

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2009-536641

(P2009-536641A)

(43) 公表日 平成21年10月15日(2009.10.15)

(51) Int.Cl.	F 1			テーマコード (参考)
C07K 16/28	(2006.01)	C 07 K	16/28	Z N A
C12N 15/02	(2006.01)	C 12 N	15/00	C
C12P 21/08	(2006.01)	C 12 P	21/08	
C12N 15/09	(2006.01)	C 12 N	15/00	A
A61K 39/395	(2006.01)	A 61 K	39/395	N

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 24 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2009-509448 (P2009-509448)	(71) 出願人	501014658 ハンワ ケミカル コーポレイション 大韓民国 ソウル 100-797 チュ ング チャンギョードン 1
(86) (22) 出願日	平成19年5月31日 (2007.5.31)		
(85) 翻訳文提出日	平成20年9月30日 (2008.9.30)		
(86) 國際出願番号	PCT/KR2007/002647		
(87) 國際公開番号	W02007/139359	(74) 代理人	110000338 特許業務法人原謙三國際特許事務所
(87) 國際公開日	平成19年12月6日 (2007.12.6)		
(31) 優先権主張番号	60/803,521	(72) 発明者	チョン, チョン ホ 大韓民国, 791-754 キョンサンプ ックト, ポハンシ, ブックーク, ヨン
(32) 優先日	平成18年5月31日 (2006.5.31)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

(71) 出願人 501014658

ハンワ ケミカル コーポレイション
大韓民国 ソウル 100-797 チュ
ング チャンギョードン 1

(74) 代理人 110000338

特許業務法人原謙三國際特許事務所

チョン, チョン ホ

大韓民国, 791-754 キョンサンブックート, ポハンーシ, ブックーク, ヨンフンドン, ヨンフン ウバン タウン,
116-109

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 VCAM-1特異的モノクローナル抗体

(57) 【要約】

本発明は、ヒトおよびマウスのV C A M - 1の両方ともに特異的に結合するモノクローナル抗体、これらの製造方法、これらを含む診断または治療用組成物、およびこれらを用いた診断または治療方法に関する。また、本発明のモノクローナル抗体は、ヒトおよびマウスV C A M - 1に特異的に結合する最初の組み換えモノクローナル抗体であり、ヒトおよびマウス内皮細胞だけでなく、ラット骨格筋および豚内皮細胞で発現されたV C A M - 1にも強い親和力を示し、白血球と活性化された内皮細胞との相互作用を強く阻害する。したがって、本発明に係るモノクローナル抗体は、V C A M - 1によって媒介された、内皮細胞への白血球の接着を効果的に阻害してV C A M - 1関連疾患、特に炎症性疾患および癌を効果的に治療することができる。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

ヒトおよびマウス血管細胞接着分子 - 1 (V C A M - 1) の両方ともに特異的に結合する、モノクローナル抗体。

【請求項 2】

さらに、内皮細胞および骨格筋細胞で発現するヒト、マウス、ラットおよび豚 V C A M - 1 を特異的に結合することを特徴とする、請求項 1 に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 3】

白血球と活性化された内皮細胞との相互作用を阻害することを特徴とする、請求項 1 に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 4】

前記モノクローナル抗体は組み換えモノクローナル抗体であることを特徴とする、請求項 1 に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 5】

配列番号 5 で定義される軽鎖 C D R 1 ; 配列番号 6 で定義される軽鎖 C D R 2 ; および配列番号 7 で定義される軽鎖 C D R 3 を含む軽鎖可変部位を含むことを特徴とする、請求項 4 に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 6】

配列番号 1 で定義される軽鎖アミノ酸配列を含むことを特徴とする、請求項 5 に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 7】

配列番号 8 で定義される重鎖 C D R 1 ; 配列番号 9 または配列番号 1 1 で定義される重鎖 C D R 2 ; および配列番号 1 0 または配列番号 1 2 で定義される重鎖 C D R 3 を含む重鎖可変部位を含むことを特徴とする、請求項 4 ~ 6 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 8】

配列番号 2 で定義される重鎖アミノ酸配列、配列番号 3 で定義される重鎖アミノ酸配列、および配列番号 4 で定義されるアミノ酸配列よりなる群から選ばれるいずれか一つの重鎖アミノ酸配列を含むことを特徴とする、請求項 7 に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 9】

前記モノクローナル抗体はヒト化されたことを特徴とする、請求項 4 に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 10】

配列番号 1 3 で定義される軽鎖アミノ酸配列、および配列番号 1 4 または 1 5 で定義される重鎖アミノ酸配列を含むことを特徴とする、請求項 9 に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 11】

配列番号 5 で定義される軽鎖 C D R 1 ; 配列番号 6 で定義される軽鎖 C D R 2 ; および配列番号 7 で定義される軽鎖 C D R 3 を含む、軽鎖可変領域。

【請求項 12】

配列番号 1 または 1 3 で定義される軽鎖アミノ酸配列を含むことを特徴とする、請求項 1 1 に記載の軽鎖可変領域。

【請求項 13】

配列番号 8 で定義される重鎖 C D R 1 ; 配列番号 9 または配列番号 1 1 で定義される重鎖 C D R 2 ; および配列番号 1 0 または配列番号 1 2 で定義される重鎖 C D R 3 を含む、重鎖可変領域。

【請求項 14】

配列番号 2 で定義される重鎖アミノ酸配列、配列番号 3 で定義される重鎖アミノ酸配列、配列番号 4 で定義される重鎖アミノ酸配列、配列番号 1 4 で定義される重鎖アミノ酸配列、および配列番号 1 5 で定義される重鎖アミノ酸配列よりなる群から選ばれる重鎖アミノ酸配列を含むことを特徴とする、請求項 1 3 に記載の重鎖可変領域。

10

20

30

40

50

【請求項 15】

下記の段階を含む、請求項 1 のモノクローナル抗体を製造する方法：

- (a) 哺乳類動物内に組み換えヒト V C A M - 1 / F c を免疫させる段階、
- (b) 免疫化された哺乳類動物の抗体力値を検出する段階、
- (c) 免疫化された哺乳類動物からポリクローナル抗体を精製する段階、
- (d) 非ヒト哺乳類動物 / ヒトキメラ抗体ライブラリーを構築する段階、および
- (e) 抗体ライブラリーから、抗 V C A M - 1 に特異的な抗体を選別する段階。

【請求項 16】

請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項のモノクローナル抗体および薬学的に許容される担体を含む、V C A M - 1 によって媒介される疾患の診断用組成物。

10

【請求項 17】

V C A M - 1 によって媒介される疾患は炎症性疾患または癌であることを特徴とする、請求項 16 に記載の組成物。

【請求項 18】

炎症性疾患は、関節炎、多発性硬化症、大腸疾患、喘息、動脈硬化、心筋梗塞および臓器移植拒否よりなる群から選ばれることを特徴とする、請求項 17 に記載の組成物。

【請求項 19】

請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項のモノクローナル抗体および薬学的に許容される担体を含む、V C A M - 1 によって媒介される疾患の治療用組成物。

【請求項 20】

V C A M - 1 によって媒介される疾患は炎症性疾患または癌であることを特徴とする、請求項 19 に記載の組成物。

20

【請求項 21】

炎症性疾患は、関節炎、多発性硬化症、大腸疾患、喘息、動脈硬化、心筋梗塞および臓器移植拒否よりなる群から選ばれる、請求項 20 に記載の組成物。

【請求項 22】

請求項 1 のモノクローナル抗体または請求項 16 の診断用組成物を用いて、V C A M - 1 によって媒介される疾患を診断する方法。

【請求項 23】

V C A M - 1 によって媒介される疾患は炎症性疾患または癌であることを特徴とする、請求項 22 に記載の方法。

30

【請求項 24】

炎症性疾患は、多発性硬化症、大腸疾患、喘息、動脈硬化、心筋梗塞および臓器移植拒否よりなる群から選ばれることを特徴とする、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

請求項 1 のモノクローナル抗体または請求項 19 の治療用組成物を投与することを含む、V C A M - 1 によって媒介される疾患を治療する方法。

【請求項 26】

V C A M - 1 によって媒介される疾患は炎症性疾患または癌であることを特徴とする、請求項 25 に記載の方法。

40

【請求項 27】

炎症性疾患は多発性硬化症、大腸疾患、喘息、動脈硬化、心筋梗塞および臓器移植拒否よりなる群から選ばれることを特徴とする、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

請求項 1 のモノクローナル抗体を用いて、V C A M - 1 によって媒介された内細胞への白血球の接着を阻害させる方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

