(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2017 年 7 月 27 日(27.07.2017)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2017/126587 A1

(51) 国際特許分類:
C07K 16/28 (2006.01)　*C12N 5/10* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)　*C12N 5/12* (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)　*C12N 15/09* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)　*C12P 21/08* (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)　*G01N 33/53* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2017/001687

(22) 国際出願日: 2017 年 1 月 19 日(19.01.2017)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2016-008983 2016 年 1 月 20 日(20.01.2016) JP

(71) 出願人: 協和発酵キリン株式会社 (KYOWA HAKKO KIRIN CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1008185 東京都千代田区大手町一丁目６番１号 Tokyo (JP). 国立大学法人京都大学 (KYOTO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町３６番地１ Kyoto (JP).

(72) 発明者: 甲斐　正之 (KAI Masayuki); 〒1008185 東京都千代田区大手町一丁目６番１号　協和発酵キリン株式会社　本社内 Tokyo (JP). 武藤　誠 (TAKETO Makoto); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町３６番地１　国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 河田　健二 (KAWADA Kenji); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町３６番地１　国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 平位秀世 (HIRAI Hideyo); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町３６番地１　国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 坂井　義治 (SAKAI Yoshiharu); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町３６番地１　国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 前川平 (MAEKAWA Taira); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町３６番地１　国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP).

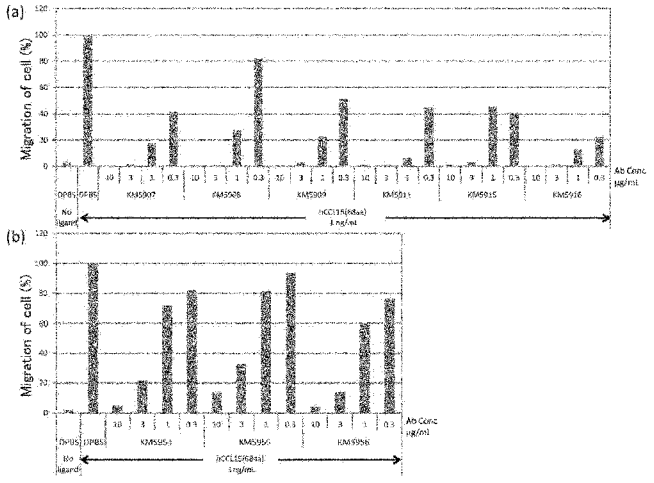
(74) 代理人: 特許業務法人栄光特許事務所 (Eikoh Patent Firm, P.C.); 〒1050003 東京都港区西新橋一丁目７番１３号　虎ノ門イーストビルディング１０階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE,

[続葉有]

(54) **Title**: ANTI-HUMAN CCR1 MONOCLONAL ANTIBODY

(54) 発明の名称 : 抗ヒトＣＣＲ１モノクローナル抗体



(57) **Abstract**: The present invention relates to: a monoclonal antibody which can bind to an extracellular domain of human CC chemokine receptor 1 (CCR1) and can inhibit the activation of CCR1 with human CC chemokine ligand 15 (CCL15), or an antibody fragment of the monoclonal antibody; a hybridoma which can produce the antibody; a nucleic acid which has a nucleotide sequence encoding the antibody or the antibody fragment; a transformed cell which contains a vector carrying the nucleic acid; a method for producing the antibody or the antibody fragment using the hybridoma or the transformed cell; a therapeutic agent and a diagnostic agent, each of which contains the antibody or the antibody fragment; and a method for treating a CCR1-related disease and a method for diagnosing a CCR1-related disease, in each of which the antibody or the antibody fragment is used.

(57) 要約:

[続葉有]

WO 2017/126587 A1

SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告（条約第 21 条(3)）

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト（規則 5.2(a))

本発明は、ヒトＣＣケモカイン受容体１（ＣＣＲ１）の細胞外領域に結合し、ヒトＣＣケモカインリガンド１５（ＣＣＬ１５）によるＣＣＲ１の活性化を阻害するモノクローナル抗体または該抗体断片、該抗体を産生するハイブリドーマ、該抗体または該抗体断片をコードする塩基配列を有する核酸、該核酸を含むベクターを含む形質転換細胞、該ハイブリドーマまたは該形質転換細胞を用いる該抗体または該抗体断片の製造方法、該抗体または該抗体断片を含む治療薬および診断薬、並びに該抗体または該抗体断片を用いたＣＣＲ１関連疾患の治療方法および診断方法に関する。

明　細　書

発明の名称 ： 抗ヒトＣＣＲ１モノクローナル抗体

技術分野

[0001] 本発明は、ヒトＣＣケモカイン受容体１（ＣＣ　ｃｈｅｍｏｋｉｎｅ　ｒｅｃｅｐｔｏｒ　１、以下、ＣＣＲ１と記載する）の細胞外領域に結合し、ヒトＣＣケモカインリガンド（以下、ＣＣＬと記載する）１５によるＣＣＲ１の活性化を阻害するモノクローナル抗体または該抗体断片、該抗体を産生するハイブリドーマ、該抗体または該抗体断片をコードする塩基配列を有する核酸、該核酸を含むベクターを含む形質転換細胞、該ハイブリドーマまたは該形質転換細胞を用いる該抗体または該抗体断片の製造方法、該抗体または該抗体断片を含む治療薬および診断薬、並びに該抗体または該抗体断片を用いたＣＣＲ１関連疾患の治療方法および診断方法に関する。

背景技術

[0002] ＣＣＲ１は、表面抗原分類（ｃｌｕｓｔｅｒ　ｏｆ　ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｉｏｎ、ＣＤ）１９１、ＣＫＲ－１、ＨＭ１４５、Ｍａｃｒｏｐｈａｇｅ　ｉｎｆｌａｍｍａｔｏｒｙ　ｐｒｏｔｅｉｎ　１α　ｒｅｃｅｐｔｏｒ（ＭＩＰ１α　Ｒ）、ＣＭＫＢＲ１またはＳＣＹＡＲ１等の別名がある。

[0003] ヒトＣＣＲ１をコードする遺伝子は、１９９３年に同定されている（非特許文献１）。ヒトＣＣＲ１のｃＤＮＡ配列（配列番号１）およびアミノ酸配列（配列番号２）は公開されており、例えばＮａｔｉｏｎａｌ　Ｃｅｎｔｅｒ　ｆｏｒ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ（ＮＣＢＩ）では、ｃＤＮＡ配列はＮＭ＿００１２９５、タンパク質のアミノ酸配列はＮＰ＿００１２８６から参照できる。マウスＣＣＲ１のｃＤＮＡ配列（配列番号３）およびアミノ酸配列（配列番号４）も公開されており、ＮＣＢＩでは、ｃＤＮＡ配列はＮＭ＿００９９１２、タンパク質のアミノ酸配列はＮＰ＿０３４０４２から参照できる。

[0004] ＣＣＲ１は、７回膜貫通型の構造を有するＧタンパク質共役型受容体（Ｇ

ｐｒｏｔｅｉｎ－ｃｏｕｐｌｅｄ　ｒｅｃｅｐｔｏｒ；以下ＧＰＣＲ）であり、全長３５５アミノ酸からなる膜タンパク質である。ヒトＣＣＲ１のリガンドとしてヒトＣＣＬ３、ＣＣＬ５、ＣＣＬ８、ＣＣＬ１４、ＣＣＬ１５、ＣＣＬ１６およびＣＣＬ２３が報告されている（非特許文献２）。また、マウスＣＣＲ１のリガンドとしてマウスＣＣＬ３、ＣＣＬ５、ＣＣＬ７およびＣＣＬ９が報告されている（非特許文献３）。

[0005] ヒトＣＣＬ１５はＣ－Ｃケモカインファミリーに含まれるリガンドであり、全長９２アミノ酸からなる。ＣＣＲ１とＣＣＲ３がＣＣＬ１５の受容体として機能することが知られている。ＣＣＬ１５はタンパク質分解酵素の作用によってＮ末端が分解され、６８アミノ酸前後の活性化型となることでより強力な活性を発揮することが知られている（非特許文献４）。

[0006] ＣＣＲ１を含むケモカイン受容体の活性化は、以下の２つのステップを経て起こると考えられている（非特許文献５）。ステップ１としてケモカイン（リガンド）と、受容体のＮ末端細胞外領域との相互作用が生じる。ステップ２としてケモカインのＮ末端領域が、受容体の細胞外ループ領域と相互作用し、受容体の構造変化が起こった結果、細胞内にシグナルが伝達される。

[0007] ＧＰＣＲの細胞内シグナル伝達においては、リガンドの結合によって生じたＧＰＣＲの構造変化に応じて、ＧＰＣＲのＣ末端に会合したＧタンパク質α、β、γ三量体が活性化され、αサブユニットがβγ複合体から解離する。αサブユニットはさらに下流の因子に作用し、シグナル伝達経路を活性化する。αサブユニットの活性化によりホスホリパーゼＣ（ｐｈｏｓｐｈｏｌｉｐａｓｅ　Ｃ、以下ＰＬＣ）が活性化すると、ホスファチジルイノシトール（４，５）$_2$リン酸［ｐｈｏｓｐｈａｔｉｄｙｌｉｎｏｓｉｔｏｌ（４，５）ｂｉｓｐｈｏｓｐｈａｔｅ、PIP_2］が分解され、イノシトール３リン酸（Ｉｎｏｓｉｔｏｌ　ｔｒｉｐｈｏｓｐｈａｔｅ、IP_3）とジアシルグリセロール（ｄｉａｃｙｌｇｌｙｃｅｒｏｌ、ＤＡＧ）が産生される。

[0008] IP_3は小胞体に作用し、カルシウムイオン（Ca^{2+}）を細胞内に放出させ、カルモジュリンを介して種々の細胞反応を引き起こす。この細胞内カルシ

ウム濃度の上昇は、蛍光カルシウムインジケーター等を使用して測定することができ、ＧＰＣＲの活性化の指標とすることができる。ＣＣＲ１についてもこの方法で細胞内シグナルの活性化を測定することが可能である。

[0009] 好中球、好酸球、好塩基球、単球、マクロファージ、樹状細胞、ＮＫ細胞、Ｔ細胞またはＢ細胞等、種々の血球細胞におけるヒトＣＣＲ１の発現がこれまでに報告されている（非特許文献６～１０）。さらに近年、癌微小環境中に存在し、癌の進展を促進する未成熟骨髄球（ｉｍｍａｔｕｒｅ ｍｙｅｌｏｉｄ ｃｅｌｌ、以下ｉＭＣ）、骨髄由来免疫抑制性細胞（ｍｙｅｌｏｉｄ ｄｅｒｉｖｅｄ ｓｕｐｐｒｅｓｓｏｒ ｃｅｌｌ、以下ＭＤＳＣ）と呼ばれる細胞群がＣＣＲ１を発現していることが報告されている（非特許文献１１および１２）。

[0010] ＣＣＲ１は関節リウマチ、多発性硬化症、慢性閉塞性肺疾患等、種々の自己免疫性疾患、炎症性疾患への関与が示唆されている（非特許文献１３）。また、上記のｉＭＣおよびＭＤＳＣに発現していることから、癌の進展および増悪過程へのＣＣＲ１の寄与が示唆されている（非特許文献１１および１２）。

[0011] 例えば、ヒト大腸癌においては、ある頻度で、癌抑制遺伝子であるＳＭＡＤ４の変異またはＳＭＡＤ４タンパク質の消失が見られることが知られており、ＳＭＡＤ４の欠損は予後不良因子であると考えられている。近年、ＳＭＡＤ４の欠損が、ＣＣＬ１５の発現上昇を介して、腫瘍環境中にＣＣＲ１陽性のｉＭＣまたはＭＤＳＣ等を引き込む要因となっていること、さらに、これらの細胞がマトリクスメタロプロテアーゼ（ｍａｔｒｉｘ ｍｅｔａｌｌｏｐｒｏｔｅａｓｅ、ＭＭＰ）の分泌や免疫抑制作用によって癌の浸潤または転移を補助し、患者の予後を悪化させるといった機序が明らかにされつつある（非特許文献１１および１２）。

[0012] 既存の低分子ＣＣＲ１阻害剤としてはＣＰ４８１，７１５（Ｐｆｉｚｅｒ社）、ＭＬＮ３８９７（Ｍｉｌｌｅｎｎｉｕｍ社）、ＢＸ－４７１（Ｂｅｒｌｅｘ社）、ＣＣＸ－３５４（Ｃｈｅｍｏｃｅｎｔｒｙｘ社）等を挙げるこ

とができる。これら低分子阻害剤については、関節リウマチ、多発性硬化症、慢性閉塞性肺疾患等の自己免疫性または炎症性疾患の患者に対する臨床試験が行われたが、いずれも有効性を示すことができていない（非特許文献１４）。

[0013] 既存の抗ＣＣＲ１抗体のうち、文献等でＣＣＲ１活性化の阻害効果が報告されているものとしては、１４１－２（ＭＢＬ社、＃Ｄ０６３－３）（非特許文献１５）、５３５０４（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ社、＃ＭＡＢ１４５）（非特許文献１６）および２Ｄ４（Ｍｉｌｌｅｎｎｉｕｍ社）（特許文献１）が挙げられる。

先行技術文献

特許文献

[0014] 特許文献1：米国特許第６，７５６，０３５号明細書

非特許文献

[0015] 非特許文献1：Neote, Kuldeep, et al. "Molecular cloning, functional expression, and signaling characteristics of a CC chemokine receptor." Cell 72.3 (1993): 415-425.

非特許文献2：Mannhold, Raimund, Hugo Kubinyi, and Gerd Folkers. Chemokine receptors as drug targets. Eds. Martine J. Smit, Sergio A. Lira, and Rob Leurs. Vol. 46. John Wiley & Sons, 2010.

非特許文献3：Ono, Santa Jeremy, et al. "Chemokines: roles in leukocyte development, trafficking, and effector function." Journal of allergy and clinical immunology 111.6 (2003): 1185-1199.

非特許文献4：Berahovich, Robert D., et al. "Proteolytic activation of alternative CCR1 ligands in inflammation." The Journal of Immunology 174.11 (2005): 7341-7351.

非特許文献5：Ludeman, Justin P., and Martin J. Stone. "The structural role of receptor tyrosine sulfation in chemokine recognition." British journal of pharmacology 171.5 (2014): 1167-1179.

非特許文献6：Su, S. B., et al. "Preparation of specific polyclonal antibodies to a CC chemokine receptor, CCR1, and determination of CCR1 expression on various types of leukocytes." Journal of leukocyte biology 60.5 (1996): 658-666.

非特許文献7：Weber, Christian, et al. "Specialized roles of the chemokine receptors CCR1 and CCR5 in the recruitment of monocytes and TH1-like/CD45RO+ T cells." Blood 97.4 (2001): 1144-1146.

非特許文献8：Phillips, Rhian M., et al. "Variations in eosinophil chemokine responses: an investigation of CCR1 and CCR3 function, expression in atopy, and identification of a functional CCR1 promoter." The Journal of Immunology 170.12 (2003): 6190-6201.

非特許文献9：Cheng, Sara S., et al. "Granulocyte-macrophage colony stimulating factor up-regulates CCR1 in human neutrophils." The Journal of Immunology 166.2 (2001): 1178-1184.

非特許文献10：Corcione, Anna, et al. "Chemotaxis of human tonsil B lymphocytes to CC chemokine receptor (CCR) 1, CCR2 and CCR4 ligands is restricted to non-germinal center cells." International immunology 14.8 (2002): 883-892.

非特許文献11：Kitamura, Takanori, et al. "SMAD4-deficient intestinal tumors recruit CCR1+ myeloid cells that promote invasion." Nature genetics 39.4 (2007): 467-475.

非特許文献12：Inamoto, Susumu, et al. "Loss of SMAD4 Promotes Colorectal Cancer Progression by Accumulation of Myeloid-Derived Suppressor Cells through CCL15-CCR1 Chemokine Axis." Clinical Cancer Research (2015): clincanres-0726.

非特許文献13：D'Ambrosio, Daniele, Paola Panina-Bordignon, and Francesco Sinigaglia. "Chemokine receptors in inflammation: an overview." Journal of immunological methods 273.1 (2003): 3-13.

非特許文献14：Schall, Thomas J., and Amanda EI Proudfoot. "Overcoming hurdles in developing successful drugs targeting chemokine receptors." Nature Reviews Immunology 11.5 (2011): 355-363.

非特許文献15：Lebre, Maria C., et al. "Why CCR2 and CCR5 blockade failed and why CCR1 blockade might still be effective in the treatment of rheumatoid arthritis." PLoS One 6.7 (2011): e21772.

非特許文献16：Oba, Yasuo, et al. "MIP-1α utilizes both CCR1 and CCR5 to induce osteoclast formation and increase adhesion of myeloma cells to marrow stromal cells." Experimental hematology 33.3 (2005): 272-278.

非特許文献17：Gao, Ji-Liang, et al. "Impaired host defense, hematopoiesis, granulomatous inflammation and type 1-type 2 cytokine balance in mice lacking CC chemokine receptor 1." The Journal of experimental medicine 185.11 (1997): 1959-1968.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0016] 上記の非特許文献１５、非特許文献１６および特許文献１等に記載の既存の抗ＣＣＲ１抗体には医薬品として開発されたものはなく、抗体医薬品としての性能に関する情報は十分ではない。したがって、本発明は、ヒトＣＣＲ１の細胞外領域に結合し、ヒトＣＣＬ１５によるＣＣＲ１の活性化を阻害するモノクローナル抗体または該抗体断片、該抗体を産生するハイブリドーマ、該抗体または該抗体断片をコードする塩基配列を有する核酸、該核酸を含むベクターを含む形質転換細胞、該ハイブリドーマまたは該形質転換細胞を用いる該抗体または該抗体断片の製造方法、該抗体または該抗体断片を含む治療薬および診断薬、並びに該抗体または該抗体断片を用いたＣＣＲ１関連疾患の治療方法および診断方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0017] 上記課題を解決するための手段として、本発明はヒトＣＣＲ１の細胞外領

域に結合し、ヒトＣＣＬ１５によるヒトＣＣＲ１の活性化を阻害するヒトＣＣＲ１モノクローナル抗体を提供する。

[0018] すなわち、本発明は以下の（１）～（２１）に関する。

（１）ヒトＣＣＲ１の細胞外領域に結合し、ヒトＣＣＬ１５によるヒトＣＣＲ１の活性化を阻害するモノクローナル抗体または該抗体断片。

（２）ヒトＣＣＬ１５により誘導されるヒトＣＣＲ１発現細胞の遊走を阻害する（１）に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

（３）ヒトＣＣＲ１の細胞外ループ２領域のアミノ酸配列のうち、少なくとも１つのアミノ酸残基に結合する、（１）または（２）に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

（４）モノクローナル抗体が、下記（ａ）～（ｌ）から選ばれるいずれか一つの抗体である、（１）～（３）のいずれか１つに記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

（ａ）重鎖可変領域（ｈｅａｖｙ ｃｈａｉｎ ｖａｒｉａｂｌｅ ｒｅｇｉｏｎ；以下、ＶＨと略記する）の相補性決定領域（ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔａｒｉｔｙ ｄｅｔｅｒｍｉｎｉｎｇ ｒｅｇｉｏｎ；以下ＣＤＲと略記する）１～３のアミノ酸配列が、それぞれ配列番号６９、７０および７１に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列であって、かつ軽鎖可変領域（ｌｉｇｈｔ ｃｈａｉｎ ｖａｒｉａｂｌｅ ｒｅｇｉｏｎ；以下、ＶＬと略記する）のＣＤＲ１～３のアミノ酸配列が、それぞれ配列番号７２、７３および７４に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列である抗体。

（ｂ）ＶＨのＣＤＲ１～３のアミノ酸配列が、それぞれ配列番号７５、７６および７７に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列であって、かつＶＬのＣＤＲ１～３のアミノ酸配列が、それぞれ配列番号７８、７９および８０に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列である抗体。

（ｃ）ＶＨのＣＤＲ１～３のアミノ酸配列が、それぞれ配列番号８１、８２および８３に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列であって、かつＶＬのＣＤＲ１～３のアミノ酸配列が、それぞれ配列番号８４、８５および８

６に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列である抗体。

（ｄ）ＶＨのＣＤＲ１～３のアミノ酸配列が、それぞれ配列番号８７、８８および８９に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列であって、かつＶＬのＣＤＲ１～３のアミノ酸配列が、それぞれ配列番号９０、９１および９２に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列である抗体。

（ｅ）ＶＨのＣＤＲ１～３のアミノ酸配列が、それぞれ配列番号９３、９４および９５に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列であって、かつＶＬのＣＤＲ１～３のアミノ酸配列が、それぞれ配列番号９６、９７および９８に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列である抗体。

（ｆ）ＶＨのＣＤＲ１～３のアミノ酸配列が、それぞれ配列番号９９、１００および１０１に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列であって、かつＶＬのＣＤＲ１～３のアミノ酸配列が、それぞれ配列番号１０２、１０３および１０４に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列である抗体。

（ｇ）ＶＨのＣＤＲ１～３のアミノ酸配列が、それぞれ配列番号１０５、１０６および１０７に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列であって、かつＶＬのＣＤＲ１～３のアミノ酸配列が、それぞれ配列番号１０８、１０９および１１０に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列である抗体。

（ｈ）ＶＨのＣＤＲ１～３のアミノ酸配列が、それぞれ配列番号１１１、１１２および１１３に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列であって、かつＶＬのＣＤＲ１～３のアミノ酸配列が、それぞれ配列番号１１４、１１５および１１６に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列である抗体。

（ｉ）ＶＨのＣＤＲ１～３のアミノ酸配列が、それぞれ配列番号１１７、１１８および１１９に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列であって、かつＶＬのＣＤＲ１～３のアミノ酸配列が、それぞれ配列番号１２０、１２１および１２２に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列である抗体。

（ｊ）前記（ａ）～（ｉ）に記載の少なくとも一つの抗体と、ヒトＣＣＲ１への結合について競合する抗体。

（ｋ）前記（ａ）～（ｉ）に記載のいずれか一つの抗体が結合するエピトー

プを含むエピトープに結合する抗体。

（ｌ）前記（ａ）～（ｉ）に記載のいずれか一つの抗体が結合するエピトープと同じエピトープに結合する抗体。

（５）モノクローナル抗体が、下記（ａ）～（ｉ）から選ばれるいずれか一つの抗体である、（１）～（４）のいずれか１つに記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

（ａ）ＶＨのアミノ酸配列が配列番号５１に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列であって、かつＶＬのアミノ酸配列が配列番号５２に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列である抗体。

（ｂ）ＶＨのアミノ酸配列が配列番号５３に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列であって、かつＶＬのアミノ酸配列が配列番号５４に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列である抗体。

（ｃ）ＶＨのアミノ酸配列が配列番号５５に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列であって、かつＶＬのアミノ酸配列が配列番号５６に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列である抗体。

（ｄ）ＶＨのアミノ酸配列が配列番号５７に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列であって、かつＶＬのアミノ酸配列が配列番号５８に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列である抗体。

（ｅ）ＶＨのアミノ酸配列が配列番号５９に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列であって、かつＶＬのアミノ酸配列が配列番号６０に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列である抗体。

（ｆ）ＶＨのアミノ酸配列が配列番号６１に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列であって、かつＶＬのアミノ酸配列が配列番号６２に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列である抗体。

（ｇ）ＶＨのアミノ酸配列が配列番号６３に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列であって、かつＶＬのアミノ酸配列が配列番号６４に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列である抗体。

（ｈ）ＶＨのアミノ酸配列が配列番号６５に記載されるアミノ酸配列を含む

アミノ酸配列であって、かつＶＬのアミノ酸配列が配列番号６６に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列である抗体。

（ｉ）ＶＨのアミノ酸配列が配列番号６７に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列であって、かつＶＬのアミノ酸配列が配列番号６８に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列である抗体。

（６）モノクローナル抗体が遺伝子組換え抗体である（１）～（５）のいずれか１つに記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

（７）遺伝子組換え抗体が、ヒト型キメラ抗体、ヒト化抗体およびヒト抗体から選ばれる１の遺伝子組換え抗体である、（６）に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

（８）Ｆａｂ、Ｆａｂ’、$(Ｆａｂ')_2$、一本鎖抗体（ｓｃＦｖ）、二量体化Ｖ領域（ｄｉａｂｏｄｙ）、ジスルフィド安定化Ｖ領域（ｄｓＦｖ）およびＣＤＲを含むペプチドから選ばれる１の抗体断片である、（１）～（７）のいずれか１つに記載の抗体断片。

（９）（１）～（８）のいずれか１つに記載のモノクローナル抗体または該抗体断片を産生するハイブリドーマ。

（１０）（１）～（８）のいずれか１つに記載のモノクローナル抗体または該抗体断片をコードする塩基配列を有する核酸。

（１１）（１０）に記載の核酸を含むベクターを含む形質転換細胞。

（１２）（９）に記載のハイブリドーマまたは（１１）に記載の形質転換細胞を培養し、培養液から（１）～（８）のいずれか１つに記載のモノクローナル抗体または該抗体断片を採取することを含む、（１）～（８）のいずれか１つに記載のモノクローナル抗体または該抗体断片の製造方法。

（１３）（１）～（８）のいずれか１つに記載のモノクローナル抗体または該抗体断片を含む、ヒトＣＣＲ１の検出または測定用試薬。

（１４）（１）～（８）のいずれか１つに記載のモノクローナル抗体または該抗体断片を含む、ヒトＣＣＲ１関連疾患の診断薬。

（１５）ヒトＣＣＲ１関連疾患が、癌、自己免疫疾患または炎症性疾患であ

る、（１４）に記載の診断薬。

（１６）（１）～（８）のいずれか１つに記載のモノクローナル抗体または該抗体断片を有効成分として含有する、ヒトＣＣＲ１関連疾患の治療薬。

（１７）ヒトＣＣＲ１関連疾患が、癌、自己免疫疾患または炎症性疾患である、（１６）に記載の治療薬。

（１８）（１）～（８）のいずれか１つに記載のモノクローナル抗体または該抗体断片を用いたヒトＣＣＲ１関連疾患の診断方法。

（１９）（１）～（８）のいずれか１つに記載のモノクローナル抗体または該抗体断片を用いたヒトＣＣＲ１関連疾患の治療方法。

（２０）ヒトＣＣＲ１関連疾患の診断薬を製造するための、（１）～（８）のいずれか１つに記載のモノクローナル抗体または該抗体断片の使用。

（２１）ヒトＣＣＲ１関連疾患の治療薬を製造するための、（１）～（８）のいずれか１項に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片の使用。

発明の効果

[0019] 本発明のモノクローナル抗体または該抗体断片は、ヒトＣＣＲ１の細胞外領域に結合し、ヒトＣＣＲ１活性化に伴う種々の反応を阻害する。それゆえ、本発明のモノクローナル抗体または該抗体断片は、ヒトＣＣＲ１関連疾患の治療薬および診断薬として利用できる。

図面の簡単な説明

[0020] [図1]図１（ａ）および図１（ｂ）は、抗ヒトＣＣＲ１抗体について、活性化ヒトＣＣＬ１５によるＴＨＰ－１の遊走を阻害する活性を測定した結果である。図１（ａ）および図１（ｂ）の縦軸は、ＴＨＰ－１細胞の遊走（％）を示し、ＤＰＢＳと活性化ＣＣＬ１５を添加した時に、Ｔｒａｎｓｗｅｌｌの下層に移動した細胞数を１００％とした。図１（ａ）および図１（ｂ）の横軸は、ＴＨＰ－１細胞に添加した抗体、リガンドおよびこれらの濃度を示している。図１（ａ）および図１（ｂ）中には、ＤＰＢＳを添加したサンプルをＤＰＢＳ、活性化ヒトＣＣＬ１５を添加していないサンプルをＮｏ ｌｉｇａｎｄ、活性化ヒトＣＣＬ１５を添加したサンプルをｈＣＣＬ１５（６８

ａａ）と記載した。抗ヒトＣＣＲ１抗体としては、ＫＭ５９０７抗体、ＫＭ５９０８抗体、ＫＭ５９０９抗体、ＫＭ５９１１抗体、ＫＭ５９１５抗体、ＫＭ５９１６抗体、ＫＭ５９５４抗体、ＫＭ５９５５抗体およびＫＭ５９５６抗体を使用した。

