

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5289285号  
(P5289285)

(45) 発行日 平成25年9月11日(2013.9.11)

(24) 登録日 平成25年6月14日(2013.6.14)

(51) Int.Cl.	F 1	
<b>C 0 7 K</b> 16/22 (2006.01)	C 0 7 K	16/22 Z N A
<b>C 1 2 N</b> 1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15
<b>C 1 2 N</b> 1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19
<b>C 1 2 N</b> 1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21
<b>C 1 2 N</b> 5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/00 1 0 1
請求項の数 9 (全 46 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2009-268214 (P2009-268214)	(73) 特許権者	508139457
(22) 出願日	平成21年11月26日(2009.11.26)		コリア リサーチ インスティテュート
(65) 公開番号	特開2010-131009 (P2010-131009A)		オブ バイオサイエンス アンド バイオ
(43) 公開日	平成22年6月17日(2010.6.17)		テクノロジー
審査請求日	平成21年11月26日(2009.11.26)		大韓民国 テジョン ユソン-グ クァン
(31) 優先権主張番号	10-2008-0118124		ハンノ 111
(32) 優先日	平成20年11月26日(2008.11.26)	(74) 代理人	110000796
(33) 優先権主張国	韓国 (KR)		特許業務法人三枝国際特許事務所
前置審査		(72) 発明者	パク ヨンウ
			大韓民国 305-762 テジョン ユ
			ソン-グ ジョンミン-ドン エクスポ
			アパートメント ナンバー506-104
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 V E G F - 特異的なヒト抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記の 1) または 2) を含む V E G F に特異的なヒト抗体:

1) 配列番号 5 1 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域 ( V H ) を含む重鎖及び配列番号 1 0 1 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域 ( V L ) を含む軽鎖、または前記可変領域を含んでいて免疫学的に活性を有した断片;

2) 配列番号 5 4 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域 ( V H ) を含む重鎖及び配列番号 1 0 4 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域 ( V L ) を含む軽鎖、または前記可変領域を含んでいて免疫学的に活性を有した断片。

【請求項 2】

請求項 1 の抗体の重鎖またはその免疫学的に活性を有した断片をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクター及び請求項 1 の抗体の軽鎖またはその免疫学的に活性を有した断片をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを宿主細胞に導入してつくられた形質転換体。

【請求項 3】

1) 請求項 1 の抗体の重鎖またはその免疫学的に活性を有した断片をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクター及び請求項 1 の抗体の軽鎖またはその免疫学的に活性を有した断片をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを宿主細胞に導入してつくられた形質転換体を培養する工程; 及び

2) 前記培養液から請求項 1 のヒト抗体を精製する工程を含む、 V E G F に特異的なヒト

抗体の製造方法。

【請求項 4】

請求項 1 のヒト抗体を含む製薬組成物。

【請求項 5】

VEGF が過発現して惹起される疾患であって、大腸癌、膵臓癌、腎臓癌、肺癌、乳癌及び卵巣癌からなる群から選択される癌；または新生血管生成と係わる疾患であって、慢性関節リウマチ、糖尿病性網膜症、虚血性網膜症、乾癬、増殖糖尿病網膜症及び糖尿病性黄斑浮腫からなる群から選択される疾患の予防及び治療に使用されることを特徴とする、請求項 4 に記載の製薬組成物。

【請求項 6】

化学的療法と並行して投与することを特徴とする、請求項 4 に記載の製薬組成物。

【請求項 7】

請求項 1 のヒト抗体、またはその免疫学的に活性を有した断片及び放射線アイソトープを含む組成物であって、該放射線アイソトープが、該ヒト抗体と結合したり該ヒト抗体が結合された運搬体に含まれることを特徴とする、組成物。

【請求項 8】

VEGF が過発現して惹起される疾患であって、大腸癌、膵臓癌、腎臓癌、肺癌、乳癌及び卵巣癌からなる群から選択される癌；または新生血管生成と係わる疾患であって、慢性関節リウマチ、糖尿病性網膜症、虚血性網膜症、乾癬、増殖糖尿病網膜症及び糖尿病性黄斑浮腫からなる群から選択される疾患の放射線免疫治療用及び検出用に使用されることを特徴とする、請求項 7 に記載の組成物。

【請求項 9】

請求項 7 の組成物を癌細胞と接触する工程を含む試験管内の VEGF が過発現する大腸癌、膵臓癌、腎臓癌、肺癌、乳癌及び卵巣癌からなる群から選択される癌の免疫検出方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、VEGF (Vascular endothelial growth factor) - 特異的なヒト抗体に関するものである。

【背景技術】

【0002】

VEGF は、発生過程の血管形成及び血管新生に決定的な役割をすることが知られていて (Soker S 等, J Cell Biochem. 2002 年, 第 85 巻, 357 - 368 頁)、VEGFR1 が血管内皮細胞の他に大腸癌、膵臓癌細胞にも過発現して直接的に腫瘍の進行、転移に関与することが報告されていて、VEGFR1 は、血管新生、腫瘍の成長と転移、炎症などにおいて重要な役割をすると見なされている (Wey JS 等, Cancer, 2005 年, 第 104 巻, 427 - 438 頁; Fan F 等, Oncogene, 2005 年, 第 24 巻, 2647 - 2653 頁)。VEGF は、腫瘍血管新生において最も重要な因子中の一つで、腎臓癌 (Tomisawa M 等, Eur J Cancer, 1999 年, 第 35 巻, 133 - 137 頁)、肺癌 (Volm M 等, Int J Cancer, 1997 年, 第 74 巻, 64 - 68 頁)、乳癌 (Yoshiji H 等, Cancer Res., 1996 年, 第 56 巻, 2013 - 2016 頁)、卵巣癌 (Sowter HM 等, Lab Invest., 1997 年, 第 77 巻, 607 - 614 頁) など大部分の腫瘍組織で発現され、腫瘍細胞だけではなく腫瘍基質細胞でも分泌する。腫瘍の成長を阻害するために、VEGF 拮抗剤を使用した試みとして、マウス抗ヒト VEGF モノクローナル抗体は、試験管で腫瘍細胞の成長には特別に影響を及ぼさない一方、癌動物モデルで腫瘍血管新生及び腫瘍成長を明白に阻害する効果を示した (Kim KJ 等, Nature, 1993 年, 第 362 巻, 841 - 844 頁; Borstrom P 等, Cancer Res., 1996 年, 第 56 巻, 4032 - 4039 頁)。

10

20

30

40

50

## 【0003】

VEGFが実際に腫瘍以外に多くの疾病とも関連性が高いという事実は、広く知られていて、これに対する治療剤開発も多角度に試みられている。代表的な例として、新生血管生成と係わる疾患である慢性関節リウマチ(RA)、糖尿病性網膜症、虚血性網膜症及び乾癬などが挙げられ、VEGFがこのような疾病に重要な要因として作用することが明らかにされている。RAの場合、対照群の患者に比較してRA患者の血清VEGFの量が上昇することが確認された(Ikeda M等, J Pathol., 2000年, 第191巻, 426-33頁)。また、糖尿病患者で血漿VEGFが上昇するが、上昇した血糖が内皮に毒性影響を及ぼして高血糖性不完全低酸素状態を誘導する。これは、VEGF生成を誘導して糖尿病で内皮損傷と障害とが関係あることを示している(Lim HS等, Diabetes Care, 2004年, 第27巻, 2918-24頁)。また、網膜でVEGFの過剰な分泌は、眼内新生血管、血腫を引き起こして視覚障害/盲目になる。増殖糖尿病網膜症(PDR)及び糖尿病性黄斑浮腫と関連した視力喪失を防止して、レーザー治療のような破壊的な治療と関連した副作用を避けるための努力として、VEGFのすべての亜形に選択的に結合するヒト化されたモノクローナル抗VEGF抗体断片を使用する。Genentech社によって生産された、rhufab V2と呼ばれるこの化合物は、現在臨床研究中であり、PDRまたは糖尿病性黄斑浮腫を防止するのに効果を示している(Heier JS, Program and abstracts of the American Academy of Ophthalmology 2002 Annual Meeting; October 20-23, Orlando, Florida)。

10

20

## 【0004】

現在40種以上の多様な血管新生抑制剤が、多様な種類の腫瘍に対して臨床開発が進行されている。VEGF及びVEGF受容体は、最も代表的な標的として、活性、信号伝達、生産を阻害する薬剤が含まれる。VEGF阻害剤では、抗体、水溶性VEGF受容体(VEGF trap)などがある。腫瘍治療剤としての血管新生抑制剤では、ヒト化抗VEGFモノクローナル抗体であるベバシズマブ(bevacizumab; Avastin<sup>TM</sup>, Genentech)が、大規模の臨床試験で転移性大腸癌患者の生命延長の効果を示すことによって、2004年2月にFDAの承認を受けた。したがって、このような抗VEGFヒトモノクローナル抗体の開発は、新生血管の治療を含めたそれと係わった多様な疾患の治療のための有望な候補物質として、副作用を極小化させて臨床及び前臨床に使用することができる長所を有して、これを使用した多方面の治療剤開発が注目されているのは、当然である。

30

## 【0005】

それで、本発明者等は、VEGFに特異的に結合する14種のヒト抗体を選別して、前記ヒト抗体が既存のヒト化抗VEGFモノクローナル抗体であるアバスチンと類似水準の結合能及び中和能を有し、マウスVEGFと交差反応性を示すことを確認して、本発明のヒト抗体が、VEGF過発現疾患の治療に効果的に使用できることを提示することにより本発明を完成した。

## 【発明の概要】

40

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0006】

本発明の目的は、VEGFに特異的なヒト抗体を提供することである。

## 【0007】

本発明の他の目的は、前記ヒト抗体の重鎖またはその断片を暗号化するポリヌクレオチド、及び前記ポリヌクレオチド及びヒト重鎖の不変領域を含む発現ベクターを提供することである。

## 【0008】

本発明の他の目的は、前記ヒト抗体の軽鎖またはその断片を暗号化するポリヌクレオチド、及び前記ポリヌクレオチド及びヒト軽鎖の不変領域を含む発現ベクターを提供するこ

50

とである。

【 0 0 0 9 】

本発明の他の目的は、前記ヒト抗体の重鎖またはその免疫学的に活性を有した断片を暗号化するポリヌクレオチドを含む発現ベクターを宿主細胞に導入してつくられた形質転換体を提供することである。

【 0 0 1 0 】

本発明の他の目的は、前記ヒト抗体の軽鎖またはその免疫学的に活性を有した断片を暗号化するポリヌクレオチドを含む発現ベクターを宿主細胞に導入してつくられた形質転換体を提供することである。

【 0 0 1 1 】

本発明の他の目的は、前記ヒト抗体の重鎖またはその断片を暗号化するポリヌクレオチドを含む発現ベクター、及び軽鎖またはその断片を暗号化するポリヌクレオチドを含む発現ベクターを同時に宿主細胞に導入してつくられた形質転換体を提供することである。

【 0 0 1 2 】

本発明の他の目的は、前記形質転換体を培養して、V E G F に特異的なヒト抗体を製造する方法を提供することである。

【 0 0 1 3 】

また、本発明は、前記ヒト抗体を含む組成物を提供することである。

【 0 0 1 4 】

また、本発明は、前記ヒト抗体を含む製薬組成物を提供することである。

【 0 0 1 5 】

本発明の他の目的は、薬学的に有効な量の前記ヒト抗体を個体に投与する工程を含む、V E G F が過発現して惹起される疾患を治療する方法を提供することである。

【 0 0 1 6 】

本発明の他の目的は、前記ヒト抗体及び放射線アイソトープを含む組成物を提供することである。

【 0 0 1 7 】

本発明の他の目的は、前記放射線アイソトープを含む組成物が癌細胞と接触する工程を含む、試験管内のV E G F が過発現する癌の免疫検出方法を提供することである。

【 0 0 1 8 】

本発明の他の目的は、前記放射線アイソトープを含む組成物の診断的有効量を個体に投与する工程を含む、生体内でV E G F が過発現する癌の映像化方法を提供することである。

【 0 0 1 9 】

本発明の他の目的は、前記放射線アイソトープを含む組成物を使用する、V E G F が過発現する癌の生体内治療方法を提供することである。

【 0 0 2 0 】

本発明の他の目的は、前記放射線アイソトープを含む組成物を使用する、V E G F が過発現する癌治療の予後評価方法を提供することである。

【 0 0 2 1 】

本発明の他の目的は、前記ヒト抗体を動物実験モデルに投与する工程を含む、前記ヒト抗体の副作用を測定する方法を提供することである。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 2 2 】

前記目的を達成するために、本発明は、配列番号 5 ~ 1 7 からなる群から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列を有する重鎖相補性決定領域（以下、H C D R）1、配列番号 1 8 ~ 3 0 からなる群から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列を有する H C D R 2 及び配列番号 3 1 ~ 4 3 からなる群から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列を有する H C D R 3 を含む、重鎖可変領域（V H）を含む重鎖またはその断片；及び、

配列番号 5 7 ~ 6 9 及び配列番号 1 3 0 ~ 配列番号 1 4 2 からなる群から選択されるい

10

20

30

40

50

いずれか一つのアミノ酸配列を有する軽鎖相補性決定領域（以下、LCDR）1、配列番号70～82及び配列番号143～配列番号152からなる群から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列を有するLCDR2及び配列番号83～93及び、配列番号153～配列番号164からなる群から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列を有するLCDR3を含む軽鎖可変領域（VL）を含む軽鎖またはその断片を含むVEGFに特異的なヒト抗体を提供する。

【0023】

また、本発明は、前記ヒト抗体の重鎖またはその免疫学的に活性を有した断片を暗号化するポリヌクレオチド、及び前記ポリヌクレオチドを含む発現ベクターを提供する。

【0024】

また、本発明は、前記ヒト抗体の軽鎖またはその免疫学的に活性を有した断片を暗号化するポリヌクレオチド、及び前記ポリヌクレオチドを含む発現ベクターを提供する。

【0025】

また、本発明は、前記ヒト抗体の重鎖またはその免疫学的に活性を有した断片を暗号化するポリヌクレオチドを含む発現ベクターを宿主細胞に導入してつくられた形質転換体を提供する。

【0026】

また、本発明は、前記ヒト抗体の軽鎖またはその免疫学的に活性を有した断片を暗号化するポリヌクレオチドを含む発現ベクターを宿主細胞に導入してつくられた形質転換体を提供する。

【0027】

また、本発明は、前記ヒト抗体の重鎖またはその免疫学的に活性を有した断片を暗号化するポリヌクレオチドを含む発現ベクター、及び軽鎖またはその免疫学的に活性を有した断片を暗号化するポリヌクレオチドを含む発現ベクターを同時に宿主細胞に導入してつくられた形質転換体を提供する。

【0028】

また、本発明は、前記形質転換体を培養して、VEGFに特異的なヒト抗体を製造する方法を提供する。

【0029】

また、本発明は、前記ヒト抗体を含む組成物を提供する。

【0030】

また、本発明は、前記ヒト抗体を含む製薬組成物を提供する。

【0031】

また、本発明は、薬学的に有効な量の前記ヒト抗体をVEGFが過発現して惹起される疾患にかかった個体に投与する工程を含む、VEGFが過発現して惹起される疾患を治療する方法を提供する。

【0032】

また、本発明は、前記ヒト抗体、ヒト抗体の軽鎖または重鎖、またはその免疫学的に活性を有した断片及び放射線アイソトープを含む組成物を提供する。

【0033】

また、本発明は、前記放射線アイソトープを含む組成物が癌細胞と接触する工程を含む、試験管内のVEGFが過発現する癌の免疫検出方法を提供する。

【0034】

また、本発明は、1)前記放射線アイソトープを含む組成物の診断的有効量を個体に投与する工程；及び、

2)前記個体に対する検出映像を得る工程を含む、生体内でVEGFが過発現する癌の映像化方法を提供する。

【0035】

また、本発明は、

1)前記放射線アイソトープを含む組成物を個体の静脈内に投与する工程；

10

20

30

40

50

2) 前記工程1)の組成物を検出して腫瘍細胞を確認する工程；  
 3) 工程2)で確認された腫瘍細胞を手術的切除によって除去する工程を含む、VEGFが過発現する癌の生体内治療方法を提供する。

【0036】

また、本発明は、

1) 前記放射線アイソトープを含む組成物を腫瘍細胞が除去された患者の静脈内に投与する工程；

2) 前記工程1)の組成物を検出して腫瘍細胞を確認する工程；

3) 工程2)で腫瘍細胞が検出されなければ、腫瘍細胞がすべて除去されたと判断することを特徴とする、VEGFが過発現する癌治療患者の予後評価方法を提供する。

10

【0037】

同時に、本発明は、前記ヒト抗体をVEGFを過発現する疾患にかかった動物実験モデルに投与する工程を含む、前記ヒト抗体の副作用を測定する方法を提供する。

【発明の効果】

【0038】

本発明のVEGFに特異的なヒト抗体は、前記VEGFが過発現して惹起される疾患の診断、疾患の分類、映像化、治療及び予後判定などに使用することができる。

【図面の簡単な説明】

【0039】

【図1】pYK602-VEGFベクターでのVEGFタンパク質発現をウエスタンブロットで確認した結果を示した図である。

20

【図2】pYK602-VEGF、pYK602-His-VEGF及びpYK603-VEGFベクターでのVEGFタンパク質発現をウエスタンブロットで比較した結果を示した図である。

【図3】pYK603-VEGFベクターでのVEGFタンパク質発現をウエスタンブロットで確認した結果を示した図である。

【図4】精製されたVEGFをSDS-PAGEで確認した結果を示した図である。

【図5】パンニング1～3次でのファージ抗体探索結果を示した図である。

【図6】VEGFに対するヒトVEGFモノクローナルファージ抗体の多様性をフィンガープリンティングを通じて確認した結果を示した図である。

30

【図7a】VEGFに対するヒトVEGFモノクローナルファージ抗体の重鎖CDRで使用されているポリペプチドを分析した結果を示した図である。

【図7b】VEGFに対するヒトVEGFモノクローナルファージ抗体の重鎖CDRで使用されているポリペプチドを分析した結果を示した図である。

【図7c】VEGFに対するヒトVEGFモノクローナルファージ抗体の重鎖CDRで使用されているポリペプチドを分析した結果を示した図である。

【図8a】VEGFに対するヒトVEGFモノクローナルファージ抗体の軽鎖CDRで使用されているポリペプチドを分析した結果を示した図である。

【図8b】VEGFに対するヒトVEGFモノクローナルファージ抗体の軽鎖CDRで使用されているポリペプチドを分析した結果を示した図である。

40

【図8c】VEGFに対するヒトVEGFモノクローナルファージ抗体の軽鎖CDRで使用されているポリペプチドを分析した結果を示した図である。

【図9a】ヒトVEGFモノクローナル抗体の結合特異性を比較した結果を示した図である：a：C5、E9、F6、G12、A4、C11、及びF2。

【図9b】ヒトVEGFモノクローナル抗体の結合特異性を比較した結果を示した図である：b：H7、G9、C9、B12、F9、D12及びC12。

【図10】HUVEC細胞でヒトVEGFモノクローナル抗体の管形成を抑制する中和能を確認した結果を示した図である。

【図11】ヒトVEGFモノクローナル抗体のhVEGFとmVEGFに対する交差反応性を測定した結果を示した図である。

50

【図12a】 pNATAB Hベクターの開列地図を示した図である。

【図12b】 pNATAB Lベクターの開列地図を示した図である。

【図13a】 pYK602ベクターの開列地図を示した図である。

【図13b】 pYK602 - Hisベクターの開列地図を示した図である。

【図13c】 pYK603 - Hisベクターの開列地図を示した図である。

【図14】 パンニング1～3次でのLCシャフリングライブラリファージ抗体探索結果を示した図である。

【図15】 LCシャフリングモノクローナルファージ抗体の多様性をフィンガープリンティングを通じて確認した結果を示した図である。

【図16】 LCシャフリングモノクローナルファージ抗体の軽鎖CDRで使用されているポリペプチドを分析した結果を示した図である。

【発明を実施するための形態】

【0040】

以下、本発明で使用した用語を説明する。

「可変領域」というのは、抗原と特異的に結合する機能を遂行しながら配列上の多くの変異を見せる抗体分子の部分を意味し、可変領域には、CDR1、CDR2及びCDR3が存在する。前記CDRの間には、フレームワーク領域(FR)部分が存在して、CDR環を支持する役割をする。

【0041】

「相補性決定領域」は、抗原の認識に関与する環状の部位であり、この部位の配列が変わることによって抗体の抗原に対する特異性が決定される。

【0042】

「パンニング(panning)」は、ファージの外壁にペプチドを発現するファージライブラリから、標的分子(抗体、酵素、細胞表面レセプターなど)と結合する性質を有したペプチドを表面に発現しているファージのみを選択し出す過程を意味する。

【0043】

以下、本発明を詳しく説明する。

【0044】

本発明は、配列番号5～17からなる群から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列を有する重鎖相補性決定領域(以下、HC DR)1、配列番号18～30からなる群から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列を有するHC DR2及び配列番号31～43からなる群から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列を有するHC DR3を含む重鎖可変領域(VH)を含む重鎖またはその断片;及び、

配列番号57～69及び配列番号130～配列番号142からなる群から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列を有する軽鎖相補性決定領域(以下、LC DR)1、配列番号70～82及び配列番号143～配列番号152からなる群から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列を有するLC DR2、及び配列番号83～93及び配列番号153～配列番号164からなる群から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列を有するLC DR3を含む軽鎖可変領域(VL)を含む軽鎖またはその断片を含むVEGFに特異的なヒト抗体を提供する。

