

(51)Int.Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード <sup>*</sup> ( 参考 )			
G 0 1 N 33/543	501	G 0 1 N 33/543	501	N	4	B 0 2 4
	525		525	G	4	H 0 4 5
			525	W		
	595		595			
C 0 7 K 16/18	ZNA	C 0 7 K 16/18	ZNA			
審査請求 未請求 予備審査請求 ( 全170数 ) 最終頁に続く						

(21)出願番号	特願2001 - 541060(P2001 - 541060)	(71)出願人	パイオサイト インコーポレイテッド アメリカ合衆国92121カリフォルニア州サン ・ディエゴ、ローゼル・ストリート11030番 スウィート・ディ
(86)(22)出願日	平成12年12月6日(2000.12.6)	(71)出願人	ジェンファーム インターナショナル アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サン ホセ キューム ドライブ 2350
(85)翻訳文提出日	平成14年6月6日(2002.6.6)	(72)発明者	ブシュラー ジョー アメリカ合衆国 カリフォルニア州 カー ルスバッド カシンズ ストリート 1343
(86)国際出願番号	PCT/US00/33042	(74)代理人	弁理士 清水 初志 ( 外 1 名 )
(87)国際公開番号	W001/040306		
(87)国際公開日	平成13年6月7日(2001.6.7)		
(31)優先権主張番号	09/456,090		
(32)優先日	平成11年12月6日(1999.12.6)		
(33)優先権主張国	米国(US)		
		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 検出試薬としてのヒト抗体

(57)【要約】

本発明はヒト抗体を用いたインビトロ検出法を提供する。  
。本方法はHAMAまたは異好性抗体を含むヒト試料を  
解析するために特に有用である。ヒト抗体は試料中に存  
在するHAMAまたは異好性抗体に結合することなくそ  
のような試料中の分析物に結合することが可能である。  
本方法は、サンドイッチ形式を用いて、他のものの間で  
実施することができる。

**【特許請求の範囲】**

【請求項 1】 以下の段階を含む、分析物を検出する方法：

試料と支持体に固定されたヒト抗体とを接触させる段階であって、抗体が分析物に対して少なくとも  $10^8 \text{ M}^{-1}$  の親和性を有する段階：

分析物に対するヒト抗体の結合を検出して、試料中の分析物の存在および / または量を示す段階。

【請求項 2】 分析物に対するヒト抗体の親和性が少なくとも  $10^{10} \text{ M}^{-1}$  である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】 分析物に対するヒト抗体の親和性が少なくとも  $10^{11} \text{ M}^{-1}$  である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 4】 支持体が複数の異なるヒト抗体を有し、異なるヒト抗体が支持体上で既知の異なる位置を占有する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 5】 試料と複数の支持体に固定された複数のヒト抗体とを接触させる請求項 1 記載の方法であって、ヒト抗体のそれぞれが少なくとも  $10^8 \text{ M}^{-1}$  の親和性を有し、且つ検出段階が少なくとも 2 つの分析物に対する少なくとも 2 つのヒト抗体の結合を検出して、試料中の分析物の存在および / または量を示す段階を含む方法。

【請求項 6】 ヒト抗体が標識される、請求項 1 記載の方法。

【請求項 7】 ヒト抗体が標識されず、且つ検出段階が質量分析または表面プラズモン共鳴によって行われる、請求項 1 記載の方法。

【請求項 8】 試料が検出すべき非標識型分析物と標識型分析物とを含み、且つ検出段階が標識型分析物に対するヒト抗体の結合を検出し、結合の程度が試料中の非標識型分析物の量と反比例する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 9】 ヒト抗体が標識され、試料が検出すべき試験型分析物とヒト抗体に対する結合に対して試験型分析物と競合する対照型分析物とを含み、且つ検出段階が試験型分析物に対する標識抗体の結合を検出する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 10】 試料と、溶液中のヒト抗体、固定化ヒト抗体、および同一の分析物の異なるエピトープに結合する溶液中のヒト抗体とさらに接触させ、且

つ検出段階が分析物に対する固定化ヒト抗体および/または溶液中のヒト抗体の結合を検出する段階を含む、請求項1記載の方法。

【請求項11】 検出段階が、試料中の少なくとも2つの分析物に対する少なくとも2つの抗体の結合を検出する段階を含む、請求項4または5記載の方法。

【請求項12】 試料が、第1の標識によって標識された異なる分析物を有する第1の試料と、第2の標識によって標識された異なる分析物を有する第2の試料との混合物であって、且つ検出段階が、複数の抗体に結合した第2の標識に対する第1の標識の比を検出して、第1および第2の試料中に存在する分析物の量の比を示す段階を含む、請求項4または5記載の方法。

【請求項13】 それぞれのヒト抗体の500 ng未満が既知の領域に存在する、請求項4記載の方法。

【請求項14】 それぞれのヒト抗体の100 ng未満が既知の領域に存在する、請求項4記載の方法。

【請求項15】 複数のヒト抗体が、試料中に存在する可能性を有する異なる分析物に対して特異的親和性を有する、少なくとも100個の異なる抗体を含む、請求項4または5記載の方法。

【請求項16】 複数のヒト抗体が、試料中に存在する可能性を有する異なる分析物に対して特異的親和性を有する、少なくとも1000個の異なる抗体を含む、請求項4または5記載の方法。

【請求項17】 異なる分析物に対する異なる抗体の特異的親和性が互いに10倍以内である、請求項15記載の方法。

【請求項18】 試料がヒト被験者に由来する試料である、請求項1記載の方法。

【請求項19】 試料がHAMAおよび/または異好性抗体を含む、請求項18記載の方法。

【請求項20】 異なる対応する分析物に対してそれぞれ少なくとも $10^8 \text{ M}^{-1}$ の親和性を有し、異なるヒト抗体が1つまたは複数の支持体上で既知の異なる位置を占有する、複数のヒト抗体。

【請求項21】 異なる抗体が同じ支持体の既知の異なる位置を占有する、請求項20記載の複数のヒト抗体。

【請求項22】 既知の位置の面積が $0.01\text{ cm}^2$ 未満である、請求項21記載の複数のヒト抗体。

【請求項23】 既知の位置の面積が $0.001\text{ cm}^2$ 未満である、請求項21記載の複数のヒト抗体。

【請求項24】 既知の位置の面積が $0.0001\text{ cm}^2$ 未満である、請求項21記載の複数のヒト抗体。

【請求項25】 既知の位置の面積が $0.00001\text{ cm}^2$ 未満である、請求項21記載の複数のヒト抗体。

【請求項26】 既知の位置の面積が $0.0000001\text{ cm}^2$ 未満である、請求項21記載の複数のヒト抗体。

【請求項27】 以下の段階を含む、ヒト以外の種に由来する抗体に特異的に結合するヒト抗体を含むヒト試料中において分析物を検出する方法：

試料とヒト抗体とを接触させる段階であって、ヒト抗体が、ヒト以外の種に由来する抗体に特異的に結合するヒト抗体に対して特異的に結合せずに、分析物に特異的に結合する段階、および

ヒト抗体と分析物との結合を検出して、分析物の存在を示す段階。

【請求項28】 ヒト試料がヒト抗マウス抗体を含む、請求項27記載の方法。

【請求項29】 ヒト抗マウス抗体が抗マウスイディオタイプ抗体である、請求項28記載の方法。

【請求項30】 ヒト試料が異好性抗体を含む、請求項27記載の方法。

【請求項31】 試料と支持体に固定された第1のヒト抗体および溶液中の第2のヒト抗体とを接触させ、第1および第2のヒト抗体が分析物上の異なるエпитープに結合し、且つ検出段階が分析物に対する第1および/または第2のヒト抗体の結合を検出する段階を含む、請求項27記載の方法。

【請求項32】 検出段階が第2のヒト抗体と分析物との結合を検出する、請求項31記載の方法。

【請求項33】 第2のヒト抗体が標識される、請求項32記載の方法。

【請求項34】 試料と支持体に固定されたヒト抗体の第1の集団および溶液中のヒト抗体の第2の集団とを接触させる、請求項32記載の方法であって、第1および第2の集団に由来する構成因子が分析物上の異なるエピトープに結合する方法。

【請求項35】 ヒト抗体の第2の集団が標識される、請求項34記載の方法。

【請求項36】 ヒト抗体が分析物に対して少なくとも $10^8 \text{ M}^{-1}$ の親和性を有する、請求項27記載の方法。

【請求項37】 ヒト抗体が分析物に対して少なくとも $10^9 \text{ M}^{-1}$ の親和性を有する、請求項27記載の方法。

【請求項38】 ヒト抗体が分析物に対して少なくとも $10^{10} \text{ M}^{-1}$ の親和性を有する、請求項27記載の方法。

【請求項39】 ヒト抗体が分析物に対して少なくとも $10^{11} \text{ M}^{-1}$ の親和性を有する、請求項27記載の方法。

【請求項40】 第1および第2のヒト抗体がそれぞれ、分析物上のそれぞれのエピトープに対して少なくとも $10^9 \text{ M}^{-1}$ の親和性を有する、請求項27記載の方法。

【請求項41】 分析物に対するヒト抗体の結合が1時間以内に平衡に達する、請求項27記載の方法。

【請求項42】 抗体が、大腸菌における組換え構築物の発現による発現によって産生される、請求項27記載の方法。

【請求項43】 少なくとも90%の抗体分子が免疫反応性である、請求項42記載の方法。

【請求項44】 以下の段階を含む、試料中の分析物を検出する方法：

試料と固相に固定された第1のヒト抗体および溶液中の第2のヒト抗体とを接触させる段階であって、分析物が試料中に存在する場合に、第1および第2の抗体が分析物の異なるエピトープに結合する段階、

第1および/または第2の抗体に対する分析物の結合を検出し、結合が試料中の

分析物の存在を示す段階。

【請求項45】 第2の抗体が標識され、且つ検出段階が分析物に対する第2の抗体の結合を検出する、請求項44記載の方法。

【請求項46】 試料と支持体に固定されたヒト抗体の第1の集団および溶液中のヒト抗体の第2の集団とを接触させて、第1および第2の集団に由来する構成因子が分析物上の異なるエピトープに結合する、請求項44記載の方法。

【請求項47】 ヒト抗体の第2の集団が標識される、請求項46記載の方法。

【請求項48】 第1および第2のヒト抗体がそれぞれ、分析物上のそれぞれのエピトープに対して少なくとも $10^9 \text{ M}^{-1}$ の親和性を有する、請求項44記載の方法。

【請求項49】 第1および第2のヒト抗体がそれぞれ、分析物に対して少なくとも $10^{10} \text{ M}^{-1}$ の親和性を有する、請求項44記載の方法。

【請求項50】 ヒト抗体が分析物に対して少なくとも $10^{11} \text{ M}^{-1}$ の親和性を有する、請求項44記載の方法。

【請求項51】 分析物に対する第1および第2のヒト抗体の結合が1時間以内に平衡に達する、請求項44記載の方法。

【請求項52】 第1および第2のヒト抗体が大腸菌における組換え構築物の発現による発現によって産生される、請求項44記載の方法。

【請求項53】 少なくとも90%の抗体分子が免疫反応性である、請求項52記載の方法。

【請求項54】 第1および第2のヒト抗体が、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現するトランスジェニックマウスに由来する第1および第2のヒト抗体をコードする核酸をファージ提示ベクターにサブクローニングする段階、ならびに所望の結合特異性に対して第1および第2のヒト抗体を示すファージをスクリーニングする段階によって産生される、請求項44記載の方法。

**【発明の詳細な説明】****【0001】****関連出願の相互参照**

本出願は1999年12月6日に出願された米国特許出願第09/456,090号の一部継続出願である。

**【0002】****背景**

治療的用途においてヒト抗体がマウス抗体より優れていることは長い間認識されてきたが、インビトロ診断においては逆が当てはまると考えられている。ヒトおよびマウス抗体の認識されている異なる役割は、その特性および調製法の差異を反映している。マウス抗体に対するヒト抗体の現在までに認識されている最も重要な利点は、患者に投与された場合に、ヒト抗マウス（HAMA）応答が欠如していること、インビボ半減期がより長いこと、およびヒト補体とより良い相互作用を行うことである。これらの利点は全て、治療的用途においてマウス抗体に対するヒト抗体の優位点を説明するが、いずれもインビトロ診断試薬として抗体を使用することにおいては重要ではない。

**【0003】**

ヒト抗体に対するマウス抗体の重要な利点の1つは、単離が容易であることである。近年のヒト抗体生産法の改良にもかかわらず、特にスクリーニングされなければならない抗体の全範囲の中で所望の抗体が僅かにしか提示されていない場合には、一般的に、ヒト抗体よりもマウス抗体を生産することがより簡便であると依然として考えられている。マウス抗体の別の利点は、マウス抗体の定常領域が、検出部分として典型的にはヤギなどの他の種から調製された標識抗マウス抗体を用いて検出可能なことである。そのような抗体は、試料中に存在するヒト抗体に結合することなくマウス抗体に特異的に結合する。二次標識部分を使用することにより、ヒト組織試料中の分析物を検出するための有用な形式が提供される。ヒト定常領域に対する抗体は、試料中のヒト抗体に反応することにより偽陽性を生じると考えられることから、同様な形式をヒト抗体に使用することができない。単離の容易さと二次標識部分を用いた検出の互換性のため、ならびにHAMA応

答の生成、インビボ半減期、および補体活性化などの特性がインビトロ診断目的においては無関係であるために、ヒト抗体を事実上または完全に排除して、マウス抗体はインビトロ診断に使用されてきた。

#### 【0004】

マウス抗体は現在、診断試薬として広範に使用されているが、そのような抗体がヒト試料中の分析物を検出するために使用される場合に、問題がいくつか生じている。いくつかのヒト試料において、試料中にHAMAまたは異好性抗体が存在するために偽陽性または偽陰性結果が得られている。試料を獲得された患者が（診断に用いられたマウス抗体とは無関係の）マウス抗体を用いて以前治療されたこと、またはマウス抗原に環境上で暴露されたことにより、HAMA抗体はヒト試料中に存在する可能性がある。数人の患者においては、異好性抗体はエプスタイン-バーウイルス（Epstein-Barr virus）等のある種の病原体感染への応答として存在する。試料中のHAMAまたは異好性抗体のいずれかは、診断試薬として使用されたマウス抗体に結合することによって、偽陽性シグナルを生じることがある。サンドイッチアッセイ形式においては、他の形式でそうであるように、HAMAまたは異好性抗体は固定化抗体と溶液抗体と間で架橋を形成することによって、偽陽性を生じることがある。または、サンドイッチアッセイ形式においては、HAMAまたは異好性抗体は溶液抗体に結合することなく固定化抗体に結合し（またはその逆）、それにより固定化抗体および溶液抗体が分析物を介して互いに架橋を形成することを阻止し、したがって偽陰性を生じることがある。結論として、診断試薬としてマウス抗体を用いる、ヒト臨床試料に対して実施される有意な数のアッセイ法は不正確な結果を生じる。

#### 【0005】

1999年12月1日に出願されたタウンセンド&タウンセンド&クルー-（Townsend and Townsend and Crew）ドケット番号020015-000110、1999年10月2日に出願された米国特許出願第60/157415号、1998年4月3日に出願されたPCT98/06704号、1997年4月4日に出願された米国特許出願第08/835,159号、および1997年4月4日に出願された米国特許出願第08/832,985号は関連した主題に向けられたものであり、全ての目的のために各々はその全体が参照として組み入れられる。



## 【0006】

## 発明の概要

本発明はヒト抗体を用いた分析物の検出法を提供する。そのような方法は、試料と支持体に固定されたヒト抗体とを接触させる段階であって、抗体が分析物に対して少なくとも $10^8\text{M}^{-1}$ の親和性を有する段階、および分析物に対するヒト抗体の結合を検出して、試料中の分析物の存在および/または量を示す段階を包含する。いくつかの方法では、ヒト抗体は少なくとも $10^{10}\text{M}^{-1}$ または $10^{11}\text{M}^{-1}$ の結合親和性を有する。いくつかの方法では、支持体が複数の異なるヒト抗体を有し、異なるヒト抗体が支持体上で既知の異なる位置を占有している。いくつかの方法では、試料と複数の支持体に固定された複数のヒト抗体とを接触させ、ヒト抗体のそれぞれが少なくとも $10^8\text{M}^{-1}$ の親和性を有し、且つ検出段階が少なくとも2つの分析物に対する少なくとも2つのヒト抗体の結合を検出して、試料中の分析物の存在および/または量を示す段階を含む。いくつかの方法では、ヒト抗体は標識されている。いくつかの方法では、ヒト抗体は標識されず、検出段階が質量分析法または表面プラズモン共鳴により実施される。いくつかの方法では、試料が検出すべき非標識型分析物と標識型分析物とを含み、且つ検出段階が標識型分析物に対するヒト抗体の結合を検出し、結合の程度が試料中の非標識型分析物の量と反比例する。いくつかの方法では、ヒト抗体が標識されており、試料が検出すべき試験型分析物とヒト抗体に対する結合に対して試験型分析物と競合する対照型分析物とを含み、且つ検出段階が試験型分析物に対する標識抗体の結合を検出する。いくつかの方法では、試料と、溶液中のヒト抗体、固定化ヒト抗体、および同一の分析物の異なるエピトープに結合する溶液中のヒト抗体とさらに接触させ、且つ検出段階が分析物に対する固定化ヒト抗体および/または溶液中のヒト抗体の結合を検出する段階を含む。いくつかの方法では、検出段階が、試料中の少なくとも2つの分析物に対する少なくとも2つの抗体の結合を検出する段階を含む。いくつかの方法では、試料が、第1の標識によって標識された異なる分析物を有する第1の試料と、第2の標識によって標識された異なる分析物を有する第2の試料との混合物であって、且つ検出段階が、複数の抗体に結合した第2の標識に対する第1の標識の比を検出して、第1および第2の試料中に存在する分析物の量

の比を示す段階を含む。いくつかの方法では、ヒトにおいて500ngまたは100ng未満である。いくつかの方法では、複数のヒト抗体が、試料中に存在する可能性を有する異なる分析物に対して特異的親和性を有する少なくとも100個の異なる抗体を含む。いくつかの方法では、複数のヒト抗体が、試料中に存在する可能性を有する異なる分析物に対して特異的親和性を有する少なくとも1000個の異なる抗体を含む。いくつかの方法では、異なる分析物に対する異なる抗体の特異的親和性が互いに10倍以内である。いくつかの方法では、試料がヒト被検者に由来する試料である。いくつかの方法では、試料がHAMAおよび/または異好性抗体を含む。

#### 【0007】

本発明はさらに、異なる対応する分析物に対してそれぞれ少なくとも $10^8 \text{M}^{-1}$ の親和性を有し、1つまたは複数の支持体上で既知の異なる位置を占有する複数のヒト抗体を提供する。1つの態様において、同一の支持体上で既知の異なる位置を占有する、異なる抗体である請求項20に記載の複数のヒト抗体である。選択的には既知の位置は $0.01 \text{cm}^2$ 、 $0.001 \text{cm}^2$ 、 $0.0001 \text{cm}^2$ 、 $0.00001 \text{cm}^2$ または $0.0000001 \text{cm}^2$ 未満の面積を占有する。

#### 【0008】

本発明はヒト以外の種に由来する抗体に特異的に結合するヒト抗体を含むヒト試料中において分析物を検出する方法を提供する。そのような方法は、試料とヒト抗体とを接触させる段階を包含する。ヒト抗体は、ヒト以外の種に由来する抗体（例えば試料中に存在するHAMAまたは異好性抗体）に特異的に結合するヒト抗体に特異的に結合することなく、分析物と特異的に結合する。その後、ヒト抗体と分析物との結合が検出される。いくつかの方法では、試料と支持体に固定された第1のヒト抗体および溶液中の第2のヒト抗体とを接触させ、第1および第2のヒト抗体が分析物上の異なるエピトープに結合し、且つ検出段階が分析物に対する第1および/または第2のヒト抗体の結合を検出する。そのような方法では第2の抗体は典型的には標識されている。いくつかの方法では、試料と支持体に固定されたヒト抗体の第1の集団、および溶液中のヒト抗体の第2の集団とを接触させ、第1および第2の集団に由来する構成因子が分析物上の異なるエピトープに結合する。

。

#### 【0009】

そのような方法で使用されるヒト抗体は、典型的には分析物に対して少なくとも $10^8 \text{ M}^{-1}$ 、 $10^9 \text{ M}^{-1}$ 、 $10^{10} \text{ M}^{-1}$ 、 $10^{11} \text{ M}^{-1}$ 、 $10^{12} \text{ M}^{-1}$ の親和性を有する。本方法で使用されるいくつかのヒト抗体は、大腸菌中での組換え構築物の発現により生産される。いくつかのそのような抗体は少なくとも90%の免疫反応性を有する。

#### 【0010】

本発明はさらに、試料中の分析物を検出する方法を提供する。そのような方法は、試料と固相に固定された第1のヒト抗体および溶液中の第2のヒト抗体とを接触させる段階を含み、分析物が試料中に存在する場合に、第1および第2の抗体が分析物の異なるエピトープに結合する。分析物の第1および/または第2の抗体に対する結合が、その後検出される。結合は試料中に分析物が存在することを示す。そのような方法では2次抗体は典型的には標識され、且つ検出段階は分析物に対する第2の抗体の結合を検出する。いくつかの方法では、試料と支持体に固定されたヒト抗体の第1の集団および溶液中のヒト抗体の第2の集団とを接触させ、第1および第2の集団に由来する構成因子が分析物上の異なるエピトープに結合する。いくつかの方法では、分析物に対する第1および/または第2のヒト抗体の結合は1時間以内に平衡に達する。

#### 【0011】

##### 定義

抗体または他の結合物質と、抗原との間の特異的結合は、少なくとも $10^6 \text{ M}^{-1}$ の親和性を意味する。好ましい結合物質は、少なくとも約 $10^7 \text{ M}^{-1}$ 、好ましくは $10^8 \text{ M}^{-1}$ から $10^9 \text{ M}^{-1}$ 、 $10^{10} \text{ M}^{-1}$ 、 $10^{11} \text{ M}^{-1}$ 、または $10^{12} \text{ M}^{-1}$ の親和性で結合する。エピトープという用語は、抗体に特異的に結合する能力のある抗原決定基を意味する。エピトープは通常、アミノ酸または糖側鎖のような化学的に活性な表面の基からなり、通常は特異的な3次元構造の特徴、および特異的な電荷の特徴を持つ。コンフォメーション依存性エピトープおよび非コンフォメーション依存性エピトープは、変性溶媒の存在下で、前者への結合は失われるが後者への結合は失われないことで区別される。

## 【0012】

基本的な抗体の構造ユニットは、四量体を含むことが知られている。各四量体は、2つの同一のポリペプチド鎖ペアからなり、各ペアは1つの「軽鎖」(約25 kDa)および1つの「重鎖」(約50~70 kDa)を持つ。各鎖のアミノ末端部分には、約100アミノ酸~110アミノ酸またはそれ以上のアミノ酸の可変領域が含まれ、このアミノ酸は主に抗原認識の役割を果たす。各鎖のカルボキシル末端部分は、主にエフェクターの機能を果たす定常領域を定める。

## 【0013】

軽鎖は、または のいずれかに分類される。重鎖は、 $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\gamma$ 、または  $\epsilon$  に分類され、それぞれ抗体のアイソタイプIgG、IgM、IgA、IgDおよびIgEとなる。軽鎖及び重鎖の中では、可変領域と定常領域は、約12アミノ酸またはそれ以上のアミノ酸の「J」領域で結合され、重鎖はさらに約10アミノ酸またはそれ以上のアミノ酸の「D」領域も含む(一般に、「基礎免疫学(Fundamental Immunology)」(Paul, W.編、第2版、Raven Press、N.Y.、1989、第4版(1999)、Paul William E.編)、Raven Press、N.Y.(全ての目的のために全体が参照として組み入れられる)参照)。免疫グロブリン重鎖及び免疫グロブリン軽鎖の可変領域をコードする遺伝子は、それぞれ $V_H$ および $V_L$ と呼ばれる。体細胞変異のために(図7参照)、免疫グロブリン鎖のアミノ酸配列は、それをコードする $V_H$ 遺伝子または $V_L$ 遺伝子から予測されるものと全く一致するわけではないが、免疫グロブリンの予測される配列と実際の配列の間には十分な類似性があるので、実際の配列は対応する $V_H$ または $V_L$ 遺伝子に特徴的であり、これを認識できる。定常領域という用語は、全長の天然の定常領域、および $C_H1$ 、ヒンジ、 $C_H2$ および $C_H3$ またはその断片のようなそのセグメントの両方を意味する。通常は、抗体の軽鎖および重鎖のセグメントは、重鎖および軽鎖の間の鎖間結合に寄与するために十分な長さを持つ。

## 【0014】

各軽鎖/重鎖ペアの可変領域は、抗体の結合部を形成する。したがって、完全な抗体には2つの結合部位がある。2機能性または2特異性抗体を除いて、2つの結合部位は同一である。鎖はすべて、4つの比較的保存されたフレームワーク(FR)

領域が、相補性決定領域(CDR)とも呼ばれる3つの超可変領域で結合されるという、同一の一般的構造を持つ。各ペアの2つの鎖のCDRは、フレームワーク部によって整列されるため、特異的なエピトープに結合できる。CDRおよびFR残基は、カバット(Kabat)ら、上記、の標準的な配列定義にしたがって、記述されている。別の構造的定義は、コティア(Chothia)ら、J. Mol. Biol.196:901-917 (1987); Nature 342:878-883 (1989);およびJ.Mol. Biol.186:651-663 (1989)によって提案されている。

#### 【0015】

抗体という用語は、抗体全体およびその結合断片を意味する。結合断片には、一本鎖断片、Fv断片およびFab断片が含まれる。Fab断片という用語は、当技術分野において、完全な抗体のパパイン開裂の結果得られる結合断片を意味するように使用される場合がある。Fab'およびF(ab')<sub>2</sub>という用語は、当技術分野において、ペプシン開裂によって生成する完全な抗体の結合断片を示すように使用される場合がある。ここで、Fabは包括的に、完全な抗体の二重鎖結合断片で、抗原特異的結合に十分な、少なくとも実質的に完全な軽鎖及び重鎖の可変領域、および軽鎖及び重鎖の会合を維持するために十分な軽鎖及び重鎖の定常領域の一部を持つものを示す。通常、Fab断片は、全長または実質的に全長の軽鎖と、可変領域および定常領域の少なくともC<sub>H</sub>1ドメインとを含む重鎖を結合して形成される。

#### 【0016】

単離された種または種の集団とは、存在する支配的な種(組成物中で、モルベースで他の種と比較して最も豊富)である対象の種(例えば、本発明の結合ポリペプチド)を意味する。好ましくは、単離された種は、存在する全ての巨大分子種の少なくとも約50%、80%または90%(モルベース)を構成する。最も好ましくは、対象の種は基本的に均一(通常の検出方法では、組成物中に不純物が検出できない)に精製される。標的は、標的に特異的な結合親和性を持つパートナーを単離することが望ましい任意の分子である。

#### 【0017】

関心対象の標的には、抗イディオタイプ抗体および、糖尿病、多発性硬化症、

慢性関節リウマチの様な自己免疫疾患に存在する自己抗体を含む、抗体が含まれる。関心対象の他の標的は、増殖因子受容体（例えば、FGFR、PDGFR、EFG、NGFR およびVEGF）およびそのリガンドである。他の標的は、Gタンパク質受容体で、サブスタンスK受容体、アンジオテンシン受容体、 および アドレナリン受容体、セロトニン受容体、およびPAF受容体が含まれる。例えば、ギルマン（Gilman）、Ann. Rev. Biochem. 56:625-649(1987)を参照されたい。他の標的には、イオンチャネル（例えば、カルシウムチャネル、ナトリウムチャネル、カリウムチャネル）、ムスカリン受容体、アセチルコリン受容体、GABA受容体、グルタミン酸受容体、およびドーパミン受容体が含まれる（Harpold、5,401,629および米国特許第5,436,128号参照）。他の標的は、インテグリン、セレクチン、および免疫グロブリンスーパーファミリーメンバーなどの接着タンパク質である（Springer、Nature346:425-433（1990）；Osborn、Cell 62:3（1990）；Hynes、Cell 69:11（1992）参照）。他の標的は、インターロイキンIL-1からIL-13、腫瘍壊死因子および、インターフェロン、 および、腫瘍増殖因子（TGF-）、コロニー刺激因子(CSF)および顆粒球単球コロニー刺激因子(GM-CSF)などのサイトカインである。「ヒトサイトカイン：基礎および臨床研究のためのハンドブック（Human Cytokines: Handbook for Basic & Clinical Research）」（Aggrawalら編、Blackwell Scientific、Boston、MA 1991）を参照されたい。他の標的は、アデニルシクラーゼ、グアニルシクラーゼ、およびホスホリパーゼCなどの、ホルモン、酵素、および細胞内および細胞間メッセンジャーである。薬剤も、関心対象の標的である。標的分子は、ヒト、哺乳類、または細菌のものでありえる。他の標的は、ウイルスおよび細菌性の微生物病原体のタンパク質、糖タンパク質および炭化水素などの抗原、および腫瘍である。さらに別の標的は、米国特許第4,366,241号に記述されている。標的によってスクリーニングされた物質には、単に標的に結合するのみのものもあるが、標的を刺激したりこれと拮抗するものもある。

#### 【0018】

全長ポリペプチドのコード配列を持つ提示ライブラリーメンバーは、ベクターの増殖前に提示ベクターにもともと挿入されたコード配列と、同じ長さのコード

配列を持つ。

【0019】

ファージという用語は、感染性のあるゲノムを持つファージと、ヘルパーファージとのみパッケージされる欠陥ゲノムを含むファージの両方を示す。そのようなファージはファージミドと呼ばれることもある。

【0020】

「ヒト抗体」という用語は、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列に由来する可変領域および定常領域（存在する場合には）を持つ抗体を含む。本発明のヒト抗体は、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列にコードされていないアミノ酸残基を含む場合がある（例えば、インビトロのランダムもしくは位置指定突然変異誘発、またはインビボの体細胞変異によって導入された変異）。しかし、「ヒト抗体」という用語は、マウスのような別の哺乳類種の生殖細胞系に由来するCDR配列が、ヒトのフレームワーク配列に接続された抗体（ヒト化抗体）は含まない。

【0021】

再配列された重鎖または軽鎖の免疫グロブリン遺伝子座では、VセグメントがD-JまたはJセグメントに直接連結して、それぞれ基本的に完全な $V_H$ または $V_L$ ドメインがコードされるような構造になっている。再配列された免疫グロブリン遺伝子座は、生殖細胞系DNAと比較して同定できる；再配列された遺伝子座は、少なくとも1つの組換え7量体/9量体相同配列を持っている。逆に、再配列されていないまたは生殖細胞系の配列は、Vセグメントが、DまたはJセグメントに直接に隣接するように組換えられてはいない配列を指す。

【0022】

「アイソタイプスイッチング」とは、抗体のクラスまたはアイソタイプが、1つのIgクラスから他のIgクラスに変わることを指す。

【0023】

「スイッチしていないアイソタイプ」とは、アイソタイプスイッチングが起きなかったときに産生される重鎖のアイソタイプクラスを指す；スイッチしていないアイソタイプをコードする $C_H$ 遺伝子は、通常は機能的に再配列されたVDJ遺伝子のすぐ下流にある最初の $C_H$ 遺伝子である。アイソタイプスイッチングは、古典

的または非古典的アイソタイプスイッチングに分類されている。古典的アイソタイプスイッチングは、導入遺伝子中の少なくとも1つのスイッチ配列領域の関与する組換え事象によって起きる。非古典的アイソタイプスイッチングは、例えば、ヒト  $\mu$  およびヒト  $\mu$  ( 関連欠失 ) の間の相同組換えによって起こることがある。導入遺伝子間および/または染色体間組換えのような、別の非古典的スイッチング機構も起き、アイソタイプスイッチングが生じる可能性がある。

#### 【0024】

「スイッチング配列」という用語は、スイッチ組換えを担うDNA配列を指す。通常は $\mu$ スイッチ領域である「スイッチドナー」配列は、スイッチ組換え中に削除される定常領域の5' ( 上流 ) にある。「スイッチアクセプター」領域は、削除される定常領域と、代わりの定常領域 ( 例えば、 $\mu$ 、 $\delta$  等 ) の間にある。必ず組換えが発生する特異的な部位はないため、最終的な遺伝子配列は、通常は構築物から予測することはできない。

#### 【0025】

抗体の体細胞変異および親和性成熟によって、抗体の可変領域の結合親和性に基づいた進化的選択が可能になる。しかし、この工程には、別々に選択された有益な変異を組み合わせる機構がないため、これは性的に生殖する種の個体の天然の進化的選択とは異なっている。個々のB細胞間の組換えがないため、有益な変異は逐次的に選択される必要がある。理論的には、コンビナトリアルライブラリーではそのような組み合わせが可能である ( 少なくとも、2つの変異がそれぞれ重鎖および軽鎖に存在する場合 )。しかし、天然の供給源からのコンビナトリアルライブラリーには、非常に多様な異なる重鎖/軽鎖のペアが含まれるため、クローンの大部分は同一のB細胞骨髓前駆細胞に由来するものではない。そのようなペア形成は、標的抗原を認識する安定な抗体分子を形成しにくい。

#### 【0026】

所定の標的に対する参照抗体の特異的結合を、試験下の抗体が阻害するアッセイ法により、競合を判断する。多数の型の競合的結合アッセイ法が知られている。例えば ( HarlowおよびLane、*「抗体、実験室マニュアル ( Antibodies、A Laboratory Manual )*」、コールドスプリングハーバー出版 ( 1988 ) を参照のこと



）。典型的にはそのようなアッセイ法は、精製された標的、非標識試験抗体、および標識参照抗体を使用することを含む。競合阻害は、試験抗体存在下で標的に結合した標識の量を決定することにより測定される。通常、試験抗体は過剰量存在する。競合アッセイ法により同定される抗体（競合抗体）は参照抗体と同一のエピトープに結合する抗体、および立体障害が生じるために参照抗体が結合するエピトープに十分近接しているエピトープに結合する抗体を含む。競合抗体が過剰量存在する場合には、標的に対する参照抗体の特異的結合を50%阻害すると思われる。

#### 【0027】

##### 詳細な説明

##### 1. 概論

本発明は検出試薬としてヒト抗体を使用する検出法を提供する。本方法は部分的には、ヒト抗体の使用によりいくつかのヒト試料に存在するHAMAおよび/または異好性抗体のために測定された分析物の濃度に大きなゆがみを生じることを回避しようという知見を前提とする。そのようなゆがみの程度を示すデータ、およびヒト抗体の使用によりそれらがいかにして克服されたかは、実施例28に提供される。

#### 【0028】

マウス抗体との比較における、ヒト抗体を生成する従来法の非効率性および限界は、桁外れに高い結合親和性および複数のエピトープ特異性を有する無数のヒト抗体を生産する新規方法の開示により克服される。これらの方法により生産されたヒト抗体の親和性の例は、実施例21に記載される。抗体が多数の異なるエピトープに結合する証拠は、実施例27により提供される。検出試薬として高親和性抗体を使用することは、洗浄をより高いストリンジェンシーで実施することを可能にし、結果としてより高いシグナル-ノイズ比を生じることから望ましい。異なるエピトープに結合する抗体を使用することは、サンドイッチ検出形式において有用である。1999年10月2日に出願された米国特許出願第60/157415号において開示され、本出願において再現された方法を使用して、高親和性ヒト抗体（選択的には異なるエピトープに結合する）はミルスタイン-コーラー（Milstein-Kohl

er) 技術により生成されるマウス抗体のものと同等に容易に生成することが可能である。

#### 【0029】

本出願において開示されたインビトロ検出アッセイ法のためのヒト抗体のさらなる優位点は、大腸菌などの細菌において組換え発現により生産されるヒト抗体が、マウス抗体に典型的な効率よりも、抗原に対して特異的に免疫反応性である抗体を高効率に生産するように折り畳まれたためである。大腸菌で発現されたヒト抗体の免疫反応性の程度に関する例は、表4に提供される。高免疫反応性抗体の使用は、インビトロ検出アッセイ法においてシグナル-ノイズ比を増加させる点で有用である。

#### 【0030】

### II. ヒト抗体の生産

#### A. 概論

ヒト抗体の生産法は1999年10月2日に出願された同時係属中の出願である米国特許出願第60/157415号に記載されている。これらの方法は、Ostbergら(1983) Hybridoma 2:361~367のトリオーマ(Trioma)技術、およびEngelmanらの米国特許第4,634,666号、ファージ提示法、およびヒト免疫系遺伝子を発現する非ヒトトランスジェニックマウスを含む。好ましい方法が以下に再現される。本方法は典型的には、ヒト免疫グロブリン遺伝子を有する非ヒトトランスジェニック動物を免疫化することにより機能する。動物は抗原に結合する広範囲のヒト抗体を発現する。そのような抗体の抗体鎖成分をコードする核酸は、続いて動物から提示ベクターにクローニングされる。典型的には、重鎖配列および軽鎖配列をコードする別々の核酸集団がクローニングされ、その後、別々の集団がベクターに挿入されることにより組換えが行われ、その結果、所定の任意のベクターコピーは重鎖および軽鎖のランダムな組み合わせを受け取る。ベクターは抗体鎖を発現するように設計され、従って、抗体鎖が組み立てられて、ベクターを含む提示パッケージの外表面に提示されうる。例えば抗体鎖はファージ外表面由来のファージコートタンパク質と共に融合タンパク質として発現されうる。その後、提示パッケージは、標的に結合する抗体の提示についてスクリーニングすることができる

。

## 【0031】

いくつかの方法では、提示パッケージがプレスクリーニング段階に供される。そのような方法では、提示パッケージは、パッケージから提示される抗体鎖と共に融合タンパク質として発現されるタグをコードしている。提示パッケージは、タグに対する受容体との結合についてプレスクリーニングされる。プレスクリーニングは、タグに連結された抗体鎖を多コピー提示している提示パッケージを濃縮するのに役立ち、続くスクリーニング段階において標的に結合する提示パッケージの亜集団であると考えられている。しかしながら本発明の実施はこの機構が正しいかどうかには依存することはない。

## 【0032】

受容体を用いたプレスクリーニング（存在する場合）および標的を用いたスクリーニングの後で、標的に結合する提示パッケージが単離され、選択的には、受容体に対するプレスクリーニングが選択的に先行実施される各回において、標的に対するさらなるスクリーニングに供される。提示パッケージは典型的には標的に対するスクリーニングの各回において増幅されるが、プレスクリーニングおよびスクリーニング段階の間には増幅されない。1回または数回の標的に対するスクリーニングの後で、残っている提示パッケージは標的に対する高親和性結合体として非常に濃縮されている。例えば実施例13に示されるように、 $10^9$ または $10^{10} \text{ M}^{-1}$ より高い親和性を有する多数の異なる抗体を単離することが可能である。さらにスクリーニング条件は、選択した閾値以上の親和性を有する抗体を選択するように調整することができる。

## 【0033】

いくつかの方法では、ヒト抗体鎖をコードする核酸は、選抜で生き残った提示ベクターから発現ベクターに一括にサブクロニングされる。典型的には、提示パッケージから提示されているある抗体の重鎖および軽鎖の両方をコードする核酸は発現ベクターにサブクロニングされ、それにより選抜で生き残った提示パッケージに存在していたものと同じの組み合わせの重鎖および軽鎖が発現ベクター内で保持される。発現ベクターは、挿入された抗体鎖を、Fab断片、完全な抗

体、または他の断片として発現するように設計することが可能である。抗体鎖をコードする核酸を一括で発現ベクターにクローニングすること、および続いて宿主細胞においてベクターを発現することにより、結果として完全なヒト抗体またはその断片のポリクローナルな集団が産生される。そのような集団は、通常は標的内の異なるエピトープに対するものとはいえ、大部分が同一の標的に対して非常に高親和性を示す型である、異なる抗体型の多様な混合物を含む。

#### 【0034】

本発明は、任意の所望の標的に対しても著しい高親和性を有する事実上無限の数のヒト抗体を提供することに成功しており（実施例21参照）、これは、部分的には、提示法とトランスジェニック動物法の組み合わせに起因すると考えられる。提示法は所望の特性に関して、無数の抗体をスクリーニングする方法を提供する。しかし、提示ベクターへクローニングする際に生じる軽鎖および重鎖のランダムな会合により、機能を有さない可能性のある重鎖および軽鎖に不自然な組み合わせが生じる。重鎖および軽鎖が天然型であるヒトからクローニングする場合に、重鎖および軽鎖の置換数は非常に高く、おそらくこれらが非常に大きな割合で非天然に生じており、高親和性結合能を有していないと思われる。したがって、高親和性抗体は、そのようなライブラリーでは非常に小さな割合で構成され、単離することが困難である。ヒト免疫グロブリン遺伝子を持つ非ヒトトランスジェニック動物は典型的には、天然型のヒトに存在するヒト免疫グロブリン遺伝子の完全な補体を含んでいない。そのような動物に存在するヒト免疫グロブリン遺伝子のより限定された補体は、高親和性結合能がない重鎖および軽鎖の非天然型ランダム置換の割合を減少させることになると考えられる。したがって、提示選抜の強力な力が、従来法に固有の多数の非天然型組み合わせの負荷なしに適用される場合、無限に多数の高親和性のヒト免疫グロブリンが生じる。

#### 【0035】

抗体遺伝子の体細胞変異および親和性成熟により、結合親和性に基づく変異型配列の進化的選抜が可能となる。しかしながら、この過程は、別々に選択された有用変異の組み合わせを可能にする機構が存在しないために、有性生殖種に由来する個体の進化的自然選択とは異なる。個々のB細胞間で組換えが存在しないこ

とにより、有用変異は段階的に選抜される必要がある。理論的には、コンビナトリアルライブラリーによりそのような組み合わせが可能となる（少なくとも2つの変異が各々重鎖および軽鎖上に存在する場合）。しかし、天然供与源に由来するコンビナトリアルライブラリーは、大部分のクローンが同一のB細胞骨髄前駆細胞には由来していない広範囲の多様性を有する異なる重鎖/軽鎖組を含む。そのような組み合わせは、標的抗原を認識する安定な抗体分子を形成する可能性がより低い。より少ない数の骨髄前駆細胞に由来するB細胞集団を含むトランスジェニック動物は、各鎖が同一起源の前B細胞の子孫に由来する、新規の体細胞変異を受けた重鎖/軽鎖組を含むライブラリーを生成するために特に有用である可能性がある。

#### 【0036】

上記の機構は本発明を用いて達成される結果を説明すると考えられるが、本発明の実施はこれらの概念が正しいかどうかには依存することはない。

#### 【0037】

#### B. ヒト免疫系を持つトランスジェニック動物

本発明で使用するトランスジェニック動物は、異種のヒト免疫系を持ち、通常、ノックアウトされた内在性免疫系を持つ。マウスは、好ましい非ヒト動物種である。HuMAbマウスと呼ばれることもあるトランスジェニックマウスは、再配列されていないヒト重鎖（ $\mu$ 鎖および  $\delta$ 鎖）および 軽鎖免疫グロブリン配列をコードする、ヒト免疫グロブリン遺伝子ミニ遺伝子座、ならびに内在性  $\mu$ 鎖および  $\delta$ 鎖遺伝子座を不活化する標的化した変異を含む（Lonbergら(1994) Nature 368 (6474):856-859および米国特許第5,770,429号）。したがって、このマウスのマウスIgMまたは  $\delta$ 鎖の発現は低下しており、免疫に応答して、導入されたヒト重鎖およびヒト軽鎖の導入遺伝子がクラススイッチングおよび体細胞変異を経て、高親和性のヒトIgG モノクローナル抗体を生成する（Lonbergら(1994)、上記；Lonberg, N. (1994)「実験薬学のハンドブック (Handbook of Experimental Pharmacology)」113:49-101に総説；LonbergおよびHuszar (1995) Intern. Rev. Immunol. Vol. 13:65-93、およびHardingおよびLonberg (1995) Ann. N.Y. Acad. Sci. 764:536-546)；Taylor, L.ら(1992) Nucleic Acids Research 20:6287-629

5;Chen, Jら(1993) International Immunology 5:647-656; Tuailonら(1993) P roc.Natl. Acad. Sci. USA 90:3720-3724; Choiら(1993) Nature Genetics 4:117-123;Chen, Jら(1993) EMBO J. 12:821-830; Tuailonら(1994) J. Immunol.152:2912-2920; Lonbergら(1994) Nature 368 (6474):856-859; Lonberg, N. (1994)Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101; Taylor, L.ら(1994)International Immunology 6:579-591; Lonberg, N.およびHuszar, D. (1995)Intern. Rev. Immunol. Vol. 13:65-93; Harding F.およびLonberg, N. (1995) Ann. N.Y. Acad. Sci 764:536-546; Fishwild, D.ら(1996) Nature Biotechnology14:845-851;米国特許第5,625,126号および第5,770,429号、第5,545,807号、第5,939,598号、国際公開公報第98/24884号、国際公開公報第94/25585号、国際公開公報第93/1227号、国際公開公報第92/22645号、国際公開公報第92/03918号、これらは全てその全体が参照として本明細書に組み入れられる。

#### 【0038】

トランスジェニック非ヒト動物の中には、V-D-J組換えおよびアイソタイプスイッチングを経て、抗原に対して複数のヒトモノクローナル抗体アイソタイプ(例えば、IgG、IgAおよび/またはIgE)を産生する能力を持つものがある。アイソタイプスイッチングは、例えば、古典的または非古典的アイソタイプスイッチングによって起きる。

#### 【0039】

トランスジェニック非ヒト動物は、トランスジェニック動物に含まれるヒト免疫グロブリン導入遺伝子が、B細胞の発生経路全体にわたって正しく機能するように設計されている。マウスの中には、異種重鎖導入遺伝子の正しい機能にアイソタイプスイッチングが含まれるものもある。したがって、本発明の導入遺伝子は、アイソタイプスイッチングおよび以下のうちの1つまたは複数を生成するように作製されている：(1) 高レベルおよび細胞型特異的発現、(2) 機能的遺伝子再配列、(3) 対立遺伝子排除の活性化およびこれに対する応答、(4) 十分なプライマリーレパートリーの発現、(5) シグナル伝達、(6) 体細胞超変異、(7) 免疫応答中の導入遺伝子抗体遺伝子座の支配。

#### 【0040】

トランスジェニック動物の内在性免疫グロブリン遺伝子座が破壊されているトランスジェニック動物では、導入遺伝子是对立遺伝子排除を活性化する必要がない。また、導入遺伝子が機能的に再配列された重鎖および/または軽鎖免疫グロブリン遺伝子を含むトランスジェニック動物では、少なくともすでに再配列されている導入遺伝子に関しては、機能的な遺伝子再配列という第2の基準は不要である。

#### 【0041】

ヒトモノクローナル抗体の産生のために使用されたトランスジェニック非ヒト動物の中には、トランスジェニック動物の生殖細胞系中に、再配列された、再配列されていない、または再配列されたおよび再配列されていないものの組み合わせの、異種免疫グロブリン重鎖および軽鎖導入遺伝子を含むものがある。また、重鎖導入遺伝子は、機能的なアイソタイプスイッチ配列を含むことがあり、これはトランスジェニック動物のB細胞中で複数の $C_H$ 遺伝子をコードする異種導入遺伝子のアイソタイプスイッチングを支持する能力を持つ。そのようなスイッチ配列は、導入遺伝子 $C_H$ 遺伝子の供給源となる種の生殖細胞系免疫グロブリン遺伝子座中に天然に存在するものであるか、導入遺伝子構築物を受け取る種（トランスジェニック動物）において発生するものに由来するスイッチ配列である可能性がある。例えば、トランスジェニックマウスの産生に使用されるヒト導入遺伝子構築物は、マウス重鎖遺伝子座で自然に存在するもの類似したスイッチ配列を組み込んでいれば、アイソタイプスイッチング事象の頻度が高くなる可能性がある。これは、おそらくマウスのスイッチ配列は、マウスのスイッチレコンビナーゼ酵素系で機能するように最適化されているが、ヒトのスイッチ配列はそうではないためである。スイッチ配列は、通常のクローニング方法によって単離およびクローニングできる。または、免疫グロブリンスイッチ領域の配列に関する公表された配列情報に基づいて設計された、重複する合成オリゴヌクレオチドから、新たに合成することもできる（Millsら、Nucl. Acids Res. 15:7305-7316 (1991); Siderasら、Intl. Immunol. 1:631-642 (1989)、参照として組み入れられる）。通常、機能的に再配列された異種重鎖および軽鎖免疫グロブリン導入遺伝子は、上述のトランスジェニック動物のB細胞中に、かなりの割合で見られる（少なくとも

も10%)。

【0042】

本発明のトランスジェニック動物の作製に使用される導入遺伝子には、少なくとも1つの可変遺伝子セグメント、1つの多様性遺伝子セグメント、1つの接合遺伝子セグメント、および少なくとも1つの定常領域遺伝子セグメントをコードするDNAを含む重鎖導入遺伝子が含まれている。免疫グロブリン軽鎖導入遺伝子には、少なくとも1つの可変遺伝子セグメント、1つの接合遺伝子セグメント、および少なくとも1つの定常領域遺伝子セグメントをコーニック非ヒト動物以外の種、通常はヒトの免疫グロブリン重鎖および軽鎖遺伝子セグメントをコードするDNAに由来する、または対応するという点で、トランスジェニック非ヒト動物に対して異種である。

【0043】

通常、導入遺伝子は、個々の遺伝子セグメントが再配列されていない形で作製される。すなわち、機能的な免疫グロブリン軽鎖または重鎖をコードするように再配列されていない。そのような再配列されていない導入遺伝子は、V遺伝子、D遺伝子、およびJ遺伝子のセグメントの組換え（機能的再配列）を支持し、好ましくは、抗原に曝露されたときに、トランスジェニック非ヒト動物内で、再配列された免疫グロブリン重鎖中のD領域遺伝子セグメント全体または一部の組み込みを支持する。そのような導入遺伝子は、通常、C、D、およびJセグメントのかなりの部分、ならびにV遺伝子セグメントのサブセットを含む。

【0044】

そのような導入遺伝子構築物では、例えば、プロモーター、エンハンサー、クラススイッチ領域、RNAプロセッシングのためのスプライドナーおよびスプライスアクセプター配列、組換えシグナル等のような種々の調節配列は、異種DNA由来の対応する配列を含む。そのような調節配列は、本発明で使用する非ヒト動物と同一または関連した種から、導入遺伝子に組み込むことができる。例えば、ヒト免疫グロブリン遺伝子セグメントは、導入遺伝子内で齧歯動物の免疫グロブリンエンハンサー配列と組み合わせて、トランスジェニックマウスで利用できる。または、哺乳類のゲノム中で自然に存在することが知られている機能的なDN



A配列と相同ではないような、合成調節配列を導入遺伝子中に組み込むこともできる。合成調節配列は、例えば、スプライスアクセプター部位またはプロモーター/エンハンサーモチーフの許容配列を指定するような、コンセンサスルールにしたがって設計される。導入遺伝子はミニ遺伝子座を含み得る。

#### 【0045】

ヒト抗体の作製に使用されるトランスジェニック動物の中には、米国特許第5,770,429号の実施例37に記述される導入遺伝子、または実施例24（例えば、HCo12）に記述される導入遺伝子のコピーを少なくとも1つ、通常は2～10個、および時折25～50個またはそれ以上、米国特許第5,770,429号の実施例38に記述される軽鎖導入遺伝子のコピーを少なくとも1つ、実施例23に記述されるC<sub>H</sub>欠失のコピーを2つ、および米国特許第5,770,429号の実施例9に記述されるJ<sub>H</sub>欠失のコピーを2つ、含むものがある。上記の各々は全ての目的のためにその全体が参照として本明細書に組み入れられる。

#### 【0046】

トランスジェニック動物の中には、かなりのレパートリーを持つ免疫グロブリン産生を示すものがある。したがって、例えば、内在性Ig遺伝子が不活化した動物において、免疫グロブリンの合計のレベルは、約0.1～10mg/ml血清、好ましくは0.5～5mg/mlの範囲である。トランスジェニックマウスの発現する免疫グロブリンは、通常、抗原性の高いタンパク質、例えば、ブドウ球菌プロテインAの約半分またはそれ以上を認識する。

