLYLDSWGHTLTVSS

【0256】

クローン番号 884 :

QVQLVQSGAEVRKPGASVKVSCKASHTFINFAMHWVRQAPGQGLEWMGYINAVNGNTQYSQKFQGRVTFRDTSANTAY
MELSSLRSEDTAVYYCARNNGSAIFIYWGQGTLTVSS

【0257】

クローン番号 886 :

QVQLVESGGVVQPGSRLSCLCAASGFSFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISNDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKKTMY
LQMNSLRRAEDTAVYFCAKTTDQRLLVDWFDPWGQGTLTVSS

【0258】

クローン番号 888 :

QLQLQESGPLVKPSETLSLTCTASGGSINSSNFYWGWIHQPPGKLEWIGSFYSGTYYNPSLKSRTISVDTSKNQF
SLKLSPVTAADTAVYHCARHGFRYCNGVCSINLDAFDIWGQGTMVTVSS

【0259】

クローン番号 894 :

QVQLVESGGVVQPGSRLSCLCAASGFRFSDYGMHWVRQAPSKGLEWVAVIWHDGSIRYADSVRGRFSISRDNSKNTLY
LQMNSMRADDTAFYYCARVPFQIWSGLYFDHWGQGTLTVSS

【0260】

これらのV_Hアミノ酸配列は、以下の核酸配列によりコードされるクローンに存在し、
それらはまた、配列番号：45-88として記載される：

【0261】

クローン番号 735 :

caggtgcagctcaggactcgcccccaggactggtaagccttcggagaccctgtccctcacgtgcacgtgtctaatgg
cgccatcgccgactacgactggagctggattcgtagtccccaggaaaggactggagttggatggaaacataattaca
gagggAACACCAACTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCAGTCAGTCACCATGTCCTACGCACGTCCACGATGCGATT
aagctgagctctgcaccgctgcggacacggccgtcttactgtcgagagatgtaggctacggtgccggcagttt
cgcatggacgtctggagccaggaccacggtcaccgttcgt
【0262】

クローン番号 736 :

caggtgcagctggtagtgtggggaggcgtggccagccctgggggtccctgagactctccgtacagcgtctggatt
cacctttagtacatatggcatgcactgggtccgccaggctccggcaagggctggatggatggatatacggat
atggaagtactcaagactatgttagactccgtgaagggccgattcaccatctccagagacaattccaagaatatggat
gtgcagatgaacagcctgagagtggggacacggctgttactgtgcgaaagacatggattactatggttcgcggag
tttattctgtcacctactacggatggacgtctggggccaaggaccacggtcaccgttcgt
【0263】

クローン番号 744 :

caggtgcagctggtagtgtggggaggcgtggccagccctgggggtccctgaggtctccgtcaaggcttcgt
cacctttagcggcttataatgcactgggtgcgacaggccctggacaaggcttgcgttgcgatggatggatcaacacta
gcagttggcacaactatgcgcagaagtttgcggcagggtcaccatgaccaggacacgtccatcagcacagccac
atggaactgaggaggctgagatctgacgacacggccgttattatgtgcgagagaggacggcaccatgggtactaatag

10

20

30

40

50

t tggtaggctggttcgaccctggggccagggAACCCtggtcaccgtctcgagt

【 0 2 6 4 】

クローン番号 793 :

cagggtcagctggggaggctggtaagccctggggggccctgagactccctgtcgcccttgatt
cccccttcggtactacatgagctggatccgcaggctccagggaaaggactggagtggttgcatacatataagag
gtggcactaccatatactacgcagactctgtgaagggccgatcaccatctccaggacaacgccaagaactccctgttt
ctgcaaataaacgcctgagagccgggacacggcccttatatactgtgcagagggctaattctagcactaccgactgc
tacggtttaggttaggacttttgtatctggggcaaggacaatggtcaccgtctcgagt

【 0 2 6 5 】

クローン番号 795:

caggtgcagctgcaggagtggcccccaggactggtaagcctcacagaccctgtccctcacctgactgtctctggtgc
ctccatcagcagtggtgattattactggagtggatccgtcagtcctccaaggaaagggcctggagtggattgggtacatct
tccacagtgggaccacgtactacaaccgtccctcaagagtgcagctgtcatctcactggacacgttccaagaaccaattc
tccctgaggctgacgtctgtgactgccgcagacacggccgtctattatgtgccagagatgtcgacgattttcccgtttg
gggtatgaatcgatatcttgcctctggggccggggaaacctggtcaccgtctcgagt

【 0 2 6 6 】

クローン番号 796 :

cagggtgcagctggtgagactggggaggcggtggccagcctggaggccctgagacttcctgtcagcctctggatt
cagcttcagtcacttggcatgcactgggtccgcaggttccaggcaagggctggagtgggtggcaattatatacatatg
atggaaataatgtacactatgccgactccgtaaagggccgattcaccatctccagagacaattccaagaacacgcgttt
ctgcaaatgaacagcctgagagatgacgacacgggtgttattactgtgcgaaggacgcgtggcgacagatttggctgc
ctactactacttcgatqtctqqqqccqttqcacccqttcacqtcacq

[0 2 6 7]

クローン番号 799 :

cagggtgcagctggtgtagtctggggcgccgtggccagccgtggaggccctgaaactcttgtgaagcctctggatt
caacttcaataattatggcatgcactgggtccgcaggcaccaggcaagggctggagtggggcgcattttcatatg
acggaagaaaataagttttgtctgactccgtgaaggccgattcatcatctccagagacgattccaggaacacagttt
ctgcaaataaacgcgcgtgcgatgtgaagatacggccgtctattactgtgcgagaggcagcgtacaagtctggctacatt
qqqacttttqacaactqqqcccaqqqaacctqgicaccqtcicqagt

【 0 2 6 8 】

クーポン番号 800

caggtgcagctggggaggccgtggccagcctggaggccctgagactccctgtgaagtgtctggatt
cagtttcagtgactatggcatgaactgggtccgcagggccaggcaagggctggagtggtggcagtatatggcatg
acggaagtaataaaaaattatctagactccgtgaaggggccgatcaccgtctccagagacaattccaagaacacatttgttt
ctgcaaatacggccctgagagccaaagacacggctgtatattactgtgcgaggacgccttacgattttgagtggtca
ttactttgacttctggggcccaaggaaaccttggtccccgtctcgat

【 0 2 6 9 】

クローナ番号 801:

cagggtgcagctggtgagactgggggaggcggtggtccagcctggaggccctgagactccctgtgcagcgtctggatt
cccccttaatagctatgccatgcactgggtccggccaggctccaggcaaggggctggagtggtggcagtgtatataattatg
aagggagtaatgaatattatgcagactccgtgaaggggccatcaccatctccagagacaattccaagaacactctgtat
ttgc当地ggatagcctgagagccgaggacacggctgtctat tactgtgcgaggaagtggctgggatggacttctgggg
ccaggaaacctggtaccgtctcgagt

【 0 3 7 0 】

タローネ番号 804 :

gagggtgcagctggtgtggagtcgtggccggcctggggggccctgagactctccgtttagcccttgatt
caccttcagtaactatgcatactgcactgggtccggccaggctccagggaaagagactgaaatatgtttcagctactagtagtactg
atggggggagcacatactacgcagactccctaaagggcacattcaccatctccagagacaattccaagaacacactgtat
cttcaaatgagcagtctcagtagtactgaggacacggctatttactgcgcggccgattctggggatttggaaacttttt
tgcactactggggccggggaaacctgtttcaccgtctcgagt

10

20

30

40

50

【 0 2 7 1 】

クローン番号 8 1 0 :

caggtgcagctggtcagctgggctgaggtaagaagtccggccctcggtgaaggctccctgcaggcctctggagg
 caccccgcaattatgctatcaactgggtgcacaggcccctggacaaggcttgagtggtggaaaggatcatccctg
 tctttgataacaacaaactacgcacagaagttccaggcagagtacgattaccgcggacagatccacaaacacagccatc
 atgcaactgagcagtctgcgacccaggacacggccatgtatttggaggttccacccgtggatactgatgg
 tggtttgatactggggcaagggacaatggtaccgtctcgagt

【 0 2 7 2 】

クローン番号 8 1 1 :

caggctcagctggtcagctgggctgtcgaggacgcctgggctcagtgaaggctccctgcaggcatctggata
 catcttcggcaactactatccactgggtgcggcaggcccctggacaaggcttgagtggtggcagttatcaatccca
 atgggttagcacaactccgcacagaagttccaagacagaataccgtgaccaggacacgtccacgaccactgtctat
 ttggaggttgacaacctgagatctgaggacacggccacatattatgtcgagacagagatctgtacacaggggcttga
 cgcgtggctttaatccagatccttaatccgcggcaggacaatggtaccgtctcgagt

【 0 2 7 3 】

クローン番号 8 1 2 :

caggtgcagctggtcagctgggctgagatgaagaaggctgggtccctcggtgaaggctccctgcaggcctctggagg
 ctccctcagcagctattctatcagctgggtgcacaggcccctggacgaggcttgagtggtggaaatgatcctgccta
 tctctggtaacaacaaactacgcacagacatttcaggcagagtcatcattagcgcggacacatccacgagcacgcctac
 atggagctgaccagcctcacatctgaagacacggccgttattctgtcgagactctttagagaatttagcacctcgac
 ccttgaccctactacttgactactggggccagggAACCTGGTaccgtctcgagt

【 0 2 7 4 】

クローン番号 8 1 4 :

caggtgcagctggtgagctggggaggcggtggccagccctggaaagtccgtgagactctccgttaggctctggctt
 caggctcatggactatgctatgcactgggtccgccaggctccaggcaaggactggattgggtggcagttatttcatatg
 atggagccatgaataactacgcagagtccgtgaaggccgattcaccgtctccagagacaattcagacaacactctgtat
 ctacaaatgaagagcctgagagctgaggacacggctgttattctgtcgagagcggccgttccatgtatgaatgaaga
 agttattatgtacttgacaactgggcctggaaacctggtaccgtctcgagt

【 0 2 7 5 】

クローン番号 8 1 6 :

gagggtgcagctttggagctggggaggcttggccagccctgggggtccctgagactctccgttaggctccggatt
 caccttagtacctacgccatgacctgggtccgccaggctccagggaagggtggagttgggtctcagtcattctgtgcta
 gtggtagatgtaaaatctacgcagactccgtgagggccggttaccatctccagagacaattccaagaacacggtgttt
 ctgcaaatggacagcctgagagctgaggacacggccgtatattctgtcgaaatataggccagcgtcggtattgttagtgg
 tgatcactgctacggacacttgactactggggccagggAACCTGGTaccgtctcgagt

【 0 2 7 6 】

クローン番号 8 1 7 :

caggtgcagctggtgagctggggaggcggtggccagccctggaaactgggtccctgagactctccgtcaggctctggatt
 cggcttcaacacccatggcatgcactgggtccgccaggctccaggcaagggtggagttggctcaattatctcacttg
 atgggatagaccactatgcagactccgtgaaggccgattcaccatctccagagacaattccaagaacacggtgttt
 ctacaaatggatggccctgagaccgtgaagacacggctgtatattactgtcgaaatataggccagcgtcggtattgttagtgg
 ttttgaatggacagtcccgttacggctggggccagggAACCTGGTaccgtctcgagt

【 0 2 7 7 】

クローン番号 8 1 8 :

caggcaccttggggaggctggccagccgtggtaagcccacagaaacgctcacttgcacctgcgccttctctgggtt
 ctcactcaacccggtagagtggtgtgagttggatccgtcagccccaggccaggccccggaaatggcttgcacgcattg
 attggatgtatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatgg
 gtccttacactgagcaacatggaccctgcggacacagccacatattactgtccccggacacaggcttcgcacgtggagg
 ctactactgtactacccatggggccagggAACCTGGTaccgtctcgagt

【 0 2 7 8 】

10

20

30

40

50

クローン番号 819 :

cagggtgcagctgcaggagtggggcccaggactggtaagccttcacagaccctgtccctcacctgcactgtctctatgg
cgccatcagtggtgctgattactactggagttggatccgccagccccagggaaagggcctggagtgggttgggttcatct
atgacagtgggagcacctactacaaccgtccctcaggagtgcagtgaccataatcaatagacacgtccaagaagcagtcc
tccctgaagctgacctctgtgactgccgcagacacggccgttattactgtgccagagatctaggctacggtggttaactc
ttactccactcctactactacggtttggacgtctggggccgagggaccacggtcaccgtctcgagt

【 0 2 7 9 】

クローン番号 824:

cagggtgcagctgcaggagtggggcccaggactggtaagccttcggagaccctgtccctcacctgactgtctctggtg
ctccatcgaaattactactgggctggatccggcagccccagggacttgagtggatggcatatctacttcg
gtggcaacacccaactacaaccttcccccagagtgcagtcaccatttcagtcgacacgtccaggaaccagtccctgt
aagttaactctgtgaccgccgcggacacggccgtgtattactgtgcgagggatagcagaactggccgcaggctatga
ggactggggccaggaaaccttggtcaccgtctcgagt

10

[0 2 8 0]

クローン番号 825:

caggttcagctggtcagtcggagctgaggtgaagaaggcctgggcctcagtgaaggctcccgcaaggttctggta
caccttaccagtaatggtctcagctgggtgcacaggccctggacaagggttgagtggctggatggatcagcgcta
gtagtgaaaacaaaaagtatgccccgaaattccagggaaagagtcaccttgaccacagacatccacgagcacagctac
atggaactgaggagtctgagatctgacgatacggccgtataattactgtgcgaaagatggggcacctacgtgccctattc
tqatgccttqattctggggccagggacaatggtcaccgtctcqagt

20

[0 2 8 1]

クローン番号 827:

cagg tccag ctgg tac agt ctggg ctg agg tga aga agc ctggg ctc agt gaagg tct cc tgc agg gttt ccggaca
ca ct ttc act gca ttat cca aac act ggat gcg acagg gtcc tggagg agg gcttg agt ggat gggat tttt gat cctg
aa gag at gg tga cac acagg ctac gca caga aat tccagg gcag agt caccat gacc gagg acac agcc acagg ca cagg ctac
at gg agt gag cag cct gac at ctg acg acac ggcc gtata tattt tgca ac agt agc gg cag ctgg aaactt tgacaa
cttggggccaggaaaccctggt caccgtctcqagt

88

[0 2 8 2]

クローン番号 829;

caggtaaaccttgaaggagtctggtcgtgcgtggtaaaagccacacagaccctgacactgacctgcaccttctctgggttttcactcagttagaatagaatgagtgtagctggatccgtcagcccccaagggaaaggccctggagtggcttgcacgcattatggatgatgataaaattctacaacacatctctgcagaccaggctcaccatctccaaggacacccctccaaaaaccaggtgtccttacaatgaccaacatggaccctgtggacacagccacctattactgcgcacggactggatataatgatagtagtggttattacactctactttqactacttggggcccaqggaaaccttggtcaccgtctcqagt

[0 2 8 3]

クローン番号 830 :

cagggtgcagctggtgcatcggagctgaggtgaagggtgcctgggcctcagtgaagggtccatgcaggcttcggta
caccttaccacttacggtgtcagctgggtgcggcaggccccctggacaagggttgagtggatgggttggatcagcgctt
acaatggtaaacacatactatctacagaagctccaggggcagagtcaccatgaccacagacatccacgagcacagctac
atggagctgcggggcctgaggctgtacgacacggccatgtattactgtgcgagagatcgtgtttggggcagctcgatccga
qgttctatcqcqqqccaaaaactacqqtttqqaqcqtcqqqccaaqqgaccacqqtaccqtcqtcqgt

