



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110959014 A

(43)申请公布日 2020.04.03

(21)申请号 201880048205.3

(22)申请日 2018.07.18

(30)优先权数据

2017-139157 2017.07.18 JP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2020.01.17

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2018/026958 2018.07.18

(87)PCT国际申请的公布数据

W02019/017401 JA 2019.01.24

(71)申请人 协和麒麟株式会社

地址 日本东京都

申请人 国立大学法人京都大学

(72)发明人 甲斐正之 小川进也 武藤诚

河田健二 平位秀世 坂井义治

前川平

(74)专利代理机构 中原信达知识产权代理有限
责任公司 11219

代理人 盛曼 金龙河

(51)Int.Cl.

G07K 16/28(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

A61P 29/00(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

A61P 37/02(2006.01)

C12N 1/15(2006.01)

C12N 1/19(2006.01)

C12N 1/21(2006.01)

C12N 5/10(2006.01)

C12N 5/12(2006.01)

C12N 15/13(2006.01)

C12P 21/08(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

权利要求书6页 说明书60页

序列表87页 附图7页

(54)发明名称

抗人CCR1单克隆抗体

(57)摘要

本发明的课题在于提供与人CC趋化因子受体1(CCR1)结合而抑制人CCR1的活化的单克隆抗体或该抗体片段。本发明涉及与人CCR1的胞外区结合而抑制由人CC趋化因子配体15(CCL15)引起的人CCR1的活化的单克隆抗体或该抗体片段、产生该抗体的杂交瘤、具有编码该抗体或该抗体片段的碱基序列的核酸、含有包含该核酸的载体的转化细胞、使用该杂交瘤或该转化细胞的该抗体或该抗体片段的制造方法、包含该抗体或该抗体片段的治疗剂和诊断剂、以及使用该抗体或该抗体片段的CCR1相关疾病的治疗方法和诊断方法。

1. 一种单克隆抗体或该抗体片段,所述单克隆抗体或该抗体片段与人CC趋化因子受体1(CC chemokine receptor 1;以下简称为CCR1)的胞外区结合,抑制由人CC趋化因子配体(以下简称为CCL)15引起的人CCR1的活化。

2. 如权利要求1所述的单克隆抗体或该抗体片段,其中,所述单克隆抗体或该抗体片段抑制由人CCL15诱导的人CCR1表达细胞的迁移。

3. 如权利要求1或2所述的单克隆抗体或该抗体片段,其中,所述单克隆抗体或该抗体片段与人CCR1的细胞外环2区域的氨基酸序列中的至少一个氨基酸残基结合。

4. 如权利要求1~3中任一项所述的单克隆抗体或该抗体片段,其中,单克隆抗体为选自下述(a)~(n)中的任意一种抗体:

(a) 重链可变区(heavy chain variable region;以下简称为VH)的互补决定区(complementarity determining region;以下简称为CDR)1~3分别包含序列号69、70和71中记载的氨基酸序列、并且轻链可变区(light chain variable region;以下简称为VL)的CDR1~3分别包含序列号72、73和74中记载的氨基酸序列的抗体;

(b) VH的CDR1~3分别包含序列号75、76和77中记载的氨基酸序列、并且VL的CDR1~3分别包含序列号78、79和80中记载的氨基酸序列的抗体;

(c) VH的CDR1~3分别包含序列号81、82和83中记载的氨基酸序列、并且VL的CDR1~3分别包含序列号84、85和86中记载的氨基酸序列的抗体;

(d) VH的CDR1~3分别包含序列号87、88和89中记载的氨基酸序列、并且VL的CDR1~3分别包含序列号90、91和92中记载的氨基酸序列的抗体;

(e) VH的CDR1~3分别包含序列号93、94和95中记载的氨基酸序列、并且VL的CDR1~3分别包含序列号96、97和98中记载的氨基酸序列的抗体;

(f) VH的CDR1~3分别包含序列号99、100和101中记载的氨基酸序列、并且VL的CDR1~3分别包含序列号102、103和104中记载的氨基酸序列的抗体;

(g) VH的CDR1~3分别包含序列号105、106和107中记载的氨基酸序列、并且VL的CDR1~3分别包含序列号108、109和110中记载的氨基酸序列的抗体;

(h) VH的CDR1~3分别包含序列号111、112和113中记载的氨基酸序列、并且VL的CDR1~3分别包含序列号114、115和116中记载的氨基酸序列的抗体;

(i) VH的CDR1~3分别包含序列号117、118和119中记载的氨基酸序列、并且VL的CDR1~3分别包含序列号120、121和122中记载的氨基酸序列的抗体;

(j) VH的CDR1包含序列号75中记载的氨基酸序列、VH的CDR2包含序列号76中记载的氨基酸序列或者导入了选自将序列号76中记载的氨基酸序列中的第2位的Ile替换为Thr、将第9位的Val替换为Ala、将第14位的Phe替换为Ala、以及将第15位的Ile替换为Ala的改造中的至少任意一种改造的氨基酸序列、VH的CDR3包含序列号77中记载的氨基酸序列或者导入了将序列号77中记载的氨基酸序列中的第5位的Tyr替换为Ala、以及将第7位的Thr替换为Ala的改造中的至少任意一种改造的氨基酸序列、并且VL的CDR1包含序列号126中记载的氨基酸序列或者导入了将序列号126中记载的氨基酸序列中的第15位的Phe替换为Ala的改造的氨基酸序列、VL的CDR2包含序列号127中记载的氨基酸序列或者导入了将序列号127中记载的氨基酸序列中的第2位的Val替换为Ile、以及将第5位的Arg替换为Lys的改造中的至少任意一种改造的氨基酸序列、VL的CDR3包含序列号128中记载的氨基酸序列的抗体;

(k) VH的CDR1~3分别包含序列号75、131和77中记载的氨基酸序列、并且VL的CDR1~3分别包含序列号126、134和128中记载的氨基酸序列的抗体；

(l) 与所述(a)~(k)中记载的至少一种抗体竞争性地与人CCR1结合的抗体；

(m) 与包含所述(a)~(k)中记载的任意一种抗体所结合的表位的表位结合的抗体；

(n) 与和所述(a)~(k)中记载的任意一种抗体所结合的表位相同的表位结合的抗体。

5. 如权利要求1~4中任一项所述的单克隆抗体或该抗体片段,其中,单克隆抗体为选自下述(a)~(j)中的任意一种抗体:

(a) VH包含序列号51中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号52中记载的氨基酸序列的抗体;

(b) VH包含序列号53中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号54中记载的氨基酸序列的抗体;

(c) VH包含序列号55中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号56中记载的氨基酸序列的抗体;

(d) VH包含序列号57中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号58中记载的氨基酸序列的抗体;

(e) VH包含序列号59中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号60中记载的氨基酸序列的抗体;

(f) VH包含序列号61中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号62中记载的氨基酸序列的抗体;

(g) VH包含序列号63中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号64中记载的氨基酸序列的抗体;

(h) VH包含序列号65中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号66中记载的氨基酸序列的抗体;

(i) VH包含序列号67中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号68中记载的氨基酸序列的抗体;

(j) VH包含序列号130中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号133中记载的氨基酸序列的抗体。

6. 如权利要求1~4中任一项所述的单克隆抗体或该抗体片段,其中,单克隆抗体为选自下述(a)~(c)中的任意一种抗体:

(a) VH包含序列号136中记载的氨基酸序列或者导入了将序列号136中记载的氨基酸序列中的第6位的Glu置换为Gln、将第20位的Leu置换为Ile、将第27位的Gly置换为Phe、将第29位的Val置换为Leu、将第30位的Ser置换为Asn、将第37位的Ile置换为Val、将第48位的Ile置换为Leu、将第67位的Val置换为Leu、将第71位的Val置换为Lys、将第73位的Thr置换为Asp、将第76位的Asn置换为Ser、将第78位的Phe置换为Val、将第80位的Leu置换为Phe、将第82位的Leu置换为Met、将第85位的Val置换为Leu、将第92位的Val置换为Ile、以及将第97位的Arg置换为Lys的氨基酸改造中的至少一种改造的氨基酸序列、并且VL包含序列号135中记载的氨基酸序列或者导入了将序列号135中记载的氨基酸序列中的第2位的Ile置换为Val、将第15位的Pro置换为Leu、将第50位的Gln置换为Lys、将第92位的Tyr置换为Phe、以及将第109位的Val置换为Leu的氨基酸改造中的至少一种改造的氨基酸序列的抗体;

(b) VH包含序列号146中记载的氨基酸序列或者导入了将序列号146中记载的氨基酸序列中的第4位的Leu置换为Val、将第44位的Gly置换为Arg、将第49位的Ser置换为Ala、将第92位的Ala置换为Gly、将第93位的Val置换为Met、将第97位的Ala置换为Thr、以及将第98位的Lys置换为Arg的氨基酸改造中的至少一种改造的氨基酸序列、并且VL包含序列号145中记载的氨基酸序列或者导入了将序列号145中记载的氨基酸序列中的第2位的Ile置换为Val、将第15位的Ser置换为Leu、将第19位的Ala置换为Val、将第43位的Gln置换为Lys、将第50位的Gln置换为Lys、以及将第109位的Val置换为Leu的氨基酸改造中的至少一种改造的氨基酸序列的抗体；

(c) VH包含序列号163中记载的氨基酸序列或者导入了将序列号163中记载的氨基酸序列中的第42位的Asp置换为Glu、将第87位的Lys置换为Arg、以及将第97位的Ala置换为Thr的氨基酸改造中的任意一种改造的氨基酸序列、并且VL包含序列号162中记载的氨基酸序列或者导入了将序列号162中记载的氨基酸序列中的第38位的Gln置换为His、以及将第43位的Ala置换为Gly的氨基酸改造中的至少一种改造的氨基酸序列的抗体。

7. 如权利要求1~4和6中任一项所述的单克隆抗体或该抗体片段,其中,单克隆抗体为选自下述(a)~(h)中的任意一种抗体:

(a) VH包含序列号144中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号135中记载的氨基酸序列的抗体;

(b) VH包含序列号144中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号137中记载的氨基酸序列的抗体;

(c) VH包含序列号144中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号138中记载的氨基酸序列的抗体;

(d) VH包含序列号144中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号139中记载的氨基酸序列的抗体;

(e) VH包含序列号144中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号140中记载的氨基酸序列的抗体;

(f) VH包含序列号144中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号141中记载的氨基酸序列的抗体;

(g) VH包含序列号144中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号142中记载的氨基酸序列的抗体;

(h) VH包含序列号143中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号142中记载的氨基酸序列的抗体。

8. 如权利要求1~4和6中任一项所述的单克隆抗体或该抗体片段,其中,单克隆抗体为选自下述(a)~(w)中的任意一种抗体:

(a) VH包含序列号146中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号145中记载的氨基酸序列的抗体;

(b) VH包含序列号146中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号147中记载的氨基酸序列的抗体;

(c) VH包含序列号146中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号148中记载的氨基酸序列的抗体;

(d) VH包含序列号146中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号149中记载的氨基酸序列的抗体；

(e) VH包含序列号146中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号150中记载的氨基酸序列的抗体；

(f) VH包含序列号146中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号151中记载的氨基酸序列的抗体；

(g) VH包含序列号146中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号152中记载的氨基酸序列的抗体；

(h) VH包含序列号146中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号153中记载的氨基酸序列的抗体；

(i) VH包含序列号161中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号145中记载的氨基酸序列的抗体；

(j) VH包含序列号161中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号147中记载的氨基酸序列的抗体；

(k) VH包含序列号161中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号148中记载的氨基酸序列的抗体；

(l) VH包含序列号161中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号149中记载的氨基酸序列的抗体；

(m) VH包含序列号161中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号150中记载的氨基酸序列的抗体；

(n) VH包含序列号161中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号151中记载的氨基酸序列的抗体；

(o) VH包含序列号161中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号152中记载的氨基酸序列的抗体；

(p) VH包含序列号161中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号153中记载的氨基酸序列的抗体；

(q) VH包含序列号154中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号151中记载的氨基酸序列的抗体；

(r) VH包含序列号155中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号151中记载的氨基酸序列的抗体；

(s) VH包含序列号156中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号151中记载的氨基酸序列的抗体；

(t) VH包含序列号157中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号151中记载的氨基酸序列的抗体；

(u) VH包含序列号158中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号151中记载的氨基酸序列的抗体；

(v) VH包含序列号159中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号151中记载的氨基酸序列的抗体；

(w) VH包含序列号160中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号151中记载的氨基酸序

列的抗体。

9. 如权利要求1~4和6中任一项所述的单克隆抗体或该抗体片段,其中,单克隆抗体为选自下述(a)~(f)中的任意一种抗体:

(a) VH包含序列号163中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号162中记载的氨基酸序列的抗体;

(b) VH包含序列号163中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号164中记载的氨基酸序列的抗体;

(c) VH包含序列号165中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号162中记载的氨基酸序列的抗体;

(d) VH包含序列号165中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号164中记载的氨基酸序列的抗体;

(e) VH包含序列号166中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号162中记载的氨基酸序列的抗体;

(f) VH包含序列号166中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号164中记载的氨基酸序列的抗体。

10. 如权利要求1~9中任一项所述的单克隆抗体或该抗体片段,其中,单克隆抗体为基因重组抗体。

11. 如权利要求10所述的单克隆抗体或该抗体片段,其中,基因重组抗体为选自人型嵌合抗体、人源化抗体和人抗体中的一种基因重组抗体。

12. 如权利要求1~11中任一项所述的抗体片段,其中,抗体片段为选自Fab、Fab'、(Fab')₂、单链抗体(scFv)、二聚体化V区(双链抗体)、二硫键稳定性V区(dsFv)和包含CDR的肽中的一种抗体片段。

13. 一种杂交瘤,其产生权利要求1~9中任一项所述的单克隆抗体。

14. 一种核酸,其具有编码权利要求1~12中任一项所述的单克隆抗体或该抗体片段的碱基序列。

15. 一种转化细胞,其含有包含权利要求14所述的核酸的载体。

16. 权利要求1~12中任一项所述的单克隆抗体或该抗体片段的制造方法,其包括:对权利要求13所述的杂交瘤或权利要求15所述的转化细胞进行培养,从培养液中采集权利要求1~12中任一项所述的单克隆抗体或该抗体片段。

17. 一种人CCR1的检测或测定用试剂,其包含权利要求1~12中任一项所述的单克隆抗体或该抗体片段。

18. 一种人CCR1相关疾病的诊断剂,其包含权利要求1~12中任一项所述的单克隆抗体或该抗体片段。

19. 如权利要求18所述的诊断剂,其中,人CCR1相关疾病为癌症、自身免疫疾病或炎性疾病。

20. 一种人CCR1相关疾病的治疗剂,其含有权利要求1~12中任一项所述的单克隆抗体或该抗体片段作为有效成分。

21. 如权利要求20所述的治疗剂,其中,人CCR1相关疾病为癌症、自身免疫疾病或炎性疾病。

22. 一种人CCR1相关疾病的诊断方法,其使用权利要求1~12中任一项所述的单克隆抗体或该抗体片段。

23. 一种人CCR1相关疾病的治疗方法,其使用权利要求1~12中任一项所述的单克隆抗体或该抗体片段。

24. 权利要求1~12中任一项所述的单克隆抗体或该抗体片段在制造人CCR1相关疾病的诊断剂中的应用。

25. 权利要求1~12中任一项所述的单克隆抗体或该抗体片段在制造人CCR1相关疾病的治疗剂中的应用。

26. 如权利要求1~12中任一项所述的单克隆抗体或该抗体片段,其用于作为人CCR1相关疾病的治疗剂来使用。

27. 如权利要求1~12中任一项所述的单克隆抗体或该抗体片段,其用于作为人CCR1相关疾病的诊断剂来使用。

抗人CCR1单克隆抗体

技术领域

[0001] 本发明涉及与人CC趋化因子受体1(CC chemokine receptor 1、以下记为人CCR1)的胞外区结合而抑制由人CC趋化因子配体(以下记为人CCL)15引起的人CCR1的活化的单克隆抗体或该抗体片段、产生该抗体的杂交瘤、具有编码该抗体或该抗体片段的碱基序列的核酸、含有包含该核酸的载体的转化细胞、使用该杂交瘤或该转化细胞的该抗体或该抗体片段的制造方法、包含该抗体或该抗体片段的治疗剂和诊断剂、以及使用该抗体或该抗体片段的CCR1相关疾病的治疗方法和诊断方法。

背景技术

[0002] CCR1有分化群(cluster of differentiation、CD)191、CKR-1、HM145、巨噬细胞炎性蛋白1 α 受体(Macrophage inflammatory protein 1 α receptor、MIP1 α R)、CMKBR1或SCYAR1等别名。

[0003] 编码人CCR1的基因在1993年被鉴定(非专利文献1)。人CCR1的cDNA序列(序列号1)和氨基酸序列(序列号2)已被公开,例如在美国国家生物技术信息中心(NCBI)中,cDNA序列可以参考NM_001295、蛋白质的氨基酸序列可以参考NP_001286。小鼠CCR1的cDNA序列(序列号3)和氨基酸序列(序列号4)也已被公开,在NCBI中,cDNA序列可以参考NM_009912、蛋白质的氨基酸序列可以参考NP_034042。

[0004] CCR1是具有七次跨膜型结构的G蛋白偶联受体(G protein-coupled receptor;以下简记为GPCR),是全长由355个氨基酸构成的膜蛋白。作为人CCR1的配体,报道了人CCL3、CCL5、CCL8、CCL14、CCL15、CCL16和CCL23(非专利文献2)。另外,作为小鼠CCR1的配体,报道了小鼠CCL3、CCL5、CCL7和CCL9(非专利文献3)。

[0005] 人CCL15是C-C趋化因子家族中包含的配体,全长由92个氨基酸构成。已知CCR1和CCR3作为CCL15的受体发挥功能。已知CCL15的N末端在蛋白水解酶的作用下被分解,成为约68个氨基酸的活化型,由此发挥出更强的活性(非专利文献4)。

[0006] 认为包括CCR1在内的趋化因子受体的活化是经过下述两个步骤而发生的(非专利文献5)。作为步骤1,发生趋化因子(配体)与受体的N末端胞外区的相互作用。作为步骤2,趋化因子的N末端区与受体的细胞外环区域相互作用,产生受体的结构变化,结果信号被转导至细胞内。

[0007] 在GPCR的细胞内信号转导中,与因配体的结合而产生的GPCR的结构变化相应地,在GPCR的C末端缔合的G蛋白 α 、 β 、 γ 三聚体被活化, α 亚基从 $\beta\gamma$ 复合物解离。 α 亚基进一步作用于下游的因子,活化信号转导通路。当 α 亚基的活化使磷脂酶C(phospholipase C、以下称为PLC)活化时,磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸[phosphatidylinositol(4,5)bisphosphate、PIP₂]被分解,产生三磷酸肌醇(Inositol triphosphate、IP₃)和二酰甘油(diacylglycerol、DAG)。

[0008] IP₃作用于内质网,向细胞内释放钙离子(Ca²⁺),引起由钙调蛋白介导的各种细胞反应。这种细胞内钙浓度的上升可以使用荧光钙指示剂等进行测定,可以作为GPCR的活化

的指标。对于CCR1,也可以利用该方法测定细胞内信号的活化。

[0009] 迄今为止,已报道了中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、单核细胞、巨噬细胞、树突细胞、NK细胞、T细胞或B细胞等各种血细胞中的人CCR1的表达(非专利文献6~10)。此外,近年来报道了:存在于癌微环境中、促进癌的发展的被称为未成熟髓样细胞(imature myeloid cell、以下称为iMC)、骨髓来源抑制性细胞(myeloid derived suppressor cell、以下称为MDSC)的细胞群表达CCR1(非专利文献11和12)。

[0010] CCR1被暗示与类风湿关节炎、多发性硬化症、慢性阻塞性肺病等各种自身免疫性疾病、炎性疾病相关(非专利文献13)。另外,由于CCR1在上述iMC和MDSC中表达,因此暗示其助长癌的发展和恶化过程(非专利文献11和12)。

[0011] 例如,已知在人大肠癌中,以一定的频率观察到癌抑制基因SMAD4的突变或SMAD4蛋白的消失,SMAD4的缺损被认为是预后不良因子。近年来,明确了:SMAD4的缺损通过CCL15的表达上升而成为在肿瘤环境中引入CCR1阳性的iMC或MDSC等的主要原因;以及这些细胞通过基质金属蛋白酶(matrix metalloprotease、MMP)的分泌和免疫抑制作用辅助癌的浸润或转移而使患者的预后变差的机制(非专利文献11和12)。

[0012] 作为现有的低分子CCR1抑制剂,可以列举CP481,715(Pfizer公司)、MLN3897(Millennium公司)、BX-471(Berlex公司)、CCX-354(Chemocentryx公司)等。针对这些低分子抑制剂,对类风湿关节炎、多发性硬化症、慢性阻塞性肺病等自身免疫性或炎性疾病的患者进行了临床试验,但均未能显示出有效性(非专利文献14)。

[0013] 在现有的抗CCR1抗体中,作为在文献等中报道了CCR1活化的抑制效果的抗CCR1抗体,可以列举141-2(MBL公司、#D063-3)(非专利文献15)、53504(R&D Systems公司、#MAB145)(非专利文献16)和2D4(Millennium公司)(专利文献1)。

[0014] 现有技术文献

[0015] 专利文献

[0016] 专利文献1:美国专利第6756035号说明书

[0017] 非专利文献

[0018] 非专利文献1:Neote,Kuldeep,et al.“Molecular cloning,functional expression,and signaling characteristics of a CC chemokine receptor.”Cell 72.3(1993):415-425.

[0019] 非专利文献2:Mannhold,Raimund,Hugo Kubinyi,and Gerd Folkers.Chemokine receptors as drug targets.Eds.Martine J.Smit,Sergio A.Lira,and Rob Leurs.Vol.46.John Wiley&Sons,2010.

[0020] 非专利文献3:Ono,Santa Jeremy,et al.“Chemokines:roles in leukocyte development,trafficking,and effector function.”Journal of allergy and clinical immunology 111.6(2003):1185-1199.

[0021] 非专利文献4:Berahovich,Robert D.,et al.“Proteolytic activation of alternative CCR1 ligands in inflammation.”The Journal of Immunology174.11(2005):7341-7351.

[0022] 非专利文献5:Ludeman,Justin P.,and Martin J.Stone.“The structural role of receptor tyrosine sulfation in chemokine recognition.”British journal of

pharmacology 171.5(2014):1167-1179.

[0023] 非专利文献6:Su,S.B.,et al.“Preparation of specific polyclonal antibodies to a CC chemokine receptor,CCR1,and determination of CCR1 expression on various types of leukocytes.”Journal of leukocyte biology60.5 (1996):658-666.

[0024] 非专利文献7:Weber,Christian,et al.“Specialized roles of the chemokine receptors CCR1 and CCR5 in the recruitment of monocytes and TH1-like/CD45RO+T cells.”Blood 97.4(2001):1144-1146.

[0025] 非专利文献8:Phillips,Rhian M.,et al.“Variations in eosinophil chemokine responses:an investigation of CCR1 and CCR3 function,expression in atopy,and identification of a functional CCR1 promoter.”The Journal of Immunology 170.12(2003):6190-6201.

[0026] 非专利文献9:Cheng,Sara S.,et al.“Granulocyte-macrophage colony stimulating factor up-regulates CCR1 in human neutrophils.”The Journal of Immunology 166.2(2001):1178-1184.

[0027] 非专利文献10:Corcione,Anna,et al.“Chemotaxis of human tonsil B lymphocytes to CC chemokine receptor(CCR)1,CCR2 and CCR4ligands is restricted to non-germinal center cells.”International immunology 14.8(2002):883-892.

[0028] 非专利文献11:Kitamura,Takanori,et al.“SMAD4-deficient intestinal tumors recruit CCR1+ myeloid cells that promote invasion.”Nature genetics 39.4(2007):467-475.

[0029] 非专利文献12:Inamoto,Susumu,et al.“Loss of SMAD4 Promotes Colorectal Cancer Progression by Accumulation of Myeloid-Derived Suppressor Cells through CCL15-CCR1 Chemokine Axis.”Clinical Cancer Research(2015):clincanres-0726.

[0030] 非专利文献13:D' Ambrosio,Daniele,Paola Panina-Bordignon,and Francesco Sinigaglia.“Chemokine receptors in inflammation:an overview.”Journal of immunological methods 273.1(2003):3-13.

[0031] 非专利文献14:Schall,Thomas J.,and Amanda EI Proudfoot.“Overcoming hurdles in developing successful drugs targeting chemokine receptors.”Nature Reviews Immunology 11.5(2011):355-363.

[0032] 非专利文献15:Lebre,Maria C.,et al.“Why CCR2 and CCR5 blockade failed and why CCR1 blockade might still be effective in the treatment of rheumatoid arthritis.”PLoS One 6.7(2011):e21772.

[0033] 非专利文献16:Oba,Yasuo,et al.“MIP-1 α utilizes both CCR1 and CCR5 to induce osteoclast formation and increase adhesion of myeloma cells to marrow stromal cells.”Experimental hematology 33.3(2005):272-278.

发明内容

[0034] 发明所要解决的问题

[0035] 上述非专利文献15、非专利文献16和专利文献1等中记载的现有的抗CCR1抗体中没有作为药品而开发的抗CCR1抗体，作为抗体药品的性能的相关信息不充分。因此，本发明的目的在于提供与人CCR1结合而抑制人CCR1的活化的单克隆抗体或该抗体片段、产生该抗体的杂交瘤、具有编码该抗体或该抗体片段的碱基序列的核酸、含有包含该核酸的载体的转化细胞、使用该杂交瘤或该转化细胞的该抗体或该抗体片段的制造方法、包含该抗体或该抗体片段的治疗剂和诊断剂、以及使用该抗体或该抗体片段的CCR1相关疾病的治疗方法和诊断方法。

[0036] 用于解决问题的方法

[0037] 作为用于解决上述技术问题方法，本发明提供与人CCR1的胞外区结合而抑制由人CCL15引起的人CCR1的活化的人CCR1单克隆抗体。

[0038] 即，本发明涉及下述(1)～(27)。

[0039] (1) 一种单克隆抗体或该抗体片段，所述单克隆抗体或该抗体片段与人CCR1的胞外区结合，抑制由人CCL15引起的人CCR1的活化。

[0040] (2) 如(1)所述的单克隆抗体或该抗体片段，其中，所述单克隆抗体或该抗体片段抑制由人CCL15诱导的人CCR1表达细胞的迁移。

[0041] (3) 如(1)或(2)所述的单克隆抗体或该抗体片段，其中，所述单克隆抗体或该抗体片段与人CCR1的细胞外环2区域的氨基酸序列中的至少一个氨基酸残基结合。

[0042] (4) 如(1)～(3)中任一项所述的单克隆抗体或该抗体片段，其中，单克隆抗体为选自下述(a)～(n)中的任意一种抗体：

[0043] (a) 重链可变区(heavy chain variable region;以下简称为VH)的互补决定区(complementarity determining region;以下简称为CDR)1～3分别包含序列号69、70和71中记载的氨基酸序列、并且轻链可变区(light chain variable region;以下简称为VL)的CDR1～3分别包含序列号72、73和74中记载的氨基酸序列的抗体；

[0044] (b) VH的CDR1～3分别包含序列号75、76和77中记载的氨基酸序列、并且VL的CDR1～3分别包含序列号78、79和80中记载的氨基酸序列的抗体；

[0045] (c) VH的CDR1～3分别包含序列号81、82和83中记载的氨基酸序列、并且VL的CDR1～3分别包含序列号84、85和86中记载的氨基酸序列的抗体；

[0046] (d) VH的CDR1～3分别包含序列号87、88和89中记载的氨基酸序列、并且VL的CDR1～3分别包含序列号90、91和92中记载的氨基酸序列的抗体；

[0047] (e) VH的CDR1～3分别包含序列号93、94和95中记载的氨基酸序列、并且VL的CDR1～3分别包含序列号96、97和98中记载的氨基酸序列的抗体；

[0048] (f) VH的CDR1～3分别包含序列号99、100和101中记载的氨基酸序列、并且VL的CDR1～3分别包含序列号102、103和104中记载的氨基酸序列的抗体；

[0049] (g) VH的CDR1～3分别包含序列号105、106和107中记载的氨基酸序列、并且VL的CDR1～3分别包含序列号108、109和110中记载的氨基酸序列的抗体；

[0050] (h) VH的CDR1～3分别包含序列号111、112和113中记载的氨基酸序列、并且VL的CDR1～3分别包含序列号114、115和116中记载的氨基酸序列的抗体；

[0051] (i) VH的CDR1~3分别包含序列号117、118和119中记载的氨基酸序列、并且VL的CDR1~3分别包含序列号120、121和122中记载的氨基酸序列的抗体；

[0052] (j) VH的CDR1包含序列号75中记载的氨基酸序列、VH的CDR2包含序列号76中记载的氨基酸序列或者导入了选自将序列号76中记载的氨基酸序列中的第2位的Ile替换为Thr、将第9位的Val替换为Ala、将第14位的Phe替换为Ala、以及将第15位的Ile替换为Ala的改造中的至少任意一种改造的氨基酸序列、VH的CDR3包含序列号77中记载的氨基酸序列或者导入了将序列号77中记载的氨基酸序列中的第5位的Tyr替换为Ala、以及将第7位的Thr替换为Ala的改造中的至少任意一种改造的氨基酸序列、并且VL的CDR1包含序列号126中记载的氨基酸序列或者导入了将序列号126中记载的氨基酸序列中的第15位的Phe替换为Ala的改造的氨基酸序列、VL的CDR2包含序列号127中记载的氨基酸序列或者导入了将序列号127中记载的氨基酸序列中的第2位的Val替换为Ile、以及将第5位的Arg替换为Lys的改造中的至少任意一种改造的氨基酸序列、VL的CDR3包含序列号128中记载的氨基酸序列的抗体；

[0053] (k) VH的CDR1~3分别包含序列号75、131和77中记载的氨基酸序列、并且VL的CDR1~3分别包含序列号126、134和128中记载的氨基酸序列的抗体；

[0054] (l) 与所述(a)~(k)中记载的至少一种抗体竞争性地与人CCR1结合的抗体；

[0055] (m) 与包含所述(a)~(k)中记载的任意一种抗体所结合的表位的表位结合的抗体；

[0056] (n) 与和所述(a)~(k)中记载的任意一种抗体所结合的表位相同的表位结合的抗体。

[0057] (5) 如(1)~(4)中任一项所述的单克隆抗体或该抗体片段,其中,单克隆抗体为选自下述(a)~(j)中的任意一种抗体:

[0058] (a) VH包含序列号51中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号52中记载的氨基酸序列的抗体；

[0059] (b) VH包含序列号53中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号54中记载的氨基酸序列的抗体；

[0060] (c) VH包含序列号55中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号56中记载的氨基酸序列的抗体；

[0061] (d) VH包含序列号57中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号58中记载的氨基酸序列的抗体；

[0062] (e) VH包含序列号59中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号60中记载的氨基酸序列的抗体；

[0063] (f) VH包含序列号61中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号62中记载的氨基酸序列的抗体；

[0064] (g) VH包含序列号63中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号64中记载的氨基酸序列的抗体；

[0065] (h) VH包含序列号65中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号66中记载的氨基酸序列的抗体；

[0066] (i) VH包含序列号67中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号68中记载的氨基酸

序列的抗体；

[0067] (j) VH包含序列号130中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号133中记载的氨基酸序列的抗体。

[0068] (6) 如(1)～(4)中任一项所述的单克隆抗体或该抗体片段,其中,单克隆抗体为选自下述(a)～(c)中的任意一种抗体:

[0069] (a) VH包含序列号136中记载的氨基酸序列或者导入了将序列号136中记载的氨基酸序列中的第6位的Glu置换为Gln、将第20位的Leu置换为Ile、将第27位的Gly置换为Phe、将第29位的Val置换为Leu、将第30位的Ser置换为Asn、将第37位的Ile置换为Val、将第48位的Ile置换为Leu、将第67位的Val置换为Leu、将第71位的Val置换为Lys、将第73位的Thr置换为Asp、将第76位的Asn置换为Ser、将第78位的Phe置换为Val、将第80位的Leu置换为Phe、将第82位的Leu置换为Met、将第85位的Val置换为Leu、将第92位的Val置换为Ile、以及将第97位的Arg置换为Lys的氨基酸改造中的至少一种改造的氨基酸序列、并且VL包含序列号135中记载的氨基酸序列或者导入了将序列号135中记载的氨基酸序列中的第2位的Ile置换为Val、将第15位的Pro置换为Leu、将第50位的Gln置换为Lys、将第92位的Tyr置换为Phe、以及将第109位的Val置换为Leu的氨基酸改造中的至少一种改造的氨基酸序列的抗体;

[0070] (b) VH包含序列号146中记载的氨基酸序列或者导入了将序列号146中记载的氨基酸序列中的第4位的Leu置换为Val、将第44位的Gly置换为Arg、将第49位的Ser置换为Ala、将第92位的Ala置换为Gly、将第93位的Val置换为Met、将第97位的Ala置换为Thr、以及将第98位的Lys置换为Arg的氨基酸改造中的至少一种改造的氨基酸序列、并且VL包含序列号145中记载的氨基酸序列或者导入了将序列号145中记载的氨基酸序列中的第2位的Ile置换为Val、将第15位的Ser置换为Leu、将第19位的Ala置换为Val、将第43位的Gln置换为Lys、将第50位的Gln置换为Lys、以及将第109位的Val置换为Leu的氨基酸改造中的至少一种改造的氨基酸序列的抗体;

[0071] (c) VH包含序列号163中记载的氨基酸序列或者导入了将序列号163中记载的氨基酸序列中的第42位的Asp置换为Glu、将第87位的Lys置换为Arg、以及将第97位的Ala置换为Thr的氨基酸改造中的任意一种改造的氨基酸序列、并且VL包含序列号162中记载的氨基酸序列或者导入了将序列号162中记载的氨基酸序列中的第38位的Gln置换为His、以及将第43位的Ala置换为Gly的氨基酸改造中的至少一种改造的氨基酸序列的抗体。

[0072] (7) 如(1)～(4)和(6)中任一项所述的单克隆抗体或该抗体片段,其中,单克隆抗体为选自下述(a)～(h)中的任意一种抗体:

[0073] (a) VH包含序列号144中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号135中记载的氨基酸序列的抗体;

[0074] (b) VH包含序列号144中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号137中记载的氨基酸序列的抗体;

[0075] (c) VH包含序列号144中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号138中记载的氨基酸序列的抗体;

[0076] (d) VH包含序列号144中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号139中记载的氨基酸序列的抗体;

[0077] (e) VH包含序列号144中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号140中记载的氨基

酸序列的抗体；

[0078] (f) VH包含序列号144中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号141中记载的氨基酸序列的抗体；

[0079] (g) VH包含序列号144中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号142中记载的氨基酸序列的抗体；

[0080] (h) VH包含序列号143中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号142中记载的氨基酸序列的抗体。

[0081] (8) 如(1)～(4)和(6)中任一项所述的单克隆抗体或该抗体片段,其中,单克隆抗体为选自下述(a)～(w)中的任意一种抗体：

[0082] (a) VH包含序列号146中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号145中记载的氨基酸序列的抗体；

[0083] (b) VH包含序列号146中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号147中记载的氨基酸序列的抗体；

[0084] (c) VH包含序列号146中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号148中记载的氨基酸序列的抗体；

[0085] (d) VH包含序列号146中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号149中记载的氨基酸序列的抗体；

[0086] (e) VH包含序列号146中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号150中记载的氨基酸序列的抗体；

[0087] (f) VH包含序列号146中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号151中记载的氨基酸序列的抗体；

[0088] (g) VH包含序列号146中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号152中记载的氨基酸序列的抗体；

[0089] (h) VH包含序列号146中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号153中记载的氨基酸序列的抗体；

[0090] (i) VH包含序列号161中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号145中记载的氨基酸序列的抗体；

[0091] (j) VH包含序列号161中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号147中记载的氨基酸序列的抗体；

[0092] (k) VH包含序列号161中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号148中记载的氨基酸序列的抗体；

[0093] (l) VH包含序列号161中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号149中记载的氨基酸序列的抗体；

[0094] (m) VH包含序列号161中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号150中记载的氨基酸序列的抗体；

[0095] (n) VH包含序列号161中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号151中记载的氨基酸序列的抗体；

[0096] (o) VH包含序列号161中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号152中记载的氨基酸序列的抗体；

- [0097] (p) VH包含序列号161中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号153中记载的氨基酸序列的抗体；
- [0098] (q) VH包含序列号154中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号151中记载的氨基酸序列的抗体；
- [0099] (r) VH包含序列号155中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号151中记载的氨基酸序列的抗体；
- [0100] (s) VH包含序列号156中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号151中记载的氨基酸序列的抗体；
- [0101] (t) VH包含序列号157中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号151中记载的氨基酸序列的抗体；
- [0102] (u) VH包含序列号158中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号151中记载的氨基酸序列的抗体；
- [0103] (v) VH包含序列号159中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号151中记载的氨基酸序列的抗体；
- [0104] (w) VH包含序列号160中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号151中记载的氨基酸序列的抗体。
- [0105] (9) 如(1)～(4)和(6)中任一项所述的单克隆抗体或该抗体片段,其中,单克隆抗体为选自下述(a)～(f)中的任意一种抗体:
- [0106] (a) VH包含序列号163中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号162中记载的氨基酸序列的抗体；
- [0107] (b) VH包含序列号163中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号164中记载的氨基酸序列的抗体；
- [0108] (c) VH包含序列号165中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号162中记载的氨基酸序列的抗体；
- [0109] (d) VH包含序列号165中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号164中记载的氨基酸序列的抗体；
- [0110] (e) VH包含序列号166中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号162中记载的氨基酸序列的抗体；
- [0111] (f) VH包含序列号166中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号164中记载的氨基酸序列的抗体。
- [0112] (10) 如(1)～(9)中任一项所述的单克隆抗体或该抗体片段,其中,单克隆抗体为基因重组抗体。
- [0113] (11) 如(10)所述的单克隆抗体或该抗体片段,其中,基因重组抗体为选自人型嵌合抗体、人源化抗体和人抗体中的任意一种基因重组抗体。
- [0114] (12) 如(1)～(11)中任一项所述的抗体片段,其中,抗体片段为选自Fab、Fab'、(Fab')₂、单链抗体(scFv)、二聚体化V区(双链抗体)、二硫键稳定性V区(dsFv)和包含CDR的肽中的任意一种抗体片段。
- [0115] (13) 一种杂交瘤,其产生(1)～(9)中任一项所述的单克隆抗体。
- [0116] (14) 一种核酸,其具有编码(1)～(12)中任一项所述的单克隆抗体或该抗体片段

的碱基序列。

[0117] (15) 一种转化细胞,其含有包含(14)所述的核酸的载体。

[0118] (16) (1) ~ (12) 中任一项所述的单克隆抗体或该抗体片段的制造方法,其包括:对(13)所述的杂交瘤或(15)所述的转化细胞进行培养,从培养液中采集(1) ~ (12) 中任一项所述的单克隆抗体或该抗体片段。

[0119] (17) 一种人CCR1的检测或测定用试剂,其包含(1) ~ (12) 中任一项所述的单克隆抗体或该抗体片段。

[0120] (18) 一种人CCR1相关疾病的诊断剂,其包含(1) ~ (12) 中任一项所述的单克隆抗体或该抗体片段。

[0121] (19) 如(18)所述的诊断剂,其中,人CCR1相关疾病为癌症、自身免疫疾病或炎性疾病。

[0122] (20) 一种人CCR1相关疾病的治疗剂,其含有(1) ~ (12) 中任一项所述的单克隆抗体或该抗体片段作为有效成分。

[0123] (21) 如(20)所述的治疗剂,其中,人CCR1相关疾病为癌症、自身免疫疾病或炎性疾病。

[0124] (22) 一种人CCR1相关疾病的诊断方法,其使用(1) ~ (12) 中任一项所述的单克隆抗体或该抗体片段。

[0125] (23) 一种人CCR1相关疾病的治疗方法,其使用(1) ~ (12) 中任一项所述的单克隆抗体或该抗体片段。

[0126] (24) (1) ~ (12) 中任一项所述的单克隆抗体或该抗体片段在制造人CCR1相关疾病的诊断剂中的应用。

[0127] (25) (1) ~ (12) 中任一项所述的单克隆抗体或该抗体片段在制造人CCR1相关疾病的治疗剂中的应用。

[0128] (26) 如(1) ~ (12) 中任一项所述的单克隆抗体或该抗体片段,其用于作为人CCR1相关疾病的治疗剂来使用。

[0129] (27) 如(1) ~ (12) 中任一项所述的单克隆抗体或该抗体片段,其用于作为人CCR1相关疾病的诊断剂来使用。

[0130] 发明效果

[0131] 本发明的单克隆抗体或该抗体片段与人CCR1的胞外区结合,抑制伴随人CCR1活化的各种反应。因此,本发明的单克隆抗体或该抗体片段能够用作人CCR1相关疾病的治疗剂和诊断剂。

附图说明

[0132] 图1(a)和图1(b)是对抗人CCR1抗体测定抑制由活化人CCL15引起的THP-1的迁移的活性的结果。图1(a)和图1(b)的纵轴表示THP-1细胞的迁移(%),将添加DPBS和活化CCL15时移动至Transwell的下层的细胞数设为100%。图1(a)和图1(b)的横轴表示添加至THP-1细胞中的抗体、配体和它们的浓度。图1(a)和图1(b)中,将添加了DPBS的样品记为DPBS、将未添加活化人CCL15的样品记为无配体、将添加了活化人CCL15的样品记为hCCL15(68aa)。作为抗人CCR1抗体,使用KM5907抗体、KM5908抗体、KM5909抗体、KM5911抗体、