#### 【0047】

トランスジェニック非ヒト動物は、抗原および/または抗原を発現する細胞の、精製または濃縮した調製物で免疫できる。この動物は、導入遺伝子内のスイッチ組換え（シス-スイッチング）によるクラススイッチングを受けるB細胞を産生し、免疫化された抗原と反応する免疫グロブリンを発現する。免疫グロブリンは、ヒト導入遺伝子によって重鎖および軽鎖ポリペプチドがコードされているヒト配列の抗体の可能性があるが、このヒト導入遺伝子配列には、体細胞変異およびV領域の組換え結合で得られた配列、ならびに生殖細胞系にコードされた配列が含まれ得る。体細胞変異および異なるV-JおよびV-D-J組換え結合の結果として、

他の非生殖細胞系配列が存在していても、これらのヒト配列の免疫グロブリンは、ヒトV<sub>L</sub>またはV<sub>H</sub>遺伝子セグメントおよびヒトJ<sub>L</sub>またはJ<sub>L</sub>セグメントによってコードされるポリペプチド配列と実質的に同一であると言える。そのようなヒト配列抗体に関して、各鎖の可変領域は、通常、ヒト生殖細胞系V、J、および重鎖の場合はD遺伝子セグメントによって少なくとも80%コードされている；しばしば可変領域の85%は、導入遺伝子上に存在するヒト生殖細胞系配列によってコードされている；しばしば可変領域配列の90%または95%またはそれ以上が、導入遺伝子上に存在するヒト生殖細胞系配列によってコードされている。しかし、体細胞変異およびVJおよびVDJ結合によって非生殖細胞系配列が導入されているので、ヒト配列抗体は、しばしば、マウスの生殖細胞系中のヒト導入遺伝子に見られるヒトV遺伝子、D遺伝子、またはJ遺伝子のセグメントによってコードされていない、いくつかの可変領域配列（およびそれより頻度は低いが定常領域配列）を持つ。通常、そのような非生殖細胞系配列（または各ヌクレオチド位置）は、CDR内もしくはその付近、または体細胞変異が密集することが知られている領域中に密集している。

#### 【0048】

あらかじめ決められた抗原に結合するヒト配列抗体は、ヒト配列鎖（1鎖、2鎖、3鎖、または4鎖のような）、およびヒト配列軽鎖（鎖または鎖のような）を含む抗体が生成する、アイソタイプスイッチングから得られる。そのようなアイソタイプスイッチングをしたヒト配列抗体はしばしば、抗原によるB細胞の親和性成熟および選択の結果、特に2次（およびその後の）抗原の攻撃後には、通常は可変領域およびCDR中またはそれから10残基以内に、1つまたは複数の体細胞変異を含む。図7は、本発明の種々の免疫グロブリンにおける体細胞変異の頻度を示す。

#### 【0049】

HuMAbトランスジェニック動物は、フロイント完全アジュバント中の抗原によって腹腔内(IP)に免疫化され、その後、数ヶ月にわたって、2週間ごとまたは毎月、フロイント不完全アジュバント中の抗原によってIP免疫化された。また、アジュバントなしの細胞全体が、高い抗原性を示すことが分かった。免疫応答は、

眼窩後方の採血によって得られた血漿試料を用いて、免疫プロトコルの期間を通してモニターされた。マウスは、屠殺して脾臓を摘出する3日前に、抗原を静脈内に追加投与できる。典型的には、免疫化に対してそれぞれ2～3回の融合を行う。

#### 【0050】

少なくとも重鎖および軽鎖可変領域をコードする核酸は、免疫化されたトランスジェニック動物または未感作のトランスジェニック動物のいずれかからクローニングすることが可能である。核酸はそのような動物のリンパ細胞からゲノムDNAまたはcDNAとしてクローニングすることが可能である。脾臓はそのような細胞の好ましい供給源である。免疫グロブリン配列のクローニングに先だってそのような細胞の不死化は必要とされない。通常mRNAが単離され、ポリdTプライマーを用いた逆転写反応により増幅される。その後、cDNAはヒト免疫グロブリンの保存領域に対するプライマーを用いて増幅される。軽鎖および重鎖の集団は各々から別々に増幅されるが、軽鎖集団内の軽鎖は一括で増幅され、重鎖集団内の重鎖も同様である。典型的には軽鎖の増幅された集団は、少なくとも100、1,000、10,000、100,000または1,000,000個の異なる軽鎖を備えている。同様に重鎖の増幅された集団は、少なくとも100、1,000、10,000、100,000または1,000,000個の異なる重鎖を備えている。

#### 【0051】

### C. 提示ライブラリー

#### 1. 提示パッケージ

複製可能な遺伝パッケージと呼ばれることもある提示パッケージは、ポリペプチドをコードする核酸に結合した、スクリーニングされるポリペプチドを含む、スクリーニング可能なユニットである。核酸はインビボ（例えば、ベクターとして）またはインビトロ（例えば、PCR、転写および翻訳による）のいずれかで複製可能である。インビボ複製は、自律的（細胞など）、宿主因子の補助を受けて（ウイルスなど）、または、宿主およびヘルパーウイルスの補助を受けて（ファージミドなど）、行われる。細胞、胞子、またはウイルスは、提示パッケージの例である。複製可能な遺伝パッケージは、真核生物または原核生物系でよい。提

示ライブラリーは、提示される外来ポリペプチドをコードする核酸を、提示パッケージのゲノムに導入して、通常は提示パッケージの外表面に発現される内在性タンパク質との融合タンパク質を形成して、作製される。融合タンパク質の発現、外表面への輸送、および会合によって、遺伝パッケージの外表面から外来ポリペプチドが提示されることになる。

#### 【0052】

提示パッケージの別の種類は、ポリペプチドをコードする核酸に結合したポリペプチドを含む。そのような配置は、いくつかの方法で可能である。米国特許第5,733,731号は、DNA結合ポリペプチドおよびスクリーニングされるポリペプチドを含む融合タンパク質が発現されるように、プラスミドを作製する方法を記述している。発現後、融合タンパク質は、DNA結合ポリペプチド成分を介して、それをコードするベクターに結合する。融合タンパク質を発現するベクターは、標的への結合によってスクリーニングし、更なるスクリーニングまたは解析のために、ベクターが回収される。別の方法では、ポリペプチドは、スクリーニングされるポリペプチド、ポリペプチドをコードするmRNA、およびmRNAとポリペプチドを結合させているリボソームを含む提示パッケージの成分として、スクリーニングされる。(HanesおよびPluckthun、PNAS 94、4937-4942 (1997); Hanesら、PNAS 95、14130-14135(1998); Hanesら、FEBS Lett、450、105-110 (1999); 米国特許第5,922,545号参照)。選択された複合体のmRNAは、逆転写およびPCR、およびインビトロ転写によって増幅され、mRNAから翻訳されるタンパク質とリボソームに結合してさらなるスクリーニングが行われる。別の方法では、スクリーニングのために、RNAはそのRNAによってコードされるポリペプチドと融合される(RobertsおよびSzostak、PNAS 94、12297-12302(1997)、Nemotoら、FEBS Letters 414、405-408 (1997))。スクリーニングで残った複合体のRNAは、逆転写PCRおよびインビトロ転写によって増幅される。。

#### 【0053】

提示ライブラリーに最もよく使用される遺伝パッケージは、バクテリオファージ、特に繊維状ファージで、特にファージM13、FdおよびF1である。大部分の研究では、これらのファージのgIIIまたはgVIII中に、提示されるポリペプチドを

コードするライブラリーが挿入され、融合タンパク質を形成する。例えば、ドウナー (Downer)、国際公開公報第91/19818号; デブリン (Devlin)、国際公開公報第91/18989号; マクカフェリティ (MacCafferty)、国際公開公報第92/01047号 (遺伝子III); フーゼ (Huse)、国際公開公報第92/06204号; カン (Kang)、国際公開公報第92/18619号 (遺伝子VIII) を参照されたい。そのような融合タンパク質には、通常はファージコートタンパク質以外の分泌タンパク質のシグナル配列、提示されるポリペプチド、および遺伝子IIIもしくは遺伝子VIIIタンパク質のいずれかまたはその断片が含まれている。外来のコード配列は、しばしば遺伝子IIIまたは遺伝子VIIIのN末端またはその付近に挿入されるが、他の挿入部位も可能である。繊維状ファージベクターの中には、遺伝子IIIまたは遺伝子VIIIの第2のコピーを産生するように加工されたものもある。そのようなベクターでは、外来配列は、2つのコピーの1つのみに挿入される。他のコピーが発現されると、ファージ粒子に組み込まれた融合タンパク質の比率を効果的に下げるので、ファージの成長に有害なポリペプチドに対する選択を低下させるという点で有益であり得る。別の変法では、外来ポリペプチド配列は、ファージコートタンパク質およびファージパッケージング配列をコードするが、複製が不可能なファージミドベクター中にクローニングされる。ファージミドは細胞にトランスフェクトされ、ヘルパーファージの感染によってパッケージングされる。ファージミド系を使用すると、やはりコートタンパク質および提示されるポリペプチドから形成される融合タンパク質を、ヘルパーファージから発現されるコートタンパク質の野生型コピーで希釈する効果がある。ガラード (Garrard)、国際公開公報第92/09690号を参照されたい。

#### 【0054】

真核細胞ウイルスは、同様な方法でポリペプチドを提示するために使用できる。例えば、マウスのモロニー白血病ウイルスのgp70に融合されたヒトヘレグリンの提示は、ハン (Han) ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:9747-9751 (1995) に報告されている。提示パッケージとして胞子も使用できる。この場合、ポリペプチドは胞子の外表面から提示される。例えば、枯草菌 (*B. subtilis*) の胞子が適当であることが報告されている。これらの胞子のコートタンパク質の配列は

、Donovanら、J. Mol. Biol. 196:1-10 (1987)に提供されている。提示パッケージとして細胞も使用できる。提示するポリペプチドは、細胞表面に発現される細胞タンパク質をコードする遺伝子に挿入される。ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*)、枯草菌 (*Bacillus subtilis*)、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、ビブリオコレラ (*Vibrio cholerae*)、ニューモニアクレブシェラ肺炎杆菌 (*Klebsiella pneumonia*)、淋菌 (*Neisseria gonorrhoeae*)、ナイセリアメニンギチジス (*Neisseria meningitidis*)、バクテロイデスノドサス (*Bacteroides nodosus*)、牛モラクセラ菌 (*Moraxella bovis*)、および特に大腸菌 (*Escherichia coli*) を含む細菌細胞が好ましい。外表面タンパク質の詳細は、ラドナー (Ladner) ら、米国特許第5,571,698号、およびジョージオ (Georgiou) ら、Nature Biotechnology 15:29-34 (1997) および、本明細書中に引用されている参照に論述されている。例えば、大腸菌 lamB タンパク質が適当である。

#### 【0055】

### 2. 提示される抗体

抗体鎖は1本鎖または2本鎖の形で提示される。1本鎖抗体ライブラリーは、抗体の重鎖または軽鎖のみ、またはその可変領域を含み得る。しかし、より一般的には、1本鎖抗体ライブラリーのメンバーは、単一のつながったタンパク質内でペプチドスペーサーによって隔てられた重鎖および軽鎖可変領域の融合から形成されている。ラドナー (Ladner) ら、国際公開公報第88/06630号；マクカフエリティ (McCafferty) ら、国際公開公報第92/01047号を参照されたい。2本鎖抗体は、重鎖および軽鎖またはその結合断片が非共有結合して形成されている。2本鎖抗体は、重鎖可変領域、リンカー、および軽鎖可変領域をそれぞれ含む2つの1本鎖抗体の会合によっても形成され得る。ダイアボディ (diabody) として知られる抗体では、1つの1本鎖抗体の重鎖は他の1本鎖抗体の軽鎖に結合し、逆もまた同じで、2つの同一の抗原結合部位が形成される (Hollingerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90、6444-6448 (1993) およびCarterおよびMerchan、Curr. Op. Biotech. 8、449-454 (1997))。したがって、1本鎖抗体を提示するファージは、ダイアボディとして2つの1本鎖抗体を会合させることによって、ダイアボディを形成できる。

## 【0056】

抗体ライブラリーの多様性は、免疫または非免疫B細胞のモノクローナル集団のような、天然の供給源から抗体をコードする配列を入手することで得られる。または、またはそれに加えて、多様性は、提示ベクターへの挿入前または挿入後に、抗体鎖をコードする核酸に人工的変異誘発を行なっても、得られる。そのような変異誘発は、PCR過程中、PCRの前または後で導入できる。

## 【0057】

選択的にスペーサーの隣接する、提示される抗体鎖をコードする核酸は、上述のように、標準的な組換えDNA手法によって、提示パッケージのゲノム中に挿入される（一般的に、Sambrookら、「分子クローニング：実験室マニュアル（Molecular Cloning: A Laboratory Manual）」第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、NY、1989、参照として本明細書に組み入れられる）。核酸は、抗体鎖（スペーサーもしくはフレームワーク残基あり、またはなし）として最終的に発現される。ファージ、細菌、および胞子ベクターでは、抗体鎖は、複製可能パッケージの外表面タンパク質の全体または一部に融合されている。ライブラリーはしばしば約 $10^3$ 個、 $10^4$ 個、 $10^6$ 個、 $10^7$ 個、 $10^8$ 個、またはそれ以上のメンバーを持つ。

## 【0058】

2本鎖抗体提示ライブラリーは、上述の提示ライブラリーの種を表す。そのようなライブラリーの作製は、例えば、ドウナー（Downer）、米国特許第5,427,908号；米国特許第5,580,717号、フーゼ（Huse）、国際公開公報第92/06204号；フーゼ（Huse）「抗体エンジニアリング（Antibody Engineering）」（Freeman 1992）、第5章；カン（Kang）、国際公開公報第92/18619号；ウィンター（Winter）ら、国際公開公報第92/20791号；マクカフェリティ（MacCafferty）、国際公開公報第92/01047号；フーゲンブーム（Hoogenboom）、国際公開公報第93/06213号；ウィンター（Winter）ら、Annu. Rev. Immunol. 12:433-455 (1994)；フーゲンブーム（Hoogenboom）ら、Immunological Reviews 130:41-68(1992)；ソダーリンド（Soderlind）ら、Immunological Reviews 130:109-124 (1992)に記述されている。例えば、2本鎖抗体ファージ提示ライブラリーでは、1本鎖ライブラリーと

同様に、1つの抗体鎖がファージのコートタンパク質に融合される。パートナー抗体鎖は、第1の抗体鎖と複合体を形成するが、パートナーはファージコートタンパク質に直接結合はしていない。重鎖または軽鎖のどちらかがコートタンパク質に融合されている鎖でありえる。コートタンパク質に融合されていないほうの鎖が、パートナー鎖になる。この配置は、通常は、1つの抗体鎖遺伝子をコードする核酸セグメントを、ファージ提示ベクターのgIIIまたはgVIIIのいずれかに組み込んで、シグナル配列、抗体鎖、およびファージコートタンパク質を含む融合タンパク質を形成させることによって、行われる。パートナー抗体鎖をコードする核酸は、第1の抗体鎖をコードするのと同じベクターに挿入できる。選択的に、重鎖および軽鎖は、同一のプロモーターに結合した同一の提示ベクターに挿入し、ポリシストロン性のメッセージとして転写されることができる。または、パートナー抗体鎖をコードする核酸は、別のベクター（ファージベクターである場合もない場合もある）に挿入できる。この場合、2つのベクターは同一の細胞中で発現される（国際公開公報第92/20791号参照）。パートナー鎖をコードする配列は、パートナー鎖がシグナル配列に結合するが、ファージコートタンパク質には融合しないように、挿入される。両方の抗体鎖は発現され、細胞の周辺細胞質に輸送され組み立てられて、ファージ粒子に組み込まれる。

#### 【0059】

通常は、ヒト軽鎖および重鎖の可変領域のみが、トランスジェニック非ヒト動物からクローニングされる。そのような場合、提示ベクターは、挿入された配列から発現される重鎖および軽鎖可変領域とインフレームで、重鎖および軽鎖の定常領域、またはその断片を発現するように設計できる。通常は、定常領域は天然に存在するヒト定常領域である；少数の保守的な置換は許容されるが、好ましくはない。Fab断片では、重鎖定常領域は、通常C<sub>H</sub>1領域、および選択的にヒンジ領域の一部または全体を含んでおり、軽鎖定常領域は、C またはC のような完全な軽鎖定常領域である。定常領域のアイソタイプの選択は、部分的に補体依存性の細胞毒性が最終的に必要かどうかによって依存する。例えば、ヒトアイソタイプIgG1およびIgG4はそのような細胞毒性を支持するが、IgG2およびIgG3は支持しない。または、提示ベクターは非ヒト定常領域を提供することもできる。そのような場



合には、通常、抗体鎖の可変領域のみが提示ベクターからサブクローニングされ、ヒト定常領域は、挿入された抗体配列とインフレームの発現ベクターによって提供される。

#### 【0060】

別の変法では、トランスジェニック動物から定常領域および可変領域の両方がクローニングされる。例えば、Fab断片の発現のために、重鎖可変領域はC<sub>H</sub>1定常領域に結合して、軽鎖可変領域は完全な軽鎖定常領域に接続して、クローニングできる。この場合、提示ベクターは定常領域をコードする必要はない。

#### 【0061】

抗体をコードする配列は、トランスジェニック非ヒト動物のリンパ細胞から得られる。通常は、細胞は免疫化されるが、この場合、免疫は細胞を採集する前にインビボで行なうか、細胞の採集後にインビトロで行なうか、その両方が可能である。免疫化された動物の脾臓細胞が、好ましい供給材料である。免疫は、任意の種類の抗原で行なうことができる。抗原は、しばしばヒトのタンパク質である。

#### 【0062】

再配列された免疫グロブリン遺伝子は、ゲノムDNAまたはmRNAからクローニングできる。後者の場合、細胞からmRNAが抽出され、逆転写酵素およびポリdTオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、cDNAが調製される。抗体をコードする配列のクローニングのためのプライマーは、ラリック (Larrick) ら、Bio/Technology 7:934 (1989)、ダニエルソン (Danielsson) およびボレバセック (Borrebaeck)、「抗体エンジニアリング：実用ガイド (Antibody Engineering: A Practical Guide)」 (Freeman, NY 1992) p89、およびフーゼ (Huse)、同書、第5章に論述されている。

#### 【0063】

抗体断片のレパートリーは、増幅されたV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>配列を、いくつかの方法で組み合わせることによって作製された。軽鎖及び重鎖を、異なるベクターに挿入し、ベクターをインビトロ (Hogrefeら、Gene 128:119-126 (1993)) またはインビボ (Waterhouseら、Nucl. Acids. Res. :2265-66 (1993)) で組み合わせるこ

とができる。または、軽鎖および重鎖は順次、同じベクターにクローニングしたり (Barbasら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7987-82 (1991))、またはPCRによって組立て、ベクター中に挿入できる (Clacksonら、Nature 352:624-28 (1991))。重鎖のレパートリーは単一の軽鎖と組み合わせるか、その逆もできる。フーゲンブーム (Hoogenboom) ら、J. Mol. Biol. 227:381-88 (1992)。

#### 【0064】

通常は、抗体重鎖及び抗体軽鎖をコードするセグメントは、軽鎖および軽鎖のさらなる集団からサブクローニングされるため、各ベクター中の集団からの重鎖および軽鎖のランダムなペアの結合が生じる。したがって、改変されたベクターは、通常、天然に存在する抗体中では見られない、重鎖および軽鎖可変領域の組み合わせを含む。これらの組み合わせの中には、通常、選択過程で残り、以下のポリクローナルライブラリー中にも存在するものがある。

#### 【0065】

重鎖および軽鎖をコードする配列の集団のクローニングのための典型的なベクターおよび手順は、フーゼ (Huse)、国際公開公報第92/06204号に記述されている。Hcポリペプチドをコードする配列の多様な集団が、M13IX30にクローニングされ、Lcポリペプチドをコードする配列がM13IX11にクローニングされる。この集団はM13IX30中のXhoI-SeeIまたはStuI制限酵素部位の間、およびM13IX11のSacI-XbaIまたはEcoRV部位の間に挿入される (それぞれHuseの図1AおよびB)。両方のベクターは、H<sub>c</sub>およびL<sub>c</sub>コード配列およびその関連ベクター配列の結合のために、MluI-HindIII制限酵素部位 (Huseの図1AおよびB) を2対含んでいる。2つのペアは、クローニング部位について対称的な方向になっており、発現される配列を含むベクタータンパク質のみが、単一のベクター中に正確に組み合わせられるようになっている。

#### 【0066】

抗体鎖の繊維状ファージへのクローニングのための他の典型的ベクターおよび手法は、本発明の実施例に記述されている。

#### 【0067】

D. 多価提示メンバーの濃縮

## 1. 本方法の理論

提示ライブラリーでは、好ましくは、ポリペプチドの複数のコピーを提示するメンバーを濃縮するべきであるという考えは、一部の初期の報告と矛盾した所見であるように見える。Cwirllaら、上記を参照されたい。提示ライブラリーに関する大部分の研究は、核酸ライブラリーを繊維状 (filamentous) ファージのpIIIまたはpVIII中に挿入して行われた。pIIIはファージ当たり4コピーまたは5コピー存在し、pVIIIはファージ当たり数百コピー存在するので、初期の報告では、外来ポリペプチドはファージ当たり対応する数で提示されると仮定された。しかし、より最近の研究では、ファージ当たりに提示されるポリペプチドの実際のコピー数は、おそらく、ポリペプチドのタンパク質分解切断のために、理論的な期待値よりもはるかに少ないことが明らかになった。Winterら、Ann. rev. Immunol. 12:433-55 (1994)。また、ファージ提示に使用されるベクター系は、しばしばファージコートタンパク質を2コピーコードしており、その内の1つは野生型タンパク質、他は提示される外来ポリペプチドと融合タンパク質を形成する。両方のコピーが発現され、野生型コートタンパク質は、ファージコートにおける融合タンパク質の割合を減少させる。

### 【0068】

Fabが繊維状ファージのpVIIIから発現される場合に、ファージ当たりに提示されるFabの典型的な比率は、約0.2である。ファージ当たりの平均発現頻度がnの場合に、y個のFabがファージ粒子上で発現される確率Pr(y)は、ポアソン分布

### 【数1】

$$\text{Pr}(y) = e^{-n} n^y / y!$$

で与えられる。

### 【0069】

ファージ当たり0.2のFabという出現率では、ファージ当たり0個、1個、2個、および3個のFabが発現する確率は、0.82、0.16、0.016、および0.0011である。したがって、2つまたはそれ以上のFabを提示するファージ粒子の比率は、0.017に過ぎない。

### 【0070】

ファージ提示ライブラリーで複数のFab断片を提示するメンバーの割合が少ないことは、そのようなライブラリーメンバーの中で、ごくわずかな割合のみが、固定化した結合パートナーへの親和性選択で残ることと関連する。特定の標的に対して高い結合親和性を持つことが知られている、同一のFab断片を全てのメンバーがコードするようなライブラリーが作製された。結合したファージから遊離のものを除去するための、ごく穏やかな分離条件下でさえも、ファージ全体の約0.004以上を結合させることは不可能だった。この割合は、少なくとも2つのFab断片を提示するファージの比率と、同じ桁であり、固定化した標的に結合するためには、ファージは少なくとも2つのFab断片を提示する必要があることが示唆される。おそらく、剪断力によって、単一のFab断片のみを提示しているファージが固相から解離され则认为られる。したがって、ファージFabライブラリーメンバーが、遊離ファージからの結合ファージの分離が可能なほど十分な親和力で固定化した標的に結合するためには、少なくとも2つの結合事象が必要である。他の形の提示ライブラリーでも、同様な制限が適用されると予想される。

#### 【0071】

したがって、本発明の好ましい戦略は、ライブラリーをスクリーニング標的に接触させる前に、提示された抗体鎖に融合されたレポーターへ結合するライブラリーメンバーを濃縮することである。プレスクリーニングにより、タグのコピーを少なくとも2つ提示し、そのためにタグに結合した抗体鎖を少なくとも2コピー提示するライブラリーメンバーが濃縮され则认为られる。したがって、2つ以上の抗体鎖を持たないライブラリーメンバーで、固定化したスクリーニング標的に対する提示された抗体の結合を介した親和性選択で残ることができないが、そのような標的またはその支持体に複数の非特異的結合を形成することによって親和性選択で残ることができるものは、標的へのライブラリーのスクリーニングの前に、実質的に除去される。

#### 【0072】

### 2. タグおよび受容体

上記の戦略は、対になったタグと受容体を使用して実施される。タグは、ライブラリーの異なるメンバーに共通で、提示パッケージには異種である任意のペプ

チド配列でよく、提示パッケージから提示されるポリペプチドに融合される。例えば、タグは合成ペプチド配列、抗体の定常領域であり得る。いくつかの方法では、軽鎖または重鎖可変領域の一方のみが、メンバー間で異なるような1本鎖抗体が提示される。そのような場合には、特に、異なるメンバー間で同一の可変領域をタグとして使用できる。適当なタグ-受容体の組み合わせには、エピトープと抗体が含まれる；例えば、多くの高親和性ヘキサペプチドリガンドが、抗ダイノルフィンmAb 32.39として知られており（Barrettら、Neuropeptides 6:113-120 (1985)およびCullら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:1865-1869 (1992)参照）、種々の短いペプチドは、MAb 3E7に結合することが知られている（Schatz、Biotechnology11:1138-43 (1993)）。タグと抗体の別の組み合わせは、BlancarおよびRutter、Science 256:1014-1018 (1992)に記述されている。

#### 【0073】

タグ-受容体ペアの別の例は、FLAG（商標）システム(Kodak)である。FLAG（商標）分子タグは、標的結合部に連結された8アミノ酸FLAGペプチドマーカースからなる。FLAGコード配列を含む24塩基対のセグメントを、提示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の隣に挿入できる。FLAGペプチドには、C末端の5アミノ酸に対応する、エンテロキナーゼ認識部位が含まれている。FLAGペプチドマーカースと共に使用するために適したキャプチャー部分には、抗FLAG M1、M2およびM5抗体が含まれ、これらは市販されている。

#### 【0074】

ペプチドおよび抗体のさらに別の組み合わせは、通常のアフィニティ提示法によって同定することができる。ペプチド配列と受容体の別の適当な組み合わせには、ポリヒスチジンおよびアガロース上に固定された $\text{Ni}^{2+}$ を含む金属キレートリガンド（Hochuli、「遺伝子エンジニアリング：原理と方法（Genetic Engineering: Principles and Methods）」（JK Setlow編、Plenum Press、NY）、第18章、pp87-96）およびマルトース結合タンパク質（Mainaら、Gene 74:365-373 (1988)）が含まれる。

#### 【0075】

受容体は、しばしばビオチンで標識され、アビジンでコートされた支持体に受

容体を固定することが可能になる。ビオチン標識は、ビオチン化酵素BirA (Schatz, Biotechnology 11:1138-43 (1993)参照) を用いて行なうことができる。

#### 【0076】

タグをコートする核酸配列は、提示されるポリペプチドおよび提示パッケージの外表面タンパク質を含む融合タンパク質の一部としてタグが発現するように、提示ベクター中に挿入される。タグと提示されるポリペプチドの両方とも、パッケージの外表面に露出していれば、これらの成分の相対的順序は、特に重要ではない。例えば、タグは外表面タンパク質と提示されるポリペプチドの間に位置したり、融合タンパク質の露出した末端またはその付近に位置することが可能である。

#### 【0077】

Fabを提示する提示パッケージでは、Fab重鎖又はFab軽鎖のいずれにも融合でき、どちらの鎖がファージコートタンパク質に連結しているかは関係ない。選択的に、重鎖および軽鎖に各々1つずつ融合した2つの異なるタグを使用することもできる。1つのタグは、通常ファージコートタンパク質とこれに連結した抗体鎖の間に位置し、他方はパートナー鎖のN末端またはC末端に位置する。

#### 【0078】

### 3. 多価ライブラリーメンバーの選択

多価ライブラリーメンバーの選択は、ライブラリーメンバーのタグ成分の受容体をライブラリーに接触させて実行される。通常は、固相に固定された受容体をライブラリーに接触させ、ライブラリーメンバーのタグを介した受容体への結合が平衡状態に達するようにする。その後、結合した受容体およびライブラリーメンバーを、受容体が親和性を持つ固相を添加することによって（例えば、ビオチン標識された受容体を固定するために、アビジン標識された固相が使用できる）、溶液から取り出す。または、ライブラリーに溶液中の受容体を接触させ、その後、受容体を固定することもできる。受容体の濃度は、通常、液相結合でのタグ/受容体のKdまたはそれ以上で、そのため標識されたタグの大部分は、平衡状態で受容体に結合する。受容体-ライブラリーメンバーが固相と接触すると、固相と溶液中のライブラリーメンバーを分離した後では、少なくとも2つの提示され

たタグを介して受容体に結合したライブラリーメンバーのみが、固相に結合したままになる。1つのタグを介して受容体に結合したライブラリーメンバーは、固相の分離および洗浄の間に、固相から離れると考えられる。結合しなかったライブラリーメンバーを除去した後、イオン強度またはpHの変化、または受容体への結合においてタグと競合する物質を添加することによって、結合したライブラリーメンバーを、受容体および固相から分離することができる。例えば、アガロース上に固定され $\text{Ni}^{2+}$ を含む金属キレートリガンドのヘキサヒスチジン配列への結合は、溶液にイミダゾールを添加して、金属キレートリガンドの結合に対して競合させることで、容易に逆行できる。抗体-ペプチド結合は、pHを10.5またはそれ以上に上昇させることで、しばしば分離できる。

#### 【0079】

この方法で選択されたライブラリーメンバー当たりのポリペプチドの平均数は、いくつかの要素による影響を受ける。液相結合中の受容体濃度を低下させると、選択されたライブラリーメンバーの平均ポリペプチド数が上昇する。洗浄条件のストリンジェンシーを上げて、やはり選択されたライブラリーメンバー当たりの平均ポリペプチド数が上昇する。ライブラリーメンバーおよび固相の間の物理的關係も操作して、ライブラリーメンバー当たりの平均ポリペプチド数を増加させることができる。例えば、固相として分離した粒子が使用される場合、粒子サイズを低下させると、結合の立体的制約が増加し、ライブラリーメンバー当たり提示されるポリペプチドの密度が高くなる必要がある。

#### 【0080】

それぞれが1つの抗体鎖に結合した2つのタグを持つFabライブラリーでは、2回の類似した選択を実行でき、1回目の産物が、2回目の出発材料になる。1回目の選択は、第1のタグに対する受容体を用いて行い、2回目は第2のタグに対する受容体を用いる。両方のタグで選択を行なうと、抗体重鎖及び抗体軽鎖の両方を2コピー（2つのFab断片）提示するライブラリーメンバーを濃縮できる。

#### 【0081】

上述の多価濃縮方法の元になる理論は正しいと考えられているが、本発明の実施は、この理論の正しさには依存しない。タグに結合するメンバーを提示ライブ

ラリーから予備スクリーニングした後、標的に結合するメンバーをスクリーニングすると、予備スクリーニング段階なしで行なった場合よりも、標的に対する親和性を持ったメンバーをさらに高度に濃縮できる。したがって、本方法は上述のように実施可能であり、基となる機構を理解せずに、高度に濃縮されたライブラリーという望ましい結果を得ることができる。

#### 【0082】

#### 4. 標的に対する親和性による選択

タグ受容体に対する予備スクリーニングを伴いまたは伴わずに、抗体鎖を提示するライブラリーメンバーは、標的に対する結合によってスクリーニングされる。標的は、結合パートナーを同定することが望ましい、関心対象の任意の分子でありうる。標的は、タグ（使用する場合）に対する特異的な結合親和性を持たないようにする。これは、この段階でスクリーニングするのは提示されたポリペプチドであって、標的に結合するタグではないためである。この段階のスクリーニング手順は、親和性試薬がタグに対する受容体ではなく、関心対象の標的であるということ以外は、予備スクリーニング段階と非常に類似している。通常は、固定化できるような方法で標識（例えば、ビオチンを使用）された標的に、濃縮されたライブラリーメンバーを接触させる。平行に達するまで結合させた後、パンニングとして知られる過程において、固相と接触させることで標的を溶液からとりだす（ParmleyおよびSmith、Gene73:305-318（1988））。選択過程を通じて固相に結合したままのライブラリーメンバーは、ライブラリーメンバーと固定化された標的分子の間の多価の結合のために、結合したままとなる。結合しなかったライブラリーメンバーは、固相から洗い流される。いくつかの方法では、ライブラリーメンバーは関心対象の受容体を提示する細胞への結合によって、スクリーニングされる。その後、遠心によって細胞集団全体を回収するか、ファージ特異的抗体で標識し、磁気ビーズまたはFACS（商標）を用いて細胞に結合した標識ファージを分離することによって、ファージに結合した画分を単離する。

#### 【0083】

通常、ライブラリーメンバーは、次のスクリーニングを行なう前に増幅しておく。しばしば、結合したライブラリーメンバーは、支持体から分離することなく



増幅できる。例えば、ビーズに固定化された遺伝子VIIIファージライブラリーメンバーは、大腸菌の培養液にビーズを浸すことで増幅できる。同様に、細菌の提示ライブラリーも、結合したライブラリーメンバーに増殖培地を添加することで、増幅できる。または、その後の選択、増幅、または増殖を行なう前に、結合したライブラリーメンバーを固相から分離（例えば、イオン強度またはpHの変化による）しても良い。

#### 【0084】

親和性選択の後、結合したライブラリーメンバーで、関心対象の標的に対する特異的な親和性を持つ抗体鎖（および予備スクリーニング段階が行われている場合には多価提示メンバー）の濃縮を行なう。その後の増幅の後では、2次ライブラリーの作製のため、2次ライブラリーでは標的に対する特異的な親和性を持つポリペプチドの提示については濃縮されているが、増幅の結果として、ポリペプチドの多価提示に関しては濃縮されていない。したがって、2回目の多価濃縮を行ない、その後、スクリーニング標的に対する2回目の親和性濃縮を行なうことができる。望ましい度合いの濃縮が得られるまで、選択的に、スクリーニング標的に対する更なる親和性濃縮と、増幅および多価提示の濃縮とを交互に行なうことができる。

#### 【0085】

ある変法では、標的に対する親和性スクリーニングは、標的に類似しているが同一ではない化合物との競合して行われる。そのようなスクリーニングは、その化合物には存在しない、標的エピトープに結合するライブラリーメンバーを優先的に選択する。別の変法では、結合したライブラリーメンバーは、標的と既知の交差反応性を持つ化合物と、抗原に対して競合して、固相から分離できる。標的に対して既知の化合物と同一または類似した結合特異性を持つライブラリーメンバーは、優先的に溶出される。その化合物の認識するエピトープとは異なるエピトープを通して、標的に対する親和性を持つライブラリーメンバーは、固相に結合したままになる。

#### 【0086】

標的に対する異なる1価の親和性を持つ抗体鎖間の選択における識別は、ライ

ブラリーメンバーの結合価および固相結合における標的の濃度によって、影響される。ライブラリーメンバーを固相に固定するために、ライブラリーメンバーには少なくとも*i*個の標識標的分子が結合しなければならないと仮定すると、*n*個のポリペプチドを提示するライブラリーメンバーの固定化の確率が計算できる。質量作用の法則から、結合/総抗体鎖の割合*F*は、 $K[\text{targ}]/(1+K[\text{targ}])$ で、 $[\text{targ}]$ は溶液中の標的の総濃度である。したがって、1つのライブラリーメンバーにつき*i*またはそれ以上の提示された抗体鎖が標識抗体に結合する確率は、二項確率分布によって与えられる：

【数2】

$$\sum_{y=i}^n \frac{n!}{y!(n-y)!} F^y (1-F)^{n-y}$$

【0087】

確率は*K*および $[\text{target}]$ の関数であるので、それぞれ標的に対して一価の親和性*K*を持つ多価提示メンバーは、標的の濃度を変えることによって選択できる。ライブラリーメンバーが一価の親和性 $0.1/[\text{Ag}]$ 、 $1/[\text{Ag}]$ 、および $10/[\text{Ag}]$ を示し、メンバー当たり*n*個のポリペプチドを提示している場合に、*i*=1、2、または3のときの固相固定化の確率は、以下の通りである。

固定化の確率 (*i* = 1)

<b>n</b>	<b>K= 0.1/[targ]</b>	<b>K= 1/[targ]</b>	<b>K= 10/[targ]</b>
1	0.09	0.5	0.91
2	0.17	0.75	0.99
3	0.25	0.875	
4	0.32	0.94	
5	0.38	0.97	
6	0.44	0.98	
7	0.49	0.99	
8	0.53		
9	0.58		
10	0.61		
20	0.85		
50	0.99		

固定化の確率 ( $i = 2$ )

$n$	$K = 0.1/[targ]$	$K = 1/[targ]$	$K = 10/[targ]$
2	0.008	0.25	0.83
3	0.023	0.50	0.977
4	0.043	0.69	0.997
5	0.069	0.81	
6	0.097	0.89	
7	0.128	0.94	
8	0.160	0.965	
9	0.194	0.98	
20	0.55		
50	0.95		

固定化の確率 ( $i = 3$ )

$n$	$K = 0.1/[targ]$	$K = 1/[targ]$	$K = 10/[targ]$
3	0.00075	0.125	0.75
4	0.0028	0.31	0.96
5	0.0065	0.50	0.99
6	0.012	0.66	
7	0.02	0.77	
8	0.03	0.855	
9	0.0415	0.91	
10	0.055	0.945	
12	0.089	0.98	
14	0.128	0.99	
20	0.27		
50	0.84		

## 【0088】

上記の表は、異なる一価の結合親和性を持つポリペプチドの固定化の識別が、ライブラリーメンバーの結合価( $n$ )および溶液結合相の標的の濃度によって影響されることを示す。 $n$  (ファージ当たり提示されるポリペプチドの数) が  $i$  (固相結合に必要な最低の結合価) に等しいときに、識別が最大化する。液相結合中の標的濃度を下げることによっても、識別が増加する。通常、標的濃度は、単離しようとするポリペプチドの  $K_d$  付近である。 $10^{-8} \sim 10^{-10} M$  の標的濃度が典型的であ

る。

### 【0089】

上記の方法で作製された濃縮されたライブラリーは、標的に対する特異的親和性を持つポリペプチドをコードするメンバーの割合が高いという特徴を持つ。例えば、メンバーの少なくとも10%、25%、50%、75%、80%、90%、95%または99%が、標的に対する特異的親和性を持つ抗体鎖をコードする。いくつかのライブラリーでは、メンバーの少なくとも10%、25%、50%、75%、80%、90%、95%または99%が、少なくとも $10^8 \text{ M}^{-1}$ 、 $10^9 \text{ M}^{-1}$ 、または $10^{10} \text{ M}^{-1}$ の親和性を持つ。二重鎖抗体のライブラリーでは、抗体の重鎖および軽鎖をコードするセグメント対が、ライブラリーメンバーと考えられる。増幅すると遺伝的欠失の割合を上昇させるので、標的に親和性を持つメンバーの正確な割合は、選択後にライブラリーが増幅されたかどうか依存する。しかし、全長のポリペプチドコード配列を持つメンバーの中では、標的に対する特異的親和性を持つポリペプチドをコードする割合は、非常に高い(例えば、少なくとも50%、75%、80%、90%、95%または99%が $10^8 \text{ M}^{-1}$ 、 $10^9 \text{ M}^{-1}$ 、または $10^{10} \text{ M}^{-1}$ の親和性を持つ)。標的に対する特異的親和性を持つ抗体鎖をコードする全てのライブラリーメンバーが、必ずしも抗体鎖を提示するわけではない。例えば、全長のコード配列を持つメンバーの95%が、標的に対する特異的親和性を持つ抗体鎖をコードするライブラリーでは、通常は抗体鎖を実際に提示するのは半分以下である。通常は、そのようなライブラリーは少なくとも4、10、20、50、100、1000、10,000または100,000の異なるコード配列を持つ。通常、そのようなコード配列の任意の1つは、ライブラリーにおけるコード配列全体の、50%、25%または10%未満である。

### 【0090】

#### F. 抗体鎖の発現ベクターへのサブクロニング

提示ライブラリーメンバーのスクリーニングでは、通常、標的に対する特異的な親和性を持つライブラリーメンバーの亜集団が得られる。この時点で、いくつかの選択肢がある。いくつかの方法では、ライブラリーメンバーのクローン単離株が得られ、各単離株が直接に使用される。他の方法では、ライブラリーメンバーのクローン単離株が得られ、各単離株から抗体鎖をコードするDNAが増幅され

る。通常、発現ベクターへの導入の前に、同一のDNA分子の成分として、重鎖および軽鎖が増幅され、提示ベクター中に存在する重鎖および軽鎖の組み合わせは発現ベクター中で保存される。ヒト可変領域およびヒト定常領域の両方を含む提示された抗体鎖では、通常、可変領域および定常領域の両方をコードする核酸がサブクローニングされる。別の方法では、各メンバーのクローン単離をせずに、ライブラリーメンバーのプールから抗体鎖をコードする核酸は増幅され、発現ベクターの複数のコピーへまとめてサブクローニングされる。

#### 【0091】

ここで提示ベクターから発現ベクターへの核酸の混合集団の導入について、サブクローニング過程を詳述する。個々の提示ベクターのクローン単離株から得られた核酸にも、基本的に同じ過程を使用できる。

#### 【0092】

サブクローニングされる抗体鎖をコードする核酸を、隣接配列の制限酵素消化により切り出すか、またはコード配列に隣接する部位に対するプライマーを用いてPCRで増幅する。一般的に「PCR技術：DNA増幅のための原理と応用(PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification)」(H.A. Erlich編、Freeman Press、NY、NY、1992)；「PCRプロトコール：方法と応用の手引き(PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications)」(Innisら編、Academic Press、San Diego、CA、1990)；Mattilaら、Nucleic Acids Res. 19:967 (1991)；Eckertら、PCR Methods and Applications 1:17 (1991)；PCR (McPhersonら編、IRL Press、Oxford)を参照されたい。PCRプライマーは、発現ベクターに導入されたときに増幅された断片の陽性選択をするために、マーカー配列を含むことがある。PCRプライマーは、発現ベクターへのクローニングのために、制限酵素部位も含むことがあるが、これは必須ではない。Fabライブラリーでは、提示ベクター中で重鎖および軽鎖が互いに隣接または近くに挿入されていれば、2つの鎖は一緒に増幅または切り出しできる。いくつかのFabライブラリーでは、抗体鎖の可変領域のみが切り出されるか、増幅される。Fabライブラリーの重鎖又は軽鎖が別々に切り出されるか増幅される場合は、その後、同一または異なる発現ベクターに挿入できる。

## 【0093】

提示された抗体鎖をコードする断片を切り出したり増幅したら、断片は通常、アガロースゲルまたはショ糖勾配上で大きさによって精製される。通常、断片はコード配列の種々の欠失型に対応する低分子側にスミアを伴う、単一の鮮明な全長のバンドとなる。全長のコード配列に対応するバンドは、ゲルまたは勾配から取り出され、これらの配列がその後の段階で使用される。

## 【0094】

次の段階は、全長のコード配列をコードする核酸を、発現ベクターに連結して、異なる挿入物を持つ発現ベクターの改変型の集団を作製する段階である。これは、切断した発現ベクターと、適合する末端を持つように切断した挿入物の混合物との通常の連結で行われうる。または、挿入物DNAに対する制限酵素の使用を避けることができる。挿入物配列内に天然にコードされる制限酵素部位が存在する可能性があり、従って、制限酵素で処理するとその配列を破壊することになるため、このクローニング法は有利である。制限酵素なしでクローニングするには、挿入物と直線状にしたベクター配列の混合集団を、T4DNAポリメラーゼまたはエキソヌクレアーゼIIIのような3'-5'エキソヌクレアーゼで簡単に処理する。Sambrookら、「分子クローニング：実験室マニュアル (Molecular Cloning: A Laboratory Manual)」(第2版、CSHP、NY、1989)を参照されたい。消化によって生成した挿入物の突出した5'末端は、ベクターの消化によって生成した一本鎖突出と相補的である。この突出をアニーリングさせ、アニーリングしたベクターをレシピエントの宿主細胞にトランスフェクトする。3'-5'エキソヌクレアーゼのかわりに5'-3'エキソヌクレアーゼを用いても、同じ結果が得られる。

## 【0095】

好ましくは、発現ベクターへの挿入物の連結は、アニーリングしたベクターと未切断のベクターを識別できるような条件下で行なう。非許容温度でアニーリングしたベクターを排除する選択を可能にする、条件致死遺伝子を含むベクターがいくつか知られている。例えば、ConleyおよびSaunders、Mol. Gen. Genet. 194:211-218(1984)を参照されたい。これらのベクターは、挿入物を受け取ったベクターの陽性選択を可能にする。選択は、陽性選択マーカー（例えば、抗生物質耐

性)の一部が削除されるような方法で、発現ベクターを切断しても実施できる。失われた部分は、全長の挿入物によって供給される。この部分は、提示ベクターのポリペプチドコード配列の3'末端に導入されるか、挿入物の増幅に使用されるプライマーに含まれてもよい。pBR誘導体ベクターのHindIII切断によって削除されたテトラサイクリン耐性遺伝子プロモーターの一部を挿入物が提供する、典型的選択スキームは、実施例14に記述されている。

#### 【0096】

発現ベクターの選択は、ベクターを発現する予定の宿主細胞に依存する。通常は、ベクターはプロモーターおよび他の調節配列が、挿入されるコード配列に機能的に連結していて、後者が発現されるようになっている。誘導条件以外では挿入された配列の発現を妨げるためには、誘導性プロモーターを利用するのが都合が良い。誘導性プロモーターには、アラビノース、lacZ、メタロチオネインプロモーター、または熱ショックプロモーターが含まれる。非誘導条件では、宿主細胞の発現産物に対する忍容性がより高いコード配列の集団に偏向することなく、形質転換された生物体の培養物の増殖が可能になる。ベクターは、挿入された配列にコードされるポリペプチドとの融合タンパク質を形成する、分泌シグナル配列位置を提供することもあるが、挿入されるポリペプチドは、ベクターへ導入される前にシグナル配列に連結されることも多い。抗体軽鎖及び抗体重鎖の可変領域をコードする配列を受け取るために使用されるベクターは、挿入される鎖との融合タンパク質として発現され得る定常領域またはその一部をコードする場合もあり、それによって完全な抗体またはその断片が産生されるようになる。通常は、そのような定常領域はヒトのものである。保守的な変異は、好ましくはないものの、許容される。例えば、提示パッケージがCH1定常領域に連結された重鎖可変領域、および完全な軽鎖定常領域に連結された軽鎖可変領域を提示し、完全な抗体鎖が提示ベクターから発現ベクターに導入される場合、発現ベクターは、ヒト重鎖定常領域ヒンジである、CH2およびH3領域を、挿入された重鎖核酸のCH1領域とインフレームでコードするように設計でき、その結果、完全な抗体が発現されることになる。もちろん、ヒト重鎖定常領域のどのセグメントが提示パッケージによって供給され、どの部分が発現ベクターによって供給されるかという点で

は、多くの小さな変法が可能である。例えば、提示パッケージはCH1領域、およびヒンジ領域の一部または全体を含むように設計できる。この場合は、完全な抗体の発現のためには、発現ベクターはヒンジ領域の残りの部分（存在する場合）、およびCH2およびCH3領域を供給するように設計される。

#### 【0097】

大腸菌は特に本発明のポリヌクレオチドのクローニングに有用な1つの原核細胞宿主である。使用に適当な他の微生物宿主には、*Bacillus subtilis*（枯草菌）のようなバチルス属、および*Salmonella*（サルモネラ）、*Serratia*（セラチア）および種々の*Pseudomonas*（シュードモナス）種のような、他の腸内細菌が含まれる。これらの原核細胞宿主では、発現ベクターも作製でき、これには通常、宿主細胞と適合する発現制御配列（例えば、複製開始点）が含まれる。さらに、ラクトースプロモーター系、トリプトファン(trp)プロモーター系、ラクタマーゼプロモーター系、またはファージのプロモーター系のような、任意の数の周知のプロモーターの変種が存在する。通常、プロモーターは選択的にオペレーター配列と共に発現を制御し、転写および翻訳の開始および完了のために、リボソーム結合部位配列などを持っている。

#### 【0098】

酵母のような他の微生物も、発現に使用できる。*Saccharomyces*（サッカロミセス）は好ましい宿主であり、3-ホスホグリセレートキナーゼまたは他の糖分解酵素を含むプロモーターのような発現制御配列、および複製開始点、終結配列や、所望の類似物を有するベクターを持つ。バキュロウイルスベクターと組み合わせて、昆虫細胞も使用できる。

#### 【0099】

本発明のポリペプチドの発現および産生に、哺乳類組織細胞培養も使用できる（Winnacker、「遺伝子からクローンへ(From Genes to Clones)」(VCH Publishers, N.Y., N.Y., 1987)。CHO細胞株、種々のCos細胞株、HeLa細胞、骨髓腫細胞株、形質転換したB細胞およびハイブリドーマを含め、完全な免疫グロブリンを分泌する能力を持ついくつかの適切な宿主細胞株が開発されている。これらの細胞のための発現ベクターには、複製開始点、プロモーター、およびエンハンサー



のような発現制御配列 (Queenら、Immunol. Rev. 89:49-68 (1986))、およびリボソーム結合部位、RNAスプライス部位、ポリアデニル化部位、および転写終結配列のような必要なプロセッシング情報部位が含まれ得る。好ましい発現制御配列は、免疫グロブリン遺伝子、SV40、アデノウイルス、ウシ乳頭腫ウイルス、またはサイトメガロウイルス由来のプロモーターである。

#### 【0100】

関心対象のポリヌクレオチド配列を含むベクターの導入方法は、細胞宿主の種類に依存する。例えば、塩化カルシウムトランスフェクションは、原核細胞によく利用されるが、他の細胞宿主には、リン酸カルシウム処理またはエレクトロポレーションが使用される場合がある (一般にSambrookら、上記、参照)。

#### 【0101】

発現されると、培地または宿主細胞から、抗体の集団が精製される。通常、抗体鎖はシグナル配列を伴って発現され、培地中に放出される。しかし、抗体鎖が宿主細胞によって自然に分泌されない場合には、穏やかな界面活性剤処理によって、抗体鎖を放出できる。その後、抗体鎖を、硫酸アンモニウム沈殿、固定化した標的に対する親和性クロマトグラフィー、カラムクロマトグラフィー、ゲル電気泳動などを含む、通常の方法によって精製できる (一般に、Scopes、「タンパク質の精製(Protein Purification)」(Springer-Verlag、N.Y.、1982)参照)。

。

#### 【0102】

上述の方法で、選択した標的に対する特異的な親和性を持つ抗体鎖をコードする核酸配列の新規のライブラリーが得られる。核酸ライブラリーは、通常、少なくとも5、10、20、50、100、1000、 $10^4$ または $10^5$ の異なるメンバーを持つ。通常、ライブラリー中の全体の配列の25%または50%以上を構成する単一のメンバーはない。通常は、ライブラリーメンバーの少なくとも25%、50%、75%、90%、95%、99%または99.9%が、標的分子に対する特異的な親和性を持つ抗体鎖をコードする。二重鎖抗体ライブラリーの場合は、それぞれ重鎖および軽鎖をコードする核酸セグメントのペアがライブラリーメンバーと考えられる。核酸ライブラリーは、遊離の形態で、任意のベクターの成分として、またはベクターの成分とし

て宿主細胞にトランスフェクトされて存在しうる。

### 【0103】

核酸ライブラリーを発現して、標的に特異的親和性を持つ抗体のポリクローナルライブラリーを作製することができる。そのようなライブラリーの組成は、ヌクレオチドライブラリーの組成によって決まる。したがって、通常そのようなライブラリーは、異なるアミノ酸組成を有する、少なくとも5、10、20、50、100、1000、 $10^4$ または $10^5$ のメンバーを持つ。通常、ライブラリー中の全体のポリペプチドの25%または50%以上を構成する単一のメンバーはない。抗体鎖ライブラリー中で標的に対する特異的親和性を持つ抗体鎖の割合は、通常、抗体鎖をコードする対応する核酸の割合よりも低い。この差は、適切な折畳みを支持するような適切なアミノ酸の1次構造を持っているにもかかわらず、すべてのポリペプチドが結合に適切な構造に折り畳まれるわけではないという事実起因する。いくつかのライブラリーでは、抗体鎖の少なくとも25%、50%、75%、90%、95%、99%または99.9%が、標的分子に対する特異的親和性を持つ。また、複数の鎖を持つ抗体のライブラリーでは、各抗体（Fabまたは完全な抗体）が、ライブラリーメンバーと考えられる。異なる抗体鎖は、標的に対する細かい結合特異性および親和性の点で互いに異なっている。そのようなライブラリーのいくつかは、同一の抗体上の異なるエピトープに結合するメンバーを含む。そのようなライブラリーのいくつかは、互いに競合することなく、同一の抗原に結合する少なくとも2つのメンバーを含む。

