

(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 I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28 Z N A	4 B 0 2 4
C 1 2 N 15/02 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 C	4 B 0 6 4
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	4 C 0 8 5
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 H 0 4 5
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 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)
 (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) 国際出願番号 PCT/KR2007/002647
 (87) 国際公開番号 W02007/139359
 (87) 国際公開日 平成19年12月6日 (2007. 12. 6)
 (31) 優先権主張番号 60/803, 521
 (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 コーポレーション
 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国際特許事務所
 (72) 発明者 チョン, チョン ホ
 大韓民国, 791-754 キョンサンブ
 ックト, ポハン-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】 V C A M - 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 にも強い親和性を示し、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。

SEQ ID NO. 1	ELVNTQTPVPSVQKQSSVSL	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 2	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 3	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 4	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 5	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 6	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 7	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 8	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 9	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 10	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 11	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 12	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 13	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 14	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 15	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 16	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 17	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 18	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 19	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 20	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 21	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 22	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 23	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 24	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 25	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 26	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 27	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 28	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 29	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 30	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 31	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 32	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 33	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 34	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 35	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 36	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 37	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 38	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 39	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 40	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 41	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 42	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 43	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 44	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 45	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 46	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 47	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 48	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 49	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 50	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 51	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 52	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 53	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 54	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 55	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 56	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 57	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 58	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 59	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 60	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 61	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 62	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 63	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 64	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 65	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 66	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 67	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 68	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 69	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 70	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 71	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 72	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 73	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 74	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 75	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 76	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 77	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 78	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 79	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 80	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 81	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 82	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 83	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 84	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 85	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 86	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 87	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 88	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 89	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 90	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 91	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 92	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 93	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 94	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 95	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 96	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 97	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 98	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 99	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR
SEQ ID NO. 100	AVGGVYTC	WYQKQGVY	AVSLAS	GVPRPSSGSGKFTFL	QVYVAGDUT	PGAGTNVBSR

【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。

10

【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。

20

【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 11 で定義される重鎖 C D R 2 ; および配列番号 10 または配列番号 12 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。

30

【請求項 10】

配列番号 13 で定義される軽鎖アミノ酸配列、および配列番号 14 または 15 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 13 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 11 に記載の軽鎖可変領域。

40

【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 11 で定義される重鎖 C D R 2 ; および配列番号 10 または配列番号 12 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 14 で定義される重鎖アミノ酸配列、および配列番号 15 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 13 に記載の重鎖可変領域。

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VCAM-1/Fc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VCAM-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、VCAM-1によって媒介される疾患の診断用組成物。

10

【請求項 17】

VCAM-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、VCAM-1によって媒介される疾患の治療用組成物。

20

【請求項 20】

VCAM-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。

【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、VCAM-1によって媒介される疾患を診断する方法。

【請求項 23】

VCAM-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、VCAM-1によって媒介される疾患を治療する方法。

【請求項 26】

VCAM-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、VCAM-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。

【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 - 、または腫瘍壊死因子(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)のための骨髓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。

【0005】

〔発明の開示〕

〔技術的課題〕

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。

【0006】

〔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) 不変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 $VCAM-1$ に由来した配列を有する $VCAM-1$ 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 $VCAM-1$ 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 μ g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。

20

【0009】

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。

30

【0010】

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 $VCAM-1$ 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HUEC、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。

【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 $VCAM-1$ 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。

40

【0012】

〔発明を実施するための最善の形態〕

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、V C A M - 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F a b'、F (a b')₂、F a b、F vおよびr I g Gを含む、抗体の抗原結合形態を含む。また、前記用語は、組み換え単鎖F v断片(s c F v)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K o s t e l n y 等(1992, J. Immunol. 148:15467)、P a c k および P l u c k t h u n (1992, Biochemistty 31:1579)、H o l l i n g e r 等(1993, supra)、G r u b e r 等(1994, J. Immunol.: 5368)、Z h u 等(1997, Protein Sci. 6:781)、H u 等(1996, Cancer Res. 56:3055)、A d a m s 等(1993, Cancer Res. 53:4026)およびM c C a r t n e y 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変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 resion、以下「C D R」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C D R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C D Rは典型的にN末端から始まって順次C D R 1、C D R 2、C D R 3と呼ばれるし、特定のC D R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C D R 1; 配列番号6で定義されるC D R 2; および配列番号7で定義されるC D R 3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C D R 1; 配列番号9または配列番号11で定義される重鎖C D R 2; および配列番号10または配列番号12で定義される重鎖C D R 3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(C D R)に公知の治療用抗体の構造領域(F R)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 C D R 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 C D R 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、W i n t e r 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 C D R 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(C D C)または抗体依存性細胞性細胞毒性(A D C C)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】

W O 9 3 / 1 4 2 2 0 には、V C A M - 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 V C A M - 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 V C A M - 1 と結合する新規のモノクローナル抗体であり、W O 9 3 / 1 4 2 0 0 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 V C A M - 1 と強い親和性を持つため、V C A M - 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 V C A M - 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 V C A M - 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、単独で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 V C A M - 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 V C A M - 1 によって特定付けられる疾患の治療で 4 B 9 または他の抗 V C A M - 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、E L A M 1 や I C A M 1 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 C D R 1 ; 配列番号 6 のアミノ酸配列を持つ C D R 2 ; および配列番号 7 のアミノ酸配列を持つ C D R 3 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 C D R 1 ; 配列番号 9 または 11 のアミノ酸配列を持つ C D R 2 ; 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

【 0 0 2 8 】

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 (Koeher 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。

【 0 0 2 9 】

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。

【 0 0 3 0 】

一般的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増幅させる段階、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。

【 0 0 3 1 】

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。

【 0 0 3 2 】

当業者は、公知のファージディスプレイ技術、例えば B a r b a s 等 (METHODS: A Companion to Methods in Enzymology 2:119, 1991 and J. Virol. 2001, Jul;75(14):6692-9) および W i n t e r 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。

【 0 0 3 3 】

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。

【 0 0 3 4 】

(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。

【0035】

(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(Sepharose)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 at 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)。

【0036】

(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VCAM-1に特異的な抗体を選別する方法は、前述した一般的なファージディスプレイ法によって容易に行われ得る。

【0037】

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、fd、M13、f1、If1、Ike、Zj/Z、Ff、Xf、Pf1またはPf3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fUSE5、fAFF1、fd-CAT1またはfdtetDOGなどのファージベクター、またはpHEN1、pComb3、pComb8またはpSEX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pComb3Xファージミドベクターである。

