(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第4398620号
(P4398620)

(45)発行日　平成22年1月13日(2010.1.13)　(24)登録日　平成21年10月30日(2009.10.30)

(51)Int.Cl.		F I		
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA
C12N 5/10	(2006.01)	C12N	5/00	A
A61K 39/395	(2006.01)	A61K	39/395	D
A61P 9/00	(2006.01)	A61K	39/395	H
A61P 9/10	(2006.01)	A61K	39/395	V

請求項の数 42　(全 109 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2001-558040 (P2001-558040)
(86)(22)出願日　平成13年2月2日 (2001.2.2)
(65)公表番号　特表2003-521927 (P2003-521927A)
(43)公表日　平成15年7月22日 (2003.7.22)
(86)国際出願番号　PCT/US2001/003537
(87)国際公開番号　WO2001/057226
(87)国際公開日　平成13年8月9日 (2001.8.9)
審査請求日　平成16年6月30日 (2004.6.30)
(31)優先権主張番号　09/497,625
(32)優先日　平成12年2月3日 (2000.2.3)
(33)優先権主張国　米国 (US)

前置審査

(73)特許権者　500287639
ミレニアム・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド
ＭＩＬＬＥＮＮＩＵＭ　ＰＨＡＲＭＡＣＥＵＴＩＣＡＬＳ，　ＩＮＣ．
アメリカ合衆国　マサチューセッツ　０２１３９，　ケンブリッジ，ランズタウン　ストリート　４０
(74)代理人　100107489
弁理士　大塩　竹志
(72)発明者　ラローザ，グレゴリー，ジェイ．
アメリカ合衆国　マサチューセッツ　０２４６８　ニュートン，ウッドワード　ストリート　３２５

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ヒト化抗ＣＣＲ－２抗体およびその使用方法

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
配列番号９の可変軽鎖に由来する相補性決定領域１（ＣＤＲ１）、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３と、配列番号１１の可変軽鎖に由来するフレームワーク領域と、配列番号１０の可変重鎖に由来するＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３と配列番号１６の可変重鎖に由来するフレームワーク領域とを含有してなり、ＣＣＲ２に対する結合特異性を有するヒト化イムノグロブリンまたはその抗原結合性断片。
【請求項２】
ヒト定常領域またはその一部をさらに含有してなる、請求項１に記載のヒト化イムノグロブリンまたは抗原結合性断片。
【請求項３】
ヒト定常領域またはその一部が、ガンマ型のものである、請求項２記載のヒト化イムノグロブリンまたは抗原結合性断片。
【請求項４】
ヒト定常領域またはその一部が、Ｆｃレセプターへの結合および／または補体を固定する能力を最小化するように変異させたものである、請求項３記載のヒト化イムノグロブリンまたは抗原結合性断片。
【請求項５】
ヒト定常領域またはその一部が、カッパ型のものである、請求項２記載のヒト化イムノグロブリンまたは抗原結合性断片。

【請求項６】
カッパ型のヒト定常領域またはその一部をさらに含有してなる、請求項３記載のヒト化イムノグロブリンまたは抗原結合性断片。
【請求項７】
可変軽鎖に由来する相補性決定領域が、ＣＤＲ１について配列番号：９のアミノ酸２４－３９；ＣＤＲ２について配列番号：９のアミノ酸５５－６１；およびＣＤＲ３について配列番号：９のアミノ酸９４－１０２であり、可変重鎖に由来する相補性決定領域が、ＣＤＲ１について配列番号：１０のアミノ酸３１－３５；ＣＤＲ２について配列番号：１０のアミノ酸５０－６８；およびＣＤＲ３について配列番号：１０のアミノ酸１０１－１０６である、請求項１記載のヒト化イムノグロブリンまたは抗原結合性断片。
【請求項８】
ＣＣＲ２への結合についてモノクローナル抗体１Ｄ９と競合しうるものである、請求項１～７いずれか１項に記載のヒト化イムノグロブリンまたはその抗原結合性断片。
【請求項９】
可変軽鎖が、配列番号：１２、１３、１４、１５または１０７のアミノ酸配列を含有するものである、請求項１または７に記載のヒト化イムノグロブリンまたはその抗原結合性断片。
【請求項１０】
可変重鎖が、配列番号：１７、１８、１９または２０のアミノ酸配列を含有するものである、請求項１または７に記載のヒト化イムノグロブリンまたはその抗原結合性断片。
【請求項１１】
軽鎖が、配列番号：１２のアミノ酸配列を含有するものであり、重鎖が、配列番号：１７のアミノ酸配列を含有するものである、請求項１記載のヒト化イムノグロブリンまたはその抗原結合性断片。
【請求項１２】
ヒト起源のヒト定常領域またはその一部をさらに含有してなる、請求項１１記載のヒト化イムノグロブリンまたはその抗原結合性断片。
【請求項１３】
ヒト定常領域またはその一部が、ガンマ型のものである、請求項１２記載のヒト化イムノグロブリンまたはその抗原結合性断片。
【請求項１４】
ヒト定常領域またはその一部が、Ｆｃレセプターへの結合および／または補体を固定する能力を最小化するように変異させたものである、請求項１３記載のヒト化イムノグロブリンまたはその抗原結合性断片。
【請求項１５】
ヒト定常領域またはその一部が、カッパ型のものである、請求項１３記載のヒト化イムノグロブリンまたはその抗原結合性断片。
【請求項１６】
カッパ型のヒト定常領域またはその一部をさらに含有してなる、請求項１３記載のヒト化イムノグロブリンまたはその抗原結合性断片。
【請求項１７】
配列番号９の軽鎖に由来するＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３と配列番号１１の軽鎖に由来するフレームワーク領域とをコードした塩基配列を含有する、ヒト化イムノグロブリン軽鎖をコードした第１の組換え核酸分子と、配列番号１０の重鎖に由来するＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３と配列番号１６の重鎖に由来するフレームワーク領域とをコードした塩基配列を含有する、ヒト化イムノグロブリン重鎖をコードした第２の組換え核酸分子とを含有してなる、宿主細胞。
【請求項１８】
請求項１７に記載の宿主細胞を、ヒト化イムノグロブリンの発現に適した条件下に維持し、それにより、ヒト化イムノグロブリン鎖を発現させ、ヒト化イムノグロブリンを製造

する工程を含む、ヒト化イムノグロブリンの製造方法。
【請求項１９】
ヒト化イムノグロブリンを単離する工程をさらに含む、請求項１８記載の方法。
【請求項２０】
ＣＣＲ２発現細胞と、有効量の請求項１～１６いずれか１項に記載のヒト化イムノグロブリンまたはその抗原結合性断片とを接触させるステップを含む、ＣＣＲ２発現細胞とケモカインの相互作用のインビトロの阻害方法。
【請求項２１】
細胞が、リンパ球、単球、顆粒球、Ｔ細胞、好塩基球およびＣＣＲ２またはその一部をコードする組換え核酸を含有した細胞からなる群より選択されたものである、請求項２０記載の方法。
【請求項２２】
ケモカインが、ＭＣＰ－１、ＭＣＰ－２、ＭＣＰ－３、ＭＣＰ－４およびそれらの組み合わせからなる群より選択されたものである、請求項２０記載の方法。
【請求項２３】
ＣＣＲ２と、有効量の請求項１～１６いずれか１項に記載のヒト化イムノグロブリンまたはその抗原結合性断片とを接触させるステップを含む、ケモカインと哺乳動物ＣＣＲ２との結合に関連した機能のインビトロの阻害方法。
【請求項２４】
ケモカインが、ＭＣＰ－１、ＭＣＰ－２、ＭＣＰ－３、ＭＣＰ－４およびそれらの組み合わせからなる群より選択されたものである、請求項２３記載の方法。
【請求項２５】
有効量の請求項１～１６いずれか１項に記載のヒト化イムノグロブリンまたはその抗原結合性断片を含有してなる、患者における白血球輸送の阻害のための薬剤。
【請求項２６】
有効量の請求項１～１６いずれか１項に記載のヒト化イムノグロブリンまたはその抗原結合性断片を含有してなる、患者におけるＣＣＲ２媒介疾患の治療のための薬剤。
【請求項２７】
疾患が、炎症性疾患である、請求項２６記載の薬剤。
【請求項２８】
該ＣＣＲ２媒介疾患が、自己免疫疾患である、請求項２７記載の薬剤。
【請求項２９】
自己免疫疾患が、多発性硬化症および慢性関節リウマチからなる群より選択されたものである、請求項２８記載の薬剤。
【請求項３０】
ＣＣＲ２媒介疾患が、アテローム発生およびアテローム性動脈硬化症からなる群より選択されたものである、請求項２９記載の薬剤。
【請求項３１】
有効量の請求項１～１６いずれか１項に記載のヒト化イムノグロブリンまたはその抗原結合性断片を含有してなる、患者における多発性硬化症の治療のための薬剤。
【請求項３２】
有効量の請求項１～１６いずれか１項に記載のヒト化イムノグロブリンまたはその抗原結合性断片を含有してなる、患者における慢性関節リウマチの治療のための薬剤。
【請求項３３】
哺乳動物ＣＣＲ２もしくはその一部に結合する有効量の請求項１～１６いずれか１項に記載のヒト化イムノグロブリンまたはその抗原結合性断片を含有してなる、再狭窄、血管の内腔の狭窄または血管の新生内膜過形成の阻害のための薬剤。
【請求項３４】
生理学的に許容され得る担体をさらに含有してなる、請求項２５～３３いずれか１項に記載の薬剤。

【請求項３５】
該再狭窄または新生内膜過形成が、該哺乳動物における血管介入に関連するものである、請求項３４記載の薬剤。
【請求項３６】
該血管介入が、血管形成および／またはステント留置を含む、請求項３５記載の薬剤。
【請求項３７】
該イムノグロブリンが、ＣＣＲ２への結合について、モノクローナル抗体１Ｄ９と競合し得るものである、請求項１１記載のヒト化イムノグロブリンまたはその抗原結合性断片。
【請求項３８】
該イムノグロブリンが、ケモカインとＣＣＲ２との結合を阻害するものである、請求項１１記載のヒト化イムノグロブリンまたはその抗原結合性断片。
【請求項３９】
ケモカインが、ＭＣＰ－１、ＭＣＰ－２、ＭＣＰ－３、ＭＣＰ－４およびそれらの組み合わせからなる群より選択されたものである、請求項３８記載のヒト化イムノグロブリンまたはその抗原結合性断片。
【請求項４０】
治療または診断に用いるための、請求項１～１６いずれか１項に記載のヒト化イムノグロブリンまたはその抗原結合性断片。
【請求項４１】
ＣＣＲ－２媒介疾患の治療に用いるための、請求項１～１６いずれか１項に記載のヒト化イムノグロブリンまたはその抗原結合性断片。
【請求項４２】
ＣＣＲ－２媒介疾患の治療のための薬剤の製造のための、請求項１～１６いずれか１項に記載のヒト化イムノグロブリンまたはその抗原結合性断片の使用。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
関連出願
本出願は、１９９８年７月２３日提出の米国出願シリアル番号０９／１２１，７８１の一部継続出願である１９９９年７月２２日提出の米国出願シリアル番号０９／３５９，１９３の一部継続出願である２０００年２月３日提出の米国出願シリアル番号０９／４９７，６２５の一部継続出願であり、これらの全教示は、参照により本明細書に組み込まれる。
【０００２】
発明の背景
過去数年に渡って、ケモカインと称される白血球化学誘因物質／活性化因子の増大するファミリー(growing family)が述べられている［オッペンハイム(Oppenheim,J.J.)ら，Annu. Rev. Immunol., 9:617-648(1991)；シュアル(Schall)およびベーコン(Bacon)，Curr.Opin. Immunol., 6:865-873 (1994)；バッジョリーニ(Baggiolini, M.)ら，Adv. Immunol., 55:97-179(1994)］。本ファミリーのメンバーは、ＩＬ－１βやＴＮＦα等の初期炎症メディエーターに応答して、多くの細胞型により産生され、分泌される。ケモカインスーパーファミリーは、２つの主要な派生物：α－ケモカイン（すなわち、ＣＸＣケモカイン）と、β－ケモカイン（ＣＣケモカイン）とを含む。α－ケモカインの派生物としては、主として好中球に対する誘発および活性化効果を有するものである、ＩＬ－８、好中球活性化ペプチド－２（ＮＡＰ－２）、メラノーマ成長刺激活性(melanoma growth stimulatory activity)（ＭＧＳＡ／ｇｒｏまたはＧＲＯα）、ＥＮＡ－７８等のタンパク質が挙げられる。β－ケモカインの派生物のメンバーは、単球、リンパ球、好塩基球、好酸球等の他の細胞型に作用し［ オッペンハイム(Oppenheim,J.J.)ら，Annu. Rev. Immunol., 9:617-648(1991)；バッジョリーニ(Baggiolini, M.)ら，Adv. Immunol.,55:97-179(1994)；ミラー(Miller)およびクランゲル(Krangel)，Crit. Rev. Immunol., 12:17-46(1992)；ホセ(Jose, P. J.)ら，J. Exp. Med., 179:881-118(1994)；ポナス(Ponath, P. D.)ら，J. Clin. I

nvest., 97:604-612 (1996)]、単球走化性タンパク質１－４（ＭＣＰ－１、ＭＣＰ－２、ＭＣＰ－３およびＭＣＰ－４）、ＲＡＮＴＥＳ、マクロファージ炎症性タンパク質（ＭＩＰ－１α、ＭＩＰ－１β）等のタンパク質が挙げられる。近年、ＣＸ３Ｃケモカインと称される新しいクラスの膜結合ケモカインが同定されている［バザン(Bazan,J.F.)ら，Nature 385:640-644 (1997)]。ケモカインは、化学走化性の誘発、脱顆粒、脂質メディエーターの合成、インテグリン活性化等の範囲の白血球への前炎症効果を媒介しうる[オッペンハイム(Oppenheim,J.J.)ら，Annu. Rev. Immunol., 9:617-648(1991); バッジョリーニ(Baggiolini, M.)ら，Adv. Immunol.,55:97-179(1994);ミラー(Miller,M.D.) およびクランゲル(Krangel,M.S.)，Crit. Rev. Immunol., 12:17-46(1992)]。最近、ある種のβ－ケモカインが、イン・ビトロでヒトＴ細胞系のＨＩＶ－１感染を抑制することを示している［コッチ(Cocchi,F.) ら，Science (Wash. DC), 270:1811-1815(1995)]。

【０００３】

ケモカインは、７回膜貫通型（７ＴＭＳ）Ｇタンパク質共役レセプターに結合する［マーフィー(Murphy, P. M.)，Annu. Rev. Immunol., 12:593-633(1994)] 。ＣＣケモカインまたはβケモカインのいくつかの公知のレセプターとしては、ＭＩＰ－１αおよびＲＡＮＴＥＳに結合するＣＣＲ１［ネオト(Neote,K.)ら，Cell,72:415-425(1993);ガオ(Gao, J. L.), J. Exp. Med., 171:1241-1427(1993)]; ＭＣＰ－１、ＭＣＰ－２、ＭＣＰ－３、ＭＣＰ－４等のケモカインに結合するＣＣＲ２［チャロ(Charo, I.F)ら，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:2752-2756(1994); マイヤーズ(Myers, S. J.)ら，J. Biol. Chem., 270:5786-5792(1995);ゴング(Gong)ら，J. Biol. Chem., 272:11682-11685 (1997); ガルシアーゼペダ(Garcia-Zepeda) ら，J. Immunol.,157:5613-5626(1996)]; エオタキシン、ＲＡＮＴＥＳ、ＭＣＰ－３等のケモカインに結合するＣＣＲ３［ポナス(Ponath, P. D.) ら，J. Exp. Med., 183:2437-2448 (1996)];ＭＣＰ－１、ＭＩＰ－１α、ＲＡＮＴＥＳに応答してシグナル伝達することが見出されているＣＣＲ４［パウエル(Power, C. A.)ら，J. Biol. Chem., 270:19495-19500(1995)]; およびＭＩＰ－１α、ＭＩＰ－１βおよびＲＡＮＴＥＳに応答してシグナル伝達することが示されているＣＣＲ５［ボーリング(Boring, L.)ら，J. Biol. Chem., 271(13):7551-7558(1996);ラポート(Raport, C. J.)，J. Biol. Chem., 271:17161-17166(1996); およびサムソン(Samson, M.)ら，Biochemistry, 35:3362-3367(1996)] が挙げられる。

【０００４】

ＣＣＲ２は、いくつかの白血球サブセットの表面に発現し、カルボキシル末端領域をコードするｍＲＮＡの選択的スプライシングのため、２つのわずかに異なる形態（ＣＣＲ２ａおよびＣＣＲ２ｂ）で発現すると思われる［チャロ(Charo) ら，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:2752-2756(1994)]。ＭＣＰ－１は、単球、リンパ球および好塩基球に、走化性、顆粒放出、呼吸バースト、ヒスタミンおよびサイトカインの放出等、作用する。研究により、ＭＣＰ－１は、慢性関節リウマチ、アテローム性硬化症、肉芽腫性疾患、多発性硬化症等の疾患の病因に関係することが示唆された［コッホ(Koch)，J. Clin. Invest., 90:772-79(1992);ホサカ(Hosaka)ら，Clin. Exp. Immunol. 97:451-457(1994); シュバルツ(Schwartz)ら，Am. J. Cardiol. 71(6):9B-14B(1993); シュインマー(Schimmer)ら，J. Immunol. 160:1466-1471(1998);フローリー(Flory) ら，Lab. Invest. 69:396-404(1993);ゴング(Gong)ら，J. Exp. Med. 186:131-137(1997)] 。さらに、ＣＣＲ２は、ＨＩＶのコレセプターとして作用しうる［コンノール(Connor)ら，J. Exp. Med. 185:621-628(1997)] 。したがって、ＣＣＲ２レセプターアンタゴニストは、新規な分類の重要な治療剤である。

【０００５】

発明の要旨

本発明は、哺乳動物ＣＣ－ケモカインレセプター２（ＣＣＲ２、ＣＫＲ－２、ＭＣＰ－１ＲＡまたはＭＣＰ－１ＲＢともいう）または該レセプターの一部に結合する抗体（イムノグロブリン）またはその機能的断片（例えば、抗原結合性断片）（抗－ＣＣＲ２）に関する。１つの態様において、本発明の抗体またはその断片は、ヒトまたはアカゲザルＣＣＲ

２またはその一部に対して特異性を有する。他の態様において、本発明の抗体または断片は、リガンド（例えば、ＭＣＰ－１、ＭＣＰ－２、ＭＣＰ－３、ＭＣＰ－４）とレセプターとの結合を妨げ、該リガンドと該レセプターとの結合に関連する機能（例えば、白血球輸送）を阻害する。例えば、本明細書に記載されるように、ヒトまたはアカゲザルＣＣＲ２若しくはその一部に結合する本発明の抗体およびその断片は、ケモカイン（例えば、ＭＣＰ－１、ＭＣＰ－２、ＭＣＰ－３、ＭＣＰ－４）とレセプターとの結合を妨げることができ、該ケモカインと該レセプターとの結合に関連する機能を阻害することができる。１つの態様において、前記抗体は、モノクローナル抗体（ｍＡｂ）ＬＳ１３２．１Ｄ９（１Ｄ９）、またはヒトＣＣＲ２若しくはヒトＣＣＲ２の一部への結合に関して１Ｄ９と競合しうる抗体である。先の抗体の機能的断片も想定される。

【０００６】

別の態様において、本発明の抗体または機能的断片は、ヒトＣＣＲ２若しくはその一部に結合し、レセプターへのヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）の結合を阻害し、それにより、ＨＩＶとレセプターとの結合に関連する機能（例えば、ＨＩＶ抗原放出および感染性）を阻害する。１つの態様において、該抗体は、モノクローナル抗体１Ｄ９、またはヒトＣＣＲ２若しくはヒトＣＣＲ２の一部への結合に関して１Ｄ９と競合しうる抗体である。

【０００７】

また、本発明は、哺乳動物ＣＣＲ２または該レセプターの一部に結合し、他の抗－ＣＣＲ２抗体に対して、ＣＣＲ２若しくはＣＣＲ２を含有する組成物の蛍光染色強度の増加を提供する抗体またはその機能的断片（例えば、抗原結合性断片等）に関する。１つの態様において、前記抗体は、モノクローナル抗体１Ｄ９若しくはＬＳ１３２．８Ｇ２（８Ｇ２）、またはヒトＣＣＲ２若しくはヒトＣＣＲ２の一部への結合に関して、１Ｄ９若しくは８Ｇ２と競合しうる抗体に関する。

【０００８】

また、本発明は、ＣＣＲ２への結合特異性を有するヒト化イムノグロブリンまたはその抗原結合性断片に関し、該イムノグロブリンは、非ヒト起源（例えば、げっ歯類）の抗原結合領域とヒト起源のイムノグロブリンの少なくとも一部分（例えば、ヒトフレームワーク領域、ガンマ型のヒト定常領域）とを含有するものである。１つの態様において、本明細書に記載されたヒト化イムノグロブリンまたはその断片は、ＣＣＲ２への結合に関して１Ｄ９と競合しうる。好ましい態様では、ヒト化イムノグロブリンの抗原結合領域は、モノクローナル抗体１Ｄ９（例えば、それぞれ、Ｆｉｇｕｒｅ　７（配列番号：９）およびＦｉｇｕｒｅ　８（配列番号：１０）に示される軽鎖および重鎖の可変領域を含有するイムノグロブリン等）に由来する。

【０００９】

例えば、ヒト化イムノグロブリンまたはその抗原結合性断片は、非ヒト起源の少なくとも１つの相補性決定領域（ＣＤＲ）を含有する抗原結合領域と、ヒトフレームワーク領域に由来するフレームワーク領域（ＦＲ）とを含有しうる。１つの側面において、ＣＣＲ２に対して結合特異性を有するヒト化イムノグロブリンは、ＣＣＲ２に結合する非ヒト起源の抗体に由来する少なくとも１つのＣＤＲとヒト起源の軽鎖に由来する（例えば、ＨＦ－２１／２８由来）ＦＲとを含有した軽鎖と、ＣＣＲ２に結合する非ヒト起源の抗体に由来するＣＤＲとヒト起源の重鎖に由来する（例えば、４Ｂ４’ＣＬ由来）ＦＲとを含有した重鎖とを含有する。他の側面において、軽鎖は、１Ｄ９抗体の軽鎖に由来する３つのＣＤＲを含有し、重鎖は、１Ｄ９抗体の重鎖に由来する３つのＣＤＲを含有する。

【００１０】

また、本発明は、ヒト化イムノグロブリン軽鎖およびその抗原結合性断片（例えば、１Ｄ９抗体の軽鎖のＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３とヒト軽鎖ＦＲとを含有する）、並びにヒト化イムノグロブリン重鎖およびその抗原結合性断片（例えば、１Ｄ９抗体の重鎖のＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３とヒト重鎖ＦＲとを含有する）に関する。好ましい態様において、本発明は、本明細書に記載されたヒト化重鎖および軽鎖（例えば、Ｆｉｇｕｒｅ　７（配列番号：９）に示される軽鎖の可変領域を含有するヒト化軽鎖、Ｆｉｇｕｒ

ｅ　８（配列番号：１０）に示される重鎖の可変領域を含有するヒト化重鎖等）に関する。１以上の軽鎖および／または重鎖を含有するヒト化イムノグロブリンも包含される。

【００１１】

さらに、本発明の主題は、重鎖と軽鎖とを含有し、該軽鎖がマウスモノクローナル抗体１Ｄ９に由来する少なくとも１つの相補性決定領域とヒト抗体ＨＦ－２１／２８の軽鎖に由来するフレームワーク領域とを含有するものであり、該重鎖が、マウスモノクローナル抗体１Ｄ９に由来する少なくとも１つの相補性決定領域とヒト抗体４Ｂ４’ＣＬの重鎖に由来するフレームワーク領域とを含有するものである、ＣＣＲ２に対する結合特異性を有するヒト化ムノグロブリンまたはその抗原結合性断片に関する。１つの態様において、前記軽鎖は、１Ｄ９抗体の軽鎖に由来する３つの相補性決定領域を含有し、前記重鎖は、１Ｄ９抗体の重鎖に由来する３つの相補性決定領域を含有する。別の態様において、１Ｄ９の軽鎖に由来する相補性決定領域は、配列番号：９のアミノ酸２４－３９、配列番号：９のアミノ酸５５－６１および配列番号：９のアミノ酸９４－１０２であり、１Ｄ９の重鎖に由来する相補性決定領域は、配列番号：１０のアミノ酸３１－３５、配列番号：１０のアミノ酸５０－６８および配列番号：１０のアミノ酸１０１－１０６である。

【００１２】

さらに、本発明は、軽鎖と相補的な重鎖とを含有し、該軽鎖が、配列番号：１２を含有した可変領域を含有するものである、ＣＣＲ２に対して結合特異性を有するヒト化イムノグロブリンまたはその抗原結合性断片に関する。また、本発明は、重鎖と相補的な軽鎖とを含有し、該重鎖が、配列番号：１７を含有する可変領域を含有するものであるＣＣＲ２に対して結合特異性を有するヒト化イムノグロブリンまたはその抗原結合性断片に関する。好ましい態様において、本発明は、重鎖と軽鎖とを含有し、該軽鎖が、配列番号：１２を含有した可変領域を含有するものであり、該重鎖が、配列番号：１７を含有する可変領域を含有するものであるＣＣＲ２に対して結合特異性を有するヒト化イムノグロブリンまたはその抗原結合性断片に関する。１つの態様において、前記ヒト化イムノグロブリンまたは抗原結合性断片は、ＣＣＲ２への結合に関してマウス抗体１Ｄ９と競合しうる。さらなる態様において、前記ヒト化イムノグロブリンまたは抗原結合性断片は、リガンドとＣＣＲ２との結合を阻害する。

【００１３】

さらに、本発明は、本発明のヒト化イムノグロブリン（例えば、単鎖抗体）をコードする核酸配列を含有した、単離された核酸分子、並びに本発明のヒト化イムノグロブリン軽鎖（例えば、配列番号：９５のヌクレオチド５２－３９０を含有する）または重鎖（例えば、配列番号：９６のヌクレオチド５８－４１１を含有する）をコードする配列を含有した、単離された核酸分子に関する。例えば、本発明は、マウス１Ｄ９モノクローナル抗体に由来する抗原結合領域をコードする第１の核酸配列とヒト起源のイムノグロブリンの定常領域の少なくとも一部をコードする第２の核酸配列とを含有した、ヒト化イムノグロブリン軽鎖または重鎖をコードする遺伝子（例えば、融合遺伝子等）を提供する。

【００１４】

さらに、本発明は、ＣＣＲ２に対して結合特異性を有するヒト化イムノグロブリンまたはかかるイムノグロブリンの鎖をコードする核酸分子を含有する構築物に関する。例えば、ＣＣＲに対する結合特異性を有する非ヒト抗体の軽鎖に由来するＣＤＲおよびヒト起源の軽鎖に由来するフレームワーク領域をコードした塩基配列を含有したヒト化イムノグロブリン軽鎖をコードした遺伝子（例えば、融合遺伝子等）を含有した発現ベクターが提供される。ＣＣＲ２に対して結合特異性を有する非ヒト抗体の重鎖に由来するＣＤＲとヒト起源の重鎖に由来するフレームワーク領域とをコードした塩基配列を含有したヒト化イムノグロブリン重鎖をコードする遺伝子を含有した発現ベクターは、かかる構築物の他の例示である。

【００１５】

また、本発明は、本発明の核酸分子を含有する１以上の構築物等の、本発明の核酸分子を含有した宿主細胞に関する。１つの態様において、本発明は、ヒト化イムノグロブリン軽

鎖をコードする組換核酸であり、かつマウス１Ｄ９抗体の軽鎖に由来するＣＤＲおよびヒト起源の軽鎖に由来するフレームワーク領域をコードする塩基配列を含有した第１の組換核酸と、ヒト化イムノグロブリン重鎖をコードする組換核酸であり、かつマウス１Ｄ９抗体の重鎖に由来するＣＤＲおよびヒト起源の重鎖に由来するフレームワーク領域をコードする塩基配列を含有した第２の組換え核酸とを含有した宿主細胞に関する。

【００１６】

また、本発明は、本発明の宿主細胞をヒト化イムノグロブリンの発現に適した条件下に維持し、それにより、１若しくは複数のヒト化イムノグロブリン鎖を発現させ、ヒト化イムノグロブリンを生産させるステップを含む、ヒト化イムノグロブリンの製造方法を提供する。本方法は、ヒト化イムノグロブリンを単離するステップをさらに含みうる。

【００１７】

本発明のヒト化イムノグロブリンは、それらのマウスまたは他の非ヒトカウンターパートよりもより低い免疫原性でありうる。したがって、本明細書に記載されたヒト化イムノグロブリンは、ヒトにおいて、例えば、粘膜リンパ様組織へのリンパ球ホーミングを制御し、それにより、炎症性応答を減少させるための治療剤として用いられうる。

【００１８】

さらに、本発明は、診断または治療（予防を含む）に使用するための本発明のヒト化イムノグロブリンに関する。１つの態様において、本発明は、組織の白血球浸潤に関連する疾患の治療、例えば、炎症性疾患、自己免疫疾患、移植片拒絶、ＨＩＶ感染およびアテローム性硬化症等の単球介在疾患の治療等に使用するための本発明のヒト化イムノグロブリンに関する。

【００１９】

他の側面において、本発明は、組織の白血球浸潤に関連する疾患の治療、例えば、炎症性疾患、自己免疫疾患、例えば、アテローム性硬化症等の単球介在疾患、移植片拒絶またはＨＩＶ感染の治療用の医薬の製造のための本発明のヒト化イムノグロブリンの使用に関する。

【００２０】

さらに、本発明は、哺乳動物（例えば、ヒト、非ヒト霊長類動物またはマウス等）ＣＣＲ２を有する細胞と、哺乳動物ＣＣＲ２若しくはＣＣＲ２の一部に結合する有効量の抗体またはその機能的断片とを接触させるステップを含む、哺乳動物（例えば、ヒト、非ヒト霊長類動物またはマウス等）ＣＣＲ２を有する細胞とそのリガンドとの相互作用の阻害方法に関する。適切な細胞としては、顆粒球；単球、マクロファージ、好塩基球、好酸球等の白血球；マスト細胞；Ｔ細胞（例えば、ＣＤ８＋細胞、ＣＤ４＋細胞、ＣＤ２５＋細胞、ＣＤ４５ＲＯ＋細胞等）を含むリンパ球；並びにＣＣＲ２を発現する組換細胞等の他のＣＣＲ発現細胞（例えば、トランスフェクト細胞等）が挙げられる。特定の態様において、前記抗体は、１Ｄ９、またはヒトＣＣＲ２若しくはヒトＣＣＲ２の一部への結合に関して１Ｄ９と競合しうる抗体である。

【００２１】

本発明の別の態様は、哺乳動物ＣＣＲ２を有する細胞と、ＣＣＲ２若しくは該レセプターの一部に結合する有効量の抗体またはその機能的断片とを接触させるステップを含む、哺乳動物ＣＣＲ２を有する細胞とケモカインとの相互作用の阻害方法に関する。本方法の１つの態様において、前記抗体またはその機能的断片は、１Ｄ９、１Ｄ９の抗原結合性断片または１Ｄ９と同じ若しくは類似したエピトープ特異性を有する抗体若しくはその断片のいずれか１以上である。さらに、本発明は、哺乳動物ＣＣＲ２タンパク質若しくは該レセプターの一部に結合する有効量の抗体またはその機能的断片を投与するステップを含む、ケモカインとＣＣＲ２との結合に関連する機能の阻害方法に関する。本方法の１つの側面において、前記抗体またはその機能的断片は、１Ｄ９、１Ｄ９の抗原結合性断片または１Ｄ９と同じ若しくは類似したエピトープ特異性を有する抗体若しくはその断片のいずれか１以上である。

【００２２】

本発明の他の側面は、細胞による、哺乳動物ＣＣＲ２または該レセプターの一部の発現の同定方法である。本方法によれば、細胞またはその画分（例えば、膜画分）を含有した組成物と、哺乳動物ＣＣＲ２タンパク質若しくは該レセプターの一部に結合する抗体またはその機能的断片（例えば、１Ｄ９または８Ｇ２）とを該抗体への結合に適した条件下に接触させ、該抗体若しくは断片と該タンパク質またはその一部との間の複合体の形成を検出する。複合体の検出は、直接的または間接的に、細胞上の前記レセプターの存在を示す。また、本発明は、哺乳動物ＣＣ－ケモカインレセプター２若しくは該レセプターの一部に結合する抗体またはその機能的断片と、該抗体若しくは断片と該タンパク質若しくはその一部との間の複合体の存在を検出するに適した１以上の助剤とを含有した、生体試料中におけるＣＣＲ２若しくはその一部の存在の検出に用いるためのキットに関する。

【００２３】

また、哺乳動物ＣＣＲ２タンパク質に結合する別のリガンド、または、哺乳動物ＣＣＲ２機能の阻害物質および／または促進物質等の他の物質の同定方法も本発明に包含される。例えば、本発明の抗体若しくはその機能的断片と同じ若しくは類似した結合特異性を有する物質が、該抗体若しくは断片との競合アッセイにより同定されうる。したがって、本発明は、ＣＣＲ２レセプターに結合するリガンド、またはレセプター機能の阻害物質（例えば、アンタゴニスト）若しくは促進物質（例えば、アゴニスト）等の他の物質の同定方法をも包含する。１つの態様において、ＣＣＲ２レセプタータンパク質を天然に発現する細胞またはＣＣＲ２レセプター若しくは細胞に導入された核酸によりコードされたバリアントを発現するように遺伝子工学的に作製された適切な宿主細胞は、リガンド、レセプター機能の阻害物質または促進物質の有効性を同定および評価するためのアッセイに用いられる。また、かかる細胞は、発現したレセプタータンパク質またはポリペプチドの機能を評価するのに有用である。

【００２４】

したがって、本発明は、試験対象の薬剤と、本発明の抗体または抗原結合性断片(例えば、モノクローナル抗体１Ｄ９、１Ｄ９と同じまたは類似したエピトープ特異性を有する抗体、１Ｄ９の抗原結合性断片、モノクローナル抗体８Ｇ２、８Ｇ２と同じまたは類似したエピトープ特異性を有する抗体、および８Ｇ２の抗原結合性断片) と、哺乳動物ＣＣＲ２タンパク質またはリガンド結合バリアントを含有した組成物とを混合するステップを含む、哺乳動物ＣＣＲ２またはリガンド結合バリアントに結合する薬剤の検出または同定方法にも関する。前記成分は、抗体または抗原結合性断片と哺乳動物ＣＣＲ２タンパク質またはリガンド結合バリアントとの結合に適した条件下に混合され得、抗体または断片と哺乳動物ＣＣＲ２タンパク質またはリガンド結合バリアントとの結合は、本明細書に記載された方法若しくは他の適切な方法により、直接的または間接的に検出または測定される。適切な対照(例えば、試験対象の薬剤の非存在下) に対して、形成した複合体の量が減少することは、該薬剤が、該レセプターまたはバリアントに結合することを示す。哺乳動物ＣＣＲ２タンパク質またはリガンド結合バリアントを含有した組成物は、組換えＣＣＲ２タンパク質またはリガンド結合バリアントを有する細胞の膜画分でありうる。前記抗体またはその断片は、ラジオアイソトープ、スピン標識、抗原標識、酵素標識、蛍光基および化学発光基等の標識で標識され得る。これらおよび類似のアッセイを用いて、リガンド(例えば、ＣＣＲ２と相互作用するケモカイン等) 等の薬剤、またはＣＣＲ２に結合し、レセプターへの結合について本明細書に記載された抗体と競合する、レセプター機能の阻害物質または促進物質等の他の物質を検出することができる。

【００２５】

本発明によれば、リガンド、レセプター機能の阻害物質または促進物質は、適切なアッセイで同定され、治療効果をさらに評価されうる。レセプター機能の阻害物質は、レセプター活性を阻害（減少または予防）することに用いられ、リガンドおよび／または促進物質は、示された場合の正常なレセプター機能を誘導（誘発または増強）することに用いられ得る。また、本発明は、レセプター機能(例えば、ケモカイン結合またはＨＩＶ結合) の阻害物質を個体(例えば、ヒト等の哺乳動物) に投与するステップを含む、炎症性疾患、

自己免疫疾患、アテローム性硬化症および移植片拒絶またはＨＩＶ感染の治療方法を提供する。さらに、本発明は、個体への新規リガンドまたは促進物質に投与するステップによる、レセプター機能の刺激方法を提供し、例えば、感染性疾患および癌の治療に有用な白血球機能の選択的刺激への新たなアプローチを提供する。

【００２６】

本発明の別の側面は、哺乳動物ＣＣＲ２またはその一部を発現する細胞と哺乳動物ＣＣＲ２または該レセプターの一部に結合し、ＨＩＶ結合および感染を阻害する有効量の抗体またはその機能的断片とを接触させるステップを含む、哺乳動物ＣＣＲ２またはその一部を発現する細胞のＨＩＶ感染の阻害方法に関する。本発明の特定の態様において、抗体またはその機能的断片は、１Ｄ９、１Ｄ９と同じまたは類似したエピトープ特異性を有する抗体、ヒトＣＣＲ２への結合について１Ｄ９と競合しうる抗体、およびその抗原結合性断片のいずれかである。

【００２７】

患者に、哺乳動物ＣＣＲ２または該レセプターの一部に結合し、ＣＣＲ２レセプターへのＨＩＶ結合を阻害する有効量の抗体またはその機能的断片を投与するステップを含む、患者におけるＨＩＶの阻害(例えば、治療) 方法も本発明により包含される。前記抗－ＣＣＲ２抗体または断片は、単独で投与または１以上のさらなる治療薬、抗－ＣＣＲ３、抗－ＣＣＲ５、および／または抗－ＣＸＣＲ４抗体等の、例えば、ＨＩＶ感染に対するコレセプターに結合し、コレセプターへの結合を阻害する１以上の抗体と組合せて投与されうる。

【００２８】

また、本発明の他の側面は、個体に、ＣＣＲ２に結合し、ＣＣＲ２へのＨＩＶ結合を阻害する有効量の抗体またはその機能的断片を投与するステップを含む、個体におけるＨＩＶ感染の予防または阻害方法に関する。本発明によれば、ＨＩＶ感染の予防としては、感染した個体における新たな細胞の感染を予防(減少または除去) するためまたはＨＩＶに曝露されるであろう個体、ＨＩＶに曝露されていたであろう個体若しくはＨＩＶに曝露されている個体における感染を予防するための治療が挙げられる。例えば、ＨＩＶ感染個体、ＨＩＶ感染女性の胎児、または医療従事者等の個体は、本発明の方法により、治療されうる。

【００２９】

本発明は、患者に、哺乳動物ＣＣＲ２または該レセプターの一部に結合し、リガンドと該レセプターとの結合に関連する機能を阻害する有効量の抗体またはその機能的断片を投与するステップを含む、患者における白血球輸送の阻害方法をも包含する。

【００３０】

また、本発明は、患者に、哺乳動物ＣＣＲ２または該レセプターの一部に結合し、ＣＣＲ２－媒介機能を阻害する有効量の抗体またはその機能的断片を投与するステップを含む、炎症性疾患等のＣＣＲ２介在疾患の阻害または治療方法に関する。例えば、本発明は、患者に、哺乳動物ＣＣＲ２または該レセプターの一部に結合し、ＣＣＲ２－媒介機能を阻害する有効量の抗体またはその機能的断片を投与するステップを含む、脈管構造の狭窄または再狭窄の阻害または治療方法に関する。

【００３１】

さらに、本発明は、治療(予防を含む) または診断に用いるための本明細書に記載された抗体またはその断片(例えば、モノクローナル抗体１Ｄ９またはその抗原結合性断片) およびＣＣＲ２介在疾患または本明細書に記載された他の疾患若しくは炎症状態の治療用医薬の製造のためのかかる抗体または断片の使用に関する。

【００３２】

発明の詳細な説明

本発明は、哺乳動物のＣＣケモカインレセプター２（ＣＣＲ２、ＣＫＲ－２、ＭＣＰ－１ＲＡもしくはＭＣＰ－１ＲＢ）またはＣＣＲ２の一部に結合する抗体（抗ＣＣＲ２）またはその機能的断片に関する。一態様では、抗体はヒトＣＣＲ２またはｒｈｅｓｕｓ　ＣＣ