### 【0104】

上述の方法で得られたヒト抗体のポリクローナルライブラリーは、本ライブラリー中では高親和性の結合をするメンバーの割合が高く、本ライブラリーは通常、天然の集団に存在するのと同じ抗体の多様性を示さないという点で、ヒト抗体の天然の集団から区別される。本ライブラリーの多様性が低下しているのは、材料を提供するトランスジェニック非ヒト動物が、全てのヒト免疫グロブリン遺伝子を含んでいるわけではないためである。例えば、ポリクローナル抗体ライブラリーの中には、軽鎖を持つ抗体がないものがある。本発明のいくつかのポリクローナル抗体ライブラリーは、10、20、30または40未満の $V_H$ 遺伝子によってコー

ドされる抗体重鎖を持つ。本発明のいくつかのポリクローナル抗体ライブラリーは、10、20、30または40未満の $V_L$ 遺伝子によってコードされる抗体軽鎖を持つ。

#### 【0105】

### III. 検出法

#### 1. 検出試薬用ヒト抗体の特性

本発明の検出法用のヒト抗体は好ましくは上記の方法を用いて生産される。この方法は結果として、任意のエピトープ結合特異性および任意の所望の標的に対して著しい高親和性を有する事実上無限の数のヒト抗体を生じる。一般的には標的に対する抗体の結合親和性が高いほど、標的抗原を取り去ることなく非特異的に結合している物質を除去するために、免疫アッセイ法においてより高ストリンジェントな洗浄条件を実施することが可能である。したがって、上記アッセイ法に使用されるヒト抗体は通常少なくとも $10^8$ 、 $10^9$ 、 $10^{10}$ 、 $10^{11}$ または $10^{12} \text{ M}^{-1}$ の結合親和性を有する。さらに検出試薬として使用される抗体は、実施例28に記載されているような標準条件下で少なくとも12時間、好ましくは少なくとも5時間、およびより好ましくは少なくとも1時間で平衡に達するような十分な速度 (on-rate) を有していることが望ましい。

#### 【0106】

本方法で使用されるヒト抗体は、好ましくは高い免疫反応性を有しおり、そのため、それらの標的抗原に対して特異的に結合することが可能なように適切に折り畳まれる抗体分子の割合が高い。そのようなことは、上記のように大腸菌内で抗体をコードする配列を発現させることにより達成されうる。そのような発現は通常少なくとも80%、90%、95%または99%の免疫反応性を生じる (表4参照)。

#### 【0107】

本発明のいくつかの方法は、検出試薬としてヒト抗体のポリクローナル調製物を利用し、他の方法はモノクローナル単離物を利用する。ポリクローナル混合物の使用は、1つのモノクローナル抗体からなる組成物に対して多数の有利な点を有する。標的の複数部位に結合することにより、ポリクローナル抗体または他のポリペプチドは、単一部位に結合するモノクローナルよりもより強い (検出用)

シグナルを発生することができる。さらに、ポリクローナル調製物はプロトタイプ標的配列の多数の変異体（例えば、対立遺伝子変異体、種変異体、系統変異体、薬剤誘導性回避変異体）に結合することが可能であり、一方モノクローナル抗体はそのプロトタイプ配列またはそれに対するより狭い範囲の変異体にのみ結合する可能性がある。しかし、モノクローナル抗体は密接に関連した抗原存在下または存在の可能性がある条件下で、単一の抗原を検出する用途において利点がある。

#### 【0108】

上記の方法に従い調製されたヒトポリクローナル抗体を利用する方法において、調製物は典型的には意図している標的抗原に対して異なるエピトープ特異性を有する抗体の組み合わせを含む。これは実施例26に記載されている方法により立証することができる。モノクローナル抗体を利用するいくつかの方法では、異なるエピトープ結合特異性を持つ2つの抗体を有することが望ましい。エピトープ結合特異性の差異は、競合アッセイ法により決定することができる。

#### 【0109】

### 2. 試料および標的

ヒト抗体は検出試薬として任意の種類の試料に対して使用することができるが、ヒト試料用検出試薬として最も有用である。試料は患者の任意の組織または体液から獲得することが可能である。試料の好ましい供与源は、全血液、血漿、精液、唾液、涙、尿、糞便物質、汗、口腔、皮膚または髪を含む。試料はまた、内部臓器の生検または癌から獲得することが可能である。試料は、診断もしくは研究用として臨床患者から、または対照または基礎研究用として疾患を有さない個体から獲得することが可能である。同一個体に由来する単一または複数の試料は、複数の標的抗原に対する結果の広範囲なパネルを生成するために、1つまたは複数の標的抗原に対してアッセイすることができる。複数の標的抗原に対する結果の多変量解析は、特定の目的のためのパネルの感度および特異性を改善するために使用することができる。1個体からの複数の標的に対する1つまたは複数の試料のアッセイ法により、サンプリング時に個体の表現型の特徴を明らかにすることが可能となる。健常人の集団に由来する複数の標的抗原に対するアッセイ結果

により、標準表現型を定義付けることが可能になり、且つ確立された標準範囲を逸脱する1つまたは複数の標的抗原に対するアッセイ結果により、表現型的に正常と異なる個体が同定される。そのような差異は、疾患診断、疾患予後または特定の薬物治療に対する個体の応答を決定するために使用することができる。

#### 【0110】

本方法は任意の型の標的抗原を検出するために使用することができる。代表的な標的抗原は、IV、肝炎（A、BおよびC型）、インフルエンザ、ヘルペス、ジアルジア、マラリア、リーシュマニア、黄色ブドウ球菌、緑膿菌等のヒト疾患を引き起こす細菌、カビ、およびウイルス性病原体を含む。他の標的抗原は、発現レベルまたは組成がヒト疾患または他の表現型と関連しているヒトタンパク質である。そのような抗原の例は、接着タンパク質、ホルモン、増殖因子、細胞受容体、自己抗原、自己抗体、およびアミロイド沈着を含む。対象となるその他の標的は癌胎児性抗原等の腫瘍細胞抗原である。対象となるその他の抗原は、クラスIおよびクラスII MHC抗原である。対象となるその他の標的は、組織試料、全血液、血漿、血清、脳脊髄液、精液、唾液、涙、尿、糞便物質、汗、口腔、皮膚、および髪中のヒトタンパク質を分離および特徴付けするために二次元ゲル電気泳動と質量分析法と組み合わせて適用することにより同定することができる全てのタンパク質を含む。

#### 【0111】

### 3. HAMAおよび異好性抗体

少なくともいくつかのヒト試料は、異なる種に由来する抗体に特異的に結合するヒト抗体を含んでいる。いくつかのそのようなヒト抗体は、ヒト以外の種に由来する抗体のアイソタイプに結合し、他のヒト抗体はヒト以外の種に由来する抗体のイディオタイプに結合する。そのようなヒト抗体は様々な機構により生じうる。例えば、ヒト患者に対するマウス抗体（例えば食品薬品局認可済みOKT3）の投与は、典型的にはヒト抗マウス応答を生じる。同様の応答はマウス抗原への環境暴露によっても生じうる。他の種、例えばウサギまたはウシなどに由来する抗体に特異的に結合するヒト抗体は、同様にウサギまたはウシに由来する抗原の環境暴露によっても生じうる。さらにヒトを、特定のウイルス、特に感染性単球増

加症の原因病原体であるエプスタイン-バーウイルスに暴露することは、ヒト以外の種に由来する抗体に結合する異好性抗体と名づけられている特定のクラスの抗体を生成する。

#### 【0112】

ヒト患者試料中のヒト以外の種に由来する抗体に反応性であるヒト抗体の頻度は、様々な報告において課題となっている。例えば、ヒト抗マウスIgGの推定頻度は異なる研究において0.72%から80%に変動しており、ヒト抗ウサギIgGの推定は0.09%から5%に変動している（Krickaら、Clinical Chemistry 45: 942～956（1999）を参照のこと）。頻度が正確であるかに関わらず、任意のヒト試料が、いくつかの非ヒト動物由来の抗体に反応するヒト抗体を含んでいるという重大な危険性が明らかである。したがって検出試薬としてヒト以外の種に由来する抗体を使用することで、不正確な結果が生じる危険を冒している。不正確性はキメラ抗体を使用することにより減少させることができるが、消し去ることはできない。キメラ抗体のイディオタイプに結合するヒト抗体の存在のために、いくらかの不正確性は残存する。しかしながら不正確性は、診断試薬としてヒト抗体を使用することにより消去される。完全にヒト型の抗体に結合する抗体は典型的なヒト試料中には存在しない。

#### 【0113】

### 4. 検出アッセイ法の形式

ヒト抗体は様々な標準的アッセイ形式において所定の標的を検出するために使用することができる。そのような形式は、免疫沈降法、ウェスタンブロッティング、ELISA、放射免疫アッセイ法、競合およびアイソメトリックアッセイ法を含む。HarlowおよびLane、「抗体、実験室マニュアル（Antibodies, A Laboratory Manual）」（CSHP、NY、1988）、米国特許第3,791,932号、同第3,839,153号、同第3,850,752号、同第3,879,262号、同第4,034,074号、同第3,791,932号、同第3,817,837号、同第3,839,153号、同第3,850,752号、同第3,850,578号、同第3,853,987号、同第3,867,517号、同第3,879,262号、同第3,901,654号、同第3,935,074号、同第3,984,533号、同第3,996,345号、同第4,034,074号、および同第4,098,876号を参照のこと。

## 【0114】

アイソメトリックまたはサンドイッチアッセイ法は好ましい形式である（米国特許第4,376,110号、同第4,486,530号、同第5,914,241号、および同第5,965,375号を参照のこと）。そのようなアッセイ法は、固相に固定された単一の抗体または抗体集団、および溶液中の別の抗体または抗体集団を使用する。典型的には、溶液抗体または抗体集団は標識化される。ある抗体集団が使用される場合に、集団は典型的には、標的抗原内の異なる特異的エピトープ特異性で結合する抗体を含んでいる。したがって同一の集団を固相および溶液抗体の両方に使用することができる。モノクローナル抗体を使用する場合、異なる結合特異性を有する第1および第2のモノクローナル抗体を固相および液相に使用する。固相および溶液抗体を、いずれかの順番で、または同時に標的抗原に接触させることができる。固相抗体を最初に接触させる場合には、アッセイ法はフォワードアッセイ法と見なされる。逆に、溶液抗体を最初に接触させる場合には、アッセイ法はリバースアッセイ法と見なされる。標的を同時に2つの抗体に接触させる場合には、アッセイ法は同時アッセイ法と見なされる。標的と抗体とを接触させた後に、通常は約10分から約24時間の間、通常は約1時間、試料とインキュベーションされる。その後、検出試薬として使用されている抗体に非特異的に結合している試料成分を除去するために、洗浄段階が実施される。固相および溶液抗体が別々の段階で結合される場合には、洗浄はいずれかのまたは両方の結合段階での後で実施してもよい。洗浄後、典型的には標識化溶液抗体の結合を介して固相に連結された標識を検出することにより、結合を定量化する。通常は所定の抗体の対または抗体集団および所定の反応条件のために、既知濃度の標的抗原を含む試料から検量線が作製される。その後、試験される試料中の抗原濃度が、検量線に挿入されることにより測定される。分析物は、平衡状態で結合している標識化溶液抗体の量から、または平衡に達する前に一連の時点において結合している標識化溶液抗体を反応速度論的に測定することのいずれかにより測定されうる。そのような曲線の傾きが試料中の標的濃度の指標となる。

## 【0115】

競合アッセイ法もまた好ましい形式である。いくつかの方法においては、試料

中の標的抗原は、抗体検出試薬に対する結合において、外因性に供給された標識化標的抗原と競合する。抗体に結合している標識化標的抗原の量は試料中の標的抗原の量に反比例する。抗体は、検出に先立ち試料から結合複合体を分離することを容易にするために固定されてもよく（異種遺伝子型アッセイ法）、または同種遺伝子型アッセイ形式で実施されているように分離は不要である可能性がある。他の方法では検出試薬として使用される抗体は標識化される。抗体が標識化される場合に、その結合部位は試料中の標的抗原、および外因性に供給された型の標的抗原（例えば固相に固定された標的抗原であってもよい）に対する結合を競合する。標識化抗体はまた、また別の競合形式において、標識化抗体と同じ標的抗原に結合する試料中の抗体を検出するために使用することができる。上記の各形式において、検出試薬として使用される抗体は、大まかには、アッセイされる標的と同じ程度の濃度で限られた量が存在する。競合アッセイ形式における検出試薬としてのヒト抗体の使用は、試料中に存在する可能性を有するHAMAまたは異好性抗体が原因となる干渉を減少または除去する。

#### 【0116】

上記方法で使用される適切な検出可能標識は分光学的手段、光化学的手段、生化学的手段、免疫化学的手段、電気的手段、光学的手段、化学的手段、またはその他の手段により検出可能である任意の部分を含む。例えば適切な標識は、標識化ストレプトアビジン結合体を用いて染色されるビオチン、蛍光色素（例えばフルオレセイン、テキサスレッド、ローダミン、緑色蛍光タンパク質、およびその同等物）、放射性標識（例えば $^3\text{H}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{14}\text{C}$ または $^{32}\text{P}$ ）、酵素（例えば西洋ワサビペルオキシターゼ、アルカリフォスファターゼ、およびELISAにおいて一般的に使用される他のもの）、ならびに金コロイドまたは有色ガラスまたはプラスチック（例えばポリスチレン、ポリプロピレン、ラテックスビーズ）などの比色標識を含む。そのような標識の使用を記載した特許は、米国特許第3,817,837号、同第3,850,752号、同第3,939,350号、同第3,996,345号、同第4,277,437号、同第4,275,149号、および同第4,366,241号を含む。「蛍光プローブおよび研究化学物質ハンドブック（Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals）」（第6版、モリキュラープローブ社、ユージン、オレゴン州）も参照の



こと。放射性標識は、写真フィルムまたはシンチレーション計測器を用いて検出することが可能であり、蛍光マーカーは、放射光を検出するための光検出器を用いて検出することが可能である。酵素標識は、典型的には酵素に基質を提供し、基質に対する酵素反応により生産される反応産物を検出することにより検出され、比色標識は、有色標識を単に可視化することにより検出される。

#### 【0117】

検出試薬として使用される抗体は、使用される検出形式によって標識されてもされなくてもよい。例えば、典型的には固相に固定されている抗体により標的抗原が結合された後に、標的抗原を検出するために、質量分析法または表面プラズモン共鳴が使用されるような形式においては、標識を使用することなく、抗体検出試薬は直接的に使用することができる。質量分析法は、固定化抗体から結合している標的抗原を脱着させるためにレーザーエネルギーを使用し、荷電した標的抗原を検出することにより、直接的に使用することが可能である（米国特許第6,027,942号、同第6,020,208号）。または、抗体に結合している標的抗原は、標的抗原を同定するために質量分析法により検出することができるペプチドファミリーを生成するためにトリプシン消化に供することができる。既知の濃度の標的抗原を含む標準試料を同一の分析に供することにより、任意の試料中の標的抗原の濃度を決定することが可能である。非ヒト固定化抗体検出試薬に対するHAMAまたは異好性抗体の結合は、質量分析法に供される試料中の阻害抗体またはそのペプチド断片の存在のために、結果として得られる質量分析のピークの同定に干渉する可能性がある。本発明において記載されているようにヒト抗体は実質的にまたは完全にこれらの干渉を取り除く。

#### 【0118】

表面プラズモン共鳴（SPR）は、表面に抗体が結合している表面のSPRに対する標的抗原の質量効果から、抗体に対する標的抗原の結合を直接的に検出する方法である（Fagerstam、J. Chromatography 597, 397～410（1992））。試料中にHAMAまたは異好性抗体が存在すると、そのような抗体がヒト以外の動物種に由来する固定化抗体へ決合する結果を生じると思われ、この結合は標的抗原の結合としてSPRにより誤って検出されられると思われる。標的抗原を検出するために、SPR固相

へ固定するために本発明で記載されているようなヒト抗体を使用することは、この干渉を減少または除去する。

#### 【0119】

上記方法に使用するために適している支持体は、たとえば、ニトロセルロース膜、ナイロン膜、および誘導化ナイロン膜、およびアガロース、デキストラン-ベース-ゲル、計量棒、粒子状物質、微細球、磁性粒子、試験管、マイクロタイターウェル、セファデックス (SEPHADEX) (商標) (アマシャムファルマシアバイオテク、ピスカタウェイ、ニュージャージー州) などの粒子、ならびにその同等物を含む。固定化は吸着または共有結合によってもよい。選択的には、抗体はアビジンなどの表面結合リンカーに接着させるためのビオチンなどのリンカー分子に連結されることが可能である。

#### 【0120】

ヒト抗体は臨床診断試験を実施するための、および研究目的を含む他のインビトロ検出アッセイ法を実施するための検出試薬として使用することができる。いくつかのインビトロアッセイ法は、アッセイ法の応答が試料中の標的抗原の存在または非存在に関連するが、アッセイ法が試料中の標的抗原の濃度を決定するようには設計されていない定性的様式で、1つまたは複数の標的抗原の存在を検出する。通常、定性的アッセイ法は、各標的抗原に対するアッセイ法の検出限界に通常相当する、試料中における最低限検出可能な抗原量より多い1つまたは複数の標的抗原の存在を示すように設計されている。しばしば定性的アッセイ法の結果は、比色応答を用いて視覚的に解釈され、視覚的に検出可能な結果は抗原の存在を示し、視覚的に検出可能な結果が存在しないことは試料が標的抗原を含まないことを示すか、またはその濃度がアッセイ法の感度限界以下であることを示す。

#### 【0121】

他のアッセイ法において、ヒト抗体は試料中の標的抗原の量を準定量的または相対的な意味で決定するために使用される。例えば、複数の標的抗原が検出され、アッセイ応答が規定された濃度範囲に渡って試料中の各標的抗原の濃度に比例しているアッセイ形式において、第1の標的抗原の濃度は相対的に不変であり

、特定の試料型に対しては既知であってもよい。各標的抗原に対するアッセイ応答を計測することにより、第1の標的抗原に対する相対的な濃度を決定することが可能である。または、2つの試料が1つまたは複数の標的抗原に関してアッセイされる場合には、1つの試料中のアッセイされる任意の標的抗原の量が、第2の試料中の同一の標的抗原の量に対して相対的に決定されうる。そのようなアッセイ法により、核酸アレイを用いた転写プロファイルまたは遺伝子発現実験に類似の結果を達成することができる。一般的には、転写プロファイルは、両標識が独立に測定されるように1つの試料中の標的分子をある1つの型の蛍光物質で標識し、別の試料中の標的分子を別の型の蛍光物質で標識することにより実施される。遺伝子発現または転写プロファイル解析の例では、標識化標的分子を含む2つの試料を標的分子に特異的な固定化オリゴヌクレオチドと反応させる。標識化標的分子は、固定化オリゴヌクレオチドへの結合に対して競合し、特定の固定化オリゴヌクレオチドに結合した各蛍光物質の相対量により、2つの試料中の標的分子の相対量を決定する。本方法は2つの試料中の標的抗原の相対量を決定する。これは第1の試料中の全てのタンパク質を第1の蛍光物質で標識し、第2の試料中の全てのタンパク質を第1の蛍光物質と識別可能な第2の蛍光物質で標識し、その後2つの標識試料を対象となる標的抗原に対する固定化結合体と接触させることで達成することができる（米国特許第5,807,522号参照）。特定の標的抗原に対する各固定化結合体は、各蛍光物質の量が決定される場合に、標的抗原に対する固定化結合体から空間的に分離され、他の標的抗原に対する固定化結合体と区別することが可能であるように、固定されうる。これは特定の標的抗原に対する特異的結合体を、他の標的抗原に特異的な固相上の他領域から識別可能な領域内の固相に固定することにより達成されうる。または、空間的に分離されるか、または混合物中で互いに識別もしくは分離されうるように、標的抗原に対する特異的結合体を異なる固相に固定して、対象となる各標的抗原に対するアッセイ応答を測定することができる。

#### 【0122】

試料中の1つまたはそれ以上の標的抗原の定量化はまた、本発明のヒト抗体を用いて達成することが可能である。標的抗原を定量化するために、測定される応

答はある濃度範囲にわたり標的抗原濃度に関連している。その相関は、測定と同時または未知濃度の標的抗原を含む試料をアッセイするために使用されるものと同一の条件下で、既知濃度の標的抗原を含む標準試料を用いてアッセイ法を実施することにより通常は達成される。標的抗原濃度の関数としてのアッセイ応答は、標準試料から決定され、未知試料中の標的抗原濃度はこの関数から決定される。試料中の複数の標的抗原に対する定量アッセイ法は、各標的抗原に特異的な固定化結合体を、それらが空間的に分離され、他の標的抗原に対する固定化結合体から識別することが可能であるように提供することにより、決定することが可能である。これは特定の標的抗原に対する特異的な結合体を、他の標的抗原に特異的な固相上の他領域から識別可能である領域内の固相に固定することにより達成することが可能である。または、対象となる各標的抗原に対するアッセイ応答の測定を可能にするように、空間的に分離されるか、または混合物中で互いに識別もしくは分離されうるように、異なる固相に標的抗原に対する特異的結合体を固定することができる。

#### 【0123】

### 5. 抗体アレイの形式

転写プロファイルまたは遺伝子発現に使用されるアレイ、および一塩基多型を検出するためのアレイは、異なる既知の場所に異なる核酸を固定している。一般的には、そのようなアレイは、相同な標的に高親和性で結合するように設計された多くの固定化オリゴヌクレオチドを含む（例えば「マイクロアレイバイオチップ技術（Microarray Biochip Technology）」M. Schena編、Eaton Publishing Massachusetts、2000）を参照のこと）。DNAハイブリッド中の2本鎖の親和性は互いに結合する2つのタンパク質の親和性よりも実質的に高いため、結合現象が特異的であることを確実にするために利用可能な条件を極めてストリンジェントにして、非特異的結合の最小化を確実にすることができる。加えて、ハイブリダイゼーション反応における既知の温度効果が特異性を増加させるために利用される。抗体アレイを用いる場合に、達成可能な選抜のストリンジェンシーは抗体試薬に対するその標的への親和性に依存する。したがって高親和性抗体はそのようなアレイにおいて有用である。例えば、いくつかのアレイは少なくとも $10^8$ 、 $10^9$ 、

$10^{10}$ 、 $10^{11}$ 、または $10^{12} \text{M}^{-1}$ の親和性を有する抗体を有する。高親和性抗体の使用により、同一抗原に対する多量体結合により提供される結合活性が増加されるために、多量体型抗体を使用する必要がなくなる。多量体型抗体の使用は、抗体により結合されるあるエピトープの複数のコピーを有する標的型に限定される。質量作用の法則が平衡状態で標的抗原に結合する抗体の割合を決定するため、抗体濃度は一般的にはその抗体/標的抗原対の解離定数以上に維持される。免疫アッセイ法においては、標的抗原濃度は試料中ではしばしば解離定数またはそれ以下であり、利用可能な標的抗原の十分な画分に結合するためには解離定数より過剰に抗体濃度が存在することが必要である。そのような高濃度の抗体の使用により、他の非特異的な結合反応が有意になり、標的抗原のアッセイ法において誤って上昇した応答が引き起こされる。固定化抗体の混合物（およびいくつかの形式では検出用の標識化抗体）が単一溶液中で試料に接触されてもよいアレイにおいては、非特異的結合問題はすべて高濃度で使用される抗体の多重度により複雑になる。HAMAまたは異好性抗体問題は典型的にはアレイで使用される高濃度の抗体により特に増大される。標的抗原検出用の抗体アレイにおいてヒト抗体を使用することは、ヒト試料をアッセイする時に直面するHAMAまたは異好性抗体問題を十分に減少または除去する。

#### 【0124】

非ヒト抗体を用いた多数の抗体アレイ形式が提唱されてきた。米国特許第5,922,615号はアレイ中で複数の標的抗原を検出するために膜上に固定された抗体の複数の別々の領域を利用する装置が記載されている。米国特許第5,458,852号、同第6,019,944号、同第6,143,576号、および米国特許出願第08/902,775号は、複数の標的抗原をアッセイするために、膜上ではなく装置中に固定された複数の別々の抗体領域を用いた診断装置が記載されている。国際公開公報第99/67641号は、微細球が光ファイバーの末端に固定された後、個々の微細球に固定された特異的結合体（抗体を含む）を解読および同定を可能にするタグを用いて、微細球が生成されるアレイを記載している。米国特許第5,981,180号においては、微細球は再び結合体（抗体を含む）を固定するために使用され、微細球に付着している特異的結合体を同定するために、微細球に含まれる2つの異なる蛍光色素の相対

量を検出することにより、試料から分離することなく微細球が互いに識別される。抗体のアレイ化用のこれらの全ての方法は、ヒト試料のアッセイ中のHAMAおよび異好性抗体により引き起こされる非特異的結合事象により制限されていた。本発明に記載されているヒト抗体の使用はこれらの干渉を減少または除去し、多数の標的抗原のアッセイのためにこれらの形式を使用することを可能にする。

#### 【0125】

いくつかのアレイにおいては、抗体は基質上の既知の小部位に固定される。高親和性抗体の使用は、所定の濃度の分析物を検出するために各部位においてより少ない抗体が必要とされる点で、小面積を達成するために有利である。例えば、いくつかのアレイにおいては、各既知の部位に固定される抗体の量は、500ngまたは100ng未満である。HAMAおよび異好性抗体による干渉は、既知部位内の抗体分子密度では有意に増加することはないので、ヒト抗体の使用は小面積内の固定において有利である。結果として抗体は、各々が0.01、0.001、0.0001、0.00001、0.000001cm<sup>2</sup>未満の面積を有する既知部位に固定することができる。異なる各ヒト抗体により占有される支持体上が小面積であることにより、同一支持体上に固定することができる異なるヒト抗体の数を増やすことができる。例えば、50、100、1,000、100,000、または1,000,000個のヒト抗体が同一の支持体上に固定されうる。

#### 【0126】

本発明は明確な理解のために詳細に記載されているが、特許請求の範囲内である変更が実施されてもよいことは明らかであると思われる。本明細書中で引用されている全ての刊行物および特許書類は、各々が個々に示されているのと同様に全てその全体が参照として組み入れられる。7F11生産細胞株(HB-12443、1997年12月5日)はブダペスト条約の下、記載された日に記載された所定のアクセシオン番号で、アメリカン-タイプ-カルチャー-コレクション(American Type Culture Collection)、ロックビル、メリーランド州)に寄託された。保管所が試料公開の要請を受けてから少なくとも5年間の期間、寄託日から少なくとも30年間の期間、関連特許の強制実施期間中、これらの中で最長の期間に渡り、寄託物は認可された保管所において維持され、突然変異、利用不可時または破壊時には置

換される。これらの細胞株の公共利用に関する全ての制限は、出願の特許審査時に取消不能な形で取り除かれることになる。

#### 【0127】

##### 実施例1：マウス脾臓からのRNAの精製

インターロイキン8に対する抗体ファージライブラリーを作るために、3つの異なるヒト重鎖遺伝子組を有するマウスが使用された。マウスの製造は実施例23および24に記載されている。マウスをインターロイキン8で免疫化した（実施例19）。マウスを0.713mg/mlの25 µgの抗原を用いて免疫化した。最初の方法では、マウスを、月に1回のCFAにより開始し、続いてIFAにより、高いヒト力価（約6500）に達するまで免疫化した。さらに6週間後、マウスを腹腔内注射で-7、-6、-5日に増強し、5日後に屠殺した。別の方法では、マウスを、2週間に1回、CFAにより開始し、続いてIFAにより免疫化した。高いヒト力価に到達した後で、マウスは-3、-2日に増強され、2日後に屠殺した。

#### 【0128】

脾臓を層流フード（laminarflow hood）内で回収し、ペトリ皿に移し、細断し、脂肪および結合組織を廃棄した。すばやく、脾臓を1.0mlの溶液D（25.0gのグアニジンチオシアネート（Roche Molecular Biochemicals、Indianapolis、IN）、29.3mlの滅菌水、1.76mlの0.75Mのクエン酸ナトリウム（pH7.0）、2.64mlの10%サルコシル（sarkosyl）（Fisher Scientific、Pittsburgh、PA）、0.36mlの2-メルカプトエタノール（Fisher Scientific、Pittsburgh、PA）存在下で滅菌5ccシリンジのピストンを用いて浸軟させた。脾臓懸濁液を粘性になるまで18ゲージ針に通して、全ての細胞を溶解させ、その後微小遠心管に移した。ペトリ皿に残った脾臓を全て回収するために100 µlの溶液Dを用いて洗浄され、チューブに移された。懸濁液をその後さらに5～10回、22ゲージ針に通した。試料を均等に2つの微小遠心管に分け、各添加ごとに転倒混和しながら、以下のものを順番どおりに添加した：100 µlの2M酢酸ナトリウム（pH4.0）、1.0mlの水飽和フェノール（Fisher Scientific、Pittsburgh、PA）、200 µlのクロロホルム/イソアミルアルコール49：1（Fisher Scientific、Pittsburgh、PA）。溶液は10秒間ボルテックス（Vortex）され、氷上で15分間インキュベートされた。2～8℃にて14krpm

で20分間遠心分離した後、水層を新しいチューブに移した。等量の水飽和フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール(50:49:1)を添加し、チューブを10秒間ボルテックスした。氷上で15分間インキュベートした後、試料を2 ~ 8 にて20分間遠心分離し、水層を新しいチューブに移し、等量のイソプロパノールを用いて-20 で少なくとも30分間の間沈殿させた。4、14000rpmで20分間遠心分離した後、上清を吸引除去し、チューブを軽く回転させ、全ての微量の液体を除去した。RNAペレットを各々300  $\mu$ lの溶液Dに溶解させ、1つに合わせて、等量のイソプロパノールを用いて-20 で少なくとも30分間の間沈殿させた。4、14000rpmで20分間遠心分離した後、上清を前記のように吸引除去し、試料を100  $\mu$ lの氷冷70%エタノールで洗浄した。試料を再度4、14000rpmで20分間遠心分離し、70%エタノール溶液を吸引除去し、RNAペレットをインバキュオ(in vacuo)で乾燥させた。ペレットは100  $\mu$ lの滅菌蒸留水に再懸濁された。濃度は、吸光度1.0が40  $\mu$ g/mlの濃度として $A_{260}$ により決定された。RNAを-80 で保存した。

#### 【0129】

#### 実施例2：相補的DNA(cDNA)の調製

前記のように精製された全RNAが、直接cDNAの鋳型として使用された。RNA(50  $\mu$ g)を滅菌水で100  $\mu$ lに希釈し、10  $\mu$ lの130ng/ $\mu$ LオリゴdT12(バイオサイトダイアグノスティックス(Biosite Diagnostics)にてアプライドバイオシステムズ(Applied Biosystems)モデル392DNA合成機で合成された)を添加した。試料は70 で10分間加熱され、その後氷上で冷却された。40  $\mu$ Lの5 $\times$ 一本鎖緩衝液(Gibco/BRL, Gaithersburg, MD)、20  $\mu$ Lの0.1Mジチオスレイトール(Gibco/BRL, Gaithersburg, MD)、10  $\mu$ Lの20mMデオキシヌクレオチド三リン酸(dNTPs, Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN)および10  $\mu$ Lの水を、氷上で添加した。試料をその後37 で2分間インキュベートした。10  $\mu$ Lの逆転写酵素(スーパースクリプト(SuperScript)(商標)II, Gibco/BRL, Gaithersburg, MD)を添加し、インキュベーションを37 で1時間続けた。cDNA産物をポリメラーゼ連鎖反応(PCR)に直接用いた。

#### 【0130】

#### 実施例3：PCRによるヒト抗体配列cDNAの増幅



HCo7遺伝子型を有する4匹のマウスのcDNAが、重鎖配列に対する3個の5'オリゴヌクレオチドおよび1個の3'オリゴヌクレオチド(表A)、鎖配列に対する10個の5'オリゴヌクレオチドおよび1個の3'オリゴヌクレオチド(表B)を用いて増幅された。HCo12遺伝子型を有する1匹のマウスのcDNAが、重鎖配列に対する5個の5'オリゴヌクレオチドおよび1個の3'オリゴヌクレオチド(表C)、表Bに示される、鎖配列に対するオリゴヌクレオチドを用いて増幅された。HCo7/HCo12遺伝子型を有する2匹のマウスのcDNAが、表Aおよび表Cに示される、重鎖配列に対するオリゴヌクレオチド配列、および表Bに示される、鎖配列に対するオリゴヌクレオチドを用いて増幅された。5'プライマーを、M13ウラシル鋳型に相補的な20ヌクレオチド配列が各プライマーの5'側に合成されるように作製した。この配列は重鎖プライマーおよび軽鎖プライマー間で異なっており、軽鎖プライマーではPeIBシグナル配列の3'側の20ヌクレオチドに相当し、重鎖プライマーではアルカリフォスファターゼシグナル配列の20ヌクレオチドに相当した。定常領域ヌクレオチド配列は重鎖および軽鎖に各々1つの3'プライマーを必要とした(表Aおよび表B)。各5'プライマーおよび3'プライマー組に関して別々にPCR増幅を実施した。50pmolの5'プライマー、50pmolの3'プライマー、0.25  $\mu$ L Taq DNAポリメラーゼ(5U/ $\mu$ L、Roche Molecular Biochemicals、Indianapolis、IN)、3  $\mu$ LのcDNA(実施例2に記載)、5  $\mu$ Lの2mM dNTPs、MgCl<sub>2</sub>を含む5  $\mu$ Lの10 $\times$ Taq DNAポリメラーゼ緩衝液(Roche Molecular Biochemicals、Indianapolis、IN)に水を加えて50  $\mu$ Lにして、各プライマー組に対して50  $\mu$ L反応を実施した。GeneAmp(登録商標)9600サーマルサイクラー(Perkin Elmer、Foster City、CA)を用いて、以下のプログラムで増幅を実施した: 94 1分間、そして94 20秒、55 30秒、72 30秒を30サイクル、72 で6分間、そして4 。

#### 【0131】

(表A) Hco7マウスのcDNA増幅に使用された重鎖オリゴヌクレオチド

オリゴヌクレオチド188、944および948は5'プライマーであり、オリゴヌクレオチド952は3'プライマーである。

オリゴ #	5' から3' 配列
188	TT ACC CCT GTG GCA AAA GCC GAA GTG CAG CTG GTG GAG TCT GG
944	TT ACC CCT GTG GCA AAA GCC CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GG
948	TT ACC CCT GTG GCA AAA GCC CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GG
952	GA TGG GCC CTT GGT GGA GGC

## 【0132】

(表B) Hco7マウス、Hco12マウス、およびHco7/Co12マウスのcDNA増幅に使用された 鎖オリゴヌクレオチド

オリゴヌクレオチド973は3'プライマーであり、残りは5'プライマーである。

オリゴ #	5' から3' 配列
189	CT GCC CAA CCA GCC ATG GCC GAA ATT GTG CTC ACC CAG TCT CC
931	TC GCT GCC CAA CCA GCC ATG GCC GTC ATC TGG ATG ACC CAG TCT CC
932	TC GCT GCC CAA CCA GCC ATG GCC AAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CC
933	TC GCT GCC CAA CCA GCC ATG GCC GCC ATC CGG ATG ACC CAG TCT CC
934	TC GCT GCC CAA CCA GCC ATG GCC GCC ATC CAG TTG ACC CAG TCT CC
935	TC GCT GCC CAA CCA GCC ATG GCC GAA ATA GTG ATG ACG CAG TCT CC
936	TC GCT GCC CAA CCA GCC ATG GCC GAT GTT GTG ATG ACA CAG TCT CC
937	TC GCT GCC CAA CCA GCC ATG GCC GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CC
955	TC GCT GCC CAA CCA GCC ATG GCC GAC ATC CAG ATG ATC CAG TCT CC
956	TC GCT GCC CAA CCA GCC ATG GCC GAT ATT GTG ATG ACC CAG ACT CC
973	CAG CAG GCA CAC AAC AGA GGC

## 【0133】

(表C) Hco12マウスのcDNA増幅に使用された重鎖オリゴヌクレオチド

オリゴヌクレオチド944、945、946、947および948は5'プライマーであり、オリゴヌクレオチド952は3'プライマーである。944、948および952の配列は表Aに示されている。

オリゴ #	5' から3' 配列
945	TT ACC CCT GTG GCA AAA GCC GAG GTG CAG CTG TTG GAG TCT GG
946	TT ACC CCT GTG GCA AAA GCC GAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GG
947	TT ACC CCT GTG GCA AAA GCC CAG GTG CAG CTA CAG CAG TGG GG

## 【0134】

PCR過程のdsDNA産物をその後、標的遺伝子のアンチセンス鎖のみを実質的に生成するために3'プライマーのみを用いて非対称性PCRに供した。オリゴヌクレオチド953が 鎖の非対称性PCRの3'プライマーとして(表D)およびオリゴヌクレオチド952が重鎖の非対称性PCRの3'プライマーとして(表A)として使用された。各脾臓において、プライマー189、931、932、933、934、936、955および956に関する 鎖PCR産物に対して2つの非対称性反応が行われ、プライマー935に対す

る鎖PCR産物に対して4つの非対称性反応が行われ、プライマー937に対する鎖PCR産物に対して8つの非対称性反応が行われた。各重鎖PCR産物に対して使用された非対称性反応の数はマウス遺伝子型に依存した。Co7マウスでは各PCR産物について8つの非対称性反応が行われた。Co12マウスでは、プライマー944からのPCR産物について8つの非対称性反応が行われ、他のプライマーからのPCR産物について4つの非対称性反応が行われた。Co7/Co12マウスでは、プライマー944および948からのPCR産物について6つの非対称性反応が行われ、他のプライマーからのPCR産物について3つの非対称性反応が行われた。200pmolの3'プライマー、2μLのds-DNA産物、0.5μL Taq DNAポリメラーゼ、10μLの2mM dNTPs、MgCl<sub>2</sub>を含む10μLの10×Taq DNAポリメラーゼ緩衝液に水を加えて100μLにして、全体で100μLの反応を実施した。重鎖反応は前記の温度プロファイルにて増幅され、鎖反応は30サイクルの代わりに25サイクルが使用された同じ温度プロファイルにて増幅された。

#### 【0135】

(表D) 鎖非対称性PCRに使用されたオリゴヌクレオチド配列

オリゴ #	5' から3' 配列
953	GAC AGA TGG TGC AGC CAC AGT

#### 【0136】

実施例4：高速液体クロマトグラフィーによるss-DNAの精製とss-DNAのキナーゼ化

重鎖ss-PCR産物および軽鎖ss-PCR産物を別々にプールし、2.5容量のエタノールおよび0.2容量の7.5M酢酸アンモニウムを添加し、-20℃で少なくとも30分間インキュベートすることによりエタノール沈殿した。DNAは2 ~ 8 にて15000rpmで15分間遠心分離することによりペレット化された。上清を注意深く吸引除去し、チューブを2度軽く回転させた。上清の最後の1滴はピペットで除去された。DNAを中温度に加熱し10分間インバキュオで乾燥させた。重鎖産物を210μLの水に溶解させ、軽鎖産物を別々に210μLの水に溶解させた。ss-DNAはヒュレットパックカード (Hewlett Packard) の1090HPLCおよびGen-Pak (商標) FAX陰イオン交換

カラム (Millipore Corp., Milford, MA) を用いて高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により精製された。ss-DNA精製に用いた勾配を表1に示し、オープン温度は60 °であった。吸光度は260nmでモニターされた。HPLCから溶出されたss-DNAは0.5分の画分で収集された。ss-DNAを含む画分がプールされ、エタノールペレット化され、ペレットにされ、前記の通り乾燥された。乾燥させたDNAペレットを200  $\mu$ lの滅菌水に再懸濁させた。

### 【0137】

【表1】 ss-DNA精製のためのHPLC勾配

時間 (分)	%A	%B	%C	流速 (mL/分)
0	70	30	0	0.75
2	40	60	0	0.75
17	15	85	0	0.75
18	0	100	0	0.75
23	0	100	0	0.75
24	0	0	100	0.75
28	0	0	100	0.75
29	0	100	0	0.75
34	0	100	0	0.75
35	70	30	0	0.75

緩衝液Aは25mMトリス、1mM EDTA、pH8.0

緩衝液Bは25mMトリス、1mM EDTA、1M NaCl、pH8.0

緩衝液Cは40mMリン酸

### 【0138】

ss-DNAは変異誘発のための調製において、5'末端がキナーゼ化された (Kinase d) (実施例7)。24  $\mu$ lの10 $\times$ キナーゼ緩衝液 (United States Biochemicals, Cleveland, OH)、10.4  $\mu$ lの10mM アデノシン-5'-三リン酸 (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) および2  $\mu$ lのポリヌクレオチドキナーゼ (30U/ $\mu$ l, United States Biochemicals, Cleveland, OH) を各試料に添加し、チューブを37 °で1時間インキュベートした。チューブを70 °で10分間インキュベートすることで反応を停止させた。DNAは平衡化フェノール (pH>8.0, United States Biochemicals, Cleveland, OH) -クロロホルム-イソアミルアルコール (50:49:1) の1回の抽出とクロロホルム:イソアミルアルコール (49:1) の1回の抽出で精製された

。抽出後DNAをエタノール沈殿し、前記の通りペレットにした。DNAペレットを乾燥させ、そして50  $\mu$ lの滅菌水に溶解させた。260nmでのDNAアリコートの吸光度を測定することにより、吸光度1.0が33  $\mu$ g/mLとして、濃度を決定した。試料を-20 で保存した。

#### 【0139】

実施例5：ヒト抗体定常領域配列を有する抗体ファージ提示 (antibody phage display) ベクターの構築

抗体をクローニングするための抗体ファージ提示ベクターはイクシス (Ixsys) から供与された668-4と名づけられたM13ベクターに由来した。ベクター668-4はヒューズ (Huse)、国際公開公報第92/06024号により記載されたベクターに挿入された、マウスモノクローナルFab断片の重鎖および軽鎖をコードするDNA配列を含んでいた。このベクターはLacプロモーター、マウス抗体の軽鎖可変領域の5'側に融合されたpelBシグナル配列、マウス抗体の 鎖全体、マウス抗体の重鎖可変領域の5'末端のアルカリフォスファターゼシグナル配列、重鎖の可変領域全体および最初の定常領域、およびIgG重鎖のヒンジ領域の5個のコドンを含んでいた。デカペプチド配列は重鎖のヒンジ領域の3'末端に位置し、アンバー終止コドンがデカペプチド配列を偽遺伝子 (pseudo-gene) VIII配列から分離していた。アンバー終止コドンはXL1blue (Stratagene, San Diego, CA) 等の大腸菌サブレッサー系統において遺伝子VIIIタンパク質との重鎖融合タンパク質の発現を可能にするが、MK30等の非サブレッサー細胞系統においては可能にしない (図1を参照されたい)。

#### 【0140】

最初の誘導体クローニングベクターを作製するために、ウラシル鋳型を用いたオリゴヌクレオチド定方向変異誘発 (directed mutagenesis) (Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA82: 488 (1985)、Kunkelら、Methods.Enzymol.154: 367 (1987)) により重鎖および軽鎖の可変領域内に欠失を作製した。これらの変異は各鎖のCDR1の5'末端からCDR3の3'末端の領域を欠失させ、変異はタンパク質翻訳が停止するであろうDNA配列を付加した (変異誘発オリゴヌクレオチドに関しては図2を参照されたい)。これにより、挿入物を有さないクローンにおいて、

重鎖または軽鎖定常領域が発現されなくなり、したがって、挿入物が存在するブランクをスクリーニングすることが可能となった。得られたクローニングベクターをBS11と呼んだ。

#### 【0141】

本スクリーニング方法において使用されるクローニングベクターを生成する前に多くの変更がBS11に行われた。重鎖と偽遺伝子VIII配列の間にあるアンバー終止コドンが取り除かれ、すべての重鎖が遺伝子VIIIタンパク質との融合タンパク質として発現された。これはBS11と比べて、ファージ上の抗体のコピー数を増加させた。軽鎖の3'末端とアルカリフォスファターゼシグナル配列の5'末端の間の配列に存在するHindIII制限酵素部位が欠失され、抗体がpBR322誘導体にサブクローニングされることが可能になった（実施例14）。Lおよび重鎖のカルボキシル末端の鎖間ジスルフィド残基がセリン残基に変更された。これは抗体の発現レベルを増加させ、抗体の安定性に影響することなく、ファージ上の抗体のコピー数を増加させた。lacプロモーターの5'側および偽遺伝子VIII配列の3'側の非必須DNA配列はM13ベクターのサイズおよび再構成の可能性を減少させるために欠失された。翻訳終止を置換する形で軽鎖クローニング部位において転写終結DNA配列がベクターに付加され、パニング（panning）において非特異的に増幅されるかもしれない重鎖タンパク質しかファージ表面に有さないファージが作製されないようになった。最後にタンパク質タグのDNA配列が異なるベクターに付加され、金属キレートクロマトグラフィー（ポリヒスチジン配列）により、またはデカペプチドタグおよびデカペプチドタグに結合する固定化抗体を有する磁性ラテックスを用いて親和性精製により、多価ファージが濃縮されることができるようになった。BS45は重鎖定常領域の末端と偽遺伝子VIII配列の間にポリヒスチジン配列を、鎖定常領域の3'末端にデカペプチド配列を有していた。

#### 【0142】

オリゴヌクレオチド定方向変異誘発によりBS45からマウス重鎖および鎖の定常領域配列が欠失された。オリゴヌクレオチド864がマウス鎖を欠失させるために使用され、オリゴヌクレオチド862がマウス重鎖を欠失させるために使用された。

## 【0143】

オリゴヌクレオチド864

5' ATC TGG CAC ATC ATA TGG ATA AGT TTC GTG TAC AAA ATG CCA GAC CTA GAG  
GAA TTT TAT TTC CAG CTT GGT CCC

オリゴヌクレオチド862

5' GTG ATG GTG ATG GTG ATG GAT CGG AGT ACC AGG TTA TCG AGC CCT CGA TAT  
TGA GGA GAC GGT GAC TGA

## 【0144】

両定常領域配列の欠失は、オリゴヌクレオチド5および197を用いたPCRにより両定常領域配列を含むDNA配列を増幅し、DNAアガロースゲルにてPCR産物のサイズを測定することにより決定された。PCRは二重鎖DNAに対して、cDNAの代わりに1 $\mu$ lのファージが鋳型とされた点を除いて、実施例3に記載されているように実施された。所望の欠失を有するファージは、1つの欠失または無欠失と比べてより短いPCR産物を有した。実施例6に記載されるように両欠失を有するファージストックからウラシル鋳型が作製された。この鋳型BS46は鎖およびIgG1に対するヒト定常領域配列を挿入するために使用された。

## 【0145】

プライマー5

5' GCA ACT GTT GGG AAG GG

プライマー197

5' TC GCT GCC CAA CCA GCC ATG

## 【0146】

ヒト定常領域DNA配列はヒト脾臓cDNA (Clontech、Palo Alto、California) から増幅された。オリゴヌクレオチド869および870が定常領域配列を増幅するために使用され、オリゴヌクレオチド867および876がIgG1定常領域配列およびヒンジ領域の6アミノ酸コドンを増幅するために使用された (Kabatら、「免疫学的関心対象のタンパク質配列 (Sequence of Proteins of Immunological Interest)」、1991年)。

## 【0147】

5' PCR プライマー (869)- GGG ACC AAG CTG GAA ATA AAA CGG GCT GTG GCT GCA CCA TCT  
GTC T

3' PCR プライマー (870)- ATC TGG CAC ATC ATA TGG ATA AGA CTC TCC CCT GTT GAA GCT  
CTT

5' PCR プライマー (867)- TCA GTC ACC GTC TCC TCA GCC TCC ACC AAG GGC CCA TC

3' PCR プライマー (876)- GTG ATG GTG ATG GTG ATG AGA TTT GGG CTC TGC TTT CTT GTC C

### 【 0 1 4 8 】

PCR (各鎖に対して1つの50  $\mu$ lの反応)はエクスパンド (Expand) 高精度PCRシステム (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN) を用いて実施された。各50  $\mu$ l反応は、50pmolの5'プライマー、50pmolの3'プライマー、0.35ユニットのエクスパンドDNAポリメラーゼ、5  $\mu$ Lの2mM dNTPs、5  $\mu$ Lの10 $\times$ エクスパンド反応緩衝液、鋳型としての1  $\mu$ l cDNAを、水を加えて50  $\mu$ lにしたものを含んでいた。反応はパーキンエルマーサーマルサイクラー (モデル9600) で、鎖に関しては以下の温度プロファイルを用いて実施された。1サイクルの94 $^{\circ}$ での変性 (1分)、10サイクルの変性 (15秒、94 $^{\circ}$ )、アニーリング (30秒、55 $^{\circ}$ )、伸長 (60秒、72 $^{\circ}$ )、そして15サイクルの変性 (15秒、94 $^{\circ}$ )、アニーリング (30秒、55 $^{\circ}$ )、伸長 (80秒で各サイクル毎に20秒増加、72 $^{\circ}$ )、その後伸長 (6分、72 $^{\circ}$ )、浸漬 (4 $^{\circ}$ 、無制限)。重鎖反応に使用された温度プロファイルは、温度プロファイルの2番目の部分が15サイクルの代わりに20サイクルであった。

### 【 0 1 4 9 】

PCR過程のdsDNA産物はその後ヒト定常領域遺伝子のアンチセンス鎖のみを実質的に生成するために、実施例3に記載されているように、3'プライマーのみを用いて非対称性PCRに供された。鎖に対して5反応が、重鎖に対して10反応が実施された (各反応100  $\mu$ l)。両定常領域遺伝子に対する温度プロファイルは実施例3に記載されている通りであり、重鎖非対称性PCRは30サイクルで、鎖非対称性PCRは25サイクルで行われたことを含んでいた。一本鎖DNAは実施例4に記載されているようにHPLCにより精製された。HPLC精製された鎖DNAは55  $\mu$ lの水に溶解され、HPLC精製重鎖は100  $\mu$ lの水に溶解された。DNAは実施例4に記載されているように260nmの吸光度で定量され、その後DNAは、50  $\mu$ lの鎖DNAに6  $\mu$ lの10 $\times$ キナーゼ緩衝液、2.6  $\mu$ lの10mM ATP、0.5  $\mu$ lのポリヌクレオチドキナーゼが加えら



