明細書

発明の名称

抗ＦＧＦＲ２抗体

技術分野

本発明は、新規な抗体、該抗体の有するアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むヌクレオチド、該ヌクレオチドが挿入されたベクター、該ヌクレオチド又はベクターが導入された細胞、該細胞を培養する工程を含む該抗体の製造方法、該抗体を含有する医薬組成物、該抗体を含有する診断用組成物、該抗体の機能断片、該抗体の修飾体等に関する。

背景技術

線維芽細胞増殖因子（ＦＧＦ）はＦＧＦレセプター（ＦＧＦＲ）シグナルを介して、胚形成、組織ホメオスタシスおよび代謝に重要な役割を果たしていることが知られている(非特許文献１)。ヒトでは、２２のＦＧＦ（ＦＧＦ１乃至１４、および、ＦＧＦ１６乃至２３）およびチロシンキナーゼドメインを有する４つのＦＧＦレセプター（ＦＧＦＲ１乃至４：以下まとめて「ＦＧＦＲｓ」と呼ぶ）が存在する。ＦＧＦＲｓは、２つあるいは３つの免疫グロブリン様ドメイン（ＩｇＤ１乃至３）から成るリガンド結合部位を含む細胞外領域、１回膜貫通領域、およびチロシンキナーゼドメインを含む細胞内領域から構成されている。ＦＧＦＲ１、ＦＧＦＲ２およびＦＧＦＲ３には、ＩＩＩｂおよびＩＩＩｃと呼ばれる各２つのスプライシングバリアントが存在する。これらのアイソフォームはＩｇＤ３の後半において約５０のアミノ酸配列が異なっており、異なる組織分布およびリガンド特異性を示す。一般に、ＩＩＩｂアイソフォームは上皮細胞で発現し、ＩＩＩｃは間葉系細胞で表現することが知られている。ＦＧＦｓがＦＧＦＲｓに結合すると、ＦＧＦＲｓは二量体化し、特定のチロシン残基がリン酸化される。この現象がＦＧＦＲ基質２α（ＦＲＳ２α）のよう

な重要なアダプター蛋白質のリクルートを促進し、ＭＡＰＫおよびＰＩ３Ｋ／Ａｋｔ経路を含む、多数のシグナル経路の活性化を誘導する(1)。その結果、ＦＧＦｓおよびそれらに対応するレセプターは、増殖、分化、運動および生存を含む幅広い細胞機能を制御する。

ＦＧＦＲｓの異常な活性化は、特定のヒトの悪性腫瘍に関わることが知られている（非特許文献１及び2)。特にＦＧＦＲ２シグナル異常と癌との関連性に関しては、ＦＧＦＲ２とそのリガンドの過剰発現、レセプターの変異や遺伝子増幅、およびアイソフォームのスイッチングなどの知見がある。具体的には、ＦＧＦＲ２のイントロン２内の一塩基変異多型（ＳＮＰ）は、ＦＧＦＲ２の高発現による乳癌進行の危険性と相関しているとの報告がある（非特許文献３及び4)。ＦＧＦＲ２を恒常的に活性化するミスセンス変異は、子宮内膜癌、卵巣癌、乳癌、肺癌および胃癌で報告されている（非特許文献２、３及び５)。また、ＦＧＦＲ２遺伝子の増幅や過剰発現が胃癌および乳癌で報告されている（非特許文献２、３及び５)。更に、ＦＧＦＲ２ＩＩＩｂからＦＧＦＲ２ＩＩＩｃへのクラススイッチが前立腺癌や腎癌の進行中に起こり、予後不良と相関することも知られている（非特許文献６及び７)。

以上のように、ＦＧＦＲ２過剰発現あるいは変異、ＩＩＩｂからＩＩＩｃへのスイッチングと多くのタイプの癌との関連性から、ＦＧＦＲ２が癌に対する優れた治療標的となる可能性が示唆されている。実際に腫瘍形成におけるＦＧＦＲ２の役割を明らかにするとともに、ＦＧＦＲ２の癌治療標的としての可能性を見極めるために、ＦＧＦＲ２に対するモノクローナル抗体が取得され、前臨床試験で抗腫瘍作用が評価されている（非特許文献８及び９)。いずれの抗体もＦＧＦＲ２ＩＩＩｂに対するリガンドからのシグナルを阻害する中和作用を有することは示されているが、ＡＤＣＣなどのエフェクター作用やＩＩＩｃに対する中和作用を有する機能抗体は報告されていない。

先行技術文献

非特許文献

非特許文献１：エスワラクマル他 (Eswarakumar, V.P., et al.)、ジャーナル・オブ・サイトカイン・グロース・ファクター・レビュー (J. Cytokine Growth Factor Rev.)、２００５年４月刊、１６巻（２号)、１３９乃至１４９頁、２００５年２月１日電子公表、レビュー (Review)

非特許文献２：ターナー及びグローセ (Turner, N. and Grose, R.)、ネイチャー・レビュー・オブ・キャンサー (Nat. Rev. Cancer)、２０１０年２月刊、１０巻（２号)、１１６乃至１２９頁、レビュー (Review)

非特許文献３：イーストン他 (Easton, D.F., et al.)、ネイチャー (Nature)、２００７年６月２８日刊、４４７巻（７１４８号)、１０８７乃至１０９３頁

非特許文献４：ハンター他 (Hunter DJ, et al.)、ネイチャー・ジェネティクス (Nat. Genet.)、２００７年７月刊、３９巻（７号)、８７０乃至８７４頁、２００７年５月２７日電子公表

非特許文献５：カトウ及びカトウ (Katoh, Y. and Katoh, M.)、インターナショナル・ジャーナル・オブ・モレキュラー・メディシン (Int. J. Mol. Med.)、２００９年３月刊、２３巻（３号)、３０７乃至３１１頁、レビュー (Review)

非特許文献６：チャファー (Chaffer, C.L., et al.)、ディファレンシエーション (Differentiation)、２００７年１１月刊、７５.巻（９号)、８３１乃至８４２頁、２００７年８月１４日電子公表、レビュー (Review)

非特許文献７：カーステンズ他 (Carstens, R.P., et al.) オンコジーン (Oncogene)、１９９７年１２月１８日刊、１５巻（２５号)、３０５９乃至３０６５頁

非特許文献８：ツァオ他 (Zhao, W.M., et al.)、クリニカル・キャンサー・リサーチ (Clin. Cancer Res.)、２０１年１２月１日刊、１６巻（２３号)、５７５０乃至５７５８頁、２０１０年７月２９日電子公表

非特許文献９：バイ他(Bai, A., et al.)、キャンサー・リサーチ(Cancer Res.、２０１０年１０月１日刊、７０巻（１９号)、７６３０乃至７６３９頁、２０１０年８月１３日電子公表

発明の概要

発明が解決しようとする課題

本発明の一つの課題は、ＦＧＦＲ２に対する抗体を提供することである。

本発明の他の一つの課題は抗癌作用を有する抗ＦＧＦＲ２抗体を含有する医薬組成物等を提供することである。

また、本発明の課題には、該抗体が有するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド、該ヌクレオチドが挿入されたベクター、該ヌクレオチド又はベクターが導入された細胞、該細胞を培養する工程を含む該抗体の製造方法等が含まれる。

さらに、本発明の他の一つの課題は、該抗体を用いた癌の治療方法を提供することである。

課題を解決するための手段

発明者らは上記課題を解決するために鋭意、検討を行い、新規な抗ＦＧＦＲ２抗体を創出し、該抗体が抗癌作用を有することを見出し、本発明を完成した。

本発明は、

（１）

抗体依存性細胞傷害活性を有し、且つ、線維芽細胞増殖因子受容体（ｆｉｂｒｏｂｌａｓｔ ｇｒｏｗｔｈ ｆａｃｔｏｒ ｒｅｃｅｐｔｏｒ：FGFR）に結合する抗体又はその機能断片、

（２）

線維芽細胞増殖因子受容体（ＦＧＦＲ）がヒトＦＧＦＲである、（１）記載の抗体又はその機能断片、

（３）

線維芽細胞増殖因子受容体（ＦＧＦＲ）がＦＧＦＲ２である、（１）又は（２）記載の抗体又はその機能断片、

（４）

ヒト線維芽細胞増殖因子受容体２（ヒトＦＧＦＲ２）ＩＩＩｂ及び/又はヒト線維芽細胞増殖因子受容体２（ヒトＦＧＦＲ２）ＩＩＩｃに結合する、（１）乃至（３）のいずれか一つに記載の抗体又はその機能断片、

（５）

ヒト線維芽細胞増殖因子受容体２（ヒトＦＧＦＲ２）ＩＩＩｂ及びヒト線維芽細胞増殖因子受容体（ヒトＦＧＦＲ２）ＩＩＩｃに結合する、（１）乃至（４）のいずれか一つに記載の抗体又はその機能断片、

（６）

ヒト線維芽細胞増殖因子受容体２の有する免疫グロブリン様ドメインの一つ又は二つ以上に結合する、（１）乃至（５）のいずれか一つに記載の抗体又はその機能断片、

（７）

ヒト線維芽細胞増殖因子受容体２の有する免疫グロブリン様ドメイン２に結合する、（１）乃至（６）のいずれか一つに記載の抗体又はその機能断片、

（８）

ヒト線維芽細胞増殖因子受容体２の有する免疫グロブリン様ドメイン３に結合する、（１）乃至（４）及び（６）のいずれか一つに記載の抗体又はその機能断片、

（９）

ヒト線維芽細胞増殖因子受容体２（ヒトＦＧＦＲ２）ＩＩＩｂ及び/又はヒト線維芽細胞増殖因子受容体２（ヒトＦＧＦＲ２）ＩＩＩｃに対する中和活性を有する、（１）乃至（８）のいずれか一つに記載の抗体又はその機能断片、

（１０）

ヒト線維芽細胞増殖因子受容体２（ヒトＦＧＦＲ２）ＩＩＩｂ及びヒト線維芽細胞増殖因子受容体２（ヒトＦＧＦＲ２）ＩＩＩｃに対する中和活性を有する、（１）乃至（９）のいずれか一つに記載の抗体又はその機能断片、

（１１）

抗腫瘍活性を有する、（１）乃至（１０）のいずれか一つに記載の抗体又はその機能断片、

（１２）

イン・ビボ（ｉｎ　ｖｉｖｏ）で抗腫瘍活性を示す、（１１）記載の抗体又はその機能断片、

（１３）

配列表の配列番号５２（図６０）に示されるアミノ酸配列もしくは該アミノ酸配列において１つ又は２つのアミノ酸が置換されてなるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１、配列表の配列番号５３（図６１）に示されるアミノ酸配列もしくは該アミノ酸配列において１つ又は２つのアミノ酸が置換されてなるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２及び配列表の配列番号５４（図６２）に示されるアミノ酸配列もしくは該アミノ酸配列において１つ又は２つのアミノ酸が置換されてなるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３を含むことからなる重鎖、並びに、配列表の配列番号６１（図６９）に示されるアミノ酸配列もしくは該アミノ酸配列において１つ又は２つのアミノ酸が置換されてなるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１、配列表の配列番号６２（図７０）に示されるアミノ酸配列もしくは該アミノ酸配列において１つ又は２つのアミノ酸が置換されてなるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２及び配列表の配列番号６３（図７１）に示されるアミノ酸配列もしくは該アミノ酸配列において１つ又は２つのアミノ酸が置換されてなるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ３を含むことからなる軽鎖からなり、且つヒトＦＧＦＲ２に結合する、（１）乃至（４）、（６）、（８）、（９）、（１１）及び（１２）のいずれか一つに記載の抗体又はその機能断片、

（１４）

配列表の配列番号５５（図６３）に示されるアミノ酸配列もしくは該アミノ酸配列において１つ又は２つのアミノ酸が置換されてなるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１、配列表の配列番号５６（図６４）に示されるアミノ酸配列もしくは該アミノ酸配列において１つ又は２つのアミノ酸が置換されてなるアミノ

酸配列からなるＣＤＲＨ２及び配列表の配列番号５７（図６５）に示されるアミノ酸配列もしくは該アミノ酸配列において１つ又は２つのアミノ酸が置換されてなるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３を含むことからなる重鎖、並びに、配列表の配列番号６４（図７２）に示されるアミノ酸配列もしくは該アミノ酸配列において１つ又は２つのアミノ酸が置換されてなるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１、配列表の配列番号６５（図７３）に示されるアミノ酸配列もしくは該アミノ酸配列において１つ又は２つのアミノ酸が置換されてなるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２及び配列表の配列番号６６（図７４）に示されるアミノ酸配列もしくは該アミノ酸配列において１つ又は２つのアミノ酸が置換されてなるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ３を含むことからなる軽鎖からなり、且つヒトＦＧＦＲ２に結合する、（１）乃至（７）及び（９）乃至（１２）のいずれか一つに記載の抗体又はその機能断片、

（１５）

配列表の配列番号５８（図６６）に示されるアミノ酸配列もしくは該アミノ酸配列において１つ又は２つのアミノ酸が置換されてなるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１、配列表の配列番号５９（図６７）に示されるアミノ酸配列もしくは該アミノ酸配列において１つ又は２つのアミノ酸が置換されてなるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２及び配列表の配列番号６０（図６８）に示されるアミノ酸配列もしくは該アミノ酸配列において１つ又は２つのアミノ酸が置換されてなるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３を含むことからなる重鎖、並びに、配列表の配列番号６７（図７５）に示されるアミノ酸配列もしくは該アミノ酸配列において１つ又は２つのアミノ酸が置換されてなるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１、配列表の配列番号６８（図７６）に示されるアミノ酸配列もしくは該アミノ酸配列において１つ又は２つのアミノ酸が置換されてなるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２及び配列表の配列番号６９（図７７）に示されるアミノ酸配列もしくは該アミノ酸配列において１つ又は２つのアミノ酸が置換されてなるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ３を含むことからなる軽鎖からなり、且

つヒトＦＧＦＲ２に結合する、（１）乃至（７）及び（９）乃至（１２）のいずれか一つに記載の抗体又はその機能断片、

（１６）

ＣＤＲＨ３が配列表の配列番号６０（図６８）に示されるアミノ酸配列において１つ又は２つのアミノ酸が置換されてなるアミノ酸配列からなる、（１５）記載の抗体又はその機能断片、

（１７）

抗体がモノクローナル抗体である、（１）乃至（１６）のいずれか一つに記載の抗体又はその機能断片、

（１８）

抗体がキメラ抗体である、（１）乃至（１７）のいずれか一つに記載の抗体又はその機能断片、

（１９）

抗体がヒト化抗体である、（１）乃至（１８）のいずれか一つに記載の抗体又はその機能断片、

（２０）

抗体が下記（ｉ）乃至（ｘｉｘ）から選択される、（１９）記載の抗体又はその機能断片：

（ｉ）配列番号７３（図８１）で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号２１乃至２３５を含む軽鎖、および、配列番号９７（図１０５）で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号２０乃至４６７を含む重鎖、を含んでなるヒト化抗体（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１９／Ｌ１）；

（ｉｉ）配列番号７３（図８１）で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号２１乃至２３５を含む軽鎖、および、配列番号９７（図１０５）で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号２０乃至４６７を含む重鎖、を含んでなるヒト化抗体（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１２／Ｌ１）；

（ｉｉｉ）配列番号７３（図８１）で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号２

１乃至２３５を含む軽鎖、および、配列番号８９（図９７）で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号２０乃至４６７を含む重鎖、を含んでなるヒト化抗体（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ８／Ｌ１）；

（ｉｖ）配列番号７３（図８１）で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号２１乃至２３５を含む軽鎖、および、配列番号９５（図１０３）で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号２０乃至４６７を含む重鎖、を含んでなるヒト化抗体（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１１／Ｌ１）；

（ｖ）配列番号７３（図８１）で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号２１乃至２３５を含む軽鎖、および、配列番号８３（図９１）で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号２０乃至４６７を含む重鎖、を含んでなるヒト化抗体（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ５／Ｌ１）；

（ｖｉ）配列番号７３（図８１）で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号２１乃至２３５を含む軽鎖、および、配列番号７５（図８３）で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号２０乃至４６７を含む重鎖、を含んでなるヒト化抗体（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１／Ｌ１）；

（ｖｉｉ）配列番号７３（図８１）で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号２１乃至２３５を含む軽鎖、および、配列番号７７（図８５）で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号２０乃至４６７を含む重鎖、を含んでなるヒト化抗体（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ２／Ｌ１）；

（ｖｉｉｉ）配列番号７３（図８１）で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号２１乃至２３５を含む軽鎖、および、配列番号７９（図８７）で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号２０乃至４６７を含む重鎖、を含んでなるヒト化抗体（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ３／Ｌ１）；

（ｉｘ）配列番号７３（図８１）で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号２１乃至２３５を含む軽鎖、および、配列番号８１（図８９）で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号２０乃至４６７を含む重鎖、を含んでなるヒト化抗体（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ４／Ｌ１）；

（ｘ）配列番号７３（図８１）で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号２１乃至２３５を含む軽鎖、および、配列番号８５（図９３）で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号２０乃至４６７を含む重鎖、を含んでなるヒト化抗体（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ６／Ｌ１）；

（ｘｉ）配列番号７３（図８１）で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号２１乃至２３５を含む軽鎖、および、配列番号８７（図９５）で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号２０乃至４６７を含む重鎖、を含んでなるヒト化抗体（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ７／Ｌ１）；

（ｘｉｉ）配列番号７３（図８１）で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号２１乃至２３５を含む軽鎖、および、配列番号９１（図９９）で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号２０乃至４６７を含む重鎖、を含んでなるヒト化抗体（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ９／Ｌ１）；

（ｘｉｉｉ）配列番号７３（図８１）で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号２１乃至２３５を含む軽鎖、および、配列番号９３（図１０１）で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号２０乃至４６７を含む重鎖、を含んでなるヒト化抗体（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１０／Ｌ１）。

（ｘｉｖ）配列番号７３（図８１）で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号２１乃至２３５を含む軽鎖、および、配列番号９９（図１０７）で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号２０乃至４６７を含む重鎖、を含んでなるヒト化抗体（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１３／Ｌ１）；

（ｘｖ）配列番号７３（図８１）で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号２１乃至２３５を含む軽鎖、および、配列番号１０１（図１０９）で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号２０乃至４６７を含む重鎖、を含んでなるヒト化抗体（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１４／Ｌ１）；

（ｘｖｉ）配列番号７３（図８１）で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号２１乃至２３５を含む軽鎖、および、配列番号１０３（図１１１）で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号２０乃至４６７を含む重鎖、を含んでなるヒト化抗

体（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１５／Ｌ１）。

（ｘｖｉｉ）配列番号７３（図８１）で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号２１乃至２３５を含む軽鎖、および、配列番号１０５（図１１３）で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号２０乃至４６７を含む重鎖、を含んでなるヒト化抗体（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１６／Ｌ１）；

（ｘｉｉｉ）配列番号７３（図８１）で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号２１乃至２３５を含む軽鎖、および、配列番号１０７（図１１５）で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号２０乃至４６７を含む重鎖、を含んでなるヒト化抗体（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１７／Ｌ１）；および

（ｘｉｘ）配列番号７３（図８１）で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号２１乃至２３５を含む軽鎖、および、配列番号１０９（図１１７）で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号２０乃至４６７を含む重鎖、を含んでなるヒト化抗体（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１８／Ｌ１）、

（２１）

（２０）に記載の抗体の重鎖および軽鎖のアミノ酸配列とそれぞれ９５％以上同一なアミノ酸配列を含む重鎖および軽鎖を含んでなり、且つヒトＦＧＦＲ２に結合する、（１）乃至（１２）のいずれか一つに記載の抗体又はその機能断片、

（２２）

（１３）乃至（１６）および（２０）のいずれか一つに記載の抗体が認識する抗原上の部位に結合する、（１）乃至（１２）のいずれか一つに記載の抗体又はその機能断片、

（２３）

（１３）乃至（１６）および（２０）のいずれか一つに記載の抗体と、ヒトＦＧＦＲ２への結合において競合する、（１）乃至（１２）のいずれか一つに記載の抗体又はその機能断片、

（２４）

配列番号７０（図７８）又は配列番号７１（図７９）で示されるアミノ酸配列中の１５５番目のチロシン（Ｔｙｒ）、１５７番目のスレオニン（Ｔｈｒ）、１７６番目のリジン（Ｌｙｓ）、１８１番目のアラニン（Ａｌａ）、１８２番目のグリシン（Ｇｌｙ）、１８３番目のグリシン（Ｇｌｙ）、１８４番目のアスパラギン（Ａｓｎ）、１８５番目のプロリン（Ｐｒｏ）、１８６番目のメチオニン（Ｍｅｔ）、１８８番目のスレオニン（Ｔｈｒ）、２００番目の（グルタミン）、２０１番目のグルタミン酸（Ｇｌｕ）、２０５番目のグリシン（Ｇｌｙ）、２０６番目のグリシン（Ｇｌｙ）、２０８番目のリジン（Ｌｙｓ）、２０９番目のバリン（Ｖａｌ）、２１０番目のアルギニン（Ａｒｇ）、２１１番目のアスパラギン（Ａｓｎ）、２１２番目のグルタミン（Ｇｌｎ）、２１３番目のヒスチジン（Ｈｉｓ）、２１４番目のトリプトファン（Ｔｒｐ）、および、２１７番目のイソロイシン（Ｉｌｅ）の各残基から構成される、ヒトＦＧＦＲ２上のエピトープに結合する、（１）乃至（１２）のいずれか一つに記載の抗体又はその機能断片、（２５）

配列番号７０（図７８）又は配列番号７１（図７９）で示されるアミノ酸配列中の１５５番目のチロシン（Ｔｙｒ）、１５７番目のスレオニン（Ｔｈｒ）、１７６番目のリジン（Ｌｙｓ）、１８１番目のアラニン（Ａｌａ）、１８２番目のグリシン（Ｇｌｙ）、１８３番目のグリシン（Ｇｌｙ）、１８４番目のアスパラギン（Ａｓｎ）、１８５番目のプロリン（Ｐｒｏ）、１８６番目のメチオニン（Ｍｅｔ）、１８８番目のスレオニン（Ｔｈｒ）、２００番目の（グルタミン）、２０１番目のグルタミン酸（Ｇｌｕ）、２０５番目のグリシン（Ｇｌｙ）、２０６番目のグリシン（Ｇｌｙ）、２０８番目のリジン（Ｌｙｓ）、２０９番目のバリン（Ｖａｌ）、２１０番目のアルギニン（Ａｒｇ）、２１１番目のアスパラギン（Ａｓｎ）、２１２番目のグルタミン（Ｇｌｎ）、２１３番目のヒスチジン（Ｈｉｓ）、２１４番目のトリプトファン（Ｔｒｐ）、および、２１７番目のイソロイシン（Ｉｌｅ）の各残基との間で相互作用距離を有する、（１）乃至（１２）のいずれか一つに記載の抗体又はその機能断片、

（２６）

相互作用距離が６オングストローム以下である、（２５）記載の抗体又はその機能断片、

（２７）

相互作用距離が４オングストローム以下である、（２５）または（２６）記載の抗体又はその機能断片、

（２８）

抗体がヒト抗体である、（１）乃至（１２）および（２１）乃至（２７）のいずれか一つに記載の抗体又はその機能断片、

（２９）

ヒトＦＧＦＲ２へのＦＧＦの結合を阻害する、（１）乃至（２８）のいずれか一つに記載の抗体又はその機能断片、

（３０）

抗体依存性細胞傷害活性及び／又は抗体依存性細胞媒介食活性を有する、（１）乃至（２９）のいずれか一つに記載の抗体又はその機能断片、

（３１）

下記（ｉ）乃至（ｉｉｉ）のいずれか一つに記載のヌクレオチド：

（ｉ）（１）乃至（３０）のいずれか一つに記載の抗体の重鎖または軽鎖の一部または全部のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含んでなるヌクレオチド；

（ｉｉ）（１）乃至（３０）のいずれか一つに記載の抗体の重鎖または軽鎖の一部または全部のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む塩基配列からなるヌクレオチド；および

（ｉｉｉ）（１）乃至（３０）のいずれか一つに記載の抗体の重鎖または軽鎖の一部または全部のアミノ酸配列をコードする塩基配列からなるヌクレオチド、

（３２）

（３１）記載のヌクレオチドが挿入された組換えベクター、

（３３）

（３１）記載のヌクレオチド又は（３２）記載の組換えベクターが導入された組換え細胞、

（３４）

（１）乃至（３０）のいずれか一つに記載の抗体又はその機能断片を産生する細胞、

（３５）

下記の工程（ｉ）及び（ｉｉ）を含むことからなる、（１）乃至（３０）のいずれか一つに記載の抗体又はその機能断片の製造方法：

（ｉ）（３３）または（３４）記載の細胞を培養する工程；および

（ｉｉ）前記工程（ｉ）で得られた培養物から（１）乃至（３０）のいずれか一つに記載の抗体又はその機能断片を回収する工程、

（３６）

（３５）に記載の方法により得られる、（１）乃至（１２）のいずれか一つに記載の抗体またはその機能断片、

（３７）

重鎖または軽鎖のアミノ末端またはカルボキシル末端において１乃至５個のアミノ酸が欠失してなる、（１）乃至（３０）および（３６）記載のいずれか一つに記載の抗体またはその機能断片。

（３８）

（１）乃至（３０）、（３６）および（３７）のいずれか一つに記載の抗体又はその機能断片の修飾体、

（３９）

糖鎖修飾が調節されてなる、（３８）記載の修飾体、

（４０）

抗体が（２０）の（ｉ）乃至（ｘｉｘ）のいずれか一つから選択される、（３９）記載の修飾体、

（４１）

（１）乃至（３０）、（３６）および（３７）のいずれか一つに記載の抗体もしくはその機能断片、または（３８）乃至（４０）のいずれか一つに記載の修飾体を有効成分として含んでなる医薬組成物、

（４２）

抗癌剤である、（４１）記載の医薬組成物、

（４３）

癌がＦＧＦＲ２陽性である、（４２）記載の医薬組成物、

（４４）

（１）乃至（３０）、（３６）および（３７）のいずれか一つに記載の抗体もしくはその機能断片、または（３８）乃至（４０）のいずれか一つに記載の修飾体を含んでなる癌の検査用または診断用の組成物、

（４５）

ヒトＦＧＦＲ２ＩＩＩｂ選択性を有する抗体もしくはその機能断片またはその修飾体を含む組成物、

（４６）

抗体が（１３）記載のＣＤＲＨ１乃至ＣＤＲＨ３を含む重鎖およびＣＤＲＬ１乃至ＣＤＲＬ３を含む軽鎖を含んでなる、（４５）記載の組成物、

（４７）

抗体が配列番号１２（図２０）で示されるアミノ酸配列を有する重鎖可変領域および配列番号２１（図２９）で示されるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含んでなる、（４６）記載の組成物、

（４８）

抗体がキメラ抗体またはラット抗体である、（４６）または（４７）記載の組成物、

（４９）

ヒトＦＧＦＲ２ＩＩＩｂの検出用または測定用である、（４５）乃至（４８）のいずれか一つに記載の組成物、

（５０）

（４５）乃至（４８）のいずれか一つに記載の組成物と被検サンプルを接触させる工程を含むことからなる、ヒトＦＧＦＲ２ＩＩＩｂを検出又は測定する方法、

（５１）

下記の工程（ｉ）乃至（ｉｉｉ）を含むことからなる、ヒトＦＧＦＲ２ＩＩＩｃを検出または測定する方法：

（ｉ）ヒトＦＧＦＲ２ＩＩＩｂとヒト２ＦＧＦＲＩＩＩｃに選択的に結合する抗体もしくはその機能断片またはその修飾体を含む組成物と被検サンプルを接触させ、被検サンプル中のヒトＦＧＦＲ２ＩＩＩｂとヒトＦＧＦＲ２ＩＩＩｃを検出または測定する工程；

（ｉｉ）（４５）乃至（４９）のいずれか一つに記載の組成物と被検サンプルを接触させ、被検サンプル中のヒトＦＧＦＲ２ＩＩＩｂを検出または測定する工程；

（ｉｉｉ）工程（ｉ）における検出または測定の結果と工程（ｉｉ）における検出または測定の結果を比較するか、または工程（ｉ）における検出または測定の結果から工程（ｉｉ）における検出または測定の結果を差し引くことにより、被検サンプル中のヒトＦＧＦＲ２ＩＩＩｃの検出または測定の結果または値を得る工程、

（５２）

ヒトＦＧＦＲ２陽性癌の診断または検査用である、（４４）乃至（４９）のいずれか一つに記載の組成物、または、（５０）又は（５１）記載の方法、

（５３）

下記の工程（ｉ）及び（ｉｉ）を含む、（４１）乃至（４３）のいずれか一つに記載の医薬組成物を投与する個体の同定方法：

（ｉ）（４４）乃至（４９）のいずれか一つに記載の組成物と個体由来のサンプルを接触させる工程；および

（ｉｉ）該サンプル中にヒトＦＧＦＲ２が検出された場合、該個体を陽性と判定する工程、

（５４）

ヒトＦＧＦＲ２がヒトＦＧＦＲ２ＩＩＩｂである、（５３）記載の方法、

（５５）

ヒトＦＧＦＲ２がヒトＦＧＦＲ２ＩＩＩｃおよびヒトＦＧＦＲ２ＩＩＩｂである、（５３）記載の方法、

（５６）

（５３）乃至（５５）のいずれか一つに記載の方法に用いられる、（４４）乃至（４９）のいずれか一つに記載の組成物、

（５７）

該個体が癌に罹患しているかまたはそのリスクがある、（５３）乃至（５５）のいずれか一つに記載の方法、または（５６）記載の組成物、

（５８）

（５３）乃至（５５）のいずれか一つに記載の方法により陽性と同定された個体に投与される、（４１）乃至（４３）のいずれか一つに記載の医薬組成物、

（５９）

（１）乃至（３０）、（３６）および（３７）のいずれか一つに記載の抗体もしくはその機能断片、または（３８）乃至（４０）のいずれか一つに記載の修飾体を含んでなる試薬、

（６０）

下記工程（ｉ）乃至（ｉｉｉ）を含むことからなる、抗腫瘍活性を有する物質の同定方法：

（ｉ）被検物質を、配列番号７０（図７８）又は配列番号７１（図７９）で示されるアミノ酸配列中のアミノ酸番号１５５のチロシン（Ｔｙｒ）乃至２１７番目のイソロイシン（Ｉｌｅ）を含む蛋白質と接触させる工程；

（ｉｉ）該蛋白質中の、配列番号７０で示されるアミノ酸配列中の１５５番目

のチロシン（Ｔｙｒ）、１５７番目のスレオニン（Ｔｈｒ）、１７６番目のリジン（Ｌｙｓ）、１８１番目のアラニン（Ａｌａ）、１８２番目のグリシン（Ｇｌｙ）、１８３番目のグリシン（Ｇｌｙ）、１８４番目のアスパラギン（Ａｓｎ）、１８５番目のプロリン（Ｐｒｏ）、１８６番目のメチオニン（Ｍｅｔ）、１８８番目のスレオニン（Ｔｈｒ）、２００番目の（グルタミン）、２０１番目のグルタミン酸（Ｇｌｕ）、２０５番目のグリシン（Ｇｌｙ）、２０６番目のグリシン（Ｇｌｙ）、２０８番目のリジン（Ｌｙｓ）、２０９番目のバリン（Ｖａｌ）、２１０番目のアルギニン（Ａｒｇ）、２１１番目のアスパラギン（Ａｓｎ）、２１２番目のグルタミン（Ｇｌｎ）、２１３番目のヒスチジン（Ｈｉｓ）、２１４番目のトリプトファン（Ｔｒｐ）、および、２１７番目のイソロイシン（Ｉｌｅ）の各残基と、該物質の距離を測定又は決定する工程；および、

（ｉｉｉ）各残基と該物質が相互作用距離を有する場合、該物質を陽性と判定する工程、

（６１）

下記工程（ｉｖ）をさらに含む、（６０）に記載の方法：

（ｉｖ）該物質の抗腫瘍活性を測定する工程、

（６２）

該物質が抗体、その機能断片もしくはその修飾体、またはペプチドである、（６０）又は（６１）記載の方法、

（６３）

（６０）又は（６１）記載の工程（ｉｉｉ）において陽性と判定された物質を遺伝子組換え、ペプチド合成又はインビトロ翻訳を含む工程により調製することからなる、該物質の製造方法、

（６４）

さらなる薬剤を含む、（４１）乃至（４３）および（５８）のいずれか一つに記載の医薬組成物、

（６５）

さらなる化合物とコンジュゲートされた、（１）乃至（３０）、（３６）および（３７）のいずれか一つに記載の抗体もしくはその機能断片、または、（３８）乃至（４０）のいずれか一つに記載の修飾体、および、

（６６）

（６５）記載の抗体、機能断片または修飾体を含む、（４１）乃至（４３）、（５８）および（６４）記載のいずれか一つに記載の医薬組成物、

等に関する。

発明の効果

本発明の提供する抗体を用いることにより各種癌の治療または予防、ならびに、各種癌の検査または診断が可能となる。

図面の簡単な説明

図１は、ラット抗ＦＧＦＲ２抗体（ＦＲ２－１０、ＦＲ２－１３およびＦＲ２－１４）のヒトＦＧＦＲ２に対する結合活性をフローサイトメトリー法により検証した図である。縦軸はフローサイトメトリー法により測定された平均蛍光強度の相対値を示す。

図２は、ラット抗ＦＧＦＲ２抗体（ＦＲ２－１０、ＦＲ２－１３およびＦＲ２－１４）のヒトＦＧＦＲ２結合エピトープをフローサイトメトリー法により検証した図である。縦軸はフローサイトメトリー法により測定された平均蛍光強度の相対値を示す

図３Ａは、ラット抗ＦＧＦＲ２抗体（ＦＲ２－１０、ＦＲ２－１３およびＦＲ２－１４）のヒトＦＧＦＲ２ＩＩＩｂに対するシグナル中和活性をＥｌｋ１トランスレポーターアッセイ法により示した図である。

図３Ｂは、ラット抗ＦＧＦＲ２抗体（ＦＲ２－１０、ＦＲ２－１３およびＦＲ２－１４）のヒトＦＧＦＲ２ＩＩＩｃに対するシグナル中和活性をＥｌｋ１トランスレポーターアッセイ法により示した図である。

図４は、ラット抗ＦＧＦＲ２抗体ＦＲ２－１０のＦＧＦＲ２に対するシグナル抑制作用をウエスタンブロット法により示した図である。ヒト胃癌細胞株ＳＮＵ－１６にＦＧＦ７を添加することによって誘導されたＦＧＦＲ２、ＦＲＳ２、ＥＲＫのリン酸化が、ラットＦＲ２－１０抗体添加により阻害されることが例証された。

図５は、ヒトキメラ化抗ＦＧＦＲ２抗体（ｃＦＲ２－１０、ｃＦＲ２－１３、ｃＦＲ２－１４）のヒトＦＧＦＲ２に対する結合活性をＣｅｌｌ－ＥＬＩＳＡ法により検証した図である。

図６Ａは、ヒトキメラ化抗ＦＧＦＲ２抗体（ｃＦＲ２－１０、ｃＦＲ２－１３、ｃＦＲ２－１４）のヒトＦＧＦＲ２ＩＩＩｂに対するシグナル中和活性をＥｌｋ１トランスレポーターアッセイ法により示した図である。

図６Ｂは、ヒトキメラ化抗ＦＧＦＲ２抗体（ｃＦＲ２－１０、ｃＦＲ２－１３、ｃＦＲ２－１４）のヒトＦＧＦＲ２ＩＩＩｃに対するシグナル中和活性をＥｌｋ１トランスレポーターアッセイ法により示した図である。

図７は、ヒトキメラ化抗ＦＧＦＲ２抗体（ｃＦＲ２－１０、ｃＦＲ２－１３、ｃＦＲ２－１４）のＡＤＣＣ活性を示した図である。ヒトＦＧＦＲ２ＩＩＩｂ発現２９３Ｔ-ｌａｃＺ細胞を標的細胞、ヒトＰＢＭＣをエフェクター細胞として用いた。

図８は、ヒトキメラ化抗ＦＧＦＲ２抗体（ｃＦＲ２－１０、ｃＦＲ２－１３、ｃＦＲ２－１４）のヒト胃癌細胞株ＳＮＵ－１６移植ヌードマウスにおけるｉｎ　ｖｉｖｏ抗腫瘍活性を示した図である。Ａ）はｃＦＲ２－１０抗体、Ｂ）はｃＦＲ２－１３抗体、Ｃ）はｃＦＲ２－１４抗体についての結果である。

図９はラット抗ＦＧＦＲ２抗体　ＦＲ２－１０の重鎖に相当するバンドのＮ末端のアミノ酸配列（配列表の配列番号１）。

図１０はラット抗ＦＧＦＲ２抗体　ＦＲ２－１０の軽鎖に相当するバンドのＮ末端のアミノ酸配列（配列表の配列番号２）。

図１１はラット抗ＦＧＦＲ２抗体　ＦＲ２－１３の重鎖に相当するバンドの

N末端のアミノ酸配列（配列表の配列番号３）。

図１２はラット抗ＦＧＦＲ２抗体　ＦＲ２－１３の軽鎖に相当するバンドのN末端のアミノ酸配列（配列表の配列番号４）。

図１３はラット抗ＦＧＦＲ２抗体　ＦＲ２－１４重鎖に相当するバンドのN末端のアミノ酸配列（配列表の配列番号５）。

図１４はラット抗ＦＧＦＲ２抗体　ＦＲ２－１４の軽鎖に相当するバンドのN末端のアミノ酸配列（配列表の配列番号６）。

図１５はラット重鎖増幅用プライマー（配列表の配列番号７）。

図１６はＦＲ２－１０重鎖用のシークエンスプライマー（配列表の配列番号８）。

図１７はＦＲ２－１３重鎖用のシークエンスプライマー（配列表の配列番号９）。

図１８はＦＲ２－１４重鎖用のシークエンスプライマー（配列表の配列番号１０）。

図１９はラット抗ＦＧＦＲ２抗体　ＦＲ２－１０の重鎖の可変領域をコードするｃＤＮＡの塩基配列（配列表の配列番号１１）。

図２０はラット抗ＦＧＦＲ２抗体　ＦＲ２－１０の重鎖の可変領域のアミノ酸配列（配列表の配列番号１２）。

図２１はラット抗ＦＧＦＲ２抗体　ＦＲ２－１３の重鎖の可変領域をコードするｃＤＮＡの塩基配列（配列表の配列番号１３）。

図２２はラット抗ＦＧＦＲ２抗体　ＦＲ２－１３の重鎖の可変領域のアミノ酸配列（配列表の配列番号１４）。

図２３はラット抗ＦＧＦＲ２抗体　ＦＲ２－１４の重鎖の可変領域をコードするｃＤＮＡの塩基配列（配列表の配列番号１５）。

図２４はラット抗ＦＧＦＲ２抗体　ＦＲ２－１４の重鎖の可変領域のアミノ酸配列（配列表の配列番号１６）。

図２５はラット軽鎖増幅用プライマー（配列表の配列番号１７）。

図２６はラット軽鎖用のシーケンスプライマー（配列表の配列番号１８）。

図２７はＦＲ２－１０軽鎖用のシークエンスプライマー（配列表の配列番号１９）。

図２８はラット抗ＦＧＦＲ２抗体　ＦＲ２－１０の軽鎖の可変領域をコードするｃＤＮＡの塩基配列（配列表の配列番号２０）。

図２９はラット抗ＦＧＦＲ２抗体　ＦＲ２－１０の軽鎖の可変領域のアミノ酸配列（配列表の配列番号２１）。

図３０はラットＦＲ２－１３及びＦＲ２－１４軽鎖増幅用プライマー（配列表の配列番号２２）。

図３１はラット抗ＦＧＦＲ２抗体　ＦＲ２－１３の軽鎖の可変領域をコードするｃＤＮＡの塩基配列（配列表の配列番号２３）。

図３２はラット抗ＦＧＦＲ２抗体　ＦＲ２－１３の軽鎖の可変領域のアミノ酸配列（配列表の配列番号２４）。

図３３はラット抗ＦＧＦＲ２抗体　ＦＲ２－１４の軽鎖の可変領域をコードするｃＤＮＡの塩基配列（配列表の配列番号２５）。

図３４はラット抗ＦＧＦＲ２抗体　ＦＲ２－１４の軽鎖の可変領域のアミノ酸配列（配列表の配列番号２６）。

図３５はヒトκ鎖分泌シグナル配列及びヒトκ鎖定常領域のアミノ酸をコードするＤＮＡ配列を含むＤＮＡ断片（配列表の配列番号２７）。

図３６は軽鎖発現ベクター用プライマーＦ（配列表の配列番号２８）。

図３７は軽鎖発現ベクター用プライマーＲ（配列表の配列番号２９）。

図３８はヒト重鎖シグナル配列及びヒトＩｇＧ１定常領域のアミノ酸をコードするＤＮＡ配列を含むＤＮＡ断片（配列表の配列番号３０）。

図３９はヒトキメラ化ＦＲ２－１０（ｃＦＲ２－１０）軽鎖の塩基配列（配列表の配列番号３１）。うちヌクレオチド番号１乃至６０はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｃＦＲ２－１０軽鎖の塩基配列には含まれない。

図４０はヒトキメラ化ＦＲ２－１０（ｃＦＲ２－１０）軽鎖のアミノ酸配列

（配列表の配列番号３２）。うちアミノ酸番号１乃至２０はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｃＦＲ２－１０軽鎖のアミノ酸配列には含まれない。

図４１はヒトキメラ化ＦＲ２－１０軽鎖用プライマーセットＦ（配列表の配列番号３３）。

図４２はヒトキメラ化ＦＲ２－１０軽鎖用プライマーセットＲ（配列表の配列番号３４）。

図４３はヒトキメラ化ＦＲ２－１０（ｃＦＲ２－１０）重鎖の塩基配列（配列表の配列番号３５）。うちヌクレオチド番号１乃至５７はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｃＦＲ２－１０重鎖の塩基配列には含まれない。

図４４はヒトキメラ化ＦＲ２－１０（ｃＦＲ２－１０）重鎖のアミノ酸配列（配列表の配列番号３６）。うちアミノ酸番号１乃至１９はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｃＦＲ２－１０重鎖のアミノ酸配列には含まれない。

図４５はヒトキメラ化ＦＲ２－１０重鎖用プライマーセットＦ（配列表の配列番号３７）。

図４６はヒトキメラ化ＦＲ２－１０重鎖用プライマーセットＲ（配列表の配列番号３８）。

図４７はヒトキメラ化ＦＲ２－１３（ｃＦＲ２－１３）軽鎖の塩基配列（配列表の配列番号３９）。うちヌクレオチド番号１乃至６０はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｃＦＲ２－１３軽鎖の塩基配列には含まれない。

図４８はヒトキメラ化ＦＲ２－１３（ｃＦＲ２－１３軽鎖のアミノ酸配列（配列表の配列番号４０）。うちアミノ酸番号１乃至２０はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｃＦＲ２－１３軽鎖のアミノ酸配列には含まれない。

図４９はヒトキメラ化ＦＲ２－１３軽鎖用プライマーＦ（配列表の配列番号４１）。

図５０はヒトキメラ化ＦＲ２－１３軽鎖用プライマーＲ（配列表の配列番号４２）。

図５１はヒトキメラ化ＦＲ２－１３（ｃＦＲ２－１３）重鎖の塩基配列（配

列表の配列番号４３）。うちヌクレオチド番号１乃至５７はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｃＦＲ２－１３重鎖の塩基配列には含まれない。

図５２はヒトキメラ化ＦＲ２－１３（ｃＦＲ２－１３）重鎖のアミノ酸配列（配列表の配列番号４４）。うちアミノ酸番号１乃至１９はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｃＦＲ２－１３重鎖のアミノ酸配列には含まれない。

図５３はヒトキメラ化ＦＲ２－１３重鎖用プライマーＦ（配列表の配列番号４５）。

図５４はヒトキメラ化ＦＲ２－１３重鎖用プライマーＲ（配列表の配列番号４６）。

図５５はヒトキメラ化ＦＲ２－１４（ｃＦＲ２－１４）軽鎖の塩基配列（配列表の配列番号４７）。うちヌクレオチド番号１乃至６０はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｃＦＲ２－１４軽鎖の塩基配列には含まれない。

図５６はヒトキメラ化ＦＲ２－１４（ｃＦＲ２－１４）軽鎖のアミノ酸配列（配列表の配列番号４８）。うちアミノ酸番号１乃至２０はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｃＦＲ２－１４軽鎖のアミノ酸配列には含まれない。

図５７はヒトキメラ化ＦＲ２－１４軽鎖用プライマー（配列表の配列番号４９）。

図５８はヒトキメラ化ＦＲ２－１４（ｃＦＲ２－１４）重鎖の塩基配列（配列表の配列番号５０）。うちヌクレオチド番号１乃至５７はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｃＦＲ２－１４重鎖の塩基配列には含まれない。

図５９はヒトキメラ化ＦＲ２－１４（ｃＦＲ２－１４）重鎖のアミノ酸配列（配列表の配列番号５１）。うちアミノ酸番号１乃至１９はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｃＦＲ２－１４重鎖のアミノ酸配列には含まれない。

図６０はラット抗ＦＧＦＲ２抗体　ＦＲ２－１０の重鎖ＣＤＲ１のアミノ酸配列（配列表の配列番号５２）。

図６１はラット抗ＦＧＦＲ２抗体　ＦＲ２－１０の重鎖ＣＤＲ２のアミノ酸配列（配列表の配列番号５３）。

図６２はラット抗ＦＧＦＲ２抗体　ＦＲ２－１０の重鎖ＣＤＲ３のアミノ酸配列（配列表の配列番号５４）。

図６３はラット抗ＦＧＦＲ２抗体　ＦＲ２－１３の重鎖ＣＤＲ１のアミノ酸配列（配列表の配列番号５５）。

図６４はラット抗ＦＧＦＲ２抗体　ＦＲ２－１３の重鎖ＣＤＲ２のアミノ酸配列（配列表の配列番号５６）。

図６５はラット抗ＦＧＦＲ２抗体　ＦＲ２－１３の重鎖ＣＤＲ３のアミノ酸配列（配列表の配列番号５７）。

図６６はラット抗ＦＧＦＲ２抗体　ＦＲ２－１４の重鎖ＣＤＲ１のアミノ酸配列（配列表の配列番号５８）。

図６７はラット抗ＦＧＦＲ２抗体　ＦＲ２－１４の重鎖ＣＤＲ２のアミノ酸配列（配列表の配列番号５９）。

図６８はラット抗ＦＧＦＲ２抗体　ＦＲ２－１４の重鎖ＣＤＲ３のアミノ酸配列（配列表の配列番号６０）。

図６９はラット抗ＦＧＦＲ２抗体　ＦＲ２－１０の軽鎖ＣＤＲ１のアミノ酸配列（配列表の配列番号６１）。

図７０はラット抗ＦＧＦＲ２抗体　ＦＲ２－１０の軽鎖ＣＤＲ２のアミノ酸配列（配列表の配列番号６２）。

図７１はラット抗ＦＧＦＲ２抗体　ＦＲ２－１０の軽鎖ＣＤＲ３のアミノ酸配列（配列表の配列番号６３）。

図７２はラット抗ＦＧＦＲ２抗体　ＦＲ２－１３の軽鎖ＣＤＲ１のアミノ酸配列（配列表の配列番号６４）。

図７３はラット抗ＦＧＦＲ２抗体　ＦＲ２－１３の軽鎖ＣＤＲ２のアミノ酸配列（配列表の配列番号６５）。

図７４はラット抗ＦＧＦＲ２抗体　ＦＲ２－１３の軽鎖ＣＤＲ３のアミノ酸配列（配列表の配列番号６６）。

図７５はラット抗ＦＧＦＲ２抗体　ＦＲ２－１４の軽鎖ＣＤＲ１のアミノ酸

配列（配列表の配列番号６７）。

図７６はラット抗ＦＧＦＲ２抗体　ＦＲ２－１４の軽鎖ＣＤＲ２のアミノ酸配列（配列表の配列番号６８）

図７７はラット抗ＦＧＦＲ２抗体　ＦＲ２－１４の軽鎖ＣＤＲ３のアミノ酸配列（配列表の配列番号６９）

図７８はヒトＦＧＦＲ２ＩＩＩｂのアミノ酸配列（配列表の配列番号７０）

図７９はヒトＦＧＦＲ２ＩＩＩｃのアミノ酸配列（配列表の配列番号７１）

図８０はｈＦＲ２－１４＿Ｌ１の塩基配列（配列表の配列番号７２）、うちヌクレオチド番号１乃至６０はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｈＦＲ２－１４＿Ｌ１の塩基配列には含まれない。

図８１はｈＦＲ２－１４＿Ｌ１のアミノ酸配列（配列表の配列番号７３）、うちヌクレオチド番号１乃至２０はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｈＦＲ２－１４＿Ｌ１のアミノ酸配列には含まれない。

図８２はｈＦＲ２－１４＿Ｈ１の塩基配列（配列表の配列番号７４）、うちヌクレオチド番号１乃至５７はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１の塩基配列には含まれない。

図８３はｈＦＲ２－１４＿Ｈ１のアミノ酸配列（配列表の配列番号７５）、うちヌクレオチド番号１乃至１９はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１のアミノ酸配列には含まれない。

図８４はｈＦＲ２－１４＿Ｈ２の塩基配列（配列表の配列番号７６）、うちヌクレオチド番号１乃至５７はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｈＦＲ２－１４＿Ｈ２の塩基配列には含まれない。

図８５はｈＦＲ２－１４＿Ｈ２のアミノ酸配列（配列表の配列番号７７）、うちヌクレオチド番号１乃至１９はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｈＦＲ２－１４＿Ｈ２のアミノ酸配列には含まれない。

図８６はｈＦＲ２－１４＿Ｈ３の塩基配列（配列表の配列番号７８）、うちヌクレオチド番号１乃至５７はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｈＦＲ２

－１４＿Ｈ３の塩基配列には含まれない。

図８７はｈＦＲ２－１４＿Ｈ３のアミノ酸配列（配列表の配列番号７９）、うちヌクレオチド番号１乃至１９はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｈＦＲ２－１４＿Ｈ３のアミノ酸配列には含まれない。

図８８はｈＦＲ２－１４＿Ｈ４の塩基配列（配列表の配列番号８０）、うちヌクレオチド番号１乃至５７はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｈＦＲ２－１４＿Ｈ４の塩基配列には含まれない。

図８９はｈＦＲ２－１４＿Ｈ４のアミノ酸配列（配列表の配列番号８１）、うちヌクレオチド番号１乃至１９はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｈＦＲ２－１４＿Ｈ４のアミノ酸配列には含まれない。

図９０はｈＦＲ２－１４＿Ｈ５の塩基配列（配列表の配列番号８２）、うちヌクレオチド番号１乃至５７はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｈＦＲ２－１４＿Ｈ５の塩基配列には含まれない。

図９１はｈＦＲ２－１４＿Ｈ５のアミノ酸配列（配列表の配列番号８３）、うちヌクレオチド番号１乃至１９はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｈＦＲ２－１４＿Ｈ５のアミノ酸配列には含まれない。

図９２はｈＦＲ２－１４＿Ｈ６の塩基配列（配列表の配列番号８４）、うちヌクレオチド番号１乃至５７はシグナル配列であり成熟、通常大部分のｈＦＲ２－１４＿Ｈ６の塩基配列には含まれない。

図９３はｈＦＲ２－１４＿Ｈ６のアミノ酸配列（配列表の配列番号８５）、うちヌクレオチド番号１乃至１９はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｈＦＲ２－１４＿Ｈ６のアミノ酸配列には含まれない。

図９４はｈＦＲ２－１４＿Ｈ７の塩基配列（配列表の配列番号８６）、うちヌクレオチド番号１乃至５７はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｈＦＲ２－１４＿Ｈ７の塩基配列には含まれない。

図９５はｈＦＲ２－１４＿Ｈ７のアミノ酸配列（配列表の配列番号８７）、うちヌクレオチド番号１乃至１９はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｈＦ

ＲＲ２－１４＿Ｈ７のアミノ酸配列には含まれない。

図９６はｈＦＲ２－１４＿Ｈ８の塩基配列（配列表の配列番号８８）、うちヌクレオチド番号１乃至５７はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｈＦＲ２－１４＿Ｈ８の塩基配列には含まれない。

図９７はｈＦＲ２－１４＿Ｈ８のアミノ酸配列（配列表の配列番号８９）、うちヌクレオチド番号１乃至１９はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｈＦＲ２－１４＿Ｈ８のアミノ酸配列には含まれない。

図９８はｈＦＲ２－１４＿Ｈ９の塩基配列（配列表の配列番号９０）、うちヌクレオチド番号１乃至５７はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｈＦＲ２－１４＿Ｈ９の塩基配列には含まれない。

図９９はｈＦＲ２－１４＿Ｈ９のアミノ酸配列（配列表の配列番号９１）、うちヌクレオチド番号１乃至１９はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｈＦＲ２－１４＿Ｈ９のアミノ酸配列には含まれない。

図１００はｈＦＲ２－１４＿Ｈ１０の塩基配列（配列表の配列番号９２）、うちヌクレオチド番号１乃至５７はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１０の塩基配列には含まれない。

図１０１はｈＦＲ２－１４＿Ｈ１０のアミノ酸配列（配列表の配列番号９３）、うちヌクレオチド番号１乃至１９はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１０のアミノ酸配列には含まれない。

図１０２はｈＦＲ２－１４＿Ｈ１１の塩基配列（配列表の配列番号９４）、うちヌクレオチド番号１乃至５７はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１１の塩基配列には含まれない。

図１０３はｈＦＲ２－１４＿Ｈ１１のアミノ酸配列（配列表の配列番号９５）、うちヌクレオチド番号１乃至１９はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１１のアミノ酸配列には含まれない。

図１０４はｈＦＲ２－１４＿Ｈ１２およびｈＦＲ２－１４＿Ｈ１９の塩基配列（配列表の配列番号９６）、うちヌクレオチド番号１乃至５７はシグナル配列

であり、通常大部分の成熟ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１２およびｈＦＲ２－１４＿Ｈ１９の塩基配列には含まれない。

図１０５はｈＦＲ２－１４＿Ｈ１２およびｈＦＲ２－１４＿Ｈ１９のアミノ酸配列（配列表の配列番号９７）、うちヌクレオチド番号１乃至１９はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１２およびｈＦＲ２－１４＿Ｈ１９のアミノ酸配列には含まれない。

図１０６はｈＦＲ２－１４＿Ｈ１３の塩基配列（配列表の配列番号９８）、うちヌクレオチド番号１乃至５７はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１３の塩基配列には含まれない。

図１０７はｈＦＲ２－１４＿Ｈ１３のアミノ酸配列（配列表の配列番号９９）、うちヌクレオチド番号１乃至１９はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１３のアミノ酸配列には含まれない。

図１０８はｈＦＲ２－１４＿Ｈ１４の塩基配列（配列表の配列番号１００）、うちヌクレオチド番号１乃至５７はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１４の塩基配列には含まれない。

図１０９はｈＦＲ２－１４＿Ｈ１４のアミノ酸配列（配列表の配列番号１０１）、うちヌクレオチド番号１乃至１９はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１４のアミノ酸配列には含まれない。

図１１０はｈＦＲ２－１４＿Ｈ１５の塩基配列（配列表の配列番号１０２）、うちヌクレオチド番号１乃至５７はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１５の塩基配列には含まれない。

図１１１はｈＦＲ２－１４＿Ｈ１５のアミノ酸配列（配列表の配列番号１０３）、うちヌクレオチド番号１乃至１９はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１５のアミノ酸配列には含まれない。

図１１２はｈＦＲ２－１４＿Ｈ１６の塩基配列（配列表の配列番号１０４）、うちヌクレオチド番号１乃至５７はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１６の塩基配列には含まれない。

図１１３はｈＦＲ２－１４＿Ｈ１６のアミノ酸配列（配列表の配列番号１０５）、うちヌクレオチド番号１乃至１９はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１６のアミノ酸配列には含まれない。

図１１４はｈＦＲ２－１４＿Ｈ１７の塩基配列（配列表の配列番号１０６）、うちヌクレオチド番号１乃至５７はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１７の塩基配列には含まれない。

図１１５はｈＦＲ２－１４＿Ｈ１７のアミノ酸配列（配列表の配列番号１０７）、うちヌクレオチド番号１乃至１９はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１７のアミノ酸配列には含まれない。

図１１６はｈＦＲ２－１４＿Ｈ１８の塩基配列（配列表の配列番号１０８）、うちヌクレオチド番号１乃至５７はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１８の塩基配列には含まれない。

図１１７はｈＦＲ２－１４＿Ｈ１８のアミノ酸配列（配列表の配列番号１０９）、うちヌクレオチド番号１乃至１９はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１８のアミノ酸配列には含まれない。

図１１８はｈＦＲ２－１４＿Ｈ２タイプ重鎖用プライマーＶＨ３Ａ－Ｆ（配列表の配列番号１１０）

図１１９はｈＦＲ２－１４＿Ｈ２タイプ重鎖用プライマーＶＨ３Ａ－Ｒ（配列表の配列番号１１１）

図１２０はＤ２増幅用プライマーＤ２３ｆｗ（配列表の配列番号１１２）

図１２１はＤ２増幅用プライマーＤ２３ｒｖ（配列表の配列番号１１３）

図１２２は、４種類のヒト化抗ＦＧＦＲ２抗体（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１～Ｈ４／Ｌ１）及びヒトキメラ化抗ＦＧＦＲ２抗体（ｃＦＲ２－１４）の各ヒトＦＧＦＲ２バリアント蛋白質に対する結合活性をＢｉａｃｏｒｅにより測定した図である。各抗体を２９３Ｆ細胞で発現させ、精製して測定に使用した。

図１２３は、１５種類のヒト化抗ＦＧＦＲ２抗体（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ３／Ｌ１及びｈＦＲ２－１４＿Ｈ５～Ｈ１８／Ｌ１）のヒトＦＧＦＲ２－ＩＩＩｃ

バリアント蛋白質に対する結合活性をＢｉａｃｏｒｅにより測定した図である。各抗体を２９３Ｆ細胞で発現させた培養上清を測定に使用した。

図１２４は、３種類のヒト化抗ＦＧＦＲ２抗体（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ３／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ８／Ｌ１及びｈＦＲ２－１４＿Ｈ１２／Ｌ１）のヒトＦＧＦＲ２選択的結合性をＣｅｌｌ－ＥＬＩＳＡ法により検証した図である。

図１２５Ａは、５種類のヒト化抗ＦＧＦＲ２抗体のサーモグラムを示した図である。

図１２５Ｂは、５種類のヒト化抗ＦＧＦＲ２抗体のサーモグラムを示した図である。

図１２５Ｃは、１０種類のヒト化抗ＦＧＦＲ２抗体のＴｍ値を示した図である。

図１２６は、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１／Ｌ１抗体、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ２／Ｌ１抗体、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ３／Ｌ１抗体、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ４／Ｌ１抗体、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ５／Ｌ１抗体、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ８／Ｌ１抗体、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ９／Ｌ１抗体、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１１／Ｌ１抗体、およびｈＦＲ２－１４＿Ｈ１２／Ｌ１抗体、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１９／Ｌ１抗体の劣化前後検体についての、抗原とのＫＤ値を示した図である。