[図2]図２は、抗ヒトＣＣＲ１抗体について、活性化ヒトＣＣＬ１５によるＴＨＰ－１の遊走を阻害する活性を測定した結果である。図の縦軸は、Ｔｒａｎｓｗｅｌｌの下層に移動した細胞数をＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏで測定した際の発光量（ｒｅｌａｔｉｖｅ　ｌｉｇｈｔ　ｕｎｉｔ；ＲＬＵ）を表わす。図２の横軸は、ＴＨＰ－１細胞に添加した抗体、リガンドおよびこれらの濃度を示している。図２中には、ＤＰＢＳを添加したサンプルをＤＰＢＳ、活性化ヒトＣＣＬ１５を添加していないサンプルをＮｏ　ｌｉｇａｎｄ、活性化ヒトＣＣＬ１５を添加したサンプルをｈＣＣＬ１５（６８ａａ）と記載した。抗ヒトＣＣＲ１抗体としては、２Ｄ４抗体（Ｍｉｌｌｅｎｎｉｕｍ社）、５３５０４抗体（Ｒ＆Ｄ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社）、１４１－２抗体（ＭＢＬ社、＃Ｄ０６３－３）、ＫＭ５９０８抗体およびＫＭ５９１６抗体を使用した。

発明を実施するための形態

[0021] 本発明は、ヒトＣＣＲ１の細胞外領域に結合し、ヒトＣＣＬ１５によるＣＣＲ１の活性化を阻害するモノクローナル抗体または該抗体断片に関する。

[0022] ＣＣＲ１は、ＣＤ１９１、ＣＫＲ－１、ＨＭ１４５、Ｍａｃｒｏｐｈａｇｅ　ｉｎｆｌａｍｍａｔｏｒｙ　ｐｒｏｔｅｉｎ　１α　ｒｅｃｅｐｔｏｒ（ＭＩＰ１αＲ）、ＣＭＫＢＲ１およびＳＣＹＡＲ１等ともいう。ＣＣＲ１は、７回膜貫通型の構造を有するＧＰＣＲであり、全長３５５アミノ酸からなる膜タンパク質である。

[0023] ＣＣＲ１を含むＧＰＣＲにおいて、細胞表面上のＧＰＣＲは、リガンドが結合することにより活性化され、該細胞内に該受容体依存的なシグナルが伝達されると同時に、該細胞内のカルシウムイオン濃度が上昇する。その結果、該細胞について、細胞遊走、ケモカインの産生、マトリックスメタロプロ

テアーゼＭＭＰの産生などが生じることが知られている。

[0024] すなわち、ＣＣＲ１の機能としては、リガンドが細胞表面上のＣＣＲ１に結合することにより、該細胞内にＣＣＲ１依存的なシグナルが伝達されると同時に、該細胞内のカルシウムイオン濃度が上昇した結果、該細胞について細胞遊走、ケモカインの産生またはＭＭＰの産生などを起こすことなどが挙げられる。

[0025] ヒトＣＣＲ１のリガンドとしては、例えば、ヒトＣＣＬ３、ＣＣＬ５、ＣＣＬ８、ＣＣＬ１４、ＣＣＬ１５、ＣＣＬ１６およびＣＣＬ２３などが挙げられる。マウスＣＣＲ１のリガンドとしては、例えば、マウスＣＣＬ３、ＣＣＬ５、ＣＣＬ７およびＣＣＬ９などが挙げられる。

[0026] ヒトＣＣＬ１５はＣ－Ｃケモカインファミリーに含まれるリガンドであり、全長９２アミノ酸からなる。ヒトＣＣＬ１５はタンパク質分解酵素の作用によってＮ末端が分解され、６８アミノ酸前後の活性化型［以下、本発明では活性化ヒトＣＣＬ１５またはｈＣＣＬ１５（６８ａａ）と記載する］になることで、全長のＣＣＬ１５（以下、本発明では全長ＣＣＬ１５と記載する）よりも強力な活性を発揮することが知られている。

[0027] ヒトＣＣＬ１５が細胞表面上のヒトＣＣＲ１に結合し、該受容体が活性化されると、該細胞内にＣＣＲ１依存的なシグナルが伝達され、ホスホリパーゼＣ（ＰＬＣ）の活性化、細胞内のカルシウムイオン濃度の上昇またはｎｕｃｌｅａｒ ｆａｃｔｏｒ－κＢ（ＮＦ－κＢ）の活性化等が起こる。その結果、該細胞について、細胞遊走などが生じる。

[0028] 本発明の抗体としては、ヒトＣＣＬ１５によるヒトＣＣＲ１活性化に伴う種々の反応を阻害する抗体が挙げられる。本発明の抗体として具体的には、例えば、ヒトＣＣＬ１５によるヒトＣＣＲ１発現細胞内でのＣＣＲ１依存的なシグナル伝達、ＰＬＣの活性化、細胞内カルシウムイオン濃度の上昇、ＮＦ－κＢの活性化およびＣＣＲ１発現細胞の遊走から選ばれる少なくとも一つの反応を阻害する抗体などが挙げられる。このうち、本発明の抗体としては、ヒトＣＣＬ１５により誘導されるヒトＣＣＲ１発現細胞の遊走を阻害す

る抗体であることが好ましい。

[0029] 本発明の抗体としては、ヒトＣＣＬ１５によるヒトＣＣＲ１活性化に伴う上記の反応について、ＣＣＬ１５のみを添加し、抗体を添加しないコントロールと比べて、好ましくは、５％以上、１０％以上、２０％以上、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、９０％以上阻害する抗体が挙げられる。ヒトＣＣＬ１５の濃度は、測定系に応じてヒトＣＣＬ１５添加時の上記反応の活性が最大値となる濃度に適宜調整することができる。例えば本願実施例に記載する方法でＣＣＲ１発現細胞の遊走を測定する場合には、ＣＣＬ１５の濃度は１ｎｇ／ｍＬであることが好ましい。また、本発明の抗体の濃度についても測定系により適宜調整することができる。例えば本実施例に記載する方法でＣＣＲ１発現細胞の遊走を測定する場合には、本発明の抗体濃度は、０．３μｇ／ｍＬ以上、好ましくは１μｇ／ｍＬ以上、より好ましくは３μｇ／ｍＬ以上、最も好ましくは１０μｇ／ｍＬ以上であることが挙げられる。

[0030] 本発明において、ヒトＣＣＬ１５は、ＣＣＲ１を活性化するものであれば、全長ＣＣＬ１５および活性化ヒトＣＣＬ１５のいずれのＣＣＬ１５であってもいい。

[0031] ヒトＣＣＲ１発現細胞としては、ヒトＣＣＲ１を発現している細胞であればいずれの細胞でもよく、例えば、ヒト細胞、ヒト細胞株およびヒトＣＣＲ１強制発現株などが挙げられる。

[0032] ヒトＣＣＲ１を発現しているヒト細胞としては、例えば、好中球、好酸球、好塩基球、単球、マクロファージ、樹状細胞、ＮＫ細胞、Ｔ細胞、Ｂ細胞、未成熟骨髄球（ｉＭＣ）および骨髄由来免疫抑制性細胞（ＭＤＳＣ）などが挙げられる。

[0033] ヒトＣＣＲ１の細胞外領域としては、ヒトＣＣＲ１のアミノ酸配列のＮ末端から１～３１番目のアミノ酸配列を含むＮ末端領域、９７～１０３番目のアミノ酸配列を含む細胞外ループ１領域、１７２～１９５番目のアミノ酸配列を含む細胞外ループ２領域および２６６～２７８番目のアミノ酸配列を含

む細胞外ループ３領域が挙げられる［Cell 72.3(1993):415-425］。

[0034] Ｎ末端領域、細胞外ループ１領域、細胞外ループ２領域および細胞外ループ３領域として、具体的には、それぞれ配列番号２のアミノ酸配列における１～３１番目、９７～１０３番目、１７２～１９５番目および２６６～２７８番目のアミノ酸配列が挙げられる。

[0035] 本発明の抗体としては、上記のヒトＣＣＲ１の細胞外領域に結合する抗体であればいかなるものでもよいが、ヒトＣＣＲ１の細胞外ループ２領域のアミノ酸配列のうち、少なくとも１つのアミノ酸残基に結合する抗体であることが好ましい。かかる抗体としては、配列番号２のアミノ酸配列の１７２～１９５番目のアミノ酸配列のうち、少なくとも１つのアミノ酸残基に結合する抗体などが挙げられる。

[0036] また、本発明の抗体としてより具体的には、下記（ａ）～（ｌ）から選ばれるいずれか一つの抗体が挙げられる。

（ａ）ＶＨのＣＤＲ１～３のアミノ酸配列が、それぞれ配列番号６９、７０および７１に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列であって、かつＶＬのＣＤＲ１～３のアミノ酸配列が、それぞれ配列番号７２、７３および７４に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列である抗体。

（ｂ）ＶＨのＣＤＲ１～３のアミノ酸配列が、それぞれ配列番号７５、７６および７７に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列であって、かつＶＬのＣＤＲ１～３のアミノ酸配列が、それぞれ配列番号７８、７９および８０に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列である抗体。

（ｃ）ＶＨのＣＤＲ１～３のアミノ酸配列が、それぞれ配列番号８１、８２および８３に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列であって、かつＶＬのＣＤＲ１～３のアミノ酸配列が、それぞれ配列番号８４、８５および８６に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列である抗体。

（ｄ）ＶＨのＣＤＲ１～３のアミノ酸配列が、それぞれ配列番号８７、８８および８９に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列であって、かつＶＬのＣＤＲ１～３のアミノ酸配列が、それぞれ配列番号９０、９１および９

２に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列である抗体。

（ｅ）ＶＨのＣＤＲ１～３のアミノ酸配列が、それぞれ配列番号９３、９４および９５に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列であって、かつＶＬのＣＤＲ１～３のアミノ酸配列が、それぞれ配列番号９６、９７および９８に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列である抗体。

（ｆ）ＶＨのＣＤＲ１～３のアミノ酸配列が、それぞれ配列番号９９、１００および１０１に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列であって、かつＶＬのＣＤＲ１～３のアミノ酸配列が、それぞれ配列番号１０２、１０３および１０４に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列である抗体。

（ｇ）ＶＨのＣＤＲ１～３のアミノ酸配列が、それぞれ配列番号１０５、１０６および１０７に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列であって、かつＶＬのＣＤＲ１～３のアミノ酸配列が、それぞれ配列番号１０８、１０９および１１０に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列である抗体。

（ｈ）ＶＨのＣＤＲ１～３のアミノ酸配列が、それぞれ配列番号１１１、１１２および１１３に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列であって、かつＶＬのＣＤＲ１～３のアミノ酸配列が、それぞれ配列番号１１４、１１５および１１６に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列である抗体。

（ｉ）ＶＨのＣＤＲ１～３のアミノ酸配列が、それぞれ配列番号１１７、１１８および１１９に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列であって、かつＶＬのＣＤＲ１～３のアミノ酸配列が、それぞれ配列番号１２０、１２１および１２２に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列である抗体。

（ｊ）前記（ａ）～（ｉ）に記載の少なくとも一つの抗体と、ヒトＣＣＲ１への結合について競合する抗体。

（ｋ）前記（ａ）～（ｉ）に記載のいずれか一つの抗体が結合するエピトープを含むエピトープに結合する抗体。

（ｌ）前記（ａ）～（ｉ）に記載のいずれか一つの抗体が結合するエピトープと同じエピトープに結合する抗体。

[0037] 本発明の抗体としては、上記（ａ）～（ｉ）に記載されるいずれか一つの

抗体のＶＨのＣＤＲ１～３およびＶＬのＣＤＲ１～３のアミノ酸配列と、それぞれ９０％以上の相同性を示す抗体のＶＨのＣＤＲ１～３およびＶＬのＣＤＲ１～３のアミノ酸配列を有する抗体を含む。９０％以上の相同性とは、具体的には９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％および９９％の相同性などが挙げられる。

[0038] 本発明において、上記（ａ）～（ｉ）に記載される抗体の一態様としては、それぞれマウス抗ヒトＣＣＲ１モノクローナル抗体ＫＭ５９０７抗体、ＫＭ５９０８抗体、ＫＭ５９０９抗体、ＫＭ５９１１抗体、ＫＭ５９１５抗体、ＫＭ５９１６抗体、ＫＭ５９５４抗体、ＫＭ５９５５抗体およびＫＭ５９５６抗体が挙げられる。また、上記（ａ）～（ｉ）に記載される抗体の一態様として、それぞれ抗ヒトＣＣＲ１キメラ抗体ｃｈＫＭ５９０７抗体、ｃｈＫＭ５９０８抗体、ｃｈＫＭ５９０９抗体、ｃｈＫＭ５９１１抗体、ｃｈＫＭ５９１５抗体、ｃｈＫＭ５９１６抗体、ｃｈＫＭ５９５４抗体、ｃｈＫＭ５９５５抗体およびｃｈＫＭ５９５６抗体が挙げられる。上記（ａ）～（ｉ）に記載される抗体の一態様として、他には上記（ａ）～（ｉ）に記載されるいずれか一つの抗体のＶＨのＣＤＲ１～３およびＶＬのＣＤＲ１～３のアミノ酸配列を有するヒト化抗体およびヒト抗体などが挙げられる。

[0039] 本発明の上記（ｊ）の抗体とは、上記（ａ）～（ｉ）に記載の抗体を第１抗体とした時に、該第１抗体とヒトＣＣＲ１との結合を阻害する第２抗体をいう。本発明の上記（ｋ）の抗体とは、上記（ａ）～（ｉ）に記載の抗体を第１抗体、及び第１抗体が結合するエピトープを第１エピトープとした場合、当該第１エピトープを含む、第２エピトープに結合する第２抗体をいう。また、本発明の上記（ｌ）の抗体とは、上記（ａ）～（ｉ）に記載の抗体を第１抗体、及び第１抗体が結合するエピトープを第１エピトープとした場合に、当該第１エピトープに結合する第２抗体をいう。

[0040] また、本発明の抗体として、具体的には、下記（ａ）～（ｉ）から選ばれるいずれか一つの抗体も挙げられる。

（ａ）ＶＨのアミノ酸配列が配列番号５１に記載されるアミノ酸配列を含む

アミノ酸配列であって、かつＶＬのアミノ酸配列が配列番号５２に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列である抗体。

（ｂ）ＶＨのアミノ酸配列が配列番号５３に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列であって、かつＶＬのアミノ酸配列が配列番号５４に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列である抗体。

（ｃ）ＶＨのアミノ酸配列が配列番号５５に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列であって、かつＶＬのアミノ酸配列が配列番号５６に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列である抗体。

（ｄ）ＶＨのアミノ酸配列が配列番号５７に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列であって、かつＶＬのアミノ酸配列が配列番号５８に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列である抗体。

（ｅ）ＶＨのアミノ酸配列が配列番号５９に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列であって、かつＶＬのアミノ酸配列が配列番号６０に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列である抗体。

（ｆ）ＶＨのアミノ酸配列が配列番号６１に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列であって、かつＶＬのアミノ酸配列が配列番号６２に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列である抗体。

（ｇ）ＶＨのアミノ酸配列が配列番号６３に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列であって、かつＶＬのアミノ酸配列が配列番号６４に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列である抗体。

（ｈ）ＶＨのアミノ酸配列が配列番号６５に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列であって、かつＶＬのアミノ酸配列が配列番号６６に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列である抗体。

（ｉ）ＶＨのアミノ酸配列が配列番号６７に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列であって、かつＶＬのアミノ酸配列が配列番号６８に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列である抗体。

[0041] 本発明の抗体としては、上記（ａ）～（ｉ）に記載されるいずれか一つの抗体のＶＨおよびＶＬのアミノ酸配列と、それぞれ９０％以上の相同性を示

す抗体のＶＨおよびＶＬのアミノ酸配列を有する抗体を含む。９０％以上の相同性とは、具体的には９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％および９９％の相同性などが挙げられる。

[0042] 本発明において、上記（ａ）～（ｉ）に記載される抗体の一態様としては、それぞれマウス抗ヒトＣＣＲ１モノクローナル抗体ＫＭ５９０７抗体、ＫＭ５９０８抗体、ＫＭ５９０９抗体、ＫＭ５９１１抗体、ＫＭ５９１５抗体、ＫＭ５９１６抗体、ＫＭ５９５４抗体、ＫＭ５９５５抗体およびＫＭ５９５６抗体が挙げられる。

[0043] また、上記（ａ）～（ｉ）に記載される抗体の一態様として、それぞれ抗ヒトＣＣＲ１キメラ抗体ｃｈＫＭ５９０７抗体、ｃｈＫＭ５９０８抗体、ｃｈＫＭ５９０９抗体、ｃｈＫＭ５９１１抗体、ｃｈＫＭ５９１５抗体、ｃｈＫＭ５９１６抗体、ｃｈＫＭ５９５４抗体、ｃｈＫＭ５９５５抗体およびｃｈＫＭ５９５６抗体が挙げられる。

[0044] 本発明においてヒトＣＣＲ１としては、配列番号２に記載のアミノ酸配列若しくはＮＣＢＩアクセッション番号ＮＰ＿００１２８６のアミノ酸配列を含むポリペプチド、配列番号２に記載のアミノ酸配列若しくはＮＣＢＩアクセッション番号ＮＰ＿００１２８６のアミノ酸配列において１つ以上のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列からなり、かつヒトＣＣＲ１の機能を有するポリペプチド、あるいは配列番号２に記載のアミノ酸配列若しくはＮＣＢＩアクセッション番号ＮＰ＿００１２８６のアミノ酸配列と６０％以上、好ましくは８０％以上、さらに好ましくは９０％以上、最も好ましくは９５％以上の相同性を有するアミノ酸配列から成り、かつヒトＣＣＲ１の機能を有するポリペプチドなどが挙げられる。

[0045] 配列番号２に記載のアミノ酸配列またはＮＣＢＩアクセッション番号ＮＰ＿００１２８６で示されるアミノ酸配列において１つ以上のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチドは、部位特異的変異導入法 [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)、Current Protocols in Molec

ular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997)、Nucleic acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6409 (1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488 (1985)］などを用いて、例えば配列番号２のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするＤＮＡに、部位特異的変異を導入することにより得ることができる。

[0046] 欠失、置換または付加されるアミノ酸の数は特に限定されないが、好ましくは１個～数十個、例えば、１～２０個、より好ましくは１個～数個、例えば、１～５個のアミノ酸である。

[0047] ヒトＣＣＲ１をコードする遺伝子としては、配列番号１に記載の塩基配列、およびＮＣＢＩアクセッション番号ＮＭ＿００１２９５の塩基配列が挙げられる。配列番号１に記載の塩基配列若しくはＮＭ＿００１２９５の塩基配列において、１以上の塩基が欠失、置換または付加された塩基配列から成り、かつヒトＣＣＲ１の機能を有するポリペプチドをコードするＤＮＡを含む遺伝子、配列番号１に記載の塩基配列若しくはＮＭ＿００１２９５の塩基配列と少なくとも６０％以上の相同性を有する塩基配列、好ましくは８０％以上の相同性を有する塩基配列、さらに好ましくは９５％以上の相同性を有する塩基配列から成り、かつヒトＣＣＲ１の機能を有するポリペプチドをコードするＤＮＡを含む遺伝子または配列番号１に記載の塩基配列、若しくはＮＭ＿００１２９５の塩基配列を含むＤＮＡとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするＤＮＡから成り、かつヒトＣＣＲ１の機能を有するポリペプチドをコードする遺伝子なども本発明のヒトＣＣＲ１をコードする遺伝子に含有される。

[0048] ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするＤＮＡとしては、配列番号１に記載の塩基配列またはＮＭ＿００１２９５の塩基配列を含むＤＮＡをプローブに用いた、コロニー・ハイブリダイゼーション法、プラーク・ハイブリダイゼーション法、サザンブロット・ハイブリダイゼーション法またはＤＮＡマイクロアレイ法などにより得られるハイブリダイズ可能なＤＮＡの

ことをいう。

[0049] 具体的には、ハイブリダイズしたコロニーあるいはプラーク由来のＤＮＡ、または該配列を有するＰＣＲ産物若しくはオリゴＤＮＡを固定化したフィルター若しくはスライドガラスを用いて、０．７～１．０ｍｏｌ／Ｌの塩化ナトリウム存在下、６５℃でハイブリダイゼーション法［Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997)、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University, (1995)］を行った後、０．１～２倍濃度のＳＳＣ溶液（１倍濃度のＳＳＣ溶液の組成は、１５０ｍｍｏｌ／Ｌ塩化ナトリウム、１５ｍｍｏｌ／Ｌクエン酸ナトリウムよりなる）を用い、６５℃条件下でフィルターまたはスライドガラスを洗浄することにより同定できるＤＮＡを挙げることができる。

[0050] ハイブリダイズ可能なＤＮＡとしては配列番号１に記載の塩基配列、またはＮＭ＿００１２９５の塩基配列と少なくとも６０％以上の相同性を有するＤＮＡ、好ましくは８０％以上の相同性を有するＤＮＡ、さらに好ましくは９５％以上の相同性を有するＤＮＡを挙げることができる

[0051] 真核生物のタンパク質をコードする遺伝子の塩基配列には、しばしば遺伝子の多型が認められる。本発明において用いられる遺伝子に、このような多型によって塩基配列に小規模な変異を生じた遺伝子も本発明のヒトＣＣＲ１をコードする遺伝子に含有される。

[0052] 本発明における相同性の数値は、特に明示した場合を除き、当業者に公知の相同性検索プログラムを用いて算出される数値であってよいが、塩基配列については、ＢＬＡＳＴ［J. Mol. Biol., 215, 403 (1990)］においてデフォルトのパラメータを用いて算出される数値など、アミノ酸配列については、ＢＬＡＳＴ２［Nucleic Acids Res.,25, 3389 (1997)、Genome Res., 7, 649 (1997)、http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Education/BLASTinfo/information3.htmL］においてデフォルトのパラメータを用いて算出される数値などが挙

げられる。

[0053] デフォルトのパラメータとしては、Ｇ（Ｃｏｓｔ ｔｏ ｏｐｅｎ ｇａｐ）が塩基配列の場合は５、アミノ酸配列の場合は１１、－Ｅ（Ｃｏｓｔ ｔｏ ｅｘｔｅｎｄ ｇａｐ）が塩基配列の場合は２、アミノ酸配列の場合は１、－ｑ（Ｐｅｎａｌｔｙ ｆｏｒ ｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ ｍｉｓｍａｔｃｈ）が－３、－ｒ（ｒｅｗａｒｄ ｆｏｒ ｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ ｍａｔｃｈ）が１、－ｅ（ｅｘｐｅｃｔ ｖａｌｕｅ）が１０、－Ｗ（ｗｏｒｄｓｉｚｅ）が塩基配列の場合は１１残基、アミノ酸配列の場合は３残基、－ｙ［Ｄｒｏｐｏｆｆ（Ｘ）ｆｏｒ ｂｌａｓｔ ｅｘｔｅｎｓｉｏｎｓ ｉｎ ｂｉｔｓ］がｂｌａｓｔｎの場合は２０、ｂｌａｓｔｎ以外のプログラムでは７、－Ｘ（Ｘ ｄｒｏｐｏｆｆ ｖａｌｕｅ ｆｏｒ ｇａｐｐｅｄ ａｌｉｇｎｍｅｎｔ ｉｎ ｂｉｔｓ）が１５および－Ｚ（ｆｉｎａｌ Ｘ ｄｒｏｐｏｆｆ ｖａｌｕｅ ｆｏｒ ｇａｐｐｅｄ ａｌｉｇｎｍｅｎｔ ｉｎ ｂｉｔｓ）がｂｌａｓｔｎの場合は５０、ｂｌａｓｔｎ以外のプログラムでは２５である（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/htmL/blastcgihelp.htmL）。

[0054] 配列番号２に記載のアミノ酸配列またはＮＣＢＩアクセッション番号ＮＰ＿００１２８６のアミノ酸配列の部分配列を含むポリペプチドは、当業者に公知の方法によって作製することができる。具体的には、配列番号２のアミノ酸配列をコードするＤＮＡの一部を欠失させ、これを含む発現ベクターを導入した形質転換体を培養することにより作製することができる。また、上記と同様の方法により、配列番号２に記載のアミノ酸配列またはＮＣＢＩアクセッション番号ＮＰ＿００１２８６のアミノ酸配列において１以上のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチドを得ることができる。さらに、配列番号２に記載のアミノ酸配列若しくはＮＣＢＩアクセッション番号ＮＰ＿００１２８６のアミノ酸配列からなるポリペプチド、または配列番号２に記載のアミノ酸配列若しくはＮＣＢＩアクセッション番号ＮＰ＿００１２８６のアミノ酸配列において１以上のアミノ酸が欠

失、置換あるいは付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチドは、フルオレニルメチルオキシカルボニル（Ｆｍｏｃ）法、ｔ－ブチルオキシカルボニル（ｔＢｏｃ）法などの化学合成法によって製造することもできる。

[0055] 本発明の抗体としては、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体およびオリゴクローナル抗体のいずれの抗体をも包含する。ポリクローナル抗体とは、異なるクローンの抗体産生細胞が分泌する抗体分子の集団をいう。モノクローナル抗体とは、単一クローンの抗体産生細胞が分泌する抗体であり、ただ一つのエピトープ（抗原決定基ともいう）を認識し、モノクローナル抗体を構成するアミノ酸配列（一次配列）が均一である抗体をいう。オリゴクローナル抗体とは、複数の異なるモノクローナル抗体を混合した抗体分子の集団をいう。

[0056] 本発明におけるモノクローナル抗体としては、ハイブリドーマにより産生される抗体、または抗体遺伝子を含む発現ベクターで形質転換した形質転換体により産生される遺伝子組換え抗体をあげることができる。

[0057] エピトープとは、モノクローナル抗体が認識し、結合する単一のアミノ酸配列、アミノ酸配列からなる立体構造、翻訳後修飾により修飾されたアミノ酸配列および該アミノ酸配列からなる立体構造などが挙げられる。

[0058] 翻訳後修飾により修飾されたアミノ酸配列としては、糖鎖がＯＨ置換基を有するＴｙｒおよびＳｅｒに結合したＯ結合型糖鎖、NH_2置換基を有するＧｌｎおよびＡｓｎに結合したＮ結合型糖鎖ならびに硫酸分子がＯＨ置換基を有するＴｙｒに結合した硫酸基などが結合したアミノ酸配列が挙げられる。

[0059] 本発明の抗体がヒトＣＣＲ１の細胞外領域に結合することは、ヒトＣＣＲ１発現細胞に対する本発明の抗体の結合性を、ＥＬＩＳＡ、フローサイトメトリーおよび表面プラズモン共鳴法などを用いて測定することにより確認することができる。また、公知の免疫学的検出法 [Monoclonal Antibodies-Principles and practice, Third edition, Academic Press (1996)、Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)、単クローン抗体実験マニュアル、講談社サイエンティフィック（１９８７）] などを

組み合わせて確認することもできる。

[0060] 本発明の抗体が結合するヒトＣＣＲ１のアミノ酸残基またはエピトープは、ヒトＣＣＲ１の一部のドメインを欠失させた欠損体、他のタンパク質由来のドメインと置換させた変異体およびヒトＣＣＲ１の部分ペプチド断片等を用いて抗体の結合実験を行うことにより決定することができる。また、上記欠損体または変異体の発現細胞を用いて抗体の結合実験を行うこともできる。

[0061] または、本発明の抗体が結合するヒトＣＣＲ１のアミノ酸残基またはエピトープは、タンパク質分解酵素にて消化したヒトＣＣＲ１のペプチド断片に本発明の抗体を添加し、既知の質量分析法を用いてエピトープマッピングを行うことによっても決定することができる。

[0062] 本発明の抗体がヒトＣＣＬ１５によるヒトＣＣＲ１の活性化を阻害することは、例えば、ヒトＣＣＲ１発現細胞内でのＣＣＲ１依存的なシグナル伝達、ＰＬＣの活性化、細胞内のカルシウムイオン濃度上昇、ＮＦ－κＢ活性化、またはヒトＣＣＲ１発現細胞の遊走を指標として確認することができる。

[0063] 細胞の遊走は、以下に記載するケモタキシスアッセイを用いて測定することができる。例えば、ケモタキシスアッセイチャンバーの上部にヒトＣＣＲ１発現細胞を、該チャンバーの下部に１）培地またはＤＰＢＳなどのネガティブコントロール、２）ヒトＣＣＬ１５および３）ヒトＣＣＬ１５と本発明の抗体をそれぞれ添加し、一定時間培養した後に、該チャンバー下部に存在するヒトＣＣＲ１発現細胞数を適当な方法で測定する。得られた結果について、ヒトＣＣＬ１５を添加した時の細胞数が、培地を添加した時の細胞数よりも増加する条件下で、ヒトＣＣＬ１５と本発明の抗体を添加した時の細胞数が、ヒトＣＣＬ１５を添加した時の細胞数よりも減少していれば、本発明の抗体は、ヒトＣＣＬ１５によるヒトＣＣＲ１の活性化を阻害すると判定することができる。