40

【 0 2 8 4 】

クロン番号 831

caggttcagctggtgcatctgggctgaggtaagaaggcctgggcctcagttaaggtttccgtcaaggctctgcaaa
catcttacttatgcaatgcattgggtgcgccaggcccccgacaaaggctttagtggatggatggatcaacgttggca
atggtcagacaaaatattcacagaggttccagggcagagtaccattaccaggacacgtccgcactacagcctacatg
gagctgagcaccctgagatctgaggacacggctgttatctgtgcgaggcgtgcgagccaatatggggaggtctatgg
caactactttactactggggccaggaaaccttgtaccgtctcgagt

【 0 2 8 5 】

クローニ番号 835

cagggtgcagctgggtcagtttggagctgagggtgaagaggcctggggccctcagtgaagggtctccctgcaaggcttcaggta
cacctttatcagctatggttttagctgggtgcacaggcccctggacaagggttgagtggtatggatggatggagcagcgitt
acaatgggtacacaaactatgcacagaagttccacggcagagtcaacatgacgactgacacatcgacgaacacggcctac
atggaaactcagggccctgagatctgacgacacggccgttatttctgtgcgagggatcgcaatgttgtctacttccagc
tgctccctttggaggtatggacgtctggggccaaggacaatggtcaccgtctcgagt

【 0 2 8 6 】

クローン番号 8 3 8 :

cagggtgcagctgggtggagtttggggaggcgtggtccagccgggacttccctgagactctccctgtgcagccctggatt
cacctttagtacgtttggcatgcactgggtccggccaggctccaggcaaggggtggagtggtggcagttatcatatag
atggaaaataagaaaatactatgcagactccgtgaaggggccgattcaccatctccagagacaattccaagaacacgcgttat
ctgcaagtgaacagcctgagagtgcgaggacacggctgttattactgtgcggcccaaactccatattcaatgagagcag
tgggttagtgcggactggggccaggcaccctggtcaccgtctcgagt

10

【 0 2 8 7 】

クローン番号 8 4 1 :

cagggtgcagctgggtcagtttggagctgagggtgaagaaggcctggggccctcagtgaagggtctccctgcaaggcttcggta
cacctttatcagtttggcatcagctgggtgcacaggcccctggacaaggacttgagtggtatggatggatcagcgctt
acaatggtaacacagactatgcacagaggctccaggacagagtaccatgactagagacacagccacgagcacagcctac
ttggagctgaggagcctgaaatctgacgacacggccgttactattgcactagagacgagtgcgttccggagttac
tgaaggattcggaccatttactactggggccaggaaaccctggtcaccgtctcgagt

20

【 0 2 8 8 】

クローン番号 8 5 3 :

gaagtgcagctgggtcagtttggagcagagggtaaaaaggccggggcagtttgcagtttgcagatctccctgtaagacttctggata
catctttaccaactactggatcggctgggtgcggccagaggccggaaaggcctggagtggtatggggccatcttccctg
ctgactctgtatgccagatacagccgtcgttccaggccagggtaccatctcggccacaaggccatcggtactgcctac
ctgcgtggagtagcctgaaaggccctggacaccgcataattactgtgcgagaccgaaatattactttgtatagtagtgg
gcaattctccgagatgtactactttgacttctggggccaggaaaccctggtcaccgtctcgagt

【 0 2 8 9 】

クローン番号 8 5 5 :

cagggtcagctgggtcagtttggacctgagggtgaagaaggcctggggccctcagtgaagggtctccctgcaaggcttcggta
tgtgttagccaactatgccttcagctgggtgcggcaggcccctggacaagggttgagtggtatggatggatcagcgctt
ccaaatggtaacacataactatgcagagaagttccaggccagggtaccatgaccacagacacatccacgagcacagcctac
atggagctgaggagttctgagatctgacgacacggcctttatttctgtgcgagagatcttgcgttccacttactttga
ctactggggccaggaaaccctggtcaccgtctcgagt

30

【 0 2 9 0 】

クローン番号 8 5 6 :

cagggtgcagctgggtcagtttggagctgagggtgaagaaggcctggggccctcagtgaagggtctccctgcaaggcttcggta
caccttttcaactacggttttagctgggtgcggcaggcccctggacagggttgagtggtatggatggatcagcgctt
acaatggtaacacataactatgcacagaaccctccaggcagggtaccatgaccacagacacatccacgaccacagcctac
atggtaactgaggagcctgagatctgacgacacggccatgttattactgtgcgagagatggaaatacagcagggttgat
gtgggtcggtatggtttgcgttgcgggacaatggtcaccgtctcgagt

40

【 0 2 9 1 】

クローン番号 8 5 7 :

gagggtgcagcttggagtttggggaggcttggtacagcctggggccctgaggctccctgttgtagccctggatt
cagcttttagcagctatgcctcatgcactggatccggccctggctccaggaaagggttgagtggttctcaggatattgtgt
gcgggtggtagacttactacggagactccgtgaaggccgggttaccatctccagagacaattccaagaacacgcgttat
ctgcataatgcacgcgttgcggccaggacacggccgtatattactgtgcgaaagagccgtggatcgatatagttagtggc
atctgttataatccccctactactacgcacggatggacgtctggggccaaggaccacggtcaccgtctcgagt

【 0 2 9 2 】

クローン番号 8 5 8 :

cagggtcagctgggtcagtttggggctgagggtgaagaaggcctgggtccctcggtgaagggtctccctgcaaggccctggagg

50

atccttcgacggctacactatcagctggctgcacaggcccggacaggggcttgagtggatggaaagggtcgcccta
cacttggttttccaaactacgcacagaagtccaaaggcagagtcaccgttaccgcggacagatccaccaacacgcctac
tttggaaattgagcagactgacatctgaagacacggccgtatattactgtgcgaggatgaatctcgatcgcatagcggcgc
ccccgggttcgacatgtgggccaaggaacctggtcaccgtctcgagt

【 0 2 9 3 】

クローン番号 8 5 9 :

caggtgcagctggtgagctggggaggcggtggccagccctgggagggtccctgagactctccgtgcagtgtctggatc
cagcttcagtaaatatggcatacactgggtccgcaggctccaggcaaggggctggagtggtggcagttatatgtatg
atggaaagtaaaaagtatttcacagactccgtgaagggccgattcaccatcgccagagacaattccagaacacgggtttt
ctgcaaataatgaacacgcctgagagccgaggacacggctgttattactgtgcacaggaggggtttaatgtcacctcg
gtccgcacgtagacactcgicgtccttaggctactgggctggaaacctggtcaccgtctcgagt

10

【 0 2 9 4 】

クローン番号 8 6 1 :

caggtgcagctggtgagctggggaggcggtggccagccctgggagggtccctgagactctccgtgcagcgtctggatt
caccttcagtagctatggcatgcactgggtccgcaggctccaggcaaggggctggagtggtggcatttatatgaaatg
atggaaagtaataatactatgcagactccgtgaagggccgattcaccatctccagagacaattccaagaacacgcgttat
ctgcaaataatgaacacgcctgagagctgaggacacggctgttattactgtgtgaaagatgaggctatgatgatagtagtg
tttacctgtactactttgactctgggcccaggaaacctggtcaccgtctcgagt

20

【 0 2 9 5 】

クローン番号 8 6 3 :

gaggtgcagctttggagctggggaggcttggtacagccctgggggtccctgagactctccgtgcagcctctggatt
cacgttagctctataccatgagctgggtccgcaggctccagggaaggggctggagtggtctcaagtattatgtcta
gtactgttctcacatactacgcagactccgtgaagggccgcttaccatctccagagacaattccaagaacacgcgttat
ctgcaaataatgagtagccctgagagccgaggacacggccgtatattactgtgcgaaagattacgattttgagtggtatcc
cgggggacagttactgggttcgatctggggccgtggcaccctggtcaccgtctcgagt

30

【 0 2 9 6 】

クローン番号 8 6 8 :

caggtgcagctgcaggagtcggcccccaggactggtgacgccttcggagacccctgtccgtcacttgacactgtctctaaatt
ttccatcgacaatgcttactacttgggttggatccggcagccccccagggaagggctggagtggtggataggcagttatccatc
atagtggagcgccctactacaatttgcctcaagagtcgagccaccatatctatagacacgttccaagaaccaattctcg
ttgaacctgaggctgtgaccgccgcagacacggccgtatattactgtgcgcgcataccatcctcacgttcgggagcc
ccactgggttcgaccctggggccaggaaacctggtcaccgtctcgagt

30

【 0 2 9 7 】

クローン番号 8 7 0 :

caggtgcagctgcaggagtcggcccccaggactggtgacgccttcggagacccctgtccctcacctgcactgtctcaggta
ctccatcgataattactacttggagttggatccggcagccccccagggaagggactggagtggtggatggaaaatatctaaca
cttggagcaccaattacaacccctccctcaagagtcgagtcaccatactctagacatgccaaagaaccagttgtccctg
aagctgagctctgtgaccgcgtgcggacacggccgtatattactgtgcgagagggctttctatgacagtggtggttacta
cttggtttacttccaacactggggccaggacccctggtcaccgtctcgagt

40

【 0 2 9 8 】

クローン番号 8 7 1 :

caggtgcagctggtgagctggggaggcggtggccagccctgggagggtccctgagactctccgtgcagcgtctggatt
caccttcagtaactatggcatgcactgggtccgcaggctccaggcaaggggctggagtggtggcagttatatgtatg
atgacagtaataaacagtatggagactccgtgaagggccgattcaccatctccagagacaattccaagagtaacgcgttat
ctgcaaataatggacagactgagagtcgaggacacggctgttattactgtgcgagagccctccgagttatgacagtggtgg
acacagggggcccttgcactactggggccaggaaacctggtcaccgtctcgagt

50

【 0 2 9 9 】

クローン番号 8 8 0 :

cagatcaccttgaaggagtcggccatcgcgtggtgagacccacacagaccctcacactgacactgcacccctctctgggtt
ctcactcagcactagtaactgggtgtggatccgtcagccccccaggaaaggccctggagtggttcactcg

attggatgatgataggcgctacaggccatcttgaagagcaggctaccgtacccaaggacaccctccaaaaaccaggta
gtccttacaatgaccaacatggaccctgtggacacagccacataattactgtgcacacagtgcctactataacttagtg
ttattaccttcaataacttccatcactggggcccccggcaccctggtcaccgtctcgagt

【 0 3 0 0 】

クローン番号 8 8 1 :

gaggtgcagctggtgagactggggaggcggtgg tacaggctggaggctccctgagactctccgtgaagtctccggatt
caccttcaatagttatgaaatgacctgggtccgccaggccccagggaaagggctggagtggttccacacattggtaata
gtggttctatgatataactacgctgactctgtgaagggccgattcaccatctccagagacaacgccaagaactcactata
ctgcaaataatgaacagcctgagagtcgaggacacggctttattactgtgcgaggtcagattactatgatagtagtggtta
ttatctccctacttagactcctgggcatggAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGT

10

【 0 3 0 1 】

クローン番号 8 8 4 :

caggtgcagctggtgagactggggctgagggtgaggaaggcctgggcctcagtgaaggttctgcaaggctctggaca
tactttattaactttgctatgcattgggtgcgccaggccccggacagggcttgagtggtggatatacatcaacgctg
tcaatggtaaacacacagtattcacagaagtccaggcagagtcaccattacgaggacacatccgcgaacacagcctac
atggagctgagcagcctgagatctgaagacacggctgttattactgtgcgagaaacaatggggctctgctatcatttt
ttactactggggccagggAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGT

20

【 0 3 0 2 】

クローン番号 8 8 6 :

caggtgcagctggtgagactggggaggcggtggccagccctgggagggtccctgagactctccgtgcagccctggatt
cagcttcagtagctatggcatgcactgggtccgccaggctccaggcaaggggctggagtggtggcagttatataatcaatg
atggaaagtaataaatactatgcagactccgtgaagggccgattcaccatctccagagacaattccaagaaaacgttat
ctgcaaataatgaacagcctgagagctgaggacacggctgttattctgtgcgagaaacaacagaccagcggctattagtgga
ctgggtcgaccctggggccagggAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGT

30

【 0 3 0 3 】

クローン番号 8 8 8 :

cagctgcagctgcaggagtcggcccccaggactggtaagccatcgagaccctgtccctcacctgcactgcctctggtg
ctccatcaacagtagtaattctactgggctggatccgcagccccccagggaaaggggctggagtggtggatataatcaatg
tttataatgtggaccacctactacaacccgtccctcaagagtcgagtcaccatccgtagacacgtccaagaaccaggttc
tccctgaagctgagccctgtgaccggccgagacacggctgtctatcactgtgcgagacatggctccggatttgtaataa
tgggtatgctataatctcgatgtttgatctggggccaagggacaatggtcaccgtctcgagt

30

【 0 3 0 4 】

クローン番号 8 9 4 :

caggtgcagctggtgagactggggaggcggtggccagccctggaaagtccctgagactctccgtgcagcgctggatt
cagattcagtagctacggcatgcactgggtccggcaggctccaaagcaaggggctggagtggtggcagttatctggcatg
acggaaagtaataaggatgcagactccgtgagggccgatttccatctccagagacaattccaagaacacgcgttat
ttgcaaataatgaacagcatgagagccgacacggcttttattatgtgcgagagtcggccatccagattggagtggtct
ttatggaccactggggccagggAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGT

40

【 0 3 0 5 】

同一のクローンにおいて、軽鎖の完全なアミノ酸配列（すわなし、定常領域および可変
領域を含む軽鎖）は以下のアミノ酸配列を有し、それらはまた、配列番号：8 9 - 1 3 2
として記載される：

【 0 3 0 6 】

クローン番号 7 3 5 :

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVNSHLAWYQQKPGQAPRLIYNTFNRVTGIPARFSGSGSGTDFTLTISLAT
EDFGVYYCQQRSNWPPALTFGGGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN
SQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFRNGEC

【 0 3 0 7 】

クローン番号 7 3 6 :

DIQMTQSPSSLASAVGDRVTFCRASQRISNHLNWYQQKPGKAPKLLIFGASTLQSGAPSRSFGSGSGTDFTLTITNVQP

50

DDFATYYCQQSYRTPP | NFGQGTRLD | KRTVAAPSVF | FPPSDEQLKSGTASVVCNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDSTYLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFRGEC

【 0 3 0 8 】

クローン番号 7 4 4 :

E | VLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLL | YGASSRATG | PDRFSGSGSGTDFTLT | SRLE
PEDFAVYYCQQYDSSLSTWFGQGTKVE | KRTVAAPSVF | FPPSDEQLKSGTASVVCNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
NSQESVTEQDSKDSTYLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFRGEC

【 0 3 0 9 】

クローン番号 7 9 3 :

D | QMTQSPSSLASVGDRVT | TCRASQS | TGYNWYQQKPGKAPKLL | YATSTLQSEVPSRFSGSGSGTDFTLT | SSLQP
EDFATYYCQQSYNTLTFGGTKVE | KRTVAAPSVF | FPPSDEQLKSGTASVVCNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDSTYLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFRGEC

10

【 0 3 1 0 】

クローン番号 7 9 5 :

E | VLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLL | HGASTGATGTPDRFSGSGSGTDFTLT | STLE
PEDFAVYYCQQYGRTPYTFGQGTKLENKRTVAAPSVF | FPPSDEQLKSGTASVVCNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDSTYLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFRGEC

11

【 0 3 1 1 】

クローン番号 7 9 6 :

D | VMTQTPLSLVTPGPAS | SCRSSQSLRSDGKTFLYWYLQKPGQSPQPLMYEVSSRFSGVPDRFSGSGGADFTLN |
SRVETEDVG | YYCMQGLK | RRTFGPGTKVE | KRTVAAPSVF | FPPSDEQLKSGTASVVCNNFYPREAKVQWKVDNALQ
SGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFRGEC

20

【 0 3 1 2 】

クローン番号 7 9 9 :

D | QMTQSPSTLSASVGDRVT | SCRASQSVSSWAWYQQKPGKAPKLL | SEASNLESGVPSRFSGSGSGTEFTLT | SSLQP
EDFATYYCQQYHSYSGYTFGQGTKLE | KRTVAAPSVF | FPPSDEQLKSGTASVVCNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDSTYLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFRGEC

