

(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2005-165

(P2005-165A)

(43) 公開日 平成17年1月6日(2005.1.6)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B O 2 4
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395	N 4 B O 6 4
A 6 1 P 7/02	A 6 1 P 7/02	4 B O 6 5
A 6 1 P 9/10	A 6 1 P 9/10	1 O 1 4 C O 8 5
A 6 1 P 11/06	A 6 1 P 11/06	4 H O 4 5
審査請求 有 請求項の数 40 O L (全 106 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2004-141719 (P2004-141719)	(71) 出願人	592221528
(22) 出願日	平成16年5月11日 (2004.5.11)		バイオジェン・アイデック・エムエイ・インコーポレイテッド
(62) 分割の表示	特願平6-516243の分割		アメリカ合衆国、マサチューセッツ O 2
原出願日	平成6年1月7日 (1994.1.7)		1 4 2、ケンブリッジ、ケンブリッジ センター 1 4
(31) 優先権主張番号	08/004, 798	(74) 代理人	100078282
(32) 優先日	平成5年1月12日 (1993.1.12)		弁理士 山本 秀策
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100062409
			弁理士 安村 高明
		(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 組換え抗 V L A 4 抗体分子

(57) 【要約】

【課題】 喘息及び炎症性腸疾患を含む特異的及び非特異的炎症の治療において有用な、ならびに炎症の診断及び炎症部位の位置決めにおいて有用なヒト化組換え抗 V L A 4 抗体分子を提供すること。

【解決手段】 V L A 4 に対する特異性及び抗原結合部位を有するヒト化組換え抗体分子であって、可変領域の相補性決定領域 (C D R) の少なくとも 1 つが非ヒト抗 V L A 4 抗体から導かれ且つ該抗体がマウス H P 1 / 2 モノクローナル抗体の効力の約 2 0 ~ 1 0 0 % の効力を有する、上記のヒト化組換え抗体分子。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記を含むヒト化組換え抗体分子又はその α 4結合性断片：

マウス抗 α 4抗体に由来するマウスCDRの31～35位(CDR1)、50～65位(CDR2)及び95～102位(CDR3)(Kabataの番号付け)を含み、フレームワークの27～30位(Kabataの番号付け)にマウスの残基を有する少なくとも一つのヒト化抗体重鎖又はその α 4結合性断片{該27～30位は、アミノ酸配列Phe27、Asn28、11e29及びLys30(SEQ ID NO:107)を有する}；及び

マウス抗 α 4抗体に由来するマウスCDRを24～34位(CDR1)、50～56位(CDR2)及び89～97位(CDR3)に含み及びヒトREIモノクローナル抗体のフレームワーク領域(SEQ ID NO:100)を含む少なくとも一つのヒト化抗体軽鎖又はその α 4結合性断片{該REIフレームワーク領域は、少なくとも一つのマウスフレームワーク残基並びにアミノ酸配列Val104、Glu105及びLys107を有する}。 10

【請求項 2】

前記の重鎖又はその α 4結合性断片が、フレームワークの75位に更なるマウス残基を含む、請求項1に記載のヒト化組換え抗体分子又はその α 4結合性断片。

【請求項 3】

前記の重鎖又はその α 4結合性断片が、更なるマウス残基をフレームワークの77～79位又は66～67位及び69～71位又は84～85位又は38位及び40位又は24位に含む、請求項2に記載のヒト化組換え抗体分子又はその α 4結合性断片。 20

【請求項 4】

前記の軽鎖又はその α 4結合性断片が、マウス残基をフレームワークの60位及び67位に含む、請求項1に記載のヒト化組換え抗体分子又はその α 4結合性断片。

【請求項 5】

2つの完全長の抗体重鎖及び2つの完全長の抗体軽鎖を含む、請求項1に記載のヒト化組換え抗体分子又はその α 4結合性断片。

【請求項 6】

マウスCDRが、HPL/2マウスモノクローナル抗体(SEQ ID NO:6及びSEQ ID NO:10)に由来する、請求項1に記載のヒト化組換え抗体分子又はその α 4結合性断片。 30

【請求項 7】

マウス抗 α 4抗体に由来するマウスCDRを31～35位(CDR1)、50～65位(CDR2)及び95～102位(CDR3)(Kabataの番号付け)に含み且つマウス残基を、フレームワークに27～30位(Kabataの番号付け)に有するヒト化抗体重鎖又はその α 4結合性断片をコードするDNAであって、該27～30位がアミノ酸配列Phe27、Asn28、Ile29及びLys30(SEQ ID NO:107)を有する当該DNA。 40

【請求項 8】

前記の重鎖又はその α 4結合性断片が更なるマウス残基をフレームワークの75位(Kabataの番号付け)に含む、請求項7に記載の抗体重鎖又はその α 4結合性断片をコードするDNA。 40

【請求項 9】

前記の重鎖又はその α 4結合性断片が更なるマウス残基をフレームワークの77～79位又は66～67位及び69～71位又は84～85位又は38及び40位又は24位(Kabataの番号付け)に含む、請求項7に記載の抗体重鎖又はその α 4結合性断片をコードするDNA。

【請求項 10】

マウス抗 α 4抗体に由来するマウスCDRを24～34位(CDR1)、50～56位(50

C D R 2) 及び 8 9 ~ 9 7 位 (C D R 3) に含み且つ R E I モノクローナル抗体に由来するフレームワーク領域 (S E Q I D N O : 1 0 0) を含むヒト化抗体軽鎖又はその α 4 結合性断片をコードする D N A であって、該 R E I フレームワーク領域が少なくとも 1 つのマウスフレームワーク残基並びにアミノ酸配列 V a l 1 0 4、G l u 1 0 5 及び L y s 1 0 7 を有する当該 D N A。

【請求項 1 1】

前記の抗体軽鎖が、完全長の抗体軽鎖である、請求項 1 0 に記載の抗体軽鎖又はその α 4 結合性断片をコードする D N A。

【請求項 1 2】

前記の軽鎖又はその α 4 結合性断片がマウス残基をフレームワークの 6 0 位及び 6 7 位に含む、請求項 1 0 に記載の抗体軽鎖又はその α 4 結合性断片をコードする D N A。 10

【請求項 1 3】

前記の抗体軽鎖が、完全長の抗体軽鎖である、請求項 1 1 に記載の抗体軽鎖又はその α 4 結合性断片をコードする D N A。

【請求項 1 4】

請求項 1 ~ 6 の何れか 1 つに記載の抗体分子又はその α 4 結合性断片をコードする D N A。

【請求項 1 5】

請求項 7、8 又は 9 の抗体重鎖をコードする D N A を含むベクター。

【請求項 1 6】

請求項 1 0、1 1、1 2 又は 1 3 の抗体軽鎖をコードする D N A を含むベクター。 20

【請求項 1 7】

請求項 1 4 の抗体分子をコードする D N A を含むベクター。

【請求項 1 8】

請求項 1 5、1 6 又は 1 7 のベクターを用いてトランスフォームした宿主細胞。

【請求項 1 9】

ヒト化組換え抗 α 4 抗体又はその α 4 結合性断片の製造方法であって、下記：

(a) (i) 抗体重鎖若しくはその α 4 結合性断片又は軽鎖若しくはその α 4 結合性断片をコードする D N A 配列を有するオペロン (ここに、可変ドメインの C D R は、マウス抗 α 4 抗体に由来し、抗体鎖の残りの免疫グロブリン由来部分は、ヒト免疫グロブリンに由来する)、及び (i i) 相補的抗体軽鎖若しくはその α 4 結合性断片又は重鎖若しくはその α 4 結合性断片をコードする D N A 配列を有するオペロン (ここに、可変ドメインの C D R は、マウス抗 α 4 抗体に由来し、抗体鎖の残りの免疫グロブリン由来部分は、ヒト免疫グロブリンに由来する) を含む発現ベクターを製造し； 30

(b) 該ベクターにより宿主細胞をトランスフェクトし；そして

(c) トランスフェクトされた細胞を培養して、ヒト化組換え抗 α 4 抗体分子又はその α 4 結合性断片を生成する

ことを含み、但し、(i) 重鎖若しくはその α 4 結合性断片は、マウス抗 α 4 抗体に由来するマウス C D R を 3 1 ~ 3 5 位 (C D R 1)、5 0 ~ 6 5 位 (C D R 2) 及び 9 5 ~ 1 0 2 位 (C D R 3) (K a b a t の番号付け) に含み且つマウス残基をフレームワークの 2 7 ~ 3 0 位 (K a b a t の番号付け) に有し (該 2 7 ~ 3 0 位は、アミノ酸配列 P h e 2 7、A s n 2 8、I l e 2 9 及び L y s 3 0 (S E Q I D N O : 1 0 7) を有する)；そして (i i) 軽鎖若しくはその α 4 結合性断片は、マウス抗 α 4 抗体に由来するマウス C D R を 2 4 ~ 3 4 位 (C D R 1)、5 0 ~ 5 6 位 (C D R 2) 及び 8 9 ~ 9 7 位 (C D R 3) に含み且つ R E I モノクローナル抗体に由来するフレームワーク領域 (S E Q I D N O : 1 0 0) を含み、ここに、該 R E I フレームワーク領域は少なくとも 1 つのマウスフレームワーク残基及びアミノ酸配列 V a l 1 0 4、G l u 1 0 5 及び L y s 1 0 7 を有する、当該製造方法。 40

【請求項 2 0】

前記の重鎖又はその α 4 結合性断片が更なるマウス残基をフレームワークの 7 5 位 (K a 50

b a t の番号付け) に含む、請求項 19 に記載のヒト化組換え抗 α 4 抗体又はその α 4 結合性断片の製造方法。

【請求項 21】

前記の重鎖又はその α 4 結合性断片が更なるマウス残基をフレームワークの 77 ~ 79 位又は 66 ~ 67 位及び 69 ~ 71 位又は 84 ~ 85 位又は 38 位及び 40 位又は 24 位に含む、請求項 19 に記載のヒト化組換え抗 α 4 抗体又はその α 4 結合性断片の製造方法。

【請求項 22】

前記の軽鎖又はその α 4 結合性断片がフレームワークの 60 位及び 67 位にマウス残基を含む、請求項 19 に記載のヒト化組換え抗 α 4 抗体又はその α 4 結合性断片の製造方法。

【請求項 23】

マウス CDR が、HP1/2 マウスモノクローナル抗体 (SEQ ID NO: 6 及び SEQ ID NO: 10) に由来する、請求項 19 に記載のヒト化組換え抗 α 4 抗体又はその α 4 結合性断片の製造方法。

【請求項 24】

請求項 1 ~ 6 の何れか 1 つに記載の抗体分子又はその α 4 結合性断片及び製薬上許容しうる希釈剤、賦形剤又はキャリアーを含む治療用組成物。

【請求項 25】

哺乳動物患者における VCAM-1/VLA-4 接着経路と関連する炎症を治療するための請求項 24 の治療用組成物の利用。

【請求項 26】

SEQ ID NO: 43、SEQ ID NO: 47、SEQ ID NO: 51 及び SEQ ID NO: 55 よりなる群から選択する重鎖可変領域を含むヒト化重鎖又はその α 4 結合性断片を、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 63 及び SEQ ID NO: 67 よりなる群から選択する軽鎖可変領域を含むヒト化軽鎖又はその α 4 結合性断片と共に含むヒト化組換え抗 α 4 抗体分子又はその α 4 結合性断片。

【請求項 27】

2 つの完全長抗体重鎖及び 2 つの完全長抗体軽鎖を含む、請求項 26 に記載のヒト化組換え抗 α 4 抗体分子又はその α 4 結合性断片。

【請求項 28】

請求項 26 又は 27 に記載のヒト化組換え抗 α 4 抗体分子又はその α 4 結合性断片をコードする DNA。

【請求項 29】

ヒト化組換え抗 α 4 抗体分子が、2 つの完全長抗体重鎖及び 2 つの完全長抗体軽鎖を含む、請求項 28 に記載の DNA。

【請求項 30】

SEQ ID NO: 43、SEQ ID NO: 47、SEQ ID NO: 51 及び SEQ ID NO: 55 よりなる群から選択する重鎖可変領域を含むヒト化重鎖又はその α 4 結合性断片、及び SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 63 及び SEQ ID NO: 67 よりなる群から選択する軽鎖可変領域を含むヒト化軽鎖又はその α 4 結合性断片をコードする DNA を含むベクター。

【請求項 31】

2 つの完全長抗体重鎖及び 2 つの完全長抗体軽鎖をコードする DNA を含む、請求項 30 に記載の DNA を含むベクター。

【請求項 32】

請求項 30 又は 31 のベクターによりトランスフォームされた宿主細胞。

【請求項 33】

V_H-AS (SEQ ID NO: 55) の重鎖可変領域を含むヒト化重鎖又はその α 4 結合性断片を、VK2-SVMDY (SEQ ID NO: 63) の軽鎖可変領域を含むヒト化軽鎖又はその α 4 結合性断片と共に含むヒト化組換え抗 α 4 抗体分子又はその α 4 結合性断片。

10

20

30

40

50

【請求項 34】

2つの完全長抗体重鎖及び2つの完全長抗体軽鎖を含む、請求項33に記載のヒト化組換え抗 α 4抗体分子又はその α 4結合性断片。

【請求項 35】

請求項26、27、33又は34に記載の抗体分子を、製薬上許容しうる希釈剤、賦形剤又はキャリアーと共に含む治療用組成物。

【請求項 36】

上記の抗体分子が2つの完全長抗体重鎖及び2つの完全長抗体軽鎖を含む、請求項35に記載の治療用組成物。

【請求項 37】

哺乳動物患者におけるVCAM-1/VLA-4接着経路と関連する炎症を治療するための請求項35に記載の治療用組成物の利用。

【請求項 38】

受け入れ番号ATCC CRL 11175を有するNSO細胞株により生成されたヒト化組換え抗 α 4抗体分子。

【請求項 39】

哺乳動物患者におけるVCAM-1/VLA-4接着経路と関連する炎症を治療するための、請求項38のヒト化組換え抗 α 4抗体の、製薬上許容しうる希釈剤、賦形剤又はキャリアーと組合せた利用。

【請求項 40】

請求項1～6、26、27、33及び34の何れか1つに記載の、ヒト化組換え抗 α 4抗体分子又はその α 4結合性断片であって、該ヒト化抗体が、HP1/2マウスモノクローナル抗体の結合親和性の約20～100%の結合親和性（半最大結合定数により規定）を有する、上記のヒト化組換え抗 α 4抗体分子又はその α 4結合性断片。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヒト化組換え抗VLA4抗体分子を含む、組換え抗VLA抗体分子に関するものである。

【背景技術】

【0002】

（A．免疫グロブリン及びモノクローナル抗体）

天然の免疫グロブリンは、種々の断片例えば酵素開裂によって誘導することの出来るFab、(Fab')₂及びFc断片を有するものとして長年にわたって公知である。天然の免疫グロブリンは、一般に、各上腕の自由末端側に抗原結合部位を有するY型分子を含む。構造の残り特にYの幹は、免疫グロブリンと関係するエフェクター機能を媒介する。

【0003】

特に、免疫グロブリン分子は、ジスルフィド結合によって結合された2つの重(H)ポリペプチド鎖及び2つの軽(L)ポリペプチド鎖からなる。免疫グロブリン鎖の各鎖は、それぞれ約110アミノ酸である領域又はドメインに分割される。軽鎖は2つのかかるドメインを有するが、他方、重鎖は4つのドメインを有する。各ポリペプチド鎖のアミノ末端ドメインのアミノ酸配列は、高度に可変性であり(V領域)、他方、残りのドメインの配列は保存的若しくは定常的である(C領域)。それ故に、軽鎖は、1つの可変ドメイン(V_L)と1つの定常ドメイン(C_L)からなり、他方、重鎖は、1つの可変ドメイン(V_H)と3つの定常ドメイン(CH₁、CH₂及びCH₃)を含む。Y型分子の1つの腕は、軽鎖(V+C_L)及び可変ドメイン(V_H)及び1つの定常ドメイン(CH₁)からなる。このYの尾部は、残りの重鎖定常ドメイン(CH₂+CH₃)からなる。重鎖のC末端は、会合してFc部分を形成する。各可変領域内には、3つの超可変域がある。これらの超可変域は、抗原の結合におけるそれらの重要性の故に相補性決定領域(CDR)としても記載される。可変ドメインの4つの一層保存された領域は、フレームワーク領域

10

20

30

40

50

(F R)として記載される。免疫グロブリンの各ドメインは、疎水性面が一緒にパックされた、ジスルフィド橋によって結合された2つのペーターシートからなる。個々のペーター鎖は、ループによって一緒に結合されている。全体の外観は、末端にループを有するペーター円筒部として記載することが出来る。C D Rは、可変領域のペーター円筒部の一端にループを形成する。

【 0 0 0 4 】

天然の免疫グロブリンは、アッセイ、診断に用いられて来ており、又一層限られた程度で治療に用いられて来た。しかしながら、かかる利用は(特に、治療において)、天然の免疫グロブリンのポリクローナル特性によって妨げられてきた。免疫グロブリンの治療剤としての可能性の実現に向けての重要なステップは、限定された特異性のモノクローナル抗体(M A b)の調製のための技術の発見(K o h l e r 等、1975 [1])であった。

10

しかしながら、殆どのM A bは、ゲッ歯類(即ち、マウス、ラット)の脾臓細胞とゲッ歯類のミエローマ細胞との融合により生成される。従って、それらは、本質的にゲッ歯動物の蛋白質である。

【 0 0 0 5 】

1990年までに、100を超えるマウスモノクローナル抗体が、臨床的に試みられた(特に米国で、特に癌の治療への応用のために)。しかしながら、現在までに、H A M A (ヒト抗マウス抗体)応答と呼ばれるヒトにおける望ましくない免疫応答によるマウスモノクローナル抗体の拒絶が特に慢性疾患の治療にとって重大な制限となっているということが認識された。それ故に、ゲッ歯類M A bのヒトにおける治療剤としての利用は、ヒト患者がそのM A bに対する免疫応答を開始して、そのM A bを完全に除去するか又は少なくともその効力を減じるという事実によって本来的に制限されている。実際に、ゲッ歯類起源のM A bは、H A M A 応答がじきにM A bを無効にし、並びに、望ましくない反応を起こすので、一人の患者において1回若しくは数回以上は使用することが出来ない。事実、H A M A 応答は、大部分の患者において、マウス抗体の一回の注射の後に観察された(S c h r o f f 等、1985 [2])。H A M Aの問題を解決する方法は、免疫的に適合性のヒトモノクローナル抗体を投与することである。しかしながら、ヒトモノクローナル抗体の開発のための技術は、マウス抗体のそれよりずっと遅れており(B o r r e b a e c k 等、1990 [3])、非常に少数のヒト抗体が臨床研究において有用であることが

20

30

【 0 0 0 6 】

それ故に、ヒトにおいて一層抗原性の少ない非ヒトM A bを製造するための提案がなされた。かかる技術は、「ヒト化(h u m a n i z a t i o n)」技術と総称することが出来る。これらの技術は、一般に、抗体分子のポリペプチド鎖をコードするD N A 配列を操作するための組換えD N A 技術の利用を含む。抗体遺伝子をクローン化するための組換えD N A 技術の利用は、別法を提供し、それにより、マウスモノクローナル抗体は、同じ抗原結合特性を有するヒト型に優勢に変換され得る(即ち、ヒト化される)(R i e c h m a n n 等、1988 [4])。一般に、ヒト化技術のゴールは、C D Rを除いて、ヒトにおける抗原性を減じ若しくは除去するために、マウス成分が非常に少ないか事実上含まれないヒト化抗体を開発することである(例えば、T e m p e s t 等、1991 [5] を参照されたい)。

40

【 0 0 0 7 】

M A bをヒト化する初期の方法は、一つの抗体の完全な可変ドメインを含む抗原結合部位が他の抗体から導かれた定常ドメインに結合したキメラ抗体の産生を含んだ。かかるキメラ化手順を実施する方法は、例えば、E P 1 2 0 6 9 4 [6]、E P 1 2 5 0 2 3 [7]、及びW O / 0 1 5 3 3 [8]に記載されている。一般に、非ヒトM A b例えばマウスM A bからの可変ドメインとヒト免疫グロブリンからの定常ドメインとを有する抗体分子の製造方法が記載されている。かかるキメラ抗体は、それらが未だかなりの割合の非ヒトアミノ酸配列即ち完全な非ヒト可変ドメインを含みそれ故に特に長期間投与した場合に幾

50

らかのHAMA応答を誘出し得る(Begent等、1990[9])ので、本当にヒト化されてはいない。更に、これらの方法は、幾つかの場合(例えば、EP120694[6]; EP125023[7]及び米国特許第4,816,567号[10])には、Igポリペプチド鎖の如何なる有意の量の発現、若しくはイン・ピトロ可溶化及び鎖再構成を伴わないIg活性の生成にも導かず、或はこれらの鎖の分泌及び所望のキメラ組換え抗体へのアセンブリーへも導かないと考えられる。これらの同じ問題は、初期の非キメラ組換え抗体の産生(例えば、米国特許第4,816,397号[11])についても注意され得る。

【0008】

(B. ヒト化組換え抗体及びCDRグラフト技術)

初期のキメラ抗体製造のための方法に続いて、新たなアプローチがEP0239400[12]に記載され、それにより、抗体は一種についてのそれらの相補性決定領域(CDR)を他の種からのもので代用することによって変更される。この方法を用いて、例えば、ヒトの重鎖及び軽鎖Igの可変領域ドメインからのCDRを別のマウス可変領域ドメインからのCDRで代用することが出来る。これらの変更されたIg可変領域を、続いて、ヒトIg定常領域と結合して、置換されたマウスCDRを除いて全体的にヒトの組成である抗体を造ることが出来る。かかるマウスCDR置換された抗体は、相当少ないマウス成分しか含まないので、ヒトにおいて、キメラ抗体と比較して、相当に減じた免疫応答を誘出することはありそうにないと予想され得る。

【0009】

CDRグラフトによってモノクローナル抗体をヒト化する方法は、「再成形(reshaping)」と呼ばれる(Riechmann等、1988[4]; Verhoeyen等、1988[13])。典型的には、マウス抗体の相補性決定領域(CDR)を、ヒト抗体の対応する領域に移植する(特異的抗原に結合するマウス抗体の領域はCDR(抗体重鎖中の3つと軽鎖中の3つ)であるので)。CDRの移植は、遺伝子工学により達成される。該遺伝子工学により、CDR DNA配列を、マウス重鎖及び軽鎖可変(V)領域遺伝子セグメントのクローニングによって決定し、次いで、部位特異的突然変異導入法によって対応するヒトV領域にトランスファーする。この方法の最後の段階で、所望のイソタイプ(通常、C_Hについてはガンマー1及びC_Lについてはカッパー)のヒト定常領域遺伝子セグメントを加え且つこれらのヒト化重鎖及び軽鎖遺伝子を、哺乳動物細胞内で同時発現させて可溶性のヒト化抗体を生成する。

【0010】

これらのCDRのヒト抗体へのトランスファーは、この抗体に元のマウス抗体の抗原結合特性を与える。これらの6つのマウス抗体中のCDRは、構造的に、V領域「フレームワーク」領域に載せられる。CDRグラフトがうまく行く理由は、マウス及びヒト抗体間でフレームワーク領域が非常に類似した3-D構造及びCDRに対する類似の付着点を有し、CDRが交換可能だからである。それにもかかわらず、フレームワーク領域内のある種のアミノ酸は、CDRと相互作用して抗原結合アフィニティーに全体的に影響を与えると考えられる。ヒトV領域フレームワークの何らの修飾をも伴わない組換えヒト化抗体を生成するためのマウス抗体からのCDRの直接トランスファーは、しばしば、結合アフィニティーの部分的な若しくは完全な喪失を生じる。

【0011】

Riechmann等、1988[4]及びWO89/07454[14]において、CDR領域のトランスファーは、単独では(Kabat等、1991[15]及びWu等、1970[16])により規定されたように)CDRグラフト生成物における満足すべき抗原結合活性を供給するのに十分でないことが見出された。Riechmann等、1988[4]は、満足すべき抗原結合活性を有するCDRグラフト生成物を得るためにはヒト配列の27位のセリン残基を対応するラットのフェニルアラニン残基に変換することが必要であることを見出した。重鎖の27位のこの残基は、CDR1に隣接する構造ループ内にある。重鎖の30位にヒトセリンのマウスチロシンへの変化を付加的に含む更なる構造

10

20

30

40

50

は、27位に単独のセリンからフェニルアラニンへの変化を有するヒト化抗体上に有意の変化した結合活性を有しなかった。これらの結果は、CDR領域の外側例えばCDR1に隣接するループ内のヒト配列の残基への変化が、一層複雑な抗原を認識するCDRグラフト抗体に対する有効な抗原結合活性を得るために必要であり得ることを示している。たとえそうであっても、得られた最良CDRグラフト抗体の結合アフィニティーはやはり元のMAbより有意に低かった。