[0064] また、本発明の抗体が、ヒトＣＣＬ１５によるヒトＣＣＲ１の活性化を阻害することは、ヒトＣＣＲ１発現細胞内でのカルシウムイオン濃度の変化を

指標として確認することができる。細胞内のカルシウム濃度の変化は、公知の方法で測定することができ、例えば、細胞内Ｃａ測定キット（Ｗａｋｏ社製）などを使用し、添付のプロトコールに従い測定することができる。

[0065] 確認方法としては、例えばヒトＣＣＲ１発現細胞に、１）培地またはＤＰＢＳなどのネガティブコントロール、２）ヒトＣＣＬ１５および３）ヒトＣＣＬ１５と本発明の抗体をそれぞれ添加した時の細胞内カルシウム濃度の変化を、上記の方法に従い測定する。ヒトＣＣＬ１５を添加した時の細胞内カルシウムイオン濃度が、培地を添加した時の細胞内カルシウムイオン濃度よりも増加する条件下で、ヒトＣＣＬ１５と本発明の抗体を添加した時の細胞内カルシウムイオン濃度が、ヒトＣＣＬ１５を添加した時の細胞内カルシウムイオン濃度よりも減少していれば、本発明の抗体は、ヒトＣＣＬ１５によるヒトＣＣＲ１の活性化を阻害すると判定することができる。

[0066] 抗体分子はイムノグロブリン（以下、Ｉｇと表記する）とも称され、ヒト抗体は、分子構造の違いに応じて、ＩｇＡ１、ＩｇＡ２、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４およびＩｇＭのアイソタイプに分類される。アミノ酸配列の相同性が比較的高いＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３およびＩｇＧ４を総称してＩｇＧともいう。

[0067] 抗体分子は重鎖（Ｈｅａｖｙ　ｃｈａｉｎ、以下Ｈ鎖と記す）および軽鎖（Ｌｉｇｈｔ　ｃｈａｉｎ、以下Ｌ鎖と記す）と呼ばれるポリペプチドより構成される。また、Ｈ鎖はＮ末端側よりＶＨ、Ｈ鎖定常領域（ＣＨとも表記される）、Ｌ鎖はＮ末端側よりＶＬ、Ｌ鎖定常領域（ＣＬとも表記される）の各領域により、それぞれ構成される。ＣＨは各サブクラスごとに、α、δ、ε、γおよびμ鎖がそれぞれ知られている。ＣＨはさらに、Ｎ末端側よりＣＨ１ドメイン、ヒンジドメイン、ＣＨ２ドメイン、ＣＨ３ドメインの各ドメインにより構成される。ドメインとは、抗体分子の各ポリペプチドを構成する機能的な構造単位をいう。また、ＣＨ２ドメインとＣＨ３ドメインを併せてＦｃ領域または単にＦｃという。ＣＬは、C_{λ}鎖およびC_{κ}鎖が知られている。

[0068] 本発明におけるＣＨ１ドメイン、ヒンジドメイン、ＣＨ２ドメイン、ＣＨ３ドメインおよびＦｃ領域は、ＥＵインデックス［Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991)］により、Ｎ末端からのアミノ酸残基の番号で特定することができる。具体的には、ＣＨ１はＥＵインデックス１１８～２１５番のアミノ酸配列、ヒンジはＥＵインデックス２１６～２３０番のアミノ酸配列、ＣＨ２はＥＵインデックス２３１～３４０番のアミノ酸配列、ＣＨ３はＥＵインデックス３４１～４４７番のアミノ酸配列とそれぞれ特定される。

[0069] 本発明の抗体としては、特に遺伝子工学的に作製された組換えマウス抗体、組換えラット抗体、組換えラビット抗体、ヒト型キメラ抗体（以下、単にキメラ抗体とも略記する）、ヒト化抗体（ヒト型相補性決定領域ＣＤＲ移植抗体ともいう）およびヒト抗体などの遺伝子組換え抗体も含まれる。

[0070] キメラ抗体とは、ヒト以外の動物（非ヒト動物）の抗体のＶＨおよびＶＬと、ヒト抗体のＣＨおよびＣＬからなる抗体を意味する。非ヒト動物としては、マウス、ラット、ハムスター、ラビット等、ハイブリドーマを作製することが可能であれば、いかなるものも用いることができる。

[0071] ハイブリドーマとは、非ヒト動物に抗原を免疫して取得されたＢ細胞と、マウスなどに由来するミエローマ細胞とを細胞融合させて得られる、所望の抗原特異性を有したモノクローナル抗体を産生する細胞をいう。したがって、ハイブリドーマが産生する抗体を構成する可変領域は、非ヒト動物抗体のアミノ酸配列からなる。

[0072] ヒト型キメラ抗体は、モノクローナル抗体を生産する非ヒト動物細胞由来のハイブリドーマより、該モノクローナル抗体のＶＨおよびＶＬをコードするｃＤＮＡを取得し、ヒト抗体のＣＨおよびＣＬをコードするＤＮＡを有する動物細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築し、動物細胞へ導入することにより発現させ、製造することができる。

[0073] ヒト化抗体とは、非ヒト動物抗体のＶＨおよびＶＬのＣＤＲのアミノ酸配

列をヒト抗体のＶＨおよびＶＬの対応するＣＤＲに移植した抗体をいう。ＶＨおよびＶＬのＣＤＲ以外の領域はフレームワーク領域（以下、ＦＲと表記する）と称される。

[0074] ヒト化抗体は、非ヒト動物抗体のＶＨのＣＤＲのアミノ酸配列と任意のヒト抗体のＶＨのＦＲのアミノ酸配列からなるＶＨのアミノ酸配列をコードするｃＤＮＡと、非ヒト動物抗体のＶＬのＣＤＲのアミノ酸配列と任意のヒト抗体のＶＬのＦＲのアミノ酸配列からなるＶＬのアミノ酸配列をコードするｃＤＮＡを構築し、ヒト抗体のＣＨおよびＣＬをコードするＤＮＡを有する動物細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト化抗体発現ベクターを構築し、動物細胞へ導入することにより発現させ、製造することができる。

[0075] ヒト抗体は、元来、ヒト体内に天然に存在する抗体をいうが、最近の遺伝子工学的、細胞工学的、発生工学的な技術の進歩により作製されたヒト抗体ファージライブラリーおよびヒト抗体産生トランスジェニック動物から得られる抗体等も含まれる。

[0076] ヒト抗体は、ヒトイムノグロブリン遺伝子を保持するマウス（Tomizuka K. et. al., Proc Natl Acad Sci U S A. 97, 722-7, 2000）に所望の抗原を免疫することにより、取得することが出来る。また、ヒト由来のＢ細胞から抗体遺伝子を増幅したｐｈａｇｅ ｄｉｓｐｌａｙライブラリーを用いることにより、所望の結合活性を有するヒト抗体を選択することで、免疫を行わずにヒト抗体を取得することができる（Winter G. et. al., Annu Rev Immunol.12:433-55. 1994）。さらに、ＥＢウイルスを用いてヒトＢ細胞を不死化することにより、所望の結合活性を有するヒト抗体を生産する細胞を作製し、ヒト抗体を取得することができる（Rosen A. et. al., Nature 267, 52-54.1977）。

[0077] ヒト体内に存在する抗体は、例えば、ヒト末梢血から単離したリンパ球を、ＥＢウイルス等を感染させることによって不死化した後、クローニングすることにより、該抗体を産生するリンパ球を得ることができ、該リンパ球を培養した培養物中より該抗体を精製することができる。

[0078] ヒト抗体ファージライブラリーは、ヒトＢ細胞から調製した抗体遺伝子をファージ遺伝子に挿入することによりＦａｂ、ｓｃＦｖ等の抗体断片を表面に発現させたファージのライブラリーである。該ライブラリーより、抗原を固定化した基質に対する結合活性を指標として所望の抗原結合活性を有する抗体断片を発現しているファージを回収することができる。該抗体断片は、更に遺伝子工学的手法により、２本の完全なＨ鎖および２本の完全なＬ鎖からなるヒト抗体分子へも変換することができる。

[0079] ヒト抗体産生トランスジェニック動物は、ヒト抗体遺伝子が宿主動物の染色体内に組込まれた動物をいう。具体的には、マウスＥＳ細胞へヒト抗体遺伝子を導入し、該ＥＳ細胞を他のマウスの初期胚へ移植後、発生させることによりヒト抗体産生トランスジェニック動物を作製することができる。ヒト抗体産生トランスジェニック動物からのヒト抗体の作製方法は、通常のヒト以外の哺乳動物で行われているハイブリドーマ作製方法によりヒト抗体産生ハイブリドーマを取得し、培養することで培養物中にヒト抗体を産生蓄積させることができる。

[0080] 本発明の抗体のＶＨおよびＶＬのアミノ酸配列としては、ヒト抗体のＶＨおよびＶＬのアミノ酸配列、非ヒト動物抗体のＶＨおよびＶＬのアミノ酸配列または非ヒト動物抗体のＣＤＲを、任意のヒト抗体のフレームワークに移植したヒト化抗体のＶＨおよびＶＬのアミノ酸配列のいずれでもよい。

[0081] 本発明の抗体におけるＣＬのアミノ酸配列としては、ヒト抗体のアミノ酸配列または非ヒト動物抗体のアミノ酸配列のいずれでもよいが、ヒト抗体のアミノ酸配列のC_κまたはC_λが好ましい。

[0082] 本発明の抗体のＣＨとしては、イムノグロブリンに属すればいかなるものでもよいが、好ましくはＩｇＧクラスに属するサブクラス、γ１（ＩｇＧ１）、γ２（ＩｇＧ２）、γ３（ＩｇＧ３）およびγ４（ＩｇＧ４）のいずれも用いることができる。

[0083] 本発明の抗体としては、Ｆｃと抗体断片とが結合したＦｃ融合タンパク質、Ｆｃと天然に存在するリガンドまたは受容体とが結合したＦｃ融合タンパ

ク質（イムノアドヘシンともいう）、複数のＦｃ領域を融合させたＦｃ融合タンパク質等も本発明に包含される。また、抗体を安定化させるためおよび血中半減期を制御するために、アミノ酸残基を改変したＦｃ領域なども本発明の抗体に用いることができる。

[0084] 本発明の抗体又は該抗体断片は、翻訳後修飾されたいかなるアミノ酸残基を含む抗体をも包含する。翻訳後修飾としては、例えば、Ｈ鎖のＣ末端におけるリジン残基の欠失［リジン・クリッピング（ｌｙｓｉｎｅ　ｃｌｉｐｐｉｎｇ）］またはポリペプチドのＮ末端におけるグルタミン残基のピログルタミン（ｐｙｒｏＧｌｕ）への変換などが挙げられる［Beck et al, Analytical Chemistry, 85, 715-736 (2013)］。

[0085] 本発明において、抗体断片とは、ヒトＣＣＲ１の細胞外領域に結合し、ヒトＣＣＬ１５によるヒトＣＣＲ１の活性化を阻害する、抗原結合活性を有する抗体断片である。本発明において抗体断片としては、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$、ｓｃＦｖ、ｄｉａｂｏｄｙ、ｄｓＦｖまたは複数のＣＤＲを含むペプチドなどが挙げられる。Ｆａｂは、ＩｇＧ抗体をタンパク質分解酵素パパインで処理して得られる断片のうち（Ｈ鎖の２２４番目のアミノ酸残基で切断される）、Ｈ鎖のＮ末端側約半分とＬ鎖全体がジスルフィド結合（Ｓ－Ｓ結合）で結合した、分子量約５万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

[0086] Ｆ（ａｂ’）$_2$は、ＩｇＧをタンパク質分解酵素ペプシンで処理して得られる断片のうち（Ｈ鎖の２３４番目のアミノ酸残基で切断される）、Ｆａｂがヒンジ領域のＳ－Ｓ結合を介して結合されたものよりやや大きい、分子量約１０万の抗原結合活性を有する抗体断片である。Ｆａｂ’は、上記Ｆ（ａｂ’）$_2$のヒンジ領域のＳ－Ｓ結合を切断した分子量約５万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

[0087] ｓｃＦｖは、１本のＶＨと１本のＶＬとを４個のＧｌｙおよび１個のＳｅｒ残基からなるリンカー（Ｇ４Ｓ）を任意の個数つなげたリンカーペプチドなどの適当なペプチドリンカー（Ｐ）を用いて連結した、ＶＨ－Ｐ－ＶＬな

いしはＶＬ－Ｐ－ＶＨポリペプチドで、抗原結合活性を有する抗体断片である。

[0088] Ｄｉａｂｏｄｙは、抗原結合特異性の同じまたは異なるｓｃＦｖが２量体を形成した抗体断片で、同じ抗原に対する２価の抗原結合活性または異なる抗原に対する特異的な抗原結合活性を有する抗体断片である。

[0089] ｄｓＦｖは、ＶＨおよびＶＬ中のそれぞれ１アミノ酸残基をシステイン残基に置換したポリペプチドを該システイン残基間のＳ－Ｓ結合を介して結合させたものをいう。

[0090] ＣＤＲを含むペプチドは、ＶＨまたはＶＬのＣＤＲの少なくとも１領域以上を含んで構成される。複数のＣＤＲを含むペプチドは、ＣＤＲ同士を直接または適当なペプチドリンカーを介して結合させることができる。本発明の改変抗体のＶＨおよびＶＬのＣＤＲをコードするＤＮＡを構築し、該ＤＮＡを原核生物用発現ベクターまたは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物または真核生物へ導入することにより発現させ、製造することができる。また、ＣＤＲを含むペプチドは、Ｆｍｏｃ法またはｔＢｏｃ法などの化学合成法によって製造することもできる。

[0091] 本発明のモノクローナル抗体には、本発明のヒトＣＣＲ１に結合するモノクローナル抗体またはその抗体断片に放射性同位元素、低分子の薬剤、高分子の薬剤、タンパク質または抗体医薬などを化学的または遺伝子工学的に結合させた抗体の誘導体を包含する。

[0092] 抗体の誘導体は、本発明のヒトＣＣＲ１に結合するモノクローナル抗体またはその抗体断片のＨ鎖若しくはＬ鎖のＮ末端側、Ｃ末端側、抗体分子中の適当な置換基または側鎖あるいは糖鎖などに、放射性同位元素、低分子の薬剤、高分子の薬剤、免疫賦活剤、タンパク質、抗体医薬または核酸医薬などを化学的手法［抗体工学入門、地人書館（１９９４）］により結合させることにより製造することができる。

[0093] また、本発明のヒトＣＣＲ１に結合するモノクローナル抗体またはその抗体断片をコードするＤＮＡと、結合させたいタンパク質または抗体医薬をコ

ードするＤＮＡを連結させて発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを適当な宿主細胞へ導入し、発現させる遺伝子工学的手法より製造することができる。

[0094] 放射性同位元素としては、例えば、^{111}Ｉｎ、^{131}Ｉ、^{125}Ｉ、^{90}Ｙ、^{64}Ｃｕ、^{99}Ｔｃ、^{77}ＬｕまたはAt211などが挙げられる。放射性同位元素は、クロラミンＴ法などによって抗体に直接結合させることができる。また、放射性同位元素をキレートする物質を抗体に結合させてもよい。キレート剤としては、例えば、１－イソチオシアネートベンジル－３－メチルジエチレントリアミンペンタ酢酸（ＭＸ－ＤＴＰＡ）などが挙げられる。

[0095] 低分子の薬剤としては、例えば、アルキル化剤、ニトロソウレア剤、代謝拮抗剤、抗生物質、植物アルカロイド、トポイソメラーゼ阻害剤、ホルモン療法剤、ホルモン拮抗剤、アロマターゼ阻害剤、Ｐ糖蛋白阻害剤、白金錯体誘導体、Ｍ期阻害剤若しくはキナーゼ阻害剤などの抗癌剤［臨床腫瘍学、癌と化学療法社（１９９６）］、ハイドロコーチゾン若しくはプレドニゾンなどのステロイド剤、アスピリン若しくはインドメタシンなどの非ステロイド剤、金チオマレート若しくはペニシラミンなどの免疫調節剤、サイクロフォスファミド若しくはアザチオプリンなどの免疫抑制剤またはマレイン酸クロルフェニラミン若しくはクレマシチンのような抗ヒスタミン剤などの抗炎症剤［炎症と抗炎症療法、医歯薬出版株式会社（１９８２）］などが挙げられる。

[0096] 抗癌剤としては、例えば、アミフォスチン（エチオール）、シスプラチン、ダカルバジン（ＤＴＩＣ）、ダクチノマイシン、メクロレタミン（ナイトロジェンマスタード）、ストレプトゾシン、シクロフォスファミド、イホスファミド、カルムスチン（ＢＣＮＵ）、ロムスチン（ＣＣＮＵ）、ドキソルビシン（アドリアマイシン）、エピルビシン、ゲムシタビン（ゲムザール）、ダウノルビシン、プロカルバジン、マイトマイシン、シタラビン、エトポシド、メトトレキセート、５－フルオロウラシル、フルオロウラシル、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ブレオマイシン、ダウノマイシン、ペプロマ

イシン、エストラムスチン、パクリタキセル（タキソール）、ドセタキセル（タキソテア）、アルデスロイキン、アスパラギナーゼ、ブスルファン、カルボプラチン、オキサリプラチン、ネダプラチン、クラドリビン、カンプトテシン、１０－ヒドロキシ－７－エチル－カンプトテシン（ＳＮ３８）、フロクスウリジン、フルダラビン、ヒドロキシウレア、イダルビシン、メスナ、イリノテカン（ＣＰＴ－１１）、ノギテカン、ミトキサントロン、トポテカン、ロイプロリド、メゲストロール、メルファラン、メルカプトプリン、ヒドロキシカルバミド、プリカマイシン、ミトタン、ペガスパラガーゼ、ペントスタチン、ピポブロマン、タモキシフェン、ゴセレリン、リュープロレニン、フルタミド、テニポシド、テストラクトン、チオグアニン、チオテパ、ウラシルマスタード、ビノレルビン、クロラムブシル、ハイドロコーチゾン、プレドニゾロン、メチルプレドニゾロン、ビンデシン、ニムスチン、セムスチン、カペシタビン、トムデックス、アザシチジン、ＵＦＴ、オキザロプラチン、ゲフィチニブ（イレッサ）、イマチニブ（ＳＴＩ５７１）、エルロチニブ、ＦＭＳ－ｌｉｋｅ ｔｙｒｏｓｉｎｅ ｋｉｎａｓｅ ３（Ｆｌｔ３）阻害剤、ｖａｓｃｕｌａｒ ｅｎｄｏｔｈｅｌｉａｌ ｇｒｏｗｔｈ ｆａｃｏｔｒ ｒｅｃｅｐｔｏｒ（ＶＥＧＦＲ）阻害剤、ｆｉｂｒｏｂｌａｓｔ ｇｒｏｗｔｈ ｆａｃｔｏｒ ｒｅｃｅｐｔｏｒ（ＦＧＦＲ）阻害剤、イレッサ若しくはタルセバなどのｅｐｉｄｅｒｍａｌ ｇｒｏｗｔｈ ｆａｃｔｏｒ ｒｅｃｅｐｔｏｒ（ＥＧＦＲ）阻害剤、ラディシコール、１７－アリルアミノ－１７－デメトキシゲルダナマイシン、ラパマイシン、アムサクリン、オール－トランスレチノイン酸、サリドマイド、レナリドマイド、アナストロゾール、ファドロゾール、レトロゾール、エキセメスタン、金チオマレート、Ｄ－ペニシラミン、ブシラミン、アザチオプリン、ミゾリビン、シクロスポリン、ラパマイシン、ヒドロコルチゾン、ベキサロテン（ターグレチン）、タモキシフェン、デキサメタゾン、プロゲスチン類、エストロゲン類、アナストロゾール（アリミデックス）、ロイプリン、アスピリン、インドメタシン、セレコキシブ、ペニシラミン、金チオマレート、マレ

イン酸クロルフェニラミン、クロロフェニラミン、クレマシチン、トレチノイン、ベキサロテン、砒素、ボルテゾミブ、アロプリノール、カリケアマイシン、イブリツモマブチウキセタン、タルグレチン、オゾガミン、クラリスロマシン、ロイコボリン、ケトコナゾール、アミノグルテチミド、スラミンまたはメイタンシノイドあるいはその誘導体などが挙げられる。

[0097] 低分子の薬剤と抗体とを結合させる方法としては、例えば、グルタールアルデヒドを介して薬剤と抗体のアミノ基間を結合させる方法または水溶性カルボジイミドを介して薬剤のアミノ基と抗体のカルボキシル基を結合させる方法などが挙げられる。

[0098] 高分子の薬剤としては、例えば、ポリエチレングリコール（以下、ＰＥＧと表記する）、アルブミン、デキストラン、ポリオキシエチレン、スチレンマレイン酸コポリマー、ポリビニルピロリドン、ピランコポリマー、またはヒドロキシプロピルメタクリルアミドなどが挙げられる。これらの高分子化合物を抗体またはその抗体断片に結合させることにより、（１）化学的、物理的若しくは生物的な種々の因子に対する安定性の向上、（２）血中半減期の顕著な延長、または（３）免疫原性の消失若しくは抗体産生の抑制、などの効果が期待される［バイオコンジュゲート医薬品、廣川書店（１９９３）］。

[0099] 例えば、ＰＥＧと抗体を結合させる方法としては、ＰＥＧ化修飾試薬と反応させる方法などが挙げられる［バイオコンジュゲート医薬品、廣川書店（１９９３）］。ＰＥＧ化修飾試薬としては、リジンのε－アミノ基への修飾剤（日本国特開昭６１－１７８９２６号公報）、アスパラギン酸およびグルタミン酸のカルボキシル基への修飾剤（日本国特開昭５６－２３５８７号公報）、またはアルギニンのグアニジノ基への修飾剤（日本国特開平２－１１７９２０号公報）などが挙げられる。

[0100] 免疫賦活剤としては、イムノアジュバントとして知られている天然物でもよく、具体例としては、免疫を亢進する薬剤が、β（１→３）グルカン（例えば、レンチナンまたはシゾフィラン）またはαガラクトシルセラミド（Ｋ

ＲＮ７０００）などが挙げられる。

[0101] タンパク質としては、例えば、ＮＫ細胞、マクロファージまたは好中球などの免疫担当細胞を活性化するサイトカイン若しくは増殖因子または毒素タンパク質などが挙げられる。

[0102] サイトカインまたは増殖因子としては、例えば、インターフェロン（以下、ＩＦＮと記す）－α、ＩＦＮ－β、ＩＦＮ－γ、インターロイキン（以下、ＩＬと記す）－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、ＩＬ－２３、顆粒球コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）、顆粒球／マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）またはマクロファージコロニー刺激因子（Ｍ－ＣＳＦ）などが挙げられる。毒素タンパク質としては、例えば、リシン、ジフテリアトキシンまたはＯＮＴＡＫなどが挙げられ、毒性を調節するためにタンパク質に変異を導入したタンパク毒素も含まれる。

[0103] 抗体医薬としては、例えば、抗体の結合によりアポトーシスが誘導される抗原、腫瘍の病態形成に関わる抗原、免疫機能を調節する抗原または病変部位の血管新生に関与する抗原に対する抗体が挙げられる。

[0104] 抗体の結合によりアポトーシスが誘導される抗原としては、例えば、ｃｌｕｓｔｅｒ ｏｆ ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｉｏｎ（以下、ＣＤと記載する）１９、ＣＤ２０、ＣＤ２１、ＣＤ２２、ＣＤ２３、ＣＤ２４、ＣＤ３７、ＣＤ５３、ＣＤ７２、ＣＤ７３、ＣＤ７４、ＣＤｗ７５、ＣＤｗ７６、ＣＤ７７、ＣＤｗ７８、ＣＤ７９ａ、ＣＤ７９ｂ、ＣＤ８０（Ｂ７．１）、ＣＤ８１、ＣＤ８２、ＣＤ８３、ＣＤｗ８４、ＣＤ８５、ＣＤ８６（Ｂ７．２）、ｈｕｍａｎ ｌｅｕｋｏｃｙｔｅ ａｎｔｉｇｅｎ（ＨＬＡ）－Ｃｌａｓｓ ＩＩまたはＥｐｉｄｅｒｍａｌ Ｇｒｏｗｔｈ Ｆａｃｔｏｒ Ｒｅｃｅｐｔｏｒ（ＥＧＦＲ）などが挙げられる。

[0105] 腫瘍の病態形成に関わる抗原または免疫機能を調節する抗体の抗原としては、例えば、ＣＤ４、ＣＤ４０、ＣＤ４０リガンド、Ｂ７ファミリー分子（例えば、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＤ２７４、Ｂ７－ＤＣ、Ｂ７－Ｈ２、Ｂ７－Ｈ３またはＢ７－Ｈ４）、Ｂ７ファミリー分子のリガンド（例えば、ＣＤ

２８、ＣＴＬＡ－４、ＩＣＯＳ、ＰＤ－１またはＢＴＬＡ）、ＯＸ－４０、ＯＸ－４０リガンド、ＣＤ１３７、ｔｕｍｏｒ ｎｅｃｒｏｓｉｓ ｆａｃｔｏｒ（ＴＮＦ）受容体ファミリー分子（例えば、ＤＲ４、ＤＲ５、ＴＮＦＲ１またはＴＮＦＲ２）、ＴＮＦ－ｒｅｌａｔｅｄ ａｐｏｐｔｏｓｉｓ－ｉｎｄｕｃｉｎｇ ｌｉｇａｎｄ ｒｅｃｅｐｔｏｒ（ＴＲＡＩＬ）ファミリー分子、ＴＲＡＩＬファミリー分子の受容体ファミリー（例えば、ＴＲＡＩＬ－Ｒ１、ＴＲＡＩＬ－Ｒ２、ＴＲＡＩＬ－Ｒ３またはＴＲＡＩＬ－Ｒ４）、ｒｅｃｅｐｔｏｒ ａｃｔｉｖａｔｏｒ ｏｆ ｎｕｃｌｅａｒ ｆａｃｔｏｒ ｋａｐｐａ Ｂ ｌｉｇａｎｄ（ＲＡＮＫ）、ＲＡＮＫリガンド、ＣＤ２５、葉酸受容体、サイトカイン［例えば、ＩＬ－１α、ＩＬ－１β、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－６、ＩＬ－１０、ＩＬ－１３、ｔｒａｎｓｆｏｒｍｉｎｇ ｇｒｏｗｔｈ ｆａｃｔｏｒ（ＴＧＦ）βまたはＴＮＦαなど］若しくはこれらのサイトカインの受容体、またはケモカイン（例えば、ＳＬＣ、ＥＬＣ、Ｉ－３０９、ＴＡＲＣ、ＭＤＣまたはＣＴＡＣＫなど）若しくはこれらのケモカインの受容体が挙げられる。

[0106] 病変部位の血管新生を阻害する抗体の抗原としては、例えば、ｖａｓｃｕｌａｒ ｅｎｄｏｔｈｅｌｉａｌ ｇｒｏｗｔｈ ｆａｃｔｏｒ（ＶＥＧＦ）、ａｎｇｉｏｐｏｉｅｔｉｎ、ｆｉｂｒｏｂｌａｓｔ ｇｒｏｗｔｈ ｆａｃｔｏｒ（ＦＧＦ）、ＥＧＦ、ｈｅｐａｔｏｃｙｔｅ ｇｒｏｗｔｈ ｆａｃｔｏｒ（ＨＧＦ）、ｐｌａｔｅｌｅｔ－ｄｅｒｉｖｅｄ ｇｒｏｗｔｈ ｆａｃｔｏｒ（ＰＤＧＦ）、ｉｎｓｕｌｉｎ－ｌｉｋｅ ｇｒｏｗｔｈ ｆａｃｔｏｒ（ＩＧＦ）、ｅｒｙｔｈｒｏｐｏｉｅｔｉｎ（ＥＰＯ）、ＴＧＦβ、ＩＬ－８、ｅｐｈｒｉｎまたはＳＤＦ－１若しくはこれらの受容体などが挙げられる。

[0107] タンパク質または抗体医薬との融合抗体は、モノクローナル抗体または抗体断片をコードするｃＤＮＡにタンパク質または抗体医薬に含まれる抗体をコードするｃＤＮＡを連結させ、融合抗体をコードするＤＮＡを構築し、該ＤＮＡを原核生物または真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクター

を原核生物または真核生物へ導入することにより発現させ、融合抗体を製造することができる。

[0108] 核酸医薬としては、例えば、遺伝子の機能を制御することによって生体に作用するｓｍａｌｌ ｉｎｔｅｒｆｅｒｅｎｃｅ ｒｉｂｏｎｕｃｌｅｉｃ ａｃｉｄ（ｓｉＲＮＡ）またはｍｉｃｒｏＲＮＡなどの核酸を含む医薬品が挙げられる。例えば、Ｔｈ１７細胞のマスター転写因子ＲＯＲγｔを抑制する核酸医薬とのコンジュゲートが考えられる。