【0038】

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M13K07またはVSCM13などがあるが、これに限定されない。好ましくはVSCM13である。

【0039】

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VCAM-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VCAM-Fc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RNAを免疫化ウサギの脾臓および骨髄から分離し、cDNA合成を行った。3段階のPCR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pComb3X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。

【0040】

免疫化マウスVCAM-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VCAM-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VCAM-1の両方ともに対する強い反応性を示した。

【0041】

このような3つのクローンを以後のDNA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。

【0042】

抗VCAM-1キメラFab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VCAM-1 Fabの6つのCDR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。

【0043】

その後、選別されたVCAM-1特異的Fab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Fab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/Fcキメラを、精製された抗VCAM-Fabを用いてウエスタンブロットした。その結果は、精製されたVCAM-1 Fabが成功的にヒトおよびマウスVCAM-1/Fc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-Fab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Fabをフローサイトメトリーによって分析した。選別されたFabが、h-TNFで刺激されたHUEC、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Fab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Fab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Fab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h-TNF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種類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、VCAM-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

【 0 0 5 0 】

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。

【 0 0 5 1 】

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、アルカリホスファターゼ、 α -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、 α -ラタマーゼなどがあり、蛍光物にはフルオレセイン、 Eu^{3+} 、 Eu^{3+} 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ステル、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 ^{57}Co 、 ^3H 、 ^{125}I 、 ^{125}I -ボントンハンター試薬などがある。

10

【 0 0 5 2 】

好ましくは、抗原-抗体複合体を酵素免疫吸着法 (E L I S A) を用いて検出することができる。酵素免疫吸着法 (E L I S A) 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 E L I S A、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 E L I S A、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 E L I S A、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 E L I S A などの多様な E L I S A 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

【 0 0 5 3 】

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 V C A M - 1 の過発現または V C A M - 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。

【 0 0 5 4 】

本発明の抗体組成物は、薬学的に有効な量で単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可能な任意の装置によって投与できる。

30

【 0 0 5 5 】

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

【 0 0 5 6 】

有効用量水準は、疾患の重症度、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。

【 0 0 5 7 】

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、V C A M - 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VCAM-1に特異的に結合することによりVCAM-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、VCAM-1関連疾患を治療することができる。好ましいVCAM-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。

【0058】

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

【0059】

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。

【0060】

〔発明の様態〕

〔実施例〕

1. 物質

組み換えヒトおよびマウスVCAM-1/Fcキメラは、R&D Systems (Minneapolis, MN) から購入した。拡張された高充実度(high fidelity)PCRシステムおよびHRPコンジュゲート抗インフルエンザAウィルスヘマグルチニン(HA)抗体(3F10)は、Roche (Mannheim, Germany) のものを使用した。TMB溶液はPierce (Rockford, IL) 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(CSFE)およびフルオレセインイソチオシアネート(FITC)標識付きヤギ抗ウサギ二次抗体は、Molecular Probes から得た。改善された化学発光物質(enhanced chemiluminescence)およびHRPコンジュゲート抗ウサギIgG抗体は、Amersham Biosciences から購入した(Uppsala, Sweden)。アプロチニン、ロイペプチン(leupeptin)、パラホルムアルデヒド、ヒトTNF (hTNF) および過酸化水素はSigma のものを使用した。ヒト胎児静脈上皮細胞(HUVEC)およびEGM-2プレートキット(EGM-2 bullet kit)はCambrex から購入した。ヤギ抗ヒトFabポリクローナル抗体はBethyl Laboratories (Montgomery, TX) 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、RPMI、Superscript Preamplification SystemおよびDulbecco's modified Eagle's minimal essential培地は、ライフテクノロジーから購入した(Gaithersburg, MD)。豚大動脈上皮細胞株(PAEC)は、Cu-rie Ahn博士(ソウル大学校、韓国)から提供を受けた。SV40形質転換マウス上皮膀胱癌細胞株MS-1(MILE SEVEN1)は、Pann-Ghill Suh博士から提供を受けた(浦項工大、韓国)。L6ラット骨格筋細胞はSang-Chul Park博士から提供を受けた(ソウル大学校、韓国)。

20

30

40

【0061】

2. 細胞培養

PAEC、MECおよびL6筋肉細胞は、10%(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Dulbecco's modified Eagle's培地内で維持された。HUVECは製造社の案内に従ってEGM-2で維持された。U937ヒト単核球(promonocytic leukocyte)細胞株は、10%(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RPMI内で培養させた。全ての細胞は、37℃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。

【0062】

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アジュバントを用いて乳化させた。免疫化されたウサギの抗体力価は、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った。簡略に、cDNAの一番目の鎖は、oligo(dT)プライミングを用いたSUPERSCRIPT Preamplification 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髓の全長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を行った。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発現ベクターに由来したヒト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SfiI(Roche, Indianapolis, 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。VCSSM13ヘルパーファージ($>1 \times 10^{12}$ pfu/mL)および70 μ g/mLのカナマイシンを培養液に付加し、一晚37℃で培養した。15分間5000 rpmで遠心分離を行った後、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った。マイクロタイタープレート(micro titer plate)内で一晚4℃で組み換えマウスVCAM-1/Fcキメラ2.5 μ gのコートイングの後、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0.1 M Glycine/HClを用いて抽出し、pH 9.1の1 M Tris-HCl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を一晚増幅させるために、ヘルパーファージVCSSM13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℃で一晚

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Lab scale 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50 mM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0.1 Mグリシンを用いて抽出し、その分画を生理学的pHに合わせるために直ちにpH 9.2の1 M 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280 nm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ブ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kimミルクパウダーを含むTTBS緩衝液(10 mMトリス/HCl、pH 7.5、150 mM 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(62.5 mMトリス-HCl、pH 6.0、100 mM 2-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2 µg/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HAMAb 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-1,3-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(Labsystems, Barcelona, Spain)によって405 nm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、400 µM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。HUVECに対しては20 ng/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、60 mm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。1500 rpm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50 µg/mLに調整された遮断バッファ内に50 µL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2000rpmで遠心分離した後、前記細胞を140μL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140μL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300μL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2.5μM 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。

【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、60mm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、0.2mM CaCl₂および0.1mM 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ポリクローナル抗体または抗VCAM-1 Fabを用いて培養させた。

【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にも強い親和性を示し、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。

【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0.2μg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、25kDa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。