【0012】

もっと最近、Queen等、1989[17]及びWO90/07861[18]は、マウスMAbのCDR(抗Tac)をヒト免疫グロブリンフレームワーク及び定常領域に結合することによってインターロイキン2レセプターに結合するヒト化抗体の調製物を記載している。彼らは、しばしば(ヒトV領域フレームワーク残基の何らの修飾をも伴わない)直接CDRトランスファーから生じる結合アフィニティーの喪失の問題に対する一つの解決を示した。彼らの解決は、2つの鍵となるステップを含んでいる。第1に、ヒトVフレームワーク領域を、元のマウス抗体(この場合には、抗TacMAb)のV領域フレームワークに対する最適の蛋白質配列相同性についてコンピューター分析により選択する。第2ステップにおいて、マウスCDRと相互作用しそうなフレームワークアミノ酸残基を可視化するためにマウスV領域の三次構造をコンピューターによって模擬し、次いで、これらのマウスアミノ酸残基を相同なヒトフレームワーク上にスーパーインポーズする。相同なヒトフレームワークを推定のマウス接触残基と共に用いる彼らのアプローチは、インターロイキン2レセプターに特異的な(Queen等、1989[17])及び単純ヘルペスウイルス(HSV)にも特異的な抗体(Co.等、1991[19])に関して元のマウス抗体に対する類似の結合アフィニティーを有するヒト化抗体を生じた。しかしながら、マウス残基のヒトフレームワークへの再導入(抗インターロイキン2レセプター抗体については少なくとも9、2つの抗HSV抗体の各々については少なくとも9及び7)は、ヒト化抗体におけるフレームワーク領域へのHAMMA応答の可能性を増大させ得る。Bruggemann等、1989[20]は、ヒトV領域フレームワークがマウスにおいて外来性として認識され、それ故に逆に、マウスの修飾ヒトフレームワークがヒトにおける免疫反応を起こすということを示した。

【0013】

上記のWO90/07861[18]の2ステップのアプローチによって、Queen等は、ヒト化免疫グロブリンをデザインするための4つの基準を概説した。第1の基準は、ヒトアクセプターとして、通常ヒト化すべき非ヒトドナー免疫グロブリンに相同である特定のヒト免疫グロブリンからのフレームワークを使用するか、又は多くのヒト抗体に由来するコンセンサスフレームワークを用いることである。第2の基準は、もしヒトアクセプター残基が普通でなく且つドナー残基がフレームワークの特異的残基においてヒト配列について典型的であるならば、アクセプターではなくてドナーアミノ酸を用いることである。第3の基準は、CDRに直接隣接する位置にはアクセプターではなくてドナーフレームワークアミノ酸残基を用いることである。第4の基準は、アミノ酸が三次元免疫グロブリンモデルにおいてCDRの約3以内の側鎖原子を有することが予想され且つ、抗原若しくはヒト化免疫グロブリンのCDRと相互作用し得ることが予想されるフレームワーク位置にはドナーアミノ酸残基を使用することである。基準2、3若しくは4を、基準1に加えて若しくは別に適用するか、又は各基準を単独で若しくは任意の組合せで適用することが勧められる。

【0014】

更に、WO90/07861[18]は、単一のCDRグラフトヒト化抗体の調製物、IL-2レセプターのp55Tac蛋白質に特異的なヒト化抗体を、このヒト化抗体をデザインする際に上記の4つのすべての条件の組合せを用いることにより詳述している。ヒト抗体EU(Kabat等、1991[15]を参照)の可変領域フレームワークがアクセプターとして用いられた。その結果生成したヒト化抗体において、ドナーCDRはKabat等、1991[15]及びWu等、1970[16]により規定されたとおりであ

10

20

30

40

50

50

50

50

50

現在まで、ヒト化組換え抗体は、主として急性疾患状態の治療適用 (Tempest 等、1991 [5]) 又は診断用イメージング (Verhoeyen 等、1991 [21]) のために開発されてきた。最近、臨床研究が、NEWM及びREIV領域フレームワークを有する少なくとも2つのヒト化抗体、CAMPATH-IH (Riechmann 等、1988 [4]) 及びヒト化抗胎盤アルカリホスファターゼ (PLAP) (Verhoeyen 等、1991 [21]) を用いて開始され、これらの研究は、初期に、これらの抗体に対する如何なる顕著な免疫反応も存在しないことを示した。CAMPATH-IH を用いる治療コースは、非ホジキンリンパ腫を有する2人の患者に対して緩解を与え、それ故、慢性疾患状態における効力を示した (Hale 等、1988 [23])。更に、CAMPATH-IHの免疫原性の欠如が、これらの2人の患者の30日及び43日の日々の治療の後に示された。ヒト化抗体に対する十分な寛容がCAMPATH-IHを用いて認められたので、ヒト化抗体を用いる治療は、急性疾患の予防及び低死亡率の病気の治療に有望である。

10

【0019】

(D・VCAM-VLA4 接着経路及びVLA4 に対する抗体)

血管内皮細胞は、血管の裏打ちを構成し、通常、循環白血球には低いアフィニティーを示さない (Harlan, 1985 [24])。炎症部位におけるサイトカインの放出は (及び免疫反応に応答して)、それらの活性化を引き起こして、表面抗原の宿主の増大した発現を生じる (Collins 等、1986 [25]; Pober 等、1986 [26]; Bevilacqua 等、1987 [27]; Leeuwenberg 等、1989 [28])。これらは、接着蛋白質ELAM-1 (好中球に結合する) (Bevilacqua 等、1989 [29])、ICAM-1 (すべての白血球と相互作用する) (Dustin 等、1986 [30]; Pober 等、1986 [26]; Boyd 等、1988 [31]; Dustin 及び Springer, 1988 [32]) 及びVCAM-1 (リンパ球に結合する) (Osborn 等、1989 [33]) を含む。これらのサイトカイン誘導された接着分子は、血管外組織への白血球補充において重要な役割を演じるらしい。

20

【0020】

インテグリンは、広い細胞分布を有し且つ進化を通じて高度に保存されたアルファ-ベータヘテロ2量体構造を示す細胞-細胞外マトリックス及び細胞-細胞接着レセプターの群である (Hynes, 1987 [34]; Marcantonio 及び Hynes, 1988 [35])。インテグリンは、3つの主要なサブグループに細分類されている; インテグリンの β_2 サブファミリー (LFA-1、Mac-1 及び p150, 95) は、殆どの免疫系内の細胞-細胞相互作用に関与する (Kishimoto 等、1989 [36]) が、他方、 β_1 及び β_2 インテグリンサブファミリーのメンバーは、優勢に、細胞の細胞外マトリックスへの付着を媒介する (Hynes, 1987 [34]; Ruoslahti, 1988 [37])。特に、 β_1 インテグリンファミリーは、VLA蛋白質とも呼ばれるが、フィブロネクチン、コラーゲン及び/又はラミニンと特異的に相互作用する少なくとも6つのレセプターを含む (Hemler, 1990 [38])。VLAファミリー内で、VLA4は、殆どリンパ様細胞及び骨髓細胞に限られているので典型的ではなく (Hemler 等、1987 [39]) 間接的証拠はそれが種々の細胞-細胞相互作用に関与し得ることを示唆した (Clayberger 等、1987 [40]; Takada 等、1989 [41]; Holtzman 等、1989 [42]; Bendarczyk 及び McIntyre, 1990 [43])。更に、VLA4は、ヒトプラズマフィブロネクチン (FN) のヘパリンII結合断片へのT及びBリンパ球付着を媒介することが示された (Wayner 1989 [44])。

30

40

【0021】

VCAM-1は、ICAM-1と同様に、免疫グロブリン遺伝子スーパーファミリーのメンバーである (Osborn 等、1989 [33])。VCAM-1 及び VLA4 は、活性化内皮へのリンパ球の付着を与えるリガンドレセプター対であることが Ellices

50

等、1990[45]により示された。従って、VLA4は、限定されたりガンドVCAM-1及びFNによる細胞-細胞接着及び細胞-細胞外マトリックス接着機能の両方に関与する β_1 インテグリンレセプターの珍しい例に相当する。

【0022】

VCAM1(INCAM-110としても知られる)は、最初、炎症性サイトカイン(TNF及びIL-1)及びLPS(Rice等、1989[46]; Osborn等、1989[33])により内皮細胞上に誘導される接着分子として同定された。VCAM1は、インテグリンVLA4($\alpha_4\beta_1$)を示す細胞(T及びBリンパ球、単核細胞及び好酸球を含むが、好中球は含まない)に結合するので、それは、これらの細胞の血流から感染及び炎症領域への補充に関与するものと考えられている(Ellices等、1990[45]; Osborn, 1990[33])。VCAM/VLA4接着経路は、多くの生理学的及び病理性プロセスを関連してきた。VLA4は、通常、造血細胞系統に限られているが、それはミエローマ細胞系統上で見出され、それ故、VCAM1はかかる腫瘍の転移に関与し得ることが示唆されている(Rice等、1989[46])。

10

【0023】

イン・ビボにおいて、VCAM1は、ウサギモデル系において、初期アテローム性動脈硬化プラークを表している動脈内皮の領域に見出される(Cybulsky及びGimbrone, 1991[46])。VCAMは又、ヒトリンパ節の濾胞性樹状細胞においても見出される(Freedman等、1990[48])。それは又、マウスの骨髄間質細胞上にも見出され(Miyake等、1991[49])、従って、VCAM1は、B細胞発生において役割を果たしているらしい。

20

【0024】

イン・ビボでの内皮細胞上のVCAM1の主要な形態は、VCAM-7Dとして言及されており、7つのIg相同性ユニット若しくはドメインを有する; ドメイン4、5及び6は、アミノ酸配列において、それぞれ、ドメイン1、2及び3に類似し、遺伝子の進化の歴史における遺伝子間重複事象を示唆している(Osborn等、1989[33]; Polte等、1990[50]; Hession等、1991[51]; Osborn及びBenjamin, 米国特許第07/821,712号(1991年9月30日出願)[52])。6ドメイン型(ここでは、VCAM-6Dとして言及する)は、4つのドメインが欠失する別のスプライシングによって生成される(Osborn等、1989[33]; Hession等、1991[51]; Cybulsky等、1991[47]; Osborn及びBenjamin, 米国特許第07/821,712号(1991年9月30日出願)[52])。VCAM-6Dは、これらの別型の中で最初に配列決定されたが、後のイン・ビボでの研究は、VCAM-7D型がイン・ビボで優勢であることを示した。この別のスプライシングの生物学的意義は、未知であるが、Osborn及びBenjamin, 米国特許第07/821,712号(1991年9月30日出願)[52]により示されたように、VCAM-6Dは、VLA4発現細胞に結合し、従って、明らかにイン・ビボで潜在的機能を有している。

30

【0025】

感染、炎症及び恐らくアテローム性動脈硬化におけるVCAM1/VLA4接着経路の見かけの関与は、分子レベルでの細胞-細胞接着の機構を理解するための徹底的研究の継続へと導き、且つ、研究者に、この接着経路における介入を病気特に炎症に対する治療として提案させた(Osborn等、1989[33])。この経路における介入の1つの方法は、抗VLA4抗体の利用を含み得る。

40

【0026】

VCAM1がVLA4に結合するのを阻止するモノクローナル抗体は公知である。例えば、抗VLA4MAbHP2/1及びHP1/3は、VLA4発現Ramos細胞のヒト臍静脈細胞及びVCAM1トランスフェクトしたCOS細胞への付着をブロックすることが示された(Ellices等、1990[45])。又、抗VCAM1抗体例えばモノクローナル抗体4B9(Carlos等、1990[53])は、Ramos(B細胞様)

50

、J u r k a t (T 細胞様) 及び H L 6 0 (顆粒細胞様) 細胞の C O S 細胞 (V C A M - 6 D 及び V C A M - 7 D を発現するようにトランスフェクトしたもの) への接着を阻止することが示された (H e s s i o n 等、1991 [51]) 。

【 0 0 2 7 】

現在までに記載された V L A 4 に対するモノクローナル抗体は、エピトープマッピング研究に基づいて幾つかのカテゴリーに入る (P u l i d o 等、1991 [54]) 。

重要なことには、エピトープ「B」に対する抗体の1つの特定のグループは、すべてのV L A 4 依存性接着機能の有効なブロッカーである (P u l i d o 等、1991 [54]) 。かかるV L A 4 のエピトープBに対するモノクローナル抗体 (例えば、H P 1 / 2 M A b を含む) の調製は、S a n c h e z - M a d r i d 等、1986 [55] により記載されている。H P 1 / 2 の結合アフィニティーに匹敵するV L A 4 に対する類似の特異性及び高い結合アフィニティーを有する抗体は、アッセイ試薬、診断薬及び治療剤としてに有用なヒト化組換え抗V L A 4 抗体の調製物に特に有望な候補であり得る。

10

【 0 0 2 8 】

上記のように、炎症性白血球は、内皮細胞表面で発現される細胞接着分子によって炎症部位に補充される (該分子は白血球表面蛋白質若しくは蛋白質複合体に対するレセプターとして働く) 。特に、好酸球は、最近、3つの別々の血管内皮への細胞接着経路に關与して、細胞間接着分子1 (I C A M - 1) 、内皮細胞接着分子1 (E L A M - 1) 及び血管細胞接着分子1 (V C A M - 1) を発現する細胞に結合することが見出された (W e l l e r 等、1991 [56] ; W a l s h 等、1991 [57] ; B o c h n e r 等、1991 [58] ; 及び D o b r i n a 等、1991 [59]) 。好酸球がV L A 4 を発現することは、それらを他の炎症細胞例えば好中球等から区別する (それらは、E L A M - 1 及び I C A M - 1 に結合するが、V C A M - 1 には結合しない) 。

20

【 0 0 2 9 】

V L A 4 媒介の接着経路は、炎症を起こした肺組織への白血球の補充におけるV L A 4 の可能な役割を調べるために喘息モデルにおいて研究されてきた (L o b b , 米国特許第07 / 821, 768号 (1992年1月13日出願) [60]) 。抗V L A 4 抗体の投与は、アレルギー性ヒツジにおいて、後期応答及び気道応答過剰の両者を阻止した。驚くべきことに、抗V L A 4 の投与は、好中球及び好酸球が共にそれらを肺組織へ補充することの出来る別の接着経路を有するにもかかわらず、アレルギー性ヒツジの後4時間で肺の好中球及び好酸球の両者の数の減少へと導いた。やはり驚くべきことには、治療されたヒツジにおける応答過剰の阻止は、白血球 (好中球及び好酸球を含む) の浸潤が有意に減少しなかったにもかかわらず、1週間継続して観察された。

30

【 0 0 3 0 】

V L A 4 媒介の接着モデルは又、炎症性腸疾患 (I B D) の霊長類モデルにおいても研究されている (L o b b , 米国特許第07 / 835, 139号 (1992年2月12日出願) [61]) 。抗V L A 4 抗体の投与は、そのモデル (ヒトの潰瘍性大腸炎に匹敵) において、驚くべき程有意に急性炎症を低減させた。

【 0 0 3 1 】

更に最近、抗V L A 4 抗体は、P a p y a n n o p o u l o u , 米国特許第07 / 835, 139号 (1992年2月12日出願) [62] に記載されたように、造血幹細胞を含むC D 3 4 ⁺ 細胞の末梢化方法において利用された。

40

【 0 0 3 2 】

こうして、ある種のエピトープ特異性及びある種の結合アフィニティーを有する抗V L A 4 抗体は、喘息及びI B D を含む種々の炎症状態において治療上有用であり得る。特に、かかる抗V L A 4 抗体のヒト化組換えバージョンは、もしそれらを構築することが出来れば、ヒトに投与するために特に有用であり得る。かかるヒト化抗体は、所望の効能及び特異性を有し、同時に、抗体を無効にし及び / 又は望ましくない副作用を起こす免疫応答を回避若しくは最小にする。

【 発明の開示 】

50

【課題を解決するための手段】

【0033】

(発明の要約)

本発明は、組換え抗VLA4抗体分子を構築する方法を提供する。特に、本発明による組換え抗体は、抗VLA4抗体の重鎖及び/又は軽鎖可変領域から導いた抗原結合領域を含む。

【0034】

本発明は、第1ステップとしてCDRグラフト若しくは「再成形」技術を用いるヒト化組換え抗体分子の構築のための方法を提供する。特に、本発明によるヒト化抗体は、VLA4に対する特異性及び抗原結合部位を有する。ここに、この可変ドメインの相補性決定領域(CDR)の少なくとも1つ以上はドナーの非ヒト抗VLA4抗体から導かれ、ドナー抗体の結合特異性を維持するためにアクセプター抗体重鎖及び/又は軽鎖可変フレームワーク領域の最小の変化を有するか又は有し得ない。好ましくは、これらのCDRグラフト重鎖可変ドメインの抗原結合領域は、31~35位(CDR1)、50~65位(CDR2)及び95~102位(CDR3)に対応するCDRを含む。好ましくは、これらのCDRグラフト軽鎖可変ドメインの抗原結合領域は、24~34位(CDR1)、50~56位(CDR2)及び89~97位(CDR3)に対応するCDRを含む。これらの残基の指示は、Kabattの番号付け(Kabatt等、1991[15])に従って番号を付けた。従って、残基/位置指示は、配列表に示したアミノ酸残基の直線的番号付けと常に直接対応はしない。ここに開示するヒト化V_K配列の場合には、Kabattの番号付けは、実際に、配列表に示したアミノ酸残基の直線的番号付けに対応する。対照的に、ここに開示するヒト化V_H配列の場合には、Kabattの番号付けは、配列表に示したアミノ酸残基の直線的番号付けと対応しない(例えば、配列表に開示したヒト化V_H領域について、CDR2=50~66、CDR3=99~110)。

【0035】

この発明は、更に、検出可能に標識された組換えのヒト化抗VLA4抗体を提供する。

【0036】

この発明は、更に、本発明の組換えのヒト化抗VLA4抗体を発現し得る組換えDNA分子を提供する。

【0037】

この発明は、更に、本発明の組換えのヒト化抗VLA4抗体を産生し得る宿主細胞を提供する。

【0038】

この発明は、更に、本発明の組換えのヒト化抗VLA4抗体に係る診断及び治療用途に関係する。

【0039】

この発明は、更に、ヒトを含む哺乳動物患者における特異的防御系の応答から生じた炎症を治療する方法であって、かかる治療を必要とする患者に炎症を抑えるのに十分な量の抗炎症剤を与えることを含み、該抗炎症剤が本発明の組換えのヒト化抗VLA4抗体である、上記の方法を提供する。

【0040】

この発明は、更に、ヒトを含む哺乳動物患者における非特異的炎症を、組換えのヒト化抗VLA4抗体を用いて治療するための方法を提供する。

【0041】

この発明は、更に、本発明の組換えのヒト化抗VLA4抗体をマウスモノクローナル抗体HP1/2から導く上記の方法の具体例に関係する。

【0042】

(発明の特定の具体例の詳細な説明)

モノクローナル抗体を生成するための技術は周知である。簡単に言えば、不滅細胞系統(典型的には、ミエローマ細胞)を、所定の抗原例えばVLA4を発現している全細胞で

10

20

30

40

50

免疫化した哺乳動物からのリンパ球（典型的には、脾臓細胞）と融合させ、その結果生成したハイブリドーマ細胞の培養上清をその抗原に対する抗体についてスクリーニングする（K o h l e r 等、1975 [1] を参照されたい）。

【0043】

免疫化は、標準的手順を用いて達成することが出来る。単位投与量及び免疫化管理（r e g i m e n）は、免疫化すべき哺乳動物の種、その免疫状態、哺乳動物の体重等に依存する。典型的には、免疫化哺乳動物から採血し、各血液試料からの血清を、適当なスクリーニングアッセイを用いて特定の抗体についてアッセイする。例えば、抗 V L A 4 抗体を、^{1 2 5} I 標識した V L A 4 発現細胞からの細胞溶解物の免疫沈降によって同定することが出来る（S a n c h e z - M a d r i d 等、1986 [55] 及び H e m l e r 等、1987 [39]）。抗 V L A 4 抗体は又、フローサイトメトリーにより、例えば V L A 4 を認識すると考えられる抗体と共にインキュベートした R a m o s 細胞の蛍光染色を測定することによって同定することが出来る（E l i c e s 等、1990 [45] を参照）。典型的には、ハイブリドーマ細胞の生成に用いるリンパ球を、免疫化した哺乳動物（その血清が抗 V L A 4 抗体の存在について陽性であることをかかるスクリーニングアッセイを用いて既に試験してある動物）から単離する。

10

【0044】

典型的には、不滅細胞系統（例えば、ミエローマ細胞系統）をリンパ球と同一の哺乳動物種から誘導する。好適な不滅細胞系統は、ヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジンを含む培養培地（「H A T 培地」）に感受性のマウスミエローマ細胞系統である。

20

【0045】

典型的には、H A T 感受性マウスミエローマ細胞を、1500 分子量のポリエチレングリコール（「P E G 1500」）を用いてマウス脾臓細胞と融合する。次いで、融合の結果生成するハイブリドーマ細胞を、H A T 培地を用いて選択する。該培地は、未融合ミエローマ細胞及び非生産的に融合したミエローマ細胞を殺す（未融合脾臓細胞は、トランスフォームされていないので数日後に死ぬ）。所望の抗体を産生するハイブリドーマを、ハイブリドーマ培養上清をスクリーニングすることによって検出する。例えば、抗 V L A 4 抗体の産生用に調製したハイブリドーマを、組換え α_4 サブユニット発現細胞系統例えばトランスフェクトした K - 562 細胞に結合する能力を有する分泌された抗体についてハイブリドーマ培養上清を試験することによってスクリーニングすることが出来る（例えば、E l i c e s 等、1990 [45] を参照）。

30

【0046】

抗 V L A 4 抗体を生成するために、かかるスクリーニングアッセイで試験して陽性であったハイブリドーマ細胞を、栄養培地で、ハイブリドーマ細胞にモノクローナル抗体を培養培地中に分泌させるのに十分な条件及び期間で培養する。ハイブリドーマ細胞に適した組織培養技術及び培養培地は周知である。調整したハイブリドーマ培養上清を集めて、更に適宜、抗 V L A 4 抗体を周知の方法によって精製することが出来る。

【0047】

或は、所望の抗体を、ハイブリドーマ細胞を非免疫化マウスの腹膜腔に注入することによって生成することが出来る。ハイブリドーマ細胞は、腹膜腔内で増殖して抗体を分泌し、それは腹水液として蓄積される。この抗体を、腹水液を腹膜腔から注射器で回収することによって採取することが出来る。

40

【0048】

幾つかの抗 V L A 4 モノクローナル抗体が、以前に記載されている（例えば、S a n c h e z - M a d r i d 等、1986 [55]；H e m l e r 等、1987 [39]；P u l l i d o 等、1991 [54] を参照）。例えば、H P 1 / 2 は、かかる V L A 4 を認識するマウスモノクローナル抗体の一つである。V L A 4 は、プラズマフィブロンネクチン及び V C A M - 1 に対する白血球レセプターとして働く。他のモノクローナル抗体例えば H P 2 / 1、H P 2 / 4、L 25 及び P 4 C 2 は、やはり V L A 4 を認識することが記載されている。

50

【0049】

ここでは、重鎖及び軽鎖の両方の可変ドメインのCDRがマウスHP1/2配列から導かれた組換え抗体を構築し且つ説明する。本発明による組換えヒト化抗体を構築するための好適な出発物質は、抗VLA4抗体例えばHP1/2（これは、VLA4がVCAM1及びフィブロネクチンの両者と相互作用するのをブロックする）等である。更に、特に、細胞凝集を引き起こさないHP1/2等の抗体が好適である。幾つかの抗VLA4ブロック抗体は、かかる凝集を引き起こすことが観察された。HP1/2MAb（Sanchez-Madrid, 1986[55]）は、極度に高い効力を有し、VLA4のVCAM1及びフィブロネクチンの両者との相互作用をブロックするが、細胞凝集を引き起こさず、且つ、VLA4上のエピトープに対する特異性を有するので、ヒト化のための特に優れた候補である。初期の実験において、V_H及びV_KDNAが、HP1/2産生ハイブリドーマ細胞系統から単離されてクローン化された。ヒト化のための可変ドメインフレームワーク及び定常ドメインを、初期には、ヒト抗体配列から導いた。

10

【0050】

重鎖及び軽鎖の両方にある3つのCDRは、構造研究から抗原結合に関与することが示された残基からなる。理論的には、もし、マウスHP1/2抗体のCDRをヒトのフレームワークにグラフトしてCDRグラフト可変ドメインを形成し、この可変ドメインをヒト定常ドメインに結合したならば、その結果生成するCDRグラフト抗体は、本質的に、ヒトVLA4に結合するマウスHP1/2の特異性を有するヒト抗体である。この抗体が高度に「ヒト」特性を有するならば、患者に投与した場合に、マウスHP1/2より遥かに少ない免疫原性しか有しないことが期待される。

20

【0051】

しかしながら、CDRのみがヒトフレームワークにグラフトされたCDRグラフトHP1/2抗体の抗原結合について試験したところ、これは、VLA4抗原に対する受当なアフィニティを有するCDRグラフト抗体を産生しなかったことが示された。従って、CDR及び臨界的フレームワーク残基の幾つかに隣接する更なる残基がヒトから対応するマウスHP1/2残基へ置換されることが、マウスHP1/2MAbの結合アフィニティの10~100%の範囲の結合アフィニティを有する抗体を生成するために必要であることが決定された。経験的に、V_H及びV_Kのフレームワーク領域内の1つ以上の残基を変化させて、所望の特異性及び効力を有するが、ヒト化V_H及びV_K領域配列の本質的にヒトの性質を危うくすることのないように、ヒトフレームワーク内にそれ程多くの変化を有しない抗体を調製した。

30

【0052】

更に、ここに記載した組換え抗VLA4抗体からVLA4結合性断片例えばFab、Fab'、(Fab')₂及びF(v)断片を調製することが出来；重鎖モノマー若しくはダイマー；軽鎖モノマー若しくはダイマー；並びに一の重鎖と一の軽鎖とからなるダイマーも又、ここで企図される。かかる抗体断片は、化学的方法、例えば無傷の抗体をペプシン若しくはパイン等のプロテアーゼで開裂させることにより、又は組換えDNA技術により、例えば切り詰めた重鎖及び/若しくは軽鎖遺伝子でトランスフォームした宿主細胞を用いることによって生成することが出来る。重鎖及び軽鎖モノマーは、同様に、無傷の抗体を還元剤例えばジチオスレイトール若しくはβ-メルカプトエタノールで処理するか又は所望の重鎖若しくは軽鎖又はその両方をコードするDNAでトランスフォームした宿主細胞を用いることによって生成することが出来る。