図１２７Ａは、ヒト化抗ＦＧＦＲ２抗体（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ２／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ３／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ４／Ｌ１）およびヒトキメラ化抗ＦＧＦＲ２抗体（ｃＦＲ２－１４）のヒトＦＧＦＲ２ＩＩＩｂに対するシグナル中和活性をＥｌｋ１トランスレポーターアッセイ法により示した図である。

図１２７Ｂは、ヒト化抗ＦＧＦＲ２抗体（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ２／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ３／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ４／Ｌ１）およびヒトキメラ化抗ＦＧＦＲ２抗体（ｃＦＲ２－１４）のヒトＦＧＦＲ２ＩＩＩｃに対するシグナル中和活性をＥｌｋ１トランスレポーターアッセイ法により示した図である。

図１２８Ａは、ヒト化抗ＦＧＦＲ２抗体（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ３／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ５／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ６／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ７／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ８／Ｌ１）のヒトＦＧＦＲ２IIIｂに対するシグナル中和活性をＥｌｋ１トランスレポーターアッセイ法により示した図である。

図１２８Ｂは、ヒト化抗ＦＧＦＲ２抗体（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ９／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１０／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１１／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１２／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１３／Ｌ１）のヒトＦＧＦＲ２IIIｂに対するシグナル中和活性をＥｌｋ１トランスレポーターアッセイ法により示した図である。

図１２８Ｃは、ヒト化抗ＦＧＦＲ２抗体（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１４／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１５／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１６／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１７／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１８／Ｌ１）のヒトＦＧＦＲ２IIIｂに対するシグナル中和活性をＥｌｋ１トランスレポーターアッセイ法により示した図である。

図１２９Ａは、ヒト化抗ＦＧＦＲ２抗体（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１２／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１９／Ｌ１）のヒトＦＧＦＲ２ＩＩＩｂに対するシグナル中和活性をＥｌｋ１トランスレポーターアッセイ法により示した図である。

図１２９Ｂは、ヒト化抗ＦＧＦＲ２抗体（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１２／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１９／Ｌ１）のヒトＦＧＦＲ２ＩＩＩｃに対するシグナル中和活性をＥｌｋ１トランスレポーターアッセイ法により示した図である。

図１３０Ａは、ヒト化抗ＦＧＦＲ２抗体（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ２／Ｌ１）のＡＤＣＣ活性を示した図である。ヒトＦＧＦＲ２ＩＩＩｂ発現２９３Ｔ-ｌａｃＺ細胞を標的細胞、ヒトＰＢＭＣをエフェクター細胞として用いた。

図１３０Ｂは、ヒト化抗ＦＧＦＲ２抗体（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ３／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ４／Ｌ１）およびヒトキメラ化抗ＦＧＦＲ２抗体（ｃＦＲ２

－１４）のＡＤＣＣ活性を示した図である。ヒトＦＧＦＲ２ＩＩＩｂ発現２９３Ｔ-ｌａｃＺ細胞を標的細胞、ヒトＰＢＭＣをエフェクター細胞として用いた。

図１３１は、ヒト化抗ＦＧＦＲ２抗体（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ３／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ８／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１２／Ｌ１のＡＤＣＣ活性を示した図である。ヒトＦＧＦＲ２発現ＮＣＩ－Ｈ７１６細胞を標的細胞、ヒトＰＢＭＣをエフェクター細胞として用いた。

図１３２は、ヒト化抗ＦＧＦＲ２抗体（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１２／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１９／Ｌ１）のＡＤＣＣ活性を示した図である。ヒトＦＧＦＲ２発現Ａ）ＮＣＩ－Ｈ７１６、Ｂ）ＳＮＵ－１６、Ｃ）ＫＡＴＯＩＩＩ細胞を標的細胞、ヒトＰＢＭＣをエフェクター細胞として用いた。

図１３３は、ヒト化抗ＦＧＦＲ２抗体（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１２／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１９／Ｌ１）のＡＤＣＰ活性を示した図である。ヒトＦＧＦＲ２発現Ａ）ＮＣＩ－Ｈ７１６、Ｂ）ＫＡＴＯＩＩＩを標的細胞、ヒトＰＢＭＣより分化させたマクロファージ様細胞をエフェクター細胞として用いた。

図１３４Ａは、ヒト化抗ＦＧＦＲ２抗体ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１／Ｌ１のヒト胃癌細胞株ＳＮＵ－１６移植ヌードマウスにおけるｉｎ　ｖｉｖｏ抗腫瘍活性を示した図である。

図１３４Ｂは、ヒト化抗ＦＧＦＲ２抗体ｈＦＲ２－１４＿Ｈ２／Ｌ１のヒト胃癌細胞株ＳＮＵ－１６移植ヌードマウスにおけるｉｎ　ｖｉｖｏ抗腫瘍活性を示した図である。

図１３４Ｃは、ヒト化抗ＦＧＦＲ２抗体ｈＦＲ２－１４＿Ｈ３／Ｌ１のヒト胃癌細胞株ＳＮＵ－１６移植ヌードマウスにおけるｉｎ　ｖｉｖｏ抗腫瘍活性を示した図である。

図１３４Ｄは、ヒト化抗ＦＧＦＲ２抗体ｈＦＲ２－１４＿Ｈ４／Ｌ１のヒト胃癌細胞株ＳＮＵ－１６移植ヌードマウスにおけるｉｎ　ｖｉｖｏ抗腫瘍活性を示した図である。

図１３５Ａは、ヒト化抗ＦＧＦＲ２抗体ｈＦＲ２－１４＿Ｈ５／Ｌ１のヒト

胃癌細胞株ＳＮＵ－１６皮下移植モデルにおけるｉｎ　ｖｉｖｏ抗腫瘍活性を示した図である。

図１３５Ｂは、ヒト化抗ＦＧＦＲ２抗体ｈＦＲ２－１４＿Ｈ８／Ｌ１のヒト胃癌細胞株ＳＮＵ－１６皮下移植モデルにおけるｉｎ　ｖｉｖｏ抗腫瘍活性を示した図である。

図１３５Ｃは、ヒト化抗ＦＧＦＲ２抗体ｈＦＲ２－１４＿Ｈ９／Ｌ１のヒト胃癌細胞株ＳＮＵ－１６皮下移植モデルにおけるｉｎ　ｖｉｖｏ抗腫瘍活性を示した図である。

図１３５Ｄは、ヒト化抗ＦＧＦＲ２抗体ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１１／Ｌ１のヒト胃癌細胞株ＳＮＵ－１６皮下移植モデルにおけるｉｎ　ｖｉｖｏ抗腫瘍活性を示した図である。

図１３５Ｅは、ヒト化抗ＦＧＦＲ２抗体ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１２／Ｌ１のヒト胃癌細胞株ＳＮＵ－１６皮下移植モデルにおけるｉｎ　ｖｉｖｏ抗腫瘍活性を示した図である。

図１３５Ｆは、ヒト化抗ＦＧＦＲ２抗体ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１９／Ｌ１のヒト胃癌細胞株ＳＮＵ－１６皮下移植モデルにおけるｉｎ　ｖｉｖｏ抗腫瘍活性を示した図である。

図１３６は、ヒト化抗ＦＧＦＲ２抗体（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１２／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１９／Ｌ１）のヒト大腸癌細胞株ＮＣＩ－Ｈ７１６腫瘍ブロックモデルにおけるｉｎ　ｖｉｖｏ抗腫瘍活性を示した図である。（Ａ）はｈＦＲ２－１４＿Ｈ１２／Ｌ１、（Ｂ）はｈＦＲ２－１４＿Ｈ１９／Ｌ１の結果である。

図１３７は、ヒト化抗ＦＧＦＲ２抗体（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１２／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１９／Ｌ１）のヒト大腸癌細胞株ＮＣＩ－Ｈ７１６－ｌｕｃ腹膜播種モデルにおけるｉｎ　ｖｉｖｏ抗腫瘍活性を示した図である。（Ａ）はＬｕｃｉｆｅｒａｓｅ活性、（Ｂ）は生存率を示した結果である。

図１３８は、ＦＧＦＲ２Ｄ２／Ｈ３Ｌ１Ｆａｂ複合体のリボンモデルを示し

た図である。ＦＧＦＲ２Ｄ２を左下方に、Ｈ３Ｌ１ＦａｂのH鎖（濃いグレー）を中央から右上方に、Ｌ鎖をそれらの右側にそれぞれ表示した。

図１３９は、ＦＧＦＲ２／ＦＧＦ１とＦＧＦＲ２Ｄ２／Ｈ３Ｌ１Ｆａｂの重ね合わせを示した図である。ＦＧＦＲＤ３（ＩｇＤ３）を中央下方に、ＦＧＦＲＤ３の上方にＦＧＦ１（濃いグレー）を、ＦＧＦ１の上方ＦＧＦＲＤ２を、ＦＧＦＲＤ２の右上方にＨ２Ｌ１ＦａｂのH鎖（濃いグレー）とＬ鎖をそれぞれ表示した。

図１４０は、ＦＧＦＲ各ファミリー分子を強制発現させた２９３α細胞ブロックに対し、ラット抗体ＦＲ２－１０を用いて免疫染色を実施した図である。

図１４１は、Ａ，Ｄ）ＳＮＵ－１６、Ｂ，Ｅ）ＫＡＴＯＩＩＩ、およびＣ，Ｆ）ＮＣＩ－Ｈ７１６細胞ブロックに対して、免疫染色を実施した図である。Ａ～Ｃはラット抗体ＦＲ２－１０、Ｄ～Ｆは市販抗体を用いた結果である。

図１４２は、Ａ）ＳＮＵ－１６、Ｂ）ＫＡＴＯＩＩＩ、およびＣ）ＮＣＩ－Ｈ７１６細胞のゼノグラフト腫瘍サンプルに対し、ラット抗体ＦＲ２－１０を用いて免疫染色を実施した図である。

図１４３は、ｃＦＲ２－１０、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１２／Ｌ１、およびｈＦＲ２－１４＿Ｈ１９／Ｌ１抗体によるリガンドＦＧＦ７のＦＧＦＲ２レセプターへの結合を阻害する活性を示した図である。

発明を実施するための形態

１．定義

本発明において、「遺伝子」とは、蛋白質のアミノ酸をコードする塩基配列が含まれるヌクレオチドまたはその相補鎖を意味し、例えば、蛋白質のアミノ酸をコードする塩基配列が含まれるヌクレオチドまたはその相補鎖であるポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ＤＮＡ、ｍＲＮＡ、ｃＤＮＡ、ｃＲＮＡ等は「遺伝子」の意味に含まれる。かかる遺伝子は一本鎖、二本鎖又は三本鎖以上のヌクレオチドであり、ＤＮＡ鎖とＲＮＡ鎖の会合体、一本のヌクレオチド

鎖上にリボヌクレオチド（ＲＮＡ）とデオキシリボヌクレオチド（ＤＮＡ）が混在するもの及びそのようなヌクレオチド鎖を含む二本鎖又は三本鎖以上のヌクレオチドも「遺伝子」の意味に含まれる。本発明の「ＦＧＦＲ２遺伝子」としては、例えば、ＦＧＦＲ２蛋白質のアミノ酸配列をコードする塩基配列が含まれるＤＮＡ、ｍＲＮＡ、ｃＤＮＡ、ｃＲＮＡ等をあげることができる。

本発明において、「ヌクレオチド」と「核酸」は同義であり、例えば、ＤＮＡ、ＲＮＡ、プローブ、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、プライマー等も「ヌクレオチド」の意味に含まれる。かかるヌクレオチドは一本鎖、二本鎖又は三本以上の鎖からなるヌクレオチドであり、ＤＮＡ鎖とＲＮＡ鎖の会合体、一本のヌクレオチド鎖上にリボヌクレオチド（ＲＮＡ）とデオキシリボヌクレオチド（ＤＮＡ）が混在するもの及びそのようなヌクレオチド鎖を含む二本鎖又は三本以上の鎖の会合体も「ヌクレオチド」の意味に含まれる。

本発明において、「ポリペプチド」、「ペプチド」および「蛋白質」は同義である。

本発明において、「抗原」を「免疫原」の意味に用いることがある。

本発明において、「細胞」には、動物個体に由来する各種細胞、継代培養細胞、初代培養細胞、細胞株、組換え細胞及び微生物等も含まれる。

本発明においては、ＦＧＦＲ２、ＦＧＦＲ２ＩＩＩｂ、ＦＧＦＲ２ＩＩＩｃ、ＦＧＦＲ３、ＦＧＦＲｓ等を認識する抗体を、それぞれ「抗ＦＧＦＲ２抗体」、「抗ＦＧＦＲ２ＩＩＩｂ抗体」、「抗ＦＧＦＲ２ＩＩＩｃ抗体」、「抗ＦＧＦＲ３抗体」及び「抗ＦＧＦＲｓ抗体」等と表記することがある。かかる抗体には、キメラ化抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体等が含まれる。

本発明における「抗体の機能断片」とは、元の抗体が奏する機能の少なくとも一部を奏する抗体断片を意味する。「抗体の機能断片」としては、例えば、Ｆａｂ、Ｆ（ａｂ’）２、ｓｃＦｖ、Ｆａｂ’、一本鎖免疫グロブリン等をあげることができるが、それらに限定されるものではない。かかる抗体の機能断片は、抗体蛋白質の全長分子をパパイン、ペプシン等の酵素で処理することによって

得られたものに加え、組換え遺伝子を用いて適当な宿主細胞において産生された組換え蛋白質であってもよい。

本発明において、抗体が結合する「部位」、すなわち抗体が認識する「部位」とは、抗体が結合又は認識する抗原上の部分ペプチド又は部分高次構造を意味する。本発明においては、かかる部位のことをエピトープ、抗体の結合部位とも呼ぶ。本発明の抗ＦＧＦＲ２抗体が結合又は認識するＦＧＦＲ２蛋白質上の部位としては、ＦＧＦＲ２蛋白質上の部分ペプチド又は部分高次構造等を例示することができる。

抗体分子の重鎖及び軽鎖にはそれぞれ３箇所の相補性決定領域（ＣＤＲ：Ｃｏｍｐｌｅｍｅｔａｒｉｔｙ　ｄｅｔｅｒｍｉｎｉｎｇ　ｒｅｇｉｏｎ）があることが知られている。相補性決定領域は、超可変領域（ｈｙｐｅｒｖａｒｉａｂｌｅ　ｄｏｍａｉｎ）とも呼ばれ、抗体の重鎖及び軽鎖の可変領域内にあって、一次構造の変異性が特に高い部位であり、重鎖及び軽鎖のポリペプチド鎖の一次構造上において、通常、それぞれ３ヶ所に分離している。本発明においては、抗体の相補性決定領域について、重鎖の相補性決定領域を重鎖アミノ酸配列のアミノ末端側からＣＤＲＨ１、ＣＤＲＨ２、ＣＤＲＨ３と表記し、軽鎖の相補性決定領域を軽鎖アミノ酸配列のアミノ末端側からＣＤＲＬ１、ＣＤＲＬ２、ＣＤＲＬ３と表記する。これらの部位は立体構造の上で相互に近接し、結合する抗原に対する特異性を決定している。

本発明において、「抗体変異体」とは、元の抗体が有するアミノ酸配列においてアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入（以下、「変異」と総称する）してなるアミノ酸配列を有し、且つ本発明のＦＧＦＲ２蛋白質に結合するポリペプチドを意味する。かかる抗体変異体における変異アミノ酸の数は、１乃至２個、１乃至３個、１乃至４個、１乃至５個、１乃至６個、１乃至７個、１乃至８個、１乃至９個、１乃至１０個、１乃至１２個、１乃至１５個、１乃至２０個、１乃至２５個、１乃至３０個、１乃至４０個又は１乃至５０個である。かかる抗体変異体も本発明の「抗体」に包含される。

本発明において、「１乃至数個」における「数個」とは、３乃至１０個を指す。

本発明の抗体が奏する活性・性質としては、例えば、生物的活性、理化学的性質等を挙げることができ、具体的には、各種生物活性、抗原やエピトープに対する結合活性、製造や保存時における安定性、熱安定性等をあげることができる。

本発明において、「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする」とは、５×ＳＳＣを含む溶液中で６５℃にてハイブリダイゼーションを行い、ついで２×ＳＳＣ－０．１％ＳＤＳを含む水溶液中で６５℃にて２０分間、０．５×ＳＳＣ－０．１％ＳＤＳを含む水溶液中で６５℃にて２０分間、ならびに、０．２×ＳＳＣ－０．１％ＳＤＳを含む水溶液中で６５℃にて２０分間、それぞれ洗浄する条件又はそれと同等の条件でハイブリダイズすることを意味する。ＳＳＣとは１５０ｍＭＮａＣｌ－１５ｍＭクエン酸ナトリウムの水溶液であり、ｎ×ＳＳＣはｎ倍濃度のＳＳＣを意味する。

本発明において「細胞傷害」とは、何らかの形で、細胞に病理的な変化をもたらすことを指し、直接的な外傷にとどまらず、ＤＮＡの切断や塩基の二量体の形成、染色体の切断、細胞分裂装置の損傷、各種酵素活性の低下などあらゆる細胞の構造や機能上の損傷を意味する。

本発明において「細胞傷害活性」とは上記細胞傷害を引き起こすことを意味する。

本発明において「抗体依存性細胞傷害活性」とは、「ａｎｔｉｂｏｄｙ ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ ｃｅｌｌｕｌａｒ ｃｙｔｏｔｏｘｉｃｉｔｙ（ＡＤＣＣ）活性」を指し、ＮＫ細胞が抗体を介して腫瘍細胞等の標的細胞を傷害する作用活性を意味する。

本発明において「抗体依存性細胞媒介食活性」とは、「ａｎｔｉｂｏｄｙ ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ ｃｅｌｌ ｐｈａｇｏｃｙｔｏｓｉｓ（ＡＤＣＰ）活性」を指し、単球やマクロファージ細胞が抗体を介して腫瘍細胞等の標的細胞を貪食する作用活性を意味する。「抗体依存的貪食作用活性」ともいう。

本発明において「補体依存性細胞傷害作用活性」とは、「ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔ ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ ｃｙｔｏｔｏｘｉｃｉｔｙ（ＣＤＣ）活性」を指し、補体が抗体を介して腫瘍細胞等の標的細胞を傷害する作用活性を意味する。

本発明において「癌」と「腫瘍」は同じ意味で用いられる。

本発明において「免疫組織化学（ｉｍｍｕｎｏｈｉｓｔｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ：ＩＨＣ）」とは組織標本中の抗原を検出する組織学的（組織化学的）手法を意味し、「免疫抗体法」と同義であり、「免疫染色（ｉｍｍｕｎｏｓｔａｉｎｉｎｇ）」も同じ意味に用いられる。

２．抗原蛋白質

（２－１）特性

ＦＧＦＲｓは線維芽細胞増殖因子（ＦＧＦ）に結合する受容体蛋白質である。本発明において、ＦＧＦＲｓは脊椎動物由来、好適には哺乳動物由来であり、より好適にはヒト由来である。ヒトＦＧＦ及びＦＧＦＲｓは、２２のＦＧＦ（ＦＧＦ１乃至１４、および、ＦＧＦ１６乃至２３）、ならびにチロシンキナーゼドメインを有する４つのＦＧＦＲ（ＦＧＦＲ１乃至４）にそれぞれ分類される。ＦＧＦＲｓは、２つあるいは３つの免疫グロブリン様ドメイン（ＩｇＤ１乃至３）から成るリガンド結合部位を含む細胞外領域、１回膜貫通領域、およびチロシンキナーゼドメインを含む細胞内領域から構成されている。このうち、ＦＧＦＲ１、ＦＧＦＲ２およびＦＧＦＲ３には、ＩＩＩｂおよびＩＩＩｃと呼ばれる各２つのスプライシングバリアントが存在する。これらのアイソフォームはＩｇＤ３の後半において約５０のアミノ酸配列が異なっており、異なる組織分布およびリガンド特異性を示す。ＦＧＦＲｓは次のような活性を有する：（１）ＦＧＦに結合する；（２）かかる結合によりＦＧＦＲｓは二量体化する；（３）かかる二量体化によりＦＧＦＲｓの特定のチロシン残基がリン酸化される；（４）かかるリン酸化によりＦＧＦＲ基質２α（ＦＲＳ２α）等のアダプター蛋白質のリクルートが促進される；（５）該ＦＧＦＲｓを発現している細胞又は

組織にＦＧＦ刺激によるシグナルを伝達するか又はシグナル伝達を活性化する。

本発明においてＦＧＦＲ２蛋白質は以下の性質を有する。

（ｉ）ＦＧＦに結合する。

ＦＧＦＲ２ＩＩＩｂ蛋白質は、通常、ＦＧＦ１、ＦＧＦ３、ＦＧＦ７（ＫＧＦ）、ＦＧＦ１０，ＦＧＦ２２及びＦＧＦ２３からなる群より選択される１又は２以上に結合するが、他のＦＧＦに結合してもよく、変異型の場合は前記群に含まれるＦＧＦであっても結合しないことがある。

ＦＧＦＲ２ＩＩＩｃ蛋白質は、通常、ＦＧＦ１、ＦＧＦ２、ＦＧＦ４、ＦＧＦ６、ＦＧＦ９、ＦＧＦ１７、ＦＧＦ１８、ＦＧＦ２１、ＦＧＦ２３からなる群より選択される１又は２以上に結合する。他のＦＧＦに結合してもよく、変異型の場合は前記群に含まれるＦＧＦであっても結合しないことがある。

（ｉｉ）ＦＧＦＲ２発現細胞又は組織内にＦＧＦ刺激により生じるシグナルを伝達する。

ＦＧＦ刺激により生じるシグナル伝達としては、特に限定されるものではないが、例えば、ＦＧＦＲ２自己リン酸化、ＦＧＦＲ基質のリクルート及びその促進、それらを介したＭＡＰＫ，ＰＩ３Ｋ、Ａｋｔ、細胞外シグナル制御キナーゼ（ＥＲＫ）等のシグナル経路の活性化等をあげることができる。ＦＧＦＲ基質としては、ＦＧＦＲ基質２α（ＦＲＳ２α）等を例示することができる。

かかるシグナル伝達の活性化及びその抑制を評価するための試験方法は、特に限定されものではなく、公知の方法から任意に選択することができるが、例えば、ＥＲＫシグナル伝達を評価する系そして、後述のＥｌｋ１ルシフェラーゼレポーターアッセイをあげることができる。

（ｉｉｉ）本発明においてＦＧＦＲ２ＩＩＩｂ蛋白質は、次の（ａ）乃至（ｄ）のいずれか一つに記載のアミノ酸配列（以下、「ＦＧＲ２ＩＩＩｂアミノ酸配列」という）を含んでなるか、ＦＧＦＲ２ＩＩＩｂアミノ酸配列を含むアミノ酸配列からなるか、またはＦＧＦＲ２ＩＩＩｂアミノ酸配列からなる：

（ａ）配列表の配列番号７０（図７８）で示されるアミノ酸配列；

（ｂ）配列表の配列番号７０（図７８）で示されるアミノ酸配列と８０％以上、８２％以上、８４％以上、８６％以上、８８％以上、９０％以上、９２％以上、９４％以上、９６％以上、９８％以上又は９９％以上の配列同一性を示し且つＦＧＦ結合活性を有するポリペプチドのアミノ酸配列；

（ｃ）配列表の配列番号７０（図７８）で示されるアミノ酸配列において１乃至５０個、１乃至４５個、１乃至４０個、１乃至３５個、１乃至３０個、１乃至２５個、１乃至２０個、１乃至１５個、１乃至１０個、１乃至８個、１乃至６個、１乃至５個、１乃至４個、１乃至３個、１若しくは２個、または１個のアミノ酸が置換、欠失、付加または挿入してなり且つＦＧＦ結合活性を有するポリペプチドのアミノ酸配列；及び、

（ｄ）配列表の配列番号７０（図７８）で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列に相補的な塩基配列を有するヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチドの有する塩基配列によりコードされ、且つ、ＦＧＦ結合活性を有するポリペプチドのアミノ酸配列。

（ｂ）乃至（ｄ）記載のいずれか一つに記載のポリペプチドは、ＦＧＦ結合活性に加え、ＦＧＦＲ２の有する他の活性を有していてもよい。

本発明においてＦＧＦＲ２ＩＩＩｃ蛋白質は、次の（ａ）乃至（ｄ）のいずれか一つに記載のアミノ酸配列（以下、「ＦＧＦＲ２ＩＩＩｃアミノ酸配列」という）を含んでなるか、ＦＧＦＲ２ＩＩＩｃアミノ酸配列を含むアミノ酸配列からなるか、またはＦＧＦＲ２ＩＩＩｃアミノ酸配列からなる：

（ａ）配列表の配列番号７１（図７９）で示されるアミノ酸配列；

（ｂ）配列表の配列番号７１（図７９）で示されるアミノ酸配列と８０％以上、８２％以上、８４％以上、８６％以上、８８％以上、９０％以上、９２％以上、９４％以上、９６％以上、９８％以上又は９９％以上の配列同一性を示し且つＦＧＦ結合活性を有するポリペプチドのアミノ酸配列；

（ｃ）配列表の配列番号７１（図７９）で示されるアミノ酸配列において１乃至５０個、１乃至４５個、１乃至４０個、１乃至３５個、１乃至３０個、１乃

至２５個、１乃至２０個、１乃至１５個、１乃至１０個、１乃至８個、１乃至６個、１乃至５個、１乃至４個、１乃至３個、１若しくは２個、または１個のアミノ酸が置換、欠失、付加または挿入してなり且つＦＧＦ結合活性を有するポリペプチドのアミノ酸配列；及び、

（ｄ）配列表の配列番号７１（図７９）で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列に相補的な塩基配列を有するヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチドの有する塩基配列によりコードされ、且つ、ＦＧＦ結合活性を有するポリペプチドのアミノ酸配列。

（ｂ）乃至（ｄ）記載のいずれか一つに記載のポリペプチドは、ＦＧＦ結合活性に加え、ＦＧＦＲ２の有する他の活性を有していてもよい。

また、ヒトＦＧＦＲ２ＩＩＩｂ及びヒトＦＧＦＲ２ＩＩＩｃのアミノ酸配列としては、それぞれ上記（ａ）乃至（ｄ）に加え、ＮＰ＿０７５２５９及びＮＰ＿０００１３２として公表されているアミノ酸も、それぞれあげることができる。

（ｉｖ）本発明のＦＧＦＲ２蛋白質は、脊椎動物、好適には哺乳動物、より好適にはマウス、ラット等のげっ歯類及びヒト、より一層好適にはヒト、ラット又はマウスの、ＦＧＦＲ２を発現している細胞、組織又は癌組織、かかる組織由来の細胞、かかる細胞の培養物等より得ることができる。

ＦＧＦＲ２を高発現している正常組織には、脳、大腸、甲状腺、子宮、胆嚢、皮膚等を例示することができる。ＦＧＦＲ２を高発現している癌には、胃癌、乳癌など遺伝子増幅が見られるもの、および、膵臓癌、卵巣癌など過剰発現がみられるものがある。ＦＧＦＲ２ＩＩＩｂを高発現している培養細胞株としては、胃癌細胞株、乳癌細胞株等を例示することができる。ＦＧＦＲ２ＩＩＩｂを高発現している培養細胞株としては、大腸（盲腸）細胞癌を例示することができる。ＦＧＦＲ２ＩＩＩｃを発現している癌組織としては、子宮頚癌、非小細胞肺癌等を例示することができ、このうち子宮頚癌では高発現している。

本発明のＦＧＦＲ２蛋白質は天然型（非組換型）及び組換え型のいずれであ

ってもよい。また、担体やタグなど他のペプチドや蛋白質との融合物もＦＧＦＲ２蛋白質の意味に含まれる。さらに、ＰＥＧ等のポリマー付加を含む化学修飾、及び／又は、糖鎖修飾を含む生物学的修飾がなされたものもＦＧＦＲ２蛋白質の意味に含まれる。また、ＦＧＦＲ２蛋白質断片も本発明のＦＧＦＲ２蛋白質の意味に含まれる。ＦＧＦＲ２蛋白質断片のうち上記（ｉ）及び／又は（ｉｉ）記載の性質を具備したものをＦＧＦＲ２蛋白質機能断片と呼ぶ。

（２－２）抗原遺伝子

本発明においてＦＧＦＲ２ＩＩＩｂ遺伝子は、次の（ａ）乃至（ｃ）のいずれか一つに記載の塩基配列（以下、「ＦＧＦＲ２遺伝子配列」という）を含んでなるか、ＦＧＦＲ２遺伝子配列を含む塩基配列からなるか、またはＦＧＦＲ２遺伝子配列からなる：

（ａ）配列表の配列番号７０（図７８）で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列；

（ｂ）配列表の配列番号７０（図７８）で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列に相補的な塩基配列からなるヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし且つＦＧＦ結合活性を有するポリペプチドのアミノ酸配列をコードする塩基配列；及び

（ｃ）配列表の配列番号７０（図７８）で示されるアミノ酸配列において１乃至５０個、１乃至４５個、１乃至４０個、１乃至３０個、１乃至２５個、１乃至２０個、１乃至１５個、１乃至１０個、１乃至８個、１乃至６個、１乃至５個、１乃至４個、１乃至３個、１若しくは２個、または１個の塩基が置換、欠失、付加または挿入してなるアミノ酸配列をコードし且つＦＧＦ結合活性を有するポリペプチドのアミノ酸配列をコードする塩基配列。

（ｂ）又は（ｃ）記載の塩基配列によりコードされるアミノ酸配列を有するポリペプチドは、ＦＧＦ結合活性に加え、ＦＧＦＲ２の有する他の活性を有していてもよい。

本発明においてＦＧＦＲ２ＩＩＩｃ遺伝子は、次の（ａ）乃至（ｃ）のいずれか一つに記載の塩基配列（以下、「ＦＧＦＲ２遺伝子配列」という）を含んでなるか、ＦＧＦＲ２遺伝子配列を含む塩基配列からなるか、またはＦＧＦＲ２遺伝子配列からなる：

（ａ）配列表の配列番号７１（図７９）で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列；

（ｂ）配列表の配列番号７１（図７９）で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列に相補的な塩基配列からなるヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし且つＦＧＦ結合活性を有するポリペプチドのアミノ酸配列をコードする塩基配列；及び

（ｃ）配列表の配列番号７１（図７９）で示されるアミノ酸配列において１乃至５０個、１乃至４５個、１乃至４０個、１乃至３０個、１乃至２５個、１乃至２０個、１乃至１５個、１乃至１０個、１乃至８個、１乃至６個、１乃至５個、１乃至４個、１乃至３個、１若しくは２個、または１個の塩基が置換、欠失、付加または挿入してなるアミノ酸配列をコードし且つＦＧＦ結合活性を有するポリペプチドのアミノ酸配列をコードする塩基配列。

（ｂ）又は（ｃ）記載の塩基配列によりコードされるアミノ酸配列を有するポリペプチドは、ＦＧＦ結合活性に加え、ＦＧＦＲ２の有する他の活性を有していてもよい。

ＦＧＦＲ２遺伝子の発現及び発現量の測定は、ＦＧＦＲ２遺伝子の転写産物及びＦＧＦＲ２蛋白質のいずれを指標としてもよく、前者はＲＴ－ＰＣＲ法、ノーザンブロット・ハイブリダーゼーション法等により、後者はＥｎｚｙｍｅ－ｌｉｎｋｅｄ　ｉｍｍｕｎｏ－ｓｏｒｂｅｎｔ　ａｓｓａｙ：以下、「ＥＬＩＳＡ」という)、ウエスタンブロッティング法、免疫組織染色法等の免疫アッセイ法等により、それぞれ測定することができる。

（２－３）抗原蛋白質の調製

本発明のＦＧＦＲ２蛋白質は、動物組織（体液を含む）、該組織由来の細胞もしくは該細胞培養物からの精製及び単離、遺伝子組換え、インビトロ翻訳、化学合成等により調製することができる。

（２－３－１）非組換型ＦＧＦＲ２の精製、単離

非組換型ＦＧＦＲ２蛋白質は、ＦＧＦＲ２を発現している細胞、正常組織もしく癌組織またはそれらに由来する細胞より精製、単離することができる。ＦＧＦＲ２を発現している正常組織、癌組織、癌細胞としては（２－２）の（ｉｖ）記載のものを例示することができるが、非組換型ＦＧＦＲ２蛋白質の由来はそれらに限定されるものではない。

かかる組織、細胞、細胞培養物等からの精製・単離は当業者に周知の分画、クロマトグラフィー等の手法を組み合わせることにより行うことができる。かかる手法には、塩析、ゲルろ過、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、順相又は逆相クロマトグラフィー等が含まれるが、それらに限定されるものではない。アフィニティークロマトグラフィー用のカラムは、抗ＦＧＦＲ２モノクローナル抗体を架橋したアフィニティーゲルを作製して充填することにより作製することができる。かかるカラムにＦＧＦＲ２蛋白質を含有する粗画分又は部分精製画分を添加し、次いで滅菌したリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）で非特異的吸着物を除去した後、溶出用緩衝液を添加することによりＦＧＦＲ２蛋白質を選択的に回収することができる。ＦＧＦＲ２蛋白質含有溶液は、ゲルろ過やＣｅｎｔｒｉｐｒｅｐ等の濃縮装置でバッファー交換及び／又は濃縮することができる。

（２－３－２）組換型ＦＧＦＲ２蛋白質の調製

本発明のＦＧＦＲ２蛋白質は、組換型としても調製することができる。すなわち、ＦＧＦＲ２蛋白質又はＦＧＦＲ２蛋白質断片のアミノ酸配列をコードする遺伝子を宿主細胞に導入し、かかる細胞の培養物からＦＧＦＲ２蛋白質を回収することができる。例えば、ＦＧＦＲ２遺伝子又はその断片を発現ベクター

に挿入し、次いで、原核又は真核の宿主細胞に該組換えベクターを導入して得られる組換え細胞を保温すれば、該細胞にＦＧＦＲ２蛋白質を発現させることができる。発現形態としては、分泌発現、細胞内可溶発現、インクルージョンボディー法など公知の形態を用いることができる。また、アミノ末端（Ｎ末）及び／又はカルボキシ末端（Ｃ末）が天然型と同一の分子のみならず、分泌シグナル、細胞内局在化シグナル、アフィニティー精製用タグ、パートナーペプチドとの融合蛋白質として発現させることもできる。かかる組換え細胞培養物からのＦＧＦＲ２蛋白質の精製、単離は、（２－３－１）記載の非組換型ＦＧＦＲ２蛋白質の精製、単離に記載の分画、クロマトグラフィー等の操作を適宜組み合わせることにより行うことができる。

ＦＧＦＲ２遺伝子又はその断片は、当業者に周知の方法により調製することができる。

例えば、ＦＧＦＲ２を発現している細胞や組織等から調製したｃＤＮＡライブラリーを鋳型とし、当該配列を特異的に増幅し得る一組のプライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応（以下、「ＰＣＲ」という：Ｓａｉｋｉ，Ｒ．Ｋ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ（１９８８）２３９，ｐ．４８７－４８９）、ＦＧＦＲ２を発現している細胞や組織等から調製したｍＲＮＡ画分を鋳型とし、当該配列を逆転写し得るプライマー及び当該配列を特異的に増幅し得る一組のプライマーを用いた逆転写ＰＣＲ（以下、「ＲＴ－ＰＣＲ」という）、免疫アッセイを利用した発現クローニング、精製ＦＧＦＲ２蛋白質の部分アミノ酸配列を利用したｃＤＮＡクローニング等をあげることができる。

（２－３－３）インビトロ翻訳

本発明のＦＧＦＲ２蛋白質はインビトロ翻訳によっても調製することができる。かかる翻訳法としては、転写及び翻訳に必要な酵素、基質並びにエネルギー物質を含む無細胞翻訳系を利用した方法であれば特に限定されるものではないが、例えば、ロシュ・ダイアグノスティックス社製のラピッドトランスレーションシステム（ＲＴＳ）を利用する方法をあげることができる。

（２－３－４）化学合成

本発明のＦＧＦＲ２蛋白質は化学合成によっても調製することができる。化学合成法としては、例えば、Ｆｍｏｃ合成法、Ｂｏｃ合成法などのペプチド固相合成法をあげることができる。

３．抗体

（３－１）抗体の分類

本発明の抗体は、モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体のいずれであってもよい。本発明のモノクローナル抗体としては、非ヒト動物由来の抗体（非ヒト動物抗体）、ヒト由来の抗体（ヒト抗体）、キメラ化抗体（「キメラ抗体」ともいう）、ヒト化抗体等をあげることができる。

非ヒト動物抗体としては、哺乳類、鳥類等の脊椎動物に由来する抗体等をあげることができる。哺乳類由来の抗体としては、マウス抗体、ラット抗体等げっ歯類由来の抗体等をあげることができる。鳥類由来の抗体としては、ニワトリ抗体等をあげることができる。抗ヒトＦＧＦＲ２ラットモノクローナル抗体としては、ＦＲ２－１０、ＦＲ２－１３、ＦＲ２－１４等をあげることができる。

キメラ化抗体としては、非ヒト動物抗体由来の可変領域とヒト抗体（ヒト免疫グロブリン）定常領域とを結合してなる抗体等をあげることができるが、それに限定されるものではない。非ヒト動物抗体由来の可変領域とヒト抗体定常領域が結合してなるキメラ化抗体としては、前述のラットモノクローナル抗体ＦＲ２－１０、ＦＲ２－１３又はＦＲ２－１４由来の重鎖及び軽鎖可変領域、ならびに、ヒト重鎖及び軽鎖定常領域を有する、ｃＦＲ２－１０、ｃＦＲ２－１３、ｃＦＲ２－１４等をそれぞれあげることができる。

ヒト化抗体としては、非ヒト動物抗体の可変領域中のＣＤＲをヒト抗体（ヒト免疫グロブリンの可変領域）に移植したもの、ＣＤＲに加え非ヒト動物抗体

のフレームワーク領域の配列も一部ヒト抗体に移植したもの、それらのいずれかの非ヒト動物抗体由来の１つ又は２つ以上のアミノ酸をヒト型のアミノ酸で置換したもの等をあげることができるが、それらに限定されるものではない。非ヒト動物抗体の可変領域中のＣＤＲとしては、前述のＦＲ２－１０、ＦＲ２－１３又はＦＲ２－１４由来の重鎖可変領域中のＣＤＲＨ１乃至ＣＤＲＨ３および軽鎖可変領域中のＣＤＲＬ１乃至ＣＤＲＬ３を例示することができる。

ヒト抗体としては、本発明の抗原を認識する抗体であれば特に限定されるものではないが、本発明の抗体のＣＤＲを有する抗体と同一の部位に結合するヒト抗体、前述のＦＲ２－１０，ＦＲ２－１３又はＦＲ２－１４とＦＧＦＲ２上で同一の部位に結合するヒト抗体等を例示することができる。

本発明における抗体は、ＦＧＦＲ２に結合する活性を有していれば、複数の異なる抗体に由来する部分から構成される抗体であってもよく、例えば、複数の異なる抗体間で重鎖及び／又は軽鎖を交換したもの、重鎖及び／又は軽鎖の全長を交換したもの、可変領域のみ又は定常領域のみを交換したもの、ＣＤＲの全部又は一部のみを交換したもの等をあげることができる。キメラ化抗体の重鎖可変領域と軽鎖可変領域は、異なる本発明の抗体に由来してもよい。ヒト化抗体の重鎖及び軽鎖の可変領域中のＣＤＲＨ１乃至ＣＤＲＨ３並びにＣＤＲＬ１乃至ＣＤＲＬ３は、２種又はそれ以上の本発明の抗体に由来してもよい。ヒト抗体の重鎖及び軽鎖の可変領域中のＣＤＲＨ１乃至ＣＤＲＨ３並びにＣＤＲＬ１乃至ＣＤＲＬ３は、２種又はそれ以上の本発明の抗体が有するＣＤＲの組合せであってもよい。そのような複数の異なる抗体に由来する部分から構成される抗体は、（３－３）乃至（３－６）記載の１つ又は２つ以上の活性を有していてもよい。

本発明のモノクローナル抗体のアイソタイプは特に限定されるものではないが、例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４等のＩｇＧ、ＩｇＭ、ＩｇＡ１、ＩｇＡ２等のＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ等をあげることができ、好適にはＩｇＧおよびＩｇＭを挙げることができる。モノクローナル抗体のアイソ

タイプ及びサブクラスは、例えば、オクテルロニー（Ｏｕｃｈｔｅｒｌｏｎｙ）法、ＥＬＩＳＡ法、Ｒａｄｉｏ　ｉｍｍｕｎｏａｓｓａｙ（以下、「ＲＩＡ」という）法等で決定することができる、市販の同定用のキット（マウスタイパーキット：バイオラッド社製、ＲＡＴ　ＭＯＮＯＣＬＯＮＡＬ　ＡＮＴＩＢＯＤＹ　ＩＳＯＴＹＰＩＮＧ　ＴＥＳＴ　ＫＩＴ：ｓｅｒｏｔｅｃ社　等）も利用することができる。

（３－２）抗体の結合特異性

本発明の抗体はＦＧＦＲ２蛋白質を認識する。言い換えれば、本発明の抗体はＦＧＦＲ２蛋白質に結合する。かかる抗体は「抗ＦＧＦＲ２抗体」と表記される。また、本発明の好適な抗体はＦＧＦＲ２蛋白質を特異的に認識する。言い換えれば、本発明の好適な抗体はＦＧＦＲ２蛋白質に特異的に結合する。さらに、本発明の、より好適な抗体はＦＧＦＲ２ＩＩＩｂ蛋白質及び／又はＦＧＦＲ２ＩＩＩｃ蛋白質に特異的に結合し、より一層好適な抗体はＦＧＦＲ２ＩＩＩｂ蛋白質及び／又はＦＧＦＲ２ＩＩＩｃ蛋白質の有する免グロブリン様ドメイン（以下、「Ｉｇ様ドメイン」という）に特異的に結合する。かかるＩｇ様ドメインとしては、Ｉｇ様ドメイン２、Ｉｇ様ドメイン３等を例示することができる。

本発明において「特異的な認識」、すなわち「特異的な結合」とは、非特異的な吸着ではない結合を意味する。結合が特異的であるか否かの判定基準としては、例えば、解離定数（Ｄｉｓｓｏｃｉａｔｉｏｎ　Ｃｏｎｓｉｔａｎｔ：以下、「ＫＤという」）をあげることができる。本発明の好適な抗体のＦＧＦＲ２蛋白質に対するＫＤ値は1×10^{-5}以下、5×10^{-6}以下、2×10^{-6}以下または1×10^{-6}以下、より好適には5×10^{-7}以下、2×10^{-7}以下または1×10^{-7}以下、より一層好適には5×10^{-8}以下、2×10^{-8}以下または1×10^{-8}以下、さらにより一層好適には5×10^{-9}以下、2×10^{-9}以下または1×10^{-9}以下、最適には5×10^{-10}以下、2×10^{-10}以下または1×10

$^{-10}$以下である。

本発明における抗原と抗体の結合は、ＥＬＩＳＡ法、ＲＩＡ法、Ｓｕｒｆａｃｅ　Ｐｌａｓｍｏｎ　Ｒｅｓｏｎａｎｃｅ（以下、「ＳＰＲ」という）解析法等により測定または判定することができる。ＳＰＲ解析に用いる機器としては、ＢＩＡｃｏｒｅ™（ＧＥヘルスケア社製）、ＰｒｏｔｅＯｎ™（ＢｉｏＲａｄ社製）、ＳＰＲ－Ｎａｖｉ™（ＢｉｏＮａｖｉｓ社製）、Ｓｐｒｅｅｔａ™（Ｔｅｘａｓ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ社製）、ＳＰＲｉ－ＰｌｅｘＩＩ™（ホリバ社製）、Ａｕｔｏｌａｂ　ＳＰＲ™（Ｍｅｔｒｏｈｍ社製）等を例示することができる。細胞表面上の発現している抗原と抗体との結合は、フローサートメトリー法、Ｃｅｌｌ　ＥＬＩＳＡ法等により測定することができる。

（３－３）抗体の抗腫瘍活性

本発明の抗体は、抗腫瘍活性を有し、好適にはイン・ビボ（ｉｎ　ｖｉｖｏ）で抗腫瘍活性を有する。本発明において、抗腫瘍活性と抗癌活性は同義である。

本発明において、抗腫瘍活性とは、腫瘍組織及び／又は腫瘍細胞の増殖、悪性化、浸潤、転移、腫瘍サイズ増大又は重量増加等を抑制する活性を意味する。

抗腫瘍活性は、定法に従って評価することができる。イン・ビボ抗腫瘍活性は、例えば、ヒト癌組織又は癌細胞を移植した非ヒト動物モデル（ゼノグラフト）を用いることにより、ヒト腫瘍に対する効果を評価することができる。ゼノグラフトに用いる非ヒト動物としては、ヌードマウス等のマウスやラット等をあげることができる。

また、抗腫瘍活性は、癌細胞の細胞増殖に対する抑制または阻害活性としても評価することができる。

（３－４）抗体の細胞傷害活性

本発明の抗ＦＧＦＲ２抗体は、抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）活性及び/又は補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）活性及び／又は抗体依存性細胞媒介食活性（Ａ

ＤＣＰ）活性を有していてもよい。本発明の好適な抗体はＡＤＣＣ活性を有し、より好適な抗体は、ＦＧＦＲ２発現細胞に対してＡＤＣＣ活性を有する。ＡＤＣＣ活性、ＣＤＣ活性およびＡＤＣＰ活性は公知の方法により測定することができる。

ＡＤＣＣ活性の測定には、目的とする抗原を発現する細胞（標的細胞）と、その標的細胞を殺傷するエフェクター細胞が用いられる。エフェクター細胞はＦｃγ受容を介して、標的細胞に結合した抗体のＦｃ領域を認識する。Ｆｃγ受容体から伝達されるシグナルにより、エフェクター細胞が標的細胞を殺傷する。ヒト由来のＦｃ領域を有する抗体のＡＤＣＣ活性を測定する場合、エフェクター細胞としてヒトＮＫ細胞が用いられる。ヒトＮＫ細胞はヒト末梢血単核球（ＰＭＢＣ）から公知の方法により調製することができる。あるいはＰＢＭＣをそのままエフェクター細胞として用いることもできる。

ＡＤＣＰ活性の測定には、目的とする抗原を発現する細胞（標的細胞）と、その標的細胞を貪食する単球やマクロファージなどのエフェクター細胞が用いられる。これらのエフェクター細胞は、ヒト末梢血単核球（ＰＭＢＣ）から公知の方法により分離したモノサイト画分を公知の方法によりマクロファージへと分化誘導させて調製することができる。

（３－５）シグナル伝達に対する抗体の作用

本発明の抗ＦＧＦＲ２抗体の有する生物学的活性及び性質は、ＦＧＦＲ２を介したＦＧＦシグナルを通じて評価することもできる。ＦＧＦＲ２を介したＦＧＦ刺激によるシグナル伝達としては、特に限定されるものではないが、例えば、ＦＧＦＲ２自己リン酸化、ＦＧＦＲ基質のリクルート及びその促進、それらを介したＭＡＰＫ，ＰＩ３Ｋ、Ａｋｔ、細胞外シグナル制御キナーゼ（ＥＲＫ）等のシグナル経路の活性化等をあげることができる。ＦＧＦＲ基質としては、ＦＧＦＲ基質２α（ＦＲＳ２α）等を例示することができる。かかるシグナル伝達の活性化及びその抑制を評価するための試験方法は、特に限定されも

のではなく、公知の方法から任意に選択することができるが、例えば、ＥＲＫシグナル伝達を評価する系そして、後述のＥｌｋ１ルシフェラーゼレポーターアッセイを例示することができる。

また、本発明の好適な抗体はＦＧＦＲ２に対する中和活性を有し、より好適にはＦＧＦＲ２ＩＩＩｂ及び／又はＦＧＦＲ２ＩＩＩｃに対する中和活性を有する。中和活性とは、ＦＧＦＲ２のリガンドによるＦＧＦＲ２活性化を阻害又は抑制する活性を意味する。例えば、ＦＧＦ依存性のＦＧＦＲ２介在性シグナル、シグナル伝達等を阻害する抗体は、かかる中和活性を有すると判定することができる。実施例２の２）－３および実施例１１に中和活性測定の例を示す。

（３－６）抗体の受容体－リガンド間の結合を阻害する活性

本発明の好適な抗体はＦＧＦＲ２とそのリガンドの結合を阻害し、より好適にはＦＧＦＲ２ＩＩＩｂ及び／又はＦＧＦＲＩＩＩｃとＦＧＦの結合を阻害する。かかる受容体－リガンド間の結合阻害は、競合的阻害および非競合的阻害のいずれであってもよい。ＦＧＦＲ２ＩＩＩｂおよびＦＧＦＲ２ＩＩＩｃに対するリガンドとしては、ＦＧＦ１、ＦＧＦ３、ＦＧＦ７、ＦＧＦ１０、ＦＧＦ２２およびＦＧＦ２３、ならびに、ＦＧＦ１、ＦＧＦ２、ＦＧＦ４、ＦＧＦ６、ＦＧＦ９、ＦＧＦ１７、ＦＧＦ１８、ＦＧＦ２１およびＦＧＦ２３を、それぞれ例示することができる。

（３－７）モノクローナル抗体

本発明はモノクローナル抗体を提供する。モノクローナル抗体には、ラット抗体、マウス抗体、ウサギ抗体、ニワトリ抗体、魚類抗体等の非ヒト動物由来のモノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、それらの機能断片、それらの修飾体等が含まれる。このうち、ラットモノクローナル抗体の例としては、ＦＲ２－１０抗体、ＦＲ２－１３抗体、ＦＲ２－１４抗体等をあげることができる。

ＦＲ２－１０は実施例１に記載の方法により得られた抗ヒトＦＧＦＲ２ラットモノクローナル抗体である。ＦＲ２－１０の重鎖可変領域の塩基配列は配列表の配列番号１１（図１９）に、アミノ酸配列は配列番号１２（図２０）に記載されている。ＦＲ２－１０の軽鎖可変領域の塩基配列は配列表の配列番号２０（図２８）に、アミノ酸配列は配列番号２１（図２９）に記載されている。ＦＲ２－１０のＣＤＲＨ１のアミノ酸配列は配列番号５２（図６０）に、ＣＤＲＨ２のアミノ酸配列は配列番号５３（図６１）に、ＣＤＲＨ３のアミノ酸配列は配列番号５４（図６２）に、ＣＤＲＬ１のアミノ酸配列は配列番号６１（図６９）に、ＣＤＲＬ２のアミノ酸配列は配列番号６２（図７０）に、ＣＤＲＬ３のアミノ酸配列は配列番号６３（図７１）にそれぞれ記載されている。

ＦＲ２－１３は実施例１に記載の方法により得られた抗ヒトＦＧＦＲ２ラットモノクローナル抗体である。ＦＲ２－１３の重鎖可変領域の塩基配列は配列表の配列番号１３（図２１）に、アミノ酸配列は配列番号１４（図２２）に記載されている。ＦＲ２－１３の軽鎖可変領域の塩基配列は配列表の配列番号２３（図３１）に、アミノ酸配列は配列番号２４（図３２）に記載されている。ＦＲ２－１３のＣＤＲＨ１のアミノ酸配列は配列番号５５（図６３）に、ＣＤＲＨ２のアミノ酸配列は配列番号５６（図６４）に、ＣＤＲＨ３のアミノ酸配列は配列番号５７（図６５）に、ＣＤＲＬ１のアミノ酸配列は配列番号６４（図７２）に、ＣＤＲＬ２のアミノ酸配列は配列番号６５（図７３）に、ＣＤＲＬ３のアミノ酸配列は配列番号６６（図７４）にそれぞれ記載されている。

ＦＲ２－１４は実施例１に記載の方法により得られた抗ヒトＦＧＦＲ２ラットモノクローナル抗体である。ＦＲ２－１４の重鎖可変領域の塩基配列は配列表の配列番号１５（図２３）に、アミノ酸配列は配列番号１６（図２４）に記載されている。ＦＲ２－１４の軽鎖可変領域の塩基配列は配列表の配列番号２５（図３３）に、アミノ酸配列は配列番号２６（図３４）に記載されている。ＦＲ２－１４のＣＤＲＨ１のアミノ酸配列は配列番号５８（図６６）に、ＣＤＲＨ２のアミノ酸配列は配列番号５９（図６７）に、ＣＤＲＨ３のアミノ酸配

列は配列番号６０（図６８）に、ＣＤＲＬ１のアミノ酸配列は配列番号６７（図７５）に、ＣＤＲＬ２のアミノ酸配列は配列番号６８（図７６）に、ＣＤＲＬ３のアミノ酸配列は配列番号６９（図７７）に記載されている。

本発明の抗体変異体には、好適には、蛋白質の分解もしくは酸化に対する感受性の低下、生物活性の改善、抗原結合能の改善、又は理化学的性質もしくは機能的性質の付与等がなされている。そのような抗体変異体の例として、抗体の有するアミノ酸配列において保存的アミノ酸置換されてなるアミノ酸配列を有する抗体をあげることができる。保存的アミノ酸置換とは、アミノ酸側鎖に関連のあるアミノ酸グループ内で生じる置換である。

好適なアミノ酸グループは、以下のとおりである：酸性グループ＝アスパギン酸、グルタミン酸；塩基性グループ＝リジン、アルギニン、ヒスチジン；非極性グループ＝アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン；および非帯電極性ファミリー＝グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、スレオニン、チロシン。他の好適なアミノ酸グループは次のとおりである：脂肪族ヒドロキシグループ＝セリン及びスレオニン；アミド含有グループ＝アスパラギン及びグルタミン；脂肪族グループ＝アラニン、バリン、ロイシン及びイソロイシン；並びに芳香族グループ＝フェニルアラニン、トリプトファン及びチロシン。かかる抗体変異体におけるアミノ酸置換は、元の抗体が有する抗原結合活性を低下させない範囲で行うのが好ましい。

蛋白質中に含まれるアスパラギン酸は、そのＣ末側に連結するアミノ酸が小さい側鎖を有する場合は異性化によりイソアスパラギン酸に変換され易く、一方で、アスパラギンの場合は脱アミド化によりアスパラギン酸に変換され易く、さらに異性化によりイソアスパラギン酸に変換される可能性がある。そのような異性化や脱アミド化が進めば、蛋白質の安定性に影響が生じ得る。そこで、かかる異性化や脱アミド化を回避するために、蛋白質中のアスパラギン酸やアスパラギンあるいはそれらに隣接するアミノ酸等を他のアミノ酸で置換するこ

とができる。かかるアミノ酸置換がなされた抗体変異体は、元の抗体が有する抗原結合活性を保持していることが好ましい。

本発明のＦＲ２－１０、ＦＲ２－１３又はＦＲ２－１４が有するアミノ酸配列において保守的アミノ酸置換がなされたアミノ酸配列を有する抗体変異体、ならびに、ＦＲ２－１０、ＦＲ２－１３又はＦＲ２－１４由来のＣＤＲＨ１乃至ＣＤＲＨ３及びＣＤＲＬ１乃至ＣＤＲＬ３のいずれかのアミノ酸配列において保守的アミノ酸変異がなされたアミノ酸配列を有する該ＣＤＲを含むマウス抗体、ラット抗体、キメラ化抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体等も本発明に包含される。

本発明のＦＲ２－１０、ＦＲ２－１３又はＦＲ２－１４由来のＣＤＲＨ１乃至ＣＤＲＨ３及びＣＤＲＬ１乃至ＣＤＲＬ３のいずれか１つ又は２つ以上のアミノ酸配列において１乃至数個、好適には１乃至３個、より好適には１又は２個、最適には１個のアミノ酸が他のアミノ酸に置換されてなるアミノ酸配列を有するＣＤＲＨ１乃至ＣＤＲＨ３及びＣＤＲＬ１乃至ＣＤＲＬ３を含む抗体の変異体であって、且つヒトＦＧＦＲ２に結合するものは、本発明の抗体の変異体に包含される。

ＦＲ２－１４の好適な変異体としては、例えば、ＣＤＲＨ３のアミノ酸配列においてアミノ酸が他のアミノ酸で置換されてなるアミノ酸配列を有するＣＤＲＨ３を含む抗体をあげることができる。

ＦＲ２－１４重鎖ＣＤＲＨ３のアミノ酸が置換された好適な変異体としては、例えば、１番目のアミノ酸であるアスパラギン酸（配列番号５１、図５９の１１８番目のアミノ酸）がグルタミン酸で置換された変異体、２番目のアミノ酸であるグリシン（配列番号５１、図５９の１１９番目のアミノ酸）がチロシン、アラニン、トリプトファン、バリン、アルギニン、アスパラギン、メチオニン、ロイシン、リジン、イソロイシン、ヒスチジン、フェニルアラニンまたはグルタミン酸で置換された変異体、８番目のアミノ酸であるスレオニンがアラニンで置換された変異体等を例示することができる。

また、複数の抗体に由来するＣＤＲＨ１乃至ＣＤＲＨ３およびＣＤＲＬ１乃至ＣＤＲＬ３を有する抗体も、抗体変異体に含まれる。そのような変異体の例として、ＣＤＲＨ３のみある抗体に由来し、ＣＤＲＨ１及びＣＤＲＨ２ならびにＣＤＲＬ１乃至ＣＤＲＬ３は別の抗体に由来する抗体変異体をあげることができる。

本発明においては抗体変異体も「抗体」に包含される。

本発明の抗体の定常領域としては、とくに限定されるものではないが、ヒトの疾患を治療または予防するための本発明の抗体としては、好適にはヒト抗体のものが使用される。ヒト抗体の重鎖定常領域としては、例えば、Ｃγ１、Ｃγ２、Ｃγ３、Ｃγ４、Ｃμ、Ｃδ、Ｃα１、Ｃα２、Ｃε等をあげることができる。ヒト抗体の軽鎖定常領域としては、例えば、Ｃκ、Ｃλ等をあげることができる。

（３－８）キメラ抗体

本発明の抗ＦＧＦＲ２キメラ化抗体又はその機能断片は、抗腫瘍活性を有し、好適にはイン・ビボ（ｉｎ　ｖｉｖｏ）で抗腫瘍活性を有する。また、かかるキメラ化抗体又はその機能断片は、好適にはＦＧＦＲ２ＩＩＩｂ蛋白質及び／又はＦＧＦＲ２ＩＩＩｃ蛋白質に特異的に結合し、より好適にはそれらの蛋白質の有するＩｇ様ドメインに結合する。さらに、かかるキメラ化抗体は、好適にはＡＤＣＣ活性及び／又はＡＤＣＰ活性を有する。また、本発明のキメラ抗体又はその機能断片はＦＧＦＲ２に対する中和活性を有し、好適にはＦＧＦＲ２ＩＩＩｂ及び／又はＦＧＦＲ２ＩＩＩｃに対する中和活性を有し、より好適にはＦＧＦＲ２ＩＩＩｂ及びＦＧＦＲ２ＩＩＩｃに対する中和活性を有する。さらに、本発明のキメラ抗体又はその機能断片は、好適にはＦＧＦＲ２とそのリガンドの結合を阻害する。