【0045】

好ましくは、前記重鎖可変領域は、配列番号44～56からなる群から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列を有し、前記軽鎖可変領域は、配列番号94～106及び配列番号165～配列番号178からなる群から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列を有する。

【0046】

前記抗体は、全長抗体形態であるのみならず、抗体分子の機能的な断片を含む。全体抗体は、2個の全長の軽鎖及び2個の全長の重鎖を有する構造で、それぞれの軽鎖は、重鎖とジスルフィド結合で連結されている。抗体分子の機能的な断片というのは、抗原結合機能を保有している断片を意味し、抗体断片の例としては、(i)軽鎖の可変領域(V<sub>L</sub>)

10

20

30

40

50

及び重鎖の可変領域 ( $V_H$ ) と軽鎖の不変領域 ( $C_L$ ) 及び重鎖の最初の不変領域 ( $C_{H1}$ ) からなる Fab 断片; (ii)  $V_H$  及び  $C_{H1}$  ドメインからなる Fd 断片; (iii) 単一抗体の  $V_L$  及び  $V_H$  ドメインからなる Fv 断片; (iv)  $V_H$  ドメインからなる dAb 断片 [Ward ES 等, Nature, 1989年, 第341巻, 544-546頁]; (v) 分離した CDR 領域; (vi) 2個の連結された Fab 断片を含む 2価断片である  $F(ab')_2$  断片; (vii)  $V_H$  ドメイン及び  $V_L$  ドメインが抗原結合部位を形成するように結合させるペプチドリンカーによって結合された単鎖 Fv 分子 (scFv); (viii) 二重特異的な単鎖 Fv 二量体 (PCT/US92/09965) 及び、(ix) 遺伝子融合によって製作された多価または多重特異的な断片であるディアボディ (diabody) WO94/13804) などを含む。

10

## 【0047】

本発明では、VEGF に対するヒト抗体をファージディスプレイ技術を使用して scFv 形態で得て、モノファージクローン形態でスクリーニングすることで、VEGF に特異的な 14 種のモノクローナルファージを得た。

## 【0048】

本発明の具体的な実施例で組換え技術で得た VEGF (図1~図4参照) をモノクローナル抗体の製造に使用した。前記 VEGF を多様性を有したヒト由来 scFv ライブラリ細胞から製造したライブラリファージと反応してパンニングさせた後、VEGF 抗原に強く結合するモノクローナルをスクリーニングした (表1、2及び図5参照)。前記選別されたモノクローナルをフィンガープリンティングで確認した後 (図6参照)、それぞれの配列を分析して抗体の  $V_H$  と  $V_L$  の CDR 部位を確認した (表5及び図7、8参照)。前記抗体と生殖系列抗体群の類似性を NCBI の IgBLAST プログラム (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>) を使用して確認した結果 (表6参照)、14種の VEGF に特異的なファージ抗体を得た。前記選別されたモノクローナル抗体は、G12>D12>E9>F6>H7>C5>B12>G9>F9>C11>F2>A4>C9>C12の順序で VEGF に対する結合能を示し (図9a及び図9b参照)、VEGF によって誘導される HUVEC 細胞の毛細管類似管形成を顕著に抑制することが観察された (図10参照)。また、アバスチンと似た中和能を示した E9、F6 及び G12 モノクローナル抗体は、すべてマウス VEGF に対してヒト VEGF 程度の高い親和力を示して交差反応した (表8、表9及び図11参照)。アバスチンは、マウス VEGF に対して全く交差反応しないので、前記アバスチンによる副作用のための動物実験研究が難しいことが報告されたが、本発明の VEGF 中和ヒト抗体は、マウスと交差反応するので、本発明の VEGF 中和ヒト抗体が既存の抗癌剤であるアバスチンとエピトープの異なる確率が確実に高くなり、本発明の VEGF 中和ヒト抗体は、マウス VEGF に対して高い交差反応を示すので、動物実験研究に容易に使用できる。

20

30

## 【0049】

前記アバスチンと似た中和能を示した F6 及び G12 モノクローナル抗体を対象に、軽鎖がシャフリングしたライブラリファージを製造した。前記製造したライブラリファージと VEGF を反応させてパンニングさせた後、VEGF 抗原に強く結合するモノクローナルをスクリーニングした (表10、11及び図14参照)。前記選別されたモノクローナルをフィンガープリンティングで確認した後 (図15参照)、それぞれの配列を分析して抗体の  $V_H$  と  $V_L$  の CDR 部位を確認し、LC シャフリングして選別された抗体の  $V_H$  の CDR 領域が同一で、 $V_L$  の CDR 領域を比較した (表12及び図16参照)。前記抗体と生殖系列抗体群の類似性を確認した結果 (表13参照)、15種の VEGF に特異的な LC シャフリングモノクローナルファージ抗体を得て、これらの VEGF に対する結合能が確認された (表14参照)。前記 LC シャフリングモノクローナルファージ抗体のヒト VEGF に対する結合能を確認した結果、2C11、2G03、2C05 及び 2F10 を除外して、F6 及び G12 と類似の程度の高い親和力を示した。

40

## 【0050】

また、本発明は、前記ヒト抗体の重鎖またはその免疫学的に活性を有した断片を暗号化

50

するポリヌクレオチド、及び前記ポリヌクレオチドを含む発現ベクターを提供する。

【0051】

また、本発明は、前記ヒト抗体の軽鎖またはその免疫学的に活性を有した断片を暗号化するポリヌクレオチド、及び前記ポリヌクレオチドを含む発現ベクターを提供する。

【0052】

本発明の具体的な実施例で組換え技術によって得たVEGFを使用して、VEGF抗原に強く結合するモノクローンをスクリーニングした(表1、2及び図5参照)。前記選別されたモノクローンをフィンガープリンティングで確認した後(図6参照)、それぞれの配列を分析して抗体のV<sub>H</sub>とV<sub>L</sub>のCDR部位を確認した(表5及び図7、8参照)。前記抗体と生殖系列抗体群の類似性を確認した結果(表6参照)、15種のVEGFに特異的なファージ抗体を得た。前記選別されたモノクローナル抗体のVEGFに対する結合能を測定し(図9a及び図9b参照)、VEGFによって誘導されるHUVEC細胞の毛細管類似管形成を顕著に抑制することが観察された(図10参照)。また、アバスチンと似た中和能を示したE9、F6及びG12モノクローナル抗体は、すべてマウスVEGFとヒトVEGFに対して高い親和力を示して交差反応した(表8、表9及び図11参照)。アバスチンは、マウスVEGFに対して全く交差反応しないので、前記アバスチンによる副作用のための動物実験研究が難しいことが知られているが、本発明のVEGF中和ヒト抗体は、マウスと交差反応するので、本発明のVEGF中和ヒト抗体が既存の抗癌剤であるアバスチンとエピトープが異なる確率が確実に高くなった。本発明のVEGF中和ヒト抗体は、マウスVEGFに対して高い交差反応を示すので、動物実験研究に容易に用いられる。

10

20

【0053】

本発明のヒト抗体の軽鎖及び重鎖またはその断片を暗号化するポリヌクレオチドは、コドンの縮退性によって、または前記ヒト抗体の軽鎖及び重鎖またはその断片を発現させようとする生物で選好されるコドン considering、コード領域から発現されるヒト抗体の軽鎖及び重鎖またはその断片のアミノ酸配列を変化させない範囲内でコード領域に多様な変形が成り立ち得、コード領域を除いた部分でも遺伝子の発現に影響を及ぼさない範囲内で多様な変形または修飾が成り立ち得、そのような変形遺伝子も本発明の範囲に含まれることを当業者はよく理解することができるだろう。すなわち、本発明のポリヌクレオチドは、これと同等な活性を有するタンパク質をコードする限り、一つ以上の核酸塩基が置換、欠失、挿入またはこれらの組み合わせによって変異することができ、これらも本発明の範囲に含まれる。このようなポリヌクレオチドの配列は、単鎖または二重鎖であり得、DNA分子またはRNA(mRNA)分子であり得る。

30

【0054】

前記発現ベクターの製作時には、前記ヒト抗体の軽鎖及び重鎖またはその断片を生産しようとする宿主細胞の種類によってプロモーター、ターミネーター、エンハンサーなどのような発現調節配列、膜標的化または分泌のための配列などを適切に選択して目的によって多様に組み合わせることができる。

【0055】

本発明の発現ベクターは、プラスミドベクター、コスミドベクター、バクテリオファージベクター及びウイルスベクターなどを含むが、これに制限されない。相応しい発現ベクターは、プロモーター、オペレーター、開始コドン、終結コドン、ポリアデニル化シグナル及びエンハンサーのような発現調節エレメントの他にも、膜標的化または分泌のためのシグナル配列またはリーダー配列を含み、目的によって多様に製造することができる。発現ベクターのプロモーターは、構成的または誘導性であり得る。前記シグナル配列には、宿主が大腸菌の場合には、PhoAシグナル配列、OmpAシグナル配列などが、宿主がバシラス属の菌の場合には、 $\sigma$ -アミラーゼシグナル配列、サブチリシンシグナル配列などが、宿主が酵母の場合には、MFシグナル配列、SUC2シグナル配列などが、宿主が動物細胞の場合には、インスリンシグナル配列、 $\sigma$ -インターフェロンシグナル配列、抗体分子シグナル配列などを使用することができるが、これに制限されない。また発現ベ

40

50

クターは、ベクターを含む宿主細胞を選択するための選択マーカーを含むことができ、複製可能な発現ベクターの場合、複製起源を含む。

【0056】

また、本発明は、前記ヒト抗体の重鎖またはその免疫学的に活性を有した断片を暗号化するポリヌクレオチドを含む発現ベクターを宿主細胞に導入してつくられた形質転換体を提供する。

【0057】

また、本発明は、前記ヒト抗体の軽鎖またはその免疫学的に活性を有した断片を暗号化するポリヌクレオチドを含む発現ベクターを宿主細胞に導入してつくられた形質転換体を提供する。

【0058】

また、本発明は、前記ヒト抗体の重鎖またはその免疫学的に活性を有した断片を暗号化するポリヌクレオチドを含む発現ベクター、及び軽鎖またはその免疫学的に活性を有した断片を暗号化するポリヌクレオチドを含む発現ベクターを同時に宿主細胞に導入してつくられた形質転換体を提供する。

【0059】

本発明の具体的な実施例では、モノクローナルファージの軽鎖及び重鎖を暗号化する遺伝子を得てそれぞれベクターに連結した後、前記発現ベクターを同時に宿主細胞に導入して発現された全長IgG形態のヒト抗体を確認した。前記ヒト抗体を得て、VEGFに対する結合能(図9a及び図9b参照)、中和能(図10参照)及びマウス及びヒトVEGFに対する交差反応性(表8、表9及び図11参照)を確認した。

【0060】

本発明による前記発現ベクターを適切な宿主細胞、例えば、大腸菌または酵母細胞などに形質転換させた後、形質転換された宿主細胞を培養することで、本発明によるヒト抗体の軽鎖及び重鎖またはその断片を大量生産することができる。宿主細胞の種類による適切な培養方法及び培地条件などは当該分野の通常技術者に知られた公知技術から当業者が容易に選択することができる。前記宿主細胞は、大腸菌またはバシラス・サブティリスのような原核生物であり得る。また、サカロマイセスセルピシエのような酵母、昆虫細胞、植物細胞、動物細胞から由来した真核細胞であり得る。前記動物細胞は、自家または同種異系動物細胞であることがより好ましい。自家または同種異系動物細胞に導入してつくられた形質転換体は、個体に投与されて癌を治療する細胞治療などに使用され得る。前記宿主細胞への発現ベクター導入方法は、当業者に公知されたどの方法を使用してもかまわない。

【0061】

また、本発明は、

- 1) 前記形質転換体を培養する工程；及び
- 2) 前記培養液から前記ヒト抗体を精製する工程を含む、VEGFに特異的なヒト抗体の製造方法を提供する。

【0062】

前記培養培地としては、当業者に公知された培養培地の中から形質転換体に相応しい培地を選択して使用することが好ましい。前記抗体精製方法は、当業者に公知されたどんな精製方法も使用可能である。

【0063】

本発明の具体的な実施例では、モノクローナルファージの軽鎖及び重鎖を暗号化する遺伝子を得てそれぞれベクターに連結した後、前記発現ベクターを同時に宿主細胞に導入して発現した全長IgG形態のヒト抗体を確認した。前記ヒト抗体を得て、VEGFに対する結合能(図9a及び図9b参照)、中和能(図10参照)及びマウス及びヒトVEGFに対する交差反応性(表8、表9及び図11参照)を確認した。

【0064】

また、本発明は、前記ヒト抗体を含む組成物を提供する。

## 【0065】

また、本発明は、前記ヒト抗体を含む製薬組成物を提供する。

## 【0066】

前記VEGFが過発現して惹起される疾患は、癌または新生血管生成と係わる疾患である。前記癌は、大腸癌、膵臓癌、腎臓癌、肺癌、乳癌及び卵巣癌からなる群から選択されたいずれかひとつであることが好ましいが、これに限定されず、VEGFが過発現する癌はすべて可能である。また、前記新生血管生成と係わる疾患には、慢性関節リウマチ(RA)、糖尿病性網膜症、虚血性網膜症、乾癬、増殖糖尿病網膜症(PDR)及び糖尿病性黄斑浮腫などがある。

## 【0067】

本発明の具体的な実施例で、VEGFに対する結合能を示した(図9a及び図9b参照)VEGFモノクローナル抗体は、ヒト臍帯静脈内皮細胞株で、VEGFによって誘導されるHUVEC細胞の毛細管類似管形成を顕著に抑制することが観察された(図10参照)。また、アバスチンと似た中和能を示すE9、F6及びG12モノクローナル抗体は、すべて、マウスVEGFに対してヒトVEGF程度の高い親和力を示して交差反応した(表8、表9及び図11参照)。アバスチンは、マウスVEGFに対して全く交差反応しないので、前記アバスチンによる副作用のための動物実験研究が難しいことが知られていたが、本発明のVEGF中和ヒト抗体はマウスと交差反応するので、本発明のVEGF中和ヒト抗体が既存の抗癌剤であるアバスチンとエピトープの異なる確率が確実に高くなり、本発明のVEGF中和ヒト抗体は、マウスVEGFに対して高い交差反応を示すので、動物実験研究に容易に使用できる。それで、本発明のモノクローナル抗体は、VEGFが過発現された疾患予防及び治療用組成物として有用に使用することができる。

## 【0068】

本発明の製薬組成物は、前記VEGFに特異的なヒト抗体または前記形質転換体を選択的に含むことができ、前記成分に追加で同一または類似の機能を示す有効成分を1種以上含むことができる。また、本発明の製薬組成物投与のために、前記で記載した有効成分以外に、追加で薬剤学的に許容可能な担体を1種以上含んで製造することができる。例えば、薬剤学的に許容可能な担体では、食塩水、滅菌水、リンゲル液、緩衝食塩水、デキストロース溶液、マルトデキストリン溶液、グリセロール、エチルアルコール、リポソーム及びこれら成分中の一つ以上の成分を混合して使用することができ、必要によって抗酸化剤、緩衝液及び静菌剤など他の通常の添加剤を添加することができる。また、希釈剤、分散剤、界面活性剤、結合剤及び滑剤を付加的に添加して水溶液、懸濁液及び乳濁液などのような注射用剤形に製剤化することができ、標的細胞に特異的に作用するように標的細胞に特異的な抗体またはその他リガンドを前記の担体とともに結合させて使用することができる。同時に、当該技術分野の適正な方法またはレミングトンの文献(Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA)に記載された方法などを使用して各疾患または成分によって好ましく製剤化することができる。

## 【0069】

本発明の製薬組成物は、非経口で投与することができ、非経口投与は、皮下注射、静脈注射、筋肉内注射または胸部内注射注入方式による。非経口投与用剤形に製剤化するためには、本発明の製薬組成物は、安定剤または緩衝剤とともに混合して溶液または懸濁液に製造し、それをアンプルまたはバイアルの単位投与型に製剤化する。

## 【0070】

本発明の製薬組成物は、投与経路によって多様な形態で製造することができる。例えば、本発明の製薬組成物は、注射用途に相応しい滅菌水溶液または分散液の形態に製造することができる。または凍結乾燥技術を使用してフリーズドライされた形態で製造することができる。フリーズドライされた製薬組成物は、典型的に約4で維持され、補助剤を含みか含まない安定化溶液、例えば、食塩水または/及びHEPESによって復元され得る。

## 【0071】

本発明の方法を実施するにおいて、投与される製薬組成物の量に影響を及ぼす因子としては、これに限定されるものではないが、投与方式、投与頻度、治療が進行中の特定疾病、疾病の重症度、疾病の病歴、個体が異なる治療剤とともに協力治療法が進行中かどうか、及び治療が進行中の個体の年齢、身長、体重、健康、及び身体条件を含む。一般的に治療が進行中の患者の体重が増加するほど、本発明の製薬組成物をさらに多い量で投薬することが好ましい。

【0072】

同時に、本発明の製薬組成物は、化学的療法と並行して投与することができる。

【0073】

また、本発明は、薬学的に有効な量の前記ヒト抗体をVEGFが過発現して惹起される疾患にかかった個体に投与する工程を含む、VEGFが過発現して惹起される疾患を治療する方法を提供する。

10

【0074】

前記VEGFが過発現して惹起される疾患は、癌または新生血管生成と係わる疾患である。前記癌は、大腸癌、膵臓癌、腎臓癌、肺癌、乳癌及び卵巣癌からなる群から選択されたいずれかひとつであることが好ましいが、これに限定されず、VEGFが過発現する癌はすべて可能である。また、前記新生血管生成と係わる疾患には、慢性関節リウマチ、糖尿病性網膜症、虚血性網膜症、乾癬、増殖糖尿病網膜症と糖尿病性黄斑浮腫などがある。

【0075】

本発明の具体的な実施例で、VEGFに対する結合能を示した(図9a及び図9b参照) VEGFモノクローナル抗体は、ヒト臍帯静脈内皮細胞株で、VEGFによって誘導されるHUVEC細胞の毛細管類似管形成を顕著に抑制することが観察された(図10参照)。また、アバスチンと似た中和能を示したE9、F6及びG12モノクローナル抗体はすべて、マウスVEGFに対してヒトVEGF程度の高い親和力を示して交差反応した(表8、表9及び図11参照)。アバスチンは、マウスVEGFに対して全く交差反応しないので、前記アバスチンによる副作用のための動物実験研究が難しいことが知られているが、本発明のVEGF中和ヒト抗体は、マウスと交差反応するので、本発明のVEGF中和ヒト抗体が既存の抗癌剤であるアバスチンとエピトープが異なる確率が明確に高くなり、本発明のVEGF中和ヒト抗体は、マウスVEGFに対して高い交差反応を示すので、動物実験研究に容易に使用できる。それで、本発明のモノクローナル抗体は、VEGFが過発現された疾患の予防及び治療に有用に使用することができる。

20

30

【0076】

本発明が適用可能な個体は、脊椎動物で、哺乳動物が好ましく、さらに好ましいのは、ネズミ、ウサギ、ギニアピッグ、ハムスター、犬、猫のような実験動物で、最も好ましいのは、チンパンジー、ゴリラのような類人猿類の動物である。

【0077】

本発明のヒト抗体の投与方法は、使用目的によって非経口投与(例えば、静脈内、皮下、腹腔内または局所などに投与する方法)で可能で、静脈投与が好ましい。場合によって固形癌に対する投与では、抗体の接近を早く容易にするために局所的な投与が好ましいこともある。投与量は、患者の体重、年齢、性別、健康状態、食餌、投与時間、投与方法、排泄率及び疾患の重症度等によってその範囲が多様である。1回の投与量は、約5~500mg/m<sup>2</sup>の量で一単位または数単位で投与することができる。前記有効量は、前記患者を治療する医師の裁量によって調節することができる。

40

【0078】

本発明のヒト抗体は、患者の治療のために単独または手術、ホルモン治療、薬物治療及び生物学的反応調節剤と並行して使用することができる。

【0079】

また、本発明は、前記ヒト抗体、ヒト抗体の軽鎖または重鎖、またはその免疫学的に活性を有した断片及び放射線アイソトープを含む組成物を提供する。

【0080】

50

前記組成物は、VEGFが過発現して惹起される疾患の放射線免疫治療用及び検出用に有用に使用することができる。前記VEGFが過発現して惹起される疾患は、癌または新生血管生成と係わる疾患である。前記癌は、大腸癌、膵臓癌、腎臓癌、肺癌、乳癌及び卵巣癌からなる群から選択されたいずれかひとつであることが好ましいが、これに限定されず、VEGFが過発現する癌はすべて可能である。また、前記新生血管生成と係わる疾患には、慢性関節リウマチ、糖尿病性網膜症、虚血性網膜症、乾癬、増殖糖尿病網膜症と糖尿病性黄斑浮腫などがある。

【0081】

本発明の具体的な実施例で、モノクローナルVEGF抗体は、VEGFに対する高い結合能を示すことを確認した(図9a及び図9b参照)。それで、本発明のモノクローナル抗体は、VEGFが過発現して惹起される疾患の放射線免疫治療用及び放射線アイソトープを含む組成物として有用に使用することができる。