40

【0053】

下記の実施例は、この発明のある好適具体例を更に説明することを意図するものであり、特性を制限することを意図するものではない。下記の実施例において、必要な制限酵素、プラスミッド並びにその他の試薬及び材料は、市販品から得ることが出来、クローニング、ライゲーション及び他の組換えDNA技術は、当業者に周知の手順によって達成することが出来る。

【実施例】

50

【0054】

(実施例1)

(マウス抗VLA4可変領域をコードするDNA配列の単離)

(A・HP1/2重鎖及び軽鎖cDNAの単離)

VLA4に対する特異性を有するヒト化組換え抗体をデザインするためには、マウスHP1/2重鎖及び軽鎖の可変ドメインの配列を決定することが第1に必要であった。この配列は、Tempes t等、1991[5]にて参照される方法によって細胞質RNAから合成された重鎖及び軽鎖cDNAから決定された。

【0055】

(1.細胞及びRNAの単離)

10

細胞質RNA(～200μg)をFavaloro等、1980[63]の方法によって、150cm²フラスコ中の準コンフルエントのHP1/2産生ハイブリドーマ細胞(約5×10⁵対数期細胞)から調製した。これらの細胞をペレット化して上清を抗体の存在について、Inno-Liaマウスモノクローナル抗体イソタイピングキット(ベルギー、Antwerp, Innogenetics)を用いて固相ELISAによってアッセイした(カップ結合体及びラムダ結合体の両者を使用)。抗体をこの方法によってIgG1/κであることを確認した。

【0056】

(2.cDNA合成)

cDNAをHP1/2 RNAから、マウスIgG1CH₁又はマウスカップー定常ドメインの5'末端に基づくプライマーから開始する、1μl/50μl Pharmacia(英国、Milton Keynes)RNA Guard(商標)及び250マイクロモルのdNTPを含む逆転写酵素緩衝液中の約5μg RNA及び25pモルプライマーを用いる逆転写によって合成した。これらのプライマーCG1FOR及びCK2FORの配列をそれぞれSEQ ID NO:1及びSEQ ID NO:2として示す。この混合物を70℃まで加熱し、次いでゆっくり室温まで冷却する。次いで、100単位/50μlのMMLV逆転写酵素(Life Technologies, 英国、Paisley)を加え、反応を42℃で1時間進行させた。

20

【0057】

(3.V_H及びV_KcDNAの増幅)

30

マウスMAb可変領域のポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を、例えばアンカードPCR又は保存配列に基づくプライマー等の手順の変法を用いて達成することが出来る(Orlandi等、1989[64]を参照されたい)。Orlandi等、[64]、Huse等、1989[65]並びにJones及びBendig, 1991[66]は、幾つかの可変領域プライマーを記載している。しかしながら、我々は、かかるプライマーの多く特にHP1/2誘導したV_K配列の軽鎖PCRに対するものを用いて成功していない。

【0058】

HP1/2 Ig V_H及びV_KcDNAを、Saiki等、1988[67]及びOrlandi等、1989[64]により記載されたPCRによって増幅した。反応を、2.5単位/50μlのAmplitaq(商標)ポリメラーゼ(コネチカット、Norwalk在、Perkin Elmer Cetus)を用いて、94℃で30秒の後の55℃で30秒及び75℃で45秒のサイクルを25回行った。最終サイクルの後に、75℃で5分間インキュベートした。cDNA合成に用いたのと同じ3'オリゴヌクレオチドを、各V領域の5'末端の比較的保存された領域のコンセンサス配列に基づく適当な5'オリゴヌクレオチドと共に用いた。V_HcDNAを、プライマーVH1BACK[SEQ ID NO:3]及びCG1FOR[SEQ ID NO:1]を用いて上首尾に増幅し、約400bpの増幅生成物を生成した。V_KcDNAを、プライマーVK5BACK[SEQ ID NO:4]及びCK2FOR[SEQ ID NO:2]を用いて上首尾に増幅し、約380bpの増幅生成物を生成した。

40

【0059】

50

(4 . V_H DNA のクローニング及び配列決定)

V_H DNA の増幅用に用いたプライマーは、配列決定用ベクター中へのクローニングを容易にする Pst I 及び Hind III 制限酵素部位を含んでいる。一般的クローニング及びライゲーション技術は、Molecular Cloning, A Laboratory Manual 1982, [68] に記載されたものである。増幅した DNA を Pst I で消化して内部 Pst I 部位をチェックし、内部 Pst I 部位を見出した。それ故、V_H DNA を Pst I - Pst I 断片及び Pst I - Hind III 断片として M13 mp18 及び 19 中にクローン化した。2つの独立の cDNA 調製物からの生成したクローンのコレクションを、シーケナーゼ (商標) (United States Biochemicals, 米国、オハイオ、Cleveland 在) を用いて、ジデオキシ法 (Sanger 等、1977, [69]) によって配列決定した。約 100 ~ 250 bp の範囲の配列を、25 クローンの各々から決定した。配列決定した 4000 より多いヌクレオチドの内、3つの PCR 誘導した過渡的突然変異が3つの分離したクローン中にあった。HP1/2 V_H DNA 配列及びその翻訳されたアミノ酸配列を、それぞれ、SEQ ID NO: 5 及び SEQ ID NO: 6 に示す。最初の 8 アミノ酸が、PCR で用いられた 5' プライマーによって指図されていることは注意すべきである。コンピューター補助された比較は、HP1/2 V_H [SEQ ID NO: 5 及び 6] がファミリー I IC のメンバーであることを示す (Kabat 等、1991 [15])。HP1/2 V_H [SEQ ID NO: 5 及び 6] とファミリー I IC のコンセンサス配列との間の比較は、単に異常な残基がアミノ酸の 80、98 及び 121 位にあることを示した (Kabat の番号付けでは、79、94 及び 121 位)。サブグループ I IC において Tyr 80 が不変であるにもかかわらず、他の配列決定したマウス V_H 領域は、この位置に他の芳香族アミノ酸を有する (但し、Trp を有するものはない)。ヒト及びマウスの V_H の大多数は、Kabat の位置 94 にアルギニン残基を有する。HP1/2 V_H 中の Asp 94 の存在は、極めて稀である (この位置で負に帯電した残基の報告例は 1 つしかない)。Kabat の位置 113 のプロリンも又異常であるが、その CDR からの距離からして、CDR のコンホメーションにおいて重要であることはありそうもない。CDR 1 を作っているアミノ酸は、3つの他の配列決定されたマウス V_H 領域に見出された。しかしながら、CDR 2 及び CDR 3 は、HP1/2 にユニークであり、如何なる他の報告されたマウス V_H 中にも見出されない。

10

20

30

【 0060 】

(5 . V_K DNA のクローニング及び配列決定)

V_K DNA の増幅に用いたプライマーは、酵素 Eco RI 及び Hind III に対する制限部位を含んでいる。プライマー VK1 BACK [SEQ ID NO: 7]、VK5 BACK [SEQ ID NO: 4] 及び VK7 BACK [SEQ ID NO: 8] を用いて得た PCR 生成物を精製して M13 中にクローン化した。信頼すべきカップー配列は、VK5 BACK [SEQ ID NO: 4] を用いてのみ得られた。約 200 ~ 350 bp の領域の配列を、2つの独立の cDNA 調製物からの 10 クローンの各々から、シーケナーゼ (商標) (United States Biochemicals, 米国、オハイオ、Cleveland 在) を用いて、ジデオキシ法 (Sanger 等、1977, [69]) によって配列決定した。配列決定した 2 kb より多くの内で、2つのクローンのみが、それぞれ、1つの PCR 誘導された過渡的突然変異を含んでいた。

40

【 0061 】

HP1/2 V_K DNA 配列及びその翻訳された配列をそれぞれ SEQ ID NO: 9 及び SEQ ID NO: 10 に示す。最初の 4 アミノ酸は 5' PCR プライマーによって指図されているが、配列の残りはすべて部分的蛋白質配列データと一致する。HP1/2 V_K DNA 配列は、Kabat のファミリー V (Kabat 等、1991 [15]) のメンバーであり、異常な残基は有しない。CDR 1 及び CDR 3 のアミノ酸残基はユニークである。CDR 2 を作っているアミノ酸は、他のマウス V_K において報告されている。

【 0062 】

50

(実施例2)

(CDRグラフト抗VLA4抗体のデザイン)

CDRグラフト抗VLA4抗体をデザインするためには、マウスHP1/2のどの残基が軽鎖及び重鎖のCDRを含むのかを決定することが必要である。3つの超可変領域(一層変化の少ない可変フレームワーク配列の中にある)が軽鎖と重鎖の両方において見出されている(Wu及びKabatt, 1970 [16]; Kabatt等, 1991 [15])。殆どの場合において、これらの超可変領域は、CDRに対応するが、それを超えて広がってもよい。マウスHP1/2V_H及びV_K鎖のアミノ酸配列を、それぞれ、SEQ ID NO: 6及びSEQ ID NO: 10に示す。マウスHP1/2のCDRは、Kabatt等, 1991 [15]により、他のV_H及びV_K配列との整列によって解明された。これらのマウスHP1/2V_HのCDRは、下記のように、同定され、ここに開示するヒト化V_H配列中で同定された残基に対応している:

CDR1 AA₃₁ ~ AA₃₅

CDR2 AA₅₀ ~ AA₆₆

CDR3 AA₉₀ ~ AA₁₁₀

これらは、それぞれ、Kabattの番号付けにおけるAA₃₁ ~ AA₃₅、AA₅₀ ~ AA₆₅及びAA₉₅ ~ AA₁₀₂に対応している。マウスHP1/2V_KのCDRは、下記のように、同定され、ここに開示するヒト化V_K配列中で同定された残基に対応している:

CDR1 AA₂₄ ~ AA₃₄

CDR2 AA₅₀ ~ AA₅₆

CDR3 AA₈₉ ~ AA₉₇

これらは、Kabattの番号付けにおける同じ番号のアミノ酸に対応している。従って、V_K(V_Hではない)の境界のみがKabattのCDR残基に対応した。HP1/2CDRを受容するために選択したヒトフレームワークは、重鎖及び軽鎖のそれぞれについてNEWM及びREIであった。NEWM及びREI配列は、Kabatt等, 1991 [15]に公開されている。

【0063】

ヒト化方法の初期ステージは、文献から予想され得る最小のフレームワーク変化の基礎的CDRグラフトを含み得る。例えば、Riechmann等, 1988 [4]において、MAb CATH-1Hは、元のマウス抗体の結合効率と類似の結合効率を有する抗体を得るために必要な唯一つのフレームワーク変化を有する直接CDRグラフトを用いて上首尾にヒト化された。このフレームワーク変化は、27位のSerのPheでの置換であった。しかしながら、CDRグラフトによる同じヒト化戦略及び他の特異性を有するヒト化抗体の調製のためにRiechmann等, 1988 [4]により発見された単一フレームワーク変化を用いることは、マウス抗体に匹敵するアフィニティを有する抗体を生成しなかった。かかる場合において、ヒト化方法は、所望の特異性及び効力を達成するために、必然的に、更なる経験的变化を含む。かかる変化は、出発マウス抗体のユニーク構造及び配列に関係し得るが、他の異なる特異性及び配列の抗体に基づいて予想することは出来ない。例えば、SEQ ID NO: 6に示したHP1/2からのマウスV_Hアミノ酸配列の他の公知の配列と比較しての分析は、残基79、94及び113(Kabattの番号付け)が異常であることを示した。勿論、Asp94がCDRコンホメーションにおいて重要であることはありそうなことである。配列決定した殆どのV_H領域は、この位置にアルギニンを有し、それは、CDR3中の比較的保存されたAsp101と塩橋を形成することが出来る。MEWMがArg94を有し、HP1/2のV_HCDR3がAsp101を有するので、通常は生じない塩橋が形成される可能性が残る。94位の負に帯電した残基の存在は非常に異常であり、それ故、推定のヒト化V_H中にAsp94を含むことが決定された。

【0064】

キメラ(マウスV/ヒトIgG1/κ)HP1/2抗体は、(i)その抗原結合能力が

正確なV領域がクローン化されたことを示し、(ii)本発明により調製した種々のヒト化抗体のアッセイにおいて有用な対照として働き得るので有用であり得るが、CDRグラフト構築物の調製の初期ステージにおいて必要な中間体ではない。

【0065】

V_Hについては、完全長のHP1/2V_Hを含むM13クローンを、それぞれV_Hドメインの5'及び3'末端にPstI及びBstEII部位を含むVH1BACK[SEQ ID NO:3]及びVH1FOR[SEQ ID NO:11]を用いて増幅した。増幅DNAをBstEIIで切断し且つPstIで部分的に切断し、完全長DNAを精製して、PstI及びBstEIIで切断してあるM13VHPCR1中にクローン化した(Orlandi等、1989[64])。V_Kについては、完全長のHP1/2V_Kを含むM13クローンを、VK3BACK[SEQ ID NO:12]及びVK1FOR[SEQ ID NO:13]を用いて増幅してPvuII及びBglII部位をそれぞれV_Kドメインの5'及び3'末端に導入した。増幅したDNAをPvuII及びBglIIで切断し、PvuII及びBclIIで切断しておいたM13VKPCR1(Orlandi等、1989[64])中にクローン化した。

10

【0066】

要するに、これらのマウスV_H及びV_K領域の増幅用に用いた5'プライマーは、発現ベクター中にクローニングするのに便利な制限部位を含んでいる。このPCRに用いた3'プライマーは、定常領域からのものであった。可変領域の3'末端の制限部位を、クローン化マウス可変領域遺伝子内に、BstEII又はBglII部位を重鎖及び軽鎖(カッ

20

【0067】

マウスV_H及びV_KDNAを、gpt及びハイグロマイシン耐性遺伝子を含むベクター(例えばOrlandi等、[64]に記載されたpSVgpt及びpSVhyg等)中にクローン化し、適当なヒトIgG1、IgG4若しくはκ定常領域を、例えばTakahashi等、1982[70]、Flanagan及びRabbitts、1982[71]、及びHietter等、1980[72]により記載されたようにして、それぞれ加えた。これらのベクターでミエローマYB2/0を同時トランスフェクトしてミコフェノール酸耐性クローンをキメラIgG/κ抗体の分泌についてELISAによってスクリーニングした。このYB2/0細胞系統は、Kilmartin等、1982[73]により記載されたものであり、American Type Culture Collection(ATCC)メリーランド、Rockville在)から入手することが出来る。ELISA陽性のクローンを広げ、培養培地からプロテインAアフィニティークロマトグラフィーによって抗体を精製した。トランスフェクトした細胞から精製したキメラ抗体を、VLA4抗体活性について実施例7に記載のようにしてアッセイしてマウスHP1/2抗体と等しい効力であることが見出された。

30

【0068】

(実施例3)

(CDR配列の移植及び選択したフレームワーク残基の突然変異誘発)

40

CDRのヒトフレームワーク中への移植を、M13突然変異誘発ベクターを用いて実施した。実施例2で概説したCDR配列を受容するために選択したヒトフレームワークをNEWM(V_H用)及びREI(V_K用)から導いた(各々、M13突然変異誘発ベクター中)。V_H及びV_Kについて用いるM13突然変異誘発ベクターは、それぞれ、M13VHPCR1及びM13VKPCR2であった。M13VKPCR2は、Orlandi等、1989[64]に記載されたように、M13VHPCR1と同一である。但し、バリン(GTG)からグルタミン(GAA)への単一アミノ酸変化が、REI V_Kコード配列のフレームワーク4にある。Orlandi等、1989[64]により記載されたM13VHPCR1は、抗ハプテン(4-ヒドロキシ-3-ニトロフェニルアセチルカプロン酸)抗体から導かれたCDRを有するNEWMフレームワーク配列であるV_H領域に対

50

するコード配列を含むM13である。これらの無関係の V_H CDRを、下記のように、位置指定突然変異導入法によって、HP1/2 V_H から導いたCDRで置換する。M13VHPCR1によりコードされた V_H 領域の配列(DNA及びアミノ酸)をSEQ ID NO: 14及び15として示す。M13VKPCR2は、Orlandi等、[64]により記載されたM13VKPCR1と同様に、抗リゾチーム抗体から導いたCDRを有するN末端修飾REIフレームワーク配列である V_K 領域に対するコード鎖を含むM13である。これらの無関係の V_K CDRを、下記のように、位置指定突然変異導入法によって、HP1/2 V_K から導いたCDRで置換する。M13PCR2によってコードされた V_K 領域の配列(DNA及びアミノ酸)を、SEQ ID NO: 16及び17として示す。

10

【0069】

合成オリゴヌクレオチドを、それぞれNEWM及びREIフレームワークから引き出された短い配列に隣接したHP1/2誘導された V_H 及び V_K CDRを含んで合成し、下記のように、オリゴヌクレオチド位置指定突然変異導入法によってヒトフレームワーク中にグラフトした。ヒト V_H フレームワーク中へのCDRグラフトのために、突然変異導入用オリゴヌクレオチド598[SEQ ID NO: 18]、599[SEQ ID NO: 19]及び600[SEQ ID NO: 20]を用いた。ヒト V_K フレームワーク中へのCDRグラフトのために、突然変異導入用オリゴヌクレオチドは、605[SEQ ID NO: 21]、606[SEQ ID NO: 22]及び607[SEQ ID NO: 23]であった。5 μ gの V_H 又は V_K 一本鎖DNA(M13中)に、2倍モル過剰の各3つの V_H 若しくは V_K リン酸化オリゴヌクレオチドを、M13配列に基づく隣接プライマー、オリゴ10[SEQ ID NO: 24](V_H 用)及びオリゴ385[SEQ ID NO: 25](V_K 用)と共に加えた。プライマーを、70℃まで加熱し、37℃までゆっくりと冷却することによってテンプレートにアニールさせた。このアニールしたDNAを、10mM トリスHCl(pH 8.0)、5mM MgCl₂、10mM DTT、1mM ATP、250 μ M dNTP中で、2.5単位のT7 DNAポリメラーゼ(United States Biochemicals)及び1単位のT4 DNAリガーゼ(Life Technologies)を用いて伸長させ且つライゲーションさせた(50 μ lの反応容積で、16℃にて、1~2時間)。

20

【0070】

新たに伸長させた突然変異導入鎖を、1単位のVent DNAポリメラーゼ(New England Biolabs)及び25pモルのオリゴ11[SEQ ID NO: 26]若しくはオリゴ391[SEQ ID NO: 27](それぞれ、 V_H 若しくは V_K 用)(10mM KCl、10mM (NH₄)₂SO₄、20mM トリスHCl(pH 8.8)、2mM MgSO₄、0.1%トリトンX-100、25 μ M dNTP中)(反応容積50 μ l)を用い且つ、試料を94℃、30秒; 50℃、30秒; 75℃、90秒の30サイクルにかけることによって、優先的に増幅した。

30

【0071】

次いで、標準的PCRを、25pモルのオリゴ10[SEQ ID NO: 24](V_H 用)又はオリゴ385[SEQ ID NO: 25](V_K 用)を加えて、10熱サイクルを行なうことによって実施した。生成物DNAを、HindIII及びBamHIで消化してM13mp19中にクローン化した。一本鎖DNAを、個々のプラークから調製し、配列決定して3つの突然変異体を同定した。

40

【0072】

その結果生成したこのDNA配列を有するステージ1の V_H 構築物及びその翻訳生成物を、それぞれ、SEQ ID NO: 28及びSEQ ID NO: 29として示す。このCDRグラフトに加えて、ステージ1の V_H 構築物は、フレームワーク変化を含んだ。CDR1の直前で、配列の1ブロックをマウス残基Phe27、Asn28、Ile29及びLys30に変更した(SEQ ID NO: 29のAA₂₇~AA₃₀をマウス V_H 配列[SEQ ID NO: 6]のそれと比較されたい)。これは、ラットのCAM

50

P A T H 1 - H 抗体のヒト化 (R i e c h m a n n 等、 1 9 8 8 [4]) において置換された P h e - 2 7 を含んだが、次いで、マウス配列において見出される次の 3 残基を代用している。これらの 4 つの残基は、名目上は C D R 1 に含まれない (即ち、 K a b a t の意味において超可変ではない) が、構造的には、それらは、C D R 1 ループの一部 (即ち、構造的ループ残基) であり、従って、経験的には、C D R 1 の一部として含まれる。更に、残基 9 4 における A r g から A s p への変更は、実施例 2 で論じた理論的根拠に基づいて行なった。C D R グラフトしたステージ 1 フレームワーク配列と N E W M フレームワークを比較する整列を表 I に示す。生成したこの D N A 配列を有する V K 1 (D Q L) 構築物及びその翻訳生成物をそれぞれ S E Q I D N O : 3 0 及び S E Q I D N O : 3 1 に示す。C D R グラフトした V K 1 (D Q L) フレームワーク配列と R E I フレームワークを比較する整列を表 I I に示す。

10

【 0 0 7 3 】

C D R 置換した V_H (ステージ 1) 及び V_K (V K 1) 遺伝子を O r l a n d i 等、 1 9 8 9 [6 4] による発現ベクター中にクローン化して p H u V H H u I g G 1、p H u V H H u I g G 4 及び p H u V K H u C K と称するプラスミッドを生成した。p H u V H H u I g G 1 及び p H u V H H u I g G 4 について、ステージ 1 V_H 遺伝子を、I g 重鎖プロモーター、適当なスプライス部位及び単一ペプチド配列と共に、H i n d I I I 及び B a m H I での消化によって、M 1 3 突然変異誘発ベクターから切り出し、O r l a n d i 等 [6 4] により記載された p S v g p t 等の発現ベクター中にクローン化した (該ベクターは、マウス I g 重鎖エンハンサー、S V 4 0 プロモーター、哺乳動物細胞中での選択のための g p t 遺伝子並びに大腸菌における複製及び選択のための遺伝子を含む)。次いで、T a k a h a s h i 等、 1 9 8 2 [7 0] に記載されたヒト I g G 1 定常領域を B a m H I 断片として加えた。或は、F l a n a g a n 及び R a b b i t t s , 1 9 8 2 [7 1] により記載されたヒト I g G 4 構築物領域を加えた。p H u V K H u C K プラスミッドの、O r l a n d i 等 [6 4] に記載された p S V h y g 等の発現ベクターを用いる構築は、本質的に、重鎖発現ベクターのそれと同じであった (但し、選択用の g p t 遺伝子をハイグロマイシン耐性遺伝子 (h y g) で置換し、H i e t e r , 1 9 8 0 [7 2] に記載されたヒトカッパー鎖定常領域を加えた)。これらのベクターでラットミエローマ Y B 2 / 0 を同時トランスフェクトし、ミコフェノール酸耐性クローンをヒト I g G / κ 抗体の分泌について E L I S A によってスクリーニングした。Y B 2 / 0 細胞系統は、K i l m a r t i n 等、 1 9 8 2 [7 3] により記載されたものであり、A m e r i c a n T y p e C u l t u r e C o l l e c t i o n (メリーランド、R o c k v i l l e 在、A T C C) から入手することが出来る。E L I S A 陽性クローンを増大させて、抗体を培地からプロテイン A アフィニティークロマトグラフィーにより精製した。トランスフェクトした細胞を、実施例 7 に記載のようにして、抗 V L A 4 抗体活性についてアッセイする。

20

30

【 0 0 7 4 】

(実施例 4)

(C D R グラフト抗体の修飾)

上記の実施例 2 及び 3 に記載のような抗 V L A 4 抗体を生成するためのデザイン及び調製のステージの次に、更なる経験的修飾のステージを用いて上首尾にヒト化組換え抗 V L A 4 抗体を調製した。実施例 3 に記載のステージ 1 修飾は、我々の一次配列分析及び上首尾に抗体をヒト化する試みにおける経験に基づくものであった。ステージ 2 と称する次の修飾は、部分的に我々の 3 D モデリングデータの分析に基づく経験的なものであった。V_H 領域について、ステージ 3 と称する更なる修飾は、アフィニティーその他の抗体特性の任意の残存する欠点を修正するために経験的に為されたいわゆる「スキヤニング」修飾であった。これらの幾つかのステージで為された修飾は、ヒト化抗 V L A 4 抗体のアフィニティーその他の所望の特性の最適化を目的とする種々のアミノ酸ブロックの経験的変更であった。種々のステージで為された修飾が何れも所望の特性を有する抗体を生じた訳ではない。

40

50

【 0 0 7 5 】

(1 . 更なる重鎖修飾)

(a . ステージ 2 修飾)

V_H フレームワーク内の更なる経験的変更を、コンピューターモデリングを利用して行ない、その DNA 配列を有するステージ 2 構築物及びその翻訳生成物を生成した (それぞれ、SEQ ID NO : 3 2 及び SEQ ID NO : 3 3 に示す) 。ステージ 1 V_H 領域のコンピューターモデリングを用いて、我々は、ステージ 2 についてのフレームワーク内の単一変更 (即ち、位置 7 5 の L y s (K a b a t の番号付け、即ち SEQ ID NO : 3 3 中の 7 6 位) を S e r で代用する) を為すことを決定した。この決定は、部分的に、L y s - 7 5 が C D R 1 に位置してそのコンホメーションを変え得る可能性に基づくものであった。実施例 3 で記載したステージ 1 C D R グラフト H u V H を含む M 1 3 ベクターを、2 ステップ P C R 指示突然変異誘発のためのテンプレートとして用いた (H o 等、1 9 8 9 [7 4] により記載された重複 / 伸長法を使用) 。第 1 ステップにおいて、2 つの別々の P C R をセットアップした。1 つは、末端プライマーオリゴ 1 0 [SEQ ID NO : 2 4] 及び所望の突然変異を含むプライマー 6 8 4 [SEQ ID NO : 3 4] を用い、他は、反対の末端プライマーオリゴ 1 1 [SEQ ID NO : 2 6] 及びプライマー 6 8 3 [SEQ ID NO : 3 5] (これは、第 1 の突然変異誘発プライマーと相補的である) を用いた。この P C R の最初の対の増幅生成物を、次いで、一緒に混合して、第 2 P C R ステップを、末端プライマーオリゴ 1 0 及び 1 1 (それぞれ、SEQ ID NO : 2 4 及び SEQ ID NO : 2 6) のみを用いて行なった。この P C R の突然変異誘発した増幅生成物を、次いで、M 1 3 m p 1 9 中にクローン化して配列決定し、L y s から S e r への変化 (ステージ 2 又は「 S 突然変異体」) を有する突然変異体を同定した。