【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。

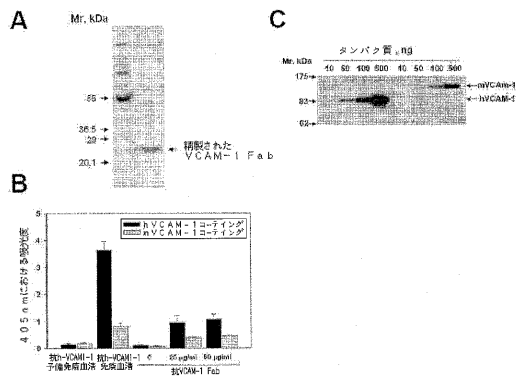
【図3】図3は抗VCAM-1 Fabによって多様な細胞類型で発現された天然型VC

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HUEC、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。

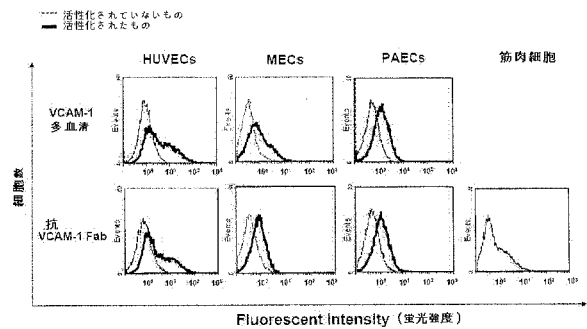
【図4】図4aおよび図4bは白血球と内皮細胞間の相互作用における抗VCAM-1 Fabの中和効果を示すもので、図4aは $400 \mu m H_2O_2$ で処理されたPAECを抗VCAM-1 Fabまたは抗VCAM-1 IgGの存在（太い線）または非存在（細い線）の下で培養し、CFSE標識付きU937細胞を用いて接着アッセイ(adhesion assay)した結果であって、内皮細胞に結合したU937の量をフローサイトメトリーによって検出した。破線は H_2O_2 非存在状態で培養した不活性化PAEC内皮細胞に対するU937の基本的な結合のために示すために使用した。図4bは内皮細胞に結合したCFSE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】