21

【 0 3 1 3 】

クローン番号 8 0 0 :

A | QLTQSPSSLASVGDRVTLTCRASQG | TDSLAWYQQKPGKAPVLLYAASRLESGVPSRFSGSGSGTDFTLT | SSLQP
EDFATYYCQQYSKSPATFGPGTKVE | RRTVAAPSVF | FPPSDEQLKSGTASVVCNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDSTYLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFRGEC

30

【 0 3 1 4 】

クローン番号 8 0 1 :

D | VMTQSPLSLVTPGPAS | SCRSSQSLNSNGFNYWDWLQKPGQSPQLL | YLGSNRASGVPSRFSGSGSGTDFTLK |
SRVEAEDVGVYYCMQALETPLTFGGTKVE | KRTVAAPSVF | FPPSDEQLKSGTASVVCNNFYPREAKVQWKVDNALQ
SGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFRGEC

31

【 0 3 1 5 】

クローン番号 8 0 4 :

E | VLTQSPGTLSLSPGRATLSCRASQSVSSGYLAWYQQKPGQAPRLL | YGASGRATG | PDRFSGSGSGTDFTLT | SRLE
PEDFAVYYCQQYFGSPYTFGQGTKLEKRTVAAPSVF | FPPSDEQLKSGTASVVCNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDSTYLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFRGEC

40

【 0 3 1 6 】

クローン番号 8 1 0 :

N | QMTQSPSAMASVGDRVT | TCRASQG | SNYLVWFQQKPGKVPKRL | YAASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLT | SSLQP
EDFATYYCLQHN | SPYTFGQGTKLETKRTVAAPSVF | FPPSDEQLKSGTASVVCNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDSTYLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFRGEC

41

【 0 3 1 7 】

クローン番号 8 1 1 :

D | VMTQSPDSLAVSLGERAT | NCRSSETVLYTSKNQSYLAWYQQKARQPPKLWASTRESGVPARFSGSGSGTDFTLA

50

ISSLQAEDVAVYYCQQFFRSPFTFGPGTRLE | KRTVAAPSVF | FPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNAL
QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFRGEC

【 0 3 1 8 】

クローン番号 8 1 2 :

EIVLTQSPGTLSLSPGERVTLSRASQS VSSSY | AWYQQKPGQAPRLV | YAASRRATGPDRFSGSGSATDFTLT | SRLE
PEDLAVYYCQHYGNLSFTFGPGTKVDVKRTVAAPSVF | FPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDSTYSLSSTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFRGEC

【 0 3 1 9 】

クローン番号 8 1 4 :

DIQMTQSPSTLSASVGDRV T | TCRASQS | GSRLAWYQQQPGKAPKFL | YDASSLES GVP SRF SGSGTEFTLT | SSLQP
EDLATYYCQQYNRDSPWTFQGQTKVE | KRTVAAPSVF | FPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDSTYSLSSTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFRGEC

10

【 0 3 2 0 】

クローン番号 8 1 6 :

DIVMTQSPLSLPVTPGE PAS | SCR SSQS LLHSDGRYYWDWYLQKPGQSPHLL | YLASNRASGV PDRFTGSGSGTDFTLK I
SRVEAEDVGVYYCMQGLHTPWTFQGQTKVD | KRTVAAPSVF | FPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQ
SGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFRGEC

【 0 3 2 1 】

クローン番号 8 1 7 :

EIVMTQSPATLSASPGERATLSCWASQT | GGNLAWYQQKPGQAPRLL | YGA STRATGVPARFSGSGSGTEFTLA | SSLQS
EDFAVYYCQQYKNWYTFGQGT KLELKRTVAAPSVF | FPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDSTYSLSSTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFRGEC

20

【 0 3 2 2 】

クローン番号 8 1 8 :

DIQMTQSPSSLSASVGDRV T | TCRASQT | ASYVN WYQQKPGRAPSLL | YAASNLQSGVPPRFSGSGSGTDFTLT | SGLQP
DDFATYYCQQSYSYRALTFGGGT KVE | KRTVAAPSVF | FPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDSTYSLSSTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFRGEC

【 0 3 2 3 】

クローン番号 8 1 9 :

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQS VSSSLAWYQQTPGQAPRLL | YDASYRVTG | PARFSGSGSG | DFTLT | SSLEP
EDFAVYYCQQRSNWPPLTFGGGT KVE | KRTVAAPSVF | FPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN
SQESVTEQDSKDSTYSLSSTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFRGEC

30

【 0 3 2 4 】

クローン番号 8 2 4 :

A1QLTQSPSSLSASVGDTVTCTCRPSQD | SSALAWYQQKPGKPPKLL | YGASTLDYGVPLRFS GTASGTHFTLT | SSLQP
EDFATYYCQQFNTPFTFGPGTKVD | KRTVAAPSVF | FPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDSTYSLSSTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFRGEC

【 0 3 2 5 】

クローン番号 8 2 5 :

DIVMTQSPDSLAVSLGERAT | NCKSSQS VLYNSNNKNYLA WYQQKPGQPPKLL | HLASTREYGV PDRFSGSGSGTDFTAL I
ISSLQAEDVAVYYCQQYYQTPLTFQGQTKVE | KRTVAAPSVF | FPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNAL
QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFRGEC

40

【 0 3 2 6 】

クローン番号 8 2 7 :

DIQMTQSPSSLAASVGDRV T | TCRASQF | SSY LH WYQQRPGKAPKLL M YAA STLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLT | SSLQP
EDFATYYCQQSYTNPYTFQGQTKLE | KRTVAAPSVF | FPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDSTYSLSSTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFRGEC

【 0 3 2 7 】

クローン番号 8 2 9 :

DIVMTQSPSSLSASVGDRV T | TCRASQS | ASYLN WYQQKPGKAPKLL | YAASSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLT | SSLQP

50

EDFATYYCQHSYSTRFTFGPGTKVDVKRTVAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDSTYSLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFRGEC

【 0 3 2 8 】

クローン番号 8 3 0 :

D1QMTQSPSTLSASVGDRVT ITCRASQSVTSELAWYQQKPGKAPNFL I YKASSLESGVPSRFSFGSGSGTEFTLT I SSLQP
DDFATYYCQQYNSFPYTFGQGTKE I KRTVAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDSTYSLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFRGEC

【 0 3 2 9 】

クローン番号 8 3 1 :

D1QMTQSPSTLSASVGDRLT ITCRASQN I YNWLAWYQQKPGKAPKLL I YDASTLESGVPSRFSFGSGSGTEFTLT I SSLQP
DDFATYYCQQYNSLSPTFGQGTKE I KRTVAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDSTYSLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFRGEC

10

【 0 3 3 0 】

クローン番号 8 3 5 :

D1QLTQSPLSASLEDRT ITCRASQG I SSYLAWYQQKPGKAPKLLDAASTLQSGVPSRFSFGSGSGTEFTLT I SSLQP
EDFATYYCQQLNSYPRTFGQGTKE I KRTVAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDSTYSLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFRGEC

【 0 3 3 1 】

クローン番号 8 3 8 :

D1QMTQSPSSLSASVGDRVS ITCRASQG I SNYLAWYQQKPGKVPKLL I YAASLQSGVPSRFSFGSGSGTDFTLT I SSLQP
EDVATYYCQKYNAPQTFGQGTKE I KRTVAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDSTYSLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFRGEC

20

【 0 3 3 2 】

クローン番号 8 4 1 :

D1VMTQSPDSLAVSLGERAT INCRSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLVYWASTRASGVPDFSGSGSGTDFTLT
LSSLQAEDVAVYYCQQFHSTPRTFGQGTKE I KRTVAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFRGEC

【 0 3 3 3 】

クローン番号 8 5 3 :

E1VLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSNYLAWYQQKPGQAPRLL I YGASSRAAGMPDRFSGSGSGTDFTLT I SRLE
PEDFAVYYCQQYGNSPLTFGGGTEVE I KRTVAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDSTYSLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFRGEC

30

【 0 3 3 4 】

クローン番号 8 5 5 :

D1QMTQSPSSVSASVGDRVT ITCRASQA ISNWLAWYQQKPGKAPKLL I YAASSLQSGVPSRFSFGSGSGTDFTLT I SGLQP
EDFATYYCQQADTFPFTFGPGTKVD I KRTVAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDSTYSLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFRGEC

【 0 3 3 5 】

クローン番号 8 5 6 :

D1VMTQTPLSLPVTPGEPA ISCRSSQSLLSDNDNTYLDWYLQKPGQSPQLL I YTFSYRASGVPDFSGSGSGTDFTLK
ISRVEAEDVGVYYCMQR I EFPYTFGQGTKE I KRTVAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQ
QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFRGEC

40

【 0 3 3 6 】

クローン番号 8 5 7 :

D1VMTQSPLSLPVTPGEPA ISCRSSQSLLHRNEYNYLDWYLQKPGQSPQLL I YWGSNRASGVPDFSGSGSGTDFTLK I
SRVEAEDVGVYYCMQTLQTPRTFGQGTKE I KRTVAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQ
SGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFRGEC

【 0 3 3 7 】

クローン番号 8 5 8 :

D1QMTQSPSSVSASVGDRVT ITQASQD ISNYLNWYQQKPGKAPKLL I FDATKLETGVPTRF I GSGSGSGTDFTVT I TSLQP

50

EDVATYYCQHFANLPYTFGQGTKE | KRTVAAPSVF | FPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDSTSLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFRGEC

【 0 3 3 8 】

クローン番号 8 5 9 :

D | QMTQSPSSLASVGDRVT | TCRASQG | RNYLAWYQQKPGKVPKLLVFAASTLQSGVPSRFSRGSGSTDFLT | SSLQP
EDVATYYCQRYNSAPLTFGGTKVE | KRTVAAPSVF | FPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDSTSLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFRGEC

【 0 3 3 9 】

クローン番号 8 6 1 :

D | QMTQSPSSLASVGDRVT | TCRASQI | ASYLNWYQQKPGRAPKLL | YAASSLQSGVPSRFSRGSGSTDFLT | SSLQP
EDFATYYCQQSYSTP | YTFGPGTKVN | KRTVAAPSVF | FPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDSTSLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFRGEC

10

【 0 3 4 0 】

クローン番号 8 6 3 :

E | VLTQSPATLSLSPGERATLSCRQS | KNNLAWYQVKPGQAPRLL | YDASN RATG | PARFSGSGSGSTDFLT | SSLEP
EDFAVYYCQQRSDWLTFGGTKVE | KRTVAAPSVF | FPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
SVTEQDSKDSTSLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFRGEC

11

【 0 3 4 1 】

クローン番号 8 6 8 :

E | VMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQS | KNNLAWYQVKPGQAPRLL | PGRFSGSGSGSTDFLT | SSLQS
ED | AVYYCQEYNNWPLLTFGGT | KRTVAAPSVF | FPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDSTSLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFRGEC

20

【 0 3 4 2 】

クローン番号 8 7 0 :

D | QMTQSPPSSLASVGDRVT | TCRASQR | ASYLNWYQQKPGRAPKLL | FAASSLQSGVPSRFSRGSGSTDFLT | SSLQP
EDYATYYCQQSYSTP | YTFGQGTKE | KRTVAAPSVF | FPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDSTSLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFRGEC

【 0 3 4 3 】

クローン番号 8 7 1 :

D | QMTQSPSSLASVGDRVT | TCQASQG | SNYLNWYQQKPGKAPKLL | FDASNLESEVPSRFSRGSGSTDFTS | SSLQP
ED | ATYFCQQYDNFPYTFGQGTKE | KRTVAAPSVF | FPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDSTSLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFRGEC

30

【 0 3 4 4 】

クローン番号 8 8 0 :

D | QMTQSPSSLASVGDRVT | TCRASQT | ASYVNWYQQKPGKAPNLL | YAASSLQSGVPSRFSRGSGSTDFLT | SSLQP
EDFASYFCQQSYSPYTFGQGTKL | KRTVAAPSVF | FPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDSTSLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFRGEC

【 0 3 4 5 】

クローン番号 8 8 1 :

D | QMTQSPSSLASVGDRVT | TCRASQT | ASYVNWYQQKPGKAPKLL | YAASNLQSGVPSRFSRGSGSTDFLT | SSLQP
EDFATYYCQQSYSPYTFGQGTVD | TRTVAAPSVF | FPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDSTSLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFRGEC

40

【 0 3 4 6 】

クローン番号 8 8 4 :

D | QMTQSPSSLASVGDRVT | TCRSSQT | SVFLNWYQQKPGKAPKLL | YAASSLHSAVPSRFSRGSGSTDFLT | SSLQP
EDSATYYCQESFSSSTFGGT | KRTVAAPSVF | FPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
SVTEQDSKDSTSLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFRGEC

【 0 3 4 7 】

クローン番号 8 8 6 :

E | VMTQSPATLSVSPGETATLSCRASQSVSSNLAWYQHKPGQAPRLL | HSASTRATG | PARFSGSGSGTEFTLT | SSLQS

50

EDFAVYYCQQYNNWPPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【0348】

クローン番号888：

DIVMTQSPLSPVTPGAPASISCRSSQSLLRTNGYNLDWYLQKPGQSPQLIYLGSIRASGPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQSLQTSITFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【0349】

クローン番号894：

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVGNLAWYQQRPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQQYDKWPETFGQGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

10

【0350】

これらのクローンにおいて核酸フラグメントをコードする軽鎖は、以下の核酸配列を有し、それらはまた、配列番号：133-176として提供される：

【0351】

クローン番号735：

gaatgtttgacacagtctccagccaccctgtccttgtctccaggagaaagagccacccttcctgcaggccagtca
gagttaacagccacttagcctggtaccaacagaaacctggccaggctccaggctccatctataatacatcaata
gggtcactggcatcccagccaggttcagtgccatgggtctggacagacttcacttcaccatcagcaggcttgcact
gaagattttggcgtttattactgtcagcagcttagcaactggcccccctacttcggcgaggaccaaagtgg
gatcaaacgaactgtggctgcaccatctgtcttcatctccgcattctgatgagcaggtaatctggactgcctctg
ttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtgaaagggtggataacgcctccaatcggt
tcccgaggagatgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacgcctcagcaggccctgacgctgagcaagcaga
ctacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtccccatcagggctgagctcgccgtcacaaagagcttcaacagg
gagagtgt

20

【0352】

クローン番号736：

gacatccagatgaccagtcctccatccctgtctgcattgtggagacagactcacccacttgcggggccagtca
gaggatttagcaaccatttaaattggtatcaacaaaagccaggaaagccctaaactcctgatcttggcatccactc
ttcaaaagtggggcccatcaaggttcagtgccatggatctggacagatcttcacttcaccatcactaatgtacaac
gacgattttgcaacttactactgtcaacagagttacagaactccccatcaacttgcggccaggacacgcctggacat
taagcgaactgtggctgcaccatctgtcttcatctccgcattctgatgagcaggtaatctggactgcctctgttg
tgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtgaaagggtggataacgcctccaatcggt
caggagatgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacgcctcagcaggccctgacgctgagcaagcagact
cgagaaaacacaaagtctacgcctgcgaagtccccatcagggctgagctcgccgtcacaaagagcttcaacagg
agatgt

30

【0353】

クローン番号744：

gaatgtttgacgcagtcctccaggccaccctgtttgtctccaggggaaagagccacccttcctgcaggccagtca
gagttagcagcagctacttagcctggtatcagcagaaacctggccaggctccaggctccatctatggcatcca
gcaggccactggcatcccagacaggttcagtgccatggcactgggtctggacagacttcacttcaccatcagcagactgg
cctgaagatttgcagttactgtcagcagttatgtatgcacccatcttgcgttgcggacgttcggccaaagg
ggaaatcaaacgaactgtggctgcaccatctgtcttcatctccgcattctgatgagcaggtaatctggactgcct
ctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtgaaagggtggataacgcctccaatcggt
aactcccaggagatgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacgcctcagcaggccctgacgctgagcaag
agactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtccccatcagggctgagctcgccgtcacaaagagcttcaaca
ggggagatgt