10

20

【 0 0 7 6 】

これは、H P 1 / 2 から導かれたヒト化重鎖における臨界的变化であることが判明した (実施例 7 参照) 。しかしながら、本発明によるヒト化組換え抗 V L A 4 抗体の調製におけるこの臨界的变化は、他のヒト化抗体の調製において同様に臨界的である訳ではなかった。特に、上記と同じ合理的解釈及び分析を用いて、その場所における変化は、2 種の異なる種の抗体のヒト化における有利な変化であることは見出されなかった。C D R グラフトしたステージ 2 フレームワーク配列の整列を、N E W M 並びにステージ 1 配列と比較して、表 I に示す。

30

【 0 0 7 7 】

(b . ステージ 3 修飾)

更なる経験的変更を、ステージ 3 構築物として作成した。ステージ 3 において、主として経験的理由のために、一連の 5 つの異なるアミノ酸のブロック変更を作成して効力を改善することを試みた。これらの構築物は、S T A W、K A I T A S、S S E、K R S 及び A S と称する。すべては、ステージ 2 で変更した 7 5 位の S e r (K a b a t の番号付け) [SEQ ID NO : 3 5 の 7 6 位] 及び上記の他の変更を含む。これらの構築物の各々を、2 ステップ P C R 指示突然変異誘発により、ステージ 2 の S e r 突然変異体について上述した H o 等、1 9 8 9 [7 4] の重複 / 発現法を用いて調製した。S T A W について、更なる変更は、7 7 位の G l n から T h r、7 8 位の P h e から A l a 及び 7 9 位の S e r から T r p (K a b a t の番号付け) であった。これらの変更は、末端プライマーオリゴ 1 0 [SEQ ID NO : 2 4] 及び 1 1 [SEQ ID NO : 2 6] を突然変異誘発プライマー 7 1 3 [SEQ ID NO : 3 6] 及び 7 1 6 [SEQ ID NO : 3 7] と共に用いて達成した。S T A W V_H DNA 配列及びその翻訳アミノ酸配列を、それぞれ、SEQ ID NO : 3 8 及び SEQ ID NO : 3 9 に示す。更なる変更 A r g から L y s (6 6 位)、V a l から A l a (6 7 位)、M e t から I l e (6 9 位)、L e u から T h r (7 0 位) 及び V a l から A l a (7 1 位) (K a b a t の番号付け) を有する K A I T A S を、オリゴ 1 0 [SEQ ID NO : 2 4] 及び 1 1 [SEQ ID NO : 2 6] をオリゴ 7 0 6 [SEQ ID NO : 4 0] 及び 7

40

50

07 [SEQ ID NO: 41] と共に用いて調製した。K A I T A S V_H DNA 配列及びその翻訳アミノ酸配列を、それぞれ、SEQ ID NO: 42 及び SEQ ID NO: 43 に示す。S S E は、更なる変更 A l a から S e r (84 位) 及び A l a から G l u (85 位) (K a b a t の番号付け) を有した (オリゴ10 及び11 をオリゴ768 [SEQ ID NO: 44] 及び769 [SEQ ID NO: 45] と共に用いて達成)。S S E V_H DNA 配列及びその翻訳アミノ酸配列を、それぞれ、SEQ ID NO: 46 及び SEQ ID NO: 47 に示す。K R S は、更なる変更 A r g から L y s (38 位) 及び P r o から A r g (40 位) (K a b a t の番号付け) を有した (オリゴ10 [SEQ ID NO: 24] 及び11 [SEQ ID NO: 26] 並びにオリゴ704 [SEQ ID NO: 48] 及び705 [SEQ ID NO: 49] の使用による)。K R S V_H DNA 配列及びその翻訳アミノ酸配列を、それぞれ、SEQ ID NO: 50 及び SEQ ID NO: 51 に示す。A S は、オリゴ10 [SEQ ID NO: 24] 及び11 [SEQ ID NO: 26] 並びにオリゴ745 [SEQ ID NO: 52] 及び746 [SEQ ID NO: 53] に由来する更なる変更 V a l から A l a を24 位 (K a b a t の番号付け) に有した。A S V_H DNA 配列及びその翻訳アミノ酸配列を、それぞれ、SEQ ID NO: 54 及び SEQ ID NO: 55 に示す。C D R グラフトしたステージ3 フレームワーク配列の、N E W M、ステージ0 (下記参照)、ステージ1 及びステージ2 配列との整列を表 I に示す。重要なことに、実施例7 に示したように、S T A W 及び A S ヒト化抗体の効力は改善されたが、他方、K A I T A S 及び K R S ヒト化抗体はより良い効力を有しなかった。これは、予想しえ

10

20

【0078】

(c. 逆 (ステージ0) 修飾)

ステージ1 を生成するために作成した28 ~ 30 位 (N I K) 及び94 位 (D) の2 ブロックの変更を、28 ~ 30 位 (T F S)、94 位 (R) 又は27 ~ 30 位 (T F S) と94 位 (R) の両方において突然変異させて N E W M に戻した。これらの構築物は、それぞれ、ステージ0 - A、0 - B 及び0 - C と称した。これらの構築物の各々を、2 ステップ P C R 指示突然変異誘発により、ステージ2 の S e r 突然変異体について上述した H o 等、1989 [74] の重複 / 伸長法を用いて調製した。ステージ0 - A 及び0 - B は、ステージ1 から生成し; ステージ0 - C は、ステージ0 - A から下記のようにして生成した。ステージ0 - A について、変更は、94 位の A s p から A r g であった。この変更は、末端プライマーオリゴ10 [SEQ ID NO: 24] 及び11 [SEQ ID NO: 26] を突然変異誘発プライマー915 [SEQ ID NO: 56] 及び917 [SEQ ID NO: 57] と共に用いて達成した。ステージ0 - B について、変更は、28 ~ 30 位の A s n - I l e - L y s から T h r - P h e - S e r であった。これらの変更は、末端プライマー10 [SEQ ID NO: 24] 及び11 [SEQ ID NO: 26] を突然変異誘発プライマー918 [SEQ ID NO: 58] 及び919 [SEQ ID NO: 59] と共に用いることによって達成した。最後に、ステージ0 - C については、変更は、ステージ0 - A での94 位の A s p から A r g への変更に加えて、28 ~ 30 位の A s n - I l e - L y s から T h r - P h e - S e r であった。これらの変更は、ステージ0 - B 構築物について上述したのと同じ末端プライマー及び突然変異誘発プライマーを用いて達成した。

30

40

【0079】

【表 1】

表 I
重 鎖 配 列

FR1

NEWM ?VQLXXSGPGLVRPSQTLSLTCTVSGSTFS

ヒト化抗-VLA4:

ステージ O-A	QVQLQE.....FNIK	10
ステージ O-B	QVQLQE.....F...	
ステージ O-C	QVQLQE.....F...	
ステージ 1	QVQLQE.....FNIK	
ステージ 2	QVQLQE.....FNIK	
ステージ 3	(STAW) QVQLQE.....FNIK	
	(KAITAS) QVQLQE.....FNIK	
	(SSE) QVQLQE.....FNIK	
	(KRS) QVQLQE.....FNIK	
	(AS) QVQLQE.....A..FNIK	

FR2

NEWM WVRQPPGRGLEWIG

ヒト化抗-VLA4:

ステージ O-A		
ステージ O-B		
ステージ O-C		
ステージ 1		
ステージ 2		
ステージ 3	(STAW)	30
	(KAITAS)	
	(SSE)	
	(KRS) ..K.R.....	
	(AS)	

表 I (続き)

FR3

NEWM

RVIMLVDTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYYCAR

ヒト化抗-VLA4:

ステージ O-A	
ステージ O-B	D
ステージ O-C	
ステージ 1	D
ステージ 2	S.....D
ステージ 3 (STAW)	S.TAW.....D
(KAITAS)	KA.ITA...S.....D
(SSE)	S.....SE.....D
(KRS)	S.....D
(AS)	S.....D

10

FR4

NEWM

WGQGS�VTVSS

ヒト化抗-VLA4:

ステージ O-A	TT.....
ステージ O-B	TT.....
ステージ O-C	TT.....
ステージ 1	TT.....
ステージ 2	TT.....
ステージ 3 (STAW)	TT.....
(KAITAS)	TT.....
(SSE)	TT.....
(KRS)	TT.....
(AS)	TT.....

20

30

注：XはG1xを意味し、?はQ若しくはEを意味する。

(2 . 軽鎖の修飾)

我々の経験において、ヒト化軽鎖は、一般に、僅かの修飾（それが必要である場合でも）しか必要としない。しかしながら、ヒト化抗VLA4抗体の調製において、HP1/2の軽鎖は幾つかの経験的変更を必要とすることが明らかとなった。例えば、マウス軽鎖を有するステージ2構築物（Ser突然変異体）のヒト化重鎖は、マウスHP1/2より約2.5倍効力が低かったが、他方、ヒト化軽鎖を有する同じヒト化重鎖は、約4倍効力が低かった。ステージ1ヒト化V_K構築物は、VK1(DQL)と称し、そのDNA配列及びその翻訳アミノ酸配列を、それぞれ、SEQ ID NO:30及びSEQ ID NO:31に示す。DQL突然変異は、V_K領域の初期クローニングにおいて用いたPCRプライマーから生じた（実施例1参照）。別法をこの軽鎖に行なって、2つの突然変異体SVMDY及びDQMDY（それぞれ、VK2及びVK3）を生成した。SVMDY突然変異体は、DQL配列から、DY配列については、オリゴ10[SEQ ID NO:24]及び11[SEQ ID NO:26]を用いて、SVM配列については、オリゴ697[SEQ ID NO:60]及び698[SEQ ID NO:61]を用いて調製した。VK2(SVMDY)DNA配列及びその翻訳アミノ酸配列を、それぞれ、SE

40

50

Q I D N O : 6 2 及び S E Q I D N O : 6 3 に示す。D Q M D Y 配列は、末端プライマー 1 0 [S E Q I D N O : 2 4] 及び 1 1 [S E Q I D N O : 2 6] を突然変異誘発プライマー 8 0 3 [S E Q I D N O : 6 4] 及び 8 0 4 [S E Q I D N O : 6 5] と共に用い、S V M D Y 配列をテンプレートとして用いる 2 ステップ P C R 指示突然変異誘発によって、元の R E I フレームワーク配列に戻した。V K 3 (D Q M D Y) D N A 配列及びその翻訳アミノ酸配列を、それぞれ、S E Q I D N O : 6 6 及び S E Q I D N O : 6 7 に示す。アミノ末端における変更 (S V M 対 D Q M) は、無関係であり、マウス軽鎖のアミノ末端に関係する。他の 2 つの変更 D 及び Y を行なって効力を改善し、実際、実施例 7 に記載のように、そのようにした。C D R グラフト D Q L (V K 1) 、 S V M D Y (V K 2) 及び D Q M D Y (V K 3) フレームワーク配列の R E I 配列と比較した整列を表 I I に示す。 10

【 0 0 8 0 】

A S 突然変異体の重鎖を改善した軽鎖 (S V M D Y) と結合させた場合、その結果生成するヒト化抗体は、表 I I I に示すようにマウス H P 1 / 2 と等しい効力であった。

【 0 0 8 1 】

(3 . 別のヒト化 V_H 及び V_K 領域)

或は、H P 1 / 2 V_H 領域 [S E Q I D N O : 5] に基づくヒト化 V_H 領域配列を調製することが出来る。かかる選択肢の一つは、V_H - P D L N と称するものである。P D L N V_H の D N A 配列及びその翻訳アミノ酸配列を、それぞれ、S E Q I D N O : 6 8 及び S E Q I D N O : 6 9 に示す。 20

【 0 0 8 2 】

更に、別の H P 1 / 2 V_K 領域 [S E Q I D N O : 9] に基づくヒト化 V_K 領域配列を調製することが出来る。かかる別の V_K 配列の一つは、V_K - P D L N と称するものであり、それとそれの翻訳アミノ酸配列を、それぞれ、S E Q I D N O : 7 0 及び S E Q I D N O : 7 1 に示す。

【 0 0 8 3 】

ヒト化 V_H - P D L N を、集合すると完全なヒト化可変領域にわたる 1 2 オリゴヌクレオチドをライゲーションし、正確な配列を有する構築物についてスクリーニングすることによって調製した。そのプロトコールを下記に一層詳細に説明する。

【 0 0 8 4 】

オリゴヌクレオチド 3 7 0 - 1 1 9 から 3 7 0 - 1 3 0 (それぞれ、S E Q I D N O : 7 2 から S E Q I D N O : 8 3) (各 2 0 p モル) を乾燥し、別々に、1 m M A T P 及び 1 μ l T 4 ポリヌクレオチドキナーゼ (1 0 U / μ l) を含む 2 0 μ l の 1 × キナーゼ緩衝液に再懸濁した。キナーゼ反応混合物を、1 時間 3 7 ° でインキュベートした。反応を、7 0 ° で 5 分間インキュベートすることによって停止させた。 30

【 0 0 8 5 】

キナーゼ処理したオリゴヌクレオチドを、互いに合わせて (全量 2 4 0 μ l) 、2 6 μ l の 1 0 m M A T P 及び 2 μ l T 4 D N A リガーゼ (1 0 U / μ l) を用いて互いにライゲーションし、その反応混合物を室温で 6 時間インキュベートした。このライゲーション反応混合物を、T E 緩衝液で飽和したフェノール : クロロホルム (1 : 1) で抽出し、次いで、エタノール沈澱して 7 0 % エタノールで 5 回洗った。 40

【 0 0 8 6 】

乾燥して洗ったエタノール沈澱を、5 0 μ l の 1 × 1 5 0 m M 制限酵素緩衝液 (1 0 × 1 5 0 m M 制限酵素緩衝液は、1 0 0 m M トリス - H C l (p H 8 . 0) 、1 . 5 M N a C l 、1 0 0 m M M g C l₂ 、1 m g / m l ゼラチン、1 0 m M ジチオスレイトールである) に再懸濁して、制限酵素 B s t E 2 及び P s t I と共に 1 6 時間 3 7 ° でインキュベートした。消化生成物を、2 % アガロースゲルを通して電気泳動し、3 3 0 b p に対応するバンドを切り出した。その断片を G E N E C L E A N I I (登録商標) を用いて溶出し、溶出物をエタノール沈澱させた。このエタノール沈澱を 2 0 μ l の T E 緩衝液に再懸濁した。 50

【0087】

次に、この330bp断片を、ベクターpLCB7中にライゲーションした（該ベクターは、ライゲーション用にPstI及びBstE2で消化し、仔ウシアルカリホスファターゼで5'末端を脱リン酸化し、低融点アガロース（LMA）ゲル上で分画し、そして、pLCB7/PstI/BstE2LMA断片を切り出すことにより調製したものである）。次いで、pLCB7LMA断片をヒト化V_H領域をコードする330bpオリゴヌクレオチド断片にT4DNAリガーゼを用いてライゲーションした。

【0088】

このライゲーション混合物を用いて大腸菌JA221（Iq）をトランスフォームしてアンピシリン耐性にした。コロニーを育成させてミニプレップDNAを調製した。組換えプラスミッドを、約413bpのNotI/BstE2断片の存在についてスクリーニングした。DNA配列分析は、ベクターpMDR1023を、デザインしたヒト化V_H-PD LN配列を有するとして同定した。

【0089】

ヒト化V_K-PD LNを、集まると完全なヒト化V_K-PD LN可変領域にわたる12オリゴヌクレオチドをライゲーションし、正確な配列を有する構築物についてスクリーニングすることによって調製した。そのプロトコルを、下記に一層詳細に説明する。

【0090】

オリゴヌクレオチド370-131から370-142（それぞれ、SEQ ID NO: 84からSEQ ID NO: 5）（各20pモル）を乾燥し、別々に、1mM ATP及び1μl T4ポリヌクレオチドキナーゼ（10単位/μl）を含む20μlの1×キナーゼ緩衝液に再懸濁した。このキナーゼ反応混合物を、37℃で1時間インキュベートした。反応を、70℃で5分間インキュベートすることによって停止した。

【0091】

キナーゼ処理したオリゴヌクレオチドを、互いに合わせて（全量240μl）、26μlの10mM ATP及び2μlのT4 DNAリガーゼ（10単位/μl）を用いて互いにライゲーションし、そして反応混合物を室温で6時間インキュベートした。ライゲーション反応混合物を、TE緩衝液で飽和したフェノール：クロロホルム（1：1）で抽出し、次いで、エタノール沈殿して70%エタノールで5回洗った。

【0092】

乾燥して洗ったエタノール沈澱を、40μlのTEに再懸濁し、次いで、2%アガロースゲルを通して電気泳動して、380bpに対応するバンドを切り出した。その断片をGENECLEAN II（登録商標）を用いて溶出し、溶出物をエタノール沈殿させた。このエタノール沈澱を、20μlのTE緩衝液に再懸濁した。

【0093】

次に、この380bp断片を、ベクターpNN03中にライゲーションした（該ベクターは、ライゲーション用に、HindIII及びBamHIで線状化し、仔ウシアルカリホスファターゼで5'末端を脱リン酸化し、低融点アガロースゲル上で分画して、線状化pNN03に対応するバンド（2.7kb）を切り出すことにより調製したものである）。この線状化した脱リン酸化pNN03を、次いで、ヒト化V_K領域をコードする380bpのオリゴヌクレオチド断片にT4 DNAリガーゼを用いてライゲーションした。

【0094】

このライゲーション混合物を用いて大腸菌JA221（Iq）をトランスフォームしてアンピシリン耐性にした。コロニーを育成させて、ミニプレップDNAを調製した。組換えプラスミッドを、可変領域断片の存在についてスクリーニングした。DNA配列分析は、ベクターpMDR1025を、デザインしたヒト化V_K-PD LN配列を有するとして同定した。

【0095】

V_H-PD LNを含む重鎖及びV_K-PD LNを含む軽鎖を有する抗体を、実施例7に従って、効力についてアッセイしたところ、生成したヒト化抗体は、マウスHP1/2抗

10

20

30

40

50

体とほぼ等しい効力であった。

【 0 0 9 6 】

【 表 2 】

表 II

軽鎖配列

FR1

REI	ヒト化抗-VLA4:	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC	
構築物 VK1	(DQL)	...L.....	10
構築物 VK2	(SVMDY)	S.VM.....	
構築物 VK3	(DQMDY)	D.QM.....	

FR2

REI	ヒト化抗-VLA4:	WYQQTPGKAPKLLIY
VK1	(DQL)	...K.....
VK2	(SVMDY)	...K.....
VK3	(DQMDY)	...K.....

FR3

REI	ヒト化抗-VLA4:	GVPSRFSGSGSGTDYTFITISLQPEDATYYC
VK1	(DQL)	F.....
VK2	(SVMDY)	...D.....Y...F.....
VK3	(DQMDY)	...D.....Y...F.....

FR4

REI	ヒト化抗-VLA4:	FGQGTKLQIT
VK1	(DQL)	VE.K
VK2	(SVMDY)	VE.K
VK3	(DQMDY)	VE.K

(実施例 5)

(組換え抗 V L A 4 抗体の発現)

実施例 1 ~ 4 によって調製した V_H 領域配列及び V_K 領域配列の各々を、定常領域配列と共に、発現ベクター中にトランスファーし、それらのベクターで、好ましくは電気穿孔法によって、哺乳動物細胞をトランスフェクトする。これらの重鎖及び軽鎖配列は、別個のベクター上にコードされて細胞に同時トランスフェクトしてもよいし、或は、重鎖及び軽鎖配列を単一ベクターでコードしてトランスフェクトしてもよい。かかる単一ベクターは、3つの発現カセット(1つはIg重鎖用、1つはIg軽鎖用、そして1つは選択マーカである)を含む。抗体の発現レベルを、トランスフェクション後、下記のように又は実施例 7 に記載のようにして測定する。

【 0 0 9 7 】

V_H 及び V_K 領域配列を、実施例 4 に記載のようにして、種々のクローニングベクター及び発現ベクター中に挿入した。抗 V L A 4 V_H 領域配列について、かかる配列 [実施例 1 ~ 4 に記載のもの] を含むプラスミッドを P s t I 及び B s t E 2 で消化した。P s t I 及び B s t E 2 での消化後のプラスミッド DNA を脱リン酸化して 2 % アガロースゲルを通して電気泳動した。ライゲーション用のバンドを切り出し、DNA を、G E N E C L E A N (商標) 技術 (カリフォルニア、L a J o l l a 在、B i o 1 0 1 I n c .) を用いて溶出し、エタノール沈殿させ、20 µ l の T E 緩衝液 (10 m M トリス - H C l 、 1 m M E D T A) 中に再懸濁した。次いで、10 µ l の再懸濁した DNA を、P s t I

10

20

30

40

50

/ B s t E 2 消化した V_H 領域配列とのライゲーション用に用いた。

【0098】

このライゲーション混合物を用いて大腸菌 K 1 2 J A 2 2 1 (I q) をトランスフォームしてアンピシリン耐性にした。大腸菌 K 1 2 J A 2 2 1 (I q) 細胞は、A T C C に寄託してある (受託番号 6 8 8 4 5) 。組換え体コロニーを、 V_H 挿入物の存在についてスクリーニングした。かかる断片を含むプラスミッドの幾つかを配列決定した。これらの V_H 含有プラスミッドを、p B A G 1 8 4 (V_H - S T A W) 、 p B A G 1 8 3 (V_H - K A I T A S) 、 p B A G 1 8 5 (V_H - K R S) 、 p B A G 2 0 7 (V_H - S S E) 及び p B A G 1 9 5 (V_H - A S) と呼び、大腸菌 K 1 2 J 2 2 1 (I q) にて、A T C C に、受託番号、それぞれ、6 9 1 1 0 、 6 9 1 0 9 、 6 9 1 1 1 、 6 9 1 1 6 及び 6 9 1 1 3 として寄託した。別の V_H - P D L N 領域を含むプラスミッドは、p M D R 1 0 2 3 と称した。 10

【0099】

V_K 領域配列について、これらの配列をコードする DNA を、P C R を利用して、クローニング及びトランスフォーメーションのために増幅した。増幅の前に、2 0 p モルの各 V_K 鎖プライマーを、従来のプロトコールに従って、T 4 ポリヌクレオチドキナーゼと 3 7 で 6 0 分間インキュベートすることによってキナーゼ処理した。キナーゼ反応を、7 0 に 1 0 分間加熱することにより停止させた。

【0100】

これらの P C R 反応物は、それぞれ、1 0 μ l の 1 0 $\times$ P C R 緩衝液を含んだ (1 0 $\times$ P C R 緩衝液は、1 0 0 m M トリス / H C l (p H 8 . 3) 、 5 0 0 m M K C l 、 1 5 m M M g C l ₂ 、 0 . 0 1 % ゼラチン、各 2 0 p モルの適当なキナーゼ処理したプライマー、2 0 μ l の c D N A 、 0 . 5 μ l の T a q ポリメラーゼ (5 単位 / μ l 、 P e r k i n E l m e r - C e t u s 製) 及び 4 9 . 5 μ l の H ₂ O である) 。 P C R 条件は、9 4 で 1 分間 ; 4 0 (重鎖用 P C R) 若しくは 5 5 (軽鎖用 P C R) で 2 分間 ; 及び 7 2 で 2 分間のインキュベーションの 3 0 サイクルであった。V K 1 - D Q L について、プライマーは、3 7 0 - 2 4 7 [S E Q I D N O : 9 6] 及び 3 7 0 - 2 1 0 [S E Q I D N O : 9 7] 。 V K 2 - S V M D Y について、プライマーは、3 7 0 - 2 6 9 [S E Q I D N O : 9 8] 及び 3 7 0 - 2 1 0 [S E Q I D N O : 9 7] であった。V K 3 - D Q M D Y について、プライマーは、3 7 0 - 2 6 8 [S E Q I D N O : 9 9] 及び 3 7 0 - 2 1 0 [S E Q I D N O : 9 7] であった。 20 30

【0101】

これらの反応混合物を、2 % アガロースゲルを通して電気泳動し、軽鎖可変領域の予想されるサイズ (~ 3 3 0 b p) に対応するバンドを A g e I 及び B a m H I を用いて切り出した。これらのバンド中の DNA を、G E N E C L E A N (商標) 技術 (カリフォルニア、L a J o l l a 在、B i o 1 0 1 I n c .) を用いて溶出し、エタノール沈澱させて、続いて、各々を 2 0 μ l の T E 緩衝液 (1 0 m M トリス - H C l 、 1 m M N a ₂ E D T A) に再懸濁した。

