

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2011-79837

(P2011-79837A)

(43) 公開日 平成23年4月21日(2011.4.21)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 16/22 (2006.01)	C O 7 K 16/22 Z N A	4 B O 2 4
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 H O 4 5

審査請求 有 請求項の数 3 O L 外国語出願 (全 106 頁)

(21) 出願番号	特願2010-241562 (P2010-241562)	(71) 出願人	500049716
(22) 出願日	平成22年10月27日 (2010.10.27)		アムジェン・インコーポレーテッド
(62) 分割の表示	特願2006-520171 (P2006-520171) の分割		アメリカ合衆国 シーエー 91320, サウザンド オークス, ワン アムジェン センター ドライブ
原出願日	平成16年7月16日 (2004.7.16)	(71) 出願人	504429002
(31) 優先権主張番号	60/488,681		アムジェン・フレモント・インコーポレイテッド
(32) 優先日	平成15年7月18日 (2003.7.18)		アメリカ合衆国、カリフォルニア・94555、フレモント、カイザー・ドライブ・6701
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100062007
			弁理士 川口 義雄
		(74) 代理人	100103920
			弁理士 大崎 勝真

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 肝細胞増殖因子に対する特異的結合因子

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】肝細胞増殖因子(HGF)と相互作用する特異的結合因子、HGFに対する特異的結合因子の薬学的有効量を投与することによって癌を治療する方法、HGFに対する特異的結合因子を用いて、試料中のHGFの量を検出する方法を提供する。

【解決手段】CDR1a、CDR2a及びCDR3aから選択される少なくとも一つの相補性決定領域(CDR)を含み、抗体の重鎖と共同して、肝細胞増殖因子(HGF)を結合することができる、単離されたポリペプチド。CDR1b、CDR2b及びCDR3bから選択される少なくとも一つの相補性決定領域(CDR)を含み、抗体の軽鎖と共同して、HGFを結合することができる、単離されたポリペプチド。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

C D R 1 a、C D R 2 a 及び C D R 3 a から選択される少なくとも一つの相補性決定領域 (C D R) を含み、抗体の重鎖と共同して、肝細胞増殖因子 (H G F) を結合することができる、単離されたポリペプチド。

(C D R 1 a は、アミノ酸配列 a b c d e f g h i j k l m n o p q を含み (アミノ酸 a は、リジン、アルギニン又はグルタミンから選択され; アミノ酸 b は、セリン又はアラニンから選択され; アミノ酸 c は、セリンであり; アミノ酸 d は、グルタミンであり; アミノ酸 e は、セリン、グリシン又はアスパラギン酸から選択され; アミノ酸 f は、バリン若しくはイソロイシンから選択され、又は存在せず; アミノ酸 g は、ロイシン若しくはフェニルアラニンから選択され、又は存在せず; アミノ酸 h は、フェニルアラニン若しくはチロシンから選択され、又は存在せず; アミノ酸 i は、セリンであり、又は存在せず; アミノ酸 j は、セリンであり、又は存在せず; アミノ酸 k は、アスパラギン、スレオニンから選択され、又は存在せず; アミノ酸 l は、アスパラギン、イソロイシン又はバリンから選択され; アミノ酸 m は、リジン、アルギニン、アスパラギン又はアスパラギン酸から選択され; アミノ酸 n は、アスパラギン又はセリンから選択され; アミノ酸 o は、チロシン、アスパラギン酸、トリプトファン又はアスパラギンから選択され; アミノ酸 p は、ロイシンであり; 及びアミノ酸 q は、アラニン、グリシン又はアスパラギンから選択される。);

C D R 2 a は、アミノ酸配列 r s t u v w x を含み (アミノ酸 r は、トリプトファン、アラニン、バリン、グルタミン酸又はグリシンから選択され; アミノ酸 s は、アラニンであり、アミノ酸 t は、セリンであり、アミノ酸 u は、スレオニン、セリン又はアスパラギン酸から選択され; アミノ酸 v は、アルギニン又はロイシンから選択され; アミノ酸 w は、グルタミン酸、グルタミン又はアラニンから選択され; 及びアミノ酸 x は、セリン、アスパラギン又はスレオニンから選択される。);

C D R 3 a は、アミノ酸配列 y z a' b' c' d' e' f' g' h' を含む (アミノ酸 y は、グルタミン又はロイシンから選択され; アミノ酸 z は、グルタミン、アスパラギン又はアルギニンから選択され; アミノ酸 a' は、チロシン、ヒスチジン、アラニン又はセリンから選択され; アミノ酸 b' は、フェニルアラニン、チロシン、アスパラギン酸、アスパラギン又はイソロイシンから選択され; アミノ酸 c' は、セリン、グリシン又はアスパラギンから選択され; アミノ酸 d' は、プロリン、チロシン、スレオニン、フェニルアラニン、アスパラギン酸、ロイシン又はトリプトファンから選択され; アミノ酸 e' は、プロリンであり; アミノ酸 f' は、プロリンであり、又は存在せず; アミノ酸 g' は、トリプトファン、ロイシン、プロリン、チロシン又はイソロイシンであり; 及びアミノ酸 h' は、スレオニン又はアスパラギンである。)。)

【請求項 2】

配列番号 24、26、28、30、32、34、36、38、40 及び 42 から選択される少なくとも一つのアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 3】

配列番号 60、61、62、63、64、65、66、67、68 及び 69 から選択される少なくとも一つのアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 4】

配列番号 70、71、72、73、74、75、76、77、78 及び 79 から選択される少なくとも一つのアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 5】

配列番号 80、81、82、83、84、85、86、87、88 及び 89 から選択される少なくとも一つのアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 6】

前記ポリペプチドが特異的結合因子である、請求項 1 から 5 の何れかに記載のポリペプチド。

10

20

30

40

50

【請求項 7】

前記ポリペプチドが抗体である、請求項 1 から 5 の何れかに記載のポリペプチド。

【請求項 8】

C D R 1 b、C D R 2 b 及び C D R 3 b から選択される少なくとも一つの相補性決定領域 (C D R) を含み、抗体の軽鎖と共同して、H G F を結合することができる、単離されたポリペプチド。

(C D R 1 b は、アミノ酸配列 a b c d e f g を含み (アミノ酸 a は、セリンであり、又は存在せず；アミノ酸 b は、アスパラギン酸若しくはグリシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸 c は、アスパラギン酸、グリシン、セリン、バリン、スレオニン又はイソロイシンから選択され；アミノ酸 d は、チロシンであり；アミノ酸 e は、チロシン又はグリシンから選択され；アミノ酸 f は、イソロイシン、メチオニン又はトリプトファンから選択され；及びアミノ酸 g は、ヒスチジン、アスパラギン又はセリンから選択される。)；

C D R 2 b は、アミノ酸配列 h i j k l m n o p q r s t u v w x を含み (アミノ酸 h は、トリプトファン、チロシン、バリン、アスパラギン又はグルタミン酸から選択され；アミノ酸 i は、イソロイシン、フェニルアラニン又はバリンから選択され；アミノ酸 j は、アスパラギン、セリン、トリプトファン又はチロシンから選択され；アミノ酸 k は、プロリン、セリン、チロシン又はヒスチジンから選択され；アミノ酸 l は、アスパラギン、セリン又はアスパラギン酸から選択され；アミノ酸 m は、セリン又はグリシンから選択され；アミノ酸 n は、グリシン若しくはセリンから選択され、又は存在せず；アミノ酸 o は、グリシン、スレオニン、アスパラギン酸、セリン、イソロイシン又はアスパラギンから選択され；アミノ酸 p は、スレオニン、イソロイシン又はリジンから選択され；アミノ酸 q は、アスパラギン又はチロシンから選択され；アミノ酸 r は、チロシン又はヒスチジンから選択され；アミノ酸 s は、アラニン又はアスパラギンから選択され；アミノ酸 t は、グルタミン、アスパラギン酸、又はプロリンから選択され；アミノ酸 u は、リジン又はセリンから選択され；アミノ酸 v は、フェニルアラニン、バリン又はロイシンから選択され；アミノ酸 w は、グルタミン又はリジンから選択され、及びアミノ酸 x は、グリシン又はセリンから選択される。)；

C D R 3 b は、アミノ酸配列 y z a' b' c' d' e' f' g' h' i' j' k' l' m' n' o' p' q' r' を含む (アミノ酸 y は、グルタミン酸、アスパラギン酸、セリン若しくはグリシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸 z は、ロイシン、グルタミン酸、アスパラギン酸、ヒスチジン、プロリン若しくはグリシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸 a' は、グルタミン酸、チロシン若しくはロイシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸 b' は、ロイシン、アスパラギン、グリシン、ヒスチジン、チロシン若しくはトリプトファンから選択され、又は存在せず；アミノ酸 c' は、アルギニン、セリン、グルタミン酸、チロシン、グリシン若しくはフェニルアラニンから選択され、又は存在せず；アミノ酸 d' は、グリシンであり、又は存在せず；アミノ酸 e' は、トリプトファン若しくはチロシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸 f' は、アスパラギン酸であり、又は存在せず；アミノ酸 g' は、セリン若しくはアルギニンから選択され、又は存在せず；アミノ酸 h' は、セリンであり、又は存在せず；アミノ酸 i' は、グリシン若しくはチロシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸 j' は、チロシン、グルタミン酸若しくはアスパラギン酸から選択され、又は存在せず；アミノ酸 k' は、チロシン、フェニルアラニン若しくはアスパラギン酸から選択され、又は存在せず；アミノ酸 l' は、チロシン、アスパラギン酸、ヒスチジン若しくはトリプトファンから選択され、又は存在せず；アミノ酸 m' は、チロシン、グリシン、アスパラギン酸、プロリン若しくはセリンから選択され、又は存在せず；アミノ酸 n' は、グリシン、バリン、チロシン若しくはアスパラギン酸から選択され、又は存在せず；アミノ酸 o' は、ロイシン、アラニン、グリシン若しくはチロシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸 p' は、メチオニン、フェニルアラニン又はチロシンから選択され；アミノ酸 q' は、アスパラギン酸であり、アミノ酸 r' は、バリン、チロシン、イソロイシン又はブ

10

20

30

40

50

ロリンから選択される。)。)

【請求項 9】

配列番号 25、27、29、31、33、35、37、39、41 及び 43 から選択される、少なくとも一つのアミノ酸配列を含む、請求項 8 に記載のポリペプチド。

【請求項 10】

配列番号 90、91、92、93、94、95、96、97、98 及び 99 から選択される、少なくとも一つのアミノ酸配列を含む、請求項 8 に記載のポリペプチド。

【請求項 11】

配列番号 100、101、102、103、104、105、106、107、108 及び 109 から選択される、少なくとも一つのアミノ酸配列を含む、請求項 8 に記載のポリペプチド。

10

【請求項 12】

配列番号 110、111、112、113、114、115、116、117、118 及び 119 から選択される、少なくとも一つのアミノ酸配列を含む、請求項 8 に記載のポリペプチド。

【請求項 13】

前記ポリペプチドが特異的結合因子である、請求項 8 から 12 の何れかに記載のポリペプチド。

【請求項 14】

前記ポリペプチドが抗体である、請求項 8 から 12 の何れかに記載のポリペプチド。

20

【請求項 15】

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

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

30

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

40

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

50

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

(i i) C D R 1 b、C D R 2 b 又は C D R 3 b から選択される少なくとも一つの相補性決定領域 (C D R) を含み、抗体の軽鎖と共同して、H G F を結合することができる、第二のポリペプチドと、

(C D R 1 b は、アミノ酸配列 a b c d e f g を含み (アミノ酸 a は、セリンであり、又は存在せず；アミノ酸 b は、アスパラギン酸若しくはグリシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸 c は、アスパラギン酸、グリシン、セリン、バリン、スレオニン又はイソロイシンから選択され；アミノ酸 d は、チロシンであり；アミノ酸 e は、チロシン又はグリシンから選択され；アミノ酸 f は、イソロイシン、メチオニン又はトリプトファンから選択され；及びアミノ酸 g は、ヒスチジン、アスパラギン又はセリンから選択される。))；

C D R 2 b は、アミノ酸配列 h i j k l m n o p q r s t u v w x を含み (アミノ酸 h は、トリプトファン、チロシン、バリン、アスパラギン又はグルタミン酸から選択され；アミノ酸 i は、イソロイシン、フェニルアラニン又はバリンから選択され；アミノ酸 j は、アスパラギン、セリン、トリプトファン又はチロシンから選択され；アミノ酸 k は、プロリン、セリン、チロシン又はヒスチジンから選択され；アミノ酸 l は、アスパラギン、セリン又はアスパラギン酸から選択され；アミノ酸 m は、セリン又はグリシンから選択され；アミノ酸 n は、グリシン若しくはセリンから選択され、又は存在せず；アミノ酸 o は、グリシン、スレオニン、アスパラギン酸、セリン、イソロイシン又はアスパラギンから選択され；アミノ酸 p は、スレオニン、イソロイシン又はリジンから選択され；アミノ酸 q は、アスパラギン又はチロシンから選択され；アミノ酸 r は、チロシン又はヒスチジンから選択され；アミノ酸 s は、アラニン又はアスパラギンから選択され；アミノ酸 t は、グルタミン、アスパラギン酸又はプロリンから選択され；アミノ酸 u は、リジン又はセリンから選択され；アミノ酸 v は、フェニルアラニン、バリン又はロイシンから選択され；アミノ酸 w は、グルタミン又はリジンから選択され、及びアミノ酸 x は、グリシン又はセリンから選択される。))；

C D R 3 b は、アミノ酸配列 y z a' b' c' d' e' f' g' h' i' j' k' l' m' n' o' p' q' r' を含む (アミノ酸 y は、グルタミン酸、アスパラギン酸、セリン若しくはグリシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸 z は、ロイシン、グルタミン酸、アスパラギン酸、ヒスチジン、プロリン若しくはグリシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸 a' は、グルタミン酸、チロシン若しくはロイシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸 b' は、ロイシン、アスパラギン、グリシン、ヒスチジン、チロシン若しくはトリプトファンから選択され、又は存在せず；アミノ酸 c' は、アルギニン、セリン、グルタミン酸、チロシン、グリシン若しくはフェニルアラニンから選択され、又は存在せず；アミノ酸 d' は、グリシンであり、又は存在せず；アミノ酸 e' は、トリプトファン若しくはチロシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸 f' は、アスパラギン酸であり、又は存在せず；アミノ酸 g' は、セリン若しくはアルギニンから選択され、又は存在せず；アミノ酸 h' は、セリンであり、又は存在せず；アミノ酸 i' は、グリシン若しくはチロシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸 j' は、チロシン、グルタミン酸若しくはアスパラギン酸から選択され、又は存在せず；アミノ酸 k' は、チロシン、フェニルアラニン若しくはアスパラギン酸から選択され、又は存在せず；アミノ酸 l' は、チロシン、アスパラギン酸、ヒスチジン若しくはトリプトファンから選択され、又は存在せず；アミノ酸 m' は、チロシン、グリシン、アスパラギン酸、プロリン若しくはセリンから選択され、又は存在せず；アミノ酸 n' は、グリシン、バリン、チロシン若しくはアスパラギン酸から選択され、又は存在せず；アミノ酸 o' は、ロイシン、アラニン、グリシン若しくはチロシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸 p' は、メチオニン、フェニルアラニン又はチロシンから選択され；アミノ酸 q

10

20

30

40

50

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

【請求項 16】

配列番号 24、26、28、30、32、34、36、38、40 及び 42 から選択される、少なくとも一つのアミノ酸配列を含む、請求項 15 に記載の特異的結合因子。

【請求項 17】

配列番号 25、27、29、31、33、35、37、39、41 及び 43 から選択される、少なくとも一つのアミノ酸配列を含む、請求項 15 に記載の特異的結合因子。

【請求項 18】

配列番号 24 及び 25 のアミノ酸配列を含む、請求項 15 に記載の特異的結合因子。

10

【請求項 19】

配列番号 26 及び 27 のアミノ酸配列を含む、請求項 15 に記載の特異的結合因子。

【請求項 20】

配列番号 28 及び 29 のアミノ酸配列を含む、請求項 15 に記載の特異的結合因子。

【請求項 21】

配列番号 30 及び 31 のアミノ酸配列を含む、請求項 15 に記載の特異的結合因子。

【請求項 22】

配列番号 32 及び 33 のアミノ酸配列を含む、請求項 15 に記載の特異的結合因子。

【請求項 23】

配列番号 34 及び 35 のアミノ酸配列を含む、請求項 15 に記載の特異的結合因子。

20

【請求項 24】

配列番号 36 及び 37 のアミノ酸配列を含む、請求項 15 に記載の特異的結合因子。

【請求項 25】

配列番号 38 及び 39 のアミノ酸配列を含む、請求項 15 に記載の特異的結合因子。

【請求項 26】

配列番号 40 及び 41 のアミノ酸配列を含む、請求項 15 に記載の特異的結合因子。

【請求項 27】

配列番号 42 及び 43 のアミノ酸配列を含む、請求項 15 に記載の特異的結合因子。

【請求項 28】

配列番号 60、61、62、63、64、65、66、67、68 及び 69 から選択される、少なくとも一つのアミノ酸配列を含む、請求項 15 に記載の特異的結合因子。

30

【請求項 29】

配列番号 70、71、72、73、74、75、76、77、78 及び 79 から選択される、少なくとも一つのアミノ酸配列を含む、請求項 15 に記載の特異的結合因子。

【請求項 30】

配列番号 80、81、82、83、84、85、86、87、88 及び 89 から選択される、少なくとも一つのアミノ酸配列を含む、請求項 15 に記載の特異的結合因子。

【請求項 31】

配列番号 90、91、92、93、94、95、96、97、98 及び 99 から選択される、少なくとも一つのアミノ酸配列を含む、請求項 15 に記載の特異的結合因子。

40

【請求項 32】

配列番号 100、101、102、103、104、105、106、107、108 及び 109 から選択される、少なくとも一つのアミノ酸配列を含む、請求項 15 に記載の特異的結合因子。

【請求項 33】

配列番号 110、111、112、113、114、115、116、117、118 及び 119 から選択される、少なくとも一つのアミノ酸配列を含む、請求項 15 に記載の特異的結合因子。

【請求項 34】

配列番号 25、27、29、31、33、35、37、39、41 及び 43 から選択さ

50

れるアミノ酸配列を含む第一の可変領域を含む重鎖と、

配列番号 24、26、28、30、32、34、36、38、40 及び 42 から選択されるアミノ酸配列を含む第二の可変領域を含む軽鎖と、
を含む、請求項 15 に記載の特異的結合因子。

【請求項 35】

特異的結合因子が、

a) 1.24.1、1.29.1、1.60.1、1.61.3、1.74.3、1.75.1、2.4.4、2.12.1、2.40.1 及び 3.10.1 から選択される少なくとも一つの抗体と、HGF への結合を競合する；

b) 1.24.1、1.29.1、1.60.1、1.61.3、1.74.3、1.75.1、2.4.4、2.12.1、2.40.1 及び 3.10.1 から選択される少なくとも一つの抗体と同一の、HGF のエピトープに結合する；並びに

c) 1.24.1、1.29.1、1.60.1、1.61.3、1.74.3、1.75.1、2.4.4、2.12.1、2.40.1 及び 3.10.1 から選択される少なくとも一つの抗体によって結合される抗原と同一の抗原に結合する；
から選択される少なくとも一つの特性を有する、請求項 34 に記載の特異的結合因子。

【請求項 36】

配列番号 25、27、29、31、33、35、37、39、41 及び 43 から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 90%、95% 又は 99% 同一のアミノ酸配列を含む第一の可変領域を含む重鎖と、

配列番号 24、26、28、30、32、34、36、38、40 及び 42 から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 90%、95% 又は 99% 同一のアミノ酸配列を含む第二の可変領域を含む軽鎖と、
を含む、請求項 15 に記載の特異的結合因子。

【請求項 37】

特異的結合因子が、

a) 1.24.1、1.29.1、1.60.1、1.61.3、1.74.3、1.75.1、2.4.4、2.12.1、2.40.1 及び 3.10.1 から選択される少なくとも一つの抗体と、HGF への結合を競合する；

b) 1.24.1、1.29.1、1.60.1、1.61.3、1.74.3、1.75.1、2.4.4、2.12.1、2.40.1 及び 3.10.1 から選択される少なくとも一つの抗体と同一の、HGF のエピトープに結合する；並びに

c) 1.24.1、1.29.1、1.60.1、1.61.3、1.74.3、1.75.1、2.4.4、2.12.1、2.40.1 及び 3.10.1 から選択される少なくとも一つの抗体によって結合される抗原と同一の抗原に結合する；
から選択される少なくとも一つの特性を有する、請求項 36 に記載の特異的結合因子。

【請求項 38】

特異的結合因子が抗体である、請求項 15 から 37 の何れかに記載の特異的結合因子。

【請求項 39】

重鎖と軽鎖がリンカーによって結合されている、請求項 38 に記載の抗体。

【請求項 40】

単一 Fv 抗体である、請求項 38 に記載の抗体。

【請求項 41】

免疫学的に機能的な免疫グロブリン断片である、請求項 38 に記載の抗体。

【請求項 42】

Fab 抗体である、請求項 38 に記載の抗体。

【請求項 43】

Fab' 抗体である、請求項 38 に記載の抗体。

【請求項 44】

(Fab')² 抗体である、請求項 38 に記載の抗体。

【請求項 45】

完全ヒト抗体である、請求項 38 に記載の抗体。

【請求項 46】

ヒト化抗体である、請求項 38 に記載の抗体。

【請求項 47】

キメラ抗体である、請求項 38 に記載の抗体。

【請求項 48】

抗体が、HGF の c - M e t 受容体への結合を阻害する、請求項 38 に記載の抗体。

【請求項 49】

配列番号 24、26、28、30、32、34、36、38、40 及び 42 から選択される、少なくとも一つのアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド。

10

【請求項 50】

配列番号 25、27、29、31、33、35、37、39、41 及び 43 から選択される、少なくとも一つのアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド。

【請求項 51】

配列番号 1、3、5、7、9、11、13、15、17 及び 19 から選択される、少なくとも一つのヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子。

【請求項 52】

配列番号 2、4、6、8、10、12、14、16、18 及び 20 から選択される、少なくとも一つのヌクレオチド酸配列を含む、単離された核酸分子。

20

【請求項 53】

C D R 1 a、C D R 2 a 及び C D R 3 a から選択される少なくとも一つの相補性決定領域 (C D R) を含み、抗体の重鎖と共同して、肝細胞増殖因子 (H G F) を結合することができるポリペプチドをコードする単離された核酸分子。

(C D R 1 a は、アミノ酸配列 a b c d e f g h i j k l m n o p q を含み (アミノ酸 a は、リジン、アルギニン又はグルタミンから選択され; アミノ酸 b は、セリン又はアラニンから選択され; アミノ酸 c は、セリンであり、アミノ酸 d は、グルタミンであり; アミノ酸 e は、セリン、グリシン又はアスパラギン酸から選択され; アミノ酸 f は、バリン若しくはイソロイシンから選択され、又は存在せず; アミノ酸 g は、ロイシン若しくはフェニルアラニンから選択され、又は存在せず; アミノ酸 h は、フェニルアラニン若しくはチロシンから選択され、又は存在せず; アミノ酸 i は、セリンであり、又は存在せず; アミノ酸 j は、セリンであり、又は存在せず; アミノ酸 k は、アスパラギン、スレオニンから選択され、又は存在せず; アミノ酸 l は、アスパラギン、イソロイシン又はバリンから選択され; アミノ酸 m は、リジン、アルギニン、アスパラギン又はアスパラギン酸から選択され; アミノ酸 n は、アスパラギン又はセリンから選択され; アミノ酸 o は、チロシン、アスパラギン酸、トリプトファン又はアスパラギンから選択され; アミノ酸 p は、ロイシンであり; 及びアミノ酸 q は、アラニン、グリシン又はアスパラギンから選択される。);

30

C D R 2 a は、アミノ酸配列 r s t u v w x を含み (アミノ酸 r は、トリプトファン、アラニン、バリン、グルタミン酸又はグリシンから選択され; アミノ酸 s は、アラニンであり、アミノ酸 t は、セリンであり、アミノ酸 u は、スレオニン、セリン又はアスパラギン酸から選択され; アミノ酸 v は、アルギニン又はロイシンから選択され; アミノ酸 w は、グルタミン酸、グルタミン又はアラニンから選択され; 及びアミノ酸 x は、セリン、アスパラギン又はスレオニンから選択される。);

40

C D R 3 a は、アミノ酸配列 y z a ' b ' c ' d ' e ' f ' g ' h ' を含む (アミノ酸 y は、グルタミン又はロイシンから選択され; アミノ酸 z は、グルタミン、アスパラギン又はアルギニンから選択され; アミノ酸 a ' は、チロシン、ヒスチジン、アラニン又はセリンから選択され; アミノ酸 b ' は、フェニルアラニン、チロシン、アスパラギン酸、アスパラギン又はイソロイシンから選択され; アミノ酸 c ' は、セリン、グリシン又はアスパラギンから選択され; アミノ酸 d ' は、プロリン、チロシン、スレ

50

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

【請求項 5 4】

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

【請求項 5 5】

C D R 1 b、C D R 2 b 及び C D R 3 b から選択される少なくとも一つの相補性決定領域 (C D R) を含み、抗体の軽鎖と共同して、H G F を結合することができるポリペプチドをコードする単離された核酸分子。

(C D R 1 b は、アミノ酸配列 a b c d e f g を含み (アミノ酸 a は、セリンであり、又は存在せず；アミノ酸 b は、アスパラギン酸若しくはグリシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸 c は、アスパラギン酸、グリシン、セリン、バリン、スレオニン又はイソロイシンから選択され；アミノ酸 d は、チロシンであり；アミノ酸 e は、チロシン又はグリシンから選択され；アミノ酸 f は、イソロイシン、メチオニン又はトリプトファンから選択され；及びアミノ酸 g は、ヒスチジン、アスパラギン又はセリンから選択される。))；

C D R 2 b は、アミノ酸配列 h i j k l m n o p q r s t u v w x を含み (アミノ酸 h は、トリプトファン、チロシン、バリン、アスパラギン又はグルタミン酸から選択され；アミノ酸 i は、イソロイシン、フェニルアラニン又はバリンから選択され；アミノ酸 j は、アスパラギン、セリン、トリプトファン又はチロシンから選択され；アミノ酸 k は、プロリン、セリン、チロシン又はヒスチジンから選択され；アミノ酸 l は、アスパラギン、セリン又はアスパラギン酸から選択され；アミノ酸 m は、セリン又はグリシンから選択され；アミノ酸 n は、グリシン若しくはセリンから選択され、又は存在せず；アミノ酸 o は、グリシン、スレオニン、アスパラギン酸、セリン、イソロイシン又はアスパラギンから選択され；アミノ酸 p は、スレオニン、イソロイシン又はリジンから選択され；アミノ酸 q は、アスパラギン又はチロシンから選択され；アミノ酸 r は、チロシン又はヒスチジンから選択され；アミノ酸 s は、アラニン又はアスパラギンから選択され；アミノ酸 t は、グルタミン、アスパラギン酸又はプロリンから選択され；アミノ酸 u は、リジン又はセリンから選択され；アミノ酸 v は、フェニルアラニン、バリン又はロイシンから選択され；アミノ酸 w は、グルタミン又はリジンから選択され、及びアミノ酸 x は、グリシン又はセリンから選択される。))；

C D R 3 b は、アミノ酸配列 y z a' b' c' d' e' f' g' h' i' j' k' l' m' n' o' p' q' r' を含み (アミノ酸 y は、グルタミン酸、アスパラギン酸、セリン若しくはグリシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸 z は、ロイシン、グルタミン酸、アスパラギン酸、ヒスチジン、プロリン若しくはグリシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸 a' は、グルタミン酸、チロシン若しくはロイシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸 b' は、ロイシン、アスパラギン、グリシン、ヒスチジン、チロシン若しくはトリプトファンから選択され、又は存在せず；アミノ酸 c' は、アルギニン、セリン、グルタミン酸、チロシン、グリシン若しくはフェニルアラニンから選択され、又は存在せず；アミノ酸 d' は、グリシンであり、又は存在せず；アミノ酸 e' は、トリプトファン若しくはチロシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸 f' は、アスパラギン酸であり、又は存在せず；アミノ酸 g' は、セリン若しくはアルギニンから選択され、又は存在せず；アミノ酸 h' は、セリンであり、又は存在せず；アミノ酸 i' は、グリシン若しくはチロシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸 j' は、チロシン、グルタミン酸若しくはアスパラギン酸から選択され、又は存在せず；アミノ酸 k' は、チロシン、フェニルアラニン若しくはアスパラギン酸から選択され、又は存在せず；アミノ酸 l' は、チロシン、アスパラギン酸、ヒスチジン若しくはトリプトファンから選択され、又は存在せず；アミノ酸 m' は、チロシン、グリシン、アスパ

10

20

30

40

50

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

【請求項 56】

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

【請求項 57】

請求項 53 に記載の核酸分子を含む宿主細胞。

【請求項 58】

請求項 55 に記載の核酸分子を含む宿主細胞。

【請求項 59】

請求項 34 又は 36 に記載の特異的結合因子を産生する、単離された細胞株。

【請求項 60】

特異的結合因子が抗体である、請求項 59 に記載の単離された細胞株。

【請求項 61】

1.24.1、1.29.1、1.60.1、1.61.3、1.74.3、1.75.1、2.4.4、2.12.1、2.40.1 及び 3.10.1 から選択される抗体を産生する、単離された細胞株。