10

【0082】

好ましい放射線アイソトープの例では、 $^3\text{H}$ 、 $^{11}\text{C}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{18}\text{F}$ 、 $^{64}\text{Cu}$ 、 $^{67}\text{Zn}$ 、 $^{86}\text{Y}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 及びこれらの混合物及び組合せを含む。前記放射線アイソトープは、ヒト抗体と結合したりヒト抗体が結合した運搬体に含まれることを特徴とする。

【0083】

また、本発明は、前記放射線アイソトープを含む組成物を癌細胞と接触する工程を含む、試験管内でVEGFが過発現する癌の免疫検出方法を提供する。

20

【0084】

前記VEGFが過発現する癌は、大腸癌、膵臓癌、腎臓癌、肺癌、乳癌及び卵巣癌からなる群から選択されたいずれか一つであることが好ましいが、これに限定されず、VEGFが過発現する癌はすべて可能である。

【0085】

本発明の具体的な実施例で、モノクローナルVEGF抗体は、VEGFに対する高い結合能を示すことを確認した(図9a及び図9b参照)。それで、本発明のモノクローナル抗体は、VEGFが過発現する放射線アイソトープを含む組成物として有用に使用することができる。

【0086】

30

前記放射線アイソトープを含む組成物は、洗浄や複合体の分離などその後の工程を容易にするために、固形基質に結合することができる。固形基質は、例えば合成樹脂、ニトロセルロース、ガラス基板、金属基板、グラスファイバー、微細球体及びマイクロビーズなどがある。また、前記合成樹脂には、ポリエステル、ポリ塩化ビニル、ポリスチレン、ポリプロピレン、PVDf及びナイロンなどがある。

【0087】

また、癌細胞は、前記放射線アイソトープを含む組成物と接触の前に適当な程度に希釈することができる。

【0088】

また、本発明は、1)前記放射線アイソトープを含む組成物の診断的有効量を個体に投与する工程；及び、

40

2)前記個体に対する検出映像を得る工程を含む、生体内でVEGFが過発現する癌の映像化方法を提供する。

【0089】

前記VEGFが過発現する癌は、大腸癌、膵臓癌、腎臓癌、肺癌、乳癌及び卵巣癌からなる群から選択されたいずれか一つであることが好ましいが、これに限定されず、VEGFが過発現する癌はすべて可能である。

【0090】

本発明の具体的な実施例で、モノクローナルVEGF抗体は、VEGFに対する高い結合能を示すことを確認した(図9a及び図9b参照)。それで、本発明のモノクローナル

50

抗体は、V E G F が過発現する癌の映像化方法に有用に使用することができる。

【0091】

前記検出映像は、近赤外光イメージング、P E T、M R Iまたは超音波イメージングによって得ることを特徴とする。

【0092】

また、本発明は、

- 1) 前記放射線アイソトープを含む組成物を個体の静脈内に投与する工程；
- 2) 前記工程1)の組成物を検出して腫瘍細胞を確認する工程；
- 3) 工程2)で確認された腫瘍細胞を手術的切除によって除去する工程を含む、V E G F が過発現する癌の生体内治療方法を提供する。

10

【0093】

前記V E G F が過発現する癌は、大腸癌、膵臓癌、腎臓癌、肺癌、乳癌及び卵巣癌からなる群から選択されたいずれか一つであることが好ましいが、これに限定されず、V E G F が過発現する癌はすべて可能である。

【0094】

本発明の具体的な実施例として、V E G F に対する結合能を示した(図9 a及び図9 b参照) V E G F モノクローナル抗体は、ヒト臍帯静脈内皮細胞株で、V E G F によって誘導されるH U V E C細胞の毛細管類似管形成を顕著に抑制することが観察された(図10参照)。また、アバスチンと似た中和能を示したE 9、F 6及びG 1 2モノクローナル抗体は、すべて、マウスV E G F に対してヒトV E G F 程度の高い親和力を示して交差反応した(表8、表9及び図11参照)。アバスチンは、マウスV E G F に対して全く交差反応しないので、前記アバスチンによる副作用のための動物実験研究が難しいことが知られていたが、本発明のV E G F 中和ヒト抗体はマウスと交差反応するので、本発明のV E G F 中和ヒト抗体が既存の抗癌剤であるアバスチンとエピトープが異なる確率が明確に高くなり、本発明のV E G F 中和ヒト抗体はマウスV E G F に対して高い交差反応を示すので、動物実験研究に容易に使用できる。それで、本発明のモノクローナル抗体は、V E G F が過発現する癌予防及び治療に有用に使用することができる。

20

【0095】

また、本発明は、

- 1) 前記放射線アイソトープを含む組成物を腫瘍細胞が除去された患者の静脈内に投与する工程；
- 2) 前記工程1)の組成物を検出して腫瘍細胞を確認する工程；
- 3) 工程2)で腫瘍細胞が検出されなければ、腫瘍細胞がすべて除去されたと判断することを特徴とする、癌治療患者の予後評価方法を提供する。

30

【0096】

同時に、本発明は、前記ヒト抗体を動物実験モデルに投与する工程を含む、前記ヒト抗体の副作用を測定する方法を提供する。

【0097】

前記動物実験モデルは、V E G F が過発現して惹起される疾患にかかった動物が好ましい。

40

【実施例】

【0098】

以下、本発明を実施例によってさらに詳しく説明する。

【0099】

但し、下記の実施例は、本発明を例示するだけのものであって、本発明の内容が下記の実施例によって限定されるのではない。

【0100】

<実施例1> V E G F 抗原タンパク質製造

<1-1> V E G F 遺伝子クローニング

<1-1-1> Y K 6 0 2 を使用してクローニング

50

韓国生命工学研究院ヒト遺伝体機能研究産業団のKUGI (Korean UniGene Information) からヒトVEGF遺伝子を含んでいるプラスミド (UG-0036-D12) の分譲を受けた。前記プラスミドを鋳型DNAにして、前記VEGFのドメインのみを発現させるために正方向プライマー (配列番号1: 5' - GCTCTAGAGTGATGAACCTTCTGCTGCTCTT - 3') 及び逆方向プライマー (配列番号2: 5' - CGGAATTCCCGCCTCGGCTTGTCAACA - 3') を使用して遺伝子を下記の条件で増幅した後、XbaIとEcoRIで処理した後、リガーゼを使用してpcDNA3.1/myc-His(-)ベクター (V80020: Invitrogen, 米国) にサブクローニングした。PCR条件は、全体反応液が50µlの時、鋳型は500ngになるように入れて、94 で5分、95 で30秒、55 で30秒、72 で1分30秒で、25サイクル、72 で10分間反応させてPCR産物を得た。

10

## 【0101】

前記pcDNA3.1-VEGFを鋳型DNAにして、正方向プライマー (配列番号3: 5' - CAGGGGGCCGTGGGGGCGCAGAAAGGAGGAGGGCAG - 3') 及び逆方向プライマー (配列番号4: 5' - TAGCGGCCGACGCGGCCAACCGCCTCGGCTTGTCAACA - 3') を使用して遺伝子を下記条件で増幅した後、SfiIで処理した後、リガーゼを使用してpYK602ベクター (図13a) にサブクローニングした。PCR条件は、全体反応液が50µlの時、鋳型は100ngになるように入れて、94 で5分、95 で30秒、58 で30秒、72 で1分

20

## 【0102】

<1-1-2> pYK602-HisとpYK603を使用してクローニング

実施例1-1-1と同一な方法でpcDNA3.1-VEGFを鋳型にして、pYK602-His (図13b) とpYK603ベクター (図13c) にVEGFをサブクローニングした。併せて、前記サブクローニングしたpYK602-His-VEGFとpYK603-VEGFベクターの塩基配列を確認した。

## 【0103】

<1-2> VEGFタンパク質発現及び精製

<1-2-1> pYK602を使用してVEGF発現確認

まず、150mmの皿10枚に $5 \times 10^6$  293E細胞を敷いた後、翌日前記サブクローニングしたpYK602-VEGFベクター10µgをPEI (23966: Polysciences, Inc, 米国) を処理して形質転換した。翌日成長培地 (無血清DMEM) に交換した後、二日ごとに上澄み液を得て、10% SDS-PAGEゲルで電気泳動した後、ウエスタンブロットで確認した。

30

## 【0104】

具体的に、前記1回目から7回目まで継代培養の上澄み液VEGF20µlがローディングされた10% SDS-PAGEゲル2枚を100Vで2時間位電気泳動した後、NC膜 (HATF00010: millipore, 米国) に85Vで2時間伝達した。以後、膜を4% スキムミルクin TBSTで4 で一晩中遮断した。以後、商業的に購入した抗ヒトFc-HRP (0.8mg/ml; 製品番号31413: Thermo Sci, 米国) を4% スキムミルクin TBSTに1:4000に希釈して常温で1時間反応させた。TBSTで10分に一回ずつ5回洗浄した後、現像 (12145: Intron, 米国) してタンパク質の発現量を比較した。

40

## 【0105】

その結果、図1に示したように、VEGFは7回目の継代培養まで発現し、全般的にVEGFの発現量は、あまり多くなく、2回目及び3回目で発現量が多かった。

## 【0106】

また、前記上澄み液をプロテインAカラム (17-1279-03: GE Health

50

h c a r e , 米 国 ) を 使 用 し て 1 . 5 m l / 分 の 速 度 で 精 製 し た 後 、 0 . 2 5 m g / m l の タ ン パ ク 質 を 得 て 、 こ れ を P B S に 透 析 し た 後 、 沈 殿 物 が 生 じ る こ と を 確 認 し た 。

【 0 1 0 7 】

そ れ で 、 相 対 的 に 沈 澱 が 少 な く 生 成 さ れ る p Y K 6 0 2 - H i s と p Y K 6 0 3 ベ ク タ ー に 再 サ ブ ク ロ ー ニ ン グ し た 。

【 0 1 0 8 】

< 1 - 2 - 2 > p Y K 6 0 2 - H i s と p Y K 6 0 3 を 使 用 し て V E G F 発 現 確 認  
サ ブ ク ロ ー ニ ン グ さ れ た p Y K 6 0 2 - H i s - V E G F と p Y K 6 0 3 - V E G F ベ ク タ ー を 実 施 例 1 - 2 - 1 の 方 法 で 形 質 導 入 し た 後 、 何 回 も 継 代 培 養 し な が ら 上 澄 み 液 を 得 た 。

10

【 0 1 0 9 】

p Y K 6 0 2 - V E G F 、 p Y K 6 0 2 - H i s - V E G F 及 び p Y K 6 0 3 - V E G F ベ ク タ ー の 1 次 及 び 2 次 継 代 培 養 上 澄 み 液 を 1 0 % S D S - P A G E ゲ ル で 電 気 泳 動 し た 後 、 ウ エ ス タ ン プ ロ ッ ト で 確 認 し た 。 ま た 、 沈 殿 物 生 成 も 確 認 し た 。

【 0 1 1 0 】

そ の 結 果 、 図 2 に 示 し た よ う に 、 p Y K 6 0 2 - V E G F と p Y K 6 0 2 - H i s - V E G F ベ ク タ ー は 、 発 現 量 が 類 似 で 相 対 的 な 沈 殿 物 形 成 も 少 な く 、 p Y K 6 0 3 - V E G F ベ ク タ ー で は 、 相 対 的 に そ れ よ り 発 現 量 が 少 な く 示 さ れ た 。

【 0 1 1 1 】

そ れ で 、 最 終 的 に p Y K 6 0 2 - H i s - V E G F ベ ク タ ー を 使 用 し て V E G F を 発 現 さ せ て 精 製 し た 。

20

【 0 1 1 2 】

< 1 - 2 - 3 > p Y K 6 0 2 - H i s - V E G F ベ ク タ ー 発 現 確 認  
1 5 0 m m の 皿 1 0 枚 に  $5 \times 10^6$  2 9 3 E 細 胞 を 敷 い て 、 p Y K 6 0 2 - H i s - V E G F ベ ク タ ー を 形 質 導 入 し た 後 、 継 代 培 養 し な が ら 1 ~ 7 次 継 代 培 養 の 上 澄 み 液 3 0 0 m l を 得 た 。 前 記 上 澄 み 液 を 1 0 % S D S - P A G E ゲ ル で 電 気 泳 動 し た 後 、 ウ エ ス タ ン プ ロ ッ ト で 確 認 し た 。

【 0 1 1 3 】

そ の 結 果 、 図 3 に 示 し た よ う に 、 2 及 び 3 次 上 澄 み 液 で 発 現 量 が 最 も 多 か っ た 。

【 0 1 1 4 】

< 1 - 2 - 4 > V E G F タ ン パ ク 質 発 現 及 び 精 製  
前 記 2 及 び 3 次 上 澄 み 液 を 5 0 m l に 濃 縮 し た 後 、 3 0 0 m l の N i - N T A 結 合 緩 衝 溶 液 ( Q i a g e n , 米 国 ) に 交 換 し た 後 、 再 び 5 0 m l に 濃 縮 し た 。 前 記 濃 縮 液 に N i - N T A ビ ーズ ( 1 0 2 4 4 7 3 , Q i a g e n , 米 国 ) を 添 加 し て 4 で 2 時 間 結 合 し た 後 、 洗 浄 し て 溶 離 し た 。

30

【 0 1 1 5 】

前 記 溶 離 液 を メ ン ブ レ イ ン ( 1 0 K , 1 3 2 5 7 4 : S P E C T R A P O R , 米 国 ) に 入 れ た 後 、 4 で 4 l の P B S 溶 液 に 4 時 間 以 上 緩 衝 溶 液 を 代 え た 後 、 再 び あ ら か じ め 冷 や し て お い た 4 l の P B S 溶 液 に 入 れ て 一 晩 中 透 析 し て 緩 衝 溶 液 を 交 換 し た 。 一 晩 中 透 析 し た 後 、 e - チ ュ ー ブ に 移 し て 、 ブ ラ ッ ド フ ォ ード 方 法 で タ ン パ ク 質 濃 度 を 測 定 し た 後 、 1 0 % S D S - P A G E ゲ ル で 確 認 し た ( 図 4 ) 。

40

【 0 1 1 6 】

そ の 結 果 、 6 0 0  $\mu$  g の V E G F タ ン パ ク 質 を 得 た 。

【 0 1 1 7 】

< 実 施 例 2 > ラ イ ブ ラ リ ファ ー ジ の 製 造  
多 様 性 を 有 し た ヒ ト 由 来 s c F v ラ イ ブ ラ リ 細 胞  $2.7 \times 10^{10}$  を 2 x Y T C M [ ト リ プ ト ン ( C O N D A , 1 6 1 2 . 0 0 ) 1 7 g 、 酵 母 エ キ ス ( C O N D A , 1 7 0 2 . 0 0 ) 1 0 g 、 N a C l ( s i g m a , S 7 6 5 3 - 5 K g ) 5 g 、 ク ロ ラ ム フ ェ ニ コ ー ル ( s i g m a , C 0 8 5 7 ) 3 4  $\mu$  g / m l ] 、 2 % グ ル コ ー ス ( s i g m a , G 5 4 0 0 ) 及 び 5 m M M g C l <sub>2</sub> ( s i g m a , M 2 3 9 3 ) を 含 む 培 地 ( 3 l ) で 3

50

7 で2～3時間培養した後 ( $OD_{600} = 0.5 \sim 0.7$ )、ヘルパーファージを感染させて2×YTCMK [2×YT CM、カナマイシン (sigma、K1876) 70  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、1 mM IPTG (ELPISBIO、IPTG025)] 培地に30 で16時間培養した。培養した細胞を遠心分離 (4500 rpm、15分、4 ) した後、上澄み液に4% PEG (Fluka、81253) 6000と3% NaCl (sigma、S7653) を添加してよく溶解した後、氷で1時間反応させた。再び、遠心分離 (8000 rpm、20分、4 ) した後、ペレットにPBSを添加して溶解した後、遠心分離 (12000 rpm、10分、4 ) してライブラリファージを含む上澄み液を新しいチューブに入れて4 で保管した。

#### 【0118】

<実施例3>モノクローナル抗体の製造

<3-1>パンニング (Panning) 過程

実施例1で得た精製されたVEGF抗原50  $\mu\text{g}$ をImmunosorbチューブ (Nunc 470319) に4 mlのコーティング緩衝溶液 [ $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (sigma、S7795) 1.59 g、 $\text{NaHCO}_3$  (sigma、S8875) 2.93 g、 $\text{NaN}_3$  (sigma、S2002)、0.2 g] で4 で16時間程度ローテーターでコーティングした後、室温で2時間PBSに溶解してスキムミルク [(BD、232100) - 4% in 1XPBS] を使用してイムノチューブ位置で遮断した。免疫チューブに実施例2で製造したライブラリファージ2 mlを添加して室温で2時間反応させ、PBST (0.05%) で5回、PBSで2回洗浄した。洗浄後、特異的に結合したscFv-ファージだけ100 mM TEA (Sigma T-0886) に溶離して、溶出したファージを大腸菌 (XL1-Blue, stratagene、200249) に感染させて増幅した。最初のパンニングで増幅されたファージをPBST洗浄回数のみ増やして (2次: 13回、3次: 23回) 同一な方法で2次及び3次パンニングを行なった。

#### 【0119】

その結果、表1に示したように、2次から抗原に対するファージのコロニー力価が1000倍以上増幅されることを確認した。

#### 【0120】

##### 【表1】

標的抗原	パンニング回数	初期ファージ数	結合したファージ数
VEGF	1 <sup>st</sup>	$4.2 \times 10^{13}$	$6.0 \times 10^5$
	2 <sup>nd</sup>	$2.6 \times 10^{13}$	$1.3 \times 10^8$
	3 <sup>rd</sup>	$1.4 \times 10^{13}$	$1.9 \times 10^8$

#### 【0121】

<3-2>ファージELISAによるファージ抗体探索

<3-2-1>パンニング結果確認

1次から3次までパンニングして氷らせておいた細胞貯蔵品を5 mlの2×YTCMK、2% グルコース、5 mM  $\text{MgCl}_2$  培地に $OD_{600} = 0.1$  になるように入れた後、37 で2～3時間 ( $OD_{600} = 0.5 \sim 0.7$ ) 培養した。以後、M1ヘルパーファージを感染させて2×YTCMK、5 mM  $\text{MgCl}_2$ 、1 mM IPTG培地に30 で16時間培養した。ここで、VEGFと関係ない発生過程に関連あるWW45抗原に特異的に結合する、本発明の実施例どおりつくられた単一ファージ抗体 (#39) を対照群に使用した。培養細胞を遠心分離した後 (4500 rpm、15分、4 ) 上澄み液 (1次～3次パンニング poly scFv-ファージ) を新しいチューブに移した。96ウェル免疫プレート (NUNC 439454) にVEGF抗原をウェル当り100 ngずつ4 で16時間程度コーティング緩衝溶液で処理してコーティングした後、PBSに溶解したスキムミルク (4%) を使用して各ウェルを遮断した。ウェルごとにPBS-ツイーン20 (0.05%) 0.2 mlで洗った後、1次～3次パンニング poly scFv-ファージを各ウェルに100  $\mu\text{l}$  ずつ入れて常温で2時間反応させた。再び、ウェル

10

20

30

40

50

ごとにPBS - ツイーン20 (0.05%) 0.2 mlを使用して、4回洗浄した後、二次抗体である抗-M13-HRP (Amersham 27-9421-01)を1:2000に希釈して室温で1時間反応させた。PBS - ツイーン20 (0.05%) 0.2 mlで洗浄した後、OPD精製 (Sigma p 8787-TAB)をPC緩衝溶液 [ $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$  (sigma, C0706) 5.1 g、 $Na_2HPO_4$  (sigma, S7907) 7.3 g]に溶解した基質溶液を作ってウェル当たり100  $\mu$ lずつ入れて10分間発色させた後、490 nmで吸光度を分光光度計 (Molecular Device, 米国)で測定した。

#### 【0122】

その結果、図5に示したように、VEGF抗原に対する結合能が2次ポリクローナル s c F v - フェージプールから増強して、2次に結合能が飽和状態に至り、タグされたHisに対する値は、相対的に低かった。

10

#### 【0123】

<3-2-2>モノクローナル抗体選別

前記結合能が大きいポリクローナルフェージ抗体群 (3次パンニング)で得たコロニーを2 x YTCM、2%グルコース、5 mM  $MgCl_2$  培地1 mlを含んだ96ディープウェルプレート (バイオニア90030)で、37 °Cで16時間培養した。培養した細胞のOD<sub>600</sub>値が0.1になるように100~200  $\mu$ lを取って1 mlの2 x YTCM、2%グルコース、5 mM  $MgCl_2$  培地に希釈した後、96ディープウェルプレートで37 °CでOD<sub>600</sub>値が0.5~0.7になるように2~3時間培養した。M1ヘルパーフェージをMOI値が1:20になるように感染させた後、2 x YTCMK、5 mM  $MgCl_2$ 、1 mM IPTG培地に30 °Cで16時間培養した。培養した細胞を遠心分離 (4500 rpm、15分、4 °C)した後、上澄み液を取って4%PEG6000と3%NaClを添加してよく溶解した後、氷で1時間反応させた。再び遠心分離 (8000 rpm、20分、4 °C)した後、ペレットにPBSを添加して溶解した後、遠心分離 (12000 rpm、10分、4 °C)して上澄み液を取って新しいチューブに移して、3次パンニングして得たモノクローナル s c F v フェージを4 °Cで保管した。

