(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2012-235783
(P2012-235783A)
(43)公開日　平成24年12月6日(2012.12.6)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA	4B024
C07K 16/24	(2006.01)	C07K	16/24		4B065
C07K 16/46	(2006.01)	C07K	16/46		4C084
C07K 19/00	(2006.01)	C07K	19/00		4C085
C12N 1/15	(2006.01)	C12N	1/15		4H045

審査請求 有　請求項の数 1　ＯＬ　外国語出願　（全 105 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2012-150185 (P2012-150185)
(22)出願日　平成24年7月4日 (2012.7.4)
(62)分割の表示　特願2006-520171 (P2006-520171)の分割
原出願日　平成16年7月16日 (2004.7.16)
(31)優先権主張番号　60/488,681
(32)優先日　平成15年7月18日 (2003.7.18)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　500049716
アムジエン・インコーポレーテツド
アメリカ合衆国　シーエー　９１３２０，サウザンド　オークス，ワン　アムジエン　センター　ドライブ
(71)出願人　504429002
アムジエン・フレモント・インコーポレイテツド
アメリカ合衆国、カリフオルニア・９４５５５、フレモント、カイザー・ドライブ・６７０１
(74)代理人　110001173
特許業務法人川口國際特許事務所

最終頁に続く

(54)【発明の名称】肝細胞増殖因子に対する特異的結合因子

(57)【要約】　（修正有）
【課題】肝細胞増殖因子（ＨＧＦ）と相互作用する特異的結合因子、ＨＧＦに対する特異的結合因子の薬学的有効量を投与することによって癌を治療する方法、ＨＧＦに対する特異的結合因子を用いて、試料中のＨＧＦの量を検出する方法を提供する。
【解決手段】ＣＤＲ１ａ、ＣＤＲ２ａ及びＣＤＲ３ａから選択される少なくとも一つの相補性決定領域（ＣＤＲ）を含み、抗体の重鎖と共同して、肝細胞増殖因子（ＨＧＦ）を結合することができる、単離されたポリペプチド。ＣＤＲ１ａ、ＣＤＲ２ａ及びＣＤＲ３ａから選択される少なくとも一つの相補性決定領域（ＣＤＲ）を含み、抗体の重鎖と共同して、肝細胞増殖因子（ＨＧＦ）を結合することができるポリペプチドをコードする単離された核酸分子。前記核酸分子を含む宿主細胞。特異的結合因子と薬学的に許容される担体とを含む、組成物。前記組成物を投与することを含む、患者の癌を治療する方法。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ＣＤＲ１ａ、ＣＤＲ２ａ及びＣＤＲ３ａから選択される少なくとも一つの相補性決定領域（ＣＤＲ）を含み、抗体の重鎖と共同して、肝細胞増殖因子（ＨＧＦ）を結合することができる、単離されたポリペプチド。
（ＣＤＲ１ａは、アミノ酸配列ａ　ｂ　ｃ　ｄ　ｅ　ｆ　ｇ　ｈ　ｉ　ｊ　ｋ　ｌ　ｍ　ｎ　ｏ　ｐ　ｑを含み（アミノ酸ａは、リジン、アルギニン又はグルタミンから選択され；アミノ酸ｂは、セリン又はアラニンから選択され；アミノ酸ｃは、セリンであり；アミノ酸ｄは、グルタミンであり；アミノ酸ｅは、セリン、グリシン又はアスパラギン酸から選択され；アミノ酸ｆは、バリン若しくはイソロイシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｇは、ロイシン若しくはフェニルアラニンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｈは、フェニルアラニン若しくはチロシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｉは、セリンであり、又は存在せず；アミノ酸ｊは、セリンであり、又は存在せず；アミノ酸ｋは、アスパラギン、スレオニンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｌは、アスパラギン、イソロイシン又はバリンから選択され；アミノ酸ｍは、リジン、アルギニン、アスパラギン又はアスパラギン酸から選択され；アミノ酸ｎは、アスパラギン又はセリンから選択され；アミノ酸ｏは、チロシン、アスパラギン酸、トリプトファン又はアスパラギンから選択され；アミノ酸ｐは、ロイシンであり；及びアミノ酸ｑは、アラニン、グリシン又はアスパラギンから選択される。）；
ＣＤＲ２ａは、アミノ酸配列ｒ　ｓ　ｔ　ｕ　ｖ　ｗ　ｘを含み（アミノ酸ｒは、トリプトファン、アラニン、バリン、グルタミン酸又はグリシンから選択され；アミノ酸ｓは、アラニンであり、アミノ酸ｔは、セリンであり、アミノ酸ｕは、スレオニン、セリン又はアスパラギン酸から選択され；アミノ酸ｖは、アルギニン又はロイシンから選択され；アミノ酸ｗは、グルタミン酸、グルタミン又はアラニンから選択され；及びアミノ酸ｘは、セリン、アスパラギン又はスレオニンから選択される。）；
ＣＤＲ３ａは、アミノ酸配列ｙ　ｚ　ａ’　ｂ’　ｃ’　ｄ’　ｅ’　ｆ’　ｇ’　ｈ’を含む（アミノ酸ｙは、グルタミン又はロイシンから選択され；アミノ酸ｚは、グルタミン、アスパラギン又はアルギニンから選択され；アミノ酸ａ’は、チロシン、ヒスチジン、アラニン又はセリンから選択され；アミノ酸ｂ’は、フェニルアラニン、チロシン、アスパラギン酸、アスパラギン又はイソロイシンから選択され；アミノ酸ｃ’は、セリン、グリシン又はアスパラギンから選択され；アミノ酸ｄ’は、プロリン、チロシン、スレオニン、フェニルアラニン、アスパラギン酸、ロイシン又はトリプトファンから選択され；アミノ酸ｅ’は、プロリンであり；アミノ酸ｆ’は、プロリンであり、又は存在せず；アミノ酸ｇ’は、トリプトファン、ロイシン、プロリン、チロシン又はイソロイシンであり；及びアミノ酸ｈ’は、スレオニン又はアスパラギンである。）。）
【請求項２】
配列番号２４、２６、２８、３０、３２、３４、３６、３８、４０及び４２から選択される少なくとも一つのアミノ酸配列を含む、請求項１に記載のポリペプチド。
【請求項３】
配列番号６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８及び６９から選択される少なくとも一つのアミノ酸配列を含む、請求項１に記載のポリペプチド。
【請求項４】
配列番号７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８及び７９から選択される少なくとも一つのアミノ酸配列を含む、請求項１に記載のポリペプチド。
【請求項５】
配列番号８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８及び８９から選択される少なくとも一つのアミノ酸配列を含む、請求項１に記載のポリペプチド。
【請求項６】
前記ポリペプチドが特異的結合因子である、請求項１から５の何れかに記載のポリペプチド。

【請求項７】
前記ポリペプチドが抗体である、請求項１から５の何れかに記載のポリペプチド。
【請求項８】
ＣＤＲ１ｂ、ＣＤＲ２ｂ及びＣＤＲ３ｂから選択される少なくとも一つの相補性決定領域（ＣＤＲ）を含み、抗体の軽鎖と共同して、ＨＧＦを結合することができる、単離されたポリペプチド。
（ＣＤＲ１ｂは、アミノ酸配列ａ　ｂ　ｃ　ｄ　ｅ　ｆ　ｇを含み（アミノ酸ａは、セリンであり、又は存在せず；アミノ酸ｂは、アスパラギン酸若しくはグリシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｃは、アスパラギン酸、グリシン、セリン、バリン、スレオニン又はイソロイシンから選択され；アミノ酸ｄは、チロシンであり；アミノ酸ｅは、チロシン又はグリシンから選択され；アミノ酸ｆは、イソロイシン、メチオニン又はトリプトファンから選択され；及びアミノ酸ｇは、ヒスチジン、アスパラギン又はセリンから選択される。）；
ＣＤＲ２ｂは、アミノ酸配列ｈ　ｉ　ｊ　ｋ　ｌ　ｍ　ｎ　ｏ　ｐ　ｑ　ｒ　ｓ　ｔ　ｕ　ｖ　ｗ　ｘを含み（アミノ酸ｈは、トリプトファン、チロシン、バリン、アスパラギン又はグルタミン酸から選択され；アミノ酸ｉは、イソロイシン、フェニルアラニン又はバリンから選択され；アミノ酸ｊは、アスパラギン、セリン、トリプトファン又はチロシンから選択され；アミノ酸ｋは、プロリン、セリン、チロシン又はヒスチジンから選択され；アミノ酸ｌは、アスパラギン、セリン又はアスパラギン酸から選択され；アミノ酸ｍは、セリン又はグリシンから選択され；アミノ酸ｎは、グリシン若しくはセリンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｏは、グリシン、スレオニン、アスパラギン酸、セリン、イソロイシン又はアスパラギンから選択され；アミノ酸ｐは、スレオニン、イソロイシン又はリジンから選択され；アミノ酸ｑは、アスパラギン又はチロシンから選択され；アミノ酸ｒは、チロシン又はヒスチジンから選択され；アミノ酸ｓは、アラニン又はアスパラギンから選択され；アミノ酸ｔは、グルタミン、アスパラギン酸、又はプロリンから選択され；アミノ酸ｕは、リジン又はセリンから選択され；アミノ酸ｖは、フェニルアラニン、バリン又はロイシンから選択され；アミノ酸ｗは、グルタミン又はリジンから選択され、及びアミノ酸ｘは、グリシン又はセリンから選択される。）；
ＣＤＲ３ｂは、アミノ酸配列ｙ　ｚ　ａ’　ｂ’　ｃ’　ｄ’　ｅ’　ｆ’　ｇ’　ｈ’　ｉ’　ｊ’　ｋ’　ｌ’　ｍ’　ｎ’　ｏ’　ｐ’　ｑ’　ｒ’を含む（アミノ酸ｙは、グルタミン酸、アスパラギン酸、セリン若しくはグリシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｚは、ロイシン、グルタミン酸、アスパラギン酸、ヒスチジン、プロリン若しくはグリシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ａ’は、グルタミン酸、チロシン若しくはロイシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｂ’は、ロイシン、アスパラギン、グリシン、ヒスチジン、チロシン若しくはトリプトファンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｃ’は、アルギニン、セリン、グルタミン酸、チロシン、グリシン若しくはフェニルアラニンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｄ’は、グリシンであり、又は存在せず；アミノ酸ｅ’は、トリプトファン若しくはチロシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｆ’は、アスパラギン酸であり、又は存在せず；アミノ酸ｇ’は、セリン若しくはアルギニンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｈ’は、セリンであり、又は存在せず；アミノ酸ｉ’は、グリシン若しくはチロシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｊ’は、チロシン、グルタミン酸若しくはアスパラギン酸から選択され、又は存在せず；アミノ酸ｋ’は、チロシン、フェニルアラニン若しくはアスパラギン酸から選択され、又は存在せず；アミノ酸ｌ’は、チロシン、アスパラギン酸、ヒスチジン若しくはトリプトファンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｍ’は、チロシン、グリシン、アスパラギン酸、プロリン若しくはセリンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｎ’は、グリシン、バリン、チロシン若しくはアスパラギン酸から選択され、又は存在せず；アミノ酸ｏ’は、ロイシン、アラニン、グリシン若しくはチロシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｐ’は、メチオニン、フェニルアラニン又はチロシンから選択され；アミノ酸ｑ’は、アスパラギン酸であり、アミノ酸ｒ’は、バリン、チロシン、イソロイシン又はプ

ロリンから選択される。）。）
【請求項９】
配列番号２５、２７、２９、３１、３３、３５、３７、３９、４１及び４３から選択される、少なくとも一つのアミノ酸配列を含む、請求項８に記載のポリペプチド。
【請求項１０】
配列番号９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８及び９９から選択される、少なくとも一つのアミノ酸配列を含む、請求項８に記載のポリペプチド。
【請求項１１】
配列番号１００、１０１、１０２、１０３、１０４、１０５、１０６、１０７、１０８及び１０９から選択される、少なくとも一つのアミノ酸配列を含む、請求項８に記載のポリペプチド。
【請求項１２】
配列番号１１０、１１１、１１２、１１３、１１４、１１５、１１６、１１７、１１８及び１１９から選択される、少なくとも一つのアミノ酸配列を含む、請求項８に記載のポリペプチド。
【請求項１３】
前記ポリペプチドが特異的結合因子である、請求項８から１２の何れかに記載のポリペプチド。
【請求項１４】
前記ポリペプチドが抗体である、請求項８から１２の何れかに記載のポリペプチド。
【請求項１５】
（ｉ）ＣＤＲ１ａ、ＣＤＲ２ａ及びＣＤＲ３ａから選択される少なくとも一つの相補性決定領域（ＣＤＲ）を含み、抗体重鎖と共同して、肝細胞増殖因子（ＨＧＦ）に結合することができる第一のポリペプチドと、
（ＣＤＲ１ａは、アミノ酸配列ａ　ｂ　ｃ　ｄ　ｅ　ｆ　ｇ　ｈ　ｉ　ｊ　ｋ　ｌ　ｍ　ｎ　ｏ　ｐ　ｑを含み（アミノ酸ａは、リジン、アルギニン又はグルタミンから選択され；アミノ酸ｂは、セリン又はアラニンから選択され；アミノ酸ｃはセリンであり；アミノ酸ｄは、グルタミンであり；アミノ酸ｅは、セリン、グリシン又はアスパラギン酸から選択され；アミノ酸ｆは、バリン若しくはイソロイシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｇは、ロイシン若しくはフェニルアラニンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｈは、フェニルアラニン若しくはチロシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｉは、セリンであり、又は又は存在せず；アミノ酸ｊは、セリンであり、又は存在せず；アミノ酸ｋは、アスパラギン、スレオニンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｌは、アスパラギン、イソロイシン又はバリンから選択され；アミノ酸ｍは、リジン、アルギニン、アスパラギン又はアスパラギン酸から選択され；アミノ酸ｎは、アスパラギン又はセリンから選択され；アミノ酸ｏは、チロシン、アスパラギン酸、トリプトファン又はアスパラギンから選択され；アミノ酸ｐは、ロイシンであり；アミノ酸ｑは、アラニン、グリシン又はアスパラギンから選択される。）；
ＣＤＲ２ａは、アミノ酸配列ｒ　ｓ　ｔ　ｕ　ｖ　ｗ　ｘを含み（アミノ酸ｒは、トリプトファン、アラニン、バリン、グルタミン酸又はグリシンから選択され；アミノ酸ｓは、アラニンであり；アミノ酸ｔは、セリンであり；アミノ酸ｕは、スレオニン、セリン又はアスパラギン酸から選択され；アミノ酸ｖは、アルギニン又はロイシンから選択され；アミノ酸ｗは、グルタミン酸、グルタミン又はアラニンから選択され；及びアミノ酸ｘは、セリン、アスパラギン又はスレオニンから選択される。）；
ＣＤＲ３ａは、アミノ酸配列ｙ　ｚ　ａ’　ｂ’　ｃ’　ｄ’　ｅ’　ｆ’　ｇ’　ｈ’を含む（アミノ酸ｙは、グルタミン又はロイシンから選択され；アミノ酸ｚは、グルタミン、アスパラギン又はアルギニンから選択され；アミノ酸ａ’は、チロシン、ヒスチジン、アラニン又はセリンから選択され；アミノ酸ｂ’は、フェニルアラニン、チロシン、アスパラギン酸、アスパラギン又はイソロイシンから選択され；アミノ酸ｃ’は、セリン、グリシン又はアスパラギンから選択され；アミノ酸ｄ’は、プロリン、チロシン、スレ

オニン、フェニルアラニン、アスパラギン酸、ロイシン又はトリプトファンから選択され；アミノ酸ｅ’は、プロリンであり；アミノ酸ｆ’は、プロリンであり、又は存在せず；アミノ酸ｇ’は、トリプトファン、ロイシン、プロリン、チロシン又はイソロイシンであり；及びアミノ酸ｈ’は、スレオニン又はアスパラギンである。））；

（ｉｉ）ＣＤＲ１ｂ、ＣＤＲ２ｂ又はＣＤＲ３ｂから選択される少なくとも一つの相補性決定領域（ＣＤＲ）を含み、抗体の軽鎖と共同して、ＨＧＦを結合することができる、第二のポリペプチドと、

（ＣＤＲ１ｂは、アミノ酸配列ａ　ｂ　ｃ　ｄ　ｅ　ｆ　ｇを含み（アミノ酸ａは、セリンであり、又は存在せず；アミノ酸ｂは、アスパラギン酸若しくはグリシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｃは、アスパラギン酸、グリシン、セリン、バリン、スレオニン又はイソロイシンから選択され；アミノ酸ｄは、チロシンであり；アミノ酸ｅは、チロシン又はグリシンから選択され；アミノ酸ｆは、イソロイシン、メチオニン又はトリプトファンから選択され；及びアミノ酸ｇは、ヒスチジン、アスパラギン又はセリンから選択される。）；

ＣＤＲ２ｂは、アミノ酸配列ｈ　ｉ　ｊ　ｋ　ｌ　ｍ　ｎ　ｏ　ｐ　ｑ　ｒ　ｓ　ｔ　ｕ　ｖ　ｗ　ｘを含み（アミノ酸ｈは、トリプトファン、チロシン、バリン、アスパラギン又はグルタミン酸から選択され；アミノ酸ｉは、イソロイシン、フェニルアラニン又はバリンから選択され；アミノ酸ｊは、アスパラギン、セリン、トリプトファン又はチロシンから選択され；アミノ酸ｋは、プロリン、セリン、チロシン又はヒスチジンから選択され；アミノ酸ｌは、アスパラギン、セリン又はアスパラギン酸から選択され；アミノ酸ｍは、セリン又はグリシンから選択され；アミノ酸ｎは、グリシン若しくはセリンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｏは、グリシン、スレオニン、アスパラギン酸、セリン、イソロイシン又はアスパラギンから選択され；アミノ酸ｐは、スレオニン、イソロイシン又はリジンから選択され；アミノ酸ｑは、アスパラギン又はチロシンから選択され；アミノ酸ｒは、チロシン又はヒスチジンから選択され；アミノ酸ｓは、アラニン又はアスパラギンから選択され；アミノ酸ｔは、グルタミン、アスパラギン酸又はプロリンから選択され；アミノ酸ｕは、リジン又はセリンから選択され；アミノ酸ｖは、フェニルアラニン、バリン又はロイシンから選択され；アミノ酸ｗは、グルタミン又はリジンから選択され、及びアミノ酸ｘは、グリシン又はセリンから選択される。）；

ＣＤＲ３ｂは、アミノ酸配列ｙ　ｚ　ａ’　ｂ’　ｃ’　ｄ’　ｅ’　ｆ’　ｇ’　ｈ’　ｉ’　ｊ’　ｋ’　ｌ’　ｍ’　ｎ’　ｏ’　ｐ’　ｑ’　ｒ’を含む（アミノ酸ｙは、グルタミン酸、アスパラギン酸、セリン若しくはグリシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｚは、ロイシン、グルタミン酸、アスパラギン酸、ヒスチジン、プロリン若しくはグリシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ａ’は、グルタミン酸、チロシン若しくはロイシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｂ’は、ロイシン、アスパラギン、グリシン、ヒスチジン、チロシン若しくはトリプトファンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｃ’は、アルギニン、セリン、グルタミン酸、チロシン、グリシン若しくはフェニルアラニンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｄ’は、グリシンであり、又は存在せず；アミノ酸ｅ’は、トリプトファン若しくはチロシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｆ’は、アスパラギン酸であり、又は存在せず；アミノ酸ｇ’は、セリン若しくはアルギニンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｈ’は、セリンであり、又は存在せず；アミノ酸ｉ’は、グリシン若しくはチロシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｊ’は、チロシン、グルタミン酸若しくはアスパラギン酸から選択され、又は存在せず；アミノ酸ｋ’は、チロシン、フェニルアラニン若しくはアスパラギン酸から選択され、又は存在せず；アミノ酸ｌ’は、チロシン、アスパラギン酸、ヒスチジン若しくはトリプトファンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｍ’は、チロシン、グリシン、アスパラギン酸、プロリン若しくはセリンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｎ’は、グリシン、バリン、チロシン若しくはアスパラギン酸から選択され、又は存在せず；アミノ酸ｏ’は、ロイシン、アラニン、グリシン若しくはチロシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｐ’は、メチオニン、フェニルアラニン又はチロシンから選択され；アミノ酸ｑ

’は、アスパラギン酸であり、アミノ酸ｒ’は、バリン、チロシン、イソロイシン又はプロリンから選択される。）。）を含む、単離された特異的結合因子。
【請求項１６】
配列番号２４、２６、２８、３０、３２、３４、３６、３８、４０及び４２から選択される、少なくとも一つのアミノ酸配列を含む、請求項１５に記載の特異的結合因子。
【請求項１７】
配列番号２５、２７、２９、３１、３３、３５、３７、３９、４１及び４３から選択される、少なくとも一つのアミノ酸配列を含む、請求項１５に記載の特異的結合因子。
【請求項１８】
配列番号２４及び２５のアミノ酸配列を含む、請求項１５に記載の特異的結合因子。
【請求項１９】
配列番号２６及び２７のアミノ酸配列を含む、請求項１５に記載の特異的結合因子。
【請求項２０】
配列番号２８及び２９のアミノ酸配列を含む、請求項１５に記載の特異的結合因子。
【請求項２１】
配列番号３０及び３１のアミノ酸配列を含む、請求項１５に記載の特異的結合因子。
【請求項２２】
配列番号３２及び３３のアミノ酸配列を含む、請求項１５に記載の特異的結合因子。
【請求項２３】
配列番号３４及び３５のアミノ酸配列を含む、請求項１５に記載の特異的結合因子。
【請求項２４】
配列番号３６及び３７のアミノ酸配列を含む、請求項１５に記載の特異的結合因子。
【請求項２５】
配列番号３８及び３９のアミノ酸配列を含む、請求項１５に記載の特異的結合因子。
【請求項２６】
配列番号４０及び４１のアミノ酸配列を含む、請求項１５に記載の特異的結合因子。
【請求項２７】
配列番号４２及び４３のアミノ酸配列を含む、請求項１５に記載の特異的結合因子。
【請求項２８】
配列番号６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８及び６９から選択される、少なくとも一つのアミノ酸配列を含む、請求項１５に記載の特異的結合因子。
【請求項２９】
配列番号７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８及び７９から選択される、少なくとも一つのアミノ酸配列を含む、請求項１５に記載の特異的結合因子。
【請求項３０】
配列番号８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８及び８９から選択される、少なくとも一つのアミノ酸配列を含む、請求項１５に記載の特異的結合因子。
【請求項３１】
配列番号９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８及び９９から選択される、少なくとも一つのアミノ酸配列を含む、請求項１５に記載の特異的結合因子。
【請求項３２】
配列番号１００、１０１、１０２、１０３、１０４、１０５、１０６、１０７、１０８及び１０９から選択される、少なくとも一つのアミノ酸配列を含む、請求項１５に記載の特異的結合因子。
【請求項３３】
配列番号１１０、１１１、１１２、１１３、１１４、１１５、１１６、１１７、１１８及び１１９から選択される、少なくとも一つのアミノ酸配列を含む、請求項１５に記載の特異的結合因子。
【請求項３４】
配列番号２５、２７、２９、３１、３３、３５、３７、３９、４１及び４３から選択さ

れるアミノ酸配列を含む第一の可変領域を含む重鎖と、
配列番号２４、２６、２８、３０、３２、３４、３６、３８、４０及び４２から選択されるアミノ酸配列を含む第二の可変領域を含む軽鎖と、
を含む、請求項１５に記載の特異的結合因子。
【請求項３５】
特異的結合因子が、
ａ）１．２４．１、１．２９．１、１．６０．１、１．６１．３、１．７４．３、１．７５．１、２．４．４、２．１２．１、２．４０．１及び３．１０．１から選択される少なくとも一つの抗体と、ＨＧＦへの結合を競合する；
ｂ）１．２４．１、１．２９．１、１．６０．１、１．６１．３、１．７４．３、１．７５．１、２．４．４、２．１２．１、２．４０．１及び３．１０．１から選択される少なくとも一つの抗体と同一の、ＨＧＦのエピトープに結合する；並びに
ｃ）１．２４．１、１．２９．１、１．６０．１、１．６１．３、１．７４．３、１．７５．１、２．４．４、２．１２．１、２．４０．１及び３．１０．１から選択される少なくとも一つの抗体によって結合される抗原と同一の抗原に結合する；
から選択される少なくとも一つの特性を有する、請求項３４に記載の特異的結合因子。
【請求項３６】
配列番号２５、２７、２９、３１、３３、３５、３７、３９、４１及び４３から選択されるアミノ酸配列と少なくとも９０％、９５％又は９９％同一のアミノ酸配列を含む第一の可変領域を含む重鎖と、
配列番号２４、２６、２８、３０、３２、３４、３６、３８、４０及び４２から選択されるアミノ酸配列と少なくとも９０％、９５％又は９９％同一のアミノ酸配列を含む第二の可変領域を含む軽鎖と、
を含む、請求項１５に記載の特異的結合因子。
【請求項３７】
特異的結合因子が、
ａ）１．２４．１、１．２９．１、１．６０．１、１．６１．３、１．７４．３、１．７５．１、２．４．４、２．１２．１、２．４０．１及び３．１０．１から選択される少なくとも一つの抗体と、ＨＧＦへの結合を競合する；
ｂ）１．２４．１、１．２９．１、１．６０．１、１．６１．３、１．７４．３、１．７５．１、２．４．４、２．１２．１、２．４０．１及び３．１０．１から選択される少なくとも一つの抗体と同一の、ＨＧＦのエピトープに結合する；並びに
ｃ）１．２４．１、１．２９．１、１．６０．１、１．６１．３、１．７４．３、１．７５．１、２．４．４、２．１２．１、２．４０．１及び３．１０．１から選択される少なくとも一つの抗体によって結合される抗原と同一の抗原に結合する；
から選択される少なくとも一つの特性を有する、請求項３６に記載の特異的結合因子。
【請求項３８】
特異的結合因子が抗体である、請求項１５から３７の何れかに記載の特異的結合因子。
【請求項３９】
重鎖と軽鎖がリンカーによって結合されている、請求項３８に記載の抗体。
【請求項４０】
単一Ｆｖ抗体である、請求項３８に記載の抗体。
【請求項４１】
免疫学的に機能的な免疫グロブリン断片である、請求項３８に記載の抗体。
【請求項４２】
Ｆａｂ抗体である、請求項３８に記載の抗体。
【請求項４３】
Ｆａｂ’抗体である、請求項３８に記載の抗体。
【請求項４４】
（Ｆａｂ’）^{2}抗体である、請求項３８に記載の抗体。

【請求項４５】
完全ヒト抗体である、請求項３８に記載の抗体。
【請求項４６】
ヒト化抗体である、請求項３８に記載の抗体。
【請求項４７】
キメラ抗体である、請求項３８に記載の抗体。
【請求項４８】
抗体が、ＨＧＦのｃ－Ｍｅｔ受容体への結合を阻害する、請求項３８に記載の抗体。
【請求項４９】
配列番号２４、２６、２８、３０、３２、３４、３６、３８、４０及び４２から選択される、少なくとも一つのアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド。
【請求項５０】
配列番号２５、２７、２９、３１、３３、３５、３７、３９、４１及び４３から選択される、少なくとも一つのアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド。
【請求項５１】
配列番号１、３、５、７、９、１１、１３、１５、１７及び１９から選択される、少なくとも一つのヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子。
【請求項５２】
配列番号２、４、６、８、１０、１２、１４、１６、１８及び２０から選択される、少なくとも一つのヌクレオチド酸配列を含む、単離された核酸分子。
【請求項５３】
ＣＤＲ１ａ、ＣＤＲ２ａ及びＣＤＲ３ａから選択される少なくとも一つの相補性決定領域（ＣＤＲ）を含み、抗体の重鎖と共同して、肝細胞増殖因子（ＨＧＦ）を結合することができるポリペプチドをコードする単離された核酸分子。
（ＣＤＲ１ａは、アミノ酸配列ａ　ｂ　ｃ　ｄ　ｅ　ｆ　ｇ　ｈ　ｉ　ｊ　ｋ　ｌ　ｍ　ｎ　ｏ　ｐ　ｑを含み（アミノ酸ａは、リジン、アルギニン又はグルタミンから選択され；アミノ酸ｂは、セリン又はアラニンから選択され；アミノ酸ｃは、セリンであり、アミノ酸ｄは、グルタミンであり；アミノ酸ｅは、セリン、グリシン又はアスパラギン酸から選択され；アミノ酸ｆは、バリン若しくはイソロイシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｇは、ロイシン若しくはフェニルアラニンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｈは、フェニルアラニン若しくはチロシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｉは、セリンであり、又は存在せず；アミノ酸ｊは、セリンであり、又は存在せず；アミノ酸ｋは、アスパラギン、スレオニンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｌは、アスパラギン、イソロイシン又はバリンから選択され；アミノ酸ｍは、リジン、アルギニン、アスパラギン又はアスパラギン酸から選択され；アミノ酸ｎは、アスパラギン又はセリンから選択され；アミノ酸ｏは、チロシン、アスパラギン酸、トリプトファン又はアスパラギンから選択され；アミノ酸ｐは、ロイシンであり；及びアミノ酸ｑは、アラニン、グリシン又はアスパラギンから選択される。）；
ＣＤＲ２ａは、アミノ酸配列ｒ　ｓ　ｔ　ｕ　ｖ　ｗ　ｘを含み（アミノ酸ｒは、トリプトファン、アラニン、バリン、グルタミン酸又はグリシンから選択され；アミノ酸ｓは、アラニンであり、アミノ酸ｔは、セリンであり、アミノ酸ｕは、スレオニン、セリン又はアスパラギン酸から選択され；アミノ酸ｖは、アルギニン又はロイシンから選択され；アミノ酸ｗは、グルタミン酸、グルタミン又はアラニンから選択され；及びアミノ酸ｘは、セリン、アスパラギン又はスレオニンから選択される。）；
ＣＤＲ３ａは、アミノ酸配列ｙ　ｚ　ａ’　ｂ’　ｃ’　ｄ’　ｅ’　ｆ’　ｇ’　ｈ’を含む（アミノ酸ｙは、グルタミン又はロイシンから選択され；アミノ酸ｚは、グルタミン、アスパラギン又はアルギニンから選択され；アミノ酸ａ’は、チロシン、ヒスチジン、アラニン又はセリンから選択され；アミノ酸ｂ’は、フェニルアラニン、チロシン、アスパラギン酸、アスパラギン又はイソロイシンから選択され；アミノ酸ｃ’は、セリン、グリシン又はアスパラギンから選択され；アミノ酸ｄ’は、プロリン、チロシン、スレ

オニン、フェニルアラニン、アスパラギン酸、ロイシン又はトリプトファンから選択され；アミノ酸ｅ’は、プロリンであり；アミノ酸ｆ’は、プロリンであり、又は存在せず；アミノ酸ｇ’は、トリプトファン、ロイシン、プロリン、チロシン又はイソロイシンであり；及びアミノ酸ｈ‘は、スレオニン又はアスパラギンである。）。）

【請求項５４】

配列番号１、３、５、７、９、１１、１３、１５、１７及び１９から選択される、ヌクレオチド配列を含む、請求項５３に記載の核酸分子。

【請求項５５】

ＣＤＲ１ｂ、ＣＤＲ２ｂ及びＣＤＲ３ｂから選択される少なくとも一つの相補性決定領域（ＣＤＲ）を含み、抗体の軽鎖と共同して、ＨＧＦを結合することができるポリペプチドをコードする単離された核酸分子。

（ＣＤＲ１ｂは、アミノ酸配列ａ　ｂ　ｃ　ｄ　ｅ　ｆ　ｇを含み（アミノ酸ａは、セリンであり、又は存在せず；アミノ酸ｂは、アスパラギン酸若しくはグリシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｃは、アスパラギン酸、グリシン、セリン、バリン、スレオニン又はイソロイシンから選択され；アミノ酸ｄは、チロシンであり；アミノ酸ｅは、チロシン又はグリシンから選択され；アミノ酸ｆは、イソロイシン、メチオニン又はトリプトファンから選択され；及びアミノ酸ｇは、ヒスチジン、アスパラギン又はセリンから選択される。）；

ＣＤＲ２ｂは、アミノ酸配列ｈ　ｉ　ｊ　ｋ　ｌ　ｍ　ｎ　ｏ　ｐ　ｑ　ｒ　ｓ　ｔ　ｕ　ｖ　ｗ　ｘを含み（アミノ酸ｈは、トリプトファン、チロシン、バリン、アスパラギン又はグルタミン酸から選択され；アミノ酸ｉは、イソロイシン、フェニルアラニン又はバリンから選択され；アミノ酸ｊは、アスパラギン、セリン、トリプトファン又はチロシンから選択され；アミノ酸ｋは、プロリン、セリン、チロシン又はヒスチジンから選択され；アミノ酸ｌは、アスパラギン、セリン又はアスパラギン酸から選択され；アミノ酸ｍは、セリン又はグリシンから選択され；アミノ酸ｎは、グリシン若しくはセリンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｏは、グリシン、スレオニン、アスパラギン酸、セリン、イソロイシン又はアスパラギンから選択され；アミノ酸ｐは、スレオニン、イソロイシン又はリジンから選択され；アミノ酸ｑは、アスパラギン又はチロシンから選択され；アミノ酸ｒは、チロシン又はヒスチジンから選択され；アミノ酸ｓは、アラニン又はアスパラギンから選択され；アミノ酸ｔは、グルタミン、アスパラギン酸又はプロリンから選択され；アミノ酸ｕは、リジン又はセリンから選択され；アミノ酸ｖは、フェニルアラニン、バリン又はロイシンから選択され；アミノ酸ｗは、グルタミン又はリジンから選択され、及びアミノ酸ｘは、グリシン又はセリンから選択される。）；

ＣＤＲ３ｂは、アミノ酸配列ｙ　ｚ　ａ’　ｂ’　ｃ’　ｄ’　ｅ’　ｆ’　ｇ’　ｈ’　ｉ’　ｊ’　ｋ’　ｌ’　ｍ’　ｎ’　ｏ’　ｐ’　ｑ’　ｒ’を含み（アミノ酸ｙは、グルタミン酸、アスパラギン酸、セリン若しくはグリシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｚは、ロイシン、グルタミン酸、アスパラギン酸、ヒスチジン、プロリン若しくはグリシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ａ’は、グルタミン酸、チロシン若しくはロイシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｂ’は、ロイシン、アスパラギン、グリシン、ヒスチジン、チロシン若しくはトリプトファンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｃ’は、アルギニン、セリン、グルタミン酸、チロシン、グリシン若しくはフェニルアラニンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｄ’は、グリシンであり、又は存在せず；アミノ酸ｅ’は、トリプトファン若しくはチロシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｆ’は、アスパラギン酸であり、又は存在せず；アミノ酸ｇ’は、セリン若しくはアルギニンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｈ’は、セリンであり、又は存在せず；アミノ酸ｉ’は、グリシン若しくはチロシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｊ’は、チロシン、グルタミン酸若しくはアスパラギン酸から選択され、又は存在せず；アミノ酸ｋ’は、チロシン、フェニルアラニン若しくはアスパラギン酸から選択され、又は存在せず；アミノ酸ｌ’は、チロシン、アスパラギン酸、ヒスチジン若しくはトリプトファンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｍ’は、チロシン、グリシン、アスパ

ラギン酸、プロリン若しくはセリンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｎ’は、グリシン、バリン、チロシン若しくはアスパラギン酸から選択され、又は存在せず；アミノ酸ｏ’は、ロイシン、アラニン、グリシン若しくはチロシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｐ’は、メチオニン、フェニルアラニン又はチロシンから選択され；アミノ酸ｑ’は、アスパラギン酸であり、及びアミノ酸ｒ’は、バリン、チロシン、イソロイシン又はプロリンから選択される。）。）

【請求項５６】

配列番号２、４、６、８、１０、１２、１４、１６、１８及び２０から選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項５５に記載の核酸分子。

【請求項５７】

請求項５３に記載の核酸分子を含む宿主細胞。

【請求項５８】

請求項５５に記載の核酸分子を含む宿主細胞。

【請求項５９】

請求項３４又は３６に記載の特異的結合因子を産生する、単離された細胞株。

【請求項６０】

特異的結合因子が抗体である、請求項５９に記載の単離された細胞株。

【請求項６１】

１．２４．１、１．２９．１、１．６０．１、１．６１．３、１．７４．３、１．７５．１、２．４．４、２．１２．１、２．４０．１及び３．１０．１．から選択される抗体を産生する、単離された細胞株。

【請求項６２】

請求項３４又は３６に記載の特異的結合因子と薬学的に許容される担体とを含む、組成物。

【請求項６３】

特異的結合因子が抗体である、請求項６２に記載の組成物。

【請求項６４】

請求項３４又は３６に記載の特異的結合因子と、アニサマイシン抗生物質のゲルダナマイシンファミリーの要素；Ｇｒｂ２　Ｓｒｃホモロジー２のアンタゴニスト；Ｇａｂ１調節物質；ドミナントネガティブＳｒｃ；フォンーヒッペルーランダウ阻害剤；非ステロイド系抗炎症薬（ＮＳＡＩＤ）；ＣＯＸ－２阻害剤；Ｃｅｌｅｂｒｅｘ™（セレコキシブ）；Ｖｉｏｘｘ™（ロフェコキシブ）；血管内皮増殖因子（ＶＥＧＦ）；ＶＥＧＦ調節物質；繊維芽細胞増殖因子（ＦＧＦ）調節物質；上皮増殖因子（ＥＧＦ）調節物質；ケラチン生成細胞増殖因子（ＫＧＦ）；ＫＧＦ関連分子；ＫＧＦ調節物質；マトリックスメタロプロテイナーゼ（ＭＭＰ）調節物質；ＩＬ－２；Ｐｒｏｌｕｅｋｉｎ；Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ；Ｒｉｔｕｘａｎ；Ｚｅｖａｌｉｎ；Ｅｒｂｉｔｕｘ；エプラツズマブ；ＯＰＧＬに対する抗体；Ａｎｇ－２に対する阻害剤；ＶＥＧＦ－２に対する抗体；アバスチン；抗腫瘍薬；抗有糸分裂剤；代謝拮抗薬；及びスルホン酸アルキルから選択される少なくとも一つの剤とを含む組成物。

【請求項６５】

特異的結合因子が抗体である、請求項６４に記載の組成物。

【請求項６６】

請求項６２に記載の組成物を投与することを含む、患者の癌を治療する方法。

【請求項６７】

請求項６３に記載の組成物を投与することを含む、患者の癌を治療する方法。

【請求項６８】

請求項６４に記載の組成物を投与することを含む、患者の癌を治療する方法。

【請求項６９】

請求項６５に記載の組成物を投与することを含む、患者の癌を治療する方法。

【請求項７０】

請求項６２に記載の組成物を投与することを含む、患者の充実性腫瘍を治療する方法。
【請求項７１】
請求項６３に記載の組成物を投与することを含む、患者の充実性腫瘍を治療する方法。
【請求項７２】
請求項６４に記載の組成物を投与することを含む、患者の充実性腫瘍を治療する方法。
【請求項７３】
請求項６５に記載の組成物を投与することを含む、患者の充実性腫瘍を治療する方法。
【請求項７４】
請求項３４又は３６に記載の特異的結合因子の投与と少なくとも一つの化学療法治療とを含む、患者の癌を治療する方法。
【請求項７５】
特異的結合因子が、化学療法治療を施す前に投与される、請求項７４に記載の方法。
【請求項７６】
特異的結合因子が、化学療法治療と同時に投与される、請求項７４に記載の方法。
【請求項７７】
特異的結合因子が、化学療法治療を施した後に投与される、請求項７４に記載の方法。
【請求項７８】
請求項３４又は３６に記載の特異的結合因子の投与と放射線療法とを含む、患者の癌を治療する方法。
【請求項７９】
特異的結合因子が、放射線治療を施す前に投与される、請求項７８に記載の方法。
【請求項８０】
特異的結合因子が、放射線療法と同時に投与される、請求項７８に記載の方法。
【請求項８１】
特異的結合因子が、放射線治療を施した後に投与される、請求項７８に記載の方法。
【請求項８２】
請求項３４又は３６に記載の特異的結合因子に試料を接触させることを含む、試料中の肝細胞増殖因子（ＨＧＦ）のレベルを検出する方法。
【請求項８３】
特異的結合因子が抗体である、請求項８２に記載の方法。
【請求項８４】
ＨＧＦに対する特異的結合因子を投与することを含む、ＨＧＦのＭｅｔへの結合を阻害する方法。
【請求項８５】
特異的結合因子が抗体である、請求項８４に記載の方法。
【請求項８６】
特異的結合因子が、配列番号２５、２７、２９、３１、３３、３５、３７、３９、４１及び４３から選択される少なくとも一つのアミノ酸配列を含む、請求項８４に記載の方法。
【請求項８７】
特異的結合因子が、配列番号２４、２６、２８、３０、３２、３４、３６、３８、４０及び４２から選択される少なくとも一つのアミノ酸配列を含む、請求項８４に記載の方法。
【請求項８８】
配列番号１６４及び１６５から選択される、少なくとも一つのアミノ酸配列を含む、ポリペプチド。
【請求項８９】
配列番号１６４及び１６５から選択される少なくとも一つのアミノ酸配列から実質的になる、ポリペプチド。
【請求項９０】

配列番号１６４及び１６５から選択される、少なくとも一つのアミノ酸配列を結合することができる、特異的結合因子。
【請求項９１】
配列番号１６４及び１６５から選択される、少なくとも一つのアミノ酸配列を結合することができる、抗体又は抗原結合ドメイン。
【請求項９２】
請求項１６４及び１６５から選択される少なくとも一つのポリペプチドを動物に投与することと、ＨＧＦを結合できる抗体を前記動物から取得することとを含む、肝細胞増殖因子（ＨＧＦ）を結合できる抗体を取得する方法。
【請求項９３】
配列番号１６４及び１６５から選択される少なくとも一つのアミノ酸配列を含むポリペプチドを投与することによって、請求項１８から２７に記載の特異的結合因子の任意の一つの、肝細胞増殖因子（ＨＧＦ）への結合を減少させ、又は防止する方法。
【請求項９４】
配列番号１６４及び１６５から選択される少なくとも一つのアミノ酸配列からなるポリペプチドを投与することによって、請求項１８から２７に記載のポリペプチドの任意の一つの、肝細胞増殖因子（ＨＧＦ）への結合を減少させ、又は防止する方法。
【請求項９５】
配列番号１６４及び１６５から選択される少なくとも一つのアミノ酸配列を含むポリペプチドを投与することによって、特異的結合因子の、肝細胞増殖因子（ＨＧＦ）への結合を減少させ、又は防止する方法。
【請求項９６】
配列番号１６４及び１６５から選択される少なくとも一つのアミノ酸配列からなるポリペプチドを投与することによって、特異的結合因子の、肝細胞増殖因子（ＨＧＦ）への結合を減させ、又は防止する方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本願は、２００３年７月１８日に出願された米国仮出願第６０／４８８，６８１号（いかなる目的のためにも、参照により本明細書に組み込まれる。）の利益を主張する。
【０００２】
本発明は、肝細胞増殖因子（ＨＧＦ）に結合する特異的結合因子に関する。組成物、該組成物を製造する方法、並びに、充実性腫瘍及び血液悪性腫瘍を含む（これらに限定されない。）、ある種の癌などの様々な疾患を治療する方法も記載されている。
【背景技術】
【０００３】
肝細胞増殖因子（ＨＧＦ）は、肝細胞に対する強力な分裂促進因子として同定された。ＨＧＦは、上皮細胞の運動を誘導する繊維芽細胞及び平滑筋の分泌タンパク質としても同定された。ＨＧＦは、拡散因子（ＳＦ、Ｓｃａｔｔｅｒ　Ｆａｃｔｏｒ）としても、文献に引用されている。
【０００４】
ＨＧＦは、主として間葉細胞によって産生される多機能ヘテロ二量体ポリペプチドであり、Ｍｅｔ受容体チロシンキナーゼ（Ｍｅｔ）に対するリガンドとして作用する。ヒトＭｅｔ受容体は、「ｃ－ｍｅｔ」としても知られている。Ｍｅｔ受容体チロシンキナーゼ－ＨＧＦ（Ｍｅｔ－ＨＧＦ）経路を介したシグナル伝達は、増殖（有糸分裂）、拡散（運動）、マトリックスを介した細胞運動の刺激（浸潤）及び分岐形態発生を含む（これらに限定されない。）、一連の細胞応答をもたらすことが示されている。インビボでは、Ｍｅｔ－ＨＧＦシグナル伝達経路（Ｍｅｔ－ＨＧＦ）は、例えば、神経の誘導、肝臓の再生、創傷治癒、血管新生、増殖、浸潤、形態的分化及び正常な発生学的発育において役割を果たしている。これらの機能に加えて、Ｍｅｔ－ＨＧＦの対は、ヒトの癌においても役割を果

たし得る。異常なＭｅｔ－ＨＧＦシグナル伝達は、腫瘍形成に、特に浸潤性及び転移性表現型の発達に関与していることが示されている。マラリアなど、ある種の病原体が、異常なＭｅｔ－ＨＧＦシグナル伝達を悪用していることも明らかとなっている。「Ｃａｒｒｏｌｏ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｍｅｄ．２００３ ９（１１）：１３６３－９（Ｏｃｔ．１２，２００３）」を参照（その内容は、参照により、いかなる目的のためにも本明細書に組み込まれる。）。

【０００５】

さらに、血管新生及び血管新生媒介疾患（増殖性糖尿病網膜症、又は黄斑変性など）において、ＨＧＦが役割を果たし得ることを、幾つかのグループが報告している。例えば、「Ｇｒａｎｔ，Ｄ．Ｓ．ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．９０（５）１９３７－４１（１９９３）；Ｂｕｓｓｏｌｉｎｏ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ．，１１９（３）：６２９－６４１（１９９２）；Ｍｏｎｔｅｓａｎｏ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ，６７：９０１－９０８（１９９１）；Ｃａｎｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｂｒ．Ｊ．Ｏｐｈｔｈａｌｍｏｌ．８４（７）：７３２－５（２０００）」を参照されたい。ＨＧＦは、アポトーシス又はプログラムされた細胞死においても役割を果たし得る。細胞が過剰な数で蓄積するように、正常な制御機構が増殖とアポトーシスのバランスを維持するのに失敗したときに、腫瘍は生じ得る。ＨＧＦは、生物学的背景に応じて、増殖とアポトーシスの両方をもたらすことができる。

【０００６】

ＨＧＦは、多くの生理的プロセスに関与しているので、場合によっては、その活性を制御できる分子を有することは有用であり得る。例えば、場合によっては、このような分子は、様々な異なるタイプの癌を治療するのに有用であり得る。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【０００７】

【非特許文献１】Ｃａｒｒｏｌｏ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｍｅｄ．２００３ ９（１１）：１３６３－９（Ｏｃｔ．１２，２００３）
【非特許文献２】Ｇｒａｎｔ，Ｄ．Ｓ．ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．９０（５）１９３７－４１（１９９３）
【非特許文献３】Ｂｕｓｓｏｌｉｎｏ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ．，１１９（３）：６２９－６４１（１９９２）
【非特許文献４】Ｍｏｎｔｅｓａｎｏ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ，６７：９０１－９０８（１９９１）
【非特許文献５】Ｃａｎｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｂｒ．Ｊ．Ｏｐｈｔｈａｌｍｏｌ．８４（７）：７３２－５（２０００）

【発明の概要】

【０００８】

ある実施形態において、本発明は、ＣＤＲ１ａ、ＣＤＲ２ａ及びＣＤＲ３ａから選択される少なくとも一つの相補性決定領域（ＣＤＲ）を含み、抗体の重鎖と共同して、肝細胞増殖因子（ＨＧＦ）を結合することができる、単離されたポリペプチドを提供する。（ＣＤＲ１ａは、アミノ酸配列ａｂｃｄｅｆｇｈｉｊｋｌｍｎｏｐｑを含み（アミノ酸ａは、リジン、アルギニン、又はグルタミンから選択され；アミノ酸ｂは、セリン又はアラニンから選択され；アミノ酸ｃは、セリンであり；アミノ酸ｄは、グルタミンであり；アミノ酸ｅは、セリン、グリシン又はアスパラギン酸から選択され；アミノ酸ｆは、バリン若しくはイソロイシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｇは、ロイシン若しくはフェニルアラニンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｈは、フェニルアラニン若しくはチロシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｉは、セリンであり、又は存在せず；アミノ酸ｊは、セリンであり、又は存在せず；アミノ酸ｋは、アスパラギン、スレオニンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｌは、アスパラギン、イソロイシン又はバリンから選択され；アミノ酸ｍは、リジン、アルギニン、アス

パラギン又はアスパラギン酸から選択され；アミノ酸ｎは、アスパラギン又はセリンから選択され；アミノ酸ｏは、チロシン、アスパラギン酸、トリプトファン又はアスパラギンから選択され；アミノ酸ｐは、ロイシンであり；及びアミノ酸ｑは、アラニン、グリシン又はアスパラギンから選択される。）；

ＣＤＲ２ａは、アミノ酸配列ｒ　ｓ　ｔ　ｕ　ｖ　ｗ　ｘを含み（アミノ酸ｒは、トリプトファン、アラニン、バリン、グルタミン酸又はグリシンから選択され；アミノ酸ｓは、アラニンであり、アミノ酸ｔは、セリンであり、アミノ酸ｕは、スレオニン、セリン又はアスパラギン酸から選択され；アミノ酸ｖは、アルギニン又はロイシンから選択され；アミノ酸ｗは、グルタミン酸、グルタミン又はアラニンから選択され；及びアミノ酸ｘは、セリン、アスパラギン又はスレオニンから選択される。）；

ＣＤＲ３ａは、アミノ酸配列ｙ　ｚ　ａ’　ｂ’　ｃ’　ｄ’　ｅ’　ｆ’　ｇ’　ｈ’を含む（アミノ酸ｙは、グルタミン又はロイシンから選択され；アミノ酸ｚは、グルタミン、アスパラギン又はアルギニンから選択され；アミノ酸ａ’は、チロシン、ヒスチジン、アラニン又はセリンから選択され；アミノ酸ｂ’は、フェニルアラニン、チロシン、アスパラギン酸、アスパラギン又はイソロイシンから選択され；アミノ酸ｃ’は、セリン、グリシン又はアスパラギンから選択され；アミノ酸ｄ’は、プロリン、チロシン、スレオニン、フェニルアラニン、アスパラギン酸、ロイシン又はトリプトファンから選択され；アミノ酸ｅ’は、プロリンであり；アミノ酸ｆ’は、プロリンであり、又は存在せず；アミノ酸ｇ’は、トリプトファン、ロイシン、プロリン、チロシン又はイソロイシンであり；及びアミノ酸ｈ’は、スレオニン又はアスパラギンである。）。）

【０００９】

ある実施形態において、本発明は、ＣＤＲ１ｂ、ＣＤＲ２ｂ及びＣＤＲ３ｂから選択される少なくとも一つの相補性決定領域（ＣＤＲ）を含み、抗体の軽鎖と共同して、ＨＧＦを結合することができる、単離されたポリペプチドを提供する。

（ＣＤＲ１ｂは、アミノ酸配列ａ　ｂ　ｃ　ｄ　ｅ　ｆ　ｇを含み（アミノ酸ａは、セリンであり、又は存在せず；アミノ酸ｂは、アスパラギン酸若しくはグリシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｃは、アスパラギン酸、グリシン、セリン、バリン、スレオニン又はイソロイシンから選択され；アミノ酸ｄは、チロシンであり；アミノ酸ｅは、チロシン又はグリシンから選択され；アミノ酸ｆは、イソロイシン、メチオニン又はトリプトファンから選択され；及びアミノ酸ｇは、ヒスチジン、アスパラギン又はセリンから選択される。）；

ＣＤＲ２ｂは、アミノ酸配列ｈ　ｉ　ｊ　ｋ　ｌ　ｍ　ｎ　ｏ　ｐ　ｑ　ｒ　ｓ　ｔ　ｕ　ｖ　ｗ　ｘを含み（アミノ酸ｈは、トリプトファン、チロシン、バリン、アスパラギン又はグルタミン酸から選択され；アミノ酸ｉは、イソロイシン、フェニルアラニン又はバリンから選択され；アミノ酸ｊは、アスパラギン、セリン、トリプトファン又はチロシンから選択され；アミノ酸ｋは、プロリン、セリン、チロシン又はヒスチジンから選択され；アミノ酸ｌは、アスパラギン、セリン又はアスパラギン酸；アミノ酸ｍは、セリン又はグリシンから選択され；アミノ酸ｎは、グリシン若しくはセリンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｏは、グリシン、スレオニン、アスパラギン酸、セリン、イソロイシン又はアスパラギンから選択され；アミノ酸ｐは、スレオニン、イソロイシン又はリジンから選択され；アミノ酸ｑは、アスパラギン又はチロシンから選択され；アミノ酸ｒは、チロシン又はヒスチジンから選択され；アミノ酸ｓは、アラニン又はアスパラギンから選択され；アミノ酸ｔは、グルタミン、アスパラギン酸又はプロリンから選択され；アミノ酸ｕは、リジン又はセリンから選択され；アミノ酸ｖは、フェニルアラニン、バリン又はロイシンから選択され；アミノ酸ｗは、グルタミン又はリジンから選択され、及びアミノ酸ｘは、グリシン又はセリンから選択される。）；

ＣＤＲ３ｂは、アミノ酸配列ｙ　ｚ　ａ’　ｂ’　ｃ’　ｄ’　ｅ’　ｆ’　ｇ’　ｈ’　ｉ’　ｊ’　ｋ’　ｌ’　ｍ’　ｎ’　ｏ’　ｐ’　ｑ’　ｒ’を含む（アミノ酸ｙは、グルタミン酸、アスパラギン酸、セリン若しくはグリシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｚは、ロイシン、グルタミン酸、アスパラギン酸、ヒスチジン、プロリン若

しくはグリシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ａ’は、グルタミン酸、チロシン又はロイシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｂ’は、ロイシン、アスパラギン、グリシン、ヒスチジン、チロシン若しくはトリプトファンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｃ’は、アルギニン、セリン、グルタミン酸、チロシン、グリシン若しくはフェニルアラニンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｄ’は、グリシンであり、又は存在せず；アミノ酸ｅ’は、トリプトファン若しくはチロシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｆ’は、アスパラギン酸であり、又は存在せず；アミノ酸ｇ’は、セリン若しくはアルギニンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｈ’は、セリンであり、又は存在せず；アミノ酸ｉ’は、グリシン若しくはチロシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｊ’は、チロシン、グルタミン酸若しくはアスパラギン酸から選択され、又は存在せず；アミノ酸ｋ’は、チロシン、フェニルアラニン若しくはアスパラギン酸から選択され、又は存在せず；アミノ酸ｌ’は、チロシン、アスパラギン酸、ヒスチジン若しくはトリプトファンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｍ’は、チロシン、グリシン、アスパラギン酸、プロリン若しくはセリンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｎ’は、グリシン、バリン、チロシン若しくはアスパラギン酸から選択され、又は存在せず；アミノ酸ｏ’は、ロイシン、アラニン、グリシン若しくはチロシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｐ’は、メチオニン、フェニルアラニン又はチロシンから選択され；アミノ酸ｑ’は、アスパラギン酸であり、アミノ酸ｒ’は、バリン、チロシン、イソロイシン又はプロリンから選択される。）。）