KM5915抗体、KM5916抗体、KM5954抗体、KM5955抗体和KM5956抗体。

[0133] 图2是对抗人CCR1抗体测定抑制由活化人CCL15引起的THP-1的迁移的活性的结果。图2的纵轴表示利用CellTiter-Glo测定移动至Transwell的下层的细胞数时的发光量(相对光单位;relative light unit,RLU)。图2的横轴表示添加至THP-1细胞中的抗体、配体和它们的浓度。图2中,将添加了DPBS的样品记为DPBS、将未添加活化人CCL15的样品记为无配体、将添加了活化人CCL15的样品记为hCCL15(68aa)。作为抗人CCR1抗体,使用2D4抗体(Millennium公司)、53504抗体(R&D Technologies公司)、141-2抗体(MBL公司、#D063-3)、KM5908抗体和KM5916抗体。

[0134] 图3是对抗人CCR1抗体测定抑制由活化人CCL15引起的THP-1的迁移的活性的结果。图3的纵轴表示利用CellTiter-Glo测定移动至Transwell的下层的细胞数时的发光量(相对光单位;relative light unit,RLU)。图3的横轴表示添加至THP-1细胞中的抗体、配体和它们的浓度。图3中,将未添加抗体的样品记为无mAb、将未添加活化人CCL15的样品记为无配体、将添加了活化人CCL15的样品记为hCCL15。抗作为人CCR1抗体,使用chKM5908抗体和chKM5908'抗体。实验以N=3来实施,图中示出其平均值和标准偏差。

[0135] 图4是对抗人CCR1抗体测定抑制由活化人CCL15引起的THP-1的迁移的活性的结果。图4的纵轴表示利用CellTiter-Glo测定移动至Transwell的下层的细胞数时的发光量(相对光单位;relative light unit,RLU)。图4的横轴表示添加至THP-1细胞中的抗体、配体和它们的浓度。图4中,将未添加抗体的样品记为无mAb、将未添加活化人CCL15的样品记为无配体、将添加了活化人CCL15的样品记为hCCL15。作为抗人CCR1抗体,使用chKM5908抗体、chKM5908'抗体、chKM5908' mut02抗体、chKM5908' mut22抗体和chKM5908' mut25抗体。实验以N=3来实施,图中示出其平均值和标准偏差。

[0136] 图5示出不含信号序列的mAb5-06抗体的VL和mAb5-06人源化抗体(以下记为hzmAb5-06抗体)的VL(LV0、LV1a、LV1b、LV2a、LV2b、LV4和LV5)的氨基酸序列。各序列中的被框包围的区域表示CDR的氨基酸序列。

[0137] 图6示出不含信号序列的mAb5-06抗体的VH和hzmAb5-06抗体的VH(HV0、HV14和HV17)的氨基酸序列。各序列中的被框包围的区域表示CDR的氨基酸序列。

[0138] 图7示出不含信号序列的KM5907抗体的VL和KM5907人源化抗体(以下记为hzmKM5907抗体)的VL(LV0、LV1a、LV1b、LV1c、LV2a、LV2b、LV4和LV6)的氨基酸序列。各序列中的被框包围的区域表示CDR的氨基酸序列。

[0139] 图8示出不含信号序列的KM5907抗体的VH和hzmKM5907抗体的VH(HV0、HV1、HV2a、HV2b、HV3a、HV3b、HV3c、HV4和HV7)的氨基酸序列。各序列中的被框包围的区域表示CDR的氨基酸序列。

[0140] 图9示出不含信号序列的KM5916抗体的VL和KM5916人源化抗体(以下记为hzmKM5916抗体)的VL(LV0和LV1a)的氨基酸序列。各序列中的被框包围的区域表示CDR的氨基酸序列。

[0141] 图10示出不含信号序列的KM5916抗体的VH和hzmKM5916抗体的VH(HV0、HV1和HV3)的氨基酸序列。各序列中的被框包围的区域表示CDR的氨基酸序列。

[0142] 图11是对抗人CCR1抗体测定抑制由活化人CCL15引起的THP-1的迁移的活性的结果。图11的纵轴表示利用CellTiter-Glo测定移动至Transwell的下层的细胞数时的发光量

(相对光单位;relative light unit,RLU)。图11的横轴表示添加至THP-1细胞中的抗体、配体和它们的浓度。图11中,将未添加抗体的样品记为无mAb、将未添加活化人CCL15的样品记为无配体、将添加了活化人CCL15的样品记为hCCL15。作为抗人CCR1抗体,使用hzmAb5-06 LV5HV14、hzKM5907 LV2bHV3a和hzKM5916 LV2HV0。实验以N=3来实施,图中示出其平均值和标准偏差。

具体实施方式

[0143] 本发明涉及与人CCR1的胞外区结合、抑制由人CCL15引起的人CCR1的活化的单克隆抗体或该抗体片段。

[0144] CCR1也称为CD191、CKR-1、HM145、巨噬细胞炎性蛋白1 α 受体(Macrophage inflammatory protein 1 α receptor、MIP1 α R)、CMKBR1和SCYAR1等。CCR1是具有七次跨膜型结构的GPCR,是全长由355个氨基酸构成的膜蛋白。

[0145] 在包括CCR1的GPCR中,细胞表面上的GPCR通过配体结合而被活化,向该细胞内转导该受体依赖性的信号,与此同时,该细胞内的钙离子浓度上升。已知其结果为对该细胞引起细胞迁移、趋化因子的产生、基质金属蛋白酶MMP的产生等。

[0146] 即,作为CCR1的功能,可以列举下述功能:通过配体与细胞表面上的CCR1结合,向该细胞内转导CCR1依赖性的信号,与此同时,该细胞内的钙离子浓度上升,结果对该细胞引起细胞迁移、趋化因子的产生或MMP的产生等。

[0147] 作为人CCR1的配体,可以列举例如人CCL3、CCL5、CCL8、CCL14、CCL15、CCL16和CCL23等。作为小鼠CCR1的配体,可以列举例如小鼠CCL3、CCL5、CCL7和CCL9等。

[0148] 人CCL15是C-C趋化因子家族中包含的配体,全长由92个氨基酸构成。已知人CCL15的N末端在蛋白水解酶的作用下被分解,成为约68个氨基酸的活化型[以下在本发明中记为活化人CCL15或hCCL15(68aa)],由此发挥出比全长的CCL15(以下在本发明中记为全长CCL15)更强的活性。

[0149] 人CCL15与细胞表面上的人CCR1结合而活化该受体时,CCR1依赖性的信号被转导至该细胞内,引起磷脂酶C(PLC)的活化、细胞内的钙离子浓度的上升或核因子- κ B(nuclear factor- κ B、NF- κ B)的活化等。其结果,对该细胞引起细胞迁移等。

[0150] 作为本发明的单克隆抗体(以下也简称为本发明的抗体),可以列举抑制由人CCL15引起的人CCR1活化所伴随的各种反应中的至少一种反应的抗体。作为本发明的抗体,具体而言,可以列举例如抑制选自由人CCL15引起的人CCR1表达细胞内的CCR1依赖性的信号转导、PLC的活化、细胞内钙离子浓度的上升、NF- κ B的活化和CCR1表达细胞的迁移中的至少一种反应的抗体等。其中,作为本发明的抗体,优选为抑制由人CCL15诱导的人CCR1表达细胞的迁移的抗体。

[0151] 作为本发明的抗体,可以列举下述抗体:对于由人CCL15引起的人CCR1活化所伴随的上述反应,与仅添加人CCL15而不添加抗体的对照相比,优选抑制5%以上、10%以上、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上的抗体。人CCL15的浓度可以根据测定系统适当调节至添加人CCL15时的上述反应的活性达到最大值的浓度。例如在利用本申请实施例中记载的方法测定CCR1表达细胞的迁移的情况下,CCL15的浓度优选为1ng/mL。另外,对于本发明的抗体的浓度,也可以根据测定系统进行适

当调节。例如在利用本实施例中记载的方法测定CCR1表达细胞的迁移的情况下,本发明的抗体浓度可以列举0.3 μ g/mL以上、优选为1 μ g/mL以上、更优选为3 μ g/mL以上、最优选为10 μ g/mL以上。

[0152] 本发明中,只要将CCR1活化,人CCL15可以为全长CCL15和活化人CCL15中的任意一种CCL15。

[0153] 作为人CCR1表达细胞,只要是表达人CCR1的细胞,则可以为任意一种细胞,可以列举例如人细胞、人细胞株和人CCR1强制表达株等。

[0154] 作为表达人CCR1的人细胞,可以列举例如中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、单核细胞、巨噬细胞、树突细胞、NK细胞、T细胞、B细胞、未成熟髓样细胞(iMC)和骨髓来源免疫抑制性细胞(MDSC)等。

[0155] 作为人CCR1的胞外区,可以列举包含人CCR1的氨基酸序列的N末端起第1~31位的氨基酸序列的N末端区、包含第97~103位的氨基酸序列的细胞外环1区域、包含第172~195位的氨基酸序列的细胞外环2区域和包含第266~278位的氨基酸序列的细胞外环3区域[Cell 72.3(1993):415-425]。

[0156] 作为N末端区、细胞外环1区域、细胞外环2区域和细胞外环3区域,具体而言,分别可以列举序列号2的氨基酸序列中的第1~31位、第97~103位、第172~195位和第266~278位的氨基酸序列。

[0157] 作为本发明的抗体,只要是与上述人CCR1的胞外区结合的抗体,则可以为任何抗体,但优选为与人CCR1的细胞外环2区域的氨基酸序列中的至少一个氨基酸残基结合的抗体。作为上述抗体,可以列举与序列号2的氨基酸序列的第172~195位的氨基酸序列中的至少一个氨基酸残基结合的抗体等。

[0158] 另外,更具体而言,作为本发明的抗体,可以列举选自下述(a)~(n)中的任意一种抗体。

[0159] (a) VH的CDR1~3分别包含序列号69、70和71中记载的氨基酸序列、并且VL的CDR1~3分别包含序列号72、73和74中记载的氨基酸序列的抗体。

[0160] (b) VH的CDR1~3分别包含序列号75、76和77中记载的氨基酸序列、并且VL的CDR1~3分别包含序列号78、79和80中记载的氨基酸序列的抗体。

[0161] (c) VH的CDR1~3分别包含序列号81、82和83中记载的氨基酸序列、并且VL的CDR1~3分别包含序列号84、85和86中记载的氨基酸序列的抗体。

[0162] (d) VH的CDR1~3分别包含序列号87、88和89中记载的氨基酸序列、并且VL的CDR1~3分别包含序列号90、91和92中记载的氨基酸序列的抗体。

[0163] (e) VH的CDR1~3分别包含序列号93、94和95中记载的氨基酸序列、并且VL的CDR1~3分别包含序列号96、97和98中记载的氨基酸序列的抗体。

[0164] (f) VH的CDR1~3分别包含序列号99、100和101中记载的氨基酸序列、并且VL的CDR1~3分别包含序列号102、103和104中记载的氨基酸序列的抗体。

[0165] (g) VH的CDR1~3分别包含序列号105、106和107中记载的氨基酸序列、并且VL的CDR1~3分别包含序列号108、109和110中记载的氨基酸序列的抗体。

[0166] (h) VH的CDR1~3分别包含序列号111、112和113中记载的氨基酸序列、并且VL的CDR1~3分别包含序列号114、115和116中记载的氨基酸序列的抗体。

[0167] (i) VH的CDR1~3分别包含序列号117、118和119中记载的氨基酸序列、并且VL的CDR1~3分别包含序列号120、121和122中记载的氨基酸序列的抗体。

[0168] (j) VH的CDR1包含序列号75中记载的氨基酸序列、VH的CDR2包含序列号76中记载的氨基酸序列或者导入了选自将序列号76中记载的氨基酸序列中的第2位的Ile替换为Thr、将第9位的Val替换为Ala、将第14位的Phe替换为Ala、以及将第15位的Ile替换为Ala的改造中的至少任意一种改造的氨基酸序列、VH的CDR3包含序列号77中记载的氨基酸序列或者导入了将序列号77中记载的氨基酸序列中的第5位的Tyr替换为Ala、以及将第7位的Thr替换为Ala的改造中的至少任意一种改造的氨基酸序列、并且VL的CDR1包含序列号126中记载的氨基酸序列或者导入了将序列号126中记载的氨基酸序列中的第15位的Phe替换为Ala的改造的氨基酸序列、VL的CDR2包含序列号127中记载的氨基酸序列或者导入了将序列号127中记载的氨基酸序列中的第2位的Val替换为Ile、以及将第5位的Arg替换为Lys的改造中的至少任意一种改造的氨基酸序列、VL的CDR3包含序列号128中记载的氨基酸序列的抗体。

[0169] (k) VH的CDR1~3分别包含序列号75、131和77中记载的氨基酸序列、并且VL的CDR1~3分别包含序列号126、134和128中记载的氨基酸序列的抗体。

[0170] (l) 与上述(a)~(k)中记载的至少一种抗体竞争性地与人CCR1结合的抗体。

[0171] (m) 与包含上述(a)~(k)中记载的任意一种抗体所结合的表位的表位结合的抗体。

[0172] (n) 与和上述(a)~(k)中记载的任意一种抗体所结合的表位相同的表位结合的抗体。

[0173] 作为本发明的抗体,包含具有与上述(a)~(k)中记载的任意一种抗体的VH的CDR1~3和VL的CDR1~3的氨基酸序列分别显示出90%以上的同源性的抗体的VH的CDR1~3和VL的CDR1~3的氨基酸序列的抗体。90%以上的同源性具体而言可以列举91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%和99%以上的同源性等。

[0174] 本发明中,作为上述(a)~(i)中记载的抗体的一个方式,分别可以列举小鼠抗人CCR1单克隆抗体KM5907抗体、KM5908抗体、KM5909抗体、KM5911抗体、KM5915抗体、KM5916抗体、KM5954抗体、KM5955抗体和KM5956抗体。作为上述(a)~(i)中记载的抗体的一个方式,分别可以列举抗人CCR1嵌合抗体chKM5907抗体、chKM5908抗体、chKM5909抗体、chKM5911抗体、chKM5915抗体、chKM5916抗体、chKM5954抗体、chKM5955抗体和chKM5956抗体。作为上述(a)和(f)中记载的抗体的一个方式,分别可以列举人源化抗人CCR1抗体hzmAb5-06抗体和hzmAb5-06抗体。作为上述(j)中记载的抗体的一个方式,可以列举抗人CCR1嵌合抗体改造体chKM5908'抗体、chKM5908' mut01~32抗体和人源化抗人CCR1抗体hzmAb5-06抗体。作为上述(k)中记载的抗体的一个方式,可以列举抗人CCR1嵌合抗体改造体chKM5908' mut22抗体(也记为mAb5-06)和人源化抗人CCR1抗体hzmAb5-06抗体。作为上述(a)~(k)中记载的抗体的一个方式,此外还可以列举具有上述(a)~(k)中记载的任意一种抗体的VH的CDR1~3和VL的CDR1~3的氨基酸序列的人抗体等。

[0175] 本发明的上述(l)的抗体是指将上述(a)~(k)中记载的抗体作为第一抗体时抑制该第一抗体与人CCR1的结合的第二抗体。本发明的上述(m)的是指在将上述(a)~(k)中记载的抗体作为第一抗体、并且将第一抗体所结合的表位作为第一表位的情况下,与包含该

第一表位的第二表位结合的第二抗体。另外,本发明的上述(n)的抗体是指在将上述(a)~(k)中记载的抗体作为第一抗体、并且将第一抗体所结合的表位作为第一表位的情况下,与该第一表位结合的第二抗体。

[0176] 另外,作为本发明的抗体,具体而言,还可以列举选自下述(1)-(a)~(j)、(2)-(a)~(c)、(3)-(a)~(h)、(4)-(a)~(w)和(5)-(a)~(f)中的任意一种抗体。

[0177] (1)-(a) VH包含序列号51中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号52中记载的氨基酸序列的抗体。

[0178] (1)-(b) VH包含序列号53中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号54中记载的氨基酸序列的抗体。

[0179] (1)-(c) VH包含序列号55中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号56中记载的氨基酸序列的抗体。

[0180] (1)-(d) VH包含序列号57中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号58中记载的氨基酸序列的抗体。

[0181] (1)-(e) VH包含序列号59中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号60中记载的氨基酸序列的抗体。

[0182] (1)-(f) VH包含序列号61中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号62中记载的氨基酸序列的抗体。

[0183] (1)-(g) VH包含序列号63中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号64中记载的氨基酸序列的抗体。

[0184] (1)-(h) VH包含序列号65中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号66中记载的氨基酸序列的抗体。

[0185] (1)-(i) VH包含序列号67中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号68中记载的氨基酸序列的抗体。

[0186] (1)-(j) VH包含序列号130中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号133中记载的氨基酸序列的抗体。

[0187] (2)-(a) VH包含序列号136中记载的氨基酸序列或者导入了将序列号136中记载的氨基酸序列中的第6位的Glu置换为Gln、将第20位的Leu置换为Ile、将第27位的Gly置换为Phe、将第29位的Val置换为Leu、将第30位的Ser置换为Asn、将第37位的Ile置换为Val、将第48位的Ile置换为Leu、将第67位的Val置换为Leu、将第71位的Val置换为Lys、将第73位的Thr置换为Asp、将第76位的Asn置换为Ser、将第78位的Phe置换为Val、将第80位的Leu置换为Phe、将第82位的Leu置换为Met、将第85位的Val置换为Leu、将第92位的Val置换为Ile、以及将第97位的Arg置换为Lys的氨基酸改造中的至少一种改造的氨基酸序列、并且VL包含序列号135中记载的氨基酸序列或者导入了将序列号135中记载的氨基酸序列中的第2位的Ile置换为Val、将第15位的Pro置换为Leu、将第50位的Gln置换为Lys、将第92位的Tyr置换为Phe、以及将第109位的Val置换为Leu的氨基酸改造中的至少一种改造的氨基酸序列的抗体。

[0188] (2)-(b) VH包含序列号146中记载的氨基酸序列或者导入了将序列号146中记载的氨基酸序列中的第4位的Leu置换为Val、将第44位的Gly置换为Arg、将第49位的Ser置换为Ala、将第92位的Ala置换为Gly、将第93位的Val置换为Met、将第97位的Ala置换为Thr、以及

将第98位的Lys置换为Arg的氨基酸改造中的至少一种改造的氨基酸序列、并且VL包含序列号145中记载的氨基酸序列或者导入了将序列号145中记载的氨基酸序列中的第2位的Ile置换为Val、将第15位的Ser置换为Leu、将第19位的Ala置换为Val、将第43位的Gln置换为Lys、将第50位的Gln置换为Lys、以及将第109位的Val置换为Leu的氨基酸改造中的至少一种改造的氨基酸序列的抗体。

[0189] (2) - (c) VH包含序列号163中记载的氨基酸序列或者导入了将序列号163中记载的氨基酸序列中的第42位的Asp置换为Glu、将第87位的Lys置换为Arg、以及将第97位的Ala置换为Thr的氨基酸改造中的任意一种改造的氨基酸序列、并且VL包含序列号162中记载的氨基酸序列或者导入了将序列号162中记载的氨基酸序列中的第38位的Gln置换为His、以及将第43位的Ala置换为Gly的氨基酸改造中的至少一种改造的氨基酸序列的抗体。

[0190] (3) - (a) VH包含序列号144中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号135中记载的氨基酸序列的抗体。

[0191] (3) - (b) VH包含序列号144中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号137中记载的氨基酸序列的抗体。

[0192] (3) - (c) VH包含序列号144中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号138中记载的氨基酸序列的抗体。

[0193] (3) - (d) VH包含序列号144中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号139中记载的氨基酸序列的抗体。

[0194] (3) - (e) VH包含序列号144中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号140中记载的氨基酸序列的抗体。

[0195] (3) - (f) VH包含序列号144中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号141中记载的氨基酸序列的抗体。

[0196] (3) - (g) VH包含序列号144中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号142中记载的氨基酸序列的抗体。

[0197] (3) - (h) VH包含序列号143中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号142中记载的氨基酸序列的抗体。

[0198] (4) - (a) VH包含序列号146中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号145中记载的氨基酸序列的抗体。

[0199] (4) - (b) VH包含序列号146中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号147中记载的氨基酸序列的抗体。

[0200] (4) - (c) VH包含序列号146中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号148中记载的氨基酸序列的抗体。

[0201] (4) - (d) VH包含序列号146中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号149中记载的氨基酸序列的抗体。

[0202] (4) - (e) VH包含序列号146中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号150中记载的氨基酸序列的抗体。

[0203] (4) - (f) VH包含序列号146中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号151中记载的氨基酸序列的抗体。

[0204] (4) - (g) VH包含序列号146中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号152中记载的

氨基酸序列的抗体。

[0205] (4) - (h) VH包含序列号146中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号153中记载的氨基酸序列的抗体。

[0206] (4) - (i) VH包含序列号161中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号145中记载的氨基酸序列的抗体。

[0207] (4) - (j) VH包含序列号161中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号147中记载的氨基酸序列的抗体。

[0208] (4) - (k) VH包含序列号161中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号148中记载的氨基酸序列的抗体。

[0209] (4) - (l) VH包含序列号161中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号149中记载的氨基酸序列的抗体。

[0210] (4) - (m) VH包含序列号161中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号150中记载的氨基酸序列的抗体。

[0211] (4) - (n) VH包含序列号161中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号151中记载的氨基酸序列的抗体。

[0212] (4) - (o) VH包含序列号161中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号152中记载的氨基酸序列的抗体。

[0213] (4) - (p) VH包含序列号161中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号153中记载的氨基酸序列的抗体。

[0214] (4) - (q) VH包含序列号154中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号151中记载的氨基酸序列的抗体。

[0215] (4) - (r) VH包含序列号155中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号151中记载的氨基酸序列的抗体。

[0216] (4) - (s) VH包含序列号156中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号151中记载的氨基酸序列的抗体。

[0217] (4) - (t) VH包含序列号157中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号151中记载的氨基酸序列的抗体。

[0218] (4) - (u) VH包含序列号158中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号151中记载的氨基酸序列的抗体。

[0219] (4) - (v) VH包含序列号159中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号151中记载的氨基酸序列的抗体。

[0220] (4) - (w) VH包含序列号160中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号151中记载的氨基酸序列的抗体。

[0221] (5) - (a) VH包含序列号163中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号162中记载的氨基酸序列的抗体。

[0222] (5) - (b) VH包含序列号163中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号164中记载的氨基酸序列的抗体。

[0223] (5) - (c) VH包含序列号165中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号162中记载的氨基酸序列的抗体。

[0224] (5) - (d) VH包含序列号165中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号164中记载的氨基酸序列的抗体。

[0225] (5) - (e) VH包含序列号166中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号162中记载的氨基酸序列的抗体。

[0226] (5) - (f) VH包含序列号166中记载的氨基酸序列、并且VL包含序列号164中记载的氨基酸序列的抗体。

[0227] 作为本发明的抗体,包含具有与上述(1) - (a) ~ (j)、(2) - (a) ~ (c)、(3) - (a) ~ (h)、(4) - (a) ~ (w)和(5) - (a) ~ (f)中记载的任意一种抗体的VH和VL的氨基酸序列分别显示出90%以上的同源性的抗体的VH和VL的氨基酸序列的抗体。90%以上的同源性具体而言可以列举91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%和99%以上的同源性等。

[0228] 本发明中,作为上述(1) - (a) ~ (i)中记载的抗体的一个方式,分别可以列举小鼠抗人CCR1单克隆抗体KM5907抗体、KM5908抗体、KM5909抗体、KM5911抗体、KM5915抗体、KM5916抗体、KM5954抗体、KM5955抗体和KM5956抗体。

[0229] 本发明中,作为上述(1) - (a) ~ (i)中记载的抗体的一个方式,分别可以列举抗人CCR1嵌合抗体chKM5907抗体、chKM5908抗体、chKM5909抗体、chKM5911抗体、chKM5915抗体、chKM5916抗体、chKM5954抗体、chKM5955抗体和chKM5956抗体。另外,作为上述(1) - (j)中记载的抗体的一个方式,可以列举抗人CCR1嵌合抗体改造体chmAb5-06。

[0230] 本发明中,作为上述(2) - (a) ~ (c)中记载的抗体的一个方式,分别可以列举人源化抗人CCR1抗体hzmAb5-06抗体、hzKM5907抗体和hzKM5916抗体。

[0231] 本发明中,作为上述(3) - (a) ~ (h)中记载的抗体的一个方式,分别可以列举人源化抗人CCR1抗体hzmAb5-06 LV0HV17抗体、hzmAb5-06 LV1aHV17抗体、hzmAb5-06 LV1bHV17抗体、hzmAb5-06 LV2aHV17抗体、hzmAb5-06 LV2bHV17抗体、hzmAb5-06 LV4HV17抗体、hzmAb5-06 LV5HV17抗体和hzmAb5-06 LV5HV14抗体。

[0232] 本发明中,作为上述(4) - (a) ~ (w)中记载的抗体的一个方式,分别可以列举人源化抗人CCR1抗体hzKM5907 LV0HV0抗体、hzKM5907 LV1aHV0抗体、hzKM5907 LV1bHV0抗体、hzKM5907 LV1cHV0抗体、hzKM5907 LV2aHV0抗体、hzKM5907 LV2bHV0抗体、hzKM5907 LV4HV0抗体、hzKM5907 LV6HV0抗体、hzKM5907 LV0HV7抗体、hzKM5907 LV1aHV7抗体、hzKM5907 LV1bHV7抗体、hzKM5907 LV1cHV7抗体、hzKM5907 LV2aHV7抗体、hzKM5907 LV2bHV7抗体、hzKM5907 LV4HV7抗体、hzKM5907 LV6HV7抗体、hzKM5907 LV2bHV1抗体、hzKM5907 LV2bHV2a抗体、hzKM5907 LV2bHV2b抗体、hzKM5907 LV2bHV3a抗体、hzKM5907 LV2bHV3b抗体、hzKM5907 LV2bHV3c抗体和hzKM5907 LV2bHV4抗体。

[0233] 本发明中,作为上述(5) - (a) ~ (f)中记载的抗体的一个方式,分别可以列举人源化抗人CCR1抗体hzKM5916 LV0HV0抗体、hzKM5916 LV2HV0抗体、hzKM5916 LV0HV1抗体、hzKM5916 LV2HV1抗体、hzKM5916 LV0HV3抗体和hzKM5916 LV2HV3抗体。

[0234] 本发明中,作为人CCR1,可以列举包含序列号2中记载的氨基酸序列或NCBI登记号NP_001286的氨基酸序列的多肽;由在序列号2中记载的氨基酸序列或NCBI登记号NP_001286的氨基酸序列中一个以上的氨基酸发生缺失、置换或添加而得到的氨基酸序列构成且具有人CCR1的功能的多肽;或者由与序列号2中记载的氨基酸序列或NCBI登记号NP_001286的氨基酸序列具有60%以上、优选80%以上、进一步优选90%以上、最优选95%以上

的同源性的氨基酸序列构成且具有人CCR1的功能的多肽等。

[0235] 具有在序列号2中记载的氨基酸序列或NCBI登记号NP_001286所表示的氨基酸序列中一个以上的氨基酸发生缺失、置换或添加而得到的氨基酸序列的多肽可以通过使用定点诱变法[Molecular Cloning, A Laboratory Manual、第二版、冷泉港实验室出版社(1989); Current Protocols in Molecular Biology、约翰威利父子出版社(1987-1997); Nucleic acids Research, 10, 6487(1982); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6409(1982); Gene, 34, 315(1985); Nucleic Acids Research, 13, 4431(1985); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488(1985)]等, 例如在编码包含序列号2的氨基酸序列的多肽的DNA中导入定点突变而得到。

[0236] 缺失、置换或添加的氨基酸的数目没有特别限定, 优选为1个~几十个、例如为1~20个, 更优选为1个~几个、例如为1~5个氨基酸。

[0237] 作为编码人CCR1的基因, 可以列举序列号1中记载的碱基序列和NCBI登记号NM_001295的碱基序列。包含由在序列号1中记载的碱基序列或NM_001295的碱基序列中一种以上的碱基发生缺失、置换或添加而得到的碱基序列构成且编码具有人CCR1的功能的多肽的DNA的基因; 包含由与序列号1中记载的碱基序列或NM_001295的碱基序列具有至少60%以上的同源性的碱基序列、优选具有80%以上的同源性的碱基序列、进一步优选具有95%以上的同源性的碱基序列构成且编码具有人CCR1的功能的多肽的DNA的基因; 或者由在严格条件下与包含序列号1中记载的碱基序列或NM_001295的碱基序列的DNA杂交的DNA构成且编码具有人CCR1的功能的多肽的基因等也包含在本发明的编码人CCR1的基因中。

[0238] 作为在严格条件下杂交的DNA, 是指通过使用包含序列号1中记载的碱基序列或NM_001295的碱基序列的DNA作为探针的菌落杂交法、噬菌斑杂交法、Southern印记杂交法或DNA微阵列法等得到的能够杂交的DNA。

[0239] 具体而言, 可以列举能够通过如下方法进行鉴定的DNA: 使用固定有来源于杂交的菌落或噬菌斑的DNA、或者具有该序列的PCR产物或寡聚DNA的滤膜或载玻片, 在0.7~1.0mol/L的氯化钠存在下在65℃下进行杂交[Molecular Cloning, A Laboratory Manual、第二版、冷泉港实验室出版社(1989); Current Protocols in Molecular Biology、约翰威利父子出版社(1987-1997); DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach (DNA克隆1: 核心技术实用方法)、第二版、牛津大学出版社(1995)]后, 使用0.1~2倍浓度的SSC溶液(1倍浓度的SSC溶液的组成由150mmol/L氯化钠、15mmol/L柠檬酸钠构成), 在65℃条件下对滤膜或载玻片进行清洗。

[0240] 作为能够杂交的DNA, 可以列举与序列号1中记载的碱基序列或NM_001295的碱基序列具有至少60%以上的同源性的DNA、优选具有80%以上的同源性的DNA、进一步优选具有95%以上的同源性的DNA。

[0241] 编码真核生物的蛋白质的基因的碱基序列常常可以确认到基因的多态性。在本发明中使用的基因内由于这种多态性使碱基序列产生小规模突变而得到的基因也包含在本发明的编码人CCR1的基因中。

[0242] 除了特别说明的情况以外, 本发明中的同源性的数值可以是使用本领域技术人员公知的同源性检索程序算出的数值, 对于碱基序列, 可以列举使用BLAST[J. Mol. Biol., 215, 403(1990)]中默认的参数算出的数值等, 对于氨基酸序列, 可以列举使用BLAST2

[Nucleic Acids Res.,25,3389(1997);Genome Res.,7,649(1997);<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Education/BLASTinfo/information3.html>]中默认的参数算出的数值等。

[0243] 作为默认的参数,G(起始空位罚分,Cost to open gap)在碱基序列的情况下为5、在氨基酸序列的情况下为11;-E(空位延伸罚分,Cost to extend gap)在碱基序列的情况下为2、在氨基酸序列的情况下为1;-q(核苷酸错配罚分,Penalty for nucleotide mismatch)为-3;-r(核苷酸匹配得分,reward for nucleotide match)为1;-e(期望值,expect value)为10;-W(字长大小,wordsize)在碱基序列的情况下为11个残基、在氨基酸序列的情况下为3个残基;-y[非空位延伸下降的阈值,Dropoff (X) for blast extensions in bits]在blastn的情况下为20、在blastn以外的程序中为7;-X(空位比对的下降阈值,X dropoff value for gapped alignment in bits)为15;-Z(最终空位比对的下降值,final X dropoff value for gapped alignment in bits)在blastn的情况下为50、在blastn以外的程序中为25(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/html/blastcgihelp.html>)。

[0244] 包含序列号2中记载的氨基酸序列或NCBI登记号NP_001286的氨基酸序列的部分序列的多肽可以通过本领域技术人员公知的方法来制作。具体而言,可以通过使编码序列号2的氨基酸序列的DNA的一部分缺失并对导入有包含上述DNA的表达载体的转化体进行培养来制作。另外,可以利用与上述同样的方法,得到具有在序列号2中记载的氨基酸序列或NCBI登记号NP_001286的氨基酸序列中一个以上的氨基酸发生缺失、置换或添加而得到的氨基酸序列的多肽。此外,由序列号2中记载的氨基酸序列或NCBI登记号NP_001286的氨基酸序列构成的多肽、或者具有在序列号2中记载的氨基酸序列或NCBI登记号NP_001286的氨基酸序列中一个以上的氨基酸发生缺失、置换或添加而得到的氨基酸序列的多肽也可以通过茱甲氧羰基(Fmoc)法、叔丁氧羰基(tBoc)法等化学合成法来制造。

[0245] 作为本发明的抗体,多克隆抗体、单克隆抗体和寡克隆抗体中的任意一种抗体都包含在内。多克隆抗体是指不同克隆的抗体产生细胞所分泌的抗体分子群。单克隆抗体是指单一克隆的抗体产生细胞所分泌的抗体,其识别唯一的表位(也称为抗原决定簇),构成单克隆抗体的氨基酸序列(一级序列)是相同的。寡克隆抗体是指将两种以上不同的单克隆抗体混合而得到的抗体分子群。

[0246] 作为本发明中的单克隆抗体,可以列举由杂交瘤产生的抗体、或者由利用包含抗体基因的表达载体进行了转化的转化体产生的基因重组抗体。

[0247] 表位可以列举单克隆抗体所识别、结合的单一的氨基酸序列、由氨基酸序列构成的立体结构、经翻译后修饰的氨基酸序列、和由经翻译后修饰的氨基酸序列构成的立体结构等。

[0248] 作为经翻译后修饰的氨基酸序列,可以列举糖链键合于具有OH取代基的Tyr和Ser上的O键合型糖链、糖链键合于具有NH₂取代基的Gln和Asn上的N键合型糖链、以及硫酸分子键合于具有OH取代基的Tyr和Ser上的键合有硫酸基等的氨基酸序列。

[0249] 本发明的抗体与人CCR1的胞外区结合可以通过使用ELISA、流式细胞术和表面等离子共振法等测定本发明的抗体对人CCR1表达细胞的结合性来确认。另外,也可以将公知的免疫学检测法[Monoclonal Antibodies-Principles and practice、第三版、学术出版社(1996);Antibodies-A Laboratory Manual、冷泉港实验室(1988);单克隆抗体实验手

册、讲谈社Scientific(1987)]等组合来确认。

[0250] 本发明的抗体所结合的人CCR1的氨基酸残基或表位可以通过使用使人CCR1的一部分结构域缺失而得到的缺陷体、将人CCR1的一部分结构域置换为其他蛋白质来源的结构域而得到的突变体和人CCR1的部分肽片段等进行抗体的结合实验来确定。另外,也可以使用上述缺陷体或突变体的表达细胞来进行抗体的结合实验。

[0251] 或者,本发明的抗体所结合的人CCR1的氨基酸残基或表位也可以通过在利用蛋白水解酶消化后的人CCR1的肽片段中添加本发明的抗体并使用已知的质谱分析法进行表位定位(epitope mapping)来确定。

[0252] 本发明的抗体抑制由人CCL15引起的人CCR1的活化例如可以以人CCR1表达细胞内的CCR1依赖性的信号转导、PLC的活化、细胞内的钙离子浓度上升、NF- κ B活化或人CCR1表达细胞的迁移等中的至少一者作为指标来确认。

[0253] 细胞的迁移可以使用以下所述的趋化性检测来测定。例如,分别在趋化性检测小室的上部添加人CCR1表达细胞,在该小室的下部添加1) 培养基或DPBS等阴性对照、2) 人CCL15和3) 人CCL15和本发明的抗体,培养一定时间后,利用适当的方法测定存在于该小室下部的人CCR1表达细胞数。对于所得到的结果,在添加人CCL15时的细胞数比添加培养基时的细胞数增加的情况下,若添加人CCL15和本发明的抗体时的细胞数比添加人CCL15时的细胞数减少,则可以判定本发明的抗体抑制由人CCL15引起的人CCR1的活化。

[0254] 另外,本发明的抗体抑制由人CCL15引起的人CCR1的活化可以以人CCR1表达细胞内的钙离子浓度的变化作为指标来确认。细胞内的钙离子浓度的变化可以利用公知的方法进行测定,例如可以使用细胞内Ca测定试剂盒(Wako公司制造)等,按照附带的操作规程来测定。

[0255] 作为确认方法,例如按照上述方法测定在人CCR1表达细胞中分别添加1) 培养基或DPBS等阴性对照、2) 人CCL15、3) 人CCL15和本发明的抗体时的细胞内钙离子浓度的变化。在添加人CCL15时的细胞内钙离子浓度比添加培养基时的细胞内钙离子浓度增加的情况下,若添加人CCL15和本发明的抗体时的细胞内钙离子浓度比添加人CCL15时的细胞内钙离子浓度减少,则可以判定本发明的抗体抑制由人CCL15引起的人CCR1的活化。

[0256] 抗体分子也被称为免疫球蛋白(以下记为Ig),人抗体根据分子结构的差异被分类为IgA1、IgA2、IgD、IgE、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4和IgM的同种型。也将氨基酸序列的同源性较高的IgG1、IgG2、IgG3和IgG4统称为IgG。

[0257] 抗体分子由被称为重链(Heavy chain、以下记为H链)和轻链(Light chain、以下记为L链)的多肽构成。另外,H链从N末端侧起由VH、H链恒定区(也记为CH)各区域构成,L链从N末端侧起由VL、L链恒定区(也记为CL)各区域构成。CH按各亚类分别已知分别有 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 链。此外,CH从N末端侧起由CH1结构域、铰链结构域、CH2结构域、CH3结构域各结构域构成。结构域是指构成抗体分子的各多肽的功能性结构单元。另外,将CH2结构域和CH3结构域合并称为Fc段或仅称为Fc。CL已知有C λ 链和C κ 链。

[0258] 本发明中的CH1结构域、铰链结构域、CH2结构域、CH3结构域和Fc段可以根据EU索引[Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest(免疫学关注的蛋白质序列)、美国卫生与公众服务部(1991)]利用自N末端起的氨基酸残基的序号来确定。具体而言,CH1确定为EU索引118~215号的氨基酸序列,铰链确定为EU索引216~230号的氨

氨基酸序列,CH2确定为EU索引231~340号的氨基酸序列,CH3确定为EU索引341~447号的氨基酸序列。

[0259] 作为本发明的抗体,也包括特别是利用基因工程方法制作的重组小鼠抗体、重组大鼠抗体、重组兔抗体、人型嵌合抗体(以下也仅称为嵌合抗体)、人源化抗体(也称为人型互补决定区CDR移植抗体)和人抗体等基因重组抗体。另外,本发明的抗体也包括将来自两种不同的抗体的H链(或VH)和L链(或VL)重组而制作的基因重组抗体(也称为VL置换抗体)。两种不同的抗体可以为来自杂交瘤的单克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体和人抗体中的任意一种。此外,作为本发明的抗体,也包括在制作上述基因重组抗体时施加了适当的氨基酸残基置换而得到的基因重组抗体。

[0260] 嵌合抗体是指人以外的动物(非人动物)的抗体的VH和VL与人抗体的CH和CL构成的抗体。作为非人动物,只要能够制作杂交瘤,可以使用小鼠、大鼠、仓鼠、兔等任何动物。

[0261] 杂交瘤是指使将抗原免疫于非人动物而获得的B细胞与来源于小鼠等的骨髓瘤细胞进行细胞融合而得到的、产生具有所期望的抗原特异性的单克隆抗体的细胞。因此,构成杂交瘤所产生的抗体的可变区由非人动物抗体的氨基酸序列构成。

[0262] 人型嵌合抗体可以通过下述方法来制造:由生产单克隆抗体的非人动物细胞来源的杂交瘤获得编码该单克隆抗体的VH和VL的cDNA,分别插入至具有编码人抗体的CH和CL的DNA的动物细胞用表达载体中,构建人型嵌合抗体表达载体,导入至动物细胞中使其进行表达。

[0263] 本发明中的嵌合抗体改造体是指,将某一嵌合抗体的VL置换为另一嵌合抗体的VL而得到的抗体(也称为VL置换嵌合抗体)、和/或将该抗体的VL或VH中的一个或多个氨基酸残基置换为其他氨基酸残基而得到的抗体。

[0264] 嵌合抗体改造体可以通过下述方法来制造:由生产某一单克隆抗体的非人动物细胞来源的杂交瘤获得编码该单克隆抗体的VH的cDNA,由生产另一单克隆抗体的非人动物细胞来源的杂交瘤获得编码该单克隆抗体的VL的cDNA,分别插入至具有编码人抗体的CH和CL的DNA的动物细胞用表达载体中,构建将不同的杂交瘤克隆来源的VH和VL组合而成的人型嵌合抗体表达载体,导入至动物细胞中使其进行表达。另外,对于嵌合抗体或VL置换嵌合抗体的VH或VL的氨基酸,可以制作将一个或多个氨基酸残基置换为与由杂交瘤得到的抗体的氨基酸残基不同的氨基酸残基的DNA,插入至该表达载体中。使用该载体同样地进行表达,所能制造的抗体也称为嵌合抗体改造体。

[0265] 人源化抗体是指将非人动物抗体的VH和VL的CDR的氨基酸序列移植至人抗体的VH和VL所对应的CDR处而得到的抗体。VH和VL的CDR以外的区域称为框架区(以下记为FR)。

[0266] 人源化抗体可以通过下述方法来制造:构建编码由非人动物抗体的VH的CDR的氨基酸序列和任意的人抗体的VH的FR的氨基酸序列构成的VH的氨基酸序列的cDNA、以及编码由非人动物抗体的VL的CDR的氨基酸序列和任意的人抗体的VL的FR的氨基酸序列构成的VL的氨基酸序列的cDNA,分别插入至具有编码人抗体的CH和CL的DNA的动物细胞用表达载体中,构建人源化抗体表达载体,导入至动物细胞中使其进行表达。

[0267] 人抗体原本是指天然存在于人体内的抗体,但也包含由基于最近的基因工程的、细胞工程的、发育工程的技术进步而制作的人抗体噬菌体文库和人抗体产生转基因动物得到的抗体等。