本発明のラット－ヒトキメラ化抗体として例示されるｃＦＲ２－１０の軽鎖塩基配列及びアミノ酸配列ならびに重鎖塩基配列及びアミノ酸配列は、配列表

の配列番号３１、３２、３５及び３６（図３９、４０、４３及び４４）にそれぞれ示される。同じく、ｃＦＲ２－１３の軽鎖塩基配列及びアミノ酸配列ならびに重鎖塩基配列及びアミノ酸配列は、配列表の配列番号３９、４０、４３及び４４（図４７、４８、５１及び５２）に、ｃＦＲ２－１４の軽鎖塩基配列及びアミノ酸配列ならびに重鎖塩基配列及びアミノ酸配列は、配列表の配列番号４７、４８、５０及び５１（図５５、５６、５８及び５９）に、それぞれ示される。それらの軽鎖の塩基配列におけるヌクレオチド番号１乃至６０、ならびに、それらの軽鎖のアミノ酸配列におけるアミノ酸番号１乃至２０は、シグナル配列であり、通常大部分の成熟軽鎖の塩基配列およびアミノ酸配列にはそれぞれ含まれない。同様に、それらの重鎖の塩基配列におけるヌクレオチド番号１乃至５７、ならびに、それらの重鎖のアミノ酸配列におけるアミノ酸番号１乃至１９は、シグナル配列であり、通常大部分の成熟重鎖の塩基配列およびアミノ酸配列にはそれぞれ含まれない。

（３－９）抗体の機能断片

本発明は一つの態様として、本発明の抗ＦＧＦＲ２抗体の機能断片を提供する。抗体の機能断片とは、該抗体の有する機能の少なくとも一部を保持する断片を意味する。かかる抗体の機能としては、一般的には、抗原結合活性、抗原の活性を調節する活性、抗体依存性細胞障害（ＡＤＣＣ）活性及び抗体依存性細胞媒介食（ＡＤＣＰ）活性等を挙げることができる。本発明の抗ＦＧＦＲ２抗体の機能としては、例えば、ＦＧＦＲ２蛋白質結合活性、ＡＤＣＣ活性、ＡＤＣＰ活性、ＦＧＦＲ２に対する中和活性、イン・ビボ抗腫瘍活性、ＦＧＦＲ２とそのリガンドの結合を阻害する活性等をあげることができる。

抗体の機能断片としては、該抗体の有する活性の少なくとも一部を保持している該抗体の断片であれば特に限定されないが、例えば、.Ｆａｂ、Ｆ（ａｂ’）２、Ｆｖ、重鎖及び軽鎖のＦｖを適当なリンカーで連結させたシングルチェインＦｖ（ｓｃＦｖ）、ｄｉａｂｏｄｙ（ｄｉａｂｏｄｉｅｓ）、線状抗体、及び

抗体断片より形成された多特異性抗体、Ｆ（ａｂ’）２を還元条件下で処理した抗体の可変領域の一価の断片であるＦａｂ’等をあげることができるが、それらに限定されるものではない。リンカー部分を保有するｓｃＦｖのように、本発明の抗体の断片以外の部分を含む分子も、本発明の抗体の機能断片の意味に包含される。

抗体蛋白質のアミノ末端及び／又はカルボキシ末端のアミノ酸が１乃至数個又はそれ以上を欠失してなり、且つ該抗体の有する機能の少なくとも一部を保持している分子も、抗体の機能断片の意味に包含される。例えば、哺乳類培養細胞で生産される抗体の重鎖のカルボキシル末端のリジン残基が欠失することが知られており（Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒａｐｈｙ　Ａ，７０５：１２９－１３４（１９９５））、また、同じく重鎖カルボキシル末端のグリシン、リジンの２アミノ酸残基が欠失し、新たにカルボキシル末端に位置するプロリン残基がアミド化されることが知られている（Ａｎａｌｙｔｉｃａｌ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，３６０：７５－８３（２００７））。しかし、これらの重鎖配列の欠失及び修飾は、抗体の抗原結合能及びエフェクター機能（補体の活性化や抗体依存性細胞障害作用など）には影響を及ぼさない。そのような抗体の機能断片の修飾体も、本発明の抗体もしくはその機能断片、又はその修飾体（後述）に包含される。

本発明の抗体又はその機能断片は、少なくとも２種類の異なる抗原に対して特異性を有する多特異性抗体であってもよい。多特異性抗体は、２種類の異なる抗原に結合する二重特異性抗体（ｂｉｓｐｅｃｉｆｉｃ　ａｎｔｉｂｏｄｙ）に限定されず、３種以上の異なる抗原に対して特異性を有する抗体も本発明の「多特異性抗体」の意味に包含される。

本発明の多特異性抗体は、全長抗体又はその機能断片であってもよい（例えば、Ｆ（ａｂ’）２二重特異性抗体）。二重特異性抗体は２種類の抗体の重鎖と軽鎖（ＨＬ対）を結合させて作製することもできる。また、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを２種類以上融合させて、二重特異性抗体産生融

合細胞を作製することによっても、得ることができる（Ｍｉｌｌｓｔｅｉｎ ｅｔ ａｌ., Ｎａｔｕｒｅ（１９８３）３０５, ｐ. ５３７－５３９）。多特異的抗体も同様の方法により調製することができる。

本発明の抗体の一つの態様は、一本鎖抗体（以下、「ｓｃＦｖ」という）である。ｓｃＦｖは、抗体の重鎖Ｖ領域と軽鎖Ｖ領域とをポリペプチドのリンカーで連結することにより得られる（Ｐｌｕｃｋｔｈｕｎ, Ｔｈｅ Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ ｏｆ Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ, １１３, Ｒｏｓｅｎｂｕｒｇ及びＭｏｏｒｅ編, Ｓｐｒｉｎｇｅｒ Ｖｅｒｌａｇ, Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ, ｐ. ２６９－３１５（１９９４）、Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（２００５）, ２３, ｐ. １１２６－１１３６）。また、２つのｓｃＦｖをポリペプチドリンカーで結合させて作製されるＢｉｓｃＦｖを二重特異性抗体として使用することができる。さらに３つ以上のｓｃＦｖよりＭｕｌｔｉｓｃＦｖも多特異性抗体として使用することができる。

本発明には、抗体の重鎖及び軽鎖の全長配列を適切なリンカーを用いて連結し、一本鎖イムノグロブリン（ｓｉｎｇｌｅ ｃｈａｉｎ ｉｍｍｕｎｏｇｌｏｂｕｌｉｎ）が含まれる（Ｌｅｅ, Ｈ－Ｓ, ｅｔ. ａｌ., Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ（１９９９）３６, ｐ. ６１－７１；Ｓｈｉｒｒｍａｎｎ, Ｔ. ｅｔ. ａｌ., ｍＡｂｓ（２０１０）, ２, (１) ｐ. １－４）。このような一本鎖イムノグロブリンは二量体化することによって、本来は四量体である抗体と類似した構造と活性を保持することが可能である。また、本発明の抗体は、単一の重鎖可変領域を有し、軽鎖配列を有さない抗体であってもよい。このような抗体は、単一ドメイン抗体（ｓｉｎｇｌｅ ｄｏｍａｉｎ ａｎｔｉｂｏｄｙ：ｓｄＡｂ）又はナノボディ（ｎａｎｏｂｏｄｙ）と呼ばれており、抗原結合能が保持されていることが報告されている（Ｍｕｙｌｄｅｍａｎｓ Ｓ. ｅｔ. ａｌ., Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇ.（１９９４）７（９）, １１２９－３５, Ｈａｍｅｒｓ－Ｃａｓｔｅｒｍａｎ Ｃ. ｅｔ. ａｌ., Ｎａｔｕｒｅ（１９９３）３６３（６４２８）４４６－８）。これらの抗体も、本発明に

おける抗体の機能性断片の意味に包含される。

（３－１０）ヒト化抗体およびヒト抗体

本発明はその一つの態様において、ヒト化抗体又はその機能断片を提供する。

本発明の抗ＦＧＦＲ２ヒト化抗体又はその機能断片は、抗腫瘍活性を有し、好適にはイン・ビボ（ｉｎ　ｖｉｖｏ）で抗腫瘍活性を有する。また、かかるヒト化抗体又はその機能断片は、好適にはＦＧＦＲ２ＩＩＩｂ蛋白質及び／又はＦＧＦＲ２ＩＩＩｃ蛋白質に特異的に結合し、より好適にはそれらの蛋白質の有するＩｇ様ドメインに結合する。さらに、かかるヒト化抗体又はその機能断片は、好適にはＡＤＣＣ活性及び／又はＡＤＣＰ活性を有する。また、本発明のヒト化抗体又はその機能断片はＦＧＦＲ２に対する中和活性を有し、好適にはＦＧＦＲ２ＩＩＩｂ及び／又はＦＧＦＲ２ＩＩＩｃに対する中和活性を有し、より好適にはＦＧＦＲ２ＩＩＩｂ及びＦＧＦＲ２ＩＩＩｃに対する中和活性を有する。さらに、本発明のヒト化抗体又はその機能断片は、好適にはＦＧＦＲ２とそのリガンドの結合を阻害する。

本発明の好適なヒト化抗体の例としては、以下のＡ乃至Ｃに記載するように、ラットＦＲ２－１０抗体、ラットＦＲ２－１３抗体またはラットＦＲ２－１４抗体の重鎖のＣＤＲＨ１乃至ＣＤＲＨ３および軽鎖のＣＤＲＬ１乃至ＣＤＲＬ３を有するヒト化抗体等をあげることができる。

（Ａ．ラットＦＲ２－１０抗体の重鎖のＣＤＲＨ１乃至ＣＤＲＨ３および軽鎖のＣＤＲＬ１乃至ＣＤＲＬ３を有するヒト化抗体）

本発明の抗ＦＧＦＲ２ヒト化抗体又はその機能断片としては、例えば、配列表の配列番号５２（図６０）に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１、配列表の配列番号５３（図６１）に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２及び配列表の配列番号５４（図６２）に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３を含む可変領域を有する重鎖、並びに、配列表の配列番号６１（図６９）に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１、配列表の配列番号６２（図７０）

に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２及び配列表の配列番号６３（図７１）に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ３を含む可変領域を有する軽鎖からなり、本発明のＦＧＦＲ２蛋白質を認識するヒト化抗体もしくは該抗体のＦＧＦＲ２蛋白質結合活性を保持している該抗体の断片、またはその変異体等をあげることができる。

（Ｂ．ラットＦＲ２－１３抗体の重鎖のＣＤＲＨ１乃至ＣＤＲＨ３および軽鎖のＣＤＲＬ１乃至ＣＤＲＬ３を有するヒト化抗体）

また、他の抗ＦＧＦＲ２ヒト化抗体又はその機能断片としては、例えば、配列表の配列番号５５（図６３）に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１、配列表の配列番号５６（図６４）に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２及び配列表の配列番号５７（図６５）に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３を含む可変領域を有する重鎖、並びに、配列表の配列番号６４（図７２）に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１、配列表の配列番号６５（図７３）に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２及び配列表の配列番号６６（図７４）に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ３を含む可変領域を有する軽鎖からなり、本発明のＦＧＦＲ２蛋白質を認識するヒト化抗体もしくは該抗体のＦＧＦＲ２蛋白質結合活性を保持している該抗体の断片、またはその変異体等をあげることができる。

（Ｃ．ラットＦＲ２－１４抗体の重鎖のＣＤＲＨ１乃至ＣＤＲＨ３および軽鎖のＣＤＲＬ１乃至ＣＤＲＬ３を有するヒト化抗体）

さらに、他の抗ＦＧＦＲ２ヒト化抗体又はその機能断片としては、例えば、配列表の配列番号５８（図６６）に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１、配列表の配列番号５９（図６７）に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２及び配列表の配列番号６０（図６８）に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３を含む可変領域を有する重鎖、並びに、配列表の配列番号６７（図７５）に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１、配列表の配列番号６８（図７６）に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２及び配列表の配列番号６９（図７

７）に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ３を含む可変領域を有する軽鎖からなり、本発明のＦＧＦＲ２蛋白質を認識するヒト化抗体もしくは該抗体のＦＧＦＲ２蛋白質結合活性を保持している該抗体の断片、またはその変異体等をあげることができる。

本発明の好適なヒト化抗体は上記Ａ乃至Ｃ記載のものには限定されない。より好適なヒト化抗体はヒト化ＦＲ２－１４抗体およびその変異体であり、以下にその例としてｈＦＲ２－１４＿Ｈ１／Ｌ１乃至ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１９／Ｌ１を挙げるが、それらに限定されるものではなく、例えば、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１／Ｌ１乃至ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１９／Ｌ１のいずれか一つのヒト化抗体の重鎖可変領域を含む重鎖、ならびに、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１／Ｌ１乃至ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１９／Ｌ１のいずれか一つのヒト化抗体の軽鎖可変領域を含む軽鎖、を含んでなる抗体も、本発明のより好適なヒト化抗体に含まれる。

ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１／Ｌ１は実施例８において得られたヒト化抗体である。当該抗体の軽鎖の塩基配列は配列番号７２（図８０）のヌクレオチド番号６１乃至７０５を、アミノ酸配列は配列番号７３（図８１）のアミノ酸番号２１乃至２３５を、重鎖の塩基配列は配列番号７４（図８２）のヌクレオチド番号５８乃至１４０１を、アミノ酸配列は配列番号７５（図８３）のアミノ酸番号２０乃至４６７を、それぞれ含んでいる。該抗体はＴｍ値が高く立体構造安定性に優れ、ＦＧＦＲ２に対する高い結合活性、ＦＧＦＲ２リガンド依存性のＦＧＦＲ２シグナル中和活性、ＡＤＣＣ活性、ならびにｉｎ　ｖｉｖｏ抗腫瘍活性を有していた（実施例参照）。

ｈＦＲ２－１４＿Ｈ２／Ｌ１は実施例８にいおいて得られたヒト化抗体である。当該抗体の軽鎖の塩基配列は配列番号７２（図８０）のヌクレオチド番号６１乃至７０５を、アミノ酸配列は配列番号７３（図８１）のアミノ酸番号２１乃至２３５を、重鎖の塩基配列は配列番号７６（図８４）のヌクレオチド番号５８乃至１４０１を、アミノ酸配列は配列番号７７（図８５）のアミノ酸番号２０乃至４６７を、それぞれ含んでいる。該抗体はＴｍ値が高く立体構造安

定性に優れ、ＦＧＦＲ２に対する高い結合活性、ＦＧＦＲ２リガンド依存性のＦＧＦＲ２シグナル中和活性、ＡＤＣＣ活性、ならびにｉｎ　ｖｉｖｏ抗腫瘍活性を有していた（実施例参照）。

ｈＦＲ２－１４＿Ｈ３／Ｌ１は実施例８において得られたヒト化抗体である。当該抗体の軽鎖の塩基配列は配列番号７２（図８０）のヌクレオチド番号６１乃至７０５を、アミノ酸配列は配列番号７３（図８１）のアミノ酸番号２１乃至２３５を、重鎖の塩基配列は配列番号７８（図８６）のヌクレオチド番号５８乃至１４０１を、アミノ酸配列は配列番号７９（図８７）のアミノ酸番号２０乃至４６７を、それぞれ含んでいる。該抗体はＴｍ値が高く立体構造安定性に優れ、ＦＧＦＲ２に対する高い結合活性、ＦＧＦＲ２リガンド依存性のＦＧＦＲ２シグナル中和活性、ＡＤＣＣ活性、ならびにｉｎ　ｖｉｖｏ抗腫瘍活性を有していた（実施例参照）。

ｈＦＲ２－１４＿Ｈ４／Ｌ１は実施例８において得られたヒト化抗体である。当該抗体の軽鎖の塩基配列は配列番号７２（図８０）のヌクレオチド番号６１乃至７０５を、アミノ酸配列は配列番号７３（図８１）のアミノ酸番号２１乃至２３５を、重鎖の塩基配列は配列番号８０（図８８）のヌクレオチド番号５８乃至１４０１を、アミノ酸配列は配列番号８１（図８９）のアミノ酸番号２０乃至４６７を、それぞれ含んでいる。該抗体はＴｍ値が高く立体構造安定性に優れ、ＦＧＦＲ２に対する高い結合活性、ＦＧＦＲ２リガンド依存性のＦＧＦＲ２シグナル中和活性、ＡＤＣＣ活性、ならびにｉｎ　ｖｉｖｏ抗腫瘍活性を有していた（実施例参照）。

ｈＦＲ２－１４＿Ｈ５／Ｌ１は実施例８において得られたヒト化抗体である。当該抗体の軽鎖の塩基配列は配列番号７２（図８０）のヌクレオチド番号６１乃至７０５を、アミノ酸配列は配列番号７３（図８１）のアミノ酸番号２１乃至２３５を、重鎖の塩基配列は配列番号８２（図９０）のヌクレオチド番号５８乃至１４０１を、アミノ酸配列は配列番号８３（図９１）のアミノ酸番号２０乃至４６７を、それぞれ含んでいる。該抗体はＴｍ値が高く立体構造安定性

に優れ、ＦＧＦＲ２に対する高い結合活性、優れた熱安定性、ＦＧＦＲ２リガンド依存性のＦＧＦＲ２シグナル中和活性、ならびにｉｎ　ｖｉｖｏ抗腫瘍活性を有しており、過酷な条件に曝しても高い抗原結合活性を維持した（実施例参照）。

ｈＦＲ２－１４＿Ｈ６／Ｌ１は実施例８において得られたヒト化抗体である。当該抗体の軽鎖の塩基配列は配列番号７２（図８０）のヌクレオチド番号６１乃至７０５を、アミノ酸配列は配列番号７３（図８１）のアミノ酸番号２１乃至２３５を、重鎖の塩基配列は配列番号８４（図９２）のヌクレオチド番号５８乃至１４０１を、アミノ酸配列は配列番号８５（図９３）のアミノ酸番号２０乃至４６７を、それぞれ含んでいる。該抗体はＴｍ値が高く立体構造安定性に優れ、ＦＧＦＲ２に対する高い結合活性、ならびにＦＧＦＲ２リガンド依存性のＦＧＦＲ２シグナル中和活性を有していた（実施例参照）。

ｈＦＲ２－１４＿Ｈ７／Ｌ１は実施例８において得られたヒト化抗体である。当該抗体の軽鎖の塩基配列は配列番号７２（図８０）のヌクレオチド番号６１乃至７０５を、アミノ酸配列は配列番号７３（図８１）のアミノ酸番号２１乃至２３５を、重鎖の塩基配列は配列番号８６（図９４）のヌクレオチド番号５８乃至１４０１を、アミノ酸配列は配列番号８７（図９５）のアミノ酸番号２０乃至４６７を、それぞれ含んでいる。該抗体はＴｍ値が高く立体構造安定性に優れ、ＦＧＦＲ２に対する高い結合活性、ならびにＦＧＦＲ２リガンド依存性のＦＧＦＲ２シグナル中和活性を有していた（実施例参照）。

ｈＦＲ２－１４＿Ｈ８／Ｌ１は実施例８において得られたヒト化抗体である。当該抗体の軽鎖の塩基配列は配列番号７２（図８０）のヌクレオチド番号６１乃至７０５を、アミノ酸配列は配列番号７３（図８１）のアミノ酸番号２１乃至２３５を、重鎖の塩基配列は配列番号８８（図９６）のヌクレオチド番号５８乃至１４０１を、アミノ酸配列は配列番号８９（図９７）のアミノ酸番号２０乃至４６７を、それぞれ含んでいる。該抗体はＴｍ値が高く立体構造安定性に優れ、ＦＧＦＲ２に対する高い結合活性、優れた熱安定性、ＦＧＦＲ２リガ

ンド依存性のＦＧＦＲ２シグナル中和活性、ＡＤＣＣ活性、ならびにｉｎ　ｖｉｖｏ抗腫瘍活性を有しており、過酷な条件に曝しても高い抗原結合活性を維持した（実施例参照）。

ｈＦＲ２－１４＿Ｈ９／Ｌ１は実施例８において得られたヒト化抗体である。当該抗体の軽鎖の塩基配列は配列番号７２（図８０）のヌクレオチド番号６１乃至７０５を、アミノ酸配列は配列番号７３（図８１）のアミノ酸番号２１乃至２３５を、重鎖の塩基配列は配列番号９０（図９８）のヌクレオチド番号５８乃至１４０１を、アミノ酸配列は配列番号９１（図９９）のアミノ酸番号２０乃至４６７を、それぞれ含んでいる。該抗体はＴｍ値が高く立体構造安定性に優れ、ＦＧＦＲ２に対する高い結合活性、優れた熱安定性、ＦＧＦＲ２リガンド依存性のＦＧＦＲ２シグナル中和活性、ならびにｉｎ　ｖｉｖｏ抗腫瘍活性を有していた（実施例参照）。

ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１０／Ｌ１は実施例８において得られたヒト化抗体である。当該抗体の軽鎖の塩基配列は配列番号７２（図８０）のヌクレオチド番号６１乃至７０５を、アミノ酸配列は配列番号７３（図８１）のアミノ酸番号２１乃至２３５を、重鎖の塩基配列は配列番号９２（図１００）のヌクレオチド番号５８乃至１４０１を、アミノ酸配列は配列番号９３（図１０１）のアミノ酸番号２０乃至４６７を、それぞれ含んでいる。該抗体はＴｍ値が高く立体構造安定性に優れ、ＦＧＦＲ２に対する高い結合活性、ならびにＦＧＦＲ２リガンド依存性のＦＧＦＲ２シグナル中和活性を有していた（実施例参照）。

ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１１／Ｌ１は実施例８において得られたヒト化抗体である。当該抗体の軽鎖の塩基配列は配列番号７２（図８０）のヌクレオチド番号６１乃至７０５を、アミノ酸配列は配列番号７３（図８１）のアミノ酸番号２１乃至２３５を、重鎖の塩基配列は配列番号９４（図１０２）のヌクレオチド番号５８乃至１４０１を、アミノ酸配列は配列番号９５（図１０３）のアミノ酸番号２０乃至４６７を、それぞれ含んでいる。該抗体はＴｍ値が高く立体構造安定性に優れ、ＦＧＦＲ２に対する高い結合活性、優れた熱安定性、ＦＧＦ

Ｒ２リガンド依存性のＦＧＦＲ２シグナル中和活性、ＡＤＣＣ活性、ならびにｉｎ　ｖｉｖｏ抗腫瘍活性を有しており、過酷な条件に曝しても高い抗原結合活性を維持した（実施例参照）。

ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１２／Ｌ１は実施例８において得られたヒト化抗体である。当該抗体の軽鎖の塩基配列は配列番号７２（図８０）のヌクレオチド番号６１乃至７０５を、アミノ酸配列は配列番号７３（図８１）のアミノ酸番号２１乃至２３５を、重鎖の塩基配列は配列番号９６（図１０４）のヌクレオチド番号５８乃至１４０１を、アミノ酸配列は配列番号９７（図１０５）のアミノ酸番号２０乃至４６７を、それぞれ含んでいる。該抗体はＴｍ値が高く立体構造安定性に優れ、ＦＧＦＲ２に対する高い結合活性、優れた熱安定性、ＦＧＦＲ２リガンド依存性のＦＧＦＲ２シグナル中和活性、ＡＤＣＣ活性、ＡＤＣＰ活性、ＦＧＦＲ２リガンドとＦＧＦＲ２の結合を阻害する活性、ならびにｉｎ　ｖｉｖｏ抗腫瘍活性を有しており、過酷な条件に曝しても高い抗原結合活性を維持した（実施例参照）。

ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１３／Ｌ１は実施例８において得られたヒト化抗体である。当該抗体の軽鎖の塩基配列は配列番号７２（図８０）のヌクレオチド番号６１乃至７０５を、アミノ酸配列は配列番号７３（図８１）のアミノ酸番号２１乃至２３５を、重鎖の塩基配列は配列番号９８（図１０６）のヌクレオチド番号５８乃至１４０１を、アミノ酸配列は配列番号９９（図１０７）のアミノ酸番号２０乃至４６７を、それぞれ含んでいる。該抗体はＴｍ値が高く立体構造安定性に優れ、ＦＧＦＲ２に対する高い結合活性、ならびにＦＧＦＲ２リガンド依存性のＦＧＦＲ２シグナル中和活性を有していた（実施例参照）。

ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１４／Ｌ１は実施例８において得られたヒト化抗体である。当該抗体の軽鎖の塩基配列は配列番号７２（図８０）のヌクレオチド番号６１乃至７０５を、アミノ酸配列は配列番号７３（図８１）のアミノ酸番号２１乃至２３５を、重鎖の塩基配列は配列番号１００（図１０８）のヌクレオチド番号５８乃至１４０１を、アミノ酸配列は配列番号１０１（図１０９）のア

ミノ酸番号２０乃至４６７を、それぞれ含んでいる。該抗体はＴｍ値が高く立体構造安定性に優れ、ＦＧＦＲ２に対する高い結合活性、ならびにＦＧＦＲ２リガンド依存性のＦＧＦＲ２シグナル中和活性を有していた（実施例参照）。

ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１５／Ｌ１は実施例８において得られたヒト化抗体である。当該抗体の軽鎖の塩基配列は配列番号７２（図８０）のヌクレオチド番号６１乃至７０５を、アミノ酸配列は配列番号７３（図８１）のアミノ酸番号２１乃至２３５を、重鎖の塩基配列は配列番号１０２（図１１０）のヌクレオチド番号５８乃至１４０１を、アミノ酸配列は配列番号１０３（図１１１）のアミノ酸番号２０乃至４６７を、それぞれ含んでいる。該抗体はＴｍ値が高く立体構造安定性に優れ、ＦＧＦＲ２に対する高い結合活性、ならびにＦＧＦＲ２リガンド依存性のＦＧＦＲ２シグナル中和活性を有していた（実施例参照）。

ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１６／Ｌ１は実施例８において得られたヒト化抗体である。当該抗体の軽鎖の塩基配列は配列番号７２（図８０）のヌクレオチド番号６１乃至７０５を、アミノ酸配列は配列番号７３（図８１）のアミノ酸番号２１乃至２３５を、重鎖の塩基配列は配列番号１０４（図１１２）のヌクレオチド番号５８乃至１４０１を、アミノ酸配列は配列番号１０５（図１１３）のアミノ酸番号２０乃至４６７を、それぞれ含んでいる。該抗体はＴｍ値が高く立体構造安定性に優れ、ＦＧＦＲ２に対する高い結合活性、ならびにＦＧＦＲ２リガンド依存性のＦＧＦＲ２シグナル中和活性を有していた（実施例参照）。

ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１７／Ｌ１は実施例８において得られたヒト化抗体である。当該抗体の軽鎖の塩基配列は配列番号７２（図８０）のヌクレオチド番号６１乃至７０５を、アミノ酸配列は配列番号７３（図８１）のアミノ酸番号２１乃至２３５を、重鎖の塩基配列は配列番号１０６（図１１４）のヌクレオチド番号５８乃至１４０１を、アミノ酸配列は配列番号１０７（図１１５）のアミノ酸番号２０乃至４６７を、それぞれ含んでいる。該抗体はＴｍ値が高く立体構造安定性に優れ、ＦＧＦＲ２に対する高い結合活性、ならびにＦＧＦＲ２リガンド依存性のＦＧＦＲ２シグナル中和活性を有していた（実施例参照）。

ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１８／Ｌ１は実施例８おいて得られたヒト化抗体である。当該抗体の軽鎖の塩基配列は配列番号７２（図８０）のヌクレオチド番号６１乃至７０５を、アミノ酸配列は配列番号７３（図８１）のアミノ酸番号２１乃至２３５を、重鎖の塩基配列は配列番号１０８（図１１６）のヌクレオチド番号５８乃至１４０１を、アミノ酸配列は配列番号１０９（図１１７）のアミノ酸番号２０乃至４６７を、それぞれ含んでいる。該抗体はＴｍ値が高く立体構造安定性に優れ、ＦＧＦＲ２に対する高い結合活性、ならびにＦＧＦＲ２リガンド依存性のＦＧＦＲ２シグナル中和活性、ＡＤＣＣ活性、ｉｎ　ｖｉｖｏ抗腫瘍活性を有していた（実施例参照）。

ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１９／Ｌ１は実施例９において得られた、糖鎖修飾が調節されたヒト化抗体である。当該抗体の軽鎖の塩基配列は配列番号７２（図８０）のヌクレオチド番号６１乃至７０５を、アミノ酸配列は配列番号７３（図８１）にのアミノ酸番号２１乃至２３５を、重鎖の塩基配列は配列番号９６（図１０４）のヌクレオチド番号５８乃至１４０１を、アミノ酸配列は配列番号９７（図１０５）のアミノ酸番号２０乃至４６７を、それぞれ含んでいる。該抗体はＴｍ値が高く立体構造安定性に優れ、ＦＧＦＲ２に対する高い結合活性、優れた熱安定性、ＦＧＦＲ２リガンド依存性のＦＧＦＲ２シグナル中和活性、ＡＤＣＣ活性、ＡＣＤＰ活性、ＦＧＦＲ２リガンドとＦＧＦＲ２の結合を阻害する活性、ならびにｉｎ　ｖｉｖｏ抗腫瘍活性を有しており、過酷な条件に曝しても高い抗原結合活性を維持した（実施例参照）。

また、これらのヒト化ＦＲ２－１４抗体をマウスに投与したところ、体重減少、その他の顕著な毒性所見は認められなかった。ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１２／Ｌ１抗体およびｈＦＲ２－１４＿Ｈ１９／Ｌ１抗体をカニクイザルに約１５０ｍｇ／ｋｇ単回投与して１４日後に観察したところ、顕著な臨床所見、血液学的変化、体重減少、その他の顕著な毒性所見は認められなかった。このように本発明のヒト化抗体は疾患の治療または予防のための医薬組成物として優れた安全性を具備している。

本発明のより好適なヒト化であるｈＦＲ２－１４＿Ｈ１／Ｌ１乃至ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１９／Ｌ１の中で、さらに好適な抗体はｈＦＲ２－１４＿Ｈ５／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１１／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ８／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１２／Ｌ１およびｈＦＲ２－１４＿Ｈ１９／Ｌ１であり、さらに一層好適な抗体はｈＦＲ２－１４＿Ｈ１２／Ｌ１およびｈＦＲ２－１４＿Ｈ１９／Ｌ１である。

本発明のラットＦＲ２－１０、ＦＲ－１０ＦＲおよびＦＲ２－１４抗体、キメラｃＦＲ２－１０、ｃＦＲ２－１３および、ｃＦＲ２－１４抗体、ならびに、ヒト化ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１／Ｌ１乃至ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１９／Ｌ１抗体のいずれか一つに記載の抗体の重鎖または軽鎖のアミノ酸配列と８０％以上、８２％以上、８４％以上、８６％以上、８８％以上、９０％以上、９２％以上、９４％以上、９６％以上、９８％以上又は９９％以上の同一なアミノ酸配列を含む重鎖または軽鎖を含み、且つＦＧＦＲ２に結合する抗体又はその機能断片も、本発明に包含される。かかる配列同一性は、好適には９４％以上、より好適には９６％以上、より一層好適には９８％以上、最適には９９％以上である。また、それらの抗体は、好適には（３－３）乃至（３－６）記載の活性を一つ又はそれ以上有している。

二種類のアミノ酸配列間の同一性あるいは相同性は、Ｂｌａｓｔ ａｌｇｏｒｉｔｈｍ ｖｅｒｓｉｏｎ ２．２．２（Ａｌｔｓｃｈｕｌ，Ｓｔｅｐｈｅｎ Ｆ．，Ｔｈｏｍａｓ Ｌ．Ｍａｄｄｅｎ，Ａｌｅｊａｎｄｒｏ Ａ．Ｓｃｈａｆｆｅｒ，Ｊｉｎｇｈｕｉ Ｚｈａｎｇ，Ｚｈｅｎｇ Ｚｈａｎｇ，Ｗｅｂｂ Ｍｉｌｌｅｒ，ａｎｄ Ｄａｖｉｄ Ｊ．Ｌｉｐｍａｎ（１９９７），「Ｇａｐｐｅｄ ＢＬＡＳＴ ａｎｄ ＰＳＩ－ＢＬＡＳＴ：ａ ｎｅｗ ｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ ｏｆ ｐｒｏｔｅｉｎ ｄａｔａｂａｓｅ ｓｅａｒｃｈ ｐｒｏｇｒａｍｓ」，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２５：３３８９－３４０２）のデフォルトパラメーターを使用することによって決定することができる。Ｂｌａｓｔ ａｌｇｏｒｉｔｈｍは、例えば、インターネットで

http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/にアクセスすることによっても使用することができる。

本発明のラットＦＲ２－１０、ＦＲ－１０ＦＲおよびＦＲ２－１４抗体、キメラｃＦＲ２－１０、ｃＦＲ２－１３および、ｃＦＲ２－１４抗体、ならびに、ヒト化ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１／Ｌ１乃至ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１９／Ｌ１抗体のいずれか一つに記載の抗体の重鎖または軽鎖のアミノ酸配列において１乃至５０個、１乃至４５個、１乃至４０個、１乃至３５個、１乃至３０個、１乃至２５個、１乃至２０個、１乃至１５個、１乃至１０個、１乃至８個、１乃至６個、１乃至５個、１乃至４個、１乃至３個、１若しくは２個、または１個のアミノ酸が置換、欠失、付加または挿入してなるアミノ酸配列を含む重鎖または軽鎖を含み、且つＦＧＦＲ２に結合する抗体又はその機能断片も、本発明に包含される。かかるアミノ酸変異は好適には置換であり、変異されるアミノ酸の個数は好適には１乃至５個、より好適には１乃至４個、より一層好適には１乃至３個、さらにより一層好適には１乃至２個、最適には１個である。また、それらの抗体は、好適には（３－３）乃至（３－６）記載の活性を一つ又はそれ以上有している。

本発明のラットＦＲ２－１０、ＦＲ－１０ＦＲおよびＦＲ２－１４抗体、キメラｃＦＲ２－１０、ｃＦＲ２－１３および、ｃＦＲ２－１４抗体、ならびに、ヒト化ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１／Ｌ１乃至ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１９／Ｌ１抗体のいずれか一つに記載の抗体の重鎖または軽鎖のアミノ酸配列をコードする塩基配列に相補的な塩基配列を有するヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチドの有する塩基配列によりコードされるアミノ酸配列を含む重鎖または軽鎖を含み、且つＦＧＦＲ２に結合する抗体又はその機能断片も、本発明に包含される。それらの抗体は、好適には（３－３）乃至（３－６）記載の活性を一つ又はそれ以上有している。

本発明は別の一つの態様において、ヒト抗体又はその機能断片を提供する。本発明のヒト抗体は、ＦＧＦＲ２に結合するヒト由来の抗体であれば特に限定

されるものではないが、抗腫瘍活性を有し、好適にはイン・ビボ（ｉｎ　ｖｉｖｏ）で抗腫瘍活性を有する。また、かかるヒト化抗体又はその機能断片は、好適にはＦＧＦＲ２ＩＩＩｂ蛋白質及び／又はＦＧＦＲ２ＩＩＩｃ蛋白質に特異的に結合し、より好適にはそれらの蛋白質の有するＩｇ様ドメインに結合する。さらに、かかるヒト抗体又はその機能断片は、好適にはＡＤＣＣ活性及び／又はＡＤＣＰ活性を有する。また、本発明のヒト抗体又はその機能断片はＦＧＦＲ２に対する中和活性を有し、好適にはＦＧＦＲ２ＩＩＩｂ及び／又はＦＧＦＲ２ＩＩＩｃに対する中和活性を有し、より好適にはＦＧＦＲ２ＩＩＩｂ及びＦＧＦＲ２ＩＩＩｃに対する中和活性を有する。さらに、本発明のヒト抗体又はその機能断片は、好適にはＦＧＦＲ２とそのリガンドの結合を阻害する。

（３－１１）エピトープに結合する抗体

本発明の提供する抗体と「同一の部位に結合する抗体」も本発明の抗体に含まれる。ある抗体と「同一の部位に結合する抗体」とは、該抗体が認識する抗原分子上の部位に結合する他の抗体を意味する。第一抗体が結合する抗原分子上の部分ペプチド又は部分立体構造に第二抗体が結合すれば、第一抗体と第二抗体は同一の部位に結合すると判定することができる。また、第一抗体の抗原に対する結合に対して第二抗体が競合する、すなわち、第二抗体が第一抗体と抗原の結合を妨げることを確認することによって、具体的な結合部位のペプチド配列又は立体構造が決定されていなくても、第一抗体と第二抗体が同一の部位に結合すると判定することができる。さらに、第一抗体と第二抗体が同一の部位に結合し、且つ第一抗体が抗腫瘍活性など本発明の抗体の一つの態様に特徴的な効果を有する場合、第二抗体も同様の活性を有する蓋然性は極めて高い。従って、第一の抗ＦＧＦＲ２抗体の結合する部位に第二の抗ＦＧＦＲ２抗体が結合すれば、第一抗体と第二抗体がＦＧＦＲ２蛋白質上の同一の部位に結合すると判定することができる。また、第一の抗ＦＧＦＲ２抗体のＦＧＦＲ２蛋白質への結合に対して第二の抗ＦＧＦＲ２抗体が競合することを確認できれば、

第一抗体と第二抗体がＦＧＦＲ２蛋白質上の同一の部位に結合する抗体と判定することができる。

本発明のモノクローナル抗体ＦＲ２－１０、ＦＲ２－１３又はＦＲ２－１４が認識するＦＧＦＲ２蛋白質上の部位に結合する抗体も本発明に含まれる。

抗体の結合部位は、免疫アッセイ法など当業者に周知の方法により決定することができる。例えば、抗原のアミノ酸配列をＣ末またはＮ末から適宜削ってなる一連のペプチドを作製し、それらに対する抗体の反応性を検討し、大まかな認識部位を決定した後に、さらに短いペプチドを合成してそれらのペプチドへの抗体の反応性を検討することにより、結合部位を決定することができる。抗原断片ペプチドは、遺伝子組換、ペプチド合成等の技術を用いて調製することができる。

抗体が抗原の部分高次構造に結合又は認識している場合、かかる抗体の結合部位は、Ｘ線構造解析を用いて、当該抗体に隣接する抗原上のアミノ酸残基を特定することにより決定することができる。例えば、抗体又はその断片および抗原又はその断片を結合させて結晶化し、構造解析を行うことにより、抗体と相互作用距離を有する抗原上のアミノ酸残基を特定することができる。相互作用距離は８Å以下であり、好適には６Å以下であり、より好適には４Å以下である。そのような抗体との相互作用距離を有するアミノ酸残基は１つまたはそれ以上で抗体の抗原結合部位（エピトープ）を構成し得る。かかるアミノ酸残基が２つ以上の場合、各アミノ酸は一次配列上で互いに隣接していなくてもよい。

ラット、キメラ又はヒト化ＦＲ２－１４抗体のＦａｂフラグメントとヒトＦＧＦＲ２ＩＩＩｂのＤ２断片（配列番号７０：図７８のアミノ酸番号１２８乃至２４９からなるペプチド）を結合させ、１．１乃至２．１Ｍ硫酸アンモニウム－０．１５ＭＴｒｉｓ塩酸緩衝液（ｐＨ６．５乃至８．５）の条件下で結晶化させると、正方晶系で空間群がＰ４１２１２、結晶の単位格子がａ＝ｂ＝６０．５７Å、ｃ＝３３１．２Åの結晶が得られる。その三次元構造座標を用い

て分子置換法を行い、位相を決定することができる（実施例１５参照）。

ラット、キメラ又はヒト化ＦＲ２－１４抗体は、ヒトＦＧＦＲ２ＩＩＩｂ上の部分高次構造を認識する。かかる抗体のエピトープは、ヒトＦＧＦＲ２ＩＩＩｂのアミノ酸配列（配列番号７０：図７８）又はヒトＦＧＦＲ２ＩＩＩｃのアミノ酸配列（配列番号７１：図７９）中の、１５５番目のチロシン（Ｔｙｒ）、１５７番目のスレオニン（Ｔｈｒ）、１７６番目のリジン（Ｌｙｓ）、１８１番目のアラニン（Ａｌａ）、１８２番目のグリシン（Ｇｌｙ）、１８３番目のグリシン（Ｇｌｙ）、１８４番目のアスパラギン（Ａｓｎ）、１８５番目のプロリン（Ｐｒｏ）、１８６番目のメチオニン（Ｍｅｔ）、１８８番目のスレオニン（Ｔｈｒ）、２００番目の（グルタミン）、２０１番目のグルタミン酸（Ｇｌｕ）、２０５番目のグリシン（Ｇｌｙ）、２０６番目のグリシン（Ｇｌｙ）、２０８番目のリジン（Ｌｙｓ）、２０９番目のバリン（Ｖａｌ）、２１０番目のアルギニン（Ａｒｇ）、２１１番目のアスパラギン（Ａｓｎ）、２１２番目のグルタミン（Ｇｌｎ）、２１３番目のヒスチジン（Ｈｉｓ）、２１４番目のトリプトファン（Ｔｒｐ）、および、２１７番目のイソロイシン（Ｉｌｅ）の各残基から構成される。言い換えると、かかる抗体はヒトＦＧＦＲＩＩＩｂのアミノ酸配列（配列番号７０：図７８）又はヒトＦＧＦＲ２ＩＩＩｃのアミノ酸配列（配列番号７１：図７９）中の、１５５番目のチロシン（Ｔｙｒ）、１５７番目のスレオニン（Ｔｈｒ）、１７６番目のリジン（Ｌｙｓ）、１８１番目のアラニン（Ａｌａ）、１８２番目のグリシン（Ｇｌｙ）、１８３番目のグリシン（Ｇｌｙ）、１８４番目のアスパラギン（Ａｓｎ）、１８５番目のプロリン（Ｐｒｏ）、１８６番目のメチオニン（Ｍｅｔ）、１８８番目のスレオニン（Ｔｈｒ）、２００番目の（グルタミン）、２０１番目のグルタミン酸（Ｇｌｕ）、２０５番目のグリシン（Ｇｌｙ）、２０６番目のグリシン（Ｇｌｙ）、２０８番目のリジン（Ｌｙｓ）、２０９番目のバリン（Ｖａｌ）、２１０番目のアルギニン（Ａｒｇ）、２１１番目のアスパラギン（Ａｓｎ）、２１２番目のグルタミン（Ｇｌｎ）、２１３番目のヒスチジン（Ｈｉｓ）、２１４番目のトリプトファン（Ｔｒｐ）、および、２１７番目の

イソロイシン（Ｉｌｅ）と相互作用距離を有する。この抗体のエピトープ部位は、ヒトＦＧＦＲ２ＩＩＩｃのアミノ酸配列中にも存在する。かかるエピトープに結合するか、または、かかるアミノ酸残基と相互作用距離を有する抗体、その機能断片またはその修飾体も、本発明の抗体、その機能断片またはその修飾体に包含される。

（３－１２）抗体の修飾体

本発明は、抗体又はその機能断片の修飾体を提供する。本発明の抗体又はその機能断片の修飾体とは、本発明の抗体又はその機能断片に化学的又は生物学的な修飾が施されてなるものを意味する。化学的な修飾体には、アミノ酸骨格への化学部分の結合、Ｎ－結合またはＯ－結合炭水化物鎖の化学修飾体等が含まれる。生物学的な修飾体には、翻訳後修飾（例えば、Ｎ－結合またはＯ－結合への糖鎖付加、Ｎ末またはＣ末のプロセッシング、脱アミド化、アスパラギン酸の異性化、メチオニンの酸化）されたもの、原核生物宿主細胞を用いて発現させることによりＮ末にメチオニン残基が付加したもの等が含まれる。また、本発明の抗体または抗原の検出または単離を可能にするために標識されたもの、例えば、酵素標識体、蛍光標識体、アフィニティ標識体もかかる修飾物の意味に含まれる。このような本発明の抗体又はその機能断片の修飾物は、元の本発明の抗体又はその機能断片の安定性および血中滞留性の改善、抗原性の低減、かかる抗体又は抗原の検出又は単離等に有用である。

化学的修飾体に含まれる化学部分としては、ポリエチレングリコール、エチレングリコール／プロピレングリコールコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール等の水溶性ポリマーを例示することができる。

生物学的な修飾体としては、酵素処理や細胞処理等により修飾が施されたもの、遺伝子組換えによりタグ等他のペプチドが付加された融合体、ならびに内因性又は外来性の糖鎖修飾酵素を発現する細胞を宿主として調製されたもの等

をあげることができる。

本発明の抗体又はその機能断片に結合している糖鎖修飾を調節すること（グリコシル化、脱フコース化等）によって、抗体依存性細胞傷害活性を増強することが可能である。抗体の糖鎖修飾の調節技術としては、例えば、WO９９／５４３４２、WO００／６１７３９、WO０２／３１１４０等に記載された方法が知られているが、これらに限定されるものではない。本発明の抗体の修飾体には当該糖鎖修飾が調節された抗体も含まれる。

かかる修飾は、抗体またはその機能断片における任意の位置に、または所望の位置において施されてもよく、１つ又は２つ以上の位置に同一又は２種以上の異なる修飾がなされてもよい。

本発明において「抗体断片の修飾体」は「抗体の修飾体の断片」をもその意味に含むものである。

本発明においては抗体の修飾体、その機能断片の修飾体を、単に「抗体」、「抗体の機能断片」と呼ぶことがある。

ｈＦＲ２－１４_Ｈ１９／Ｌ１は実施例９において得られた、糖鎖修飾が調節されたヒト化抗体である。当該抗体の軽鎖の塩基配列は配列番号７２（図８０）のヌクレオチド番号６１乃至７０５を、アミノ酸配列は配列番号７３（図８１）のアミノ酸番号２１乃至２３５を、重鎖の塩基配列は配列番号９６（図１０４）のヌクレオチド番号５８乃至１４０１を、アミノ酸配列は配列番号９７（図１０５）のアミノ酸番号２０乃至４６７を、それぞれ含んでいる。かかるヒト化抗体も本発明の抗体、本発明の抗体の修飾体に包含される。

４．抗体の製造方法

（４－１）ハイブリドーマを用いる方法

本発明の抗ＦＧＦＲ２抗体は、コーラーとミルスタインの方法（Ｋｏｈｌｅｒ ａｎｄ Ｍｉｌｓｔｅｉｎ, Ｎａｔｕｒｅ （１９７５）２５６, ｐ．４９５－４９７、Ｋｅｎｎｅｔ, Ｒ. ｅｄ., Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂ

ｏｄｙ，ｐ．３６５－３６７，Ｐｒｅｎｕｍ　Ｐｒｅｓｓ，Ｎ．Ｙ．（１９８０））に従って、ＦＧＦＲ２蛋白質又はその可溶型フォームで免疫した動物の脾臓より抗ＦＧＦＲ２抗体の産生細胞を単離し、該細胞とミエローマ細胞とを融合させることによりハイブリドーマを樹立し、かかるハイブリドーマの培養物からモノクローナル抗体を取得することができる。

（４－１－１）抗原の調製

抗ＦＧＦＲ２抗体を作製するための抗原は、本発明の他の部分に記載された天然型または組換え型のＦＧＦＲ２蛋白質の調製法等に従って、取得することができる。そのようにして調製し得る抗原としては、ＦＧＦＲ２蛋白質若しくはその少なくとも６個の連続した部分アミノ酸配列を含むことからなるＦＧＦＲ２蛋白質断片、またはそれらに任意のアミノ酸配列や担体が付加された誘導体等（以下、まとめて「ＦＧＦＲ２抗原」とよぶ）を挙げることができる。

組換え型ＦＧＦＲ２抗原は、ＦＧＦＲ２抗原の有するアミノ酸配列をコードする塩基配列が含まれる遺伝子を宿主細胞に導入し、該細胞の培養物から該抗原を回収することにより、調製することができる。かかる組換型抗原は、免疫グロブリンのＦｃ領域など他の蛋白質との融合蛋白質であってもよい。また、ＦＧＦＲ２抗原のアミノ酸配列をコードする塩基配列が含まれる遺伝子をイン・ビトロ（ｉｎ　ｖｉｔｒｏ）翻訳系により無細胞系において得られるＦＧＦＲ２抗原も組換え型ＦＧＦＲ２抗原に含まれる。非組換型ＦＧＦＲ２抗原は、（２－２）の（ｉｖ）に記載された、ＦＧＦＲを発現している正常組織、癌組織、癌細胞、癌細胞の培養物等から精製、単離することができる。

（４－１－２）抗ＦＧＦＲ２モノクローナル抗体の製造

モノクローナル抗体の製造は、通常、下記のような工程を経る。

（ａ）抗原を調製する工程、

（ｂ）抗体産生細胞を調製する工程、

（ｃ）骨髄腫細胞（以下、「ミエローマ」という）を調製する工程、

（ｄ）抗体産生細胞とミエローマとを融合させる工程、

（ｅ）目的とする抗体を産生するハイブリドーマ群を選別する工程、及び

（ｆ）単一細胞クローンを得る工程（クローニング）。

必要に応じてさらに、（ｇ）ハイブリドーマの培養工程、ハイブリドーマを移植した動物の飼育工程等、（ｈ）モノクローナル抗体の生物活性の測定工程・判定工程等が加わる。

以下、モノクローナル抗体の作製法を上記工程に沿って詳述するが、該抗体の作製法はこれに制限されず、例えば脾細胞以外の抗体産生細胞及びミエローマを使用することもできる。

（ａ）抗原の精製

前記（２－３）記載のＦＧＦＲ２蛋白質の調製法に準ずる。

（ｂ）抗体産生細胞を調製する工程

工程（ａ）で得られた抗原と、フロインドの完全又は不完全アジュバント、又はカリミョウバンのような助剤とを混合し、免疫原として実験動物に免疫する。実験動物は公知のハイブリドーマ作製法に用いられる動物を支障なく使用することができる。具体的には、たとえばマウス、ラット、ヤギ、ヒツジ、ウシ、ウマ等を使用することができる。ただし、摘出した抗体産生細胞と融合させるミエローマ細胞の入手容易性等の観点から、マウス又はラットを被免疫動物とするのが好ましい。

また、実際に使用するマウス及びラットの系統は特に制限はなく、マウスの場合には、例えば、Ａ、ＡＫＲ、ＢＡＬＢ／ｃ、ＢＡＬＢ／ｃＡｎＮＣｒｊ、ＢＤＰ、ＢＡ、ＣＥ、Ｃ３Ｈ、５７ＢＬ、Ｃ５７ＢＬ、Ｃ５７Ｌ、ＤＢＡ、ＦＬ、ＨＴＨ、ＨＴ１、ＬＰ、ＮＺＢ、ＮＺＷ、ＲＦ、Ｒ　ＩＩＩ、ＳＪＬ、ＳＷＲ、ＷＢ、１２９等が、ラットの場合には、例えば、Ｗｉｓｔａｒ、Ｌｏｗ、Ｌｅｗｉｓ、Ｓｐｒａｑｕｅ、Ｄａｗｅｌｅｙ、ＡＣＩ、ＢＮ、Ｆｉｓｃｈｅｒ等を用いることができる。

これらのマウス及びラットは例えば日本クレア、日本チャールスリバー、等実験動物飼育販売業者より入手することができる。

このうち、後述のミエローマ細胞との融合適合性を勘案すれば、マウスではＢＡＬＢ／ｃ系統が、ラットではＷｉｓｔａｒ及びＬｏｗ系統が被免疫動物として特に好ましい。

また、抗原のヒトとマウスでの相同性を考慮し、自己抗体を除去する生体機構を低下させたマウス、すなわち自己免疫疾患マウスを用いることも好ましい。

なお、これらマウス又はラットの免疫時の週齢は、好ましくは５乃至１２週齢、さらに好ましくは６乃至８週齢である。

ＦＧＦＲ２蛋白質で動物を免疫するには、例えば、Ｗｅｉｒ，　Ｄ．Ｍ．，Ｈａｎｄｂｏｏｋ　ｏｆ　Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ　Ｖｏｌ．Ｉ．ＩＩ．ＩＩＩ．，Ｂｌａｃｋｗｅｌｌ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ　Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎｓ，Ｏｘｆｏｒｄ（１９８７）、Ｋａｂａｔ，Ｅ．Ａ．ａｎｄ　Ｍａｙｅｒ，Ｍ．Ｍ．，Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ　Ｉｍｍｕｎｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，Ｃｈａｒｌｅｓ　Ｃ　Ｔｈｏｍａｓ　Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒ　Ｓｐｉｇｆｉｅｌｄ，Ｉｌｌｉｎｏｉｓ（１９６４）　等の方法を用いることができる。

抗体価の測定法としては、例えば、ＲＩＡ法、ＥＬＩＳＡ法等の免疫アッセイを挙げることができるが、それらの方法に限定されるものではない。

免疫された動物から分離された脾臓細胞又はリンパ球に由来する抗体産生細胞は、例えば、Ｋｏｈｌｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ（１９７５）２５６，ｐ．４９５，；Ｋｏｈｌｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｅｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｎｏｌ．（１９７７）６，ｐ．５１１，；Ｍｉｌｓｔｅｉｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ（１９７７），２６６，ｐ．５５０，；Ｗａｌｓｈ，Ｎａｔｕｒｅ，（１９７７）２６６，ｐ．４９５，）等の公知の方法に従って調製することができる。

脾臓細胞の場合には、脾臓を細切して細胞をステンレスメッシュで濾過した後、イーグル最小必須培地（ＭＥＭ）等に浮遊させて抗体産生細胞を分離する一般的方法を採用することができる。

（ｃ）ミエローマを調製する工程

細胞融合に用いるミエローマ細胞には特段の限定はなく、公知の細胞株から適宜選択して用いることができるが、融合細胞からハイブリドーマを選択する際の利便性を考慮して、その選択手続が確立しているＨＧＰＲＴ（Ｈｉｐｏｘａｎｔｈｉｎｅ－ｇｕａｎｉｎｅ ｐｈｏｓｐｈｏｒｉｂｏｓｙｌ ｔｒａｎｓｆｅｒａｓｅ）欠損株、すなわちマウス由来のＸ６３－Ａｇ８（Ｘ６３）、ＮＳ１－ＡＮＳ／１（ＮＳ１）、Ｐ３Ｘ６３－Ａｇ８．Ｕ１（Ｐ３Ｕ１）、Ｘ６３－Ａｇ８．６５３（Ｘ６３．６５３）、ＳＰ２／０－Ａｇ１４（ＳＰ２／０）、ＭＰＣ１１－４５．６ＴＧ１．７（４５．６ＴＧ）、ＦＯ、Ｓ１４９／５ＸＸＯ、ＢＵ．１等、ラット由来の２１０．ＲＳＹ３．Ａｇ．１．２．３（Ｙ３）等、ヒト由来のＵ２６６ＡＲ（ＳＫＯ－００７）、ＧＭ１５００・ＧＴＧ－Ａ１２（ＧＭ１５００）、ＵＣ７２９－６、ＬＩＣＲ－ＬＯＷ－ＨＭｙ２（ＨＭｙ２）、８２２６ＡＲ／ＮＩＰ４－１（ＮＰ４１）等を用いるのが好ましい。これらのＨＧＰＲＴ欠損株は例えば、Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（ＡＴＣＣ）等から入手することができる。

これらの細胞株は、適当な培地、例えば８－アザグアニン培地［ＲＰＭＩ－１６４０培地にグルタミン、２－メルカプトエタノール、ゲンタマイシン、及びウシ胎児血清（以下「ＦＢＳ」という）を加えた培地に８－アザグアニンを加えた培地］、イスコフ改変ダルベッコ培地（Ｉｓｃｏｖｅ’ｓ Ｍｏｄｉｆｉｅｄ Ｄｕｌｂｅｃｃｏ’ｓ Ｍｅｄｉｕｍ；以下「ＩＭＤＭ」という）、又はダルベッコ改変イーグル培地（Ｄｕｌｂｅｃｃｏ’ｓ Ｍｏｄｉｆｉｅｄ Ｅａｇｌｅ Ｍｅｄｉｕｍ；以下「ＤＭＥＭ」という）で継代培養するが、細胞融合の３乃至４日前に正常培地［例えば、１０％ ＦＢＳを含むＡＳＦ１０４培地（味の素（株）社製）］で継代培養し、融合当日に2×10^7以上の細胞数を確保しておく。

（ｄ）抗体産生細胞とミエローマ細胞との融合させる工程

抗体産生細胞とミエローマ細胞との融合は、公知の方法（Ｗｅｉｒ，Ｄ．Ｍ．，Ｈａｎｄｂｏｏｋｏｆ Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ

Vol. I. II. III., Blackwell Scientific Publications, Oxford (1987)、Kabat, E. A. and Mayer, M. M., Experimental Immunochemistry, Charles C Thomas Publisher Spigfield, Illinois (1964) 等) に従い、細胞の生存率を極度に低下させない程度の条件下で実施することができる。例えば、ポリエチレングリコール等の高濃度ポリマー溶液中で抗体産生細胞とミエローマ細胞とを混合する化学的方法、電気的刺激を利用する物理的方法等を用いることができる。

(e) 目的とする抗体を産生するハイブロドーマ群を選別する工程

細胞融合により得られるハイブリドーマの選択方法は特に制限はないが、通常HAT (ヒポキサンチン・アミノプテリン・チミジン) 選択法 (Kohler et al., Nature (1975) 256, p. 495; Milstein et al., Nature (1977) 266, p. 550) が用いられる。この方法は、アミノプテリンで生存し得ないHGPRT欠損株のミエローマ細胞を用いてハイブリドーマを得る場合に有効である。すなわち、未融合細胞及びハイブリドーマをHAT培地で培養することにより、アミノプテリンに対する耐性を持ち合わせたハイブリドーマのみを選択的に残存させ、かつ増殖させることができる。

(f) 単一細胞クローンを得る工程 (クローニング)

ハイブリドーマのクローニング法としては、例えば、メチルセルロース法、軟アガロース法、限界希釈法等の公知の方法を用いることができるが (例えば、Barbara, B. M. and Stanley, M. S.: Selected Methods in Cellular Immunology, W. H. Freeman and Company, San Francisco (1980) 参照)、好適には限界希釈法である。

(g) ハイブリドーマの培養工程、ハイブリドーマを移植した動物の飼育工程

選択されたハイブリドーマを培養することにより、モノクローナル抗体を産生することができるが、好適には所望のハイブリドーマをクローニングしてから抗体の産生に供する。

かかるハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体は、該ハイブリドーマの培養物から回収することができる。また、該モノクローナル抗体遺伝子が導入された細胞の培養物から組換え抗体として回収することもできる。さらに、同系統のマウス（例えば、上記のＢＡＬＢ／ｃＡｎＮＣｒｊ）、あるいはＮｕ／Ｎｕマウスの腹腔内にハイブリドーマを注射し、該ハイブリドーマを増殖させることにより、その腹水から回収することもできる。