れた点を除いて実施例4に記載されているようにキナーゼ化された。これらの2倍の容量のキナーゼ試薬が100  $\mu$ lの重鎖DNAに添加された。

【0150】

抽出によるDNA精製を行わずに、キナーゼ化されたDNAはBS46に変異誘発するために使用された。変異誘発は2  $\mu$ gスケールで以下のものを0.2mL PCR反応チューブ内で混合することにより実施された。8  $\mu$ lのBS46ウラシル鑄型 (250ng/ $\mu$ l)、8  $\mu$ lの10 $\times$  アニーリング緩衝液 (200mM トリス pH7.0、20mM  $MgCl_2$ 、500mM NaCl)、2.85  $\mu$ lのキナーゼ化一本鎖重鎖挿入物 (94ng/ $\mu$ l)、6.6  $\mu$ lのキナーゼ化一本鎖鎖挿入物 (43.5ng/ $\mu$ l)、滅菌水を80  $\mu$ lになるまで加える。DNAはGene Amp (登録商標) 9600サーマルサイクラーで以下の温度プロファイルでアニールされた。94 20秒、85 60秒、85 から55 に30分以上かけて減少させ、55 で15分保った。プログラム終了後DNAは氷に移された。伸長/ライゲーションは8  $\mu$ lの10 $\times$  合成緩衝液 (各dNTP 5mM、10mM ATP、100mM トリス pH7.4、50mM  $MgCl_2$ 、20mM DTT)、8  $\mu$ lのT4DNAリガーゼ (1U/ $\mu$ l、Roche Molecular Biochemicals、Indianapolis、IN)、8  $\mu$ lの希釈されたT7 DNAポリメラーゼ (1U/ $\mu$ l、New England Biolabs、Beverly、MA) を添加して、37 で30分間インキュベートすることにより実施された。反応は296  $\mu$ lの変異誘発停止緩衝液 (10mM トリスpH8.0、10mM EDTA) により停止された。変異誘発DNAは、平衡化フェノール (pH>8.0) : クロロホルム : イソアミルアルコール (50 : 49 : 1) にて1回とクロロホルム/イソアミルアルコール (49 : 1) にて1回抽出され、DNAは-20 で少なくとも30分間エタノール沈殿された。DNAはペレット化され、上清が前記のように慎重に除去された。試料を再び軽く回転させ、エタノールの残液を全てピペットマンで除去した。ペレットがインバキュオで乾燥された。DNAは4  $\mu$ lの滅菌水に再懸濁された。1  $\mu$ lの変異誘発DNA (500ng) が40  $\mu$ lのエレクトロコンピテント (electocompetent) 大腸菌DH12S (Gibco/BRL、Gaithersburg、MD) 40  $\mu$ lに、実施例8のエレクトロポレーション条件を用いて導入された。形質転換された細胞は1.0mLの2 $\times$ YT培地 (Sambrookら、前記) と混合され、15mLの滅菌培養チューブに移された。形質転換細胞のアリコート (10<sup>-3</sup>希釈から10<sup>-4</sup>希釈を10  $\mu$ l) は実施例11に記載されているように100mmLB寒天プレート上にプレーティングされた。37 で6時間増殖

後、20個の別々のプラークがプレートから選択され2.75mLの2×YTおよび0.25mLの一晩培養したXL1Blue細胞に加えられた。個々のプラークからのファージを増幅するために培養物は37℃にて300rpmで一晩増殖された。ファージ試料は、オリゴヌクレオチド197および5'（前記のBS46解析を参照されたい）を用いたPCRにより、続いてアガロースゲル電気泳動にてPCR産物のサイズを測定することにより、2つの定常領域の挿入が解析された。アガロースゲル電気泳動により2つの挿入物と考えられるものを含んでいる2つのクローンの配列が、セクアサーム（Sequatherm）シーケンシングキット（Epicenter Technologies、Madison、WI）およびLI-COR4000L自動シーケンサー（LI-COR、Lincoln、NE）を用いて、MacConnel Research（マックコネルリサーチ）（San Diego、CA）にてダイデオキシ鎖終結法により確認された。鎖および重鎖の各々3'側に結合するオリゴヌクレオチドプライマー885および5'が使用された。両クローンは正しい配列を有していた。BS46と呼ばれるヒト定常領域配列を有するウラシル鋳型は実施例6に記載されるように調製された。

#### 【0151】

プライマー 885

5' TAA GAG CGG TAA GAG TGC CAG

#### 【0152】

実施例6：脾臓抗体ファージライブラリー作製のために使用されるウラシル鋳型の調製

一晩培養した1mLの大腸菌CJ236（BioRAD、Hercules、CA）と10μLの1/100希釈ベクターファージストックが250mLの溝付振盪フラスコ中の50mLの2×YTに添加された。培養物は37℃で6時間増殖された。約40mLの培養液が4℃にて12000rpmで15分間遠心分離された。上清（30mL）が新しい遠心分離チューブに移され、15μLの10mg/mLのRNaseA（Boehringer Mannheim、Indianapolis、IN）を添加後15分間室温にてインキュベートされた。7.5mLの20%ポリエリチレングリコール8000（Fisher Scientific、Pittsburgh、PA）/3.5M硫酸アンモニウム（Sigma Chemicals Co.、St. Louis、MO）を添加し、氷上で30分間インキュベーションすることによりファージを沈殿させた。試料は2～8℃にて12000rpmで15分間遠心分離され

た。上清が注意深く廃棄され、チューブは軽く回転され、全ての微量の上清が除去された。ペレットは400  $\mu$ lの高塩濃度緩衝液（300mM NaCl、100mM トリス pH8.0、1mM EDTA）に再懸濁され、1.5mLチューブに移された。ファージストックは白い中間層の残存物が見えなくなるまで、等量の平衡化フェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール（50：49：1）にて繰り返し抽出され、その後等量のクロロホルム：イソアミルアルコール（49：1）にて抽出された。DNAを、2.5容量のエタノールおよび1/5容量の7.5M酢酸アンモニウムを添加し、-20℃で30分間インキュベートすることによりペレット化した。DNAを4℃、14000rpmで10分間遠心分離し、ペレットを冷70%エタノールで一度洗浄し、インバキュオで乾燥させた。ウラシル鋳型DNAは100  $\mu$ lの滅菌水に溶解され、濃度は吸光度1.0が40  $\mu$ g/mlの濃度として $A_{260}$ により決定された。鋳型は滅菌水で250ng/ $\mu$ lに希釈され、分注され、-20℃で保存された。

### 【0153】

実施例7：抗体ファージライブラリーを生成するためのss-DNAを用いたウラシル鋳型への変異誘発および大腸菌へのエレクトロポレーション

抗体ファージ提示ライブラリーはウラシル鋳型のファージ提示ベクター上に同時に一本鎖重鎖および軽鎖遺伝子を導入することにより生成された。典型的な変異誘発は2  $\mu$ gスケールで以下のものを0.2mL PCR反応チューブ内で混合することにより実施された：8  $\mu$ lのBS46ウラシル鋳型（250ng/ $\mu$ l）（実施例5および6）、8  $\mu$ lの10×アニーリング緩衝液（200mM トリス pH7.0、20mM  $MgCl_2$ 、500mM NaCl）、3.33  $\mu$ lのキナーゼ化一本鎖重鎖挿入物（100ng/ $\mu$ l）、3.1  $\mu$ lのキナーゼ化一本鎖軽鎖挿入物（100ng/ $\mu$ l）、滅菌水を80  $\mu$ lまで加える。DNAはGeneAmp（登録商標）9600サーマルサイクラーで以下の温度プロファイルでアニールされた。94℃20秒、85℃60秒、85℃から55℃に30分以上かけて減少させ、55℃で15分保持された。プログラム終了後DNAは氷に移された。伸長/ライゲーションは8  $\mu$ lの10×合成緩衝液（各dNTP 5mM、10mM ATP、100mM トリス pH7.4、50mM  $MgCl_2$ 、20mM DTT）、8  $\mu$ lのT4DNAリガーゼ（1U/ $\mu$ l）、8  $\mu$ lの希釈T7 DNAポリメラーゼ（1U/ $\mu$ l）を添加して、37℃で30分間インキュベートすることにより実施された。反応は300  $\mu$ lの変異誘発停止緩衝液（10mM トリス pH8.0、10mM EDTA）により停止さ

れた。変異誘発されたDNAは、平衡化フェノール (pH > 8) : クロロホルム : イソアミルアルコール (50 : 49 : 1) にて1回、及びクロロホルム : イソアミルアルコール (49 : 1) にて1回抽出され、かつDNAは-20℃で少なくとも30分間エタノール沈殿された。DNAをペレット化し、上清を前記のように慎重に除去した。試料を再び軽く回転し、エタノールの残液を全てピペットマンで除去した。ペレットがインバキュオで乾燥された。DNAは4 µlの滅菌水に再懸濁された。1 µlの変異誘発されたDNA (500ng) が40 µlのエレクトロコンピテント大腸菌DH12S (Gibco/BRL, Gaithersburg, MD) に、実施例8のエレクトロポレーション条件を用いて導入された。形質転換された細胞を0.4mLの2×YT培地 (Sambrookら、前記) 及び0.6mLの一晩培養したXL1 Blue細胞と混合し、15mLの滅菌培養チューブに移した。初回の抗体ファージ試料が、エレクトロポレーションされた試料を実施例11に記載されているように150mmLBプレート上にプレーティングすることにより生成された。プレートを37℃にて4時間インキュベートした後、-20℃で一晩インキュベートした。10mLの2YT培地をピペットでローン (lawn) に添加し、プレートを室温で20分間緩やかに振盪することで、初回の抗体ファージを150mmプレートから抽出した。ファージを15mLのプラグシールキャップ付使い捨て滅菌遠心分離チューブに移し、LBプレート由来の碎片を3500rpmで15分間遠心分離することによりペレット化した。初回の抗体ファージはその後新しいチューブに移された。

#### 【0154】

エレクトロポレーションの効率は $10^{-3}$ 希釈から $10^{-4}$ 希釈した培養物10 µlをLB寒天プレートにプレーティングすることで測定された (実施例11を参照されたい)。効率は $10^{-3}$ 希釈プレートのプラーク数に $10^5$ をかけることにより、又は $10^{-4}$ 希釈プレートのプラーク数に $10^6$ をかけることにより決定された。

#### 【0155】

実施例8 : エレクトロポレーションによる大腸菌の形質転換

エレクトロコンピテント大腸菌は氷上で融解された。細胞を緩やかに2~3回上下させることでピペッティングし、気泡が入らないように注意しながら、20~40 µlのエレクトロコンピテント細胞と、DNAを混合させた。移すときに再度気泡が入らないように注意しながら、氷上で冷却されたジーンパルサーキューベット (Ge

ne Pulser cuvette、0.2cmギャップ、BioRAD、Hercules、CA)に細胞を移した。キュベットは大腸菌パルサー (E. Coli Pulser、BioRAD、Hercules、CA)に設置され、製造者の推奨に従い1.88kVに設定された電圧でエレクトロポレーションされた。形質転換された試料は直ちに1mlの2×YT培地または、400 μlの2×YT/600 μlのXL1 Blue細胞の1mlの一晩培養液で希釈され、記載された手順に進んだ。

#### 【0156】

#### 実施例9：ビオチン化インターロイキン8 (IL8) の調製

IL8は少なくとも100容量の20mMホウ酸、150mM NaCl pH8 (BBS) に対して2 ~ 8で少なくとも4時間透析された。緩衝液はビオチン化の前に少なくとも1回取り換えられた。IL8はビオチン-XX-NHSエステル (Molecular Probes、Eugene、OR、ジメチルフォルムアミドに40mMで溶解させたストック溶液) と室温にて1時間、最終濃度1mMで反応した。未反応の低分子を除くため1時間後IL8はBBSに対して十分に透析された。

#### 【0157】

#### 実施例10：アビジン磁性ラテックスの調製

磁性ラテックス (スーパパラマグネチック・マイクロパーティクル (Superparamagnetic Paramicroparticles)、0.96 μm、エスタポール、10%固体、Bangs Laboratories、Carmel、IN) を完全に再懸濁し、2mlが15mlのコニカルチューブに分注した。磁性ラテックスを12mlの滅菌水に懸濁し、磁石を使って10分間液相から分離させた。磁石中で静置させながら、液体を10ml滅菌ピペットで慎重に除去した。この洗浄過程はさらに3回繰り返された。最後の洗浄の後、ラテックスは2mlの滅菌水に再懸濁された。別の50mlのコニカルチューブ中で、10mgのアビジン-HS (ニュートラアビジン (NeutrAvidin)、Pierce、Rockford、IL) が、18mlの40mMトリス、0.15M NaCl, pH7.5 (TBS) に溶解された。ボルテックス中に、2mlの洗浄された磁性ラテックスが、希釈されたアビジン-HSに添加され、混合液はさらに30秒間ボルテックスされた。この混合液を30分毎に振盪させながら、45で2時間インキュベートされた。アビジン磁性ラテックスは磁石を使って液体から分離され、前記のように20mlのBBSで3回洗浄された。最後の洗浄の後、ラテックスは10mlのBBSに再懸濁され、4で保存された。

## 【0158】

使用直前に、アビジン磁性ラテックスをパニング緩衝液（40mM トリス、150mM NaCl, 20mg/ml BSA、0.1% Tween20 (Fisher Scientific、Pittsburgh、PA)、pH 7.5) 中で平衡化した。パニング実験に必要なアビジン磁性ラテックス（200  $\mu$ l / 試料）が滅菌された15ml 遠心分離チューブに添加され、パニング緩衝液で10ml にされた。ラテックスを分離するためにチューブは磁石上に10分間置かれた。溶液を10mL 滅菌ピペットを用いて前記のように慎重に除去した。2回目の洗浄を開始するために、磁性ラテックスが10mL のパニング緩衝液に再懸濁された。磁性ラテックスはパニング緩衝液を用いて総計3回洗浄された。最後の洗浄の後、ラテックスをパニング緩衝液に再懸濁し、最初の分注量にした。

## 【0159】

実施例11：抗体ファージ提示ベクター変異誘発反応を用いて形質転換されたM13 ファージまたは細胞のプレーティング

ファージ試料が15ml の滅菌培養チューブ中の100mm のLB寒天プレートにプレーティングされる時は200  $\mu$  L の一晚培養したXL1 Blue大腸菌に、150mm のプレートにプレーティングされる時は600  $\mu$  L の一晚培養した細胞に添加された。エレクトロポレーションされたファージ試料は、150mm のプレートにプレーティングされる前に、実施例8に記載されているように1mL の2 $\times$ YT/一晚培養したXL1細胞中に入れられた。LBトッパガー（100mm のプレートに3mL、150mm のプレートに9mL の、55 $^{\circ}$  で保存されたトッパガー、付録A1、「分子クローニング、実験室マニュアル (Molecular Cloning, A Laboratory Manual)」(1989)、Sambrook J) を添加した後、寒天表面のいかなる過剰な水分も除くために前加温された（37 $^{\circ}$  ~ 55 $^{\circ}$ ）LB寒天プレート上に混合液が均等に分布された。トッパガーが固化するまで、プレートを室温で冷却した。プレートを逆さにし、示されるように37 $^{\circ}$  でインキュベートした。

## 【0160】

実施例12：アルカリフォスファターゼ（AP）結合体を用いたニトロセルロースフィルターの現像

ニトロセルロースフィルターをLB寒天プレート上で一晚インキュベートした後

、フィルターを膜ピンセットを用いて慎重にプレートから取り外し、ブロッキング液 (block) (1%ウシ胎児血清 (30% BSA由来、Bayer、Kankakee、IL)、10mM トリス、150mM NaCl、1mM  $MgCl_2$ 、0.1mM  $ZnCl_2$ 、0.1%ポリビニルアルコール (80%加水分解物、Aldrich Chemical Co.、Milwaukee、WI、pH8.0) 中で2時間インキュベートされた。

#### 【0161】

2時間後、フィルターをやぎ抗ヒト AP (Southern Biotechnolpgy Associates, Inc.、Birmingham、AL) と2~4時間インキュベートさせた。AP結合体はブロッキング液中で最終濃度1  $\mu g/ml$  に希釈された。フィルターは40mM トリス、150mM NaCl、0.05% Tween20、pH7.5 (TBST) (Fisher Chemical、Pittsburgh、PA) で5分間ずつ3回洗浄された。最後の洗浄の後、フィルターを0.2M 2-アミノ-2-メチル-1-プロパノール (JBL Scientific、San Luis Obispo、CA)、0.5M トリス、0.33mg/mL ニトロブルーテトラゾリウム (Fisher Scientific、Pittsburgh、PA) および0.166mg/mLの5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルーリン酸、p-トルイジン塩) を含む溶液中で現像した。

#### 【0162】

実施例13： 鎖上のデカペプチドタグを用いたヒトインターロイキン8に対するポリクローナルファージの濃縮

初回の抗体ファージが、多価濃縮のために 鎖に融合されたデカペプチドタグを有するBS46ウラシル鋳型を用いて実施例7に記載されるように調製された。7個の異なる脾臓由来の変異誘発DNAの14回のエレクトロポレーション (各脾臓につき2回のエレクトロポレーション) が行われ、14個の異なるファージ試料がもたらされた。機能的パニングの前に、抗体ファージ試料が、 鎖上のデカペプチドおよび7F11磁性ラテックスを用いて多価提示のために濃縮された。結合実験により、デカペプチドが比較的緩やかなpH10.5~11にてモノクローナル抗体7F11 (実施例17を参照されたい) から溶出されるだろうことが以前に示された。7F11磁性ラテックス (2.9mL) を、アビジン磁性ラテックスに関して記載されたように (実施例10) パニング緩衝液により平衡化した。初回の各ファージストック (1mL) が15mLチューブに分注された。7F11磁性ラテックス (ファージ試料につき200

μL) が室温にて10分間ファージと共にインキュベートされた。10分後9mLのパニング緩衝液が添加され、チューブを磁石に10分間置くことにより、未結合ファージから磁性ラテックスが分離された。磁石中で10分後、未結合ファージを10mLの滅菌ピペットを用いて慎重に除去した。磁性ラテックスはその後1mLのパニング緩衝液に再懸濁され、1.5mLチューブに移された。チューブを小さな磁石に5分間置くことにより、未結合ファージから磁性ラテックスを分離し、その後上清を滅菌ピペットを用いて慎重に除去した。ラテックスはさらに1回の1mLパニング緩衝液洗浄により洗浄された。各ラテックスは1mLの溶出緩衝液(20mM 3-(シクロヘキシルアミノ)プロパンスルホン酸(United States Biochemicals、Cleveland、OH)、150mM NaCl、20mg/mL BSA、pH10.5)に再懸濁され、室温で10分間インキュベートされた。10分後、チューブを小さな磁石内に再び5分間置き、溶出されたファージを新しい1.5mLチューブに移した。移したラテックスの最後の少量を取り除くためファージ試料を磁石内に再び5分間置き、溶出されたファージを新しい1.5mLチューブに移した。溶出されたファージを慎重に取り除いて新たなチューブに移し、25 μLの3MトリスpH6.8をファージを中和するために添加した。IL8-ビオチンを用いたパニングは、900 μLの7F11/デカペプチド濃縮ファージ、100 μLのパニング緩衝液、および10 μLの $10^{-7}$ M IL8-ビオチンを混合することにより各試料について準備され、2 ~ 8 で一晩インキュベートされた。

#### 【0163】

抗体ファージ試料はアビジン磁性ラテックスを用いてパニングされた。平衡化されたアビジン磁性ラテックス(実施例11を参照されたい)、各試料に付き200 μLのラテックスが、室温で10分間ファージとインキュベートされた。10分後、約9mLのパニング緩衝液が各ファージ試料に添加され、磁性ラテックスが7F11磁性ラテックスに関して前記のように洗浄された。9mLで1回、1mLで3回の全てのパニング緩衝液を用いた洗浄が行われた。最後の洗浄後、各ラテックスは200 μLの2×YTに再懸濁され、その後各試料のラテックスが全て150mmのLBプレートにプレーティングされ、2回目の抗体ファージが生成された。150mmプレートは37 で4時間、その後20 で一晩インキュベートされた。

#### 【0164】



生じた2回目の抗体ファージ試料は、別々の15mLのプラグシールキャップ付使い捨て滅菌遠心分離チューブ中で900  $\mu$ Lのパニング緩衝液、100  $\mu$ Lの2回目の抗体ファージおよび10  $\mu$ Lの $10^{-7}$ Mインターロイキン8ビオチンを混合することにより、2回目の機能的パニングのために準備された。2 ~ 8 で一晩インキュベーションした後、ファージ試料は前記のようにアビジン磁性ラテックスを用いてパニングされた。各脾臓由来の1つの試料のアリコートが100mm LB寒天プレートにプレーティングされ、陽性の割合が決定された（実施例12）。2回目のパニングの陽性の割合は13試料について83% ~ 92%であった。1つの試料は63% 陽性であったので、廃棄された。

#### 【0165】

残りの13試料は、950  $\mu$ Lのパニング緩衝液、50  $\mu$ Lの3回目の抗体ファージおよび10  $\mu$ Lの $10^{-6}$ Mインターロイキン8ビオチンを用いて前記のように3回目の機能的パニングのために準備された。2 ~ 8 で1.5時間インキュベーションした後、ファージ試料はアビジン磁性ラテックスを用いてパニングされ、前記のようにニトロセルロースフィルターが各ファージ試料の上に置かれた。4回目の抗体ファージ試料の陽性の割合は80%以上であると推定された。

#### 【0166】

4回目の抗体ファージ試料は50  $\mu$ Lの $10^{-8}$ 希釈液を100mmのLBプレートにプレーティングすることにより力価が測定された。37 で6時間後に各プレートのプラーク数が計数され、プラーク数に $2 \times 10^9$ をかけることで力価が計算された。13個の4回目のファージのプールが各ファージストックから同数のファージを混合し、高力価のファージストックがプールを偏らせないように作製された。プールされた抗体ファージは、950  $\mu$ Lのパニング緩衝液、50  $\mu$ Lの4回目のプールされた抗体ファージを用いて前記のように4回目の機能的パニングのために二重に準備された。1つの試料（フォアグラウンド（foreground））は10  $\mu$ Lの $10^{-6}$ Mインターロイキン8ビオチンを添加され、もう1つの試料（バックグラウンド（background））はインターロイキン8ビオチンを添加されずファージの磁性ラテックスへの非特異的な結合をモニターするためのブランクとして機能した。2 ~ 8 で1.5時間インキュベーションした後、ファージ試料はアビジン磁性ラテックスを用い

て前記のようにパニングされた。翌日、5回目の抗体ファージが溶出され、プレート数がフォアグラウンドおよびバックグラウンドのプレートに関して計数された。フォアグラウンド：バックグラウンドの比率は58：1であった。

#### 【0167】

5回目の抗体ファージは、各試料につき、950  $\mu$ Lのパニング緩衝液、50  $\mu$ Lの5回目の抗体ファージを用いて三重に準備され、実験（フォアグラウンド）チューブは10  $\mu$ Lの $10^{-7}$ Mインターロイキン8ビオチンまたは、10  $\mu$ Lの $10^{-8}$ Mインターロイキン8ビオチンをそれぞれ添加された。三番目のチューブはインターロイキン8ビオチンを添加されなかった。この回のパニングすなわち親和性選択は、インターロイキン8ビオチンを最終濃度をそれぞれ $10^{-9}$ Mおよび $10^{-10}$ Mにて含めることにより、 $10^{-9}$ および $10^{-10}$ の親和性の抗体を優先的に選択する。2～8で24時間以上インキュベーションした後、ファージ試料はアビジン磁性ラテックスを用いて前記のようにパニングされ、処理された。 $10^{-9}$ Mで切り捨てられた（cut）6回目の抗体ファージ試料はフォアグラウンド：バックグラウンドの比率は1018：1であり、 $10^{-10}$ Mで切り捨てられたものはフォアグラウンド：バックグラウンドの比率は225：1であった。

#### 【0168】

$10^{-10}$ の親和性の抗体数を増加させるために、 $10^{-10}$ Mで切り捨てられた6回目の抗体ファージについてさらにもう1回のパニングが行われた。6回目のファージは、各試料につき、975  $\mu$ Lのパニング緩衝液、25  $\mu$ Lの6回目の抗体ファージを用いて前記のように準備され、実験（フォアグラウンド）チューブに10  $\mu$ Lの $10^{-8}$ Mインターロイキン8ビオチンが添加された。ブランクはインターロイキン8ビオチンを添加されなかった。2～8で一晩インキュベーションした後、ファージ試料はアビジン磁性ラテックスを用いて前記のようにパニングされ、処理された。 $10^{-10}$ Mで切り捨てられた7回目の抗体ファージ試料はフォアグラウンド：バックグラウンドの比率が276：1であった。抗体ファージ集団は発現ベクターにサブクローニングされ、実施例15に記載されるようにエレクトロポレーションされた。

#### 【0169】

実施例14：pBR発現ベクターの構築

発現ベクターおよびファージ提示ベクターからのモノクローナル抗体遺伝子およびポリクローナル抗体遺伝子のサブクローニングの過程は、効率的であり、ポリクローナル集団を実質的に偏らせず、抗生物質耐性を保持した挿入物を含むベクターを選択するように開発された。ベクターは、アラビノースプロモーター、アンピシリン耐性（ラクタマーゼ）遺伝子、部分的なテトラサイクリン耐性遺伝子、*pelB*（ペクチン酸リアーゼ）シグナル配列、*NcoI*および*HindIII*制限酵素部位を含む、*pBRncoH3*と名づけられた*pBR322*プラスミドの改変体である（図3）。*pBRncoH3*ベクターはまたFab以外のシグナル配列を有するタンパク質をクローニングするためにも使用することができる。2番目のベクター*pBRnsiH3*は、*pelB*シグナル配列が欠失され、*NcoI*制限酵素部位が*Nsi*部位で置換されている点を除いては前記のベクターと全く同一であり、シグナル配列を有するまたは有さないタンパク質のクローニングのために開発された。

#### 【0170】

*araC*制御遺伝子（*araBAD*プロモーターを含む）は大腸菌K12株NL31-001（UCSBのNancy Lee博士より寄贈）から、プライマーAおよびB（表3）を用いてTaq DNAポリメラーゼ（Boehringer Mannheim、Indianapolis、IN）を使用してPCR（実施例3）により増幅された。プライマーAおよびBはそれぞれ、*lac*プロモーターの5'側および*pelB*シグナル配列の5'側に相当するBS39ベクターの20塩基対の配列をその5'末端に含んでいる。プライマーAは、後で*ara*挿入物を*pBR*ベクターにライゲーションする際に使用される*EcoRI*制限酵素部位をその5'末端に含んでいる。*araCparaBAD* PCR産物はアガロースゲル電気泳動により確認され、挿入物のアンチセンス鎖を生成するためにプライマー「B」を用いた非対称性PCRの鋳型として使用された。一本鎖産物はアガロースゲル電気泳動され、切り出され、GeneClean（Bio101、San Diego、CA）により精製され、製造者の推奨に従い水に再懸濁された。挿入物はT4ポリヌクレオチドキナーゼを用いて37℃で45分間キナーゼ化された。T4ポリヌクレオチドキナーゼは70℃で10分間加熱することで失活され、挿入物は等量のフェノール/クロロホルムを用いて抽出され、次にクロロホルムを用いて抽出された。DNAは-20℃で30分間エタノール沈殿された。DNAは、4℃、14krpmで15分間遠心分離されペレットとされ、氷冷70%エタノールを用いて洗浄され、

インバキュオで乾燥された。

#### 【0171】

挿入物は水に再懸濁され、濃度は吸光度1.0を40 µg/mlの濃度として $A_{260}$ により決定された。挿入物は配列確認およびpeIBシグナル配列をアラビノースプロモーターに対して同じ読み枠で導入するために（peIBシグナル配列もまた、その3'末端に、後でara挿入物をpBRベクターにクローニングするために使用される、NcoI制限酵素部位を含む）BS39ファージ提示ベクターにクローニングされた。クローニングは、250ngのBS39ウラシル鋳型（実施例5）、150ngのキナーゼ化araCpBAD挿入物、1.0 µlの10×アニーリング緩衝液を最終容量10 µl中で混合することにより実施された。試料は70 °Cで2分間加熱され、挿入物およびベクターがアニーリングできるように20分かけて室温に冷却された。挿入物とベクターは1 µlの10×合成緩衝液、1 µlのT4DNAリガーゼ（1U/µl）、1 µlのT7 DNAポリメラーゼ（1U/µl）を添加して、37 °Cで30分間インキュベートすることにより互いにライゲーションされた。反応は90 µlの停止緩衝液（10mM トリスpH8.0、10mM EDTA）により停止され、1 µlがエレクトロコンピテント大腸菌株DH10B（Life Technologies、Gaithersburg、MD）にエレクトロポレーションされた（実施例8）。

#### 【0172】

形質転換された細胞は1.0mLの2×YT培地を用いて希釈され、1 µl、10 µl、100 µlが実施例12に記載されているようにプレーティングされた。一晚37 °Cでインキュベートした後、各プラークが選択され、プライマーAおよびBを用いてPCRにより増幅され、アガロースゲル電気泳動により挿入物全長があるかが調べられた。挿入物全長を有するクローンがプライマーD、E、F、G（表3）を用いて配列決定され、文献と比較された。正しいDNA配列を有する挿入物はBS39からプライマーAおよびC（図4A）を用いてPCRにより増幅され（実施例3）、産物がアガロースゲル電気泳動された。

#### 【0173】

全長産物はゲルから切り出され、以前に記載されたように精製され、EcoRIおよびNcoI消化によりクローニングのために調製された。マウスFabを発現するpBR lacを基礎とする発現ベクターがこの挿入物を受容するためにEcoRIおよびNcoI

消化により調製された。この消化により、lacプロモーターおよび重鎖 ( $C_H1$ ) 定常領域の5'末端までのコード領域全体が切り出された (図4A)。

#### 【0174】

挿入物とベクターは (2:1のモル比)、1  $\mu$ lの10mM ATP、1  $\mu$ lのT4DNAリガーゼ (1U/ $\mu$ l)、1  $\mu$ lの10 $\times$ リガーゼ緩衝液と最終容量10  $\mu$ l中で混合され、15で一晩ライゲーションされた。ライゲーション反応物は20  $\mu$ lに希釈され、1  $\mu$ lがエレクトロコンピテント大腸菌株DH10Bにエレクトロポレーションされ (実施例8)、LBテトラサイクリン (10  $\mu$ g/ml) プレート上にプレーティングされ、37で一晩増殖された。

#### 【0175】

クローンが選択され、20  $\mu$ g/mlのテトラサイクリンを含む3ml LB培地中で一晩増殖された。これらのクローンは、1  $\mu$ lの一晩培養物を鋳型としてプライマーAおよびCを用いてPCRにより増幅され (実施例3)、正しい挿入物を有するかが試験された。PCR反応物のアガロースゲル電気泳動により全クローンがaraCparaB挿入物を有することが明らかとなった。ベクター (プラスミド) は、ウィザード (Wizard) ミニプレップカラム (Promega, Madison, WI) により製造者の推奨に従い、各培養物から精製された。新ベクターは、araC遺伝子、araBプロモーター、PelBシグナル配列、および本質的に重鎖の $C_H1$ 領域全体を含んでいた (図4B)。

#### 【0176】

ベクターは、EcoRIおよびNcoI消化により除去されたFab領域を再導入することにより発現が試験された。その領域は14F8を発現するプラスミド (20ng) からプライマーHおよびI (表3) を用いてPCR (実施例3) により増幅された。これらのプライマーは、14F8特異的な配列を有することに加えて、PelBシグナル配列の3'末端および $C_H1$ 領域の5'末端に相当する20塩基対のベクター配列をその5'末端にクローニングのために含んでいた。PCR産物はアガロースゲル電気泳動され、全長産物はゲルから切り出され、以前に記載されたように精製された。

#### 【0177】

ベクターはNcoIを用いて直鎖状にされ、挿入物とともにT4DNAポリメラーゼの3'から5'エキソヌクレアーゼ活性を介したクローニングのために調製された。挿入

物およびNcoI消化ベクターは、各1.0 µgを別々のチューブに分注し、1.0 µlの10 ×制限エンドヌクレアーゼ緩衝液A (Boehringer Mannheim、Indianapolis、IN) を添加し、水で容量を9.0 µlにすることにより、T4エキソヌクレアーゼ消化のために調製された。試料は、1 µlのT4DNAポリメラーゼ (1U/µl) を用いて30 °で5分間消化された。T4DNAポリメラーゼは70 °で15分間加熱することで失活された。試料は冷却され、軽く回転され、消化された挿入物 (35ng) およびベクター (100ng) が混合され、1mM MgCl<sub>2</sub>を用いて容量が10 µlにされた。試料は70 °で2分間加熱され、エキソヌクレアーゼ消化により生じた挿入物およびベクターの相補的な5'一本鎖突出が互いにアニールできるように20分かけて室温に冷却された (図5)。アニールされたDNA (1.5 µl) は30 µlのエレクトロコンピテント大腸菌株DH10Bにエレクトロポレーションされた (実施例8)。

#### 【0178】

形質転換された細胞は1.0mLの2 × YT培地を用いて希釈され、1 µl、10 µl、100 µlがテトラサイクリン (10 µg/ml) を含むLB寒天プレート上にプレーティングされ、37 °で一晩増殖された。翌日2つのクローンが選択され2 × YT (10 µg/mlのテトラサイクリン) 中で37 °で一晩増殖された。araプロモーターに駆動されるタンパク質発現を試験するために、これらの培養物は2 × YT (テトラサイクリン) 中で1/50に希釈され、OD<sub>600</sub>が1.0になるまで増殖され、その時点でそれらは2つの培養物に分割され、1つはアラビノースを最終濃度が0.2% (W/V) になるように添加されることにより誘導された。培養物は室温で一晩増殖させた後、ELISAによりFab産生が試験された。誘導された培養物はともに約20 µg/mlのFabを産生していた。非誘導培養物中ではFabは検出できなかった。

#### 【0179】

Fabのポリクローン集団をクローニングしようとする最初の試みは3% ~ 13%に渡る未消化ベクターのバックグラウンドにより妨害された。非発現クローンがFab発現クローンよりも選択的な優位性を持つため、未消化ベクターはFab発現クローンの消失を引き起こした。未消化ベクターをベクター調製物中から除去するために様々な方法が試みられたが、わずかに部分的に成功しただけだった。例としては、ベクターを一晩37 °でNcoI消化し、抽出し、その調製物を再消化する、ま

たはNcoI消化にスperlミジンを含める、またはNcoI消化に一本鎖結合タンパク質 (United States Biochemicals、Cleveland、OH) を含める、または予備のゲル電気泳動を行うことが含まれる。その後テトラサイクリンプロモーターの5'末端から19塩基対のところにpBR中のHindIII制限酵素部位が存在することが分かった。これらの19塩基対を失ったベクターはテトラサイクリン存在下での増殖に耐えることができなくなり、未消化ベクターによるバックグラウンドは消失した。

#### 【0180】

araに基づく発現ベクターは挿入物非存在下ではテトラサイクリン感受性になるように改変された。これはpBRncoベクターをNcoIおよびHindIII (Boehringer Mannheim、Indianapolis、IN) で消化することにより達成され、抗体遺伝子カセット全体およびtetプロモーターの一部を除去した (図4B)。NcoI/HindIII消化により切り出された領域は、無関係なDNAスタッファー (stuffer) 断片と前記のようにライゲーションにより置換された。ライゲーション反応物は20  $\mu$  lに希釈され、1  $\mu$  lがエレクトロコンピテント大腸菌株DH10Bにエレクトロポレーションされ (実施例8)、LBアンピシリン (100  $\mu$  g/ml) プレート上にプレーティングされ、37 °Cでインキュベーションされた。

#### 【0181】

一晩インキュベーションした後、形質転換体を選択され、アンピシリン (100  $\mu$  g/ml) を含むLB培地中で一晩増殖された。ベクター (プラスミド) は、ウイザードミニプレップカラムにより製造者の推奨に従い、各培養物から精製された。この改変されたベクターpBRncoH3はテトラサイクリン感受性であるが、ベクターの増殖調製物では依然としてアンピシリン耐性を保持していた。

#### 【0182】

抗体遺伝子挿入物は実施例3に記載されているようにプライマーIおよびJ (表3) を用いてPCRにより増幅された。プライマーJは、アニーリングのためのHindIIIの3'側の20塩基対のベクター配列に加えて、HindIII消化により除去されたtetプロモーターの19塩基対を含んでいた。この改変されたベクターは、挿入物とともにNcoI/HindIIIで消化され、エクソヌクレアーゼ処理され、以前に記載されたようにアニーリングされた。テトラサイクリン耐性は、tetプロモーターを完成

させることができた挿入物を含むクローンでのみ回復された。アニールされたFabベクター (1  $\mu$ l) が30  $\mu$ lのエレクトロコンピテント大腸菌株DH10Bにエレクトロポレーションされた (実施例8)。

#### 【0183】

形質転換された細胞は1.0mLの2 $\times$ YT培地に希釈され、10  $\mu$ lの $10^{-2}$ および $10^{-3}$ 希釈物が10  $\mu$ g/mlのテトラサイクリンを含むLB寒天プレート上にプレーティングされ、サブクローニングされたポリクローナル集団の大きさが決定された。このプレーティングはまた、必要であればポリクローンから個々のクローンを選択する機会を提供した。残りの細胞は37 $^{\circ}$ で1時間インキュベートされ、それから1%グリセロールおよび20  $\mu$ g/mlのテトラサイクリンを含む2 $\times$ YT 30mLに1/100希釈され、37 $^{\circ}$ で一晩増殖された。一晩培養物は同じ培地に1/100希釈され、8時間増殖させた後、-80 $^{\circ}$ で長期保存するためのグリセロール凍結ストックが作製された。

#### 【0184】

新規のベクターは、挿入物を有するベクターと比べて、ベクターのみを含むクローン増殖の偏りを除去する。これはアラビノース非存在下で完全に抑制 (repress) されているアラビノースプロモーターとともに、誘導をかけるまでは大腸菌によりよく許容される抗体を得るために、ポリクローナル抗体集団を偏らせることなく形質転換生物の培養を拡大することを可能にする。

#### 【0185】

このベクターの変異体もシグナル配列を有するまたは有さない、任意のタンパク質のクローニングのために構築された。改変されたベクターにおいてはNcoI制限酵素部位およびPeIBシグナル配列全体が除去された。その場所にNsiI制限酵素部位が導入され、NsiI消化の時およびT4消化の時に、ATG開始コドンのアデニン残基 (A) になる一塩基が、araBADプロモーターにインフレームで付加された。HindIII部位およびプライマーJ (表3) を用いたテトラサイクリンプロモーターの回復はpBRncoH3ベクターについて記載されたものと同じである。さらにT4エキソヌクレアーゼクローニング過程も、挿入物を増幅するために使用された5' PCRプライマーがPeIBシグナル配列の3'末端ではなく、araBADプロモーターの3'末



端に相当する20bpのベクター配列を5'末端に有している点を除いては、前記と同一であった。

#### 【0186】

3種のPCRプライマーK、LおよびM（表3）がaraC制御遺伝子（araBADプロモーターを含む）を増幅するために使用された。5'プライマー、プライマーKは、ara挿入物をpBRベクターにライゲーションするためにその5'末端にEcoRI制限酵素部位を含む。1つのプライマーでは合成するには大きすぎるため、挿入物の3'末端は2つのプライマーを用いて増幅された。内側の3'プライマー（L）はaraBADプロモーターに対してインフレームでNsiI制限酵素部位を導入し、外側の3'プライマー（M）は挿入物をベクターにライゲーションするために使用されることになるHindIII制限酵素部位を導入する。

#### 【0187】

PCR反応は実施例3のように100  $\mu$ lスケールで4個実施された。反応液は、100pmolの5'プライマー（K）、1pmolの内側の3'プライマー（L）、および100pmolの外側の3'プライマー（M）、10  $\mu$ lの2mM dNTPs、0.5  $\mu$ lのTaq DNAポリメラーゼ、MgCl<sub>2</sub>を含む10  $\mu$ lの10 $\times$  Taq DNAポリメラーゼ緩衝液に水を加えて100  $\mu$ lにしたものを含んでいた。以前に記載されたように、araCparaBAD PCR産物はペレット化され、アガロースゲル電気泳動により分画され、全長産物がゲルから切り出され、精製され、水に再懸濁され、EcoRIおよびHindIII消化によりクローニングのために調製された。pBRベクター（Life Technologies、Gaithersburg、MD）が、前記のようにEcoRIおよびHindIII消化およびアガロースゲル電気泳動による精製により挿入物を受容するために調製された。

#### 【0188】

挿入物とベクターは（2：1のモル比）、1  $\mu$ lの10mM ATP、1  $\mu$ lのT4DNAリガーゼ（1U/ $\mu$ l）、1  $\mu$ lの10 $\times$  リガーゼ緩衝液と最終容量10  $\mu$ l中で混合され、15で一晩ライゲーションされた。ライゲーション反応物は20  $\mu$ lに希釈され、1  $\mu$ lがエレクトロコンピtent大腸菌株DH10Bにエレクトロポレーションされ（実施例8）、LBテトラサイクリン（10  $\mu$ g/ml）プレート上にプレーティングされ、37で一晩増殖された。クローンが選択され、テトラサイクリンを含む3ml LB培地

中で一晩増殖された。

#### 【0189】

これらのクローンは、1  $\mu$ lの一晩培養物を鋳型としてプライマーKおよびMを用いてPCRにより増幅され（実施例3）、正しい挿入物を有するかが試験された。PCR反応物のアガロースゲル電気泳動により全クローンがaraCparaB挿入物を有することが明らかとなった。ベクター（プラスミド）は、ウイザードミニプレップカラムにより製造者の推奨に従い、各培養物から精製された。新規のベクターpBRnsiは、araC遺伝子、araBADプロモーター、およびNsiI制限酵素部位を含んでいた。

#### 【0190】

ベクターはマウスFabを再導入することにより発現が試験された。その領域はマウスFabを含むプラスミド（20ng）からプライマーOおよびN（表3）を用いてPCR（実施例3）により増幅された。プライマーは、Fabに特異的な配列を有することに加えて、araBADプロモーターの3'末端およびC<sub>H</sub>1領域の5'末端に相当する20塩基対のベクター配列をその5'末端にクローニングのために含んでいた。pBRnsiベクターはNsiIおよびHindIIIを用いて直鎖状にされた。ベクターとPCR産物はアガロースゲル電気泳動され、全長産物はゲルから切り出され、以前に記載されたように精製された。ベクターおよび挿入物は、以前に記載されたように、T4DNAポリメラーゼ消化され、アニーリングされた。アニールされたDNA（1  $\mu$ l）は30  $\mu$ lのエレクトロコンピテント大腸菌株DH10Bにエレクトロポレーションされた（実施例8）。形質転換された細胞は1.0mLの2  $\times$  YT培地を用いて希釈され、1  $\mu$ l、10  $\mu$ l、100  $\mu$ lがテトラサイクリン（10  $\mu$ g/ml）を含むLB寒天プレート上にプレーティングされ、37  $^{\circ}$ Cで一晩増殖された。

#### 【0191】

ニトロセルロースリフト（lifts）は寒天プレート表面上に1分間置かれ、記載されているように（12.24節、分子クローニング、実験室マニュアル（1989）、Sambrook J）処理された。フィルターはヤギ抗APを用いて現像され、陽性（発現）クローンが選択され、2  $\times$  YT（10  $\mu$ g/mlテトラサイクリン）において37  $^{\circ}$ Cで増殖された。ベクター（プラスミド）は、ウイザードミニプレップカラム（Pr

omega、Madison、WI)により製造者の推奨に従い、培養物から精製された。Fab領域はNcoI/HindIII消化により切り出され、無関係なDNAスタッファー断片と前記のようにライゲーションにより置換された。ライゲーション反応物は20  $\mu$ lに希釈され、1  $\mu$ lがエレクトロコンピテント大腸菌株DH10Bにエレクトロポレーションされ(実施例8)、LBアンピシリン(100  $\mu$ g/ml)プレート上にプレーティングされ、37  $^{\circ}$ Cでインキュベーションされた。一晩インキュベーションした後、形質転換体を選択され、アンピシリン(100  $\mu$ g/ml)を含むLB培地中で一晩増殖された。ベクター(プラスミド)は、ウイザードミニプレップカラムにより製造者の推奨に従い、各培養物から精製された。改変されたベクターpBRnsiH3はテトラサイクリン感受性であるが、ベクターの増殖調製物中では依然としてアンピシリン耐性を有していた。

#### 【0192】

実施例15：ポリクローナルFab集団の発現ベクターへのサブクローニングと大腸菌へのエレクトロポレーション

$10^9$ および $10^{10}$ の親和性で切り捨てられたもの(実施例13を参照されたい)両方に由来するポリクローナルIL8抗体ファージは2  $\times$  YTで1/30に希釈され、1  $\mu$ lが、プライマー197(実施例5)および970(以下を参照されたい)を用いて抗体遺伝子挿入物をPCR増幅するための鋳型として使用された。PCR(3  $\mu$ l ~ 100  $\mu$ lの反応)は、DNA産物に導入される誤りを最小限にするために高精度PCRシステム、エクスパンド(Roche Molecular Biochemicals、Indianapolis、IN)を用いて実施された。各100  $\mu$ l反応は、100pmolの5'プライマー197、100pmolの3'プライマー970、0.7ユニットのエクスパンドDNAポリメラーゼ、10  $\mu$ lの2mM dNTPs、10  $\mu$ lの10 $\times$ エクスパンド反応緩衝液、鋳型としての1  $\mu$ l希釈ファージストック、水を加えて100  $\mu$ lにしたものを含んでいた。反応はパーキンエルマーサーマルサイクラー(モデル9600)で以下の温度プロファイルを用いて実施された：1サイクルの94  $^{\circ}$ Cでの変性(1分)；10サイクルの変性(15秒、94  $^{\circ}$ C)、アニーリング(30秒、55  $^{\circ}$ C)、伸長(60秒、72  $^{\circ}$ C)、15サイクルの変性(15秒、94  $^{\circ}$ C)、アニーリング(30秒、55  $^{\circ}$ C)、伸長(80秒で各サイクル毎に20秒増加、72  $^{\circ}$ C)；伸長(6分、72  $^{\circ}$ C)；浸漬(4  $^{\circ}$ C、無制限)。PCR産物は前記のように、エタノール沈殿され、

ペレットとされ、乾燥された。DNAは水に溶解され、アガロースゲル電気泳動により分画された。全長産物は以前に記載されたようにゲルから切り出され、水に再懸濁された。

### 【0193】

プライマー 970- 5' GT GAT AAA CTA CCG TA AAG CTT ATC GAT GAT AAG CTG  
TCA A TTA GTG ATG GTG ATG GTG ATG AGA TTT G

### 【0194】

挿入物およびNcoI/HindIII消化pBRncoH3ベクターは、1.0  $\mu$ lの10 $\times$ 緩衝液Aを1.0  $\mu$ gのDNAに添加し、水で最終容量を9  $\mu$ lにすることにより、T4エキソヌクレアーゼ消化のために調製された。試料は、1  $\mu$ lのT4DNAポリメラーゼ (1U/ $\mu$ l) を用いて30 $^{\circ}$ で4分間消化された。T4DNAポリメラーゼは70 $^{\circ}$ で10分間加熱することで失活された。試料は冷却され、軽く回転され、100ngの消化抗体遺伝子挿入物および1  $\mu$ lの10 $\times$ アニーリング緩衝液が100ngの消化ベクターと1.5mLチューブで混合された。水を用いて容量が10  $\mu$ lにされ、70 $^{\circ}$ で2分間加熱され、挿入物およびベクターがアニールできるように20分かけて室温に冷却された。挿入物およびベクターは1  $\mu$ lの10 $\times$ 合成緩衝液、1  $\mu$ lのT4DNAリガーゼ (1U/ $\mu$ l)、1  $\mu$ lの希釈T7 DNAポリメラーゼ (1U/ $\mu$ l) を添加して、37 $^{\circ}$ で15分間インキュベートすることにより互いにライゲーションされた。

### 【0195】

ライゲーションされたDNA (1  $\mu$ l) が2  $\mu$ lの水に希釈され、その後1  $\mu$ lの希釈されたDNAが40  $\mu$ lのエレクトロコンピテント大腸菌株DH10Bにエレクトロポレーションされた (実施例8)。形質転換された細胞は1.0mLの2 $\times$ YT培地を用いて希釈され、10  $\mu$ lの $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ および $10^{-3}$ 希釈物が10  $\mu$ g/mlのテトラサイクリンを含むLB寒天プレート上にプレーティングされ、サブクローニングされたポリクローナル集団の大きさが決定された。 $10^9$ 親和性-のポリクローナルは約6000個の異なるクローンを有し、 $10^{10}$ 親和性-のポリクローナルは約10000個の異なるクローンを有した。残りの細胞は37 $^{\circ}$ 、300rpmで1時間インキュベートされ、それから全培養物が、1%グリセロールおよび20  $\mu$ g/mlのテトラサイクリンを含む2 $\times$ YT 50mLに移され、37 $^{\circ}$ で一晩増殖された。一晩培養された培養物は同じ培地に1

/100希釈され、8時間増殖された後、-80 で長期保存するためのグリセロール凍結ストックが作製された。

#### 【0196】

モノクローナル抗体は、サブクロニング効率を測定するために使用されたテトラサイクリンを含むLB寒天プレートから、またはグリセロール凍結ストックからストリークされた(streaked)プレートから個々のコロニーを選択することにより、得られた。選択されたコロニーは、10 µg/mLのテトラサイクリン及び2×YT培地を含む振盪フラスコ中で37 °C、300rpmで一晩インキュベートされた。グリセロール凍結ストックが各モノクローナルについて-80 °Cで長期保存するために作製された。全体で15個の異なるコロニーが10<sup>9</sup>親和性で切り捨てられたものから選択され、IL8への結合に関して解析された。それらの15クローンのうち、2つが非常に少ない量の抗体を発現しており、1つは抗体を発現していたがIL8に結合せず、2つが機能的な抗体を発現していたが、恐らく配列鑄型の品質のせいでDNA配列が不明瞭であり、1つは機能的な抗体を発現していたが配列決定されなかった。9個のクローンが実施例22に記載されているように配列決定された。全体で21個の異なるコロニーが10<sup>10</sup>親和性で切り捨てられたものから選択され、IL8への結合が解析された。それらの21クローンのうち、4つが非常に少ない量の抗体を発現しており、3つは抗体を発現していたがIL8に結合せず、4つは機能的なタンパク質を発現していたが配列決定されなかった。10個のクローンが実施例22に記載されているように配列決定された。

#### 【0197】

実施例16：振盪フラスコ中でのIL8または抗体の発現および精製

振盪フラスコ接種物は-80 °C細胞バンクまたはコロニー(実施例15)から、37 °C、300rpmに設定されたインキュベーション振盪器中に一晩入れて生成された。細胞は前記で規定された培地中で培養された。接種物は37 °C、300rpmで増殖される2Lのツネアー(Tunair)振盪フラスコ(Shelton Scientific, Shelton, CT)に播種するために使用される。対数増殖期にL-(+)アラビノースを2g/Lで添加し、続いて、フラスコを23 °C、300rpmに維持することにより発現が誘導される。バッチ終了させた後、培養物はM-110Yマイクロフリューダイザー(Microfluidiz

er) (Microfluidics, Newton, MA) に17000psiにて通過される。

#### 【0198】

精製には固相化金属親和性クロマトグラフィーが用いられる。キレート性セファロースファストフロー (Chelating Sepharose FastFlow) 樹脂 (Pharmacia, Piscataway, NJ) は0.1M  $\text{NiCl}_2$  を用いて充填され、20mMホウ酸、150mM NaCl、10mMイミダゾール、0.01%  $\text{NaN}_3$ 、pH8.0緩衝液を用いて平衡化された。培養物を10mMイミダゾールにするためにストック溶液が使用される。上清がその後樹脂と混合され、少なくとも1時間、室温にて150rpm~200rpmに設定されたインキュベーション振盪器中でインキュベートされる。IL8または抗体はニッケルとタンパク質上のヘキサヒスチジンタグの間の高い親和性相互作用により捕捉される。バッチ結合が完了した後、樹脂がビンの底に少なくとも10分間沈められる。培養物は、樹脂が失われないように注意しながら、注意深くビンから注ぎ出された。残った培養物および樹脂の混合物はクロマトグラフィーカラムに注がれる。洗浄後、タンパク質は20mMホウ酸、150mM NaCl、200mMイミダゾール、0.01%  $\text{NaN}_3$ 、pH8.0緩衝液を用いて溶出された。必要であれば、タンパク質プールはセントリプレップ-10 (Centriprep-10) 濃縮器 (Amicon, Beverly, MA) 中で3500rpmにて濃縮される。その後、保存のため、12-14000のMWCQ透析チューブを用いて、20mMホウ酸、150mM NaCl、0.01%  $\text{NaN}_3$ 、pH8.0緩衝液に一晩透析される。

#### 【0199】

IL8はさらに以下の方法で精製された。タンパク質は、10mMリン酸ナトリウム、150mM NaCl、pH7.35に対して徹底的に透析され、10mMリン酸ナトリウム、pH7.35を用いて1:3に希釈された。この物質が10mMリン酸ナトリウム、40mM NaClで平衡化されたQ-セファロースカラム (Q-Sepharose) (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) にロードされた。IL8は流出 (flow through) 画分に含まれていた。SDSポリアクリルアミドゲル分析によれば、IL8は95%以上の純度であった。IL8は120mM NaClおよび0.01%  $\text{NaN}_3$  にされ、-80 で保存された。