[0268] 人抗体可以通过将所期望的抗原免疫于保有人免疫球蛋白基因的小鼠 (Tomizuka K.et.al., Proc Natl Acad Sci U S A.97,722-7,2000) 而获得。另外,通过使用由人来源的B细胞对抗体基因进行扩增而得到的噬菌体展示文库来选择具有所期望的结合活性的人抗体,可以在不进行免疫的情况下获得人抗体 (Winter G.et.al., Annu Rev Immunol.12: 433-55.1994)。此外,可以通过使用EB病毒使人B细胞永生而制作出生产具有所期望的结合活性的人抗体的细胞,获得人抗体 (Rosen A.et.al., Nature 267,52-54.1977)。

[0269] 存在于人体内的抗体例如可以如下获得:通过使EB病毒等感染由人外周血分离的淋巴细胞而使其永生后,进行克隆,由此能够得到产生该抗体的淋巴细胞,对该淋巴细胞进行培养,从所得到的培养物中纯化出该抗体。

[0270] 人抗体噬菌体文库是通过将由人B细胞制备的抗体基因插入至噬菌体基因中而使 Fab、scFv 等抗体片段表达在表面的噬菌体的文库。可以以对固定有抗原的底物的结合活性作为指标,从该文库中回收表达具有所期望的抗原结合活性的抗体片段的噬菌体。该抗体片段还可以进一步利用基因工程方法转换成由两条完整的H链和两条完整的L链构成的人抗体分子。

[0271] 人抗体产生转基因动物是指人抗体基因整合至宿主动物的染色体内的动物。具体而言,可以通过向小鼠ES细胞中导入人抗体基因、将该ES细胞移植至其他小鼠的早期胚胎中后使其发育来制作人抗体产生转基因动物。利用人抗体产生转基因动物的人抗体的制作可以通过下述方法进行:利用通常在人以外的哺乳动物中进行的杂交瘤制作方法获得人抗体产生杂交瘤并进行培养,由此使人抗体在培养物中产生并蓄积。

[0272] 作为本发明的抗体的VH和VL的氨基酸序列,可以为抗体的VH和VL的氨基酸序列、非人动物抗体的VH和VL的氨基酸序列、或者将非人动物抗体的CDR移植至任意的人抗体的框架中而得到的人源化抗体的VH和VL的氨基酸序列中的任意一者。

[0273] 作为本发明的抗体中的CL的氨基酸序列,可以为抗体的氨基酸序列或非人动物抗体的氨基酸序列中的任意一者,优选为抗体的氨基酸序列的C_κ或C_λ。

[0274] 作为本发明的抗体的CH,只要属于免疫球蛋白,则可以为任何的CH,优选使用属于IgG类的亚类、γ 1 (IgG1)、γ 2 (IgG2)、γ 3 (IgG3) 和 γ 4 (IgG4) 中的任意一种。

[0275] 作为本发明的抗体,Fc与抗体片段结合而成的Fc融合蛋白质、Fc与天然存在的配体或受体结合而成的Fc融合蛋白质(也称为免疫粘附素)、使多个Fc段融合而成的Fc融合蛋白质等也包含在本发明中。另外,为了使抗体稳定化和为了控制血中半衰期而对氨基酸残基进行了改造的Fc段等也可以用于本发明的抗体。

[0276] 本发明的抗体或该抗体片段也包含含有经翻译后修饰的任何氨基酸的抗体。作为翻译后修饰,可以列举例如H链的C末端的赖氨酸残基的缺失[赖氨酸剪切(lysine clipping)]、或多肽的N末端的谷氨酰胺残基向焦谷氨酰胺(puroGlu)的转换等[Beck et al, Analytical Chemistry, 85, 715-736 (2013)]。

[0277] 本发明中,抗体片段是指与人CCR1的胞外区结合而抑制由人CCL15引起的人CCR1的活化的具有抗原结合活性的抗体片段。作为本发明中的抗体片段,可以列举Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、双链抗体、dsFv或包含多个CDR的肽等。Fab是将IgG抗体用蛋白水解酶木瓜蛋白酶进行处理而得到的片段中(在H链的第224位的氨基酸残基处被切断)H链的N末端侧约一半与L链整体以二硫键(S-S键)结合而成的、分子量约5万的具有抗原结合活性的抗体片

段。

[0278] $F(ab')_2$ 是将IgG用蛋白水解酶胃蛋白酶进行处理而得到的片段中(在H链的第234位的氨基酸残基处被切断)比Fab借助较链区的S-S键结合而成的片段稍大的、分子量约10万的具有抗原结合活性的抗体片段。Fab'是将上述 $F(ab')_2$ 的较链区的S-S键切断而得到的、分子量约5万的具有抗原结合活性的抗体片段。

[0279] scFv是使用由4个Gly和1个Ser残基构成的连接子(G4S)以任意个数连接而成的连接肽等适当的肽连接子(P)将一条VH与一条VL连接而得到的VH-P-VL或VL-P-VH多肽,是具有抗原结合活性的抗体片段。

[0280] 双链抗体是抗原结合特异性相同或不同的scFv形成二聚体而得到的抗体片段,是具有针对相同抗原的二价的抗原结合活性或者针对不同抗原的特异性抗原结合活性的抗体片段。

[0281] dsFv是指将VH和VL中的各一个氨基酸残基置换为半胱氨酸残基、使所得的多肽借助该半胱氨酸残基间的S-S键进行结合而成的片段。

[0282] 包含CDR的肽含有VH或VL的CDR中的至少一个区域以上而构成。包含多个CDR的肽可以使CDR彼此直接或借助适当的肽连接子进行结合。包含CDR的肽可以通过下述方法来制造:构建编码本发明的改造抗体的VH和VL的CDR的DNA,将该DNA插入至原核生物用表达载体或真核生物用表达载体中,将该表达载体导入至原核生物或真核生物中使其进行表达。另外,包含CDR的肽也可以利用Fmoc法(苄氧羰基法)或tBoc法(叔丁氧羰基法)等化学合成法来制造。

[0283] 本发明的单克隆抗体包含在本发明的与人CCR1结合的单克隆抗体或其抗体片段上通过化学方法或基因工程方法结合放射性同位素、低分子药剂、高分子药剂、蛋白质或抗体药物等而得到的抗体的衍生物。

[0284] 抗体的衍生物可以通过利用化学方法[抗体工程入门、地人书馆(1994)]在本发明的与人CCR1结合的单克隆抗体或其抗体片段的H链或L链的N末端侧、C末端侧、抗体分子中的适当的取代基或侧链或者糖链等上结合放射性同位素、低分子药剂、高分子药剂、免疫激活剂、蛋白质、抗体药物或核酸药物等而制造。

[0285] 另外,抗体的衍生物可以通过下述基因工程方法来制造:将编码本发明的与人CCR1结合的单克隆抗体或其抗体片段的DNA与编码想要结合的蛋白质或抗体药物的DNA连接并插入至表达载体中,将该表达载体导入至适当的宿主细胞中使其进行表达。

[0286] 作为放射性同位素,可以列举例如 ^{111}In 、 ^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{90}Y 、 ^{64}Cu 、 ^{99}Tc 、 ^{77}Lu 或 ^{211}At 等。可以利用氯胺T法等使放射性同位素直接结合于抗体上。另外,也可以在抗体上结合对放射性同位素进行螯合的物质。作为螯合剂,可以列举例如1-异硫氰酸苄酯基-3-甲基二亚乙基三胺五乙酸(MX-DTPA)等。

[0287] 作为低分子药剂,可以列举例如烷化剂、亚硝基脲剂、代谢拮抗剂、抗生素、植物生物碱、拓扑异构酶抑制剂、激素疗法剂、激素拮抗剂、芳香化酶抑制剂、P糖蛋白抑制剂、铂络合物衍生物、M期抑制剂或激酶抑制剂等抗癌剂[临床肿瘤学、癌症与化学疗法出版社(1996)]、氢化可的松或泼尼松龙等甾体剂、阿司匹林或吲哚美辛等非甾体剂、硫代苹果酸金或青霉胺等免疫调节剂、环磷酰胺或硫唑嘌呤等免疫抑制剂、或者马来酸氯苯那敏或氯马斯汀之类的抗组胺剂等抗炎剂[炎症与抗炎疗法、医齿药出版株式会社(1982)]等。

[0288] 作为抗癌剂,可以列举例如阿米福汀(氨磷汀)、顺铂、达卡巴嗪(DTIC)、更生霉素、二氯甲基二乙胺(氮芥)、链脲霉素、环磷酰胺、异环磷酰胺、卡莫司汀(BCNU)、洛莫司汀(CCNU)、多柔比星(阿霉素)、表柔比星、吉西他滨(健择)、柔红霉素、丙卡巴肼、丝裂霉素、阿糖胞苷、依托泊苷、氨甲蝶呤、5-氟尿嘧啶、氟尿嘧啶、长春碱、长春新碱、博来霉素、道诺霉素、培洛霉素、雌莫司汀、紫杉醇(泰素)、多西紫杉醇(多西他奇)、阿地白介素、天冬酰胺酶、白消安、卡铂、奥沙利铂、奈达铂、克拉屈滨、喜树碱、10-羟基-7-乙基喜树碱(SN38)、氟尿苷、氟达拉滨、羟基脲、伊达比星、美司那、依立替康(CPT-11)、拓扑替康、米托蒽醌、托泊替康、亮丙瑞林、甲地孕酮、美法仑、巯基嘌呤、羟基脲、普卡霉素、密妥坦、培门冬酶、喷司他丁、哌泊溴烷、他莫昔芬、戈舍瑞林、亮丙瑞林、氟他胺、替尼泊苷、睾内酯、硫鸟嘌呤、塞替派、乌拉莫司汀、长春瑞滨、苯丁酸氮芥、氢化可的松、泼尼松龙、甲基泼尼松龙、长春地辛、尼莫司汀、司莫司汀、卡培他滨、雷替曲塞、氮胞苷、UFT、奥沙利铂、吉非替尼(易瑞沙)、伊马替尼(STI571)、厄洛替尼、FMS样酪氨酸激酶3(FMS-like tyrosine kinase 3;Flt3)抑制剂、血管内皮生长因子受体(vascular endothelial growth factor receptor;VEGFR)抑制剂、成纤维细胞生长因子受体(fibroblast growth factor receptor;FGFR)抑制剂、艾瑞莎或特罗凯等表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor;EGFR)抑制剂、根赤壳菌素、17-烯丙基氨基-17-去甲氧基格尔德霉素、雷帕霉素、安吡啶、全反式维甲酸、沙利度胺、来那度胺、阿那曲唑、法曲唑、来曲唑、依西美坦、硫代苹果酸金、D-青霉胺、布西拉明、硫唑嘌呤、咪唑立宾、环孢素、雷帕霉素、氢化可的松、蓓萨罗丁(塔革雷汀)、他莫昔芬、地塞米松、孕激素类、雌激素类、阿那曲唑(瑞宁德)、利普安、阿司匹林、吡喹酮、塞来昔布、青霉胺、硫代苹果酸金、马来酸氯苯那敏、氯苯那敏、氯马斯汀、维甲酸、蓓萨罗丁、砷、硼替佐米、别嘌醇、卡奇霉素、替伊莫单抗、塔革雷汀、奥唑米星、克拉霉素、瘤可维、酮康唑、氨鲁米特、苏拉明或类美登醇或者其衍生物等。

[0289] 作为使低分子药剂与抗体结合的方法,可以列举例如借助戊二醛使药剂与抗体的氨基间结合的方法、或者借助水溶性碳二亚胺使药剂的氨基与抗体的羧基结合的方法等。

[0290] 作为高分子药剂,可以列举例如聚乙二醇(以下记为PEG)、白蛋白、葡聚糖、聚环氧乙烷、苯乙烯马来酸共聚物、聚乙烯基吡咯烷酮、吡喃共聚物或羟丙基甲基丙烯酰胺等。通过使这些高分子化合物与抗体或该抗体片段结合,可期待下述等效果:(1)对化学性、物理性或生物性的各种因子的稳定性提高、(2)血中半衰期显著延长、或者(3)免疫原性消失或抑制抗体产生[生物偶联药品、广川书店(1993)]。

[0291] 例如,作为使PEG与抗体结合的方法,可以列举与PEG化修饰试剂反应的方法等[生物偶联药品、广川书店(1993)]。作为PEG化修饰试剂,可以列举对赖氨酸的 ϵ -氨基的修饰剂(日本特开昭61-178926号公报)、对天冬氨酸和谷氨酸的羧基的修饰剂(日本特开昭56-23587号公报)、或者对精氨酸的胍基的修饰剂(日本特开平2-117920号公报)等。

[0292] 作为免疫激活剂,可以是作为免疫佐剂而已知的天然物质,作为具体例,促进免疫的药剂可以列举 β (1 \rightarrow 3)葡聚糖(例如香菇多糖或西佐糖)或 α -半乳糖神经酰胺(KRN7000)等。

[0293] 作为蛋白质,可以列举例如使NK细胞、巨噬细胞或中性粒细胞等免疫活性细胞活化的细胞因子或增殖因子或者毒素蛋白质等。

[0294] 作为细胞因子或增殖因子,可以列举例如干扰素(以下记为IFN)- α 、IFN- β 、IFN-

γ 、白细胞介素(以下记为IL)-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21、IL-23、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、粒细胞/巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)或巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)等。作为毒素蛋白质,可以列举例如蓖麻毒素、白喉毒素或ONTAK等,也包括为了调节毒性而向蛋白质中导入了突变的蛋白质毒素。

[0295] 作为抗体药物,可以列举例如通过与抗体的结合而诱导凋亡的抗原、与肿瘤的病态形成相关的抗原、针对调节免疫功能的抗原或与病变部位的血管新生相关的抗原的抗体。

[0296] 作为通过与抗体的结合而诱导凋亡的抗原,可以列举例如分化群(cluster of differentiation;以下记为CD) 19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD37、CD53、CD72、CD73、CD74、CDw75、CDw76、CD77、CDw78、CD79a、CD79b、CD80 (B7.1)、CD81、CD82、CD83、CDw84、CD85、CD86 (B7.2)、人白细胞抗原(HLA) II类或表皮生长因子受体(Epidermal Growth Factor Receptor;EGFR)等。

[0297] 作为与肿瘤的病态形成相关的抗原或调节免疫功能的抗体的抗原,可以列举例如CD4、CD40、CD40配体、B7家族分子(例如CD80、CD86、CD274、B7-DC、B7-H2、B7-H3或B7-H4)、B7家族分子的配体(例如CD28、CTLA-4、ICOS、PD-1或BTLA)、OX-40、OX-40配体、CD137、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor;TNF)受体家族分子(例如DR4、DR5、TNFR1或TNFR2)、肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体受体(TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor;TRAIL)家族分子、TRAIL家族分子的受体家族(例如TRAIL-R1、TRAIL-R2、TRAIL-R3或TRAIL-R4)、核因子 κ -B配体受体激活剂(receptor activator of nuclear factor kappa B ligand;RANK)、RANK配体、CD25、叶酸受体、细胞因子[例如IL-1 α 、IL-1 β 、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-13、转化生长因子(transforming growth factor;TGF) β 或TNF α 等]或这些细胞因子的受体、或者趋化因子(例如SLC、ELC、I-309、TARC、MDC或CTACK等)或这些趋化因子的受体。

[0298] 作为抑制病变部位的血管新生的抗体的抗原,可以列举例如血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor;VEGF)、血管生成素、成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor;FGF)、EGF、肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor;HGF)、血小板源性生长因子(platelet-derived growth factor;PDGF)、胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor;IGF)、促红细胞生成素(EPO)、TGF β 、IL-8、肝配蛋白(heparin)或SDF-1或者它们的受体等。

[0299] 与蛋白质或抗体药物的融合抗体可以通过下述方法来制造融合抗体:在编码单克隆抗体或抗体片段的cDNA上连接编码蛋白质或抗体药物中包含的抗体的cDNA,构建编码融合抗体的DNA,将该DNA插入至原核生物或真核生物用表达载体中,将该表达载体导入至原核生物或真核生物中,使其进行表达。

[0300] 作为核酸药物,可以列举例如包含通过控制基因的功能而作用于生物体的小干扰核糖核酸(small interference ribonucleic acid;siRNA)或小分子核糖核酸(microRNA)等核酸的药品。例如可以考虑与抑制Th17细胞的主要转录因子ROR γ t的核酸药物的偶联。

[0301] 在将本发明的抗体的衍生物用于人CCR1的检测和测定以及人CCR1相关疾病的诊断的情况下,作为与该抗体结合的药剂,可以列举通常的免疫学检测或测定法中使用的标记物。作为标记物,可以列举例如碱性磷酸酶、过氧化物酶或荧光素酶等酶、吖啶酯或洛酚

碱等发光物质、或者异硫氰酸荧光素 (FITC) 或四甲基罗丹明异硫氰酸酯 (RITC) 等荧光物质等。

[0302] 另外,本发明包含含有与人CCR1结合的单克隆抗体或该抗体片段作为有效成分的组合物。

[0303] 另外,本发明涉及一种人CCR1相关疾病的治疗剂,其含有与人CCR1结合的单克隆抗体或该抗体片段作为有效成分。另外,本发明涉及一种人CCR1相关疾病的治疗方法,其包括给药与人CCR1结合的单克隆抗体或该抗体片段。

[0304] 作为人CCR1相关疾病,只要是与人CCR1或人CCR1的配体相关的疾病,则可以为任何疾病,可以列举例如癌症、自身免疫疾病和炎症疾病。作为癌疾病,可以列举例如弥漫性大B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、B细胞淋巴瘤、T细胞淋巴瘤、浆细胞骨髓瘤、急性髓细胞白血病、霍奇金淋巴瘤、慢性淋巴性白血病、有毛细胞白血病、套细胞淋巴瘤、淋巴结边缘区淋巴瘤、小淋巴细胞淋巴瘤、多发性骨髓瘤、肝细胞癌、结直肠癌、非小细胞肺癌、口腔鳞状细胞癌、卵巢癌、前列腺癌、乳腺癌、神经胶质瘤或骨肉瘤等。作为自身免疫疾病或炎症疾病,可以列举例如类风湿关节炎、多发性硬化症、慢性阻塞性肺病、系统性红斑狼疮、狼疮性肾炎、哮喘、特应性皮炎、炎症肠病、克罗恩病或白塞氏病等。

[0305] 含有本发明的抗体或该抗体片段的治疗剂可以仅包含作为有效成分的该抗体或该抗体片段,但通常优选以与药理学上可接受的一种以上的载体一起混合、利用制剂学技术领域中公知的任意方法制造而成的药物制剂的形式提供。

[0306] 给药途径优选使用治疗时最有效的途径,可以列举例如经口给药或口腔内、呼吸道内、直肠内、皮下、肌肉内或静脉内等非经口给药,优选列举静脉内给药。作为给药形态,可以列举例如喷雾剂、胶囊剂、片剂、散剂、颗粒剂、糖浆剂、乳剂、栓剂、注射剂、软膏或贴片剂等。

[0307] 给药量或给药次数根据目标治疗效果、给药方法、治疗期间、年龄和体重等而有所不同,通常成人每一天为 $10\mu\text{g}/\text{kg}\sim 10\text{mg}/\text{kg}$ 。

[0308] 本发明涉及含有与人CCR1结合的单克隆抗体或该抗体片段的CCR1的检测或测定用试剂、或者使用与人CCR1结合的单克隆抗体或该抗体片段的CCR1的检测或测定方法。作为本发明中检测或测定人CCR1的方法,可以列举任意的公知的方法。可以列举例如免疫学检测或测定方法等。

[0309] 免疫学检测或测定方法是指使用实施了标记的抗原或抗体对抗体量或抗原量进行检测或测定的方法。作为免疫学检测或测定方法,可以列举例如放射性物质标记免疫抗体法 (RIA)、酶免疫测定法 (EIA或ELISA)、荧光免疫测定法 (FIA)、发光免疫测定法 (luminescent immunoassay)、蛋白免疫印迹法或物理化学方法等。

[0310] 本发明涉及一种CCR1相关疾病的诊断剂,其包含与人CCR1结合的单克隆抗体或该抗体片段;或者一种CCR1相关疾病的诊断方法,其包括使用与人CCR1结合的单克隆抗体或该抗体片段,进行CCR1的检测或测定。通过使用本发明的单克隆抗体或该抗体片段,按照上述方法对表达人CCR1的细胞进行检测或测定,能够诊断人CCR1相关疾病。

[0311] 本发明中,作为进行人CCR1的检测或测定的对象的生物体试样,只要是例如组织、细胞、血液、血浆、血清、胰液、尿、粪便、组织液或培养液等可能包含人CCR1或表达人CCR1的细胞的试样,则没有特别限定。

[0312] 含有本发明的单克隆抗体或该抗体片段的诊断剂可以根据目标诊断法含有用于进行抗原抗体反应的试剂、该反应的检测用试剂。作为用于进行抗原抗体反应的试剂,可以列举缓冲剂、盐等。作为检测用试剂,可以列举识别该单克隆抗体或该抗体片段的进行了标记的二次抗体、或者与标记对应的底物等在通常的免疫学检测或测定法中使用的试剂。

[0313] 另外,本发明涉及抗人CCR1单克隆抗体或该抗体片段在制造CCR1相关疾病的治疗剂或诊断剂中的应用。

[0314] 以下,具体地对本发明的抗体的制造方法、疾病的治疗方法和疾病的诊断方法进行说明。

[0315] 1. 抗体的制造方法

[0316] (1) 抗原的制备

[0317] 作为抗原的人CCR1或人CCR1表达细胞可以通过将包含编码全长或部分长度的人CCR1的cDNA的表达载体导入至大肠杆菌、酵母、昆虫细胞或动物细胞等中而得到。另外,人CCR1也可以通过从大量表达人CCR1的各种人细胞株、人细胞和人组织等中纯化人CCR1而得到。另外,也可以直接使用这些人细胞株、人细胞和人组织等作为抗原。此外,也可以利用Fmoc法或tBoc法等化学合成法制备具有人CCR1的部分序列的合成肽,将其用作抗原。在人CCR1或具有人CCR1的部分序列的合成肽上,可以在C末端或N末端附加有FLAG或His等公知的标签。

[0318] 本发明中使用的人CCR1可以通过使用Molecular Cloning, A Laboratory Manual、第二版、冷泉港实验室出版社(1989)或Current Protocols In Molecular Biology、约翰威利父子出版社(1987-1997)等中记载的方法等,利用例如下述方法使编码该人CCR1的DNA在宿主细胞中进行表达来制造。

[0319] 首先,将包含编码人CCR1的部分的全长cDNA插入至适当的表达载体的启动子的下游,由此制作重组载体。代替上述全长cDNA,也可以使用基于全长cDNA而制备的、包含编码多肽的部分的适当长度的DNA片段。接着,将所得到的该重组载体导入至适合于该表达载体的宿主细胞中,由此能够得到生产多肽的转化体。

[0320] 作为表达载体,只要是能够在所使用的宿主细胞中自主复制或能够整合到染色体中、并且在能够对编码多肽的DNA进行转录的位置含有适当的启动子的表达载体,均可以使用。作为宿主细胞,只要是大肠杆菌等属于埃希氏菌属等的微生物、酵母、昆虫细胞或动物细胞等能够表达目的基因的宿主细胞,均可以使用。

[0321] 在使用大肠杆菌等原核生物作为宿主细胞的情况下,表达载体优选为能够在原核生物中自主复制、并且包含启动子、核糖体结合序列、包含编码人CCR1的部分的DNA和转录终止序列的载体。另外,该表达载体中未必需要具有转录终止序列,但优选紧挨在结构基因下配置转录终止序列。此外,该重组载体可以含有控制启动子的基因。

[0322] 作为该重组载体,优选使用将作为核糖体结合序列的夏因-达尔加诺序列(也称为SD序列)与起始密码子之间调节为适当的距离(例如6~18个碱基)的质粒。

[0323] 另外,作为编码该人CCR1的DNA的碱基序列,可以对碱基进行置换以形成最适于在宿主内表达的密码子,由此能够提高作为目标的人CCR1的生产率。

[0324] 作为表达载体,只要能够在所使用的宿主细胞中发挥功能,均可以使用,可以列举例如pBTrp2、pBTac1、pBTac2(以上为罗氏诊断公司制造)、pKK233-2(法玛西亚公司制造)、

pSE280 (Invitrogen公司制造)、pGEMEX-1 (普洛麦格公司制造)、pQE-8 (Qiagen公司制造)、pKYP10 (日本特开昭58-110600号公报)、pKYP200 [Agricultural Biological Chemistry, 48, 669 (1984)]、pLSA1 [Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989)]、pGEL1 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4306 (1985)]、pBluescript II SK(-) (Stratagene公司制造)、pTrs30 [由大肠杆菌JM109/pTrs30 (FERM BP-5407) 制备]、pTrs32 [由大肠杆菌JM109/pTrs32 (FERM BP-5408) 制备]、pGHA2 [由大肠杆菌IGHA2 (FERM BP-400) 制备、日本特开昭60-221091号公报]、pGKA2 [由大肠杆菌IGKA2 (FERM BP-6798) 制备、日本特开昭60-221091号公报]、pTerm2 (美国专利第4686191号说明书、美国专利第4939094号说明书、美国专利第160735号说明书)、pSupex、pUB110、pTP5、pC194、pEG400 [J. Bacteriol., 172, 2392 (1990)]、pGEX (法玛西亚公司制造)、pET系统 (Novagen公司制造) 或pME18SFL3等。

[0325] 作为启动子,只要能够在所使用的宿主细胞中发挥功能,可以为任何启动子。可以列举例如trp启动子(Ptrp)、lac启动子、PL启动子、PR启动子或T7启动子等来源于大肠杆菌或噬菌体等的启动子。另外,还可以列举例如将两个Ptrp串联而成的串联启动子、tac启动子、lacT7启动子或let I启动子等进行了人工设计改造的启动子等。

[0326] 作为宿主细胞,可以列举例如大肠杆菌XL1-Blue、大肠杆菌XL2-Blue、大肠杆菌DH1、大肠杆菌MC1000、大肠杆菌KY3276、大肠杆菌W1485、大肠杆菌JM109、大肠杆菌HB101、大肠杆菌No. 49、大肠杆菌W3110、大肠杆菌NY49或大肠杆菌DH5 α 等。

[0327] 作为将重组载体导入至宿主细胞中的方法,只要是将DNA导入至所使用的宿主细胞中的方法,可以使用任何方法,可以列举例如使用钙离子的方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972); Gene, 17, 107 (1982); Molecular & General Genetics, 168, 111 (1979)]。

[0328] 在使用动物细胞作为宿主的情况下,作为表达载体,只要是能够在动物细胞中发挥功能的表达载体,均可以使用,可以列举例如pcDNA1、pCDM8 (Funakoshi公司制造)、pAGE107 [日本特开平3-22979号公报; Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、pAS3-3 (日本特开平2-227075号公报)、pCDM8 [Nature, 329, 840 (1987)]、pcDNA1/Amp (Invitrogen公司制造)、pcDNA3.1 (Invitrogen公司制造)、pREP4 (Invitrogen公司制造)、pAGE103 [J. Biochemistry, 101, 1307 (1987)]、pAGE210、pME18SFL3、pKANTEX93 (国际公开第97/10354号)、N5KG1val (美国专利第6001358号说明书)、INPEP4 (Biogen-IDEC公司制造) 和转座子载体 (国际公开第2010/143698号) 等。

[0329] 作为启动子,只要是能够在动物细胞中发挥功能的启动子均可以使用,可以列举例如巨细胞病毒 (CMV) 的即刻早期 (IE) 基因的启动子、SV40的早期启动子、逆转录病毒的启动子、金属硫蛋白启动子、热休克启动子、SR α 启动子或莫洛尼小鼠白血病病毒的启动子或增强子。另外,也可以将人CMV的IE基因的增强子与启动子一起使用。

[0330] 作为宿主细胞,可以列举例如人白血病细胞那马瓦 (Namalwa) 细胞、猴细胞COS细胞、中国仓鼠卵巢细胞CHO细胞 [Journal of Experimental Medicine, 108, 945 (1958); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 60, 1275 (1968);

Genetics, 55, 513 (1968); Chromosoma, 41, 129 (1973); Methods in Cell Science, 18, 115 (1996); Radiation Research, 148, 260 (1997); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216 (1980); Proc. Natl. Acad. Sci., 60, 1275 (1968);

[0332] Cell, 6, 121 (1975); Molecular Cell Genetics, Appendix I, II (pp. 883-900)、二氢叶酸还原酶基因(以下记为 dhfr) 缺陷的 CHO 细胞(CHO/DG44 细胞)[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216 (1980)]、CHO-K1 (ATCC CCL-61)、DUKXB11 (ATCC CCL-9096)、Pro-5 (ATCC CCL-1781)、CHO-S (Life Technologies, Cat#11619)、Pro-3、大鼠骨髓瘤细胞 YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 (或者也称为 YB2/0)、小鼠骨髓瘤细胞 NS0、小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0-Ag14、叙利亚仓鼠细胞 BHK 或 HBT5637 (日本特开昭63-000299号公报) 等。

[0333] 作为将重组载体导入至宿主细胞中的方法, 只要是将 DNA 导入至动物细胞中的方法均可以使用, 可以列举例如电穿孔法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、磷酸钙法 (日本特开平2-227075号公报) 或脂质体转染法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)]、等。

[0334] 将如上得到的来源于包含整合有编码人 CCR1 的 DNA 的重组载体的微生物或动物细胞等的转化体在培养基中进行培养, 使该人 CCR1 在培养液中生成并蓄积, 从该培养液中采集, 由此能够制造人 CCR1。将该转化体在培养基中进行培养的方法可以按照宿主培养中使用的通常的方法来进行。

[0335] 在来源于真核生物的细胞中进行表达的情况下, 能够得到附加有糖或糖链的人 CCR1。

[0336] 在对利用使用了诱导性启动子的重组载体进行了转化的微生物进行培养时, 可以根据需要向培养基中添加诱导剂。例如, 在对利用使用了 lac 启动子的重组载体进行了转化的微生物进行培养的情况下, 可以在培养基中添加异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷等, 在对利用使用了 trp 启动子的重组载体进行了转化的微生物进行培养的情况下, 可以在培养基中添加吡啶丙烯酸等。

[0337] 作为对以动物细胞为宿主而得到的转化体进行培养的培养基, 可以列举例如通常使用的 RPMI1640 培养基 [The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)]、伊格尔 (Eagle) 的 MEM 培养基 [Science, 122, 501 (1952)]、杜氏改良 MEM 培养基 [Virology, 8, 396 (1959)]、199 培养基 [Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 73, 1 (1950)] 或伊斯科夫 (Iscove) 改良的杜氏培养基 (IMDM) 或者在这些培养基中添加胎牛血清 (FBS) 等而得到的培养基等。培养通常在 pH6~8、30~40°C、5% CO₂ 存在下等条件下进行 1~7 天。另外, 培养中可以根据需要向培养基中添加卡那霉素、青霉素等抗生素。

[0338] 作为编码人 CCR1 的基因的表达方法, 例如除了直接表达以外, 还可以列举分泌生产或融合蛋白质表达等方法 [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 第二版, 冷泉港实验室出版社 (1989)]。

[0339] 作为人 CCR1 的生产方法, 可以列举例如在宿主细胞内进行生产的方法、分泌至宿主细胞外的方法、或者在宿主细胞外膜上进行生产的方法, 可以通过改变所使用的宿主细胞或所生产的人 CCR1 的结构来选择适当的方法。

[0340] 在人 CCR1 在宿主细胞内或宿主细胞外膜上进行生产的情况下, 通过使用鲍尔森等人的方法 [J. Biol. Chem., 264, 17619 (1989)]、罗等人的方法 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86, 8227 (1989); Genes Develop., 4, 1288 (1990)]、日本特开平05-336963号公报或国际公开第94/23021号等中记载的方法, 能够使人 CCR1 主动地分泌至宿主细胞外。另外, 也可以利用使用了二氢叶酸还原酶基因等的基因扩增系统 (日本特开平2-227075号公报) 来提高人 CCR1 的生产量。

[0341] 所得到的人CCR1例如可以如下进行分离、纯化。在人CCR1在细胞内以溶解状态表达的情况下,在培养结束后通过离心分离回收细胞,悬浮于水系缓冲液中后,利用超声波破碎机、弗氏压碎器、MANTON-GAULIN匀浆器或戴诺磨机(Dyno mill)等将细胞破碎,得到无细胞提取液。从将该无细胞提取液离心分离而得到的上清中,利用通常的蛋白质分离纯化法,即,单独使用或组合使用溶剂提取法、利用硫酸铵等的盐析法、脱盐法、利用有机溶剂的沉淀法、使用二乙氨基乙基(DEAE)-琼脂糖、DIAION HPA-75(三菱化学公司制造)等树脂的阴离子交换色谱法、使用S-琼脂糖FF(法玛西亚公司制造)等树脂的阳离子交换色谱法、使用丁基琼脂糖、苯基琼脂糖等树脂的疏水性色谱法、使用分子筛的凝胶过滤法、亲和色谱法、色谱聚焦法或等电电泳等电泳法等方法,能够得到纯化制备品。

[0342] 在人CCR1在细胞内形成不溶体而进行表达的情况下,与上述同样地回收细胞后将其破碎,进行离心分离,由此作为沉淀级分回收该人CCR1的不溶体。将回收的该人CCR1的不溶体用蛋白变性剂进行可溶化。对该可溶化液进行稀释或透析,由此使该人CCR1恢复至正常的立体结构后,利用与上述同样的分离纯化法能够得到多肽的纯化制备品。

[0343] 在人CCR1或其糖修饰体等衍生物被分泌至细胞外的情况下,可以在培养上清中回收该人CCR1或其糖修饰体等衍生物。与上述同样地使用离心分离等方法对该培养物进行处理,由此获取可溶性级分,使用与上述同样的分离纯化法,能够从该可溶性级分中得到纯化制备品。

[0344] 另外,本发明中使用的人CCR1也可以利用Fmoc法或tBoc法等化学合成法来制造。另外,也可以利用Advanced ChemTech公司制造、泊金埃尔默公司制造、法玛西亚公司制造、Protein Technology Instrument公司制造、Synthecell-Vega公司制造、Perceptive公司制造或岛津制作所公司制造等的肽合成仪进行化学合成。

[0345] (2) 动物的免疫和融合用抗体产生细胞的制备

[0346] 对3~20周龄的小鼠、大鼠或仓鼠等动物进行(1)中得到的抗原的免疫,采集该动物的脾脏、淋巴结、外周血中的抗体产生细胞。另外,也可以使用小鼠CCR1敲除小鼠作为被免疫动物。

[0347] 免疫通过将抗原与例如弗氏完全佐剂、或者氢氧化铝凝胶与百日咳菌疫苗等适当的佐剂一起给药于动物的皮下、静脉内或腹腔内来进行。在抗原为部分肽的情况下,制作与BSA(牛血清白蛋白)或钥孔血蓝蛋白(Keyhole Limpet hemocyanin, KLH)等载体蛋白的结合体,将其用作免疫原。

[0348] 抗原的给药在第一次给药后每隔1~2周进行5~10次。在各给药后第3~7天从眼底静脉丛采血,使用酶联免疫测定法[Antibodies-A Laboratory Manual、冷泉港实验室(1988)]等测定其血清的抗体效价。将其血清对免疫所用的抗原显示出充分的抗体效价的动物作为融合用抗体产生细胞的供给源。

[0349] 在抗原的最终给药后第3~7天,从免疫后的动物体内摘除脾脏等包含抗体产生细胞的组织,采集抗体产生细胞。在使用脾脏细胞的情况下,将脾脏细切、打散后离心分离,进而除去红细胞,从而获得融合用抗体产生细胞。

[0350] (3) 骨髓瘤细胞的制备

[0351] 作为骨髓瘤细胞,使用由小鼠得到的细胞株,例如8-氮杂鸟嘌呤抗性小鼠(来源于BALB/c)骨髓瘤细胞株P3-X63Ag8-U1(P3-U1)[Current Topics in Microbiology and

Immunology, 18, 1 (1978)]、P3-NS1/1-Ag41 (NS-1) [European J. Immunology, 6, 511 (1976)]、SP2/0-Ag14 (SP-2) [Nature, 276, 269 (1978)]、P3-X63-Ag8653 (653) [J. Immunology, 123, 1548 (1979)]或P3-X63-Ag8 (X63) [Nature, 256, 495 (1975)]等。

[0352] 该骨髓瘤细胞在正常培养基[添加有谷氨酰胺、2-巯基乙醇、庆大霉素、FBS和8-氮杂鸟嘌呤的RPMI1640培养基]中传代,在细胞融合的3~4天前传代于正常培养基中,在融合当天确保 2×10^7 个以上的细胞数。

[0353] (4) 细胞融合和单克隆抗体产生杂交瘤的制备

[0354] 将(2)中得到的融合用抗体产生细胞和(3)中得到的骨髓瘤细胞用最低必需培养基(MEM)或PBS(磷酸氢二钠1.83g、磷酸二氢钾0.21g、氯化钠7.65g、蒸馏水1升、pH7.2)充分清洗,按照细胞数为融合用抗体产生细胞:骨髓瘤细胞=5~10:1的方式混合,离心分离后,除去上清。将沉淀的细胞团块充分打散后,在37℃下一边搅拌一边加入聚乙二醇-1000(PEG-1000)、MEM培养基和二甲亚砜的混合液。进一步,每1~2分钟添加MEM培养基1~2mL,添加数次后,加入MEM培养基使总量为50mL。离心分离后,除去上清。将沉淀的细胞团块轻轻打散后,将细胞轻柔地悬浮于HAT培养基[添加有次黄嘌呤、胸腺嘧啶和氨基蝶呤的正常培养基]中。将该悬浮液在37℃、5%CO₂培养箱中培养7~14天。

[0355] 培养后,抽取一部分培养上清,利用后述的结合检测等杂交瘤的选择方法,筛选出与包含人CCR1的抗原反应而不与不包含人CCR1的抗原反应的细胞群。接着,利用有限稀释法进行克隆化,筛选出稳定确认到强抗体效价的细胞作为单克隆抗体产生杂交瘤。

[0356] (5) 纯化单克隆抗体的制备

[0357] 对姥鲛烷处理[腹腔内给药2, 6, 10, 14-四甲基十五碳烷(姥鲛烷)0.5mL,饲养2周]后的8~10周龄的小鼠或裸鼠腹腔内注射(4)中得到的单克隆抗体产生杂交瘤。在10~21天,杂交瘤形成癌性腹水。从该小鼠采集腹水,离心分离除去固体成分后,用40~50%硫酸铵进行盐析,利用辛酸沉淀法、DEAE-琼脂糖柱、蛋白A柱或凝胶过滤柱进行纯化,收集IgG或IgM级分,制成纯化单克隆抗体。

[0358] 另外,将(4)中得到的单克隆抗体产生杂交瘤在添加有10%FBS的RPMI1640培养基等中进行培养后,通过离心分离除去上清,悬浮于Hybridoma SFM培养基中,培养3~7天。对所得到的细胞悬浮液进行离心分离,利用蛋白A柱或蛋白G柱从所得到的上清中进行纯化,收集IgG级分,也能够得到纯化单克隆抗体。需要说明的是,也可以在Hybridoma SFM培养基中添加5%的Daigo GF21。

[0359] 抗体亚类的确定使用亚类分型试剂盒通过酶联免疫测定法来进行。蛋白量的定量可以利用劳里法或由280nm处的吸光度算出。

[0360] (6) 单克隆抗体的筛选

[0361] 抗体的筛选如下所示,通过利用流式细胞术测定抗体对人CCR1表达细胞的结合性等来进行。人CCR1表达细胞只要在细胞表面上表达人CCR1,可以为任何细胞,可以列举例如人细胞、人细胞株和(1)中得到的人CCR1强制表达细胞株等。

[0362] 将人CCR1表达细胞分注至96孔板等板中后,分注血清、杂交瘤的培养上清或纯化单克隆抗体等受试物质作为第一抗体,使其进行反应。将反应后的细胞用含有1~10%牛血清白蛋白(BSA)的PBS(以下记为BSA-PBS)等充分清洗后,分注用荧光试剂等进行了标记的抗免疫球蛋白抗体作为第二抗体,使其进行反应。用BSA-PBS等充分清洗后,使用流式细胞

仪对标记化抗体的荧光量进行测定,由此筛选出与人CCR1表达细胞特异性地反应的单克隆抗体。

[0363] 另外,与本发明的抗体竞争性地与人CCR1结合的抗体可以通过将受试抗体添加至上述的使用流式细胞术的测定系统中使其进行反应而获得。即,通过筛选在添加了受试抗体时抑制本发明的抗体与人CCR1的结合的抗体,能够获得在与CCR1的氨基酸序列或其立体结构的结合中与本发明的抗体竞争的单克隆抗体。

[0364] 另外,与包含本发明的与人CCR1结合的单克隆抗体所结合的表位的表位结合的抗体可以通过下述方法获得:利用公知的方法对通过上述筛选方法获得的抗体的表位进行鉴定,制作包含所鉴定出的表位的合成肽或模拟表位的立体结构的合成肽等,进行免疫。

[0365] 此外,与和本发明的与人CCR1结合的单克隆抗体所结合的表位相同的表位结合的抗体可以通过下述方法获得:对利用上述的筛选方法获得的抗体的表位进行鉴定,制作包含所鉴定出的表位的部分的合成肽或模拟表位的立体结构的合成肽等,进行免疫。

[0366] 2. 基因重组抗体的制作

[0367] 作为基因重组抗体的制作例,以下示出人型嵌合抗体、人型嵌合抗体改造体和人源化抗体的制作方法。基因重组的小鼠抗体、大鼠抗体和兔抗体等也可以利用同样的方法制作。

[0368] (1) 基因重组抗体表达用载体的构建

[0369] 基因重组抗体表达用载体是整合有编码人抗体的CH和CL的DNA的动物细胞用表达载体,可以通过将编码人抗体的CH和CL的DNA分别克隆至动物细胞用表达载体中来构建。