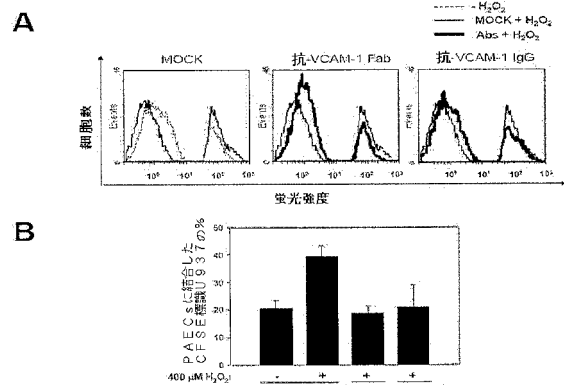
【図3】



【図2】

Clone name	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
HE-1	ELWVETTPPVSGSGSGSSYLE	WYQRRPGQV	AVSYLAR	GVVSRPSGGGTEPTLGGSYGAGLT	GVVSRPSGGGTEPTLGGSYGAGLT	GVVSRPSGGGTEPTLGGSYGAGLT	GVVSRPSGGGTEPTLGGSYGAGLT
SEQ ID No.1	SAVGGTYTRC	SSQ ID No.5	KLLLY	ITAMKASAAATYC	SSQ ID No.6	SSQ ID No.7	PGAGTNVNR
HE-2	ELWVETTPPVSGSGSGSSYLE	WYQRRPGQV	AVSYLAR	GVVSRPSGGGTEPTLGGSYGAGLT	GVVSRPSGGGTEPTLGGSYGAGLT	GVVSRPSGGGTEPTLGGSYGAGLT	GVVSRPSGGGTEPTLGGSYGAGLT
SEQ ID No.2	SAVGGTYTRC	SSQ ID No.5	KLLLY	ITAMKASAAATYC	SSQ ID No.6	SSQ ID No.7	PGAGTNVNR
HE-3	ELWVETTPPVSGSGSGSSYLE	WYQRRPGQV	AVSYLAR	GVVSRPSGGGTEPTLGGSYGAGLT	GVVSRPSGGGTEPTLGGSYGAGLT	GVVSRPSGGGTEPTLGGSYGAGLT	GVVSRPSGGGTEPTLGGSYGAGLT
SEQ ID No.3	SAVGGTYTRC	SSQ ID No.5	KLLLY	ITAMKASAAATYC	SSQ ID No.6	SSQ ID No.7	PGAGTNVNR
HE-4	ELWVETTPPVSGSGSGSSYLE	WYQRRPGQV	AVSYLAR	GVVSRPSGGGTEPTLGGSYGAGLT	GVVSRPSGGGTEPTLGGSYGAGLT	GVVSRPSGGGTEPTLGGSYGAGLT	GVVSRPSGGGTEPTLGGSYGAGLT
SEQ ID No.4	SAVGGTYTRC	SSQ ID No.5	KLLLY	ITAMKASAAATYC	SSQ ID No.6	SSQ ID No.7	PGAGTNVNR
HE-5	ELWVETTPPVSGSGSGSSYLE	WYQRRPGQV	AVSYLAR	GVVSRPSGGGTEPTLGGSYGAGLT	GVVSRPSGGGTEPTLGGSYGAGLT	GVVSRPSGGGTEPTLGGSYGAGLT	GVVSRPSGGGTEPTLGGSYGAGLT
SEQ ID No.5	SAVGGTYTRC	SSQ ID No.5	KLLLY	ITAMKASAAATYC	SSQ ID No.6	SSQ ID No.7	PGAGTNVNR
HE-6	ELWVETTPPVSGSGSGSSYLE	WYQRRPGQV	AVSYLAR	GVVSRPSGGGTEPTLGGSYGAGLT	GVVSRPSGGGTEPTLGGSYGAGLT	GVVSRPSGGGTEPTLGGSYGAGLT	GVVSRPSGGGTEPTLGGSYGAGLT
SEQ ID No.6	SAVGGTYTRC	SSQ ID No.5	KLLLY	ITAMKASAAATYC	SSQ ID No.6	SSQ ID No.7	PGAGTNVNR
HE-7	ELWVETTPPVSGSGSGSSYLE	WYQRRPGQV	AVSYLAR	GVVSRPSGGGTEPTLGGSYGAGLT	GVVSRPSGGGTEPTLGGSYGAGLT	GVVSRPSGGGTEPTLGGSYGAGLT	GVVSRPSGGGTEPTLGGSYGAGLT
SEQ ID No.7	SAVGGTYTRC	SSQ ID No.5	KLLLY	ITAMKASAAATYC	SSQ ID No.6	SSQ ID No.7	PGAGTNVNR
HE-8	ELWVETTPPVSGSGSGSSYLE	WYQRRPGQV	AVSYLAR	GVVSRPSGGGTEPTLGGSYGAGLT	GVVSRPSGGGTEPTLGGSYGAGLT	GVVSRPSGGGTEPTLGGSYGAGLT	GVVSRPSGGGTEPTLGGSYGAGLT
SEQ ID No.8	SAVGGTYTRC	SSQ ID No.5	KLLLY	ITAMKASAAATYC	SSQ ID No.6	SSQ ID No.7	PGAGTNVNR
HE-9	ELWVETTPPVSGSGSGSSYLE	WYQRRPGQV	AVSYLAR	GVVSRPSGGGTEPTLGGSYGAGLT	GVVSRPSGGGTEPTLGGSYGAGLT	GVVSRPSGGGTEPTLGGSYGAGLT	GVVSRPSGGGTEPTLGGSYGAGLT
SEQ ID No.9	SAVGGTYTRC	SSQ ID No.5	KLLLY	ITAMKASAAATYC	SSQ ID No.6	SSQ ID No.7	PGAGTNVNR
HE-10	ELWVETTPPVSGSGSGSSYLE	WYQRRPGQV	AVSYLAR	GVVSRPSGGGTEPTLGGSYGAGLT	GVVSRPSGGGTEPTLGGSYGAGLT	GVVSRPSGGGTEPTLGGSYGAGLT	GVVSRPSGGGTEPTLGGSYGAGLT
SEQ ID No.10	SAVGGTYTRC	SSQ ID No.5	KLLLY	ITAMKASAAATYC	SSQ ID No.6	SSQ ID No.7	PGAGTNVNR
HE-11	ELWVETTPPVSGSGSGSSYLE	WYQRRPGQV	AVSYLAR	GVVSRPSGGGTEPTLGGSYGAGLT	GVVSRPSGGGTEPTLGGSYGAGLT	GVVSRPSGGGTEPTLGGSYGAGLT	GVVSRPSGGGTEPTLGGSYGAGLT
SEQ ID No.11	SAVGGTYTRC	SSQ ID No.5	KLLLY	ITAMKASAAATYC	SSQ ID No.6	SSQ ID No.7	PGAGTNVNR
HE-12	ELWVETTPPVSGSGSGSSYLE	WYQRRPGQV	AVSYLAR	GVVSRPSGGGTEPTLGGSYGAGLT	GVVSRPSGGGTEPTLGGSYGAGLT	GVVSRPSGGGTEPTLGGSYGAGLT	GVVSRPSGGGTEPTLGGSYGAGLT
SEQ ID No.12	SAVGGTYTRC	SSQ ID No.5	KLLLY	ITAMKASAAATYC	SSQ ID No.6	SSQ ID No.7	PGAGTNVNR
HE-13	ELWVETTPPVSGSGSGSSYLE	WYQRRPGQV	AVSYLAR	GVVSRPSGGGTEPTLGGSYGAGLT	GVVSRPSGGGTEPTLGGSYGAGLT	GVVSRPSGGGTEPTLGGSYGAGLT	GVVSRPSGGGTEPTLGGSYGAGLT
SEQ ID No.13	SAVGGTYTRC	SSQ ID No.5	KLLLY	ITAMKASAAATYC	SSQ ID No.6	SSQ ID No.7	PGAGTNVNR
HE-14	ELWVETTPPVSGSGSGSSYLE	WYQRRPGQV	AVSYLAR	GVVSRPSGGGTEPTLGGSYGAGLT	GVVSRPSGGGTEPTLGGSYGAGLT	GVVSRPSGGGTEPTLGGSYGAGLT	GVVSRPSGGGTEPTLGGSYGAGLT
SEQ ID No.14	SAVGGTYTRC	SSQ ID No.5	KLLLY	ITAMKASAAATYC	SSQ ID No.6	SSQ ID No.7	PGAGTNVNR
HE-15	ELWVETTPPVSGSGSGSSYLE	WYQRRPGQV	AVSYLAR	GVVSRPSGGGTEPTLGGSYGAGLT	GVVSRPSGGGTEPTLGGSYGAGLT	GVVSRPSGGGTEPTLGGSYGAGLT	GVVSRPSGGGTEPTLGGSYGAGLT
SEQ ID No.15	SAVGGTYTRC	SSQ ID No.5	KLLLY	ITAMKASAAATYC	SSQ ID No.6	SSQ ID No.7	PGAGTNVNR



【図4】



【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		
<i>C07K 16/46(2006.01)i</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.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "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) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "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 "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 "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 "&" document member of the same patent family		
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 item 1.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	SZEKANECZ, 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	19-5-1993
		EP 0541701 A4	25-1-1995
		EP 0745611 A1	4-12-1996
		JP 5509318 T	22-12-1993
		US 6123915 A	26-9-2000
		WO 9202253 A1	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,チョンリャンニ 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，特别是炎症疾病和癌症。你可以。