（ｈ）モノクローナル抗体の生物活性の測定工程・判定工程

各種生物試験を目的に応じて選択し、適用することができる。

（４－２）細胞免疫法

天然型のＦＧＦＲ２蛋白質を発現する細胞、組換え型ＦＧＦＲ２蛋白質またはその断片を発現する細胞等を免疫原として使用することにより、前記のハイブリドーマ法により抗ＦＧＦＲ２抗体を調製することができる。

天然型のＦＧＦＲ２蛋白質を発現する細胞としては、ＦＧＦＲ２を発現している細胞、ＦＧＦＲ２を発現している組織又は癌に由来する細胞株、ＦＧＦＲ２ＩＩＩｂからＦＧＦＲ２ＩＩＩｃへのスイッチングが見られる癌組織に由来する細胞株等を例示することができる。ＦＧＦＲ２を高発現している癌には、胃癌、乳癌など遺伝子増幅が見られるもの、および、膵臓癌、卵巣癌など過剰発現がみられるものがある。ＦＧＦＲ２ＩＩＩｂを高発現している培養細胞株としては、胃癌細胞株、乳癌細胞株等を例示することができる。ＦＧＦＲ２ＩＩＩｃを高発現している培養細胞株としては、大腸（盲腸）細胞癌を例示することができる。ＦＧＦＲ２ＩＩＩｂからＦＧＦＲ２ＩＩＩｃへのスイッチングが見られる癌組織としては、前立腺癌、膀胱癌、乳癌等を例示することができる。ＦＧＦＲ２ＩＩＩｃを発現している癌組織としては、子宮頚癌、非小細胞

肺癌等を例示することができ、このうち子宮頚癌では高発現している。また、ＦＧＦＲ２を高発現している正常組織としては、脳、大腸、甲状腺、子宮、胆嚢、皮膚等を例示することができる。

ＦＧＦＲ２を発現している細胞は、1×10^{5}乃至1×10^{9}個、好適には1×10^{6}乃至1×10^{8}個、より好適には０．５乃至2×10^{7}個、より一層好適には1×10^{7}個を１回の免疫に用いるが、ＦＧＦＲ２蛋白質の発現量に応じて免疫に供する細胞数を変えることができる。かかる免疫源は、一般的には腹腔内に投与するが、皮内等に投与することもできる。ハイブリドーマの作製手法としては（４－１－２）記載の方法を適用することができる。

（４－３）遺伝子組換え

本発明の抗体は、その重鎖アミノ酸配列をコードする塩基配列が含まれるヌクレオチド（重鎖ヌクレオチド）及びその軽鎖アミノ酸配列をコードする塩基配列が含まれるヌクレオチド（軽鎖ヌクレオチド）、又は、かかる重鎖ヌクレオチドが挿入されたベクター及び軽鎖ヌクレオチドが挿入されたベクターを宿主細胞に導入し、該細胞を培養した後その培養物からかかる抗体を回収することにより調製することができる。一つのベクターに重鎖ヌクレオチド及び軽鎖ヌクレオチドが挿入されていてもよい。

宿主細胞としては、原核細胞又は真核細胞を用いることができる。真核細胞を宿主として使用する場合、動物細胞、植物細胞、真核微生物を用いることができる。

動物細胞としては、例えば、哺乳類由来の細胞、すなわち、サル由来のＣＯＳ細胞（Ｇｌｕｚｍａｎ，　Ｙ．　Ｃｅｌｌ（１９８１）２３，ｐ．１７５－１８２、ＡＴＣＣ　ＣＲＬ－１６５０）、マウス線維芽細胞ＮＩＨ３Ｔ３（ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－１６５８）、マウスＮＳ０細胞株（ＥＣＡＣＣ）、チャイニーズ・ハムスター卵巣細胞（ＣＨＯ細胞、ＡＴＣＣ　ＣＣＬ－６１）、そのジヒドロ葉酸還元酵素欠損株（$CHO^{dhfr^{-}}$：Ｕｒｌａｕｂ，Ｇ．ａｎｄ　Ｃｈａ

sin, L. A. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (1980) 77, p. 4126－4220)、CHOK1SV (Lonza Biologics)、ニワトリ等鳥類由来の細胞、昆虫由来の細胞等を挙げることができる。

また、抗体等の蛋白質の糖鎖修飾を調節するよう改変された細胞も宿主として用いることができる。例えば、抗体のＦｃ領域に結合するＮ－グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミンにフコースが結合している糖鎖を減らすかまたは無くすよう改変されたＣＨＯ細胞を用いて抗体等を発現させれば、脱フコース化した抗体（抗体の修飾体とも呼ぶ）を調製することが可能である（ＷＯ００／６１７３９号、ＷＯ０２／３１１４０号等）。

真核微生物としては、例えば、酵母等をあげることができる。

原核細胞としては、例えば、大腸菌、枯草菌等をあげることができる。

本発明の抗体（各種動物由来のモノクローナル抗体、ラット抗体、マウス抗体、キメラ化抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体等）を分泌させるためのシグナルペプチドとしては、当該抗体と同種、同タイプ及び同サブタイプの抗体の分泌シグナル、ならびに、当該抗体自体の分泌シグナルに限定されるものではなく、他のタイプもしくはサブタイプの抗体の分泌シグナル、または、他の真核生物種もしくは原核生物由来の蛋白質の分泌シグナルであれば、任意のものを選択して利用することができる。

（４－４）ヒト化抗体のデザイン法および調製法

ヒト化抗体としては、非ヒト動物抗体のＣＤＲのみがヒト由来の抗体に組込まれ抗体（Ｎａｔｕｒｅ（１９８６）３２１，ｐ．５２２－５２５参照)、ＣＤＲ移植法によりＣＤＲの配列に加え一部のフレームワークのアミノ酸残基もヒト抗体に移植した抗体（ＷＯ９０／０７８６１号、ＵＳ６９７２３２３号公報参照)、それらのいずれかにおける非ヒト動物抗体の１つまたは２つ以上のアミ

ノ酸がヒト型のアミノ酸で置換されてなる抗体等を挙げることができるが、それらに限定されるものではない。

（４－５）ヒト抗体の調製法

本発明の抗体としては、さらに、ヒト抗体を挙げることができる。抗ＦＧＦＲ２ヒト抗体とは、ヒト由来の抗体のアミノ酸配列からなる抗ＦＧＦＲ２抗体を意味する。抗ＦＧＦＲ２ヒト抗体は、ヒト抗体の重鎖と軽鎖の遺伝子を含むヒトゲノムＤＮＡ断片を有するヒト抗体産生マウスを用いた方法（Ｔｏｍｉｚｕｋａ，Ｋ．ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　Ｇｅｎｅｔｉｃｓ（１９９７）１６，ｐ．１３３－１４３，；　Ｋｕｒｏｉｗａ，Ｙ．ｅｔ．ａｌ．，Ｎｕｃ．Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．（１９９８）２６，ｐ．３４４７－３４４８；Ｙｏｓｈｉｄａ，Ｈ．ｅｔ．ａｌ．，Ａｎｉｍａｌ　Ｃｅｌｌ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ：Ｂａｓｉｃ　ａｎｄ　Ａｐｐｌｉｅｄ　Ａｓｐｅｃｔｓ　ｖｏｌ．１０，ｐ．６９－７３（Ｋｉｔａｇａｗａ，　Ｙ．，Ｍａｔｕｄａ，Ｔ．ａｎｄ　Ｉｉｊｉｍａ，Ｓ．ｅｄｓ．），Ｋｌｕｗｅｒ　Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ，１９９９．；Ｔｏｍｉｚｕｋａ，Ｋ．ｅｔ．ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ（２０００）９７，ｐ．７２２－７２７等を参照。）によって取得することができる。

ヒト抗体産生動物は、具体的には、非ヒト哺乳動物の内在性免疫グロブリン重鎖及び軽鎖の遺伝子座が破壊され、代わりに酵母人工染色体（Ｙｅａｓｔ　ａｒｔｉｆｉｃｉａｌ　ｃｈｒｏｍｏｓｏｍｅ，ＹＡＣ）ベクターなどを介してヒト免疫グロブリン重鎖及び軽鎖の遺伝子座が導入された組換え動物、それらの動物同士を掛け合わせることにより作り出された組換え動物のいずれであってもよい。

また、遺伝子組換え技術により、そのようなヒト抗体の重鎖及び軽鎖の各々をコードするｃＤＮＡ、好ましくは該ｃＤＮＡを含むベクターにより真核細胞を形質転換し、遺伝子組換えヒトモノクローナル抗体を産生する形質転換細胞

を培養することにより、この抗体を培養上清中から得ることもできる。

ここで、宿主としては例えば真核細胞、好ましくはCHO細胞、リンパ球やミエローマ等の哺乳動物細胞を用いることができる。

また、ヒト抗体ライブラリーより選別したファージディスプレイ由来のヒト抗体を取得する方法（Wormstone, I. M. et. al, Investigative Ophthalmology & Visual Science.（2002）43（7), p. 2301−2308；Carmen, S. et. al., Briefings in Functional Genomics and Proteomics（2002), 1（2), p. 189−203；Siriwardena, D. et. al., Opthalmology（2002）109（3), p. 427−431等参照。）も知られている。

例えば、ヒト抗体の可変領域を一本鎖抗体（scFv）としてファージ表面に発現させて、抗原に結合するファージを選択するファージディスプレイ法（Nature Biotechnology（2005), 23, (9), p. 1105−1116）を用いることができる。

抗原に結合することで選択されたファージの遺伝子を解析することによって、抗原に結合するヒト抗体の可変領域をコードするDNA配列を決定することができる。

抗原に結合するscFvのDNA配列が明らかになれば、当該配列を有する発現ベクターを作製し、適当な宿主に導入して発現させることによりヒト抗体を取得することができる（WO92／01047, WO92／20791, WO93／06213, WO93／11236, WO93／19172, WO95／01438, WO95／15388、Annu. Rev. Immunol（1994）12, p. 433−455、Nature Biotechnology（2005）23（9), p. 1105−1116)。

（４－６）抗体の機能断片の調製法

一本鎖抗体を作成する方法は当技術分野において周知である（例えば、米国特許第４，９４６，７７８号、米国特許第５，２６０，２０３号、米国特許第５，０９１，５１３号、米国特許第５，４５５，０３０号等を参照）。このｓｃＦｖにおいて、重鎖可変領域と軽鎖可変領域は、コンジュゲートを作らないようなリンカー、好ましくはポリペプチドリンカーを介して連結される（Ｈｕｓｔｏｎ，Ｊ．Ｓ．ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．（１９８８），８５，ｐ．５８７９－５８８３）。ｓｃＦｖにおける重鎖可変領域及び軽鎖可変領域は、同一の抗体に由来してもよく、別々の抗体に由来してもよい。

可変領域を連結するポリペプチドリンカーとしては、例えば１２乃至１９残基からなる任意の一本鎖ペプチドが用いられる。

ｓｃＦｖをコードするＤＮＡは、前記抗体の重鎖又は重鎖可変領域をコードするＤＮＡ、及び軽鎖又は軽鎖可変領域をコードするＤＮＡのうち、それらの配列のうちの全部又は所望のアミノ酸配列をコードするＤＮＡ部分を鋳型とし、その両端を規定するプライマー対を用いてＰＣＲ法により増幅し、次いで、さらにポリペプチドリンカー部分をコードするＤＮＡ、及びその両端が各々重鎖、軽鎖と連結されるように規定するプライマー対を組み合わせて増幅することにより得られる。

ｓｃＦｖをコードするＤＮＡを用いて、該ＤＮＡを含有する発現ベクター、及び該発現ベクターにより形質転換された宿主細胞を常法に従って調製することができ、また、その宿主細胞を培養することにより、常法に従ってかかる培養物から該ｓｃＦｖを回収することができる。

その他の抗体の機能断片も、前記の方法に準じて該機能断片をコードする遺伝子を取得して細胞に導入し、該細胞の培養物から該機能断片を回収することにより、得ることができる。

本発明の抗体は、多量化して抗原に対する親和性を高めたものであってもよ

い。多量化する抗体としては、１種類の抗体であっても、同一の抗原の複数のエピトープを認識する複数の抗体であってもよい。抗体を多量化する方法としては、ＩｇＧ　ＣＨ３ドメインと２つのｓｃＦｖとの結合、ストレプトアビジンとの結合、ヘリックスーターン‐ヘリックスモチーフの導入等を挙げることができる。

本発明の抗体は、アミノ酸配列が異なる複数種類の抗ＦＧＦＲ２抗体の混合物、すなわちポリクローナル抗体であってもよい。ポリクローナル抗体としては、例えば、ＣＤＲの一部又は全部が異なる複数種類の抗体の混合物を挙げることができる。そのようなポリクローナル抗体は、異なる抗体の産生細胞を混合培養し、該培養物から回収することができる（ＷＯ２００４／０６１１０４号）。また、別個に調製した抗体を混合することも可能である。さらに、ポリクローナル抗体の一つの態様である抗血清は、動物を所望の抗原で免疫し、定法に従って、該動物から血清を回収することにより調製することができる。

抗体の修飾物として、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）等の各種分子と結合した抗体を使用することもできる。

本発明の抗体は、更にこれらの抗体と他の薬剤がコンジュゲートを形成しているもの（Ｉｍｍｕｎｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ）でもよい。このような抗体の例としては、該抗体が放射性物質や薬理作用を有する化合物と結合している物を挙げることができる（Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（２００５）２３，ｐ．１１３７－１１４６）。

（４－７）抗体の精製

得られた抗体は、均一にまで精製することができる。抗体の分離、精製は通常の蛋白質で使用されている分離、精製方法を使用すればよい。

例えばクロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、透析、調製用ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動等を適宜選択、組み合わせれば、抗体を分離、精製することができる（Ｓｔｒａｔｅｇｉｅｓ　ｆｏ

r Protein Purification and Charcterization:A Laboratoy Course Manual, Daniel R. Marshak et al. eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996);Antibodies:A Laboratory Manual. Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory(1988))が、これらに限定されるものではない。

クロマトグラフィーとしては、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等が挙げられる。

これらのクロマトグラフィーは、ＨＰＬＣやＦＰＬＣ等の液相クロマトグラフィーを用いて行うことができる。

アフィニティークロマトグラフィーに用いるカラムとしては、プロテインＡカラム、プロテインＧカラム、抗原カラム等をあげることができる。

プロテインＡカラムとしては、例えば、Ｈｙｐｅｒ　Ｄ（ポール社製,, ＰＯＲＯＳ（アプライドシステムズ社製), Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ．Ｆ．Ｆ．（ＧＥヘルスケア社製）等が挙げられる。

また抗原を固定化した担体を用いて、抗原への結合性を利用して抗体を精製することも可能である。

(4－8)抗体をコードするヌクレオチド・組換ベクター・組換細胞

本発明は、本発明の抗体もしくはその機能断片またはその修飾体をコードするヌクレオチド（「抗体遺伝子」という)、該遺伝子が挿入された組換えベクター、該遺伝子又はベクターが導入された細胞（「抗体遺伝子導入細胞」という)、その他本発明の抗体もしくは機能断片またかうその修飾体を産生する細胞（「抗体産生細胞」という）をも提供する。

本発明の抗体遺伝子は、好適には、次の（ａ）乃至（ｅ）のいずれか一つに

記載の塩基配列（以下、「抗体遺伝子配列」という）を含んでなるか、抗体遺伝子配列を含む塩基配列からなるか、または抗体遺伝子配列からなる：

（ａ）ラットＦＲ２－１０、ＦＲ２－１３およびＦＲ２－１４、キメラｃＦＲ２－１０、ｃＦＲ２－１３およびｃＦＲ２－１４、ならびに、ヒト化ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１／Ｌ１乃至ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１９／Ｌ１のいずれか一つの抗体の重鎖アミノ酸配列をコードする塩基配列と軽鎖アミノ酸配列をコードする塩基配列の組合せ；

（ｂ）ラットＦＲ２－１０、ＦＲ２－１３およびＦＲ２－１４、キメラｃＦＲ２－１０、ｃＦＲ２－１３およびｃＦＲ２－１４、ならびに、ヒト化ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１／Ｌ１乃至ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１９／Ｌ１のいずれか一つの抗体のＣＤＲＨ１乃至ＣＤＲＨ３を含む重鎖のアミノ酸配列をコードする塩基配列とＣＤＲＬ１乃至ＣＤＲＬ３を含む軽鎖のアミノ酸配列をコードする塩基配列の組合せ；

（ｃ）ラットＦＲ２－１０、ＦＲ２－１３およびＦＲ２－１４、キメラｃＦＲ２－１０、ｃＦＲ２－１３およびｃＦＲ２－１４、ならびに、ヒト化ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１／Ｌ１乃至ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１９／Ｌ１のいずれか一つの抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列を含む重鎖アミノ酸配列をコードする塩基配列と軽鎖可変領域のアミノ酸配列を含む軽鎖アミノ酸配列コードする塩基配列の組合せ；

（ｄ）（ａ）乃至（ｃ）のいずれか一つに記載の塩基配列に相補的な塩基配列からなるヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし且つＦＧＦＲ２に結合する抗体のアミノ酸配列をコードする塩基配列；および、

（ｅ）（ａ）乃至（ｃ）のいずれか一つに記載のアミノ酸配列において１乃至５０個、１乃至４５個、１乃至４０個、１乃至３０個、１乃至２５個、１乃至２０個、１乃至１５個、１乃至１０個、１乃至８個、１乃至６個、１乃至５個、１乃至４個、１乃至３個、１若しくは２個、または１個の塩基が置換、欠失、付加または挿入してなるアミノ酸配列をコードし且つＦＧＦＲ２に結合する抗

体のアミノ酸配列をコードする塩基配列；

（ｄ）又は（ｅ）記載の塩基配列によりコードされるアミノ酸配列を有する抗体は、ＦＧＦＲ２結合活性に加え、上記（３－３）乃至（３－６）記載の１つ又は２つ以上の活性を有していてもよい。

ただし、本発明の抗体遺伝子は、上記（ａ）乃至（ｅ）記載のものに限定されない。

本発明は、（４－３）記載のように、本発明の抗体遺伝子導入細胞を培養する工程、および、その培養物から抗体もしくはその機能断片またはその修飾体を回収する工程、を含む、抗体もしくはその機能断片またはその修飾体の製造方法をも提供する。かかる製造方法により得られた抗体もしくはその機能断片またはその修飾体も、本発明に含まれる。

５．医薬組成物

本発明は抗ＦＧＦＲ２抗体もしくはその機能断片またはその修飾体を含む医薬組成物を提供する。

本発明の医薬組成物は、ＦＧＦＲ２もしくはそのリガンドの過剰発現またはＦＧＦＲ２の変異もしくは遺伝子増幅によるＦＧＦＲ２シグナル異常又は亢進、または、ＦＧＦＲ２のアイソフォームのスイッチングにより惹起されるか又は増悪化される各種疾患（以下、「ＦＧＦＲ２に関わる疾患」という）、とりわけ各種癌の治療又は予防に有用である。

かかる治療又は予防の対象となる癌の惹起又は増悪化の原因としては、ＦＧＦＲ２遺伝子のイントロン内の一塩基置換（ＳＮＰ）、ＦＧＦＲ２の高発現、ＦＧＦＲ２を恒常的に活性化するミスセンス変異、ＦＧＦＲ２遺伝子の増幅又は過剰発現、ＦＧＦＲ２ＩＩＩｂからＦＧＦＲ２ＩＩＩｃへのスイッチング等を例示することができる。

かかる癌種としては、例えば、乳癌、子宮内膜癌、卵巣癌、非小細胞肺癌などの肺癌、胃癌、前立腺癌、腎癌、肝臓癌、膵臓癌、大腸癌、食道癌、膀胱癌、

子宮頚癌、血液癌、リンパ腫、悪性黒色腫等をあげることができ、好適にはＦＧＦＲ２蛋白質を発現しているそれらの癌をあげることができる。

本発明において、疾患の治療または予防には、かかる疾患、好適にはＦＧＦＲ２蛋白質を発現している個体におけるかかる疾患の発症の予防、増悪化又は進行の抑制又は阻害、かかる疾患に罹患した個体が呈する一つ又は二つ以上の症状の軽減、増悪化若しくは進行の抑制または寛解、二次性疾患の治療又は予防等が含まれるが、それらに限定されるものではない。

本発明の医薬組成物には、治療または予防に有効な量の抗ＦＧＦＲ２抗体又は該抗体の機能断片と薬学上許容される希釈剤、担体、可溶化剤、乳化剤、保存剤及び／又は補助剤を含有せしめることができる。

「治療または予防に有効な量」とは、特定の疾患、投与形態および投与径路につき治療又は予防効果を奏する量を意味し、「薬理学的に有効な量」と同義である。

本発明の医薬組成物には、ｐＨ、浸透圧、粘度、透明度、色、等張性、無菌性、該組成物又はそれに含まれる抗体の安定性、溶解性、徐放性、吸収性、浸透性、剤型、強度、性状、形状等を変化させたり、維持したり、保持したりするための物質（以下、「製剤用の物質」という）を含有せしめることができる。製剤用の物質としては、薬理学的に許容される物質であれば特に限定されるものではない。例えば、非毒性又は低毒性であることは、製剤用の物質が好適に具備する性質である。

製剤用の物質として、例えば、以下のものをあげることができるが、これらに限定されるものではない；　グリシン、アラニン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン又はリジン等のアミノ酸類、抗菌剤、アスコルビン酸、硫酸ナトリウム又は亜硫酸水素ナトリウム等の抗酸化剤、リン酸、クエン酸、ホウ酸バッファー、炭酸水素ナトリウム、トリス－塩酸（Ｔｒｉｓ－Ｈｃｌ）溶液等の緩衝剤、マンニトールやグリシン等の充填剤、エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）等のキレート剤、カフェイン、ポリビニルピロリジン、

β－シクロデキストリンやヒドロキシプロピル－β－シクロデキストリン等の錯化剤、グルコース、マンノース又はデキストリン等の増量剤、単糖類、二糖類やグルコース、マンノースやデキストリン等の他の炭水化物、着色剤、香味剤、希釈剤、乳化剤やポリビニルピロリジン等の親水ポリマー、低分子量ポリペプチド、塩形成対イオン、塩化ベンズアルコニウム、安息香酸、サリチル酸、チメロサール、フェネチルアルコール、メチルパラベン、プロピルパラベン、クロレキシジン、ソルビン酸又は過酸化水素等の防腐剤、グリセリン、プロピレングリコール又はポリエチレングリコール等の溶媒、マンニトール又はソルビトール等の糖アルコール、懸濁剤、ＰＥＧ、ソルビタンエステル、ポリソルビテート２０やポリソルビテート８０等ポリソルビテート、トリトン（ｔｒｉｔｏｎ）、トロメタミン（ｔｒｏｍｅｔｈａｍｉｎｅ）、レシチン又はコレステロール等の界面活性剤、スクロースやソルビトール等の安定化増強剤、塩化ナトリウム、塩化カリウム、マンニトールやソルビトール等の弾性増強剤、輸送剤、希釈剤、賦形剤、及び／又は薬学上の補助剤。

これらの製剤用の物質の添加量は、抗ＦＧＦＲ２抗体もしくはその機能断片またはその修飾体の重量に対して０．００１乃至１０００倍、好適には０．０１乃至１００倍、より好適には０．１乃至１０倍である。

抗ＦＧＦＲ２抗体もしくはその機能断片またはその修飾体をリポソーム中に含有せしめたイムノリポソーム、抗体とリポソームとが結合してなる抗体修飾体（米国特許第６２１４３８８号等）を含有する医薬組成物も、本発明の医薬組成物に含まれる。

賦形剤や担体は、通常液体又は固体であり、注射用の水、生理食塩水、人工脳脊髄液、その他の、経口投与又は非経口投与用の製剤に用いられる物質であれば特に限定されない。生理食塩水としては、中性のもの、血清アルブミンを含むもの等をあげることができる。

緩衝剤としては、医薬組成物の最終ｐＨが７．０乃至８．５になるように調製されたＴｒｉｓバッファー、同じく４．０乃至５．５になるように調製され

た酢酸バッファー、同じく５．０乃至８．０になるように調製されたクエン酸バッファー、同じく５．０乃至８．０になるように調製されたヒスチジンバッファー等を例示することができる。

本発明の医薬組成物は、固体、液体、懸濁液等である。凍結乾燥製剤をあげることができる。凍結乾燥製剤を成型するには、スクロース等の賦形剤を用いることができる。

本発明の医薬組成物の投与径路としては、経腸投与、局所投与及び非経口投与のいずれでもよく、例えば、静脈内投与、動脈内投与、筋肉内投与、皮内投与、皮下投与、腹腔内投与、経皮投与、骨内投与、関節内投与等をあげることができる。

かかる医薬組成物の組成は、投与方法、抗体のＦＧＦＲ２蛋白質結合親和性等に応じて決定することができる。本発明の抗ＦＧＦＲ２抗体もしくはその機能断片またはその修飾体のＦＧＦＲ２蛋白質に対する親和性が高いほど（ＫＤ値が低いほど）、少ない投与量でその薬効を発揮し得る。

本発明の抗ＦＧＦＲ２抗体の投与量は、薬理学的に有効な量であれば限定されず、個体の種、疾患の種類、症状、性別、年齢、持病、該抗体のＦＧＦＲ２蛋白質結合親和性又はその生物活性、その他の要素に応じて適宜決定することができるが、通常、０．０１乃至１０００ｍｇ／ｋｇ、好適には０．１乃至１００ｍｇ／ｋｇを、１乃至１８０日間に１回、又は１日２回若しくは３回以上投与することができる。

医薬組成物の形態としては、注射剤（凍結乾燥製剤、点滴剤を含む）、坐剤、経鼻型吸収製剤、経皮型吸収製剤、舌下剤、カプセル、錠剤、軟膏剤、顆粒剤、エアーゾル剤、丸剤、散剤、懸濁剤、乳剤、点眼剤、生体埋め込み型製剤等を例示することができる。

抗ＦＧＦＲ２抗体もしくはその機能断片またはその修飾体を有効成分として含む医薬組成物は他の医薬と同時にあるいは個々に投与することができる。例えば、他の医薬を投与した後に抗ＦＧＦＲ２抗体又は該抗体の機能断片を有効

成分として含む医薬組成物を投与するか、かかる医薬組成物を投与した後に、他の医薬を投与するか、または、当該医薬組成物と他の医薬とを同時に投与してもよい。他の医薬としては、化学療法剤、放射線療法など各種抗癌剤等をあげることができる。それらをまとめて本発明の抗体と「他の薬剤との併用」と呼び、本発明の抗体、その機能断片またはその修飾体に加えてさらなる薬剤を含む医薬組成物も本発明に含まれる。

本発明は癌などＦＧＦＲに関わる疾患の治療方法または予防方法、該疾患の治療用または予防用医薬組成物を調製するための本発明の抗体の使用、該疾患の治療または予防のための本発明の抗体の使用、をも提供する。本発明の抗体を含む治療用または予防用キットも本発明に含まれる。

６．診断用組成物

本発明の抗ＦＧＦＲ２抗体もしくはその機能断片またはその修飾体を含む検査用または診断用組成物（以下、まとめて「診断用組成物」という）を提供する。

本発明の診断用組成物は、癌などＦＧＦＲ２に関わる疾患、ＦＧＦＲ２発現の検査または診断に有用である。本発明において検査または診断には、例えば、罹患リスクの判定又は測定、罹患の有無の判定、進行や増悪化の程度の測定、抗ＦＧＦＲ２抗体等の医薬組成物による薬物治療の効果の測定又は判定、薬物治療以外の治療の効果の測定又は判定、再発リスクの測定、再発の有無の判定等が含まれるが、検査または診断であればそれらに限定されるものではない。

本発明の診断用組成物は、本発明の抗体もしくはその機能断片またはその修飾体、それらを含む組成物、それらを含む医薬組成物を投与する個体の同定に有用である。

かかる診断用組成物には、ｐＨ緩衝剤、浸透圧調節剤、塩類、安定化剤、防腐剤、顕色剤、増感剤、凝集防止剤等を含有せしめることができる。

本発明は癌などＦＧＦＲ２に関わる疾患の検査方法または診断方法、該疾患

の診断用組成物を調製するための本発明の抗体の使用、該疾患の検査または診断のための本発明の抗体の使用、をも提供する。本発明の抗体を含む検査または診断用キットも本発明に含まれる。

本発明の抗体を含む検査または診断の方法としてはサンドウィッチＥＬＩＳＡが望ましいが、通常のＥＬＩＳＡ法やＲＩＡ法、ＥＬＩＳＰＯＴ（Ｅｎｚｙｍｅ－Ｌｉｎｋｅｄ ＩｍｍｕｎｏＳｐｏｔ）法、ドットブロット法、オクタロニー法、ＣＩＥ（Ｃｏｕｎｔｅｒｉｍｍｕｎｏｅｌｅｃｔｒｏｐｈｏｒｅｓｉｓ）法などの抗体を利用した検出方法が利用可能である。抗体の標識法としてはビオチンのほか、ＨＲＰ、アルカリフォスファターゼ、ＦＩＴＣなど生化学的解析に実施可能な標識法が利用できる。酵素標識を利用した検出にはＴＭＢ（３，３’，５，５’－ｔｅｔｒａｍｅｔｈｙｌｂｅｎｚｉｄｉｎｅ）、ＢＣＩＰ（５－ｂｒｏｍｏ－４－ｃｈｌｏｒｏ－３－ｉｎｄｏｌｙｌ ｐｈｏｓｐｈａｔｅ）、ρ－ＮＰＰ（ρ－ｎｉｔｒｏｐｈｅｎｙｌ ｐｈｏｓｐｈａｔｅ）、ＯＰＤ（ｏ－Ｐｈｅｎｙｌｅｎｅｄｉａｍｉｎｅ）、ＡＢＴＳ（３－Ｅｔｈｙｌ ｂｅｎｚｏｔｈｉａｚｏｌｉｎｅ－６－ｓｕｌｆｏｎｉｃ ａｃｉｄ）、ＳｕｐｅｒＳｉｇｎａｌ ＥＬＩＳＡ Ｐｉｃｏ Ｃｈｅｍｉｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｔ Ｓｕｂｓｔｒａｔｅ（サーモフィッシャーサイエンティフィック社）などの発色基質やＱｕａｎｔａＢｌｕ™ Ｆｌｕｏｒｏｇｅｎｉｃ Ｐｅｒｏｘｉｄａｓｅ Ｓｕｂｓｔｒａｔｅ（サーモフィッシャーサイエンティフィック社）蛍光基質のほか、化学発光基質を用いることができる。本測定には、ヒト又は非ヒト動物由来の試料に加え、組換え蛋白質等の人工的な処理を加えた試料をも供することができる。生物個体由来の被検試料としては、例えば、血液、関節液、腹水、リンパ液、脳脊髄液、組織ホモジネート上清、組織切片等をあげることができるが、それらに限定されるものではない。

本発明の抗体を含む検査または診断用のサンドウィッチＥＬＩＳＡキットには、ＦＧＦＲ２蛋白質標準液、発色試薬、希釈用緩衝液、固相用抗体、検出用抗体、ならびに洗浄液等が含まれてよい。抗原に結合した抗体量を測定する方

法としては、吸光法、蛍光法、発光法、ＲＩ（Ｒａｄｉｏｉｓｏｔｏｐｅ）法等が好適に適用され、測定には、吸光プレートリーダー、蛍光プレートリーダー、発光プレートリーダー、ＲＩ液体シンチレーションカウンター等が好適に使用される。

本発明は免疫組織化学（ｉｍｍｕｎｏｈｉｓｔｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ：ＩＨＣ）の分析に有用な抗体、その機能断片およびその修飾体、ならびにそれらを含む組成物を提供する。かかる組成物も本発明の「診断用組成物」に包含される。

免疫組織化学は、組織切片を抗原に結合する抗体（一次抗体）を反応させ、抗原に結合した一次抗体を検出する手法であれば特に限定されない。

組織切片は、好適にはパラフィン処理する。パラフィン処理した組織切片を脱パラフィン処理した後、抗原賦活処理および非特異的反応抑制処理を行う。抗原賦活処理の方法としては、加熱処理、トリプシン等による酵素処理を例示することができ、好適には加熱処理である。加熱処理の条件としては、通常、温度９０乃至１１０℃、ｐＨ８乃至１０、処理時間２０乃至６０分の範囲が好適である。ｐＨの調整にはＴｒｉｓ－ＥＤＴＡ緩衝液（例えば、１ｍＭのＥＤＴＡを含有する１０ｍＭトリス緩衝液）等を使用することができる。非特異的反応抑制処理としては、発色に使用する酵素と同様または類似の触媒活性を有する内因性の酵素を不活性化する方法が通常用いられる。ペルオキシダーゼ反応により発色させる場合、予め組織中に存在する内因性のペルオキシダーゼをH_2O_2等で阻害することが好ましい。H_2O_2の溶媒は水、メタノール等を使用することができ、H_2O_2の濃度は０．１乃至３％、好適には０．３乃至３％である。H_2O_2溶液にはアジ化ナトリウムを添加することができる。また、血清やカゼインによりブロッキングする方法も非特異的反応抑制処理として使用することができる。血清やカゼインは、一次抗体反応の前に組織を処理することができるが、１次抗体を希釈する溶媒に含有せしめることもできる。

一次抗体の反応条件は特に限定されないが、温度２０乃至５０℃、好適には

２５乃至４２℃、より好適には３７℃である。反応時間は５分乃至一昼夜、好適には１０分乃至６時間、より好適には３０分乃至２時間である。

一次抗体の検出には、好適には、可視化することができ且つ一次抗体に結合する抗体（二次抗体）を用いることができる。二次抗体の可視化法としては、ペルオキシダーゼやアルカリフォスファターゼ等の酵素を二次抗体に結合させるか、または二次抗体にビオチン等を付加して前記酵素を結合させたストレプトアビジン等と結合させ、それらの酵素に対応する発色基質を反応させる方法を好適に使用することができる。酵素を二次抗体に結合させる方法としては、デキストリンポリマーやアミノ酸ポリマーに前記酵素と二次抗体を多数結合させた試薬を用いる方法（ポリマー法）を例示することができる。ビオチン化二次抗体およびペルオキシダーゼ標識したストレプトアビジンを反応させる方法（ＬＳＡＢ法）では、発色基質としてＤＡＢ等を用いることができる。

免疫組織化学に係る操作は、反応液、反応条件、洗浄回数等をプログラムして免疫装置に組み込み、自動化して行なうことができる。

本発明の診断用組成物に含まれる抗体、その機能断片またはその修飾体は、好適にはＦＧＦＲ２に結合する抗体、すなわちＦＧＦＲ２選択性を有する抗体、その機能断片またはその修飾体であり、より好適にはヒトＦＧＦＲ２ＩＩＩｂ選択性を有する抗体、その機能断片またはその修飾体である。本発明の診断用組成物の別の態様において、より好適な抗体、その機能断片またはその修飾体は、ヒトＦＧＦＲ２ＩＩＩｂおよびヒトＦＧＦＲ２ＩＩＩｃの両方に選択性を有する。

ヒトＦＧＦＲ２ＩＩＩｂ選択性を有する抗体としては、ラットＦＲ２－１０抗体の重鎖のＣＤＲＨ１乃至ＣＤＲＨ３を含む重鎖、ならびに、軽鎖のＣＤＲＬ１乃至ＣＤＲＬ３を含む重鎖、を含んでなる抗体、ラットＦＲ２－１０抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含んでなる抗体、ラットＦＲ２－１０抗体の重鎖および軽鎖を含んでなる抗体等を例示することができる。かかる抗体としては、ラットＦＲ２－１０抗体、キメラｃＦＲ２－１０抗体、ヒト化ＦＲ

２－１０抗体等をあげることができるが、それらに限定されるものではない。

ヒトＦＧＦＲ２ＩＩＩｂおよびヒトＦＧＦＲ２ＩＩＩｃの両方に選択性を有する抗体としては、ラットＦＲ２－１３抗体の重鎖のＣＤＲＨ１乃至ＣＤＲＨ３を含む重鎖、ならびに、軽鎖のＣＤＲＬ１乃至ＣＤＲＬ３を含む重鎖、を含んでなる抗体、ラットＦＲ２－１４抗体の重鎖のＣＤＲＨ１乃至ＣＤＲＨ３を含む重鎖、ならびに、軽鎖のＣＤＲＬ１乃至ＣＤＲＬ３を含む重鎖、を含んでなる抗体、ラットＦＲ２－１３抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含んでなる抗体、ラットＦＲ２－１４抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含んでなる抗体、ラットＦＲ２－１３抗体の重鎖および軽鎖を含んでなる抗体、ラットＦＲ２－１４抗体の重鎖および軽鎖を含んでなる抗体等を例示することができる。かかる抗体としては、ラットＦＲ２－１３抗体、キメラｃＦＲ２－１３抗体、ヒト化ＦＲ２－１３抗体、ラットＦＲ２－１４抗体、キメラｃＦＲ２－１４抗体、ヒト化ＦＲ２－１４抗体等をあげることができるが、それらに限定されるものではない。

本発明の一つの好適な態様において、診断用組成物は、ＦＧＦＲ２検出用または測定用であり、より好適にはヒトＦＧＦＲ２ＩＩＩｂ及び／又はヒトＦＧＦＲ２ＩＩＩｃの検出用または測定用であり、より一層好適にはヒトＦＧＦＲ２ＩＩＩｂ、あるいはヒトＦＧＦＲ２ＩＩＩｂおよびヒトＦＧＦＲ２ＩＩＩｃの検出用または測定用である。

本発明は被検サンプル中のヒトＦＧＦＲ２ＩＩＩｂを検出または測定する方法を提供する。

また、（ｉ）被検サンプル中のヒトＦＧＦＲ２ＩＩＩｂとヒトＦＧＦＲ２ＩＩＩｃを検出または測定し、（ｉｉ）該サンプル中のヒトＦＧＦＲ２ＩＩＩｂを検出または測定し、（ｉｉｉ）（ｉ）の検出または測定の結果と（ｉｉ）の検出または測定の結果を比較することにより、あるいは（ｉ）の検出または測定の結果から（ｉｉ）の検出または測定の結果を差し引くことにより、該サンプル中のヒトＦＧＦＲ２ＩＩＩｃを検出または測定することができる。かかるヒトＦ

ＧＦＲ２ＩＩＩｃの検出または測定方法も本発明に包含される。

これらの検出またか測定方法には、本発明の診断用組成物を使用することができる。かかる測定方法および診断用組成物は、ヒトＦＧＦＲ２陽性癌、好適にはヒトＦＧＦＲ２ＩＩＩｂ及び／又はヒトＦＧＦＲ２ＩＩＩｃ陽性癌の診断用または検査用としても本発明に含まれる。

本発明の医薬組成物が投与される個体を同定する方法も本発明に包含される。かかる同定方法においては、該個体由来サンプル中のヒトＦＧＦＲ２を測定し、該サンプル中に、ヒトＦＧＦＲ２が検出されたか、または、健常個体由来サンプル中に検出されたヒトＦＧＦＲ２の量と比較してより多くのヒトＦＧＦＲ２が検出された場合に、該個体を陽性と判定することができる。かかる同定方法において、好適にはヒトＦＧＦＲ２は、ヒトＦＧＦＲ２ＩＩＩｂ及び／又はヒトＦＧＦＲ２ＩＩＩｃであり、より好適にはヒトＦＧＦＲ２ＩＩＩｂ、あるいはヒトＦＧＦＲ２ＩＩＩｂ及びヒトＦＧＦＲ２ＩＩＩｃである。

当該方法には、本発明の診断用組成物を使用することができる。

また、かかる同定方法の好適な一態様において、該個体は癌に罹患しているかまたはそのリスクがある。

さらに、本発明の医薬組成物は、その一態様において、かかる同定方法において陽性と判定された個体に投与され得る。

７．試薬

本発明の抗体もしくはその機能断片またはその修飾体は、試薬としても有用である。かかる試薬は、上述の検査又は診断用、研究用およびその他の用途で使用される。

８．スクリーニング方法

本発明はＦＧＦＲ２中和活性を有する物質の同定方法を提供する。かかる方法においては、本発明の抗体が結合する抗原上の部位に結合する物質を同定す

る。例えば、被検物質とヒトＦＧＦＲ２ＩＩＩｂ蛋白質またはその断片を接触させ、次いでラットＦＲ２－１４抗体、キメラｃＦＲ２－１４抗体およびヒト化ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１／Ｌ１乃至ｈＦＲ２－１４＿Ｌ１９／Ｌ１のいずれか一つの抗体が結合するヒトＦＧＦＲＩＩＩｂ上のエピトープを構成するアミノ酸残基と該物質の距離を測定し、各残基と該物質が相互作用距離を有する場合、該物質を陽性と判定することができる。

かかる同定方法は抗腫瘍活性を有する物質の同定方法としても有用である。該方法において陽性と判定された物質の抗腫瘍活性をさらに測定することもできる。

被検物質は、好適にはペプチドまたは抗体、その機能断片もしくはその修飾体である。

かかる方法において、陽性と判定されたペプチドまたは抗体、その機能断片もしくはその修飾体を、遺伝子組換え、ペプチド合成またはインビトロ翻訳により調製することもでき、そのようなペプチドや抗体等を製造する方法も、本発明に含まれる。

実施例

以下、実施例において本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されない。

なお、下記実施例において遺伝子操作に関する各操作は特に明示がない限り、「モレキュラークローニング（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ）」（Ｓａｍｂｒｏｏｋ，Ｊ．，Ｆｒｉｔｓｃｈ，Ｅ．Ｆ．およびＭａｎｉａｔｉｓ，Ｔ．著，Ｃｏｌｄ ＳｐｒｉｎｇＨａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓより１９８９年発刊）に記載の方法及びその他の当業者が使用する実験書に記載の方法により行うか、または、市販の試薬やキットを用いる場合には市販品の指示書に従って行った。

実施例１．ラット抗ヒトＦＧＦＲ２抗体の作製

１）－１　免疫

８週齢のＷＫＹ/Ｉｚｍラットの雌（日本エスエルシー社）および７週齢のＣｒｌｊ：ＷＩラットの雌（日本チャールスリバー社）を使用した。ＷＫＹ/Ｉｚｍラットでは０日目に５０μｇのＲｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ　Ｈｕｍａｎ　ＦＧＦＲ２β（ＩＩＩｂ）/Ｆｃ　Ｃｈｉｍｅｒａ（Ｒ&Ｄ　ＳＹＳＴＥＭ社製）とＦｒｅｕｎｄ‘ｓ　Ｃｏｍｐｌｅｔｅ　Ａｄｊｕｖａｎｔ（和光純薬社製）を混合（体積比で１：２）したものをラットの尾根部に投与した。２１日目に５０μｇのＲｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ　Ｈｕｍａｎ　ＦＧＦＲ２β（ＩＩＩｂ）/Ｆｃ　Ｃｈｉｍｅｒａをラットの尾根部に投与した。３５日目にラットのリンパ節あるいは脾臓を採取しハイブリドーマ作製に用いた。Ｃｒｌｊ：ＷＩラットでは０日目に５０μｇのＦＧＦＲ２β（ＩＩＩｂ）/Ｆｃ　ＣｈｉｍｅｒａとＦｒｅｕｎｄ‘ｓ　Ｃｏｍｐｌｅｔｅ　Ａｄｊｕｖａｎｔを混合（体積比で１：１）したものをラットの皮下あるいは皮内に投与した。７日目、１４日目と２１日目に５０μｇのＦＧＦＲ２β（ＩＩＩｂ）/Ｆｃ　ＣｈｉｍｅｒａとＦｒｅｕｎｄ‘ｓ　Ｉｎｃｏｍｐｌｅｔｅ　Ａｄｊｕｖａｎｔを混合（体積比で１：１）したものをラットの皮下あるいは皮内に投与した。３８日目に５０μｇのＦＧＦＲ２β（ＩＩＩｂ）/Ｆｃ　Ｃｈｉｍｅｒａをラットの尾静脈内に投与し、４２日目にマウスのリンパ節あるいは脾臓を採取しハイブリドーマ作製に用いた。

１）－２　ハイブリドーマ作製

リンパ節細胞あるいは脾臓細胞とマウスミエローマＳＰ２／０－ａｇ１４細胞とをＨｙｂｒｉｍｕｎｅ　Ｈｙｂｒｉｄｏｍａ　Ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ　Ｓｙｓｔｅｍ（Ｃｙｔｏ　Ｐｕｌｓｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ社製）を用いて電気細胞融合し、ＣｌｏｎａＣｅｌｌ－ＨＹ　Ｓｅｌｅｃｔｉｏｎ　ＭｅｄｉｕｍＤ（ＳｔｅｍＣｅｌｌ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製）に希釈して培養した。出現したハイブリドーマコロニーを回収することでモノクローンハイブリドー

マを作製した。回収された各ハイブリドーマコロニーを培養し、得られたハイブリドーマ培養上清用いて抗ＦＧＦＲ２抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングを行った。

1）－３　抗原結合性抗体スクリーニング用発現ベクターの構築

1）－３－１　ヒトＦＧＦＲ２ＩＩＩｂおよびＦＧＦＲ２ＩＩＩｃ発現ベクター（ｐｃＤＮＡ－ＤＥＳＴ４０－ＦＧＦＲ２ＩＩＩｂおよびｐｃＤＮＡ－ＤＥＳＴ４０－ＦＧＦＲ２ＩＩＩｃ）の構築

ヒトＦＧＦＲ２ＩＩＩｂバリアント蛋白質（アイソフォーム２：ＮＰ＿０７５２５９）およびヒトＦＧＦＲ２ＩＩＩｃバリアント蛋白質（アイソフォーム１：ＮＰ＿０００１３２）をコードするｃＤＮＡをｐｃＤＮＡ－ＤＥＳＴ４０ベクターにクローニングし、それぞれのバリアント蛋白質を発現するベクターｐｃＤＮＡ－ＤＥＳＴ４０－ＦＧＦＲ２ＩＩＩｂおよびｐｃＤＮＡ－ＤＥＳＴ４０－ＦＧＦＲ２ＩＩＩｃを構築した。

1）－３－２　Ｉｇ様ドメイン欠損ＦＧＦＲ２ＩＩＩｂ発現ベクターの構築

ＦＧＦＲ２ＩＩＩｂの全長アミノ酸（１－８２２）のうちの５４－１１０番の領域の欠損体（以下「ＩｇＤ１欠損体」と記す）、１５４－２４６番の領域の欠損体（以下「ＩｇＤ２欠損体」と記す）、２６３－３５８番の領域の欠損体（以下「ＩｇＤ３欠損体」と記す）を発現するベクターをｐｃＤＮＡ－ＤＥＳＴ４０－ＦＧＦＲ２ＩＩＩｂを鋳型にしてＰＣＲ法により構築した。

1）－４　Ｃｅｌｌ－ＥＬＩＳＡ法による抗体スクリーニング

1）－４－１　Ｃｅｌｌ－ＥＬＩＳＡ用抗原遺伝子発現細胞の調製

ＨＥＫ２９３細胞を１０％　ＦＢＳ含有ＤＭＥＭ培地中７．５ｘ１０^{5}細胞／ｍｌになるよう調製した。それに対し、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製）を用いて、ｐｃＤＮＡ－ＤＥ

ＳＴ４０－ＦＧＦＲ２ＩＩＩｂもしくはコントロールとしてｐｃＤＮＡ－ＤＥＳＴ４０を導入し、９６－ｗｅｌｌハーフエリア　ｐｌａｔｅ（Ｃｏｒｎｉｎｇ社製）に５０μｌずつ分注し、１０％ＦＢＳ含有ＤＭＥＭ培地中で３７℃、５％CO_2の条件下で一晩培養した。得られた導入細胞を接着状態のまま、Ｃｅｌｌ－ＥＬＩＳＡに使用した。

１）－４－２　Ｃｅｌｌ－ＥＬＩＳＡ

実施例１）－４－１で調製した発現ベクター導入ＨＥＫ２９３細胞の培養上清を除去後、ｐｃＤＮＡ－ＤＥＳＴ４０－ＦＧＦＲ２ＩＩＩｂまたはｐｃＤＮＡ－ＤＥＳＴ４０導入ＨＥＫ２９３細胞のそれぞれに対しハイブリドーマ培養上清を添加し、４℃で１時間静置した。ウェル中の細胞を５％　ＦＢＳ含有ＰＢＳで１回洗浄後、５％　ＦＢＳ含有ＰＢＳで５００倍に希釈したＡｎｔｉ－Ｒａｔ　ＩｇＧ－Ｐｅｒｏｘｉｄａｓｅ　ａｎｔｉｂｏｄｙ　ｐｒｏｄｕｃｅｄ　ｉｎ　ｒａｂｂｉｔ（ＳＩＧＭＡ社製）を加えて、４℃で１時間静置した。ウェル中の細胞を５％　ＦＢＳ含有ＰＢＳで５回洗浄した後、ＯＰＤ発色液（ＯＰＤ溶解液（０．０５　Ｍ　クエン酸３ナトリウム、０．１Ｍ　リン酸水素２ナトリウム・１２水　ｐＨ４．５）にｏ－フェニレンジアミン二塩酸塩（和光純薬社製）、H_2O_2をそれぞれ０．４ｍｇ／ｍｌ、０．６％（ｖ／ｖ）になるように溶解）を２５μｌ／ウェルで添加した。時々攪拌しながら発色反応を行い、１Ｍ　ＨＣｌを２５μｌ／ウェルを添加して発色反応を停止させた後、プレートリーダー（ＥＮＶＩＳＩＯＮ：ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ社）で４９０ｎｍの吸光度を測定した。細胞膜表面上に発現するＦＧＦＲ２に特異的に結合する抗体を産生するハイブリドーマを選択するため、コントロールのｐｃＤＮＡ－ＤＥＳＴ４０導入ＨＥＫ２９３細胞と比較し、ｐｃＤＮＡ－ＤＥＳＴ４０－ＦＧＦＲ２ＩＩＩｂ発現ベクター導入ＨＥＫ２９３細胞の方でより高い吸光度を示す培養上清を産生するハイブリドーマを抗ＦＧＦＲ２抗体産生陽性として選択した。

1）－5　フローサイトメトリーによる抗体スクリーニング

1）－5－1　フローサイトメトリー解析用抗原遺伝子発現細胞の調製

ＨＥＫ２９３Ｔ細胞を５×１０^{4}細胞／ｃｍ^{2}になるよう２２５平方ｃｍフラスコ（住友ベークライト社製）に播種し、１０％　ＦＢＳ含有ＤＭＥＭ培地中で３７℃、５％　CO_2の条件下で一晩培養した。翌日、Ｎ末端ＩｇＤ１ドメインを欠損したｐｃＤＮＡ－ＤＥＳＴ４０－ＦＧＦＲ２ＩＩＩｂ　ＩｇＤ１欠損体とコントロールとしてｐｃＤＮＡ－ＤＥＳＴ４０をそれぞれＨＥＫ２９３Ｔ細胞にＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００を用いて導入し、３７℃、５％ CO_2の条件下でさらに一晩培養した。翌日、発現ベクター導入ＨＥＫ２９３Ｔ細胞をＴｒｙｐＬＥ　Ｅｘｐｒｅｓｓ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製）で処理し、１０％　ＦＢＳ含有ＤＭＥＭで細胞を洗浄した後、５％　ＦＢＳ含有ＰＢＳに懸濁した。得られた細胞懸濁液をフローサイトメトリー解析に使用した。

1）－5－2　フローサイトメトリー解析

実施例1）－4のＣｅｌｌ－ＥＬＩＳＡで陽性と判定されたハイブリドーマが産生する抗体のＦＧＦＲ２ＩＩＩｂに対する結合特異性をフローサイトメトリー法によりさらに確認した。実施例1）－5－1で調製したＨＥＫ２９３Ｔ細胞懸濁液を遠心し、上清を除去した後、ｐｃＤＮＡ－ＤＥＳＴ４０－ＦＧＦＲ２ＩＩＩｂ　ＩｇＤ１欠損体導入ＨＥＫ２９３Ｔ細胞およびｐｃＤＮＡ－ＤＥＳＴ４０導入ＨＥＫ２９３Ｔ細胞のそれぞれに対しハイブリドーマ培養上清を加えて懸濁し、４℃で１時間静置した。５％　ＦＢＳ含有ＰＢＳで２回洗浄した後、５％　ＦＢＳ含有ＰＢＳで３２０倍に希釈したＡｎｔｉ－Ｒａｔ　ＩｇＧ　ＦＩＴＣ　ｃｏｎｊｕｇａｔｅ（ＳＩＧＭＡ社製）を加えて懸濁し、４℃で１時間静置した。５％　ＦＢＳ含有ＰＢＳで３回洗浄した後、２μｇ／ｍｌ　７－ａｍｉｎｏａｃｔｉｎｏｍｙｃｉｎ　Ｄ（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂ

ｅｓ社製）を含む５％　ＦＢＳ含有ＰＢＳに再懸濁し、フローサイトメーター（ＦＣ５００：ＢｅｃｋｍａｎＣｏｕｌｔｅｒ社製）で検出を行った。データ解析はＦｌｏｗｊｏ（ＴｒｅｅＳｔａｒ社製）で行った。７－ａｍｉｎｏａｃｔｉｎｏｍｙｃｉｎ　Ｄ陽性の死細胞をゲートで除外した後、生細胞のＦＩＴＣ蛍光強度のヒストグラムを作成した。コントロールであるｐｃＤＮＡ－ＤＥＳＴ４０導入ＨＥＫ２９３Ｔ細胞の蛍光強度ヒストグラムに対しｐｃＤＮＡ－ＤＥＳＴ４０－ＦＧＦＲ２ＩＩＩｂ　ＩｇＤ１欠損体導入ＨＥＫ２９３Ｔ細胞のヒストグラムが強蛍光強度側にシフトしているサンプルを産生するハイブリドーマを抗ＦＧＦＲ２ＩＩＩｂ抗体産生ハイブリドーマとして取得した。

１）－６　シグナル中和作用スクリーニング

得られたハイブリドーマが産生する抗ＦＧＦＲ２抗体のシグナル中和作用を評価するため、リガンドであるＦＧＦ７刺激によるＦＧＦＲ２活性化により誘導されるＥＲＫ（細胞外シグナル制御キナーゼ）活性化を検出するＥｌｋ１ルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイ系を以下に示す方法で構築し、取得抗体の作用を評価した。

１）－６－１　レポーターアッセイ用ベクターの構築

まず始めにｐＦＲ－ＬｕｃＣＰベクターを構築した。ｐＦＲ－Ｌｕｃ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ　＃２１９００５）をＨｉｎｄＩＩＩで切断して末端をＴ４ＤＮＡ　ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ で平滑化した後、ＢａｍＨＩで切断し、５個のＧＡＬ４ 結合エレメントとＴＡＴＡ　ｂｏｘを含む１４０ｂｐ の断片を取り出した。次にｐＧＬ４．１２［ｌｕｃ２ＣＰ］（Ｐｒｏｍｅｇａ　＃Ｅ６６６１）をＥｃｏＩＣＲＩとＢｇｌＩＩで切断して脱リン酸化した後、前記の１４０ｂｐの断片とライゲーションしｐＦＲ－Ｌｕｃ２ＣＰベクターを作製した。

１）－６－２　Ｅｌｋ１ルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイ

実施例１）－５で選択したハイブリドーマ培養上清を用いて、Ｅｌｋ１ルシ

フェラーゼレポーター遺伝子アッセイを実施した。インテグリンαvおよびインテグリンβ3発現ベクターをHEK293細胞内に安定形質移入した細胞株293αに対して、Lipofectamine 2000（Invitrogen社製）を用いた形質移入手順に従い、pcDNA-DEST40-FGFR2IIIb、pcDNA-DEST40、pFA2-Elk1（Stratagene社製）、pFR-Luc2CP、およびpGL4.74[hRluc/TK]（Promega社製）で一過性に同時トランスフェクションし、白色96ウェル細胞培養プレート（Corning社製）に播種し、37℃、5% CO_2で一晩培養した。翌日、培養上清を除去し、5% FBS-DMEMで5倍に希釈したハイブリドーマ培養上清を50 μl/well で添加し37℃、5% CO_2で1 時間培養の後、リガンドであるヒトFGF7 （R&D systems社製）を終濃度10ng/mlでウェルに添加した。6時間のインキュベーションの後、細胞溶解物を調製し、Dual-luciferaseレポーターアッセイシステム（Promega社製）を用いて、ホタルルシフェラーゼ活性（特異的シグナル）およびRenillaルシフェラーゼ活性（正規化のためのシグナル）を測定した。各ウェルのデータを正規化するために、ホタル/Renilla比を計算した。FGFR2発現HEK293レポーター細胞において、FGF7によるリガンド依存的レポーター活性化をリガンド無しの値レベルまで抑制する抗FGFR2抗体産生ハイブリドーマFR2-10、FR2-13、FR2-14を選択した。

1）-7 抗体のアイソタイプ決定

抗FGFR2抗体産生ハイブリドーマFR2-10、FR2-13、FR2-14のアイソタイプは、Rat monoclonal isotyping test kit（serotec社製）により決定された。その結果、FR2-10のアイソタイプはIgG2a、κ鎖であり、FR2-13及びFR2-14のアイソタイプはIgG1、κ鎖であることが確認された。

1）－8　モノクローナル抗体の調製

モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ移植マウスの腹水（以下「抗体精製原料」という。）から精製した。

マウス腹水は以下のように調製した。まず、7－8週齢のＢＡＬＢ／ｃＡＪｃｌ－ｎｕ／ｎｕ（日本エスエルシー社）をプリスタン（Ｓｉｇｍａ社製）処理し、約1－4週間後にＰＢＳで洗浄したハイブリドーマをマウス1匹あたり1－2×10^7細胞で腹腔内に移植した。1－2週間後に腹腔内に貯留した腹水を採取し0．22μmのフィルターを通して滅菌し抗体精製原料として用いた。

抗体はＨｉｔｒａｐ　ＭａｂＳｅｌｅｃｔ　ＳｕＲｅ（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　Ｂｉｏ－Ｓｃｉｅｎｃｅｓ社製）で精製された。抗体精製原料をカラムに添加しＰＢＳで洗浄後、2Ｍ　Ａｒｇｉｎｉｎｅ－ＨＣｌ　pH4．0で溶出した。溶出された抗体溶液は中和後、ＰＢＳにバッファー置換された。精製した抗体の濃度は、ＰＯＲＯＳ　Ｇ　20μm　Ｃｏｌｕｍｎ　ＰＥＥＫ，4．6mm×50mm，0．83ml（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ社製）に結合させた抗体を溶出し、溶出液の吸光度（Ｏ．Ｄ．280nm）を測定することにより求めた。具体的には、平衡化バッファー（30．6mMリン酸2水素ナトリウム・12水、19．5mM　リン酸1カリウム、0．15Ｍ　ＮａＣｌ、pH7．0）で平衡化したＰＯＲＯＳ　Ｇ　20μmにＰＢＳで希釈した抗体サンプルを添加し、平衡化バッファーでカラムを洗浄後、カラムに結合した抗体を溶離液（0．1％（ｖ／ｖ）　ＨＣｌ、0．15Ｍ　ＮａＣｌ）で溶出した。溶出液の吸光度（Ｏ．Ｄ．280nm）のピーク面積を測定し、次式で濃度を算出した。抗体サンプル濃度（ｍｇ／ｍｌ）＝（抗体サンプルのピーク面積）／（標準品（ヒトＩｇＧ1）のピーク面積）×標準品の濃度（ｍｇ／ｍｌ）×サンプルの希釈倍率。また、得られた抗体に含まれるエンドトキシン濃度をリムルス　ＥＳ－ＩＩ　シングルテスト　ワコー（和光純薬工業　295－51030　コントロールスタンダードエンドトキシンを含