【００１０】

ある実施形態において、本発明は、

（ｉ）ＣＤＲ１ａ、ＣＤＲ２ａ及びＣＤＲ３ａから選択される少なくとも一つの相補性決定領域（ＣＤＲ）を含み、抗体の重鎖と共同して、肝細胞増殖因子（ＨＧＦ）を結合することができる、第一のポリペプチドと、

（ＣＤＲ１ａは、アミノ酸配列ａ　ｂ　ｃ　ｄ　ｅ　ｆ　ｇ　ｈ　ｉ　ｊ　ｋ　ｌ　ｍ　ｎ　ｏ　ｐ　ｑを含み（アミノ酸ａは、リジン、アルギニン又はグルタミンから選択され；アミノ酸ｂは、セリン又はアラニンから選択され；アミノ酸ｃはセリンであり；アミノ酸ｄは、グルタミンであり；アミノ酸ｅは、セリン、グリシン、又はアスパラギン酸から選択され；アミノ酸ｆは、バリン若しくはイソロイシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｇは、ロイシン若しくはフェニルアラニンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｈは、フェニルアラニン若しくはチロシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｉは、セリンであり、又は存在せず；アミノ酸ｊは、セリンであり、又は存在せず；アミノ酸ｋは、アスパラギン、スレオニンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｌは、アスパラギン、イソロイシン、又はバリンから選択され；アミノ酸ｍは、リジン、アルギニン、アスパラギン、又はアスパラギン酸から選択され；アミノ酸ｎは、アスパラギン又はセリンから選択され；アミノ酸ｏは、チロシン、アスパラギン酸、トリプトファン又はアスパラギンから選択され；アミノ酸ｐは、ロイシンであり；アミノ酸ｑは、アラニン、グリシン又はアスパラギンから選択される。）；

ＣＤＲ２ａは、アミノ酸配列ｒ　ｓ　ｔ　ｕ　ｖ　ｗ　ｘを含み（アミノ酸ｒは、トリプトファン、アラニン、バリン、グルタミン酸、又はグリシンから選択され；アミノ酸ｓは、アラニンであり；アミノ酸ｔは、セリンであり；アミノ酸ｕは、スレオニン、セリン、又はアスパラギン酸から選択され；アミノ酸ｖは、アルギニン又はロイシンから選択され；アミノ酸ｗは、グルタミン酸、グルタミン又はアラニンから選択され；及びアミノ酸ｘは、セリン、アスパラギン又はスレオニンから選択される。）；

ＣＤＲ３ａは、アミノ酸配列ｙ　ｚ　ａ’　ｂ’　ｃ’　ｄ’　ｅ’　ｆ’　ｇ’　ｈ’を含む（アミノ酸ｙは、グルタミン又はロイシンから選択され；アミノ酸ｚは、グルタミン、アスパラギン、又はアルギニンから選択され；アミノ酸ａ’は、チロシン、ヒスチジン、アラニン又はセリンから選択され；アミノ酸ｂ’は、フェニルアラニン、チロシン、アスパラギン酸、アスパラギン又はイソロイシンから選択され；アミノ酸ｃ’は、セリン、グリシン又はアスパラギンから選択され；アミノ酸ｄ’は、プロリン、チロシン、ス

レオニン、フェニルアラニン、アスパラギン酸、ロイシン又はトリプトファンから選択され；アミノ酸ｅ’は、プロリンであり；アミノ酸ｆ’は、プロリンであり、又は存在せず；アミノ酸ｇ’は、トリプトファン、ロイシン、プロリン、チロシン、又はイソロイシンであり；及びアミノ酸ｈ’は、スレオニン又はアスパラギンである。））；

（ｉｉ）ＣＤＲ１ｂ、ＣＤＲ２ｂ又はＣＤＲ３ｂから選択される少なくとも一つの相補性決定領域（ＣＤＲ）を含み、抗体の軽鎖と共同して、ＨＧＦを結合することができる、第二のポリペプチドと、

（ＣＤＲ１ｂは、アミノ酸配列ａ　ｂ　ｃ　ｄ　ｅ　ｆ　ｇを含み（アミノ酸ａは、セリンであり、又は存在せず；アミノ酸ｂは、アスパラギン酸若しくはグリシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｃは、アスパラギン酸、グリシン、セリン、バリン、スレオニン又はイソロイシンから選択され；アミノ酸ｄは、チロシンであり；アミノ酸ｅは、チロシン又はグリシンから選択され；アミノ酸ｆは、イソロイシン、メチオニン又はトリプトファンから選択され；及びアミノ酸ｇは、ヒスチジン、アスパラギン又はセリンから選択される。）；

ＣＤＲ２ｂは、アミノ酸配列ｈ　ｉ　ｊ　ｋ　ｌ　ｍ　ｎ　ｏ　ｐ　ｑ　ｒ　ｓ　ｔ　ｕｖ　ｗ　ｘを含み（アミノ酸ｈは、トリプトファン、チロシン、バリン、アスパラギン又はグルタミン酸から選択され；アミノ酸ｉは、イソロイシン、フェニルアラニン又はバリンから選択され；アミノ酸ｊは、アスパラギン、セリン、トリプトファン又はチロシンから選択され；アミノ酸ｋは、プロリン、セリン、チロシン又はヒスチジンから選択され；アミノ酸ｌは、アスパラギン、セリン又はアスパラギン酸から選択され；アミノ酸ｍは、セリン又はグリシンから選択され；アミノ酸ｎは、グリシン若しくはセリンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｏは、グリシン、スレオニン、アスパラギン酸、セリン、イソロイシン又はアスパラギンから選択され；アミノ酸ｐは、スレオニン、イソロイシン又はリジンから選択され；アミノ酸ｑは、アスパラギン又はチロシンから選択され；アミノ酸ｒは、チロシン又はヒスチジンから選択され；アミノ酸ｓは、アラニン又はアスパラギンから選択され；アミノ酸ｔは、グルタミン、アスパラギン酸又はプロリンから選択され；アミノ酸ｕは、リジン又はセリンから選択され；アミノ酸ｖは、フェニルアラニン、バリン又はロイシンから選択され；アミノ酸ｗは、グルタミン又はリジンから選択され、及びアミノ酸ｘは、グリシン又はセリンから選択される。）；

ＣＤＲ３ｂは、アミノ酸配列ｙ　ｚ　ａ’　ｂ’　ｃ’　ｄ’　ｅ’　ｆ’　ｇ’　ｈ’　ｉ’　ｊ’　ｋ’　ｌ’　ｍ’　ｎ’　ｏ’　ｐ’　ｑ’　ｒ’を含む（アミノ酸ｙは、グルタミン酸、アスパラギン酸、セリン若しくはグリシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｚは、ロイシン、グルタミン酸、アスパラギン酸、ヒスチジン、プロリン若しくはグリシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ａ’は、グルタミン酸、チロシン又はロイシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｂ’は、ロイシン、アスパラギン、グリシン、ヒスチジン、チロシン若しくはトリプトファンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｃ’は、アルギニン、セリン、グルタミン酸、チロシン、グリシン若しくはフェニルアラニンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｄ’は、グリシンであり、又は存在せず；アミノ酸ｅ’は、トリプトファン若しくはチロシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｆ’は、アスパラギン酸であり、又は存在せず；アミノ酸ｇ’は、セリン若しくはアルギニンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｈ’は、セリンであり、又は存在せず；アミノ酸ｉ’は、グリシン若しくはチロシン、又は存在せず；アミノ酸ｊ’は、チロシン、グルタミン酸若しくはアスパラギン酸から選択され、又は存在せず；アミノ酸ｋ’は、チロシン、フェニルアラニン若しくはアスパラギン酸から選択され、又は存在せず；アミノ酸ｌ’は、チロシン、アスパラギン酸、ヒスチジン若しくはトリプトファンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｍ’は、チロシン、グリシン、アスパラギン酸、プロリン若しくはセリンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｎ’は、グリシン、バリン、チロシン若しくはアスパラギン酸から選択され、又は存在せず；アミノ酸ｏ’は、ロイシン、アラニン、グリシン若しくはチロシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｐ’は、メチオニン、フェニルアラニン又はチロシンから選択され；アミノ酸ｑ’は、アスパラギ

ン酸であり、アミノ酸ｒ’は、バリン、チロシン、イソロイシン又はプロリンから選択される。）。）を含む、単離された特異的結合因子を提供する。

【００１１】

ある実施形態において、本発明は、配列番号２４、２６、２８、３０、３２、３４、３６、３８、４０及び４２から選択される少なくとも一つのアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチドを提供する。

【００１２】

ある実施形態において、本発明は、配列番号２５、２７、２９、３１、３３、３５、３７、３９、４１及び４３から選択される、少なくとも一つのアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチドを提供する。

【００１３】

ある実施形態において、本発明は、配列番号１、３、５、７、９、１１、１３、１５、１７及び１９から選択される、少なくとも一つのヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子を提供する。

【００１４】

ある実施形態において、本発明は、配列番号２、４、６、８、１０、１２、１４、１６、１８及び２０から選択される、少なくとも一つのヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子を提供する。

【００１５】

ある実施形態において、本発明は、

ＣＤＲ１ａ、ＣＤＲ２ａ及びＣＤＲ３ａから選択される少なくとも一つの相補性決定領域（ＣＤＲ）を含み、抗体の重鎖と共同して、肝細胞増殖因子（ＨＧＦ）を結合することができるポリペプチドをコードする単離された核酸分子を提供する。

（ＣＤＲ１ａは、アミノ酸配列ａ　ｂ　ｃ　ｄ　ｅ　ｆ　ｇ　ｈ　ｉ　ｊ　ｋ　ｌ　ｍ　ｎ　ｏ　ｐ　ｑを含み（アミノ酸ａは、リジン、アルギニン又はグルタミンから選択され；アミノ酸ｂは、セリン又はアラニンから選択され；アミノ酸ｃは、セリンであり；アミノ酸ｄは、グルタミンであり；アミノ酸ｅは、セリン、グリシン又はアスパラギン酸から選択され；アミノ酸ｆは、バリン若しくはイソロイシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｇは、ロイシン若しくはフェニルアラニンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｈは、フェニルアラニン若しくはチロシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｉは、セリンであり、又は存在せず；アミノ酸ｊは、セリンであり、又は存在せず；アミノ酸ｋは、アスパラギン、スレオニンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｌは、アスパラギン、イソロイシン又はバリンから選択され；アミノ酸ｍは、リジン、アルギニン、アスパラギン、又はアスパラギン酸から選択され；アミノ酸ｎは、アスパラギン又はセリンから選択され；アミノ酸ｏは、チロシン、アスパラギン酸、トリプトファン又はアスパラギンから選択され；アミノ酸ｐは、ロイシンであり；及びアミノ酸ｑは、アラニン、グリシン又はアスパラギンから選択される。）；

ＣＤＲ２ａは、アミノ酸配列ｒ　ｓ　ｔ　ｕ　ｖ　ｗ　ｘを含み（アミノ酸ｒは、トリプトファン、アラニン、バリン、グルタミン酸又はグリシンから選択され；アミノ酸ｓは、アラニンであり、アミノ酸ｔは、セリンであり、アミノ酸ｕは、スレオニン、セリン又はアスパラギン酸から選択され；アミノ酸ｖは、アルギニン又はロイシンから選択され；アミノ酸ｗは、グルタミン酸、グルタミン又はアラニンから選択され；及びアミノ酸ｘは、セリン、アスパラギン又はスレオニンから選択される。）；

ＣＤＲ３ａは、アミノ酸配列ｙ　ｚ　ａ’　ｂ’　ｃ’　ｄ’　ｅ’　ｆ’　ｇ’　ｈ’を含む（アミノ酸ｙは、グルタミン又はロイシンから選択され；アミノ酸ｚは、グルタミン、アスパラギン又はアルギニンから選択され；アミノ酸ａ’は、チロシン、ヒスチジン、アラニン又はセリンから選択され；アミノ酸ｂ’は、フェニルアラニン、チロシン、アスパラギン酸、アスパラギン又はイソロイシンから選択され；アミノ酸ｃ’は、セリン、グリシン又はアスパラギンから選択され；アミノ酸ｄ’は、プロリン、チロシン、スレオニン、フェニルアラニン、アスパラギン酸、ロイシン又はトリプトファンから選択され

；アミノ酸ｅ’は、プロリンであり；アミノ酸ｆ’は、プロリンであり、又は存在せず；アミノ酸ｇ’は、トリプトファン、ロイシン、プロリン、チロシン又はイソロイシンであり；及びアミノ酸ｈ‘は、スレオニン又はアスパラギンである。）。）

【００１６】

ある実施形態において、本発明は、

ＣＤＲ１ｂ、ＣＤＲ２ｂ及びＣＤＲ３ｂから選択される少なくとも一つの相補性決定領域（ＣＤＲ）を含み、抗体の軽鎖と共同して、ＨＧＦを結合することができるポリペプチドをコードする単離された核酸分子を提供する。

（ＣＤＲ１ｂは、アミノ酸配列ａ ｂ ｃ ｄ ｅ ｆ ｇを含み（アミノ酸ａは、セリンであり、又は存在せず；アミノ酸ｂは、アスパラギン酸若しくはグリシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｃは、アスパラギン酸、グリシン、セリン、バリン、スレオニン又はイソロイシンから選択され；アミノ酸ｄは、チロシンであり；アミノ酸ｅは、チロシン又はグリシンから選択され；アミノ酸ｆは、イソロイシン、メチオニン又はトリプトファンから選択され；及びアミノ酸ｇは、ヒスチジン、アスパラギン又はセリンから選択される。）；

ＣＤＲ２ｂは、アミノ酸配列ｈ ｉ ｊ ｋ ｌ ｍ ｎ ｏ ｐ ｑ ｒ ｓ ｔ ｕ ｖ ｗ ｘを含み（アミノ酸ｈは、トリプトファン、チロシン、バリン、アスパラギン又はグルタミン酸から選択され；アミノ酸ｉは、イソロイシン、フェニルアラニン又はバリンから選択され；アミノ酸ｊは、アスパラギン、セリン、トリプトファン又はチロシンから選択され；アミノ酸ｋは、プロリン、セリン、チロシン、又はヒスチジンから選択され；アミノ酸ｌは、アスパラギン、セリン又はアスパラギン酸から選択され；アミノ酸ｍは、セリン又はグリシンから選択され；アミノ酸ｎは、グリシン若しくはセリンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｏは、グリシン、スレオニン、アスパラギン酸、セリン、イソロイシン又はアスパラギンから選択され；アミノ酸ｐは、スレオニン、イソロイシン又はリジンから選択され；アミノ酸ｑは、アスパラギン又はチロシンから選択され；アミノ酸ｒは、チロシン又はヒスチジンから選択され；アミノ酸ｓは、アラニン又はアスパラギンから選択され；アミノ酸ｔは、グルタミン、アスパラギン酸又はプロリンから選択され；アミノ酸ｕは、リジン又はセリンから選択され；アミノ酸ｖは、フェニルアラニン、バリン又はロイシンから選択され；アミノ酸ｗは、グルタミン又はリジンから選択され、及びアミノ酸ｘは、グリシン又はセリンから選択される。）；

ＣＤＲ３ｂは、アミノ酸配列ｙ ｚ ａ’ ｂ’ ｃ’ ｄ’ ｅ’ ｆ’ ｇ’ ｈ’ ｉ’ ｊ’ ｋ’ ｌ’ ｍ’ ｎ’ ｏ’ ｐ’ ｑ’ ｒ’を含み（アミノ酸ｙは、グルタミン酸、アスパラギン酸、セリン若しくはグリシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｚは、ロイシン、グルタミン酸、アスパラギン酸、ヒスチジン、プロリン若しくはグリシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ａ’は、グルタミン酸、チロシン若しくはロイシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｂ’は、ロイシン、アスパラギン、グリシン、ヒスチジン、チロシン若しくはトリプトファンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｃ’は、アルギニン、セリン、グルタミン酸、チロシン、グリシン若しくはフェニルアラニンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｄ’は、グリシンであり、又は存在せず；アミノ酸ｅ’は、トリプトファン若しくはチロシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｆ’は、アスパラギン酸であり、又は存在せず；アミノ酸ｇ’は、セリン若しくはアルギニンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｈ’は、セリンであり、又は存在せず；アミノ酸ｉ’は、グリシン若しくはチロシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｊ’は、チロシン、グルタミン酸若しくはアスパラギン酸から選択され、又は存在せず；アミノ酸ｋ’は、チロシン、フェニルアラニン若しくはアスパラギン酸から選択され、又は存在せず；アミノ酸ｌ’は、チロシン、アスパラギン酸、ヒスチジン若しくはトリプトファンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｍ’は、チロシン、グリシン、アスパラギン酸、プロリン若しくはセリンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｎ’は、グリシン、バリン、チロシン若しくはアスパラギン酸から選択され、又は存在せず；アミノ酸ｏ’は、ロイシン、アラニン、グリシン若しくはチロシンから選択され、又は存在せず；

アミノ酸ｐ’は、メチオニン、フェニルアラニン又はチロシンから選択され；アミノ酸ｑ’は、アスパラギン酸であり、及びアミノ酸ｒ’は、バリン、チロシン、イソロイシン又はプロリンから選択される。）。）

【００１７】

ある実施形態において、本発明は、１．２４．１、１．２９．１、１．６０．１、１．６１．３、１．７４．３、１．７５．１、２．４．４、２．１２．１、２．４０．１及び３．１０．１．から選択される抗体を産生する、単離された細胞株を提供する。

【００１８】

ある実施形態において、本発明は、ＨＧＦに対する特異的結合因子を投与することを含む、ＨＧＦのＭｅｔへの結合を阻害する方法を提供する。

【００１９】

ある実施形態において、本発明は、配列番号１６４及び１６５から選択される、少なくとも一つのアミノ酸配列を含む、ポリペプチドを提供する。

【００２０】

ある実施形態において、本発明は、配列番号１６４及び１６５から選択される、少なくとも一つのアミノ酸配列から実質的になる、ポリペプチドを提供する。

【００２１】

ある実施形態において、本発明は、配列番号１６４及び１６５から選択される、少なくとも一つのアミノ酸配列を結合することができる、特異的結合因子を提供する。

【００２２】

ある実施形態において、本発明は、配列番号１６４及び１６５から選択される、少なくとも一つのアミノ酸配列を結合することができる、抗体又は抗原結合ドメインを提供する。

【００２３】

ある実施形態において、本発明は、配列番号１６４及び１６５から選択される少なくとも一つのポリペプチドを動物に投与することと、ＨＧＦを結合できる抗体を前記動物から取得することとを含む、肝細胞増殖因子（ＨＧＦ）を結合できる抗体を取得する方法を提供する。

【００２４】

ある実施形態において、本発明は、配列番号１６４及び１６５から選択される少なくとも一つのアミノ酸配列を含むポリペプチドを投与することによって、肝細胞増殖因子（ＨＧＦ）に対する特異的結合因子の結合を減少し、又は抑制する方法を提供する。

【００２５】

ある実施形態において、本発明は、配列番号１６４及び１６５から選択される少なくとも一つのアミノ酸配列からなるポリペプチドを投与することによって、肝細胞増殖因子（ＨＧＦ）に対する特異的結合因子の結合を減少し、又は抑制する方法を提供する。

【００２６】

本発明の他の実施形態は、本明細書に記載されている開示から明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【００２７】

【図１Ａ】ＨＧＦに対するある抗体の、κ軽鎖の樹状図を示しており、樹状図には、それらの生殖系列の関係が示されている。生殖細胞系列遺伝子の識別は、抗体表記の右側に記されている。

【図１Ｂ】ＨＧＦに対するある抗体の、κ軽鎖可変領域のアミノ酸配列のアラインメントを示している。生殖細胞系列遺伝子の識別は、左に記されている。ＣＤＲ領域は、並置された配列の上に、太線として記されている。

【図２Ａ】ＨＧＦに対するある抗体の、γ重鎖の樹状図を示しており、樹状図には、それらの生殖系列の関係が示されている。生殖細胞系列遺伝子の識別は、抗体表記の右側に記されている。

【図２Ｂ】ＨＧＦに対するある抗体の、γ重鎖可変領域のアミノ酸配列のアラインメント

を示している。生殖細胞系列遺伝子の識別は、左に記されている。ＣＤＲ領域は、並置された配列の上に、太線として記されている。
【図３－１】図３は、ＨＧＦに対する、ある抗体の軽鎖及び重鎖の両方から得られた可変領域をコードするＤＮＡ配列を示している。抗体名、生殖細胞系列の表記及び配列番号が、それぞれの配列に対して記されている。天然のシグナルペプチド配列には、下線が付されている。ヒトκ、ＩｇＧ１及びＩｇＧ２定常領域のＤＮＡ配列も示されている。
【図３－２】図３は、ＨＧＦに対する、ある抗体の軽鎖及び重鎖の両方から得られた可変領域をコードするＤＮＡ配列を示している。抗体名、生殖細胞系列の表記及び配列番号が、それぞれの配列に対して記されている。天然のシグナルペプチド配列には、下線が付されている。ヒトκ、ＩｇＧ１及びＩｇＧ２定常領域のＤＮＡ配列も示されている。
【図３－３】図３は、ＨＧＦに対する、ある抗体の軽鎖及び重鎖の両方から得られた可変領域をコードするＤＮＡ配列を示している。抗体名、生殖細胞系列の表記及び配列番号が、それぞれの配列に対して記されている。天然のシグナルペプチド配列には、下線が付されている。ヒトκ、ＩｇＧ１及びＩｇＧ２定常領域のＤＮＡ配列も示されている。
【図３－４】図３は、ＨＧＦに対する、ある抗体の軽鎖及び重鎖の両方から得られた可変領域をコードするＤＮＡ配列を示している。抗体名、生殖細胞系列の表記及び配列番号が、それぞれの配列に対して記されている。天然のシグナルペプチド配列には、下線が付されている。ヒトκ、ＩｇＧ１及びＩｇＧ２定常領域のＤＮＡ配列も示されている。
【図３－５】図３は、ＨＧＦに対する、ある抗体の軽鎖及び重鎖の両方から得られた可変領域をコードするＤＮＡ配列を示している。抗体名、生殖細胞系列の表記及び配列番号が、それぞれの配列に対して記されている。天然のシグナルペプチド配列には、下線が付されている。ヒトκ、ＩｇＧ１及びＩｇＧ２定常領域のＤＮＡ配列も示されている。
【図４－１】ＨＧＦに対するある抗体の、軽鎖及び重鎖の可変領域のアミノ酸配列を示している。抗体名、生殖細胞系列の表記及び配列番号が、それぞれの配列に対して記され手いる。天然のシグナルペプチド配列には、下線が付されている。ヒトκ、ＩｇＧ１及びＩｇＧ２定常領域のアミノ配列も示されている。
【図４－２】ＨＧＦに対するある抗体の、軽鎖及び重鎖の可変領域のアミノ酸配列を示している。抗体名、生殖細胞系列の表記及び配列番号が、それぞれの配列に対して記され手いる。天然のシグナルペプチド配列には、下線が付されている。ヒトκ、ＩｇＧ１及びＩｇＧ２定常領域のアミノ配列も示されている。
【図４－３】ＨＧＦに対するある抗体の、軽鎖及び重鎖の可変領域のアミノ酸配列を示している。抗体名、生殖細胞系列の表記及び配列番号が、それぞれの配列に対して記され手いる。天然のシグナルペプチド配列には、下線が付されている。ヒトκ、ＩｇＧ１及びＩｇＧ２定常領域のアミノ配列も示されている。
【図５Ａ】ＨＧＦに対するある抗体の、軽鎖及び重鎖の相補性決定領域（ＣＤＲ）のアミノ酸配列を示している。抗体名及び配列番号が、それぞれの配列に対して記されている。図５Ａは、ＨＧＦに対するある抗体の、軽鎖のＣＤＲのアミノ酸配列を示している。
【図５Ｂ】ＨＧＦに対するある抗体の、軽鎖及び重鎖の相補性決定領域（ＣＤＲ）のアミノ酸配列を示している。抗体名及び配列番号が、それぞれの配列に対して記されている。図５Ｂは、ＨＧＦに対するある抗体の、重鎖のＣＤＲのアミノ酸配列を示している。
【図６Ａ】実施例８に論述されている、ＨＧＦに対するある抗体の、Ｋｄ測定の結果を示している。図６Ａは、速度論的方法から得られたデータを示している。
【図６Ｂ】実施例８に論述されている、ＨＧＦに対するある抗体の、Ｋｄ測定の結果を示している。図６Ｂは、平衡／溶液法から得られたデータを示している。
【図７－１】ある抗体の、ヒトＨＧＦ及びマウスＨＧＦへの結合能を調べる、実施例８に論述されているウェスタンブロットから得られるオートラジオグラムを示している。左（レーン１－４）のパネルは、非還元条件下で実施された実験から得られたオートラジオグラムを示している。右（レーン５－８）のパネルは、還元条件下で実施された実験から得られたオートラジオグラムを示している。
【図７－２】ある抗体の、ヒトＨＧＦ及びマウスＨＧＦへの結合能を調べる、実施例８に

論述されているウェスタンブロットから得られるオートラジオグラムを示している。左（レーン１－４）のパネルは、非還元条件下で実施された実験から得られたオートラジオグラムを示している。右（レーン５－８）のパネルは、還元条件下で実施された実験から得られたオートラジオグラムを示している。

【図８－１】実施例８に論述されている実験から得られた蛍光標示式細胞分取器（ＦＡＣＳ）データを示しており、ある標的に対する、ある抗体の結合を評価している。図８の上部は、特異的結合因子を欠如する対照試料から得られたＦＡＣＳデータを示している。パネル１及び２（左から）は、それぞれ、ＦＩＴＣ及びＰＥとともにインキュベートされた、標的を欠如する対照試料から得られたデータを示している。パネル３及び４は、それぞれＦＩＴＣ及びＰＥ標識されたｄ５ＨＧＦを含むが、特異的結合因子を欠如する対照試料から得られたデータを示している。実線の下のパネルは、ＨＧＦに対する５つの抗体を調べる実験から得られたＦＡＣＳデータを示している。各抗体について、第一のパネル（左から）は、標的を欠如する対照試料から得られたデータを示しており、第２から第４のパネルは、それぞれ標的がヒトＨＧＦ、マウスＨＧＦ及びヒトｄ５　ＨＧＦである実験から得られたデータを示している。

【図８－２】実施例８に論述されている実験から得られた蛍光標示式細胞分取器（ＦＡＣＳ）データを示しており、ある標的に対する、ある抗体の結合を評価している。図８の上部は、特異的結合因子を欠如する対照試料から得られたＦＡＣＳデータを示している。パネル１及び２（左から）は、それぞれ、ＦＩＴＣ及びＰＥとともにインキュベートされた、標的を欠如する対照試料から得られたデータを示している。パネル３及び４は、それぞれＦＩＴＣ及びＰＥ標識されたｄ５ＨＧＦを含むが、特異的結合因子を欠如する対照試料から得られたデータを示している。実線の下のパネルは、ＨＧＦに対する５つの抗体を調べる実験から得られたＦＡＣＳデータを示している。各抗体について、第一のパネル（左から）は、標的を欠如する対照試料から得られたデータを示しており、第２から第４のパネルは、それぞれ標的がヒトＨＧＦ、マウスＨＧＦ及びヒトｄ５　ＨＧＦである実験から得られたデータを示している。

【図９Ａ】実施例８に論述されているように、アビジンと標的タンパク質を含む融合タンパク質を作製するために使用されたマルチクローニング部位に隣接しているアビジンをコードするプラスミドの模式図を示している。

【図９Ｂ】ニワトリのアビジンの配列を示している。

【図１０Ａ】ある融合タンパク質の模式的な表示と、実施例８Ｃ及び８Ｄに論述されている、これらの融合タンパク質を用いる結合アッセイから得られた結果を示している。

【図１０Ｂ】ある融合タンパク質の模式的な表示と、実施例８Ｃ及び８Ｄに論述されている、これらの融合タンパク質を用いる結合アッセイから得られた結果を示している。

【図１０Ｃ】点変異、挿入又は欠失を有する、ある融合タンパク質の模式的な表示を示している。

【図１０Ｄ】アミノ酸４５１－７３１の領域中の、ヒト及びマウスＨＧＦのアミノ酸配列（それぞれ、配列番号１２０及び１２１）を示しており、対応するコンセンサス配列（配列番号１２２）が記されている。

【図１１Ａ】実施例８Ｅに論述されている、ヒトＨＧＦに対するプロテアーゼ保護実験のＨＰＬＣ分析を示している。

【図１１Ｂ】実施例８Ｅに論述されている、ヒトＨＧＦに対するプロテアーゼ保護実験のＨＰＬＣ分析を示している。

【図１１Ｃ】実施例８Ｅに論述されている、ヒトＨＧＦに対するプロテアーゼ保護実験において、抗体２．１２．１への結合によって、タンパク質分解消化から保護されたペプチドのアミノ酸配列を示している。

【図１２－１】、実施例８に論述されている競合結合アッセイから得られた結果を示している。

【図１２－２】、実施例８に論述されている競合結合アッセイから得られた結果を示している。

【図１３】実施例９に論述されている中和アッセイから得られたＩＣ$_{50}$データを示している。
【図１４】実施例１０に論述されている、ＰＣ３細胞での中和アッセイから得られたデータを示している。
【図１５】実施例１０に論述されている、Ｕ－８７細胞での阻害アッセイから得られたデータを示している。
【図１６Ａ】実施例１１に論述されている実験から得られた結果を示しており、マウス中のＵ－８７ＭＧ異種移植腫瘍に対して、ＨＧＦに対するある抗体が及ぼす影響を評価している。微小残存病変モデルにおける、Ｕ－８７　ＭＧ異種移植腫瘍増殖に対する、抗体２．４．４の用量反応データを示している。
【図１６Ｂ】実施例１１に論述されている実験から得られた結果を示しており、マウス中のＵ－８７ＭＧ異種移植腫瘍に対して、ＨＧＦに対するある抗体が及ぼす影響を評価している。確立された病変モデルにおける、Ｕ－８７異種移植腫瘍増殖に対する、抗体２．４．４の用量反応データを示している。
【図１６Ｃ】実施例１１に論述されている実験から得られた結果を示しており、マウス中のＵ－８７ＭＧ異種移植腫瘍に対して、ＨＧＦに対するある抗体が及ぼす影響を評価している。Ｕ－８７の微小残存病変モデル（１６Ｃ及び１６Ｄ）において、ＨＧＦに対する抗体を検査する一対一実験から得られたデータを示している。
【図１６Ｄ】実施例１１に論述されている実験から得られた結果を示しており、マウス中のＵ－８７ＭＧ異種移植腫瘍に対して、ＨＧＦに対するある抗体が及ぼす影響を評価している。Ｕ－８７の微小残存病変モデル（１６Ｃ及び１６Ｄ）において、ＨＧＦに対する抗体を検査する一対一実験から得られたデータを示している。
【図１６Ｅ】実施例１１に論述されている実験から得られた結果を示しており、マウス中のＵ－８７ＭＧ異種移植腫瘍に対して、ＨＧＦに対するある抗体が及ぼす影響を評価している。Ｕ－８７の確立された病変モデル（１６Ｅ及び１６Ｆ）において、ＨＧＦに対する抗体を検査する一対一実験から得られたデータを示している。
【図１６Ｆ】実施例１１に論述されている実験から得られた結果を示しており、マウス中のＵ－８７ＭＧ異種移植腫瘍に対して、ＨＧＦに対するある抗体が及ぼす影響を評価している。Ｕ－８７の確立された病変モデル（１６Ｅ及び１６Ｆ）において、ＨＧＦに対する抗体を検査する一対一実験から得られたデータを示している。
【発明を実施するための形態】
【００２８】
先述の一般的な記載及び以下の詳細な記載は何れも、典型的で、説明的なものにすぎず、特許請求の範囲に記載されている本発明を限定するものではないことを理解しなければならない。本願において、特段の記載がなければ、単数の使用は複数を含む。本願において、別段の記載がなければ、「又は」の使用は、「及び／又は」を意味する。さらに、「含んでいる」という用語並びに「含む」及び「含まれた」などのその他の形式の使用は、限定的なものではない。また、「要素」又は「成分」などの用語は、特段の記載がなければ、一つのユニットを含む要素及び成分並びに１より多いサブユニットを含む要素及び成分を包含する。「部分」という用語の使用は、部分の一部又は部分の全体を含み得る。
【００２９】
本明細書に使用されている節の見出しは、整理の目的のためにすぎず、記載されている主題を限定することを意図するものではない。本願に引用されている全部の文書又は文書の一部（特許、特許出願、記事、書籍及び学術論文を含むが、これらに限定されない。）は、参照により、その全体が、いかなる目的のためにも、明示的に本明細書に組み込まれる。
【００３０】
定義
組み換えＤＮＡ、オリゴヌクレオチド合成並びに組織培養及び形質転換（例えば、電気穿孔、リポフェクション）に対しては、標準的な技術を使用し得る。酵素反応及び精製技

術は、製造業者の説明書に従って、又は本分野で一般的に遂行されているように、又は本明細書に記載されているように、実施することができる。一般に、先述の技術及び手順は、本分野で周知の慣用的な方法に従い、本明細書を通じて引用及び論述されている様々な一般的参考文献及びより具体的な参考文献中に記載されているように、実施することができる。例えば、「Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ（２ｄ ｅｄ．, Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ, Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ, Ｎ．Ｙ．（１９８９））」（参照により、いかなる目的のためにも、本明細書に組み込まれる。）を参照されたい。具体的な定義が記されていなければ、本明細書に記載されている分析化学、合成有機化学及び医薬品化学及び薬化学に関して使用される命名法、並びに本明細書に記載されている分析化学、合成有機化学及び医薬品化学及び薬化学の実験室操作及び技術は、周知のものであり、本分野で一般的に使用されているものである。化学合成、化学分析、薬学的な調製、調合、及び送達、及び患者の治療に対しては、標準的な技術を使用し得る。

【００３１】

本開示において使用される場合、以下の用語は、別段の記載がなければ、以下の意味を有するものと理解しなければならない。

【００３２】

「肝細胞増殖因子」又は「ＨＧＦ」という用語は、「Ｎａｋａｍｕｒａ ｅｔ ａｌ．, Ｎａｔｕｒｅ ３４２：４４０－４４３（１９８９）」に記載されているポリペプチド又はそれらの断片、並びに関連ポリペプチドを表す。関連ペプチドには、対立遺伝子バリアント、スプライスバリアント、派生的バリアント、置換バリアント、欠失バリアント及び／又は挿入バリアント、融合ポリペプチド、並びに種間相同体が含まれるが、これらに限定されない。ある実施形態において、ＨＧＦポリペプチドは、リーダー配列残基、ターゲッティング残基、アミノ末端メチオニン残基、リジン残基、タグ残基及び／又は融合タンパク質残基などの（これらに限定されない。）末端残基を含む。

【００３３】

「特異的結合因子」という用語は、標的に特異的に結合する天然分子又は非天然分子を表す。特異的結合因子の例には、タンパク質、ペプチド、核酸、炭水化物、脂質及び小分子化合物が含まれるが、これらに限定されるものではない。ある実施形態において、特異的結合因子は抗体である。ある実施形態において、特異的結合因子は抗原結合領域である。

【００３４】

「ＨＧＦに対する特異的結合因子」という用語は、ＨＧＦの任意の部分を特異的に結合する特異的結合因子を表す。ある実施形態において、ＨＧＦに対する特異的結合因子は、ＨＧＦに対する抗体である。ある実施形態において、特異的結合因子は抗原結合領域である。

【００３５】

「ポリクローナル抗体」という用語は、同一抗原の異なるエピトープに結合する抗体の不均一混合物を表す。

【００３６】

「モノクローナル抗体」という用語は、同じ核酸分子によってコードされる抗体の群を表す。ある実施形態において、モノクローナル抗体は、単一のハイブリドーマ若しくは他の細胞株によって、又はトランスジェニック哺乳動物によって産生される。モノクローナル抗体は、典型的には、同じエピトープを認識する。「モノクローナル」という用語は、抗体を製造するための何らかの具体的な方法に対して限定されるものではない。

【００３７】

「キメラ抗体」という用語は、抗体の一部が特定の種又は特定の抗体クラスの配列に対して相同であるが、抗体の別の部分は異なる種又は異なる抗体クラスの配列に対して相同である抗体を表す。例えば、米国特許第４，８１６，５６７号及び「Ｍｏｒｒｉｓｏｎ

ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ（ＵＳＡ），８１：６８５１－６８５５（１９８５）」を参照されたい。

【００３８】

「ＣＤＲ移植抗体」という用語は、ある抗体由来のＣＤＲが別の抗体のフレームワーク中に挿入されている抗体を表す。ある実施形態において、ＣＤＲが得られた抗体とフレームワークが得られた抗体とは、異なる種の抗体である。ある実施形態において、ＣＤＲが得られた抗体とフレームワークが得られた抗体とは、異なるイソタイプの抗体である。

【００３９】

「多重特異性抗体」という用語は、２以上の可変領域が異なるエピトープに結合する抗体を表す。エピトープは、同一又は異別の標的上に存在し得る。ある実施形態において、多重特異性抗体は、同一又は異別の抗原上の２つの異なるエピトープを認識する「二重特異性抗体」である。

【００４０】

「触媒抗体」という用語は、一又は複数の触媒部分が付着されている抗体を表す。ある実施形態において、触媒抗体は、細胞傷害部分を含む細胞傷害抗体である。

【００４１】

「ヒト化抗体」という用語は、抗体フレームワーク領域の全部又は一部がヒトに由来するが、一又は複数のＣＤＲ領域の全部又は一部が別の種（例えば、マウス）に由来する抗体を表す。

【００４２】

「完全ヒト抗体」という用語は、ＣＤＲとフレームワークの両方が実質的にヒト配列を含む抗体を表す。ある実施形態において、完全ヒト抗体は、マウス、ラット及びウサギ目を含む（これらに限定されない。）、ヒト以外の哺乳動物中で産生される。ある実施形態において、完全ヒト抗体は、ハイブリドーマ細胞中で産生される。ある実施形態において、完全ヒト抗体は、組み換え的に産生される。

【００４３】

「抗イディオタイプ抗体」という用語は、別の抗体に特異的に結合する抗体を表す。

【００４４】

「特異的に結合する」という用語は、特異的結合因子が、非標的への結合に比べて大きな親和性で、標的に結合する能力を表す。ある実施形態において、特異的結合とは、非標的に対する親和性より少なくとも１０、５０、１００、２５０、５００又は１０００倍大きな親和性での、標的への結合を表す。ある実施形態において、親和性は、アフィニティＥＬＩＳＡアッセイによって決定される。ある実施形態において、親和性は、ＢＩＡｃｏｒｅアッセイによって決定される。ある実施形態において、親和性は、速度論的な方法によって決定される。ある実施形態において、親和性は、平衡／溶液法によって決定される。

【００４５】

「エピトープ」という用語は、特異的結合因子によって結合されることができる、分子の部分を表す。ある実施形態において、エピトープは、典型的には、例えばアミノ酸又は炭水化物側鎖などの分子の、化学的に活性な表面配置を含み、特異的な三次元構造特性及び特異的な電荷特性を含む。エピトープは、連続的又は非連続的であり得る。ある実施形態において、エピトープは、抗体を生成するために使用されるエピトープと類似する三次元構造を含むが、抗体を生成するために使用される当該エピトープ中に見出されるアミノ酸残基を全く又は一部しか含まないという点で模倣体であり得る。

【００４６】

「阻害及び／又は中和エピトープ」という用語は、特異的結合因子によって結合されたときに、インビボ、インビトロ及び／又はインシチュで、生物活性の減少をもたらすエピトープを表す。ある実施形態において、中和エピトープは、標的の生物学的に活性な領域上に位置し、標的の生物学的に活性な領域と会合している。

【００４７】

「活性化エピトープ」という用語は、特異的結合因子によって結合されたときに、インビボ、インビトロ及び／又はインシチュで、生物活性の活性化又は維持をもたらすエピトープを表す。ある実施形態において、活性化エピトープは、標的の生物学的に活性な領域上に位置し、標的の生物学的に活性な領域と会合している。

【００４８】

本明細書において使用される「単離されたポリペプチド」という用語は、ゲノム、ｃＤＮＡ若しくは合成起源又はこれらの幾つかの組み合わせのポリヌクレオチドを意味し、その起源に基づいて、「単離されたポリヌクレオチド」は、（１）「単離されたポリヌクレオチド」が本来その中に存在するポリヌクレオチドの全部又は一部と会合していない、（２）本来連結されていないポリヌクレオチドに連結されている、又は（３）より大きな配列の一部として本来生じない。

【００４９】

本明細書において使用される「単離されたタンパク質」という用語は、（１）本来一緒に存在する、少なくとも幾つかのタンパク質が存在しない、（２）同じ起源由来（例えば、同一種由来）の他のタンパク質が実質的に存在しない、（３）異なる種由来の細胞によって発現されている、又は（４）本来発生しない、ｃＤＮＡ、組み換えＲＮＡ若しくは合成起源又はこれらの幾つかの組み合わせによってコードされるタンパク質を意味する。

【００５０】

本明細書において、「ポリペプチド」という用語は、原型タンパク質、又は原型配列の一もしくは複数のアミノ酸の欠失、付加及び／又は置換を有する、このようなタンパク質の修飾物を表す包括的な用語として使用される。ある実施形態において、ポリペプチドは、原型配列の少なくとも一つ、但し、５０、３０、２０、１５、１０、８、５又は３個を超えないアミノ酸の欠失、付加及び／又は置換を有する。

【００５１】

ある対象に対して適用される、本明細書で使用する「天然に存在する」という用語は、対象が自然に見出すことができるという事実を表している。例えば、自然の取得源から単離することができる生物（ウイルスを含む。）中に存在し、実験室その他においてヒトが意図的に修飾を加えていないポリペプチド又はポリヌクレオチド配列は、天然に存在する。

【００５２】

本明細書において使用される「作用可能に連結された」という用語は、それらを所期の様式で機能させることができる関係にある成分を表す。例えば、コード配列に対して「作用可能に連結された」制御配列は、制御配列と適合的な条件下で、コード配列の発現が達成されるように連結されている。

【００５３】

本明細書において使用される「制御配列」という用語は、それらが連結されているコード配列の発現及びプロセッシングに影響を与え得るポリヌクレオチド配列を表す。このような制御配列の性質は、宿主生物に応じて異なり得る。ある実施形態によれば、原核生物に対する制御配列には、プロモーター、リボソーム結合部位及び転写終結配列が含まれ得る。ある実施形態によれば、真核生物に対する制御配列には、プロモーター、一以上のエンハンサー及び転写終結配列が含まれ得る。ある実施形態において、「制御配列」は、リーダー配列及び／又は融合対配列を含むことができる。

【００５４】

本明細書において使用される「ポリヌクレオチド」という用語は、少なくとも１０塩基長のヌクレオチドのポリマー形態を意味する。ある実施形態において、前記塩基は、リボヌクレオチド若しくはデオキシリボヌクレオチド、又は何れかの種類のヌクレオチドの修飾された形態であり得る。本用語には、ＤＮＡの一本鎖形態と二本鎖形態とが含まれる。

【００５５】

本明細書において使用される「オリゴヌクレオチド」という用語には、天然に存在するヌクレオチド、並びに天然に存在するオリゴヌクレオチド連結によって、及び／又は天然

に存在しないオリゴヌクレオチド連結によって互いに連結された修飾ヌクレオチドが含まれる。オリゴヌクレオチドは、一般的に、２００塩基以下の長さを含むポリヌクレオチドサブセットである。ある実施形態において、オリゴヌクレオチドの長さは、１０から６０塩基である。ある実施形態において、オリゴヌクレオチドの長さは、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９又は２０ないし４０塩基である。例えば、遺伝子変異体の構築に使用するためのオリゴヌクレオチドは、一本鎖又は二本鎖であり得る。オリゴヌクレオチドは、センスオリゴヌクレオチド又はアンチセンスオリゴヌクレオチドであり得る。

【００５６】

「天然に存在するヌクレオチド」という用語には、デオキシリボヌクレオチド及びリボヌクレオチドが含まれる。「修飾されたヌクレオチド」という用語には、修飾又は置換された糖類などを有するヌクレオチドが含まれる。「オリゴヌクレオチド連結」という用語には、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホロセレノエート、ホスホロジセレノエート、ホスホロアニロチオエート（ｐｈｏｓｐｈｏｒｏａｎｉｌｏｔｈｉｏａｔｅ）、ホスホルアニラデート（ｐｈｏｓｈｏｒａｎｉｌａｄａｔｅ）、ホスホロアミデートなどのオリゴヌクレオチド連結が含まれる。例えば、「ＬａＰｌａｎｃｈｅ ｅｔ ａｌ．Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１４：９０８１（１９８６）；Ｓｔｅｃ ｅｔ ａｌ．Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．１０６：６０７７（１９８４）；Ｓｔｅｉｎ ｅｔ ａｌ．Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１６：３２０９（１９８８）；Ｚｏｎ ｅｔ ａｌ．Ａｎｔｉ－Ｃａｎｃｅｒ Ｄｒｕｇ Ｄｅｓｉｇｎ ６：５３９（１９９１）；Ｚｏｎ ｅｔ ａｌ．Ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ ａｎｄ Ａｎａｌｏｇｕｅｓ：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ，ｐｐ．８７－１０８（Ｆ．Ｅｃｋｓｔｅｉｎ，Ｅｄ．，Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｏｘｆｏｒｄ Ｅｎｇｌａｎｄ（１９９１））；Ｓｔｅｃ ｅｔ ａｌ．Ｕ．Ｓ．Ｐａｔ．Ｎｏ．５，１５１，５１０；Ｕｈｌｍａｎｎ ａｎｄ Ｐｅｙｍａｎ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｒｅｖｉｅｗｓ ９０：５４３（１９９０）」を参照されたい（これらの開示内容は、参照により、いかなる目的のためにも、本明細書に組み込まれる。）。ある種の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、検出用の標識を含むことができる。

【００５７】

関連するポリペプチドの同一性及び類似性は、公知の方法によって、容易に算出することができる。このような方法には、「Ｃｏｍｐｕｔａｔｉｏｎａｌ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｌｅｓｋ，Ａ．Ｍ．，ｅｄ．，Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９８８）；Ｂｉｏｃｏｍｐｕｔｉｎｇ：Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ ａｎｄ Ｇｅｎｏｍｅ Ｐｒｏｊｅｃｔｓ，Ｓｍｉｔｈ，Ｄ．Ｗ．，ｅｄ．，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９９３）；Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ａｎａｌｙｓｉｓ ｏｆ Ｓｅｑｕｅｎｃｅ Ｄａｔａ，Ｐａｒｔ １，Ｇｒｉｆｆｉｎ，Ａ．Ｍ．，ａｎｄ Ｇｒｉｆｆｉｎ，Ｈ．Ｇ．，ｅｄｓ．，Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ Ｊｅｒｓｅｙ（１９９４）；Ｓｅｑｕｅｎｃｅ Ａｎａｌｙｓｉｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，ｖｏｎ Ｈｅｉｎｊｅ，Ｇ．，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ（１９８７）；Ｓｅｑｕｅｎｃｅ Ａｎａｌｙｓｉｓ Ｐｒｉｍｅｒ，Ｇｒｉｂｓｋｏｖ，Ｍ．ａｎｄ Ｄｅｖｅｒｅｕｘ，Ｊ．，ｅｄｓ．，Ｍ．Ｓｔｏｃｋｔｏｎ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９９１）；ａｎｄ Ｃａｒｉｌｌｏ ｅｔ ａｌ．，ＳＩＡＭ Ｊ．Ａｐｐｌｉｅｄ Ｍａｔｈ．，４８：１０７３（１９８８）」に記載されている方法が含まれるが、これらに限定されるものではない。

【００５８】

同一性を決定するための方法には、検査される配列間の一致を最大にするように設計されているものがある。同一性を決定するための方法は、公に入手可能なコンピュータプログラムに記載されている。２つの配列間の同一性を決定するためのコンピュータプログラ

ム法には、ＧＡＰ（Ｄｅｖｅｒｅｕｘ ｅｔ ａｌ．， Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄ．Ｒｅｓ．，１２：３８７（１９８４）；Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ｇｒｏｕｐ，Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ，Ｍａｄｉｓｏｎ，Ｗｌ，ＢＬＡＳＴＰ，ＢＬＡＳＴＮ，ａｎｄ ＦＡＳＴＡ（Ａｌｔｓｃｈｕｌ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２１５：４０３－４１０（１９９０））を含む、ＧＣＧプログラムパッケージが含まれるが、これに限定されるものではない。ＢＬＡＳＴＸプログラムは、全米バイオテクノロジー情報センター（ＮＣＢＩ）及び他の入手源から公に入手することができる（ＢＬＡＳＴ Ｍａｎｕａｌ，Ａｌｔｓｃｈｕｌ ｅｔ ａｌ．ＮＣＢ／ＮＬＭ／ＮＩＨ Ｂｅｔｈｅｓｄａ，ＭＤ ２０８９４；Ａｌｔｓｃｈｕｌ ｅｔ ａｌ．，ｓｕｐｒａ（１９９０））。周知のＳｍｉｔｈ Ｗａｔｅｒｍａｎアルゴリズムも、同一性を決定するために使用することができる。

【００５９】

２つのアミノ酸配列を並置するための、ある種のアラインメントスキームは、２つの配列の短い領域のみの一致をもたらす場合があり、２つの完全長配列間に有意な関係が存在しなくても、並置されたこの小領域が極めて高い配列同一性を有する場合がある。従って、ある実施形態において、選択されたアライメント法（ＧＡＰプログラム）は、標的ポリペプチドの少なくとも連続する５０アミノ酸にわたるアラインメントをもたらすであろう。

【００６０】

例えば、コンピュータアルゴリズムＧＡＰ（Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ｇｒｏｕｐ，Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ，Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ）を用いて、パーセント配列同一性を決定すべき２つのポリペプチドが、それぞれのアミノ酸の最適なマッチングを得るために並置される（アルゴリズムによって決定される、「マッチしたスパン」）。ある実施形態において、ギャップ・オープニング・ペナルティ（平均ダイアゴナルの３倍として計算される；「平均ダイアゴナル」とは、使用されている比較マトリックスのダイアゴナルの平均である。；「ダイアゴナル」とは、ある比較マトリックスによって、完全なアミノ酸一致のそれぞれに対して割り当てられるスコア又は数である。）及びギャップ伸長ペナルティ（通常、ギャップ・オープニング・ペナルティの１／１０倍である。）並びにＰＡＭ２５０又はＢＬＯＳＵＭ ６２などの比較マトリックスが、アルゴリズムと併せて使用される。ある実施形態において、標準的な比較マトリックス（ＰＡＭ ２５０比較マトリックスについては、「Ｄａｙｈｏｆｆ ｅｔ ａｌ．，Ａｔｌａｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｅｑｕｅｎｃｅ ａｎｄ Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ，５（３）（１９７８）を参照。」；ＢＬＯＳＵＭ ６２比較マトリックスについては、「Ｈｅｎｉｋｏｆｆ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ ＵＳＡ，８９：１０９１５－１０９１９（１９９２）」を参照。）も、アルゴリズムによって使用される。

【００６１】

ある実施形態において、ポリペプチド配列比較に対するパラメータには、以下のものが含まれる：

アルゴリズム：Ｎｅｅｄｌｅｍａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，４８：４４３－４５３（１９７０）；

比較マトリックス：上記Ｈｅｎｉｋｏｆｆら（１９９２）から得られるＢＬＯＳＵＭ６２；

ギャップペナルティ：１２

ギャップ長ペナルティ：４

類似性の閾値：０。

【００６２】

ＧＡＰプログラムは、上記パラメータを用いると有用であり得る。ある実施形態において、先述されたパラメータは、（エンドギャップに対するペナルティなしに）ＧＡＰアルゴリズムを用いたポリペプチド比較に対する初期設定のパラメータである。

【００６３】
ある実施形態において、特異的結合因子は、配列番号２５、２７、２９、３１、３３、３５、３７、３９、４１及び４３から選択されるアミノ酸配列と少なくとも９０％同一のアミノ酸配列を含む可変領域を含む重鎖を含む。ある実施形態において、特異的結合因子は、配列番号２５、２７、２９、３１、３３、３５、３７、３９、４１及び４３から選択されるアミノ酸配列と少なくとも９５％同一のアミノ酸配列を含む可変領域を含む重鎖を含む。ある実施形態において、特異的結合因子は、配列番号２５、２７、２９、３１、３３、３５、３７、３９、４１及び４３から選択されるアミノ酸配列と少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む可変領域を含む重鎖を含む。

【００６４】
ある実施形態において、特異的結合因子は、配列番号２４、２６、２８、３０、３２、３４、３６、３８、４０及び４２から選択されるアミノ酸配列と少なくとも９０％同一のアミノ酸配列を含む可変領域を含む軽鎖を含む。ある実施形態において、特異的結合因子は、配列番号２４、２６、２８、３０、３２、３４、３６、３８、４０及び４２から選択されるアミノ酸配列と少なくとも９５％同一のアミノ酸配列を含む可変領域を含む軽鎖を含む。ある実施形態において、特異的結合因子は、配列番号２４、２６、２８、３０、３２、３４、３６、３８、４０及び４２から選択されるアミノ酸配列と少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む可変領域を含む軽鎖を含む。

【００６５】
本明細書において使用される、２０の慣用アミノ酸及びそれらの略号は、慣用的な用法に従う。「Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ－－Ａ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ（２ｎｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ, Ｅ．Ｓ．Ｇｏｌｕｂ ａｎｄ Ｄ．Ｒ．Ｇｒｅｎ, Ｅｄｓ．, Ｓｉｎａｕｅｒ Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ, Ｓｕｎｄｅｒｌａｎｄ, Ｍａｓｓ．（１９９１））」を参照されたい（参照により、いかなる目的のためにも、本明細書に組み込まれる。）。２０の慣用アミノ酸、α－、α－二置換されたアミノ酸などの非天然アミノ酸、Ｎ－アルキルアミノ酸、乳酸及びその他の非慣用アミノ酸の立体異性体（例えば、Ｄ－アミノ酸）も、本発明のポリペプチドに対する適切な成分であり得る。非慣用アミノ酸の例には、４－ヒドロキシプロリン、γ－カルボキシグルタミン酸、ε－Ｎ，Ｎ，Ｎ－トリメチルリジン、ε－Ｎ－アセチルリジン、Ｏ－ホスホセリン、Ｎ－アセチルセリン、Ｎ－ホルミルメチオニン、３－メチルヒスチジン、５－ヒドロキシリジン、σ－Ｎ－メチルアルギニン並びに他の類似のアミノ酸及びイミノ酸（例えば、４－ヒドロキシプロリン）が含まれる。本明細書において使用されるポリペプチドの表記法では、標準的な用法と慣習に従って、左手方向がアミノ末端方向であり、右手方向がカルボキシ末端方向である。

【００６６】
同様に、別段の記載がなければ、一本鎖ポリヌクレオチド配列の左手末端は５’末端である。二本鎖ポリヌクレオチド配列の左手方向は、５’方向と称される。新生ＲＮＡ転写物の、５’から３’への付加の方向は、転写方向と称される。ＲＮＡと同じ配列を有し、ＲＮＡ転写物の５’末端に対して５’である、ＤＮＡ鎖上の配列領域は、「上流配列」と称される。ＲＮＡと同じ配列を有し、ＲＮＡ転写物の３’末端に対して３’である、ＤＮＡ鎖上の配列領域は、「下流配列」と称される。

【００６７】
保存的なアミノ酸置換は、天然に存在しないアミノ酸残基を包含することができ、典型的には、生物系内での合成によるのではなく、化学ペプチド合成によって組み込まれる。これらには、ペプチド模倣体、及びアミノ酸部分の他の逆転又は逆位された形態が含まれる。

【００６８】
天然に存在する残基は、
１）疎水性：ノルロイシン、Ｍｅｔ、Ａｌａ、Ｖａｌ、Ｌｅｕ、Ｉｌｅ；
２）中性親水性：Ｃｙｓ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、Ａｓｎ、Ｇｌｎ；
３）酸性：Ａｓｐ、Ｇｌｕ；