〔技術分野〕

50

本発明は、血管細胞接着分子 - 1 (vascular cell adhesion molecule-1、以下「V C A M - 1」という)に特異的に結合するモノクローナル抗体に関する。具体的には、本発明は、ヒトおよびマウスのV C A M - 1の両方ともに特異的に結合するモノクローナル抗体、これらの製造方法、これらを含む診断または治療用組成物、およびこれらを用いた診断または治療方法に関する。また、本発明は、V C A M - 1によって媒介された、内皮細胞への白血球の接着を阻害させる方法に関する。

【0002】

〔背景技術〕

細胞接着分子 (C A M s) は、循環する血液から炎症反応の起る内皮へまでの白血球の補充において重要である。

10

【0003】

細胞外反応に対する反応における能動的応答者(responder)として、内皮細胞はE - およびP - セレクチンおよび細胞内接着分子 (I C A M) - 1、- 2 および - 3 を含む免疫グロブリンスーパーファミリーの一員、血管細胞接着分子 (V C A M) - 1などの多様なC A Mを発現し、これらは白血球内で発現する炭水化物リガンドおよびインテグリンと反応する。よって、炎症反応における白血球の蓄積を媒介するC A Mの核心役割のため、C A Mの遮断は炎症性障害において治療学的調整のための展望のある戦略になるだろうと思われる。

【0004】

C A Mの中でも、V C A M - 1 および C D 1 0 6 が優勢に発現され、これらは脂質多糖 (L P S)、インターロイキン - 1、インターフェロン - 、または腫瘍怪死因子 (T N F -) による活性化状態で内皮細胞上に誘導的に発現される。V C A M - 1 は、炎症および免疫拒否において活性化された白血球上で発現されるV L A - 4 (Very late antigen-4) および 4 1 インテグリンと結合して内皮細胞と単核球およびT 細胞を含む白血球間の相互作用を引き起こす重要な役割を果たす。現在、炎症性疾患における治療学的調整に対するターゲットとしてV C A M - 1 - V L A - 4 相互作用への関心が高まっている。例えば、インテグリン 4 1 および T R 1 4 0 3 5 の小さいペプチド拮抗剤および 4 インテグリン抗体であるT y s a b r i またはN a t a l i z u m a b は、炎症性腸疾患、多発性硬化症および喘息の改善に有効である。T R 1 4 0 3 5 およびN a t a l i z u m a b は現在、それぞれ臨床2相および3相段階にある。しかも、最近増加する証拠によれば、V C A M - 1 は癌の進行に密接に関連している。具体的に、第一に、可溶性V C A M - 1 は多様な癌の診断に対するマーカーとして見なされる。第二に、腫瘍の周囲で発現されるV C A M - 1 は、腫瘍新血管新生(neovascularization)のための骨髄由来の前駆細胞の回帰を促進する重要な役割を担当する。第三に、V C A M - 1 は転移の際に重要な段階である循環する腫瘍細胞の血管遊出において重要である。第四に、免疫抵抗性が非常に高い癌細胞株におけるV C A M - 1 の下方制御は腫瘍免疫浸透を減少させるものと明らかになった。このような観点から、癌の治療において抗接着薬物の診断および治療に対する必要は増加しつつある。

20

【0005】

〔発明の開示〕

〔技術的課題〕

30

V C A M - 1 - V A L - 4 の相互作用に対する最近の関心にも拘らず、V C A M - 1 を中和させる抗体の開発は盛んには研究されていない。マウスV C A M - 1 に対するモノクローナル抗体であるM / K - 2 . 7 が最近開発され、コラーゲン誘導関節炎マウスモデルにおいて関節炎を減少させる効果を示したが、前記抗体の有用性は臨床適用のためにさらに検証されなければならない。これまで、抗接着分子療法の最も臨床的な試みはヒト化モノクローナル抗体を使用したことであった。このような観点から、前臨床および臨床の研究のためにマウスおよびヒトV C A M - 1 に特異的に結合し、ヒト化抗体への転換が可能なモノクローナル抗体の開発が切実に求められている。

40

【0006】

50

〔技術的解決方法〕

最近の研究において、本発明者は、最初、合成抗体ライブラリーからウサギの重鎖(V_H)および軽鎖(V_L)可変ドメインとヒト重鎖(C_{H1})および軽鎖(C_L)不变ドメインを含むヒトおよびマウスVCAM-1に特異的なウサギ/ヒトキメラ化モノクローナル抗体を製造した。このような抗体は、内皮細胞および骨格筋細胞などの多様な細胞で発現するヒト、マウス、ラットおよび豚VCAM-1を特異的に認識する。しかも、このような抗体は、U937単核球(promonocytic leukocyte)と活性化された内皮細胞との相互作用を遮断する強い活性を持つ。ついに、本発明者は、マウスVCAM-1に由來した配列を有するVCAM-1特異的な抗体に対するエピトープ部分を確認した。要するに、このような本研究はヒトおよびマウスVCAM-1の両方ともに特異的な効果的治療用モノクローナル抗体を提供する。

10

【0007】

〔図面の簡単な説明〕

本発明は次の詳細な説明からさらに十分に理解されるであろう。添付図面は説明のために提供されるものに過ぎず、本発明を限定するものではない。

【0008】

図1a～図1cはヒトおよびマウスVCAM-1に特異的な抗VCAM-1Fabクローンの精製および特性描写(characterization)を示すもので、図1aは0.2 μ gの抗VCAM-1Fabに対するSDS-PAGEおよびクマシーブルー染色結果であって、25kDaの分子量を持つ抗VCAM-1Fabを矢印によって示した。図1bは96ウェルプレートにコートさせた組み換えヒトおよびマウスVCAM-1/Fcキメラを免疫前血清、免疫血清および精製された抗VCAM-1Fabそれぞれを用いて検出した結果を示すものである。図1cは相異なる量の組み換えヒトおよびマウスVCAM-1/Fcキメラをゲルにロードし、抗VCAM-1Fabを用いて免疫プロットした結果である。

20

【0009】

図2は抗VCAM-1Fabクローンの重鎖および軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示す。選択されたFabクローンをDNAシーケンシングした後、特定された重鎖(V_H)および軽鎖(V_L)可変領域の配列を図示のように示した。FRは構造領域(framework region)、CDRは相補性決定領域(complementarity-determining region)を意味する。また、抗VCAM-1Fabクローンに由來したヒト化抗体を示した。

30

【0010】

図3は抗VCAM-1Fabによって多様な細胞類型で発現された天然型VCAM-1を検出した結果を示すもので、hTNFまたは H_2O_2 の存在(実線)または非存在(破線)の下に培養されたHUVEC、MEC、PAECおよびL6骨格筋細胞を抗VCAM-1Fabを用いてフローサイトメトリーした結果である。精製されたVCAM-1特異的多血清(polysera)を陽性対照群として使用した。現れた結果は少なくとも3回の別個の実験から得られた平均結果である。

【0011】

図4aおよび図4bは白血球と内皮細胞間の相互作用における抗VCAM-1Fabの中和効果を示すもので、図4aは400 μ m H_2O_2 で処理されたPAECを抗VCAM-1Fabまたは抗VCAM-1IgGの存在(太い線)または非存在(細い線)の下で培養し、CSFE標識付きU937細胞を用いて接着アッセイ(adhesion assay)した結果であって、内皮細胞に結合したU937の量をフローサイトメトリーによって検出した。破線は H_2O_2 非存在状態で培養した不活性化PAEC内皮細胞に対するU937の基本的な結合のために示すために使用した。図4bは内皮細胞に結合したCSFE標識付きU937の百分率数値を垂直棒で示したもので、現れた結果は同様に行われた2回の別個の実験から得られた平均 \pm S.Dを示す。

40

【0012】

〔発明を実施するための最善の様態〕

50

上述した課題を解決するための本発明の一つの様態として、本発明は、ヒトおよびマウス血管接着細胞分子-1（以下、VCAM-1という）の両方ともに特異的に結合するモノクローナル抗体を提供する。

【0013】

本願で使用される用語「抗体」は、免疫学的に特定の抗原と反応する免疫グロブリン分子を含み、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を全て含む。また、前記用語は、キメラ性抗体（例えば、ヒト化免疫抗体）および異種結合抗体（例えば、両特異性抗体）などの遺伝工学によって生産された形態を含む。また、用語「抗体」は、抗原結合能力を持つ断片、例えばFab'、Fab(ab')2、Fab、FvおよびrIgGを含む、抗体の抗原結合形態を含む。また、前記用語は、組み換え単一鎖Fv断片（scFv）を示し、二価または両特異性分子、ジアバディ(diabody)、トリアバディ(triabody)およびテトラバディ(tetrabody)を含む。二価および両特異性分子は、例えばKostelnik等(1992, *J. Immunol.* 148:15467)、PacakおよびPleckthuhn(1992, *Biochemistry* 31:1579)、Hollinger等(1993, *supra*)、Grubber等(1994, *J. Immunol.* 153:68)、Zhu等(1997, *Protein Sci.* 6:781)、Hu等(1996, *Cancer Res.* 56:3055)、Adams等(1993, *Cancer Res.* 53:4026)およびMcCartney等(1995, *Protein Eng.* 8:301)に記述されている。