40

【0354】

クローン番号793：

50

gacatccagatgaccagtcctccatcctccctgtctgcattgttaggagacagagtaccatcaacttgcggggcaagtca
gaggcattaccggctatttaaatttgtatcagcagaaaccaggaaagcccctaaactcctgatctatgctacatccactt
tgcaaaagtgagggtcccatcaaggttcagtgccagtgatctggacagatttcacttcaccatcagcagttcaacct
gaagatttgcaacttactactgtcaacagagtataataccctcactttcggccggaggggaccagggtggagatcaaacg
aactgtggctgcaccatctgtctcatctcccccattgtatgagcagttgaaatctggaaactgcctctgttggtgcc
tgctgaataacttctatccagagaggccaaagttacagtggaaagggtggataacgcctccaatcggttaactccaggag
agtgtcacagagcaggacagcaaggacacgcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaagcagactacgagaa
acacaaagtctacgcctgcaagtaccatcagggctgagctcgccgtcacaagagcttcaacaggggagagtgt

【 0 3 5 5 】

クローン番号 7 9 5 :

10

gaaatgtgttgcgcagtcctccaggcaccctgtcttgcctccaggggaaagagccacccttcctgcaggccagtc
gagtgtagcagcagctacttagcctggatcagcagaaaccctggccaggctccaggctccatcatactggcgcatcca
ccggggccactggcaccctcaggttcagtgccagtggtctggacagacttcacttcaccatcagtacacttgag
cctgaagatttgcagttactgtcagcaatatgttaggacaccgtacactttggccaggggaccaggctggagaa
caaacgaactgtggctgcaccatctgtctcatctcccccattgtatgagcagttgaaatctggaaactgcctctgttg
tgtgcctgctgaataacttctatccagagaggccaaagttacagtggaaagggtggataacgcctccaatcggttaactcc
caggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacacgcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaagcagacta
cgagaaacacaaagtctacgcctgcaagtaccatcagggctgagctcgccgtcacaagagcttcaacaggggag
agtgt

【 0 3 5 6 】

20

クローン番号 7 9 6 :

gatattgtgtatgacccagactccactctctgtccgtcacccctggacagccggcctccatctcctgcaggcttagtca
gagccctctgcgaagtgtatggaaagacgttttgtatggatctgcagaagccaggccagtcctcccaaccctaattgt
atgaggtgtccagccgttctctggagtgcagataggttcagtgccagcgggtcagggcagattcacactgaacatc
agccgggtggagactgaggatgtggatctatactgtcatgcagggttggaaattctgtcggacgtttggccaggag
caaggctgaaatcaagcgaactgtggctgcaccatctgtctcatctcccccattgtatgagcagttgaaatctggaa
ctgcctctttgtgtccctgctgaataacttctatccagagaggccaaagttacagtggaaagggtggataacgcctcca
tcggtaactccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacacgcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgag
caaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcaagtaccatcagggctgagctcgccgtcacaagagct
tcaacaggggagagtgt

30

【 0 3 5 7 】

クローン番号 7 9 9 :

gacatccagatgaccagtcctccaccctgtctgcattgttaggagacagagtaccattcttgcggggccagtc
gagtgtagtagttgggtggccctggatcagcagaaaccaggaaaagcccctaagctcctgatctctgaggccctccaatt
tggaaagtgggtcccatcccggttcagcggcagtgatccggacagaattcacttcaccatcagcagcctgcagcc
gaagatttgcaacttattactgcacactatcatagttaactctgggtacactttggccaggggaccaggatggaaat
caagcgaactgtggctgcaccatctgtctcatctcccccattgtatgagcagttgaaatctggaaactgcctctgttg
tgtgcctgctgaataacttctatccagagaggccaaagttacagtggaaagggtggataacgcctccaatcggttaactcc
caggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacacgcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaagcagacta
cgagaaacacaaagtctacgcctgcaagtaccatcagggctgagctcgccgtcacaagagcttcaacaggggag
agtgt

40

【 0 3 5 8 】

クローン番号 8 0 0 :

gccatccagttgaccagtcctccatcgtccctgtctgcattgttaggagacagagtaccattcttgcggggcagtc
ggcattaccgatttttagcctggatcagcagaaaccaggaaagcccctaaggctcctgctctatgcttccagat
tggaaagtgggtcccatcccggttcagtgccgtggatctggacggattcacttcaccatcagcagcctgcagcc
gaagactttgcaacttattactgtcaacactatctaaactccctgcgacgttcggccaggggaccaggatggaaatcag
acgaactgtggctgcaccatctgtctcatctcccccattgtatgagcagttgaaatctggaaactgcctctgttg
gcctgctgaataacttctatccagagaggccaaagttacagtggaaagggtggataacgcctccaatcggttaactcc
gagagtgtcacagagcaggacagcaaggacacgcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaagcagactacga

50

gaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctgcccgtcacaaagagcttcaacagggagagt
gt

【 0 3 5 9 】

クローン番号 8 0 1 :

gatatttgtatgacccagctccactctccctgcccgtcacccctggagagagccggcctccatctcctgcaggcttagtca
gagccctctaaatagaatggattcaactatgtggattggtaacctgcagaagccaggcagtcctccacaactcctgatct
atttgggttctaatacgccctccgggtccctgacagggttcagtgccagtgatcaggcacagatttacactgaaaatc
agcagagtgaggctgaggatgtgggtttatctgcattgcagactcttagaaactccgcctcacttccggagggac
caagggtggagatcaaacgaactgtggctgcaccatctgtttcatctccgcctcacttgatgagcagttgaaatctggaa
ctgcctctttgtgcctgtaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaagggtggataacgcctccaa
tcgggtaactccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggcacctacagcctcagcagcaccctigacgctgag
caaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctgcccgtcacaaagagct
tcaacagggagagtgt

10

【 0 3 6 0 】

クローン番号 8 0 4 :

gaaatttgttgacgcagctccaggcaccctgtcttgcctccaggggaaagagccaccctctcctgcaggccagtc
gagtttagcagcggctacttagcctggtaccacgcagaaacccctggccaggctccaggctccatctatggtgcattcc
gcaggccactggcatccacagacagggttcagtgccagtggtctggacagacttcacttcaccatcagcagactggag
cctgaagatttgcagtgttactgtcagcagttttggctaccgtacactttggccaggggaccaagctggagct
caaacgaactgtggctgcaccatctgtttcatctccgcctcactgtatgagcagttgaaatctggaaactgcctctgtt
tgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaagggtggataacgcctccaaatcggttaactcc
caggagagtgtcacagagcaggacagcaaggcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagacta
cgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctgcccgtcacaaagagcttcaacagggag
agtgt

20

【 0 3 6 1 】

クローン番号 8 1 0 :

aacatccagatgacccagctccatctgcctgtctgcattgttaggagacagagtcacccatcacttgcggcgagtc
ggcatttagtaatttttagtctggttcagcagaaaccaggaaagtccttaagcgcctgatctatgtgcattcc
tgcaaaagtgggtcccatcaagggtcagcggcagtggtctggacagaattcacttcacaatcagcagcctgacgcct
gaagatttgcaacttattactgtcatacgcataatattcccttacactttggccaggggaccaagctggagaccaa
acgaactgtggctgcaccatctgtttcatctccgcctcactgtatgagcagttgaaatctggaaactgcctctgtgt
gcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaagggtggataacgcctccaaatcggttaactcc
gagagtgtcacagagcaggacagcaaggcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacga
gaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctgcccgtcacaaagagcttcaacagggagagt
gt

30

【 0 3 6 2 】

クローン番号 8 1 1 :

gacatcgatgacccagctccagactccctggctgtctctggcgagaggccaccatcaactgcaggccagtg
gactgtttatacacctctaaaaatcagactacttagtttgtaccacgcagaaagcacgcacgcctctaaactactcc
tttactggcatctacccggaaatccgggtccctgcccattcagtgccagcggatctggacagatttcacttcgc
atcagcagcctgcaggctgaagatgtggcagtttattactgtcagcaatttttaggatctttcactttcgccccgg
gaccagactggagattaaacgaactgtggctgcaccatctgtttcatctccgcctcactgtatgagcagttgaaatctg
gaactgcctctgttgtgcctgtaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaagggtggataacgcctcc
caatcggttaactcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggcacctacagcctcagcagcaccctgacgct
gagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctgcccgtcacaaaga
gcttcaacagggagagtgt

40

【 0 3 6 3 】

クローン番号 8 1 2 :

gaaatttgttgacgcagctccaggcaccctgtcttgcctccaggggaaagagttacccctcttgcaggccagtc
gagtttagcagcagttacatagcctggtaccacgcagaaggctggccaggctccaggctcgtcatctatgtgcattcc

50

gcagggccactggcgtcccagacaggttcagtggcagtgggtctgcgacagacttcactctcaccatcagtagactggag
cctgaagatcttgcagtgtattactgtcagcactatgttaactcactattcacttgcggccctgggaccaagggtggatgt
caaacgaactgtggctgcaccatctgtttcatcttcccgccatctgtatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttg
tgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaagggtggataacgcctccaatcgggtaactcc
caggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagacta
cgagaaaacacaaagtctacgcctgcaagtccccatcagggcctgagctgccccgtcacaagagcttcaacaggggag
agtgt

【 0 3 6 4 】

クローン番号 8 1 4 :

gacatccagatgacccagttctccctccaccctgtctgcattgtcgagacagactcaccatcacttgcggccaggta
gagtttggtagccggttggcctggatcagcacaaccaggaaagccctaaattcctgtatgtatgcctccagg
tggaaagtgggtcccatcaaggttcagcggcagtggatcagggacagaattcacttcaccatcagcagcctgcagcc
gaggatcttgcacttattactgccaacagtacaatagagatttccctggacgttgcggccaaaggaccaagggtggaaat
caagcgaactgtggctgcaccatctgtttcatcttcccgccatctgtatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttg
tgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaagggtggataacgcctccaatcgggtaactcc
caggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagacta
cgagaaaacacaaagtctacgcctgcaagtccccatcagggcctgagctgccccgtcacaagagcttcaacaggggag
agtgt

【 0 3 6 5 】

クローン番号 8 1 6 :

gatattgtatgacccagttctccactctccctgcccgtcacccaggagagccggccatctcctgcaggcttagtca
gagccctctgcatagtgtatggacgctactatgtggatttgttacctgcagaagccaggcagttccacacccctgtatct
atttggcttctaattcggccctccgggttccctgacaggttcactggcagtggatcaggcacagatttacactgaaaatc
agcagagtggaggctgaggatgttggcgttattactgtcatgcaaggctacacactcttggacgttgcggccaggggac
caagggtggacatcaagcgaactgtggctgcaccatctgtttcatcttcccgccatctgtatgagcagttgaaatctggaa
ctgcctctgttgcctgtatccacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaagggtggataacgcctccaa
tcgggtaactcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgag
caaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcaagtccccatcagggcctgagctgccccgtcacaagagct
tcaacagggagagtgt

【 0 3 6 6 】

クローン番号 8 1 7 :

gaaattgtatgacacagttctccagccaccctgtctgcgtccccaggggaaagagccacccttcctgttggccaggta
gactattggaggcaactttagcttggatcaggcagaaaccctggccaggctccaggcttcatctatgtgtcatccacca
ggccacttgggttcccgccagggtttagtggcagtgggtctggacagagattcacttcgcacatcagcagcctgcagtt
gaagatttgcagtttattactgtcagcagttataaaaactgttacactttggccaggggaccaagctggagctcaaacg
aactgtggctgcaccatctgtttcatcttcccgccatctgtatgagcagttgaaatctggaactgcctctgtgtgt
tgtgtatccacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaagggtggataacgcctccaatcgggtaactcccaggag
agtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacgagaa
acacaaagtctacgcctgcaagtccccatcagggcctgagctgccccgtcacaagagcttcaacaggggagagtgt

【 0 3 6 7 】

クローン番号 8 1 8 :

gacatccagatgacccagttctccatccctgtctgcattgttaggagacagactcaccatcacttgcggccaggta
gaccattgccagttacgttaattggatccaacaaaaaccaggagagcccttagtctcctgtatgtcatcttaact
tgcagagtgggtcccaagggtttagtggcagtggatctggacagacttcacttcaccatcagcggctgcacact
gacgatttgcacttattactgtcaacagagttacagttagtgcagcgcctactttcggccggaggaccaagggtggagat
caaacgaactgtggctgcaccatctgtttcatcttcccgccatctgtatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttg
tgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaagggtggataacgcctccaatcgggtaactcc
caggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagacta
cgagaaaacacaaagtctacgcctgcaagtccccatcagggcctgagctgccccgtcacaagagcttcaacaggggag
agtgt

10

20

30

40

50

【 0 3 6 8 】

クローン番号 8 1 9 :

gaaattgtttgacacagtctccagccaccctgtcggtgtccccagggaaagagccacccttcctgcagggccagtca
 gagtgttagcagctcccttagcctggtaccaacacagacaccctggccaggctccaggcttcatctatgtatgcgtccata
 gggtaactggcatcccagccaggttcagtggcagtgggtctggatagacttcacttcaccatcagcagcctagagcct
 gaagatttgcagttactattgtcagcagcgttagcaactggcccccggctcacttcggcgggggaccaagggtgg
 gatcaaacaactgtggctgcaccatctgtctcatctccgcacatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctg
 ttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaagggtggataacgcctccaatcggttaac
 tcccaggagagtgtcacagagcaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcaga
 ctacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtccccatcagggcctgagctcgccctgacaaagagcttcaacagg
 gagagtgt

10

【 0 3 6 9 】

クローン番号 8 2 4 :

gccatccagttgacccagttccatccctgtctgcattgtggagacacagtcaccgtcacttgcggccaagtc
 ggacattagcagtgttttagcctggtatcagcagaaaccaggaaacctcctaagctctgtatctatgggtgcctccactt
 tggattatgggtcccattaaggttcagcggcactgcattgtggacacatttcacttcaccatcagcagcctgcaac
 gaagatttgcaacttattactgtcaacagtttaataacttacccattacttccgcctgggaccaaagtggatata
 acgaactgtggctgcaccatctgtctcatctccgcacatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgtgt
 gcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaagggtggataacgcctccaatcggttaactcc
 gagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactac
 gaaacacaaagtctacgcctgcgaagtccccatcagggcctgagctcgccctgacaaagagcttcaacagg
 gt

20

【 0 3 7 0 】

クローン番号 8 2 5 :

gacatcgatgacccagttccagactccctggctgtgtctggcgagagggccaccatcaactgcaagtccagcca
 gagttttatacaactccaacaataagaactacttagcctggtatcagcagaaaccaggacagccctctaagctcc
 ttcaacttggcatctacccggaaatacgggtccctgaccgattcagtgccagcgggtctgggacagatttcgc
 atcagcagcctgcaggctgaagatgtggcagtttattactgtcaacaatattatcaaactccctctaacttt
 ggccagggg
 gaccaagggtggagatcaaacgaactgtggctgcaccatctgtctcatctccgcacatctgatgagcagtt
 gaaactgcctctgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaagggtggata
 acgcctccaatcggttaactccaggagagtgtcacagagcaggacagcacctacagcctcagcagcaccct
 gagcaaaggagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtccccatcagggcctgagctcgccct
 gacaaagcttcaacaggagatgt