む）と、トキシノメーター（和光純薬工業　ＥＴ－３０１、またはＥＴ－５０００）を用いて測定し、１ＥＵ／ｍｇ以下であることを確認し以下の実験に使用した。

実施例２．ラット抗ヒトＦＧＦＲ２抗体（ＦＲ２－１０、ＦＲ２－１３、ＦＲ２－１４）のｉｎ　ｖｉｔｒｏ評価

２）－１　取得ラット抗ＦＧＦＲ２抗体（ＦＲ２－１０、ＦＲ２－１３、ＦＲ２－１４）のヒトＦＧＦＲ２選択的結合性の検討

２）－１－１　ヒトＦＧＦＲ１ＩＩＩｃ、ヒトＦＧＦＲ３ＩＩＩｂ、ヒトＦＧＦＲ３ＩＩＩｃ、およびヒトＦＧＦＲ４発現ベクターの構築

ヒトＦＧＦＲ１ＩＩＩｃバリアント蛋白質（アイソフォーム１：ＮＰ＿０７５５９８）、ヒトＦＧＦＲ３ＩＩＩｂバリアント蛋白質（アイソフォーム３：ＮＰ＿００１１５６６８５）、ヒトＦＧＦＲ３ＩＩＩｃバリアント蛋白質（アイソフォーム１：ＮＰ＿０００１３３）、およびヒトＦＧＦＲ４蛋白質（アイソフォーム１：ＮＰ＿００２００２）をコードするｃＤＮＡをｐｃＤＮＡ－ＤＥＳＴ４０ベクターにクローニングし、それぞれのバリアント蛋白質を発現するベクターｐｃＤＮＡ－ＤＥＳＴ４０－ＦＧＦＲ１ＩＩＩｃ、ｐｃＤＮＡ－ＤＥＳＴ４０－ＦＧＦＲ３ＩＩＩｂ、ｐｃＤＮＡ－ＤＥＳＴ４０－ＦＧＦＲ３ＩＩＩｃ、およびｐｃＤＮＡ－ＤＥＳＴ４０－ＦＧＦＲ４を構築した。

２）－１－２　フローサイトメトリー解析

実施例１）－３－１および２）－１－１で構築した各種ヒトＦＧＦＲ発現ベクターを１）－５－１で示す方法によりＨＥＫ２９３Ｔ細胞に導入した細胞懸濁液を遠心し、上清を除去した後、各種ヒトＦＧＦＲ発現ベクター導入ＨＥＫ２９３Ｔ細胞およびｐｃＤＮＡ－ＤＥＳＴ４０導入ＨＥＫ２９３Ｔ細胞のそれぞれに対しＦＲ２－１０、ＦＲ２－１３、またはＦＲ２－１４抗体を含むハイブリドーマ培養上清を加えて懸濁し、４℃で１時間静置した。５％　ＦＢＳ含

有ＰＢＳで２回洗浄した後、５％　ＦＢＳ含有ＰＢＳで３２０倍に希釈したＡｎｔｉ－Ｒａｔ　ＩｇＧ　ＦＩＴＣ　ｃｏｎｊｕｇａｔｅ（ＳＩＧＭＡ社製）を加えて懸濁し、４℃で１時間静置した。５％　ＦＢＳ含有ＰＢＳで３回洗浄した後、２μｇ／ｍｌ　７－ａｍｉｎｏａｃｔｉｎｏｍｙｃｉｎ　Ｄ（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ社製）を含む５％　ＦＢＳ含有ＰＢＳに再懸濁し、フローサイトメーター（ＦＣ５００：ＢｅｃｋｍａｎＣｏｕｌｔｅｒ社製）で検出を行った。データ解析はＦｌｏｗｊｏ（ＴｒｅｅＳｔａｒ社製）で行った。７－ａｍｉｎｏａｃｔｉｎｏｍｙｃｉｎ　Ｄ陽性の死細胞をゲートで除外した後、生細胞のＦＩＴＣ蛍光強度のヒストグラムを作成し、平均蛍光強度（ＭＦＩ）を算出した。図１に示すとおり、ラットＦＲ２－１０抗体は、ヒトＦＧＦＲ２ＩＩＩｂ選択的に結合し、ラットＦＲ２－１３およびＦＲ２－１４抗体はヒトＦＧＦＲ２ＩＩＩｂおよびＦＧＦＲ２ＩＩＩｃの両方に対して選択的に結合することが示された。

２）－２　取得ラット抗ＦＧＦＲ２抗体（ＦＲ２－１０、ＦＲ２－１３、ＦＲ２－１４）のエピトープの同定

ＦＧＦＲ２細胞外領域に存在する３つのＩｇ様ドメインを一箇所ずつ欠失発現するベクターを用いて、取得ラット抗ＦＧＦＲ２抗体が結合するエピトープを同定した。１）－３－２で構築したＦＧＦＲ２ＩＩＩｂのＩｇＤ１、ＩｇＤ２、ＩｇＤ３欠損体発現ベクターを実施例１）－５－１で示す方法によりＨＥＫ２９３Ｔ細胞に導入した細胞懸濁液を遠心し、上清を除去した後、各Ｉｇ様ドメイン欠損ＦＧＦＲ２ＩＩＩｂ発現ベクター導入ＨＥＫ２９３Ｔ細胞およびｐｃＤＮＡ－ＤＥＳＴ４０導入ＨＥＫ２９３Ｔ細胞のそれぞれに対しＦＲ２－１０、ＦＲ２－１３、またはＦＲ２－１４抗体を含むハイブリドーマ培養上清を加えて懸濁し、４℃で１時間静置した。５％　ＦＢＳ含有ＰＢＳで２回洗浄した後、５％　ＦＢＳ含有ＰＢＳで３２０倍に希釈したＡｎｔｉ－Ｒａｔ　ＩｇＧ　ＦＩＴＣ　ｃｏｎｊｕｇａｔｅ（ＳＩＧＭＡ社製）を加えて懸濁し、４℃

で1時間静置した。5％　FBS含有PBSで3回洗浄した後、2μg／ml 7－aminoactinomycin D（Molecular Probes社製）を含む5％　FBS含有PBSに再懸濁し、フローサイトメーター（FC500：BeckmanCoulter社製）で検出を行った。データ解析はFlowjo（TreeStar社製）で行った。7－aminoactinomycin　D陽性の死細胞をゲートで除外した後、生細胞のFITC蛍光強度のヒストグラムを作成し、平均蛍光強度（MFI）を算出した。図2に示すとおり、ラットFR2－10抗体は、ヒトFGFR2IIIbのIg様ドメイン3に結合することが示された。一方、ヒトFGFR2IIIcにも結合性を示すラットFR2－13およびFR2－14抗体はヒトFGFR2IIIbとFGFR2IIIcで共通するIg様ドメイン2に結合することが示された。

2）－3　取得ラット抗FGFR2抗体（FR2－10、FR2－13、FR2－14）のシグナル中和作用

Elk1ルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイにより取得抗体のシグナル中和作用を評価するため、実施例1）－3－1で構築したpcDNA－DEST40－FGFR2IIIbまたはpcDNA－DEST40－FGFR2IIIcと、pFA2－Elk1（Stratagene社製）、pFR－Luc2CP、およびpGL4．74［hRluc／TK］（Promega社製）を実施例1）－6－2で示す方法により293α細胞に導入し、37℃、5％ CO_2で一晩培養した。翌日、培養上清を除去後、2％　FBSを含むDMEMで希釈したラットFR2－10、FR2－13、またはFR2－14抗体と共に1時間プレインキュベートし、次いで、リガンドであるヒトFGF7（R&D systems社製）またはヒトFGF9、peprotech社製）を終濃度10ng/mlでウェルに添加した。6時間のインキュベーションの後Dual－Glo Luciferase Assay System（Pro

ｍｅｇａ社製）を用いて、ホタルルシフェラーゼ活性（特異的シグナル）およびＲｅｎｉｌｌａルシフェラーゼ活性（正規化のためのシグナル）を測定した。各ウェルのデータを正規化するために、ホタル／Ｒｅｎｉｌｌａ比を計算した。図３Ａに示す通り、ラットＦＲ２－１０、ＦＲ２－１３、ＦＲ２－１４は、ＦＧＦＲ２ＩＩＩｂ発現細胞において、ＦＧＦ７によるリガンド依存的レポーター活性化を抑制した。また、図３Ｂに示す通り、ラットＦＲ２－１３、ＦＲ２－１４は、ＦＧＦＲ２ＩＩＩｃ発現細胞において、ＦＧＦ９によるリガンド依存的レポーター活性を抑制した。以上の結果、これらの抗体はＦＧＦＲ２のリガンドによる活性化を阻害する作用を有することが明らかとなった。

２）－４　取得ラット抗ＦＧＦＲ２抗体（ＦＲ２－１０）のヒト癌細胞株におけるＦＧＦＲ２シグナル抑制作用

ＦＧＦＲ２を内在的に発現する胃癌細胞株ＳＮＵ－１６を用いて、取得抗体のＦＧＦＲ２シグナル抑制作用を検証した。１２ウェルプレート上に、０．１％のウシ血清アルブミン－ＲＰＭＩ培地で懸濁したＳＮＵ－１６細胞（3×10^6）を播き、終夜インキュベーションした。ラットＦＲ２－１０抗体を添加して３７℃で１時間インキュベーションの後に、１０ｎｇ／ｍｌのＦＧＦ７（Ｒ＆Ｄ　ｓｙｓｔｅｍｓ社製）を添加し、さらに、１０分間インキュベートした。次いで、ｃｏｍｐｌｅｔｅ　ｍｉｎｉ（Ｒｏｃｈｅ社製）およびホスファターゼ阻害剤（Ｎａｋａｒａｉ　ｔｅｓｑｕｅ社製）を含有するＲＩＰＡバッファー（１％　ＮＰ－４０，０．５％　Ｓｏｄｉｕｍ　ｄｅｏｘｙｃｈｏｌａｔｅ，０．１％　ＳＤＳ　ｉｎ　ＰＢＳ）で細胞を溶解させた。その細胞溶解液から溶解物を遠心分離し、ＢＣＡタンパク質アッセイ（ＰＩＥＲＣＥ社製）を用いてタンパク質濃度を決定した。溶解物をＤＴＴを含有するバッファー中に再懸濁し、９９℃で５分間変性させた。５～２０％のゲルにおけるＳＤＳ－ＰＡＧＥによって、タンパク質（２０μｇ／レーン）を分離した。ＰＶＤＦ膜（ＢｉｏＲａｄ社製）上にタンパク質をブロッティングした。その膜を室温で１時間、

５％スキムミルク（雪印）－ＴＢＳ－Ｔ（２mＭ　Ｔｒｉｓ，５０mＭ　ＮａＣｌ，０．１％　Ｔｗｅｅｎ－２０（ｐＨ７．４））でブロックした後、ＦＧＦＲ２、リン酸化ＦＧＦＲ２（ｐ－ＦＧＦＲ２）、ＦＲＳ２、リン酸化ＦＲＳ２（ｐ－ＦＲＳ２）、ＥＲＫ、リン酸化ＥＲＫ（ｐ－ＥＲＫ）抗体を添加して４℃で一終夜インキュベートした。洗浄の後、膜をホースラディッシュペルオキシダーゼ結合抗ウサギ二次抗体（Ａｍｅｒｓｈａｍ）と共にインキュベートした。ＥＣＬ　ｐｌｕｓ基質（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を用いて、Ｘ線フィルムで免疫反応性バンドを可視化した。図４に示すとおり、リガンドＦＧＦ７刺激によってＦＧＦＲ２、ＦＲＳ２，ＥＲＫのリン酸化が亢進し、ラットＦＲ２－１０抗体の添加濃度依存的にこれらの分子のリン酸化の亢進が抑制された。

実施例３．ラット抗ヒトＦＧＦＲ２抗体（ＦＲ２－１０、ＦＲ２－１３、ＦＲ２－１４）の可変領域をコードするｃＤＮＡの塩基配列の決定

３）－１　ラットＦＲ２－１０、ＦＲ２－１３、及びＦＲ２－１４の重鎖と軽鎖のＮ末端アミノ酸配列の同定

ラットＦＲ２－１０、ＦＲ２－１３、及びＦＲ２－１４抗体の重鎖と軽鎖のＮ末端アミノ酸配列を同定するために、実施例１）－８で精製したラットＦＲ２－１０、ＦＲ２－１３、及びＦＲ２－１４抗体をそれぞれＳＤＳ－ＰＡＧＥで分離した。分離後のゲルからＳｅｑｕｉ－Ｂｌｏｔ　ＰＶＤＦ膜（ＢＩＯ－ＲＡＤ社）にゲル中のタンパク質を転写し、洗浄バッファー（２５mＭ　ＮａＣｌ、１０mＭ　ホウ酸ナトリウムバッファー　ｐＨ８．０）で洗浄した後、染色液（５０％　メタノール、２０％　酢酸、０．０５％　クマシーブリリアントブルー）に５分間浸して染色してから、９０％　メタノールで脱色した。ＰＶＤＦ膜上で可視化されたそれぞれの重鎖（移動度が小さい方のバンド）および軽鎖（移動度が大きい方のバンド）に相当するバンド部分を切りとり、Ｐｒｏｃｉｓｅ　ｃＬＣ　プロテインシーケンサー　Ｍｏｄｅｌ　４９２ｃＬＣ（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）を用いて、自動エドマン法（Ｅｄ

man et al. (1967) Eur. J. Biochem. 1, 80参照）によりそれぞれのN末端アミノ酸配列の同定を試みた。その結果、FR2－10の重鎖に相当するバンドのN末端のアミノ酸配列は、EVQLVESGGGLV（配列表の配列番号1：図9）であり、軽鎖に相当するバンドのN末端アミノ酸配列は、DIQMTQSPSSLSA（配列表の配列番号2：図10）であった。

FR2－13の重鎖に相当するバンドのN末端のアミノ酸配列は、QVKLL（配列表の配列番号3：図11）であり、軽鎖に相当するバンドのN末端アミノ酸配列は、DIQMTQSPASLSASLGE（配列表の配列番号4：図12）であった。

FR2－14の重鎖に相当するバンドのN末端のアミノ酸配列は、QVKLL（配列表の配列番号5：図13）であり、軽鎖に相当するバンドのN末端アミノ酸配列は、DIQMTQSPASLSASLGE（配列表の配列番号6：図14）であった。

3）－2 FR2－10、FR2－13、及びFR2－14産生ハイブリドーマからのmRNAの調製

FR2－10、FR2－13、及びFR2－14の可変領域を含むcDNAを増幅するため、FR2－10、FR2－13、及びFR2－14産生ハイブリドーマよりmRNA Isolation kit（Roche applied science社）を用いてそれぞれの細胞からmRNAを調製した。

3）－3 cDNA（5'－RACE－Ready cDNA）の合成

cDNA（5'－RACE－Ready cDNA）の合成は実施例3）－2で調製したmRNAの70ngを用い、PrimeScript Reverse Transcriptase（TAKARA社）とSMART RACE cDNA Amplification Kit（CLONTECH社）を用

いて実施した。

3）－4　5’-RACE　PCRによるFR2－10、FR2－13、及びFR2－14の重鎖可変領域を含むcDNAの増幅と配列の決定

FR2－10の重鎖のアイソタイプがIgG2aであり、FR2－13、及びFR2－14のそれがIgG1であることから（実施例1）－7）、重鎖遺伝子の可変領域のcDNAをPCRで増幅するためのプライマーとして、UPM（Universal Primer A Mix：SMART RACE cDNA Amplification Kitに付属）、及び、5’－GAGTTACTTTTGAGAGCAGTTCCAGGAG－3’（RG1R1：配列表の配列番号7：図15）の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを用いた。UPMはSMART RACE cDNA Amplification Kit（CLONTECH社）に付属のものを使用し、RG1R1はデータベースのラット重鎖（IgG2a及びIgG1）の定常領域の配列から設計した。

このプライマーの組み合わせと、実施例3）－3で合成したcDNA（5’－RACE－Ready cDNA）を鋳型とした5’－RACE　PCRによりFR2－10、FR2－13、及びFR2－14の重鎖の可変領域を含むcDNAをそれぞれ増幅した。PCRは、PolymeraseとしてKOD－Plus－（TOYOBO社）を用い、SMART RACE cDNA Amplification Kit（CLONTECH社）のマニュアルに従い、タッチダウンPCRプログラムで実施した。

5’－RACE　PCRで増幅したそれぞれの重鎖の可変領域を含むcDNAをMinElute PCR Purification Kit（QIAGEN社）を用いて精製した後に、塩基配列のシークエンス解析を実施した。

シークエンスプライマーとして、5’－GAGTTACTTTTGAGAGCAGTTCCAGGAG－3’（RG1R1：配列表の配列番号7：図15）の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを用いた。

さらに、このシークエンス解析結果をもとに、下記に示すそれぞれのｃＤＮＡの相補鎖に対するシークエンスプライマーを設計して塩基配列のシークエンス解析を実施した。

ＦＲ２－１０用のシークエンスプライマー

５’－ＧＧＴＴＣＴＣＣＣＡＣＴＣＡＧＴＡＡＴＣ－３’（１０ＨＦ：配列表の配列番号８：図１６）

ＦＲ２－１３用のシークエンスプライマー

５’－ＣＡＴＡＴＧＡＴＣＡＧＴＧＴＣＣＴＣＴＣ－３’（１３ＨＦ：配列表の配列番号９：図１７）

ＦＲ２－１４用のシークエンスプライマー

５’－ＡＴＡＴＧＡＴＣＡＧＴＧＴＣＣＴＣＴＣＣ－３’（１４ＨＦ：配列表の配列番号１０：図１８）

シークエンス解析は遺伝子配列解析装置（「ＡＢＩ　ＰＲＩＳＭ　３７００　ＤＮＡ　Ａｎａｌｙｚｅｒ；Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ」あるいは「Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ　３７３０ｘｌ　Ａｎａｌｙｚｅｒ；Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ」）を用いて実施し、シークエンス反応は、ＧｅｎｅＡｍｐ　９７００（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ社）を用いた。

決定されたＦＲ２－１０、ＦＲ２－１３、及びＦＲ２－１４の重鎖の可変領域をコードするｃＤＮＡの塩基配列、ならびに、該可変領域のアミノ酸配列を、配列表の配列番号１１、１３、および１５、ならびに、配列番号１２、１４、および１６（図１９、２１及び２３、ならびに、図２０、２２及び２４）にそれぞれ示した。

塩基配列より決定されたＦＲ２－１０、ＦＲ２－１３、及びＦＲ２－１４の重鎖の可変領域のアミノ酸配列は実施例３）－１で決定したＮ末端アミノ酸配

列と一致した。

3）－5　5’-RACE　PCRによるFR2－10の軽鎖可変領域を含むcDNAの増幅と配列の決定

FR2－10の軽鎖のアイソタイプがκであることから（実施例1）－7）、軽鎖遺伝子の可変領域のcDNAをPCRで増幅するためのプライマーとして、UPM（Universal Primer A Mix：SMART RACE cDNA Amplification Kitに付属）及び5’－TTCATGAGGCACACGACTGAGGCACCTCC－3’（RKR3：配列表の配列番号17：図25）の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを用いた。UPMはSMART RACE cDNA Amplification Kit（CLONTECH社）に付属のものを使用し、RKR3はデータベースのラット軽鎖の定常領域の配列から設計した。

このプライマーの組み合わせと、実施例3）－3で合成したcDNA（5’-RACE-Ready cDNA）を鋳型とした5’－RACE　PCRによりFR2－10の軽鎖の可変領域を含むcDNAを増幅した。PCRは、PolymeraseとしてKOD－Plus－（TOYOBO社）を用い、SMART RACE cDNA Amplification Kit（CLONTECH社）のマニュアルに従い、タッチダウンPCRプログラムで実施した。5’－RACE　PCRで増幅したそれぞれの軽鎖の可変領域を含むcDNAをMinElute PCR Purification Kit（QIAGEN社）を用いて精製した後に、塩基配列のシークエンス解析を実施した。

シークエンスプライマーとして、データベースのラット軽鎖の定常領域の配列から設計した5’－TCCAGTTGCTAACTGTTCCG－3’（sqRK：配列表の配列番号18：図26）の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを用いた。

さらに、このシークエンス解析結果をもとに、下記に示すそれぞれのcDN

Ａの相補鎖に対するシークエンスプライマーを設計して塩基配列のシークエンス解析を実施した。

ＦＲ２－１０用のシークエンスプライマー

5’－ＣＡＧＴＧＧＴＡＴＣＡＡＣＧＣＡＧＡＧ－３’（１０ＬＦ：配列表の配列番号１９：図２７）

シークエンス解析及びシークエンス反応は前述のとおりに行った。

決定されたＦＲ２－１０の軽鎖の可変領域をコードするｃＤＮＡの塩基配列、および、該可変領域のアミノ酸配列を、配列表の配列番号２０、および、配列番号２１（図２８及び２９）にそれぞれ示した。

塩基配列より決定されたＦＲ２－１０の軽鎖の可変領域のアミノ酸配列は実施例３）－１で決定したＮ末端アミノ酸配列と一致した。

３）－６　5’-ＲＡＣＥ　ＰＣＲによるＦＲ２－１３、及びＦＲ２－１４の軽鎖可変領域を含むｃＤＮＡの増幅と配列の決定

ＦＲ２－１３、及びＦＲ２－１４の軽鎖のアイソタイプがκであることから（実施例１）－７）、軽鎖遺伝子の可変領域のｃＤＮＡをＰＣＲで増幅するためのプライマーとして、ＵＰＭ（Ｕｎｉｖｅｒｓａｌ　Ｐｒｉｍｅｒ　Ａ　Ｍｉｘ：ＳＭＡＲＴ　ＲＡＣＥ　ｃＤＮＡ　Ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ　Ｋｉｔに付属）、及び5’－ＴＡＣＧＴＧＣＴＧＴＣＴＴＴＧＣＴＧＴＣＣＴＧＡＴＣＡＧ－３’（ＲＫＲ６：配列表の配列番号２２：図３０）の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを用いた。ＵＰＭはＳＭＡＲＴ　ＲＡＣＥ　ｃＤＮＡ　Ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ　Ｋｉｔ（ＣＬＯＮＴＥＣＨ社）に付属のものを使用し、ＲＫＲ６はデータベースのラット軽鎖の定常領域の配列から設計した。

このプライマーの組み合わせと、実施例３）－３で合成したｃＤＮＡ（5’－ＲＡＣＥ－Ｒｅａｄｙ　ｃＤＮＡ）を鋳型とした5’－ＲＡＣＥ　ＰＣＲに

よりＦＲ２－１３、及びＦＲ２－１４の軽鎖遺伝子の可変領域を含むｃＤＮＡを増幅した。ＰＣＲは、ＰｏｌｙｍｅｒａｓｅとしてＫＯＤ－Ｐｌｕｓ－（ＴＯＹＯＢＯ社）を用い、ＳＭＡＲＴ ＲＡＣＥ ｃＤＮＡ Ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ Ｋｉｔ（ＣＬＯＮＴＥＣＨ社）のマニュアルに従い、タッチダウンＰＣＲプログラムで実施した。

５’－ＲＡＣＥ ＰＣＲで増幅したそれぞれの軽鎖の可変領域を含むｃＤＮＡをＭｉｎＥｌｕｔｅ ＰＣＲ Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ Ｋｉｔ（ＱＩＡＧＥＮ社）を用いて精製後、Ｚｅｒｏ Ｂｌｕｎｔ ＴＯＰＯ ＰＣＲ Ｃｌｏｎｉｎｇ Ｋｉｔ（ＩＮＶＩＴＲＯＧＥＮ社）を用いてクローニングし、クローニングした軽鎖の可変領域を含むｃＤＮＡの塩基配列のシークエンス解析を実施した。

シークエンスプライマーとして、データベースのラット軽鎖の定常領域の配列から設計した５’－ＴＴＣＡＴＧＡＧＧＣＡＣＡＣＧＡＣＴＧＡＧＧＣＡＣＣＴＣＣ－３’（ＲＫＲ３：配列表の配列番号１７：図２５）の塩基配列を有するオリゴヌクレオチド、及びＮＵＰ（Ｎｅｓｔｅｄ Ｕｎｉｖｅｒｓａｌ Ｐｒｉｍｅｒ Ａ：ＳＭＡＲＴ ＲＡＣＥ ｃＤＮＡ Ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ Ｋｉｔに付属）を用いた。

シークエンス解析及びシークエンス反応は前述のとおりに行った。

決定されたＦＲ２－１３、及びＦＲ２－１４の軽鎖の可変領域をコードするｃＤＮＡの塩基配列、ならびに、該可変領域のアミノ酸配列を、配列表の配列番号２３及び２５（図３１及び３３）、ならびに、配列番号２４及び２６（図３２及び３４）にそれぞれ示した。

塩基配列より決定されたＦＲ２－１３及びＦＲ２－１４の軽鎖の可変領域のアミノ酸配列は実施例３）－１で決定したＮ末端アミノ酸配列と一致した。

実施例４．ヒトキメラ化抗ＦＧＦＲ２抗体（ｃＦＲ２－１０、ｃＦＲ２－１３、ｃＦＲ２－１４）の作製

4）－1　キメラ化及びヒト化軽鎖発現ベクターｐＣＭＡ－ＬＫの構築

プラスミドｐｃＤＮＡ３．３-ＴＯＰＯ／ＬａｃＺ（ＩＮＶＩＴＲＯＧＥＮ社）を制限酵素ＸｂａＩ及びＰｍｅＩで消化して得られる約５．４ｋｂのフラグメントと、配列表の配列番号２７（図３５）に示すヒトκ鎖分泌シグナル及びヒトκ鎖定常領域をコードするＤＮＡ配列を含むＤＮＡ断片をＩｎ－Ｆｕｓｉｏｎ　Ａｄｖａｎｔａｇｅ　ＰＣＲクローニングキット（ＣＬＯＮＴＥＣＨ社）を用いて結合して、ｐｃＤＮＡ３．３／ＬＫを作製した。

ｐｃＤＮＡ３．３／ＬＫを鋳型として、下記プライマーセットでＰＣＲを行い、得られた約３．８ｋｂのフラグメントをリン酸化後セルフライゲーションすることによりＣＭＶプロモーターの下流にシグナル配列、クローニングサイト、及びヒトκ鎖定常領域を持つ、キメラ化及びヒト化軽鎖発現ベクターｐＣＭＡ－ＬＫを構築した。

プライマーセット

５’－ｔａｔａｃｃｇｔｃｇａｃｃｔｃｔａｇｃｔａｇａｇｃｔｔｇｇｃ－３’

（３．３－Ｆ１：配列表の配列番号２８：図３６）

５’－ｇｃｔａｔｇｇｃａｇｇｇｃｃｔｇｃｃｇｃｃｃｃｇａｃｇｔｔｇ－３’

（３．３－Ｒ１：配列表の配列番号２９：図３７）

4）－2　キメラ化及びヒト化ＩｇＧ１タイプ重鎖発現ベクターｐＣＭＡ－Ｇ１の構築

ｐＣＭＡ－ＬＫをＸｂａＩ及びＰｍｅＩで消化してκ鎖分泌シグナル及びヒトκ鎖定常領域を取り除いたＤＮＡ断片と、配列表の配列番号３０（図３８）で示されるヒト重鎖シグナル配列及びヒトＩｇＧ１定常領域のアミノ酸をコードするＤＮＡ配列を含むＤＮＡ断片をＩｎ－Ｆｕｓｉｏｎ　Ａｄｖａｎｔａｇｅ　ＰＣＲクローニングキット（ＣＬＯＮＴＥＣＨ社）を用いて結合して、ＣＭＶプロモーターの下流にシグナル配列、クローニングサイト、ヒトＩｇＧ１

重鎖定常領域をもつキメラ化及びヒト化ＩｇＧ１タイプ重鎖発現ベクターｐＣＭＡ－Ｇ１を構築した。

４）－３　ヒトキメラ化ＦＲ２－１０軽鎖発現ベクターの構築

実施例３）で得られたＦＲ２－１０軽鎖の可変領域を含むｃＤＮＡをテンプレートとして、ＫＯＤ－Ｐｌｕｓ－（ＴＯＹＯＢＯ社）と下記のプライマーセットで軽鎖の可変領域をコードするｃＤＮＡを含むＤＡＮ断片を増幅し、キメラ化及びヒト化抗体軽鎖発現汎用ベクターｐＣＭＡ－ＬＫを制限酵素ＢｓｉＷＩで切断した箇所にＩｎ－Ｆｕｓｉｏｎ　Ａｄｖａｎｔａｇｅ　ＰＣＲクローニングキット（ＣＬＯＮＴＥＣＨ社）を用いて挿入することにより、ヒトキメラ化ＦＲ２－１０軽鎖発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターを「ｐＣＭＡ－ＬＫ／ｃＦＲ２－１０」と命名した。ヒトキメラ化ＦＲ２－１０軽鎖の塩基配列及び該軽鎖のアミノ酸配列を、配列表の配列番号３１及び３２（図３９及び４０）にそれぞれ示す。

ヒトキメラ化ＦＲ２－１０軽鎖用プライマーセット

５’－ａｔｃｔｃｃｇｇｃｇｃｇｔａｃｇｇｃｇａｃａｔｃｃａｇａｔｇａｃｃｃａｇｔｃｔｃｃａｔｃｔｔｃｃ－３’（ｃ１０－ＬＦ：配列表の配列番号３３：図４１）

５’－ｇｇａｇｇｇｇｇｃｇｇｃｃａｃａｇｃｃｃｇｔｔｔｔａｔｔｔｃｃａａｃｔｔｃｇｔｃｃｃｔｇ－３’（ｃ１０－ＬＲ：配列表の配列番号３４：図４２）

４）－４　ヒトキメラ化ＦＲ２－１０重鎖発現ベクターの構築

実施例３）で得られたＦＲ２－１０重鎖の可変領域をコードするｃＤＮＡをテンプレートとして、ＫＯＤ－Ｐｌｕｓ－（ＴＯＹＯＢＯ社）と下記のプライマーセットで重鎖の可変領域をコードするｃＤＮＡを含むＤＮＡ断片を増幅し、

キメラ化及びヒト化ＩｇＧ１タイプ重鎖発現ベクターｐＣＭＡ－Ｇ１を制限酵素ＢｌｐＩで切断した箇所にＩｎ－Ｆｕｓｉｏｎ　Ａｄｖａｎｔａｇｅ　ＰＣＲクローニングキット（ＣＬＯＮＴＥＣＨ社）を用いて挿入することにより、ヒトキメラ化ＦＲ２－１０重鎖発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターを「ｐＣＭＡ－Ｇ１／ｃＦＲ２－１０」と命名した。ヒトキメラ化ＦＲ２－１０重鎖をコードする塩基配列及び該重鎖のアミノ酸配列を、配列表の配列番号３５及び３６（図４３及び４４）にそれぞれ示す。

ヒトキメラ化ＦＲ２－１０重鎖用プライマーセット

５’－ｃｃａｇａｔｇｇｇｔｇｃｔｇａｇｃｇａｇｇｔｇｃａｇｃｔｇｇｔｇｇａｇｔｃｔｇｇｇｇｇａｇｇｃ－３’（ｃ１０－ＨＦ：配列表の配列番号３７：図４５）

５’－ｃｔｔｇｇｔｇｇａｇｇｃｔｇａｇｃｔｇａｃａｇｔｇａｃｔｇａａｇｔｔｃｃｔｔｇａｃｃｃｃａｇｇｃ－３’（ｃ１０－ＨＲ：配列表の配列番号３８：図４６）

４）－５　ヒトキメラ化ＦＲ２－１３軽鎖発現ベクターの構築

実施例３）で得られたＦＲ２－１３軽鎖の可変領域をコードするｃＤＮＡをテンプレートとして、ＫＯＤ－Ｐｌｕｓ－（ＴＯＹＯＢＯ社）と下記のプライマーセットで軽鎖の可変領域をコードするｃＤＮＡを含むＤＮＡ断片を増幅し、キメラ化及びヒト化抗体軽鎖発現汎用ベクターｐＣＭＡ－ＬＫを制限酵素ＢｓｉＷＩで切断した箇所にＩｎ－Ｆｕｓｉｏｎ　Ａｄｖａｎｔａｇｅ　ＰＣＲクローニングキット（ＣＬＯＮＴＥＣＨ社）を用いて挿入することにより、ヒトキメラ化ＦＲ２－１３軽鎖発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターを「ｐＣＭＡ－ＬＫ／ｃＦＲ２－１３」と命名した。ヒトキメラ化ＦＲ２－１３軽鎖をコードする塩基配列及び該軽鎖のアミノ酸を、配列表の配列番号３９及び４０（図４７及び４８）にそれぞれ示した。

ヒトキメラ化ＦＲ２－１３軽鎖用プライマーセット

５’－ａｔｃｔｃｃｇｇｃｇｃｇｔａｃｇｇｃｇａｃａｔｃｃａｇａｔｇａｃａｃａｇｔｃｔｃｃａｇｃｔｔｃｃ－３’（ｃ１３－ＬＦ：配列表の配列番号４１：図４９）

５’－ｇｇａｇｇｇｇｇｃｇｇｃｃａｃａｇｃｃｃｇｔｔｔｃａｇｔｔｃｃａｇｃｔｔｇｇｔｃｃｃａａｃ－３’（ｃ１３－ＬＲ：配列表の配列番号４２：図５０）

４）－６　ヒトキメラ化ＦＲ２－１３重鎖発現ベクターの構築

実施例３）で得られたＦＲ２－１３重鎖の可変領域をコードするｃＤＮＡをテンプレートとして、ＫＯＤ－Ｐｌｕｓ－（ＴＯＹＯＢＯ社）と下記のプライマーセットで重鎖の可変領域をコードするｃＤＮＡを含むＤＮＡ断片を増幅し、キメラ化及びヒト化ＩｇＧ１タイプ重鎖発現ベクターｐＣＭＡ－Ｇ１を制限酵素ＢｌｐＩで切断した箇所にＩｎ－Ｆｕｓｉｏｎ　Ａｄｖａｎｔａｇｅ　ＰＣＲクローニングキット（ＣＬＯＮＴＥＣＨ社）を用いて挿入することにより、ヒトキメラ化ＦＲ２－１３重鎖発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターを「ｐＣＭＡ－Ｇ１／ｃＦＲ２－１３」と命名した。ヒトキメラ化ＦＲ２－１３重鎖をコードする塩基配列及び該重鎖のアミノ酸配列を、配列表の配列番号４３及び４４（図５１及び５２）にそれぞれ示す。

ヒトキメラ化ＦＲ２－１３重鎖用プライマーセット

５’－ｃｃａｇａｔｇｇｇｔｇｃｔｇａｇｃｃａｇｇｔｔａａｇｃｔｇｃｔｇｃａｇｔｃｔｇｇｇｇｃｔｇａｇ－３’（ｃ１３－ＨＦ：配列表の配列番号４５：図５３）

５’－ｃｔｔｇｇｔｇｇａｇｇｃｔｇａｇｃｔｇａｃａｇｔｇａｃｃａｇａｇｔｇｃｃｔｔｇｇｃｃｃｃａｇ－３’（ｃ１３－ＨＲ：配列表の配列番号４６：

図５４）

４）－７　ヒトキメラ化ＦＲ２－１４軽鎖発現ベクターの構築

実施例３）で得られたＦＲ２－１４軽鎖の可変領域をコードするｃＤＮＡをテンプレートとして、ＫＯＤ－Ｐｌｕｓ－（ＴＯＹＯＢＯ社）と下記のプライマーセットで軽鎖の可変領域をコードするｃＤＮＡを含むＤＮＡ断片を増幅し、キメラ及びヒト化抗体軽鎖発現汎用ベクターｐＣＭＡ－ＬＫを制限酵素ＢｓｉＷＩで切断した箇所にＩｎ－Ｆｕｓｉｏｎ　Ａｄｖａｎｔａｇｅ　ＰＣＲクローニングキット（ＣＬＯＮＴＥＣＨ社）を用いて挿入することにより、ヒトキメラ化ＦＲ２－１４軽鎖発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターを「ｐＣＭＡ－ＬＫ／ｃＦＲ２－１４」と命名した。ヒトキメラ化ＦＲ２－１４軽鎖をコードする塩基配列及び該軽鎖のアミノ酸配列を、配列表の配列番号４７及び４８（図５５及び５６）にそれぞれ示す。

ヒトキメラ化ＦＲ２－１４軽鎖用プライマーセット

５’－ａｔｃｔｃｃｇｇｃｇｃｇｔａｃｇｇｃｇａｃａｔｃｃａｇａｔｇａｃａｃａｇｔｃｔｃｃａｇｃｔｔｃｃ－３’（ｃ１３－ＬＦ：配列表の配列番号４１：図４９）

５’－ｇｇａｇｇｇｇｇｃｇｇｃｃａｃａｇｃｃｃｇｔｔｃａｇｔｔｃｃａｇｃｔｔｇｇｔｃｃｃａｇｃ－３’（ｃ１４－ＬＲ：配列表の配列番号４９：図５７）

４）－８　ヒトキメラ化ＦＲ２－１４重鎖発現ベクターの構築

実施例３）で得られたＦＲ２－１４重鎖の可変領域をコードするｃＤＮＡをテンプレートとして、ＫＯＤ－Ｐｌｕｓ－（ＴＯＹＯＢＯ社）と下記のプライマーセットで重鎖の可変領域をコードするｃＤＮＡを含むＤＮＡ断片を増幅し、キメラ化及びヒト化ＩｇＧ１タイプ重鎖発現ベクターｐＣＭＡ－Ｇ１を制限酵

素ＢｌｐＩで切断した箇所にＩｎ－Ｆｕｓｉｏｎ Ａｄｖａｎｔａｇｅ ＰＣＲクローニングキット（ＣＬＯＮＴＥＣＨ社）を用いて挿入することにより、ヒトキメラ化ＦＲ２－１４重鎖発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターを「ｐＣＭＡ－Ｇ１／ｃＦＲ２－１４」と命名した。ヒトキメラ化ＦＲ２－１４重鎖をコードする塩基配列及び該重鎖のアミノ酸配列を、配列表の配列番号５０及び５１（図５８及び５９）にそれぞれ示す。

ヒトキメラ化ＦＲ２－１４重鎖用プライマーセット

５’－ｃｃａｇａｔｇｇｇｔｇｃｔｇａｇｃｃａｇｇｔｔａａｇｃｔｇｃｔｇｃａｇｔｃｔｇｇｇｇｃｔｇａｇ－３’（ｃ１３－ＨＦ：配列表の配列番号４５：図５３）

５’－ｃｔｔｇｇｔｇｇａｇｇｃｔｇａｇｃｔｇａｃａｇｔｇａｃｃａｇａｇｔｇｃｃｔｔｇｇｃｃｃｃａｇ－３’（ｃ１３－ＨＲ：配列表の配列番号４６：図５４）

４）－９　ヒトキメラ化抗ＦＧＦＲ２抗体の調製

４）－９－１　ヒトキメラ化抗ＦＧＦＲ２抗体の生産

ＦｒｅｅＳｔｙｌｅ　２９３Ｆ細胞（ＩＮＶＩＴＲＯＧＥＮ社）はマニュアルに従い、継代、培養をおこなった。

対数増殖期の１．２×１０^{9}個のＦｒｅｅＳｔｙｌｅ　２９３Ｆ細胞（ＩＮＶＩＴＲＯＧＥＮ社）を３Ｌ　Ｆｅｒｎｂａｃｈ　Ｅｒｌｅｎｍｅｙｅｒ　Ｆｌａｓｋ（ＣＯＲＮＩＮＧ社）に播種し、ＦｒｅｅＳｔｙｌｅ２９３　ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　ｍｅｄｉｕｍ　（ＩＮＶＩＴＲＯＧＥＮ社）で希釈して１．０×１０^{6}細胞／ｍｌに調整したのちに、３７℃、８％　CO_2インキュベーター内で９０ｒｐｍで一時間振とう培養した。Ｐｏｌｙｅｔｈｙｌｅｎｅｉｍｉｎｅ（Ｐｏｌｙｓｃｉｅｎｃｅ　＃２４７６５）３．６ｍｇをＯｐｔｉ－ＰｒｏＳＦＭ培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）２０ｍｌに溶解し、次にＰｕｒｅＬｉ

ｎｋ ＨｉＰｕｒｅ Ｐｌａｓｍｉｄキット（ＩＮＶＩＴＲＯＧＥＮ社）を用いて調製したH鎖発現ベクター（０．４ｍｇ）及びL鎖発現ベクター（０．８ｍｇ）を２０ｍｌのＯｐｔｉ－Ｐｒｏ ＳＦＭ培地（ＩＮＶＩＴＲＯＧＥＮ社）に懸濁した。Ｐｏｌｙｅｔｈｙｌｅｎｅｉｍｉｎｅ／Ｏｐｔｉ－Ｐｒｏ ＳＦＭ混合液２０ｍｌに、発現ベクター／Ｏｐｔｉ－Ｐｒｏ ＳＦＭ混合液２０ｍｌを加え穏やかに攪拌し、さらに５分間放置した後にＦｒｅｅＳｔｙｌｅ ２９３Ｆ細胞に添加した。３７℃、８％ CO_2インキュベーターで７日間、９０ｒｐｍで振とう培養して得られた培養上清をＤｉｓｐｏｓａｂｌｅ Ｃａｐｓｕｌｅ Ｆｉｌｔｅｒ （ADVANTEC #ＣＣＳ－０４５－Ｅ１Ｈ）でろ過した。

ｐＣＭＡ－Ｇ１／ｃＦＲ２－１０とｐＣＭＡ－ＬＫ／ｃＦＲ２－１０との組合せによって取得されたヒトキメラ化ＦＲ２－１０を「ｃＦＲ２－１０」、ｐＣＭＡ－Ｇ１／ｃＦＲ２－１３とｐＣＭＡ－ＬＫ／ｃＦＲ２－１３との組合せによって取得されたヒトキメラ化ＦＲ２－１３を「ｃＦＲ２－１３」、及びｐＣＭＡ－Ｇ１／ｃＦＲ２－１４とｐＣＭＡ－ＬＫ／ｃＦＲ２－１４との組合せによって取得されたヒトキメラ化ＦＲ２－１４を「ｃＦＲ２－１４」、と命名した。

４）－９－２ ヒトキメラ化抗ＦＧＦＲ２抗体の精製

上記４）－９－１で得られた培養上清を、ｒＰｒｏｔｅｉｎＡアフィニティークロマトグラフィー（４－６℃下）とセラミックヒドロキシルアパタイト（室温下）の２段階工程で精製した。ｒＰｒｏｔｅｉｎＡアフィニティークロマトグラフィー精製後とセラミックヒドロキシルアパタイト精製後のバッファー置換工程は室温下で実施した。最初に、培養上清１１００－１２００ｍｌを、ＰＢＳで平衡化したＭａｂＳｅｌｅｃｔＳｕＲｅ（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ社製、ＨｉＴｒａｐカラム：容積１ｍｌ×２連結）にアプライした。培養液がカラムに全て入ったのち、ＰＢＳ１５－３０ｍｌでカラムを洗浄した。次に２Ｍ アルギニン塩酸塩溶液（ｐＨ４．０）で溶出し、抗

体の含まれる画分を集めた。その画分を脱塩カラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ社製、ＨｉＴｒａｐ　Ｄｅｓａｌｔｉｎｇカラム：容積５ｍｌ×２連結）で５ｍＭ　りん酸ナトリウム／５０ｍＭ　ＭＥＳ／２０ｍＭ　ＮａＣｌ／ｐＨ６．５のバッファーへ置換を行った。さらにその置換した抗体溶液を、５ｍＭ　ＮａＰｉ／５０ｍＭ　ＭＥＳ／２０ｍＭ　ＮａＣｌ／ｐＨ６．５のバッファーで平衡化されたセラミックハイドロキシルアパタイトカラム（日本バイオラッド、Ｂｉｏ－Ｓｃａｌｅ　ＣＨＴ２－１　Ｈｙｄｒｏｘｙａｐａｔｉｔｅ　Ｃｏｌｕｍｎ：容積２ｍｌ）にアプライした。塩化ナトリウムによる直線的濃度勾配溶出を実施し、抗体の含まれる画分を集めた。その画分を脱塩カラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ社製、ＨｉＴｒａｐ　Ｄｅｓａｌｔｉｎｇカラム：容積５ｍｌｘ２連結）でＣＢＳ（１０ｍＭ　クエン酸緩衝液／１４０ｍＭ　塩化ナトリウム、ｐＨ６．０）への液置換を行った。最後にＣｅｎｔｒｉｆｕｇａｌ　ＵＦ　Ｆｉｌｔｅｒ　Ｄｅｖｉｃｅ　ＶＩＶＡＳＰＩＮ２０（分画分子量３０Ｋ，Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ社，４℃下）にて濃縮し、ＩｇＧ濃度を１．０ｍｇ／ｍｌ以上に調製し精製サンプルとした。

実施例５．ヒトキメラ化抗ＦＧＦＲ２抗体（ｃＦＲ２－１０、ｃＦＲ２－１３、ｃＦＲ２－１４）のｉｎ　ｖｉｔｒｏ活性

５）－１　ヒトキメラ化抗ＦＧＦＲ２抗体（ｃＦＲ２－１０、ｃＦＲ２－１３、ｃＦＲ２－１４）の抗原結合活性

２９３α細胞（実施例１）－６に記載）を１０％　ＦＢＳ含有ＤＭＥＭ培地中５ｘ１０^{5}細胞／ｍｌになるよう調製した。それに対し、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社製）を用いて、ｐｃＤＮＡ－ＤＥＳＴ４０－ＦＧＦＲ２ＩＩＩｂもしくはｐｃＤＮＡ－ＤＥＳＴ４０－ＦＧＦＲ２ＩＩＩｃを導入し、９６－ｗｅｌｌ　ｐｌａｔｅ（Ｃｏｒｎｉｎｇ社製）に１００μｌずつ分注し、１０％　ＦＢＳ含有ＤＭＥＭ培地中で３７℃、５％

CO_2の条件下で一晩培養した。得られた導入細胞を接着状態のまま、Ｃｅｌｌ－ＥＬＩＳＡに使用した。培養上清を除去後、ｐｃＤＮＡ－ＤＥＳＴ４０－ＦＧＦＲ２ＩＩＩｂもしくはｐｃＤＮＡ－ＤＥＳＴ４０－ＦＧＦＲ２ＩＩＩｃ導入細胞のそれぞれに対しｃＦＲ２－１０、ｃＦＲ２－１３、ｃＦＲ２－１４抗体を終濃度２μｇ／ｍｌで添加し、４℃で１時間静置した。ウェル中の細胞を５％　ＦＢＳ含有ＰＢＳで１回洗浄後、５％　ＦＢＳ含有ＰＢＳで５００倍に希釈したＡｎｔｉ－Ｈｕｍａｎ　ＩｇＧ－Ｐｅｒｏｘｉｄａｓｅ　ａｎｔｉｂｏｄｙ　ｐｒｏｄｕｃｅｄ　ｉｎ　ｇｏａｔ（ＳＩＧＭＡ社製）を加えて、４℃で１時間静置した。ウェル中の細胞を５％　ＦＢＳ含有ＰＢＳで５回洗浄した後、ＯＰＤ発色液（ＯＰＤ溶解液（０．０５Ｍ　クエン酸３ナトリウム、０．１Ｍ　リン酸水素２ナトリウム・１２水　ｐＨ４．５）にｏ－フェニレンジアミン二塩酸塩（和光純薬社製）、H_2O_2をそれぞれ０．４ｍｇ／ｍｌ、０．６％（ｖ／ｖ）になるように溶解）を１００μｌ／ウェルで添加した。時々攪拌しながら発色反応を行い、１Ｍ　ＨＣｌを１００μｌ／ウェルを添加して発色反応を停止させた後、プレートリーダー（ＡＲＶＯ：ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ社）で４９０ｎｍの吸光度を測定した。図５に示すとおり、ｃＦＲ２－１０抗体はＦＧＦＲ２ＩＩＩｂに選択的に結合し、ｃＦＲ２－１３およびｃＦＲ２－１４抗体はＦＧＦＲ２ＩＩＩｂとＦＧＦＲ２ＩＩＩｃ両方に結合した。

５）－２　ヒトキメラ化抗ＦＧＦＲ２抗体（ｃＦＲ２－１０、ｃＦＲ２－１３、ｃＦＲ２－１４）のシグナル中和作用

Ｅｌｋ１ルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイにより取得抗体のシグナル中和作用を評価するため、実施例１）－３－１で構築したｐｃＤＮＡ－ＤＥＳＴ４０－ＦＧＦＲ２ＩＩＩｂまたはｐｃＤＮＡ－ＤＥＳＴ４０－ＦＧＦＲ２ＩＩＩｃを実施例１）－６－２で示す方法により２９３α細胞に導入し、３７℃、５％　CO_2で一晩培養した。翌日、培養上清を除去後、２％　ＦＢＳを含むＤＭＥＭで希釈したｃＦＲ２－１０、ｃＦＲ２－１３、ｃＦＲ２－１４抗体（終

濃度０．０５－５μｇ／ｍｌ）と共に１時間プレインキュベートし、次いで、リガンドであるヒトＦＧＦ７（Ｒ＆Ｄ　ｓｙｓｔｅｍｓ社製）またはヒトＦＧＦ９、Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ社製）を終濃度１０ｎｇ/ｍｌでウェルに添加した。６時間のインキュベーションの後、細胞溶解物を調製し、Ｄｕａｌ－ｌｕｃｉｆｅｒａｓｅレポーターアッセイシステム（Ｐｒｏｍｅｇａ社製）を用いて、ホタルルシフェラーゼ活性（特異的シグナル）およびＲｅｎｉｌｌａルシフェラーゼ活性（正規化のためのシグナル）を測定した。各ウェルのデータを正規化するために、ホタル／Ｒｅｎｉｌｌａ比を計算した。図６Ａに示す通り、ｃＦＲ２－１０、ｃＦＲ２－１３、ｃＦＲ２－１４は、ＦＧＦＲ２ＩＩＩｂ発現細胞において、ＦＧＦ７によるリガンド依存的レポーター活性化を抑制した。また、図６Ｂに示す通り、ｃＦＲ２－１３、ｃＦＲ２－１４は、ＦＧＦＲ２ＩＩｃ発現細胞において、ＦＧＦ９によるリガンド依存的レポーター活性化を抑制した。以上の結果、これらの抗体はＦＧＦＲ２のリガンドによる活性化を阻害する作用を有することが明らかとなった。

５）－３　ヒトキメラ化抗ＦＧＦＲ２抗体（ｃＦＲ２－１０、ｃＦＲ２－１３、ｃＦＲ２－１４）のＡＤＣＣ活性

５）－３－１　標的細胞の作製

ｐＬｅｎｔｉ６／Ｖ５－ＧＷ／ｌａｃＺ、およびＶｉｒａＰｏｗｅｒ™ Ｐａｃｋａｇｉｎｇ　Ｍｉｘ（Ｉｎｖｉｔｏｒｏｇｅｎ社）を添付プロトコールに従って２９３ＦＴ細胞（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）にトランスフェクションすることにより、β－ガラクトシダーゼ遺伝子を発現する組み換えレンチウイルスを作製した。得られた組み換えレンチウイルスをＶｉｒａＰｏｗｅｒ　Ｌｅｎｔｉｖｉｒａｌ　Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　Ｓｙｓｔｅｍｓ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）のプロトコールに従って２９３Ｔ細胞に感染させ、１０μｇ／ｍｌのブラストサイジン（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）でウイルス感染細胞を選択することにより、β－ガラクトシダーゼの安定発現株を取得した。このβ－ラク

トシダーゼを安定発現する２９３Ｔ細胞を標的細胞としてＡＤＣＣ活性を測定した。

５）－３－２　標的細胞の調製

実施例５）－３－１で取得したβ－ガラクトシダーゼ安定発現２９３Ｔ細胞（以下２９３Ｔ-ｌａｃＺと表記）を、１０％　ＦＢＳ含有ＤＭＥＭ培地中１ｘ１０^{7}細胞／ｍｌになるよう２２５ｃｍ^{2}フラスコに播種した。３７℃で一晩培養後、ｐｃＤＮＡ－ＤＥＳＴ４０－ＦＧＦＲ２ＩＩＩｂをＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社製）を用いて導入し、１０％　ＦＢＳ含有ＤＭＥＭ培地中３７℃、５％　CO_2の条件下で２日間培養した後、ＴｒｙｐＬＥｘｐｒｅｓｓ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社製）を用いて剥離・回収した。５％　ＦＢＳを含むフェノールレッド不含ＲＰＭＩ１６４０（以下「ＡＤＣＣ用培地」と略す）にて２回洗浄し、生細胞数をトリパンブルー色素排除試験にて計測し、ＡＤＣＣ用培地で１×１０^{5}細胞／ｍｌになるよう再懸濁したものを標的細胞として用いた。

５）－３－３　エフェクター細胞の調製

Ｕｎｃｈａｒａｃｔｅｒｉｚｅｄ　Ｃｒｙｏｐｒｅｓｅｒｖｅｄ　ＰＢＭＣ（Ｃｅｌｌｕｌａｒ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　Ｌｔｄ．社製）を１０％　ＦＢＳを含むフェノールレッド不含ＲＰＭＩ１６４０培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社製）に懸濁し、遠心後再懸濁して生細胞数をトリパンブルー色素排除試験にて計測した。遠心後培地を除去し、ＡＤＣＣ用培地に懸濁し、生細胞密度で２．３×１０^{6}細胞／ｍｌになるよう調製し、エフェクター細胞とした。

５）－３－４　ＡＤＣＣアッセイ

５）－３－２の２９３Ｔ-ｌａｃＺ細胞を５０μｌ／ウェルで９６穴Ｕ底マイクロプレートに添加した。そこに終濃度で１～１００ｎｇ／ｍｌになるようＡ

ＤＣＣ用培地で希釈したｃＦＲ２－１０、ｃＦＲ２－１３、ｃＦＲ２－１４、またはヒトコントロール抗体（ｈＩｇＧ）を５０μｌ／ウェルで添加し、４℃で１時間静置した。さらに、5)－３－３のエフェクター細胞を７５μｌ添加し、室温で１２００ｒｐｍ×５分間遠心の後、３７℃、５％　CO_2の条件下で一晩培養した。翌日、上清５０μｌを白色プレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ社製）に回収し、β－Ｇｌｏアッセイシステム（Ｐｒｏｍｅｇａ社製）溶液５０μｌを添加し、発光量をプレートリーダー（ＥＮＶＩＳＩＯＮ：ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ社製）で測定した。ＡＤＣＣ活性による細胞溶解率は次式で算出した。

細胞溶解率（％）＝（Ａ－Ｂ）／（Ｃ－Ｂ）×１００

Ａ：サンプルウェルのカウント

Ｂ：自然放出（抗体・エフェクター細胞非添加ウェル）カウントの平均値（ｎ＝３）。抗体添加時とエフェクター細胞添加時にそれぞれＡＤＣＣ用培地を５０μｌ、７５μｌ添加した。それ以外はサンプルウェルと同様の操作を行った。

Ｃ：最大放出（標的細胞を界面活性剤で溶解させたウェル）カウントの平均値（ｎ＝３）。抗体添加時とエフェクター細胞添加時にそれぞれＡＤＣＣ用培地を５０μｌ、７５μｌ添加した。測定時には、細胞を含むウェルに１７５μｌのβ－Ｇｌｏアッセイシステム溶液を添加して混和し、そのうち１００μｌ分を白色プレートに加えて測定を実施した。

図７に示す通り、ｃＦＲ２－１０、ｃＦＲ２－１３およびｃＦＲ２－１４は、ＦＧＦＲ２ＩＩＩｂ発現細胞に対しＡＤＣＣ活性を有した。

実施例６．ヒトキメラ化抗ＦＧＦＲ２抗体（ｃＦＲ２－１０、ｃＦＲ２－１３、ｃＦＲ２－１４）のｉｎ　ｖｉｖｏ抗腫瘍活性

５×１０^{6}ｃｅｌｌｓのヒト胃癌株ＳＮＵ－１６（ＡＴＣＣより購入）を５０％マトリゲル（日本ＢＤより購入）で懸濁し、ヌードマウス（ＣＡｎＮ．Ｃｇ－Ｆｏｘｎｌ^{nu}／ＣｒｌＣｒｌｊ、日本チャールス・リバーより購入）の腋窩部皮下に移植した。腫瘍体積をもとに群分けをし、移植の７、１１、１４、１８日後にヒトキメラ化抗ＦＧＦＲ２抗体（ｃＦＲ２－１０、ｃＦＲ２－１３、ｃＦＲ２－１４）を１．５、１５ｍｇ／ｋｇで担癌マウスの腹腔内に投与した（ｎ＝８）。移植腫瘍の長径および短径を週２回、電子デジタルノギス（株式会社ミツトヨ製）を用いて測定し、以下に示す計算式により腫瘍体積を算出した。

腫瘍体積（mm^3）＝１／２×短径（ｍｍ）×短径（ｍｍ）×長径（ｍｍ）

ｃＦＲ２－１０抗体の結果を図８－Ａに示した。最終測定日である移植２１日後における腫瘍増殖抑制率は、１．５ｍｇ／ｋｇ投与群で５５％、１５ｍｇ／ｋｇ投与群で３５％であった。

ｃＦＲ２－１３抗体の結果を図８－Ｂに示した。最終測定日である移植２１日後における腫瘍増殖抑制率は、１．５ｍｇ／ｋｇ投与群で５７％、１５ｍｇ／ｋｇ投与群で４６％であった。

ｃＦＲ２－１４抗体の結果を図８－Ｃに示した。最終測定日である移植２１日後における腫瘍増殖抑制率は、１．５ｍｇ／ｋｇ投与群で３４％、１５ｍｇ／ｋｇ投与群で５３％であった。

実施例７．ヒトキメラ化抗ＦＧＦＲ２抗体（ｃＦＲ２－１４）のヒト化バージョン（ｈＦＲ２－１４）の設計

７）－１　ＦＲ２－１４の可変領域の分子モデリング

ｃＦＲ２－１４の可変領域の分子モデリングは、相同性モデリングとして一般的に公知の方法（Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ，２０３，１