[0109] 本発明の抗体の誘導体をヒトＣＣＲ１の検出および測定ならびにヒトＣＣＲ１関連疾患の診断に使用する場合に、当該抗体に結合する薬剤としては、通常の免疫学的検出または測定法で用いられる標識体が挙げられる。標識体としては、例えば、アルカリフォスファターゼ、ペルオキシダーゼ若しくはルシフェラーゼなどの酵素、アクリジニウムエステル若しくはロフィンなどの発光物質、またはフルオレセインイソチオシアネート（ＦＩＴＣ）若しくはテトラメチルローダミンイソチオシアネート（ＲＩＴＣ）などの蛍光物質などが挙げられる。

[0110] また、本発明は、ヒトＣＣＲ１に結合するモノクローナル抗体またはその抗体断片を有効成分として含有する組成物を含む。

[0111] また、本発明は、ヒトＣＣＲ１に結合するモノクローナル抗体またはその抗体断片を有効成分として含有する、ヒトＣＣＲ１関連疾患の治療薬に関する。また、本発明は、ヒトＣＣＲ１に結合するモノクローナル抗体またはその抗体断片を投与することを含む、ヒトＣＣＲ１関連疾患の治療方法に関する。

[0112] ヒトＣＣＲ１関連疾患としては、ヒトＣＣＲ１又はヒトＣＣＲ１のリガンドが関与する疾患であればいかなるものでもよく、例えば、癌、自己免疫疾患および炎症性疾患が挙げられる。癌疾患としては、例えば、びまん性大細胞型Ｂ細胞性リンパ腫、濾胞性リンパ腫、Ｂ細胞リンパ腫、Ｔ細胞リンパ腫、形質細胞性骨髄腫、急性骨髄性白血病、ホジキンリンパ腫、慢性リンパ性白血病、有毛細胞白血病、マントル細胞リンパ腫、濾胞辺縁帯リンパ腫、小

リンパ球性リンパ腫、多発性骨髄腫、肝細胞癌、結腸直腸癌、非小細胞肺癌、口腔扁平上皮癌、卵巣癌、前立腺癌、乳癌、神経膠腫または骨肉腫などが挙げられる。自己免疫疾患または炎症性疾患としては、例えば、関節リウマチ、多発性硬化症、慢性閉塞肺疾患、全身性エリテマトーデス、ループス腎炎、喘息、アトピー性皮膚炎、炎症性大腸炎、クローン病またはベーチェット病などが挙げられる。

[0113] 本発明の抗体または該抗体断片を含有する治療剤は、有効成分としての該抗体または該抗体断片のみを含むものであってもよいが、通常は薬理学的に許容される１以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野において公知の任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが好ましい。

[0114] 投与経路は、治療に際して最も効果的なものを使用するのが好ましく、経口投与、または口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内若しくは静脈内などの非経口投与が挙げられ、好ましくは静脈内投与を挙げられる。投与形態としては、例えば、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、軟膏またはテープ剤などが挙げられる。

[0115] 投与量または投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢および体重などにより異なるが、通常成人１日当たり１０μｇ／ｋｇ～１０ｍｇ／ｋｇである。

[0116] 本発明はヒトＣＣＲ１に結合するモノクローナル抗体または該抗体断片を含有する、ＣＣＲ１の検出若しくは測定用試薬、またはヒトＣＣＲ１に結合するモノクローナル抗体または該抗体断片を用いたＣＣＲ１の検出若しくは測定方法に関する。本発明においてヒトＣＣＲ１を検出または測定する方法としては、任意の公知の方法が挙げられる。例えば、免疫学的検出または測定方法などが挙げられる。

[0117] 免疫学的検出または測定方法とは、標識を施した抗原または抗体を用いて、抗体量または抗原量を検出または測定する方法である。免疫学的検出または測定方法としては、例えば、放射性物質標識免疫抗体法（ＲＩＡ）、酵素免疫測定法（ＥＩＡまたはＥＬＩＳＡ）、蛍光免疫測定法（ＦＩＡ）、発光

免疫測定法（ｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｔ　ｉｍｍｕｎｏａｓｓａｙ）、ウエスタンブロット法または物理化学的手法などが挙げられる。

[0118] 本発明はヒトＣＣＲ１に結合するモノクローナル抗体又は該抗体断片を含む、ＣＣＲ１関連疾患の診断薬、またはヒトＣＣＲ１に結合するモノクローナル抗体又は該抗体断片を用いてＣＣＲ１の検出または測定をすることを含む、ＣＣＲ１関連疾患の診断方法に関する。本発明のモノクローナル抗体または該抗体断片を用いて、上記の方法に従いヒトＣＣＲ１が発現した細胞を検出または測定することにより、ヒトＣＣＲ１が関連する疾患を診断することができる。

[0119] 本発明においてヒトＣＣＲ１を検出または測定する対象となる生体試料としては、例えば、組織、細胞、血液、血漿、血清、膵液、尿、糞便、組織液または培養液など、ヒトＣＣＲ１又はヒトＣＣＲ１が発現している細胞を含む可能性のあるものであれば特に限定されない。

[0120] 本発明のモノクローナル抗体またはその抗体断片を含有する診断薬は、目的の診断法に応じて、抗原抗体反応を行なうための試薬、該反応の検出用試薬を含んでもよい。抗原抗体反応を行なうための試薬としては、緩衝剤、塩などが挙げられる。検出用試薬としては、該モノクローナル抗体若しくはその抗体断片を認識する標識された二次抗体、または標識に対応した基質などの通常の免疫学的検出または測定法に用いられる試薬が挙げられる。

[0121] また、本発明はＣＣＲ１関連疾患の治療薬若しくは診断薬の製造のための、抗ヒトＣＣＲ１モノクローナル抗体または該抗体断片の使用に関する。

[0122] 以下に、本発明の抗体の製造方法、疾患の治療方法、および疾患の診断方法について、具体的に説明する。

[0123] １．抗体の製造方法

（１）抗原の調製

抗原となるヒトＣＣＲ１またはヒトＣＣＲ１発現細胞は、ヒトＣＣＲ１全長またはその部分長をコードするｃＤＮＡを含む発現ベクターを、大腸菌、酵母、昆虫細胞または動物細胞などに導入することで得ることができる。ま

た、ヒトＣＣＲ１は、ヒトＣＣＲ１を多量に発現している各種ヒト細胞株、ヒト細胞およびヒト組織などからヒトＣＣＲ１を精製することによっても得ることができる。また、これらヒト細胞株、ヒト細胞およびヒト組織などをそのまま抗原として使用することもできる。さらに、Ｆｍｏｃ法またはｔＢｏｃ法などの化学合成法によりヒトＣＣＲ１の部分配列を有する合成ペプチドを調製し、抗原に用いることもできる。ヒトＣＣＲ１またはヒトＣＣＲ１の部分配列を有する合成ペプチドには、Ｃ末端またはＮ末端にＦＬＡＧまたはＨｉｓなどの公知のタグが付加されていてもよい。

[0124] 本発明で用いられるヒトＣＣＲ１は、Molecular Cloning,A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)やCurrent Protocols In Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997)などに記載された方法などを用い、例えば以下の方法により、該ヒトＣＣＲ１をコードするＤＮＡを宿主細胞中で発現させて、製造することができる。

[0125] まず、ヒトＣＣＲ１をコードする部分を含む完全長ｃＤＮＡを適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換えベクターを作製する。上記完全長ｃＤＮＡの代わりに、完全長ｃＤＮＡをもとにして調製された、ポリペプチドをコードする部分を含む適当な長さのＤＮＡ断片を用いてもよい。次に、得られた該組換えベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより、ポリペプチドを生産する形質転換体を得ることができる。

[0126] 発現ベクターとしては、使用する宿主細胞における自律複製または染色体中への組込みが可能で、ポリペプチドをコードするＤＮＡを転写できる位置に、適当なプロモーターを含有しているものであればいずれも用いることができる。宿主細胞としては、大腸菌などのエシェリヒア属などに属する微生物、酵母、昆虫細胞または動物細胞など、目的とする遺伝子を発現できるものであればいずれも用いることができる。

[0127] 大腸菌などの原核生物を宿主細胞として用いる場合、組換えベクターは、原核生物中で自律複製が可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結

合配列、ヒトＣＣＲ１をコードする部分を含むＤＮＡ、および転写終結配列を含むベクターであることが好ましい。また、該組換えベクターには、転写終結配列は必ずしも必要ではないが、構造遺伝子の直下に転写終結配列を配置することが好ましい。さらに、該組換えベクターには、プロモーターを制御する遺伝子を含んでいてもよい。

[0128] 該組換えベクターとしては、リボソーム結合配列であるシャイン・ダルガルノ配列（ＳＤ配列ともいう）と開始コドンとの間を適当な距離（例えば６～１８塩基）に調節したプラスミドを用いることが好ましい。

[0129] また、該ヒトＣＣＲ１をコードするＤＮＡの塩基配列としては、宿主内での発現に最適なコドンとなるように塩基を置換することができ、これにより目的とするヒトＣＣＲ１の生産率を向上させることができる。

[0130] 発現ベクターとしては、使用する宿主細胞中で機能を発揮できるものであればいずれも用いることができ、例えば、ｐＢＴｒｐ２、ｐＢＴａｃ１、ｐＢＴａｃ２（以上、ロシュ・ダイアグノスティックス社製）、ｐＫＫ２３３－２（ファルマシア社製）、ｐＳＥ２８０（インビトロジェン社製）、ｐＧＥＭＥＸ－１（プロメガ社製）、ｐＱＥ－８（キアゲン社製）、ｐＫＹＰ１０（日本国特開昭５８－１１０６００号公報）、ｐＫＹＰ２００［Agricultural Biological Chemistry, 48, 669 (1984)］、ｐＬＳＡ１［Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989)］、ｐＧＥＬ１［Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4306 (1985)］、ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ ＩＩ ＳＫ（－）（ストラタジーン社製）、ｐＴｒｓ３０［大腸菌ＪＭ１０９／ｐＴｒＳ３０（ＦＥＲＭ ＢＰ－５４０７）より調製］、ｐＴｒｓ３２［大腸菌ＪＭ１０９／ｐＴｒＳ３２（ＦＥＲＭ ＢＰ－５４０８）より調製］、ｐＧＨＡ２［大腸菌ＩＧＨＡ２（ＦＥＲＭ ＢＰ－４００）より調製、日本国特開昭６０－２２１０９１号公報］、ｐＧＫＡ２［大腸菌ＩＧＫＡ２（ＦＥＲＭ ＢＰ－６７９８）より調製、日本国特開昭６０－２２１０９１号公報］、ｐＴｅｒｍ２（米国特許第４，６８６，１９１号明細書、米国特許第４，９３９，０９４号明細書、米国特許第１６０，７３５号明細書）、ｐＳｕｐｅｘ、ｐＵＢ１１０、ｐ

ＴＰ５、ｐＣ１９４、ｐＥＧ４００［J. Bacteriol., 172, 2392 (1990)］、ｐＧＥＸ（ファルマシア社製）、ｐＥＴシステム（ノバジェン社製）またはｐＭＥ１８ＳＦＬ３などが挙げられる。

[0131] プロモーターとしては、使用する宿主細胞中で機能を発揮できるものであればいかなるものでもよい。例えば、ｔｒｐプロモーター（Ｐｔｒｐ）、ｌａｃプロモーター、ＰＬプロモーター、ＰＲプロモーターまたはＴ７プロモーターなどの、大腸菌またはファージなどに由来するプロモーターが挙げられる。また、例えば、Ｐｔｒｐを２つ直列させたタンデムプロモーター、ｔａｃプロモーター、ｌａｃＴ７プロモーターまたはｌｅｔ Ｉプロモーターなどの人為的に設計改変されたプロモーターなどが挙げられる。

[0132] 宿主細胞としては、例えば、大腸菌ＸＬ１－Ｂｌｕｅ、大腸菌ＸＬ２－Ｂｌｕｅ、大腸菌ＤＨ１、大腸菌ＭＣ１０００、大腸菌ＫＹ３２７６、大腸菌Ｗ１４８５、大腸菌ＪＭ１０９、大腸菌ＨＢ１０１、大腸菌Ｎｏ．４９、大腸菌Ｗ３１１０、大腸菌ＮＹ４９または大腸菌ＤＨ５αなどが挙げられる。

[0133] 宿主細胞への組換えベクターの導入方法としては、使用する宿主細胞へＤＮＡを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、カルシウムイオンを用いる方法［Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972)、Gene, 17, 107 (1982)、Molecular & General Genetics, 168, 111 (1979)］が挙げられる。

[0134] 動物細胞を宿主として用いる場合、発現ベクターとしては、動物細胞中で機能を発揮できるものであればいずれも用いることができ、例えば、ｐｃＤＮＡⅠ、ｐＣＤＭ８（フナコシ社製）、ｐＡＧＥ１０７［日本国特開平３－２２９７９号公報；Cytotechnology, 3, 133 (1990)］、ｐＡＳ３－３（日本国特開平２－２２７０７５号公報）、ｐＣＤＭ８［Nature, 329, 840 (1987)］、ｐｃＤＮＡⅠ／Ａｍｐ（インビトロジェン社製）、ｐｃＤＮＡ３．１（インビトロジェン社製）、ｐＲＥＰ４（インビトロジェン社製）、ｐＡＧＥ１０３［J. Biochemistry, 101, 1307 (1987)］、ｐＡＧＥ２１０、ｐＭＥ１８ＳＦＬ３、ｐＫＡＮＴＥＸ９３（国際公開第９７／１０３５４号）、Ｎ５

ＫＧ１ｖａｌ（米国特許第６，００１，３５８号明細書）、ＩＮＰＥＰ４（Ｂｉｏｇｅｎ－ＩＤＥＣ社製）およびトランスポゾンベクター（国際公開第２０１０／１４３６９８号）などが挙げられる。

[0135] プロモーターとしては、動物細胞中で機能を発揮できるものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）のｉｍｍｅｄｉａｔｅ ｅａｒｌｙ（ＩＥ）遺伝子のプロモーター、ＳＶ４０の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、ＳＲαプロモーターまたはモロニーマウス白血病ウイルスのプロモーター若しくはエンハンサーが挙げられる。また、ヒトＣＭＶのＩＥ遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

[0136] 宿主細胞としては、例えば、ヒト白血病細胞Ｎａｍａｌｗａ細胞、サル細胞ＣＯＳ細胞、チャイニーズ・ハムスター卵巣細胞ＣＨＯ細胞［Journal of Experimental Medicine, 108, 945 (1958); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 60 , 1275 (1968); Genetics, 55, 513 (1968); Chromosoma, 41, 129 (1973); Methods in Cell Science, 18, 115 (1996); Radiation Research, 148, 260 (1997); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216 (1980); Proc. Natl. Acad. Sci., 60, 1275 (1968); Cell, 6, 121 (1975); Molecular Cell Genetics, Appendix I, II (pp. 883-900)］；ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子（以下、ｄｈｆｒと表記する）が欠損したＣＨＯ細胞（ＣＨＯ／ＤＧ４４細胞）［Proc.Natl.Acad.Sci.USA,77,4216(1980)］、ＣＨＯ－Ｋ１（ＡＴＣＣ ＣＣＬ－６１）、ＤＵｋＸＢ１１（ＡＴＣＣ ＣＣＬ－９０９６）、Ｐｒｏ－５（ＡＴＣＣ ＣＣＬ－１７８１）、ＣＨＯ－Ｓ（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｃａｔ＃１１６１９）、Ｐｒｏ－３、ラットミエローマ細胞ＹＢ２／３ＨＬ．Ｐ２．Ｇ１１．１６Ａｇ．２０（またはＹＢ２／０ともいう）、マウスミエローマ細胞ＮＳＯ、マウスミエローマ細胞ＳＰ２／０－Ａｇ１４、シリアンハムスター細胞ＢＨＫまたはＨＢＴ５６３７（日本国特開昭６３－０００２９９号公報）などが挙げられる。

[0137] 宿主細胞への組換えベクターの導入方法としては、動物細胞にＤＮＡを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法［Cytotechnology, 3, 133 (1990)］、リン酸カルシウム法（日本国特開平２－２２７０７５号公報）またはリポフェクション法［Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)］、などが挙げられる。

[0138] 以上のようにして得られるヒトＣＣＲ１をコードするＤＮＡを組み込んだ組換えベクターを保有する微生物または動物細胞などの由来の形質転換体を培地中で培養し、培養液中に該ヒトＣＣＲ１を生成蓄積させ、該培養液から採取することにより、ヒトＣＣＲ１を製造することができる。該形質転換体を培地中で培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。

[0139] 真核生物由来の細胞で発現させた場合には、糖または糖鎖が付加されたヒトＣＣＲ１を得ることができる。

[0140] 誘導性のプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、ｌａｃプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養する場合にはイソプロピル－β－Ｄ－チオガラクトピラノシドなどを、ｔｒｐプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養する場合にはインドールアクリル酸などを培地に添加してもよい。

[0141] 動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、例えば、一般に使用されているＲＰＭＩ１６４０培地［The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)］、ＥａｇｌｅのＭＥＭ培地［Science, 122, 501 (1952)］、ダルベッコ改変ＭＥＭ培地［Virology, 8, 396 (1959)］、199培地[Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 73, 1 (1950)］若しくはＩｓｃｏｖｅ’ｓ Ｍｏｄｉｆｉｅｄ Ｄｕｌｂｅｃｃｏ’ｓ Ｍｅｄｉｕｍ（ＩＭＤＭ）培地またはこれら培地に牛胎児血清（ＦＢＳ）などを添加した培地などが挙げられる。培養は、通常ｐＨ６～８、３０～４０℃、５％CO_2存在下などの条件下で１～７日間行う。また、培養中に必要に応じて、

カナマイシンまたはペニシリンなどの抗生物質を培地に添加してもよい。

[0142] ヒトＣＣＲ１をコードする遺伝子の発現方法としては、例えば、直接発現以外に、分泌生産または融合タンパク質発現などの方法［Molecular Cloning, A Laboratory Manual,Second Edition,Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)］が挙げられる。

[0143] ヒトＣＣＲ１の生産方法としては、例えば、宿主細胞内に生産させる方法、宿主細胞外に分泌させる方法、または宿主細胞外膜上に生産させる方法が挙げられ、使用する宿主細胞または生産させるヒトＣＣＲ１の構造を変えることにより、適切な方法を選択することができる。

[0144] ヒトＣＣＲ１が宿主細胞内又は宿主細胞外膜上に生産される場合、ポールソンらの方法［J. Biol. Chem., 264, 17619 (1989)］、ロウらの方法［Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86, 8227 (1989)、Genes Develop., 4, 1288 (1990)］、日本国特開平０５－３３６９６３号公報または国際公開第９４／２３０２１号などに記載の方法を用いることにより、ヒトＣＣＲ１を宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。また、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子などを用いた遺伝子増幅系（日本国特開平２－２２７０７５号公報）を利用してヒトＣＣＲ１の生産量を上昇させることもできる。

[0145] 得られたヒトＣＣＲ１は、例えば、以下のようにして単離、精製することができる。ヒトＣＣＲ１が細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後に細胞を遠心分離により回収し、水系緩衝液に懸濁後、超音波破砕機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザーまたはダイノミルなどを用いて細胞を破砕し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られる上清から、通常のタンパク質の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫安などによる塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル（ＤＥＡＥ）－セファロース、ＤＩＡＩＯＮ　ＨＰＡ－７５（三菱化学社製）などのレジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、Ｓ－Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ　ＦＦ（ファルマシア社製）などのレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロ

ースなどのレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、または等電点電気泳動などの電気泳動法などの手法を単独または組み合わせて用い、精製標品を得ることができる。

[0146] ヒトＣＣＲ１が細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、上記と同様に細胞を回収後破砕し、遠心分離を行うことにより、沈殿画分として該ヒトＣＣＲ１の不溶体を回収する。回収した該ヒトＣＣＲ１の不溶体をタンパク質変性剤で可溶化する。該可溶化液を希釈または透析することにより、該ヒトＣＣＲ１を正常な立体構造に戻した後、上記と同様の単離精製法によりポリペプチドの精製標品を得ることができる。

[0147] ヒトＣＣＲ１またはその糖修飾体などの誘導体が細胞外に分泌された場合には、培養上清において該ヒトＣＣＲ１またはその糖修飾体などの誘導体を回収することができる。該培養物を上記と同様に遠心分離などの手法により処理することにより可溶性画分を取得し、該可溶性画分から、上記と同様の単離精製法を用いることにより、精製標品を得ることができる。

[0148] また、本発明において用いられるヒトＣＣＲ１は、Ｆｍｏｃ法またはｔＢｏｃ法などの化学合成法によっても製造することができる。また、アドバンストケムテック社製、パーキン・エルマー社製、ファルマシア社製、プロテインテクノロジインストルメント社製、シンセセルーベガ社製、パーセプチブ社製または島津製作所社製などのペプチド合成機を利用して化学合成することもできる。

[0149] （２）動物の免疫と融合用抗体産生細胞の調製

３～２０週令のマウス、ラットまたはハムスターなどの動物に、（１）で得られる抗原を免疫して、その動物の脾、リンパ節、末梢血中の抗体産生細胞を採取する。また、マウスＣＣＲ１ノックアウトマウスを被免疫動物として用いることもできる。

[0150] 免疫は、動物の皮下、静脈内または腹腔内に、例えば、フロインドの完全アジュバント、または水酸化アルミニウムゲルと百日咳菌ワクチンなどの適

当なアジュバントとともに抗原を投与することにより行う。抗原が部分ペプチドである場合には、ＢＳＡ（ウシ血清アルブミン）またはＫＬＨ（Ｋｅｙｈｏｌｅ　Ｌｉｍｐｅｔ　ｈｅｍｏｃｙａｎｉｎ）などのキャリアタンパク質とコンジュゲートを作製し、これを免疫原として用いる。

[0151] 抗原の投与は、１回目の投与の後、１～２週間おきに５～１０回行う。各投与後３～７日目に眼底静脈叢より採血し、その血清の抗体価を酵素免疫測定法［Antibodies - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)］などを用いて測定する。免疫に用いた抗原に対し、その血清が十分な抗体価を示した動物を融合用抗体産生細胞の供給源とする。

[0152] 抗原の最終投与後３～７日目に、免疫した動物より脾臓などの抗体産生細胞を含む組織を摘出し、抗体産生細胞を採取する。脾臓細胞を用いる場合には、脾臓を細断、ほぐした後、遠心分離し、さらに赤血球を除去して融合用抗体産生細胞を取得する。

[0153] （３）骨髄腫細胞の調製

骨髄腫細胞としては、マウスから得られた株化細胞を用い、例えば、８－アザグアニン耐性マウス（ＢＡＬＢ／ｃ由来）骨髄腫細胞株Ｐ３－Ｘ６３Ａｇ８－Ｕ１（Ｐ３－Ｕ１）［Current Topics in Microbiology and Immunology, 18, 1 (1978)］、Ｐ３－ＮＳ１／１－Ａｇ４１（ＮＳ－１）［European J. Immunology, 6, 511 (1976)］、ＳＰ２／０－Ａｇ１４（ＳＰ－２）［Nature, 276, 269 (1978)］、Ｐ３－Ｘ６３－Ａｇ８６５３（６５３）［J. Immunology, 123, 1548 (1979)］またはＰ３－Ｘ６３－Ａｇ８（Ｘ６３）［Nature, 256, 495 (1975)］などが用いられる。

[0154] 該骨髄腫細胞は、正常培地［グルタミン、２－メルカプトエタノール、ジェンタマイシン、ＦＢＳ、および８－アザグアニンを加えたＲＰＭＩ１６４０培地］で継代し、細胞融合の３～４日前に正常培地に継代し、融合当日２×１０^{7}個以上の細胞数を確保する。

[0155] （４）細胞融合とモノクローナル抗体産生ハイブリドーマの調製

（２）で得られる融合用抗体産生細胞と（３）で得られる骨髄腫細胞をＭ

ｉｎｉｍｕｍ　Ｅｓｓｅｎｔｉａｌ　Ｍｅｄｉｕｍ（ＭＥＭ）培地またはＰＢＳ（リン酸二ナトリウム１．８３ｇ、リン酸一カリウム０．２１ｇ、食塩７．６５ｇ、蒸留水１リットル、ｐＨ７．２）でよく洗浄し、細胞数が、融合用抗体産生細胞：骨髄腫細胞＝５～１０：１になるよう混合し、遠心分離した後、上清を除く。沈澱した細胞群をよくほぐした後、ポリエチレングリコール－１０００（ＰＥＧ－１０００）、ＭＥＭ培地およびジメチルスルホキシドの混液を３７℃で、攪拌しながら加える。さらに１～２分間毎にＭＥＭ培地１～２ｍＬを数回加えた後、ＭＥＭ培地を加えて全量が５０ｍＬになるようにする。遠心分離後、上清を除く。沈澱した細胞群をゆるやかにほぐした後、融合用抗体産生細胞にＨＡＴ培地［ヒポキサンチン、チミジン、およびアミノプテリンを加えた正常培地］中にゆるやかに細胞を懸濁する。この懸濁液を５％CO_2インキュベーター中、３７℃にて７～１４日間培養する。

[0156] 培養後、培養上清の一部を抜き取り、後述のバインディングアッセイなどのハイブリドーマの選択方法により、ヒトＣＣＲ１を含む抗原に反応し、ヒトＣＣＲ１を含まない抗原に反応しない細胞群を選択する。次に、限界希釈法によりクローニングを行い、安定して強い抗体価の認められたものをモノクローナル抗体産生ハイブリドーマとして選択する。

[0157] （５）精製モノクローナル抗体の調製

プリスタン処理［２，６，１０，１４－テトラメチルペンタデカン（Ｐｒｉｓｔａｎｅ）０．５ｍＬを腹腔内投与し、２週間飼育する］した８～１０週令のマウスまたはヌードマウスに、（４）で得られるモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを腹腔内に注射する。１０～２１日でハイブリドーマは腹水癌化する。このマウスから腹水を採取し、遠心分離して固形分を除去後、４０～５０％硫酸アンモニウムで塩析し、カプリル酸沈殿法、ＤＥＡＥ－セファロースカラム、プロテインＡ－カラムまたはゲル濾過カラムによる精製を行ない、ＩｇＧまたはＩｇＭ画分を集め、精製モノクローナル抗体とする。

[0158] また、（４）で得られるモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを、１０％ＦＢＳを添加したＲＰＭＩ１６４０培地などで培養した後、遠心分離により上清を除き、Ｈｙｂｒｉｄｏｍａ　ＳＦＭ培地に懸濁し、３～７日間培養する。得られた細胞懸濁液を遠心分離し、得られた上清よりプロテインＡ－カラムまたはプロテインＧ－カラムによる精製を行ない、ＩｇＧ画分を集め、精製モノクローナル抗体を得ることもできる。なお、Ｈｙｂｒｉｄｏｍａ　ＳＦＭ培地には５％ダイゴＧＦ２１を添加することもできる。

[0159] 抗体のサブクラスの決定は、サブクラスタイピングキットを用いて酵素免疫測定法により行う。タンパク質量の定量は、ローリー法または２８０ｎｍでの吸光度より算出する。

[0160] （６）モノクローナル抗体の選択

モノクローナル抗体の選択は以下に示すように、フローサイトメトリーを用いて、ヒトＣＣＲ１発現細胞への抗体の結合性を測定することなどにより行う。ヒトＣＣＲ１発現細胞は、細胞表面上にヒトＣＣＲ１が発現していればいずれの細胞でもよく、例えば、ヒト細胞、ヒト細胞株および（１）で得られるヒトＣＣＲ１強制発現細胞株などが挙げられる。

[0161] ヒトＣＣＲ１発現細胞を９６ウェルプレートなどのプレートに分注した後、第１抗体として血清、ハイブリドーマの培養上清又は精製モノクローナル抗体などの被験物質を分注し、反応させる。反応後の細胞を１～１０％ｂｏｖｉｎｅ　ｓｅｒｕｍ　ａｌｂｕｍｉｎ（ＢＳＡ）を含むＰＢＳ（以下、ＢＳＡ－ＰＢＳと記す）などで、よく洗浄した後、第２抗体として蛍光試薬などで標識した抗イムノグロブリン抗体を分注して反応させる。ＢＳＡ－ＰＢＳなどでよく洗浄した後、フローサイトメーターを用いて標識化抗体の蛍光量を測定することにより、ヒトＣＣＲ１発現細胞に対して特異的に反応するモノクローナル抗体を選択する。