30

【 0 3 7 1 】

クローン番号 8 2 7 :

gacatccagatgacccagttccatccctggctgcattgttaggagacagagtcaccatcacttgcggccaagtc
 gttcattagcagtttacattggtatcagcagaaagaccaggcaaggccctaaactcctgtatgtatgcctccactt
 tgccatcaagggtcccatcaaggttcagtgccagttggatctggacagatttcacttcaccatcagcagtt
 gaagatttgcaacttactactgtcaacagagttacactaaccataactttggccaggggaccaagctggagatcaa
 acgaactgtggctgcaccatctgtctcatctccgcacatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgtgt
 gcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaagggtggataacgcctccaatcggttaactcc
 gagagtgtcacagagcaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactac
 gaaacacaaagtctacgcctgcgaagtccccatcagggcctgagctcgccctgacaaagagcttcaacagg
 gt

40

【 0 3 7 2 】

クローン番号 8 2 9 :

gacatccagatgacccagttccatccctatctgcattgttaggagacagagtcaccatcacttgcggccaagtc
 gagcattgcctagtttaattggtatcagcagaaaccaggaaagcccccaaactcctgtatctatgcgtccat
 tgcattatgggtcccatcaaggattcagtgccagttggatctggacagatttcacttcaccatcagcagtt
 gaagatttgcaacttactactgtcaacacagttacagttactcgattcactttccgcctggaccaag
 gtggatgtcaa

50

acgaactgtggctgaccatctgtttcatcttccgcacatctgtatgagcagttaaaatcttggactgcctctgtgt
gcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaagggtggataacgcctccaatcggttaactcc
gagagtgtcacagagcaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacga
gaaacacaaagtctacgcctgcaagtcacccatcagggctgagctcgccgtcacaagagcttcaacagggagagt
gt

【 0 3 7 3 】

クローン番号 8 3 0 :

gacatccagatgacccagttcccttgcacccctgtctgcattgttaggagacagactcaccatcacttgcggccagtc
gagtgttacttagtgagttggcctggatcagcagaaccaggaaagccctaaacttccctgatctataaggcgtcttagt
tagaaagtgggtcccatcaaggttcagcggcagtggatctggacagaattcactctcaccatcagcagcctgcagcct
gtatgtttgcaacttattactgccaacagtaataatagtttccgtacacttttggccaggggaccaagctggagatcaa
acgaactgtggctgaccatctgtttcatcttccgcacatctgtatgagcagttaaaatcttggactgcctctgtgt
gcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaagggtggataacgcctccaatcggttaactcc
gagagtgtcacagagcaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacga
gaaacacaaagtctacgcctgcaagtcacccatcagggctgagctcgccgtcacaagagcttcaacagggagagt
gt

10

【 0 3 7 4 】

クローン番号 8 3 1 :

gacatccagatgacccagttcccttccacccctgtctgcattgttaggacagactcaccatcacttgcggccagtc
gaatattataacttggttggcctggatcagcagaaccaggaaagccctaaacttccctgatctatgacgcctccactt
tggaaagtgggtcccatcaaggttcagcggcagtggatctggacagagttcactctcaccatcagcagcctgcagcct
gtatgtttgcacttattactgccaacaatataatagtttgcctccgacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaa
gcgaactgtggctgaccatctgtttcatcttccgcacatctgtatgagcagttaaaatcttggactgcctctgtgt
gcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaagggtggataacgcctccaatcggttaactcc
gagagtgtcacagagcaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacga
gaaacacaaagtctacgcctgcaagtcacccatcagggctgagctcgccgtcacaagagcttcaacagggagagt
gt

20

【 0 3 7 5 】

クローン番号 8 3 5 :

gacatccagttgacccagttccatccctgtctgcattttagaagacagactcactatcacttgcggccagtc
ggcatttagcagtttatattagcctggatcagcaaaaaccaggaaagccctaaacttccctgctgatgtcatccactt
tgcaaaagtgggtcccatcaaggttcagcggcagtggatctggacagagttcactctcacaatcagcagcctgcagcct
gaagatttgcaacttattactgtcaacagcttaatagttaccctggacgttcggccaagggaccaaggtggacatcaa
acgaactgtggctgaccatctgtttcatcttccgcacatctgtatgagcagttaaaatcttggactgcctctgtgt
gcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaagggtggataacgcctccaatcggttaactcc
gagagtgtcacagagcaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacga
gaaacacaaagtctacgcctgcaagtcacccatcagggctgagctcgccgtcacaagagcttcaacagggagagt
gt

30

【 0 3 7 6 】

クローン番号 8 3 8 :

gacatccagatgacccagttccatccctgtctgcattgttaggagacagactcagcatcacttgcggccagtc
ggcatttagcaatttatattagcctggatcagcagaaccaggaaagggttcctaagcttccctgatctatgcatccactt
tgcaatcaggggtcccatctcggttcagttggcagtggatctggacagagttcactctcaccatcagcagcctgcagcct
gaggatgttgcacttattactgtcaaaagtataacagtgccctcaaacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaa
acgaactgtggctgaccatctgtttcatcttccgcacatctgtatgagcagttaaaatcttggactgcctctgtgt
gcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaagggtggataacgcctccaatcggttaactcc
gagagtgtcacagagcaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacga
gaaacacaaagtctacgcctgcaagtcacccatcagggctgagctcgccgtcacaagagcttcaacagggagagt
gt

40

【 0 3 7 7 】

50

クローン番号 8 4 1 :

gacatcggtatgaccaggactccagactccctggctgtctctggcgagagggccaccatcaactgcaggccaggcca
gagtgtttatacagctccaacaataagaactacttagcttggtaccagcagaaaccaggacagccctctaagctgctcg
tttactggcatcaacccggcatccgggcccctgaccgattcagtgccagcgggtctggacagatttcactctcacc
ctcagcagcctgcaggctgaagatgtggcagtttattactgtcagcagttcatagtaactccctggacgttcggccaagg
gaccaagggtggagatcaaacaactgtggctgcaccatctgtctcatcttcccccattctgatgagcagttgaaatctg
gaactgcctctgttgtgcctgtaataactctatcccagagaggccaaagtacagtggaaagggtggataacgcctc
caatcggtaactcccaggagagtgtcacagagcaggacagcacctacagccctcagcagcaccctgacgct
gagcaaaggcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcaagtccccatcagggctgagctcgcccgtcacaaaga
gcttcaacaggagagtgt

10

【 0 3 7 8 】

クローン番号 8 5 3 :

gaaattgtgttgcgcagctccaggcaccctgtcttgcctccaggaaagagccacccttcctgcaggccagtc
gaggtttagcagcaactacttagcctggtaccagcagaaacccctggccaggctcccatctatggtgcattcca
gcaggccgcgtggcatgccagacaggttcagtgccagttgggtctggacagacttcactctcaccatcagcagactgg
cctgaagatttgcagtgtattactgtcagcagttatgtaactcaccgctcacttccggggaggaccgagggtggagat
caaacgaactgtggctgcaccatctgtctcatcttcccccattctgatgagcagttgaaatctgaaactgcctctgtt
tgtgcctgtaataactctatcccagagaggccaaagtacagtggaaagggtggataacgcctccatcggtaactcc
caggagagtgtcacagagcaggacagcacctacagccctcagcagcaccctgacgctgagcaaaggcagacta
cgagaaaacacaaagtctacgcctgcaagtccccatcagggctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggagg
agtgt

20

【 0 3 7 9 】

クローン番号 8 5 5 :

gacatccagatgaccaggactccatcttctgtctgcattctgttaggagacagactaccatcacttgcggcgagtc
ggctattagtaactggtagcctggatcagcagaaaccaggaaagccctaaactctctgtatctatgtgcattccat
tgcaaagtgggtcccatcaagattcagcggcagttggatctggacagatttcactctcactatcagcggctgcagcct
gaggatttgcaacttactattgtcaacaggctgacacttcccttcaattccggccctggaccaaaagtggatata
acgaactgtggctgcaccatctgtctcatcttcccccattctgatgagcagttgaaatctgaaactgcctctgtgt
gcctgtaataactctatcccagagaggccaaagtacagtggaaagggtggataacgcctccatcggtaactcc
gagagtgtcacagagcaggacagcacctacagccctcagcagcaccctgacgctgagcaaaggcagactacga
gaaacacaaagtctacgcctgcaagtccccatcagggctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggagg
gt

30

【 0 3 8 0 】

クローン番号 8 5 6 :

gatattgtgtatgaccaggactccactctccctgcccgtcaccctggagagccggccatctcctgcaggcttagtca
gagcccttggatagtaatgtatggaaacacacttggacttggatctgcagaagccaggccagttccacagctcc
tttatacatttccatcgggccttggagttccagacaggttcagtgccagttgggtctggactgtttcacacttgaaa
atcagcagggtggaggccaggatgtggattttattactgtcatgcaacgtatcgatgtttccgtacactttggccagg
gaccaaggctggagatcaaacaactgtggctgcaccatctgtctcatcttcccccattctgatgagcagttgaaatctg
gaactgcctctgtgtgcctgtatcacttccagagaggccaaagtacagtggaaagggtggataacgcctc
caatcggtaactcccaggagagtgtcacagagcaggacagcacctacagccctcagcagcaccctgacgct
gagcaaaggcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcaagtccccatcagggctgagctcgcccgtcacaaaga
gcttcaacaggaggagagtgt

40

【 0 3 8 1 】

クローン番号 8 5 7 :

gatattgtgtatgaccaggactccactctccctgcccgtcaccctggagagccggccatctcctgcaggcttagtca
gagcccttgcataaaaaatgagtacaacttggatggacttgcagaagccaggccagttccacagctcc
attgggttctaatcgggcctccgggtccctgacaggttcagtgccagttggatcaggcacagatttacactgaaaatc
agcagagtggaggctgaggatgtgggtttattactgtcatgcaacactacaaactccctggacgttcggccaagg
caagggtggaaatcaaacaactgtggctgcaccatctgtctcatcttcccccattctgatgagcagttgaaatctggaa

50

ctgcctctgttgtgcctgtaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaagggtggataacgcctccaa
tcgggtaactcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgcttag
caaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcaagtaccatcagggctgagctcgccgtcacaagagact
tcaacagggagagtgt

【 0 3 8 2 】

クローン番号 8 5 8 :

gacatccagatgaccaggctccatcctccgtctgcattctgtggagacagagtaccatcacttgcaggcgagtca
agacattagcaactattnaaatttgttatcagcagaaaccaggaaagcccctaagctcctgatcttcgtatgcaccaat
tggagacaggggtcccaacaaggttcatggaaatggatctggacagatttactgtcaccatcaccaggctgcagcc
gaagatgttgcaacatattactgtcaacactttgtaatctccatcacacttttgccaggggaccaagctggagatcaa
gcgaactgtggctgcaccatctgtctcatcttccgcacatctgtatggatctggacagatgtgaaatctggaaactgcct
gcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaagggtggataacgcctccaatcggttaactcc
gagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacgcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacga
gaaacacaaagtctacgcctgcaagtaccatcagggctgagctcgccgtcacaagagacttcaacagggagagt
gt

10

【 0 3 8 3 】

クローン番号 8 5 9 :

gacatccagatgaccaggctccatcttccctgtctgcattctgttaggagacagagtaccatcacttgcgggcaagtca
ggcatttagaattattnaaatttgttatcagcagaaaccaggaaagttccataagctcctggatcttgcaccaat
tgcaatcagggtccatctcggttcagttggcagttggatctggacagatttcactctcaccatcagcagcctgcagcc
gaggatgttgcaacttattactgtcaaaaggtaaacagtgcctcatcttccgcacatctgtatggatctggagatcaa
acgaactgtggctgcaccatctgtctcatcttccgcacatctgtatggatctggacagatgtgaaatctggaaactgcct
gcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaagggtggataacgcctccaatcggttaactcc
gagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacgcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacga
gaaacacaaagtctacgcctgcaagtaccatcagggctgagctcgccgtcacaagagacttcaacagggagagt
gt

20

【 0 3 8 4 】

クローン番号 8 6 1 :

gacatccagatgaccaggctccatcctccctgtctgcattctgttaggagacagagtaccatcacttgcgggcaagtca
gatcatgtccagctattnaaatttgttatcagcagaaaccaggcagagcccctaagctcctgatctatgtcatccaggat
tgcaaaagtgggtccatcaaggttcagttggcagttggatctggacagatttcactctcaccatcagcagctgcaccaat
gaagatttgcaacttactactgtcaacagagtacagtacccatattcactttcgccctggaccaaggtaat
caaacgaactgtggctgcaccatctgtctcatcttccgcacatctgtatggatctggacagatgtgaaatctggaaactgcct
tgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaagggtggataacgcctccaatcggttaactcc
caggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacgcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagact
cgagaaaacacaaagtctacgcctgcaagtaccatcagggctgagctcgccgtcacaagagacttcaacagggag
agtgt

30

【 0 3 8 5 】

クローン番号 8 6 3 :

gaaattgttgtgacacagctccagccaccctgtttgtctccaggggaaagagccaccctcctgcaggaccaggta
gaggttgttagcagctactttagcctggatccaacacaaaccctggccaggctccaggctccatctatgtatgttccaata
ggccactggcatccagccagggttcagttggcagttggatctggacagacttcaactctcaccatcagcagcctagac
gaagatttgcaggatattactgtcagcagcgttagtgactggctcacattcggccggaggaccaagggtggagatcaa
aactgtggctgcaccatctgtctcatcttccgcacatctgtatggatctggacagatgtgaaatctggaaactgcct
tgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaagggtggataacgcctccaatcggt
actacgactacgaggacagcaaggacagcacctacgcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacgagaa
acacaaagtctacgcctgcaagtaccatcagggctgagctcgccgtcacaagagacttcaacagggagagtgt

40

【 0 3 8 6 】

クローン番号 8 6 8 :

gaaattgttgtgacacagctccagccaccctgtttgtctccaggggaaagagccaccctcctgcaggccaggta

50

gagattaaaaacaacttgcctggtaccaggtaaaacctggccaggctccaggctcccacctctggtgcatccgcca
 gggccactggaattccaggcaggttcagtggcagtgggtctgggactgacttcacttcaccatcagcagccctcaggct
 gaagatattgcagtttattactgtcaggagtataataattggcccgtcaacttcggcggagggaccaagggtggagat
 ccaacgaactgtggctgcaccatctgttcatcttccgcacatctgtatgagcagttgaaatctgaaactgcctctgtt
 tgcctgtgaataacttctatcccagagaggccaaagttacagtggaaagggtggataacgcctccaatcggttaactcc
 caggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacacgcacccatcagcgcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagacta
 cgagaaaacacaaagtctacgcctgcgaagtccccatcagggcctgagctcgccgtcacaagagcttcaacagggag
 agtgt

【0387】

クローン番号870:

10

gacatccagatgacccagtcctccctccctgtctgcattgtggagacagagtcaccatcacttgcgggcaagtc
 gaggattgccagctattnaaattggtatcagcagaaaccaggagagccctaagctcctgtatcttgcattccaggat
 tacaatgggtcccatcaaggttcagtggcagtggatctggacagacttcacttcaccatcagtagtctgcaacct
 gaagattatgcacttactactgtcaacagagtacagtactccatctacacttttgcctggggaccaagctggagat
 caaacgaactgtggctgcaccatctgttcatcttccgcacatctgtatgagcagttgaaatctgaaactgcctctgtt
 tgcctgtgaataacttctatcccagagaggccaaagttacagtggaaagggtggataacgcctccaatcggttaactcc
 caggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacacgcacccatcagcgcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagacta
 cgagaaaacacaaagtctacgcctgcgaagtccccatcagggcctgagctcgccgtcacaagagcttcaacagggag
 agtgt

【0388】

20

クローン番号871:

gacatccagatgacccagtcctccatcctccctgtctgcattgttaggagacagagtcaccatcacttgcaggcgagtc
 gggcattagcaactattnaaattggtatcaacagaaaccaggaaagccctaagctcctgtatctcgatgcattcaatt
 tggaatcagaggcccataaggttcagtggcgtggatctggacagatttacttctccatcagcagcctgcagcc
 gaagatattgcacatattctgtcaacagttacagtttccgtacacttttgcctggggaccaagctggagatcaa
 acgaactgtggctgcaccatctgttcatcttccgcacatctgtatgagcagttgaaatctgaaactgcctctgtgt
 gcctgtgaataacttctatcccagagaggccaaagttacagtggaaagggtggataacgcctccaatcggttaactcc
 gagagtgtcacagagcaggacagcaaggacacgcacccatcagcgcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacga
 gaaacacaaagtctacgcctgcgaagtccccatcagggcctgagctcgccgtcacaagagcttcaacagggag
 gt