[0370] 人抗体的C区可以使用任何人抗体的CH和CL。例如使用人抗体的 $\gamma 1$ 亚类的CH和 κ 类的CL等。编码人抗体的CH和CL的DNA使用cDNA,但也可以使用由外显子和内含子构成的染色体DNA。动物细胞用表达载体只要能够整合编码人抗体的C区的基因并进行表达,可以使用任何表达载体。例如使用pAGE107[Cytotechnol., 3, 133 (1990)]、pAGE103[J. Biochem., 101, 1307 (1987)]、pHSG274[Gene, 27, 223 (1984)]、pKCR[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 1527 (1981)]、pSG1bd2-4[Cytotechnol., 4, 173 (1990)]或pSE1UK1Sed1-3[Cytotechnol., 13, 79 (1993)]等。动物细胞用表达载体中启动子和增强子可以列举SV40的早期启动子[J. Biochem., 101, 1307 (1987)]、莫洛尼小鼠白血病病毒LTR[Biochem. Biophys. Res. Commun., 149, 960 (1987)]或免疫球蛋白H链的启动子[Cell, 41, 479 (1985)]和增强子[Cell, 33, 717 (1983)]等。

[0371] 从基因重组抗体表达载体的构建的容易度、向动物细胞中导入的容易度、抗体H链和L链在动物细胞内的表达量的平衡达到均衡等观点出发,基因重组抗体表达用载体使用抗体H链和L链存在于同一载体上的类型(串联型)的基因重组抗体表达用载体[J. Immunol. Methods, 167, 271 (1994)],但也可以使用抗体H链和L链存在于分开的载体上的类型的载体。串联型的基因重组抗体表达用载体使用pKANTEX93(国际公开第97/10354号)、pEE18[Hybridoma, 17, 559 (1998)]等。

[0372] (2) 编码来源于人以外的动物的抗体的V区的cDNA的获得和氨基酸序列的分析

[0373] 编码非人抗体的VH和VL的cDNA的获得和氨基酸序列的分析可以如下进行。

[0374] 由产生非人抗体的杂交瘤细胞提取mRNA,合成cDNA。将所合成的cDNA克隆至噬菌体或质粒等载体中,制作cDNA文库。使用编码小鼠抗体的C区部分或V区部分的DNA作为探

针,从上述文库中分别分离出具有编码VH或VL的cDNA的重组噬菌体或重组质粒。分别确定重组噬菌体或重组质粒上的作为目标的小鼠抗体的VH或VL的全部碱基序列,由碱基序列分别推定VH或VL的全部氨基酸序列。

[0375] 制作产生非人抗体的杂交瘤细胞的人以外的动物使用小鼠、大鼠、仓鼠或兔等,但只要能够制作杂交瘤细胞,任何动物均可以使用。

[0376] 由杂交瘤细胞制备总RNA时,使用异硫氰酸胍-三氟乙酸铯法[Methods in Enzymol.,154,3(1987)]或RNA easy kit(Qiagen公司制造)等试剂盒等。

[0377] 由总RNA制备mRNA时,使用固定有寡聚(dT)的纤维素柱法[Molecular Cloning,A Laboratory Manual、第二版、冷泉港实验室出版社(1989)]或Oligo-dT30<Super>(注册商标)mRNA纯化试剂盒(宝生物公司制造)等试剂盒等。另外,也可以使用Fast Track(注册商标)mRNA分离试剂盒(Invitrogen公司制造)或QuickPrep(注册商标)mRNA纯化试剂盒(法玛西亚公司制造)等试剂盒由杂交瘤细胞制备mRNA。

[0378] cDNA的合成和cDNA文库的制作使用公知的方法[Molecular Cloning,A Laboratory Manual、第二版、冷泉港实验室出版社(1989);Current Protocols in Molecular Biology、附录1、约翰威利父子出版社(1987-1997)];或者用于cDNA合成和质粒克隆的SuperScript质粒系统(Invitrogen公司制造)或ZAP-cDNA(注册商标)合成试剂盒(Stratagene公司制造)等试剂盒等。

[0379] 制作cDNA文库时,作为整合以由杂交瘤细胞提取的mRNA为模板而合成的cDNA的载体,只要是可整合该cDNA的载体,任何载体均可以使用。例如使用ZAP Express[Strategies,5,58(1992)]、pBluescript II SK(+)[Nucleic Acids Research,17,9494(1989)]、λZAPII(Stratagene公司制造)、λgt10、λgt11[DNA Cloning:A Practical Approach(DNA克隆实用方法),I,49(1985)]、Lambda BlueMid(Clontech公司制造)、λ ExCell、pT7T3-18U(法玛西亚公司制造)、pCD2[Mol.Cell.Biol.,3,280(1983)]或pUC18[Gene,33,103(1985)]等。

[0380] 作为导入利用噬菌体或质粒载体构建的cDNA文库的大肠杆菌,只要能够导入、表达和维持该cDNA文库,可以使用任何大肠杆菌。例如使用XL1-Blue MRF⁺[Strategies,5,81(1992)]、C600[Genetics,39,440(1954)]、Y1088、Y1090[Science,222,778(1983)]、NM522[J.Mol.Biol.,166,1(1983)]、K802[J.Mol.Biol.,16,118(1966)]或JM105[Gene,38,275(1985)]等。

[0381] 从cDNA文库中选择编码非人抗体的VH或VL的cDNA克隆时,使用利用了同位素或荧光标记的探针的集落杂交法或菌斑杂交法[Molecular Cloning,A Laboratory Manual、第二版、冷泉港实验室出版社(1989)]等。

[0382] 另外,也可以通过制备引物,以由mRNA合成的cDNA或cDNA文库作为模板,进行聚合酶链式反应法[以下记为PCR法;Molecular Cloning,A Laboratory Manual、第二版、冷泉港实验室出版社(1989);Current Protocols in Molecular Biology、附录1、约翰威利父子出版社(1987-1997)]来制备编码VH或VL的cDNA。

[0383] 将所选择的cDNA用适当的限制酶等切割后,克隆至pBluescript SK(-)(Stratagene公司制造)等质粒中,利用通常使用的碱基序列分析方法等确定该cDNA的碱基序列。作为碱基序列分析方法,例如在进行双脱氧法[Proc.Natl.Acad.Sci.USA,74,5463

(1977)]等反应后,使用ABI PRISM3700(PE生物系统公司制造)或A.L.F.DNA测序仪(法玛西亚公司制造)等碱基序列自动分析装置等。

[0384] 由所确定的碱基序列分别推定VH和VL的全部氨基酸序列,与已知抗体的VH和VL的全部氨基酸序列[Sequences of Proteins of Immunological Interest(免疫学关注的蛋白质序列)、美国卫生与公众服务部(1991)]进行比较,由此分别确认所获得的cDNA是否编码包含分泌包含信号序列的抗体的VH和VL的完整氨基酸序列。关于包含分泌信号序列的抗体的VH和VL的完整氨基酸序列,通过与已知抗体的VH和VL的全部氨基酸序列[Sequences of Proteins of Immunological Interest(免疫学关注的蛋白质序列)、美国卫生与公众服务部(1991)]进行比较,能够推定分泌信号序列的长度和N末端氨基酸序列,进而能够知晓它们所属的亚类。另外,对于VH和VL的各CDR的氨基酸序列,也可以通过与已知抗体的VH和VL的氨基酸序列[Sequences of Proteins of Immunological Interest(免疫学关注的蛋白质序列)、美国卫生与公众服务部(1991)]进行比较来找出。

[0385] 另外,使用所得到的VH和VL的完整氨基酸序列,对例如SWISS-PROT或PIR-Protein等任意的数据库进行BLAST法[J.Mol.Biol.,215,403(1990)]等的同源性检索,能够确认VH和VL的完整氨基酸序列是否为新序列。

[0386] (3)人型嵌合抗体表达载体或人型嵌合抗体改造体表达载体的构建

[0387] 将分别编码非人抗体的VH或VL的cDNA分别克隆至(1)中得到的基因重组抗体表达用载体的编码人抗体的CH或CL的各基因的上游,由此能够构建人型嵌合抗体表达载体。

[0388] 通过使用编码来源于某一单克隆抗体的VH的cDNA和编码来源于另一单克隆抗体的VL的cDNA,能够构建人型嵌合抗体改造体表达载体。

[0389] 另外,以该cDNA或已经制作好的人型嵌合抗体表达载体作为PCR的模板,使用在期望的氨基酸改造位点导入点突变的PCR引物对基因片段进行扩增,进行克隆连接至(1)中得到的载体中,由此能够构建人型嵌合抗体改造体表达载体。在改造位点涉及多个部位的情况下,也可以使用通过人工DNA合成制作的基因片段。

[0390] 为了将编码非人抗体的VH或VL的cDNA的3'末端侧与人抗体的CH或CL的5'末端侧连接,制作以如下方式设计的VH和VL的cDNA:连接部分的碱基序列编码适当的氨基酸且成为适当的限制酶识别序列。将所制作的VH和VL的cDNA分别克隆至(1)中得到的基因重组抗体表达用载体的编码人抗体的CH或CL的各基因的上游,以使它们以适当的形式进行表达,从而构建人型嵌合抗体表达载体或人型嵌合抗体改造体表达载体。

[0391] 另外,也可以使用在两端具有适当的限制酶的识别序列的合成DNA,利用PCR法对编码非人抗体VH或VL的cDNA分别进行扩增,将它们克隆至(1)中得到的基因重组抗体表达用载体中。

[0392] (4)编码人源化抗体的V区的cDNA的构建

[0393] 编码人源化抗体的VH或VL的cDNA可以如下构建。

[0394] 分别选择出用于移植非人抗体的VH或VL的CDR的氨基酸序列的人抗体的VH或VL的FR的氨基酸序列。所选择的FR的氨基酸序列只要来源于人抗体,可以使用任何的FR的氨基酸序列。例如使用蛋白数据库(Protein Data Bank)等数据库中登记的人抗体的FR的氨基酸序列、或人抗体的FR的各亚类的共有氨基酸序列[Sequences of Proteins of Immunological Interest(免疫学关注的蛋白质序列)、美国卫生与公众服务部(1991)]等。

为了抑制抗体的结合活性的降低,选择与原抗体的VH或VL的FR的氨基酸序列具有尽量高的同源性(至少60%以上)的FR的氨基酸序列。

[0395] 接着,向所选择的人抗体的VH或VL的FR的氨基酸序列中分别移植原抗体的CDR的氨基酸序列,分别设计出人源化抗体的VH或VL的氨基酸序列。考虑在抗体基因的碱基序列中出现的密码子的使用频率[Sequences of Proteins of Immunological Interest(免疫学关注的蛋白质序列)、美国卫生与公众服务部(1991)]而将所设计的氨基酸序列转换成DNA序列,分别设计出编码人源化抗体的VH或VL的氨基酸序列的DNA序列。

[0396] 基于所设计的DNA序列,合成多条由约100个碱基的长度构成的合成DNA,使用这些合成DNA进行PCR反应。这种情况下,从PCR反应中的反应效率和能够合成的DNA的长度的观点出发,优选对于VH、VL分别设计各6条合成DNA。此外,通过在位于两端的合成DNA的5'末端或3'末端导入适当的限制酶的识别序列,能够容易地将编码人源化抗体的VH或VL的cDNA克隆至(1)中得到的基因重组抗体表达用载体中。

[0397] PCR反应后,将扩增产物分别克隆至pBluescript SK(-)(Stratagene公司制造)等质粒中,通过与(2)中记载的方法同样的方法确定碱基序列,从而获得具有编码所期望的人源化抗体的VH或VL的氨基酸序列的DNA序列的质粒。

[0398] 或者,也可以使用基于所设计的DNA序列以各一条长链DNA的形式合成VH全长和VL全长而得到的DNA来代替上述PCR扩增产物。进一步,通过在合成长链DNA的两端导入适当的限制酶的识别序列,能够容易地将编码人源化抗体的VH或VL的cDNA克隆至(1)中得到的基因重组抗体表达用载体中。

[0399] (5) 人源化抗体的V区的氨基酸序列的改造

[0400] 对于人源化抗体而言,仅将非人抗体的VH和VL的CDR移植至人抗体的VH和VL的FR中时,其抗原结合活性与原来的非人抗体相比降低[BIO/TECHNOLOGY,9,266(1991)]。在人源化抗体中,通过鉴定出人抗体的VH和VL的FR的氨基酸序列中直接与抗原的结合相关的氨基酸残基、与CDR的氨基酸残基相互作用的氨基酸残基、以及维持抗体的立体结构而间接与抗原的结合相关的氨基酸残基,并将这些氨基酸残基置换为原来的非人抗体的氨基酸残基,能够使降低的抗原结合活性升高。

[0401] 为了鉴定出与抗原结合活性相关的FR的氨基酸残基,可以通过使用X射线晶体分析[J.Mol.Biol.,112,535(1977)]或计算机建模[Protein Engineering,7,1501(1994)]等进行抗体的立体结构的构建和分析。另外,通过针对各个抗体制作多种改造体并反复研究与各自的抗原结合活性的相关性来进行各种尝试,能够获得具有所需要的抗原结合活性的人源化抗体。

[0402] 人抗体的VH和VL的FR的氨基酸残基可以通过使用改造用合成DNA进行(4)中记载的PCR反应来进行改造。对于PCR反应后的扩增产物,通过(2)中记载的方法来确定碱基序列,从而确认已实施了目标改造。

[0403] (6) 人源化抗体表达载体的构建

[0404] 将所构建的编码基因重组抗体的VH或VL的cDNA分别克隆至(1)中得到的基因重组抗体表达用载体的编码人抗体的CH或CL的各基因的上游,能够构建人源化抗体表达载体。

[0405] 例如,通过向(4)和(5)中得到的构建人源化抗体的VH或VL时使用的合成DNA中位于两端的合成DNA的5'末端或3'末端导入适当的限制酶的识别序列,分别克隆至(1)中得到

的基因重组抗体表达用载体的编码人抗体的CH或CL的各基因的上游,以使它们以适当的形式进行表达。

[0406] 另外,在制作上述嵌合抗体、人源化抗体等基因重组抗体的情况下,通过制作将来源于两种不同的抗体的H链(或VH)和L链(或VL)重组而成的抗体表达用载体,能够构建VL置换嵌合抗体表达用载体。

[0407] (7) 基因重组抗体的瞬时性表达

[0408] 使用(3)和(6)中得到的基因重组抗体表达载体或者对它们进行改造而得到的表达载体,进行基因重组抗体的瞬时性表达,能够高效地对所制作的多种人型嵌合抗体、人源化抗体的抗原结合活性进行评价。

[0409] 导入表达载体的宿主细胞只要是能够表达基因重组抗体的宿主细胞,可以使用任何细胞,例如使用COS-7细胞[美国典型培养物保藏中心(ATCC)编号:CRL1651][Methods in Nucleic Acids Res.,CRC press,283(1991)]。

[0410] 向COS-7细胞中导入表达载体时,使用DEAE-右旋糖酐法[Methods in Nucleic Acids Res.,CRC press(1991)]或脂质体转染法[Proc.Natl.Acad.Sci.USA,84,7413(1987)]等。

[0411] 导入表达载体后,使用酶免疫抗体法[Monoclonal Antibodies-Principles and practice、第三版、学术出版社(1996);Antibodies-A Laboratory Manual、冷泉港实验室(1988);单克隆抗体实验手册、讲谈社Scientific(1987)]等测定培养上清中的基因重组抗体的表达量和抗原结合活性。

[0412] (8) 稳定表达基因重组抗体的转化株的获得和基因重组抗体的制备

[0413] 通过将(3)和(6)中得到的基因重组抗体表达载体导入至适当的宿主细胞中,能够得到稳定表达基因重组抗体的转化株。

[0414] 表达载体向宿主细胞中的导入使用电穿孔法[日本特开平2-257891号公报;Cytotechnology,3,133(1990)]等。

[0415] 导入基因重组抗体表达载体的宿主细胞只要是能够表达基因重组抗体的宿主细胞,可以使用任何细胞。例如使用CHO-K1(ATCC CCL-61)、DUKXB11(ATCC CCL-9096)、Pro-5(ATCC CCL-1781)、CHO-S(Life Technologies,Cat#11619)、大鼠骨髓瘤细胞YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20(ATCC编号:CRL1662、或者也称为YB2/0)、小鼠骨髓瘤细胞NS0、小鼠骨髓瘤细胞SP2/0-Ag14(ATCC编号:CRL1581)、小鼠P3X63-Ag8.653细胞(ATCC编号:CRL1580)、二氢叶酸还原酶基因(Dihydroforate Reductase、以下记为dhfr)缺陷的CHO细胞(CHO/DG44细胞)[Proc.Natl.Acad.Sci.USA,77,4216(1980)]等。

[0416] 另外,也可以使用与细胞内糖核苷酸GDP-岩藻糖的合成相关的酶等蛋白质、与在N-糖苷键复合型糖链的还原末端的N-乙酰葡糖胺的6位上使岩藻糖的1位进行 α 连接的糖链修饰相关的酶等蛋白质、或者与细胞内糖核苷酸GDP-岩藻糖向高尔基体的转运相关的蛋白质等的活性降低或缺失的宿主细胞,例如 α 1,6-岩藻糖转移酶基因缺陷的CHO细胞(国际公开第2005/035586号、国际公开第02/31140号)、获得了凝集素抗性的Lec13[Somatic Cell and Molecular genetics,12,55(1986)]等。

[0417] 导入表达载体后,将稳定表达基因重组抗体的转化株在含有G418硫酸盐(以下记为G418)等药剂的动物细胞培养用培养基进行培养,由此进行筛选(日本特开平2-257891号

公报)。

[0418] 动物细胞培养用培养基使用RPMI1640培养基(Invitrogen公司制造)、GIT培养基(日本制药公司制造)、EX-CELL301培养基(JRH公司制造)、IMDM培养基(Invitrogen公司制造)或Hybridoma-SFM培养基(Invitrogen公司制造)、或者在这些培养基中添加有FBS等各种添加物的培养基等。通过将所得到的转化株在培养基中进行培养,使基因重组抗体在培养上清中表达并蓄积。培养上清中的基因重组抗体的表达量和抗原结合活性可以利用ELISA法等进行测定。另外,可以利用dhfr基因扩增系统(日本特开平2-257891号公报)等使转化株所产生的基因重组抗体的表达量升高。

[0419] 基因重组抗体可以使用蛋白A柱从转化株的培养上清中进行纯化[Monoclonal Antibodies-Principles and practice、第三版、学术出版社(1996);Antibodies-A Laboratory Manual、冷泉港实验室(1988)]。另外,也可以将凝胶过滤、离子交换色谱和超滤等蛋白质的纯化中使用的方法组合来进行纯化。

[0420] 纯化后的基因重组抗体的H链、L链或整个抗体分子的分子量可以使用聚丙烯酰胺凝胶电泳法[Nature, 227, 680 (1970)]或蛋白免疫印迹法[Monoclonal Antibodies-Principles and practice、第三版、学术出版社(1996);Antibodies-A Laboratory Manual、冷泉港实验室(1988)]等进行测定。

[0421] 3. 纯化单克隆抗体或该抗体片段的活性评价

[0422] 纯化后的本发明的单克隆抗体或该抗体片段的活性评价可以如下进行。

[0423] 本发明的抗体或该抗体片段对人CCR1的结合活性使用上述1-(6)中记载的流式细胞术进行测定。另外,也可以使用荧光抗体法[Cancer Immunol. Immunother., 36, 373 (1993)]等进行测定。

[0424] 本发明的抗体或该抗体片段抑制由人CCL15引起的人CCR1表达细胞的迁移的活性可以使用上述的趋化性检测进行测定。

[0425] 对人CCR1表达细胞的CDC活性或ADCC活性可以利用公知的测定方法[Cancer Immunol. Immunother., 36, 373 (1993);Current protocols in Immunology, Chapter7. Immunologic studies in humans, Editor, John E. Coligan et al., John Wiley&Sons, Inc., (1993)]进行测定。

[0426] 4. 控制抗体的效应子活性的方法

[0427] 作为控制本发明的单克隆抗体的效应子活性的方法,已知有对结合于抗体的Fc段的第297位的天冬酰胺(Asn)的N键合复合型糖链的还原末端上存在的N-乙酰基葡萄糖胺(GlcNAc)上 α 1,6键合的岩藻糖(也称为核心岩藻糖)的量进行控制的方法(国际公开第2005/035586号、国际公开第2002/31140号、国际公开第00/61739号);或者通过对抗体的Fc段的氨基酸残基进行改造而进行控制的方法等。对本发明的单克隆抗体使用任意一种方法,均能够控制效应子活性。

[0428] 效应子活性是指由抗体的Fc段所引起的抗体依赖性活性,已知有ADCC活性、CDC活性、或者由巨噬细胞或树突细胞等吞噬细胞产生的抗体依赖性吞噬活性(Antibody-dependent phagocytosis、ADP活性)等。

[0429] 作为效应子活性的测定法,例如,可以将作为标靶的炎性细胞、作为效应子的人外周血单核细胞(PBMC)、以及炎性细胞特异性的抗体混合,温育约4小时后,测定作为细胞损

伤指标的游离出来的乳酸脱氢酶 (LDH)。或者,可以在人全血中添加识别例如CD20之类的血液细胞特异性的抗原的抗体,温育后,测定作为标靶的血液细胞数的减少作为效应子活性。或者,例如,可以在人全血中混合另外的标靶细胞,进一步添加标靶细胞的特异性抗体并温育后,测定标靶细胞数的减少作为效应子活性。任何一种情况下,效应子活性均可以通过游离LDH法、游离⁵¹Cr法或流式细胞术法等来进行测定。

[0430] 通过控制抗体的Fc的N键合复合型糖链的核心岩藻糖的含量,能够增加或降低抗体的效应子活性。作为降低与抗体的Fc结合的N键合复合型糖链上结合的岩藻糖的含量的方法,可以通过使用 α 1,6-岩藻糖转移酶基因缺陷的CHO细胞对抗体进行表达而获得未结合岩藻糖的抗体。未结合岩藻糖的抗体具有高的ADCC活性。

[0431] 另一方面,作为增加与抗体的Fc结合的N键合复合型糖链上结合的岩藻糖的含量的方法,可以通过使用导入有 α 1,6-岩藻糖转移酶基因的宿主细胞对抗体进行表达而获得结合有岩藻糖的抗体。结合有岩藻糖的抗体具有比未结合岩藻糖的抗体低的ADCC活性。

[0432] 另外,可以通过对抗体的Fc段的氨基酸残基进行改造来增加或降低ADCC活性或CDC活性。例如,通过使用美国专利申请公开第2007/0148165号说明书中记载的Fc段的氨基酸序列,能够增加抗体的CDC活性。

[0433] 另外,通过进行美国专利第6737056号说明书、美国专利第7297775号说明书或美国专利第7317091号说明书中记载的氨基酸改造,既可以增加也可以降低ADCC活性或CDC活性。另外,本发明的抗体也包含通过配合上述的抗体恒定区中的氨基酸改造或糖链改造来进行例如日本特开第2013-165716号公报或日本特开第2012-021004号公报等中记载的氨基酸改造而控制对Fc受体的反应性、由此控制了血中半衰期的抗体。

[0434] 此外,通过将上述方法组合而用于一种抗体,能够获得控制了抗体的效应子活性、血中半衰期的抗体。

[0435] 5. 使用本发明的抗人CCR1单克隆抗体或该抗体片段的疾病的治疗方法

[0436] 只要是人CCR1依赖性的细胞迁移、病变等CCR1相关的疾病,本发明的单克隆抗体或该抗体片段能够用于任何人CCR1相关疾病的治疗。

[0437] 含有本发明的单克隆抗体或该抗体片段的治疗剂可以仅含有作为有效成分的该抗体或该抗体片段,但通常优选以与药理学上可接受的一种以上的载体一起混合、利用制剂技术领域中公知的方法制造而成的药物制剂的形式提供。

[0438] 作为给药途径,可以列举例如经口给药或口腔内、呼吸道内、直肠内、皮下、肌肉内或静脉内等非经口给药。作为给药形态,可以列举例如喷雾剂、胶囊剂、片剂、散剂、颗粒剂、糖浆剂、乳剂、栓剂、注射剂、软膏或贴片剂等。

[0439] 作为适合于经口给药的制剂,可以列举乳剂、糖浆剂、胶囊剂、片剂、散剂或颗粒剂等。

[0440] 乳剂或糖浆剂这样的液体制备物使用水、蔗糖、山梨醇或果糖等糖类、聚乙二醇或聚丙二醇等二醇类、芝麻油、橄榄油或大豆油等油类,对羟基苯甲酸酯类等防腐剂、或者草莓香料或薄荷等香料类等作为添加剂来制造。

[0441] 胶囊剂、片剂、散剂或颗粒剂等使用乳糖、葡萄糖、蔗糖或甘露醇等赋形剂、淀粉或海藻酸钠等崩解剂、硬脂酸镁或滑石等润滑剂、聚乙烯醇、羟丙基纤维素或明胶等粘结剂、脂肪酸酯等表面活性剂或甘油等增塑剂等作为添加剂来制造。

[0442] 作为适合于非经口给药的制剂,为注射剂、栓剂或喷雾剂等。注射剂使用由盐溶液或葡萄糖溶液或者这两者的混合物构成的载体等来制造。栓剂使用可可脂、氢化脂肪或羧酸等载体来制造。

[0443] 喷雾剂使用不刺激接受者的口腔和呼吸道粘膜并且使本发明的单克隆抗体或该抗体片段以微细粒子的形式分散从而容易吸收的载体等来制造。作为载体,使用例如乳糖或甘油等。另外,也可以以气溶胶或干粉的形式制造。此外,上述非经口剂中也可以添加在适合于经口给药的制剂中作为添加剂所例示的成分。

[0444] 6. 使用本发明的抗人CCR1单克隆抗体或该抗体片段的疾病的诊断方法

[0445] 通过使用本发明的单克隆抗体或该抗体片段对人CCR1或表达人CCR1的细胞进行检测或测定,能够对人CCR1相关疾病进行诊断。

[0446] 作为人CCR1相关疾病的癌疾病、自身免疫性疾病和炎症疾病的诊断例如可以利用免疫学方法对患者体内存在的人CCR1进行检测或测定。另外,可以通过使用流式细胞术等免疫学方法检测在患者体内的细胞上表达的人CCR1来进行诊断。

[0447] 免疫学方法是指使用实施了标记的抗原或抗体等对抗体量或抗原量进行检测或测定的方法。例如使用放射性物质标记免疫抗体法、酶联免疫测定法、荧光免疫测定法、发光免疫测定法、蛋白免疫印迹法或物理化学方法等。

[0448] 放射性物质标记免疫抗体法例如是使本发明的抗体或该抗体片段与抗原或表达抗原的细胞等反应,进一步使实施了放射线标记的抗免疫球蛋白抗体或该抗体片段进行反应,然后利用闪烁计数仪等进行测定。

[0449] 酶联免疫测定法例如是使本发明的抗体或该抗体片段与抗原或表达抗原的细胞等反应,进一步使利用酶等实施了标记的抗免疫球蛋白抗体或该抗体片段进行反应,然后添加底物并利用吸光光度计测定反应液的吸光度。例如使用夹心ELISA法等。作为酶联免疫测定法中使用的标记物,可以使用公知[酶联免疫测定法、医学书院(1987)]的酶标记。

[0450] 例如使用碱性磷酸酶标记、过氧化物酶标记、荧光素酶标记或生物素标记等。夹心ELISA法是使抗体结合于固相上后、使其捕获作为检测或测定对象的抗原并使第二抗体与被捕获的抗原反应的方法。在该ELISA法中,准备作为对想要检测或测定的抗原进行识别的抗体或抗体片段的、抗原识别位点不同的两种抗体,预先使其中的第一抗体或抗体片段吸附至板(例如96孔板)上,接着将第二抗体或抗体片段预先用FITC等荧光物质、过氧化物酶等酶或生物素等进行标记。在吸附有上述抗体的板上使从生物体内分离的细胞或其破碎液、组织或其破碎液、细胞培养上清、血清、胸水、腹水或眼液等进行反应,然后使标记的单克隆抗体或抗体片段进行反应,并进行与标记物质对应的检测反应。利用将浓度已知的抗原进行连续稀释而制作的标准曲线,算出受试样品中的抗原浓度。作为夹心ELISA法中使用的抗体,可以使用多克隆抗体或单克隆抗体中的任何一种,也可以使用Fab、Fab' 或F(ab)₂等抗体片段。作为夹心ELISA法中使用的两种抗体的组合,可以是识别不同表位的单克隆抗体或抗体片段的组合,也可以是多克隆抗体与单克隆抗体或抗体片段的组合。

[0451] 荧光免疫测定法利用文献[Monoclonal Antibodies-Principles and practice、第三版、学术出版社(1996);单克隆抗体实验手册、讲谈社Scientific(1987)]等中记载的方法进行测定。作为荧光免疫测定法中使用的标记物,可以使用公知[荧光抗体法、Soft Science公司(1983)]的荧光标记。例如使用FITC或RITC等。

[0452] 发光免疫测定法利用文献[生物发光与化学发光临床检查42、广川书店(1998)]等中记载的方法进行测定。作为发光免疫测定法中使用的标记物,可以列举公知的发光物标记,使用吖啶酯或洛酚碱等。

[0453] 蛋白免疫印记法通过将抗原或表达抗原的细胞等利用SDS(十二烷基硫酸钠)-PAGE(聚丙烯酰胺凝胶)[Antibodies-A Laboratory Manual、冷泉港实验室(1988)]分级分离后,将该凝胶印迹至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜或硝酸纤维素膜上,使识别抗原的抗体或抗体片段与该膜进行反应,进而使实施了FITC等荧光物质、过氧化物酶等酶标记或生物素标记等的抗小鼠IgG抗体或结合片段进行反应,然后使该标记可见化来进行测定。

[0454] 以下示出一例。将表达具有序列号2的氨基酸序列的多肽的细胞或组织溶解,在还原条件下使每个泳道的蛋白量为0.1~30 μ g,利用SDS-PAGE法进行电泳。将电泳后的蛋白转录至PVDF膜上,在含有1~10%BSA的PBS(以下记为BSA-PBS)中在室温下反应30分钟,进行封闭操作。在此,使本发明的单克隆抗体进行反应,用含有0.05~0.1%的Tween-20的PBS(以下记为Tween-PBS)进行清洗,并使过氧化物酶标记的山羊抗小鼠IgG在室温下反应2小时。用Tween-PBS进行清洗,使用ECL蛋白免疫印迹检测试剂(安玛西亚公司制造)等对结合有单克隆抗体的条带进行检测,由此对具有序列号2的氨基酸序列的多肽进行检测。作为利用蛋白免疫印迹法的检测中使用的抗体或该抗体片段,使用能够与未保持天然型立体结构的多肽结合的抗体。

[0455] 物理化学方法例如通过使作为抗原的人CCR1与本发明的单克隆抗体或该抗体片段结合而形成聚集体并检测该聚集体来进行。作为其他物理化学方法,还可以列举毛细管法、单向免疫扩散法、免疫比浊法或乳胶免疫比浊法[临床检查法提要、金原出版(1998)]等。乳胶免疫比浊法中,使用以抗体或抗原致敏的粒径约0.1 μ m~约1 μ m的聚苯乙烯乳胶等载体,利用对应的抗原或抗体引起抗原抗体反应时,反应液中的散射光增加,透射光减少。以吸光度或积分球浊度的形式检测该变化,由此测定受试样品中的抗原浓度等。

[0456] 表达人CCR1的细胞的检测或测定可以使用公知的免疫学检测法,其中优选使用免疫沉淀法、免疫细胞染色法、免疫组织染色法或荧光抗体染色法等。

[0457] 免疫沉淀法中,使表达人CCR1的细胞等与本发明的单克隆抗体或该抗体片段反应后,加入对蛋白G-琼脂糖等免疫球蛋白具有特异性结合能力的载体,使抗原抗体复合物沉淀。或者也可以利用下述方法进行。使上述本发明的单克隆抗体或该抗体片段固相化于ELISA用96孔板上,然后利用BSA-PBS进行封闭。在抗体为例如杂交瘤培养上清等未进行纯化的状态的情况下,使抗小鼠免疫球蛋白、抗大鼠免疫球蛋白、蛋白A或蛋白G等预先固相化于ELISA用96孔板上,利用BSA-PBS进行封闭后,分注杂交瘤培养上清使其进行结合。接着,弃去BSA-PBS并用PBS充分清洗后,使表达人CCR1的细胞或组织的溶解液进行反应。利用SDS-PAGE用样品缓冲液从充分清洗后的板上提取免疫沉淀物,通过上述蛋白免疫印迹法进行检测。

[0458] 免疫细胞染色法或免疫组织染色法为下述方法:将表达抗原的细胞或组织等根据情况用表面活性剂或甲醇等进行处理以使抗体的透过性良好,然后与本发明的抗体进行反应,进而与实施了FITC等荧光标记、过氧化物酶等酶标记或生物素标记等的抗免疫球蛋白抗体或其结合片段进行反应,然后使该标记可见化并利用显微镜进行显微观察。另外,可以通过使细胞与荧光标记的抗体反应并利用流式细胞仪进行分析的荧光抗体染色法

[Monoclonal Antibodies-Principles and practice、第三版、学术出版社(1996);单克隆抗体实验手册、讲谈社Scientific(1987)]来进行检测。特别地,与人CCR1结合的本发明的单克隆抗体或该抗体片段可以利用荧光抗体染色法对保持天然型立体结构而表达的细胞进行检测。

[0459] 另外,荧光抗体染色法中,在使用FMAT8100HTS系统(应用生物系统公司制造)等的情况下,可以在不对形成的抗体-抗原复合物与未参与抗体-抗原复合物形成的游离抗体或抗原进行分离的情况下测定抗原量或抗体量。

[0460] 以下,利用实施例具体地对本发明进行说明,但本发明不受下述实施例的限定。

[0461] 实施例

[0462] [实施例1]人、小鼠CCR1的表达载体的制作

[0463] (1)各CCR1基因的制作

[0464] 合成下述1~7的编码人或小鼠的CCR1或CCR1-CCR3嵌合受体的DNA(GenScript Japan公司)。合成时附加用于整合到各载体中的限制酶位点(BamHI和NotI)和Kozak序列。

[0465] 1.编码人CCR1(以下记为hCCR1)的cDNA序列(序列号1)

[0466] 2.编码小鼠CCR1(以下记为mCCR1)的cDNA序列(序列号3)

[0467] 3.编码人CCR3(以下记为hCCR3)的cDNA序列(序列号5)

[0468] 4.编码将人CCR1的第1位至第31位的氨基酸序列替换为人CCR3的相应的N末端的氨基酸序列而得到的嵌合受体(以下记为NC3-hCCR1)的cDNA序列(序列号6)

[0469] 5.编码将小鼠CCR1的第1位至第31位的氨基酸序列替换为人CCR3的相应的N末端的氨基酸序列而得到的嵌合受体(以下记为NC3-mCCR1)的cDNA序列(序列号7)

[0470] 6.编码将人CCR3的第171位至第194位的氨基酸序列替换为人CCR1的第171位至第194位的氨基酸序列而得到的嵌合受体(以下记为hCCR3_EL2hCCR1)的cDNA序列(序列号8)

[0471] 7.编码将人CCR3的第171位至第194位的氨基酸序列替换为小鼠CCR1的第171位至第194位的氨基酸序列而得到的嵌合受体(以下记为hCCR3_EL2mCCR1)的cDNA序列(序列号9)

[0472] (2)人CCR1表达载体的制作

[0473] 用限制酶BamHI和NotI(New England Biolab公司)对上述(1)-1中合成的编码hCCR1的DNA进行处理,对DNA片段进行纯化。用相同的限制酶对To12转座子载体(国际公开第2010/143698号)(以下记为Tn-pMug-Hygro)进行处理,与编码CCR1的DNA片段混合后,通过DNA连接酶(宝生物公司)处理进行连接。将连接后的DNA导入至大肠杆菌感受态细胞(宝生物公司)中,从获得了抗药性的菌落中筛选出具有目标质粒DNA的大肠杆菌株。将该大肠杆菌株再次进行培养,从培养液中纯化出转染用的DNA(以下,将这样制作的质粒表示为hCCR1/Tn-pMug-Hygro)。

[0474] (3)各种CCR表达载体的制作

[0475] 利用与上述(2)同样的方法,将上述(1)中合成的mCCR1、hCCR3、NC3-hCCR1、NC3-mCCR1、hCCR3_EL2hCCR1、hCCR3_EL2mCCR1与Tn-pMug-Hygro连接,构建表达载体(以下,分别表示为mCCR1/Tn-pMug-Hygro、hCCR3/Tn-pMug-Hygro、NC3-hCCR1/Tn-pMug-Hygro、NC3-mCCR1/Tn-pMug-Hygro、hCCR3_EL2hCCR1/Tn-pMug-Hygro、hCCR3_EL2mCCR1/Tn-pMug-

Hygro)。

[0476] (4) mCCR1表达载体的制作

[0477] 利用与上述(2)同样的方法,将上述(1)中合成的编码mCCR1的DNA与在pCAGGS [Gene.1991 Dec 15;108(2):193-9.]上附加有内部核糖体进入位点(internal ribosomal entry site;IRES)和新霉素抗性基因的载体pCAG-IRES-neo连接,构建表达载体(以下表示为mCCR1/pCAG-IRES-neo)。

[0478] [实施例2]CCR1表达细胞株的制作

[0479] (1) hCCR1表达细胞的制作

[0480] 将作为实施例1中制作的质粒DNA的hCCR1/Tn-pMug-Hygro和Tol2转座酶表达载体TPEX_pMug(国际公开第2013/005649号)共导入至CHO-S(Thermo Fisher Scientific公司)中,制作表达细胞株。基因导入使用Fugene HD(普洛麦格公司)如下进行。在6孔板中接种制备成 1×10^5 细胞/mL的细胞各2.5mL,24小时后在培养液中添加hCCR1/Tn-pMug-Hygro、TPEX_pMug、Fugene HD的混合物。添加后72小时后,添加1mg/mL的潮霉素(Invitrogen公司),进行约2周的药剂筛选。回收获得了抗药性的细胞,利用流式细胞术(FACS Calibur、BD Biosciences公司)进行表达分析,结果确认到所导入的hCCR1的表达。将该细胞株表示为CHO-S-hCCR1。

[0481] (2) 各种CCR表达细胞的制作

[0482] 对于实施例1中制作的mCCR1/Tn-pMug-Hygro、hCCR3/Tn-pMug-Hygro、NC3-hCCR1/Tn-pMug-Hygro、NC3-mCCR1/Tn-pMug-Hygro、hCCR3_EL2hCCR1/Tn-pMug-Hygro和hCCR3_EL2mCCR1/Tn-pMug-Hygro,利用与上述(1)同样的方法导入至CHO-S细胞中,制作表达细胞株。以下,将这些细胞株分别表示为CHO-S-mCCR1、CHO-S-hCCR3、CHO-S-NC3-hCCR1、CHO-S-NC3-mCCR1、CHO-S-hCCR3_EL2hCCR1和CHO-S-hCCR3_EL2mCCR1。

[0483] (3) RL33-hCCR1细胞的制作

[0484] 将实施例1中制作的hCCR1/Tn-pMug-Hygro和Tol2转座酶表达载体TPEX_pMug(国际公开第2013/005649号)共导入至兔细胞株RL-33[Yoshii et al., Jpn J Med Sci Biol.1977 Jun;30(3):149-57]中,制作hCCR1表达细胞株。基因导入使用Lipofectamine LTX(Thermo Fisher Scientific公司)如下进行。在6孔板中接种制备成 1×10^5 细胞/mL的细胞各2mL,在培养基中添加2.5 μ g的质粒DNA、5 μ L的Lipofectamine LTX的混合物。添加后72小时后,添加1mg/mL的新霉素,进行约2周的药剂筛选。回收获得了抗药性的细胞,利用流式细胞术进行表达分析,结果确认到所导入的hCCR1的表达。以下,将该细胞株表示为RL33-hCCR1。

[0485] (4) RL33-mCCR1细胞的制作

[0486] 利用与上述(3)同样的方法将实施例1(4)中制作的mCCR1/pCAG-IRES-neo导入至RL-33中,制作表达细胞株。药剂筛选利用0.5mg/mL的G418来进行。以下,将该细胞株表示为RL33-mCCR1。

[0487] [实施例3]抗CCR1兔多克隆抗体的制作

[0488] 利用以下的方法制作抗CCR1兔多克隆抗体。合成人CCR1的N末端肽(序列号10),对2只兔(新西兰白兔)以2周的间隔进行5次免疫。免疫仅在首次使用完全弗氏佐剂(CFA),第二次以后使用不完全弗氏佐剂(IFA),在背部的多个部位以皮下注入进行免疫。免疫后从抗

体效价上升的个体中采集血清,通过利用蛋白A柱(GE Healthcare公司)的亲纯化对IgG进行纯化。将这样制作的抗CCR1兔多克隆抗体表示为E5971。

[0489] [实施例4]利用流式细胞术进行的表达分析

[0490] (1) CCR1表达的确证

[0491] 对于实施例2中制作的CCR1表达细胞株,使用实施例3中制作的抗CCR1兔多克隆抗体E5971进行染色,利用流式细胞术(FCM)确认CCR1的表达。FCM分析如下进行。将细胞以 2×10^5 细胞/孔接种至96孔板中,利用染色缓冲液[3%FBS(Thermo Fisher Scientific公司)/DPBS(Nacalai Tesque公司)/0.1%叠氮化钠(Nacalai Tesque公司)]进行清洗。利用10 μ g/mL的E5971对该细胞在冰上进行1小时处理,利用染色缓冲液进行清洗后,以终浓度1 μ g/mL添加二次抗体Alexa Fluor647山羊抗兔IgG(Thermo Fisher Scientific公司制造),在室温下处理30分钟。对于该细胞,再次利用染色缓冲液进行清洗后,在染色缓冲液中悬浮,使用BD FACSCalibur(BD Biosciences公司)进行分析。由此,能够确认所制作的CCR1表达细胞株表达了导入的CCR1。

[0492] (2) CCR3表达的确证

[0493] 对于实施例2中制作的CHO-S-hCCR3,利用与上述(1)同样的方法确认CCR3的表达。一次抗体使用市售的作为抗CCR3抗体的444-11抗体(MBL公司),二次抗体使用Alexa Fluor 647山羊抗小鼠IgG(H+L)(Thermo Fisher Scientific公司)。由此,能够确认利用CHO-S-hCCR3导入的CCR3进行了表达。