#### 【0200】

実施例17: 7F11モノクローナル抗体の調製

アセチルチオプロピオン酸の合成

テトラヒドロフラン (THF、700ml) に3-メルカプトプロピオン酸 (7ml、0.08モル) およびイミダゾール (5.4g、0.08モル) を入れた攪拌溶液に、THF (100ml) 中の1-アセチルイミダゾール (9.6g、0.087モル) の溶液がアルゴン下で一滴ずつ15分に渡って添加された。溶液は室温でさらに3時間攪拌され、その後THFがインバキュオで除去された。残留物は氷冷水 (18ml) で処理され、生じた溶液は氷冷濃塩酸 (14.5ml) でpH1.5 ~ pH2に酸性化された。混合物は水で (50mlで2回) 抽出され、硫酸マグネシウム上で乾燥され、脱水蒸発された。残留物の粗製の黄色油状固形物 (10.5g) は、クロロホルム-ヘキサンから再結晶化され、4.8g (41%の収率) の44 ~ 45 の融点を有する白色固体のアセチルチオプロピオン酸が得られた。

#### 【0201】

#### デカペプチド誘導体

##### デカペプチド

##### YPYDVDPDYAS

(Chiron Mimotopes Peptide Systems、San Diego、CA) は、穏やかに攪拌しながらアルゴン下で丸底フラスコ中で無水DMF (5.4mL) 中で溶解された (0.3g)。イミダゾール (0.02g) は攪拌されている溶液中に添加された。別々にアセチルチオプロピオン酸 (0.041g) が、攪拌しながらアルゴン下で丸底フラスコ中で0.55mLの無水DMF中に溶解され、0.056gの1,1'-カルボニルジイミダゾール (Aldrich Chemical Co.、Milwaukee、WI) が攪拌されている溶液中に添加された。フラスコはアルゴン下で密閉され、少なくとも30分室温で攪拌された。この溶液がデカペプチド溶液に添加され、反応混合物は、溶媒がインバキュオで除去される前に少なくとも6時間室温で攪拌された。フラスコ中の残留物は各回10mLのジエチルエーテルを用いて2回研磨され、エーテルはデカントで捨てられた。塩化メチレン (20mL) がフラスコ中の残留物に添加され、固形物はフラスコからこすりとられ、ファインフリット (fine fritted) のブーフナー漏斗を用いて濾過された。固形物はさらに20mLの塩化メチレンを洗浄され、ブーフナー漏斗は真空下で乾燥された。誘導体を加水分解し遊離チオールを生成するために、それは70%DMF中に溶解され、激しく攪拌しながら1M水酸化カリウムが最終濃度0.2Mまで添加さ

れた。誘導体溶液は、0.5Mリン酸カリウム、0.1Mホウ酸、pH7.0に濃塩酸が最終濃度1Mになるまで添加された溶液を添加して溶液が中和される前に、室温で5分間放置された。加水分解されたデカペプチド誘導体のチオール濃度は、0.25mM 5,5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)(DTNB、Aldrich Chemical Co.、Milwaukee、WI)および0.2Mホウ酸カリウム、pH8.0を含む990  $\mu$ l溶液に10  $\mu$ lの溶液を希釈することにより、決定された。mM単位のチオール濃度はA412(100/13.76)に等しかった。

#### 【0202】

キーホールリンペットヘモシニアンおよびウシ胎児血清を用いたデカペプチド誘導体の結合体の調製

15mgのスルフォスクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシル酸(SULFO-SMCC)を添加し、攪拌しながら室温で1時間に渡り1N水酸化カリウムを用いてpHを7から7.5の間に維持することにより、SULFO-SMCCとキーホールリンペットヘモシニアン(KLH、14mg/mlを6ml、Calbiochem、San Diego、CA)を反応させた。タンパク質は、0.1Mリン酸カリウム、0.02Mホウ酸カリウム、および0.15M塩化ナトリウム、pH7.0中のゲル濾過クロマトグラフィーにより未反応のSULFO-SMCCから分離され、24mlのKLH-マレイミドが3.1mg/mlの濃度で回収された。加水分解されたデカペプチド誘導体は、存在すると推定されるマレイミドの量に対して十分過剰なモル比でKLH-マレイミドの画分に別々に添加され、溶液は4 で4時間攪拌され、その後免疫前に各々が1Lの無発熱性物質のリン酸緩衝食塩水、pH7.4に対して3回透析された。

#### 【0203】

0.3mlアセトニトリル中6.7mgのSMCCを添加し、攪拌しながら室温で1時間の間に渡り1N水酸化カリウムを用いてpHを7から7.5の間に維持することにより、SMCCとウシ血清アルブミン(BSA、20mg/mlを3.5ml)を反応させた。タンパク質は、0.1Mリン酸カリウム、0.02Mホウ酸カリウム、および0.15M塩化ナトリウム、pH7.0中のゲル濾過クロマトグラフィーにより未反応物から分離された。加水分解されたデカペプチド誘導体は、存在すると推定されるマレイミドの量に対して十分過剰なモル比でKLH-マレイミドの画分に別々に添加され、溶液は4 で4時間攪拌さ



れた。溶液は、標準的技術によりデカペプチド誘導体に結合した抗体を検出するためのマイクロプレートのコートするために使用された。

#### 【0204】

##### モノクローナル抗体の産生および一次選抜

Balb/cマウスの免疫はLiuら、Clin Chem 25: 527~538 (1987)の方法に従って実施された。脾臓細胞のSP2/0-Ag14骨髓腫細胞との融合、ハイブリドーマの増殖、およびクローニングは標準的技術に従い実施された。さらなるクローニングのためのハイブリドーマの選択は96ウェル段階の培養上清を用いて開始された。標準的なELISA処理は、ELISAプレートに吸着されたデカペプチド誘導体のBSA結合体を用いて実施された。典型的には、1つの融合物が20プレートにプレーティングされ、各プレートにつき約10ウェル~20ウェルがELISAアッセイ法で陽性であった。この段階では、もし連結アームのSMCC部分に対する抗体をさらに考慮にいれなくてよくするためには、二次選択を実施することが可能であろう。デカペプチド誘導体に連結されていないSMCCを用いて誘導体化されたBSAを用いたELISA分析により、BSA結合体に結合した陽性クローンのどれが実際にSMCC-BSAに結合していたかを同定できた。SMCC-BSAに特異的な抗体はこの段階で除去されてもよい。デカペプチド誘導体に特異的なモノクローナル抗体7F11が産生され、この過程で選択された。

#### 【0205】

##### 実施例18: 7F11磁性ラテックスの調製

##### MAG/CM-BSA

6mLの5%磁性ラテックス (MAG/CM、740  $\mu$ m 5.0%、Seradyn、Indianapolis、IN) に、21mLの水、続いて3mLの600mM 2-(4-モルフォリノ)-エタンスルホン酸、pH5.9 (MES、Fisher Scientific、Pittsburgh、PA) が添加された。ホモシステインチオラクトン塩酸 (HCTL、480mg、Aldrich Chemical Co.、Milwaukee、WI) および1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド (EDAC、660mg、Aldrich Chemical Co.、Milwaukee、WI) が連続して添加され、反応混合液は室温で2時間ゆり動かされた。誘導体化された磁性ラテックスは、粒子を再懸濁するためのプローブ超音波処理 (probe sonication) を用いて、30mLの水で3

回洗浄された（実施例14に示すように磁石を用いて）。洗浄された粒子は30mLの水に再懸濁された。水酸化ナトリウム（2M）およびEDTA（1mM）を含む溶液3mLが磁性ラテックス-HCTL懸濁液に添加され、反応は室温で5分間進行された。500mMリン酸ナトリウムおよび100mMのホウ酸ナトリウム中の1M塩酸6.45mLを用いてpHが6.9に調製された。加水分解された磁性ラテックス-HCTLは磁石を用いて上清から分離され、その後33mLの50mMリン酸ナトリウム、10mMのホウ酸ナトリウム、0.1mM EDTA、pH7.0に再懸濁された。磁性ラテックス懸濁液はその後36mg/mLのBSA-SMCC（BSAに対してモル数で5倍以上過剰に用いて、実施例21に記載されているように作製された）2mLに添加され、反応混合液は室温で一晩ゆり動かされた。N-ヒドロキシエチルマレイミド（NHEM、500mMを0.42mL、Organix Inc.、Woburn、MA）が、残存しているチオールをキャップするために30分間添加された。30分後、磁性ラテックス-BSAは30mLの50mMリン酸カリウム、10mMのホウ酸カリウム、150mM塩化カリウム、pH7.0（50/10/150）で2回洗浄され、30mLの10mMリン酸カリウム、2mMのホウ酸カリウム、200mM チオシアン酸ナトリウム、pH7.0（10/2/200）を用いて2回洗浄された。磁性ラテックス-BSAは30mLの10/2/200に再懸濁された。

#### 【0206】

7F11-SH（1：5）

18  $\mu$ LのSPDP（アセトニトリル中で40mM）が7F11溶液（5.85mg/mLを3.8mL）に添加された。タウリン（Aldrich Chemical Co.、Milwaukee、WI）を最終濃度20mMまで添加した後、反応は室温で90分間進行された。15分後DTTが最終濃度2mMまで添加され、還元反応が室温で30分間進行された。7F11-SHはG-50（40mL）で精製され、0.1mM EDTAを添加した50/10/150で溶出された。精製された7F11-SHのブールは、MAG/CM-BSA-SMCCへ連結反応のために保存された。

#### 【0207】

MAG/CM-BSA-7F11

SMCC（10mg）が0.5mLの無水ジメチルフォルムアミド（Aldrich Chemical Co.、Milwaukee、WI）に溶解され、この溶液が磁性ラテックス-BSA懸濁液に添加された。緩やかにゆり動かしながら、反応は室温で2時間進行された。タウリンが

最終濃度20mMまで添加された。20分後、磁性ラテックス-BSA-SMCCは磁石を用いて上清から分離され、そして粒子を再懸濁するためのプローブ超音波処理を用いて10/2/200 (20mL) に再懸濁された。磁性ラテックスはスパーフロー6 (SuperFlow-6、240mL、Sterogene Bioseparations Inc.、Carlebad、CA) カラムで精製され、10/2/200で溶出された。緩衝液が除去され、磁性ラテックスケーキに30mLの0.7mg/mLの7F11-SHが添加された。反応混合液は室温で一晩ゆり動かされた。20時間後、反応物はメルカプトエタノール (2mM、Aldrich Chemical Co.、Milwaukee、WI) および続いてNHEM (6mM) を用いてクエンチングされた。MAG/CM-7F11は、10/2/200、続いて50/10/150を用いて洗浄された。磁性ラテックスはその後30mLの50/10/150に再懸濁された。

#### 【0208】

##### 実施例19：成熟ヒトインターロイキン8抗原のクローニング

PCRプライマーAおよびB (それぞれ5'および3'、表3) が、成熟ヒトインターロイキン8抗原の5'末端コード配列およびヒトインターロイキン8 (ゲンバンクアクセス番号M28130) の3'末端コード配列に相当するように作製された。5'プライマーはpBRncoH3ベクター (実施例14) の3'末端に相当する20塩基対のベクター配列をその5'末端に含んでいる。3'プライマーはまた、組換えタンパク質の金属キレートクロマトグラフィーによる精製を助けるために、コード配列の最後と終止コドンの間に挿入された6個のヒスチジンコドンを含んでいる。3'プライマーはまた、その5'末端に、HindIII消化によりpBRncoH3のtet耐性遺伝子から除去されたtetプロモーターの19塩基対、およびHindIII部位の3'側の20塩基対のベクター配列を有している (実施例14)。

#### 【0209】

成熟インターロイキン8遺伝子挿入物のPCR増幅が、各々が100pmolの5'プライマー (A)、100pmolの3'プライマー (B)、2.5ユニットのエクスパンドポリメラーゼ、10μLの2mM dNTPs、10μLの10×エクスパンド反応緩衝液、鋳型として1μLのクロンテッククイッククローンヒト肝臓cDNA (Clontech、Palo Alto、CA)、水を加えて100μLにしたものを含む、3個の100μL反応スケールで実施された。反応はパーキン-エルマーサーマルサイクラーで実施例18に記載されているよう

に実施された。PCR産物はペレット化され、アガロースゲル電気泳動により分離され、全長産物はゲルから切り出され、精製され、水に再懸濁された（実施例17）。挿入物およびNcoI/HindIII消化pBRncoH3ベクターは、1.0  $\mu$ lの10 $\times$ 緩衝液Aを1.0  $\mu$ gのDNAに添加し、水で容量を9.0  $\mu$ lにすることにより、T4エキソヌクレアーゼ消化のために調製された。試料は、1  $\mu$ lのT4DNAポリメラーゼ（1U/ $\mu$ l）を用いて30 $^{\circ}$ で4分間消化された。T4DNAポリメラーゼは70 $^{\circ}$ で10分間インキュベーションすることで加熱失活された。試料は冷却され、軽く回転され、15ngの消化挿入物が100ngの消化pBRncoH3ベクターに新しいマイクロチューブ中で添加された。1.0  $\mu$ lの10 $\times$ アニーリング緩衝液を添加後、水を用いて容量が10  $\mu$ lにされた。混合液は70 $^{\circ}$ で2分間加熱され、挿入物およびベクターがアニールできるように20分かけて室温に冷却された。アニールされたDNAは滅菌水で4倍希釈され、30  $\mu$ lのエレクトロコンピテント大腸菌株DH10Bにエレクトロポレーションされた（実施例8）。形質転換された細胞は1.0mLの2 $\times$ YT培地を用いて希釈され、10  $\mu$ l、100  $\mu$ l、300  $\mu$ lがテトラサイクリン（10  $\mu$ g/ml）を含むLB寒天プレート上にプレーティングされ、37 $^{\circ}$ で一晩増殖された。コロニーが選択され、2 $\times$ YT（20  $\mu$ g/mlのテトラサイクリン）中で37 $^{\circ}$ で一晩増殖された。翌日、-80 $^{\circ}$ で長期保存するためのグリセロール凍結ストックが作製された。これらのクローンの配列は、セクアサームシーケンシングキット（Epicenter Technologies、Madison、WI）、それぞれpBRベクター内の挿入物の5'および3'側に結合するオリゴヌクレオチドプライマーCおよびD（表3）を用いて、LI-COR4000L自動シーケンサー（LI-COR、Lincoln、NE）を用いて、MacConnell Research（マックコネルリサーチ）（San Diego、CA）にてダイデオキシ鎖終結法により確認された。

【0210】

【表3】 PCRおよび配列決定プライマーの配列

- A- 5' (TCGCTGCCCAACCAGCCATGGCCAGTGCTAAAGAACTTAGATCTCAG)
- B- 5' (GTGATAAACTACCGCATTAAGCTTATCGATGATAAGCTGTCAATTAGTGATGGTGATGGTGATGTGAATTCTCAGCCCTCTTCAA)
- C- 5' (GCAACTCTCTACTGTTTCTCC)
- D- 5' (GAGGATGACGATGAGCGC)

【0211】

## 実施例20：ライブラリー多様性の推定

所与の標的抗原に対するライブラリー選抜を終了した時点では、ライブラリーは、選抜過程で用いられた基準により決定されている親和性を示す抗体をコードするメンバーを含んでいる。好ましくは、ライブラリーメンバーの大部分が所望の特性を示す抗体をコードするようになるまで選抜過程は繰り返される。最も好ましくは実質的に全てのライブラリーメンバーが標的抗原に対して所望の親和性を示す抗体をコードするようになるまで選抜過程は繰り返される。選択されたライブラリー中の異なる抗体の数を推定するために、個々のメンバーがランダムに選択され、アミノ酸配列が異なるかを決定するために配列決定される。重鎖または軽鎖のいずれかの可変領域（好ましくはCDRs）において少なくとも少なくとも1つのアミノ酸の差異を示す抗体が異なる抗体であると考えられる。そのような様式でライブラリーのランダムサンプリングを行うことによりライブラリー内の抗体のコピー数の頻度の推定が与えられる。もし10個の抗体がランダムにサンプリングされ、各抗体のアミノ酸配列が他にサンプリングされた抗体と異なるならば、ライブラリー中で繰り返し抗体を観察した時に期待される頻度として1/10という推定が適用可能である。数百または数千の全メンバーを有するライブラリーはポイズン分布に非常に近似した、抗体コピー頻度の確率分布を示すであろう。

ポイズン分布

【数3】

$$\Pr(y) = e^{-\lambda} \lambda^y / y!$$

では特定の頻度値 $y$ の確率は平均頻度  $\lambda$  にのみ依存する。10個の抗体をランダムサンプリングして抗体の重複が見られなければ  $\lambda$  の推定値は0.1であり、ライブラリーをランダムサンプリングした時にライブラリーメンバーのコピーを見出さない確率は

【数4】

$$\Pr(0) = e^{-0.1} = 0.9$$

により推定される。この確率をライブラリーメンバーの総数にかけることにより、ライブラリー中の異なる抗体の総数の推定を提供することができる。

【0212】

# 実施例21：ビオチン化IL-8に対する抗体の親和性の決定

各モノクローナル抗体の平衡結合定数は、pH8.0に緩衝されたウシ血清アルブミン1%溶液中にビオチン化IL-8が $10^{-10}$ M存在する中で結合平衡が達成された後の総抗体濃度および遊離抗体濃度を解析することにより決定された。ニュートラアビジン（商標）、（脱グリコシル化アビジン、Pierce、Rockford、IL）コートされたスーパーパラ磁性微粒子（superparamagnetic microparticles、 $0.96\mu\text{M}$ 、Bangs Laboratories、Carmel、IN）を添加し、10分間インキュベーションし、永久磁石を用いて溶液から粒子を分離することにより溶液からビオチン化IL-8が除去される前に、全実験において抗体はIL-8と混合され、室温で一晩インキュベーションされた。上清溶液は磁性粒子を含むマイクロタイタープレートから除去され、抗体濃度が決定された。個々のウェルに添加された総抗体濃度は、IL-8と混合されていない試料中の抗体を定量することにより決定された。免疫反応性抗体の濃度（IL-8に結合することができる抗体タンパク質の画分）は、大過剰量のビオチン化IL-8を濃度既知の抗体と平衡に達するのに十分な時間インキュベーションし、前記のように磁性ラテックスを用いてIL-8を除去し、下記に示すアッセイを用いて溶液中に残された抗体濃度を定量することにより、決定された。過剰量のIL-8に結合する抗体の画分が免疫反応性の画分であり、IL-8に結合しない画分が非免疫反応性の画分であった。平衡混合物中で総抗体濃度を決定する時、抗体濃度は下記で示すアッセイ法により決定された混合液中の総抗体量に免疫反応性の分画を乗じたものである。同様にIL-8除去後の平衡混合物中で遊離抗体濃度を計算する時、下記のアッセイ法により決定された遊離抗体濃度から非免疫反応性の抗体画分が引かれる。結合比率Bは、混合液中の免疫反応性の全抗体濃度から遊離の免疫反応性の抗体濃度Fを引くことにより決定される。質量作用の法則より、

## 【数5】

$$B/F = -KB + KT \quad (T \text{は全抗原濃度})$$

となる。B/FのBに対するプロットは-Kの傾きとKTのy切片を生じる。

## 【0213】

試料中の抗体濃度を決定するために、鎖のC末端に存在するデカペプチドタ

グに結合する固相化7F11モノクローナル抗体および各ヒト抗体の鎖に結合するアルカリフォスファターゼ (Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, AL) 結合の親和性精製されたヤギ抗ヒト抗体を用いてサンドイッチアッセイ法が構築された。分析される抗体と同じ鎖構造を有する既知濃度の精製抗体が校正するために使用された。7F11抗体はビオチン化され標準的方法によりstreptavidinでコートされたマイクロタイタープレートに固定された。アッセイ法は、平衡化混合液由来の50  $\mu$ lの試料を各ウェルに添加し、室温で4時間インキュベートすることにより実施された。結合体は最終濃度が約0.125  $\mu$ g/mlになるように各ウェルに添加され、室温で一晩インキュベートされた。ウェルは0.02%ポリオキシエチレン20ソルビタンモノラウリン酸、pH8.2を含むホウ酸塩緩衝食塩水を用いて自動プレート洗浄機で洗浄され、ELISA増幅システム (Life Technologies, Gaithersburg, MD) がアッセイを現像するために使用された。490nmでの吸光度がマイクロプレートリーダーを用いて測定され、未知の抗体濃度が検量線から決定された。

#### 【0214】

【表4】

モノクローナル抗体	免疫反応性タンパク質の割合 (%)	親和性 ( $10^{10} M^{-1}$ )
M1-3	93	6.1
M1-4	93	22
M1-5	90	11
M1-8	91	10
M1-10	90	6.1
M1-21	67	6.6
M1-23	91	8.9
M1-25	90	6.4
M2-11	93	10
M2-12	93	28
M2-16	90	1.9
M2-18	80	5.4
M2-20	94	37
M2-34	94	27

#### 【0215】

#### 実施例22：ランダムクローンのDNA配列分析

解析される各モノクローナルFabに相当するグリセロール凍結ストック (実施例15) が、プラスミド単離および引き続くIL8挿入物のDNAシーケンシングのため

めに50mL培地に接種するために使用された。2×YT (10 µg/mlテトラサイクリン) 37 °Cで一晩増殖され、組換えプラスミドはキアゲンプラスミドミディ (Qiagen Plasmid Midi) キット (キアゲン (Qiagen)、バレンシア、カリフォルニア州) を用いて製造者の指示にしたがい精製された。各モノクローナル抗体の鎖および重鎖可変および定常領域に相当する配列が、MacConnell Research (マックコネルリサーチ) (San Diego, CA) において決定された。抗体に用いられた命名法は実施例21のものと同一である。配列決定はセクアサームシーケンシングキット (Epicenter Technologies, Madison, WI)、pBRベクターのFabカセットの5'および3'側に結合するオリゴヌクレオチドプライマーCおよびD (表3) の各々、およびLI-COR4000L自動シーケンサー (LI-COR, Lincoln, NE) を用いて、ダイデオキシ鎖終結法により行われた。

## M1-1L

```
AAATTGTGTTGACGCATTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGG
GCCAGTCAGGGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTC
ATCTATGATGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAC
TTCACCTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGCGTAGAACT
GGCCTCGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCA
TCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCT
ATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTG
TCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACT
ACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCT
TCAACAGGGGAGAGTCTTATCCATATGATGTGCCAGATTATGCGAGC
```



## M1-3L

GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGC  
AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGG  
CTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGG  
ACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTGACAGTAT  
GGTAGCTCACCTCCATTCACTTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAACGAACTGTGGCTGCACCA  
TCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTG  
AATAACTTCTATCCCAGAGAGGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCC  
CAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGC  
AAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTC  
ACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTCTTATCCATATGATGTGCCAGATTATGCGAGC

## M1-4L

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGC  
AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGG  
CTCCACATCTATGGTGCATCCAGAAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGG  
ACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTGACAGTAT  
GGTAGCTCATTCACTTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTC  
TTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAAC  
TTCTATCCCAGAGAGGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAG  
AGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCA  
GACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAG  
AGCTTCAACAGGGGAGAGTCTTATCCATATGATGTGCCAGATTATGCGAGC

## M1-5L

GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGC  
AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGG  
CTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGG  
ACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTGACAGTAT  
GGTAGCTCACCTATATTCACTTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAACGAACTGTGGCTGCACCA  
TCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTG  
AATAACTTCTATCCCAGAGAGGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCC  
CAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGC  
AAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTC  
ACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTCTTATCCATATGATGTGCCAGATTATGCGAGC

## M1-8L

GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGC  
AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGG  
CTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGG  
ACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTGACAGTAT  
GTTAGCTCATTCACTTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTC  
TTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAAC  
TTCTATCCCAGAGAGGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAG  
AGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCA  
GACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAG  
AGCTTCAACAGGGGAGAGTCTTATCCATATGATGTGCCAGATTATGCGAGC

## M1-10L

GATGTTGTGATGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGC  
AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTC  
CTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCCAGCAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACA  
GACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTGACAGCGTAGC  
AACTGGCCTCCCACTTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTC  
TTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAAC  
TTCTATCCCAGAGAGGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAG  
AGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCA  
GACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAG  
AGCTTCAACAGGGGAGAGTCTTATCCATATGATGTGCCAGATTATGCGAGC

## M1-21L

GCCATCCGGATGACCCAGTCTCCATCCTTCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGC  
CGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCCTAAGCTC  
CTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGTGAGTGGATCTGGGACA  
GATCTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTGCAACTTATTACTGTGAGTGTGGTTAC  
AGTACACCATTCACTTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTC  
TTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAAC  
TTCTATCCAGAGAGGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAGGAG  
AGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCA  
GACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCAACCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAG  
AGCTTCAACAGGGGAGAGTCTTATCCATATGATGTGCCAGATTATGCGAGC

## M1-23L

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGC  
AGGGCCAGTCAGAGTGTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGG  
CTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGG  
ACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTGCAAGTGTATTACTGTGAGCAGTAT  
GGTAGCTCACCTCCGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCACCA  
TCTGTCTTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTG  
AATAACTTCTATCCAGAGAGGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCC  
CAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGC  
AAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCAACCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTC  
ACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTCTTATCCATATGATGTGCCAGATTATGCGAGC

## M1-25L

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGC  
AGGGCCAGTCAGAGTGTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGG  
CTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAAACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGG  
ACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTGCAAGTGTATTACTGTGAGCAGTAT  
GGTAGCTCACTTCACTTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTC  
TTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAAC  
TTCTATCCAGAGAGGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAGGAG  
AGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCA  
GACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCAACCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAG  
AGCTTCAACAGGGGAGAGTCTTATCCATATGATGTGCCAGATTATGCGAGC

## M1-1H

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAAGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCA  
GCGTCTGAATTCACCATCAGTTACTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGTTCCAGGCAAGGGGCTGGAG  
TGGGTGGCAGCTGTCTGGTATGATGAAAGTACTACATATTCTCCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCC  
ATCTCCAGAGACGATTCCAAGAACAGCCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCT  
GTGTATTACTGTGCGAGAGATAGGGTGGGCCTCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTC  
TCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGC  
ACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAAGTCAAGC  
GCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC  
GTGGTGACCGTGGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGC  
AACACCAAGGTGGACAAGAAAGCAGAGCCCAATCTCATCACCATCACCATCAC

## M1-3H

CCGATGTCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG  
CAGCGTCTGGATTACCTTCAGTTACTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGGCTGG  
AGTGGGTGACACTTATAACCTATGATGGAGATAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCA  
CCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGG  
CTGTGTATTACTGTGCGAGAGACGGGATCGGGTACTTTGACTATTGGGGCCAGGGAACCTTGGTCACCG  
TCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGG  
GCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAG  
GCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCA  
GCGTGGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCA  
GCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGCAGAGCCCCAAATCTCATCACCATCACCATCAC

## M1-4H

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAAGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCA  
GCGTCTGGATTACCTTCAGTTACTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGTTCCAGGCAAGGGGGCTGGAG  
TGGGTGGCAGCTGTCTGGTATGATGGAAGTACTACATATTCTCCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCC  
ATCTCCAGAGACGATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCT  
GTGTATTACTGTGCGAGAGATAGGGTGGGCTCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCTTGGTCACCGTC  
TCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGG  
ACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGC  
GCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC  
GTGGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCGAGC  
AACACCAAGGTGGACAAGAAAGCAGGGCCCCAAATCTCATCACCATCACCATCAC

## M1-5H

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCA  
GCGTCTGGATTTACCTTCAGTTACTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGGCTGGAG  
TGGGTGACACTTATAACCTATGATGGAGATAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCC  
ATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCT  
GTGTATTACTGTGCGAGAGACGGGATCGGGTACTTTGACTATTGGGGCCAGGGAACCTTGGTCACCGTC  
TCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGG  
ACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGC  
GCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC  
GTGGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCGAGC  
AACACCAAGGTGGACAAGAAAGCAGAGCCCCAAATCTCATCACCATCACCATCAC

## M1-8H

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAAGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCA  
GCGTCTGGATTACCTTCAGTTACTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGGCTGGAG  
TGGGTGGCAGCTGTATGGTATGATGGAAGTAACACATACTCTCCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCC  
ATCTCCAGAGACGATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCT  
GTGTATTACTGTGCGAGAGATAGGGTGGGCTCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCTTGGTCACCGTC  
TCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGG  
ACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGC  
GCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC  
GTGGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCGAGC  
AACACCAAGGTGGACAAGAAAGCAGAGCCCCAAATCTCATCACCATCACCATCAC

## M1-10H

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACATCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGAA  
GGCTCTGGATTACCTTCAGGAACCATCCTATACACTGGGTTCCGCCAGGCTCCAGGAAAAGGTCTGGAG  
TGGGTATCAGTTAGTGGTATTGGTGGTGACATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCTCCATC  
TCCAGAGACAATGCCAAGAACTCCTTGTATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACATGGCTGTG  
TATTACTGTGCAAGAGAATATTACTATGGTTCCGGGAGTTATCGCGTTGACTACTACTACTACGGTATG  
GACGTCTGGGGGCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCC  
CTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTC  
CCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGT  
CTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTCAGCAGCTTGGGCACCCAG  
ACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCGAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGCAGAGCCCCAAATCT  
CATCACCATCACCATCAC

M1-21H

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAAGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCA  
GCGTCTGGATTACCTTCAGTTACTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGTTCCAGGCAAGGGGCTGGAG  
TGGGTGGCAGCTGTCTGGTATGATGGAAGTACTACATATTCTCCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACACC  
ATCTCCAGAGACGATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAGCAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCT  
GTGTATTACTGTGCGAGAGATAGGGTGGGCCTCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACCGTC  
TCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGC  
ACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGC  
GCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC  
GTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGC  
AACACCAAGGTGGACAAGAAAGCAGAGCCCAAATCTCATCACCATCACCATCAC

M1-23H

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCA  
GCGTCTGGATTACCTTCAGTTACTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGTTCCAGGCAAGGGGCTGGAG  
TGGGTGGCAGCTATATGGTATGATGGAAGTAAACATACAATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACACC  
ATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCT  
GTGTATTACTGTGCGAGAGATGGGATAGGCTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACCGTC  
TCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGC  
ACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGC  
GCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC  
GTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGC  
AACACCAAGGTGGACAAGAAAGCAGAGCCCAAATCTCATCACCATCACCATCAC

M1-25H

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCA  
GCGTCTGGATTACCTTCAGTTACTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGTTCCAGGCAAGGGGCTGGAG  
TGGGTGGCAGCTGTCTGGTATGATGGAAGTACTACATATCTCCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACACC  
ATCTCCAGAGACGATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCT  
GTTTATTACTGTGCGAGAGATAGGGTGGGCCTCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACCGTC  
TCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGC  
ACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGC  
GCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC  
GTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGC  
AACACCAAGGTGGACAAGAAAGCAGAGCCCAAATCTCATCACCATCACCATCAC

M2-11L

GAAATAGTGATGACGCACTCTCCAGGCACCCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGC  
AGGGCCAGTCAGGGTGTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGG  
CTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCAGACAGGTTTCACTGGCAGTGGGTCTGGG  
ACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGAGTGTATTACTGTGTCAGCAGTAT  
GGTAGCTCACCTCCATTCACTTTTGGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAACGAACTGTGGCTGCACCA  
TCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAGATCTGGAAGTGCCTCTGTGTGTGCTGCTG  
AATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCC  
CAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGC  
AAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTC  
ACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTCTTATCCATATGATGTGCCAGATTATGCGAGC

M2-12L

GAAATAGTGATGACGCACTCTCCAGGCACCCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGC  
AGGGCCAGTCAGGGTGTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGG  
CTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCAGACAGGTTTCACTGGCAGTGGGTCTGGG  
ACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGAGTGTATTACTGTGTCAGCAGTAT  
GGTAGCTCACCTCCGTACACTTTTGGGCCAGGGGACCAAAGTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCACCA  
TCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTGTGTGCTGCTG  
AATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCC  
CAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGC  
AAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTC  
ACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTCTTATCCATATGATGTGCCAGATTATGCGAGC

## M2-16L

GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGC  
AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGG  
CTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAAGTGTCAAGTGGGTCTGGG  
ACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAAGCAGTAT  
GGTAGCTCATTCACTTTTGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTC  
TTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAAC  
TTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAG  
AGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCA  
GACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCAACCATCAGGGCTGAGCTCGCCCGTCACAAAG  
AGCTTCAACAGGGGAGAGTCTTATCCATATGATGTGCCAGATTATGCGAGC

## M2-18L

GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGC  
AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGG  
CTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGG  
ACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAAGCAGTAT  
GTTAGCTCATTCACTTTTGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTC  
TTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAAC  
TTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAG  
AGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCA  
GACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCAACCATCAGGGCTGAGCTCGCCCGTCACAAAG  
AGCTTCAACAGGGGAGAGTCTTATCCATATGATGTGCCAGATTATGCGAGC

## M2-20L

GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGC  
AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGG  
CTCCTCATCTATGGTGCATCCAGGAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGG  
ACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAAGCAGTAT  
GGTAGCTCACCCATGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCACCA  
TCTGTCTTCTATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTG  
AATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCC  
CAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGC  
AAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCAACCATCAGGGCTGAGCTCGCCCGTC  
ACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTCTTATCCATATGATGTGCCAGATTATGCGAGC

## M2-31L

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGC  
AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTC  
CTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACA  
GACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAAGCAGCTACG  
AACTGGCCTCGGACGTTTGGCCAAGGGACCAAGTGGAAATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTC  
TTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAAC  
TTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAG  
AGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCA  
GACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCAACCATCAGGGCTGAGCTCGCCCGTCACAAAG  
AGCTTCAACAGGGGAGAGTCTTATCCATATGATGTGCCAGATTATGCGAGC

## M2-32L

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGC  
AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTC  
CTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCCGCTGGCATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACA  
GACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTGTCAGTTTATTACTGTGAGCAACGTAAC  
AACTGGCCTCTCACTTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTC  
TTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAAC  
TTCTATCCCAGAGAGGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAG  
AGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCA  
GACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAG  
AGCTTCAACAGGGGAGAGTCTTATCCATATGATGTGCCAGATTATGCGAGC

## M2-33L

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGC  
AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGG  
CTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGG  
ACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCTGGAGCCTGAAGATTTGTCAGTGTATTACTGTGAGCAGTAT  
GGTAGCTCACCTCCGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCACCA  
TCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTG  
AATAACTTCTATCCCAGAGAGGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCC  
CAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGC  
AAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTC  
ACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTCTTATCCATATGATGTGCCAGATTATGCGAGC

## M2-34L

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGC  
AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTC  
CTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACA  
GACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTGTCAGTTTATTACTGTGAGCAGCGTACG  
AACTGGCCTCGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTC  
TTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAAC  
TTCTATCCCAGAGAGGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAG  
AGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCA  
GACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAG  
AGCTTCAACAGGGGAGAGTCTTATCCATATGATGTGCCAGATTATGCGAGC

## M2-35L

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGC  
AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTC  
CTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACA  
GACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTGTCAGTTTATTACTGTGAGCAGCGTACG  
AACTGGCCTCGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTC  
TTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAAC  
TTCTATCCCAGAGAGGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAG  
AGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCA  
GACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAG  
AGCTTCAACAGGGGAGAGTCTTATCCATATGATGTGCCAGATTATGCGAGC

## M2-11H

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCA  
GCGTCTGGATTTACCTTCAGTTACTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAG  
TGGGTGACACTTATAACCTATGATGGAGATAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACAC  
ATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACAGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCT  
GTGTATTACTGTGCGAGAGACGGGATCGGGTACTTTGACTATTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTC  
TCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCTCCAAGAGCACCTCTGGGGC  
ACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACCGTGTGCTGGAACCTCAGGC  
GCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC  
  
GTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGC  
AACACCAAGGTGGACAAGAAAGCAGAGCCCAAATCTCATCACCATCACCATCAC

## M2-12H

GATGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCATCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCA  
GCGTCTGGATTACCTTCAGTTACTATGGCATGCAGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAA  
TGGATGACACTTATATCCTATGATGGAGATAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCC  
ATCTCCAGAGAAAATCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCCGAGGACACGGCT  
GTGTATTACTGTGCGAGAGACGGGATCGGGTACTTTGACTATTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTC  
TCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGC  
ACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGC  
GCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC  
GTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGC  
AGACCAAGGTGGACAAGAAAGCAGAGCCCAAATCTCATCACCATCACCATCAC

## M2-16H

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAAGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCA  
GCGTCTGGATTACCTTCAGTTACTATGGCATGCAGTGGGTCCGCCAGGTTCCAGGCAAGGGGCTGGAG  
TGGGTGGCAGCTGTCTGGTATGATGGAAGTACTAGATATTCTCCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCC  
ATCTCCAGAGACGATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCT  
GTGTATTACTGTGCGAGAGATAGGGTGGGCCTCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTC  
TCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGC  
ACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGC  
GCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC  
GTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGC  
AACACCAAGGTGGACAAGAAAGCAGAGCCCAAATCTCATCACCATCACCATCAC

## M2-18H

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAAGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCA  
GCGTCTGGATTACCTTCAGTTACTATGGCATGCAGTGGGTCCGCCAGGTTCCAGGCAAGGGGCTGGAG  
TGGGTGGCAGCTGTCTGGTATGATGGAAGTACTACATATTCTCCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCC  
ATCTCCAGAGACGATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCT  
GTGTATTACTGTGCGAGAGATAGGGTGGGCCTCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTC  
TCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGC  
ACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGC  
GCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC  
GTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGC  
AACACCAAGGTGGACAAGAAAGCAGAGCCCAAATCTCATCACCATCACCATCAC

## M2-20H

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGGCTCTCCTGTGCA  
GCCTCTGGATTACCTTCAGTTACTATGGTATGCACTGGGTCCGCCAGGTTCCAGGCAAGGGGCTGGAG  
TGGGTGTCACTTATAACATATGATGGAAGGAATAAATACTACGCCGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCC  
ATCTCCAGAGAGAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAACTGAGGACACGGCT  
GAGTATTACTGTGCGAGAGACGGGATCGGATACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAATCCTGGTCACCGTC  
TCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGC  
ACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAGGC  
GCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC  
GTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGC  
AACACCAAGGTGGACAAGAAAGCAGAGCCCAAATCTCATCACCATCACCATCAC

## M2-31H

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGTCTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCA  
GCCTCTGGATTACCTTCAGTTACTATGGTATGCACTGGGTCCGCCAGGTTCCAGGCAAGGGACTAGAG  
TGGGTGGCACTTATATCATACGATGGAAGCAATAAATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCC  
ATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACTCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCT  
GTGTATTACTGTGCGAGAGACTGGATCGGGTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTC  
TCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGC  
ACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGC  
GCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC  
GTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGC  
AACACCAAGGTGGACAAGAAAGCAGAGCCCAAATCTCATCACCATCACCATCAC

## M2-32H

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACATCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGAA  
GGCTCTGGATTTCATCTTCAGGAACCATCCTATACACTGGGTTCCGCCAGGCTCCAGGAAAAGGTCTGGAG  
TGGGTATCAGTTAGTGGTATTGGTGGTGACACATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCTCCATC  
TCCAGAGACAATGCCAAGAACCTCTTGTATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACATGGCTGTG  
TATTACTGTGCAAGAGAATATTACTATGGTTCCGGGGAGTTATCGCGTTGACTACTACTACTACGGTATG  
GACGTCTGGGGCCAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCC  
CTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGTGCCTGGTCAAGGACTACTTC  
CCCCAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACACCTTCCCGGTGTG  
CTACAGTCTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAG  
ACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGCAGAGCCCCAAATCT  
CATCACCATCACCATCAC

## M2-33H

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCA  
GCGTCTGGATTACCTTCAGTTACTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAA  
TGGATGACACTTATAACCTATGATGGAGATAATAAACTACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACAC  
ATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCCGAGGACAEGGCT  
GTGTATTACTGTGCGAGAGACGGGATCGGGTACTTTGACTATTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACCGTC  
TCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGC  
ACAGCGGCCCTGGGTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGC  
GCCCTGACCAGCGGCGTGACACACCTTCCCGGTGTCTTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC  
GTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGC  
AACACCAAGGTGGACAAGAAAGCAGAGCCCCAAATCTCATCACCATCACCATCAC

## M2-34H

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCA  
GCCTCTGGATTACAGTTTCAGTTACTATGGTATACACTGGGTCCGCCAGGTTCCAGGCAAGGGACTAGAG  
TGGGTGGTACTTATATCATACGATGGAAGCAATAAATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACAC  
ATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACTCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCT  
GTGTATTACTGTGCGAGAGACTGGATCGGGTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACCGTC  
TCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGC  
ACAGCGGCCCTGGGTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGC  
GCCCTGACCAGCGGCGTGACACACCTTCCCGGTGTCTTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC  
GTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGC  
AACACCAAGGTGGACAAGAAAGCAGAGCCCCAAATCTCATCACCATCACCATCAC

## M2-35H

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCA  
GCCTCTGGATTACAGTTCAGTTACTATGGTATACACTGGGTCCGCCAGGTTCCAGGCAAGGGACTAGAG  
TGGGTGGAACCTTATATCATACGATGGAAGCAATAAATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACAC  
ATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACTCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCT  
GTGTATTACTGTGCGAGAGACTGGATCGGGTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACCGTC  
TCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGC  
ACAGCGGCCCTGGGTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGC  
GCCCTGACCAGCGGCGTGACACACCTTCCCGGTGTCTTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC  
GTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGC  
AACACCAAGGTGGACAAGAAAGCAGAGCCCCAAATCTCATCACCATCACCATCAC



配列決定された抗体の翻訳アミノ酸配列

10-9M親和性で切り捨てられたM1-H重鎖可変およびCH1領域

	1				50
M1_10H	QVQLVQSGGG	LVHPGGSRL	SCEGSGFIFR	NHPIHWVRQA	PGKGLEWVS
M1_1H	QVQLVESGGG	VVQPGKSLRL	SCAASEFTIS	YGMHWVRQV	PGKGLEWVAA
M1_21H	QVQLVQSGGG	VVQPGKSLRL	SCAASGFTFS	YGMHWVRQV	PGKGLEWVAA
M1_23H	QVQLVQSGGG	VVQPGKSLRL	SCAASGFTFS	NYGMHWVRQA	PGKGLEWVAA
M1_25H	QVQLVESGGG	LVHPGGSRL	SCAASGFTFS	YGMHWVRQV	PGKGLEWVAA
M1_3H	DVQLVQSGGG	VVQPGKSLRL	SCAASGFTFS	YGMHWVRQA	PGKGLEWVTL
M1_4H	QVQLVESGGG	VVQPGKSLRL	SCAASGFTFS	YGMHWVRQV	PGKGLEWVAA
M1_5H	QVQLVESGGG	VVQPGKSLRL	SCAASGFTFS	YGMHWVRQA	PGKGLEWVTL
M1_8H	QVQLVQSGGG	VVQPGKSLKL	SCAASGFTFS	YGMHWVRQA	PGKGLEWVAA
	51				100
M1_10H	SGIGGDTYY	ADSVKGRFSI	SRDNAKNSLY	LQMNSLRAED	MAVYYCAREY
M1_1H	VWYDESTTYS	PDSVKGRFTI	SRDDSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARDR
M1_21H	VWYDGSSTYS	PDSVKGRFTI	SRDDSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARDR
M1_23H	IWYDGSSTYN	ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARDG
M1_25H	VWYDGSSTYP	PDSVKGRFTI	SRDDSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARDR
M1_3H	ITYDGDNKYY	ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARDG
M1_4H	VWYDGSSTYS	PDSVKGRFTI	SRDDSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARDR
M1_5H	ITYDGDNKYY	ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARDG
M1_8H	VWYDGSNTYS	PDSVKGRFTI	SRDDSKNTVY	LQMNSLRAED	TAVYYCARDR
	101				150
M1_10H	YVSGSYRVD	YYYYGMDVWG	QGTTLVTVSSA	STKGPSVFPL	APSSKSTSGG
M1_1H	VG.....	....LFDYWG	QGTTLVTVSSA	STKGPSVFPL	APSSKSTSGG
M1_21H	VG.....	....LFDYWG	QGTTLVTVSSA	STKGPSVFPL	APSSKSTSGG
M1_23H	IG.....	....YFDYWG	QGTTLVTVSSA	STKGPSVFPL	APSSKSTSGG
M1_25H	VG.....	....LFDYWG	QGTTLVTVSSA	STKGPSVFPL	APSSKSTSGG
M1_3H	IG.....	....YFDYWG	QGTTLVTVSSA	STKGPSVFPL	APSSKSTSGG
M1_4H	VG.....	....LFDYWG	QGTTLVTVSSA	STKGPSVFPL	APSSKSTSGG
M1_5H	IG.....	....YFDYWG	QGTTLVTVSSA	STKGPSVFPL	APSSKSTSGG
M1_8H	VG.....	....LFDYWG	QGTTLVTVSSA	STKGPSVFPL	APSSKSTSGG
	151				200
M1_10H	TAALGCLVKD	YFPEPVTVSW	NSGALTSGVH	TFFAVLQSSG	LYSLSSVTV
M1_1H	TAALGCLVKD	YFPEPVTVSW	NSGALTSGVH	TFFAVLQSSG	LYSLSSVTV
M1_21H	TAALGCLVKD	YFPEPVTVSW	NSGALTSGVH	TFFAVLQSSG	LYSLSSVTV
M1_23H	TAALGCLVKD	YFPEPVTVSW	NSGALTSGVH	TFFAVLQSSG	LYSLSSVTV
M1_25H	TAALGCLVKD	YFPEPVTVSW	NSGALTSGVH	TFFAVLQSSG	LYSLSSVTV
M1_3H	TAALGCLVKD	YFPEPVTVSW	NSGALTSGVH	TFFAVLQSSG	LYSLSSVTV
M1_4H	TAALGCLVKD	YFPEPVTVSW	NSGALTSGVH	TFFAVLQSSG	LYSLSSVTV
M1_5H	TAALGCLVKD	YFPEPVTVSW	NSGALTSGVH	TFFAVLQSSG	LYSLSSVTV
M1_8H	TAALGCLVKD	YFPEPVTVSW	NSGALTSGVH	TFFAVLQSSG	LYSLSSVTV
	201			237	
M1_10H	PSSSLGTQTY	ICNVNHKPSN	TKVDKKAEPK	SHHHHHH	
M1_1H	PSSSLGTQTY	ICNVNHKPSN	TKVDKKAEPK	SHHHHHH	
M1_21H	PSSSLGTQTY	ICNVNHKPSN	TKVDKKAEPK	SHHHHHH	
M1_23H	PSSSLGTQTY	ICNVNHKPSN	TKVDKKAEPK	SHHHHHH	
M1_25H	PSSSLGTQTY	ICNVNHKPSN	TKVDKKAEPK	SHHHHHH	
M1_3H	PSSSLGTQTY	ICNVNHKPSN	TKVDKKAEPK	SHHHHHH	
M1_4H	PSSSLGTQTY	ICNVNHKPSN	TKVDKKAEPK	SHHHHHH	
M1_5H	PSSSLGTQTY	ICNVNHKPSN	TKVDKKAEPK	SHHHHHH	
M1_8H	PSSSLGTQTY	ICNVNHKPSN	TKVDKKAEPK	SHHHHHH	

10-9親和性で切り捨てられたM1-L<sub>k</sub>鎖可変および定常領域

	1				50
M1_10L	DVVMTQSPAT	LSLSPGERAT	LSCRASQSVS	S.YLAWYQQK	PGQAPRLLIY
M1_1L	EIVLTQSPAT	LSLSPGERAT	LSCRASQGV	S.YLAWYQQK	PGQAPRLLIY
M1_21L	AIRMTQSPSF	LSASVGDRVT	ITCRASQSI	S.YLNWYQQK	PGKAPKLLIY
M1_23L	EIVLTQSPGT	LSLSPGERAT	LSCRASQSVS	SSYLAWYQQK	PGQAPRLLIY
M1_25L	EIVLTQSPGT	LSLSPGERAT	LSCRASQSVS	SSYLAWYQQK	PGQAPRLLIY
M1_3L	EIVMTQSPAT	LSLSPGERAT	LSCRASQSVS	SSYLAWYQQK	PGQAPRLLIY
M1_4L	EIVLTQSPGT	LSLSPGERAT	LSCRASQSVS	SSYLAWYQQK	PGQAPRLHIY
M1_5L	EIVMTQSPGT	LSLSPGERAT	LSCRASQSVS	SSYLAWYQQK	PGQAPRLLIY
M1_8L	EIVMTQSPGT	LSLSPGERAT	LSCRASQSVS	STYLAWYQQK	PGQAPRLLIY
	51				100
M1_10L	DASNRATGIP	ARFSGSGSGT	DFTLTISSE	PEDFAVYYCQ	QRSNWP.PTF
M1_1L	DASNRATGIP	ARFSGSGSGT	DFTLTISSE	PEDFAVYYCQ	QRSNWP.RTF
M1_21L	AASSLQSGVP	SRFSVSGSGT	DLTLTISLQ	PEDFATYYCQ	CGYSTP.FTF
M1_23L	GASSRATGIP	DRFSGSGSGT	DFTLTISRLE	PEDFAVYYCQ	QYGSSPPYTF
M1_25L	GASSRATGIP	NRFSGSGSGT	DFTLTISRLE	PEDFAVYYCQ	QYGSS..FTF
M1_3L	GASSRATGIP	DRFSGSGSGT	DFTLTISRLE	PEDFAVYYCQ	QYGSSPPFTF
M1_4L	GASRRATGIP	DRFSGSGSGT	DFTLTISRLE	PEDFAVYYCQ	QFGSS..FTF
M1_5L	GASSRATGIP	DRFSGSGSGT	DFTLTISRLE	PEDFAVYYCQ	QYGSSPIFTF
M1_8L	GASSRATGIP	DRFSGSGSGT	DFTLTISRLE	PEDFAVYYCQ	QYVSS..FTF
	101				150
M1_10L	GGGTKVEIKR	TVAAPSVFIF	PPSDEQLKSG	TASVVCLLNN	FYPREAKVQW
M1_1L	GQGTKVEIKR	TVAAPSVFIF	PPSDEQLKSG	TASVVCLLNN	FYPREAKVQW
M1_21L	GPGTKVDIKR	TVAAPSVFIF	PPSDEQLKSG	TASVVCLLNN	FYPREAKVQW
M1_23L	GQGTKLEIKR	TVAAPSVFIF	PPSDEQLKSG	TASVVCLLNN	FYPREAKVQW
M1_25L	GPGTKVDIKR	TVAAPSVFIF	PPSDEQLKSG	TASVVCLLNN	FYPREAKVQW
M1_3L	GPGTKVDIKR	TVAAPSVFIF	PPSDEQLKSG	TASVVCLLNN	FYPREAKVQW
M1_4L	GPGTKVDIKR	TVAAPSVFIF	PPSDEQLKSG	TASVVCLLNN	FYPREAKVQW
M1_5L	GPGTKVDIKR	TVAAPSVFIF	PPSDEQLKSG	TASVVCLLNN	FYPREAKVQW
M1_8L	GPGTKVDIKR	TVAAPSVFIF	PPSDEQLKSG	TASVVCLLNN	FYPREAKVQW
	151				200
M1_10L	KVDNALQSGN	SQESVTEQDS	KDSTYSLSST	LTLKADYEK	HKVYACEVTH
M1_1L	KVDNALQSGN	SQESVTEQDS	KDSTYSLSST	LTLKADYEK	HKVYACEVTH
M1_21L	KVDNALQSGN	SQESVTEQDS	KDSTYSLSST	LTLKADYEK	HKVYACEVTH
M1_23L	RVDNALQSGN	SQESVTEQDS	KDSTYSLSST	LTLKADYEK	HKVYACEVTH
M1_25L	KVDNALQSGN	SQESVTEQDS	KDSTYSLSST	LTLKADYEK	HKVYACEVTH
M1_3L	KVDNALQSGN	SQESVTEQDS	KDSTYSLSST	LTLKADYEK	HKVYACEVTH
M1_4L	KVDNALQSGN	SQESVTEQDS	KDSTYSLSST	LTLKADYEK	HKVYACEVTH
M1_5L	KVDNALQSGN	SQESVTEQDS	KDSTYSLSST	LTLKADYEK	HKVYACEVTH
M1_8L	KVDNALQSGN	SQESVTEQDS	KDSTYSLSST	LTLKADYEK	HKVYACEVTH
	201		226		
M1_10L	QGLSSPVTKS	FNRGESYPYD	VPDYAS		
M1_1L	QGLSSPVTKS	FNRGESYPYD	VPDYAS		
M1_21L	QGLSSPVTKS	FNRGESYPYD	VPDYAS		
M1_23L	QGLSSPVTKS	FNRGESYPYD	VPDYAS		
M1_25L	QGLSSPVTKS	FNRGESYPYD	VPDYAN		
M1_3L	QGLSSPVTKS	FNRGESYPYD	VPDYAS		
M1_4L	QGLSSPVTKS	FNRGESYPYD	VPDYAS		
M1_5L	QGLSSPVTKS	FNRGESYPYD	VPDYAS		
M1_8L	QGLSSPVTKS	FNRGESYPYD	VPDYAS		

