

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4052515号
(P4052515)

(45) 発行日 平成20年2月27日 (2008. 2. 27)

(24) 登録日 平成19年12月14日 (2007. 12. 14)

(51) Int. Cl.

F 1

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)
 A 6 1 K 39/395 (2006. 01)
 A 6 1 P 11/02 (2006. 01)
 A 6 1 P 11/06 (2006. 01)
 A 6 1 P 17/00 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A
 A 6 1 K 39/395 D
 A 6 1 P 11/02
 A 6 1 P 11/06
 A 6 1 P 17/00

請求項の数 50 (全 75 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-523494 (P2003-523494)
 (86) (22) 出願日 平成14年8月30日 (2002. 8. 30)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2002/008828
 (87) 国際公開番号 W02003/018635
 (87) 国際公開日 平成15年3月6日 (2003. 3. 6)
 審査請求日 平成17年6月14日 (2005. 6. 14)
 (31) 優先権主張番号 特願2001-265144 (P2001-265144)
 (32) 優先日 平成13年8月31日 (2001. 8. 31)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

微生物の受託番号 FERM BP-7709
 微生物の受託番号 FERM BP-7710
 微生物の受託番号 FERM BP-7711
 微生物の受託番号 FERM BP-7712
 微生物の受託番号 FERM BP-7713
 微生物の受託番号 FERM BP-7714

(73) 特許権者 000001029
 協和醗酵工業株式会社
 東京都千代田区大手町1丁目6番1号
 (74) 代理人 100105647
 弁理士 小栗 昌平
 (74) 代理人 100132986
 弁理士 矢澤 清純
 (74) 代理人 100129160
 弁理士 古館 久丹子
 (74) 代理人 100105474
 弁理士 本多 弘徳
 (74) 代理人 100108589
 弁理士 市川 利光

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト型CDR移植抗体およびその抗体断片

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

少なくとも以下の (a) ~ (e) のいずれか 1 であるヒトCCケモカイン受容体4 (CCR4) の細胞外領域に特異的に反応し、ヒト血小板に反応性を示さないヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

(a) 抗体の重鎖 (H鎖) 可変領域 (V領域) に配列番号4で示されるアミノ酸配列のうち、40番目のAla、42番目のGly、43番目のLys、44番目のGly、76番目のLys、および97番目のAlaから選ばれる少なくとも1つ以上のアミノ酸残基が置換されたアミノ酸配列を含む

(b) 抗体の重鎖 (H鎖) 可変領域 (V領域) に配列番号38で示されるアミノ酸配列のうち、28番目のThrおよび97番目のAlaのうち少なくとも1つ以上のアミノ酸残基が置換されたアミノ酸配列を含む

(c) 抗体の重鎖 (H鎖) 可変領域 (V領域) に配列番号4、9、10、11、38、39、40および41から選ばれるアミノ酸配列を含む

(d) 抗体の軽鎖 (L鎖) 可変領域 (V領域) に配列番号8で示されるアミノ酸配列のうち、2番目のIle、3番目のVal、50番目のGln、および88番目のValから選ばれる少なくとも1つ以上のアミノ酸残基が置換されたアミノ酸配列を含む

(e) 抗体の軽鎖 (L鎖) 可変領域 (V領域) 配列番号8、12、13および14から選ばれるアミノ酸配列を含む

【請求項2】

CCR4発現細胞に対し細胞傷害活性を示す請求の範囲1に記載のヒト型CDR移植抗体また

はその抗体断片。

【請求項 3】

細胞外領域が、配列番号48で示されるアミノ酸配列の1～39、98～112、176～206および271～284番目からなる群から選ばれる細胞外領域である請求の範囲 1 または 2 に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

【請求項 4】

細胞外領域が、配列番号48で示されるアミノ酸配列の2～29番目に存在するエピトープである請求の範囲 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

【請求項 5】

細胞外領域が、配列番号48で示されるアミノ酸配列の13～29番目に存在するエピトープである請求の範囲 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

【請求項 6】

細胞外領域が、配列番号48で示されるアミノ酸配列の13～25番目に存在するエピトープである請求の範囲 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

【請求項 7】

CCR4発現細胞に特異的に反応する請求の範囲 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

【請求項 8】

CCR4発現細胞に対し、非ヒト動物由来ハイブリドーマが生産するモノクローナル抗体よりも高い細胞傷害活性を示す請求の範囲 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

【請求項 9】

細胞傷害活性が抗体依存性細胞傷害(ADCC)活性である請求の範囲 2 ～ 8 のいずれか 1 項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

【請求項 10】

ADCC活性がCCR4発現細胞の細胞死を誘導することによるものである請求の範囲 9 記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

【請求項 11】

CCR4発現細胞を除去する作用を示す抗体である請求の範囲 1 ～ 10 のいずれか 1 項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

【請求項 12】

CCR4発現細胞がTh2細胞である請求の範囲 7 ～ 11 のいずれか 1 項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

【請求項 13】

Th2細胞が産生するサイトカイン産生を抑制する活性を示す請求の範囲 1 ～ 12 のいずれか 1 項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

【請求項 14】

サイトカインが、IL-4、IL-5、またはIL-13である請求の範囲 13 記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

【請求項 15】

ヒト抗体IgG型に属する請求の範囲 1 ～ 14 のいずれか 1 項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

【請求項 16】

それぞれ配列番号1、2、3で示されるアミノ酸配列からなる抗体重鎖(H鎖)可変領域(V領域)の相補性決定領域(CDR)1、CDR2、CDR3を含む、請求の範囲 1 ～ 15 のいずれか 1 項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

【請求項 17】

それぞれ配列番号5、6、7で示されるアミノ酸配列からなる抗体軽鎖（L鎖）可変領域（V領域）の相補性決定領域（CDR）1、CDR2、CDR3を含む、請求の範囲1～15のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

【請求項18】

それぞれ配列番号1、2、3で示されるアミノ酸配列からなる抗体重鎖（H鎖）可変領域（V領域）の相補性決定領域（CDR）1、CDR2、CDR3、およびそれぞれ配列番号5、6、7で示されるアミノ酸配列からなる抗体軽鎖（L鎖）V領域の相補性決定領域（CDR）1、CDR2、CDR3を含む、請求の範囲1～17のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

【請求項19】

10

抗体の重鎖（H鎖）可変領域（V領域）が、配列番号4で示されるアミノ酸配列のうち、40番目のAla、42番目のGly、43番目のLys、44番目のGly、76番目のLys、および97番目のAla、ならびに抗体の軽鎖（L鎖）V領域が、配列番号8で示されるアミノ酸配列のうち、2番目のIle、3番目のVal、50番目のGln、および88番目のValから選ばれる少なくとも1つ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む、請求の範囲1～18のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

【請求項20】

抗体の重鎖（H鎖）可変領域（V領域）が、配列番号38で示されるアミノ酸配列のうち、28番目のThrおよび97番目のAla、ならびに抗体の軽鎖（L鎖）V領域が、配列番号8で示されるアミノ酸配列のうち、2番目のIle、3番目のVal、50番目のGln、および88番目のValから選ばれる少なくとも1つ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む、請求の範囲1～18のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

20

【請求項21】

抗体の重鎖（H鎖）可変領域（V領域）が、配列番号4、9、10、11、38、39、40および41から選ばれるアミノ酸配列、ならびに抗体の軽鎖（L鎖）V領域が、配列番号8、12、13および14から選ばれるアミノ酸配列を含む請求の範囲1～18のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

【請求項22】

抗体の重鎖（H鎖）可変領域（V領域）が、配列番号9または10で示されるアミノ酸配列、および抗体の軽鎖（L鎖）V領域が配列番号14で示されるアミノ酸配列を含む請求の範囲1～18のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

30

【請求項23】

抗体断片が、Fab、Fab'、F(ab')₂、1本鎖抗体（scFv）、2量体化可変領域（V領域）断片（Diabody）、ジスルフィド安定化V領域断片（dsFv）および相補性決定領域（CDR）を含むペプチドから選ばれる抗体断片である請求の範囲1～22のいずれか1項に記載の抗体断片。

【請求項24】

形質転換株KM8759（FERM BP-8129）またはKM8760（FERM BP-8130）が生産するヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

40

【請求項25】

請求の範囲1～24のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片を生産する形質転換株。

【請求項26】

形質転換株が、KM8759（FERM BP-8129）またはKM8760（FERM BP-8130）である請求の範囲25記載の形質転換株。

【請求項27】

請求の範囲25または26記載の形質転換株を培地に培養し、培養物中に請求の範囲1～24のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片を生成蓄積させ、該培養物から該抗体または該抗体断片を採取することを特徴とするヒト型CDR移植抗体ま

50

たはその抗体断片を生産する形質転換株の製造方法。

【請求項 2 8】

請求の範囲 1 ～ 2 4 のいずれか 1 項に記載されたヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片が、放射性同位元素、蛋白質または薬剤と化学的または遺伝子工学的に結合しているヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

【請求項 2 9】

請求の範囲 1 ～ 2 4 のいずれか 1 項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片をコードするDNA。

【請求項 3 0】

請求の範囲 2 9 記載のDNAを含有する組換えベクター。

10

【請求項 3 1】

請求の範囲 3 0 記載の組換えベクターを宿主細胞に導入して得られる形質転換株。

【請求項 3 2】

請求の範囲 1 ～ 2 4 および 2 8 のいずれか 1 項に記載のヒト型CDR移植抗体およびその抗体断片から選ばれる少なくとも1種を有効成分として含有する医薬。

【請求項 3 3】

請求の範囲 1 ～ 2 4 および 2 8 のいずれか 1 項に記載のヒト型CDR移植抗体およびその抗体断片から選ばれる少なくとも1種を有効成分として含有するCCR4関連疾患の治療薬。

【請求項 3 4】

CCR4関連疾患が癌または炎症性疾患である請求の範囲 3 3 記載の治療薬。

20

【請求項 3 5】

癌が血液癌である請求の範囲 3 4 記載の治療薬。

【請求項 3 6】

血液癌が白血病またはリンパ腫である請求の範囲 3 5 記載の治療薬。

【請求項 3 7】

炎症性疾患が、急性あるいは慢性の気道過敏性または気管支喘息、アトピー性皮膚疾患、アレルギー性鼻炎または花粉症である請求の範囲 3 4 記載の治療薬。

【請求項 3 8】

請求の範囲 1 ～ 2 4 および 2 8 のいずれか 1 項に記載のヒト型CDR移植抗体およびその抗体断片から選ばれる少なくとも1種を有効成分として含有するCCR4関連疾患の診断薬。

30

【請求項 3 9】

CCR4関連疾患が癌または炎症性疾患である請求の範囲 3 8 記載の診断薬。

【請求項 4 0】

癌が血液癌である請求の範囲 3 9 記載の診断薬。

【請求項 4 1】

血液癌が白血病またはリンパ腫である請求の範囲 3 9 記載の診断薬。

【請求項 4 2】

炎症性疾患が、慢性気道過敏性喘息、気管支喘息、アトピー性皮膚疾患、アレルギー性鼻炎または花粉症である請求の範囲 3 9 記載の診断薬。

【請求項 4 3】

40

請求の範囲 1 ～ 2 4 および 2 8 のいずれか 1 項に記載のヒト型CDR移植抗体およびその抗体断片から選ばれる少なくとも1種を有効成分として含有するTh2介在性免疫疾患の治療薬。

【請求項 4 4】

Th2介在性免疫疾患が、慢性気道過敏性喘息、気管支喘息、アトピー性皮膚疾患、アレルギー性鼻炎または花粉症である請求の範囲 4 3 記載の治療薬。

【請求項 4 5】

請求の範囲 1 ～ 2 4 および 2 8 のいずれか 1 項に記載のヒト型CDR移植抗体およびその抗体断片から選ばれる少なくとも1種を有効成分として含有するTh2介在性免疫疾患の診断薬。

50

【請求項 4 6】

Th2介在性免疫疾患が、慢性気道過敏性喘息、気管支喘息、アトピー性皮膚疾患、アレルギー性鼻炎または花粉症である請求の範囲 4 5 記載の診断薬。

【請求項 4 7】

請求の範囲 1 ～ 2 4 および 2 8 のいずれか 1 項に記載のヒト型CDR移植抗体およびその抗体断片を用いて、CCR4を免疫学的に検出する方法。

【請求項 4 8】

請求の範囲 1 ～ 2 4 および 2 8 のいずれか 1 項に記載のヒト型CDR移植抗体およびその抗体断片を用いて、CCR4を細胞表面に発現した細胞を免疫学的に検出する方法。

【請求項 4 9】

請求の範囲 1 ～ 2 4 および 2 8 のいずれか 1 項に記載のヒト型CDR移植抗体およびその抗体断片を有効成分とするCCR4発現細胞の減少剤または除去剤。

【請求項 5 0】

請求の範囲 1 ～ 2 4 および 2 8 のいずれか 1 項に記載のヒト型CDR移植抗体およびその抗体断片を有効成分とするTh2細胞サイトカインの産生抑制剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、ヒトのCCケモカイン受容体4（以下、CCR4と表記する）の細胞外領域に対して特異的に反応し、血小板に反応性を有さないヒト型CDR移植抗体およびその抗体断片に関する。また、本発明は、ヒトのCCR4の細胞外領域に対して特異的に反応し、CCR4リガンドであるTARCまたはMDCのCCR4への結合を阻害する活性を有さないヒト型CDR移植抗体およびその抗体断片に関する。さらに、本発明は細胞傷害活性、Th2細胞によるサイトカイン産生抑制を示し、特定の相補性決定領域（以下、CDRと表記する）を含む、CCR4に特異的に反応するヒト型CDR移植抗体およびその抗体断片に関する。さらに、本発明は上記の抗体およびその抗体断片をコードするDNA配列に関する。さらに、本発明は、該DNA配列を含んでなるベクターおよび該ベクターにより形質転換された形質転換体に関する。さらに、本発明は該形質転換体を用いた上記の抗体およびその抗体断片の製造方法、ならびに該抗体およびその抗体断片を用いるアレルギー性疾患を始めとするTh2介在性免疫疾患の治療または診断剤等の医薬に関する。さらに、本発明は、該抗体およびその抗体断片を用いる白血病、リンパ腫等の血液癌を始めとする癌疾患の治療または診断剤等の医薬に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