Ｒ２またはその一部に対する特異性を有する。一態様では、抗体（イムノグロブリン）は単離されたおよび／または組換えの哺乳動物のＣＣＲ２またはその一部（例えば、ペプチド）に対してあるいは、哺乳動物のＣＣＲ２を発現する宿主細胞に対して産生される。好ましい一態様では、抗体は、（１または複数の）ヒトＣＣＲ２レセプター（例えばＣＣＲ２ａおよび／またはＣＣＲ２ｂ）またはその一部に特異的に結合し、また特に好ましい一態様では、該抗体は天然または内因性のヒトのＣＣＲ２に対して特異性を有する。本明細書で使用するように、「ＣＣ－ケモカインレセプター２」（「ＣＣＲ２」）は、ＣＣ－ケモカインレセプター２ａおよび／またはＣＣ－ケモカインレセプター２ｂをいう。哺乳動物のＣＣＲ２に特有の１つ以上の機能、例えば結合活性（例えば、リガンド、阻害物質および／または促進物質の結合）、シグナル伝達活性（例えば、哺乳動物のＧタンパク質の活性化、細胞質ゾルの遊離カルシウム濃度［Ca^{2+}］$_i$の急速でそして一時的な増大の誘導）および／または細胞性の応答の刺激（例えば、走化性の刺激、エキソサイトーシスまたは白血球による炎症メディエーターの放出、インテグリン活性化）などを阻害できる抗体またはその機能的断片も本発明に包含される。この抗体は、ＣＣＲ２に対するリガンド（すなわち１つ以上のリガンド）の結合および／またはリガンドに応答してＣＣＲ２によって媒介される１つ以上の機能を阻害できる。例えば、一つの側面においては、抗体またはその機能的断片は、ＭＣＰ－１、ＭＣＰ－２、ＭＣＰ－３および／またはＭＣＰ－４などの天然リガンドとのレセプターの相互作用を阻害（減少または防止）し得る。別の側面においては、ＣＣＲ２に結合する抗体またはその機能的断片は、哺乳動物のＣＣＲ２（例えばヒトのＣＣＲ２、非ヒト霊長類のＣＣＲ２、ネズミのＣＣＲ２）に対するＭＣＰ－１、ＭＣＰ－２、ＭＣＰ－３および／またはＭＣＰ－４および／またはＨＩＶの結合を阻害し得る。本発明の抗体またはその機能的断片は、白血球の輸送、細胞へのＨＩＶの侵入、Ｔ細胞の活性化、炎症メディエーターの放出および／または白血球の脱顆粒を含む、ヒトのＣＣＲ２によって媒介される機能を阻害し得る。好ましくは、該抗体または断片は、少なくとも約０．１×１０$^{-9}$Ｍ、好ましくは少なくとも約１×１０$^{-9}$Ｍ、より好ましくは少なくとも約３×１０$^{-9}$Ｍの親和性でＣＣＲ２に結合しうる。特定の態様では、抗体またはその機能的断片は、約１５０μｇ／ｍｌ未満、好ましくは約１００μｇ／ｍｌ未満、より好ましくは約５０μｇ／ｍｌ未満、さらにより好ましくは約２０μｇ／ｍｌ未満で、ケモカイン誘導性（例えば、ＭＣＰ－１誘導性）の細胞（例えば、ＰＢＭＣ）の走化性の阻害を示す。

【００３３】

本発明のさらなる態様では、本発明の抗体またはその機能的断片は、ＣＣＲ２へのＣＣＲ２リガンド（例えばケモカイン）の結合を、約１．０μｇ／ｍｌ未満、好ましくは約０．０５μｇ／ｍｌ未満、より好ましくは約０．００５μｇ／ｍｌ未満のIC_{50}で阻害できる。

【００３４】

ＣＣＲ２に対して特異的なネズミ(murine)モノクローナル抗体（１Ｄ９および８Ｇ２と命名した）を本明細書に記載するように産生させた。好ましい一態様では、本発明の抗体はヒトのＣＣＲ２に結合し、本明細書に記載のネズミの１Ｄ９または８Ｇ２抗体のものと同じもしくは類似のエピトープ特異性を有する。ネズミの１Ｄ９モノクローナル抗体のものと同一または類似のエピトープ特異性を有する抗体は、ヒトＣＣＲ２（例えば、ヒトのＣＣＲ２を有する細胞（例えば、ＣＣＲ２を有するトランスフェクタント、ＣＤ８＋細胞、ＣＤ４＋細胞、ＣＤＲ４５ＲＯ＋細胞、ＣＤ２５＋細胞、単球、樹状細胞、マクロファージおよび好塩基球））に対する結合に関してネズミの１Ｄ９モノクローナル抗体と競合するそれらの能力によって同定できる。同様に、ネズミの８Ｇ２モノクローナル抗体のものと同じもしくは類似のエピトープ特異性を有する抗体は、ヒトのＣＣＲ２に対する結合に関してネズミの８Ｇ２モノクローナル抗体と競合するそれらの能力によって同定できる。レセプターのキメラ（Ｒｕｃｋｅｒら，Ｃｅｌｌ　８７：４３７－４４６（１９９６））を用いて、ｍＡｂ　１Ｄ９および８Ｇ２の結合部位を、ヒトＣＣ－ケモカインレセプター２のアミノ末端ドメイン、具体的には該タンパク質のほぼアミノ酸１位からほぼアミノ酸

３０位までを含有するエピトープにマッピングした。これらの技術または他の適切な技術を用いて、本発明の抗体のものと同じまたは類似のエピトープ特異性を有する抗体を同定できる。ｍＡｂ　１Ｄ９および８Ｇ２は、ＣＣＲ２レセプターのアミノ末端ドメイン、例えば、該レセプタータンパク質のほぼアミノ酸１位からほぼアミノ酸３０位までに対するエピトープ特異性を有する。したがって、本発明は、哺乳動物のＣＣ－ケモカインレセプター２のアミノ末端ドメインもしくはその一部、具体的には哺乳動物のＣＣ－ケモカインレセプター２のほぼアミノ酸１位からほぼアミノ酸３０位までを含有するエピトープに結合する抗体またはその機能的部分に関する。

【００３５】

また本発明は、本明細書に記載の抗体のうち少なくとも２種類と同一または類似のエピトープ特異性を有する二重特異性抗体またはその機能的断片（例えばＦ（ａｂ’）$_2$）に関する（例えば、米国特許第５，１４１，７３６号（Ｉｗａｓａら）、米国特許第４，４４４，８７８号、第５，２９２，６６８号、第５，５２３，２１０号（すべてＰａｕｌｕｓら）および米国特許第５，４９６，５４９号（Ｙａｍａｚａｋｉら）を参照されたい）。例えば本発明の二重特異性抗体はｍＡｂ　１Ｄ９および８Ｇ２と同じもしくは類似のエピトープ特異性を有し得、例えば哺乳動物のＣＣＲ２タンパク質のアミノ末端ドメインまたはその一部と結合する。

【００３６】

本発明の抗体を産生するハイブリドーマ細胞株は、１９９８年7月１７日にＬｅｕｋｏＳｉｔｅ，Ｉｎｃ．，２１５　Ｆｉｒｓｔ　Ｓｔｒｅｅｔ，Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ，ＭＡ　０２１４２，Ｕ．Ｓ．Ａ．（現在は、Ｍｉｌｌｅｎｎｉｕｍ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ，Ｉｎｃ．，７５　Ｓｉｄｎｅｙ　Ｓｔｒｅｅｔ，Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ，ＭＡ　０２１３９，Ｕ．Ｓ．Ａ）を代表してアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション（Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ）、１０８０１、Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　Ｂｏｕｌｅｖａｒｄ，Ｍａｎａｓｓａｓ，Ｖｉｒｇｉｎｉａ　２０１１０，Ｕ．Ｓ．Ａ．に、登録番号ＨＢ－１２５４９（１Ｄ９）およびＨＢ－１２５５０（８Ｇ２）で寄託された。本発明はまた、ＡＴＣＣ登録番号ＨＢ－１２５４９およびＡＴＣＣ登録番号ＨＢ－１２５５０の下で寄託されたハイブリーマ細胞株、ならびにＡＴＣＣ登録番号ＨＢ－１２５４９およびＨＢ－１２５５０の下で寄託されたハイブリドーマ細胞株により産生されるモノクローナル抗体に関する。

【００３７】

本発明の抗体はポリクローナルであってもモノクローナルであってもよく、「抗体」という用語はポリクローナル抗体とモノクローナル抗体の両方を包含することが意図される。さらにまた、８Ｇ２を利用する本明細書に記載の方法では８Ｇ２の機能的断片（例えば抗原結合性断片）、８Ｇ２と同一または類似のエピトープ特異性を有する抗体およびそれらの組み合わせも、必要であれば８Ｇ２とは同じでなく類似してもいないエピトープ特異性を有する抗体または断片と組み合わせて使用できる；同様に、１Ｄ９を利用すると記載されている方法では、１Ｄ９の機能的断片、１Ｄ９と同一または類似のエピトープ特異性を有する抗体およびそれらの組み合わせも、必要であれば１Ｄ９とは同じでなく類似してもいないエピトープ特異性を有する抗体または断片と組み合わせて使用することもできることが理解される。本発明の抗体は適切な免疫原（例えば単離および／または組換えの哺乳動物のＣＣＲ２タンパク質もしくはその一部）または合成分子（例えば、合成ペプチド）に対して産生させることができる。好ましい一態様では、レセプターを発現する細胞（例えばトランスフェクト細胞）は免疫原としてまたはレセプターに結合する抗体のスクリーニングに使用され得る。

【００３８】

本発明の抗体およびその断片は、本明細書に記載するように治療適用、診断適用および研究適用において有用である。本発明は、治療（予防を含む）または（例えば本明細書に記載するような特定の疾患または症状の）診断に使用するための本発明の抗体またはその機能的部分（例えばｍＡｂ　１Ｄ９もしくは８Ｇ２またはその抗原結合性断片）、および本

明細書に記載するような疾患または症状の治療に使用するための医薬品の製造のためのかかる抗体またはその機能的部分の使用を包含する。

【００３９】

免疫化抗原の調製とポリクローナルおよびモノクローナル抗体の産生は本明細書に記載のようにまたは他の適当な技術を使って行なうことができる。様々な方法が記載されている（例えばＫｏｈｌｅｒら、Ｎａｔｕｒｅ，２５６：４９５－４９７（１９７５）およびＥｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．　６：５１１－５１９（１９７６）；Ｍｉｌｓｔｅｉｎら，Ｎａｔｕｒｅ　２６６：５５０－５５２　（１９７７）；Ｋｏｐｒｏｗｓｋｉら、米国特許第４，１７２，１２４号；Ｈａｒｌｏｗ，Ｅ．およびＤ．　Ｌａｎｅ（１９８８），Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ（コールドスプリングハーバー研究所，ニューヨーク州コールドスプリングハーバー）；Ａｕｓｕｂｅｌ，Ｆ．Ｍ．ら編，Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　Ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ　Ｖｏｌ．２（Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔ　２７，１９９４年夏）（Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ　＆　Ｓｏｎｓ，ニューヨーク州ニューヨーク）のＣｈａｐｔｅｒ　１１（１９９１）を参照されたい）。一般にハイブリドーマは適当な不死化細胞株（例えばＳＰ２／０などの骨髄腫細胞株）を抗体産生細胞と融合させることによって産生され得る。抗体産生細胞、好ましくは脾臓またはリンパ節由来の細胞は、対象とする抗原で免疫した動物から得られる。融合細胞（ハイブリドーマ）は選択培養条件を使って単離し、限界希釈法によってクローン化できる。望ましい結合特性をもつ抗体を産生する細胞は適切なアッセイ（例えばＥＬＩＳＡ）によって選択し得る。

【００４０】

ＣＣＲ２に結合する抗体（ヒト抗体または人工的な抗体を含む）を産生または単離する他の適切な方法が使用され得る。これは、例えば組換え抗体（例えば、単鎖ＦｖまたはＦａｂ）をライブラリーから選択する方法や、ヒト抗体のレパートリーを産生できるトランスジェニック動物（例えばマウス）の免疫化による方法を含む（例えば、Ｊａｋｏｂｏｖｉｔｓら，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，９０：２５５１－２５５５（１９９３）；Ｊａｋｏｂｏｖｉｔｓら，Ｎａｔｕｒｅ，３６２：２５５－２５８（１９９３）；Ｌｏｎｂｅｒｇら、米国特許第５，５４５，８０６号；Ｓｕｒａｎｉら、米国特許第５，５４５，８０７号を参照されたい）。

【００４１】

単鎖抗体およびキメラ抗体、ヒト化抗体または霊長類化（ｐｒｉｍａｔｉｚｅｄ）（ＣＤＲ移植）抗体ならびに異なる種に由来する部分を含むキメラ抗体またはＣＤＲ移植単鎖抗体なども、本発明および「抗体」という用語に包含される。これらの抗体の種々の部分は従来の技術によって化学的に互いに連結されたり、遺伝子操作技術を使って連続するタンパク質として製造されうる。例えば、キメラ鎖またはヒト化鎖をコードする核酸は、連続したタンパク質を産生するように発現され得る。例えば、Ｃａｂｉｌｌｙら、米国特許第４，８１６，５６７号、Ｃａｂｉｌｌｙら、欧州特許第０，１２５，０２３　Ｂ１号；Ｂｏｓｓら、米国特許第４，８１６，３９７号；Ｂｏｓｓら、欧州特許第０，１２０，６９４　Ｂ１号；Ｎｅｕｂｅｒｇｅｒ，Ｍ．Ｓ．ら、国際公開第８６／０１５３３号パンフレット；Ｎｅｕｂｅｒｇｅｒ，Ｍ．Ｓ．ら、欧州特許第０，１９４，２７６　Ｂ１号；Ｗｉｎｔｅｒ、米国特許第５，２２５，５３９号；Ｗｉｎｔｅｒ、欧州特許第０，２３９，４００　Ｂ１号；ならびにＱｕｅｅｎら、米国特許第５，５８５０８９号、第５，６９８，７６１号および第５，６９８，７６２号を参照されたい。また、霊長類化抗体についてはＮｅｗｍａｎ，Ｒ．ら，ＢｉｏＴｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，１０：１４５５－１４６０（１９９２）、単鎖抗体についてはＬａｄｎｅｒら、米国特許第４，９４６，７７８号およびＢｉｒｄ，Ｒ．Ｅ．ら、Ｓｃｉｅｎｃｅ，２４２：４２３－４２６（１９８８））も参照されたい。

【００４２】

また、抗体の機能的断片（キメラ抗体、ヒト化抗体、霊長類化抗体または単鎖抗体の断片を含む）も産生され得る。上述した抗体の機能的断片は、それらの元となる完全長抗体の

少なくとも１つの結合機能および／または調節機能を保持している。好ましい機能的断片は対応する完全長抗体の抗原結合機能（例えば哺乳動物のＣＣＲ２を結合する能力）を保持している。特に好ましい機能的断片は、哺乳動物のＣＣＲ２に特有な１つ以上の機能（例えば結合活性、シグナル伝達活性および／または細胞性の応答の刺激など）を阻害する能力を保持している。例えば、一態様では、機能的断片はＣＣＲ２と１つ以上のリガンド（例えばＭＣＰ－１、ＭＣＰ－２、ＭＣＰ－３および／またはＭＣＰ－４）との相互作用を阻害しおよび／または１つ以上のレセプターが媒介する機能（例えば白血球の輸送、細胞へのＨＩＶの侵入、Ｔ細胞の活性化、炎症メディエーターの放出および／または白血球の脱顆粒）を阻害することができる。

【００４３】

例えば、哺乳動物のＣＣＲ２レセプターまたはその一部に結合できる抗体断片（Ｆｖ、Ｆａｂ、Ｆａｂ’およびＦ（ａｂ’）$_2$ 断片を含むが、これらに限定されない）は本発明に包含される。このような断片は、例えば酵素的切断や組換え技術によって産生し得る。例えばパパインまたはペプシンによる切断によってそれぞれＦａｂ断片またはＦ（ａｂ’）$_2$ 断片を生成することができる。抗体は、１つ以上の停止コドンが天然の停止部位の上流に導入されている抗体遺伝子を使って種々の切断された形態で産生することもできる。例えばＦ（ａｂ’）$_2$ 重鎖部分をコードするキメラ遺伝子は重鎖のＣＨ$_1$ ドメインとヒンジ領域とをコードするＤＮＡ配列を含むように設計することができる。

【００４４】

本発明は、非ヒト起源（例えばげっ歯類）の抗原結合領域と、ヒト起源のイムノグロブリンの少なくとも一部（例えば、ヒトのフレームワーク領域、ヒトの定常領域またはそれらの一部）とを含む、ＣＣＲ２に対して結合特異性を有するヒト化イムノグロブリンまたはその抗原結合性断片に関する。一態様では、ヒト化イムノグロブリンは、ＣＣＲ２に結合する非ヒト起源の抗原結合領域と、ヒト定常領域に由来する定常領域とを含む。別の態様では、ＣＣＲ２に結合するヒト化イムノグロブリンは、非ヒト起源の相補性決定領域と、ヒト起源の可変フレームワーク領域と、任意にヒト起源の定常領域とを含む。例えば、ヒト化イムノグロブリンは、ＣＣＲ２に結合する非ヒト起源の抗体に由来する相補性決定領域とヒト起源の軽鎖に由来するフレームワーク領域とを含有する軽鎖、およびＣＣＲ２に結合する非ヒト起源の抗体に由来する相補性決定領域とヒト起源の重鎖に由来するフレームワーク領域とを含有する重鎖を含みうる。

【００４５】

一態様では、ヒト化イムノグロブリンは、ヒトのＣＣＲ２に対する結合に関してネズミの１Ｄ９または８Ｇ２モノクローナル抗体と競合しうる。好ましい態様では、ヒト化イムノグロブリンの抗原結合領域は、（ａ）１Ｄ９モノクローナル抗体に由来する（例えば、１Ｄ９軽鎖のＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３および／または１Ｄ９重鎖のＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３を含有するヒト化イムノグロブリンの場合のように）、または（ｂ）８Ｇ２モノクローナル抗体に由来する（例えば、８Ｇ２軽鎖のＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３および／または８Ｇ２重鎖のＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３を含有するヒト化イムノグロブリンの場合のように）。キメラまたはＣＤＲ移植単鎖抗体もヒト化イムノグロブリンという用語に包含される。

【００４６】

本発明はまた、ヒト化イムノグロブリン軽鎖もしくはその抗原結合性断片、またはヒト化イムノグロブリン重鎖もしくはその抗原結合性断片に関する。一態様では、本発明は、非ヒト起源の軽鎖ＣＤＲ（すなわち、１つもしくはそれ以上のＣＤＲ）とヒト軽鎖フレームワーク領域とを含有するヒト化軽鎖に関する。別の態様では、本発明は、非ヒト起源の重鎖のＣＤＲ（すなわち、１つもしくはそれ以上のＣＤＲ）とヒト重鎖のフレームワーク領域とを含有するヒト化イムノグロブリン重鎖に関する。ＣＤＲは、非ヒトイムノグロブリンに由来しうる。

【００４７】

天然のイムノグロブリンは、２つの同一の軽鎖（約２４ｋＤ）と２つの同一の重鎖（約５

５または７０ｋＤ）とが四量体を形成している共通のコア構造を有する。各鎖のアミノ末端部分は、可変（Ｖ）領域として知られており、各鎖の残りの部分のより保存的な定常（Ｃ）領域と区別されうる。軽鎖の可変領域内には、Ｊ領域として知られるＣ末端部分がある。重鎖の可変領域内には、Ｊ領域に加えてＤ領域がある。イムノグロブリンにおけるアミノ酸配列のバリエーションのほとんどは、抗原結合に直接関与する超可変領域または相補性決定領域（ＣＤＲ）として知られるＶ領域内の３つの分離した位置に限定される。これらの領域を、アミノ末端から順に、それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３と命名する。ＣＤＲは、より保存されたフレームワーク領域（ＦＲ）により定位置に保持される。これらの領域を、アミノ末端から順に、それぞれＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３およびＦＲ４と命名する。ＣＤＲおよびＦＲ領域の位置ならびに番号付けは、Ｋａｂａｔら（Ｋａｂａｔら、Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，第５版，Ｕ．Ｓ．Ｄｅｐａｒｔｍｅｎｔ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ ａｎｄ Ｈｕｍａｎ Ｓｅｒｖｉｃｅｓ，Ｕ．Ｓ．Ｇｏｖｅｒｎｍｅｎｔ Ｐｒｉｎｔｉｎｇ Ｏｆｆｉｃｅ（１９９１）により定義されている。

【００４８】

ヒトイムノグロブリンは、重鎖のアイソタイプに応じてクラスおよびサブクラスに分けることができる。クラスには、ＩｇＧ、ＩｇＭ、ＩｇＡ、ＩｇＤおよびＩｇＥが含まれ、それぞれ重鎖がガンマ（γ）、ミュー（μ）、アルファ（α）、デルタ（δ）またはイプシロン（ε）型である。サブクラスには、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ１およびＩｇＡ２が含まれ、それぞれ重鎖がγ１、γ２、γ３、γ４、α１およびα２型である。選択したクラスまたはサブクラスのヒトイムノグロブリン分子は、カッパ（κ）軽鎖またはラムダ（λ）軽鎖のいずれかを含みうる。例えば、Ｃｅｌｌｕｌａｒ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，Ｗｏｎｓｉｅｗｉｃｚ，Ｍ．Ｊ．編、第４５章、４１～５０頁、Ｗ．Ｂ．Ｓａｕｎｄｅｒｓ Ｃｏ．，Ｐｈｉｌａｄｅｌｐｈｉａ，ＰＡ（１９９１）；Ｎｉｓｏｎｏｆｆ，Ａ．，Ｉｎｔｒｏｄｕｃｔｉｏｎ ｔｏ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，第２版、第４章、４５～６５頁、Ｓｉｎａｕｅｒ Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ，Ｉｎｃ．，Ｓｕｎｄｅｒｌａｎｄ，ＭＡ（１９８４）を参照されたい。

【００４９】

本明細書で使用する用語「イムノグロブリン」は、完全な抗体およびその生物学的に機能的な断片を包含する。かかる生物学的に機能的な断片は、対応する完全長の抗体の少なくとも１つの抗原結合機能（例えば、抗体１Ｄ９のＣＣＲ２に対する特異性）を保持し、好ましくは、そのリガンド（例えば、ＨＩＶ、ＭＣＰ－１、ＭＣＰ－２、ＭＣＰ－３、ＭＣＰ－４）の１つまたはそれ以上とＣＣＲ２との相互作用を阻害する能力を保持する。使用しうる生物学的に機能的な抗体断片の例には、単鎖抗体、Ｆｖ、Ｆａｂ、Ｆａｂ’およびＦ（ａｂ’）$_2$ 断片などのＣＣＲ２との結合能を有する断片が含まれる。かかる断片は酵素的切断により、または組換え技術により作製し得る。例えば、Ｆａｂ断片またはＦ（ａｂ’）$_2$ 断片をそれぞれ生成するために、パパインによる切断またはペプシンによる切断を用いることができる。抗体は、１つまたはそれ以上の停止コドンが天然の停止部位の上流に導入されている抗体遺伝子を使って種々の切断された形態で産生することもできる。例えば、Ｆ（ａｂ’）$_2$ 断片の重鎖をコードするキメラ遺伝子は重鎖のＣＨ$_1$ ドメインとヒンジ領域とをコードするＤＮＡ配列を含むように設計することができる。本明細書で使用するように、ヒト化イムノグロブリンの重鎖または軽鎖の抗原結合性断片は、相補鎖と対になったとき抗原と結合する断片を意味するものとする。すなわち、ヒト化軽鎖の抗原結合性断片は、可変領域を含有する（例えば、ネズミ、キメラ、ヒト化）重鎖と対になったとき抗原と結合し、ヒト化重鎖の抗原結合性断片は、可変領域を含有する（例えば、ネズミ、キメラ、ヒト化）軽鎖と対になったとき抗原と結合する。

【００５０】

本明細書で使用される「ヒト化イムノグロブリン」という用語は、異なる起源を持つイムノグロブリンの部分を含むイムノグロブリンであって少なくとも１つの部分がヒト起源の

ものをいう。例えば、ヒト化抗体は、必要な特異性を有する非ヒト起源（例えばマウス）のイムノグロブリンに由来する部分とヒト起源のイムノグロブリン配列に由来する部分とを含み得（例えば、キメライムノグロブリン）、それらは互いに従来の技術（例えば合成）によって化学的に連結され、または遺伝子操作技術を使って連続したポリペプチドとして調製されうる（例えば、キメラ抗体のタンパク質部分をコードするＤＮＡを発現させて連続したポリペプチド鎖を製造することができる）。本発明のヒト化イムノグロブリンの別の例は、非ヒト起源の抗体に由来するＣＤＲとヒト起源の軽鎖および／または重鎖由来のフレームワーク領域とを含有する１つまたはそれ以上のイムノグロブリン鎖を含有するイムノグロブリン（例えばフレームワークが変化したまたは変化していないＣＤＲ移植抗体）である。キメラまたはＣＤＲ移植単鎖抗体もヒト化イムノグロブリンという用語に包含される。例えば、Ｃａｂｉｌｌｙら、米国特許第４，８１６，５６７号；Ｃａｂｉｌｌｙら、欧州特許第０，１２５，０２３　Ｂ１号；Ｂｏｓｓら、米国特許第４，８１６，３９７号；Ｂｏｓｓら、欧州特許第０，１２０，６９４　Ｂ１号；Ｎｅｕｂｅｒｇｅｒ，Ｍ．Ｓ．ら、国際公開第８６／０１５３３号パンフレット；Ｎｅｕｂｅｒｇｅｒ，Ｍ．Ｓ．ら、欧州特許第０，１９４，２７６　Ｂ１号；Ｗｉｎｔｅｒ、米国特許第５，２２５，５３９号；Ｗｉｎｔｅｒ、欧州特許第０，２３９，４００　Ｂ１号；Ｐａｄｌａｎ，Ｅ．Ａ．ら、欧州特許出願第０，５１９，５９６　Ａ１号を参照されたい。また、単鎖抗体についてはＬａｄｎｅｒら、米国特許第４，９４６，７７８号；Ｈｕｓｔｏｎ，米国特許第５，４７６，７８６号；およびＢｉｒｄ，Ｒ．Ｅ．ら、Ｓｃｉｅｎｃｅ，２４２：４２３－４２６（１９８８））も参照されたい。

【００５１】

例えば、ヒト化イムノグロブリンを、所望のヒト化鎖をコードする遺伝子（例えば、ｃＤＮＡ）を調製するための合成および／または組換え核酸を用いて作製することができる。例えば、ヒト化可変領域をコードする核酸（例えば、ＤＮＡ）配列は、ヒトまたはヒト化鎖をコードするＤＮＡ配列（例えば、予めヒト化された可変領域由来のＤＮＡ鋳型）を改変するためのＰＣＲ突然変異導入法を用いて構築できる（例えばＫａｍｍａｎ，Ｍ．ら，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．，１７：５４０４（１９８９）；Ｓａｔｏ，Ｋ．ら，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ，５３：８５１－８５６（１９９３）；Ｄａｕｇｈｅｒｔｙ，Ｂ．Ｌ．ら，Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．，１９（９）：２４７１－２４７６（１９９１）；ならびにＬｅｗｉｓ，Ａ．Ｐ．およびＪ．Ｓ．　Ｃｒｏｗｅ，Ｇｅｎｅ，１０１：２９７－３０２（１９９１）を参照されたい）。これらの方法または他の適切な方法を用い、バリアントもまた容易に作製することができる。一態様では、クローン化された可変領域は、突然変異され得、所望の特異性を有するバリアントをコードする配列が選択され得る（例えばファージライブラリーから；例えばＫｒｅｂｂｅｒｓら、米国特許第５，５１４，５４８号；１９９３年４月１日に公開されたＨｏｏｇｅｎｂｏｏｍら、国際公開第９３／０６２１３号パンフレットを参照されたい）。

【００５２】

ヒト化イムノグロブリンの抗原結合領域（非ヒト部分）は、ＣＣＲ２に対する結合特異性を有する非ヒト起源のイムノグロブリン（ドナーイムノグロブリンと称する）に由来しうる。例えば、適切な抗原結合領域はネズミモノクローナル抗体１Ｄ９に由来しうる。他の供給源には、齧歯類（例えば、マウス、ラット）、ウサギ、ブタ、ヤギまたは非ヒト霊長類（例えば、サル）などの非ヒト起源から得たＣＣＲ２特異的抗体が含まれる。さらにまた、１Ｄ９抗体と同じもしくは類似のエピトープに結合する抗体などの他のポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を作製しうる（例えば、Ｋｏｈｌｅｒら、Ｎａｔｕｒｅ、２５６：４９５－４９７（１９７５）；Ｈａｒｌｏｗら、１９８８，Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ，（ニューヨーク州コールドスプリングハーバー）；およびＡｕｓｕｂｅｌら編，Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ　第２巻（Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔ　２７，１９９４年夏）（Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ　＆　Ｓｏｎｓ，ニューヨーク州ニューヨーク）の第１１章（１９９１）を参照されたい）。

【００５３】
例えば、適当な哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ウサギまたはヒツジ）において適切な免疫原に対する抗体を作製しうる。ＣＣＲ２を有する細胞、ＣＣＲ２を含有する膜画分およびＣＣＲ２の免疫原性断片は、好適な免疫原の例である。抗体産生細胞（例えば、リンパ球）は、例えば、免疫化した動物のリンパ節または脾臓から単離しうる。次いで、該細胞を適当な不死化細胞（例えば、骨髄腫細胞株）と融合させ、それによりハイブリドーマを形成しうる。融合細胞を選択培養技術を用いて単離しうる。所望の特異性を有する抗体を産生する細胞を、適当なアッセイ（例えば、ＥＬＩＳＡ）により選択することができる。ＣＣＲ２に対する結合特異性を有する非ヒト起源のイムノグロブリンはまた、抗体ライブラリー（例えば、非ヒトＦａｂ分子を含むファージライブラリー）から得ることができる。

【００５４】
一態様では、ヒト化イムノグロブリンの抗原結合領域は、非ヒト起源のＣＤＲを含有する。この態様では、ＣＣＲ２に対する結合特異性を有するヒト化イムノグロブリンは、非ヒト起源の少なくとも１つのＣＤＲを含有する。例えば、ＣＤＲは、ヒト化イムノグロブリンが非ヒト起源の１つまたはそれ以上のイムノグロブリン由来の重鎖のＣＤＲ１、ＣＤＲ２および／またはＣＤＲ３、および／または軽鎖のＣＤＲ１、ＣＤＲ２および／またはＣＤＲ３を実質的に含み、得られるヒト化イムノグロブリンがＣＣＲ２に対する結合特異性を有するように、非ヒト起源のイムノグロブリンの軽鎖可変領域および重鎖可変領域から得られうる。好ましくは、選択した鎖のすべての３つのＣＤＲが、ドナーの対応する鎖のＣＤＲと実質的に同じであり、より好ましくは、軽鎖および重鎖のすべての３つのＣＤＲが対応するドナー鎖のＣＤＲと実質的に同じである。一態様では、本発明は、１Ｄ９抗体の軽鎖のＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３を含有するヒト化軽鎖またはその抗原結合性断片と、重鎖、例えばヒト重鎖とを含有してなる、ＣＣＲ２に対する結合特異性を有するイムノグロブリンに関する。本発明はまた、１Ｄ９抗体の重鎖のＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３を含有するヒト化重鎖またはその抗原結合性断片と、軽鎖、例えばヒト軽鎖とを含有してなる、ＣＣＲ２に対する結合特異性を有するイムノグロブリンを含む。

【００５５】
本発明はまた、軽鎖および重鎖を含有する、ＣＣＲ２に対する結合特異性を有するイムノグロブリンであって、該軽鎖が非ヒト起源の抗体（例えば、１Ｄ９）の少なくとも１つのＣＤＲと、ヒト起源のフレームワーク領域および定常領域とを有し（例えば、配列番号：１２、配列番号：１３、配列番号：１４、配列番号：１５および配列番号：１０７）、該重鎖が非ヒト起源（例えば、１Ｄ９由来）の可変領域とヒト起源の定常領域とを有する、イムノグロブリンに関する。本発明はまた、これらのイムノグロブリンの抗原結合性断片を提供する。本発明はまた、軽鎖および重鎖を含有する、ＣＣＲ２に対する結合特異性を有するイムノグロブリンであって、該軽鎖が非ヒト起源（例えば、１Ｄ９由来）の可変鎖と、ヒト起源の定常領域とを有し、該重鎖が非ヒト起源の抗体（例えば、１Ｄ９）の少なくとも１つのＣＤＲと、ヒト起源のフレームワーク領域および定常領域とを有する（例えば、配列番号：１７、配列番号：１８、配列番号：１９および配列番号：２０）イムノグロブリンに関する。本発明はまた、これらのイムノグロブリンの抗原結合性断片を提供する。

【００５６】
ヒト起源であるヒト化イムノグロブリンまたはイムノグロブリン鎖の部分（ヒト部分）は、任意の適切なヒトイムノグロブリンまたはイムノグロブリン鎖に由来しうる。例えば、ヒト定常領域またはその部分は、存在する場合には、対立遺伝子バリアントを含む、ヒト抗体のκまたはλ軽鎖、および／またはγ（例えば、γ１、γ２、γ３、γ４）、μ、α（例えば、α１、α２）、δまたはε重鎖に由来しうる。エフェクター機能を調整（ｔａｉｌｏｒ）するために、特定の定常領域（例えば、ＩｇＧ１）、そのバリアントまたは部分を選択することができる。例えば、Ｆｃレセプターへの結合および／または補体と結合する能力を最小にするため、変異させた定常領域（バリアント）を融合タンパク質に組み

込むことができる（例えば、実施例３を参照されたい；また、Ｗｉｎｔｅｒら、英国特許第２，２０９，７５７Ｂ号；Ｍｏｒｒｉｓｏｎら、国際公開第８９／０７１４２号パンフレット；Ｍｏｒｇａｎら、国際公開第９４／２９３５１号パンフレット，１９９４年１２月２２日を参照されたい）。

【００５７】

ヒトフレームワーク領域（例えば、軽鎖の可変領域の）は、存在する場合には、好ましくは、抗原結合領域ドナーの相同または同等領域（例えば、軽鎖の可変領域）との配列類似性を有するヒト抗体の可変領域に由来する。ヒト化イムノグロブリンのヒト起源の部分のためのフレームワーク領域の他の供給源には、ヒト可変コンセンサス配列（例えば、Ｋｅｔｔｌｅｂｏｒｏｕｇｈ、Ｃ．Ａ．ら、Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ ４：７７３－７８３（１９９１）；１９９４年3月3日に公開されたＣａｒｔｅｒら、国際公開第９４／０４６７９号パンフレットを参照されたい）が含まれる。例えば、非ヒト部分を得るために使用される抗体または可変領域の配列は、Ｋａｂａｔら、Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ、第5版、Ｕ．Ｓ．Ｄｅｐａｒｔｍｅｎｔ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ ａｎｄ Ｈｕｍａｎ Ｓｅｒｖｉｃｅｓ，Ｕ．Ｓ．Ｇｏｖｅｒｎｍｅｎｔ Ｐｒｉｎｔｉｎｇ Ｏｆｆｉｃｅ（１９９１）に記載のようなヒト配列と比較しうる。特に好ましい態様では、ヒト化イムノグロブリン鎖のフレームワーク領域は、非ヒトドナー（例えば、ネズミ抗体１Ｄ９）の可変領域と、少なくとも約６０％の全配列同一性、好ましくは少なくとも約７０％の全配列同一性、より好ましくは少なくとも約８５％の全配列同一性を有するヒト可変領域に由来する。ヒト部分はまた、非ヒトドナーの同等部分（例えば、ＦＲ）と比較すると、使用している特定部分（例えば、ＦＲ）内で、少なくとも約６５％の配列同一性、好ましくは少なくとも約７０％の配列同一性を有するヒト抗体に由来しうる。

【００５８】

一態様では、ヒト化イムノグロブリンは、ヒト起源の抗体の１つまたはそれ以上の鎖に由来する少なくとも１つのフレームワーク領域（ＦＲ）を含有する。したがって、ＦＲは、ヒト起源の１つまたはそれ以上の抗体に由来するＦＲ１および／またはＦＲ２および／またはＦＲ３および／またはＦＲ４を包含しうる。好ましくは、選択したヒト化鎖のヒト部分は、ヒト起源の可変領域由来（例えば、ヒトイムノグロブリン鎖由来、ヒトコンセンサス配列由来）のＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３およびＦＲ４を含む。

【００５９】

本発明における使用のための非ヒト起源およびヒト起源のイムノグロブリン部分は、それらが由来するイムノグロブリンもしくはイムノグロブリン部分と同じ配列、またはそのバリアントと同じ配列を有する。かかるバリアントには、１つまたはそれ以上の残基の付加、欠失または置換により異なる変異体が含まれる。上述のように、非ヒト起源であるＣＤＲは、非ヒトドナーと実質的に同じ、好ましくは非ヒトドナーのＣＤＲと同一である。実施例２に記載のように、ヒト起源のフレームワーク領域の残基を、ドナーの対応する位置由来の残基と置換する変更などの、フレームワーク領域における変更を行なうことができる。フレームワーク領域において、１つまたはそれ以上のアミノ酸の欠失、挿入および置換を含む、１つまたはそれ以上の変異を行なうことができる。いくつかのこのような置換を、実施例２のヒト化１Ｄ９抗体の設計において記載している。選択したヒト化抗体または鎖について、本明細書に記載のようにしてフレームワーク変異を設計することができる。好ましくは、ヒト化イムノグロブリンは、非ヒトドナーと同様またはより良好な親和性でＣＣＲ２と結合しうる。バリアントは、非ヒトドナーまたはアクセプターヒト鎖の変異誘発を含む種々の適切な方法により作製することができる。

【００６０】

本発明のヒト化イムノグロブリンは、ヒトＣＣＲ２に対する結合特異性を有する。好ましい態様では、本発明のヒト化イムノグロブリンは、結合機能（例えば、ＣＣＲ２に対する特異性を有する、同じまたは類似のエピトープ特異性を有する）および／または阻害機能（例えば、ＣＣＲ２を有する細胞のそのリガンド（例えば、ケモカイン）への結合を阻害

する能力などのインビトロおよび／またはインビボでＣＣＲ２依存性機能を阻害する能力）などのネズミ抗体１Ｄ９の少なくとも１つの機能的特徴を有する。したがって、好ましいヒト化イムノグロブリンは、ネズミ抗体１Ｄ９の結合特異性、ネズミ抗体１Ｄ９のエピトープ特異性（例えば、ＣＣＲ２（例えばＣＣＲ２を有する細胞上）に対する結合に関してネズミ１Ｄ９、キメラ１Ｄ９抗体またはヒト化１Ｄ９と競合しうる）および／またはネズミ抗体１Ｄ９の阻害機能を有し得る。

【００６１】

ＣＣＲ２に対する結合特異性を有するヒト化免疫の結合機能は、標準的な免疫学的方法、例えば、ヒト化イムノグロブリンとＣＣＲ２（例えば、ＣＣＲ２を含有する膜画分、ＣＣＲ２を有する細胞上、ＣＣＲ２を発現する、ＣＣＲ２をコードする核酸を含むヒト細胞株または組換え宿主細胞）との間での複合体の形成をモニターするアッセイの使用により検出することができる。結合アッセイおよび／または接着アッセイあるいは他の適切な方法もまた、必要とされる特異性により（例えば、ライブラリーからの）ヒト化イムノグロブリンの同定および／または単離のための手順（例えば、ＣＣＲ２を有する細胞とそのリガンド（例えば、ＨＩＶ、ＭＣＰ－１、ＭＣＰ－２、ＭＣＰ－３、ＭＣＰ－４）との接着をモニターするアッセイ）または他の適切な方法）において使用することができる。