10-10M親和性で切り捨てられたM2-H重鎖VH-CH1配列

	1				50
M2_11H	QVQLVESGGG	VVQPGKSLRL	SCAASGFTFS	YYGMHWVRQA	PGKGLEWVTL
M2_12H	DVQLVESGGG	VVHPGRSLRL	SCAASGFTFS	YYGMHWVRQA	PGKGLEWMTL
M2_16H	QVQLVQSGGG	VVQPGKSLRL	SCAASGFSLS	YYGMHWVRQV	PGKGLEWVAA
M2_18H	QVQLVQSGGG	VVQPGKSLRL	SCAASGFSFS	YYGMHWVRQV	PGKGLEWVAA
M2_20H	QVQLVQSGGG	VVQPGKSLRL	SCAASGFTFS	YYGMHWVRQA	PGKGLEWVSL
M2_31H	QVQLVESGGV	VVQPGKSLRL	SCAASGFTFS	YYGIHWVRQV	PGKGLEWVAL
M2_32H	QVQLVQSGGG	LVHPGGSLRL	SCEGSGFIFR	NHPIHWVRQA	PGKGLEWVSV
M2_33H	QVQLVQSGGG	VVQPGKSLRL	SCAASGFTFS	YYGMHWVRQA	PGKGLEWMTL
M2_34H	QVQLVESGGG	VVQPGKSLRL	SCAASGFTFS	YYGIHWVRQV	PGKGLEWVVL
M2_35H	QVQLVESGGG	VVQPGKSLRL	SCAASGFTIS	YYGIHWVRQV	PGKGLEWVEL
	51				100
M2_11H	ITYDGDNKYY	ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARDG
M2_12H	ISYDGDNKYY	ADSVKGRFTI	SRENSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARDG
M2_16H	VWYDGSTRYS	PDSVKGRFTI	SRDDSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARDR
M2_18H	VWYDGSTTYS	PDSVKGRFTI	SRDDSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARDR
M2_20H	ITYDGRNKYY	ADSVKGRFTI	SRENSKNTLY	LQMNSLRTE	TAEYYCARDG
M2_31H	ISYDGSNKYY	ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARDW
M2_32H	SGIGG.DTYY	ADSVKGRFSI	SRDNAKNSLY	LQMNSLRAED	MAVYYCAREY
M2_33H	ITYDGDNKYY	ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARDG
M2_34H	ISYDGSNKYY	ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARDW
M2_35H	ISYDGSNKYY	ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARDW
	101				150
M2_11H	IG.....	....YFDYWG	QGTTLVTVSSA	STKGPSVFPL	APSSKSTSGG
M2_12H	IG.....	....YFDYWG	QGTTLVTVSSA	STKGPSVFPL	APSSKSTSGG
M2_16H	VG.....	....LFDYWG	QGTTLVTVSSA	STKGPSVFPL	APSSKSTSGG
M2_18H	VG.....	....LFDYWG	QGTTLVTVSSA	STKGPSVFPL	APSSKSTSGG
M2_20H	IG.....	....YFDYWG	QGILVTVSSA	STKGPSVFPL	APSSKSTSGG
M2_31H	IG.....	....YFDYWG	QGTTLVTVSSA	STKGPSVFPL	APSSKSTSGG
M2_32H	YYGSGSYRVD	YYYYGMDVWG	QGTTLVTVSSA	STKGPSVFPL	APSSKSTSGG
M2_33H	IG.....	....YFDYWG	QGTTLVTVSSA	STKGPSVFPL	APSSKSTSGG
M2_34H	IG.....	....YFDYWG	QGTTLVTVSSA	STKGPSVFPL	APSSKSTSGG
M2_35H	IG.....	....YFDYWG	QGTTLVTVSSA	STKGPSVFPL	APSSKSTSGG
	151				200
M2_11H	TAALGCLVKD	YFPEPVTVSW	NSGALTSGVH	TFFPAVLQSSG	LYSLSSVVTV
M2_12H	TAALGCLVKD	YFPEPVTVSW	NSGALTSGVH	TFFPAVLQSSG	LYSLSSVVTV
M2_16H	TAALGCLVKD	YFPEPVTVSW	NSGALTSGVH	TFFPAVLQSSG	LYSLSSVVTV
M2_18H	TAALGCLVKD	YFPEPVTVSW	NSGALTSGVH	TFFPAVLQSSG	LYSLSSVVTV
M2_20H	TAALGCLVKD	YFPEPVTVSW	KSGALTSGVH	TFFPAVLQSSG	LYSLSSVVTV
M2_31H	TAALGCLVKD	YFPEPVTVSW	NSGALTSGVH	TFFPAVLQSSG	LYSLSSVVTV
M2_32H	TAALGCLVKD	YFPEPVTVSW	NSGALTSGVH	TFFPAVLQSSG	LYSLSSVVTV
M2_33H	TAALGCLVKD	YFPEPVTVSW	NSGALTSGVH	TFFPAVLQSSG	LYSLSSVVTV
M2_34H	TAALGCLVKD	YFPEPVTVSW	NSGALTSGVH	TFFPAVLQSSG	LYSLSSVVTV
M2_35H	TAALGCLVKD	YFPEPVTVSW	NSGALTSGVH	TFFPAVLQSSG	LYSLSSVVTV
	201				237
M2_11H	PSSSLGTQTY	ICNVNHKPSN	TKVDKKAEPK	SHHHHHH	
M2_12H	PSSSLGTQTY	ICNVNHKPSN	TKVDKKAEPK	SHHHHHH	
M2_16H	PSSSLGTQTY	ICNVNHKPSN	TKVDKKAEPK	SHHHHHH	
M2_18H	PSSSLGTQTY	ICNVNHKPSN	TKVDKKAEPK	SHHHHHH	
M2_20H	PSSSLGTQTY	ICNVNHKPSN	TKVDKKAEPK	SHHHHHH	
M2_31H	PSSSLGTQTY	ICNVNHKPSN	TKVDKKAEPK	SHHHHHH	
M2_32H	PSSSLGTQTY	ICNVNHKPSN	TKVDKKAEPK	SHHHHHH	
M2_33H	PSSSLGTQTY	ICNVNHKPSN	TKVDKKAEPK	SHHHHHH	
M2_34H	PSSSLGTQTY	ICNVNHKPSN	TKVDKKAEPK	SHHHHHH	
M2_35H	PSSSLGTQTY	ICNVNHKPSN	TKVDKKAEPK	SHHHHHH	

10-10M親和性で切り捨てられたM2-Lκ鎖VKCK (9月23日木曜日)

	1				50
M2_11L	EIVMTQSPGT	LSLSPGERAT	LSCRASQGV	SSYLAWYQQK	PGQAPRLLIY
M2_12L	EIVMTQSPGT	LSLSPGERAT	LSCRASQGV	SSYLAWYQQK	PGQAPRLLIY
M2_16L	EIVMTQSPGT	LSLSPGERAT	LSCRASQSV	SSYLAWYQQK	PGQAPRLLIY
M2_18L	EIVMTQSPGT	LSLSPGERAT	LSCRASQSV	STYLAWYQQK	PGQAPRLLIY
M2_20L	EIVMTQSPGT	LSLSPGERAT	LSCRASQSV	SSYLAWYQQK	PGQAPRLLIY
M2_31L	EIVLTQSPAT	LSLSPGERAT	LSCRASQSV	S.YLAWYQQK	PGQAPRLLIY
M2_32L	EIVLTQSPAT	LSLSPGERAT	LSCRASQSV	S.YLAWYQQK	PGQAPRLLIY
M2_33L	EIVLTQSPGT	LSLSPGERAT	LSCRASQSV	SSYLAWYQQK	PGQAPRLLIY
M2_34L	EIVLTQSPAT	LSLSPGERAT	LSCRASQSV	S.YLAWYQQK	PGQAPRLLIY
M2_35L	EIVLTQSPAT	LSLSPGERAT	LSCRASQSV	S.YLAWYQQK	PGQAPRLLIY

	51				100
M2_11L	GASSRATGIP	DRFSGSGSGT	DFTLTISRLE	PEDFAVYYCQ	QYGSSPPFTF
M2_12L	GASSRATGIP	DRFSGSGSGT	DFTLTISSE	PEDFAVYYCQ	QYGSSPPYTF
M2_16L	GASSRATGIP	DRFSVSGSGT	DFTLTISRLE	PEDFAVYYCQ	QYGSS...FTF
M2_18L	GASSRATGIP	DRFSGSGSGT	DFTLTISRLE	PEDFAVYYCQ	QYVSS...FTF
M2_20L	GASSRATGIP	DRFSGSGSGT	DFTLTISRLE	PEDFAVYYCQ	QYGSSPMYTF
M2_31L	DASNRAAGIP	ARFSGSGSGT	DFTLTISSE	PEDFAVYYCQ	QRTNWP.RTF
M2_32L	DASNRAAGIP	ARFSGSGSGT	DFTLTISSE	PEDFAVYYCQ	QRNNWP.LTF
M2_33L	GASSRATGIP	DRFSGSGSGT	DFTLTISRLE	PEDFAVYYCQ	QYGSSPPYTF
M2_34L	DASNRAAGIP	ARFSGSGSGT	DFTLTISSE	PEDFAVYYCQ	QRTNWP.RTF
M2_35L	DASNRAAGIP	ARFSGSGSGT	DFTLTISSE	PEDFAVYYCQ	QRTNWP.RTF

	101				150
M2_11L	GPGTKVDIKR	TVAAPSVFIF	PPSDEQLRSG	TASVVCLLNN	FYPREAKVQW
M2_12L	GQGTKLEIKR	TVAAPSVFIF	PPSDEQLKSG	TASVVCLLNN	FYPREAKVQW
M2_16L	GPGTKVDIKR	TVAAPSVFIF	PPSDEQLKSG	TASVVCLLNN	FYPREAKVQW
M2_18L	GPGTKVDIKR	TVAAPSVFIF	PPSDEQLKSG	TASVVCLLNN	FYPREAKVQW
M2_20L	GQGTKLEIKR	TVAAPSVFIF	PPSDEQLKSG	TASVVCLLNN	FYPREAKVQW
M2_31L	GQGTKVEIKR	TVAAPSVFIF	PPSDEQLKSG	TASVVCLLNN	FYPREAKVQW
M2_32L	GGGTKVEIKR	TVAAPSVFIF	PPSDEQLKSG	TASVVCLLNN	FYPREAKVQW
M2_33L	GQGTKLEIKR	TVAAPSVFIF	PPSDEQLKSG	TASVVCLLNN	FYPREAKVQW
M2_34L	GQGTKVEIKR	TVAAPSVFIF	PPSDEQLKSG	TASVVCLLNN	FYPREAKVQW
M2_35L	GQGTKVEIKR	TVAAPSVFIF	PPSDEQLKSG	TASVVCLLNN	FYPREAKVQW

	151				200
M2_11L	KVDNALQSGN	SQESVTEQDS	KDSTYLSST	LTLKADYEK	HKVYACEVTH
M2_12L	KVDNALQSGN	SQESVTEQDS	KDSTYLSST	LTLKADYEK	HKVYACEVTH
M2_16L	KVDNALQSGN	SQESVTEQDS	KDSTYLSST	LTLKADYEK	HKVYACEVTH
M2_18L	KVDNALQSGN	SQESVTEQDS	KDSTYLSST	LTLKADYEK	HKVYACEVTH
M2_20L	KVDNALQSGN	SQESVTEQDS	KDSTYLSST	LTLKADYEK	HKVYACEVTH
M2_31L	KVDNALQSGN	SQESVTEQDS	KDSTYLSST	LTLKADYEK	HKVYACEVTH
M2_32L	KVDNALQSGN	SQESVTEQDS	KDSTYLSST	LTLKADYEK	HKVYACEVTH
M2_33L	KVDNALQSGN	SQESVTEQDS	KDSTYLSST	LTLKADYEK	HKVYACEVTH
M2_34L	KVDNALQSGN	SQESVTEQDS	KDSTYLSST	LTLKADYEK	HKVYACEVTH
M2_35L	KVDNALQSGN	SQESVTEQDS	KDSTYLSST	LTLKADYEK	HKVYACEVTH

	201		226
M2_11L	QGLSSPVTKS	FNRGESYPYD	VPDYAS
M2_12L	QGLSSPVTKS	FNRGESYPYD	VPDYAS
M2_16L	QGLSSPVTKS	FNRGESYPYD	VPDYAS
M2_18L	QGLSSPVTKS	FNRGESYPYD	VPDYAS
M2_20L	QGLSSPVTKS	FNRGESYPYD	VPDYAS
M2_31L	QGLSSPVTKS	FNRGESYPYD	VPDYAS
M2_32L	QGLSSPVTKS	FNRGESYPYD	VPDYAS
M2_33L	QGLSSPVTKS	FNRGESYPYD	VPDYAS
M2_34L	QGLSSPVTKS	FNRGESYPYD	VPDYAS
M2_35L	QGLSSPVTKS	FNRGESYPYD	VPDYAS

【0216】

実施例23：大腸菌培養物の増殖および組換え抗体および抗原の精製

振盪フラスコ接種物は37℃、300rpmに設定されたInnova4330恒温振盪装置 (New Brunswick Scientific、Edison、NJ) 中で-70℃細胞バンクから一晩で生成された。接種物は3g/LのL-ロイシン、3g/LのL-イソロイシン、12g/Lのカゼイン消化物 (Difco、Detroit、MI)、12.5g/Lのグリセロールおよび10mg/mlのテトラサイクリンを添加した規定の培養培地 (Packら、Bio/Technology 11: 1271~1277 (1993)) を含む20Lの発酵器 (Applikon、Foster City、CA) に播種するために使用される。発酵器の温度、pH、および溶解酸素はそれぞれ、26℃、6.0~6.8% および25%飽和に制御される。ポリプロピレングリセロール (Dow、Midland、MI) を添加することにより泡が制御される。グリセロールは流加培養様式で発酵器に添加される。Fab発現は、後期対数増殖相中に2g/LのL(+ ) アラビノース (Sigma、St. Louis、MO) を添加することにより誘導される。細胞密度は、UV-1201分光測光器 (Shimadzu、Columbia、MD) 中600nmの光学的密度により測定される。最終Fab濃度は典型的には100~500mg/Lである。行程終了およびpHを6.0に調節した後、培養物はM-210B-EHマイクロフリューイダー (Microfluidics、Newton、MA) を17000psiで2度通過させる。細胞を高圧ホモジナイズすることにより、Fabが培養上清に放出される。

#### 【0217】

精製の第1の段階は、増殖用床固定化金属親和性クロマトグラフィー (expanded bed immobilized metal affinity chromatography; EB-IMAC) である。ストリームラインキレーティング樹脂 (Pharmacia、Piscataway、NJ) を0.1M  $\text{NiCl}_2$  を用いて充填する。その後、上向きに流れる、50mM酢酸、200mM NaCl、10mMイミダゾール、0.01%  $\text{NaN}_3$ 、pH6.0緩衝液中で増殖および平衡化される。培養ホモジネートを10mMイミダゾールとするためにストック溶液が使用され、続いて、固体含有物の湿重量を5%未満に減少させるために、2倍またはそれ以上で平衡緩衝液で希釈する。その後、表面速度300cm/時間で上向きに流れるストリームラインカラム上にロードする。細胞破壊片は妨げられることなく通過するが、FabはFab重鎖上のヘキサヒスチジンタグとニッケルの高親和性相互作用により捕捉される。洗浄後、増殖用床は充填用床に変換され、Fabは下向きに流れる20mMホウ酸、150mM NaCl、200mMイミダゾール、0.01%  $\text{NaN}_3$ 、pH8.0緩衝液中で溶出される。精製の

第2の段階はイオン交換クロマトグラフィー (IEC) を使用する。Qセファロースファストフロー樹脂 (Pharmacia、Piscataway、NJ) を20mMホウ酸、37.5mM NaCl、0.01%NaN<sub>3</sub>、pH8.0緩衝液で平衡化する。EB-IMAC段階のFab溶出プールは、20mMホウ酸、0.01%NaN<sub>3</sub>、pH8.0中で4倍希釈され、IECカラム上にロードされる。洗浄後、Fabは37.5～200mMのNaCl塩勾配を用いて溶出される。溶出画分は、プールする前にXcell II SDS-PAGEシステム (Novex、San Diego、CA) を用いて純度が評価される。最終的には、Fabプールは濃縮され、20mMホウ酸、150mM NaCl、0.01%NaN<sub>3</sub>、pH8.0保存緩衝液中で限外濾過 (diafiltered) される。これは、10,000 MWCOカセット (Sartorius、Bohemia、NY) を装着したSartocon Slice系中で達成される。最終精製収量は、典型的には50%である。精製Fabの濃度は280nmのUV吸光度により測定され、吸光度1.6が1mg/mL溶液として推定される。

#### 【0218】

##### 実施例24：Cmu標的化マウス

以下の実施例は、破壊された、したがって機能しない免疫グロブリン遺伝子を有するマウスを作製することを記載する。

#### 【0219】

##### CMD標的化ベクターの構築

マウス免疫グロブリン遺伝子を破壊するために、マウスIg重鎖遺伝子座の断片を含むベクターがマウス胚性幹細胞にトランスフェクトされる。マウスIg重鎖配列は、ベクターをマウス免疫グロブリン遺伝子座に「標的化」する。以下にこの免疫グロブリン遺伝子標的化ベクターの構築を記載する。

#### 【0220】

プラスミドpICEmuは、Balb/Cゲノムラムダファージライブラリー (Marcuら、Cell 22: 187, 1980) から得られた、mu遺伝子に渡るマウスIg重鎖遺伝子座のEcoRI/XhoI断片を含む。このゲノム断片は、プラスミドpICEMI9H (Marshら、Gene 32: 481～485, 1984) のXhoI/EcoRI部位にサブクローニングされた。pICEmuに含まれる重鎖配列は、muイントロンエンハンサーのちょうど3'側に位置するEcoRI部位の下流側に向かって、mu遺伝子の最後の膜貫通エクソンの約1kb下流に位置するXhoI部位まで及んでいる。しかしながらmuスイッチ反復領域の多くは大腸菌中

の継代により除去されている。

#### 【0221】

標的化ベクターは以下のように構築された（図6参照）。1.3kbのHindIII/SmaI断片はpICEmuから切り出され、HindIII/SmaI消化されたpBluescript（Stratagene、La Jolla、CA）にサブクローニングされた。このpICEmu断片は、Cmu1の約1kbの5'側に位置するHindIII部位からCmu1内のSmaI部位まで及んでいる。得られたプラスミドはSmaI/SpeI消化され、Cmu1の3'側のSmaI部位からCmuの最終エクソンのすぐ下流に位置するXbaI部位にまで及びpICEmu由来の約4kbのSmaI/XbaI断片が挿入された。

#### 【0222】

得られたプラスミド、pTAR1はSmaI部位で直鎖状にされ、neo発現カセットが挿入された。このカセットは、マウスホスホグリセリン酸キナーゼ（pgk）プロモーターの転写制御下のneo遺伝子（XbaI/TaqI断片、Adraら（1987）Gene 60：65～74）を含み、pgkポリアデニル化部位（PvuII/HindIII断片、Boerら（1990）Biochemical Genetics 28：299～308）を含んでいる。このカセットは、neoカセットがEcoRI/HindIII断片として切り出されたプラスミドpKJ1より得られ（Tybulewiczら（1991）Cell 65：1153～1163に記載されている）、pGEM-7（KJ1）を生成するためにEcoRI/HindIII消化されたpGEM-7Zf（+）にサブクローニングされた。このneoカセットはpGEM-7（KJ1）からEcoRI/SalI消化により切り出され、平滑末端化され、プラスミドpTARのSmaI部位にゲノムCmu配列と逆の向きにサブクローニングされた。

#### 【0223】

得られたプラスミドはNotIを用いて直鎖状にされ、ヘルペス単純ウイルスチミジンキナーゼ（tk）カセットが、Mansourら（1988）Nature 336：348～352により記載されているように、相同組換え体を有するESクローン（マウス胚由来幹細胞）を濃縮できるように挿入された。このカセットは、Tybulewiczら（1991）Cell 65：1153～1163に記載されているように、マウスpgkプロモーターおよびポリアデニル化部位には含まれたtk遺伝子のコード配列を含む。得られたCMD標的化ベクターは、重鎖遺伝子座と全体で約5.3kbの類似性を有し、その中にCmuの最

初のエクソンの独特なSmaI部位内に、neo発現カセットが挿入されている変異mu遺伝子を生成するように設計されている。標的化ベクターは、ES細胞へのエレクトロポレーションの前にプラスミド配列内で切断するPvuIを用いて直鎖状にされる。

#### 【0224】

##### 標的化ES細胞の生成および解析

マウスIg重鎖遺伝子断片を含むベクターは、その後、マウス胚性幹細胞（ES細胞）に挿入される。以下のものは、免疫グロブリン遺伝子含有ベクターにより標的化されたES細胞と、ベクターが細胞に挿入された（すなわちトランスフェクトされた）後でES細胞のDNAを解析することとを記載する。

#### 【0225】

AB-1 ES細胞（McMahon、A.P.およびBradley、A.（1990）Cell 62：1073～1085）は、基本的には「奇形癌および胚性幹細胞：実践法（Teratocarcinoma and Embryonic Stem Cells：a Practical Approach）」、E.J.Robertson編、Oxford：IRL出版、p71～112に記載されるように（Robertson、E.J（1987））細胞分裂的に不活性であるSNL76/7細胞フィーダー層（前掲）上で増殖される。直鎖状にされたCMD標的化ベクターは、Hastyら（Hasty、P.R.ら（1991）Nature 350：243～246）に記載されている方法によりAB-1細胞にエレクトロポレーションされた。エレクトロポレーションされた細胞は100mmディッシュに1～2×10<sup>6</sup>細胞/ディッシュの密度でプレーティングされた。24時間後、G418（活性成分で200マイクログラム/ml）およびFIAU（5×10<sup>-7</sup>M）が培地に添加され、薬剤耐性クローンを8～9日間にわたって発生させた。クローンを回収して、トリプシン処理し、2つの部分に分割して、さらに増殖させた。その後、各クローン由来の半分の細胞は凍結され、別の半分はベクターおよび標的配列間の相同組換えに関して解析された。

#### 【0226】

DNA解析をサザンブロットハイブリダイゼーションにより実施した。DNAをLairdら（Laird、P. W.ら（1991）Nucleic Acids Res. 19：4293）に記載されているようにクローンから単離した。単離ゲノムDNAをSpeIで消化し、muイントロンエンハンサーとmuスイッチ領域の間に存在する配列にハイブリダイズする、915bp



のSacI断片であるプローブA(図6)を用いてプロービングした。プローブAは野生型遺伝子座に由来する9.9kbのSpeI断片、およびCMD標的化ベクター(neo発現カセットがSpeI部位を含む)を用いて相同組換えされたmu遺伝子座由来の診断的な7.6kbのバンドを検出する。サザンブロット解析によりスクリーニングされた1132個のG418およびFIAU耐性クローンのうち3つがmu遺伝子座の相同組換えを示す7.6kbのSpeIバンドを示した。これら3クローンはさらに酵素BglII、BstXIおよびEcoRIを用いて消化され、ベクターに相同的にmu遺伝子が組み込まれていることを確認した。プローブAとハイブリダイズさせる場合に、BglII、BstXI、またはEcoRI消化された野生型DNAのサザンブロットは、15.7、7.3、および12.5kbの断片を各々生じ、一方、標的化mu対立遺伝子の存在は、各々7.7、6.6、および14.3kbの断片により示される。SpeI消化により検出された3つの陽性クローン全てで、neoカセットがCmu1エクソンに挿入されたことの特徴である予期されたBglII、BstXI、およびEcoRI制限酵素切断断片が示された。

#### 【0227】

#### 変異mu遺伝子を有するマウスの作製

264、272および408番と名づけられた3個の標的化ESクローンを融解して、Bradleyら(Bradley、A.、「奇形癌および胚性幹細胞：実践法」(1987)、E.J.Robertson編、Oxford:IRL出版、p113~151)に記載されているようにC57BL/6J未分化胚芽細胞に注入した。注入された未分化胚芽細胞は、偽妊娠雌の子宮に移植して、導入ES細胞および宿主未分化胚芽細胞に由来する細胞の混合物を示すキメラマウスを作製した。キメラに寄与しているES細胞の程度は、黒色C57BL/6JのバックグラウンドにおいてのES細胞由来のアグーチ毛色の程度から視覚的に推定することが可能である。クローン272および408は低い割合のキメラ(すなわち低い割合のアグーチ色素沈着)しか生産しなかったが、クローン264は高い割合の雄性キメラを生産した。これらのキメラはC57BL/6J雌と交配され、ES細胞ゲノムの生殖細胞系列伝達を示すアグーチの子孫が生産された。標的化mu遺伝子のスクリーニングは、尾生検由来のBglII消化DNAのサザンブロット解析により実施された(ES細胞DNAの解析のために上述されているように)。約50%のアグーチ子孫が野生型の15.7kbのバンドに加えて、7.7kbのハイブリダイズするBglIIバンドを示し、

標的化 $\mu$ 遺伝子の生殖細胞系列伝達を示す。

### 【0228】

#### $\mu$ 遺伝子の機能的不活性化に関するトランスジェニックマウスの解析

neoカセット (Ig重鎖配列を含む) のCmu1への挿入がIg重鎖遺伝子を不活性化しているかを決定するために、クローン264キメラが、JH遺伝子断片の欠失の結果として重鎖発現を不活性化するJHD変異を同種接合で有するマウス (Chenら、(1993) Immunol. 5: 647~656) と交配された。4匹のアグーチの子孫が生まれた。これらの動物から1ヶ月齢において血清が採取され、マウスIgMが存在に関してELISAでアッセイした。4匹の子孫の内2匹は完全にIgMを欠失していた (表2)。BgII消化およびプローブAを用いたハイブリダイゼーション (図6) およびStuI消化および475bpのEcoRI/StuI断片 (前掲) を用いたハイブリダイゼーションによる尾生検由来のDNAのサザンブロット解析による4匹の動物の遺伝子型判定によって、血清IgMを発現できなかった動物が、重鎖遺伝子座の一つの対立遺伝子がJHD変異を有し、もう一つの対立遺伝子がCmu1変異を有することが証明された。JHD変異の異種接合体であるマウスは、野生型レベルの血清Igを示す。これらのデータはCmu1変異が $\mu$ 遺伝子の発現を不活性化することを証明する。

### 【0229】

【表2】 CMDおよびJHD変異を共に有するマウス (CMD/JHD) ; JHD変異の異種接合体マウス (+/JHD) ; 野生型 (129SvxC57BL/6J) F1マウス (+/+) およびJHD変異の同種接合体であるB細胞欠失マウス (JHD/JHD) のELISAにより検出された血清IgMレベル

マウス	血清IgM ( $\mu$ g/ml)	IgH鎖遺伝子型
42	<0.002	CMD/JHD
43	196	+/JHD
44	<0.002	CMD/JHD
45	174	+/JHD
129 x BL6 F1	153	+/+
JHD	<0.002	JHD/JHD

### 【0230】

実施例25: HCo12トランスジェニックマウスの作製

以下のものはヒト免疫グロブリンを作製することができるヒト免疫グロブリン重鎖遺伝子配列を含むトランスジェニックマウスの作製を記載する。これらのマウスは内因性の（すなわちマウスの）免疫グロブリンを作製することができないため、例えばヒトポリペプチドの抗原感作時にヒト配列免疫グロブリンのみがトランスジェニックマウスにより作製される。

### 【0231】

#### HCo12ヒト重鎖導入遺伝子

HCo12導入遺伝子はpHC2の80kbの挿入物（Taylorら、1994、Int. Immunol., 6: 579~591）およびpVx6の25kbの挿入物の共注入により作製された。プラスミドpVx6は下記のように構築された。約2.5kbの5'隣接および約5kbの3'隣接ゲノム配列とともに生殖細胞系列ヒトVH1-18（DP-14）遺伝子を含む、8.5kbのHindIII/SalI DNA断片は、プラスミドp343.7.16を作製するためにプラスミドベクターpSP72（Promega、Madison、WI）にサブクローニングされた。約5kbの5'隣接および約1kbの3'隣接ゲノム配列と共に生殖細胞系列ヒトVH5-51（DP-73）遺伝子を含む、7kbのBamHI/HindIII DNA断片を、pBR322を基礎とするプラスミドクローニングベクターpGP1f（Taylorら、1992、Nucleic Acids Res. 20: 6287~6295）にサブクローニングして、プラスミドp251fを作製した。

### 【0232】

pGP1fに由来するクローニングベクター、pGP1k（配列番号：1）はEcoRV/BamHIを用いて消化され、約4kbの5'隣接および約5kbの3'隣接ゲノム配列と共に生殖細胞系列ヒトVH3-23（DP47）遺伝子を含む10kbのEcoRV/BamHI DNA断片に連結された。得られたプラスミドp112.2RR.7がBamHI/SalI消化され、p251fの7kbの精製BamHI/SalI挿入物に連結された。得られたプラスミドpVx4はXhoI消化され、p343.7.16の8.5kbのXhoI/SalI挿入物に連結された。

### 【0233】

他の2つのV遺伝子と同じ方向のV<sub>H</sub>1-18を持つプラスミドが得られた。pVx6と名づけられたこのクローンはその後NotIを用いて消化され、精製された26kb挿入物をHoganら（B. Hoganら、「マウス胚操作、実験室マニュアル（Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual）」第2版、1994、コールドスプリング

ハーバーラボラトリー出版、ブレインビュー、NY)に記載されているように1.5日の(C57BL/6JxDBA/2J)F2胚の前核に、pHC2の精製された80kbのNotI挿入物と共に1:1のモル比で共注入した。

#### 【0234】

Vx6およびHC2の両者に由来する配列を含む3つの独立したトランスジェニックマウス系統が、注入された胚から発生したマウスより確立された。これらのトランスジェニックマウス系統は(HCo12)14881、(HCo12)15083、および(HCo12)15087と名づけられた。3系統の各々はその後、実施例23に記載されているCMD変異、JKD変異(Chenら(1993)EMBO J. 12:811~820)および(KCo5)9272導入遺伝子(Fishwildら、1996、Nature Biotechnology 14:845~851)を含むマウスと交配された。得られたマウスは、内因性マウス重鎖および軽鎖遺伝子座が同種接合体で破壊されたバックグラウンドにおいて、ヒト重鎖および軽鎖導入遺伝子を発現する(およびヒト配列重鎖および軽鎖抗体を産生する)。

#### 【0235】

2つの異なる系統のマウスを使用して、ヒトIL-8反応性のハイブリドーマおよびモノクローナル抗体を作製した。((CMD)++;(JKD)++;(HCo7)11952+/++;(KCo5)9272+/++)系統、および((CMD)++;(JKD)++;(HCo12)15087+/++;(KCo5)9272+/++)系統。これらの系統は各々内因性重鎖(CMD)および軽鎖(JKD)遺伝子座が同種接合体で破壊されている。両系統はまた、#11952の挿入が半接合体または同種接合体である個々の動物において、ヒト軽鎖導入遺伝子(HCo7)を含む。その2つの系統は、使用されているヒト重鎖導入遺伝子が異なる。マウスはHCo7またはHCo12導入遺伝子のいずれかにおいて半接合体または同種接合体である。CMD変異は実施例23に前記されている。(HCo12)15087マウスの作製は前記されている。JKD変異(Chenら、1993、EMBO J.12:811~820)および(KCo5)9272(Fishwildら、1996、Nature Biotechnology 14:845~851)および(HCo7)11952マウスは、米国特許第5,770,429号(LonbergおよびKay、6/23/98)に記載されている。

#### 【0236】

実施例26: ビオチン化抗体の調製

精製抗体を最低でも100倍容量のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS)、pH7.4に対し少なくとも4時間透析した。抗体はPBSで終濃度2mg/mlに希釈された。40mMのビオチン-XX-NHSエステル (Molecular Probes、Eugene、OR) を含むストック溶液はジメチルスルホキシドで調製された。ビオチン-XX-NHS溶液を抗体に終濃度0.4 mMで添加し、室温で90分間反応させた。アミノエタンスルホン酸は、終濃度20mMになるように添加され、残存反応基を消滅させるために5分間インキュベーションされた。ビオチン化抗体は、ビオチンを含む低分子を抗体から取り除くために十分に透析された。

#### 【0237】

##### アルカリフォスファターゼ抗体結合体の調製

アルカリフォスファターゼ (AP、カルザイム研究所 (Calzyme Laboratories)、San Luis Obispo、CA) は少なくとも100倍量のカラム緩衝液 (50mMリン酸カリウム、10mMホウ酸、150mM NaCl、1mM MgSO<sub>4</sub>、pH7.0) を用いて少なくとも4時間の間2~8 にて透析に供された。APの使用に先立ち、緩衝液を少なくとも2回交換した。APが透析から除かれ、室温にされ、吸光度0.77を1mg/mL溶液として使用して、280nmの吸光度により濃度を決定した。APIはカラム緩衝液で5mg/mLに希釈された。APとスクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート (SMCC、Pierce Chemical Co.、Rockford、IL) との反応が、20:1比のSMCC:APを用いて実施された。SMCCをアセトニトリルに20mg/mLで溶解し、ボルテックスまたは急速攪拌しながらAPIに添加して84倍に希釈した。未反応SMCCおよび低分子量反応物は、カラム緩衝液で平衡化されたカラム中でゲル濾過クロマトグラフィー (G50ファイン、Pharmacia Biotech、Piscataway、NJ) を用いてAPから分離される前に、溶液は室温で90分間静置された。

#### 【0238】

抗体を少なくとも100倍量のPBSで透析し、PBSで2mg/mLに希釈した。40mMのN-スクシンイミジルS-アセチルチオプロピオネート (SATP、Pierce Chemical Co.、Rockford、IL) を含む溶液をジメチルスルフォキシドで調製し、抗体溶液で終濃度0.32mMに希釈し、室温で90分間インキュベートした。アミノエタンスルホン酸を終濃度20mMになるまで添加し、反応を停止させるために5分間インキュベ-

トした。修飾抗体は、少なくとも100倍量の50mMリン酸カリウム、10mMホウ酸、150mM NaCl、pH7.0を用いて、透析緩衝液が変更される前に少なくとも4時間の間透析され、透析は少なくとも4時間続いた。抗体濃度は吸光度1.6が1mg/mL溶液に相当するとして280nmの吸光度を用いて決定された。ヒドロキシアミンは、0.1Mリン酸カリウム、10mMエチレンジアミン四酢酸、pH7.2中で0.5Mの濃度になるように溶解された。この溶液を、ヒドロキシアミンの終濃度が50mMになるように抗体溶液に希釈し、室温で2時間インキュベーションした。修飾抗体はSMCC-APと等モル量混合され、メルカプトエタノールを終濃度1mM添加する前に室温で1時間インキュベーションし、5分間インキュベーションし、N-エチルマレイミドを終濃度2mMで添加し、5分間インキュベーションした。抗体-酵素結合体は、未結合抗体からSEPHACRYL (商標) S-200 (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) を用いたゲル濾過クロマトグラフィーによりカラム緩衝液中で分離された。結合体は免疫アッセイ法に使用するブロッキング溶液に希釈された。

#### 【0239】

##### 実施例27：IL-8に対するヒトモノクローナル抗体のエピトープマッピング

BIACORE (登録商標) 3000装置 (Biacore AB, Uppsala, Sweden) がエピトープ結合を測定するために使用された。ヤギ抗ヒト鎖抗体 (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) が、ヤギ抗ヒト鎖抗体が10mM酢酸ナトリウム、pH4.0に希釈されたことを除いては、ビアコアアプリケーションノート101 (Biacore AB, Uppsala, Sweden) に記載されているようにCM5センサーチップ (Biacore AB, Uppsala, Sweden) 上に固定された。

#### 【0240】

14種のヒトモノクローナル抗体 (実施例15) が2部位アッセイ法 (two-site assay) (Johnsら、Journal of Immunological Methods、160 (1993)、191~198) を用いてIL-8エピトープをマッピングするために使用された。各抗体は100 µg/mLに希釈され、IL-8は10mM N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンサルホン酸、150mM 塩化ナトリウム、3mM EDTA、0.005%ポリソルベート20、pH7.4 (HBS-EP、Biacore AB, Uppsala, Sweden) で1 µMに希釈された。一次抗体 (M1-10) は、全4チャンネルにわたり20 µLを注入することによりCM5チップ上のヤギ抗

ヒト 鎖抗体に結合された。IL-8 (10  $\mu$ L) は、その後全4チャンネルにおいて一次抗体に結合された。一つの二次抗体 (10  $\mu$ L) が各々のチャンネルを通過させられた。二次抗体の共鳴ユニットは、注入終了後20秒後に測定された。各一次/二次抗体の組み合わせのブランクの共鳴ユニット値はIL-8の代わりにHSA-EPを注入することにより得られ、これらはIL-8と接触された相当する一次/二次抗体の組み合わせについて測定された共鳴ユニットから減算された。ブロッキング抗体の注入は行われなかった。M1-10自身に対するものを除いた、全抗体組み合わせに関する高レベルの共鳴値は、M1-10以外の全ての列記された抗体がM1-10が結合するエピトープとは異なるエピトープに結合しており、これらの抗体の結合はM1-10のIL-8への結合によりほとんど影響されないことを示している。示されていないデータは、M1-10以外の列記された全ての抗体のIL-8に対する結合が、事前に任意の一つをIL-8結合させることにより、IL-8への結合が大きく影響を受けることを示している。

二次モノクローナル抗体	共鳴ユニット
M1-3	839
M1-4	911
M1-5	820
M1-8	888
M1-10	-17
M1-21	706
M1-23	796
M1-25	925
M2-11	798
M2-12	794
M2-16	818
M2-18	754
M2-20	848
M2-34	799

#### 【0241】

##### 実施例28：実験手順

連続的なサンドイッチ酵素結合抗体免疫吸着アッセイ法 (ELISA) が、濃度に対する応答の標準曲線を作製し、各抗体組のアッセイ感度を決定するために実施された。全てのアッセイ法は、約50フェントモルビオチン/ウェルの平均結合能を有する384ウェル黒色ポリスチレンストレプタアビジンコートマイクロプレート (Pierce Chemical Co., Rockford, IL) 中で実施された。固定化抗体により

捕捉された抗原に結合させるために、アルカリホスファターゼ (AP) 標識抗体が使用され、結合はAttoPhos (アットフォス) 基質 (JBL Scientific、San Luis Obispo、CA) を用いて検出された。解析された抗体組はポリクローナルマウス抗体-ビオチン/ポリクローナルマウス抗体-AP、ポリクローナルヒト抗体-ビオチン/ポリクローナルヒト抗体-AP、およびモノクローナルヒト抗体M1-10-ビオチン/モノクローナルヒト抗体M1-25-APであった。ポリクローナルヒト抗体およびポリクローナルマウス抗体はともに、 $10^9 \text{M}^{-1}$  のより低い親和性のカットオフ値を用いてIL-8への結合に関して選択された。両モノクローナル抗体は、ポリクローナルヒトライブラリーから選択された。ポリクローナルマウス抗体ライブラリーを、1nMのビオチン化IL-8を用いた多数回の選択を行い、1998年4月3日に出願されたPCT98/06704に記載のように得た。試薬のピペティングはTECAN Genesis RSP200/8口ボット試料処理機 (TECAN U. S. Inc、Research Triangle Park、NC) を用いて実施された。個々のマイクロプレートウェルはTECANコロンブス384ウェルストリップ洗浄機を用いて洗浄され、各マイクロプレートウェルの動力学的蛍光光度はTECAN SpectraFluor Plusマイクロプレートリーダーにより430nmの励起波長および570nmの発光波長を用いて決定された。全てのピペティング法は、TECAN Gemini3.0液体ハンドリングソフトウェアを用いてプログラムされた。全てのTECAN口ボットリソースをTECANマルチスケジューラーソフトウェアFACT4.5を用いて制御した。

#### 【0242】

解析される試料は、結合体希釈液 (CD8 ; 10mMトリス、150mM塩化ナトリウム、1mM塩化マグネシウム、0.1mM塩化亜鉛、0.1%ポリビニルアルコール、1%ウシ血清アルブミン、0.1%アジ化ナトリウム、pH8.15) 中で1:4.5に希釈された。標準曲線は結合体希釈液または添加された様々な濃度のインターロイキン8 (IL-8) を含むプール正常血漿のいずれかの試料を用いて作製された。2  $\mu\text{g/ml}$  のビオチン化ポリクローナルマウス抗体、ポリクローナルヒト抗体、またはモノクローナルヒト抗体M1-10のCD8溶液40  $\mu\text{l}$  が、個々のマイクロプレートウェルにピペット分注された。マイクロプレートは25℃にて1時間インキュベートされ、個々のウェルは洗浄緩衝液 (20mMホウ酸、150mM塩化ナトリウム、0.02%ポリオキシエ



チレン20-ソルビタンモノラウレート、0.1%アジ化ナトリウム、pH8.2)を用いてオーバーフロー様式で3回洗浄された。40  $\mu$ lの解析試料は、個々のマイクロプレートウェルにピペット分注され、プレートは25℃で1時間インキュベートされた。個々のマイクロプレートウェルは洗浄緩衝液を用いて3回洗浄され、CD8中の5  $\mu$ g/mlアルカリホスファターゼ標識抗体40  $\mu$ lが個々のマイクロプレートウェルにピペット分注された。ポリクローナルマウス抗体-AP、ポリクローナルヒト抗体-AP、およびモノクローナルヒト抗体M1-25-APが、それぞれポリクローナルマウス抗体-ビオチン、ポリクローナルヒト抗体-ビオチン、およびモノクローナルヒト抗体M1-10-ビオチンと組み合わせられた。マイクロプレートは25℃にて1時間インキュベートされ、個々のウェルは洗浄緩衝液を用いて6回洗浄された。2.4Mジエタノールアミン、0.057mMの塩化マグネシウム、0.005%のアジ化ナトリウム、pH10.0中の1mMアットフォス基質40  $\mu$ lが各マイクロプレートウェルにピペット分注され、動力学的蛍光光度が20分間計測された。ヒト抗マウス抗体 (HAMA) または異好性抗体を含むことが知られている試料は購入された (Scantibodies、Inc、Santee、CA)。全てのHAMA陽性および標準曲線試料は4回の試験で解析された。

#### 【0243】

データ解析に使用された全ての統計学的計算およびグラフはマイクロソフトエクセル97を用いて行われた。各ウェルの動力学的蛍光光度は、0.1xミリ-1秒当りの相対蛍光ユニット (0.1xmRFU/秒) の単位を用いて応答の傾きを計算することにより定量化された。標準曲線は濃度 (X軸) に対してブランク補正傾き (0.1xmRFU/秒、Y軸) をプロットすることにより各抗体組に対して作製された。曲線の直線部分の相関計数が決定された。アッセイ感度は標準曲線から計算され、標準偏差2倍分を加えた、アッセイブランク (陰性対照、分析物非存在下) の傾きと等しい傾きに相当する分析物濃度として定義される。傾き (0.1xmRFU/秒) は、添加された様々な濃度のIL-8を用いて血漿試料から作製された標準曲線を用いて、全てのHAMA陽性試料に対して濃度 (pM) に変換された。

#### 【0244】

連続的なサンドイッチELISAを用いたヒト血漿試料中のIL-8濃度を検出するた

めのポリクローナルマウス抗体、ポリクローナルヒト抗体の感度はそれぞれ65.2 pM、30.7pMおよび1.3pMと計算された。連続的なサンドイッチELISAを用いたヒト血漿試料中のIL-8濃度を検出するためのポリクローナルマウス抗体、ポリクローナルヒト抗体の標準曲線のブランク補正後の直線部分の相関計数はそれぞれ0.912、0.993および0.998と計算された。

### 【0245】

表に提供されているデータは、ヒト抗体を使用した結果としてL-8濃度の値の劇的な低下を示している。ヒト抗体ベースのアッセイ法はマウス抗体ベースのアッセイ法よりも十分感度が高いので、これらの結果はポリクローナルマウス抗体ベースのアッセイ法を用いて決定された、アッセイ法の検出限界以上である見かけ上のこれら試料中のIL-8濃度は、試料中のHAMAまたは異好性抗体のために誤って上昇していることを示している。

### 【0246】

【表5】

試料ID	傾き (0.1xmRFU/ 秒), ブランク補正済み			[IL-8] (pM)		
	ポリクローナル マウス 抗体	ポリクローナル ヒト 抗体	モノクローナル ヒト 抗体M1 10/M1-25	ポリクローナル マウス 抗体	ポリクローナル ヒト 抗体	モノクローナル ヒト 抗体M1 10/M1-25
HAMA- 陽性ヒト血漿						
11882-201	0.2671	0.5830	0.6530	31.42	1.27	1.30
11879-966	0.4351	0.2260	0.1397	51.19	0.49	0.28
2172-51	4.3512	3.9161	3.7688	511.91	8.55	7.49
11658-332	16.0843	0.9385	1.7111	1892.27	2.05	3.40
11879-857	46.8286	0.8811	0.3661	5509.25	1.92	0.73
2161-17	20.1484	0.7397	0.9231	2370.40	1.61	1.84
11707-22	7.4092	1.7971	2.5912	871.67	3.92	5.15
11707-31	16.0596	0.1015	2.4966	1889.36	0.22	4.96
11879-819	5.1529	0.3544	0.5127	606.22	0.77	1.02
11658-88	2.3892	0.6264	0.7798	281.08	1.37	1.55
2160-52	0.8846	0.6428	1.0283	104.07	1.40	2.04
2154-7	25.5515	0.8860	2.7664	3006.06	1.93	5.50
10132-523	54.9596	0.6422	0.6183	6465.83	1.40	1.23
9881-276	6.9326	1.6051	2.2132	815.60	3.50	4.40
11906-47	5.5530	0.2734	0.7166	653.29	0.60	1.43
11879-210	50.7084	0.7032	0.5550	5965.69	1.54	1.10
異好性ヒト血漿						
10049-320	8.4718	0.3944	-0.1345	996.68	0.86	-0.27
2217-1	0.1872	0.1965	0.1952	22.03	0.43	0.39
10049-114	0.5470	0.5707	0.1850	64.36	1.25	0.37
10060-285	0.4577	0.2119	0.0569	53.84	0.46	0.11

### 【0247】

実施例29：酸化トロポニンIの調製

心臓のトロポニンI (Bio-tech International社、シアトル、ワシントン州) を、100 mM リン酸カリウム、50 mM ホウ酸カリウム、1 M NaCl、pH 7.0に対して十分透析を行った。透析後、1 M  $H_2O_2$  をタンパク質に最終濃度が20 mMになるように添加し、この混合物を室温で30分インキュベートした。トロポニンIの酸化溶液を透析チューブに移し、100 mM リン酸カリウム、50 mM ホウ酸カリウム、1 M NaCl、1.4  $\mu$ g/ml カタラーゼ、pH 7.0に対して3時間室温で透析を行った。3時間後、このタンパク質を、100 mM リン酸カリウム、50 mM ホウ酸カリウム、1 M NaCl、pH 7.0に対して2回透析を行い、次に100 mMリン酸カリウム、50 mM ホウ酸カリウム、0.5 M NaCl、pH 7.0に対して少なくとも4時間かけて、それぞれ1回2~8 で透析を行った。

#### 【0248】

実施例30：ビオチン化C反応性タンパク質、ビオチン化トロポニン複合体 (TIC)、およびビオチン化酸化トロポニンの調製

トロポニン複合体および酸化トロポニンを対象に、2 mM  $CaCl_2$  を添加した最小100容量の20 mM ホウ酸、150 mM NaCl、pH 8 (BBS) に対して2~8 で少なくとも4時間透析を行った。この緩衝液は、ビオチン化する前に少なくとも1回交換した。トロポニン複合体および酸化トロポニンを、ビオチン-XX-NHSエステル (Molecular Probes、ユージーン、オレゴン州、ジメチルホルムアミドを溶媒とする40 mMのストック溶液) と、最終濃度が、TICの場合は0.1 mMとなるように、また酸化トロポニンの場合は0.2 mMとなるようにして1時間室温で反応させた。1時間後、このタンパク質を2 mM  $CaCl_2$  を添加したBBS中で十分透析を行い、未反応の小分子を除去した。

#### 【0249】

C反応性タンパク質 (Scripps Laboratories、San Diego、CA) は、 $CaCl_2$  が存在しないこと以外は、上記と同様にビオチン化された。

#### 【0250】

実施例31：TIC免疫マウスに由来するポリクローナルファージの濃縮

5つの脾臓に由来するcDNAをPCR法で増幅し (実施例3、HCo12)、実施例7の通りにBS47ウラシル鋳型を用いて第1回目の抗体ファージを調製した。変異導入用D

NAの10回のエレクトロポレーション（各脾臓で2回のエレクトロポレーションを行う）を行い、10種の異なるファージ試料を得た。0.92mLのファージ、30  $\mu$ Lの300mg/mL BSA、2  $\mu$ Lの1M  $\text{CaCl}_2$ 、50  $\mu$ Lの1M TRIS、pH 8.0および10  $\mu$ Lの $10^{-7}$  MのTIC-ビオチン（実施例30）を混合して一晩2～8 でインキュベートすることで第1回目のパニング用のファージを調製した。抗体ファージ試料を対象に、実施例13の通りにアビジン磁性ラテックスを用いてパニングを行った。唯一の差は、パニング用緩衝液に2 mM  $\text{CaCl}_2$  も含まれる点である。このパニング用緩衝液は、本実施例に記載されたすべてのパニング段階に使用した。

#### 【0251】

得られた第2回目の抗体ファージ試料を、実施例13の通りに7F11磁性ラテックスを用いたパニング法で多価提示について濃縮した。TIC-ビオチンによるパニング法は、900  $\mu$ Lの7F11/デカペプチド濃縮ファージ、2  $\mu$ Lの1 M  $\text{CaCl}_2$ 、100  $\mu$ Lのパニング用緩衝液、および10  $\mu$ Lの $10^{-7}$  M TIC-ビオチンを混合することで各試料に対して調製した。2～8 で一晩インキュベートした後に、ファージ試料を対象に上述の通りにアビジン磁性ラテックスでパニングを行った。

#### 【0252】

得られた第3回目の抗体ファージ試料を、多価提示について再び濃縮し、溶出したファージを、上述の通りにTIC-ビオチンで調製した。2～8 で一晩インキュベートした後に、ファージ試料を対象に、上述の通りにアビジン磁性ラテックスでパニングを行った。各試料の一定分量を、100 mmのLB寒天プレートに播種して、陽性の割合を決定した（実施例12）。第3回目のパニングにおける陽性の割合は91～97%であった。

#### 【0253】

第4回目の抗体ファージ試料の力価を実施例13の通りに測定した。プールされた抗体ファージは、900  $\mu$ Lのパニング用緩衝液、100  $\mu$ Lの第4回目でプールされた抗体ファージを用いて上述の通りに第4回目の機能パニング用に2通りに調製した。一方の試料（フォアグラウンド）は10  $\mu$ Lの $10^{-7}$  M TIC-ビオチンを受容し、もう一方の試料（バックグラウンド）はTIC-ビオチンを受容せず、ファージと磁性ラテックスの非特異的な結合をモニタリングするためのブランクとして用