20

#### 【0124】

以後、96ウェル免疫プレートにVEGF抗原をウェル当たり100 ngずつ入れて、4 °Cで16時間コーティングした後、PBSに溶解したスキムミルク (4%)を使用して各ウェルを遮断した。ウェルごとにPBS - ツイーン20 (0.05%) 0.2 mlを使用して洗浄した後、3次パンニングして得たモノクローナル s c F v フェージを各ウェルに100  $\mu$ lずつ入れて常温で2時間反応させた。再び、ウェルごとにPBS - ツイーン20 (0.05%) 0.2 mlを使用して4回洗った後、二次抗体である抗-M13-HRPを1/2000に希釈して室温で1時間反応させた。PBS - ツイーン20 (0.05%) 0.2 mlで洗浄した後、発色させて吸光度490 nmで測定した。

30

#### 【0125】

その結果、抗原VEGFに対する結合能が、1.5以上の50個のモノクローナルフェージ (表2で強調したもの)を選別した。

#### 【0126】

40

【表 2】

VEGF値 ≥ 15	VEGF	抗-myc	His		VEGF	抗-myc	His		VEGF	抗-myc	His
A1	0.452	0.624	0.080	A5	1.991	1.142	0.076	A9	0.954	0.121	0.058
B1	1.561	0.692	0.055	B5	1.451	1.054	0.067	B9	1.696	0.987	0.064
C1	0.237	0.148	0.047	C5	1.927	1.134	0.091	C9	1.640	1.171	0.074
D1	1.372	0.393	0.068	D5	0.628	1.117	0.082	D9	2.091	0.771	0.065
E1	1.594	0.484	0.049	E5	0.042	0.045	0.059	E9	2.162	0.705	0.066
F1	1.494	0.962	0.049	F5	1.759	0.983	0.113	F9	2.077	1.525	0.096
G1	1.909	1.088	0.065	G5	0.507	0.336	0.137	G9	1.852	1.091	0.089
H1	0.832	0.596	0.052	H5	1.312	1.160	0.069	H9	1.550	0.829	0.156
A2	1.663	0.313	0.058	A6	1.095	1.202	0.083	A10	1.811	1.110	0.061
B2	1.504	0.845	0.062	B6	1.140	1.143	0.061	B10	0.553	0.335	0.062
C2	1.153	0.953	0.051	C6	0.291	0.118	0.074	C10	1.676	1.005	0.063
D2	1.117	0.832	0.056	D6	1.344	0.807	0.075	D10	1.711	0.849	0.055
E2	1.825	0.566	0.068	E6	1.454	1.215	0.083	E10	1.661	1.401	0.084
F2	1.517	0.778	0.064	F6	2.003	0.637	0.063	F10	1.711	0.882	0.071
G2	0.724	0.167	0.085	G6	1.763	0.975	0.050	G10	1.721	0.661	0.060
H2	1.213	0.928	0.049	H6	1.710	0.778	0.063	H10	1.719	1.152	0.072
A3	0.581	0.134	0.056	A7	1.910	1.124	0.056	A11	1.265	1.512	0.068
B3	1.509	0.915	0.066	B7	0.180	0.278	0.059	B11	0.440	0.099	0.062
C3	1.399	1.070	0.072	C7	0.406	0.234	0.054	C11	1.719	1.484	0.069
D3	1.607	0.844	0.062	D7	1.999	0.684	0.063	D11	0.047	0.032	0.049
E3	1.602	1.040	0.078	E7	2.000	0.750	0.066	E11	0.429	0.138	0.052
F3	1.332	0.911	0.062	F7	0.205	1.457	0.343	F11	1.393	1.142	0.058
G3	1.877	0.950	0.071	G7	1.417	1.198	0.086	G11	2.045	1.207	0.100
H3	1.765	0.830	0.058	H7	1.780	1.420	0.185	H11	0.534	0.483	0.072
A4	1.699	0.904	0.055	A8	0.992	1.008	0.066	A12	0.049	0.184	0.063
B4	0.345	0.051	0.054	B8	1.472	1.201	0.092	B12	1.686	1.268	0.073
C4	1.418	0.969	0.061	C8	1.588	0.862	0.061	C12	1.688	1.590	0.084
D4	0.725	0.910	0.066	D8	1.233	0.962	0.087	D12	1.849	0.853	0.054
E4	1.307	0.959	0.054	E8	1.650	1.314	0.065	E12	2.139	1.012	0.064
F4	1.153	0.915	0.061	F8	1.452	1.039	0.072	F12	2.109	0.858	0.048
G4	1.270	0.844	0.060	G8	1.433	1.264	0.089	G12	2.142	1.752	0.104
H4	1.468	0.523	0.063	H8	1.488	0.620	0.064	H12	2.165	1.319	0.107

10

20

## 【0127】

&lt; 3 - 3 &gt; モノクローナルファージ分類及び検査

30

&lt; 3 - 3 - 1 &gt; フィンガープリンティングによる検証

1次選別されたモノクローナル50個のモノクローナル細胞1μlとTaq-DNAポリメラーゼ(ゼンダックス5U/μl)0.2μl、50p/μlの正方向プライマー(PE1B5、配列番号125:5'-CTAGATAACGAGGGCAAATCATG-3')及び逆方向プライマー(c1a3、配列番号126:5'-CGTCACCAATGAAACCATC-3')0.2μl、10×緩衝溶液3μl、10mM dNTP mix 0.6μl、蒸留水24.8μlを混合して、コロニーPCR(iCycler iQ、BIO-RAD)を行なった。PCRプログラムの条件を、下記表3に示す。

## 【0128】

【表 3】

40

温度	時間	サイクル
95℃	5分	30サイクル
95℃	30秒	
56℃	30秒	
72℃	1分	
72℃	10分	
4℃		

## 【0129】

前記コロニーPCR産物は、1%アガロースゲル(Seakem LE, CAMERES 50004)で確認し、BstNI(Roche 11288075001, 10U/

50

$\mu\text{l}$ ) 0.2  $\mu\text{l}$  を加えて、37 で2~3時間反応させた。反応条件は、下記の表4のとおりである。前記切断した産物を8% DNA ポリアクリルアミドゲルで確認した。

【0130】

【表4】

10×バッファー	3 $\mu\text{l}$
コロニーPCR産物	10 $\mu\text{l}$
BstNI (10U/ $\mu\text{l}$ )	0.2 $\mu\text{l}$
蒸留水	16.8 $\mu\text{l}$

【0131】

10

前記コロニーPCR産物は、1%アガロースゲル (Seakem LE, CAMERESS 50004) で確認し、BstNI (Roche 11288075001, 10U/ $\mu\text{l}$ ) 0.2  $\mu\text{l}$  を取って、37 で2~3時間反応させた。反応条件は、下記の表5のとおりである。前記切断した産物を8% DNA ポリアクリルアミドゲルで確認した。

【0132】

その結果、図6に示したように、BstNIによって切られたモノクローナルファージ抗体の断片に対して多様性が確認された。

【0133】

<3-3-2> 塩基配列分析による検証

前記50種のモノクローナルファージを2×YTCM、2%グルコース、5mM MgCl<sub>2</sub> 培地 (5ml) に37 で16時間培養した。培養したモノクローンからDNA精製キット (Nuclogen 5112) を使用してDNAを得た後、配列番号125のpelB5プライマーを使用した配列分析を依頼した (ソルジェント、韓国)。

20

【0134】

その結果、表5、図7及び図8に示されたように、選別された抗体のV<sub>H</sub>とV<sub>L</sub>のCDR領域を確認した。

【0135】

これら抗体と生殖細胞系抗体群の類似性をNCBIのIgBLASTプログラム (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>) を使用して調査した結果、14種のVEGFに特異的なファージ抗体を得て、それを下記表6に整理して提示した。特に、重鎖の場合、ヒト生殖細胞系配列と89.9%から約96%までの相同性を示し、軽鎖の場合は89.2%から約97%の相同性を示した。また、それぞれのヒト抗体の重鎖及び軽鎖のCDR3で使用されているポリペプチドを分析して、互いに配列が異なることを確認した。

30

【0136】

【表5 - 1】

グループ	クローン名	重鎖			軽鎖		
		CDR 1	CDR 2	CDR 3	CDR 1	CDR 2	CDR 3
1	A 4	DYAMH配列番号5	FINEDGGNIYYGDSVKG配列番号18	EPSGSLTFDY配列番号31	RASQTISSYLN配列番号57	AASRLQS配列番号70	QQSYS TPYT配列番号83
2	B 12	SYAIS配列番号6	GIIPIFGTANYAQQKFAQG配列番号19	DRSGYTAMDY配列番号32	RASQGISSYLA配列番号58	AASLQS配列番号71	QQGHT TPYT配列番号84
3	C 11	SDAIS配列番号7	GVIPIFATTTYAQQGFAQG配列番号20	GQMDRGGGLDP配列番号33	RASQGIIGNYLN配列番号59	AASLQR配列番号72	QQSYT TPYS配列番号85
4	C 12	SYGMN配列番号8	SISSSSSSSIHYADSVKG配列番号21	LGPYDAFDF配列番号34	PGGTSNIDSKYVH配列番号60	RNDQRPS配列番号73	QSYDT SLSAPYV配列番号86
5	C 5	SYSMH配列番号9	GISYDGGSSKQFGDSVKG配列番号22	DGVPGHSYGIGMDV配列番号35	RASQGISSWLA配列番号61	AASILQT配列番号74	QQANS FPYT配列番号87
6	C 9	SYAMH配列番号10	VISYDGSNKYYADSVKG配列番号23	DVDSSWSQGWFPH配列番号36	RASQTISTFVN配列番号62	SASLQS配列番号75	QQNYS TPLT配列番号88
7	D 12	EYAMH配列番号11	LISGDDYNTFYADSVKG配列番号24	DAGPAGGGGLDH配列番号37	RTSQTI TNFLN配列番号63	GASLQS配列番号76	QQSHG TPYT配列番号89
8	E 9	TSGVAVG配列番号12	LIYWDNDKRYSPSLKN配列番号25	GDGWL FDF配列番号38	TGSNSNIGAGHDVH配列番号64	GNTNRAS配列番号77	QSYDN SLSGYV配列番号90
9	F 2	SYAMS配列番号13	YISSSGHDIIYADPVKG配列番号26	DKLATPGAFDI配列番号39	RASQSI SNWLA配列番号65	EASLES配列番号78	QQSHG TPYT配列番号89
10	F 6	TSGVAVG配列番号12	LIYWDNDKRYSPSLKN配列番号25	GDGWL FDF配列番号38	TGSNSNIGAGHDVH配列番号64	GNTNRAS配列番号77	QSYDN SLSGYV配列番号90
11	F 9	TTAIT配列番号14	WITPFNGNTFYAQQKFAQD配列番号27	SQAALGTGAFDI配列番号40	SGSYSNIGTNYVY配列番号66	KNTQRPS配列番号79	SAWDDL SLSAVL配列番号91
12	G 12	NYAIS配列番号15	RIPIIYGTPTYAQQKFRD配列番号28	ERSFWNWFAP配列番号41	TGSSSNIGAGYDVH配列番号67	GNNNRPS配列番号80	QSYDS RLGVV配列番号92

10

20

30

40

【表5 - 2】

13	G9	TYA LH配 列番号 16	VISHDG TTDYR DSVKG配 列番号29	DGSGY FFDY配 列番号42	TGSSS DVGGY NYVS配 列番号68	DVTK RPS配 列番号8 1	SSYS STFYV 配列番号9 3
14	H7	KYG MH配 列番号 17	FIWFDG SNKFYA DSVKG配 列番号30	DRDYY GSGPL DY配列番 号43	RASQR IATYL H配列番号 69	AASS LQS配 列番号8 2	QSYS TPYT配 列番号83

【0137】

10

【表6】

クローン名	VH	相同性	VL	相同性	VH(CDR-3)配列	VL(CDR-3)配列	VEGF	抗VEGF	IC50	比率	グループ
A4	VH3-43	93.2(272/292)	O12	97.2(276/284)	EPSSGLTFDY	QGSYSTPYT	1699	0.904	0.055	1.880	1
B12	VH1-69	99.3(294/296)	O12	93.3(265/284)	DRSGYTAMDY	QQGHTTPYT	1686	1.288	0.073	1.309	2
C11	VH1-69	90.8(268/295)	O12	93.3(265/284)	GQMDRGGGLDP	QGSYTPYS	1719	1.484	0.069	1.159	3
C12	VH3-21	95.6(280/293)	V1-17	87.4(250/286)	LGPYDAFDF	QSYDTSLSAPYV	1688	1.390	0.084	1.214	4
C5	VH3-30	94.3(279/296)	L6	97.5(277/284)	DGVPGHYSYGIMDV	QQANSFPYT	1927	1.134	0.091	1.700	5
C9	VH3-30	96.6(286/296)	O2	93.4(267/286)	DVDSWSQGWFFH	QQNYSTPLT	1640	1.171	0.074	1.400	6
D12	VH3-43	91.8(269/293)	O12	94.0(267/284)	DAGPAGGGGLDH	QGSHTPYT	1849	0.833	0.054	2.221	7
D9	VH2-5	94.3(280/297)	V1-13	93.2(272/292)	GDGWLFDF	QSYDNSLSGYV	2091	0.771	0.065	2.712	8
E2	VH2-5	94.3(280/297)	V1-13	93.2(272/292)	GDGWLFDF	QSYDNSLSGYV	1825	0.566	0.068	3.226	8
E7	VH2-5	94.3(280/297)	V1-13	93.2(272/292)	GDGWLFDF	QSYDNSLSGYV	2000	0.750	0.066	2.668	8
E9	VH2-5	94.3(280/297)	V1-13	93.2(272/292)	GDGWLFDF	QSYDNSLSGYV	2152	0.705	0.066	3.069	8
F2	VH3-11	89.9(266/296)	L12a	94.1(254/270)	DKLATPGAFDI	QGSHTPYT	1517	0.778	0.064	1.949	9
F6	VH2-5	94.3(280/297)	V1-13	93.2(272/292)	GDGWLFDF	QSYDNSLSGYV	2003	0.637	0.063	3.143	10
F9	VH1-45	90.5(268/296)	V1-17	89.2(255/286)	SOAAELGTGAFDI	SAWDDLSAVL	2077	1.525	0.096	1.362	11
G12	VH1-69	94.3(279/296)	V1-13	96.5(279/289)	ERSFWNWFAP	QSYDSRLGWV	2142	1.752	0.104	1.222	12
G9	VH3-33	91.6(271/296)	V1-4	94.3(264/280)	DGSGYFFDY	SSYSSTFYV	1852	1.091	0.089	1.698	13
H7	VH3-33	94.3(278/292)	O12	97.5(278/285)	DRDYGSGPLDY	QGSYSTPYT	1780	1.420	0.185	1.253	14

20

30

【0138】

<実施例4> VEGFに対するヒト抗体の特性分析

<4-1> 結合能測定

VEGFに対する実施例3で選別された14種のモノクローナルファージ抗体の結合能を測定するため、実施例3-2の方法で結合能をそれぞれ測定した。

【0139】

40

その結果、図9a及び図9bに示したように、前記14種のモノクローナルファージ抗体の結合能順位は、G12>D12>E9>F6>H7>C5>B12>G9>F9>C11>F2>A4>C9>C12だった。

【0140】

<4-2> 全長IgG変換分析

VEGFに対するモノクローナルファージ抗体をファージでIgG全長ベクターに転換するために、重鎖はモノクローナルDNA 1µlと10pmole/µl表7の重鎖正方向プライマーと重鎖逆方向プライマー、10×バッファー5µl、10mM dNTP mix 1µl、pfu DNA重合酵素(ソルジェント、2.5U/µl)0.5µl、蒸留水を混合してコロニーPCR(iCycler iQ、BIO-RAD)を行なっ

50

た。また、軽鎖も表7の軽鎖正方向及び逆方向プライマーを使用して同一な方法でコロニーPCRを行なった。

【0141】

【表7-1】

クローン名	重鎖		逆方向プライマー (NheI)		軽鎖		逆方向プライマー (BglII)	
	正方向プライマー (SfiI)				正方向プライマー (SfiI)			
A4	NA TV H7 -1 配列 番号 10 7	TTGGTGG CCACAGC GGCCGAT GTCCACT CGCAGAT GCAGCTG GTGGAGT C	N A T J H - A L L L 配列 番号 1 1 4	GA GG AG GC TA GC TG AG GA GA CG GT GA	NA TV K1 -1 配列 番号 1 1 5	TTGGTGGC CACAGCGG CCGATGTC CACTCGGA CATCCAGA TGACCCAG TC	NA TJ K- R7 配列 番号 1 1 9	GAGGAG AGATCT TTTGAT ATCCAC CTTGGT
C5	NA TV H3 -1 配列 番号 10 8	TTGGTGG CCACAGC GGCCGAT GTCCACT CGCAGGT GCAGCTG GTGGAGT C					NA TJ K- R1 配列 番号 1 2 0	GAGGAG AGATCT TTTTGA TCTCTA CCTTGG T
C11	NA TV H1 -2 配列 番号 10 9	TTGGTGG CCACAGC GGCCGAT GTCCACT CGCAGAT GCAGCTG GTGCAGT C					NA TJ K- R2 配列 番号 1 2 1	GAGGAG AGATCT TTTTGA TCTCCA CTTTGG T
C12	NA TV H7 -1 配列 番号 10 7	TTGGTGG CCACAGC GGCCGAT GTCCACT CGCAGAT GCAGCTG GTGGAGT C			NA TV L1 0 配列 番号 1 1 6	TTGGTGGC CACAGCGG CCGATGTC CACTCGCA GCTCGTGC TGACTCAG CC	NA TJ L1 -R 配列 番号 1 2 2	GAGGAG AGATCT TTAGGA CGGTGA CCTTGG TCCC
E9	NA TV H2 -1 配列 番号 11 0	TTGGTGG CCACAGC GGCCGAT GTCCACT CGCAGGT CACCTTG AAGGAGT C			NA TV L2 配列 番号 1 1 7	TTGGTGGC CACAGCGG CCGATGTC CACTCGCA GCCGTGTC TGACTCAG CC		
F2	NA TV H3 -2 配列 番号 11 1	TTGGTGG CCACAGC GGCCGAT GTCCACT CGCAGGT GCAGCTG GTGGAGT C			NA TV K1 -1 配列 番号 1 1 5	TTGGTGGC CACAGCGG CCGATGTC CACTCGGA CATCCAGA TGACCCAG TC	NA TJ K- R5 配列 番号 1 2 3	GAGGAG AGATCT TTTTGA TTTCCA GCTTGG T

10

20

30

40

【表 7 - 2】

F 6	NA TV H2 -1 配列 番号 11 0	TTGGTGG CCACAGC GGCCGAT GTCCACT CGCAGGT CACCTTG AAGGAGT C			NA TV L2 配列 番号 11 7	TTGGTGGC CACAGCGG CCGATGTC CACTCGCA GCCTGTGC TGACTCAG CC	NA TJ L1 -R 配列 番号 12 2	GAGGAG AGATCT TTAGGA CGGTGA CCTTGG TCCC
	G 9	NA TV H3 -2 配列 番号 11 1			TTGGTGG CCACAGC GGCCGAT GTCCACT CGCAGGT GCAGCTG GTGGAGT C	NA TV L9 配列 番号 11 8		
G 12	NA TV H1 -1 配列 番号 11 2	TTGGTGG CCACAGC GGCCGAT GTCCACT CGCAGGT GCAGCTG GTGCAGT C	NA TJ H- ALL 配列 番号 114	GA GG AG GC TA GC TG AG GA CG GT GA	NA TV L2 配列 番号 11 7	TTGGTGGC CACAGCGG CCGATGTC CACTCGCA GCCTGTGC TGACTCAG CC	NA TJ L2 -R 配列 番号 12 4	GAGGAG AGATCT TTAGGA CGGTCA GCTTGG TCCC
H 7	NA TV H7 -2 配列 番号 11 3	TTGGTGG CCACAGC GGCCGAT GTCCACT CGCAGAT GCAGCTG GTAAAGT C			NA TV K1 -1 配列 番号 11 5	TTGGTGGC CACAGCGG CCGATGTC CACTCGGA CATCCAGA TGACCCAG TC	NA TJ K- R1 配列 番号 12 0	GAGGAG AGATCT TTTTGA TCTCTA CCTTGG T
D 12	NA TV H7 -1 配列 番号 10 7	TTGGTGG CCACAGC GGCCGAT GTCCACT CGCAGAT GCAGCTG GTGGAGT C			NA TJ K- R5 配列 番号 12 3	GAGGAG AGATCT TTTTGA TTTCCA GCTTGG T		
C 9	NA TV H7 -3 配列 番号 12 8	TTGGTGG CCACAGC GGCCGAT GTCCACT CGCAGGT GCAGCTG GTAAAGT C			NA TJ K- R3 配列 番号 12 9	GAGGAG AGATCT TTTGAT CTCCAG TCGTGT		

10

20

30

40

【表 7 - 3】

F 9					NA TV L1 0 配列 番号 11 6	TTGGTGGC CACAGCGG CCGATGTC CACTCGCA GCTCGTGC TGACTCAG CC	NA TJ L2 -R 配列 番号 12 4	GAGGAG AGATCT TAGGAC GGTCAG CTTGGT CCC
	B 1 2	NA TV H1 -1 配列 番号 11 2	TTGGTGG CCACAGC GGCCGAT GTCCACT CGCAGGT GCAGCTG GTGCAGT C		NA TV K1 -1 配列 番号 11 5	TTGGTGGC CACAGCGG CCGATGTC CACTCGGA CATCCAGA TGACCAG TC	NA TJ K- R5 配列 番号 12 3	GAGGAG AGATCT TTTGAT TTCCAG CTTGGT