【００６２】

本発明における使用のための非ヒト起源またはヒト起源のイムノグロブリン部分には、軽鎖、重鎖ならびに軽鎖および重鎖の部分が含まれる。これらのイムノグロブリン部分は、（例えば、部分のデ・ノボ（ｄｅ　ｎｏｖｏ）合成により）イムノグロブリンから得ることができるか、もしくはこれらから誘導することができ、または所望の性質（例えば、ＣＣＲ２への結合、配列類似性）を有するイムノグロブリンまたはその鎖をコードする核酸分子を作製し、発現させることができる。ヒトおよび非ヒト起源の所望の部分（例えば、抗原結合領域、ＣＤＲ、ＦＲ、Ｃ領域）を含有するヒト化イムノグロブリンは、所望のヒト化鎖をコードする遺伝子（例えば、ｃＤＮＡ）を調製するための合成および／または組換え核酸を用いて作製することができる。鎖の部分を調製するために、１つまたはそれ以上の停止コドンを所望の位置に導入することができる。例えば、新たに設計したヒト化可変領域をコードする核酸（例えば、ＤＮＡ）配列を、既存のＤＮＡ配列を改変するためのＰＣＲ変異導入法（例えば、Ｋａｍｍａｎ，Ｍ．ら、Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．１７：５４０４（１９８９）を参照されたい）を用いて構築することができる。新しいＣＤＲをコードするＰＣＲプライマーを、同じまたは非常に類似したヒト可変領域に基づく予めヒト化した可変領域（Ｓａｔｏ，Ｋ．ら、Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　５３：８５１－８５６（１９９３））のＤＮＡ鋳型にハイブリダイズさせることができる。類似のＤＮＡ配列が鋳型としての使用に利用可能でない場合、可変領域の配列をコードする配列を含有する核酸を合成オリゴヌクレオチドから構築することができる（例えば、Ｋｏｌｂｉｎｇｅｒ，Ｆ．，Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ　８：９７１－９８０（１９９３）を参照されたい）。シグナルペプチドをコードする配列もまた、該核酸と一体化させることができる（例えば、合成時、ベクター内への挿入時）。天然のシグナル配列が利用可能でない場合、別の抗体由来のシグナルペプチド配列を使用することができる（例えば、Ｋｅｔｔｌｅｂｏｒｏｕｇｈ，Ｃ．Ａ．，Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ　４：７７３－７８３（１９９１）を参照されたい）。これらの方法、本明細書に記載の方法または他の適切な方法を用いて、バリアントを容易に作製することができる。一態様では、クローン化された可変領域は突然変異され得、所望の特異性を有するバリアントをコードする配列を選択しうる（例えば、ファージライブラリーから；例えばＫｒｅｂｂｅｒら；米国特許第５，５１４，５４８号明細書；１９９３年４月１日に公開されたＨｏｏｇｅｎｂｏｏｍら、国際公開第９３／０６２１３号パンフレットを参照されたい）。

【００６３】

本発明は、配列番号：９の軽鎖可変領域のアミノ酸配列の少なくとも機能的な部分を含有するアミノ酸配列を含有するヒト化イムノグロブリン軽鎖またはその抗原結合性断片に関する。好ましい態様では、該アミノ酸配列は、配列番号：９のＣＤＲの少なくとも１つ、

好ましくは２つ、より好ましくは３つを含有する。本発明はまた、配列番号：１０に示す重鎖可変領域のアミノ酸配列の少なくとも機能的な部分を含有するアミノ酸配列を含有するヒト化イムノグロブリン重鎖またはその抗原結合性断片に関する。好ましい態様では、該アミノ酸配列は、配列番号：１０のＣＤＲの少なくとも１つ、好ましくは２つ、より好ましくは３つを含有する。なお、本明細書に記載のすべてのネズミ配列はＭｕｓ　ｍｕｓｃｕｌｕｓ由来である。

【００６４】

本発明の一実施形態によれば、ＣＣＲ２に対する結合特異性を有するヒト化イムノグロブリン軽鎖またはその抗原結合性断片は、配列番号：１２、配列番号：１３、配列番号：１４、配列番号：１５および配列番号：１０７からなる群より選ばれるアミノ酸配列を含有しうる。本発明の別の態様によれば、ＣＣＲ２に対する結合特異性を有するヒト化イムノグロブリン重鎖またはその抗原結合性断片は、配列番号：１７、配列番号：１８、配列番号：１９および配列番号：２０からなる群より選ばれるアミノ酸配列を含有しうる。特定の態様では、本発明のヒト化イムノグロブリンは、配列番号：１２、配列番号：１３、配列番号：１４、配列番号：１５および配列番号：１０７からなる群より選ばれるアミノ酸配列を含有する、ＣＣＲ２に対する結合特異性を有する軽鎖またはその抗原結合性断片、および配列番号：１７、配列番号：１８、配列番号：１９および配列番号：２０からなる群より選ばれるアミノ酸配列を含有する、ＣＣＲ２に対する結合特異性を有する重鎖またはその抗原結合性断片の両方を含有しうる。

【００６５】

一態様では、本発明は、配列番号：１２のアミノ酸配列を含有する軽鎖と相補的重鎖とを含有する、ＣＣＲ２に対する結合特異性を有するヒト化イムノグロブリン、またはＣＣＲ２に対する結合特異性を有する該ヒト化イムノグロブリンの抗原結合性断片に関する。別の態様では、本発明は、配列番号：１７のアミノ酸配列を含有する重鎖と相補的軽鎖とを含有する、ＣＣＲ２に対する結合特異性を有するヒト化イムノグロブリン、またはＣＣＲ２に対する結合特異性を有する該ヒト化イムノグロブリンの抗原結合性断片に関する。相補的な軽鎖または重鎖は、それぞれ選択された重鎖または軽鎖と会合し、該相補的な重鎖および軽鎖を含有するイムノグロブリンにＣＣＲ２に対する結合特異性を有する能力をもたらすものである。好ましい態様では、本発明は、配列番号：１２のアミノ酸配列を含有する軽鎖と、配列番号：１７のアミノ酸配列を含有する重鎖とを含有する、ＣＣＲ２に対する結合特異性を有するヒト化イムノグロブリン、またはＣＣＲ２に対する結合特異性を有する該ヒト化イムノグロブリンの抗原結合性断片に関する。

【００６６】

代替的な態様では、本発明のヒト化イムノグロブリンは、配列番号：１２のアミノ酸配列を含有する軽鎖、および配列番号：１８、配列番号：１９および配列番号：２０からなる群より選ばれるアミノ酸配列を含有する重鎖の両方、またはＣＣＲ２に対する結合特異性を有する該イムノグロブリンの抗原結合性断片を含有する。さらなる態様では、本発明のヒト化イムノグロブリンは、配列番号：１３のアミノ酸配列を含有する軽鎖、および配列番号：１７、配列番号：１８、配列番号：１９および配列番号：２０からなる群より選ばれるアミノ酸配列を含有する重鎖の両方、またはＣＣＲ２に対する結合特異性を有する該イムノグロブリンの抗原結合性断片を含有する。さらなる態様では、本発明のヒト化イムノグロブリンは、配列番号：１４のアミノ酸配列を含有する軽鎖、および配列番号：１７、配列番号：１８、配列番号：１９および配列番号：２０からなる群より選ばれるアミノ酸配列を含有する重鎖の両方、またはＣＣＲ２に対する結合特異性を有する該イムノグロブリンの抗原結合性断片を含有する。別の態様では、本発明のヒト化イムノグロブリンは、配列番号：１５のアミノ酸配列を含有する軽鎖、および配列番号：１７、配列番号：１８、配列番号：１９および配列番号：２０からなる群より選ばれるアミノ酸配列を含有する重鎖の両方、またはＣＣＲ２に対する結合特異性を有する該イムノグロブリンの抗原結合性断片を含有する。代替的な態様では、本発明のヒト化イムノグロブリンは、配列番号：１０７のアミノ酸配列を含有する軽鎖、および配列番号：１７、配列番号：１８、配列

番号：１９および配列番号：２０からなる群より選ばれるアミノ酸配列を含有する重鎖の両方、またはＣＣＲ２に対する結合特異性を有する該イムノグロブリンの抗原結合性断片を含有する。

【００６７】

別の態様では、本発明のヒト化イムノグロブリンは、配列番号：１３、配列番号：１４、配列番号：１５および配列番号：１０７からなる群より選ばれるアミノ酸配列を含有する軽鎖、および配列番号：１７のアミノ酸配列を含有する重鎖の両方、またはＣＣＲ２に対する結合特異性を有する該イムノグロブリンの抗原結合性断片を含有する。代替的な態様では、本発明のヒト化イムノグロブリンは、配列番号：１２、配列番号：１３、配列番号：１４、配列番号：１５および配列番号：１０７からなる群より選ばれるアミノ酸配列を含有する軽鎖、および配列番号：１８のアミノ酸配列を含有する重鎖の両方、またはＣＣＲ２に対する結合特異性を有する該イムノグロブリンの抗原結合性断片を含有する。さらなる態様では、本発明のヒト化イムノグロブリンは、配列番号：１２、配列番号：１３、配列番号：１４、配列番号：１５および配列番号：１０７からなる群より選ばれるアミノ酸配列を含有する軽鎖、および配列番号：１９のアミノ酸配列を含有する重鎖の両方、またはＣＣＲ２に対する結合特異性を有する該イムノグロブリンの抗原結合性断片を含有する。さらなる態様では、本発明のヒト化イムノグロブリンは、配列番号：１２、配列番号：１３、配列番号：１４、配列番号：１５および配列番号：１０７からなる群より選ばれるアミノ酸配列を含有する軽鎖、および配列番号：２０のアミノ酸配列を含有する重鎖の両方、またはＣＣＲ２に対する結合特異性を有する該イムノグロブリンの抗原結合性断片を含有する。

【００６８】

一態様では、ＣＣＲ２に対する結合特異性を有するヒト化イムノグロブリン軽鎖またはその抗原結合性断片は、配列番号：９８を含有する核酸分子によりコードされうる。別の態様では、ＣＣＲ２に対する結合特異性を有するヒト化イムノグロブリン重鎖またはその抗原結合性断片は、配列番号：９７を含有する核酸分子によりコードされうる。

【００６９】

本発明はまた、非ヒト起源の軽鎖可変領域とヒトの定常領域（例えば、軽鎖の定常領域）とを含有する、ＣＣＲ２に対する結合特異性を有するキメライムノグロブリンまたはその抗原結合性断片に関する。本発明はさらに、非ヒト起源の重鎖可変領域とヒトの定常領域（例えば、重鎖定常領域）とを含有する、ＣＣＲ２に対する結合特異性を有するキメライムノグロブリンまたはその抗原結合性断片に関する。別の態様では、ＣＣＲ２に対する結合特異性を有するキメライムノグロブリンまたはその抗原結合性断片は、非ヒト起源の軽鎖可変鎖領域と、非ヒト起源の重鎖可変領域とを含有し、さらにヒトの定常領域（例えば、ヒトの軽鎖定常領域および／またはヒトの重鎖定常領域）を含有する。

【００７０】

核酸および構築物

本発明はまた、本発明のヒト化イムノグロブリンまたはヒト化イムノグロブリンの軽鎖または重鎖をコードする核酸配列を含有する、単離されたおよび／または組換え核酸分子（例えば、本質的に純粋なものを含む）に関する。

【００７１】

本明細書でいう「単離された」核酸分子は、その起源（例えば、細胞内、またはライブラリーなどの核酸の混合物中に存在するなど）である供給源のゲノムＤＮＡまたは細胞性ＲＮＡの核酸から分離された核酸分子であり、本質的に純粋な核酸分子、化学的合成により作製された核酸分子、生物学的方法および化学的方法の組み合せにより作製された核酸分子、ならびに単離された組換え核酸分子を含む、本明細書に記載の方法または他の適切な方法により得られる核酸分子を包含する（例えば、Ｄａｕｇｈｅｒｔｙ，Ｂ．Ｌ．ら、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．，１９（９）：２４７１－２４７６（１９９１）；Ｌｅｗｉｓ，Ａ．Ｐ．およびＪ．Ｓ．Ｃｒｏｗｅ，Ｇｅｎｅ，１０１：２９７－３０２（１９９１）を参照されたい）。

【００７２】
本明細書でいう「組換え」核酸分子は、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）および／または制限酵素を用いたベクターへのクローニングなどの、人工的な組換え方法による手順により生成する核酸分子を含む、組換えＤＮＡ方法論により作製された核酸分子である。「組換え」核酸分子は、細胞の自然な機構を介して起こる組換え事象により生じるものもあるが、所望の組換え事象を許容し、それが起こりうるように設計された核酸分子の細胞への導入後に選択される。
【００７３】
本発明はまた、より具体的には、ヒト化１Ｄ９イムノグロブリン（すなわち、非ヒト部分がネズミモノクローナル抗体１Ｄ９に由来する本発明のヒト化イムノグロブリン）またはその鎖をコードする塩基配列を含有する単離されたおよび／または組換え核酸分子に関する。一態様では、軽鎖が、１Ｄ９抗体の軽鎖に由来する３つの相補性決定領域を含有し、重鎖が、１Ｄ９抗体の重鎖に由来する３つの相補性決定領域を含有する。かかる核酸分子は、例えば、（ａ）ヒト化１Ｄ９イムノグロブリンの重鎖可変領域（例えば、Ｆｉｇｕｒｅ　８および２１の重鎖可変領域）のアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードする配列を含有する核酸分子（例えば、配列番号：９６のヌクレオチド５８～４１１）；（ｂ）ヒト化１Ｄ９イムノグロブリンの軽鎖可変領域（例えば、Ｆｉｇｕｒｅ　７および２２の軽鎖可変領域）のアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードする配列を含有する核酸分子（例えば、配列番号：９５のヌクレオチド５２～３９０）；（ｃ）ヒト化１Ｄ９イムノグロブリンの軽鎖または重鎖の可変領域の少なくとも機能的な部分（例えば、該鎖を含有するヒト化イムノグロブリンが抗原に結合するのに充分な部分）をコードする配列を含有する核酸分子を包含する。遺伝コードの縮重のため、選択したポリペプチドをコードする種々の核酸を作製しうる。一態様では、該核酸は、二本鎖または一本鎖のポリヌクレオチドを含む、Ｆｉｇｕｒｅ　２１に示す可変領域の塩基配列を含有するか、もしくは実質的に含有するか、またはＦｉｇｕｒｅ　２２に示す可変領域の塩基配列を含有するか、もしくは実質的に含有する。（それぞれのＦｉｇｕｒｅにおいて、可変領域よりも大きなポリペプチドを示している（すなわち、シグナルペプチドコード配列または定常領域コード配列の部分を含む）場合があるが、特定のＦｏｇｕｒｅの可変領域に対する言及は、示された配列の可変領域の部分を含むことを意図する。）。これらの基準を満たす単離されたおよび／または組換え核酸分子は、ヒト化１Ｄ９抗体の配列と同一の配列をコードする核酸分子または上述のようなそのバリアントを含みうる。
【００７４】
本発明の核酸分子は、ＣＣＲ２に対する結合特異性を有するヒト化イムノグロブリンの作製に使用することができる。例えば、本発明のヒト化イムノグロブリンをコードする核酸分子（例えば、ＤＮＡ）を、配列のさらなる操作のために、または、コードされたポリペプチドを適切な宿主細胞において産生させるために、適切な構築物（例えば、ベクター）に組み込むことができる。
【００７５】
ターゲティング分子
本発明はまた、ＣＣＲ２発現細胞と標的細胞との相互作用を実現させることができるターゲティング分子に関する。ターゲティング分子は、哺乳動物のＣＣＲ２に結合しうる第１結合部分と、標的細胞の表面上に発現される分子に結合しうる第２結合部分とを含む。好ましい標的細胞には、腫瘍細胞およびウイルス感染細胞が含まれる。腫瘍細胞上で高レベルで発現されたり、または腫瘍細胞特有に発現される様々な分子（例えば、Ｌｅｗｉｓ　Ｙ、ＨＥＲ－２／ｎｅｕ、ジシアロガングリオシド(disialoganglioside)Ｇ３、癌胎児性抗原、ＣＤ３０などの腫瘍抗原）および／またはウイルス感染細胞（例えば、インフルエンザウイルス血球凝集素、エプスタイン－バーウイルスＬＭＰ－１、Ｃ型肝炎ウイルスＥ２糖タンパク質、ＨＩＶ　ｇｐ　１６０、ＨＩＶ　ｇｐ　１２０などのウイルス抗原）が当該技術分野において公知である。ターゲティング分子は、所望の標的細胞上に発現される分子と結合する任意の適切な結合第２部分を含みうる（例えば、Ｒｉｎｇ、米国特許第

５，９４８，６４７号明細書（その全教示は参照により本明細書に取り込まれる）を参照されたい）。適切な結合部分には、例えば、タンパク質およびペプチド（翻訳後修飾された形態、例えば、グリコシル化、リン酸化、脂質化を含む）、糖類、脂質、ペプチド擬似物、小さな有機分子、核酸、および哺乳動物のＣＣＲ２または標的細胞の表面上に発現される分子に結合するその他の剤が含まれる。好適な結合部分は、本明細書に記載の結合アッセイなどの、任意の適切な方法を用いて同定することができる。

【００７６】

好ましい態様では、第１の結合部分は、たとえば、哺乳動物ＣＣＲ２またはその抗原結合性断片〔たとえば、Ｆａｂ、Ｆｖ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ）’$_2$〕に結合する、本発明のヒト化イムノグロブリンでありうる。第２の結合部分は、たとえば、標的細胞上に発現された分子またはその抗原結合性断片に結合する、抗体（たとえば、第２のヒト化イムノグロブリン）またはその抗原結合性断片でありうる。標的化分子がヒト化抗ＣＣＲ２イムノグロブリンまたはその抗原結合性断片である第１の結合部分を含む場合、ヒト化抗ＣＣＲ２イムノグロブリンはＣＣＲ２へのリガンドの結合を阻害しないのが好ましい。

【００７７】

第１の結合部分は、種々の適切な連結を介して第２の結合部分に直接的にまたは間接的に結合されうる。たとえば、第１の結合部分および第２の結合部分が共にタンパク質またはペプチドである場合、当該部分は連続したポリペプチド（すなわち、融合タンパク質）の一部でありうる。標的化分子が融合タンパク質である場合、第１および第２の結合部分は任意の適切な立体配置で当該ポリペプチド上に配置されうる。第１および第２の結合部分は（すなわち、１またはそれ以上の）ペプチドリンカーを介して間接的に、またはペプチド結合を介して互いに直接的に結合されうる。

【００７８】

結合分子が連続したポリペプチドの一部でない場合、それらは、第１の部分上の官能基（またはその活性化誘導体）と第２の部分上の第２の官能基（またはその活性化誘導体）との反応により形成される化学結合により直接的に結合されうる。たとえば、２つのチオールは反応してジスルフィド結合を形成しえ、アミンはカルボン酸またはハロゲン化アシルと反応してアミドを形成しうる。使用されうる種々の他の適切な反応は当該分野において既知である〔たとえば、Hermanson, G. T., Bioconjugate Techniques, Academic Press: San Diego, CA (1996)参照〕。結合部分は適切なリンカー（たとえば、ペプチドリンカー）を介して間接的に結合されうる。一般に、リンカーは、反応して第１の結合部分および／または第２の結合部分と結合を形成しうる２つの反応性基を含む。２つの異なる反応性基を含むリンカー（たとえば、ヘテロ二官能性リンカー）を使用して、第１の結合部分を第２の結合部分に選択的に結合することができる。タンパク質、核酸、ペプチド、ビタミン、糖、脂質、小有機分子および他の適切な薬剤の間の結合を形成するのに適切な多くのリンカーは既知である〔たとえば、米国特許第5,856,571号、第5,880,270号；Hermanson, G. T., Bioconjugate Techniques, Academic Press: San Diego, CA (1996)参照〕。

【００７９】

標的化分子の結合部分の個々の活性（たとえば、結合活性、化学誘因活性）は、別個に存在する分子としての結合部分の活性と顕著に異なっていないのが好ましい。たとえば、第１の結合部分が、ＣＣＲ２に結合する、ヒト化イムノグロブリンまたは抗原結合性断片である場合、約１０００ファクター内の、好ましくは１００ファクター内の、より好ましくは１０ファクター内の親和性、または遊離の抗体もしくは抗原結合性断片の親和性と実質的に同じ親和性により、標的化分子はＣＣＲ２に結合しうる。これらの好ましい特性を有する標的分子は任意の適切な方法により調製されうる。次いで、得られた標的化分子を結合性（たとえば、ＥＬＩＳＡにより）について、および化学誘因活性についてアッセイしうる。

【００８０】

１つの態様では、標的化分子は、哺乳動物ＣＣＲ２および標的細胞上に発現された分子（たとえば、腫瘍抗原、ウイルス抗原）に特異性を有する、二重特異性（bispecific）ヒト

化抗体またはその二重特異性抗原結合性断片〔たとえば、Ｆ（ａｂ’）$_2$〕である。二重特異性抗体はトリオーマ（trioma）およびハイブリッドハイブリドーマにより分泌されうる。トリオーマおよびハイブリッドハイブリドーマの上清を適切なアッセイ（たとえば、ＥＬＩＳＡ）を用いて二重特異性抗体についてアッセイしえ、二重特異性抗体を従来の方法を用いて精製しうる。次いで、これらの抗体は本明細書に記載の方法によりヒト化されうる。このように、本発明は、ＣＣＲ２および標的細胞上に発現された抗原に結合特異性を有するヒト化二重特異性抗体、または該二重特異性抗体の二価抗原結合性断片である標的化分子を提供する。本発明はまた、ＣＣＲ２および標的細胞上に発現された抗原に結合特異性を有するヒト化二重特異性抗体、または該二重特異性抗体の二価抗原結合性断片である標的化分子の有効量を患者に投与することを含む、患者においてＣＣＲ２を有する細胞と標的細胞との相互作用を可能にする方法に関する。

【００８１】

ＣＣＲ２に特異性を有するヒト化イムノグロブリンの生産方法

本発明の別の側面は、ＣＣＲ２に結合特異性を有するヒト化イムノグロブリンの生産方法に関する。たとえば、ヒト化イムノグロブリンは、たとえば、適切な宿主細胞内でＣＣＲ２に結合特異性を有するヒト化イムノグロブリンをコードする１またはそれ以上の組換え核酸の発現により得ることができる。

【００８２】

ＣＣＲ２に結合特異性を有するヒト化イムノグロブリンの発現に適する構築物または発現ベクターも提供する。該構築物は適切な宿主細胞に導入され得、本発明のヒト化イムノグロブリンを発現する細胞が生産され、培養で維持されうる。適切な宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌および　または他の適切な細菌などの細菌細胞を含む原核生物、あるいは真菌または酵母細胞〔たとえば、ピキア　パストリス（Pichia pastoris）、アスペルギルス（Aspergillus）種、サッカロミセス　セレビシェ（Saccharomyces cerevisiae）、シゾサッカロミセス　ポンベ（Schizosaccharomyces pombe）、ニューロスポラ　クラッサ（Neurospora crassa）〕などの真核生物、あるいは他の下等真核細胞、ならびに昆虫〔たとえば、Ｓｆ９昆虫細胞（国際公開第94/26087号パンフレット、O'Connor、1994年11月24日公開）〕または哺乳動物〔たとえば、ＣＯＳ－１（ATCC登録番号CRL-1650）およびＣＯＳ－７（ATCC登録番号CRL-1651）などのＣＯＳ細胞、ＣＨＯ（たとえば、ATCC登録番号CRL-9096）、２９３（ATCC登録番号CRL-1573）、ＨｅＬａ（ATCC登録番号CCL-2）、ＣＶ１（ATCC登録番号CCL-70）、ＷＯＰ〔Daileyら、J. Virol. 54:739-749 (1985)〕、３Ｔ３、２９３Ｔ〔Pearら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 90:8392-8396 (1993)〕、ＮＳＯ細胞、ＳＰ２／０、ＨｕＴ７８細胞など〔たとえば、Ausubel, F. M.ら編、Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and John Wiley & Sons Inc., (1993)参照〕由来のものなどの高等真核生物の細胞でありうる。

【００８３】

ＣＣＲ２に結合特異性を有するヒト化イムノグロブリンを産生する宿主細胞は以下のようにして生産されうる。たとえば、所望のヒト化イムノグロブリンのコード配列の全部または一部をコードする核酸を核酸ベクター、たとえば、発現用のプラスミド、ウイルスまたは他の適切なレプリコンなどのＤＮＡベクターに挿入しうる。種々のベクターを入手可能である。当該ベクターとしては、単一コピーまたは多コピーで維持されるベクターまたは宿主細胞の染色体に組み込まれるベクターが挙げられる。

【００８４】

適切な発現ベクターは多くの成分を含みうる。当該成分としては、それらに限定されるものではないが以下の１またはそれ以上のものが挙げられる：複製起点；選択マーカー遺伝子；転写制御エレメント（たとえば、プロモーター、エンハンサー、ターミネーター）などの１またはそれ以上の発現制御エレメント、および／または１またはそれ以上の翻訳シグナル；膜標的化または分泌のためのシグナル配列またはリーダー配列。構築物において、シグナル配列はベクターまたは他の供給源より提供されうる。たとえば、イムノグロブリンの転写および／または翻訳シグナルを用いて発現に向けうる。

【００８５】
プロモーターは適切な宿主細胞における発現のために提供されうる。プロモーターは構成的または誘導性でありうる。たとえば、プロモーターを、コードされたポリペプチドの発現が行われるように、ヒト化イムノグロブリンまたはイムノグロブリン鎖をコードする核酸に作動可能に連結しうる。原核生物宿主用の種々の適切なプロモーター（たとえば、大腸菌用のｌａｃ、ｔａｃ、Ｔ３、Ｔ７プロモーター）および真核生物宿主用の種々の適切なプロモーター（たとえば、酵母アルコールデヒドロゲナーゼ（ＡＤＨ１）、ＳＶ４０、ＣＭＶ）が入手可能である。
【００８６】
さらに、発現ベクターは、通常、ベクターを保持する宿主細胞の選択のための選択マーカーを含み、また、複製可能な発現ベクターの場合、起点もしくは複製を含む。抗生作用もしくは薬物耐性を付与する産物をコードする遺伝子が一般に選択マーカーであり、当該遺伝子は、原核細胞〔たとえば、β－ラクタマーゼ遺伝子（アンピシリン耐性）、テトラサイクリン耐性のためのＴｅｔ遺伝子〕および真核細胞〔たとえば、ネオマイシン〔Ｇ４１８もしくはゲネチシン（geneticin）〕、ｇｐｔ（ミコフェノール酸）、アンピシリン、またはハイグロマイシン耐性遺伝子〕で使用されうる。ジヒドロ葉酸レダクターゼマーカー遺伝子は種々の宿主でメトトレキサートによる選択を可能にする。宿主の栄養要求性マーカーの遺伝子産物をコードする遺伝子（たとえば、ＬＥＵ２、ＵＲＡ３、ＨＩＳ３）はしばしば酵母で選択マーカーとして使用される。ウイルス（たとえば、バキュロウイルス）ベクターまたはファージベクター、およびレトロウイルスベクターなどの、宿主のゲノムに組み込み可能なベクターの使用も考えられる。１つの態様では、該ベクターはｐＬＫＴＯＫ３８である。本発明はまた、これらの発現ベクターを保持する細胞に関する。
【００８７】
ヒト化イムノグロブリン軽鎖をコードする融合遺伝子を含む発現ベクター。該遺伝子は、ＣＣＲ２に結合特異性を有する非ヒト抗体の軽鎖に由来するＣＤＲおよびヒト起源の軽鎖に由来するフレームワーク領域をコードする塩基配列を含む。
【００８８】
このように、本発明は、ヒト化イムノグロブリン軽鎖をコードする遺伝子を含む発現ベクターを含む。ここで、該遺伝子は、ＣＣＲ２に結合特異性を有する非ヒト抗体の軽鎖に由来するＣＤＲおよびヒト起源の軽鎖に由来するフレームワーク領域をコードする塩基配列を含む。本発明はまた、ヒト化イムノグロブリン重鎖をコードする遺伝子を含む発現ベクターに関する。ここで、該遺伝子は、ＣＣＲ２に結合特異性を有する非ヒト抗体の重鎖に由来するＣＤＲおよびヒト起源の重鎖に由来するフレームワーク領域をコードする塩基配列を含む。オン（on）態様では、非ヒト抗体はネズミ抗体１Ｄ９である。本発明はまた、本発明の発現ベクターを含む宿主細胞を含む。本発明はまた、ネズミモノクローナル抗体１Ｄ９に由来する抗原結合領域をコードする第１の核酸配列；およびヒト起源のイムノグロブリンの定常領域の少なくとも一部をコードする第２の核酸配列を含む、ヒト化イムノグロブリン軽鎖または重鎖をコードする単離遺伝子または組換え遺伝子に関する。
【００８９】
本発明はまた、ヒト化イムノグロブリン軽鎖もしくはその断片をコードする第１の組換え核酸分子およびヒト化イムノグロブリン重鎖もしくはその断片をコードする第２の組換え核酸分子を含む（たとえば、ＣＣＲ２に特異性を有するヒト化イムノグロブリンもしくはその抗原結合性断片を発現する）宿主細胞に関する。ここで、前記第１の核酸分子はネズミ抗体１Ｄ９の軽鎖に由来するＣＤＲおよびヒト起源の軽鎖に由来するフレームワーク領域をコードする塩基配列を含み、また、前記第２の核酸分子はネズミ抗体１Ｄ９の重鎖に由来するＣＤＲおよびヒト起源の重鎖に由来するフレームワーク領域をコードする塩基配列を含む。本発明はまた、ヒト化イムノグロブリンの発現に好適な条件下で本発明の宿主細胞を維持し、それにより、ヒト化イムノグロブリン鎖が発現され、ＣＣＲ２に特異性を有するヒト化イムノグロブリンまたはその抗原結合性断片が生産される工程を含む、ヒト化イムノグロブリンまたはその抗原結合性断片の調製方法を含む。該方法はさらに、ヒト

化イムノグロブリンまたはその断片の単離工程を含みうる。

【００９０】

たとえば、ＣＣＲ２に結合特異性を有するヒト化イムノグロブリンの重鎖および軽鎖をコードする核酸分子（すなわち、１またはそれ以上の核酸分子）、または１または複数のかかる核酸分子を含む構築物（すなわち、１またはそれ以上の構築物）を、選択された宿主細胞に適する方法（たとえば、形質転換、トランスフェクション、エレクトロポレーション、感染）により、（たとえば、ベクター中、細胞でのプロセスにより形成された構築物中、宿主細胞ゲノムに組み込まれて）１または複数の核酸分子が１またはそれ以上の発現制御エレメントに作動可能に連結されるように適切な宿主細胞に導入しうる。宿主細胞は発現に適する条件下（たとえば、誘導物質、好適な塩を添加した適切な培地、成長因子、抗生物質、栄養補助剤などの存在下）で維持されえ、それにより、１または複数のコードされたポリペプチドが生産される。所望により、コードされたタンパク質（たとえば、ヒト化１Ｄ９抗体）を、たとえば、宿主細胞、培地、乳汁から単離しうる。この工程はトランスジェニック動物の宿主細胞での発現を包含する（たとえば、国際公開第92/03918号パンフレット、GenPharm International、1992年 3月19日公開参照）。

【００９１】

融合タンパク質を生産しえ、該融合タンパク質では、Ｎ末端の位置で、Ｃ末端の位置で、もしくは該融合タンパク質の内部で、ヒト化イムノグロブリンまたはイムノグロブリン鎖が非イムノグロブリン部分（すなわち、天然に存在するイムノグロブリンに存在しない部分）に連結されている。たとえば、いくつかの態様が、ｐＥＴベクター（たとえば、ｐＥＴ－１５ｂ、Novagen）、ファージベクター（たとえば、ｐＣＡＮＴＡＢ５Ｅ、Pharmacia）、または他のベクター（たとえば、ｐＲＩＴ２ＴプロテインＡフュージョンベクター、Pharmacia）などの適切な発現ベクターへのイムノグロブリン配列をコードする核酸の挿入により生産されうる。得られた構築物は発現用の適切な宿主細胞に導入されうる。発現の際、融合タンパク質には適切な親和性マトリックスにより細胞溶解物から単離もしくは精製されうるものもある〔たとえば、Current Protocols in Molecular Biology (Ausbel, F. M. ら編、Vol.2、補遺２６、16.4.1-16.7.8頁 (1991) 参照〕。

【００９２】

治療方法および治療組成物

本発明は、（１）イン・ビトロおよび／またはイン・ビボでＣＣＲ２に結合しうる；および／または（２）（ａ）結合機能（たとえば、ＣＣＲ２のリガンドへの結合能）および／または（ｂ）組織での白血球の招集および／または蓄積などの白血球の輸送（leukocyte trafficking）などのＣＣＲ２の活性または機能を調節しうるヒト化イムノグロブリンを提供する。ヒト化イムノグロブリンはイン・ビトロおよび／またはイン・ビボで選択的にＣＣＲ２に結合しえ、ＣＣＲ２媒介性相互作用を阻害しうるのが好ましい。１つの態様では、ヒト化イムノグロブリンはＣＣＲ２に結合しえ、ＣＣＲ２の１またはそれ以上のそのリガンド（たとえば、ＨＩＶ、ＭＣＰ－１、ＭＣＰ－２、ＭＣＰ－３、ＭＣＰ－４）への結合を阻害しうる。本発明のヒト化イムノグロブリンは、研究、診断および治療の用途での種々の工程に有用である。たとえば、ヒト化イムノグロブリンを用い、（たとえば、親和性精製または他の適切な方法により）ＣＣＲ２またはそのバリアントを検出、単離、および／または精製することができ、また、ＣＣＲ２の構造（たとえば、立体配置）および機能を研究することができる。また、本発明のヒト化イムノグロブリンを（たとえば、イン・ビトロ、エクス・ビボでの）診断用途に用いることができ、または該ヒト化イムノグロブリンを用いて治療（予防を含む）用途でＣＣＲ２の機能を調節することができる。

【００９３】

たとえば、本発明のヒト化イムノグロブリンを用いて試料（たとえば、組織、または炎症性滲出物（inflammatory exudate）、血液、血清、腸液（bowel fluid）などの体液、ＣＣＲ２を有する細胞上）中のＣＣＲ２のレベルを検出および／または測定することができる。たとえば、試料（たとえば、組織および／または体液）は個体から得ることができ、固相酵素免疫測定法（ＥＬＩＳＡ）などの方法や、化学発光アッセイ、ラジオイムノアッ

セイ、および免疫組織学などの適切な免疫学的方法を用いてＣＣＲ２の発現を検出および／または測定することができる。１つの態様では、ヒト化イムノグロブリンのＣＣＲ２への特異的結合に適する条件下で試料を本発明のヒト化イムノグロブリンと接触させる工程および形成される抗体－ＣＣＲ２複合体を検出する工程を含む、試料中の選択されたＣＣＲ２を検出する方法が提供される。該方法の実施においては、ヒト化イムノグロブリンを用いてＣＣＲ２反応性および／または発現について（たとえば、免疫組織学的に）正常組織対炎症組織（たとえば、ヒト由来）を解析し、（たとえば、冒された組織での）ＣＣＲ２の発現の増加と特定の症状との間の関係を検出しうる。本発明のヒト化イムノグロブリンは正常組織対炎症組織でのＣＣＲ２の存在の免疫学的評価方法を可能にする。それにより、疾患の存在、疾患の進行および／または炎症性疾患での抗ＣＣＲ２インテグリン治療の有効性を評価しうる。

【００９４】

また、本発明のヒト化イムノグロブリンを用いて、ＣＣＲ２により調節される、結合機能および／または白血球（たとえば、リンパ球、単球）の輸送を調節〔たとえば、阻害（減少または防止）〕することができる。たとえば、ＣＣＲ２のリガンド（すなわち、１またはそれ以上のリガンド）への結合を阻害するヒト化イムノグロブリンを、組織の白血球（たとえば、リンパ球、単球）浸潤に関連する疾患の治療で該方法に従って投与することができる。さらに、ＣＣＲ２のリガンド（すなわち、１またはそれ以上のリガンド）への結合を阻害するヒト化イムノグロブリンを、ＨＩＶの治療で該方法に従って投与することができる。本発明のヒト化イムノグロブリン（すなわち、１またはそれ以上）の有効量をかかる疾患を治療するために個体（たとえば、ヒトまたは他の霊長類などの哺乳動物）に投与する。

【００９５】

ヒト化イムノグロブリンをＣＣＲ２のそのリガンドへの結合を阻害する有効量で投与する。治療にとっては、有効量は所望の治療（予防を含む）効果を達成するのに充分（たとえば、ＣＣＲ２媒介性結合および／またはシグナル伝達を減少または防止するのに充分な量など）であろう。ヒト化イムノグロブリンは単回投与または複数回投与で投与されうる。投与量は当業者に既知の方法により決定されえ、たとえば、個体の年齢、感受性、耐性および全体の状況に依存しうる。抗体の適切な投与量としては、１回の処置当たり約０．１ｍｇ／ｋｇ体重～約１０．０ｍｇ／ｋｇ体重でありうる。

【００９６】

該方法によれば、ヒト化イムノグロブリンを個体（たとえば、ヒト）に単独でまたはその他の薬剤と共に投与することができる。ヒト化イムノグロブリンはさらなる薬剤の投与前、投与と共に、または投与の後に投与されうる。従って、本発明は、本発明のヒト化イムノグロブリンまたはその抗原結合性断片と適切な担体を含む医薬組成物を含む。１つの態様では、ＣＣＲ２のそのリガンドへの結合を阻害する１つを超えるヒト化イムノグロブリンを投与する。他の態様では、さらなるモノクローナル抗体を本発明のヒト化イムノグロブリンと共に投与する。さらに他の態様では、さらなる薬理学的に活性な成分（たとえば、サルファサラジンなどの抗炎症性化合物、他の非ステロイド抗炎症性化合物、またはステロイド抗炎症性化合物）を本発明のヒト化イムノグロブリンと共に投与することができる。

【００９７】

治療対象の疾患または症状に依存して種々の投与経路が可能であり、必ずしも限定されるものではないが、非経口（たとえば、静脈内注射、動脈内注射、筋肉内注射、皮下注射）、経口（たとえば、規定食）、局所、吸入（たとえば、気管支内吸入、鼻腔内吸入または経口吸入、鼻腔内滴剤）、または直腸が挙げられる。非経口投与は投与の好ましい方法である。

【００９８】

処方は選択された投与経路により変わるであろう（たとえば、液剤、乳剤）。投与対象のヒト化抗体を含む適当な組成物を生理学的に許容されうるビヒクルまたは担体中で調製す

ることができる。液剤または乳剤にとって適切な担体としては、たとえば、生理食塩水および緩衝化媒体などの、水溶液またはアルコール性／水溶液、乳濁液または懸濁液が挙げられる。非経口ビヒクルとしては塩化ナトリウム溶液、リンゲルデキストロース（Ringer's dextrose）、デキストロースおよび塩化ナトリウム、乳酸化リンゲル油または固定油（lactated Ringer's or fixed oil）を挙げることができる。静脈内ビヒクルとしては種々の添加物、保存剤、または液体、栄養素もしくは電解質補給剤を挙げることができる（一般には、Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th Edition, Mack Publishing Co., PA, 1985参照）。吸入については、化合物を溶解し、投与のための適切なディスペンサー（たとえば、アトマイザー、ネブライザーまたは加圧エーロゾルディスペンサー）中に充填することができる。

【００９９】

このように、本発明は、本発明のヒト化イムノグロブリンまたはその抗原結合性断片を含む組成物の有効量と細胞とを接触させることを含む、細胞のＨＩＶ感染を阻害する方法を含む。また、本発明は、本発明のヒト化イムノグロブリンまたはその抗原結合性断片の有効量を含む組成物を患者に投与することを含む、患者においてＨＩＶ感染を治療する、またはＨＩＶ感染を阻害する方法に関する。

【０１００】

また、本発明は、本発明のヒト化イムノグロブリンまたはその抗原結合性断片の有効量とＣＣＲ２またはその一部を含む組成物とを接触させることを含む、哺乳動物ＣＣＲ２またはＣＣＲ２の機能性部分へのケモカインの結合に関連する機能を阻害する方法に関する。ここで、前記ヒト化イムノグロブリンは哺乳動物ＣＣＲ２へのケモカインの結合を阻害し、また、ＣＣＲ２へのケモカインの結合に関連する１またはそれ以上の機能を阻害する。たとえば、ケモカインはＭＣＰ－１、ＭＣＰ－２、ＭＣＰ－３、ＭＣＰ－４およびその組合せからなる群より選択することができる。