【請求項 62】

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

【請求項 63】

特異的結合因子が抗体である、請求項 62 に記載の組成物。

【請求項 64】

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

【請求項 65】

特異的結合因子が抗体である、請求項 64 に記載の組成物。

【請求項 66】

請求項 62 に記載の組成物を投与することを含む、患者の癌を治療する方法。

【請求項 67】

請求項 63 に記載の組成物を投与することを含む、患者の癌を治療する方法。

【請求項 68】

請求項 64 に記載の組成物を投与することを含む、患者の癌を治療する方法。

【請求項 69】

請求項 65 に記載の組成物を投与することを含む、患者の癌を治療する方法。

【請求項 70】

10

20

30

40

50

- 請求項 6 2 に記載の組成物を投与することを含む、患者の充実性腫瘍を治療する方法。
- 【請求項 7 1】
- 請求項 6 3 に記載の組成物を投与することを含む、患者の充実性腫瘍を治療する方法。
- 【請求項 7 2】
- 請求項 6 4 に記載の組成物を投与することを含む、患者の充実性腫瘍を治療する方法。
- 【請求項 7 3】
- 請求項 6 5 に記載の組成物を投与することを含む、患者の充実性腫瘍を治療する方法。
- 【請求項 7 4】
- 請求項 3 4 又は 3 6 に記載の特異的結合因子の投与と少なくとも一つの化学療法治療とを含む、患者の癌を治療する方法。 10
- 【請求項 7 5】
- 特異的結合因子が、化学療法治療を施す前に投与される、請求項 7 4 に記載の方法。
- 【請求項 7 6】
- 特異的結合因子が、化学療法治療と同時に投与される、請求項 7 4 に記載の方法。
- 【請求項 7 7】
- 特異的結合因子が、化学療法治療を施した後に投与される、請求項 7 4 に記載の方法。
- 【請求項 7 8】
- 請求項 3 4 又は 3 6 に記載の特異的結合因子の投与と放射線療法とを含む、患者の癌を治療する方法。 20
- 【請求項 7 9】
- 特異的結合因子が、放射線治療を施す前に投与される、請求項 7 8 に記載の方法。
- 【請求項 8 0】
- 特異的結合因子が、放射線療法と同時に投与される、請求項 7 8 に記載の方法。
- 【請求項 8 1】
- 特異的結合因子が、放射線治療を施した後に投与される、請求項 7 8 に記載の方法。
- 【請求項 8 2】
- 請求項 3 4 又は 3 6 に記載の特異的結合因子に試料を接触させることを含む、試料中の肝細胞増殖因子（HGF）のレベルを検出する方法。
- 【請求項 8 3】
- 特異的結合因子が抗体である、請求項 8 2 に記載の方法。 30
- 【請求項 8 4】
- HGF に対する特異的結合因子を投与することを含む、HGF の Me t への結合を阻害する方法。
- 【請求項 8 5】
- 特異的結合因子が抗体である、請求項 8 4 に記載の方法。
- 【請求項 8 6】
- 特異的結合因子が、配列番号 2 5、2 7、2 9、3 1、3 3、3 5、3 7、3 9、4 1 及び 4 3 から選択される少なくとも一つのアミノ酸配列を含む、請求項 8 4 に記載の方法。
- 【請求項 8 7】 40
- 特異的結合因子が、配列番号 2 4、2 6、2 8、3 0、3 2、3 4、3 6、3 8、4 0 及び 4 2 から選択される少なくとも一つのアミノ酸配列を含む、請求項 8 4 に記載の方法。
- 【請求項 8 8】
- 配列番号 1 6 4 及び 1 6 5 から選択される、少なくとも一つのアミノ酸配列を含む、ポリペプチド。
- 【請求項 8 9】
- 配列番号 1 6 4 及び 1 6 5 から選択される少なくとも一つのアミノ酸配列から実質的になる、ポリペプチド。
- 【請求項 9 0】 50

配列番号 1 6 4 及び 1 6 5 から選択される、少なくとも一つのアミノ酸配列を結合することができる、特異的結合因子。

【請求項 9 1】

配列番号 1 6 4 及び 1 6 5 から選択される、少なくとも一つのアミノ酸配列を結合することができる、抗体又は抗原結合ドメイン。

【請求項 9 2】

請求項 1 6 4 及び 1 6 5 から選択される少なくとも一つのポリペプチドを動物に投与することと、HGF を結合できる抗体を前記動物から取得することを含む、肝細胞増殖因子 (HGF) を結合できる抗体を取得する方法。

【請求項 9 3】

配列番号 1 6 4 及び 1 6 5 から選択される少なくとも一つのアミノ酸配列を含むポリペプチドを投与することによって、請求項 1 8 から 2 7 に記載の特異的結合因子の任意の一つの、肝細胞増殖因子 (HGF) への結合を減少させ、又は防止する方法。

【請求項 9 4】

配列番号 1 6 4 及び 1 6 5 から選択される少なくとも一つのアミノ酸配列からなるポリペプチドを投与することによって、請求項 1 8 から 2 7 に記載のポリペプチドの任意の一つの、肝細胞増殖因子 (HGF) への結合を減少させ、又は防止する方法。

【請求項 9 5】

配列番号 1 6 4 及び 1 6 5 から選択される少なくとも一つのアミノ酸配列を含むポリペプチドを投与することによって、特異的結合因子の、肝細胞増殖因子 (HGF) への結合を減少させ、又は防止する方法。

【請求項 9 6】

配列番号 1 6 4 及び 1 6 5 から選択される少なくとも一つのアミノ酸配列からなるポリペプチドを投与することによって、特異的結合因子の、肝細胞増殖因子 (HGF) への結合を減少させ、又は防止する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本願は、2003 年 7 月 18 日に出願された米国仮出願第 60 / 488, 681 号 (いかなる目的のためにも、参照により本明細書に組み込まれる。) の利益を主張する。

【0002】

本発明は、肝細胞増殖因子 (HGF) に結合する特異的結合因子に関する。組成物、該組成物を製造する方法、並びに、充実性腫瘍及び血液悪性腫瘍を含む (これらに限定されない。) 、ある種の癌などの様々な疾患を治療する方法も記載されている。

【背景技術】

【0003】

肝細胞増殖因子 (HGF) は、肝細胞に対する強力な分裂促進因子として同定された。HGF は、上皮細胞の運動を誘導する繊維芽細胞及び平滑筋の分泌タンパク質としても同定された。HGF は、拡散因子 (SF、Scatter Factor) としても、文献に引用されている。

【0004】

HGF は、主として間葉細胞によって産生される多機能ヘテロ二量体ポリペプチドであり、Met 受容体チロシンキナーゼ (Met) に対するリガンドとして作用する。ヒト Met 受容体は、「c-met」としても知られている。Met 受容体チロシンキナーゼ - HGF (Met - HGF) 経路を介したシグナル伝達は、増殖 (有糸分裂)、拡散 (運動)、マトリックスを介した細胞運動の刺激 (浸潤) 及び分岐形態発生を含む (これらに限定されない。) 、一連の細胞応答をもたらすことが示されている。インビボでは、Met - HGF シグナル伝達経路 (Met - HGF) は、例えば、神経の誘導、肝臓の再生、創傷治癒、血管新生、増殖、浸潤、形態的分化及び正常な発生学的発育において役割を果たしている。これらの機能に加えて、Met - HGF の対は、ヒトの癌においても役割を果

10

20

30

40

50

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

【0005】

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

【0006】

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

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Carrolo et al., Nat Med. 2003 9(11):1363-9 (Oct. 12, 2003)

【非特許文献2】Grant, D.S. et al., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 90(5) 1937-41 (1993)

【非特許文献3】Bussolino et al., J. Cell Biol., 119(3):629-641 (1992)

【非特許文献4】Montesano et al., Cell, 67:901-908 (1991)

【非特許文献5】Canon et al., Br. J. Ophthalmol. 84(7):732-5 (2000)

【発明の概要】

【0008】

ある実施形態において、本発明は、CDR1a、CDR2a及びCDR3aから選択される少なくとも一つの相補性決定領域(CDR)を含み、抗体の重鎖と共同して、肝細胞増殖因子(HGF)を結合することができる、単離されたポリペプチドを提供する。

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

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

C D R 2 a は、アミノ酸配列 r s t u v w x を含み (アミノ酸 r は、トリプトファン、アラニン、バリン、グルタミン酸又はグリシンから選択され；アミノ酸 s は、アラニンであり、アミノ酸 t は、セリンであり、アミノ酸 u は、スレオニン、セリン又はアスパラギン酸から選択され；アミノ酸 v は、アルギニン又はロイシンから選択され；アミノ酸 w は、グルタミン酸、グルタミン又はアラニンから選択され；及びアミノ酸 x は、セリン、アスパラギン又はスレオニンから選択される。)；

C D R 3 a は、アミノ酸配列 y z a' b' c' d' e' f' g' h' を含む (アミノ酸 y は、グルタミン又はロイシンから選択され；アミノ酸 z は、グルタミン、アスパラギン又はアルギニンから選択され；アミノ酸 a' は、チロシン、ヒスチジン、アラニン又はセリンから選択され；アミノ酸 b' は、フェニルアラニン、チロシン、アスパラギン酸、アスパラギン又はイソロイシンから選択され；アミノ酸 c' は、セリン、グリシン又はアスパラギンから選択され；アミノ酸 d' は、プロリン、チロシン、スレオニン、フェニルアラニン、アスパラギン酸、ロイシン又はトリプトファンから選択され；アミノ酸 e' は、プロリンであり；アミノ酸 f' は、プロリンであり、又は存在せず；アミノ酸 g' は、トリプトファン、ロイシン、プロリン、チロシン又はイソロイシンであり；及びアミノ酸 h' は、スレオニン又はアスパラギンである。)。

【0009】

ある実施形態において、本発明は、C D R 1 b、C D R 2 b 及び C D R 3 b から選択される少なくとも一つの相補性決定領域 (C D R) を含み、抗体の軽鎖と共同して、H G F を結合することができる、単離されたポリペプチドを提供する。

(C D R 1 b は、アミノ酸配列 a b c d e f g を含み (アミノ酸 a は、セリンであり、又は存在せず；アミノ酸 b は、アスパラギン酸若しくはグリシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸 c は、アスパラギン酸、グリシン、セリン、バリン、スレオニン又はイソロイシンから選択され；アミノ酸 d は、チロシンであり；アミノ酸 e は、チロシン又はグリシンから選択され；アミノ酸 f は、イソロイシン、メチオニン又はトリプトファンから選択され；及びアミノ酸 g は、ヒスチジン、アスパラギン又はセリンから選択される。)；

C D R 2 b は、アミノ酸配列 h i j k l m n o p q r s t u v w x を含み (アミノ酸 h は、トリプトファン、チロシン、バリン、アスパラギン又はグルタミン酸から選択され；アミノ酸 i は、イソロイシン、フェニルアラニン又はバリンから選択され；アミノ酸 j は、アスパラギン、セリン、トリプトファン又はチロシンから選択され；アミノ酸 k は、プロリン、セリン、チロシン又はヒスチジンから選択され；アミノ酸 l は、アスパラギン、セリン又はアスパラギン酸；アミノ酸 m は、セリン又はグリシンから選択され；アミノ酸 n は、グリシン若しくはセリンから選択され、又は存在せず；アミノ酸 o は、グリシン、スレオニン、アスパラギン酸、セリン、イソロイシン又はアスパラギンから選択され；アミノ酸 p は、スレオニン、イソロイシン又はリジンから選択され；アミノ酸 q は、アスパラギン又はチロシンから選択され；アミノ酸 r は、チロシン又はヒスチジンから選択され；アミノ酸 s は、アラニン又はアスパラギンから選択され；アミノ酸 t は、グルタミン、アスパラギン酸又はプロリンから選択され；アミノ酸 u は、リジン又はセリンから選択され；アミノ酸 v は、フェニルアラニン、バリン又はロイシンから選択され；アミノ酸 w は、グルタミン又はリジンから選択され、及びアミノ酸 x は、グリシン又はセリンから選択される。)；

C D R 3 b は、アミノ酸配列 y z a' b' c' d' e' f' g' h' i' j' k' l' m' n' o' p' q' r' を含む (アミノ酸 y は、グルタミン酸、アスパラギン酸、セリン若しくはグリシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸 z は、ロイシン、グルタミン酸、アスパラギン酸、ヒスチジン、プロリン若

10

20

30

40

50

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

10

20

【0010】

ある実施形態において、本発明は、

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

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

30

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

40

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

50

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

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

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

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

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

10

20

30

40

50

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

【0011】

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

【0012】

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

10

【0013】

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

【0014】

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

【0015】

ある実施形態において、本発明は、

20

C D R 1 a、C D R 2 a 及び C D R 3 a から選択される少なくとも一つの相補性決定領域 (C D R) を含み、抗体の重鎖と共同して、肝細胞増殖因子 (H G F) を結合することができるポリペプチドをコードする単離された核酸分子を提供する。

(C D R 1 a は、アミノ酸配列 a b c d e f g h i j k l m n o p q を含み (アミノ酸 a は、リジン、アルギニン又はグルタミンから選択され; アミノ酸 b は、セリン又はアラニンから選択され; アミノ酸 c は、セリンであり; アミノ酸 d は、グルタミンであり; アミノ酸 e は、セリン、グリシン又はアスパラギン酸から選択され; アミノ酸 f は、バリン若しくはイソロイシンから選択され、又は存在せず; アミノ酸 g は、ロイシン若しくはフェニルアラニンから選択され、又は存在せず; アミノ酸 h は、フェニルアラニン若しくはチロシンから選択され、又は存在せず; アミノ酸 i は、セリンであり、又は存在せず; アミノ酸 j は、セリンであり、又は存在せず; アミノ酸 k は、アスパラギン、スレオニンから選択され、又は存在せず; アミノ酸 l は、アスパラギン、イソロイシン又はバリンから選択され; アミノ酸 m は、リジン、アルギニン、アスパラギン、又はアスパラギン酸から選択され; アミノ酸 n は、アスパラギン又はセリンから選択され; アミノ酸 o は、チロシン、アスパラギン酸、トリプトファン又はアスパラギンから選択され; アミノ酸 p は、ロイシンであり; 及びアミノ酸 q は、アラニン、グリシン又はアスパラギンから選択される。);

30

C D R 2 a は、アミノ酸配列 r s t u v w x を含み (アミノ酸 r は、トリプトファン、アラニン、バリン、グルタミン酸又はグリシンから選択され; アミノ酸 s は、アラニンであり、アミノ酸 t は、セリンであり、アミノ酸 u は、スレオニン、セリン又はアスパラギン酸から選択され; アミノ酸 v は、アルギニン又はロイシンから選択され; アミノ酸 w は、グルタミン酸、グルタミン又はアラニンから選択され; 及びアミノ酸 x は、セリン、アスパラギン又はスレオニンから選択される。);

40

C D R 3 a は、アミノ酸配列 y z a' b' c' d' e' f' g' h' を含み (アミノ酸 y は、グルタミン又はロイシンから選択され; アミノ酸 z は、グルタミン、アスパラギン又はアルギニンから選択され; アミノ酸 a' は、チロシン、ヒスチジン、アラニン又はセリンから選択され; アミノ酸 b' は、フェニルアラニン、チロシン、アスパラギン酸、アスパラギン又はイソロイシンから選択され; アミノ酸 c' は、セリン、グリシン又はアスパラギンから選択され; アミノ酸 d' は、プロリン、チロシン、スレオニン、フェニルアラニン、アスパラギン酸、ロイシン又はトリプトファンから選択され

50

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

【0016】

ある実施形態において、本発明は、

C D R 1 b、C D R 2 b 及び C D R 3 b から選択される少なくとも一つの相補性決定領域 (C D R) を含み、抗体の軽鎖と共同して、H G F を結合することができるポリペプチドをコードする単離された核酸分子を提供する。

(C D R 1 b は、アミノ酸配列 a b c d e f g を含み (アミノ酸 a は、セリンであり、又は存在せず；アミノ酸 b は、アスパラギン酸若しくはグリシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸 c は、アスパラギン酸、グリシン、セリン、バリン、スレオニン又はイソロイシンから選択され；アミノ酸 d は、チロシンであり；アミノ酸 e は、チロシン又はグリシンから選択され；アミノ酸 f は、イソロイシン、メチオニン又はトリプトファンから選択され；及びアミノ酸 g は、ヒスチジン、アスパラギン又はセリンから選択される。))；

C D R 2 b は、アミノ酸配列 h i j k l m n o p q r s t u v w x を含み (アミノ酸 h は、トリプトファン、チロシン、バリン、アスパラギン又はグルタミン酸から選択され；アミノ酸 i は、イソロイシン、フェニルアラニン又はバリンから選択され；アミノ酸 j は、アスパラギン、セリン、トリプトファン又はチロシンから選択され；アミノ酸 k は、プロリン、セリン、チロシン、又はヒスチジンから選択され；アミノ酸 l は、アスパラギン、セリン又はアスパラギン酸から選択され；アミノ酸 m は、セリン又はグリシンから選択され；アミノ酸 n は、グリシン若しくはセリンから選択され、又は存在せず；アミノ酸 o は、グリシン、スレオニン、アスパラギン酸、セリン、イソロイシン又はアスパラギンから選択され；アミノ酸 p は、スレオニン、イソロイシン又はリジンから選択され；アミノ酸 q は、アスパラギン又はチロシンから選択され；アミノ酸 r は、チロシン又はヒスチジンから選択され；アミノ酸 s は、アラニン又はアスパラギンから選択され；アミノ酸 t は、グルタミン、アスパラギン酸又はプロリンから選択され；アミノ酸 u は、リジン又はセリンから選択され；アミノ酸 v は、フェニルアラニン、バリン又はロイシンから選択され；アミノ酸 w は、グルタミン又はリジンから選択され、及びアミノ酸 x は、グリシン又はセリンから選択される。))；

C D R 3 b は、アミノ酸配列 y z a' b' c' d' e' f' g' h' i' j' k' l' m' n' o' p' q' r' を含み (アミノ酸 y は、グルタミン酸、アスパラギン酸、セリン若しくはグリシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸 z は、ロイシン、グルタミン酸、アスパラギン酸、ヒスチジン、プロリン若しくはグリシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸 a' は、グルタミン酸、チロシン若しくはロイシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸 b' は、ロイシン、アスパラギン、グリシン、ヒスチジン、チロシン若しくはトリプトファンから選択され、又は存在せず；アミノ酸 c' は、アルギニン、セリン、グルタミン酸、チロシン、グリシン若しくはフェニルアラニンから選択され、又は存在せず；アミノ酸 d' は、グリシンであり、又は存在せず；アミノ酸 e' は、トリプトファン若しくはチロシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸 f' は、アスパラギン酸であり、又は存在せず；アミノ酸 g' は、セリン若しくはアルギニンから選択され、又は存在せず；アミノ酸 h' は、セリンであり、又は存在せず；アミノ酸 i' は、グリシン若しくはチロシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸 j' は、チロシン、グルタミン酸若しくはアスパラギン酸から選択され、又は存在せず；アミノ酸 k' は、チロシン、フェニルアラニン若しくはアスパラギン酸から選択され、又は存在せず；アミノ酸 l' は、チロシン、アスパラギン酸、ヒスチジン若しくはトリプトファンから選択され、又は存在せず；アミノ酸 m' は、チロシン、グリシン、アスパラギン酸、プロリン若しくはセリンから選択され、又は存在せず；アミノ酸 n' は、グリシン、バリン、チロシン若しくはアスパラギン酸から選択され、又は存在せず；アミノ酸 o' は、ロイシン、アラニン、グリシン若しくはチロシンから選択され、又は存在せず；

10

20

30

40

50

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

【0017】

ある実施形態において、本発明は、1.24.1、1.29.1、1.60.1、1.61.3、1.74.3、1.75.1、2.4.4、2.12.1、2.40.1及び3.10.1から選択される抗体を産生する、単離された細胞株を提供する。

【0018】

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

10

【0019】

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

【0020】

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

【0021】

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

【0022】

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

20

【0023】

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

【0024】

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

30

【0025】

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

【0026】

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

【図面の簡単な説明】

【0027】

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

40

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

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

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

50

を示している。生殖細胞系列遺伝子の識別は、左に記されている。C D R 領域は、並置された配列の上に、太線として記されている。

【図 3】H G F に対するある抗体の、軽鎖及び重鎖の可変領域をコードする D N A 配列を示している。抗体名、生殖細胞系列の標記及び配列番号が、それぞれの配列に対して記されている。天然のシグナルペプチド配列には、下線が付されている。ヒト κ、I g G 1 及び I g G 2 定常領域のアミノ酸配列も記載されている。

【図 3 - 1】図 3 (続き)

【図 3 - 2】図 3 (続き)

【図 3 - 3】図 3 (続き)

【図 3 - 4】図 3 (続き)

10

【図 4】H G F に対するある抗体の、軽鎖及び重鎖の可変領域のアミノ酸配列を示している。抗体名、生殖細胞系列の表記及び配列番号が、それぞれの配列に対して記されている。天然のシグナルペプチド配列には、下線が付されている。ヒト κ、I g G 1 及び I g G 2 定常領域のアミノ酸配列も示されている。

【図 4 - 1】図 4 (続き)

【図 4 - 2】図 4 (続き)

【図 5 A】H G F に対するある抗体の、軽鎖及び重鎖の相補性決定領域 (C D R) のアミノ酸配列を示している。抗体名及び配列番号が、それぞれの配列に対して記されている。図 5 A は、H G F に対するある抗体の、軽鎖の C D R のアミノ酸配列を示している。

【図 5 B】H G F に対するある抗体の、軽鎖及び重鎖の相補性決定領域 (C D R) のアミノ酸配列を示している。抗体名及び配列番号が、それぞれの配列に対して記されている。図 5 B は、H G F に対するある抗体の、重鎖の C D R のアミノ酸配列を示している。

20

【図 6 A】実施例 8 に論述されている、H G F に対するある抗体の、K d 測定の結果を示している。図 6 A は、速度論的方法から得られたデータを示している。

【図 6 B】実施例 8 に論述されている、H G F に対するある抗体の、K d 測定の結果を示している。図 6 B は、平衡 / 溶液法から得られたデータを示している。

【図 7】ある抗体の、ヒト H G F 及びマウス H G F への結合能を調べる、実施例 8 に論述されているウェスタンブロットから得られるオートラジオグラムを示している。左 (レーン 1 - 4) のパネルは、非還元条件下で実施された実験から得られたオートラジオグラムを示している。右 (レーン 5 - 8) のパネルは、還元条件下で実施された実験から得られたオートラジオグラムを示している。

30

【図 7 - 1】図 7 (続き)

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

40

【図 8 - 1】図 8 (続き)

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

【図 9 B】ニワトリのアビジンの配列を示している。

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

50

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

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

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

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

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

10

【図 11C】実施例 8E に論述されている、ヒト HGF に対するプロテアーゼ保護実験において、抗体 2.12.1 への結合によって、タンパク質分解消化から保護されたペプチドのアミノ酸配列を示している。

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

【図 12 - 1】図 12（続き）

【図 13】実施例 9 に論述されている中和アッセイから得られた IC_{50} データを示している。

【図 14】実施例 10 に論述されている、PC3 細胞での中和アッセイから得られたデータを示している。

20

【図 15】実施例 10 に論述されている、U-87 細胞での阻害アッセイから得られたデータを示している。

【図 16A】実施例 11 に論述されている実験から得られた結果を示しており、マウス中の U-87 MG 異種移植腫瘍に対して、HGF に対するある抗体が及ぼす影響を評価している。微小残存病変モデルにおける、U-87 MG 異種移植腫瘍増殖に対する、抗体 2.4.4 の用量反応データを示している。

【図 16B】実施例 11 に論述されている実験から得られた結果を示しており、マウス中の U-87 MG 異種移植腫瘍に対して、HGF に対するある抗体が及ぼす影響を評価している。確立された病変モデルにおける、U-87 異種移植腫瘍増殖に対する、抗体 2.4.4 の用量反応データを示している。

30

【図 16C】実施例 11 に論述されている実験から得られた結果を示しており、マウス中の U-87 MG 異種移植腫瘍に対して、HGF に対するある抗体が及ぼす影響を評価している。U-87 の微小残存病変モデル（16C 及び 16D）において、HGF に対する抗体を検査する一対一実験から得られたデータを示している。

【図 16D】実施例 11 に論述されている実験から得られた結果を示しており、マウス中の U-87 MG 異種移植腫瘍に対して、HGF に対するある抗体が及ぼす影響を評価している。U-87 の微小残存病変モデル（16C 及び 16D）において、HGF に対する抗体を検査する一対一実験から得られたデータを示している。

【図 16E】実施例 11 に論述されている実験から得られた結果を示しており、マウス中の U-87 MG 異種移植腫瘍に対して、HGF に対するある抗体が及ぼす影響を評価している。U-87 の確立された病変モデル（16E 及び 16F）において、HGF に対する抗体を検査する一対一実験から得られたデータを示している。

40

【図 16F】実施例 11 に論述されている実験から得られた結果を示しており、マウス中の U-87 MG 異種移植腫瘍に対して、HGF に対するある抗体が及ぼす影響を評価している。U-87 の確立された病変モデル（16E 及び 16F）において、HGF に対する抗体を検査する一対一実験から得られたデータを示している。

【発明を実施するための形態】

【0028】

先述の一般的な記載及び以下の詳細な記載は何れも、典型的で、説明的なものにすぎず

50

、特許請求の範囲に記載されている本発明を限定するものではないことを理解しなければならない。本願において、特段の記載がなければ、単数の使用は複数を含む。本願において、別段の記載がなければ、「又は」の使用は、「及び／又は」を意味する。さらに、「含んでいる」という用語並びに「含む」及び「含まれた」などのその他の形式の使用は、限定的なものではない。また、「要素」又は「成分」などの用語は、特段の記載がなければ、一つのユニットを含む要素及び成分並びに１より多いサブユニットを含む要素及び成分を包含する。「部分」という用語の使用は、部分の一部又は部分の全体を含み得る。

【００２９】

本明細書に使用されている節の見出しは、整理の目的のためにすぎず、記載されている主題を限定することを意図するものではない。本願に引用されている全部の文書又は文書の一部（特許、特許出願、記事、書籍及び学術論文を含むが、これらに限定されない。）は、参照により、その全体が、いかなる目的のためにも、明示的に本明細書に組み込まれる。

10

【００３０】

定義

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

20

30

【００３１】

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

【００３２】

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

40

【００３３】

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

【００３４】

50

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

【0035】

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

【0036】

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

【0037】

「キメラ抗体」という用語は、抗体の一部が特定の種又は特定の抗体クラスの配列に対して相同であるが、抗体の別の部分は異なる種又は異なる抗体クラスの配列に対して相同である抗体を表す。例えば、米国特許第 4,816,567 号及び「Morrisone et al., Proc Natl Acad Sci (USA), 81:6851-6855 (1985)」を参照されたい。

【0038】

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

【0039】

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

【0040】

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

【0041】

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

【0042】

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

【0043】

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

【0044】

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

10

20

30

40

50

r e アッセイによって決定される。ある実施形態において、親和性は、速度論的な方法によって決定される。ある実施形態において、親和性は、平衡 / 溶液法によって決定される。

【 0 0 4 5 】

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

10

【 0 0 4 6 】

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

【 0 0 4 7 】

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

20

【 0 0 4 8 】

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

【 0 0 4 9 】

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

30

【 0 0 5 0 】

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

40

【 0 0 5 1 】

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

【 0 0 5 2 】

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

50

成されるように連結されている。

【 0 0 5 3 】

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

【 0 0 5 4 】

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

【 0 0 5 5 】

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

【 0 0 5 6 】

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

【 0 0 5 7 】

関連するポリペプチドの同一性及び類似性は、公知の方法によって、容易に算出することができる。このような方法には、「Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford Unive

10

20

30

40

50

rsity Press, New York (1988); Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York (1993); Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey (1994); Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press (1987); Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York (1991); and Carillo et al., SIAM J. Applied Math., 48:1073 (1988)」に記載されている方法が含まれるが、これらに限定されるものではない。

10

【0058】

同一性を決定するための方法には、検査される配列間の一致を最大にするように設計されているものがある。同一性を決定するための方法は、公に入手可能なコンピュータプログラムに記載されている。2つの配列間の同一性を決定するためのコンピュータプログラム法には、GAP (Devereux et al., Nucl. Acid. Res., 12:387 (1984); Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI, BLASTP, BLASTN, and FASTA (Altschul et al., J. Mol. Biol., 215:403-410 (1990))を含む、GCGプログラムパッケージが含まれるが、これに限定されるものではない。BLASTXプログラムは、全米バイオテクノロジー情報センター (NCBI) 及び他の入手源から公に入手することができる (BLAST Manual, Altschul et al., NCB/NLM/NIH Bethesda, MD 20894; Altschul et al., supra (1990))。周知の Smith Waterman アルゴリズムも、同一性を決定するために使用することができる。

20

【0059】

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

30

【0060】

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

40

50

ては、「Henikoff et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:10915-10919 (1992)」を参照。)も、アルゴリズムによって使用される。

【0061】

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

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

比較マトリックス：上記Henikoffら(1992)から得られるBLOSUM 62；

ギャップペナルティ：12

ギャップ長ペナルティ：4

類似性の閾値：0。

【0062】

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

【0063】

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

【0064】

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

【0065】

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

【 0 0 6 6 】

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

【 0 0 6 7 】

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

10

【 0 0 6 8 】

天然に存在する残基は、

- 1) 疎水性：ノルロイシン、Met、Ala、Val、Leu、Ile；
- 2) 中性親水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；
- 3) 酸性：Asp、Glu；
- 4) 塩基性：His、Lys、Arg；
- 5) 鎖の配向性に影響を与える残基：Gly、Pro；及び
- 6) 芳香族：Trp、Tyr、Phe

20

という一般的な側鎖特性に基づいて、クラスに分類することができる。

【 0 0 6 9 】

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

【 0 0 7 0 】

このような変化を施す際には、ある実施形態によれば、アミノ酸の疎水性親水性指標を考慮し得る。その疎水性及び電荷特性に基づいて、各アミノ酸には、疎水性親水性指標が割り当てられている。それらは、イソロイシン(+4.5)；バリン(+4.2)；ロイシン(+3.8)；フェニルアラニン(+2.8)；システイン/シスチン(+2.5)；メチオニン(+1.9)；アラニン(+1.8)；グリシン(-0.4)；スレオニン(-0.7)；セリン(-0.8)；トリプトファン(-0.9)；チロシン(-1.3)；プロリン(-1.6)；ヒスチジン(-3.2)；グルタミン酸(-3.5)；グルタミン(-3.5)；アスパラギン酸(-3.5)；アスパラギン(-3.5)；リジン(-3.9)；及びアルギニン(-4.5)である。

30

【 0 0 7 1 】

タンパク質に対して相互作用的生物機能を付与する上での、疎水性親水性アミノ酸指標の重要性は本分野において理解されている。Kyte et al., J. Mol. Biol., 157:105-132 (1982)。ある種のアミノ酸は、類似の疎水性親水性指標又はスコアを有する他のアミノ酸と置換されても、なお、類似の生物活性を保持し得ることが知られている。疎水性親水性指標に基づいて変化を施す際に、ある実施形態では、その疎水性親水性指標が±2以内であるアミノ酸の置換が含まれる。ある実施形態では、±1以内であるものが含まれ、ある実施形態では、±0.5以内であるものが含まれる。

40

【 0 0 7 2 】

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

50

関する。

【0073】

これらのアミノ酸残基には、以下の親水性値が割り振られている。アルギニン（+3.0）；リジン（+3.0）；アスパラギン酸（+3.0±1）；グルタミン酸（+3.0±1）；セリン（+0.3）；アスパラギン（+0.2）；グルタミン（+0.2）；グリシン（0）；スレオニン（-0.4）；プロリン（-0.5±1）；アラニン（-0.5）；ヒスチジン（-0.5）；システイン（-1.0）；メチオニン（-1.3）；バリン（-1.5）；ロイシン（-1.8）；イソロイシン（-1.8）；チロシン（-2.3）；フェニルアラニン（-2.5）及びトリプトファン（-3.4）。類似の親水性値に基づいて変化を施す際に、ある実施形態では、その親水性値が±2以内のアミノ酸の置換が含まれ、ある実施形態では、±1以内のものが含まれ、ある実施形態では、±0.5以内のものが含まれる。一次アミノ酸配列から、親水性に基づいて、エピトープを同定することもできる。これらの領域は、「エピトープコア領域」とも称される。