[0494] [实施例5]使用CCR1敲除小鼠的单克隆抗体的制作

[0495] 为了得到小鼠交叉性抗体,使用市售的CCR1敲除(KO)小鼠(B6.129S4-Ccr1^{tm1Gao}N10+N5)(Taconic公司)制作单克隆抗体。抗体制作按照下述过程进行。

[0496] (1) 免疫致敏

[0497] 作为免疫原,使用实施例2中制作的CHO-S-hCCR1、CHO-S-mCCR1、RL33-hCCR1和RL33-mCCR1。每一次免疫使用 1×10^7 细胞/只。对5~9周龄的CCR1 KO小鼠仅初次免疫时施加作为佐剂的Alum凝胶(LSL公司)(80 μ L/只)和百日咳疫苗(Nacalai Tesque公司)(1×10^7 细胞/只),通过腹腔内给药进行免疫致敏。任何一次免疫均按照给药量为500 μ L/只的方式用PBS进行制备。在初次免疫两周后进行第二次免疫,进而在一周后进行第三次免疫,三天后进行部分采血。

[0498] (2) 抗血清评价(FCM)

[0499] 使用实施例2中制作的各种CCR1表达细胞,通过FCM对血清中的特异性抗体效价进行测定。测定按照下述过程进行。将细胞分别以 1×10^5 细胞/孔的方式用1%BSA(Nacalai Tesque公司)-PBS(Nacalai Tesque公司)[包含0.02%EDTA(Nacalai Tesque公司)、0.05%NaN₃(Nacalai Tesque公司)]进行制备,以50 μ L/孔分注于96孔细胞培养用U型底的板中。将作为受试样品的从被免疫动物采集的血清按照终浓度200倍稀释、1000倍稀释和5000倍稀释的方式用1%BSA-PBS(0.02%EDTA、0.05%NaN₃)进行制备,以50 μ L/孔分注于上述板中,在4 $^{\circ}$ C下放置30分钟。离心分离(2000rpm、2分钟)后抽吸上清,利用微孔板振荡器使细胞的团块解体。以200 μ L/孔分注1%BSA-PBS(0.02%EDTA、0.05%NaN₃),再次离心分离(2000rpm、2分钟)后抽吸上清,利用微孔板振荡器使细胞的团块解体。将Alexa Fluor647山羊抗小鼠IgG(H+L)或Alexa Fluor488山羊抗小鼠IgG(H+L)以最终为300倍稀释的方式用

1%BSA-PBS (0.02%EDTA、0.05%NaN₃) 进行制备,以50μL/孔分注于上述板中,在遮光下在4℃放置30分钟。离心分离(2000rpm、2分钟)后抽吸上清,利用微孔板振荡器使细胞的团块解体。以200μL/孔分注1%BSA-PBS (0.02%EDTA、0.05%NaN₃),再次离心分离(2000rpm、2分钟)后抽吸上清,利用微孔板振荡器使细胞的团块解体。以50μL/孔向其中分注1%BSA-PBS (0.02%EDTA、0.05%NaN₃),利用流式细胞仪[FACSCanto (商标) II/BD]测定荧光强度。由此,筛选出确认到抗体效价上升的个体,摘除其脾脏。

[0500] (3) 通过细胞融合进行的杂交瘤制作

[0501] 将小鼠骨髓瘤细胞株P3-U1 (P3X63Ag8U.1、ATCC CRL-1597) 在S-Clone克隆培养基(EIDIA公司)中培养而进行无血清驯化后,作为细胞融合的亲本株来使用。以无菌方式采集被免疫动物的脾脏,利用红细胞裂解缓冲液(Sigma-Aldrich公司)进行溶血后,用PBS清洗两次,按照脾细胞与P3-U1的细胞数为脾脏细胞:P3-U1=8:1的方式混合,进行离心分离(1200rpm、5分钟)。将所得到的沉淀级分的细胞群充分打散后,一边搅拌一边在37℃下添加1g的聚乙二醇-1000 (PEG-1000、纯正化学公司)、1mL的MEM培养基(Nacalai Tesque公司)和0.35mL的二甲亚砷(Sigma-Aldrich公司)的混合液0.5mL,每一分钟向其中添加1mL的MEM培养基,添加5次后,加入MEM培养基使全量为50mL。对细胞悬浮液进行离心分离(900rpm、5分钟),将所得到的沉淀级分的细胞轻轻打散后,利用添加有HAT补充剂(Thermo Fisher Scientific公司)的S-Clone克隆培养基使脾脏细胞以 1.5×10^7 细胞/9mL的细胞浓度悬浮。预先在96孔培养用板中以100μL/孔分注添加有HAT的克隆培养基,向其中以100μL/孔分别分注细胞悬浮液,在CO₂培养箱(5%CO₂、37℃)中培养8~10天。

[0502] (4) 杂交瘤的筛选

[0503] 通过FCM对杂交瘤培养上清中包含的抗体与CCR1的结合活性进行评价。受试样品使用杂交瘤培养上清,染色和测定按照与上述(2)同样的过程来实施。

[0504] (5) 杂交瘤的亚克隆

[0505] 对于通过筛选呈阳性的孔的细胞进行亚克隆,在克隆培养基中培养约7~10天。

[0506] (6) 抗体亚类的决定

[0507] 使用亚类特异性的二次抗体通过FCM确定各抗体的亚类。染色、测定的过程与上述(2)同样地进行。受试样品使用杂交瘤培养上清。检测抗体使用Alexa Fluor488山羊抗小鼠IgG(H+L)(Thermo Fisher Scientific公司)和各亚类特异性的抗体(Alexa Fluor488山羊抗小鼠IgG1(Thermo Fisher Scientific公司)、Alexa Fluor488山羊抗小鼠IgG2a(Thermo Fisher Scientific公司)、Alexa Fluor488山羊抗小鼠IgG2b(Thermo Fisher Scientific edium公司)、Alexa Fluor488山羊抗小鼠IgG3)(Thermo Fisher Scientific公司)。

[0508] (7) 从杂交瘤培养上清中的抗体纯化

[0509] 从如上所述克隆的杂交瘤的培养上清中对抗体进行纯化。纯化使用蛋白G琼脂糖4Fast Flow(GE Healthcare公司)。对培养上清进行离心分离,除去沉淀物,用过滤器进行过滤。在柱中填充400μL的载体,用DPBS置换缓冲液。添加培养上清,使抗体吸附于单体上后,用10mL的DPBS清洗两次。添加0.4mL的IgG洗脱缓冲液(Thermo Fisher Scientific公司)进行洗脱,之后立即用0.1mL的1M Tris-HCl(NIPPON GENE公司)pH8.6进行中和。使用NAP柱(GE Healthcare公司)进行脱盐和向DPBS的缓冲液置换,用于之后的分析。将所制作的抗体的克隆名、来源和亚类示于表1。

[0510] [表1]

抗体名	来源	亚类
KM5907	小鼠	IgG1
KM5908	小鼠	IgG2a
KM5909	小鼠	IgG1
KM5911	小鼠	IgG2b
[0511] KM5915	小鼠	IgG2b
KM5916	小鼠	IgG2b
KM5954	小鼠	IgG2a
KM5955	小鼠	IgG2a
KM5956	小鼠	IgG2a

[0512] [实施例6] THP-1迁移(趋化性)检测

[0513] 作为表达CCR1的人细胞株,已知人单核细胞性白血病细胞株THP-1。已知该细胞对CCL3、CCL5、CCL15或CCL23等CCR1配体的浓度梯度显示出趋化性,使用THP-1的迁移检测是作为CCR1抑制剂的评价系统而被通用的系统。因此,对实施例5中得到的抗人CCR1抗体,也使用该实验系统来评价是否抑制由人CCL15引起的人CCR1的活化。

[0514] 迁移检测的方法如下所述。THP-1细胞从ATCC获得。将THP-1细胞在5 μ M全反式维甲酸(ATRA)(和光纯药工业公司)存在下培养3天,分化诱导后进行回收,在37 $^{\circ}$ C下用加温的检测培养基[1%FBS(Thermo Fisher Scientific公司)/RPMI1640(Nacalai Tesque公司)]清洗后,重悬于该培养基中。制备成1 \times 10⁶细胞/mL,以100 μ L/孔将细胞分注于孔径5 μ m的Transwell(Corning公司、#3421)的上层。在下层中加入添加有作为趋化因子的1ng/mL的重组人CCL15(68aa)(R&D technologies公司、#628-LK)的检测培养基,在37 $^{\circ}$ C下在5%CO₂培养箱内培养4-6小时后,利用Celltiter-Glo(普洛麦格公司)对移动至下层的细胞数进行定量。

[0515] 使用本测定系统评价纯化抗体的细胞迁移时,预先在1.5mL管内将90 μ L的细胞悬浮液与10 μ L的纯化抗体溶液混合,在37 $^{\circ}$ C下温育1小时后,将细胞分注于Traswell的上层。抗体的终浓度调节至0.3 μ g/mL、1 μ g/mL、3 μ g/mL和10 μ g/mL,用于测定。

[0516] 将所得到的结果示于图1(a)和图1(b)。如图1(a)和图1(b)所示,实施例5中得到的小鼠抗人CCR1单克隆抗体KM5907抗体、KM5908抗体、KM5909抗体、KM5911抗体、KM5915抗体、KM5916抗体、KM5954抗体、KM5955抗体和KM5956抗体均以浓度依赖的方式抑制了由活化CCL15诱导的THP-1的迁移。

[0517] 由以上表明,本发明的小鼠抗人CCR1单克隆抗体均为抑制由人CCL15引起的人CCR1的活化的抗体。

[0518] [实施例7] 抗人CCR1抗体的人CCR1结合区域的确定

[0519] 使用CCR1-CCR3嵌合受体表达细胞,通过FCM考察实施例5中得到的小鼠抗人CCR1单克隆抗体的人CCR1的结合区域。测定通过与实施例4同样的方法进行。

[0520] 作为CCR1-CCR3嵌合受体表达细胞,使用实施例2中制作的CHO-S-hCCR3、CHO-S-NC3-hCCR1、CHO-S-NC3-mCCR1和CHO-S-hCCR3_EL2hCCR1。另外,作为阴性对照,使用CHO-S。

[0521] 作为受试抗体,使用10倍稀释的各杂交瘤培养上清、现有小鼠抗人CCR1单克隆抗体53504抗体(R&D Technologies公司)和小鼠抗人CCR3单克隆抗体444-11抗体(MBL公司)。

[0522] 关于测定结果,将用某种受试抗体(各杂交瘤培养上清、53504抗体或444-11抗体)和二次抗体对某种细胞进行染色时的荧光强度除以仅用二次抗体对该细胞进行染色时的荧光强度。所得到的数值为10以上时,判定为该受试抗体与该细胞结合,小于10时,判定为该受试抗体不与该细胞结合,在表2中分别用○、×来表示。

[0523] [表2]

细胞 抗体	CHO-S-NC3-hCCR1	CHO-S-NC3-mCCR1	CHO-S-hCCR3	CHO-S-hCCR3_EL2hCCR1	CHO-S
KM5907	○	○	×	○	×
KM5908	○	○	×	○	×
KM5909	○	○	×	○	×
KM5911	○	○	×	○	×
KM5915	○	○	×	○	×
KM5916	○	○	×	○	×
KM5954	○	○	×	○	×
KM5955	○	×	×	○	×
KM5956	○	○	×	○	×
53504 抗体 (R&D 公司)	○	×	×	×	×
444-11 抗体 (MBL 公司)	×	×	○	×	×

[0524] 根据表2,小鼠抗人CCR1单克隆抗体KM5907抗体、KM5908抗体、KM5909抗体、KM5911抗体、KM5915抗体、KM5916抗体、KM5954抗体、KM5955抗体和KM5956抗体均不与CHO-S-hCCR3结合,与CHO-NC3-hCCR1和CHO-S-hCCR3_EL2hCCR1这两者结合。因此可知,本发明的小鼠抗人CCR1单克隆抗体均与人CCR1的细胞外环2结合。

[0525] [实施例8]使用现有的抗人CCR1抗体和抗人CCR1抗体的趋化性检测

[0526] (1) 现有小鼠抗人CCR1单克隆抗体2D4抗体的制备

[0527] 从ATCC获得产生作为现有的抗人CCR1抗体的2D4抗体(美国专利第6756035号说明书)的杂交瘤(LS-125-2D4-11-10-1)。使用Hybridoma-SFM(Thermo Fisher Scientific公司)对该杂交瘤进行培养,从培养上清中对抗体进行纯化。纯化使用蛋白G琼脂糖4Fast Flow(GE Healthcare公司)。对培养上清进行离心分离,将所得到的培养上清用过滤器进行过滤。在柱中填充400μL的载体,用DPBS置换缓冲液。在该柱中添加该培养上清,使抗体吸附于载体上后,用10mL的DPBS清洗两次。在该柱中添加0.4mL的IgG洗脱缓冲液(Thermo Scientific公司),使抗体洗脱,立即用0.1mL的1M Tris-Cl(Nacalai Tesque公司)pH8.6对抗体溶液进行中和。使用NAP柱(GE Healthcare公司)进行该抗体溶液的脱盐和向DPBS的缓冲液置换,用于之后的分析。

[0528] 对于纯化的2D4抗体,利用通常的方法进行还原条件下的SDS-PAGE,确认了抗体已被纯化。

[0529] 另外,按照实施例4中记载的方法通过FCM确认2D4抗体对人CCR1的结合活性。使

2D4抗体以0.1、1 μ g/mL进行反应,细胞使用CHO-S-hCCR1作为人CCR1表达细胞,使用CHO-S作为阴性对照。其结果,2D4抗体不与CHO-S结合,以浓度依赖的方式与CHO-S-hCCR1结合。因此能够确认,纯化的2D4抗体与市售的141-2抗体(MBL公司)和53504抗体(R&D Systems公司)同样地具有对人CCR1的结合性。

[0531] (2) 趋化性检测

[0532] 对于现有的抗人CCR1抗体以及实施例5中得到的小鼠抗人CCR1抗体单克隆抗体KM5908抗体和KM5916抗体,按照实施例6中记载的方法测定对人CCR1的活化进行抑制的活性,将各抗体所得到的结果进行比较。

[0533] 作为现有的抗人CCR1抗体,使用(1)中制作的2D4抗体以及市售的141-2抗体和53504抗体。

[0534] 将所得到的结果示于图2。如图2所示出,作为现有的抗人CCR1抗体的2D4抗体、141-2抗体和53504抗体均不抑制由活化CCL15诱导的THP-1细胞的迁移,另一方面,本发明的小鼠抗人CCR1单克隆抗体KM5908抗体和KM5916抗体均以浓度依赖的方式抑制上述细胞的迁移。

[0535] 如实施例6中所记载,实施例5中获得的抗人CCR1抗体均在与本实施例相同的实验条件下以抗体浓度依赖的方式抑制由活化CCL15诱导的THP-1细胞的迁移[图1(a)和图1(b)]。

[0536] 因此可知,现有的抗人CCR1抗体不抑制由人CCL15引起的人CCR1的活化,另一方面,实施例5中得到的小鼠抗人CCR1单克隆抗体KM5907抗体、KM5908抗体、KM5909抗体、KM5911抗体、KM5915抗体、KM5916抗体、KM5954抗体、KM5955抗体和KM5956抗体均为抑制由人CCL15引起的人CCR1的活化的抗体。

[0537] [实施例9]基因重组抗体的制作

[0538] (1) 抗体可变区基因的克隆和序列确定

[0539] 使用Trizol(Life Technologies公司)从实施例5中克隆的杂交瘤中提取总RNA,利用5'-RACE法对抗体基因进行扩增。RACE用cDNA的合成中使用SMARTer RACE试剂盒(Clontech公司)。通过使用对于在RACE用cDNA合成过程中附加的序列具有特异性的引物和小鼠Ig γ 链或 κ 链扩增用引物(序列号11-14)的PCR扩增抗体可变区片段,进行克隆并对该DNA片段的碱基序列进行确认。

[0540] 对于实施例5中得到的各抗人CCR1抗体,将表示编码重链和轻链的可变区的氨基酸序列的碱基序列、由该碱基序列推定的氨基酸序列和由该氨基酸序列除去了信号序列的氨基酸序列的序列号分别示于表3。此外,将表示本发明的各抗体的CDR的氨基酸序列的序列号分别示于表4。

[0541] [表3]

抗体	VH			VL		
	碱基序列	氨基酸序列	除去信号序列外的氨基酸序列	碱基序列	氨基酸序列	除去信号序列外的氨基酸序列
[0542] KM5907	序列号 15	序列号 16	序列号 51	序列号 17	序列号 18	序列号 52
KM5908	序列号 19	序列号 20	序列号 53	序列号 21	序列号 22	序列号 54
KM5909	序列号 23	序列号 24	序列号 55	序列号 25	序列号 26	序列号 56
KM5911	序列号 27	序列号 28	序列号 57	序列号 29	序列号 30	序列号 58
KM5915	序列号 31	序列号 32	序列号 59	序列号 33	序列号 34	序列号 60
KM5916	序列号 35	序列号 36	序列号 61	序列号 37	序列号 38	序列号 62
KM5954	序列号 39	序列号 40	序列号 63	序列号 41	序列号 42	序列号 64
KM5955	序列号 43	序列号 44	序列号 65	序列号 45	序列号 46	序列号 66
KM5956	序列号 47	序列号 48	序列号 67	序列号 49	序列号 50	序列号 68

[0543] [表4]

	VH			VL		
	CDR1	CDR2	CDR3	CDR1	CDR2	CDR3
[0544] KM5907	序列号 69	序列号 70	序列号 71	序列号 72	序列号 73	序列号 74
KM5908	序列号 75	序列号 76	序列号 77	序列号 78	序列号 79	序列号 80
KM5909	序列号 81	序列号 82	序列号 83	序列号 84	序列号 85	序列号 86
KM5911	序列号 87	序列号 88	序列号 89	序列号 90	序列号 91	序列号 92
KM5915	序列号 93	序列号 94	序列号 95	序列号 96	序列号 97	序列号 98
KM5916	序列号 99	序列号 100	序列号 101	序列号 102	序列号 103	序列号 104
KM5954	序列号 105	序列号 106	序列号 107	序列号 108	序列号 109	序列号 110
KM5955	序列号 111	序列号 112	序列号 113	序列号 114	序列号 115	序列号 116
KM5956	序列号 117	序列号 118	序列号 119	序列号 120	序列号 121	序列号 122

[0545] (2) 嵌合抗体的表达载体的制作

[0546] 对于实施例5中制作的各抗人CCR1抗体,通过以下记载的方法制作将恒定区置换为包含S228P、L235E和R409K的氨基酸改造的人IgG4恒定区(人IgG4PE_R409K)的嵌合抗体。以(1)中制作的克隆了编码各抗体的可变区的氨基酸序列的碱基序列的质粒DNA作为模板,通过使用附加有同源重组用的碱基序列的引物的PCR对编码各抗体的可变区的氨基酸序列的碱基序列进行扩增。使用In-Fusion HD克隆试剂盒(Clontech公司),将该碱基序列与N5KG4PE R409K载体[将N5KG1载体(美国专利第6001358号说明书)中的编码人IgG1的恒定区的碱基序列置换为编码包含上述氨基酸改造的突变人IgG4的恒定区的碱基序列的载体(以下记为N5KG4PE R409K载体)]连接,制作嵌合抗体的表达载体。实验的过程按照试剂盒附带的操作说明来进行。

[0547] (3) 嵌合抗体的产生和纯化

[0548] 使用(2)中制作的表达载体和Expi293表达系统(Life Technologies公司),产生嵌合抗体。过程按照附带的操作说明如下进行。将Expi293F细胞(Thermo Fisher Scientific公司)以 2×10^6 细胞/mL的密度在37°C下培养24小时,然后对每一反应在42.5mL的Expi293表达培养基(Thermo Fisher Scientific公司)中添加 1.25×10^8 细胞。在Opti-MEM(Thermo Fisher Scientific公司)中添加50 μ g的质粒DNA和ExpiFectamin 293试剂(Thermo Fisher Scientific公司),静置30分钟后,将该质粒溶液添加至上述的细胞液中。进一步培养一晚后,在该细胞液中添加ExpiFectamin 293转染增强剂(培养体积总计为50mL)。将该细胞液培养7~10天后,回收培养上清。

[0549] 抗体的纯化使用蛋白G琼脂糖4Fast Flow(GE Healthcare公司)。将回收的培养上清离心分离,用过滤器对所得到的培养上清进行过滤。在柱中填充400 μ L的载体,用DPBS置

换缓冲液。在该柱中添加培养上清,使抗体吸附于单体上后,用10mL的DPBS将该柱清洗两次。在该柱中添加0.4mL的IgG洗脱缓冲液(Thermo Scientific公司),使抗体洗脱,立即在该抗体溶液中加入0.1mL的1M Tris-Cl pH8.6进行中和。使用NAP柱(GE Healthcare公司)对该抗体溶液进行脱盐,用于之后的分析。

[0550] 将这样得到的小鼠抗人CCR1单克隆抗体KM5907抗体、KM5908抗体、KM5909抗体、KM5911抗体、KM5915抗体、KM5916抗体、KM5954抗体、KM5955抗体和KM5956抗体的嵌合抗体分别记为chKM5907抗体、chKM5908抗体、chKM5909抗体、chKM5911抗体、chKM5915抗体、chKM5916抗体、chKM5954抗体、chKM5955抗体和chKM5956抗体。

[0551] [实施例10]嵌合抗体的结合性的评价

[0552] 对于实施例9中制作的嵌合抗体chKM5907抗体、chKM5908抗体、chKM5909抗体、chKM5911抗体、chKM5915抗体、chKM5916抗体、chKM5954抗体、chKM5955抗体和chKM5956抗体,按照实施例4中记载的方法通过FCM测定抗体对人和小鼠CCR1的结合性。作为人CCR1表达细胞和小鼠CCR1表达细胞,分别使用实施例2中制作的CHO-S-hCCR1、CHO-S-mCCR1。其结果, chKM5955抗体显示出与人CCR1的结合。其他嵌合抗体显示出与人和小鼠CCR1两者的结合。

[0553] [实施例11]使用嵌合抗体的趋化性检测

[0554] 对于实施例9中制作的嵌合抗体chKM5907抗体、chKM5908抗体、chKM5909抗体、chKM5911抗体、chKM5915抗体、chKM5916抗体、chKM5954抗体、chKM5955抗体和chKM5956抗体,按照实施例6中记载的方法进行抑制人CCR1活化的活性测定。其结果表明,任何一种嵌合抗体均抑制由活化人CCL15引起的THP-1的迁移。

[0555] [实施例12]置换了VL的chKM5908抗体改造体的制作

[0556] 为了进一步对chKM5908抗体进行改良,研究了将chKM5908抗体的VL置换为其他抗CCR1嵌合抗体的VL的抗体的制作。作为进行置换的VL,基于利用实施例5中记载的方法获得的小鼠抗人CCR1抗体,对多种利用实施例10中记载的方法制作的嵌合抗体的VL进行了研究。其中,以下记载了将按照THP-1迁移活性等基准筛选出的、VL被置换为chKM5914抗体的VL而得到的chKM5908抗体改造体的制作。

[0557] (1) VL置换嵌合抗体的设计

[0558] 进行置换的chKM5914的VL由于与chKM5908的VL的氨基酸序列的同源性高而被选择。将编码chKM5914抗体的VL的氨基酸序列的碱基序列、由该碱基序列推定的包含信号序列的氨基酸序列和从该氨基酸序列中除外信号序列的氨基酸序列分别示于序列号123、124和125。另外,将chKM5914抗体的VL的CDR1~3的氨基酸序列分别示于序列号126~128。

[0559] (2) 表达载体的制作

[0560] 以克隆了编码chKM5914抗体的VL可变区的氨基酸序列的碱基序列的质粒DNA作为模板,通过使用附加有同源重组用的碱基序列的引物的PCR对编码各抗体的VL可变区的氨基酸序列的碱基序列进行扩增。对chKM5908 VH可变区也同样地进行扩增。使用In-Fusion HD克隆试剂盒(Clontech公司),将该碱基序列与N5hK载体(L链用表达载体)或N5hG4PE_R409K载体(H链用表达载体)连接,制作嵌合抗体的表达载体。实验的过程按照试剂盒附带的操作说明来进行。对大肠杆菌DH5 α 感受态细胞(宝生物公司)进行转化,确认所得到的质粒的序列。筛选出产生插入了正确的碱基序列的质粒的大肠杆菌的菌落,使用NucleoBond

Xtra Midi EF试剂盒(宝生物公司)制备质粒。

[0561] (3) VL置换嵌合抗体的产生和纯化

[0562] 使用Expi293表达系统(Life Technologies公司)使目标VL置换嵌合抗体进行瞬时性表达。质粒导入的方法按照附带的资料进行。轻链的表达载体与重链的表达载体以1:2的比率混合而导入。将质粒导入后的细胞在120mL的培养液中在37°C、5%CO₂、125rpm的条件下培养3天。然后,进行细胞培养悬浮液的离心分离,在0.2μm过滤器(Thermo Scientific公司)中通过并回收培养上清。通过使用MabSelect SuRe(GE Healthcare公司)的亲纯化从培养上清中获得纯化抗体。

[0563] 具体而言,用PBS将填充于柱中的树脂平衡化后,在该柱中添加培养上清,用PBS清洗两次,用洗涤缓冲液1(PBS中的1M NaCl)、洗涤缓冲液2(20mM柠檬酸、50mM NaCl、pH5.0)各清洗一次后,使用洗脱缓冲液(20mM柠檬酸、50mM NaCl、pH3.4)将抗体洗脱。

[0564] 在所得到的抗体溶液中加入1/10量的中和缓冲液(1M磷酸-NaOH、pH7.0)进行中和,使用NAP25(GE Healthcare公司)将抗体溶液的溶剂置换为PBS。对于缓冲液置换后的抗体溶液,使用Amicon Ultra-4离心过滤单元(Millipore公司)进行基于超滤的浓缩,使用Nanodrop(Thermo Scientific公司)测定吸光度A₂₈₀,进行抗体溶液的浓度的测定和调节。在下文的记述中将这样得到的包含chKM5908抗体的VH和chKM5914抗体的VL的嵌合抗体改造体记为chKM5908'抗体。

[0565] [实施例13] chKM5908'抗体的抗原结合活性和THP-1迁移抑制活性的评价

[0566] 通过使用实施例2中制作的CHO-S-hCCR1细胞的流式细胞术,对作为VL置换嵌合抗体的chKM5908'抗体的抗原结合活性进行测定。离心分离并收集细胞,除去上清,在包含2%胎牛血清(FBS)、0.05%NaN₃和1mM EDTA的PBS(染色介质、以下简称SM)中悬浮。接着,按照细胞数为每一孔1×10⁵个的方式接种至96孔板中,添加10000、2000、400、80、16和3.2ng/mL的各最终浓度的chKM5908'抗体,在4°C下进行60分钟的反应。用SM清洗细胞后,添加用SM稀释至500倍的山羊F(ab')₂抗人IgG PE(γ链特异性)(Southern Biotech公司),在4°C下进行60分钟的反应。用SM清洗细胞后,将细胞重悬在50μL的SM中,利用流式细胞术(FACS CantoII、BD Bioscience公司)测定荧光强度。

[0567] 数据利用FlowJo 7.65(Tomy Digital Biology公司)进行分析,根据各浓度下的几何平均值对结合强度进行比较。其结果可知,chKM5908'抗体对CHO-S-hCCR1细胞具有与chKM5908同等的结合活性。

[0568] 另外,对于chKM5908'抗体,利用实施例6中所示的方法进行THP-1迁移抑制活性的测定。抗体浓度以1μg/mL的浓度进行添加。其结果,如图3所示,可知chKM5908'抗体具有与chKM5908抗体同等以上的THP-1迁移抑制活性。

[0569] [实施例14] CDR改造chKM5908'抗体改造体的制作和评价

[0570] (1) 对CDR的氨基酸进行了改造的嵌合抗体改造体的制作和评价

[0571] 基于chKM5908'抗体,尝试进一步进行CDR改造。将所设计的chKM5908 VH的改造VH示于表5。另外,将所设计的chKM5914 VL的改造VL示于表6。此外,将它们组合而成的CDR改造嵌合抗体改造体示于表7。

[0572] [表5]

改造 VH	改造后的 CDR	改造前的氨基酸序列	改造部位	改造后的氨基酸残基
5908VH-m1	VH CDR2	序列号 76	第 2 位的异亮氨酸	苏氨酸
5908VH-m2	VH CDR2	序列号 76	第 9 位的缬氨酸	丙氨酸
5908VH-m3	VH CDR2	序列号 76	第 14 位的苯丙氨酸	丙氨酸
5908VH-m4	VH CDR2	序列号 76	第 15 位的异亮氨酸	丙氨酸
5908VH-m5	VH CDR3	序列号 77	第 5 位的酪氨酸	丙氨酸
5908VH-m6	VH CDR3	序列号 77	第 7 位的苏氨酸	丙氨酸
5908VH-m7	VH CDR2 VH CDR2 VH CDR2	序列号 76 序列号 76 序列号 76	第 2 位的异亮氨酸 第 9 位的缬氨酸 第 15 位的异亮氨酸	苏氨酸 丙氨酸 丙氨酸
5908VH-m8	VH CDR2 VH CDR2 VH CDR3 VH CDR3	序列号 76 序列号 76 序列号 77 序列号 77	第 2 位的异亮氨酸 第 15 位的异亮氨酸 第 5 位的酪氨酸 第 7 位的苏氨酸	苏氨酸 丙氨酸 丙氨酸 丙氨酸
5908VH-m9	VH CDR2 VH CDR2 VH CDR3	序列号 76 序列号 76 序列号 77	第 2 位的异亮氨酸 第 15 位的异亮氨酸 第 7 位的苏氨酸	苏氨酸 丙氨酸 丙氨酸
5908VH-m10	VH CDR2 VH CDR2	序列号 76 序列号 76	第 2 位的异亮氨酸 第 15 位的异亮氨酸	苏氨酸 丙氨酸
5908VH-m11	VH CDR2 VH CDR3 VH CDR3	序列号 76 序列号 77 序列号 77	第 2 位的异亮氨酸 第 5 位的酪氨酸 第 7 位的苏氨酸	苏氨酸 丙氨酸 丙氨酸
5908VH-m12	VH CDR2 VH CDR3	序列号 77 序列号 77	第 2 位的异亮氨酸 第 5 位的酪氨酸	苏氨酸 丙氨酸

[0574] [表6]

改造 VL	改造后的 CDR	改造前的氨基酸序列	改造部位	改造后的氨基酸残基
5914VL-m1	VL CDR1	序列号 126	第 15 位的苯丙氨酸	丙氨酸
5914VL-m2	VL CDR2	序列号 127	第 2 位的缬氨酸	异亮氨酸
5914VL-m3	VL CDR2	序列号 127	第 5 位的精氨酸	赖氨酸
5914VL-m4	VL CDR1 VL CDR2	序列号 126 序列号 127	第 15 位的苯丙氨酸 第 2 位的缬氨酸	丙氨酸 异亮氨酸

[0576] [表7]

抗体	VH	VL
chKM5908'	5908VH	5914VL
chKM5908' mut01	5908VH	5914VL-m1
chKM5908' mut02	5908VH	5914VL-m2
chKM5908' mut03	5908VH	5914VL-m3
chKM5908' mut04	5908VH	5914VL-m4
chKM5908' mut05	5908VH-m1	5914VL
chKM5908' mut06	5908VH-m2	5914VL
chKM5908' mut07	5908VH-m3	5914VL
chKM5908' mut08	5908VH-m4	5914VL
chKM5908' mut09	5908VH-m5	5914VL
chKM5908' mut10	5908VH-m6	5914VL
chKM5908' mut11	5908VH-m7	5914VL
chKM5908' mut12	5908VH-m8	5914VL
chKM5908' mut13	5908VH-m9	5914VL

chKM5908' mut14	5908VH-m10	5914VL
chKM5908' mut15	5908VH-m11	5914VL
chKM5908' mut16	5908VH-m12	5914VL
chKM5908' mut17	5908VH-m1	5914VL-m1
chKM5908' mut18	5908VH-m3	5914VL-m1
chKM5908' mut19	5908VH-m7	5914VL-m1
chKM5908' mut20	5908VH-m8	5914VL-m1
chKM5908' mut21	5908VH-m1	5914VL-m2
chKM5908' mut22	5908VH-m3	5914VL-m2
chKM5908' mut23	5908VH-m7	5914VL-m2
chKM5908' mut24	5908VH-m8	5914VL-m2
chKM5908' mut25	5908VH-m1	5914VL-m3
chKM5908' mut26	5908VH-m3	5914VL-m3
chKM5908' mut27	5908VH-m7	5914VL-m3
chKM5908' mut28	5908VH-m8	5914VL-m3
chKM5908' mut29	5908VH-m1	5914VL-m4
chKM5908' mut30	5908VH-m3	5914VL-m4
chKM5908' mut31	5908VH-m7	5914VL-m4
chKM5908' mut32	5908VH-m8	5914VL-m4

[0578] 通过全合成或者通过使用导入了相应突变的引物的装配PCR来制作用于表达这些嵌合抗体改造体所需要的碱基序列,使用实施例12-(2)中所示的方法导入至表达载体中,制作所需要的质粒。接着,使用实施例12-(3)中所示的方法获得嵌合抗体改造体。

[0579] 使用实施例13中所示的方法对所得到的CDR改造嵌合抗体改造体分别测定抗原结合活性,将与同种型对照嵌合抗体[使用Mol Immunol. 1996Jun; 33 (9) :759-68.中记载的编码DNP-1抗体的VL和VH(GenBank登记号:VL U16688、VH U116687)的载体,按照实施例12-(3)中记载的方法制作的抗体;以下记为chDNP1)]相比显示出10倍以上的荧光强度的抗体判定为与人CCR1结合。其结果可知,任何一种CDR改造嵌合抗体改造体从抗体浓度为至少80ng/mL开始均显示出对人CCR1的结合性。

[0580] 另外,使用实施例13中所示的方法对各个CDR改造抗体进行THP-1迁移抑制活性的评价。其结果可知,任何一种CDR改造嵌合抗体改造体均抑制由活化人CCL15引起的THP-1的迁移。

[0581] 对于chKM5908' mut02、chKM5908' mut22和chKM5908' mut25,进一步在抗体浓度为10 μ g/mL、3 μ g/mL、1 μ g/mL、0.75 μ g/mL、0.5 μ g/mL、0.3 μ g/mL、0.1 μ g/mL和0.05 μ g/mL的条件下进行THP-1迁移抑制活性的测定。将结果示于图4。

[0582] 如图4所示,任何一种抗体均以抗体浓度依赖的方式抑制THP-1细胞迁移。另外可知,chKM5908' mut22与chKM5908'、chKM5908' mut02和chKM5908' mut25相比具有同等或更高的抑制活性。

[0583] 在下文的记述中,将chKM5908' mut22记为mAb5-06。将mAb5-06的VH和VL的碱基序列和氨基酸序列以及VH和VL各自的CDR1~3的氨基酸序列的序列号示于表8。

[0584] [表8]

[0585]	碱基序列	氨基酸序列	CDR1氨基酸序列	CDR2氨基酸序列	CDR3氨基酸序列
VH	序列号129	序列号130	序列号75	序列号131	序列号77
VL	序列号132	序列号133	序列号126	序列号134	序列号128

[0586] [实施例15]mAb5-06、chKM5907和chKM5916的人源化抗体的轻链和重链可变区的设计

[0587] (1) mAb5-06人源化抗体的VL和VH的氨基酸序列的设计

[0588] 利用以下记载的方法设计mAb5-06人源化抗体的各种VL和VH的氨基酸序列。在下文的记述中,将具有各种VL、VH的氨基酸序列的mAb5-06人源化抗体的总称记为hzmAb5-06抗体。对于VL和VH,分别比较mAb5-06抗体的FR的氨基酸序列与由Kabat等人[Sequences of Proteins of Immunological Interest (免疫学关注的蛋白质序列)、美国卫生与公众服务部(1991)]报道的人FR共有序列的同源性。其结果,人亚群L链II(hSGLII)和人亚群H链II(hSGHII)分别与mAb5-06抗体的VL和VH的FR的氨基酸序列的同源性最高。

[0589] 因此,在hSGLII的FR的氨基酸序列的适当位置分别移植序列号126、134和128所表示的mAb5-06 VL的CDR1~3的氨基酸序列,设计出hzmAb5-06 LV0(序列号135)。另外,在hSGHII的FR的氨基酸序列的适当位置分别移植序列号75、131和77所表示的mAb5-06 VH的CDR1~3的氨基酸序列,设计出hzmAb5-06 HV0(序列号136)。

[0590] 如上所述设计的hzmAb5-06 LV0和hzmAb5-06 HV0是仅将作为小鼠来源抗体的CDR改造体的mAb5-06来源的CDR的氨基酸序列移植至所选择的人抗体的FR的氨基酸序列中而得到的氨基酸序列。但是,通常,在制作人源化抗体的情况下,仅将啮齿类来源抗体的CDR的氨基酸序列移植至人抗体的FR的氨基酸序列中时,人源化抗体的生物活性大多会降低。为了避免这样的结合活性的降低,在CDR的氨基酸序列的移植的同时,对在人抗体与啮齿类抗体之间存在差异的FR的氨基酸残基中被认为对抗体的结合活性产生影响的氨基酸残基进行改造。因此,本实施例中,也如下对被认为对抗体的结合活性产生影响的FR的氨基酸残基进行了鉴定、改造。

[0591] 在下文的记述中,将上述中设计的VL、VH分别具有hzmAb5-06 LV0和hzmAb5-06 HV0的抗体记为hzmAb5-06 LV0HV0抗体或简记为hzmAb5-06 LV0HV0。对其他hzmAb5-06抗体也用同样的方法进行记载。使用计算机建模的方法构建hzmAb5-06 LV0HV0抗体的可变区的三维结构。

[0592] 三维结构坐标制作和三维结构的表示使用Discovery Studio(BIOVIA公司)。另外,mAb5-06抗体的可变区的三维结构的计算机模型也同样地进行构建。进一步,制作将hzmAb5-06 LV0HV0抗体的VL和VH的FR的氨基酸序列中与mAb5-06抗体不同的氨基酸残基置换为存在于mAb5-06抗体的相同部位的氨基酸残基而得到的氨基酸序列,同样地构建三维结构模型。对这些制作出的mAb5-06抗体、hzmAb5-06 LV0HV0抗体和改造体的可变区的三维结构进行比较,鉴定出预测对抗体的结合活性产生影响的氨基酸残基。

[0593] 其结果,作为在hzmAb5-06 LV0HV0抗体的可变区的FR的氨基酸残基中被认为改变抗原结合部位的三维结构对抗体的结合活性产生影响的氨基酸残基,在VL中选择出序列号135所表示的氨基酸序列的第2位的Ile、第15位的Pro、第50位的Gln、第92位的Tyr、第109位的Val,在VH中选择出序列号136所表示的氨基酸序列的第6位的Glu、第20位的Leu、第27

位的Gly、第29位的Val、第30位的Ser、第37位的Ile、第48位的Ile、第67位的Val、第71位的Val、第73位的Thr、第76位的Asn、第78位的Phe、第80位的Leu、第82位的Leu、第85位的Val、第92位的Val、第97位的Arg。将这些选择出的氨基酸残基中的至少一个以上的氨基酸残基置换为存在于mAb5-06抗体的相同部位的氨基酸残基,设计出具有各种改造的人源化抗体的VL和VH。

[0594] 具体而言,对于VL,导入将序列号135所表示的氨基酸序列的第2位的Ile置换为Val、将第15位的Pro置换为Leu、将第50位的Gln置换为Lys、将第92位的Tyr置换为Phe、以及将第109位的Val置换为Leu的氨基酸改造中的至少一种改造。由此,作为hzmAb5-06抗体的VL,设计出hzmAb5-06 LV0(序列号135)、LV1a(序列号137)、LV1b(序列号138)、LV2a(序列号139)、LV2b(序列号140)、LV4(序列号141)和LV5(序列号142),将各自的氨基酸序列示于图5。

[0595] 另外,对于VH,导入将序列号136所表示的氨基酸序列的第6位的Glu置换为Gln、将第20位的Leu置换为Ile、将第27位的Gly置换为Phe、将第29位的Val置换为Leu、将第30位的Ser置换为Asn、将第37位的Ile置换为Val、将第48位的Ile置换为Leu、将第67位的Val置换为Leu、将第71位的Val置换为Lys、将第73位的Thr置换为Asp、将第76位的Asn置换为Ser、将第78位的Phe置换为Val、将第80位的Leu置换为Phe、将第82位的Leu置换为Met、将第85位的Val置换为Leu、将第92位的Val置换为Ile、以及将第97位的Arg置换为Lys的氨基酸改造中的至少一种改造。由此,作为hzmAb5-06抗体的VH,设计出hzmAb5-06 HV0(序列号136)、HV14(序列号143)和HV17(序列号144),将各自的氨基酸序列示于图6。

[0596] (2) chKM5907人源化抗体的VL和VH的氨基酸序列的设计

[0597] 对于chKM5907人源化抗体的各种VL和VH的氨基酸序列,也利用与实施例15(1)同样的方法进行设计。在下文的记述中,将具有各种VL、VH的氨基酸序列的chKM5907人源化抗体的总称记为hzKM5907抗体。在GenBank登记号ABG38363.1(免疫球蛋白轻链可变区、部分[智人])所表示的人抗体的VL的FR的氨基酸序列的适当位置移植KM5907抗体的VL的CDR1~3的氨基酸序列(分别为序列号72、73和74),由此设计出hzKM5907 LV0(序列号145)。

[0598] 另外,在结合有人重链V区胚系VH3-23(FR1~3)和hSGHI(FR4)的人抗体的FR的氨基酸序列的适当位置移植KM5907抗体VH的CDR1~3的氨基酸序列(分别为序列号69、70和71),由此设计出hzKM5907 HV0(序列号146)。