【０１０１】

また、本発明は、哺乳動物ＣＣＲ２に結合し、該レセプターへのリガンドの結合を阻害する、本発明のヒト化イムノグロブリンまたはその抗原結合性断片の有効量を含む組成物を患者に投与することを含む、患者において白血球の輸送を阻害する方法に関する。たとえば、リガンドはケモカイン（たとえば、ＭＣＰ－１、ＭＣＰ－２、ＭＣＰ－３、ＭＣＰ－４）またはＨＩＶでありうる。

【０１０２】

また、本発明は、ＣＣＲ２を発現する第１の細胞とリガンド（たとえば、ＣＣＲ２のリガンドを発現する第２の細胞上）との相互作用を阻害する方法であって、第１の細胞を本発明のヒト化イムノグロブリンまたはその抗原結合性断片の有効量と接触させることを含む方法に関する。ここで、特に前記イムノグロブリンまたは断片はＣＣＲ２へのリガンドの結合を阻害する。たとえば、該細胞はリンパ球、単球、顆粒球、Ｔ細胞、好塩基球、およびＣＣＲ２またはその一部をコードする組換え核酸を含む細胞からなる群より選択することができる。１つの態様では、該リガンドはケモカイン（たとえば、ＭＣＰ－１、ＭＣＰ－２、ＭＣＰ－３、ＭＣＰ－４）である。他の態様では、該リガンドはＨＩＶである。

【０１０３】

また、本発明は、哺乳動物ＣＣＲ２に結合する、本発明のヒト化イムノグロブリンまたはその抗原結合性断片の有効量を患者に投与することを含む、患者においてＣＣＲ２媒介性障害を治療する方法を含む。該障害としては、限定されるものではないが、アレルギー、アテローム発生、アナフィラキシー、悪性腫瘍、慢性および急性炎症性障害、ヒスタミンおよびＩｇＥ媒介性アレルギー反応、卒中、および慢性関節リューマチ、アテローム性動脈硬化症、多発性硬化症、狭窄、再狭窄、同種異系移植片拒絶、繊維症、喘息、および炎症性糸球体症（inflammatory glomerulopathies）を挙げることができる。

【０１０４】

特定の態様では、本発明は、哺乳動物ＣＣＲ２に結合する、本発明のヒト化イムノグロブリンまたはその抗原結合性断片の有効量を患者に投与することを含む、患者において再狭

窄を阻害する方法に関する。また、本発明は、治療もしくは診断に使用するための、またはＣＣＲ２媒介性疾患もしくは障害の治療に使用するための、本発明のヒト化イムノグロブリンまたはその抗原結合性断片を含む。また、本発明は、ＣＣＲ２媒介性疾患を治療するための医薬の製造のための本発明のヒト化イムノグロブリンまたはその抗原結合性断片の使用を含む。

【０１０５】

抗イディオタイプ抗体も提供される。抗イディオタイプ抗体は別の抗体の抗原結合部位に関わる抗原決定基を認識する。抗イディオタイプ抗体は、二次抗体を産生するのに使用される動物と同じ種の、好ましくは同じ系統の動物を免疫化することによって、二次抗体に対して産生させることができる。例えば米国特許第４，６９９，８８０号を参照されたい。

【０１０６】

また本発明は、ＡＴＣＣ登録番号ＨＢ－１２５４９およびＨＢ－１２５５０の下で寄託されたハイブリドーマ細胞株ならびにＡＴＣＣ登録番号ＨＢ－１２５４９およびＨＢ－１２５５０の下で寄託されたハイブリドーマ細胞株によって産生されるモノクローナル抗体に関する。本発明の細胞株はモノクローナル抗体の産生の他にも用途を有する。例えば、本発明の細胞株をさらなるハイブリドーマを作製するために、他の細胞（適当な薬物標識された（ｄｒｕｇ－ｍａｒｋｅｄ）ヒトの骨髄腫、マウスの骨髄腫、ヒト－マウスヘテロ骨髄腫またはヒトのリンパ芽球細胞など）と融合させて、モノクローナル抗体をコードする遺伝子の導入を提供することができる。またこれらの細胞株は抗ＣＣＲ２イムノグロブリン鎖をコードする核酸の供給源として使用することもできる。これは、単離し、発現させることができる〔例えば任意の適切な技術を使って他の細胞に導入した場合（例えばＣａｂｉｌｌｙら、米国特許第４，８１６，５６７号；Ｗｉｎｔｅｒ、米国特許第５，２２５，５３９号を参照されたい）〕。例えば、再配列された抗ＣＣＲ２軽鎖または重鎖を含むクローンは（例えばＰＣＲによって）単離され得るか、またはこれらの細胞株から単離されるｍＲＮＡからｃＤＮＡライブラリーを作成して抗ＣＣＲ２イムノグロブリン鎖をコードするｃＤＮＡクローンが単離され得る。したがって、特異的なイムノグロブリン、イムノグロブリン鎖またはそのバリアント（例えばヒト化イムノグロブリン）を様々な宿主細胞中またはイン・ビトロ翻訳系中で産生するために、抗体またはその一部の重鎖および／または軽鎖をコードする核酸を組換えＤＮＡ技術に従って取得し使用することができる。例えば、核酸（ｃＤＮＡ、またはヒト化イムノグロブリンもしくはイムノグロブリン鎖などのバリアントをコードするその誘導体を含む）は、適切な原核生物または真核生物ベクター（例えば発現ベクター）中に配置され得る。これを適切な宿主細胞中に適当な方法（例えば形質転換、トランスフェクション、エレクトロポレーション、感染）によって導入することができる。その結果、核酸が（例えばベクター中または宿主細胞のゲノム中に組み込まれ）１つ以上の発現制御因子に作動可能な形で連結される。産生のためには、宿主細胞を発現に適した条件下に（例えば誘導物質、適当な塩類が補足された適切な培地、成長因子、抗生物質、栄養補充剤などの存在下に）維持することができ、それによりコードされたポリペプチドが産生される。所望であれば、コードされたタンパク質を（例えば、宿主細胞、培地、乳汁から）回収および／または単離し得る。この産生方法にトランスジェニック動物の宿主細胞中での発現が包含されることは理解されるだろう（例えば、１９９２年3月１９日に公開された国際公開第９２／０３９１８号，ＧｅｎＰｈａｒｍ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌを参照されたい）。

【０１０７】

本明細書で記載されているように、本発明の抗体とその機能的断片はＣＣＲ２に対するリガンドの結合をブロック（阻害）および／またはＣＣＲ２に対するそのリガンドの結合に関連する機能を阻害することができる。以下に述べるように、ＣＣＲ２に対するリガンドの結合の阻害、および／または該レセプターに対するリガンドの結合に関連する機能を評価するためには、様々な方法を使用することができる。

【０１０８】

結合アッセイ
本明細書で用いられる「哺乳動物ＣＣＲ２タンパク質」とは、天然に生じる(naturally occuring)もしくは内因性の哺乳動物ＣＣＲ２タンパク質、および天然に生じるもしくは内因性の対応する哺乳動物ＣＣＲ２タンパク質のものと同一であるアミノ酸配列を有するタンパク質（例えば、組換えタンパク質）をいう。従って、本明細書において規定されるように、前記用語は、成熟レセプタータンパク質、多型または対立遺伝子バリアント、および（例えば、オルタナティブスプライシングまたは他の細胞プロセスによって産生された）哺乳動物ＣＣＲ２の他のイソ型、および前記のものの修飾型または未修飾型（例えば、グリコシル化、非グリコシル化）を含む。哺乳動物ＣＣＲ２タンパク質は単離および／または組換えタンパク質（合成により生産されたタンパク質など）でありうる。天然に生じるまたは内因性の哺乳動物ＣＣＲ２タンパク質としては、成熟ＣＣＲ２などの野生型タンパク質、多型または対立遺伝子バリアントおよび哺乳動物（例えば、ヒト、非ヒト霊長類）において天然に生じる、該タンパク質のカルボキシ末端のオルタナティブスプライシングにより産生される該レセプタータンパク質のＣＣＲ２ａ型およびＣＣＲ２ｂ型などの他のイソ型が挙げられる。かかるタンパク質は、例えば、天然に哺乳動物ＣＣＲ２を生じる供給源から回収または単離されうる。これらのタンパク質および天然に生じるまたは内因性の対応する哺乳動物ＣＣＲ２と同一のアミノ酸配列を有する哺乳動物ＣＣＲ２タンパク質を、対応する哺乳動物の名称によって呼称する。例えば、対応する哺乳動物がヒトである場合、タンパク質は、ヒトＣＣＲ２タンパク質（例えば、適切な宿主細胞で産生された組換えヒトＣＣＲ２）として表示される。

【０１０９】
哺乳動物ＣＣＲ２タンパク質の「機能的バリアント」としては、機能的断片、機能的変異タンパク質、および／または機能的融合タンパク質（例えば、変異誘発および／または組換え技術を介して産生されたもの）が挙げられる。一般に、哺乳動物ＣＣＲ２タンパク質の断片または一部としては、（Ｎ－末端、Ｃ－末端または内部欠失などの）成熟哺乳動物ＣＣＲ２タンパク質に関してアミノ酸（すなわち、１以上のアミノ酸）の欠失（すなわち、１以上の欠失）を有するものが挙げられる。成熟哺乳動物ＣＣＲ２タンパク質に関して連続した(contiguous)アミノ酸のみが欠失された断片もしくは部分、または非連続アミノ酸が欠失された断片もしくは部分も考えられる。

【０１１０】
一般に、哺乳動物ＣＣＲ２タンパク質の変異体としては、１以上の連続または非連続アミノ酸残基の付加、欠失および／または置換だけ異なる哺乳動物ＣＣＲ２タンパク質の天然または人工バリアント（例えば、レセプターキメラ）を含む。かかる変異は、例えば、（他のＣＸＣおよび／またはＣＣケモカインレセプターと比較して）保存領域または非保存領域、細胞外領域、細胞質領域、または膜貫通領域であり得る。

【０１１１】
一般に、融合タンパク質は、ペプチド結合を介して、天然に見出される哺乳動物ＣＣＲ２には存在しない第２の部分(moiety)に連結した、哺乳動物ＣＣＲ２（例えば、ヒトＣＣＲ２）を第１の部分として含有したポリペプチドを包含する。したがって、第２の部分は、アミノ酸、オリゴペプチドまたはポリペプチドであり得る。第１の部分は、融合タンパク質に対してＮ－末端位置、Ｃ－末端位置または内部であり得る。１つの態様において、融合タンパク質は、親和性リガンド〔例えば、酵素、抗原、エピトープタグ（tage）〕を第１の部分とし、リンカー配列とヒトＣＣＲ２またはその一部とを含有した第２の部分とを含有する。

【０１１２】
哺乳動物ＣＣＲ２タンパク質の「機能的断片または一部(portion)」、「機能的変異体」および／または「機能的融合タンパク質」とは、結合活性、シグナル伝達活性および／または細胞応答を刺激する能力などの、本明細書に記載された哺乳動物ＣＣＲ２タンパク質の少なくとも１つの機能的特徴を有する単離されたおよび／または組換えタンパク質またはポリペプチドをいう。好ましい機能的バリアントは、リガンド（すなわち、ＭＣＰ－１

、ＭＣＰ－２、ＭＣＰ－３および／またはＭＣＰ－４などの１以上のリガンド）に結合することができ、本明細書において、「リガンド結合バリアント」と称される。

【０１１３】

１つの態様において、哺乳動物ＣＣＲ２の機能的バリアントは、該哺乳動物ＣＣＲ２と少なくとも約８５％の配列同一性、好ましくは、該哺乳動物ＣＣＲ２と少なくとも約９０％の配列同一性、より好ましくは、少なくとも約９５％の配列同一性を有する。ヒトＣＣＲ２ａおよびＣＣＲ２ｂの核酸配列およびアミノ酸配列は米国特許第5,707,815号に記載されている。配列同一性は、Ｂｌａｓｔｘプログラム（バージョン１．４）などの適切なプログラムを用い、デフォルトパラメーターなどの適切なパラメーターを用いて決定することができる。１つの態様において、Ｂｌａｓｔｘサーチについてのパラメーターは、スコアリングマトリックスＢＬＯＳＵＭ６２、Ｗ＝３である。他の態様において、機能的バリアントは、天然に生じる核酸分子と異なるが、遺伝子コードの縮重により、哺乳動物ＣＣＲ２またはその一部をコードする核酸配列を含有する。

【０１１４】

単離されたおよび／または組換え哺乳動物ＣＣＲ２またはその機能的バリアントを含有した組成物(composition) を、結合に適した条件下に維持することができ、哺乳動物ＣＣＲ２またはバリアントと、試験対象抗体または断片とを接触させ、結合を直接的または間接的に検出または測定する。１つの態様において、天然にＣＣＲ２を発現する細胞または哺乳動物ＣＣＲ２またはそのバリアントをコードする組換え核酸配列を含有した細胞が使用される。前記細胞を、レセプターの発現に適した条件下に維持する。前記細胞を、結合に適した条件下で（例えば、適切な結合緩衝液中で）、抗体または断片と接触させ、標準的な技術によって、結合を検出する。結合を測定するには、結合の程度を適切な対照について測定することができる（例えば、抗体の非存在下で測定されたバックグラウンドとの比較、第２の抗体（すなわち、標準）の結合との比較、抗体の非トランスフェクト細胞への結合との比較）。レセプターを含有した膜画分またはレセプターを含有したリポソームを含有した膜画分などの細胞画分を全細胞の代わりに使用することができる。

【０１１５】

１つの態様において、抗体を適切な標識（例えば、蛍光標識、同位体標識、抗原またはエピトープ標識、酵素標識）で標識し、標識の検出により、結合を測定する。他の態様において、結合した抗体を、標識された第２の抗体によって検出することができる。結合の特異性は、例えば、コンペティターとしての非標識抗体またはリガンドを用い、競合または置換によって評価することができる。

【０１１６】

また、結合阻害アッセイを用いて、ＣＣＲ２に結合し、かつリガンド（例えば、ＭＣＰ－１、ＭＣＰ－２、ＭＣＰ－３および／またはＭＣＰ－４）などの他の化合物のＣＣＲ２または機能的バリアントへの結合を阻害する抗体またはその断片を同定することができる。例えば、抗体の非存在下におけるリガンドの結合と比較して、（抗体の存在下での）ＣＣＲ２のリガンドの結合の減少を検出または測定する結合アッセイを行なうことができる。単離されたおよび／または組換え哺乳動物ＣＣＲ２もしくはその機能的バリアントを含有した組成物を、リガンドおよび抗体と同時に、または他方の後に一方を、いずれかの順序で接触させうる。抗体の存在下におけるリガンドの結合の程度の低下は、抗体による結合の阻害の指標である。例えば、リガンドの結合は減少または破壊(abolished) されうる。

【０１１７】

１つの態様において、リガンド（例えば、ＭＣＰ－１などのケモカイン）の哺乳動物ＣＣＲ２またはそのバリアントへの結合の、抗体または断片による直接的阻害をモニターする。例えば、^{125}Ｉ－標識ＭＣＰ－１、^{125}Ｉ－標識ＭＣＰ－２、^{125}Ｉ－標識ＭＣＰ－３または^{125}Ｉ－標識ＭＣＰ－４の哺乳動物ＣＣＲ２への結合を阻害する抗体の能力をモニターすることができる。そのようなアッセイは、例えば、単離された血液細胞（例えば、Ｔ細胞、ＰＢＭＣ）または天然にＣＣＲ２を発現する適切な細胞株、または哺乳動物ＣＣＲ２をコードする核酸を含有する細胞株、または該細胞からの膜画分などの、ＣＣＲ２ま

たはその機能的バリアントを生じる適切な細胞を用いて行なうことができる。
【０１１８】
他の適切な結合アッセイ、またはシグナル伝達機能および／または細胞応答の刺激（例えば、白血球の輸送）を含む、レセプター結合により引き起こされる事象をモニターする方法などの、ＣＣＲ２に結合する抗体の存在を同定する他の方法が利用できる。
【０１１９】
本発明の抗体の阻害効果は、結合阻害アッセイで評価されうることが理解されよう。レセプター結合のための抗体間の競合を、該方法で評価することもできる。このようにして同定された抗体をさらに評価して、結合に続いて、それらがＣＣＲ２の他の機能を阻害するように、および／またはそれらの治療利用性を評価するように作用するか否かを判断することができる。
【０１２０】
シグナル伝達アッセイ
アゴニストなどのリガンドまたは促進物質のＣＣＲ２への結合は、このＧタンパク質－共役型レセプターによるシグナル伝達がもたらされ得、Ｇタンパク質ならびに他の細胞内シグナル伝達分子の活性が刺激される。化合物（例えば、抗体またはその断片）によるシグナル伝達機能の誘導は、いかなる適切な方法を用いてもモニターすることができる。そのようなアッセイを用いて、ＣＣＲ２の抗体アゴニストを同定することができる。抗体またはその機能的断片の阻害活性は、アッセイにおいてリガンドまたは促進物質を用い、リガンドまたは促進物質によって誘導された活性を阻害する抗体の能力を評価し、測定することができる。
【０１２１】
ＧＴＰのＧＤＰへの加水分解、または細胞内（細胞質）遊離カルシウム［$Ca^{2+}]_i$の濃度の迅速かつ一過性の増加の誘導などの、レセプター結合により引き起こされる後のシグナル伝達事象のようなＧタンパク質活性は、当該分野で公知の方法または他の適切な方法によってアッセイすることができる（例えば、Ｎｅｏｔｅ，　Ｋ．ら，　Ｃｅｌｌ　７２：４１５－４２５　１９９３）；　Ｖａｎ　Ｒｉｐｅｒら，　Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．，　１７７：８５１－８５６（１９９３）；Ｄａｈｉｎｄｅｎ，　Ｃ．Ａ．ら，　Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．，　１７９：７５１－７５６（１９９４））。
【０１２２】
例えば、ハイブリッドＧタンパク質結合レセプターを用いるＳｌｅｄｚｉｅｗｓｋｉらの機能アッセイを用いて、レセプターに結合し、かつＧタンパク質を活性化するリガンドまたは促進物質の能力をモニターすることができる（Ｓｌｅｄｚｉｅｗｓｋｉら，米国特許第５，２８４，７４６号、その教示は、参照により本明細書に取り込まれる）。
【０１２３】
かかるアッセイは、評価対象である抗体またはその断片の存在下で行なうことができ、リガンドまたは促進物質によって誘導された活性を阻害する抗体または断片の能力は、公知の方法および／または本明細書に記載された方法を用いて測定される。
【０１２４】
走化性および細胞刺激のアッセイ
また、走化性アッセイを用いて、リガンドの哺乳動物ＣＣＲ２またはその機能的バリアントへの結合をブロックする、および／またはリガンドのレセプターへの結合に関連する機能を阻害する抗体またはその機能的断片の能力を評価することができる。これらのアッセイは、化合物によって誘導されたイン・ビトロまたはイン・ビボでの細胞の機能的移動に基づく。走化性は、例えば、９６穴走化性プレートを用い、または走化性を評価するための他の当該分野で認識された方法を用いるアッセイにおいて、実施例に記載したように評価しうる。例えば、イン・ビトロ経内皮細胞走化性アッセイの使用はＳｐｒｉｎｇｅｒらによって記載されている（Ｓｐｒｉｎｇｅｒら，国際公開第９４／２０１４２号パンフレット，１９９４年９月１５日公開、その教示は、参照により本明細書に取り込まれる；また、Ｂｅｒｍａｎら，　Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｉｎｖｅｓｔ．，　１７：６２５－６７７（１

９８８）参照）。内皮を通過するコラーゲンゲルへの移動もまた記載されている（Ｋａｖａｎａｕｇｈら，　Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，　１４６：４１４９－４１５６（１９９１））。例えば、マウスＬ１－２プレ－Ｂ細胞の、または化学走化しうる他の適切な宿主細胞の安定なトランスフェクタントを走化性アッセイで用いることができる。

【０１２５】

一般に、走化性アッセイは、バリアー（例えば、内皮、フィルター）の中へのまたはそれを通っての、化合物の増大したレベルに向けての、バリアーの第１の表面から対向する第２の表面に向けての、〔白血球（たとえば、リンパ球、好酸球、好塩基球）などの〕適切な細胞の方向性運動または移動をモニターする。膜またはフィルターは、適切な細胞のフィルターへのまたはそれを通っての、化合物の増大したレベルに向けての、フィルターの第１の表面からフィルターの対向する第２の表面への方向性運動または移動がモニターされるように、便宜なバリアーを提供する。いくつかのアッセイにおいては、膜を、ＩＣＡＭ－１、フィブロネクチンまたはコラーゲンなどの接着を容易にする物質で被覆する。そのようなアッセイは白血球「ホーミング(homing)」のイン・ビトロ近似を提供する。

【０１２６】

例えば、試験対象の抗体を含み、膜によって第１のチャンバーから分割される第２のチャンバーへの多孔性膜へのまたはそれを通っての第１のチャンバーからの、適切な容器〔包含手段（containing means）〕中の細胞の移動の阻害を検出または測定することができる。例えば、ニトロセルロース、ポリカーボネートを含めた、化合物に応答しての特異的移動をモニターするための適切なポアサイズを有する適切な膜を選択する。例えば、約３－８ミクロン、好ましくは約５－８ミクロンのポアサイズを用いることができる。ポアサイズはフィルター上で均一であるか、または適切なポアサイズの範囲内でありうる。

【０１２７】

移動および移動の阻害を評価するには、フィルターへの移動の距離、フィルターの第２の表面に接着したままであるフィルターを横切る細胞の数、および／または第２のチャンバーに蓄積する細胞の数を、標準的な技術（例えば、顕微鏡）を用いて測定することができる。１つの態様において、細胞を検出可能な標識（例えば、放射性同位体、蛍光標識、抗原またはエピトープ標識）で標識し、移動は、適切な方法を用い、膜に接着したおよび／または第２のチャンバーに存在する標識の存在を測定することによって（例えば、放射活性、蛍光の検出、イムノアッセイによって）、抗体または断片の存在および非存在下で評価することができる。抗体アゴニストによって誘導された移動の程度は、適切な対照に対して測定することができる（例えば、抗体の非存在下で測定したバックグラウンド移動との比較、第２の化合物（すなわち、標準）によって誘導された移動の程度との比較、抗体によって誘導された非トランスフェクト細胞の移動との比較）。

【０１２８】

１つの態様において、特に、Ｔ細胞、単球、または哺乳動物ＣＣＲ２発現細胞については、経内皮細胞移動をモニターすることができる。この態様において、内皮細胞層を介する移動を評価する。細胞層を調製するために、内皮細胞を、所望により、内皮細胞の付着を容易にするためのコラーゲン、フィブロネクチン、または他の細胞外マトリックスタンパク質などの物質で被覆される多孔性フィルターまたは膜上で培養することができる。好ましくは、内皮細胞は、コンフルエントな単層が形成されるまで培養する。例えば、ヒト臍帯静脈内皮細胞（Ｃｌｏｎｅｔｉｃｓ　Ｃｏｒｐ，　Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，　ＣＡ）などの、静脈、動脈または微小血管内皮細胞などの種々の哺乳動物内皮細胞が単層形成のために利用できる。特定の哺乳動物レセプターに応答しての走化性を評価するには、同一哺乳動物の内皮細胞が好ましい；しかしながら、異種哺乳動物種または属からの内皮細胞も使用できる。

【０１２９】

一般に、前記アッセイは、第１の表面上に内皮細胞層を含むフィルターの第１の表面からフィルターの対向する第２の表面に向けての、化合物の増大するレベルに向けての方向での、膜またはフィルターへのまたはそれを通っての細胞の方向性の移動を検出することに

よって行われる。方向性の移動は、第１の表面に隣接する領域から、膜へのまたはそれを通っての、フィルターの対向する側に位置する化合物に向けて起こる。第２の表面に隣接する領域に存在する化合物の濃度が第１の表面に隣接する領域におけるものよりも大きい。

【０１３０】

抗体阻害物質について試験するのに用いられる１つの態様において、移動でき、かつ哺乳動物ＣＣＲ２レセプターを発現しうる細胞を含有した組成物が、第１のチャンバーに配置されうる。第１のチャンバー中の細胞の走化性を誘導できる１以上のリガンドまたは促進物質を含有した組成物（化学誘因機能を有する）を第２のチャンバーに入れる。好ましくは、細胞を第１のチャンバーに入れる直前または該細胞と同時に、試験対象の抗体を含有した組成物を、好ましくは、第１のチャンバーに入れる。このアッセイにおいては、レセプターに結合し、哺乳動物ＣＣＲ２発現細胞の走化性の、リガンドまたは促進物質による誘導を阻害できる抗体またはその機能的断片は、レセプター機能の阻害物質（例えば、刺激機能の阻害物質）である。抗体または断片の存在下に、リガンドまたは促進物質によって誘導される移動の程度の低下は、阻害活性の指標である。別の結合試験（前記参照）を行なって、阻害が、抗体のレセプターへの結合の結果であるか、異なるメカニズムを介して生ずるのかを判断できる。

【０１３１】

組織における化合物（例えば、ケモカインまたは抗体）の注入に応答した組織の白血球侵潤をモニターするイン・ビボアッセイを後述する（炎症のモデル参照）。イン・ビボホーミングのこれらのモデルは、炎症の部位への移動および走化性によるリガンドまたは促進物質に応答する細胞の能力を測定し、およびこの移動をブロックする抗体またはその断片の能力を評価する。

【０１３２】

記載された方法に加えて、ＣＣＲ２の刺激機能に対する抗体または断片の効果は、レセプターを含む適切な宿主細胞を用い、活性レセプターによって誘導された細胞応答をモニターすることにより評価されうる。

【０１３３】

哺乳動物のＣＣＲ２機能のさらなるリガンド、阻害物質、および／または促進物質の同定本発明の抗体および断片の結合および機能を評価するために用いられうる上記アッセイ法を調整し、哺乳動物ＣＣＲ２、またはその機能的バリアントに結合する別のリガンドまたはそれ以外の物質、ならびに哺乳動物ＣＣＲ２機能の阻害物質および／または促進物質を同定することができる。例えば、本発明の抗体またはその一部を用いた競合アッセイ法によって、本発明の抗体またはその機能的部分の機能と同一ないし類似した結合特異性を有する薬剤を同定することができる。したがって、本発明は、レセプターのリガンド、または哺乳動物ＣＣＲ２タンパク質に結合する他の物質、および、レセプター機能の阻害物質（例えば、アンタゴニスト）または促進物質（例えば、アゴニスト）の同定法をも包含する。１つの態様において、哺乳動物ＣＣＲ２タンパク質、またはその機能的バリアントを産生する細胞（例えば、細胞に導入された核酸によりコードされた哺乳動物ＣＣＲ２タンパク質または機能的バリアントを発現するよう操作された白血球、細胞株または適切な宿主細胞）は、リガンドや、レセプター機能の阻害物質または促進物質などの、レセプターに結合する他の物質の効力を同定および評価するアッセイ法に用いられる。かかる細胞はまた、発現されたレセプタータンパク質またはポリペプチドの機能を評価するのに有用である。

【０１３４】

本発明によれば、リガンド、およびレセプターに結合する他の物質、レセプター機能の阻害物質または促進物質を適切なアッセイ法によって同定し、さらに、治療効果を評価することができる。レセプター機能の阻害物質は、レセプター活性を阻害（低下または阻止）するのに用いられ得、リガンドおよび／または促進物質は、示された正常なレセプター機能を誘導（開始または促進）するのに用いられうる。したがって、本発明は、レセプター

機能の阻害物質を個体（例えば、哺乳動物）に投与することを含む、自己免疫疾患および移植片拒絶などの炎症疾患を治療する方法を提供する。さらに、本発明は、レセプター機能の新規のリガンドまたは促進物質を個体に投与することによって、レセプター機能を刺激する方法を提供し、白血球機能を選択的に刺激するための新規のアプローチを提供するが、これは、例えば、感染症や癌の治療に役立つ。

【０１３５】

本明細書に用いられるように、哺乳動物ＣＣＲ２タンパク質の「リガンド」とは、天然のリガンド、ならびに天然のリガンドの合成型および／または組換型を含む、哺乳動物ＣＣＲ２タンパク質に結合する物質の特定の分類群を意味する。哺乳動物ＣＣＲ２陽性細胞に対する親和性を有する感染病原体（例えば、ＨＩＶなどのウイルス）も、哺乳動物ＣＣＲ２タンパク質に結合することができる。選ばれた哺乳動物のレセプターの天然のリガンドは、哺乳動物ＣＣＲ２タンパク質のリガンド（例えば、ＭＣＰ－１、ＭＣＰ－２、ＭＣＰ－３および／またはＭＣＰ－４などのケモカインなど）と同じ哺乳動物由来である。好ましい態様では、哺乳動物ＣＣＲ２タンパク質のリガンド結合は、高い親和性で生じる。

【０１３６】

本明細書に用いられるように、「阻害物質」とは、結合活性（例えば、リガンド結合、促進物質結合、抗体結合）、シグナル伝達活性（例えば、哺乳動物Ｇタンパク質の活性化、細胞質中の遊離カルシウム［$Ca^{2+}]_i$の急速かつ一過的な濃度上昇の誘導など）、および／または細胞応答機能（例えば、白血球による走化性、エキソサイトーシス、または炎症メディエーター放出の刺激）など、哺乳動物ＣＣＲ２タンパク質（例えば、ヒトＣＣＲ２）に特徴的な機能の少なくとも１つを阻害（低下または阻止）する物質である。阻害物質は、ＨＩＶが細胞の中に侵入するのを阻害する物質でもある。阻害物質という語は、レセプターに結合するアンタゴニスト（例えば、抗体、天然リガンドの変異体、低分子量の有機分子、その他リガンド結合の競合阻害物質）、および、レセプターに結合することなく、レセプター機能を阻害する物質（例えば、抗イディオタイプ抗体）などの物質を意味する。

【０１３７】

本明細書に用いられるように、「促進物質」とは、結合活性（例えば、リガンド結合、促進物質結合、抗体結合）、シグナル伝達活性（例えば、哺乳動物Ｇタンパク質の活性化、細胞質中の遊離カルシウム［$Ca^{2+}]_i$の急速かつ一過的な濃度上昇の誘導など）、および／または細胞応答機能（例えば、白血球による走化性、エキソサイトーシス、または炎症メディエーター放出の刺激）など、哺乳動物ＣＣＲ２タンパク質（例えば、ヒトＣＣＲ２）に特徴的な機能の少なくとも１つを促進（誘導、惹起、亢進、または増加させる）物質である。促進物質という語は、レセプターに結合するアゴニスト（例えば、抗体、別種由来の天然リガンドのホモログなど）、および、レセプターに結合することなくレセプター機能を（例えば、会合するタンパク質を活性化することによって）促進させる物質を含む物質を意味する。好ましい態様においては、アゴニストは、天然のリガンドのホモログ以外のものである。

【０１３８】

したがって、本発明は、リガンド、阻害物質、促進物質、および哺乳動物ＣＣＲ２レセプターまたはその機能的バリアントに結合する他の物質などの哺乳動物のＣＣ－ケモカインレセプター２またはそのリガンド結合バリアントに結合する薬剤を検出または同定する方法にも関する。本方法によれば、試験対象の薬剤、本発明の抗体または抗原結合断片（例えば、８Ｇ２、１Ｄ９、８Ｇ２または１Ｄ９のエピトープ特異性と同一または類似のエピトープ特異性を有する抗体、およびこれらの抗原結合断片）、および哺乳動物のＣＣ－ケモカインレセプター２またはそのリガンド結合バリアントを含有した組成物を組合わせることができる。抗体または抗原結合断片が哺乳動物のＣＣ－ケモカインレセプター２またはそのリガンド結合バリアントに結合するのに適した条件下で上記成分を組合わせ、哺乳動物ＣＣ－ケモカインレセプター２またはそのリガンド結合バリアントへの抗体またはその断片の結合を、本明細書記載の方法または適切な他の方法により、直接または間接的に

検出または測定する。適切な対照（例えば、試験対象の薬剤非存在下）に比べて、形成された複合体の量が減少すれば、薬剤が該レセプターまたはそのバリアントに結合することの指標となる。哺乳動物ＣＣ－ケモカインレセプター２またはそのリガンド結合バリアントを含有した組成物は、組換えケモカインレセプター２またはそのリガンド結合バリアントを産生する細胞の膜画分でもよい。抗体またはその断片は、放射性同位元素、スピン標識、抗原またはエピトープ標識、酵素標識、蛍光基および化学発光基などの標識によって標識することができる。

【０１３９】

１つの態様において、本発明は、試験対象の薬剤、本発明の抗体または抗原結合断片（例えば、１Ｄ９、８Ｇ２、１Ｄ９または８Ｇ２のエピトープ特異性と同一または類似のエピトープ特異性をもつ抗体、またはその抗原結合断片）、および哺乳動物のＣＣケモカインレセプター２またはそのリガンド結合バリアントを産生する細胞を組み合わせることを含む、哺乳動物ＣＣ－ケモカインレセプター２またはそのリガンド結合バリアントに結合する薬剤を検出または同定する方法に関する。上記成分は、抗体または抗原結合断片がＣＣＲ２タンパク質またはそのリガンド結合バリアントに結合するのに適した条件下で組み合わせられ、該抗体またはその断片による哺乳動物ケモカインレセプター２またはバリアントへの結合を、本明細書記載の方法または適切な他の方法により、直接または間接的に検出または測定する。適切な対照と比べて、形成された複合体の量が減少すれば、薬剤が該レセプターまたはバリアントに結合することの指標となる。抗体またはその断片は、放射性同位元素、スピン標識、抗原またはエピトープ標識、酵素標識、蛍光基および化学発光基からなる群より選択された標識によって標識することができる。これらのアッセイ、および同様のアッセイを用いて、ＣＣＲ２に結合して、レセプター結合について、本明細書記載の抗体と競合する、リガンド（例えば、ＣＣＲ２と相互作用するケモカインまたはＨＩＶ株）またはレセプター機能の阻害物質もしくは促進物質などの他の物質などの薬剤を検出することができる。

【０１４０】

前記アッセイ法は、単独で、もしくはそれぞれを組み合わせて、または、適切な別法と組み合わせて、哺乳動物ＣＣＲ２タンパク質に結合するリガンドまたは他の物質、および哺乳動物ＣＣＲ２タンパク質またはそのバリアントの阻害物質または促進物質を同定するために用いることができる。本発明のインビトロ法は、多数の試料を処理するハイスループットスクリーニング（例えば、９６穴方式）を行うために調整することができる。ハイスループットスクリーニングを行なうのに適した量の哺乳動物ＣＣＲ２（例えば、ヒトＣＣＲ２）を発現する細胞を用いることができるため、このような細胞は、リガンドまたはレセプターに結合する他の物質、および哺乳動物ＣＣＲ２タンパク質の阻害物質または促進物質を同定および／または単離するのに有用である。レセプターの発現は、さまざまな方法でモニターすることができる。例えば、レセプターまたはその一部に結合する、本発明の抗体を用いて、発現を観察することができる。また、市販の抗体を用いて、レセプタータンパク質またはポリペプチド（例えば、ＦＬＡＧでタグしたレセプター）を含む、抗原またはエピトープでタグした融合タンパク質の発現を検出することができ、所望の量を発現する細胞を選択することができる。

【０１４１】

哺乳動物ＣＣＲ２タンパク質またはその機能的バリアントをコードする核酸を発現系に組み込んで、レセプタータンパク質またはポリペプチドを産生しうる。哺乳動物ＣＣＲ２タンパク質またはそのバリアントをコードする組換え核酸を含有した構築物により、安定にまたは一過的にトランスフェクトされた細胞内、またはレセプターを含む細胞画分（例えば、トランスフェクト細胞由来の膜画分、レセプターを組み込んだリポソーム）の中で発現するレセプターなど、単離および／または組換え哺乳動物ＣＣＲ２タンパク質またはバリアントを、レセプター機能を調べるために用いることができる。所望であれば、前記レセプターをさらに精製することができる。レセプター機能の試験は、インビトロまたはインビボで行なわれうる。

【０１４２】
ヒトＣＣＲ２などの、単離されたおよび／または組換え哺乳動物ＣＣＲ２タンパク質またはその機能的バリアントを、本明細書に記載したように、レセプター機能をモニターすることまたは他の適切な技術を用いることにより、化合物の効果を判定する本方法で用いることができる。例えば、安定または一過的なトランスフェクタント（例えば、バキュロウイルス感染Ｓｆ９細胞、マウスＬ１／２プレＢ細胞の安定なトランスフェクタントなど）を、結合アッセイ法において用いることができる。例えば、ジャーカット細胞、または走化しうる他の適切な細胞（例えば、マウスＬ１／２プレＢ細胞）の安定なトランスフェクタントを走化性アッセイに用いうる。
【０１４３】
本発明の方法によれば、化合物を個別にスクリーニングしたり、本明細書記載の方法によって１種以上の化合物を同時に調べることもできる。化合物の混合物を試験する場合、記載されたプロセスにより選択された化合物を適切な方法（例えば、ＰＣＲ、シークエンシング、クロマトグラフィー、質量分析法）によって、（適切に）分離し、同定することができる。試験対象の試料における１種以上の化合物（例えば、リガンド、阻害物質、促進物質など）の存在も、これらの方法によって決定することができる。
【０１４４】
コンビナトリアル化学合成法または別法によって作出された化合物（例えば、有機化合物、組換えまたは合成したペプチド、“ペプトイド”、核酸など）のラージコンビナトリアルライブラリーを調べることができる（例えば、Ｚｕｃｋｅｒｍａｎ，Ｒ．Ｎ．ら、Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．，３７：２６７８－２６８５（１９９４）およびそこで引用されている文献を参照のこと；また、Ｏｈｌｍｅｙｅｒ，Ｍ．Ｈ．Ｊ．ら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９０：１０９２２－１０９２６（１９９３）、ならびに、タグされた化合物については、ＤｅＷｉｔｔ，Ｓ．Ｈ．ら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９０：６９０９－６９１３（１９９３）；Ｒｕｔｔｅｒ，Ｗ．Ｊ．ら、米国特許第５，０１０，１７５号明細書；Ｈｕｅｂｎｅｒ，Ｖ．Ｄ．ら、米国特許第５，１８２，３６６号明細書；およびＧｅｙｓｅｎ，Ｈ．Ｍ．米国特許第４，８３３，０９２号明細書参照）。本方法によりコンビナトリアルライブラリーから選択された化合物がユニークなタグを持っていれば、クロマトグラフィー法による各化合物の同定が可能になる。
【０１４５】
１つの態様において、ファージディスプレイ法を用いる。例えば、哺乳動物ＣＣＲ２タンパク質またはその機能的バリアント、本発明の抗体またはその機能的部分、およびポリペプチドを提示するファージ（例えば、ファージ、またはライブラリーなどのファージのコレクション）を、抗体またはその一部が哺乳動物ＣＣＲ２タンパク質またはバリアントに結合するのに適した条件下（例えば、適切な結合バッファー中）で組み合わせることができる。抗体またはその一部と競合して、哺乳動物ＣＣＲ２タンパク質またはそのバリアントに結合するファージは、標準的な技術または他の適切な方法を用いて検出または選択することができる。結合したファージは、適切な溶出用バッファーを用いて、レセプターから分離することができる。例えば、イオン強度またはｐＨを変えてファージの遊離をもたらすことができる。または、溶出用バッファーは、遊離成分、または、化合物の結合を破壊するように設計された成分（単数または複数）（例えば、結合を競合阻害するリガンド、阻害物質、および／または促進物質など、提示されたペプチドがレセプターに結合するのを破壊できる１種以上の化合物）を含有する。任意に、選択プロセスを繰り返したり、別の選択ステップを用いて、レセプターに結合するファージをさらに富化することができる。提示されたポリペプチドの特徴を（例えば、ファージＤＮＡの配列を決定して）調べることができる。同定されたポリペプチドを産生させて、さらに結合について、および阻害物質または促進物質の機能について調べることができる。かかるペプチドのアナログで、安定性が増加したか、他の所望の性質を有するペプチドアナログを製造することができる。