10

【0074】

典型的なアミノ酸置換が表1に示されている。

【0075】

【表 1】

表 1
アミノ酸置換

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

【0076】

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

保存的アミノ酸置換を施すことができる。

【0077】

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

【0078】

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

【0079】

多数の科学的刊行物が二次構造の予測を取り扱っている。「Moult J., Curr. Opin. in Biotech., 7(4):422-427(1996), Chou et al., Biochemistry, 13(2):222-245(1974); Chou et al., Biochemistry, 113(2):211-222(1974); Chou et al., Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol., 47:45-148(1978); Chou et al., Ann. Rev. Biochem., 47:251-276 and Chou et al., Biophys. J., 26:367-384(1979)」を参照されたい。さらに、現在では、二次構造の予測を補助するために、コンピュータプログラムを使用することができる。二次構造を予測する方法の一つの方法は、相同性モデリングに基づいている。例えば、30%を超える配列同一性又は40%を超える類似性を有する2つのポリペプチド又はタンパク質は、しばしば、類似の構造的トポロジーを有する。近年のタンパク質構造データベース(PDB)の充実、ポリペプチド又はタンパク質の構造内に生じ得る折り畳みの数など、二次構造の予測可能性を向上させた。「Holm et al., Nucl. Acid. Res., 27(1):244-247(1999)」を参照されたい。所定のポリペプチド又はタンパク質中には、限られた数の折り畳みが存在すること、及び、一定以上の数の構造が決定されると、構造予測は劇的に正確さが増し得ることが、示唆されている(Brenner et al., Curr. Opin. Struct. Biol., 7(3):369-376(1997))。

【0080】

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

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

【0081】

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

10

20

【0082】

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

30

40

【0083】

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

50

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

【0084】

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

【0085】

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

【0086】

ペプチド類縁体は、一般に、テンプレートペプチドの特性と類似の特性を有する非ペプチド薬として、製薬産業で使用される。この種の非ペプチド化合物は、「ペプチド模倣体」と名づけられている。「Fauchere, J. Adv. Drug Res. 15:29 (1986); Veber and Freidinger TINS p. 392 (1985); and Evans et al. J. Med. Chem. 30:1229 (1987)」(参照により、いかなる目的のためにも、本明細書に組み込まれる。)このような化合物は、しばしば、コンピュータ化された分子モデリングの助けを借りて開発される。治療的に有用なペプチドと構造的に類似するペプチド模倣体は、類似の治療効果又は予防効果を生じさせるために使用し得る。一般的に、ペプチド模倣体は、ヒト抗体などの模範ポリペプチド（すなわち、生化学的特性又は薬理学的活性を有するポリペプチド）と構造的に類似するが、本分野で周知の方法によって、- - CH₂NH - -、- - CH₂S - -、- - CH₂ - CH₂ - -、- - CH = CH - (シス及びトランス)、- - COCH₂ - -、- - CH(OH)CH₂ - - 及び - - CH₂SO - - から選択される結合によって必要に応じて置換された一又は複数のペプチド結合を有する。コンセンサス配列の一又は複数のアミノ酸を同種のDアミノ酸で体系的に置換すること（例えば、L-リジンに代えてD-リジン）は、一部の実施形態において、より安定なペプチドを作製するために使用し得る。さらに、コンセンサス配列又は実質的に同一なコンセンサス配列変異を含む拘束されたペプチドは、本分野で公知の方法によって、例えば、ペプチドを環状化する分子内ジスルフィド架橋を形成することができる内部システイン残基を付加することによって、作製され得る(Rizo and Gierasch Ann. Rev. Biochem. 61:387 (1992)、参照により、いかなる目的のためにも、本明細書に組み込まれる。)。

【0087】

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

10

20

30

40

50

型の抗体と競合する、原型の抗体の結合断片を表す。ある実施形態において、結合断片は、組み換えDNA技術によって産生される。ある実施形態において、結合断片は、原型抗体の酵素的又は化学的切断によって産生される。結合断片には、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv及び一本鎖抗体が含まれるが、これらに限定されない。

【0088】

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

【0089】

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

【0090】

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

【0091】

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

【0092】

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

【0093】

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

【0094】

「エピトープ」という用語には、免疫グロブリン又はT細胞受容体に特異的な結合をすることができる、任意のポリペプチド決定基が含まれる。ある実施形態において、エピトープ決定基は、例えばアミノ酸、糖側鎖、ホスホリル又はスルホニルなどの分子の、化学的に活性な表面配置を含み、ある実施形態において、特異的な三次元構造特性及び/又は特異的な電荷特性を有し得る。エピトープとは、抗体によって結合される、抗原の領域である。ある実施形態では、タンパク質及び/又は高分子の複雑な混合物中に存在するその標的抗原を、抗体が優先的に認識するときに、抗体は抗原を特異的に結合すると称される。ある実施形態では、解離定数が $1\mu\text{M}$ 以下であるときに、ある実施形態では、解離定数が 100nM 以下であるときに、ある実施形態では、解離定数が 10nM 以下であるときに、抗体は抗原を特異的に結合すると称される。

10

【0095】

本明細書において、「因子」という用語は、化学的化合物、化学的化合物の混合物、生物学的高分子又は生物由来物質から作製された抽出物を表記するために使用される。

【0096】

本明細書において使用される、「標識」又は「標識された」という用語は、例えば、放射性標識されたアミノ酸を取り込ませることによって、又は印を付けたアビジン（例えば、光学的方法又は比色分析法によって検出することができる、蛍光マーカー又は酵素活性を含有するストレプトアビジン）によって検出することができるビオチン部分をポリペプチドに付着させることによって、検出可能なマーカーを取り込むことを表す。ある実施形態において、前記標識又はマーカーは、治療用とすることもできる。標識ポリペプチド及び糖タンパク質を標識する様々な方法が本分野において公知であり、使用することができる。ポリペプチド用の標識の例には、以下の放射性同位体又は放射性核種（例えば、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I ）、蛍光標識（例えば、FITC、ローダミン、ランタニドリン光体）、酵素的標識（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ（ β -ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ）、化学発光、ビオチニル基、二次レポーターによって認識される所定のポリペプチドエピトープ（例えば、ロイシンジッパー対配列、二次抗体に対する結合部位、金属結合ドメイン、エピトープタグ）が含まれるが、これらに限定されない。ある実施形態において、発生し得る立体的障害を減らすために、標識には、様々な長さのスペーサーアームが付着される。

20

30

【0097】

本明細書において使用される「生物試料」という用語には、生物又は以前生物であったものから得られる任意の量の物質が含まれるが、これらに限定されない。このような生物には、ヒト、マウス、サル、ラット、ウサギ及びその他の動物が含まれるが、これらに限定されない。このような物質には、血液、血清、尿、細胞、臓器、組織、骨、骨髓、リンパ節及び皮膚が含まれるが、これらに限定されない。

【0098】

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

40

【0099】

「HGF活性」という用語には、HGFの任意の生物学的効果が含まれる。ある実施形態において、HGF活性は、Met-HGF活性である。ある実施形態において、HGF活性は、Met非依存性のHGF活性である。

【0100】

「Met-HGFシグナル伝達」という用語には、HGFのMet受容体との相互作用

50

が含まれる。

【0101】

「Met - HGF 活性」という用語には、Met - HGF シグナル伝達から生じる任意の生物学的活性が含まれる。典型的な活性には、神経系誘導、肝再生、創傷治癒、成長、浸潤、形態分化、胎生発育、拡散、増殖、アポトーシス、細胞運動、転移、遊走、細胞接着、インテグリンクラスターリング、パキシリンのリン酸化、局所的接着の形成、及び異常な Met - HGF シグナル伝達から生じる癌が含まれるが、これらに限定されない。

【0102】

「異常な Met - HGF シグナル伝達」という用語には、本来シグナル伝達がこのような活性をもたらすときに、Met - HGF シグナル伝達は何らかの Met - HGF 活性を刺激できない任意の状況が含まれる。異常な Met - HGF シグナル伝達には、Met - HGF シグナル伝達が、正常なシグナル伝達とともに発生するはずの Met - HGF 活性より小さな Met - HGF 活性をもたらす任意の状況も含まれる。異常な活性には、Met - HGF シグナル伝達が、正常なシグナル伝達とともに発生するはずの Met - HGF 活性より大きな Met - HGF 活性をもたらす任意の状況も含まれる。異常な Met - HGF シグナル伝達は、例えば、ある種の癌をもたらすことができる。

10

【0103】

「Met 非依存性 HGF 活性」という用語は、Met 受容体への HGF の結合に依存しない、HGF によって影響を受ける任意の生物活性を表す。このような活性には、HGF の他の受容体との相互作用によって影響を受ける生物活性及び他の経路（例えば、Ron 又は met / ron ヘテロ二量体）を通じて HGF によって影響を受ける生物活性が含まれるが、これらに限定されない。

20

【0104】

「異常な HGF 活性」という用語は、HGF 活性が本来あるべき活性よりも高い又は低い、任意の状況を表す。ある状況において、異常な HGF 活性は異常な HGF シグナル伝達から生じる。ある状況において、異常な HGF 活性は、本来あるべき濃度より高い HGF の濃度から生じる。ある状況において、異常な HGF 活性は、本来あるべき濃度より低い HGF の濃度から生じる。

【0105】

本明細書において使用される「薬学的因子又は薬物」という用語は、患者に適切に投与されたときに、所望の治療効果を誘導することができる化学的化合物又は組成物を表す。

30

【0106】

本明細書において使用される「調節物質」という用語は、分子の活性又は機能を変化又は変更する化合物である。例えば、調節物質は、調節物質の不存在下で観察される活性又は機能の規模と比べて、分子のある活性又は機能の規模の増加又は減少を引き起こし得る。ある実施形態において、調節物質は阻害剤であり、分子の少なくとも一つの活性又は機能の規模を減少させる。分子の典型的な活性及び機能には、結合親和性、酵素活性及びシグナル伝達が含まれるが、これらに限定されない。典型的な阻害剤の例には、タンパク質、ペプチド、抗体、ペプチボディ (peptibody)、炭水化物又は小有機分子が含まれるが、これらに限定されるものではない。ペプチボディは、例えば、米国特許第 6, 660, 843 号 (PCT 出願 WO 01/83525 に対応する。) に記載されている。

40

【0107】

本明細書において使用される「実質的に純粋な」とは、対象種が主に存在する種であることを意味する（すなわち、モルベースでは、対象種が、組成物中の他の何れの各種より豊富である。）。ある実施形態において、実質的に精製された画分は、対象種が、存在する全ての高分子種の少なくとも約 50% (モルベースで) を含む組成物である。ある実施形態において、実質的に純粋な組成物は、組成物中に存在する全ての高分子種 (macromolecular species) の約 80% 超、85% 超、90% 超、95% 超又は 99% 超を含むであろう。ある実施形態において、対象種は、組成物が実質的に単一の高分

50

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

【0108】

患者という用語には、ヒト及び動物対象が含まれる。

【0109】

典型的な幾つかの特異的結合因子

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

10

【0110】

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

20

【0111】

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

【0112】

ある実施形態において、HGFに対する特異的結合因子は完全ヒトモノクローナル抗体である。ある実施形態では、重鎖及び軽鎖免疫グロブリン分子をコードするヌクレオチド配列並びに重鎖及び軽鎖免疫グロブリン分子を含むアミノ酸配列（特に、可変領域に対応する配列）が提供される。ある実施形態では、相補性決定領域（CDR）、特にCDR1からCDR3に対応する配列が提供される。ある実施形態によれば、このような免疫グロブリン分子を発現するハイブリドーマ細胞株が提供される。ある実施形態によれば、このようなモノクローナル抗体を発現するハイブリドーマ細胞株が提供される。ある実施形態において、ハイブリドーマ細胞株は、1.24.1、1.29.1、1.60.1、1.61.3、1.74.3、1.75.1、2.4.4、2.12.1、2.40.1及び3.10.1のうち少なくとも一つから選択される。ある実施形態において、ヒトHGFに対する精製されたヒトモノクローナル抗体が提供される。

30

【0113】

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

40

【0114】

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

50

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

【0115】

マウスが、マウス抗体の不存在下でヒト抗体を産生することを期待して、マウス抗体産生を欠損し、ヒト I g 遺伝子座の巨大断片を備えたマウス系統を設計することが可能である。巨大なヒト I g 断片は、大きな可変遺伝子の多様性並びに抗体産生及び発現の適切な制御を保ち得る。抗体の多様化及び選択のためのマウスの機構と、ヒトタンパク質に対する免疫学的寛容の欠如を活用することによって、これらのマウス系統中の再生されたヒト抗体レパートリーは、任意の対象抗原 (ヒト抗原を含む。) に対する高親和性完全ヒト抗体を産生し得る。ハイブリドーマ技術を使用して、所望の特異性を有する抗原特異的ヒト M A b が産生及び選択され得る。いくつかの典型的な方法が、W O 9 8 / 2 4 8 9 3、米国特許第 5, 5 4 5, 8 0 7 号、E P 5 4 6 0 7 3 B 1 及び E P 5 4 6 0 7 3 A 1 に記載されている。

10

【0116】

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

20

【0117】

天然に存在する抗体構造

天然に存在する抗体構造の単位は、典型的には、テトラマーを備える。このような各テトラマーは、典型的には、各対が 1 つの完全長「軽」鎖 (ある実施形態において、約 2 5 k D a) と 1 つの完全長「重」鎖 (ある実施形態において、約 5 0 から 7 0 k D a) とを有する、ポリペプチド鎖の 2 つの同じ対から構成される。各鎖のアミノ末端部分は、典型的には抗原認識を担う約 1 0 0 から 1 1 0 以上のアミノ酸の可変領域を典型的に含む。各鎖のカルボキシ末端部分は、典型的には、エフェクター機能を担い得る定常領域を規定する。ヒト軽鎖は、典型的には、κ 及び λ 軽鎖として分類される。重鎖は、典型的には、μ、δ、γ、α 又は ε として分類され、それぞれ、I g M、I g D、I g G、I g A 及び I g E として、抗体のイソタイプを規定する。I g G は、I g G 1、I g G 2、I g G 3 及び I g G 4 を含む (これらに限定されない。) 幾つかのサブクラスを有する。I g M は、I g M 1 及び I g M 2 を含む (これらに限定されない。) サブクラスを有する。I g A は、同様に、I g A 1 及び I g A 2 を含む (これらに限定されない。) サブクラスに細分される。完全長軽鎖及び重鎖内で、典型的には、可変及び定常領域は、約 1 2 以上のアミノ酸の「J」領域によって連結されており、重鎖はさらに約 1 0 のアミノ酸の「D」領域も含む。例えば、「Fundamental Immunology Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989))」を参照 (参照により、いかなる目的のためにも、その全体が組み込まれる。) 各軽/重鎖対の可変領域は、典型的には、抗原結合部位を形成する。

30

40

【0118】

通例、可変領域は、比較的保存されたフレームワーク領域 (F R) が 3 つの超可変領域 (相補性決定領域又は C D R とも称される。) によって連結されているという同じ一般的構造を呈する。各対の 2 つの鎖由来の C D R は、典型的には、フレームワーク領域によって並列されており、特異的なエピトープに結合することが可能であり得る。N 末端から C 末端へと、軽鎖及び重鎖可変領域は何れも、典型的には、ドメイン F R 1、C D R 1、F R 2、C D R 2、F R 3、C D R 3 及び F R 4 を含む。各ドメインへのアミノ酸の割り振りは、典型的には、「Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest」(National Instit

50

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

【0119】

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

10

【0120】

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

【0121】

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

20

30

40

【0122】

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

【0123】

二重特異的又は二重機能的抗体

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

50

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

【0124】

抗体の調製

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

10

【0125】

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

20

【0126】

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

30

【0127】

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

40

【0128】

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

50

【0129】

ある実施形態では、その免疫原性を減少させつつ、抗原結合ドメインの原親和性を減弱させずに修飾され得る抗体可変ドメインのアミノ酸が同定される。例えば、米国特許第5,766,886号及び第5,869,619号を参照されたい。

【0130】

ある実施形態において、本分野で公知の方法による抗体の修飾は、典型的には、標的に対する増加された結合親和性を達成し、及び/又はレシビエント中の抗体の免疫原性を減少させるように設計されている。ある実施形態において、ヒト化抗体は、そのコグネイト抗原に対する抗体の親和性を増加させるために、グリコシル部位をなくすように修飾される。例えば、「Co et al., Mol Immunol 30:1361-1367 (1993)」を参照されたい。ある実施形態では、ヒト化抗体を作製するために、「リシェーピング」、「超キメラ化」又は「ベニヤリング/リサーフェシング」などの技術が使用される。例えば、「Vaswami et al., Annals of Allergy, Asthma, & Immunol 81:105 (1998); Roguska et al., Prot Engineer 9:895-904 (1996); 及び米国特許第6,072,035号」を参照されたい。このような実施形態において、このような技術は、典型的には、外来残基の数を減らすことによって抗体の免疫原性を減少させるが、抗体の反復投与後に抗イディオタイプ及び抗アロタイプ応答を抑制しない。例えば、「Gilliland et al., J Immunol 162(6):3663-71 (1999)」には、免疫原性を減少させるための他の方法がいくつか記載されている。

【0131】

ある例において、ヒト化抗体は、抗原結合能の喪失をもたらす。ある実施形態において、ヒト化抗体は「逆突然変異」される。このような実施形態の幾つかでは、ヒト化抗体は、ドナー抗体中に見られるアミノ酸残基の一又は複数を含むように変異される。例えば、「Saldanha et al., Mol Immunol 36:709-19 (1999)」を参照されたい。

【0132】

ある実施形態では、HGFに対する抗体の軽鎖及び重鎖可変領域の相補性決定領域(CDR)は、同じ種又は別の種由来のフレームワーク領域(FR)に移植され得る。ある実施形態では、HGFに対する抗体の軽鎖及び重鎖可変領域の相補性決定領域(CDR)は、コンセンサスヒトFRに移植され得る。コンセンサスヒトFRを作製するために、ある実施形態では、コンセンサスアミノ酸配列を同定するために、幾つかのヒト重鎖又は軽鎖アミノ酸配列由来のFRが並置される。ある実施形態において、HGF重鎖又は軽鎖に対する抗体のFRは、異なる重鎖又は軽鎖由来のFRで置換される。ある実施形態において、HGFに対する抗体の重鎖及び軽鎖のFR中にある珍しいアミノ酸は置換されないが、FRアミノ酸の残りは置換される。珍しいアミノ酸は、FR中に通常見出されない位置にある特異的なアミノ酸である。ある実施形態において、HGFに対する抗体由来の移植された可変領域は、HGFに対する抗体の定常領域とは異なる定常領域とともに使用され得る。ある実施形態では、移植された可変領域は、一本鎖Fv抗体の一部である。CDR移植は、例えば、米国特許第6,180,370号、第6,054,297号、第5,693,762号、第5,859,205号、第5,693,761号、第5,565,332号、第5,585,089号及び第5,530,101号並びに「Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeven et al., Science 239:1534-1536 (1988), Winter, FEBS Letts 430:92-94 (1998)」に記載されており、これらは、参照により、いかなる目的のためにも本明細書に組み込まれる。

【0133】

ある実施形態では、ファージディスプレイ技術が、モノクローナル抗体を作製するため

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

【0134】

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

【0135】

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

【0136】

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

【0137】

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

されたい。あるアプローチでは、ヒト末梢血リンパ球は、S C I Dマウス中に移植される。例えば、「Mosier et al., Nature 335:256-259 (1988)」を参照されたい。このような実施形態では、刺激因子(ブドウ球菌のエンテロトキシンA (S E A) など)又は抗ヒトC D 4 0モノクローナル抗体の何れかで、このような移植された細胞が処理されると、B細胞産生のレベルの上昇が検出される。例えば、「Martensson et al., Immunol 84:224-230 (1995); Murphy et al., Blood 86:1946-1953 (1995)」を参照されたい。

【0138】

ある実施形態では、本発明の抗体は、以下のハイブリドーマ: 1.24.1、1.29.1、1.60.1、1.61.1、1.74.1、1.75.1、2.4.4、2.12.1、2.40.1及び3.10.1のうち少なくとも一つによって産生される。ある実施形態において、特異的結合因子は、 10^{-8} 、 10^{-9} 又は 10^{-10} Mの K_D でH G Fに結合する。ある実施形態では、特異的結合因子は、速度論的方法によって測定された場合に、約0.099と0.79 nMの間の解離定数(K_D)でH G Fに結合する(図6A)。ある実施形態では、特異的結合因子は、平衡/溶液方法によって測定された場合に、10 pM未満から約54 pMの K_D でH G Fに結合する(図6B)。

【0139】

ある実施形態において、特異的結合因子は、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g E、I g A、I g D及びI g Mアイソタイプの少なくとも一つの免疫グロブリン分子を含む。ある実施形態において、特異的結合因子は、ヒト κ 軽鎖及び/又はヒト重鎖を含む。ある実施形態において、重鎖は、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g E、I g A、I g D及びI g Mアイソタイプの重鎖である。ある実施形態において、特異的結合因子は、哺乳類細胞中での発現のためにクローニングされる。ある実施形態において、特異的結合因子は、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g E、I g A、I g D及びI g Mアイソタイプの定常領域の何れか以外の定常領域を含む。

【0140】

ある実施形態において、特異的結合因子は、ヒト κ 軽鎖及び/又はヒトI g G 1重鎖を含む。ある実施形態において、特異的結合因子は、ヒト κ 軽鎖及びヒトI g G 2重鎖を含む。ある実施形態において、特異的結合因子は、ヒト κ 軽鎖とヒトI g G 3、I g G 4、I g E、I g A、I g D又はI g M重鎖を含む。ある実施形態において、特異的結合因子は、I g G 1アイソタイプに対する定常領域でもなく、I g G 2アイソタイプに対する定常領域でもない定常領域に連結された抗体の可変領域を含む。ある実施形態において、特異的結合因子は、哺乳類細胞中での発現のためにクローニングされた。

【0141】

ある実施形態において、ハイブリドーマ株: 1.24.1、1.29.1、1.60.1、1.61.1、1.74.1、1.75.1、2.4.4、2.12.1、2.40.1及び3.10.1のうち少なくとも一つから得られる抗体の重鎖及び軽鎖への保存的な修飾(及びコードするヌクレオチドへの対応する修飾)は、ハイブリドーマ株: 1.24.1、1.29.1、1.60.1、1.61.1、1.74.1、1.75.1、2.4.4、2.12.1、2.40.1及び3.10.1から得られる抗体と同様の機能的及び化学的特性を有する、H G Fに対する抗体を産生するであろう。これに対して、ある種の実施形態において、H G Fに対する抗体の機能的及び/又は化学的特性の実質的な修飾は、(a)置換の領域中にある分子骨格の構造(例えば、シート又はヘリックス高次構造として)、(b)標的部位における分子の電荷若しくは疎水性又は(c)側鎖のかさ高さの維持に対するそれらの効果とは著しく異なる、重鎖及び軽鎖のアミノ酸配列中の置換を選択することによって達成され得る。

【0142】

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

10

20

30

40

50

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

【0143】

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

【0144】

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

【0145】

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

【0146】

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

【0147】

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

10

20

30

40

50

る誘導に際して、アルコールオキシダーゼ (A O X 1) プロモータによって駆動される。

【0148】

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

【0149】

ある実施形態において、ポリペプチドをコードする核酸は、p V L 1 3 9 3 (P h a r M i n g e n , S a n D i e g o , C A) などの、バキュロウイルス発現ベクター中にクローニングされる。ある実施形態において、このようなベクターは、s F 9 タンパク質の含まれていない培地中で *Spodoptera frugiperda* 細胞を感染させ、組み換えポリペプチドを産生するために、製造業者 (P h a r M i n g e n) の指示に従って使用することができる。ある実施形態において、ポリペプチドは、ヘパリン - S e p h a r o s e カラム (P h a r m a c i a) を用いて、このような培地から精製及び濃縮される。

【0150】

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

【0151】

ある実施形態では、*S. frugiperda* 細胞又は *Trichoplusia* 幼生を感染させるために、組み換えウイルスを使用することができる。例えば、「S m i t h e t a l . , J V i r o l 4 6 : 5 8 4 (1 9 8 3) ; E n g e l h a r d e t a l . , P r o c N a t A c a d S c i (U S A) 9 1 : 3 2 2 4 - 7 (1 9 9 4) 」を参照されたい。

【0152】

ある実施形態では、細菌細胞中で作られたポリペプチドは、細菌中の不溶性封入体として産生される。ある実施形態において、このような封入体を含む宿主細胞は、遠心によって集められ、0 . 1 5 M N a C l 、1 0 m M T r i s 、p H 8 、1 m M E D T A 中で洗浄し、0 . 1 m g / m L のリゾチーム (S i g m a , S t . L o u i s , M O) で、1 5 分間、室温で処理される。ある実施形態では、可溶化液は音波処理によって清浄化され、細胞細片は、1 2 , 0 0 0 × g での、1 0 分間の遠心によって沈降される。ある実施形態において、ポリペプチドを含有するペレットは、5 0 m M T r i s 、p H 8 及び 1 0 m M E D T A 中に再懸濁され；5 0 % グリセロール上に積層され、3 0 分間、6 0 0 0 × g で遠心される。ある実施形態において、このペレットは、M g ⁺⁺ 及び C a ⁺⁺ を含まない標準的なリン酸緩衝食塩溶液 (P B S) 中に再懸濁することができる。ある実施形態において、前記ポリペプチドは、変性 S D S ポリアクリルアミドゲル中に、前記再懸濁されたペレットを分画することによって、さらに精製される (例えば、上記 S a m b r o o k e t a l . を参照。) 。ある実施形態では、このようなゲルは、タンパク質を可視化するために、0 . 4 M K C l 中に浸すことが可能であり、浸したゲルは、切り出して、S D S を欠くゲル走行緩衝液中で電気溶出することができる。ある実施形態によれば、グルタチオン - S - トランスフェラーゼ (G S T) 融合タンパク質は、可溶性タンパク質として細菌中に産生される。ある実施形態において、このような G S T 融合タンパク

質は、G S T精製分子 (P h a r m a c i a) を用いて精製される。

【 0 1 5 3 】

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

10

20

【 0 1 5 4 】

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

30

【 0 1 5 5 】

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

40

【 0 1 5 6 】

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

50

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

【0157】

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

【0158】

典型的な幾つかのエピトープ

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

【0159】

幾つかの治療用途

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

【0160】

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

【0161】

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

【0162】

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

10

20

30

40

50

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

【0163】

本発明の薬学的組成物は、併用治療で（すなわち、他の薬剤と組み合わせで）投与されることが可能である。ある実施形態において、併用治療は、少なくとも一つの抗血管新生剤と組み合わせた、HGFを結合できる特異的結合因子を含む。薬剤には、インビトロで合成的に調製された化学的組成物、抗体、抗原結合領域、放射性核種、並びにこれらの組み合わせ及び接合体が含まれるが、これらに限定されない。ある実施形態において、薬剤は、アゴニスト、アンタゴニスト、アロステリック調節物質又はトキシンとして作用し得る。ある実施形態において、薬剤は、その標的を阻害又は刺激し（例えば、受容体又は酵素の活性化又は阻害）、これにより、細胞死を促進し、又は細胞増殖を停止させるように作用し得る。

【0164】

化学療法治療には、ナイトロジェンマスタード、メクロレタミン（m e c h l o r e t h a m i n e）、シクロホスファミド（c y c l o p h o s p h a m i d e）、イフォスファミド（i f o s f a m i d e）、メルファラン（m e l p h a l a n）及びクロラムブシル（c h l o r a m b u c i l）などのアルキル化剤を含む（これに限定されない。）抗腫瘍薬；カルムスチン（B C N U）、ロムスチン（C C N U）及びセムスチン（メチル - C C N U）などのニトロソウレア；T e m o d a l ^{T M}（テモゾラミド）、トリエチレンメラミン（T E M）、トリエチレン、チオホスホルアミド（チオテパ）、ヘキサメチルメラミンH M M、アルトレタミン）などのエチレンイミン/メチルメラミン；ブスルファンなどのスルホン酸アルキル；デカルバジン（D T I C）などのトリアジン（t r i a z i n e s）；メトトレキサート及びトリメトトレキサートなどの葉酸類縁体を含む代謝拮抗剤、5 - フルオロウラシル（5 F U）、フルオロデオキシウリジン、ゲムシタビン、シトシン・アラビノシド（A r a C、シタラビン）、5 - アザシチジン、2 , 2 ' - ジフルオロデオキシシチジンなどのピリミジン類縁体、6 - メルカプトプリン、6 - チオグアニン、アザチオプリン、2 ' - デオキシコフォルマイシン（ペントスタチン）、エリスロヒドロキシニルアデニン（E H N A）、リン酸フルダラビン及び2 - クロロデオキシアデノシン（クラドリビン、2 - C d A）などのプリン類縁体；バクリタキセル、ビンカアルカロイド（ビンブラスチン（V L B）、ビンクリスチン及びビンORELビンを含む。）、タキソテル、エストラムスチン及びリン酸エストラムスチンなどの抗有糸分裂薬を含む天然産物；エトポシド及びテニポシドなどのポドフィロトキシン（p p i p o d o p h y l o t o x i n）；アクチモマイシンD（a c t i m o m y c i n D）、ダウノマイシン（ルビドマイシン）、ドキソルビシン、ミトキサントロン、イダルビシン、ブレオマイシン、プリカマイシン（ミトラマイシン）、マイトマイシンC及びアクチノマイシンなどの抗生物質；L - アスパラギナーゼなどの酵素；インターフェロン - α、I L - 2、G - C S F及びG M - C S Fなどの生物反応修飾物質；シスプラチン及びカルボプラチンなどのプラチナ配位錯体、ミトキサントロンなどのアントラセンジオン、ヒドロキシ尿素などの置換された尿素、N - メチルヒドラジン（M I H）及びプロカルバジンを含むメチルヒドラジン誘導体、ミトタン（o , p ' - D D D）及びアミノグルテチミドなどの副腎皮質抑制物質；プレドニソン及び等価物、デキサメタゾン及びアミノグルテチミドなどのアドレノコルチコステロイドアンタゴニストを含むホルモン及びアンタゴニスト；G e m z a r ^{T M}（ゲムシタビン）、カブロン酸ヒドロキシプロゲステロン、酢酸メドロキシプロゲステロン及び酢酸メゲストロールなどのプロゲステン；ジエチルスチルベストロール及びエチニルエストラジオール等価物などのエストロゲン；タモキシフェンなどのアンチエストロゲン；プロピオン酸テストステロン及びフルオキシメステロン/等価物を含むアンドロゲン；フルタミド、ゴナドトロピン放出ホルモン類縁体及びロイプロリドなどの抗アンドロゲン；並びにフルタミドなどの非ステロイド系抗アンドロゲン、が含まれるが、これら

10

20

30

40

50

に限定されない。

【0165】

HGFに対する特異的結合剤を投与し得る癌療法には、標的療法も含まれるが、これに限定されない。標的療法の例には、治療用抗体の使用が含まれるが、これに限定されない。典型的な治療用抗体には、マウス、マウス-ヒトキメラ、CDR移植、ヒト化及び完全ヒト抗体並びに合成抗体（抗体ライブラリーをスクリーニングすることによって選択されたものを含むが、これに限定されない。）が含まれるが、これらに限定されない。典型的な抗体には、細胞表面タンパク質、Her2、CD20、CD33、ムチン様糖タンパク質及び腫瘍細胞上に存在する上皮細胞増殖因子受容体（EGFR）に結合し、これらのタンパク質を提示する腫瘍細胞に対して細胞分裂阻害及び/又は細胞毒性効果を必要に応じた誘導する抗体が含まれるが、これに限定されない。典型的な抗体には、乳癌及び他の形態の癌を治療するために使用し得るHERCEPTINTM（トラスツズマブ）及びRITUXANTM（リツキシマブ）、ZEVALLINTM（イブリツモマブ チウキセタン）、並びに非ホジキンリンパ腫及び他の形態の癌を治療するために使用し得るGLEEVECTM及びLYMPHOCIDETM（エブラツズマブ）も含まれる。典型的な抗体の幾つかには、ERBITUXTM（IMC-C225）；エルチノリブ（Iressa）；BEXXARTM（ヨウ素131トシツモマブ）；KDR（キナーゼドメイン受容体）阻害剤；抗VEGF抗体及びアンタゴニスト（例えば、AvastinTM及びVEGAF-TRAP）；抗VEGF受容体抗体及び抗原結合領域；抗Ang-1及びAng-2抗体及び抗原結合領域；Tie-2並びに他のAng-1及びAng-2受容体に対する抗体；Tie-2リガンド；Tie-2キナーゼ阻害剤に対する抗体；並びにCampath^(R)（Alemtuzumabu）も含まれる。ある実施形態において、癌治療剤は、腫瘍細胞中にアポトーシスを選択的に誘導するポリペプチド（TNF関連ポリペプチドTRAILを含むが、これに限定されない。）である。