10

## 【0142】

PCRの結果得られた重鎖遺伝子をDNAゲル抽出キット(Qiagen)で精製した後、pNATAB Hベクター(図12a) 1 $\mu$ l (10ng)、重鎖(100~200ng) 15 $\mu$ l、10 $\times$ バッファファー2 $\mu$ l、リガーゼ(1U/ $\mu$ l) 1 $\mu$ l、蒸留水を混合して室温で1~2時間放置して前記ベクターと連結した。前記ベクターを形質転換用細胞(XL1-blue)とともに氷に30分放置した後、42 $^{\circ}$ Cで90秒間熱衝撃を与えて形質導入した。再び氷に5分間放置した後、LB培地1mlを注入して1時間37 $^{\circ}$ Cで培養した。LB Amp固体培地に塗抹した後、37 $^{\circ}$ Cで16時間培養した。単一コロニーをLB Amp液体培地5mlに接種して、37 $^{\circ}$ Cで16時間培養した。前記培養液からDNA-prep.キット(Nucleogen)を使用してDNAを抽出した。

20

## 【0143】

また、軽鎖は、pNATAB Lベクター(図12b)を使用して前記と同じ方法でDNAを抽出した。

## 【0144】

前記得られたDNAのCMV-proFプライマー(配列番号127: AAA TGG GCG GTA GGC GTG)を使用した塩基配列分析を依頼した(ソルジェント)。

30

## 【0145】

その結果、全長IgGに転換したVEGFに対する14個のクローンファージの重鎖と軽鎖の配列が、ファージ抗体の配列と一致することを確認した。

## 【0146】

<4-3>全長IgGの検証

293E細胞(Invitrogen)に、PEI40 $\mu$ gと全長形態抗体重鎖DNA10 $\mu$ g、軽鎖DNA10 $\mu$ gを入れて、共同形質感染をして得られた上澄み液をウエスタンブロットで確認した。対照群には、正常ヒトIgG(Jackson Lab)を使用した。

40

## 【0147】

その結果、対照群と比較して成功的に全長IgG形態に転換されたことを確認した。

## 【0148】

<4-4>管形成抑制分析を通じた抗-VEGF抗体の中和能確認

約80%コンフルエンス状態のヒト臍帯静脈内皮細胞であるHUEC細胞(C2517A:Lonza)の単一細胞層を1%FBSを添加したEBM-2(CC3156、Cambrex)培地に交替して37 $^{\circ}$ C/5%CO<sub>2</sub>培養器で4時間栄養飢餓状態にした。以後、細胞をトリプシンで集めて3 $\times$ 10<sup>5</sup>/mlで栄養飢餓培地に懸濁した。細胞懸濁液100 $\mu$ lと精製された本発明のヒトVEGFAb溶液150 $\mu$ l(VEGF Abは

50

栄養飢餓培地に希釈して4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で処理)、陰性対照群に正常ヒトIgGを4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で処理または陽性対照群にアバスチン(Genentech)を4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で処理して37 で一時間事前インキュベーションした。事前インキュベーションをする途中に24ウェルプレートに氷で冷やしたマトリゲル(354230:BD Bio-science, 米国)を200  $\mu\text{l}$ ずつ入れて37 / 5%CO<sub>2</sub>培養器で30分間ホモゲナイジングした。反応が終わった細胞とAbの混合物に組換えヒトVEGFを20 ng/mlの濃度で添加した後、マトリゲル上に入れて、37 / 5%CO<sub>2</sub>で培養した。16時間培養した後、管形成を測定するために3.7%パラホルムアルデヒド500  $\mu\text{l}$ を入れて30分間室温で固定した。次に、0.01%クリスタルバイオレット/100 mM NaBorate 500  $\mu\text{l}$ で30分間染色し、乾燥させて100倍率の顕微鏡で管の形成程度を観察した。

10

## 【0149】

その結果、図10に示したように、精製されたVEGF Abは、陽性対照群より明らかな管形成抑制を示した。

## 【0150】

E9、F6、G12及びC5の4種類の抗体の中で、C5を除く3種類の抗体はすべて、VEGFによって誘導されるHUVEC細胞の毛細管類似管形成を顕著に抑制することが観察され、これにより、本発明のVEGFに対するヒト抗体の中和能を確認できた。

## 【0151】

<4-5>抗-VEGF抗体のマウスでの交差反応確認

20

また、各抗体がヒトVEGFだけでなくマウスVEGFに対して交差反応するかどうかを調べるため、ELISAを行なった。

## 【0152】

二つの96ウェル免疫プレートに、組換えヒトVEGF(293-VE, R&D systems, 米国)と組換えマウスVEGF(493-MV, R&D systems, 米国)タンパク質をウェル当り50 ngずつ4 で16時間程度コーティング緩衝溶液でコーティングした後、PBSに溶解したスキムミルク(4%)を使用して各ウェルを遮断した。ウェルごとにPBS-ツイーン20(0.05%)0.2 mlを加えて洗った後、アバスチンを対照群にしてE9、F6及びG12モノクローナル抗体を333 nMから1 / 3ずつ順次に希釈して二つの抗原がコーティングされたプレート各々のウェルに同時に100  $\mu\text{l}$ ずつ入れて常温で2時間反応させた。再びウェルごとに、PBS-ツイーン20(0.05%)0.2 mlを加えて4回洗った後、二次抗体である抗-ヒトFc-HRPを1:3000に希釈して室温で30分間反応させた。PBS-ツイーン20(0.05%)0.2 mlで洗った後にOPD錠をPC緩衝溶液に入れて基質溶液を作り、ウェル当り100  $\mu\text{l}$ ずつ入れて5分間発色させた後、吸光度490 nmで分光光度計で測定した。

30

## 【0153】

ELISA結果は、Graphpad prism ver.4 software(CA 92037:Graphpad Software Inc., 米国)を使用して分析した。

40

## 【0154】

その結果、図10でアバスチンと似た中和能を示したE9、F6及びG12モノクローナル抗体はすべて、マウスVEGFに対してヒトVEGF程度の高い親和力を示さして交差反応した(表8、表9及び図11)。また、最大の中和能を示したF6抗体は、一貫性をもってアバスチンより約2倍も低いK<sub>D</sub>値を示した。このことから、本発明のVEGF中和ヒト抗体が既存の抗癌剤であるアバスチンとエピトープの異なる確率が確実に高くなった。

## 【0155】

【表 8】

Ag	Ab	E9 (R <sup>2</sup> )	F6 (R <sup>2</sup> )	G12 (R <sup>2</sup> )	アバスタチン (R <sup>2</sup> )
mVEGF		6.5×10 <sup>-11</sup> (0.99)	3.4×10 <sup>-11</sup> (0.98)	2.6×10 <sup>-10</sup> (0.99)	N.D
hVEGF		5.1×10 <sup>-11</sup> (0.99)	2.8×10 <sup>-11</sup> (0.97)	2.4×10 <sup>-10</sup> (0.99)	5.9×10 <sup>-11</sup> (0.87)

【 0 1 5 6 】

【表 9】

Ag	Ab	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.20	0.10	0.049	0.024
mVEGF	E9	2.4569	2.2777	2.3099	2.0685	2.3331	2.2543	2.2338	2.0163	1.7289	1.4132	0.9682	0.6036
	F6	2.3555	2.3232	2.3049	2.3041	2.1922	2.1811	2.1585	2.1425	2.1341	1.7251	1.3023	0.8829
	G12	2.4617	2.302	2.2623	2.168	2.1757	2.0375	1.7438	1.3811	0.9585	0.721	0.3959	0.2159
	アバスタチン	0.6949	0.1074	0.1041	0.0424	0.0489	0.0455	0.0438	0.0569	0.0433	0.147	0.0687	0.0467 Nor huIgG (50nM)
hVEGF	E9	2.5106	2.4446	2.4182	2.3279	2.4466	2.3016	2.1899	2.0938	1.9197	1.7033	1.1523	0.6822
	F6	2.5407	2.3745	2.3649	2.3101	2.2942	2.2765	2.2617	2.1795	2.1829	1.8819	1.5032	0.9789
	G12	2.5305	2.4915	2.2875	2.251	2.0766	1.9873	1.8751	1.4892	0.9924	0.7689	0.4748	0.226
	アバスタチン	2.5166	2.4828	2.4441	2.4332	2.4087	2.3666	2.1938	2.187	2.0882	1.7951	1.3536	0.052 Nor huIgG (50nM)

【 0 1 5 7 】

<実施例 5> V E G F F 6 及び G 1 2 モノクローナル抗体の L C シャフリング遂行

< 5 - 1 > L C シャフリングライブラリの製造

実施例 3 で得た、モノクローナル F 6 と G 1 2 の s c F v - フェージで重鎖部分を S f i I を 5 0 で処理して 2 時間ごとに S f i I を追加して 3 回繰り返した後、ゲル溶離した。また、ライブラリプラスミドである p Y G 1 0 0 を S f i I で 5 0 で 4 時間処理した後、もう一度処理して一晩中制限して、ゲル溶離した。前記切られたモノクローナル F 6 と G 1 2 の重鎖断片とベクターの濃度を測定した後、ベクター：重鎖断片 = 1 : 5 のモル濃度で全体 1 μ g / 1 0 0 μ l に合わせて、1 0 ユニットリガーゼで 2 ~ 4 時間程度室温で連結させた。連結された産物をエチルアルコールで濃縮した後、蒸留水に溶解した連結された産物 2 0 μ l を X L 1 - B L U E 細胞 1 × 1 0 <sup>9</sup> 個 / 1 0 0 μ l に電気穿孔法で形質導入した。3 7 で一晩中培養した後、1 5 % グリセロール 2 X Y T 5 0 0 μ l に入れて - 7 0 で保管し、力価測定の結果、2 . 1 × 1 0 <sup>6</sup> 多様性が示された。

【 0 1 5 8 】

< 5 - 2 > L C シャフリングライブラリフェージの製造

実施例 5 - 1 で製造した、多様性を有したヒト由来 V E G F F 6 & G 1 2 L C シャフリング s c F v ライブラリ細胞 2 . 1 × 1 0 <sup>6</sup> を対象に、実施例 2 と同一な方法でライブラリフェージを製造した。

【 0 1 5 9 】

< 5 - 3 > L C シャフリングモノクローナル抗体の製造

実施例 1 で得た精製された V E G F 抗原 5 0 μ g と実施例 5 - 2 で製造したライブラリ

ファージ 2 m l を使用して、実施例 3 と同一な方法でファージパンニング、パンニング結果の確認、モノクローナル抗体選別及びモノクローナルファージ分類及び検査を行なった。

【 0 1 6 0 】

パンニング結果、表 1 0 に示したように、1 次から力価が高く示され、2 次で抗原に対するファージのコロニー力価が、5 倍以上増幅することを確認した。

【 0 1 6 1 】

【表 1 0】

標的抗原	パンニング回数	初期ファージ数	結合したファージ数
V E G F	1 <sup>st</sup>	2 . 0 × 1 0 <sup>13</sup>	2 . 2 × 1 0 <sup>8</sup>
	2 <sup>nd</sup>	1 . 2 × 1 0 <sup>14</sup>	4 . 6 × 1 0 <sup>9</sup>

10

【 0 1 6 2 】

また、パンニング結果を E L I S A で確認した結果、図 1 4 に示したように、V E G F 抗原に対する結合能が、L C シャフリングしたポリクローナル s c F v - ファージプール ( p o o l s ) から増強して 1 次に結合能が飽和状態に至り、テグされた H i s に対する値は、相対的に低かった。

【 0 1 6 3 】

また、モノクローナル抗体選別の結果、V E G F 抗原に対する結合能が 2 . 0 以上の 6 1 個のモノクローナルファージ ( 表 1 1 で強調したもの ) を選別した。ここで、L C シャフリングに使用した F 6 と G 1 2 を陽性対照群に使用した。

20

【 0 1 6 4 】

【表 1 1】

VEGF 値 ≥ 2	VEGF	a-Myc	His		VEGF	a-Myc	His		VEGF	a-Myc	His
F6(P)	2.1429	0.9678	0.0676	2A5	0.0887	0.3496	0.049	2A9	2.3329	0.5437	0.0404
2B1	2.0582	0.4846	0.0492	2B5	2.0985	0.3641	0.0421	2B9	0.1331	1.1312	0.0588
2C1	0.1025	0.2734	0.0691	2C5	2.0353	0.5153	0.0495	2C9	2.4079	1.8004	0.0644
2D1	2.1003	0.53	0.0457	2D5	2.3745	1.3868	0.0438	2D9	2.3357	0.5361	0.0746
2E1	2.1951	1.5993	0.0622	2E5	2.1236	0.2695	0.0435	2E9	2.4236	1.8445	0.0773
2F1	2.1038	0.5177	0.0458	2F5	1.7101	0.2912	0.044	2F9	2.4779	1.9456	0.0748
2G1	2.2817	1.5247	0.052	2G5	1.9003	0.2901	0.0469	2G9	2.1722	0.4629	0.0762
2H1	2.1367	1.5036	0.0611	2H5	1.9973	0.5086	0.0549	2H9	2.4965	0.2568	0.0758
G12(P)	2.2051	1.5689	0.0722	2A6	0.0885	0.0882	0.0584	2A10	2.3897	0.5235	0.0707
2B2	0.1809	0.9459	0.0807	2B6	0.0795	0.2852	0.0885	2B10	2.22	0.6045	0.0618
2C2	0.1299	0.9915	0.0439	2C6	1.7495	0.508	0.0526	2C10	2.1576	0.5934	0.088
2D2	2.0196	0.4016	0.0456	2D6	2.154	0.3657	0.0476	2D10	2.0469	0.3506	0.0776
2E2	2.2887	1.7453	0.0423	2E6	0.2323	0.1379	0.0415	2E10	2.2935	0.5794	0.0772
2F2	1.8987	0.1885	0.0474	2F6	0.0873	0.2748	0.0476	2F10	2.1954	1.3957	0.1092
2G2	2.1864	0.7625	0.0543	2G6	2.2531	1.4719	0.1067	2G10	2.4281	0.6977	0.0771
2H2	2.1421	1.5466	0.0615	2H6	1.9059	0.8611	0.0535	2H10	0.1533	0.7327	0.0884
2A3	0.0977	0.7916	0.0529	2A7	0.1089	0.0617	0.0497	2A11	2.3206	0.6291	0.0452
2B3	0.092	0.1313	0.0991	2B7	0.0628	0.056	0.0451	2B11	2.351	1.7903	0.0472
2C3	1.933	0.5737	0.0519	2C7	2.4357	0.3304	0.0472	2C11	2.0415	0.1523	0.0417
2D3	0.0892	0.2641	0.0513	2D7	1.0819	0.0701	0.0312	2D11	2.3062	0.5896	0.0555
2E3	2.1191	0.1907	0.0446	2E7	2.2672	0.1321	0.0545	2E11	2.5328	0.5573	0.0523
2F3	0.1427	0.0939	0.0498	2F7	2.5211	1.7065	0.0503	2F11	0.6742	0.0516	0.0472
2G3	2.0927	0.6483	0.051	2G7	2.5117	0.421	0.0471	2G11	2.2852	0.0724	0.0605
2H3	0.2129	0.6897	0.0593	2H7	2.546	0.3305	0.0695	2H11			
2A4	0.0924	0.1556	0.0462	2A8	1.7183	0.0715	0.0284	2A12	0.7908	1.9569	0.0366
2B4	0.0869	0.0832	0.0587	2B8	2.515	0.454	0.0166	2B12	0.1316	0.2801	0.0657
2C4	2.1647	0.3987	0.0908	2C8	2.5858	1.6898	0.0657	2C12	2.2555	0.9498	0.0523
2D4	0.6499	1.662	0.0458	2D8	2.4508	0.3582	0.0561	2D12	2.3707	1.8137	0.0456
2E4	2.0785	0.2826	0.0445	2E8	2.5421	1.6896	0.0735	2E12	2.3824	1.7744	0.0498
2F4	2.1739	0.4714	0.044	2F8	2.5074	1.8255	0.046	2F12	2.2861	0.667	0.0518
2G4	2.1193	0.6522	0.0462	2G8	2.5346	1.7471	0.0305	2G12	2.2646	0.7852	0.0593
2H4	1.9737	1.1456	0.0589	2H8	2.4231	0.1895	0.0863	2H12			

30

40

50

## 【 0 1 6 5 】

また、フィンガープリンティングによる検証の結果、図 1 5 に示したように、B s t N I によって切られたモノクローナルファージ抗体の断片に対して多様性が確認された。

## 【 0 1 6 6 】

同時に、塩基配列分析による検証結果、表 1 2 に示したように、選別された抗体の  $V_H$  と  $V_L$  の C D R 領域を確認した。前記選別された抗体と生殖細胞系抗体群の類似性を調査した結果、F 6 と同一な H C を有し L C のみ異なる 1 2 種の V E G F に特異的なファージ抗体を得、G 1 2 と同一な H C を有し L C のみ異なる 3 種の V E G F に特異的なファージ抗体を得た (表 1 3 )。特に、軽鎖の場合、9 0 . 1 % で約 9 4 . 4 % の相同性を示した。また、各々のヒト抗体の軽鎖の C D R 1、2、3 で使用されているポリペプチドを分

10

## 【 0 1 6 7 】

【表 1 2 - 1】

クローン名	重鎖			軽鎖		
	CDR1	CDR2	CDR3	CDR1	CDR2	CDR3
F6 (P)	TSGVAVG : SEQ ID No. 12	LIYWDNDKRY SPSLKN: SEQ ID No. 25	GDGWLDFD: SEQ ID No. 38	TGSNSNIG AGHDVH: SEQ ID No. 64	GNTNRAS: SEQ ID No. 77	QSYDNSLSGY V: SEQ ID No. 90
2A 09	TSGVAVG : SEQ ID No. 12	LIYWDNDKRY SPSLKN: SEQ ID No. 25	GDGWLDFD: SEQ ID No. 38	TGSSSNIG AG-- YDVH: SEQ ID No. 67	GNSNRPS: SEQ ID No. 143	QSYDNSLS-- -AY: SEQ ID No. 153
2B 05	TSGVAVG : SEQ ID No. 12	LIYWDNDKRY SPSLKN: SEQ ID No. 25	GDGWLDFD: SEQ ID No. 38	TGGDSNIG AG-- YDVN: SEQ ID No. 130	GDTFRPS: SEQ ID No. 144	QSYDSSLS-- -GY: SEQ ID No. 154
2C 11	TSGVAVG : SEQ ID No. 12	LIYWDNDKRY SPSLKN: SEQ ID No. 25	GDGWLDFD: SEQ ID No. 38	RSSQSLVR SDGTTYLS : SEQ ID No. 131	KISNRFS: SEQ ID No. 145	MQATFFPFT- ---: SEQ ID No. 155
2D 10	TSGVAVG : SEQ ID No. 12	LIYWDNDKRY SPSLKN: SEQ ID No. 25	GDGWLDFD: SEQ ID No. 38	TGSSSNLG AP-- NDVH: SEQ ID No. 132	GSTNRPS: SEQ ID No. 146	QSYDNSLS-- -AY: SEQ ID No. 153
2E 11	TSGVAVG : SEQ ID No. 12	LIYWDNDKRY SPSLKN: SEQ ID No. 25	GDGWLDFD: SEQ ID No. 38	TGSSSNIG AG-- YDVH: SEQ ID No. 67	GNNNRPS: SEQ ID No. 80	QSNDP SLGGL --H: SEQ ID No. 156
2F 01	TSGVAVG : SEQ ID No. 12	LIYWDNDKRY SPSLKN: SEQ ID No. 25	GDGWLDFD: SEQ ID No. 38	TGSSSNIG AP-- NDVH: SEQ ID No. 133	GNTNRPS: SEQ ID No. 147	QSYDNGLSAS --Y: SEQ ID No. 157
2G 03	TSGVAVG : SEQ ID No. 12	LIYWDNDKRY SPSLKN: SEQ ID No. 25	GDGWLDFD: SEQ ID No. 38	RSSQSLVR SDGTTYLS : SEQ ID No. 134	KISNRFS: SEQ ID No. 144	MQATFFPFT- ---: SEQ ID No. 155
2G 04	TSGVAVG : SEQ ID No. 12	LIYWDNDKRY SPSLKN: SEQ ID No. 25	GDGWLDFD: SEQ ID No. 38	TGSRSNFG AG-- HDVH: SEQ ID No. 135	GNNNRPS: SEQ ID No. 80	QSFNTLNG- --W: SEQ ID No. 158
2G 12	TSGVAVG : SEQ ID No. 12	LIYWDNDKRY SPSLKN: SEQ ID No. 25	GDGWLDFD: SEQ ID No. 38	TGSSSNIG AG-- SDVH: SEQ ID No. 136	GNNNRPS: SEQ ID No. 80	QSYDSSLSG- --Y: SEQ ID No. 154