[0599] 对于被认为对hzKM5907抗体的结合活性产生影响的FR的氨基酸残基,也利用与hzmAb5-06抗体的情况下同样的方法分别对VL、VH进行选择。将选择出的氨基酸残基中的至少一个以上的氨基酸序列置换为存在于KM5907抗体的相同部位的氨基酸残基,设计出具有各种改造的人源化抗体的VL和VH。

[0600] 具体而言,对于VL,导入将序列号145所表示的氨基酸序列的第2位的Ile置换为Val、将第15位的Ser置换为Leu、将第19位的Ala置换为Val、将第43位的Gln置换为Lys、将第50位的Gln置换为Lys、以及将第109位的Val置换为Leu的氨基酸改造中的至少一种改造。由此,作为hzKM5907抗体的VL,设计出hzKM5907 LV0(序列号145)、LV1a(序列号147)、LV1b(序列号148)、LV1c(序列号149)、LV2a(序列号150)、LV2b(序列号151)、LV4(序列号152)和LV6(序列号153),将各自的氨基酸序列示于图7。

[0601] 另外,对于VH,导入将序列号146所表示的氨基酸序列的第4位的Leu置换为Val、将

第44位的Gly置换为Arg、将第49位的Ser置换为Ala、将第92位的Ala置换为Gly、将第93位的Val置换为Met、将第97位的Ala置换为Thr、以及将第98位的Lys置换为Arg的氨基酸改造中的至少一种改造。由此,作为hzKM5907抗体的VH,设计出hzKM5907 HV0(序列号146)、HV1(序列号154)、HV2a(序列号155)、HV2b(序列号156)、HV3a(序列号157)、HV3b(序列号158)、HV3c(序列号159)、HV4(序列号160)和HV7(序列号161),将各自的氨基酸序列示于图8。

[0602] 在下文的记述中,将VL、VH分别具有hzKM5907 LV0和hzKM5907 HV0的抗体记为hzKM5907 LV0HV0抗体或hzKM5907 LV0HV0。对其他hzKM5907抗体也用同样的方法进行记载。

[0603] (3) chKM5916人源化抗体的VL和VH的氨基酸序列的设计

[0604] 对于chKM5916人源化抗体的各种VL和VH的氨基酸序列,也利用与实施例15(1)同样的方法进行设计。在下文的记述中,将具有各种VL、VH的氨基酸序列的chKM5916人源化抗体的总称记为hzKM5916抗体。在PIR登记号S52789(Igk链V区-人(片段))所表示的人抗体的VL的FR的氨基酸序列的适当位置移植KM5916抗体的VL的CDR1~3的氨基酸序列(分别为序列号102、103和104),由此设计出hzKM5916 LV0(序列号162)。

[0605] 另外,在GenBank登记号AAX82494.1(抗恶性疟原虫裂殖子表面蛋白3免疫球蛋白重链可变区、部分[智人])所表示的人抗体的VH的FR的氨基酸序列的适当位置移植KM5916抗体VH的CDR1~3的氨基酸序列(分别为序列号99、100和101),由此设计出hzKM5916 HV0(序列号163)。

[0606] 对于被认为对hzKM5916抗体的结合活性产生影响的FR的氨基酸残基,也利用与hzmAb5-06抗体的情况下同样的方法分别对VL、VH进行选择。将选择出的氨基酸残基中的至少一个以上的氨基酸序列置换为存在于KM5916抗体的相同部位的氨基酸残基,设计出具有各种改造的人源化抗体的VL和VH。

[0607] 具体而言,对于VL,导入将序列号162所表示的氨基酸序列的第38位的Gln置换为His、以及将第43位的Ala置换为Gly的氨基酸改造中的至少一种改造。由此,作为hzKM5916抗体的VL,设计出hzKM5916 LV0(序列号162)和LV2(序列号164),将各自的氨基酸序列示于图9。

[0608] 另外,对于VH,导入将序列号163所表示的氨基酸序列的第42位的Asp置换为Glu、将第87位的Lys置换为Arg、以及将第97位的Ala置换为Thr的氨基酸改造中的至少一种改造。由此,作为hzKM5916抗体的VH,设计出hzKM5907 HV0(序列号163)、HV1(序列号165)和HV3(序列号166),将各自的氨基酸序列示于图10。

[0609] 在下文的记述中,将VL、VH分别具有hzKM5916 LV0和hzKM5916 HV0的抗体记为KM5916 LV0HV0抗体或hzKM5916LV0HV0。对其他hzKM5916抗体也用同样的方法进行记载。

[0610] (4) 人源化抗体的可变区基因的设计

[0611] 使用在动物细胞中高频使用的密码子,设计出编码表9中所示的人源化抗体(hzmAb5-06抗体、hzKM5907抗体、hzKM5916抗体)的可变区的氨基酸序列的碱基序列。

[0612] [表9]

[0613]

人源化抗体		VL氨基酸序列	VH氨基酸序列
hzmAb5-06	LV0HV17	序列号 135	序列号 144
	LV1aHV17	序列号 137	序列号 144
	LV1bHV17	序列号 138	序列号 144
	LV2aHV17	序列号 139	序列号 144
	LV2bHV17	序列号 140	序列号 144
	LV4HV17	序列号 141	序列号 144
	LV5HV17	序列号 142	序列号 144
	LV5HV14	序列号 142	序列号 143
hzmAb5907	LV0HV0	序列号 145	序列号 146
	LV1aHV0	序列号 147	序列号 146
	LV1bHV0	序列号 148	序列号 146
	LV1cHV0	序列号 149	序列号 146
	LV2aHV0	序列号 150	序列号 146
	LV2bHV0	序列号 151	序列号 146
	LV4HV0	序列号 152	序列号 146
	LV6HV0	序列号 153	序列号 146
	LV0HV7	序列号 145	序列号 161
	LV1aHV7	序列号 147	序列号 161
	LV1bHV7	序列号 148	序列号 161
	LV1cHV7	序列号 149	序列号 161
	LV2aHV7	序列号 150	序列号 161
	LV2bHV7	序列号 151	序列号 161
	LV4HV7	序列号 152	序列号 161
	LV6HV7	序列号 153	序列号 161
	LV2bHV1	序列号 151	序列号 154
	LV2bHV2a	序列号 151	序列号 155
	LV2bHV2b	序列号 151	序列号 156
	LV2bHV3a	序列号 151	序列号 157
	LV2bHV3b	序列号 151	序列号 158
	LV2bHV3c	序列号 151	序列号 159
	LV2bHV4	序列号 151	序列号 160
	hzmAb5916	LV0HV0	序列号 162
LV2HV0		序列号 164	序列号 163
LV0HV1		序列号 162	序列号 165
LV2HV1		序列号 164	序列号 165
LV0HV3		序列号 162	序列号 166
LV2HV3		序列号 164	序列号 166

[0614] [实施例16]人源化抗体的制作和评价

[0615] 使用实施例12-(2)中所示的方法将实施例15-(4)中设计的碱基序列导入至表达载体中,制作所需要的质粒。其中,作为VL表达载体,使用具有信号序列和人 κ 链恒定区序列的pCI-0tCMV_hK载体,作为VH表达载体,使用具有信号序列和人 γ 链恒定区序列的pCI-0tCAG_hG4PE (R409K)载体。

[0616] 接着,使用实施例12-(3)中所示的方法进行改造抗体的获得。通过SDS-PAGE进行品质确认后,使用实施例13中所示的方法进行抗原结合活性的测定,将与同种型对照人源化抗体[是基于chDNP1、按照实施例15中记载的方法进行设计(使用共有序列作为人FR序列)、按照实施例12-(3)中记载的方法制作得到的抗体,具有分别由序列号167和168所表示的氨基酸序列构成的VL和VH;以下记为hzDNP1)]相比显示出10倍以上的荧光强度的抗体判定为与人CCR1结合。其结果可知,任何一种人源化抗体从抗体浓度为至少80ng/mL开始均显示出对人CCR1的结合性。

[0617] 接着,对所制作的全部人源化抗体进行THP-1迁移抑制活性的评价。其结果可知,任何一种人源化抗体均具有THP-1迁移抑制活性。对于hzmAb5-06 LV5HV14、hzKM5907 LV2bHV3a和hzKM5916 LV2HV0,进一步在抗体浓度为10 μ g/mL、3 μ g/mL、1 μ g/mL、0.75 μ g/mL、0.5 μ g/mL、0.3 μ g/mL、0.1 μ g/mL和0.05 μ g/mL的条件下评价THP-1迁移抑制活性。其结果,如图11所示,任何一种人源化抗体在抗体浓度为0.3 μ g/mL以上时均显示出THP-1迁移抑制活性。

[0618] 参考特定的方式详细地对本发明进行了说明,但对于本领域技术人员而言显而易见的是,可以在不脱离本发明的精神和范围的情况下进行各种变更和修正。需要说明的是,本申请基于2017年7月18日提交的日本专利申请(日本特愿2017-139157),通过引用对其全部内容进行援引。另外,在此引用的所有参考作为整体并入本说明书中。

[0619] 序列自由文本

[0620] 序列号6-人工序列的说明:NC3-hCCR1的碱基序列

[0621] 序列号7-人工序列的说明:NC3-mCCR1的碱基序列

[0622] 序列号8-人工序列的说明:hCCR3_EL2hCCR1的碱基序列

[0623] 序列号9-人工序列的说明:hCCR3_EL2mCCR1的碱基序列

[0624] 序列号10-人工序列的说明:N末端hCCR1肽的氨基酸序列

[0625] 序列号11-人工序列的说明:引物_小鼠_ γ _r1的碱基序列

[0626] 序列号12-人工序列的说明:引物_小鼠_ γ _r2的碱基序列

[0627] 序列号13-人工序列的说明:引物_小鼠_ κ _r1的碱基序列

[0628] 序列号14-人工序列的说明:引物_小鼠_ κ _r2的碱基序列

[0629] 序列号51-人工序列的说明:除信号序列外的KM5907 VH的氨基酸序列

[0630] 序列号52-人工序列的说明:除信号序列外的KM5907 VL的氨基酸序列

[0631] 序列号53-人工序列的说明:除信号序列外的KM5908 VH的氨基酸序列

[0632] 序列号54-人工序列的说明:除信号序列外的KM5908 VL的氨基酸序列

[0633] 序列号55-人工序列的说明:除信号序列外的KM5909 VH的氨基酸序列

[0634] 序列号56-人工序列的说明:除信号序列外的KM5909 VL的氨基酸序列

[0635] 序列号57-人工序列的说明:除信号序列外的KM5911 VH的氨基酸序列

[0636] 序列号58-人工序列的说明:除信号序列外的KM5911 VL的氨基酸序列

[0637] 序列号59-人工序列的说明:除信号序列外的KM5915 VH的氨基酸序列

[0638] 序列号60-人工序列的说明:除信号序列外的KM5915 VL的氨基酸序列

[0639] 序列号61-人工序列的说明:除信号序列外的KM5916 VH的氨基酸序列

[0640] 序列号62-人工序列的说明:除信号序列外的KM5916 VL的氨基酸序列

- [0641] 序列号63-人工序列的说明:除信号序列外的KM5954 VH的氨基酸序列
- [0642] 序列号64-人工序列的说明:除信号序列外的KM5954 VL的氨基酸序列
- [0643] 序列号65-人工序列的说明:除信号序列外的KM5955 VH的氨基酸序列
- [0644] 序列号66-人工序列的说明:除信号序列外的KM5955 VL的氨基酸序列
- [0645] 序列号67-人工序列的说明:除信号序列外的KM5956 VH的氨基酸序列
- [0646] 序列号68-人工序列的说明:除信号序列外的KM5956 VL的氨基酸序列
- [0647] 序列号69-人工序列的说明:KM5907 VH CDR1的氨基酸序列
- [0648] 序列号70-人工序列的说明:KM5907 VH CDR2的氨基酸序列
- [0649] 序列号71-人工序列的说明:KM5907 VH CDR3的氨基酸序列
- [0650] 序列号72-人工序列的说明:KM5907 VL CDR1的氨基酸序列
- [0651] 序列号73-人工序列的说明:KM5907 VL CDR2的氨基酸序列
- [0652] 序列号74-人工序列的说明:KM5907 VL CDR3的氨基酸序列
- [0653] 序列号75-人工序列的说明:KM5908 VH CDR1的氨基酸序列
- [0654] 序列号76-人工序列的说明:KM5908 VH CDR2的氨基酸序列
- [0655] 序列号77-人工序列的说明:KM5908 VH CDR3的氨基酸序列
- [0656] 序列号78-人工序列的说明:KM5908 VL CDR1的氨基酸序列
- [0657] 序列号79-人工序列的说明:KM5908 VL CDR2的氨基酸序列
- [0658] 序列号80-人工序列的说明:KM5908 VL CDR3的氨基酸序列
- [0659] 序列号81-人工序列的说明:KM5909 VH CDR1的氨基酸序列
- [0660] 序列号82-人工序列的说明:KM5909 VH CDR2的氨基酸序列
- [0661] 序列号83-人工序列的说明:KM5909 VH CDR3的氨基酸序列
- [0662] 序列号84-人工序列的说明:KM5909 VL CDR1的氨基酸序列
- [0663] 序列号85-人工序列的说明:KM5909 VL CDR2的氨基酸序列
- [0664] 序列号86-人工序列的说明:KM5909 VL CDR3的氨基酸序列
- [0665] 序列号87-人工序列的说明:KM5911 VH CDR1的氨基酸序列
- [0666] 序列号88-人工序列的说明:KM5911 VH CDR2的氨基酸序列
- [0667] 序列号89-人工序列的说明:KM5911 VH CDR3的氨基酸序列
- [0668] 序列号90-人工序列的说明:KM5911 VL CDR1的氨基酸序列
- [0669] 序列号91-人工序列的说明:KM5911 VL CDR2的氨基酸序列
- [0670] 序列号92-人工序列的说明:KM5911 VL CDR3的氨基酸序列
- [0671] 序列号93-人工序列的说明:KM5915 VH CDR1的氨基酸序列
- [0672] 序列号94-人工序列的说明:KM5915 VH CDR2的氨基酸序列
- [0673] 序列号95-人工序列的说明:KM5915 VH CDR3的氨基酸序列
- [0674] 序列号96-人工序列的说明:KM5915 VL CDR1的氨基酸序列
- [0675] 序列号97-人工序列的说明:KM5915 VL CDR2的氨基酸序列
- [0676] 序列号98-人工序列的说明:KM5915 VL CDR3的氨基酸序列
- [0677] 序列号99-人工序列的说明:KM5916 VH CDR1的氨基酸序列
- [0678] 序列号100-人工序列的说明:KM5916 VH CDR2的氨基酸序列
- [0679] 序列号101-人工序列的说明:KM5916 VH CDR3的氨基酸序列

- [0680] 序列号102-人工序列的说明:KM5916 VL CDR1的氨基酸序列
- [0681] 序列号103-人工序列的说明:KM5916 VL CDR2的氨基酸序列
- [0682] 序列号104-人工序列的说明:KM5916 VL CDR3的氨基酸序列
- [0683] 序列号105-人工序列的说明:KM5954 VH CDR1的氨基酸序列
- [0684] 序列号106-人工序列的说明:KM5954 VH CDR2的氨基酸序列
- [0685] 序列号107-人工序列的说明:KM5954 VH CDR3的氨基酸序列
- [0686] 序列号108-人工序列的说明:KM5954 VL CDR1的氨基酸序列
- [0687] 序列号109-人工序列的说明:KM5954 VL CDR2的氨基酸序列
- [0688] 序列号110-人工序列的说明:KM5954 VL CDR3的氨基酸序列
- [0689] 序列号111-人工序列的说明:KM5955 VH CDR1的氨基酸序列
- [0690] 序列号112-人工序列的说明:KM5955 VH CDR2的氨基酸序列
- [0691] 序列号113-人工序列的说明:KM5955 VH CDR3的氨基酸序列
- [0692] 序列号114-人工序列的说明:KM5955 VL CDR1的氨基酸序列
- [0693] 序列号115-人工序列的说明:KM5955 VL CDR2的氨基酸序列
- [0694] 序列号116-人工序列的说明:KM5955 VL CDR3的氨基酸序列
- [0695] 序列号117-人工序列的说明:KM5956 VH CDR1的氨基酸序列
- [0696] 序列号118-人工序列的说明:KM5956 VH CDR2的氨基酸序列
- [0697] 序列号119-人工序列的说明:KM5956 VH CDR3的氨基酸序列
- [0698] 序列号120-人工序列的说明:KM5956 VL CDR1的氨基酸序列
- [0699] 序列号121-人工序列的说明:KM5956 VL CDR2的氨基酸序列
- [0700] 序列号122-人工序列的说明:KM5956 VL CDR3的氨基酸序列
- [0701] 序列号125-人工序列的说明:除信号序列外的chKM5914 VL的氨基酸序列
- [0702] 序列号126-人工序列的说明:chKM5914 VL CDR1的氨基酸序列
- [0703] 序列号127-人工序列的说明:chKM5914 VL CDR2的氨基酸序列
- [0704] 序列号128-人工序列的说明:chKM5914 VL CDR3的氨基酸序列
- [0705] 序列号129-人工序列的说明:mAb5-06 VH的碱基序列
- [0706] 序列号130-人工序列的说明:mAb5-06 VH的氨基酸序列
- [0707] 序列号131-人工序列的说明:mAb5-06 VH CDR2的氨基酸序列
- [0708] 序列号132-人工序列的说明:mAb5-06 VL的碱基序列
- [0709] 序列号133-人工序列的说明:mAb5-06 VL的氨基酸序列
- [0710] 序列号134-人工序列的说明:mAb5-06 VL CDR2的氨基酸序列
- [0711] 序列号135-人工序列的说明:hzmAb5-06 LV0的氨基酸序列
- [0712] 序列号136-人工序列的说明:hzmAb5-06 HV0的氨基酸序列
- [0713] 序列号137-人工序列的说明:hzmAb5-06 LV1a的氨基酸序列
- [0714] 序列号138-人工序列的说明:hzmAb5-06 LV1b的氨基酸序列
- [0715] 序列号139-人工序列的说明:hzmAb5-06 LV2a的氨基酸序列
- [0716] 序列号140-人工序列的说明:hzmAb5-06 LV2b的氨基酸序列
- [0717] 序列号141-人工序列的说明:hzmAb5-06 LV4的氨基酸序列
- [0718] 序列号142-人工序列的说明:hzmAb5-06 LV5的氨基酸序列

- [0719] 序列号143-人工序列的说明:hzAb5-06 HV14的氨基酸序列
- [0720] 序列号144-人工序列的说明:hzAb5-06 HV17的氨基酸序列
- [0721] 序列号145-人工序列的说明:hzKM5907 LV0的氨基酸序列
- [0722] 序列号146-人工序列的说明:hzKM5907 HV0的氨基酸序列
- [0723] 序列号147-人工序列的说明:hzKM5907 LV1a的氨基酸序列
- [0724] 序列号148-人工序列的说明:hzKM5907 LV1b的氨基酸序列
- [0725] 序列号149-人工序列的说明:hzKM5907 LV1c的氨基酸序列
- [0726] 序列号150-人工序列的说明:hzKM5907 LV2a的氨基酸序列
- [0727] 序列号151-人工序列的说明:hzKM5907 LV2b的氨基酸序列
- [0728] 序列号152-人工序列的说明:hzKM5907 LV4的氨基酸序列
- [0729] 序列号153-人工序列的说明:hzKM5907 LV6的氨基酸序列
- [0730] 序列号154-人工序列的说明:hzKM5907 HV1的氨基酸序列
- [0731] 序列号155-人工序列的说明:hzKM5907 HV2a的氨基酸序列
- [0732] 序列号156-人工序列的说明:hzKM5907 HV2b的氨基酸序列
- [0733] 序列号157-人工序列的说明:hzKM5907 HV3a的氨基酸序列
- [0734] 序列号158-人工序列的说明:hzKM5907 HV3b的氨基酸序列
- [0735] 序列号159-人工序列的说明:hzKM5907 HV3c的氨基酸序列
- [0736] 序列号160-人工序列的说明:hzKM5907 HV4的氨基酸序列
- [0737] 序列号161-人工序列的说明:hzKM5907 HV7的氨基酸序列
- [0738] 序列号162-人工序列的说明:hzKM5916 LV0的氨基酸序列
- [0739] 序列号163-人工序列的说明:hzKM5916 HV0的氨基酸序列
- [0740] 序列号164-人工序列的说明:hzKM5916 LV2的氨基酸序列
- [0741] 序列号165-人工序列的说明:hzKM5916 HV1的氨基酸序列
- [0742] 序列号166-人工序列的说明:hzKM5916 HV3的氨基酸序列
- [0743] 序列号167-人工序列的说明:hzDNP1 VL的氨基酸序列
- [0744] 序列号168-人工序列的说明:hzDNP1 VH的氨基酸序列

序列表

<110> 协和麒麟株式会社 (Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd.)

国立大学法人京都大学 (National University Corporation, Kyoto University)

<120> 抗人CCR1单克隆抗体 (Anti-human CCR1 monoclonal antibody)

<130> W525071

<140> JP2017-139157

<141> 2017-07-18

<160> 168

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 1068

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (1068)

<400> 1

```

atg gaa act cca aac acc aca gag gac tat gac acg acc aca gag ttt 48
Met Glu Thr Pro Asn Thr Thr Glu Asp Tyr Asp Thr Thr Thr Glu Phe
1           5           10           15
gac tat ggg gat gca act ccg tgc cag aag gtg aac gag agg gcc ttt 96
Asp Tyr Gly Asp Ala Thr Pro Cys Gln Lys Val Asn Glu Arg Ala Phe
           20           25           30
ggg gcc caa ctg ctg ccc cct ctg tac tcc ttg gta ttt gtc att ggc 144
Gly Ala Gln Leu Leu Pro Pro Leu Tyr Ser Leu Val Phe Val Ile Gly
           35           40           45
ctg gtt gga aac atc ctg gtg gtc ctg gtc ctt gtg caa tac aag agg 192
Leu Val Gly Asn Ile Leu Val Val Leu Val Leu Val Gln Tyr Lys Arg
           50           55           60
cta aaa aac atg acc agc atc tac ctc ctg aac ctg gcc att tct gac 240
Leu Lys Asn Met Thr Ser Ile Tyr Leu Leu Asn Leu Ala Ile Ser Asp
65           70           75           80
ctg ctc ttc ctg ttc acg ctt ccc ttc tgg atc gac tac aag ttg aag 288
Leu Leu Phe Leu Phe Thr Leu Pro Phe Trp Ile Asp Tyr Lys Leu Lys
           85           90           95
gat gac tgg gtt ttt ggt gat gcc atg tgt aag atc ctc tct ggg ttt 336
Asp Asp Trp Val Phe Gly Asp Ala Met Cys Lys Ile Leu Ser Gly Phe
           100           105           110

```

tat tac aca ggc ttg tac agc gag atc ttt ttc atc atc ctg ctg acg	384
Tyr Tyr Thr Gly Leu Tyr Ser Glu Ile Phe Phe Ile Ile Leu Leu Thr	
115 120 125	
att gac agg tac ctg gcc atc gtc cac gcc gtg ttt gcc ttg cgg gca	432
Ile Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Ala Val Phe Ala Leu Arg Ala	
130 135 140	
cgg acc gtc act ttt ggt gtc atc acc agc atc atc att tgg gcc ctg	480
Arg Thr Val Thr Phe Gly Val Ile Thr Ser Ile Ile Ile Trp Ala Leu	
145 150 155 160	
gcc atc ttg gct tcc atg cca ggc tta tac ttt tcc aag acc caa tgg	528
Ala Ile Leu Ala Ser Met Pro Gly Leu Tyr Phe Ser Lys Thr Gln Trp	
165 170 175	
gaa ttc act cac cac acc tgc agc ctt cac ttt cct cac gaa agc cta	576
Glu Phe Thr His His Thr Cys Ser Leu His Phe Pro His Glu Ser Leu	
180 185 190	
cga gag tgg aag ctg ttt cag gct ctg aaa ctg aac ctc ttt ggg ctg	624
Arg Glu Trp Lys Leu Phe Gln Ala Leu Lys Leu Asn Leu Phe Gly Leu	
195 200 205	
gta ttg cct ttg ttg gtc atg atc atc tgc tac aca ggg att ata aag	672
Val Leu Pro Leu Leu Val Met Ile Ile Cys Tyr Thr Gly Ile Ile Lys	
210 215 220	
att ctg cta aga cga cca aat gag aag aaa tcc aaa gct gtc cgt ttg	720
Ile Leu Leu Arg Arg Pro Asn Glu Lys Lys Ser Lys Ala Val Arg Leu	
225 230 235 240	
att ttt gtc atc atg atc atc ttt ttt ctc ttt tgg acc ccc tac aat	768
Ile Phe Val Ile Met Ile Ile Phe Phe Leu Phe Trp Thr Pro Tyr Asn	
245 250 255	
ttg act ata ctt att tct gtt ttc caa gac ttc ctg ttc acc cat gag	816
Leu Thr Ile Leu Ile Ser Val Phe Gln Asp Phe Leu Phe Thr His Glu	
260 265 270	
tgt gag cag agc aga cat ttg gac ctg gct gtg caa gtg acg gag gtg	864
Cys Glu Gln Ser Arg His Leu Asp Leu Ala Val Gln Val Thr Glu Val	
275 280 285	
atc gcc tac acg cac tgc tgt gtc aac cca gtg atc tac gcc ttc gtt	912
Ile Ala Tyr Thr His Cys Cys Val Asn Pro Val Ile Tyr Ala Phe Val	
290 295 300	
ggt gag agg ttc cgg aag tac ctg cgg cag ttg ttc cac agg cgt gtg	960
Gly Glu Arg Phe Arg Lys Tyr Leu Arg Gln Leu Phe His Arg Arg Val	
305 310 315 320	

```

gct gtg cac ctg gtt aaa tgg ctc ccc ttc ctc tcc gtg gac agg ctg 1008
Ala Val His Leu Val Lys Trp Leu Pro Phe Leu Ser Val Asp Arg Leu
          325                330                335
gag agg gtc agc tcc aca tct ccc tcc aca ggg gag cat gaa ctc tct 1056
Glu Arg Val Ser Ser Thr Ser Pro Ser Thr Gly Glu His Glu Leu Ser
          340                345                350
gct ggg ttc tga
Ala Gly Phe
          355
<210> 2
<211> 355
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 2
Met Glu Thr Pro Asn Thr Thr Glu Asp Tyr Asp Thr Thr Thr Glu Phe
1          5          10          15
Asp Tyr Gly Asp Ala Thr Pro Cys Gln Lys Val Asn Glu Arg Ala Phe
          20          25          30
Gly Ala Gln Leu Leu Pro Pro Leu Tyr Ser Leu Val Phe Val Ile Gly
          35          40          45
Leu Val Gly Asn Ile Leu Val Val Leu Val Leu Val Gln Tyr Lys Arg
          50          55          60
Leu Lys Asn Met Thr Ser Ile Tyr Leu Leu Asn Leu Ala Ile Ser Asp
65          70          75          80
Leu Leu Phe Leu Phe Thr Leu Pro Phe Trp Ile Asp Tyr Lys Leu Lys
          85          90          95
Asp Asp Trp Val Phe Gly Asp Ala Met Cys Lys Ile Leu Ser Gly Phe
          100         105         110
Tyr Tyr Thr Gly Leu Tyr Ser Glu Ile Phe Phe Ile Ile Leu Leu Thr
          115         120         125
Ile Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Ala Val Phe Ala Leu Arg Ala
          130         135         140
Arg Thr Val Thr Phe Gly Val Ile Thr Ser Ile Ile Ile Trp Ala Leu
145         150         155         160
Ala Ile Leu Ala Ser Met Pro Gly Leu Tyr Phe Ser Lys Thr Gln Trp
          165         170         175
Glu Phe Thr His His Thr Cys Ser Leu His Phe Pro His Glu Ser Leu
          180         185         190
Arg Glu Trp Lys Leu Phe Gln Ala Leu Lys Leu Asn Leu Phe Gly Leu

```

195	200	205
Val Leu Pro Leu Leu Val Met Ile Ile Cys Tyr Thr Gly Ile Ile Lys		
210	215	220
Ile Leu Leu Arg Arg Pro Asn Glu Lys Lys Ser Lys Ala Val Arg Leu		
225	230	235
Ile Phe Val Ile Met Ile Ile Phe Phe Leu Phe Trp Thr Pro Tyr Asn		
245	250	255
Leu Thr Ile Leu Ile Ser Val Phe Gln Asp Phe Leu Phe Thr His Glu		
260	265	270
Cys Glu Gln Ser Arg His Leu Asp Leu Ala Val Gln Val Thr Glu Val		
275	280	285
Ile Ala Tyr Thr His Cys Cys Val Asn Pro Val Ile Tyr Ala Phe Val		
290	295	300
Gly Glu Arg Phe Arg Lys Tyr Leu Arg Gln Leu Phe His Arg Arg Val		
305	310	315
Ala Val His Leu Val Lys Trp Leu Pro Phe Leu Ser Val Asp Arg Leu		
325	330	335
Glu Arg Val Ser Ser Thr Ser Pro Ser Thr Gly Glu His Glu Leu Ser		
340	345	350

Ala Gly Phe

355

<210> 3

<211> 1068

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (1068)

<400> 3

atg gag att tca gat ttc aca gaa gcc tac ccc aca act aca gaa ttt	48		
Met Glu Ile Ser Asp Phe Thr Glu Ala Tyr Pro Thr Thr Thr Glu Phe			
1	5	10	15
gac tat ggg gac tcc act cca tgc caa aag act gct gta aga gcc ttt	96		
Asp Tyr Gly Asp Ser Thr Pro Cys Gln Lys Thr Ala Val Arg Ala Phe			
20	25	30	
ggg gct gga ctc ctg ccc ccc ctg tat tct cta gtg ttc atc att gga	144		
Gly Ala Gly Leu Leu Pro Pro Leu Tyr Ser Leu Val Phe Ile Ile Gly			
35	40	45	
gtg gtg ggc aat gtc cta gtg att ctg gtg ctc atg cag cat agg agg	192		

Val Val Gly Asn Val Leu Val Ile Leu Val Leu Met Gln His Arg Arg	
50	55 60
ctt caa agc atg acc agc atc tac ctg ttc aac ctg gct gtc tct gat	240
Leu Gln Ser Met Thr Ser Ile Tyr Leu Phe Asn Leu Ala Val Ser Asp	
65	70 75 80
ctg gtc ttc ctt ttc act tta cct ttc tgg att gac tac aag ttg aaa	288
Leu Val Phe Leu Phe Thr Leu Pro Phe Trp Ile Asp Tyr Lys Leu Lys	
	85 90 95
gac gac tgg att ttt ggt gat gcc atg tgc aag ctt ctc tct ggg ttt	336
Asp Asp Trp Ile Phe Gly Asp Ala Met Cys Lys Leu Leu Ser Gly Phe	
	100 105 110
tat tac ctg ggt tta tac agt gag atc ttc ttt atc atc ctg ttg acg	384
Tyr Tyr Leu Gly Leu Tyr Ser Glu Ile Phe Phe Ile Ile Leu Leu Thr	
	115 120 125
att gac aga tac ctg gcc att gtc cat gct gtg ttt gcc ctg agg gcc	432
Ile Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Ala Val Phe Ala Leu Arg Ala	
	130 135 140
cga act gtt act ttt ggc atc atc acc agt att atc acc tgg gcc cta	480
Arg Thr Val Thr Phe Gly Ile Ile Thr Ser Ile Ile Thr Trp Ala Leu	
145	150 155 160
gcc atc tta gct tcc atg cct gcc tta tac ttt ttt aag gcc cag tgg	528
Ala Ile Leu Ala Ser Met Pro Ala Leu Tyr Phe Phe Lys Ala Gln Trp	
	165 170 175
gag ttc act cac cgt acc tgt agc cct cat ttc ccc tac aag agc ctg	576
Glu Phe Thr His Arg Thr Cys Ser Pro His Phe Pro Tyr Lys Ser Leu	
	180 185 190
aag cag tgg aag agg ttt caa gct cta aag cta aac ctt ctt gga cta	624
Lys Gln Trp Lys Arg Phe Gln Ala Leu Lys Leu Asn Leu Leu Gly Leu	
	195 200 205
att ttg cct ctg tta gtc atg ata atc tgc tat gca ggg atc atc aga	672
Ile Leu Pro Leu Leu Val Met Ile Ile Cys Tyr Ala Gly Ile Ile Arg	
	210 215 220
att ctg ctc aga aga ccc agt gag aag aag gtc aaa gcc gtg cgt ctg	720
Ile Leu Leu Arg Arg Pro Ser Glu Lys Lys Val Lys Ala Val Arg Leu	
225	230 235 240
ata ttt gct att act ctt cta ttc ttc ctc ctc tgg acc ccc tac aat	768
Ile Phe Ala Ile Thr Leu Leu Phe Phe Leu Leu Trp Thr Pro Tyr Asn	
	245 250 255
ctg agt gta ttt gtt tct gct ttc caa gat gtt cta ttc acc aat cag	816

Leu Ser Val Phe Val Ser Ala Phe Gln Asp Val Leu Phe Thr Asn Gln	
260	265
tgt gag cag agt aag caa ctg gac ctg gcc atg cag gtg act gag gtg	864
Cys Glu Gln Ser Lys Gln Leu Asp Leu Ala Met Gln Val Thr Glu Val	
275	280
att gcc tac acc cac tgt tgt gtc aac cca atc att tat gtt ttt gtg	912
Ile Ala Tyr Thr His Cys Cys Val Asn Pro Ile Ile Tyr Val Phe Val	
290	295
ggg gaa cgg ttc tgg aag tac ctt cgg cag ctg ttt caa agg cat gtg	960
Gly Glu Arg Phe Trp Lys Tyr Leu Arg Gln Leu Phe Gln Arg His Val	
305	310
gct ata cca ctg gca aaa tgg ctg ccc ttc ctc tct gtg gac caa cta	1008
Ala Ile Pro Leu Ala Lys Trp Leu Pro Phe Leu Ser Val Asp Gln Leu	
325	330
gaa agg acc agt tct ata tct cca tcc aca gga gaa cat gag ctc tct	1056
Glu Arg Thr Ser Ser Ile Ser Pro Ser Thr Gly Glu His Glu Leu Ser	
340	345
gct ggc ttc tga	1068
Ala Gly Phe	
355	
<210> 4	
<211> 355	
<212> PRT	
<213> Mus musculus	
<400> 4	
Met Glu Ile Ser Asp Phe Thr Glu Ala Tyr Pro Thr Thr Thr Glu Phe	
1	5
Asp Tyr Gly Asp Ser Thr Pro Cys Gln Lys Thr Ala Val Arg Ala Phe	
20	25
Gly Ala Gly Leu Leu Pro Pro Leu Tyr Ser Leu Val Phe Ile Ile Gly	
35	40
Val Val Gly Asn Val Leu Val Ile Leu Val Leu Met Gln His Arg Arg	
50	55
Leu Gln Ser Met Thr Ser Ile Tyr Leu Phe Asn Leu Ala Val Ser Asp	
65	70
Leu Val Phe Leu Phe Thr Leu Pro Phe Trp Ile Asp Tyr Lys Leu Lys	
85	90
Asp Asp Trp Ile Phe Gly Asp Ala Met Cys Lys Leu Leu Ser Gly Phe	
100	105
	110

Tyr Tyr Leu Gly Leu Tyr Ser Glu Ile Phe Phe Ile Ile Leu Leu Thr
 115 120 125
 Ile Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Ala Val Phe Ala Leu Arg Ala
 130 135 140
 Arg Thr Val Thr Phe Gly Ile Ile Thr Ser Ile Ile Thr Trp Ala Leu
 145 150 155 160
 Ala Ile Leu Ala Ser Met Pro Ala Leu Tyr Phe Phe Lys Ala Gln Trp
 165 170 175
 Glu Phe Thr His Arg Thr Cys Ser Pro His Phe Pro Tyr Lys Ser Leu
 180 185 190
 Lys Gln Trp Lys Arg Phe Gln Ala Leu Lys Leu Asn Leu Leu Gly Leu
 195 200 205
 Ile Leu Pro Leu Leu Val Met Ile Ile Cys Tyr Ala Gly Ile Ile Arg
 210 215 220
 Ile Leu Leu Arg Arg Pro Ser Glu Lys Lys Val Lys Ala Val Arg Leu
 225 230 235 240
 Ile Phe Ala Ile Thr Leu Leu Phe Phe Leu Leu Trp Thr Pro Tyr Asn
 245 250 255
 Leu Ser Val Phe Val Ser Ala Phe Gln Asp Val Leu Phe Thr Asn Gln
 260 265 270
 Cys Glu Gln Ser Lys Gln Leu Asp Leu Ala Met Gln Val Thr Glu Val
 275 280 285
 Ile Ala Tyr Thr His Cys Cys Val Asn Pro Ile Ile Tyr Val Phe Val
 290 295 300
 Gly Glu Arg Phe Trp Lys Tyr Leu Arg Gln Leu Phe Gln Arg His Val
 305 310 315 320
 Ala Ile Pro Leu Ala Lys Trp Leu Pro Phe Leu Ser Val Asp Gln Leu
 325 330 335
 Glu Arg Thr Ser Ser Ile Ser Pro Ser Thr Gly Glu His Glu Leu Ser
 340 345 350
 Ala Gly Phe
 355

<210> 5

<211> 1068

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

atgacaacct cactagatac agttgagacc tttggtacca catcctacta tgatgacgtg 60
 ggctgtctct gtgaaaaagc tgataccaga gcactgatgg cccagtttgt gccccgctg 120

tactccctgg tgttcaactgt gggcctcttg ggcaatgtgg tgggtggtgat gatcctcata 180
 aaatacagga ggctccgaat tatgaccaac atctacctgc tcaacctggc catttcggac 240
 ctgctcttcc tcgtcaccct tccattctgg atacactatg tcagggggca taactggggt 300
 tttggccatg gcatgtgtaa gctcctctca gggttttatc acacaggctt gtacagcgag 360
 atctttttca taatcctgct gacaatcgac aggtacctgg ccattgtcca tgctgtgttt 420
 gcccttcgag cccggactgt cacttttggt gtcatcacca gcatcgtcac ctggggcctg 480
 gcagtgctag cagctcttcc tgaatttatc ttctatgaga ctgaagagtt gtttgaagag 540
 actctttgca gtgctcttta cccagaggat acagtatata gctggaggca tttccacact 600
 ctgagaatga ccatcttctg tctcgttctc cctctgctcg ttatggccat ctgctacaca 660
 ggaatcatca aaacgctgct gaggtgcccc agtaaaaaaa agtacaaggc catccggctc 720
 atttttgtca tcatggcggt gtttttcatt ttctggacac cctacaatgt ggctatcctt 780
 ctctcttctc atcaatccat cttatttggg aatgactgtg agcggagcaa gcatctggac 840
 ctggatcatg tggtgacaga ggtgatcgcc tactcccact gctgcatgaa cccggtgatc 900
 tacgcctttg ttggagagag gttccggaag tacctgcgcc acttcttcca caggcacttg 960
 ctcatgcacc tgggcagata catcccattc ctctctagtg agaagctgga aagaaccagc 1020
 tctgtctctc catccacagc agagccgga ctctctattg tgttttag 1068

<210> 6

<211> 1068

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of the artificial sequence : nucleotide sequence of NC3-hCCR1

<400> 6

atgacaacct cactagatac agttgagacc tttggtacca catcctacta tgatgacgtg 60
 ggctgctct gtgaaaaagc tgataccaga gcatttgggg cccaactgct gccccctctg 120
 tactccttgg tatttgtcat tggcctgggt ggaaacatcc tgggtgctct ggtccttgtg 180
 caatacaaga ggctaaaaaa catgaccagc atctacctcc tgaacctggc catttctgac 240
 ctgctcttcc tgttcaactg tcccttctgg atcgactaca agttgaagga tgactggggt 300
 tttggtgatg ccatgtgtaa gatectctct gggttttatt acacaggctt gtacagcgag 360
 atctttttca tcatcctgct gacgattgac aggtacctgg ccatcgtcca cgccgtgttt 420
 gccttgccggg cacggaccgt cacttttggt gtcatcacca gcatcatcat ttgggcccctg 480
 gccatcttgg cttccatgcc aggettatac tttccaaga cccaatggga attcactcac 540
 cacacctgca gccttcaatt tctcaccgaa agcctacgag agtggaagct gtttcaggct 600
 ctgaaaactga acctcttgg gctggtattg ctttgttgg tcatgatcat ctgctacaca 660
 gggattataa agattctgct aagacgacca aatgagaaga aatccaaagc tgtccgtttg 720
 atttttgtca tcatgatcat ctttttctc ttttgacc cctacaattt gactatactt 780
 atttctgttt tccaagactt cctgttcacc catgagtgtg agcagagcag acatttggac 840
 ctggctgtgc aagtgacgga ggtgatcgcc tacacgact gctgtgtcaa cccagtgatc 900

tacgccttcg ttggtgagag gttccggaag tacctgcggc agttggtcca caggcgtgtg 960
 gctgtgcacc tggttaaatg gctccccttc ctctccgtgg acaggctgga gagggtcagc 1020
 tccacatctc cctccacagg ggagcatgaa ctctctgctg gtttctga 1068

<210> 7

<211> 1068

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of the artificial sequence : nucleotide sequence of NC3-mCCR1