気管支喘息を始めとするアレルギー疾患には好酸球や肥満細胞、IgEなど様々な因子が関与している。好酸球は炎症局所に浸潤し、脱顆粒によりMBP (major basic protein) 等の細胞傷害性塩基性蛋白質を放出して周囲の組織傷害を誘発する。肥満細胞は、B細胞から産生されたIgEと抗原との免疫複合体と結合することでヒスタミンを放出し、即時型アレルギー反応を誘発する。アレルギー反応をコントロールしているのはサイトカイン・ケモカイン等の生体機能分子である。生体機能分子は細胞間の情報伝達を担っている。IL-5は好酸球を分化誘導し、寿命を延長させ、さらに脱顆粒を誘発する。IL-4はB細胞を活性化し、IgEを生産させる。生産されたIgEは、抗原との免疫複合体となり肥満細胞の脱顆粒を促す。また肥満細胞から生産されるIL-4、IL-13などは、B細胞からのIgE産生に寄与することが判明している (Am. J. Respir. Crit. Care Med., 152, 2059 (1995)、Immunol. Today, 15, 19 (1994))。このように炎症性細胞間には巧妙なサイトカイン・ケモカインネットワークが存在し、複雑にバランスを保っている。

【0 0 0 3】

これらサイトカイン・ケモカインを産生するのは細胞表面にCD4を発現しているヘルパーT細胞（以下、CD4+Th細胞と表記する）である。実際に、気管支喘息患者の気道炎症局所にはヘルパーT細胞の浸潤が顕著に見られること、そのうちのかなりのT細胞は活性化していること、喘息の重症度または気道過敏性の程度と活性化T細胞数とが相関すること、

10

20

30

40

50

さらに喘息患者の末梢血中にも活性化T細胞が増加していることなどが明らかにされている (Am. Rev. Respir. Dis., 145, S22 (1992))。

ヘルパーT細胞は、産生されるサイトカインによってTh1細胞とTh2細胞に分類される (Annu. Rev. Immunol., 7, 145 (1989))。Th2細胞は、IL-4、IL-5およびIL-13などを産生する。Th2細胞が産生するサイトカインをTh2サイトカインと称する。

【0004】

アトピー性疾患患者より分離した抗原特異的T細胞クローンは、インビトロ (in vitro) で刺激するとTh2サイトカインを放出する (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 4538 (1991))。また、喘息患者の気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage fluid: 以下BALと表記する) や気道粘膜にはTh2細胞が存在する (N. Engl. J. Med., 326, 298 (1992)、Eur. J. Immunol., 23, 1445 (1993))。アレルギー性炎症動物モデルでのBAL中細胞の種々のサイトカインのmRNA発現を調べると、Th2サイトカインであるIL-4、IL-5のmRNAの発現が上昇している (Clin. Immunol. Immunopathol., 75, 75 (1995))。さらに、マウス静脈内および鼻腔内にTh2細胞を投与した場合、肺に抗原特異的な喘息様炎症症状が誘導され (J. Exp. Med., 186, 1737 (1997)、J. Immunol., 160, 1378 (1998))、好酸球増多症を引き起こす (J. Immunol., 161, 3128 (1998))。喘息患者の気道粘膜組織、アトピー性皮膚炎患者の病変部においてはIL-5の発現が認められ (J. Clin. Invest., 87, 1541 (1991)、J. Exp. Med., 173, 775 (1991))、通年性鼻アレルギー患者粘膜のIL-5の発現量は、IL-13の発現量、血清総IgE値および抗原特異的IgE値とよく相関する (治療学, 32, 19 (1998))。

【0005】

ケモカインとは、生体内で産生される白血球遊走・活性化作用を有する塩基性のヘパリン結合性蛋白質の総称であり、それらは一次構造上よく保存されたシステイン残基の位置によって、CXC、CC、C、およびCX₃Cのサブファミリーに分類される。現在までに16種類のケモカイン受容体が同定されており (Curr. Opin. Immunol., 11, 626 (1999))、また、各種ケモカイン受容体は、Th1細胞、Th2細胞などの白血球により発現が異なる (細胞工学, 17, 1022 (1998))。

【0006】

ヒトCCR4は、ヒト未熟好塩基球細胞株KU-812からK5-5としてクローニングされたG蛋白共役型の7回膜貫通型受容体である (J. Biol. Chem., 270, 19495 (1995)、W096/23068)。CCR4の膜貫通領域はアミノ酸配列40~67番目、78~97番目、113~133番目、151~175番目、207~226番目、243~270番目、285~308番目、細胞外領域はアミノ酸配列1~39番目、98~112番目、176~206番目、271~284番目、細胞内領域はアミノ酸配列68~77番目、134~150番目、227~242番目、309~360番目であると推定されている。クローニング当時はCCR4のリガンドがMIP-1 α (macrophage inflammatory protein-1 α)、RANTES(regulated on activation normal T-cell expressed and secreted)、もしくはMCP-1(monocyte chemotactic protein)であると報告されていた (Biochem. Biophys. Res. Commun., 218, 337 (1996)、W096/23068)。しかし、その後刺激したヒト末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cells) や胸腺細胞から産生されるTARC (thymus and activation - regulated chemokine) (J. Biol. Chem., 271, 21514 (1996))がCCR4に特異的に結合することが判明した (J. Biol. Chem., 272, 15036 (1997))。さらにマクロファージから単離されたMDC(macrophage-derived chemokine) (J. Exp. Med., 185, 1595 (1997))、別名STCP-1 (stimulated T cell chemotactic protein-1 (J. Biol. Chem., 272, 25229 (1997)) がTARCよりも強くCCR4に結合することも報告されている (J. Biol. Chem., 273, 1764 (1998))。

【0007】

CCR4は、サイトカイン・ケモカイン産生能を持つCD4+Th細胞に発現していることが示され (J. Biol. Chem., 272, 15036 (1997))、さらにCD4+Th細胞の中でもTh2細胞に選択的に発現していることが報告された (J. Exp. Med., 187, 129 (1998)、J. Immunol., 161, 5111 (1998))。さらに、エフェクター/メモリーT細胞 (CD4+/CD45RO+) 集団中にCCR4+

細胞が確認され、CCR4+細胞を刺激するとIL-4、IL-5を産生するがIFN- γ は産生されない(Int. Immunol., 11, 81 (1999))。またメモリーT細胞中のCLA (cutaneous lymphocyte antigen) 陽性、 $\alpha 4 \beta 8$ インテグリン陰性集団にCCR4+細胞が属しており、CCR4は腸管免疫ではなく、皮膚などの全身性免疫に関わるメモリーT細胞に発現していることが報告されている(Nature, 400, 776 (1999))。以上のことから、炎症が誘発された場合にメモリーT細胞は活性化されてCCR4を発現し、CCR4のリガンドであるMDCまたはTARCによってメモリーT細胞が炎症局所に遊走して、他の炎症性細胞を活性化する可能性が強く示唆される。

【0008】

最近になって、ヒトではナチュラルキラー細胞(Journal of Immunology, 164, 4048-4054 (2000)、Blood, 97, 367-375 (2001))や血小板(Thrombosis Research, 101, 279-289 (2001)、Blood, 96, 4046-4054 (2000)、Blood, 97, 937-945 (2001))にもCCR4が発現されていることが明らかになった。

CCR4のリガンドであるTARCまたはMDCの拮抗剤、すなわちCCR4アンタゴニストは、血小板凝集を阻害することが知られている(WO99/15666)。このようにCCR4の機能に影響を与える薬剤は、血小板機能に対しても影響を及ぼすことが、知られている。

血小板にはCCR4の発現が認められる。例えば、Adrianら(Blood, 97, 937-945 (2001))、Abi-Younesら(Thrombosis Research, 101, 279-289 (2001)、WO00/42074、WO00/41724)はいずれもヒト血小板でのCCR4の発現を抗CCR4抗体により検出している。これまでにCCR4に反応性を有するが、ヒト血小板に結合しない抗体はこれまで知られていない。

【0009】

また、血小板に結合する自己抗体が出現すると、自己免疫性血小板減少症を引き起こすことが知られている(Blood, 70, 428-431 (1987)、Transfusion Science, 19, 245-251 (1998))。血小板減少や血小板機能に影響を与える薬剤は、出血、血栓形成など重篤な副作用を発現し易く、一般的には医薬品としては好ましくない。特に、抗体は血中半減期が長いことから、血小板機能に影響を与える性質を有する抗体は、医薬品として開発することは困難である。例えば、自己免疫疾患治療薬として開発されていた抗CD40リガンド抗体は、活性化血小板上に発現している抗原を認識することに起因すると思われる副作用の出現により開発が中断されている(Nature Medicine, 6, 114 (2000)、BioCentury, A8 of 18 (2002.06.20))。

タンパク質は、翻訳後様々な修飾反応を受けることが知られている。修飾反応の一つにチロシン残基の硫酸化反応が知られている。今まで多くのタンパク質がチロシン残基の硫酸化を受けることが報告されている(Chemistry and Biology, 7, R57-R61 (2000))。硫酸化を受けるチロシン残基に関しては、近傍に酸性アミノ酸残基が多いことが特徴とされ、硫酸化を受ける可能性のあるタンパク質とその部位に関して示唆もされている(Cell, 96, 667-676 (1999))。CCR4に関しても、N末端近くに4残基のチロシン残基が存在するが、これらのチロシン残基が硫酸化を受けるという報告はされていない。

【0010】

現在のTh2介在性免疫疾患に対する治療法としては、(1)サイトカイン・ケモカインに対する拮抗剤、例えば、ヒト化抗IL-5抗体(SB-240563：スミス・クラインビーチャム社、Sch-55700 (CDP-835)：シェーリング・プラウ/セルテック社)、ヒト化抗IL-4抗体(US Patent No. 5,914,110)、可溶性ケモカイン受容体(J. Immunol., 160, 624 (1998))など、(2)サイトカイン・ケモカイン産生抑制剤、例えば、IL-5産生阻害剤(特開平8-53355)、レンチノイドアンタゴニスト(WO99/24024)、トシル酸スプラタスト(IPD-1151T、大鵬薬品工業社製)など、(3)好酸球や肥満細胞などの最終的な炎症性細胞を対象としたもの、例えば、ヒト化抗IL-5受容体抗体(WO97/10354)、CCケモカイン受容体3(CCR3)拮抗剤(特開平11-147872)など、(4)炎症性生体機能分子阻害剤、例えば、ヒト化抗IgE抗体(Am. J. Respir. Crit. Care Med., 157, 1429 (1998))など、が開発されているが、これらは複雑なサイトカイン・ケモカイン・炎症性細胞間のネットワークの一部を阻害するだけであり、根治的ではない。T細胞を制御するものとしては抗CD4抗体があり、重度のステロイド依存性喘息に効果をあげている。しかしCD4分子は免疫担当細胞に広く発現しているた

め、特異性に欠け、強い免疫抑制作用を伴うという欠点を有する (Int. Arch. Aller. Immunol., 118, 133 (1999))。

【0011】

このことから、これらすべてを抑制するためには、アレルギー反応の上流部、すなわちTh2細胞の制御が必要となる。

現在の重度のTh2介在性免疫疾患患者に対する主な治療法はステロイド投与であるが、ステロイドによる副作用を免れることは出来ない。また、ステロイド投与を中止した場合には、患者の病態はまた元に戻り、長期間のステロイド投与は耐性を獲得するなどの欠点を有する。

これまで、CCR4を発現している細胞を検出でき、かつ、CCR4発現細胞に対して細胞傷害活性を有するヒト型CDR移植抗体およびその抗体断片は確立されていない。さらに、Th2サイトカインの産生を抑制するヒト型CDR移植抗体およびその抗体断片はこれまでに知られていない。

10

白血病患者においても腫瘍細胞にCCR4が発現している例があることが報告されているが (Blood, 96, 685 (2000))、それらCCR4を発現している白血病細胞を傷害し、治療効果を有するようなヒト型CDR移植抗体及びその抗体断片はこれまでに報告されていない。

【0012】

一般にヒト以外の動物の抗体、例えばマウス抗体などをヒトに投与すると、異物として認識されることにより、ヒト体内にマウス抗体に対するヒト抗体 (Human Anti Mouse Antibody: HAMA) が誘導されることが知られている。HAMAは投与されたマウス抗体と反応し、副作用を引き起こしたり (J. Clin. Oncol., 2, 881 (1984)、Blood, 65, 1349 (1985)、J. Natl. Cancer Inst., 80, 932 (1988)、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82, 1242 (1985))、マウス抗体の体内からの消失を速め (J. Nucl. Med., 26, 1011 (1985)、Blood, 65, 1349 (1985)、J. Natl. Cancer Inst., 80, 937 (1988))、マウス抗体の治療効果を減じてしまうことが知られている (J. Immunol., 135, 1530 (1985)、Cancer Res., 46, 6489 (1986))。

20

【0013】

これらの問題点を解決するため、遺伝子組換え技術を利用してヒト以外の動物の抗体をヒト型CDR移植抗体にすることが試みられている。

ヒト型CDR移植抗体とは、ヒト以外の動物の抗体の可変領域 (以下、V領域と表記する) 中のCDRのアミノ酸配列をヒト抗体の適切な位置に移植した抗体である (Nature, 321, 522 (1986))。このようなヒト型CDR移植は、マウス抗体などのヒト以外の動物の抗体に比較してヒトへの臨床応用上、様々な利点を有している。例えば、サルを用いた実験でマウス抗体に比べ免疫原性が低下し、血中半減期が延長したことが報告されている (Cancer Res., 56, 1118, 1996、Immunol., 85, 668 (1995))。すなわち、ヒト型CDR移植抗体は、ヒト以外の動物の抗体に比べ、ヒトにおいて副作用が少なく、その治療効果が長期間持続することが期待される。