Comp. no.	SEQ ID NO.1	SEQ ID NO.2	SEQ ID NO.3	SEQ ID NO.4	SEQ ID NO.5	SEQ ID NO.6	SEQ ID NO.7	SEQ ID NO.8	SEQ ID NO.9	SEQ ID NO.10	SEQ ID NO.11	SEQ ID NO.12	SEQ ID NO.13	SEQ ID NO.14	SEQ ID NO.15	SEQ ID NO.16	SEQ ID NO.17	SEQ ID NO.18	SEQ ID NO.19	SEQ ID NO.20	SEQ ID NO.21	SEQ ID NO.22	SEQ ID NO.23	SEQ ID NO.24	SEQ ID NO.25	SEQ ID NO.26	SEQ ID NO.27	SEQ ID NO.28	SEQ ID NO.29	SEQ ID NO.30	SEQ ID NO.31	SEQ ID NO.32	SEQ ID NO.33	SEQ ID NO.34	SEQ ID NO.35	SEQ ID NO.36	SEQ ID NO.37	SEQ ID NO.38	SEQ ID NO.39	SEQ ID NO.40	SEQ ID NO.41	SEQ ID NO.42	SEQ ID NO.43	SEQ ID NO.44	SEQ ID NO.45	SEQ ID NO.46	SEQ ID NO.47	SEQ ID NO.48	SEQ ID NO.49	SEQ ID NO.50	SEQ ID NO.51	SEQ ID NO.52	SEQ ID NO.53	SEQ ID NO.54	SEQ ID NO.55	SEQ ID NO.56	SEQ ID NO.57	SEQ ID NO.58	SEQ ID NO.59	SEQ ID NO.60	SEQ ID NO.61	SEQ ID NO.62	SEQ ID NO.63	SEQ ID NO.64	SEQ ID NO.65	SEQ ID NO.66	SEQ ID NO.67	SEQ ID NO.68	SEQ ID NO.69	SEQ ID NO.70	SEQ ID NO.71	SEQ ID NO.72	SEQ ID NO.73	SEQ ID NO.74	SEQ ID NO.75	SEQ ID NO.76	SEQ ID NO.77	SEQ ID NO.78	SEQ ID NO.79	SEQ ID NO.80	SEQ ID NO.81	SEQ ID NO.82	SEQ ID NO.83	SEQ ID NO.84	SEQ ID NO.85	SEQ ID NO.86	SEQ ID NO.87	SEQ ID NO.88	SEQ ID NO.89	SEQ ID NO.90	SEQ ID NO.91	SEQ ID NO.92	SEQ ID NO.93	SEQ ID NO.94	SEQ ID NO.95	SEQ ID NO.96	SEQ ID NO.97	SEQ ID NO.98	SEQ ID NO.99	SEQ ID NO.100	SEQ ID NO.101	SEQ ID NO.102	SEQ ID NO.103	SEQ ID NO.104	SEQ ID NO.105	SEQ ID NO.106	SEQ ID NO.107	SEQ ID NO.108	SEQ ID NO.109	SEQ ID NO.110	SEQ ID NO.111	SEQ ID NO.112	SEQ ID NO.113	SEQ ID NO.114	SEQ ID NO.115	SEQ ID NO.116	SEQ ID NO.117	SEQ ID NO.118	SEQ ID NO.119	SEQ ID NO.120	SEQ ID NO.121	SEQ ID NO.122	SEQ ID NO.123	SEQ ID NO.124	SEQ ID NO.125	SEQ ID NO.126	SEQ ID NO.127	SEQ ID NO.128	SEQ ID NO.129	SEQ ID NO.130	SEQ ID NO.131	SEQ ID NO.132	SEQ ID NO.133	SEQ ID NO.134	SEQ ID NO.135	SEQ ID NO.136	SEQ ID NO.137	SEQ ID NO.138	SEQ ID NO.139	SEQ ID NO.140	SEQ ID NO.141	SEQ ID NO.142	SEQ ID NO.143	SEQ ID NO.144	SEQ ID NO.145	SEQ ID NO.146	SEQ ID NO.147	SEQ ID NO.148	SEQ ID NO.149	SEQ ID NO.150	SEQ ID NO.151	SEQ ID NO.152	SEQ ID NO.153	SEQ ID NO.154	SEQ ID NO.155	SEQ ID NO.156	SEQ ID NO.157	SEQ ID NO.158	SEQ ID NO.159	SEQ ID NO.160	SEQ ID NO.161	SEQ ID NO.162	SEQ ID NO.163	SEQ ID NO.164	SEQ ID NO.165	SEQ ID NO.166	SEQ ID NO.167	SEQ ID NO.168	SEQ ID NO.169	SEQ ID NO.170	SEQ ID NO.171	SEQ ID NO.172	SEQ ID NO.173	SEQ ID NO.174	SEQ ID NO.175	SEQ ID NO.176	SEQ ID NO.177	SEQ ID NO.178	SEQ ID NO.179	SEQ ID NO.180	SEQ ID NO.181	SEQ ID NO.182	SEQ ID NO.183	SEQ ID NO.184	SEQ ID NO.185	SEQ ID NO.186	SEQ ID NO.187	SEQ ID NO.188	SEQ ID NO.189	SEQ ID NO.190	SEQ ID NO.191	SEQ ID NO.192	SEQ ID NO.193	SEQ ID NO.194	SEQ ID NO.195	SEQ ID NO.196	SEQ ID NO.197	SEQ ID NO.198	SEQ ID NO.199	SEQ ID NO.200	SEQ ID NO.201	SEQ ID NO.202	SEQ ID NO.203	SEQ ID NO.204	SEQ ID NO.205	SEQ ID NO.206	SEQ ID NO.207	SEQ ID NO.208	SEQ ID NO.209	SEQ ID NO.210	SEQ ID NO.211	SEQ ID NO.212	SEQ ID NO.213	SEQ ID NO.214	SEQ ID NO.215	SEQ ID NO.216	SEQ ID NO.217	SEQ ID NO.218	SEQ ID NO.219	SEQ ID NO.220	SEQ ID NO.221	SEQ ID NO.222	SEQ ID NO.223	SEQ ID NO.224	SEQ ID NO.225	SEQ ID NO.226	SEQ ID NO.227	SEQ ID NO.228	SEQ ID NO.229	SEQ ID NO.230	SEQ ID NO.231	SEQ ID NO.232	SEQ ID NO.233	SEQ ID NO.234	SEQ ID NO.235	SEQ ID NO.236	SEQ ID NO.237	SEQ ID NO.238	SEQ ID NO.239	SEQ ID NO.240	SEQ ID NO.241	SEQ ID NO.242	SEQ ID NO.243	SEQ ID NO.244	SEQ ID NO.245	SEQ ID NO.246	SEQ ID NO.247	SEQ ID NO.248	SEQ ID NO.249	SEQ ID NO.250	SEQ ID NO.251	SEQ ID NO.252	SEQ ID NO.253	SEQ ID NO.254	SEQ ID NO.255	SEQ ID NO.256	SEQ ID NO.257	SEQ ID NO.258	SEQ ID NO.259	SEQ ID NO.260	