４）塩基性：Ｈｉｓ、Ｌｙｓ、Ａｒｇ；
５）鎖の配向性に影響を与える残基：Ｇｌｙ、Ｐｒｏ；及び
６）芳香族：Ｔｒｐ、Ｔｙｒ、Ｐｈｅ
という一般的な側鎖特性に基づいて、クラスに分類することができる。

【００６９】
例えば、非保存的置換は、これらのクラスの１つの要素を、別のクラスから得られる要素と交換することが含まれ得る。このような置換された残基は、非ヒト抗体と相同である、ヒト抗体の領域中に、又は該分子の非相同領域中に導入し得る。

【００７０】
このような変化を施す際には、ある実施形態によれば、アミノ酸の疎水性親水性指標を考慮し得る。その疎水性及び電荷特性に基づいて、各アミノ酸には、疎水性親水性指標が割り当てられている。それらは、イソロイシン（＋４．５）；バリン（＋４．２）；ロイシン（＋３．８）；フェニルアラニン（＋２．８）；システイン／シスチン（＋２．５）；メチオニン（＋１．９）；アラニン（＋１．８）；グリシン（－０．４）；スレオニン（－０．７）；セリン（－０．８）；トリプトファン（－０．９）；チロシン（－１．３）；プロリン（－１．６）；ヒスチジン（－３．２）；グルタミン酸（－３．５）；グルタミン（－３．５）；アスパラギン酸（－３．５）；アスパラギン（－３．５）；リジン（－３．９）；及びアルギニン（－４．５）である。

【００７１】
タンパク質に対して相互作用的生物機能を付与する上での、疎水性親水性アミノ酸指標の重要性は本分野において理解されている。Ｋｙｔｅ　ｅｔ　ａｌ．，　Ｊ．　Ｍｏｌ．　Ｂｉｏｌ．，　１５７：１０５－１３１（１９８２）。ある種のアミノ酸は、類似の疎水性親水性指標又はスコアを有する他のアミノ酸と置換されても、なお、類似の生物活性を保持し得ることが知られている。疎水性親水性指標に基づいて変化を施す際に、ある実施形態では、その疎水性親水性指標が±２以内であるアミノ酸の置換が含まれる。ある実施形態では、±１以内であるものが含まれ、ある実施形態では、±０．５以内であるものが含まれる。

【００７２】
特に、これにより作製された生物学的に機能的なタンパク質又はペプチドが、本事例のように、免疫学的な実施形態に使用されることが意図されている場合には、類似のアミノ酸の置換は、親水性に基づいて有効に為し得ることも本分野で理解されている。ある実施形態において、その隣接アミノ酸の親水性によって支配されている、タンパク質の最大局所平均親水性は、その免疫原性及び抗原性と、すなわち、タンパク質の生物学的特性と相関する。

【００７３】
これらのアミノ酸残基には、以下の親水性値が割り振られている。アルギニン（＋３．０）；リジン（＋３．０）；アスパラギン酸（＋３．０±１）；グルタミン酸（＋３．０±１）；セリン（＋０．３）；アスパラギン（＋０．２）；グルタミン（＋０．２）；グリシン（０）；スレオニン（－０．４）；プロリン（－０．５±１）；アラニン（－０．５）；ヒスチジン（－０．５）；システイン（－１．０）；メチオニン（－１．３）；バリン（－１．５）；ロイシン（－１．８）；イソロイシン（－１．８）；チロシン（－２．３）；フェニルアラニン（－２．５）及びトリプトファン（－３．４）。類似の親水性値に基づいて変化を施す際に、ある実施形態では、その親水性値が±２以内のアミノ酸の置換が含まれ、ある実施形態では、±１以内のものが含まれ、ある実施形態では、±０．５以内のものが含まれる。一次アミノ酸配列から、親水性に基づいて、エピトープを同定することもできる。これらの領域は、「エピトープコア領域」とも称される。

【００７４】
典型的なアミノ酸置換が表１に示されている。

【００７５】

【表１】

表１
アミノ酸置換

元の残基	典型的な置換	好ましい置換
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, ﾉﾙﾛｲｼﾝ	Leu
Leu	ﾉﾙﾛｲｼﾝ, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, 1,4 ｼﾞｱﾐﾉ酪酸, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, ﾉﾙﾛｲｼﾝ	Leu

【００７６】

当業者であれば、本明細書に記載されているように、周知の技術を用いて、ポリペプチドの適切なバリアントを決定することができるであろう。ある実施形態において、当業者は、活性にとって重要でないと考えられている領域を標的とすることによって、活性を破壊することなく変化することができる、分子の適切な領域を同定し得る。ある実施形態において、類似のポリペプチド間で保存されている、分子の残基及び部分を同定することができる。ある実施形態では、生物活性にとって、又は構造にとって重要であり得る領域でさえ、生物活性を破壊することなく、又はポリペプチド構造に悪影響を与えることなく、

保存的アミノ酸置換を施すことができる。

【００７７】

さらに、当業者は、活性又は構造にとって重要である、類似のポリペプチド中の残基を同定する、構造機能研究を調査することができる。このような比較の見地から、類似のタンパク質において、活性又は構造にとって重要であるアミノ酸に対応する、あるタンパク質中のアミノ酸残基の重要性を予測することができる。当業者であれば、このような予測された重要なアミノ酸残基に対して、化学的に類似するアミノ酸置換を選択し得る。

【００７８】

当業者であれば、類似のポリペプチド中の構造に関して、三次元構造及びアミノ酸配列を分析することも可能である。このような情報の見地から、当業者は、その三次元構造に関して、抗体のアミノ酸残基のアラインメントを予測し得る。ある実施形態において、タンパク質の表面上に存在すると予測されるアミノ酸残基は他の分子との重要な相互作用に関与し得るので、当業者は、タンパク質の表面上に存在すると予測されるアミノ酸残基に対して大幅な変化を与えないように選択し得る。さらに、当業者であれば、各所望のアミノ酸残基に単一アミノ酸置換を含有する試験バリアントを作製することもできる。次いで、このバリアントは、当業者に公知の活性アッセイを用いてスクリーニングすることができる。このようなバリアントは、適切なバリアントについての情報を集めるために使用し得る。例えば、あるアミノ酸残基への変化が、損なわれた活性、望ましくない程度に減少した活性又は不適切な活性をもたらすことを発見したのであれば、このような変化を有するバリアントは回避され得る。換言すれば、このような日常的な実験から集められた情報に基づいて、当業者は、単独で、又は他の変異と組み合わせて、さらなる置換を回避すべきアミノ酸を容易に決定することができる。

【００７９】

多数の科学的刊行物が二次構造の予測を取り扱っている。「Ｍｏｕｌｔ Ｊ．, Ｃｕｒｒ. Ｏｐ. ｉｎ Ｂｉｏｔｅｃｈ., ７（４）：４２２－４２７（１９９６）, Ｃｈｏｕ ｅｔ ａｌ., Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ, １３（２）：２２２－２４５（１９７４）；Ｃｈｏｕ ｅｔ ａｌ., Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ, １１３（２）：２１１－２２２（１９７４）；Ｃｈｏｕ ｅｔ ａｌ., Ａｄｖ. Ｅｎｚｙｍｏｌ. Ｒｅｌａｔ. Ａｒｅａｓ Ｍｏｌ. Ｂｉｏｌ., ４７：４５－１４８（１９７８）；Ｃｈｏｕ ｅｔ ａｌ., Ａｎｎ. Ｒｅｖ. Ｂｉｏｃｈｅｍ., ４７：２５１－２７６ ａｎｄ Ｃｈｏｕ ｅｔ ａｌ., Ｂｉｏｐｈｙｓ. Ｊ., ２６：３６７－３８４（１９７９）」を参照されたい。さらに、現在では、二次構造の予測を補助するために、コンピュータプログラムを使用することができる。二次構造を予測する一つの方法は、相同性モデリングに基づいている。例えば、３０％を超える配列同一性又は４０％を超える類似性を有する２つのポリペプチド又はタンパク質は、しばしば、類似の構造的トポロジーを有する。近年のタンパク質構造データベース（ＰＤＢ）の充実は、ポリペプチド又はタンパク質の構造内に生じ得る折り畳みの数など、二次構造の予測可能性を向上させた。「Ｈｏｌｍ ｅｔ ａｌ., Ｎｕｃｌ. Ａｃｉｄ. Ｒｅｓ., ２７（１）：２４４－２４７（１９９９）」を参照されたい。所定のポリペプチド又はタンパク質中には、限られた数の折り畳みが存在すること、及び、一定以上の数の構造が決定されると、構造予測は劇的に正確さが増し得ることが、示唆されている（Ｂｒｅｎｎｅｒ ｅｔ ａｌ., Ｃｕｒｒ. Ｏｐ. Ｓｔｒｕｃｔ. Ｂｉｏｌ., ７（３）：３６９－３７６（１９９７））。

【００８０】

二次構造を予測する、さらなる方法には、「スレッディング」（Ｊｏｎｅｓ, Ｄ., Ｃｕｒｒ. Ｏｐｉｎ. Ｓｔｒｕｃｔ. Ｂｉｏｌ., ７（３）：３７７－８７（１９９７）；Ｓｉｐｐｌ ｅｔ ａｌ., Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ, ４（１）：１５－１９（１９９６））、「プロファイル分析」（Ｂｏｗｉｅ ｅｔ ａｌ., Ｓｃｉｅｎｃｅ, ２５３：１６４－１７０（１９９１）；Ｇｒｉｂｓｋｏｖ ｅｔ ａｌ., Ｍｅｔｈ. Ｅｎｚｙｍ., １８３：１４６－１５９（１９９０）；Ｇｒｉｂｓｋｏｖ

ｅｔ ａｌ．， Ｐｒｏｃ． Ｎａｔ． Ａｃａｄ． Ｓｃｉ．， ８４（１３）：４３５５－４３５８（１９８７））、及び「進化的連関」（Ｈｏｌｍ， ｓｕｐｒａ（１９９９）， ａｎｄ Ｂｒｅｎｎｅｒ， ｓｕｐｒａ（１９９７）を参照。）が含まれる。

【００８１】

ある実施形態において、特異的結合因子バリアントには、親ポリペプチドのアミノ酸配列に比べて、グリコシル化部位の数及び／又は種類が変化している、グリコシル化バリアントが含まれる。ある実施形態において、タンパク質バリアントは、原型タンパク質より多い又は少ない数のＮ結合型グリコシル化部位を含む。Ｎ結合型グリコシル化部位は、配列：Ａｓｎ－Ｘ－Ｓｅｒ又はＡｓｎ－Ｘ－Ｔｈｒ（Ｘとして表記されるアミノ酸残基は、プロリンを除く任意のアミノ酸残基であり得る。）を特徴とする。この配列を作製するためのアミノ酸残基の置換は、Ｎ結合型炭水化物鎖を付加し得る新しい部位を与える。あるいは、この配列を削除する置換は、既存のＮ結合型炭水化物鎖を除去するであろう。一又は複数のＮ結合型グリコシル化部位（典型的には、天然に存在するもの）が除去され、一又は複数の新たなＮ結合型部位が作出されている、Ｎ結合型炭水化物鎖の再配置も提供される。その他の好ましい抗体バリアントには、親アミノ酸配列と比べて、一または複数のシステイン残基が欠失され、又は別のアミノ酸（例えば、セリン）に置換されている、システインバリアントが含まれる。システインバリアントは、不溶性の封入体の単離後のように、抗体が生物学的に活性な高次構造に再折り畳みされなければならないときに、有用であり得る。システインバリアントは、一般的に、原型タンパク質に比べて少ないシステイン残基を有しており、典型的には、対を形成していないシステインから生じる相互作用を最小限に抑えるために、偶数を有する。

【００８２】

ある実施形態によれば、アミノ酸置換は、（１）タンパク質分解の受け易さを減少させる、（２）酸化され易さを減少させる、（３）タンパク質複合体を形成するための結合親和性を変化させる、（４）結合親和性を変化させる、及び／又は（４）このようなポリペプチドに対して、他の物理化学的若しくは機能的特性を付与し、若しくは修飾するアミノ酸置換である。ある実施形態によれば、単一又は複数のアミノ酸置換（ある実施形態では、保存的アミノ酸置換）は、天然に存在する配列中に（ある実施形態では、分子間接触を形成するドメインの外側にある、ポリペプチド部分中に）行い得る。ある実施形態において、保存的アミノ酸置換は、典型的には、親配列の構造的特性を実質的に変化し得ない（例えば、置換アミノ酸は、親配列中に存在するヘリックスを切断する傾向が存在すべきでなく、又は親配列を特徴付ける他の種類の二次構造を破壊する傾向が存在すべきない。）。本分野で認知されているポリペプチド二次構造及び三次構造の例は、「Ｐｒｏｔｅｉｎｓ， Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅｓ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ（Ｃｒｅｉｇｈｔｏｎ， Ｅｄ．， Ｗ． Ｈ． Ｆｒｅｅｍａｎ ａｎｄ Ｃｏｍｐａｎｙ， Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９８４））；Ｉｎｔｒｏｄｕｃｔｉｏｎ ｔｏ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ（Ｃ． Ｂｒａｎｄｅｎ ａｎｄ Ｊ． Ｔｏｏｚｅ， ｅｄｓ．， Ｇａｒｌａｎｄ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ， Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ， Ｎ． Ｙ．（１９９１））；ａｎｄ Ｔｈｏｒｎｔｏｎ ｅｔ ａｔ． Ｎａｔｕｒｅ ３５４：１０５（１９９１）」（それぞれ、参照により、本明細書に組み込まれる。）に記載されている。

【００８３】

「誘導体」という用語は、アミノ酸の挿入、欠失又は置換以外の化学的修飾を含む分子を表す。ある実施形態において、誘導体は、ポリマー、脂質又は他の有機若しくは無機部分との化学的結合などの（これらに限定されない。）、共有結合修飾を含む。ある実施形態において、化学的に修飾された特異的結合因子は、化学的に修飾されていない特異的結合因子より長い循環半減期を有し得る。ある実施形態において、化学的に修飾された特異的結合因子は、所望の細胞、組織及び／又は臓器に対して、向上した標的誘導能を有し得る。ある実施形態において、誘導体特異的結合因子は、ポリエチレングリコール、ポリオキシエチレングリコール又はポリプロピレングリコールなどの（これらに限定されない。

）、一又は複数の水溶性ポリマー結合を含むように共有結合で修飾される。例えば、米国特許第４，６４０，８３５号、第４，４９６，６８９号、第４，３０１，１４４号、第４，６７０，４１７号、第４，７９１，１９２号及び第４，１７９，３３７号を参照されたい。ある実施形態において、誘導体特異的結合因子は、モノメトキシ－ポリエチレングリコール、デキストラン、セルロース又は炭水化物を基礎としたその他のポリマー、ポリ－（Ｎ－ビニルピロリドン）－ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシド／エチレンオキシド共重合体、ポリオキシエチル化されたポリオール（例えば、グリセロール）及びポリビニルアルコール並びにこのようなポリマーの混合物などを含む（これらに限定されない。）、一又は複数のポリマーを含む。

【００８４】

ある実施形態において、誘導体は、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）サブユニットで共有結合的に修飾される。ある実施形態において、一又は複数の水溶性ポリマーは、誘導体の一又は複数の特異的な位置で（例えば、アミノ末端で）結合されている。ある実施形態において、一又は複数の水溶性ポリマーは、誘導体の一又は複数の側鎖に無作為に付着されている。ある実施形態において、特異的結合因子に対する治療的能力を向上させるために、ＰＥＧが使用される。ある実施形態において、ヒト化抗体に対する治療的能力を向上させるために、ＰＥＧが使用される。このような方法の幾つかは、例えば、米国特許第６，１３３，４２６号（参照により、いかなる目的のためにも本明細書に組み込まれる。）中に論述されている。

【００８５】

本明細書において使用される「ポリペプチド断片」という用語は、アミノ酸末端及び／又はカルボキシ末端の欠失を有するポリペプチドを表す。ある実施形態において、断片は、少なくとも５から４７８アミノ酸の長さである。ある実施形態において、断片は、少なくとも５、６、８、１０、１４、２０、５０，７０、１００、１５０、２００、２５０、３００、３５０、４００又は４５０アミノ酸長であることが理解されるであろう。

【００８６】

ペプチド類縁体は、一般に、テンプレートペプチドの特性と類似の特性を有する非ペプチド薬として、製薬産業で使用される。この種の非ペプチド化合物は、「ペプチド模倣体」と名づけられている。「Ｆａｕｃｈｅｒｅ，Ｊ．Ａｄｖ．Ｄｒｕｇ Ｒｅｓ．１５：２９（１９８６）；Ｖｅｂｅｒ ａｎｄ Ｆｒｅｉｄｉｎｇｅｒ ＴＩＮＳ ｐ．３９２（１９８５）；ａｎｄ Ｅｖａｎｓ ｅｔ ａｌ．Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．３０：１２２９（１９８７）」（参照により、いかなる目的のためにも、本明細書に組み込まれる。）このような化合物は、しばしば、コンピュータ化された分子モデリングの助けを借りて開発される。治療的に有用なペプチドと構造的に類似するペプチド模倣体は、類似の治療効果又は予防効果を生じさせるために使用し得る。一般的に、ペプチド模倣体は、ヒト抗体などの模範ポリペプチド（すなわち、生化学的特性又は薬理学的活性を有するポリペプチド）と構造的に類似するが、本分野で周知の方法によって、－－ＣＨ$_2$ＮＨ－－、－－ＣＨ$_2$Ｓ－－、－－ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－－、－－ＣＨ＝ＣＨ－（シス及びトランス）、－－ＣＯＣＨ$_2$－－、－－ＣＨ（ＯＨ）ＣＨ$_2$－－及び－－ＣＨ$_2$ＳＯ－－から選択される結合によって必要に応じて置換された一又は複数のペプチド結合を有する。コンセンサス配列の一又は複数のアミノ酸を同種のＤアミノ酸で体系的に置換すること（例えば、Ｌ－リジンに代えてＤ－リジン）は、一部の実施形態において、より安定なペプチドを作製するために使用し得る。さらに、コンセンサス配列又は実質的に同一なコンセンサス配列変異を含む拘束されたペプチドは、本分野で公知の方法によって、例えば、ペプチドを環状化する分子内ジスルフィド架橋を形成することができる内部システイン残基を付加することによって、作製され得る（Ｒｉｚｏ ａｎｄ Ｇｉｅｒａｓｃｈ Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．６１：３８７（１９９２）、参照により、いかなる目的のためにも、本明細書に組み込まれる。）。

【００８７】

「抗体」又は「抗体ペプチド」という用語は、原型の抗体、又は特異的結合に対して原

型の抗体と競合する、原型の抗体の結合断片を表す。ある実施形態において、結合断片は、組み換えＤＮＡ技術によって産生される。ある実施形態において、結合断片は、原型抗体の酵素的又は化学的切断によって産生される。結合断片には、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$、Ｆｖ及び一本鎖抗体が含まれるが、これらに限定されない。

【００８８】

「重鎖」という用語には、標的に対する特異性を付与するのに十分な可変領域配列を有する任意の配列が含まれる。「軽鎖」という用語には、標的に対する特異性を付与するのに十分な可変領域配列を有する任意の配列が含まれる。完全長の重鎖には、可変領域ドメインV_H、並びに３つの定常領域ドメインC_H1、C_H2及びC_H3が含まれる。V_Hドメインは、ポリペプチドのアミノ末端に存在し、C_H3ドメインはカルボキシ末端に存在する。本明細書において使用される「重鎖」という用語は、完全長の重鎖とそれらの断片を包含する。完全長の軽鎖には、可変領域ドメインV_L、定常領域ドメインC_Lが含まれる。重鎖と同様、軽鎖の可変領域ドメインは、ポリペプチドのアミノ末端に存在する。本明細書において使用される「軽鎖」という用語は、完全長の軽鎖とそれらの断片を包含する。Ｆａｂ断片は、１つの軽鎖と１つの重鎖の、C_H1及び可変領域とから構成される。Ｆａｂ分子の重鎖は、別の重鎖分子とジスルフィド結合を形成することができない。Ｆａｂ’断片は、２つの重鎖の間で鎖間ジスルフィド結合が形成されて、Ｆ（ａｂ’）$_2$分子を形成できるように、１つの軽鎖と、C_H1及びC_H2ドメインの間に、定常領域の多くを含有する１つの重鎖とを含有する。Ｆｖ領域は、重鎖と軽鎖の両方から得られる可変領域を含むが、定常領域を欠く。一本鎖抗体は、重鎖と軽鎖可変領域が、柔軟なリンカーによって接続されて、抗原結合領域を形成する単一ポリペプチド鎖を形成している、Ｆｖ分子である。一本鎖抗体は、例えば、ＷＯ　８８／０１６４９及び米国特許第４，９４６，７７８号及び第５，２６０，２０３号に詳しく論述されている。

【００８９】

「可変領域」又は「可変ドメイン」という用語は、重鎖中のアミノ末端の約１２０から１３０アミノ酸と、軽鎖中の約１１０から１１０アミノ末端アミノ酸とを典型的に含む、抗体の軽鎖及び／又は重鎖の部分を表す。ある実施形態において、異なる抗体の可変領域は、同じ種の抗体の間でさえ、アミノ酸配列が大幅に異なる。抗体の可変領域は、典型的には、ある抗体の標的に対する特異性を決定する。

【００９０】

「免疫学的に機能的な免疫グロブリン断片」という用語は、免疫グロブリン重鎖の可変ドメインと免疫グロブリン軽鎖とを少なくとも含むポリペプチド断片を表す。ある実施形態において、免疫学的に機能的な免疫グロブリン断片は、リガンドに結合し、その受容体へのリガンドの結合を妨害し、それにより、受容体へのリガンド結合から生じる生物学的応答を妨げることができる。ある実施形態において、免疫学的に機能的な免疫グロブリン断片は、受容体に結合し、その受容体へのリガンドの結合を妨害し、それにより、受容体へのリガンド結合から生じる生物学的応答を妨げることができる。ある実施形態において、免疫学的に機能的な免疫グロブリン断片は、受容体を結合し、その受容体を活性化又は不活化することができる。

【００９１】

「多重特異性」抗体又は「多機能性」抗体以外の二価抗体は、ある実施形態において、典型的には、その結合部位の各々が同一であると理解される。

【００９２】

過剰の特異的結合因子が対受容体に結合された受容体の量を（インビトロ競合結合アッセイで測定した場合に）少なくとも約２０％、４０％、６０％、８０％、８５％以上減少させるときに、特異的結合因子は、受容体へのリガンドの接着を実質的に阻害する。

【００９３】

「標的」という用語は、特異的結合因子によって結合されることができる、分子又は分子の部分を表す。ある実施形態において、標的は、一又は複数のエピトープを有し得る。ある実施形態において、標的は抗原である。

【００９４】
「エピトープ」という用語には、免疫グロブリン又はＴ細胞受容体に特異的な結合をすることができる、任意のポリペプチド決定基が含まれる。ある実施形態において、エピトープ決定基は、例えばアミノ酸、糖側鎖、ホスホリル又はスルホニルなどの分子の、化学的に活性な表面配置を含み、ある実施形態において、特異的な三次元構造特性及び／又は特異的な電荷特性を有し得る。エピトープとは、抗体によって結合される、抗原の領域である。ある実施形態では、タンパク質及び／又は高分子の複雑な混合物中に存在するその標的抗原を、抗体が優先的に認識するときに、抗体は抗原を特異的に結合すると称される。ある実施形態では、解離定数が１μＭ以下であるときに、ある実施形態では、解離定数が１００ｎＭ以下であるときに、ある実施形態では、解離定数が１０ｎＭ以下であるときに、抗体は抗原を特異的に結合すると称される。
【００９５】
本明細書において、「因子」という用語は、化学的化合物、化学的化合物の混合物、生物学的高分子又は生物由来物質から作製された抽出物を表記するために使用される。
【００９６】
本明細書において使用される、「標識」又は「標識された」という用語は、例えば、放射性標識されたアミノ酸を取り込ませることによって、又は印を付けたアビジン（例えば、光学的方法又は比色分析法によって検出することができる、蛍光マーカー又は酵素活性を含有するストレプトアビジン）によって検出することができるビオチン部分をポリペプチドに付着させることによって、検出可能なマーカーを取り込むことを表す。ある実施形態において、前記標識又はマーカーは、治療用とすることもできる。標識ポリペプチド及び糖タンパク質を標識する様々な方法が本分野において公知であり、使用することができる。ポリペプチド用の標識の例には、以下の放射性同位体又は放射性核種（例えば、３Ｈ、１４Ｃ、１５Ｎ、３５Ｓ、９０Ｙ、９９Ｔｃ、１１１Ｉｎ、１２５Ｉ、１３１Ｉ）、蛍光標識（例えば、ＦＩＴＣ、ローダミン、ランタニドリン光体）、酵素的標識（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ（β－ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ）、化学発光、ビオチニル基、二次レポーターによって認識される所定のポリペプチドエピトープ（例えば、ロイシンジッパー対配列、二次抗体に対する結合部位、金属結合ドメイン、エピトープタグ）が含まれるが、これらに限定されない。ある実施形態において、発生し得る立体的障害を減らすために、標識には、様々な長さのスペーサーアームが付着される。
【００９７】
本明細書において使用される「生物試料」という用語には、生物又は以前生物であったものから得られる任意の量の物質が含まれるが、これらに限定されない。このような生物には、ヒト、マウス、サル、ラット、ウサギ及びその他の動物が含まれるが、これらに限定されない。このような物質には、血液、血清、尿、細胞、臓器、組織、骨、骨髄、リンパ節及び皮膚が含まれるが、これらに限定されない。
【００９８】
「癌」という用語には、充実性腫瘍及び血液悪性腫瘍が含まれるが、これらに限定されない。典型的な癌には、乳癌、結腸直腸癌、胃癌、神経膠腫、頭頸部扁平上皮癌、遺伝性及び突発性乳頭状腎細胞癌、白血病、リンパ腫、リー－フラウメニ癌症候群、悪性胸膜中皮腫、悪性黒色腫、多発性骨髄腫、非小細胞肺癌、骨肉種、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、小細胞肺癌、滑膜肉腫、甲状腺癌及び膀胱の移行上皮癌が含まれるが、これらに限定されない。
【００９９】
「ＨＧＦ活性」という用語には、ＨＧＦの任意の生物学的効果が含まれる。ある実施形態において、ＨＧＦ活性は、Ｍｅｔ－ＨＧＦ活性である。ある実施形態において、ＨＧＦ活性は、Ｍｅｔ非依存性のＨＧＦ活性である。
【０１００】
「Ｍｅｔ－ＨＧＦシグナル伝達」という用語には、ＨＧＦのＭｅｔ受容体との相互作用

が含まれる。
【０１０１】
「Ｍｅｔ－ＨＧＦ活性」という用語には、Ｍｅｔ－ＨＧＦシグナル伝達から生じる任意の生物学的活性が含まれる。典型的な活性には、神経系誘導、肝再生、創傷治癒、成長、浸潤、形態分化、胎生発育、拡散、増殖、アポトーシス、細胞運動、転移、遊走、細胞接着、インテグリンクラスタリング、パキシリンのリン酸化、局所的接着の形成、及び異常なＭｅｔ－ＨＧＦシグナル伝達から生じる癌が含まれるが、これらに限定されない。
【０１０２】
「異常なＭｅｔ－ＨＧＦシグナル伝達」という用語には、本来シグナル伝達がこのような活性をもたらすときに、Ｍｅｔ－ＨＧＦシグナル伝達が何らかのＭｅｔ－ＨＧＦ活性を刺激できない任意の状況が含まれる。異常なＭｅｔ－ＨＧＦシグナル伝達には、Ｍｅｔ－ＨＧＦシグナル伝達が、正常なシグナル伝達とともに発生するはずのＭｅｔ－ＨＧＦ活性より小さなＭｅｔ－ＨＧＦ活性をもたらす任意の状況も含まれる。異常な活性には、Ｍｅｔ－ＨＧＦシグナル伝達が、正常なシグナル伝達とともに発生するはずのＭｅｔ－ＨＧＦ活性より大きなＭｅｔ－ＨＧＦ活性をもたらす任意の状況も含まれる。異常なＭｅｔ－ＨＧＦシグナル伝達は、例えば、ある種の癌をもたらすことができる。
【０１０３】
「Ｍｅｔ非依存性ＨＧＦ活性」という用語は、Ｍｅｔ受容体へのＨＧＦの結合に依存しない、ＨＧＦによって影響を受ける任意の生物活性を表す。このような活性には、ＨＧＦの他の受容体との相互作用によって影響を受ける生物活性及び他の経路（例えば、Ｒｏｎ又はｍｅｔ／ｒｏｎヘテロ二量体）を通じてＨＧＦによって影響を受ける生物活性が含まれるが、これらに限定されない。
【０１０４】
「異常なＨＧＦ活性」という用語は、ＨＧＦ活性が本来あるべき活性よりも高い又は低い、任意の状況を表す。ある状況において、異常なＨＧＦ活性は異常なＨＧＦシグナル伝達から生じる。ある状況において、異常なＨＧＦ活性は、本来あるべき濃度より高いＨＧＦの濃度から生じる。ある状況において、異常なＨＧＦ活性は、本来あるべき濃度より低いＨＧＦの濃度から生じる。
【０１０５】
本明細書において使用される「薬学的因子又は薬物」という用語は、患者に適切に投与されたときに、所望の治療効果を誘導することができる化学的化合物又は組成物を表す。
【０１０６】
本明細書において使用される「調節物質」という用語は、分子の活性又は機能を変化又は変更する化合物である。例えば、調節物質は、調節物質の不存在下で観察される活性又は機能の規模と比べて、分子のある活性又は機能の規模の増加又は減少を引き起こし得る。ある実施形態において、調節物質は阻害剤であり、分子の少なくとも一つの活性又は機能の規模を減少させる。分子の典型的な活性及び機能には、結合親和性、酵素活性及びシグナル伝達が含まれるが、これらに限定されない。典型的な阻害剤の例には、タンパク質、ペプチド、抗体、ペプチボディ（ｐｅｐｔｉｂｏｄｙ）、炭水化物又は小有機分子が含まれるが、これらに限定されるものではない。ペプチボディは、例えば、米国特許第６，６６０，８４３号（ＰＣＴ出願ＷＯ　０１／８３５２５に対応する。）に記載されている。
【０１０７】
本明細書において使用される「実質的に純粋な」とは、対象種が主要に存在する種であることを意味する（すなわち、モルベースでは、対象種が、組成物中の他の何れの各種より豊富である。）。ある実施形態において、実質的に精製された画分は、対象種が、存在する全ての高分子種の少なくとも約５０％（モルベースで）を含む組成物である。ある実施形態において、実質的に純粋な組成物は、組成物中に存在する全ての高分子種（ｍａｃｒｏｍｏｌａｒ　ｓｐｅｃｉｅｓ）の約８０％超、８５％超、９０％超、９５％超又は９９％超を含むであろう。ある実施形態において、対象種は、組成物が実質的に単一の高分

子種からなる、実質的な均一状態（慣用的な検出法によって、莢雑種が組成物中に検出できない。）に精製される。

【０１０８】

患者という用語には、ヒト及び動物対象が含まれる。

【０１０９】

典型的な幾つかの特異的結合因子

ある例において、ＨＧＦは、Ｍｅｔ受容体を結合して、Ｍｅｔのリン酸化を誘導する。ある例において、正常なＨＧＦによって誘導されたＭｅｔのリン酸化は、様々な細胞プロセスを制御する。ある例において、異常なＭｅｔ－ＨＧＦ活性は、多数の、ヒトの病状と相関する。例えば、ある例において、ＨＧＦ活性の過多は、ある種の癌と相関する。従って、ある例において、ＨＧＦ活性を調節することは治療的に有用である。ある実施形態においては、ＨＧＦ活性の量を異常に高いレベルから減少させるために、ＨＧＦに対する特異的な結合因子が使用される。ある実施形態において、ＨＧＦ活性を異常に高いレベルから減少させることは、腫瘍原性活性を減少させ、及び癌の重篤度を軽減する。ある実施形態によれば、ＨＧＦに対する特異的結合因子は癌を治療するために使用される。ある実施形態において、ＨＧＦに対する特異的結合因子は癌を予防するために使用される。

【０１１０】

ある実施形態において、ＨＧＦに対する特異的結合因子は、ＨＧＦ活性が正常である癌を治療するために使用される。このような癌では、例えば、ＨＧＦ活性を正常より低くなるまで減少させることは、治療的な効果を与え得る。

【０１１１】

ある実施形態において、ＨＧＦに対する特異的結合因子は、少なくとも一つのＭｅｔ－ＨＧＦ活性を調節するために使用される。ある実施形態において、ＨＧＦに対する特異的結合因子は、少なくとも一つのＭｅｔ非依存性ＨＧＦ活性を調節するために使用される。ある実施形態において、ＨＧＦに対する２以上の特異的結合因子が、ＨＧＦ活性を調節するために使用される。

【０１１２】

ある実施形態において、ＨＧＦに対する特異的結合因子は完全ヒトモノクローナル抗体である。ある実施形態では、重鎖及び軽鎖免疫グロブリン分子をコードするヌクレオチド配列並びに重鎖及び軽鎖免疫グロブリン分子を含むアミノ酸配列（特に、可変領域に対応する配列）が提供される。ある実施形態では、相補性決定領域（ＣＤＲ）、特にＣＤＲ１からＣＤＲ３に対応する配列が提供される。ある実施形態によれば、このような免疫グロブリン分子を発現するハイブリドーマ細胞株が提供される。ある実施形態によれば、このようなモノクローナル抗体を発現するハイブリドーマ細胞株が提供される。ある実施形態において、ハイブリドーマ細胞株は、１．２４．１、１．２９．１、１．６０．１、１．６１．３、１．７４．３、１．７５．１、２．４．４、２．１２．１、２．４０．１及び３．１０．１のうち少なくとも一つから選択される。ある実施形態において、ヒトＨＧＦに対する精製されたヒトモノクローナル抗体が提供される。

【０１１３】

メガ塩基サイズのヒト遺伝子座を酵母人工染色体（ＹＡＣ）中にクローニング及び再構築し、これをマウス生殖系列中に導入できることによって、極めて巨大な遺伝子座又は大まかにマッピングされた遺伝子座の機能的成分を解明するためのアプローチ及びヒト疾病の有用なモデルを生成するアプローチが提供される。さらに、マウス遺伝子座をヒトの等価物で置換するためのこのような技術を使用すると、発育時におけるヒト遺伝子産物の発現及び制御、他の系とのそれらのコミュニケーション、並びに疾病誘導及び進行におけるそれらの関与に対する洞察を得ることができる。

【０１１４】

このような戦略の重要な実践的応用が、マウス液性免疫系の「ヒト化」である。内在性Ｉｇ遺伝子が不活化されているヒト免疫グロブリン（Ｉｇ）遺伝子座をマウスに導入すると、抗体のプログラムされた発現及び集合の基礎を成す機序並びにＢ細胞の発育における

それらの役割を研究する機会が与えられる。さらに、このような戦略は、完全ヒトモノクローナル抗体（Ｍａｂ）の産生原を与え得る。ある実施形態において、完全ヒト抗体は、マウスＭａｂ又はマウス誘導化Ｍａｂに固有の免疫原性応答及びアレルギー性応答を最小限に抑えると予想され、このため、ある実施形態において、投与された抗体の効力及び安全性を増加させる。ある実施形態において、完全ヒト抗体は、癌、マラリア又は増殖性糖尿病網膜症などの慢性又は再発性ヒト疾病の治療において使用されることができ、これは、抗体の反復投与を含み得る。

【０１１５】

マウスが、マウス抗体の不存在下でヒト抗体を産生することを期待して、マウス抗体産生を欠損し、ヒトＩｇ遺伝子座の巨大断片を備えたマウス系統を設計することが可能である。巨大なヒトＩｇ断片は、大きな可変遺伝子の多様性並びに抗体産生及び発現の適切な制御を保ち得る。抗体の多様化及び選択のためのマウスの機構と、ヒトタンパク質に対する免疫学的な寛容の欠如を活用することによって、これらのマウス系統中の再生されたヒト抗体レパートリーは、任意の対象抗原（ヒト抗原を含む。）に対する高親和性完全ヒト抗体を産生し得る。ハイブリドーマ技術を使用して、所望の特異性を有する抗原特異的ヒトＭＡｂが産生及び選択され得る。いくつかの典型的な方法が、ＷＯ　９８／２４８９３、米国特許第５，５４５，８０７号、ＥＰ　５４６０７３Ｂ１及びＥＰ　５４６０７３Ａ１に記載されている。

【０１１６】

ある実施形態では、ヒトの可変領域とともに、ヒト以外の種から得られた定常領域を使用し得る。

【０１１７】

天然に存在する抗体構造

天然に存在する抗体構造の単位は、典型的には、テトラマーを備える。このような各テトラマーは、典型的には、各対が１つの完全長「軽」鎖（ある実施形態において、約２５ｋＤａ）と１つの完全長「重」鎖（ある実施形態において、約５０から７０ｋＤａ）とを有する、ポリペプチド鎖の２つの同じ対から構成される。各鎖のアミノ末端部分は、典型的には抗原認識を担う約１００から１１０以上のアミノ酸の可変領域を典型的に含む。各鎖のカルボキシ末端部分は、典型的には、エフェクター機能を担い得る定常領域を規定する。ヒト軽鎖は、典型的には、κ及びλ軽鎖として分類される。重鎖は、典型的には、μ、δ、γ、α又はεとして分類され、それぞれ、ＩｇＭ、ＩｇＤ、ＩｇＧ、ＩｇＡ及びＩｇＥとして、抗体のイソタイプを規定する。ＩｇＧは、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３及びＩｇＧ４を含む（これらに限定されない。）幾つかのサブクラスを有する。ＩｇＭは、ＩｇＭ１及びＩｇＭ２を含む（これらに限定されない。）サブクラスを有する。ＩｇＡは、同様に、ＩｇＡ１及びＩｇＡ２を含む（これらに限定されない。）サブクラスに細分される。完全長軽鎖及び重鎖内で、典型的には、可変及び定常領域は、約１２以上のアミノ酸の「Ｊ」領域によって連結されており、重鎖はさらに約１０のアミノ酸の「Ｄ」領域も含む。例えば、「Ｆｕｎｄａｍｅｎｔａｌ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ　Ｃｈ．　７（Ｐａｕｌ，　Ｗ．，　ｅｄ．，　２ｎｄ　ｅｄ．　Ｒａｖｅｎ　Ｐｒｅｓｓ，　Ｎ．Ｙ．（１９８９））」を参照（参照により、いかなる目的のためにも、その全体が組み込まれる。）各軽／重鎖対の可変領域は、典型的には、抗原結合部位を形成する。

【０１１８】

通例、可変領域は、比較的保存されたフレームワーク領域（ＦＲ）が３つの超可変領域（相補性決定領域又はＣＤＲとも称される。）によって連結されているという同じ一般的構造を呈する。各対の２つの鎖由来のＣＤＲは、典型的には、フレームワーク領域によって並列されており、特異的なエピトープに結合することが可能であり得る。Ｎ末端からＣ末端へと、軽鎖及び重鎖可変領域は何れも、典型的には、ドメインＦＲ１、ＣＤＲ１、ＦＲ２、ＣＤＲ２、ＦＲ３、ＣＤＲ３及びＦＲ４を含む。各ドメインへのアミノ酸の割り振りは、典型的には、「Ｋａｂａｔ　Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ　ｏｆ　Ｐｒｏｔｅｉｎｓ　ｏｆ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｉｎｔｅｒｅｓｔ」（Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｉｎｓｔｉｔ

utes of Health, Bethesda, Md.（1987 and 1991））又は「Chothia & Lesk J.Mol.Biol.196：901－917（1987）；Chothia et al. Nature 342：878－883（1989）」の定義に従う。

【0119】

ある実施形態において、抗体重鎖は、抗体軽鎖の不存在下で抗原に結合する。ある実施形態において、抗体軽鎖は、抗体重鎖の不存在下で抗原に結合する。ある実施形態において、抗体結合領域は、抗体軽鎖の不存在下で抗原に結合する。ある実施形態において、抗体結合領域は、抗体重鎖の不存在下で抗原に結合する。ある実施形態において、各可変領域は、他の可変領域の不存在下で抗原に特異的に結合する。

【0120】

ある実施形態において、ＣＤＲの確定的な描出及び抗体の結合部位を含む残基の同定は、抗体の構造を解明すること及び／又は抗体－リガンド複合体の構造を解明することによって達成される。ある実施形態において、これは、Ｘ線結晶解析など、当業者に公知の様々な技術の何れによっても達成することができる。ある実施形態において、ＣＤＲ領域を同定又は近似するために、様々な分析方法を使用することができる。このような方法の例には、Ｋａｂａｔ定義、Ｃｈｏｔｈｉａ定義、ＡｂＭ定義及びコンタクト定義が含まれるが、これらに限定されるものではない。

【0121】

Ｋａｂａｔ定義は、抗体中の残基に番号を付与するための標準であり、典型的には、ＣＤＲ領域を同定するために使用されている。例えば、「Johnson and Wu, Nucleic Acids Res, 28：214－8（2000）」を参照されたい。Ｃｈｏｔｈｉａ定義は、Ｋａｂａｔ定義に類似するが、Ｃｈｏｔｈｉａ定義は、ある種の構造的ループ領域の位置を考慮する。例えば、「Chothia et al., J Mol Biol, 196：901－17（1986）；Chothia et al., Nature, 342：877－83（1989）」を参照。ＡｂＭ定義は、Oxford Molecular Groupによって作製された、抗体構造をモデル化する総合的なコンピュータプログラム群を使用する。例えば、「Martin et al., Proc Natl Acad Sci（USA） 86：9268－9272（1989）； AbM™, a computer program for modeling variable regions of antibodies, Oxford, UK； Oxford Molecular, Ltd」を参照されたい。ＡｂＭ定義は、知識データベースと非経験法（Samudrala et al., Ab Initio Protein Structure Prediction Using a Combined Hierarchical Approach, PROTEINS, Structure, Function and Genetics Suppl. 3：194－198（1999）に記載されているものなど）の組み合わせを用いて、一次配列から抗体の三次構造をモデル化する。コンタクト定義は、利用可能な複雑な結晶構造の分析を基礎とする。例えば、「MacCallum et al., J Mol Biol, 5：732－45（1996）」を参照されたい。

【0122】

慣習によって、重鎖中のＣＤＲ領域は、通例、Ｈ１、Ｈ２及びＨ３と称され、アミノ末端からカルボキシ末端の方向に順に番号が付される。軽鎖中のＣＤＲ領域は、通例、Ｌ１、Ｌ２及びＬ３と称され、アミノ末端からカルボキシ末端の方向に順に番号が付される。

【0123】

二重特異的又は二重機能的抗体

二重特異的又は二重機能的抗体は、典型的には、２つの異なる重／軽鎖対と２つの異なる結合対とを有する人工のハイブリッド抗体である。二重特異的抗体は、ハイブリドーマの融合又はＦａｂ’断片の連結を含む（但し、これに限定されない。）様々な方法によっ

て作製され得る。例えば、「Ｓｏｎｇｓｉｖｉｌａｉ ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ．Ｅｘｐ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．７９：３１５－３２１（１９９０）；Ｋｏｓｔｅｌｎｙ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４８：１５４７－１５５３（１９９２）」を参照されたい。

【０１２４】

抗体の調製

ある実施形態によれば、ＨＧＦに特異的に結合するある種の抗体が、本発明によって包含される。ある種の実施形態において、抗体は、抗原での免疫化によって産生される。「抗原」という用語は、その抗原及び／又は別の標的に結合することができる抗体を産生する動物において使用される分子を表す。ある実施形態において、抗体は、完全長ＨＧＦ，ＨＧＦの可溶型、ＨＧＦのスプライスバリアント形態又はその断片によってによる免疫化によって作製され得る。ある実施形態において、本発明の抗体は、ポリクローナル若しくはモノクローナルであり得、及び／又は組み換え抗体であり得る。ある実施形態において、本発明の抗体は、例えば、ヒト抗体を産生することができるトランスジェニック動物の免疫化によって調製される、ヒト抗体である（例えば、ＰＣＴ出願公開ＷＯ　９３／１２２２７を参照）。

【０１２５】

ある実施形態では、その標的に対する抗体の親和性など、抗体の固有の特性を操作するために、ある種の戦略を使用することができる。このような戦略には、抗体バリアントを作製するために、抗体をコードするポリヌクレオチド分子の部位特異的又はランダム突然変異導入を使用することが含まれるが、これに限定されない。ある実施形態において、このような作製に続いて、所望の変化（例えば、増加又は減少した親和性）を呈する抗体バリアントをスクリーニングする。

【０１２６】

ある実施形態において、突然変異戦略において標的とされるアミノ酸残基は、ＣＤＲ中のアミノ酸残基である。ある実施形態において、可変ドメインのフレームワーク領域中のアミノ酸が標的とされる。ある実施形態において、このようなフレームワーク領域は、ある抗体の標的結合特性に寄与することが示された。例えば、「Ｈｕｄｓｏｎ，Ｃｕｒｒ Ｏｐｉｎ Ｂｉｏｔｅｃｈ，９：３９５－４０２（１９９９）」及びその中の参考文献を参照されたい。

【０１２７】

ある実施形態では、ランダム又は部位特異的突然変異誘発をＣＤＲ中の高頻度変異部位（体細胞性親和性成熟過程の間に突然変異が起こりやすい領域に対応する部位である。）に限定することによって、より小さく効果的にスクリーニングされる、抗体バリアントのライブラリーが作製される。例えば、「Ｃｈｏｗｄｈｕｒｙ ａｎｄ Ｐａｓｔａｎ，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈ，１７：５６８－５７２（１９９９）」及びその中の参考文献を参照されたい。ある実施形態において、ある種の直列及び逆方向反復、ある種のコンセンサス配列、ある種の二次構造及びある種のパリンドロームを含む（これらに限定されない。）高頻度変異部位を同定するために、ＤＮＡエレメントのある種のタイプを使用し得る。例えば、高頻度変異部位を同定するために使用し得るこのようなＤＮＡエレメントには、プリン（Ａ又はＧ）の後にグアニン（Ｇ）、その後にピリミジン（Ｃ又はＴ）、その後にアデノシン又はチロシン（Ａ又はＴ）（すなわち、Ａ／Ｇ－Ｇ－Ｃ／Ｔ－Ａ／Ｔ）を含む四塩基配列が含まれるが、これに限定されない。高頻度変異部位を同定するために使用し得るＤＮＡエレメントの別の例は、セリンコドン；Ａ－Ｇ－Ｃ／Ｔである。

【０１２８】

ある実施形態において、抗体はヒト化される。ある実施形態において、ヒト化抗体は、ヒトにおいて実質的に非免疫原性である。ある実施形態において、ヒト化抗体は、そのヒト化抗体が由来する別の種から得た抗体と実質的に同じ、標的に対する親和性を有する。例えば、米国特許第５，５３０，１０１号、米国特許第５，６９３，７６１号；米国特許第５，６９３，７６２号；米国特許第５，５８５，０８９号を参照されたい。

【０１２９】
ある実施形態では、その免疫原性を減少させつつ、抗原結合ドメインの原親和性を減弱させずに修飾され得る抗体可変ドメインのアミノ酸が同定される。例えば、米国特許第５，７６６，８８６号及び第５，８６９，６１９号を参照されたい。
【０１３０】
ある実施形態において、本分野で公知の方法による抗体の修飾は、典型的には、標的に対する増加された結合親和性を達成し、及び／又はレシピエント中の抗体の免疫原性を減少させるように設計されている。ある実施形態において、ヒト化抗体は、そのコグネイト抗原に対する抗体の親和性を増加させるために、グリコシル部位をなくすように修飾される。例えば、「Ｃｏ ｅｔ ａｌ．，ＭｏＩ Ｉｍｍｕｎｏｌ ３０：１３６１－１３６７（１９９３）」を参照されたい。ある実施形態では、ヒト化抗体を作製するために、「リシェーピング」、「超キメラ化」又は「ベニヤリング／リサーフェシング」などの技術が使用される。例えば、「Ｖａｓｗａｍｉ ｅｔ ａｌ．，Ａｎｎａｌｓ ｏｆ Ａｌｌｅｒｇｙ，Ａｓｔｈｍａ，＆ Ｉｍｍｕｎｏｌ ８１：１０５（１９９８）；Ｒｏｇｕｓｋａ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｔ Ｅｎｇｉｎｅｅｒ ９：８９５－９０４（１９９６）；及び米国特許第６，０７２，０３５号」を参照されたい。このような実施形態において、このような技術は、典型的には、外来残基の数を減らすことによって抗体の免疫原性を減少させるが、抗体の反復投与後に抗イディオタイプ及び抗アロタイプ応答を抑制しない。例えば、「Ｇｉｌｌｉｌａｎｄ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ ６２（６）：３６６３－７１（１９９９）」には、免疫原性を減少させるための他の方法がいくつか記載されている。
【０１３１】
ある例において、ヒト化抗体は、抗原結合能の喪失をもたらす。ある実施形態において、ヒト化抗体は「逆突然変異」される。このような実施形態の幾つかでは、ヒト化抗体は、ドナー抗体中に見られるアミノ酸残基の一又は複数を含むように変異される。例えば、「Ｓａｌｄａｎｈａ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｉｍｍｕｎｏｌ ３６：７０９－１９（１９９９）」を参照されたい。
【０１３２】
ある実施形態では、ＨＧＦに対する抗体の軽鎖及び重鎖可変領域の相補性決定領域（ＣＤＲ）は、同じ種又は別の種由来のフレームワーク領域（ＦＲ）に移植され得る。ある実施形態では、ＨＧＦに対する抗体の軽鎖及び重鎖可変領域の相補性決定領域（ＣＤＲ）は、コンセンサスヒトＦＲに移植され得る。コンセンサスヒトＦＲを作製するために、ある実施形態では、コンセンサスアミノ酸配列を同定するために、幾つかのヒト重鎖又は軽鎖アミノ酸配列由来のＦＲが並置される。ある実施形態において、ＨＧＦ重鎖又は軽鎖に対する抗体のＦＲは、異なる重鎖又は軽鎖由来のＦＲで置換される。ある実施形態において、ＨＧＦに対する抗体の重鎖及び軽鎖のＦＲ中にある珍しいアミノ酸は置換されないが、ＦＲアミノ酸の残りは置換される。珍しいアミノ酸は、ＦＲ中に通常見出されない位置にある特異的なアミノ酸である。ある実施形態において、ＨＧＦに対する抗体由来の移植された可変領域は、ＨＧＦに対する抗体の定常領域とは異なる定常領域とともに使用され得る。ある実施形態では、移植された可変領域は、一本鎖Ｆｖ抗体の一部である。ＣＤＲ移植は、例えば、米国特許第６，１８０，３７０号、第６，０５４，２９７号、第５，６９３，７６２号、第５，８５９，２０５号、第５，６９３，７６１号、第５，５６５，３３２号、第５，５８５，０８９号及び第５，５３０，１０１号並びに「Ｊｏｎｅｓ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ３２１：５２２－５２５（１９８６）；Ｒｉｅｃｈｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，３３２：３２３－３２７（１９８８）；Ｖｅｒｈｏｅｙｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２３９：１５３４－１５３６（１９８８），Ｗｉｎｔｅｒ，ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔｓ ４３０：９２－９４（１９９８）」に記載されており、これらは、参照により、いかなる目的のためにも本明細書に組み込まれる。
【０１３３】
ある実施形態では、ファージディスプレイ技術が、モノクローナル抗体を作製するため

に使用される。ある実施形態では、このような技術は、完全ヒトモノクローナル抗体を産生する。ある実施形態では、単一Ｆａｂ又はＦｖ抗体断片をコードするポリヌクレオチドが、ファージ粒子の表面上に発現される。例えば、「Ｈｏｏｇｅｎｂｏｏｍ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ ２２７：３８１（１９９１）；Ｍａｒｋｓ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ ２２２：５８１（１９９１）；米国特許第５，８８５，７９３号」を参照されたい。ある実施形態において、標的に対する親和性を有する抗体断片を同定するために、ファージが「スクリーニングされる」。このように、このような幾つかのプロセスは、繊維状バクテリオファージの表面上に抗体断片レパートリーのディスプレイを行い、続いて、標的へのそれらの結合によってファージを選択することを通じて、免疫選択を模倣する。このような手順の幾つかでは、高親和性機能的アゴニスト抗体断片が単離される。このような実施形態の幾つかでは、末梢血リンパ球から、天然に再編成されたヒトＶ遺伝子をクローニングすることによって、ヒト抗体遺伝子の完全なレパートリーが作製される。例えば、「Ｍｕｌｌｉｎａｘ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ（ＵＳＡ）８７：８０９５－８０９９（１９９０）」を参照されたい。

【０１３４】

ある実施形態によれば、本発明の抗体は、ヒト抗体産生ゲノムの相当部分が挿入されているが、内在性マウス抗体の産生が欠損したトランスジェニックマウスを使用することによって調製される。次いで、このようなマウスは、ヒト免疫グロブリン分子及び抗体を作製することが可能であり、マウス免疫グロブリン分子及び抗体の産生を欠損している。この結果を達成するために使用される技術は、本明細書に開示されている、特許、出願及び参考文献の中に開示されている。ある実施形態では、ＰＣＴ出願公開ＷＯ ９８／２４８９３又は「Ｍｅｎｄｅｚ ｅｔ ａｌ，Ｎａｔｕｒｅ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ １５：１４６－１５６（１９９７）」（参照により、いかなる目的のためにも、本明細書に組み込まれる。）に開示されている方法を使用し得る。

【０１３５】

ある実施形態によれば、ＨＧＦに対して特異的な完全ヒトモノクローナル抗体は、以下のように作製される。ヒト免疫グロブリン遺伝子を含有するトランスジェニックマウスは、目的の抗原（例えば、ＨＧＦ）で免疫される。抗体を発現するマウスから得られるリンパ細胞（Ｂ細胞など）が得られる。回収されたこのような細胞は、不死化ハイブリドーマ細胞株を調製するために骨髄タイプの細胞株と融合され、目的の抗原に対して特異的な抗体を産生するハイブリドーマ細胞株を同定するために、このようなハイブリドーマ細胞株がスクリーニングされ、選択される。ある実施形態では、ＨＧＦに対して特異的な抗体を産生するハイブリドーマ細胞株の作製が提供される。

【０１３６】

ある実施形態では、完全ヒト抗体は、宿主細胞中での組み換えＤＮＡ発現によって又はハイブリドーマ細胞中での発現によって作製される。ある実施形態において、抗体は、上記ファージディスプレイ技術を用いて作製される。

【０１３７】

ある実施形態では、完全ヒト抗体は、ヒト脾細胞（Ｂ又はＴ細胞）をインビトロで抗原に曝露させた後、この曝露された細胞を免疫無防備状態のマウス（例えば、ＳＣＩＤ又はｎｏｄ／ＳＣＩＤ）中で再構築することによって作製される。例えば、「Ｂｒａｍｓ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ，１６０：２０５１－２０５８（１９９８）；Ｃａｒｂａｌｌｉｄｏ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｍｅｄ，６：１０３－１０６（２０００）」を参照されたい。このようなアプローチの幾つかでは、ヒト胎児組織のＳＣＩＤマウスへの移植（ＳＣＩＤ－ｈｕ）は、長期の造血及びヒトＴ細胞の発育をもたらす。例えば、「ＭｃＣｕｎｅ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４１：１５３２－１６３９（１９８８）；Ｉｆｖｅｒｓｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｓｅｍ Ｉｍｍｕｎｏｌ ８：２４３－２４８（１９９６）」を参照されたい。ある例では、このようなキメラマウス中での液性免疫応答は、動物中でのヒトＴ細胞の同時発生に依存する。例えば、「Ｍａｒｔｅｎｓｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｉｍｍｕｎｏｌ ８３：１２７１－１７９（１９９４）」を参照