[0162] また、本発明の抗体と競合してヒトＣＣＲ１に結合する抗体は、上述のフローサイトメトリーを用いた測定系に、被験抗体を添加して反応させることで取得できる。すなわち、被験抗体を加えた時に本発明の抗体とヒトＣＣＲ

１との結合が阻害される抗体をスクリーニングすることにより、ヒトＣＣＲ１のアミノ酸配列、又はその立体構造への結合について、本発明の抗体と競合するモノクローナル抗体を取得することができる。

[0163] また、本発明のヒトＣＣＲ１に結合するモノクローナル抗体が結合するエピトープを含むエピトープに結合する抗体は、上述のスクリーニング方法で取得された抗体のエピトープを公知の方法で同定し、同定したエピトープを含む合成ペプチド、またはエピトープの立体構造に擬態させた合成ペプチド等を作製し、免疫することで取得することができる。

[0164] 更に、本発明のヒトＣＣＲ１に結合するモノクローナル抗体が結合するエピトープと、同じエピトープに結合する抗体は、上述のスクリーニング方法で取得された抗体のエピトープを同定し、同定したエピトープの部分的な合成ペプチド、またはエピトープの立体構造に擬態させた合成ペプチド等を作製し、免疫することで、取得することができる。

[0165] ２．遺伝子組換え抗体の作製

遺伝子組換え抗体の作製例として、以下にヒト型キメラ抗体およびヒト化抗体の作製方法を示す。遺伝子組換えのマウス抗体、ラット抗体およびラビット抗体なども同様の方法で作製することができる。

[0166] （１）遺伝子組換え抗体発現用ベクターの構築

遺伝子組換え抗体発現用ベクターは、ヒト抗体のＣＨおよびＣＬをコードするＤＮＡが組み込まれた動物細胞用発現ベクターであり、動物細胞用発現ベクターにヒト抗体のＣＨおよびＣＬをコードするＤＮＡをそれぞれクローニングすることにより構築することができる。

[0167] ヒト抗体のＣ領域は任意のヒト抗体のＣＨおよびＣＬを用いることができる。例えば、ヒト抗体のγ１サブクラスのＣＨおよびκクラスのＣＬなどを用いる。ヒト抗体のＣＨおよびＣＬをコードするＤＮＡには、ｃＤＮＡを用いるが、エキソンとイントロンからなる染色体ＤＮＡを用いることもできる。動物細胞用発現ベクターには、ヒト抗体のＣ領域をコードする遺伝子を組込み発現できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば

、ｐＡＧＥ１０７［Cytotechnol., 3, 133 (1990)］、ｐＡＧＥ１０３［J. Biochem., 101, 1307 (1987)］、ｐＨＳＧ２７４［Gene, 27, 223 (1984)］、ｐＫＣＲ［Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 1527 (1981)］、ｐＳＧ１ｂｄ２－４［Cytotechnol., 4, 173 (1990)］またはｐＳＥ１ＵＫ１Ｓｅｄ１－３［Cytotechnol., 13, 79 (1993)］などを用いる。動物細胞用発現ベクターのうちプロモーターとエンハンサーには、ＳＶ４０の初期プロモーター［J. Biochem., 101, 1307 (1987)］、モロニーマウス白血病ウイルスＬＴＲ［Biochem. Biophys. Res. Commun., 149, 960 (1987)］または免疫グロブリンＨ鎖のプロモーター［Cell, 41, 479 (1985)］とエンハンサー［Cell, 33, 717 (1983)］などが挙げられる。

[0168] 遺伝子組換え抗体発現用ベクターには、遺伝子組換え抗体発現ベクターの構築の容易さ、動物細胞への導入の容易さ、動物細胞内での抗体Ｈ鎖およびＬ鎖の発現量のバランスが均衡するなどの点から、抗体Ｈ鎖およびＬ鎖が同一のベクター上に存在するタイプ（タンデム型）の遺伝子組換え抗体発現用ベクター［J. Immunol. Methods, 167, 271 (1994)］を用いるが、抗体H鎖およびL鎖が別々のベクター上に存在するタイプを用いることもできる。タンデム型の遺伝子組換え抗体発現用ベクターには、ｐＫＡＮＴＥＸ９３（国際公開第９７／１０３５４号）、ｐＥＥ１８［Hybridoma, 17, 559 (1998)］などを用いる。

[0169] （２）ヒト以外の動物由来の抗体のＶ領域をコードするｃＤＮＡの取得およびアミノ酸配列の解析

非ヒト抗体のＶＨ及びＶＬをコードするｃＤＮＡの取得およびアミノ酸配列の解析は以下のようにして行うことができる。

[0170] 非ヒト抗体を産生するハイブリドーマ細胞よりｍＲＮＡを抽出し、ｃＤＮＡを合成する。合成したｃＤＮＡをファージまたはプラスミドなどのベクターにクローニングしてｃＤＮＡライブラリーを作製する。該ライブラリーより、マウス抗体のＣ領域部分またはＶ領域部分をコードするＤＮＡをプローブとして用い、ＶＨ若しくはＶＬをコードするｃＤＮＡを有する組換えファ

ージまたは組換えプラスミドをそれぞれ単離する。組換えファージまたは組換えプラスミド上の目的とするマウス抗体のＶＨまたはＶＬの全塩基配列をそれぞれ決定し、塩基配列よりＶＨまたはＶＬの全アミノ酸配列をそれぞれ推定する。

[0171] 非ヒト抗体を産生するハイブリドーマ細胞を作製するヒト以外の動物には、マウス、ラット、ハムスターまたはラビットなどを用いるが、ハイブリドーマ細胞を作製することが可能であれば、いかなる動物も用いることができる。

[0172] ハイブリドーマ細胞からの全ＲＮＡの調製には、チオシアン酸グアニジン－トリフルオロ酢酸セシウム法［Methods in Enzymol., 154, 3 (1987)］、またはＲＮＡ ｅａｓｙ ｋｉｔ（キアゲン社製）などのキットなどを用いる。

[0173] 全ＲＮＡからのｍＲＮＡの調製には、オリゴ（ｄＴ）固定化セルロースカラム法［Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)］、またはＯｌｉｇｏ－ｄＴ３０＜Ｓｕｐｅｒ＞ｍＲＮＡ Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ（登録商標）Ｋｉｔ（タカラバイオ社製）などのキットなどを用いる。また、Ｆａｓｔ Ｔｒａｃｋ ｍＲＮＡ Ｉｓｏｌａｔｉｏｎ（登録商標）Ｋｉｔ（インビトロジェン社製）、またはＱｕｉｃｋＰｒｅｐ ｍＲＮＡ Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ（登録商標）Ｋｉｔ（ファルマシア社製）などのキットを用いてハイブリドーマ細胞からｍＲＮＡを調製することもできる。

[0174] ｃＤＮＡの合成およびｃＤＮＡライブラリーの作製には、公知の方法［Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)、Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1, John Wiley & Sons (1987-1997)］、またはＳｕｐｅｒＳｃｒｉｐｔ Ｐｌａｓｍｉｄ Ｓｙｓｔｅｍ ｆｏｒ ｃＤＮＡ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ ａｎｄ Ｐｌａｓｍｉｄ Ｃｌｏｎｉｎｇ（インビトロジェン社製）若しくはＺＡＰ－ｃＤＮＡ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ（登録商標）Ｋｉｔ（ス

トラタジーン社製）などのキットなどを用いる。

[0175] ｃＤＮＡライブラリーの作製の際、ハイブリドーマ細胞から抽出したｍＲＮＡを鋳型として合成したｃＤＮＡを組み込むベクターには、該ｃＤＮＡを組み込めるベクターであればいかなるものでも用いることができる。例えば、ＺＡＰ Ｅｘｐｒｅｓｓ [Strategies, 5, 58 (1992)]、ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ ＩＩ ＳＫ（＋） [Nucleic Acids Research, 17, 9494 (1989)]、λＺＡＰＩＩ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ社製）、λｇｔ１０、λｇｔ１１ [DNA Cloning:A Practical Approach, I, 49 (1985)]、Ｌａｍｂｄａ ＢｌｕｅＭｉｄ（クローンテック社製）、λＥｘＣｅｌｌ、ｐＴ７Ｔ３－１８Ｕ（ファルマシア社製）、ｐＣＤ２ [Mol. Cell. Biol., 3, 280 (1983)] またはｐＵＣ１８ [Gene, 33, 103 (1985)] などを用いる。

[0176] ファージまたはプラスミドベクターにより構築されるｃＤＮＡライブラリーを導入する大腸菌には、該ｃＤＮＡライブラリーを導入、発現および維持できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、ＸＬ１－Ｂｌｕｅ ＭＲＦ’ [Strategies, 5, 81 (1992)]、Ｃ６００ [Genetics, 39, 440 (1954)]、Ｙ１０８８、Ｙ１０９０ [Science, 222, 778 (1983)]、ＮＭ５２２ [J. Mol. Biol., 166, 1 (1983)]、Ｋ８０２ [J. Mol. Biol., 16, 118 (1966)] またはＪＭ１０５ [Gene, 38, 275 (1985)] などを用いる。

[0177] ｃＤＮＡライブラリーからの非ヒト抗体のＶＨまたはＶＬをコードするｃＤＮＡクローンの選択には、アイソトープ若しくは蛍光標識したプローブを用いたコロニー・ハイブリダイゼーション法、またはプラーク・ハイブリダイゼーション法 [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)] などを用いる。

[0178] また、プライマーを調製し、ｍＲＮＡから合成したｃＤＮＡまたはｃＤＮＡライブラリーを鋳型として、Ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ Ｃｈａｉｎ Ｒｅａｃｔｉｏｎ法 [以下、ＰＣＲ法と表記する、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition , Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989

)、Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1, John Wiley & Sons (1987-1997)]を行うことよりＶＨまたはＶＬをコードするｃＤＮＡを調製することもできる。

[0179] 選択されたｃＤＮＡを、適当な制限酵素などで切断後、ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ ＳＫ（－）（ストラタジーン社製）などのプラスミドにクローニングし、通常用いられる塩基配列解析方法などにより該ｃＤＮＡの塩基配列を決定する。塩基配列解析方法には、例えば、ジデオキシ法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463 (1977)]などの反応を行った後、ＡＢＩ ＰＲＩＳＭ３７００（ＰＥバイオシステムズ社製）またはＡ．Ｌ．Ｆ．ＤＮＡシークエンサー（ファルマシア社製）などの塩基配列自動分析装置などを用いる。

[0180] 決定した塩基配列からＶＨおよびＶＬの全アミノ酸配列をそれぞれ推定し、既知の抗体のＶＨおよびＶＬの全アミノ酸配列 [Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991)]と比較することにより、取得したｃＤＮＡが分泌シグナル配列を含む抗体のＶＨおよびＶＬの完全なアミノ酸配列をコードしているかをそれぞれ確認する。分泌シグナル配列を含む抗体のＶＨおよびＶＬの完全なアミノ酸配列に関しては、既知の抗体のＶＨおよびＶＬの全アミノ酸配列 [Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991)]と比較することにより、分泌シグナル配列の長さおよびＮ末端アミノ酸配列を推定でき、更にはそれらが属するサブグループを知ることができる。また、ＶＨおよびＶＬの各ＣＤＲのアミノ酸配列についても、既知の抗体のＶＨおよびＶＬのアミノ酸配列 [Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991)]と比較することによって見出すことができる。

[0181] また、得られたＶＨおよびＶＬの完全なアミノ酸配列を用いて、例えば、ＳＷＩＳＳ－ＰＲＯＴまたはＰＩＲ－Ｐｒｏｔｅｉｎなどの任意のデータベースに対してＢＬＡＳＴ法 [J. Mol. Biol., 215, 403 (1990)]などの相同性検索を行い、ＶＨおよびＶＬの完全なアミノ酸配列が新規なものかを確認

できる。

[0182] （３）ヒト型キメラ抗体発現ベクターの構築

（１）で得られる遺伝子組換え抗体発現用ベクターのヒト抗体のＣＨまたはＣＬをコードするそれぞれの遺伝子の上流に、それぞれ非ヒト抗体のＶＨまたはＶＬをコードするｃＤＮＡをそれぞれクローニングすることで、ヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築することができる。

[0183] 非ヒト抗体のＶＨまたはＶＬをコードするｃＤＮＡの３’末端側と、ヒト抗体のＣＨまたはＣＬの５’末端側とを連結するために、連結部分の塩基配列が適切なアミノ酸をコードし、かつ適当な制限酵素認識配列になるように設計したＶＨおよびＶＬのｃＤＮＡを作製する。作製されたＶＨおよびＶＬのｃＤＮＡを、（１）で得られる遺伝子組換え抗体発現用ベクターのヒト抗体のＣＨまたはＣＬをコードするそれぞれの遺伝子の上流にそれらが適切な形で発現する様にそれぞれクローニングし、ヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築する。

[0184] また、非ヒト抗体ＶＨまたはＶＬをコードするｃＤＮＡを、適当な制限酵素の認識配列を両端に有する合成ＤＮＡを用いてＰＣＲ法によりそれぞれ増幅し、（１）で得られる遺伝子組換え抗体発現用ベクターにクローニングすることもできる。

[0185] （４）ヒト化抗体のＶ領域をコードするｃＤＮＡの構築

ヒト化抗体のＶＨまたはＶＬをコードするｃＤＮＡは、以下のようにして構築することができる。

[0186] 非ヒト抗体のＶＨまたはＶＬのＣＤＲのアミノ酸配列を移植するための、ヒト抗体のＶＨまたはＶＬのＦＲのアミノ酸配列をそれぞれ選択する。選択するＦＲのアミノ酸配列には、ヒト抗体由来のものであれば、いずれのものでも用いることができる。例えば、Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｄａｔａ　Ｂａｎｋなどのデータベースに登録されているヒト抗体のＦＲのアミノ酸配列、またはヒト抗体のＦＲの各サブグループの共通アミノ酸配列［Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (199

1)]などを用いる。抗体の結合活性の低下を抑えるため、元の抗体のＶＨまたはＶＬのＦＲのアミノ酸配列とできるだけ高い相同性（少なくとも６０％以上）のＦＲのアミノ酸配列を選択する。

[0187] 次に、選択したヒト抗体のＶＨまたはＶＬのＦＲのアミノ酸配列に、もとの抗体のＣＤＲのアミノ酸配列をそれぞれ移植し、ヒト化抗体のＶＨまたはＶＬのアミノ酸配列をそれぞれ設計する。設計したアミノ酸配列を抗体の遺伝子の塩基配列に見られるコドンの使用頻度［Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991)］を考慮してＤＮＡ配列に変換し、ヒト化抗体のＶＨまたはＶＬのアミノ酸配列をコードするＤＮＡ配列をそれぞれ設計する。

[0188] 設計したＤＮＡ配列に基づき、１００塩基前後の長さからなる数本の合成ＤＮＡを合成し、それらを用いてＰＣＲ反応を行う。この場合、ＰＣＲ反応での反応効率及び合成可能なＤＮＡの長さから、好ましくはＶＨ、ＶＬ各々について各６本の合成ＤＮＡを設計する。さらに、両端に位置する合成ＤＮＡの５’または３’末端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、ヒト化抗体のＶＨまたはＶＬをコードするｃＤＮＡを、（１）で得られる遺伝子組換え抗体発現用ベクターへ容易にクローニングすることができる。

[0189] ＰＣＲ反応後、増幅産物をｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ　ＳＫ（－）（ストラタジーン社製）などのプラスミドにそれぞれクローニングし、（２）に記載の方法と同様の方法により、塩基配列を決定し、所望のヒト化抗体のＶＨまたはＶＬのアミノ酸配列をコードするＤＮＡ配列を有するプラスミドを取得する。

[0190] または、設計したＤＮＡ配列に基づき、ＶＨ全長およびＶＬ全長を各々１本の長鎖ＤＮＡとして合成したものを、上記ＰＣＲ増幅産物に代えて用いることもできる。さらに、合成長鎖ＤＮＡの両端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、ヒト化抗体のＶＨまたはＶＬをコードするｃＤＮＡを、（１）で得られる遺伝子組換え抗体発現用ベクターへ容易にクローニングすることができる。

[0191] （５）ヒト化抗体のＶ領域のアミノ酸配列の改変

ヒト化抗体は、非ヒト抗体のＶＨおよびＶＬのＣＤＲのみをヒト抗体のＶＨおよびＶＬのＦＲに移植しただけでは、その抗原結合活性は元の非ヒト抗体に比べて低下する［BIO/TECHNOLOGY, 9, 266 (1991)］。ヒト化抗体では、ヒト抗体のＶＨおよびＶＬのＦＲのアミノ酸配列の中で、直接抗原との結合に関与しているアミノ酸残基、ＣＤＲのアミノ酸残基と相互作用するアミノ酸残基、および抗体の立体構造を維持し、間接的に抗原との結合に関与しているアミノ酸残基を同定し、それらのアミノ酸残基を元の非ヒト抗体のアミノ酸残基に置換することにより、低下した抗原結合活性を上昇させることができる。

[0192] 抗原結合活性に関わるＦＲのアミノ酸残基を同定するために、Ｘ線結晶解析［J. Mol. Biol., 112, 535 (1977)］またはコンピューターモデリング［Protein Engineering, 7, 1501 (1994) ］などを用いることにより、抗体の立体構造の構築および解析を行うことができる。また、それぞれの抗体について数種の改変体を作製し、それぞれの抗原結合活性との相関を検討することを繰り返し、試行錯誤することで必要な抗原結合活性を有するヒト化抗体を取得できる。

[0193] ヒト抗体のＶＨ及びＶＬのＦＲのアミノ酸残基は、改変用合成ＤＮＡを用いて（４）に記載のＰＣＲ反応を行うことにより、改変させることができる。ＰＣＲ反応後の増幅産物について（２）に記載の方法により、塩基配列を決定し、目的の改変が施されたことを確認する。

[0194] （６）ヒト化抗体発現ベクターの構築

（１）で得られる遺伝子組換え抗体発現用ベクターのヒト抗体のＣＨまたはＣＬをコードするそれぞれの遺伝子の上流に、構築した遺伝子組換え抗体のＶＨまたはＶＬをコードするｃＤＮＡをそれぞれクローニングし、ヒト化抗体発現ベクターを構築することができる。

[0195] 例えば、（４）および（５）で得られるヒト化抗体のＶＨまたはＶＬを構築する際に用いる合成ＤＮＡのうち、両端に位置する合成ＤＮＡの５’また

は３’末端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、（１）で得られる遺伝子組換え抗体発現用ベクターのヒト抗体のＣＨまたはＣＬをコードするそれぞれの遺伝子の上流にそれらが適切な形で発現するようにそれぞれクローニングする。

[0196] （７）遺伝子組換え抗体の一過性発現

（３）および（６）で得られる遺伝子組換え抗体発現ベクター、またはそれらを改変した発現ベクターを用いて遺伝子組換え抗体の一過性発現を行い、作製した多種類のヒト型キメラ抗体、ヒト化抗体の抗原結合活性を効率的に評価することができる。

[0197] 発現ベクターを導入する宿主細胞には、遺伝子組換え抗体を発現できる宿主細胞であれば、いかなる細胞でも用いることができるが、例えばＣＯＳ－７細胞［American Type Culture Collection(ATCC)番号:CRL1651］を用いる［Methods in Nucleic Acids Res., CRC press, 283 (1991)］。

[0198] ＣＯＳ－７細胞への発現ベクターの導入には、ＤＥＡＥ－デキストラン法［Methods in Nucleic Acids Res., CRC press (1991)］、またはリポフェクション法［Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)］などを用いる。

[0199] 発現ベクターの導入後、培養上清中の遺伝子組換え抗体の発現量および抗原結合活性は酵素免疫抗体法［Monoclonal Antibodies-Principles and practice, Third edition, Academic Press (1996)、Antibodies - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)、単クローン抗体実験マニュアル、講談社サイエンティフィック（１９８７）］などを用いて測定する。

[0200] （８）遺伝子組換え抗体を安定に発現する形質転換株の取得と遺伝子組換え抗体の調製

（３）および（６）で得られた遺伝子組換え抗体発現ベクターを適当な宿主細胞に導入することにより遺伝子組換え抗体を安定に発現する形質転換株を得ることができる。

宿主細胞への発現ベクターの導入には、エレクトロポレーション法［日本

国特開平２－２５７８９１号公報、Cytotechnology, 3, 133 (1990)］などを用いる。

[0201] 遺伝子組換え抗体発現ベクターを導入する宿主細胞には、遺伝子組換え抗体を発現させることができる宿主細胞であれば、いかなる細胞でも用いることができる。例えば、ＣＨＯ－Ｋ１（ＡＴＣＣ ＣＣＬ－６１）、ＤＵＫＸＢ１１（ＡＴＣＣ ＣＣＬ－９０９６）、Ｐｒｏ－５（ＡＴＣＣ ＣＣＬ－１７８１）、ＣＨＯ－Ｓ（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｃａｔ＃１１６１９）、ラットミエローマ細胞ＹＢ２／３ＨＬ．Ｐ２．Ｇ１１．１６Ａｇ．２０（ＡＴＣＣ番号：ＣＲＬ１６６２、またはＹＢ２／０ともいう）、マウスミエローマ細胞ＮＳ０、マウスミエローマ細胞ＳＰ２／０－Ａｇ１４（ＡＴＣＣ番号：ＣＲＬ１５８１）、マウスＰ３Ｘ６３－Ａｇ８．６５３細胞（ＡＴＣＣ番号：ＣＲＬ１５８０）、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子（Ｄｉｈｙｄｒｏｆｏｒａｔｅ Ｒｅｄｕｃｔａｓｅ、以下、ｄｈｆｒと表記する）が欠損したＣＨＯ細胞（ＣＨＯ／ＤＧ４４細胞）［Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216 (1980)］などを用いる。

[0202] また、細胞内糖ヌクレオチドＧＤＰ－フコースの合成に関与する酵素などのタンパク質、Ｎ－グリコシド結合複合型糖鎖の還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素などのタンパク質若しくは細胞内糖ヌクレオチドＧＤＰ－フコースのゴルジ体への輸送に関与するタンパク質などの活性が低下または欠失した宿主細胞、例えばα１，６－フコース転移酵素遺伝子が欠損したＣＨＯ細胞（国際公開第２００５／０３５５８６号、国際公開第０２／３１１４０号）、レクチン耐性を獲得したＬｅｃ１３［Somatic Cell and Molecular genetics, 12, 55 (1986)］などを用いることもできる。

[0203] 発現ベクターの導入後、遺伝子組換え抗体を安定に発現する形質転換株は、Ｇ４１８硫酸塩（以下、Ｇ４１８と表記する）などの薬剤を含む動物細胞培養用培地で培養することにより選択する（日本国特開平２－２５７８９１号公報）。

[0204] 動物細胞培養用培地には、ＲＰＭＩ１６４０培地（インビトロジェン社製）、ＧＩＴ培地（日本製薬社製）、ＥＸ－ＣＥＬＬ３０１培地（ジェイアールエイチ社製）、ＩＭＤＭ培地（インビトロジェン社製）若しくはＨｙｂｒｉｄｏｍａ－ＳＦＭ培地（インビトロジェン社製）、またはこれら培地にＦＢＳなどの各種添加物を添加した培地などを用いる。得られた形質転換株を培地中で培養することで培養上清中に遺伝子組換え抗体を発現蓄積させる。培養上清中の遺伝子組換え抗体の発現量および抗原結合活性はＥＬＩＳＡ法などにより測定できる。また、ｄｈｆｒ遺伝子増幅系（日本国特開平２－２５７８９１号公報）などを利用して、形質転換株の産生する遺伝子組換え抗体の発現量を向上させることができる。

[0205] 遺伝子組換え抗体は、形質転換株の培養上清よりプロテインＡ－カラムを用いて精製する［Monoclonal Antibodies - Principles and practice, Third edition, Academic Press (1996)、Antibodies - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)］。また、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィーおよび限外濾過などのタンパク質の精製で用いられる方法を組み合わすこともできる。

[0206] 精製した遺伝子組換え抗体のＨ鎖、Ｌ鎖或いは抗体分子全体の分子量は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法［Nature, 227, 680 (1970)］、またはウェスタンブロッティング法［Monoclonal Antibodies - Principles and practice, Third edition, Academic Press (1996)、Antibodies - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory(1988)］など用いて測定することができる。

[0207] ３．精製モノクローナル抗体またはその抗体断片の活性評価

精製した本発明のモノクローナル抗体またはその抗体断片の活性評価は、以下のように行うことができる。

[0208] 本発明の抗体または該抗体断片のヒトＣＣＲ１に対する結合活性は、前述の１－（６）記載のフローサイトメトリーを用いて測定する。また、蛍光抗体法［Cancer Immunol. Immunother., 36, 373 (1993)］などを用いて測定で

きる。

[0209] 本発明の抗体または該抗体断片のヒトＣＣＬ１５によるヒトＣＣＲ１発現細胞の遊走を阻害する活性は、上述のケモタキシスアッセイを用いて測定することができる。

[0210] ヒトＣＣＲ１発現細胞に対するＣＤＣ活性、又はＡＤＣＣ活性は公知の測定方法［Cancer Immunol. Immunother., 36, 373(1993); Current protocols in Immunology, Chapter7. Immunologic studies in humans, Editor, John E, Coligan et al., John Wiley & Sons,Inc.,(1993)］により測定することができる。

[0211] 4. 抗体のエフェクター活性を制御する方法

本発明のモノクローナル抗体のエフェクター活性を制御する方法としては、抗体のＦｃ領域の２９７番目のアスパラギン（Ａｓｎ）に結合するＮ結合複合型糖鎖の還元末端に存在するＮ－アセチルグルコサミン（ＧｌｃＮＡｃ）にα１，６結合するフコース（コアフコースともいう）の量を制御する方法（国際公開第２００５／０３５５８６号、国際公開第２００２／３１１４０号、国際公開第００／６１７３９号）、又は抗体のＦｃ領域のアミノ酸残基を改変することで制御する方法などが知られている。本発明のモノクローナル抗体にはいずれの方法を用いても、エフェクター活性を制御することができる。

[0212] エフェクター活性とは、抗体のＦｃ領域を介して引き起こされる抗体依存性の活性をいい、ＡＤＣＣ活性、ＣＤＣ活性、又はマクロファージ若しくは樹状細胞などの食細胞による抗体依存性ファゴサイトーシス（Ａｎｔｉｂｏｄｙ－ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ　ｐｈａｇｏｃｙｔｏｓｉｓ、ＡＤＰ活性）などが知られている。

[0213] エフェクター活性の測定法として、例えば、標的として炎症性細胞、エフェクターとしてヒト末梢血単核球（ＰＢＭＣ）、そして炎症性細胞特異的な抗体を混合し、４時間程度インキュベーションした後、細胞傷害の指標として遊離してきた乳酸脱水素酵素（ＬＤＨ）を測定することができる。若しく

は、ヒト全血に、例えばＣＤ２０の様な血液細胞特異的な抗原を認識する抗体を添加し、インキュベーションした後、標的となる血液細胞数の減少をエフェクター活性として測定することができる。または、例えば、ヒト全血に別の標的細胞を混合し、さらに標的細胞に特異的な抗体を添加しインキュベーションした後、標的細胞数の減少をエフェクター活性として測定することができる。いずれの場合においてもエフェクター活性は、遊離ＬＤＨ法、遊離^{51}Ｃｒ法またはフローサイトメトリー法などによって測定することができる。

[0214] 抗体のＦｃのＮ結合複合型糖鎖のコアフコースの含量を制御することで、抗体のエフェクター活性を増加又は低下させることができる。抗体のＦｃに結合しているＮ結合複合型糖鎖に結合するフコースの含量を低下させる方法としては、α１，６－フコース転移酵素遺伝子が欠損したＣＨＯ細胞を用いて抗体を発現することで、フコースが結合していない抗体を取得することができる。フコースが結合していない抗体は高いＡＤＣＣ活性を有する。

[0215] 一方、抗体のＦｃに結合しているＮ結合複合型糖鎖に結合するフコースの含量を増加させる方法としては、α１，６－フコース転移酵素遺伝子を導入した宿主細胞を用いて抗体を発現させることで、フコースが結合している抗体を取得できる。フコースが結合している抗体は、フコースが結合していない抗体よりも低いＡＤＣＣ活性を有する。

[0216] また、抗体のＦｃ領域のアミノ酸残基を改変することでＡＤＣＣ活性又はＣＤＣ活性を増加又は低下させることができる。例えば、米国特許出願公開第２００７／０１４８１６５号明細書に記載のＦｃ領域のアミノ酸配列を用いることで、抗体のＣＤＣ活性を増加させることができる。

[0217] また、米国特許第６，７３７，０５６号明細書、米国特許第７，２９７，７７５号明細書又は米国特許第７，３１７，０９１号明細書に記載のアミノ酸改変を行うことで、ＡＤＣＣ活性又はＣＤＣ活性を、増加させることも低下させることもできる。また本発明の抗体には、上述の抗体定常領域におけるアミノ酸改変または糖鎖改変に合わせて、例えば、日本国特開第２０１３