30

【0014】

また、ヒト型CDR移植抗体は、遺伝子組換え技術を利用して作製するため、様々な形態の分子として作製することができる。例えば、ヒト抗体の重鎖 (以下、H鎖と表記する) 定常領域 (以下、C領域と表記する) (H鎖C領域を、CHと表記する) としてγ1サブクラスを使用すれば、抗体依存性細胞傷害 (以下、ADCCと表記する) 活性などのエフェクター機能の高いヒト化抗体を作製することができ (Cancer Res., 56, 1118 (1996))、かつ、マウス抗体に比べ血中半減期の延長が期待される (Immunol., 85, 668 (1995))。特にCCR4発現細胞数を減少させる治療においては、抗体のFc領域 (抗体重鎖のヒンジ領域以降の領域) を介した補体依存性細胞傷害活性 (以下、CDC活性と表記する) やADCC活性等の細胞傷害活性の高さがその治療効果に重要であるために、ヒト型CDR移植抗体のほうがマウス抗体等のヒト以外の動物の抗体より望ましいことを明確に示している。

40

【0015】

さらに、ヒト型CDR移植抗体は、最近の蛋白質工学、遺伝子工学の進歩により、Fab、Fa

50

b'、F(ab')₂、一本鎖抗体（以下、scFvと表記する）(Science, 242, 423 (1988))、2量体化V領域断片（以下、Diabodyと表記する）(Nature Biotechnol., 15, 629 (1997))、ジスルフィド安定化V領域断片（以下、dsFvと表記する）(Molecular Immunol., 32, 249 (1995))、CDRを含むペプチド (J. Biol. Chem., 271, 2966 (1996)) などの、分子量の小さい抗体断片としても作製でき、これらの抗体断片は、完全な抗体分子に比べ、標的組織への移行性に優れている (Cancer Res., 52, 3402 (1992))。

以上の事実は、ヒトへの臨床応用に用いる抗体としては、マウス抗体などのヒト以外の動物の抗体よりもヒト型CDR移植抗体およびその抗体断片の方が望ましいことを示している。

【0016】

10

これまで述べてきたように、ヒト型CDR移植抗体およびその抗体断片は、単独の使用によっても診断およびその治療の効果が期待されるが、更に他の分子との併用により、それらの効果をより高めることが検討されている。例えば、該他の分子の一つとしてサイトカインが用いられている。サイトカインは免疫反応における細胞間相互作用を司る種々の液性因子の総称である。抗体の細胞傷害活性には、CDC活性やADCC活性等が知られているが、ADCC活性は単核球、マクロファージ、NK細胞のようなFc受容体を細胞表面に有するエフェクター細胞によって担われている (J. Immunol., 138, 1992 (1987))。種々のサイトカインはこれらのエフェクター細胞を活性化することから、抗体のADCC活性を高める目的で、抗体と組み合わせて投与することが行われている。

【発明の開示】

20

【課題を解決するための手段】

【0017】

本発明は、以下の (1)～(59) に関する。

(1) ヒトCCケモカイン受容体4 (CCR4) の細胞外領域に特異的に反応し、ヒト血小板に反応性を示さないヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

(2) ヒトCCケモカイン受容体4 (CCR4) の細胞外領域に特異的に反応し、CCR4発現細胞に対し細胞傷害活性を示すヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

(3) CCR4発現細胞に対し細胞傷害活性を示す上記 (1) 記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

(4) 細胞外領域が、配列番号48で示されるアミノ酸配列の1～39、98～112、176～206 および271～284番目からなる群から選ばれる細胞外領域である上記 (1)～(3) のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

30

(5) 細胞外領域が、配列番号48で示されるアミノ酸配列の2～29番目に存在するエピートープである上記 (1)～(4) のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

【0018】

(6) 細胞外領域が、配列番号48で示されるアミノ酸配列の13～29番目に存在するエピートープである上記 (1)～(5) のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

(7) 細胞外領域が、配列番号48で示されるアミノ酸配列の13～25番目に存在するエピートープである上記 (1)～(6) のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

40

(8) CCR4発現細胞に特異的に反応する上記 (1)～(7) のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

(9) CCR4発現細胞に対し、非ヒト動物由来ハイブリドーマが生産するモノクローナル抗体よりも高い細胞傷害活性を示す上記 (1)～(8) のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

(10) 細胞傷害活性が抗体依存性細胞傷害 (ADCC) 活性である上記 (2)～(9) のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

【0019】

50

(11) ADCC活性がCCR4発現細胞の細胞死を誘導することによるものである上記 (10) 記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

(12) CCR4発現細胞を除去する作用を示す抗体である上記 (1)～(11) のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

(13) CCR4発現細胞がTh2細胞である上記 (8)～(12) のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

(14) Th2細胞が産生するサイトカイン産生を抑制する活性を示す上記 (1)～(13) のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

(15) サイトカインが、IL-4、IL-5、またはIL-13である上記 (14) 記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

10

【0020】

(16) ヒト抗体IgG型に属する上記 (1)～(15) のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

(17) CCR4に対するモノクローナル抗体の重鎖 (H鎖) 可変領域 (V領域) および軽鎖 (L鎖) V領域の相補性決定領域 (CDR) を含む、上記 (1)～(16) のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

(18) CCR4に対するモノクローナル抗体の重鎖 (H鎖) 可変領域 (V領域) および軽鎖 (L鎖) V領域の相補性決定領域 (CDR) とヒト抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のフレームワーク領域 (FR) を含む、上記 (1)～(17) のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

20

(19) CCR4に対するモノクローナル抗体の重鎖 (H鎖) 可変領域 (V領域) および軽鎖 (L鎖) V領域の相補性決定領域 (CDR) とヒト抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のフレームワーク領域 (FR)、ならびにヒト抗体のH鎖定常領域 (C領域) およびL鎖C領域を含む、上記 (1)～(18) のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

(20) それぞれ配列番号1、2、3で示されるアミノ酸配列からなる抗体重鎖 (H鎖) 可変領域 (V領域) の相補性決定領域 (CDR) 1、CDR2、CDR3を含む、上記 (1)～(19) のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

【0021】

(21) それぞれ配列番号5、6、7で示されるアミノ酸配列からなる抗体軽鎖 (L鎖) 可変領域 (V領域) の相補性決定領域 (CDR) 1、CDR2、CDR3を含む、上記 (1)～(20) のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

30

(22) それぞれ配列番号1、2、3で示されるアミノ酸配列からなる抗体重鎖 (H鎖) 可変領域 (V領域) の相補性決定領域 (CDR) 1、CDR2、CDR3、およびそれぞれ配列番号5、6、7で示されるアミノ酸配列からなる抗体軽鎖 (L鎖) V領域の相補性決定領域 (CDR) 1、CDR2、CDR3を含む、上記 (1)～(21) のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

(23) 抗体の重鎖 (H鎖) 可変領域 (V領域) が、配列番号4で示されるアミノ酸配列のうち、40番目のAla、42番目のGly、43番目のLys、44番目のGly、76番目のLys、および97番目のAlaから選ばれる少なくとも1つ以上のアミノ酸残基が置換されたアミノ酸配列を含む、上記 (1)～(22) のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

40

(24) 抗体の重鎖 (H鎖) 可変領域 (V領域) が、配列番号38で示されるアミノ酸配列のうち、28番目のThrおよび97番目のAlaのうち少なくとも1つ以上のアミノ酸残基が置換されたアミノ酸配列を含む、上記 (1)～(22) のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

(25) 抗体の軽鎖 (L鎖) 可変領域 (V領域) が、配列番号8で示されるアミノ酸配列のうち、2番目のIle、3番目のVal、50番目のGln、および88番目のValから選ばれる少なくとも1つ以上のアミノ酸残基が置換されたアミノ酸配列を含む、上記 (1)～(24) のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

【0022】

(26) 抗体の重鎖 (H鎖) 可変領域 (V領域) が、配列番号4で示されるアミノ酸配列の

50

うち、40番目のAla、42番目のGly、43番目のLys、44番目のGly、76番目のLys、および97番目のAla、ならびに抗体の軽鎖（L鎖）V領域が、配列番号8で示されるアミノ酸配列のうち、2番目のIle、3番目のVal、50番目のGln、および88番目のValから選ばれる少なくとも1つ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む、上記（1）～（23）および（25）のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

（27） 抗体の重鎖（H鎖）可変領域（V領域）が、配列番号38で示されるアミノ酸配列のうち、28番目のThrおよび97番目のAla、ならびに抗体の軽鎖（L鎖）V領域が、配列番号8で示されるアミノ酸配列のうち、2番目のIle、3番目のVal、50番目のGln、および88番目のValから選ばれる少なくとも1つ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む、上記（1）～（22）、（24）および（25）のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

10

【0023】

（28） 抗体の重鎖（H鎖）可変領域（V領域）が、配列番号4、9、10、11、38、39、40および41から選ばれるアミノ酸配列を含む、上記（1）～（22）および（25）のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

（29） 抗体の軽鎖（L鎖）可変領域（V領域）が、配列番号8、12、13および14から選ばれるアミノ酸配列を含む上記（1）～（24）および（28）のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

（30） 抗体の重鎖（H鎖）可変領域（V領域）が、配列番号4、9、10、11、38、39、40および41から選ばれるアミノ酸配列、ならびに抗体の軽鎖（L鎖）V領域が、配列番号8、12、13および14から選ばれるアミノ酸配列を含む上記（1）～（22）のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

20

【0024】

（31） 抗体の重鎖（H鎖）可変領域（V領域）が、配列番号9または10で示されるアミノ酸配列、および抗体の軽鎖（L鎖）V領域が配列番号14で示されるアミノ酸配列を含む上記（1）～（22）のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

（32） 抗体断片が、Fab、Fab'、F(ab')₂、1本鎖抗体（scFv）、2量体化可変領域（V領域）断片（Diabody）、ジスルフィド安定化V領域断片（dsFv）および相補性決定領域（CDR）を含むペプチドから選ばれる抗体断片である上記（1）～（31）のいずれか1項に記載の抗体断片。

30

（33） 形質転換株KM8759（FERM BP-8129）またはKM8760（FERM BP-8130）が生産するヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

（34） 上記（1）～（33）のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片を生産する形質転換株。

（35） 形質転換株が、KM8759（FERM BP-8129）またはKM8760（FERM BP-8130）である上記（34）記載の形質転換株。

【0025】

（36） 上記（34）または（35）記載の形質転換株を培地に培養し、培養物中に上記（1）～（33）のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片を生成蓄積させ、該培養物から該抗体または該抗体断片を採取することを特徴とするヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片を生産する形質転換株の製造方法。

40

（37） 上記（1）～（33）のいずれか1項に記載されたヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片が、放射性同位元素、蛋白質または薬剤と化学的または遺伝子工学的に結合しているヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

（38） 上記（1）～（33）のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片をコードするDNA。

（39） 上記（38）記載のDNAを含有する組換えベクター。

【0026】

（40） 上記（39）記載の組換えベクターを宿主細胞に導入して得られる形質転換株。

（41） 上記（1）～（37）のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体およびその抗体断片

50

から選ばれる少なくとも1種を有効成分として含有する医薬。

(42) 上記 (1)～(33) および (37) のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体およびその抗体断片から選ばれる少なくとも1種を有効成分として含有するCCR4関連疾患の治療薬。

(43) CCR4関連疾患が癌または炎症性疾患である上記 (42) 記載の治療薬。

(44) 癌が血液癌である上記 (43) 記載の治療薬。

(45) 血液癌が白血病またはリンパ腫である上記 (44) 記載の治療薬。

(46) 炎症性疾患が、急性あるいは慢性の気道過敏性または気管支喘息、アトピー性皮膚疾患、アレルギー性鼻炎または花粉症である上記 (43) 記載の治療薬。

【0027】

(47) 上記 (1)～(33) および (37) のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体およびその抗体断片から選ばれる少なくとも1種を有効成分として含有するCCR4関連疾患の診断薬。

(48) CCR4関連疾患が癌または炎症性疾患である上記 (47) 記載の診断薬。

(49) 癌が血液癌である上記 (48) 記載の診断薬。

(50) 血液癌が白血病またはリンパ腫である上記 (48) 記載の診断薬。

(51) 炎症性疾患が、慢性気道過敏性喘息、気管支喘息、アトピー性皮膚疾患、アレルギー性鼻炎または花粉症である上記 (48) 記載の診断薬。

(52) 上記 (1)～(37) のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体およびその抗体断片から選ばれる少なくとも1種を有効成分として含有するTh2介在性免疫疾患の治療薬。

(53) Th2介在性免疫疾患が、慢性気道過敏性喘息、気管支喘息、アトピー性皮膚疾患、アレルギー性鼻炎または花粉症である上記 (52) 記載の治療薬。

(54) 上記 (1)～(37) のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体およびその抗体断片から選ばれる少なくとも1種を有効成分として含有するTh2介在性免疫疾患の診断薬。

(55) Th2介在性免疫疾患が、慢性気道過敏性喘息、気管支喘息、アトピー性皮膚疾患、アレルギー性鼻炎または花粉症である上記 (54) 記載の診断薬。

【0028】

(56) 上記 (1)～(33) および (37) のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体およびその抗体断片を用いて、CCR4を免疫学的に検出する方法。

(57) 上記 (1)～(33) および (37) のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体およびその抗体断片を用いて、CCR4を細胞表面に発現した細胞を免疫学的に検出する方法。

(58) 上記 (1)～(33) および (37) のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体およびその抗体断片を用いて、CCR4を細胞表面に発現した細胞を減少または除去する方法。

(59) 上記 (1)～(33) および (37) のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体およびその抗体断片を用いて、Th2細胞が産生するサイトカインを抑制する方法。

【0029】

本発明におけるCCR4関連疾患としては、癌、炎症性疾患などを包含する。

本発明における癌としては、血液癌、特に白血病、リンパ腫などを包含する。

本発明における炎症性疾患としては、急性あるいは慢性の気道過敏性または気管支喘息、アトピー性皮膚炎などのアトピー性皮膚疾患、アレルギー性鼻炎または花粉症などを包含する。