いた。2～8 で一晚インキュベートした後に、ファージ試料を対象に、上述の通りにアビジン磁性ラテックスでパニングを行った。翌日、第5回目の抗体ファージを溶出し、フォアグラウンドプレートおよびバックグラウンドプレート上のプラーク数を数えた。フォアグラウンド：バックグラウンドの比は149：1であった。

#### 【0254】

第5回目の抗体ファージ試料をトロポニン複合体に特異的な抗体を作製するために、過剰量の非ビオチン化トロポニンICを用いてパニングした。パニングは、10  $\mu$ Lの $10^{-7}$ M TICビオチンに加えて、10  $\mu$ Lの350  $\mu$ g/mLの非標識ICを添加した点をのぞいては、上記の4回目のファージに関して記載されているものと本質的には同様に設定された。2～8 で一晚インキュベーションした後、ファージ試料を上記のようにアビジン磁性ラテックスを用いてパニングした。翌日5回目の抗体ファージが溶出され、プラークの数がフォアグラウンドおよびバックグラウンドのプレートで計数された。フォアグラウンド：バックグラウンド比は約1500：1であった。

#### 【0255】

抗体ファージ集団は、オリゴヌクレオチド1161および1182が抗体遺伝子挿入物を増幅するために使用された点を除いては、実施例15に記載されているように発現ベクターのサブクローニングされエレクトロポレーションされた。

#### 【0256】

プライマー1161 5'-TC GCT GCC CAA CCA GCC ATG GCC

プライマー1182 5'-GT GAT AAA CTA CCG CAT TA AAG CTT ATC GAT GAT  
AAG CTG TCA A TTA GTG ATG GTG ATG GTG ATG ACA TTT GG

#### 【0257】

実施例32：C反応性タンパク質で免疫化されたマウスからのポリクローナルファージの濃縮

C反応性タンパク質に特異的なポリクローナルファージは、以下の変更を行って、概して実施例31に記載されているように選択された。ファージライブラリー

は3匹のHCo7マウスおよび2匹のHCo12マウスから単離されたRNAから作製され、C反応性タンパク質ビオチン（実施例30）は各回の選抜において $10^{-9}$ Mの終濃度で使用され、パニング用緩衝液は $\text{CaCl}_2$ を含まなかった。ファージライブラリーは5回の機能的パニングの後、抗体カセットを増幅するためのオリゴヌクレオチド1161および1182を用いて、サブクローニングされた。

#### 【0258】

実施例33：酸化トロポニンIで免疫化されたマウスからのポリクローナルファージの濃縮

酸化トロポニンIに特異的なポリクローナルファージは、以下の変更を行って、概して実施例31に記載されているように選択された。ファージライブラリーは5匹のHCo7マウスから単離されたRNAから作製され、酸化トロポニンビオチン（実施例30）は各回の選抜において $10^{-9}$ Mの終濃度で使用され、高塩濃度結合体希釈液（1%ウシ血清アルブミン（30%BSA由来、Bayer、Kankakee、IL）、10mM MOPS、650mM NaCl、1mM  $\text{MgCl}_2$ 、0.1mM  $\text{ZnCl}_2$ 、0.25%カゼイン、0.1%ポリビニルアルコール（80%加水分解物、Aldrich Chemical Co.、Milwaukee、WI）pH7.0）がパニング用緩衝液の代わりに使用された。ファージライブラリーは5回の機能的パニングの後、抗体カセットを増幅するためのオリゴヌクレオチド1161および1182を用いて、サブクローニングされた。

#### 【0259】

実施例34：2つの標的抗原を検出するための16個の高親和性ヒト抗体のアレイ

連続的なサンドイッチ酵素免疫アッセイ法は、標的抗原を含む試料を解析するためにモノクローナルヒト抗インターロイキン-8（IL-8）抗体およびヒト抗C反応性タンパク質（CRP）抗体の2つの8x8アレイを用いて実施された。いくつかの試料においては既知濃度のIL-8がプール化された正常ヘパリン処理血漿に添加され、別の試料は既知濃度のCRP抗原を、10mM MOPS、pH7、650mM塩化ナトリウム、1mM塩化マグネシウム、0.1mM塩化亜鉛、2mM塩化カルシウム、0.1%ポリビニルアルコール、1%ウシ血清アルブミン、および0.1%アジ化ナトリウムを含むマトリックス（HSCD）に添加することにより作製された。5種の異なる濃度のIL-8およびCRP抗原が、校正物質溶液を調製するために使用された。IL-8が、抗IL-8抗体

を用いたアッセイ用のヘパリン処理血漿に添加された。CRPは、抗CRP抗体を用いたアッセイ用のHSCDに添加された。レベル0は、抗原を添加せず、内因性のIL-8をブロッキングするために1  $\mu$ g/mlの終濃度の未結合型ヒト抗IL-8抗体を有するプール化ヘパリン処理血漿、または抗原を添加しないHSCDであった。レベル1は20pg/mlのIL-8または0.1ng/mlのCRPを含んでいた。レベル2は100pg/mlのIL-8または1ng/mlのCRPを含んでいた。レベル3は500pg/mlのIL-8または5ng/mlのCRPを含んでいた。レベル4は1ng/mlのIL-8または10ng/mlのCRPを含んでいた。レベル5は5ng/mlのIL-8または20ng/mlのCRPを含んでいた。全てのアッセイ法は384ウェル黒色Maxi-Sorbポリスチレンマイクロプレート (Nalge Nunc International、Rochester、NY) 中で実施された。ヒト抗IL-8抗体MED002.1.10、MED002.1.25.1.4、MED002.1.25.1.5、MED002.1.25.1.9、MED002.1.25、MED002.1.4、MED002.1.3、およびMED002.1.5、ならびにヒト抗CRP抗体CAR007.1.1、CAR007.1.11、CAR007.1.12、CAR007.1.14、CAR007.1.16、CAR007.1.20、CAR007.1.6、およびCAR007.1.18が、各抗体がその標的抗原に対する他の全てのモノクローナル抗体と、全ての可能な固相/液相の組み合わせで対にされている8x8アレイ中で使用された。試薬のピペッティングはTECAN Genesis RSP200/8口ロボット試料処理機 (TECAN U.S. Inc、Research Triangle Park、NC) を用いて実施された。個々のマイクロプレートウェルはTECANコロンブス384ウェルストリップ洗浄機を用いて洗浄され、各マイクロプレートウェルの動力学的蛍光光度はTECAN SpectraFluor Plusマイクロプレートリーダーにより430nmの励起波長および570nmの発光波長を用いて決定された。全てのピペッティング法はTECAN Gemini3.0液体ハンドリングソフトウェアを用いてプログラムされた。全てのTECANロボットリソースはTECANマルチスケジューラーソフトウェアFACT4.5を用いて制御された。

#### 【0260】

抗体を50mM炭酸緩衝液pH9.6で10  $\mu$ g/mlの終濃度に希釈した。384ウェルのマイクロプレートの各列は30  $\mu$ lの特殊な抗体を受領し、マイクロプレートはシールされ4 にて一晩インキュベーションされた。全16個のモノクローナル抗体において、各々の標的抗原に対する8個がマイクロタイタープレートの列にわたり配置された。抗体溶液は除去され、個々のウェルは室温にて2時間HSCD60  $\mu$ lを用い

てブロッキングされた。マイクロプレートのウェルは洗浄緩衝液（20mMホウ酸、150mM塩化ナトリウム、0.02%ポリオキシエチレン20-ソルビタンモノラウリン酸、0.1%アジ化ナトリウム、pH8.2）を用いてオーバーフロー様式で4回洗浄された。10  $\mu$ lの抗原（IL-8用ヘパリン処理血漿およびCRPアッセイ用HSCD）がマイクロプレートウェルに添加され、プレートは室温で1時間インキュベートされた。マイクロプレートウェルは、洗浄緩衝液を用いて3回洗浄され、アレイは10  $\mu$ lのHSCD中1  $\mu$ g/mlのビオチン化型の各抗体をマイクロプレートウェルの各行に添加することにより完了された。マイクロプレートは室温で1時間インキュベーションされ、洗浄緩衝液を用いて3回洗浄された。10  $\mu$ lのHSCD中1：300希釈ニュートラライトアビジンアルカリホスファターゼ（Southern Biothchnology Association、Birmingham、AL）が各ウェルに添加され、マイクロプレートは室温で1時間インキュベーションされ、洗浄緩衝液を用いて9回洗浄された。2.4Mジエタノールアミン、0.057mMの塩化マグネシウム、0.005%のアジ化ナトリウム、pH10.0中の1mMアットフォス基質（Scientific、San Luis Obispo、CA）10  $\mu$ lが各マイクロプレートウェルにピペット分注され、動力学的蛍光光度が16分間計測された。

#### 【0261】

データ解析に使用された全ての統計学的計算およびグラフはマイクロソフトエクセル97を用いて行った。各ウェルの動力学的蛍光光度は、0.1xミリ-1秒当りの相対蛍光ユニット（0.1xmRFU/秒）の単位を用いて応答の傾きを計算することにより定量化された。

#### 【0262】

表6に提供されるデータは、各抗原レベルについて、アレイ中の各抗体組から得られた生の反応速度データを示す。

#### 【0263】

CRPに結合しCAR007と称されるモノクローナル抗体は、固定化および液相モノクローナル抗体の全ての可能な組み合わせでアレイ化された。標的抗原CRPの濃度に比例するサンドイッチアッセイ応答は、評価された全ての固定化（一次）および液相（二次）抗体の組み合わせで明確となった。固定化モノクローナル抗体が標的抗原に結合し、その後、同一のモノクローナル抗体をサンドイッチアッセ



イ法に用いて標的抗原を検出可能にするためには、モノクローナル抗体により結合されるエピトープは2またはそれ以上のコピー数が標的抗原上に存在しなければならない。CRPの場合は、タンパク質は5個の同一のサブユニットからなり、それゆえ5コピーの同一エピトープを有すると考えられることが知られている。この知識がない場合にも、この実験より、アレイ中のモノクローナル抗体により結合される各々のエピトープについて標的抗原が多量体であると導き出すことができると思われる。

#### 【0264】

IL-8に結合するモノクローナル抗体は2つの群に分類することができる。これらの抗体のいずれの組み合わせも標的抗原の濃度に比例したサンドイッチアッセイ応答を生じないので、抗体MED002.1.10、MED002.1.25.1.4、MED002.1.25.1.5およびMED002.1.25.1.9を含む第1の群は、IL-8上の単一エピトープに結合する。これらの抗体のいずれの組み合わせも標的抗原の濃度に比例したサンドイッチアッセイ応答を生じないので、抗体MED002.1.25、MED002.1.4、MED002.1.3およびMED002.1.5を含む第2の群は、IL-8上の単一エピトープに結合する。第1の群の抗体が結合するエピトープと第2のグループの抗体が結合するエピトープは異なり、第1の群から一つおよび第2のグループから一つのものクローナル抗体の全ての可能な対の組み合わせにおいて、標的抗原の濃度に比例したサンドイッチアッセイ応答を示すことができるほど、これら2つのエピトープは互いに十分に分離されている。

#### 【0265】

アッセイ応答は標的抗原の濃度に比例しているため、本明細書に示された固定化抗体アレイは試料中の複数の標的抗原を定量化できる能力を証明している。アレイはさらに、異なる対のものクローナル抗体の結合特性を検討することに基づいて、標的抗原に関する貴重な情報を提供することが可能である。例えば同一のものクローナル抗体がCRPを捕捉し検出するために使用できることの証拠は、CRPが多エピトープの抗原であることを示している。

#### 【0266】

#### 【表6】

二次抗体 (液相)

レベリ5		レベリ4		レベリ3		レベリ2		レベリ1											
CAR007.11	0.96	1.34	2.51	2.49	0.75	1.10	1.18	0.65	MED002.110	2.40	1.01	2.77	0.84	3.31	1.03	5.12	3.55	MED002.125	3.55
CAR007.111	1.42	1.80	1.52	1.72	0.90	0.67	0.94	0.60	MED002.125.14	1.11	1.07	0.60	0.92	1.28	0.59	4.31	3.16	MED002.125.14	3.16
CAR007.112	1.55	1.77	2.05	2.55	0.71	0.81	1.40	0.65	MED002.125.15	2.11	1.81	0.39	0.55	2.22	0.52	2.28	2.01	MED002.125.15	6.93
CAR007.114	1.64	2.53	2.80	3.81	1.73	1.60	3.11	1.35	MED002.125.19	0.52	0.56	0.03	0.27	0.75	0.92	2.98	2.58	MED002.125.19	6.41
CAR007.116	1.70	1.19	1.47	1.27	0.41	0.57	1.29	0.89	MED002.14	2.65	1.75	3.14	0.73	3.59	2.92	4.46	4.46	MED002.14	4.31
CAR007.120	0.97	5.04	1.92	2.15	0.58	0.91	1.22	0.99	MED002.14.1	1.12	1.12	2.49	0.91	1.41	1.03	1.18	1.18	MED002.14.1	2.27
CAR007.16	0.70	1.35	2.46	3.15	0.58	0.81	1.42	0.96	MED002.14.2	3.17	1.53	2.44	2.44	2.54	2.05	3.54	4.31	MED002.14.2	4.31
CAR007.118	0.78	1.02	1.50	0.95	1.10	0.98	1.28	0.63	MED002.14.3	4.89	4.23	4.57	3.19	6.31	3.33	3.00	1.29	MED002.14.3	1.29
CAR007.113	1.59	1.27	2.45	2.43	1.10	1.19	1.41	0.79	MED002.14.4	2.95	1.03	0.98	0.98	4.17	2.83	7.05	4.46	MED002.14.4	4.46
CAR007.114	1.45	1.19	2.57	3.43	0.92	1.12	1.21	1.32	MED002.14.5	0.97	0.72	0.95	0.95	4.10	1.68	2.11	2.83	MED002.14.5	2.83
CAR007.114.1	1.16	1.35	3.12	4.02	2.54	2.94	3.16	1.51	MED002.14.5.1	0.92	0.92	0.92	0.92	1.58	1.14	5.60	2.43	MED002.14.5.1	2.43
CAR007.116	1.26	1.81	3.13	3.46	1.73	1.70	2.68	1.44	MED002.14.5.2	4.85	3.58	5.17	1.73	7.32	4.13	6.99	6.92	MED002.14.5.2	6.92
CAR007.116.1	2.95	1.72	2.65	3.23	1.70	1.50	1.40	1.26	MED002.14.5.3	2.16	3.64	4.72	2.97	7.45	1.95	2.03	3.17	MED002.14.5.3	3.17
CAR007.118	1.55	1.33	2.60	3.83	1.18	0.90	1.31	1.26	MED002.14.5.4	4.96	4.76	4.76	4.13	5.52	2.78	5.14	6.44	MED002.14.5.4	6.44
CAR007.118.1	1.65	1.13	2.72	2.58	1.40	1.92	1.11	1.13	MED002.14.5.5	7.75	3.75	6.11	3.16	8.82	4.75	7.13	10.46	MED002.14.5.5	10.46
CAR007.11	2.52	2.43	2.50	4.43	1.51	1.74	2.19	1.72	MED002.110	2.95	0.95	1.00	0.99	5.18	3.50	8.99	6.13	MED002.110	6.13
CAR007.111	4.42	4.58	5.15	3.49	3.20	2.72	3.51	3.12	MED002.125.14	0.97	0.96	0.96	0.96	4.02	2.23	4.49	3.77	MED002.125.14	3.77
CAR007.112	6.58	5.82	5.80	9.50	1.68	3.36	3.12	3.68	MED002.125.15	2.54	1.70	3.85	0.44	6.94	4.53	9.94	9.74	MED002.125.15	9.74
CAR007.114	3.00	3.32	3.62	6.33	2.97	2.36	4.28	3.01	MED002.125.19	0.46	0.45	0.45	0.44	4.22	2.65	1.92	1.08	MED002.125.19	1.08
CAR007.116	5.24	6.35	6.35	10.12	2.96	3.33	3.31	3.61	MED002.125	3.96	3.10	5.15	3.15	7.82	2.95	5.56	7.57	MED002.125	7.57
CAR007.120	4.10	12.72	4.54	5.43	3.76	3.43	3.25	3.94	MED002.14	2.43	3.13	4.13	1.77	1.63	0.56	1.74	4.46	MED002.14	4.46
CAR007.16	2.20	1.27	4.52	6.08	2.34	2.51	1.69	1.67	MED002.13	4.31	3.46	5.36	1.74	4.46	0.56	1.74	4.46	MED002.13	4.46
CAR007.118	1.77	2.29	3.12	3.30	2.02	2.35	0.93	1.24	MED002.15	4.61	3.43	4.56	3.36	4.25	7.62	3.26	4.95	MED002.15	4.95
CAR007.11	16.83	6.57	8.74	6.84	6.04	4.44	4.44	2.78	MED002.110	2.00	0.81	0.82	0.83	14.51	9.43	16.28	12.10	MED002.110	12.10
CAR007.111	17.02	23.01	19.49	19.49	13.62	9.59	13.32	13.32	MED002.125.14	0.57	0.61	0.71	0.71	41.03	5.15	16.83	10.97	MED002.125.14	10.97
CAR007.112	17.51	17.93	24.66	13.62	15.42	10.50	16.82	9.71	MED002.125.15	2.54	1.19	3.25	0.54	10.12	7.79	8.94	9.96	MED002.125.15	9.96
CAR007.114	9.92	9.55	11.93	14.91	9.19	9.56	9.71	3.18	MED002.125.19	0.55	0.60	0.40	0.31	10.12	7.79	8.94	9.96	MED002.125.19	9.96
CAR007.116	16.61	20.23	21.18	25.64	8.77	15.42	10.58	16.43	MED002.125	7.14	9.29	12.29	5.44	7.83	3.46	5.85	7.78	MED002.125	7.78
CAR007.120	17.78	17.57	19.23	19.65	16.39	15.26	10.63	10.63	MED002.14	6.38	10.75	13.93	7.71	2.98	1.17	2.98	1.17	MED002.14	1.17
CAR007.118	9.12	9.30	12.64	13.47	6.03	6.09	1.18	6.19	MED002.15	8.16	10.63	12.13	6.01	5.75	2.21	3.99	4.91	MED002.15	4.91
CAR007.11	8.45	9.30	12.64	13.47	6.03	6.09	1.18	6.19	MED002.15	8.16	10.63	12.13	6.01	5.75	2.21	3.99	4.91	MED002.15	4.91
CAR007.111	12.69	11.55	11.82	11.82	11.76	13.78	11.44	12.42	MED002.110	2.59	0.97	3.24	0.43	18.14	13.92	20.42	19.09	MED002.110	19.09
CAR007.112	25.24	31.58	29.72	28.31	26.50	19.08	27.45	27.45	MED002.125.14	0.60	0.60	0.69	0.69	11.89	14.24	18.54	13.95	MED002.125.14	13.95
CAR007.114	30.40	30.75	30.15	30.75	28.96	27.62	28.52	28.52	MED002.125.15	2.15	1.02	3.16	0.19	24.11	20.26	26.03	25.67	MED002.125.15	25.67
CAR007.116	16.19	17.13	16.57	20.72	16.12	15.46	16.74	17.51	MED002.125.19	0.31	0.36	0.46	0.46	14.23	11.27	13.56	13.67	MED002.125.19	13.67
CAR007.118	28.66	32.35	32.31	30.57	21.49	20.32	16.77	16.77	MED002.14	8.05	14.97	17.05	1.66	7.71	0.82	1.92	1.73	MED002.14	1.73
CAR007.120	28.61	29.25	29.23	29.23	28.03	29.34	28.49	28.49	MED002.14.1	2.94	4.57	6.76	1.66	7.71	0.82	1.92	1.73	MED002.14.1	1.73
CAR007.118	13.13	14.24	14.26	29.15	19.61	17.19	2.94	9.19	MED002.14.2	9.99	11.88	16.48	11.23	4.43	1.13	3.47	4.18	MED002.14.2	4.18
CAR007.11	22.59	21.76	23.51	20.31	25.50	21.63	22.16	22.16	MED002.14.3	10.15	10.23	16.48	9.24	4.63	3.43	3.43	3.43	MED002.14.3	3.43
CAR007.111	26.71	25.27	24.57	24.50	48.95	45.30	39.61	42.16	MED002.14.4	2.93	6.46	4.23	0.50	83.33	52.24	61.72	56.71	MED002.14.4	56.71
CAR007.112	41.83	46.27	48.50	43.46	48.95	45.30	39.61	42.16	MED002.14.5	0.50	6.46	4.23	0.50	83.33	52.24	61.72	56.71	MED002.14.5	56.71
CAR007.114	31.55	31.60	25.97	32.48	48.40	45.30	39.61	42.16	MED002.14.5.1	6.31	10.81	4.28	0.59	83.33	52.24	61.72	56.71	MED002.14.5.1	56.71
CAR007.116	50.24	49.58	48.61	51.50	27.92	26.50	29.63	29.63	MED002.14.5.2	30.72	5.75	4.28	0.59	83.33	52.24	61.72	56.71	MED002.14.5.2	56.71
CAR007.118	70.16	70.43	68.61	64.98	31.81	30.42	30.72	30.72	MED002.14.5.3	30.72	5.75	4.28	0.59	83.33	52.24	61.72	56.71	MED002.14.5.3	56.71
CAR007.120	70.16	70.43	68.61	64.98	31.81	30.42	30.72	30.72	MED002.14.5.4	30.72	5.75	4.28	0.59	83.33	52.24	61.72	56.71	MED002.14.5.4	56.71
CAR007.118	70.16	70.43	68.61	64.98	31.81	30.42	30.72	30.72	MED002.14.5.5	30.72	5.75	4.28	0.59	83.33	52.24	61.72	56.71	MED002.14.5.5	56.71

### 【図面の簡単な説明】

【図1】 イクシス社 (Ixsys Inc) から入手し、Huseの国際公開公報第92/06204号に記載されている、ファージ提示ベクターを生産するための出発材料を提供するベクターを示す。以下の略語が使用される。

- A 後に削除される非必須DNA配列
- B Lacプロモーターおよびリボソーム結合部位
- C ペクチン酸リアーゼシグナル配列
- D 鎖可変領域
- E 鎖定常領域
- F 鎖および重鎖間を分断するDNA配列は重鎖のリボソーム結合部位を含む

- G アルカリホスファターゼシグナル配列
- H 重鎖可変領域
- I ヒンジ領域の5アミノ酸を含む重鎖定常領域
- J デカペプチドDNA配列
- K 5'末端にアンバー停止コドンをもつ偽遺伝子VIII配列
- L 後に削除される非必須DNA配列

【図2】 ベクターの構築に使用されるオリゴヌクレオチド。

【図3】 pBRncoH3ベクターの地図。

【図4】 pBRを基礎とするベクターへのaraCの挿入（図4A）および得られたベクターpBRnco（図4B）。

【図5】 T4エクソヌクレアーゼ消化によるFabをコードするDNA断片のサブクローニング。

【図6】 mu1エクソンのSmaI部位へのneoカセットの標的化挿入。A.mu遺伝子座のゲノム構造の概略図。黒塗りの箱はmuのエクソンを示す。B.CmuD標的化ベクターの概略図。点線は構築物中に含まれるmuゲノム配列を示す。プラスミド配列は示さない。C.neoカセットがmu1に挿入されている標的化mu遺伝子座の概略図。右側の箱は標的化構築物とmu遺伝子座との間の相同組換えにおけるRFLP診断を示す。FGLPは、Cに示される915のSal断片であるプローブAを用いたサザンブロットハイブリダイゼーションにより検出された。

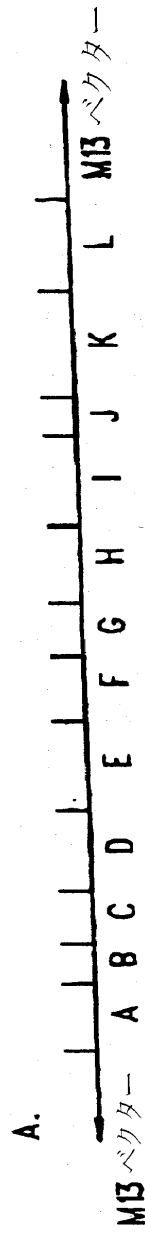
【図7】 非生殖細胞系列がコードする重鎖および軽鎖V遺伝子中のヌクレオチド配列。重鎖V遺伝子は体細胞において非常に変異していることが見出された。軽鎖V遺伝子は非生殖細胞系列がコードするヌクレオチドをほとんど有していなかった。

【図8】 サンドイッチアッセイ法におけるポリクローナルマウス抗体を用いて検出される、異なるIL-8濃度の検量線。

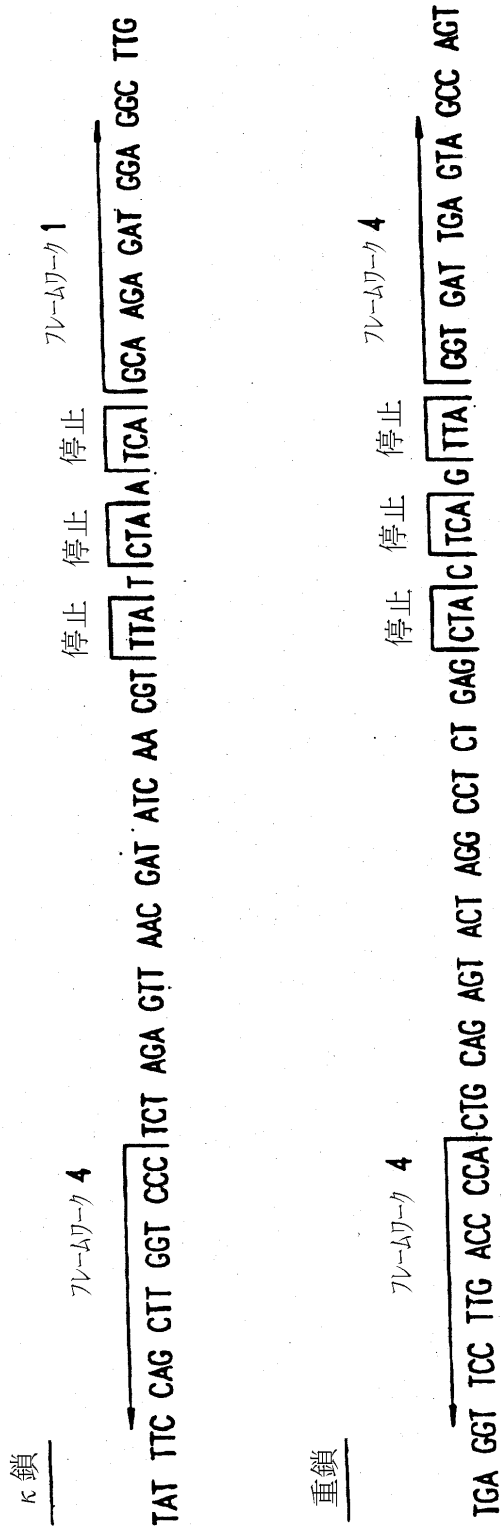
【図9】 サンドイッチアッセイ法におけるポリクローナルヒト抗体を用いて検出される、異なるIL-8濃度の検量線。

【図10】 サンドイッチアッセイ法における2つのモノクローナルヒト抗体を用いて検出される、異なるIL-8濃度の検量線。

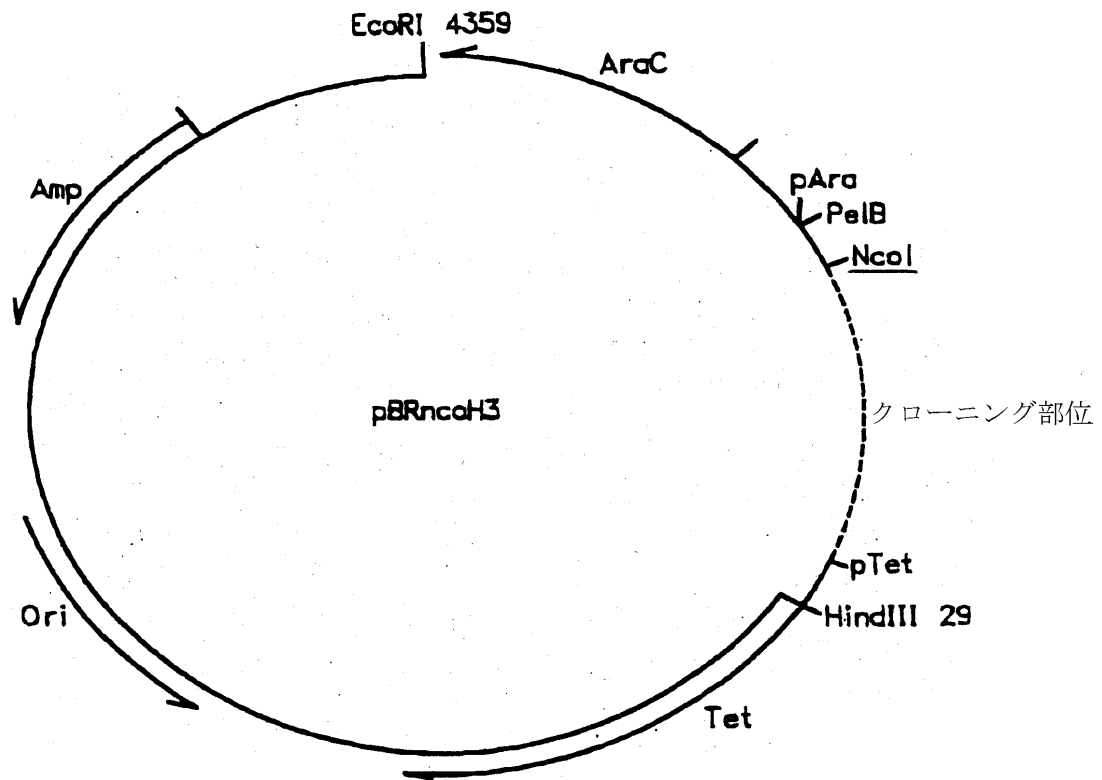
【図1】



668-4のCDR1～CDR3領域を欠失させるために使用されるオリゴDNA配列

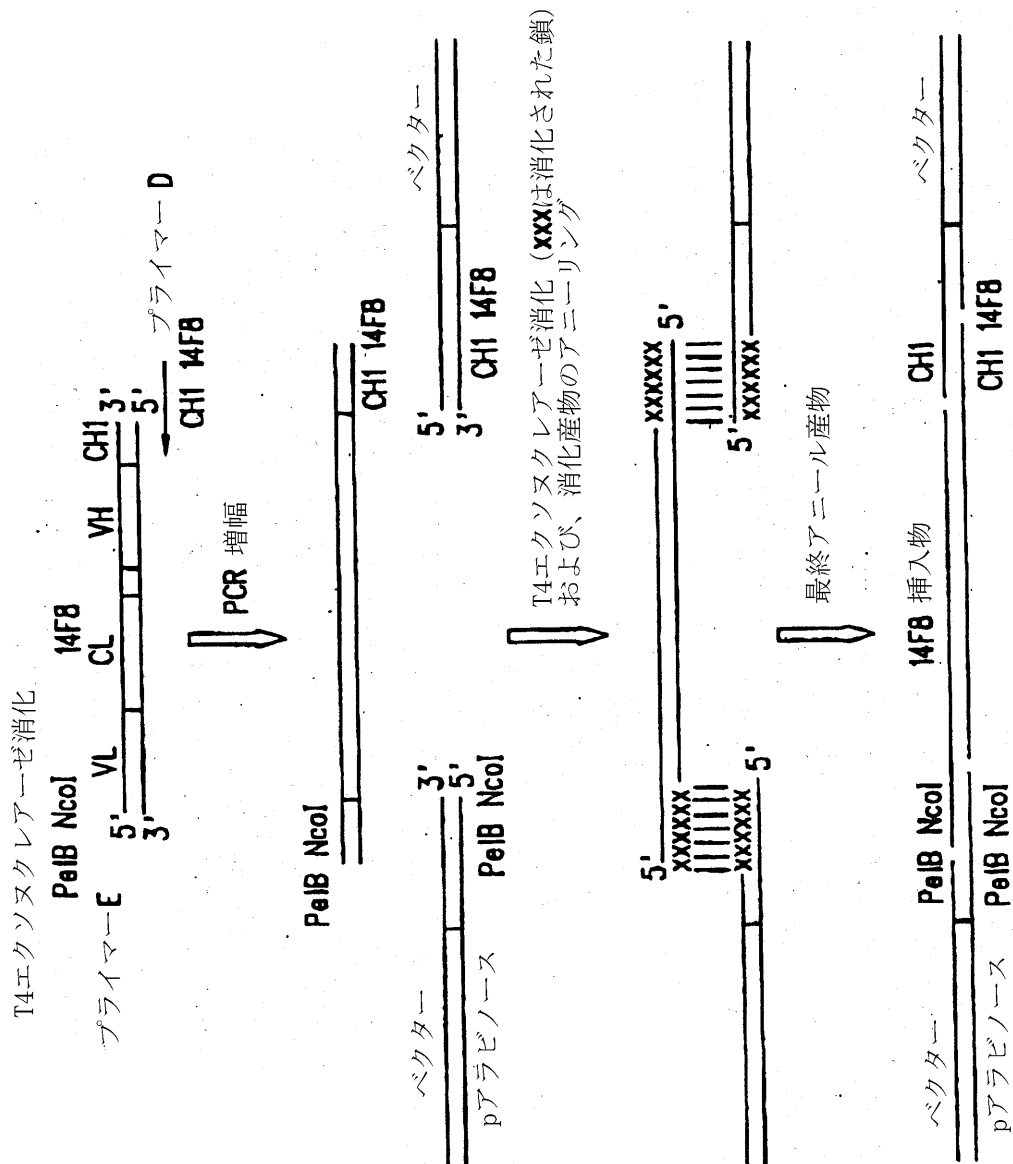


【図3】



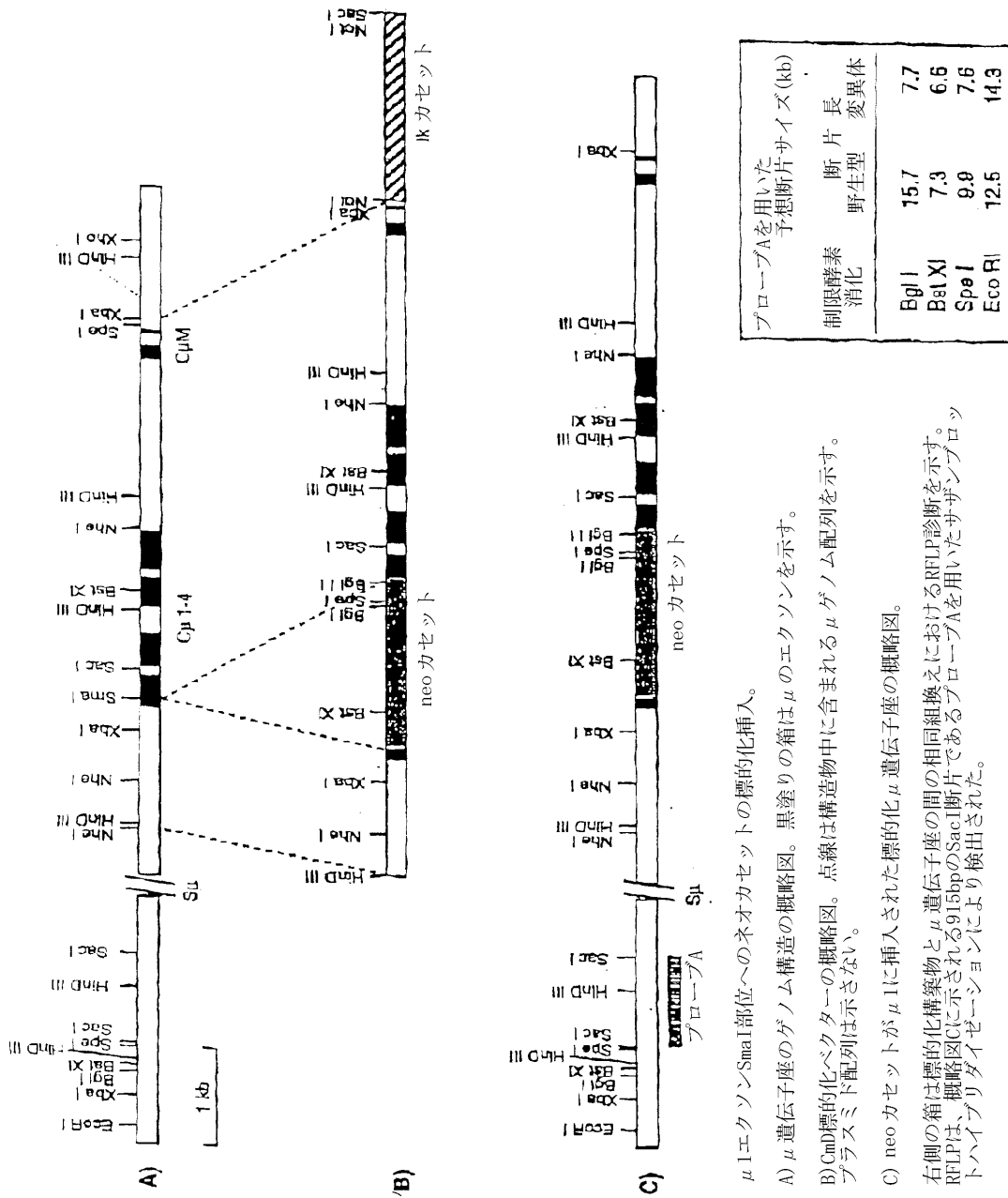


【図5】





【図6】



μ1エクソン/SmaI部位へのネオカセットの標的化挿入。

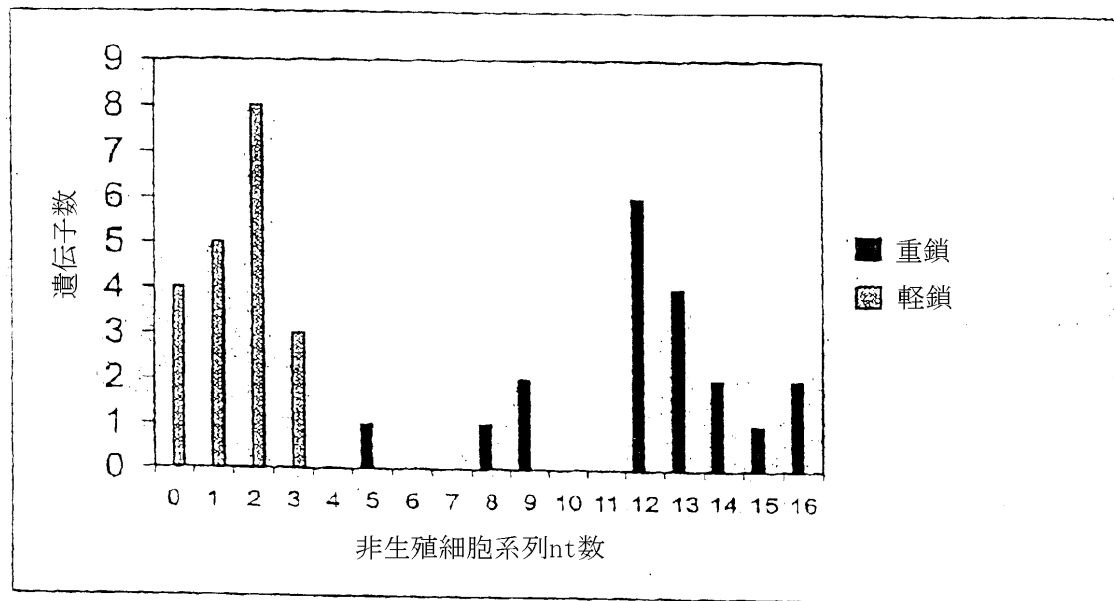
A) μ遺伝子座のゲノム構造の概略図。黒塗りの箱はμのエクソンを示す。

B) CμD標的化ベクターの概略図。点線は構造物中に含まれるμゲノム配列を示す。プラスミド配列は示さない。

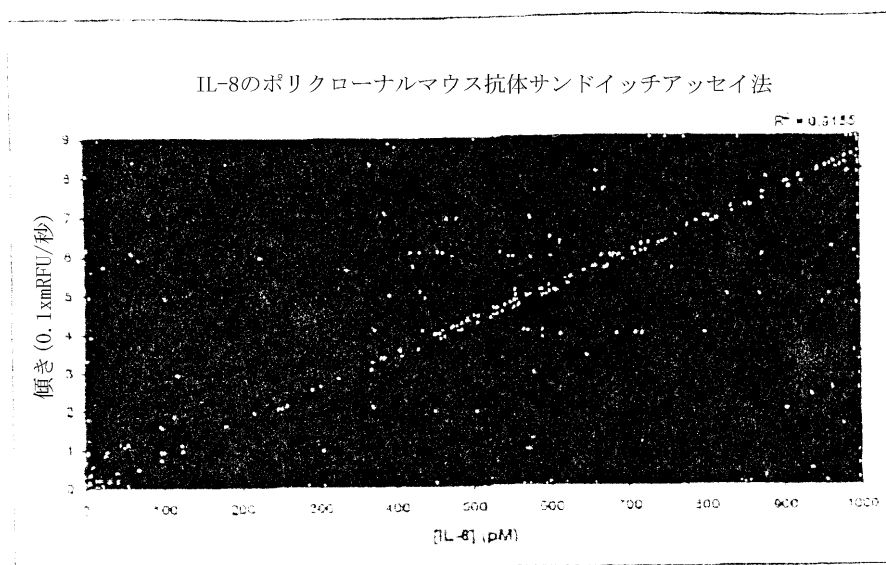
C) neoカセットがμ1に挿入された標的化μ遺伝子座の概略図。

右側の箱は標的化構築物とμ遺伝子座の間の相同組換えにおけるRFLP診断を示す。RFLPは、概略図Cに示される915bpのSacI断片であるプロンプAを用いたサザンブロットハイブリダイゼーションにより検出された。

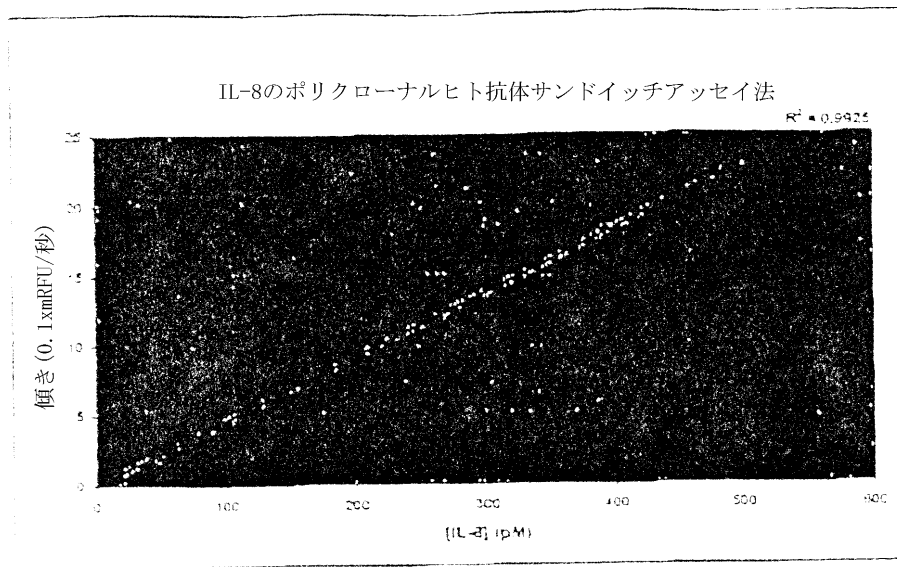
【図7】



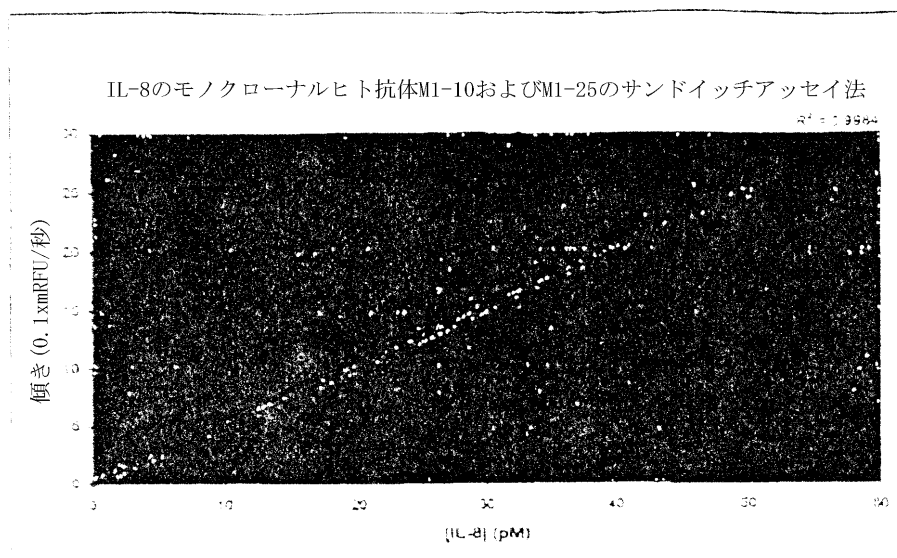
【図8】



【図9】



【図10】



## 【手続補正書】

【提出日】平成14年6月25日(2002.6.25)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0131

【補正方法】変更

【補正の内容】

## 【0131】

(表A) Hco7マウスのcDNA増幅に使用された重鎖オリゴヌクレオチド

オリゴヌクレオチド188(配列番号:1)、944(配列番号:2)および948(配列番号:3)は5'プライマーであり、オリゴヌクレオチド952(配列番号:4)は3'プライマーである。

オリゴ#

5'から3'配列

188	TT ACC CCT GTG GCA AAA GCC GAA GTG CAG CTG GTG GAG TCT GG
944	TT ACC CCT GTG GCA AAA GCC CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GG
948	TT ACC CCT GTG GCA AAA GCC CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GG
952	GA TGG GCC CTT GGT GGA GGC

## 【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0132

【補正方法】変更

【補正の内容】

## 【0132】

(表B) Hco7マウス、Hco12マウス、およびHco7/Co12マウスのcDNA増幅に使用された 鎖オリゴヌクレオチド

オリゴヌクレオチド973(配列番号:15)は3'プライマーであり、残りは5'プライマーである。

オリゴ #

5' から3' 配列

```

189 CT GCC CAA CCA GCC ATG GCC GAA ATT GTG CTC ACC CAG TCT CC
931 TC GCT GCC CAA CCA GCC ATG GCC GTC ATC TGG ATG ACC CAG TCT CC
932 TC GCT GCC CAA CCA GCC ATG GCC AAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CC
933 TC GCT GCC CAA CCA GCC ATG GCC GCC ATC CGG ATG ACC CAG TCT CC
934 TC GCT GCC CAA CCA GCC ATG GCC GCC ATC CAG TTG ACC CAG TCT CC
935 TC GCT GCC CAA CCA GCC ATG GCC GAA ATA GTG ATG ACG CAG TCT CC
936 TC GCT GCC CAA CCA GCC ATG GCC GAT GTT GTG ATG ACA CAG TCT CC
937 TC GCT GCC CAA CCA GCC ATG GCC GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CC
955 TC GCT GCC CAA CCA GCC ATG GCC GAC ATC CAG ATG ATC CAG TCT CC
956 TC GCT GCC CAA CCA GCC ATG GCC GAT ATT GTG ATG ACC CAG ACT CC
973 CAG CAG GCA CAC AAC AGA GGC

```

## 【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0133

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0133】

(表C) Hco12マウスのcDNA増幅に使用された重鎖オリゴヌクレオチド

オリゴヌクレオチド944 (配列番号:2)、945 (配列番号:16)、946 (配列番号:17)、947 (配列番号:18) および948 (配列番号:3) は5'プライマーであり、オリゴヌクレオチド952は3'プライマーである。944 (配列番号:2)、948 (配列番号:3) および952 (配列番号:4) の配列は表Aに示されている。

オリゴ #

5' から3' 配列

```

945 TT ACC CCT GTG GCA AAA GCC GAG GTG CAG CTG TTG GAG TCT GG
946 TT ACC CCT GTG GCA AAA GCC GAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GG
947 TT ACC CCT GTG GCA AAA GCC CAG GTG CAG CTA CAG CAG TGG GG

```

## 【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0134

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0134】

PCR過程のdsDNA産物をその後、標的遺伝子のアンチセンス鎖のみを実質的に生

成するために3'プライマーのみを用いて非対称性PCRに供した。オリゴヌクレオチド953が鎖の非対称性PCRの3'プライマーとして(表D)およびオリゴヌクレオチド952が重鎖の非対称性PCRの3'プライマーとして(表A)として使用された。各脾臓において、プライマー189(配列番号:5)、931(配列番号:6)、932(配列番号:7)、933(配列番号:8)、934(配列番号:9)、936(配列番号:11)、955(配列番号:13)および956(配列番号:14)に関する鎖PCR産物に対して2つの非対称性反応が行われ、プライマー935(配列番号:10)に対する鎖PCR産物に対して4つの非対称性反応が行われ、プライマー937(配列番号:12)に対する鎖PCR産物に対して8つの非対称性反応が行われた。各重鎖PCR産物に対して使用された非対称性反応の数はマウス遺伝子型に依存した。Co7マウスでは各PCR産物について8つの非対称性反応が行われた。Co12マウスでは、プライマー944(配列番号:2)からのPCR産物について8つの非対称性反応が行われ、他のプライマーからのPCR産物について4つの非対称性反応が行われた。Co7/Co12マウスでは、プライマー944(配列番号:2)および948(配列番号:3)からのPCR産物について6つの非対称性反応が行われ、他のプライマーからのPCR産物について3つの非対称性反応が行われた。200pmolの3'プライマー、2μLのds-DNA産物、0.5μL Taq DNAポリメラーゼ、10μLの2mM dNTPs、MgCl<sub>2</sub>を含む10μLの10×Taq DNAポリメラーゼ緩衝液に水を加えて100μLにして、全体で100μLの反応を実施した。重鎖反応は前記の温度プロファイルにて増幅され、鎖反応は30サイクルの代わりに25サイクルが使用された同じ温度プロファイルにて増幅された。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0135

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0135】

(表D) 鎖非対称性PCRに使用されたオリゴヌクレオチド配列

オリゴ #

5' から3' 配列

953

**GAC AGA TGG TGC AGC CAC AGT** (配列番号 : 19)

## 【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0143

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0143】

オリゴヌクレオチド864 (配列番号 : 20)

**5' ATC TGG CAC ATC ATA TGG ATA AGT TTC GTG TAC AAA ATG CCA GAC CTA GAG  
GAA TTT TAT TTC CAG CTT GGT CCC**

オリゴヌクレオチド862 (配列番号 : 21)

**5' GTG ATG GTG ATG GTG ATG GAT CGG AGT ACC AGG TTA TCG AGC CCT CGA TAT  
TGA GGA GAC GGT GAC TGA**

## 【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0145

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0145】

プライマー5 (配列番号 : 22)

**5' GCA ACT GTT GGG AAG GG**

プライマー197 (配列番号 : 23)

**5' TC GCT GCC CAA CCA GCC ATG**

## 【手続補正8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0147

【補正方法】変更

【補正の内容】

## 【0147】

5' PCRプライマー (869)- GGG ACC AAG CTG GAA ATA AAA CGG GCT GTG GCT GCA CCA TCT  
GTC T (配列番号: 24)

3' PCRプライマー (870)- ATC TGG CAC ATC ATA TGG ATA AGA CTC TCC CCT GTT GAA GCT  
CTT (配列番号: 25)

5' PCRプライマー (867)- TCA GTC ACC GTC TCC TCA GCC TCC ACC AAG GGC CCA TC  
(配列番号: 26)

3' PCRプライマー (876)- GTG ATG GTG ATG GTG ATG AGA TTT GGG CTC TGC TTT CTT GTC C  
(配列番号: 27)

## 【手続補正9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0151

【補正方法】変更

【補正の内容】

## 【0151】

プライマー885

5' TAA GAG CGG TAA GAG TGC CAG (配列番号: 28)

## 【手続補正10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0193

【補正方法】変更

【補正の内容】

## 【0193】

プライマー970 - 5' GT GAT AAA CTA CCG TA AAG CTT ATC GAT GAT AAG CTG  
TCA A TTA GTG ATG GTG ATG GTG ATG AGA TTT G (配列番号: 29)