10

【0014】

また、用語「モノクローナル抗体」は、実質的に同一の抗体集団から得た単一分子組成の抗体分子を指す。このようなモノクローナル抗体は、特定のエピトープに対して単一結合特異性および新和度を示す。

20

【0015】

典型的に、免疫グロブリンは、重鎖および軽鎖を有し、それぞれの重鎖および軽鎖は不变部位および可変部位（前記部位は「ドメイン」として知られている）を含有する。軽鎖および重鎖の可変部位は「相補性決定領域」（complementarity-determining region、以下「CDR」という）と呼ばれる3つの多変可能な領域および4つの「構造領域（framework region）」を含む。前記CDRは主に抗原のエピトープに結合する役割を果たす。それぞれの鎖のCDRは典型的にN末端から始まって順次CDR1、CDR2、CDR3と呼ばれるし、特定のCDRが位置している鎖によって識別される。

30

【0016】

好適な一様態において、本発明のモノクローナル抗体は、配列番号5で定義される軽鎖CDR1；配列番号6で定義されるCDR2；および配列番号7で定義されるCDR3を含む軽鎖可変部位を含むモノクローナル抗体である。さらに好ましくは、配列番号1で定義される軽鎖アミノ酸配列を含むモノクローナル抗体である。

【0017】

また、好適な一様態において、本発明のモノクローナル抗体は、配列番号8で定義される重鎖CDR1；配列番号9または配列番号11で定義される重鎖CDR2；および配列番号10または配列番号12で定義される重鎖CDR3を含む重鎖可変部位を含むモノクローナル抗体である。さらに好ましくは、配列番号2、配列番号3および配列番号4で定義される重鎖アミノ酸配列番号のいずれか一つを含むモノクローナル抗体である。

40

【0018】

また、本発明のモノクローナル抗体は、前記軽鎖可変部位および前記重鎖可変部位を全て含むモノクローナル抗体であってもよい。

【0019】

一方、本発明のモノクローナル抗体は、前記相補性決定領域（CDR）に公知の治療用抗体の構造領域（FR）を接合させて製造することができる。好ましくは、前記構造領域は図2に開示されたアミノ酸配列を有する。

【0020】

好適な別の様態において、本発明に係るモノクローナル抗体は、ヒトに対するより適切な治療のためにヒト化できる。さらに好ましくは、前記ヒト化モノクローナル抗体は、配

50

列番号 13 で定義される軽鎖アミノ酸配列および / または配列番号 14 または配列番号 15 で定義される重鎖アミノ酸配列を含むモノクローナル抗体である。

【0021】

用語「ヒト化抗体」とは、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含む免疫グロブリン分子であって、受血者の CDR からの残基が、好適な特異性、親和力および収容力を持つマウス、ラットまたはウサギなどの非ヒト種（供血者の抗体）の CDR からの残基で代替されるヒト免疫グロブリン（受血者の抗体）を含む。ヒト化は、Winter と共同研究者 (Jones et al., Nature 321:522-525(1986); Riechmann et al., Nature 332:323-327(1988)) の方法によって、非ヒト種の CDR 配列を、相応するヒト抗体の配列で置換することにより必須的に行われ得る。ヒト化抗体は、通常、ヒトの治療に用いられるが、3 つ以上の潜在的な利点を持つ。第一に、これはヒト免疫体系とより良好に相互作用し、例えば補体依存性細胞毒性 (CDC) または抗体依存性細胞性細胞毒性 (ADCC) によって目的細胞をより効率よく破壊する。第二に、ヒト免疫体系は前記抗体を外来の者と認識しなければならない。第三に、さらに少ない量、より少ない頻度の薬物を投与したときにもヒト循環系内半減期が天然発生抗体と類似であろう。

10

【0022】

WO 93/14220 には、VCAM-1 の 4 番目の免疫グロブリンドメインを認識するモノクローナル抗体が開示されており、このような抗体がヒト VCAM-1 に対して効果があることを示した。ところが、本発明のモノクローナル抗体は、前述したように、ヒト、マウスおよび豚内皮細胞やラット骨格筋細胞などの多様な細胞類型で発現する VCAM-1 と結合する新規のモノクローナル抗体であり、WO 93/14200 に開示されたモノクローナル抗体とはそのエピトープも異なる。

20

【0023】

このような本発明のモノクローナル抗体は、ヒト、マウスおよび豚内皮細胞やラット骨格筋細胞などの多様な細胞類型で発現される VCAM-1 と強い親和性を持つため、VCAM-1 に対する抗原認識を有用に使用することが可能な任意の適用で使用でき、特に、活性化された内皮細胞に対する白血球の結合を効果的に阻害させるので、炎症性障害などの VCAM-1 関連疾患に対する効果的な診断および治療方法を提供することができる。

【0024】

したがって、ヒトおよびマウスの VCAM-1 の両方ともに特異的に結合する本発明のヒトモノクローナル抗体は、単独または通常の薬学的に許容される担体と共に炎症性障害などの VCAM-1 関連疾患に対する診断および治療用薬学的組成物の形で使用可能である。

30

【0025】

また、本発明のモノクローナル抗体は、多様な目的のために他の抗体、生物学的活性を持つ製剤または物質と共に使用できる。例えば、本発明のモノクローナル抗体は、内皮細胞で発現する VCAM-1 によって特定付けられる疾患の治療で 4B9 または他の抗 VCAM-1 抗体と共に使用できる。また、本発明のモノクローナル抗体は、炎症反応で現れる内皮細胞受容体（例えば、ELAM1 や ICAM1 など）を認識する抗体と併用して使用できるうえ、公知の炎症性疾患抑制薬物とも併用して使用できる。

40

【0026】

別の様態として、本発明は、配列番号 5 のアミノ酸配列を持つ CDR1；配列番号 6 のアミノ酸配列を持つ CDR2；および配列番号 7 のアミノ酸配列を持つ CDR3 を含む軽鎖可変領域に関する。好ましくは、前記軽鎖可変領域は配列番号 1 または配列番号 13 で定義される軽鎖アミノ酸配列を含む。

【0027】

別の様態として、本発明は、配列番号 8 のアミノ酸配列を持つ CDR1；配列番号 9 または 11 のアミノ酸配列を持つ CDR2；および配列番号 10 または 12 のアミノ酸配列を持つ重鎖可変領域に関する。好ましくは、前記重鎖可変領域は配列番号 2、3、4、14 および 15 で定義される重鎖アミノ酸配列のいずれか一つを含む。

50

【0028】

別の様態として、本発明は、ヒトおよびマウスV C A M - 1の両方ともに特異的に結合するモノクローナル抗体の製造方法に関する

本発明のモノクローナル抗体は、公知のモノクローナル抗体製造技術で容易に製造できる。例えば、モノクローナル抗体を製造する方法は、免疫された動物から得たBリンパ球を用いてハイブリドーマを製造することにより行われてもよく(Koehler and Milstein, 1976, *Nature*, 256:495)、ファージディスプレイ技術を用いて行われてもよいが、これに限定されない。

【0029】

ファージディスプレイ技術を用いた抗体ライブラリーは、ハイブリドーマを製作せず、直ちにBリンパ球から抗体遺伝子を得てファージの表面に抗体を発現させる方法である。ファージディスプレイ技術を用いると、B細胞の不滅化(immortalization)によってモノクローナル抗体を生成することに関連した既存の多くの難しさが克服できる。

【0030】

一般なファージディスプレイ技術は、1) ファージの外皮タンパク質pIII(またはpIV)のN末端に該当する遺伝子部位に無作為配列のオリゴヌクレオチドを挿入する段階、2) 天然型の外皮タンパク質の一部と前記無作為配列のオリゴヌクレオチドによってコードされるポリペプチドの融合タンパク質を発現させる段階、3) 前記オリゴヌクレオチドによってコードされるポリペプチドと結合することが可能な受容体物質を処理する段階、4) 受容体に結合したペプチド-ファージ粒子を低いpHまたは結合競争力のある分子を用いて溶出させる段階、5) パンニング(panning)によって溶出されたファージを宿主細胞内で增幅させる段階、6) 所望の量を得るために前記方法を繰り返し行う段階、および7) パンニングによって選別されたファージクローンのDNA配列から活性のあるペプチドの配列を決定する段階から構成される。