－１６５７１６号公報または日本国特開第２０１２－０２１００４号公報などに記載のアミノ酸改変を行うことにより、Ｆｃ受容体への反応性を制御することで血中半減期を制御した抗体も含まれる。

[0218] さらに、上述の方法を組み合わせて、一つの抗体に使用することにより、抗体のエフェクター活性や血中半減期が制御された抗体を取得することができる。

[0219] ５．本発明の抗ヒトＣＣＲ１モノクローナル抗体またはその抗体断片を用いた疾患の治療方法

本発明のモノクローナル抗体またはその抗体断片は、ヒトＣＣＲ１依存的な細胞遊走、病変などＣＣＲ１が関連する疾患であれば、いずれのヒトＣＣＲ１関連疾患の治療に用いることができる。

[0220] 本発明のモノクローナル抗体またはその抗体断片を含有する治療剤は、有効成分としての該抗体または該抗体断片のみを含むものであってもよいが、通常は薬理学的に許容される１以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野において公知の方法により製造した医薬製剤として提供される。

[0221] 投与経路としては、例えば、経口投与、または口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内若しくは静脈内などの非経口投与が挙げられる。投与形態としては、例えば、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、軟膏またはテープ剤などが挙げられる。

[0222] 経口投与に適当な製剤としては、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤または顆粒剤などが挙げられる。

[0223] 乳剤またはシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトール若しくは果糖などの糖類、ポリエチレングリコール若しくはプロピレングリコールなどのグリコール類、ごま油、オリーブ油若しくは大豆油などの油類、ｐ－ヒドロキシ安息香酸エステル類などの防腐剤またはストロベリーフレーバー若しくはペパーミントなどのフレーバー類などを添加剤として用いて製造する。

[0224] カプセル剤、錠剤、散剤または顆粒剤などは、乳糖、ブドウ糖、ショ糖若

しくはマンニトールなどの賦形剤、デンプン若しくはアルギン酸ナトリウムなどの崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム若しくはタルクなどの滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース若しくはゼラチンなどの結合剤、脂肪酸エステルなどの界面活性剤またはグリセリンなどの可塑剤などを添加剤として用いて製造する。

[0225] 非経口投与に適当な製剤としては、注射剤、座剤または噴霧剤などである。注射剤は、塩溶液若しくはブドウ糖溶液、またはその両者の混合物からなる担体などを用いて製造する。座剤はカカオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸などの担体を用いて製造する。

[0226] 噴霧剤は受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ本発明のモノクローナル抗体またはその抗体断片を微細な粒子として分散させ、吸収を容易にさせる担体などを用いて製造する。担体としては、例えば乳糖またはグリセリンなどを用いる。また、エアロゾルまたはドライパウダーとして製造することもできる。さらに、上記非経口剤においても、経口投与に適当な製剤で添加剤として例示した成分を添加することもできる。

[0227] ６．本発明の抗ヒトＣＣＲ１モノクローナル抗体またはその抗体断片を用いた疾患の診断方法

本発明のモノクローナル抗体または該抗体断片を用いて、ヒトＣＣＲ１またはヒトＣＣＲ１が発現した細胞を検出または測定することにより、ヒトＣＣＲ１関連疾患を診断することができる。

[0228] ヒトＣＣＲ１関連疾患である癌疾患、自己免疫性疾患および炎症性疾患の診断は、例えば患者体内に存在するヒトＣＣＲ１を免疫学的手法により検出または測定して行うことができる。また、患者体内の細胞に発現しているヒトＣＣＲ１をフローサイトメトリーなどの免疫学的手法を用いて検出することにより診断を行うことができる。

[0229] 免疫学的手法とは、標識を施した抗原または抗体を用いて、抗体量または抗原量を検出または測定する方法である。例えば、放射性物質標識免疫抗体法、酵素免疫測定法、蛍光免疫測定法、発光免疫測定法、ウエスタンブロッ

ト法または物理化学的手法などを用いる。

[0230] 放射性物質標識免疫抗体法は、例えば、抗原または抗原を発現した細胞などに、本発明の抗体または該抗体断片を反応させ、さらに放射線標識を施した抗イムノグロブリン抗体または該抗体断片を反応させた後、シンチレーションカウンターなどで測定する。

[0231] 酵素免疫測定法は、例えば、抗原または抗原を発現した細胞などに、本発明の抗体または該抗体断片を反応させ、さらに酵素などで標識を施した抗イムノグロブリン抗体または結合断片を反応させた後、基質を添加して反応液の吸光度を吸光光度計で測定する。例えばサンドイッチＥＬＩＳＡ法などを用いる。酵素免疫測定法で用いる標識体としては、公知［酵素免疫測定法、医学書院（１９８７）］の酵素標識を用いることができる。

[0232] 例えば、アルカリフォスファターゼ標識、ペルオキシダーゼ標識、ルシフェラーゼ標識またはビオチン標識などを用いる。サンドイッチＥＬＩＳＡ法は、固相に抗体を結合させた後、検出または測定対象である抗原をトラップさせ、トラップされた抗原に第２の抗体を反応させる方法である。該ＥＬＩＳＡ法では、検出または測定したい抗原を認識する抗体または抗体断片であって、抗原認識部位の異なる２種類の抗体を準備し、そのうち、第１の抗体または抗体断片を予めプレート（例えば、９６ウェルプレート）に吸着させ、次に第２の抗体または抗体断片をＦＩＴＣなどの蛍光物質、ペルオキシダーゼなどの酵素またはビオチンなどで標識しておく。上記の抗体が吸着したプレートに、生体内から分離された、細胞またはその破砕液、組織またはその破砕液、細胞培養上清、血清、胸水、腹水または眼液などを反応させた後、標識したモノクローナル抗体または抗体断片を反応させ、標識物質に応じた検出反応を行う。濃度既知の抗原を段階的に希釈して作成した検量線より、被験サンプル中の抗原濃度を算出する。サンドイッチＥＬＩＳＡ法に用いる抗体としては、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体のいずれを用いてもよく、Ｆａｂ、Ｆａｂ’または$F(ab)_2$などの抗体フラグメントを用いてもよい。サンドイッチＥＬＩＳＡ法で用いる２種類の抗体の組み合

わせとしては、異なるエピトープを認識するモノクローナル抗体または抗体断片の組み合わせでもよいし、ポリクローナル抗体とモノクローナル抗体または抗体断片との組み合わせでもよい。

[0233] 蛍光免疫測定法は、文献［Monoclonal Antibodies-Principles and practice, Third edition,Academic Press (1996)、単クローン抗体実験マニュアル、講談社サイエンティフィック (1987)］などに記載された方法で測定する。蛍光免疫測定法で用いる標識体としては、公知［蛍光抗体法、ソフトサイエンス社（１９８３）］の蛍光標識を用いることができる。例えば、ＦＩＴＣまたはＲＩＴＣなどを用いる。

[0234] 発光免疫測定法は文献［生物発光と化学発光　臨床検査４２、廣川書店（１９９８）］などに記載された方法で測定する。発光免疫測定法で用いる標識体としては、公知の発光体標識が挙げられ、アクリジニウムエステルまたはロフィンなどを用いる。

[0235] ウエスタンブロット法は、抗原または抗原を発現した細胞などをＳＤＳ（ドデシル硫酸ナトリウム）－ＰＡＧＥ（ポリアクリルアミドゲル）［Antibodies - A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory (1988)］で分画した後、該ゲルをポリフッ化ビニリデン（ＰＶＤＦ）膜またはニトロセルロース膜にブロッティングし、該膜に抗原を認識する抗体または抗体断片を反応させ、さらにＦＩＴＣなどの蛍光物質、ペルオキシダーゼなどの酵素標識またはビオチン標識などを施した抗マウスＩｇＧ抗体または結合断片を反応させた後、該標識を可視化することによって測定する。

[0236] 一例を以下に示す。配列番号２のアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現している細胞や組織を溶解し、還元条件下でレーンあたりのタンパク量として０．１～３０μｇをＳＤＳ－ＰＡＧＥ法により泳動する。泳動されたタンパク質をＰＶＤＦ膜にトランスファーし１～１０％ＢＳＡを含むＰＢＳ（以下、ＢＳＡ－ＰＢＳと表記する）に室温で３０分間反応させブロッキング操作を行う。ここで本発明のモノクローナル抗体を反応させ、０．０５～０．１％のＴｗｅｅｎ－２０を含むＰＢＳ（以下、Ｔｗｅｅｎ－ＰＢＳと表記

する）で洗浄し、ペルオキシダーゼ標識したヤギ抗マウスＩｇＧを室温で２時間反応させる。Ｔｗｅｅｎ－ＰＢＳで洗浄し、ＥＣＬ　Ｗｅｓｔｅｒｎ　Ｂｌｏｔｔｉｎｇ　Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ　Ｒｅａｇｅｎｔｓ（アマシャム社製）などを用いてモノクローナル抗体が結合したバンドを検出することにより、配列番号２のアミノ酸配列を有するポリペプチドを検出する。ウェスタンブロッティングでの検出に用いられる抗体としては、天然型の立体構造を保持していないポリペプチドに結合できる抗体が用いられる。

[0237] 物理化学的手法は、例えば、抗原であるヒトＣＣＲ１と本発明のモノクローナル抗体またはその抗体断片とを結合させることにより凝集体を形成させて、この凝集体を検出することにより行う。この他に物理化学的手法として、毛細管法、一次元免疫拡散法、免疫比濁法またはラテックス免疫比濁法［臨床検査法提要、金原出版（１９９８）］などを用いることもできる。ラテックス免疫比濁法は、抗体または抗原を感作させた粒径０．１～１μｍ程度のポリスチレンラテックスなどの担体を用い、対応する抗原または抗体により抗原抗体反応を起こさせると、反応液中の散乱光は増加し、透過光は減少する。この変化を吸光度または積分球濁度として検出することにより被験サンプル中の抗原濃度などを測定する。

[0238] ヒトＣＣＲ１が発現している細胞の検出または測定は、公知の免疫学的検出法を用いることができるが、中でも、免疫沈降法、免疫細胞染色法、免疫組織染色法または蛍光抗体染色法などを用いることが好ましい。

[0239] 免疫沈降法は、ヒトＣＣＲ１を発現した細胞などを本発明のモノクローナル抗体またはその抗体断片と反応させた後、プロテインＧ－セファロースなどのイムノグロブリンに特異的な結合能を有する担体を加えて抗原抗体複合体を沈降させる。または以下のような方法によっても行うことができる。ＥＬＩＳＡ用９６ウェルプレートに上述した本発明のモノクローナル抗体またはその抗体断片を固相化した後、ＢＳＡ－ＰＢＳによりブロッキングする。抗体が、例えばハイブリドーマ培養上清などの精製されていない状態である場合には、抗マウスイムノグロブリン、抗ラットイムノグロブリン、プロテ

イン－Ａまたはプロテイン－Ｇなどをあらかじめ ＥＬＩＳＡ用９６ウェルプレートに固相化し、ＢＳＡ－ＰＢＳでブロッキングした後、ハイブリドーマ培養上清を分注して結合させる。次に、ＢＳＡ－ＰＢＳを捨てＰＢＳでよく洗浄した後、ヒトＣＣＲ１を発現している細胞や組織の溶解液を反応させる。よく洗浄した後のプレートより免疫沈降物をＳＤＳ－ＰＡＧＥ用サンプルバッファーで抽出し、上記のウェスタンブロッティングにより検出する。

[0240] 免疫細胞染色法または免疫組織染色法は、抗原を発現した細胞または組織などを、場合によっては抗体の通過性を良くするため界面活性剤やメタノールなどで処理した後、本発明のモノクローナル抗体と反応させ、さらにＦＩＴＣなどの蛍光標識、ペルオキシダーゼなどの酵素標識またはビオチン標識などを施した抗イムノグロブリン抗体またはその結合断片と反応させた後、該標識を可視化し、顕微鏡にて顕鏡する方法である。また、蛍光標識の抗体と細胞を反応させ、フローサイトメーターにて解析する蛍光抗体染色法［Monoclonal Antibodies-Principles and practice, Third edition,Academic Press (1996)、単クローン抗体実験マニュアル、講談社サイエンティフィック(1987)］により検出を行うことができる。特に、ヒトＣＣＲ１に結合する、本発明のモノクローナル抗体またはその抗体断片は、蛍光抗体染色法により天然型の立体構造を保持して発現している細胞の検出ができる。

[0241] また、蛍光抗体染色法のうち、ＦＭＡＴ８１００ＨＴＳシステム（アプライドバイオシステム社製）などを用いた場合には、形成された抗体－抗原複合体と、抗体－抗原複合体の形成に関与していない遊離の抗体または抗原とを分離することなく、抗原量または抗体量を測定できる。

[0242] 以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

実施例

[0243] ［実施例１］ヒト、マウスＣＣＲ１の発現ベクターの作製

（１）各ＣＣＲ１遺伝子の作製

下記、１～７のヒトまたはマウスのＣＣＲ１若しくはＣＣＲ１－ＣＣＲ３

キメラ受容体をコードするＤＮＡを合成した（ジェンスクリプトジャパン社）。合成の際には各ベクターに組み込むための制限酵素サイト（ＢａｍＨＩおよびＮｏｔＩ）と、Ｋｏｚａｋ配列を付加した。

１．ヒトＣＣＲ１（以下、ｈＣＣＲ１）をコードするｃＤＮＡ配列（配列番号１）

２．マウスＣＣＲ１（以下、ｍＣＣＲ１）をコードするｃＤＮＡ配列（配列番号３）

３．ヒトＣＣＲ３（以下、ｈＣＣＲ３）をコードするｃＤＮＡ配列（配列番号５）

４．ヒトＣＣＲ１の１番目から３１番目のアミノ酸配列をヒトＣＣＲ３の対応するＮ末端のアミノ酸配列に置換したキメラ受容体（以下、ＮＣ３－ｈＣＣＲ１）をコードするｃＤＮＡ配列（配列番号６）

５．マウスＣＣＲ１の１番目から３１番目のアミノ酸配列をヒトＣＣＲ３の対応するＮ末端のアミノ酸配列に置換したキメラ受容体（以下、ＮＣ３－ｍＣＣＲ１）をコードするｃＤＮＡ配列（配列番号７）

６．ヒトＣＣＲ３の１７１番目から１９４番目のアミノ酸配列をヒトＣＣＲ１の１７１番目から１９４番目のアミノ酸配列に置換したキメラ受容体（以下、ｈＣＣＲ３＿ＥＬ２ｈＣＣＲ１）をコードするｃＤＮＡ配列（配列番号８）

７．ヒトＣＣＲ３の１７１番目から１９４番目のアミノ酸配列をマウスＣＣＲ１の１７１番目から１９４番目のアミノ酸配列に置換したキメラ受容体（以下、ｈＣＣＲ３＿ＥＬ２ｍＣＣＲ１）をコードするｃＤＮＡ配列（配列番号９）

[0244] （２）ヒトＣＣＲ１発現ベクターの作製

上記（１）－１で合成したｈＣＣＲ１をコードするＤＮＡを制限酵素ＢａｍＨＩおよびＮｏｔＩ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂ社）で処理し、ＤＮＡ断片を精製した。Ｔｏｌ２トランスポゾンベクター（国際公開第２０１０／１４３６９８号）（以下、Ｔｎ－ｐＭｕｇ－Ｈｙｇｒｏと記載す

る）を同制限酵素で処理し、ＣＣＲ１をコードするＤＮＡ断片と混ぜたうえで、ＤＮＡ　ｌｉｇａｓｅ（タカラバイオ社）処理によって連結した。ライゲーション後のＤＮＡを大腸菌コンピテントセル（タカラバイオ社）に導入し、薬剤耐性を獲得したコロニーの中から目的のプラスミドＤＮＡを持つ大腸菌株を選択した。この大腸菌株を再度培養し、培養液からトランスフェクション用のＤＮＡを精製した（以下、このように作製したプラスミドをｈＣＣＲ１／Ｔｎ－ｐＭｕｇ－Ｈｙｇｒｏと表わす。）。

[0245] （３）各種ＣＣＲ発現ベクターの作製

上記（２）と同様の方法で、上記（１）で合成したｍＣＣＲ１、ｈＣＣＲ３、ＮＣ３－ｈＣＣＲ１、ＮＣ３－ｍＣＣＲ１、ｈＣＣＲ３＿ＥＬ２ｈＣＣＲ１、ｈＣＣＲ３＿ＥＬ２ｍＣＣＲ１をＴｎ－ｐＭｕｇ－Ｈｙｇｒｏに連結させ、発現ベクターを構築した（以下、それぞれｍＣＣＲ１／Ｔｎ－ｐＭｕｇ－Ｈｙｇｒｏ、ｈＣＣＲ３／Ｔｎ－ｐＭｕｇ－Ｈｙｇｒｏ、ＮＣ３－ｈＣＣＲ１／Ｔｎ－ｐＭｕｇ－Ｈｙｇｒｏ、ＮＣ３－ｍＣＣＲ１／Ｔｎ－ｐＭｕｇ－Ｈｙｇｒｏ、ｈＣＣＲ３＿ＥＬ２ｈＣＣＲ１／Ｔｎ－ｐＭｕｇ－Ｈｙｇｒｏ、ｈＣＣＲ３＿ＥＬ２ｍＣＣＲ１／Ｔｎ－ｐＭｕｇ－Ｈｙｇｒｏと表わす。）。

[0246] （４）ｍＣＣＲ１発現ベクターの作製

上記（２）と同様の方法で、上記（１）で合成したｍＣＣＲ１をコードするＤＮＡを、ｐＣＡＧＧＳ［Gene. 1991 Dec 15;108(2):193-9.］にｉｎｔｅｒｎａｌ　ｒｉｂｏｓｏｍａｌ　ｅｎｔｒｙ　ｓｉｔｅ（ＩＲＥＳ）とネオマイシン耐性遺伝子が付加されたベクターであるｐＣＡＧ－ＩＲＥＳ－ｎｅｏに連結させ、発現ベクターを構築した（以下、ｍＣＣＲ１／ｐＣＡＧ－ＩＲＥＳ－ｎｅｏと表わす。）。

[0247] ［実施例２］ＣＣＲ１発現細胞株の作製

（１）ｈＣＣＲ１発現細胞の作製

実施例１で作製したプラスミドＤＮＡであるｈＣＣＲ１／Ｔｎ－ｐＭｕｇ－ＨｙｇｒｏとＴｏｌ２　ｔｒａｎｓｐｏｓａｓｅ発現ベクターＴＰＥＸ＿

ｐＭｕｇ（国際公開第２０１３／００５６４９号）をＣＨＯ－Ｓ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社）に共導入し、発現細胞株を作製した。遺伝子導入はＦｕｇｅｎｅ ＨＤ（プロメガ社）を用いて下記のように行った。１×１０^{5}細胞／ｍＬに調製した細胞を６ウェルプレートに２．５ｍＬずつ播種し、２４時間後に、ｈＣＣＲ１／Ｔｎ－ｐＭｕｇ－Ｈｙｇｒｏ、ＴＰＥＸ＿ｐＭｕｇ、Ｆｕｇｅｎｅ ＨＤの混合物を培養液に添加した。添加後７２時間後に１ｍｇ／ｍＬのハイグロマイシン（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）を添加し、約２週間の薬剤選択を行った。薬剤耐性を獲得した細胞を回収し、フローサイトメトリー（ＦＡＣＳ Ｃａｌｉｂｕｒ、ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ社）による発現解析を行ったところ、導入したｈＣＣＲ１の発現が確認された。この細胞株をＣＨＯ－Ｓ－ｈＣＣＲ１と表わす。

[0248] （２）各種ＣＣＲ発現細胞の作製

実施例１で作製したｍＣＣＲ１／Ｔｎ－ｐＭｕｇ－Ｈｙｇｒｏ、ｈＣＣＲ３／Ｔｎ－ｐＭｕｇ－Ｈｙｇｒｏ、ＮＣ３－ｈＣＣＲ１／Ｔｎ－ｐＭｕｇ－Ｈｙｇｒｏ、ＮＣ３－ｍＣＣＲ１／Ｔｎ－ｐＭｕｇ－Ｈｙｇｒｏ、ｈＣＣＲ３＿ＥＬ２ｈＣＣＲ１／Ｔｎ－ｐＭｕｇ－ＨｙｇｒｏおよびｈＣＣＲ３＿ＥＬ２ｍＣＣＲ１／Ｔｎ－ｐＭｕｇ－Ｈｙｇｒｏについて、上記（１）と同様の方法でＣＨＯ－Ｓ細胞に導入し、発現細胞株を作製した。以下、これらの細胞株をそれぞれＣＨＯ－Ｓ－ｍＣＣＲ１、ＣＨＯ－Ｓ－ｈＣＣＲ３、ＣＨＯ－Ｓ－ＮＣ３－ｈＣＣＲ１、ＣＨＯ－Ｓ－ＮＣ３－ｍＣＣＲ１、ＣＨＯ－Ｓ－ｈＣＣＲ３＿ＥＬ２ｈＣＣＲ１およびＣＨＯ－Ｓ－ｈＣＣＲ３＿ＥＬ２ｍＣＣＲ１と表わす。

[0249] （３）ＲＬ３３－ｈＣＣＲ１細胞の作製

実施例１で作製したｈＣＣＲ１／Ｔｎ－ｐＭｕｇ－ＨｙｇｒｏとＴｏｌ２ ｔｒａｎｓｐｏｓａｓｅ発現ベクターＴＰＥＸ＿ｐＭｕｇ（国際公開第２０１３／００５６４９号）をウサギ細胞株ＲＬ－３３［Yoshii et al., Jpn J Med Sci Biol. 1977 Jun;30(3):149-57］に共導入し、ｈＣＣＲ１発現細胞株を作製した。遺伝子導入はＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ＬＴＸ（Ｔｈｅ

ｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社）を使用し、以下のように行った。１×１０^{5}細胞／ｍＬに調製した細胞を６ウェルプレートに２ｍＬずつ播種し、２．５μｇのプラスミドＤＮＡ、５μＬのＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　ＬＴＸの混合物を培地中に添加した。添加後７２時間後に１ｍｇ／ｍＬのハイグロマイシンを添加し、約２週間の薬剤選択を行った。薬剤耐性を獲得した細胞を回収し、フローサイトメトリーによる発現解析を行ったところ、導入したｈＣＣＲ１の発現が確認された。以下、この細胞株をＲＬ３３－ｈＣＣＲ１と表わす。

[0250] （４）ＲＬ３３－ｍＣＣＲ１細胞の作製

実施例１（４）で作製したｍＣＣＲ１／ｐＣＡＧ－ＩＲＥＳ－ｎｅｏを上記（３）と同様の方法でＲＬ－３３に導入し、発現細胞株を作製した。薬剤選択は０．５ｍｇ／ｍＬのＧ４１８で行った。以下、この細胞株をＲＬ３３－ｍＣＣＲ１と表わす。

[0251] ［実施例３］抗ＣＣＲ１ウサギポリクローナル抗体の作製

以下の方法で抗ＣＣＲ１ウサギポリクローナル抗体を作製した。ヒトＣＣＲ１のＮ末端ペプチド（配列番号１０）を合成し、２匹のウサギ（Ｎｅｗ　Ｚｅａｌａｎｄ　Ｗｈｉｔｅ）を２週おきに５回免疫した。免疫は、初回のみＣｏｍｐｌｅｔｅ　Ｆｒｅｕｎｄ’ｓ　Ａｄｊｕｖａｎｔ（ＣＦＡ）を用い、二回目以降はＩｎｃｏｍｐｌｅｔｅ　Ｆｒｅｕｎｄ’ｓ　Ａｄｊｕｖａｎｔ（ＩＦＡ）を使用し、背部の複数個所に皮下注入で行った。免疫後に抗体価の上昇した個体から血清を採取し、Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ａカラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ社）によるアフィニティ精製でＩｇＧを精製した。このようにして作製した抗ＣＣＲ１ウサギポリクローナル抗体はＥ５９７１と表わす。

[0252] ［実施例４］フローサイトメトリーによる発現解析

（１）ＣＣＲ１発現の確認

実施例２で作製したＣＣＲ１発現細胞株について、実施例３で作製した抗ＣＣＲ１ウサギポリクローナル抗体Ｅ５９７１を用いて染色し、フローサイ

トメトリー（ＦＣＭ）でＣＣＲ１の発現を確認した。ＦＣＭ解析は以下のように行った。細胞を９６ウェルプレートに２×１０^{5}細胞／ウェルで播種し、染色バッファー［３％ＦＢＳ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社）／ＤＰＢＳ（ナカライテスク社）／０．１％アジ化ナトリウム（ナカライテスク社）］で洗浄した。該細胞を１０μｇ／ｍＬのＥ５９７１によって１時間氷上で処理し、染色バッファーによる洗浄後、二次抗体Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　６４７　ｇｏａｔ　Ａｎｔｉ－Ｒａｂｂｉｔ　ＩｇＧ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社製）を終濃度１μｇ／ｍＬで添加し、室温にて３０分間処理した。該細胞について、再度染色バッファーによる洗浄を行った後に、染色バッファーにて懸濁し、ＢＤ　ＦＡＣＳＣａｌｉｂｕｒ（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ社）を用いて解析を行った。これにより、作製したＣＣＲ１発現細胞株について、導入したＣＣＲ１が発現していることを確認できた。

[0253] （２）ＣＣＲ３発現の確認

実施例２で作製したＣＨＯ－Ｓ－ｈＣＣＲ３についても、上記（１）と同様の方法でＣＣＲ３の発現を確認した。一次抗体には、市販の抗ＣＣＲ３抗体である４４４－１１抗体（ＭＢＬ社）を、二次抗体にはＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　６４７　ｇｏａｔ　Ａｎｔｉ－ｍｏｕｓｅＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ）（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社）を使用した。これにより、ＣＨＯ－Ｓ－ｈＣＣＲ３で導入したＣＣＲ３が発現していることを確認できた。

[0254] ［実施例５］ＣＣＲ１ノックアウトマウスを用いたモノクローナル抗体の作製

マウス交差性抗体を得るため、市販のＣＣＲ１ノックアウト（ＫＯ）マウス（Ｂ６．１２９Ｓ４－Ｃｃｒ１^{tm1Gao}　Ｎ１０＋Ｎ５）（非特許文献１７）（Ｔａｃｏｎｉｃ社）を用いてモノクローナル抗体を作製した。抗体作製は以下の手順で行った。

[0255] （１）免疫感作

免疫原として、実施例２で作製したＣＨＯ－Ｓ－ｈＣＣＲ１、ＣＨＯ－Ｓ－ｍＣＣＲ１、ＲＬ３３－ｈＣＣＲ１、およびＲＬ３３－ｍＣＣＲ１を用いた。一回の免疫あたり１×１０^{7}細胞／匹を用いた。５～９週齢のＣＣＲ１ＫＯ　マウスに、初回免疫時のみアジュバントとしてＡｌｕｍゲル（エル・エス・エル社）（８０μＬ／匹）及び百日咳ワクチン（ナカライテスク社）（１×１０^{7}細胞／匹）を加え腹腔内投与により免疫感作を行った。いずれの免疫も投与量が５００μＬ／匹になるようにＰＢＳで調製した。初回免疫２週間後に２回目、さらに１週間後に３回目の免疫を行い、３日後に部分採血を行った。

[0256] （２）抗血清評価（ＦＣＭ）

実施例２で作製した各種ＣＣＲ１発現細胞を用いて、血清中の特異的抗体価をＦＣＭで測定した。測定は以下の手順で行った。細胞をそれぞれ１×１０^{5}細胞／ウェルになるように、１％ＢＳＡ（ナカライテスク社）－ＰＢＳ（ナカライテスク社）［０．０２％ＥＤＴＡ（ナカライテスク社）、０．０５％NaN_3（ナカライテスク社）を含む］で調製し、９６ウェル細胞培養用プレートＵ底に５０μＬ／ウェルで分注した。そこへ被験サンプルとして被免疫動物から採取した血清を、終濃度２００倍希釈、１０００倍希釈、及び５０００倍希釈になるように１％ＢＳＡ－ＰＢＳ（０．０２％ＥＤＴＡ、０．０５％NaN_3）で調製し５０μＬ／ウェルで分注し、４℃で３０分間放置した。遠心分離（２０００ｒｐｍ、２分間）した後に上清を吸引し、プレートシェーカーで細胞のペレットを解した。１％ＢＳＡ－ＰＢＳ（０．０２％ＥＤＴＡ、０．０５％NaN_3）を２００μＬ／ウェルで分注し、再度遠心分離（２０００ｒｐｍ、２分間）した後に上清を吸引し、プレートシェーカーで細胞のペレットを解した。そこへＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ６４７　ｇｏａｔ　ａｎｔｉ－ｍｏｕｓｅ　ＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ）、若しくはＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ４８８　ｇｏａｔ　ａｎｔｉ－ｍｏｕｓｅ　ＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ）を最終的に３００倍希釈になるように１％ＢＳＡ－ＰＢＳ（０．０２％ＥＤＴＡ、０．０５％NaN_3）で調製し、５０μＬ／ウェルで分注し遮光下４℃で３０分