されたい。あるアプローチでは、ヒト末梢血リンパ球は、ＳＣＩＤマウス中に移植される。例えば、「Ｍｏｓｉｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ３３５：２５６－２５９（１９８８）」を参照されたい。このような実施形態では、刺激因子（ブドウ球菌のエンテロトキシンＡ（ＳＥＡ）など）又は抗ヒトＣＤ４０モノクローナル抗体の何れかで、このような移植された細胞が処理されると、Ｂ細胞産生のレベルの上昇が検出される。例えば、「Ｍａｒｔｅｎｓｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｉｍｍｕｎｏｌ ８４：２２４－２３０（１９９５）；Ｍｕｒｐｈｙ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ ８６：１９４６－１９５３（１９９５）」を参照されたい。

【０１３８】

ある実施形態では、本発明の抗体は、以下のハイブリドーマ：１．２４．１、１．２９．１、１．６０．１、１．６１．１、１．７４．１、１．７５．１、２．４．４、２．１２．１、２．４０．１及び３．１０．１のうち少なくとも一つによって産生される。ある実施形態において、特異的結合因子は、10^{-8}、10^{-9}又は10^{-10}ＭのＫ$_D$でＨＧＦに結合する。ある実施形態では、特異的結合因子は、速度論的方法によって測定された場合に、約０．０９９と０．７９ｎＭの間の解離定数（Ｋ$_D$）でＨＧＦに結合する（図６Ａ）。ある実施形態では、特異的結合因子は、平衡／溶液方法によって測定された場合に、１０ｐＭ未満から約５４ｐＭのＫ$_D$でＨＧＦに結合する（図６Ｂ）。

【０１３９】

ある実施形態において、特異的結合因子は、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＥ、ＩｇＡ、ＩｇＤ及びＩｇＭアイソタイプの少なくとも一つの免疫グロブリン分子を含む。ある実施形態において、特異的結合因子は、ヒトκ軽鎖及び／又はヒト重鎖を含む。ある実施形態において、重鎖は、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＥ、ＩｇＡ、ＩｇＤ及びＩｇＭアイソタイプの重鎖である。ある実施形態において、特異的結合因子は、哺乳類細胞中での発現のためにクローニングされる。ある実施形態において、特異的結合因子は、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＥ、ＩｇＡ、ＩｇＤ及びＩｇＭアイソタイプの定常領域の何れか以外の定常領域を含む。

【０１４０】

ある実施形態において、特異的結合因子は、ヒトκ軽鎖及び／又はヒトＩｇＧ１重鎖を含む。ある実施形態において、特異的結合因子は、ヒトκ軽鎖及びヒトＩｇＧ２重鎖を含む。ある実施形態において、特異的結合因子は、ヒトκ軽鎖とヒトＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＥ、ＩｇＡ、ＩｇＤ又はＩｇＭ重鎖を含む。ある実施形態において、特異的結合因子は、ＩｇＧ１アイソタイプに対する定常領域でもなく、ＩｇＧ２アイソタイプに対する定常領域でもない定常領域に連結された抗体の可変領域を含む。ある実施形態において、特異的結合因子は、哺乳類細胞中での発現のためにクローニングされた。

【０１４１】

ある実施形態において、ハイブリドーマ株：１．２４．１、１．２９．１、１．６０．１、１．６１．１、１．７４．１、１．７５．１、２．４．４、２．１２．１、２．４０．１及び３．１０．１のうち少なくとも一つから得られる抗体の重鎖及び軽鎖への保存的な修飾（及びコードするヌクレオチドへの対応する修飾）は、ハイブリドーマ株：１．２４．１、１．２９．１、１．６０．１、１．６１．１、１．７４．１、１．７５．１、２．４．４、２．１２．１、２．４０．１及び３．１０．１から得られる抗体と同様の機能的及び化学的特性を有する、ＨＧＦに対する抗体を産生するであろう。これに対して、ある種の実施形態において、ＨＧＦに対する抗体の機能的及び／又は化学的特性の実質的な修飾は、（ａ）置換の領域中にある分子骨格の構造（例えば、シート又はヘリックス高次構造として）、（ｂ）標的部位における分子の電荷若しくは疎水性又は（ｃ）側鎖のかさ高さの維持に対するそれらの効果とは著しく異なる、重鎖及び軽鎖のアミノ酸配列中の置換を選択することによって達成され得る。

【０１４２】

例えば、「保存的なアミノ酸置換」は、その位置にあるアミノ酸残基の極性又は電荷に対して、ほとんど又は全く影響が存在しないように、原アミノ酸残基を原残基とは異なる

残基で置換することが含まれ得る。さらに、「アラニンスキャニング突然変異導入」について以前に記載されているように、ポリペプチド中の任意の原残基をアラニンに置換することもできる。

【０１４３】

所望のアミノ酸置換（保存的であると、保存的でないとを問わない。）は、このような置換が望まれる時点で、当業者によって決定することができる。ある実施形態において、アミノ酸置換は、ＨＧＦに対する抗体の重要な残基を同定するために、又は本明細書に記載されている、ＨＧＦに対する抗体の親和性を増加若しくは減少させるために使用することができる。

【０１４４】

ある実施形態において、本発明の抗体は、ハイブリドーマ細胞株以外の細胞株中で発現することができる。ある実施形態において、ある抗体をコードする配列は、適切な哺乳類宿主細胞の形質転換のために使用することができる。ある実施形態によれば、形質転換は、宿主細胞中にポリヌクレオチドを導入するための任意の公知の方法によって、例えば、ウイルス中（又はウイルスベクター中に）にポリヌクレオチドをパッケージングし、宿主細胞をこのウイルス（又はベクター）で形質導入するか、又は米国特許４，３９９，２１６号、第４，９１２，０４０号、第４，７４０，４６１及び第４，９５９，４５５号（これらの特許は、参照により、いかなる目的のためにも、本明細書に組み込まれる。）に例示されているような、本分野で公知のトランスフェクション手法などによって、行うことができる。ある実施形態において、使用される形質転換手法は、形質転換すべき宿主に依存し得る。異種のポリヌクレオチドを哺乳類細胞中に導入する方法は、本分野において周知であり、デキストランによって媒介される形質移入、リン酸カルシウム沈殿、ポリブレンによって媒介される形質移入、プロトプラスト融合、電気穿孔、リポソーム中へのポリヌクレオチドの封入及びＤＮＡの核内への直接微量注入が含まれるが、これらに限定されない。

【０１４５】

発現用の宿主として利用可能な哺乳類細胞株は本分野で周知であり、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞、ＨｅＬａ細胞、仔ハムスター腎臓（ＢＨＫ）細胞、サル腎臓細胞（ＣＯＳ）、ヒト肝細胞癌細胞（例えば、Ｈｅｐ　Ｇ２）、及び多数の他の細胞株を含む（これらに限定されない。）、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション（ＡＴＣＣ）から入手できる、多くの不死化された細胞株が含まれるが、これらに限定されない。ある実施形態において、細胞株は、どの細胞株が高い発現レベルを有し、恒常的なＨＧＦ結合特性を有する抗体を産生するかを決定することを通じて選択され得る。哺乳類宿主細胞にとって適切な発現ベクターは周知である。

【０１４６】

ある実施形態において、特異的結合因子は、一又は複数のポリペプチドを含む。ある実施形態において、様々な発現ベクター／宿主系の何れも、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド分子を発現するために使用し得る。このような系には、組み換えバクテリオファージ、プラスミド若しくはコスミドＤＮＡ発現ベクターで形質転換された細菌のような微生物；酵母発現ベクターで形質転換された酵母；ウイルス発現ベクター（例えば、バキュロウイルス）で感染された昆虫細胞系；ウイルス発現ベクター（例えば、カリフラワーモザイクウイルス、ＣａＭＶ、タバコモザイクウイルス、ＴＭＶ）を形質移入され、若しくは細菌発現ベクター（例えば、Ｔｉ又はｐＢＲ３２２プラスミド）で形質転換された植物細胞系；又は動物細胞系が含まれるが、これらに限定されない。

【０１４７】

ある実施形態において、ポリペプチドは、酵母中で組み換え的に発現される。このような実施形態の幾つかは、製造業者の説明書に従って、市販の発現系、例えば、Ｐｉｃｈｉａ　Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　Ｓｙｓｔｅｍ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，　Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，　ＣＡ）を使用する。ある実施形態において、このような系は、分泌を誘導するためにプレプロα配列に依存する。ある実施形態において、挿入物の転写は、メタノールによ

る誘導に際して、アルコールオキシダーゼ（ＡＯＸ１）プロモータによって駆動される。

【０１４８】

ある実施形態において、分泌されたポリペプチドは、酵母増殖培地から精製される。ある実施形態において、酵母増殖培地からポリペプチドを精製するために使用される方法は、細菌及び哺乳類の細胞上清からポリペプチドを精製するために使用される方法と同じである。

【０１４９】

ある実施形態において、ポリペプチドをコードする核酸は、ｐＶＬ１３９３（ＰｈａｒＭｉｎｇｅｎ，　Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，　ＣＡ）などの、バキュロウイルス発現ベクター中にクローニングされる。ある実施形態において、このようなベクターは、ｓＦ９タンパク質の含まれていない培地中でＳｐｏｄｏｐｔｅｒａ　ｆｒｕｇｉｐｅｒｄａ細胞を感染させ、組み換えポリペプチドを産生するために、製造業者（ＰｈａｒＭｉｎｇｅｎ）の指示に従って使用することができる。ある実施形態において、ポリペプチドは、ヘパリン－Ｓｅｐｈａｒｏｓｅカラム（Ｐｈａｒｍａｃｉａ）を用いて、このような培地から精製及び濃縮される。

【０１５０】

ある実施形態において、ポリペプチドは、昆虫系中で発現される。ポリペプチド発現用の昆虫系の幾つかが、当業者に周知である。このような系の一つでは、Ａｕｔｏｇｒａｐｈａ　ｃａｌｉｆｏｒｎｉｃａ核多角体ウイルス（ＡｃＮＰＶ）は、Ｓｐｏｄｏｐｔｅｒａ　ｆｒｕｇｉｐｅｒｄａ細胞中又はＴｒｉｃｈｏｐｌｕｓｉａ幼生中で外来遺伝子を発現するためのベクターとして使用される。ある実施形態において、ポリペプチドをコードする核酸分子は、ウイルスの非必須遺伝子中（例えば、ポリヘドリン遺伝子内）に挿入し、その遺伝子に対するプロモーターの制御下に置くことができる。ある実施形態において、核酸分子を上手く挿入することによって、非必須遺伝子は不活性になるであろう。ある実施形態において、その不活化は、検出可能な特徴をもたらす。例えば、ポリヘドリン遺伝子の不活化は、コートタンパク質を欠くウイルスの産生をもたらす。

【０１５１】

ある実施形態では、Ｓ．　ｆｒｕｇｉｐｅｒｄａ細胞又はＴｒｉｃｈｏｐｌｕｓｉａ幼生を感染させるために、組み換えウイルスを使用することができる。例えば、「Ｓｍｉｔｈ　ｅｔ　ａｌ．，　Ｊ　Ｖｉｒｏｌ４６：５８４（１９８３）；Ｅｎｇｅｌｈａｒｄ　ｅｔ　ａｌ．，　Ｐｒｏｃ　Ｎａｔ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ（ＵＳＡ）９１：３２２４－７（１９９４）」を参照されたい。

【０１５２】

ある実施形態では、細菌細胞中で作られたポリペプチドは、細菌中の不溶性封入体として産生される。ある実施形態において、このような封入体を含む宿主細胞は、遠心によって集められ、０．１５Ｍ　ＮａＣｌ、１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ、ｐＨ８、１ｍＭ　ＥＤＴＡ中で洗浄し、０．１ｍｇ／ｍＬのリゾチーム（Ｓｉｇｍａ，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）で、１５分間、室温で処理される。ある実施形態では、可溶化液は音波処理によって清浄化され、細胞細片は、１２，０００×ｇでの、１０分間の遠心によって沈降される。ある実施形態において、ポリペプチドを含有するペレットは、５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ、ｐＨ８及び１０ｍＭ　ＥＤＴＡ中に再懸濁され；５０％グリセロール上に積層され、３０分間、６０００×ｇで遠心される。ある実施形態において、このペレットは、Mg^{++}及びCa^{++}を含まない標準的なリン酸緩衝食塩溶液（ＰＢＳ）中に再懸濁することができる。ある実施形態において、前記ポリペプチドは、変性ＳＤＳポリアクリルアミドゲル中に、前記再懸濁されたペレットを分画することによって、さらに精製される（例えば、上記Ｓａｍｂｒｏｏｋ　ｅｔ　ａｌ．を参照。）。ある実施形態では、このようなゲルは、タンパク質を可視化するために、０．４Ｍ　ＫＣｌ中に浸すことが可能であり、浸したゲルは、切り出して、ＳＤＳを欠くゲル走行緩衝液中で電気溶出することができる。ある実施形態によれば、グルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）融合タンパク質は、可溶性タンパク質として細菌中に産生される。ある実施形態において、このようなＧＳＴ融合タンパク

質は、ＧＳＴ精製分子（Ｐｈａｒｍａｃｉａ）を用いて精製される。

【０１５３】

ある実施形態では、ある種のポリペプチドを「再折り畳みする」ことが望ましい。ある実施形態において、このようなポリペプチドは、本明細書に論述されている幾つかの組み換え系を用いて産生される。ある実施形態において、所望の三次構造を形成し、及び／又はジスルフィド結合を生成するために、ポリペプチドは、「再折り畳みされ」及び／又は「酸化され」る。ある実施形態において、このような構造及び／又は連結は、ポリペプチドの幾つかの生物活性に関連する。ある実施形態において、再折り畳みは、本分野で公知である多数の手法のうち任意の手法を用いて達成される。典型的な方法には、カオトロピック剤の存在下で、可溶化されたポリペプチド因子を、典型的には７を上回るｐＨに曝露することが含まれるが、これに限定されない。典型的なカオトロピック剤は、グアニジンである。ある実施形態において、再折り畳み／酸化溶液は、還元剤及び該還元剤の酸化された形態も含有する。ある実施形態において、還元剤及びその酸化形態は、ジスルフィドシャッフリングの発生を可能とする酸化還元電位を生じ得る比で存在する。ある実施形態において、このようなシャッフリングは、システイン架橋の形成を可能とする。典型的な酸化還元対には、システイン／シスタミン、グルタチオン／ジチオビスＧＳＨ、塩化第二銅、ジチオスレイトールＤＴＴ／ジチアンＤＴＴ及び２－メルカプトエタノール（ｂＭＥ）／ジチオ－ｂＭＥが含まれるが、これらに限定されない。ある実施形態では、再折り畳みの効率を増加させるために、共溶媒が使用される。典型的な共溶媒には、グリセロール、様々な分子量のポリエチレングリコール及びアルギニンが含まれるが、これらに限定されない。

【０１５４】

ある実施形態では、ポリペプチドを実質的に精製する。幾つかのタンパク質精製技術が、当業者に公知である。ある実施形態において、タンパク質精製は、非ポリペプチド画分からポリペプチド分画を粗分画することを含む。ある実施形態において、ポリペプチドは、クロマトグラフィー及び／又は電気泳動技術を用いて精製される。典型的な精製法には、硫酸アンモニウムによる沈殿；ＰＥＧによる沈殿；免疫沈降；熱変性後の遠心；クロマトグラフィー（アフィニティークロマトグラフィー（例えば、プロテイン－Ａ－セファロース）、イオン交換クロマトグラフィー、排除クロマトグラフィー及び逆相クロマトグラフィーが含まれるが、これらに限定されない。）；ゲルろ過；ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー；等電点電気泳動；ポリアクリルアミドゲル電気泳動；並びにこのような技術及び他の技術の組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。ある実施形態において、ポリペプチドは、高速タンパク質液体クロマトグラフィー又は高圧液体クロマトグラフィ（ＨＰＬＣ）によって精製される。ある実施形態において、精製工程は変化させることができ、又は幾つかの工程を省略することができるが、実質的に精製されたポリペプチドの調製に適した方法をなお与える。

【０１５５】

ある実施形態では、ポリペプチド調製物の精製度を定量する。精製度を定量するための幾つかの方法が、当業者に公知である。典型的な幾つかの方法には、調製物の特異的結合活性を測定し、調製物中のポリペプチドの量をＳＤＳ／ＰＡＧＥ分析によって評価することが含まれるが、これに限定されるものではない。ポリペプチド調製物の精製の量を評価するための典型的なある種の方法は、調製物の結合活性を算出すること、及びこれを最初の抽出物の結合活性と比較することを含む。ある実施形態において、このような計算の結果は、「精製倍数」として表される。結合活性の量を表すために使用される単位は、実施されているアッセイに依存する。

【０１５６】

ある実施形態において、ポリペプチドは部分的に精製される。ある実施形態において、部分精製は、より少ない精製工程を使用することによって、又は同じ一般的な精製スキームの異なる形態を用いることによって達成することができる。例えば、ある実施形態において、ＨＰＬＣ装置を用いて行われる陽イオン交換カラムクロマトグラフィーは、一般的

には、低圧クロマトグラフィーシステムを用いた同じ技術より大きな「精製倍数」をもたらし得る。ある実施形態において、より低い精製度をもたらす方法は、ポリペプチドの総回収率の上で、又はポリペプチドの結合活性を維持する上で利点を有し得る。

【０１５７】

ある例において、ポリペプチドの電気泳動的遊走は、ＳＤＳ／ＰＡＧＥの異なる条件によって、時折著しく変動し得る。例えば、「Ｃａｐａｌｄｉ ｅｔ ａｌ．, Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｂｉｏｐｈｙｓｌ＼Ｒｅｓ Ｃｏｍｍ, ７６：４２５（１９７７）」を参照されたい。当然のことながら、異なる電気泳動条件下では、精製又は部分精製されたポリペプチドの見かけの分子量は異なり得る。

【０１５８】

典型的な幾つかのエピトープ

ある実施形態では、抗ＨＧＦ抗体が結合するエピトープが提供される（例えば、実施例８、図１０及び１１並びに配列番号１６４及び１６５を参照）。ある実施形態において、ＨＧＦエピトープは、抗ＨＧＦ抗体又は特異的結合因子のＨＧＦへの結合を抑制するために使用され得る。ある実施形態において、ＨＧＦエピトープは、抗ＨＧＦ抗体又は特異的結合因子の、ＨＧＦへの結合を減少させるために使用され得る。ある実施形態において、ＨＧＦエピトープは、抗ＨＧＦ抗体又は特異的結合因子の、ＨＧＦへの結合を実質的に阻害するために使用され得る。ＨＧＦに結合された抗ＨＧＦ抗体又は特異的結合因子の量を、過剰のエピトープが少なくとも約２０％、４０％、６０％、８０％、８５％以上減少させるときに、エピトープは、抗ＨＧＦ抗体又は特異的結合因子の、ＨＧＦへの結合を実質的に阻害する。ある実施形態において、ＨＧＦエピトープは、抗ＨＧＦ抗体又は特異的結合因子を結合するために使用され得る。ある実施形態において、ＨＧＦエピトープは、ＨＧＦに結合する抗体又は特異的結合因子を同定するために使用され得る。ある実施形態において、ＨＧＦエピトープは、ＨＧＦに結合する抗体又は特異的結合因子を単離するために使用され得る。ある実施形態において、ＨＧＦエピトープは、ＨＧＦに結合する抗体又は特異的結合因子を作製するために使用され得る。ある実施形態において、ＨＧＦエピトープは、ＨＧＦに結合する抗体又は特異的結合因子を生成するための免疫原として使用され得る。ある実施形態では、ＨＧＦエピトープを動物に投与することができ、続いて、ＨＧＦに結合する抗体はこの動物から取得され得る。ある実施形態において、ＨＧＦエピトープは、正常なＨＧＦ－Ｍｅｔシグナル伝達を妨害するために使用され得る。

【０１５９】

幾つかの治療用途

ある実施形態では、ＨＧＦに対する一又は複数の特異的結合因子の治療的有効量を投与することを含む、癌を治療する方法が提供される。ある実施形態では、ＨＧＦに対する一又は複数の特異的結合因子の治療的有効量と別の治療剤とを投与することを含む、癌を治療する方法が提供される。

【０１６０】

ある実施形態では、ＨＧＦに対する一又は複数の特異的結合因子の治療的有効量を投与することを含む、マラリアを治療又は予防する方法が提供される。ある実施形態では、ＨＧＦに対する一又は複数の特異的結合因子の治療的有効量と別の治療剤とを投与することを含む、マラリアを治療又は予防する方法が提供される。

【０１６１】

ある実施形態では、ＨＧＦに対する一又は複数の特異的結合因子の治療的有効量を投与することを含む、増殖性糖尿病網膜症を治療又は予防する方法が提供される。ある実施形態では、ＨＧＦに対する一又は複数の特異的結合因子の治療的有効量と別の治療剤とを投与することを含む、増殖性糖尿病網膜症を治療又は予防する方法が提供される。

【０１６２】

ある実施形態において、ＨＧＦに対する特異的結合因子は単独で投与される。ある実施形態において、ＨＧＦに対する特異的結合因子は、少なくとも一つの他の治療剤の投与前に投与される。ある実施形態において、ＨＧＦに対する特異的結合因子は、少なくとも一

つの他の治療剤の投与と同時に投与される。ある実施形態において、ＨＧＦに対する特異的結合因子は、少なくとも一つの他の治療剤の投与後に投与される。治療剤には、少なくともひとつの他の癌治療剤が含まれるが、これらに限定されない。典型的な癌治療剤には、放射線治療及び化学治療が含まれるが、これらに限定されない。

【０１６３】

本発明の薬学的組成物は、併用治療で（すなわち、他の薬剤と組み合わせて）投与されることが可能である。ある実施形態において、併用治療は、少なくとも１つの抗血管新生剤と組み合わせた、ＨＧＦを結合できる特異的結合因子を含む。薬剤には、インビトロで合成的に調製された化学的組成物、抗体、抗原結合領域、放射性核種、並びにこれらの組み合わせ及び接合体が含まれるが、これらに限定されない。ある実施形態において、薬剤は、アゴニスト、アンタゴニスト、アロステリック調節物質又はトキシンとして作用し得る。ある実施形態において、薬剤は、その標的を阻害又は刺激し（例えば、受容体又は酵素の活性化又は阻害）、これにより、細胞死を促進し、又は細胞増殖を停止させるように作用し得る。

【０１６４】

化学療法治療には、ナイトロジェンマスタード、メクロレタミン（ｍｅｃｈｌｏｒｅｔｈａｍｉｎｅ）、シクロホスファミド（ｃｙｃｌｏｐｈｏｓｐｈａｍｉｄｅ）、イフォスファミド（ｉｆｏｓｆａｍｉｄｅ）、メルファラン（ｍｅｌｐｈａｌａｎ）及びクロラムブシル（ｃｈｌｏｒａｍｂｕｃｉｌ）などのアルキル化剤を含む（これに限定されない。）抗腫瘍薬；カルムスチン（ＢＣＮＵ）、ロムスチン（ＣＣＮＵ）及びセムスチン（メチル－ＣＣＮＵ）などのニトロソウレア；Ｔｅｍｏｄａｌ™（テモゾラミド）、トリエチレンメラミン（ＴＥＭ）、トリエチレン、チオホスホルアミド（チオテパ）、ヘキサメチルメラミンＨＭＭ、アルトレタミン）などのエチレンイミン／メチルメラミン；ブスルファンなどのスルホン酸アルキル；デカルバジン（ＤＴＩＣ）などのトリアジン（ｔｒｉａｚｉｎｅｓ）；メトトレキサート及びトリメトレキサートなどの葉酸類縁体を含む代謝拮抗剤、５－フルオロウラシル（５ＦＵ）、フルオロデオキシウリジン、ゲムシタビン、シトシン・アラビノシド（ＡｒａＣ、シタラビン）、５－アザシチジン、２，２’－ジフルオロデオキシシチジンなどのピリミジン類縁体、６－メルカプトプリン、６－チオグアニン、アザチオプリン、２’－デオキシコフォルマイシン（ペントスタチン）、エリスロヒドロキシノニルアデニン（ＥＨＮＡ）、リン酸フルダラビン及び２－クロロデオキシアデノシン（クラドリビン、２－ＣｄＡ）などのプリン類縁体；パクリタキセル、ビンカアルカロイド（ビンブラスチン（ＶＬＢ）、ビンクリスチン及びビノレルビンを含む。）、タキソテール、エストラムスチン及びリン酸エストラムスチンなどの抗有糸分裂薬を含む天然産物；エトポシド及びテニポシドなどのポドフィロトキシン（ｐｐｉｐｏｄｏｐｈｙｌｏｔｏｘｉｎ）；アクチモマイシンＤ（ａｃｔｉｍｏｍｙｃｉｎ Ｄ）、ダウノマイシン（ルビドマイシン）、ドキソルビシン、ミトキサントロン、イダルビシン、ブレオマイシン、プリカマイシン（ミトラマイシン）、マイトマイシンＣ及びアクチノマイシンなどの抗生物質；Ｌ－アスパラギナーゼなどの酵素；インターフェロン－α、ＩＬ－２、Ｇ－ＣＳＦ及びＧＭ－ＣＳＦなどの生物反応修飾物質；シスプラチン及びカルボプラチンなどのプラチナ配位錯体、ミトキサントロンなどのアントラセンジオン、ヒドロキシ尿素などの置換された尿素、Ｎ－メチルヒドラジン（ＭＩＨ）及びプロカルバジンを含むメチルヒドラジン誘導体、ミトタン（ｏ，ｐ’－ＤＤＤ）及びアミノグルテチミドなどの副腎皮質抑制物質；プレドニゾン及び等価物、デキサメタゾン及びアミノグルテチミドなどのアドレノコルチコステロイドアンタゴニストを含むホルモン及びアンタゴニスト；Ｇｅｍｚａｒ™（ゲムシタビン）、カプロン酸ヒドロキシプロゲステロン、酢酸メドロキシプロゲステロン及び酢酸メゲストロールなどのプロゲスチン；ジエチルスチルベストロール及びエチニルエストラジオール等価物などのエストロゲン；タモキシフェンなどのアンチエストロゲン；プロピオン酸テストステロン及びフルオキシメステロン／等価物を含むアンドロゲン；フルタミド、ゴナドトロピン放出ホルモン類縁体及びロイプロリドなどの抗アンドロゲン；並びにフルタミドなどの非ステロイド系抗アンドロゲン、が含まれるが、これら

に限定されない。

【０１６５】

ＨＧＦに対する特異的結合剤を投与し得る癌療法には、標的療法も含まれるが、これに限定されない。標的療法の例には、治療用抗体の使用が含まれるが、これに限定されない。典型的な治療用抗体には、マウス、マウス－ヒトキメラ、ＣＤＲ移植、ヒト化及び完全ヒト抗体並びに合成抗体（抗体ライブラリーをスクリーニングすることによって選択されたものを含むが、これに限定されない。）が含まれるが、これらに限定されない。典型的な抗体には、細胞表面タンパク質、Ｈｅｒ２、ＣＤＣ２０、ＣＤＣ３３、ムチン様糖タンパク質及び腫瘍細胞上に存在する上皮細胞増殖因子受容体（ＥＧＦＲ）に結合し、これらのタンパク質を提示する腫瘍細胞に対して細胞分裂阻害及び／又は細胞毒性効果を必要に応じて誘導する抗体が含まれるが、これに限定されない。典型的な抗体には、乳癌及び他の形態の癌を治療するために使用し得るＨＥＲＣＥＰＩＮ^{TM}（トラスツズマブ）及びＲＩＴＵＸＡＮ^{TM}（リツキシマブ）、ＺＥＶＡＬＩＮ^{TM}（イブリツモマブ　チウキセタン）、並びに非ホジキンリンパ腫及び他の形態の癌を治療するために使用し得るＧＬＥＥＶＥＣ^{TM}及びＬＹＭＰＨＯＣＩＤＥ^{TM}（エプラツズマブ）も含まれる。典型的な抗体の幾つかには、ＥＲＢＩＴＵＸ^{TM}（ＩＭＣ－Ｃ２２５）；エルチノリブ（Ｉｒｅｓｓａ）；ＢＥＸＸＡＲ^{TM}（ヨウ素１３１トシツモマブ）；ＫＤＲ（キナーゼドメイン受容体）阻害剤；抗ＶＥＧＦ抗体及びアンタゴニスト（例えば、Ａｖａｓｔｉｎ^{TM}及びＶＥＧＡＦ－ＴＲＡＰ）；抗ＶＥＧＦ受容体抗体及び抗原結合領域；抗Ａｎｇ－１及びＡｎｇ－２抗体及び抗原結合領域；Ｔｉｅ－２並びに他のＡｎｇ－１及びＡｎｇ－２受容体に対する抗体；Ｔｉｅ－２リガンド；Ｔｉｅ－２キナーゼ阻害剤に対する抗体；並びにＣａｍｐａｔｈ$^{(R)}$（Ａｌｅｍｕｔｕｚｕｍａｂｕ）も含まれる。ある実施形態において、癌治療剤は、腫瘍細胞中にアポトーシスを選択的に誘導するポリペプチド（ＴＮＦ関連ポリペプチドＴＲＡＩＬを含むが、これに限定されない。）である。

【０１６６】

ある実施形態において、癌治療剤は、血管新生を減少させる抗血管新生剤である。このような治療剤には、ＩＬ－８；Ｃａｍｐａｔｈ、Ｂ－ＦＧＦ；ＦＧＦアンタゴニスト；ＴｅｋアンタゴニストＣｅｒｒｅｔｔｉ　ｅｔ　ａｌ．，　米国公報Ｎｏ．２００３／０１６２７１２；Ｃｅｒｒｅｔｔｉ　ｅｔ　ａｌ．，　米国特許第６，４１３，９３２号及びＣｅｒｒｅｔｔｉ　ｅｔ　ａｌ．，　米国特許第６，５２１，４２４号、それぞれ、参照により、いかなる目的のためにも本明細書に組み込まれる。）、抗ＴＷＥＡＫ剤（抗体及び抗原結合領域を含むが、これらに限定されない。）；可溶性ＴＷＥＡＫ受容体アンタゴニスト（Ｗｉｌｅｙ、米国特許第６，７２７，２２５号）；インテグリンのそのリガンドへの結合を拮抗するＡＤＡＭディスインテグリンドメイン（Ｆａｎｓｌｏｗ　ｅｔ　ａｌ．，　米国公報Ｎｏ．２００２／００４２３６８）；抗ｅｐｈ受容体及び抗エフリン抗体；抗原結合領域、又はアンタゴニスト（米国特許第５，９８１，２４５号；第５，７２８，８１３号；第５，９６９，１１０号；第６，５９６，８５２号；第６，２３２，４４７号；第６，０５７，１２４号及びそれらの対応特許群）；Ａｖａｓｔｉｎ^{TM}又はＶＥＧＦ－ＴＲＡＰ^{TM}などの抗ＶＥＧＦ剤（例えば、ＶＥＧＦを特異的に結合する抗体若しくは抗原結合領域、又は可溶性ＶＥＧＦ受容体若しくはそれらのリガンド結合領域）、並びに抗ＶＥＧＦ受容体剤（例えば、これに特異的に結合する抗体又は抗原結合領域）、パニツムマブ、ＩＲＥＳＳＡ^{TM}（ゲフィチニブ）；ＴＡＲＣＥＶＡ^{TM}（エルロチニブ）、などのＥＧＦＲ阻害剤（例えば、これに特異的に結合する抗体又は抗原結合領域）、抗Ａｎｇ－１及び抗Ａｎｇ－２剤（例えば、これに又はそれらの受容体に特異的に結合する抗体又は抗原結合領域、例えば、Ｔｉｅ－２／ＴＥＫ）、並びにＴｉｅ－２キナーゼ阻害剤（例えば、増殖因子に特異的に結合し、増殖因子の活性を阻害する抗体又は抗原結合領域、肝細胞増殖因子のアンタゴニストなど（ＨＧＦ、Ｓｃａｔｔｅｒ　Ｆａｃｔｏｒとしても知られる。）、並びにその受容体「ｃ－ｍｅｔ」を特異的に結合する抗体又は抗原結合領域；抗ＰＤＧＦ－ＢＢアンタゴニスト；ＰＤＧＦ－ＢＢリガンドに対する抗体及び抗原結合領域；並びにＰＤＧＦＲキナーゼ阻害剤、が含まれるが、これらに限定されない。

【０１６７】
ある実施形態において、癌治療剤は、血管新生阻害剤である。このような阻害剤には、ＳＤ－７７８４（Ｐｆｉｚｅｒ，ＵＳＡ）；シレンギチド（ｃｉｌｅｎｇｉｔｉｄｅ）（Ｍｅｒｃｋ ＫＧａＡ，Ｇｅｒｍａｎｙ，ＥＰＯ ７７０６２２）；ペガプタニブ・オクタナトリウム（ｐｅｇａｐｔａｎｉｂ ｏｃｔａｓｏｄｉｕｍ）、（Ｇｉｌｅａｄ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，ＵＳＡ）；アルファスタチン（Ａｌｐｈａｓｔａｔｉｎ）、（ＢｉｏＡｃｔａ，ＵＫ）；Ｍ－ＰＧＡ，（Ｃｅｌｇｅｎｅ，ＵＳＡ，ＵＳ ５７１２２９１）；イロマスタット（ｉｌｏｍａｓｔａｔ）、（Ａｒｒｉｖａ，ＵＳＡ，ＵＳ ５８９２１１２）；セマキサニブ（ｓｅｍａｘａｎｉｂ）、（Ｐｆｉｚｅｒ，ＵＳＡ，ＵＳ ５７９２７８３）；バタラニブ（ｖａｔａｌａｎｉｂ）、（Ｎｏｖａｒｔｉｓ，Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）；２－メトキシエストラジオール、（ＥｎｔｒｅＭｅｄ，ＵＳＡ）；ＴＬＣ ＥＬＬ－１２、（Ｅｌａｎ，Ｉｒｅｌａｎｄ）；酢酸アネコルタブ（ａｎｅｃｏｒｔａｖｅ ａｃｅｔａｔｅ）、（Ａｌｃｏｎ，ＵＳＡ）；α－Ｄ１４８ Ｍａｂ、（Ａｍｇｅｎ，ＵＳＡ）；ＣＥＰ－７０５５、（Ｃｅｐｈａｌｏｎ，ＵＳＡ）；抗Ｖｎ Ｍａｂ、（Ｃｒｕｃｅｌｌ，Ｎｅｔｈｅｒｌａｎｄｓ）ＤＡＣ：抗血管新生剤（ａｎｔｉａｎｇｉｏｇｅｎｉｃ）、（ＣｏｎｊｕＣｈｅｍ，Ｃａｎａｄａ）；アンギオシジン（Ａｎｇｉｏｃｉｄｉｎ）、（ＩｎＫｉｎｅ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ，ＵＳＡ）；ＫＭ－２５５０，（Ｋｙｏｗａ Ｈａｋｋｏ，Ｊａｐａｎ）；ＳＵ－０８７９，（Ｐｆｉｚｅｒ，ＵＳＡ）；ＣＧＰ－７９７８７，（Ｎｏｖａｒｔｉｓ，Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ，ＥＰ ９７００７０）；ＡＲＧＥＮＴ技術、（Ａｒｉａｄ，ＵＳＡ）；ＹＩＧＳＲ－Ｓｔｅａｌｔｈ，（Ｊｏｈｎｓｏｎ ＆ Ｊｏｈｎｓｏｎ，ＵＳＡ）；フィブリノーゲン－Ｅ断片、（ＢｉｏＡｃｔａ，ＵＫ）；血管新生阻害剤、（Ｔｒｉｇｅｎ，ＵＫ）；ＴＢＣ－１６３５、（Ｅｎｃｙｓｉｖｅ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ，ＵＳＡ）；ＳＣ－２３６、（Ｐｆｉｚｅｒ，ＵＳＡ）；ＡＢＴ－５６７、（Ａｂｂｏｔｔ，ＵＳＡ）；メタスタチン（Ｍｅｔａｓｔａｔｉｎ）、（ＥｎｔｒｅＭｅｄ，ＵＳＡ）；血管新生阻害剤、（Ｔｒｉｐｅｐ，Ｓｗｅｄｅｎ）；マスピン（ｍａｓｐｉｎ）、（Ｓｏｓｅｉ，Ｊａｐａｎ）；２－メトキシエストラジオール、（Ｏｎｃｏｌｏｇｙ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ，ＵＳＡ）；ＥＲ－６８２０３－００、（ＩＶＡＸ，ＵＳＡ）；Ｂｅｎｅｆｉｎ、（Ｌａｎｅ Ｌａｂｓ，ＵＳＡ）；Ｔｚ－９３、（Ｔｓｕｍｕｒａ，Ｊａｐａｎ）；ＴＡＮ－１１２０，（Ｔａｋｅｄａ，Ｊａｐａｎ）；ＦＲ－１１１１４２，（Ｆｕｊｉｓａｗａ，Ｊａｐａｎ，ＪＰ ０２２３３６１０）；血小板因子４、（ＲｅｐｌｉＧｅｎ，ＵＳＡ，ＥＰ ４０７１２２）；血管内皮細胞増殖因子アンタゴニスト、（Ｂｏｒｅａｎ，Ｄｅｎｍａｒｋ）；癌治療（Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｓｏｕｔｈ Ｃａｒｏｌｉｎａ，ＵＳＡ）；ベバシズマブ（ｂｅｖａｃｉｚｕｍａｂ）（ｐＩＮＮ）、（Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ，ＵＳＡ）；血管新生阻害剤（ＳＵＧＥＮ，ＵＳＡ）；ＸＬ ７８４、（Ｅｘｅｌｉｘｉｓ，ＵＳＡ）；ＸＬ ６４７、（Ｅｘｅｌｉｘｉｓ，ＵＳＡ）；ＭＡｂ、α５β３インテグリン、第二世代、（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｅｖｏｌｕｔｉｏｎ，ＵＳＡ ａｎｄ ＭｅｄＩｍｍｕｎｅ，ＵＳＡ）；遺伝子療法、網膜症（Ｏｘｆｏｒｄ ＢｉｏＭｅｄｉｃａ，ＵＫ）；エンザスタウリン塩酸塩（ＵＳＡＮ），（Ｌｉｌｌｙ，ＵＳＡ）；ＣＥＰ ７０５５，（Ｃｅｐｈａｌｏｎ，ＵＳＡ ａｎｄ Ｓａｎｏｆｉ－Ｓｙｎｔｈｅｌａｂｏ，Ｆｒａｎｃｅ）；ＢＣ １，（Ｇｅｎｏａ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ ｏｆ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，Ｉｔａｌｙ）；血管新生阻害剤（Ａｌｃｈｅｍｉａ，Ａｕｓｔｒａｌｉａ）；ＶＥＧＦアンタゴニスト、（Ｒｅｇｅｎｅｒｏｎ，ＵＳＡ）；ｒＢＰＩ ２１ 及びＢＰＩ由来血管新生剤、（ＸＯＭＡ，ＵＳＡ）；ＰＩ ８８，（Ｐｒｏｇｅｎ，Ａｕｓｔｒａｌｉａ）；シレンギチド（ｃｉｌｅｎｇｉｔｉｄｅ）（ｐＩＮＮ），（Ｍｅｒｃｋ ＫＧａＡ，Ｇｅｒｍａｎ；Ｍｕｎｉｃｈ Ｔｅｃｈｎｉｃａｌ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ，Ｇｅｒｍａｎｙ，Ｓｃｒｉｐｐｓ Ｃｌｉｎｉｃ ａｎｄ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｆｏｕｎｄａｔｉｏｎ，ＵＳＡ）；セツキシマブ（ｃｅｔｕｘｉｍａｂ）（ＩＮＮ），（Ａｖｅｎｔｉｓ，Ｆｒａｎｃｅ）；ＡＶＥ ８０６２，（Ａｊｉｎｏｍｏｔｏ，Ｊａｐａｎ）；ＡＳ １４０４，（Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，

New Zealand）；SG 292,（Telios, USA）；エンドスタチン、（Boston Children Hospital, USA）；ATN 161、（Attenuon, USA）；ANGIOSTATIN、（Boston Children Hospital, USA）；2－メトキシエストラジオール（Boston Children Hospital, USA）；ZD 6474,（AstraZeneca, UK）；ZD 6126,（Angiogene Pharmaceuticals, UK）；PPI 2458,（Praecis, USA）；AZD 9935,（AstraZeneca, UK）；AZD 2171,（AstraZeneca, UK）；バタラニブ（vatalanib）（pINN）、（Novartis, Switzerland and Schering AG, Germany）；組織因子経路阻害剤（tissue factor pathway inhibitors）（EntreMed, USA）；ペガタニブ（pegaptanib）（Pinn）,（Gilead Sciences, USA）；キサントルリゾール（xanthorrhizol）、（Yonsei University, South Korea）；ワクチン、遺伝子ベース、VEGF－2、（Scripps Clinic and Research Foundation, USA）；SPV5.2、（Supratek, Canada）；SDX 103、（University of California at San Diego, USA）；PX 478、（ProIX, USA）；METASTATIN,（EntreMed, USA）；トロポニン1（Harvard University, USA）；SU 6668,（SUGEN, USA）；OXI 4503,（OXiGENE, USA）；o－グアニジン、（Dimensional Pharmaceuticals, USA）；モツポラミンC（motuporamine C）、（British Columbia University, Canada）；CDP 791,（Celltech Group, UK）；アチプリモド（atiprimo）（pINN）、（GlaxoSmithKline, UK）；E 7820,（Eisai, Japan）；CYC 381,（Harvard University, USA）；AE 941,（Aeterna, Canada）；ワクチン、血管新生、（EntreMed, USA）；ウロキナーゼプラスミノーゲン活性化因子阻害剤、（Dendreon, USA）；オグルファニド（oglufanide）（plNN）、（Melmotte, USA）；HIF－1α阻害剤（Xenova, UK）；CEP 5214,（Cephalon, USA）；BAY RES 2622,（Bayer, Germany）；アンギオシジン（Angiocidin）、（InKine, USA）；A6,（Angstrom, USA）；KR 31372,（Korea Research Institute of Chemical Technology, South Korea）；GW 2286,（GlaxoSmithKline, UK）；EHT 0101,（ExonHit, France）；CP 868596,（Pfizer, USA）；CP 564959,（OSI, USA）；CP 547632,（Pfizer, USA）；786034,（GlaxoSmithKline, UK）；KRN 633,（Kirin Brewery, Japan）；薬物送達系、眼内、2－メトキシエストラジオール（EntreMed, USA）；アンギネックス（anginex）、（Maastricht University, Netherlands, and Minnesota University, USA）；ABT 510、（Abbott, USA）；AAL 993、（Novartis, Switzerland）；VEGI、（ProteomTech, USA）；腫瘍壊死因子－α阻害剤、（National Institute on Aging, USA）；SU 11248、（Pfizer, USA and SUGEN USA）；ABT 518、（Abbott, USA）；YH16、（Yantai Rongchang, China）；S－3APG、（Boston Children Hospital, USA and EntreMed, USA）；MAb, KDR,（ImClone Systems, USA）；MAb、α5 β1、（Protein Design, USA）；KDRキナーゼ阻害剤、

（Ｃｅｌｌｔｅｃｈ Ｇｒｏｕｐ，．ＵＫ，ａｎｄ Ｊｏｈｎｓｏｎ ＆ Ｊｏｈｎｓｏｎ，ＵＳＡ）；ＧＦＢ １１６、（Ｓｏｕｔｈ Ｆｌｏｒｉｄａ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ，ＵＳＡ ａｎｄ Ｙａｌｅ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ，ＵＳＡ）；ＣＳ ７０６、（Ｓａｎｋｙｏ，Ｊａｐａｎ）；コンブレスタチン（ｃｏｍｂｒｅｔａｓｔａｔｉｎ）Ａ４プロドラッグ、（Ａｒｉｚｏｎａ Ｓｔａｔｅ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ，ＵＳＡ）；コンドロイチナーゼＡＣ，（ＩＢＥＸ，Ｃａｎａｄａ）；ＢＡＹ ＲＥＳ ２６９０，（Ｂａｙｅｒ，Ｇｅｒｍａｎｙ）；ＡＧＭ １４７０，（Ｈａｒｖａｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ，ＵＳＡ，Ｔａｋｅｄａ，Ｊａｐａｎ，ａｎｄ ＴＡＰ，ＵＳＡ）；ＡＧ １３９２５，（Ａｇｏｕｒｏｎ，ＵＳＡ）；テトラチオモリブデン酸塩、（Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｍｉｃｈｉｇａｎ，ＵＳＡ）；ＧＣＳ １００、（Ｗａｙｎｅ Ｓｔａｔｅ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ，ＵＳＡ） ＣＶ ２４７、（Ｉｖｙ Ｍｅｄｉｃａｌ，ＵＫ）；ＣＫＤ ７３２、（Ｃｈｏｎｇ Ｋｕｎ Ｄａｎｇ，Ｓｏｕｔｈ Ｋｏｒｅａ）；ＭＡｂ，血管内皮細胞増殖因子、（Ｘｅｎｏｖａ，ＵＫ）；イルソグラジン（ｉｒｓｏｇｌａｄｉｎｅ）（ＩＮＮ）、（Ｎｉｐｐｏｎ Ｓｈｉｎｙａｋｕ，Ｊａｐａｎ）；ＲＧ １３５７７，（Ａｖｅｎｔｉｓ，Ｆｒａｎｃｅ）；ＷＸ ３６０，（Ｗｉｌｅｘ，Ｇｅｒｍａｎｙ）；スクアラミン（ｐＩＮＮ），（Ｇｅｎａｅｒａ，ＵＳＡ）；ＲＰＩ ４６１０，（Ｓｉｒｎａ，ＵＳＡ）；癌療法、（Ｍａｒｉｎｏｖａ，Ａｕｓｔｒａｌｉａ）；ヘパラナーゼ阻害剤、（ＩｎＳｉｇｈｔ，Ｉｓｒａｅｌ）；ＫＬ ３１０６，（Ｋｏｌｏｎ，Ｓｏｕｔｈ Ｋｏｒｅａ）；ホノキオール（Ｈｏｎｏｋｉｏｌ）、（Ｅｍｏｒｙ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ，ＵＳＡ）；ＺＫ ＣＤＫ、（Ｓｃｈｅｒｉｎｇ ＡＧ，Ｇｅｒｍａｎｙ）；ＺＫ Ａｎｇｉｏ，（Ｓｃｈｅｒｉｎｇ ＡＧ，Ｇｅｒｍａｎｙ）；ＺＫ ２２９５６１，（Ｎｏｖａｒｔｉｓ，Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ，ａｎｄ Ｓｃｈｅｒｉｎｇ ＡＧ，Ｇｅｒｍａｎｙ）；ＸＭＰ ３００，（ＸＯＭＡ，ＵＳＡ）；ＶＧＡ １１０２，（Ｔａｉｓｈｏ，Ｊａｐａｎ）；ＶＥＧＦ受容体調節物質、（Ｐｈａｒｍａｃｏｐｅｉａ，ＵＳＡ）；ＶＥ－カドヘリン－２アンタゴニスト、（ＩｍＣｌｏｎｅ Ｓｙｓｔｅｍｓ，ＵＳＡ）；バソスタチン（Ｖａｓｏｓｔａｔｉｎ）、（Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ，ＵＳＡ）；ワクチン、Ｆｌｋ－１、（ＩｍＣｌｏｎｅ Ｓｙｓｔｅｍｓ，ＵＳＡ）；ＴＺ ９３，（Ｔｓｕｍｕｒａ，Ｊａｐａｎ）；ＴｕｍＳｔａｔｉｎ，（Ｂｅｔｈ Ｉｓｒａｅｌ Ｈｏｓｐｉｔａｌ，ＵＳＡ）；末端切断された可溶性ＦＬＴ １（血管内皮増殖因子受容体１），（Ｍｅｒｃｋ ＆ Ｃｏ，ＵＳＡ）；Ｔｉｅ－２リガンド、（Ｒｅｇｅｎｅｒｏｎ，ＵＳＡ）；トロンボスポンジン１阻害剤、（Ａｌｌｅｇｈｅｎｙ Ｈｅａｌｔｈ，Ｅｄｕｃａｔｉｏｎ ａｎｄ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｆｏｕｎｄａｔｉｏｎ，ＵＳＡ）；２－ベンゼンスルホンアミド、４－（５－（４－クロロフェニル）－３－（トリフルオロメチル）－１Ｈ－ピラゾール－１－イル）－；Ａｒｒｉｖａ；およびＣ－Ｍｅｔ．ＡＶＥ ８０６２（（２Ｓ）－２－アミノ－３－ヒドロキシ－Ｎ－［２－メトキシ－５－［（１Ｚ）－２－（３，４，５－トリメトキシフェニル）エテニル］フェニル］プロパンアミド一塩酸塩）；メテリムマブ（ｐＩＮＮ）（免疫グロブリンＧ４、抗（ヒト形質転換増殖因子β１（ヒトモノクローナルＣＡＴ １９２．γ４－鎖））、ヒトモノクローナルＣＡＴ １９２．κ鎖二量体とのジスルフィド）；Ｆｌｔ３リガンド；ＣＤ４０リガンド；インターロイキン－２；インターロイキン－１２；４－１ ＢＢリガンド；抗－４－１ ＢＢ抗体；ＴＮＦアンタゴニストおよびＴＮＦ受容体アンタゴニスト（ＴＮＦＲ／Ｆｃを含む。）、ＴＷＥＡＫ－Ｒ／Ｆｃを含むＴＷＥＡＫアンタゴニストおよびＴＷＥＡＫ－Ｒアンタゴニスト；ＴＲＡＩＬ；抗ＶＥＧＦ抗体を含むＶＥＧＦアンタゴニスト；ＶＥＧＦ受容体（ＶＥＧＦ－Ｒ１およびＶＥＧＦ－Ｒ２を含む。Ｆｌｔ１およびＦｌｋ１又はＫＤＲとしても知られる。）アンタゴニスト；ＣＤ１４８（ＤＥＰ－１、ＥＣＲＴＰおよびＰＴＰＲＪとも称される。Ｔａｋａｈａｓｈｉ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ａｍ．Ｓｏｃ．Ｎｅｐｈｒｏｌ．１０：２１３５－４５（１９９９）を参照。参照により、いかなる目的のためにも、本明細書に組み込まれる。）アゴニスト；トロンボスポンジン１阻害剤、並びにＴｉｅ－２又はＴｉｅ－２リガンドの一方又は両方の阻害剤（Ａｎｇ－２など

）が含まれるが、これらに限定されるものではない。公開された米国特許出願２００３０１２４１２９（ＰＣＴ出願　ＷＯ　０３／０３０８３３に対応する。）および米国特許第６，１６６，１８５号（その内容は、参照により、その全体が本明細書に組み込まれる。）に記載されている抗Ａｎｇ－２抗体を含む、Ａｎｇ－２の多数の阻害剤が本分野で知られている。さらに、Ａｎｇ－２ペプチボディも本分野で公知であり、例えば、米国特許出願２００３０２２９０２３（ＰＣＴ出願　ＷＯ　０３／０５７１３４に対応する。）および公開された米国特許第２００３０２３６１９３号（その内容は、参照により、その全体が本明細書に組み込まれる。）に見出すことができる。

【０１６８】

ある種の癌治療剤には、サリドマイド及びサリドマイド類縁体（Ｎ－（２，６－ジオキソ－３－ピペリジル）フタルイミド）；テコガランナトリウム（硫酸化多糖ペプチドグリカン）；ＴＡＮ１１２０（８－アセチル－７，８，９，１０－テトラヒドロ－６，８，１１－トリヒドロキシ－１－メトキシ－１０－［［オクタヒドロ－５－ヒドロキシ－２－（２－ヒドロキシプロピル）－４，１０－ジメチルピラノ［３，４－ｄ］－１，３，６－ジオキサゾシン－８－イル］オキシ］－５，１２－ナフタセンジオン）；スラジスタ（７，７’－［カルボニルビス［イミノ（１－メチル－１Ｈ－ピロール－４，２－ジイル）カルボニルイミノ（１－メチル－１Ｈ－ピロール－４，２－ジイル）カルボニルイミノ］］ビス－１，３－ナフタレンジスルホン酸テトラナトリウム塩）；ＳＵ３０２；ＳＵ３０１；ＳＵ１４９８（（Ｅ）－２－シアノ－３－［４－ヒドロキシ－３，５－ビス（１－メチルエチル）フェニル］－Ｎ－（３－フェニルプロピル）－２－プロペンアミド）；ＳＵ１４３３（４－（６，７－ジメチル－２－キノキサリニル）－１，２－ベンゼンジオール）；ＳＴ１５１４；ＳＲ２５９８９；可溶性Ｔｉｅ－２；ＳＥＲＭ誘導体，Ｐｈａｒｍｏｓ；セマキサニブ（ｓｅｍａｘａｎｉｂ）（ｐＩＮＮ）（３－［（３，５－ジメチル－１Ｈ－ピロル－２－イル）メチレン］－１，３－ジヒドロ－２Ｈ－インドール－２－オン）；Ｓ８３６；ＲＧ８８０３；ＲＥＳＴＩＮ；Ｒ４４０（３－（１－メチル－１Ｈ－インドール－３－イル）－４－（１－メチル－６－ニトロ－１Ｈ－インドール－３－イル）－１Ｈ－ピロール－２，５－ジオン）；Ｒ１２３９４２（１－［６－（１，２，４－チアジアゾール－５－イル）－３－ピリダジニル］－Ｎ－［３－（トリフルオロメチル）フェニル］－４－ピペリジンアミン）；プロリルヒドロキシラーゼ阻害剤；進行性上昇遺伝子（ｐｒｏｇｒｅｓｓｉｏｎ　ｅｌｅｖａｔｅｄ　ｇｅｎｅｓ）；プリノマスタット（ｐｒｉｎｏｍａｓｔａｔ）（ＩＮＮ）（（Ｓ）－２，２－ジメチル－４－［［ｐ－（４－ピリジルオキシ）フェニル］スルホニル］－３－チオモルホリンカルボヒドロキサム酸）；ＮＶ１０３０；ＮＭ３（８－ヒドロキシ－６－メトキシ－ａｌｐｈａ－メチル－１－オキソ－１Ｈ－２－ベンゾピラン－３－酢酸）；ＮＦ６８１；ＮＦ０５０；ＭＩＧ；ＭＥＴＨ２；ＭＥＴＨ１；マナスサンチン　Ｂ（ｍａｎａｓｓａｎｔｉｎ　Ｂ）（α－［１－［４－［５－［４－［２－（３，４－ジメトキシフェニル）－２－ヒドロキシ－１－メチルエトキシ］－３－メトキシフェニル］テトラヒドロ－３，４－ジメチル－２－フラニル］－２－メトキシフェノキシ］エチル］－１，３－ベンゾジオキソール－５－メタノール）；ＫＤＲモノクローナル抗体；α５β３インテグリンモノクローナル抗体；ＬＹ２９０２９３（２－アミノ－４－（３－ピリジニル）－４Ｈ－ナフト［１，２－ｂ］ピラン－３－カルボニトリル）；ＫＰ　０２０１４４８；ＫＭ２５５０；インテグリン－特異的ペプチド；ＩＮＧＮ　４０１；ＧＹＫＩ　６６４７５；ＧＹＫＩ　６６４６２；グリーンスタチン（１０１－３５４－プラスミノーゲン（ヒト））；関節リウマチ、前立腺癌、卵巣癌、神経膠腫、エンドスタチン、結腸直腸癌、ＡＴＦ　ＢＴＰＩ、抗血管新生遺伝子、血管新生阻害剤又は血管新生、のための遺伝子治療；ゼラチナーゼ阻害剤、ＦＲ１１１１４２（４，５－ジヒドロキシ－２－ヘキセン酸５－メトキシ－４－［２－メチル－３－（３－メチル－２－ブテニル）オキシラニル］－１－オキサスピロ［２．５］オクト－６－イルエステル）；フォルフェニメックス（ｆｏｒｆｅｎｉｍｅｘ）（ｐＩＮＮ）（Ｓ）－α－アミノ－３－ヒドロキシ－４－（ヒドロキシメチル）ベンゼン酢酸）；フィブロネクチンアンタゴニスト（１－アセチル－Ｌ－プロリル－Ｌ－ヒスチジル－Ｌ－セリル－Ｌ－システイニル－Ｌ－