【0031】

好適な一様態として、本発明のモノクローナル抗体の製造方法は、ファージディスプレイ技術を用いて行われることができ、下記の段階を含む：

- (a) 哺乳類動物内に組み換えヒトV C A M - 1 / F cを免疫させる段階、
- (b) 免疫化された哺乳類動物の抗体力価を検出する段階、
- (c) 免疫化された哺乳類動物からポリクローナル抗体を精製する段階、
- (d) 非ヒト哺乳類動物 / ヒトキメラ抗体ライブラリーを構築する段階、および
- (e) 抗体ライブラリーから、抗V C A M - 1に特異的な抗体を選別する段階。

【0032】

当業者は、公知のファージディスプレイ技術、例えばBarbabs等(METHODS: A Companion to Methods in Enzymology 2:119, 1991 and J. Virol. 2001, Jul;75(14):6692-9)およびWinter等(Ann. Rev. Immunol. 12:433, 1994)の論文などに公知になった方法を参考し、前記本発明の製造方法の各段階を容易に行うことができる。

【0033】

具体的に、(a) 哺乳類動物内に組み換えヒトV C A M - 1 / F cを免疫させる方法は、当業界に公知になっている任意の動物の免疫化方法で行うことができる。例えば、文献[Harlow and Lane, Antibodies:A Laboratory Manual, New York:Cold Spring Harbor Press(1990)]を参照する。ヒト以外の動物、例えばマウス、ラット、羊、ヤギ、豚、牛および馬の免疫化方法は、当業界によく知られている。好ましくは、V C A M - 1 / F c抗原は免疫反応の促進のためにアジュバントと共に投与される。このようなアジュバントは、完全または不完全フロイントアジュバント、R I B I (ムラミルジペプチド)またはI S C O M (免疫刺激複合体)を含む。

【0034】

(b) 免疫化された哺乳類動物の抗体力価を検出する方法であって、当業者は公知の力価測定法、例えば酵素結合免疫分析法(enzyme-linked immunoassay、E L I S A)または放射性免疫分析法(radioimmunoassay、R I A)を使用することができるが、これに限

10

20

30

40

50

定されない。好ましくは E L I S A を用いて行われる。

【 0 0 3 5 】

(c) 免疫化された哺乳類動物からポリクローナル抗体を精製する方法としては、多様に知られている分離および精製技術を使用することができる。このような分離技術はタンパク質 A - セファロース (Sephadex) を用いた親和性クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー (size-exclusion chromatography) およびイオン交換クロマトグラフィーを含む (Coligan et al. pages 2.7.1-2.7.12 and pages 2.9.1-2.9.3. および Baines et al., "Purification of Immunoglobulin G (IgG)," in METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, VOL. 10, pages 79-104 (The Humana Press, Inc. 1992 参照)。

【 0 0 3 6 】

(d) 非ヒト哺乳類動物 / ヒトキメラ抗体ライブラリーを構築する方法および (e) 抗体ライブラリーから抗 V C A M - 1 に特異的な抗体を選別する方法は、前述した一般なファージディスプレイ法によって容易に行われ得る。

【 0 0 3 7 】

前記段階で抗体ライブラリーを構築するために使用できるファージは、例えばフィラメント性ファージ (filamentous phage) であって、 f d 、 M 1 3 、 f 1 、 I f 1 、 I k e 、 Z j / Z 、 F f 、 X f 、 P f 1 または P f 3 ファージがあるが、これに限定されない。また、前記フィラメント性ファージの表面上における異種遺伝子の発現のために使用できるベクターには、例えば f U S E 5 、 f A F F 1 、 f d - C A T 1 または f d t e t D O G などのファージベクター、または p H E N 1 、 p C o m b 3 、 p C o m b 8 または p S E X などのファージミドベクターがあるが、これに限定されない。好ましくは p C o m b 3 X ファージミドベクターである。

【 0 0 3 8 】

また、増幅のための組み換えファージの成功的な再感染のために要求される野生型外皮タンパク質を提供するために使用できるヘルパーファージには、例えば M 1 3 K 0 7 または V S C M 1 3 などがあるが、これに限定されない。好ましくは V S C M 1 3 である。

【 0 0 3 9 】

具体的な一実施例において、本発明者は、本発明に係るヒトおよびマウス V C A M - 1 の両方ともに特異的な組み換え抗体を製造するために、まず、組み換えマウス V C A M - F c キメラをウサギで免疫させた。免疫化過程を通じて収集されたウサギ血清の酵素免疫アッセイは、全てのウサギが抗原に対して増加した抗体力価を持っていることを示した (データを表示せず)。5回の促進注射の後、総 R N A を免疫化ウサギの脾臓および骨髄から分離し、 c D N A 合成を行った。3段階の P C R を用いて、ウサギ / ヒトキメラ抗体ライブラリーを製造し、ファージミドベクター p C o m b 3 X でクローニングした。これは独立した形質転換体 5.7×10^9 の複雑度 (complexity) を示した。

【 0 0 4 0 】

免疫化マウス V C A M - 1 の 6 回のバイオパンニングの後、20 クローンを無作為に選別し、ヘルパーファージ (helper phage) を感染させた後、ファージ酵素免疫アッセイでヒトおよびマウス V C A M - 1 の両方ともに対するそれらの反応性を検査した。選別された 20 クローンのうち 3 クローンは、ヒトおよびマウス V C A M - 1 の両方ともに対する強い反応性を示した。

【 0 0 4 1 】

このような 3 つのクローンを以後の D N A シーケンシングによって分析した。3 クローンは非常に同様のヌクレオチド配列を持っており、その配列を図 2 に示した。

【 0 0 4 2 】

抗 V C A M - 1 キメラ F a b のヒトにおける免疫生成を予防するために、本発明者は、公知の治療用ヒト化抗体の可変部位の構造領域上に抗 V C A M - 1 F a b の 6 つの C D R を接合させてヒト化抗体を製造しようとした。デザインされた配列は図 2 に示した。

【 0 0 4 3 】

その後、選別された V C A M - 1 特異的 F a b の生化学的および機能的特性 化のため

10

20

30

40

50

に、大腸菌(*E.coli*)における過発現および抗H A 親和性カラムクロマトグラフィーによる精製の後、0.3mgの抗VCAM-1特異的なF a bを1Lの振とう培養液(shaking culture)から最終的に収得した。その純度はSDS-PAGEおよびクマシーブルー染色を用いて確認した(図1A)。酵素免疫アッセイ実験は、精製された抗体が特異的にヒトおよびマウスVCAM-1に結合することを示す。免疫前血清および免疫血清は、実験セット内で陰性対照群および陽性対照群として用いられた(図1B)。しかも、ヒトおよびマウスVCAM-1の両方ともに対する抗体の特異性を証明するために、精製された組み換えヒトおよびマウスVCAM-1/F cキメラを、精製された抗VCAM-F a bを用いてウエスタンプロットした。その結果は、精製されたVCAM-1 F a bが成功的にヒトおよびマウスVCAM-1/F cキメラそれぞれと反応することを示す(図1C)。このような発見は、前記VCAM-1-F a bがヒトおよびマウスVCAM-1の両方ともに特異性を持っているという明白な証拠を提供する。

10

【0044】

また、本発明者は、天然型VCAM-1に対するその反応性を調べるために、VCAM-1特異的F a bをフローサイトメトリーによって分析した。選別されたF a bが、h-TNFで刺激されたHUVEC、H₂O₂で活性化された豚およびマウス内皮細胞内で発現されたVCAM-1に結合することを見出した。また、このようなF a bがラット骨格筋細胞内で基本的に発現されたVCAM-1と反応することを証明した(図3)。白血球と活性化された内皮細胞との相互作用がVCAM-1によって媒介されるため、本発明者は選別されたF a bがこのような相互作用を阻害することができるか否かを実験した。このような目的のために、本発明者は、選別されたF a bを用いた培養の後、CFSE標識付きU937ヒト前単核白血球(promonocytic leukocyte)、およびhTNFまたはH₂O₂で刺激されたヒト、マウスおよび豚内皮細胞を用いて接着アッセイを行った。得られた結果によって、本発明に係るモノクローナル抗体はヒト単核球と3類型の活性化内皮細胞間の相互作用の効果的な阻害作用を示すことが分かった(図4)。

20

【0045】

別の様態として、本発明は、ヒトおよびマウスVCAM-1の両方ともに特異的に結合するモノクローナル抗体を含有する、VAM-1の発現有無または発現程度に関連した疾患またはVCAM-1によって媒介される疾患に対する診断用組成物、およびこれを用いた前記疾患の診断方法に関する。