【０１４６】
１つの態様において、ランダムな配列の核酸によってコードされたＮ末側ペプチドを有するコートタンパク質を含有する融合タンパク質を発現し提示するファージを作出することができる。哺乳動物ＣＣＲ２タンパク質またはバリアント、および抗－ＣＣＲ２抗体またはその機能的部位を発現する適切な宿主細胞をファージと一緒にして、結合したファージを選択し、回収して特徴を調べる。（例えば、Ｄｏｏｒｂａｒ，Ｊ．およびＧ．Ｗｉｎｔｅｒ、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２４４：３６１（１９９４）（Ｇタンパク質共役型レセプターとともに用いられるファージディスプレイ法を検討している）を参照のこと）。
【０１４７】
哺乳動物ＣＣＲ２タンパク質に結合するリガンドもしくは他の物質、またはその阻害物質および／または促進物質の可能性のあるものが得られる他のソースとしては、限定されないが、ＭＣＰ－１、ＭＣＰ－２、ＭＣＰ－３および／またはＭＣＰ－４の天然、合成、または組換えバリアントなどのＣＣＲ２リガンドのバリアント、他の化学誘引物質またはケモカインなどの物質、それらのバリアント、低分子量有機分子、他の阻害物質および／または促進物質（例えば、抗－ＣＣＲ２抗体、アンタゴニスト、アゴニストなど）、他のＧタンパク質共役型レセプターリガンド、阻害物質および／または促進物質（例えば、アンタゴニストまたはアゴニスト）、および、適切なレセプターペプチド、またはレセプター機能を阻害することのできる適切なレセプターペプチドまたはアナログなど、哺乳動物ＣＣＲ２レセプターの可溶性部分（例えば、Ｍｕｒｐｈｙ，Ｒ．Ｂ．，国際公開第９４／０５６９５号パンフレットを参照）などが挙げられる。
【０１４８】
炎症のモデル
本発明の抗体および断片のインビボでの治療薬としての効果を判定するために用いることのできるインビボの炎症モデルを利用することができる。例えば、ウサギ、マウス、ラット、モルモット、またはアカゲザルなど、適当な動物にケモカインと、哺乳動物ＣＣＲ２に反応する抗体またはその断片を皮内注射したときの白血球の浸潤をモニターすることができる（例えば、Ｖａｎ　Ｄａｍｍｅ、Ｊ．ら、Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．，１７６：５９－６５（１９９２）；Ｚａｃｈａｒｉａｅ，Ｃ．Ｏ．Ｃ．ら、；Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．，１７１：２１７７－２１８２（１９９０）；Ｊｏｓｅ，Ｐ．Ｊ．ら、Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．，１７９：８８１－８８７（１９９４）参照）。一つの態様において、皮膚の生検を、白血球（例えば、好酸球、顆粒球など）の浸潤について組織学的に判定する。別の態様において、走化性および血管外遊出能力をもつ標識された細胞（例えば、哺乳動物ＣＣＲ２を発現する安定にトランスフェクトされた細胞で、^{111}Ｉｎで標識されたもの）を動物に投与する。例えば、判定対象の抗体または断片は、リガンドまたはアゴニストを試験動物に投与する前か後、またはこれと同時に投与することができる。阻害物質不在下での浸潤の程度と較べた場合の、抗体存在下での浸潤の程度の減少が阻害の指標となる。
【０１４９】
診断および治療への適用
本発明の抗体および断片は、研究、診断、および治療への適用など、さまざまな適用場面に役立つ。一つの態様において、適当な標識（例えば、蛍光標識、化学発光標識、アイソトープ標識、抗原またはエピトープ標識、または酵素標識）によって抗体を標識する。例えば、それらを用いて、レセプターまたはその一部を単離および／または精製したり、レセプター構造（例えば、立体構造）および機能を研究することができる。
【０１５０】
さらに、本発明のさまざまな抗体を用いて、ＣＣＲ２を検出したり、例えば、Ｔ細胞（例えば、ＣＤ８＋細胞、ＣＤ４５ＲＯ＋細胞）、単球、および／またはレセプター遺伝子でトランスフェクトされた細胞などの上でのレセプター発現を測定することができる。したがって、診断や研究目的で、細胞分取（例えば、フローサイトメトリー、蛍光標示式細胞分取）などに適用することもできる。
【０１５１】

本発明の抗－ＣＣＲ２抗体は、診断に適用する上で価値がある。抗－ＣＣＲ２抗体またはその断片は、抗－ＣＤ４を疾患の段階の診断指標として用いたときと同様の方法で、ＨＩＶ感染個体におけるこのレセプターの発現をモニターすることができる。

【０１５２】

一般的に、診断アッセイでは、抗体またはその断片がＣＣＲ２に結合してできる複合体の形成を検出する必要がある。診断目的で、抗体または抗原結合断片を標識したり、非標識化することができる。抗体または断片を直接標識することができる。放射性核種、蛍光剤、酵素、酵素基質、酵素補助因子、酵素阻害物質およびリガンド（例えば、ビオチン、ハプテンなど）などがあるが、これらに限定されない、さまざまな標識を用いることができる。数多くの適切な免疫アッセイ法が当業者に知られている（例えば、米国特許第３，８１７，８２７号；第３，８５０，７５２号；第３，９０１，６５４号および第４，０９８，８７６号を参照）。標識されていないときには、例えば、凝集アッセイ法など、適当な手段を用いて、抗体または断片を検出することができる。非標識抗体または断片は、第一の抗体と反応する標識抗体（例えば、二次抗体）など、抗体を検出するために使用できる別の（すなわち、一つ以上の）適当な試薬（例えば、抗イディオタイプ抗体、または、非標識イムノグロブリンに特異的な別の抗体）、または他の適当な試薬（例えば、標識されたプロテインＡ）と組み合わせて用いることもできる。

【０１５３】

一つの態様において、本発明の抗体または断片は、酵素免疫測定法に利用することができるが、その場合、本発明の抗体または断片、もしくは二次抗体は酵素に結合している。哺乳動物ＣＣＲ２タンパク質を含む生物学的試料を該抗体と合わせると、抗体とＣＣＲ２タンパク質の間で結合が生じる。一つの態様において、ヒト血液のように、哺乳動物ＣＣＲ２タンパク質を発現する細胞を含む試料を該抗体と合わせると、抗体と、該抗体によって認識されるエピトープを含むヒトＣＣＲ２タンパク質を有する細胞との間で結合が生じる。これらの結合細胞を非結合の試薬から分離し、例えば、試料を、酵素作用を受けると発色やその他検出可能な変化を生じる酵素基質に接触させて、細胞に特異的に結合している抗体－酵素結合物の存在を測定することができる。別の態様において、本発明の抗体を標識せずに、該抗体を認識する標識二次抗体を加えることができる。

【０１５４】

生物学的試料中に哺乳動物ＣＣＲ２タンパク質が存在することを検出するときに使用するキットを調製することもできる。このようなキットには、哺乳動物ＣＣ－ケモカインレセプター２または該レセプターの一部に結合する抗体またはその機能的断片、および、抗体または断片とＣＣＲ２またはその一部との間の複合体の存在を検出するのに適した一種類以上の補助試薬が含まれている。本発明の抗体組成物は、単独、または、別のエピトープに特異的な別の抗体と組み合わせて、凍結乾燥した形で提供することができる。抗体は、標識されていてもいなくてもよく、添加成分（例えば、トリス、リン酸および炭酸などの緩衝液、安定化剤、賦形剤、殺生物剤、および／または、例えば、ウシ血清アルブミンなどの不活性タンパク質）とともにキットに含まれうる。例えば、抗体は、添加成分との凍結乾燥混合物として提供することができるが、もしくは使用者が組み合わせられるように添加成分を別に提供することもできる。一般的に、これらの添加物質は、活性抗体量に基づいて約５重量％よりも少なく、通常は、全量で、抗体濃度の約０．００１重量％以上存在する。モノクローナル抗体に結合できる二次抗体を利用するとき、この抗体は、例えば、別のバイアル瓶または容器に入れて、キット内に提供することができる。二次抗体が存在するときには、この二次抗体は、一般的には標識されており、上記の抗体処方物と同様の方法で処方することができる。

【０１５５】

同様に、本発明は、哺乳動物ＣＣＲ２またはこのレセプターの一部の細胞による発現を検出および／または定量する方法で、抗体またはその断片が結合するのに適した条件下で、細胞またはその画分（例えば、膜画分）を含む組成物を、哺乳動物ＣＣＲ２またはこのレセプターの一部に結合する抗体またはその機能的断片（例えば、１Ｄ９および／または８

Ｇ２）に接触させ、結合をモニターする方法にも関する。抗体と、ＣＣＲ２またはその一部との間で複合体を形成したことを示す、抗体の検出は、該レセプターの存在を示している。抗体の細胞への結合は、例えば、「結合アッセイ」という見出しの下で上記したようにして測定することができる。この方法を用いて、（例えば、血液、唾液などの体液などの試料、またはその他適当な試料中の）個体由来の細胞上でのＣＣＲ２発現を検出することができる。また、Ｔ細胞または単球の表面におけるＣＣＲ２発現量を、例えば、フローサイトメトリーによって測定することができ、発現量（例えば、染色強度）が、病気感受性、病気の進行またはリスクと相関しうる。

【０１５６】

ケモカインレセプターは、身体全体、特に、炎症部位に白血球が移動するときに機能する。脈管からの炎症細胞の遊出は、白血球および内皮細胞接着タンパク質および細胞特異的化学誘引物質および活性化因子との相互作用を含む３段階のプロセスによって制御されている（Ｓｐｒｉｎｇｅｒ，Ｔ．Ａ．，Ｃｅｌｌ，７６：３０１－３１４（１９９４）；Ｂｕｔｃｈｅｒ，Ｅ．Ｃ．，Ｃｅｌｌ，６７：１０３３－１０３６（１９９１）；Ｂｕｔｃｈｅｒ，Ｅ．Ｃ．とＰｉｃｋｅｒ，Ｌ．Ｊ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ（Ｗａｓｈ．ＤＣ），２７２：６０－６６（１９９６））。これらは：（ａ）白血球のセレクチンと内皮細胞の炭水化物との間の低親和性相互作用；（ｂ）白血球の化学誘引物質レセプターと化学誘引物質／活性化因子との間の高親和性相互作用；ならびに（ｃ）白血球のインテグリンと、イムノグロブリンスーパーファミリーの内皮細胞接着タンパク質との間の緊密な結合である。白血球のサブセットが異なると、セレクチン、化学誘引物質レセプター、およびインテグリンの異なったレパートリーを発現する。さらに、炎症が起きると、内皮接着タンパク質の発現、および化学誘引物質および白血球活性化因子の発現が変わる。その結果、血管外部位に白血球を補充するときの選択性の制御が非常に多様になる。第二の工程は、白血球化学誘引物質レセプターの活性化が、セレクチン媒介性のセルローリング（cell rolling）からインテグリン媒介性の緊密な結合への変化を引き起こすと考えられている点で重要である。この結果、白血球が血管周囲部位に遊出する準備ができる。化学誘引物質／化学誘引物質レセプター相互作用も、経内皮遊走、および組織内への局在化にとって重要である（Ｃａｍｐｂｅｌｌ，Ｊ．Ｊ．ら、Ｊ．Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌ．，１３４：２５５－２６６（１９９６）；Ｃａｒｒ，Ｍ．Ｗ．ら、Ｉｍｍｕｎｉｔｙ，４：１７９－１８７（１９９６））。この遊走は、炎症の中心に導く化学誘引物質の濃度勾配によって誘発される。

【０１５７】

ＣＣＲ２は、白血球輸送に重要な役割を果たしている。ＣＣＲ２は、一定の炎症部位へのＴ細胞もしくはＴ細胞サブセット、または単球の遊走に関する重要なケモカインレセプターである可能性が高いため、抗－ＣＣＲ２ｍＡｂを用いて、Ｔ細胞または単球の遊走、特に、自己免疫疾患またはアレルギー反応などのＴ細胞機能異常、または、アテローム性動脈硬化症など、単球媒介性障害に関連する遊走を阻害（減少または阻止）することができる。したがって、本発明の抗体およびその断片を用いて、研究や治療への適用場面で、レセプター機能を調節することもできる。例えば、本明細書記載の抗体および機能的断片は、（ａ）（例えば、リガンド、阻害物質、または促進物質の）レセプターへの結合、（ｂ）レセプターのシグナル伝達機能、および／または（ｃ）刺激機能を阻害（低下または阻止）するための阻害物質として作用することができる。レセプター機能の阻害物質として作用する抗体は、（例えば、立体構造の変化を生じさせることによって）直接または間接的に、リガンドまたは促進物質の結合をブロックすることができる。例えば、抗体は、リガンドの結合を阻害することによって、または、（リガンドの結合を阻害したり、阻害することなしに）脱感作することによってレセプター機能を阻害することができる。レセプターに結合する抗体は、レセプター機能のアゴニストとしても作用することができ、レセプターに結合して、レセプターのシグナル伝達機能および／または刺激機能（例えば、白血球の輸送）などのレセプター機能を開始または刺激する。

【０１５８】

このように、本発明は、哺乳動物（例えば、ヒトの患者）における白血球の輸送を阻害す

る方法で、哺乳動物に本発明の抗体またはその機能的断片を有効量投与することを含む方法を提供する。本発明の抗体または断片を投与すると、疾病状態の改善または解消をもたらすことができる。

【０１５９】

また、本発明の抗体またはその機能的断片は、ケモカインの結合によるＣＣＲ２レセプターの活性化が関与している病気の治療に用いることができる。例えば、抗体またはその機能的断片（例えば１Ｄ９および／または８Ｇ２またはその機能的断片）を用いて、アレルギー、アテローム発生、アナフィラキシー、悪性腫瘍、慢性および急性炎症、ヒスタミンおよびＩｇＥ媒介性のアレルギー反応、ショック、および慢性関節リューマチ、アテローム性動脈硬化症、多発性硬化症，同種移植片拒絶、線維症、喘息、および炎症性糸球体症を治療することができる。

【０１６０】

ＣＣＲ２レセプター機能の阻害物質（抗体またはその好適な断片など）を用いて治療可能な、ヒトまたは他の生物種の病気または症状には以下のものがあるが，それらに限定されない。すなわち：

【０１６１】

●　喘息、アレルギー性鼻炎、過敏性肺疾患、過敏性肺炎、間質性肺疾患（ＩＬＤ）（例えば特発性肺線維症、または慢性関節リューマチと関連したＩＬＤ、全身性エリテマトーデス、強直性脊椎炎、全身性硬化症、シェーグレン症候群、多発性筋炎または皮膚筋炎）等の呼吸器系統のアレルギー性疾患；アナフィラキシーまたは過敏性反応、（例えばペニシリン、セファロスポリンに対する）薬物アレルギー、昆虫の刺毛アレルギー；クローン病および潰瘍性大腸炎等の炎症性腸疾患；脊椎関節症；硬皮症；乾癬、および皮膚炎、湿疹、アトピー性皮膚炎、アレルギー性接触皮膚炎，蕁麻疹のような炎症性皮膚炎；血管炎（例えば壊死性血管炎，皮膚血管炎および過敏性血管炎）を含む、炎症性またはアレルギー性の疾患および症状；

【０１６２】

●　関節炎（例えば慢性関節リューマチ、若年性関節リューマチ、乾癬性関節炎）、多発性硬化症、全身性エリテマトーデス、重症筋無力症、若年性糖尿病、糸球体腎炎等の腎炎，自己免疫性甲状腺炎、ベーチェット病等の自己免疫疾患；

【０１６３】

●　同種移植片拒絶または移植片対宿主疾患、ならびに器官移植関連動脈硬化症を含む移植片拒絶（例えば臓器移植における）；

【０１６４】

●　アテローム性動脈硬化症；

【０１６５】

●　皮膚または器官の白血球の浸潤を伴う癌；

【０１６６】

●　血管介入（例えば、外科的、治療的または機械的介入）により生じる狭窄または再狭窄などの血管系、特に動脈、例えば、冠状動脈の狭窄または再狭窄、ならびに脈管内膜過形成。例えば、再狭窄は、典型的には、血管の管腔の隙間を狭くすることを引き起こし、限定されないが、血管移植手順、バルーン、アテレクトミー、レーザーまたは他の適切な方法（例えば、経皮的経管的冠状動脈形成（ＰＴＣＡ））、ステント配置（例えば、機械的または生物学的血管内ステント配置）、血管バイパス手順またはそれらの組み合わせにより行なわれる血管形成を含む血管形成、ならびに狭窄または閉塞血管を治療するために使用される他の手順により引き起こされる血管損傷により生じうる。

【０１６７】

●　望ましくない炎症反応を阻害することで治療できる他の疾患または症状　（ＣＣＲ２媒介性疾患または症状を含む）には、再潅流障害，ある種の血液学的な悪性腫瘍、サイトカインが誘発する毒性（例えば敗血症性ショック，内毒性ショック）、多発性筋炎、皮膚筋炎、および全身性肉芽腫症を含む肉芽腫性疾患などがあるが、それらに限定されない

【０１６８】
ＣＣＲ２レセプター機能の促進物質（抗体およびその断片を含む）を用いて治療可能な疾患または症状には以下のものがあるが、それらに限定されない：
【０１６９】
● たとえばＡＩＤＳのような免疫不全症候群に罹った個体、免疫抑制を生じる放射線治療、化学治療、自己免疫疾患の治療または他の薬物治療（例えば副腎皮質ホルモン治療）を受けている個体における免疫抑制；およびレセプター機能の先天的な不全または他の原因による免疫抑制。
【０１７０】
本発明の抗－ＣＲＲ４抗体は、１種類以上のケモカインの結合をブロックすることができ、その結果、上述の障害をもたらす一つ以上の事象のカスケードの下流をブロックすることができる。
【０１７１】
ＣＣＲ２のアンタゴニストである抗体およびその機能的断片は、ＡＩＤＳ、ならびに一定の炎症疾患に対する治療に使用されうる。ＨＩＶ－１およびＨＩＶ－２は、ヒトにおける後天性免疫不全症候群（ＡＩＤＳ）の病因論的因子である。ＡＩＤＳは、ＨＩＶ感染個体においてＣＤ４＋Ｔリンパ球の枯渇から部分的に生じる。ＨＩＶ－１は、主としてＴリンパ球、単球／マクロファージ、樹状細胞、および中枢神経系における小膠細胞に感染する。これらの細胞の全てはＣＤ４糖タンパク質を発現し、ＨＩＶ－１およびＨＩＶ－２のレセプターとして役に立つ。ＨＩＶの標的細胞への効率のよい侵入は、アミノ末端ＣＤ４ドメインへのウイルスの外側のエンベロープ糖タンパク質であるｇｐ１２０の結合に依存している。ウイルス結合の後、ＨＩＶ－１エンベロープ糖タンパク質は、ウイルスと宿主細胞膜の融合を媒介し、侵入プロセスを完了する。感染した細胞表面上で発現したＨＩＶ－１エンベロープ糖タンパク質による膜融合は、細胞－細胞融合を導き、シンシチウムをもたらす。
【０１７２】
最近、ＣＤ４に加えて宿主細胞因子が、ＨＩＶ－１エンベロープ糖タンパク質媒介膜融合の効率を決定することが示唆されている。ＨＵＭＳＴＳＲ、ＬＥＳＴＲ、または「フュージョン（fusin ）」と呼ばれる７膜貫通レセプター（７ＴＭＲ）は、一連のＣＤ４発現細胞が実験室適合ＨＩＶ－１エンベロープ糖タンパク質により媒介される感染および細胞融合を補助することを可能にすることが示されている（Ｆｅｎｇ，Ｙ．ら、Ｓｃｉｅｎｃｅ（Ｗａｓｈ．ＤＣ）、２７２：８７２－８７７（１９９６））。ＨＵＭＳＴＳＲに対する抗体は、実験室適合ＨＩＶ－１単離物による細胞融合および感染をブロックしたが、インビトロでのマクロファージ性一次ウイルスによる細胞融合および感染をブロックしなかった（Ｆｅｎｇ，Ｙ．ら、Ｓｃｉｅｎｃｅ（Ｗａｓｈ．ＤＣ）、２７２：８７２－８７７（１９９６））。
【０１７３】
一次臨床ＨＩＶ－１単離物の感染を促進するケモカインレセプターおよび関連する分子の能力が、最近いくつかのグループにより報告されている（例えば、Ｂａｔｅｓ，Ｐ．、Ｃｅｌｌ、８６：１－３（１９９６）；Ｃｈｏｅ，Ｈ．ら、Ｃｅｌｌ、８５：１１３５－１１４８（１９９６）；Ｄｏｒａｎｚら、Ｃｅｌｌ ８５：１１４９－１１５８（１９９６））。これらの研究は、ＨＩＶ－１感染の初期の段階におけるケモカインレセプターファミリーの様々なメンバーの関与が、一次ＨＩＶ－１単離物のウイルス親和性およびβ－ケモカイン阻害を説明するのを助けることを示した。
【０１７４】
本発明はまた、哺乳動物ＣＣＲ２または該レセプターの一部に結合する抗体またはその機能的断片の有効量を含有してなる組成物と細胞とを接触させることを含む、哺乳動物ＣＣＲ２またはその一部を発現する細胞のＨＩＶ感染（例えば、新しい感染および／またはシンシチウム形成）を阻害する方法を提供する。組成物はまた、抗－ＣＣＲ３抗体、抗－ＣＣＲ５抗体および抗フュージョン抗体を含むがこれらに限定されないＨＩＶに有効な１つ

以上のさらなる薬剤を含有しうる。

【０１７５】

本発明の抗体の存在下での細胞へのＨＩＶの結合および／またはＨＩＶによる細胞の感染を評価するために、種々の方法が使用されうる。例えば、レセプターへのｇｐ１２０またはその一部の結合、ＨＩＶ感染およびシンシチウム形成を評価するアッセイが使用されうる（例えば、Ｃｈｏｅ，Ｈ．ら、Ｃｅｌｌ、８５：１１３５－１１４８（１９９６）を参照のこと）。これらのプロセスを阻害する本発明の抗体の能力は、これらまたは他の適切な方法を使用して評価されうる。

【０１７６】

また、本発明は、哺乳動物のＣＣＲ２または該レセプターの一部に結合する抗体またはその機能的断片の有効量を含有してなる組成物を患者に投与することを含む、患者におけるＨＩＶを治療する方法を提供する。さらに、組成物はまた、抗－ＣＣＲ３抗体、抗－ＣＣＲ５抗体および抗フュージョン抗体を含むがこれらに限定されないＨＩＶに有効な１つ以上のさらなる薬剤を含有しうる。ＨＩＶを治療するための抗体の治療的使用は、予防的使用を含む（例えば、ＨＩＶに曝露されるかもしれないまたは曝露されているかもしれない患者の治療のため）。例えば、ＨＩＶに曝露されるかもしれないまたは曝露されているかもしれない（例えば、注射針を誤って刺してできた刺傷による）ヘルスケア提供者が、本方法により治療されうる。もう１つの例は、保護のない性的接触または保護の失敗の後にウイルスに曝露された患者の治療である。

【０１７７】

ＡＩＤＳにおいて、複数の薬物治療が最も有望であるようである。ＨＩＶ感染を阻害する抗ケモカインレセプターアンタゴニストは、特に新しい細胞のウイルス感染をブロックすることにより、薬物治療養生法に追加されうる。したがって、ヌクレオシドアナログ（例えば、ＡＺＴ、３ＴＣおよびｄｄＩ）および／またはプロテアーゼ阻害物質等の１つ以上の他の治療用薬剤と組み合わせた本発明の抗体または断片の投与が構想され、ＨＩＶ治療養生法への重要な追加を提供する。１つの態様において、ヒト化抗－ＣＣＲ２　ｍＡｂは、新しい細胞の融合および／または感染を妨げることにより、患者からウイルス荷重を低減する（すなわち１つ以上の）治療用薬剤と組み合わせて使用される。かかる抗体は、周産期の感染を防ぐのにも有用でありうる。

【０１７８】

本発明のもう１つの側面は、ＣＣＲ２に結合する抗体またはその機能的断片の有効量を個体に投与することを含む、個体におけるＨＩＶ感染を妨げる方法に関する。本方法のＨＩＶ感染の阻止は、感染した個体における新しい細胞の感染を阻止（低下または除去）するため、またはＨＩＶに曝露されるかもしれない、曝露されているかもしれないもしくは曝露されている個体における感染を阻止するための治療を含む。例えば、ＨＩＶ感染個体、ＨＩＶ感染女性の胎児またはヘルスケアワーカー等の個体は、本発明の方法により治療されうる。

【０１７９】

投与法

本発明の一つ以上の抗体または断片は、適当な経路により、単独で、または別の薬物もしくは薬剤と組み合わせて（その投与前に、同時に、もしくは投与後に）、または外科的、機械的もしくは治療的介入の前に、同時に、もしくはその後に、個体に投与することができる。例えば、本発明の抗体は、他のモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体と組み合わせて（例えば、ＣＣＲ３およびＣＣＲ５などであるがこれらに限定されない他のケモカインレセプターに結合する抗体を組み合わせて）、または、予防処置または治療処置に用いる市販のガンマグロブリン製剤およびイムノグロブリン製剤のような既存の血液血漿産物と組み合わせて用いることもできる。本発明の抗体または断片は、抗生物質および／または抗菌剤と共に供される、別個に投与される組成物として用いることができる。

【０１８０】

有効量の抗体または断片（すなわち１種類以上の抗体または断片）が投与される。有効量

とは，ＣＣＲ２機能を阻害し、それによって、炎症反応またはＨＩＶ感染を阻害するのに十分な量、または、上述のように、ＣＣＲ２機能を促進するのに十分な量というように、投薬条件下で、所望の治療効果（予防も含む）を達成するのに十分な量のことである。抗体または断片が単回用量または複数回用量で投与されうる。投与量は、当該分野で既知の方法で決定され得、例えば、選択された抗体または断片、被験者の年齢、薬物に対する感受性および耐性、ならびに総合的な健康に依存する。ヒト抗体、ヒト化抗体およびキメラ抗体ならびに抗原結合断片等の抗体およびその抗原結合断片は、しばしば他の型の治療より少ない頻度で投与されうる。例えば、抗体の有効量は、毎日、毎週、２週間毎または毎月の投与で約０．０１ｍｇ／ｋｇ～約５または１０ｍｇ／ｋｇの範囲でありうる。

【０１８１】

経口、摂食、局部、非経口（例えば、静脈内、動脈内、筋肉内、および皮下への注射または注入）、吸入（例えば、気管支内、眼球内、鼻腔内または経口吸入、点鼻）などであり、必ずしもこれらに限定されない、さまざまな投与経路が、治療対象の疾患と症状に応じて可能である。他の適当な投与方法には、再充填可能な、または生物分解性のデバイス（devices）や、緩徐放出ポリマーデバイスなどがある。本発明の医薬組成物は、他の薬剤との併用治療の一部として投与することも可能である。

【０１８２】

投与対象の抗体または断片の処方は、選択した投与経路および処方（例えば、溶液、乳濁物、カプセルなど）によって様々である。投与対象の抗体またはその機能的断片を含む、適当な医薬組成物を生理学的に許容できるビヒクル（vehicle）や担体に入れて調製することができる。抗体および／または断片の混合物を用いることもできる。溶液または乳濁物の場合、適当な担体は、例えば、生理食塩水や緩衝化媒体などの、水溶液もしくはアルコール／水溶液、乳濁物もしくは懸濁物などである。非経口的なビヒクルには、塩化ナトリウム溶液、リンガーのデキストロース、デキストロース、および塩化ナトリウム、乳酸化リンガーのまたは固定された油などがある。水、緩衝化された水、緩衝化生理食塩水、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコールなど）、デキストロース液、およびグリシンなど、当業者には、さまざまな適当な水性担体が知られている。静脈内ビヒクルとしては、さまざまな添加剤、保存剤、または液剤、栄養素または電解質の補充剤などがある（一般的には、レミントンの薬剤科学、第１６版、マック編、１９８０（Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅ，１６ｔｈ，Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｍａｃｋ，Ｅｄ．１９８０）を参照）。該組成物は、例えば、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、および乳酸ナトリウムなどのｐＨ調節剤、緩衝剤、および毒性調節剤のように、生理的条件に近づけるのに必要な薬学的に許容される補助物質を任意に含むことができる。本発明の抗体および断片は、当技術分野において既知の凍結乾燥および再構成の技術によって、貯蔵するために凍結乾燥し、使用する前に適当な担体中で再構成することができる。選択した媒体中の活性成分の至適濃度は、所望の最終的な医薬製剤に応じて、当業者に公知の手順によって経験的に決定される。吸入の場合には、抗体または断片を可溶化し、適当な投薬用容器（例えば、アトマイザー、ネブライザー、または加圧エアロゾル投薬容器）に入れることができる。

【０１８３】

ここで、以下の実施例によって、本発明をさらに具体的に説明するが、それらは、いずれも制限するためのものではない。本明細書において引用されているすべての文献が教示するところは、参照してここに組み込まれる。

【０１８４】

実施例

実施例１

材料：

以下の材料を、示した供給源から得た：

ＰＥ－結合抗ＣＤ１６、ＰＥ－結合ストレプトアビジン、およびビオチン化抗ヒトＩｇＥ

は、Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ（Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）由来であった。ＦＩＴＣ－結合ヤギ抗マウスＩｇＧは、Ｊａｃｋｓｏｎ Ｉｍｍｕｎｏｒｅｓｅａｒｃｈ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ（Ｗｅｓｔ Ｇｒｏｖｅ，ＰＡ）由来であった。ＦＡＣＳ溶解緩衝液は、Ｂｅｃｔｏｎ Ｄｉｃｋｅｎｓｏｎ（Ｍｏｕｎｔａｉｎ Ｖｉｅｗ，ＣＡ）由来であり、[^{125}Ｉ]－ＭＣＰ－1は、ＮＥＮ由来であった（Ｂｏｓｔｏｎ，ＭＡ）。

【０１８５】

細胞、細胞株、および細胞培養

１０％のＦｅｔａｌ Ｃｌｏｎｅ Ｉ（Ｇｉｂｃｏ ＢＲＬ、Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ，ＭＤ）、５０ユニット／ｍＬのペニシリン（Ｇｉｂｃｏ ＢＲＬ）、５０μｇ／ｍＬのストレプトマイシン（Ｇｉｂｃｏ ＢＲＬ）、2ｍＭのＬ－グルタミン（Ｇｉｂｃｏ ＢＲＬ）、および５５μＭのβ－メルカプトエタノール（Ｇｉｂｃｏ ＢＲＬ）を補充したＲＰＭＩ－１６４０中に、マウスプレＢリンパ腫細胞株Ｌ１／２を維持した。他の細胞株は、８００μｇ／ｍｌの活性Ｇ４１８を補充した前記培養培地で増殖した、ＣＣＲ１（Ｃａｍｐｂｅｌｌ，Ｊ．ら、（１９９６）Ｊ．Ｃｅｌｌ Ｂｉｏ．、１３４：２５５－２６６）、ＣＣＲ５（Ｗｕら、Ｎａｔｕｒｅ ３８４：１７９－１８３（１９９６））のいずれかを発現するＬ１／２細胞のトランスフェクタントを含んだ。ＴＨＰ－１細胞（ＡＴＣＣ番号ＴＩＢ２０２）をＡＴＣＣの指示に従って増殖した。Ｐｏｎａｔｈら、Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．、９７：６０４－６１２（１９９６）に記載のように、ＰＢＭＣをヘパリン処理血液から精製した。

【０１８６】

ＣＣＲ２ｂ発現構築物および安定なトランスフェクタントの調製

ヒトＣＣＲ２ｂのコード領域（Ｃｈａｒｏら（１９９４）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、９１：２７５２）を（Ｑｉｎ，Ｓ．ら（１９９６）Ｅｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．、２６：６４０－６４７）に記載のＲＴ－ＰＣＲ増幅により得た。ｃＤＮＡをオリゴ（ｄＴ）－プライミングを用いて作製し、次に示すようにＣＣＲ２ｂ配列（ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号Ｕ０３９０５；Ｃｈａｒｏら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９１：２７５２－２７５６（１９９４））の位置に対応する以下のプライマーセットを用いるネスティッドＰＣＲにより、ＣＣＲ２ｂコード領域の増幅を達成した。

【０１８７】

１） 5'プライマー： 5'-TGAGACAAGCCACAAGCTGAAC-3' （ヌクレオチド11～32；配列番号：１）；

3'プライマー： 5'-TCTGTATTAGTACACACAGCCC-3' （ヌクレオチド1301～1280；配列番号：２）；

【０１８８】

２） 5'プライマー： 5'-ATGCTGTCCACATCTCGTTCTCGG-3' （ヌクレオチド81～104 ；配列番号：３）；

3'プライマー： 5'-TTATAAACCAGCCGAGACTTCCTGCTC-3'（ヌクレオチド116 4 ～1137；配列番号：４）。

【０１８９】

ＣＣＲ２Ｂ ｃＤＮＡコード領域をＣＤ５シグナルペプチドリーダー配列（Ａｒｕｆｆｏら、Ｃｅｌｌ ６１：１３０３－１３１３（１９９０））を含むように改変した。このペプチドの予測されるアミノ酸配列は下記である。

【０１９０】

NH_2-Met-Pro-Met-Gly-Ser-Leu-Gln-Pro-Leu-Ala-Thr-Leu-Tyr-Leu-Leu-Gly-Met-Leu-Val-Ala-Ser-Val-Leu-Ala...（配列番号：５）

【０１９１】

鋳型としてＣＣＲ２ｂ ｃＤＮＡ、ならびにＢａｍＨＩ制限部位を含み、ＣＤ５シグナルペプチド配列およびＣＣＲ２ｂのアミノ末端配列をコードする２つのオーバーラップする５’プライマー、およびＣＣＲ２ｂコード領域の内部に位置する３’プライマーを使用す

るＰＣＲを用いる。
【０１９２】
5' CD5 Seq1 プライマー
5'-GGGGATCCAGAAACCATGCCCATGGGGTCTCTGCAACCGCTGGCCACCTTGTACCTGCTG-3'（配列番号：６）
【０１９３】
5' CD5 Seq2 プライマー
5'-GCCACCTTGTACCTGCTGGGGATGCTGGTCGCTTCCGTGCTAGCGATGCTGTCCACATCTCGTTC-3' （配列番号：７）
3' CCR2AB2 プライマー - 5'-GACGACCAGCATGTTGCC-3' （配列番号：８；U03905ヌクレオチド 272～255)

【０１９４】
２７８塩基対の増幅断片をＢａｍＨＩおよびＡｐａＩで消化し、得られた２０９塩基対の断片をＣＣＲ２ｂ ｃＤＮＡ（GenBank アクセッション番号U03905）の２０６位のＡｐａＩ部位に挿入し、ＣＣＲ２の内因性５’塩基対断片を置換した。レセプターイニシエーターメチオニンの直前にＣＤ５シグナルペプチドリーダー配列を有するＣＣＲ２ｂをコードする得られた配列を、ｐｃＤＮＡ３（Invitrogen, San Diego, CA ）のＢａｍＨＩおよびＸｈｏＩ部位に挿入し、哺乳動物発現プラスミドｐＣＤ５ＭＣＰＲＢを作製した。ＣＤ５－ＣＣＲ２ｂ断片をｐＣＤＥＦ３（Goldman ら、(1996) Biotechniques 21:1013-1015 ）のＢａｍＨＩ－ＮｏｔＩ部位にサブクローン化し、この構築物をＣＣＲ２ｂＤＥＦ３と命名した。この発現ベクターにおいて、挿入遺伝子の発現は、ＥＦ－１αプロモーターにより駆動される。
【０１９５】
エレクトロポレーションの前日に、５０ｍｌのＬ１／２細胞を4×10^5 個の細胞／ｍＬで播種した。エレクトロポレーションの日に、1×10^6 ／ｍＬの密度に増殖させた細胞を、遠心分離により培地から取り出し、８００μｌの室温エレクトロポレーション緩衝液（Zajac ら、DNA 7:509-513 ）に再懸濁させた。１２０ｍＭのＬ－グルタミン酸（Sigma ）、７ｍＭの酢酸Ｍｇ（EM Science）、４．３ｍＭのグルコース（Sigma ）、１７ｍＭのＫ Ｐｉｐｅｓ、ｐＨ６．９（Sigma ）、１ｍＭのＥＧＴＡ（Sigma ）、５ｍＭのＡＴＰ、ｐＨ７．０（Sigma ）。２５μｇのＳｃａＩ線状化した、フェノール／クロロホルム／イソアミルアルコール抽出し、イソプロパノール沈殿させたＣＣＲ２ｂＤＥＦ３プラスミドＤＮＡを０．４ｃｍギャップのエレクトロポレーションキュベットに配置した。再懸濁した細胞をキュベットに加え、シングルパルスを４５０ボルト、９６０μＦｄで印加した。次いで、細胞をキュベットから上記の１５ｍＬのＬ１／２増殖培地を含有するＴ－７５フラスコに移し、３日間増殖させ、この時に、細胞を遠心分離により培地から取り出し、さらに１ｍＭのピルビン酸ナトリウム（Gibco BRL ）および０．８ｍｇ／ｍＬの活性Ｇ４１８（Gibco BRL ）を補充したＬ１／２増殖培地に再懸濁した。
【０１９６】
走化性によるＣＣＲ２ｂ発現細胞の選択
トランスフェクトした細胞を、７日間増殖させ、この時に、新鮮な増殖培地に１：２０に分割した。１６日目に、細胞を走化性により選択した。０．５％ＢＳＡ（ＲＰＭＩ／ＢＳＡ）を補充したＲＰＭＩ１６４０中の６００μＬの１ｎＭ ＭＣＰ－１を下部チャンバーに配置し、１００μｌのＲＰＭＩ／ＢＳＡ中の1×10^6 個のＣＣＲ２ｂＤＥＦ３細胞を３．０ミクロン細孔の２４ウェル走化性プレート（Becton Dickinson）の上部チャンバーに配置した。細胞を３７℃、５％CO_2 、加湿インキュベーター中で４時間２０分間走化（chemotax）させ、このとき上部チャンバーを取り出した。このインキュベーション時間を実験時間に選択した。なぜなら、それはＭＣＰ－１に応答する細胞が移動するのに充分な長さであるが、バックグラウンドを低く保つのに充分短いからであった。
【０１９７】

ＦＡＣＳ分取によるＣＣＲ２ｂ発現細胞の第２の選択
膜を介して下部チャンバーに走化させた細胞を増殖させ、さらに無菌ＦＡＣＳ分取によって精製した。１０００万個のＣＣＲ２ｂＤＥＦ３細胞を、遠心分離により培地から分離し、１％の熱不活化ウシ胎仔血清（「ＨＩ　ＦＣＳ」）（Gibco BRL ）および２．５ｍＬの濾過滅菌した抗ＣＣＲ２ｂアミノ末端ペプチド抗体上清５Ａ１１を補充した２．５ｍＬのＰＢＳ（＋Ｃａ、Ｍｇ）に再懸濁した。細胞および抗体を混合し、氷上で３０分間インキュベートした。次いで、ＰＢＳ（＋）（Gibco BRL ）で細胞を２回洗浄し、１％ＨＩ　ＦＣＳを補充した５ｍＬのＰＢＳ（＋）中の濾過滅菌した、ＦＩＴＣ結合、アフィニティー精製Ｆ（ａｂ^{1}）$_{2}$ ヤギ抗マウスＩｇＧ（Jackson ImmunoResearch Laboratories ）の１：２５０希釈物に再懸濁させた。細胞を暗所で氷上にて３０分間インキュベートし、次いでＰＢＳ（＋）（GIBCO BRL ）で２回洗浄した。細胞をＦＡＣＳＣａｌｉｂｕｒ（登録商標）で分取し、最も明るい４％の細胞を収集した（ＦＬ１≧３×１０^{2} ）。

【０１９８】
分取した細胞を増殖させ、それらを上記と同じプロトコルを用いて再分取した。最も明るい１％の細胞を収集した（ＦＬ１≧３×１０^{3} ）。

【０１９９】
モノクローナル抗体産生
ＣＣＲ２ｂに対するｍＡｂを産生するために、発現のレベルが下がらないように確認するためにトランスフェクタントを継続的にモニターした。トランスフェクタントにおけるレセプター発現を確認するために、抗ＣＣＲ２ｂ抗体上清５Ａ１１および第２抗体としてヤギ抗マウスＩｇＧ　ＦＩＴＣを用いてＦＡＣＳ染色を行った。