SEQ ID NO.261	SEQ ID NO.262	SEQ ID NO.263	SEQ ID NO.264	SEQ ID NO.265	SEQ ID NO.266	SEQ ID NO.267	SEQ ID NO.268	SEQ ID NO.269	SEQ ID NO.270	SEQ ID NO.271	SEQ ID NO.272	SEQ ID NO.273	SEQ ID NO.274	SEQ ID NO.275	SEQ ID NO.276	SEQ ID NO.277	SEQ ID NO.278	SEQ ID NO.279	SEQ ID NO.280	SEQ ID NO.281	SEQ ID NO.282	SEQ ID NO.283	SEQ ID NO.284	SEQ ID NO.285	SEQ ID NO.286	SEQ ID NO.287	SEQ ID NO.288	SEQ ID NO.289	SEQ ID NO.290	SEQ ID NO.291	SEQ ID NO.292	SEQ ID NO.293	SEQ ID NO.294	SEQ ID NO.295	SEQ ID NO.296	SEQ ID NO.297	SEQ ID NO.298	SEQ ID NO.299	SEQ ID NO.300	SEQ ID NO.301	SEQ ID NO.302	SEQ ID NO.303	SEQ ID NO.304	SEQ ID NO.305	SEQ ID NO.306	SEQ ID NO.307	SEQ ID NO.308	SEQ ID NO.309	SEQ ID NO.310	SEQ ID NO.311	SEQ ID NO.312	SEQ ID NO.313	SEQ ID NO.314	SEQ ID NO.315	SEQ ID NO.316	SEQ ID NO.317	SEQ ID NO.318	SEQ ID NO.319	SEQ ID NO.320	SEQ ID NO.321	SEQ ID NO.322	SEQ ID NO.323	SEQ ID NO.324	SEQ ID NO.325	SEQ ID NO.326	SEQ ID NO.327	SEQ ID NO.328	SEQ ID NO.329	SEQ ID NO.330	SEQ ID NO.331	SEQ ID NO.332	SEQ ID NO.333	SEQ ID NO.334	SEQ ID NO.335	SEQ ID NO.336	SEQ ID NO.337	SEQ ID NO.338	SEQ ID NO.339	SEQ ID NO.340	SEQ ID NO.341	SEQ ID NO.342	SEQ ID NO.343	SEQ ID NO.344	SEQ ID NO.345	SEQ ID NO.346	SEQ ID NO.347	SEQ ID NO.348	SEQ ID NO.349	SEQ ID NO.350	SEQ ID NO.351	SEQ ID NO.352	SEQ ID NO.353	SEQ ID NO.354	SEQ ID NO.355	SEQ ID NO.356	SEQ ID NO.357	SEQ ID NO.358	SEQ ID NO.359	SEQ ID NO.360	SEQ ID NO.361	SEQ ID NO.362	SEQ ID NO.363	SEQ ID NO.364	SEQ ID NO.365	SEQ ID NO.366	SEQ ID NO.367	SEQ ID NO.368	SEQ ID NO.369	SEQ ID NO.370	SEQ ID NO.371	SEQ ID NO.372	SEQ ID NO.373	SEQ ID NO.374	SEQ ID NO.375	SEQ ID NO.376	SEQ ID NO.377	SEQ ID NO.378	SEQ ID NO.379	SEQ ID NO.380	SEQ ID NO.381	SEQ ID NO.382	SEQ ID NO.383	SEQ ID NO.384	SEQ ID NO.385	SEQ ID NO.386	SEQ ID NO.387	SEQ ID NO.388	SEQ ID NO.389	SEQ ID NO.390	SEQ ID NO.391	SEQ ID NO.392	SEQ ID NO.393	SEQ ID NO.394	SEQ ID NO.395	SEQ ID NO.396	SEQ ID NO.397	SEQ ID NO.398	SEQ ID NO.399	SEQ ID NO.400	SEQ ID NO.401	SEQ ID NO.402	SEQ ID NO.403	SEQ ID NO.404	SEQ ID NO.405	SEQ ID NO.406	SEQ ID NO.407	SEQ ID NO.408	SEQ ID NO.409	SEQ ID NO.410	SEQ ID NO.411	SEQ ID NO.412	SEQ ID NO.413	SEQ ID NO.414	SEQ ID NO.415	SEQ ID NO.416	SEQ ID NO.417	SEQ ID NO.418	SEQ ID NO.419	SEQ ID NO.420	SEQ ID NO.421	SEQ ID NO.422	SEQ ID NO.423	SEQ ID NO.424	SEQ ID NO.425	SEQ ID NO.426	SEQ ID NO.427	SEQ ID NO.428	SEQ ID NO.429	SEQ ID NO.430	SEQ ID NO.431	SEQ ID NO.432	SEQ ID NO.433	SEQ ID NO.434	SEQ ID NO.435	SEQ ID NO.436	SEQ ID NO.437	SEQ ID NO.438	SEQ ID NO.439	SEQ ID NO.440	SEQ ID NO.441	SEQ ID NO.442	SEQ ID NO.443	SEQ ID NO.444	SEQ ID NO.445	SEQ ID NO.446	SEQ ID NO.447	SEQ ID NO.448	SEQ ID NO.449	SEQ ID NO.450	SEQ ID NO.451	SEQ ID NO.452	SEQ ID NO.453	SEQ ID NO.454	SEQ ID NO.455	SEQ ID NO.456	SEQ ID NO.457	SEQ ID NO.458	SEQ ID NO.459	SEQ ID NO.460	SEQ ID NO.461	SEQ ID NO.462	SEQ ID NO.463	SEQ ID NO.464	SEQ ID NO.465	SEQ ID NO.466	SEQ ID NO.467	SEQ ID NO.468	SEQ ID NO.469	SEQ ID NO.470	SEQ ID NO.471	SEQ ID NO.472	SEQ ID NO.473	SEQ ID NO.474	SEQ ID NO.475	SEQ ID NO.476	SEQ ID NO.477	SEQ ID NO.478	SEQ ID NO.479	SEQ ID NO.480	SEQ ID NO.481	SEQ ID NO.482	SEQ ID NO.483	SEQ ID NO.484	SEQ ID NO.485	SEQ ID NO.486	SEQ ID NO.487	SEQ ID NO.488	SEQ ID NO.489	SEQ ID NO.490	SEQ ID NO.491	SEQ ID NO.492	SEQ ID NO.493	SEQ ID NO.494	SEQ ID NO.495	SEQ ID NO.496	SEQ ID NO.497	SEQ ID NO.498	SEQ ID NO.499	SEQ ID NO.500	SEQ ID NO.501	SEQ ID NO.502	SEQ ID NO.503	SEQ ID NO.504	SEQ ID NO.505	SEQ ID NO.506	SEQ ID NO.507	SEQ ID NO.508	SEQ ID NO.509	SEQ ID NO.510	SEQ ID NO.511	SEQ ID NO.512	SEQ ID