30

【0389】

クローン番号880:

gacatccagatgacccagtcctccatcctccctggctgcattgttaggagacagagtcaccatcacctgcgggcaagtc
 gacgattgccagttatgtaaattggtatcaacagaaaccaggaaagccctaattctcctgtatgtcatccaggat
 tgcaagttgggtcccatcaaggttcagtggcagtggatctggacagatttacttcacttcaccatcagcagtc
 gaagatttgcattactctgtcaacagagtacagttccgtacacttttgcctggggaccaagctggatata
 acgaactgtggctgcaccatctgttcatcttccgcacatctgtatgagcagttgaaatctgaaactgcctctgtgt
 gcctgtgaataacttctatcccagagaggccaaagttacagtggaaagggtggataacgcctccaatcggttaactcc
 gagagtgtcacagagcaggacagcaaggacacgcacccatcagcgcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacga
 gaaacacaaagtctacgcctgcgaagtccccatcagggcctgagctcgccgtcacaagagcttcaacagggag
 gt

40

【0390】

クローン番号881:

gacatccagatgacccagtcctccatcctccctggctgcattgttaggagacagagtcaccatcacttgcgggcaagtc
 gaccattgccagctatgtaaattggtatcagcagaaaccaggaaagccctaagctcctgtatgtcatccaggat
 tgcaagttgggtcccatcaaggttcagtggcagtggatctggacagatttacttcacttcaccatcagcagtc
 gaagatttgcacacttactactgtcaacagagtacagttccctggctcactttcggcggagggaccaagggtggacat
 cacacgaactgtggctgcaccatctgttcatcttccgcacatctgtatgagcagttgaaatctgaaactgcctctgtt
 tgcctgtgaataacttctatcccagagaggccaaagttacagtggaaagggtggataacgcctccaatcggttaactcc
 caggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacacgcacccatcagcgcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagacta

50

cgagaaaacacaaagtctacgcctgcaagtaccatcagggcctgagctgcggcgtcacaaagagcttcaacagggag
agtgt

【0391】

クローン番号884：

gacatccagatgaccaggctccatccctgtctgcattgttaggagacagagttaccatcacttgccggtcaagtc
gaccattagcgcttttaatttgtatcagcagaaccaggaaagccccataagctccatgtatgccatccagg
tgcacagtgcggccatcaaggttcagtgccatggatctggacagatttcacttcaccatcagcagttgcac
gaagattctgcaacttactactgtcaagagagttcagtagctcaacttccggggagggaccagggtgg
aactgtggctgcaccatctgtttcatctcccccattgtatgagcagttgaaatctggactgcctgttgc
tgctgaataacttctatccagagaggccaaagttacagtggaaagggtggataacgcctccatcggt
actcccaggagtgacagagcaggacacgcaccatcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactac
acacaaaagtctacgcctgcaagtaccatcagggcctgagctgcggcgtcacaaagagcttcaacagg
ggagagtgt

10

【0392】

クローン番号886：

gaaattgtaatgacacaggctccagccaccctgtctgtctccaggggaaacagccacccttcctgcagg
gagtgttagcagcaacttagccttgttaccaacataaacctggccaggctccatccatagtgcatcc
ggccactggatcccagggttcagtgccatgggtctggacagagttcacttcaccataaggcc
gaagattttgcagtttattactgtcagcgtataatatgtggctccctggacgttcggccaagg
aaacgaactgtggctgcaccatctgtttcatctcccccattgtatgagcagttgaaatctgg
actgcctgtgaataacttctatccagagaggccaaagttacagtggaaagggtggataacgc
caggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacacgcaccatcagcagcaccctgac
cgagaaaacacaaagtctacgcctgcaagtaccatcagggcctgagctgcggcgtcac
aaagagcttcaacagggagagtgt

20

【0393】

クローン番号888：

gatattgtatgaccaggctccactccctgcccgtaccctggagcgccggccatccctgcagg
gagccctctgcgtactaatggataacaactatttgttacctgcagaagccaggcagtt
atccatgcacttcgtatccctgtcaggttcagtgccatggctcaggcacagat
tttacactgaaaatc
agcagagtggaggctgaggatgttgggtttattactgtcatgcataacttc
gacccatctccatctgtatgagcagttgaaatctgg
ctgcctctgttgtgcctgtgaataacttctatccagagaggccaaagtt
acagtggaaagggtggataacgc
ctggtaactccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacacgc
caaagcagactacgagaaaacacaaagtctacgcctgcaagtaccat
cagggcctgagctgcggcgtcacaaagagcttcaacaggg
ggagagtgt

30

【0394】

クローン番号894：

gaaattgtaatgacacaggctccagccaccctgtctgtctccggggaaagagccacccttcctgcagg
gagtgtggcaacaacttagccttgttaccaaggcagacccgtggccaggctcc
ggccactggatcccagggttcagtgccatgggtctggacagagtt
cacttcaccatcagcagcaccctgacgct
gaggatttgcatgttattactgtcagcgtatgataaggccctgagac
gttccggccaggggaccaagggtggacatcaa
gcgaactgtggctgcaccatctgttcatctcccccattgtatg
gagcagttgaaatctggactgcctgttgc
gcctgtgaataacttctatccagagaggccaaagtt
acagtggaaagggtggataacgc
gagagtgtcacagagcaggacagcaaggacacgc
gaaacacaaaagtctacgcctgcaagtaccatcagggcctgag
ctgcggcgtcacaaagagcttcaacaggg
ggagagtgt

40

【0395】

上記で考察された44個のクローンの全てにおいて、コードされた抗体は、同一の定常IgG重鎖を含み、それらは、以下のアミノ酸配列を有する（配列番号178）：
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPSSSLGTQ
TYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPDKTLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN

50

WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISAKGQPREPQVTLPSSRE
EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY
TQKSLSLSPKG

【0396】

この重鎖をコードするゲノム配列は、以下の核酸配列を有する（配列番号：177）：

【表8】

agtgcctccaccaaggcccacggcttccccctggacaccctcccaagagcacacctggaaaaacacaggccacccctggactgccta
gtcaaggactacttccccaaaccggtaacggatcgtagaactcaggccctgaccaggccgtgcacacccctccggctgtccta
cagtccctcaggactctactccctcaacggcgtggtaaccgtccctcaacggcttggcacccagacccatctcaacgtqaatc
acaaggcccaccaacaccaaaqgtggacaagagacttggtagagggcagcacagggaggggtgtctgctggaaaggccaggct
cagcgctcctgcctggacgcacccggctatgcagtcccagttccaggcagcaaggcaggccctgtgccttcacccggaggcc
tctgcccggccactcatgctcaggagagggcttctggctttcccgaggctctggcaggcacaggctaggtgcccataaccca
ggccctgcacacaaaaggggcaggtctggctcagacctgccaagagccatccggaggccctgaccctaagccac
cccaaaggccaaactctccactccctcaacgtccggacaccctctccctccagattcagtaactccaaatctctctgcagagccca
aatcttgtgacaaaactcacacatgcccacccgtcccaaggtaaagccagccaggccctgcctccagctcaaggcgggacagggtgc
cctagagtagcctgcattccaggacaggcccgccgggtctgacacgtccacccatcttcctcagcacctqaactccctggaa
ggaccgtcaqtcttccttcccccacccaaacccaaaggacaccctcatqatctccggacccttggatqtcacatqctgttgtggacq
tgaggccaccaagaccctgaggtaactcaactgttacgtggacccgggtgcataatqccaaagacaaaaggccgggggggggggggg
ggcgtacatcacaacccatccgttggatqaccatccctccatccaaaggccaaagggtgggaccctgcccgggggggggggggggg
gtctccaacaaaaggccctccatccggccatccaaaggccaaagggtgggaccctgcccgggggggggggggggggggggggggggg
gacagaggccggctggccaccctctggccctgagagtgaccgctgtaccaacccctgtccctacaggccagccgggggggggggggg
ggtotacaccctccccatccgg
acatccgggtgg
ttccctctatgcaagctaccgtggacaaggacccgggtggccaccgg
caaccactacacccgg

10

20

30

40

【0397】

この配列において、エクソンは二重下線により示される。さらに、最初の S e r をコードするヌクレオチド a g t (ボルド体下線) は、I g G 発現ベクターにおいて、可変重鎖部位をコードする X h o I で消化された P C R 産物の X h o I で消化された発現ベクターへの導入の結果として作成される。

【0398】

上に記載される V_H および V_L をコードするペアは、E L I S A および / または F L I S A における様々な抗原およびペプチドに対する結合特異性、エピトープマッピング、抗原多様性、ならびに配列多様性により選択された。誤りが見つかった場合、選択された同種 V - 遺伝子ペアをクローン修復（実施例 1、セクション f ）にかけた。各々の発現構築物を、C H O - F l p I n 受容細胞株（I n v i t r o g e n ）への F l p - リコンビナーゼを発現するプラスミドを用いて共トランスフェクトし、次いで、組み込み体の抗生物質選択を行った。トランスフェクション、選択、および無血清培地への適応を、実施例 1、セクション g - 1 および g - 2 に記載されるごとく行った。

40

【0399】

各抗体を产生する細胞株の細胞バンクを作成するために、安定的にトランスフェクトされ、無血清の懸濁培地が適応された個々の発現細胞株を複数のアンプルで凍結保存した。

【実施例3】

【0400】

インビトロ中和実験を、单一抗体クローニングおよび精製された抗体の組み合わせの両方で行った。以下に記載される全ての抗体混合物は、本発明の各抗 - R S V 抗体の多くからなり、それらを等量の異なる抗体を用いた混合物中に混合させた。

50

【0401】

单一抗体のテスト

最初に、各抗体の中和活性を、実施例1、セクションj-2で上に記載されるごとく、RSVサブタイプAおよびB株に対する補体の存在下におけるPRNTで調べた。多くの精製抗体のEC₅₀値を表7に示す。興味深いことに、ほとんどの抗-F抗体が各々ウイルス中和活性を示した一方、EC₅₀は抗-RSVタンパク質G抗体の大半で測定されなかつた。このことは、これらの抗体が各々、ウイルスを中和することができないことを示す。空欄は、まだ解析を行っていないことを示す。NDは、EC₅₀値が非常に低いか、もしくは中和活性を欠失しているため、PRNTで測定できなかつたことを示す。

【0402】

表7：RSVサブタイプAおよびBに対する精製された抗-RSVタンパク質Fおよびタンパク質G抗体のEC₅₀値

【表9】

| クローン | 抗原特異性 | EC ₅₀ 値(μg/ml) | |
|------|-------|---------------------------|--------|
| | | サブタイプA | サブタイプB |
| 793 | G | 2.52 | |
| 800 | F | 0.15 | 0.16 |
| 810 | F | 0.06 | 0.14 |
| 816 | G | ND | |
| 818 | F | 1.86 | 0.21 |
| 819 | F | 0.18 | |
| 824 | F | 0.03 | 0.02 |
| 825 | F | 0.12 | 0.04 |
| 827 | F | 0.16 | 0.10 |
| 831 | F | 0.08 | 1.66 |
| 853 | G | 1.49 | |
| 855 | G | 6.35 | ND |
| 856 | G | ND | |
| 858 | F | ND | |
| 868 | G | ND | |
| 880 | F | 0.38 | 0.40 |
| 888 | G | 0.14 | |
| 894 | F | 0.08 | 0.07 |

【0403】

抗-F抗体の混合物

サブタイプAおよびBのRSV株を中和する抗-RSVタンパク質F抗体の混合物の能力を、パリビズマブ（抗-F抗体についても）を用いて得られた中和効果と比較した。中和能力を、実施例1、セクションjに記載されるごとくマイクロ中和試験またはPRNTを用いて測定した。最初の実験では、5個および11個の異なる抗-F抗体を含む2つの抗体混合物、抗-F(I)および抗-F(II)を各々、マイクロ中和試験を用いてパリビズマブと比較した。抗-F(I)は、クローン810、818、819、825および827から得られる抗体からなる。抗体810および819は、抗原部位A/I/Iに結合し、抗体818は、部位B/IまたはF1に、抗体825は、部位AおよびCと重複する複合エピトープに結合し、ならびに抗体827は、別の複合エピトープに結合する（表5を参照）。抗-F(II)は、クローン735、800、810、818、819、825、827、863、880、884および894から得られる抗体からなる。抗-F(II)は、所定の抗原部位のいずれかに対する複数の結合部位を含む：抗体810、819および863はA/I/Iに結合し、抗体800および818はF1（またはB/I）に

10

20

30

40

50

結合し、抗体 827 および 825 は、上に記載される複合エピトープに、抗体 735 および 894 は、未知のクラスター (U C) I に属し、抗体 880 は、U C II に、ならびに 884 は、別のいまだ未知のエピトープに結合する（表 5 を参照）。図 5 に示されるごとく、組成物抗 - F (I) および F (II) の両方は、両サブタイプの RSV 株の中和に関してパリビズマブよりより強力である。

【0404】

図 5 はまた、5 個の抗体（抗 - F (I)）の組み合わせが 11 個の抗体（抗 - F (II)）の組み合わせより強力であることが示唆されることを示す。抗 - F (I) 混合物は、これまで明確にされてきた異なるエピトープ特異性のうちで最も強力な個々の中和抗体のいくつかを含む。抗 - F (II) 混合物は、同一の 5 個の極めて強力な抗体を含むが、それはまた、所定のエピトープのいくつかに対するさらなる結合部位を含み、含まれた抗体はまた、それら自身におけるより広い範囲の中和活性を示す。それゆえ、極めて強力な抗体の活性は、F タンパク質における中和エピトープへの結合による競合のため、抗 - F (II) 組み合わせで希釈される可能性がある。しかしながら、各々の抗体に関連する中和効果以外の効果、例えば、食作用の増加、抗体依存性細胞障害活性 (ADCC) の上昇、抗炎症効果、補体活性、およびエスケープ変異体が作成される可能性の低下が可能性として存在することから、インビボを考慮に入れると、この結果は、5 個の抗体混合物がインビボで用いられる際に 11 個の抗体混合物よりも良好であるという指標として解釈されるべきではない。

10

【0405】

この最初の実験および補体の存在下で極めて強力である F - 特異的な抗体クローニング多くの組み合わせが同定されたことから、インビトロアッセイおよびクローニングの組み合わせの両方が精査された。さらなる抗 - F 抗体組成物の EC₅₀ 値（ブラーク数の 50 % 減少を引き起こすのに必要とされる有効濃度）として表される中和能力を表 8 に記載する。組成物中のクローニングの正確な数によらず、F - 特異的抗体のテストされた組み合わせの大半は、RSV 株サブタイプ A の中和に関してパリビズマブよりも強力である。

20

【0406】

抗 - G 抗体の混合物

サブタイプ A の RSV 株を中和する抗 - G 抗体混合物の能力を、実施例 1、セクション j - 2 に記載されるように、PRNT を用いてテストした。テストした抗 - G 抗体組成物からの EC₅₀ 値を表 8 に記載する。2 つの抗 - G 抗体の組成物のほとんどは、個々の抗 - G 抗体と比較してウイルスを中和する能力の顕著な上昇を示さなかった。2 または 3 つの抗 - G 抗体のうちのいくつかの組み合わせは、濃度にかかわらず、決して 100 % のウイルス中和率には到達しなかった。しかしながら、さらなる抗 - G 抗体を組成物に添加すると能力が上昇し、それは、可能性として抗 - G 抗体間ににおける相乗的な中和効果を示唆する。図 7 は、複数の G - 特異的なクローニングを組み合わせた際の能力の上昇の一例を示す。