30

【0046】

例えば、本発明のヒト化モノクローナル抗体を生物学的試料と反応させ、抗原-抗体複合体の形成を検出することにより、VCAM-1タンパク質を検出することができる。

【0047】

本明細書で使用された用語「生物学的試料」としては、組織、細胞、全血、血清、血漿、組織剖検試料(脳、皮膚、リンパ節、脊髄など)、細胞培養上澄液、破裂された真核細胞および細菌発現系などを挙げることができるが、これに限定されない。これらの生物学的試料を操作している状態あるいは操作していない状態で本発明の抗体と反応させてVCAM-1タンパク質の存在、炎症性疾患または癌の有無を確認することができる。

40

【0048】

本明細書で使用された用語「抗原-抗体複合体」とは、試料中のVCAM-1タンパク質抗原とこれを認知する本発明に係るモノクローナル抗体の結合物を意味し、このような抗原-抗体複合体の形成においては、比色法(colormetric method)、電気化学法(electrochemical method)、蛍光法(fluorimetric method)、発光法(luminometry)、粒子計数法(particle counting method)、肉眼測定法(visual assessment)、および閃光計数法(scintillation counting method)よりなる群から選ばれる任意の方法で検出することができる。ところが、必ずしもこれらに限定されるものではなく、多様な応用と適用が可能である。

【0049】

本発明では、抗原-抗体複合体を検出するためのもので、いろいろの標識体を使用することができる。

50

【0050】

具体的な例としては、酵素、蛍光物、リガンド、発光物、微小粒子、および放射性同位元素よりなる群から選択でき、必ずしもこれらに限定されるものではない。

【0051】

検出標識体として使用される酵素にはアセチルコリンエステラーゼ、アルカリホスファーゼ、 β -D-ガラクトシダーゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、 β -ラタマーゼなどがあり、蛍光物にはフルオレセイン、Eu³⁺、Eu³⁺キレートまたはクリプタートなどがあり、リガンドにはビオチン誘導体などがあり、発光物にはアクリジニウムエヌテル、イソルミノール誘導体などがあり、微小粒子にはコロイド金、着色されたラテックスなどがあり、放射性同位元素には⁵⁷Co、³H、¹²⁵I、¹²⁵I-ボントンハンター試薬などがある。

10

【0052】

好ましくは、抗原-抗体複合体を酵素免疫吸着法(ELISA)を用いて検出することができる。酵素免疫吸着法(ELISA)は、固体支持体に付着した抗原を認知する標識付き抗体を用いる直接的ELISA、固体支持体に付着した抗原を認知する抗体と抗原の複合体における捕獲抗体を認知する標識付き二次抗体を用いる間接的ELISA、固体支持体に付着した抗体と抗原の複合体における抗原を認知する標識付き別の抗体を用いる直接的サンドイッチELISA、固体支持体に付着した抗体と抗原の複合体における抗原を認知する別の抗体と反応させた後、この抗体を認知する標識付き2次抗体を用いる間接的サンドイッチELISAなどの多様なELISA方法を含む。前記モノクローナル抗体は、検出標識を持つことができ、検出標識を持たない場合はこれらのモノクローナル抗体を捕獲することができ、検出標識を持つ別の抗体を処理して確認することができる。

20

【0053】

別の様態として、本発明は、ヒトおよびマウスVCAM-1の両方ともに特異的に結合するモノクローナル抗体および薬学的に許容される担体または賦形剤を含有するVCAM-1の過発現またはVCAM-1に媒介される疾患の予防または治療用薬学的組成物、およびこれを用いて前記疾患を治療する方法に関する。前記疾患は好ましく炎症性疾患または癌である。

【0054】

本発明の抗体組成物は、薬学的に有効な量で单一投与または多重投与できる。抗体組成物は、液剤、酸剤、エアロゾール、カプセル剤、腸溶コーティング錠剤またはカプセル剤または座剤の形で投与することができる。投与経路は、腹腔内投与、静脈内投与、筋肉内投与、皮下内投与、内皮投与、経口投与、局所投与、鼻内投与、肺内投与、直腸内投与などを含むが、これに限定されない。ところが、経口投与の際に、ペプチドは消化されるため、経口用組成物は活性薬剤をコートし、あるいは胃における分解から保護されるように剤形化されなければならない。また、製薬組成物は活性物質が標的細胞に移動することができる任意の装置によって投与できる。

30

【0055】

本発明の抗体組成物は、薬学的に有効な量で投与する。「薬学的に有効な量」とは、医学的治療または予防に適用できる合理的な恵み/危険の比で疾患の治療または予防に十分な量を意味する。

40

【0056】

有用用量水準は、疾患の重証度、薬物の活性、患者の年齢、体重、健康、性別、患者の薬物に対する敏感度、使用された本発明の組成物の投与時間、投与経路および排出比率、治療期間、使用された本発明の組成物と配合または同時使用される薬物を含む要素、およびその他医学分野によく知られている要素によって決定できる。また、本発明の抗体組成物は、個別治療剤として投与し、あるいは他の治療剤と併用して投与することができ、従来の治療剤とは順次または同時に投与することができる。

【0057】

本発明の薬学的組成物を薬学的に有効な量で投与する場合、VCAM-1と強い親和性

50

を持つ本発明のモノクローナル抗体が内皮細胞に発現されたV C A M - 1に特異的に結合することによりV C A M - 1を中和させ、前記内皮細胞に白血球が接着されることを阻害することにより、V C A M - 1関連疾患を治療することができる。好ましいV C A M - 1関連疾患は、炎症性疾患または癌であり、さらに好ましくは、前記炎症性疾患は関節炎、多発性硬化症、大腸疾患、喘息、動脈硬化、心筋梗塞、臓器移植拒否である。

【 0 0 5 8 】

本明細書で引用された文献は、その全部が参考文献として含まれる。また、当該技術分野の熟練者は通常の実験によって、ここで、特に記述した本発明の特定の様態の数多くの同等なものがあることを認識または確認することができる。このような同等なものは本請求項の範囲に含まれる。

10

【 0 0 5 9 】

以下、実施例によって本発明を詳細に説明する。これらの実施例は本発明を例示するもので、本発明を限定するものではない。

【 0 0 6 0 】

〔発明の様態〕

〔実施例〕

1. 物質

組み換えヒトおよびマウスV C A M - 1 / F cキメラは、R & D S y s t e m s (M i n n e a p o l i s s、M N) から購入した。拡張された高充実度(h i g h f i d e l i t y) P C RシステムおよびH R Pコンジュゲート抗インフルエンザAウイルスヘマグルチニン(H A)抗体(3 F 1 0)は、R o c h e (M a n n h e i m、G e r m a n y) のものを使用した。T M B溶液はP i e r c e (R o c k f o r d、I L) のものを使用した。5, 6-カルボキシ-フルオレセインスクシニミジルエステル(C S F E)およびフルオレセインイソチオシアネート(F I T C)標識付きヤギ抗ウサギ二次抗体は、M o l e c u l a r P r o b e s から得た。改善された化学発光物質(enhanced chemiluminescence)およびH R Pコンジュゲート抗ウサギI g G抗体は、A m e r s h a m B i o s c i e n c e s から購入した(U p p s a l a、S w e d e n)。アプロチニン、ロイペプチジン(I e u p e t i n)、パラホルムアルデヒド、ヒトT N F (h T N F) および過酸化水素はS i g m a のものを使用した。ヒト胎児静脈上皮細胞(H U V E C)およびE G M - 2 ブレットキット(EGM-2 bullet kit)はC a m b r e x から購入した。ヤギ抗ヒトF a b ポリクローナル抗体はB e t h y l L a b o r a t o r i e s (M o n t g o m e r y、T X) のものを使用した。フェニシリン/ストレプトマイシン、胎児牛血清、R P M I、S u p e r s c r i p t P r e a m p l i c a t i o n S y s t e m およびD u l b e c c o ' s m o d i f i e d E a g l e ' s m i n i m a l e s s e n t i a l 培地は、ライフテクノロジーから購入した(G a u t h e r s b u r g、M D)。豚大動脈上皮細胞株(P A E C)は、C u - r r i e A h n 博士(ソウル大学校、韓国)から提供を受けた。S V 4 0 形質転換マウス上皮臍島細胞株M S - 1 (M I L E S E V E N 1)は、P a n n - G h i l l S u h 博士から提供を受けた(浦項工大、韓国)。L 6 ラット骨格筋細胞はS a n g - C h u l P a r k 博士から提供を受けた(ソウル大学校、韓国)。