NO.513	SEQ ID NO.514	SEQ ID NO.515	SEQ ID NO.516	SEQ ID NO.517	SEQ ID NO.518	SEQ ID NO.519	SEQ ID NO.520	SEQ ID NO.521	SEQ ID NO.522	SEQ ID NO.523	SEQ ID NO.524	SEQ ID NO.525	SEQ ID NO.526	SEQ ID NO.527	SEQ ID NO.528	SEQ ID NO.529	SEQ ID NO.530	SEQ ID NO.531	SEQ ID NO.532	SEQ ID NO.533	SEQ ID NO.534	SEQ ID NO.535	SEQ ID NO.536	SEQ ID NO.537	SEQ ID NO.538	SEQ ID NO.539	SEQ ID NO.540	SEQ ID NO.541	SEQ ID NO.542	SEQ ID NO.543	SEQ ID NO.544	SEQ ID NO.545	SEQ ID NO.546	SEQ ID NO.547	SEQ ID NO.548	SEQ ID NO.549	SEQ ID NO.550	SEQ ID NO.551	SEQ ID NO.552	SEQ ID NO.553	SEQ ID NO.554	SEQ ID NO.555	SEQ ID NO.556	SEQ ID NO.557	SEQ ID NO.558	SEQ ID NO.559	SEQ ID NO.560	SEQ ID NO.561	SEQ ID NO.562	SEQ ID NO.563	SEQ ID NO.564	SEQ ID NO.565	SEQ ID NO.566	SEQ ID NO.567	SEQ ID NO.568	SEQ ID NO.569	SEQ ID NO.570	SEQ ID NO.571	SEQ ID NO.572	SEQ ID NO.573	SEQ ID NO.574	SEQ ID NO.575	SEQ ID NO.576	SEQ ID NO.577	SEQ ID NO.578	SEQ ID NO.579	SEQ ID NO.580	SEQ ID NO.581	SEQ ID NO.582	SEQ ID NO.583	SEQ ID NO.584	SEQ ID NO.585	SEQ ID NO.586	SEQ ID NO.587	SEQ ID NO.588	SEQ ID NO.589	SEQ ID NO.590	SEQ ID NO.591	SEQ ID NO.592	SEQ ID NO.593	SEQ ID NO.594	SEQ ID NO.595	SEQ ID NO.596	SEQ ID NO.597	SEQ ID NO.598	SEQ ID NO.599	SEQ ID NO.600	SEQ ID NO.601	SEQ ID NO.602	SEQ ID NO.603	SEQ ID NO.604	SEQ ID NO.605	SEQ ID NO.606	SEQ ID NO.607	SEQ ID NO.608	SEQ ID NO.609	SEQ ID NO.610	SEQ ID NO.611	SEQ ID NO.612	SEQ ID NO.613	SEQ ID NO.614	SEQ ID NO.615	SEQ ID NO.616	SEQ ID NO.617	SEQ ID NO.618	SEQ ID NO.619	SEQ ID NO.620	SEQ ID NO.621	SEQ ID NO.622	SEQ ID NO.623	SEQ ID NO.624	SEQ ID NO.625	SEQ ID NO.626	SEQ ID NO.627	SEQ ID NO.628	SEQ ID NO.629	SEQ ID NO.630	SEQ ID NO.631	SEQ ID NO.632	SEQ ID NO.633	SEQ ID NO.634	SEQ ID NO.635	SEQ ID NO.636	SEQ ID NO.637	SEQ ID NO.638	SEQ ID NO.639	SEQ ID NO.640	SEQ ID NO.641	SEQ ID NO.642	SEQ ID NO.643	SEQ ID NO.644	SEQ ID NO.645	SEQ ID NO.646	SEQ ID NO.647	SEQ ID NO.648	SEQ ID NO.649	SEQ ID NO.650	SEQ ID NO.651	SEQ ID NO.652	SEQ ID NO.653	SEQ ID NO.654	SEQ ID NO.655	SEQ ID NO.656	SEQ ID NO.657	SEQ ID NO.658	SEQ ID NO.659	SEQ ID NO.660	SEQ ID NO.661	SEQ ID NO.662	SEQ ID NO.663	SEQ ID NO.664	SEQ ID NO.665	SEQ ID NO.666	SEQ ID NO.667	SEQ ID NO.668	SEQ ID NO.669	SEQ ID NO.670	SEQ ID NO.671	SEQ ID NO.672	SEQ ID NO.673	SEQ ID NO.674	SEQ ID NO.675	SEQ ID NO.676	SEQ ID NO.677	SEQ ID NO.678	SEQ ID NO.679	SEQ ID NO.680	SEQ ID NO.681	SEQ ID NO.682	SEQ ID NO.683	SEQ ID NO.684	SEQ ID NO.685	SEQ ID NO.686	SEQ ID NO.687	SEQ ID NO.688	SEQ ID NO.689	SEQ ID NO.690	SEQ ID NO.691	SEQ ID NO.692	SEQ ID NO.693	SEQ ID NO.694	SEQ ID NO.695	SEQ ID NO.696	SEQ ID NO.697	SEQ ID NO.698	SEQ ID NO.699	SEQ ID NO.700	SEQ ID NO.701	SEQ ID NO.702	SEQ ID NO.703	SEQ ID NO.704	SEQ ID NO.705	SEQ ID NO.706	SEQ ID NO.707	SEQ ID NO.708	SEQ ID NO.709	SEQ ID NO.710	SEQ ID NO.711	SEQ ID NO.712	SEQ ID NO.713	SEQ ID NO.714	SEQ ID NO.715	SEQ ID NO.716	SEQ ID NO.717	SEQ ID NO.718	SEQ ID NO.719	SEQ ID NO.720	SEQ ID NO.721	SEQ ID NO.722	SEQ ID NO.723	SEQ ID NO.724	SEQ ID NO.725	SEQ ID NO.726	SEQ ID NO.727	SEQ ID NO.728	SEQ ID NO.729	SEQ ID NO.730	SEQ ID NO.731	SEQ ID NO.732	SEQ ID NO.733	SEQ ID NO.734	SEQ ID NO.735	SEQ ID NO.736	SEQ ID NO.737	SEQ ID NO.738	SEQ ID NO.739	SEQ ID NO.740	SEQ ID NO.741	SEQ ID NO.742	SEQ ID NO.743	SEQ ID NO.744	SEQ ID NO.745	SEQ ID NO.746	SEQ ID NO.747	SEQ ID NO.748	SEQ ID NO.749	SEQ ID NO.750	SEQ ID NO.751	SEQ ID NO.752	SEQ ID NO.753	SEQ ID NO.754	SEQ ID NO.755	SEQ ID NO.756	SEQ ID NO.757	SEQ ID NO.758	SEQ ID NO.759	SEQ ID NO.760	SEQ ID NO.761	SEQ ID NO.762	SEQ ID NO.763	SEQ ID NO.764	SEQ ID NO.765	SEQ ID