【０２００】
２０００万個のＣＣＲ２ｂＤＥＦ３．Ｌ１／２細胞をＲＰＭＩ１６４０（Gibco BRL ）において洗浄し、ＲＰＭＩ１６４０＋０．２ｍｇ／ｍＬのマイトマイシンＣ中で３７℃にて３０分間インキュベートした。次いで、細胞をＰＢＳ（＋）で２回洗浄し、０．５ｍＬのＰＢＳ（＋）中の２×１０^{7} 個の細胞をＣ５７ＢＬ／６雌マウスに腹腔内に注射した。これを２週間間隔で２回以上繰り返した。４回目に、２×１０^{7} 個の細胞を０．２５ｍＬに再懸濁し、静脈内に注射した。静脈注射の３日後、マウスを屠殺し、脾臓を取り出し、記載のように（Current Prococols in Immunology, John Wiley and sons, New York, 1992 ）細胞をＳＰ２／０細胞株と融合させた。

【０２０１】
このセットのマウスを、２つの異なる細胞株および合成ペプチドで何度も予め免疫し、ＣＣＲ２陽性細胞を染色した抗体はいくつかの融合からは生じなかった。高レベルのＣＣＲ２ｂを発現するＣＣＲ２ｂＤＥＦ３．Ｌ１／２細胞株を用いた上記４つの免疫化は、上記抗体を得るために重要であった。

【０２０２】
限界希釈によるＣＣＲ２トランスフェクタントの単一細胞クローンの選択
マウスに最後の注射を与えた後、２回分取した細胞を再び増殖させ、次いでそれらを限界希釈によりさらに精製した。細胞を、９６ウェルプレート中でウェル当たり１個および０．５個の細胞でプレーティングした。ウェル当たり０．５個の細胞希釈物からサブクローン化細胞を増殖させ、抗ＣＣＲ２ｂ抗体上清５Ａ１１および二次抗体としてヤギ抗マウスＩｇＧ　ＦＩＴＣを用いた間接免疫蛍光ＦＡＣＳ解析によりＣＣＲ２ｂ発現について試験した。手順は、染色容量が１００μｌである以外は前記と同じであった。４つの陽性を選択し、凍結させた。

【０２０３】
陽性モノクローナル抗体の同定
ＦＡＣＳｃａｎ（登録商標）（Becton Dickinson & Co., Mountain View, CA ）を用いた免疫蛍光染色解析を用いて、ＣＣＲ２ｂレセプターと反応性であるモノクローナル抗体を同定した。ハイブリドーマ培養上清を、二次抗体としてヤギ抗マウスＩｇＧ　ＦＩＴＣを用いて９６ウェル形式でアッセイした。ＣＣＲ２ｂＤＥＦ３．Ｌ１／２細胞を用いてＣＣ

ＲＲ２ｂと反応性であるモノクローナル抗体を同定し、非トランスフェクトＬ１／２細胞を用いて、他の細胞表面タンパク質と反応性であるモノクローナル抗体を除去した。

【０２０４】

ＦＡＣＳ染色－培養細胞

培養トランスフェクト細胞株の染色のために、５０μｌ中の０．５×１０^{6} 個の細胞を９６ウェルポリスチレンＶ底プレート中のＰＢＳ＋１％ＦＣＳに再懸濁した。５０μｌの一次抗体上清またはＨＴ培地（陰性対照）を添加し、サンプルを４℃で３０分間インキュベートした。１００μｌのＰＢＳを添加し、細胞を遠心分離によりペレット化し、ＰＢＳで１回洗浄した。ペレットを、ＦＩＴＣ結合ヤギ抗マウスＩｇＧ抗体（１：２５０希釈物）を含有する１００μｌのＰＢＳ＋１％ＦＣＳに再懸濁し、暗所で４℃にて３０分間インキュベートした。細胞をＰＢＳで２回洗浄し、ＰＢＳに再懸濁し、ＣｅｌｌＱｕｅｓｔソフトウェア（Becton-Dickenson）細胞を用いたＦａｃＳｃａｎサイトメーターでフローサイトメトリーにより解析し、同じ日に解析しない場合には、細胞をＰＢＳ／１％ホルムアルデヒドで固定化した。モノクローナル抗体１Ｄ９および８Ｇ２株ＣＣＲ２トランスフェクタントであるが、ＣＣＲ１またはＣＣＲ５トランスフェクタントではない（Ｆｉｇｕｒｅ１Ａから１Ｏ）。

【０２０５】

ＦＡＣＳ染色－全血

１００μｌの全血を１００μＬの１Ｄ９抗体ハイブリドーマ上清またはＨＴ培地（陰性対照）と混合し、４℃で３０分間インキュベートした。ＰＢＳで１回洗浄した後、１００μＬのＦＩＴＣ結合ヤギ抗マウスＩｇＧ抗体（１：２５０希釈物）を各サンプルに添加し、暗所で４℃にて３０分間インキュベートした。次いで、２色染色を行う場合、サンプルをＰＢＳで１回洗浄し、そうでない場合にはＰＢＳで２回以上洗浄した。２色染色のために、１回の洗浄の後、５μｌのマウス血清を細胞ペレットに添加し、混合し、暗所で４℃にて５分間インキュベートした。二次一次抗体（または陰性対照としてＰＢＳ）を添加し（１０μｌの抗ＣＤ１６、抗ＩｇＥの１００μｌの１：２００希釈物）、暗所で４℃にて３０分間インキュベートした。次いで、サンプルをＰＢＳで１回洗浄し、１００μＬのストレプトアビジンＰＥ（１：２００のＰＢＳ＋１％ＢＳＡ）に再懸濁し、暗所で４℃にて１５分間インキュベートした。２ｍｌのＦＡＣＳ溶解緩衝液を各サンプルに添加することにより赤血球を溶解させ、暗所で室温にて１５分間またはサンプルが透明になるまでインキュベートした。細胞を、遠心分離によりペレット化し、全ての２００μｌの上清を吸引した。サンプルをフローサイトメトリーにより解析し、ＣｅｌｌＱｕｅｓｔソフトウェア（Becton-Dickenson）を用いるＦａｃＳｃａｎにおいてフローサイトメトリーにより解析した。ＣＣＲ２ｂは、ほとんどの単球、リンパ球のサブ集団および顆粒球のサブセットにおいて発現される（Ｆｉｇｕｒｅ２Ａ～２Ｌ）。ＣＣＲ２ｂは、末梢血（好塩基球）中のＩｇＥ陽性集団において発現される（Ｆｉｇｕｒｅ３Ａ～３Ｉ）。

【０２０６】

ＭＣＰ－１結合アッセイ

ＭＣＰ－１結合を、２．５μｇのＴＨＰ－１膜タンパク質または５０００，０００個のＰＢＭＣおよび０．１ｎＭの［^{125} Ｉ］－ＭＣＰ－１のいずれかを含有する最終容量０．１ｍｌの５０ｍＭのＨｅｐｅｓ、ｐＨ７．４、１ｍＭの$CaCl_2$、５ｍＭの$MgCl_2$、０．０２％のアジ化ナトリウム、０．５％のＢＳＡ（ＨＢＢ）中で行った。競合結合実験を、種々の濃度の非標識ＭＣＰ－１、１Ｄ９抗体、または陰性対照ＩｇＧ２ａを含ませることにより行った。非特異的結合を、２５００倍過剰の非標識ＭＣＰ－１の添加後に測定した。サンプルを室温で６０分間インキュベートし、結合トレーサーおよび遊離トレーサーを、０．３％ポリエチレングリコールに予浸した９６ウェルＧＦ／Ｂフィルタープレートにより濾過することにより分離した。フィルターを、０．５ＭのＮａＣｌをさらに補充したＨＢＢで洗浄し、乾燥させ、液体シンチレーション計数により結合した放射活性の量を測定した。ｍＡｂ　１Ｄ９は、約０．００４μｇ／ｍｌのIC_{50}（約０．０２ｎＭ；Ｆｉｇｕｒｅ４）でＴＨＰ－１細胞膜への［^{125} Ｉ］ＭＣＰ－１の結合を阻害し、約０．０

４μｇ／ｍｌのＩＣ$_{50}$（約０．２ｎＭ；Ｆｉｇｕｒｅ５）で新鮮なＰＢＭＣへの［^{125}Ｉ］ＭＣＰ－１の結合を阻害する。

【０２０７】

ＰＢＭＣの走化性

走化性を、３μｍ細孔サイズの９６ウェル走化性プレート（Neuroprobe, Cabin John, MD）を用いてアッセイした。Ｆｉｃｏｌｌ－Ｈｙｐａｑｕｅ密度勾配遠心分離を用いた標準的な方法により単離したＰＢＭＣを、ＰＢＳ／０．５％ＢＳＡで洗浄し、次いで１０×１０^{6} 細胞／ｍｌの最終濃度で走化性アッセイ培地（ＨＢＳＳ／１０ｍＭのＨＥＰＥＳ／０．５％脂肪酸遊離ＢＳＡ）に再懸濁した。細胞を、種々の濃度の抗ＣＣＲ２抗体、１Ｄ９、または非特異的マウスＩｇＧ２ａとともに、走化性アッセイ培地中で室温で２０分間プレインキュベートした。抗体の同一の希釈物をケモカインと混合し、３０μｌの混合物を走化性プレートの各々の下部ウェルに添加した。下部ウェルをメンブレンで覆い、２５μｌの細胞および抗体混合物をフィルターの上面に添加する。前記プレートを５％CO_2 インキュベーター中で３７℃で約８０分間インキュベートする。移動の完了時に、メンブレンを取り出し、下部ウェルを有するプレートを－８０℃で３０分間インキュベートし、内容物を凍結させる。プレートを、３７℃で１０分間解凍する。供給会社により提供される溶解緩衝液中のＣｙＱｕａｎｔ試薬（Molecular Probes, Eugene, OR）の１：４００希釈物の６μｌを各ウェルに添加し、細胞移動を、ＣｙｔｏＦｌｏｕｒ蛍光プレートリーダーを４８５ｅｘ／５３５ｅｍで用いて測定される蛍光強度により示されるように定量する。ｍＡｂ　１Ｄ９は、新鮮なＰＢＭＣのＭＣＰ－１誘導性走化性を阻害するが、ＲＮＴＥＳ誘導性走化性を阻害しない（Ｆｉｇｕｒｅ６Ａおよび６Ｂ）。新鮮なＰＢＭＣのＭＣＰ－１誘導性走化性の阻害は、１０μｇ／ｍｌ（約４０ｎＭ）で示された。

【０２０８】

実施例２

モノクローナル抗体１Ｄ９のヒト化

１Ｄ９モノクローナル抗体は、ヒト抗マウス抗体（ＨＡＭＡ）応答を強力に惹起する、ヒトにおける免疫原であるようである。このＨＡＭＡ応答は、通常、身体からのマウスモノクローナル抗体の迅速なクリアランスを生じ、従って、１Ｄ９モノクローナル抗体が有し得るいかなる治療効果をも制限する。従って、この抗体のヒトにおける免疫原性を減少し、その治療可能性を最大化する試みにおいて、１Ｄ９マウスモノクローナル抗体のヒト化を行った。以下の実施例は、１Ｄ９アミノ酸配列データの詳細な解析、マウス１Ｄ９F_v ドメインの分子モデルの構築、および前記マウス抗体の首尾良いヒト化の設計ストラテジーを提供する。この設計ストラテジーは、κ軽鎖可変（V_K）領域および重鎖可変（V_H）領域の両方の多数のヒト化バージョンの設計を生じた。全体で、ヒト化V_H 領域は、選択されたヒトV_H 領域のＦＲ中に１６個までのアミノ酸変更を含んでいた。これらの変更は、ヒト化V_H 領域の４つのバージョンに細分化された。さらに、選択されたヒトV_K 領域のＦＲ中の１２個のアミノ酸は、同様に設計されたヒト化V_K 領域の４つのバージョンに含まれた。

【０２０９】

マウス１Ｄ９κ軽鎖可変領域の配列解析

１Ｄ９V_K 領域のアミノ酸配列（Ｆｉｇｕｒｅ７）を、他のマウスκ軽鎖可変領域、およびさらに可変領域がＫａｂａｔデータベース（Kabat ら、Sequence of proteins of immunological interest, 第５版、米国保健福祉省、米国政府出版局（1991））に細分化されたサブグループのコンセンサス配列と比較した。この解析から、１Ｄ９V_K 領域は、マウスκサブグループＩＩのマウスコンセンサス配列と最も密接にマッチすることが見出された（同一性＝７９．４６％、類似性＝８２．１４％）。１Ｄ９κ軽鎖のＦＲのみがマウスサブグループＩＩにおいて比較された場合、同一性パーセンテージは、８７．５％に上昇し、一方、類似性パーセンテージは８８．７５％に上昇した。さらに、マウス１Ｄ９V_K 領域は、７０／３マウスV_K 生殖系列遺伝子（Ｆｉｇｕｒｅ１３）の翻訳に対して良好な相同性を示した。全て合わせると、上記証拠は、１Ｄ９配列がマウスV_K 領域の典型であ

ったことを明確に証明した。

【０２１０】

マウス１Ｄ９重鎖可変領域の配列解析

１Ｄ９V_H 領域（Ｆｉｇｕｒｅ８）の類似性解析により、それがＫａｂａｔデータベース（Kabat ら、Sequence of proteins of immunological interest, 第５版、米国保健福祉省、米国政府出版局（1991））のマウス重鎖サブグループＩＩＩｃのコンセンサス配列に最も密接にマッチすることが見出された。１Ｄ９のマウス重鎖可変領域アミノ酸配列とマウスサブグループＩＩＩＣのコンセンサス配列との間の同一性は、７０．９４％であると測定され、一方、類似性は７６．０７％であると計算された。１Ｄ９V_H 領域のＦＲのみをマウスサブグループＩＩＩと比較した場合、同一性パーセンテージは７５．８６％に上昇し、一方、類似性は８０．４６％に上昇した。マウス１Ｄ９V_H 領域はまた、とりわけ、ＭＬＲ－ＲＦ２４ＢＧマウスV_H 生殖系列遺伝子の翻訳物に対して良好な相同性を示した（Ｆｉｇｕｒｅ１４）。従って、上記証拠は、１Ｄ９配列が、マウスV_H 領域の典型であることを証明した。

【０２１１】

１Ｄ９ドメインの分子モデリング

１Ｄ９抗体のヒト化可変領域の設計を補助するため、マウス１Ｄ９F_V 領域および８個のＣＤＲグラフトバリアントの一連の分子モデルを構築した。これは、Ｏｘｆｏｒｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｌｉｍｉｔｅｄ（ＯＭＬ）により供給され、利用されるＡｂＭ分子モデリングパッケージを用いて行った。Ｂｒｏｏｋｈａｖｅｎデータベースから入手可能な抗体Ｘ線結晶構造を、ＡｂＭを用いたモデリングのために使用できるようにフォーマットした。

【０２１２】

１Ｄ９可変領域のＦＲを、類似した、構造解析されたイムノグロブリン可変領域のＦＲにおいて設計した。同定されたアミノ酸側鎖をそれらの本来の配向で維持しながら、ミスマッチした側鎖を本来の１Ｄ９F_V のように置換した。Ｆａｂ Ｂｖ０４－０１ V_K 領域のＦＲの骨格原子を、V_K 鎖およびV_H 鎖の両方についての１Ｄ９のＦｖフレームワーク領域の設計に使用した。Ｆａｂ Ｂｖ０４－０１の配列は、マウス１Ｄ９の可変領域配列およびそのヒト化バリアントへの良好な対応物（match ）であった。Ｆａｂ Ｂｖ０４－０１とマウス１Ｄ９およびヒト化配列との間の同一性は、V_K については７６％～７８％の範囲であり、V_H 配列については７４％～８４％の範囲であった。既知配列を有するＡｂＭの試験により、ＦＲ骨格相同性が任意のモデルの質において重要な因子であることを示した。なぜなら、モデルである配列にあまりマッチしないＦＲ構造の使用がＣＤＲループの位置および配向に対して有意に不都合に影響しうるからである。

【０２１３】

ＣＤＲ Ｌ１、Ｌ２、Ｌ３、Ｈ１およびＨ２の骨格構造のために、全てのモデルのコンホメーションを、Ｆｉｇｕｒｅ９および１０に示されるクラスを用いて、改変することなくＡｂＭによって使用される基準分類から取得した。

【０２１４】

Ｌ１ループの骨格構造のために、マウス１Ｄ９ ＶＫ領域のループコンホメーションを、ＡｂＭに由来する基準クラス４から取得した。この基準分類は、Chothia および彼の同僚達（Chothia およびLesk, J.Mol.Biol. 197:901 (1987); Chothia ら、Nature 34:877 (1989); Tramontanoら、J.Mol.Biol. 215:175 (1990); およびChothia ら、J.Mol.Biol. 227:799 (1992)）によって記載されたものを基礎とするが、それらは、本来の文献が公開されてから利用可能になった構造を考慮して改変された。既知のループ構造のＡｂＭ予測の性能の試験により、この方法で作製されたＣＤＲループが非常に正確に、すなわち、１～１．５Å ＲＭＳ偏差内に通常設計されることを示した。

【０２１５】

１Ｄ９V_H 領域内のＨ３ループは、６残基長で比較的短い。これは、Ｂｒｏｏｋｈａｖｅｎデータバンクの Ｘ線構造からの骨格コンホメーションについてのサーチを用いて設計し

た。このような短いループに関して、ループに利用可能なループコンホメーションスペースを飽和するのに充分な既知のＸ線構造に由来するループコンホメーションがある。新規抗体の構造を有するＡｂＭによって作製される予測の試験（ここで前記構造は、前記プログラムによって使用されるデータベースに含まれていない）は、このサイズのＣＤＲ　Ｈ３ループに関して、正確度は、少なくとも２．０Åであるようである。

【０２１６】

明かな立体衝突について前記モデルの全体を調整した後、それを、MACROMODELにおいて実行されるようなエネルギー極小化に供し、不都合な原子接触を軽減し、ファンデルワールス力および静電気的相互作用を最適化する。

【０２１７】

ヒト化１Ｄ９V_K 抗体バリアントの設計

１Ｄ９抗体のヒト化可変領域の設計の第１ステップは、ヒト化１Ｄ９V_K 領域の基礎として働きうるヒトκ軽鎖可変領域の選択であった。このプロセスの補助として、１Ｄ９V_K 領域を、Ｋａｂａｔ（Kabat ら、Sequences of proteins of tmmunological interest 、第５版、米国保健福祉省、米国政府出版局（1991））により規定される４つのヒトκ軽鎖可変領域サブグループのコンセンサス配列と最初に比較した。マウス１Ｄ９軽鎖可変領域は、ヒトκ軽鎖サブグループＩＩのコンセンサス配列に最も類似し、これは全可変領域にわたって７６．２％同一およびＦＲ単独内で８２．５％の同一性を示した。類似性に関して測定した場合、これらの値は、全体で７９．７％の同一性およびＦＲ単独内で８５．０％に上昇した。結果的に、これは、一般に、κサブグループＩＩに由来するヒトκ軽鎖可変領域配列に良好にマッチするようであった。

【０２１８】

次いで、マウス１Ｄ９V_K を、公に入手可能なヒト可変領域の個々の配列の記録された例の全てと比較した。Ｆｉｇｕｒｅ１５は、この解析を通じて同定したマウス１Ｄ９V_K 領域に対する最良の１７個の対応物を示す。全体で、サーチアルゴリズムは、マウス１Ｄ９V_K 領域に対する最良のマッチとして、ヒトV_K 領域抗体０３６５２１（Rheinnecker ら、Journal of Immunology. 157 (7):2989-97 (1996)）を選択した。しかし、この抗体に関する原典となる論文の総説により、マウスオリゴヌクレオチドプライマーがハイブリドーマに由来する遺伝子をレスキュー（rescue）するために使用されたことが示された。従って、Ｋａｂａｔデータベースにより示唆されるように、この抗体が実際にマウス抗体でありヒト抗体でないことを意味した。従って、データベース検索により選択されたマウス１Ｄ９V_K 領域への次の最良の対応物は、抗体ＨＦ－２１／２８に由来するヒトV_K 領域であった（Kabat データベースＩＤ番号005056；Chastagnerら、Gene. 101 (2):305-6 (1991)）。ヒト配列は、１Ｄ９V_K 領域に対して７９．３％の全体の同一性、およびＦＲ単独内で８５．０％の同一性を有していた。類似性に関して測定した場合、これらの値は、全体で８３．９９％およびＦＲ単独内で８７．５％に上昇した。さらに、鍵となるＦＲアミノ酸は、他の候補ヒトκ軽鎖可変領域におけるよりも保存的にＨＦ－２１／２８V_K 領域において保存されていた。従って、ＨＦ－２１／２８κ軽鎖可変領域ＦＲを、１Ｄ９抗体κ軽鎖可変領域のヒト化のためのヒトアクセプター配列として選択した。

【０２１９】

不運なことに、ヒトＨＦ－２１／２８V_K 領域のＦＲ４の最後の残基（Kabat ナンバリングシステムに従って１０７位）は、Ｋａｂａｔデータベースまたはこの可変領域配列を最初に単離した著者によって規定されていなかった。それゆえ、Ｋａｂａｔヒトκ軽鎖サブグループκ－ＩＩ（Kabat ら、Sequences of proteins of immunological interest 、第５版、米国保健福祉省、米国政府出版局（1991））によって記載された可変領域配列内のこの位置で最も一般に見出されるアミノ酸を挿入することを決めた。従って、Ｋａｂａｔヒトκ軽鎖サブグループ$_K$ －ＩＩの８５．７％の配列がこの位置にリジンを有することを見出したＫａｂａｔデータベースの解析に基づいてＦＲ４の１０７位にリジンを加えた。次いで、これは、１Ｄ９κ軽鎖の第１のヒト化バージョン（１Ｄ９ＲＫ$_A$）の基礎となり、これは１Ｄ９V_K 領域のＣＤＲおよびＨＦ－２１／２８V_K 領域のＦＲを本質的に含ん

でいた。Ｆｉｇｕｒｅ１９Ａ～１９Ｃは、ヒト化１Ｄ９V_K領域のＣＤＲ移植バージョンのアミノ酸配列を規定する。

【０２２０】

設計プロセスの次の工程は、これらのアミノ酸残基のいずれかが抗原への結合に不都合に影響するようであるかどうかを決定するために、ヒトアクセプターＨＦ－２１／２８V_K領域ＦＲのアミノ酸配列を研究することであった。これは、抗原との相互作用を介して直接的に引き起こされうるか、またはＣＤＲループの確認もしくは配向を変更させることにより間接的に引き起こされうる。これは、１Ｄ９可変領域、すなわち、V_KおよびV_H領域の両方のモデルが利用可能であることによってのみ可能になる困難なプロセスであった。それにもかかわらず、抗原結合に影響するようであるマウス１Ｄ９ＦＲ中の任意のアミノ酸を、次いで、ヒト化１Ｄ９抗体における転換のために考慮した。マウス残基を転換する決定において、以下の点に取り組んだ：

【０２２１】

・高度可変性ループの規範的構造（Chothia およびLesk, J.Mol.Biol.197:901 (1987); Chothiaら、Nature 34:877 (1989); Tramontanoら、J.Mol.Biol. 215:175 (1990); およびChothia ら、J.Mol.Biol. 227:799 (1992)）が保存されていることが非常に重要であった。従って、ヒト化１Ｄ９可変領域内に、これらの規範構造の一部である全てのマウスＦＲ残基を保存することが重要であった（Ｆｉｇｕｒｅ９および１０）。

【０２２２】

・１Ｄ９抗体可変領域の配列を、他のマウス抗体に由来する類似した配列と比較して、抗原結合に重要な役割を示しうる異常なまたは稀な残基を同定した。次いで、これを１Ｄ９可変領域遺伝子のマウスモデルを用いて調査した。

【０２２３】

・前記モデルの直接解析もまた行い、ヒト化ＦＲに存在しない任意の他のマウスＦＲ残基がなんらかの方法で抗原結合に影響しうるかどうかを試し、予想した。

【０２２４】

・κ軽鎖および重鎖の可変領域についての個々のヒトアクセプター配列と前記アクセプター配列が属するヒト可変領域サブグループのコンセンサス配列との比較もまた行った。ヒトドナー配列内の任意の特異的アミノ酸の同定は重要である。なぜなら、これらが不都合に影響を受けた抗原結合を有しうるからである。

【０２２５】

・選択されたヒト軽鎖および重鎖の可変領域は、２つの異なるヒト抗体に由来しうるので、ドナーおよびアクセプターの両方のκ軽鎖可変領域のドメイン間充填残基の注意深い解析が行われるべきである（Chothia ら、J.Mol.Biol. 186:651 (1985)）。これは、ヒト化１Ｄ９抗体のＣＤＲループ構造のコンホメーションに関わりなく、この領域におけるいかなる誤った充填も抗原結合の際に劇的な影響を有しうるからであった。

【０２２６】

ドナーマウス１Ｄ９V_K領域のＦＲとアクセプターヒトＨＦ－２１／２８V_K領域との間に１２アミノ酸の差異が存在するが、２個のマウス残基のみが、それらをヒト化ＦＲに保存するのに充分に、結合親和性のために重要であると考えた。１Ｄ９ＲＫ$_B$に導入された第１のＦＲ変更は３６位に位置した。この残基は補助（Vernier ）残基（Foote and Winter, J.Mol.Biol. 224:487 (1992)）であり、Chothia および彼の共同研究者により規定されたＬ１ループ構造の鍵となる構造決定残基（Chothia およびLesk, J.Mol.Biol. 197:901 (1987); Chothia ら、Nature 34:877 (1989); Tramontanoら、J.Mol.Biol. 215:175 (1990); Chothia ら、J.Mol.Biol. 227: 799 (1992) ）であると予想される。両方の残基が疎水性であるが、ヒトＰｈｅは、この位置でかさ高く（bulkier ）、この位置にＬｅｕおよびＰｈｅを有するＸ線構造は、Ｐｈｅが存在する場合、立体障害により３４Ａｓｎで側鎖が反対の方向を向くことを示している。従って、それは１Ｄ９κ軽鎖の首尾良いヒト化に重要であると考えられた。

【０２２７】

１Ｄ９ＲＫ$_B$ ヒト化バージョンに取り込まれた第２の変更は、残基３７、すなわち、Ｇｌｎ３７Ｌｅｕであった。これは、保存的変更であるが、ＣＤＲ１の基礎の高度に保存された領域に生じた。このバージョンにこのマウスＬｅｕ残基を保存することにより、３６位のマウスＬｅｕ残基のそばにヒト化抗体の親和性が保存されうる。

【０２２８】

ヒト化Ｖ$_K$ 領域の２つの他のバージョンをまた、ヒト化１Ｄ９抗体のＦＲを操作することの構造のおよび結合親和性の結果を探索するための構築物のために考慮した。１Ｄ９ＲＫ$_c$ は、変異Ｇｌｎ１００Ｇｌｙ以外は１Ｄ９ＲＫ$_B$ と本質的に同一であった。これらの２つの残基の間の分子かさ高さには劇的な差異があり、従って、このバージョンは、抗体構造および全体の抗体親和性における、作りなおしたヒトκ軽鎖のＦＲに対するこの変更の結果を探索するために作製した。１Ｄ９ＲＫ$_D$ は、１Ｄ９ＲＫ$_C$ に記載された変更を含み、さらに、ＦＲ変更Ｇｌｎ１７Ｈｉｓを含んでいた。ＧｌｎおよびＨｉｓは、類似したサイズであり、両方とも弱い極性であるが、この位置のマウス残基（Ｈｉｓ）は、全てのマウスＶ$_K$ 配列間で非常に稀であり（全体で０．０７％であるが、Ｋａｂａｔサブグループ ＩＩ配列では見られなかった）、いかなるヒトＶ$_K$ 配列でも見られなかった。逆に、Ｇｌｎ残基は、マウス（全体で１６．１６％、マウスＫａｂａｔサブグループＩＩ配列で６．１２％）およびヒト（全体で５．００％、ヒトＫａｂａｔサブグループＩＩ配列で３９．７％）配列の両方においてこの位置でより一般的に見られる。従って、この位置でＨｉｓが単純に稀なことは、結合に重要であり得るが、分子モデリングデータからはこのことを支持する明かな証拠はない。上記で提案された全てのヒト化１Ｄ９抗体Ｖ$_K$ 領域バリアントのアミノ酸配列の記載は、Ｆｉｇｕｒｅ１１に与えられている。

【０２２９】

ヒト化１Ｄ９Ｖ$_H$ 抗体バリアントの設計

再び、マウス１Ｄ９抗体のヒト化Ｖ$_H$ 領域の設計における第１の工程は、ヒト化１Ｄ９Ｖ$_H$ 領域の基礎として働きうるアクセプターヒト重鎖可変領域の選択であった。１Ｄ９Ｖ$_H$ 領域を最初に３つのヒト重鎖可変領域サブグループのコンセンサス配列と比較した場合、６９．２３１％の全体の同一性およびＦＲ単独間での７８．１６１％の同一性で、ヒト重鎖サブグループＩＩのコンセンサス配列と最も類似することを見出した。類似性に関して測定した場合、これらの値は、全体で７４．３５９％およびＦＲ単独内で８２．７５９％に上昇した。

【０２３０】

次いで、マウス１Ｄ９Ｖ$_H$ 領域を、公に入手可能なヒト可変領域の個々の配列の全ての記録された例と比較した。Ｆｉｇｕｒｅ１７Ａ～Ｂは、この解析を介して同定したマウス１Ｄ９Ｖ$_H$ 領域に対する２４個の最良の対応物を示す。全体で、検索アルゴリズムは、マウス１Ｄ９ＶＨ領域に対する最良の対応物として、抗体４Ｂ４’ＣＬ（Ｋａｂａｔデータベース ＩＤ番号０００４９０；Sanzら、Journal of Immunology. 142:883 (1993) ）由来のヒトＶ$_H$ 領域を選択した。このクローンのＶ$_H$ 領域は、１Ｄ９Ｖ$_H$ 領域に対して６７．２％の全体の同一性を有し、ＦＲ単独を比較した場合には８０．９５％に上昇した値を有した（Ｆｉｇｕｒｅ１８Ａ～Ｂ）。類似性に関して測定した場合、これらの値は全体で６９．６６％に、ＦＲ単独で８４．５２％に上昇した。従って、再び、潜在的なヒトアクセプターＶ$_H$ 配列に最も相同ではないが、このヒトＦＲは、１Ｄ９重鎖のヒト化バージョンの基礎になった。

【０２３１】

設計プロセスにおける次の工程は、これらのアミノ酸残基のいずれかが抗原への結合に不都合に影響しそうであるかどうかを決定するために、ヒトアクセプター４Ｂ４’ＣＬ Ｖ$_H$ 領域ＦＲのアミノ酸配列を研究することであった。再び、ＯＭＬによって構築した分子モデルは、この設計プロセスに重要であり、そこからマウス１Ｄ９Ｖ$_H$ 領域ＦＲの多数のアミノ酸を、ヒト化１Ｄ９抗体の第１（１Ｄ９ＲＨ$_A$ ）および引き続くバージョンにおける転換のために同定した（Ｆｉｇｕｒｅ１２およびＦｉｇｕｒｅ２０Ａ～Ｃ）。ドナーマウス１Ｄ９のＦＲとアクセプターヒト４Ｂ４’ＣＬＶ$_H$ 領域のＦＲとの間に１６アミノ酸

の差異があり、５個までのマウス残基がヒト化ＦＲにおける転換のために考慮された（Ｆｉｇｕｒｅ１２）。

【０２３２】

マウス１Ｄ９抗体V_H領域のＣＤＲからなる１Ｄ９ＲＨ$_A$を、ヒト４Ｂ４’ＣＬ抗体V_H領域のＦＲに遺伝的に挿入した。１Ｄ９ＲＨ$_B$は、２つのＦＲ１変異、Ｔｈｒ２８ＳｅｒおよびＡｓｎ３０Ｓｅｒは別として、バージョン１Ｄ９ＲＨ$_A$に同一であった。これらの変更は、それらがＨ１ループコンホメーションに重要であると考えられるFoote およびWinter（J.Mol.Biol.224:487 (1992)）により規定されるような補助アミノ酸を表すので作製した。残基２７～３０は、Ｈ１ループそれ自身の一部であると考えられ、それゆえ、このループのコンホメーションおよび配向を訂正するのにより重要であり、それらの保存をより強固に正当化する。従って、これらの２つの残基は、１Ｄ９ＲＨ$_B$におけるヒト４Ｂ４’ＣＬ　V_H配列のＦＲに作製した変更の和を示した。１Ｄ９ＲＨ$_C$は、それが２つのさらなる変更をＧｌｙ４９Ａ１ａおよびＰｈｅ６７Ｔｙｒに含むこと以外は、バージョン１Ｄ９ＲＨ$_B$に同一であった。Ｇｌｙ４９Ａｌａは保存的変更であった。しかし、４９位の残基は、Ｈ２超可変性ループ構造に重要な、補助残基（Foote およびWinter, J.Mol.Biol.224:487 (1992)）であると同定され、それゆえ、このバージョンにマウスＡｌａ残基を保存することを決めた。６７位の残基もまた、補助残基位置であり、ＣＤＲループコンホメーションを維持するのに重要であると同定した。ＴｙｒはヒトV_H配列において非常に稀にしか見られず（全体で０．０８％）、マウスV_H領域のこの位置では以前には見出されていなかった。結果的に、これは体細胞性変異を介して生じたはずである。従って、分子モデルに従ってＣＤＲ２に密接したその位置およびその補助残基状態を考慮して、この位置にマウスＴｙｒ残基を保存することを決めた。１Ｄ９ＲＨ$_D$は、Ｔｈｒ９３Ｖａｌ変異以外は１Ｄ９ＲＨ$_C$と同一であった。この残基は、V_H／V_K充填残基として重要であると同定されていた（Chothia ら、J.Mol.Biol. 186:651 (1985)）。さらに、分子モデルに従った、ＣＤＲループＨ１とＨ３との間に埋められたその位置は、この位置にマウスＴｙｒ残基を保存することを決めるのを支持した。上記の全てのヒト化V_H領域バリアントのアミノ酸配列の記載は、Ｆｉｇｕｒｅ１２に示されている。

【０２３３】

１Ｄ９のヒト化バージョンによるＭＣＰ－１結合の阻害

Ｆｉｇｕｒｅ２５は、マウスｍＡｂ　１Ｄ９、ならびに１Ｄ９ＲＨ$_A$ V_H重鎖（Ｆｉｇｕｒｅ１２）および１Ｄ９ＲＫ$_A$ V_K軽鎖（Ｆｉｇｕｒｅ１１）を含有するｍＡｂ　１Ｄ９のヒト化バージョンの、全ＴＨＰ－１細胞への［^{125}Ｉ］－ＭＣＰ－１の結合を阻害する能力を示す。０．５×１０^{6}個のＴＨＰ－１細胞を、５０ｍＭのＨＥＰＥＳ、１ｍＭの$CaCl_2$、５ｍＭの$MgCl_2$、０．１％のＢＳＡ、０．０５％のアジ化ナトリウム（結合緩衝液）中で抗体サンプルの種々の希釈物とともに３７℃で１０分間インキュベートした。等量の結合緩衝液中の［^{125}Ｉ］－ＭＣＰ－１を、０．１ｎＭの最終濃度で添加し、３７℃でさらに３０分間インキュベートした。細胞を希釈し、０．５ＭのＮａＣｌを有する等容量の結合緩衝液（洗浄緩衝液）とともにボルテックスし、遠心分離（ベンチトップ遠心分離、７０００ｒｐｍ、２分）によりペレット化した。上清の除去の後、ペレットを２００μＬの洗浄緩衝液中でボルテックスし、前記と同様に遠心分離し、上清を取り出した。細胞を、１００μＬの洗浄緩衝液に再懸濁させ、ガンマカウンター（Cobra, Packard Instruments）で計数した。データ解析をＧｒａｐｈｐａｄソフトウェアを用いて行った。

【０２３４】

本発明は、その好ましい態様に関して詳細に示され、記載されたが、形態および細部における種々の変更が、特許請求の範囲により包囲される発明の範囲を逸脱することなく行われ得ることを当業者は理解する。

【０２３５】

Applicant's or agent's file reference 1855.1052005	International application No.

INDICATIONS RELATING TO DEPOSITED MICROORGANISM OR OTHER BIOLOGICAL MATERIAL

(PCT Rule 13*bis*)

A. The indications made below relate to the deposited microorganism or other biological material referred to in the description on pages 22 and 50, lines 7-16; and 19-21, respectively

B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT — Further deposits are identified on an additional sheet ☐

Name of depositary institution

American Type Culture Collection

Address of depositary institution *(including postal code and country)*

10801 University Boulevard
Manassas, Virginia 20110-2209

Date of deposit	Accession Number
17 July 1998	HB-12549 and HB-12550*

C. ADDITIONAL INDICATIONS *(leave blank if not applicable)* — This information is continued on an additional sheet ☐

In respect of those designations for which a European patent is sought, the Applicant(s) hereby informs the International Bureau that the Applicant wishes that, until the publication of the mention of the grant of a European patent or for 20 years from the date of filing if the application is refused or withdrawn or deemed to be withdrawn, the biological material deposited with the American Type Culture Collection under Accession No. see above*

D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE *(if the indications are not for all designated States)*

E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS *(leave blank if not applicable)*

The indications listed below will be submitted to the International Bureau later *(specify the general nature of the indications e.g., "Accession Number of Deposit")*

For receiving Office use only	For International Bureau use only
☑ This sheet was received with the international application	☐ This sheet was received by the International Bureau on:
Authorized officer: [illegible] S. BROOKS SR INTERNATIONAL DIVISION 703-305-5169 MJB	Authorized officer

Form PCT/RO/134 (July1998)

【0236】

INDICATIONS RELATING TO A DEPOSITED MICROORGANISM
(Additional Sheet)

C. ADDITIONAL INDICATIONS (Continued)

shall be made available as provided in Rule 28(3) EPC only by the issue of a sample to an expert nominated by the requester (Rule 28(4) EPC).

In respect of the designation of Australia in the subject PCT application, and in accordance with Regulation 3.25(3) of the Australian Patents Regulations, the Applicant hereby gives notice that the furnishing of a sample of the biological material deposited with the American Type Culture Collection under Accession No. see PG 1* shall only be effected prior to the grant of a patent, or prior to the lapsing, refusal or withdrawal of the application, to a person who is a skilled addressee without an interest in the invention and who is nominated in a request for the furnishing of a sample.

In respect of the designation of Canada in the subject PCT application, the Applicant hereby informs the International Bureau that the Applicant wishes that, until either a Canadian patent has been issued on the basis of an application or the application has been refused, or is abandoned and no longer subject to reinstatement, or is withdrawn, the Commissioner of Patents only authorizes the furnishing of a sample of the biological material deposited with the American Type Culture Collection under Accession No. see PG 1* and referred to in the application to an independent expert nominated by the Commissioner.