<400> 7

atgacaacct cactagatac agttgagacc tttggtacca catcctacta tgatgacgtg 60
 ggctgtctct gtgaaaaagc tgataccaga gcatttgggg ctggactcct gccccccctg 120
 tattctctag tgttcatcat tggagtgggt ggcaatgtcc tagtgattct ggtgctcatg 180
 cagcatagga ggcttcaaag catgaccagc atctacctgt tcaacctggc tgtctctgat 240
 ctggctcttc ttttcacttt acctttctgg attgactaca agttgaaaga cgactggatt 300
 tttggtgatg ccatgtgcaa gcttctctct gggttttatt acctggggtt atacagttag 360
 atcttcttta tcatcctggt gacgattgac agataacctg ccattgtcca tgctgtgttt 420
 gccctgaggg cccgaactgt tacttttggc atcatcacca gtattatcac ctgggcccta 480
 gccatcttag ctccatgcc tgccttatac ttttttaagg cccagtggga gttcactcac 540
 cgtacctgta gccctcattt ccctacaag agcctgaagc agtgaagag gtttcaagct 600
 ctaaagctaa accttcttgg actaattttg cctctgtag tcatgataat ctgctatgca 660
 gggatcatca gaattctgct cagaagacc agtgagaaga aggtcaaagc cgtgcgtctg 720
 atatttgcta ttactcttct attcttctc ctctggacc cctacaatct gagtgtattt 780
 gtttctgctt tccaagatgt tctattcacc aatcagtgtg agcagagtaa gcaactggac 840
 ctggccatgc aggtgactga ggtgattgcc tacaccact gttgtgtcaa cccaatcatt 900
 tatgtttttg tgggtgaacg gttctggaag tacctcggc agctgtttca aaggcatgtg 960
 gctataccac tggcaaaatg gctgcccttc ctctctgtgg accaactaga aaggaccagt 1020
 tctatatctc catccacagg agaacatgag ctctctgctg gtttctga 1068

<210> 8

<211> 1068

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of the artificial sequence : nucleotide sequence of hCCR3_EL2hCCR1

<400> 8

atgacaacct cactagatac agttgagacc tttggtacca catcctacta tgatgacgtg 60
 ggctgtctct gtgaaaaagc tgataccaga gcaactgatg cccagtttgt gccccgctg 120

tactccctgg tgttcaactgt gggcctcttg ggcaatgtgg tgggtggtgat gatcctcata 180
 aaatacagga ggctccgaat tatgaccaac atctacctgc tcaacctggc catttcggac 240
 ctgctcttcc tcgtcaccct tccattctgg atacactatg tcagggggca taactgggtt 300
 tttggccatg gcatgtgtaa gctcctctca gggttttatc acacaggctt gtacagcgag 360
 atctttttca taatcctgct gacaatcgac aggtacctgg ccattgtcca tgctgtgttt 420
 gcccttcgag cccggactgt cacttttggt gtatcacca gcatcgtcac ctggggcctg 480
 gcagtgctag cagctcttcc tgaatttate tttccaaga cccaatggga attcactcac 540
 cacacctgca gccttcaact tctcaccgaa agcctacgag agtggaggca tttccacact 600
 ctgagaatga ccatcttctg tctcgttctc cctctgctcg ttatggccat ctgctacaca 660
 ggaatcatca aaacgctgct gaggtgcccc agtaaaaaaa agtacaaggc catccggctc 720
 atttttgtca tcatggcggt gtttttcatt ttctggacac cctacaatgt ggctatcctt 780
 ctctcttctc atcaatccat cttatttggg aatgactgtg agcggagcaa gcatctggac 840
 ctggatcatg tggtagacaga ggtgatcgcc tactcccact gctgcatgaa cccggtgatc 900
 tacgcctttg ttggagagag gttccggaag tacctgcgcc acttcttcca caggcacttg 960
 ctcatgcacc tgggcagata catcccattc ctctctagtg agaagctgga aagaaccagc 1020
 tctgtctctc catccacagc agagccggaa ctctctattg tgttttag 1068

<210> 9

<211> 1068

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of the artificial sequence : nucleotide sequence of hCCR3_EL2mCCR1

<400> 9

atgacaacct cactagatac agttgagacc tttggtacca catcctacta tgatgacgtg 60
 ggctgctct gtgaaaaagc tgataccaga gcaactgatgg ccagtttgt gccccgctg 120
 tactccctgg tgttcaactgt gggcctcttg ggcaatgtgg tgggtggtgat gatcctcata 180
 aaatacagga ggctccgaat tatgaccaac atctacctgc tcaacctggc catttcggac 240
 ctgctcttcc tcgtcaccct tccattctgg atacactatg tcagggggca taactgggtt 300
 tttggccatg gcatgtgtaa gctcctctca gggttttatc acacaggctt gtacagcgag 360
 atctttttca taatcctgct gacaatcgac aggtacctgg ccattgtcca tgctgtgttt 420
 gcccttcgag cccggactgt cacttttggt gtatcacca gcatcgtcac ctggggcctg 480
 gcagtgctag cagctcttcc tgaatttate ttttttaagg ccagtgagg gttcactcac 540
 cgtacctgta gccctcattt cccctacaag agcctgaagc agtggaggca tttccacact 600
 ctgagaatga ccatcttctg tctcgttctc cctctgctcg ttatggccat ctgctacaca 660
 ggaatcatca aaacgctgct gaggtgcccc agtaaaaaaa agtacaaggc catccggctc 720
 atttttgtca tcatggcggt gtttttcatt ttctggacac cctacaatgt ggctatcctt 780
 ctctcttctc atcaatccat cttatttggg aatgactgtg agcggagcaa gcatctggac 840
 ctggatcatg tggtagacaga ggtgatcgcc tactcccact gctgcatgaa cccggtgatc 900

tacgcctttg ttggagagag gttccggaag tacctgccc acttcttcca caggcacttg 960
 ctcatgcacc tgggcagata catcccattc ctctctagtg agaagctgga aagaaccagc 1020
 tctgtctctc catccacagc agagccgga ctctctattg tgttttag 1068

<210> 10

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Description of the artificial sequence : amino acid sequence of
 N-terminal hCCR1 peptide

<400> 10

Cys Thr Thr Glu Asp Tyr Asp Thr Thr Thr Glu Phe Asp Tyr Gly Asp

1 5 10 15

Ala Thr Pro Ala Gln Lys

20

<210> 11

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of the artificial sequence : primer mouse_gamma_r1

<400> 11

gcacacyrct ggacagggat ccagagttcc 30

<210> 12

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of the artificial sequence : primer mouse_gamma_r2

<400> 12

cckygtsyt gctggcyggg tg 22

<210> 13

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of the artificial sequence : primer mouse_kappa_r1

<400> 13

gaagcacacg actgaggcac ctccagatgt 30

<210> 14
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Description of the artificial sequence : primer_mouse_kappa_r2
 <400> 14
 gtaggtgctg tctttgctgt cctgatcagt 30
 <210> 15
 <211> 411
 <212> DNA
 <213> Mus musculus
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (411)
 <400> 15
 atg aac ttc ggg ctc agc ttg att ttc ctt gcc ctt att tta aaa ggt 48
 Met Asn Phe Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Ala Leu Ile Leu Lys Gly
 1 5 10 15
 gtc cag tgt gag gtg cag gtg gtg gag tct ggg gga aac tta gtg aaa 96
 Val Gln Cys Glu Val Gln Val Val Glu Ser Gly Gly Asn Leu Val Lys
 20 25 30
 cct gga ggg tcc ctg aaa ctt tcc tgt tca gcc tct gga ttc act ttc 144
 Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45
 agt cgc tat ggc atg tcc tgg gtt cgc cag act cca gac aag agg ctg 192
 Ser Arg Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu
 50 55 60
 gag tgg gtc gca tcc att agt gct act ttt act tac acc tac tat aca 240
 Glu Trp Val Ala Ser Ile Ser Ala Thr Phe Thr Tyr Thr Tyr Tyr Thr
 65 70 75 80
 gac aat gtg aag ggg cgt ttc acc atc tcc aga gac aat gcc aag aac 288
 Asp Asn Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
 85 90 95
 acc ctg tac cta caa atg agc agt ctg agg tct gag gac aca ggc atg 336
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Gly Met
 100 105 110
 tat tac tgt aca aga caa gat aat tac gcc tgg ttt gat tcc tgg ggc 384
 Tyr Tyr Cys Thr Arg Gln Asp Asn Tyr Ala Trp Phe Asp Ser Trp Gly

115	120	125	
caa ggg act ctg gtc act gtc tct gca			411
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala			
130	135		
<210> 16			
<211> 137			
<212> PRT			
<213> Mus musculus			
<400> 16			
Met Asn Phe Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Ala Leu Ile Leu Lys Gly			
1 5 10 15			
Val Gln Cys Glu Val Gln Val Val Glu Ser Gly Gly Asn Leu Val Lys			
20 25 30			
Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Thr Phe			
35 40 45			
Ser Arg Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu			
50 55 60			
Glu Trp Val Ala Ser Ile Ser Ala Thr Phe Thr Tyr Thr Tyr Tyr Thr			
65 70 75 80			
Asp Asn Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn			
85 90 95			
Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Gly Met			
100 105 110			
Tyr Tyr Cys Thr Arg Gln Asp Asn Tyr Ala Trp Phe Asp Ser Trp Gly			
115 120 125			
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala			
130 135			
<210> 17			
<211> 393			
<212> DNA			
<213> Mus musculus			
<220>			
<221> CDS			
<222> (1) .. (393)			
<400> 17			
atg aag ttg cct gtt agg ctg ttg gtg ctg atg ttc tgg att cct gtt 48			
Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Val			
1 5 10 15			
tcc aac agt gat gtt ttg atg acc caa act cca ctc tcc ctg cct gtc 96			

Ser Asn Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
 20 25 30
 agt ctt gga gat caa gtc tcc atc tcc tgc aga tct agt cag agt att 144
 Ser Leu Gly Asp Gln Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile
 35 40 45
 gtg cat agt aat gga aac acc ttt tta gaa tgg tac ctg aag aaa cca 192
 Val His Ser Asn Gly Asn Thr Phe Leu Glu Trp Tyr Leu Lys Lys Pro
 50 55 60
 ggc cag tct cca aag ctc ctg atc tat aaa gtt tcc agc cga ttt tct 240
 Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Ser Arg Phe Ser
 65 70 75 80
 ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca 288
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 85 90 95
 ctc aag atc agg aga gtg gag gct gac gat ctg gga gtt tat tac tgc 336
 Leu Lys Ile Arg Arg Val Glu Ala Asp Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys
 100 105 110
 ttt caa ggt tca cat att ccg tgg acg ttc ggt gga ggc acc aac ctg 384
 Phe Gln Gly Ser His Ile Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Asn Leu
 115 120 125
 gaa atc aaa 393
 Glu Ile Lys
 130
 <210> 18
 <211> 131
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 18
 Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Val
 1 5 10 15
 Ser Asn Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
 20 25 30
 Ser Leu Gly Asp Gln Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile
 35 40 45
 Val His Ser Asn Gly Asn Thr Phe Leu Glu Trp Tyr Leu Lys Lys Pro
 50 55 60
 Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Ser Arg Phe Ser
 65 70 75 80
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

	85		90		95
Leu Lys Ile Arg Arg Val Glu Ala Asp Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys					
	100		105		110
Phe Gln Gly Ser His Ile Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Asn Leu					
	115		120		125
Glu Ile Lys					
	130				
<210> 19					
<211> 414					
<212> DNA					
<213> Mus musculus					
<220>					
<221> CDS					
<222> (1) .. (414)					
<400> 19					
atg gct gtc ctg gtg ctg ctc ttc tgc ctg gtg aca ttc cca agc tgt 48					
Met Ala Val Leu Val Leu Leu Phe Cys Leu Val Thr Phe Pro Ser Cys					
1	5		10		15
gtc cta tcc cag gtg cag ctg aag cag tca gga cct ggc cta gtg cag 96					
Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln					
	20		25		30
ccc tca cag agt ctg tcc atc acc tgc aca gtc tct ggt ttc tca tta 144					
Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu					
	35		40		45
aat aac tat ggt gta cac tgg gtt cgc cag cct cca gga aag ggt ctg 192					
Asn Asn Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu					
	50		55		60
gag tgg ctg gga gtg ata tgg agt gct gga acc aca gtc tat aat gct 240					
Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ser Ala Gly Thr Thr Val Tyr Asn Ala					
65	70		75		80
gct ttc ata tcc aga ctg agc atc agc aag gac gac tcc aag agc caa 288					
Ala Phe Ile Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asp Ser Lys Ser Gln					
	85		90		95
gtt ttc ttt aaa atg aac agt ctg caa gct ggt gac act gcc ata tac 336					
Val Phe Phe Lys Met Asn Ser Leu Gln Ala Gly Asp Thr Ala Ile Tyr					
	100		105		110
tac tgt gcc aaa gac ggt agt aga tat tat act gct atg gac tac tgg 384					
Tyr Cys Ala Lys Asp Gly Ser Arg Tyr Tyr Thr Ala Met Asp Tyr Trp					
	115		120		125

ggt caa gga acc tca gtc acc gtc tcc tca 414
 Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 130 135
 <210> 20
 <211> 138
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 20
 Met Ala Val Leu Val Leu Leu Phe Cys Leu Val Thr Phe Pro Ser Cys
 1 5 10 15
 Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln
 20 25 30
 Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu
 35 40 45
 Asn Asn Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ser Ala Gly Thr Thr Val Tyr Asn Ala
 65 70 75 80
 Ala Phe Ile Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asp Ser Lys Ser Gln
 85 90 95
 Val Phe Phe Lys Met Asn Ser Leu Gln Ala Gly Asp Thr Ala Ile Tyr
 100 105 110
 Tyr Cys Ala Lys Asp Gly Ser Arg Tyr Tyr Thr Ala Met Asp Tyr Trp
 115 120 125
 Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 130 135
 <210> 21
 <211> 393
 <212> DNA
 <213> Mus musculus
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (393)
 <400> 21
 atg aag ttg cct gtt agg ctg ttg gtg ctg atg ttc tgg att cct gct 48
 Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
 1 5 10 15
 acc agc agt gat gtt gtg atg acc caa act cct cgc tcc ctg cct gtc 96
 Thr Ser Ser Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Arg Ser Leu Pro Val

	20	25	30	
agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tct cgt cag agc ctt	144			
Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Arg Gln Ser Leu				
	35	40	45	
att cac agt aat gga atc acc ttt tta cat tgg tac ctg cag aag gca	192			
Ile His Ser Asn Gly Ile Thr Phe Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Ala				
	50	55	60	
ggc cag tct cca aag ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt tct	240			
Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser				
65	70	75	80	
ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca	288			
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr				
	85	90	95	
ctc agg atc agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga gtt tat ttc tgc	336			
Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys				
	100	105	110	
tct caa ggt aca cat gtt cct ccc acg ttc ggt gga ggc acc aag ctg	384			
Ser Gln Gly Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu				
	115	120	125	
gaa atc aaa				393
Glu Ile Lys				
	130			
<210> 22				
<211> 131				
<212> PRT				
<213> Mus musculus				
<400> 22				
Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala				
1	5	10	15	
Thr Ser Ser Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Arg Ser Leu Pro Val				
	20	25	30	
Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Arg Gln Ser Leu				
	35	40	45	
Ile His Ser Asn Gly Ile Thr Phe Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Ala				
	50	55	60	
Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser				
65	70	75	80	
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr				
	85	90	95	

Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys
 100 105 110
 Ser Gln Gly Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 115 120 125
 Glu Ile Lys
 130
 <210> 23
 <211> 414
 <212> DNA
 <213> Mus musculus
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (414)
 <400> 23
 atg aac ttc ggg ctc agc ttg att ttc ctt gcc ctt att tta aaa ggt 48
 Met Asn Phe Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Ala Leu Ile Leu Lys Gly
 1 5 10 15
 gtc cag tgt gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga gac tta gtg aag 96
 Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys
 20 25 30
 cct gga ggg tcc ctg aaa ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc tta 144
 Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu
 35 40 45
 agt aat tat ggc atg tct tgg gtt cgc cag act cca gac aag agg ctg 192
 Ser Asn Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu
 50 55 60
 gaa tgg gtc gca tcc att agt att ggc aat tac atc tat tat cta gac 240
 Glu Trp Val Ala Ser Ile Ser Ile Gly Asn Tyr Ile Tyr Tyr Leu Asp
 65 70 75 80
 agt gtg aag ggg cga ttc acc atc tac aga gac aat gcc aag aac acc 288
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Tyr Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr
 85 90 95
 ctg ttc ctg caa atg agg agt ctg aag tct gag gac aca gcc atg tat 336
 Leu Phe Leu Gln Met Arg Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr
 100 105 110
 cac tgt gca aga cag ggg aat gat tac gac tgg ttt act tac tgg ggc 384
 His Cys Ala Arg Gln Gly Asn Asp Tyr Asp Trp Phe Thr Tyr Trp Gly
 115 120 125
 caa ggg act ctg gtc act gtc tct gca gcc 414

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala
 130 135
 <210> 24
 <211> 138
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 24
 Met Asn Phe Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Ala Leu Ile Leu Lys Gly
 1 5 10 15
 Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys
 20 25 30
 Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu
 35 40 45
 Ser Asn Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu
 50 55 60
 Glu Trp Val Ala Ser Ile Ser Ile Gly Asn Tyr Ile Tyr Tyr Leu Asp
 65 70 75 80
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Tyr Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr
 85 90 95
 Leu Phe Leu Gln Met Arg Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr
 100 105 110
 His Cys Ala Arg Gln Gly Asn Asp Tyr Asp Trp Phe Thr Tyr Trp Gly
 115 120 125
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala
 130 135
 <210> 25
 <211> 393
 <212> DNA
 <213> Mus musculus
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (393)
 <400> 25
 atg aag ttg cct gtt aga ctg ttg gtg ctg atg ttc tgg att cct gtt 48
 Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Val
 1 5 10 15
 tcc agc agt gat gtt ttg atg acc caa act cca ctc tcc ctg cct gtc 96
 Ser Ser Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
 20 25 30

```

agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tct agt cag agc gtt 144
Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Val
      35                40                45
gta cat act aat gga aac acc tat tta gag tgg tac ctg cag aaa cca 192
Val His Thr Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
      50                55                60
ggc cag tct cca aag ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt tct 240
Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
      65                70                75                80
ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca 288
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
      85                90                95
ctc aag atc aac aga gtg gag gct gag gat ctg gga gtt tat tac tgc 336
Leu Lys Ile Asn Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys
      100               105               110
ttt caa ggt tca cat ctt ccg tgg acg ttc ggt gga ggc acc aaa ctg 384
Phe Gln Gly Ser His Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
      115               120               125
gag atc aaa
Glu Ile Lys
      130
<210> 26
<211> 131
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 26
Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Val
1          5          10          15
Ser Ser Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
      20                25                30
Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Val
      35                40                45
Val His Thr Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
      50                55                60
Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
      65                70                75                80
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
      85                90                95
Leu Lys Ile Asn Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys

```

	100		105		110	
Phe Gln Gly Ser His Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu						
	115		120		125	
Glu Ile Lys						
	130					
<210> 27						
<211> 420						
<212> DNA						
<213> Mus musculus						
<220>						
<221> CDS						
<222> (1) .. (420)						
<400> 27						
atg aac ttc ggg ctc aga ttg att ttc ctt gtc ctt act tta aaa ggt 48						
Met Asn Phe Gly Leu Arg Leu Ile Phe Leu Val Leu Thr Leu Lys Gly						
1	5		10		15	
gtc cag tgt gac gtg aag ttg gtg gag tct ggg gaa ggc tta gtg aag 96						
Val Gln Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Glu Gly Leu Val Lys						
	20		25		30	
cct gga ggg tcc ctg aaa ctc tcc tgt gct gcc tct gga ttc acg ttc 144						
Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe						
	35		40		45	
agc aga aat gcc atg tct tgg gtt cgc cag act cca gag aag agg atg 192						
Ser Arg Asn Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Met						
	50		55		60	
gag tgg gtc gca tac att agt agt ggt ggt gat tac atc tac tat gca 240						
Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Asp Tyr Ile Tyr Tyr Ala						
65	70		75		80	
gac act gtg aag ggc cga ttc acc gtc tcc aga gac aat gcc agg aac 288						
Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn						
	85		90		95	
acc ctg tac ctg cga atg agc agt ctg aag tct gag gac aca gcc atg 336						
Thr Leu Tyr Leu Arg Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met						
	100		105		110	
tat tac tgt aca aga ttc tcc tat ggt tac gca aaa aat gct ctg gac 384						
Tyr Tyr Cys Thr Arg Phe Ser Tyr Gly Tyr Ala Lys Asn Ala Leu Asp						
	115		120		125	
tac tgg ggt caa gga acc tca gtc acc gtc tcc tca						420
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser						

130	135	140
<210> 28		
<211> 140		
<212> PRT		
<213> Mus musculus		
<400> 28		
Met Asn Phe Gly Leu Arg Leu Ile Phe Leu Val Leu Thr Leu Lys Gly		
1 5 10 15		
Val Gln Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Glu Gly Leu Val Lys		
20 25 30		
Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe		
35 40 45		
Ser Arg Asn Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Met		
50 55 60		
Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Asp Tyr Ile Tyr Tyr Ala		
65 70 75 80		
Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn		
85 90 95		
Thr Leu Tyr Leu Arg Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met		
100 105 110		
Tyr Tyr Cys Thr Arg Phe Ser Tyr Gly Tyr Ala Lys Asn Ala Leu Asp		
115 120 125		
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser		
130 135 140		
<210> 29		
<211> 378		
<212> DNA		
<213> Mus musculus		
<220>		
<221> CDS		
<222> (1) .. (378)		
<400> 29		
atg aga ccg tct att cag ttc ctg ggg ctc ttg ttg ttc tgg ctt cat 48		
Met Arg Pro Ser Ile Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Phe Trp Leu His		
1 5 10 15		
ggt gct cag tgt gac atc cag atg aca cag tct cca tcc tca ctg tct 96		
Gly Ala Gln Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser		
20 25 30		
gca tct ttg gga ggc aaa gtc acc atc act tgc aag gca agc caa gac 144		

Ala Ser Leu Gly Gly Lys Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp
 35 40 45
 att aag aag tat ata gct tgg tac caa cac aag cct gga aaa ggt cct 192
 Ile Lys Lys Tyr Ile Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Gly Pro
 50 55 60
 agg ctg ctc ata cat tac aca tct tca tta cag cca ggc atc cca tca 240
 Arg Leu Leu Ile His Tyr Thr Ser Ser Leu Gln Pro Gly Ile Pro Ser
 65 70 75 80
 agg ttc agt gga agt ggg tct ggg aga gat tat tcc ttc agc atc agc 288
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr Ser Phe Ser Ile Ser
 85 90 95
 aac ctg gag cct gag gat att gca act tat tat tgt cta cag tat gat 336
 Asn Leu Glu Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp
 100 105 110
 tat ctt atg acg ttc ggt gga ggc acc aag ctg gaa atc aaa 378
 Tyr Leu Met Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 115 120 125

<210> 30

<211> 126

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 30

Met Arg Pro Ser Ile Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Phe Trp Leu His
 1 5 10 15
 Gly Ala Gln Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
 20 25 30
 Ala Ser Leu Gly Gly Lys Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp
 35 40 45
 Ile Lys Lys Tyr Ile Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Gly Pro
 50 55 60
 Arg Leu Leu Ile His Tyr Thr Ser Ser Leu Gln Pro Gly Ile Pro Ser
 65 70 75 80
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr Ser Phe Ser Ile Ser
 85 90 95
 Asn Leu Glu Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp
 100 105 110
 Tyr Leu Met Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 115 120 125

<210> 31

<211> 414
 <212> DNA
 <213> Mus musculus
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (414)
 <400> 31
 atg aac ttc ggg ctc agc ttg att ttc ctt gcc ctt att tta aaa ggt 48
 Met Asn Phe Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Ala Leu Ile Leu Lys Gly
 1 5 10 15
 gtc cag tgt gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga gac tta gtg aag 96
 Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys
 20 25 30
 cct gga ggg tcc ctg aaa ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttc 144
 Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45
 agt aac tat ggc atg tct tgg gtt cgc cag act cca gac aag agg ctg 192
 Ser Asn Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu
 50 55 60
 gag tgg gtc gca tcc att agt att ggc agt tac atc tat tat cta gac 240
 Glu Trp Val Ala Ser Ile Ser Ile Gly Ser Tyr Ile Tyr Tyr Leu Asp
 65 70 75 80
 agt gtg aag ggg cga ttc acc atc tac aga gac aat gcc aag aac acc 288
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Tyr Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr
 85 90 95
 ctg ttc ctg caa atg agg agt ctg aag tct gag gac aca gcc atg tat 336
 Leu Phe Leu Gln Met Arg Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr
 100 105 110
 cac tgt gca aga cag ggg aat gat tac gac tgg ttt gct tac tgg ggc 384
 His Cys Ala Arg Gln Gly Asn Asp Tyr Asp Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
 115 120 125
 caa ggg act ctg gtc act gtc tct gca gcc 414
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala
 130 135
 <210> 32
 <211> 138
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 32

Met Asn Phe Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Ala Leu Ile Leu Lys Gly
 1 5 10 15
 Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys
 20 25 30
 Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45
 Ser Asn Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu
 50 55 60
 Glu Trp Val Ala Ser Ile Ser Ile Gly Ser Tyr Ile Tyr Tyr Leu Asp
 65 70 75 80
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Tyr Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr
 85 90 95
 Leu Phe Leu Gln Met Arg Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr
 100 105 110
 His Cys Ala Arg Gln Gly Asn Asp Tyr Asp Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
 115 120 125
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala
 130 135

<210> 33

<211> 393

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (393)

<400> 33

atg aag ttg cct gtt aga ctg ttg gtg ctg atg ttc tgg att cct gct 48
 Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
 1 5 10 15
 tcc agc agt gat gtt ttg atg acc caa act cca ctc tcc ctg cct gtc 96
 Ser Ser Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
 20 25 30
 agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tct agt cag aac att 144
 Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn Ile
 35 40 45
 gta cat act aat gga aac acc tat tta gag tgg tac ctg cag aaa cca 192
 Val His Thr Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
 50 55 60
 ggc cag tct cca aag ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt tct 240

```

Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
65                70                75                80
ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca 288
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
                85                90                95
ctc aag atc agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga gtt tat tac tgc 336
Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys
                100                105                110
ttt caa ggt tca cat ctt ccg tgg acg ttc ggt gga ggc acc aag ctg 384
Phe Gln Gly Ser His Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
                115                120                125
gag atc aaa
Glu Ile Lys
    130
<210> 34
<211> 131
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 34
Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
1                5                10                15
Ser Ser Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
                20                25                30
Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn Ile
                35                40                45
Val His Thr Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
                50                55                60
Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
65                70                75                80
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
                85                90                95
Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys
                100                105                110
Phe Gln Gly Ser His Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
                115                120                125
Glu Ile Lys
    130
<210> 35
<211> 420

```

<212> DNA
 <213> Mus musculus
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(420)
 <400> 35
 atg aac ttc ggg ctc aga ttg att ctc ctt gtc ctt act tta aaa ggt 48
 Met Asn Phe Gly Leu Arg Leu Ile Leu Leu Val Leu Thr Leu Lys Gly
 1 5 10 15
 gtc caa tgt gac gtg aag ctg gtg gag tct ggg gaa ggc tta gtg aag 96
 Val Gln Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Glu Gly Leu Val Lys
 20 25 30
 cct gga ggg tcc ctg aaa ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acg ttc 144
 Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45
 agc aga aat gcc atg tct tgg gtt cgc cag act cca gag aag agg ctg 192
 Ser Arg Asn Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu
 50 55 60
 gag tgg gtc gca tac att agt agt ggt agt gat tac atc tac tat gca 240
 Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Asp Tyr Ile Tyr Tyr Ala
 65 70 75 80
 gac act gtg aag ggc cga ttc act gtc tcc aga gac aat gcc agg aac 288
 Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn
 85 90 95
 acc ctg tac ctg caa atg acc agt ctg agg tct gag gac aca gcc atg 336
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met
 100 105 110
 tat ttc tgt aca aga ttc tcg tat ggt tac gga aaa aat gct ccg gac 384
 Tyr Phe Cys Thr Arg Phe Ser Tyr Gly Tyr Gly Lys Asn Ala Pro Asp
 115 120 125
 tac tgg ggt caa gga acc tca gtc acc gtc tcc tca 420
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 130 135 140
 <210> 36
 <211> 140
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 36
 Met Asn Phe Gly Leu Arg Leu Ile Leu Leu Val Leu Thr Leu Lys Gly

1	5	10	15
Val Gln Cys Asp	Val Lys Leu Val	Glu Ser Gly Glu Gly	Leu Val Lys
	20	25	30
Pro Gly Gly Ser	Leu Lys Leu Ser	Cys Ala Ala Ser	Gly Phe Thr Phe
	35	40	45
Ser Arg Asn Ala	Met Ser Trp Val	Arg Gln Thr Pro	Glu Lys Arg Leu
	50	55	60
Glu Trp Val Ala	Tyr Ile Ser Ser	Gly Ser Asp Tyr	Ile Tyr Tyr Ala
65	70	75	80
Asp Thr Val Lys	Gly Arg Phe Thr	Val Ser Arg Asp	Asn Ala Arg Asn
	85	90	95
Thr Leu Tyr Leu	Gln Met Thr Ser	Leu Arg Ser Glu	Asp Thr Ala Met
	100	105	110
Tyr Phe Cys Thr	Arg Phe Ser Tyr	Gly Tyr Gly Lys	Asn Ala Pro Asp
	115	120	125
Tyr Trp Gly Gln	Gly Thr Ser Val	Thr Val Ser Ser	
	130	135	140

<210> 37

<211> 378

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (378)

<400> 37

atg aga ccg tct att cag ttc ctg ggg ctc ttg ttg ttc tgg ctt cat 48
Met Arg Pro Ser Ile Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Phe Trp Leu His
1 5 10 15
ggt act cag tgt gac atc cag atg aca cag tca cca tcc tca ctg tct 96
Gly Thr Gln Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
20 25 30
gca tct ctg gga ggc aaa gtc acc atc act tgc aag gca agc caa gac 144
Ala Ser Leu Gly Gly Lys Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp
35 40 45
att aac aag tat ata gcg tgg tac caa cac aag cct gga caa ggt cct 192
Ile Asn Lys Tyr Ile Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Gln Gly Pro
50 55 60
agg ctg ctc ata cat tac aca tct tca tta cag cca ggc atc cca tca 240
Arg Leu Leu Ile His Tyr Thr Ser Ser Leu Gln Pro Gly Ile Pro Ser

65	70	75	80	
agg ttc agt gga agt ggg tct ggg aga gat tat tcc ttc agc atc agc	288			
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr Ser Phe Ser Ile Ser				
	85	90	95	
aac ctg gag cct gaa gat att gca act tat tat tgt cta cag tat gat	336			
Asn Leu Glu Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp				
	100	105	110	
tat act atg acg ttc ggt gga ggc acc aag ctg gaa atc aga	378			
Tyr Thr Met Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Arg				
	115	120	125	
<210> 38				
<211> 126				
<212> PRT				
<213> Mus musculus				
<400> 38				
Met Arg Pro Ser Ile Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Phe Trp Leu His				
1	5	10	15	
Gly Thr Gln Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser				
	20	25	30	
Ala Ser Leu Gly Gly Lys Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp				
	35	40	45	
Ile Asn Lys Tyr Ile Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Gln Gly Pro				
	50	55	60	
Arg Leu Leu Ile His Tyr Thr Ser Ser Leu Gln Pro Gly Ile Pro Ser				
65	70	75	80	
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr Ser Phe Ser Ile Ser				
	85	90	95	
Asn Leu Glu Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp				
	100	105	110	
Tyr Thr Met Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Arg				
	115	120	125	
<210> 39				
<211> 429				
<212> DNA				
<213> Mus musculus				
<220>				
<221> CDS				
<222> (1) .. (429)				
<400> 39				

```

atg gct gtc ctg gcg cta ctc ctc tgc ctg gtg act ttc cca agc tgt 48
Met Ala Val Leu Ala Leu Leu Leu Cys Leu Val Thr Phe Pro Ser Cys
1           5           10           15
gcc ctg tcc cag gtg cag ctg aag gag tca gga cct ggc ctg gtg gcg 96
Ala Leu Ser Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala
           20           25           30
ccc tca caa agc ctg tcc atc aca tgc act gtc tct ggg ttc tca ttg 144
Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu
           35           40           45
ccc aga tat act ata acc tgg gtt cgc cag cca cca gga aag ggt ctg 192
Pro Arg Tyr Thr Ile Thr Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu
           50           55           60
gag tgg ctt gga tta ata agg act ggt gga ggc aca att tat aat tca 240
Glu Trp Leu Gly Leu Ile Arg Thr Gly Gly Gly Thr Ile Tyr Asn Ser
65           70           75           80
gct ctc aaa tcc aga ctg agc atc agc aaa gac aac tcc aag agt caa 288
Ala Leu Lys Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln
           85           90           95
gtt ttc ttg aaa atg aac agt ctg caa agt ggt gac aca gcc agg tac 336
Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Gly Asp Thr Ala Arg Tyr
           100          105          110
tac tgt gcc aga aat gga gcc tac tat agt aag tcc ggt tct tac tgg 384
Tyr Cys Ala Arg Asn Gly Ala Tyr Tyr Ser Lys Ser Gly Ser Tyr Trp
           115          120          125
tac ttc gat gtc tgg ggc aca ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca 429
Tyr Phe Asp Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
           130          135          140
<210> 40
<211> 143
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 40
Met Ala Val Leu Ala Leu Leu Leu Cys Leu Val Thr Phe Pro Ser Cys
1           5           10           15
Ala Leu Ser Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala
           20           25           30
Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu
           35           40           45
Pro Arg Tyr Thr Ile Thr Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu

```

50	55	60	
Glu Trp Leu Gly Leu Ile Arg Thr Gly Gly Gly Thr Ile Tyr Asn Ser			
65	70	75	80
Ala Leu Lys Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln			
	85	90	95
Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Gly Asp Thr Ala Arg Tyr			
	100	105	110
Tyr Cys Ala Arg Asn Gly Ala Tyr Tyr Ser Lys Ser Gly Ser Tyr Trp			
	115	120	125
Tyr Phe Asp Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser			
130	135	140	
<210> 41			
<211> 384			
<212> DNA			
<213> Mus musculus			
<220>			
<221> CDS			
<222> (1) .. (384)			
<400> 41			
atg gat ttt cag gtg cag att ttc agc ttc ctg cta atc agt gcc tca 48			
Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser			
1	5	10	15
gtc ata atg tcc aga gga caa att gtt ctc acc cag tct cca gca atc 96			
Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile			
	20	25	30
atg tct gta tct cta ggg gag gag atc acc cta acc tgc agt gcc agc 144			
Met Ser Val Ser Leu Gly Glu Glu Ile Thr Leu Thr Cys Ser Ala Ser			
	35	40	45
tcg agt gta agt tac atg cac tgg tac cag cag aag tca ggc act tct 192			
Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser			
50	55	60	
ccc aaa ctc ttg att tat agc aca tcc aac ctg gct tct gga gtc cct 240			
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro			
65	70	75	80
tct cgc ttc agt ggc agt ggg tct ggg acc ttt tat tct ctc aca atc 288			
Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Phe Tyr Ser Leu Thr Ile			
	85	90	95
agc agt gtg gag gct gaa gat gct gcc gat tat tac tgt cat cag tgg 336			
Ser Ser Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Asp Tyr Tyr Cys His Gln Trp			

	100		105		110	
agt agt cat cca tgc acg ttc gga ggg gga acc aag ctg gaa ata aaa						384
Ser Ser His Pro Cys Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys						
	115		120		125	
<210> 42						
<211> 128						
<212> PRT						
<213> Mus musculus						
<400> 42						
Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser						
1	5		10		15	
Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile						
	20		25		30	
Met Ser Val Ser Leu Gly Glu Glu Ile Thr Leu Thr Cys Ser Ala Ser						
	35		40		45	
Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser						
	50		55		60	
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro						
65	70		75		80	
Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Phe Tyr Ser Leu Thr Ile						
	85		90		95	
Ser Ser Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Asp Tyr Tyr Cys His Gln Trp						
	100		105		110	
Ser Ser His Pro Cys Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys						
	115		120		125	
<210> 43						
<211> 417						
<212> DNA						
<213> Mus musculus						
<220>						
<221> CDS						
<222> (1) .. (417)						
<400> 43						
atg gac tcc agg ctc aat tta gtt ttc ctt gtc ctt att tta aaa ggt						48
Met Asp Ser Arg Leu Asn Leu Val Phe Leu Val Leu Ile Leu Lys Gly						
1	5		10		15	
gtc cag tgt gag gtg caa ctg gtg gag tct ggg gga ggc tta gtg aag						96
Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys						
	20		25		30	

cct gga ggg tcc ctg aaa ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc act ctc 144
 Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu
 35 40 45
 agg gac ttt gga atg cac tgg gtt cga cag gtc cca gag aag ggg ctg 192
 Arg Asp Phe Gly Met His Trp Val Arg Gln Val Pro Glu Lys Gly Leu
 50 55 60
 gag tgg gtt gca tat atc agt agt ggc agg act gcc atc tcc tat gta 240
 Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Thr Ala Ile Ser Tyr Val
 65 70 75 80
 gac aaa gtg aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat gcc aag aac 288
 Asp Lys Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
 85 90 95
 acc ctg ttc ctg caa atg acc agt ctg agg tct gag gac acg gcc atg 336
 Thr Leu Phe Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met
 100 105 110
 tat tac tgt gca agg agg ccc tat agt aag tct tat gct atg gac tac 384
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Pro Tyr Ser Lys Ser Tyr Ala Met Asp Tyr
 115 120 125
 tgg ggt caa gga acc tca gtc acc gtc tcc tca 417
 Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 130 135
 <210> 44
 <211> 139
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 44
 Met Asp Ser Arg Leu Asn Leu Val Phe Leu Val Leu Ile Leu Lys Gly
 1 5 10 15
 Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys
 20 25 30
 Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu
 35 40 45
 Arg Asp Phe Gly Met His Trp Val Arg Gln Val Pro Glu Lys Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Thr Ala Ile Ser Tyr Val
 65 70 75 80
 Asp Lys Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
 85 90 95
 Thr Leu Phe Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met

	100		105		110	
Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Pro Tyr Ser Lys Ser Tyr Ala Met Asp Tyr						
	115		120		125	
Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser						
	130		135			
<210> 45						
<211> 396						
<212> DNA						
<213> Mus musculus						
<220>						
<221> CDS						
<222> (1) .. (396)						
<400> 45						
atg aag ctg cct gtt ctg cta gtg gtg ctg cta ttg ttc acg agt cca 48						
Met Lys Leu Pro Val Leu Leu Val Val Leu Leu Leu Phe Thr Ser Pro						
1	5		10		15	
gcc tca agc agt gat gtt gtt ctg acc caa act cca ctc tct ctg cct 96						
Ala Ser Ser Ser Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro						
	20		25		30	
gtc aat att gga gac caa gcc tct atc tct tgc aag tct att aag agt 144						
Val Asn Ile Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ile Lys Ser						
	35		40		45	
ctt ctg aat agt gat gga ttc act tat ttg gac tgg tat ctg cag aag 192						
Leu Leu Asn Ser Asp Gly Phe Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys						
	50		55		60	
cca ggc cag tct cca cag ctc cta ata tat ttg gtt tct aat cga ttt 240						
Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn Arg Phe						
65	70		75		80	
tct gga gtt cca gac agg ttc agt ggc agt ggg tca gga aca gat ttc 288						
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe						
	85		90		95	
aca ctc aag atc aga aga gtg gag gct gag gat ttg gga gtt tat tat 336						
Thr Leu Lys Ile Arg Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr						
	100		105		110	
tgc ttc cag agt aac tat ctt cct ctc acg ttc ggt gct ggg acc aag 384						
Cys Phe Gln Ser Asn Tyr Leu Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys						
	115		120		125	
ctg gag ctg aaa						396
Leu Glu Leu Lys						

130
 <210> 46
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 46
 Met Lys Leu Pro Val Leu Leu Val Val Leu Leu Leu Phe Thr Ser Pro
 1 5 10 15
 Ala Ser Ser Ser Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro
 20 25 30
 Val Asn Ile Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ile Lys Ser
 35 40 45
 Leu Leu Asn Ser Asp Gly Phe Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys
 50 55 60
 Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn Arg Phe
 65 70 75 80
 Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 85 90 95
 Thr Leu Lys Ile Arg Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr
 100 105 110
 Cys Phe Gln Ser Asn Tyr Leu Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys
 115 120 125
 Leu Glu Leu Lys

130
 <210> 47
 <211> 429
 <212> DNA
 <213> Mus musculus
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (429)
 <400> 47
 atg gct gtc ctg gcg cta ctc ctc tgc ctg gtc act ttc cca agc tgt 48
 Met Ala Val Leu Ala Leu Leu Leu Cys Leu Val Thr Phe Pro Ser Cys
 1 5 10 15
 gcc ctg tcc cag gtg cag ctg aag gag tca gga cct ggc ctg gtg gcg 96
 Ala Leu Ser Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala
 20 25 30
 ccc tca caa agc ctg tcc atc aca tgc act gtc tct ggg ttc tca ttg 144

Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu
 35 40 45
 gcc agg tat act ata acc tgg gtt cgc cag cca cca gga aag ggt ctg 192
 Ala Arg Tyr Thr Ile Thr Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 gag tgg ctt gga tta ata agg act ggt gga ggc aca att tat aat tca 240
 Glu Trp Leu Gly Leu Ile Arg Thr Gly Gly Gly Thr Ile Tyr Asn Ser
 65 70 75 80
 gct ctc aaa tcc aga ctg agc atc agc aaa gac aac tcc aag agt caa 288
 Ala Leu Lys Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln
 85 90 95
 gtt ttc tta aaa atg aac agt ctg caa agt ggt gac aca gcc agg tac 336
 Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Gly Asp Thr Ala Arg Tyr
 100 105 110
 tac tgt gcc aga aat gga gcc tac tat agt aac tcc ggt tct tac tgg 384
 Tyr Cys Ala Arg Asn Gly Ala Tyr Tyr Ser Asn Ser Gly Ser Tyr Trp
 115 120 125
 tac ttc gat gtc tgg ggc aca ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca 429
 Tyr Phe Asp Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 130 135 140
 <210> 48
 <211> 143
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 48
 Met Ala Val Leu Ala Leu Leu Leu Cys Leu Val Thr Phe Pro Ser Cys
 1 5 10 15
 Ala Leu Ser Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala
 20 25 30
 Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu
 35 40 45
 Ala Arg Tyr Thr Ile Thr Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Leu Gly Leu Ile Arg Thr Gly Gly Gly Thr Ile Tyr Asn Ser
 65 70 75 80
 Ala Leu Lys Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln
 85 90 95
 Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Gly Asp Thr Ala Arg Tyr
 100 105 110