２１－１５３，（１９９１））によって実行された。Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｄａｔａ Ｂａｎｋ（Ｎｕｃ. Ａｃｉｄ Ｒｅｓ. ２８，２３５－２４２（２０００））に登録されるヒト免疫グロブリンの可変領域の１次配列（Ｘ線結晶構造から誘導される三次元構造が入手可能である）を、上で決定されたＦＲ２－１４の可変領域と比較した。結果として、１ＺＡＮが、ｃＦＲ２－１４の軽鎖の可変領域に対して最も高い配列相同性を有するとして選択された。また、１ＣＴ８が、ｃＦＲ２－１４の重鎖の可変領域に対して最も高い配列相同性を有するとして選択された。フレームワーク領域の三次元構造は、ｃＦＲ２－１４の軽鎖及び重鎖に対応する１ＺＡＮ及び１ＣＴ８の座標を組み合わせて、「フレームワークモデル」を得ることによって作製された。ｃＦＲ２－１４のＣＤＲは、Ｔｈｏｒｎｔｏｎ ｅｔ ａｌ.（Ｊ. Ｍｏｌ. Ｂｉｏｌ., ２６３，８００－８１５，（１９９６））の分類に従って、ＣＤＲＬ１、ＣＤＲＬ２、ＣＤＲＬ３、ＣＤＲＨ１及びＣＤＲＨ２は、それぞれクラスター１１Ａ、７Ａ、１０Ａ、１０Ａ、１０Ａに割り当てられた。ＣＤＲＨ３は、Ｈ３ルール（ＦＥＢＳ ｌｅｔｔｅｒ ３９９，１－８（１９９６））を使用して、ｋ（６）－に分類された。次いで、それぞれのＣＤＲについての代表的なコンホメーションがフレームワークモデルに組み込まれた。

最後に、エネルギーの点でｃＦＲ２－１４の可変領域の可能性のある分子モデルを得るために、不利な原子間接触を除くためのエネルギー計算を行った。上記手順を、市販の蛋白質立体構造予測プログラムＰｒｉｍｅ及び配座探索プログラムＭａｃｒｏＭｏｄｅｌ（Ｓｃｈｒödｉｎｇｅｒ，ＬＬＣ）を使用して行った。

７）－２　ヒト化ＦＲ２－１４に対するアミノ酸配列の設計

ヒト化ＦＲ２－１４抗体の構築を、ＣＤＲグラフティング（Ｐｒｏｃ. Ｎａｔｌ. Ａｃａｄ. Ｓｃｉ. ＵＳＡ ８６，１００２９－１００３３（１９８９））として一般的に公知の方法によって行った。アクセプター抗体は、フレームワー

ク領域内のアミノ酸相同性に基づいて選択された。

ｃＦＲ２－１４のフレームワーク領域の配列を、抗体のアミノ酸配列のＫａｂａｔデータベース（Ｎｕｃ．Ａｃｉｄ Ｒｅｓ．２９，２０５－２０６（２００１））の全てのヒトフレームワークと比較し、結果として、ＦＶ／ＩＬ－２’ＣＬ抗体がフレームワーク領域についての７２％の配列相同性に起因して、アクセプターとして選択された。ＦＶ／ＩＬ－２’ＣＬについてのフレームワーク領域のアミノ酸残基を、ｃＦＲ２－１４についてのアミノ酸残基と整列させ、異なるアミノ酸が使用される位置を同定した。これらの残基の位置は、上で構築されたｃＦＲ２－１４の三次元モデルを使用して分析され、そしてアクセプター上にグラフティングされるべきドナー残基が、Ｑｕｅｅｎ ｅｔ ａｌ．（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８６，１００２９－１００３３（１９８９））によって与えられる基準によって選択された。

選択されたいくつかのドナー残基をアクセプター抗体に移入することによって、ヒト化ＦＲ２－１４配列を以下の実施例に記載されるように構築した。

また、ｃＦＲ２－１４の各ＣＤＲ中の１乃至３個のアミノ酸残基を他のアミノ酸残基に置換したＣＤＲ改変ヒト化ＦＲ２－１４配列についても以下の実施例に記載されるように構築した。

７）－３　ＦＲ２－１４軽鎖のヒト化

７）－３－１　ｈＦＲ２－１４＿Ｌ１タイプ軽鎖：

配列表の配列番号４８に示されるｃＦＲ２－１４軽鎖のアミノ酸番号２９（アラニン）、３５（ロイシン）、３７（グルタミン酸）、３８（スレオニン）、４２（グルタミン酸）、６２（アスパラギン）、９０（グルタミン）、９２（セリン）、９４（リジン）、９６（アスパラギン）、１００（セリン）、１０３（バリン）、１０５（セリン）、１０７（フェニルアラニン）、１２１（アラニン）、１２５（ロイシン）、１２７（ロイシン）、１３０（アラニン）をそれぞれセリン、バリン、アスパラギン酸、アルギニン、スレオニン、リジン、アスパラギン酸、

スレオニン、スレオニン、セリン、プロリン、フェニルアラニン、スレオニン、チロシン、グルタミン、バリン、イソロイシン、スレオニンに置き換えることを伴い設計されたヒト化ＦＲ２－１４軽鎖を「ｈＦＲ２－１４＿Ｌ１タイプ軽鎖」と命名した。

ｈＦＲ２－１４＿Ｌ１タイプ軽鎖をコードするヌクレオチド配列は、配列表の配列番号７２であり、シグナル配列が切除された成熟軽鎖をコードするのはヌクレオチド番号６１乃至７０５である。また、ｈＦＲ２－１４＿Ｌ１タイプ軽鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号７３であり、シグナル配列が切除された成熟軽鎖はそのアミノ酸番号２１乃至２３５からなる。さらに、配列番号７２及び７３の配列は、それぞれ図８０及び８１にも記載されている。

７）－４　ＦＲ２－１４重鎖のヒト化

７）－４－１　ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１タイプ重鎖：

配列表の配列番号５１に示されるｃＦＲ２－１４重鎖のアミノ酸番号２２（リジン）、２４（ロイシン）、３０（ロイシン）、３１（バリン）、３９（ロイシン）、４３（スレオニン）、５６（ロイシン）、５７（リジン）、５９（バリン）、６２（プロリン）、６３（セリン）、６４（スレオニン）、６７（イソロイシン）、８６（リジン）、８７（アラニン）、９４（フェニルアラニン）、９５（セリン）、１０１（アスパラギン酸）、１０６（スレオニン）、１１０（アラニン）、１１４（フェニルアラニン）をそれぞれグルタミン、バリン、バリン、リジン、バリン、アラニン、バリン、アルギニン、アラニン、グルタミン、グリシン、ロイシン、メチオニン、アルギニン、バリン、セリン、スレオニン、グルタミン酸、アルギニン、スレオニン、チロシンに置き換えることを伴い設計されたヒト化ＦＲ２－１４重鎖を「ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１タイプ重鎖」と命名した。

ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１タイプ重鎖をコードするヌクレオチド配列は、配列表の配列番号７４であり、シグナル配列が切除された成熟重鎖をコードするのはヌクレオチド番号５８乃至１４０１である。また、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１タイ

プ重鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号７５であり、シグナル配列が切除された成熟重鎖はそのアミノ酸番号２０乃至４６７からなる。さらに、配列番号７４及び７５の配列は、それぞれ図８２及び８３にも記載されている。

7）－4－2　hFR2－14_H2タイプ重鎖：

配列表の配列番号５１に示されるcFR2－14重鎖のアミノ酸番号２２（リジン）、２４（ロイシン）、３０（ロイシン）、３１（バリン）、３９（ロイシン）、４３（スレオニン）、５６（ロイシン）、５７（リジン）、５９（バリン）、６２（プロリン）、６３（セリン）、６４（スレオニン）、６７（イソロイシン）、８６（リジン）、８７（アラニン）、９１（バリン）、９４（フェニルアラニン）、９５（セリン）、１０１（アスパラギン酸）、１０６（スレオニン）、１１０（アラニン）、１１４（フェニルアラニン）をそれぞれグルタミン、バリン、バリン、リジン、バリン、アラニン、バリン、アルギニン、アラニン、グルタミン、グリシン、ロイシン、メチオニン、アルギニン、バリン、アラニン、セリン、スレオニン、グルタミン酸、アルギニン、スレオニン、チロシンに置き換えることを伴い設計されたヒト化FR2－14重鎖を「hFR2－14_H2タイプ重鎖」と命名した。

hFR2－14_H2タイプ重鎖をコードするヌクレオチド配列は、配列表の配列番号７６であり、シグナル配列が切除された成熟重鎖をコードするのはヌクレオチド番号５８乃至１４０１である。また、hFR2－14_H2タイプ重鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号７７であり、シグナル配列が切除された成熟重鎖はそのアミノ酸番号２０乃至４６７からなる。さらに、配列番号７６及び７７の配列は、それぞれ図８４及び８５にも記載されている。

7）－4－3　hFR2－14_H3タイプ重鎖：

配列表の配列番号５１に示されるcFR2－14重鎖のアミノ酸番号２２（リジン）、２４（ロイシン）、３０（ロイシン）、３１（バリン）、３９（ロイ

シン)、４３（スレオニン)、５６（ロイシン)、５７（リジン)、５９（バリン)、６７（イソロイシン)、８６（リジン)、８７（アラニン)、９４（フェニルアラニン)、９５（セリン)、１０１（アスパラギン酸)、１０６（スレオニン)、１１０（アラニン)、１１４（フェニルアラニン）をそれぞれグルタミン、バリン、バリン、リジン、バリン、アラニン、バリン、アルギニン、アラニン、メチオニン、アルギニン、バリン、セリン、スレオニン、グルタミン酸、アルギニン、スレオニン、チロシンに置き換えることを伴い設計されたヒト化ＦＲ２－１４重鎖を「ｈＦＲ２－１４__Ｈ３タイプ重鎖」と命名した。

ｈＦＲ２－１４__Ｈ３タイプ重鎖をコードするヌクレオチド配列は、配列表の配列番号７８であり、シグナル配列が切除された成熟重鎖をコードするのはヌクレオチド番号５８乃至１４０１である。また、ｈＦＲ２－１４__Ｈ３タイプ重鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号７９であり、シグナル配列が切除された成熟重鎖はそのアミノ酸番号２０乃至４６７からなる。さらに、配列番号７８及び７９の配列は、それぞれ図８６及び８７にも記載されている。

７）－４－４　ｈＦＲ２－１４__Ｈ４タイプ重鎖：

配列表の配列番号５１に示されるｃＦＲ２－１４重鎖のアミノ酸番号２２（リジン)、２４（ロイシン)、３０（ロイシン)、３１（バリン)、３９（ロイシン)、４３（スレオニン)、５６（ロイシン)、５７（リジン)、５９（バリン)、６４（スレオニン)、６７（イソロイシン)、８６（リジン)、８７（アラニン)、９４（フェニルアラニン)、９５（セリン)、１０１（アスパラギン酸)、１０６（スレオニン)、１１０（アラニン)、１１４（フェニルアラニン)、１２５（スレオニン）をそれぞれグルタミン、バリン、バリン、リジン、バリン、アラニン、バリン、アルギニン、アラニン、イソロイシン、メチオニン、アルギニン、バリン、セリン、スレオニン、グルタミン酸、アルギニン、スレオニン、チロシン、アラニンに置き換えることを伴い設計されたヒト化ＦＲ２－１４重鎖を「ｈＦＲ２－１４__Ｈ４タイプ重鎖」と命名した。

ｈＦＲ２－１４＿Ｈ４タイプ重鎖をコードするヌクレオチド配列は、配列表の配列番号８０であり、シグナル配列が切除された成熟重鎖をコードするのはヌクレオチド番号５８乃至１４０１である。また、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ４タイプ重鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号８１であり、シグナル配列が切除された成熟重鎖はそのアミノ酸番号２０乃至４６７からなる。さらに、配列番号８０及び８１の配列は、それぞれ図８８及び８９にも記載されている。

７）－４－５　ｈＦＲ２－１４＿Ｈ５タイプ重鎖：

配列表の配列番号５１に示されるｃＦＲ２－１４重鎖のアミノ酸番号２２（リジン）、２４（ロイシン）、３０（ロイシン）、３１（バリン）、３９（ロイシン）、４３（スレオニン）、５６（ロイシン）、５７（リジン）、５９（バリン）、６７（イソロイシン）、８６（リジン）、８７（アラニン）、９４（フェニルアラニン）、９５（セリン）、１０１（アスパラギン酸）、１０６（スレオニン）、１１０（アラニン）、１１４（フェニルアラニン）、１１８（アスパラギン酸）をそれぞれグルタミン、バリン、バリン、リジン、バリン、アラニン、バリン、アルギニン、アラニン、メチオニン、アルギニン、バリン、セリン、スレオニン、グルタミン酸、アルギニン、スレオニン、チロシン、グルタミン酸に置き換えることを伴い設計されたヒト化ＦＲ２－１４重鎖を「ｈＦＲ２－１４＿Ｈ５タイプ重鎖」と命名した。

ｈＦＲ２－１４＿Ｈ５タイプ重鎖をコードするヌクレオチド配列は、配列表の配列番号８２であり、シグナル配列が切除された成熟重鎖をコードするのはヌクレオチド番号５８乃至１４０１である。また、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ５タイプ重鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号８３であり、シグナル配列が切除された成熟重鎖はそのアミノ酸番号２０乃至４６７からなる。さらに、配列番号８２及び８３の配列は、それぞれ図９０及び９１にも記載されている。

７）－４－６　ｈＦＲ２－１４＿Ｈ６タイプ重鎖：

配列表の配列番号５１に示されるｃＦＲ２－１４重鎖のアミノ酸番号２２（リジン）、２４（ロイシン）、３０（ロイシン）、３１（バリン）、３９（ロイシン）、４３（スレオニン）、５６（ロイシン）、５７（リジン）、５９（バリン）、６７（イソロイシン）、８６（リジン）、８７（アラニン）、９４（フェニルアラニン）、９５（セリン）、１０１（アスパラギン酸）、１０６（スレオニン）、１１０（アラニン）、１１４（フェニルアラニン）、１１９（グリシン）をそれぞれグルタミン、バリン、バリン、リジン、バリン、アラニン、バリン、アルギニン、アラニン、メチオニン、アルギニン、バリン、セリン、スレオニン、グルタミン酸、アルギニン、スレオニン、チロシン、アラニンに置き換えることを伴い設計されたヒト化ＦＲ２－１４重鎖を「ｈＦＲ２－１４＿Ｈ６タイプ重鎖」と命名した。

ｈＦＲ２－１４＿Ｈ６タイプ重鎖をコードするヌクレオチド配列は、配列表の配列番号８４であり、シグナル配列が切除された成熟重鎖をコードするのはヌクレオチド番号５８乃至１４０１である。また、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ６タイプ重鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号８５であり、シグナル配列が切除された成熟重鎖はそのアミノ酸番号２０乃至４６７からなる。さらに、配列番号８４及び８５の配列は、それぞれ図９２及び９３にも記載されている。

７）－４－７　ｈＦＲ２－１４＿Ｈ７タイプ重鎖：

配列表の配列番号５１に示されるｃＦＲ２－１４重鎖のアミノ酸番号２２（リジン）、２４（ロイシン）、３０（ロイシン）、３１（バリン）、３９（ロイシン）、４３（スレオニン）、５６（ロイシン）、５７（リジン）、５９（バリン）、６７（イソロイシン）、８６（リジン）、８７（アラニン）、９４（フェニルアラニン）、９５（セリン）、１０１（アスパラギン酸）、１０６（スレオニン）、１１０（アラニン）、１１４（フェニルアラニン）、１１９（グリシン）をそれぞれグルタミン、バリン、バリン、リジン、バリン、アラニン、バリン、アルギニン、アラニン、メチオニン、アルギニン、バリン、セリン、スレオニン、グ

ルタミン酸、アルギニン、スレオニン、チロシン、グルタミン酸に置き換えることを伴い設計されたヒト化ＦＲ２－１４重鎖を「ｈＦＲ２－１４＿Ｈ７タイプ重鎖」と命名した。

ｈＦＲ２－１４＿Ｈ７タイプ重鎖をコードするヌクレオチド配列は、配列表の配列番号８６であり、シグナル配列が切除された成熟重鎖をコードするのはヌクレオチド番号５８乃至１４０１である。また、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ７タイプ重鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号８７であり、シグナル配列が切除された成熟重鎖はそのアミノ酸番号２０乃至４６７からなる。さらに、配列番号８６及び８７の配列は、それぞれ図９４及び９５にも記載されている。

７）－４－８　ｈＦＲ２－１４＿Ｈ８タイプ重鎖：

配列表の配列番号５１に示されるｃＦＲ２－１４重鎖のアミノ酸番号２２（リジン）、２４（ロイシン）、３０（ロイシン）、３１（バリン）、３９（ロイシン）、４３（スレオニン）、５６（ロイシン）、５７（リジン）、５９（バリン）、６７（イソロイシン）、８６（リジン）、８７（アラニン）、９４（フェニルアラニン）、９５（セリン）、１０１（アスパラギン酸）、１０６（スレオニン）、１１０（アラニン）、１１４（フェニルアラニン）、１１９（グリシン）をそれぞれグルタミン、バリン、バリン、リジン、バリン、アラニン、バリン、アルギニン、アラニン、メチオニン、アルギニン、バリン、セリン、スレオニン、グルタミン酸、アルギニン、スレオニン、チロシン、フェニルアラニンに置き換えることを伴い設計されたヒト化ＦＲ２－１４重鎖を「ｈＦＲ２－１４＿Ｈ８タイプ重鎖」と命名した。

ｈＦＲ２－１４＿Ｈ８タイプ重鎖をコードするヌクレオチド配列は、配列表の配列番号８８であり、シグナル配列が切除された成熟重鎖をコードするのはヌクレオチド番号５８乃至１４０１である。また、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ８タイプ重鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号８９であり、シグナル配列が切除された成熟重鎖はそのアミノ酸番号２０乃至４６７からなる。さらに、配列番

号８８及び８９の配列は、それぞれ図９６及び９７にも記載されている。

７）－４－９　ｈＦＲ２－１４＿Ｈ９タイプ重鎖：

配列表の配列番号５１に示されるｃＦＲ２－１４重鎖のアミノ酸番号２２（リジン）、２４（ロイシン）、３０（ロイシン）、３１（バリン）、３９（ロイシン）、４３（スレオニン）、５６（ロイシン）、５７（リジン）、５９（バリン）、６７（イソロイシン）、８６（リジン）、８７（アラニン）、９４（フェニルアラニン）、９５（セリン）、１０１（アスパラギン酸）、１０６（スレオニン）、１１０（アラニン）、１１４（フェニルアラニン）、１１９（グリシン）をそれぞれグルタミン、バリン、バリン、リジン、バリン、アラニン、バリン、アルギニン、アラニン、メチオニン、アルギニン、バリン、セリン、スレオニン、グルタミン酸、アルギニン、スレオニン、チロシン、ヒスチジンに置き換えることを伴い設計されたヒト化ＦＲ２－１４重鎖を「ｈＦＲ２－１４＿Ｈ９タイプ重鎖」と命名した。

ｈＦＲ２－１４＿Ｈ９タイプ重鎖をコードするヌクレオチド配列は、配列表の配列番号９０であり、シグナル配列が切除された成熟重鎖をコードするのはヌクレオチド番号５８乃至１４０１である。また、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ９タイプ重鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号９１であり、シグナル配列が切除された成熟重鎖はそのアミノ酸番号２０乃至４６７からなる。さらに、配列番号９０及び９１の配列は、それぞれ図９８及び９９にも記載されている。

７）－４－１０　ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１０タイプ重鎖：

配列表の配列番号５１に示されるｃＦＲ２－１４重鎖のアミノ酸番号２２（リジン）、２４（ロイシン）、３０（ロイシン）、３１（バリン）、３９（ロイシン）、４３（スレオニン）、５６（ロイシン）、５７（リジン）、５９（バリン）、６７（イソロイシン）、８６（リジン）、８７（アラニン）、９４（フェニルアラニン）、９５（セリン）、１０１（アスパラギン酸）、１０６（スレオニン）、１

１０（アラニン）、１１４（フェニルアラニン）、１１９（グリシン）をそれぞれグルタミン、バリン、バリン、リジン、バリン、アラニン、バリン、アルギニン、アラニン、メチオニン、アルギニン、バリン、セリン、スレオニン、グルタミン酸、アルギニン、スレオニン、チロシン、イソロイシンに置き換えることを伴い設計されたヒト化ＦＲ２－１４重鎖を「ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１０タイプ重鎖」と命名した。

ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１０タイプ重鎖をコードするヌクレオチド配列は、配列表の配列番号９２であり、シグナル配列が切除された成熟重鎖をコードするのはヌクレオチド番号５８乃至１４０１である。また、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１０タイプ重鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号９３であり、シグナル配列が切除された成熟重鎖はそのアミノ酸番号２０乃至４６７からなる。さらに、配列番号９２及び９３の配列は、それぞれ図１００及び１０１にも記載されている。

７）－４－１１　ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１１タイプ重鎖：

配列表の配列番号５１に示されるｃＦＲ２－１４重鎖のアミノ酸番号２２（リジン）、２４（ロイシン）、３０（ロイシン）、３１（バリン）、３９（ロイシン）、４３（スレオニン）、５６（ロイシン）、５７（リジン）、５９（バリン）、６７（イソロイシン）、８６（リジン）、８７（アラニン）、９４（フェニルアラニン）、９５（セリン）、１０１（アスパラギン酸）、１０６（スレオニン）、１１０（アラニン）、１１４（フェニルアラニン）、１１９（グリシン）をそれぞれグルタミン、バリン、バリン、リジン、バリン、アラニン、バリン、アルギニン、アラニン、メチオニン、アルギニン、バリン、セリン、スレオニン、グルタミン酸、アルギニン、スレオニン、チロシン、リジンに置き換えることを伴い設計されたヒト化ＦＲ２－１４重鎖を「ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１１タイプ重鎖」と命名した。

ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１１タイプ重鎖をコードするヌクレオチド配列は、配列

表の配列番号９４であり、シグナル配列が切除された成熟重鎖をコードするのはヌクレオチド番号５８乃至１４０１である。また、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１１タイプ重鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号９５であり、シグナル配列が切除された成熟重鎖はそのアミノ酸番号２０乃至４６７からなる。さらに、配列番号９４及び９５の配列は、それぞれ図１０２及び１０３にも記載されている。

７）－４－１２　ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１２タイプ重鎖：

配列表の配列番号５１に示されるｃＦＲ２－１４重鎖のアミノ酸番号２２（リジン）、２４（ロイシン）、３０（ロイシン）、３１（バリン）、３９（ロイシン）、４３（スレオニン）、５６（ロイシン）、５７（リジン）、５９（バリン）、６７（イソロイシン）、８６（リジン）、８７（アラニン）、９４（フェニルアラニン）、９５（セリン）、１０１（アスパラギン酸）、１０６（スレオニン）、１１０（アラニン）、１１４（フェニルアラニン）、１１９（グリシン）をそれぞれグルタミン、バリン、バリン、リジン、バリン、アラニン、バリン、アルギニン、アラニン、メチオニン、アルギニン、バリン、セリン、スレオニン、グルタミン酸、アルギニン、スレオニン、チロシン、ロイシンに置き換えることを伴い設計されたヒト化ＦＲ２－１４重鎖を「ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１２タイプ重鎖」と命名した。

ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１２タイプ重鎖をコードするヌクレオチド配列は、配列表の配列番号９６であり、シグナル配列が切除された成熟重鎖をコードするのはヌクレオチド番号５８乃至１４０１である。また、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１２タイプ重鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号９７であり、シグナル配列が切除された成熟重鎖はそのアミノ酸番号２０乃至４６７からなる。さらに、配列番号９６及び９７の配列は、それぞれ図１０４及び１０５にも記載されている。

7）－4－13　hFR2－14_H13タイプ重鎖：

配列表の配列番号51に示されるcFR2－14重鎖のアミノ酸番号22（リジン）、24（ロイシン）、30（ロイシン）、31（バリン）、39（ロイシン）、43（スレオニン）、56（ロイシン）、57（リジン）、59（バリン）、67（イソロイシン）、86（リジン）、87（アラニン）、94（フェニルアラニン）、95（セリン）、101（アスパラギン酸）、106（スレオニン）、110（アラニン）、114（フェニルアラニン）、119（グリシン）をそれぞれグルタミン、バリン、バリン、リジン、バリン、アラニン、バリン、アルギニン、アラニン、メチオニン、アルギニン、バリン、セリン、スレオニン、グルタミン酸、アルギニン、スレオニン、チロシン、メチオニンに置き換えることを伴い設計されたヒト化FR2－14重鎖を「hFR2－14_H13タイプ重鎖」と命名した。

hFR2－14_H13タイプ重鎖をコードするヌクレオチド配列は、配列表の配列番号98であり、シグナル配列が切除された成熟重鎖をコードするのはヌクレオチド番号58乃至1401である。また、hFR2－14_H13タイプ重鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号99であり、シグナル配列が切除された成熟重鎖はそのアミノ酸番号20乃至467からなる。さらに、配列番号98及び99の配列は、それぞれ図106及び107にも記載されている。

7）－4－14　hFR2－14_H14タイプ重鎖：

配列表の配列番号51に示されるcFR2－14重鎖のアミノ酸番号22（リジン）、24（ロイシン）、30（ロイシン）、31（バリン）、39（ロイシン）、43（スレオニン）、56（ロイシン）、57（リジン）、59（バリン）、67（イソロイシン）、86（リジン）、87（アラニン）、94（フェニルアラニン）、95（セリン）、101（アスパラギン酸）、106（スレオニン）、110（アラニン）、114（フェニルアラニン）、119（グリシン）をそれぞ

れグルタミン、バリン、バリン、リジン、バリン、アラニン、バリン、アルギニン、アラニン、メチオニン、アルギニン、バリン、セリン、スレオニン、グルタミン酸、アルギニン、スレオニン、チロシン、グルタミンに置き換えることを伴い設計されたヒト化ＦＲ２－１４重鎖を「ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１４タイプ重鎖」と命名した。

ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１４タイプ重鎖をコードするヌクレオチド配列は、配列表の配列番号１００であり、シグナル配列が切除された成熟重鎖をコードするのはヌクレオチド番号５８乃至１４０１である。また、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１４タイプ重鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号１０１であり、シグナル配列が切除された成熟重鎖はそのアミノ酸番号２０乃至４６７からなる。さらに、配列番号１００及び１０１の配列は、それぞれ図１０８及び１０９にも記載されている。

７）－４－１５　ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１５タイプ重鎖：

配列表の配列番号５１に示されるｃＦＲ２－１４重鎖のアミノ酸番号２２（リジン）、２４（ロイシン）、３０（ロイシン）、３１（バリン）、３９（ロイシン）、４３（スレオニン）、５６（ロイシン）、５７（リジン）、５９（バリン）、６７（イソロイシン）、８６（リジン）、８７（アラニン）、９４（フェニルアラニン）、９５（セリン）、１０１（アスパラギン酸）、１０６（スレオニン）、１１０（アラニン）、１１４（フェニルアラニン）、１１９（グリシン）をそれぞれグルタミン、バリン、バリン、リジン、バリン、アラニン、バリン、アルギニン、アラニン、メチオニン、アルギニン、バリン、セリン、スレオニン、グルタミン酸、アルギニン、スレオニン、チロシン、アルギニンに置き換えることを伴い設計されたヒト化ＦＲ２－１４重鎖を「ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１５タイプ重鎖」と命名した。

ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１５タイプ重鎖をコードするヌクレオチド配列は、配列表の配列番号１０２であり、シグナル配列が切除された成熟重鎖をコードする

のはヌクレオチド番号５８乃至１４０１である。また、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１５タイプ重鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号１０３であり、シグナル配列が切除された成熟重鎖はそのアミノ酸番号２０乃至４６７からなる。さらに、配列番号１０２及び１０３の配列は、それぞれ図１１０及び１１１にも記載されている。

７）－４－１６　ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１６タイプ重鎖：

配列表の配列番号５１に示されるｃＦＲ２－１４重鎖のアミノ酸番号２２（リジン）、２４（ロイシン）、３０（ロイシン）、３１（バリン）、３９（ロイシン）、４３（スレオニン）、５６（ロイシン）、５７（リジン）、５９（バリン）、６７（イソロイシン）、８６（リジン）、８７（アラニン）、９４（フェニルアラニン）、９５（セリン）、１０１（アスパラギン酸）、１０６（スレオニン）、１１０（アラニン）、１１４（フェニルアラニン）、１１９（グリシン）をそれぞれグルタミン、バリン、バリン、リジン、バリン、アラニン、バリン、アルギニン、アラニン、メチオニン、アルギニン、バリン、セリン、スレオニン、グルタミン酸、アルギニン、スレオニン、チロシン、バリンに置き換えることを伴い設計されたヒト化ＦＲ２－１４重鎖を「ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１６タイプ重鎖」と命名した。

ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１６タイプ重鎖をコードするヌクレオチド配列は、配列表の配列番号１０４であり、シグナル配列が切除された成熟重鎖をコードするのはヌクレオチド番号５８乃至１４０１である。また、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１６タイプ重鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号１０５であり、シグナル配列が切除された成熟重鎖はそのアミノ酸番号２０乃至４６７からなる。さらに、配列番号１０４及び１０５の配列は、それぞれ図１１２及び１１３にも記載されている。

７）－４－１７　ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１７タイプ重鎖：

配列表の配列番号５１に示されるｃＦＲ２－１４重鎖のアミノ酸番号２２（リジン）、２４（ロイシン）、３０（ロイシン）、３１（バリン）、３９（ロイシン）、４３（スレオニン）、５６（ロイシン）、５７（リジン）、５９（バリン）、６７（イソロイシン）、８６（リジン）、８７（アラニン）、９４（フェニルアラニン）、９５（セリン）、１０１（アスパラギン酸）、１０６（スレオニン）、１１０（アラニン）、１１４（フェニルアラニン）、１１９（グリシン）をそれぞれグルタミン、バリン、バリン、リジン、バリン、アラニン、バリン、アルギニン、アラニン、メチオニン、アルギニン、バリン、セリン、スレオニン、グルタミン酸、アルギニン、スレオニン、チロシン、トリプトファンに置き換えることを伴い設計されたヒト化ＦＲ２－１４重鎖を「ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１７タイプ重鎖」と命名した。

ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１７タイプ重鎖をコードするヌクレオチド配列は、配列表の配列番号１０６であり、シグナル配列が切除された成熟重鎖をコードするのはヌクレオチド番号５８乃至１４０１である。また、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１７タイプ重鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号１０７であり、シグナル配列が切除された成熟重鎖はそのアミノ酸番号２０乃至４６７からなる。さらに、配列番号１０６及び１０７の配列は、それぞれ図１１４及び１１５にも記載されている。

７）－４－１８　ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１８タイプ重鎖：

配列表の配列番号５１に示されるｃＦＲ２－１４重鎖のアミノ酸番号２２（リジン）、２４（ロイシン）、３０（ロイシン）、３１（バリン）、３９（ロイシン）、４３（スレオニン）、５６（ロイシン）、５７（リジン）、５９（バリン）、６７（イソロイシン）、８６（リジン）、８７（アラニン）、９４（フェニルアラニン）、９５（セリン）、１０１（アスパラギン酸）、１０６（スレオニン）、１１０（アラニン）、１１４（フェニルアラニン）、１１９（グリシン）をそれぞれグルタミン、バリン、バリン、リジン、バリン、アラニン、バリン、アルギ

ニン、アラニン、メチオニン、アルギニン、バリン、セリン、スレオニン、グルタミン酸、アルギニン、スレオニン、チロシン、チロシンに置き換えることを伴い設計されたヒト化ＦＲ２－１４重鎖を「ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１８タイプ重鎖」と命名した。

ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１８タイプ重鎖をコードするヌクレオチド配列は、配列表の配列番号１０８であり、シグナル配列が切除された成熟重鎖をコードするのはヌクレオチド番号５８乃至１４０１である。また、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１８タイプ重鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号１０９であり、シグナル配列が切除された成熟重鎖はそのアミノ酸番号２０乃至４６７からなる。さらに、配列番号１０８及び１０９の配列は、それぞれ図１１６及び１１７にも記載されている。

実施例８．ラット抗ヒトＦＧＦＲ２抗体ＦＲ２－１４のヒト化抗体（ｈＦＲ２－１４）の取得／発現

８）－１　ラット抗ヒトＦＧＦＲ２抗体ＦＲ２－１４のヒト化抗体（ｈＦＲ２－１４）の軽鎖発現ベクターの構築

８）－１－１　ｈＦＲ２－１４＿Ｌ１タイプ軽鎖発現ベクターの構築

配列番号７３のアミノ酸番号２１乃至１３０に示されるｈＦＲ２－１４＿Ｌ１タイプ軽鎖可変領域をコードする遺伝子を含むＤＮＡを合成し、制限酵素ＢｓｉＷＩで切り出されるＤＮＡ断片を、キメラ及びヒト化抗体軽鎖発現汎用ベクター（ｐＣＭＡ－ＬＫ）を制限酵素ＢｓｉＷＩで切断した箇所に挿入することにより、ｈＦＲ２－１４＿Ｌ１タイプ軽鎖発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターを「ｐＣＭＡ－ＬＫ／ｈＦＲ２－１４＿Ｌ１」と命名した。

８）－２　ラット抗ヒトＦＧＦＲ２抗体ＦＲ２－１４のヒト化抗体（ｈＦＲ２－１４）の重鎖発現ベクターの構築

８）－２－１　ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ３、及びｈＦＲ２

－１４＿Ｈ４タイプ重鎖発現ベクターの構築

配列表の配列番号７５のアミノ酸番号２０乃至１３７、配列番号７９のアミノ酸番号２０乃至１３７、及び配列番号８１のアミノ酸番号２０乃至１３７に示される、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ３、及びｈＦＲ２－１４＿Ｈ４タイプ重鎖可変領域をコードする遺伝子を含むＤＮＡを合成し、制限酵素ＢｌｐＩで切り出されるＤＮＡ断片を、ヒト化抗体重鎖発現汎用ベクター（ｐＣＭＡ－Ｇ１）を制限酵素ＢｌｐＩで切断した箇所に挿入することにより、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ３、及びｈＦＲ２－１４＿Ｈ４タイプ重鎖発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターをそれぞれ「ｐＣＭＡ－Ｇ１／ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１」、「ｐＣＭＡ－Ｇ１／ｈＦＲ２－１４＿Ｈ３」、及び「ｐＣＭＡ－Ｇ１／ｈＦＲ２－１４＿Ｈ４」と命名した。

８）－２－２　ｈＦＲ２－１４＿Ｈ２タイプ重鎖発現ベクターの構築

実施例８）－２－１で構築したｐＣＭＡ－Ｇ１／ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１をテンプレートとして、下記に示すプライマーセットとＱｕｉｋＣｈａｎｇｅ　ＸＬ　Ｓｉｔｅ－Ｄｉｒｅｃｔｅｄ　Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ　Ｋｉｔ（Ａｇｉｌｅｎｔ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社）を用いて、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ２タイプ重鎖発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターを「ｐＣＭＡ－Ｇ１／ｈＦＲ２－１４＿Ｈ２」と命名した。ｈＦＲ２－１４＿Ｈ２タイプ重鎖のヌクレオチド配列を配列表の配列番号７６に示し、アミノ酸配列を配列番号７７に示した。

プライマーセット

５’－ｇｇｃａｇａｇｔｇａｃｃｃｔｇａｃｃｇｃｃｇａｃａａｇａｇｃａｃｃａｇｃａｃｃ－３’（ＶＨ３Ａ－Ｆ：配列表の配列番号１１０）

５’－ｇｇｔｇｃｔｇｇｔｇｃｔｃｔｔｇｔｃｇｇｃｇｇｔｃａｇｇｇｔｃａｃｔｃｔｇｃｃ－３’（ＶＨ３Ａ－Ｒ：配列表の配列番号１１１）

8）－2－3　hFR2－14_H5タイプ重鎖発現ベクターの構築

実施例8）－2－1で作製したhFR2－14_H3タイプ重鎖発現ベクターpCMA－G1／hFR2－14_H3をテンプレートとし、下記プライマーセットとKOD　－Plus－　Mutagenesis　Kit（TOYOBO社）を用いて、変異を導入することによりhFR2－14_H5タイプ重鎖発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターを「pCMA－G1／hFR2－14_H5」と命名した。

プライマーセット：

5’－GAGGGCTACGGCGACTGGTTCACATAC－3’（H5－F）

5’－GGTGGCGCAGTAGTACACGGCGGT－3’（H－R　このプライマーは以下共通です）

8）－2－4　hFR2－14_H6タイプ重鎖発現ベクターの構築

実施例8）－2－1で作製したhFR2－14_H3タイプ重鎖発現ベクターpCMA－G1／hFR2－14_H3をテンプレートとし、下記プライマーセットとKOD　－Plus－　Mutagenesis　Kit（TOYOBO社）を用いて、変異を導入することによりhFR2－14_H6タイプ重鎖発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターを「pCMA－G1／hFR2－14_H6」と命名した。

プライマーセット：

5’－GACGCCTACGGCGACTGGTTCACATAC－3’（H6－F）

5’－GGTGGCGCAGTAGTACACGGCGGT－3’（H－R）

8）－2－5　hFR2－14_H7タイプ重鎖発現ベクターの構築

実施例8）－2－1で作製したhFR2－14_H3タイプ重鎖発現ベクタ

ーｐＣＭＡ－Ｇ１／ｈＦＲ２－１４__Ｈ３をテンプレートとし、下記プライマーセットとＫＯＤ －Ｐｌｕｓ－ Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ Ｋｉｔ（ＴＯＹＯＢＯ社）を用いて、変異を導入することによりｈＦＲ２－１４__Ｈ７タイプ重鎖発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターを「ｐＣＭＡ－Ｇ１／ｈＦＲ２－１４__Ｈ７」と命名した。

プライマーセット：

５’－ＧＡＣＧＡＧＴＡＣＧＧＣＧＡＣＴＧＧＴＴＣＡＣＡＴＡＣ－３’（Ｈ７－Ｆ）

５’－ＧＧＴＧＧＣＧＣＡＧＴＡＧＴＡＣＡＣＧＧＣＧＧＴ－３’（Ｈ－Ｒ）

８）－２－６ ｈＦＲ２－１４__Ｈ８タイプ重鎖発現ベクターの構築

実施例８）－２－１で作製したｈＦＲ２－１４__Ｈ３タイプ重鎖発現ベクターｐＣＭＡ－Ｇ１／ｈＦＲ２－１４__Ｈ３をテンプレートとし、下記プライマーセットとＫＯＤ －Ｐｌｕｓ－ Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ Ｋｉｔ（ＴＯＹＯＢＯ社）を用いて、変異を導入することによりｈＦＲ２－１４__Ｈ８タイプ重鎖発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターを「ｐＣＭＡ－Ｇ１／ｈＦＲ２－１４__Ｈ８」と命名した。

プライマーセット：

５’－ＧＡＣＴＴＣＴＡＣＧＧＣＧＡＣＴＧＧＴＴＣＡＣＡＴＡＣ－３’（Ｈ８－Ｆ）

５’－ＧＧＴＧＧＣＧＣＡＧＴＡＧＴＡＣＡＣＧＧＣＧＧＴ－３’（Ｈ－Ｒ）

８）－２－７ ｈＦＲ２－１４__Ｈ９タイプ重鎖発現ベクターの構築

実施例８）－２－１で作製したｈＦＲ２－１４__Ｈ３タイプ重鎖発現ベクターｐＣＭＡ－Ｇ１／ｈＦＲ２－１４__Ｈ３をテンプレートとし、下記プライマーセットとＫＯＤ －Ｐｌｕｓ－ Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ Ｋｉｔ（ＴＯＹＯＢＯ社）を用いて、変異を導入することによりｈＦＲ２－１４__Ｈ９タイプ

重鎖発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターを「ｐＣＭＡ－Ｇ１／ｈＦＲ２－１４＿Ｈ９」と命名した。

プライマーセット：

５’－ＧＡＣＣＡＣＴＡＣＧＧＣＧＡＣＴＧＧＴＴＣＡＣＡＴＡＣ－３’（Ｈ９－Ｆ）

５’－ＧＧＴＧＧＣＧＣＡＧＴＡＧＴＡＣＡＣＧＧＣＧＧＴ－３’（Ｈ－Ｒ）

８）－２－８　ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１０タイプ重鎖発現ベクターの構築

実施例８）－２－１で作製したｈＦＲ２－１４＿Ｈ３タイプ重鎖発現ベクターｐＣＭＡ－Ｇ１／ｈＦＲ２－１４＿Ｈ３をテンプレートとし、下記プライマーセットとＫＯＤ　－Ｐｌｕｓ－　Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ　Ｋｉｔ（ＴＯＹＯＢＯ社）を用いて、変異を導入することによりｈＦＲ２－１４＿Ｈ１０タイプ重鎖発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターを「ｐＣＭＡ－Ｇ１／ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１０」と命名した。

プライマーセット：

５’－ＧＡＣＡＴＣＴＡＣＧＧＣＧＡＣＴＧＧＴＴＣＡＣＡＴＡＣ－３’（Ｈ１０－Ｆ）

５’－ＧＧＴＧＧＣＧＣＡＧＴＡＧＴＡＣＡＣＧＧＣＧＧＴ－３’（Ｈ－Ｒ）

８）－２－９　ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１１タイプ重鎖発現ベクターの構築

実施例８）－２－１で作製したｈＦＲ２－１４＿Ｈ３タイプ重鎖発現ベクターｐＣＭＡ－Ｇ１／ｈＦＲ２－１４＿Ｈ３をテンプレートとし、下記プライマーセットとＫＯＤ　－Ｐｌｕｓ－　Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ　Ｋｉｔ（ＴＯＹＯＢＯ社）を用いて、変異を導入することによりｈＦＲ２－１４＿Ｈ１１タイプ重鎖発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターを「ｐＣＭＡ－Ｇ１／ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１１」と命名した。

プライマーセット：

5’－GACAAGTACGGCGACTGGTTCACATAC－3’（H1
1－F）
5’－GGTGGCGCAGTAGTACACGGCGGT－3’（H－R）

8）－2－10　hFR2－14_H12タイプ重鎖発現ベクターの構築

実施例8）－2－1で作製したhFR2－14_H3タイプ重鎖発現ベクターpCMA－G1／hFR2－14_H3をテンプレートとし、下記プライマーセットとKOD　－Plus－　Mutagenesis　Kit（TOYOBO社）を用いて、変異を導入することによりhFR2－14_hH12タイプ重鎖発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターを「pCMA－G1／hFR2－14_H12」と命名した。

プライマーセット：
5’－GACCTGTACGGCGACTGGTTCACATAC－3’（H1
2－F）
5’－GGTGGCGCAGTAGTACACGGCGGT－3’（H－R）

8）－2－11　hFR2－14_hH13タイプ重鎖発現ベクターの構築

実施例8）－2－1で作製したhFR2－14_hH3タイプ重鎖発現ベクターpCMA－G1／hFR2－14_H3をテンプレートとし、下記プライマーセットとKOD　－Plus－　Mutagenesis　Kit（TOYOBO社）を用いて、変異を導入することによりhFR2－14_hH13タイプ重鎖発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターを「pCMA－G1／hFR2－14_H13」と命名した。

プライマーセット：
5’－GACATGTACGGCGACTGGTTCACATAC－3’（H1
3－F）
5’－GGTGGCGCAGTAGTACACGGCGGT－3’（H－R）

8）－2－12　hFR2－14_hH14タイプ重鎖発現ベクターの構築

実施例8）－2－1で作製したhFR2－14_hH3タイプ重鎖発現ベクターpCMA－G1／hFR2－14_H3をテンプレートとし、下記プライマーセットとKOD　－Plus－　Mutagenesis　Kit（TOYOBO社）を用いて、変異を導入することによりhFR2－14_hH14タイプ重鎖発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターを「pCMA－G1／hFR2－14_H14」と命名した。

プライマーセット：

5’－GACCAGTACGGCGACTGGTTCACATAC－3’（H14－F）

5’－GGTGGCGCAGTAGTACACGGCGGT－3’（H－R）

8）－2－13　hFR2－14_hH15タイプ重鎖発現ベクターの構築

実施例8）－2－1で作製したhFR2－14_hH3タイプ重鎖発現ベクターpCMA－G1／hFR2－14_H3をテンプレートとし、下記プライマーセットとKOD　－Plus－　Mutagenesis　Kit（TOYOBO社）を用いて、変異を導入することによりhFR2－14_hH15タイプ重鎖発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターを「pCMA－G1／hFR2－14_H15」と命名した。

プライマーセット：

5’－GACCGGTACGGCGACTGGTTCACATAC－3’（H15－F）

5’－GGTGGCGCAGTAGTACACGGCGGT－3’（H－R）

8）－2－14　hFR2－14_hH16タイプ重鎖発現ベクターの構築

実施例8）－2－1で作製したhFR2－14_hH3タイプ重鎖発現ベク

ターｐＣＭＡ－Ｇ１／ｈＦＲ２－１４＿Ｈ３をテンプレートとし、下記プライマーセットとＫＯＤ　－Ｐｌｕｓ－　Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ　Ｋｉｔ（ＴＯＹＯＢＯ社）を用いて、変異を導入することによりｈＦＲ２－１４＿ｈＨ１６タイプ重鎖発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターを「ｐＣＭＡ－Ｇ１／ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１６」と命名した。

プライマーセット：

５’－ＧＡＣＧＴＧＴＡＣＧＧＣＧＡＣＴＧＧＴＴＣＡＣＡＴＡＣ－３’（Ｈ１６－Ｆ）

５’－ＧＧＴＧＧＣＧＣＡＧＴＡＧＴＡＣＡＣＧＧＣＧＧＴ－３’（Ｈ－Ｒ）

８）－２－１５　ｈＦＲ２－１４＿ｈＨ１７タイプ重鎖発現ベクターの構築

実施例８）－２－１で作製したｈＦＲ２－１４＿ｈＨ３タイプ重鎖発現ベクターｐＣＭＡ－Ｇ１／ｈＦＲ２－１４＿Ｈ３をテンプレートとし、下記プライマーセットとＫＯＤ　－Ｐｌｕｓ－　Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ　Ｋｉｔ（ＴＯＹＯＢＯ社）を用いて、変異を導入することによりｈＦＲ２－１４＿ｈＨ１７タイプ重鎖発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターを「ｐＣＭＡ－Ｇ１／ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１７」と命名した。

プライマーセット：

５’－ＧＡＣＴＧＧＴＡＣＧＧＣＧＡＣＴＧＧＴＴＣＡＣＡＴＡＣ－３’（Ｈ１７－Ｆ）

５’－ＧＧＴＧＧＣＧＣＡＧＴＡＧＴＡＣＡＣＧＧＣＧＧＴ－３’（Ｈ－Ｒ）

８）－２－１６　ｈＦＲ２－１４＿ｈＨ１８タイプ重鎖発現ベクターの構築

実施例８）－２－１で作製したｈＦＲ２－１４＿ｈＨ３タイプ重鎖発現ベクターｐＣＭＡ－Ｇ１／ｈＦＲ２－１４＿Ｈ３をテンプレートとし、下記プライマーセットとＫＯＤ　－Ｐｌｕｓ－　Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ　Ｋｉｔ（ＴＯＹＯＢＯ社）を用いて、変異を導入することによりｈＦＲ２－１４＿ｈＨ１８

タイプ重鎖発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターを「ｐＣＭＡ－Ｇ１／ｈＦＲ２－１４_Ｈ１８」と命名した。

プライマーセット：

５’－ＧＡＣＴＡＣＴＡＣＧＧＣＧＡＣＴＧＧＴＴＣＡＣＡＴＡＣ－３’（Ｈ１８－Ｆ）

５’－ＧＧＴＧＧＣＧＣＡＧＴＡＧＴＡＣＡＣＧＧＣＧＧＴ－３’（Ｈ－Ｒ）

８）－３　ヒト化ＦＲ２－１４抗体の調製（ＦｒｅｅＳｔｙｌｅ　２９３Ｆ細胞）

８）－３－１　ヒト化ＦＲ２－１４抗体の生産

ＦｒｅｅＳｔｙｌｅ　２９３Ｆ細胞（ＩＮＶＩＴＲＯＧＥＮ社）はマニュアルに従い、継代、培養をおこなった。

対数増殖期の１．２×１０^{9}個のＦｒｅｅＳｔｙｌｅ　２９３Ｆ細胞（ＩＮＶＩＴＲＯＧＥＮ社）を３Ｌ　Ｆｅｒｎｂａｃｈ　Ｅｒｌｅｎｍｅｙｅｒ　Ｆｌａｓｋ（ＣＯＲＮＩＮＧ社）に播種し、ＦｒｅｅＳｔｙｌｅ２９３　ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　ｍｅｄｉｕｍ　（ＩＮＶＩＴＲＯＧＥＮ社）で希釈して１．０×１０^{6}細胞／ｍＬに調製したのちに、３７℃、８％CO_2インキュベーター内で９０ｒｐｍで一時間振とう培養した。Ｐｏｌｙｅｔｈｙｌｅｎｅｉｍｉｎｅ（Ｐｏｌｙｓｃｉｅｎｃｅ　＃２４７６５）３．６ｍｇをＯｐｔｉ－Ｐｒｏ　ＳＦＭ培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）２０ｍｌに溶解し、次にＰｕｒｅＬｉｎｋ　ＨｉＰｕｒｅ　Ｐｌａｓｍｉｄキット（ＩＮＶＩＴＲＯＧＥＮ社）を用いて調製したＨ鎖発現ベクター（０．４ｍｇ）及びＬ鎖発現ベクター（０．８ｍｇ）を２０ｍｌのＯｐｔｉ－Ｐｒｏ　ＳＦＭ培地（ＩＮＶＩＴＲＯＧＥＮ社）に懸濁した。Ｐｏｌｙｅｔｈｙｌｅｎｅｉｍｉｎｅ／Ｏｐｔｉ－Ｐｒｏ　ＳＦＭ混合液２０ｍｌに、発現ベクター／Ｏｐｔｉ－Ｐｒｏ　ＳＦＭ混合液２０ｍｌを加え穏やかに攪拌し、さらに５分間放置した後にＦｒｅｅＳｔｙｌｅ　２９３Ｆ細胞に添加した。３７℃、８％CO_2インキュベーターで７日間、９０ｒ

ｐｍで振とう培養して得られた培養上清をＤｉｓｐｏｓａｂｌｅ　Ｃａｐｓｕｌｅ　Ｆｉｌｔｅｒ　（ＡＤＶＡＮＴＥＣ　＃ＣＣＳ－０４５－Ｅ１Ｈ）でろ過した。

ｐＣＭＡ－Ｇ１／ｈＦＲ２－１４＿Ｈ５、ｐＣＭＡ－Ｇ１／ｈＦＲ２－１４＿Ｈ６、ｐＣＭＡ－Ｇ１／ｈＦＲ２－１４＿Ｈ７、ｐＣＭＡ－Ｇ１／ｈＦＲ２－１４＿Ｈ８、ｐＣＭＡ－Ｇ１／ｈＦＲ２－１４＿Ｈ９、ｐＣＭＡ－Ｇ１／ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１０、ｐＣＭＡ－Ｇ１／ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１１、ｐＣＭＡ－Ｇ１／ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１２、ｐＣＭＡ－Ｇ１／ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１３、ｐＣＭＡ－Ｇ１／ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１４、ｐＣＭＡ－Ｇ１／ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１５、ｐＣＭＡ－Ｇ１／ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１６、ｐＣＭＡ－Ｇ１／ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１７、及びｐＣＭＡ－Ｇ１／ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１８とｐＣＭＡ－ＬＫ／ｈＦＲ２－１４＿Ｌ１との組合せによって取得されたヒト化ＦＲ２－１４抗体をそれぞれ、「ｈＦＲ２－１４＿Ｈ５／Ｌ１」、「ｈＦＲ２－１４＿Ｈ６／Ｌ１」、「ｈＦＲ２－１４＿Ｈ７／Ｌ１」、「ｈＦＲ２－１４＿Ｈ８／Ｌ１」、「ｈＦＲ２－１４＿Ｈ９／Ｌ１」、「ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１０／Ｌ１」、「ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１１／Ｌ１」、「ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１２／Ｌ１」、「ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１３／Ｌ１」、「ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１４／Ｌ１」、「ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１５／Ｌ１」、「ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１６／Ｌ１」、「ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１７／Ｌ１」、及び「ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１８／Ｌ１と命名した。

８）－３－２　ヒト化ＦＲ２－１４抗体の精製

上記８）－３－１で得られた培養上清から抗体を、ｒＰｒｏｔｅｉｎＡアフィニティークロマトグラフィー（４乃至６℃下）とセラミックヒドロキシルアパタイト（室温下）の２段階工程で精製した。ｒＰｒｏｔｅｉｎＡアフィニティークロマトグラフィー精製後とセラミックヒドロキシルアパタイト精製後のバッファー置換工程は４乃至６℃下で実施した。最初に、培養上清を、ＰＢＳで平衡化したＭａｂＳｅｌｅｃｔＳｕＲｅ（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　Ｂ

ｉｏｓｃｉｅｎｃｅ社製、ＨｉＴｒａｐカラム）にアプライした。培養液がカラムに全て入ったのち、カラム容量２倍以上のＰＢＳでカラムを洗浄した。次に２Ｍアルギニン塩酸塩溶液（ｐＨ４．０）で溶出し、抗体の含まれる画分を集めた。その画分を透析（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社、Ｓｌｉｄｅ－Ａ－Ｌｙｚｅｒ　Ｄｉａｌｙｓｉｓ　Ｃａｓｓｅｔｔｅ）によりＰＢＳに置換した後、５ｍＭ　りん酸ナトリウム／５０ｍＭ　ＭＥＳ／ｐＨ７．０のバッファーで５倍希釈した抗体溶液を、５ｍＭ　ＮａＰｉ／５０ｍＭ　ＭＥＳ／３０ｍＭ　ＮａＣｌ／ｐＨ７．０のバッファーで平衡化されたセラミックハイドロキシルアパタイトカラム（日本バイオラッド、Ｂｉｏ－Ｓｃａｌｅ　ＣＨＴ　Ｔｙｐｅ－Ｉ　Ｈｙｄｒｏｘｙａｐａｔｉｔｅ　Ｃｏｌｕｍｎ）にアプライした。塩化ナトリウムによる直線的濃度勾配溶出を実施し、抗体の含まれる画分を集めた。その画分を透析（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社、Ｓｌｉｄｅ－Ａ－Ｌｙｚｅｒ　Ｄｉａｌｙｓｉｓ　Ｃａｓｓｅｔｔｅ）によりＨＢＳｏｒ（２５ｍＭ ヒスチジン／５％ ソルビトール、ｐＨ６．０）への液置換を行った。最後にＣｅｎｔｒｉｆｕｇａｌ　ＵＦ　Ｆｉｌｔｅｒ　Ｄｅｖｉｃｅ　ＶＩＶＡＳＰＩＮ２０（分画分子量ＵＦ１０Ｋ，Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ社，４℃下）にて濃縮し、ＩｇＧ濃度を２５ｍｇ／ｍｌ以上に調製し精製サンプルとした。

実施例９．糖鎖修飾が調節されたヒト化ＦＲ２－１４抗体の調製

配列番号９７（図１０５）で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号２０乃至４６７を含む重鎖、および、配列番号７３（図８１）で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号２１乃至２３５を含む軽鎖を含んでなるヒト化抗体を、公知の方法に従って、該抗体蛋白質に結合する糖鎖修飾を脱フコース化することにより調節し、得られた抗体をｈＦＲ２－１４　Ｈ１９／Ｌ１と命名した。当該修飾体を質量分析に供したところ、フコースを含有するＨ鎖のピークは検出限界以下であった。本発明においては、ｈＦＲ２－１４　Ｈ１９／Ｌ１のように糖鎖修

飾が調節された抗体も「抗体」または「抗体の修飾体」と呼ぶ。

実施例１０．ヒト化抗ヒトＦＧＦＲ２抗体（ｈＦＲ２－１４）の物性評価

１０）－１ ヒト化抗ヒトＦＧＦＲ２抗体（ｈＦＲ２－１４）のＢｉａｃｏｒｅによる抗原結合活性測定

抗体と抗原（ｒｈＦＧＦＲ２ａｌｐｈａ（ＩＩＩｂ）Ｆｃ ｃｈｉｍｅｒａまたはｒｈＦＧＦＲ２ａｌｐｈａ（ＩＩＩｃ）Ｆｃ ｃｈｉｍｅｒａ）との解離定数測定は、Ｂｉａｃｏｒｅ ３０００（ＧＥヘルスケアバイオサイエンス（株））を使用し、固定化した抗ヒトＩｇＧ（Ｆａｂ）抗体に抗体をリガンドとして捕捉（キャプチャー）し、抗原をアナライトとして測定するキャプチャー法にて行った。抗ヒトＩｇＧ（Ｆａｂ）抗体（Ｈｕｍａｎ Ｆａｂ ｃａｐｔｕｒｅ ｋｉｔ、ＧＥヘルスケアバイオサイエンス（株））は、センサーチップＣＭ５（ＢＩＡｃｏｒｅ，Ｉｎｃ.）へアミンカップリング法にて約５０００ＲＵ共有結合させた。リファレンスセルにも同様に固定化した。ランニングバッファーとしてＨＢＳ－ＥＰ＋（１０ｍＭ ＨＥＰＥＳ ｐＨ７．４、０．１５Ｍ ＮａＣｌ，３ｍＭ ＥＤＴＡ、０．０５％Ｓｕｒｆａｃｔａｎｔ Ｐ２０）を用いた。抗ヒトＩｇＧ（Ｆａｂ）抗体を固定化したチップ上に、精製抗体では１μｇ／ｍＬの抗体溶液を流速１０μＬ／分で６０秒間、抗体を含む培養上清では６０秒間添加した後、抗原の希釈系列溶液（０．３乃至５００ｎＭ）を流速３０μｌ／分で１８０秒間添加し、引き続き３００秒間の解離相をモニターした。再生溶液として、１０ｍＭ Ｇｌｙ－ＨＣｌ ｐＨ２．１を流速１０μｌ／分で６０秒間、２回添加した。データの解析には、分析ソフトウェア（ＢＩＡｅｖａｌｕａｔｉｏｎ ｓｏｆｔｗａｒｅ，ｖｅｒｓｉｏｎ ４．１）のＢｉｖａｌｅｎｔ結合モデルを用いて、結合速度定数ｋｏｎ、解離速度定数ｋｏｆｆ及び解離定数（ＫＤ；ＫＤ＝ｋｏｆｆ／ｋｏｎ）を算出した。

１０）－１－１ ４種類のヒト化抗ＦＧＦＲ２抗体（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１／

Ｌ１乃至ｈＦＲ２－１４＿Ｈ４／Ｌ１）およびヒトキメラ化抗ＦＧＦＲ２抗体（ｃＦＲ２－１４）の結合活性評価

４種類のヒト化抗ＦＧＦＲ２抗体（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１／Ｌ１乃至ｈＦＲ２－１４＿Ｈ４／Ｌ１）およびヒトキメラ化抗ＦＧＦＲ２抗体（ｃＦＲ２－１４）を実施例８）－３及び実施例４）－９の方法により発現・精製し、各ヒトＦＧＦＲ２バリアント蛋白質との結合活性を実施例１０）－１に示す方法により評価した。Ｂｉａｃｏｒｅ測定結果を図１２２に示す。

１０）－１－２　１５種類のヒト化抗ＦＧＦＲ２抗体（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ３／Ｌ１及びｈＦＲ２－１４＿Ｈ５～Ｈ１８／Ｌ１）の結合活性評価