【0102】

DNA ポリメラーゼのクレノー断片 (N e w E n g l a n d B i o l a b s , 5 単位 / μ l) (1 μ l) を、1 $\times$ ライゲーション緩衝液 (1 0 $\times$ ライゲーション緩衝液は、0 . 5 M トリス / H C l (p H 7 . 5) 、 1 0 0 m M M g C l ₂ 及び 4 0 m M D T T) 及び 0 . 1 2 5 m M の各 d X T P を含む 2 5 μ l の反応物容積中の精製した P C R 断片に加え、この反応物を室温で 1 5 分間インキュベートした。反応を、7 0 に 5 分間インキュベートすることにより停止させ、次いで、氷上に貯蔵した。 40

【0103】

各 P C R 反応からの断片を、p N N 0 3 等のプラスミッド又は p N J 0 3 から誘導したプラスミッド例えば p L C B 7 等にライゲーションする (これらは、前以て E c o R V により線状化し、脱リン酸化して低融点アガロースを通して分画しておく) 。かかる p N N 0 3 及び p L C B 7 を含むプラスミッドは、同時係属中の及び同時譲渡された (B u r k 50

ly等、米国特許第07/916,098号(1992年7月24日出願)[75])に記載されている。

【0104】

このライゲーション混合物を用いて大腸菌K12JA221(Iq)をトランスフォームしてアンピシリン耐性にした。大腸菌K12JA221(Iq)細胞は、American Type Culture Collectionに寄託されている(受託番号68845)。組換え体コロニーを、V_K挿入物の存在についてスクリーニングした。かかる断片を含むプラスミッドの幾つかを配列決定した。これらのV_K含有プラスミッドをpBAG190(VK1-DQL)、pBAG198(VK2-SVMDY)及びpBAG197(VK3-DQMDY)と呼び、大腸菌K12JA221(Iq)細胞にて、それぞれ、受託番号69112、69115及び69114としてATCCに寄託した。別のV_K(PDLN)領域を含むプラスミッドは、pMDR1025と称した。

10

【0105】

一連の実験において、組換え抗VLA4重鎖及び軽鎖をコードする発現ベクターを電気穿孔法によるトランスフェクションに用い、次いで、細胞を48時間培養する。48時間の培養の後に、これらの細胞を、³⁵S-システインを用いて一晩放射性標識し、次いで、それらの細胞の抽出物及び調整した培地をプロテインA-セファロースと共にインキュベートすることによって免疫沈降させる。プロテインA-セファロースをSDS-PAGEロード用緩衝液で洗い、結合した蛋白質を溶出する。これらの試料を、還元条件下の10%SDS-PAGE電気泳動により分析する。この方法において、軽鎖の発現は、重鎖と結合した結果としてのみ検出される。10%ゲルで可視化したときの、重鎖及び軽鎖の予想サイズは、それぞれ、50kD及び25kDである。

20

【0106】

実施例1~4に記載のようにして調製した組換え抗VLA4抗体分子は、種々の哺乳動物細胞系統において安定に発現されるので、組換え抗体遺伝子を、Ig遺伝子プロモーター及びエンハンサーの制御下で非分泌性ミエローマ若しくはハイブリドーマにて発現させ、或は、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞等の非リンパ様細胞にて発現させることは可能である(DHFR選択を用いるベクター増幅と共に)。最近、Bebbington等、1992[76]は、グルタミンシンテターゼ遺伝子を増幅マーカーとして用いるミエローマ細胞からの組換え抗体の高レベル発現のための方法を記載した。このGS発現系は、本発明の組換え抗VLA4抗体分子の生成のために最も好適なものである。組換え抗体のGS発現のための方法、hCMVプロモーターを有するベクター及びhCMV-MIE遺伝子含有細胞系統(最も好ましくは、NSO)に由来する5'非翻訳配列を有するベクター及び培地は、Bebbington等、1992[76]、WO86/05807[77]、WO87/04462[78]、WO89/01036[79]及びWO89/10404[80]に詳細に記載されている。

30

【0107】

これらの刊行物の教示に従って、NSO細胞を、VH-AS領域配列[SEQ ID NO:54]を有する重鎖配列及びVK-SVMDY配列[SEQ ID NO:66]を有する軽鎖配列と共にトランスフェクトして、マウスHP1/2抗体に匹敵する高い効力を有するヒト化組換え抗VLA4抗体を分泌する安定な細胞系統を得た。この細胞系統を、1992年11月3日に、ATCCに寄託して、受託番号CRL11175を付与された。このAS/SVMDYヒト化抗体は、少なくとも、マウスのHP1/2抗体と効力が等しいか、恐らくは一層高い効力を有する。

40

【0108】

(実施例6)

(アッセイ用調整培地からのMAbの精製)

最大結合若しくは最大阻害の半分(half-maximal)の正確な値を得るためには、濃度既知の精製抗体のストック溶液が必要である。関心のある抗体を分泌する安定な細胞系統を作成して、ヒト化組換え抗VLA4抗体を調整培地から慣用のプロテインA

50

クロマトグラフィーを用いて精製した。精製した抗体の濃度を、それらの280nmでの吸光度係数により評価した（これは、抗体について十分確立している）。

【0109】

ヒト化抗VLA4抗体を産生する細胞系統をローラーボトル中で、10%ウシ胎児血清を含むダルベッコ改変イーグル培地にて生育させる。調整培地の2リットルバッチを各精製行程用に用いる。細胞を、RC-3B調製用遠心分離機（4K、30分、H4000ローター）での遠心分離によって培地から取り出し、上清を、先ず、0.45μmメンブレンを通して、次いで、0.22μmメンブレンを通して濾過する。この培地を、処理することが出来るまで4に貯蔵する。

【0110】

2リットルの調整培地を、S1Y30（YM30）Diafloカートリッジを取り付けたらせん式限外濾過ユニット（マサチューセッツ、Danvers, Cherry Hill Drive在、Amicon, Corp.）にて、220mlまで濃縮する。濃縮物を、400mlのプロテインA結合緩衝液（3M NaCl、1.5Mグリシン、pH8.9）で希釈し、再び、200mlまで濃縮する。その濃縮物を、バッチ式で、混合物を攪拌するためのレイズド・スター・パーを用いて、0.5mlのファーストフロープロテインAセファロース4（ニュージャージー、Piscataway, Centennial Avenue 800在、Pharmacia Inc.）で処理する。一晚4でインキュベートした後、樹脂を遠心分離（5分間、50g）によって集めて20容のプロテインA結合緩衝液で2回洗い（樹脂回収には遠心分離を使用）、そして、続く処理のためのカラムに移す。このカラムを、0.5mlのプロテインA結合緩衝液で4回洗い、0.25mlのPBSで2回洗い、そして、IgGをPierce IgG溶出緩衝液（イリノイ、Rockford在、Pierce Chemical Co., Cat No. 21004Y又は21009Y）を用いて溶出させる。180μlの画分を集め、20μlの1M HEPES（pH7.5）で中和する。画分を、280nmの吸光度及びSDS-PAGEによって分析する。ゲルを、クーマシーブルーで染色する。ピーク画分をプールする。100μl（14ml/ml）を、100μlのPBSで希釈して、PBS中でのSuperose 6 FPLCカラム（ニュージャージー、Piscataway, Centennial Avenue 800在、Pharmacia Inc.）でのゲル濾過にかける。このカラムでの処理は20ml/時で行ない、1.5分の画分を集める。ピークのカラム画分をプールしてアリコートを採取し、ドライアイス上で凍結して-70に保存する。最終生成物のSDS-ポリアクリルアミドゲルプロファイルを、還元条件及び非還元条件下で得る。幾つかの場合には、試料を非還元条件下で分析したときに、生成物の約10%が無傷の抗体ではない。これらの場合の研究は、この生成物が重-軽鎖ダイマーであることを示している。これは、以前に、IgG4抗体の問題として認められている。

【0111】

（実施例7）

（ヒト化組換え抗VLA4抗体の相対的結合アフィニティーの決定）

本発明の組換え抗体を、実施例6に記載のようにして精製し、アッセイしてそれらのVLA4に対する特異性及び結合アフィニティー若しくは効力を決定する。特に、組換え抗VLA4抗体の効力を、下記の2つの異なるアッセイを用いて、最大結合定数の半分（half-maximal binding constant）（精製抗体のng/ml又はμg/mlとして報告）を計算することによって評価した。

【0112】

（1.VCAM1へのVLA4依存性接着の阻止）

抗VLA4抗体の臨界的機能は、VCAM1/VLA4接着経路を阻止する能力により規定される。精製した組換えの可溶性VCAM1（rsVCAM1）はプラスチック上に固定化され得て、機能性接着分子であることが以前に示されている（Lobb等、1991a, [81]）。固定化rsVCAM1は、VLA4発現細胞例えばヒトB細胞系統R

10

20

30

40

50

a m o s 等に結合し、この結合は、V C A M 1 に対する M A b 例えば 4 B 9 又は V L A 4 に対する M A b 例えば H P 1 / 2 によって阻止され得る。このアッセイは、任意のヒト化組換え抗体の効力を評価するための再現可能な方法を提供する。簡単に言えば、抗体溶液を希釈して、一連の抗体希釈物を R a m o s 細胞と共にインキュベートし、次いで、それを r s V C A M 1 被覆したプレートでインキュベートする。R a m o s 細胞は、により記載されたようにして蛍光標識し、結合を、下記のプロトコールに従って、96 ウェルクラスタプレートにて、蛍光により評価する。

【0113】

組換え可溶性 V C A M 1 を調製し、本質的に L o b b 等、1991a [81] により記載されたようにして精製した。可溶性 V C A M を、0.05 M N a H C O₃ (15 mM N a H C O₃、35 mM N a₂ C O₃) pH 9.2 にて 10 µg / ml まで希釈する。次いで、50 µl / ウェルを、L i n b r o T i t e r t e k ポリスチレン平底 96 ウェルプレート (F l o w L a b s カタログ番号 76 - 231 - 05) 中に加える。このプレートを、一晚、4 でインキュベートする。

【0114】

このインキュベーションの後に、ウェルの内容物を逆さにしてプレートにプロットすることによって取り出す。これらの空のウェルに、P B S、0.02 % N a N₃ 中の 1 % B S A を、室温で 1 時間以上、ウェル当り 100 µl で加える。もしこのプレートを直ちに使用しないならば、それをブロックして 1 週間 4 で保存することが出来る。B S A を幾つかのウェルに加えて非特異的結合を評価する。

【0115】

結合を定量するために、V L A 4 提示細胞、好ましくは R a m o s 細胞を、予備標識すべきである。これらの細胞を、放射性標識又は蛍光標識することが出来る。放射性標識するためには、細胞の予備標識を、一晚、³ H - チミジン (0.5 µCi / ml) を用いて行なうことが出来る。或は (そして、好ましくは)、これらの細胞を、B C E C F - A M (化学名: 2', 7' - ビス - (2 - カルボキシエチル) - 5 (及び - 6) カルボキシフルオレセイン、アセトキシメチルエステル、オレゴン、E u g e n e , M o l e c u l a r P r o b e s I n c . , カタログ番号 B - 1150) とプレインキュベートする。この方法のために、細胞を 5 × 10⁶ / ml に懸濁し、2 µM B C E C F - A M を加えて、混合物を 37 で 30 分間インキュベートする。何れかの方法の後に、これらの細胞を、R P M I、2 % F B S (pH 7.4) で洗う。1 % F B S を有する R P M I も使用することが出来る。

【0116】

結合研究のために、2 ~ 4 × 10⁶ 細胞 / ml (R P M I、2 % F B S 中) を再懸濁し、次いで、50 µl の標識細胞をウェル当りに加える (室温で 10 分間の結合)。

【0117】

10 分間のインキュベーションの後に、これらのウェルの内容物を逆さにすることにより取り出して、プレートを R P M I、2 % F B S で穏やかに 1 ~ 2 回洗う。光学顕微鏡で調べた場合に、B S A ブランクのウェルは、非常に僅かの結合細胞しか有しない。しっかりと付着していない細胞を除去するために簡単な逆さ回転を含むことが出来、これらのプレートを再び 1 ~ 2 回洗うことが出来る。

【0118】

B C E C F - A M 法のために、100 µl の 1 % N P 40 を各ウェルに加えて細胞を可溶化し、次いで、プレートを、蛍光プレートスキャナー上で読む (放射性標識法を用いたならば、100 µl の 0.1 % N a O H を各ウェルに加え、次いで、各ウェルの内容物を、カクテルを含むシンチレーションバイアルに移す)。

【0119】

50 µl の容積の標識細胞をカウントして各ウェルに加えた全既知値を得る。次いで、50 µl の標識細胞を、100 µl の 1 % N P 40 のみを含むウェル又は用いる方法に依存するシンチレーションバイアルに加える。

【0120】

抗体ブロッキング研究のために、 $100\mu\text{l}$ / ウェルのマウスHP1 / 2MAb (抗VLA4) を、典型的には、RPMI、2% FBS 中 $10\mu\text{g} / \text{ml}$ で、rsVCA M1 被覆したプレートに加え、上記のように細胞結合の前に室温で30分間インキュベートする。MAb HP1 / 2 (抗VLA4) 又はここに記載したようにして調製した任意の組換えヒト化抗VLA4抗体は、細胞結合の前に、室温で30分間、標識細胞とプレインキュベートしなければならない。プレインキュベートした抗体の濃度は変化するが、一般に、濃度は、約 $1\mu\text{g} / \text{ml}$ の範囲にあった。

【0121】

これらの接着アッセイにおいて、マウスHP1 / 2は、約 $40\text{ng} / \text{ml}$ にて Ramos 細胞結合を完全に阻止し、約 $15\text{ng} / \text{ml}$ ($10\mu\text{M}$) で最大値の半分だけ阻止する。本発明により作成したヒト化組換え抗VLA4抗体を用いる接着アッセイの、計算した半最大結合定数 (half-maximal binding constant) により表した結果を、表IIIに示す。各値について実施した実験数 (n) は、組換えヒト化抗体について示してある。下記において検討するように、これらの結果は、一般に、FACS 結合アッセイで得られた結果に匹敵する。

【0122】

安定にトランスフェクトされたYB2 / 0細胞系統から精製したVK1 (DQL) 軽鎖を有する組換えステージ0、ステージ1、ステージ2及びステージ3抗体の効力を、表IIIに示すように、接着アッセイにおいて測定した。その結果は、ステージ0 - B及び0 - Cヒト化抗体を用いては、 $1\mu\text{g} / \text{ml}$ ($1000\text{ng} / \text{ml}$) までの濃度において阻止はないことを示した。改良したVK2 (SVM DY) 軽鎖を有する組換えステージ3抗体STA W及びASを用いた結果は、AS / SVM DY抗体が少なくともマウスHP1 / 2抗体と等しい効力を有するか恐らくは一層高い効力を有することを示した。あるステージ2及びステージ3構築物は、マウスHP1 / 2抗体の効力の約20 ~ 100%の効力を示した。

【0123】

(2. FACSアッセイ)

ヒト化組換え抗体の細胞表面への結合を、蛍光標識抗体を用いて、蛍光活性化セルソーター (FACS) 分析によって直接評価することが出来る。これは、投与量応答測定の後半最大結合情報をも提供する標準的技術である。これらのFACS法は、Lobb等、1991b [82] に記載されている。

【0124】

簡単に言えば、 $25\mu\text{l}$ の細胞 ($4 \times 10^6 / \text{ml}$ FACS緩衝液、2% FBS、0.1% NaN_3 中) を氷上で、 $5\mu\text{l}$ の $5\mu\text{g} / \text{ml}$ のFITC又はフィコエリトリン (PE) 結合抗体 (FACS緩衝液中) に加えて、氷上でV底マイクロタイターウェル中で30分間インキュベートする。これらのウェルに、 $125\mu\text{l}$ のFACS緩衝液を加え、そのプレートを $350 \times g$ で5分間遠心分離して上清を振り落とす。各ウェルに、 $125\mu\text{l}$ のFACS緩衝液を加え、次いで、細胞を $12 \times 75\text{mm}$ のFalconポリスチレンチューブに移して最終容積 $250\mu\text{l}$ (FACS緩衝液中) に再懸濁する。この混合物を、Becton Dickinson FACSstarにて分析する。このFACSアッセイの結果を、本発明により作成したヒト化組換え抗VLA4抗体を用いて計算した半最大結合定数により表して、表IIIに示し、各値について実施した実験数 (n) をヒト化抗体について示した。表IIIは又、組合せた接着及びFACSアッセイから計算した効力をも示す。マウスHP1 / 2は、 $15\text{ng} / \text{ml}$ にて、Ramos細胞に対して半最大で結合する。AS / SVM DYヒト化抗体は、 $12\text{ng} / \text{ml}$ にて、Ramos細胞に対して半最大で結合する。従って、これらの2つのアッセイ (即ち、接着及びFACSアッセイ) は、マウス抗体とヒト化AS / SVM DY抗体について優れた相関を示す。

【0125】

【表 3】

表 I I I

ヒト化組換え抗 V L A 4 抗体についての
半最大結合定数の要約

抗体	接着 アッセイ	FACS アッセイ	組合せ
マウス HP1/2	15 ng/ml	15 ng/ml	15 ng/ml
ステージ 0 (ヒト化 重鎖)	>1000ng/ml (n=3)	—	—
ステージ 1 (ヒト化 重鎖)	228 ng/ml (n=6)	—	228 ng/ml (n=6)
ステージ 2 (Ser突然変 異体)	56 ng/ml (n=14)	47 ng/ml (n=6)	60 ng/ml (n=20)
ステージ 3			
(STAW)	30 ng/ml (n=3)	33 ng/ml (n=3)	32 ng/ml (n=6)
(KAITAS)	85 ng/ml (n=2)	100 ng/ml (n=1)	90 ng/ml (n=3)
(SSE)	100 ng/ml (n=2)	40 ng/ml (n=1)	80 ng/ml (n=3)
(KRS)	50 ng/ml (n=2)	70 ng/ml (n=1)	57 ng/ml (n=3)
(AS)	28 ng/ml (n=2)	14 ng/ml (n=2)	21 ng/ml (n=4)
改善した軽鎖を用いた構築物			
STAW/ SVMDY	25 ng/ml (n=4)	35 ng/ml (n=3)	29 ng/ml (n=7)
AS/SVMDY	12 ng/ml (n=2)	12 ng/ml (n=2)	12 ng/ml (n=4)

(寄託)

下記のプラスミッドを、大腸菌 K 1 2 J 2 2 1 (I q) にて、ブダペスト条約の下、
メリーランド (U S A) R o c k v i l l e 在、A m e r i c a n T y p e C u l t u r e
C o l l e c t i o n (A T C C) に、1 9 9 2 年 1 0 月 3 0 日に寄託した。こ
れらの寄託物は、下記の通りである：

プラスミッド

p B A G 1 8 4 (V_H - S T A W)

受託番号

6 9 1 1 0

p B A G 1 8 3 (V_H - K A I T A S) 6 9 1 0 9
 p B A G 1 8 5 (V_H - K R S) 6 9 1 1 1
 p B A G 2 0 7 (V_H - S S E) 6 9 1 1 6
 p B A G 1 9 5 (V_H - A S) 6 9 1 1 3
 p B A G 1 9 0 (V K 1 - D Q L) 6 9 1 1 2
 p B A G 1 9 8 (V K 2 - S V M D Y) 6 9 1 1 5
 p B A G 1 9 7 (V K 3 - D Q M D Y) 6 9 1 1 4

更に、ヒト化組換え抗 V L A 4 抗体を産生する N S O 細胞系統を、ブダペスト条約の下、
 、メリーランド (U S A) R o c k v i l l e 在、A m e r i c a n T y p e C u l
 t u r e C o l l e c t i o n (A T C C) に、1 9 9 2 年 1 1 月 3 日に寄託した。こ 10
 の寄託物は、A T C C 受託番号 C R L 1 1 1 7 5 を付与された。

【 0 1 2 6 】

(配 列)

下記は、S e q u e n c e L i s t i n g に示した配列の要約である：

S E Q	I D	N O : 1	C G 1 F O R プライマーの D N A 配列	
S E Q	I D	N O : 2	C K 2 F O R プライマーの D N A 配列	
S E Q	I D	N O : 3	V H 1 B A C K プライマーの D N A 配列	
S E Q	I D	N O : 4	V H 5 B A C K プライマーの D N A 配列	
S E Q	I D	N O : 5	H P 1 / 2 重鎖可変領域の D N A 配列	
S E Q	I D	N O : 6	H P 1 / 2 重鎖可変領域のアミノ酸配列	20
S E Q	I D	N O : 7	V H 1 B A C K プライマーの D N A 配列	
S E Q	I D	N O : 8	V K 7 B A C K プライマーの D N A 配列	
S E Q	I D	N O : 9	H P 1 / 2 軽鎖可変領域の D N A 配列	
S E Q	I D	N O : 1 0	H P 1 / 2 軽鎖可変領域のアミノ酸配列	
S E Q	I D	N O : 1 1	V H 1 F O R プライマーの D N A 配列	
S E Q	I D	N O : 1 2	V K 3 B A C K プライマーの D N A 配列	
S E Q	I D	N O : 1 3	V K 1 F O R プライマーの D N A 配列	
S E Q	I D	N O : 1 4	M 1 3 V H P C R 1 中の V H 挿入物の D N A 配列	
S E Q	I D	N O : 1 5	M 1 3 V H P C R 1 中の V H 挿入物のアミノ酸配列	
S E Q	I D	N O : 1 6	M 1 3 V K P C R 2 中の V K 挿入物の D N A 配列	30
S E Q	I D	N O : 1 7	M 1 3 V K P C R 2 中の V K 挿入物のアミノ酸配列	
S E Q	I D	N O : 1 8	オリゴ 5 9 8 の D N A 配列	
S E Q	I D	N O : 1 9	オリゴ 5 9 9 の D N A 配列	
S E Q	I D	N O : 2 0	オリゴ 6 0 0 の D N A 配列	
S E Q	I D	N O : 2 1	オリゴ 6 0 5 の D N A 配列	
S E Q	I D	N O : 2 2	オリゴ 6 0 6 の D N A 配列	
S E Q	I D	N O : 2 3	オリゴ 6 0 7 の D N A 配列	
S E Q	I D	N O : 2 4	オリゴ 1 0 の D N A 配列	
S E Q	I D	N O : 2 5	オリゴ 3 8 5 の D N A 配列	
S E Q	I D	N O : 2 6	オリゴ 1 1 の D N A 配列	40
S E Q	I D	N O : 2 7	オリゴ 3 9 1 の D N A 配列	
S E Q	I D	N O : 2 8	ステージ 1 重鎖可変領域の D N A 配列	
S E Q	I D	N O : 2 9	ステージ 1 重鎖可変領域のアミノ酸配列	
S E Q	I D	N O : 3 0	V K 1 (D Q L) 軽鎖可変領域の D N A 配列	
S E Q	I D	N O : 3 1	V K 1 (D Q L) 軽鎖可変領域のアミノ酸配列	
S E Q	I D	N O : 3 2	ステージ 2 重鎖可変領域の D N A 配列	
S E Q	I D	N O : 3 3	ステージ 2 重鎖可変領域のアミノ酸配列	
S E Q	I D	N O : 3 4	オリゴ 6 8 4 の D N A 配列	
S E Q	I D	N O : 3 5	オリゴ 6 8 3 の D N A 配列	
S E Q	I D	N O : 3 6	オリゴ 7 1 3 の D N A 配列	50

SEQ	ID	NO : 37	オリゴ716のDNA配列	
SEQ	ID	NO : 38	STAW重鎖可変領域のDNA配列	
SEQ	ID	NO : 39	STAW重鎖可変領域のアミノ酸配列	
SEQ	ID	NO : 40	オリゴ706のDNA配列	
SEQ	ID	NO : 41	オリゴ707のDNA配列	
SEQ	ID	NO : 42	KAITAS重鎖可変領域のDNA配列	
SEQ	ID	NO : 43	KAITAS重鎖可変領域のアミノ酸配列	
SEQ	ID	NO : 44	オリゴ768のDNA配列	
SEQ	ID	NO : 45	オリゴ769のDNA配列	
SEQ	ID	NO : 46	SSE重鎖可変領域のDNA配列	10
SEQ	ID	NO : 47	SSE重鎖可変領域のアミノ酸配列	
SEQ	ID	NO : 48	オリゴ704のDNA配列	
SEQ	ID	NO : 49	オリゴ705のDNA配列	
SEQ	ID	NO : 50	KRS重鎖可変領域のDNA配列	
SEQ	ID	NO : 51	KRS重鎖可変領域のアミノ酸配列	
SEQ	ID	NO : 52	オリゴ745のDNA配列	
SEQ	ID	NO : 53	オリゴ746のDNA配列	
SEQ	ID	NO : 54	AS重鎖可変領域のDNA配列	
SEQ	ID	NO : 55	AS重鎖可変領域のアミノ酸配列	
SEQ	ID	NO : 56	オリゴ915のDNA配列	20
SEQ	ID	NO : 57	オリゴ917のDNA配列	
SEQ	ID	NO : 58	オリゴ918のDNA配列	
SEQ	ID	NO : 59	オリゴ919のDNA配列	
SEQ	ID	NO : 60	オリゴ697のDNA配列	
SEQ	ID	NO : 61	オリゴ698のDNA配列	
SEQ	ID	NO : 62	VK2(SVMDY)軽鎖可変領域のDNA配列	
SEQ	ID	NO : 63	VK2(SVMDY)軽鎖可変領域のアミノ酸配列	
SEQ	ID	NO : 64	オリゴ803のDNA配列	
SEQ	ID	NO : 65	オリゴ804のDNA配列	
SEQ	ID	NO : 66	VK3(DQMDY)軽鎖可変領域のDNA配列	30
SEQ	ID	NO : 67	VK3(DQMDY)軽鎖可変領域のアミノ酸配列	
SEQ	ID	NO : 68	PDLN重鎖可変領域のDNA配列	
SEQ	ID	NO : 69	PDLN重鎖可変領域のアミノ酸配列	
SEQ	ID	NO : 70	PDLN軽鎖可変領域のDNA配列	
SEQ	ID	NO : 71	PDLN軽鎖可変領域のアミノ酸配列	
SEQ	ID	NO : 72	オリゴ370-119のDNA配列	
SEQ	ID	NO : 73	オリゴ370-120のDNA配列	
SEQ	ID	NO : 74	オリゴ370-121のDNA配列	
SEQ	ID	NO : 75	オリゴ370-122のDNA配列	
SEQ	ID	NO : 76	オリゴ370-123のDNA配列	40
SEQ	ID	NO : 77	オリゴ370-124のDNA配列	
SEQ	ID	NO : 78	オリゴ370-125のDNA配列	
SEQ	ID	NO : 79	オリゴ370-126のDNA配列	
SEQ	ID	NO : 80	オリゴ370-127のDNA配列	
SEQ	ID	NO : 81	オリゴ370-128のDNA配列	
SEQ	ID	NO : 82	オリゴ370-129のDNA配列	
SEQ	ID	NO : 83	オリゴ370-130のDNA配列	
SEQ	ID	NO : 84	オリゴ370-131のDNA配列	
SEQ	ID	NO : 85	オリゴ370-132のDNA配列	
SEQ	ID	NO : 86	オリゴ370-133のDNA配列	50