10

20

【0166】

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

30

40

50

【 0 1 6 7 】

ある実施形態において、癌治療剤は、血管新生阻害剤である。このような阻害剤には、SD-7784 (Pfizer, USA); シレンギチド (cilengitide) (Merck KGaA, Germany, EPO 770622); ペガブタニブ・オクタナトリウム (pegaptanib octasodium)、(Gilead Sciences, USA); アルファスタチン (Alphastatin)、(BioActa, UK); M-PGA、(Celgene, USA, US 5712291); イロマスタット (ilomastat)、(Arriva, USA, US 5892112); セマキサニブ (semaxanib)、(Pfizer, USA, US 5792783); バタラニブ (vatalanib)、(Novartis, Switzerland); 2-メトキシエストラジオール、(EntreMed, USA); TLC ELL-12、(Elan, Ireland); 酢酸アネコルタブ (anecortave acetate)、(Alcon, USA); α -D148 Mab、(Amgen, USA); CEP-7055、(Cephalon, USA); 抗Vn Mab、(Crucell, Netherlands) DAC: 抗血管新生剤 (antiangiogenic)、(ConjuChem, Canada); アンジオシジン (Angiocidin)、(InKine Pharmaceutical, USA); KM-2550、(Kyowa Hakko, Japan); SU-0879、(Pfizer, USA); CGP-79787、(Novartis, Switzerland, EP 970070); ARGENT技術、(Ariad, USA); YIGSR-Stealth、(Johnson & Johnson, USA); フィブリノーゲン-E断片、(BioActa, UK); 血管新生阻害剤、(Trigen, UK); TBC-1635、(Encysive Pharmaceutical, USA); SC-236、(Pfizer, USA); ABT-567、(Abbott, USA); メタスタチン (Metastatin)、(EntreMed, USA); 血管新生阻害剤、(Tripep, Sweden); マスピン (maspin)、(Sosei, Japan); 2-メトキシエストラジオール、(Oncology Sciences Corporation, USA); ER-68203-00、(IVAX, USA); Benefin、(Lane Labs, USA); Tz-93、(Tsumura, Japan); TAN-1120、(Takeda, Japan); FR-111142、(Fujisawa, Japan, JP 02233610); 血小板因子4、(Repligen, USA, EP 407122); 血管内皮細胞増殖因子アンタゴニスト、(Boreale, Denmark); 癌治療 (University of South Carolina, USA); ベバシズマブ (bevacizumab) (pINN)、(Genentech, USA); 血管新生阻害剤 (SUGEN, USA); XL 784、(Exelixis, USA); XL 647、(Exelixis, USA); MA b、 $\alpha 5 \beta 3$ インテグリン、第二世代、(Applied Molecular Evolution, USA and MedImmune, USA); 遺伝子療法、網膜症 (Oxford BioMedica, UK); エンザスタウリン塩酸塩 (USAN)、(Lilly, USA); CEP 7055、(Cephalon, USA and Sanofi-Synthelabo, France); BC 1、(Genoa Institute of Cancer Research, Italy); 血管新生阻害剤 (Alchemia, Australia); VEGFアンタゴニスト、(Regeneron, USA); rBPI 21 及びBPI由来血管新生剤、(XOMA, USA); PI 88、(Progen, Australia); シレンギチド (cilengitide) (pINN)、(Merck KGaA, Germany; Munich Technical University, Germany; Scripps Clinic and Research Foundation, USA); セツキシマブ (cetuximab) (INN)、(Aventis, France); AVE 8062、(Ajinomoto, Japan); AS 1404、(Cancer Research Laboratory,

New Zealand); SG 292, (Telios, USA); エンドスタチン、
 (Boston Children Hospital, USA); ATN 161、
 (Attenuon, USA); ANGIOSTATIN、(Boston Child
 ren Hospital, USA); 2-メトキシエストラジオール (Boston
 Children Hospital, USA); ZD 6474, (AstraZen
 eca, UK); ZD 6126, (Angiogene Pharmaceutica
 ls, UK); PPI 2458, (Praecis, USA); AZD 9935, (A
 strazeneca, UK); AZD 2171, (AstraZeneca, UK
); パタラニブ (vatalanib) (pINN)、(Novartis, Switz
 erland and Schering AG, Germany); 組織因子経路阻害 10
 剤 (tissue factor pathway inhibitors) (Entre
 Med, USA); ペガタニブ (pegaptanib) (Pinn), (Gilea
 d Sciences, USA); キサントルリゾール (xanthorrhizol)
 、(Yonsei University, South Korea); ワクチン、遺伝
 子ベース、VEGF-2、(Scripps Clinic and Research
 Foundation, USA); SPV5.2、(Supratek, Canada
); SDX 103、(University of California at S
 an Diego, USA); PX 478、(ProIX, USA); METASTA
 TIN, (EntreMed, USA); トロボニン1 (Harvard Univer
 sity, USA); SU 6668, (SUGEN, USA); OXI 4503, (20
 OXIGENE, USA); o-グアニジン、(Dimensional Pharma
 ceuticals, USA); モツボラミンC (motuporamine C)、(B
 ritish Columbia University, Canada); CDP
 791, (Celltech Group, UK); アチプリモド (atiprimo)
 (pINN)、(GlaxoSmithKline, UK); E 7820, (Eisa
 i, Japan); CYC 381, (Harvard University, USA
); AE 941, (Aeterna, Canada); ワクチン、血管新生、(Ent
 reMed, USA); ウロキナーゼプラスミノージェン活性化因子阻害剤、(Dendr
 eon, USA); オグルファニド (ogluflanide) (pINN)、(Melm
 otte, USA); HIF-1 α 阻害剤 (Xenova, UK); CEP 5214, 30
 (Cephalon, USA); BAY RES 2622, (Bayer, Germa
 ny); アンギオシジン (Angiocidin)、(InKine, USA); A6,
 (Angstrom, USA); KR 31372, (Korea Research
 Institute of Chemical Technology, South K
 orea); GW 2286, (GlaxoSmithKline, UK); EHT 0
 101, (ExonHit, France); CP 868596, (Pfizer, U
 SA); CP 564959, (OSI, USA); CP 547632, (Pfize
 r, USA); 786034, (GlaxoSmithKline, UK); KRN 6
 33, (Kirin Brewery, Japan); 薬物送達系、眼内、2-メトキシ
 エストラジオール (EntreMed, USA); アンギネックス (anginex)、 40
 (Maastricht University, Netherlands, and M
 innesota University, USA); ABT 510、(Abbott
 , USA); AAL 993、(Novartis, Switzerland); VEG
 I、(ProteomTech, USA); 腫瘍壊死因子- α 阻害剤、(Nationa
 l Institute on Aging, USA); SU 11248、(Pfiz
 er, USA and SUGEN USA); ABT 518、(Abbott, US
 A); YH16、(Yantai Rongchang, China); S-3APG、
 (Boston Children Hospital, USA and EntreM
 ed, USA); MA b, KDR, (ImClone Systems, USA); MA
 b、 $\alpha 5 \beta 1$ 、(Protein Design, USA); KDRキナーゼ阻害剤、 50

(Celltech Group, .UK, and Johnson & Johnson, USA); GFB 116、(South Florida University, USA and Yale University, USA); CS 706、(Sankyo, Japan); コンブレスタチン (combreastatin) A4プロドラッグ、(Arizona State University, USA); コンドロイチナーゼAC, (IBEX, Canada); BAY RES 2690, (Bayer, Germany); AGM 1470, (Harvard University, USA, Takeda, Japan, and TAP, USA); AG 13925, (Agouron, USA); テトラチオモリブデン酸塩、(University of Michigan, USA); GCS 100、(Wayne State University, USA) CV 247、(Ivy Medical, UK); CKD 732、(Chong Kun Dang, South Korea); MAb, 血管内皮細胞増殖因子、(Xenova, UK); イルスグラジン (irsogladine) (INN)、(Nippon Shinyaku, Japan); RG 13577, (Aventis, France); WX 360, (Wilex, Germany); スクアラミン (pINN), (Genaera, USA); RPI 4610, (Sirna, USA); 癌療法、(Marinova, Australia); ヘパラナーゼ阻害剤、(Insight, Israel); KL 3106, (Kolon, South Korea); ホノキオール (Honokiol)、(Emory University, USA); ZK CDK、(Schering AG, Germany); ZK Angio, (Schering AG, Germany); ZK 229561, (Novartis, Switzerland, and Schering AG, Germany); XMP 300, (XOMA, USA); VGA 1102, (Taisho, Japan); VEGF受容体調節物質、(Pharmacopeia, USA); VE-カドヘリン-2アンタゴニスト、(ImClone Systems, USA); バソスタチン (Vasostatin)、(National Institutes of Health, USA); ワクチン、Flk-1、(ImClone Systems, USA); TZ 93, (Tsumura, Japan); TumStatins, (Beth Israel Hospital, USA); 末端切断された可溶性FLT 1 (血管内皮増殖因子受容体1), (Merck & Co, USA); Tie-2リガンド、(Regeneron, USA); トロンボスポンジン1阻害剤、(Allegheny Health, Education and Research Foundation, USA); 2-ベンゼンスルホンアミド、4-(5-(4-クロロフェニル)-3-(トリフルオロメチル)-1H-ピラゾール-1-イル)-; Arriva; およびC-Met. AVE 8062 ((2S)-2-アミノ-3-ヒドロキシ-N-[2-メトキシ-5-[(1Z)-2-(3,4,5-トリメトキシフェニル)エチニル]フェニル]プロパンアミド-塩酸塩); メテリムマブ (pINN) (免疫グロブリンG4、抗(ヒト形質転換増殖因子β1(ヒトモノクローナルCAT 192.y4-鎖))、ヒトモノクローナルCAT 192.κ鎖二量体とのジスルフィド); Flt3リガンド; CD40リガンド; インターロイキン-2; インターロイキン-12; 4-1 BBリガンド; 抗-4-1 BB抗体; TNFアンタゴニストおよびTNF受容体アンタゴニスト(TNFR/Fcを含む。)、TWEAK-R/Fcを含むTWEAKアンタゴニストおよびTWEAK-Rアンタゴニスト; TRAIL; 抗VEGF抗体を含むVEGFアンタゴニスト; VEGF受容体(VEGF-R1およびVEGF-R2を含む。Flt1およびFlk1又はKDRとしても知られる。)アンタゴニスト; CD148(DEP-1、ECRTPおよびPTPRJとも称される。Takahashi et al., J. Am. Soc. Nephrol. 10:2135-45(1999)を参照。参照により、いかなる目的のためにも、本明細書に組み込まれる。)アゴニスト; トロンボスポンジン1阻害剤、並びにTie-2又はTie-2リガンドの一方又は両方の阻害剤(Ang-2など

）が含まれるが、これらに限定されるものではない。公開された米国特許出願 2 0 0 3 0 1 2 4 1 2 9 (P C T 出 願 W O 0 3 / 0 3 0 8 3 3 に対応する。) および米国特許第 6 , 1 6 6 , 1 8 5 号 (その内容は、参照により、その全体が本明細書に組み込まれる。) に記載されている抗 A n g - 2 抗体を含む、 A n g - 2 の多数の阻害剤が本分野で知られている。さらに、 A n g - 2 ペプチボディも本分野で公知であり、例えば、米国特許出願 2 0 0 3 0 2 2 9 0 2 3 (P C T 出 願 W O 0 3 / 0 5 7 1 3 4 に対応する。) および公開された米国特許第 2 0 0 3 0 2 3 6 1 9 3 号 (その内容は、参照により、その全体が本明細書に組み込まれる。) に見出すことができる。

【 0 1 6 8 】

ある種の癌治療剤には、サリドマイド及びサリドマイド類縁体 (N - (2 , 6 - ジオキソ - 3 - ピペリジル) フタルイミド) ; テコガランナトリウム (硫酸化多糖ペプチドグリカン) ; T A N 1 1 2 0 (8 - アセチル - 7 , 8 , 9 , 1 0 - テトラヒドロ - 6 , 8 , 1 1 - トリヒドロキシ - 1 - メトキシ - 1 0 - [[オクタヒドロ - 5 - ヒドロキシ - 2 - (2 - ヒドロキシプロピル) - 4 , 1 0 - ジメチルピラノ [3 , 4 - d] - 1 , 3 , 6 - ジオキサゾシン - 8 - イル] オキシ] - 5 , 1 2 - ナフタセンジオン) ; スラジスタ (7 , 7 ' - [カルボニルビス [イミノ (1 - メチル - 1 H - ピロール - 4 , 2 - ジイル) カルボニルイミノ (1 - メチル - 1 H - ピロール - 4 , 2 - ジイル) カルボニルイミノ]] ビス - 1 , 3 - ナフタレンジスルホン酸テトラナトリウム塩) ; S U 3 0 2 ; S U 3 0 1 ; S U 1 4 9 8 ((E) - 2 - シアノ - 3 - [4 - ヒドロキシ - 3 , 5 - ビス (1 - メチルエチル) フェニル] - N - (3 - フェニルプロピル) - 2 - プロペンアミド) ; S U 1 4 3 3 (4 - (6 , 7 - ジメチル - 2 - キノキサリニル) - 1 , 2 - ベンゼンジオール) ; S T 1 5 1 4 ; S R 2 5 9 8 9 ; 可溶性 T i e - 2 ; S E R M 誘導体 , P h a r m o s ; セマキサニブ (s e m a x a n i b) (p I N N) (3 - [(3 , 5 - ジメチル - 1 H - ピロール - 2 - イル) メチレン] - 1 , 3 - ジヒドロ - 2 H - インドール - 2 - オン) ; S 8 3 6 ; R G 8 8 0 3 ; R E S T I N ; R 4 4 0 (3 - (1 - メチル - 1 H - インドール - 3 - イル) - 4 - (1 - メチル - 6 - ニトロ - 1 H - インドール - 3 - イル) - 1 H - ピロール - 2 , 5 - ジオン) ; R 1 2 3 9 4 2 (1 - [6 - (1 , 2 , 4 - チアジアゾール - 5 - イル) - 3 - ピリダジニル] - N - [3 - (トリフルオロメチル) フェニル] - 4 - ピペリジンアミン) ; プロリルヒドロキシラーゼ阻害剤 ; 進行性上昇遺伝子 (p r o g r e s s i o n e l e v a t e d g e n e s) ; プリノマスタット (p r i n o m a s t a t) (I N N) ((S) - 2 , 2 - ジメチル - 4 - [[p - (4 - ピリジルオキシ) フェニル] スルホニル] - 3 - チオモルホリンカルボヒドロキサム酸) ; N V 1 0 3 0 ; N M 3 (8 - ヒドロキシ - 6 - メトキシ - a l p h a - メチル - 1 - オキソ - 1 H - 2 - ベンゾピラン - 3 - 酢酸) ; N F 6 8 1 ; N F 0 5 0 ; M I G ; M E T H 2 ; M E T H 1 ; マナスサンチン

B (m a n a s s a n t i n B) (α - [1 - [4 - [5 - [4 - [2 - (3 , 4 - ジメトキシフェニル) - 2 - ヒドロキシ - 1 - メチルエトキシ] - 3 - メトキシフェニル] テトラヒドロ - 3 , 4 - ジメチル - 2 - フラニル] - 2 - メトキシフェノキシ] エチル] - 1 , 3 - ベンゾジオキサール - 5 - メタノール) ; K D R モノクローナル抗体 ; α 5 β 3 インテグリンモノクローナル抗体 ; L Y 2 9 0 2 9 3 (2 - アミノ - 4 - (3 - ピリジニル) - 4 H - ナフト [1 , 2 - b] ピラン - 3 - カルボニトリル) ; K P 0 2 0 1 4 4 8 ; K M 2 5 5 0 ; インテグリン - 特異的ペプチド ; I N G N 4 0 1 ; G Y K I 6 6 4 7 5 ; G Y K I 6 6 4 6 2 ; グリーンスタチン (1 0 1 - 3 5 4 - プラスミノーゲン (ヒト)) ; 関節リウマチ、前立腺癌、卵巣癌、神経膠腫、エンドスタチン、結腸直腸癌、A T F B T P I、抗血管新生遺伝子、血管新生阻害剤又は血管新生、のための遺伝子治療 ; ゼラチナーゼ阻害剤、F R 1 1 1 1 4 2 (4 , 5 - ジヒドロキシ - 2 - ヘキセン酸 5 - メトキシ - 4 - [2 - メチル - 3 - (3 - メチル - 2 - ブテニル) オキシラニル] - 1 - オキサスピロ [2 . 5] オクト - 6 - イルエステル) ; フォルフェニメックス (f o r f e n i m e x) (p I N N) (S) - α - アミノ - 3 - ヒドロキシ - 4 - (ヒドロキシメチル) ベンゼン酢酸) ; フィプロネクチンアンタゴニスト (1 - アセチル - L - プ

10

20

30

40

50

ロリル - L - ヒスチジル - L - セリル - L - システイニル - L - アスパルタミド) ; 繊維
 芽細胞増殖因子受容体阻害剤 ; 繊維芽細胞増殖因子アンタゴニスト ; F C E 2 7 1 6 4 (
 7 , 7 ' - [カルボニルビス [イミノ (1 - メチル - 1 H - ピロール - 4 , 2 - ジイル)
 カルボニルイミノ (1 - メチル - 1 H - ピロール - 4 , 2 - ジイル) カルボニルイミノ]
] ビス - 1 , 3 , 5 - ナフタレントリスルホン酸ヘキサナトリウム塩) ; F C E 2 6 7 5
 2 (8 , 8 ' - [カルボニルビス [イミノ (1 - メチル - 1 H - ピロール - 4 , 2 - ジイ
 ル) カルボニルイミノ (1 - メチル - 1 H - ピロール - 4 , 2 - ジイル) カルボニルイミ
 ノ]] ビス - 1 , 3 , 6 - ナフタレントリスルホン酸) ; 内皮単球活性化ポリペプチド I
 I ; V E G F R アンチセンスオリゴヌクレオチド ; 抗血管新生及び栄養性因子 ; A N C H
 O R 血管新生抑制剤 ; エンドスタチン ; D e l - 1 血管新生タンパク質 ; C T 3 5 7 7 10
 ; コントートロスタチン ; C M 1 0 1 ; コンドロイチナーゼ A C ; C D P 8 4 5 ; C
 a n S t a t i n ; B S T 2 0 0 2 ; B S T 2 0 0 1 ; B L S 0 5 9 7 ; B I B F
 1 0 0 0 ; A R R E S T I N ; アポミグレン (1 3 0 4 - 1 3 8 8 - タイプ X V コラ
 ーゲン (ヒト遺伝子 C O L 1 5 A 1 α 1 - 鎖前駆体)) ; アンジオインヒビン ; a a A
 T I I I ; A 3 6 ; 9 α - フルオロメドロキシプロゲステロンアセテート ((6 - α) -
 1 7 - (アセチルオキシ) - 9 - フルオロ - 6 - メチル - プレゲン - 4 - エン - 3 , 2 0
 - ジオン) ; 2 - メチル - 2 - フタルイミジノ - グルタル酸 (2 - (1 , 3 - ジヒドロ -
 1 - オキソ - 2 H - イソインドール - 2 - イル) - 2 - メチルペンタジオン酸) ; イット
 リウム 9 0 標識されたモノクローナル抗体 B C - 1 ; S e m a x a n i b (3 - (4 , 5
 - ジメチルピロル - 2 - イルメチレン) インドリン - 2 - オン) (C 1 5 H 1 4 N 2 O) 20
 ; P I 8 8 (ホスホマンノペンタオースサルフェート) ; A l v o c i d i b (4 H - 1
 - ベンゾピラン - 4 - オン , 2 - (2 - クロロフェニル) - 5 , 7 - ジヒドロキシ - 8 -
 (3 - ヒドロキシ - 1 - メチル - 4 - ピペリジニル) - c i s - (-) -) (C 2 1 H 2
 0 C 1 N O 5) ; E 7 8 2 0 ; S U 1 1 2 4 8 (5 - [3 - フルオロ - 2 - オキソ - 1 ,
 2 - ジヒドロインドール - (3 Z) - イリデンメチル] - 2 , 4 - ジメチル - 1 H - ピロ
 ール - 3 - カルボン酸 (2 - ジエチルアミノエチル) アミド) (C 2 2 H 2 7 F N 4 O 2
) ; スクアラミン (コレスタン - 7 , 2 4 - ジオール , 3 - [[3 - [(4 - アミノブチ
 ル) アミノプロピル] アミノ] - , 2 4 - (硫酸水素塩) , (3 . β , 5 . α . , 7 . α
 .) -) (C 3 4 H 6 5 N 3 O 5 S) ; E r i o c h r o m e B l a c k T ; A G M
 1 4 7 0 (カルバミン酸 , (クロロアセチル) - , 5 - メトキシ - 4 - [2 - メチル - 3 30
 - (3 - メチル - 2 - ブテニル) オキシラニル] - 1 - オキサスピロ [2 , 5] オクト
 6 - イルエステル , [3 R - [3 α , 4 α (2 R , 3 R) , 5 β , 6 β]]) (C 1 9 H
 2 8 C 1 N O 6) ; A Z D 9 9 3 5 ; B I B F 1 0 0 0 ; A Z D 2 1 7 1 ; A B T
 8 2 8 ; K S - インターロイキン - 2 ; ウテログロビン ; A 6 ; N S C 6 3 9 3 6 6 (1
 - [3 - (ジエチルアミノ) - 2 - ヒドロキシプロピルアミノ] - 4 - (オキシラン - 2
 - イルメチルアミノ) アントラキノ - フメラート) (C 2 4 H 2 9 N 3 O 4 . C 4 H 4
 O 4) ; I S V 6 1 6 ; 抗 - E D - B 融合タンパク質 ; H U I 7 7 ; T r o p o n i
 n 1 ; B C - 1 モノクローナル抗体 ; S P V 5 . 2 ; E R 6 8 2 0 3 ; C K D 7
 3 1 (3 - (3 , 4 , 5 - トリメトキシフェニル) - 2 (E) - プロペン酸 (3 R , 4 S
 , 5 S , 6 R) - 4 - [2 (R) - メチル - 3 (R) - 3 (R) - (3 - メチル - 2 - ブ 40
 テニル) オキシラン - 2 - イル] - 5 - メトキシ - 1 - オキサスピロ [2 . 5] オクト
 6 - イルエステル) (C 2 8 H 3 8 O 8) ; I M C - 1 C 1 1 ; a a A T I I I ; S C
 7 ; C M 1 0 1 ; A n g i o c o l ; K r i n g l e 5 ; C K D 7 3 2 (3 - [4
 - [2 - (ジメチルアミノ) エトキシ] フェニル] - 2 (E) - プロペン酸) (C 2 9 H
 4 1 N O 6) ; U 9 9 5 ; C a n s t a t i n ; S Q 8 8 5 ; C T 2 5 8 4 (1 - [1 1
 - (ドデシルアミノ) - 1 0 - ヒドロキシウンデシル] - 3 , 7 - ジメチルキサンチン)
 (C 3 0 H 5 5 N 5 O 3) ; S a l m o s i n ; E M A P I I ; T X 1 9 2 0 (1 - (4
 - メチルピペラジノ) - 2 - (2 - ニトロ - 1 H - 1 - イミダゾイル) - 1 - エタノン)
 (C 1 0 H 1 5 N 5 O 3) ; A l p h a - v B e t a - x 阻害剤 ; C H I R 1 1 5 0 9
 (N - (1 - プロピニル) グリシル - [N - (2 - ナフチル)] グリシル - [N - (カル 50

バモイルメチル)] グリシン ビス(4 - メトキシフェニル)メチルアミド) (C₃₆H₃₇N₅O₆) ; B S T 2 0 0 2 ; B S T 2 0 0 1 ; B 0 8 2 9 ; F R 1 1 1 1 4 2 ; 4
 , 5 - ジヒドロキシ - 2 (E) - ヘキセン酸 (3 R , 4 S , 5 S , 6 R) - 4 - [1 (R) , 2 (R) - エポキシ - 1 , 5 - ジメチル - 4 - ヘキセニル] - 5 - メトキシ - 1 - オ
 キサスピロ [2 . 5] オクタ - 6 - イルエステル (C₂₂H₃₄O₇) ; 及びキナーゼ阻
 害剤、N - (4 - クロロフェニル) - 4 - (4 - ピリジニルメチル) - 1 - フタラジナミ
 ドを含むが、これに限定されない ; 4 - [4 - [[[4 - クロロ - 3 - (トリフルオロ
 メチル) フェニル] アミノ] カルボニル] アミノ] フェノキシ] - N - メチル - 2 - ピリ
 ジンカルボキサミド ; N - [2 - (ジエチルアミノ) エチル] - 5 - [(5 - フルオロ -
 1 , 2 - ジヒドロ - 2 - オキソ - 3 H - インドール - 3 - イリデン) メチル] - 2 , 4 -
 ジメチル - 1 H - ピロール - 3 - カルボキサミド ; 3 - [(4 - ブロモ - 2 , 6 - ジフル
 オロフェニル) メトキシ] - 5 - [[[[4 - (1 - ピロリジニル) ブチル] アミノ] カ
 ルボニル] アミノ] - 4 - イソチアゾールカルボキサミド ; N - (4 - ブロモ - 2 - フル
 オロフェニル) - 6 - メトキシ - 7 - [(1 - メチル - 4 - ピペリジニル) メトキシ] -
 4 - キナゾリンアミン ; 3 - [5 , 6 , 7 , 13 - テトラヒドロ - 9 - [(1 - メチルエ
 トキシ) メチル] - 5 - オキソ - 12 H - インデノ [2 , 1 - a] ピロロ [3 , 4 - c]
 カルバゾール - 12 - イル] プロピルエステル N , N - ジメチル - グリシン ; N - [5
 - [[[5 - (1 , 1 - ジメチルエチル) - 2 - オキサゾリル] メチル] チオ] - 2 - チ
 アゾリル] - 4 - ピペリジンカルボキサミド ; N - [3 - クロロ - 4 - [(3 - フルオロ
 フェニル) メトキシ] フェニル] - 6 - [5 - [[[2 - (メチルスルホニル) エチル]
 アミノ] メチル] - 2 - フラニル] - 4 - キナゾリンアミン ; 4 - [(4 - メチル - 1 -
 ピペラジニル) メチル] - N - [4 - メチル - 3 - [[4 - (3 - ピリジニル) - 2 - ピ
 リミジニル] アミノ] - フェニル] ベンズアミド ; N - (3 - クロロ - 4 - フルオロフェ
 ニル) - 7 - メトキシ - 6 - [3 - (4 - モルホリニル) プロボキシ] - 4 - キナゾリン
 アミン ; N - (3 - エチニルフェニル) - 6 , 7 - ビ (2 - メトキシエトキシ) - 4 - キ
 ナゾリンアミン ; N - (3 - (((2 R) - 1 - メチル - 2 - ピロリジニル) メチル)
 オキシ) - 5 - (トリフルオロメチル) フェニル) - 2 - ((3 - (1 , 3 - オキサゾー
 ル - 5 - イル) フェニル) アミノ) - 3 - ピリジンカルボキサミド ; 2 - (((4 - フル
 オロフェニル) メチル) アミノ) - N - (3 - (((2 R) - 1 - メチル - 2 - ピロリ
 ジニル) メチル) オキシ) - 5 - (トリフルオロメチル) フェニル) - 3 - ピリジンカル
 ボキサミド ; N - [3 - (アゼチジン - 3 - イルメトキシ) - 5 - トリフルオロメチル -
 フェニル] - 2 - (4 - フルオロ - ベンジルアミノ) - ニコチンアミド ; 6 - フルオロ -
 N - (4 - (1 - メチルエチル) フェニル) - 2 - ((4 - ピリジニルメチル) アミノ)
 - 3 - ピリジンカルボキサミド ; 2 - ((4 - ピリジニルメチル) アミノ) - N - (3 -
 (((2 S) - 2 - ピロリジニルメチル) オキシ) - 5 - (トリフルオロメチル) フェ
 ニル) - 3 - ピリジンカルボキサミド ; N - (3 - (1 , 1 - ジメチルエチル) - 1 H - ピ
 ラゾール - 5 - イル) - 2 - ((4 - ピリジニルメチル) アミノ) - 3 - ピリジンカルボ
 キサミド ; N - (3 , 3 - ジメチル - 2 , 3 - ジヒドロ - 1 - ベンゾフラン - 6 - イル)
 - 2 - ((4 - ピリジニルメチル) アミノ) - 3 - ピリジンカルボキサミド ; N - (3 -
 (((2 S) - 1 - メチル - 2 - ピロリジニル) メチル) オキシ) - 5 - (トリフルオ
 ロメチル) フェニル) - 2 - ((4 - ピリジニルメチル) アミノ) - 3 - ピリジンカルボ
 キサミド ; 2 - ((4 - ピリジニルメチル) アミノ) - N - (3 - ((2 - (1 - ピロリ
 ジニル) エチル) オキシ) - 4 - (トリフルオロメチル) フェニル) - 3 - ピリジンカル
 ボキサミド ; N - (3 , 3 - ジメチル - 2 , 3 - ジヒドロ - 1 H - インドール - 6 - イル)
 - 2 - ((4 - ピリジニルメチル) アミノ) - 3 - ピリジンカルボキサミド ; N - (4
 - (ペンタフルオロエチル) - 3 - (((2 S) - 2 - ピロリジニルメチル) オキシ) フ
 ェニル) - 2 - ((4 - ピリジニルメチル) アミノ) - 3 - ピリジンカルボキサミド ; N
 - (3 - ((3 - アゼチジニルメチル) オキシ) - 5 - (トリフルオロメチル) フェ
 ニル) - 2 - ((4 - ピリジニルメチル) アミノ) - 3 - ピリジンカルボキサミド ; N - (3
 - (4 - ピペリジニルオキシ) - 5 - (トリフルオロメチル) フェニル) - 2 - ((2 -