アスパルタミド）；繊維芽細胞増殖因子受容体阻害剤；繊維芽細胞増殖因子アンタゴニスト；ＦＣＥ２７１６４（７，７’－［カルボニルビス［イミノ（１－メチル－１Ｈ－ピロール－４，２－ジイル）カルボニルイミノ（１－メチル－１Ｈ－ピロール－４，２－ジイル）カルボニルイミノ］］ビス－１，３，５－ナフタレントリスルホン酸ヘキササトリウム塩）；ＦＣＥ２６７５２（８，８’－［カルボニルビス［イミノ（１－メチル－１Ｈ－ピロール－４，２－ジイル）カルボニルイミノ（１－メチル－１Ｈ－ピロール－４，２－ジイル）カルボニルイミノ］］ビス－１，３，６－ナフタレントリスルホン酸）；内皮単球活性化ポリペプチドＩＩ；ＶＥＧＦＲアンチセンスオリゴヌクレオチド；抗血管新生及び栄養性因子；ＡＮＣＨＯＲ血管新生抑制剤；エンドスタチン；Ｄｅｌ－１血管新生タンパク質；ＣＴ　３５７７；コントートロスタチン；ＣＭ　１０１；コンドロイチナーゼＡＣ；ＣＤＰ　８４５；ＣａｎＳｔａｔｉｎ；ＢＳＴ　２００２；ＢＳＴ　２００１；ＢＬＳ　０５９７；ＢＩＢＦ　１０００；ＡＲＲＥＳＴＩＮ；アポミグレン（１３０４－１３８８－タイプ　ＸＶコラーゲン（ヒト遺伝子ＣＯＬ１５Ａ１　α１－鎖前駆体））；アンギオインヒビン；ａａＡＴＩＩＩ；Ａ３６；９α－フルオロメドロキシプロゲステロンアセテート（（６－α）－１７－（アセチルオキシ）－９－フルオロ－６－メチル－プレグン－４－エン－３，２０－ジオン）；２－メチル－２－フタルイミジノ－グルタル酸（２－（１，３－ジヒドロ－１－オキソ－２Ｈ－イソインドール－２－イル）－２－メチルペンタジオン酸）；イットリウム９０標識されたモノクローナル抗体ＢＣ－１；Ｓｅｍａｘａｎｉｂ（３－（４，５－ジメチルピロル－２－イルメチレン）インドリン－２－オン）（Ｃ１５Ｈ１４Ｎ２Ｏ）；ＰＩ８８（ホスホマンノペンタオースサルフェート）；Ａｌｖｏｃｉｄｉｂ（４Ｈ－１－ベンゾピラン－４－オン，２－（２－クロロフェニル）－５，７－ジヒドロキシ－８－（３－ヒドロキシ－１－メチル－４－ピペリジニル）－ｃｉｓ－（－）－）（Ｃ２１Ｈ２０ＣｌＮＯ５）；Ｅ７８２０；ＳＵ１１２４８（５－［３－フルオロ－２－オキソ－１，２－ジヒドロインドール－（３Ｚ）－イリデンメチル］－２，４－ジメチル－１Ｈ－ピロール－３－カルボン酸（２－ジエチルアミノエチル）アミド）（Ｃ２２Ｈ２７ＦＮ４Ｏ２）；スクアラミン（コレスタン－７，２４－ジオール，３－［［３－［（４－アミノブチル）アミノプロピル］アミノ］－，２４－（硫酸水素塩），（３．β，５．α．，７．α．）－）（Ｃ３４Ｈ６５Ｎ３Ｏ５Ｓ）；Ｅｒｉｏｃｈｒｏｍｅ　Ｂｌａｃｋ　Ｔ；ＡＧＭ１４７０（カルバミン酸，（クロロアセチル）－，５－メトキシ－４－［２－メチル－３－（３－メチル－２－ブテニル）オキシラニル］－１－オキサスピロ［２，５］オクト－６－イルエステル，［３Ｒ－［３α，４α（２Ｒ，３Ｒ），５β，６β］］）（Ｃ１９Ｈ２８ＣｌＮＯ６）；ＡＺＤ９９３５；ＢＩＢＦ　１０００；ＡＺＤ　２１７１；ＡＢＴ　８２８；ＫＳ－インターロイキン－２；ウテログロビン；Ａ６；ＮＳＣ６３９３６６（１－［３－（ジエチルアミノ）－２－ヒドロキシプロピルアミノ］－４－（オキシラン－２－イルメチルアミノ）アントラキノン・フメラート）（Ｃ２４Ｈ２９Ｎ３Ｏ４．Ｃ４Ｈ４Ｏ４）；ＩＳＶ　６１６；抗－ＥＤ－Ｂ融合タンパク質；ＨＵＩ　７７；Ｔｒｏｐｏｎｉｎ　１；ＢＣ－１モノクローナル抗体；ＳＰＶ　５．２；ＥＲ６８２０３；ＣＫＤ　７３１（３－（３，４，５－トリメトキシフェニル）－２（Ｅ）－プロペン酸（３Ｒ，４Ｓ，５Ｓ，６Ｒ）－４－［２（Ｒ）－メチル－３（Ｒ）－３（Ｒ）－（３－メチル－２－ブテニル）オキシラン－２－イル］－５－メトキシ－１－オキサスピロ［２．５］オクト－６－イルエステル）（Ｃ２８Ｈ３８Ｏ８）；ＩＭＣ－１Ｃ１１；ａａＡＴＩＩＩ；ＳＣ　７；ＣＭ　１０１；Ａｎｇｉｏｃｏｌ；Ｋｒｉｎｇｌｅ　５；ＣＫＤ　７３２（３－［４－［２－（ジメチルアミノ）エトキシ］フェニル］－２（Ｅ）－プロペン酸）（Ｃ２９Ｈ４１ＮＯ６）；Ｕ９９５；Ｃａｎｓｔａｔｉｎ；ＳＱ８８５；ＣＴ２５８４（１－［１１－（ドデシルアミノ）－１０－ヒドロキシウンデシル］－３，７－ジメチルキサンチン）（Ｃ３０Ｈ５５Ｎ５Ｏ３）；Ｓａｌｍｏｓｉｎ；ＥＭＡＰＩＩ；ＴＸ１９２０（１－（４－メチルピペラジノ）－２－（２－ニトロ－１Ｈ－１－イミダゾイル）－１－エタノン）（Ｃ１０Ｈ１５Ｎ５Ｏ３）；Ａｌｐｈａ－ｖＢｅｔａ－ｘ阻害剤；ＣＨＩＲ　１１５０９（Ｎ－（１－プロピニル）グリシル－［Ｎ－（２－ナフチル）］グリシル－［Ｎ－（カルバモイルメチル）］グリシン　ビス（４－メトキシフェニル）メ

チルアミド）（Ｃ３６Ｈ３７Ｎ５Ｏ６）；ＢＳＴ２００２；ＢＳＴ２００１；Ｂ０８２９；ＦＲ１１１１４２；４，５－ジヒドロキシ－２（Ｅ）－ヘキセン酸（３Ｒ，４Ｓ，５Ｓ，６Ｒ）－４－［１（Ｒ），２（Ｒ）－エポキシ－１，５－ジメチル－４－ヘキセニル］－５－メトキシ－１－オキサスピロ［２．５］オクター６－イルエステル（Ｃ２２Ｈ３４Ｏ７）；及びキナーゼ阻害剤、Ｎ－（４－クロロフェニル）－４－（４－ピリジニルメチル）－１－フタラジナミドを含むが、これに限定されない；４－［４－［［［［４－クロロ－３－（トリフルオロメチル）フェニル］アミノ］カルボニル］アミノ］フェノキシ］－Ｎ－メチル－２－ピリジンカルボキサミド；Ｎ－［２－（ジエチルアミノ）エチル］－５－［（５－フルオロ－１，２－ジヒドロ－２－オキソ－３Ｈ－インドール－３－イリデン）メチル］－２，４－ジメチル－１Ｈ－ピロール－３－カルボキサミド；３－［（４－ブロモ－２，６－ジフルオロフェニル）メトキシ］－５－［［［［４－（１－ピロリジニル）ブチル］アミノ］カルボニル］アミノ］－４－イソチアゾールカルボキサミド；Ｎ－（４－ブロモ－２－フルオロフェニル）－６－メトキシ－７－［（１－メチル－４－ピペリジニル）メトキシ］－４－キナゾリンアミン；３－［５，６，７，１３－テトラヒドロ－９－［（１－メチルエトキシ）メチル］－５－オキソ－１２Ｈ－インデノ［２，１－ａ］ピロロ［３，４－ｃ］カルバゾール－１２－イル］プロピルエステル　Ｎ，Ｎ－ジメチル－グリシン；Ｎ－［５－［［［５－（１，１－ジメチルエチル）－２－オキサゾリル］メチル］チオ］－２－チアゾリル］－４－ピペリジンカルボキサミド；Ｎ－［３－クロロ－４－［（３－フルオロフェニル）メトキシ］フェニル］－６－［５－［［［２－（メチルスルホニル）エチル］アミノ］メチル］－２－フラニル］－４－キナゾリンアミン；４－［（４－メチル－１－ピペラジニル）メチル］－Ｎ－［４－メチル－３－［［４－（３－ピリジニル）－２－ピリミジニル］アミノ］－フェニル］ベンズアミド；Ｎ－（３－クロロ－４－フルオロフェニル）－７－メトキシ－６－［３－（４－モルホリニル）プロポキシ］－４－キナゾリンアミン；Ｎ－（３－エチニルフェニル）－６，７－ビ（２－メトキシエトキシ）－４－キナゾリンアミン；Ｎ－（３－（（（（２Ｒ）－１－メチル－２－ピロリジニル）メチル）オキシ）－５－（トリフルオロメチル）フェニル）－２－（（３－（１，３－オキサゾール－５－イル）フェニル）アミノ）－３－ピリジンカルボキサミド；２－（（（４－フルオロフェニル）メチル）アミノ）－Ｎ－（３－（（（（２Ｒ）－１－メチル－２－ピロリジニル）メチル）オキシ）－５－（トリフルオロメチル）フェニル）－３－ピリジンカルボキサミド；Ｎ－［３－（アゼチジン－３－イルメトキシ）－５－トリフルオロメチル－フェニル］－２－（４－フルオロ－ベンジルアミノ）－ニコチンアミド；６－フルオロ－Ｎ－（４－（１－メチルエチル）フェニル）－２－（（４－ピリジニルメチル）アミノ）－３－ピリジンカルボキサミド；２－（（４－ピリジニルメチル）アミノ）－Ｎ－（３－（（（２Ｓ）－２－ピロリジニルメチル）オキシ）－５－（トリフルオロメチル）フェニル）－３－ピリジンカルボキサミド；Ｎ－（３－（１，１－ジメチルエチル）－１Ｈ－ピラゾール－５－イル）－２－（（４－ピリジニルメチル）アミノ）－３－ピリジンカルボキサミド；Ｎ－（３，３－ジメチル－２，３－ジヒドロ－１－ベンゾフラン－６－イル）－２－（（４－ピリジニルメチル）アミノ）－３－ピリジンカルボキサミド；Ｎ－（３－（（（（２Ｓ）－１－メチル－２－ピロリジニル）メチル）オキシ）－５－（トリフルオロメチル）フェニル）－２－（（４－ピリジニルメチル）アミノ）－３－ピリジンカルボキサミド；２－（（４－ピリジニルメチル）アミノ）－Ｎ－（３－（（２－（１－ピロリジニル）エチル）オキシ）－４－（トリフルオロメチル）フェニル）－３－ピリジンカルボキサミド；Ｎ－（３，３－ジメチル－２，３－ジヒドロ－１Ｈ－インドール－６－イル）－２－（（４－ピリジニルメチル）アミノ）－３－ピリジンカルボキサミド；Ｎ－（４－（ペンタフルオロエチル）－３－（（（２Ｓ）－２－ピロリジニルメチル）オキシ）フェニル）－２－（（４－ピリジニルメチル）アミノ）－３－ピリジンカルボキサミド；Ｎ－（３－（（３－アゼチジニルメチル）オキシ）－５－（トリフルオロメチル）フェニル）－２－（（４－ピリジニルメチル）アミノ）－３－ピリジンカルボキサミド；Ｎ－（３－（４－ピペリジニルオキシ）－５－（トリフルオロメチル）フェ

ニル）－２－（（２－（３－ピリジニル）エチル）アミノ）－３－ピリジンカルボキサミド；Ｎ－（４，４－ジメチル－１，２，３，４－テトラヒドロ－イソキノリン－７－イル）－２－（１Ｈ－インダゾール－６－イルアミノ）－ニコチンアミド；２－（１Ｈ－インダゾ－６－イルアミノ）－Ｎ－［３－（１－メチルピロリジ－２－イルメトキシ）－５－トリフルオロメチル－フェニル］－ニコチンアミド；Ｎ－［１－（２－ジメチルアミノ－アセチル）－３，３－ジメチル－２，３－ジヒドロ－１Ｈ－インドール－６－イル］－２－（１Ｈ－インダゾ－６－イルアミノ）－ニコチンアミド；２－（１Ｈ－インダゾ－６－イルアミノ）－Ｎ－［３－（ピロリジ－２－イルメトキシ）－５－トリフルオロメチル－フェニル］－ニコチンアミド；Ｎ－（１－アセチル－３，３－ジメチル－２，３－ジヒドロ－１Ｈ－インドール－６－イル）－２－（１Ｈ－インダゾ－６－イルアミノ）－ニコチンアミド；Ｎ－（４，４－ジメチル－１－オキソ－１，２，３，４－テトラヒドロ－イソキノリン－７－イル）－２－（１Ｈ－インダゾ－６－イルアミノ）－ニコチンアミド；Ｎ－［４－（ｔｅｒｔ－ブチル）－３－（３－ピペリジルプロピル）フェニル］［２－（１Ｈ－インダゾ－６－イルアミノ）（３－ピリジル）］カルボキサミド；Ｎ－［５－（ｔｅｒｔ－ブチル）イソキサゾール－３－イル］［２－（１Ｈ－インダゾ－６－イルアミノ）（３－ピリジル）］カルボキサミド；及びＮ－［４－（ｔｅｒｔ－ブチル）フェニル］［２－（１Ｈ－インダゾ－６－イルアミノ）（３－ピリジル）］カルボキサミド、並びに米国特許第６，２５８，８１２号；第６，２３５，７６４号；第６，６３０，５００号；第６，５１５，００４号；第６，７１３，４８５号；第５，５２１，１８４号；第５，７７０，５９９号；第５，７４７，４９８号；第５，９９０，１４１号；米国特許公開ＵＳ２００３０１０５０９１号；特許協力条約公開ＷＯ０１／３７８２０；ＷＯ０１／３２６５１；ＷＯ０２／６８４０６；ＷＯ０２／６６４７０；ＷＯ０２／５５５０１；ＷＯ０４／０５２７９；ＷＯ０４／０７４８１；ＷＯ０４／０７４５８；ＷＯ０４／０９７８４；ＷＯ０２／５９１１０；ＷＯ９９／４５００９；ＷＯ９８／３５９５８；ＷＯ００／５９５０９；ＷＯ９９／６１４２２；ＷＯ００／１２０８９；及びＷＯ００／０２８７１（出版物のそれぞれは、参照により、いかなる目的のためにも本明細書に組み込まれる。）に開示されているキナーゼ阻害剤が含まれるが、これらに限定されない。

【０１６９】

ある実施形態において、ＨＧＦに対する特異的結合因子は、癌治療剤を用いた治療の前、治療と同時および治療後に投与することができる。ある実施形態において、ＨＧＦに対する特異的結合因子は、転移性癌による骨量減少の発症を予防し、又は軽減するために、予防的に投与することができる。ある実施形態において、ＨＧＦに対する特異的結合因子は、転移による骨量減少の既存の症状を治療するために投与することができる。

【０１７０】

典型的な癌には、乳癌、結腸直腸癌、胃癌、神経膠腫、頭頸部扁平上皮癌、遺伝性及び突発性乳頭状腎細胞癌、白血病、リンパ腫、リー－フラウメニ癌症候群、悪性胸膜中皮腫、悪性黒色腫、多発性骨髄腫、非小細胞肺癌、骨肉種、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、小細胞肺癌、滑膜肉腫、甲状腺癌及び膀胱の移行上皮癌が含まれるが、これらに限定されない。

【０１７１】

ある実施形態において、ＨＧＦに対する特異的結合因子は、単独で、又は癌を治療するための、少なくとも一つの追加の治療剤とともに使用することができる。ある実施形態において、ＨＧＦに対する特異的結合因子は、追加の治療剤の治療的有効量とともに使用される。ＨＧＦに対する特異的結合因子とともに投与され得る典型的な治療剤には、アニサマイシン抗生物質のゲルダナマイシンファミリーに属する要素；Ｐｒｏ－ＨＧＦ；ＮＫ２；ｃ－Ｍｅｔペプチド阻害剤；Ｇｒｂ２　Ｓｒｃホモロジー２のアンタゴニスト；Ｇａｂ１調節物質；ドミナントネガティブＳｒｃ；フォンーヒッペルーランダウ阻害剤（ウォルトマンニンを含むが、これに限定されない。）；Ｐ１３キナーゼ阻害剤、その他の抗受容体治療、抗ＥＧＦＲ、ＣＯＸ－２阻害剤、Ｃｅｌｅｂｒｅｘ™、ＶＩＯＸＸ™；血管内皮細胞増殖因子（ＶＥＧＦ）；ＶＥＧＦ調節物質；繊維芽細胞増殖因子（ＦＧＦ）、Ｆ

ＧＦ調節物質、上皮増殖因子（ＥＧＦ）；ＥＧＦ調節物質；ケラチン生成細胞増殖因子（ＫＧＦ）；ＫＧＦ関連分子；ＫＧＦ調節物質；マトリックスメタロプロテイナーゼ（ＭＭＰ）調節物質が含まれるが、これらに限定されない。

【０１７２】

ある実施形態において、ＨＧＦに対する特異的結合因子は、様々な癌を治療するための具体的な治療剤とともに使用される。ある実施形態において、ＨＧＦに対する特異的結合因子は、マラリアを治療又は予防するための具体的な治療剤とともに使用される。ある実施形態において、ＨＧＦに対する特異的結合因子は、増殖性糖尿病網膜症を治療又は予防するための具体的な治療剤とともに使用される。ある実施形態において、症状の観点及び所望される治療の観点から、２、３又はそれ以上の薬剤を投与し得る。ある実施形態において、このような薬剤は、同じ製剤に含めることによって、一緒に提供され得る。ある実施形態において、このような薬剤及びＨＧＦに対する特異的結合因子は、同じ製剤に含めることによって、一緒に提供され得る。ある実施形態において、このような薬剤は別々に調合され、治療キットに含めることによって、一緒に提供され得る。ある実施形態において、このような薬剤及びＨＧＦに対する特異的結合因子は、別々に調合され、治療キットに含めることによって、一緒に提供され得る。ある実施形態において、このような薬剤は別々に提供され得る。ある実施形態において、遺伝子治療によって投与されたときに、タンパク質因子をコードする遺伝子、及びＨＧＦに対する特異的結合因子は、同じベクター中に含めることができる。ある実施形態において、タンパク質因子をコードする遺伝子、及び／又はＨＧＦに対する特異的結合因子は、同じプロモーター領域の制御下に置くことができる。ある実施形態において、タンパク質因子をコードする遺伝子及び／又はＨＧＦに対する特異的結合因子は、別個のベクター中に存在し得る。

【０１７３】

ある実施形態において、本発明は、薬学的に許容される、希釈剤、担体、可溶化剤、乳化剤、防腐剤及び／又は佐剤とともに、ＨＧＦに対する特異的結合因子を含む薬学的組成物を提供する。

【０１７４】

ある実施形態において、本発明は、薬学的に許容される、希釈剤、担体、可溶化剤、乳化剤、防腐剤及び／又は佐剤とともに、ＨＧＦに対する特異的結合因子と、少なくとも一つの追加の治療剤の治療的有効量とを含む薬学的組成物を提供する。

【０１７５】

ある実施形態において、本発明は、ＨＧＦに対する特異的結合因子と少なくとも一つのセリンプロテアーゼ阻害剤とを含む治療剤、及びこのような治療剤を用いた治療法に関する。ある実施形態において、治療剤は、ＨＧＦに対する特異的結合因子と、セリンプロテアーゼ阻害剤と、本明細書に記載されている少なくとも一つの追加の分子とを含む。

【０１７６】

ある例では、プロテアーゼ／プロテアーゼ阻害剤バランスの乱れが、プロテアーゼによって媒介される組織の破壊（転移を引き起こす、正常組織への腫瘍の浸潤を含むが、これに限定されない。）をもたらすことがある。

【０１７７】

ある実施形態において、ＨＧＦに対する特異的結合因子は、少なくとも一つの炎症用治療剤とともに使用され得る。ある実施形態において、ＨＧＦに対する特異的結合因子は、少なくとも一つの免疫疾患用治療剤とともに使用され得る。炎症及び免疫疾患用の典型的な治療剤には、シクロオキシゲナーゼ１型（ＣＯＸ－１）及びシクロオキシゲナーゼ２型（ＣＯＸ－２）阻害剤、３８ｋＤａマイトージェン活性化タンパク質キナーゼ（ｐ３８－ＭＡＰＫ）の小分子調節物質；炎症経路に関与する細胞内分子の小分子調節物質（このような細胞内分子には、ｊｎｋ、ＩＫＫ、ＮＦ－ＫＢ、ＺＡＰ－７０及びＩｃｋが含まれるが、これらに限定されない。）が含まれるがこれらに限定されない。炎症用の典型的な治療剤の幾つかは、例えば、「Ｃ．Ａ．　Ｄｉｎａｒｅｌｌｏ　ａｎｄ　Ｌ．Ｌ．　Ｍｏｌｄａｗｅｒ　Ｐｒｏｉｎｆｌａｍｍａｔｏｒｙ　ａｎｄ　Ａｎｔｉ－Ｉｎｆｌａｍｍａｔ

ｏｒｙ Ｃｙｔｏｋｉｎｅｓ ｉｎ Ｒｈｅｕｍａｔｏｉｄ Ａｒｔｈｒｉｔｉｓ：Ａ Ｐｒｉｍｅｒ ｆｏｒ Ｃｌｉｎｉｃｉａｎｓ Ｔｈｉｒｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ（２００１）Ａｍｇｅｎ Ｉｎｃ．Ｔｈｏｕｓａｎｄ Ｏａｋｓ，ＣＡ」に記載されている。

【０１７８】

ある実施形態において、薬学的組成物は、異なる、ＨＧＦに対する特異的結合因子を２以上含むであろう。ある実施形態において、薬学的組成物は、２以上のエピトープを結合する、ＨＧＦに対する特異的結合因子を２以上含むであろう。

【０１７９】

ある実施形態において、許容される製剤材料は、好ましくは、使用される用量及び濃度で、レシピエントに対して無毒である。

【０１８０】

ある実施形態において、前記薬学的組成物は、例えば、組成物の、ｐＨ、浸透圧、粘度、透明度、色、等張度、匂い、無菌性、安定性、溶解又は放出速度、吸着又は進入を改変し、維持し、又は保存するための、製剤材料を含有することができる。ある実施形態において、適切な製剤材料には、アミノ酸（グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン又はリジンなど）；抗菌剤；抗酸化剤（アスコルビン酸、亜硫酸ナトリウム又は亜硫酸水素ナトリウム）；緩衝剤（ホウ酸塩、重炭酸塩、Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、クエン酸塩、リン酸塩又はその他の有機酸など）；増量剤（マニトール又はグリシンなど）；キレート剤（エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）など）；錯化剤（カフェイン、ポリビニルピロリドン、β－シクロデキストリン又はヒドロキシプロピル－β－シクロデキストリンなど）；充填剤；単糖；二糖；及び他の炭水化物（グルコース、マンノース又はデキストリンなど）；タンパク質（血清アルブミン；ゼラチン又は免疫グロブリンなど）；着色、着香及び希釈剤；乳化剤；親水性ポリマー（ポリビニルピロリドンなど）；低分子量ポリペプチド；塩形成カウンターイオン（ナトリウムなど）；防腐剤（塩化ベンズアルコニウム、安息香酸、サリチル酸、チメロサール、フェネチルアルコール、メチルパラベン、プロピルパラベン、クロルヘキシジン、ソルビン酸又は過酸化水素）；溶媒（グリセリン、プロピレングリコール又はポリエチレングリコールなど）；糖アルコール（マニトール又はソルビトールなど）；懸濁剤；界面活性剤又は湿潤剤（プルロニック、ＰＥＧ、ソルビタンエステル、ポリソルベート２０、ポリソルベート８０などのポリソルベート、トリトン、トロメタミン、レシチン、コレステロール、チロキサパル（ｔｙｌｏｘａｐａｌ）など）；安定性強化剤（スクロース又はスロビトールなど）；張度増強剤（アルカリ金属ハロゲン化物、好ましくは塩化ナトリウム又は塩化カリウム、マニトール　ソルビトールなど）；送達ビヒクル；希釈剤；賦形剤及び／又は薬学的佐剤が含まれるが、これらに限定されない。（Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，１８^{ｔｈ} Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ａ．Ｒ．Ｇｅｎｎａｒｏ，ｅｄ．，Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏｍｐａｎｙ（１９９０）。

【０１８１】

ある実施形態において、ＨＧＦに対する特異的結合因子及び／又は治療分子は、本分野で公知の半減期延長ビヒクルに連結されている。このようなビヒクルには、ポリエチレングリコール及びデキストランが含まれるが、これらに限定されない。このようなビヒクルは、例えば、米国出願０９／４２８，０８２及び公開されたＰＣＴ出願ＷＯ　９９／２５０４４に記載されており、これらは、参照により、いかなる目的のためにも本明細書に組み込まれる。

【０１８２】

ある実施形態において、最適な薬学的組成物は、例えば、所期の投与経路、送達フォーマット及び所望される投薬量に応じて、当業者によって決定されるであろう。例えば、「Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，上記」を参照されたい。ある実施形態において、このような組成物は、物理的状態、安定性、インビボでの放出速度及び本発明の抗体のインビボでのクリアランス速度に影響を与え得る。

【０１８３】

ある実施形態において、薬学的組成物中の主要なビヒクル又は担体は、性質上、水性又は非水性の何れかであり得る。

【０１８４】

例えば、ある実施形態において、適切なビヒクル又は担体は、非経口投与用組成物において一般的な他の物質を補充できる、注射用水、生理的食塩水溶液又は人工の脳脊髄液であり得る。ある実施形態において、中性の緩衝された生理的食塩水又は血清アルブミンと混合された生理的食塩水は、さらに典型的なビヒクルである。ある実施形態において、薬学的組成物は、ｐＨ約７．０から８．５のＴｒｉｓ緩衝液、又は約４．０から５．５の酢酸緩衝液を含み、緩衝液は、ソルビトール又は適切な代替物をさらに含み得る。ある実施形態において、少なくとも一つの追加の治療剤とともに、又は少なくとも一つの追加の治療剤なしに、ＨＧＦに対する特異的結合因子を含む組成物は、所望の純度を有する選択された組成物を、凍結乾燥ケーキ又は水溶液の形態の、必要に応じて加えられる製剤因子（Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，　上記）と混合することによって、保存用に調製され得る。さらに、ある実施形態において、少なくとも一つの追加の治療剤とともに、又は少なくとも一つの追加の治療剤なしに、ＨＧＦに対する特異的結合因子を含む組成物は、スクロースなどの適切な賦形剤を用いて、凍結乾燥物として調合され得る。

【０１８５】

ある実施形態において、本発明の薬学的組成物は、非経口的送達のために選択することができる。ある実施形態において、前記組成物は、吸入用に、又は消化管を通じた送達用に（例えば、経口的に）選択され得る。このような薬学的に許容される組成物の調製は、本分野の技術に属する。

【０１８６】

ある実施形態において、製剤成分は、投与部位に対して許容される濃度で存在する。ある実施形態において、生理的なｐＨ又はこれより若干低いｐＨに、典型的には約５から約８の範囲のｐＨ内に組成物を維持するために、緩衝剤が使用される。

【０１８７】

ある実施形態において、非経口投与が想定されるときには、治療用組成物は、薬学的に許容されるビヒクル中に、追加の治療剤を加え又は加えずに、ＨＧＦに対する所望の特異的結合因子を含む非経口的に許容される、水発熱物質を含まない水溶液の形態であり得る。ある実施形態において、非経口注射用ビヒクルは、少なくとも一つの追加の治療剤を加え又は加えずに、ＨＧＦに対する特異的結合因子が、適切に防腐された無菌の等張溶液として調合されている、無菌蒸留水である。ある実施形態において、前記調製は、産物の徐放又は持続的放出を与えた後に持続性注射を介して送達され得る、注射可能な小球、生物侵食可能な粒子、ポリマー化合物（ポリ乳酸又はポリグリコール酸など）、ビーズ又はリポソームなどの因子とともに、所望の分子を調合することを含むことができる。ある実施形態において、ヒハルロン酸を使用することもでき、循環中の持続期間を促進する効果を有し得る。ある実施形態において、インプラント可能な薬物送達装置は、所望の分子を導入するために使用し得る。

【０１８８】

ある実施形態において、薬学的組成物は吸入用に調合され得る。ある実施形態において、少なくとも一つの追加の治療剤を加え又は加えていない、ＨＧＦに対する特異的結合因子は、吸入用乾燥粉末として調合され得る。ある実施形態において、少なくとも一つの追加の治療剤を加え又は加えずに、ＨＧＦに対する特異的結合因子を含む吸入溶液は、エアロゾル送達用の噴射剤とともに調合され得る。ある実施形態において、溶液は噴霧され得る。経肺投与は、さらに、化学的に修飾されたタンパク質の経肺送達を記載するＰＣＴ出願ＰＣＴ／ＵＳ９４／００１８７５に記載されている。

【０１８９】

ある実施形態において、製剤は経口的に投与され得ることが想定される。ある実施形態において、少なくとも一つの追加の治療剤を加え又は加えずに、このようにして投与され

る、ＨＧＦに対する特異的結合因子は、錠剤及びカプセルなどの固体剤形の配合に通例使用される担体を加え又は加えずに調合され得る。ある実施形態において、生物利用可能性を最大化し、前全身的分解を最小化する場合には、カプセルは、胃腸管中の点で、製剤の活性部分を放出するように設計され得る。ある実施形態において、ＨＧＦに対する特異的結合因子及び／又は任意の追加治療剤の吸収を促進するために、少なくとも一つの追加剤を含めることができる。ある実施形態において、希釈剤、着香剤、低融点蝋、植物油、潤滑剤、懸濁剤、錠剤崩壊剤及び結合剤も使用し得る。

【０１９０】

ある実施形態において、薬学的組成物は、錠剤の製造に適した無毒の賦形剤との混合物中に、少なくとも一つの追加の治療剤を加え又は加えずに、ＨＧＦに対する特異的結合因子の有効量を含み得る。ある実施形態では、無菌水又は別の適切なビヒクル中に錠剤を溶かすことによって、溶液は単位投薬形態中に調製し得る。ある実施形態において、適切な賦形剤には、炭酸カルシウム、炭酸ナトリウム若しくは重炭酸ナトリウム、ラクトース又はリン酸カルシウムなどの不活性な希釈剤；又は、デンプン、ゼラチン若しくはアカシアなどの結合剤；又はステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸若しくはタルクなどの潤滑剤が含まれるが、これらに限定されない。

【０１９１】

持続的又は徐放送達製剤中に、少なくとも一つの追加の治療剤を加え又は加えずに、ＨＧＦに対する特異的結合因子を含む製剤など、さらなる薬学的組成物が当業者に自明であろう。ある実施形態では、リポソーム担体、生物侵食可能な微粒子又は多孔性ビーズ及び徐放注射などの、他の様々な持続的又は徐放送達手段を調合するための技術も当業者に公知である。例えば、薬学的組成物を送達するための多孔性ポリマー微粒子の徐放を記載するＰＣＴ出願ＰＣＴ／ＵＳ９３／００８２９を参照されたい。ある実施形態において、徐放性調製物は、成型品の形態（例えば、フィルム又はミクロカプセル）の、半透性ポリマーマトリックスを含み得る。徐放性マトリックスは、ポリエステル、ハイドロゲル、ポリラクチド（米国特許第３，７７３，９１９号及びＥＰ０５８，４８１号）、Ｌ－グルタミン酸とγエチル－Ｌ－グルタミン酸の共重合体（Ｓｉｄｍａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｐｏｌｙｍｅｒｓ，２２：５４７－５５６（１９８３））、ポリ（２－ヒドロキシエチル－メタクリレート）（Ｌａｎｇｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｍｅｄ．Ｍａｔｅｒ．Ｒｅｓ．，１５：１６７－２７７（１９８１）ａｎｄ Ｌａｎｇｅｒ，Ｃｈｅｍ．Ｔｅｃｈ．，１２：９８－１０５（１９８２））、エチレン酢酸ビニル（Ｌａｎｇｅｒ ｅｔ ａｌ．，上記 又はポリ－Ｄ（－）－３－ヒドロキシ酪酸（ＥＰ１３３，９８８号）を含み得る。ある実施形態において、徐放性組成物はリポソームも含むことができ、リポソームは本分野で公知の複数の方法のうち何れによっても調製できる。例えば、「Ｅｐｐｓｔｅｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８２：３６８８－３６９２（１９８５）；ＥＰ ０３６，６７６；ＥＰ ０８８，０４６及びＥＰ １４３，９４９」を参照されたい。

【０１９２】

インビボ投与のために使用すべき薬学的組成物は、典型的には無菌である。ある実施形態において、これは、無菌ろ過膜を通したろ過によって達成し得る。ある実施形態では、組成物が凍結乾燥されている場合、凍結乾燥と再生の前又は後の何れかで、この方法を用いた無菌化を行い得る。ある実施形態において、非経口投与用組成物は、凍結乾燥された形態で、又は溶液中に保存され得る。ある実施形態において、非経口組成物は、一般的には、無菌のアクセスポート（例えば、皮下注射針によって貫通できるストッパーを有する静脈注射用溶液袋又は容器）を有する容器中に配置される。

【０１９３】

ある実施形態では、一旦、薬学的組成物が調合されたら、薬学的組成物は、溶液、懸濁液、ゲル、エマルジョン、固体、又は脱水若しくは凍結乾燥された粉末として、無菌バイアル中に、保存することができる。ある実施形態では、このような製剤は、即時使用形態、又は使用前に再生される形態（例えば、凍結乾燥される。）で保存することができる。

【０１９４】
ある実施形態において、本発明は、単回投与ユニットを作製するためのキットに関する。ある実施形態において、前記キットは、それぞれ、乾燥されたタンパク質を有する第一の容器と、水性製剤を有する第二の容器とを含有し得る。本発明のある実施形態において、単一及び複数チャンバーが設けられた、予め充填されている注射器（例えば、液体注射器及びリオシリンジ（ｌｙｏｓｙｒｉｎｇｅ））を含有するキットが含まれる。
【０１９５】
ある実施形態において、少なくとも一つの追加の治療剤を加え又は加えずに、ＨＧＦに対する特異的結合因子を含む、治療のために使用すべき薬学的組成物の有効量は、例えば、治療の状況及び目的に依存し得る。当業者であれば、ある実施形態における、治療用の適切な投薬レベルは、このように、一部には、送達される分子、少なくとも一つの追加の治療剤を加え又は加えずに、ＨＧＦに対する特異的結合因子が使用される適応症、投与経路、並びに患者の大きさ（体重、体表面又は臓器の大きさ）及び／又は状態（年齢及び一般的な健康）に依存し得ることが、当業者には自明である。ある実施形態において、医師は、最適な治療効果を得るために、投薬量を滴定し、投与経路を修飾し得る。ある実施形態において、典型的な投薬量は、上記要因に応じて、約０．１μｇ／ｋｇから最大約１００ｍｇ／ｋｇ以上の範囲にわたり得る。ある実施形態において、前記投薬量は、上記要因に応じて、約０．１μｇ／ｋｇから最大約１００ｍｇ／ｋｇ；又は１μｇ／ｋｇから最大約１００ｍｇ／ｋｇ；又は５μｇ／ｋｇから最大約１００ｍｇ／ｋｇの範囲にわたり得る。
【０１９６】
ある実施形態において、投薬の頻度は、使用される製剤中の、ＨＧＦに対する特異的結合因子及び／又は任意の追加の治療剤の薬物動態学的パラメータを考慮し得る。ある実施形態において、投薬が所望の効果を達成するまで、医師は組成物を投与し得る。ある実施形態において、従って、前記組成物は、単一用量として投与し、若しくは２以上の用量として経時的に投与し（同量の所望の分子を含有してもよく、又は含有しなくてもよい）、又は埋め込み装置若しくはカテーテルを介した連続注入として投与することができる。適切な投薬のさらなる改良は、当業者によって一般的に行われ、当業者によって日常的に実施される作業の範疇に属する。ある実施形態において、適切な投薬は、適切な用量応答データの使用を通じて確認し得る。
【０１９７】
ある実施形態において、薬学的組成物の投与経路は、公知の方法（例えば、経口的に、静脈内、腹腔内、脳内（実質内）、脳室内、筋肉内、眼内、動脈内、門脈内又は病変内経路による注射を通じて、徐放システム又は埋め込み装置）に従う。ある実施形態において、組成物は、大量瞬時注射によって、又は連続的に注入によって、又は埋め込み装置によって、投与され得る。
【０１９８】
ある実施形態において、組成物は、膜、スポンジ又はその上に所望の分子が吸収若しくは封入された別の適切な材料の埋め込みを介して、局所的に投与され得る。ある実施形態において、埋め込み装置が使用される場合、該装置は、任意の適切な組織又は臓器中に埋め込むことができ、所望の分子の送達は、拡散、持続放出ボーラス又は継続的投与によって行うことができる。
【０１９９】
ある実施形態では、少なくとも一つの追加の治療剤を加え又は加えずに、ＨＧＦに対する特異的結合因子を含む薬学的組成物を、エキソビボ様式で使用することが望ましい場合があり得る。このような例では、少なくとも一つの追加の治療剤を加え又は加えずに、ＨＧＦに対する特異的結合因子を含む薬学的組成物に、患者から採取された細胞、組織及び／又は臓器を曝露させ、その後、細胞、組織及び／又は臓器は患者に再度埋め込まれる。
【０２００】
ある実施形態において、ＨＧＦに対する特異的結合因子及び／又は任意の追加の治療剤

は、本明細書に記載されている方法などを用いて、ポリペプチドを発現及び分泌するように遺伝的に操作されたある種の細胞を埋め込むことによって、送達することができる。ある実施形態において、このような細胞は、動物又はヒト細胞であり得、自家、非相同又は異種であり得る。ある実施形態において、前記は不死化され得る。ある実施形態では、免疫反応の機会を減少させるために、細胞をカプセル封入して、周囲組織への浸潤を回避させ得る。ある実施形態において、封入材料は、典型的には、タンパク質産物を放出することが可能であるが、患者の免疫系による細胞の破壊又は周囲組織からの他の有害因子による細胞の破壊を抑制する、生物適合性半透性ポリマーの囲い又は膜である。

【０２０１】

実施例

以下の実施例は、実施されている実験及び得られた結果を含み、例示のために記載されているにすぎず、本発明を限定することを意図するものではない。

【実施例１】

【０２０２】

抗ＨＧＦハイブリドーマの作製

ヒト免疫グロブリン遺伝子を含有するマウスであるＸｅｎｏＭｏｕｓｅ（Ｒ）マウス（Ａｂｇｅｎｉｘ，　Ｆｒｅｍｏｎｔ，　ＣＡ）中で、ＨＧＦに対する抗体を産生した。ＨＧＦに対する抗体を作製するために、ＸｅｎｏＭｏｕｓｅ（Ｒ）マウスの三つのグループ（グループ１ａ、１ｂ及び２）を使用し、表１に要約されている。グループ１ａは、完全ヒトＩｇＧ２$_{\kappa}$抗体を産生するＸｅｎｏＭｏｕｓｅ（Ｒ）系統ＸＭＧ２のマウスからなった。グループ１ａマウスは、ＨＧＦで免疫した。ＨＧＦは、「Ｎａｋａｍｕｒａ　ｅｔ　ａｌ．，　Ｎａｔｕｒｅ　３４２：４４０－４４３（１９８９）」中の配列を使用する標準的な組み換え技術を用いて調製した。

【０２０３】

グループ１ｂもＸｅｎｏＭｏｕｓｅ（Ｒ）系統ＸＭＧ２のマウスからなるが、グループ１ｂマウスは、配列：Ｇｌｎ　Ｔｙｒ　Ｉｌｅ　Ｌｙｓ　Ａｌａ　Ａｓｎ　Ｓｅｒ　Ｌｙｓ　Ｐｈｅ　Ｉｌｅ　Ｇｌｙ　Ｉｌｅ　Ｔｈｒ　Ｇｌｕ　Ｌｅｕ　Ｌｙｓ　Ｌｙｓ　Ｃｙｓ（配列番号４７）を有するＴ細胞エピトープ（ＴＣＥ）に化学的に接合されたＨＧＦで免疫された。Ｓｕｌｐｈｏ－ＳＭＣＣ（Ｐｉｅｒｃｅ，　ｃａｔ＃　２２３２２）及びジチオスレイトール（Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を用いて、ＴＣＥのＣ末端システインを介して、ＨＧＦのＮ末端に架橋することによって、ＴＣＥをＨＧＦに接合した。得られた、接合されたＴＣＥ－ＨＧＦを、Ｃｅｎｔｒｉｃｏｎ（Ｒ）カラム（Ａｍｉｃｏｎ）を用いて、接合されていないペプチドから分離した。

【０２０４】

グループ２は、完全ヒトＩｇＧ１$_{\kappa}$抗体を産生するＸｅｎｏＭｏｕｓｅ（Ｒ）系統ＸＭＧ１のマウスからなった。グループ２マウスは、上記接合されたＴＣＥ－ＨＧＦで免疫した。

【０２０５】

表１のスケジュールにしたがって、３つの全てのグループのマウスに、抗原（ＨＧＦ又はＴＣＥ－ＨＧＦの何れか）を８回注射した。初回免疫では、各マウスの後脚の足蹠中に、計１０μｇの抗原を注射した（５μｇ／足蹠）。これらの注射は、アジュバントＴｉｔｅｒＭａｘ（Ｒ）　Ｇｏｌｄ（Ｓｉｇｍａ，　Ｃａｔ　＃　Ｔ２６８４）を含有した。注射２から７では、アジュバント　アルムゲル（リン酸アルミニウムゲルアジュバント；Ｓｕｐｅｒｆｏｓ　Ｂｉｏｓｅｃｔｏｒ　ａ／ｓ、Ｅ．Ｍ．Ｓａｒｇｅｎｔ　Ｐｕｌｐ　ａｎｄ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｃｏ．，　Ｃｌｉｆｔｏｎ　ＮＪ，　ｃａｔ　＃　１４５２－２５０により頒布）中の計５μｇの抗原を各マウスに注射した。最後の注射は、マウス当り計１０μｇの抗原を含有し、アジュバントは含有しなかった。

【０２０６】

【表２】

表１．マウスの免疫化

	グループ1a	グループ1b	グループ２
系統	XMG2	XMG2	XMG1
マウスの数	8	8	10
抗原	HGF	HGF-TCE	HGF-TCE
最初の注射（１日目）	TiterMax Gold中、10μg/マウス	TiterMax Gold中、10μg/マウス	TiterMax Gold中、10μg/マウス
強化注射（７日目）	Alum Gel中、5μg/マウス	Alum Gel中、5μg/マウス	Alum Gel中、5μg/マウス
強化注射（９日目）	Alum Gel中、5μg/マウス	Alum Gel中、5μg/マウス	Alum Gel中、5μg/マウス
強化注射（13日目）	Alum Gel中、5μg/マウス	Alum Gel中、5μg/マウス	Alum Gel中、5μg/マウス
強化注射（16日目）	Alum Gel中、5μg/マウス	Alum Gel中、5μg/マウス	Alum Gel中、5μg/マウス
強化注射（20日目）	Alum Gel中、5μg/マウス	Alum Gel中、5μg/マウス	Alum Gel中、5μg/マウス
採血（22日目）			
強化注射（24日目）	Alum Gel中、5μg/マウス	Alum Gel中、5μg/マウス	Alum Gel中、5μg/マウス
強化注射（27日目）	D-PBS中、5μg/マウス	D-PBS中、5μg/マウス	D-PBS中、5μg/マウス

【０２０７】

６回目の注射から２日後に、各マウスから採血した。ＨＧＦに対する抗体の力価を決定するために、これらの採血から得た血液試料をＥＬＩＳＡによってアッセイした。これらのＥＬＩＳＡアッセイでは、９６ウェルのプレート（Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ ｃａｔ．＃１２－５６５－１３６）を、０．１Ｍの炭酸緩衝液（ｐＨ９．６）中のＨＧＦでコートした。血液試料を添加し、プレートを室温で２時間インキュベートした。インキュベーション後、洗浄溶液（ＰＢＳ中の０．０５％ Ｔｗｅｅｎ ２０）でプレートを三回洗浄し、１００μＬ／ウェルの二次抗体を添加した。二次抗体は、西洋ワサビペルオキシダーゼを接合されたヤギ抗ヒトＩｇＧＦｃ抗体（Ｓｏｕｔｈｅｒｎ Ｂｉｏｔｅｃｈ ｃａｔ． ＃ ９０６０－０５）であった。室温で１時間インキュベーションを行った後、プレートを洗浄し、１００μＬ／ウェルのＴＭＢ展開溶液（ＢｉｏＦＸ Ｌａｂ Ｃａｔ．＃ ＴＭＳＫ－ ０１００－０１）を添加した。１０分後、５０μＬ／ウェルのＴＭＢ停止溶液（ＢｉｏＦＸ Ｌａｂ Ｃａｔ．＃ ＳＴＰＲ－０１００－０１）を添加した。プレートは、４５０ｎｍの波長で、ＥＬＩＳＡプレートリーダー上で読み取られた。

【０２０８】

最後の注射から４日後、マウスを屠殺し、マウスの流入領域リンパ節を採取し、リンパ球を回収した。３つの各グループのマウスから得たリンパ球を別々にプールした。リンパ球試料のＢ細胞を濃縮するために、抗ＣＤ９０磁気ビーズ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃｈ ｃａｔ．＃ ４９１－０１）を添加することによって、Ｔ細胞を枯渇させた後、リンパ球をＬＳ$^{+}$カラム（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃｈ ｃａｔ． ＃ ４２４－０１）に通した。

【０２０９】

次いで、ハイブリドーマを作製するために、電気細胞融合装置（Ｇｅｎｅｔｒｏｎｉｃ

，　Ｉｎｃ．，　Ｍｏｄｅｌ　ＥＣＭ　２００１）を使用して、Ｂ細胞が濃縮されたリンパ球の３つのサンプルそれぞれをＰ３ミエローマ細胞と融合した。次いで、ヒポキサンチン－アザセリンを含有するハイブリドーマ溶媒（Ｓｉｇｍａ）（成分については、表２を参照）中に、１×１０^{6}個の入力Ｂ細胞濃縮リンパ球／ウェルの密度で、融合されたハイブリドーマ株の３つのグループを９６ウェルプレートに播種した。３７℃で、１５％CO_2中、ハイブリドーマ株を１４日間培養した。

【０２１０】

１４日後、ＨＧＦに対するヒトＩｇＧ抗体の存在を検出するために、上記、血液試料をアッセイするために使用したものと同じプロトコールを用いて、ＥＬＩＳＡによって培養上清をアッセイした。ＥＬＩＳＡで検査結果が陽性であった培養上清を、第二のＥＬＩＳＡで、ヒトκ鎖の存在を調べた。第二のＥＬＩＳＡでは、二次抗体が、西洋ワサビペルオキシダーゼに対して接合されたヤギ抗ヒトκ鎖抗体であることを除いて、条件は第一のＥＬＩＳＡと同一であった。インビトロ機能試験用に５ｍＬの上清を産生させるために、両ＥＬＩＳＡアッセイで陽性の検査結果を示したハイブリドーマをさらに増殖させた。インビトロ機能試験は、実施例８及び９に論述されている。グループ１ａのマウスに対応する８２のクローン、グループ１ｂのマウスに対応する４２のクローン及びグループ２のマウスに対応する１７６のクローンから得た上清を検査した。

【０２１１】

これらの機能的アッセイの結果に基づき、数個のハイブリドーマ株が、ＨＧＦに対する抗体を産生するものとして同定された。各株から３ないし６個のクローンを単離するために、限界希釈を使用した。クローンは、ハイブリドーマ株番号（例えば、１．２４）及びクローン番号（例えば、１．２４．１）によって表記した。実施例８及び９に論述されている機能的アッセイによって、ある特定の株の異なるクローン間には、差は検出されなかった。５０から１００ｍＬのハイブリドーマ溶媒中で、これらの単離されたクローンをそれぞれ増殖させ、枯渇するまで（すなわち、約１０％未満の細胞生存）増殖させた。実施例８及び９に論述されているように、ＥＬＩＳＡ及びインビトロ機能検査によって、これらの培養の上清中のＨＧＦに対する抗体の濃度及び効力を測定した。ＨＧＦに対する抗体の力価が最高である１０個のハイブリドーマが同定された。これらのハイブリドーマは、１．２４．１、１．２９．１、１．６０．１、１．６１．３、１．７４．３、１．７５．１、２．４．４、２．１２．１、２．４０．１及び３．１０．１と表記された。

【０２１２】

【表３】

表２．成分培地

ハイブリドーマ培地	
成分	入手先
DMEM	Gibco
１５％ウシ胎児血清	Hyclone, cat # SH 30070.03
1% 200mM L-ｸﾞﾙﾀﾐﾝ	Sigma, cat # G2150
1% 100×非必須ｱﾐﾉ酸	Sigma cat # M 7145
1% 100×ﾍﾟﾆｼﾘﾝ/ｽﾄﾚﾌﾟﾄﾏｲｼﾝ	Sigma Cat# P 7539 (10,000 U/ml penicillin/ 10 mg/ml streptomycin)
10 U/ml IL-6	Boehringer Mannheim, cat. # 1299972
1ﾊﾞｲｱﾙ/L OPI培地 補充物（ｵｷｻﾛ酢酸、ﾋﾟﾙﾋﾞﾝ酸、ｳｼｲﾝｼｭﾘﾝ）	Sigma, cat # O 5003
HSFM MEDIA	
HSFM	Gibco, Cat # 12045-076
10% Ultra Low IgG血清	Gibco Cat# 16250-078
2mmol/L L-ｸﾞﾙﾀﾐﾝ	JRH 200mM Cat# 59202
1% 100×非必須ｱﾐﾉ酸	JRH 100X Cat# 58572
1% 100×ﾍﾟﾆｼﾘﾝ/ｽﾄﾚﾌﾟﾄﾏｲｼﾝ	Gemini Cat# 400-109
INTEGRA MEDIA	
HSFM	Gibco, Cat # 12045-076
10% Ultra Low IgG血清	Gibco Cat# 16250-078
2mmol/L L-ｸﾞﾙﾀﾐﾝ	JRH 200mM Cat# 59202
1% NEAA	JRH 100X Cat# 58572
4g/L ｸﾞﾙｺｰｽ	JT Baker Cat # 1920-07

【実施例２】

【０２１３】

ハイブリドーマからの抗体の作製

２つの異なるシステム（Ｉｎｔｅｇｒａフラスコ及びスパージャー型スピナー）のうち１つを用いて、実施例１に論述した１０個のハイブリドーマから、抗体を調製した。

【０２１４】

Ｉｎｔｅｇｒａフラスコ

７個のハイブリドーマ株２．１２．１、１．２４．２、１．２９．１、１．７４．１、１．７５．１、１．６０．２及び２．４０．１を、それぞれ別個に、２０ｍＬのＨＳＦＭ培地中のＴ７５フラスコ中で増殖させた（培地成分については、表２参照）。ハイブリドーマがＴ７５フラスコ中でほぼ集密になったときに、ハイブリドーマをＩｎｔｅｇｒａフラスコ（Ｉｎｔｅｇｒａ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｉｎｔｅｇｒａ ＣＬ１０００，ｃａｔ＃ ９０ ００５）に移した。

【０２１５】

Ｉｎｔｅｇｒａフラスコとは、膜によって、小チャンバーと大チャンバーという２つの

チャンバーに分けられた細胞培養フラスコである。７個のハイブリドーマ株のそれぞれから得た、１×１０^{6}細胞／ｍＬの最小細胞密度の、２０から３０ｍＬ容量のハイブリドーマ細胞を、Ｉｎｔｅｇｒａ培地（Ｉｎｔｅｇｒａ培地の成分については、表２を参照）中、７個のＩｎｔｅｇｒａフラスコの小チャンバーに配置した。Ｉｎｔｅｇｒａ培地のみ（１Ｌ）を、Ｉｎｔｅｇｒａフラスコの大チャンバー中に配置した。２つのチャンバーを分割する膜は、小分子量の栄養素に対して透過性であるが、ハイブリドーマ細胞及びハイブリドーマによって産生された抗体に対して不透過性である。このため、ハイブリドーマ細胞及びこれらのハイブリドーマ細胞によって産生された抗体は、小チャンバー中に保持された。

【０２１６】

一週後、７個の各Ｉｎｔｅｇｒａフラスコの両チャンバーから培地を除去し、新鮮なＩｎｔｅｇｒａ培地と交換した。７個の小チャンバーから集めた培地は、別々に保持された。二週目の増殖の後、小チャンバーから得た培地を再び集めた。１週目に各ハイブリドーマ株から集めた培地を、２週目に同じハイブリドーマ株から集めた培地と合わせた。細胞及び細片を除去するために、７個のハイブリドーマ株から収集して得られた７個の培地試料を遠心し（３０００ｒｐｍで１５分）、得られた上清をろ過した（０．２２μｍ）。

【０２１７】

スパージャー型スピナーフラスコ（３Ｌ）

３つのハイブリドーマ株（３．１０．１、２．４．４及び２．１２．１）を、２０ｍＬのＨＳＦＭ培地中、Ｔ７５フラスコ中で別々に増殖させた。ハイブリドーマが十分な細胞密度に達したら、ハイブリドーマをＴ１７５フラスコに移した。同様に、ハイブリドーマがＴ１７５フラスコ中で十分な細胞密度に達したら、１００ｍＬのスピナーフラスコ、次いで５００ｍＬのスピナーフラスコ、次いで１Ｌのスピナーフラスコにハイブリドーマを移した。１Ｌのスピナーフラスコ中で、細胞が十分な細胞密度に達したら、細胞を３Ｌのスパージャー型スピナーフラスコ（Ｂｅｌｌｃｏ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，ｃａｔ ＃ １９６５－３００、サイドアーム取り付け具付き ｃａｔ ＃ １９６５－３００３）に移した。

【０２１８】

３Ｌのスパージャー型スピナーフラスコとは、磁気プラットフォームによって制御された羽根車で培養物が混合されるガラス溶液である。スピナーは、５％CO_2及び空気を与えるために、ガス管線に接続されている。

【０２１９】

ハイブリドーマ３．１０．１

２つのスパージャー型フラスコの増殖条件が要約されている表３に記された添加物を加えたＨＳＦＭ培地中のハイブリドーマ株３．１０．１から得たハイブリドーマ細胞を、２つの３Ｌスパージャー型スピナーフラスコに播種した。