１５種類のヒト化抗ＦＧＦＲ２抗体（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ３／Ｌ１及びｈＦＲ２－１４＿Ｈ５～Ｈ１８／Ｌ１）を実施例８）－３の方法により発現させた培養上清を用いてＦＧＦＲ２－ＩＩＩｃ蛋白質との結合活性を実施例１０）－１に示す方法により評価した。Ｂｉａｃｏｒｅ測定結果を図１２３に示す。

１０）－２　ヒト化抗ヒトＦＧＦＲ２抗体（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ３／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ８／Ｌ１及びｈＦＲ２－１４＿Ｈ１２／Ｌ１）のヒトＦＧＦＲ２選択的結合性の検討

１０）－２－１　ヒトＦＧＦＲ１ＩＩＩｂ発現ベクター（ｐｃＤＮＡ－ＤＥＳＴ４０－ＦＧＦＲ１ＩＩＩｂ）の構築

ヒトＦＧＦＲ１ＩＩＩｂバリアント蛋白質（アイソフォーム２：ＮＰ＿０５６９３４の１－３１０番目のアミノ酸、および３５９－８２０番目のアミノ酸の間に、ＦＧＦＲ１のＩＩＩｂドメイン：ＡＡＢ１９５０２のアミノ酸配列を挿入したもの）をコードするｃＤＮＡをｐｃＤＮＡ－ＤＥＳＴ４０ベクターにクローニングし、ｐｃＤＮＡ－ＤＥＳＴ４０－ＦＧＦＲ１ＩＩＩｂを構築した。

１０）－２－２　Ｃｅｌｌ－ＥＬＩＳＡ

実施例１）－３－１、２）－１－１、及び１０）－２－１で構築した各種ヒトＦＧＦＲ発現ベクターをＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製）を用いて２９３α細胞（実施例１）－６に記載）へ導入し、９６－ｗｅｌｌ　ｐｌａｔｅ（Ｃｏｒｎｉｎｇ社製）に１００μｌずつ分注し、１０％ＦＢＳ含有ＤＭＥＭ培地中で３７℃、５％CO_2の条件下で一晩培養した。培養上清を除去後、５％　ＦＢＳ含有ＰＢＳでｈＦＲ２－１４＿Ｈ３／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ８／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１２／Ｌ１を３μｇ／ｍｌに希釈した溶液を５０μｌ添加し、４℃で１時間静置した。ウェル中の細胞を５％　ＦＢＳ含有ＰＢＳで２回洗浄後、５％　ＦＢＳ含有ＰＢＳで２０００倍希釈したＡｎｔｉ－ｈｕｍａｎ　ＩｇＧ－Ｐｅｒｏｘｉｄａｓｅ ｃｏｎｊｕｇａｔｅ ａｎｔｉｂｏｄｙ ｐｒｏｄｕｃｅｄ ｉｎ ｇｏａｔ（ＳＩＧＭＡ社製）を加えて、４℃で１時間静置した。ウェル中の細胞を５％　ＦＢＳ含有ＰＢＳで３回洗浄した後、ＯＰＤ発色液（ＯＰＤ溶解液（０．０５　Ｍ　クエン酸３ナトリウム、０．１Ｍ　リン酸水素２ナトリウム・１２水　ｐＨ４．５）にｏ－フェニレンジアミン二塩酸塩（和光純薬社製）、H_2O_2をそれぞれ０．４ｍｇ／ｍｌ、０．６％（ｖ／ｖ）になるように溶解）を１００μｌ／ウェルで添加した。時々攪拌しながら発色反応を行い、１Ｍ　ＨＣｌを１００μｌ／ウェルを添加して発色反応を停止させた後、プレートリーダー（ＡＲＶＯ：ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ社）で４９０ｎｍの吸光度を測定した。図１２４に示すとおり、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ３／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ８／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１２／Ｌ１抗体は、ヒトＦＧＦＲ２ＩＩＩｂおよびＦＧＦＲ２ＩＩＩｃの両方に対して特異的に結合することが示された。

１０）－３　示差走査カロリメトリー（ＤＳＣ）を用いたヒト化抗ヒトＦＧＦＲ２抗体（ｈＦＲ２－１４）の熱安定性測定

示差走査カロリメトリー（ＤＳＣ）を用いた、熱安定性の測定を行なった。サンプルは０．５ｍｇ／ｍＬの濃度でＨＢＳｏｒ緩衝液（２５ｍＭヒスチジン

（pH6．0）５％ソルビトールに調製）に溶解させ、４００μＬずつ試料溶液としてＤＳＣ測定に使用した。ＤＳＣ測定条件は、以下のように設定した。即ち、初期温度は２０℃、最終温度を１００℃とし、昇温速度を２００℃／１時間、フィルター時間２秒、フィードバックモードをＬｏｗとした。参照液はＨＢＳｏｒを使用した。全てのＤＳＣ測定装置としては、米国ＧＥヘルスケアバイオサイエンス（株）製ＶＰ－Ｃａｐｉｌｌａｒｙ ＤＳＣ Ｐｌａｔｆｏｒｍを使用した。試料溶液から得られたスキャン曲線からベースライン（試料セルにも参照溶液を充填して得られたスキャン曲線）を差し引いてベースライン補正を行なった。次に、各サンプルの分子量から算出されたモル濃度を用いて濃度のキャリブレーションを行った。図１２５Ａおよび図１２５Ｂに種々のヒト化ＦＧＦＲ２抗体のサーモグラムを示す。それぞれのサーモグラム中の最大のピークについてピークトップを示した温度を熱変性中点Ｔｍとすると、図１２５Ｃに示すように、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１／Ｌ１抗体のＴｍ値が８７．６℃、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ２／Ｌ１抗体のＴｍ値が８７．２℃、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ３／Ｌ１抗体のＴｍ値が７９．５℃、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ４／Ｌ１抗体のＴｍ値が８１．６℃、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ５／Ｌ１抗体のＴｍ値が７７．２℃、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ８／Ｌ１抗体のＴｍ値が８１．０℃、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ９／Ｌ１抗体のＴｍ値が７８．８℃、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１１／Ｌ１抗体のＴｍ値が８０．３℃、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１２／Ｌ１抗体のＴｍ値が８２．２℃、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１９／Ｌ１抗体のＴｍ値が８２．２℃であった。

１０）－４　Ｂｉａｃｏｒｅを用いたヒト化抗ヒトＦＧＦＲ２抗体（ｈＦＲ２－１４）の結合安定性試験

ヒト化抗ヒトＦＧＦＲ２抗体（ｈＦＲ２－１４）の抗原との結合安定性を以下の方法により評価した。

各種ヒト化抗ＦＧＦＲ２抗体（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１／Ｌ１乃至ｈＦＲ２－１４＿Ｈ５／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ８／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ９／Ｌ

1、hFR2－14_H11／L1、hFR2－14_H12／L1、hFR2－14_H19／L1）およびヒトキメラ化抗FGFR2抗体（cFR2－14）を実施例8）－3、実施例9）及び実施例4）－9の方法により発現、精製し、20mg／mLの濃度でHBSor緩衝液（25mMヒスチジン（pH6．0）5％ソルビトールに調製）に溶解させ、40℃に4週間加温して劣化検体を作製した。劣化前検体と劣化後検体につきBiacoreによる結合活性測定を実施例10）－1に示す方法により実施した。Biacore測定結果を図126に示す。

実施例11．ヒト化抗ヒトFGFR2抗体（hFR2－14）のシグナル中和作用

11）－1　ヒト化抗FGFR2抗体（hFR2－14_H1／L1、hFR2－14_H2／L1、hFR2－14_H3／L1、hFR2－14_H4／L1）およびヒトキメラ化抗FGFR2抗体（cFR2－14）のシグナル中和作用

Elk1ルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイによりヒト化抗体のシグナル中和作用を評価するため、pcDNA－DEST40－FGFR2IIIbまたはpcDNA－DEST40－FGFR2IIIcと、pFA2－Elk1（Stratagene社製）、pFR－Luc2CP、およびpGL4.74［hRluc／TK］（Promega社製）を実施例1）－6－2で示す方法により293α細胞に導入し、37℃、5％　CO_2で一晩培養した。翌日、培養上清を除去後、2％　FBSを含むDMEMで希釈したhFR2－14_H1／L1、hFR2－14_H2／L1、hFR2－14_H3／L1、hFR2－14_H4／L1、またはcFR2－14抗体と共に1時間プレインキュベートし、次いで、リガンド（ヒトFGF7またはヒトFGF9、Peprotech社製）を終濃度10ng/mlでウェルに添加した。6時間のインキュベーションの後、Dual－Glo Luciferase Assay

Ｓｙｓｔｅｍ（Ｐｒｏｍｅｇａ社製）を用いて、ホタルルシフェラーゼ活性（特異的シグナル）およびＲｅｎｉｌｌａルシフェラーゼ活性（正規化のためのシグナル）を測定した。各ウェルのデータを正規化するために、ホタル／Ｒｅｎｉｌｌａ比を計算した。図１２７Ａに示す通り、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ２／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ３／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ４／Ｌ１およびｃＦＲ２－１４は、ＦＧＦＲ２ＩＩＩｂ発現細胞において、ＦＧＦ７によるリガンド依存的レポーター活性化を抑制した。また、図１２７Ｂに示す通り、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ２／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ３／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ４／Ｌ１およびｃＦＲ２－１４は、ＦＧＦＲ２ＩＩＩｃ発現細胞において、ＦＧＦ９によるリガンド依存的レポーター活性を抑制した。以上の結果、これらの抗体はＦＧＦＲ２のリガンドによる活性化を阻害する作用を有することが明らかとなった。

１１）－２　ヒト化抗ＦＧＦＲ２抗体（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ３／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ５／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ６／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ７／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ８／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ９／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１０／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１１／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１２／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１３／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１４／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１５／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１６／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１７／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１８／Ｌ１）のシグナル中和作用

Ｅｌｋ１ルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイによりヒト化抗体のシグナル中和作用を評価するため、ｐｃＤＮＡ－ＤＥＳＴ４０－ＦＧＦＲ２ＩＩＩｂまたはｐｃＤＮＡ－ＤＥＳＴ４０－ＦＧＦＲ２ＩＩＩｃと、ｐＦＡ２－Ｅｌｋ１（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ社製）、ｐＦＲ－Ｌｕｃ２ＣＰ、およびｐＧＬ４．７４［ｈＲｌｕｃ／ＴＫ］（Ｐｒｏｍｅｇａ社製）を実施例１）－６－２で示す方法により２９３α細胞に導入し、３７℃、５％　ＣＯ２で一晩培養した。翌

日、培養上清を除去後、２％　ＦＢＳを含むＤＭＥＭで希釈した、実施例８）－３－１で調製したｈＦＲ２－１４＿Ｈ３／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ５／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ６／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ７／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ８／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ９／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１０／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１１／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１２／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１３／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１４／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１５／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１６／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１７／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１８／Ｌ１抗体産生２９３ＦｒｅｅＳｔｙｌｅ細胞（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社製）培養上清と共に１時間プレインキュベートし、次いで、リガンド（ヒトＦＧＦ７、Ｒ＆Ｄ　ｓｙｓｔｅｍｓ社製）を終濃度１０ｎｇ/ｍｌでウェルに添加した。６時間のインキュベーションの後、Ｄｕａｌ－Ｇｌｏ　Ｌｕｃｉｆｅｒａｓｅ　Ａｓｓａｙ　Ｓｙｓｔｅｍ（Ｐｒｏｍｅｇａ社製）を用いて、ホタルルシフェラーゼ活性（特異的シグナル）およびＲｅｎｉｌｌａルシフェラーゼ活性（正規化のためのシグナル）を測定した。各ウェルのデータを正規化するために、ホタル／Ｒｅｎｉｌｌａ比を計算した。図１２８Ａ、図１２８Ｂおよび図１２８Ｃに示す通り、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ３／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ５／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ６／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ７／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ８／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ９／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１０／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１１／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１２／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１３／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１４／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１５／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１６／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１７／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１８／Ｌ１は、ＦＧＦＲ２ＩＩＩｂ発現細胞において、ＦＧＦ７によるリガンド依存的レポーター活性化を抑制した。

１１）－３　ヒト化抗ＦＧＦＲ２抗体（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１２／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１９／Ｌ１）のシグナル中和作用

Ｅｌｋ１ルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイによりヒト化抗体のシグナル中和作用を評価するため、ｐｃＤＮＡ－ＤＥＳＴ４０－ＦＧＦＲ２ＩＩＩｂまたはｐｃＤＮＡ－ＤＥＳＴ４０－ＦＧＦＲ２ＩＩＩｃと、ｐＦＡ２－Ｅｌｋ１（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ社製）、ｐＦＲ－Ｌｕｃ２ＣＰ、およびｐＧＬ４．７４［ｈＲｌｕｃ／ＴＫ］（Ｐｒｏｍｅｇａ社製）を実施例１）－６－２で示す方法により２９３α細胞に導入し、３７℃、５％　CO_2で一晩培養した。翌日、培養上清を除去後、２％　ＦＢＳを含むＤＭＥＭで希釈した実施例８）および９）で調製したｈＦＲ２－１４＿Ｈ１２／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１９／Ｌ１抗体と共に１時間プレインキュベートし、次いで、リガンドであるヒトＦＧＦ７（Ｒ＆Ｄ　ｓｙｓｔｅｍｓ社製）またはヒトＦＧＦ９、Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ社製）を終濃度１０ｎｇ/ｍｌでウェルに添加した。６時間のインキュベーションの後、Ｄｕａｌ－Ｇｌｏ　Ｌｕｃｉｆｅｒａｓｅ　Ａｓｓａｙ　Ｓｙｓｔｅｍ（Ｐｒｏｍｅｇａ社製）を用いて、ホタルルシフェラーゼ活性（特異的シグナル）およびＲｅｎｉｌｌａルシフェラーゼ活性（正規化のためのシグナル）を測定した。各ウェルのデータを正規化するために、ホタル／Ｒｅｎｉｌｌａ比を計算した。図１２９Ａに示す通り、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１２／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１９／Ｌ１は、ＦＧＦＲ２ＩＩＩｂ発現細胞において、ＦＧＦ７によるリガンド依存的レポーター活性化を抑制した。また、図１２９Ｂに示す通り、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１２／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１９／Ｌ１は、ＦＧＦＲ２ＩＩＩｃ発現細胞において、ＦＧＦ９によるリガンド依存的レポーター活性を抑制した。以上の結果、これらの抗体はＦＧＦＲ２のリガンドによる活性化を阻害する作用を有することが明らかとなった。

実施例１２．ヒト化抗ヒトＦＧＦＲ２抗体（ｈＦＲ２－１４）のＡＤＣＣ活性

１２）－１　ヒト化抗ＦＧＦＲ２抗体（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ２／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ３／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ４／Ｌ１）およびヒトキメラ化抗ＦＧＦＲ２抗体（ｃＦＲ２－１４）のＦＧＦＲ

２過剰発現細胞に対するＡＤＣＣ活性

実施例５）－３－２の方法で調製したＦＧＦＲ２ＩＩＩｂを発現させた２９３Ｔ-１ａｃＺ細胞を５０μｌ／ウェルで９６穴Ｕ底マイクロプレートに添加した。そこに終濃度で１乃至１００ｎｇ／ｍｌになるよう実施例５）－３－２に記すＡＤＣＣ用培地で希釈したｈＦＲ２－１４_Ｈ１／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４_Ｈ２／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４_Ｈ３／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４_Ｈ４／Ｌ１、ｃＦＲ２－１４またはヒトＩｇＧを５０μｌ／ウェルで添加し、４℃で１時間静置した。さらに、実施例５）－３－３のエフェクター細胞を７５μｌ添加し、室温で１２００ｒｐｍ×５分間遠心の後、３７℃、５％　CO_2の条件下で一晩培養した。翌日、上清５０μｌを白色プレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ社製）に回収し、β－Ｇｌｏアッセイシステム（Ｐｒｏｍｅｇａ社製）溶液５０μｌを添加し、発光量をプレートリーダー（ＥＮＶＩＳＩＯＮ：ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ社製）で測定した。ＡＤＣＣ活性による細胞溶解率は次式で算出した。

細胞溶解率（％）＝（Ａ－Ｂ）／（Ｃ－Ｂ）×１００

Ａ：サンプルウェルのカウント

Ｂ：自然放出（抗体・エフェクター細胞非添加ウェル）カウントの平均値（ｎ＝３）。抗体添加時とエフェクター細胞添加時にそれぞれＡＤＣＣ用培地を５０μｌ、７５μｌ添加した。それ以外はサンプルウェルと同様の操作を行った。

Ｃ：最大放出（標的細胞を界面活性剤で溶解させたウェル）カウントの平均値（ｎ＝３）。抗体添加時とエフェクター細胞添加時にそれぞれＡＤＣＣ用培地を５０μｌ、７５μｌ添加した。測定時には、細胞を含むウェルに１７５μｌのβ－Ｇｌｏアッセイシステム溶液を添加して混和し、そのうち１００μｌ分を白色プレートに加えて測定を実施した。

図１３０Ａおよび図１３０Ｂに示す通り、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ２／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ３／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ４／Ｌ１、およびｃＦＲ２－１４は、ＦＧＦＲ２ＩＩＩｂ発現細胞に対しＡＤＣＣ活性を有した。

１２）－２　ヒト化抗ＦＧＦＲ２抗体（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ３／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ８／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１２／Ｌ１）のＦＧＦＲ２発現癌細胞株に対するＡＤＣＣ活性

１２）－２－１　標的細胞の調製

ＫＡＴＯＩＩＩ、ＮＣＩ－Ｈ７１６、ＳＮＵ１６細胞は、ＡＤＣＣ用培地で２回洗浄し、セルストレーナー（Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｓｏｎ社製）を通した後、生細胞数をトリパンブルー色素排除試験にて計測した。１×10^5 細胞／ｍｌになるよう再懸濁したものを標的細胞として用いた。

１２）－２－２　ＰＢＭＣ細胞の調製

２０ｍｌリンホセパールＩ（免疫生物研究所社製）に２５ｍｌ健常人血液をゆっくり重層後、室温１５００ｒｐｍ×３０分間遠心した。血漿とリンホセパールＩ（免疫生物研究所社製）の中間に位置する細胞層をスポイトで回収し、２０ｍｌ　１０％　ＦＢＳを含むフェノールレッド不含ＲＰＭＩ１６４０培地（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ社製）に懸濁した。１５００ｒｐｍ×５分間遠心した。上清を除去後　２０ｍｌ　ＡＤＣＣ用培地を添加し、２回洗浄した。生細胞数はトリパンブルー色素排除試験にて計測し、遠心後培地を除去し、ＡＤＣＣ用培地に懸濁し、エフェクター細胞とした。

１２）－２－３　ＡＤＣＣ活性の評価

実施例１２）－２－１の方法で調製したＮＣＩ－Ｈ７１６細胞を５０μｌ／ウェルで９６穴Ｕ底マイクロプレートに添加した。そこに終濃度で１乃至１０

００ｎｇ／ｍｌになるようＡＤＣＣ用培地で希釈したｈＦＲ２－１４＿Ｈ３／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ８／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１２／Ｌ１またはヒトＩｇＧを５０μｌ／ウェルで添加し、４℃で１時間静置した。さらに、実施例１２）－２－２のＰＢＭＣ細胞１３．４ ×１０^{6}／ｍｌを７５μｌ添加し、室温で１２００ｒｐｍ×５分間遠心の後、３７℃、５％ CO_2の条件下で一晩培養した。翌日、ＣｙｔｏＴｏｘ９６ Ｎｏｎ－Ｒａｄｉｏｚｃｔｉｖｅ Ｃｙｔｏｔｏｘｉｃｉｔｙ Ａｓｓａｙ（Ｐｒｏｍｅｇａ社製）キット付属の１０×Ｌｙｓｉｓ Ｓｏｌｕｔｉｏｎを標的細胞および培地のみのウェルに１７．５μｌ／ウェル添加し攪拌後、３７℃、５％ CO_2の条件下で４５分間静置した。室温２００ｇ、４分間遠心後、上清５０μｌ／ウェルを９６穴平底マイクロプレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ社製）に回収し、５０μｌ／ウェルのＳｕｂｓｔｒａｔｅ Ｍｉｘを添加、遮光し室温で３０分間静置した。さらに５０μｌ／ウェルのＳｔｏｐ Ｓｏｌｕｔｉｏｎを添加、４９０ｎｍの吸光度をプレートリーダー（ＡＲＶＯ：ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ社製）で測定した。ＡＤＣＣ活性による細胞溶解率は次式で算出した。

細胞毒性（％）＝（Ａ－Ｂ－Ｃ）／（Ｄ－Ｃ）×１００

Ａ：サンプルウェルのカウント

Ｂ：エフェクター細胞からの自然放出（エフェクター細胞ウェルから培養液ウェルの補正）カウントの平均値（ｎ＝３）。

Ｃ：標的細胞からの自然放出（標的細胞ウェルから培養液ウェルの補正）カウントの平均値（ｎ＝３）。

Ｄ：最大放出（標的細胞を界面活性剤で溶解させたウェルから培養液を界面活

性剤で溶解させたウェルの補正）カウントの平均値（ｎ＝３）。

図１３１に示す通り、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ３／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ８／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１２／Ｌ１は、ＦＧＦＲ２発現癌細胞株ＮＣＩ－Ｈ７１６細胞に対しＡＤＣＣ活性を有した。

１２）－３　ヒト化抗ＦＧＦＲ２抗体（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１２／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１９／Ｌ１）のＦＧＦＲ２発現癌細胞株に対するＡＤＣＣ活性

実施例１２）－２－１の方法で調製したＫＡＴＯＩＩＩ、ＮＣＩ－Ｈ７１６、ＳＮＵ１６細胞を５０μｌ／ウェルで９６穴Ｕ底マイクロプレートに添加した。そこに終濃度で１～１０００ｎｇ／ｍｌになるようＡＤＣＣ用培地で希釈した実施例８）および９）で調製したｈＦＲ２－１４＿Ｈ１２／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１９／Ｌ１またはヒトＩｇＧを５０μｌ／ウェルで添加し、４℃で１時間静置した。さらに、実施例１２）－２－２のエフェクター細胞２０ ×10^6／ｍｌを７５μｌ添加し、室温で１２００ｒｐｍ×５分間遠心の後、３７℃、５％ CO_2の条件下で一晩培養した。翌日、ＣｙｔｏＴｏｘ９６ Ｎｏｎ－Ｒａｄｉｏｚｃｔｉｖｅ Ｃｙｔｏｔｏｘｉｃｉｔｙ Ａｓｓａｙ（Ｐｒｏｍｅｇａ社製）キット付属の１０×Ｌｙｓｉｓ Ｓｏｌｕｔｉｏｎを標的細胞および培地のみのウェルに１７．５μｌ／ウェル添加し攪拌後、３７℃、５％ CO_2の条件下で45分間静置した。室温２００ｇ、４分間遠心後、上清５０μｌ／ウェルを９６穴平底マイクロプレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ社製）に回収し、５０μｌ／ウェルのＳｕｂｓｔｒａｔｅ Ｍｉｘを添加、遮光し室温で３０分間静置した。さらに５０μｌ／ウェルのＳｔｏｐ Ｓｏｌｕｔｉｏｎを添加、４９０ｎｍの吸光度をプレートリーダー（ＡＲＶＯ：ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ社製）で測定した。ＡＤＣＣ活性による細胞溶解率は実施例１２）－２－３に示す計算方法に従い算出した。

図１３２のＡ、Ｂ、Ｃに示す通り、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１２／Ｌ１、ｈＦＲ

２－１４_Ｈ１９／Ｌ１は、ＦＧＦＲ２発現癌細胞株ＮＣＩ－Ｈ７１６、ＳＮＵ－１６、ＫＡＴＯＩＩＩに対しＡＤＣＣ活性を有し、その活性はｈＦＲ２－１４_Ｈ１９／Ｌ１の方が高いことが示された。

実施例１３．ヒト化抗ヒトＦＧＦＲ２抗体（ｈＦＲ２－１４）のＡＤＣＰ活性

１３）－１　ヒト化抗ＦＧＦＲ２抗体（ｈＦＲ２－１４_Ｈ１２／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４_Ｈ１９／Ｌ１）のＦＧＦＲ２発現癌細胞株に対するＡＤＣＰ活性

１３）－１－１　標的細胞の調製

ＫＡＴＯＩＩＩおよびＮＣＩ－Ｈ７１６細胞を回収し、ＰＢＳで３回洗浄後、生細胞数をトリパンブルー色素排除試験にて計測した。1×10^{6} 細胞を分取、遠心後、ＰＫＨ２６ Ｒｅｄ Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ Ｃｅｌｌ Ｌｉｎｋｅｒ Ｋｉｔ ｆｏｒ Ｇｅｎｅｒａｌ Ｃｅｌｌ Ｍｅｍｂｒａｎｅ Ｌａｂｅｌｉｎｇ（Ｓｉｇｍａ社製）付属のＤｉｌｌｕｅｎｔＣ ２００μｌで細胞を懸濁した。標識溶液として１ｍＭ ＰＫＨ２６ ＬｉｎｋｅｒをＤｉｌｌｕｅｎｔＣで１０μＭに希釈後、ただちに、細胞懸濁液と等量のＰＫＨ２６Ｌｉｎｋｅｒ溶液を混合し、室温５分間静置した。５ｍｌの１０％ ＦＢＳ含有ＲＰＭＩ１６４０培地（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ社製）を添加し２回洗浄後、5×10^{5} 細胞／ｍｌになるよう再懸濁したものを標的細胞として用いた。

１３）－１－２　ＰＢＭＣ細胞の調製

２０ｍｌリンホセパールＩ（免疫生物研究所社製）に２５ｍｌ健常人血液をゆっくり重層後、室温１５００ｒｐｍ×３０分間遠心した。血漿とリンホセパールＩ（免疫生物研究所社製）の中間に位置する細胞層をスポイトで回収し、２０ｍｌ １０％ ＦＢＳ含有ＲＰＭＩ１６４０培地（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ社製）に懸濁した。１５００ｒｐｍ×５分間遠心、上清除去後、２０ｍｌ １０％ ＦＢＳ含有ＲＰＭＩ１６４０培地（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏ

ｌｏｇｙ社製）を添加し、２回洗浄した。生細胞数はトリパンブルー色素排除試験にて計測し、エフェクター細胞として用いた。

１３）－１－３　エフェクター細胞の調製

実施例１３）－１－２で調製したＰＢＭＣ細胞はＲｏｂｏＳｅｐ　ｂｕｆｆｅｒ（ＳＴＥＭＣＥＬＬ社製）にて５×１０^{7}細胞／ｍｌになるように調製した。Ｈｕｍａｎ　ｍｏｎｏｃｙｔｅ　Ｅｎｒｉｃｈｍｅｎｔ　Ｋｉｔ　Ｗｉｔｈｏｕｔ　ＣＤ１６　Ｄｅｐｌｅｔｉｏｎ（ＳＴＥＭＣＥＬＬ社製）付属のＥａｓｙＳｅｐ ｈｕｍａｎ　Ｍｏｎｏｃｙｔｅ　ｅｎｒｉｃｈｍｅｎｔ　ｃｏｃｋｔａｉｌ　をＰＢＭＣ細胞懸濁液１ｍｌあたり５０μｌ添加した。４℃　１０分間反応後、ＥａｓｙＳｅｐ Ｍａｇｎｅｔｉｃ　ＰａｒｔｉｃｌｅｓをＰＢＭＣ細胞懸濁液１ｍｌあたり５０μｌ添加した。４℃　５分間反応後、２．５ｍｌになるようにＲｏｂｏＳｅｐ　ｂｕｆｆｅｒ（ＳＴＥＭＣＥＬＬ社製）を添加し、ＥａｓｙＳｅｐ　Ｍａｇｎｅｔにセットした。２分３０秒後に上清を回収した後１２００ｒｐｍ×５分間遠心し、Ｍｏｎｏｃｙｔｅ画分を分取した。１０％　ＦＢＳ含有ＲＰＭＩ１６４０培地（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ社製）を添加１回洗浄後、１０ｎｇ／ｍｌ　ＧＭ－ＣＳＦ（ＰＥＰＲＯＴＥＣ社製）と１０ｎｇ／ｍｌ　Ｍ－ＣＳＦ（ＰＥＰＲＯＴＥＣ社製）を含む１０％ＦＢＳ含有ＲＰＭＩ１６４０培地（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ社製）を添加し、浮遊用２２５ｃｍ^{2}フラスコ（住友ベークライト社製）に播種した。３７℃、５％　CO_2の条件下で１４日間培養した。培養期間中は、３～４日毎に１０ｎｇ／ｍｌ　ＧＭ－ＣＳＦ（ＰＥＰＲＯＴＥＣ社製）と１０ｎｇ／ｍｌ　Ｍ－ＣＳＦ（ＰＥＰＲＯＴＥＣ社製）を含む１０％　ＦＢＳ含有ＲＰＭＩ１６４０培地（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ社製）に交換した。１４日後、分化誘導されたマクロファージは０．０５％Ｔｒｙｐｓｉｎ－ＥＤＴＡ（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ社製）を添加し、３７℃　４０分間反応後、剥離した。１０％　ＦＢＳ含有ＲＰＭＩ１６４０培地（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ

社製）を添加し２回洗浄後、５×１０^5 細胞／ｍｌになるように、１０ｎｇ／ｍｌのＭ－ＣＳＦ（ＰＥＰＲＯＴＥＣ社製）と２５０Ｕ／ｍｌのＩＦＮ－γ（ＰＥＰＲＯＴＥＣ社製）を含む１０％　ＦＢＳ含有ＲＰＭＩ１６４０培地（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ社製）に再懸濁し、エフェクター細胞として用いた。

１３）－１－４　ＡＤＣＰ活性の評価

実施例１３）－１－１の方法で調製した標的細胞１００μｌ／ウェルを超低接着表面９６穴Ｕ底マイクロプレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ社製）に添加した。そこに終濃度で０．５乃至５００ｎｇ／ｍｌになるよう１０％　ＦＢＳ含有ＲＰＭＩ１６４０培地（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ社製）で希釈した実施例８）および9）で調製したｈＦＲ２－１４_Ｈ１２／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４_Ｈ１９／Ｌ１、またはヒトＩｇＧを１００μｌ／ウェル添加し、４℃　３０分間静置した。室温１２００ｒｐｍ×５分間遠心、上清除去後、１００μｌ／ウェルの１０％　ＦＢＳ含有ＲＰＭＩ１６４０培地（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ社製）で懸濁した。実施例１３）－１－３で調製した、５×１０^5 細胞／ｍｌ１００μｌ／ウェルのエフェクター細胞を添加後、３７℃、５％　CO_2 の条件下で３時間静置した。４℃　１２００ｒｐｍ×５分間遠心、上清除去後、２００μｌ／ウェルの５％ＦＢＳ含有ＰＢＳで洗浄した。細胞に４５μｌ／ウェルの５％ＦＢＳ含有ＰＢＳ、５μｌ／ウェルのＡＰＣ　ｈｕｍａｎ　ＣＤ１１ｂ（Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｓｏｎ社製）を添加し、　４℃、１５分間静置した。２００μｌ／ウェルの５％ＦＢＳ含有ＰＢＳで２回洗浄した。２００μｌ/ウェルの１％パラホルムアルデヒド含有ＰＢＳで懸濁し、４℃、一晩放置した。翌日フローサイトメトリー（ＦＡＣＳ　ＣａｎｔｏＩＩ：Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｓｏｎ社製）にて測定した。データ解析にはＦｌｏｗｊｏ（ＴｒｅｅＳｔａｒ社製）を用いた。ＦＳＣ（前方散乱光）／ＳＳＣ（側方散乱光）で展開したのち、ＰＥ陽性（Ａ）、ＡＰＣ、ＰＥ共に陽性（Ｂ）となる細胞数を算

出した。ＡＰＣ、ＰＥ共に陽性（Ｂ）となった細胞をマクロファージにより標的細胞が貪食されたものとした。ＡＤＣＰ活性による細胞貪食率は次式で算出した。

細胞貪食率（％）＝Ｂ／（Ａ＋Ｂ）×１００

図１３３Ａ、図１３３Ｂに示す通り、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１２／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１９／Ｌ１は、ＦＧＦＲ２発現癌細胞株ＮＣＩ－Ｈ７１６、ＫＡＴＯＩＩＩに対しＡＤＣＰ活性を有した。

実施例１４．ヒト化抗ＦＧＦＲ２抗体（ｈＦＲ２－１４）のｉｎ ｖｉｖｏ抗腫瘍活性

１４）－１　ヒト化抗Ｆ　ＧＦＲ２抗体（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ２／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ３／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ４／Ｌ１）のヒト胃癌細胞株ＳＮＵ－１６皮下移植モデルにおけるｉｎ　ｖｉｖｏ抗腫瘍活性

５×１０^{6}ｃｅｌｌｓのヒト胃癌株ＳＮＵ－１６（ＡＴＣＣより購入）を５０％マトリゲル（日本ＢＤより購入）で懸濁し、ヌードマウス（ＣＡｎＮ．Ｃｇ－Ｆｏｘｎ１^{nu}／ＣｒｌＣｒｌｊ、日本チャールス・リバーより購入）の腋窩部皮下に移植した。腫瘍体積をもとに群分けをし、移植の７、１０、１４、１７、２１日後に実施例８）－３で調製したヒト化抗ＦＧＦＲ２抗体（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ２／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ３／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ４／Ｌ１）を１．５、１５ ｍｇ／ｋｇで担癌マウスの腹腔内に投与した（ｎ＝８）。移植腫瘍の長径および短径を週２回、電子デジタルノギス（株式会社ミツトヨ製）を用いて測定し、以下に示す計算式により腫瘍体積を算出した。

腫瘍体積（ｍｍ^{3}）＝１／２×短径（ｍｍ）×短径（ｍｍ）×長径（ｍｍ）

ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１／Ｌ１抗体の結果を図１３４Ａに示した。最終測定日である移植２１日後における腫瘍増殖抑制率は、１．５ｍｇ／ｋｇ投与群で５８％、１５ｍｇ／ｋｇ投与群で５３％であった。

ｈＦＲ２－１４＿Ｈ２／Ｌ１抗体の結果を図１３４Ｂに示した。最終測定日である移植２１日後における腫瘍増殖抑制率は、１．５ｍｇ／ｋｇ投与群で５８％、１５ｍｇ／ｋｇ投与群で５８％であった。

ｈＦＲ２－１４＿Ｈ３／Ｌ１抗体の結果を図１３４Ｃに示した。最終測定日である移植２１日後における腫瘍増殖抑制率は、１．５ｍｇ／ｋｇ投与群で６４％、１５ｍｇ／ｋｇ投与群で４１％であった。

ｈＦＲ２－１４＿Ｈ４／Ｌ１抗体の結果を図１３４Ｄに示した。最終測定日である移植２１日後における腫瘍増殖抑制率は、１．５ｍｇ／ｋｇ投与群で７０％、１５ｍｇ／ｋｇ投与群で３９％であった。

１４）－２　ヒト化抗ＦＧＦＲ２抗体（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ５／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ８／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ９／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１１／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１２／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１９／Ｌ１）のヒト胃癌細胞株ＳＮＵ－１６皮下移植モデルにおけるｉｎ　ｖｉｖｏ抗腫瘍活性

５×１０^{6}ｃｅｌｌｓのヒト胃癌株ＳＮＵ－１６（ＡＴＣＣより購入）を５０％マトリゲル（日本ＢＤより購入）で懸濁し、ヌードマウス（ＣＡｎＮ．Ｃｇ－Ｆｏｘｎｌ^{nu}／ＣｒｌＣｒｌｊ、日本チャールス・リバーより購入）の腋窩部皮下に移植した。腫瘍体積をもとに群分けをし、移植の７、１０（または１１）、１４、１７（または１８）日後に実施例８）－３で調製したヒト化抗体（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ５／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ８／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ９／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１１／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１２／Ｌ１）または実施例９）で調製したヒト化抗体（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１９／Ｌ１）を２、２０ｍｇ／ｋｇで担癌マウスの腹腔内にそれぞれ投与した（ｎ＝８

または９）。移植腫瘍の長径および短径を週２回、電子デジタルノギス（株式会社ミツトヨ製）を用いて測定し、以下に示す計算式により腫瘍体積を算出した。

腫瘍体積（mm^3）＝１／２×短径（mm）×短径（mm）×長径（mm）

ｈＦＲ２－１４＿Ｈ５／Ｌ１の結果を図１３５Ａに示した。最終測定日である移植２１日後における腫瘍増殖抑制率は、２ｍｇ／ｋｇ投与群で４１％、２０ｍｇ／ｋｇ投与群で５１％であった。

ｈＦＲ２－１４＿Ｈ８／Ｌ１の結果を図１３５Ｂに示した。最終測定日である移植２１日後における腫瘍増殖抑制率は、２ｍｇ／ｋｇ投与群で３０％、２０ｍｇ／ｋｇ投与群で３０％であった。

ｈＦＲ２－１４＿Ｈ９／Ｌ１の結果を図１３５Ｃに示した。最終測定日である移植２１日後における腫瘍増殖抑制率は、２ｍｇ／ｋｇ投与群で１％、２０ｍｇ／ｋｇ投与群で２３％であった。

ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１１／Ｌ１の結果を図１３５Ｄに示した。最終測定日である移植２１日後における腫瘍増殖抑制率は、２ｍｇ／ｋｇ投与群で６１％、２０ｍｇ／ｋｇ投与群で４２％であった。

ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１２／Ｌ１の結果を図１３５Ｅに示した。最終測定日である移植２１日後における腫瘍増殖抑制率は、２ｍｇ／ｋｇ投与群で３６％、２０ｍｇ／ｋｇ投与群で５８％であった。

ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１９／Ｌ１の結果を図１３５Ｆに示した。最終測定日である移植２１日後における腫瘍増殖抑制率は、２ｍｇ／ｋｇ投与群で７０％、２０ｍｇ／ｋｇ投与群で４０％であった。

１４）－３　ヒト化抗ＦＧＦＲ２抗体（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１２／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１９／Ｌ１）のヒト大腸癌細胞株ＮＣＩ－Ｈ７１６ブロック移植モデルにおけるｉｎ　ｖｉｖｏ抗腫瘍活性

ヒト大腸癌株ＮＣＩ－Ｈ７１６（ＡＴＣＣより購入）の腫瘍ブロック（５ｘ５ｘ５mm^3）を、ヌードマウス（ＣＡｎＮ．Ｃｇ－Ｆｏｘｎ１^{nu}／ＣｒｌＣｒ

ｌｊ、日本チャールス・リバーより購入）の腋窩部皮下に移植した。移植当日および移植の３、７、１０、１４、１７、２１、２４日後に実施例９）で調製したヒト化抗体（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１２／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１９／Ｌ１）を２０ｍｇ／ｋｇで担癌マウスの腹腔内にそれぞれ投与した（ｎ＝１１）。移植腫瘍の長径および短径を週２回、電子デジタルノギス（株式会社ミツトヨ製）を用いて測定し、以下に示す計算式により腫瘍体積を算出した。

腫瘍体積（mm^3）＝１／２×短径（ｍｍ）×短径（ｍｍ）×長径（ｍｍ）

ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１２／Ｌ１の結果を図１３６Ａに示した。最終測定日である移植２８日後における腫瘍増殖抑制率は９９％であった。

ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１９／Ｌ１の結果を図１３６Ｂに示した。最終測定日である移植２８日後における腫瘍増殖抑制率は９９％であった

１４）－４　ヒト化抗ＦＧＦＲ２抗体（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１２／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１９／Ｌ１）のヒト大腸癌細胞株ＮＣＩ－Ｈ７１６－ｌｕｃ腹膜播種モデルにおけるｉｎ　ｖｉｖｏ抗腫瘍活性

３×10^6ｃｅｌｌｓのＬｕｃｉｆｅｒａｓｅ遺伝子発現細ヒト大腸癌株ＮＣＩ－Ｈ７１６－ｌｕｃ（ＮＣＩ－Ｈ７１６はＡＴＣＣより購入し、Ｌｕｃｉｆｅｒａｓｅ遺伝子を遺伝子導入）を生理食塩水（大塚製薬より購入）で懸濁し、ＮＯＧマウス（ＮＯＤ／Ｓｈｉ－ＳＣＩＤ，　ＩＬ－２Ｒγｎｕｌｌ、実験動物中央研究所より購入）の腹腔内に移植した。移植１日後に体重をもとに群分けをし、移植の１、５、８、１２、１６、１９、２６日後に実施例８）および９）で調製したヒト化抗体（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１２／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１９／Ｌ１）を２０ ｍｇ／ｋｇで担癌マウスの腹腔内にそれぞれ投与した（ｎ＝１１）。マウスの死亡日を記録し、生存率（％）を算出した。移植３７日後、ＶｉｖｏＧｌｏ　Ｌｕｃｉｆｅｒｉｎ（プロメガより購入）を１５０ｍｇ／ｋｇで担癌マウスの尾静脈内に投与し、投与１０分後に担癌マウスのＬｕｃｉｆｅｒａｓｅ活性を、ＩＶＩＳ（キャリパーライフサイエンス製）を用

いて測定した。Ｌｕｃｉｆｅｒａｓｅ活性（ｐ／ｓ／ｃｍ^2／ｓｒ）はＬｉｖｉｎｇ　Ｉｍａｇｅ（キャリパーライフサイエンス製）を用いて定量化した。

ヒト化抗体の腫瘍増殖抑制効果を図１３７の（Ａ）に示した。移植３７日後でのＬｕｃｉｆｅｒａｓｅ活性を指標とした非投与群に対する腫瘍増殖抑制率は、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１２／Ｌ１投与群で９８％、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１９／Ｌ１投与群で９８％であった。

ヒト化抗体の延命効果を図１３７の（Ｂ）に示した。移植９３日後における生存率は非投与群が０％であるのに対し、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１２／Ｌ１抗体投与群で６４％、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１９／Ｌ１抗体投与群で９１％であった。

実施例１５．ヒト化抗ＦＧＦＲ２抗体（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ３／Ｌ１）抗体とＦＧＦＲ２蛋白質との複合体のＸ一線構造解析

１５）－１　結晶化用ＦＧＦＲ２蛋白質の調製

１５）－１－１　結晶化用ＦＧＦＲ２蛋白質発現ベクターの作製

ヒトＦＧＦＲ２ＩＩＩｂ・ＩＩＩｃ（図７８：配列番号７０および図７９：配列番号７１）共通部分のアミノ酸番号１４８－２４９のアミノ酸配列からなる領域（以下「Ｄ２」と記す。）を発現するベクターを構築するため、Ｄ２増幅用プライマーセット：

Ｄ２３ｆｗ：５’－ＣＴＧＴＴＴＣＡＡＧＧＴＣＣＧＡＧＣＡＡＴＡＡＣＡＡＡＣＧＴＧＣＡＣＣＧＴＡＴＴＧＧ－３’（図１２０：配列番号１１２）及び、

Ｄ２ｒｖ：５’－ＣＧＣＡＡＧＣＴＴＧＴＣＧＡＣＴＣＡＡＡＣＡＡＣＡＴＣＣＡＧＡＴＧＡＴＡＧＧＴＡＴＧ－３’　（図１２１：配列番号１１３）、

のプライマーセットを用いて、ヒトＦＧＦＲ２（図７８：配列番号７０および図７９：配列番号７１）のアミノ酸番号１２６－３１３を含むベクタープラスミドを鋳型としてＰＣＲ反応を行った。得られたＰＣＲ産物を、あらかじめＨｉｓタグおよびＨＲＶ３ｃプロテアーゼ切断サイトを導入したｐＥＴ２４ｂ（＋）（Ｎｏｖａｇｅｎ社製）にＩｎ－Ｆｕｓｉｏｎ ＨＤ Ｃｌｏｎｉｎｇ Ｋ

ｉｔ（タカラバイオ社製）を用いて導入した（以下「ｐＥＴ２４ｂ（＋）－Ｄ２」と略す。また、以下及び図中で「ｐＥＴ２４ｂ（＋）－Ｄ２」によって発現する組換え蛋白質をＦＧＦＲ２Ｄ２と記す）。

１５）－１－２　結晶化用ＦＧＦＲ２蛋白質（ＦＧＦＲ２Ｄ２）の作製

発現プラスミドｐＥＴ２４ｂ（＋）－Ｄ２で大腸菌Ｏｒｉｇａｍｉ２（ＤＥ３）（Ｎｏｖａｇｅｎ社製）を形質転換し、２５μｇ／ｍｌのカナマイシン（Ｗａｋｏ社製）、１２μｇ／ｍｌのテトラサイクリン（Ｗａｋｏ社製）を添加したＴｅｒｒｉｆｉｃ培地（ＦＯＲＭＥＤＩＵＭ社製）５０ｍＬで３７℃、２００ｒｐｍで一晩前培養を行った。前培養した溶液５０ｍＬを同じく２５μｇ／ｍｌのカナマイシンおよび１２μｇ／ｍｌのテトラサイクリンを添加したＴｅｒｒｉｆｉｃ培地１Ｌに加え、３７℃２５０ｒｐｍで１時間培養した後温度を１６℃に下げ、１ｍＭＩＰＴＧ添加でＦＧＦＲ２Ｄ２の発現を誘導し、２６時間培養を行った。４５００ｒｐｍ、３０分間遠心して集菌し、インヒビターカクテル（Ｒｏｃｈｅ社製）を溶かした結合バッファー（５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－塩酸　ｐＨ８．０、４００ｍＭ　ＮａＣｌ、２０ｍＭ　Ｉｍｉｄａｚｏｌｅ）に懸濁した後、氷上で超音波破砕を行った。２５０００ｒｐｍ、２０分間遠心して上清を回収し、ＨｉｓＴｒａｐ　ＦＦ　ｃｒｕｄｅカラム（ＧＥヘルスケア社製）に供与した。結合バッファーで洗浄した後に、溶出バッファー（５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ　ｐＨ８．０、４００ｍＭ　ＮａＣｌ、５００ｍＭ　Ｉｍｉｄａｚｏｌｅ）にてグラジエント溶出し、目的タンパク質を含むフラクションを集めた。集めたサンプルは、バッファー（５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－塩酸　ｐＨ７．５、０．１ｍＭ　ＥＤＴＡ）で希釈した後、ＨｉＴｒａｐ　ＳＰ　ＨＰに供与し、バッファー（５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－塩酸　ｐＨ７．５、１Ｍ　ＮａＣｌ、０．１ｍＭ　ＥＤＴＡ）でグラジエント溶出し、目的タンパク質を含むフラクションを集めた。得られたサンプルは、バッファー（２５ｍＭ　ＨＥＰＥＳ　ｐＨ７．５、３００ｍＭ　ＮａＣｌ、０．１ｍＭ ＥＤＴＡ）で平衡化したゲル濾過

カラム（ＨｉＬｏａｄ　１６／６００　Ｓｕｐｅｒｄｅｘ　７５　ｐｇ：ＧＥヘルスケア社製）に供与し、目的タンパク質を含むフラクションを集めた。得られたＦＧＦＲ２Ｄ２はアミコンウルトラ－４（メルクミリポア社製）で１５ｍｇ／ｍＬに濃縮した。

１５）－２　ヒト化抗ＦＧＦＲ２抗体（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ３／Ｌ１）のＦａｂフラグメントの作製

ｈＦＲ２－１４＿Ｈ３／Ｌ１は２０ｍＭ リン酸１０ｍＭ　ＥＤＴＡ（ｐＨ７．０）に透析した後、ＡｍｉｃｏｎＵｌｔｒａ１５　ＭＷＣＯ　１０Ｋ（ミリポア社製）で２４ｍｇ/ｍｌに濃縮し１．９ｍｌ調製した。２０ｍＭ リン酸１０ｍＭ　ＥＤＴＡ（ｐＨ７．０）で０．００５ｍＭに調製した、Ｃｙｓｔｅｉｎｅ（Ｓｉｇｍａ社製）を５．５ｍｌと２０ｍＭ リン酸１０ｍＭ　ＥＤＴＡ（ｐＨ７．０）で１／１００に希釈したｐａｐａｉｎ（Ｓｉｇｍａ社製）を０．１９ｍｌ添加し、３７℃、１８時間反応させた。１８時間後、２０ｍＭ リン酸１０ｍＭ　ＥＤＴＡ（ｐＨ７．０）で１２０ｍＭに溶解させたＮ－ｅｔｈｙｌｍａｌｅｉｍｉｄｅ（東京化成製）を２．５３ｍｌ添加して反応を停止させた。反応液はＰＢＳで平衡化させたＭａｂＳｅｌｅｃｔ　ＳｕＲｅ　５ｍｌ（ＧＥヘルスケア社製）に添加し、素通りにＦａｂフラグメントに相当するフラクション１８ｍｌを回収した。ＡｍｉｃｏｎＵｌｔｒａ１５　ＭＷＣＯ　１０Ｋ（ミリポア社製）で濃縮し、５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、２０ｍＭ　ＮａＣｌ（ｐＨ７．５）で平衡化させたＳｕｐｅｒｄｅｘ２００　１６/６０（ＧＥヘルスケア社製）に添加し、Ｆａｂフラグメントに相当するフラクション１８ｍｌを回収した（以下「Ｈ３Ｌ１Ｆａｂフラグメント」と記す）。

１５）－３　Ｈ３Ｌ１ＦａｂフラグメントとＦＧＦＲ２Ｄ２複合体試料の調製

Ｈ３Ｌ１Ｆａｂフラグメント１２．５ｍｇ／ｍＬ１ｍＬに対し、１５ｍｇ/ｍＬのＦＧＦＲ２Ｄ２を０．５ ｍＬ混合し、４℃で一晩置いたのち、結合バッフ

ァー（５０mM Ｔｒｉｓ－塩酸 ｐＨ８．０、４００mM ＮａＣｌ、２０mM Ｉｍｉｄａｚｏｌｅ）で平衡化したＨｉｓＴｒａｐ ＦＦ ｃｒｕｄｅに添加した。結合バッファーで洗浄した後に、溶出バッファー（５０mM Ｔｒｉｓ－塩酸 ｐＨ８．０、４００mM ＮａＣｌ、５００mM Ｉｍｉｄａｚｏｌｅ）にて溶出した。溶出サンプルはバッファー（２５mM Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ ｐＨ７．５、５０mMＮａＣｌ）で平衡化したゲル濾過カラム（ＨｉＬｏａｄ １６／６００ Ｓｕｐｅｒｄｅｘ ２００ ｐｇ：ＧＥヘルスケア社製）に添加し、複合体に相当するフラクション１１mＬを回収した。

１５）－４ Ｈ３Ｌ１ＦａｂフラグメントとＦＧＦＲ２Ｄ２複合体の結晶化と構造解析

得られたＨ３Ｌ１ＦａｂとＦＧＦＲ２Ｄ２の複合体を２２ｍｇ／ｍＬに濃縮し、結晶化に用いた。結晶化には蒸気拡散法を用いた。タンパク質溶液０．５乃至０．７μＬに沈殿剤溶液（１．２２５M 硫酸アンモニウム、０．１５M Ｔｒｉｓ－塩酸 ｐＨ８．５）を等量加えた溶液を、０．４５mＬの沈殿剤溶液を入れた密閉容器に両溶液が触れ合わないように収め、２０℃で静置した。３日後に０．２mm×０．２mm×０．２mmの単結晶が得られた。

得られた結晶を３０％（ｖ／ｖ）ｅｔｈｙｌｅｎｅｇｌｙｃｏｌを加えた沈殿剤溶液に浸し、続いて－１８０℃の窒素気流下で凍結した。高エネルギー加速器研究機構放射光科学研究施設のＢＬ５Ａにて９５Ｋ窒素気流下でＸ線回折データを収集した。得られた回折像からソフトウェアＨＫＬ２０００（ＨＫＬ社製）を用いて回折強度を数値化し、結晶構造因子を求めた。結晶は正方晶系で空間群はＰ４１２１２、結晶の単位格子はａ＝ｂ＝６０．５７ Å、ｃ＝３３１．２ Åであった。

得られた構造因子とＦＧＦＲ２（ＰＤＢコード：３ＯＪ２より該当部分を抜粋）及びＦａｂ（過去に結晶構造解析した抗体構造を利用）の三次元構造座標を用いて分子置換法を行い、位相を決定した。計算にはソフトウェアｐｈａｓ

ｅｒ（ＣＣＰ４：Ｃｏｌｌａｂｏｒａｔｉｖｅ Ｃｏｍｐｕｔａｔｉｏｎａｌ Ｐｒｏｊｅｃｔ Ｎｏ．　４）を使用した。結晶は非対称単位に１複合体を含んでいた。

ソフトウェアｒｅｆｍａｃ５（ＣＣＰ４）を用いて構造の精密化を行い、ソフトウェアｃｏｏｔを用いてモデルの修正を行った。この操作を繰り返し行い、２．３Å分解能で最終のＲ値２１．８％、ｆｒｅｅ　Ｒ値２５．８％を得た。モデルは１複合体から成り、Ｈ３Ｌ１ＦａｂのＬ鎖アミノ酸残基１－２１５、Ｈ鎖アミノ酸残基１－２２１、ＦＧＦＲ２Ｄ２のアミノ酸残基１５０－２４９、硫酸イオン１個、及び２８５個の水分子を含む。Ｈ３Ｌ１ＦａｂのＬ鎖のＣ末１残基、Ｈ鎖のＣ末４残基、ＦＧＦＲ２Ｄ２のＨｉｓタグおよびプロテアーゼ切断箇所を含むＮ末２０残基はそれぞれ電子密度が明瞭でなかったためモデル構築していない。

決定されたＨ３Ｌ１Ｆａｂから４Å以内にあるＦＧＦＲ２Ｄ２のアミノ酸残基は以下の通りである：Ｔｙｒ１５５、Ｔｈｒ１５７、Ｌｙｓ１７６、Ａｌａ１８１、Ｇｌｙ１８２、Ｇｌｙ１８３、Ａｓｎ１８４、Ｐｒｏ１８５、Ｍｅｔ１８６、Ｔｈｒ１８８、Ｇｌｎ２００、Ｇｌｕ２０１、Ｇｌｙ２０５、Ｇｌｙ２０６、Ｌｙｓ２０８、Ｖａｌ２０９、Ａｒｇ２１０、Ａｓｎ２１１、Ｇｌｎ２１２、Ｈｉｓ２１３、Ｔｒｐ２１４、Ｉｌｅ２１７。図１３８に複合体全体のリボンモデルを、また図１３９にＦＧＦＲ２Ｄ２／Ｈ３Ｌ１Ｆａｂ複合体構造中のＤ２領域をＦＧＦＲ２／ＦＧＦ１の複合体構造（ＰＤＢコード：３ＯＪ２）の該当部分に重ね合わせた図をそれぞれ示した。

実施例１６．ラット抗ＦＧＦＲ２抗体ＦＲ２－１０を用いた免疫染色

１６）－１　免疫染色用サンプルの調製

１６）－１－１　ＦＧＦＲファミリー分子発現細胞株の調製

２９３α細胞（実施例１）－６に記載）を１０％　ＦＢＳ含有ＤＭＥＭ培地中６×１０^{6}細胞／２２５ｃｍ^{2}フラスコ（住友ベークライト社製）となるよう

に調製し、３７℃、５％　CO^2で一晩培養した。実施例１）－３－１、２）－１－１　、および１０）－２－１で構築したＦＧＦＲ１ＩＩＩｂ、ＦＧＦＲ１ＩＩＩｃ、ＦＧＦＲ２ＩＩＩｂ、ＦＧＦＲ２ＩＩＩｃ、ＦＧＦＲ３ＩＩＩｂ、ＦＧＦＲ３ＩＩＩｃ、およびＦＧＦＲ４の発現ベクター、または空ベクター、すなわち、ｐｃＤＮＡ－ＤＥＳＴ４０－ＦＧＦＲ１ＩＩＩｂ、ｐｃＤＮＡ－ＤＥＳＴ４０－ＦＧＦＲ１ＩＩＩｃ、ｐｃＤＮＡ－ＤＥＳＴ４０－ＦＧＦＲ２ＩＩＩｂ、ｐｃＤＮＡ－ＤＥＳＴ４０－ＦＧＦＲ２ＩＩＩｃ、ｐｃＤＮＡ－ＤＥＳＴ４０－ＦＧＦＲ３ＩＩＩｂ、ｐｃＤＮＡ－ＤＥＳＴ４０－ＦＧＦＲ３ＩＩＩｃ、ｐｃＤＮＡ－ＤＥＳＴ４０－ＦＧＦＲ４、およびｐｃＤＮＡ－ＤＥＳＴ４０をＦｕＧＥＮＥ６（ロシュダイアグノスティック社製）を用いて導入し、３７℃、５％CO_2の条件下で二晩培養した。得られた細胞をＴｒｙｐＬＥｘｐｒｅｓｓ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ社製）を用いて回収し、遠心してペレットにした後、ＰＢＳで１回洗浄し、遠心して得られたペレットを２０％中性緩衝ホルマリンで固定した。

１６）－１－２　ＦＧＦＲ２発現癌細胞株の調製

１０％ＦＢＳ／ＲＰＭＩで培養したヒト胃癌株ＳＮＵ－１６およびヒト大腸癌株ＮＣＩ－Ｈ７１６（ＡＴＣＣより購入）をそれぞれ回収し、遠心してペレットにした後、２０％中性緩衝ホルマリンで固定した。１０％ＦＢＳ／ＤＭＥＭで培養したヒト胃癌株ＫＡＴＯＩＩＩ（ＡＴＣＣより購入）を回収し、遠心してペレットにした後、２０％中性緩衝ホルマリンで固定した。

１６）－１－３　ＦＧＦＲ２発現癌細胞株ゼノグラフトモデル腫瘍サンプルの作製

5×10^6細胞のＳＮＵ－１６を５０％マトリゲル（日本ベクトン・ディッキンソン株式会社製）で懸濁し、ヌードマウス（ＣＡｎＮ．Ｃｇ－Ｆｏｘｎl^{nu}／ＣｒｌＣｒｌｊ、日本チャールス・リバーより購入）の腋窩部皮下に移植し

た。移植２０日後に腫瘍を回収し、マイルドホルム（和光純薬工業株式会社製）で固定した。

３×１０^{5}細胞のＫＡＴＯＩＩＩを１００％マトリゲル（日本ベクトン・ディッキンソン株式会社製）で懸濁し、ＳＣＩＤマウス（ＣＢ１７／ｌｃｒ－Ｐｒｋｄｃ^{scid}／ＣｒｌＣｒｌｊ、日本チャールス・リバーより購入）の腋窩部皮下に移植した。移植３０日後に腫瘍を回収し、マイルドホルム（和光純薬工業株式会社製）で固定した。

２．５×１０^{6}細胞のＮＣＩ－Ｈ７１６を１００％マトリゲル（日本ＢＤより購入）で懸濁し、ヌードマウス（ＣＡｎＮ．Ｃｇ－Ｆｏｘｎｌ^{nu}／ＣｒｌＣｒｌｊ、日本チャールス・リバーより購入）の腋窩部皮下に移植した。移植２１日後に腫瘍を回収した。