10

20

30

40

50

(3 - ピリジニル) エチル) アミノ) - 3 - ピリジンカルボキサミド ; N - (4 , 4 - ジメチル - 1 , 2 , 3 , 4 - テトラヒドロ - イソキノリン - 7 - イル) - 2 - (1 H - インダゾール - 6 - イルアミノ) - ニコチンアミド ; 2 - (1 H - インダゾール - 6 - イルアミノ) - N - [3 - (1 - メチルピロリジ - 2 - イルメトキシ) - 5 - トリフルオロメチル - フェニル] - ニコチンアミド ; N - [1 - (2 - ジメチルアミノ - アセチル) - 3 , 3 - ジメチル - 2 , 3 - ジヒドロ - 1 H - インドール - 6 - イル] - 2 - (1 H - インダゾール - 6 - イルアミノ) - ニコチンアミド ; 2 - (1 H - インダゾール - 6 - イルアミノ) - N - [3 - (ピロリジ - 2 - イルメトキシ) - 5 - トリフルオロメチル - フェニル] - ニコチンアミド ; N - (1 - アセチル - 3 , 3 - ジメチル - 2 , 3 - ジヒドロ - 1 H - インドール - 6 - イル) - 2 - (1 H - インダゾール - 6 - イルアミノ) - ニコチンアミド ; N - (4 , 4 - ジメチル - 1 - オキソ - 1 , 2 , 3 , 4 - テトラヒドロ - イソキノリン - 7 - イル) - 2 - (1 H - インダゾール - 6 - イルアミノ) - ニコチンアミド ; N - [4 - (tert - ブチル) - 3 - (3 - ピペリジルプロピル) フェニル] [2 - (1 H - インダゾール - 6 - イルアミノ) (3 - ピリジル)] カルボキサミド ; N - [5 - (tert - ブチル) イソキサゾール - 3 - イル] [2 - (1 H - インダゾール - 6 - イルアミノ) (3 - ピリジル)] カルボキサミド ; 及び N - [4 - (tert - ブチル) フェニル] [2 - (1 H - インダゾール - 6 - イルアミノ) (3 - ピリジル)] カルボキサミド、並びに米国特許第 6 , 2 5 8 , 8 1 2 号 ; 第 6 , 2 3 5 , 7 6 4 号 ; 第 6 , 6 3 0 , 5 0 0 号 ; 第 6 , 5 1 5 , 0 0 4 号 ; 第 6 , 7 1 3 , 4 8 5 号 ; 第 5 , 5 2 1 , 1 8 4 号 ; 第 5 , 7 7 0 , 5 9 9 号 ; 第 5 , 7 4 7 , 4 9 8 号 ; 第 5 , 9 9 0 , 1 4 1 号 ; 米国特許公開 US 2 0 0 3 0 1 0 5 0 9 1 号 ; 特許協力条約公開 WO 0 1 / 3 7 8 2 0 ; WO 0 1 / 3 2 6 5 1 ; WO 0 2 / 6 8 4 0 6 ; WO 0 2 / 6 6 4 7 0 ; WO 0 2 / 5 5 5 0 1 ; WO 0 4 / 0 5 2 7 9 ; WO 0 4 / 0 7 4 8 1 ; WO 0 4 / 0 7 4 5 8 ; WO 0 4 / 0 9 7 8 4 ; WO 0 2 / 5 9 1 1 0 ; WO 9 9 / 4 5 0 0 9 ; WO 9 8 / 3 5 9 5 8 ; WO 0 0 / 5 9 5 0 9 ; WO 9 9 / 6 1 4 2 2 ; WO 0 0 / 1 2 0 8 9 ; 及び WO 0 0 / 0 2 8 7 1 (出版物のそれぞれは、参照により、いかなる目的のためにも本明細書に組み込まれる。) に開示されているキナーゼ阻害剤が含まれるが、これらに限定されない。

10

20

30

40

50

【 0 1 6 9 】

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

【 0 1 7 0 】

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

【 0 1 7 1 】

ある実施形態において、HGF に対する特異的結合因子は、単独で、又は癌を治療するための、少なくとも一つの追加の治療剤とともに使用することができる。ある実施形態において、HGF に対する特異的結合因子は、追加の治療剤の治療的有効量とともに使用される。HGF に対する特異的結合因子とともに投与され得る典型的な治療剤には、アニサマイシン抗生物質のゲルダナマイシンファミリーに属する要素 ; Pro - HGF ; NK 2 ; c - Met ペプチド阻害剤 ; Grb 2 Src ホモロジー 2 のアンタゴニスト ; Gab 1 調節物質 ; ドミナントネガティブ Src ; フォノーヒッペル - ランダウ阻害剤 (ウォルトマンニンを含むが、これに限定されない。) ; P 1 3 キナーゼ阻害剤、その他の抗受容体治療、抗 EGFR、COX - 2 阻害剤、CelebrexTM、VIOXXTM ; 血管

内皮細胞増殖因子 (V E G F) ; V E G F 調節物質 ; 繊維芽細胞増殖因子 (F G F) 、 F G F 調節物質、上皮増殖因子 (E G F) ; E G F 調節物質 ; ケラチン生成細胞増殖因子 (K G F) ; K G F 関連分子 ; K G F 調節物質 ; マトリックスメタロプロテイナーゼ (M M P) 調節物質が含まれるが、これらに限定されない。

【 0 1 7 2 】

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

10

20

【 0 1 7 3 】

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

【 0 1 7 4 】

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

30

【 0 1 7 5 】

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

【 0 1 7 6 】

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

40

【 0 1 7 7 】

ある実施形態において、H G F に対する特異的結合因子は、少なくとも一つの炎症用治療剤とともに使用され得る。ある実施形態において、H G F に対する特異的結合因子は、少なくとも一つの免疫疾患用治療剤とともに使用され得る。炎症及び免疫疾患用の典型的な治療剤には、シクロオキシゲナーゼ1型 (C O X - 1) 及びシクロオキシゲナーゼ2型 (C O X - 2) 阻害剤、38 k D a マイトージェン活性化タンパク質キナーゼ (p 3 8 - M A P K) の小分子調節物質 ; 炎症経路に関連する細胞内分子の小分子調節物質 (このような細胞内分子には、j n k 、 I K K 、 N F - K B 、 Z A P - 7 0 及び I c k が含まれるが、これらに限定されない。) が含まれるがこれらに限定されない。炎症用の典型的な治療剤の幾つかは、例えば、*C . A . D i n a r e l l o a n d L . L . M o l*

50

dawer Proinflammatory and Anti-Inflammatory Cytokines in Rheumatoid Arthritis: A Primer for Clinicians Third Edition (2001) Amgen Inc. Thousand Oaks, CA」に記載されている。
【0178】

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

【0179】

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

【0180】

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

【0181】

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

【0182】

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

【0183】

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

【0184】

例えば、ある実施形態において、適切なビヒクル又は担体は、非経口投与用組成物において一般的な他の物質を補充できる、注射用水、生理的食塩水溶液又は人工の脳脊髄液であり得る。ある実施形態において、中性の緩衝された生理的食塩水又は血清アルブミンと混合された生理的食塩水は、さらに典型的なビヒクルである。ある実施形態において、薬学的組成物は、pH約7.0から8.5のTris緩衝液、又は約4.0から5.5の酢酸緩衝液を含み、緩衝液は、ソルビトール又は適切な代替物をさらに含み得る。ある実施形態において、少なくとも一つの追加の治療剤とともに、又は少なくとも一つの追加の治療剤なしに、HGFに対する特異的結合因子を含む組成物は、所望の純度を有する選択された組成物を、凍結乾燥ケーキ又は水溶液の形態の、必要に応じて加えられる製剤因子(Remington's Pharmaceutical Sciences, 上記)と混合することによって、保存用に調製され得る。さらに、ある実施形態において、少なくとも一つの追加の治療剤とともに、又は少なくとも一つの追加の治療剤なしに、HGFに対する特異的結合因子を含む組成物は、スクロースなどの適切な賦形剤を用いて、凍結乾燥物として調合され得る。

10

【0185】

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

20

【0186】

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

【0187】

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

30

40

【0188】

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

【0189】

ある実施形態において、製剤は経口的に投与され得ることが想定される。ある実施形態

50

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

【0190】

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

【0191】

持続的又は徐放送達製剤中に、少なくとも一つの追加の治療剤を加え又は加えずに、HGFに対する特異的結合因子を含む製剤など、さらなる薬学的組成物が当業者に自明であろう。ある実施形態では、リポソーム担体、生物侵食可能な微粒子又は多孔性ビーズ及び徐放注射などの、他の様々な持続的又は徐放送達手段を調合するための技術も当業者に公知である。例えば、薬学的組成物を送達するための多孔性ポリマー微粒子の徐放を記載するPCT出願PCT/US93/00829を参照されたい。ある実施形態において、徐放性調製物は、成型品の形態（例えば、フィルム又はマイクロカプセル）の、半透性ポリマーマトリックスを含み得る。徐放性マトリックスは、ポリエステル、ハイドロゲル、ポリラクチド（米国特許第3,773,919号及びEP058,481号）、L-グルタミン酸とγエチル-L-グルタミン酸の共重合体（Sidman et al., *Biopolymers*, 22:547-556 (1983)）、ポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート)（Langer et al., *J. Biomed. Mater. Res.*, 15:167-277 (1981) and Langer, *Chem. Tech.*, 12:98-105 (1982)）、エチレン酢酸ビニル（Langer et al., 上記）又はポリ-D(-)-3-ヒドロキシ酪酸（EP133,988号）を含み得る。ある実施形態において、徐放性組成物はリポソームも含むことができ、リポソームは本分野で公知の複数の方法のうち何れによっても調製できる。例えば、「Eppstein et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:3688-3692 (1985)；EP036,676；EP088,046及びEP143,949」を参照されたい。

【0192】

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

【0193】

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

10

20

30

40

50

、又は使用前に再生される形態（例えば、凍結乾燥される。）で保存することができる。

【0194】

ある実施形態において、本発明は、単回投与ユニットを作製するためのキットに関する。ある実施形態において、前記キットは、それぞれ、乾燥されたタンパク質を有する第一の容器と、水性製剤を有する第二の容器とを含有し得る。本発明のある実施形態において、単一及び複数チャンバーが設けられた、予め充填されている注射器（例えば、液体注射器及びリオシリンジ（*lyosyringe*））を含有するキットが含まれる。

【0195】

ある実施形態において、少なくとも一つの追加の治療剤を加え又は加えずに、HGFに対する特異的結合因子を含む、治療のために使用すべき薬学的組成物の有効量は、例えば、治療の状況及び目的に依存し得る。当業者であれば、ある実施形態における、治療用の適切な投薬レベルは、このように、一部には、送達される分子、少なくとも一つの追加の治療剤を加え又は加えずに、HGFに対する特異的結合因子が使用される適応症、投与経路、並びに患者の大きさ（体重、体表面又は臓器の大きさ）及び／又は状態（年齢及び一般的な健康）に依存し得ることが、当業者には自明である。ある実施形態において、医師は、最適な治療効果を得るために、投薬量を滴定し、投与経路を修飾し得る。ある実施形態において、典型的な投薬量は、上記要因に応じて、約 $0.1\mu\text{g}/\text{kg}$ から最大約 $100\text{mg}/\text{kg}$ 以上の範囲にわたり得る。ある実施形態において、前記投薬量は、上記要因に応じて、約 $0.1\mu\text{g}/\text{kg}$ から最大約 $100\text{mg}/\text{kg}$ ；又は $1\mu\text{g}/\text{kg}$ から最大約 $100\text{mg}/\text{kg}$ ；又は $5\mu\text{g}/\text{kg}$ から最大約 $100\text{mg}/\text{kg}$ の範囲にわたり得る。

10

20

【0196】

ある実施形態において、投薬の頻度は、使用される製剤中の、HGFに対する特異的結合因子及び／又は任意の追加の治療剤の薬物動態学的パラメータを考慮し得る。ある実施形態において、投薬が所望の効果を達成するまで、医師は組成物を投与し得る。ある実施形態において、従って、前記組成物は、単一用量として投与し、若しくは2以上の用量として経時的に投与し（同量の所望の分子を含有してもよく、又は含有しなくてもよい）、又は埋め込み装置若しくはカテーテルを介した連続注入として投与することができる。適切な投薬のさらなる改良は、当業者によって一般的に行われ、当業者によって日常的に実施される作業の範疇に属する。ある実施形態において、適切な投薬は、適切な用量応答データの使用を通じて確認し得る。

30

【0197】

ある実施形態において、薬学的組成物の投与経路は、公知の方法（例えば、経口的に、静脈内、腹腔内、脳内（実質内）、脳室内、筋肉内、眼内、動脈内、門脈内又は病変内経路による注射を通じて、徐放システム又は埋め込み装置）に従う。ある実施形態において、組成物は、大量瞬時注射によって、又は連続的に注入によって、又は埋め込み装置によって、投与され得る。

【0198】

ある実施形態において、組成物は、膜、スポンジ又はその上に所望の分子が吸収若しくは封入された別の適切な材料の埋め込みを介して、局所的に投与され得る。ある実施形態において、埋め込み装置が使用される場合、該装置は、任意の適切な組織又は臓器中に埋め込むことができ、所望の分子の送達は、拡散、持続放出ポラス又は継続的投与によって行うことができる。

40

【0199】

ある実施形態では、少なくとも一つの追加の治療剤を加え又は加えずに、HGFに対する特異的結合因子を含む薬学的組成物を、エキソピボ様式で使うことが望ましい場合があり得る。このような例では、少なくとも一つの追加の治療剤を加え又は加えずに、HGFに対する特異的結合因子を含む薬学的組成物に、患者から採取された細胞、組織及び／又は臓器を曝露させ、その後、細胞、組織及び／又は臓器は患者に再度埋め込まれる。

【0200】

50

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

【0201】

10

実施例

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

【実施例1】

【0202】

抗HGFハイブリドーマの作製

ヒト免疫グロブリン遺伝子を含むマウスであるXenomouse^(R)マウス(Abgenix, Fremont, CA)中で、HGFに対する抗体を産生した。HGFに対する抗体を作製するために、Xenomouse^(R)マウスの三つのグループ(グループ1a、1b及び2)を使用し、表1に要約されている。グループ1aは、完全ヒトIgG2_κ抗体を産生するXenomouse^(R)系統XMG2のマウスからなった。グループ1aマウスは、HGFで免疫した。HGFは、「Nakamura et al., Nature 342:440-443(1989)」中の配列を使用する標準的な組み換え技術を用いて調製した。

20

【0203】

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

30

【0204】

グループ2は、完全ヒトIgG1_κ抗体を産生するXenomouse^(R)系統XMG1のマウスからなった。グループ2マウスは、上記接合されたTCE-HGFで免疫した。

【0205】

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

40

【0206】

【表 2】

表 1. マウスの免疫化

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

【0207】

6 回目の注射から 2 日後に、各マウスから採血した。HGF に対する抗体の力価を決定するために、これらの採血から得た血液試料を ELISA によってアッセイした。これらの ELISA アッセイでは、96 ウェルのプレート（Fisher Scientific cat. # 12-565-136）を、0.1 M の炭酸緩衝液（pH 9.6）中の HGF でコートした。血液試料を添加し、プレートを室温で 2 時間インキュベートした。インキュベーション後、洗浄溶液（PBS 中の 0.05% Tween 20）でプレートを三回洗浄し、100 μ L / ウェルの二次抗体を添加した。二次抗体は、西洋ワサビペルオキシダーゼを接合されたヤギ抗ヒト IgG Fc 抗体（Southern Biotech cat. # 9060-05）であった。室温で 1 時間インキュベーションを行った後、プレートを洗浄し、100 μ L / ウェルの TMB 展開溶液（BioFX Lab Cat. # TMSK-0100-01）を添加した。10 分後、50 μ L / ウェルの TMB 停止溶液（BioFX Lab Cat. # STPR-0100-01）を添加した。プレートは、450 nm の波長で、ELISA プレートリーダー上で読み取られた。

【0208】

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

【0209】

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

, Inc., Model ECM 2001) を使用して、B 細胞が濃縮されたリンパ球の 3 つのサンプルそれぞれを P3 ミエロマ細胞と融合した。次いで、ヒポキサンチン - アザセリンを含有するハイブリドーマ溶媒 (Sigma) (成分については、表 2 を参照) 中に、 1×10^6 個の入力 B 細胞濃縮リンパ球 / ウェルの密度で、融合されたハイブリドーマ株の 3 つのグループを 96 ウェルプレートに播種した。37 °C で、15% CO₂ 中、ハイブリドーマ株を 14 日間培養した。

【0210】

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

10

【0211】

これらの機能的アッセイの結果に基づき、数個のハイブリドーマ株が、HGF に対する抗体を産生するものとして同定された。各株から 3 ないし 6 個のクローンを単離するために、限界希釈を使用した。クローンは、ハイブリドーマ株番号 (例えば、1.24) 及びクローン番号 (例えば、1.24.1) によって表記した。実施例 8 及び 9 に論述されている機能的アッセイによって、ある特定の株の異なるクローン間には、差は検出されなかった。50 から 100 mL のハイブリドーマ溶媒中で、これらの単離されたクローンをそれぞれ増殖させ、枯渇するまで (すなわち、約 10% 未満の細胞生存) 増殖させた。実施例 8 及び 9 に論述されているように、ELISA 及びインビトロ機能検査によって、これらの培養の上清中の HGF に対する抗体の濃度及び効力を測定した。HGF に対する抗体の力価が最高である 10 個のハイブリドーマが同定された。これらのハイブリドーマは、1.24.1、1.29.1、1.60.1、1.61.3、1.74.3、1.75.1、2.4.4、2.12.1、2.40.1 及び 3.10.1 と表記された。

20

30

【0212】

【表 3】

表 2. 成分培地

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

【実施例 2】

【0213】

ハイブリドーマからの抗体の作製

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

【0214】

Integraフラスコ

7個のハイブリドーマ株2.12.1、1.24.2、1.29.1、1.74.1、1.75.1、1.60.2及び2.40.1を、それぞれ別個に、20mLのHSFM培地中のT75フラスコ中で増殖させた（培地成分については、表2参照）。ハイブリドーマがT75フラスコ中でほぼ集密になったときに、ハイブリドーマをIntegraフラスコ（Integra Biosciences, Integra CL1000, cat # 90005）に移した。

【0215】

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

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

【0216】

一週後、7個の各Integraフラスコの両チャンバーから培地を除去し、新鮮なIntegra培地と交換した。7個の小さなチャンバーから集めた培地は、別々に保持された。二週目の増殖の後、小さなチャンバーから得た培地を再び集めた。1週目に各ハイブリドーマ株から集めた培地を、2週目に同じハイブリドーマ株から集めた培地と合わせた。細胞及び細片を除去するために、7個のハイブリドーマ株から収集して得られた7個の培地試料を遠心し (3000 rpmで15分)、得られた上清をろ過した (0.22 μ m)。

【0217】

スパージャー型スピナーフラスコ (3 L)

3つのハイブリドーマ株 (3.10.1、2.4.4及び2.12.1) を、20 mLのHSFM培地中、T75フラスコ中で別々に増殖させた。ハイブリドーマが十分な細胞密度に達したら、ハイブリドーマをT175フラスコに移した。同様に、ハイブリドーマがT175フラスコ中で十分な細胞密度に達したら、100 mLのスピナーフラスコ、次いで500 mLのスピナーフラスコ、次いで1 Lのスピナーフラスコにハイブリドーマを移した。1 Lのスピナーフラスコ中で、細胞が十分な細胞密度に達したら、細胞を3 Lのスパージャー型スピナーフラスコ (Bellco Biotechnology, cat # 1965-300、サイドアーム取り付け具付き cat # 1965-30003) に移した。

【0218】

3 Lのスパージャー型スピナーフラスコとは、磁気プラットフォームによって制御された羽根車で培養物が混合されるガラス溶液である。スピナーは、5% CO₂ 及び空気を与えるために、ガス管線に接続されている。

【0219】

ハイブリドーマ 3.10.1

2つのスパージャー型フラスコの増殖条件が要約されている表3に記された添加物を加えたHSFM培地中のハイブリドーマ株3.10.1から得たハイブリドーマ細胞を、2つの3 Lスパージャー型スピナーフラスコに播種した。

【0220】

10

20

30

【表 4】

表 3. ハイブリドーマ 3. 10. 1 を増殖させるための条件

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

10

【0221】

この培養物を 15 日間増殖させ、トリパンブルー排除によって決定された生存率が 20 %を下回った時点で採集した。採集は、7000 rpmで15分間遠心し、続いて、得られた上清を、0.22 μmフィルターを通してろ過することにより行なった。最後の採集された試料中に存在するタンパク質の量をプロテインA HPLCによって測定することによって、生産性を測定し、これは表3に報告されている。

20

【0222】

ハイブリドーマ 2. 4. 4

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

【0223】

【表 5】

表 4. ハイブリドーマ 2. 4. 4 を増殖させるための条件

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

10

20

【0 2 2 4】

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

【0 2 2 5】

ハイブリドーマ 2. 1 2. 1

30

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

【0 2 2 6】

【表 6】

表 5. ハイブリドーマ 2. 1 2. 1 を増殖させるための条件

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

10

20

【0227】

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

【実施例 3】

【0228】

抗体重鎖及び軽鎖のクローニングと配列分析

A. 軽鎖のクローニング

10 個のハイブリドーマ (1.24.1、1.29.1、1.60.1、1.61.3、1.74.3、1.75.1、2.4.4、2.12.1、2.40.1 及び 3.10.1) が、実施例 1 に論述されているように、HGF に対するモノクローナル抗体を発現するものとして同定された。TRIzol^(R) 試薬 (Invitrogen, Carlsbad, CA) を用いて、総 RNA を、10 個の各ハイブリドーマから単離した。GeneRacer^(R) Kit (Invitrogen) を用いて、これら 10 個の総 RNA 調製物の 5' 末端を、5' cDNA 末端迅速増幅 (RACE) に適合させた。次いで、それぞれが伸長アダプター (5' - GGC CGG ATA GGC CTC C AN NNN NNT - 3') (配列番号 48) を有するランダムプライマーを使用する、10 の別個の RACE 反応において、これら 10 個の 5' 修飾された RNA 調製物を使用し、10 個の cDNA 分子を得た。

30

40

【0229】

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

【0230】

50

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

【0231】

10個の各PCRに対するプライマーセットは、5'プライマーと3'プライマーを含んだ。各5'プライマーは、あるκ軽鎖配列のアミノ末端の配列と相補的な部分(最適化されたKozak配列)と一又は複数の制限部位とを含んだ。例えば、ハイブリドーマ3.10.1から最終的に得られたプラスミドとの反応で使用される5'プライマーの配列は、

【0232】

【化1】

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

XbaI Kozak

GCT TCT CTT -3'

(配列番号51)であった。

【0233】

それぞれのPCRに対する3'プライマーは、特定のκ軽鎖配列の配列のカルボキシル末端(終止コドンと制限部位とを含む。)と相補的な部分を含んだ。例えば、ハイブリドーマ3.10.1から最終的に得られたプラスミドとの反応で使用される3'プライマーの配列は、

【0234】

【化2】

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

SalI *

C -3'

(配列番号52)であった。

【0235】

10個のκ軽鎖コード領域配列を増幅するために、対応するクローニングされたプラスミドを使用する別個のPCR反応では、別個のプライマーセットを使用した。これらの反応から得た10個の増幅産物は、QIAquick^(R) Gel Extraction kit (Catalog No. 28704, Qiagen, Valencia, CA)を用いて、別個にゲル単離され、精製された。次いで、プラスミドを含まないκ軽鎖コード領域配列を取得するために、これらの精製産物をそれぞれ適切な制限酵素で切断した。例えば、ハイブリドーマ3.10.1に対応する精製産物は、XbaI及びSalI(この部位は、上述のように、クローニングされたプラスミドのPCR増幅中にプライマーによって導入された。)で切断した。得られた、制限消化されたκ軽鎖コード領域配列を、同じく、QIAquick^(R) Gel Extraction kit (Catalog No. 28704, Qiagen, Valencia, CA)を用いて、別個にゲル単離し、精製した。

【0236】

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

作製するために、これらの10個の、制限消化された精製κ軽鎖コード領域配列を、それぞれ別個に、哺乳類発現ベクターpDSRα20(WO 90/14363)中に連結した。次いで、10個のκ軽鎖発現ベクター挿入物の配列を決定した。ハイブリドーマ3.10.1(pDSRα20:3.10.1)から最終的に得られたκ軽鎖コード領域を含有するpDSRα20発現ベクターは、719塩基対のPCR断片(3.10.1κ軽鎖の235アミノ酸残基(20アミノ酸のκ鎖シグナル配列を含む。)をコードする。)を含む5473塩基を包含することが確認された。この発現ベクターは、表6に記載されているように7つの機能的領域を含んでいた。

【0237】

【表7】

10

表6 発現ベクターpDSRα20:3.10.1κ

プラスミド塩基
対番号

2 to 881		マウス下垂体糖タンパク質ホルモンα77ユニット(α-FSH)由来の転写終結/ホリテニル化シグナル(Goodwin, et al., 1983, Nucleic Acids Res. 11:6873-82; Genbank Accession Number X00004)
882 to 2027		内在性マウスDHFRプロモーター、cDNAコード配列及びDHFR転写終結/ホリテニル化シグナルを含有するマウスヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)ミニ遺伝子(Gasser et al., 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79:6522-6; Nunberg et al., 1980, Cell 19:355-64; Setzer et al., 1982, J. Biol. Chem. 257:5143-7; McGrogan et al., 1985, J. Biol. Chem. 260:2307-14)
2031 to 3947		アピシリン耐性マーカー遺伝子とE. coli中のプラスミドの複製起点とを含有するpBR322配列(Genbank Accession Number J01749)
3949 to 4292		SV40初期プロモーター、エンハンサー及び複製起点(Takebe et al., 1988, Mol. Cell Biol. 8:466-72, Genbank Accession Number J02400)
4299 to 4565		HTLV-1 LTRドメイン由来の翻訳エンハンサーエレメント(Seiki et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 80:3618-22, Genbank Accession Number J02029)
4574 to 4730		SV40 16Sからのイントロン、19S スプライストナー/アクセプターシグナル(Okayama and Berg, 1983, Mol. Cell Biol. 3:280-9, Genbank Accession Number J02400)
4755 to 5473		XbaIとSalI部位の間の、3.10.1κ軽鎖鎖cDNA

20

30

40

【0238】

B. 重鎖のクローニング

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

【0239】

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

50

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

【0240】

10個の増幅された重鎖可変領域配列のそれぞれを、別個のPCR4-TOPOプラスミドの中に、別々に連結した。次いで、得られた10個のプラスミド(それぞれ、10個の重鎖可変領域配列のうちの1つを含有する。)を細菌中で別個に増幅し、実施例3Aで軽鎖について上述したように、それぞれの数クローンの配列を決定した。以下のようにして、クローニングされたプラスミドから重鎖可変領域の各々を増幅するためのPCRプライマーをデザインするために、これらの配列を使用した。

10

【0241】

10のPCRそれぞれに対するプライマーセットは、実施例3Aに上述されている、軽鎖に対して使用したものと同一戦略を用いてデザインした。各5'プライマーは、ある重鎖可変領域配列のアミノ酸末端の配列と相補的な部分(最適化されたKozak配列)と一又は複数の制限部位とを含んだ。例えば、ハイブリドーマ3.10.1から最終的に得られた重鎖可変領域を増幅するために使用した5'プライマーの配列は、

【0242】

【化3】

5' - AGC AGA AGC TTC TAG ACC ACC ATG AAA CAC CTG TGG
TTC
XbaI Kozak
TTC CTC CTC -3'

20

(配列番号54)であった。

【0243】

10のPCRそれぞれに対する3'プライマーは、特定の重鎖可変領域配列のコンセンサス配列のカルボキシル末端(終止コドンと制限部位とを含む。)と相補的な部分を含んだ。例えば、ハイブリドーマ3.10.1から最終的に得られた重鎖可変領域を増幅するために使用した3'プライマーの配列は、

30

【0244】

【化4】

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

(配列番号55)であった。

【0245】

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

40

【0246】

次いで、精製され、制限消化された10個の重鎖可変領域配列のうち、ハイブリドーマ3.10.1、1.24.1及び2.4.4から最終的に得られた3個を、3つの重鎖IgG1発現ベクターを作製するために哺乳類発現ベクターpDSRα20:hlgGCH_H中に別々に連結した。pDSRα20:hlgGCH_H発現ベクターは、IgG1定常領域

50

配列も含有していることを除き、p D S R α 2 0 と同じである。p D S R α 2 0 : h l g G C_H 発現ベクターは、表 7 に要約されている。

【 0 2 4 7 】

【 表 8 】

表 7 発現ベクター p D S R α 2 0 : h l g G C_H

プラスミド塩基
対番号

2 to 881	ウシ下垂体糖タンパク質ホルモン α サブユニット(α -FSH)由来の転写終結/ ポリデシル化シグナル(Goodwin, et al., 1983, Nucleic Acids Res. 11:6873-82; Genbank Accession Number X00004)	10
882 to 2027	内在性マウスDHFRプロモーター、cDNAコード配列及びDHFR転写終結/ ポリデシル化シグナルを含有するマウスヒドロメチル転移酵素(DHFR) ミニ遺伝子(Gasser et al., 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79:6522-6; Nunberg et al., 1980, Cell 19:355-64; Setzer et al., 1982, J. Biol. Chem. 257:5143-7; McGrogan et al., 1985, J. Biol. Chem. 260:2307-14)	
2031 to 3947	アピシリン耐性マーカー遺伝子とE. coli中のプラスミドの複製起点とを含有する pBR322配列(Genbank Accession Number J01749)	20
3949 to 4292	SV40初期プロモーター、エンハンサー及び複製起点(Takebe et al., 1988, Mol. Cell Biol. 8:466-72, Genbank Accession Number J02400)	
4299 to 4565	HTLV-1 LTRドメイン由来の翻訳エンハンサーエレメント(Seiki et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 80:3618-22, Genbank Accession Number J02029)	
4574 to 4730	SV40 16Sからのイントロン、19Sトランスクリプターシグナル(Okayama and Berg, 1983, Mol. Cell Biol. 3:280-9, Genbank Accession Number J02400)	30
4755 to 5791	XbaI及びSalI部位の間の、pl/hCh1重鎖cDNA 配列は以下のとおりである。 XbaI BsmBI TCTAG ACCACCGCCATGGGTGAAAATTGAAT CGTCTCTA GTGCCTCCACCAAGGGCCCA TCGGTCTTCC CCCTGGCACC CTCCTCCAAG AGCACCTCTGGGGGCACAGC GGCCCTGGGC TGCCTGGTCA AGGACTACTT CCCC GAACCG GTGACGGTGT CGTGGAAGCTC AGGCGCCCTG ACCAGCGGCG TGCACACCTT CCCGGCTGTC CTACAGTCCT CAGGACTCTA CTCCCTCAGC AGCGTGGTGACCGTGCCCTC CAGCAGCTTG GGCACCCAGA CCTACATCTG CAACGTGAATCACAAGCCCCA	40

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

10

20

30

【 0 2 4 8 】

3つのI g G 1 発現ベクター挿入物の重鎖可変領域の配列を決定した。ハイブリドーマ 3 . 1 0 . 1 (p D S R α 2 0 : h l g G C _H : 3 . 1 0 . 1) から最終的に得られた重鎖可変領域を含有する p D S R α 2 0 : h l g G C _H 発現ベクターは、表 8 に要約されている。