【０２２０】

【表４】

表３．ハイブリドーマ３．１０．１を増殖させるための条件

条件	Spinner1	Spinner2
播種密度 (10E6 cells/ml)	0.46	0.46
HSFM (Gibco cat# 12045-076)	X	X
Ultra低IgG血清 (Gibco cat# 16250-078)	5%	5%
Lグルタミン (JRH cat# 59202-500M)	8 mmol/L	2mmol/L
P/S (Gemini cat# 400-109)	1%	1%
NEAA (JRH cat# 58572-77P)	1%	1%
ペプトン (Difco, cat # 211693)	1g/L	1g/L
2M glucose (JT Baker, cat # 1920-07)	8g/L	2g/L
消泡剤 C (Sigma cat # A-8011)	2ml/L	2ml/L
生産力 (μg/ml)	24	34

【０２２１】

この培養物を１５日間増殖させ、トリパンブルー排除によって決定された生存率が２０％を下回った時点で採集した。採集は、７０００ｒｐｍで１５分間遠心し、続いて、得られた上清を、０．２２μｍフィルターを通してろ過することにより行なった。最後の採集された試料中に存在するタンパク質の量をプロテインＡ　ＨＰＬＣによって測定することによって、生産性を測定し、これは表３に報告されている。

【０２２２】

ハイブリドーマ２．４．４

５つのスパージャー型フラスコの増殖条件が要約されている表４に記された添加物を加えたＨＳＦＭ培地中のハイブリドーマ株２．４．４から得たハイブリドーマ細胞を、５つの３Ｌ　スパージャー型スピナーフラスコに播種した。

【０２２３】

【表５】

表４．ハイブリドーマ２．４．４を増殖させるための条件

条件	Spinner1	Spinner2	Spinner3	Spinner4	Spinner5
播種密度(10E6細胞/mL)	0.3	0.3	0.18	0.18	0.4
HSFM (Gibco cat# 12045-076)	X	X	X	X	X
Ultra低IgG血清 (Gibco cat# 16250-078)	5%	5%	5%	5%	5%
Lグルタミン (JRH cat# 59202-500M)	8mmol/L	2mmol/L	2mmol/L	8mmol/L	4mmol/L
P/S (Gemini cat# 400-109)	1%	1%	1%	1%	1%
NEAA (JRH cat# 58572-77P)	1%	1%	1%	1%	1%
ペプトン	1g/L	1g/L	1g/L	1g/L	1g/L
2M グルコース	8g/L	2g/L	2g/L	8g/L	4g/L
消泡剤 C	2ml/L	2ml/L	2ml/L	2ml/L	2ml/L
生産力 (ug/ml)	41	82	38	45	79
培養期間（日）	10	10	7	7	8

【０２２４】

表４に記されているように、培養物を７、８又は１０日間増殖させ、上述のように、細胞生存率が２０％を下回った時点で採集した。

【０２２５】

ハイブリドーマ２．１２．１

６つのスパージャー型フラスコの増殖条件が要約されている表５に記された添加物を加えたＨＳＦＭ培地中のハイブリドーマ株２．１２．１から得たハイブリドーマ細胞を、６つの３Ｌ　スパージャー型スピナーフラスコに播種した。

【０２２６】

【表６】

表５．ハイブリドーマ２．１２．１を増殖させるための条件

条件	Spinner 1	Spinner 2	Spinner 3	Spinner 4	Spinner 5	Spinner 6
播種密度 (10E6細胞/mL)	0.2	0.2	0.4	0.4	0.4	0.4
HSFM (Gibco cat# 12045-076)	X	X	X	X	X	X
Ultra低IgG血清 (Gibco cat# 16250-078)	5%	5%	5%	5%	5%	5%
Lグルタミン (JRH cat# 59202-500M)	2 mmol/L	8 mmol/L	4 mmol/L	4 mmol/L	4 mmol/L	4 mmol/L
P/S (Gemini cat# 400-109)	1%	1%	1%	1%	1%	1%
NEAA (JRH cat# 58572-77P)	1%	1%	1%	1%	1%	1%
ペプトン	1g/L	1g/L	1g/L	1g/L	1g/L	1g/L
2M グルコース	2g/L	8g/L	4g/L	4g/L	4g/L	4g/L
消泡剤C	2ml/L	2ml/L	2ml/L	2ml/L	2ml/L	2ml/L
生産力 (μg/ml)	44	49	65	65	65	65
培養期間（日）	7	7	11	11	11	11

【０２２７】

表５に記されているように、培養物を７又は１１日間増殖させ、上述のように、細胞生存率が２０％を下回った時点で採集した。

【実施例３】

【０２２８】

抗体重鎖及び軽鎖のクローニングと配列分析

Ａ．軽鎖のクローニング

１０個のハイブリドーマ（１．２４．１、１．２９．１、１．６０．１、１．６１．３、１．７４．３、１．７５．１、２．４．４、２．１２．１、２．４０．１及び３．１０．１）が、実施例１に論述されているように、ＨＧＦに対するモノクローナル抗体を発現するものとして同定された。ＴＲＩｚｏｌ（Ｒ）試薬（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，　Ｃａｒｌｓｂａｄ，　ＣＡ）を用いて、総ＲＮＡを、１０個の各ハイブリドーマから単離した。ＧｅｎｅＲａｃｅｒ（Ｒ）　Ｋｉｔ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を用いて、これら１０個の総ＲＮＡ調製物の５’末端を、５’ｃＤＮＡ末端迅速増幅（ＲＡＣＥ）に適合させた。次いで、それぞれが伸長アダプター（５’－ＧＧＣ　ＣＧＧ　ＡＴＡ　ＧＧＣ　ＣＴＣ　ＣＡＮ　ＮＮＮ　ＮＮＴ－３’）（配列番号４８）を有するランダムプライマーを使用する、１０の別個のＲＡＣＥ反応において、これら１０個の５’修飾されたＲＮＡ調製物を使用し、１０個のｃＤＮＡ分子を得た。

【０２２９】

次いで、１０個の増幅されたκ軽鎖配列を生成するために、１０個のｃＤＮＡ分子を別個のポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）において増幅した。これらの反応のそれぞれについて、フォーワードプライマーは、フォワードＧｅｎｅＲａｃｅｒ（ＴＭ）ネステッドプライマー（５’ＧＧＡ　ＣＡＣ　ＴＧＡ　ＣＡＴ　ＧＧＡ　ＣＴＧ　ＡＡＧ　ＧＡＧ　ＴＡ－３’）（配列番号４９）であった。リバースプライマー（５’－ＧＧＧ　ＧＴＣ　ＡＧＧ　ＣＴＧ　ＧＡＡ　ＣＴＧ　ＡＧＧ－３’）（配列番号５０）は、κ軽鎖に対して相補的な配列を結合するように設計された。

【０２３０】

次いで、１０個の増幅されたκ軽鎖配列のそれぞれを、別個のｐＣＲ４－ＴＯＰＯプラスミド（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）の中に、別々に連結した。次いで、得られた１０個のプラスミド（それぞれ、１０個のκ軽鎖配列のうちの１つを含有する。）を細菌中で別々に増幅し、それぞれの数クローンを配列決定した。以下のようにして、クローニングされたプラスミドから１０個のκ軽鎖オープンリーディングフレーム配列を増幅するためのＰＣＲプライマーをデザインするために、これらの配列を使用した。

【０２３１】

１０個の各ＰＣＲに対するプライマーセットは、５’プライマーと３’プライマーを含んだ。各５’プライマーは、あるκ軽鎖配列のアミノ末端の配列と相補的な部分（最適化されたＫｏｚａｋ配列）と一又は複数の制限部位とを含んだ。例えば、ハイブリドーマ３．１０．１から最終的に得られたプラスミドとの反応で使用される５’プライマーの配列は、

【０２３２】

【化１】

5’- ACA ACA AAG CTT CTA GAC CAC CAT GGA AGC CCC AGC TCA

XbaI Kozak

GCT TCT CTT -3’

（配列番号５１）であった。

【０２３３】

それぞれのＰＣＲに対する３’プライマーは、特定のκ軽鎖配列の配列のカルボキシル末端（終止コドンと制限部位とを含む。）と相補的な部分を含んだ。例えば、ハイブリドーマ３．１０．１から最終的に得られたプラスミドとの反応で使用される３’プライマーの配列は、

【０２３４】

【化２】

5’-CTT GTC GAC TCA ACA CTC TCC CCT GTT GAA GCT

SalI *

C -3’

（配列番号５２）であった。

【０２３５】

１０個のκ軽鎖コード領域配列を増幅するために、対応するクローニングされたプラスミドを使用する別個のＰＣＲ反応では、別個のプライマーセットを使用した。これらの反応から得た１０個の増幅産物は、ＱｌＡｑｕｉｃｋ（Ｒ） Ｇｅｌ Ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎ ｋｉｔ（Ｃａｔａｌｏｇ Ｎｏ． ２８７０４， Ｑｉａｇｅｎ， Ｖａｌｅｎｃｉａ， ＣＡ）を用いて、別個にゲル単離され、精製された。次いで、プラスミドを含まないκ軽鎖コード領域配列を取得するために、これらの精製産物をそれぞれ適切な制限酵素で切断した。例えば、ハイブリドーマ３．１０．１に対応する精製産物は、ＸｂａＩ及びＳａｌＩ（この部位は、上述のように、クローニングされたプラスミドのＰＣＲ増幅中にプライマーによって導入された。）で切断した。得られた、制限消化されたκ軽鎖コード領域配列を、同じく、ＱｌＡｑｕｉｃｋ（Ｒ） Ｇｅｌ Ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎ ｋｉｔ（Ｃａｔａｌｏｇ Ｎｏ． ２８７０４， Ｑｉａｇｅｎ， Ｖａｌｅｎｃｉａ， ＣＡ）を用いて、別個にゲル単離し、精製した。

【０２３６】

次いで、１０個の元のハイブリドーマに対応する１０個の別々のκ軽鎖発現ベクターを

作製するために、これらの１０個の、制限消化された精製κ軽鎖コード領域配列を、それぞれ別個に、哺乳類発現ベクターｐＤＳＲα２０（ＷＯ　９０／１４３６３）中に連結した。次いで、１０個のκ軽鎖発現ベクター挿入物の配列を決定した。ハイブリドーマ３．１０．１（ｐＤＳＲａ２０：３．１０．１）から最終的に得られたκ軽鎖コード領域を含有するｐＤＳＲα２０発現ベクターは、７１９塩基対のＰＣＲ断片（３．１０．１κ軽鎖の２３５アミノ酸残基（２０アミノ酸のκ鎖シグナル配列を含む。）をコードする。）を含む５４７３塩基を包含することが確認された。この発現ベクターは、表６に記載されているように７つの機能的領域を含んでいた。

【０２３７】

【表７】

表６　発現ベクターｐDSRα２０：３．１０．１κ

プラスミド塩基対番号	
2 to 881	ｳｼ下垂体糖ﾀﾝﾊﾟｸ質ﾎﾙﾓﾝのαｻﾌﾞﾕﾆｯﾄ(α-FSH)由来の転写終結/ﾎﾟﾘｱﾃﾞﾆﾙ化ｼｸﾞﾅﾙ(Goodwin, et al., 1983, Nucleic Acids Res. 11:6873-82;Genbank Accession Number X00004)
882 to 2027	内在性ﾏｳｽDHFRﾌﾟﾛﾓｰﾀｰ、cDNAｺｰﾄﾞ配列及びDHFR転写終結/ﾎﾟﾘｱﾃﾞﾆﾙ化ｼｸﾞﾅﾙを含有するﾏｳｽｼﾞﾋﾄﾞﾛ葉酸還元酵素(DHFR)ﾐﾆ遺伝子(Gasser et al, 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79:6522-6;Nunberg et al., 1980, Cell 19:355-64;Setzer et al., 1982, J. Biol. Chem. 257:5143-7;McGrogan et al., 1985, J. Biol. Chem. 260:2307-14)
2031 to 3947	ｱﾝﾋﾟｼﾘﾝ耐性ﾏｰｶｰ遺伝子とE.ｺﾘ中のﾌﾟﾗｽﾐﾄﾞの複製起点とを含有するpBR322配列(Genbank Accession Number J01749)
3949 to 4292	SV40初期ﾌﾟﾛﾓｰﾀｰ、ｴﾝﾊﾝｻｰ及び複製起点(Takebe et al., 1988, Mol. Cell Biol. 8:466-72, Genbank Accession Number J02400)
4299 to 4565	HTLV-1 LTRﾄﾞﾒｲﾝ由来の翻訳ｴﾝﾊﾝｻｰｴﾚﾒﾝﾄ(Seiki et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 80:3618-22, Genbank Accession Number J02029)
4574 to 4730	SV40 16Sからのｲﾝﾄﾛﾝ、19S ｽﾌﾟﾗｲｽﾄﾞﾅｰ/ｱｸｾﾌﾟﾀｰｼｸﾞﾅﾙ (Okayama and Berg, 1983. Mol. Cell Biol. 3:280-9, Genbank Accession Number J02400)
4755 to 5473	XbalとSall部位の間の、3.10.1κ軽鎖鎖cDNA

【０２３８】

Ｂ．重鎖のクローニング

１０個のハイブリドーマから得られた、ＨＧＦに対する抗体の重鎖の可変領域は、実施例３Ａで上述されてた、軽鎖について使用した方法と同じ方法を用いてクローニングされた。１０個のハイブリドーマのそれぞれから総ＲＮＡを単離し、ＲＡＣＥのために５’を修飾し、実施例３Ａに上記されているように、ｃＤＮＡ分子を作製するために使用した。

【０２３９】

これら１０個のｃＤＮＡ分子は、リバースプライマー（５’－ＧＧＡ　ＣＡＣ　ＴＧＡ　ＣＡＴ　ＧＧＡ　ＣＴＧ　ＡＡＧ　ＧＡＧ　ＴＡ－３’（配列番号５３））が重鎖可変領域の相補的配列に結合するようにデザインされていることを除き、実施例３Ａで軽鎖に

ついて論述されているとおり、別個のＰＣＲ反応で増幅した。フォーワードプライマーも、同じく、フォワードＧｅｎｅＲａｃｅｒ^{TM}ネステッドプライマー（５’ＧＧＡ　ＣＡＣ　ＴＧＡ　ＣＡＴ　ＧＧＡ　ＣＴＧ　ＡＡＧ　ＧＡＧ　ＴＡ－３’）（配列番号４９）であった。

【０２４０】

１０個の増幅された重鎖可変領域配列のそれぞれを、別個のｐＣＲ４－ＴＯＰＯプラスミドの中に、別々に連結した。次いで、得られた１０個のプラスミド（それぞれ、１０個の重鎖可変領域配列のうちの１つを含有する。）を細菌中で別個に増幅し、実施例３Ａで軽鎖について上述したように、それぞれの数クローンの配列を決定した。以下のようにして、クローニングされたプラスミドから重鎖可変領域の各々を増幅するためのＰＣＲプライマーをデザインするために、これらの配列を使用した。

【０２４１】

１０のＰＣＲそれぞれに対するプライマーセットは、実施例３Ａに上述されている、軽鎖に対して使用したものと同じ戦略を用いてデザインした。各５’プライマーは、ある重鎖可変領域配列のアミノ酸末端の配列と相補的な部分（最適化されたＫｏｚａｋ配列）と一又は複数の制限部位とを含んだ。例えば、ハイブリドーマ３．１０．１から最終的に得られた重鎖可変領域を増幅するために使用した５’プライマーの配列は、

【０２４２】

【化３】

5′- AGC AGA AGC TTC TAG ACC ACC ATG AAA CAC CTG TGG TTC

XbaI　Kozak

TTC CTC CTC -3′

（配列番号５４）であった。

【０２４３】

１０のＰＣＲそれぞれに対する３’プライマーは、特定の重鎖可変領域配列のコンセンサス配列のカルボキシル末端（終止コドンと制限部位とを含む。）と相補的な部分を含んだ。例えば、ハイブリドーマ３．１０．１から最終的に得られた重鎖可変領域を増幅するために使用した３’プライマーの配列は、

【０２４４】

【化４】

5′-GTG GAG GCA CTA GAG ACG GTG ACC AGG GTT CC -3′

BsmBI

（配列番号５５）であった。

【０２４５】

１０個の重鎖可変領域配列を増幅するために、対応するクローニングされたプラスミドを使用する別個のＰＣＲ反応では、別個のプライマーセットを使用した。これらの反応から得た１０個の増幅産物は、ＱｌＡｑｕｉｃｋ　Ｇｅｌ　Ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎ　ｋｉｔを用いて、別個にゲル単離、精製され、実施例３Ａで軽鎖について記載したように、適切な制限酵素で切断した。得られた、制限消化された重鎖可変領域配列を、実施例３Ａで記載したように、同じく、ＱｌＡｑｕｉｃｋｓ　Ｇｅｌ　Ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎ　ｋｉｔを用いて、別個にゲル単離し、精製した。

【０２４６】

次いで、精製され、制限消化された１０個の重鎖可変領域配列のうち、ハイブリドーマ３．１０．１、１．２４．１及び２．４．４から最終的に得られた３個を、３つの重鎖ＩｇＧ１発現ベクターを作製するために哺乳類発現ベクターｐＤＳＲα２０：ｈｌｇＧＣ$_{H}$中に別々に連結した。ｐＤＳＲα２０：ｈｌｇＧＣ$_{H}$発現ベクターは、ＩｇＧ１定常領域

配列も含有していることを除き、ｐＤＳＲα２０と同じである。ｐＤＳＲα２０：ｈｌｇＧＣ$_{H}$発現ベクターは、表７に要約されている。

【０２４７】

【表８】

表７　発現ベクターｐＤＳＲα２０:**hIgGC$_H$**

プラスミド塩基対番号	
2 to 881	ｳｼ下垂体糖ﾀﾝﾊﾟｸ質ﾎﾙﾓﾝのαｻﾌﾞﾕﾆｯﾄ(α-FSH)由来の転写終結/ﾎﾟﾘｱﾃﾞﾆﾙ化ｼｸﾞﾅﾙ(Goodwin, et al., 1983, Nucleic Acids Res. 11:6873-82;Genbank Accession Number X00004)
882 to 2027	内在性ﾏｳｽDHFRﾌﾟﾛﾓｰﾀｰ、cDNAｺｰﾄﾞ配列及びDHFR転写終結/ﾎﾟﾘｱﾃﾞﾆﾙ化ｼｸﾞﾅﾙを含有するﾏｳｽｼﾞﾋﾄﾞﾛ葉酸還元酵素(DHFR)ﾐﾆ遺伝子(Gasser et al, 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79:6522-6;Nunberg et al., 1980, Cell 19:355-64;Setzer et al., 1982, J. Biol. Chem. 257:5143-7;McGrogan et al., 1985, J. Biol. Chem. 260:2307-14)
2031 to 3947	ｱﾝﾋﾟｼﾘﾝ耐性ﾏｰｶｰ遺伝子とE.ｺﾘ中のﾌﾟﾗｽﾐﾄﾞの複製起点とを含有するpBR322配列(Genbank Accession Number J01749)
3949 to 4292	SV40初期ﾌﾟﾛﾓｰﾀｰ、ｴﾝﾊﾝｻｰ及び複製起点(Takebe et al., 1988, Mol. Cell Biol. 8:466-72, Genbank Accession Number J02400)
4299 to 4565	HTLV-1 LTRﾄﾞﾒｲﾝ由来の翻訳ｴﾝﾊﾝｻｰｴﾚﾒﾝﾄ(Seiki et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 80:3618-22, Genbank Accession Number J02029)
4574 to 4730	SV40 16Sからのｲﾝﾄﾛﾝ、19Sﾄﾞﾅｰ/ｱｸｾﾌﾟﾀｰｼｸﾞﾅﾙ(Okayama and Berg, 1983. Mol. Cell Biol. 3:280-9, Genbank Accession Number J02400)
4755 to 5791	XbaI及びSalI部位の間の、pI/hCh1重鎖cDNA 配列は以下のとおりである。 XbaI　　BsmBI **TCTAGA**CCACCGCCATGGGTGAAAATTGAAT**CGTCTC**TA GTGCCTCCACCAAGGGCCCA TCGGTCTTCC CCCTGGCACC CTCCTCCAAG AGCACCTCTGGGGGCACAGC GGCCCTGGGC TGCCTGGTCA AGGACTACTT CCCCGAACCG GTGACGGTGT CGTGGAACTC AGGCGCCCTG ACCAGCGGCG TGCACACCTT CCCGGCTGTC CTACAGTCCT CAGGACTCTA CTCCCTCAGC AGCGTGGTGACCGTGCCCTC CAGCAGCTTG GGCACCCAGA CCTACATCTG CAACGTGAATCACAAGCCCA

	GCAACACCAA GGTGGACAAG AAAGTTGAGC CCAAATCTTG TGACAAAACT CACACATGCC CACCGTGCCC AGCACCTGAA CTCCTGGGGG GACCGTCAGT CTTCCTCTTC CCCCCAAAAC CCAAGGACAC CCTCATGATC TCCCGGACCC CTGAGGTCAC ATGCGTGGTG GTGGACGTGA GCCACGAAGACCCTGAGGTC AAGTTCAACT GGTACGTGGA CGGCGTGGAG GTGCATAATG CCAAGACAAA GCCGCGGGAG GAGCAGTACA ACAGCACGTA CCGTGTGGTC AGCGTCCTCA CCGTCCTGCA CCAGGACTGG CTGAATGGCA AGGAGTACAAGTGCAAGGTC TCCAACAAAG CCCTCCCAGC CCCCATCGAG AAAACCATCTCCAAAGCCAA AGGGCAGCCC CGAGAACCAC AGGTGTACAC CCTGCCCCCA TCCCGGGATG AGCTGACCAA GAACCAGGTC AGCCTGACCT GCCTGGTCAA AGGCTTCTAT CCCAGCGACA TCGCCGTGGA GTGGGAGAGC AATGGGCAGCCGGAGAACAA CTACAAGACC ACGCCTCCCG TGCTGGACTC CGACGGCTCC TTCTTCCTCT ATAGCAAGCT CACCGTGGAC AAGAGCAGGT GGCAGCAGGG GAACGTCTTC TCATGCTCCG TGATGCATGA GGCTCTGCAC AACCACTACA CGCAGAAGAG CCTCTCCCTG TCTCCGGGTA SalI AATGATAA**GT CGAC** (SEQ ID NO: 56)

【０２４８】

３つのＩｇＧ１発現ベクター挿入物の重鎖可変領域の配列を決定した。ハイブリドーマ３．１０．１（ｐＤＳＲα２０：ｈｌｇＧＣ$_{H}$：３．１０．１）から最終的に得られた重鎖可変領域を含有するｐＤＳＲα２０：ｈｌｇＧＣ$_{H}$発現ベクターは、表８に要約されている。

【０２４９】

【表９】

表８　発現ベクターｐＤＳＲα２０:hIgGC$_H$:3.10.1

プラスミド塩基対番号	
2 to 881	ｳｼ下垂体糖ﾀﾝﾊﾟｸ質ﾎﾙﾓﾝのαｻﾌﾞﾕﾆｯﾄ(α-FSH)由来の転写終結/ﾎﾟﾘｱﾃﾞﾆﾙ化ｼｸﾞﾅﾙ(Goodwin, et al., 1983, Nucleic Acids Res. 11:6873-82;Genbank Accession Number X00004)
882 to 2027	内在性ﾏｳｽDHFRﾌﾟﾛﾓｰﾀｰ、cDNAｺｰﾄﾞ配列及びDHFR転写終結/ﾎﾟﾘｱﾃﾞﾆﾙ化ｼｸﾞﾅﾙを含有するﾏｳｽｼﾞﾋﾄﾞﾛ葉酸還元酵素(DHFR)ﾐﾆ遺伝子(Gasser et al, 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79:6522-6;Nunberg et al., 1980, Cell 19:355-64; Setzer et al., 1982, J. Biol. Chem. 257:5143-7; McGrogan et al., 1985, J.Biol. Chem. 260:2307-14)
2031 to 3947	ｱﾝﾋﾟｼﾘﾝ耐性ﾏｰｶｰ遺伝子とE.ｺﾘ中のﾌﾟﾗｽﾐﾄﾞの複製起点とを含有するpBR322配列(Genbank Accession Number J01749)
3949 to 4292	SV40初期ﾌﾟﾛﾓｰﾀｰ、ｴﾝﾊﾝｻｰ及び複製起点(Takebe et al., 1988, Mol. Cell Biol. 8:466-72, Genbank Accession Number J02400)
4299 to 4565	HTLV-1 LTRﾄﾞﾒｲﾝ由来の翻訳ｴﾝﾊﾝｻｰｴﾚﾒﾝﾄ(Seiki et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 80:3618-22, Genbank Accession Number J02029)
4574 to 4730	SV40 16Sからのｲﾝﾄﾛﾝ、19Sﾄﾞﾅｰ/ｱｸｾﾌﾟﾀｰｼｸﾞﾅﾙ(Okayama and Berg, 1983. Mol. Cell Biol. 3:280-9, Genbank Accession Number J02400)
4755 to 6178	XbaI及びSalI部位の間の3.10.1重鎖IgG1 cDNA

【０２５０】

精製された１０個の重鎖可変領域配列のそれぞれを、ＩｇＧ２定常領域をコードする配列とともに、ｐＤＳＲα２０哺乳類発現ベクター中に別個に連結して、１０個のＩｇＧ２発現ベクターを作製した。得られた１０個のＩｇＧ２発現ベクター（ｐＤＳＲα２０：ｈＩｇＧ２：ハイブリドーマ＃と表記）のそれぞれは、ＩｇＧ２の定常領域と１０個の重鎖可変領域配列のうち１つとをコードする配列を含んでいた。ｐＣＲ４－ＴＯＰＯクローンからクローニングされたプラスミド中に同定された同じ重鎖可変領域配列を含んでいることを確認するために、１０個の重鎖可変領域配列挿入物の配列を決定した。ハイブリドーマ２．１２．１（ｐＤＳＲα２０：ｈＩｇＧ２：２．１２．１）から最終的に得られた重鎖可変領域を含有するｐＤＳＲα２０：ｈＩｇＧ２発現ベクターは、表９に要約されている。

【０２５１】

【表１０】

表９　発現ベクター　ｐＤＳＲα２０：ＩｇＧ２：２．１２．１

プラスミド塩基
対番号

2 to 881	ｳｼ下垂体糖ﾀﾝﾊﾟｸ質ﾎﾙﾓﾝのαｻﾌﾞﾕﾆｯﾄ(α-FSH)由来の転写終結/ ﾎﾟﾘｱﾃﾞﾆﾙ化ｼｸﾞﾅﾙ(Goodwin, et al., 1983, Nucleic Acids Res. 11:6873-82;Genbank Accession Number X00004)
882 to 2027	内在性ﾏｳｽDHFRﾌﾟﾛﾓｰﾀｰ、cDNAｺｰﾄﾞ配列及びDHFR転写終結/ ﾎﾟﾘｱﾃﾞﾆﾙ化ｼｸﾞﾅﾙを含有するﾏｳｽｼﾞﾋﾄﾞﾛ葉酸還元酵素(DHFR) ﾐﾆ遺伝子(Gasser et al, 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79:6522-6;Nunberg et al., 1980, Cell 19:355-64;Setzer et al., 1982, J. Biol. Chem. 257:5143-7;McGrogan et al., 1985, J. Biol. Chem. 260:2307-14)
2031 to 3947	ｱﾝﾋﾟｼﾘﾝ耐性ﾏｰｶｰ遺伝子とE.ｺﾘ中のﾌﾟﾗｽﾐﾄﾞの複製起点とを含有するpBR322配列(Genbank Accession Number J01749)
3949 to 4292	SV40初期ﾌﾟﾛﾓｰﾀｰ、ｴﾝﾊﾝｻｰ及び複製起点(Takebe et al., 1988, Mol. Cell Biol. 8:466-72, Genbank Accession Number J02400)
4299 to 4565	HTLV-1 LTRﾄﾞﾒｲﾝ由来の翻訳ｴﾝﾊﾝｻｰｴﾚﾒﾝﾄ(Seiki et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 80:3618-22, Genbank Accession Number J02029)
4574 to 4730	SV40 16Sからのｲﾝﾄﾛﾝ、19Sﾄﾞﾅｰ/ｱｸｾﾌﾟﾀｰｼｸﾞﾅﾙ(Okayama and Berg, 1983. Mol. Cell Biol. 3:280-9, Genbank Accession Number J02400)
4755 to 6166	XbaI及びSalI部位の間の2.12.1重鎖IgG2 cDNA

【０２５２】

κ軽鎖可変領域（配列番号：１、３、５、７、９、１１、１３、１５、１７及び１９）κ軽鎖定常領域（配列番号：２１）、重鎖可変領域（配列番号：２、４、６、８、１０、１２、１４、１６、１８及び２０）、並びにＩｇＧ１及びＩｇＧ２重鎖定常領域（配列番号：２２及び２３）に対するｃＤＮＡ配列が、図３に示されている。

【０２５３】

これらのｃＤＮＡ配列のそれぞれから予想されるポリペプチド配列が決定された。κ軽鎖可変領域（配列番号：２４、２６、２８、３０、３２、３４、３６、３８、４０及び４２）、κ軽鎖定常領域（配列番号：４４）、重鎖可変領域（配列番号：２５、２７、２９、３１、３３、３５、３７、３９、４１及び４３）、並びにＩｇＧ１及びＩｇＧ２重鎖定常領域（配列番号：４５及び４６）に対する予想ポリペプチド配列が、図４に示されている。

【０２５４】

配列データに基づいて、各重鎖又は軽鎖可変領域を与えた生殖系列遺伝子を決定した。生殖系列遺伝子の識別は、図１、２、３及び４に、対応するハイブリドーマ株の隣に記されている。配列の関連性をさらに分析することによって（図１Ｂ及び２Ｂ）、図１Ａ（κ軽鎖可変領域）及び図２Ａ（重鎖可変領域）に表示された樹状図が得られた。

【実施例４】

【０２５５】

２９３Ｔ細胞中での一過性発現

１０の別個の同時形質移入では、実施例３Ａに記載したκ軽鎖配列を含むｐＤＳＲα２０発現ベクター（軽鎖ベクター）と実施例３Ｂに記載した重鎖配列を含むｐＤＳＲα２０発現ベクター（重鎖ベクター）とを、２９３Ｔ細胞に同時形質移入した。これら１０の別個の同時形質移入では、実施例１で論述したハイブリドーマの１つから最終的に得られた軽鎖ベクター及び重鎖ベクターの両方を２９３Ｔ細胞に同時形質移入した。具体的には、ハイブリドーマ３．１０．１から最終的に得られたベクターの同時形質移入については、ＩｇＧ１（ｐＤＳＲα２０：ｈＩｇＧＣ$_{H}$：３．１０．１）を含む重鎖ベクターを使用した。他の９個のハイブリドーマから最終的に得られたベクターの同時形質移入については、ＩｇＧ２（ｐＤＳＲα２０：ｈＩｇＧ２：ハイブリドーマ＃）を含む重鎖を使用した。同時形質移入は、製造業者によって与えられた説明書に従って、Ｆｕｇｅｎｅ６又はＸ－ＴｒｅｍｅＧｅｎｅ　ＲＯ－１５３９（ともにＲｏｃｈｅ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌｓ，　Ｉｎｄｉａｎａｐｏｌｉｓ，　ＩＮから得られる。）の何れかを用いて行った。

【０２５６】

同時形質移入は、まず、標準的なローラーボトル中で、接着性２９３Ｔ細胞を用いて行った。５％ウシ胎児血清（ＦＢＳ）（Ｈｙｃｌｏｎｅ，　ｃａｔ　＃　ＳＨ　３００７０．　０３）、１×非必須アミノ酸（Ｓｉｇｍａ，ｃａｔ＃　Ｍ７１４５）、１×ペニシリン／ストレプトマイシン（Ｓｉｇａｍ，ｃａｔ　＃Ｐ７５３９（１０，０００Ｕ／ｍＬペニシリン／ストレプトマイシン））及び１×ピルビン酸ナトリウム（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）を含有するＤＭＥＭ中、ローラーボトル当り４×１０^{7}から５×１０^{7}個の細胞を、ローラーボトルに播種した。細胞が６０から７０％の集密度に達した時点で、特定のハイブリドーマから最終的に得られた重鎖ベクター及び軽鎖ベクターを、前記細胞中に２４時間同時形質移入し、その後、この培地は、血清を欠く同じ培地に変更した。無血清培地を集め、形質移入から４８時間及び９６時間の時点で、新鮮な無血清培地に２回交換して、総容量１．２５Ｌの収集された無血清培地を得た。

【０２５７】

血清を欠く上記同じ培地中の懸濁液中で、無血清順応された２９３Ｔ細胞を用いて、別個の同時形質導入を１０回繰り返した。特定のハイブリドーマに対応する重鎖ベクター及び軽鎖ベクターを、５００ｍＬの培養容量で、細胞中に同時形質移入した。形質移入された細胞を７日間インキュベートし、その後、無血清馴化培地を集めた。

【実施例５】

【０２５８】

抗体発現及びＣＨＯ細胞のクローニング

ＨＧＦに対する組み換え抗体の安定な発現を得るために、ＤＨＦＲを欠損したチャイニーズハムスター卵巣細胞（ＣＨＯｄ$^{-}$）を使用した。１０の別個の同時形質移入では、実施例４で論述したように、実施例１で論述したハイブリドーマの１つから最終的に得られた重鎖ベクター及び軽鎖ベクターの両方をＣＨＯｄ$^{-}$細胞に同時形質移入した。標準的なリン酸カルシウム法を用いて、同時形質移入を行った。

【０２５９】

５％の透析されたウシ胎児血清を加えた、ヒポキサンチンチミジンを欠如する高グルコースＤＭＥＭを含有する選択培地中（Ｇｉｂｃｏ／ＢＲＬ，　Ｃａｒｌｓｂａｄ，　ＣＡ　Ｃａｔ＃　１１９６５）で、１０の同時移入の各々から得られた被形質移入細胞を別々に増殖させた。ヒポキサンチン－チミジンを欠如するこのような培地は、組み換えＤＨＦＲ酵素を発現する細胞の増殖を選択する。ヒト抗体の存在を検出するために、標準的なＥＬＩＳＡアッセイを用いて、増殖された形質移入体のそれぞれから得られた培地をスクリーニングした。

【実施例６】

【０２６０】

ＣＨＯｄ$^{-}$クローン中での、ＨＧＦに対する抗体の発現

実施例５に記載した異なる安定な１０個のＣＨＯｄ$^{-}$クローン（それぞれの異なるクロ

ーンが、ＨＧＦに対する１０個の異なる抗体のうち１つを発現している。）それぞれの６つの試料を、別々に、増殖培地中で増殖させた。増殖培地は、５％の透析されたＦＢＳ、非必須アミノ酸及びＬ－グルタミン（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）を補充された、高グルコース加ＤＭＥＭ（Ｇｉｂｃｏ／ＢＲＬ，Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ Ｃａｔ ＃ １１９６５）であった。細胞は、５％ CO_2下、３７℃で増殖された。

【０２６１】

ＣＨＯｄ$^-$クローンが増殖の６ウェル段階に達した時点で、抗体の発現を増幅するために、増殖培地に１０ｎＭ メトトレキセートを添加した。細胞が集密になった後、細胞を１００ｍｍ皿に移した。メトトレキセート濃度は、１０ｎＭから２０ｎＭまで、５０ｎＭまで、１００ｎＭまで、２５０ｎＭまで、５００ｎＭまで、１μＭまで、２μＭまで、４μＭまで、最後に１０μＭまで段階的に増加させた。最低一週間、及び、視覚的に測定したときに、細胞が所定の濃度のメトトレキセートに十分順応するまで、細胞を各濃度に維持した。

【０２６２】

ＨＧＦに対する各抗体の発現レベルを決定するために、クローンのそれぞれから得た馴化培地を、各メトトレキセート濃度でアッセイした。ヒトＨＧＦをコートしたプレートへの、ＨＧＦに対する抗体の結合を半定量的に測定するために、標準的なＥＬＩＳＡ及び時間分解蛍光（ＴＲＦ）サンドイッチアッセイによって、培地をアッセイした。

【０２６３】

メトトレキセートによって増殖された、最高の抗体発現レベルを有するクローンを、以下のように、無血清産生培地中で増殖するように順応させた。培養容器からクローンをトリプシン処理し、遠心し、しっかり蓋をした２５０ｍＬの振盪フラスコ中、4×10^5細胞／ｍＬで、５０ｍＬの無血清産生培地中に再懸濁した。３７℃の暖かい部屋の中で培養物をインキュベートし、約１２５ＲＰＭで攪拌した。３から４日ごとに、細胞を遠沈させ、4×10^5細胞／ｍＬになるように新鮮な無血清産生培地で希釈した。この順応相を完了するために、培養物の各々に対して、新鮮な無血清産生培地を約１０回添加した。

【実施例７】

【０２６４】

組み換え細胞馴化培地からの抗体精製

実施例１で記載したハイブリドーマから、実施例４で記載した一過性発現２９３Ｔ細胞から、実施例５で記載した安定な形質移入体から、及び実施例６で記載したメトトレキセートで増幅されたクローンから、培地を集めた。製造業者によって与えられた説明書に従い、ＹＭ３０螺旋状カートリッジ（Ｍｉｌｉｐｏｒｅ，Ｂｅｄｆｏｒｄ，ＭＡ Ｃａｔ ＃Ｓ１０Ｙ３０）を用いて、これら各採取源から得た培地を、別々に約１０倍濃縮した。濃縮された各培地試料中に存在する抗体の濃度は、高性能液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）によって推定した。

【０２６５】

組み換えプロテインＡセファロース（ｒＰｒｏＡ）（Ａｍｅｒｓｈａｍ，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪ，Ｃａｔ ＃ １７－１２７９－０３）を用いたアフィニティー樹脂精製によって、濃縮された前記培地試料から抗体を精製した。まず、ｒＰｒｏＡを、リン酸緩衝食塩水（ＰＢＳ）で４回洗浄した。最後の洗浄後、等容量のｒＰｒｏＡとＰＢＳを混合することによって、ＰＢＳ中の洗浄されたｒＰｒｏＡのスラリーを作製した。培地試料中の各５μｇの抗体に対して約１μＬのｒＰｒｏＡスラリーであるが、何れの培地試料に対しても５０μＬ以上のｒＰｒｏＡスラリーとなる量で、このｒＰｒｏＡスラリーを濃縮された各培地試料に添加した。得られた培地／スラリー試料を、振盪しながら、４℃で一晩インキュベートした。次いで、ｒＰｒｏＡを沈降させるために培地／スラリー試料を遠心した。結合していないタンパク質を含有する上清画分は廃棄した。ｒＰｒｏＡペレットは、各０．５ｍＬのＰＢＳ中に、別々に再懸濁した。次いで、再懸濁されたｒＰｒｏＡ試料を０．４５μｍ Ｓｐｉｎ－Ｘチューブ（ＣｏＳｔａｒ，Ｃｏｒｎｉｎｇ ＮＹ

，　Ｃａｔ＃８１６２）に移し、ＰＢＳを除去するために遠沈させた。次いで、Ｓｐｉｎ－Ｘチューブ中のｒＰｒｏＡを、一回の洗浄当り０．５ｍＬ　ＰＢＳで３回洗浄した。

【０２６６】

１．５容量の０．１Ｍグリシン、ｐＨ２．７を添加することによって、Ｓｐｉｎ－Ｘチューブ中のｒＰｒｏＡから、抗体画分を溶出し、室温で１０分間インキュベートした。次いで、Ｓｐｉｎ－Ｘチューブを遠心し、各Ｓｐｉｎ－Ｘチューブからの溶出物を別々に集めた。溶出を繰り返し、各Ｓｐｉｎ－Ｘチューブからの２つの溶出物をプールした。プールされた溶出物のｐＨを、１／２５容量の１．０Ｍ　Ｔｒｉｓ、ｐＨ９．２で中和した。次いで、粒状物を除去するために、新しいＳｐｉｎ－Ｘチューブを通過させて各試料をろ過した。

【０２６７】

ヒトＩｇＧを標準として使用するＢｒａｄｆｏｒｄアッセイによって、最終調製物のタンパク質濃度を測定した。純度を評価するために、最終調製物の各々の試料を、ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルの別個のレーン上を別々に走行させ、クマシーで染色し、視覚的に検査した。

【実施例８】

【０２６８】

ＨＧＦへの抗体の結合の性質決定

Ａ．アフィニティー測定

ＢＩＡｃｏｒｅ（Ｒ）３０００（Ｂｉａｃｏｒｅ，　Ｉｎｃ．，　Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪ）を用いて、実施例６に記載されている、ＨＧＦに対する６個の抗体（ハイブリドーマ３．１０．１、２．４．４、２．１２．１、１．２９．１、１．７５．１及び１．７４．３から最終的に得られた抗体）のアフィニティー分析を、製造業者の指示書に従って実施した。これらの分析に対する走行緩衝液は、０．００５％　Ｐ２０界面活性剤を加えたＰＢＳであった（ＢＩＡｃｏｒｅ，　Ｉｎｃ．　Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，　ＮＪ）。製造業者の指示書に従って、Ａｍｉｎｅ　Ｃｏｕｐｌｉｎｇ　Ｋｉｔ（Ｂｉａｃｏｒｅ，　Ｉｎｃ．　Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，　ＮＪ）を使用し、一級アミン基を介して、組み換えプロテインＧ（Ｐｉｅｒｃｅ，　Ｒｃｋｆｏｒｄ，　ＩＬ）を、研究等級のＣＭ５センサーチップ（Ｂｉａｃｏｒｅ，　Ｉｎｃ．　Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，　ＮＪ）に固定化した。

【０２６９】

６つの別個の試料において、製造業者の指示書に従って、ＨＧＦに対する６個の各抗体の約２００共鳴単位（ＲＵ、ｒｅｓｏｎａｎｃｅ　ｕｎｉｔ）を、固定化されたプロテインＧに別々に付着させた。様々な濃度（０から１００ｎＭ）のヒトＨＧＦを含む試料を、結合された抗体表面上に、５０μＬ／分の流速で、３分間注入した。ＢＩＡエバリュエーション３．１コンピュータプログラム（ＢＩＡｃｏｒｅ，Ｉｎｃ．　Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，　ＮＪ）を用いて、Ｋａ（会合速度定数）、Ｋｄ（解離速度定数）及びK_D（解離平衡定数）を含む抗体結合速度論パラメータを決定した。解離平衡定数が低いほど、ＨＧＦに対する抗体の親和性が大きいことを示す。データを図６Ａに示す。

【０２７０】

ＨＧＦに対する４個の各抗体（ハイブリドーマ２．４．４、１．２９．１、１．７４．２及び２．１２．１から最終的に得られた抗体）のK_D値も、平衡結合法を用いて測定した。この方法は、０．００５％のＰ２０界面活性剤を加えたＰＢＳ（ＢｌＡｃｏｒｅ，　Ｉｎｃ．　Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，　ＮＪ）を走行緩衝液として使用して、ＢＩＡｃｏｒｅ（Ｒ）　３０００（Ｂｉａｃｏｒｅ，　Ｉｎｃ．，　Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，　ＮＪ）によって行った。製造業者の指示書に従って、Ａｍｉｎｅ　Ｃｏｕｐｌｉｎｇ　Ｋｉｔ（Ｂｉａｃｏｒｅ，　Ｉｎｃ．　Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，　ＮＪ）を使用し、一級アミン基を介して、ＨＧＦに対する４個の抗体を、研究等級のＣＭ５センサーチップ（Ｂｉａｃｏｒｅ，　Ｉｎｃ．　Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，　ＮＪ）に別々に固定化した。

【０２７１】

別々のアッセイにおいて０．００５％　Ｐ－２０と０．１ｍｇ／ｍＬ　ＢＳＡを加えたＰＢＳ中の２つの異なる各濃度（０．０５ｎＭ及び１ｎＭ）の各ヒトＨＧＦとともに、ＨＧＦに対する４個の各抗体を、濃度範囲（０．０１ｎＭから５０ｎＭ）にわたって、室温で少なくとも６時間、別々にインキュベートした。次いで、ＨＧＦに対する同じ抗体がその上に固定化されたＣＭ５センサーチップの表面上に、これらの試料のそれぞれを注入した。得られた結合シグナルは、溶液中の遊離ＨＧＦと比例していた。解離平衡定数（K_D）は、双対曲線一部位均一結合モデル（ＫｉｎＥｘＡ　ｓｏｆｔｗａｒｅ，　Ｓａｐｉｄｙｎｅ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ　Ｉｎｃ．，　Ｂｏｉｓｅ　ＩＤ）を用いて、競合曲線の非線形回帰分析によって得られた。この解離平衡定数の値は、図６Ｂに記されている。

【０２７２】

Ｂ．ＨＧＦに対する抗体の結合の特異性

ヒトＨＧＦは、ＣＨＯ細胞中に発現するか、又はＲ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ，　Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ　ＭＮ，　Ｃａｔ　＃　２９４－ＨＧ－００５）から購入した。「Ｌｉｕ　ｅｔ　ａｌ．，　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　ｃｌｏｎｉｎｇ　ａｎｄ　ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｚａｔｉｏｎ　ｏｆ　ｃＤＮＡ　ｅｎｃｏｄｉｎｇ　ｍｏｕｓｅ　ｈｅｐａｔｏｃｙｔｅ　ｇｒｏｗｔｈ　ｆａｃｔｏｒ，　Ｂｉｏｃｈｉｍ　Ｂｉｏｐｈｙｓ　Ａｃｔａ．　１６：１２１６（２）：２９９－３００（１９９３）」中の配列を用いて、組み換えマウスＨＧＦを調製した。組み換えマウスＨＧＦは、バキュロウイルスベクターを用いて昆虫細胞中に発現することによって、又は２９３Ｔ細胞中に発現することによって取得した。何れの手順でも、マウスＨＧＦは、ヘパリン硫酸アフィニティークロマトグラフィーによって精製した。

【０２７３】

ヒト及びマウスＨＧＦの調製物の各々は、生物学的活性であることが示された。ヒトＰＣ３細胞（ＡＴＣＣ　Ｍａｎａｓｓａｓ，　ＶＡ　＃　ＣＲＬ　１４３５）及びマウス４Ｔ１細胞（ＡＴＣＣ　Ｍａｎａｓｓａｓ，　ＶＡ　＃　ＣＲＬ　２５３１）中で、ヒトＨＧＦは、用量依存性ヒトＭｅｔリン酸化を誘導した。マウスＨＧＦは、マウス４Ｔ１細胞中でＭｅｔリン酸化を誘導したが、ヒトＰＣ３細胞中では誘導しなかった。

【０２７４】

ヒトＨＧＦ及びマウスＨＧＦを、ＳＤＳ　ＰＡＧＥゲルの各別のレーン上で走行させた。ヒトＨＧＦ及びマウスＨＧＦは、１００ｎｇ／レーン及び１０ｎｇ／レーンで、それぞれ別々に走行させた。一部のゲルは非還元条件下で走行させ、他の各別のゲルはβ－メルカプトエタノールを用いた還元条件下で走行させた。ＳＤＳ　ＰＡＧＥゲル中のヒトＨＧＦＰ及びマウスＨＧＦをニトロセルロース膜に転写した。これらの膜を、実施例６で記載した、ＨＧＦに対する１０個の抗体のうち１つとともに別々にインキュベートした。ＨＧＦに対する１０個の抗体の各々を、還元条件下で、ヒトＨＧＦ及びマウスＨＧＦを含有するゲルから得たニトロセルロース膜とともに、並びに、非還元条件下で、ヒトＨＧＦ及びマウスＨＧＦを含有するゲルから得たニトロセルロース膜とともに、別々にインキュベートした。次いで、ＨＲＰ（Ｐｉｅｒｃｅ，　Ｒｏｃｋｆｏｒｄ，　ＩＬ，　Ｃａｔ．　＃　３１４１２）に連結されたヤギ抗ヒトＩｇＧ抗体とともに、前記膜をインキュベートした。ＨＲＰに連結されたヤギ抗ヒトＩｇＧ抗体から得られるシグナルを、製造業者の指示書に従って、電気化学発光によって検出した（ＥＣＬ^{TM}；Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｐｈａｒｍａｃｉａ　Ｂｉｏｔｅｃｈ，　Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，　ＮＪ，　Ｃａｔ．　＃　ＲＰＮ２１０６）。

【０２７５】

図７は、実施例６で記載した、ＨＧＦに対する１０個の各抗体を調べるゲルの図を示している。左側のパネルは、非還元条件下で、１００ｎｇのヒトＨＧＦ（レーン１）、１０ｎｇのヒトＨＧＦ（レーン２）、１００ｎｇのマウスＨＧＦ、及び１０ｎｇのマウスＨＧＦ（レーン４）に対する各抗体を調べるゲルを示している。右側のパネルは、還元条件下で、１００ｎｇのヒトＨＧＦ（レーン５）、１０ｎｇのヒトＨＧＦ（レーン６）、１００ｎｇのマウスＨＧＦ（レーン７）、及び１０ｎｇのマウスＨＧＦ（レーン８）に対する各

抗体を調べるゲルを示している。検査されたＨＧＦに対する各抗体は、非還元条件下でヒトＨＧＦに結合した（レーン１及び２）。検査されたＨＧＦに対する抗体は何れも、非還元条件下（レーン３及び４）でマウスＨＧＦに、又は還元条件下でヒトＨＧＦ（レーン５及び６）若しくはマウスＨＧＦ（レーン７及び８）に、有意に結合しなかった。

【０２７６】

Ｃ．融合タンパク質を用いたエピトープマッピング

標準的な分子技術を用いて、ベクターｐＣＥＰ４（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，　Ｃａｒｌｓｂａｄ，　ＣＡ，　ｃａｔ＃　Ｖ０４４－５０）の多重クローニング部位の隣に、ニワトリのアビジンをコードするｃＤＮＡ配列を含む哺乳類発現ベクターを構築した（図９Ａ）。このベクターは、続いて発現された融合タンパク質の分泌を可能とするために、ニワトリのアビジンシグナル配列（図９Ｂ）を含んでいた。融合タンパク質発現ベクターの多重クローニング部位中に標的タンパク質をコードする配列を挿入することによって、発現ベクターを構築した。得られた各融合構築物はそれぞれ、標的タンパク質のＮ末端にアビジンタンパク質をコードしていた。

【０２７７】

この技術を用いて、以下の標的タンパク質：完全長ヒトＨＧＦ；ヒトＨＧＦの天然スプライスバリアントであるｄ５　ＨＧＦ（Ｒｕｂｉｎ，　Ｊ．　ｅｔ　ａｌ．ＰＮＡＳ　８８：４１５－４１９（１９９１））；完全長のマウスＨＧＦ；ヒトＨＧＦのＮ末端部分（アミノ酸３２－５０５）とマウスＨＧＦのＣ末端部分（アミノ酸５０８－７２８）を含むキメラ＃１；マウスＨＧＦのＮ末端部分（アミノ酸３３－５０６）とヒトＨＧＦのＣ末端部分（アミノ酸５０６－７２８）を含むキメラ＃２；及びヒトＨＧＦのＮ末端部分（アミノ酸３２－５８２）とマウスＨＧＦのＣ末端部分（アミノ酸５８３－７２８）を含むキメラ＃３、に融合されたアビジンを含む融合タンパク質を調製した。

【０２７８】

融合タンパク質の模式図が、図１０に示されている。ＨＧＦのＮ末端ドメインは、Ｋ１－Ｋ４で標識されたボックスによって表されている、４つのクリングルドメインを含有する。ＨＧＦのＣ末端ドメインは、セリンプロテアーゼと相同性を有する。このドメインは、棒によって表されている。白のボックスと実線は、ヒトＨＧＦ配列を表す。影が付いたボックスと帯状の棒は、マウスの配列を表す。

【０２７９】

製造業者の指示書に従って、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ（Ｇｉｂｃｏ　ＢＲＬ，　Ｃａｒｌｓｂａｄ，　ＣＡ，　Ｃａｔ　＃１８３２４）を用いて、各融合タンパク質発現ベクターのうち１つを別々に細胞に形質移入することによって、各融合タンパク質を、２９３Ｔ細胞中に一過性に発現した。形質移入から約４８時間後に、馴化培地を集め、アッセイした。

【０２８０】

別々の試料において、実施例６で記載した、ＨＧＦに対する１０個の抗体のうち５個（ハイブリドーマ２．４．４、１．７４．１、１．７５．１、３．１０．１及び２．１２．１から最終的に得られた抗体）を、以下の標的タンパク質：完全長ヒトＨＧＦ、ｄ５　ＨＧＦ及びマウスＨＧＦのそれぞれを含む融合タンパク質とともに別々にインキュベートした。インキュベート後、ビオチンコートされたビーズ（Ｓｐｈｅｒｏｔｅｃｈ　Ｉｎｃ．，　Ｌｉｂｅｒｔｙｖｉｌｌｅ，　ＩＬ，　Ｃａｔ　＃　ＴＰ－６０－５）を用いて、各試料中の融合タンパク質を別々に捕捉した。ＦＩＴＣ標識された抗アビジン抗体（Ｖｅｃｔｏｒ　Ｌａｂ，　Ｂｕｒｌｉｎｇａｍｅ，　ＣＡ，　Ｃａｔ．　＃　ＳＰ－２０４０）を添加することによって、得られたビーズ－タンパク質複合体を標識した。フィコエリトリン（ＰＥ）標識されたヤギ抗ヒトＦ（ａｂ’）$_2$抗体（Ｓｏｕｔｈｅｒｎ　Ｂｉｏｔｅｃｈ　Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ，　Ｉｎｃ，　Ｂｉｒｍｉｎｇｈａｍ，　ＡＬ，　Ｃａｔ　＃　２０４３－０９）を添加することによって、ＨＧＦに対する抗体の存在を決定した。

【０２８１】

次いで、これらの試料をＦｌｕｏｒｅｓｃｅｎｃｅ　Ａｃｔｉｖａｔｅｄ　Ｃｅｌｌ

Ｓｏｒｔｅｒ（ＦＡＣＳ）分析に供した。ＦＩＴＣによって標識されたビーズ複合体（アビジンの存在を示す。）及び／又はＰＥ（ＨＧＦに対する抗体の存在を示す。）を、Ｂｅｃｔｏｎ Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ ＦＡＣＳｃａｎ（ＢＤ, Ｆｒａｎｋｌｉｎ Ｌａｋｅｓ, ＮＪ）上で検出した。検査された、ＨＧＦに対する５個の抗体に対するＦＡＣＳスキャッタープロットが図８に示されている。

【０２８２】

別々の試料において、実施例６で記載した、ＨＧＦに対する１０個の抗体のうち２個（ハイブリドーマ２．１２．１及び２．４．４から最終的に得られた抗体）を、以下の標的タンパク質：完全長ヒトＨＧＦ、ｄ５ ＨＧＦ及びマウスＨＧＦ、キメラ＃１、キメラ＃２及びキメラ＃３のそれぞれを含む融合タンパク質とともに別々にインキュベートした。これらの試料を、上記ＦＡＣＳ分析に供した。

【０２８３】

これらの結合実験の結果は、図１０Ａに、模式図の右に要約されている。抗体２．１２．１および２．４．４は何れも、キメラ＃１を結合しなかった。抗体２．１２．１および２．４．４はともに、キメラ＃２を結合した。抗体２．４．４はキメラ＃３に結合した。抗体２．１２．１はキメラ＃３に結合しなかった。

【０２８４】

Ｄ．融合タンパク質を用いたさらなるエピトープマッピング

抗体２．４．４及び２．１２．１が結合する、ＨＧＦのエピトープについての情報をさらに与えるため、実施例８Ｃ（図１ＯＢ）に上記されているように、さらなるヒト／マウスキメラを構築し、アッセイした。キメラを作製するために使用されたプライマーは、表１０に示されている。