NO.766	SEQ ID NO.767	SEQ ID NO.768	SEQ ID NO.769	SEQ ID NO.770	SEQ ID NO.771	SEQ ID NO.772	SEQ ID NO.773	SEQ ID NO.774	SEQ ID NO.775	SEQ ID NO.776	SEQ ID NO.777	SEQ ID NO.778	SEQ ID NO.779	SEQ ID NO.780	SEQ ID NO.781	SEQ ID NO.782	SEQ ID NO.783	SEQ ID NO.784	SEQ ID NO.785	SEQ ID NO.786	SEQ ID NO.787	SEQ ID NO.788	SEQ ID NO.789	SEQ ID NO.790	SEQ ID NO.791	SEQ ID NO.792	SEQ ID NO.793	SEQ ID NO.794	SEQ ID NO.795	SEQ ID NO.796	SEQ ID NO.797	SEQ ID NO.798	SEQ ID NO.799	SEQ ID NO.800	SEQ ID NO.801	SEQ ID NO.802	SEQ ID NO.803	SEQ ID NO.804	SEQ ID NO.805	SEQ ID NO.806	SEQ ID NO.807	SEQ ID NO.808	SEQ ID NO.809	SEQ ID NO.810	SEQ ID NO.811	SEQ ID NO.812	SEQ ID NO.813	SEQ ID NO.814	SEQ ID NO.815	SEQ ID NO.816	SEQ ID NO.817	SEQ ID NO.818	SEQ ID NO.819	SEQ ID NO.820	SEQ ID NO.821	SEQ ID NO.822	SEQ ID NO.823	SEQ ID NO.824	SEQ ID NO.825	SEQ ID NO.826	SEQ ID NO.827	SEQ ID NO.828	SEQ ID NO.829	SEQ ID NO.830	SEQ ID NO.831	SEQ ID NO.832	SEQ ID NO.833	SEQ ID NO.834	SEQ ID NO.835	SEQ ID NO.836	SEQ ID NO.837	SEQ ID NO.838	SEQ ID NO.839	SEQ ID NO.840	SEQ ID NO.841	SEQ ID NO.842	SEQ ID NO.843	SEQ ID NO.844	SEQ ID NO.845	SEQ ID NO.846	SEQ ID NO.847	SEQ ID NO.848	SEQ ID NO.849	SEQ ID NO.850	SEQ ID NO.851	SEQ ID NO.852	SEQ ID NO.853	SEQ ID NO.854	SEQ ID NO.855	SEQ ID NO.856	SEQ ID NO.857	SEQ ID NO.858	SEQ ID NO.859	SEQ ID NO.860	SEQ ID NO.861	SEQ ID NO.862	SEQ ID NO.863	SEQ ID NO.864	SEQ ID NO.865	SEQ ID NO.866	SEQ ID NO.867	SEQ ID NO.868	SEQ ID NO.869	SEQ ID NO.870	SEQ ID NO.871	SEQ ID NO.872	SEQ ID NO.873	SEQ ID NO.874	SEQ ID NO.875	SEQ ID NO.876	SEQ ID NO.877	SEQ ID NO.878	SEQ ID NO.879	SEQ ID NO.880	SEQ ID NO.881	SEQ ID NO.882	SEQ ID NO.883	SEQ ID NO.884	SEQ ID NO.885	SEQ ID NO.886	SEQ ID NO.887	SEQ ID NO.888	SEQ ID NO.889	SEQ ID NO.890	SEQ ID NO.891	SEQ ID NO.892	SEQ ID NO.893	SEQ ID NO.894	SEQ ID NO.895	SEQ ID NO.896	SEQ ID NO.897	SEQ ID NO.898	SEQ ID NO.899	SEQ ID NO.900	SEQ ID NO.901	SEQ ID NO.902	SEQ ID NO.903	SEQ ID NO.904	SEQ ID NO.905	SEQ ID NO.906	SEQ ID NO.907	SEQ ID NO.908	SEQ ID NO.909	SEQ ID NO.910	SEQ ID NO.911	SEQ ID NO.912	SEQ ID NO.913	SEQ ID NO.914	SEQ ID NO.915	SEQ ID NO.916	SEQ ID NO.917	SEQ ID NO.918	SEQ ID NO.919	SEQ ID NO.920	SEQ ID NO.921	SEQ ID NO.922	SEQ ID NO.923	SEQ ID NO.924	SEQ ID NO.925	SEQ ID NO.926	SEQ ID NO.927	SEQ ID NO.928	SEQ ID NO.929	SEQ ID NO.930	SEQ ID NO.931	SEQ ID NO.932	SEQ ID NO.933	SEQ ID NO.934	SEQ ID NO.935	SEQ ID NO.936	SEQ ID NO.937	SEQ ID NO.938	SEQ ID NO.939	SEQ ID NO.940	SEQ ID NO.941	SEQ ID NO.942	SEQ ID NO.943	SEQ ID NO.944	SEQ ID NO.945	SEQ ID NO.946	SEQ ID NO.947	SEQ ID NO.948	SEQ ID NO.949	SEQ ID NO.950	SEQ ID NO.951	SEQ ID NO.952	SEQ ID NO.953	SEQ ID NO.954	SEQ ID NO.955	SEQ ID NO.956	SEQ ID NO.957	SEQ ID NO.958	SEQ ID NO.959	SEQ ID NO.960	SEQ ID NO.961	SEQ ID NO.962	SEQ ID NO.963	SEQ ID NO.964	SEQ ID NO.965	SEQ ID NO.966	SEQ ID NO.967	SEQ ID NO.968	SEQ ID NO.969	SEQ ID NO.970	SEQ ID NO.971	SEQ ID NO.972	SEQ ID NO.973	SEQ ID NO.974	SEQ ID NO.975	SEQ ID NO.976	SEQ ID NO.977	SEQ ID NO.978	SEQ ID NO.979	SEQ ID NO.980	SEQ ID NO.981	SEQ ID NO.982	SEQ ID NO.983	SEQ ID NO.984	SEQ ID NO.985	SEQ ID NO.986	SEQ ID NO.987	SEQ ID NO.988	SEQ ID NO.989	SEQ ID NO.990	SEQ ID NO.991	SEQ ID NO.992	SEQ ID NO.993	SEQ ID NO.994	SEQ ID NO.995	SEQ ID NO.996	SEQ ID NO.997	SEQ ID NO.998	SEQ ID NO.999	SEQ ID NO.1000
Comp. no. 1	ELVNTQITPSVPS AAVGCTVYTHC	QAGSSSSSELS (SEQ ID NO.6)	FWYQKPGGPP RLLY	AVSYLAS (SEQ ID NO.6)	CWSPSSGGSGGDTDTL TSDMKRADAATTC	AGSYTAGAGLT (SEQ ID NO.9)	PGAGTIVEKQ																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																	