【 0 2 4 9 】

【表 9】

表 8 発現ベクター p D S R α 2 0 : hlgGC_H:3.10.1

プラスミド塩基
対番号

2 to 881	ウシ下垂体糖タンパク質ホルモン α サブユニット(α -FSH)由来の転写終結/ ポリデニル化シグナル(Goodwin, et al., 1983, Nucleic Acids Res. 11:6873-82; Genbank Accession Number X00004)
882 to 2027	内在性マウスDHFRプロモーター、cDNAコード配列及びDHFR転写終結/ ポリデニル化シグナルを含有するマウスヒドロメチル転移酵素(DHFR) ミニ遺伝子(Gasser et al., 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79:6522-6; Nunberg et al., 1980, Cell 19:355-64; Setzer et al., 1982, J. Biol. Chem. 257:5143-7; McGrogan et al., 1985, J. Biol. Chem. 260:2307-14)
2031 to 3947	アンピシリン耐性マーカー遺伝子とE. coli中のプラスミドの複製起点とを 含有するpBR322配列(Genbank Accession Number J01749)
3949 to 4292	SV40初期プロモーター、エンハンサー及び複製起点(Takebe et al., 1988, Mol. Cell Biol. 8:466-72, Genbank Accession Number J02400)
4299 to 4565	HTLV-1 LTRドメイン由来の翻訳エンハンサーエレメント(Seiki et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 80:3618-22, Genbank Accession Number J02029)
4574 to 4730	SV40 16Sからのイントロン、19Sドナー/アクセプターシグナル(Okayama and Berg, 1983, Mol. Cell Biol. 3:280-9, Genbank Accession Number J02400)
4755 to 6178	XbaI及びSalI部位の間の3.10.1重鎖IgG1 cDNA

10

20

30

【0250】

精製された10個の重鎖可変領域配列のそれぞれを、IgG2定常領域をコードする配列とともに、p D S R α 2 0 哺乳類発現ベクター中に別個に連結して、10個のIgG2発現ベクターを作製した。得られた10個のIgG2発現ベクター(p D S R α 2 0 : hlgG2:ハイブリドーマ#と表記)のそれぞれは、IgG2の定常領域と10個の重鎖可変領域配列のうち1つとをコードする配列を含んでいた。pCR4-TOPOクローンからクローニングされたプラスミド中に同定された同じ重鎖可変領域配列を含んでいることを確認するために、10個の重鎖可変領域配列挿入物の配列を決定した。ハイブリドーマ2.12.1(p D S R α 2 0 : hlgG2:2.12.1)から最終的に得られた重鎖可変領域を含有するp D S R α 2 0 : hlgG2発現ベクターは、表9に要約されている。

40

【0251】

【表 10】

表9 発現ベクター pDSRα20: IgG2: 2. 12. 1

プラスミド塩基
対番号

2 to 881	ラット下垂体糖タンパク質ホルモンαサブユニット(α-FSH)由来の転写終結/ ポリデニル化シグナル(Goodwin, et al., 1983, Nucleic Acids Res. 11:6873-82; Genbank Accession Number X00004)
882 to 2027	内在性マウスDHFRプロモーター、cDNAコード配列及びDHFR転写終結/ ポリデニル化シグナルを含有するマウスヒドロメチル転移酵素(DHFR) ミニ遺伝子(Gasser et al., 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 79:6522-6; Nunberg et al., 1980, Cell 19:355-64; Setzer et al., 1982, J. Biol. Chem. 257:5143-7; McGrogan et al., 1985, J. Biol. Chem. 260:2307-14)
2031 to 3947	アンプリシリン耐性マーカー遺伝子とE. coli中のプラスミドの複製起点とを含有する pBR322配列(Genbank Accession Number J01749)
3949 to 4292	SV40初期プロモーター、エンハンサー及び複製起点(Takebe et al., 1988, Mol. Cell Biol. 8:466-72, Genbank Accession Number J02400)
4299 to 4565	HTLV-1 LTRドメイン由来の翻訳エンハンサーエレメント(Seiki et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 80:3618-22, Genbank Accession Number J02029)
4574 to 4730	SV40 16Sからのイントロン、19Sドナー/アクセプターシグナル(Okayama and Berg, 1983, Mol. Cell Biol. 3:280-9, Genbank Accession Number J02400)
4755 to 6166	XbaI及びSalI部位の間の2.12.1重鎖IgG2 cDNA

10

20

30

【0252】

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

【0253】

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

40

【0254】

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

【実施例4】

【0255】

293T細胞中での一過性発現

50

10の別個の同時形質移入では、実施例3Aに記載したκ軽鎖配列を含むpDSRα20発現ベクター（軽鎖ベクター）と実施例3Bに記載した重鎖配列を含むpDSRα20発現ベクター（重鎖ベクター）とを、293T細胞に同時形質移入した。これら10の別個の同時形質移入では、実施例1で論述したハイブリドーマの1つから最終的に得られた軽鎖ベクター及び重鎖ベクターの両方を293T細胞に同時形質移入した。具体的には、ハイブリドーマ3.10.1から最終的に得られたベクターの同時形質移入については、IgG1（pDSRα20:hIgGC_H:3.10.1）を含む重鎖ベクターを使用した。他の9個のハイブリドーマから最終的に得られたベクターの同時形質移入については、IgG2（pDSRα20:hIgG2:ハイブリドーマ#）を含む重鎖を使用した。同時形質移入は、製造業者によって与えられた説明書に従って、Fugene6又はX-TremeGene RO-1539（ともにRoche Molecular Biochemicals, Indianapolis, INから得られる。）の何れかを用いて行った。

10

20

30

40

50

【0256】

同時形質移入は、まず、標準的なローラーボトル中で、接着性293T細胞を用いて行った。5%ウシ胎児血清（FBS）（Hyclone, cat # SH 30070.03）、1×非必須アミノ酸（Sigma, cat # M7145）、1×ペニシリン/ストレプトマイシン（Sigma, cat # P7539（10,000U/mLペニシリン/ストレプトマイシン））及び1×ビルビン酸ナトリウム（Invitrogen, Carlsbad, CA）を含有するDMEM中、ローラーボトル当たり 4×10^7 から 5×10^7 個の細胞を、ローラーボトルに播種した。細胞が60から70%の集密度に達した時点で、特定のハイブリドーマから最終的に得られた重鎖ベクター及び軽鎖ベクターを、前記細胞中に24時間同時形質移入し、その後、この培地は、血清を欠く同じ培地に変更した。無血清培地を集め、形質移入から48時間及び96時間の時点で、新鮮な無血清培地に2回交換して、総容量1.25Lの収集された無血清培地を得た。

【0257】

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

【実施例5】

【0258】

抗体発現及びCHO細胞のクローニング

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

【0259】

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

【実施例6】

【0260】

CHO^dクローン中での、HGFに対する抗体の発現

実施例5に記載した異なる安定な10個のCHO^dクローン（それぞれの異なるクロ

ーンが、HGFに対する10個の異なる抗体のうち1つを発現している。)それぞれの6つの試料を、別々に、増殖培地中で増殖させた。増殖培地は、5%の透析されたFBS、非必須アミノ酸及びL-グルタミン(Life Technologies, Carlsbad, CA)を補充された、高グルコース加DMEM(Gibco/BRL, Carlsbad, CA Cat # 11965)であった。細胞は、5% CO₂下、37℃で増殖された。

【0261】

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

10

【0262】

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

20

【0263】

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

【実施例7】

【0264】

組み換え細胞馴化培地からの抗体精製

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

30

【0265】

組み換えプロテインAセファロース(rProA)(Amersham, Piscataway, NJ, Cat # 17-1279-03)を用いたアフィニティー樹脂精製によって、濃縮された前記培地試料から抗体を精製した。まず、rProAを、リン酸緩衝食塩水(PBS)で4回洗浄した。最後の洗浄後、等容量のrProAとPBSを混合することによって、PBS中の洗浄されたrProAのスラリーを作製した。培地試料中の各5μgの抗体に対して約1μLのrProAスラリーであるが、何れの培地試料に対しても50μL以上のrProAスラリーとなる量で、このrProAスラリーを濃縮された各培地試料に添加した。得られた培地/スラリー試料を、振盪しながら、4で一晩インキュベートした。次いで、rProAを沈降させるために培地/スラリー試料を遠心した。結合していないタンパク質を含有する上清画分は廃棄した。rProAペレットは、各0.5mLのPBS中に、別々に再懸濁した。次いで、再懸濁されたrProA試料を0.45μm Spin-Xチューブ(Costar, Corning NY

40

50

、Cat # 8162)に移し、PBSを除去するために遠沈させた。次いで、Spin-Xチューブ中のrProAを、一回の洗浄当り0.5mL PBSで3回洗浄した。

【0266】

1.5容量の0.1Mグリシン、pH2.7を添加することによって、Spin-Xチューブ中のrProAから、抗体画分を溶出し、室温で10分間インキュベートした。次いで、Spin-Xチューブを遠心し、各Spin-Xチューブからの溶出物を別々に集めた。溶出を繰り返し、各Spin-Xチューブからの2つの溶出物をプールした。プールされた溶出物のpHを、1/25容量の1.0M Tris、pH9.2で中和した。次いで、粒状物を除去するために、新しいSpin-Xチューブを通過させて各試料をろ過した。

10

【0267】

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

【実施例8】

【0268】

HGFへの抗体の結合の性質決定

A. アフィニティー測定

BIAcore^(R) 3000 (Biacore, Inc., Piscataway, NJ)を用いて、実施例6に記載されている、HGFに対する6個の抗体(ハイブリドーマ3.10.1、2.4.4、2.12.1、1.29.1、1.75.1及び1.74.3から最終的に得られた抗体)のアフィニティー分析を、製造業者の指示書に従って実施した。これらの分析に対する走行緩衝液は、0.005% P20界面活性剤を加えたPBSであった(BIAcore, Inc. Piscataway, NJ)。製造業者の指示書に従って、Amine Coupling Kit (Biacore, Inc. Piscataway, NJ)を使用し、一級アミン基を介して、組み換えプロテインG (Pierce, Rockford, IL)を、研究等級のCM5センサーチップ(Biacore, Inc. Piscataway, NJ)に固定化した。

20

30

【0269】

6つの別個の試料において、製造業者の指示書に従って、HGFに対する6個の各抗体の約200共鳴単位(RU、resonance unit)を、固定化されたプロテインGに別々に付着させた。様々な濃度(0から100nM)のヒトHGFを含む試料を、結合された抗体表面上に、50μL/分の流速で、3分間注入した。BIAエバリュエーション3.1コンピュータプログラム(BIAcore, Inc. Piscataway, NJ)を用いて、K_a(会合速度定数)、K_d(解離速度定数)及びK_D(解離平衡定数)を含む抗体結合速度論パラメータを決定した。解離平衡定数が低いほど、HGFに対する抗体の親和性が大きいことを示す。データを図6Aに示す。

【0270】

HGFに対する4個の各抗体(ハイブリドーマ2.4.4、1.29.1、1.74.2及び2.12.1から最終的に得られた抗体)のK_D値も、平衡結合法を用いて測定した。この方法は、0.005%のP20界面活性剤を加えたPBS(BIAcore, Inc. Piscataway, NJ)を走行緩衝液として使用して、BIAcore^(R) 3000 (Biacore, Inc., Piscataway, NJ)によって行った。製造業者の指示書に従って、Amine Coupling Kit (Biacore, Inc. Piscataway, NJ)を使用し、一級アミン基を介して、HGFに対する4個の抗体を、研究等級のCM5センサーチップ(Biacore, Inc. Piscataway, NJ)に別々に固定化した。

40

【0271】

50

別々のアッセイにおいて0.005% P-20と0.1mg/mL BSAを加えたPBS中の2つの異なる各濃度(0.05nM及び1nM)の各ヒトHGFとともに、HGFに対する4個の各抗体を、濃度範囲(0.01nMから50nM)にわたって、室温で少なくとも6時間、別々にインキュベートした。次いで、HGFに対する同じ抗体がその上に固定化されたCM5センサーチップの表面上に、これらの試料のそれぞれを注入した。得られた結合シグナルは、溶液中の遊離HGFと比例していた。解離平衡定数(K_D)は、双対曲線一部位均一結合モデル(KinExA software, Sapid yne Instruments Inc., Boise ID)を用いて、競合曲線の非線形回帰分析によって得られた。この解離平衡定数の値は、図6Bに記されている。

【0272】

10

B. HGFに対する抗体の結合の特異性

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

20

【0273】

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

【0274】

ヒトHGF及びマウスHGFを、SDS PAGEゲルの各別のレーン上で走行させた。ヒトHGF及びマウスHGFは、100ng/レーン及び10ng/レーンで、それぞれ別々に走行させた。一部のゲルは非還元条件下で走行させ、他の各別のゲルはβ-メルカプトエタノールを用いた還元条件下で走行させた。SDS PAGEゲル中のヒトHGF及びマウスHGFをニトロセルロース膜に転写した。これらの膜を、実施例6で記載した、HGFに対する10個の抗体のうち1つとともに別々にインキュベートした。HGFに対する10個の抗体の各々を、還元条件下で、ヒトHGF及びマウスHGFを含有するゲルから得たニトロセルロース膜とともに、並びに、非還元条件下で、ヒトHGF及びマウスHGFを含有するゲルから得たニトロセルロース膜とともに、別々にインキュベートした。次いで、HRP(Pierce, Rockford, IL, Cat. # 31412)に連結されたヤギ抗ヒトIgG抗体とともに、前記膜をインキュベートした。HRPに連結されたヤギ抗ヒトIgG抗体から得られるシグナルを、製造業者の指示書に従って、電気化学発光によって検出した(ECLTM; Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, Cat. # RPN 2106)。

30

40

【0275】

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

50

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

【0276】

C. 融合タンパク質を用いたエピトープマッピング

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

【0277】

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

【0278】

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

【0279】

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

【0280】

別々の試料において、実施例6で記載した、HGFに対する10個の抗体のうち5個(ハイブリドーマ2.4.4、1.74.1、1.75.1、3.10.1及び2.12.1から最終的に得られた抗体)を、以下の標的タンパク質: 完全長ヒトHGF、d5 HGF及びマウスHGFのそれぞれを含む融合タンパク質とともに別々にインキュベートした。インキュベート後、ビオチンコートされたビーズ(Spherotech Inc., Libertyville, IL, Cat# TP-60-5)を用いて、各試料中の融合タンパク質を別々に捕捉した。FITC標識された抗アビジン抗体(Vector Lab, Burlingame, CA, Cat# SP-2040)を添加することによって、得られたビーズ-タンパク質複合体を標識した。フィコエリトリン(PE)標識されたヤギ抗ヒトF(ab')₂抗体(Southern Biotech Associates, Inc., Birmingham, AL, Cat# 2043-09)を添加することによって、HGFに対する抗体の存在を決定した。

【0281】

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

10

20

30

40

50

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

【0282】

別々の試料において、実施例 6 で記載した、HGF に対する 10 個の抗体のうち 2 個 (ハイブリドーマ 2.12.1 及び 2.4.4 から最終的に得られた抗体) を、以下の標的タンパク質: 完全長ヒト HGF、d5 HGF 及びマウス HGF、キメラ # 1、キメラ # 2 及びキメラ # 3 のそれぞれを含む融合タンパク質とともに別々にインキュベートした。これらの試料を、上記 FACS 分析に供した。

10

【0283】

これらの結合実験の結果は、図 10A に、模式図の右に要約されている。抗体 2.12.1 および 2.4.4 は何れも、キメラ # 1 を結合しなかった。抗体 2.12.1 および 2.4.4 はともに、キメラ # 2 を結合した。抗体 2.4.4 はキメラ # 3 に結合した。抗体 2.12.1 はキメラ # 3 に結合しなかった。

【0284】

D. 融合タンパク質を用いたさらなるエピトープマッピング

抗体 2.4.4 及び 2.12.1 が結合する、HGF のエピトープについての情報をさらに与えるため、実施例 8C (図 10B) に上記されているように、さらなるヒト/マウスキメラを構築し、アッセイした。キメラを作製するために使用されたプライマーは、表 10 に示されている。

20

【0285】

【表 11】

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

配列番号	オリゴ番号	配列	n	構築物	切断点又は変異
124	3201-76	ATG CGT CTC CCT TGA TGA TGC TGG CTG CAT TTC	33	点変異	hHGFR647Q
125	3201-75	ATG CGT CTC TCA AGG GAA GGT GAC TCT GAA TGA	33	点変異	hHGFR647Q
126	3201-72	ATG CGT CTC TAA CTA GGT AAA TCA ATC GTA CTA ACA	36	点変異	hHGFR601S
127	3201-71	ATG CGT CTC TAG TTA TGG ATG CAC AAT TCC TGA AA	35	点変異	hHGFR601S
128	3201-70	ATG CGT CTC AAT TAT CCA GGA CAG CAG GCC TG	32	点変異	hHGFR592N
129	3201-69	ATG CGT CTC ATA ATT TTG TTA GTA CGA TTG ATT TAC	37	点変異	hHGFR592N

30

40

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

10

20

30

40

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

10

20

【 0 2 8 6 】

図 1 0 B は、研究のために作製されたマウス及びヒト H G F キメラ分子の模式図を示しており、各キメラへの抗体 2 . 1 2 . 1 及び 2 . 4 . 4 の結合の挙動が図の右手側に記されている。本研究におけるキメラ # 1 - 3 は、実施例 8 C 及び図 1 0 A に記載されたキメラ # 1 - 3 と同一であった。キメラ # 4 - 6 は、その他の点では完全なヒト H G F 分子中に、マウス H G F の N 末端の漸増量を取り込んだ。キメラ # 7 は、他の点はそのままのヒト H G F 分子中にマウス H G F のアミノ酸 5 0 7 から 5 8 5 を使用し、キメラ # 8 は他の点はそのままのマウス H G F 分子中にヒト H G F のアミノ酸 5 0 7 から 5 8 5 を使用した。キメラ # 9 は、マウス H G F のアミノ酸 1 から 5 8 5 とヒト H G F のアミノ酸 5 8 6 から 7 3 1 から構築された。

30

【 0 2 8 7 】

キメラタンパク質への抗体 2 . 4 . 4 及び 2 . 1 2 . 1 の結合は、実施例 8 C に記載されているようにアッセイを行った。抗体 2 . 4 . 4 又は抗体 2 . 1 2 . 1 の何れかを、融合タンパク質の 1 つとともにインキュベートした後、ビオチンコートされたビーズ (S p h e r o t e c h I n c . , L i b e r t y v i l l e , I L , C a t # T P - 6 0 - 5) を用いて、各試料中の融合タンパク質を別々に捕捉した。F I T C 標識された抗アビジン抗体 (V e c t o r L a b , B u r l i n g a m e , C A , C a t . # S P - 2 0 4 0) を添加することによって、得られたビーズ - タンパク質複合体を標識した。フィコエリトリン (P E) 標識されたヤギ抗ヒト F (a b ') ² 抗体 (S o u t h e r n B i o t e c h A s s o c i a t e s , I n c , B i r m i n g h a m , A L , C a t # 2 0 4 3 - 0 9) を添加することによって、H G F に対する抗体の存在を決定した。次いで、これらの試料を F l u o r e s c e n c e A c t i v a t e d C e l l S o r t e r (F A C S) 分析に供した。F I T C によって標識されたビーズ複合体 (アビジンの存在を示す。) 及び / 又は P E (H G F に対する抗体の存在を示す。) を、B e c t o n D i c k i n s o n B i o s c i e n c e F A C S c a n (B D , F r a n k l i n L a k e s , N J) 上で検出した。一部の事例では、F I T C を用いて発現を標準化した後、P E 標識による抗体結合の後、単色 F A C S 分析を行った。この方法はアッセイの感度を増し、あまり高いレベルで発現されてい

40

50

ない構築物との結合の測定に役立った。

【0288】

図10Bに示されているように、抗体2.4.4及び2.12.1は何れも、ヒトHGFのアミノ酸507から585を含有するキメラ#8を結合した(図10B)。これらの結果は、抗体2.4.4及び2.12.1のHGFへの結合に直接又は間接的に関与する残基を、この領域が含有することを示唆した。この同じ507から585領域中にマウス配列を含有するキメラ(キメラ7及び9)は、抗体2.12.1又は2.4.4を結合しなかった。キメラ3は、ヒトHGFのアミノ酸507から585の存在にも関わらず、抗体2.12.1に結合しなかったが、抗体2.4.4には結合した。

【0289】

ヒトHGFのアミノ酸507から585

【0290】

【化5】

:(GWMVSLRYRNKHICGGSLIKESWVLTARQCFPSR--

DLKDYEAWLGIHVDVHGRGDEKCKQVLNVSQVLVYGPEGSDLVLM

(配列番号123)(図10D参照)についての情報をさらに得るために、表10に記載されているプライマーを用いて、アミノ酸507から585の領域内でヒト残基をマウス残基に変化させる特異的な点変異を含有する変異HGFを作製した(図10C)。ヒトHGF配列からマウスHGF配列(それぞれ、Genbank受託番号NM_000601及びNM_010427)への非保存的な単一アミノ酸変化を5個含有するヒトHGF-アビジン融合タンパク質を構築した。一方はヒトHGF配列中に2つのアミノ酸の挿入を含有し、他方はマウス配列から2つのアミノ酸の欠失を含有する、さらに2つの構築物も作製した(図10C)。

【0291】

これらの構築物を発現させ、実施例8C及び8Dに記載されているように、結合分析に供した。抗体2.4.4又は抗体2.12.1の何れかを、前記変異タンパク質の1つとともにインキュベートした後、ビオチンコートされたビーズ(Spherotech Inc., Libertyville, IL, Cat # TP-60-5)を用いて、各試料中の変異タンパク質を別々に捕捉した。FITC標識された抗アビジン抗体(Vector Lab, Burlingame, CA, Cat. # SP-2040)を添加することによって、前記得られたビーズ-タンパク質複合体を標識した。フィコエリトリン(PE)標識されたヤギ抗ヒトF(ab')²抗体(Southern Biotech Associates, Inc, Birmingham, AL, Cat # 2043-09)を添加することによって、HGFに対する抗体の存在を決定した。次いで、これらの試料をFluorescence Activated Cell Sorter(FACS)分析に供した。FITCによって標識されたビーズ複合体(アビジンの存在を示す。)及び/又はPE(HGFに対する抗体の存在を示す。)を、Becton Dickinson Bioscience FACScan(BD, Franklin Lakes, NJ)上で検出した。一部の事例では、FITCを用いて発現を標準化した後、PE標識による抗体結合の後、単色FACS分析を行った。この方法はアッセイの感度を増し、あまり高いレベルで発現されていない構築物との結合の測定に役立った。

【0292】

アミノ酸561の変異は、変異されたヒトHGFと抗体2.12.1との結合及び変異されたヒトHGFと抗体2.4.4との結合を妨げるが、アミノ酸592、601又は647の変異は妨げないことが明らかとなった。アミノ酸555の変異は、抗体2.12.1の結合を妨げたが、抗体2.4.4結合は妨害しなかった。ヒト配列中に存在しない、2つのマウスアミノ酸540N及び541Kの挿入は(図10D参照)、何れの抗体への

10

20

30

40

50

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

【0293】

E. プロテアーゼ保護アッセイによるエピトープマッピング

抗体2.12.1によって結合されるHGFエピトープを同定するために、古典的な相補的プロテアーゼ保護アッセイも行った。「Yi and Skalka, Mapping Epitopes of Monoclonal Antibodies Against HIV-1 Integrase with Limited Proteolysis and Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry, Biopolymers (Peptide Science) 55: 308-318 (2000)」を参照されたい。200 μ Lの0.1M Tris緩衝液、pH7.5中で、ヒトHGF(30 μ g/10 μ L)を抗体2.12.1(40 μ g/4 μ L)と混合し、氷上で30分間、インキュベートした。トリプシン(1 μ g)での消化を、37℃で1時間行った。ペプチドを分離するために、消化された物質を逆相HPLCに供した。抗体2.12.1を加えない、ヒトHGFのみの同様のトリプシン消化を、平行して行った。HPLCカラム(Vydac C18, 2.1 $\times$ 150mm, Vydac Inc., Hesperia CA)は、0.1% TFA中の2から35%アセトニトリルの溶出グラジエントを用いる、0.1%トリフルオロ酢酸(TFA)中で実行した。溶出ペプチドのUV追跡は、HP 1090 HPLC装置(Hewlett Packard, Palo Alto)によって記録した。抗体2.12.1への結合によって保護されたペプチドを調べるために、2つのHPLCマップを比較した(図11A)。

10

20

30

40

50

【0294】

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

【0295】

ヒトHGFの α サブユニットはアミノ酸32から494にわたり、 β サブユニットはアミノ酸495から728にわたる(ヒトHGFに対するSwiss-ProtエントリーP14210参照)。ヒトHGFへの抗体2.12.1の結合は、2つのピークT33及びT38.6を保護した(図11A)。ピークT38.6は2つのペプチドを含有しており、何れも、成熟したHGFの β サブユニットの先頭又は先頭付近の配列に対応する(図10D、太字で始まる配列、下線が付された文字(VVNGIPTRTN(配列番号172))及び図11C参照)。T33は、 α サブユニットに由来した(図11C)。質量分析に基づく、ピークT38.6中の2つのペプチドの観察された質量は、それぞれ、7165及び6840ダルトンと測定された。HGFの配列中に存在する可能性があるトリプシン切断部位に基づき(例えば、図10D中のヒトHGFのアミノ酸559に位置する下線が付された太字のアルギニン残基を参照。)、アルギニン残基番号559が保護されたペプチドのC末端を画すると予想される。

【0296】

抗体結合ペプチドを調べるために、別の相補性実験も設計した。上述されているように、HGFと抗体2.12.1の混合物をトリプシンで1時間消化し、次いで、結合してい

ないペプチドを除去するために、Microcone^(R) 10 (Millipore Corp., Bedford, MA) によるろ過に供した。結合されたペプチドは、抗体 2.12.1 と一緒に、膜によって捕捉されると予想された。結合されたペプチドを複合体から溶出するために、原型のヒト HGF (15 µg) をペプチド - 抗体 2.12.1 混合物に添加した。試料を 4 で一晩インキュベートし、HGF 溶出されたペプチドを抗体及び原型 HGF から分離するために、Micron^(R) 10 によるろ過に再び供した。両試料 (結合したペプチド及び結合していないペプチド) を逆相 HPLC によって分析した (図 11B)。結合したペプチドを HPLC によって単離し、上述のように、N 末端配列決定及び質量分析に供した。

【0297】

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

【0298】

総合すると、これら 2 つの実験は、HGF の β サブユニットの N 末端領域が抗体 2.12.1 に対するエピトープの一部であることを示していた。このデータは、結合に關与するエピトープがヒト HGF のアミノ酸 507 から 585 内に位置することを明らかにした、実施例 8D のデータを補完する。変異分析及び保護されたペプチドの分子質量は、ヒト HGF の抗体結合エピトープがヒト HGF のアミノ酸 495 から 556 内に位置することを示している。

【0299】

F. 抗体の競合結合

実施例 6 に記載されている、ハイブリドーマ 2.4.4 から最終的に得られた HGF に対する抗体 (抗体 2.4.4)、及びハイブリドーマ 2.12.1 から最終的に得られた HGF に対する抗体 (抗体 2.12.1) を、以下のように、競合アッセイで使用するために FITC 標識した。抗体 2.4.4 及び 2.12.1 を、PBS pH 8.5 中で別々に透析した。FITC 標識 ({ 6 - フルオレセイン - 5 - (及び - 6) - カルボキサミド } ヘキサ酸、スクシンイミジルエステル (5 (6) - SFX] 混合異性体) (Molecular Probes, Cat # F-2181) を、モル比 5 : 1 (標識 : 抗体) で、透析された 2 つの抗体のそれぞれに、DMSO 中、5 mg / mL で FITC 標識の原溶液から添加した。これらの混合物を、室温 (20 から 22) で、一晩、暗所においてインキュベートした。次いで、PBS で平衡化させた Pharmacia PD-10 カラム (Amersham, Piscataway, NJ) に、この混合物を、それぞれ別個に走らせた。得られた調製物は、280 nm と 495 nm で、分光光度計上において読み取った。280 nm での吸光度を用いて、これらの調製物の抗体濃度を算出した。非標識抗体に対する標識抗体の比は、以下の式 :

$$A_{x/E} \times MW_{\text{抗体}} / mg_{\text{抗体}} / mL = \text{モル標識抗体} / \text{モル非標識抗体} \quad (A_x = 495 \text{ nm での標識吸光度、} E = \text{標識の吸光係数} = 77500)。$$
を用いて算出された。典型的には、抗体は、約 3 : 1 で標識された (FITC 標識抗体 : 非標識抗体) 。

【0300】

標識された 2 つの各抗体が、HGF に対する他の 9 個の各抗体との結合を競合する能力を調べた。HGF に対する標識された 2 つの各抗体を HGF とともに別々にインキュベートし、HGF に対する標識された 2 つの各抗体は、HGF に対する標識されていない他の 9 個の抗体のうち 1 つが 50 倍モル過剰で存在する状態で、HGF とともに別々にインキュベートした。このように、9 個の別個の試料において、標識抗体 2.4.4 は、HGF に対する標識されていない他の 9 個の抗体のそれぞれと合わせて、HGF とともに別々に

10

20

30

40

50

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

【0301】

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

10

【0302】

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

20

30

【0303】

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

40

【実施例9】

【0304】

中和ELISAアッセイ

実施例6で論述した抗体がMet-HGF結合を妨害することができるかどうかを評価するために中和ELISAアッセイを展開した。100µLのHGFを、6.25µg/mL/ウェルで添加することによって、Delphia 96ウェルプレート（Cat#：AAND-0001, Wallac Inc., Gaithersburg, MD）をHGFでコートした。このプレートを、37℃で1時間又は4℃で一晩インキュ

50

ベートした。次いで、0.1% Tween 20を含有するPBS中の5%BSA (Cat # 50-61-00, KPL, Gaithersburg, MD)で、室温で1時間、揺動しながら、プレートのブロッキングを行った。

【0305】

検査されているHGFに対する、異なる濃度の抗体とともに、可溶性Met (2 nM、0.256 µg/mL)と別々に混合することによって、検査試料を調製した。検査した濃度は、667 nM、223 nM、74.1 nM、24.7 nM、8.2 nM、2.7 nM、0.91 nM、0.30 nM、0.10 nM及び0.034 nMであった。100 µL容量の検査試料を、プレートの各ウェルに添加した。次いで、このプレートを4で一晚インキュベートした後、0.1% Tween 20を含有するPBSで4回洗浄した。次に、100 µL/ウェルのビオチン化抗cMet R抗体 (Cat # : BAF358, R&D Systems Inc., Minneapolis, MN)を2 µg/mLで添加した。この抗体は、プレート上のMet-HGF複合体に結合するが、プレート上のHGFに結合された抗HGF抗体には結合しない。次いで、揺動しながら、このプレートを2時間インキュベートし、0.1% Tween 20を含有するPBSで4回洗浄した。Eu-ストレプトアビジン (アッセイ緩衝液中1:1000希釈) (Cat # 1244-360, Wallac Inc., Gaithersburg, MD)を添加し、このプレートを室温で1時間揺動した。次いで、0.1% Tween 20を含有するPBSで、このプレートを4回洗浄した。次に、100 µLの増強緩衝液 (Wallac Inc., Cat # : 1244-105, Gaithersburg, MD)を添加した。少なくとも5分後、Victor 2 (1420 Multilabel Counter, Wallac Inc., Gaithersburg, MD)で、ユーロピウム法を用いて、プレートを読み取った。