１６）－２　パラフィン包埋、薄切

パラフィン包埋、薄切は一般的な手法であり、用いる器具や機器は特に制限はない。

実施例１６）－１－１、１６）－１－２で調製した細胞は１５ｍＬチューブに回収し、１５００ｒｐｍで５分遠心し上清を除去した。細胞ペレットに２０％中性緩衝ホルマリン（和光純薬工業社製）３ｍＬを重層し、室温で３０分間以上静置して固定した。その後クロロホルム５ｍＬを添加し、直ちに１０００ｒｐｍで１０分間遠心し、直ちにホルマリン層を除去した後、ホルマリン層とクロロホルム層の間に形成された細胞ペレットを回収した。細胞ペレットをナイロンメッシュ袋に入れ、組織標本用のカセット（ユニカセットスタンダード、サクラファインテックジャパン株式会社製）に入れ、カセットごとエタノールに浸してクロロホルムを洗い流した。実施例１６）－１－３で作製したゼノグラフト組織は、マイルドホルム（和光純薬から購入）で固定後、切り出し面をトリミングしカセットに入れた。

細胞ペレットおよびゼノグラフト組織は、通常の方法でパラフィン包埋した。

自動固定包埋装置（ティシュー・テックＶＩＰ５ジュニア：サクラファインテックジャパン株式会社製）を用いて脱水、脱脂、パラフィン浸透させた。自動固定包埋装置よりカセットを取り出し、パラフィン包埋ブロック作製装置（ティシュー・テックＴＥＣプラス：サクラファインテックジャパン株式会社製）のパラフィン槽に移した。同装置にセットした包埋皿に融解したパラフィンを少量流し込み、この包埋皿のパラフィン内に、パラフィン槽から出したカセット容器内、あるいはナイロンメッシュ内の細胞ペレットあるいは組織をピンセットで取り出してセットした。次いで包埋皿の上に包埋枠としてカセットを乗せて、上から融解パラフィンを流し込み、細胞あるいは組織と一体となった包埋枠を含む包埋皿を冷却部上に置いて冷却した。パラフィンが固まったら包埋皿より取り出し、包埋ブロックとして薄切に供した。薄切は、上記で作製した包埋ブロックを、ミクロトーム（ＩＶＳ－４１０：サクラファインテックジャパン株式会社製）で厚さ３μｍに薄切した。薄切した切片を剥離防止スライドグラス（プラチナ：松浪硝子工業株式会社製）に貼った。５０℃のパラフィン伸展器（サクラファインテックジャパン株式会社製）上で一晩乾燥させ、スライドケースに収容し、デシケータ内で保管した。

１６）－３　染色

染色は、自動染色装置（ディスカバリー　Ｕｌｔｒａ：Ｖｅｎｔａｎａ　Ｍｅｄｉｃａｌ　Ｓｙｓｔｅｍｓ社製）を用いて実施した。染色過程の反応温度は３７℃で、それ以外の場合のみ記載した。各種試薬の添加液量は全て一滴に設定した。脱パラフィンはＥＺバッファー（Ｖｅｎｔａｎａ　Ｍｅｄｉｃａｌ　Ｓｙｓｔｅｍｓ社製）、６８℃で４分間のインキュベートを３回液を換えて実施した。ＥＺバッファーで洗浄した。ＣＣ１バッファー（Ｖｅｎｔａｎａ　Ｍｅｄｉｃａｌ　Ｓｙｓｔｅｍｓ社製）、９５℃で４回液を換えて計５２分間実施した。リアクションバッファー（Ｖｅｎｔａｎａ　Ｍｅｄｉｃａｌ　Ｓｙｓｔｅｍｓ社製）で４回洗浄した。ラット抗ＦＧＦＲ２抗体ＦＲ２－１０および市販

抗体Ａｎｔｉ-Ｈｕｍａｎ　Ｋ-ｓａｍ Ｒａｂｂｉｔ　ＩｇＧ　Ａｆｆｉｎｉｔｙ　Ｐｕｒｉｆｙ（ＩＢＬ社製）をディスカバリー専用抗体希釈液（Ｖｅｎｔａｎａ　Ｍｅｄｉｃａｌ　Ｓｙｓｔｅｍｓ社製）でそれぞれ１０μｇ／ｍＬおよび２１０μｇ／ｍＬに希釈し、１時間反応させた。リアクションバッファーで４回洗浄後、Ｂｉｏｔｉｎ化ヤギ抗ラットＩｇＧ（Ｊａｃｋｓｏｎ　ｉｍｍｕｎｏ　ｒｅｓｅａｒｃｈ社製）のディスカバリー専用抗体希釈液による５００倍希釈液およびＤｉｓｃｏｖｅｒｙ　Ｕｎｉｖｅｒｓａｌ　Ｓｅｃｏｎｄａｒｙ Ａｎｔｉｂｏｄｙ（Ｖｅｎｔａｎａ　Ｍｅｄｉｃａｌ　Ｓｙｓｔｅｍｓ社製）を３２分間反応させ、リアクションバッファーで２回洗浄した。インヒビターＤ（ＤＡＢマップキット：Ｖｅｎｔａｎａ　Ｍｅｄｉｃａｌ　Ｓｙｓｔｅｍｓ社製）を８分間反応させた後、リアクションバッファーで２回洗浄した。ＳＡ－ＨＲＰ　Ｄ（ＤＡＢマップキット：Ｖｅｎｔａｎａ　Ｍｅｄｉｃａｌ　Ｓｙｓｔｅｍｓ社製）を１６分間反応させ、リアクションバッファーで２回洗浄した。ＤＡＢ　Ｄ（ＤＡＢマップキット：Ｖｅｎｔａｎａ　Ｍｅｄｉｃａｌ　Ｓｙｓｔｅｍｓ社製）を４分反応させた後ＤＡＢ　H_2O_2（ＤＡＢマップキット：Ｖｅｎｔａｎａ　Ｍｅｄｉｃａｌ　Ｓｙｓｔｅｍｓ社製）を添加し、８分間反応させ、リアクションバッファーで２回洗浄した。Ｃｏｐｐｅｒ－Ｄ（ＤＡＢマップキット：Ｖｅｎｔａｎａ　Ｍｅｄｉｃａｌ　Ｓｙｓｔｅｍｓ社製）を４分間反応させ、リアクションバッファーで３回洗浄した。ヘマトキシリン核染色試薬ＩＩ（Ｖｅｎｔａｎａ　Ｍｅｄｉｃａｌ　Ｓｙｓｔｅｍｓ社製）を４分間反応させ、リアクションバッファーで２回洗浄した。炭酸リチウム試薬（Ｖｅｎｔａｎａ　Ｍｅｄｉｃａｌ　Ｓｙｓｔｅｍｓ社製）を４分間反応させ、リアクションバッファーで１回洗浄した。

染色完了した標本はエタノール系列で脱水、キシレン系列で透徹後、封入剤とともにカバーグラスで封入した。光学顕微鏡で観察し、陽性反応産物である褐色の染色を評価した。

図１４０に示すとおり、ラット抗ＦＧＦＲ２抗体ＦＲ２－１０は、ＦＧＦＲ

２ＩＩＩｂを強制発現させた細胞ブロックの一部の細胞にのみ非常に強い染色が見られた。その他の強制発現細胞、または空ベクター導入細胞に陽性染色は認められなかった。従って、ラット抗ＦＧＦＲ２抗体ＦＲ２－１０は、ＦＧＦＲ２ＩＩＩｂの特異的染色が可能と判断された。

図１４１に示すとおり、市販のＦＧＦＲ２抗体は、ＳＮＵ－１６細胞（図１４１－Ｄ)、ＫＡＴＯＩＩＩ細胞（図１４１－Ｅ）およびＮＣＩ－Ｈ７１６細胞（図１４１－Ｆ）のブロックに対して多くの細胞で明瞭な陽性染色が見られたことから、これらの細胞株はＦＧＦＲ２蛋白質を発現していることが確認された。一方、ラット抗ＦＧＦＲ２抗体ＦＲ２－１０は、ＳＮＵ－１６細胞（図１４１－Ａ)、ＫＡＴＯＩＩＩ細胞（図１４１－Ｂ）では多くの細胞で明瞭な陽性染色が見られたが、ＮＣＩ－Ｈ７１６細胞（図１４１－Ｃ）に陽性染色は認められなかったことから、ＮＣＩ－Ｈ７１６細胞はＦＧＦＲ２ＩＩＩｂ蛋白質を発現していないことが明らかとなった。

さらに、図１４２に示すとおり、ラット抗ＦＧＦＲ２抗体ＦＲ２－１０は、ＳＮＵ－１６細胞（図１４２－Ａ)、ＫＡＴＯＩＩＩ細胞（図１４２－Ｂ）のゼノグラフト腫瘍では多くの細胞で明瞭な陽性染色が見られた一方、ＮＣＩ－Ｈ７１６細胞（図１４２－Ｃ）ゼノグラフト腫瘍に染色は認められなかった。

実施例１７．ヒト化抗ヒトＦＧＦＲ２抗体（ｈＦＲ２－１４）のリガンドーレセプター間の結合に対する阻害活性

ＦＧＦ７リガンドと抗原（Ｃ末端にＨｉｓタグを付加したｒｈＦＧＦＲ２ａｌｐｈａ（ＩＩＩｂ))間の結合をＥＬＩＳＡにて検出した。ｒｈＦＧＦＲ２ａｌｐｈａ（ＩＩＩｂ）をＰＢＳで２μｇ／ｍｌに希釈し、１００μｌを９６ｗｅｌｌ Ｃｌｅａｒ Ｐｏｌｙｓｔｙｒｅｎｅ Ｈｉｇｈ Ｂｉｎｄ Ｓｔｒｉｐｗｅｌｌ Ｍｉｃｒｏｐｌａｔｅ（コーニング社製）に添加し、４℃で一晩放置した。翌日、溶液をアスピレーターで除去し、０．０５％ Ｔｗｅｅｎ－２０（ＢｉｏＲａｄ社製）含有ＰＢＳで３回洗浄後、１％ ＢＳＡ（Ｓｉｇ

ｍａ社製）含有ＰＢＳを２００μｌ添加し、室温で１時間放置した。溶液を除去後、０．０５％　Ｔｗｅｅｎ－２０含有ＰＢＳで３回洗浄し、１％　ＢＳＡ含有ＰＢＳで９ｎｇ／ｍｌに希釈したＦＧＦ７、３００μｇ／ｍｌに希釈したヘパリン（Ｓｉｇｍａ社製）、０．３乃至３０μｇ／ｍｌに希釈した実施例４）で調製したｃＦＲ２－１０、実施例８）で調製したｈＦＲ２－１４＿Ｈ１２／Ｌ１、実施例９）で調製したｈＦＲ２－１４＿Ｈ１９／Ｌ１抗体をそれぞれ５０μｌずつ添加し、室温で２時間放置した。溶液を除去後、０．０５％　Ｔｗｅｅｎ－２０含有ＰＢＳで３回洗浄し、１％　ＢＳＡ含有ＰＢＳで１８０倍希釈したビオチン化抗ＦＧＦ－７抗体（Ｈｕｍａｎ　ＫＧＦ／ＦＧＦ－７　ＤｕｏＳｅｔ、Ｒ＆Ｄ社製）を１００μｌ添加し、室温で２時間放置した。溶液を除去後、０．０５％　Ｔｗｅｅｎ－２０含有ＰＢＳで３回洗浄し、１％　ＢＳＡ含有ＰＢＳで２００倍希釈したＳｔｒｅｐｔａｖｉｓｉｎ－ＨＲＰ（Ｈｕｍａｎ　ＫＧＦ／ＦＧＦ－７　ＤｕｏＳｅｔ、Ｒ＆Ｄ社製）を１００μｌ添加し、遮光して室温で２０分放置した。溶液を除去後、０．０５％　Ｔｗｅｅｎ－２０含有ＰＢＳで３回洗浄し、Ｒｅａｇｅｎｔ　Ａ、Ｒｅａｇｅｎｔ　Ｂを等量混合した基質溶液（Ｓｕｂｓｔｒａｔｅ　Ｒｅａｇｅｎｔ　Ｐａｃｋ、Ｒ＆Ｄ社製）を１００μｌ添加し、遮光して室温で２０分放置して発色反応を行った。Ｓｔｏｐ　ｓｏｌｕｔｉｏｎ（Ｒ＆Ｄ社製）を５０μｌ添加して反応を停止させた後、４５０ｎｍ、および５７０ｎｍの吸光度をプレートリーダーで測定し、４５０ｎｍの測定値から５７０ｎｍの測定値を引いた値を求めた。図１４３に示すとおり、ｃＦＲ２－１０、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１２／Ｌ１、ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１９／Ｌ１抗体は、いずれもリガンドのレセプターへの結合を阻害する活性を有していた。

産業上の利用可能性

本発明の提供する抗体を用いることにより各種癌の治療または予防、ならび

に、各種癌の検査または診断が可能となる。

配列表フリーテキスト

配列番号１：ラット抗ＦＧＦＲ２抗体　ＦＲ２－１０の重鎖に相当するバンドのＮ末端のアミノ酸配列（図９）。

配列番号２：ラット抗ＦＧＦＲ２抗体　ＦＲ２－１０の軽鎖に相当するバンドのＮ末端のアミノ酸配列（図１０）。

配列番号３：ラット抗ＦＧＦＲ２抗体　ＦＲ２－１３の重鎖に相当するバンドのＮ末端のアミノ酸配列（図１１）。

配列番号４：ラット抗ＦＧＦＲ２抗体　ＦＲ２－１３の軽鎖に相当するバンドのＮ末端のアミノ酸配列（図１２）。

配列番号５：ラット抗ＦＧＦＲ２抗体　ＦＲ２－１４重鎖に相当するバンドのＮ末端のアミノ酸配列（図１３）。

配列番号６：ラット抗ＦＧＦＲ２抗体　ＦＲ２－１４の軽鎖に相当するバンドのＮ末端のアミノ酸配列（図１４）。

配列番号７：ラット重鎖増幅用プライマー（図１５）。

配列番号８：ＦＲ２－１０重鎖用のシークエンスプライマー（図１６）。

配列番号９：ＦＲ２－１３重鎖用のシークエンスプライマー（図１７）。

配列番号１０：ＦＲ２－１４重鎖用のシークエンスプライマー（図１８）。

配列番号１１：ラット抗ＦＧＦＲ２抗体　ＦＲ２－１０の重鎖の可変領域をコードするｃＤＮＡの塩基配列（図１９）。

配列番号１２：ラット抗ＦＧＦＲ２抗体　ＦＲ２－１０の重鎖の可変領域のアミノ酸配列（図２０）。

配列番号１３：ラット抗ＦＧＦＲ２抗体　ＦＲ２－１３の重鎖の可変領域をコードするｃＤＮＡの塩基配列（図２１）。

配列番号１４：ラット抗ＦＧＦＲ２抗体　ＦＲ２－１３の重鎖の可変領域のア

ミノ酸配列（図２２）。

配列番号１５：ラット抗ＦＧＦＲ２抗体　ＦＲ２－１４の重鎖の可変領域をコードするｃＤＮＡの塩基配列（図２３）。

配列番号１６：ラット抗ＦＧＦＲ２抗体　ＦＲ２－１４の重鎖の可変領域のアミノ酸配列（図２４）。

配列番号１７：ラット軽鎖増幅用プライマー（図２５）。

配列番号１８：ラット軽鎖用のシーケンスプライマー（図２６）。

配列番号１９：ＦＲ２－１０軽鎖用のシークエンスプライマー（図２７）。

配列番号２０：ラット抗ＦＧＦＲ２抗体　ＦＲ２－１０の軽鎖の可変領域をコードするｃＤＮＡの塩基配列（図２８）。

配列番号２１：ラット抗ＦＧＦＲ２抗体　ＦＲ２－１０の軽鎖の可変領域のアミノ酸配列（図２９）。

配列番号２２：ラットＦＲ２－１３及びＦＲ２－１４軽鎖増幅用プライマー（図３０）。

配列番号２３：ラット抗ＦＧＦＲ２抗体　ＦＲ２－１３の軽鎖の可変領域をコードするｃＤＮＡの塩基配列（図３１）。

配列番号２４：ラット抗ＦＧＦＲ２抗体　ＦＲ２－１３の軽鎖の可変領域のアミノ酸配列（図３２）。

配列番号２５：ラット抗ＦＧＦＲ２抗体　ＦＲ２－１４の軽鎖の可変領域をコードするｃＤＮＡの塩基配列（図３３）。

配列番号２６：ラット抗ＦＧＦＲ２抗体　ＦＲ２－１４の軽鎖の可変領域のアミノ酸配列（図３４）。

配列番号２７：ヒトκ鎖分泌シグナル配列及びヒトκ鎖定常領域のアミノ酸をコードするＤＮＡ配列を含むＤＮＡ断片（図３５）。

配列番号２８：軽鎖発現ベクター用プライマーＦ（図３６）。

配列番号２９：軽鎖発現ベクター用プライマーＲ（図３７）。

配列番号３０：ヒト重鎖シグナル配列及びヒトＩｇＧ１定常領域のアミノ酸を

コードするＤＮＡ配列を含むＤＮＡ断片（図３８）。

配列番号３１：ヒトキメラ化ＦＲ２－１０（ｃＦＲ２－１０）軽鎖の塩基配列（図３９）。うちアミノ酸番号１乃至６０はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｃＦＲ２－１０軽鎖の塩基配列には含まれない。

配列番号３２：ヒトキメラ化ＦＲ２－１０（ｃＦＲ２－１０）軽鎖のアミノ酸配列（図４０）。うちアミノ酸番号１乃至２０はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｃＦＲ２－１０軽鎖のアミノ酸配列には含まれない。

配列番号３３：ヒトキメラ化ＦＲ２－１０軽鎖用プライマーセットＦ（図４１）。

配列番号３４：ヒトキメラ化ＦＲ２－１０軽鎖用プライマーセットＲ（図４２）。

配列番号３５：ヒトキメラ化ＦＲ２－１０（ｃＦＲ２－１０）重鎖の塩基配列（図４３）。うちアミノ酸番号１乃至５７はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｃＦＲ２－１０重鎖の塩基配列には含まれない。

配列番号３６：ヒトキメラ化ＦＲ２－１０（ｃＦＲ２－１０）重鎖のアミノ酸配列（図４４）。うちアミノ酸番号１乃至１９はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｃＦＲ２－１０重鎖のアミノ酸配列には含まれない。

配列番号３７：ヒトキメラ化ＦＲ２－１０重鎖用プライマーセットＦ（図４５）。

配列番号３８：ヒトキメラ化ＦＲ２－１０重鎖用プライマーセットＲ（図４６）。

配列番号３９：ヒトキメラ化ＦＲ２－１３（ｃＦＲ２－１３）軽鎖の塩基配列（図４７）。うちアミノ酸番号１乃至６０はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｃＦＲ２－１３軽鎖の塩基配列には含まれない。

配列番号４０：ヒトキメラ化ＦＲ２－１３（ｃＦＲ２－１３軽鎖のアミノ酸配列（図４８）。うちアミノ酸番号１乃至２０はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｃＦＲ２－１３軽鎖のアミノ酸配列には含まれない。

配列番号４１：ヒトキメラ化ＦＲ２－１３軽鎖用プライマーＦ（図４９）。

配列番号４２：ヒトキメラ化ＦＲ２－１３軽鎖用プライマーＲ（図５０）。

配列番号４３：ヒトキメラ化ＦＲ２－１３（ｃＦＲ２－１３）重鎖の塩基配列（図５１）。うちアミノ酸番号１乃至５７はシグナル配列であり、通常大部分

の成熟ｃＦＲ２－１３重鎖の塩基配列には含まれない。

配列番号４４：ヒトキメラ化ＦＲ２－１３（ｃＦＲ２－１３）重鎖のアミノ酸配列（図５２）。うちアミノ酸番号１乃至１９はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｃＦＲ２－１３重鎖のアミノ酸配列には含まれない。

配列番号４５：ヒトキメラ化ＦＲ２－１３重鎖用プライマーＦ（図５３）。

配列番号４６：ヒトキメラ化ＦＲ２－１３重鎖用プライマーＲ（図５４）。

配列番号４７：ヒトキメラ化ＦＲ２－１４（ｃＦＲ２－１４）軽鎖の塩基配列（図５５）。うちアミノ酸番号１乃至６０はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｃＦＲ２－１４軽鎖の塩基配列には含まれない。

配列番号４８：ヒトキメラ化ＦＲ２－１４（ｃＦＲ２－１４）軽鎖のアミノ酸配列（図５６）。うちアミノ酸番号１乃至２０はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｃＦＲ２－１４軽鎖のアミノ酸配列には含まれない。

配列番号４９：ヒトキメラ化ＦＲ２－１４軽鎖用プライマー（図５７）。

配列番号５０：ヒトキメラ化ＦＲ２－１４（ｃＦＲ２－１４）重鎖の塩基配列（図５８）。うちアミノ酸番号１乃至５７はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｃＦＲ２－１４重鎖の塩基配列には含まれない。

配列番号５１：ヒトキメラ化ＦＲ２－１４（ｃＦＲ２－１４）重鎖のアミノ酸配列（図５９）。うちアミノ酸番号１乃至１９はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｃＦＲ２－１４重鎖のアミノ酸配列には含まれない。

配列番号５２：ラット抗ＦＧＦＲ２抗体　ＦＲ２－１０の重鎖ＣＤＲ１のアミノ酸配列（図６０）。

配列番号５３：ラット抗ＦＧＦＲ２抗体　ＦＲ２－１０の重鎖ＣＤＲ２のアミノ酸配列（図６１）

配列番号５４：ラット抗ＦＧＦＲ２抗体　ＦＲ２－１０の重鎖ＣＤＲ３のアミノ酸配列（図６２）

配列番号５５：ラット抗ＦＧＦＲ２抗体　ＦＲ２－１３の重鎖ＣＤＲ１の（図６３）

配列番号５６：ラット抗ＦＧＦＲ２抗体　ＦＲ２－１３の重鎖ＣＤＲ２のアミノ酸配列（図６４）

配列番号５７：ラット抗ＦＧＦＲ２抗体　ＦＲ２－１３の重鎖ＣＤＲ３のアミノ酸配列（図６５）

配列番号５８：ラット抗ＦＧＦＲ２抗体　ＦＲ２－１４の重鎖ＣＤＲ１のアミノ酸配列（図６６）

配列番号５９：ラット抗ＦＧＦＲ２抗体　ＦＲ２－１４の重鎖ＣＤＲ２のアミノ酸配列（図６７）

配列番号６０：ラット抗ＦＧＦＲ２抗体　ＦＲ２－１４の重鎖ＣＤＲ３のアミノ酸配列（図６８）

配列番号６１：ラット抗ＦＧＦＲ２抗体　ＦＲ２－１０の軽鎖ＣＤＲ１のアミノ酸配列（図６９）

配列番号６２：ラット抗ＦＧＦＲ２抗体　ＦＲ２－１０の軽鎖ＣＤＲ２のアミノ酸配列（図７０）

配列番号６３：ラット抗ＦＧＦＲ２抗体　ＦＲ２－１０の軽鎖ＣＤＲ３のアミノ酸配列（（図７１）

配列番号６４：ラット抗ＦＧＦＲ２抗体　ＦＲ２－１３の軽鎖ＣＤＲ１のアミノ酸配列（図７２）

配列番号６５：ラット抗ＦＧＦＲ２抗体　ＦＲ２－１３の軽鎖ＣＤＲ２のアミノ酸配列（図７３）

配列番号６６：ラット抗ＦＧＦＲ２抗体　ＦＲ２－１３の軽鎖ＣＤＲ３のアミノ酸配列（図７４）

配列番号６７：ラット抗ＦＧＦＲ２抗体　ＦＲ２－１４の軽鎖ＣＤＲ１のアミノ酸配列（図７５）

配列番号６８：ラット抗ＦＧＦＲ２抗体　ＦＲ２－１４の軽鎖ＣＤＲ２のアミノ酸配列（図７６）

配列番号６９：ラット抗ＦＧＦＲ２抗体　ＦＲ２－１４の軽鎖ＣＤＲ３のアミ

ノ酸配列（図７７）

配列番号７０：ヒトＦＧＦＲ２ＩＩＩｂのアミノ酸配列（図７８）

配列番号７１：ヒトＦＧＦＲ２ＩＩＩｃのアミノ酸配列（図７９）

配列番号７２：ヒト化ＦＲ２－１４軽鎖（ｈＦＲ２－１４＿Ｌ１）の塩基配列（図８０）、うちヌクレオチド番号１乃至６０はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｈＦＲ２－１４＿Ｌ１の塩基配列には含まれない。

配列番号７３：ヒト化ＦＲ２－１４軽鎖（ｈＦＲ２－１４＿Ｌ１）のアミノ酸配列（図８１）、うちアミノ酸番号１乃至２０はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｈＦＲ２－１４＿Ｌ１のアミノ酸配列には含まれない。

配列番号７４：ヒト化ＦＲ２－１４重鎖（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１）の塩基配列（図８２）、うちヌクレオチド番号１乃至５７はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１の塩基配列には含まれない。

配列番号７５：ヒト化ＦＲ２－１４重鎖（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１）のアミノ酸配列（図８３）、うちアミノ酸番号１乃至１９はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１のアミノ酸配列には含まれない。

配列番号７６：ヒト化ＦＲ２－１４重鎖（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ２）の塩基配列（図８４）、うちヌクレオチド番号１乃至５７はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｈＦＲ２－１４＿Ｈ２の塩基配列には含まれない。

配列番号７７：ヒト化ＦＲ２－１４重鎖（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ２）のアミノ酸配列（図８５）、うちアミノ酸番号１乃至１９はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｈＦＲ２－１４＿Ｈ２のアミノ酸配列には含まれない。

配列番号７８：ヒト化ＦＲ２－１４重鎖（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ３）の塩基配列（図８６）、うちヌクレオチド番号１乃至５７はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｈＦＲ２－１４＿Ｈ３の塩基配列には含まれない。

配列番号７９：ヒト化ＦＲ２－１４重鎖（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ３）のアミノ酸配列（図８７）、うちアミノ酸番号１乃至１９はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｈＦＲ２－１４＿Ｈ３のアミノ酸配列には含まれない。

配列番号８０：ヒト化ＦＲ２－１４重鎖（ｈＦＲ２－１４_Ｈ４）の塩基配列（図８８）、うちヌクレオチド番号１乃至５７はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｈＦＲ２－１４_Ｈ４の塩基配列には含まれない。

配列番号８１：ヒト化ＦＲ２－１４重鎖（ｈＦＲ２－１４_Ｈ４）のアミノ酸配列（図８９）、うちアミノ酸番号１乃至１９はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｈＦＲ２－１４_Ｈ４のアミノ酸配列には含まれない。

配列番号８２：ヒト化ＦＲ２－１４重鎖（ｈＦＲ２－１４_Ｈ５）の塩基配列（図９０）、うちヌクレオチド番号１乃至５７はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｈＦＲ２－１４_Ｈ５の塩基配列には含まれない。

配列番号８３：ヒト化ＦＲ２－１４重鎖（ｈＦＲ２－１４_Ｈ５）のアミノ酸配列（図９１）、うちアミノ酸番号１乃至１９はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｈＦＲ２－１４_Ｈ５のアミノ酸配列には含まれない。

配列番号８４：ヒト化ＦＲ２－１４重鎖（ｈＦＲ２－１４_Ｈ６）の塩基配列（図９２）、うちヌクレオチド番号１乃至５７はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｈＦＲ２－１４_Ｈ６の塩基配列には含まれない。

配列番号８５：ヒト化ＦＲ２－１４重鎖（ｈＦＲ２－１４_Ｈ６）のアミノ酸配列（図９３）、うちアミノ酸番号１乃至１９はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｈＦＲ２－１４_Ｈ６のアミノ酸配列には含まれない。

配列番号８６：ヒト化ＦＲ２－１４重鎖（ｈＦＲ２－１４_Ｈ７）の塩基配列（図９４）、うちヌクレオチド番号１乃至５７はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｈＦＲ２－１４_Ｈ７の塩基配列には含まれない。

配列番号８７：ヒト化ＦＲ２－１４重鎖（ｈＦＲ２－１４_Ｈ７）のアミノ酸配列（図９５）、うちアミノ酸番号１乃至１９はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｈＦＲ２－１４_Ｈ７のアミノ酸配列には含まれない。

配列番号８８：ヒト化ＦＲ２－１４重鎖（ｈＦＲ２－１４_Ｈ８）の塩基配列（図９６）、うちヌクレオチド番号１乃至５７はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｈＦＲ２－１４_Ｈ８の塩基配列には含まれない。

配列番号８９：ヒト化ＦＲ２－１４重鎖（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ８）のアミノ酸配列（図９７）、うちアミノ酸番号１乃至１９はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｈＦＲ２－１４＿Ｈ８のアミノ酸配列には含まれない。

配列番号９０：ヒト化ＦＲ２－１４重鎖（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ９）の塩基配列（図９８）、うちヌクレオチド番号１乃至５７はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｈＦＲ２－１４＿Ｈ９の塩基配列には含まれない。

配列番号９１：ヒト化ＦＲ２－１４重鎖（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ９）のアミノ酸配列（図９９）、うちアミノ酸番号１乃至１９はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｈＦＲ２－１４＿Ｈ９のアミノ酸配列には含まれない。

配列番号９２：ヒト化ＦＲ２－１４重鎖（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１０）の塩基配列（図１００）、うちヌクレオチド番号１乃至５７はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１０の塩基配列には含まれない。

配列番号９３：ヒト化ＦＲ２－１４重鎖（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１０）のアミノ酸配列（図１０１）、うちアミノ酸番号１乃至１９はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１０のアミノ酸配列には含まれない。

配列番号９４：ヒト化ＦＲ２－１４重鎖（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１１）の塩基配列（図１０２）、うちヌクレオチド番号１乃至５７はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１１の塩基配列には含まれない。

配列番号９５：ヒト化ＦＲ２－１４重鎖（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１１）のアミノ酸配列（図１０３）、うちアミノ酸番号１乃至１９はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１１のアミノ酸配列には含まれない。

配列番号９６：ヒト化ＦＲ２－１４重鎖（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１２およびｈＦＲ２－１４＿Ｈ１９）の塩基配列（図１０４）、うちヌクレオチド番号１乃至５７はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１２およびｈＦＲ２－１４＿Ｈ１９の塩基配列には含まれない。

配列番号９７：ヒト化ＦＲ２－１４重鎖（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１２およびｈＦＲ２－１４＿Ｈ１９）のアミノ酸配列（図１０５）、うちアミノ酸番号１乃至

１９はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１２およびｈＦＲ２－１４＿Ｈ１９のアミノ酸配列には含まれない。

配列番号９８：ヒト化ＦＲ２－１４重鎖（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１３）の塩基配列（図１０６）、うちヌクレオチド番号１乃至５７はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１３の塩基配列には含まれない。

配列番号９９：ヒト化ＦＲ２－１４重鎖（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１３）のアミノ酸配列（図１０７）、うちアミノ酸番号１乃至１９はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１３のアミノ酸配列には含まれない。

配列番号１００：ヒト化ＦＲ２－１４重鎖（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１４）の塩基配列（図１０８）、うちヌクレオチド番号１乃至５７はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１４の塩基配列には含まれない。

配列番号１０１：ヒト化ＦＲ２－１４重鎖（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１４）のアミノ酸配列（図１０９）、うちアミノ酸番号１乃至１９はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１４のアミノ酸配列には含まれない。

配列番号１０２：ヒト化ＦＲ２－１４重鎖（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１５）の塩基配列（図１１０）、うちヌクレオチド番号１乃至５７はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１５の塩基配列には含まれない。

配列番号１０３：ヒト化ＦＲ２－１４重鎖（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１５）のアミノ酸配列（図１１１）、うちアミノ酸番号１乃至１９はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１５のアミノ酸配列には含まれない。

配列番号１０４：ヒト化ＦＲ２－１４重鎖（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１６）の塩基配列（図１１２）、うちヌクレオチド番号１乃至５７はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１６の塩基配列には含まれない。

配列番号１０５：ヒト化ＦＲ２－１４重鎖（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１６）のアミノ酸配列（図１１３）、うちアミノ酸番号１乃至１９はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１６のアミノ酸配列には含まれない。

配列番号１０６：ヒト化ＦＲ２－１４重鎖（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１７）の塩基

配列（図１１４）、うちヌクレオチド番号１乃至５７はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１７の塩基配列には含まれない。

配列番号１０７：ヒト化ＦＲ２－１４重鎖（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１７）のアミノ酸配列（図１１５）、うちアミノ酸番号１乃至１９はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１７のアミノ酸配列には含まれない。

配列番号１０８：ヒト化ＦＲ２－１４重鎖（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１８）の塩基配列（図１１６）、うちヌクレオチド番号１乃至５７はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１８の塩基配列には含まれない。

配列番号１０９：ヒト化ＦＲ２－１４重鎖（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１８）のアミノ酸配列（図１１７）、うちアミノ酸番号１乃至１９はシグナル配列であり、通常大部分の成熟ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１８のアミノ酸配列には含まれない。

配列番号１１０：ｈＦＲ２－１４＿Ｈ２タイプ重鎖用プライマーＶＨ３Ａ－Ｆ（図１１８）。

配列番号１１１：ｈＦＲ２－１４＿Ｈ２タイプ重鎖用プライマーＶＨ３Ａ－Ｒ（図１１９）。

配列番号１１２：Ｄ２増幅用プライマーＤ２３ｆｗ（図１２０）

配列番号１１３：Ｄ２増幅用プライマーＤ２３ｒｖ（図１２１）

請求の範囲

[請求項１]

抗体依存性細胞傷害活性を有し、且つ、線維芽細胞増殖因子受容体（ｆｉｂｒｏｂｌａｓｔ ｇｒｏｗｔｈ ｆａｃｔｏｒ ｒｅｃｅｐｔｏｒ：ＦＧＦＲ）に結合する抗体又はその機能断片。

[請求項２]

線維芽細胞増殖因子受容体（ＦＧＦＲ）がヒトＦＧＦＲである、請求項１記載の抗体又はその機能断片。

[請求項３]

線維芽細胞増殖因子受容体（ＦＧＦＲ）がＦＧＦＲ２である、請求項１又は２記載の抗体又はその機能断片。

[請求項４]

ヒト線維芽細胞増殖因子受容体２（ヒトＦＧＦＲ２）ＩＩＩｂ及び/又はヒト線維芽細胞増殖因子受容体２（ヒトＦＧＦＲ２）ＩＩＩｃに結合する、請求項１乃至３のいずれか一つに記載の抗体又はその機能断片。

[請求項５]

ヒト線維芽細胞増殖因子受容体２（ヒトＦＧＦＲ２）ＩＩＩｂ及びヒト線維芽細胞増殖因子受容体（ヒトＦＧＦＲ２）ＩＩＩｃに結合する、請求項１乃至４のいずれか一つに記載の抗体又はその機能断片。

[請求項６]

ヒト線維芽細胞増殖因子受容体２の有する免疫グロブリン様ドメインの一つ又は二つ以上に結合する、請求項１乃至５のいずれか一つに記載の抗体又はその機能断片。

[請求項７]

ヒト線維芽細胞増殖因子受容体２の有する免疫グロブリン様ドメイン２に結合する、請求項１乃至６のいずれか一つに記載の抗体又はその機能断片。

[請求項８]

ヒト線維芽細胞増殖因子受容体２の有する免疫グロブリン様ドメイン３に結合する、請求項１乃至４及び６のいずれか一つに記載の抗体又はその機能断片。

[請求項９]

ヒト線維芽細胞増殖因子受容体２（ヒトＦＧＦＲ２）ＩＩＩｂ及び/又はヒト線維芽細胞増殖因子受容体２（ヒトＦＧＦＲ２）ＩＩＩｃに対する中和活性を有する、請求項１乃至８のいずれか一つに記載の抗体又はその機能断片。

[請求項１０]

ヒト線維芽細胞増殖因子受容体２（ヒトＦＧＦＲ２）ＩＩＩｂ及びヒト線維芽細胞増殖因子受容体２（ヒトＦＧＦＲ２）ＩＩＩｃに対する中和活性を有する、請求項１乃至９のいずれか一つに記載の抗体又はその機能断片。

[請求項１１]

抗腫瘍活性を有する、請求項１乃至１０のいずれか一つに記載の抗体又はその機能断片。

[請求項１２]

イン・ビボ（ｉｎ　ｖｉｖｏ）で抗腫瘍活性を示す、請求項１１記載の抗体又はその機能断片。

[請求項１３]

配列表の配列番号５２（図６０）に示されるアミノ酸配列もしくは該アミノ酸配列において１つ又は２つのアミノ酸が置換されてなるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１、配列表の配列番号５３（図６１）に示されるアミノ酸配列もしくは該アミノ酸配列において１つ又は２つのアミノ酸が置換されてなるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２及び配列表の配列番号５４（図６２）に示されるアミノ酸配列もしくは該アミノ酸配列において１つ又は２つのアミノ酸が置換されてなるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３を含むことからなる重鎖、並びに、配列表の配列番号６１（図６９）に示されるアミノ酸配列もしくは該アミノ酸配列において１つ又は２つのアミノ酸が置換されてなるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１、配列表の配列番号６２（図７０）に示されるアミノ酸配列もしく

は該アミノ酸配列において１つ又は２つのアミノ酸が置換されてなるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２及び配列表の配列番号６３（図７１）に示されるアミノ酸配列もしくは該アミノ酸配列において１つ又は２つのアミノ酸が置換されてなるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ３を含むことからなる軽鎖からなり、且つヒトＦＧＦＲ２に結合する、請求項１乃至４、６、８、９、１１及び１２のいずれか一つに記載の抗体又はその機能断片。

[請求項１４]

配列表の配列番号５５（図６３）に示されるアミノ酸配列もしくは該アミノ酸配列において１つ又は２つのアミノ酸が置換されてなるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１、配列表の配列番号５６（図６４）に示されるアミノ酸配列もしくは該アミノ酸配列において１つ又は２つのアミノ酸が置換されてなるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２及び配列表の配列番号５７（図６５）に示されるアミノ酸配列もしくは該アミノ酸配列において１つ又は２つのアミノ酸が置換されてなるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３を含むことからなる重鎖、並びに、配列表の配列番号６４（図７２）に示されるアミノ酸配列もしくは該アミノ酸配列において１つ又は２つのアミノ酸が置換されてなるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１、配列表の配列番号６５（図７３）に示されるアミノ酸配列もしくは該アミノ酸配列において１つ又は２つのアミノ酸が置換されてなるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２及び配列表の配列番号６６（図７４）に示されるアミノ酸配列もしくは該アミノ酸配列において１つ又は２つのアミノ酸が置換されてなるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ３を含むことからなる軽鎖からなり、且つヒトＦＧＦＲ２に結合する、請求項１乃至７及び９乃至１２のいずれか一つに記載の抗体又はその機能断片。

[請求項１５]

配列表の配列番号５８（図６６）に示されるアミノ酸配列もしくは該アミノ酸配列において１つ又は２つのアミノ酸が置換されてなるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１、配列表の配列番号５９（図６７）に示されるアミノ酸配列もし

くは該アミノ酸配列において１つ又は２つのアミノ酸が置換されてなるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２及び配列表の配列番号６０（図６８）に示されるアミノ酸配列もしくは該アミノ酸配列において１つ又は２つのアミノ酸が置換されてなるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３を含むことからなる重鎖、並びに、配列表の配列番号６７（図７５）に示されるアミノ酸配列もしくは該アミノ酸配列において１つ又は２つのアミノ酸が置換されてなるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１、配列表の配列番号６８（図７６）に示されるアミノ酸配列もしくは該アミノ酸配列において１つ又は２つのアミノ酸が置換されてなるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２及び配列表の配列番号６９（図７７）に示されるアミノ酸配列もしくは該アミノ酸配列において１つ又は２つのアミノ酸が置換されてなるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ３を含むことからなる軽鎖からなり、且つヒトＦＧＦＲ２に結合する、請求項１乃至７及び９乃至１２のいずれか一つに記載の抗体又はその機能断片。

[請求項１６]

ＣＤＲＨ３が配列表の配列番号６０（図６８）に示されるアミノ酸配列において１つ又は２つのアミノ酸が置換されてなるアミノ酸配列からなる、請求項１５記載の抗体又はその機能断片。

[請求項１７]

抗体がモノクローナル抗体である、請求項１乃至１６のいずれか一つに記載の抗体又はその機能断片。

[請求項１８]

抗体がキメラ抗体である、請求項１乃至１７のいずれか一つに記載の抗体又はその機能断片。

[請求項１９]

抗体がヒト化抗体である、請求項１乃至１８のいずれか一つに記載の抗体又はその機能断片。

[請求項２０]

抗体が下記（ｉ）乃至（ｘｉｘ）から選択される、請求項１９記載の抗体又はその機能断片：

（ｉ）配列番号７３（図８１）で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号２１乃至２３５を含む軽鎖、および、配列番号９７（図１０５）で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号２０乃至４６７を含む重鎖、を含んでなるヒト化抗体（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１９／Ｌ１）；

（ｉｉ）配列番号７３（図８１）で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号２１乃至２３５を含む軽鎖、および、配列番号９７（図１０５）で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号２０乃至４６７を含む重鎖、を含んでなるヒト化抗体（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１２／Ｌ１）；

（ｉｉｉ）配列番号７３（図８１）で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号２１乃至２３５を含む軽鎖、および、配列番号８９（図９７）で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号２０乃至４６７を含む重鎖、を含んでなるヒト化抗体（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ８／Ｌ１）；

（ｉｖ）配列番号７３（図８１）で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号２１乃至２３５を含む軽鎖、および、配列番号９５（図１０３）で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号２０乃至４６７を含む重鎖、を含んでなるヒト化抗体（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１１／Ｌ１）；

（ｖ）配列番号７３（図８１）で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号２１乃至２３５を含む軽鎖、および、配列番号８３（図９１）で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号２０乃至４６７を含む重鎖、を含んでなるヒト化抗体（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ５／Ｌ１）；

（ｖｉ）配列番号７３（図８１）で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号２１乃至２３５を含む軽鎖、および、配列番号７５（図８３）で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号２０乃至４６７を含む重鎖、を含んでなるヒト化抗体（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１／Ｌ１）；

（ｖｉｉ）配列番号７３（図８１）で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号２

１乃至２３５を含む軽鎖、および、配列番号７７（図８５）で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号２０乃至４６７を含む重鎖、を含んでなるヒト化抗体（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ２／Ｌ１）；

（ｖｉｉｉ）配列番号７３（図８１）で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号２１乃至２３５を含む軽鎖、および、配列番号７９（図８７）で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号２０乃至４６７を含む重鎖、を含んでなるヒト化抗体（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ３／Ｌ１）；

（ｉｘ）配列番号７３（図８１）で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号２１乃至２３５を含む軽鎖、および、配列番号８１（図８９）で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号２０乃至４６７を含む重鎖、を含んでなるヒト化抗体（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ４／Ｌ１）；

（ｘ）配列番号７３（図８１）で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号２１乃至２３５を含む軽鎖、および、配列番号８５（図９３）で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号２０乃至４６７を含む重鎖、を含んでなるヒト化抗体（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ６／Ｌ１）；

（ｘｉ）配列番号７３（図８１）で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号２１乃至２３５を含む軽鎖、および、配列番号８７（図９５）で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号２０乃至４６７を含む重鎖、を含んでなるヒト化抗体（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ７／Ｌ１）；

（ｘｉｉ）配列番号７３（図８１）で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号２１乃至２３５を含む軽鎖、および、配列番号９１（図９９）で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号２０乃至４６７を含む重鎖、を含んでなるヒト化抗体（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ９／Ｌ１）；

（ｘｉｉｉ）配列番号７３（図８１）で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号２１乃至２３５を含む軽鎖、および、配列番号９３（図１０１）で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号２０乃至４６７を含む重鎖、を含んでなるヒト化抗体（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１０／Ｌ１）。

（ｘｉｖ）配列番号７３（図８１）で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号２１乃至２３５を含む軽鎖、および、配列番号９９（図１０７）で示されるアミノ酸配列を含むのアミノ酸番号２０乃至４６７重鎖、を含んでなるヒト化抗体（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１３／Ｌ１）；

（ｘｖ）配列番号７３（図８１）で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号２１乃至２３５を含む軽鎖、および、配列番号１０１（図１０９）で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号２０乃至４６７を含む重鎖、を含んでなるヒト化抗体（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１４／Ｌ１）；

（ｘｖｉ）配列番号７３（図８１）で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号２１乃至２３５を含む軽鎖、および、配列番号１０３（図１１１）で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号２０乃至４６７を含む重鎖、を含んでなるヒト化抗体（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１５／Ｌ１）。

（ｘｖｉｉ）配列番号７３（図８１）で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号２１乃至２３５を含む軽鎖、および、配列番号１０５（図１１３）で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号２０乃至４６７を含む重鎖、を含んでなるヒト化抗体（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１６／Ｌ１）；

（ｘｉｉｉ）配列番号７３（図８１）で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号２１乃至２３５を含む軽鎖、および、配列番号１０７（図１１５）で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号２０乃至４６７を含む重鎖、を含んでなるヒト化抗体（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１７／Ｌ１）；および

（ｘｉｘ）配列番号７３（図８１）で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号２１乃至２３５を含む軽鎖、および、配列番号１０９（図１１７）で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号２０乃至４６７を含む重鎖、を含んでなるヒト化抗体（ｈＦＲ２－１４＿Ｈ１８／Ｌ１）。

[請求項２１]

請求項２０に記載の抗体の重鎖および軽鎖のアミノ酸配列とそれぞれ９５％以上同一なアミノ酸配列を含む重鎖および軽鎖を含んでなり、且つヒトＦＧＦ

Ｒ２に結合する、請求項１乃至１２のいずれか一つに記載の抗体又はその機能断片。

[請求項２２]

請求項１３乃至１６および２０のいずれか一つに記載の抗体が認識する抗原上の部位に結合する、請求項１乃至１２のいずれか一つに記載の抗体又はその機能断片。

[請求項２３]

請求項１３乃至１６および２０のいずれか一つに記載の抗体と、ヒトＦＧＦＲ２への結合において競合する、請求項１乃至１２のいずれか一つに記載の抗体又はその機能断片。

[請求項２４]

配列番号７０（図７８）で示されるアミノ酸配列中の１５５番目のチロシン（Ｔｙｒ）、１５７番目のスレオニン（Ｔｈｒ）、１７６番目のリジン（Ｌｙｓ）、１８１番目のアラニン（Ａｌａ）、１８２番目のグリシン（Ｇｌｙ）、１８３番目のグリシン（Ｇｌｙ）、１８４番目のアスパラギン（Ａｓｎ）、１８５番目のプロリン（Ｐｒｏ）、１８６番目のメチオニン（Ｍｅｔ）、１８８番目のスレオニン（Ｔｈｒ）、２００番目の（グルタミン）、２０１番目のグルタミン酸（Ｇｌｕ）、２０５番目のグリシン（Ｇｌｙ）、２０６番目のグリシン（Ｇｌｙ）、２０８番目のリジン（Ｌｙｓ）、２０９番目のバリン（Ｖａｌ）、２１０番目のアルギニン（Ａｒｇ）、２１１番目のアスパラギン（Ａｓｎ）、２１２番目のグルタミン（Ｇｌｎ）、２１３番目のヒスチジン（Ｈｉｓ）、２１４番目のトリプトファン（Ｔｒｐ）、および、２１７番目のイソロイシン（Ｉｌｅ）の各残基から構成される、ヒトＦＧＦＲ２上のエピトープに結合する、請求項１乃至１２のいずれか一つに記載の抗体又はその機能断片。

[請求項２５]

配列番号７０（図７８）で示されるアミノ酸配列中の１５５番目のチロシン（Ｔｙｒ）、１５７番目のスレオニン（Ｔｈｒ）、１７６番目のリジン（Ｌｙｓ）、

１８１番目のアラニン（Ａｌａ）、１８２番目のグリシン（Ｇｌｙ）、１８３番目のグリシン（Ｇｌｙ）、１８４番目のアスパラギン（Ａｓｎ）、１８５番目のプロリン（Ｐｒｏ）、１８６番目のメチオニン（Ｍｅｔ）、１８８番目のスレオニン（Ｔｈｒ）、２００番目の（グルタミン）、２０１番目のグルタミン酸（Ｇｌｕ）、２０５番目のグリシン（Ｇｌｙ）、２０６番目のグリシン（Ｇｌｙ）、２０８番目のリジン（Ｌｙｓ）、２０９番目のバリン（Ｖａｌ）、２１０番目のアルギニン（Ａｒｇ）、２１１番目のアスパラギン（Ａｓｎ）、２１２番目のグルタミン（Ｇｌｎ）、２１３番目のヒスチジン（Ｈｉｓ）、２１４番目のトリプトファン（Ｔｒｐ）、および、２１７番目のイソロイシン（Ｉｌｅ）の各残基との間で相互作用距離を有する、請求項１乃至１２のいずれか一つに記載の抗体又はその機能断片。

[請求項２６]

相互作用距離が６オングストローム以下である、請求項２５記載の抗体又はその機能断片。

[請求項２７]

相互作用距離が４オングストローム以下である、請求項２５または２６記載の抗体又はその機能断片。

[請求項２８]

抗体がヒト抗体である、請求項１乃至１２および２１乃至２７のいずれか一つに記載の抗体又はその機能断片。

[請求項２９]

ヒトＦＧＦＲ２へのＦＧＦの結合を阻害する、請求項１乃至２８のいずれか一つに記載の抗体又はその機能断片。

[請求項３０]

抗体依存性細胞傷害活性及び／又は抗体依存性細胞媒介食活性を有する、請求項１乃至２９のいずれか一つに記載の抗体又はその機能断片。

[請求項３１]

下記（ｉ）乃至（ｉｉｉ）のいずれか一つに記載のヌクレオチド：

（ｉ）請求項１乃至３０のいずれか一つに記載の抗体の重鎖または軽鎖の一部または全部のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含んでなるヌクレオチド；

（ｉｉ）請求項１乃至３０のいずれか一つに記載の抗体の重鎖または軽鎖の一部または全部のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む塩基配列からなるヌクレオチド；および

（ｉｉｉ）請求項１乃至３０のいずれか一つに記載の抗体の重鎖または軽鎖の一部または全部のアミノ酸配列をコードする塩基配列からなるヌクレオチド。

[請求項３２]

請求項３１記載のヌクレオチドが挿入された組換えベクター。

[請求項３３]

請求項３１記載のヌクレオチド又は請求項３２記載の組換えベクターが導入された組換え細胞。

[請求項３４]

請求項１乃至３０のいずれか一つに記載の抗体又はその機能断片を産生する細胞。

[請求項３５]

下記の工程（ｉ）及び（ｉｉ）を含むことからなる、請求項１乃至３０のいずれか一つに記載の抗体又はその機能断片の製造方法：

（ｉ）請求項３３または３４記載の細胞を培養する工程；および

（ｉｉ）前記工程（ｉ）で得られた培養物から請求項１乃至３０のいずれか一つに記載の抗体又はその機能断片を回収する工程。

[請求項３６]

請求項３５に記載の方法により得られる、請求項１乃至１２のいずれか一つに記載の抗体またはその機能断片。

[請求項３７]

重鎖または軽鎖のアミノ末端またはカルボキシル末端において１乃至５個の

アミノ酸が欠失してなる、請求項１乃至３０および３６記載のいずれか一つに記載の抗体またはその機能断片。

[請求項３８]

請求項１乃至３０、３６および３７のいずれか一つに記載の抗体又はその機能断片の修飾体。

[請求項３９]

糖鎖修飾が調節されてなる、請求項３８記載の修飾体。

[請求項４０]

抗体が請求項２０の（ｉ）乃至（ｘｉｘ）のいずれか一つから選択される、請求項３９記載の修飾体。

[請求項４１]

請求項１乃至３０、３６および３７のいずれか一つに記載の抗体もしくはその機能断片、または請求項３８乃至４０のいずれか一つに記載の修飾体を有効成分として含んでなる医薬組成物。

[請求項４２]

抗癌剤である、請求項４１記載の医薬組成物。

[請求項４３]

癌がＦＧＦＲ２陽性である、請求項４２記載の医薬組成物。

[請求項４４]

請求項１乃至３０、３６および３７のいずれか一つに記載の抗体もしくはその機能断片、または請求項３８乃至４０のいずれか一つに記載の修飾体を含んでなる癌の検査用または診断用の組成物。

[請求項４５]

ヒトＦＧＦＲ２ＩＩＩｂ選択性を有する抗体もしくはその機能断片またはその修飾体を含む組成物。

[請求項４６]

抗体が請求項１３記載のＣＤＲＨ１乃至ＣＤＲＨ３を含む重鎖およびＣＤＲ

ＬＣＤＲＬ１乃至ＣＤＲＬ３を含む軽鎖を含んでなる、請求項４５記載の組成物。

[請求項４７]

抗体が配列番号１２（図２０）で示されるアミノ酸配列を有する重鎖可変領域および配列番号２１（図２９）で示されるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含んでなる、請求項４６記載の組成物。

[請求項４８]

抗体がキメラ抗体またはラット抗体である、請求項４６または４７記載の組成物。

[請求項４９]

ヒトＦＧＦＲ２ＩＩＩｂの検出用または測定用である、請求項４５乃至４８のいずれか一つに記載の組成物。

[請求項５０]

請求項４５乃至４８のいずれか一つに記載の組成物と被検サンプルを接触させる工程を含むことからなる、ヒトＦＧＦＲ２ＩＩＩｂを検出又は測定する方法。

[請求項５１]

下記の工程（ｉ）乃至（ｉｉｉ）を含むことからなる、ヒトＦＧＦＲ２ＩＩＩｃを検出または測定する方法：

（ｉ）ヒトＦＧＦＲ２ＩＩＩｂとヒトＦＧＦＲ２ＩＩＩｃに選択的に結合する抗体もしくはその機能断片またはその修飾体を含む組成物と被検サンプルを接触させ、被検サンプル中のヒトＦＧＦＲ２ＩＩＩｂとヒトＦＧＦＲ２ＩＩＩｃを検出または測定する工程；

（ｉｉ）請求項４５乃至４９のいずれか一つに記載の組成物と被検サンプルを接触させ、被検サンプル中のヒトＦＧＦＲ２ＩＩＩｂを検出または測定する工程；

（ｉｉｉ）工程（ｉ）における検出または測定の結果と工程（ｉｉ）における検出または測定の結果を比較するか、または工程（ｉ）における検出または測

定の結果から工程（ｉｉ）における検出または測定の結果を差し引くことにより、被検サンプル中のヒトＦＧＦＲＩＩＩ２ｃの検出または測定の結果または値を得る工程。

[請求項５２]

ヒトＦＧＦＲ２陽性癌の診断または検査用である、請求項４４乃至４９のいずれか一つに記載の組成物、または、請求項５０又は５１記載の方法。

[請求項５３]

下記の工程（ｉ）乃至（ｉｉｉ）を含む、請求項４１乃至４３のいずれか一つに記載の医薬組成物を投与する個体の同定方法：

（ｉ）請求項４４乃至４９のいずれか一つに記載の組成物と個体由来のサンプルを接触させる工程；および、

（ｉｉ）該サンプル中にヒトＦＧＦＲ２が検出された場合、該個体を陽性と判定する工程。

[請求項５４]

ヒトＦＧＦＲ２がヒトＦＧＦＲ２ＩＩＩｂである、請求項５３記載の方法。

[請求項５５]

ヒトＦＧＦＲ２がヒトＦＧＦＲ２ＩＩＩｃおよびヒトＦＧＦＲ２ＩＩＩｂである、請求項５３記載の方法。

[請求項５６]

請求項５３乃至５５のいずれか一つに記載の方法に用いられる、請求項４４乃至４９のいずれか一つに記載の組成物。

[請求項５７]

該個体が癌に罹患しているかまたはそのリスクがある、請求項５３乃至５５のいずれか一つに記載の方法、または請求項５６記載の組成物。

[請求項５８]

請求項５３乃至５５のいずれか一つに記載の方法により陽性と同定された個体に投与される、請求項４１乃至４３のいずれか一つに記載の医薬組成物。

[請求項５９]

請求項１乃至３０、３６および３７のいずれか一つに記載の抗体もしくはその機能断片、または請求項３８乃至４０のいずれか一つに記載の修飾体を含んでなる試薬。

[請求項６０]

下記工程（ｉ）乃至（ｉｉｉ）を含むことからなる、抗腫瘍活性を有する物質の同定方法：

（ｉ）被検物質を、配列番号７０（図７８）で示されるアミノ酸配列中のアミノ酸番号１５５のチロシン（Ｔｙｒ）乃至２１７番目のイソロイシン（Ｉｌｅ）を含む蛋白質と接触させる工程；

（ｉｉ）該蛋白質中の、配列番号７０で示されるアミノ酸配列中の１５５番目のチロシン（Ｔｙｒ）、１５７番目のスレオニン（Ｔｈｒ）、１７６番目のリジン（Ｌｙｓ）、１８１番目のアラニン（Ａｌａ）、１８２番目のグリシン（Ｇｌｙ）、１８３番目のグリシン（Ｇｌｙ）、１８４番目のアスパラギン（Ａｓｎ）、１８５番目のプロリン（Ｐｒｏ）、１８６番目のメチオニン（Ｍｅｔ）、１８８番目のスレオニン（Ｔｈｒ）、２００番目の（グルタミン）、２０１番目のグルタミン酸（Ｇｌｕ）、２０５番目のグリシン（Ｇｌｙ）、２０６番目のグリシン（Ｇｌｙ）、２０８番目のリジン（Ｌｙｓ）、２０９番目のバリン（Ｖａｌ）、２１０番目のアルギニン（Ａｒｇ）、２１１番目のアスパラギン（Ａｓｎ）、２１２番目のグルタミン（Ｇｌｎ）、２１３番目のヒスチジン（Ｈｉｓ）、２１４番目のトリプトファン（Ｔｒｐ）、および、２１７番目のイソロイシン（Ｉｌｅ）の各残基と、該物質の距離を測定又は決定する工程；および、

（ｉｉｉ）各残基と該物質が相互作用距離を有する場合、該物質を陽性と判定する工程。

[請求項６１]

下記工程（ｉｖ）をさらに含む、請求項６０に記載の方法：

（ｉｖ）該物質の抗腫瘍活性を測定する工程。

[請求項６２]

該物質が抗体、その機能断片もしくはその修飾体、またはペプチドである、請求項６０又は６１記載の方法。

[請求項６３]

請求項６０又は６１記載の工程（ｉｉｉ）において陽性と判定された物質を遺伝子組換え、ペプチド合成又はインビトロ翻訳を含む工程により調製することからなる、該物質の製造方法。

[請求項６４]

さらなる薬剤を含む、請求項４１乃至４３および５８のいずれか一つに記載の医薬組成物。

[請求項６５]

さらなる化合物とコンジュゲートされた、請求項１乃至３０、３６および３７のいずれか一つに記載の抗体もしくはその機能断片、または、請求項３８乃至４０のいずれか一つに記載の修飾体。

[請求項６６]

請求項６５記載の抗体、機能断片または修飾体を含む、請求項４１乃至４３、５８および６４記載のいずれか一つに記載の医薬組成物。