10

20

30

40

【表 1 2 - 2】

2H 07	TSGVAVG : SEQ ID No. 12	LIYWDNDKRY SPSLKN: SEQ ID No. 25	GDGWLFDF: SEQ ID No. 38	TGSSTNIG AG-- YDVH: SEQ ID No. 137	GNSNRPS: SEQ ID No. 143	QSYDSSLG- SLY: SEQ ID No. 159
2H 08	TSGVAVG : SEQ ID No. 12	LIYWDNDKRY SPSLKN: SEQ ID No. 25	GDGWLFDF: SEQ ID No. 38	SESSSNIG AG-- FDVH: SEQ ID No. 138	GNTDRPS: SEQ ID No. 148	QSYDSSLR-- -AY: SEQ ID No. 160
2H 09	TSGVAVG : SEQ ID No. 12	LIYWDNDKRY SPSLKN: SEQ ID No. 25	GDGWLFDF: SEQ ID No. 38	RASQGIVS ----- WLA: SEQ ID No. 139	AASELQS: SEQ ID No. 149	QQLNNFLFA- ---: SEQ ID No. 161
G1 2( P)	NYAIS: SEQ ID No. 15	RIIPIYGTPT YAQKFRD: SEQ ID No. 28	ERSFNNWFAP : SEQ ID No. 41	TGSSSNIG AGYDVH: SEQ ID No. 67	GNNNRPS: SEQ ID No. 80	QSYDSRLGVV : SEQ ID No. 92
2C 05	NYAIS: SEQ ID No. 15	RIIPIYGTPT YAQKFRD: SEQ ID No. 28	ERSFNNWFAP : SEQ ID No. 41	GSSAGAVT SGHYPF: SEQ ID No. 140	DTSNRHF: SEQ ID No. 150	FVAYG-- AIW: SEQ ID No. 162
2F 09	NYAIS: SEQ ID No. 15	RIIPIYGTPT YAQKFRD: SEQ ID No. 28	ERSFNNWFAP : SEQ ID No. 41	TGSSSNLG AGYDVH: SEQ ID No. 141	GDVNRPS: SEQ ID No. 151	QSYDTSLVGS : SEQ ID No. 163
1F 10	NYAIS: SEQ ID No. 15	RIIPIYGTPT YAQKFRD: SEQ ID No. 28	ERSFNNWFAP : SEQ ID No. 41	RASQP--- ISNWL: SEQ ID No. 142	ATSILQS: SEQ ID No. 152	QQHRD-- YPL: SEQ ID No. 164

10

20

【 0 1 6 8 】

30

【表 13】

クローン名	VL	相同性	CDR1-aaseq	CDR2-aaseq	CDR3-aaseq	VEGF	a-myc	比率	グループ
F06(P)	V1-13	272/292(93.2%)	TGSSNSNIGAG--HDVH	GNTNRAS	QSYDNSLS---GY	2.1429	0.4678	4.5908	P
A09	V1-13	282/288(97.9%)	TGSSSNIGAG--YDVH	GNSNRPS	QSYDNSLS---AY	2.3329	0.5437	4.2908	1
B05	V1-13	266/292(91.1%)	TGSDSNIGAG--YDVH	GIFPRPS	QSYDSSLS---GY	2.0985	0.3641	5.7635	2
C11	A23	280/299(93.6%)	RSSQSLVRSIDGTFYLS	KLSNRPS	HQATFFFPFT----	2.0415	0.1523	13.4045	3
D10	V1-13	268/292(91.8%)	TGSSSNIGAG--NDVH	GSTNRPS	QSYDNSLS---AY	2.0469	0.3506	5.8383	4
F11	V1-13	269/291(92.4%)	TGSSSNIGAG--YDVH	GNNNRPS	QSNLPSLGGI--H	2.5328	0.5573	4.5448	5
F01	V1-13	273/289(94.5%)	TGSSSNIGAG--NDVH	GNTNRPS	QSYDNGLSAS--Y	2.1038	0.5177	4.0637	6
G03	A23	282/299(94.3%)	RSSQSLVRSIDGTFYLS	KLSNRPS	HQATFFFPFT----	2.0927	0.6483	3.2280	7
G04	V1-13	267/290(92.1%)	TGSRSNFGAG--HDVH	GNNNRPS	QSYDNPLNG---W	2.1193	0.6572	3.2247	8
G12	V1-13	283/292(96.9%)	TGSSSNIGAG--SDVH	GNNNRPS	QSYDSSLSG---Y	2.2646	0.7852	2.8841	9
H07	V1-13	277/293(94.5%)	TGSSSNIGAG--YDVH	GNSNRPS	QSYDSSLSG-SLY	2.546	0.3305	7.7035	10
H08	V1-13	275/288(95.5%)	SKSSSNIGAG--FDVH	GNTDRPS	QSYDSSLSR---AY	2.4231	0.1895	12.7868	11
H09	L8	258/283(91.2%)	RASQGIVS-----NLA	AASKIQS	QQLNNFLFA----	2.4965	0.8568	2.9137	12
G12(P)	V1-13	279/289(96.5%)	TGSSSNIGAGYDVH	GNNNRPS	QSYDS-RLGV	2.2051	1.5689	1.4055	P
C05	V3-3	270/286(94.4%)	GSSAGAVPSGHYPF	DTSNRHP	FVAYG--ATW	2.0353	0.5153	3.9497	13
F09	V1-13	281/299(94.0%)	TGSSSNIGAGYDVH	GDVNRPS	QSYDPSLVSS	2.4779	1.9456	1.2736	14
F10	L15	256/284(90.1%)	RASQP-----ISNMLA	ATSLIQS	QQRD---YPL	2.1954	1.3957	1.5730	15

10

20

## 【0169】

&lt;実施例 6&gt; LCシャフリングヒト抗体の特性分析

&lt;6-1&gt; 結合能測定

実施例 5-3 で選別された LCシャフリングモノクローナル抗体を対象に、実施例 4-1 と同一な方法で結合能を測定した。その結果、表 14 に示したように、前記 15 種の LCシャフリングモノクローナルファージ抗体の抗原に対する結合能が確認された。

## 【0170】

30

【表 1 4】

	V E G F - H i s					
(溶離)	3 1 2 5	6 2 5	1 2 5	2 5	5	1
F 6 (P)	0 . 4 5 0 2	1 . 0 1 6 1	1 . 7 4 9 2	2 . 3 7 8 7	2 . 6 3 3 4	2 . 6 0 2 7
G 1 2 (P)	1 . 2 0 4 1	1 . 8 8 1 7	2 . 3 6 9 6	2 . 5 9 6 1	2 . 7 5 8 2	2 . 5 9 5 7
2 A 9	0 . 5 8 7 4	1 . 1 8 4 8	1 . 8 1 3 4	2 . 3 5 2	2 . 6 4 1 1	2 . 5 3 6 4
2 B 5	0 . 1 9 5 1	0 . 4 7 7 6	1 . 1 4 9 7	1 . 9 6 3 9	2 . 4 2 8	2 . 6 9 3 4
2 C 5	0 . 0 7 1	0 . 1 2 5 8	0 . 3 3 8 8	0 . 9 9 9 4	2 . 1 2 2 6	2 . 6 5 2 8
2 C 1 1	0 . 0 5 9 2	0 . 0 8 6 3	0 . 2 1 9 5	0 . 7 5 1 1	1 . 7 1 7 8	2 . 4 3 5 3
2 D 1 0	0 . 0 9 5 5	0 . 1 8 7 6	0 . 5 0 4 5	1 . 1 5 6 9	2 . 0 3 5 9	2 . 4 8 4 3
2 E 1 1	0 . 3 6	0 . 7 2 3 9	1 . 4 0 1 1	2 . 0 1 3 3	2 . 4 1 7 3	2 . 3 2 8 6
2 F 1	0 . 2 9 7 7	0 . 5 7 3 5	1 . 1 7 3	1 . 9 0 2 1	2 . 3 9 7 7	2 . 3 6 6 6
2 F 9	0 . 9 4 1	1 . 4 7 9 8	2 . 1 9 4	2 . 4 7 5 4	2 . 5 7 9 4	2 . 4 6 8 0
2 F 1 0	0 . 0 7 9 8	0 . 1 1 5 8	0 . 3 2 4	0 . 8 9 9 6	1 . 9 1 5 9	2 . 4 5 0 1
2 G 3	0 . 0 8 8 8	0 . 1 6 8 2	0 . 4 7 3 7	1 . 1 6 4 1	2 . 1 6 8 1	2 . 5 6 3 9
2 G 4	0 . 5 6 7 3	1 . 1 6 2 4	1 . 8 6 9 4	2 . 4 3 4 2	2 . 6 2 6 2	2 . 6 7 1 1
2 G 1 2	0 . 5 4 6 4	0 . 9 8 0 2	1 . 9 2 3 9	2 . 4 6 4 3	2 . 7 9 5 7	2 . 7 9 9 9
2 H 7	0 . 4 0 0 1	0 . 6 8 3 3	1 . 6 3 1 3	2 . 2 2 8	2 . 7 1 7 5	2 . 7 3 8 3
2 H 8	0 . 1 4 0 4	0 . 2 7 2 5	0 . 9 0 6 4	1 . 6 1 7	2 . 4 8 8 8	2 . 8 5 1 2
2 H 9	0 . 1 4 7 6	0 . 3 2 8 2	0 . 9 1 7 7	1 . 9 1 7 8	2 . 6 8 4 1	3 . 0 9 8 1

10

20

30

## 【 0 1 7 1】

&lt; 6 - 2 &gt; 全長 I g G 変換分析

実施例 5 - 3 で選別された LC シャフリングモノクローナルファージ抗体を I g G 全長ベクターに転換するため、表 1 5 のプライマー対を使用して実施例 4 - 2 と同一な方法でコロニー PCR を遂行することで、重鎖は p N A T A B H ベクター ( 図 1 2 a )、軽鎖は p N A T A B L ベクター ( 図 1 2 b ) に連結した。前記ベクターから DNA を抽出して、塩基配列分析を依頼した結果、全長 I g G に転換した LC シャフリングモノクローナルファージ抗体に対する 1 5 個のクローンファージの重鎖と軽鎖の配列がファージ抗体の配列と一致することを確認した。

40

## 【 0 1 7 2】

【表 15 - 1】

クロー ン名	重鎖				軽鎖			
	正方向プライ マー (S f i I)		逆方向プライマ ー (N h e I)		正方向プライマー (S f i I)		逆方向プライマー (B g l I I)	
F 0 6 (P)	NAT VH2 - 3 : SEQ ID No. 1 7 9	TTG GTG GCC ACA GCG GCC GAT GTC CAC TCG CAG GTC ACC TTG AGG GAG TC	NAT JH - AL L : S EQ ID No. 1 1 4	GAG GAG GCT AGC TGA GGA GAC GGT GA	NAT VL1 0 : S EQ ID No. 1 1 6	TTGGTG GCCACA GCGGCC GATGTC CACTCG CAGCTC GTGCTG ACTCAG CC	NAT JL1 - R : SEQ ID No. 1 8 6	GAGG AGAG ATCT TAGG ACGG TGAC CTTG GTCC C
2 A 0 9					NAT VL1 3 : S EQ ID No. 1 8 0	TTGGTG GCCACA GCGGCC GATGTC CACTCG CAGTTC GTGCTG ACTCAG CC		
2 B 0 5					NAT VL1 0 : S EQ ID No. 1 1 6	TTGGTG GCCACA GCGGCC GATGTC CACTCG CAGCTC GTGCTG ACTCAG CC		
2 C 1 1					NAT VK 3 : S EQ ID No. 1 8 1	TTGGTG GCCACA GCGGCC GATGTC CACTCG GATATT GTGATG ACCCAG ACTCC	NAT JK - R 2 : SEQ ID No. 1 8 7	GAGG AGAG ATCT TTTG ATCT CCAC TTTG GT
2 D 1 0					NAT VL1 0 : S EQ ID No. 1 1 6	TTGGTG GCCACA GCGGCC GATGTC CACTCG CAGCTC GTGCTG ACTCAG CC	NAT JL1 - R : SEQ ID No. 1 8 8	GAGG AGAG ATCT TAGG ACGG TGAC CTTG GTCC C
2 E 1 1								
2 F 0 1								

10

20

30

40

【表 15 - 2】

2 G 0 3					NAT VK 3	TTGGGTG GCCACA GCGGCC GATGTC CACTCG GATATT GTGATG ACCCAG ACTCC	NAT JK - R 7 : SEQ ID No. 1 1 9	GAGG AGAG ATCT TTTG ATAT CCAC CTTG GT	
2 G 0 4					NAT VL 1 0 : S EQ ID No. 1 1 6	TTGGGTG GCCACA GCGGCC GATGTC CACTCG CAGCTC GTGCTG ACTCAG CC	NAT JL 2 - R : SEQ ID No. 1 2 4	GAGG AGAG ATCT TAGG ACGG TCAG CTTG GTCC C	10
2 G 1 2							NAT JL 1 - R : SEQ ID No. 1 8 9	GAGG AGAG ATCT TAGG ACGG TGAC CTTG GTCC C	20
2 H 0 7									
2 H 0 8					NAT VL 1 3 : S EQ ID No. 1 8 2	TTGGGTG GCCACA GCGGCC GATGTC CACTCG CAGTTC GTGCTG ACTCAG CC			
2 H 0 9					NAT VK 1 - 1 : SEQ ID No. 1 8 3	TTGGGTG GCCACA GCGGCC GATGTC CACTCG GACATC CAGATG ACCCAG TC	NAT JK - R 2 : SEQ ID No. 1 9 0	GAGG AGAG ATCT TTTG ATCT CCAC TTTG GT	30
G 1 2 (P)	NAT VH 1 - 1 : SEQ ID No. 1 1 2	TTG GTG GCC ACA GCG GCC GAT GTC CAC	NAT JH - AL L : S EQ ID No. 1 1 4		NAT VL 1 0 : S EQ ID No. 1 1 6	TTGGGTG GCCACA GCGGCC GATGTC CACTCG CAGCTC GTGCTG ACTCAG CC	NAT JL 2 - R : SEQ ID No. 1 2 4	GAGG AGAG ATCT TAGG ACGG TCAG CTTG GTCC C	40

【表 15 - 3】

2 C 0 5		T C G C A G G T G C A G C T G G T G C A G T C			N A T V L 1 2 : S E Q I D N o . 1 8 4	T T G G T G G C C A C A G C G G C C G A T G T C C A C T C G C A G G C T G T G G T G A C T C A G G A	N A T J L 5 - R : S E Q I D N o . 1 9 1	G A G G A G A G A T C T T A G G A C G G T C A G C T C G G T
2 F 0 9					N A T V L 1 3 : S E Q I D N o . 1 8 5	T T G G T G G C C A C A G C G G C C G A T G T C C A C T C G C A G T T C G T G C T G A C T C A G C C	N A T J L 2 - R : S E Q I D N o . 1 2 4	G A G G A G A G A T C T T A G G A C G G T C A G C T T G G T C C C
1 F 1 0					N A T V K 1 - 1 : S E Q I D N o . 1 1 5	T T G G T G G C C A C A G C G G C C G A T G T C C A C T C G G A C A T C C A G A T G A C C C A G T C	N A T J K - R 7 : S E Q I D N o . 1 1 9	G A G G A G A G A T C T T T T G A T A T C C A C C T T G G T

10

20

## 【 0 1 7 3 】

< 6 - 3 > 抗 - V E G F 抗体の結合能確認

また、各 L C シャフリングモノクローナルファージ抗体が、F 6 と G 1 2 と比較して V E G F に対する結合能を確認するために、実施例 4 - 5 と同一な方法で E L I S A を行なった。

## 【 0 1 7 4 】

その結果、表 1 6 に示したように、2 C 1 1、2 G 0 3、2 C 0 5 及び 2 F 1 0 の場合のみ結合程度が非常に弱く、残りは陽性対照群と類似の程度の高い親和力を示した。

## 【 0 1 7 5 】

30

【表 16】

(nM)	50	25	12.5	6.25	3.125	1.5625	0.78125	0.39063	0.19531	0.09766	0.04883	0.02441	Kd 値 (M)(R2)
IgG	0.0952	0.1015	0.1032	0.1227	0.0951	0.0993	0.0941	0.1011	0.0911	0.092	0.091	0.0874	-
F06(P)	2.5809	2.4606	2.6248	2.5862	2.5017	2.5287	2.4768	2.2867	1.8512	1.3136	0.864	0.4936	8.8 * 10 <sup>-11</sup> M(0.99)
2A09	2.529	2.5265	2.6023	2.6243	2.4743	2.5441	2.4944	2.234	1.8063	1.1968	0.8211	0.4838	9.8 * 10 <sup>-11</sup> M(0.99)
2B05	2.479	2.5411	2.499	2.4371	2.4739	2.4681	2.5128	2.1458	1.6658	1.1279	0.6944	0.4271	1.1 * 10 <sup>-10</sup> M(0.98)
2C11	0.0881	0.0942	0.0919	0.0912	0.0982	0.1021	0.0989	0.101	0.0928	0.0895	0.0879	0.0865	-
2D10	2.1757	2.6057	1.4823	1.0899	0.7038	0.3882	0.2463	0.1615	0.1252	0.1033	0.0956	0.0892	8.4 * 10 <sup>-9</sup> M(0.98)
2E11	2.1736	1.7494	1.3507	0.8021	0.5537	0.3098	0.1866	0.1332	0.1077	0.0986	0.0929	0.0907	1.3 * 10 <sup>-8</sup> M(0.94)
2F01	2.6062	2.5367	2.2299	2.2665	1.9197	1.6427	1.2476	0.7042	0.4147	0.2151	0.1299	0.1146	9.4 * 10 <sup>-10</sup> M(0.99)
2G03	0.0886	0.0926	0.092	0.0939	0.0927	0.096	0.0985	0.0929	0.0986	0.1	0.086	0.0927	-
2G04	2.5279	2.5187	2.4115	2.4195	2.5001	2.4575	2.424	2.4811	2.3615	1.6605	1.2495	0.7616	3.3 * 10 <sup>-11</sup> M(1)
2G12	2.5233	2.546	2.3541	2.6124	2.4604	2.4384	2.4091	2.0182	1.6568	1.1688	0.6642	0.4813	1.1 * 10 <sup>-10</sup> M(0.99)
2H07	2.3654	2.4546	2.548	2.4666	2.3474	1.8805	1.5607	1.152	0.5821	0.3146	0.1824	0.1408	5.3 * 10 <sup>-10</sup> M(0.99)
2H08	2.5012	2.5022	2.6496	2.5016	2.5143	2.1478	2.1006	1.7333	1.0913	0.6665	0.3348	0.2256	2.5 * 10 <sup>-10</sup> M(0.99)
2H09	1.1042	2.0759	2.0025	1.7831	1.3284	0.8864	0.5223	0.3525	0.2049	0.1341	0.1055	0.0873	2.4 * 10 <sup>-9</sup> M(1)
G12(P)	2.7337	2.4535	2.5613	2.4466	2.3736	2.0751	1.8909	1.2653	0.7613	0.4329	0.2541	0.1633	4.2 * 10 <sup>-10</sup> M(0.99)
2C05	0.1073	0.1434	0.1019	0.1036	0.0974	0.1023	0.1175	0.1004	0.0951	0.0965	0.0935	0.0937	-
2F09	2.6076	2.3879	2.4921	2.4349	2.2943	2.0733	2.1207	1.6154	1.0599	0.6351	0.3728	0.231	2.5 * 10 <sup>-10</sup> M(0.99)
2F10	0.807	0.4553	0.2579	0.1709	0.149	0.1266	0.1185	0.1107	0.1049	0.1058	0.1009	0.093	7.8 * 10 <sup>-8</sup> M(0.96)