間放置した。遠心分離（２０００ｒｐｍ、２分間）した後に上清を吸引し、プレートシェーカーで細胞のペレットを解した。１％ＢＳＡ－ＰＢＳ（０．０２％ＥＤＴＡ、０．０５％NaN_3）を２００μＬ／ウェルで分注し、再度遠心分離（２０００ｒｐｍ、２分間）した後に上清を吸引し、プレートシェーカーで細胞のペレットを解した。そこへ１％ＢＳＡ－ＰＢＳ（０．０２％ＥＤＴＡ、０．０５％NaN_3）を５０μＬ／ウェルで分注し、フローサイトメーター［ＦＡＣＳＣａｎｔｏ（商標）ＩＩ／ＢＤ］で蛍光強度を測定した。これにより、抗体化の上昇が確認された個体を選択し、脾臓を摘出した。

[0257] （３）細胞融合によるハイブリドーマ作製

マウスミエローマ細胞株　Ｐ３－Ｕ１（Ｐ３Ｘ６３Ａｇ８Ｕ．１、ＡＴＣＣ　ＣＲＬ－１５９７）をエスクロンクローニングメディウム（エーディア社）で培養して無血清馴化したのち、細胞融合の親株として用いた。被免疫動物の脾臓を無菌的に採取しＲＥＤ　ＢＬＯＯＤ　ＣＥＬＬ　ＬＹＳＩＮＧ　ＢＵＦＦＥＲ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ社）で溶血後、ＰＢＳで２回洗浄し、脾細胞とＰ３－Ｕ１の細胞数が、脾臓細胞：Ｐ３－Ｕ１＝８：１になるよう混合し、遠心分離（１２００ｒｐｍ、５分間）した。得られた沈澱画分の細胞群をよくほぐした後、攪拌しながら３７℃にて１ｇのポリエチレングリコール－１０００（ＰＥＧ－１０００、純正化学社）、１ｍＬのＭＥＭ培地（ナカライテスク社）および０．３５ｍＬのジメチルスルホキシド（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ社）の混液を０．５ｍＬ加え、そこに１分間毎に１ｍＬのＭＥＭ培地を５回加えた後、ＭＥＭ培地を加えて全量が５０ｍＬになるようにした。細胞懸濁液を遠心分離（９００ｒｐｍ、５分間）し、得られた沈澱画分の細胞をゆるやかにほぐした後、ＨＡＴ　ＳＵＰＰＬＥＭＥＮＴ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社）を添加したエスクロンクローニングメディウムで脾臓細胞１．５×10^7細胞／９ｍＬの細胞濃度に懸濁した。事前に９６ウェル培養用プレートにはＨＡＴ添加クローニングメディウムを１００μＬ／ウェルで分注しておき、そこへ細胞懸濁液を１００μＬ／ウェルずつ分注し、CO_2インキュベーター（５％CO_2、

３７℃）で８～１０日間培養した。

[0258] （４）ハイブリドーマのスクリーニング

ハイブリドーマ培養上清に含まれる抗体のＣＣＲ１への結合活性をＦＣＭで評価した。被験サンプルにはハイブリドーマ培養上清を使用し、染色と測定は上記（２）と同様の手順で実施した。

[0259] （５）ハイブリドーマのサブクローニング

スクリーニングで陽性であったウェルの細胞についてサブクローニングを行い、クローニングメディウム中で７～１０日ほど培養した。

[0260] （６）抗体サブクラスの決定

サブクラス特異的な二次抗体を用いたＦＣＭで各抗体のサブクラスを決定した。染色、測定の手順は上記（２）と同様に行った。被験サンプルにはハイブリドーマ培養上清を使用した。検出抗体にはＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ４８８　ｇｏａｔ　ａｎｔｉ－ｍｏｕｓｅ　ＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ）（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社）及び、各サブクラス特異的な抗体（Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ４８８　ｇｏａｔ　ａｎｔｉ－ｍｏｕｓｅ　ＩｇＧ１（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社）、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ４８８　ｇｏａｔ　ａｎｔｉ－ｍｏｕｓｅ　ＩｇＧ２ａ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社）、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ４８８　ｇｏａｔ　ａｎｔｉ－ｍｏｕｓｅ　ＩｇＧ２ｂ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社）、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ４８８　ｇｏａｔ　ａｎｔｉ－ｍｏｕｓｅ　ＩｇＧ３）（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社）を使用した。

[0261] （７）ハイブリドーマ培養上清からの抗体精製

上記のようにクローニングしたハイブリドーマの培養上清から抗体を精製した。精製はＰｒｏｔｅｉｎ　Ｇ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ　４Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ社）を使用した。培養上清を遠心分離して沈殿物を除き、フィルターでろ過した。カラムに４００μＬの担体を充填し、ＤＰＢＳでバッファーを置換した。培養上清を添加し、単体に抗体を吸

着させた後に、１０ｍＬのＤＰＢＳで２回洗浄した。０．４ｍＬのＩｇＧ Ｅｌｕｔｉｏｎ Ｂｕｆｆｅｒ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社）を添加して溶出し、直後に０．１ｍＬの１Ｍ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ニッポンジーン社）ｐＨ８．６にて中和した。ＮＡＰカラム（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ社）を用いて脱塩とＤＰＢＳへのバッファー置換を行い、以降の解析に使用した。作製された抗体のクローン名、由来、およびサブクラスを表１に示す。

[0262] [表1]

抗体名	由来	サブクラス
KM5907	マウス	IgG1
KM5908	マウス	IgG2a
KM5909	マウス	IgG1
KM5911	マウス	IgG2b
KM5915	マウス	IgG2b
KM5916	マウス	IgG2b
KM5954	マウス	IgG2a
KM5955	マウス	IgG2a
KM5956	マウス	IgG2a

[0263] ［実施例６］ＴＨＰ－１遊走（ケモタキシス）アッセイ

ＣＣＲ１を発現するヒト細胞株としてはヒト単球性白血病細胞株ＴＨＰ－１が知られている。本細胞はＣＣＬ３、ＣＣＬ５、ＣＣＬ１５またはＣＣＬ２３等のＣＣＲ１リガンドの濃度勾配に対して走化性を示すことが知られており、ＴＨＰ－１を用いた遊走アッセイはＣＣＲ１阻害剤の評価系として汎用される系である。よって、実施例５で得られた抗ヒトＣＣＲ１抗体についても、この実験系を用いてヒトＣＣＬ１５によるヒトＣＣＲ１の活性化を阻害するか否かを評価した。

[0264] 遊走アッセイの方法を以下に記す。ＴＨＰ－１細胞はＡＴＣＣより入手した。ＴＨＰ－１細胞を５μＭ Ａｌｌ－ｔｒａｎｓ－ｒｅｔｉｎｏｉｃ ａｃｉｄ（ＡＴＲＡ）（和光純薬工業社）存在下で３日間培養し分化誘導した上で回収し、３７℃で加温したアッセイ培地［１％ＦＢＳ（Ｔｈｅｒｍｏ

Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社）／ＲＰＭＩ１６４０（ナカライテスク社）］にて洗浄後、同培地に再懸濁した。１×１０^{6}細胞／ｍＬに調製し、ポアサイズ５μｍのＴｒａｎｓｗｅｌｌ（Ｃｏｒｎｉｎｇ社、＃３４２１）の上層に１００μＬ／ウェルで細胞を分注した。下層にはケモアトラクタントとして、１ｎｇ／ｍＬの組換えヒトＣＣＬ１５（６８ａａ）（Ｒ＆Ｄｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社、＃６２８－ＬＫ）を添加したアッセイ培地を入れ、３７℃にて５％CO_2インキュベーター内で４－６時間培養した後に、下層に移動した細胞数をＣｅｌｌｔｉｔｅｒ－Ｇｌｏ（プロメガ社）で定量した。

[0265] 本測定系を用いて精製抗体の細胞遊走を評価する際には、予め１．５ｍＬチューブ内で９０μＬの細胞懸濁液と１０μＬの精製抗体溶液を混合し、３７℃にて１時間インキュベートした上で、細胞をＴｒａｓｎｗｅｌｌの上層に分注した。抗体は、終濃度を０．３、１、３および１０μｇ／ｍＬに調整し、測定に使用した。

[0266] 得られた結果を図１（ａ）および図１（ｂ）に示す。図１（ａ）および図１（ｂ）に示すように、実施例５で得られたマウス抗ヒトＣＣＲ１モノクローナル抗体ＫＭ５９０７抗体、ＫＭ５９０８抗体、ＫＭ５９０９抗体、ＫＭ５９１１抗体、ＫＭ５９１５抗体、ＫＭ５９１６抗体、ＫＭ５９５４抗体、ＫＭ５９５５抗体およびＫＭ５９５６抗体は、いずれも活性化ＣＣＬ１５により誘導されるＴＨＰ－１の遊走を濃度依存的に阻害した。

[0267] 以上より、本発明のマウス抗ヒトＣＣＲ１モノクローナル抗体は、いずれもヒトＣＣＬ１５によるヒトＣＣＲ１の活性化を阻害する抗体であることが明らかになった。

[0268] ［実施例７］抗ヒトＣＣＲ１抗体のヒトＣＣＲ１結合領域の決定

実施例５で得られたマウス抗ヒトＣＣＲ１モノクローナル抗体のヒトＣＣＲ１の結合領域を、ＣＣＲ１－ＣＣＲ３キメラ受容体発現細胞を用いてＦＣＭで調べた。測定は実施例４と同様の方法で行った。

[0269] ＣＣＲ１－ＣＣＲ３キメラ受容体発現細胞として、実施例２で作製したＣ

ＨＯ－Ｓ－ｈＣＣＲ３、ＣＨＯ－Ｓ－ＮＣ３－ｈＣＣＲ１、ＣＨＯ－Ｓ－ＮＣ３－ｍＣＣＲ１、およびＣＨＯ－Ｓ－ｈＣＣＲ３＿ＥＬ２ｈＣＣＲ１を使用した。また、ネガティブコントロールとしてＣＨＯ－Ｓを使用した。

[0270] 被験抗体としては、１０倍希釈した各ハイブリドーマ培養上清、既存のマウス抗ヒトＣＣＲ１モノクローナル抗体　５３５０４抗体（Ｒ＆Ｄ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社）およびマウス抗ヒトＣＣＲ３モノクローナル抗体４４４－１１抗体（ＭＢＬ社）を使用した。

[0271] 測定結果について、ある細胞を、ある被験抗体（各ハイブリドーマ培養上清、５３５０４抗体または４４４－１１抗体）および二次抗体で染色した時の蛍光強度を、該細胞を二次抗体のみで染色した時の蛍光強度で除した。得られた数値が１０以上の時は、該被験抗体は該細胞に結合すると判定し、１０未満の時は、該被験抗体は該細胞に結合しないと判定し、表２中にそれぞれ○、×で示した。

[0272] [表2]

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

[0273] 表２より、マウス抗ヒトＣＣＲ１モノクローナル抗体ＫＭ５９０７抗体、ＫＭ５９０８抗体、ＫＭ５９０９抗体、ＫＭ５９１１抗体、ＫＭ５９１５抗

体、ＫＭ５９１６抗体、ＫＭ５９５４抗体、ＫＭ５９５５抗体およびＫＭ５９５６抗体は、いずれもＣＨＯ－Ｓ－ｈＣＣＲ３には結合せず、ＣＨＯ－Ｓ－ｈＣＣＲ３＿ＥＬ２ｈＣＣＲ１に結合した。したがって本発明のマウス抗ヒトＣＣＲ１モノクローナル抗体はいずれもヒトＣＣＲ１の細胞外ループ２に結合することが明らかとなった。

[0274] ［実施例８］既存の抗ヒトＣＣＲ１抗体と抗ヒトＣＣＲ１抗体を用いたケモタキシスアッセイ

（１）既存のマウス抗ヒトＣＣＲ１モノクローナル抗体２Ｄ４抗体の調製

既存の抗ヒトＣＣＲ１抗体である２Ｄ４抗体（米国特許第６，７５６，０３５号明細書）を産生するハイブリドーマ（ＬＳ－１２５－２Ｄ４－１１－１０－１）をＡＴＣＣより入手した。本ハイブリドーマをＨｙｂｒｉｄｏｍａ－ＳＦＭ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社）を用いて培養し、培養上清から抗体を精製した。精製はＰｒｏｔｅｉｎ Ｇ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ ４Ｆａｓｔ Ｆｌｏｗ（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ社）を使用した。培養上清を遠心分離して、得られた培養上清をフィルターでろ過した。カラムに４００μＬの担体を充填し、ＤＰＢＳでバッファーを置換した。該カラムに該培養上清を添加し、担体に抗体を吸着させた後に、１０ｍＬのＤＰＢＳで２回洗浄した。該カラムに０．４ｍＬのＩｇＧ Ｅｌｕｔｉｏｎ Ｂｕｆｆｅｒ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社）を添加して抗体を溶出させ、すぐに０．１ｍＬの１Ｍ Ｔｒｉｓ－Ｃｌ（ナカライテスク社）ｐＨ８．６にて抗体溶液を中和した。ＮＡＰカラム（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ社）を用いて該抗体溶液の脱塩とＤＰＢＳへのバッファー置換を行い、以降の解析に使用した。

[0275] 精製した２Ｄ４抗体について、還元条件でのＳＤＳ－ＰＡＧＥを通常の方法で行い、抗体が精製されていることを確認した。

[0276] また、２Ｄ４抗体のヒトＣＣＲ１への結合活性を、実施例４に記載する方法に準じてＦＣＭで確認した。２Ｄ４抗体は０．１、１μｇ／ｍＬで反応させ、細胞は、ヒトＣＣＲ１発現細胞としてＣＨＯ－Ｓ－ｈＣＣＲ１を、ネガ

ティブコントロールとしてＣＨＯ－Ｓを使用した。その結果、２Ｄ４抗体は、ＣＨＯ－Ｓには結合せず、ＣＨＯ－Ｓ－ｈＣＣＲ１には濃度依存的に結合した。よって、精製した２Ｄ４抗体は、市販されている２Ｄ４抗体と同様に、ヒトＣＣＲ１への結合性を有していることが確認できた。

[0277] （２）ケモタキシスアッセイ

既存の抗ヒトＣＣＲ１抗体と、実施例５で得られたマウス抗ヒトＣＣＲ１抗体モノクローナル抗体ＫＭ５９０８抗体およびＫＭ５９１６抗体について、実施例６に記載した方法に準じてＣＣＲ１の活性化を阻害する活性を測定し、得られた結果を抗体毎に比較した。

[0278] 既存の抗ヒトＣＣＲ１抗体としては、（１）で作製した２Ｄ４抗体、１４１－２抗体（ＭＢＬ社）および５３５０４抗体（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ社）を使用した。

[0279] 得られた結果を図２に示す。図２に示すように、既存の抗ヒトＣＣＲ１抗体である２Ｄ４抗体、１４１－２抗体、および５３５０４抗体は、いずれも活性化ＣＣＬ１５により誘導されるＴＨＰ－１細胞の遊走を阻害しない一方で、マウス抗ヒトＣＣＲ１モノクローナル抗体ＫＭ５９０８抗体およびＫＭ５９１６抗体は、濃度依存的に上記細胞の遊走を阻害した。

[0280] 実施例６にて記載したように、実施例５で取得した抗ヒトＣＣＲ１抗体は、いずれも本実施例と同じ実験条件で、抗体濃度依存的に活性化ＣＣＬ１５により誘導されるＴＨＰ－１細胞の遊走を阻害した［図１（ａ）および図１（ｂ）］。

[0281] したがって、既存の抗ヒトＣＣＲ１抗体は、ヒトＣＣＬ１５によるヒトＣＣＲ１の活性化を阻害しない一方で、実施例５で得られたマウス抗ヒトＣＣＲ１モノクローナル抗体ＫＭ５９０７抗体、ＫＭ５９０８抗体、ＫＭ５９０９抗体、ＫＭ５９１１抗体、ＫＭ５９１５抗体、ＫＭ５９１６抗体、ＫＭ５９５４抗体、ＫＭ５９５５抗体およびＫＭ５９５６抗体は、いずれもヒトＣＬ１５によるヒトＣＣＲ１の活性化を阻害する抗体であることが示された。

[0282] ［実施例９］遺伝子組換え抗体の作製

（１）抗体可変領域遺伝子のクローニングと配列決定

実施例５でクローニングしたハイブリドーマからＴｒｉｚｏｌ（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社）を用いてトータルＲＮＡを抽出し、５’－ＲＡＣＥ法により抗体遺伝子を増幅させた。ＲＡＣＥ用ｃＤＮＡの合成にはＳＭＡＲＴｅｒ ＲＡＣＥ Ｋｉｔ（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ社）を用いた。ＲＡＣＥ用ｃＤＮＡ合成過程で付加される配列に特異的なプライマーと、マウスＩｇ ｇａｍｍａ鎖またはｋａｐｐａ鎖増幅用プライマー（配列番号１１－１４）を用いたＰＣＲによって抗体可変領域断片を増幅させ、クローニングして該ＤＮＡ断片の塩基配列を確認した。

[0283] 実施例５で得られたの各抗ヒトＣＣＲ１抗体について、重鎖および軽鎖の可変領域のアミノ酸配列をコードする塩基配列、該塩基配列から推定されるアミノ酸配列および該アミノ酸配列からシグナル配列を除いたアミノ酸配列を表す配列番号を、それぞれ表３に示す。さらに、本発明の各抗体のＣＤＲのアミノ酸配列を表す配列番号を、それぞれ表４に示す。

[0284] [表3]

	VH			VL		
抗体	塩基配列	ｱﾐﾉ酸配列	ｼｸﾞﾅﾙ配列を除いたｱﾐﾉ酸配列	塩基配列	ｱﾐﾉ酸配列	ｼｸﾞﾅﾙ配列を除いたｱﾐﾉ酸配列
KM5907	配列番号15	配列番号16	配列番号51	配列番号17	配列番号18	配列番号52
KM5908	配列番号19	配列番号20	配列番号53	配列番号21	配列番号22	配列番号54
KM5909	配列番号23	配列番号24	配列番号55	配列番号25	配列番号26	配列番号56
KM5911	配列番号27	配列番号28	配列番号57	配列番号29	配列番号30	配列番号58
KM5915	配列番号31	配列番号32	配列番号59	配列番号33	配列番号34	配列番号60
KM5916	配列番号35	配列番号36	配列番号61	配列番号37	配列番号38	配列番号62
KM5954	配列番号39	配列番号40	配列番号63	配列番号41	配列番号42	配列番号64
KM5955	配列番号43	配列番号44	配列番号65	配列番号45	配列番号46	配列番号66
KM5956	配列番号47	配列番号48	配列番号67	配列番号49	配列番号50	配列番号68

[0285]

[表4]

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

[0286] （２）キメラ抗体の発現ベクターの作製

実施例５で作製した各抗ヒトＣＣＲ１抗体について、定常領域をＳ２２８Ｐ、Ｌ２３５ＥおよびＲ４０９Ｋのアミノ酸改変を含むヒトＩｇＧ４定常領域（ヒトＩｇＧ４ＰＥ＿Ｒ４０９Ｋ）に置換したキメラ抗体を以下に記載する方法で作製した。（１）で作製した各抗体の可変領域のアミノ酸配列をコードする塩基配列がクローニングされたプラスミドＤＮＡを鋳型として、相同組換え用の塩基配列を付加したプライマーを用いたＰＣＲで各抗体の可変領域のアミノ酸配列をコードする塩基配列を増幅させた。Ｉｎ－Ｆｕｓｉｏｎ ＨＤ Ｃｌｏｎｉｎｇ Ｋｉｔ（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ社）を使用して、該塩基配列を、Ｎ５ＫＧ４ＰＥ Ｒ４０９Ｋベクター［Ｎ５ＫＧ１ベクター（米国特許第６，００１，３５８号明細書）中のヒトＩｇＧ１の定常領域をコードする塩基配列を、上記のアミノ酸改変を含む変異ヒトＩｇＧ４の定常領域をコードする塩基配列に置換したベクター（以下Ｎ５ＫＧ４ＰＥ Ｒ４０９Ｋベクターと記載する）］に連結させ、キメラ抗体の発現ベクターを作製した。実験の手順はキットに付属のマニュアルに従った。

[0287] （３）キメラ抗体の産生と精製

（２）で作製した発現ベクターおよびＥｘｐｉ２９３　Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　Ｓｙｓｔｅｍ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社）を使用して、キメラ抗体を産生した。手順は付属マニュアルに従い以下のように行った。Ｅｘｐｉ２９３Ｆ細胞（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社）を２×１０^{6}細胞／ｍＬの密度で３７℃、２４時間培養し、その後、１反応あたり１．２５×１０^{8}細胞を、４２．５ｍＬのＥｘｐｉ２９３　Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　Ｍｅｄｉｕｍ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社）に加えた。Ｏｐｔｉ－ＭＥＭ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社）に５０μｇのプラスミドＤＮＡとＥｘｐｉＦｅｃｔａｍｉｎ　２９３　Ｒｅａｇｅｎｔ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社）を添加し、３０分間静置した後に、該プラスミド溶液を上記の細胞液に添加した。さらに一晩の培養後に、該細胞液にＥｘｐｉＦｅｃｔａｍｉｎ　２９３　Ｔｒａｎｓｆｅｃｔｉｏｎ　Ｅｎｈａｎｃｅｒを添加した（培養ボリュームはトータルで５０ｍＬ）。該細胞液を７～１０日間培養した後に、培養上清を回収した。

[0288] 抗体の精製には、Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｇ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ　４Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ社）を使用した。回収した培養上清を遠心分離し、得られた培養上清をフィルターでろ過した。カラムに４００μＬの担体を充填し、ＤＰＢＳでバッファーを置換した。該カラムに培養上清を添加し、単体に抗体を吸着させた後に、該カラムを１０ｍＬのＤＰＢＳで２回洗浄した。該カラムに０．４ｍＬのＩｇＧ　Ｅｌｕｔｉｏｎ　Ｂｕｆｆｅｒ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社）を添加して抗体を溶出させ、ただちに該抗体溶液に０．１ｍＬの１Ｍ　Ｔｒｉｓ－Ｃｌ　ｐＨ８．６を加えて中和した。ＮＡＰカラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ社）を用いて該抗体溶液を脱塩し、以降の解析に使用した。

[0289] こうして得られたマウス抗ヒトＣＣＲ１モノクローナル抗体ＫＭ５９０７抗体、ＫＭ５９０８抗体、ＫＭ５９０９抗体、ＫＭ５９１１抗体、ＫＭ５９１５抗体、ＫＭ５９１６抗体、ＫＭ５９５４抗体、ＫＭ５９５５抗体および

ＫＭ５９５６抗体のキメラ抗体を、それぞれｃｈＫＭ５９０７抗体、ｃｈＫＭ５９０８抗体、ｃｈＫＭ５９０９抗体、ｃｈＫＭ５９１１抗体、ｃｈＫＭ５９１５抗体、ｃｈＫＭ５９１６抗体、ｃｈＫＭ５９５４抗体、ｃｈＫＭ５９５５抗体およびｃｈＫＭ５９５６抗体と記載する。

[0290] ［実施例１０］キメラ抗体の結合性の評価

実施例９で作製したキメラ抗体ｃｈＫＭ５９０７抗体、ｃｈＫＭ５９０８抗体、ｃｈＫＭ５９０９抗体、ｃｈＫＭ５９１１抗体、ｃｈＫＭ５９１５抗体、ｃｈＫＭ５９１６抗体、ｃｈＫＭ５９５４抗体、ｃｈＫＭ５９５５抗体およびｃｈＫＭ５９５６抗体について、ヒトおよびマウスＣＣＲ１への結合性を実施例４に記載する方法に準じてＦＣＭで測定した。ヒトＣＣＲ１発現細胞およびマウスＣＣＲ１発現細胞としては、それぞれ実施例２で作製したＣＨＯ－Ｓ－ｈＣＣＲ１、ＣＨＯ－Ｓ－ｍＣＣＲ１を使用した。その結果、ｃｈＫＭ５９５５抗体は、ヒトＣＣＲ１に結合することが示された。その他のキメラ抗体は、ヒトおよびマウスＣＣＲ１に結合することが示された。

[0291] ［実施例１１］キメラ抗体を用いたケモタキシスアッセイ

実施例９で作製したキメラ抗体ｃｈＫＭ５９０７抗体、ｃｈＫＭ５９０８抗体、ｃｈＫＭ５９０９抗体、ｃｈＫＭ５９１１抗体、ｃｈＫＭ５９１５抗体、ｃｈＫＭ５９１６抗体、ｃｈＫＭ５９５４抗体、ｃｈＫＭ５９５５抗体およびｃｈＫＭ５９５６抗体について、実施例６に記載する方法に準じて、ヒトＣＣＲ１活性化を阻害する活性測定した。その結果、いずれのキメラ抗体も、活性化ヒトＣＣＬ１５によるＴＨＰ－１の遊走を阻害することが示された。

[0292] 本発明を特定の態様を用いて詳細に説明したが、本発明の意図と範囲を離れることなく様々な変更および変形が可能であることは、当業者にとって明らかである。なお、本出願は、２０１６年１月２０日付けで出願された日本特許出願（特願２０１６－８９８３号）に基づいており、その全体が引用により援用される。