20

30

30

40

【 0 0 6 1 】

2. 細胞培養

P A E C、M E C およびL 6 筋肉細胞は、1 0 % (v / v) の胎児牛血清および1 % (v / v) フェニシリン/ストレプトマイシンそれぞれを追加したD u l b e c c o ' s m o d i f i e d E a g l e ' s 培地内で維持された。H U V E C は製造社の案内に従ってE G M - 2 で維持された。U 9 3 7 ヒト単核球(promonocytic leukocyte)細胞株は、1 0 % (v / v) 胎児牛血清および1 % (v / v) フェニシリン/ストレプトマイシンを追加したR P M I 内で培養させた。全ての細胞は、3 7 ℃ で二酸化炭素が調節された(5 %) 湿潤状態の培養器内で培養した。

【 0 0 6 2 】

50

3. ヒトVCAM-1 / Fcキメラの免疫化

2. 5 μ gの組み換えヒトVCAM-1 / Fcキメラは、2 mLのPBSで混合させ、30分間37℃で前培養したMPL + TDM + CWSアジュvantを用いて乳化させた。免疫化されたウサギの抗体力値は、2次抗体としてHRPコンジュゲート抗ウサギIgG抗体を用いたELISA法によって決定した。3週間の注射間隔をもって5回の促進注射を行った後、免疫化されたウサギからのポリクローナル血清をタンパク質Aセファローズビードを用いて精製した。

【0063】

4. ウサギ / ヒトキメラ抗体ライブラリーの構築

実験プロトコルは、Barbas et al., 2001の方法に若干の変更を加えて行つた。簡略に、cDNAの一番目の鎖は、oligo(dT)プライミングを用いたSUPERSCRIPT Preamplication Systemを用いた組み換えヒトVCAM-1 / Fcキメラ - 免疫化されたウサギ脾臓および骨髄の全長RNAから合成された。VCAM-1 Fabライブラリーを構築するために、3段階のPCRを用いてPCRを行つた。第1のPCRを用いて、ウサギ V_L （軽鎖可変部位）および V_H （重鎖可変部位）をウサギcDNAおよびヒトFabを含むpComb3X発現ベクターに由來したヒト C_L および C_{H1} から増幅させた。その後、第2のPCRを用いて、ウサギ / ヒトキメラ軽鎖および重鎖をそれぞれ、overlap extension PCRを用いてウサギ V_L とヒト C_K を結合させ、ウサギ V_H とヒト C_{H1} を結合させて製造した。その結果として生成された、ライブラリーを暗号化するFabをSfi I (Roche, India napolis, IN)を用いて消化させ、ファージミドベクターpComb3X内に結合させ、10 μ g / mLのテトラサイクリンを含むSB培地で培養された大腸菌(E.coli)菌株ER2738細胞(New England Biolabs)内に形質転換させた。培養液はその後に30 μ g / mLのカルベニシリンを付加した後、37℃の振とう器で1時間培養した。VCSM13ヘルパーファージ(>1 \times 10¹² pfu / mL)および70 μ g / mLのカナマイシンを培養液に付加し、一晩37℃で培養した。15分間5000 rpmで遠心分離を行つた後、収集した上澄液を8 gのPEG-8000および6 gの塩化ナトリウムを仕込んで30分間氷上で培養し、しかる後に、20分間9000 rpmで遠心分離した。ファージペレットは3% (w/v) BSAおよび0.02% NaN₃MF含有トリス緩衝生理食塩水(TBS)で再懸濁した。

【0064】

5. 抗体ライブラリーからの抗VCAM-1特異的な抗体の選別

総6回のパンニングを行つた。マイクロタイタープレート(micro titer plate)内で一晩4℃で組み換えマウスVCAM-1 / Fcキメラ2.5 μ gのコーティングの後、5% (w/v) BSA含有TBSを37℃で2時間非特異的な結合を遮断するために培養し、その後3(v/v)% BSA含有TBS内で50 μ Lの組み換えファージを2時間37℃で培養した。非特異的ファージは0.1% (v/v) Tween 20を含むTBSを用いて洗浄して除去した。結合したファージはpH 2.2の0.1M Glycine / HC1を用いて抽出し、pH 9.1の1M Tris-HC1で中和させた。抽出物はER2739を対数的に成長させるために使用し、ファージミドライブラリーを抱く前記ER2738を一晩増幅させるために、ヘルパーファージVCSM13を用いてファージミドを成長させた。ファージ製造物は、前述したように精製し、PEGおよび塩化ナトリウムを付加することにより濃縮させた。この全体的な選別過程を6回繰り返し行い、洗浄段階を1番目で1回、2番目、3番目および4番目でそれぞれ3回、5番目で6回、そして6番目で10回に増加させた。

【0065】

6. 抗VCAM-1 Fabの過発現および精製

0.5 μ gのファージミドDNAをHB2141大腸菌内で形質転換させ、前記細胞を37℃で絶え間なく振とうしながら、50 mg / mLのカルベニシリンを含むLB培地内で成長させた。600 nmで光学的濃度が0.6に達するとき、前記細胞を30℃で一晩

10

20

30

40

50

成長させた。15000×gで30分間遠心分離した後、収集された上澄液をLabscale TFF System (Millipore、Bedford、MA)を用いて濃縮させ、しかる後に、タンパク質Aセファロースにコンジュゲートされた抗ヘマグルチニン(HA)抗体を用いて培養させた。pH 8.2の50mMナトリウムを含む緩衝液を用いて洗浄した後、前記FabをpH 2.2の0.1Mグリシンを用いて抽出し、その分画を生理的pHに合わせるために直ちにpH 9.2の1M Trisを用いて中和させた。4で一晩PBSで透析した後、サンプルの濃度を280nmにおける光学的濃度を測定することにより計算した。Fabの純度はクマシーブリリアントブルー染色を用いて検出した。

【0066】

10

7. 免疫プロットの分析

Bradford溶液を用いてアッセイした後、タンパク質をLaemmliサンプル緩衝液内で95で5分間沸かして変性させ、SDS-PAGEを用いて分離し、ウェットトランスファーシステム(wet transfer system) (Amersham Biosciences)を用いたエレクトロプロッティングによってニトロセルロース膜に移動させた。5% (w/v)スキムミルクパウダーを含むTTBS緩衝液(10mMトリス/HCl、pH 7.5、150mM NaClおよび0.05% Tween 20)内で遮断させた後、その膜をそれぞれのモノクローナルまたはポリクローナル抗体を用いて培養させ、しかる後に、必要に応じて、ホースラディッシュペルオキシダーゼで結合した抗マウスまたは抗ウサギ免疫グロブリンGを用いて別の培養を行った。検出は、改善された化学発光キット(enhanced chemiluminescence kit)を用いて製造社の説明に従って行った。別の1次抗体を用いて再探針するために、膜をストリッピングバッファ(62.5mMトリス-HCl、pH 6.0、100mM2-メルカプトエタノール[2-ME]および2% SDS)内で30分間50で培養し、洗浄した後、追加的な研究のために使用した。

20

【0067】

8. ELISA

PBSに溶解させた組み換えヒトおよびマウスVCAM-1/Fcキメラを2μg/mLの濃度でマイクロプレートのそれぞれのウェルで一晩4で培養させた。PBSを用いて簡単に洗浄した後、前記プレートをPBSで3% (w/v) BSAを用いて遮断させ、多血清(1:2000)を用いて1時間37で培養させ、0.05%のTween 20を含むPBSを用いて3回以上洗浄した。プレートに結合したFabの量は、抗HA mAb 3F10 (Roche)コンジュゲートされたホースラディッシュペルオキシダーゼの適用によって検出した。光学的濃度は30分間37でABTS基質溶液(2,2'-アジノ-ビス-13-エチルベンズチアゾリン-6-スルホン酸、MP Biomedicals、Inc.)を用いて培養した後、マイクロタイターリーダー(Lab systems、Barcelona、Spain)によって405nmで測定した。競争的ELISAのために、VCAM-1ペプチドは、抗体コーティングの後、1時間37でマイクロタイター内で培養した。以後の過程は前述と同様である。

30

【0068】

9. ヒト、マウスおよび豚内皮細胞におけるH₂O₂およびhTNFの処理

40

PAECおよびMECに対して、400μMのH₂O₂を、細胞内でVCAM-1の最大発現を検出するために24時間処理した。HUECに対しては20ng/mLのhTNFを24時間処理した。