本発明におけるTh2介在性免疫疾患としては、Th2細胞を介在する免疫疾患であればいずれでもよいが、急性あるいは慢性の気道過敏性または気管支喘息、アトピー性皮膚炎などのアトピー性皮膚疾患、アレルギー性鼻炎または花粉症、間質性肺炎、肺繊維症、全身性エリテマトーデスなどの自己免疫疾患を包含する。

本発明におけるCCR4に特異的に反応するヒト型CDR移植抗体（抗CCR4CDR移植抗体）およびその抗体断片（以下、両者を総称して本発明の抗体と表記することもある）は、ヒトCCR4の細胞外領域に特異的に反応し、ヒト血小板に反応性を有さないヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片であればいかなるものでもよい。ヒト血小板に反応性を示さないとは、抗体がヒト血小板と実質的に結合性を示さないことをいい、具体的には、フローサイトメ

10

20

30

40

50

ーターによる測定で結合性を示さないことをいう。

【0030】

また、本発明の抗体は、ヒトCCR4の細胞外領域に特異的に反応し、CCR4発現細胞に対し細胞傷害活性を示す抗体である。

細胞傷害活性としては、CDC活性、ADCC活性があげられる。

また、本発明の抗体として、好ましくは、配列番号48に示されるアミノ酸配列の1～39、98～112、176～206または271～284番目を含む領域、より好ましくは配列番号48に示されるアミノ酸配列の2～29番目（配列番号36）、さらに好ましくは配列番号48に示されるアミノ酸配列の13～29番目（配列番号37）、特に好ましくは配列番号48に示されるアミノ酸配列の13～25番目に、特異的に反応する抗体があげられる。

10

ヒト型CDR移植抗体は、ヒト以外の動物の抗体の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の適切な位置に移植した抗体を意味する。

本発明のヒト型CDR移植抗体は、CCR4に特異的に反応するヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLのCDRのアミノ酸配列を任意のヒト抗体のVHおよびVLのFRに移植したV領域をコードするcDNAを構築し、ヒト抗体のCHおよびH鎖C領域（以下、CLと表記する）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CDR移植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。

【0031】

ヒト抗体のVHおよびVLのFRのアミノ酸配列を選択方法としては、ヒト抗体由来のものであれば、いかなるものでも用いることができる。例えば、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VHおよびVLのFRのアミノ酸配列、またはヒト抗体のVHおよびVL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, 1991）などがあげられる。

20

本発明の抗体のCHとしては、ヒトイムノグロブリン（以下、hIgと表記する）に属すればいかなるものでもよいが、hIgGクラスのもの好適であり、さらにhIgGクラスに属するγ1、γ2、γ3、γ4といったサブクラスのいずれも用いることができる。また、ヒト型CDR移植抗体のCLとしては、hIgに属すればいずれのものでもよく、κクラスあるいはλクラスのものを用いることができる。

本発明の抗体としては、それぞれ配列番号1、2、3で示されるアミノ酸配列からなる抗体VHのCDR1、CDR2、CDR3および／またはそれぞれ配列番号5、6、7で示されるアミノ酸配列からなるVLのCDR1、CDR2、CDR3を含むヒト型CDR移植抗体または該抗体断片などがあげられる。

30

好ましくは、抗体のVHが配列番号4または38、および／またはVLが配列番号8で示されるアミノ酸配列を含む、ヒト型CDR移植抗体などがあげられる。

【0032】

より好ましくは、

抗体のVHが、配列番号4で示されるアミノ酸配列のうち、40番目のAla、42番目のGly、43番目のLys、44番目のGly、76番目のLys、および97番目のAlaから選ばれる少なくとも1つ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体、

40

抗体のVHが、配列番号38で示されるアミノ酸配列のうち、28番目のThrおよび97番目のAlaのうち少なくとも1つ以上のアミノ酸残基が置換されたアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体、

抗体のVLが、配列番号8で示されるアミノ酸配列のうち、2番目のIle、3番目のVal、50番目のGln、および88番目のValから選ばれる少なくとも1つ以上のアミノ酸残基が置換されたアミノ酸配列を含む、ヒト型CDR移植抗体、

抗体のVHが、配列番号4で示されるアミノ酸配列のうち、40番目のAla、42番目のGly、43番目のLys、44番目のGly、76番目のLys、および97番目のAla、ならびに抗体のVLが、配列番号8で示されるアミノ酸配列のうち、2番目のIle、3番目のVal、50番目のGln、および88番目のValから選ばれる少なくとも1つ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換さ

50

れたアミノ酸配列を含む、ヒト型CDR移植抗体、

【0033】

抗体のVHが、配列番号38で示されるアミノ酸配列のうち、28番目のThrおよび97番目のAla、ならびに抗体のVLが、配列番号8で示されるアミノ酸配列のうち、2番目のIle、3番目のVal、50番目のGln、および88番目のValから選ばれる少なくとも1つ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む、ヒト型CDR移植抗体、などがあげられる。

これらのアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、付加、置換または挿入され、かつ上述した性質を有するCCR4と特異的に反応する抗体または抗体断片も本発明の範囲に包含される。

【0034】

本発明のアミノ酸配列において1以上のアミノ酸残基が欠失、置換、挿入または付加されたとは、同一配列中の任意かつ1もしくは複数のアミノ酸配列中の位置において、1または複数のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入または付加があることを意味し、欠失、置換、挿入または付加が同時に生じてもよく、置換、挿入または付加されるアミノ酸残基は天然型と非天然型とを問わない。天然型アミノ酸残基としては、L-アラニン、L-アスパラギン、L-アスパラギン酸、L-グルタミン、L-グルタミン酸、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リジン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-バリン、L-システインなどがあげられる。

以下に、相互に置換可能なアミノ酸残基の好ましい例を示す。同一群に含まれるアミノ酸残基は相互に置換可能である。

【0035】

A群：ロイシン、イソロイシン、ノルロイシン、バリン、ノルバリン、アラニン、2-アミノブタン酸、メチオニン、O-メチルセリン、t-ブチルグリシン、t-ブチルアラニン、シクロヘキシルアラニン

B群：アスパラギン酸、グルタミン酸、イソアスパラギン酸、イソグルタミン酸、2-アミノアジピン酸、2-アミノスベリン酸

C群：アスパラギン、グルタミン

D群：リジン、アルギニン、オルニチン、2,4-ジアミノブタン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸

E群：プロリン、3-ヒドロキシプロリン、4-ヒドロキシプロリン

F群：セリン、スレオニン、ホモセリン

G群：フェニルアラニン、チロシン

【0036】

本発明の抗体断片としては、Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、Diabody、dsFv、CDRを含むペプチドなどがあげられる。

Fabは、IgGを蛋白質分解酵素パパイニ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。

本発明のFabは、本発明のCCR4に特異的に反応するヒト型CDR移植抗体を蛋白質分解酵素パパイニンで処理して得ることができる。または、該抗体のFabをコードするDNAを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、Fabを製造することができる。

F(ab')₂は、IgGを蛋白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。

本発明のF(ab')₂は、本発明のCCR4に特異的に反応するヒト型CDR移植抗体を蛋白質分解酵素ペプシンで処理して得ることができる。または、下記のFab'をチオエーテル結合あるいはS-S結合させ、作製することができる。

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。

【0037】

本発明のFab'は、本発明のCCR4に特異的に反応するF(ab')₂を還元剤ジチオスレイトール処理して得ることができる。または、CCR4に特異的に反応するヒト型CDR移植抗体のFab'をコードするDNAを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該ベクターを原核生物あるい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。

scFvは、1本のVHと1本のVLとを12残基以上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。

10

本発明のscFvは、本発明のCCR4に特異的に反応するヒト型CDR移植抗体のVHおよびVLをコードするcDNAを取得し、scFv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あるい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あるい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。

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2特異的な抗原結合活性を有する抗体断片である。

【0038】

本発明のDiabodyは、例えば、CCR4に特異的に反応する2価のDiabodyは、本発明のCCR4に特異的に反応するヒト型CDR移植抗体のVHおよびVLをコードするcDNAを取得し、3~10残基のポリペプチドリンカーを有するscFv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あるい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あるいは真核生物へ導入することによりDiabodyを発現させ、製造することができる。

20

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。システイン残基に置換するアミノ酸残基はReiterらにより示された方法 (Protein Engineering, 7, 697 (1994)) に従って、抗体の立体構造予測に基づいて選択することができる。

本発明のdsFvは、本発明のCCR4に特異的に反応するヒト型CDR移植抗体のVHおよびVLをコードするcDNAを取得し、dsFv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あるい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あるい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。

30

【0039】

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、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により製造することができる。

本発明のCDRを含むペプチドは、本発明のCCR4に特異的に反応するヒト型CDR移植抗体のVHおよびVLのCDRをコードするcDNAを構築し、該cDNAを原核生物用発現ベクターあるい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あるい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 (フルオレニルメチルオキシカルボニル法)、tBoc法 (t-ブチルオキシカルボニル法) などの化学合成法によって製造することもできる。

40

【0040】

本発明の抗体は、本発明の抗体に放射性同位元素、蛋白質または薬剤などを化学的にあるいは遺伝子工学的に結合させた抗体の誘導体を包含する。

本発明の抗体の誘導体は、本発明のCCR4に特異的に反応する抗体または抗体断片のH鎖或いはL鎖のN末端側或いはC末端側、抗体または抗体断片中の適当な置換基あるいは側鎖、さらには抗体または抗体断片中の糖鎖に放射性同位元素、蛋白質あるいは薬剤などを化学的手法 (抗体工学入門、金光修著、(株) 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。

50

または、本発明のCCR4に特異的に反応する抗体または抗体断片をコードするDNAと、結合させたい蛋白質をコードするDNAを連結させて発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを宿主細胞へ導入する。以上のような遺伝子工学的手法によっても製造することができる。

放射性同位元素としては、 ^{131}I 、 ^{125}I 等があげられ、例えば、クロラミンT法等により、抗体に結合させることができる。

【0041】

薬剤としては、低分子のものが好ましく、ナイトロジェン・マスタード、サイクロフォスファミドなどのアルキル化剤、5-フルオロウラシル、メソトレキセートなどの代謝拮抗剤、ダウノマイシン、ブレオマイシン、マイトマイシンC、ダウノルビシン、ドキソルビシンなどの抗生物質、ビンクリスチン、ビンブラスチン、ビンデシンのような植物アルカロイド、タモキシフェン、デキサメタゾンなどのホルモン剤等の抗癌剤（臨床腫瘍学、日本臨床腫瘍研究会編、癌と化学療法社（1996））、またはヒドロコチゾン、プレドニゾンなどのステロイド剤、アスピリン、インドメタシンなどの非ステロイド剤、金チオマレート、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、アザチオプリンなどの免疫抑制剤、マレイン酸クロルフェニラミン、クレマシチンのような抗ヒスタミン剤等の抗炎症剤（炎症と抗炎症療法、医歯薬出版株式会社（1982））などがあげられる。例えば、ダウノマイシンと抗体を結合させる方法としては、グルタルアルデヒドを介してダウノマイシンと抗体のアミノ基間を結合させる方法、水溶性カルボジイミドを介してダウノマイシンのアミノ基と抗体のカルボキシル基を結合させる方法等があげられる。

【0042】

蛋白質としては、免疫担当細胞を活性化するサイトカインが好適であり、例えば、ヒトインターロイキン2（以下、hIL-2と表記する）、ヒト顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（以下、hGM-CSFと表記する）、ヒトマクロファージコロニー刺激因子（以下、hM-CSFと表記する）、ヒトインターロイキン12（以下、hIL-12と表記する）等があげられる。また、癌細胞を直接傷害するため、リシンやジフテリア毒素などの毒素を用いることができる。例えば、蛋白質との融合抗体については、抗体または抗体断片をコードするcDNAに蛋白質をコードするcDNAを連結させ、融合抗体をコードするDNAを構築し、該DNAを原核生物あるい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あるい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。

【0043】

以下に、本発明のCCR4に特異的に反応するヒト型CDR移植抗体およびその抗体断片の作製方法、活性評価方法およびそれらの使用方法について説明する。

1. ヒト型CDR移植抗体の作製

(1) ヒト化抗体発現用ベクターの構築

ヒト化抗体発現用ベクターとは、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。

ヒト抗体のC領域は任意のヒト抗体のCHおよびCLであることができ、例えば、ヒト抗体の $\gamma 1$ サブクラスのCHおよび κ クラスのCLなどがあげられる。ヒト抗体のCHおよびCLをコードするDNAとしてはエキソンとイントロンからなる染色体DNAを用いることができ、また、cDNAを用いることもできる。動物細胞用発現ベクターとしては、ヒト抗体のC領域をコードする遺伝子を組み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. U.S.A., 78, 1527 (1981))、pSG1 β d2-4 (Cytotechnol., 4, 173 (1990))、pSE1UK1Sed1-3 (Cytotechnol., 13, 79 (1993)) などがあげられる。動物細胞用発現ベクターに用いるプロモーターとエンハンサーとしては、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のLTR (Biochem. Biophys. Res. Commun., 149, 960 (1978))、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 (Cel

1, 33, 717 (1983)) などがあげられる。

【0044】

ヒト化抗体発現用ベクターは、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あるいは同一のベクター上に存在するタイプ（タンデム型）のどちらでも用いることができるが、ヒト化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タンデム型のヒト化抗体発現用ベクターの方が好ましい（J. Immunol. Methods, 167, 271 (1994)）。タンデム型のヒト化抗体発現用ベクターとしては、pKANTEX93 (W097/10354)、pEE18 (Hybridoma, 17, 559 (1998)) などがあげられる。

構築したヒト化抗体発現用ベクターは、ヒト型CDR移植抗体の動物細胞での発現に使用できる。

【0045】

(2) ヒト型CDR移植抗体のV領域をコードするcDNAの構築

ヒト型CDR移植抗体のVHおよびVLをコードするcDNAは、以下の様にして構築することができる。まず、目的のヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLのCDRのアミノ酸配列を移植するヒト抗体のVHおよびVLのFRのアミノ酸配列を選択する。ヒト抗体のVHおよびVLのFRのアミノ酸配列としては、ヒト抗体由来のものであれば、いかなるものでも用いることができる。例えば、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VHおよびVLのFRのアミノ酸配列、ヒト抗体のVHおよびVL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, 1991) などがあげられるが、それらの中でも、十分な活性を有するヒト型CDR移植抗体を作製するためには、目的のヒト以外の動物の抗体のVHおよび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）を有するアミノ酸配列を選択することが望ましい。