10

【配列表フリーテキスト】

20

【0176】

配列番号 1 : V E G F フォワードプライマー

配列番号 2 : V E G F リバースプライマー

配列番号 3 : p c D N A 3 . 1 - V E G F フォワードプライマー

配列番号 4 : p c D N A 3 . 1 - V E G F リバースプライマー

配列番号 5 : A 4 H C - C D R 1

配列番号 6 : B 1 2 H C - C D R 1

配列番号 7 : C 1 1 H C - C D R 1

配列番号 8 : C 1 2 H C - C D R 1

配列番号 9 : C 5 H C - C D R 1

30

配列番号 10 : C 9 H C - C D R 1

配列番号 11 : D 1 2 H C - C D R 1

配列番号 12 : E 9 & F 6 H C - C D R 1

配列番号 13 : F 2 H C - C D R 1

配列番号 14 : F 9 H C - C D R 1

配列番号 15 : G 1 2 H C - C D R 1

配列番号 16 : G 9 H C - C D R 1

配列番号 17 : H 7 H C - C D R 1

配列番号 18 : A 4 H C - C D R 2

配列番号 19 : B 1 2 H C - C D R 2

40

配列番号 20 : C 1 1 H C - C D R 2

配列番号 21 : C 1 2 H C - C D R 2

配列番号 22 : C 5 H C - C D R 2

配列番号 23 : C 9 H C - C D R 2

配列番号 24 : D 1 2 H C - C D R 2

配列番号 25 : E 9 & F 6 H C - C D R 2

配列番号 26 : F 2 H C - C D R 2

配列番号 27 : F 9 H C - C D R 2

配列番号 28 : G 1 2 H C - C D R 2

配列番号 29 : G 9 H C - C D R 2

50

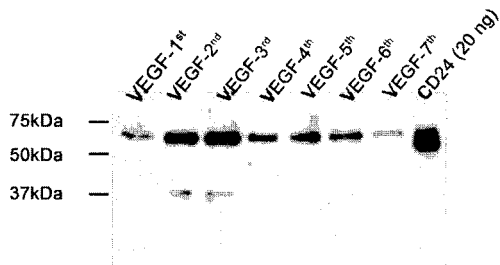
配列番号 30 : H 7 H C - C D R 2	
配列番号 31 : A 4 H C - C D R 3	
配列番号 32 : B 1 2 H C - C D R 3	
配列番号 33 : C 1 1 H C - C D R 3	
配列番号 34 : C 1 2 H C - C D R 3	
配列番号 35 : C 5 H C - C D R 3	
配列番号 35 : C 9 H C - C D R 3	
配列番号 37 : D 1 2 H C - C D R 3	
配列番号 38 : E 9 & F 6 H C - C D R 3	
配列番号 39 : F 2 H C - C D R 3	10
配列番号 40 : F 9 H C - C D R 3	
配列番号 41 : G 1 2 H C - C D R 3	
配列番号 42 : G 9 H C - C D R 3	
配列番号 43 : H 7 H C - C D R 3	
配列番号 44 : V E G F A 4 重鎖	
配列番号 45 : V E G F B 1 2 重鎖	
配列番号 46 : V E G F C 1 1 重鎖	
配列番号 47 : V E G F C 1 2 重鎖	
配列番号 48 : V E G F C 5 重鎖	
配列番号 49 : V E G F C 9 重鎖	20
配列番号 50 : V E G F D 1 2 重鎖	
配列番号 51 : V E G F E 9 & V E G F F 6 重鎖	
配列番号 52 : V E G F F 2 重鎖	
配列番号 53 : V E G F F 9 重鎖	
配列番号 54 : V E G F G 1 2 重鎖	
配列番号 55 : V E G F G 9 重鎖	
配列番号 56 : V E G F H 7 重鎖	
配列番号 57 : A 4 L C - C D R 1	
配列番号 58 : B 1 2 L C - C D R 1	
配列番号 59 : C 1 1 L C - C D R 1	30
配列番号 60 : C 1 2 L C - C D R 1	
配列番号 61 : C 5 L C - C D R 1	
配列番号 62 : C 9 L C - C D R 1	
配列番号 63 : D 1 2 L C - C D R 1	
配列番号 64 : E 9 & F 6 L C - C D R 1	
配列番号 65 : F 2 L C - C D R 1	
配列番号 66 : F 9 L C - C D R 1	
配列番号 67 : G 1 2 , 2 A 0 9 & 2 E 1 1 L C - C D R 1	
配列番号 68 : G 9 L C - C D R 1	
配列番号 69 : H 7 L C - C D R 1	40
配列番号 70 : A 4 L C - C D R 2	
配列番号 71 : B 1 2 L C - C D R 2	
配列番号 72 : C 1 1 L C - C D R 2	
配列番号 73 : C 1 2 L C - C D R 2	
配列番号 74 : C 5 L C - C D R 2	
配列番号 75 : C 9 L C - C D R 2	
配列番号 76 : D 1 2 L C - C D R 2	
配列番号 77 : E 9 & F 6 L C - C D R 2	
配列番号 78 : F 2 L C - C D R 2	
配列番号 79 : F 9 L C - C D R 2	50

配列番号 80 : G 1 2 , 2 E 1 1 , 2 G 0 4 & 2 G 1 2 L C - C D R 2	
配列番号 81 : G 9 L C - C D R 2	
配列番号 82 : H 7 L C - C D R 2	
配列番号 83 : A 4 & H 7 L C - C D R 3	
配列番号 84 : B 1 2 L C - C D R 3	
配列番号 85 : C 1 1 L C - C D R 3	
配列番号 86 : C 1 2 L C - C D R 3	
配列番号 87 : C 5 L C - C D R 3	
配列番号 88 : C 9 L C - C D R 3	
配列番号 89 : D 1 2 & F 2 L C - C D R 3	10
配列番号 90 : E 9 & F 6 L C - C D R 3	
配列番号 91 : F 9 L C - C D R 3	
配列番号 92 : G 1 2 L C - C D R 3	
配列番号 93 : G 9 L C - C D R 3	
配列番号 94 : V E G F A 4 軽鎖	
配列番号 95 : V E G F B 1 2 軽鎖	
配列番号 96 : V E G F C 1 1 軽鎖	
配列番号 97 : V E G F C 1 2 軽鎖	
配列番号 98 : V E G F C 5 軽鎖	
配列番号 99 : V E G F C 9 軽鎖	20
配列番号 100 : V E G F D 1 2 軽鎖	
配列番号 101 : V E G F E 9 & V E G F F 6 軽鎖	
配列番号 102 : V E G F F 2 軽鎖	
配列番号 103 : V E G F F 9 軽鎖	
配列番号 104 : V E G F G 1 2 軽鎖	
配列番号 105 : V E G F G 9 軽鎖	
配列番号 106 : V E G F H 7 軽鎖	
配列番号 107 : N A T V H 7 - 1	
配列番号 108 : N A T V H 3 - 1	
配列番号 109 : N A T V H 1 - 2	30
配列番号 110 : N A T V H 2 - 1	
配列番号 111 : N A T V H 3 - 2	
配列番号 112 : N A T V H 1 - 1	
配列番号 113 : N A T V H 7 - 2	
配列番号 114 : N A T J H - A L L	
配列番号 115 : N A T V K 1 - 1	
配列番号 116 : N A T V L 1 0	
配列番号 117 : N A T V L 2	
配列番号 118 : N A T V L 9	
配列番号 119 : N A T J K - R 7	40
配列番号 120 : N A T J K - R 1	
配列番号 121 : N A T J K - R 2	
配列番号 122 : N A T J L 1 - R	
配列番号 123 : N A T J K - R 5	
配列番号 124 : N A T J L 2 - R	
配列番号 125 : p e l B 5 プライマー	
配列番号 126 : c l a 3 プライマー	
配列番号 127 : C M V - p r o F プライマー	
配列番号 128 : N A T V H 7 - 3	
配列番号 129 : N A T J K - R 3	50

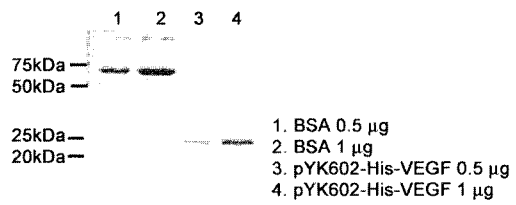
配列番号 130	: 2B05	LC - CDR 1			
配列番号 131	: 2C11	LC - CDR 1			
配列番号 132	: 2D10	LC - CDR 1			
配列番号 133	: 2F01	LC - CDR 1			
配列番号 134	: 2G03	LC - CDR 1			
配列番号 135	: 2G04	LC - CDR 1			
配列番号 135	: 2G12	LC - CDR 1			
配列番号 137	: 2H07	LC - CDR 1			
配列番号 138	: 2H08	LC - CDR 1			
配列番号 139	: 2H09	LC - CDR 1			10
配列番号 140	: 2C05	LC - CDR 1			
配列番号 141	: 2F09	LC - CDR 1			
配列番号 142	: 1F10	LC - CDR 1			
配列番号 143	: 2A09	& 2H07	LC - CDR 2		
配列番号 144	: 2B05	& 2G03	LC - CDR 2		
配列番号 145	: 2C11		LC - CDR 2		
配列番号 146	: 2D10		LC - CDR 2		
配列番号 147	: 2F01		LC - CDR 2		
配列番号 148	: 2H08		LC - CDR 2		
配列番号 149	: 2H09		LC - CDR 2		20
配列番号 150	: 2C05		LC - CDR 2		
配列番号 151	: 2F09		LC - CDR 2		
配列番号 152	: 1F10		LC - CDR 2		
配列番号 153	: 2A09	& 2D10	LC - CDR 3		
配列番号 154	: 2B05	& 2G12	LC - CDR 3		
配列番号 155	: 2C11	& 2G03	LC - CDR 3		
配列番号 156	: 2E11		LC - CDR 3		
配列番号 157	: 2F01		LC - CDR 3		
配列番号 158	: 2G04		LC - CDR 3		
配列番号 159	: 2H07		LC - CDR 3		30
配列番号 160	: 2H08		LC - CDR 3		
配列番号 161	: 2H09		LC - CDR 3		
配列番号 162	: 2C05		LC - CDR 3		
配列番号 163	: 2F09		LC - CDR 3		
配列番号 164	: 1F10		LC - CDR 3		
配列番号 165	: VEGF	LC シャッフリング	2A09	軽鎖	
配列番号 166	: VEGF	LC シャッフリング	2B05	軽鎖	
配列番号 167	: VEGF	LC シャッフリング	2C11	& 2G03	軽鎖
配列番号 168	: VEGF	LC シャッフリング	2D10	軽鎖	
配列番号 169	: VEGF	LC シャッフリング	2E11	軽鎖	40
配列番号 170	: VEGF	LC シャッフリング	2F01	軽鎖	
配列番号 171	: VEGF	LC シャッフリング	2G04	軽鎖	
配列番号 172	: VEGF	LC シャッフリング	2G12	軽鎖	
配列番号 173	: VEGF	LC シャッフリング	2H07	軽鎖	
配列番号 174	: VEGF	LC シャッフリング	2H08	軽鎖	
配列番号 175	: VEGF	LC シャッフリング	2H09	軽鎖	
配列番号 176	: VEGF	LC シャッフリング	2C05	軽鎖	
配列番号 177	: VEGF	LC シャッフリング	2F09	軽鎖	
配列番号 178	: VEGF	LC シャッフリング	1F10	軽鎖	
配列番号 179	: NATVH2 - 3				50

- 配列番号 180 : N A T V L 1 3
- 配列番号 181 : N A T V K 3
- 配列番号 182 : N A T V L 1 3
- 配列番号 183 : N A T V K 1 - 1
- 配列番号 184 : N A T V L 1 2
- 配列番号 185 : N A T V L 1 3
- 配列番号 186 : N A T J L 1 - R
- 配列番号 187 : N A T J K - R 2
- 配列番号 188 : N A T J L 1 - R
- 配列番号 189 : N A T J L 1 - R
- 配列番号 190 : N A T J K - R 2
- 配列番号 191 : N A T J L 5 - R

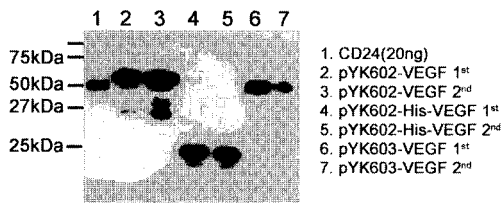
【 図 1 】



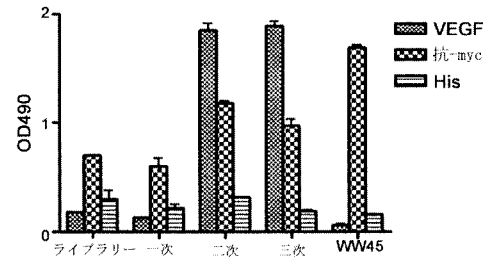
【 図 4 】



【 図 2 】



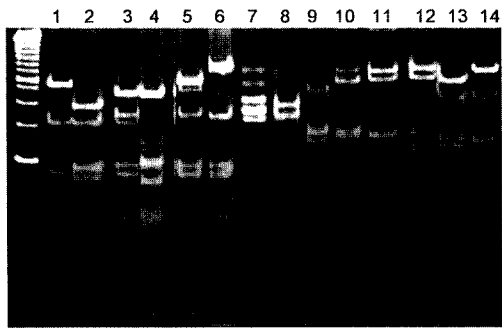
【 図 5 】



【 図 3 】



【図6】



【図7b】

		CDR 2	FR 3
VEGF-A4	(49)	WVS FINEGGNIYYGDSVKG	FTTISRNSKNTLYLQMNLSLRADTAVYYGAR
VEGF-B12	(49)	WVG GIPIPIFGTANVAQKFGQ	WVTITAEESTSTAYMELSLSLRSEDTAVYYGAR
VEGF-C11	(49)	WVG GVPIPIFATTYYAQKFGQ	WVTITAEESTSTAYMELSLSLRSEDTAVYYGAR
VEGF-C12	(49)	WVS SISISSSSIHYADSVKG	WFTISRNSKNTLYLQMNLSLRADTAVYYGAR
VEGF-C5	(49)	WVA GISYDGGSKPFGDSVKG	WFTISRNSKNTLYLQMNLSLRADTAVYYGAR
VEGF-C9	(49)	WVA VISYDGGSNKYADSVKG	WFTISRNSKNTLYLQMNLSLRADTAVYYGAR
VEGF-D12	(49)	WVS LISGGDYNTFYADSVKG	WFTISRNSKNTLYLQMNLSLRADTAVYYGAR
VEGF-E9	(51)	WLA LIYWN-DKRYSPSLKN	WLTVAKVTSSKQVVLWTHNMDPMPTATYGAR
VEGF-F2	(49)	WVS YISSGGDIYYADVEEG	WFTISRNSKNTLYLQMNLSLRADTAVYYGAR
VEGF-F6	(51)	WLA LIYWN-DKRYSPSLKN	WLTVAKVTSSKQVVLWTHNMDPMPTATYGAR
VEGF-F9	(49)	WVG WITPFNGNTFYAQKFGQ	WVTITAEESTSTAYMELSLSLRSEDTAVYYGAR
VEGF-G12	(49)	WVG RIPIIYGTPTTYAQKFGQ	WVTITAEESTSTAYMELSLSLRSEDTAVYYGAR
VEGF-G9	(49)	WVA VISHDGTTDYRYDSVKG	WFTISRNSKNTLYLQMNLSLRADTAVYYGAR
VEGF-H7	(49)	WLA FIWFDGSKNFYADSVKG	WFTVSRNSKNTLYLQMNLSLRADTAVYYGAR

【図7a】

重鎖		FR 1	CDR1	FR 2
VEGF-A4	(1)	MA QMQVEVGGGVVQGGSLRLSAAASFTFPA	D-YAMH	WVRCAPKQGLE
VEGF-B12	(1)	MA QVQVQGAEVKKGGSVVKVSKASGTFPS	S-YAIS	WVRCAPKQGLE
VEGF-C11	(1)	MA QMQVEVGGGVVQGGSLRLSAAASFTFPA	S-DAIS	WVRCAPKQGLE
VEGF-C12	(1)	MA QMQVEVGGGVVQGGSLRLSAAASFTFPA	S-YGMN	WVRCAPKQGLE
VEGF-C5	(1)	MA QVQVQGGGVVQGGSLRLSAAASFTFPA	S-YSMH	WVRCAPKQGLE
VEGF-C9	(1)	MA QVQVQGGGVVQGGSLRLSAAASFTFPA	S-YAMH	WVRCAPKQGLE
VEGF-D12	(1)	MA QMQVEVGGGVVQGGSLRLSAAASFTFPA	E-YAMH	WVRCAPKQGLE
VEGF-E9	(1)	MA QVTLREGGPTMVKQTQTLTLTFTFSFSL	TSQVAVG	WVRCAPKQGLE
VEGF-F2	(1)	MA QVQVQGGGVVQGGSLRLSAAASFTFPA	S-YAMS	WVRCAPKQGLE
VEGF-F6	(1)	MA QVTLREGGPTMVKQTQTLTLTFTFSFSL	TSQVAVG	WVRCAPKQGLE
VEGF-F9	(1)	MA QVQVQGGGVVQGGSLRLSAAASFTFPA	T-TALT	WVRCAPKQGLE
VEGF-G12	(1)	MA QVQVQGAEVKKGGSVVKVSKAAGTFPN	N-YAIS	WVRCAPKQGLE
VEGF-G9	(1)	MA QVQVQGGGVVQGGSLRLSAAASFTFPA	T-YALH	WVRCAPKQGLE
VEGF-H7	(1)	MA QMQVEVGGGVVQGGSLRLSAAASFTFPA	K-YGMH	WVRCAPKQGLE

【図7c】

		CDR 3	FR 4	リンカー
VEGF-A4	(99)	EPGSGSLT---FDY	WVQQLVTVSS	GLGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID No. 44)
VEGF-B12	(99)	DRSG-YTA---MDV	WVQQLVTVSS	GLGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID No. 45)
VEGF-C11	(99)	GMDSGGG---LDP	WVQQLVTVSS	GLGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID No. 46)
VEGF-C12	(99)	LGPYD---AFDP	WVQQLVTVSS	GLGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID No. 47)
VEGF-C5	(99)	DGVPSHSGYIGMEV	WVQQLVTVSS	GLGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID No. 48)
VEGF-C9	(99)	DVDSHSGG WEFR	WVQQLVTVSS	GLGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID No. 49)
VEGF-D12	(99)	DAGPAGGG GLDH	WVQQLVTVSS	GLGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID No. 50)
VEGF-E9	(100)	GDG---MLDFP	WVQQLVTVSS	GLGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID No. 51)
VEGF-F2	(99)	DKLATPS---AFDI	WVQQLVTVSS	GLGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID No. 52)
VEGF-F6	(100)	GDG---MLDFP	WVQQLVTVSS	GLGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID No. 53)
VEGF-F9	(99)	SQAELGT-SAFDI	WVQQLVTVSS	GLGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID No. 54)
VEGF-G12	(99)	ERS---FN-MWFAF	WVQQLVTVSS	GLGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID No. 55)
VEGF-G9	(99)	DGSG---YFFDY	WVQQLVTVSS	GLGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID No. 56)
VEGF-H7	(99)	DRDYSGG PLDY	WVQQLVTVSS	GLGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID No. 56)

【図8a】

軽鎖		FR 1	CDR 1	FR 2
VEGF-A4	(145)	QVSS DIQMTQSSISLPASVGDRTVITC	RAS---QTSSVYLN	WVQQLKPKAP
VEGF-B12	(145)	QVSS DIQMTQSSISLPASVGDRTVITC	RAS---QGSSVYLA	WVQQLKPKAP
VEGF-C11	(146)	QVSS DIQMTQSSISLPASVGDRTVITC	RAS---QGIGNVYLN	WVQQLKPKAP
VEGF-C12	(144)	QVSS QLVLTQ-PPVSGTPTQQRVTISC	PGG-TSNIDSKVYH	WVQQLKPKAP
VEGF-C5	(149)	QVSS DIQMTQSSISLPASVGDRTVITC	RAS---QGISNMLA	WVQQLKPKAP
VEGF-C9	(147)	QVSS DIQMTQSSISLPASVGDRTVITC	RAS---QTISTFVN	WVQQLKPKAP
VEGF-D12	(147)	QVSS DIQMTQSSISLPASVGDRTVITC	RTS---QTITNFLN	WVQQLKPKAP
VEGF-E9	(144)	QVSS QLVLTQ-PPVSGTPTQQRVTISC	TGNSNIGAGHDVH	WVQQLKPKAP
VEGF-F2	(146)	QVSS DIQMTQSSISLPASVGDRTVITC	RAS---QGISNMLA	WVQQLKPKAP
VEGF-F6	(144)	QVSS QLVLTQ-PPVSGTPTQQRVTISC	TGNSNIGAGHDVH	WVQQLKPKAP
VEGF-F9	(146)	QVSS QLVLTQ-PPVSGTPTQQRVTISC	SGSYSNIGNY-VY	WVQQLKPKAP
VEGF-G12	(145)	QVSS QLVLTQ-PPVSGTPTQQRVTISC	TGNSNIGAGHDVH	WVQQLKPKAP
VEGF-G9	(144)	QVSS NEMLRQ-PPVSGTPTQQRVTISC	TGSSSDVGGYNYVS	WVQQLKPKAP
VEGF-H7	(147)	QVSS DIQMTQSSISLPASVGDRTVITC	RAS---QRIATYLR	WVQQLKPKAP

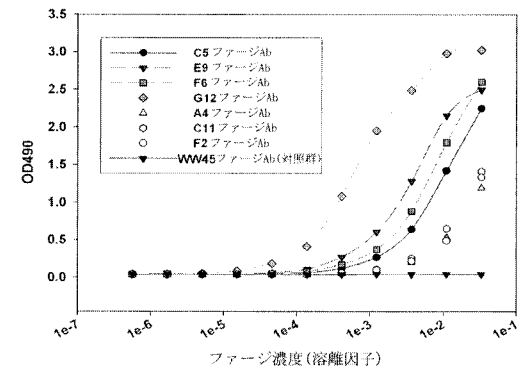
【図8c】

		FR 4	Myc Tag
VEGF-A4	(239)	TPYTGGQTKVDIKR	GGASLVEFEQKLISEEDL (SEQ ID No. 94)
VEGF-B12	(239)	TPYTGGQTKLEIKR	GGASLVEFEQKLISEEDL (SEQ ID No. 95)
VEGF-C11	(240)	--YSFGPGTKVEIKR	GGASLVEFEQKLISEEDL (SEQ ID No. 96)
VEGF-C12	(242)	APVYGGTGTIVTLG	GGASLVEFEQKLISEEDL (SEQ ID No. 97)
VEGF-C5	(243)	--YTGGQTKVEIKR	GGASLVEFEQKLISEEDL (SEQ ID No. 98)
VEGF-C9	(241)	TPLTGGQTKLEIKR	GGASLVEFEQKLISEEDL (SEQ ID No. 99)
VEGF-D12	(241)	TPYTGGQTKLEIKR	GGASLVEFEQKLISEEDL (SEQ ID No. 100)
VEGF-E9	(242)	SGIVGGTGTIVTLG	GGASLVEFEQKLISEEDL (SEQ ID No. 101)
VEGF-F2	(240)	TPYTGGQTKLEIKR	GGASLVEFEQKLISEEDL (SEQ ID No. 102)
VEGF-F6	(242)	SGIVGGTGTIVTLG	GGASLVEFEQKLISEEDL (SEQ ID No. 103)
VEGF-F9	(245)	SAVLGGGKTLTVLG	GGASLVEFEQKLISEEDL (SEQ ID No. 104)
VEGF-G12	(243)	G-VVGGGKTLTVLG	GGASLVEFEQKLISEEDL (SEQ ID No. 105)
VEGF-G9	(241)	TPVYGGTGTIVTLG	GGASLVEFEQKLISEEDL (SEQ ID No. 106)
VEGF-H7	(241)	TPYTGGQTKVEIKR	GGASLVEFEQKLISEEDL (SEQ ID No. 106)