## 【手続補正11】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0201

【補正方法】変更



## 【補正の内容】

## 【0201】

## デカペプチド誘導体

## デカペプチド

YPYDVPDYAS

(配列番号: 30)

(Chiron Mimotopes Peptide Systems, San Diego, CA) は、穏やかに攪拌しながらアルゴン下で丸底フラスコ中で無水DMF (5.4mL) 中で溶解された (0.3g)。イミダゾール (0.02g) は攪拌されている溶液中に添加された。別々にアセチルチオプロピオン酸 (0.041g) が、攪拌しながらアルゴン下で丸底フラスコ中で0.55mLの無水DMF中に溶解され、0.056gの1,1'-カルボニルジイミダゾール (Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI) が攪拌されている溶液中に添加された。フラスコはアルゴン下で密閉され、少なくとも30分室温で攪拌された。この溶液がデカペプチド溶液に添加され、反応混合物は、溶媒がインバキュオで除去される前に少なくとも6時間室温で攪拌された。フラスコ中の残留物は各回10mLのジエチルエーテルを用いて2回研磨され、エーテルはデカントで捨てられた。塩化メチレン (20mL) がフラスコ中の残留物に添加され、固形物はフラスコからこすりとられ、ファインフリット (fine fritted) のブーフナー漏斗を用いて濾過された。固形物はさらに20mLの塩化メチレンを洗浄され、ブーフナー漏斗は真空下で乾燥された。誘導体を加水分解し遊離チオールを生成するために、それは70%DMF中に溶解され、激しく攪拌しながら1M水酸化カリウムが最終濃度0.2Mまで添加された。誘導体溶液は、0.5Mリン酸カリウム、0.1Mホウ酸、pH7.0に濃塩酸が最終濃度1Mになるまで添加された溶液を添加して溶液が中和される前に、室温で5分間放置された。加水分解されたデカペプチド誘導体のチオール濃度は、0.25mM 5,5'-ジチオビス (2-ニトロ安息香酸) (DTNB, Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI) および0.2Mホウ酸カリウム、pH8.0を含む990  $\mu$ l溶液に10  $\mu$ lの溶液を希釈することにより、決定された。mM単位のチオール濃度はA412 (100/13.76) に等しかった。

## 【手続補正12】

## 【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0210

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0210】

【表3】 PCRおよび配列決定プライマーの配列（配列番号：31、32、33、および34をそれぞれ示す）

A- 5' (TCGCTGCCCAACCAGCCATGGCCAGTGCTAAAGAACTTAGATCTCAG)  
 B- 5' (GTGATAAACTACCGCATTAAGCTTATCGATGATAAGCTGTCAATTAGTGAT  
 GGTGATGGTGATGTGAATTCTCAGCCCTCTTCAA)  
 C- 5' (GCAACTCTCTACTGTTTCTCC)  
 D- 5' (GAGGATGACGATGAGCGC)

【手続補正13】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0215

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0215】

実施例22：ランダムクローンのDNA配列分析

解析される各モノクローナルFabに相当するグリセロール凍結ストック（実施例15）が、プラスミド単離および引き続くIL8挿入物のDNAシーケンシングのために50mL培地に接種するために使用された。2×YT（10 μg/ml テトラサイクリン）37℃で一晩増殖され、組換えプラスミドはキアゲンプラスミドミディ（Qiagen Plasmid Midi）キット（キアゲン（Qiagen）、バレンシア、カリフォルニア州）を用いて製造者の指示にしたがい精製された。各モノクローナル抗体の鎖および重鎖可変および定常領域に相当する配列が、MacConnell Research（マックコネルリサーチ）（San Diego, CA）において決定された。抗体に用いられた命名法は実施例21のものと同一である。配列決定はセクアサームシーケンシングキット（Epicenter Technologies, Madison, WI）、pBRベクターのFabカセットの5'および3'側に結合するオリゴヌクレオチドプライマーCおよびD（表3）の各々、およびLI-COR4000L自動シーケンサー（LI-COR, Lincoln, NE）を用いて、

ダイデオキシ鎖終結法により行われた。

M1-1L (配列番号 : 35)

AAATTGTGTGACGCATTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGG  
GCCAGTCAGGGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTC  
ATCTATGATGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAC  
TTCACCTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGCGTAGAACT  
GGCCTCGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCA  
TCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCT  
ATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTG  
TCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACT  
ACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCT  
TCAACAGGGGAGAGTCTTATCCATATGATGTGCCAGATTATGCGAGC

## M1-3L ( 配列番号 : 37)

GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGC  
AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGG  
CTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGG  
ACAGACTTCACCTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCACTGTATTACTGTCAGCAGTAT  
GGTAGCTCACCTCCATTCACTTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAACGAACTGTGGCTGCACCA  
TCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTG  
AATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCC  
CAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGC  
AAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTC  
ACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTCTTATCCATATGATGTGCCAGATTATGCGAGC

## M1-4L ( 配列番号 : 39)

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGC  
AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGG  
CTCCACATCTATGGTGCATCCAGAAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGG  
ACAGACTTCACCTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCACTGTATTACTGTCAGCAGTTT  
GGTAGCTCATTCACTTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTC  
TTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAAC  
TTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAGGAG  
AGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCA  
GACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAG  
AGCTTCAACAGGGGAGAGTCTTATCCATATGATGTGCCAGATTATGCGAGC

## M1-5L ( 配列番号 : 41)

GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGC  
AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGG  
CTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGG  
ACAGACTTCACCTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCACTGTATTACTGTCAGCAGTAT  
GGTAGCTCACCTATATTCACTTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAACGAACTGTGGCTGCACCA  
TCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTG  
AATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCC  
CAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGC  
AAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTC  
ACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTCTTATCCATATGATGTGCCAGATTATGCGAGC

## M1-8L ( 配列番号 : 43)

GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGC  
AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGG  
CTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGG  
ACAGACTTCACCTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCACTGTATTACTGTCAGCAGTAT  
GTTAGCTCATTCACTTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTC  
TTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAAC  
TTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAGGAG  
AGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCA  
GACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAG  
AGCTTCAACAGGGGAGAGTCTTATCCATATGATGTGCCAGATTATGCGAGC

## M1-10L ( 配列番号 : 45)

GATGTTGTGATGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGC  
AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTC  
CTCATCTATGATGCATCCAGAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACA  
GACTTCACCTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCACTTTATTACTGTCAGCAGCGTAGC  
AACTGGCCTCCCACTTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTC  
TTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAAC  
TTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAGGAG  
AGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCA  
GACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAG  
AGCTTCAACAGGGGAGAGTCTTATCCATATGATGTGCCAGATTATGCGAGC

## M1-21L ( 配列番号 : 47)

GCCATCCGGATGACCCAGTCTCCATCCTTCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGC  
CGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTC  
CTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGTCAAGTGGATCTGGGACA  
GATCTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTGCAACTTATTACTGTCAAGTGTGGTTAC  
AGTACACCATTCACTTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTC  
TTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCTGCTGAATAAC  
TTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAG  
AGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCA  
GACTACGAGAAACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAG  
AGCTTCAACAGGGGAGAGTCTTATCCATATGATGTGCCAGATTATGCGAGC

## M1-23L ( 配列番号 : 49)

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGC  
AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGG  
CTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGG  
ACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTGCAAGTGTATTACTGTCAAGCAGTAT  
GGTAGCTCACCTCCGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCACCA  
TCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCTGCTG  
AATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAGGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCC  
CAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGC  
AAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTC  
ACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTCTTATCCATATGATGTGCCAGATTATGCGAGC

## M1-25L ( 配列番号 : 51)

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGC  
AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGG  
CTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAAACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGG  
ACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTGCAAGTGTATTACTGTCAAGCAGTAT  
GGTAGCTCACTTCACTTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTC  
TTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCTGCTGAATAAC  
TTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAG  
AGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCA  
GACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAG  
AGCTTCAACAGGGGAGAGTCTTATCCATATGATGTGCCAGATTATGCGAGC

## M1-1H ( 配列番号 : 53)

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAAGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCA  
GCGTCTGAATTCAACATCAGTTACTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGTTCCAGGCAAGGGGCTGGAG  
TGGGTGGCAGCTGTCTGGTATGATGAAAGTACTACATATTCTCCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCAAC  
ATCTCCAGAGACGATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCT  
GTGTATTACTGTGCGAGAGATAGGGTGGGCCTCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCAACGTC  
TCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGC  
ACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGG  
GCCCTGACCAGCGGCTGCACACCTTCCCGGCTGTCTTACAGTCCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC  
GTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGC  
AACACCAAGGTGGACAAGAAAGCAGAGCCCAAATCTCATCACCATCACCATCAC

## M1-3H ( 配列番号 : 55)

CCGATGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG  
CAGCGTCTGGATTACCTTCAGTTACTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGG  
AGTGGGTGACACTTATAACCTATGATGGAGATAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCA  
CCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGG  
CTGTGTATTACTGTGCGAGAGACGGGATCGGGTACTTTGACTATTGGGGCCAGGGAACCTTGGTCACCG  
TCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGG  
GCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAG  
GCGCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCA  
GCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCA  
GCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGCAGAGCCCAAATCTCATCACCATCACCATCAC

## M1-4H ( 配列番号 : 57)

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAAGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCA  
GCGTCTGGATTACCTTCAGTTACTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGTTCCAGGCAAGGGGCTGGAG  
TGGGTGGCAGCTGTCTGGTATGATGGAAGTACTACATATTCTCCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCC  
ATCTCCAGAGACGATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCT  
GTGTATTACTGTGCGAGAGATAGGGTGGGCCTCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCTTGGTCACCGTC  
TCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGC  
ACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGC  
GCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC  
GTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGC  
AACACCAAGGTGGACAAGAAAGCAGGGCCCAAATCTCATCACCATCACCATCAC

## M1-5H ( 配列番号 : 59)

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCA  
GCGTCTGGATTACCTTCAGTTACTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAG  
TGGGTGACACTTATAACCTATGATGGAGATAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCC  
ATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCT  
GTGTATTACTGTGCGAGAGACGGGATCGGGTACTTTGACTATTGGGGCCAGGGAACCTTGGTCACCGTC  
TCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGC  
ACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGC  
GCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC  
GTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGC  
AACACCAAGGTGGACAAGAAAGCAGAGCCCAAATCTCATCACCATCACCATCAC

## M1-8H ( 配列番号 : 61)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAAGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCA  
GCGTCTGGATTACCTTCAGTTACTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAG  
TGGGTGGCAGCTGTATGGTATGATGGAAGTAACATACTCTCCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCC  
ATCTCCAGAGACGATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCT  
GTGTATTACTGTGCGAGAGATAGGGTGGGCCTCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCTTGGTCACCGTC  
TCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGC  
ACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGC  
GCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC  
GTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGC  
AACACCAAGGTGGACAAGAAAGCAGAGCCCAAATCTCATCACCATCACCATCAC

## M1-10H ( 配列番号 : 63)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACATCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGAA  
GGCTCTGGATTACCTTCAGGAACCATCCTATACTAGGTTTCGCCAGGCTCCAGGAAAAGGTCTGGAG  
TGGGTATCAGTTAGTGGTATTGGTGGTGACATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCTCCATC  
TCCAGAGACAATGCCAAGAATCCTTGTATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACATGGCTGTG  
TATTACTGTGCAAGAGAATATTACTATGGTTCCGGGAGTTATCGCGTTGACTACTACTACGGTATG  
GACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCC  
CTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTC  
CCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGT  
CTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAG  
ACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGCAGAGCCCAAATCT  
CATCACCATCACCATCAC

## M1-21H ( 配列番号 : 65)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAAGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCA  
GCGTCTGGATTACCTTCAGTTACTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGTTCCAGGCAAGGGGCTGGAG  
TGGGTGGCAGCTGTCTGGTATGATGGAAGTACTACATATTCTCCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACAC  
ATCTCCAGAGACGATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAGCAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCT  
GTGTATTACTGTGCGAGAGATAGGGTGGGCTCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTC  
TCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGC  
ACAGCGGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGAACTCAGGC  
GCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC  
GTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAGCCAGC  
AACACCAAGGTGGACAAGAAAGCAGAGCCCAAATCTCATCACCATCACCATCAC

## M1-23H ( 配列番号 : 67)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCA  
GCGTCTGGATTACCTTCAGTAACTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGTTCCAGGCAAGGGGCTGGAG  
TGGGTGGCAGCTATATGGTATGATGGAAGTAAACATACAATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACAC  
ATCTCCAGAGACAAATCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCT  
GTGTATTACTGTGCGAGAGATGGGATAGGCTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTC  
TCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGC  
ACAGCGGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGAACTCAGGC  
GCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC  
GTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAGCCAGC  
AACACCAAGGTGGACAAGAAAGCAGAGCCCAAATCTCATCACCATCACCATCAC

## M1-25H ( 配列番号 : 69)

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCA  
GCGTCTGGATTACCTTCAGTTACTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGTTCCAGGCAAGGGGCTGGAG  
TGGGTGGCAGCTGTCTGGTATGATGGAAGTACTACATATCCTCCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACAC  
ATCTCCAGAGACGATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCT  
GTTTATTACTGTGCGAGAGATAGGGTGGGCTCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTC  
TCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGC  
ACAGCGGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGAACTCAGGC  
GCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC  
GTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAGCCAGC  
AACACCAAGGTGGACAAGAAAGCAGAGCCCAAATCTCATCACCATCACCATCAC

## M2-11L ( 配列番号 : 71)

GAAATAGTGATGACGCGAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGC  
AGGGCCAGTCAGGGTGTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGG  
CTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGG  
ACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGAGTGTATTACTGTCTCAGCAGTAT  
GGTAGCTCACCTCCATTCACTTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAACGAAGTGTGGCTGCACCA  
TCTGTCTTCATCTTCCCGCATCTGATGAGCAGTTGAGATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCTGCTG  
AATAACTTCTATCCAGAGAGGCCCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCC  
CAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTTGACGCTGAGC  
AAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCCTGCGAAGTACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTC  
ACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTCTTATCCATATGATGTGCCAGATTATGCGAGC

## M2-12L ( 配列番号 : 73)

GAAATAGTGATGACGCGAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGC  
AGGGCCAGTCAGGGTGTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGG  
CTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGG  
ACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGAGTGTATTACTGTCTCAGCAGTAT  
GGTAGCTCACCTCCGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGAAGTGTGGCTGCACCA  
TCTGTCTTCATCTTCCCGCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCTGCTG  
AATAACTTCTATCCAGAGAGGCCCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCC  
CAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTTGACGCTGAGC  
AAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCCTGCGAAGTACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTC  
ACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTCTTATCCATATGATGTGCCAGATTATGCGAGC

## M2-16L ( 配列番号 : 75)

GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGC  
AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGG  
CTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTTCAGTGTTCAGTGGGTCTGGG  
ACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTAT  
GGTAGCTCATTCACTTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTC  
TTCATCTTCCC GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAAC  
TTCATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAG  
AGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCA  
GACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAG  
AGCTTCAACAGGGGAGAGTCTTATCCATATGATGTGCCAGATTATGCGAGC

## M2-18L ( 配列番号 : 77)

GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGC  
AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGG  
CTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGG  
ACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTAT  
GTTAGCTCATTCACTTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTC  
TTCATCTTCCC GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAAC  
TTCATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAG  
AGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCA  
GACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAG  
AGCTTCAACAGGGGAGAGTCTTATCCATATGATGTGCCAGATTATGCGAGC

## M2-20L ( 配列番号 : 79)

GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGC  
AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGG  
CTCCTCATCTACGGTGCATCCAGGAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGG  
ACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTAT  
GGTAGCTCACCCTGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCACCA  
TCTGTCTTCATCTTCCC GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTG  
AATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCC  
CAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGC  
AAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTC  
ACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTCTTATCCATATGATGTGCCAGATTATGCGAGC

## M2-31L ( 配列番号 : 81)

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGC  
AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTC  
CTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACA  
GACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGCGTACG  
AACTGGCCTCGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTC  
TTCATCTTCCC GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAAC  
TTCATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAG  
AGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCA  
GACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAG  
AGCTTCAACAGGGGAGAGTCTTATCCATATGATGTGCCAGATTATGCGAGC



## M2-32L ( 配列番号 : 83)

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGC  
AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTC  
CTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCCGCTGGCATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACA  
GACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTGAGCAACGTAAC  
AACTGGCCTCTCACTTTTCGGCCGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTC  
TTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAAC  
TTCTATCCCAGAGAGGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAG  
AGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCA  
GACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAG  
AGCTTCAACAGGGGAGAGTCTTATCCATATGATGTGCCAGATTATGCGAGC

## M2-33L ( 配列番号 : 85)

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGC  
AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGG  
CTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGG  
ACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTGAGCAGTAT  
GGTAGCTCACCTCCGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCACCA  
TCTGTCTTCACTTTCGGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTG  
AATAACTTCTATCCCAGAGAGGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCC  
CAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGC  
AAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTC  
ACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTCTTATCCATATGATGTGCCAGATTATGCGAGC

## M2-34L ( 配列番号 : 87)

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGC  
AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTC  
CTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACA  
GACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTGAGCAGCGTACG  
AACTGGCCTCGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTC  
TTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAAC  
TTCTATCCCAGAGAGGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAG  
AGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCA  
GACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAG  
AGCTTCAACAGGGGAGAGTCTTATCCATATGATGTGCCAGATTATGCGAGC

## M2-35L ( 配列番号 : 89)

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGC  
AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTC  
CTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACA  
GACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTGAGCAGCGTACG  
AACTGGCCTCGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTC  
TTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAAC  
TTCTATCCCAGAGAGGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAG  
AGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCA  
GACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAG  
AGCTTCAACAGGGGAGAGTCTTATCCATATGATGTGCCAGATTATGCGAGC

## M2-11H ( 配列番号 : 91)

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCA  
GCGTCTGGATTACCTTCAGTTACTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAG  
TGGGTGACACTTATAACCTATGATGGAGATAATAAATACTATGAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCC  
ATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCT  
GTGTATTACTGTGCGAGAGACGGGATCGGGTACTTTGACTATTGGGGCCAGGGAACCTTGGTCACCGTC  
TCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCGTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACTCTGGGGGC  
ACAGCGGCCCTGGGCTGCGTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTGGAACCTCAGGC  
GCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGCTGTCTTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC  
GTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGC  
AACACCAAGGTGGACAAGAAAGCAGAGCCCAATCTCATCACCATCACCATCAC

## M2-12H ( 配列番号 : 93)

GATGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCATCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCA  
GCGTCTGGATTACCTTCAGTTACTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGTCCAGGCAAGGGGCTGGAA  
TGGATGACACTTATATCCTATGATGGAGATAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCC  
ATCTCCAGAGAAAATCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCCGAGGACACGGCT  
GTGTATTACTGTGCGAGAGACGGGATCGGGTACTTTGACTATTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTC  
TCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGC  
ACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGC  
GCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC  
GTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGC  
AGCACCAAGGTGGACAAGAAAGCAGAGCCCCAAATCTCATCACCATCACCATCAC

## M2-16H ( 配列番号 : 95)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAAGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCA  
GCGTCTGGATTACCTTCAGTTACTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGTCCAGGCAAGGGGCTGGAG  
TGGGTGGCAGCTGTCTGGTATGATGGAAGTACTAGATATTCTCCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCC  
ATCTCCAGAGACGATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCT  
GTGTATTACTGTGCGAGAGATAGGGTGGGCCTCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTC  
TCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGC  
ACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGC  
GCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC  
GTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGC  
AACACCAAGGTGGACAAGAAAGCAGAGCCCCAAATCTCATCACCATCACCATCAC

## M2-18H ( 配列番号 : 97)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAAGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCA  
GCGTCTGGATTACCTTCAGTTACTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGTCCAGGCAAGGGGCTGGAG  
TGGGTGGCAGCTGTCTGGTATGATGGAAGTACTACATATTCTCCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCC  
ATCTCCAGAGACGATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCT  
GTGTATTACTGTGCGAGAGATAGGGTGGGCCTCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTC  
TCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGC  
ACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGC  
GCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC  
GTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGC  
AACACCAAGGTGGACAAGAAAGCAGAGCCCCAAATCTCATCACCATCACCATCAC

## M2-20H ( 配列番号 : 99)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGGCTCTCCTGTGCA  
GCCTCTGGATTACCTTCAGTTACTATGGTATGCACTGGGTCCGCCAGGTCCAGGCAAGGGGCTGGAG  
TGGGTGTCACTTATAACATATGATGGAAGGAATAAATACTACGCCGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCC  
ATCTCCAGAGAGAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAACTGAGGACACGGCT  
GAGTATTACTGTGCGAGAGACGGGATCGGATCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAATCCTGGTCACCGTC  
TCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGC  
ACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAAGTCAAGGC  
GCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC  
GTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGC  
AACACCAAGGTGGACAAGAAAGCAGAGCCCCAAATCTCATCACCATCACCATCAC

## M2-31H ( 配列番号 : 101)

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGTCTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCA  
GCCTCTGGATTACCTTCAGTTACTATGGTATGCACTGGGTCCGCCAGGTCCAGGCAAGGGACTAGAG  
TGGGTGGCAGCTTATATCATACGATGGAAGCAATAAATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCC  
ATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACTCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCT  
GTGTATTACTGTGCGAGAGACTGGATCGGGTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTC  
TCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGC  
ACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGC  
GCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC  
GTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGC  
AACACCAAGGTGGACAAGAAAGCAGAGCCCCAAATCTCATCACCATCACCATCAC

## M2-32H ( 配列番号 : 103)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACATCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGAA  
GGCTCTGGATTTCATCTTCAGGAACCATCCTATACACTGGGTTCGCCAGGCTCCAGGAAAAGGTCTGGAG  
TGGGTATCAGTTAGTGGTATTGGTGGTGACACATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCTCCATC  
TCCAGAGACAATGCCAAGAACTCCTTGTATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACATGGCTGTG  
TATTACTGTGCAAGAGAATATTACTATGGTTCGGGGAGTTATCGCGTTGACTACTACTACGGTATG  
GACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCC  
CTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTC  
CCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGTGTG  
CTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAG  
ACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGCAGAGCCCCAAATCT  
CATCACCATCACCATCAC

## M2-33H ( 配列番号 : 105)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCA  
GCGTCTGGATTTCATCTTCAGTTACTATGGCATGCACTGGGTTCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAA  
TGGATGACACTTATAACCTATGATGGAGATAATAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCCACC  
ATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCCGAGGACACGGCT  
GTGTATTACTGTGCGAGAGACGGGATCGGGTACTTTGACTATTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACCGTC  
TCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGC  
ACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGC  
GCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGTGTCTTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC  
GTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGC  
AACACCAAGGTGGACAAGAAAGCAGAGCCCCAAATCTCATCACCATCACCATCAC

## M2-34H ( 配列番号 : 107)

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCA  
GCCTCTGGATTTCAGTTACTATGGTATACACTGGGTTCGCCAGGTTCCAGGCAAGGGGACTAGAG  
TGGGTGGTACTTATATCATACGATGGAAGCAATAATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCCACC  
ATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACTCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCT  
GTGTATTACTGTGCGAGAGACTGGATCGGGTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACCGTC  
TCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGC  
ACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGC  
GCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGTGTCTTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC  
GTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGC  
AACACCAAGGTGGACAAGAAAGCAGAGCCCCAAATCTCATCACCATCACCATCAC

## M2-35H ( 配列番号 : 109)

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCA  
GCCTCTGGATTTCAGTACTATGGTATACACTGGGTTCGCCAGGTTCCAGGCAAGGGGACTAGAG  
TGGGTGGAACCTTATATCATACGATGGAAGCAATAATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCCACC  
ATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACTCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCT  
GTGTATTACTGTGCGAGAGACTGGATCGGGTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACCGTC  
TCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGC  
ACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGC  
GCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGTGTCTTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC  
GTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGC  
AACACCAAGGTGGACAAGAAAGCAGAGCCCCAAATCTCATCACCATCACCATCAC

## 配列決定された抗体の翻訳アミノ酸配列

10-9M親和性で切り捨てられたM1-H重鎖可変およびCH1領域  
(配列番号: 64、54、66、68、70、56、58、60、および62をそれぞれ示す)

	1				50
M1_10H	QVQLVQSGGG	LVHPGGSRLRL	SCEGSGFIFR	NHPIHWVRQA	PGKGLEWVSV
M1_1H	QVQLVESGGG	VVQPGKSLRL	SCAASEFTIS	YYGMHWVRQV	PGKGLEWVAA
M1_21H	QVQLVQSGGG	VVQPGKSLRL	SCAASGFTFS	YYGMHWVRQV	PGKGLEWVAA
M1_23H	QVQLVQSGGG	VVQPGKSLRL	SCAASGFTFS	NYGMHWVRQA	PGKGLEWVAA
M1_25H	QVQLVESGGG	LVQPGGSRLRL	SCAASGFTFS	YYGMHWVRQV	PGKGLEWVAA
M1_3H	DVQLVQSGGG	VVQPGKSLRL	SCAASGFTFS	YYGMHWVRQA	PGKGLEWVTL
M1_4H	QVQLVESGGG	VVQPGKSLRL	SCAASGFTFS	YYGMHWVRQV	PGKGLEWVAA
M1_5H	QVQLVESGGG	VVQPGKSLRL	SCAASGFTFS	YYGMHWVRQA	PGKGLEWVTL
M1_8H	QVQLVQSGGG	VVQPGKSLKL	SCAASGFTFS	YYGMHWVRQA	PGKGLEWVAA
	51				100
M1_10H	SGIGGDTYY.	ADSVKGRFSI	SRDNAKNSLY	LQMNSLRAED	MAVYYCAREY
M1_1H	VWYDESTTYS	PDSVKGRFTI	SRDDSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARDR
M1_21H	VWYDGSTTYS	PDSVKGRFTI	SRDDSKNTLY	LQMSSLRAED	TAVYYCARDR
M1_23H	IWYDGSKTYN	ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARDG
M1_25H	VWYDGSTTYP	PDSVKGRFTI	SRDDSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARDR
M1_3H	ITYDGDNKYY	ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARDG
M1_4H	VWYDGSTTYS	PDSVKGRFTI	SRDDSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARDR
M1_5H	ITYDGDNKYY	ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARDG
M1_8H	VWYDGSNTYS	PDSVKGRFTI	SRDDSKNTVY	LQMNSLRAED	TAVYYCARDR
	101				150
M1_10H	YYGSGSYRVD	YYYYGMDVWG	QGTTLTVVSSA	STKGPSVFPL	APSSKSTSGG
M1_1H	VG.....	....LFDYWG	QGTTLTVVSSA	STKGPSVFPL	APSSKSTSGG
M1_21H	VG.....	....LFDYWG	QGTTLTVVSSA	STKGPSVFPL	APSSKSTSGG
M1_23H	IG.....	....YFDYWG	QGTTLTVVSSA	STKGPSVFPL	APSSKSTSGG
M1_25H	VG.....	....LFDYWG	QGTTLTVVSSA	STKGPSVFPL	APSSKSTSGG
M1_3H	IG.....	....YFDYWG	QGTTLTVVSSA	STKGPSVFPL	APSSKSTSGG
M1_4H	VG.....	....LFDYWG	QGTTLTVVSSA	STKGPSVFPL	APSSKSTSGG
M1_5H	IG.....	....YFDYWG	QGTTLTVVSSA	STKGPSVFPL	APSSKSTSGG
M1_8H	VG.....	....LFDYWG	QGTTLTVVSSA	STKGPSVFPL	APSSKSTSGG
	151				200
M1_10H	TAALGCLVKD	YFPEPVTVSW	NSGALTSGVH	TFFAVLQSSG	LYSLSSVTV
M1_1H	TAALGCLVKD	YFPEPVTVSW	NSGALTSGVH	TFFAVLQSSG	LYSLSSVTV
M1_21H	TAALGCLVKD	YFPEPVTVSW	NSGALTSGVH	TFFAVLQSSG	LYSLSSVTV
M1_23H	TAALGCLVKD	YFPEPVTVSW	NSGALTSGVH	TFFAVLQSSG	LYSLSSVTV
M1_25H	TAALGCLVKD	YFPEPVTVSW	NSGALTSGVH	TFFAVLQSSG	LYSLSSVTV
M1_3H	TAALGCLVKD	YFPEPVTVSW	NSGALTSGVH	TFFAVLQSSG	LYSLSSVTV
M1_4H	TAALGCLVKD	YFPEPVTVSW	NSGALTSGVH	TFFAVLQSSG	LYSLSSVTV
M1_5H	TAALGCLVKD	YFPEPVTVSW	NSGALTSGVH	TFFAVLQSSG	LYSLSSVTV
M1_8H	TAALGCLVKD	YFPEPVTVSW	NSGALTSGVH	TFFAVLQSSG	LYSLSSVTV
	201			237	
M1_10H	PSSSLGTQTY	ICNVNHNKPSN	TKVDKKAEPK	SHHHHHH	
M1_1H	PSSSLGTQTY	ICNVNHNKPSN	TKVDKKAEPK	SHHHHHH	
M1_21H	PSSSLGTQTY	ICNVNHNKPSN	TKVDKKAEPK	SHHHHHH	
M1_23H	PSSSLGTQTY	ICNVNHNKPSN	TKVDKKAEPK	SHHHHHH	
M1_25H	PSSSLGTQTY	ICNVNHNKPSN	TKVDKKAEPK	SHHHHHH	
M1_3H	PSSSLGTQTY	ICNVNHNKPSN	TKVDKKAEPK	SHHHHHH	
M1_4H	PSSSLGTQTY	ICNVNHNKPSN	TKVDKKAEPK	SHHHHHH	
M1_5H	PSSSLGTQTY	ICNVNHNKPSN	TKVDKKAEPK	SHHHHHH	
M1_8H	PSSSLGTQTY	ICNVNHNKPSN	TKVDKKAEPK	SHHHHHH	

10-9 親和性で切り捨てられたM1-Lκ鎖可変および定常領域  
(配列番号: 46、36、48、50、52、38、40、42、および44をそれぞれ示す)

	1				50
M1_10L	DVVMTQSPAT	LSLSPGERAT	LSCRASQSVS	S.YLAWYQOK	PGQAPRLLIY
M1_1L	EIVLTQSPAT	LSLSPGERAT	LSCRASQGVs	S.YLAWYQOK	PGQAPRLLIY
M1_21L	AIRMTQSPSF	LSASVGDRVT	ITCRASQSiS	S.YLNWYQOK	PGKAPKLLIY
M1_23L	EIVLTQSPGT	LSLSPGERAT	LSCRASQSVS	SSYLAWYQOK	PGQAPRLLIY
M1_25L	EIVLTQSPGT	LSLSPGERAT	LSCRASQSVS	SSYLAWYQOK	PGQAPRLLIY
M1_3L	EIVMTQSPAT	LSLSPGERAT	LSCRASQSVS	SSYLAWYQOK	PGQAPRLLIY
M1_4L	EIVLTQSPGT	LSLSPGERAT	LSCRASQSVS	SSYLAWYQOK	PGQAPRLHIY
M1_5L	EIVMTQSPGT	LSLSPGERAT	LSCRASQSVS	SSYLAWYQOK	PGQAPRLLIY
M1_8L	EIVMTQSPGT	LSLSPGERAT	LSCRASQSVS	STYLAWYQOK	PGQAPRLLIY
	51				100
M1_10L	DASNRATGIP	ARFSGSGSGT	DFTLTiSSLE	PEDFAVYYCQ	QRSNWP.PTF
M1_1L	DASNRATGIP	ARFSGSGSGT	DFTLTiSSLE	PEDFAVYYCQ	QRSNWP.RTF
M1_21L	AASSLQSGVP	SRFSVSGSGT	DLTLTiSSLQ	PEDFATYYCQ	CGYSTP.PTF
M1_23L	GASSRATGIP	DRFSGSGSGT	DFTLTiSRLE	PEDFAVYYCQ	QYGSSPPYTF
M1_25L	GASSRATGIP	NRFSGSGSGT	DFTLTiSRLE	PEDFAVYYCQ	QYGSS..FTF
M1_3L	GASSRATGIP	DRFSGSGSGT	DFTLTiSRLE	PEDFAVYYCQ	QYGSSPPFTF
M1_4L	GASRRATGIP	DRFSGSGSGT	DFTLTiSRLE	PEDFAVYYCQ	QFGSS..FTF
M1_5L	GASSRATGIP	DRFSGSGSGT	DFTLTiSRLE	PEDFAVYYCQ	QYGSSPIFTF
M1_8L	GASSRATGIP	DRFSGSGSGT	DFTLTiSRLE	PEDFAVYYCQ	QYVSS..FTF
	101				150
M1_10L	GGGTKVEIKR	TVAAPSVFIF	PPSDEQLKSG	TASVVCLLNN	FYPREAKVQW
M1_1L	GQGTKVEIKR	TVAAPSVFIF	PPSDEQLKSG	TASVVCLLNN	FYPREAKVQW
M1_21L	GPGTKVDIKR	TVAAPSVFIF	PPSDEQLKSG	TASVVCLLNN	FYPREAKVQW
M1_23L	GQGTKLEIKR	TVAAPSVFIF	PPSDEQLKSG	TASVVCLLNN	FYPREAKVQW
M1_25L	GPGTKVDIKR	TVAAPSVFIF	PPSDEQLKSG	TASVVCLLNN	FYPREAKVQW
M1_3L	GPGTKVDIKR	TVAAPSVFIF	PPSDEQLKSG	TASVVCLLNN	FYPREAKVQW
M1_4L	GPGTKVDIKR	TVAAPSVFIF	PPSDEQLKSG	TASVVCLLNN	FYPREAKVQW
M1_5L	GPGTKVDIKR	TVAAPSVFIF	PPSDEQLKSG	TASVVCLLNN	FYPREAKVQW
M1_8L	GPGTKVDIKR	TVAAPSVFIF	PPSDEQLKSG	TASVVCLLNN	FYPREAKVQW
	151				200
M1_10L	KVDNALQSGN	SQESVTEQDS	KDSTYSLSST	LTLKADYK	HKVYACEVTH
M1_1L	KVDNALQSGN	SQESVTEQDS	KDSTYSLSST	LTLKADYK	HKVYACEVTH
M1_21L	KVDNALQSGN	SQESVTEQDS	KDSTYSLSST	LTLKADYK	HKVYACEVTH
M1_23L	RVDNALQSGN	SQESVTEQDS	KDSTYSLSST	LTLKADYK	HKVYACEVTH
M1_25L	KVDNALQSGN	SQESVTEQDS	KDSTYSLSST	LTLKADYK	HKVYACEVTH
M1_3L	KVDNALQSGN	SQESVTEQDS	KDSTYSLSST	LTLKADYK	HKVYACEVTH
M1_4L	KVDNALQSGN	SQESVTEQDS	KDSTYSLSST	LTLKADYK	HKVYACEVTH
M1_5L	KVDNALQSGN	SQESVTEQDS	KDSTYSLSST	LTLKADYK	HKVYACEVTH
M1_8L	KVDNALQSGN	SQESVTEQDS	KDSTYSLSST	LTLKADYK	HKVYACEVTH
	201		226		
M1_10L	QGLSSPVTKS	FNRGESYPYD	VPDYAS		
M1_1L	QGLSSPVTKS	FNRGESYPYD	VPDYAS		
M1_21L	QGLSSPVTKS	FNRGESYPYD	VPDYAS		
M1_23L	QGLSSPVTKS	FNRGESYPYD	VPDYAS		
M1_25L	QGLSSPVTKS	FNRGESYPYD	VPDYAN		
M1_3L	QGLSSPVTKS	FNRGESYPYD	VPDYAS		
M1_4L	QGLSSPVTKS	FNRGESYPYD	VPDYAS		
M1_5L	QGLSSPVTKS	FNRGESYPYD	VPDYAS		
M1_8L	QGLSSPVTKS	FNRGESYPYD	VPDYAS		

10-10M親和性で切り捨てられたM2-H重鎖VH-CH1配列

(配列番号: 92、94、96、98、100、102、104、106、108、および110をそれぞれ示す)

	1				50
M2_11H	QVQLVESGGG	VVQPGRSRL	SCAASGFTFS	YYGMHWVRQA	PGKGLEWVTL
M2_12H	DVQLVESGGG	VVHPGRSLRL	SCAASGFTFS	YYGMHWVRQA	PGKGLEWMTL
M2_16H	QVQLVQSGGG	VVQPGKSLRL	SCAASGFSL	YYGMHWVRQV	PGKGLEWVAA
M2_18H	QVQLVQSGGG	VVQPGKSLRL	SCAASGFSS	YYGMHWVRQV	PGKGLEWVAA
M2_20H	QVQLVQSGGG	VVQPGRSRL	SCAASGFTFS	YYGMHWVRQA	PGKGLEWVSL
M2_31H	QVQLVESGGV	VVQPGRSRL	SCAASGFTFS	YYGIHWVRQV	PGKGLEWVAL
M2_32H	QVQLVQSGGG	LVHPGGSLRL	SCGSGGFIFR	NHPIHWVRQA	PGKGLEWVS
M2_33H	QVQLVQSGGG	VVQPGRSRL	SCAASGFTFS	YYGMHWVRQA	PGKGLEWMTL
M2_34H	QVQLVESGGG	VVQPGRSRL	SCAASGFTFS	YYGIHWVRQV	PGKGLEWVVL
M2_35H	QVQLVESGGG	VVQPGRSRL	SCAASGFTIS	YYGIHWVRQV	PGKGLEWVEL
	51				100
M2_11H	ITYDGDNKYY	ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARDG
M2_12H	ISYDGDNKYY	ADSVKGRFTI	SRENSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARDG
M2_16H	VWYDGSTRYS	PDSVKGRFTI	SRDDSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARDR
M2_18H	VWYDGSTTYS	PDSVKGRFTI	SRDDSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARDR
M2_20H	ITYDGRNKYY	ADSVKGRFTI	SRENSKNTLY	LQMNSLRTE	TAEYYCARDG
M2_31H	ISYDGSNKYY	ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARDW
M2_32H	SGIGG.DTYY	ADSVKGRFSI	SRDNAKNSLY	LQMNSLRAED	MAVYYCAREY
M2_33H	ITYDGDNKYY	ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARDG
M2_34H	ISYDGSNKYY	ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARDW
M2_35H	ISYDGSNKYY	ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARDW
	101				150
M2_11H	IG.....	....YFDYWG	QGTLLTVSSA	STKGPSVFPL	APSSKSTSGG
M2_12H	IG.....	....YFDYWG	QGTLLTVSSA	STKGPSVFPL	APSSKSTSGG
M2_16H	VG.....	....LFDYWG	QGTLLTVSSA	STKGPSVFPL	APSSKSTSGG
M2_18H	VG.....	....LFDYWG	QGTLLTVSSA	STKGPSVFPL	APSSKSTSGG
M2_20H	IG.....	....YFDYWG	QGILTVSSA	STKGPSVFPL	APSSKSTSGG
M2_31H	IG.....	....YFDYWG	QGTLLTVSSA	STKGPSVFPL	APSSKSTSGG
M2_32H	YYGSGSYRVD	YYYGYMDVWG	QGTLLTVSSA	STKGPSVFPL	APSSKSTSGG
M2_33H	IG.....	....YFDYWG	QGTLLTVSSA	STKGPSVFPL	APSSKSTSGG
M2_34H	IG.....	....YFDYWG	QGTLLTVSSA	STKGPSVFPL	APSSKSTSGG
M2_35H	IG.....	....YFDYWG	QGTLLTVSSA	STKGPSVFPL	APSSKSTSGG
	151				200
M2_11H	TAALGCLVKD	YFPEPVTWS	NSGALTSGVH	TFFAVLQSSG	LYSLSSVTV
M2_12H	TAALGCLVKD	YFPEPVTWS	NSGALTSGVH	TFFAVLQSSG	LYSLSSVTV
M2_16H	TAALGCLVKD	YFPEPVTWS	NSGALTSGVH	TFFAVLQSSG	LYSLSSVTV
M2_18H	TAALGCLVKD	YFPEPVTWS	NSGALTSGVH	TFFAVLQSSG	LYSLSSVTV
M2_20H	TAALGCLVKD	YFPEPVTWS	KSGALTSGVH	TFFAVLQSSG	LYSLSSVTV
M2_31H	TAALGCLVKD	YFPEPVTWS	NSGALTSGVH	TFFAVLQSSG	LYSLSSVTV
M2_32H	TAALGCLVKD	YFPEPVTWS	NSGALTSGVH	TFFAVLQSSG	LYSLSSVTV
M2_33H	TAALGCLVKD	YFPEPVTWS	NSGALTSGVH	TFFAVLQSSG	LYSLSSVTV
M2_34H	TAALGCLVKD	YFPEPVTWS	NSGALTSGVH	TFFAVLQSSG	LYSLSSVTV
M2_35H	TAALGCLVKD	YFPEPVTWS	NSGALTSGVH	TFFAVLQSSG	LYSLSSVTV
	201			237	
M2_11H	PSSSLGTQTY	ICNVNHKPSN	TKVDKKAEPK	SHHHHHH	
M2_12H	PSSSLGTQTY	ICNVNHKPS	TKVDKKAEPK	SHHHHHH	
M2_16H	PSSSLGTQTY	ICNVNHKPSN	TKVDKKAEPK	SHHHHHH	
M2_18H	PSSSLGTQTY	ICNVNHKPSN	TKVDKKAEPK	SHHHHHH	
M2_20H	PSSSLGTQTY	ICNVNHKPSN	TKVDKKAEPK	SHHHHHH	
M2_31H	PSSSLGTQTY	ICNVNHKPSN	TKVDKKAEPK	SHHHHHH	
M2_32H	PSSSLGTQTY	ICNVNHKPSN	TKVDKKAEPK	SHHHHHH	
M2_33H	PSSSLGTQTY	ICNVNHKPSN	TKVDKKAEPK	SHHHHHH	
M2_34H	PSSSLGTQTY	ICNVNHKPSN	TKVDKKAEPK	SHHHHHH	
M2_35H	PSSSLGTQTY	ICNVNHKPSN	TKVDKKAEPK	SHHHHHH	

10-10M親和性で切り捨てられたM2-Lκ鎖VKCK (9月23日木曜日)

(配列番号: 72、74、76、78、80、82、84、86、88、および90をそれぞれ示す)

	1				50
M2_11L	EIVMTQSPGT	LSLSPGERAT	LSCRASQGV	SSYLAWYQK	PGQAPRLLIY
M2_12L	EIVMTQSPGT	LSLSPGERAT	LSCRASQGV	SSYLAWYQK	PGQAPRLLIY
M2_16L	EIVMTQSPGT	LSLSPGERAT	LSCRASQSV	SSYLAWYQK	PGQAPRLLIY
M2_18L	EIVMTQSPGT	LSLSPGERAT	LSCRASQSV	STYLAWYQK	PGQAPRLLIY
M2_20L	EIVMTQSPGT	LSLSPGERAT	LSCRASQSV	SSYLAWYQK	PGQAPRLLIY
M2_31L	EIVLTQSPAT	LSLSPGERAT	LSCRASQSV	S.YLAWYQK	PGQAPRLLIY
M2_32L	EIVLTQSPAT	LSLSPGERAT	LSCRASQSV	S.YLAWYQK	PGQAPRLLIY
M2_33L	EIVLTQSPGT	LSLSPGERAT	LSCRASQSV	SSYLAWYQK	PGQAPRLLIY
M2_34L	EIVLTQSPAT	LSLSPGERAT	LSCRASQSV	S.YLAWYQK	PGQAPRLLIY
M2_35L	EIVLTQSPAT	LSLSPGERAT	LSCRASQSV	S.YLAWYQK	PGQAPRLLIY
	51				100
M2_11L	GASSRATGIP	DRFSGSGSGT	DFTLTISRLE	PEDFAVYYCQ	QYGSSPPFTF
M2_12L	GASSRATGIP	DRFSGSGSGT	DFTLTISSE	PEDFAVYYCQ	QYGSSPPYTF
M2_16L	GASSRATGIP	DRFSVSGSGT	DFTLTISRLE	PEDFAVYYCQ	QYGSS...FTF
M2_18L	GASSRATGIP	DRFSGSGSGT	DFTLTISRLE	PEDFAVYYCQ	QYVSS...FTF
M2_20L	GASSRATGIP	DRFSGSGSGT	DFTLTISRLE	PEDFAVYYCQ	QYGSSPMYTF
M2_31L	DASNRATGIP	ARFSGSGSGT	DFTLTISSE	PEDFAVYYCQ	QRTNWP.RTF
M2_32L	DASNRAAGIP	ARFSGSGSGT	DFTLTISSE	PEDFAVYYCQ	QRNWP.LTF
M2_33L	GASSRATGIP	DRFSGSGSGT	DFTLTISRLE	PEDFAVYYCQ	QYGSSPPYTF
M2_34L	DASNRATGIP	ARFSGSGSGT	DFTLTISSE	PEDFAVYYCQ	QRTNWP.RTF
M2_35L	DASNRATGIP	ARFSGSGSGT	DFTLTISSE	PEDFAVYYCQ	QRTNWP.RTF
	101				150
M2_11L	GPGTKVDIKR	TVAAPSVFIF	PPSDEQLRSG	TASVVCLLNN	FYPREAKVQW
M2_12L	GQGTKLEIKR	TVAAPSVFIF	PPSDEQLKSG	TASVVCLLNN	FYPREAKVQW
M2_16L	GPGTKVDIKR	TVAAPSVFIF	PPSDEQLKSG	TASVVCLLNN	FYPREAKVQW
M2_18L	GPGTKVDIKR	TVAAPSVFIF	PPSDEQLKSG	TASVVCLLNN	FYPREAKVQW
M2_20L	GQGTKLEIKR	TVAAPSVFIF	PPSDEQLKSG	TASVVCLLNN	FYPREAKVQW
M2_31L	GQGTKVEIKR	TVAAPSVFIF	PPSDEQLKSG	TASVVCLLNN	FYPREAKVQW
M2_32L	GGGTKVEIKR	TVAAPSVFIF	PPSDEQLKSG	TASVVCLLNN	FYPREAKVQW
M2_33L	GQGTKLEIKR	TVAAPSVFIF	PPSDEQLKSG	TASVVCLLNN	FYPREAKVQW
M2_34L	GQGTKVEIKR	TVAAPSVFIF	PPSDEQLKSG	TASVVCLLNN	FYPREAKVQW
M2_35L	GQGTKVEIKR	TVAAPSVFIF	PPSDEQLKSG	TASVVCLLNN	FYPREAKVQW
	151				200
M2_11L	KVDNALQSGN	SQESVTEQDS	KDSTYLSST	LTLKADYK	HKVYACEVTH
M2_12L	KVDNALQSGN	SQESVTEQDS	KDSTYLSST	LTLKADYK	HKVYACEVTH
M2_16L	KVDNALQSGN	SQESVTEQDS	KDSTYLSST	LTLKADYK	HKVYACEVTH
M2_18L	KVDNALQSGN	SQESVTEQDS	KDSTYLSST	LTLKADYK	HKVYACEVTH
M2_20L	KVDNALQSGN	SQESVTEQDS	KDSTYLSST	LTLKADYK	HKVYACEVTH
M2_31L	KVDNALQSGN	SQESVTEQDS	KDSTYLSST	LTLKADYK	HKVYACEVTH
M2_32L	KVDNALQSGN	SQESVTEQDS	KDSTYLSST	LTLKADYK	HKVYACEVTH
M2_33L	KVDNALQSGN	SQESVTEQDS	KDSTYLSST	LTLKADYK	HKVYACEVTH
M2_34L	KVDNALQSGN	SQESVTEQDS	KDSTYLSST	LTLKADYK	HKVYACEVTH
M2_35L	KVDNALQSGN	SQESVTEQDS	KDSTYLSST	LTLKADYK	HKVYACEVTH
	201			226	
M2_11L	QGLSSPVTKS	FNRGESYPYD	VPDYAS		
M2_12L	QGLSSPVTKS	FNRGESYPYD	VPDYAS		
M2_16L	QGLSSPVTKS	FNRGESYPYD	VPDYAS		
M2_18L	QGLSSPVTKS	FNRGESYPYD	VPDYAS		
M2_20L	QGLSSPVTKS	FNRGESYPYD	VPDYAS		
M2_31L	QGLSSPVTKS	FNRGESYPYD	VPDYAS		
M2_32L	QGLSSPVTKS	FNRGESYPYD	VPDYAS		
M2_33L	QGLSSPVTKS	FNRGESYPYD	VPDYAS		
M2_34L	QGLSSPVTKS	FNRGESYPYD	VPDYAS		
M2_35L	QGLSSPVTKS	FNRGESYPYD	VPDYAS		

【手続補正14】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0256

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0256】

プライマー1161 **5'-TC GCT GCC CAA CCA GCC ATG GCC** (配列番号：111)

プライマー1182 **5'- GT GAT AAA CTA CCG CAT TA AAG CTT ATC GAT GAT  
AAG CTG TCA A TTA GTG ATG GTG ATG GTG ATG ACA TTT GG**  
(配列番号：112)



## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US00/33042
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(7) : C07K 16/00; G01N 33/53 US CL : 435/7.1; 530/388.15 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/7.1; 530/388.15 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WEST BIOSIS MEDLINE EMBASE CAS ABSTRACTS		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5,811,524 A (BRAMS et al) 22 Septmeber 1998, see entire document.	1-53
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 16 JANUARY 2001		Date of mailing of the international search report 12 APR 2001
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer PATRICK J. NOLAN <i>Pat. J. Nolan</i> Telephone No. (703) 308-0196

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコ-ト <sup>*</sup> (参考)
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	N
// C 1 2 N 15/09		C 1 2 N 15/00	A
(81)指定国	EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW		
(72)発明者	バルキース グナース アメリカ合衆国 カリフォルニア州 エス コンディード パセオ デル ソル 2893		
(72)発明者	グレイ ジェフ アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ソラ ナ ビーチ ベイ メドーズ ウェイ 417		
(72)発明者	ロンバーグ ニルス アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ウッ ドサイド ウェスト カリフォルニア ウ エイ 780		
F タ-ム(参考)	4B024 AA11 BA44 BA56 CA04 DA06 EA04 GA14 HA15 4H045 AA11 BA10 CA40 DA76 EA50 FA74 GA21		

专利名称(译)	人抗体作为检测试剂		
公开(公告)号	<a href="#">JP2003530543A</a>	公开(公告)日	2003-10-14
申请号	JP2001541060	申请日	2000-12-06
[标]申请(专利权)人(译)	公司的Biosite 仁国际农场		
申请(专利权)人(译)	公司的Biosite 仁国际农场		
[标]发明人	ブシュラージュ バルキースグナース グレイジェフ ロンバーグニルス		
发明人	ブシュラージュ バルキースグナース グレイジェフ ロンバーグニルス		
IPC分类号	C07K16/18 C07K16/24 C12N15/09 G01N33/53 G01N33/543		
CPC分类号	C07K16/18 C07K16/244 C07K2317/21 C07K2317/55 G01N33/543 Y02A50/58 Y10S435/962 Y10S435/973 Y10S436/809		
FI分类号	G01N33/543.501.N G01N33/543.525.G G01N33/543.525.W G01N33/543.595 C07K16/18.ZNA G01N33/53.N C12N15/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA44 4B024/BA56 4B024/CA04 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA14 4B024/HA15 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/GA21		
优先权	09/456090 1999-12-06 US		
其他公开文献	JP2003530543A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

本发明提供了使用人抗体的体外检测方法。该方法对于分析含有HAMA或嗜异性抗体的人类样品特别有用。人抗体能够与此类样品中的分析物结合，而不会与样品中存在的HAMA或嗜异性抗体结合。该方法尤其可以使用三明治格式来执行。

モノクローナル抗体	免疫反応性タンパク質の割合 (%)	親和性 ( $10^9 M^{-1}$ )
M1-3	93	6.1
M1-4	93	22
M1-5	90	11
M1-8	91	10
M1-10	90	6.1
M1-21	67	6.6
M1-23	91	8.9
M1-25	90	6.4
M2-11	93	10
M2-12	93	28
M2-16	90	1.9
M2-18	80	5.4
M2-20	94	37
M2-34	94	27