【0046】

次に、選択したヒト抗体のVHおよびVLのFRのアミノ酸配列に目的のヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLのCDRのアミノ酸配列を移植し、ヒト型CDR移植抗体のVHおよびVLのアミノ酸配列を設計する。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) や目的のヒト以外の動物の抗体の塩基配列を考慮して塩基配列に変換し、ヒト型CDR移植抗体のVHおよびVLのアミノ酸配列をコードする塩基配列を設計する。設計した塩基配列に基づき、100～200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法を行う。この場合、PCRでの反応効率および合成可能なDNAの長さから、VH、VLとも4本もしくは6本程度の合成DNAを設計することが好ましい。また、両端に位置する合成DNAの5'末端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、本項1の(1)で構築したヒト化抗体発現用ベクターに容易にクローニングすることができる。PCR反応後、増幅産物をpBluescript II SK(-) (Stratagene社製) などのプラスミドベクターにクローニングし、塩基配列を決定し、所望のヒト型CDR移植抗体のVHおよびVLのアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するプラスミドを取得する。

【0047】

(3) ヒト型CDR移植抗体のV領域のアミノ酸配列の改変

ヒト型CDR移植抗体は、目的のヒト以外の動物の抗体の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ヒト以外の動物の抗体に比べて低下してしまうことが知られている (BIO/TECHNOLOGY, 9, 266 (1991))。この原因としては、元のヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLでは、CDRのみならず、FRのいくつかのアミノ酸残基が直接的あるいは間接的に抗原結合活性に関与しており、それらアミノ酸残基がCDRの移植に伴い、ヒト抗体のVHおよびVLのFRの異なるアミノ酸残基へと変化してしまうことが考えられている。この問題を解決するため、ヒト型CDR移植抗体では、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やCDRのアミノ酸残基と相互作用したり、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、それらを元のヒト以外の動物の抗体に見出されるアミノ酸残基に改変し、低下した抗原結合活性を上昇させることが行われている (BIO/TECHNOLOGY, 9, 266 (1991))。ヒト型CDR移植抗体の作製においては、それら抗原結合活性に関わるFRのアミノ酸残基を如何に効率よく同定するかが、最も重要な点であり、そのためにX線結晶解析 (J. Mol. Biol., 112, 535 (1977)) あるいはコンピューターモデリング (Protein Engineering, 7, 1501 (1994)) などによる抗体の立体構造の構築および解析が行われている。これら抗体の立体構造の情報は、ヒト型CDR移植抗体の作製に多くの有益な情報をもたらして来たが、その一方、あらゆる抗体に適応可能なヒト型CDR移植抗体の作製法は未だ確立されておらず、現状では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などの種々の試行錯誤が必要である。

10

ヒト抗体のVHおよびVLのFRのアミノ酸残基の改変は、改変用合成DNAを用いてPCR法を行うことにより、達成できる。PCR後の増幅産物について本項1の(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。

【0048】

(4) ヒト型CDR移植抗体発現ベクターの構築

本項1の(1)に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体のCHおよびCLをコードするDNAの上流に、本項1の(2)および(3)で構築したヒト型CDR移植抗体のVHおよびVLをコードするcDNAをクローニングし、ヒト型CDR移植抗体発現ベクターを構築することができる。例えば、本項1の(2)および(3)でヒト型CDR移植抗体のVHおよび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'末端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、本項1の(1)に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体のCHおよびCLをコードするDNAの上流にそれらが適切な形で発現する様にクローニングすることができる。

20

【0049】

(5) ヒト型CDR移植抗体の一過性発現

作製した多種類のヒト型CDR移植抗体の抗原結合活性を効率的に評価するために、本項1の(4)に記載のヒト型CDR移植抗体発現ベクター、あるいはそれらを改変した発現ベクターを用いてヒト型CDR移植抗体の一過性発現を行うことができる。発現ベクターを導入する宿主細胞としては、ヒト型CDR移植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、その発現量の高さから、COS-7細胞(ATCC CRL1651)が一般に用いられる(Methods in Nucleic Acids Res., CRC press, 283 (1991))。COS-7細胞への発現ベクターの導入法としては、DEAE-デキストラン法(Methods in Nucleic Acids Res., CRC press, 283 (1991))、リポフェクション法(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 84, 7413 (1987))などがあげられる。

30

発現ベクターの導入後、培養上清中のヒト型CDR移植抗体の発現量および抗原結合活性は酵素免疫抗体法(ELISA; Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14 (1988)、Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press Limited (1996))などにより測定できる。

【0050】

40

(6) ヒト型CDR移植抗体の安定発現

本項1の(4)に記載のヒト型CDR移植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ヒト型CDR移植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法としては、エレクトロポレーション法(Cytotechnology, 3, 133 (1990))などがあげられる。

ヒト型CDR移植抗体発現ベクターを導入する宿主細胞としては、ヒト型CDR移植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、マウスSP2/0-Ag14細胞(ATCC CRL1581)、マウスP3X63-Ag8.653細胞(ATCC CRL1580)、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子(dhfr)が欠損したCHO細胞(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 77, 4216 (1980))、ラットYB2/3HL.P2.G11.16Ag.20細胞(YB2/0細胞; ATCC CRL1662)

50

などがあげられる。

【0051】

発現ベクターの導入後、ヒト型CDR移植抗体を安定に発現する形質転換株は、G418 sulfate (G418; SIGMA社製) 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できる (J. Immunol. Methods, 167, 271 (1994))。動物細胞培養用培地としては、RPMI1640培地 (日水製薬社製)、GIT培地 (日本製薬社製)、EX-CELL302培地 (JRH社製)、IMDM培地 (GIBCO BRL社製)、Hybridoma-SFM培地 (GIBCO BRL社製)、またはこれら培地に牛胎児血清 (FBS) などの各種添加物を添加した培地等を用いることができる。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ヒト型CDR移植抗体を発現蓄積させることができる。培養上清中のヒト化抗体の発現量および抗原結合活性はELISAなどにより測定できる。また、形質転換株は、dhfr増幅系などを利用してヒト型CDR移植抗体の発現量を上昇させることができる (J. Immunol. Methods, 167, 271 (1994))。

10

【0052】

ヒト型CDR移植抗体は、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ことができる (Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 8 (1988)、Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press Limited (1996))。また、その他に通常、蛋白質の精製で用いられる精製方法を使用することができる。例えば、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等を組み合わせを行い、精製することができる。精製したヒト化抗体のH鎖、L鎖ある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 (SDS-PAGE; Nature, 227, 680 (1970)) やウエスタンブロッティング法 (Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 12 (1988)、Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press Limited (1996)) などで測定することができる。

20

【0053】

2. 抗体断片の作製

抗体断片は、本項1に記載のヒト化抗体を元に遺伝子工学的的手法あるいは蛋白質化学的手法により、作製することができる。抗体断片としては、Fab、F(ab')₂、Fab'、scFv、Dibody、dsFv、CDRを含むペプチドなどがあげられる。

【0054】

(1) Fabの作製

Fabは、IgGを蛋白質分解酵素パパインで処理することにより、作製することができる。パパインの処理後は、元の抗体がプロテインA結合性を有するIgGサブクラスであれば、プロテインAカラムに通すことで、IgG分子やFc断片と分離し、均一なFabとして回収することができる (Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, third edition (1995))。プロテインA結合性を持たないIgGサブクラスの抗体の場合は、イオン交換クロマトグラフィーにより、Fabは低塩濃度で溶出される画分中に回収することができる (Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, third edition (1995))。また、Fabは、大腸菌を用いて遺伝子工学的に作製することもできる。例えば、本項1の (2) および (3) に記載の抗体のV領域をコードするDNAを、Fab発現用ベクターにクローニングし、Fab発現ベクターを作製することができる。Fab発現用ベクターとしては、Fab用のDNAを組み込み発現できるものであればいかなるものも用いることができる。例えば、pIT106 (Science, 240, 1041 (1988)) などがあげられる。Fab発現ベクターを適当な大腸菌に導入し、封入体あるいはペリプラズマ層にFabを生成蓄積させることができる。封入体からは、通常蛋白質で用いられるリフォールディング法により、活性のあるFabとすることができ、また、ペリプラズマ層に発現させた場合は、培養上清中に活性を持ったFabが漏出する。リフォールディング後あるいは培養上清からは、抗原を結合させたカラムを用いることにより、均一なFabを精製することができる (Antibody Engineering, A Practical Guide, W. H. Freeman and Company (1992))。

30

40

【0055】

(2) F(ab')₂の作製

50

F(ab')₂は、IgGを蛋白質分解酵素ペプシンで処理することにより、作製することができる。ペプシンの処理後は、Fabと同様の精製操作により、均一なF(ab')₂として回収することができる (Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, third edition, Academic Press (1995))。また、本項2の (3) に記載のFab'をo-PDMやビスマレイミドヘキサンのようなマレイミドで処理し、チオエーテル結合させる方法や、DTNBで処理し、S-S結合させる方法によっても作製することができる (Antibody Engineering, A Practical Approach, IRL PRESS (1996))。

【0056】

(3) Fab'の作製

Fab'は、大腸菌を用いて遺伝子工学的に作製することができる。例えば、本項1の (2) および (3) に記載の抗体のV領域をコードするDNAを、Fab'発現用ベクターにクローニングし、Fab'発現ベクターを作製することができる。Fab'発現用ベクターとしては、Fab'用のDNAを組み込み発現できるものであればいかなるものも用いることができる。例えば、pAK19 (Bio/Technology, 10, 163 (1992)) などがあげられる。Fab'発現ベクターを適当な大腸菌に導入し、封入体あるいはペリプラズマ層にFab'を生成蓄積させることができる。封入体からは、通常蛋白質で用いられるリフォールディング法により、活性のあるFab'とすることができ、また、ペリプラズマ層に発現させた場合は、リゾチームによる部分消化、浸透圧ショック、ソニケーション等の処理により菌を破碎し、菌体外へ回収させることができる。リフォールディング後あるいは菌の破碎液からは、プロテインGカラム等を用いることにより、均一なFab'を精製することができる (Antibody Engineering, A Practical Approach, IRL PRESS (1996))。

【0057】

(4) scFvの作製

scFvは遺伝子工学的には、ファージまたは大腸菌を用いて作製することができる。例えば、本項1の (2) および (3) に記載の抗体のVHおよびVLをコードするDNAを、12残基以上のアミノ酸配列からなるポリペプチドリンカーをコードするDNAを介して連結し、scFvをコードするDNAを作製する。作製したDNAをscFv発現用ベクターにクローニングし、scFv発現ベクターを作製することができる。scFv発現用ベクターとしては、scFvのDNAを組み込み発現できるものであればいかなるものも用いることができる。例えば、pCANTAB5E (Pharmacia社製)、Phfa (Hum. Antibody Hybridoma, 5, 48 (1994)) などがあげられる。scFv発現ベクターを適当な大腸菌に導入し、ヘルパーファージを感染させることで、ファージ表面にscFvがファージ表面蛋白質と融合した形で発現するファージを得ることができる。また、scFv発現ベクターを導入した大腸菌の封入体あるいはペリプラズマ層にscFvを生成蓄積させることができる。封入体からは、通常蛋白質で用いられるリフォールディング法により、活性のあるscFvとすることができ、また、ペリプラズマ層に発現させた場合は、リゾチームによる部分消化、浸透圧ショック、ソニケーション等の処理により菌を破碎し、菌体外へ回収することができる。リフォールディング後あるいは菌の破碎液からは、陽イオン交換クロマトグラフィー等を用いることにより、均一なscFvを精製することができる (Antibody Engineering, A Practical Approach, IRL PRESS (1996))。

【0058】

(5) Diabodyの作製

Diabodyは、上記のscFvを作製する際のポリペプチドリンカーを3~10残基程度にすることで、作製することができる。1種類の抗体のVHおよびVLを用いた場合には、2価のDiabodyを、2種類の抗体のVHおよびVLを用いた場合は、2特異性を有するDiabodyを作製することができる (FEBS Letters, 453, 164 (1999)、Int. J. Cancer, 77, 763 (1998))。

【0059】

(6) dsFvの作製

dsFvは、大腸菌を用いて遺伝子工学的に作製することができる。まず、本項1の (2) および (3) に記載の抗体のVHおよびVLをコードするDNAの適当な位置に変異を導入し、コードするアミノ酸残基がシステインに置換されたDNAを作製する。作製した各DNAをdsFv発現

用ベクターにクローニングし、VHおよびVLの発現ベクターを作製することができる。dsFv発現用ベクターとしては、dsFv用のDNAを組み込み発現できるものであればいかなるものも用いることができる。例えば、pULI9 (Protein Engineering, 7, 697 (1994)) などがあげられる。VHおよびVLの発現ベクターを適当な大腸菌に導入し、封入体あるいはペリプラズマ層にVHおよびVLを生成蓄積させることができる。封入体あるいはペリプラズマ層からVHおよびVLを得、混合し、通常蛋白質で用いられるリフォールディング法により、活性のあるdsFvとすることができる。リフォールディング後は、イオン交換クロマトグラフィーおよびゲル濾過等により、さらに精製することができる (Protein Engineering, 7, 697 (1994))。

【0060】

(7) CDRを含むペプチドの作製

CDRを含むペプチドは、Fmoc法あるいはtBoc法等の化学合成法によって作製することができる。また、CDRを含むペプチドをコードするDNAを作製し、作製したDNAを適当な発現用ベクターにクローニングし、CDRペプチド発現ベクターを作製することができる。発現用ベクターとしては、CDRを含むペプチドをコードするDNAを組み込み発現できるものであればいかなるものも用いることができる。例えば、pLEX (Invitrogen社製)、pAX4a+ (Invitrogen社製) などがあげられる。発現ベクターを適当な大腸菌に導入し、封入体あるいはペリプラズマ層にCDRを含むペプチドを生成蓄積させることができる。封入体あるいはペリプラズマ層からCDRを含むペプチドを得、イオン交換クロマトグラフィーおよびゲル濾過等により、精製することができる (Protein Engineering, 7, 697 (1994))。