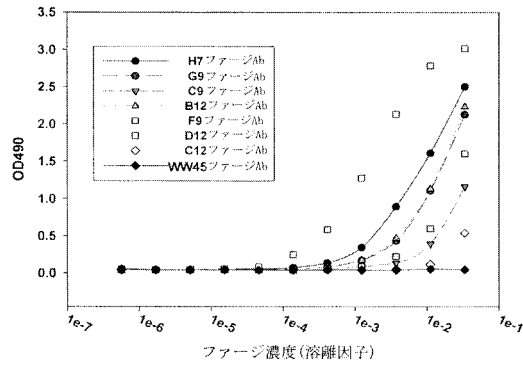
【図8b】

		CDR 2	FR 3	CDR 3
VEGF-A4	(192)	KLLIY AASLSLQS	WVPSRPSGGSGTDFPTTNSIQPEEFATYY	QQSYS---
VEGF-B12	(192)	KLLIY AASLSLQS	WVPSRPSGGSGSHPTTNTNQPPEFATYY	QQGHT---
VEGF-C11	(193)	KLLIY AASLSLQR	WVPSRPSRGGSGTDFPTTNSIQPEEFATYY	QQSYE-TP
VEGF-C12	(192)	KLLIY RNDQRPS	WVPSRPSRGGSGTDFPTTNSIQPEEFATYY	QSYDTSLS
VEGF-C5	(196)	KLLIY AASLIQT	WVPSRPSGGSGTDFPTTNSIQPEEFATYY	QQANS-PP
VEGF-C9	(194)	KLLIY SASLSLQS	WVPSRPSGGSGTDFPTTNSIQPEEFATYY	QQNYS---
VEGF-D12	(194)	KLLIY GASLSLQS	WVPSRPSGGSGTDFPTTNSIQPEEFATYY	QQSHC---
VEGF-E9	(193)	KVVIY GNTNRAS	WVPSRPSRGGSGTDFPTTNSIQPEEFATYY	QSYDN-SL
VEGF-F2	(193)	KLLIY SASLSLQS	WVPSRPSGGSGTDFPTTNSIQPEEFATYY	QQSHC---
VEGF-F6	(193)	KVVIY GNTNRAS	WVPSRPSRGGSGTDFPTTNSIQPEEFATYY	QSYDN-SL
VEGF-F9	(196)	KLVIQ KNTQRPS	WVPSRPSRGGSGTDFPTTNSIQPEEFATYY	SAMDD-SL
VEGF-G12	(194)	KLLIY GNNRPS	WVPSRPSRGGSGTDFPTTNSIQPEEFATYY	QSYDS-RL
VEGF-G9	(193)	QLLIY DVTKRPS	WVPSRPSRGGSGTDFPTTNSIQPEEFATYY	SSYSS---
VEGF-H7	(194)	KLLIY AASLSLQS	WVPSRPSGGSGTDFPTTNSIQPEEFATYY	QQSYS---

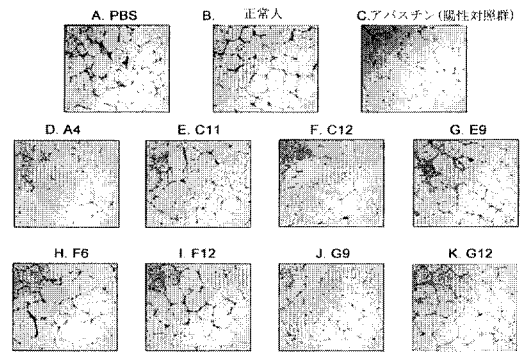
【図9a】



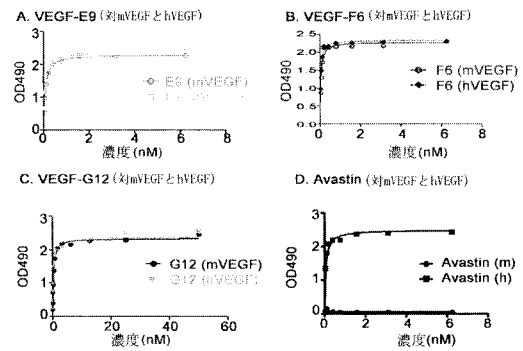
【図9b】



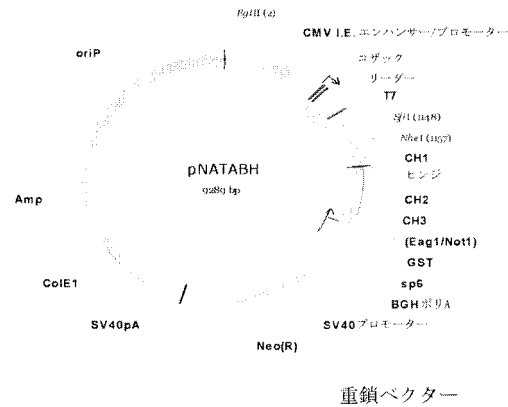
【図10】



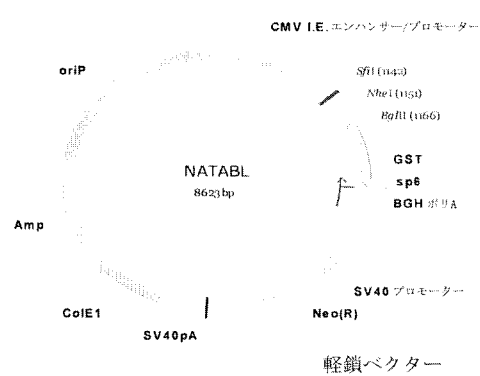
【図11】



【図12a】

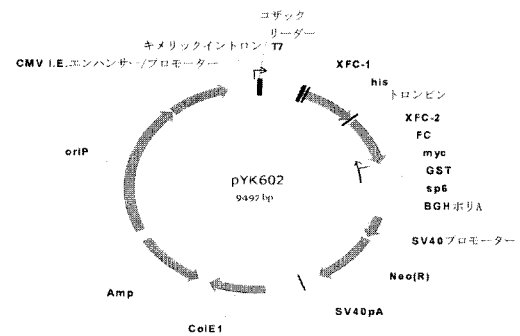


【図12b】

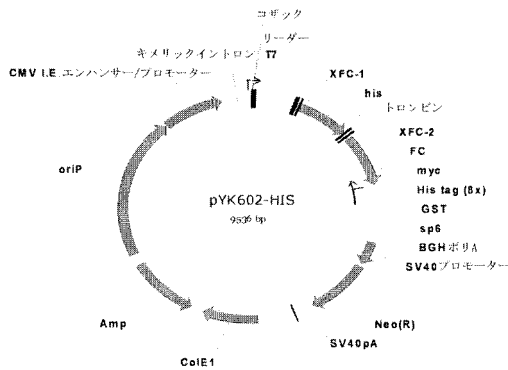


重鎖ベクター

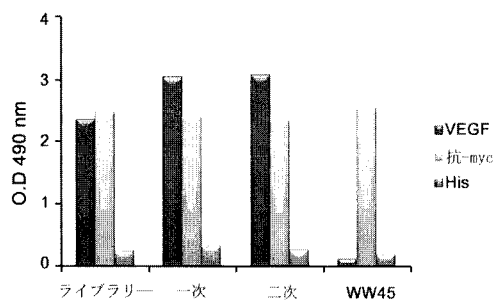
【図13a】



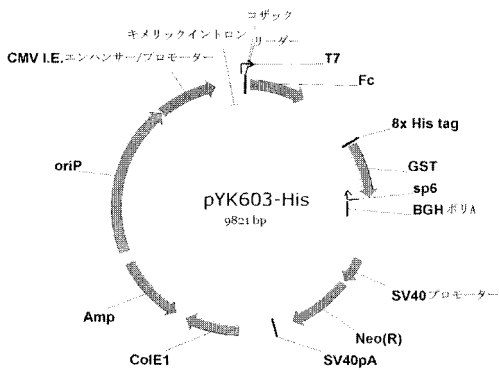
【図13b】



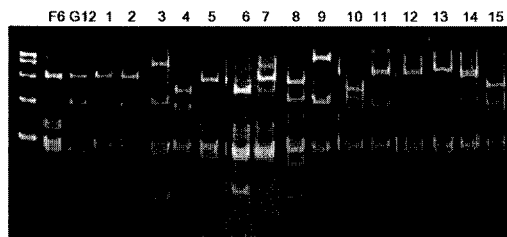
【図14】



【図13c】



【図15】



【図16】

軽鎖	FR 4	CDR 1	FR 2
VEGF-F06 (144)	GVGS QLVLTQ-PPFSVSGAPGQRTVISC	TGSSNIGAG--NDVH	WYQQLPGIAP
VEGF-2A09 (144)	GVGS QLVLTQ-PPFSVSGAPGQRTVISC	TGSSNIGAG--YDVH	WYQQLPGIAP
VEGF-2B05 (144)	GVGS QLVLTQ-PPFSVSGAPGQRTVISC	TGSSNIGAG--YDVH	WYQQLPGIAP
VEGF-2C11 (144)	GVGS QLVLTQ-PPFSVSGAPGQRTVISC	TGSSNIGAG--YDVH	WYQQLPGIAP
VEGF-2D10 (144)	GVGS QLVLTQ-PPFSVSGAPGQRTVISC	TGSSNIGAG--YDVH	WYQQLPGIAP
VEGF-2E11 (144)	GVGS QLVLTQ-PPFSVSGAPGQRTVISC	TGSSNIGAG--YDVH	WYQQLPGIAP
VEGF-2F01 (144)	GVGS QLVLTQ-PPFSVSGAPGQRTVISC	TGSSNIGAG--YDVH	WYQQLPGIAP
VEGF-2G03 (144)	GVGS QLVLTQ-PPFSVSGAPGQRTVISC	TGSSNIGAG--YDVH	WYQQLPGIAP
VEGF-2G04 (144)	GVGS QLVLTQ-PPFSVSGAPGQRTVISC	TGSSNIGAG--YDVH	WYQQLPGIAP
VEGF-2G12 (144)	GVGS QLVLTQ-PPFSVSGAPGQRTVISC	TGSSNIGAG--YDVH	WYQQLPGIAP
VEGF-2H06 (144)	GVGS QLVLTQ-PPFSVSGAPGQRTVISC	TGSSNIGAG--YDVH	WYQQLPGIAP
VEGF-2H08 (144)	GVGS QLVLTQ-PPFSVSGAPGQRTVISC	TGSSNIGAG--YDVH	WYQQLPGIAP
VEGF-2H09 (144)	GVGS QLVLTQ-PPFSVSGAPGQRTVISC	TGSSNIGAG--YDVH	WYQQLPGIAP
VEGF-G12 (145)	GVGS QLVLTQ-PPFSVSGAPGQRTVISC	TGSSNIGAG--YDVH	WYQQLPGIAP
VEGF-2C05 (145)	GVGS QLVLTQ-PPFSVSGAPGQRTVISC	TGSSNIGAG--YDVH	WYQQLPGIAP
VEGF-2F09 (145)	GVGS QLVLTQ-PPFSVSGAPGQRTVISC	TGSSNIGAG--YDVH	WYQQLPGIAP
VEGF-2F10 (145)	GVGS QLVLTQ-PPFSVSGAPGQRTVISC	TGSSNIGAG--YDVH	WYQQLPGIAP

軽鎖	CDR2	FR 3	CDR 3
VEGF-F06 (193)	KVVIV GNINRAS	GVPERFSGSKSATASLAITGLQAEDEADYYC	QSYDNSLS
VEGF-2A09 (193)	KVVIV GNINRAS	GVPERFSGSKSATASLAITGLQAEDEADYYC	QSYDNSLS
VEGF-2B05 (193)	KVVIV GNINRAS	GVPERFSGSKSATASLAITGLQAEDEADYYC	QSYDNSLS
VEGF-2C11 (193)	KVVIV GNINRAS	GVPERFSGSKSATASLAITGLQAEDEADYYC	QSYDNSLS
VEGF-2D10 (193)	KVVIV GNINRAS	GVPERFSGSKSATASLAITGLQAEDEADYYC	QSYDNSLS
VEGF-2E11 (193)	KVVIV GNINRAS	GVPERFSGSKSATASLAITGLQAEDEADYYC	QSYDNSLS
VEGF-2F01 (193)	KVVIV GNINRAS	GVPERFSGSKSATASLAITGLQAEDEADYYC	QSYDNSLS
VEGF-2G03 (193)	KVVIV GNINRAS	GVPERFSGSKSATASLAITGLQAEDEADYYC	QSYDNSLS
VEGF-2G04 (193)	KVVIV GNINRAS	GVPERFSGSKSATASLAITGLQAEDEADYYC	QSYDNSLS
VEGF-2G12 (194)	KVVIV GNINRAS	GVPERFSGSKSATASLAITGLQAEDEADYYC	QSYDNSLS
VEGF-2H06 (194)	KVVIV GNINRAS	GVPERFSGSKSATASLAITGLQAEDEADYYC	QSYDNSLS
VEGF-2H08 (194)	KVVIV GNINRAS	GVPERFSGSKSATASLAITGLQAEDEADYYC	QSYDNSLS
VEGF-2H09 (194)	KVVIV GNINRAS	GVPERFSGSKSATASLAITGLQAEDEADYYC	QSYDNSLS
VEGF-2F09 (194)	KVVIV GNINRAS	GVPERFSGSKSATASLAITGLQAEDEADYYC	QSYDNSLS
VEGF-2F10 (193)	KVVIV GNINRAS	GVPERFSGSKSATASLAITGLQAEDEADYYC	QSYDNSLS

VEGF-F06 (242)	---GYV	FGTGTKVTVLG	GGASLVEFQKLISEEDL
VEGF-2A09 (242)	---AYV	FGTGTKVTVLG	GGASLVEFQKLISEEDL
VEGF-2B05 (242)	---GYV	FGTGTKVTVLG	GGASLVEFQKLISEEDL
VEGF-2C11 (245)	I-----	FGTGTKVTVLG	GGASLVEFQKLISEEDL
VEGF-2D10 (242)	---AYV	FGTGTKVTVLG	GGASLVEFQKLISEEDL
VEGF-2E11 (242)	---AYV	FGTGTKVTVLG	GGASLVEFQKLISEEDL
VEGF-2F01 (242)	A---LVV	FGTGTKVTVLG	GGASLVEFQKLISEEDL
VEGF-2G03 (245)	T-----	FGTGTKVTVLG	GGASLVEFQKLISEEDL
VEGF-2G04 (242)	G---AVV	FGTGTKVTVLG	GGASLVEFQKLISEEDL
VEGF-2G12 (242)	G---AVV	FGTGTKVTVLG	GGASLVEFQKLISEEDL
VEGF-2H06 (242)	G---LVV	FGTGTKVTVLG	GGASLVEFQKLISEEDL
VEGF-2H08 (242)	G---AVV	FGTGTKVTVLG	GGASLVEFQKLISEEDL
VEGF-2H09 (245)	G---AVV	FGTGTKVTVLG	GGASLVEFQKLISEEDL
VEGF-G12 (243)	G---AVV	FGTGTKVTVLG	GGASLVEFQKLISEEDL
VEGF-2C05 (242)	I---VF	FGTGTKVTVLG	GGASLVEFQKLISEEDL
VEGF-2F09 (244)	G---AVV	FGTGTKVTVLG	GGASLVEFQKLISEEDL
VEGF-2F10 (242)	P---LT	FGTGTKVTVLG	GGASLVEFQKLISEEDL

【配列表】

0005289285000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/00 A
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	C 1 2 P	21/08
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395 N
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/395 T
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 P	19/02 (2006.01)	A 6 1 P	29/00 1 0 1
A 6 1 P	27/02 (2006.01)	A 6 1 P	19/02
A 6 1 P	17/06 (2006.01)	A 6 1 P	27/02
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	A 6 1 P	17/06
G 0 1 N	33/574 (2006.01)	G 0 1 N	33/53 V
		G 0 1 N	33/574 D

- (72)発明者 チョイ ソ-ヨン  
大韓民国 305-744 テジョン ユソン-グ グァンピョン-ドン サンヨン スウィート  
ドット ホーム ナンバー402-1101
- (72)発明者 ソン ウン-ジョン  
大韓民国 300-310 テジョン ドン-グ ビリョン-ドン 202-4
- (72)発明者 ユ ジョン  
大韓民国 301-140 テジョン ジョン-グ ユチョン-ドン ヒュンダイ アパートメン  
ト ナンバー104-501
- (72)発明者 ソン ミョン-ホ  
大韓民国 300-310 テジョン ドン-グ ビリョン-ドン 202-4
- (72)発明者 ジョン ジェウォン  
大韓民国 305-744 テジョン ユソン-グ グァンピョン-ドン サンヨン スウィート  
ドット ホーム ナンバー410-301
- (72)発明者 ジョン ジュン-グ  
大韓民国 302-280 テジョン ソ-グ ウォルピョン-ドン 3 フロア 1155
- (72)発明者 ジャン ミョウンヒ  
大韓民国 306-826 テジョン テドク-グ ジョンニ-ドン 239-5 ナンバー40  
2
- (72)発明者 キム ソンソブ  
大韓民国 305-761 テジョン ユソン-グ ジョンミン-ドン エクスポ アパートメン  
ト ナンバー307-1404

審査官 北村 悠美子

- (56)参考文献 国際公開第2008/133706(WO, A1)  
国際公開第2008/052489(WO, A1)  
THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 2006年 1月13日, Vol.281, No.2, p.951-961

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
C 0 7 K 1 6 / 2 2  
C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0  
C A p l u s / M E D L I N E / B I O S I S ( S T N )  
W P I

专利名称(译)	VEGF特异性人抗体		
公开(公告)号	<a href="#">JP5289285B2</a>	公开(公告)日	2013-09-11
申请号	JP2009268214	申请日	2009-11-26
[标]申请(专利权)人(译)	韩国生命工学研究院		
申请(专利权)人(译)	韩国研究所生物科学和生物技术		
当前申请(专利权)人(译)	韩国研究所生物科学和生物技术		
[标]发明人	パクヨンウ チョイソヨン ソンウンジョン ユジョン ソンミヨンホ ジョンジェウオン ジョンジュング ジャンミョウンヒ キムソンソブ		
发明人	パク ヨンウ チョイ ソ-ヨン ソン ウン-ジョン ユ ジョン ソン ミヨン-ホ ジョン ジェウオン ジョン ジュン-グ ジャン ミョウンヒ キム ソンソブ		
IPC分类号	C07K16/22 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12P21/08 A61K39/395 A61P35/00 A61P29/00 A61P19/02 A61P27/02 A61P17/06 G01N33/53 G01N33/574		
CPC分类号	A61P9/00 A61P9/10 A61P17/06 A61P19/02 A61P27/02 A61P29/00 A61P35/00 A61P43/00 C07K16/22 C07K2317/21 C07K2317/622 C07K2317/76		
FI分类号	C07K16/22.ZNA C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 C12N15/00.A C12P21/08 A61K39/395.N A61K39/395.T A61P35/00 A61P29/00.101 A61P19/02 A61P27/02 A61P17/06 G01N33/53.V G01N33/574.D A61B5/05.383 A61B5/055.383 A61K45/00 A61K49/02.C A61K49/18 A61K51/00 A61K51/00.200 A61K51/02.200 A61K51/10.200 A61K51/12.200 A61P43/00.121 A61P9/00 A61P9/10 C07K16/22 C12N15/00.AZN.A C12N15/13 C12N15/63.Z C12N5/10 G01N33/531.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA44 4B024/CA05 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA01 4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/CE06 4B064/CE12 4B064/DA01 4B064/DA05 4B065/AA26X 4B065/AA90X 4B065/AA94Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA01 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA19 4C084/MA02 4C084/MA17 4C084/MA23 4C084/MA66 4C084/NA05 4C084/NA14 4C084/ZA33 4C084/ZA36 4C084/ZA96 4C084/ZB15 4C084/ZB26 4C084/ZC75 4C085/AA14 4C085/CC02 4C085/DD23 4C085/DD33 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/GG02 4C085/GG03 4C085/GG04 4C085/HH03 4C085/JJ02 4C085/JJ03 4C085/KA04 4C085/KA29 4C085/LL18 4C096/AA11 4C096/AB41 4C096/FC14 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA71 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA24 4H045/EA28 4H045/EA50 4H045/EA51 4H045/FA74 4H045/GA26		
优先权	1020080118124 2008-11-26 KR		

外部链接

[Espacenet](#)

## 摘要(译)

(经修改) 要解决的问题: 提供VEGF (血管内皮生长因子) 特异性人抗体。已知VEGF在发育过程中在血管生成和血管生成中起决定性作用。人抗体由来自人的特异性结合VEGF的互补决定区 (CDR) 和构架区 (FR) 组成。对VEGF特异的人抗体可用于诊断由VEGF的过表达引起的疾病, 疾病的分类, 可视化, 治疗, 预后的确定等。【选择图】无

標的抗原	パニング回数	初期フージ数	結合したフージ数
VEGF	1 <sup>st</sup>	$4.2 \times 10^{13}$	$6.0 \times 10^5$
	2 <sup>nd</sup>	$2.6 \times 10^{13}$	$1.3 \times 10^8$
	3 <sup>rd</sup>	$1.4 \times 10^{13}$	$1.9 \times 10^8$