【0306】

HGFへのMet結合の%阻害 (すなわち、中和)を計算し、4パラメータ適合式Excel fit, Version 2.0.6 (Microsoft Inc, Seattle, WA)を用いて、IC₅₀値を決定した。実施例6で論述した、HGFに対する抗体の存在下では、HGFへのMetの結合は中和された。2つの実験に対するデータは、図13に示されている。

【実施例10】

【0307】

細胞中での中和

A. Metリン酸化

HGFは、PC-3細胞中でMetリン酸化を誘導する (ATCC, Manassas, VA # CRL 1435)。5%ウシ胎児血清 (Hyclone, Logan, UT, Cat. # SH 30070.03)及び1×ペニシリン、ストレプトマイシン、グルタミン (Invitrogen, Carlsbad, CA, Cat. # 10378-016)を含有する100 µLのRPMI 1640中の、1×10⁴個のPC-3細胞/ウェル (Invitrogen, Carlsbad, CA, Cat. # 11875-093)を添加することによって、96ウェルのFalcon組織培養プレート (VWR, San Diego, CA, Cat. # 62740-081)中でPC-3細胞を増殖させた。37、5% CO₂下で24時間増殖させた後、0.1% ウシ血清アルブミン (Sigma, Louisi, MO, Cat. # A-3156)を含有するDEME-低グルコース (Invitrogen, Carlsbad, CA, Cat. # 11885-084)で細胞を一回濯ぎ、0.1% ウシ血清アルブミン (Sigma, Louisi, MO, Cat. # A-3156)を含有する100 µLのDMEM低グルコース培地とともに、18から20時間インキュベートした。

【0308】

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

10

20

30

40

50

ng/mLのHGFを含有する培地(0.1%ウシ血清アルブミンを添加した、DMEM - 低グルコース)中で系列希釈することによって別々に調製した。別個の希釈液中に存在する、HGFに対する抗体の濃度は、200 nM、67 nM、22 nM、7 nM、2.5 nM、1 nM、0.3 nM及び0.1 nMの、HGFに対する抗体であった。これらの抗体/HGF希釈液を37℃で30分間インキュベートした。

【0309】

0.1%ウシ血清アルブミンを含有する、100 µLのDMEM - 低グルコースで、PC-3細胞を一回濯いだ。次いで、個々のPC-3細胞のウェルに、100 µLの各抗体/HGF希釈液を別々に添加した。37℃、5% CO₂下で10分間インキュベートした後、抗体/HGF希釈液をウェルから吸入し、このプレートを1から2分間氷上に置いた。0.3 mM オルトパナジウム酸ナトリウム(Sigma, Louis, MO, Cat. # S-6508)を含有する100 µLの氷冷PBSで、細胞を一回注いだ。1% Triton X-100(Pierce, Rockford, IL, Cat. # 28314)、50 mM Tris pH8、100 mM NaCl、0.3 mM オルトパナジウム酸ナトリウム(Sigma, Louis, MO, Cat. # S-6508)及び1×プロテアーゼ阻害剤カクテル(Sigma Cat. # P-8340)を含有する60 µLの溶解緩衝液中、氷上で、前記洗浄された細胞を15から30分間インキュベートした。

10

【0310】

1%ウシ血清アルブミン(Sigma, St. Louis, MO, Cat. # A-7888)、0.1% Tween 20(Biorad, Hercules, CA, Cat. # 170-6531)を含有するPBS中、4 µg/mLのヤギ抗Met-ビオチン(R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, Cat. # BAF 358)とともに、室温で30分間、Dynabeads M-280 Streptavidin(IGEN International, Gaithersburgh, MD, Cat. # 110029)をインキュベートすることによって、抗Met抗体でコートされたビーズを調製した。96ウェルのCostarアッセイプレート(Corning, NY, Cat. # 3365)中に、ウェル当り25 µL容量の抗Met抗体コートされたビーズを置いた。

20

【0311】

25 µL容量の異なる各PC-3細胞溶解液を、抗Met抗体コートされたビーズを含有する各ウェルに、別々に添加した。このプレートを、揺動しながら、室温で1時間インキュベートした。1%のウシ血清アルブミン(Sigma, Louis, MO, Cat. # A-7888)、0.1% Tween 20(Biorad, Hercules, CA, Cat. # 170-6531)及び0.04 µgの抗ホスホチロシン抗体4G10(Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, Cat. # 05-321)を含有する、ウェル当り12.5 µL容量のPBSを添加し、揺動しながら、室温で1時間インキュベートした。1%ウシ血清アルブミン、0.1% Tween 20及び8 µg/mLの抗マウスORI-TAG-標識(IGEN International, Gaithersburgh, MD, Cat. # 110087)を含有する12.5 µL容量のPBSを添加し、揺動しながら、室温で30分間プレートをインキュベートした。(IGENカウントで表された)シグナルを、IGEN M8リーダー(IGEN International, Gaithersburgh, MD)で測定した。IC₅₀は、4パラメータの適合式とExcel fitソフトウェアパッケージ、バージョン2.0.6(Microsoft Inc., Seattle WA)を用いて算出した。IGENフォーマットを用いた2つの実験のデータが図14に示されている。HGFに対する10個の抗体のそれぞれについて、IC₅₀値は、低ナノモル濃度からサブナノモル濃度であった。

30

40

【0312】

B.U-87MG 増殖/生存の中和

50

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

【0313】

U - 87 MG細胞は、5 % FBS を含有する IMEM 培地 (Gibco BRL, Rockville, MD, catalog # 11125 - 028) 中、800 細胞 / ウェルを添加することによって、96 ウェル Costar アッセイプレート (Corning, NY, Cat. # 3365) 中で U - 87 MG細胞を増殖させた。約 24 時間後に、実施例 6 から得られた、HGF に対する 10 個の各抗体の異なる 11 濃度のそれぞれを、U - 87 MG細胞の各別のウェルに添加した。別個の希釈液中に存在する、HGF に対する抗体の濃度は、100 $\mu\text{g} / \text{mL}$ 、33.3 $\mu\text{g} / \text{mL}$ 、11.1 $\mu\text{g} / \text{mL}$ 、3.7 $\mu\text{g} / \text{mL}$ 、1.2 $\mu\text{g} / \text{mL}$ 、0.4 $\mu\text{g} / \text{mL}$ 、0.14 $\mu\text{g} / \text{mL}$ 、0.05 $\mu\text{g} / \text{mL}$ 、0.015 $\mu\text{g} / \text{mL}$ 、5.1 ng / mL 及び 1.7 ng / mL の、HGF に対する抗体であった。

【0314】

HGF に対する抗体を添加してから 7 日後に、プレートから培地を除去し、ウェル当たり 100 μL の 10 % トリクロロ酢酸 (Sigma Inc., St Louis, MO Cat # : T - 9159) で細胞を固定し、4 で 1 から 2 時間インキュベートした。ウェルを水道水で 5 回濯いだ。室温での 10 分のインキュベーションにより、1 % 酢酸 (Fisher, Pittsburgh, PA Cat # : UN2789) 中の 100 μL の 0.4 % スルホローダミン B (Sigma, St Louis, MO Cat # : S - 9012) で、固定された細胞を染色した。染色後、1 % 酢酸で細胞を 5 回洗浄し、風乾した。540 nm でのプレートの光学密度を、マイクロタイタープレートリーダー (SpectraMax PLUS, Molecular Devices, Sunnyvale, CA) 上で読み取った。光学密度は、細胞単層中に存在するタンパク質の総量に比例するので、7 日のアッセイ期間中の細胞生存 / 増殖の指標である。IC₅₀ 値を計算するために、アイソタイプ対照抗体とともに、又は抗体を加えずにインキュベートした細胞と比較し、パーセント阻害を計算した。IC₅₀ 値は、4 つの 4 パラメータフィッティング式と Excel fit ソフトウェアパッケージ、バージョン 2.0.6 (Microsoft Inc., Seattle WA) を用いて算出した。

【0315】

2 つの実験に対するデータが図 15 に示されている。実施例 6 に記載されている、HGF に対する 10 個の抗体全てが、U - 87 MG細胞の増殖 / 生存を阻害した。各抗体の IC₅₀ 値は、典型的には、100 nM 未満であった。

【実施例 11】

【0316】

異種移植腫瘍における中和

A. U - 87 MG 異種移植微小残存病変モデル

U - 87 MG細胞を集密状態に近くなるまで増殖させ、次いで、 25×10^6 個の細胞 / mL の濃度で無血清培地中に懸濁した。トリパンブルー排除によって測定した場合、細胞は視覚的に > 98.5 % 生存することが評価された。HGF に対する単一抗体を検査するために、無血清培地中の 5×10^6 個の U - 87 MG細胞は、50 匹の雌ヌードマウス (CD1 Nu / Nu, Charles River Laboratories, Wilmington, Mass.) の右脇腹に皮下注射した。50 匹のマウスを、各 10 匹のマウスからなる 5 つのグループに配置した。

【0317】

実施例 7 に論述されている、HGF に対する同一抗体又は IgG 1 定常領域 (アイソタイプ対照) の同一用量を腹腔内注射することによって、10 匹のマウスのグループ内の各

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

【0318】

別々の実験で、実施例6に論述されている、HGFに対する各10個の抗体をこのモデルで検査した。抗体2.4.4に対する用量-応答実験は、図16Aに示されている。矢印は投薬の時点を示しており、用量は図面の凡例に示されている。測定可能な腫瘍がない、各用量の動物の数(10匹のうち)が括弧に示されている。検査した2つの最高用量について($10\mu\text{g}$ を週2回投与と、 $30\mu\text{g}$ を週2回投与)、腫瘍増殖の障害は、 $30\mu\text{g}$ のアイソタイプ対照(human IgG2 #PK16.3.1, Abgenix Inc., Fremont, CA)を週2回与えた対照動物に比べて、統計的に有意であった。これより少ない2つの2.4.4の用量(1 及び $3\mu\text{g}$ 、週2回)では、統計的に有意ではないが、若干の増殖障害が見られた。データは、平均±標準誤差として表されている； $n=10$ 動物/グループ、 $p<0.05$ を統計的に有意と考えた。実施例6で得られた、HGFに対する残り9個の抗体を検査する実験は、これより高い用量において、同様に腫瘍増殖を完全に障害することを示した。

【0319】

B. U-87 MG 異種移植確立病変モデル

実施例11Aに上記されている手順に従って、無血清培地中のU-87 MG細胞をヌードマウス中に注入した。HGFに対する抗体の腹腔内投薬が開始する前に、約 200mm^3 の容量に達するまで、約2週間、腫瘍を増殖させた。図16Bで矢印によって示されているように、16日目から開始して、週2回、 $200\mu\text{g}$ 、 $100\mu\text{g}$ 又は $30\mu\text{g}$ の抗体2.4.4で、マウスを週2回処置した。上述のように、腫瘍容量を測定し、評価した。30日目に測定可能な腫瘍がない動物の数(10匹のうち)が括弧に示されている。U-87 MG腫瘍増殖の完全な障害が、全ての用量で観察された。確立された腫瘍の統計的に有意な退化が、29日までに達成された。別々の実験において、実施例6で論述した、HGFに対する各10個の抗体をこのモデルで検査し、より高用量の抗体で、完全な障害が観察された。

【0320】

C. U-87 MG 最小残存病変モデルでの抗体のランク付け

実施例11Aで論述されたU-87 MG腫瘍モデルにおいて、実施例6で記載した、HGFに対する10個の抗体の相対効力を決定するために、最小残存病変モデルにおいて部分的に腫瘍増殖を障害するに留まった低用量を選択した。予備的な用量-応答研究(図16A)は、週2回、 $5\mu\text{g}$ が、HGFに対する抗体によって部分的障害を与え得ることを示唆した。HGFに対する最大5つの異なる抗体を比較する一連の対一実験を行った。これら実験の2つから得られた結果は、図16C及び16Dに示されている。**は、PBS及びアイソタイプ対照IgG抗体と比べて腫瘍増殖を有意に障害した、HGFに対する抗体を表す($p<0.0001$)。

【0321】

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

HGF 1.743 重组 V 领域(Vh, V_H1-02)-hulgG2 C 领域

ATGCTAGGACCTGAGCTTGGAGCTCTCTCTCTGGTGGCAGGACGCGCAGGAGCCACTCCCAGGTGTCAG
TGTGCTGCACTCTGGGGCTGAGGTGAGAAGAGCTCTGGGGCTCAGTGAAGCTGTCCTGCAAGGCTTCT
GGATACCACTTCACCGCGCTATATATACACTGGGTGGCAGAGCGCCCTGGACAGGGCTTGAGTGGT
ATGGGATGGATCAACCTCAACGTCAAGTGTGGCACAACATATGCAACAGAGTTTGAGGAGGAGGCTCACC
ATGACGAGGACGACCTTCATCAGTCAGGACCTACATAGGCTGTGACGAGCTTCAGGATCTGACGACGAC
CCCTGGTATATCTGTGCGAGAACTGGAACCTACCTACTACGGTATGAGACGTCTGGGCGCACGGG
ACCGGCTGTCACGCTCTCAGT (配列番号: 10)

【図 3 - 2】

Figure 3 (続き)

HGF 1.75.1 軽鎖 V 領域 (Vk, 1-A30)

ATGGAACATGAGGGTGCCTGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGGTCCCAGGTGCCAGGTGT
GACATCCAGATGACCCAGTCTTCATCTCCCTGTCGTCGATCTGTAGGAGACAGAGTCAACATCACT
TGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGAAATGATTAGGCTGGTTTCAGCAGAAACAGGGGAAAGCCCTT
AAGCGCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTACGGCGCAGTGGCA
TCTGGGACAGAATTCACTCTCAATCAGCAGCCTGACGCTGAAGATTTTGCAACTTTATTACTGT
CTACAGCATGATAGTTACCCGCTCACTTTTCGGCGGAGGGACAGGTGGAGATCAAA
(配列番号: 11)

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

ATGAAACACCTGTGGTCTTCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCAGATGGGTCTGTCCAGGTGCGAG
CTGCAGGAGTGGGGCCAGGACTGGTGAAGCTTTCAGAGCCCTGTCCCTCACTGCACTGTCTCT
GGTGGCTCCATCAGCAGTGGTGGTACTACTGGAGCTGGATCCCGCAGCACCCAGGGAAGGGCTG
GAGTGGATTGGGTACATCTATTACAGTGGGAGCACTACTACAACCCGCTCCCTCAAGAGTTCGAGTT
ACCATATCAGTAGACAGCTCTAAGAACCACTTTCCTCTGAAGTGGAGCTCTGTGACTGCCCGGAG
ACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGCCCACTATGGTTCTGGGAGTTTCCACTACTACGGTATGGAC
GTCTGGGCGCAAGGACCAACGGTCAACGCTCTCTAGT* (配列番号: 12)

HGF 2.4.4 軽鎖 V 領域 (Vk, 4-B3)

ATGGTGTGTCAGACCCAGGTCTTCAATTCTCTGTGTGCTCTGGATCTCTGTGCTGCTACGGGACATC
GTGATGACCCAGCTCCAGACTCCCTGGCTGTCTCTGGGCGAGAGGCCCACTCAACTCACTGCAAT
TCCAGCCAGAGTGTTTTATCTAGCTCCAACAATAAGAAATTACTTACCTTGGTATCAGCAGAAACCA
GGACCGGCTCCTAAGTGTGCTATTACTTGGGCATCTACCCGGAAATCCGGGTCCTGTGACCGATT
AGTGGCAGCGGTCTGGGACAGATTTCATCTCAACATCAGCAGCTGCGAGGCTGAAGATGTGGCA
GTTTATTACTGTGACCAATATTTTAGTCTCCCTGGAGCGTTCGGCCAGGGACCAAGGTGGAAATC
AAA (配列番号: 13)

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

ATGAAACACCTGTGGTCTTCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCAGATGGATCCTGTGCCAGGTGCGAG
CTGAAGAGTTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCTTTCAGAGCCCTGTCCCTCACTGCACTGTCTCT
GGTGGCTCCATCAGCAGTGGTGGTACTACTGGAGCTGGATCCCGCAGCACCCAGGGAAGGGCTG
GAGTGGATTGGGTACTTCTATTATAGTGGGAAACCTACCAACAACCCCTCCCTCAAGAGTTCGAGTG
ACCATATCAGTAGACAGCTCTAAGAACCACTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACTGCGCCGGAG
ACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGATCTGATGGCTACGATCAACCTGAGTGTCTTTGATATCTG
GGCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTAGT* (配列番号: 14)

HGF 2.12.1 軽鎖 V 領域 (Vk, 3-L2/L16)

ATGGAAGCCCGAGCTCAGCTTCTCTCTCTGCTACTCTGGCTCCCAGATACCACTGGAGAAATA
GTGATGACCGAGTCTCAGGCCACCTGTCTGTGTCTCCAGGGGAAGAGCCACCCCTCTCTGCAAG
GCCAGTCAGAGTGTGACAGCAACTTAGCTGTGATCCGGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAAGGCTC
CTCATCTATGGTGCATCCAGCGGCGCATCGGTATCCCGAGCGAGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGG
ACTGAGTTCACTCTCAACTCAGGAGCGCTGACGAGTCTGAAGATTTTCAGATTATTACTGTCTCAGCAG
TATATTAATCTGGCTCCGATCACTCTCGGCCAAGGGACAGACTGGAGATTAA (配列番号: 15)

【図 3 - 4】

Figure 3 (続き)

ヒトκ 定常領域

CGAAGCTGTGGCTGCACCACTCTGTCTTCATCTTCCCGCACTCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACT
GCCTCTGTTGTGTGCTGCTGCTGAATACTTCTATCCAGAGAGCGCAAGTACAGTGGAGGTGGAT
AAGCGCCCTCCAATCGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACTAC
AGCTCTCAGCAGCACCTTGACGCTGAGCAAGAGCAGACTACGAGAAACACAAGTCTACGCTCGCGAA
GTCAACCATCAGGGCTGAGCTGCCGCTGACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTGA
(配列番号: 21)

ヒトI g 1 定常領域

GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCTCTGGCACCCCTCCTCAAGAGCACCTCTGGGGGCACA
GCGGCCCTGGGCTGCTGGTCAAGGACTACTTCCCGGAACCGGTGACGGTGTCTGTGAATCTCAGGC
GCCCTGACGACGCGGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTTCACTGCTCAGGACTCTACTCCCTCAGC
AGCGTGGTGAACGCTGCCCTCCAGCAGCTTGGGACCCAGACCTTACATCTGCAACGTGAATCAAGA
CCAGCAACCAAGGTGGAGCAAGAAAGTTGAGCCCAATCTTGTGACAAAACCTACACATGCGGCA
CCGTGCCAGCAGCTGAATCCTCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCGCCAAAACCAAGGAC
ACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGAGCTGAGCCACGAAGACCCCT
GAGGTCAAGTTCACTGCTAGTGGACGCGGTGGAGGTGCATATGCGCAAGCAAGAGCGCGGGAG
GAGCAGTACAAACAGCAGTACCGTGTGGTCAAGCTCTCACCTGCCCCCATCCCGGATGAGCTGACC
GGCAAGGAGTACAAGTCAAGGTCTCCAAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAACCACTCTCC
AAGGCCAAAGGGCAGCCCGGAAACCAAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGATGAGCTGACC
AAGAACCAAGGTGAGCTGACCTGCTGCTGCTCAAGGCTTCTATCCAGCAGCATCGCCGTGGAGTGG
GAGAGCAATGGGCGAGCGGAGAACACTACAAGAACCAAGCTCCCGTCTGAGCTCCGACGCGCTCC
TCTTCTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGAACAGAGAGGTGGCAGCAGGGAAGCTCTTCTCATGCT
TCGCTGATGATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAAGAGCGCTCTCCTCTGCTCCGGGTAA
TGA (配列番号: 22)

ヒトI g 2 定常領域

GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCTCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACA
GCGGCCCTGGGCTGCTGGTCAAGGACTACTTCCCGGAACCGGTGACGGTGTCTGTGAATCTCAGGC
GCTCTGACGACGCGGTGCACACCTTCCAGCTGTCTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGC
AGCGTGGTGAACGCTGCCCTCCAGCAACTTCCGACCCAGACCTACACTGCAACGTAGATCACAAG
CCAGCAACCAAGGTGGACAGACAGTGTGAGCGCAATTTGTGTGAGTGCACCCAGCGTGCCTCA
GCACCACTCTGGCGAGGACCGTCACTTCTCTCTTCCCGCCAAAACCAAGGACCACTCATGATCT
TCCCGGACCCCTGAGGTCACTGCTGCTGGTGGTGAAGCTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTC
AATCTGATCGTGGACGCGGTGGAGGTGCATATGCGCAAGCAAGCAACCGGAGGAGCAAGTTCAAC
AGCAGCTTCCGTGTGGTCAAGCTCTTCAACGTTTGTGCAACGAGCTGCTGCAAGCGCAAGGAGTAC
AAGTGCAGAGTCTCCACAAAGGCTTCCAGCGCCACTCGAAGAAACCATCTCCAACAAACAAAGG
CAGCCCCAGAGAACCAAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGAGGAGAGTACCAAGAACCAAGGT
AGCTCTGACCTGCTGGTCAAGGCTTCAACCCAGCAACATCGCCGTGGAGTGGGAGCAATGGG
CAGCCGAGAACCACTACAGCAGAGAGCTCTCCCTGCTCCGGTAAATGA
(配列番号: 23)

【図 3 - 3】

Figure 3 (続き)

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

ATGAAACACCTGTGGTCTTCTCTCTCCTGCTGGCAGCTCCAGATGGGTCTGTGCCAGGTGCGAG
CTGCAGAGTGGGGCCAGGACTGGTGAAGCTTCCGAGACCCCTGTCCCTCACTGCACTGTCTCT
GGTGGCTCCATCAGTATTTACTACTGGAGCTGGATCCGGCAGCCCCCAGGGAGGGACTGGAGTGG
ATTGGGTATGCTATTATACAGTGGGAGCAACAAATACAAACCCCTCCCTCAAGAGTTCAGTCAACATA
TCAGTAGACACGTTCAAGAACAGTTCCTCCTGAAGCTGAACCTCTGTACCGCTGCGGACACGGCC
GTGTTATTACTGTGCGAGAGGGGATACGATTTTGGAGTGGTTATTTTGACTACTGGGCGAGGGA
ACCTCGTCAACGCTCTCTAGT* (配列番号: 16)

HGF 2.40.1 軽鎖 V 領域 (Vk, 1A20)

ATGGACATGAGGGTGCCTGCTCAGCTCCTGGGCTCTGCTGCTCTGGTTCACAGGTGCCAGGTGT
GACATCCAGATGACCCAGCTCCATCTCTCTGCTGCTATCTGTAGGAGACAGACTCACCATCACT
TGCCGGGCAAGTCAGGCAATTAGAAATGATTTAGCTGTGATCAGCAGAAACAGGGAAGGCCCT
AAGCGCTGATCTATGTTGCACTCCAGTTTGCAGAGTGGGTCCCATCAAGGTTTACGCGCAGTGGGA
TCTGGGACAGAAATTCACCTCTCAACATCAGCAGCTGCGAGCTGAAGATTTTGAACCTTTATTACTGT
CTCAACATAATAGTTACCCGCTCACTTTGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA
(配列番号: 17)

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

ATGAAACACCTGTGGTCTTCTCTCTGCTGGTGGCAGCTCCAGATGGGTCTGTGCCAGGTGCGAG
CTGCAGGAGTGGGGCCAGGACTGGTGAAGCTTTCAGAGACCCCTGTCCCTCACTGCACTGTCTCT
GGTGGCTCCATCAGCAGTGGTGGTACTACTGAGCTGGATCCGCTCAGCACCCAGGGGAAGGGCTG
GAGTGGATTGGGAACATCTATTACAGTGGGATCACTACTACAACCCGCTCCCTCAAGAGTTCGAGTT
AGCTGTCACTAGACAGCTCTAAGAACAGTTCCTCCCTGAAGCTGAGTCTGTGACTGCGCGGAG
ACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGATCCCTCTACCGTGACTACGGGTTCGACCCCTGGGCGCAG
GGAACCCCTGGTCAACGCTCTCTAGT* (配列番号: 18)

HGF 3.10.1 軽鎖 V 領域 (Vk, 3-L2/L16)

ATGGAAGCCCGAGCTCAGCTTCTCTCTCTGCTACTCTGGCTCCCAGATACCACTGGAGAAATA
GTGATGACCGCAGTCTCCAGCCACCTGTCTGTGTCTCTGGGGAAGAGGCCACCTCTCTGCGAGG
GCCAGTCAGAGTGTAGCAGCAACTAGCTGTGTACCAAGCAAGAACTGCCAGGCTCCCAAGGCTC
CTCATGTATGGTGCATCCACAGGGCCACTGGATTCGCCAGCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGG
ACAGAGTTCACTCTCAACATCAGCAGCTGCGAGTCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCTCAGCAG
TATAATACTGGCTCCGATCACTTCGGCCAGGGACAGCTGGAGATTAA (配列番号: 19)

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

ATGAAACACCTGTGGTCTTCTCTCTCTGCTGGCAGCTCCAGATGGGTCTGTGCCAGGTGCGAG
CTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCTTCGGAGACCCCTGTCCCTCACTGCGCTGTCTAT
GTGGGTCTCTTCAGTACTTACTACTGAGCTGGATCGCCAGCCCCCAGGGGAAGGGCTGGAGTGG
ATTGGGGAATCAATCATAGTGAAGACCACTACAAACCCGCTCCCTCAAGAGTTCAGTCAACATA
TCAGTAGACACGCTCAAGAACCACTGTTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCCCGGACACCGCT
GTGTTATTACTGTGCGAGAGGGGGTACGATTTTGGAGTGGTTATTGACTACTGGGGCCAGGGA
ACCTCGTCAACGCTCTCTAGT* (配列番号: 20)

【図 4】

Figure 4

HGF 1.24.1 軽鎖 V 領域 (Vk, 1-L15)

MDMRVPAQLLGLLLWFPGRDCIQMTQSPSSVSASVGDRTVITCRASQGISSLAWYQQKPKGAP
NLLIYVASSLQNGVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQANGFPWTFGGGTKEIK
(配列番号: 24)

HGF 1.24.1 重鎖 V 領域 (Vh, H3-1)-huIgG2 C 領域

MEFLGWSWFLVAILIKGVQCVQLVSGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRAPGKGLEW
VSYISSGGSTIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRADDTAVYICARDEYSGWYVLFYDWG
QGLTVTVSS (配列番号: 25)

HGF 1.29.1 軽鎖 V 領域 (Vk, 4-B3) 領域

MVLQTVQVIFISLLWISDAYGDIVMTQSPDLSAVSLGERATINCKSSQSFYSSTNKNLYAWYQKPK
GQPPKLLIYWASTRESVGPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDEVAVYYCQQYSTPWTFGGTKEIK
(配列番号: 26)

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

MEFGLNWSWFLVALLRGVQCVQLVSGGVSQVQGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRAPGKGLEW
VAVIYWDSDYIYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRADDTAVYICAREDYEGEDVWGQGLT
VTVSS (配列番号: 27)

HGF 1.60.1 軽鎖 V 領域 (Vk, 1-A20) 領域

MDMRVPAQLLGLLLWLPDTRCDIQMTQSPSSLSVSVGDRTVITCRASQGISYLAWYQQKPKGV
KLLIYVASTLQSGVPSRFGSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQNYNSDPLTFGGGTKEIK
(配列番号: 28)

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

MDWTWRILFLVAAATGAHSVQVLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTGYIINWVRAPGQGLEW
MGWINPNSGNTYAKFGQGRVTMTSDTSTAYMELSLRLADDTAVYICARELEIRYYGMDVWGQ
TTVTVSS (配列番号: 29)

HGF 1.61.3 軽鎖 V 領域 (Vk, 1-018/08)

MDMRVPAQLLGLLLWLSGARCDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCQASQDISNYLNWYQQKPGTAP
KLLIYVASSDLETGVPSRFGSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQYDNLNPNYFNGGTKEIK
(配列番号: 30)

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

MKHLWFFLLVAERIVLSQVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSSGSSISDGYIYMSWIRHHPGKGL
EWKHYIYSSGTYYNPSLKSRTVITSDTSKNQPSLKLSSVTAADTAVYICARSHLHYDSSGYIY
GAPDIWGQTMVTVSS (配列番号: 31)

HGF 1.74.3 軽鎖 V 領域 (Vk, 1-012/02)

MDMRVPAQLLGLLLWLRGARDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQGISNLDNLYQQKPKGV
KLLIYVASSLQNGVPSRFGSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQRYSYTPPTFGGTKEIK
(配列番号: 32)

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

MDWTWRILFLVAAATGAHSVQVLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTGYIINWVRAPGQGLEW
MGWINPNSGNTYAKFGQGRVTMTSDTSTAYMELSLRLSDTAVYICARELEIRYYGMDVWGQ
TTVTVSS (配列番号: 33)

【図 4 - 1】

Figure 4 (続き)

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

HGF 1.75.1 重鎖 V 領域 (Vh, VG4-31)-huIgG2 C 領域
MKHLWFFLLVAAPRWLSQVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGGYYSWIRQHPGKGL
EWIGYIYSGSTYINPSLKSRTVTSVDTSKNQFSLKSSVTAADTAVYYCARDPLWGFGEFDYGYMD
VWGQGTIVTVSS (配列番号: 35)

HGF 2.44 軽鎖 V 領域 (Vk, 4-B3)
MVLQTVQVIFSLLLWISGAYGDIVMTQSPDLSAVSLGERATINCKSSQSVLFSNNKNYLAWYQQK
GQPPKLLIYWASTRESGVDRFSRSGSGSDFTLTISLQAEADVAVYYCQQYFSPPTWTFGGGKVEIK
K (配列番号: 36)

HGF 2.44 重鎖 V 領域 (Vh, VG4-31)-huIgG2 C 領域
MKHLWFFLLVAAPRWLSQVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGGYYSWIRQHPGKGL
EWIGYIYSGSTYINPSLKSRTVTSVDTSKNQFSLKSSVTAADTAVYYCARDRSGYDHFDAFDI
WQGTIVTVSS (配列番号: 37)

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

HGF 2.12.1 重鎖 V 領域 (Vg, 4-59)-huIgG2 C 領域
MKHLWFFLLVAAPRWLSQVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGGYYSWIRQHPGKGL
IGVYVYSGSTNYNPSLKSRTVTSVDTSKNQFSLKSSVTAADTAVYYCARGGYDFWGSYFYDWGQ
TLTVVSS (配列番号: 39)

HGF 2.40.1 軽鎖 V 領域 (Vk, 1-A20)
MDMRVPAQLLGLLLWFPGARCDIQMTQSPSSLSASVGRDVTITCRASQGRINDLWYQQKPGKAP
KRLIVASSLSQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCLQHSYPLTFGGGKVEIK
(配列番号: 40)

HGF 2.40.1 重鎖 V 領域 (Vh, VG4-31)-huIgG2 C 領域
MKHLWFFLLVAAPRWLSQVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGGYYSWIRQHPGKGL
EWIGYIYSGSTYINPSLKSRTVTSVDTSKNQFSLKSSVTAADTAVYYCARDPLYGDYDFDPWGQ
GTIVTVSS (配列番号: 41)