<213> Mus musculus

<400> 50

Met	Asp	Phe	Gln	Val	Gln	Ile	Phe	Ser	Phe	Leu	Leu	Ile	Ser	Ala	Ser
1			5					10					15		
Val	Met	Met	Ser	Arg	Gly	Gln	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ile
			20					25					30		
Met	Ser	Ala	Ser	Leu	Gly	Glu	Glu	Ile	Thr	Leu	Thr	Cys	Ser	Ala	Ser
		35					40					45			
Ser	Ser	Val	Thr	Tyr	Met	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser
		50				55					60				
Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Ser	Thr	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro
65					70					75					80
Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Phe	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile
				85					90						95
Ser	Ser	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Ala	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	His	Gln	Trp
			100						105					110	
Ser	Ser	His	Pro	Cys	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Ala	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys
			115					120							125

<210> 51

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Description of the artificial sequence : amino acid sequence of KM5907 VH excluding signal sequence

<400> 51

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

100	105	110
Leu Val Thr Val Ser Ala		
115		
<210> 52		
<211> 112		
<212> PRT		
<213> Artificial		
<220>		
<223> Description of the artificial sequence : amino acid sequence of KM5907 VL excluding signal sequence		
<400> 52		
Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly		
1 5 10 15		
Asp Gln Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser		
20 25 30		
Asn Gly Asn Thr Phe Leu Glu Trp Tyr Leu Lys Lys Pro Gly Gln Ser		
35 40 45		
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Ser Arg Phe Ser Gly Val Pro		
50 55 60		
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile		
65 70 75 80		
Arg Arg Val Glu Ala Asp Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly		
85 90 95		
Ser His Ile Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Asn Leu Glu Ile Lys		
100 105 110		
<210> 53		
<211> 119		
<212> PRT		
<213> Artificial		
<220>		
<223> Description of the artificial sequence : amino acid sequence of KM5908 VH excluding signal sequence		
<400> 53		
Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln		
1 5 10 15		
Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Asn Asn Tyr		
20 25 30		
Gly Val His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu		
35 40 45		

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

<210> 54

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Description of the artificial sequence : amino acid sequence of
 KM5908 VL excluding signal sequence

<400> 54

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

<210> 55

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Description of the artificial sequence : amino acid sequence of
 KM5909 VH excluding signal sequence

<400> 55

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

<210> 56

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Description of the artificial sequence : amino acid sequence of
 KM5909 VL excluding signal sequence

<400> 56

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

<210> 57
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Description of the artificial sequence : amino acid sequence of
 KM5911 VH excluding signal sequence
 <400> 57

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

<210> 58
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Description of the artificial sequence : amino acid sequence of
 KM5911 VL excluding signal sequence
 <400> 58

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

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

<210> 61

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Description of the artificial sequence : amino acid sequence of
 KM5916 VH excluding signal sequence

<400> 61

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

<210> 62

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Description of the artificial sequence : amino acid sequence of KM5916 VL excluding signal sequence

<400> 62

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

<210> 63

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Description of the artificial sequence : amino acid sequence of KM5954 VH excluding signal sequence

<400> 63

Gln	Val	Gln	Leu	Lys	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Ala	Pro	Ser	Gln
1				5						10				15	
Ser	Leu	Ser	Ile	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Pro	Arg	Tyr
				20					25				30		
Thr	Ile	Thr	Trp	Val	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Leu
		35					40					45			
Gly	Leu	Ile	Arg	Thr	Gly	Gly	Gly	Thr	Ile	Tyr	Asn	Ser	Ala	Leu	Lys
		50					55				60				
Ser	Arg	Leu	Ser	Ile	Ser	Lys	Asp	Asn	Ser	Lys	Ser	Gln	Val	Phe	Leu
65					70					75				80	

Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Gly Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Asn Gly Ala Tyr Tyr Ser Lys Ser Gly Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp
 100 105 110
 Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 64

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Description of the artificial sequence : amino acid sequence of
 KM5954 VL excluding signal sequence

<400> 64

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

<210> 65

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Description of the artificial sequence : amino acid sequence of
 KM5955 VH excluding signal sequence

<400> 65

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Arg Asp Phe

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

<210> 66

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Description of the artificial sequence : amino acid sequence of KM5955 VL excluding signal sequence

<400> 66

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

<210> 67

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Description of the artificial sequence : amino acid sequence of KM5956 VH excluding signal sequence

<400> 67

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

<210> 68

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Description of the artificial sequence : amino acid sequence of KM5956 VL excluding signal sequence

<400> 68

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

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Description of the artificial sequence : amino acid sequence of
KM5909 VL CDR1

<400> 84

Arg Ser Ser Gln Ser Val Val His Thr Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu

1

5

10

15

<210> 85

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Description of the artificial sequence : amino acid sequence of
KM5909 VL CDR2

<400> 85

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

1

5

<210> 86

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Description of the artificial sequence : amino acid sequence of
KM5909 VL CDR3

<400> 86

Phe Gln Gly Ser His Leu Pro Trp Thr

1

5

<210> 87

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Description of the artificial sequence : amino acid sequence of
KM5911 VH CDR1

<400> 87

Arg Asn Ala Met Ser

1

5

<210> 88

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Description of the artificial sequence : amino acid sequence of
KM5911 VH CDR2

<400> 88

Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Asp Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 89

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Description of the artificial sequence : amino acid sequence of
KM5911 VH CDR3

<400> 89

Phe Ser Tyr Gly Tyr Ala Lys Asn Ala Leu Asp Tyr

1 5 10

<210> 90

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Description of the artificial sequence : amino acid sequence of
KM5911 VL CDR1

<400> 90

Lys Ala Ser Gln Asp

1 5

<210> 91

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Description of the artificial sequence : amino acid sequence of
KM5911 VL CDR2

<400> 91

Tyr Thr Ser Ser Leu Gln

1 5
 <210> 92
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Description of the artificial sequence : amino acid sequence of
 KM5911 VL CDR3
 <400> 92
 Leu Gln Tyr Asp Tyr Leu Met Thr
 1 5
 <210> 93
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Description of the artificial sequence : amino acid sequence of
 KM5915 VH CDR1
 <400> 93
 Asn Tyr Gly Met Ser
 1 5
 <210> 94
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Description of the artificial sequence : amino acid sequence of
 KM5915 VH CDR2
 <400> 94
 Ser Ile Ser Ile Gly Ser Tyr Ile Tyr Tyr Leu Asp Ser Val Lys Gly
 1 5 10 15
 <210> 95
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Description of the artificial sequence : amino acid sequence of
 KM5915 VH CDR3
 <400> 95

<400> 99

Arg Asn Ala Met Ser

1 5

<210> 100

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Description of the artificial sequence : amino acid sequence of
KM5916 VH CDR2

<400> 100

Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Asp Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 101

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Description of the artificial sequence : amino acid sequence of
KM5916 VH CDR3

<400> 101

Phe Ser Tyr Gly Tyr Gly Lys Asn Ala Pro Asp Tyr

1 5 10

<210> 102

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Description of the artificial sequence : amino acid sequence of
KM5916 VL CDR1

<400> 102

Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Lys Tyr Ile Ala

1 5 10

<210> 103

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Description of the artificial sequence : amino acid sequence of
KM5916 VL CDR2

<400> 103

Tyr Thr Ser Ser Leu Gln Pro

1 5

<210> 104

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Description of the artificial sequence : amino acid sequence of
KM5916 VL CDR3

<400> 104

Leu Gln Tyr Asp Tyr Thr Met Thr

1 5

<210> 105

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Description of the artificial sequence : amino acid sequence of
KM5954 VH CDR1

<400> 105

Arg Tyr Thr Ile Thr

1 5

<210> 106

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Description of the artificial sequence : amino acid sequence of
KM5954 VH CDR2

<400> 106

Leu Ile Arg Thr Gly Gly Gly Thr Ile Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 107

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<213> Artificial

<220>

<223> Description of the artificial sequence : amino acid sequence of
KM5955 VH CDR1

<400> 111

Asp Phe Gly Met His

1 5

<210> 112

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Description of the artificial sequence : amino acid sequence of
KM5955 VH CDR2

<400> 112

Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Thr Ala Ile Ser Tyr Val Asp Lys Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 113

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Description of the artificial sequence : amino acid sequence of
KM5955 VH CDR3

<400> 113

Arg Pro Tyr Ser Lys Ser Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 114

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Description of the artificial sequence : amino acid sequence of
KM5955 VL CDR1

<400> 114

Lys Ser Ile Lys Ser Leu Leu Asn Ser Asp Gly Phe Thr Tyr Leu Asp

1 5 10 15

<210> 115

<211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Description of the artificial sequence : amino acid sequence of
 KM5955 VL CDR2
 <400> 115
 Leu Val Ser Asn Arg Phe Ser
 1 5
 <210> 116
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Description of the artificial sequence : amino acid sequence of
 KM5955 VL CDR3
 <400> 116
 Phe Gln Ser Asn Tyr Leu Pro Leu Thr
 1 5
 <210> 117
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Description of the artificial sequence : amino acid sequence of
 KM5956 VH CDR1
 <400> 117
 Arg Tyr Thr Ile Thr
 1 5
 <210> 118
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Description of the artificial sequence : amino acid sequence of
 KM5956 VH CDR2
 <400> 118
 Leu Ile Arg Thr Gly Gly Gly Thr Ile Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser
 1 5 10 15

1 5
 <210> 123
 <211> 393
 <212> DNA
 <213> Mus musculus
 <400> 123
 atgaagttgc gtgtaggct gttggtgctg atgttctgga ttctgcttc caccggtgat 60
 gttgtgatga cccaaactcc actctcctg cctgtcagtc ttggagatca agcctccatc 120
 ttttgcagat ctagtcagag ccttgtagac aggaatggaa tcaccttttt tcattggtac 180
 ctgcagaagc caggccagtc tccaaaactc ctgatctaca aagtctccaa ccgattttct 240
 ggggtcccag acaggttcag tggcagtggga tcagggacag atttcacact caagatcagc 300
 aggggtggcgc ctgacgatct gggagtttat ttctgctctc aaggaacaca tgttctctcc 360
 actttcgggtg gaggcaccaa gctggaaatc aaa 393
 <210> 124
 <211> 131
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 124
 Met Lys Leu Arg Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
 1 5 10 15
 Ser Thr Gly Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
 20 25 30
 Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Phe Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
 35 40 45
 Val His Arg Asn Gly Ile Thr Phe Phe His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
 50 55 60
 Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 65 70 75 80
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 85 90 95
 Leu Lys Ile Ser Arg Val Ala Pro Asp Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys
 100 105 110
 Ser Gln Gly Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 115 120 125
 Glu Ile Lys
 130
 <210> 125
 <211> 112
 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> description of the artificial sequence: amino acid sequence of KM5914 VL excluding signal sequence

<400> 125

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

<210> 126

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> description of the artificial sequence: amino acid sequence of KM5914 VL CDR1

<400> 126

Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Val	His	Arg	Asn	Gly	Ile	Thr	Phe	Phe	His
1					5					10					15

<210> 127

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> description of the artificial sequence: amino acid sequence of KM5914 VL CDR2

<400> 127

Lys	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser
1					5	

mAb5-06 VL

<400> 133

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

<210> 134

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> description of the artificial sequence: amino acid sequence of
 mAb5-06 VL CDR2

<400> 134

Lys Ile Ser Asn Arg Phe Ser
 1 5

<210> 135

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> description of the artificial sequence: amino acid sequence of
 hzmAb5-06 LV0

<400> 135

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

	35		40		45														
	Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Ile	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser	Gly	Val	Pro			
	50						55					60							
	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile			
65					70						75				80				
	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ser	Gln	Gly			
				85						90				95					
	Thr	His	Val	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys			
			100						105					110					

<210> 136

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> description of the artificial sequence: amino acid sequence of hzmAb5-06 HV0

<400> 136

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

<210> 137

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> description of the artificial sequence: amino acid sequence of

hzmAb5-06 LV1a

<400> 137

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

<210> 138

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> description of the artificial sequence: amino acid sequence of

hzmAb5-06 LV1b

<400> 138

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

<210> 139

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> description of the artificial sequence: amino acid sequence of hzmAb5-06 LV2a

<400> 139

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

<210> 140

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> description of the artificial sequence: amino acid sequence of hzmAb5-06 LV2b

<400> 140

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

35	40	45	
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro			
50	55	60	
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile			
65	70	75	80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Gly			
	85	90	95
Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
100	105	110	

<210> 143

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> description of the artificial sequence: amino acid sequence of hzmAb5-06 HV14

<400> 143

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

<210> 144

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> description of the artificial sequence: amino acid sequence of

hzmAb5-06 HV17

<400> 144

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

<210> 145

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> description of the artificial sequence: amino acid sequence of

hzKM5907 LV0

<400> 145

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

100 105 110

<210> 146
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> description of the artificial sequence: amino acid sequence of hzKM5907 HV0

<400> 146

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

<210> 147
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> description of the artificial sequence: amino acid sequence of hzKM5907 LV1a

<400> 147

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

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

<210> 148

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> description of the artificial sequence: amino acid sequence of
 hzKM5907 LV1b

<400> 148

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

<210> 149

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> description of the artificial sequence: amino acid sequence of
 hzKM5907 LV1c

<400> 149

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Ser Gly

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

<210> 150

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> description of the artificial sequence: amino acid sequence of hzKM5907 LV2a

<400> 150

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

<210> 151

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> description of the artificial sequence: amino acid sequence of hzKM5907 LV2b

<400> 151

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

<210> 152

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> description of the artificial sequence: amino acid sequence of hzKM5907 LV4

<400> 152

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

100	105	110
<210> 153		
<211> 112		
<212> PRT		
<213> Artificial		
<220>		
<223> description of the artificial sequence: amino acid sequence of hzKM5907 LV6		
<400> 153		
Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly		
1 5 10 15		
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser		
20 25 30		
Asn Gly Asn Thr Phe Leu Glu Trp Tyr Leu Lys Lys Pro Gly Gln Ser		
35 40 45		
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Ser Arg Phe Ser Gly Val Pro		
50 55 60		
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile		
65 70 75 80		
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly		
85 90 95		
Ser His Ile Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
100 105 110		
<210> 154		
<211> 118		
<212> PRT		
<213> Artificial		
<220>		
<223> description of the artificial sequence: amino acid sequence of hzKM5907 HV1		
<400> 154		
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
1 5 10 15		
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr		
20 25 30		
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Arg Leu Glu Trp Val		
35 40 45		
Ser Ser Ile Ser Ala Thr Phe Thr Tyr Thr Tyr Tyr Thr Asp Asn Val		
50 55 60		

<400> 156

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

<210> 157

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> description of the artificial sequence: amino acid sequence of
 hzKM5907 HV3a

<400> 157

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

	35		40		45														
	Ser	Ser	Ile	Ser	Ala	Thr	Phe	Thr	Tyr	Thr	Tyr	Tyr	Thr	Asp	Asn	Val			
	50						55					60							
	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr			
	65					70					75				80				
	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys			
				85					90				95						
	Thr	Lys	Gln	Asp	Asn	Tyr	Ala	Trp	Phe	Asp	Ser	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr			
				100					105				110						
	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser													
	115																		
<210>	160																		
<211>	118																		
<212>	PRT																		
<213>	Artificial																		
<220>																			
<223>	description of the artificial sequence: amino acid sequence of																		
hzKM5907	HV4																		
<400>	160																		
	Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly			
	1			5						10				15					
	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Arg	Tyr			
			20						25				30						
	Gly	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val			
		35						40					45						
	Ala	Ser	Ile	Ser	Ala	Thr	Phe	Thr	Tyr	Thr	Tyr	Tyr	Thr	Asp	Asn	Val			
	50						55					60							
	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr			
	65					70					75				80				
	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys			
				85						90			95						
	Thr	Arg	Gln	Asp	Asn	Tyr	Ala	Trp	Phe	Asp	Ser	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr			
				100					105				110						
	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser													
	115																		
<210>	161																		
<211>	118																		
<212>	PRT																		
<213>	Artificial																		

Ile Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Gly Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 His Tyr Thr Ser Ser Leu Gln Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Leu Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Tyr Thr Met Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 165

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> description of the artificial sequence: amino acid sequence of
 hzKM5916 HV1

<400> 165

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

<210> 166

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> description of the artificial sequence: amino acid sequence of hzKM5916 HV3

<400> 166

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

<210> 167

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> description of the artificial sequence: amino acid sequence of hzDNP1 VL

<400> 167

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

Thr His Gln Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110
 <210> 168
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> description of the artificial sequence: amino acid sequence of
 hzDNP1 VH
 <400> 168
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Val Ser Ser Gly
 20 25 30
 Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Trp Gly Val Arg His Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

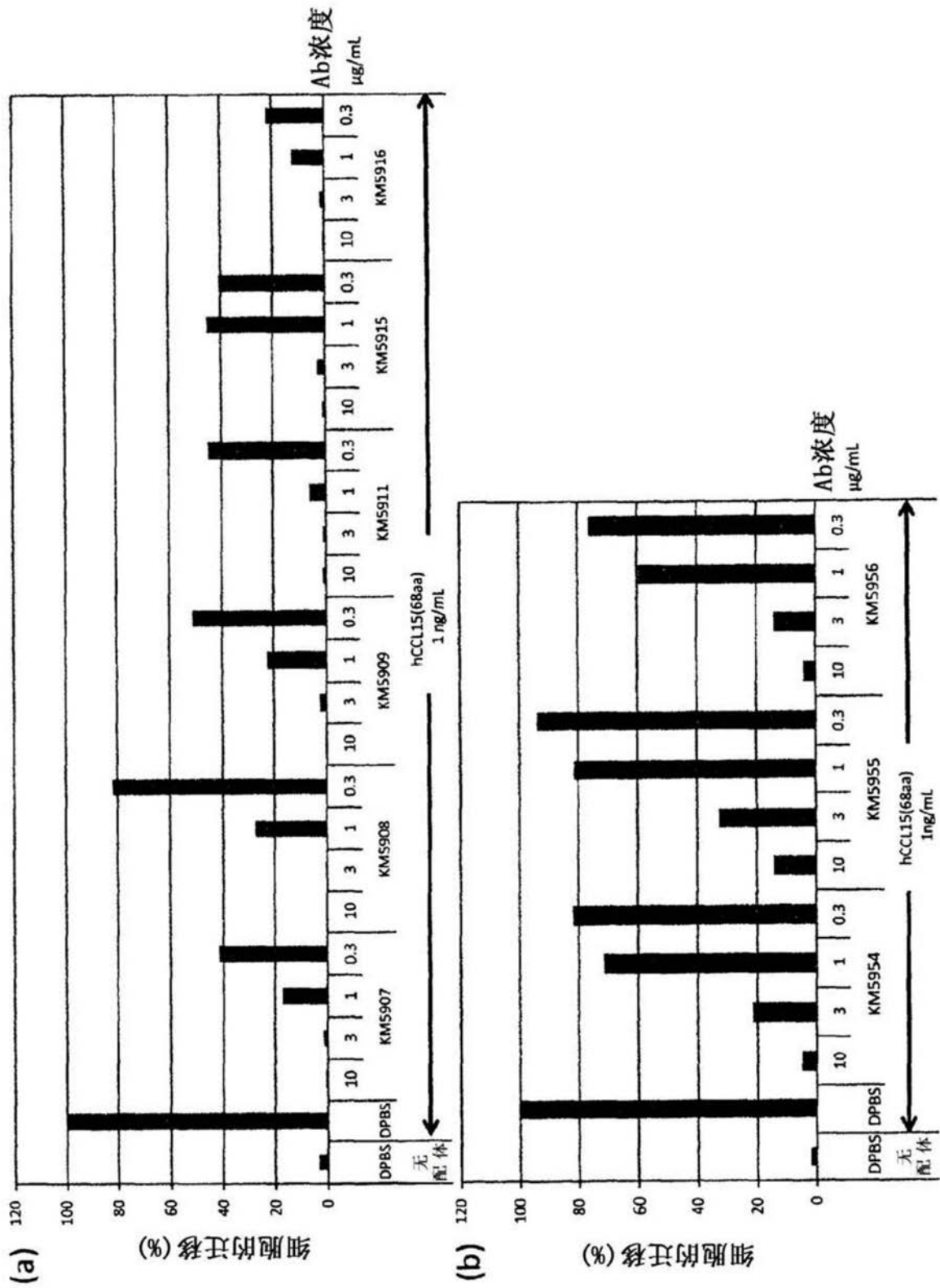


图1

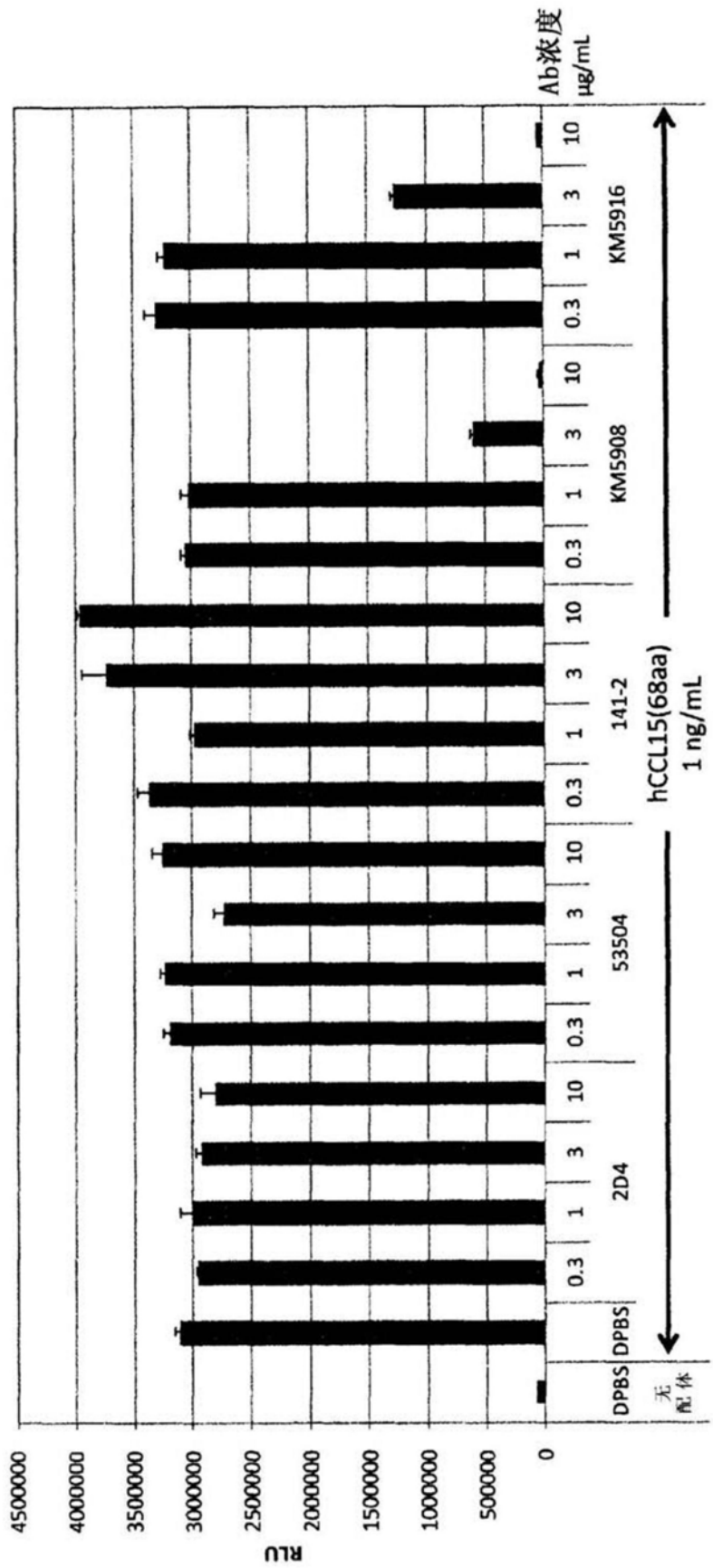


图2

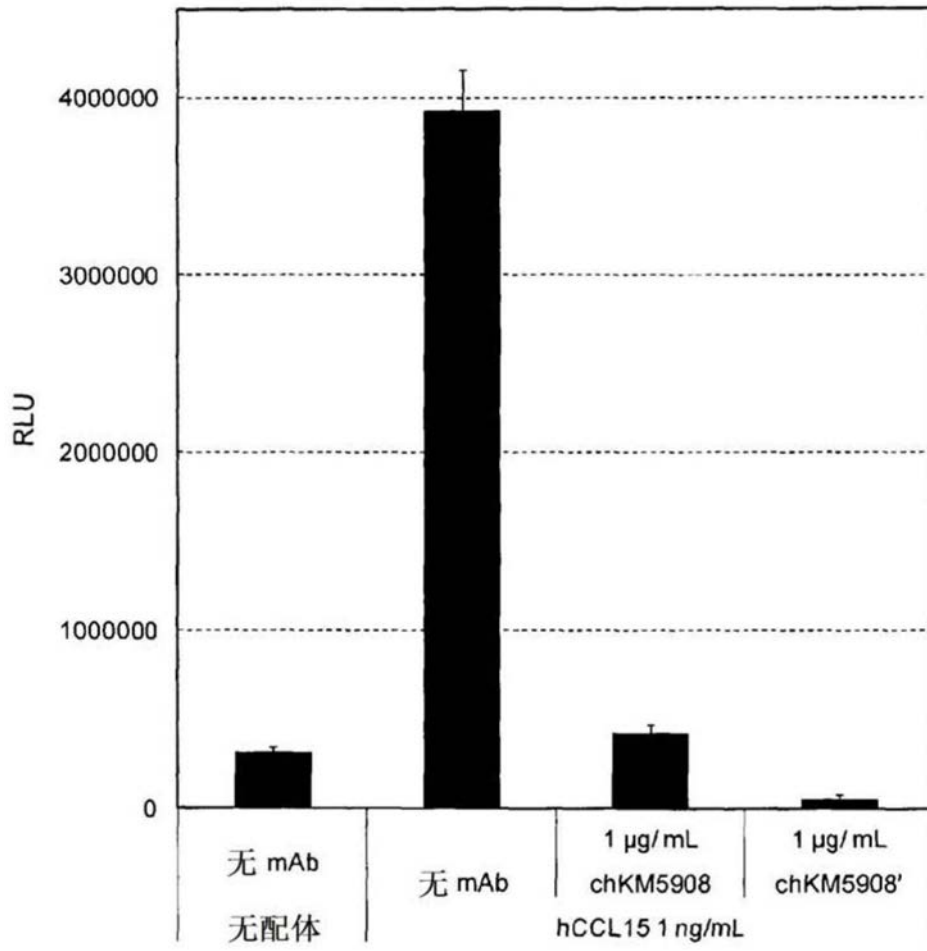


图3

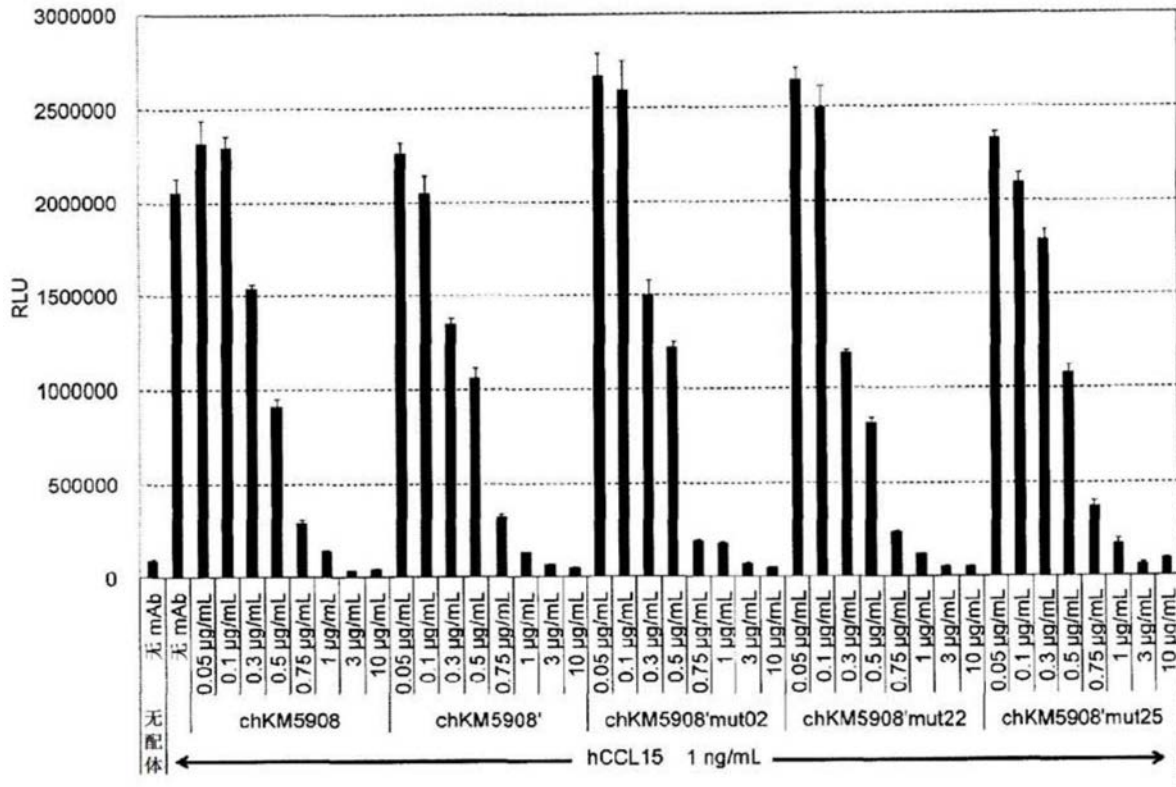


图4

	12345678901234567890123	4567890123456789	012345678901234	5678901
mAb5-06 VL	DVVMTQTPLSLPVS LGDQASIFC	RSSQSLVHRNGITFFH	WYLQKPGQSPKLLIY	KISNRF S
LV0	DIVMTQSPLSLPVT PGEPASISC		WYLQKPGQSPQLLIY	
LV1a	DIVMTQSPLSLPVT PGEPASISC		WYLQKPGQSPKLLIY	
LV1b	DIVMTQSPLSLPVT LGEPASISC		WYLQKPGQSPQLLIY	
LV2a	DIVMTQSPLSLPVT LGEPASISC	CDR L1	WYLQKPGQSPKLLIY	CDR L2
LV2b	DIVMTQSPLSLPVT PGEPASISC		WYLQKPGQSPKLLIY	
LV4	DIVMTQSPLSLPVT LGEPASISC		WYLQKPGQSPKLLIY	
LV5	DVVMTQSPLSLPVT LGEPASISC		WYLQKPGQSPKLLIY	

	2345678901234567890123	456789012	3456789012
mAb5-06 VL	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISR VAPDDLGVYFC	SQGTHVPPT	FGGGTKLEIK
LV0	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISR VEAEDVG VYYC		FGQGTKVEIK
LV1a	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISR VEAEDVG VYYC		FGQGTKVEIK
LV1b	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISR VEAEDVG VYYC		FGQGTKVEIK
LV2a	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISR VEAEDVG VYYC	CDR L3	FGQGTKVEIK
LV2b	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISR VEAEDVG VYFC		FGQGTKVEIK
LV4	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISR VEAEDVG VYFC		FGQGTKLEIK
LV5	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISR VEAEDVG VYFC		FGQGTKLEIK

图5

	123456789012345678901234567890	12345	67890123456789	0123456789012345
mAb5-06 VH	QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLN	NYGVH	WVRQPPGKGLEWLG	VIWSAGTTVYNAAAIS
HV0	QVQLQESGPGLVKPSQTLTCTVSGGSVS		WIRQPPGKGLEWIG	
HV14	QVQLQQSGPGLVKPSQTLTCTVSGFSLN	CDR H1	WVRQPPGKGLEWLG	CDR H2
HV17	QVQLQQSGPGLVKPSQTLTCTVSGFSLN		WVRQPPGKGLEWLG	

	67890123456789012345678901234567	89012345678	90123456789
mAb5-06 VH	RLSISKDDSKSQVFFKMNSLQAGDTAIYYCAK	DGSRYTAMDY	WGQGTSTVTVSS
HV0	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAIVYYCAR		WGQGTSLVTVSS
HV14	RLTISKDTSKNQVSFKMSSLTAADTAIVYYCAK	CDR H3	WGQGTSLVTVSS
HV17	RLTISKDDSKSQVFFKMNSLQAGDTAIYYCAK		WGQGTSLVTVSS

图6

	12345678901234567890123	4567890123456789	012345678901234	5678901
KM5907 VL	DVLMQTPLSLPVS LGDQVSISC	RSSQSI VHSNGNTFLE	WYLK KPGQSPKLLIY	KVSSRFS
LV0	DIVMTQTPLSLPVTSGEPASISC		WYLQKPGQSPQLLIY	
LV1a	DIVMTQTPLSLPVTSGEPASISC		WYLK KPGQSPQLLIY	
LV1b	DIVMTQTPLSLPVTSGEPASISC		WYLQKPGQSPKLLIY	
LV1c	DIVMTQTPLSLPVTSGEPVSISC		WYLQKPGQSPQLLIY	
LV2a	DIVMTQTPLSLPVTSGEPASISC	CDR L1	WYLK KPGQSPKLLIY	CDR L2
LV2b	DIVMTQTPLSLPVTSGEPVSISC		WYLK KPGQSPQLLIY	
LV4	DIVMTQTPLSLPVT LGEPVSISC		WYLK KPGQSPKLLIY	
LV6	DVVMQTPLSLPVT LGEPASISC		WYLK KPGQSPKLLIY	

	23456789012345678901234567890123	456789012	3456789012
KM5907 VL	GVPDRFSGSGSGTDFTLKIRRVEADDLGVYYC	FQGSHIPWT	FGGGTNLEIK
LV0	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC		FGGGTKVEIK
LV1a	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC		FGGGTKVEIK
LV1b	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC		FGGGTKVEIK
LV1c	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC		FGGGTKVEIK
LV2a	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC	CDR L3	FGGGTKVEIK
LV2b	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC		FGGGTKVEIK
LV4	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC		FGGGTKVEIK
LV6	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC		FGGGTKLEIK

图7

	123456789012345678901234567890	12345	67890123456789	01234567890123456
KM5907 VH	EVQVVESGGNLVKPGGSLKLSASGFTFS	RYGMS	WVRQTPDKRLEWVA	SISATFTYTYTNDNVKG
HV0	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS		WVRQAPGKGLEWVS	
HV1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS		WVRQAPGKRLEWVS	
HV2a	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS		WVRQAPGKRLEWVS	
HV2b	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	CDR H1	WVRQAPGKGLEWVA	CDR H2
HV3a	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS		WVRQAPGKRLEWVS	
HV3b	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS		WVRQAPGKRLEWVA	
HV3c	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS		WVRQAPGKRLEWVS	
HV4	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS		WVRQAPGKGLEWVA	
HV7	EVQVLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS		WVRQAPGKRLEWVA	

	78901234567890123456789012345678	901234567	89012345678
KM5907 VH	RFTISRDNKNTLYLQMSSLRSEDGMYCTR	QDNYAWFDS	WGQGLVTVSA
HV0	RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK		WGQGLVTVSS
HV1	RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK		WGQGLVTVSS
HV2a	RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR		WGQGLVTVSS
HV2b	RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	CDR H3	WGQGLVTVSS
HV3a	RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTGVYYCAR		WGQGLVTVSS
HV3b	RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTK		WGQGLVTVSS
HV3c	RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTGVYYCTK		WGQGLVTVSS
HV4	RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTGVYYCTR		WGQGLVTVSS
HV7	RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDGMYCTR		WGQGLVTVSS

图8

	12345678901234567890123	45678901234	567890123456789	0123456
KM5916 VL	DIQMTQSPSSLSASLGGKVTITC	KASQDINKYIA	WYQHKPGQGPRLLIH	YTSSLQP
LVO	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC		WYQQKPGKAPKLLIH	
LV1a	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC	CDR L1	WYQHKPGKGPKLLIH	CDR L2

	78901234567890123456789012345678	90123456	7890123456
KM5916 VL	GIPSRFSGSGGRDYSFISNLEPEDIATYYC	LQYDYTMT	FGGGTKLEIR
LVO	GVPSRFSGSGSGTDFSFYISNLEPEDIATYYC		FGGGTKVEIK
LV1a	GVPSRFSGSGSGTDFSFYISNLEPEDIATYYC	CDR L3	FGGGTKVEIK

图9

	123456789012345678901234567890	12345	67890123456789	01234567890123456
KM5916 VH	DVKLVESGEGLVKPGGSLKLSKAASGFTFS	RNAMS	WVRQTPEKRLEWVA	YISSGSDYIYYADTVKG
HV0	QVQLQESGGGLVKPGGSLKLSKAASGFTFS	CDR H1	WVRQTPDKRLEWVA	CDR H2
HV1	QVQLQESGGGLVKPGGSLKLSKAASGFTFS		WVRQTPDKRLEWVA	
HV3	QVQLQESGGGLVKPGGSLKLSKAASGFTFS		WVRQTPEKRLEWVA	

	78901234567890123456789012345678	901234567890	12345678901
KM5916 VH	RFTVSRDNARNTLYLQMTSLRSEDNTAMYFCTR	FSYGYGKNAPDY	WGQGTSTVTVSS
HV0	RFTISRDNAKNTLYLQMSLKSSEDNTAMYCAR	CDR H3	WGQGTMTVTVSS
HV1	RFTISRDNAKNTLYLQMSLKSSEDNTAMYCTR		WGQGTMTVTVSS
HV3	RFTISRDNAKNTLYLQMSLKSSEDNTAMYCTR		WGQGTMTVTVSS

图10

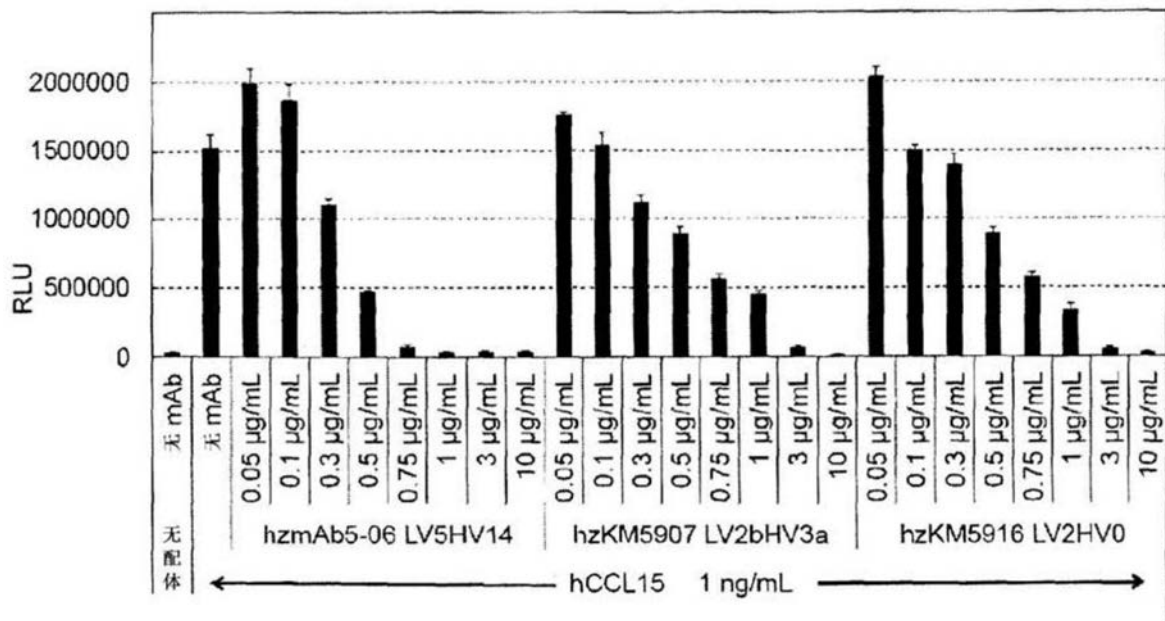


图11

专利名称(译)	抗人CCR1单克隆抗体		
公开(公告)号	CN110959014A	公开(公告)日	2020-04-03
申请号	CN201880048205.3	申请日	2018-07-18
[标]申请(专利权)人(译)	国立大学法人京都大学		
申请(专利权)人(译)	国立大学法人京都大学		
当前申请(专利权)人(译)	国立大学法人京都大学		
[标]发明人	甲斐正之 小川进也 武藤诚 河田健二 平位秀世 坂井义治 前川平		
发明人	甲斐正之 小川进也 武藤诚 河田健二 平位秀世 坂井义治 前川平		
IPC分类号	C07K16/28 A61K39/395 A61P29/00 A61P35/00 A61P37/02 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N5/12 C12N15/13 C12P21/08 G01N33/53		
CPC分类号	A61K39/395 A61P29/00 A61P35/00 A61P37/02 C07K16/28 C12N5/10 C12N5/12 G01N33/53 A61P43/00 C07K16/2866 G01N33/577		
代理人(译)	盛曼		
优先权	20171139157 2017-07-18 JP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明的课题在于提供与人CC趋化因子受体1(CCR1)结合而抑制人CCR1的活化的单克隆抗体或该抗体片段。本发明涉及与人CCR1的胞外区结合而抑制由人CC趋化因子配体15(CCL15)引起的人CCR1的活化的单克隆抗体或该抗体片段、产生该抗体的杂交瘤、具有编码该抗体或该抗体片段的碱基序列的核酸、含有包含该核酸的载体的转化细胞、使用该杂交瘤或该转化细胞的该抗体或该抗体片段的制造方法、包含该抗体或该抗体片段的治疗剂和诊断剂、以及使用该抗体或该抗体片段的CCR1相关疾病的治疗方法和诊断方法。

抗体名	来源	亚类
KM5907	小鼠	IgG1
KM5908	小鼠	IgG2a
KM5909	小鼠	IgG1
KM5911	小鼠	IgG2b
KM5915	小鼠	IgG2b
KM5916	小鼠	IgG2b
KM5954	小鼠	IgG2a
KM5955	小鼠	IgG2a
KM5956	小鼠	IgG2a