30

【0407】

抗 - F および抗 - G 抗体の混合物

RSV サブタイプ B 株を中和する抗 - RSV タンパク質 F およびタンパク質 G 抗体混合物の能力を、パリビズマブを用いて得られる中和効果と比較した。実施例 1、セクション j - 4 に記載ごときマイクロ中和融合阻害アッセイまたはブラーク減少中和アッセイ（実施例 1、セクション j - 2）のどちらかを用いて中和能力を測定した。

40

【0408】

最初に、2 つの抗体混合物、抗 - F (I) G および抗 - F (II) G の中和活性をマイクロ中和融合阻害アッセイで測定した。これらの混合物の各々は、上に記載される組成物抗 - F (I) および抗 - F (II) の抗 - F 抗体ならびにクローニング 793、796、838、841、856 および 888 から得られる抗 - G 抗体を含み、ここで、抗体 793、796、838 は G タンパク質の保存領域に結合し、841、956 は RSV サブタイプ A の GCCR に結合し、および 888 は両方のサブタイプの GCCR に結合する（表 5 を

50

参照)。図6に示されるように、両組成物抗-F(I)GおよびF(II)Gは、RSV B1株の中和に関してパリビズマブよりも強力である。さらに、2つの混合物の中和活性はおよそ同等である。それゆえ、抗-F抗体を多くのタンパク質G-特異的クローニングと組み合わせると、2つの抗-F抗体混合物間で以前観察された能力の差異は減少するようと思われる。このことは、RSVにおける広い範囲の抗原およびエピトープを認識する抗体を組み合わせると、一般的に中和活性が増加することを示唆しうる。

【0409】

その後、抗-Fおよび抗-G抗体の両方の多くの異なる組み合わせを、補体の存在または非存在下におけるPRNTを用いてテストした。活性な補体の存在下でこのアッセイにより得られるEC₅₀値を表8に表す。抗-Fおよび抗-G抗体の両方を含む全てのテストされた組成物はRSVサブタイプAを中和し、これらの大半はパリビズマブよりより強力である。

10

【0410】

結果はまた、本発明の抗体クローニング技術を用いてヒトドナーから自然に高い親和性を有する抗体を繰り返し得られうることを示す。

【0411】

表8: RSVサブタイプAおよびBに対する抗-RSV抗体の組み合わせのEC₅₀値。空欄は、解析がまだ行われていないことを示す。NDは、EC₅₀値が非常に低いか、もしくは中和活性を欠失しているため、PRNTにおいて測定できなかつたことを示す。

20

【表10】

| 組成物番号 | 組成物中の抗体 | EC ₅₀ 値 (μg/ml) | |
|-------|--|----------------------------|--------|
| | | サブタイプA | サブタイプB |
| 1 | 810, 818, 819, 825, 827 | 0.19 | 0.38 |
| 2 | 810, 818, 819, 825, 827, 831, 858, 863, 884, 894, 793, 796, 816, 838, 853, 856, 859, 888 | 0.34 | |
| 3 | 810, 818, 825, 827, 884, 886, 793, 853, 868, 888 | 0.30 | |
| 4 | 810, 818, 825, 827, 831, 858, 884, 886, 793, 796, 816, 853, 856, 868, 888 | 0.19 | |
| 5 | 810, 818, 825, 827, 831, 858, 884, 886, 793, 853, 868, 888 | 0.21 | |
| 6 | 810, 819, 825, 827, 831, 793, 853, 856, 858, 868 | 0.20 | |
| 7 | 810, 811, 817, 819, 825, 827, 831, 838, 853, 856, 858, 859, 863, 868 | 0.18 | |
| 8 | 800, 801, 811, 838, 853, 855, 859, 861, 880, 894, 736, 795, 796, 799 | ND | |
| 9 | 810, 818, 825 | 0.14 | 0.29 |
| 10 | 810, 818, 819, 825, 827, 884 | 0.21 | 0.42 |
| 11 | 810, 818, 819, 825, 827, 884, 886 | 0.15 | 0.29 |
| 12 | 793, 816, 853, 856 | 0.06 | |
| 13 | 793, 816, 853, 855, 856 | 0.03 | |
| 14 | 793, 868, 888, 853, 856 | 0.34 | |

30

40

【表11】

| 組成物番号 | 組成物中の抗体 | E C 5 0 値 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) | |
|-------|---|---------------------------------------|--------|
| | | サブタイプA | サブタイプB |
| 15 | 793, 796, 818, 816, 838, 853, 855, 856, 859, 868, 888 | 0.11 | |
| 16 | 810, 818, 827 | 0.11 | 0.21 |
| 17 | 810, 818, 825, 827, 858, 886 | 0.10 | 0.16 |
| 18 | 810, 818, 825, 827, 858, 886, 793, 816, 853, 855, 856 | 0.04 | 0.15 |
| 19 | 818, 825, 827, 858, 886, 793, 816, 853, 855, 856 | 0.06 | |
| 20 | 810, 818, 819, 825, 827, 858, 793, 816, 853, 855, 856 | 0.10 | |
| 21 | 810, 793, 816, 853, 855, 856 | 0.04 | |
| 22 | 818, 825, 827, 831, 858, 886, 793, 816, 853, 855, 856 | 0.06 | |
| 23 | 818, 825, 827, 831, 858, 819, 793, 816, 853, 855, 856 | 0.06 | |
| 24 | 818, 827, 831, 858, 819, 793, 816, 853, 855, 856 | 0.06 | |

10

20

【表12】

| | | | |
|----|---|------|------|
| 25 | 810, 818, 819, 824, 825, 827, 858, 793, 816, 853, 855, 856 | 0.07 | |
| 26 | 831, 818, 819, 824, 825, 827, 858, 793, 816, 853, 855, 856 | 0.08 | |
| 27 | 831, 818, 819, 824, 827, 858, 793, 816, 853, 855, 856 | 0.05 | |
| 28 | 810, 818, 824 | 0.06 | 0.04 |
| 29 | 810, 824 | 0.05 | |
| 30 | 818, 824 | 0.04 | |
| 31 | 810, 818 | 0.11 | |
| 32 | 824, 793, 816, 853, 855, 856 | 0.05 | |
| 33 | 810, 818, 819, 824, 825, 827, 858, 894, 793, 816, 853, 855, 856 | 0.07 | 0.03 |
| 34 | 810, 818, 819, 824, 825, 827, 894, 793, 816, 853, 855, 856 | 0.07 | |
| 35 | 793, 816 | 5.94 | |
| 36 | 855, 856 | ND | |
| 37 | 793, 856 | ND | |
| 38 | 793, 853 | 2.35 | |
| 39 | 853, 856 | 0.21 | |
| 40 | 793, 853, 856 | 2.84 | |
| 41 | 793, 816, 853 | 1.97 | |
| 42 | 853, 855, 856 | 0.25 | |
| 43 | 793, 816, 853, 856 | 0.45 | |
| 44 | 793, 853, 855 | 0.26 | |
| 45 | 793, 853, 855, 856 | 0.16 | |
| 46 | 816, 853, 855, 856 | 0.07 | |
| 47 | 816, 856 | 0.06 | |
| 48 | 816, 853 | 0.75 | |
| 49 | 816, 853, 856 | 0.07 | |
| 50 | 810, 818, 824, 816 | 0.09 | |
| 51 | 810, 818, 824, 853 | 0.11 | |

【表13】

| 組成物番号 | 組成物中の抗体 | E C 5 0 値 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) | |
|-------|------------------------------|---------------------------------------|--------|
| | | サブタイプA | サブタイプB |
| 52 | 810, 818, 824, 856 | 0.10 | |
| 53 | 810, 818, 824, 816, 853 | 0.09 | |
| 54 | 810, 818, 824, 816, 856 | 0.05 | |
| 55 | 810, 818, 824, 853, 856 | 0.08 | |
| 56 | 810, 818, 824, 816, 853, 856 | 0.05 | 0.03 |
| | パリビズマブ | 0.14 | |

【実施例4】

【0412】

10

20

30

40

50

R S V 感染マウス肺におけるウイルス負荷の減少

R S V 感染に対する本発明の精製抗体の組み合わせのインビオ保護能力を、実施例 1、セクション k - 1 に記載されるように、B A L B / c マウスモデルにおいて示した (Taylor et al. 1984. Immunology 52, 137-142; Mejias, et al. 2005. Antimicrob. Agents Chemother. 49: 4700-4707)。表 9において、本発明の異なる抗体クローニングの等量からなる 3 つの異なる抗 - R S V r p A b を用いる実験からのデータを、同一の実験の未感染コントロールマウスおよびプラセボ (P B S) 処理マウスからのデータと比較して表す。各処理群は 5 匹ずつのマウスを含み、このモデルにおいてウイルス複製のだいたいのピークである感染 5 日後にサンプルを得た。表 9 に示されるように、予防的に投与されると、r p A b 組み合わせは、少なくとも投与量の順にウイルス負荷を有効に減少させる。コピー数を平均 ± 標準偏差として表す。2 つの処理群では、コピー数はこのアッセイの検出限界点またはそれ以下、すなわち、 $3.8 \log_{10} \text{RNA コピー} / \text{ml}$ であった。

10

【 0 4 1 3 】

表 9 : マウス肺における予防および R S V 誘発後のウイルス負荷

【 表 1 4 】

| 処理群 | RT-PCRによるウイルス負荷 (\log_{10} RNA コピー/ml) | 新規データ |
|--------------------------------------|--|-------|
| 未感染 | 陰性 | |
| P B S | 5.14 ± 0.09 | 4.25 |
| 抗-R S V r p A b 18 (50 mg/kg) | ND | |
| 抗-R S V r p A b 18 (5 mg/kg) | 4.61 ± 0.22 | 3.64 |
| 抗-R S V r p A b 9 (50 mg/kg) 小 F Hi | ND | |
| 抗-R S V r p A b 9 (5 mg/kg) 小 F Lo | 4.74 ± 0.38 | 3.82 |
| 抗-R S V r p A b 17 (50 mg/kg) 大 F Hi | 4.41 ± 0.14 | 3.04 |
| 抗-R S V r p A b 17 (5 mg/kg) 大 F Lo | 4.69 ± 0.05 | 3.90 |

20

【 0 4 1 4 】

R S V 感染マウスに由来する肺サンプルにおけるサイトカインおよびケモカインレベル試験的なマウス予防研究に由来する肺サンプルを市販されている複合的な免疫アッセイを用いて解析することにより、実施例 1、セクション k - 1 に記載されるように、R S V 感染および r p A b 18 による抗体予防後における異なるサイトカインおよびケモカインのレベルを調べた (表 8)。未感染および未処理マウスからのサンプルについても、B A L B / c マウスの基準データを得るために解析した。感染 5 日後に全てのサンプルを得た。データを平均 ± 標準偏差として表す。

30

【 0 4 1 5 】

解析では、ヒトとマウスの両方において、R S V 感染、次いで炎症応答の重要なマーカーとして示される多くのサイトカインおよびケモカインは、インターフェロン (I F N) - 、インターロイキン (I L) - 1 、 I L - 4 、 I L - 6 、 I L - 8 (K C / G R O) 、 I L - 10 、マクロファージ炎症タンパク質 (M I P) - 1 、発現および分泌標準 T 細胞活性調整 (R A N T E S 、 C C L 5) および腫瘍壊死因子 (T N F) - を含み、これらサイトカインおよびケモカイン数のレベルがプラセボ処理マウスの肺で上昇する一方、約 5 0 m g / k g の r p A b で処理したマウスの肺は、未感染のコントロールマウスとほぼ同一のレベルであることが示された。同様の結果を他の抗 - R S V r p A b の組み合わせで得た。マウスは I L - 8 の自明なホモログを有していないが、K C と呼ばれるヒト G R O に機能的な相同性 (I L - 8 と同様な機能) を有することは注目すべきである。

40

【 0 4 1 6 】

炎症応答の動力学および抗体予防の用量応答効果は調査中である。

【 0 4 1 7 】

表 1 0 : R S V 感染マウスに由来する肺組織におけるサイトカインおよびケモカインのレベル

50

【表15】

| 組織サンプルのレベル (pg/ml) | 未感染のコントロールマウス | プラセボ処理マウス | 抗-RSV rpAb処理マウス |
|------------------------|---------------|-----------|-----------------|
| IL-1 β | 270±71 | 570±100 | 310±140 |
| IL-4 | 7.7±4.7 | 26±4.6 | 14±8.5 |
| IL-6 | 6.4±2.6 | 22±12 | 8.2±3.8 |
| IL-10 | 120±17 | 320±58 | 170±41 |
| IFN- γ | 20±7.6 | 420±88 | 81±72 |
| KC/GRO α (IL-8) | 51±38 | 290±83 | 94±99 |
| MIP-1 α (CCL3) | 39±16 | 940±170 | 160±110 |
| RANTES (CCL5) | 60±28 | 380±32 | 140±66 |
| TNF- α | 18±6.1 | 95±10 | 38±25 |

【図面の簡単な説明】

【0418】

【図1】(A) プロトタイプ株、Long (サブタイプA) および18537 (サブタイプB) 由来の全体のGタンパク質のアミノ酸配列の並列比較。シグナル / 膜貫通領域を点線で囲う。Cane et al 1991 J.Gen.Virology 72:2091-2096により同定されるようなアミノ酸 101 ~ 133 および 208 ~ 299 の間の 2 つの可変領域を下線で特定する。Gタンパク質の中心フラグメントは E . c o l i で融合タンパク質として発現され、黒色で囲う。2 つのアミノ酸配列を、配列番号 : 711 (サブタイプA) および配列番号 : 712 (サブタイプB) に記載する。(B) (A) に示される中心フラグメントの並列比較。13 - a a 保存領域およびGタンパク質システインリッチドメイン (G C R R) の局在を角括弧で示す。(両サブタイプ間で同一の) G C R R におけるジスルフィド架橋を四角角括弧で示す。2 つのアミノ酸配列を配列番号 : 713 (サブタイプA) および配列番号 : 714 (サブタイプB) に記載する。

【図2】多重重複伸長 R T - P C R (A) およびクローン化工程 (B) の模式的概要。(A) V_H および V_K 遺伝子ファミリー各々に特異的な 2 組のプライマー、C H + V H 1 - 8 および V K 1 - 6 + C K 1 を第一の P C R 工程に用いた。V_H または V_K プライマー間の相同領域は重複する P C R 産物を生じる。第 2 工程において、この産物をネスティド P C R で増幅させる。プライマーはまた、クローン化を容易にする制限酵素の認識部位を含む。(B) 作成した同種の連結 V_H および V_K をコードするペアをプールし、隣接する X h o I および N o t I 制限部位の使用により哺乳動物 I g G 発現ベクターに挿入した。次いで、全長抗体の発現を促進するために、二方向性プロモーターを連結 V_H および V_K をコードする配列間の A s c I - N h e I 制限酵素部位に挿入する。用いられる P C R プライマーを平行矢印により示す。C H 1 : 重鎖定常領域 1 、C L : 定常領域、L C : 軽鎖 ; A b : 抗体 ; P 1 - P 2 : 二方向性プロモーター。

【図3】哺乳動物全長抗体発現ベクター 00 - V P - 530 の模式図。ベクターは以下の構成要素を含む : A m p および A m p p r o = アンピシリン耐性遺伝子およびそのプロモーター。p U C 開始点 = p U C 複製開始点。P 1 = 軽鎖の発現を促進する哺乳動物プロモーター。P 2 = 重鎖の発現を促進する哺乳動物プロモーター。リーダー I G H V = ゲノムヒト重鎖リーダー。V H = 重鎖可変領域をコードする配列。I g G 1 = ゲノム免疫グロブリンアイソタイプ G 1 重鎖定常領域をコードする配列。ウサギ - グロブリン A = ウサギベータ - グロブリンポリ A 配列。カッパリーダー = マウスカッパリーダーをコードする配列。L C = 軽鎖をコードする配列の配列。S V 4 0 t e r m = サルウイルス 40 転写終結配列。F R T = F 1 p 認識標的部位。N e o = ネオマイシン耐性遺伝子。S V 4 0 p o l y A = サルウイルス 40 ポリ A シグナル配列。