【0061】

3. 本発明の抗体の活性並びに性質の評価

(1) 抗原に対する結合性の評価

本発明の抗体の抗原との結合性は免疫酵素抗体法 (ELISA法)、蛍光抗体法 (Cancer Immunol. Immunother., 36, 373 (1993))、BIAcoreTM等を用いた表面プラズモン共鳴等により測定できる。具体的には、CCR4の部分配列を有する合成ペプチドを作製し、これとウシ血清アルブミンなどのキャリアー蛋白質とを化学的に結合させたコンジュゲートを作製する。このコンジュゲートをELISAプレートに固相化し、本発明の抗体を反応させ、さらにペルオキシダーゼ、ビオチンなどの酵素標識などを施した抗イムノグロブリン抗体あるいは結合断片を反応させた後、発色色素を吸光光度計で測定することにより、本発明の抗体のCCR4結合活性を測定することができる。

【0062】

(2) CCR4発現細胞に対する反応性

CCR4発現細胞に対する反応性を検討するためには、細胞表面に発現されているCCR4を効率よく検出する方法を用いることが好ましい。方法としては、蛍光抗体法を用いたフローサイトメーター、グルタルアルデヒドなどによる検定などがあげられる。更に、血小板などの生体由来の細胞などとの反応性を検討する際には、出来る限り生体内に近い条件で検討を行うことが好ましい。これらの理由から、本発明の抗CCR4抗体の反応性を検討する際には、蛍光抗体法を用い、フローサイトメーターにより検討を行うことが最も好ましい。

蛍光抗体法に用いる抗体としては、FITCなどの蛍光物質、ビオチンなどにより標識された抗体であっても、標識をされていない抗体であってもよい。用いた抗体の標識の有無、その種類により、蛍光標識アビジン、蛍光標識抗ヒト免疫グロブリン抗体などを使用する。反応性は、十分量の抗CCR4抗体 (通常最終濃度が0.1~10 µg/ml) を検体に加えて行い、陰性対照抗体、陽性対照抗体の反応性との比較を行うことにより評価することができる。

【0063】

(3) 細胞傷害活性

CCR4発現細胞に対する細胞傷害活性は、CDC活性、ADCC活性等を測定し、評価する事が出来る (Cancer Immunol. Immunother., 36, 373 (1993))。産生サイトカイン量の変化は

10

20

30

40

50

サイトカインに対する抗体を用いて、ELISA法及び蛍光抗体法等により測定できる。

【0064】

(4) リガンド結合阻害活性

CCR4に結合性を有するリガンドであるTARCやMDCの標識体とCCR4発現細胞あるいはその細胞膜画分を用いる事により、本発明の抗CCR4抗体のリガンド結合阻害活性を検討する事が出来る。TARCやMDCの標識には、検出可能なものであればどのような手法を用いても良く、例えば、蛍光標識、酵素標識、放射線標識などが挙げられる。具体的な手法としては、例えばW000/42074に放射標識体を用いる結合阻害活性の測定方法があげられる。

また、CCR4へのリガンドの結合によって引き起こされる細胞応答を指標とし、本発明の抗CCR4抗体のリガンド結合阻害活性を検討する事が出来る。細胞応答としては、CCR4発現細胞にリガンドを接触させる事により引き起こされるものであれば如何なるものでも良く、例えば細胞内カルシウム濃度の変化、細胞遊走などをあげることができる。具体的な手法としては、例えば、W000/42074にCCR4リガンドによって引き起こされるCCR4発現細胞の遊走阻害を測定する方法があげられる。

【0065】

(5) 認識配列の検討

本発明の抗体の認識するアミノ酸配列の決定は、対応する抗原タンパク質の一次配列に基づいて設計された合成ペプチドを用いることにより調べることが出来る。

合成ペプチドの一次配列は、抗原タンパク質の一次配列に基づいて設計される。合成ペプチドとキャリアー蛋白質とを架橋させたタンパク質を作製する為、合成ペプチドのカルボキシル末端あるいはアミノ末端にシステイン残基を付加することもできる。こうして作製されたタンパク質は、後述するELISAに用いることが出来る。また、必要に応じ合成ペプチドのN末端はアセチル化することもでき、C末端はアミド化することもできる。

ペプチドは一般的な液相、固相ペプチド合成法およびそれらを適宜組み合わせる方法、またはそれらに準じる方法によって合成することができる (International Journal of Peptide Protein Research, 35, 161-214 (1990)、「Solid-Phase Peptide Synthesis」, Methods in Enzymology, vol. 289, Gregg B. Fields編, Academic Press, (1997)、「Peptide Synthesis Protocols」, Methods in Molecular Biology, vol. 35, Michael W. Pennington, Ben M. Dunn編, Humana Press (1994))。

【0066】

また、自動ペプチド合成機を用いることもできる。ペプチド合成機によるペプチドの合成は、島津製作所製ペプチド合成機、アドバンス・ケムテック社 (Advanced ChemTech Inc., USA、以後 ACT社と略称する) 製ペプチド合成機等の市販のペプチド合成機上で、適当に側鎖を保護した N^α-Fmoc-アミノ酸あるいは N^α-Boc-アミノ酸等を用い、それぞれの合成プログラムに従って実施することができる。原料となる保護アミノ酸および担体樹脂は、ABI 社、島津製作所、国産化学 (株)、ノバビオケム社 (NovaBiochem)、渡辺化学 (株)、ACT 社、アナスペック社 (AnaSpec Inc.)、またはペプチド研究所 (株) 等から入手することができる。

合成ペプチドを用いて、本発明の抗体の認識するアミノ酸配列を決定する方法としては、合成ペプチドと該抗体の結合を検出することが出来る方法であれば如何なる手法を用いることもできる。例えば、合成ペプチドを蛍光物質、放射性物質などで標識し、得られた標識ペプチドと抗体との結合性を調べることにより、抗体の認識するアミノ酸配列を決定することができる。あるいは、合成ペプチドをウシ血清アルブミン (BSA) などのタンパク質と架橋し、得られたタンパク質の抗体との反応性をELISA法などの方法により評価することにより行うこともできる。さらには、抗原タンパクなど、抗体が結合することが確認されている物質を用い、その物質に対する抗体の結合を阻害する合成ペプチドを調べることにより、本発明の抗体の認識するアミノ酸配列を決定することもできる。

【0067】

4. 本発明の抗体を用いたCCR4の検出および定量法

本発明は、本発明の抗体を用いて、CCR4またはCCR4を細胞表面に発現した細胞を免疫学

的に検出および定量する方法に関する。

本発明の抗体を用いて、CCR4、CCR4を細胞表面に発現した細胞を免疫学的に検出および定量する方法としては、蛍光抗体法、免疫酵素抗体法（ELISA法）、放射性物質標識免疫抗体法（RIA）、免疫組織染色法、免疫細胞染色法などの免疫組織化学染色法（ABC法、CSA法等）、上記に記した酵素免疫測定法、サンドイッチELISA法（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）、続生化学実験講座5 免疫生化学研究法、東京化学同人（1986））などがあげられる。

蛍光抗体法とは、分離した細胞あるいは組織などに、本発明の抗体を反応させ、さらにフルオレシニン・イソチオシアネート（FITC）などの蛍光物質でラベルした抗イムノグロブリン抗体あるいは結合断片を反応させた後、蛍光色素をフローサイトメーターで測定する方法である。

10

【0068】

免疫酵素抗体法（ELISA法）とは、分離した、細胞あるいはその破砕液、組織あるいはその破砕液、細胞培養上清、血清、胸水、腹水、眼液などに、本発明の抗体を反応させ、さらにペルオキシダーゼ、ビオチンなどの酵素標識などを施した抗イムノグロブリン抗体あるいは結合断片を反応させた後、発色色素を吸光光度計で測定する方法である。

放射性物質標識免疫抗体法（RIA）とは、分離した、細胞あるいはその破砕液、組織あるいはその破砕液、細胞培養上清、血清、胸水、腹水、眼液などに、本発明の抗体を反応させ、さらに放射線標識を施した抗イムノグロブリン抗体あるいは結合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方法である。

20

【0069】

免疫細胞染色法、免疫組織染色法とは、分離した、細胞あるいは組織などに、本発明の抗体を反応させ、さらにフルオレシニン・イソチオシアネート（FITC）などの蛍光物質、ペルオキシダーゼ、ビオチンなどの酵素標識を施した抗イムノグロブリン抗体あるいは結合断片を反応させた後、顕微鏡を用いて観察する方法である。

サンドイッチELISA法とは、本発明の抗体で、抗原認識部位の異なる2種類の抗体のうち、あらかじめ一方の抗体はプレートに吸着させ、もう一方の抗体はFITCなどの蛍光物質、ペルオキシダーゼ、ビオチンなどの酵素で標識しておき、抗体吸着プレートに、分離した、細胞あるいはその破砕液、組織あるいはその破砕液、細胞培養上清、血清、胸水、腹水、眼液などを反応させた後、標識した抗体を反応させ、標識物質に応じた反応を行う方法である。

30

【0070】

5. ヒト型CDR移植抗体または抗体断片の使用方法

本発明の抗体は、培養細胞株に発現しているCCR4と特異的に結合し、かつCDC活性およびADCC活性等の細胞傷害活性を示すため、Th2介在性免疫疾患等のCCR4が関与する疾患の診断、治療において有用であると考えられる。また、ヒト以外の動物の抗体やキメラ抗体に比べ、ほとんどがヒト抗体のアミノ酸配列に由来するため、ヒト体内において高い効果を示し、かつ、免疫原性が低く、その効果が長期間に渡り持続することが期待される。

また、本発明の抗体を、被験者の細胞あるいは組織に投与することにより、Th2等のCCR4を発現している細胞が産生するサイトカインであるIL-4、IL-5、IL-13等の産生を抑制することができる。

40

本発明に係るCCR4を発現している細胞としてはTh2細胞などがあげられる。Th2細胞としては、好ましくは、活性化Th2細胞またはメモリーTh2細胞などがあげられる。具体的には、CD45RA- またはCD45RO+ およびCD4+ の性質を有する細胞があげられる。

【0071】

本発明の抗体が有する細胞傷害活性は、Th2細胞等のCCR4発現細胞に本発明の抗体が結合し、当該細胞にアポトーシスを誘導することなどにより生ずる。また、アポトーシスを誘導することにより当該細胞に傷害を与え、除去することができる。

また、Th2介在性免疫疾患、癌疾患等のCCR4関連疾患の診断方法としては、被験者の細胞あるいは組織に存在するヒトCCR4陽性細胞を、上述した免疫学的に検出する方法があげ

50

られる。

また、本発明の抗体は、Th2介在性免疫疾患、癌疾患等のCCR4関連疾患、また異常なCCR4発現細胞の増加・減少により病態が進行する疾患の診断薬として用いることができる。

【0072】

さらに、本発明の抗体はその細胞傷害活性によりヒトCCR4発現細胞を減少もしくは除去できるため、本発明の抗体を用いるTh2介在性免疫疾患、癌疾患等のCCR4関連疾患の診断方法あるいは治療方法、本発明の抗体を有効成分とする、Th2介在性免疫疾患、癌疾患等のCCR4関連疾患の治療薬および予防薬が提供される。

Th2介在性免疫疾患とは、軽度・重度に関わらず、急性あるいは慢性の気道過敏性や気管支喘息、アトピー性皮膚炎を含むアトピー性皮膚疾患、アレルギー性鼻炎または花粉症などの炎症性疾患、Th2細胞から放出されるサイトカイン・ケモカインによって増殖もしくは活性化し得る好酸球や肥満細胞などの炎症担当細胞、ならびにTh2細胞から放出されるサイトカイン・ケモカインによって産生されるIgE等の生体機能分子に基づく疾患、また異常なTh2細胞の変動により病態が進行する免疫疾患を示す。

【0073】

本発明の抗体は、単独で投与することも可能ではあるが、通常は薬理学的に許容される一つあるいはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる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望ましい。

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望ましく、経口投与、または口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内および静脈内などの非経口投与をあげることができ、望ましくは静脈内投与をあげることができる。

投与形態としては、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、軟膏、テープ剤などがあげられる。

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、顆粒剤などがあげられる。

【0074】

乳剤および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、果糖などの糖類、ポリエチレングリコール、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、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、ストロベリーフレーバー、ペパーミントなどのフレーバー類等を添加剤として用いて製造できる。

カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等は、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニトールなどの賦形剤、デンプン、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、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、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、グリセリンなどの可塑剤等を添加剤として用いて製造できる。

【0075】

非経口投与に適当な製剤としては、注射剤、座剤、噴霧剤などがあげられる。

注射剤は、塩溶液、ブドウ糖溶液、あるいは両者の混合物からなる担体等を用いて調製される。

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調製される。

また、噴霧剤は本発明の抗体そのもの、ないしは受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ該抗体または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等を用いて調製される。

担体として具体的には乳糖、グリセリンなどが例示される。本発明の抗体および用いる担体の性質により、エアロゾル、ドライパウダーなどの製剤が可能である。また、これらの非経口剤においても経口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。

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、体重等により異なるが、通常成人1日当たり0.01mg/kg～20mg/kgである。