【0069】

10. フローサイトメトリー

全ての細胞は、60mmの皿内で3×10⁵細胞/ウェルの濃度で塗抹し、H₂O₂およびhTNFでそれぞれ処理した。その後、細胞をトリプシン化した。1500rpmで5分間簡略に遠心分離した後、そのペレットを1×PBSで洗浄し、1×PBS内に1% (w/v) BSAを含む遮断バッファおよび最終濃度が50μg/mLに調整された遮断バッファ内に50μLの抗VCAM-1特異的なFabを50分間37で細胞と共に培

50

養した。5分間2000 rpmで遠心分離した後、前記細胞を140 μLの遮断バッファを用いて洗浄し、FITC標識付き抗ヒトFab抗体(1:100)を30分間37℃で培養させた。簡略に遠心分離した後、そのペレットを140 μLの遮断バッファを用いて洗浄し、その後、PBSに入っている2%(w/v)パラホルムアルデヒド300 μLを用いて再懸濁した。VCAM-1の発現はフローサイトメーターによって分析した(Beckmann Coulter, CA, USA)。

【0070】

11. CFSE 標識

U937細胞を収穫した後、その細胞をHBSSを用いて2回洗浄した。洗浄された細胞(1×10⁷細胞)を5分間暗い状態で、氷上で最終濃度が2.5 μM CFSEに調整されるようにDMSO内のCFSE溶液を用いて培養させた。標識(ラベリング)過程のクエンチング(quenching)のために、1/10体積の胎児牛血清を付加し、1分間徐々に混合した。簡略な遠心分離の後、その細胞を再懸濁させ、使用前に計数した。

10

【0071】

12. 細胞接着および中和アッセイ

白血球接着アッセイは若干修正して行った。要するに、60 mmの皿に塗抹された3×10⁵個の内皮細胞を、図示のように、H₂O₂およびhTNFで刺激した後、細胞を1×PBSで1回洗浄させた。U937単核球を用いてCFSE標識を行った後、図示のように標識された細胞を37℃で1時間H₂O₂およびhTNF刺激内皮細胞で培養させ、しかる後に、結合していない細胞を、0.2 mM CaCl₂および0.1 mM MgCl₂を含む1×PBSで5回洗浄した。最終細胞をトリプシン化させた後、FACS分析を行った。中和アッセイのために、一日間H₂O₂およびhTNFで刺激した内皮細胞を、図示のように、CFSE標識U937の追加前に37℃で1時間抗VCAM-1ポリクローン抗体または抗VCAM-1 Fabを用いて培養させた。

20

【0072】

〔産業上の利用可能性〕

本発明に係るモノクローナル抗体は、ヒトおよびマウスVCAM-1に特異的に結合する最初の組み換えモノクローナル抗体であって、ヒトおよびマウス内皮細胞だけでなく、ラット骨格筋および豚内皮細胞で発現されたVCAM-1にも強い親和力を示し、白血球と活性化された内皮細胞との相互作用を強く阻害する。したがって、本発明に係るモノクローナル抗体は、VCAM-1によって媒介された、内皮細胞への白血球の接着を効果的に阻害することにより、VCAM-1関連疾患、特に炎症性疾患を効果的に治療することができる。

30

【図面の簡単な説明】

【0073】

【図1】図1a～図1cはヒトおよびマウスVCAM-1に特異的な抗VCAM-1 Fabクローンの精製および特性描写(characterization)を示すもので、図1aは0.2 μgの抗VCAM-1 Fabに対するSDS-PAGEおよびクマシーブルー染色結果であって、25 kDaの分子量を持つ抗VCAM-1 Fabを矢印によって示した。図1bは96ウェルプレートにコートさせた組み換えヒトおよびマウスVCAM-1/Fcキメラを免疫前血清、免疫血清および精製された抗VCAM-1 Fabそれぞれを用いて検出した結果を示すものである。図1cは相異なる量の組み換えヒトおよびマウスVCAM-1/Fcキメラをゲルにロードし、抗VCAM-1 Fabを用いて免疫プロットした結果である。

40

【図2】図2は抗VCAM-1 Fabクローンの重鎖および軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示す。選択されたFabクローンをDNAシーケンシングした後、特定された重鎖(V_H)および軽鎖(V_L)可変領域の配列を図示のように示した。FRは構造領域(framework region)、CDRは相補性決定領域(complementarity-determining region)を意味する。また、抗VCAM-1 Fabクローンに由来したヒト化抗体を示した。

【図3】図3は抗VCAM-1 Fabによって多様な細胞類型で発現された天然型VC

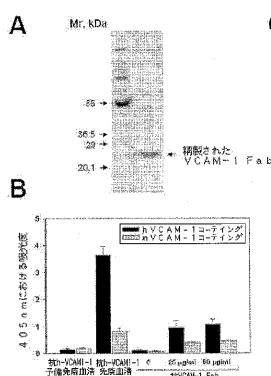
50

AM-1を検出した結果を示すもので、hTNF または H_2O_2 の存在（実線）または非存在（破線）の下に培養されたHUVEC、MEC、PAECおよびL6骨格筋細胞を抗VCAM-1 Fabを用いてフローサイトメトリーした結果である。精製されたVCAM-1特異的多血清(polysera)を陽性対照群として使用した。現れた結果は少なくとも3回の別個の実験から得られた平均結果である。

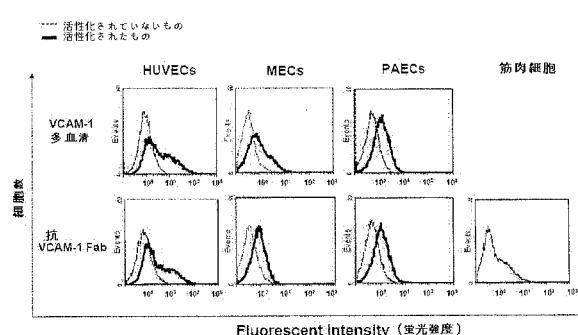
【図4】図4aおよび図4bは白血球と内皮細胞間の相互作用における抗VCAM-1 Fabの中和効果を示すもので、図4aは400 μ m H_2O_2 で処理されたPAECを抗VCAM-1 Fabまたは抗VCAM-1 IgGの存在（太い線）または非存在（細い線）の下で培養し、CSFE標識付きU937細胞を用いて接着アッセイ（adhesion assay）した結果であって、内皮細胞に結合したU937の量をフローサイトメトリーによって検出した。破線は H_2O_2 非存在状態で培養した不活性化PAEC内皮細胞に対するU937の基本的な結合のために示すために使用した。図4bは内皮細胞に結合したCSFE標識付きU937の百分率数値を垂直棒で示したもので、現れた結果は同様に行われた2回の別個の実験から得られた平均 \pm S.D.を示す。

10

【図1】



【図3】



【図2】

Clone name	FRI	COR1	FRI	COR2	FRI2	COR3	FRI4
h-1	ALVANLQGPGKQASQGKSYLS	WVSYHMMVPP	ANPNTV	EVVRSRISGSGCIMPLILQSGYVSDAGLTT			
h-2	AAAGCTTTCR, SEQ ID No.5	WLLV		TSVAMKQGAAATTA	ISB2 ID No.7	PGACTIVHRR	
h-3	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP		GVVRRSGGGGTHPTI		PGCVYAGDLT	PGACTIVHRR
h-4	AAAGCTTTCR	WVQGQPPQPP	WLLV	TEDEKQADAAATVY			
h-5	AAAGCTTTCR	WVQGQPPQPP	WLLV	WVQGQPPQPP	ISB2 ID No.12	PGCVYAGDLT	PGACTIVHRR
h-6	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-7	AAAGCTTTCR	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-8	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-9	AAAGCTTTCR	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-10	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-11	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-12	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-13	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-14	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-15	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-16	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-17	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-18	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-19	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-20	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-21	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-22	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-23	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-24	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-25	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-26	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-27	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-28	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-29	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-30	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-31	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-32	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-33	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-34	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-35	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-36	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-37	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-38	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-39	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-40	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-41	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-42	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-43	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-44	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-45	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-46	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-47	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-48	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-49	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-50	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-51	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-52	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-53	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-54	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-55	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-56	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-57	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-58	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-59	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-60	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-61	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-62	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-63	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-64	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-65	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-66	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-67	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-68	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-69	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-70	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-71	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-72	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-73	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-74	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-75	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-76	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-77	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-78	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-79	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-80	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-81	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-82	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-83	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-84	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-85	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-86	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-87	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-88	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-89	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-90	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-91	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-92	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-93	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-94	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-95	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-96	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-97	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-98	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-99	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-100	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-101	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-102	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-103	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-104	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-105	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-106	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-107	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-108	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-109	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-110	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-111	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-112	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-113	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-114	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-115	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-116	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-117	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-118	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-119	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-120	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-121	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-122	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-123	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-124	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-125	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-126	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-127	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-128	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-129	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			
h-130	GGVNTTCTTPPWP	WVQGQPPQPP	WLLV	TSVAMKQGAAATTC			