【０２８５】

【表１１】

表１０　ヒト／マウスＨＧＦキメラ及び点変異、挿入と欠失を作製するために使用されるオリゴヌクレオチド

配列番号	ｵﾘｺﾞ番号	配 列	n	構築物	切断点又は変異
124	3201-76	ATG CGT CTC CCT TGA TGA TGC TGG CTG CAT TTC	33	点変異	hHGFR647Q
125	3201-75	ATG CGT CTC TCA AGG GAA GGT GAC TCT GAA TGA	33	点変異	hHGFR647Q
126	3201-72	ATG CGT CTC TAA CTA GGT AAA TCA ATC GTA CTA ACA	36	点変異	hHGFN601S
127	3201-71	ATG CGT CTC TAG TTA TGG ATG CAC AAT TCC TGA AA	35	点変異	hHGFN601S
128	3201-70	ATG CGT CTC AAT TAT CCA GGA CAG CAG GCC TG	32	点変異	hHGFD592N
129	3201-69	ATG CGT CTC ATA ATT TTG TTA GTA CGA TTG ATT TAC	37	点変異	hHGFD592N

		C			
130	3201-68	ATG CGT CTC GCG TTT CTC ATC TCC TCT TCC GT	32	点変異	hHGFC561R
131	3201-67	ATG CGT CTC AAA CGC AAA CAG GTT CTC AAT GTT T	34	点変異	hHGFC561R
132	3201-66	ATG CGT CTC CTT TCG TGG ACA TCA TGA ATT CCA A	34	点変異	hHGFG555E
133	3201-65	ATG CGT CTC CGA AAG AGG AGA TGA GAA ATG CAA A	34	点変異	hHGFG555E
134	3201-64	GAG CAG CTG CTA GCA AGC TTG CTA	24	制限部位	hHGF n-末端+ NotI
135	3167-41	ATG CGT CTC AGA GAC TTG AAA GAC TAT GAA GCT TG	35	欠失	mHGF DK 欠失
136	3167-42	ATG CGT CTC GTC TCT GGC TGG AAA ACA TTG TCT T	34	欠失	mHGF DK 欠失
137	3167-44	ATG CGT CTC AAC AAA GAC TTG AAA GAT TAT GAA GCT TG	38	挿入	hHGF DK 挿入
138	3167-43	ATG CGT CTC TTT GTT TCG AGA AGG GAA ACA CTG TCG	36	挿入	hHGF DK 挿入
139	3167-37	ATG CGT CTC AAG CTT GCC AGG CCT GCT GT	29	キメラ9	hHGF aa586-3'
140	3167-40	ATG CGT CTC AAG CTT CAG TAA AAC CAA GTC TGA	33	キメラ9	mHGF 5'-aa585
141	3167-38	ATG CGT CTC AAG CTT GCT CGA CCT GCA ATC	30	キメラ8	mHGF aa586-3'
142	3167-39	ATG CGT CTC AAG CTT CAT TAA AAC CAG ATC TGA	33	キメラ8	hHGF 5'-aa585
143	3167-37	ATG CGT CTC AAG CTT GCC AGG CCT GCT GT	29	キメラ7	hHGF aa586-3'
144	3167-40	ATG CGT CTC AAG CTT CAG TAA AAC CAA GTC TGA	33	キメラ7	mHGF 5'-aa585
145	3167-38	ATG CGT CTC AAG CTT GCT CGA CCT GCA ATC	30	キメラ3	mHGF aa586-3'
146	3167-39	ATG CGT CTC AAG CTT CAT TAA AAC CAG ATC TGA	33	キメラ3	hHGF 5'-aa585
147	3167-35	ATG CGT CTC TAG GAT GGA TGG TTA GTT TGA GAT	33	キメラ2	hHGF aa507-3'
148	3167-36	ATG CGT CTC ATC CTA CTG TTG TTT GTG TTG GAA T	34	キメラ2	mHGF 5'-aa506
149	3144-31	ATG CGT CTC TAG GAT GGA TGG TTA GTT TGA AAT A	34	キメラ1	mHGF aa507-3'
150	3080-16	ATG CGT CTC ATC CTA TGT TTG TTC GTG TTG G	31	キメラ1	hHGF 5'-aa506
151	3080-04	ATG CGT CTC ATG CAT CCA AGG TCA AGG AGA AG	32	キメラ6	hHGF aa307-3'
152	3144-28	ATG CGT CTC ATG CAT TCA	32	キメラ6	mHGF 5'-aa306

		GTT GTT TCC ATA GG			
153	3079-84	ATG CGT CTC ATG CAT GAC CTG CAA TGG GGA G	31	キメラ５	hHGF aa213-3'
154	3144-27	ATG CGT CTC ATG CAT TCA ACT TCT GAA CAC TGA	33	キメラ５	mHGF 5'-aa212
155	3079-77	ATG CGT CTC ATG CAT CAT TGG TAA AGG ACG C	31	キメラ４	hHGF aa129-3'
156	3079-78	ATG CGT CTC ATG CAG TTT CTA ATA TAG TCT TTG TTT TC	38	キメラ４	mHGF 5'-aa128
157	3079-83	ATG GGA TCC CTA TGA CTG TGG TAC CTT ATA TG	32	制限部位	hHGF c-末端 + BamHI
158	2870-60	ATG CGG CCG CAC AAA GGA AAA GAA GAA ATA CAA TTC	36	制限部位	hHGF n-末端 + NotI
159	3013-96	CGG GAT CCT TAC AAC TTG TAT GTC AAA ATT AC	32	制限部位	mHGF c-末端 + BamHI
160	3013-95	ATG ATG GCG GCC GCT CAG AAG AAA AGA AGA AAT ACA CTT C	40	制限部位	mHGF n-末端 + NotI

【０２８６】

図１０Ｂは、研究のために作製されたマウス及びヒトＨＧＦキメラ分子の模式図を示しており、各キメラへの抗体２．１２．１及び２．４．４の結合の挙動が図の右手側に記されている。本研究におけるキメラ＃１－３は、実施例８Ｃ及び図１０Ａに記載されたキメラ＃１－３と同一であった。キメラ＃４－６は、その他の点では完全なヒトＨＧＦ分子中に、マウスＨＧＦのＮ末端の漸増量を取り込んだ。キメラ＃７は、他の点はそのままのヒトＨＧＦ分子中にマウスＨＧＦのアミノ酸５０７から５８５を使用し、キメラ＃８は他の点はそのままのマウスＨＧＦ分子中にヒトＨＧＦのアミノ酸５０７から５８５を使用した。キメラ＃９は、マウスＨＧＦのアミノ酸１から５８５とヒトＨＧＦのアミノ酸５８６から７３１から構築された。

【０２８７】

キメラタンパク質への抗体２．４．４及び２．１２．１の結合は、実施例８Ｃに記載されているようにアッセイを行った。抗体２．４．４又は抗体２．１２．１の何れかを、融合タンパク質の１つとともにインキュベートした後、ビオチンコートされたビーズ（Ｓｐｈｅｒｏｔｅｃｈ Ｉｎｃ．, Ｌｉｂｅｒｔｙｖｉｌｌｅ, ＩＬ, Ｃａｔ ＃ ＴＰ－６０－５）を用いて、各試料中の融合タンパク質を別々に捕捉した。ＦＩＴＣ標識された抗アビジン抗体（Ｖｅｃｔｏｒ Ｌａｂ, Ｂｕｒｌｉｎｇａｍｅ, ＣＡ, Ｃａｔ． ＃ ＳＰ－２０４０）を添加することによって、得られたビーズ－タンパク質複合体を標識した。フィコエリトリン（ＰＥ）標識されたヤギ抗ヒトＦ（ａｂ'）^{2}抗体（Ｓｏｕｔｈｅｒｎ Ｂｉｏｔｅｃｈ Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ, Ｉｎｃ, Ｂｉｒｍｉｎｇｈａｍ, ＡＬ, Ｃａｔ ＃ ２０４３－０９）を添加することによって、ＨＧＦに対する抗体の存在を決定した。次いで、これらの試料をＦｌｕｏｒｅｓｃｅｎｃｅ Ａｃｔｉｖａｔｅｄ Ｃｅｌｌ Ｓｏｒｔｅｒ（ＦＡＣＳ）分析に供した。ＦＩＴＣによって標識されたビーズ複合体（アビジンの存在を示す。）及び／又はＰＥ（ＨＧＦに対する抗体の存在を示す。）を、Ｂｅｃｔｏｎ Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ ＦＡＣＳｃａｎ（ＢＤ, Ｆｒａｎｋｌｉｎ Ｌａｋｅｓ, ＮＪ）上で検出した。一部の事例では、ＦＩＴＣを用いて発現を標準化した後、ＰＥ標識による抗体結合の後、単色ＦＡＣＳ分析を行った。この方法はアッセイの感度を増し、あまり高いレベルで発現されてい

ない構築物との結合の測定に役立った。

【０２８８】

図１０Ｂに示されているように、抗体２．４．４及び２．１２．１は何れも、ヒトＨＧＦのアミノ酸５０７から５８５を含有するキメラ＃８を結合した（図１０Ｂ）。これらの結果は、抗体２．４．４及び２．１２．１のＨＧＦへの結合に直接又は間接的に関与する残基を、この領域が含有することを示唆した。この同じ５０７から５８５領域中にマウス配列を含有するキメラ（キメラ７及び９）は、抗体２．１２．１又は２．４．４を結合しなかった。キメラ３は、ヒトＨＧＦのアミノ酸５０７から５８５の存在にも関わらず、抗体２．１２．１に結合しなかったが、抗体２．４．４には結合した。

【０２８９】

ヒトＨＧＦのアミノ酸５０７から５８５

【０２９０】

【化５】

:(GWMVSLRYRNKHICGGSLIKESWVLTARQCFPSR--

DLKDYEAWLGIHDVHGRGDEKCKQVLNVSQLVYGPEGSDLVLM

（配列番号１２３）（図１０Ｄ参照））についての情報をさらに得るために、表１０に記載されているプライマーを用いて、アミノ酸５０７から５８５の領域内でヒト残基をマウス残基に変化させる特異的な点変異を含有する変異ＨＧＦを作製した（図１０Ｃ）。ヒトＨＧＦ配列からマウスＨＧＦ配列（それぞれ、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号ＮＭ＿０００６０１及びＮＭ＿０１０４２７）への非保存的な単一アミノ酸変化を５個含有するヒトＨＧＦ－アビジン融合タンパク質を構築した。一方はヒトＨＧＦ配列中に２つのアミノ酸の挿入を含有し、他方はマウス配列から２つのアミノ酸の欠失を含有する、さらに２つの構築物も作製した（図１０Ｃ）。

【０２９１】

これらの構築物を発現させ、実施例８Ｃ及び８Ｄに記載されているように、結合分析に供した。抗体２．４．４又は抗体２．１２．１の何れかを、前記変異タンパク質の１つとともにインキュベートした後、ビオチンコートされたビーズ（Ｓｐｈｅｒｏｔｅｃｈ Ｉｎｃ．，Ｌｉｂｅｒｔｙｖｉｌｌｅ，ＩＬ，Ｃａｔ ＃ ＴＰ－６０－５）を用いて、各試料中の変異タンパク質を別々に捕捉した。ＦＩＴＣ標識された抗アビジン抗体（Ｖｅｃｔｏｒ Ｌａｂ，Ｂｕｒｌｉｎｇａｍｅ，ＣＡ，Ｃａｔ．＃ ＳＰ－２０４０）を添加することによって、前記得られたビーズ－タンパク質複合体を標識した。フィコエリトリン（ＰＥ）標識されたヤギ抗ヒトＦ（ａｂ’）^{2}抗体（Ｓｏｕｔｈｅｒｎ Ｂｉｏｔｅｃｈ Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ，Ｉｎｃ，Ｂｉｒｍｉｎｇｈａｍ，ＡＬ，Ｃａｔ ＃ ２０４３－０９）を添加することによって、ＨＧＦに対する抗体の存在を決定した。次いで、これらの試料をＦｌｕｏｒｅｓｃｅｎｃｅ Ａｃｔｉｖａｔｅｄ Ｃｅｌｌ Ｓｏｒｔｅｒ（ＦＡＣＳ）分析に供した。ＦＩＴＣによって標識されたビーズ複合体（アビジンの存在を示す。）及び／又はＰＥ（ＨＧＦに対する抗体の存在を示す。）を、Ｂｅｃｔｏｎ Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ ＦＡＣＳｃａｎ（ＢＤ，Ｆｒａｎｋｌｉｎ Ｌａｋｅｓ，ＮＪ）上で検出した。一部の事例では、ＦＩＴＣを用いて発現を標準化した後、ＰＥ標識による抗体結合の後、単色ＦＡＣＳ分析を行った。この方法はアッセイの感度を増し、あまり高いレベルで発現されていない構築物との結合の測定に役立った。

【０２９２】

アミノ酸５６１の変異は、変異されたヒトＨＧＦと抗体２．１２．１との結合及び変異されたヒトＨＧＦと抗体２．４．４との結合を妨げるが、アミノ酸５９２、６０１又は６４７の変異は妨げないことが明らかとなった。アミノ酸５５５の変異は、抗体２．１２．１の結合を妨げたが、抗体２．４．４結合は妨害しなかった。ヒト配列中に存在しない、２つのマウスアミノ酸５４０Ｎ及び５４１Ｋの挿入は（図１０Ｄ参照）、何れの抗体への

結合も妨げた。マウスＨＧＦ配列からこれら２つのアミノ酸を欠失させても、マウスＨＧＦへの何れの抗体の結合ももたらさなかった。

【０２９３】

Ｅ．プロテアーゼ保護アッセイによるエピトープマッピング

抗体２．１２．１によって結合されるＨＧＦエピトープを同定するために、古典的な相補的プロテアーゼ保護アッセイも行った。「Ｙｉ ａｎｄ Ｓｋａｌｋａ, Ｍａｐｐｉｎｇ Ｅｐｉｔｏｐｅｓ ｏｆ Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ Ａｇａｉｎｓｔ ＨＩＶ－１ Ｉｎｔｅｇｒａｓｅ ｗｉｔｈ Ｌｉｍｉｔｅｄ Ｐｒｏｔｅｏｌｙｓｉｓ ａｎｄ Ｍａｔｒｉｘ－Ａｓｓｉｓｔｅｄ Ｌａｓｅｒ Ｄｅｓｏｒｐｔｉｏｎ Ｉｏｎｉｚａｔｉｏｎ Ｔｉｍｅ－ｏｆ－Ｆｌｉｇｈｔ Ｍａｓｓ Ｓｐｅｃｔｒｏｍｅｔｒｙ, Ｂｉｏｐｏｌｙｍｅｒｓ（Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ） ５５：３０８－３１８（２０００）」を参照されたい。２００μＬの０．１Ｍ Ｔｒｉｓ緩衝液、ｐＨ７．５中で、ヒトＨＧＦ（３０μｇ／１０μＬ）を抗体２．１２．１（４０μｇ／４μＬ）と混合し、氷上で３０分間、インキュベートした。トリプシン（１μｇ）での消化を、３７℃で１時間行った。ペプチドを分離するために、消化された物質を逆相ＨＰＬＣに供した。抗体２．１２．１を加えない、ヒトＨＧＦのみの同様のトリプシン消化を、平行して行った。ＨＰＬＣカラム（Ｖｙｄａｃ Ｃ１８, ２．１×１５０ｍｍ, Ｖｙｄａｃ Ｉｎｃ., Ｈｅｓｐｅｒｉａ ＣＡ）は、０．１％ ＴＦＡ中の２から３５％アセトニトリルの溶出グラジエントを用いる、０．１％トリフルオロ酢酸（ＴＦＡ）中で実行した。溶出ペプチドのＵＶ追跡は、ＨＰ １０９０ ＨＰＬＣ装置（Ｈｅｗｌｅｔｔ Ｐａｃｋａｒｄ, Ｐａｌｏ Ａｌｔｏ）によって記録した。抗体２．１２．１への結合によって保護されたペプチドを調べるために、２つのＨＰＬＣマップを比較した（図１１Ａ）。

【０２９４】

続いて、特異的に保護されたペプチドを同定するために、Ｎ末端の配列決定と質量分析を行った。Ｎ末端ペプチドの配列決定は、ＡＢＩ－Ｐｒｏｃｉｓｅタンパク質配列決定機（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ, Ｆｏｓｔｅｒ Ｃｉｔｙ, ＣＡ）上で、エドマン分解によって行った。各サイクル中のアミノ酸は、連結されたＨＰＬＣ装置上での保持時間とアミノ酸標準との比較によって同定した。保護された断片の質量分析は、Ｐｅｒｃｅｐｔｉｖｅ Ｖｏｙａｇｅｒ質量分析器（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ, Ｆｒａｍｉｎｇｈａｍ, ＭＡ）で行った。マトリックス支援レーザー脱離イオン化法（ＭＡＬＤＩ）は、マトリックス、４－ヒドロキシシアノ桂皮酸（ＨＣＣＡ）又はシナピン酸を用いて行った。分子量は、既知の標準（酸化されたインシュリンβ鎖及びチトクロムｃ）に対する較正によって決定した。

【０２９５】

ヒトＨＧＦのαサブユニットはアミノ酸３２から４９４にわたり、βサブユニットはアミノ酸４９５から７２８にわたる（ヒトＨＧＦに対するＳｗｉｓｓ－Ｐｒｏｔエントリー Ｐ１４２１０参照）。ヒトＨＧＦへの抗体２．１２．１の結合は、２つのピークＴ３３及びＴ３８．６を保護した（図１１Ａ）。ピークＴ３８．６は２つのペプチドを含有しており、何れも、成熟したＨＧＦのβサブユニットの先頭又は先頭付近の配列に対応する（図１０Ｄ、太字で始まる配列、下線が付された文字（ＶＶＮＧＩＰＴＲＴＮ（配列番号１７２））及び図１１Ｃ参照）。Ｔ３３は、αサブユニットに由来した（図１１Ｃ）。質量分析に基づくと、ピークＴ３８．６中の２つのペプチドの観察された質量は、それぞれ、７１６５及び６８４０ダルトンと測定された。ＨＧＦの配列中に存在する可能性があるトリプシン切断部位に基づき（例えば、図１０Ｄ中のヒトＨＧＦのアミノ酸５５９に位置する下線が付された太字のアルギニン残基を参照。）、アルギニン残基番号５５９が保護されたペプチドのＣ末端を画すると予想される。

【０２９６】

抗体結合ペプチドを調べるために、別の相補性実験も設計した。上述されているように、ＨＧＦと抗体２．１２．１の混合物をトリプシンで１時間消化し、次いで、結合してい

ないペプチドを除去するために、Ｍｉｃｒｏｃｏｎｅ（Ｒ）　１０（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ　Ｃｏｒｐ．，　Ｂｅｄｆｏｒｄ，　ＭＡ）によるろ過に供した。結合されたペプチドは、抗体２．１２．１と一緒に、膜によって捕捉されると予想された。結合されたペプチドを複合体から溶出するために、原型のヒトＨＧＦ（１５μｇ）をペプチド－抗体２．１２．１混合物に添加した。試料を４℃で一晩インキュベートし、ＨＧＦ溶出されたペプチドを抗体及び原型ＨＧＦから分離するために、Ｍｉｃｒｏｎ（Ｒ）１０によるろ過に再び供した。両試料（結合したペプチド及び結合していないペプチド）を逆相ＨＰＬＣによって分析した（図１１Ｂ）。結合したペプチドをＨＰＬＣによって単離し、上述のように、Ｎ末端配列決定及び質量分析に供した。

【０２９７】

結合したペプチドを溶出するためにＨＧＦを使用すると、巨大なペプチドピーク（図１１Ｂ中のＴ４８）が抗体－ＨＧＦ複合体から溶出するのが観察され、上記Ｔ３８．６中に見出された２つの同じβサブユニット配列を含有することが、Ｎ末端ペプチド配列決定によって同定された。ピークＴ４８中のペプチドのサイズは、質量分析に基づくと不均一であり、従って、正確なＣ末端は、このデータから予測できなかった。３つの他のピーク（図１１Ｂ中では＃と標識されている。）は、何れも、ペプチドを含有しないか、ＨＧＦとは関連のない、起源未知のペプチドを含有していた。

【０２９８】

総合すると、これら２つの実験は、ＨＧＦのβサブユニットのＮ末端領域が抗体２．１２．１に対するエピトープの一部であることを示していた。このデータは、結合に関与するエピトープがヒトＨＧＦのアミノ酸５０７から５８５内に位置することを明らかにした、実施例８Ｄのデータを補完する。変異分析及び保護されたペプチドの分子質量は、ヒトＨＧＦの抗体結合エピトープがヒトＨＧＦのアミノ酸４９５から５５６内に位置することを示している。

【０２９９】

Ｆ．抗体の競合結合

実施例６に記載されている、ハイブリドーマ２．４．４から最終的に得られたＨＧＦに対する抗体（抗体２．４．４）、及びハイブリドーマ２．１２．１から最終的に得られたＨＧＦに対する抗体（抗体２．１２．１）を、以下のように、競合アッセイで使用するためにＦＩＴＣ標識した。抗体２．４．４及び２．１２．１を、ＰＢＳ　ｐＨ８．５中で別々に透析した。ＦＩＴＣ標識（｛６－フルオレセイン－５－（及び－６）－カルボキサミド｝ヘキサン酸、スクシンイミジルエステル（５（６）－ＳＦＸ］混合異性体）（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ．　Ｃａｔ　＃　Ｆ－２１８１）を、モル比５：１（標識：抗体）で、透析された２つの抗体のそれぞれに、ＤＭＳＯ中、５ｍｇ／ｍＬでＦＩＴＣ標識の原溶液から添加した。これらの混合物を、室温（２０から２２℃）で、一晩、暗所においてインキュベートした。次いで、ＰＢＳで平衡化させたＰｈａｒｍａｃｉａ　ＰＤ－１０カラム（Ａｍｅｒｓｈａｍ，　Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，　ＮＪ）に、この混合物を、それぞれ別個に走らせた。得られた調製物は、２８０ｎｍと４９５ｎｍで、分光光度計上において読み取った。２８０ｎｍでの吸光度を用いて、これらの調製物の抗体濃度を算出した。非標識抗体に対する標識抗体の比は、以下の式：

Ａｘ／Ｅ　×　ＭＷ抗体／ｍｇ抗体／ｍＬ　＝　モル標識抗体／モル非標識抗体（Ａｘ＝４９５ｎｍでの標識吸光度、Ｅ＝標識の吸光係数＝７７５００）。を用いて算出された。典型的には、抗体は、約３：１で標識された（ＦＩＴＣ標識抗体：非標識抗体）。

【０３００】

標識された２つの各抗体が、ＨＧＦに対する他の９個の各抗体との結合を競合する能力を調べた。ＨＧＦに対する標識された２つの各抗体をＨＧＦとともに別々にインキュベートし、ＨＧＦに対する標識された２つの各抗体は、ＨＧＦに対する標識されていない他の９個の抗体のうち１つが５０倍モル過剰で存在する状態で、ＨＧＦとともに別々にインキュベートした。このように、９個の別個の試料において、標識抗体２．４．４は、ＨＧＦに対する標識されていない他の９個の抗体のそれぞれと合わせて、ＨＧＦとともに別々に

インキュベートされた。同様に、９個の別個の試料において、標識抗体２．１２．１は、ＨＧＦに対する標識されていない他の９個の抗体のそれぞれと合わせて、ＨＧＦとともに別々にインキュベートされた。完全長ＨＧＦの代わりに、ＨＧＦのｄ５スプライスバリアントを使用して、これらの各組み合わせも繰り返した。

【０３０１】

これらの競合アッセイに対する陽性競合対照では、５０倍モル過剰の標識されていない同一抗体とともに、標識された各抗体をインキュベートした。このように、ＦＩＴＣ標識された抗体２．１２．１は、５０倍モル過剰の非標識抗体２．１２．１の存在下でインキュベートされ、別個に、５０倍モル過剰の非標識抗体２．１２．１の不存在下でインキュベートされた。同様に、ＦＩＴＣ標識された抗体２．４．４は、５０倍モル過剰の非標識抗体２．４．４の存在下及び不存在下でインキュベートされた。予想通り、５０倍モル過剰の非標識抗体の存在下で試料から得られた蛍光シグナルは、非標識抗体が添加されていない試料から得られた蛍光シグナルより著しく低かった。

【０３０２】

結合特性は、図１２に示されている。図１２Ａ及び１２Ｂは、標識抗体２．１２．１を用いた実験を示している。１２Ａ及び１２Ｂの全パネル中の曲線についての記号：Ａ：陰性対照（ＦＩＴＣ標識抗体２．１２．１、ＨＧＦなし）；Ｂ：陽性対照（ＦＩＴＣ標識抗体２．１２．１、ＨＧＦあり）；Ｃ：抗体１．７４．１；Ｄ：抗体１．７５．１；Ｅ：抗体１．２９．１；Ｆ：抗体３．１０．１；Ｇ抗体１．６１．３；Ｈ：抗体１．２４．１；Ｉ：抗体１．６０．１；Ｊ：抗体２．４０．１；Ｋ：抗体２．１２．１；Ｌ：抗体２．４．４。図１２Ａは、ｄ５　ＨＧＦスプライスバリアント標識タンパク質とともに、蛍光抗体２．１２．１を用いる競合結合アッセイから得られた結果を示している。図１２Ｂは、完全長ＨＧＦ標的タンパク質とともに蛍光抗体２．１２．１を用いた競合結合アッセイから得られた結果を示している。図１２Ｃ及び１２Ｄは、標識抗体２．４．４を用いた実験を示している。１２Ｃ及び１２Ｄの全パネル中の曲線についての記号：Ａ：陰性対照（ＦＩＴＣ標識抗体２．４．４、ＨＧＦなし）；Ｂ：陽性対照（ＦＩＴＣ標識抗体２．４．４、ＨＧＦあり）；Ｃ：抗体１．７４．１；Ｄ：抗体１．７５．１；Ｅ：抗体１．２９．１；Ｆ：抗体３．１０．１；Ｇ抗体１．６１．３；Ｈ：抗体１．２４．１；Ｉ抗体１．６０．１；Ｊ：抗体２．４０．１；Ｋ：抗体２．１２．１；Ｌ：抗体２．４．４。図１２Ｃは、ｄ５　ＨＧＦスプライスバリアント標的タンパク質とともに蛍光抗体２．４．４を用いた競合結合アッセイから得られた結果を示している。図１２Ｄは、完全長ＨＧＦ標的タンパク質とともに蛍光抗体２．４．４を用いた競合結合アッセイから得られた結果を示している。

【０３０３】

データは、ＨＧＦに対する１０個の各抗体が、完全長又はｄ５　ＨＧＦへの結合に関して、標識された２つの各抗体と競合することを示している。抗体のうち幾つかは、標識された抗体との完全な競合を示した（例えば、抗体２．１２．１、１．２４．１及び２．４．４は、ＦＩＴＣ標識された抗体２．１２．１と完全に競合する、それぞれ、図１２及び１２Ｂ、ピークＨ、Ｋ及びＬ）。他の抗体は、結合に関して、部分的に競合するにすぎなかった（例えば、抗体２．１２．１、２．４０．１及び１．６１．３は、ＦＩＴＣ標識された抗体２．４．４と部分的に競合する、それぞれ、図１２Ｃ及び１２Ｄ、ピークＫ、Ｊ及びＧ）。

【実施例９】

【０３０４】

中和ＥＬＩＳＡアッセイ

実施例６で論述した抗体がＭｅｔ－ＨＧＦ結合を妨害することができるかどうかを評価するために中和ＥＬＩＳＡアッセイを展開した。１００μＬのＨＧＦを、６．２５μｇ／ｍＬ／ウェルで添加することによって、Ｄｅｌｐｈｉａ　９６ウェルプレート（Ｃａｔ＃：ＡＡＡＮＤ－０００１，　Ｗａｌｌａｃ　Ｉｎｃ．，　Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ，ＭＤ）をＨＧＦでコートした。このプレートを、３７℃で１時間又は４℃で一晩インキュ

ベートした。次いで、０．１％ Ｔｗｅｅｎ ２０を含有するＰＢＳ中の５％ＢＳＡ（Ｃａｔ# ５０－６１－００，ＫＰＬ，Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ，ＭＤ）で、室温で１時間、揺動しながら、プレートのブロッキングを行った。

【０３０５】

検査されているＨＧＦに対する、異なる濃度の抗体とともに、可溶性Ｍｅｔ（２ｎＭ、０．２５６μｇ／ｍＬ）と別々に混合することによって、検査試料を調製した。検査した濃度は、６６７ｎＭ、２２３ｎＭ、７４．１ｎＭ、２４．７ｎＭ、８．２ｎＭ、２．７ｎＭ、０．９１ｎＭ、０．３０ｎＭ、０．１０ｎＭ及び０．０３４ｎＭであった。１００μＬ容量の検査試料を、プレートの各ウェルに添加した。次いで、このプレートを４℃で一晩インキュベートした後、０．１％ Ｔｗｅｅｎ ２０を含有するＰＢＳで４回洗浄した。次に、１００μＬ／ウェルのビオチン化抗ｃＭｅｔＲ抗体（Ｃａｔ#：ＢＡＦ３５８，Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ Ｉｎｃ．，Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ，ＭＮ）を２μｇ／ｍＬで添加した。この抗体は、プレート上のＭｅｔ－ＨＧＦ複合体に結合するが、プレート上のＨＧＦに結合された抗ＨＧＦ抗体には結合しない。次いで、揺動しながら、このプレートを２時間インキュベートし、０．１％ Ｔｗｅｅｎ ２０を含有するＰＢＳで４回洗浄した。Ｅｕ－ストレプトアビジン（アッセイ緩衝液中１：１０００希釈）（Ｃａｔ# １２４４－３６０，Ｗａｌｌａｃ Ｉｎｃ．，Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ，ＭＤ）を添加し、このプレートを室温で１時間揺動した。次いで、０．１％ Ｔｗｅｅｎ ２０を含有するＰＢＳで、このプレートを４回洗浄した。次に、１００μＬの増強緩衝液（Ｗａｌｌａｃ Ｉｎｃ．，Ｃａｔ#：１２４４－１０５，Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ，ＭＤ）を添加した。少なくとも５分後、Ｖｉｃｔｏｒ ２（１４２０ Ｍｕｌｔｉｌａｂｅｌ Ｃｏｕｎｔｅｒ，Ｗａｌｌａｃ Ｉｎｃ．，Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ，ＭＤ）で、ユーロピウム法を用いて、プレートを読み取った。

【０３０６】

ＨＧＦへのＭｅｔ結合の％阻害（すなわち、中和）を計算し、４パラメータ適合式Ｅｘｃｅｌｆｉｔ，Ｖｅｒｓｉｏｎ ２．０．６（Ｍｉｃｒｏｓｏｆｔ Ｉｎｃ，Ｓｅａｔｔｌｅ，ＷＡ）を用いて、IC_{50}値を決定した。実施例６で論述した、ＨＧＦに対する抗体の存在下では、ＨＧＦへのＭｅｔの結合は中和された。２つの実験に対するデータは、図１３に示されている。

【実施例１０】

【０３０７】

細胞中での中和

Ａ．Ｍｅｔリン酸化

ＨＧＦは、ＰＣ－３細胞中でＭｅｔリン酸化を誘導する（ＡＴＣＣ，Ｍａｎａｓｓａｓ，ＶＡ # ＣＲＬ １４３５）。５％ウシ胎児血清（Ｈｙｃｌｏｎｅ，Ｌｏｇａｎ，ＵＴ，Ｃａｔ．＃ＳＨ ３００７０．０３）及び１×ペニシリン、ストレプトマイシン、グルタミン（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ，Ｃａｔ． # １０３７８－０１６）を含有する１００μＬのＲＰＭＩ １６４０中の、1×10^4個のＰＣ－３細胞／ウェル（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ，Ｃａｔ． ＣＡ，Ｃａｔ．# １１８７５－０９３）を添加することによって、９６ウェルのＦａｌｃｏｎ組織培養プレート（ＶＷＲ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ，Ｃａｔ．＃６２７４０－０８１）中でＰＣ－３細胞を増殖させた。３７℃、５％ CO_2下で２４時間増殖させた後、０．１％ ウシ血清アルブミン（Ｓｉｇｍａ，Ｌｏｕｓｉ，ＭＯ，Ｃａｔ．＃Ａ－３１５６）を含有するＤＥＭＥ－低グルコース（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ，Ｃａｔ．＃１１８８５－０８４）で細胞を一回濯ぎ、０．１％ ウシ血清アルブミン（Ｓｉｇｍａ，Ｌｏｕｓｉ，ＭＯ，Ｃａｔ．＃Ａ－３１５６）を含有する１００μＬのＤＭＥＭ低グルコース培地とともに、１８から２０時間インキュベートした。

【０３０８】

実施例６から得られた、ＨＧＦに対する１０個の各抗体の異なる希釈液８つを、２００

ｎｇ／ｍＬのＨＧＦを含有する培地（０．１％ウシ血清アルブミンを添加した、ＤＭＥＭ－低グルコース）中で系列希釈することによって別々に調製した。別個の希釈液中に存在する、ＨＧＦに対する抗体の濃度は、２００ｎＭ、６７ｎＭ、２２ｎＭ、７ｎＭ、２．５ｎＭ、１ｎＭ、０．３　ｎＭ及び０．１　ｎＭの、ＨＧＦに対する抗体であった。これらの抗体／ＨＧＦ希釈液を３７℃で３０分間インキュベートした。

【０３０９】

０．１％ウシ血清アルブミンを含有する、１００μＬのＤＭＥＭ－低グルコースで、ＰＣ－３細胞を一回濯いだ。次いで、個々のＰＣ－３細胞のウェルに、１００μＬの各抗体／ＨＧＦ希釈液を別々に添加した。３７℃、５％ CO_2 下で１０分間インキュベートした後、抗体／ＨＧＦ希釈液をウェルから吸入し、このプレートを１から２分間氷上に置いた。０．３ｍＭ　オルトバナジウム酸ナトリウム（Ｓｉｇｍａ，　Ｌｏｕｉｓ，　ＭＯ，　Ｃａｔ．　＃Ｓ－６５０８）を含有する１００μＬの氷冷ＰＢＳで、細胞を一回注いだ。１％　Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００（Ｐｉｅｒｃｅ，　Ｒｏｃｋｆｏｒｄ，　ＩＬ，　Ｃａｔ．＃　２８３１４）、５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ　ｐＨ８、１００ｍＭ　ＮａＣｌ、０．３ｍＭ　オルトバナジウム酸ナトリウム（Ｓｉｇｍａ，　Ｌｏｕｉｓ，　ＭＯ，　Ｃａｔ．　＃Ｓ－６５０８）及び１×プロテアーゼ阻害剤カクテル（Ｓｉｇｍａ　Ｃａｔ．＃　Ｐ－８３４０）を含有する６０μＬの溶解緩衝液中、氷上で、前記洗浄された細胞を１５から３０分間インキュベートした。

【０３１０】

１％ウシ血清アルブミン（Ｓｉｇｍａ，　Ｓｔ．　Ｌｏｕｉｓ，　ＭＯ，　Ｃａｔ．．　＃　Ａ－７８８８）、０．１％　Ｔｗｅｅｎ　２０（Ｂｉｏｒａｄ，　Ｈｅｒｃｕｌｅｓ，　ＣＡ，　Ｃａｔ．．　＃　１７０－６５３１）を含有するＰＢＳ中、４μｇ／ｍＬのヤギ抗Ｍｅｔ－ビオチン（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ　Ｉｎｃ．，　Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ，　ＭＮ，　Ｃａｔ．．　＃　ＢＡＦ　３５８）とともに、室温で３０分間、Ｄｙｎａｂｅａｄｓ　Ｍ－２８０　Ｓｔｒｅｐｔａｖｉｄｉｎ（ＩＧＥＮ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ，　Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇｈ，　ＭＤ，　Ｃａｔ．＃１１００２９）をインキュベートすることによって、抗Ｍｅｔ抗体でコートされたビーズを調製した。９６ウェルのＣｏｓｔａｒアッセイプレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ，　ＮＹ，　Ｃａｔ．．　＃３３６５）中に、ウェル当り２５μＬ容量の抗Ｍｅｔ抗体コートされたビーズを置いた。

【０３１１】

２５μＬ容量の異なる各ＰＣ－３細胞溶解液を、抗Ｍｅｔ抗体コートされたビーズを含有する各ウェルに、別々に添加した。このプレートを、揺動しながら、室温で１時間インキュベートした。１％のウシ血清アルブミン（Ｓｉｇｍａ，　Ｌｏｕｉｓ，　ＭＯ，　Ｃａｔ．＃　Ａ－７８８８）、０．１％　Ｔｗｅｅｎ　２０（Ｂｉｏｒａｄ，　Ｈｅｒｃｕｌｅｓ，　ＣＡ，　Ｃａｔ．＃　１７０－６５３１）及び０．０４μｇの抗ホスホチロシン抗体４Ｇ１０（Ｕｐｓｔａｔｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，　Ｌａｋｅ　Ｐｌａｃｉｄ，　ＮＹ，　Ｃａｔ．＃　０５－３２１）を含有する、ウェル当り１２．５μＬ容量のＰＢＳを添加し、揺動しながら、室温で１時間インキュベートした。１％ウシ血清アルブミン、０．１％　Ｔｗｅｅｎ２０及び８μｇ／ｍＬの抗マウスＯＲＩ－ＴＡＧ－標識（ＩＧＥＮ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ，　Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇｈ，　ＭＤ，　Ｃａｔ．＃；１１００８７）を含有する１２．５μＬ容量のＰＢＳを添加し、揺動しながら、室温で３０分間プレートをインキュベートした。（ＩＧＥＮカウントで表された）シグナルを、ＩＧＥＮ　Ｍ８リーダー（ＩＧＥＮ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ，　Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇｈ，　ＭＤ）で測定した。IC_{50} は、４パラメータの適合式とＥｘｃｅｌｆｉｔソフトウェアパッケージ、バージョン２．０．６（Ｍｉｃｒｏｓｏｆｔ　Ｉｎｃ．，　Ｓｅａｔｔｌｅ　ＷＡ）を用いて算出した。ＩＧＥＮフォーマットを用いた２つの実験のデータが図１４に示されている。ＨＧＦに対する１０個の抗体のそれぞれについて、IC_{50} 値は、低ナノモル濃度からサブナノモル濃度であった。

【０３１２】

Ｂ．Ｕ－８７ＭＧ　増殖／生存の中和

Ｕ－８７　ＭＧ細胞（ＡＴＣＣ＃ＨＴＢ－１４）は、Ｍｅｔ及びＨＧＦの両方を発現するヒト膠芽細胞腫株である。培養物中の細胞の増殖／生存は、外在性ＨＧＦによって増強されない。しかしながら、内在性Ｍｅｔは、増殖条件下において、内在性ＨＧＦによって活性化されるようである。内在性ＨＧＦの内在性Ｍｅｔへの結合の妨害は、増殖及び／又は生存の減少をもたらし得る。

【０３１３】

Ｕ－８７　ＭＧ細胞は、５％ＦＢＳを含有するＩＭＥＭ培地（Ｇｉｂｃｏ　ＢＲＬ，Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ，　ＭＤ，　ｃａｔａｌｏｇ　＃　１１１２５－０２８）中、８００細胞／ウェルを添加することによって、９６ウェルＣｏｓｔａｒアッセイプレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ，　ＮＹ，　Ｃａｔ．＃３３６５）中でＵ－８７ＭＧ細胞を増殖させた。約２４時間後に、実施例６から得られた、ＨＧＦに対する１０個の各抗体の異なる１１濃度のそれぞれを、Ｕ－８７　ＭＧ細胞の各別のウェルに添加した。別個の希釈液中に存在する、ＨＧＦに対する抗体の濃度は、１００μｇ／ｍＬ、３３．３μｇ／ｍＬ、１１．１μｇ／ｍＬ、３．７μｇ／ｍＬ、１．２μｇ／ｍＬ、０．４μｇ／ｍＬ、０．１４μｇ／ｍＬ、０．０５μｇ／ｍＬ、０．０１５μｇ／ｍＬ、５．１ｎｇ／ｍＬ及び１．７ｎｇ／ｍＬの、ＨＧＦに対する抗体であった。

【０３１４】

ＨＧＦに対する抗体を添加してから７日後に、プレートから培地を除去し、ウェル当り１００μＬの１０％　トリクロロ酢酸（Ｓｉｇｍａ　Ｉｎｃ．，　Ｓｔ　Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ　Ｃａｔ＃：Ｔ－９１５９）で細胞を固定し、４℃で１から２時間インキュベートした。ウェルを水道水で５回濯いだ。室温での１０分のインキュベーションにより、１％酢酸（Ｆｉｓｈｅｒ，　Ｐｉｔｔｓｂｕｒｇｈ，　ＰＡ　Ｃａｔ＃：ＵＮ２７８９）中の１００μＬの０．４％スルホローダミンＢ（Ｓｉｇｍａ，　Ｓｔ　Ｌｏｕｉｓ，　ＭＯ　Ｃａｔ＃：Ｓ－９０１２）で、固定された細胞を染色した。染色後、１％酢酸で細胞を５回洗浄し、風乾した。５４０ｎｍでのプレートの光学密度を、マイクロタイタープレートリーダー（ＳｐｅｃｔｒａＭａｘ　ＰＬＵＳ，　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ，Ｓｕｎｎｙｖａｌｅ，　ＣＡ）上で読み取った。光学密度は、細胞単層中に存在するタンパク質の総量に比例するので、７日のアッセイ期間中の細胞生存／増殖の指標である。IC_{50}値を計算するために、アイソタイプ対照抗体とともに、又は抗体を加えずにインキュベートした細胞と比較し、パーセント阻害を計算した。IC_{50}値は、４つの４パラメータフィッティング式とＥｘｃｅｌｆｉｔソフトウェアパッケージ、バージョン２．０．６（Ｍｉｃｒｏｓｏｆｔ　Ｉｎｃ．，　Ｓｅａｔｔｌｅ　ＷＡ）を用いて算出した。

【０３１５】

２つの実験に対するデータが図１５に示されている。実施例６に記載されている、ＨＧＦに対する１０個の抗体全てが、Ｕ－８７　ＭＧ細胞の増殖／生存を阻害した。各抗体のIC_{50}値は、典型的には、１００ｎＭ未満であった。

【実施例１１】

【０３１６】

異種移植腫瘍における中和

Ａ．Ｕ－８７ＭＧ異種移植微小残存病変モデル

Ｕ－８７　ＭＧ細胞を集密状態に近くなるまで増殖させ、次いで、25×10^{6}個の細胞／ｍＬの濃度で無血清培地中に懸濁した。トリパンブルー排除によって測定した場合、細胞は視覚的に＞９８．５％生存することが評価された。ＨＧＦに対する単一抗体を検査するために、無血清培地中の5×10^{6}個のＵ－８７　ＭＧ細胞は、５０匹の雌ヌードマウス（ＣＤ１　Ｎｕ／Ｎｕ，　Ｃｈａｒｌｅｓ　Ｒｉｖｅｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，　Ｗｉｌｍｉｎｇｔｏｎ，　Ｍａｓｓ．）の右脇腹に皮下注射した。５０匹のマウスを、各１０匹のマウスからなる５つのグループに配置した。

【０３１７】

実施例７に論述されている、ＨＧＦに対する同一抗体又はＩｇＧ１定常領域（アイソタイプ対照）の同一用量を腹腔内注射することによって、１０匹のマウスのグループ内の各

マウスを処置した。検査した抗体用量は、１μｇ、３μｇ、１０μｇおよび３０μｇ／注射であった。抗体注射は、Ｕ－８７　ＭＧ細胞の注射から２日後に始まり、週２回、４週間行った。週２回、３０日間、腫瘍測定及び体重を記録し、式：長さ×幅×高さを用いて、腫瘍の容積を計算した。反復測定ＡＮＯＶＡの後、Ｓｃｈｅｆｆｅの事後検定を使用して、ＳｔａｔＶｉｅｗ（Ｒ）　ｓｔａｔｉｓｔｉｃａｌ　ｐｒｏｇｒａｍ（ＳＡＳ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ，　Ｉｎｃ．，　Ｃａｒｙ，　Ｎ．　Ｃ．　）によって、結果を解析した。

【０３１８】

別々の実験で、実施例６に論述されている、ＨＧＦに対する各１０個の抗体をこのモデルで検査した。抗体２．４．４に対する用量－応答実験は、図１６Ａに示されている。矢印は投薬の時点を示しており、用量は図面の凡例に示されている。測定可能な腫瘍がない、各用量の動物の数（１０匹のうち）が括弧に示されている。検査した２つの最高用量について（１０μｇを週２回投与と、３０μｇを週２回投与）、腫瘍増殖の阻害は、３０μｇのアイソタイプ対照（ｈｕｍａｎ　ＩｇＧ２　＃ＰＫ１６．３．１，　Ａｂｇｅｎｉｘ　Ｉｎｃ．　Ｆｒｅｍｏｎｔ，　ＣＡ）を週２回与えた対照動物に比べて、統計的に有意であった。これより少ない２つの２．４．４の用量（１及び３μｇ、週２回）では、統計的に有意ではないが、若干の増殖阻害が見られた。データは、平均±標準誤差として表されている；ｎ＝１０動物／グループ、ｐ＜０．０５を統計的に有意と考えた。実施例６で得られた、ＨＧＦに対する残り９個の抗体を検査する実験は、これより高い用量において、同様に腫瘍増殖を完全に阻害することを示した。

【０３１９】

Ｂ．　Ｕ－８７　ＭＧ　異種移植確立病変モデル

実施例１１Ａに上記されている手順に従って、無血清培地中のＵ－８７　ＭＧ細胞をヌードマウス中に注入した。ＨＧＦに対する抗体の腹腔内投薬が開始する前に、約２００ｍｍ^{3}の容量に達するまで、約２週間、腫瘍を増殖させた。図１６Ｂで矢印によって示されているように、１６日目から開始して、週２回、２００μｇ、１００μｇ又は３０μｇの抗体２．４．４で、マウスを週２回処置した。上述のように、腫瘍容量を測定し、評価した。３０日目に測定可能な腫瘍がない動物の数（１０匹のうち）が括弧に示されている。Ｕ－８７　ＭＧ腫瘍増殖の完全な阻害が、全ての用量で観察された。確立された腫瘍の統計的に有意な退化が、２９日までに達成された。別々の実験において、実施例６で論述した、ＨＧＦに対する各１０個の抗体をこのモデルで検査し、より高用量の抗体で、完全な阻害が観察された。

【０３２０】

Ｃ．Ｕ－８７　ＭＧ最小残存病変モデルでの抗体のランク付け

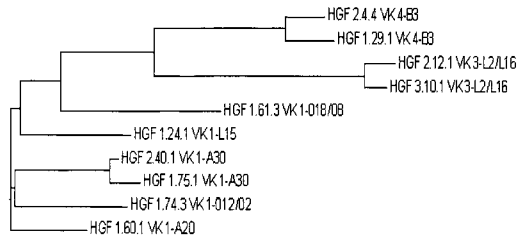
実施例１１Ａで論述されたＵ－８７　ＭＧ腫瘍モデルにおいて、実施例６で記載した、ＨＧＦに対する１０個の抗体の相対効力を決定するために、最小残存病変モデルにおいて部分的に腫瘍増殖を阻害するに留まった低用量を選択した。予備的な用量－応答研究（図１６Ａ）は、週２回、５μｇが、ＨＧＦに対する抗体によって部分的阻害を与え得ることを示唆した。ＨＧＦに対する最大５つの異なる抗体を比較する一連の一対一実験を行った。これら実験の２つから得られた結果は、図１６Ｃ及び１６Ｄに示されている。＊＊は、ＰＢＳ及びアイソタイプ対照ＩｇＧ抗体と比べて腫瘍増殖を有意に阻害した、ＨＧＦに対する抗体を表す（ｐ＜０．０００１）。

【０３２１】

実施例１１Ｂに論述された、確立Ｕ－８７病変モデルを用いて、類似のランク付け実験を行った。これらの実験では、１０μｇの用量、週２回を使用した。これら実験の２つから得られた結果は、図１６Ｅ及び１６Ｆに示されている。

【図１Ａ】

Figure 1A



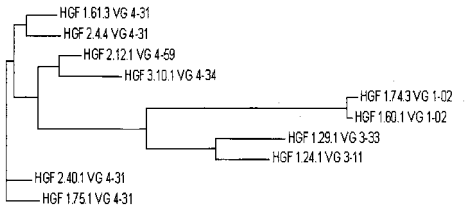
【図１Ｂ】

Figure 1B



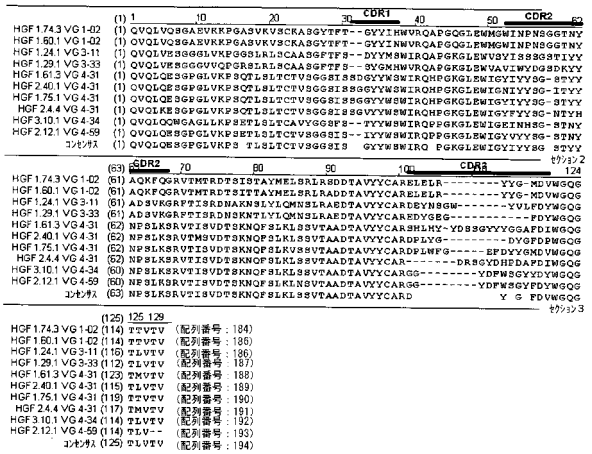
【図２Ａ】

Figure 2A



【図２Ｂ】

Figure 2B



【図３－１】

Figure 3

HGF 1.24.1 軽鎖 V 領域 (Vk, 1-L15)

ATGGACATGAGGGTGCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGGTTCCCAGGTTCCAGATGC
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACT
TGTCGGGCGAGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCT
AACCTCCTGATCTATGAAGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCGGCGGCAGTGGA
TCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTACTATTGT
CAACAGGCTAACGGTTTCCCGTGGACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA
（配列番号：０１）

HGF 1.24.1 重鎖 V 領域 (Vh, H3-11)-huIgG2 C 領域)

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCCTTGTTGCTATTATAAAAGGTGTCCAGTGTCAGGTGCAG
CTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCT
GGATTCACCTTCAGTGACTACTACATGAGCTGGATCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGG
GTTTCATACATTAGTAGTAGTGGTAGTACCATATACTACGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACC
ATCTCCAGGGACAACGCCAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACG
GCCGTGTATTACTGTGCGAGAGATGAGTATAACAGTGGCTGGTACGTCCTCTTTGACTACTGGGGC
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCTAGT （配列番号：０２）

HGF 1.29.1 軽鎖 V 領域 (Vk, 4-B3)

ATGGTGTTGCAGACCCAGGTCTTCATTTCTCTGTTGCTCTGGATCTCTGATGCCTACGGAGACATC
GTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGGGCCACCATCAACTGCAAG
TCCAGCCAGAGTATTTTTTACAGCTCCACCAATAAGAACTACTTAGCTTGGTATCAGAAGAAACCG
GGACAGCCTCCTAAGCTGCTCATTTACTGGGCATCTACCCGGGAATCCGGGGTCCCTGACCGGTTC
AGTGGCAGCGGGTCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCA
GTTTATTACTGTCAGCAATATTATAGTACTCCGTGGACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATC
AAA （配列番号：０３）

HGF 1.29.1 重鎖 V 領域 (Vh, 3-33)- huIgG2 C 領域

ATGGAGTTTGGGCTGAACTGGGTTTTCCTCGTTGCTCTTTTAAGAGGTGTCCAGTGTCAGGTGCAG
CTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCT
GGATTCACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCGGGCAAGGGACTGGAGTGG
GTGGCAGTTATATGGTATGATGGAAGTGATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACC
ATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACG
GCTGTGTATTACTGTGCGAGAGAGGACTACGGCGAGGGTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTG
GTCACCGTCTCTAGT （配列番号：０４）

HGF 1.60.1 軽鎖 V 領域 (Vk, 1-A20)

ATGGACATGAGGGTGCCCGCTCAGCTCCTGGGACTCCTGCTGCTCTGGCTCCCAGATACCAGATGT
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGTATCTGTCGGAGACAGAGTCACCATCACT
TGCCGGGCGAGTCAGGGCATTAGCAGTTATTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGTTCCT
AAGCTCCTGATCTATGTTGCATCCACTTTGCAATCAGGGGTCCCGTCTCGGTTCAGTGGCAGTGGA
TCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGTTGCAACTTATTACTGT
CAAAACTATAACAGTGACCCGCTCACTTTCGGCGGCGGGACCAAGGTGGAGATCAAA
（配列番号：０５）

HGF 1.60.1 重鎖 V 領域 (Vh, H1-02)- huIgG2 C 領域

ATGGACTGGACCTGGAGGATCCTCTTCTTGGTGGCAGCAGCCACAGGAGCCCACTCCCAGGTGCAG
CTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCT
GGATACACCTTCACCGGCTACTATATAAACTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGG
ATGGGATGGATCAACCCTAACAGTGGTGGCACAAACTATGCACAGAAGTTTCAGGGCAGGGTCACC
ATGACCAGGGACACGTCCATCACCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGGCTGAGAGCTGACGACACG
GCCGTGTACTACTGTGCGAGAGAACTGGAACTACGCTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGG
ACCACGGTCACCGTCTCTAGT （配列番号：０６）

HGF 1.61.3 軽鎖 V 領域 (Vk, 1-018/08)

ATGGACATGAGGGTGCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGGCTCTCAGGTGCCAGATGT
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACT
TGCCAGGCGAGTCAGGACATTAGCAACTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGACAGCCCCT
AAACTCCTGATCTACGGTGCATCCGATTTGGAAACGGGGGTCCCATCAAGGTTCAGTGGAAGTGGA
TCTGGGACAGATTTTACTTTCGCCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATATTGCAACATATTACTGT
CAACAGTATGATAATCTCCCGTACAATTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA
（配列番号：０７）

HGF 1.61.3 重鎖 V 領域 (Vh, 4-31)- huIgG2 C 領域

ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTCCTGTCCCAGGTGCAG
CTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCT
GGTGGCTCCATCAGCAGTGATGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCACCCAGGGAAGGGCCTG
GAGTGGATTGGGTACATCTATTACAGTGGGAGCACCTACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTC
ACCATATCAGTAGACACGTCTAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACTGCCGCGGAC
ACGGCCGTCTATTACTGTGCGAGATCCCACCTTCATTACTATGATAGTAGTGGTTATTACTACGGC
GGTGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTAGT （配列番号：０８）

HGF 1.74.3 軽鎖 V 領域 (Vk, 1-012/02)

ATGGACATGAGGGTGCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTACTCTGGCTCCGAGGTGCCAGATGT
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACT
TGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAACAGCGATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGTCCCT
AAGCTCCTGATCTATGTTGCATCCAGTTTGCAAAATGGGGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGA
TCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGT
CAACGGAGTTACAGTACCCCTCCCACTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAA
（配列番号：０９）

HGF 1.74.3 重鎖 V 領域 (Vh, VG1-02)- huIgG2 C 領域

ATGGACTGGACCTGGAGGATCCTCTTCTTGGTGGCAGCAGCCACAGGAGCCCACTCCCAGGTGCAG
CTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCT
GGATACACCTTCACCGGCTACTATATACACTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGG
ATGGGATGGATCAACCCTAACAGTGGTGGCACAAACTATGCACAGAAGTTTCAGGGCAGGGTCACC
ATGACCAGGGACACGTCCATCAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGACACG
GCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAACTGGAACTACGCTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGG
ACCACGGTCACCGTCTCTAGT （配列番号：１０）

【図３－３】

Figure 3（続き）

HGF 1.75.1 軽鎖 V 領域 **(Vk, 1-A30)**

ATGGACATGAGGGTGCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGGTTCCCAGGTGCCAGGTGT
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACT
TGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGAAATGATTTAGGCTGGTTTCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCT
AAGCGCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGA
TCTGGGACAGAATTCACTCTCACAATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGT
CTACAGCATGATAGTTACCCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA
（配列番号：１１）