【発明を実施するための最良の形態】

【0076】

以下に、本発明の実施例を示すが、これにより本発明の範囲が限定されるものではない。

実施例 1

CCR4に対するヒト型CDR移植抗体の作製：

1. CCR4に対するヒト型CDR移植抗体のVHおよびVLをコードするcDNAの設計

(1) CCR4に対するヒト型CDR移植抗体のVHのアミノ酸配列の設計

まず、CCR4に対するヒト型CDR移植抗体（抗CCR4CDR移植抗体）のVHのアミノ酸配列を以下の様にして設計した。参考例1で作製された抗CCR4マウス抗体KM2160（Int. Immunol., 11, 81 (1999)）を使用し、配列番号1、2、および3に示したVHのCDR1、2、および3のアミノ酸配列を移植するためのヒト抗体のVHのFRのアミノ酸配列を選択した。配列解析システムとしてGCG Package（Genetics Computer Group社製）を用いて、既存の蛋白質のアミノ酸配列データベースをBLASTP法（Nucleic Acid Res., 25, 3389 (1997)）によりKM2160と相同性の高いヒト抗体を検索した。相同性スコアと実際のアミノ酸配列の相同性を比較したところ、SWISSPROTデータベースアクセッションナンバーP01781、Ig Heavy chain V-III region Gal（Hoppe. Seylers. Z. Physiol. Chem., 354, 1505-1509 (1973);以下、Galと称す）が82.5%を示し、最も相同性の高いヒト抗体であったため、この抗体のFRのアミノ酸配列を選択した。ただしデータベース上のGalのFRのアミノ酸配列中には、アミノ酸残基が一義的に決定されていない部分（分泌型抗体のN末端から28番目、30番目）やヒト抗体の配列では出現頻度の低いアミノ酸残基（V領域の最後の残基であるThr）が認められた。そこで、28番目と30番目については、マウス抗体KM2160に見られる残基であるIleとSerを選択し、V領域の最後のThrについては、Serへ置換した。これらのアミノ酸残基は、任意のヒト抗体の配列（Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991）においても高頻度に認められることから、ヒト抗体の配列から逸脱するものではない。

【0077】

以上のようにして決定したヒト抗体のFRのアミノ酸配列の適切な位置に配列番号1、2、および3に示した抗CCR4マウス抗体KM2160のVHのCDR1、2、および3のアミノ酸配列を移植し、配列番号4に記載の抗CCR4CDR移植抗体のVHのアミノ酸配列Gal0を設計した。配列番号4のアミノ酸配列をコードする塩基配列を配列番号49に示した。

また、カバットらによって分類された共通配列を基に抗CCR4CDR移植抗体のVHのアミノ酸配列を設計した。

カバットらは、既知の様々なヒト抗体のVHをそのアミノ酸配列の相同性から3種類のサブグループ（HSG I～III）に分類し、更に、それら各サブグループ毎に共通配列を報告している（Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991）。それら共通配列は、ヒトにおいてより免疫原性が低下する可能性が考えられる。そこで、活性の高い抗CCR4CDR移植抗体を作製するために、設計にあたってはヒト抗体のVHの3種類のサブグループの共通配列のFRのアミノ酸配列のうち、KM2160のVHのFRのアミノ酸配列と最も高い相同性を有するFRのアミノ酸配列を選択した。第1表には、ヒト抗体のVHの各サブグループの共通配列のFRのアミノ酸配列とKM2160のVHのFRのアミノ酸配列との間の相同性の検索結果を示した。第1表に示した様に、KM2160のVH領域のFRのアミノ酸配列はサブグループIIIと最も高い相同性を有していた。

【0078】

【表1】

第1表

HSGI	HSGII	HSGIII
57.47%	50.58%	77.01%

【0079】

以上の結果から、ヒト抗体のVHのサブグループIIIの共通配列のFRのアミノ酸配列の適切な位置に抗CCR4マウス抗体KM2160のVHのCDRのアミノ酸配列を移植し、配列番号38に記載の抗CCR4CDR移植抗体のVHのアミノ酸配列HV0を設計した。配列番号38のアミノ酸配列をコードする塩基配列を配列番号57に示した。

10

【0080】

(2) CCR4に対するヒト型CDR移植抗体のVLのアミノ酸配列の設計

次に、抗CCR4CDR移植抗体のVLのアミノ酸配列を以下の様にして設計した。配列番号5、6、および7に示した抗CCR4マウス抗体KM2160のVLのCDR1、2、および3のアミノ酸配列を移植するためのヒト抗体のVLのFRのアミノ酸配列を選択した。カバットらは、既知の様々なヒト抗体のVLをそのアミノ酸配列の相同性から4種類のサブグループ (HSG I~IV) に分類し、更に、それら各サブグループ毎に共通配列を報告している (Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991)。そこで、ヒト抗体のVLの4種類のサブグループの共通配列のFRのアミノ酸配列のうち、KM2160のVLのFRのアミノ酸配列と最も高い相同性を有するFRのアミノ酸配列を選択した。第1表には、ヒト抗体のVLの各サブグループの共通配列のFRのアミノ酸配列とKM2160のVLのFRのアミノ酸配列との間の相同性の検索結果を示した。第1表に示した様に、KM2160のVLのFRのアミノ酸配列はサブグループIIと最も高い相同性を有していた。

20

【0081】

【表2】

第2表

HSGI	HSGII	HSGIII	HSGIV
65.00%	82.50%	65.00%	72.50%

30

【0082】

以上の結果から、ヒト抗体のVLのサブグループIIの共通配列のFRのアミノ酸配列の適切な位置に配列番号5、6、および7に示した抗CCR4マウス抗体KM2160のVLのCDR1、2、および3のアミノ酸配列を移植し、配列番号8に記載の抗CCR4CDR移植抗体のVLのアミノ酸配列LV0を設計した。配列番号8のアミノ酸配列をコードする塩基配列を配列番号53に示した。

40

【0083】

(3) CCR4に対するヒト型CDR移植抗体のVHおよびVLの改変

上記で設計した抗CCR4CDR移植抗体のVHのアミノ酸配列Gal0、HV0およびVLのアミノ酸配列LV0は、選択したヒト抗体のFRのアミノ酸配列に抗CCR4マウス抗体KM2160のCDRのアミノ酸配列のみを移植した配列であるが、一般に、ヒト型CDR移植抗体では、マウス抗体のCDRのアミノ酸配列の移植のみでは活性が低下してしまうことが多く、それを回避するため、ヒト抗体とマウス抗体で異なっているFRのアミノ酸残基のうち、活性に影響を与えると考えられるアミノ酸残基をCDRのアミノ酸配列とともに移植することが行われている。そこで、本実施例においても、活性に影響を与えると考えられるFRのアミノ酸残基を同定する

50

ことを検討した。

【0084】

まず、上記で設計した抗CCR4CDR移植抗体のVHのアミノ酸配列Gal0、HV0およびVLのアミノ酸配列LV0よりなる抗体V領域（Gal0LV0およびHV0LV0）の三次元構造をコンピューターモデリングの手法を用いて構築した。三次元構造座標作製に関してはソフトウェアAbM (Oxford Molecular社製) を、三次元構造の表示についてはソフトウェアPro-Explore (Oxford Molecular社製) あるいはRasMol (Glaxo社製) を用いてそれぞれ添付の使用説明書に従い、行った。また、抗CCR4マウス抗体KM2160のV領域の三次元構造のコンピューターモデルも同様にして構築した。更に、Gal0LV0またはHV0LV0のVHおよびVLのFRのアミノ酸配列において、抗CCR4マウス抗体KM2160と異なっている残基について順次、抗CCR4マウス抗体KM2160の相当する位置に見られる残基へ改変したアミノ酸配列からなる三次元構造モデルを同様にして構築し、抗CCR4マウス抗体KM2160、Gal0LV0またはHV0LV0および改変体のV領域の三次元構造を比較した。

10

【0085】

その結果、Gal0LV0またはHV0LV0のFRのアミノ酸残基の中で抗原結合部位の三次元構造を変化させ、抗体の活性に影響を与えられと考えられる残基として、Gal0では40番目のAla、42番目のGly、43番目のLys、44番目のGly、76番目のLys、および97番目のAlaを、HV0では、28番目のThrおよび97番目のAlaを、LV0では、2番目のIle、3番目のVal、50番目のGln、および88番目のValを選択した。これらの選択したアミノ酸残基のうち、少なくとも1つ以上をマウス抗体KM2160に見られるアミノ残基へ改変し、様々な改変を有するヒト型CDR移植抗体のVHおよびVLを設計した。

20

【0086】

まず、VHについては、例えばGal0の97番目のAla を改変した配列番号9で示したGal1、Gal0の42番目のGly、44番目のGlyを改変した配列番号10で示したGal2、Gal0の97番目のAla、42番目のGly、44番目のGlyを改変した配列番号11に示したGal3、HV0の28番目のThrを改変した配列番号39に示したHV1、HV0の97番目のAlaを改変した配列番号40で示したHV2、およびHV0の28番のThr、97番目のAlaを改変した配列番号41で示したHV3をそれぞれ設計した。さらにVLについては、例えば2番目のIleを改変した配列番号12に示したLV1、3番目のValを改変した配列番号13に示したLV2、2番目のIleおよび3番目のValを改変した配列番号14に示したLV3を設計した。配列番号9～11、39～41および12～14のアミノ酸配列をコードする塩基配列を、それぞれ配列番号50～52、58～60、54～56に示した。

30

【0087】

2. 抗CCR4CDR移植抗体のcDNAの構築

(1) 抗CCR4CDR移植抗体のVHをコードするcDNAの構築

実施例1の1項 (1) で設計した抗CCR4CDR移植抗体のVHのアミノ酸配列Gal0をコードするcDNAをPCR法を用いて以下の様にして構築した。

まず、設計したアミノ酸配列に配列番号15に記載の抗CCR4マウス抗体KM2160のH鎖の分泌シグナル配列を繋げて完全な抗体アミノ酸配列とした。次に、該アミノ酸配列を遺伝子コドンに変換した。1つのアミノ酸残基に対して複数の遺伝子コドンが存在する場合は、抗体の遺伝子の塩基配列に見られる使用頻度 (Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991) を考慮し、対応する遺伝子コドンを選定した。決定した遺伝子コドンをつなぎ、完全な抗体V領域のアミノ酸配列をコードするcDNAの塩基配列を設計し、更に5'末端と3'末端にPCR反応時の増幅用プライマーの結合塩基配列 (ヒト化抗体発現用ベクターへクローニングするための制限酵素認識配列も含む) を付加した。設計した塩基配列を5'末端側から約100塩基ずつ計6本の塩基配列に分け (隣り合う塩基配列は、その末端に約20塩基の重複配列を有する様にする)、それらをセンス鎖、アンチセンス鎖の交互の順で、実際には、配列番号16、17、18、19、20、および21の6本の合成オリゴヌクレオチドを合成した (GENSET社製)。

40

【0088】

各オリゴヌクレオチドを最終濃度が0.1 μ Mとなる様に0.2mM dNTPs、1mM塩化マグネシウ

50

ムを含む反応液に加え、さらに0.4 μ M M13 primer RV (宝酒造社製)、0.4 μ M M13 primer M3 (GENSET社製) および2.5単位のKOD polymerase (TOYOBO社製) を用いて、合計50 μ lとし、PCR反応を行った。反応条件は94°C30秒間、55°C30秒間、74°C60秒間のサイクルを30サイクル、その後74°C10分間を1サイクルで行った。該反応液をQIA quick PCR purification kit (QIAGEN社製) にて精製し、最終的に滅菌水に溶解した。10単位の制限酵素ApaI (宝酒造社製) および10単位の制限酵素NotI (宝酒造社製) を用いて37°Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約0.47kbのApaI-NotI断片を回収した。

【0089】

次に、プラスミドpBluescript II SK(-) (Stratagene社製) の3 μ gを10単位の制限酵素ApaI (宝酒造社製) および10単位の制限酵素NotI (宝酒造社製) を用いて37°Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約2.95kbのApaI-NotI断片を回収した。

次に、上記で得られた抗CCR4CDR移植抗体のVHのPCR産物のApaI-NotI断片とプラスミドpBluescript II SK(-)のApaI-NotI断片を、DNA Ligation Kit Ver.2 (宝酒造社製) のSolution Iを用いて添付の説明書に従って連結した。この様にして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌DH5 α 株 (東洋紡績社製) を形質転換し、形質転換株のクローンより各プラスミドDNAを調製し、Big Dye Terminator Kit ver.2 (Appliedbiosystems社製) を用いて塩基配列の解析を行った。塩基配列を解析した結果、目的の塩基配列を有する第1図に示したプラスミドpKM2160Gal0を得た。プラスミドpKM2160Gal0で形質転換された大腸菌株であるEscherichia coli DH5 α /pKM2160Gal0は、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6) に平成13年8月22日付けでFERM BP-7709として寄託されている。

【0090】

次に、実施例1の1項 (3) で設計したFRのアミノ酸残基の改変は以下のように行った。改変後のアミノ酸残基の遺伝子コドンについては、マウス抗体KM2160で見られる遺伝子コドンとなるように行った。

97番目のAlaをGlyに改変する際には、本項で作製したプラスミド pKM2160Gal0の25ngを鋳型とし、配列番号22と23に記載の塩基配列を有する変異導入のための合成DNA (GENSET社製) をプライマーとしてそれぞれ終濃度0.4 μ Mとなるように加え、2.5単位のKOD plus polymerase (TOYOBO社製) を用いて、添付の取扱説明書に従い、50 μ lの系でまず94°Cで2分間加熱した後、94°C15秒間、55°C30秒間、68°C40秒間の条件で35サイクルのPCR反応を行った。該反応液をQIA quick PCR purification kit (QIAGEN社製) にて精製し、最終的に滅菌水に溶解した。全量を10単位の制限酵素PstI (宝酒造社製) を用いて37°Cで1時間反応させた後、10単位の制限酵素DraIII (New England Biolabs社製) を用いて37°Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約0.58kbのPstI-DraIII断片を回収した。

【0091】

次に、プラスミドpKM2160Gal0の3 μ gを10単位の制限酵素PstI (宝酒造社製) を用いて37°Cで1時間反応させた後、10単位の制限酵素DraIII (New England Biolabs社製) を用いて37°Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約2.7kbのPstI-DraIII断片を回収した。

次に、上記で得られたPCR産物由来のPstI-DraIII断片とプラスミドpKM2160Gal0由来のPstI-DraIII断片をDNA Ligation Kit Ver.2 (宝酒造社製) のSolution Iを用いて添付の説明書に従って連結した。この様にして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌DH5 α 株 (東洋紡績社製) を形質転換し、形質転換株のクローンより各プラスミドDNAを調製し、Big Dye Terminator Kit ver.2 (Appliedbiosystems社製) を用いて塩基配列の解析を行った。塩基配列を解析した結果、目的の塩基配列を有する第2図に示したプラスミドpKM2160Gal1を得た。プラスミドpKM2160Gal1で形質転換された大腸菌株であるEscherichia coli DH5 α /pKM2160Gal1は、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センタ