【配列表】

2009536641000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/KR2007/002647
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C07K 16/46(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC8: C07K 16/46		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Delphion, Esp@snet, Pubmed		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	STONE, P. C. W., et al.: 'Transmigrated neutrophils down-regulate the expression of VCAM-1 on endothelial cells and inhibit the adhesion of flowing lymphocytes' Journal of Leukocyte Biology, Vol. 77(1), pp. 44-51 (30 September 2004) See the whole document.	1-28
Y	AZIMZADEH, A., et al: 'Antibodies to human adhesion molecules and von Willebrand factor: in vitro cross-species reactivity in the xenotransplantation setting' Xenotransplantation, Vol. 5(4), pp. 284-291 (November 1998) See the abstract.	1-28
Y	GROOBY, W. L., et al.: 'Anti-ovine VCAM-1 monoclonal antibodies inhibit adhesion and proliferation between sheep endothelial and mononuclear cells in vitro' Immunology and Cell Biology, Vol. 75(6), pp. 546-553 (December 1997) See the abstract.	1-28
Y	CARTER, R. A., et al.: 'Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) blockade in collagen-induced arthritis reduces joint involvement and alters B cell trafficking' Clinical and Experimental Immunology, Vol. 128(1), pp. 44-51 (April 2002) See the whole document.	1-28
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 10 SEPTEMBER 2007 (10.09.2007)	Date of mailing of the international search report 10 SEPTEMBER 2007 (10.09.2007)	
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office 920 Dunsan-dong, Seo-gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140	Authorized officer KIN, Ji Yun Telephone No. 82-42-481-8288 	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/KR2007/002647

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of:
 - a. type of material
 - a sequence listing
 - table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material
 - on paper
 - in electronic form
 - c. time of filing/furnishing
 - contained in the international application as filed
 - filed together with the international application in electronic form
 - furnished subsequently to this Authority for the purposes of search
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/KR2007/002647

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 25-28
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 25-28 pertain to methods for diagnosis of the human or animal body, thus relate to a subject-matter which International Searching Authority is not required to search under PCT Art. 17(2)(a)(i) and Rule 39.1(iv).
REMARK: Although said claims are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out based on the alleged effects of the composition.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.: 16, 19, 22, 25 (See Extra sheet.)
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2007/002647

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SZEKANE CZ, Z. AND KOCH, A. E.: 'Therapeutic inhibition of leukocyte recruitment in inflammatory diseases' Current Opinion in Pharmacology, Vol. 4(4), pp. 423-428 (August 2004) See the whole document.	1-28
A	US 5,827,670 (BORIS, M. et al.) (27 October 1998) See the abstract.	1-28

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2007/002647

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5,827,670	27-10-1998	EP 0541701 A1 EP 0541701 A4 EP 0745611 A1 JP 5509318 T US 6123915 A WO 9202253 A1	19-5-1993 25-1-1995 4-12-1996 22-12-1993 26-9-2000 20-2-1992

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2007/002647

Although claims 16, 19, 22, 25 are not drafted in accordance with the second and third sentence of Rule 6.4(a), the search and examination has been carried out.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 1/00 (2006.01)	A 6 1 P 1/00	
A 6 1 P 11/06 (2006.01)	A 6 1 P 11/06	
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 9/10 1 0 1	
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 9/10 1 0 3	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 P 37/06 G 0 1 N 33/53 D	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MT,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 イ,チ ウン

大韓民国, 4 1 2 - 7 4 8 キョンギ - ド, コヤン - シ, トギャン - グ, ホワジョン 1 - ドン, ウンビッマウル, 6 ダンジ, 6 1 4 - 1 5 0 3

(72)発明者 リュ, ウン ギョン

大韓民国, 1 4 0 - 1 3 3 ソウル, ヨンサン - グ, チャンパ - ドン 3 - ガ, 1 1 8 - 3 4

(72)発明者 イ, ソク ムク

大韓民国, 1 3 0 - 8 6 7 ソウル, トンデムン - グ, チヨンリヤンニ 1 - ドン, 6 1 - 1 6 9

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 AA12 BA44 CA02 DA03 DA06 EA04 GA11 HA01

4B064 AG27 CA19 CA20 CC24 DA05 DA08 DA13

4C085 AA14 CC23 DD62

4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA11 CA40 DA76 EA22 EA28 EA50

FA72 FA74

专利名称(译)	VCAM-1特异性单克隆抗体		
公开(公告)号	JP2009536641A	公开(公告)日	2009-10-15
申请号	JP2009509448	申请日	2007-05-31
[标]申请(专利权)人(译)	韩华石油化学株式会社		
申请(专利权)人(译)	阪和化工股份有限公司		
[标]发明人	チヨンチヨンホ イチウン リュウンギヨン イソクムク		
发明人	チヨン,チヨン ホ イ,チ ウン リュ,ウン ギヨン イ,ソク ムク		
IPC分类号	C07K16/28 C12N15/02 C12P21/08 C12N15/09 A61K39/395 A61P29/00 A61P35/00 A61P19/02 A61P25/00 A61P1/00 A61P11/06 A61P9/10 A61P37/06 G01N33/53		
CPC分类号	A61P1/00 A61P11/06 A61P19/02 A61P25/00 A61P29/00 C07K16/2836 C07K2317/55 C07K2319/30		
FI分类号	C07K16/28.ZNA C12N15/00.C C12P21/08 C12N15/00.A A61K39/395.N A61P29/00 A61P35/00 A61P19/02 A61P25/00 A61P1/00 A61P11/06 A61P9/10.101 A61P9/10.103 A61P37/06 G01N33/53.D		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/AA12 4B024/BA44 4B024/CA02 4B024/DA03 4B024/DA06 4B024/ /EA04 4B024/GA11 4B024/HA01 4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA05 4B064/DA08 4B064/DA13 4C085/AA14 4C085/CC23 4C085/DD62 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/ /AA30 4H045/BA10 4H045/CA11 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA22 4H045/EA28 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
优先权	60/803521 2006-05-31 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及特异性结合人和小鼠VCAM-1的单克隆抗体，其制备方法，含有它们的诊断或治疗组合物，以及使用它们的诊断或治疗方法。此外，本发明的单克隆抗体是第一种特异性结合人和小鼠VCAM-1的重组单克隆抗体，不仅是人和小鼠内皮细胞，还有大鼠骨骼肌和猪内皮细胞中表达的VCAM。-1，强烈抑制白细胞和活化的内皮细胞之间的相互作用。因此，根据本发明的单克隆抗体有效抑制由VCAM-1介导的白细胞与内皮细胞的粘附，并有效地治疗VCAM-1相关疾病，特别是炎性疾病和癌症。你可以。

Seq ID	Primary Sequence	Conn	Conn	Conn	Conn	Conn
1	ELVNTVPSVPEAQKSSVLS	WVQKQPGKPP	AVSYLAS	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT	PGACTNVEKR
2	ELVNTVPSVPEAQKSSVLS	WVQKQPGKPP	WAK	SEQ ID No.6	TEKNUKEDAAATYC	SEQ ID No.7
3	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
4	ELVNTVPSVPEAQKSSVLS	WVQKQPGKPP	AVSYLAS	TEKNUKEDAAATYC	ASGTYAGDGT	PGACTNVEKR
5	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
6	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
7	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
8	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
9	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
10	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
11	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
12	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
13	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
14	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
15	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
16	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
17	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
18	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
19	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
20	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
21	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
22	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
23	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
24	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
25	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
26	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
27	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
28	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
29	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
30	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
31	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
32	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
33	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
34	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
35	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
36	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
37	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
38	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
39	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
40	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
41	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
42	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
43	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
44	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
45	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
46	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
47	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
48	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
49	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
50	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
51	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
52	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
53	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
54	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
55	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
56	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
57	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
58	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
59	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
60	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
61	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
62	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
63	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
64	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
65	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
66	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
67	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
68	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
69	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
70	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
71	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
72	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
73	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
74	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
75	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
76	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
77	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
78	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
79	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
80	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
81	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
82	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
83	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
84	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
85	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
86	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
87	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
88	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
89	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
90	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
91	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
92	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
93	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
94	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
95	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
96	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
97	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
98	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
99	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
100	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
101	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
102	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
103	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
104	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
105	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
106	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
107	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
108	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
109	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
110	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
111	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT
112	AAVGGTYVHIC	QASGSSSSVLS	WAK	WVQKQPGKPP	GWPSRPSGSGCTTFL	ASGTYAGDGT