【図面の簡単な説明】

【図１】　Ｆｉｇｕｒｅ　１Ａ～１Ｏは、ｍＡｂ　１Ｄ９および８Ｇ２が、ＣＣＲ２トランスフェクタントを染色するがＣＣＲ５若しくはＣＣＲ１トランスフェクタントを染色しないことを示す蛍光活性化細胞走査(FACS)ヒストグラムプロファイルである。Ｌ１／２(本明細書においては、Ｌ１．２ともいう)マウスプレＢリンパ腫宿主細胞を、示されたように、ＣＣＲ２、ＣＣＲ５およびＣＣＲ１でトランスフェクトし、異なるレセプター特異性を有する抗体で染色した。フローサイトメトリーにより染色を解析した。

【図２】　Ｆｉｇｕｒｅ　２Ａ～２Ｌは、ほとんどの単球、リンパ球の亜集団および顆粒球の小サブセットにおけるＣＣＲ２の発現を示すＦＡＣＳドットプロットである。全血球細胞を、３つの抗－ＣＣＲ２　ｍＡｂ(ＣＣＲ２アミノ末端の最初の３２アミノ酸からなるペプチドを免疫原として用いて生じさせた５Ａ１１、本明細書に記載されたように、ＣＣＲ２ｂ　Ｌ１／２細胞トランスフェクタントを免疫原として用いて生じさせた１Ｄ９および８Ｇ２）の１つで染色した。フローサイトメトリーにより染色を解析し、リンパ球、顆粒球および単球の集団を、前方および側方光散乱を用いて集めた(gate)。Ｘ軸は、前方光散乱(細胞サイズの尺度)を示し、Ｙ軸は、ＣＣＲ２の染色の蛍光強度を示す。陰性対照染色のレベルを線で示す。

【図３】　Ｆｉｇｕｒｅ　３Ａ～３Ｉは、ｍＡｂ　１Ｄ９が、ＩｇＥとＣＣＲ２とに対する２色染色を用いた末梢血(好塩基球)におけるＩｇＥ陽性集団を染色することを示すＦＡＣＳドットプロットである。全血液細胞を、第１に、示されたように、陰性対照抗体(抗－Ｆｌａｇ)、抗－ＣＣＲ２抗体１Ｄ９、または抗－ＣＸＣＲ１抗体のいずれかで染色し、抗－マウス－ＦＩＴＣコンジュゲートで検出した。第２染色は、示されたように、ＰＢＳまたはＩｇＥ若しくはＣＤ１６に特異的なビオチン化抗体のいずれかを用いて行ない、ストレプトアビジン－フィコエリトリンで検出した。フローサイトメトリーで染色を解析した。

【図４】　Ｆｉｇｕｒｅ　４は、ｍＡｂ　１Ｄ９が、ＴＨＰ－１細胞膜への[^{125}Ｉ]ＭＣ

Ｐ－１結合を阻害することを示す。３．０μｇのＴＨＰ－１膜タンパク質を、種々の濃度の１Ｄ９またはイソタイプ適合抗－ＣＸＣＲ３抗体１Ｃ６の存在下に０．１ｎＭ [^{125}Ｉ] ＭＣＰ－１とともにインキュベートした。結合したトレーサーの量をろ過およびシンチレーションカウンティングによる遊離物と結合物との分離により測定した。ＫａｌｅｉｄａＧｒａｐｈソフトウェアによる4-パラメーターロジスティック式を用いた非直線回帰によりデータを解析して、IC50値を決定した。

【図５】 Ｆｉｇｕｒｅ ５は、ｍＡｂ １Ｄ９が、新しいヒトＰＢＭＣへの[^{125}Ｉ] ＭＣＰ－１結合を阻害することを示す。新たに単離した末梢血単核細胞(５００，０００）を種々の濃度の１Ｄ９またはイソタイプ適合抗－ＣＸＣＲ３抗体１Ｃ６の存在下に０．１ｎＭ [^{125}Ｉ] ＭＣＰ－１とともにインキュベートした。結合したトレーサーの量をろ過およびシンチレーションカウンティングによる遊離物と結合物との分離により測定した。データをＦｉｇｕｒｅ ４と同様に解析してＩＣ$_{50}$値を決定した。

【図６】 Ｆｉｇｕｒｅ ６Ａおよび６Ｂは、ｍＡｂ １Ｄ９が、新しいＰＢＭＣのＭＣＰ－１－誘導された走化性を阻害するが、ＲＡＮＴＥＳ－誘導された走化性を阻害しないことを示すグラフである。Ｆｉｇｕｒｅ ６Ａは、抗体無しまたは０．１若しくは１０μｇ／ｍｌの１Ｄ９または非特異的マウスＩｇＧ2a を伴う１０ｎＭ ＭＣＰ－１に対するＰＢＭＣの走化性アッセイの結果を示す。自発性非特異的遊走も示す。Ｆｉｇｕｒｅ ６Ｂは、抗体無し、１０μｇ／ｍｌ １Ｄ９または１０μｇ／ｍｌ非特異的マウスＩｇＧ2aを伴う１０ｎＭ ＲＡＮＴＥＳに対するＰＢＭＣの走化性アッセイの結果を示す。ＲＡＮＴＥＳ非存在下での自発性非特異的遊走も示す。

【図７】 Ｆｉｇｕｒｅ ７は、マウス１Ｄ９抗体のκ軽鎖可変領域のアミノ酸配列(配列番号：９）を示す。ＣＤＲを太字で強調した。

【図８】 Ｆｉｇｕｒｅ ８は、マウス１Ｄ９抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列(配列番号：１０）を示す。ＣＤＲを太字で強調した。

【図９】 Ｆｉｇｕｒｅ ９は、マウス１Ｄ９ V_K 領域におけるＣＤＲの規準分類を示す。「チョツィア(Chothia) 規準分類」は、チョツィア(Chothia) および協力者達により定義された規準分類〔チョツィア(Chothia) およびレスク(Lesk), J. Mol. Biol. 197:901 (1987); チョツィア(Chothia) ら, Nature 34:877 (1989); トラモンターノ(Tramontano)ら, J. Mol. Biol. 215:175 (1990); 並びにチョツィア(Chothia) ら, J. Mol. Biol. 227:799 (1992)〕を用いた場合を示し、「マーチン(Martin)規準分類」は、マーチン(Martin)およびゾーントン(Thornton)により定義された規準分類〔マーチン(Martin)およびゾーントン(Thornton), J. Mol. Biol. 263:800 (1996)〕を用いた場合を示す。ＦＲ残基を太字で強調した。

【図１０】 Ｆｉｇｕｒｅ １０は、マウス１Ｄ９ V_H 領域におけるＣＤＲの規準分類を示す。「チョツィア(Chothia) 規準分類」は、チョツィア(Chothia) および協力者達により定義された規準分類〔チョツィア(Chothia) およびレスク(Lesk), J. Mol. Biol. 197:901 (1987); チョツィア(Chothia) ら, Nature 34:877 (1989); トラモンターノ(Tramontano)ら, J. Mol. Biol. 215:175 (1990); およびチョツィア(Chothia) ら, J. Mol. Biol. 227:799 (1992)〕を用いた場合を示し、「マーチン(Martin)規準分類」は、マーチン(Martin)およびゾーントン(Thornton)により定義された規準分類〔マーチン(Martin)およびゾーントン(Thornton), J. Mol. Biol. 263:800 (1996)〕を用いた場合を示す。ＦＲ残基を太字で強調した。

【図１１】 Ｆｉｇｕｒｅ １１は、種々のバージョンのヒト化１Ｄ９ V_K 領域のアミノ酸配列(それぞれ、配列番号：１２－１５および１０７）を示す。１Ｄ９ V_K 領域残基(配列番号：９）およびヒトＨＦ－２１／２８ V_K 領域 (配列番号：１１）配列が適合する場合、ドット[.] で示す。特定残基位置にアミノ酸が存在しない場合、ダッシュ[-] で示す。ＨＦ－２１／２８ ＦＲにおけるアミノ酸がヒト化１Ｄ９ V_K 領域で変化していない場合、太字で強調する。命名法[==L1==]の使用により、ＣＤＲを記載する。用いたナンバリングは、カバット(Kabat) ら, 免疫学的に重要なタンパク質の配列(Sequences of proteins of immunological interest), Fifth edition, U.S. Department of Healt

h and Human Services, U.S. Government Printing Office (1991)によるものである。
【図１２】　Ｆｉｇｕｒｅ　１２は、種々のバージョンのヒト化１Ｄ９　V_H 領域のアミノ酸配列(それぞれ、配列番号：１７－２０）を示す。１Ｄ９　V_H 領域残基（配列番号：１０）およびヒト４Ｂ４’ＣＬ　V_H 領域配列（配列番号：１６）が適合する場合、ドット[.] で示す。特定残基位置にアミノ酸が存在しない場合、ダッシュ[-] で示す。４Ｂ４’ＣＬにおけるアミノ酸が、ヒト化１Ｄ９　V_H 領域で変化しない場合、太字で強調する。ＣＤＲは、命名法 [==H1==] の使用により記載され、[-----] は、H1構造ループの部分を示す。用いたナンバリングは、カバット(Kabat) ら，免疫学的に重要なタンパク質の配列(Sequences of proteins of immunological interest), Fifth edition, U.S. Department of Health and Human Services, U.S. Government Printing Office (1991)によるものである。
【図１３】　Ｆｉｇｕｒｅ　１３は、マウス１Ｄ９　V_K 領域(配列番号：２１）の一部とマウス生殖系列V_K 遺伝子配列(それぞれ、配列番号：２２－３３）との比較を示す。「同一残基」は、マウス１Ｄ９　V_K 領域に対してマウス生殖系列VK領域における同一残基の数を示す。１Ｄ９　V_K 領域配列およびマウス生殖系列V_K 領域配列が適合する場合、ドット[.] で示す。特定残基位置にアミノ酸が存在しない場合、ダッシュ[-] で示す。
【図１４】　Ｆｉｇｕｒｅ　１４は、マウス１Ｄ９　V_H 領域（配列番号：３４）の一部とマウス生殖系列V_H 遺伝子配列(それぞれ、配列番号：３５－５３）との比較を示す。「同一残基」は、マウス１Ｄ９　V_H 領域に対してマウス生殖系列V_H 領域における同一残基の数を示す。１Ｄ９　V_H 領域配列およびマウスV_H 領域配列が適合する場合、ドット[.] で示す。特定残基位置にアミノ酸が存在しない場合、ダッシュ[-] で示す。
【図１５】　Ｆｉｇｕｒｅ　１５は、マウス１Ｄ９　V_K 領域(配列番号：９）と最も相同的な１７のヒトVKアミノ酸配列(それぞれ、配列番号：５４－７０）との比較を示す。「ＩＤ」は、マウス１Ｄ９　V_K 領域に対するヒトV_K 配列の同一性の割合を示す。１Ｄ９　V_K 領域残基およびヒトV_K 領域配列が適合する場合、ドット[.] で示す。特定残基位置にアミノ酸が存在しない場合、ダッシュ[-] で示す。「Ｓ」は、ＦＶ ドメインの表面におけるアミノ酸の位置を示す。「Ｃ」は、ＦＶ ドメインのコア内に局在する残基を示す。ＣＤＲの５Å以内の残基を、大文字を用いて規定し、さらに離れて局在する残基を小文字で記載する。ＣＤＲ自体は、命名法= = L1= = の使用により記載される。「ｖ」は、ＦＲに局在するベルニエ残基〔フーテ(Foote) およびウィンター(Winter), J. Mol. Biol. 224:487 (1992)〕を示す。下線を付したヒトV_K 領域配列におけるこれらの残基は、それらの最も近いヒトV_K 生殖系列遺伝子とは異なる。用いたナンバリングは、カバット(Kabat) ら，免疫学的に重要なタンパク質の配列(Sequences of proteins of immunological interest), Fifth edition, U.S. Department of Health and Human Services, U.S. Government Printing Office (1991)によるものである。
【図１６】　Ｆｉｇｕｒｅ　１６は、マウス１Ｄ９　V_K 領域と最も相同的な１７のヒトV_K アミノ酸配列との比較を示す。「ID」は、マウス１Ｄ９　V_K 領域に対するヒトV_K 配列の同一性割合を示す。「表面」は、表面における同一残基の数を示す。「コア」は、ＦＶ ドメインのコア内の同一残基の数を示す。「ＣＤＲ」は、ＣＤＲ内の同一残基の数を示す。「ＦＲ」は、ＦＲ内の同一残基の数を示す。「ＦＲ表面」は、表面に露出した同一残基を示す。「ＦＲコア」は、ＦＶ ドメインのコア内に局在する同一残基の数を示す。「ＣＤＲ近傍ＦＲ」は、ＣＤＲの５Å以内のＦＲアミノ酸における同一残基の数を示す。「ベルニエ」は、１４のベルニエアミノ酸〔フーテ(Foote) およびウィンター(Winter), J. Mol. Biol. 224:487 (1992)〕における同一残基の数を示す。「V_K 」は、V_K 遺伝子内の同一残基の数を示す。「Ｊ鎖」は、Ｊ鎖遺伝子内の同一残基の数を示す。「Ｌ１　Ｌｅｎ」～「Ｌ３　Ｌｅｎ」は、各ＣＤＲにおける残基の数を規定し、「Ｌ１クラス」～「Ｌ３クラス」は、マーチン(Martin)およびゾーントン(Thornton)によるＣＤＲの規準分類〔マーチン(Martin)およびゾーントン(Thornton), J. Mol. Biol. 263:800 (1996)〕を記載する。
【図１７】　Ｆｉｇｕｒｅ　１７Ａ－１７Ｂは、マウス１Ｄ９　V_H 領域（配列番号：１

０）と最も相同的な２４のヒトV_Hアミノ酸配列(それぞれ、配列番号：７１－９４）との比較を示す。「ＩＤ」は、マウス１Ｄ９　V_H領域に対するヒトV_H配列の同一性割合を示す。１Ｄ９　V_H領域残基およびヒトV_H領域配列が適合する場合、ドット[.]で示す。特定残基位置にアミノ酸が存在しない場合、ダッシュ[-]で示す。「Ｓ」は、ＦＶドメインの表面におけるアミノ酸の位置を示す。「Ｃ」は、ＦＶドメインのコア内に局在する残基を示す。ＣＤＲの５Å以内の残基を、大文字を用いて規定し、さらに離れて局在する残基を小文字で記載する。ＣＤＲ自体は、命名法= = Hl = =の使用により記載される。「ｖ」は、ＦＲに局在するベルニエ残基〔フーテ(Foote) およびウィンター(Winter), J. Mol. Biol. 224:487 (1992)〕を示す。下線を付したヒトV_H領域配列におけるこれらの残基は、それらの最も近いヒトV_H生殖系列遺伝子とは異なる。用いたナンバリングは、カバット(Kabat) ら, 免疫学的に重要なタンパク質の配列(Sequences of proteins of immunological interest), Fifth edition, U.S. Department of Health and Human Services, U.S. Government Printing Office (1991)によるものである。

【図１８】　Ｆｉｇｕｒｅ　１８Ａ－１８Ｂは、マウス１Ｄ９　V_H領域と最も相同的な24のヒトVHアミノ酸配列との比較を示す。「ＩＤ」は、マウスｌＤ９　V_H領域に対するヒトV_H配列の同一性割合を示す。「全」は、マウス１Ｄ９　V_H領域の全体に比べた場合のヒトV_H領域の全体における同一残基の数を示す。「表面」は、表面における同一残基の数を示す。「コア」は、ＦＶドメインのコア内の同一残基の数を示す。「ＣＤＲ」は、ＣＤＲ(CDRs)内の同一残基の数を示す。「ＦＲ」は、ＦＲ（Frs ）内の同一残基の数を示す。「ＦＲ表面」は、表面に露出した同一残基を示す。「ＦＲコア」は、ＦＶドメインのコア内に局在する同一残基の数を示す。「ＣＤＲ近傍ＦＲ」は、ＣＤＲの５Å以内のＦＲアミノ酸における同一残基の数を示す。「ベルニエ」は、１４のベルニエアミノ酸〔フーテ(Foote) およびウィンター(Winter), J. Mol. Biol. 224:487 (1992)〕における同一残基の数を示す。「V_H」は、V_H遺伝子内の同一残基の数を示す。「Ｊ鎖」は、Ｊ鎖遺伝子内の同一残基の数を示す。「H １サイズ」および「H ２サイズ」は、各ＣＤＲにおける残基の数を規定し、「Ｈ１クラス」および「Ｈ２クラス」は、マーチン(Martin)およびゾーントン(Thornton)によるＣＤＲの規準分類〔J. Mol. Biol. 263:800 (1996)〕を記載する。

【図１９】　Ｆｉｇｕｒｅ　１９Ａ－１９Ｃは、第１の(１Ｄ９ＲＫ$_A$）および第２の(１Ｄ９ＲＫ$_B$）ヒト化バージョンの１Ｄ９抗体κ軽鎖可変領域のデザインを導くアミノ酸配列のアラインメントを示す。カラム7 の特定の残基位置のマウス１Ｄ９と同一のアミノ酸を示さない;「- 」は、この残基の位置にアミノ酸がないことを示す。太字は、ヒトアミノ酸残基が対応するマウス残基に置換された場合のＦＲおよびＣＤＲにおける位置を示す。「Δ」は、１Ｄ９ＲＫ$_A$のヒトＦＲにおける変化のナンバリングを示す。「マウス１Ｄ９　V_K」は、マウス１Ｄ９κ軽鎖可変領域のV_K領域のアミノ酸配列を示す。「マウスκ－ＩＩ」は、カバットサブグループκ－ＩＩのマウスVK領域のコンセンサス配列を示す。「ヒトκ－ＩＩ」は、カバットサブグループκ－ＩＩのヒトV_K領域のコンセンサス配列を示す。「ＨＦ－２１／２８」は、ヒトＨＦ－２１／２８抗体〔チャスタナー(Chastagner)ら, Gene 101(2):305-6 (1991)〕の軽鎖可変領域のアミノ酸配列を示す。丸括弧内の数 (005056) は、カバットデータベースＩＤ番号である。「表面またはコア」は、抗体可変領域の両方の鎖における残りの残基に対するアミノ酸の位置を示す。ＣＤＲの５Å以内の残基は、大文字を用いて規定する。「１Ｄ９ＲＫ$_A$」は、第１のバージョンのヒト化１Ｄ９　V_K領域のアミノ酸配列を示す。「１Ｄ９ＲＫ$_B$」は、第２のバージョンのヒト化１Ｄ９　V_K領域のアミノ酸配列を示す。

【図２０】　Ｆｉｇｕｒｅ　２０Ａ－２０Ｃは、第１の(１Ｄ９ＲＨ$_A$）および第２の(１Ｄ９ＲＨ$_B$）ヒト化バージョンの１Ｄ９抗体κ軽鎖可変領域のデザインを導くアミノ酸配列のアラインメントを示す。カラム7 の特定の残基位置のマウス１Ｄ９と同一のアミノ酸を示さない;「- 」は、この残基の位置にアミノ酸がないことを示す。太字は、ヒトアミノ酸残基が対応するマウス残基に置換された場合のＦＲおよびＣＤＲにおける位置を示す。「Δ」は、１Ｄ９ＲＨ$_A$のヒトＦＲにおける変化のナンバリングを示す。「マウス１

Ｄ９　V_H 」は、マウス１Ｄ９重鎖可変領域のV_H 領域のアミノ酸配列を示す。「マウスＩＩＩｃ」は、カバットサブグループＩＩＩｃのマウスV_H 領域のコンセンサス配列を示す。「ヒトＩＩＩ」は、カバットサブグループＩＩＩのヒトV_H 領域のコンセンサス配列を示す。「４Ｂ４’ＣＬ」は、ヒト４Ｂ４’ＣＬ抗体〔サンズ(Sanz)ら，Journal of Immunology 142:883 (1989)〕の重鎖可変領域のアミノ酸配列を示す。丸括弧内の数(000490)は、カバットデータベースＩＤ番号を示す。「表面またはコア」は、抗体可変領域の両方の鎖における残りの残基に対するアミノ酸の位置を示す。ＣＤＲの５Å以内の残基は、大文字を用いて規定する。「１Ｄ９RH_A 」は、第１のバージョンのヒト化１Ｄ９　VH領域のアミノ酸配列を示す。「１Ｄ９RH_B 」は、第２のバージョンのヒト化１Ｄ９　V_H 領域のアミノ酸配列を示す。

【図２１】　Ｆｉｇｕｒｅ　２１は、マウス抗体１Ｄ９重鎖可変領域の塩基配列、相補配列およびコードされたアミノ酸配列を示す。リーダー配列および定常領域の一部も示す。記載された塩基配列は、配列番号：９６、相補配列は、配列番号：９９、アミノ酸配列は、配列番号：１００である。

【図２２】　Ｆｉｇｕｒｅ　２２は、マウス抗体１Ｄ９κ軽鎖可変領域の塩基配列、相補配列およびコードされたアミノ酸配列を示す。リーダー配列および定常領域の一部も示す。記載された塩基配列は、配列番号：９５、相補配列は、配列番号：１０１、アミノ酸配列は、配列番号：１０２である。

【図２３】　Ｆｉｇｕｒｅ　２３は、ヒト化重鎖１Ｄ９RH_A の塩基配列を示す。示された酵素部位をベクターｐＬＫＴＯＫ４１へのクローニングのために付加した。また、ベクターは、ヒトのリーダー配列および定常領域を有する。記載された塩基配列は、配列番号：９７、相補配列は、配列番号：１０３、アミノ酸配列は、配列番号：１０４である。

【図２４】　Ｆｉｇｕｒｅ　２４は、ヒト化軽鎖１Ｄ９RK_A の塩基配列を示す。示された酵素部位をベクターｐＬＫＴＯＫ４１へのクローニングのために付加した。また、ベクターは、ヒトのリーダー配列および定常領域を有する。角型括弧を付けたＹは、ｐＬＫＴＯＫ４１のＥｃｏＲＶクローニング部位にクローン化した場合にアスパラギン酸に変化する残基を示す。記載された塩基配列は、配列番号：９８、相補配列は、配列番号：１０５、アミノ酸配列は、配列番号：１０６である。

【図２５】　Ｆｉｇｕｒｅ　２５は、マウスｍＡｂ　１Ｄ９とヒト化バージョンのｍＡｂ　１Ｄ９(１Ｄ９RH_A V_H の重鎖、１Ｄ９RK_A V_K の軽鎖)とにおける[^{125}Ｉ]－ＭＣＰ－１と全ＴＨＰ－１細胞との結合を阻害する能力の比較を示す。マウス１Ｄ９(mus-１Ｄ９)のデータポイントを、黒三角で示す。ヒト化バージョンの１Ｄ９(hum-１Ｄ９)のデータポイントを黒四角で示す。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Millennium Pharmaceuticals, Inc.
LaRosa, Gregory J.
Horvath, Christopher
Newman, Walter
Jones, S. Tarran
O'Brien, Siobhan H.
O'Keefe, Theresa

<120> HUMANIZED ANTI-CCR2 ANTIBODIES AND METHODS OF USE THEREFOR

<130> 1855.1052005

<150> 09/497,625
<151> 2000-02-03

<150> 09/359,193
<151> 1999-07-22

<150> 09/121,781
<151> 1998-07-23

<160> 107

<170> FastSEQ for Windows Version 3.0

<210> 1
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer sequence

<400> 1
tgagacaagc cacaagctga ac 22

<210> 2
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer sequence

<400> 2
tctgtattag tacacacagc cc 22

<210> 3
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer sequence

<400> 3
atgctgtcca catctcgttc tcgg 24

<210> 4
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer sequence

<400> 4
ttataaacca gccgagactt cctgctc 27

<210> 5
<211> 24
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CD5 signal peptide leader sequence

<400> 5
Met Pro Met Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Thr Leu Tyr Leu Leu Gly
1 5 10 15
Met Leu Val Ala Ser Val Leu Ala
20

<210> 6
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 6
ggggatccag aaaccatgcc catggggtct ctgcaaccgc tggccacctt gtacctgctg 60

<210> 7
<211> 65
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 7
gccaccttgt acctgctggg gatgctggtc gcttccgtgc tagcgatgct gtccacatct 60
cgttc 65

<210> 8
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 8
gacgaccagc atgttgcc 18

<210> 9
<211> 112
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 9
Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Val Gly
1 5 10 15
His Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
20 25 30
Asp Gly Lys Thr Phe Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95
Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 10
<211> 117
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 10
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly
1 5 10 15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Asn Ala Tyr
20 25 30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Arg Ile Arg Thr Lys Asn Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60
Ser Val Lys Asp Arg Tyr Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Glu Ser Met
65 70 75 80
Leu Phe Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr
85 90 95
Tyr Cys Val Thr Phe Tyr Gly Asn Gly Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 11
<211> 111
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 11

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

<210> 12
<211> 112
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized sequence

<400> 12

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

<210> 13
<211> 112
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized sequence

<400> 13

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

```
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65                  70                  75                  80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
                85                  90                  95
Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
            100                 105                 110
```

<210> 14
<211> 112
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized sequence

<400> 14

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

<210> 15
<211> 112
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized sequence

<400> 15

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

<210> 16
<211> 119

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
20 25 30
Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Gly Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala
50 55 60
Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95
Tyr Cys Thr Thr Asp Ser Leu Pro Pro His Arg Val Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 17
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized sequence

<400> 17
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ala Tyr
20 25 30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Gly Arg Ile Arg Thr Lys Asn Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60
Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95
Tyr Cys Thr Thr Phe Tyr Gly Asn Gly Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 18
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized sequence

<400> 18

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

<210> 19
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized sequence

<400> 19

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

<210> 20
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized sequence

<400> 20

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1               5                  10                  15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Asn Ala Tyr
            20                  25                  30
```

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

<210> 21
<211> 100
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 21

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

<210> 22
<211> 100
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 22

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

<210> 23
<211> 100

<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 23
Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly
1 5 10 15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
20 25 30
Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Val Gln Gly
85 90 95
Thr His Phe Pro
100

<210> 24
<211> 100
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> VARIANT
<222> (1)...(100)
<223> Xaa = Any Amino Acid

<400> 24
Asp Val Val Met Thr Gln Xaa Leu His Ser Leu Ser Val Thr Ile Gly
1 5 10 15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
20 25 30
Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Val Gln Pro
35 40 45
Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Tyr Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Xaa Pro Glu Asp Leu Gly Val Tyr Xaa Cys Met Gln Asp
85 90 95
Thr His Phe Pro
100

<210> 25
<211> 100
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 25
Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

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

<210> 26
<211> 100
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 26

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

<210> 27
<211> 100
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 27

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

<210> 28
<211> 100
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 28

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

<210> 29
<211> 100
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 29

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

<210> 30
<211> 100
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 30

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

<210> 31
<211> 100
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 31
Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Phe Ser Asn Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15
Thr Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30
Ser Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Tyr Ile Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly
85 90 95
Leu Glu Tyr Pro
100

<210> 32
<211> 100
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 32
Asp Ile Val Ile Thr Gln Asp Glu Leu Ser Asn Pro Val Thr Ser Gly
1 5 10 15
Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Tyr Lys
20 25 30
Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Met Ser Thr Arg Ala Ser Gly Val Ser
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Glu Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Lys Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Leu
85 90 95
Val Glu Tyr Pro
100

<210> 33
<211> 100
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 33
Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Phe Ser Asn Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15
Thr Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30
Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

      <210> 34
      <211> 101
      <212> PRT
      <213> Mus musculus

      <400> 34
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly
 1               5                  10                  15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Asn Ala Tyr
            20                  25                  30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45
Ala Arg Ile Arg Thr Lys Asn Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
    50                  55                  60
Ser Val Lys Asp Arg Tyr Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Glu Ser Met
65                  70                  75                  80
Leu Phe Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr
                85                  90                  95
Tyr Cys Val Thr Phe
            100

      <210> 35
      <211> 100
      <212> PRT
      <213> Mus musculus

      <400> 35
Glu Val Gln Leu Val Glu Val Trp Trp Arg Met Val Gln Pro Lys Gly
 1               5                  10                  15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
            20                  25                  30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45
Ala Arg Ile Arg Ser Lys Ser Ser Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
    50                  55                  60
Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Met
65                  70                  75                  80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr
                85                  90                  95
Tyr Cys Val Ile
            100

      <210> 36
      <211> 100
      <212> PRT
      <213> Mus musculus

      <400> 36
Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1               5                  10                  15
```

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

<210> 37
<211> 100
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 37

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

<210> 38
<211> 98
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 38

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

<210> 39
<211> 98

<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 39

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

<210> 40
<211> 98
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> VARIANT
<222> (1)...(98)
<223> Xaa = Any Amino Acid

<400> 40

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

<210> 41
<211> 98
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 41

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

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

<210> 42
<211> 101
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 42

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

<210> 43
<211> 100
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 43

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

<210> 44
<211> 98
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 44

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

<210> 45
<211> 98
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 45

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

<210> 46
<211> 101
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 46

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

<210> 47
<211> 98
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 47
Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Arg Tyr
20 25 30
Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Glu Ile Asn Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Thr Pro Ser Leu
50 55 60
Lys Asp Lys Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Ser Lys Val Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg

<210> 48
<211> 89
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 48
Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser
1 5 10 15
Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro
20 25 30
Asp Lys Arg Leu Glu Leu Val Ala Thr Ile Asn Ser Asn Gly Gly Ser
35 40 45
Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
50 55 60
Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu
65 70 75 80
Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg
85

<210> 49
<211> 89
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 49
Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser
1 5 10 15
Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro
20 25 30
Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr
35 40 45
Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
50 55 60
Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu
65 70 75 80

```
Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg
                85

      <210> 50
      <211> 89
      <212> PRT
      <213> Mus musculus

      <400> 50
Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Arg Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 1               5                  10                  15
Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro
            20                  25                  30
Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr
        35                  40                  45
Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
    50                  55                  60
Asn Pro Lys Asn Thr Leu Phe Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu
65                  70                  75                  80
Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg
                85

      <210> 51
      <211> 88
      <212> PRT
      <213> Mus musculus

      <400> 51
Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 1               5                  10                  15
Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro
            20                  25                  30
Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val Ala Ser Ile Ser Ser Gly Gly Ser Thr
        35                  40                  45
Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
    50                  55                  60
Ala Arg Asn Ile Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp
65                  70                  75                  80
Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg
                85

      <210> 52
      <211> 98
      <212> PRT
      <213> Mus musculus

      <400> 52
Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1               5                  10                  15
Ser Leu Asn Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Arg Tyr
            20                  25                  30
Trp Met Ser Trp Ala Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Gln Glu Trp Ile
        35                  40                  45
Gly Glu Ile Asn Pro Gly Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Thr Pro Ser Leu
    50                  55                  60
Lys Asp Lys Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80
```

```
Leu Gln Met Ser Lys Val Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95
Ala Arg
```

<210> 53
<211> 87
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 53

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

<210> 54
<211> 112
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 54

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

<210> 55
<211> 112
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 55

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

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

<210> 56
<211> 112
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 56

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

<210> 57
<211> 112
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 57

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

<210> 58
<211> 112
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 58

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


<210> 59
<211> 111
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 59

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


<210> 60
<211> 112
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 60

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

<210> 61
<211> 112
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 61
Asp Val Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Leu Gly
1 5 10 15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Thr Gln Ile Leu Val Phe Ser
20 25 30
Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Thr Pro Gly His Ser
35 40 45
Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly
85 90 95
Thr His Trp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 62
<211> 112
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 62
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Phe Ser
20 25 30
Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Met Gln Gly
85 90 95
Ala His Trp Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Thr
100 105 110

<210> 63
<211> 113
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 63
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30
Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

```
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65                  70                  75                  80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Leu Tyr Tyr Cys Met Gln His
                85                  90                  95
Thr His Trp Ser Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile
            100                 105                 110
Lys
```

<210> 64
<211> 113
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 64

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

<210> 65
<211> 113
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 65

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

<210> 66
<211> 112

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 66

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

<210> 67
<211> 112
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 67

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

<210> 68
<211> 113
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 68

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

```
Ile Ser Arg Val Gln Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln
                85                  90                  95
Arg Leu Glu Ile Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
            100                 105                 110
Arg
```

<210> 69
<211> 112
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 69

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

<210> 70
<211> 112
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 70

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

<210> 71
<211> 127
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 71

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1               5                  10                  15
```

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

<210> 72
<211> 126
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 72

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

<210> 73
<211> 126
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 73

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

```
Tyr Cys Ala Arg Ala Glu Thr Asp Arg Gly Tyr Tyr Tyr Tyr His Gly
            100                 105                 110
Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125

      <210> 74
      <211> 126
      <212> PRT
      <213> Homo sapiens

      <400> 74
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1               5                  10                  15
Ser Leu Lys Val Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser
            20                  25                  30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45
Gly Arg Ile Arg Ser Lys Ala Asn Ser Tyr Ala Thr Ala Tyr Ala Ala
    50                  55                  60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65                  70                  75                  80
Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
                85                  90                  95
Tyr Cys Thr Arg Trp Val Leu Gly Arg Gly Ser Glu Gly His Tyr Tyr
            100                 105                 110
Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125

      <210> 75
      <211> 115
      <212> PRT
      <213> Homo sapiens

      <400> 75
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1               5                  10                  15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser
            20                  25                  30
Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45
Gly His Ile Arg Asn Lys Pro Asn Asn Tyr Ala Thr Ala Tyr Ala Ala
    50                  55                  60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65                  70                  75                  80
Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
                85                  90                  95
Tyr Cys Ala Ser Gly Ser Tyr Leu Lys Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
            100                 105                 110
Val Ser Ser
        115

      <210> 76
      <211> 125
      <212> PRT
      <213> Homo sapiens

      <400> 76
```

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

<210> 77
<211> 128
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (1)...(128)
<223> Xaa = Any Amino Acid

<400> 77

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

<210> 78
<211> 128
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (1)...(128)
<223> Xaa = Any Amino Acid

<400> 78

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

<210> 79
<211> 128
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (1)...(128)
<223> Xaa = Any Amino Acid

<400> 79

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

<210> 80
<211> 116
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 80

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

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

<210> 81
<211> 124
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 81

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

<210> 82
<211> 123
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 82

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

<210> 83
<211> 117
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 83
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Thr Thr Tyr Tyr Gly Asp Gly Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Met
100 105 110
Ile Thr Val Ser Ser
115

<210> 84
<211> 125
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 84
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Ala Val Val Arg Gly Val Ile Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met
100 105 110
Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 85
<211> 120
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 85
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

      <210> 86
      <211> 128
      <212> PRT
      <213> Homo sapiens

      <400> 86
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1               5                  10                  15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Thr Gly
            20                  25                  30
Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45
Gly Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Ile Asp Tyr Ala Glu
    50                  55                  60
Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65                  70                  75                  80
Leu Phe Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
                85                  90                  95
Tyr Cys Thr Thr Ala Leu Thr Arg Tyr Phe Phe Asp Ser Ser Gly Tyr
            100                 105                 110
Pro His Phe Asp His Trp Gly His Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125

      <210> 87
      <211> 127
      <212> PRT
      <213> Homo sapiens

      <400> 87
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1               5                  10                  15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
            20                  25                  30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95
Ala Lys Asp Arg Thr Pro Arg Asn Ile Val Ala Thr Lys Gly Met Asp
            100                 105                 110
```

Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 88
<211> 119
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 88
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
20 25 30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Thr His Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 89
<211> 124
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 89
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val His Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Trp Gly Leu Arg Gly Glu Glu Gly Asp Tyr Tyr Met Asp
100 105 110
Val Trp Gly Lys Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 90
<211> 124
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 90
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

<210> 91
<211> 123
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 91

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

<210> 92
<211> 121
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 92

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

```
Ala Lys Asp Ile Ser Trp Gly Asp Leu Glu Gly Leu Asp Tyr Trp Gly
            100                 105                 110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120

      <210> 93
      <211> 119
      <212> PRT
      <213> Homo sapiens

      <400> 93
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1               5                  10                  15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
            20                  25                  30
Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45
Gly Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala
    50                  55                  60
Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65                  70                  75                  80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
                85                  90                  95
Tyr Cys Thr Thr Asp Ser Leu Pro Pro His Arg Val Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115

      <210> 94
      <211> 123
      <212> PRT
      <213> Homo sapiens

      <400> 94
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1               5                  10                  15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
            20                  25                  30
Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45
Gly Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala
    50                  55                  60
Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65                  70                  75                  80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
                85                  90                  95
Tyr Cys Thr Thr Ser Ile Pro Gly Ile Ala Val Ala Gly Thr Asp Tyr
            100                 105                 110
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120

      <210> 95
      <211> 426
      <212> DNA
      <213> Mus musculus

      <400> 95
```

atgaagttgc ctgttaggct gttggtgctc tggattcggg agacaatcgg cgatgttgtg 60
atgacccaga ctccactcac tttgtcggtt accgttggac acccagcctc catctcttgc 120
aagtcaagtc agagcctctt agatagtgat ggaaagacat ttttgaattg gttgttacag 180
aggccaggcc agtctccaaa gcgcctaatc tatctggtgt ctaaactgga ctctggagtc 240
cctgacaggt tcactggcag tggatcaggg acagatttca cactgaaaat cagcagagtg 300
gaggctgagg atttgggagt ttattattgc tggcaaggta cacattttcc gtacacgttc 360
ggagggggga ccaagctgga aataaaacgg gctgatgctg caccaactgt atccatcttc 420
ccacca 426

<210> 96
<211> 443
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 96
atggacttcg ggttaaactt ggttttcttt gttgtttttt atcaaggtgt gcattgtgag 60
gtgcagcttg ttgagtctgg aggaggattg gtgcagccta aagggtcatt gaaactctca 120
tgtgcagcct ctggattcag cttcaatgcc tacgccatga actgggtccg ccaggctcca 180
ggaaagggtt tggaatgggt tgctcgcata agaactaaaa ataataatta tgcaacatat 240
tatgccgatt cagtgaaaga cagatacacc atctccagag atgattcaga aagtatgctc 300
tttctgcaaa tgaacaactt gaaaactgag gacacagcca tgtattactg tgtgaccttt 360
tacggtaacg gtgtctgggg cacagggacc acggtcaccg tctcctcagc caaaacaaca 420
gccccatccg tctatccect ggt 443

<210> 97
<211> 357
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized heavy chain

<400> 97
gaggtgcaat tggttgagtc tggaggagga ttggtgaagc ctggggggtc attgagactc 60
tcatgtgcag cctctggatt cactttcagt gcctacgcca tgaactgggt ccgccaggct 120
ccaggaaagg gtttggaatg ggttggccgc ataagaacta aaaataataa ttatgcaaca 180
tattatgccg attcagtgaa agacagattc accatctcca gagatgattc aaaaaacacg 240
ctctatctgc aaatgaacag cttgaaaact gaggacacag ccgtgtatta ctgtaccacc 300
ttttacggta acggtgtctg gggccagggg accctggtca ccgtcagctc agccaaa 357

<210> 98
<211> 344
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized light chain

<400> 98
ctacgtagtg atgacccagt ctccactctc cttgcccgtt acccttggac agccagcctc 60
catctcttgc aagtcaagtc agagcctctt agatagtgat ggaaagacat ttttgaattg 120
gtttcagcag aggccaggcc agtctccaag gcgcctaatc tatctggtgt ctaaactgga 180
ctctggagtc cctgacaggt tcagcggcag tggatcaggg acagatttca cactgaaaat 240
cagcagagtg gaggctgagg atgttggagt ttattattgc tggcaaggta cacattttcc 300
gtacacgttc ggacaaggga cccgactgga aataaaacgt acgg 344

<210> 99

<211> 443
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 99
accaggggat agacggatgg ggctgttgtt ttggctgagg agacggtgac cgtggtccct 60
gtgccccaga caccgttacc gtaaaaggtc acacagtaat acatggctgt gtcctcagtt 120
ttcaagttgt tcatttgcag aaagagcata ctttctgaat catctctgga gatggtgtat 180
ctgtctttca ctgaatcggc ataatatgtt gcataattat tatttttagt tcttatgcga 240
gcaacccatt ccaaaccctt tcctggagcc tggcggaccc agttcatggc gtaggcattg 300
aagctgaatc cagaggctgc acatgagagt ttcaatgacc ctttaggctg caccaatcct 360
cctccagact caacaagctg cacctcacaa tgcacacctt gataaaaaac aacaaagaaa 420
accaagttta acccgaagtc cat 443

<210> 100
<211> 148
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 100
Met Asp Phe Gly Leu Asn Leu Val Phe Phe Val Val Phe Tyr Gln Gly
1 5 10 15
Val His Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30
Pro Lys Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe
35 40 45
Asn Ala Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60
Glu Trp Val Ala Arg Ile Arg Thr Lys Asn Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr
65 70 75 80
Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Tyr Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser
85 90 95
Glu Ser Met Leu Phe Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr
100 105 110
Ala Met Tyr Tyr Cys Val Thr Phe Tyr Gly Asn Gly Val Trp Gly Thr
115 120 125
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val
130 135 140
Tyr Pro Leu Val
145

<210> 101
<211> 426
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 101
tggtgggaag atggatacag ttggtgcagc atcagcccgt tttatttcca gcttggtccc 60
ccctccgaac gtgtacggaa aatgtgtacc ttgccagcaa taataaactc ccaaatcctc 120
agcctccact ctgctgattt tcagtgtgaa atctgtccct gatccactgc cagtgaacct 180
gtcagggact ccagagtcca gtttagacac cagatagatt aggcgctttg gagactggcc 240
tggcctctgt aacaaccaat tcaaaaatgt ctttccatca ctatctaaga ggctctgact 300
tgacttgcaa gagatggagg ctgggtgtcc aacggtaacc gacaaagtga gtggagtctg 360
ggtcatcaca acatcgccga ttgtctcccg aatccagagc accaacagcc taacaggcaa 420
cttcat 426