【図4】ピアコア(Biacore)解析を用いてクローン801から得られた抗体(Ab801)のエピトープ特異性の特徴付け。抗体801結合を、3つの抗体、9c5(2)、133-h(3)およびパリビズマブ(4)であって、各々、抗原部位F1、CおよびIIに結合する抗体を用いて、タンパク質Fへの結合に関する対競合(pair-wise competition)でテストした。対照の細胞は、競合しないAb801(1)のタンパク質Fへの結合を示す。4つの抗体の注入時間を矢印により示す。応答を相対的共鳴単位(RU)で示す。長い両方向矢印は競合しない応答の大きさを示し、短い両方向矢印は9c5で阻害された応答の大きさを示す。

【図5】図は、RSVサブタイプAおよびB株のインビトロ中和の結果である。抗-F抗体混合物の希釈物を、RSV long(グラフA)およびRSV B1(グラフB)株を中和する能力についてテストした。クローン810、818、819、825および827から得られた抗体混合物、抗-F(I)を三角形(△)として示し、クローン735、800、810、818、819、825、827、863、880、884および894から得られた抗体混合物、抗-F(II)を四角形(□)として示す。パリビズマブをダイヤモンド(◇)として示し、アイソタイプに適合する陰性コントロール(抗-アカゲザルD)抗体を円(○)として示す。吸光度を490nmで測定し、RSV複製と相関関係にある。10

【図6】図は、インビトロRSV融合阻害アッセイの結果である。抗体混合物の希釈物を、RSV B1株を中和する能力についてテストした。クローン810、818、819、825、827、796、838841、856および888から得られる抗体混合物、抗-F(I)Gを白抜きの四角形(□)として示し、735、800、810、818、819、825、827、863、880、884、894、793、796、838、841、856および888から得られる抗体混合物、抗-F(II)Gを、白抜きの三角形(△)として示す。パリビズマブをダイアモンド(◇)として示す。吸光度を490nmで測定し、RSV複製と相関関係にある。20

【図7】図は、活性な補体の存在下でPRNTにより測定されるごとく抗-G抗体クローンの組み合わせによるRSVのインビトロ中和からの結果である。(表8に記載される)個々の抗体組成物の希釈物を、ウサギ補体の存在下におけるRSV株Longとインキュベートし、その後、HEp-2細胞を感染させた。インキュベーション24時間後、感染の程度を、RSV特異的血小板の免疫検出を用いて検出した。抗-RSV rpa b13を白抜き三角形(△)として、抗-RSV rpa b35を三角形(△)として、抗-RSV rpa b36を四角形(□)として、抗-RSV rpa b41を円(○)として、ならびに抗-RSV rpa b45を白抜き四角形(□)として示す。データをコントロール±SDと比較して%感染として表す。30

(1)

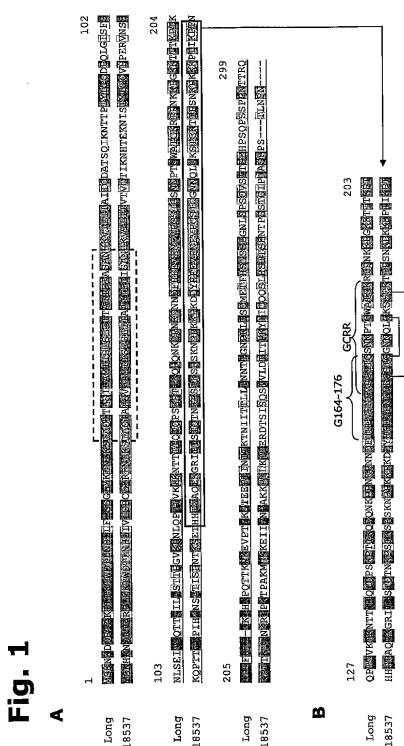
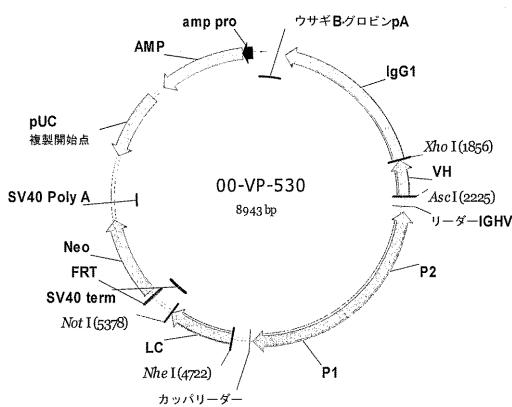
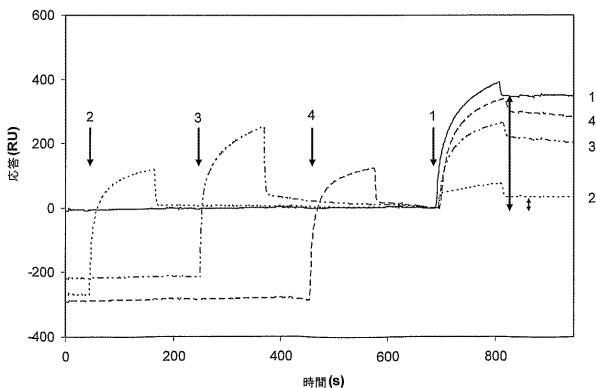


Fig. 1

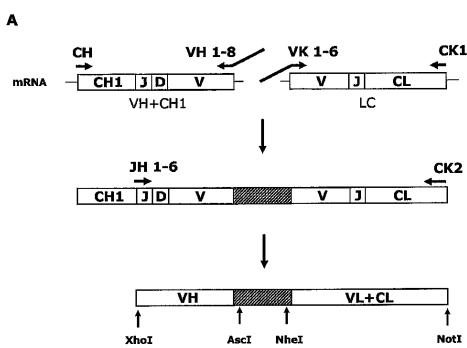
【 四 3 】



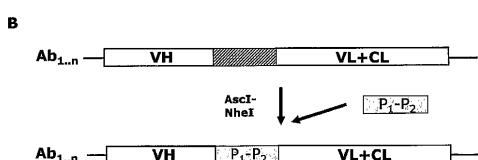
【 図 4 】



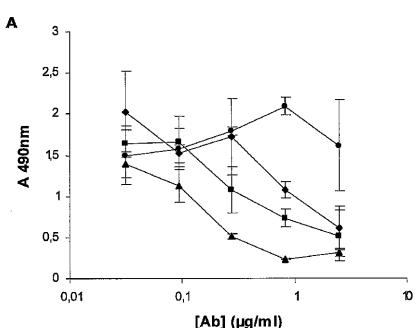
【 义 2 A 】



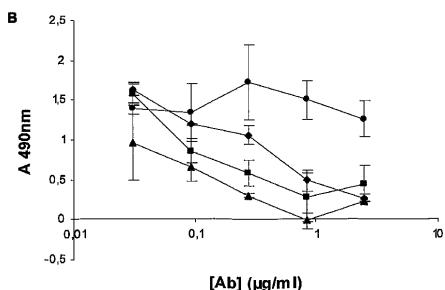
【 図 2 B 】



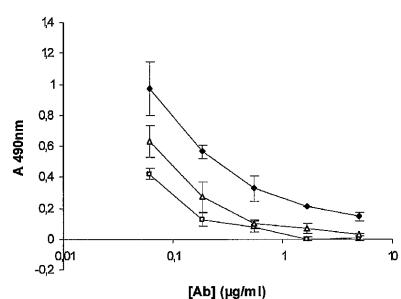
【 図 5 A 】



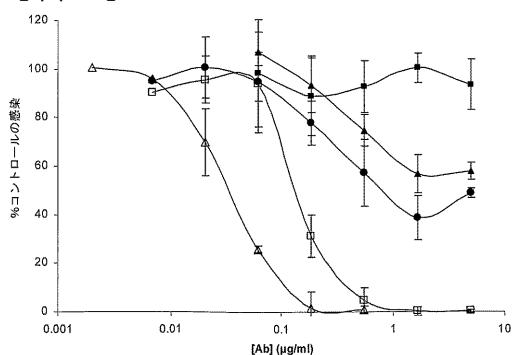
【 5 B 】



【図 6】

Fig. 6

【図 7】



【手続補正書】

【提出日】平成20年11月10日(2008.11.10)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】変更

【補正の内容】

【配列表】

2009528828000001.app

【国際調査報告】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | International application No PCT/DK2007/000113 | | | | | | |
|--|--|--|-----------|--|-----------------------|---|--|----------------------------------|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/10 A61K39/42 A61P31/14 | | | | | | | | |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | | | | | | | |
| B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K A61P A61K | | | | | | | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched | | | | | | | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, SCISEARCH | | | | | | | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category*</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">X</td> <td style="padding: 2px;"> MCGILL A ET AL: "Analysis of the binding of monoclonal and polyclonal antibodies to the glycoproteins of antigenic variants of human respiratory syncytial virus by surface plasmon resonance" JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V., AMSTERDAM, NL, vol. 297, no. 1-2, February 2005 (2005-02), pages 143-152, XP004793114 ISSN: 0022-1759 page 145 pages 149-150; table 5 -/-/ </td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">1-10, 12, 24-26, 38, 44-46</td> </tr> </tbody> </table> | | | Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. | X | MCGILL A ET AL: "Analysis of the binding of monoclonal and polyclonal antibodies to the glycoproteins of antigenic variants of human respiratory syncytial virus by surface plasmon resonance" JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V., AMSTERDAM, NL, vol. 297, no. 1-2, February 2005 (2005-02), pages 143-152, XP004793114 ISSN: 0022-1759 page 145 pages 149-150; table 5 -/-/ | 1-10, 12, 24-26, 38, 44-46 |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. | | | | | | |
| X | MCGILL A ET AL: "Analysis of the binding of monoclonal and polyclonal antibodies to the glycoproteins of antigenic variants of human respiratory syncytial virus by surface plasmon resonance" JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V., AMSTERDAM, NL, vol. 297, no. 1-2, February 2005 (2005-02), pages 143-152, XP004793114 ISSN: 0022-1759 page 145 pages 149-150; table 5 -/-/ | 1-10, 12, 24-26, 38, 44-46 | | | | | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. | | <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex. | | | | | | |
| * Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the International filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed | | | | | | | | |
| Date of the actual completion of the international search | | Date of mailing of the international search report | | | | | | |
| 30 July 2007 | | 09/08/2007 | | | | | | |
| Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016 | | Authorized officer Domingues, Helena | | | | | | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/DK2007/000113

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|---|---|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | RESPIGAM PRESCRIPTION INFORMATION:[Online] May 2000 (2000-05), XP002444042 Retrieved from the Internet: URL: http://www.medimmune.com/pdf/products/respigam_pi.pdf [retrieved on 2007-07-25] the whole document ----- | 1-8, 10-12, 14-22, 27-37, 39-50 |
| X | SASTRE PATRICIA ET AL: "Comparison of affinity chromatography and adsorption to vaccinia virus recombinant infected cells for depletion of antibodies directed against respiratory syncytial virus glycoproteins present in a human immunoglobulin preparation" JOURNAL OF MEDICAL VIROLOGY, vol. 76, no. 2, June 2005 (2005-06), pages 248-255, XP002444395 ISSN: 0146-6615 page 250 page 253 ----- | 1-8, 10-12, 14-22, 27-37, 39-50 |
| Y | EP 1 516 929 A (SYMPHOGEN AS [DK]) 23 March 2005 (2005-03-23) page 13; example 11 ----- | 1-50 |
| Y | WO 2004/061104 A (SYMPHOGEN AS [DK]; HAURUM JOHN S [DK]; WIBERG FINN C [DK]; COLJEE VINC) 22 July 2004 (2004-07-22) the whole document ----- | 1-50 |
| Y | MEJFAS ASUNCION ET AL: "Comparative effects of two neutralizing anti-respiratory syncytial virus (RSV) monoclonal antibodies in the RSV murine model: Time versus potency" ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, vol. 49, no. 11, November 2005 (2005-11), pages 4700-4707, XP002444035 ISSN: 0066-4804 the whole document ----- | 1-50 |
| Y,P | BREGENHOLT SOREN ET AL: "Recombinant human polyclonal antibodies: A new class of therapeutic antibodies against viral infections" CURRENT PHARMACEUTICAL DESIGN, BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS, SCHIPHOL, NL, vol. 12, no. 16, 2006, pages 2007-2015, XP008080864 ISSN: 1381-6128 the whole document ----- -/- | 1-50 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

| |
|---|
| International application No PCT/DK2007/000113 |
|---|

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| Y,P | HAURUM ET AL: "Recombinant polyclonal antibodies: the next generation of antibody therapeutics?" DRUG DISCOVERY TODAY, ELSEVIER, RAHWAY, NJ, US, vol. 11, no. 13-14, July 2006 (2006-07), pages 655-660, XP005511756 ISSN: 1359-6446 the whole document | 1-50 |
| E | WO 2007/065433 A (SYMPHOGEN AS [DK]; JENSEN ALLAN [DK]; LANTTO JOHAN [SE]; HANSEN MARGIT) 14 June 2007 (2007-06-14) abstract; examples 1-3 | 1-50 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

| |
|--|
| International application No. PCT/DK2007/000113 |
|--|

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 15-21 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. Claims Nos.: because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

| |
|---|
| International application No PCT/DK2007/000113 |
|---|

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|--|------------------|---|--|
| EP 1516929 | A 23-03-2005 | AU 2004286019 A1 BR PI0414282 A CA 2539576 A1 WO 2005042774 A2 EP 1670912 A2 IS 8415 A JP 2007505611 T KR 20060092218 A | 12-05-2005 21-11-2006 12-05-2005 12-05-2005 21-06-2006 12-04-2006 15-03-2007 22-08-2006 |
| WO 2004061104 | A 22-07-2004 | AT 338816 T AU 2004203727 A1 BR 0406678 A CA 2512647 A1 EP 1583830 A2 HK 1078896 A1 JP 2006515520 T KR 20050101538 A MX PA05006724 A NZ 541458 A | 15-09-2006 22-07-2004 20-12-2005 22-07-2004 12-10-2005 26-01-2007 01-06-2006 24-10-2005 08-09-2005 28-04-2006 |
| WO 2007065433 | A 14-06-2007 | NONE | |

フロントページの続き

| (51) Int.CI. | F I | テーマコード(参考) |
|--------------------------|--------------------------------|------------|
| C 1 2 N 1/21 (2006.01) | C 1 2 N 1/21 | |
| A 6 1 K 39/395 (2006.01) | C 1 2 N 5/00 A 6 1 K 39/395 | A D |

(81) 指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MT,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

- (72) 発明者 ヨハン・ラント
スウェーデン、エスエー - 227 36 ルンド、ブリッガレガータン 4 番
- (72) 発明者 ルシーラ・ステイナー
デンマーク、デーコー - 2970 ヘルスホルム、ステンハーヴェヴァイ 12 ペー番
- (72) 発明者 クラウス・ケーフェーズ
デンマーク、デーコー - 2300 コペンハーゲン・エス、ルエズ・ランガールズスヴァイ 23、5 チル・ハイレ
- (72) 発明者 ラース・エス・ニールセン
デンマーク、デーコー - 2990 ニヴォ、ニヴォパルク 58 番
- (72) 発明者 ヘンリエッテ・シェーニング・ニールセン
デンマーク、デーコー - 3400 ヴェアレーセ、ラウネフースパーケン 34 番
- F ターム(参考) 4B024 AA01 BA51 BA61 CA01 GA11 HA01
4B065 AA90X AA90Y AB01 AB04 AC14 BA02 BA08 CA24 CA25 CA44
4C085 AA13
4H045 AA11 BA10 CA40 DA75 EA22 FA74