HGF 1.75.1 重鎖 V 領域 **(Vh, VG4-31)- huIgG2 C** 領域

ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTCCTGTCCCAGGTGCAG
CTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCT
GGTGGCTCCATCAGCAGTGGTGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCACCCAGGGAAGGGCCTG
GAGTGGATTGGGTACATCTATTACAGTGGGAGCACCTACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTT
ACCATATCAGTAGACACGTCTAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGGTGAGCTCTGTGACTGCCGCGGAC
ACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGACCCACTATGGTTCGGGGAGTTCGACTACTACGGTATGGAC
GTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCTAGT （配列番号：１２）

HGF 2.4.4 軽鎖 V 領域 **(Vk, 4-B3)**

ATGGTGTTGCAGACCCAGGTCTTCATTTCTCTGTTGCTCTGGATCTCTGGTGCCTACGGGGACATC
GTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGGGCCACCATCAACTGCAAG
TCCAGCCAGAGTGTTTTATTCAGCTCCAACAATAAGAATTACTTAGCTTGGTATCAGCAGAAACCA
GGACAGCCTCCTAAGTTGCTCATTTACTGGGCATCTACCCGGGAATCCGGGGTCCCTGACCGATTC
AGTGGCAGCGGGTCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCA
GTTTATTACTGTCAGCAATATTTTAGTCCTCCGTGGACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATC
AAA （配列番号：１３）

HGF 2.4.4 重鎖 V 領域 **(Vh, VG 4-31)- huIgG2 C** 領域

ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGATCCTGTCCCAGGTGCAG
CTGAAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCT
GGTGGCTCCATCAGCAGTGGTGTTTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCACCCAGGGAAGGGCCTG
GAGTGGATTGGGTACTTCTATTATAGTGGGAACACCTACCACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTG
ACCATATCAGTAGACACGTCTAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACTGCCGCGGAC
ACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGATCGTAGTGGCTACGATCACCCTGATGCTTTTGATATCTGG
GGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTAGT （配列番号：１４）

HGF 2.12.1 軽鎖 V 領域 **(Vk, 3-L2/L16)**

ATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATACCACTGGAGAAATA
GTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGG
GCCAGTCAGAGTGTTGACAGCAACTTAGCCTGGTACCGGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTC
CTCATCTATGGTGCATCCACCAGGGCCACTGGTATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGG
ACTGAGTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAG
TATATTAACTGGCCTCCGATCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAA （配列番号：１５）

【図３－４】

Figure 3（続き）

HGF 2.12.1 重鎖 V 領域 **(Vh4-59)- huIgG2 C** 領域

ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTTCTCCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTCCTGTCCCAGGTGCAG
CTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCT
GGTGGCTCCATCAGTATTTACTACTGGAGCTGGATCCGGCAGCCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGG
ATTGGGTATGTCTATTACAGTGGGAGCACCAATTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATA
TCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAACTCTGTGACCGCTGCGGACACGGCC
GTGTATTACTGTGCGAGAGGGGGATACGATTTTTGGAGTGGTTATTTTGACTACTGGGGCCAGGGA
ACCCTGGTCACCGTCTCTAGT （配列番号：１６）

HGF 2.40.1 軽鎖 V 領域 **(Vk, 1A20)**

ATGGACATGAGGGTGCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGGTTCCCAGGTGCCAGGTGT
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACT
TGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGAAATGATTTAGGCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCT
AAGCGCCTGATCTATGTTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGA
TCTGGGACAGAATTCACTCTCACAATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGT
CTACAACATAATAGTTACCCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA
（配列番号：１７）

HGF 2.40.1 重鎖 V 領域 **(Vh, VG 4-31)- huIgG2 C** 領域

ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTCCTGTCCCAGGTGCAG
CTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCT
GGTGGCTCCATCAGCAGTGGTGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGTCAGCACCCAGGGAAGGGCCTG
GAGTGGATTGGGAACATCTATTACAGTGGGATCACCTACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTT
ACCATGTCAGTAGACACGTCTAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACTGCCGCGGAC
ACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGATCCCCTCTACGGTGACTACGGGTTCGACCCCTGGGGCCAG
GGAACCCTGGTCACCGTCTCTAGT （配列番号：１８）

HGF 3.10.1 軽鎖 V 領域 **(Vk, 3-L2/L16)**

ATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATACCACTGGAGAAATA
GTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCTGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGG
GCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTC
CTCATGTATGGTGCATCCACCAGGGCCACTGGTATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGG
ACAGAGTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAG
TATAATAACTGGCCTCCGATCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAA （配列番号：１９）

HGF 3.10.1 重鎖 V 領域 **(Vh, VG 4-34)- huIgG1 C** 領域

ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTCCTGTCCCAGGTGCAG
CTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCGCTGTCTAT
GGTGGGTCCTTCAGTACTTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGG
ATTGGGGAAATCAATCATAGTGGAAGCACCAACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATA
TCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCT
GTGTATTACTGTGCGAGAGGGGGGTACGATTTTTGGAGTGGTTATTATGACTACTGGGGCCAGGGA
ACCCTGGTCACCGTCTCTAGT （配列番号：２０）

【図３－５】

Figure 3（続き）

ヒトκ定常領域

CGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACT
GCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGAT
AACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTAC
AGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAA
GTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTGA
（配列番号：２１）

ヒトＩｇＧ１定常領域

GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACA
GCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGC
GCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGC
AGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAG
CCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCA
CCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGAC
ACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCT
GAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAG
GAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAAT
GGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCC
AAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACC
AAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG
GAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCC
TTCTTCCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGC
TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
TGA （配列番号：２２）

ヒトＩｇＧ２定常領域

GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACA
GCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGC
GCTCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCAGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGC
AGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAG
CCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGTGTCGAGTGCCCACCGTGCCCA
GCACCACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATC
TCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTC
AACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAAC
AGCACGTTCCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTAC
AAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGG
CAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTC
AGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGG
CAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTAC
AGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCAT
GAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA
（配列番号：２３）

【図４－１】

Figure 4

HGF 1.24.1 軽鎖 V 領域 **(Vk, 1-L15)**

MDMRVPAQLLGLLLLWFPGSRCDIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAP
NLLIYEASSLQSGVPSRFGGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANGFPWTFGQGTKVEIK
（配列番号：２４）

HGF 1.24.1 重鎖 V 領域 **(Vh, H3-11)-huIgG2 C** 領域

MEFGLSWVFLVAIIKGVQCQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGKGLEW
VSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDEYNSGWYVLFDYWG
QGTLVTVSS （配列番号：２５）

HGF 1.29.1 軽鎖 V 領域 **(Vk, 4-B3)** 領域

MVLQTQVFISLLLWISDAYGDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSIFYSSTNKNYLAWYQKKP
GQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPWTFGQGTKVEI
K （配列番号：２６）

HGF 1.29.1 重鎖 V 領域 **(Vh, 3-33)- huIgG2 C** 領域

MEFGLNWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEW
VAVIWYDGSDKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREDYGEGFDYWGQGTL
VTVSS （配列番号：２７）

HGF 1.60.1 軽鎖 V 領域 **(Vk, 1-A20)** 領域

MDMRVPAQLLGLLLLWLPDTRCDIQMTQSPSSLSVSVGDRVTITCRASQGISSYLAWYQQKPGKVP
KLLIYVASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQNYNSDPLTFGGGTKVEIK
（配列番号：２８）

HGF 1.60.1 重鎖 V 領域 **(Vh, H1-02)- huIgG2 C** 領域

MDWTWRILFLVAAATGAHSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYINWVRQAPGQGLEW
MGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSITTAYMELSRLRADDTAVYYCARELELRYYGMDVWGQG
TTVTVSS （配列番号：２９）

HGF 1.61.3 軽鎖 V 領域 **(Vk, 1-018/08)**

MDMRVPAQLLGLLLLWLSGARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGTAP
KLLIYGASDLETGVPSRFSGSGSGTDFTFAISSLQPEDIATYYCQQYDNLPYNFGQGTKLEIK
（配列番号：３０）

HGF 1.61.3 重鎖 V 領域 **(Vg, 4-31)- huIgG2 C** 領域

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSDGYYWSWIRQHPGKGL
EWIGYIYYSGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARSHLHYYDSSGYYYG
GAFDIWGQGTMVTVSS （配列番号：３１）

HGF 1.74.3 軽鎖 V 領域 **(Vk, 1-012/02)**

MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSINSDLNWYQQKPGKVP
KLLIYVASSLQNGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQRSYSTPPTFGPGTKVDIK
（配列番号：３２）

HGF 1.74.3 重鎖 V 領域 **(Vh, VG1-02)-huIgG2 C** 領域

MDWTWRILFLVAAATGAHSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYIHWVRQAPGQGLEW
MGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARELELRYYGMDVWGQG
TTVTVSS （配列番号：３３）

【図４－２】

Figure 4（続き）

HGF 1.75.1 軽鎖 V 領域 (Vk, 1-A30)
MDMRVPAQLLGLLLLWFPGARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWFQQKPGKAP
KRLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHDSYPLTFGGGTKVEIK
（配列番号：３４）

HGF 1.75.1 重鎖 V 領域 (Vh, VG4-31)-huIgG2 C 領域
MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGGYYWSWIRQHPGKGL
EWIGYIYYSGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKVSSVTAADTAVYYCARDPLWFGEFDYYGMD
VWGQGTTVTVSS （配列番号：３５）

HGF 2.4.4 軽鎖 V 領域 (Vk, 4-B3)
MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLFSSNNKNYLAWYQQKP
GQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYFSPPWTFGQGTKVEI
K （配列番号：３６）

HGF 2.4.4 重鎖 V 領域 (Vh, VG 4-31)-huIgG2 C 領域
MKHLWFFLLLVAAPRWILSQVQLKESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGVYYWSWIRQHPGKGL
EWIGYFYYSGNTYHNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDRSGYDHPDAFDIW
GQGTMVTVSS （配列番号：３７）

HGF 2.12.1 軽鎖 V 領域 (Vk, 3-L2/L16)
MEAPAQLLFLLLLWLPDTTGEIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVDSNLAWYRQKPGQAPRL
LIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYINWPPITFGQGTRLEIK
（配列番号：３８）

HGF 2.12.1 重鎖 V 領域 (Vg, 4-59)- huIgG2 C 領域
MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISIYYWSWIRQPPGKGLEW
IGYVYYSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLNSVTAADTAVYYCARGGYDFWSGYFDYWGQG
TLVTVSS （配列番号：３９）

HGF 2.40.1 軽鎖 V 領域 (Vk, 1A20)
MDMRVPAQLLGLLLLWFPGARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAP
KRLIYVASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNSYPLTFGGGTKVEIK
（配列番号：４０）

HGF 2.40.1 重鎖 V 領域 (Vh, VG 4-31)-huIgG2 C 領域
MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGGYYWSWIRQHPGKGL
EWIGNIYYSGITYYNPSLKSRVTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDPLYGDYGFDPWGQ
GTLVTVSS （配列番号：４１）

HGF 3.10.1 軽鎖 V 領域 (Vk, 3-L2/L16)
MEAPAQLLFLLLLWLPDTTGEIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRL
LMYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNNWPPITFGQGTRLEIK
（配列番号：４２）

HGF 3.10.1 重鎖 V 領域 (Vh, VG 4-34)-huIgG1 C 領域
MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSTYYWSWIRQPPGKGLEW
IGEINHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGGYDFWSGYYDYWGQG
TLVTVSS （配列番号：４３）

【図４－３】

Figure 4（続き）

ヒトκ定常領域
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY
SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC （配列番号：４４）

ヒトＩｇＧ１定常領域
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS
SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
（配列番号：４５）

ヒトＩｇＧ２定常領域
ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS
SVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEY
KCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
（配列番号：４６）

【図５Ａ】

Figure 5A

ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３の軽鎖可変領域アミノ酸配列

抗体	CDR1	CDR2	CDR3
1.24.1	RASQGISSWLA（配列番号：６０）	EASSLQS（配列番号：７０）	QQANGFPWT（配列番号：８０）
1.29.1	KSSQSIFYSSTNKNYLA（配列番号：６１）	WASTRES（配列番号：７１）	QQYYSTPWT（配列番号：８１）
1.60.1	RASQGISSYLA（配列番号：６２）	VASTLQS（配列番号：７２）	QNYNSDPLT（配列番号：８２）
1.61.3	QASQDISNYLN（配列番号：６３）	GASDLET（配列番号：７３）	QQYDNLPYN（配列番号：８３）
1.74.3	RASQSINSDLN（配列番号：６４）	VASSLQN（配列番号：７４）	QRSYSTPPT（配列番号：８４）
1.75.1	RASQGIRNDLG（配列番号：６５）	AASSLQS（配列番号：７５）	LQHDSYPLT（配列番号：８５）
2.4.4	KSSQSVLFSSNNKNYLA（配列番号：６６）	WASTRES（配列番号：７６）	QQYFSPPWT（配列番号：８６）
2.12.1	RASQSVDSNLA（配列番号：６７）	GASTRAT（配列番号：７７）	QQYINWPPIT（配列番号：８７）
2.40.1	RASQGIRNDLG（配列番号：６８）	VASSLQS（配列番号：７８）	LQHNSYPLT（配列番号：８８）
3.10.1	RASQSVSSNLA（配列番号：６９）	GASTRAT（配列番号：７９）	QQYNNWPPIT（配列番号：８９）

軽鎖ＣＤＲ１コンセンサス配列（ＣＤＲ１ａ）（配列番号１６６）：ａ　ｂ　ｃ　ｄ　ｅ　ｆ　ｇ　ｈ　ｉ　ｊ　ｋ　ｌ　ｍ　ｎ　ｏ　ｐ　ｑ、アミノ酸ａは、リジン、アルギニン又はグルタミンから選択され；アミノ酸ｂは、セリン又はアラニンから選択され；アミノ酸ｃは、セリンであり；アミノ酸ｄは、グルタミンであり；アミノ酸ｅは、セリン、グリシン又はアスパラギン酸から選択され；アミノ酸ｆは、バリン若しくはイソロイシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｇは、ロイシン若しくはフェニルアラニンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｈは、フェニルアラニン若しくはチロシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｉは、セリンであり、又は存在せず；アミノ酸ｊは、セリンであり、又は存在せず；アミノ酸ｋは、アスパラギン、スレオニンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｌは、アスパラギン、イソロイシン又はバリンから選択され；アミノ酸ｍは、リジン、アルギニン、アスパラギン又はアスパラギン酸から選択され；アミノ酸ｎは、アスパラギン又はセリンから選択され；アミノ酸ｏは、チロシン、アスパラギン酸、トリプトファン又はアスパラギンから選択され；アミノ酸ｐは、ロイシンであり；及びアミノ酸ｑは、アラニン、グリシン又はアスパラギンから選択される

軽鎖ＣＤＲ２コンセンサス配列（ＣＤＲ２ａ）（配列番号１６７）：ｒ　ｓ　ｔ　ｕ　ｖ　ｗ　ｘ、アミノ酸ｒは、トリプトファン、アラニン、バリン、グルタミン酸又はグリシンから選択され；アミノ酸ｓは、アラニンであり、アミノ酸ｔは、セリンであり、アミノ酸ｕは、スレオニン、セリン又はアスパラギン酸から選択され；アミノ酸ｖは、アルギニン又はロイシンから選択され；アミノ酸ｗは、グルタミン酸、グルタミン又はアラニンから選択され；及びアミノ酸ｘは、セリン、アスパラギン又はスレオニンから選択される

軽鎖ＣＤＲ３コンセンサス配列（ＣＤＲ３ａ）（配列番号１６８）：ｙ　ｚ　ａ’　ｂ’　ｃ’　ｄ’　ｅ’　ｆ’　ｇ’　ｈ’、アミノ酸ｙは、グルタミン又はロイシンから選択され；アミノ酸ｚは、グルタミン、アスパラギン又はアルギニンから選択され；アミノ酸ａ’は、チロシン、ヒスチジン、アラニン又はセリンから選択され；アミノ酸ｂ’は、フェニルアラニン、チロシン、アスパラギン酸、アスパラギン又はイソロイシンから選択され；アミノ酸ｃ’は、セリン、グリシン又はアスパラギンから選択され；アミノ酸ｄ’は、プロリン、チロシン、スレオニン、フェニルアラニン、アスパラギン酸、ロイシン又はトリプトファンから選択され；アミノ酸ｅ’は、プロリンであり；アミノ酸ｆ’は、プロリンであり、又は存在せず；アミノ酸ｇ’は、トリプトファン、ロイシン、プロリン、チロシン又はイソロイシンであり；及びアミノ酸ｈ’は、スレオニン又はアスパラギンである

【図５Ｂ】

Figure 5B

ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３の重鎖可変領域アミノ酸配列

抗体	CDR1	CDR2	CDR3
1.24.1	DYYMS（配列番号：９０）	YISSSGSTIYYADSVKG（配列番号：１００）	DEYNSGWYVLFDY（配列番号：１１０）
1.29.1	SYGMH（配列番号：９１）	VIWYDGSDKYYADSVKG（配列番号：１０１）	EDYGEGFDY（配列番号：１１１）
1.60.1	GYYIN（配列番号：９２）	WINPNSGGTNYAQKFQG（配列番号：１０２）	ELELRYYGMDV（配列番号：１１２）
1.61.3	SDGYYWS（配列番号：９３）	YIYYSGSTYYNPSLKS（配列番号：１０３）	SHLHYYDSSGYYYGGAFDI（配列番号：１１３）
1.74.3	GYYIH（配列番号：９４）	WINPNSGGTNYAQKFQG（配列番号：１０４）	ELELRYYGMDV（配列番号：１１４）
1.75.1	SGGYYWS（配列番号：９５）	YIYYSGSTYYNPSLKS（配列番号：１０５）	DPLWFGEFDYYGMDV（配列番号：１１５）
2.4.4	SGVYYWS（配列番号：９６）	YFYYSGNTYHNPSLKS（配列番号：１０６）	DRSGYDHPDAFDI（配列番号：１１６）
2.12.1	IYYWS（配列番号：９７）	YVYYSGSTNYNPSLKS（配列番号：１０７）	GGYDFWSGYFDY（配列番号：１１７）
2.40.1	SGGYYWS（配列番号：９８）	NIYYSGITYYNPSLKS（配列番号：１０８）	DPLYGDYGFDP（配列番号：１１８）
3.10.1	TYYWS（配列番号：９９）	EINHSGSTNYNPSLKS（配列番号：１０９）	GGYDFWSGYYDY（配列番号：１１９）

鎖ＣＤＲ１コンセンサス配列（ＣＤＲ１ｂ）（配列番号１６９）：ａ　ｂ　ｃ　ｄ　ｅ　ｆ、アミノ酸ａは、セリンであり、又は存在せず；アミノ酸ｂは、アスパラギン酸若しくはグリシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｃは、アスパラギン酸、グリシン、セリン、バリン、スレオニン又はイソロイシンから選択され；アミノ酸ｄは、チロシンであり；アミノ酸ｅは、チロシン又はグリシンから選択され；アミノ酸ｆは、イソロイシン、メチオニン又はトリプトファンから選択され；及びアミノ酸ｇは、ヒスチジン、アスパラギン又はセリンから選択される

重鎖ＣＤＲ２コンセンサス配列（ＣＤＲ２ｂ）（配列番号１７０）：ｈ　ｉ　ｊ　ｋ　ｌ　ｍ　ｎ　ｏ　ｐ　ｑ　ｒ　ｓ　ｔ　ｕ　ｖ　ｗ　ｘ、アミノ酸ｈは、トリプトファン、チロシン、バリン、アスパラギン又はグルタミン酸から選択され；アミノ酸ｉは、イソロイシン、フェニルアラニン又はバリンから選択され；アミノ酸ｊは、アスパラギン、セリン、トリプトファン又はチロシンから選択され；アミノ酸ｋは、プロリン、セリン、チロシン又はヒスチジンから選択され；アミノ酸ｌは、アスパラギン、セリン又はアスパラギン酸から選択され；アミノ酸ｍは、セリン又はグリシンから選択され；アミノ酸ｎは、グリシン若しくはセリンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｏは、グリシン、スレオニン、アスパラギン酸、セリン、イソロイシン又はアスパラギンから選択され；アミノ酸ｐは、スレオニン、イソロイシン又はリジンから選択され；アミノ酸ｑは、アスパラギン又はチロシンから選択され；アミノ酸ｒは、チロシン又はヒスチジンから選択され；アミノ酸ｓは、アラニン又はアスパラギンから選択され；アミノ酸ｔは、グルタミン、アスパラギン酸、又はプロリンから選択され；アミノ酸ｕは、リジン又はセリンから選択され；アミノ酸ｖは、フェニルアラニン、バリン又はロイシンから選択され；アミノ酸ｗは、グルタミン又はリジンから選択され、及びアミノ酸ｘは、グリシン又はセリンから選択される。）：

重鎖ＣＤＲ３コンセンサス配列（ＣＤＲ３ｂ）（配列番号１７１）：アミノ酸配列ｙ　ｚ　ａ’　ｂ’　ｃ’　ｄ’　ｅ’　ｆ’　ｇ’　ｈ’　ｉ’　ｊ’　ｋ’　ｌ’　ｍ’　ｎ’　ｏ’　ｐ’　ｑ’　ｒ’を含む（アミノ酸ｙは、グルタミン酸、アスパラギン酸、セリン若しくはグリシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｚは、ロイシン、グルタミン酸、アスパラギン酸、ヒスチジン、プロリン若しくはグリシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ａ’は、グルタミン酸、チロシン若しくはロイシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｂ’は、ロイシン、アスパラギン、グリシン、ヒスチジン、チロシン若しくはトリプトファンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｃ’は、アルギニン、セリン、グルタミン酸、チロシン、グリシン若しくはフェニルアラニンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｄ’は、グリシンであり、又は存在せず；アミノ酸ｅ’は、トリプトファン若しくはチロシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｆ’は、アスパラギン酸であり、又は存在せず；アミノ酸ｇ’は、セリン若しくはアルギニンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｈ’は、セリンであり、又は存在せず；アミノ酸ｉ’は、グリシン若しくはチロシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｊ’は、チロシン、グルタミン酸若しくはアスパラギン酸から選択され、又は存在せず；アミノ酸ｋ’は、チロシン、フェニルアラニン若しくはアスパラギン酸から選択され、又は存在せず；アミノ酸ｌ’は、チロシン、アスパラギン酸、ヒスチジン若しくはトリプトファンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｍ’は、チロシン、グリシン、アスパラギン酸、プロリン若しくはセリンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｎ’は、グリシン、バリン、チロシン若しくはアスパラギン酸から選択され、又は存在せず；アミノ酸ｏ’は、ロイシン、アラニン、グリシン若しくはチロシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｐ’は、メチオニン、フェニルアラニン又はチロシンから選択され；アミノ酸ｑ’は、アスパラギン酸であり、アミノ酸ｒ’は、バリン、チロシン、イソロイシン又はプロリンから選択される

【図６Ａ】

Figure 6A

ID	~KD (M)	ka (1/Ms)	kd (1/s)
3.10.1	4.7E-10	6.5E+04	3.0E-05
2.4.4	9.9E-11	2.7E+05	2.7E-05
2.12.1	2.2E-10	1.3E+05	2.8E-05
1.29.1	7.9E-10	6.2E+04	4.8E-05
1.75.1	7.8E-10	3.6E+04	2.8E-05
1.74.3	3.6E-10	1.3E+05	4.7E-05

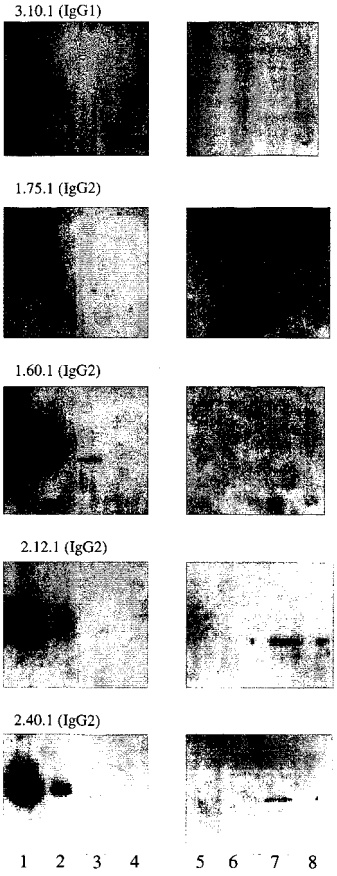
【図６Ｂ】

Figure 6B

ID	K_D (pM)
2.4.4	< 10
1.29.1	34 +/- 15
1.74.2	41 +/- 13
2.12.1	54 +/- 7

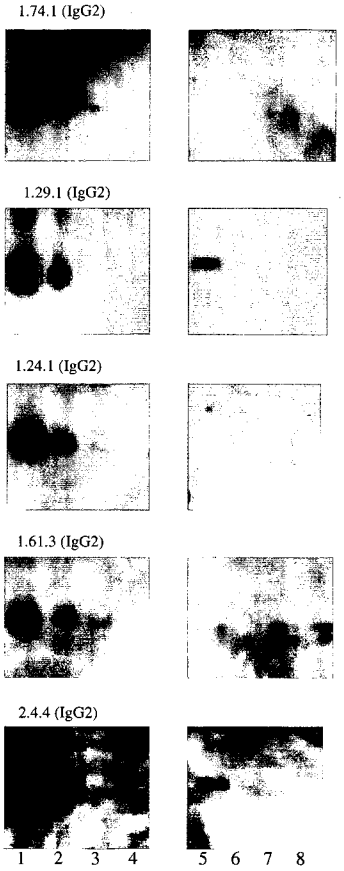
【図７－１】

Figure 7



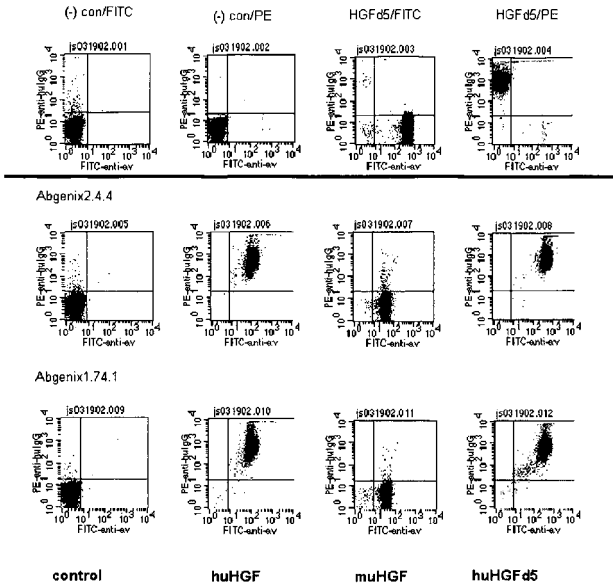
【図７－２】

Figure 7（続き）



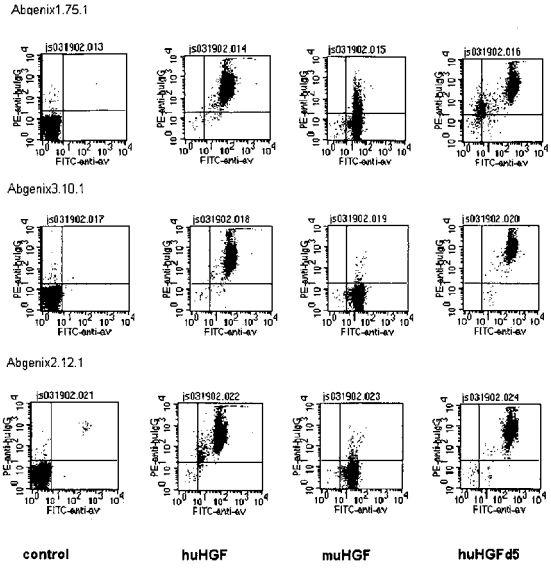
【図８－１】

Figure 8



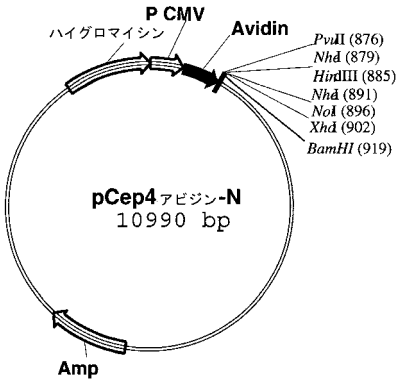
【図８－２】

Figure 8（続き）



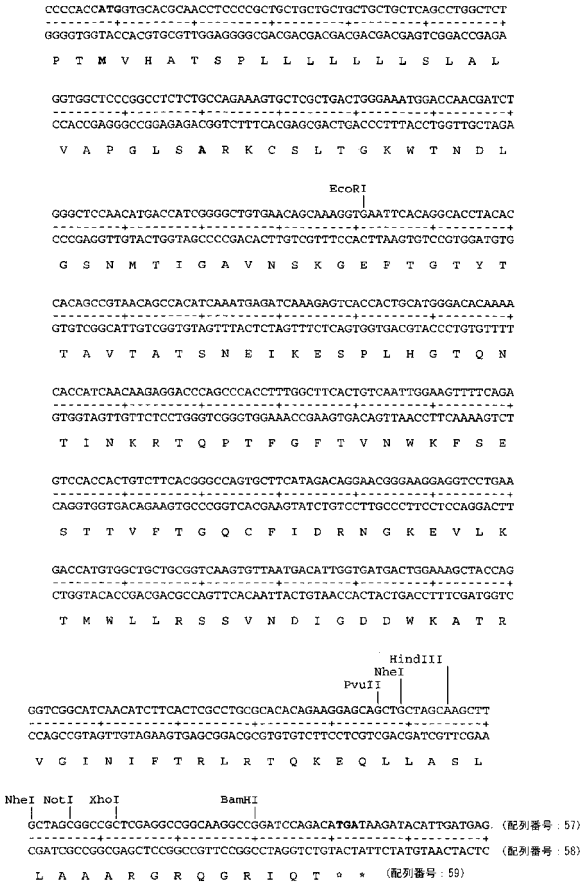
【図９Ａ】

Figure 9A



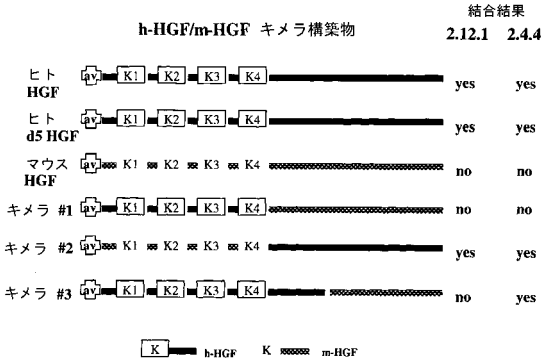
【図９Ｂ】

Figure 9B



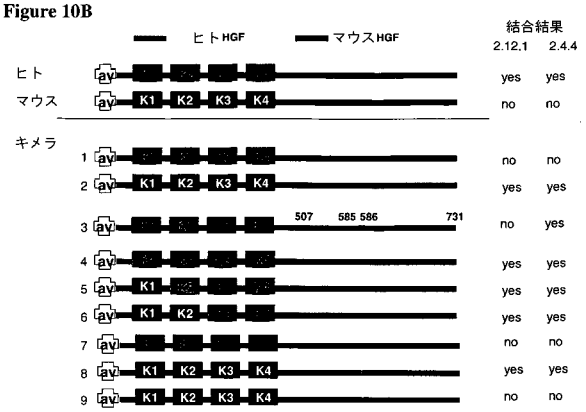
【図１０Ａ】

Figure 10A



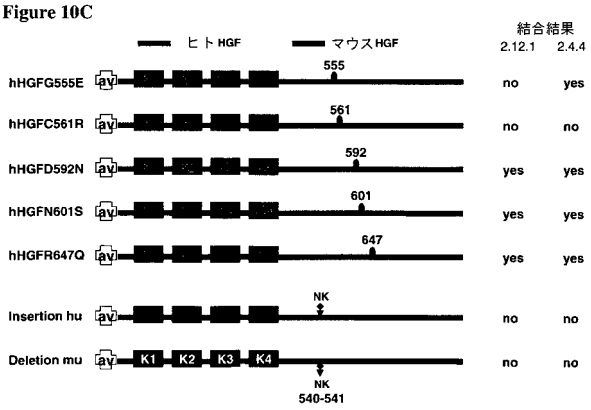
【図１０Ｂ】

Figure 10B



【図１０Ｃ】

Figure 10C



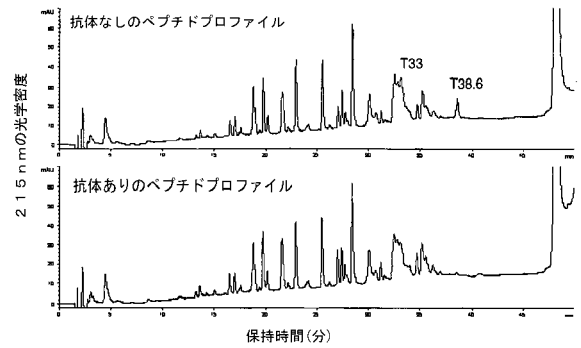
【図１０Ｄ】

Figure 10D

```
                    451                                                 500
ヒト   HGF  (450) PWCYTGNPLIPWDYCPISRCEGDTTPTIVNLDHPVISCAKTKQLRVVNGI
マウス HGF  (451) PWCYTGNPLIPWDYCPISRCEGDTTPTIVNLDHPVISCAKTKQLRVVNGI
コンセンサス (451) PWCYTGNPLIPWDYCPISRCEGDTTPTIVNLDHPVISCAKTKQLRVVNGI
                    501                                                 550
ヒト   HGF  (500) PTRTNIGWMVSLRYRNKHICGGSLIKESWVLTARQCFPSR--DLKDYEAW
マウス HGF  (501) PTQTTVGWMVSLKYRNKHICGGSLIKESWVLTARQCFPARNKDLKDYEAW
コンセンサス (501) PT T IGWMVSLKYRNKHICGGSLIKESWVLTARQCFPAR  DLKDYEAW
                    551                                                 600
ヒト   HGF  (548) LGIHDVHGRGDEKCKQVLNVSQLVYGPEGSDLVLMKLARPAVLDDFVSTI
マウス HGF  (551) LGIHDVHERGEEKRKQILNISQLVYGPEGSDLVLLKLARPAILDNFVSTI
コンセンサス (551) LGIHDVH RGDEK KQILNISQLVYGPEGSDLVLLKLARPAILD FVSTI
                    601                                                 650
ヒト   HGF  (598) DLPNYGCTIPEKTSCSVYGWGYTGLINYDGLLRVAHLYIMGNEKCSQHHR
マウス HGF  (601) DLPSYGCTIPEKTTCSIYGWGYTGLINADGLLRVAHLYIMGNEKCSQHHQ
コンセンサス (601) DLP YGCTIPEKTSCSIYGWGYTGLIN DGLLRVAHLYIMGNEKCSQHH
                    651                                                 700
ヒト   HGF  (648) GKVTLNESEICAGAEKIGSGPCEGDYGGPLVCEQHKMRMVLGVIVPGRGC
マウス HGF  (651) GKVTLNESELCAGAEKIGSGPCEGDYGGPLICEQHKMRMVLGVIVPGRGC
コンセンサス (651) GKVTLNESEICAGAEKIGSGPCEGDYGGPLICEQHKMRMVLGVIVPGRGC
                    701                          731
ヒト   HGF  (698) AIPNRPGIFVRVAYYAKWIHKIILTYKVPQS  (配列番号 120)
マウス HGF  (701) AIPNRPGIFVRVAYYAKWIHKVILTYKL---  (配列番号 121)
コンセンサス (701) AIPNRPGIFVRVAYYAKWIHKIILTYKL     (配列番号 122)
```

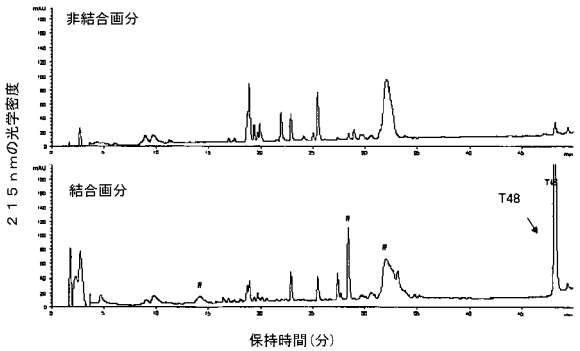
【図１１Ａ】

Figure 11A



【図１１Ｂ】

Figure 11B



【図１１Ｃ】

Figure 11C

T38.6= ＶＶＮＧＩＰＴＲ----------ＨＧＲ (calc. mass=7152)　obs. mass=7165　(配列番号 161)

ＧＩＰＴＲＴ----------ＨＧＲ (calc. Mass= 6840)　obs mass= ~6878　(配列番号 162)

T33= ＶＮＴＬＤＱ ----------?

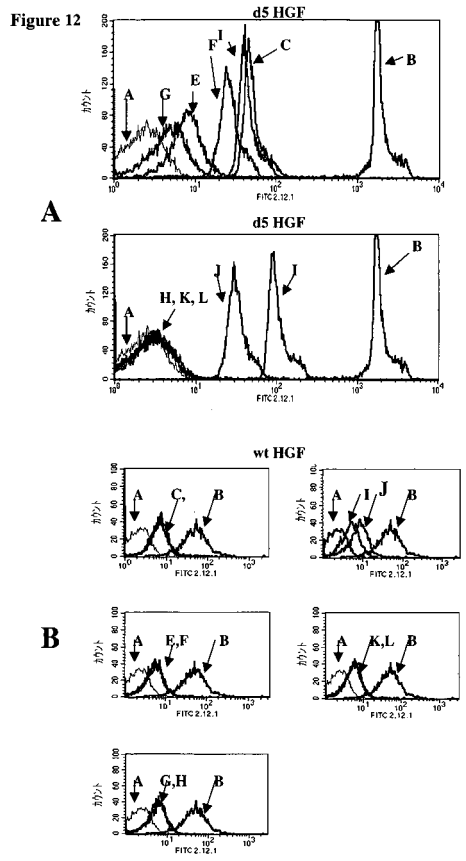
予想される、Ｔ３８．６由来の保護されたペプチド

VVNGIPTRTNIGWMVSLRYRNKHICGGSLIKESWVLTARQCFPSRDLKDYEAWLGIHDVHGR
(配列番号 164)

GIPTRTNIGWMVSLRYRNKHICGGSLIKESWVLTARQCFPSRDLKDYEAWLGIHDVHGR
(配列番号 165)

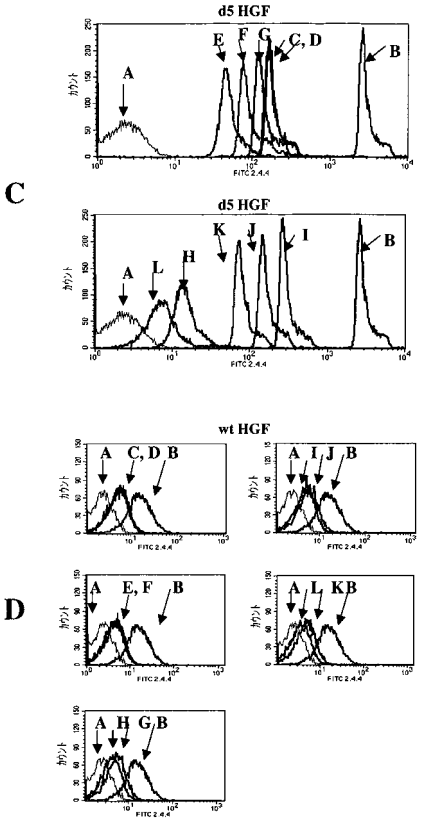
【図１２－１】

Figure 12



【図１２－２】

Figure 12（続き）



【図１３】

Figure 13

ID	IC50 IP (nM)
3.10.1	0.9
2.40.1	1.0
1.75.1	1.0
2.12.1	2.1
1.24.1	2.6
1.29.1	3.2
1.74.1	3.7
1.60.2	4.5
2.4.4	5.1

ID	IC50 IP (nM)
3.10.1	0.37
2.12.1	0.52
1.75.1	0.72
1.29.1	1.93
1.74.1	2.31
1.61.3	2.59
1.24.1	9.36

【図１４】

Figure 14

実験 #1

ID	IC50 IP (nM)
1.75.1	0.34
2.12.1	0.49
2.40.1	0.51
3.10.1	0.64
1.24.1	0.64
1.29.1	1.18
2.4.4	1.24
1.74.1	1.25

実験 #2

ID	IC50 IP (nM)
1.61.3	0.28
1.24.1	0.40
1.75.1	0.59
1.29.1	0.88
1.60.1	1.06
1.74.1	2.17

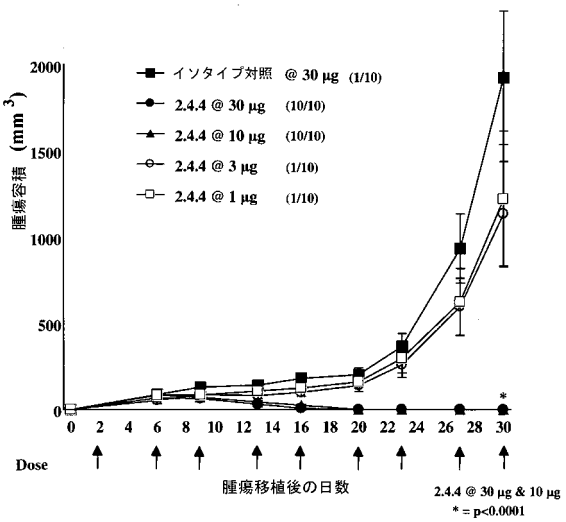
【図１５】

Figure 15

実験 #1		実験 #2	
ID	**IC50 IP (nM)**	**ID**	**IC50 IP (nM)**
1.24.1	15	2.4.4	8
1.60.1	15	1.61.3	17
1.29.1	23	1.29.1	21
2.4.4	33	2.12.1	34
2.12.1	57	2.40.1	59
3.10.1	137	3.10.1	133
		1.60.1	215
		1.74.1	>666
		1.75.1	>666

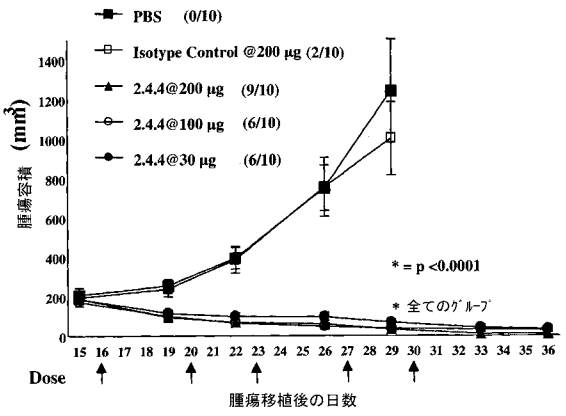
【図１６Ａ】

Figure 16A



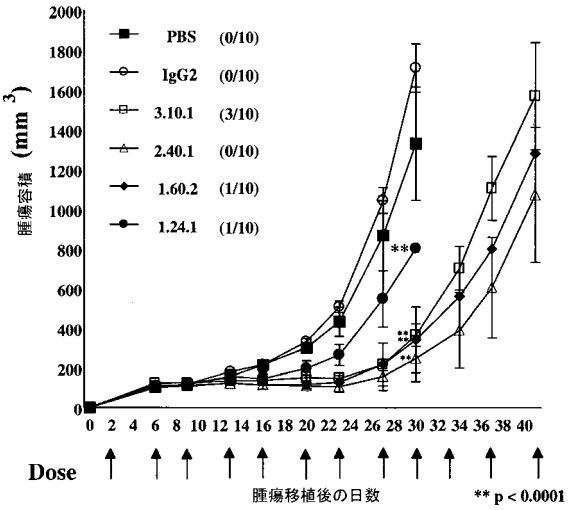
【図１６Ｂ】

Figure 16B



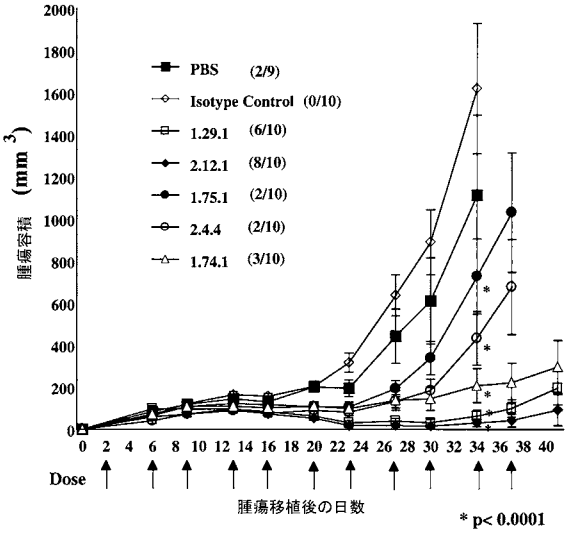
【図１６Ｃ】

Figure 16C



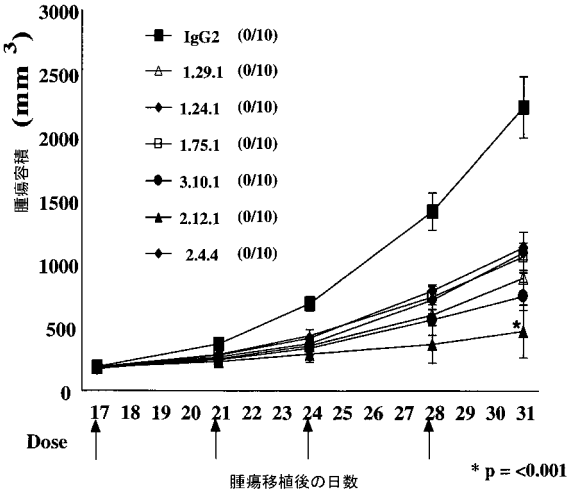
【図１６Ｄ】

Figure 16D



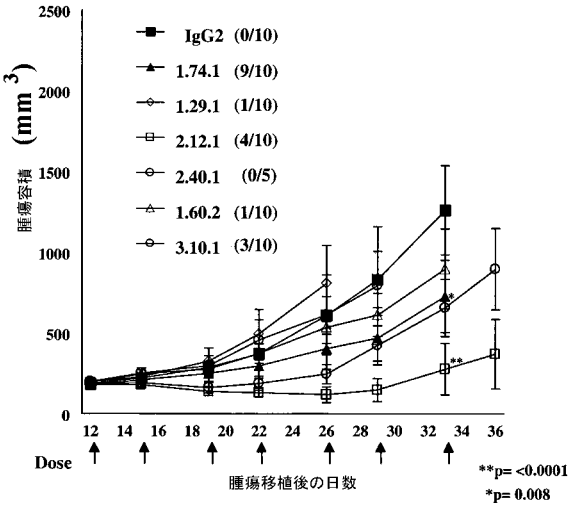
【図１６Ｅ】

Figure 16E



【図１６Ｆ】

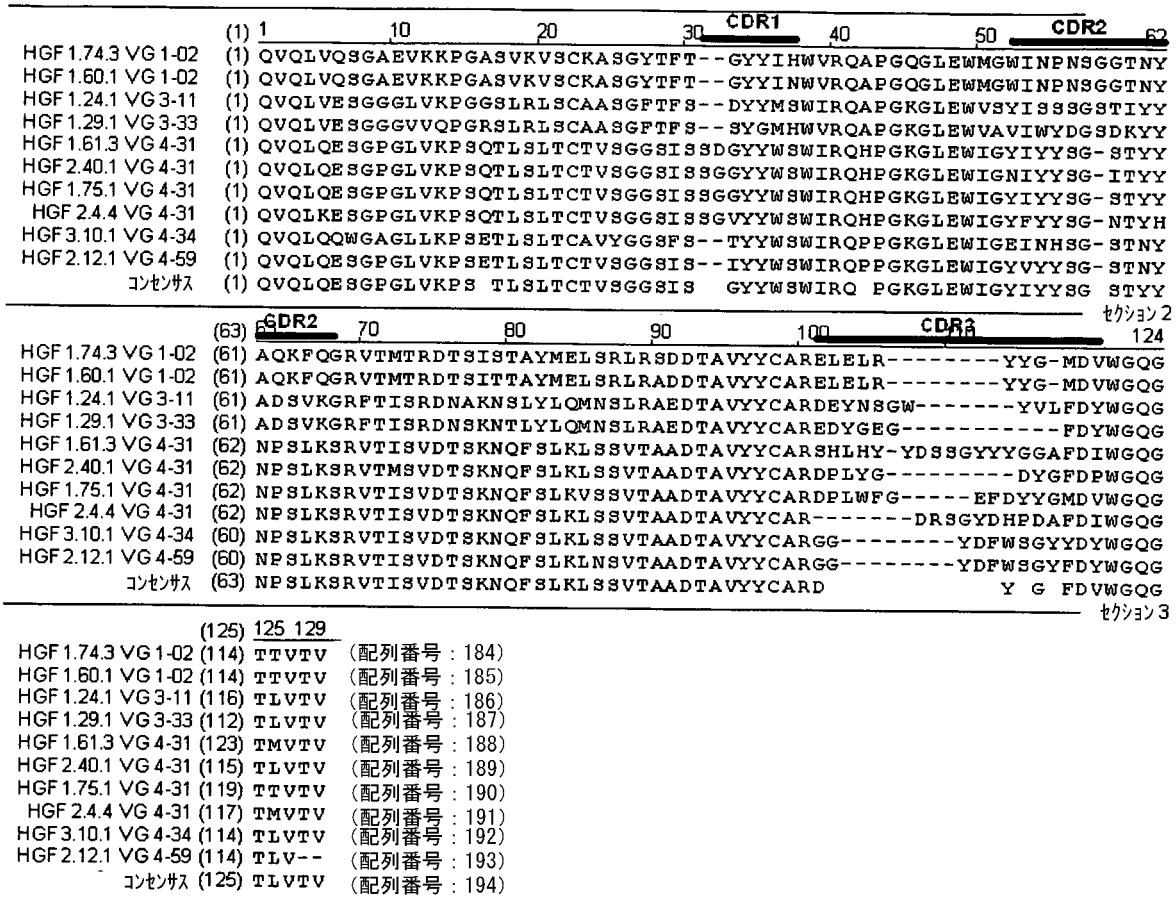
Figure 16F



【配列表】
2012235783000001.app
【手続補正書】
【提出日】平成24年7月27日(2012.7.27)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
ＣＤＲ１ａ、ＣＤＲ２ａ及びＣＤＲ３ａから選択される少なくとも一つの相補性決定領域（ＣＤＲ）を含み、抗体の重鎖と共同して、肝細胞増殖因子（ＨＧＦ）を結合することができる、単離されたポリペプチド。
（ＣＤＲ１ａは、アミノ酸配列ａ　ｂ　ｃ　ｄ　ｅ　ｆ　ｇ　ｈ　ｉ　ｊ　ｋ　ｌ　ｍ　ｎ　ｏ　ｐ　ｑを含み（アミノ酸ａは、リジン、アルギニン又はグルタミンから選択され；アミノ酸ｂは、セリン又はアラニンから選択され；アミノ酸ｃは、セリンであり；アミノ酸ｄは、グルタミンであり；アミノ酸ｅは、セリン、グリシン又はアスパラギン酸から選択され；アミノ酸ｆは、バリン若しくはイソロイシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｇは、ロイシン若しくはフェニルアラニンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｈは、フェニルアラニン若しくはチロシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｉは、セリンであり、又は存在せず；アミノ酸ｊは、セリンであり、又は存在せず；アミノ酸ｋは、アスパラギン、スレオニンから選択され、又は存在せず；アミノ酸ｌは、アスパラギン、イソロイシン又はバリンから選択され；アミノ酸ｍは、リジン、アルギニン、アスパラギン又はアスパラギン酸から選択され；アミノ酸ｎは、アスパラギン又はセリンから選択され；アミノ酸ｏは、チロシン、アスパラギン酸、トリプトファン又はアスパラギンから選択され；アミノ酸ｐは、ロイシンであり；及びアミノ酸ｑは、アラニン、グリシン又はアスパラギンから選択される。）；
ＣＤＲ２ａは、アミノ酸配列ｒ　ｓ　ｔ　ｕ　ｖ　ｗ　ｘを含み（アミノ酸ｒは、トリプトファン、アラニン、バリン、グルタミン酸又はグリシンから選択され；アミノ酸ｓは、アラニンであり、アミノ酸ｔは、セリンであり、アミノ酸ｕは、スレオニン、セリン又はアスパラギン酸から選択され；アミノ酸ｖは、アルギニン又はロイシンから選択され；アミノ酸ｗは、グルタミン酸、グルタミン又はアラニンから選択され；及びアミノ酸ｘは、セリン、アスパラギン又はスレオニンから選択される。）；
ＣＤＲ３ａは、アミノ酸配列ｙ　ｚ　ａ’　ｂ’　ｃ’　ｄ’　ｅ’　ｆ’　ｇ’　ｈ’を含む（アミノ酸ｙは、グルタミン又はロイシンから選択され；アミノ酸ｚは、グルタミン、アスパラギン又はアルギニンから選択され；アミノ酸ａ’は、チロシン、ヒスチジン、アラニン又はセリンから選択され；アミノ酸ｂ’は、フェニルアラニン、チロシン、アスパラギン酸、アスパラギン又はイソロイシンから選択され；アミノ酸ｃ’は、セリン、グリシン又はアスパラギンから選択され；アミノ酸ｄ’は、プロリン、チロシン、スレオニン、フェニルアラニン、アスパラギン酸、ロイシン又はトリプトファンから選択され；アミノ酸ｅ’は、プロリンであり；アミノ酸ｆ’は、プロリンであり、又は存在せず；アミノ酸ｇ’は、トリプトファン、ロイシン、プロリン、チロシン又はイソロイシンであり；及びアミノ酸ｈ’は、スレオニン又はアスパラギンである。）。）
【手続補正２】
【補正対象書類名】図面
【補正対象項目名】図２Ｂ
【補正方法】変更
【補正の内容】

【図２Ｂ】

Figure 2B



フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI			テーマコード（参考）
C12N	***1/19***	***(2006.01)***	Ｃ１２Ｎ	1/19		
C12N	***1/21***	***(2006.01)***	Ｃ１２Ｎ	1/21		
C12N	***5/10***	***(2006.01)***	Ｃ１２Ｎ	5/00	１０１	
A61K	***48/00***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	48/00		
A61K	***45/00***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	45/00		
A61P	***35/00***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ	35/00		
A61K	***39/395***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｅ	
A61K	*38/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｔ	
			Ａ６１Ｋ	37/02		

(72)発明者　テレサ・エル・バージエス
アメリカ合衆国、カリフオルニア・９３００３、ベンチユラ、ハイ・ポイント・ドライブ・９０８
(72)発明者　アンジエラ・コクソン
アメリカ合衆国、カリフオルニア・９３０２１、ムーアパーク、バブリング・ブルツク・ストリート・１２００４
(72)発明者　ラリー・エル・グリーン
アメリカ合衆国、カリフオルニア・９４１１４、サン・フランシスコ、ヒル・ストリート・４６４
(72)発明者　コー・チヤン
アメリカ合衆国、メリーランド・２０８１７、ベセスダ、レイバーン・ロード・８７１０

Ｆターム(参考)　4B024 AA01 BA44 CA04 CA20 DA02 DA03 EA04 GA11
4B065 AA90X AA93X AA93Y AB01 AB05 AC14 BA02 CA25 CA44
4C084 AA13 AA19 BA01 CA23 DB62 MA17 MA52 MA66 NA14 ZB26
4C085 AA13 AA14 BB01 EE01 EE03 GG02 GG08
4H045 AA11 AA30 BA10 BA41 DA76 EA20 FA74 GA26

【外国語明細書】
2012235783000001.pdf