<210> 102

<211> 142
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 102

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

<210> 103
<211> 357
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized heavy chain

<400> 103

```
tttggctgag ctgacggtga ccagggtccc ctggccccag acaccgttac cgtaaaaggt      60
ggtacagtaa tacacggctg tgtcctcagt tttcaagctg ttcatttgca gatagagcgt     120
gttttttgaa tcatctctgg agatggtgaa tctgtctttc actgaatcgg cataatatgt     180
tgcataatta ttatttttag ttcttatgcg gccaacccat tccaaaccct ttcctggagc     240
ctggcggacc cagttcatgg cgtaggcact gaaagtgaat ccagaggctg cacatgagag     300
tctcaatgac cccccaggct tcaccaatcc tcctccagac tcaaccaatt gcacctc        357
```

<210> 104
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized heavy chain

<400> 104

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

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

<210> 105
<211> 344
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized light chain

<400> 105

```
ccgtacgttt tatttccagt cgggtccctt gtccgaacgt gtacggaaaa tgtgtacctt      60
gccagcaata ataaactcca acatcctcag cctccactct gctgattttc agtgtgaaat     120
ctgtccctga tccactgccg ctgaacctgt cagggactcc agagtccagt ttagacacca     180
gatagattag gcgccttgga gactggcctg gcctctgctg aaaccaattc aaaaatgtct     240
ttccatcact atctaagagg ctctgacttg acttgcaaga gatggaggct ggctgtccaa     300
gggtaacggg caaggagagt ggagactggg tcatcactac gtag                      344
```

<210> 106
<211> 114
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized light chain

<400> 106

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

<210> 107
<211> 112
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized sequence

<400> 107

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

【図１】

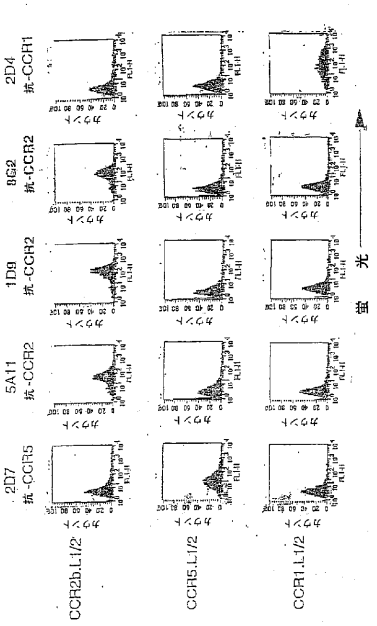


FIG. 1

【図２】

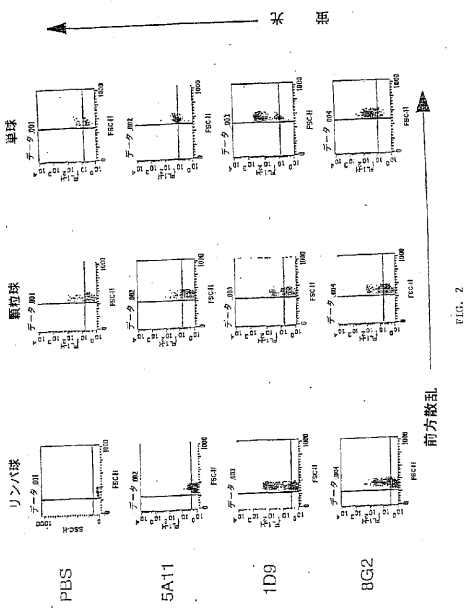


FIG. 2

【図３】

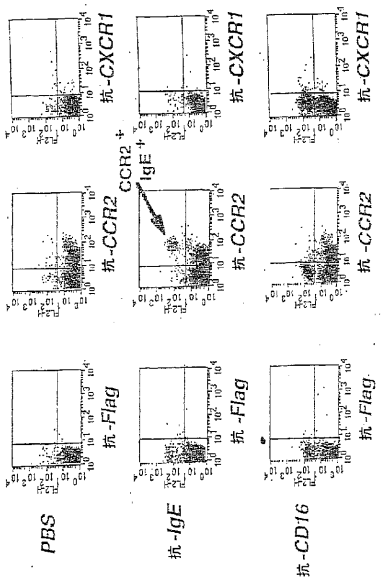


FIG. 3

【図４】

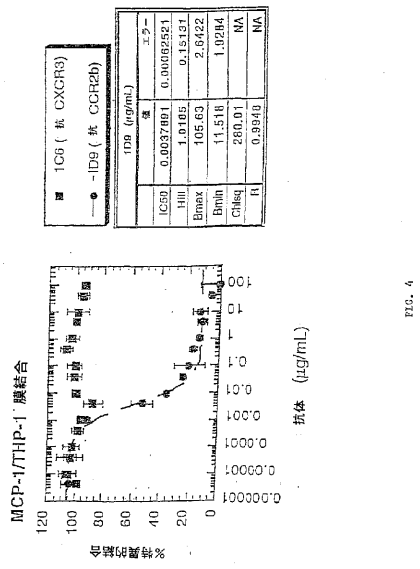


FIG. 4

【図５】

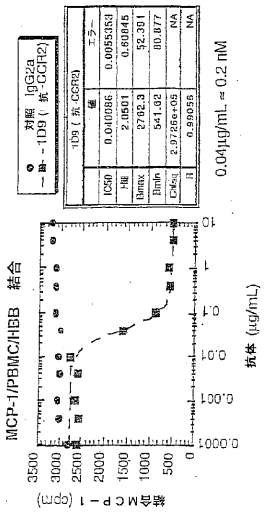


FIG. 5

【図６】

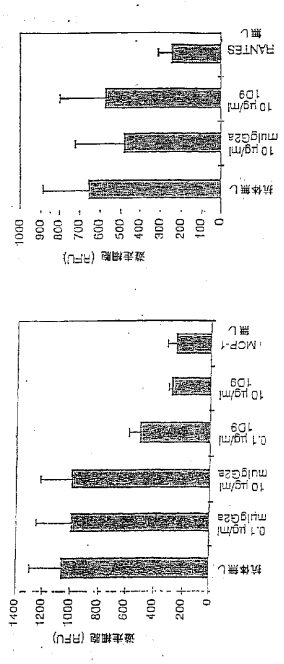


FIG. 6B

FIG. 6A

【図７】

```
  1  DVVMTQTPLT LSVTVGHPAS ISCKSSQSLL DSDGKTFLNW LLQRPGQSPK
 51  RLIYLVSKLD SGVPDRFTGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCWQGTHFP
101  YTFGGGTKLE IK
```

FIG. 7

【図８】

```
  1  EVQLVESGGG LVQPKGSLKL SCAASGFSFN AYAMNWVRQA PGKGLEWVAR
 51  IRTKNNNYAT YYADSVKDRF TISRDDSQSM LFLQMNNLKT EDTAMYYCVT
101  FYGNGVWGTG TTVTVSS
```

FIG. 8

【図９】

チョツィア（Chothia）規準分類

L1 (16 アミノ酸) = クラス 4
重要残基: **2(V)**, 25(SA), 29(L), 33(L), **71(F)**

L2 (7 アミノ酸) = クラス 1
重要残基: **48(IV)**, 51(AT), 52(ST), **64(G)**

L3 (9 アミノ酸) = クラス 1
重要残基: 90(QNH), 95(P)

マーチン（Martin）規準分類

L1 (16 アミノ酸) = クラス 4/16A
重要残基: **2(V), 4(ML), 23(C)**, 25(SSP), 26(SN), 27(Q), 29(**LI**), 30A(HL), 30B(S), 30C(NDS), 30D(G), 32(YS), 33(LF), 34(HEN), **35(W), 51(V), 71(F), 88(C)**, 90(Q), 92(TS), 93(H)

L2 (7 アミノ酸) = クラス 1/7A
重要残基: **23(C)**

L3 (9 アミノ酸) = クラス 1/9A
重要残基: **2(IVL), 3(VQLE), 4(ML)**, 28(SNDTE), 30(DYLVISNFGHT), 31(SNTKG), 32(FYNAHSR), 33(MLVIF), **88(C)**, 89(QSGFL), 90(QNH), 91(NFGSRDHTYV), 92(NYWTSRQHAD), 93(ENGIITSRAQHAD), 94(DYTVLHNNIWPS), 95(P), 96(PLYRIWF), 97(**T**), **98(F)**

FIG. 9

【図１０】

チョツィア（Chothia）規準分類

H1 (5 アミノ酸) = クラス 1
重要残基: **24(AVG), 26(G), 27(FY)**

H2 (19 アミノ酸) = クラス 4
重要残基: 54(S), 55(Y), **71(R)**

マーチン（Martin）規準分類

H1 (5 アミノ酸) = クラス 1/10A
重要残基: **2(VIG), 4(LG), 20(LIMV), 22(C), 24(TAGVS), 26(G), 29(IFLS)**, 32(IIIYFTNCED), 33(AWGTLV), 34(IVMW), 35(HENQSYT), **36(W), 48(IMLV),** 51(LIVTSN), **69(ILFMV), 78(ALVYF), 80(LM), 90(YF), 92(C), 94(RKGSNH), 102(YHVISDG).**

H2 (19 アミノ酸) = クラス?/12B
重要残基: **47(W),** 50(RQ), 51(I), 59(Y), **69(I), 71(R), 78(LV)**

FIG. 10

【図１１】

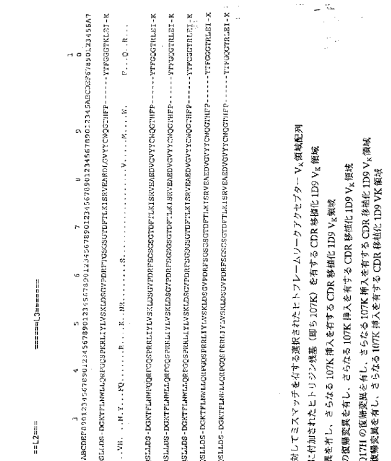


Figure 11

【図１２】

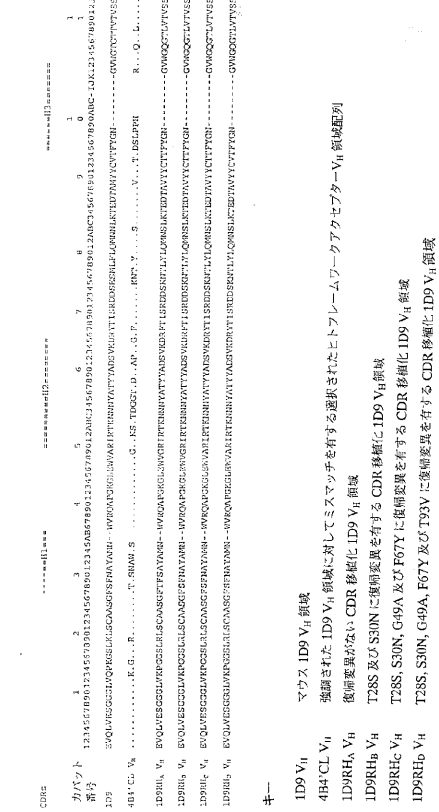


Figure 12

【図１３】

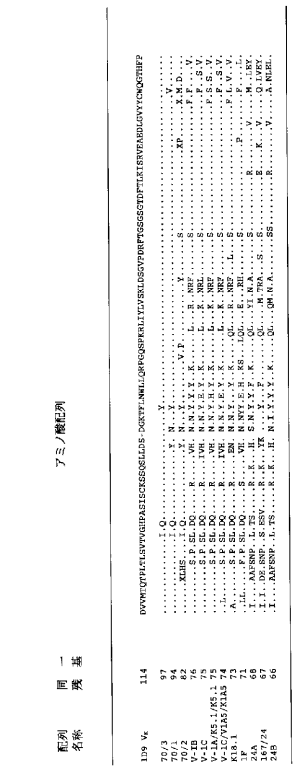


FIG. 13

【図１４】

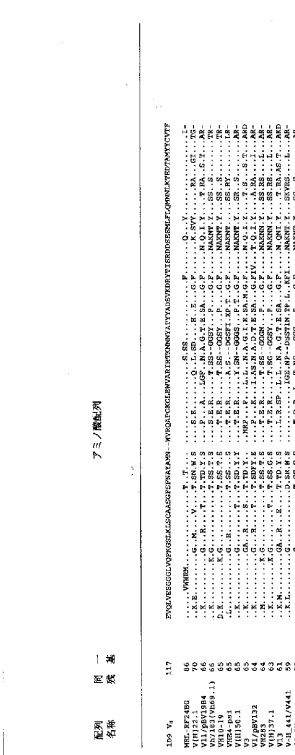


FIG. 14

【図１５】

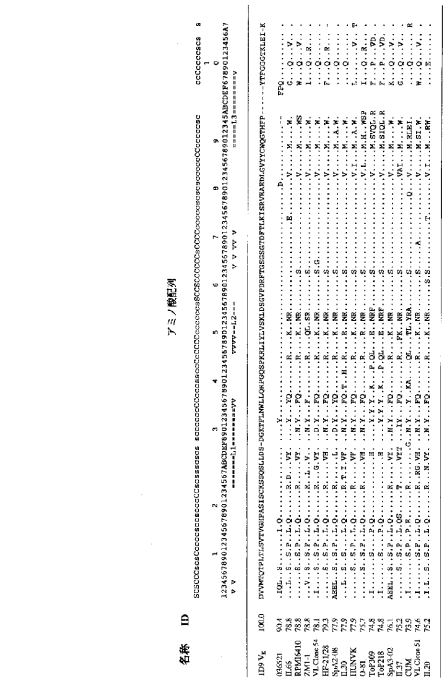


FIG.15

【図１６】

FIG.16

【図１７】

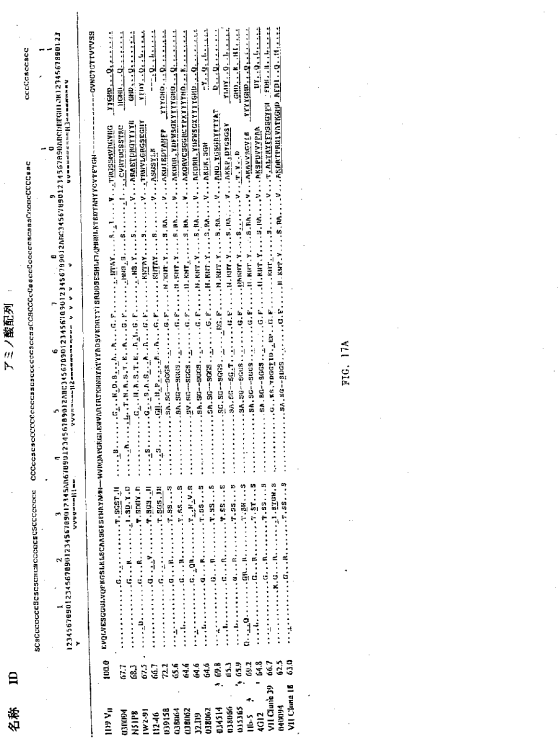


FIG. 17A

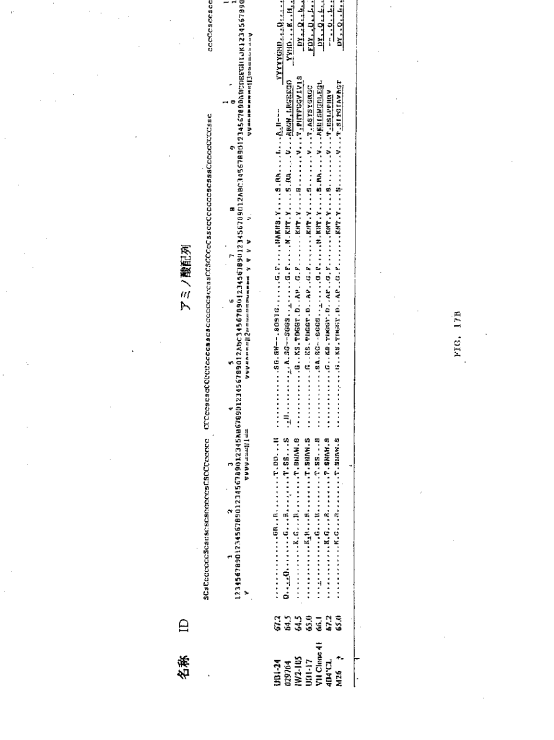


FIG. 17B

【図１８】

名称	ID	全	表面	コア	カバット CDR	FR	FR 表面	コア FR	CDR 近傍 FR	ベルニエ (Vernier)	V_H	J鎖	最も近いヒト生殖系列遺伝子	H1 サイズ	H2 サイズ	H3 サイズ	H1 クラス	H2 クラス
IDY V_H	100.0	117	29	84	30	87	21	65	30	16	100	17				5	19	6	1	4
030094	67.7	86	19	67	15	72	17	57	26	12	75	13	DP-29-122+	同—	同—	16	同—	同—
N5198	68.3	86	18	66	15	72	16	57	25	12	75	13	DP-29-122+	同—	同—	15	2	d—
IW2-91	67.5	85	18	65	15	72	16	56	25	12	75	12	DP-29-122+	同—	同—	15	同—	同—
H2-46	66.7	84	18	65	15	72	16	56	25	12	75	12	DP-29-122+	同—	同—	15	同—	同—
039158	72.2	83	17	64	15	71	15	56	25	12	74	12	DP-29-122+					
038064	65.6	82	17	64	14	71	15	56	25	11	74	12	VH26Rabbits+					
038062	64.6	82	17	63	14	71	15	56	25	11	73	12	VH26Rabbits+	同—	17	19	同—	3
038061	64.6	82	17	63	14	71	15	56	25	11	72	12	VH26Rabbits+					
034514	69.8	81	17	63	14	70	15	56	25	11	72	12	VH26Rabbits+					
038066	65.3	81	16	63	14	70	15	55	25	11	71	12	VH26Rabbits+					
035365	65.9	81	16	63	14	70	15	55	25	11	71	12	VH26Rabbits+					

FIG. 18A

名称	ID	全	表面	コア	カバット CDR	FR	FR 表面	コア FR	CDR 近傍 FR	ベルニエ (Vernier)	V_H	J鎖	最も近いヒト生殖系列遺伝子	H1 サイズ	H2 サイズ	H3 サイズ	H1 クラス	H2 クラス
Hb-5	69.2	81	16	63	14	69	15	55	25	11	71	12	VH26Rabbits+					
4G12	64.8	81	16	63	14	69	15	55	25	11	71	12	VH26Rabbits+	同—	17	16	同	3
VH clone 39	66.7	80	16	63	14	69	14	55	25	11	71	12	VH26Rabbits+	同—	17	11	同	3
040094	62.5	80	16	63	14	69	14	55	25	11	71	12	LSG3.1					
VH clone 18	63.0	80	16	63	13	69	14	55	25	11	71	12	VH26Rabbits+	同—	17	18	同—	3
UBI-24	67.2	80	16	63	13	69	14	55	25	11	71	12	DP-31-V39P+	同—	17	10	同—	3
029764	64.5	80	16	63	13	69	14	55	25	11	71	12	VH26Rabbits+	同 ·	17	15	同—	3
IW2-105	64.5	80	16	63	13	69	14	55	25	11	71	12	LSG3.1	同—	同 ·	13	同—	?
UBI-17	65.0	80	16	63	13	69	14	55	25	11	71	11	LSG3.1	同 ·	同—	12	同—	?
VH clone 41	66.1	80	16	62	13	69	14	55	25	11	71	11	VH26Rabbits+	同 ·	17	12	同—	3
4B4 'CL	67.2	80	16	62	13	68	14	55	25	11	71	11	LSG3.1	同 ·	同—	8	同—	?
M26	65.0	80	16	62	13	68	14	55	25	11	71	11	LSG3.1	同 ·	同—	12	同—	?

Figure 18B

【図１９】

カバット	#	FR又はCDR	マウス 1D9 V_K	マウス κ-II	ヒト κ-II	ヒト アクセプター HF-21/28 (005056)	表面又はコア	1D9 RK_A	1D9 RK_B	コメント
1	1	FR1	D	D*	D		S	D	D	
2	2		V	V	I*		C	V	V	
3	3		V	V	V*		S	V	V	
4	4		M	M	M		C	M	M	
5	5		T	T*	T		C	T	T	
6	6		Q	Q*	Q		C	Q	Q	
7	7		T	T	S	S	S	S	S	
8	8		P	P	P		e	P	P	
9	9		L	L	L		s	L	L	
10	10		T	S	S	S	C	S	S	
11	11		L	L	L*		e	L	L	
12	12		S	P	P	P	e	P	P	
13	13		V	V*	V*		e	V	V	
14	14		T	S	T		e	T	T	
15	15		V	L	P	L	s	L	L	
16	16		G	G	G		e	G	G	
17	17		H	D	E	Q	e	Q	Q	
18	18		P	Q	P		s	P	P	
19	19		A	A	A		e	A	A	
20	20		S	S*	S		e	S	S	
21	21		I	I*	I		e	I	I	
22	22		S	S*	S*		C	S	S	
23	23	FR1	C	C	C		C	C	C	
24	24	CDR1	K	R	R	R	s	K	K	
25	25		S	S*	S*		e	S	S	
26	26		S	S*	S		s	S	S	
27	27		Q	Q	Q		s	Q	Q	
27A	28		S	S	S		s	S	S	
27B	29		L	L	L		e	L	L	
27C	30		L	V	L	V	s	L	L	
27D	31		D	H	H	H	e	D	D	
27E	32		S	S	S		s	S	S	
27F			-		x			-	-	
28	33		D	N	D		s	D	D	
29	34		G	G*	G		e	G	G	
30	35		K	N	N	N	e	K	K	
31	36		T	T	N		e	T	T	
32	37		F	Y*	Y	Y	e	F	F	
33	38		L	L*	L		e	L	L	
34	39	CDR1	N	E	N		e	N	N	
35	40	FR2	W	W	W		C	W	W	
36	41		L	Y	Y	F	C	F	L	Δ1

FIG. 19A

カバット	#	FR又はCDR	マウス 1D9 V_K	マウス κ-II	ヒト κ-II	ヒト アクセプター HF-21/28 (005056)	表面又はコア	1D9 RK_A	1D9 RK_B	コメント
37	42		L	L	L	O	e	Q	L	Δ2
38	43		Q	Q*	Q		e	Q	Q	
39	44		R	K	K		e	R	R	
40	45		P	P*	P		s	P	P	
41	46		G	G*	G		s	G	G	
42	47		Q	Q	Q		e	Q	Q	
43	48		S	S*	S		e	S	S	
44	49		P	P*	P		C	P	P	
45	50		K	K	Q	R	e	R	R	
46	51		R	L	L		C	R	R	
47	52		I	I*	I		C	L	L	
48	53		I	I*	I		C	I	I	
49	54	FR2	Y	Y	Y		C	Y	Y	
50	55	CDR2	L	K	L		e	L	L	
51	56		V	V	V	K	e	V	V	
52	57		S	S	S		e	S	S	
53	58		K	N	N		e	K	K	
54	59		L	R	R	N	e	L	L	
55	60		D	F	A	R	e	D	D	
56	61	CDR2	S	S*	S		s	S	S	
57	62	FR3	G	G	G		S	G	G	
58	63		V	V	V		C	V	V	
59	64		P	P	P		C	P	P	
60	65		D	D*	D		S	D	D	
61	66		R	R	R		C	R	R	
62	67		F	F*	F		C	F	F	
63	68		T	S	S	S	C	S	S	
64	69		G	G*	G		C	G	G	
65	70		S	S*	S		C	S	S	
66	71		G	G*	G		C	G	G	
67	72		S	S*	S		s	S	S	
68	73		G	G*	G		C	G	G	
69	74		T	T*	T		C	T	T	
70	75		D	D*	D		C	D	D	
71	76		F	F*	F		C	F	F	
72	77		T	T*	T		e	T	T	
73	78		L	L	I		e	I	I	
74	79		K	K	K		e	K	K	
75	80		I	I	I		e	I	I	
76	81		S	S	S		e	S	S	
77	82		R	R*	R		s	R	R	
78	83		V	V	V		e	V	V	
79	84		E	E	E		s	E	E	
80	85		A	A*	A		e	A	A	
81	86		E	E*	E		s	E	E	
82	87		D	D*	D		e	D	D	
83	88		L	L	V	V	e	V	V	
84	89		G	G*	G		e	G	G	
85	90		V	V	V		e	V	V	
86	91		Y	V*	Y		e	Y	Y	
87	92		Y	Y	Y		C	Y	Y	
88	93	FR3	C	C	C		C	C	C	

FIG. 19B

カバット	#	FR又はCDR	マウス 1D9 V_K	マウス κ-II	ヒト κ-II	ヒト アクセプター HF-21/28 (005056)	表面又はコア	1D9 RK_A	1D9 RK_B	コメント
89	94	CDR3	W	F	M		e	W	W	
90	95		Q	Q*	Q	M	e	Q	Q	
91	96		Q	G	A		e	G	G	
92	97		T	T	L		e	T	T	
93	98		H	H	Q		e	H	H	
94	99		F	V	x		s	F	F	
95	100		P	P*	P	W	e	P	P	
95A			-	P	R			-	-	
95B			-	-	-			-	-	
95C			-	-	-			*	*	
95D			-	-	-			-	-	
95E			-	-	-			-	-	
95F			-	-	-			-	-	
96	101		Y	Y	x	-	e	Y	Y	
97	102	CDR3	T	T*	T	F	e	T	T	
98	103	FR4	F	F*	F		C	F	F	
99	104		G	G	G		e	G	G	
100	105		G	G	Q	Q	e	Q	G	
101	106		G	G	G		e	G	G	
102	106		T	T	T		e	T	T	
103	107		K	K*	K	R	s	R	R	
104	108		L	L	V		e	L	L	
105	109		E	E	E		s	E	E	
106	110		I	I	I		s	I	I	
106A			-	-	-			-	-	
107	111	FR4	K	K*	K	-	s	K	K	

FIG. 19C

【図２０】

カバット	#	FR又はCDR	マウス 1D9 V_H	マウス IIIc	ヒト III	ヒト アクセプター 4BHFCL (000490)	表面又はコア	1D9 RH_A	1D9 RH_B	コメント
1	1	FR1	E	E*	E		s	E	E	
2	2		V	V	Q		C	V	V	
3	3		Q	K*	Q		s	Q	Q	
4	4		L	L*	I*		C	L	L	
5	5		V	E	V		s	V	V	
6	6		E	E	E		e	E	E	
7	7		S	S	S*		e	S	S	
8	8		G	G	G*		e	G	G	
9	9		G	G	G*		e	G	G	
10	10		G	G*	G		e	G	G	
11	11		L	L	L		S	L	L	
12	12		V	V*	V		e	V	V	
13	13		Q	Q	Q	K	s	K	K	
14	14		P	P	P*		e	P	P	
15	15		K	G	G*	G	s	Q	G	
16	16		G	G	G		s	G	G	
17	17		S	S	S*		e	S	S	
18	18		L	M*	L*		e	L	L	
19	19		K	K*	K	R	e	R	R	
20	20		L	L	L		e	L	L	
21	21		S	S	S*		e	S	S	
22	22		C	C	C*		C	C	C	
23	23		A	V	A		e	A	A	
24	24		A	A	C		C	A	A	
25	25		S	S	S*		e	S	S	
26	26		G	G	G		e	G	G	
27	27		F	F	F*		C	F	F	
28	28		S	T*	T	T	C	I	S	A1
29	29		F	F*	F		C	F	F	
30	30	FR1	N	S	S	S	S	S	N	A2
31	31	CDR1	A	N	S	N	e	A	A	
32	32		Y	Y	Y	A	S	Y	Y	
33	33		A	T	A	W	S	A	A	
34	34		M	M	M		e	M	M	
35	35		N	N	S	S	e	N	N	
35a			-	-	-		e	-	-	
35b		CDR1	-	-	-		e	-	-	

FIG. 20A

カバット	#	FR又はCDR	マウス1D9 V_H	マウスIIIc	ヒトIII	ヒトアクセプター4B4'CL(000490)	表面又はコア	1D9 RH_A	1D9 RH_B	コメント
36	36	FR2	W	W	W*		C	W	W	
37	37		V	V	V*		C	V	V	
38	38		R	R	R*		C	R	R	
39	39		Q	Q	Q*		c	Q	Q	
40	40		A	S	A		c	A	A	
41	41		P	P	P		s	P	P	
42	42		G	E	G*		s	G	G	
43	43		K	K	K		s	K	K	
44	44		G	G	G		c	G	G	
45	45		L	L	L*		C	L	L	
46	46		E	F*	E		C	E	E	
47	47		W	W	W*		C	W	W	
48	48		V	V*	V*		C	V	V	
49	49	FR2	A	A	S	G	C	G	G	
50	50	CDR2	R	E	V		c	R	R	
51	51		I	I	I		c	I	I	
52	52		R	R	S	K	s	R	R	
52a	53		T	L	G	S	s	T	T	
52b	54		K	K	K*		s	K	K	
52c	55		N	S	T	T	c	N	N	
53	56		N	H	D	D		N	N	
54	57		N	N	G	G		N	N	
55	58		Y	Y	G	G		Y	Y	
56	59		A	A	S	T	s	A	A	
57	60		T	T	T		c	T	T	
58	61		Y	H	Y	D	c	Y	Y	
59	62		Y	Y	Y		c	Y	Y	
60	63		A	A	A		c	A	A	
61	64		D	E	D	A	s	D	D	
62	65		S	S	S	P	s	S	S	
63	66		V	V	V*		c	V	V	
64	67		K	K	K		s	K	K	
65	68	CDR2	D	G	G*	G	s	D	D	
66	69	FR3	R	R	R*		C	R	R	
67	70		Y	F	F*	F	C	F	F	
68	71		T	T	I		C	T	T	
69	72		I	I*	I*		C	I	I	
70	73		S	S	S*		S	S	S	
71	74		R	R	R*		C	R	R	
72	75		D	D	D		c	D	D	
73	76		D	D	N		C	D	D	
74	77		S	S	S		s	S	S	
75	78		E	K	K	K	s	K	K	
76	79		S	S	N	N	s	N	N	
77	80		M	S	T	T	c	T	T	
78	81		L	V	L		C	L	L	
79	82		F	Y	Y	Y	c	Y	Y	
80	83		L	L	L*		c	L	L	

FIG 20B

カバット	#	FR又はCDR	マウス1D9 V_H	マウスIIIc	ヒトIII	ヒトアクセプター4B4'CL(000490)	表面又はコア	1D9 RH_A	1D9 RH_B	コメント
81	84		Q	Q*	Q		c	Q	Q	
82	85		M	M	M*		C	M	M	
82a	86		N	N	N		s	N	N	
82b	87		N	N	S	S	s	S	S	
82c	88		L	L	L*		c	L	L	
83	89		K	R	R		s	K	K	
84	90		T	A	A		c	T	T	
85	91		E	E	E		s	E	E	
86	92		D	D	D		C	D	D	
87	93		T	T	T		c	T	T	
88	94		A	G	A*		c	A	A	
89	95		M	I	V	V	c	V	V	
90	96		Y	Y	Y*		c	Y	Y	
91	97		Y	Y	Y*		C	Y	Y	
92	98		C	C*	C*		C	C	C	
93	99		V	T	A	T	C	T	T	
94	100	FR3	T	T	R		C	T	T	
95	101	CDR3	F	G	G	D	c	F	F	
96	102		Y	F	R	S	c	Y	Y	
97	103		G	-	x	L	s	G	G	
98	104		N	-	G	P	c	N	N	
99			-	-	x	P	c	-	-	
100			-	-	S	H	c	-	-	
100a			-	-	L		C	-	-	
100b			-	-	S		C	-	-	
100c			-	-	G			-	-	
100d			-	-	x			-	-	
100e			-	-	Y			-	-	
100f			-	-	Y			-	-	
100g			-	-	Y			-	-	
100h			-	-	Y			-	-	
100i			-	-	H			-	-	
100j			-	-	Y			-	-	
100k			-	F	F		C	-	-	
101	105		G	A	D	R	C	G	G	
102	106	CDR3	V	Y	Y		C	V	V	
103	107	FR4	W	W	W*		C	W	W	
104	108		G	G	G*		C	G	G	
105	109		T	Q	Q	Q	S	Q	Q	
106	110		G	G	G*		C	G	G	
107	111		T	-	T*		C	T	T	
108	112		T	L	L	L	C	I	I	
109	113		V	V	V*		C	V	V	
110	114		T	T	T*		C	T	T	
111	115		V	V*	V*			V	V	
112	116		S	S	S*			S	S	
113	117	FR4	S	S	S*			S	S	

FIG. 20C

【図２１】

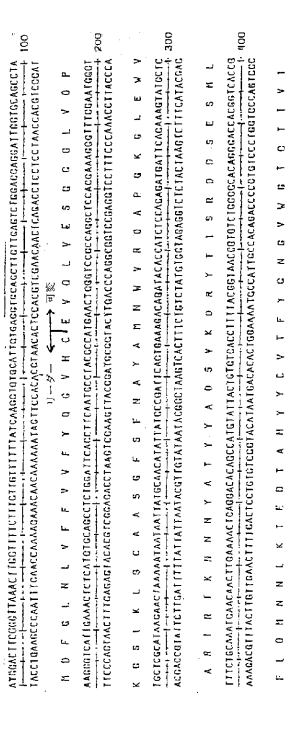


FIG. 21

【図２２】

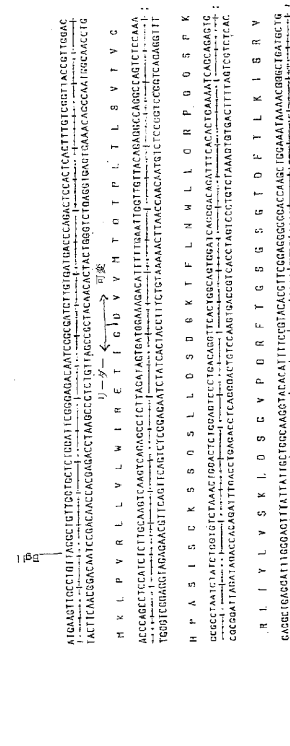


FIG. 22

【図２３】

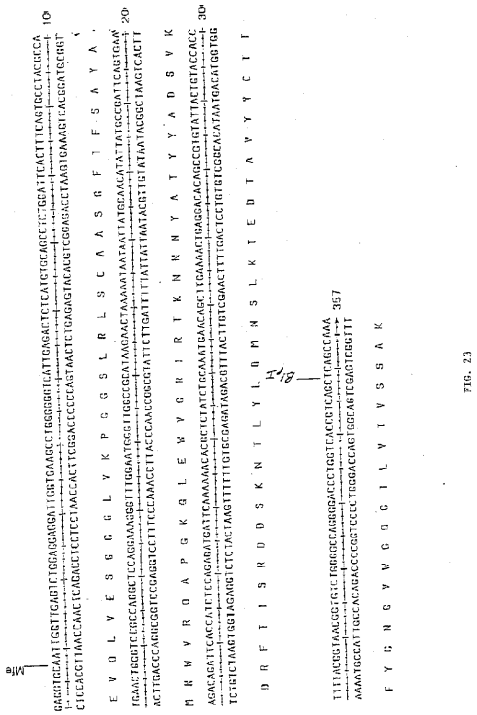


FIG. 23

【図２４】

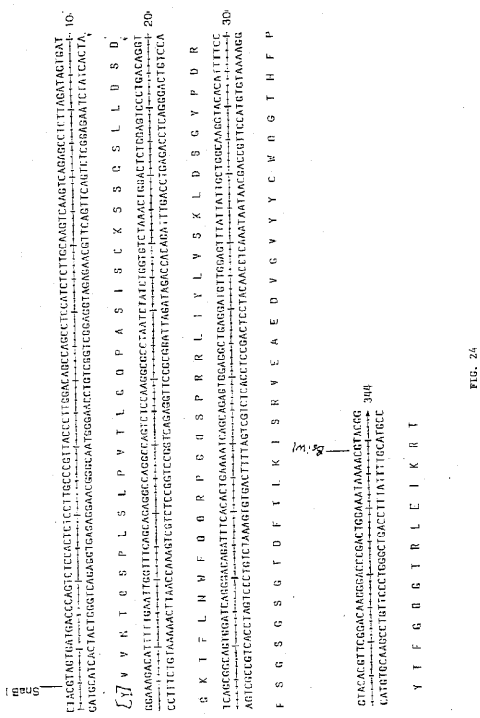
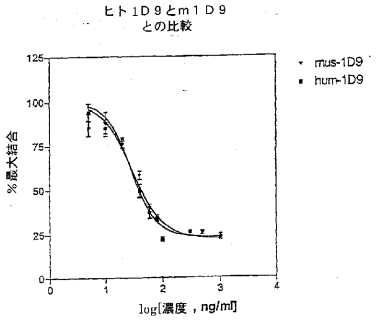


FIG. 24

【図２５】



	hum-1D9	mus-1D9
式1		
ベストフィット値		
BOTTOM	23.46	22.40
TOP (定数)	100.0	100.0
LOGEC50	1.452	1.472
HILLSLOPE	-1.972	-1.627
EC50	28.32	29.68
Std. エラー		
BOTTOM	2.656	3.945
LOGEC50	0.04151	0.05251
HILLSLOPE	0.2946	0.3143
95% 信頼区間		
BOTTOM	17.18 to 29.74	13.07 to 31.73
LOGEC50	1.354 to 1.550	1.325 to 1.620
HILLSLOPE	-2.668 to -1.275	-2.370 to -0.8835
EC50	22.59 to 35.51	21.12 to 41.71
適合度		
自由度	7	7
R 平方	0.9931	0.9858
平方の絶対合計	48.60	86.53
Sy.x	2.635	3.556
データ		
X 値の数	10	10
Y 反復の数(解析平均)	3	3
値の総数	10	10
欠測値の数	20	20

Figure 25

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI		
A61P 25/00	*(2006.01)*	A61P	9/00	
A61P 29/00	*(2006.01)*	A61P	9/10	
A61P 31/18	*(2006.01)*	A61P	25/00	
A61P 37/06	*(2006.01)*	A61P	29/00	
A61P 43/00	*(2006.01)*	A61P	29/00	１０１
C07K 16/28	*(2006.01)*	A61P	31/18	
C07K 16/46	*(2006.01)*	A61P	37/06	
C12N 1/15	*(2006.01)*	A61P	43/00	
C12N 1/19	*(2006.01)*	C07K	16/28	
C12N 1/21	*(2006.01)*	C07K	16/46	
A61K 38/00	*(2006.01)*	C12N	1/15	
C12P 21/02	*(2006.01)*	C12N	1/19	
		C12N	1/21	
		A61K	37/02	
		C12P	21/02	C

(72)発明者　ホルバス，クリストファー
アメリカ合衆国　マサチューセッツ　０２７８０　トーントン，プレイン　ストリート　２０９
(72)発明者　ニューマン，ウォルター
アメリカ合衆国　マサチューセッツ　０２１１５　ボストン，ナンバースリー，ダラム　ストリート　３
(72)発明者　ジョーンズ，エス．，タラン
イギリス国　ハートフォードシア　ダブリュディー７　８エイジー　ラドレット，クライスト　チャーチ　クレセント　１
(72)発明者　オブライエン，シオバン
イギリス国　ロンドン　エヌ３　２ビーエヌ　フィンチリー，ドーセット　ミューズ　３９
(72)発明者　オキーフェ，テレサ
アメリカ合衆国　マサチューセッツ　０２４５３　ウォールサム，パーカーズ　レーン　６１

審査官　小暮　道明

(56)参考文献　国際公開第９７／０３１９４９（WO，Ａ１）
特開平１１－００４６９４（ＪＰ，Ａ）
特表平０４－５０５３９８（ＪＰ，Ａ）
J. Clin. Invest. ,100[3](1997) p.497-502
Gene, 101(1991) p.305-306
J.Immunol., 142[3](1989) p.883-887

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
C12N15/
C07K
CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)