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

HGF 3.10.1 重鎖 V 領域 (Vh, VG4-34)-huIgG1 C 領域
MKHLWFFLLVAAPRWLSQVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVAVYGSFSTYYSWIRQHPGKGL
IGIINHSQSTNYNPSLKSRTVTSVDTSKNQFSLKSSVTAADTAVYYCARGGYDFWGSYFYDWGQ
TLTVVSS (配列番号: 43)

【図 5 A】

Figure 5A

CDR1、CDR2及びCDR3の軽鎖可変領域アミノ酸配列

抗体	CDR1	CDR2	CDR3
1.24.1	RASQGISWIA (配列番号: 60)	BASSLG (配列番号: 70)	QOANGPVPWT (配列番号: 80)
1.29.1	KSSQSYFISSTNNKYLA (配列番号: 61)	WASTRES (配列番号: 71)	QVHATPWT (配列番号: 81)
1.60.1	RASQGISWIA (配列番号: 62)	VASTLOS (配列番号: 72)	QNYNSDPLT (配列番号: 82)
1.61.3	QASQGLSWIA (配列番号: 63)	GASDLET (配列番号: 73)	QYDILPYN (配列番号: 83)
1.74.3	RASQISNIDL (配列番号: 64)	VASSLON (配列番号: 74)	QRSYSTPPT (配列番号: 84)
1.75.1	RASQGRINDLG (配列番号: 65)	AASSLOS (配列番号: 75)	LQHDSYPLT (配列番号: 85)
2.4.4	KSSQSVLFSNNKYLA (配列番号: 66)	WASTRES (配列番号: 76)	QVYFSPFWT (配列番号: 86)
2.12.1	RASQSVDSNLA (配列番号: 67)	GASTRAT (配列番号: 77)	QYINWPPIT (配列番号: 87)
2.40.1	RASQGRINDLG (配列番号: 68)	VASSLOS (配列番号: 78)	LQHNSYPLT (配列番号: 88)
3.10.1	RASQSVSSNLA (配列番号: 69)	GASTRAT (配列番号: 79)	QYINWPPIT (配列番号: 89)

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

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

軽鎖 CDR3 コンセンサス配列 (CDR3a) (配列番号 168): y z a' b' c' d' e' f' g' h' i' j' k' l' m' n' o' p' q' r' s' t' u' v' w' x' y' z'. アミノ酸 a' は、グルタミン、アスパラギン又はアルギニンから選択され; アミノ酸 b' は、チロシン、ヒスチジン、アラニン又はセリンから選択され; アミノ酸 c' は、フェニルアラニン、チロシン、アスパラギン酸、アスパラギン又はイソロイシンから選択され; アミノ酸 d' は、セリン、グリシン又はアスパラギンから選択され; アミノ酸 e' は、プロリン、チロニン、スレオニン、フェニルアラニン、アスパラギン酸、ロイシン又はトリプトファンから選択され; アミノ酸 f' は、プロリンであり; アミノ酸 g' は、プロリンであり、又は存在せず; アミノ酸 h' は、トリプトファン、ロイシン、プロリン、チロニン又はイソロイシンであり; 及びアミノ酸 i' は、スレオニン又はアスパラギンである

【図 4 - 2】

Figure 4 (続き)

ヒト K 定常領域

RTVAAPSVFIFPPSSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQKWVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSY
SLSSITLTSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKFSNRGEC (配列番号: 44)

ヒト IgG1 定常領域

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SVVTVPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHITCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD
TLMISSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVHQQDNLNGEY
KCKYVKCKVSKALPAPEIKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPNENYKTTTPVLDSDSGSFYLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYTKQSLSLSPGK
(配列番号: 45)

ヒト IgG2 定常領域

ASTKGPSVFPLAPCSRSTESTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SVVTVPPSSNFGTQTYTCNVNHDKPSNTKVDKTVKCCVCCPCCPAPFVAGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVHQQDNLNGEY
KCKYVKCKVSKALPAPEIKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPNENYKTTTPMLDSDSGSFYLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYTKQSLSLSPGK
(配列番号: 46)

【図 5 B】

Figure 5B

CDR1、CDR2及びCDR3の重鎖可変領域アミノ酸配列

抗体	CDR1	CDR2	CDR3
1.24.1	DYVMS (配列番号: 90)	YISSGSDTIYADSVKG (配列番号: 100)	DEYNSGWWYVDFY (配列番号: 110)
1.29.1	SYGMH (配列番号: 91)	VWYDGSQXYADSVKG (配列番号: 101)	EDYGEQFDY (配列番号: 111)
1.60.1	GYVIN (配列番号: 92)	WINPNSGGTNYACKQFG (配列番号: 102)	ELRLRYGMGV (配列番号: 112)
1.61.3	SDGYVWS (配列番号: 93)	YIYSGSTYINPSLKS (配列番号: 103)	SHLHYDSSGYYGGAFDI (配列番号: 113)
1.74.3	GYIYH (配列番号: 94)	WINPNSGGTNYACKQFG (配列番号: 104)	ELRLRYGMGV (配列番号: 114)
1.75.1	SGGYVWS (配列番号: 95)	YIYSGSTYINPSLKS (配列番号: 105)	DPLWFGEDYVGMGV (配列番号: 115)
2.4.4	SGYVWS (配列番号: 96)	YFYSGSTYINPSLKS (配列番号: 106)	DHSQYDHPDAFDI (配列番号: 116)
2.12.1	IYVWS (配列番号: 97)	YVYSGSTYINPSLKS (配列番号: 107)	GGYDFWSGYFDY (配列番号: 117)
2.40.1	SGGYVWS (配列番号: 98)	NIYSGITYNPSLKS (配列番号: 108)	DPLVQDYGFDP (配列番号: 118)
3.10.1	TYVWS (配列番号: 99)	ENHSGSTYINPSLKS (配列番号: 109)	GGYDFWSGYVY (配列番号: 119)

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

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

重鎖 CDR3 コンセンサス配列 (CDR3b) (配列番号 171): アミノ酸配列 y z a' b' c' d' e' f' g' h' i' j' k' l' m' n' o' p' q' r' s' t' u' v' w' x' y' z'. アミノ酸 a' は、アスパラギン酸、セリン若しくはグリシンから選択され、又は存在せず; アミノ酸 b' は、ロイシン、グルタミン酸、アスパラギン酸、ヒスチジン、プロリン若しくはグリシンから選択され、又は存在せず; アミノ酸 c' は、グルタミン酸、チロニン若しくはロイシンから選択され、又は存在せず; アミノ酸 d' は、ロイシン、アスパラギン、グリシン、ヒスチジン、チロニン若しくはトリプトファンから選択され、又は存在せず; アミノ酸 e' は、チロニン、アスパラギン、チロニン、スレオニン、フェニルアラニン若しくはアスパラギン酸から選択され、又は存在せず; アミノ酸 f' は、チロニン、アスパラギン、ヒスチジン若しくはトリプトファンから選択され、又は存在せず; アミノ酸 g' は、チロニン、アスパラギン、ヒスチジン若しくはトリプトファンから選択され、又は存在せず; アミノ酸 h' は、チロニン、アスパラギン、ヒスチジン若しくはトリプトファンから選択され、又は存在せず; アミノ酸 i' は、グリシン若しくはチロニンから選択され、又は存在せず; アミノ酸 j' は、グリシン、バリン、チロニン若しくはアスパラギン酸から選択され、又は存在せず; アミノ酸 k' は、ロイシン、アラニン、グリシン若しくはチロニンから選択され、又は存在せず; アミノ酸 l' は、アスパラギン酸であり、アミノ酸 m' は、バリン、チロニン、イソロイシン又はプロリンから選択される

【 図 6 A 】

Figure 6A

ID	$\sim K_D$ (M)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)
3.10.1	4.7E-10	6.5E+04	3.0E-05
2.4.4	9.9E-11	2.7E+05	2.7E-05
2.12.1	2.2E-10	1.3E+05	2.8E-05
1.29.1	7.9E-10	6.2E+04	4.8E-05
1.75.1	7.8E-10	3.6E+04	2.8E-05
1.74.3	3.6E-10	1.3E+05	4.7E-05

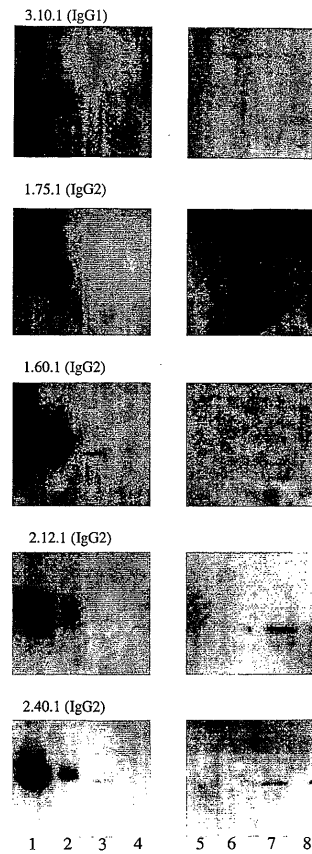
【 図 6 B 】

Figure 6B

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

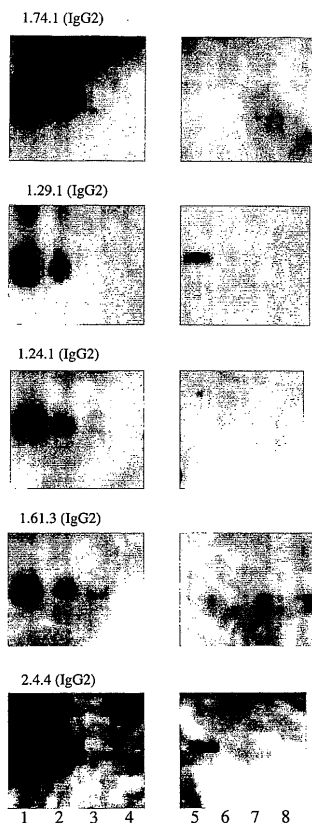
【 図 7 】

Figure 7



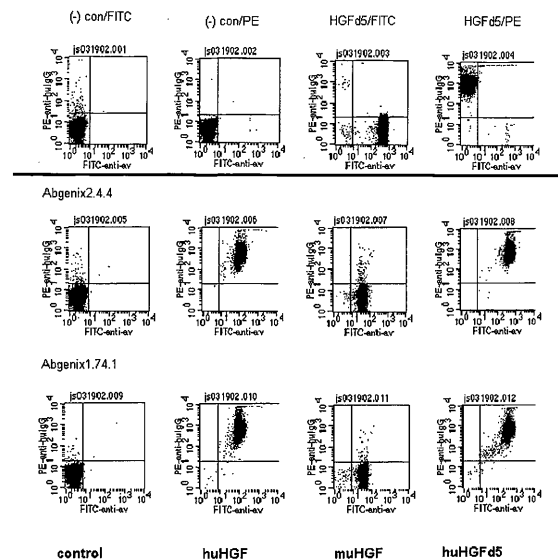
【 図 7 - 1 】

Figure 7 (続き)



【 図 8 】

Figure 8



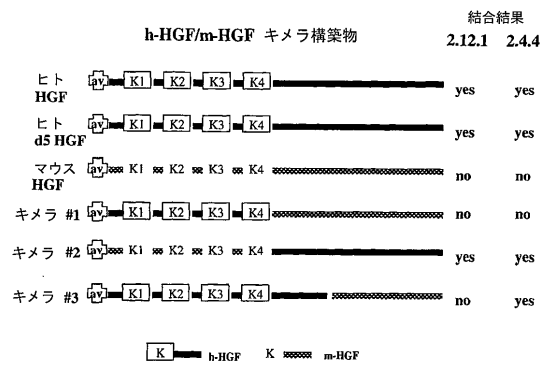


Figure 10B

Figure 10C

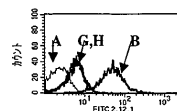
Figure 11B

Figure 11C

Figure 10D

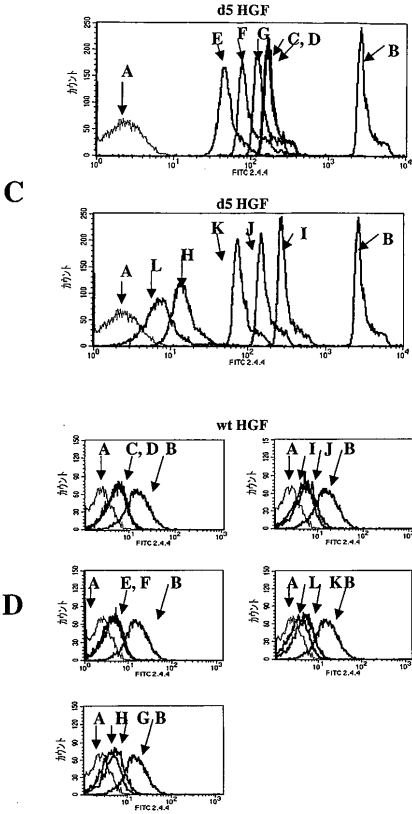
Figure 11A

Figure 12



【 図 1 2 - 1 】

Figure 12 (続き)



【 図 1 4 】

Figure 14

実験 #1		実験 #2	
ID	IC50 IP (nM)	ID	IC50 IP (nM)
1.75.1	0.34	1.61.3	0.28
2.12.1	0.49	1.24.1	0.40
2.40.1	0.51	1.75.1	0.59
3.10.1	0.64	1.29.1	0.88
1.24.1	0.64	1.60.1	1.06
1.29.1	1.18	1.74.1	2.17
2.4.4	1.24		
1.74.1	1.25		

【 図 1 3 】

Figure 13

IC50 IP		IC50 IP	
ID	(nM)	ID	(nM)
3.10.1	0.9	3.10.1	0.37
2.40.1	1.0	2.12.1	0.52
1.75.1	1.0	1.75.1	0.72
2.12.1	2.1	1.29.1	1.93
1.24.1	2.6	1.74.1	2.31
1.29.1	3.2	1.61.3	2.59
1.74.1	3.7	1.24.1	9.36
1.60.2	4.5		
2.4.4	5.1		

【 図 1 5 】

Figure 15

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

Figure 16A

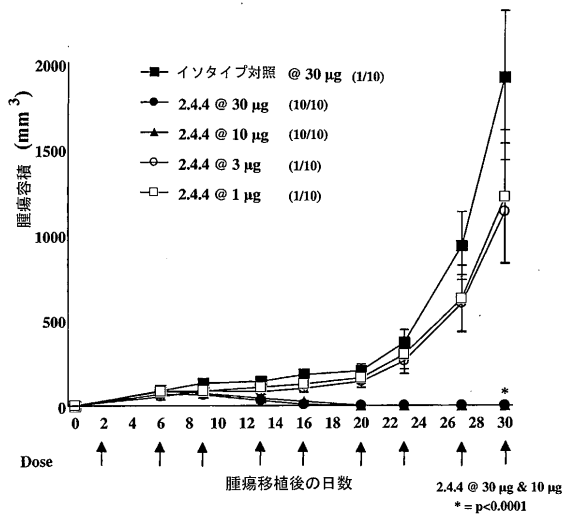


Figure 16B

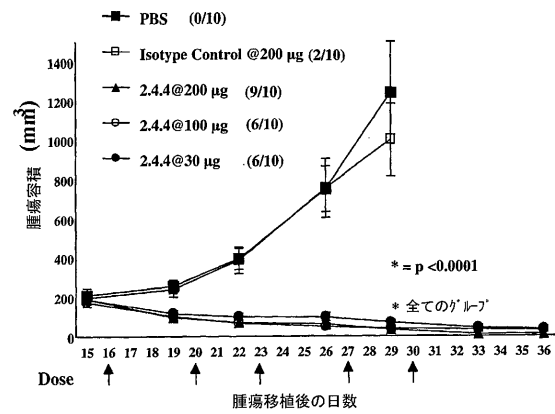


Figure 16C

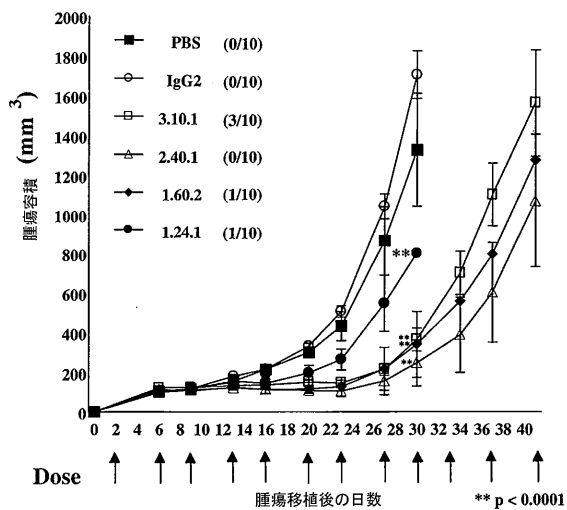
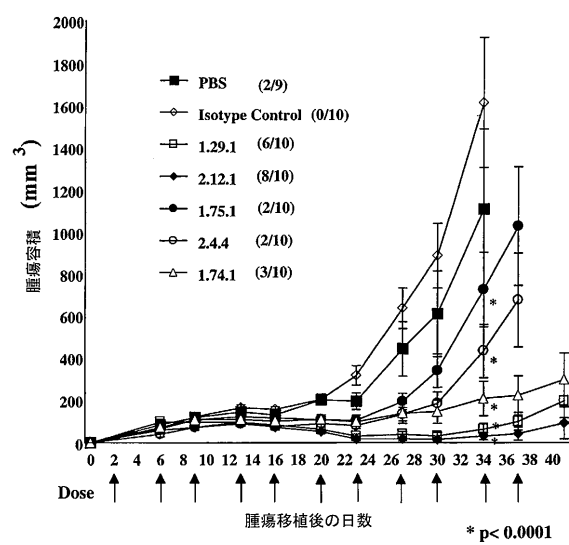
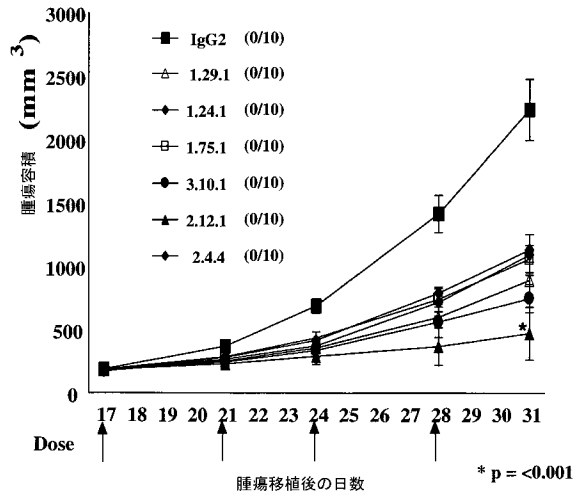


Figure 16D



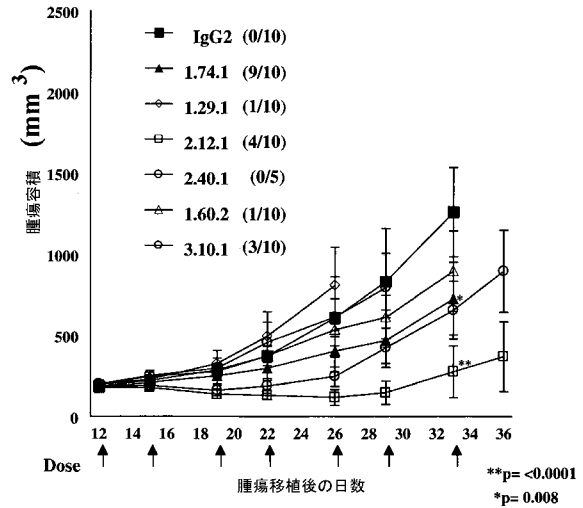
【図 16 E】

Figure 16E



【図 16 F】

Figure 16F



【配列表】

2011079837000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成22年11月26日(2010.11.26)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

C D R 1 a、C D R 2 a 及び C D R 3 a から選択される少なくとも一つの相補性決定領域 (C D R) を含み、抗体の重鎖と共同して、肝細胞増殖因子 (H G F) を結合することができる、単離されたポリペプチド。

(C D R 1 a は、アミノ酸配列 a b c d e f g h i j k l m n o p q を含み (アミノ酸 a は、リジン、アルギニン又はグルタミンから選択され; アミノ酸 b は、セリン又はアラニンから選択され; アミノ酸 c は、セリンであり; アミノ酸 d は、グルタミンであり; アミノ酸 e は、セリン、グリシン又はアスパラギン酸から選択され; アミノ酸 f は、バリン若しくはイソロイシンから選択され、又は存在せず; アミノ酸 g は、ロイシン若しくはフェニルアラニンから選択され、又は存在せず; アミノ酸 h は、フェニルアラニン若しくはチロシンから選択され、又は存在せず; アミノ酸 i は、セリンであり、又は存在せず; アミノ酸 j は、セリンであり、又は存在せず; アミノ酸 k は、アスパラギン、スレオニンから選択され、又は存在せず; アミノ酸 l は、アスパラギン、イソロイシン又はバリンから選択され; アミノ酸 m は、リジン、アルギニン、アスパラギン又はアスパラギン酸から選択され; アミノ酸 n は、アスパラギン又はセリンから

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

C D R 2 a は、アミノ酸配列 r s t u v w x を含み（アミノ酸 r は、トリプトファン、アラニン、バリン、グルタミン酸又はグリシンから選択され；アミノ酸 s は、アラニンであり、アミノ酸 t は、セリンであり、アミノ酸 u は、スレオニン、セリン又はアスパラギン酸から選択され；アミノ酸 v は、アルギニン又はロイシンから選択され；アミノ酸 w は、グルタミン酸、グルタミン又はアラニンから選択され；及びアミノ酸 x は、セリン、アスパラギン又はスレオニンから選択される。）；

C D R 3 a は、アミノ酸配列 y z a' b' c' d' e' f' g' h' を含む（アミノ酸 y は、グルタミン又はロイシンから選択され；アミノ酸 z は、グルタミン、アスパラギン又はアルギニンから選択され；アミノ酸 a' は、チロシン、ヒスチジン、アラニン又はセリンから選択され；アミノ酸 b' は、フェニルアラニン、チロシン、アスパラギン酸、アスパラギン又はイソロイシンから選択され；アミノ酸 c' は、セリン、グリシン又はアスパラギンから選択され；アミノ酸 d' は、プロリン、チロシン、スレオニン、フェニルアラニン、アスパラギン酸、ロイシン又はトリプトファンから選択され；アミノ酸 e' は、プロリンであり；アミノ酸 f' は、プロリンであり、又は存在せず；アミノ酸 g' は、トリプトファン、ロイシン、プロリン、チロシン又はイソロイシンであり；及びアミノ酸 h' は、スレオニン又はアスパラギンである。）。

【請求項 2】

C D R 1 b、C D R 2 b 及び C D R 3 b から選択される少なくとも一つの相補性決定領域（C D R）を含み、抗体の軽鎖と共同して、H G F を結合することができる、単離されたポリペプチド。

（C D R 1 b は、アミノ酸配列 a b c d e f g を含み（アミノ酸 a は、セリンであり、又は存在せず；アミノ酸 b は、アスパラギン酸若しくはグリシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸 c は、アスパラギン酸、グリシン、セリン、バリン、スレオニン又はイソロイシンから選択され；アミノ酸 d は、チロシンであり；アミノ酸 e は、チロシン又はグリシンから選択され；アミノ酸 f は、イソロイシン、メチオニン又はトリプトファンから選択され；及びアミノ酸 g は、ヒスチジン、アスパラギン又はセリンから選択される。）；

C D R 2 b は、アミノ酸配列 h i j k l m n o p q r s t u v w x を含み（アミノ酸 h は、トリプトファン、チロシン、バリン、アスパラギン又はグルタミン酸から選択され；アミノ酸 i は、イソロイシン、フェニルアラニン又はバリンから選択され；アミノ酸 j は、アスパラギン、セリン、トリプトファン又はチロシンから選択され；アミノ酸 k は、プロリン、セリン、チロシン又はヒスチジンから選択され；アミノ酸 l は、アスパラギン、セリン又はアスパラギン酸から選択され；アミノ酸 m は、セリン又はグリシンから選択され；アミノ酸 n は、グリシン若しくはセリンから選択され、又は存在せず；アミノ酸 o は、グリシン、スレオニン、アスパラギン酸、セリン、イソロイシン又はアスパラギンから選択され；アミノ酸 p は、スレオニン、イソロイシン又はリジンから選択され；アミノ酸 q は、アスパラギン又はチロシンから選択され；アミノ酸 r は、チロシン又はヒスチジンから選択され；アミノ酸 s は、アラニン又はアスパラギンから選択され；アミノ酸 t は、グルタミン、アスパラギン酸、又はプロリンから選択され；アミノ酸 u は、リジン又はセリンから選択され；アミノ酸 v は、フェニルアラニン、バリン又はロイシンから選択され；アミノ酸 w は、グルタミン又はリジンから選択され、及びアミノ酸 x は、グリシン又はセリンから選択される。）；

C D R 3 b は、アミノ酸配列 y z a' b' c' d' e' f' g' h' i' j' k' l' m' n' o' p' q' r' を含む（アミノ酸 y は、グルタミン酸、アスパラギン酸、セリン若しくはグリシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸 z は、ロイシン、グルタミン酸、アスパラギン酸、ヒスチジン、プロリン若しくはグリシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸 a' は、グルタミン酸、チロシン

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

【請求項 3】

(i) C D R 1 a、C D R 2 a 及び C D R 3 a から選択される少なくとも一つの相補性決定領域 (C D R) を含み、抗体重鎖と共同して、肝細胞増殖因子 (H G F) に結合することができる第一のポリペプチドと、

(C D R 1 a は、アミノ酸配列 a b c d e f g h i j k l m n o p q を含み (アミノ酸 a は、リジン、アルギニン又はグルタミンから選択され；アミノ酸 b は、セリン又はアラニンから選択され；アミノ酸 c はセリンであり；アミノ酸 d は、グルタミンであり；アミノ酸 e は、セリン、グリシン又はアスパラギン酸から選択され；アミノ酸 f は、バリン若しくはイソロイシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸 g は、ロイシン若しくはフェニルアラニンから選択され、又は存在せず；アミノ酸 h は、フェニルアラニン若しくはチロシンから選択され、又は存在せず；アミノ酸 i は、セリンであり、又は又は存在せず；アミノ酸 j は、セリンであり、又は存在せず；アミノ酸 k は、アスパラギン、スレオニンから選択され、又は存在せず；アミノ酸 l は、アスパラギン、イソロイシン又はバリンから選択され；アミノ酸 m は、リジン、アルギニン、アスパラギン又はアスパラギン酸から選択され；アミノ酸 n は、アスパラギン又はセリンから選択され；アミノ酸 o は、チロシン、アスパラギン酸、トリプトファン又はアスパラギンから選択され；アミノ酸 p は、ロイシンであり；アミノ酸 q は、アラニン、グリシン又はアスパラギンから選択される。) ；

C D R 2 a は、アミノ酸配列 r s t u v w x を含み (アミノ酸 r は、トリプトファン、アラニン、バリン、グルタミン酸又はグリシンから選択され；アミノ酸 s は、アラニンであり；アミノ酸 t は、セリンであり；アミノ酸 u は、スレオニン、セリン又はアスパラギン酸から選択され；アミノ酸 v は、アルギニン又はロイシンから選択され；アミノ酸 w は、グルタミン酸、グルタミン又はアラニンから選択され；及びアミノ酸 x は、セリン、アスパラギン又はスレオニンから選択される。) ；

C D R 3 a は、アミノ酸配列 y z a' b' c' d' e' f' g' h' を含む (アミノ酸 y は、グルタミン又はロイシンから選択され；アミノ酸 z は、グルタミン、アスパラギン又はアルギニンから選択され；アミノ酸 a' は、チロシン、ヒスチジン、アラニン又はセリンから選択され；アミノ酸 b' は、フェニルアラニン、チロシン、アスパラギン酸、アスパラギン又はイソロイシンから選択され；アミノ酸 c' は、セリン、グリシン又はアスパラギンから選択され；アミノ酸 d' は、プロリン、チロシン、スレオニン、フェニルアラニン、アスパラギン酸、ロイシン又はトリプトファンから選択され；アミノ酸 e' は、プロリンであり；アミノ酸 f' は、プロリンであり、又は存在せず；

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

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

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

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

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

フロントページの続き

(72)発明者 テレサ・エル・バージェス
アメリカ合衆国、カリフォルニア・９３００３、ベンチュラ、ハイ・ポイント・ドライブ・９０８

(72)発明者 アンジェラ・コクソン
アメリカ合衆国、カリフォルニア・９３０２１、ムーアパーク、バブリング・ブルック・ストリート・１２００４

(72)発明者 ラリー・エル・グリーン
アメリカ合衆国、カリフォルニア・９４１１４、サン・フランシスコ、ヒル・ストリート・４６４

(72)発明者 コー・チャン
アメリカ合衆国、メリーランド・２０８１７、ベセスダ、レイバーン・ロード・８７１０

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA44 CA04 DA03 DA05 EA04 GA11 HA01
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA76 EA20 EA50 FA74
GA26

【外国語明細書】
2011079837000001.pdf

专利名称(译)	肝细胞生长因子的特异性结合因子		
公开(公告)号	JP2011079837A	公开(公告)日	2011-04-21
申请号	JP2010241562	申请日	2010-10-27
[标]申请(专利权)人(译)	安姆根有限公司 每次上午二烯顿蒙特Incorporated的莱特		
申请(专利权)人(译)	每次Amujien酒店股份有限公司的Rete 每次Amujien弗里蒙特股份有限公司莱特		
[标]发明人	テレサエルバージェス アンジエラコクソン ラリーエルグリーン コーチャン		
发明人	テレサ・エル・バージェス アンジエラ・コクソン ラリー・エル・グリーン コー・チャン		
IPC分类号	C07K16/22 C12N15/09 C07K14/74 C07K16/28 C12N G01N33/53		
CPC分类号	A61K2039/505 C07K16/22 C07K2317/21 C07K2317/56 C07K2317/73 C07K2317/76 C07K2317/92 A61K39/3955 A61K45/06		
FI分类号	C07K16/22.ZNA C12N15/00.A A61K39/395.N A61P35/00		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA44 4B024/CA04 4B024/DA03 4B024/DA05 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA01 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/GA26 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/BB33 4C085/BB34 4C085/BB35 4C085/BB36 4C085/BB37 4C085/BB41 4C085/BB43 4C085/BB50 4C085/CC23 4C085/DD62 4C085/EE01		
代理人(译)	Masarushin大崎		
优先权	60/488681 2003-07-18 US		
其他公开文献	JP5543315B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

与肝细胞生长因子 (HGF) 相互作用的特异性结合因子，通过给药药有效量的HGF特异性结合因子和HGF特异性结合因子来治疗癌症的方法提供一种检测样品中HGF含量的方法。 SOLUTION：抗体包含至少一个选自CDR1a，CDR2a和CDR3a的互补决定区 (CDR)，并且可以与抗体的重链协同结合肝细胞生长因子 (HGF)。分离的多肽。一种分离的多肽，其包含至少一个选自CDR1b，CDR2b和CDR3b的互补决定区 (CDR)，其能够与抗体的轻链协同结合HGF。 [选择图]无

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