SEQ	ID	NO : 87	オリゴ370 - 134のDNA配列	
SEQ	ID	NO : 88	オリゴ370 - 135のDNA配列	
SEQ	ID	NO : 89	オリゴ370 - 136のDNA配列	
SEQ	ID	NO : 90	オリゴ370 - 137のDNA配列	
SEQ	ID	NO : 91	オリゴ370 - 138のDNA配列	
SEQ	ID	NO : 92	オリゴ370 - 139のDNA配列	
SEQ	ID	NO : 93	オリゴ370 - 140のDNA配列	
SEQ	ID	NO : 94	オリゴ370 - 141のDNA配列	
SEQ	ID	NO : 95	オリゴ370 - 142のDNA配列	
SEQ	ID	NO : 96	VK1 - DQLプライマー370 - 247のDNA配列	10
SEQ	ID	NO : 97	VK1 - DQLプライマー370 - 210のDNA配列	
SEQ	ID	NO : 98	VK2 - SVM DYプライマー370 - 269のDNA配列	
SEQ	ID	NO : 99	VK3 - SVM DYプライマー370 - 268のDNA配列	

我々は、上に、この発明の幾つかの具体例を説明してきたが、我々の基本的具体例を変形して、この発明の組成物及び方法を利用する他の具体例を与え得ることは明白である。それ故に、この発明の範囲は、上記の明細書中に規定され及び添付の請求の範囲により規定されるすべての別の具体例及び変法を含み且つ、この発明は説明のためにここに提供した特定の具体例に限定されるべきでないことは、認められるであろう。

【0127】

【表 4】

引用文献リスト

- [1] Kohler, G. and Milstein, 1975, C. Nature 265: 295-497, "Continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity"
- [2] Schroff et al., 1985, Cancer Res 45: 879-885, "Human-antimurine immunoglobulin responses in patients receiving monoclonal antibody therapy"
- [3] Borrebaeck et al., 1990, in Therapeutic Monoclonal Antibodies, Borrebaeck and Larrick (eds.), Stockton Press pp. 1-15
- [4] Riechmann et al., 1988, Nature 332: 323-327, "Reshaping human antibodies for therapy"
- [5] Tempest et al., 1991, Biotechnology 9: 266-271, "Reshaping a human monoclonal antibody to inhibit human respiratory syncytial virus infection in vivo"
- [6] EP 120694 (Celltech Limited)
- [7] EP 125023 (Genentech, Inc. and City of Hope)
- [8] WO 86/01533 (Celltech Limited)
- [9] Begent et al., 1990, Br. J. Cancer 62: 487
- [10] U.S. Patent No. 4,816,567, Cabilly et al., "Recombinant Immunoglobulin Preparations", issued March 28, 1989.
- [11] U.S. Patent No. 4,816,397, Boss et al., "Multichain Polypeptides Or Proteins And Processes For Their Production", issued March 28, 1989.
- [12] EP 0239400 (Winter)
- [13] Verhoeyen et al., 1988, Science 239: 1534-1536, "Reshaping of human antibodies using CDR-grafting in Monoclonal Antibodies"
- [14] WO 89/07454 (Medical Research Council)

10

20

30

- [15] Kabat et al., 1991, 5th Ed., 4 vol., Sequences of Proteins of Immunological Interest U.S. Department of Health Human Services, NIH, USA
- [16] Wu et al., 1970, "An Analysis of the Sequences of the Variable Regions of Bence Jones Proteins and Myeloma Light Chains and Their Implications for Antibody Complementarity", J. Exp. Med. 132: 211-250
- [17] Queen et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 10029-10033, "A humanized antibody that binds to the interleukin 2 receptor" 10
- [18] WO 90/07861 (Protein Design Labs Inc.)
- [19] Co. et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 2869-2873, "Humanised antibodies for antiviral therapy"
- [20] Bruggemann, et al., 1989., J. Exp. Med. 170: 2153-2157, "The immunogenicity of chimeric antibodies"
- [21] Verhoeyen et al., 1991, "Reshaping of Human Antibodies Using CDR-Grafting" in Monoclonal Antibodies, Chapman and Hall, pp. 37-43. 20
- [22] WO 92/04881 (Scotgen Limited)
- [23] Hale et al., 1988, "Remission induction in non-Hodgkin Lymphoma with Reshaped Human Monoclonal Antibody CAMPATH-1H", Lancet ii 1394-1398.
- [24] Harlan, J.M, 1985, Blood 65: 513-526, "Leukocyte-endothelial interactions" 30
- [25] Collins, et al., 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 446-450, "Recombinant Human Tumor Necrosis Factor Increases mRNA Levels and Surface Expression of HLA-A,B antigens in vascular endothelial cells and dermal fibroblasts in vitro"
- [26] Pober et al., 1986, "Overlapping Pattern of Activation of Human Endothelial Cells by

- Interleukin-1, Tumor Necrosis Factor, and Immune Interferon, *J. Immunol.* 137: 1893-1896
- [27] Bevilacqua, et al., 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 9238-9242, "Identification of an Inducible Endothelial-Leukocyte Adhesion Molecule"
- [28] Leeuwenberg, et al., 1989, "Induction of an Activation Antigen on Human Endothelial Cells in vitro, *Eur. J. Immunol.* 19: 715-729
- [29] Bevilacqua, et al., 1989, "Endothelial leukocyte adhesion molecule 1; an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins, *Science* 243: 1160-1165. 10
- [30] Dustin, et al., 1986, "Induction by IL-1 and Interferon- γ : tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1), *J. Immunol.* 137: 245-254 20
- [31] Boyd et al., 1988, "Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) has a central role in cell-cell contact-mediated immune mechanisms, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 3095-3099
- [32] Dustin and Springer, 1988, "Lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) Interaction with Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) is one of at least three mechanisms for lymphocyte adhesion to cultured endothelial cells", *J. Cell Biol.* 107: 321-331 30
- [33] Osborn et al., 1989, "Direct Cloning of Vascular Cell Adhesion Molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes, *Cell* 59: 1203-1211
- [34] Hynes, 1987, "Integrins: a family of cell surface receptors" *Cell* 48: 549-554

- [35] Marcantonio and Hynes, 1988, "Antibodies to the conserved cytoplasmic domain of the integrin β_1 subunit react with proteins in vertebrates, invertebrates and fungi, J. Cell Biol. 106: 1765-1772
- [36] Kishimoto et al., 1989, "The leucocyte integrins", Adv. Immunol. 46: 149-182
- [37] Ruoslahti, 1988, "Fibronectin and its receptors" Annu. Rev. Biochem. 57: 375-413
- [38] Hemler et al., 1990, "VLA proteins in the integrin family: structures, functions and their role on leukocytes" Annu Rev. Immunol. 8: 365-400
- [39] Hemler et al., 1987, "Characterization of the cell surface heterodimer VLA4 and related peptides" J. Biol. Chem. 262: 11478-11485
- [40] Clayberger, et al., 1987, "Identification and Characterization of two novel lymphocyte function-associated antigens, L24 and L25" J. Immunol. 138: 1510-1514
- [41] Takada et al., 1989, "The Primary Structure of the α_4 subunit of VLA4; homology to other integrins and a possible cell-cell adhesion function:", EMBO J. 8: 1361-1368
- [42] Holtzmann et al., 1989, "Identification of a murine Peyer's patch-specific lymphocyte homing receptor as an integrin molecule with an α chain homologous to human VLA4 α ," Cell 56: 37-46
- [43] Bednarczyk and McIntyre, 1990, "A monoclonal antibody to VLA4 α chain (CDw49) induces homotypic lymphocyte aggregation", J. Immunol. in press
- [44] Wayner et al., 1989, "Identification and characterization of the lymphocyte adhesion receptor for an alternative cell attachment

10

20

30

- domain in plasma fibronectin", J. Cell Biol. 109: 1321-1330
- [45] Elices et al., 1990, "VCAM-1 on Activated Endothelium Interacts with the Leukocyte Integrin VLA4 at a Site Distinct from the VLA4/Fibronectin Binding Site", Cell 60: 577-584
- [46] Rice et al., 1989, "An inducible endothelial cell surface glycoprotein mediates melanoma adhesion," Science, 246: 1303-1306
- [47] Cybulsky, M.I. and Gimbrone, M.A., Jr. 1991, "Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis," Science, 251: 788-791
- [48] Freedman et al., 1990, "Adhesion of human B cells to germinal centers in vitro involves VLA-4 and INCAM-110," Science, 249: 1030-1033
- [49] Miyake et al., 1991, "A VCAM-like adhesion molecule on murine bone marrow stromal cells mediates binding of lymphocyte precursors in culture," J. Cell Biol., 114: 557-565
- [50] Polte et al., 1990, "Full length vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1)," Nuc. Ac. Res., 18: 5901
- [51] Hession et al., 1991, "Cloning of an alternate form of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM1)", J. Biol. Chem., 266: 6682-6685
- [52] Osborn and Benjamin, U.S. Ser. No. 07/821,712 filed September 30, 1991
- [53] Carlos et al., 1990, "Vascular cell adhesion molecule-1 mediates lymphocyte adherence to cytokine-activated cultured human endothelial cells," Blood, 76, 965-970
- [54] Pulido et al., 1991, "Functional Evidence for Three Distinct and Independently Inhibitable Adhesion Activities Mediated by the Human

10

20

30

- Integrin VLA-4," J. Biol. Chem., 266(16): 10241-10245
- [55] Sanchez-Madrid et al., 1986, "VLA-3: A novel polypeptide association within the VLA molecular complex: cell distribution and biochemical characterization," Eur. J. Immunol., 16: 1343-1349
- [56] Weller et al., 1991, "Human eosinophil adherence to vascular endothelium mediated by binding to vascular cell adhesion molecule 1 and endothelial leukocyte adhesion molecule 1," Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 4488: 7430-7433 10
- [57] Walsh et al., 1991, "Human Eosinophil, But Not Neutrophil, Adherence to IL-1-Stimulated Human Umbilical Vascular Endothelial Cells Is $\alpha_4\beta_1$ (Very Late Antigen-4) Dependent," J. Immunol., 146: 3419-3423
- [58] Bochner et al., 1991, "Adhesion of Human Basophils, Eosinophils, and Neutrophils to Interleukin 1-activated Human Vascular Endothelial Cells: Contributions of Endothelial Cell Adhesion Molecules," J. Exp. Med., 173: 1553-1556 20
- [59] Dobrina et al., 1991, "Mechanisms of Eosinophil Adherence to Cultured Vascular Endothelial Cells," J. Clin. Invest., 88: 20-26
- [60] Lobb, U.S. Ser. No. 07/821,768 filed January 13, 1992 30
- [61] Lobb, U.S. Ser. No. 07/835,139 filed February 12, 1992
- [62] Papayannopoulou, U.S. Ser. No. 07/977,702 filed November 13, 1992
- [63] Favoloro et al., 1980, "Transcriptional Maps of Polyome Virus Specific RNA: Analysis by

- Two-Dimensional Nuclease S1 Gel Mapping",
Methods in Enzymology 65: 718-749.
- [64] Orlandi et al., 1989, "Cloning immunoglobulin
variable domains for expression by the
polymerase chain reaction", Proc. Natl. Acad.
Sci. USA 86: 3833-3837.
- [65] Huse et al., 1989, "Generation of a Large
Combinational Library of Immunoglobulin
Repertoire in Phage Lambda", Science 246:
1275-1281.
- [66] Jones and Bendig, 1991, "Rapid PCR-Cloning of
Full-length Mouse Immunoglobulin Variable
Regions", Biotechnology 9: 88-89
- [67] Saiki et al., 1988, "Primer-Directed Enzymatic
Amplification of DNA with a Thermostable DNA
Polymerase", Science 239: 487-491
- [68] Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 1982,
eds. T. Maniatis et al., published by Cold
Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor,
New York
- [69] Sanger et al., 1977, "DNA Sequencing with
Chain-terminating Inhibitors", Proc. Natl.
Acad. Sci. USA 74: 5463-5467.
- [70] Takahashi et al., 1982, "Structure of Human
Immunoglobulin Gamma Genes: Implications for
Evolution of a Gene Family", Cell 29: 671-679,
- [71] Flanagan and Rabbitts, 1982, "Arrangement of
Human Immunoglobulin Heavy Chain Construct
Region Genes Implies Evolutionary
Amplification of a Segment Containing γ , ϵ and
 α genes", Nature 300: 709-713.
- [72] Hieter, 1980, "Cloned Human and Mouse Kappa
Immunoglobulin Constant and J. Region Genes
Conserve Homology in Functional Segments",
Cell 22: 197-207

10

20

30

- [73] Kilmartin et al., 1982, "Rat Monoclonal Antitubulin Antibodies Derived by Using a New Non-secreting Rat Cell Line", J. Cell Biol. 93: 576-582.
- [74] Ho et al., 1989, "Site-directed Mutagenesis by Overlap Extension Using The Polymerase Chain Reaction", Gene 77: 51-59
- [75] Burkly et al., U.S. Ser. No. 07/916,098, filed July 24, 1992
- [76] Bebbington et al., 1992, "High-Level Expression of a Recombinant Antibody from Myeloma Cells Using A Glutamine Synthetase Gene as an Amplifiable Selectable Marker", Bio/Technology 10: 169-175. 10
- [77] WO86/05807 (Celltech Limited)
- [78] WO87/04462 (Celltech Limited)
- [79] WO89/01036 (Celltech Limited)
- [80] WO89/10404 (Celltech Limited)
- [81] Lobb et al., 1991a, "Expression and Functional Characterization of a Soluble Form of Vascular Cell Adhesion Molecule 1", Biochem. Biophys. Res. Comm. 178: 1498-1504 20
- [82] Lobb et al., 1991b, "Expression and Functional Characterization of a Soluble Form of Endothelial-Leukocyte Adhesion Molecule 1", J. Immunol. 147: 124-129

ここに列記した各文献は、そのまま、参考として本明細書中に援用する。

【 0 1 2 8 】

【表 5】

SEQUENCE LISTING

(1) GENERAL INFORMATION:

(i) APPLICANT: Lobb, Roy R.; Carr, Frank J.; Tempest, Philip R.

(ii) TITLE OF INVENTION: Recombinant Anti-VLA4 Antibody Molecules

(iii) NUMBER OF SEQUENCES: 99

(iv) CORRESPONDENCE ADDRESS:

(A) ADDRESSEE: Allegretti & Witcoff, Ltd.

(B) STREET: 10 South Wacker Drive, Suite 3000

(C) CITY: Chicago

(D) STATE: IL

(E) COUNTRY: US

(F) ZIP: 60606

10

(v) COMPUTER READABLE FORM:

(A) MEDIUM TYPE: Floppy disk

(B) COMPUTER: IBM PC compatible

(C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25

(vi) CURRENT APPLICATION DATA:

(A) APPLICATION NUMBER: US

(B) FILING DATE:

(C) CLASSIFICATION:

20

(viii) ATTORNEY/AGENT INFORMATION:

(A) NAME: McNicholas, Janet M.

(B) REGISTRATION NUMBER: 32,918

(C) REFERENCE/DOCKET NUMBER: 92,445/D012 US

(ix) TELECOMMUNICATION INFORMATION:

(A) TELEPHONE: 312-715-1000

(B) TELEFAX: 312-715-1234

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:1:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 31 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

30

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: misc_feature

(B) LOCATION: 1

(D) OTHER INFORMATION: /note= "CGI FOR PCR primer"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:1:

GGAAGCTTAG ACAGATGGGG GTGTCGTTTT G

31

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:2:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 32 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: misc_feature
- (B) LOCATION: 1
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "CK2FOR PCR primer"

10

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:2:

GGAAGCTTGA AGATGGATAC AGTTGGTGCA GC

32

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:3:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 22 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

20

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: misc_feature
- (B) LOCATION: 1
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "VH1BACK PCR primer"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:3:

AGGTSMARCT GCAGSAGTCW GG

22

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:4:

30

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 32 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: misc_feature
- (B) LOCATION: 1
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "VK5BACK PCR primer"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:4:

TTGAATTCGG TGCCAGAKCW SAHATYGTGA TG

32

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:5:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 360 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

10

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: misc_feature
- (B) LOCATION: 1
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "pBAG159 insert: HP1/2 heavy chain variable region; 1, 3 & 6 = E, Q & E in HP1/2"

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: CDS
- (B) LOCATION: 1..360

20

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:5:

GTC AAA CTG CAG CAG TCT GGG GCA GAG CTT GTG AAG CCA GGG GCC TCA	48
Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser	
2 6 11 16	
GTC AAG TTG TCC TGC ACA GCT TCT GGC TTC AAC ATT AAA GAC ACC TAT	96
Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr	
21 26 31	
ATG CAC TGG GTG AAG CAG AGG CCT GAA CAG GGC CTG GAG TGG ATT GCA	144
Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly	
36 41 46	
AGG ATT GAT CCT GCG AGT GGC GAT ACT AAA TAT GAC CCG AAG TTC CAG	192
Arg Ile Asp Pro Ala Ser Gly Asp Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe Gln	
51 56 61	
GTC AAG GCC ACT ATT ACA GCG GAC ACG TCC TCC AAC ACA GCC TGG CTG	240
Val Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Trp Leu	
66 71 76 81	

30

CAG CTC AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC ACT GCC GTC TAC TAC TGT GCA 288
 Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 86 91 96

 GAC GGA ATG TGG GTA TCA ACG GGA TAT GCT CTG GAC TTC TGG GGC CAA 336
 Asp Gly Met Trp Val Ser Thr Gly Tyr Ala Leu Asp Phe Trp Gly Gln
 101 106 111

 GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA 360
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 116 121

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:6:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 120 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:6:

Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser
 2 6 11 16

 Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr
 21 26 31

 Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 36 41 46

 Arg Ile Asp Pro Ala Ser Gly Asp Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe Gln
 51 56 61

 Val Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Trp Leu
 66 71 76 81

 Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 86 91 96

 Asp Gly Met Trp Val Ser Thr Gly Tyr Ala Leu Asp Phe Trp Gly Gln
 101 106 111

 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 116 121

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:7:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 24 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid

10

20

30

- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: misc_feature
- (B) LOCATION: 1
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "VK1BACK PCR primer"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:7:

GACATTCAGC TGACCCAGTC TCCA

24

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:8:

10

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 32 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: misc_feature
- (B) LOCATION: 1
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "VK7BACK PCR primer"

20

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:8:

TTGAATTCGG AGTTGATGGG AACATTGTAA TG

32

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:9:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 318 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: double
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

30

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: CDS
- (B) LOCATION: 1..318
- (D) OTHER INFORMATION: /product= "HP1/2 light chain variable region"

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: misc_feature
- (B) LOCATION: 1

(D) OTHER INFORMATION: /note= "pBAG172 insert: HP1/2 light chain variable region"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:9:

AGT ATT GTG ATG ACC CAG ACT CCC AAA TTC CTG CTT GTT TCA GCA GGA	48	
Ser Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Lys Phe Leu Leu Val Ser Ala Gly		
1 5 10 15		
GAC AGG GTT ACC ATA ACC TGC AAG GCC AGT CAG AGT GTG ACT AAT GAT	96	
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Thr Asn Asp		
20 25 30		
GTA GCT TGG TAC CAA CAG AAG CCA GGG CAG TCT CCT AAA CTG CTG ATA	144	10
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile		
35 40 45		
TAT TAT GCA TCC AAT CGC TAC ACT GGA GTC CCT GAT CGC TTC ACT GGC	192	
Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly		
50 55 60		
AGT GGA TAT GGG ACG GAT TTC ACT TTC ACC ATC AGC ACT GTG CAG GCT	240	
Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Thr Val Gln Ala		
65 70 75 80		
GAA GAC CTG GCA GTT TAT TTC TGT CAG CAG GAT TAT AGC TCT CCG TAC	288	
Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Tyr		
85 90 95		20
ACC TTC GGA GGG GGG ACC AAG CTG GAG ATC	318	
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile		
100 105		

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:10:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 106 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:10:

Ser Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Lys Phe Leu Leu Val Ser Ala Gly	
1 5 10 15	
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Thr Asn Asp	
20 25 30	
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile	
35 40 45	

Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60
 Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Thr Val Gln Ala
 65 70 75 80
 Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:11:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
- (A) LENGTH: 34 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: linear

10

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: misc_feature
- (B) LOCATION: 1
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "VH1FOR PCR primer"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:11:

20

TGAGGAGACG GTGACCGTGG TCCCTTGGCC CCAG

34

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:12:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
- (A) LENGTH: 17 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: misc_feature
- (B) LOCATION: 1
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "VK3BACK PCR primer"

30

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:12:

GACATTCAGC TGACCCA

17

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:13:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 22 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: misc_feature
 - (B) LOCATION: 1
 - (D) OTHER INFORMATION: /note= "VK1FOR PCR primer"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:13:

10

GTTAGATCTC CAGCTTGGTC CC

22

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:14:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 823 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: misc_feature
 - (B) LOCATION: 1..621
 - (D) OTHER INFORMATION: /note= "VH insert in M13 VHPCR1"

20

- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: exon
 - (B) LOCATION: 261..621

- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: sig_peptide
 - (B) LOCATION: join(122..167, 250..260)

- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: mat_peptide
 - (B) LOCATION: 261..621

30

- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: CDS
 - (B) LOCATION: join(122..167, 250..621)

- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: TATA_signal
 - (B) LOCATION: 38..45

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: misc_feature
 (B) LOCATION: 351..365
 (D) OTHER INFORMATION: /note= "CDR1"

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: misc_feature
 (B) LOCATION: 408..458
 (D) OTHER INFORMATION: /note= "CDR2"

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: misc_feature
 (B) LOCATION: 555..587
 (D) OTHER INFORMATION: /note= "CDR3"

10

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: misc_feature
 (B) LOCATION: (621^622)
 (D) OTHER INFORMATION: /note= "splice to constant region"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:14:

```

AAGCTTATGA ATATGCAAAT CCTCTGAATC TACATGGTAA ATATAGGTTT GTCTATACCA      60
CAAACAGAAA AACATGAGAT CACAGTTCTC TCTACAGTTA CTGAGCACAC AGGACCTCAC      120
C ATG GGA TGG AGC TGT ATC ATC CTC TTC TTG GTA GCA ACA GCT ACA  G      167
  Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr
  -19          -15          -10          -5
GTAAGGGGCT CACAGTAGCA GGCTTGAGGT CTGGACATAT ATATGGGTGA CAATGACATC      227
CACTTTGCCT TTCTCTCCAC AG  GT GTC CAC TCC CAG GTC CAA CTG CAG GAG      278
                        Gly Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu
                        -3          1          5
AGC GGT CCA GGT CTT GTG AGA CCT AGC CAG ACC CTG AGC CTG ACC TGC      326
Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys
      10          15          20
ACC GTG TCT GGC AGC ACC TTC AGC AGC TAC TGG ATG CAC TGG GTG AGA      374
Thr Val Ser Gly Ser Thr Phe Ser Ser Tyr Trp Met His Trp Val Arg
      25          30          35
CAG CCA CCT GGA CGA GGT CTT GAG TGG ATT GGA AGG ATT GAT CCT AAT      422
Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Asn
      40          45          50
AGT GGT GGT ACT AAG TAC AAT GAG AAG TTC AAG AGC AGA GTG ACA ATG      470
Ser Gly Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Ser Arg Val Thr Met
      55          60          65          70

```

20

30

CTG GTA GAC ACC AGC AAG AAC CAG TTC AGC CTG AGA CTC AGC AGC GTG 518
 Leu Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Arg Leu Ser Ser Val
 75 80 85

ACA GCC GCC GAC ACC GCG GTC TAT TAT TGT GCA AGA TAC GAT TAC TAC 566
 Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Asp Tyr Tyr
 90 95 100

GGT AGT AGC TAC TTT GAC TAC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC 614
 Gly Ser Ser Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
 105 110 115

TCC TCA G 621
 Ser Ser
 120

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:15:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 139 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:15:

20

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 -19 -15 -10 -5

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg
 1 5 10

Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ser Thr Phe
 15 20 25

Ser Ser Tyr Trp Met His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu
 30 35 40 45

Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Asn Ser Gly Gly Thr Lys Tyr Asn
 50 55 60

Glu Lys Phe Lys Ser Arg Val Thr Met Leu Val Asp Thr Ser Lys Asn
 65 70 75

Gln Phe Ser Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val
 80 85 90

Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Asp Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Phe Asp Tyr
 95 100 105