配列表フリーテキスト

[0293] 配列番号６－人工配列の説明：ＮＣ３－ｈＣＣＲ１の塩基配列

配列番号７－人工配列の説明：ＮＣ３－ｍＣＣＲ１の塩基配列

配列番号８－人工配列の説明：ｈＣＣＲ３＿ＥＬ２ｈＣＣＲ１の塩基配列

配列番号９－人工配列の説明：ｈＣＣＲ３＿ＥＬ２ｍＣＣＲ１の塩基配列

配列番号１０－人工配列の説明：Ｎ末端ｈＣＣＲ１　ｐｅｐｔｉｄｅのアミノ酸配列

配列番号１１－人工配列の説明：プライマー＿ｍｏｕｓｅ＿ｇａｍｍａ＿ｒ１の塩基配列

配列番号１２－人工配列の説明：プライマー＿ｍｏｕｓｅ＿ｇａｍｍａ＿ｒ２の塩基配列

配列番号１３－人工配列の説明：プライマー＿ｍｏｕｓｅ＿ｋａｐｐａ＿ｒ１の塩基配列

配列番号１４－人工配列の説明：プライマー＿ｍｏｕｓｅ＿ｋａｐｐａ＿ｒ２の塩基配列

配列番号５１－人工配列の説明：シグナル配列を除いたＫＭ５９０７　ＶＨのアミノ酸配列

配列番号５２－人工配列の説明：シグナル配列を除いたＫＭ５９０７　ＶＬのアミノ酸配列

配列番号５３－人工配列の説明：シグナル配列を除いたＫＭ５９０８　ＶＨのアミノ酸配列

配列番号５４－人工配列の説明：シグナル配列を除いたＫＭ５９０８　ＶＬのアミノ酸配列

配列番号５５－人工配列の説明：シグナル配列を除いたＫＭ５９０９　ＶＨのアミノ酸配列

配列番号５６－人工配列の説明：シグナル配列を除いたＫＭ５９０９　ＶＬのアミノ酸配列

配列番号５７－人工配列の説明：シグナル配列を除いたＫＭ５９１１　ＶＨのアミノ酸配列

配列番号５８－人工配列の説明：シグナル配列を除いたＫＭ５９１１　ＶＬのアミノ酸配列

配列番号５９－人工配列の説明：シグナル配列を除いたＫＭ５９１５　ＶＨのアミノ酸配列

配列番号６０－人工配列の説明：シグナル配列を除いたＫＭ５９１５　ＶＬのアミノ酸配列

配列番号６１－人工配列の説明：シグナル配列を除いたＫＭ５９１６　ＶＨのアミノ酸配列

配列番号６２－人工配列の説明：シグナル配列を除いたＫＭ５９１６　ＶＬのアミノ酸配列

配列番号６３－人工配列の説明：シグナル配列を除いたＫＭ５９５４　ＶＨのアミノ酸配列

配列番号６４－人工配列の説明：シグナル配列を除いたＫＭ５９５４　ＶＬのアミノ酸配列

配列番号６５－人工配列の説明：シグナル配列を除いたＫＭ５９５５　ＶＨのアミノ酸配列

配列番号６６－人工配列の説明：シグナル配列を除いたＫＭ５９５５　ＶＬのアミノ酸配列

配列番号６７－人工配列の説明：シグナル配列を除いたＫＭ５９５６　ＶＨのアミノ酸配列

配列番号６８－人工配列の説明：シグナル配列を除いたＫＭ５９５６　ＶＬのアミノ酸配列

配列番号６９－人工配列の説明：ＫＭ５９０７　ＶＨ　ＣＤＲ１のアミノ酸配列

配列番号７０－人工配列の説明：ＫＭ５９０７　ＶＨ　ＣＤＲ２のアミノ酸配列

配列番号７１－人工配列の説明：ＫＭ５９０７　ＶＨ　ＣＤＲ３のアミノ酸配列

配列番号７２－人工配列の説明：ＫＭ５９０７　ＶＬ　ＣＤＲ１のアミノ酸配列

配列番号７３－人工配列の説明：ＫＭ５９０７　ＶＬ　ＣＤＲ２のアミノ酸配列

配列番号７４－人工配列の説明：ＫＭ５９０７　ＶＬ　ＣＤＲ３のアミノ酸配列

配列番号７５－人工配列の説明：ＫＭ５９０８　ＶＨ　ＣＤＲ１のアミノ酸配列

配列番号７６－人工配列の説明：ＫＭ５９０８　ＶＨ　ＣＤＲ２のアミノ酸配列

配列番号７７－人工配列の説明：ＫＭ５９０８　ＶＨ　ＣＤＲ３のアミノ酸配列

配列番号７８－人工配列の説明：ＫＭ５９０８　ＶＬ　ＣＤＲ１のアミノ酸配列

配列番号７９－人工配列の説明：ＫＭ５９０８　ＶＬ　ＣＤＲ２のアミノ酸配列

配列番号８０－人工配列の説明：ＫＭ５９０８　ＶＬ　ＣＤＲ３のアミノ酸配列

配列番号８１－人工配列の説明：ＫＭ５９０９　ＶＨ　ＣＤＲ１のアミノ酸配列

配列番号８２－人工配列の説明：ＫＭ５９０９　ＶＨ　ＣＤＲ２のアミノ酸配列

配列番号８３－人工配列の説明：ＫＭ５９０９　ＶＨ　ＣＤＲ３のアミノ酸配列

配列番号８４－人工配列の説明：ＫＭ５９０９　ＶＬ　ＣＤＲ１のアミノ酸配列

配列番号８５－人工配列の説明：ＫＭ５９０９　ＶＬ　ＣＤＲ２のアミノ酸配列

配列番号８６－人工配列の説明：ＫＭ５９０９　ＶＬ　ＣＤＲ３のアミノ酸配列

配列番号８７－人工配列の説明：ＫＭ５９１１　ＶＨ　ＣＤＲ１のアミノ酸配列

配列番号８８－人工配列の説明：ＫＭ５９１１　ＶＨ　ＣＤＲ２のアミノ酸配列

配列番号８９－人工配列の説明：ＫＭ５９１１　ＶＨ　ＣＤＲ３のアミノ酸配列

配列番号９０－人工配列の説明：ＫＭ５９１１　ＶＬ　ＣＤＲ１のアミノ酸配列

配列番号９１－人工配列の説明：ＫＭ５９１１　ＶＬ　ＣＤＲ２のアミノ酸配列

配列番号９２－人工配列の説明：ＫＭ５９１１　ＶＬ　ＣＤＲ３のアミノ酸配列

配列番号９３－人工配列の説明：ＫＭ５９１５　ＶＨ　ＣＤＲ１のアミノ酸配列

配列番号９４－人工配列の説明：ＫＭ５９１５　ＶＨ　ＣＤＲ２のアミノ酸配列

配列番号９５－人工配列の説明：ＫＭ５９１５　ＶＨ　ＣＤＲ３のアミノ酸配列

配列番号９６－人工配列の説明：ＫＭ５９１５　ＶＬ　ＣＤＲ１のアミノ酸配列

配列番号９７－人工配列の説明：ＫＭ５９１５　ＶＬ　ＣＤＲ２のアミノ酸配列

配列番号９８－人工配列の説明：ＫＭ５９１５　ＶＬ　ＣＤＲ３のアミノ酸配列

配列番号９９－人工配列の説明：ＫＭ５９１６　ＶＨ　ＣＤＲ１のアミノ酸配列

配列番号１００－人工配列の説明：ＫＭ５９１６　ＶＨ　ＣＤＲ２のアミノ酸配列

配列番号１０１－人工配列の説明：ＫＭ５９１６　ＶＨ　ＣＤＲ３のアミノ酸配列

配列番号１０２－人工配列の説明：ＫＭ５９１６　ＶＬ　ＣＤＲ１のアミノ酸配列

配列番号１０３－人工配列の説明：ＫＭ５９１６　ＶＬ　ＣＤＲ２のアミノ酸配列

配列番号１０４－人工配列の説明：ＫＭ５９１６　ＶＬ　ＣＤＲ３のアミノ酸配列

配列番号１０５－人工配列の説明：ＫＭ５９５４　ＶＨ　ＣＤＲ１のアミノ酸配列

配列番号１０６－人工配列の説明：ＫＭ５９５４　ＶＨ　ＣＤＲ２のアミノ酸配列

配列番号１０７－人工配列の説明：ＫＭ５９５４　ＶＨ　ＣＤＲ３のアミノ酸配列

配列番号１０８－人工配列の説明：ＫＭ５９５４　ＶＬ　ＣＤＲ１のアミノ酸配列

配列番号１０９－人工配列の説明：ＫＭ５９５４　ＶＬ　ＣＤＲ２のアミノ酸配列

配列番号１１０－人工配列の説明：ＫＭ５９５４　ＶＬ　ＣＤＲ３のアミノ酸配列

配列番号１１１－人工配列の説明：ＫＭ５９５５　ＶＨ　ＣＤＲ１のアミノ酸配列

配列番号１１２－人工配列の説明：ＫＭ５９５５　ＶＨ　ＣＤＲ２のアミノ酸配列

配列番号１１３－人工配列の説明：ＫＭ５９５５　ＶＨ　ＣＤＲ３のアミノ酸配列

配列番号１１４－人工配列の説明：ＫＭ５９５５　ＶＬ　ＣＤＲ１のアミノ酸配列

配列番号１１５－人工配列の説明：ＫＭ５９５５　ＶＬ　ＣＤＲ２のアミノ酸配列

配列番号１１６－人工配列の説明：ＫＭ５９５５　ＶＬ　ＣＤＲ３のアミノ酸配列

配列番号１１７－人工配列の説明：ＫＭ５９５６　ＶＨ　ＣＤＲ１のアミノ酸配列

配列番号１１８－人工配列の説明：ＫＭ５９５６　ＶＨ　ＣＤＲ２のアミノ酸配列

配列番号１１９－人工配列の説明：ＫＭ５９５６　ＶＨ　ＣＤＲ３のアミノ酸配列

配列番号１２０－人工配列の説明：ＫＭ５９５６　ＶＬ　ＣＤＲ１のアミノ酸配列

配列番号１２１－人工配列の説明：ＫＭ５９５６　ＶＬ　ＣＤＲ２のアミノ酸配列

配列番号１２２－人工配列の説明：ＫＭ５９５６　ＶＬ　ＣＤＲ３のアミノ酸配列

請求の範囲

[請求項1] ヒトＣＣケモカイン受容体１（ＣＣ ｃｈｅｍｏｋｉｎｅ ｒｅｃｅｐｔｏｒ １；以下ＣＣＲ１と略記する）の細胞外領域に結合し、ヒトＣＣ ｃｈｅｍｏｋｉｎｅ ｌｉｇａｎｄ（以下、ＣＣＬと略記する）１５によるヒトＣＣＲ１の活性化を阻害するモノクローナル抗体または該抗体断片。

[請求項2] ヒトＣＣＬ１５により誘導されるヒトＣＣＲ１発現細胞の遊走を阻害する請求項１に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

[請求項3] ヒトＣＣＲ１の細胞外ループ２領域のアミノ酸配列のうち、少なくとも１つのアミノ酸残基に結合する、請求項１または２に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

[請求項4] モノクローナル抗体が、下記（ａ）～（ｌ）から選ばれるいずれか一つの抗体である、請求項１～３のいずれか１項に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

（ａ）重鎖可変領域（ｈｅａｖｙ ｃｈａｉｎ ｖａｒｉａｂｌｅ ｒｅｇｉｏｎ；以下、ＶＨと略記する）の相補性決定領域（ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔａｒｉｔｙ ｄｅｔｅｒｍｉｎｉｎｇ ｒｅｇｉｏｎ；以下ＣＤＲと略記する）１～３のアミノ酸配列が、それぞれ配列番号６９、７０および７１に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列であって、かつ軽鎖可変領域（ｌｉｇｈｔ ｃｈａｉｎ ｖａｒｉａｂｌｅ ｒｅｇｉｏｎ；以下、ＶＬと略記する）のＣＤＲ１～３のアミノ酸配列が、それぞれ配列番号７２、７３および７４に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列である抗体。

（ｂ）ＶＨのＣＤＲ１～３のアミノ酸配列が、それぞれ配列番号７５、７６および７７に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列であって、かつＶＬのＣＤＲ１～３のアミノ酸配列が、それぞれ配列番号７８、７９および８０に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列である抗体。

（ｃ）ＶＨのＣＤＲ１～３のアミノ酸配列が、それぞれ配列番号８１、８２および８３に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列であって、かつＶＬのＣＤＲ１～３のアミノ酸配列が、それぞれ配列番号８４、８５および８６に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列である抗体。

（ｄ）ＶＨのＣＤＲ１～３のアミノ酸配列が、それぞれ配列番号８７、８８および８９に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列であって、かつＶＬのＣＤＲ１～３のアミノ酸配列が、それぞれ配列番号９０、９１および９２に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列である抗体。

（ｅ）ＶＨのＣＤＲ１～３のアミノ酸配列が、それぞれ配列番号９３、９４および９５に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列であって、かつＶＬのＣＤＲ１～３のアミノ酸配列が、それぞれ配列番号９６、９７および９８に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列である抗体。

（ｆ）ＶＨのＣＤＲ１～３のアミノ酸配列が、それぞれ配列番号９９、１００および１０１に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列であって、かつＶＬのＣＤＲ１～３のアミノ酸配列が、それぞれ配列番号１０２、１０３および１０４に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列である抗体。

（ｇ）ＶＨのＣＤＲ１～３のアミノ酸配列が、それぞれ配列番号１０５、１０６および１０７に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列であって、かつＶＬのＣＤＲ１～３のアミノ酸配列が、それぞれ配列番号１０８、１０９および１１０に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列である抗体。

（ｈ）ＶＨのＣＤＲ１～３のアミノ酸配列が、それぞれ配列番号１１１、１１２および１１３に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列であって、かつＶＬのＣＤＲ１～３のアミノ酸配列が、それぞれ配

列番号１１４、１１５および１１６に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列である抗体。

（ｉ）ＶＨのＣＤＲ１～３のアミノ酸配列が、それぞれ配列番号１１７、１１８および１１９に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列であって、かつＶＬのＣＤＲ１～３のアミノ酸配列が、それぞれ配列番号１２０、１２１および１２２に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列である抗体。

（ｊ）前記（ａ）～（ｉ）に記載の少なくとも一つの抗体と、ヒトＣＣＲ１への結合について競合する抗体。

（ｋ）前記（ａ）～（ｉ）に記載のいずれか一つの抗体が結合するエピトープを含むエピトープに結合する抗体。

（ｌ）前記（ａ）～（ｉ）に記載のいずれか一つの抗体が結合するエピトープと同じエピトープに結合する抗体。

[請求項5] モノクローナル抗体が、下記（ａ）～（ｉ）から選ばれるいずれか一つの抗体である、請求項１～４のいずれか１項に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

（ａ）ＶＨのアミノ酸配列が配列番号５１に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列であって、かつＶＬのアミノ酸配列が配列番号５２に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列である抗体。

（ｂ）ＶＨのアミノ酸配列が配列番号５３に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列であって、かつＶＬのアミノ酸配列が配列番号５４に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列である抗体。

（ｃ）ＶＨのアミノ酸配列が配列番号５５に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列であって、かつＶＬのアミノ酸配列が配列番号５６に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列である抗体。

（ｄ）ＶＨのアミノ酸配列が配列番号５７に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列であって、かつＶＬのアミノ酸配列が配列番号５８に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列である抗体。

（ｅ）ＶＨのアミノ酸配列が配列番号５９に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列であって、かつＶＬのアミノ酸配列が配列番号６０に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列である抗体。

（ｆ）ＶＨのアミノ酸配列が配列番号６１に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列であって、かつＶＬのアミノ酸配列が配列番号６２に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列である抗体。

（ｇ）ＶＨのアミノ酸配列が配列番号６３に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列であって、かつＶＬのアミノ酸配列が配列番号６４に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列である抗体。

（ｈ）ＶＨのアミノ酸配列が配列番号６５に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列であって、かつＶＬのアミノ酸配列が配列番号６６に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列である抗体。

（ｉ）ＶＨのアミノ酸配列が配列番号６７に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列であって、かつＶＬのアミノ酸配列が配列番号６８に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列である抗体。

[請求項6] モノクローナル抗体が遺伝子組換え抗体である請求項１～５のいずれか１項に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

[請求項7] 遺伝子組換え抗体が、ヒト型キメラ抗体、ヒト化抗体およびヒト抗体から選ばれる１の遺伝子組換え抗体である、請求項６に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

[請求項8] Ｆａｂ、Ｆａｂ’、（Ｆａｂ’）$_2$、一本鎖抗体（ｓｃＦｖ）、二量体化Ｖ領域（ｄｉａｂｏｄｙ）、ジスルフィド安定化Ｖ領域（ｄｓＦｖ）およびＣＤＲを含むペプチドから選ばれる１の抗体断片である、請求項１～７のいずれか１項に記載の抗体断片。

[請求項9] 請求項１～８のいずれか１項に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片を産生するハイブリドーマ。

[請求項10] 請求項１～８のいずれか１項に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片をコードする塩基配列を有する核酸。

[請求項11] 請求項１０に記載の核酸を含むベクターを含む形質転換細胞。

[請求項12] 請求項９に記載のハイブリドーマまたは請求項１１に記載の形質転換細胞を培養し、培養液から請求項１～８のいずれか１項に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片を採取することを含む、請求項１～８のいずれか１項に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片の製造方法。

[請求項13] 請求項１～８のいずれか１項に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片を含む、ヒトＣＣＲ１の検出または測定用試薬。

[請求項14] 請求項１～８のいずれか１項に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片を含む、ヒトＣＣＲ１関連疾患の診断薬。

[請求項15] ヒトＣＣＲ１関連疾患が、癌、自己免疫疾患または炎症性疾患である、請求項１４に記載の診断薬。

[請求項16] 請求項１～８のいずれか１項に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片を有効成分として含有する、ヒトＣＣＲ１関連疾患の治療薬。

[請求項17] ヒトＣＣＲ１関連疾患が、癌、自己免疫疾患または炎症性疾患である、請求項１６に記載の治療薬。

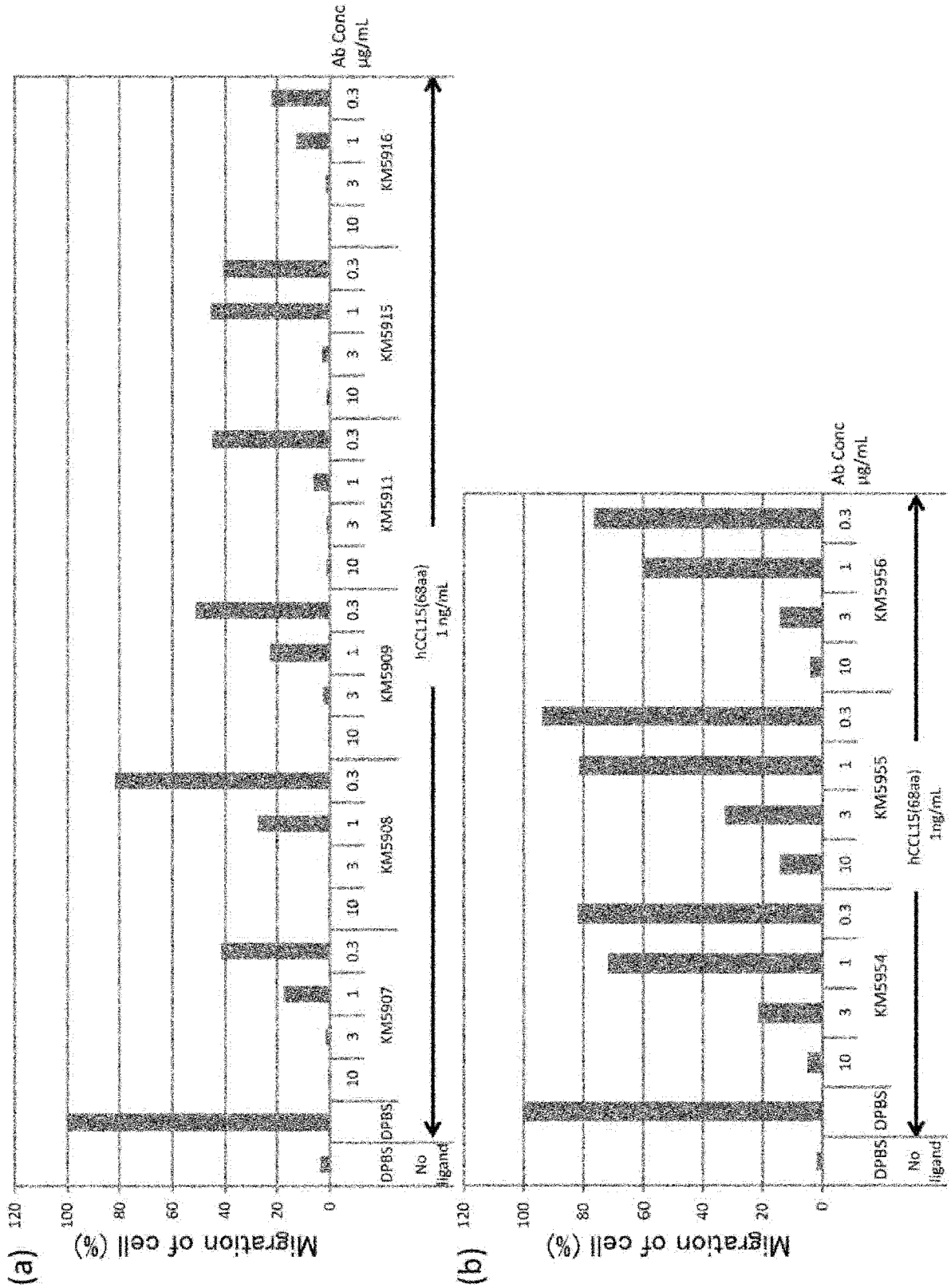
[請求項18] 請求項１～８のいずれか１項に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片を用いたヒトＣＣＲ１関連疾患の診断方法。

[請求項19] 請求項１～８のいずれか１項に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片を用いたヒトＣＣＲ１関連疾患の治療方法。

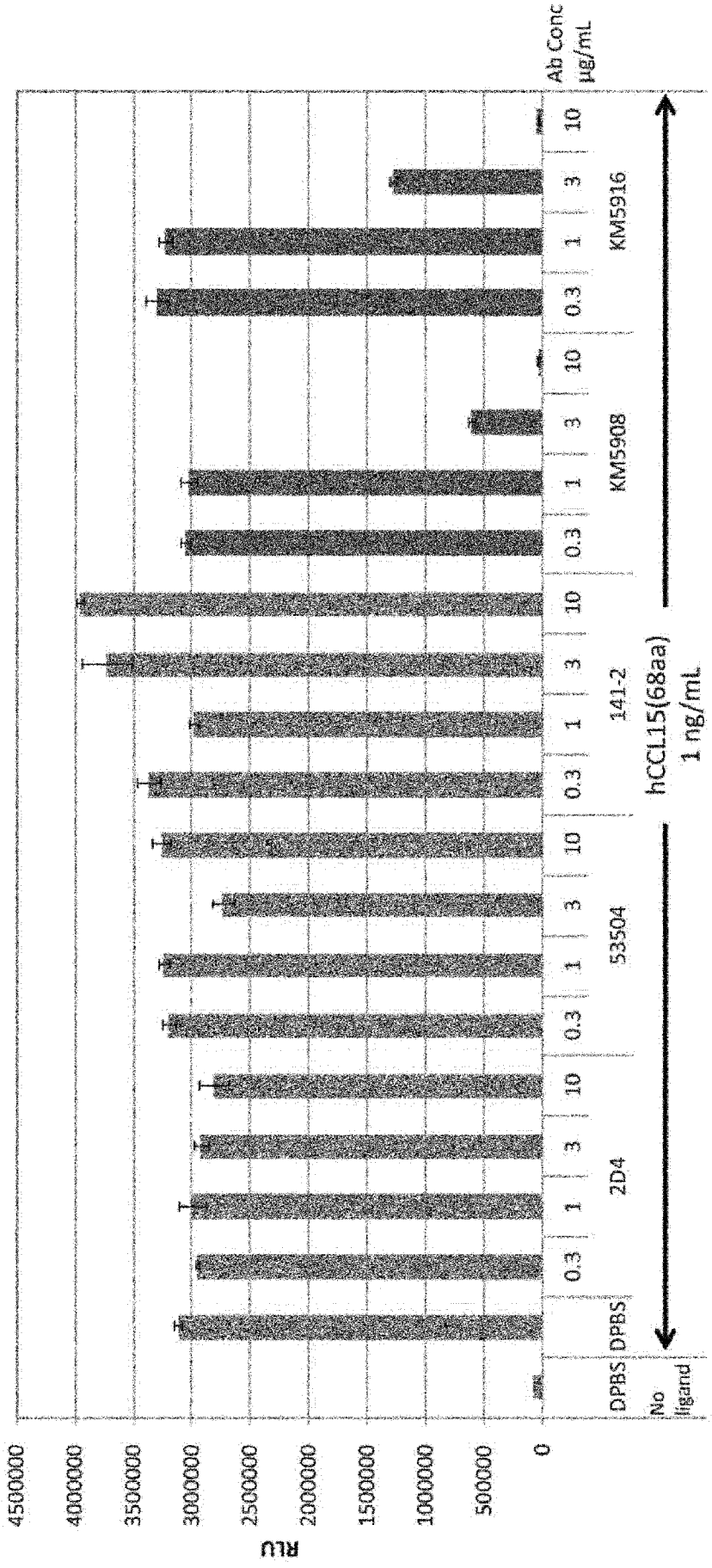
[請求項20] ヒトＣＣＲ１関連疾患の診断薬を製造するための、請求項１～８のいずれか１項に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片の使用。

[請求項21] ヒトＣＣＲ１関連疾患の治療薬を製造するための、請求項１～８のいずれか１項に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片の使用。

[図1]


(a)
Migration of cell (%)
120
100
80
60
40
20
0
Ab Conc μg/mL
0.3
1
3
10
KM5916
KM5915
KM5911
KM5909
KM5908
KM5907
DPBS
No ligand
hCCL15(68aa) 1 ng/mL
(b)
Migration of cell (%)
KM5956
KM5955
KM5954
hCCL15(68aa) 1ng/mL

[図2]


RLU
4500000
4000000
3500000
3000000
2500000
2000000
1500000
1000000
500000
0
Ab Conc μg/mL
No ligand
DPBS
DPBS
0.3
1
3
10
2D4
0.3
1
3
10
53504
0.3
1
3
10
141-2
0.3
1
3
10
KM5908
0.3
1
3
10
KM5916
hCCL15(68aa) 1 ng/mL

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2017/001687

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C07K16/28(2006.01)i, *A61K39/395*(2006.01)i, *A61P29/00*(2006.01)i, *A61P35/00*(2006.01)i, *A61P37/06*(2006.01)i, *C12N5/10*(2006.01)i, *C12N5/12*(2006.01)i, *C12N15/09*(2006.01)i, *C12P21/08*(2006.01)i, *G01N33/53*(2006.01)i
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K16/28, A61K39/395, A61P29/00, A61P35/00, A61P37/06, C12N5/10, C12N5/12, C12N15/09, C12P21/08, G01N33/53

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2017
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2017 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2017

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), PubMed, CiNii, CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS(STN), UniProt/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y/A	HWANG J. et al, Angiogenic activity of human CC chemokine CCL15 in vitro and in vivo., FEBS Letters, 2004, 570, p.47-51, abstract, Figs.1,2, page 51, right column, 16th to 11th lines from the bottom	1,2,6-21/ 1-4,6-21/5
X/Y/A	WO 00/44789 A1 (LEUKOSITE, INC.), 03 August 2000 (03.08.2000), claims 1, 4, 13, 17, 45, 48, 49; table 1 & JP 2003-517810 A & EP 1151011 A1	1,3,6-21/ 1-4,6-21/5
X/Y/A	WO 00/44790 A1 (LEUKOSITE, INC.), 03 August 2000 (03.08.2000), claims 1, 4, 13, 17, 45, 48, 49; table 1 & JP 2003-517810 A & US 6329510 B1 & EP 1151011 A1	1,3,6-21/ 1-4,6-21/5

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
02 February 2017 (02.02.17)	21 February 2017 (21.02.17)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3,Kasumigaseki,Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915,Japan	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2017/001687

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y/A	LEBRE M.C. et al, Why CCR2 and CCR5 Blockade Failed and Why CCR1 Blockade Might Still Be Effective in the Treatment of Rheumatoid Arthritis., PLoS ONE, 2011, 6(7), e21772, pp. 1-7, abstract, Fig.4A,B	1-4,6-21/5
Y/A	OBA Y. et al., MIP-1α utilizes both CCR1 and CCR5 to induce osteoclast formation and increase adhesion of myeloma cells to marrow stromal cells., Experimental Hematology, 2005, 33, pp.272-278, abstract, Figs.1,4	1-4,6-21/5
Y/A	Yoshiro ITATANI et al., "CCL15-CCR1 axis ni yoru Daichogan Kanten'i Kijo to, CCR1 Sogaiyaku ni yoru Kanten'i Yokusei eno Kitai", Journal of Japan Surgical Society, 2013, vol.114, special extra issue (2), page 387, SSSA-3-3, entire text	1-4,6-21/5

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１７／００１６８７

A.　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C07K16/28(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P29/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P37/06(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N5/12(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i

B.　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C07K16/28, A61K39/395, A61P29/00, A61P35/00, A61P37/06, C12N5/10, C12N5/12, C12N15/09, C12P21/08, G01N33/53

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報　１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報　１９７１－２０１７年
日本国実用新案登録公報　１９９６－２０１７年
日本国登録実用新案公報　１９９４－２０１７年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), PubMed, CiNii, CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN), UniProt/GeneSeq

C.　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X／Y／A	HWANG J. et al, Angiogenic activity of human CC chemokine CCL15 in vitro and in vivo., FEBS Letters, 2004, 570, p.47-51, 要約、Figs.1,2、第51頁右欄下から第16行－下から第11行	1,2,6-21/1-4,6-21/5
X／Y／A	WO 00/44789 A1 (LEUKOSITE, INC.) 2000.08.03, 請求項１、４、１３、１７、４５、４８、４９、表１ & JP 2003-517810 A & EP 1151011 A1	1,3,6-21/1-4,6-21/5

☑　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。　☐　パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
０２．０２．２０１７	２１．０２．２０１７

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
郵便番号１００－８９１５
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｂ　４０４４
宮岡　真衣
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８

Ｃ（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
Ｘ／Ｙ／Ａ	WO 00/44790 A1 (LEUKOSITE, INC.) 2000.08.03, 請求項１、４、１３、１７、４５、４８、４９、表１ & JP 2003-517810 A & US 6329510 B1 & EP 1151011 A1	1,3,6-21/1-4,6-21/5
Ｙ／Ａ	LEBRE M.C. et al, Why CCR2 and CCR5 Blockade Failed and Why CCR1 Blockade Might Still Be Effective in the Treatment of Rheumatoid Arthritis., PLoS ONE, 2011, 6(7), e21772, pp.1-7, 要約、Fig.4A,B	1-4,6-21/5
Ｙ／Ａ	OBA Y. et al., MIP-1α utilizes both CCR1 and CCR5 to induce osteoclast formation and increase adhesion of myeloma cells to marrow stromal cells., Experimental Hematology, 2005, 33, pp.272-278, 要約、Figs.1,4	1-4,6-21/5
Ｙ／Ａ	板谷喜朗　他, CCL15-CCR1 axisによる大腸癌肝転移機序と、CCR1阻害薬による肝転移抑制への期待, 日本外科学会雑誌,2013, 第114巻　臨時増刊号(2), p.387, SSSA-3-3, 全文	1-4,6-21/5