30

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 110 115 120

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:16:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 594 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: misc_feature
- (B) LOCATION: 1..632
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "VK insert in M13 VKPCR2"

10

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: exon
- (B) LOCATION: 273..594

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: sig_peptide
- (B) LOCATION: join(134..179, 262..272)

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: mat_peptide
- (B) LOCATION: 273..594

20

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: CDS
- (B) LOCATION: join(134..179, 262..594)

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: TATA_signal
- (B) LOCATION: 50..57

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: misc_feature
- (B) LOCATION: 342..374
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "CDR1"

30

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: misc_feature
- (B) LOCATION: 420..440
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "CDR2"

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: misc_feature
- (B) LOCATION: 537..563
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "CDR3"

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: misc_feature

(B) LOCATION: (594~595)

(D) OTHER INFORMATION: /note= "splice to constant region"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:16:

CTCTTAAACT TCAAGCTTAT GAATATGCAA ATCCTCTGAA TCTACATGGT AAATATAGGT	60	
TTGTCTATAC CACAAACAGA AAAACATGAG ATCAGAGTTC TCTCTACAGT TACTGAGCAC	120	
ACAGGACCTC ACC ATG GGA TGG AGC TGT ATC ATC CTC TTC TTG GTA GCA	169	
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala		
-19 -15 -10		10
ACA GCT ACA G GTAAGGGGCT CACAGTAGCA GGCTTGAGGT CTGGACATAT	219	
Thr Ala Thr		
-5		
ATATGGGTGA CAATGACATC CACTTTGCCCT TTCTCTCCAC AG GT GTC CAC TCC	272	
Gly Val His Ser		
-3		
GAC ATC CAG CTG ACC CAG AGC CCA AGC AGC CTG AGC GCC AGC GTG GGT	320	
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
1 5 10 15		
GAC AGA GTG ACC ATC ACC TGT AGA GCC AGC GGT AAC ATC CAC AAC TAC	368	
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gly Asn Ile His Asn Tyr		20
20 25 30		
CTG GCT TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGT AAG GCT CCA AAG CTG CTG ATC	416	
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile		
35 40 45		
TAC TAC ACC ACC ACC CTG GCT GAC GGT GTG CCA AGC AGA TTC AGC GGT	464	
Tyr Tyr Thr Thr Thr Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
50 55 60		
AGC GGT AGC GGT ACC GAC TTC ACC TTC ACC ATC AGC AGC CTC CAG CCA	512	
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
65 70 75 80		30
GAG GAC ATC GCC ACC TAC TAC TGC CAG CAC TTC TGG AGC ACC CCA AGG	560	
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Thr Pro Arg		
85 90 95		
ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA C	594	
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
100 105		

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:17:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 126 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:17:

```

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
-19          -15          -10          -5

Val His Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala
          1              5              10

Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gly Asn Ile
    15              20              25

His Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
    30              35              40              45

Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Thr Thr Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg
          50              55              60

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser
          65              70              75

Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser
    80              85              90

Thr Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
    95              100             105

```

10

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:18:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 54 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

30

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: misc_feature
- (B) LOCATION: 1
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "DNA sequence of 598
oligonucleotide"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:18:

TGTCTCACCC AGTGCATATA GGTGTCTTTA ATGTTGAAGC CAGACACGCT GCAG 54

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:19:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 71 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: misc_feature
- (B) LOCATION: 1
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "DNA sequence of 599
oligonucleotide"

10

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:19:

CAGCATTGTC ACTCTGACCT GGAAGTTCGG GTCATATTTA GTATCGCCAC TCGCAGGATC 60

AATCCTTCCA A 71

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:20:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 70 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: misc_feature
- (B) LOCATION: 1
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "DNA sequence of 600
oligonucleotide"

20

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:20:

GGTCCCTTCG CCCAGAACT CCAGAGCATA TCCCGTTGAT ACCCAGATTC CGTCTGCACA 60

ATAATAGACC 70

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:21:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 51 base pairs

30

- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: misc_feature
- (B) LOCATION: 1
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "DNA sequence of 605
oligonucleotide"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:21:

TCCCTTGGCC GAACGTGTAC GCAGAGCTAT AATCCTCCTG GCAGTAGTAG G

51

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:22:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 52 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: misc_feature
- (B) LOCATION: 1
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "DNA sequence of 606
oligonucleotide"

20

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:22:

ATCTGCTTGG GCACACCACT GTAGCGATTG GATGCATAGT AGATCAGCAG CT

52

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:23:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 61 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

30

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: misc_feature
- (B) LOCATION: 1
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "DNA sequence of 607
oligonucleotide"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:23:

TCTGCTGGTA CCAAGCTACA TCATTAGTCA CACTCTGACT GGCCTTACAG GTGATGGTCA 60

C 61

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:24:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 17 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA 10

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: misc_feature
- (B) LOCATION: 1
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "DNA sequence OLIGO 10
oligonucleotide"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:24:

GTAAAACGAC GGCCAGT 17

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:25:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS: 20

- (A) LENGTH: 22 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: misc_feature
- (B) LOCATION: 1
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "DNA sequence of OLIGO 385
oligonucleotide"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:25: 30

CGGGGCCTCT TCGCTATTACGC 22

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:26:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 16 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: misc_feature

(B) LOCATION: 1

(D) OTHER INFORMATION: /note= "DNA sequence of OLIGO 11
oligonucleotide"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:26:

AACAGCTATG ACCATG

16

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:27:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 22 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: misc_feature

(B) LOCATION: 1

(D) OTHER INFORMATION: /note= "DNA sequence of OLIGO 391
oligonucleotide"

20

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:27:

CTCTCTCAGG GCCAGGCGGT GA

22

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:28:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 429 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

30

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: sig_peptide

(B) LOCATION: 1..57

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: mat_peptide

(B) LOCATION: 58..429

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: CDS
(B) LOCATION: 1..429

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: misc_feature
(B) LOCATION: 1
(D) OTHER INFORMATION: /note= "pMDR1019 insert: Stage 1 heavy chain variable region "

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:28:

ATG GAC TGG ACC TGG AGG GTC TTC TGC TTG CTG GCT GTA GCA CCA GGT	48	
Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Cys Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly		10
-19 -15 -10 -5		
GCC CAC TCC CAG GTC CAA CTG CAG GAG AGC GGT CCA GGT CTT GTG AGA	96	
Ala His Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg		
1 5 10		
CCT AGC CAG ACC CTG AGC CTG ACC TGC ACC GTG TCT GCC TTC AAC ATT	144	
Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Asn Ile		
15 20 25		
AAA GAC ACC TAT ATG CAC TGG GTG AGA CAG CCA CCT GGA CGA GGT CTT	192	
Lys Asp Thr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu		20
30 35 40 45		
GAG TGG ATT GGA AGG ATT GAT CCT GCG AGT GGC GAT ACT AAA TAT GAC	240	
Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Ala Ser Gly Asp Thr Lys Tyr Asp		
50 55 60		
CCG AAG TTC CAG GTC AGA GTG ACA ATG CTG GTA GAC ACC AGC AAG AAC	288	
Pro Lys Phe Gln Val Arg Val Thr Met Leu Val Asp Thr Ser Lys Asn		
65 70 75		
CAG TTC AGC CTG AGA CTC AGC AGC GTG ACA GCC GCC GAC ACC GCG GTC	336	
Gln Phe Ser Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val		
80 85 90		
TAT TAT TGT GCA GAC GGA ATG TGG GTA TCA ACG GGA TAT GCT CTG GAC	384	
Tyr Tyr Cys Ala Asp Gly Met Trp Val Ser Thr Gly Tyr Ala Leu Asp		30
95 100 105		
TTC TGG GGC CAA GCG ACC ACC CTC ACC GTC TCC TCA GGT GAG TCC	429	
Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Ser		
110 115 120		

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:29:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 143 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:29:

```

Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Cys Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly
-19          -15          -10          -5

Ala His Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg
      1              5              10

Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Asn Ile
15              20              25

Lys Asp Thr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu
30              35              40              45

Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Ala Ser Gly Asp Thr Lys Tyr Asp
      50              55              60

Pro Lys Phe Gln Val Arg Val Thr Met Leu Val Asp Thr Ser Lys Asn
      65              70              75

Gln Phe Ser Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val
      80              85              90

Tyr Tyr Cys Ala Asp Gly Met Trp Val Ser Thr Gly Tyr Ala Leu Asp
95              100              105

Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Ser
110              115              120

```

10

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:30:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 386 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

30

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: sig_peptide

(B) LOCATION: 1..57

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: mat_peptide

(B) LOCATION: 58..386

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: CDS
(B) LOCATION: 1..386

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: misc_feature
(B) LOCATION: 1
(D) OTHER INFORMATION: /note= "pBAG190 insert: VK1 (DQL)
light chain variable region"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:30:

ATG GGT TGG TCC TGC ATC ATC CTG TTC CTG GTT GCT ACC GCT ACC GGT	48	
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly		10
-19 -15 -10 -5		
GTT CAC TCC GAC ATC CAG CTG ACC CAG AGC CCA AGC ACC CTG AGC GCC	96	
Val His Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala		
1 5 10		
AGC GTG GGT GAC AGA GTG ACC ATC ACC TGT AAG GCC AGT CAG AGT GTG	144	
Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val		
15 20 25		
ACT AAT GAT GTA GCT TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGT AAG GCT CCA AAG	192	
Thr Asn Asp Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys		
30 35 40 45		20
CTG CTG ATC TAC TAT GCA TCC AAT CGC TAC ACT GGT GTG CCA AGC AGA	240	
Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg		
50 55 60		
TTC AGC GGT AGC GGT AGC GGT ACC GAC TTC ACC TTC ACC ATC AGC AGC	288	
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser		
65 70 75		
CTC CAG CCA GAG GAC ATC GCC ACC TAC TAC TGC CAG CAG GAT TAT AGC	336	
Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Ser		
80 85 90		
TCT CCG TAC ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA CGT AAG TG	386	
Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Lys		30
95 100 105		

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:31:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 128 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:31:

```

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
-19          -15          -10          -5

Val His Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala
          1          5          10

Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val
          15          20          25

Thr Asn Asp Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
          30          35          40          45

Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg
          50          55          60

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser
          65          70          75

Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Ser
          80          85          90

Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Lys
          95          100          105

```

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:32:

20

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 429 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: sig_peptide
- (B) LOCATION: 1..57

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: mat_peptide
- (B) LOCATION: 58..429

30

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: CDS
- (B) LOCATION: 1..429

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: misc_feature

(B) LOCATION: 1

(D) OTHER INFORMATION: /note= "pMDR1028 insert: Stage 2
heavy chain variable region"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:32:

ATG GAC TGG ACC TGG AGG GTC TTC TGC TTG CTG GCT GTA GCA CCA GGT	48
Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Cys Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly	
-19 -15 -10 -5	
GCC CAC TCC CAG GTC CAA CTG CAG GAG AGC GGT CCA GGT CTT GTG AGA	96
Ala His Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg	
1 5 10	
CCT AGC CAG ACC CTG AGC CTG ACC TGC ACC GTG TCT GGC TTC AAC ATT	144
Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Asn Ile	
15 20 25	
AAA GAC ACC TAT ATG CAC TGG GTG AGA CAG CCA CCT GGA CGA GGT CTT	192
Lys Asp Thr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu	
30 35 40 45	
GAG TGG ATT GGA AGG ATT GAT CCT GCG AGT GGC GAT ACT AAA TAT GAC	240
Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Ala Ser Gly Asp Thr Lys Tyr Asp	
50 55 60	
CCG AAG TTC CAG GTC AGA GTG ACA ATG CTG GTA GAC ACC AGC AGC AAC	288
Pro Lys Phe Gln Val Arg Val Thr Met Leu Val Asp Thr Ser Ser Asn	
65 70 75	
CAG TTC AGC CTG AGA CTC AGC AGC GTG ACA GCC GCC GAC ACC GCG GTC	336
Gln Phe Ser Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val	
80 85 90	
TAT TAT TGT GCA GAC GGA ATG TGG GTA TCA ACC GGA TAT GCT CTG GAC	384
Tyr Tyr Cys Ala Asp Gly Met Trp Val Ser Thr Gly Tyr Ala Leu Asp	
95 100 105	
TTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA GGT GAG TCC	429
Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Ser	
110 115 120	

10

20

30

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:33:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 143 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:33:

Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Cys Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly
 -19 -15 -10 -5

Ala His Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg
 1 5 10

Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Asn Ile
 15 20 25

Lys Asp Thr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu
 30 35 40 45

Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Ala Ser Gly Asp Thr Lys Tyr Asp
 50 55 60

Pro Lys Phe Gln Val Arg Val Thr Met Leu Val Asp Thr Ser Ser Asn
 65 70 75

Gln Phe Ser Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val
 80 85 90

Tyr Tyr Cys Ala Asp Gly Met Trp Val Ser Thr Gly Tyr Ala Leu Asp
 95 100 105

Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Ser
 110 115 120

10

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:34:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
- (A) LENGTH: 24 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: misc_feature
- (B) LOCATION: 1
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "DNA sequence of 684
 oligonucleotide"

30

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:34:

AGACACCAGC AGCAACCACT TCAG

24

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:35:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 24 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: misc_feature
- (B) LOCATION: 1
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "DNA sequence of 683
oligonucleotide"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:35:

10

TGAACTGGTT GCTGCTGGTG TCTA

24

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:36:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 37 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: misc_feature
- (B) LOCATION: 1
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "DNA sequence of 713
oligonucleotide"

20

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:36:

ACCAGCAGCA ACACAGCCTG GCTGAGACTC AGCAGCG

37

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:37:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 38 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

30

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: misc_feature
- (B) LOCATION: 1
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "DNA sequence of 716
oligonucleotide"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:37:

GCTGAGTCTC AGCCAGGCTG TGTGCTGCT GGTGTCGA

38

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:38:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 429 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: sig_peptide
- (B) LOCATION: 1..57

10

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: mat_peptide
- (B) LOCATION: 58..429

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: CDS
- (B) LOCATION: 1..429

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: misc_feature
- (B) LOCATION: 1
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "pBAG184 insert: STAW heavy chain variable region"

20

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:38:

ATG GAC TGG ACC TGG AGG GTC TTC TGC TTG CTG GCT GTA GCA CCA GGT	48
Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Cys Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly	
-19 -15 -10 -5	
GCC CAC TCC CAG GTC CAA CTG CAG GAG AGC GGT CCA GGT CTT GTG AGA	96
Ala His Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg	
1 5 10	
CCT AGC CAG ACC CTG AGC CTG ACC TGC ACC GTG TCT GGC TTC AAC ATT	144
Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Asn Ile	
15 20 25	
AAA GAC ACC TAT ATG CAC TGG GTG AGA CAG CCA CCT GGA CGA GGT CTT	192
Lys Asp Thr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu	
30 35 40 45	

30

GAG TCG ATT CGA AGC ATT GAT CCT GCG AGT GCC GAT ACT AAA TAT GAC 240
 Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Ala Ser Gly Asp Thr Lys Tyr Asp
 50 55 60

CCG AAG TTC CAG GTC AGA GTG ACA ATG CTG GTA GAC ACC AGC AGC AAC 288
 Pro Lys Phe Gln Val Arg Val Thr Met Leu Val Asp Thr Ser Ser Asn
 65 70 75

ACA GCC TGG CTG AGA CTC AGC AGC GTG ACA GCC GCC GAC ACC GCG GTC 336
 Thr Ala Trp Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val
 80 85 90

TAT TAT TGT GCA GAC GGA ATG TGG GTA TCA ACG GGA TAT GCT CTG GAC 384
 Tyr Tyr Cys Ala Asp Gly Met Trp Val Ser Thr Gly Tyr Ala Leu Asp
 95 100 105

TTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA GGT GAG TCC 429
 Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Ser
 110 115 120

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:39:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 143 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

20

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:39:

Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Cys Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly
 -19 -15 -10 -5

Ala His Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg
 1 5 10

Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Asn Ile
 15 20 25

Lys Asp Thr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu
 30 35 40 45

Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Ala Ser Gly Asp Thr Lys Tyr Asp
 50 55 60

Pro Lys Phe Gln Val Arg Val Thr Met Leu Val Asp Thr Ser Ser Asn
 65 70 75

Thr Ala Trp Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val
 80 85 90

30

Tyr Tyr Cys Ala Asp Gly Met Trp Val Ser Thr Gly Tyr Ala Leu Asp
 95 100 105
 Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Ser
 110 115 120

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:40:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 40 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

10

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: misc_feature
- (B) LOCATION: 1
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "DNA sequence of 706
oligonucleotide"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:40:

AGTTCCAGGT CAAAGCGACA ATTACGGCAG ACACCAGCAA

40

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:41:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 40 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

20

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: misc_feature
- (B) LOCATION: 1
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "DNA sequence of 707
oligonucleotide"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:41:

30

CTTGCTGGTG TCTGCCGTAA TTGTCGCTTT CACCTGGAAC

40

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:42:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 429 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: sig_peptide
(B) LOCATION: 1..57

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: mat_peptide
(B) LOCATION: 58..429

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: CDS
(B) LOCATION: 1..429

10

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: misc_feature
(B) LOCATION: 1
(D) OTHER INFORMATION: /note= "pBAG183 insert: KAITAS
heavy chain variable region"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:42:

ATG GAC TGG ACC TGG AGG GTC TTC TGC TTG CTG GCT GTA GCA CCA GGT	48
Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Cys Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly	
-19 -15 -10 -5	
GCC CAC TCC CAG GTC CAA CTG CAG GAG AGC GGT CCA GGT CTT GTG AGA	96
Ala His Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg	
1 5 10	
CCT AGC CAG ACC CTG AGC CTG ACC TGC ACC GTG TCT GGC TTC AAC ATT	144
Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Asn Ile	
15 20 25	
AAA GAC ACC TAT ATG CAC TGG GTG AGA CAG CCA CCT GGA CGA GGT CTT	192
Lys Asp Thr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu	
30 35 40 45	
GAG TGG ATT GGA AGG ATT GAT CCT GCG AGT GGC GAT ACT AAA TAT GAC	240
Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Ala Ser Gly Asp Thr Lys Tyr Asp	
50 55 60	
CCG AAG TTC CAG GTC AAA GCG ACA ATT ACC CCA GAC ACC AGC AGC AAC	288
Pro Lys Phe Gln Val Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn	
65 70 75	
CAG TTC AGC CTG AGA CTC AGC AGC GTG ACA GCC GCC GAC ACC GCG GTC	336
Gln Phe Ser Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val	
80 85 90	

20

30

TAT TAT TGT CCA GAC GGA ATG TGG GTA TCA ACG GGA TAT GCT CTG GAC 384
 Tyr Tyr Cys Ala Asp Gly Met Trp Val Ser Thr Gly Tyr Ala Leu Asp
 95 100 105

TTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA GGT GAG TCC 429
 Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Ser
 110 115 120

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:43:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 143 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

10

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:43:

Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Cys Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly
 -19 -15 -10 -5

Ala His Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg
 1 5 10

Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Asn Ile
 15 20 25

Lys Asp Thr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu
 30 35 40 45

Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Ala Ser Gly Asp Thr Lys Tyr Asp
 50 55 60

Pro Lys Phe Gln Val Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn
 65 70 75

Gln Phe Ser Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val
 80 85 90

Tyr Tyr Cys Ala Asp Gly Met Trp Val Ser Thr Gly Tyr Ala Leu Asp
 95 100 105

Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Ser
 110 115 120

20

30

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:44:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 36 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: misc_feature

(B) LOCATION: 1

(D) OTHER INFORMATION: /note= "DNA sequence of 768
oligonucleotide"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:44:

CTCAGCAGCG TGACATCTGA GGACACCGCG GTCTAT

36

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:45:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 36 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: misc_feature

(B) LOCATION: 1

(D) OTHER INFORMATION: /note= "DNA sequence of 769
oligonucleotide"

20

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:45:

ATAGACCGCG GTGTCCTCAG ATGTCACGCT GCTGAG

36

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:46:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 372 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

30

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: misc_feature

(B) LOCATION: 1..372

(D) OTHER INFORMATION: /note= "pBAG207 insert: SSE heavy
chain variable region"

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: mat_peptide

(B) LOCATION: 1..372

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: CDS

(B) LOCATION: 1..372

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:46:

CAG GTC CAA CTG CAG GAG AGC GGT CCA GGT CTT GTG AGA CCT AGC CAG	48
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln	
1 5 10 15	
ACC CTG AGC CTG ACC TGC ACC GTG TCT GGC TTC AAC ATT AAA GAC ACC	96
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr	
20 25 30	
TAT ATG CAC TGG GTG AGA CAG CCA CCT GGA CGA GGT CTT GAG TGG ATT	144
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile	
35 40 45	
GGA AGG ATT GAT CCT GCG AGT GGC GAT ACT AAA TAT GAC CCG AAG TTC	192
Gly Arg Ile Asp Pro Ala Ser Gly Asp Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe	
50 55 60	
CAG GTC AGA GTG ACA ATG CTG GTA GAC ACC AGC AGC AAC CAG TTC AGC	240
Gln Val Arg Val Thr Met Leu Val Asp Thr Ser Ser Asn Gln Phe Ser	
65 70 75 80	
CTG AGA CTC AGC AGC GTG ACA TCT GAG GAC ACC GCG GTC TAT TAT TGT	288
Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
85 90 95	
GCA GAC GGA ATG TGG GTA TCA ACG GGA TAT GCT CTG GAC TTC TGG GGC	336
Ala Asp Gly Met Trp Val Ser Thr Gly Tyr Ala Leu Asp Phe Trp Gly	
100 105 110	
CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA GGT GAG TCC	372
Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Ser	
115 120	

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:47:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 124 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

10

20

30

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:47:

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Arg Ile Asp Pro Ala Ser Gly Asp Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe
 50 55 60
 Gln Val Arg Val Thr Met Leu Val Asp Thr Ser Ser Asn Gln Phe Ser
 65 70 75 80
 Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Asp Gly Met Trp Val Ser Thr Gly Tyr Ala Leu Asp Phe Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Ser
 115 120

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:48:

20

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
- (A) LENGTH: 31 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: misc_feature
- (B) LOCATION: 1
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "DNA sequence of 704
oligonucleotide"

30

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:48:

TGCACTGGGT GAAACAGCGA CCTGGACGAG G

31

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:49:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
- (A) LENGTH: 31 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: misc_feature

(B) LOCATION: 1

(D) OTHER INFORMATION: /note= "DNA sequence of 705
oligonucleotide"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:49:

CCTCGTCCAG GTCGCTGTTT CACCCAGTGC A

31

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:50:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 429 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: sig_peptide

(B) LOCATION: 1..57

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: mat_peptide

(B) LOCATION: 58..429

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: CDS

(B) LOCATION: 1..429

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: misc_feature

(B) LOCATION: 1

(D) OTHER INFORMATION: /note= "pBAG185 insert: KRS heavy
chain variable region"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:50:

30

ATG GAC TGG ACC TGG AGG GTC TTC TGC TTG CTG GCT GTA GCA CCA GGT 48
Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Cys Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly
-19 -15 -10 -5

GCC CAC TCC CAG GTC CAA CTG CAG GAG AGC GGT CCA GGT CTT GTG AGA 96
Ala His Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg
1 5 10

CCT AGC CAG ACC CTG AGC CTG ACC TGC ACC GTG TCT GGC TTC AAC ATT 144
 Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Asn Ile
 15 20 25
 AAA GAC ACC TAT ATG CAC TGG GTG AAA CAG CGA CCT GGA CGA GGT CTT 192
 Lys Asp Thr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Arg Gly Leu
 30 35 40 45
 GAG TGG ATT CGA AGG ATT GAT CCT CCC AGT GGC GAT ACT AAA TAT GAC 240
 Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Ala Ser Gly Asp Thr Lys Tyr Asp
 50 55 60
 CCG AAG TTC CAG GTC AGA GTG ACA ATG CTG GTA GAC ACC AGC AGC AAC 288
 Pro Lys Phe Gln Val Arg Val Thr Met Leu Val Asp Thr Ser Ser Asn
 65 70 75
 CAG TTC AGC CTG AGA CTC AGC AGC GTG ACA GCC GCC GAC ACC GCG GTC 336
 Gln Phe Ser Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val
 80 85 90
 TAT TAT TGT GCA GAC GGA ATG TGG GTA TCA ACG GGA TAT GCT CTG GAC 384
 Tyr Tyr Cys Ala Asp Gly Met Trp Val Ser Thr Gly Tyr Ala Leu Asp
 95 100 105
 TTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA GGT GAG TCC 429
 Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Ser
 110 115 120

10

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:51:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 143 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:51:

Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Cys Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly
 -19 -15 -10 -5
 Ala His Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg
 1 5 10
 Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Asn Ile
 15 20 25
 Lys Asp Thr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Arg Gly Leu
 30 35 40 45

30

Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Ala Ser Gly Asp Thr Lys Tyr Asp
 50 55 60
 Pro Lys Phe Gln Val Arg Val Thr Met Leu Val Asp Thr Ser Ser Asn
 65 70 75
 Gln Phe Ser Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val
 80 85 90
 Tyr Tyr Cys Ala Asp Gly Met Trp Val Ser Thr Gly Tyr Ala Leu Asp
 95 100 105
 Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Ser
 110 115 120

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:52:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
- (A) LENGTH: 26 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: misc_feature
- (B) LOCATION: 1
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "DNA sequence of 745
oligonucleotide"

20

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:52:

TGACCTGCAC CGCGTCTGGC TTCAAC

26

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:53:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
- (A) LENGTH: 26 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: linear

30

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: misc_feature
- (B) LOCATION: 1
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "DNA sequence of 746
oligonucleotide"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:53:

TTGAAGCCAG ACGCGGTGCA GGTGAG

26

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:54:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 429 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: sig_peptide
- (B) LOCATION: 1..57

10

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: mat_peptide
- (B) LOCATION: 58..429

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: CDS
- (B) LOCATION: 1..429

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: misc_feature
- (B) LOCATION: 1
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "pBAG195 insert: AS heavy chain variable region"

20

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:54:

ATG GAC TGG ACC TGG AGG GTC TTC TGC TTG CTG GCT GTA GCA CCA GGT	48
Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Cys Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly	
-19 -15 -10 -5	
GCC CAC TCC CAG GTC CAA CTG CAG GAG AGC GGT CCA GGT CTT GTG AGA	96
Ala His Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg	
1 5 10	
CCT AGC CAG ACC CTG AGC CTG ACC TGC ACC GCG TCT GGC TTC AAC ATT	144
Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile	
15 20 25	
AAA GAC ACC TAT ATG CAC TGG GTG AGA CAG CCA CCT GGA CGA GGT CTT	192
Lys Asp Thr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu	
30 35 40 45	
GAG TGG ATT GGA AGG ATT GAT CCT GCG AGT GGC GAT ACT AAA TAT GAC	240
Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Ala Ser Gly Asp Thr Lys Tyr Asp	
50 55 60	

30

CCG AAC TTC CAG GTC AGA GTG ACA ATG CTG GTA GAC ACC AGC AGC AAC 288
 Pro Lys Phe Gln Val Arg Val Thr Met Leu Val Asp Thr Ser Ser Asn
 65 70 75

CAG TTC AGC CTG AGA CTC AGC AGC GTG ACA GCC GCC GAC ACC GCG GTC 336
 Gln Phe Ser Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val
 80 85 90

TAT TAT TGT GCA GAC GGA ATG TCG GTA TCA ACG GCA TAT GCT CTG GAC 384
 Tyr Tyr Cys Ala Asp Gly Met Trp Val Ser Thr Gly Tyr Ala Leu Asp
 95 100 105

TTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA GGT GAG TCC 429
 Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Ser
 110 115 120

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:55:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 143 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:55:

Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Cys Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly
 -19 -15 -10 -5

Ala His Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg
 1 5 10

Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile
 15 20 25

Lys Asp Thr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu
 30 35 40 45

Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Ala Ser Gly Asp Thr Lys Tyr Asp
 50 55 60

Pro Lys Phe Gln Val Arg Val Thr Met Leu Val Asp Thr Ser Ser Asn
 65 70 75

Gln Phe Ser Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val
 80 85 90

Tyr Tyr Cys Ala Asp Gly Met Trp Val Ser Thr Gly Tyr Ala Leu Asp
 95 100 105

20

30

Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Ser
 110 115 120

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:56:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 29 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: misc_feature
- (B) LOCATION: 1
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "DNA sequence of 915
oligonucleotide"

10

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:56:

TATTATTGTG CAAGAGGAAT GTGGGTATC

29

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:57:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 29 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

20

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: misc_feature
- (B) LOCATION: 1
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "DNA sequence of 917
oligonucleotide"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:57:

ATACCCACAT TCCTCTTGCA CAATAATAG

29

30

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:58:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 41 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: misc_feature
- (B) LOCATION: 1
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "DNA sequence of 918
oligonucleotide"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:58:

CTGCACCGTG TCTGGCTTCA CCTTCAGCGA CACCTATATG C

41

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:59:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 41 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

10

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: misc_feature
- (B) LOCATION: 1
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "DNA sequence of 919
oligonucleotide"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:59:

GCATATAGGT GTCGCTGAAG GTGAAGCCAG ACACGGTGCA G

41

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:60:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 31 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: misc_feature
- (B) LOCATION: 1
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "DNA sequence of 697
oligonucleotide"

30

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:60:

GGTGTCCACT CCAGCATCGT GATGACCCAG A

41

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:61:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 31 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: misc_feature
 - (B) LOCATION: 1
 - (D) OTHER INFORMATION: /note= "DNA sequence of 698
oligonucleotide"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:61:

10

TCTGGGTCAT CACGATGCTG GAGTGGACAC C

41

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:62:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 386 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

20

- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: sig_peptide
 - (B) LOCATION: 1..57

- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: mat_peptide
 - (B) LOCATION: 58..386

- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: CDS
 - (B) LOCATION: 1..386

- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: misc_feature
 - (B) LOCATION: 1
 - (D) OTHER INFORMATION: /note= "pBAG198 insert: VK2 (SVMDY)
light chain variable region"

30

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:62:

ATG GGT TGG TCC TGC ATC ATC CTG TTC CTG GTT GCT ACC GCT ACC GGT
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
-19 -15 -10 -5

48

GTC CAC TCC AGC ATC GTG ATG ACC CAG AGC CCA AGC AGC CTG AGC GCC 96
 Val His Ser Ser Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala
 1 5 10

AGC GTG GGT GAC AGA GTG ACC ATC ACC TGT AAG GCC AGT CAG AGT GTG 144
 Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val
 15 20 25

ACT AAT GAT GTA GCT TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGT AAG GCT CCA AAG 192
 Thr Asn Asp Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
 30 35 40 45

CTG CTG ATC TAC TAT GCA TCC AAT CGC TAC ACT GGT GTG CCA GAT AGA 240
 Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg
 50 55 60

TTC ACC GGT AGC CGT TAT GGT ACC GAC TTC ACC TTC ACC ATC AGC AGC 288
 Phe Ser Gly Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser
 65 70 75

CTC CAG CCA GAG GAC ATC GCC ACC TAC TAC TGC CAG CAG GAT TAT AGC 336
 Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Ser
 80 85 90

TCT CCG TAC ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA CGT AAG TG 386
 Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Lys
 95 100 105

10

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:63:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 128 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:63:

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 -19 -15 -10 -5

Val His Ser Ser Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala
 1 5 10

Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val
 15 20 25

Thr Asn Asp Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
 30 35 40 45

30

Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg
 50 55 60
 Phe Ser Gly Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser
 65 70 75
 Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Ser
 80 85 90
 Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Lys
 95 100 105

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:64:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
- (A) LENGTH: 32 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: linear

10

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: misc_feature
- (B) LOCATION: 1
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "DNA sequence of 803
oligonucleotide"

20

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:64:

GGTGTCCACT CCGACATCCA GATGACCCAG AG

32

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:65:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
- (A) LENGTH: 32 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: misc_feature
- (B) LOCATION: 1
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "DNA sequence of 804
oligonucleotide"

30

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:65:

CTCTGGGTCA TCTGGATGTC GGAGTGGACA CC

32

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:66:

(1) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 386 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: sig_peptide
- (B) LOCATION: 1..57

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: mat_peptide
- (B) LOCATION: 58..386

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: CDS
- (B) LOCATION: 1..386

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: misc_feature
- (B) LOCATION: 1
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "pBAG197 insert: VK3 (DQMDY)
light chain variable region"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:66:

ATG GGT TGG TCC TGC ATC ATC CTG TTC CTG GTT GCT ACC GCT ACC GGT	48
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly	
-19 -15 -10 -5	
GTC CAC TCC GAC ATC CAG ATG ACC CAG AGC CCA AGC AGC CTG AGC GCC	96
Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala	
1 5 10	
AGC GTG GGT GAC AGA GTG ACC ATC ACC TGT AAG GCC AGT CAG AGT GTG	144
Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val	
15 20 25	
ACT AAT GAT GTA GCT TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGT AAG GCT CCA AAG	192
Thr Asn Asp Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys	
30 35 40 45	
CTG CTG ATC TAC TAT GCA TCC AAT CGC TAC ACT GGT GTG CCA GAT AGA	240
Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg	
50 55 60	

10

20

30

TTC ACC GGT AGC GGT TAT GGT ACC GAC TTC ACC TTC ACC ATC AGC AGC 288
 Phe Ser Gly Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser
 65 70 75

 CTC CAG CCA GAG GAC ATC GCC ACC TAC TAC TGC CAG CAG GAT TAT AGC 336
 Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Ser
 80 85 90

 TCT CCG TAC ACG TTC GGC CAA GGC ACC AAG CTC GAA ATC AAA CGT AAG TC 386
 Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Lys
 95 100 105

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:67:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 128 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:67:

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 -19 -15 -10 -5

 Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala
 1 5 10

 Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val
 15 20 25

 Thr Asn Asp Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
 30 35 40 45

 Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg
 50 55 60

 Phe Ser Gly Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser
 65 70 75

 Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Ser
 80 85 90

 Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Lys
 95 100 105

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:68:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 429 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid

10

20

30

(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: misc_feature
(B) LOCATION: 1..429
(D) OTHER INFORMATION: /note= "pMDR1023 insert: PDLN heavy chain variable region"

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: sig_peptide
(B) LOCATION: 1..57

10

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: mat_peptide
(B) LOCATION: 58..429

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: CDS
(B) LOCATION: 1..429

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:68:

ATG GAC TGG ACC TGG AGG GTC TTC TGC TTG CTG GCT GTA GCA CCA GGT	48
Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Cys Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly	
-19 -15 -10 -5	
GCC CAC TCC CAG GTC CAA CTG CAG GAG TCC GGT GCT GAA GTT GTT AAA	96
Ala His Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Ala Glu Val Val Lys	
1 5 10	
CCG GGT TCC TCC GTT AAA CTG TCC TGC AAA GCT TCC GGT TTC AAC ATC	144
Pro Gly Ser Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile	
15 20 25	
AAA GAC ACC TAC ATG CAC TGG GTT AAA CAG CGT CCG GGT CAG GGT CTG	192
Lys Asp Thr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu	
30 35 40 45	
GAA TGG ATC GGT CGT ATC GAC CCG GCT TCC GGT GAC ACC AAA TAC GAC	240
Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Ala Ser Gly Asp Thr Lys Tyr Asp	
50 55 60	
CCG AAA TTC CAG GTT AAA GCT ACC ATC ACC GCT GAC GAA TCC ACC TCC	288
Pro Lys Phe Gln Val Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser	
65 70 75	
ACC GCT TAC CTG GAA CTG TCC TCC CTG CGT TCC GAA GAC ACC GCT GTT	336
Thr Ala Tyr Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val	
80 85 90	

20

30

TAC TAC TGC GCT GAC GGT ATG TGG GTT TCC ACC GGT TAC CCT CTG GAC 384
 Tyr Tyr Cys Ala Asp Gly Met Trp Val Ser Thr Gly Tyr Ala Leu Asp
 95 100 105

TTC TGG GGT CAG GGT ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA GGT GAG TCC 429
 Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Ser
 110 115 120

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:69:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 143 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

10

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:69:

Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Cys Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly
 -19 -15 -10 -5

Ala His Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Ala Glu Val Val Lys
 1 5 10

Pro Gly Ser Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile
 15 20 25

Lys Asp Thr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
 30 35 40 45

Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Ala Ser Gly Asp Thr Lys Tyr Asp
 50 55 60

Pro Lys Phe Gln Val Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser
 65 70 75

Thr Ala Tyr Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
 80 85 90

Tyr Tyr Cys Ala Asp Gly Met Trp Val Ser Thr Gly Tyr Ala Leu Asp
 95 100 105

Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Ser
 110 115 120

20

30

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:70:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 383 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single

ATG GGT TGG TCC TGC ATC ATC CTG TTC CTG GTT GCT ACC GGT	48
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly	
-19 -15 -10 -5	
GTT CAC TCC ATC GTT ATG ACC CAG TCC CCG GAC TCC CTG GCT GTT TCC	96
Val His Ser Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser	
1 5 10	
CTG GGT GAA CGT GTT ACC ATC AAC TGC AAA GCT TCC CAG TCC GTT ACC	144
Leu Gly Glu Arg Val Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Thr	
15 20 25	
AAC GAC GTT GCT TGG TAC CAG CAG AAA CCG GGT CAG TCC CCG AAA CTG	192
Asn Asp Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu	
30 35 40 45	
CTG ATC TAC TAC GCT TCC AAC CGT TAC ACC GGT GTT CCG GAC CGT TTC	240
Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe	
50 55 60	
TCC GGT TCC GGT TAC GGT ACC GAC TTC ACC TTC ACC ATC TCC TCC GTT	288
Ser Gly Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val	
65 70 75	
CAG GCT GAA GAC GTT GCT GTT TAC TAC TGC CAG CAG GAC TAC TCC TCC	336
Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser	
80 85 90	

30

CCG TAC ACC TTC GGT GGT GGT ACC AAA CTG GAG ATC TAA GGA TCC TC 383
 Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile *
 95 100 105

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:71:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 124 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:71:

10

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 -19 -15 -10 -5
 Val His Ser Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser
 1 5 10
 Leu Gly Glu Arg Val Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Thr
 15 20 25
 Asn Asp Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu
 30 35 40 45
 Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val
 65 70 75
 Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser
 80 85 90
 Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile *
 95 100 105

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:72:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 60 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

30

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: misc_feature
- (B) LOCATION: 1

(D) OTHER INFORMATION: /note= "Oligo 370-119 corresponding
to 58-117 VH-PDLN"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:72:

CAGGTTTCAGC TGCAGGAGTC CCGTGCTGAA GTTGTTAAAC CCGGTTCTCT CGTTAAACTG 60

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:73:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 60 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

10

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: misc_feature
- (B) LOCATION: 1
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "Oligo 370-120 corresponds
to 118-177 VH-PDLN"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:73:

TCCTGCAAAG CTTCGGGTTT CAACATCAAA GACACCTACA TGCACTGGGT TAAACAGCGT 60

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:74:

20

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 60 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: misc_feature
- (B) LOCATION: 1
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "Oligo 370-121 corresponds
to 178-237 VH-PDLN"

30

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:74:

CCGGGTCAGG GTCTGGAATG GATCGGTCGT ATCGACCCGG CTTCGGGTGA CACCAAATAC 60

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:75:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 66 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: misc_feature

(B) LOCATION: 1

(D) OTHER INFORMATION: /note= "Oligo 370-122 corresponds
to 238-303 VH-PDLN"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:75:

GACCCGAAAT TCCAGGTTAA AGCTACCATC ACCGCTGACG AATCCACCTC CACCGCTTAC 60 10

CTGGAA 66

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:76:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 63 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: misc_feature

(B) LOCATION: 1

(D) OTHER INFORMATION: /note= "Oligo 370-123 corresponds
to 304-366 VH-PDLN"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:76:

CTGTCCTCCC TGC GTTCCGA AGACACCGCT GTTACTACT GCGCTGACGG TATGTGGGTT 60

TCC 63

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:77:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 54 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: misc_feature

(B) LOCATION: 1

30

(D) OTHER INFORMATION: /note= "Oligo 370-124 corresponds to 367-420 VH-PDLN"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:77:

ACCGGTTACG CTCGGGACTT CTGGGGTCAG GGTACCACGG TCACCGTTTC CTCC 54

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:78:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 63 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

10

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iv) ANTI-SENSE: YES

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: misc_feature
- (B) LOCATION: 1
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "Oligo 370-125 corresponds to reverse VH-PDLN 420-358"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:78:

GGAGGAAACG GTGACCGTGG TACCTGACC CCAGAAGTCC AGACCGTAAC CGGTGGAAC 60
CCA 63

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:79:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 47 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iv) ANTI-SENSE: YES

30

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: misc_feature
- (B) LOCATION: 1
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "Oligo 370-126 corresponds to reverse VH-PDLN 357-311"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:79:

CATACCGTCA GCGCAGTAGT AAACAGCGGT GTCTCGGAA CGCAGGG 47

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:80:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 67 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iv) ANTI-SENSE: YES

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: misc_feature
- (B) LOCATION: 1
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "Oligo 370-127 corresponds to reverse VH-PDLN 310-244"

10

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:80:

AGGACAGTTC CAGGTAAGCG GTGGAGGTGG ATTCGTCAGC GGTGATGGTA GCTTTAACCT 60

GGAATTT 67

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:81:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 60 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

20

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iv) ANTI-SENSE: YES

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: misc_feature
- (B) LOCATION: 1
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "Oligo 370-128 corresponds to reverse VH-PDLN 243-186"

30

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:81:

CGGGTCGTAT TTGGTGTCAC CGGAAGCCGG GTCGATACGA CCGATCCATT CCAGACCCTG 60

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:82:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 60 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iv) ANTI-SENSE: YES

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: misc_feature

(B) LOCATION: 1

(D) OTHER INFORMATION: /note= "Oligo 370-129 corresponds to reverse VH-PDLN 185-124"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:82:

ACCCGGACGC TGTTTAACCC AGTGCATGTA GGTGCTTTG ATGTTGAAAC CGGAAGCTTT 60

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:83:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 66 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iv) ANTI-SENSE: YES

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: misc_feature

(B) LOCATION: 1

(D) OTHER INFORMATION: /note= "Oligo 370-130 corresponds to reverse VH-PDLN 123-58"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:83:

GCAGGACAGT TTAACGGAGG AACCCGGTTT AACAACTTCA GCACCGGACT CCTGCAGCTG 60

AACCTG 66

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:84:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 66 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: misc_feature

30

(B) LOCATION: 1

(D) OTHER INFORMATION: /note= "Oligo 370-131 corresponds
to 1-58 VK-PDLN"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:84:

AGCTTACCAT GGGTTGGTCC TGCATCATCC TGTTCTGGT TGCTACGCT ACCGGTGTTT 60
ACTCCA 66

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:85:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 66 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

10

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: misc_feature
- (B) LOCATION: 1
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "Oligo 370-132 corresponds
to 59-124 VK-PDLN"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:85:

TCGTTATGAC CCAGTCCCCG GACTCCCTGG CTGTTCCCT GGGTGAACGT GTTACCATCA 60
ACTGCA 66

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:86:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 66 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: misc_feature
- (B) LOCATION: 1
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "Oligo 370-133 corresponds
to 125-190 VK-PDLN"

30

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:86:

AAGCTTCCCA GTCCGTTACC AACGACGTTG CTTGGTACCA GCAGAAACCG GGTCACTCCC 60
CGAAAC 66

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:87:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 66 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

10

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: misc_feature
- (B) LOCATION: 1
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "Oligo 370-134 corresponds to 191-256 VK-PDLN"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:87:

TGCTGATCTA CTACGCTTCC AACCGTTACA CCGGTGTTCC GGACCGTTTC TCCGGTTCCG 60
GTTACG 66

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:88:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 66 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: misc_feature
- (B) LOCATION: 1
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "Oligo 370-135 corresponds to 257-322 VK-PDLN"

30

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:88:

GTACCGACTT CACCTTCACC ATCTCCTCCG TTCAGGCTGA AGACGTTGCT GTTACTACT 60
GCCAGC 66

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:89:

- (1) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 54 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: misc_feature
- (B) LOCATION: 1
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "Oligo 370-136 corresponds to 323-376 VK-PDLN"

10

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:89:

AGGACTACTC CTCCCCGTAC ACCTTCGGTG GTGGTACCAA ACTGGAGATC TAAG 54

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:90:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 63 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

20

(iv) ANTI-SENSE: YES

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: misc_feature
- (B) LOCATION: 1
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "Oligo 370-137 corresponds to reverse VK-PDLN 380-318"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:90:

GATCCTTAGA TCTCCAGTTT GGTACCACCA CCGAAGGTGT ACGGGGAGGA GTAGTCCTGC 60

TGG 63

30

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:91:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 66 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iv) ANTI-SENSE: YES

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: misc_feature

(B) LOCATION: 1

(D) OTHER INFORMATION: /note= "Oligo 370-138 corresponds
to reverse VK-PDLN 317-252"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:91:

CAGTAGTAAA CAGCAACGTC TTCAGCCTGA ACGGAGGAGA TGGTGAAGGT GAAGTCGGTA 60
CCGTAA 66

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:92:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 66 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iv) ANTI-SENSE: YES

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: misc_feature

(B) LOCATION: 1

(D) OTHER INFORMATION: /note= "Oligo 370-139 corresponds
to reverse VK-PDLN 251-186"

20

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:92:

CCGGAACCGG AGAAACGGTC CGGAACACCG GTGTAACGGT TGGAAAGCGTA GTAGATCACC 60
AGTTTC 66

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:93:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 66 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iv) ANTI-SENSE: YES

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: misc_feature

30

(B) LOCATION: 1

(D) OTHER INFORMATION: /note= "Oligo 370-140 corresponds
to reverse VK-PDLN 185-120"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:93:

GGGGACTGAC CCGGTTTCTG CTGGTACCAA GCAACGTCGT TGGTAACGGA CTGGGAAGCT 60
TTGCAG 66

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:94:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 66 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

10

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iv) ANTI-SENSE: YES

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: misc_feature
- (B) LOCATION: 1
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "Oligo 370-141 corresponds
to reverse VK-PDLN 119-54"

20

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:94:

TTGATGGTAA CACGTTTACC CAGGGAAACA GCCAGGGAGT CCGGGGACTG GGTCATAACG 60
ATGGAG 66

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:95:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 57 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

30

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iv) ANTI-SENSE: YES

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: misc_feature
- (B) LOCATION: 1
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "Oligo 370-142 corresponds
to reverse VK-PDLN 53-1"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:95:

TGAACACCGG TAGCGGTAGC AACCAGGAAC AGGATGATGC AGGACCAACC CATGGTA

57

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:96:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 51 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: misc_feature
- (B) LOCATION: 1
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "DNA sequence of VK1-DQL primer 307-247"

10

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:96:

ACCGCTACCG GTGTTCACTC CGACATCCAG CTGACCCAGA GCCCAAGCAG C

51

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:97:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 56 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

20

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: misc_feature
- (B) LOCATION: 1
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "DNA sequence of VK1-DQL primer 370-210"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:97:

CTGAGGATCC AGAAAGTGCA CTTACGTTTG ATTCCACCT TGGTCCCTTG GCCGAA

56

30

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:98:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 51 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: misc_feature

(B) LOCATION: 1

(D) OTHER INFORMATION: /note= "DNA sequence of VK2-SVMDY
primer 370-269"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:98:

CTCTCCACCG GTGTCCACTC CAGCATCGTG ATGACCCAGA GCCCAAGCAG C

51

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:99:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 51 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

10

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: misc_feature

(B) LOCATION: 1

(D) OTHER INFORMATION: /note= "DNA sequence of VK3-DQMDY
primer 370-268"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:99:

20

CTCTCCACCG GTGTCCACTC CGACATCCAG ATGACCCAGA GCCCAAGCAG C

51

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 31/00	A 6 1 P 31/00	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/02	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 P 37/02	A 6 1 P 37/02	
C 0 7 K 16/28	C 0 7 K 16/28	
C 0 7 K 19/00	C 0 7 K 19/00	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 P 21/02	C 1 2 N 5/00	A

(72)発明者 ロイ アール . ロブ
アメリカ合衆国 0 2 0 9 0 マサチューセッツ, ウェストウッド, ロリング ストリート 6 2

(72)発明者 フランク ジェイ . カール
イギリス国 エイビー 2 3 8 エクスユー, アバディーンシャー, バルメディー, ザ ホールディ
ングズ, パーチリー (番地なし)

(72)発明者 フィリップ アール . テンペスト
イギリス国 エイアール 1 6 アールティー, アバディーン, ブライトン プレイス 6 3

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA61 CA04 CA07 CA20 DA02 EA04 GA11 GA14
GA25 HA01 HA03 HA06
4B064 AG27 CA10 CA19 CC01 CC24 CE12 DA01 DA13
4B065 AA01X AA58X AA72X AA91X AA91Y AA93Y AB01 AC14 BA02 CA25
CA43 CA44 CA46
4C085 AA14 AA16 CC32 DD62 DD88 GG01
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA76 EA20 EA50 FA74
GA26

专利名称(译)	重组抗vla-4抗体分子		
公开(公告)号	JP2005000165A	公开(公告)日	2005-01-06
申请号	JP2004141719	申请日	2004-05-11
申请(专利权)人(译)	Biogen Idec公司 , Emuei公司		
[标]发明人	ロイアールロブ フランクジェイカール フィリップアールテンペスト		
发明人	ロイ アール. ロブ フランク ジェイ. カール フィリップ アール. テンペスト		
IPC分类号	C12N15/09 A61K38/00 A61K39/395 A61P7/02 A61P9/10 A61P11/00 A61P11/06 A61P29/00 A61P31/00 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/02 C07K14/78 C07K16/18 C07K16/28 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00 C12N5/10 C12N15/13 C12P21/02 C12P21/08 C12R1/91 G01N33/53 G01N33/577		
CPC分类号	A61K38/00 A61P11/00 A61P11/06 A61P29/00 A61P31/00 A61P35/00 A61P35/02 C07K16/2842 C07K2317/24 C07K2317/56 C07K2317/92 C07K2319/00		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K39/395.N A61P7/02 A61P9/10.101 A61P11/06 A61P29/00 A61P31/00 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/02 C07K16/28 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12N5/00.A C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.101 C12N5/10		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA61 4B024/CA04 4B024/CA07 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/GA14 4B024/GA25 4B024/HA01 4B024/HA03 4B024/HA06 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC01 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA58X 4B065/AA72X 4B065/AA91X 4B065/AA91Y 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA25 4B065/CA43 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/CC32 4C085/DD62 4C085/DD88 4C085/GG01 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/GA26		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	08/004798 1993-01-12 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供人源化重组抗VLA-4抗体分子，其可用于治疗特异性和非特异性炎症，包括哮喘和炎性肠病，以及诊断和定位炎症部位的方法。ŽSOLUTION：在具有针对VLA-4的特异性和抗原结合位点的人源化重组抗体分子中，可变结构域的至少一个互补决定区（CDR）衍生自非人VLA-4抗体，并且抗体具有HP1 / 2鼠单克隆抗体的效力为20%至100%。Ž

NEWM

WGQGSLVTVSS

ヒト化抗-VLA4:

ステージ	O-A	TT.....
ステージ	O-B	TT.....
ステージ	O-C	TT.....
ステージ	1	TT.....
ステージ	2	TT.....
ステージ	3	TT.....
	(STAW)	TT.....
	(KAITAS)	TT.....
	(SSE)	TT.....
	(KRS)	TT.....
	(AS)	TT.....