ー（日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6）に平成13年8月22日付けでFERM BP-7710として寄託されている。

【0092】

42番目のGlyをAspに、また44番目のGlyをArgに改変する際には、PCRプライマーとしては配列番号24に記載の塩基配列を有する変異導入のための合成DNA(GENSET社製)とM13 primer RV(宝酒造社製)をプライマーとする以外は、基本的には上記と同様の方法で実施し、pKM2160Gal2を得た。プラスミドpKM2160Gal2で形質転換された大腸菌株であるEscherichia coli DH5α/pKM2160Gal2は、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6）に平成13年8月22日付けでFERM BP-7711として寄託されている。

10

【0093】

また上記3残基全ての改変は、以下のようにして構築した。得られたpKM2160Gal1とpKM2160Gal2を各約0.5 μg用いて、10単位のNheI(宝酒造社製)で37℃で1時間反応させた後、更にScaI(宝酒造社製)で37℃で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、pKM2160Gal1由来の約1.3kbのNheI-ScaI断片と、pKM2160Gal2由来の約2.0kbの断片を回収した。得られた2種類の断片をDNA Ligation Kit Ver.2(宝酒造社製)のSolution Iを用いて添付の説明書に従って連結した。この様にして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌DH5α株(東洋紡績社製)を形質転換し、形質転換株のクローンより各プラスミドDNAを調製し、Big Dye Terminator Kit ver.2(Appliedbiosystems社製)を用いて塩基配列の解析を行った。塩基配列を解析した結果、目的の塩基配列を有する第3図に示したプラスミドpKM2160Gal3を得た。プラスミドpKM2160Gal3で形質転換された大腸菌株であるEscherichia coli DH5α/pKM2160Gal3は、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6）に平成13年8月22日付けでFERM BP-7712として寄託されている。

20

【0094】

次に、実施例1の1項(1)で設計した抗CCR4CDR移植抗体のVHのアミノ酸配列HV0をコードするcDNAをPCR法を用いて以下の様にして構築した。

まず、設計したアミノ酸配列に配列番号15に記載の抗CCR4マウス抗体KM2160のH鎖の分泌シグナル配列を繋げて完全な抗体アミノ酸配列とした。次に、該アミノ酸配列を遺伝子コドンに変換した。1つのアミノ酸残基に対して複数の遺伝子コドンが存在する場合は、抗体の遺伝子の塩基配列に見られる使用頻度(Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991)を考慮し、対応する遺伝子コドンを選定した。決定した遺伝子コドンと繋げて、完全な抗体V領域のアミノ酸配列をコードするcDNAの塩基配列を設計し、更に5'末端と3'末端にPCR反応時の増幅用プライマーの結合塩基配列(ヒト化抗体発現用ベクターへクローニングするための制限酵素認識配列も含む)を付加した。設計した塩基配列を5'末端側から約100塩基ずつ計6本の塩基配列に分け(隣り合う塩基配列は、その末端に約20塩基の重複配列を有する様にする)、それらをセンス鎖、アンチセンス鎖の交互の順で、実際には、配列番号16、42、43、44、45、および21の6本の合成オリゴヌクレオチドを合成し(GENSET社製)、本項に記載したpKM2160Gal0と同様の方法でpKM2160HV0を得た。プラスミドpKM2160HV0で形質転換された大腸菌株であるEscherichia coli DH5α/pKM2160HV0は、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6）に平成13年8月27日付けでFERM BP-7718として寄託されている。

30

40

【0095】

28番目のThrをIleに改変する際には、配列番号42に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドの代わりに配列番号69に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを、また配列番号43に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドの代わりに、配列番号46に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを用いて上記のプラスミドpKM2160HV0の構築と同様の反応を行うことにより、目的の塩基配列を有するpKM2160HV1を得た。プラスミドpKM2160HV1で形質転換された大腸菌株であるEscherichia coli DH5α/pKM2160HV1は、独立行政

50

法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6）に平成13年8月27日付けでFERM BP-7719として寄託されている。

【0096】

28番目のThrをIleに、および97番目のAlaをGlyに改変する際には、配列番号42に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドの代わりに配列番号69に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを、また配列番号43に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドの代わりに配列番号46に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチド、また配列番号45に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドの代わりに、配列番号47に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを用いて上記のプラスミドpKM2160HV0の構築と同様の反応を行うことにより、目的の塩基配列を有するpKM2160HV3を得た。プラスミドpKM2160HV3で形質転換された大腸菌株であるEscherichia coli DH5 α /pKM2160HV3は、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6）に平成13年8月27日付けでFERM BP-7721として寄託されている。

10

【0097】

97番目のAlaをGlyに改変する際には、以下の様にして構築した。得られたpKM2160HV0とpKM2160HV3を各約0.5 μ g用いて、10単位のNheI（宝酒造社製）で37℃で1時間反応させた後、更にScaI（宝酒造社製）で37℃で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、pKM2160HV3由来の約1.3kbのNheI-ScaI断片と、pKM2160HV0由来の約2.0kbの断片を回収した。得られた2種類の断片をDNA Ligation Kit Ver.2（宝酒造社製）のSolution Iを用いて添付の説明書に従って連結した。この様にして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌DH5 α 株（東洋紡績社製）を形質転換し、形質転換株のクローンより各プラスミドDNAを調製し、Big Dye Terminator Kit ver.2(Appliedbiosystems社製)を用いて塩基配列の解析を行った。塩基配列を解析した結果、目的の塩基配列を有するプラスミドpKM2160HV2を得た。プラスミドpKM2160HV2で形質転換された大腸菌株であるEscherichia coli DH5 α /pKM2160HV2は、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6）に平成13年8月27日付けでFERM BP-7720として寄託されている。

20

【0098】

(2) 抗CCR4CDR移植抗体のVLをコードするcDNAの構築

実施例1の1項 (2) で設計した抗CCR4CDR移植抗体のVLのアミノ酸配列LV0をコードするcDNAをVHと同様にPCR法を用いて以下の様にして構築した。ただし、分泌シグナル配列としては、配列番号25に記載のアミノ酸配列を有する抗CCR4マウス抗体KM2160のL鎖の配列を用いた。

30

【0099】

まず、配列番号26、27、28、29、30および31に記載の塩基配列を有する6本の合成オリゴヌクレオチドを合成した（GENSET社製）。各オリゴヌクレオチドを最終濃度が0.1 μ Mとなる様に50 μ lの反応液に加えて、0.4 μ M M13 primer RV（宝酒造社製）、0.4 μ M M13 primer M4（宝酒造社製）もしくは配列番号32に示したM13 primer M3（GENSET社製）、および2.5単位のKOD polymerase（TOYOBO社製）を用いて、PCR反応を行った。この際の反応条件は94℃30秒間、55℃30秒間、74℃60秒間のサイクルを30サイクル、その後72℃で10分間を1サイクルとした。該反応液をQIA quick PCR purification kit（QIAGEN社製）にて精製し、最終的に滅菌水に溶解した。10単位の制限酵素EcoRI（宝酒造社製）および10単位の制限酵素XhoI（宝酒造社製）を用いて37℃で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約0.44kbのEcoRI-XhoI断片を回収した。

40

【0100】

次に、プラスミドpBluescript II SK(-)（Stratagene社製）の3 μ gを15単位の制限酵素EcoRI（宝酒造社製）および15単位の制限酵素XhoI（宝酒造社製）を用いて37℃で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約2.95kbのEcoRI-XhoI断片を回収した。

【0101】

50

次に、上記で得られた抗CCR4CDR移植抗体のVLのPCR産物のEcoRI-XhoI断片とプラスミドpBluescript II SK(-)のEcoRI-XhoI断片をDNA Ligation Kit Ver.2 (宝酒造社製) のSolution Iを用いて添付の説明書に従って連結した。この様にして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌DH5α株(東洋紡績社製)を形質転換し、形質転換株のクローンより各プラスミドDNAを調製し、Big Dye Terminator Kit ver.2 (Appliedbiosystems社製)を用いて塩基配列の解析を行った。塩基配列を解析した結果、目的の塩基配列を有する第4図に示したプラスミドpKM2160LV0を得た。プラスミドpKM2160LV0で形質転換された大腸菌株であるEscherichia coli DH5α/pKM2160LV0は、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6) に平成13年8月22日付けでFERM BP-7713として寄託されている。

10

【0102】

次に、実施例1の1項 (3) で設計したFRのアミノ酸残基の改変は以下に示す方法で行った。改変後のアミノ酸残基の遺伝子コドンについては、マウス抗体KM2160で見られる遺伝子コドンとなるように行った。

2番目のIleをValに改変する際には、配列番号27に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドの代わりに、配列番号33に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを用いて上記のプラスミドpKM2160LV0の構築と同様の反応を行うことにより、目的の塩基配列を有する第5図に示したプラスミドpKM2160LV1を得た。プラスミドpKM2160LV1で形質転換された大腸菌株であるEscherichia coli DH5α/pKM2160LV1は、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6) に平成13年8月22日付けでFERM BP-7714として寄託されている。

20

【0103】

同様にして3番目のValをLeuに改変する際には、配列番号27に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドの代わりに配列番号34に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを用い、また上記2残基をすべて改変する際には、配列番号27に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドの代わりに配列番号35に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを用いることで目的のプラスミドpKM2160LV2、pKM2160LV3をそれぞれ得た。プラスミドpKM2160LV2で形質転換された大腸菌株であるEscherichia coli DH5α/pKM2160LV2およびプラスミドpKM2160LV3で形質転換された大腸菌株であるEscherichia coli DH5α/pKM2160LV3は、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6) に平成13年8月22日付けでFERM BP-7715およびFERM BP-7716としてそれぞれ寄託されている。

30

【0104】

(3) 抗CCR4CDR移植抗体発現ベクターの構築

ヒト化抗体発現用ベクターpKANTEX93 (Mol. Immunol., 37, 1035 (2000)) と実施例1の2項 (1) および (2) で得られたプラスミドpKM2160Gal0およびpKM2160LV0を用いて抗CCR4CDR移植抗体発現ベクターpKANTEX2160Gal0LV0を以下の様にして構築した。

実施例1の2項 (2) で得られたプラスミドpKM2160LV0の3μgを10単位の制限酵素BsiWI (New England Biolabs社製) を用いて55℃で1時間反応させた後、10単位の制限酵素EcoRI (宝酒造社製) を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約0.44kbのBsiWI-EcoRI断片を回収した。

40

【0105】

次に、ヒト化抗体発現用ベクターpKANTEX93の3μgを10単位の制限酵素BsiWI (New England Biolabs社製) を用いて55℃で1時間反応させた後、10単位の制限酵素EcoRI (宝酒造社製) を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約12.75kbのBsiWI-EcoRI断片を回収した。

次に、上記で得られたpKM2160LV0由来BsiWI-EcoRI断片とプラスミドpKANTEX93由来のBsiWI-EcoRI断片をDNA Ligation Kit Ver.2 (宝酒造社製) のSolution Iを用いて添付の説明書に従って連結した。この様にして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌DH5(株) (東洋紡績社製) を形質転換し、第6図に示したプラスミドpKANTEX2160LV0を得た。

50

次に、実施例1の2項(1)で得られたプラスミドpKM2160Gal0の3 μ gを10単位の制限酵素ApaI(宝酒造社製)を用いて37°Cで1時間反応させた後、更に10単位の制限酵素NotI(宝酒造社製)を用いて37°Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約0.47kbのApaI-NotI断片を回収した。

【0106】

次に、上記で得られたプラスミドpKANTEX2160LV0の3 μ gを10単位の制限酵素ApaI(宝酒造社製)を用いて37°Cで1時間反応させた後、更に10単位の制限酵素NotI(宝酒造社製)を用いて37°Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約0.45kbのApaI-NotI断片を回収した。

次に、上記で得られたpKM2160Gal0由来のApaI-NotI断片とプラスミドpKANTEX2160LV0由来のApaI-NotI断片をDNA Ligation Kit Ver.2(宝酒造社製)のSolution Iを用いて、添付の説明書に従って連結した。この様にして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌DH5 α 株(東洋紡績社製)を形質転換し、形質転換株のクローンより各プラスミドDNAを調製した。

【0107】

得られたプラスミドを用い、Big Dye Terminator Kit ver.2(Applied Biosystems社製)を用いて塩基配列の解析を行った結果、目的のDNAがクローニングされている第6図に示した発現ベクターpKANTEX2160Gal0LV0が得られたことを確認した。

また、HV0を含め、その他FRのアミノ酸残基に改変を加えたVHおよびVLについても同様の方法を用いて発現ベクターを作製した。

【0108】

具体的には、実施例1の2項(1)で作製したpKM2160Gal0、pKM2160Gal1、pKM2160Gal2、pKM2160Gal3、pKM2160HV0、pKM2160HV1、pKM2160HV2およびpKM2160HV3と、実施例1の2項(2)で作製したpKM2160LV0、pKM2160LV1、pKM2160LV2およびpKM2160LV3とをそれぞれ組み合わせて以下の発現ベクターであるpKM2160Gal0LV0、pKM2160Gal0LV1、pKM2160Gal0LV2、pKM2160Gal0LV3、pKM2160Gal1LV1、pKM2160Gal1LV3、pKM2160Gal2LV1、pKM2160Gal2LV3、pKM2160Gal3LV1、pKM2160Gal3LV3、pKM2160HV0LV0、pKM2160HV0LV1、pKM2160HV0LV2、pKM2160HV0LV3、pKM2160HV1LV0、pKM2160HV1LV1、pKM2160HV1LV2、pKM2160HV1LV3、pKM2160HV2LV0、pKM2160HV2LV3、pKM2160HV3LV0およびpKM2160HV3LV3の22種類の発現ベクターを作製した。

【0109】

実施例2 抗CCR4CDR移植抗体の動物細胞による発現

1. COS-7細胞(ATCC CRL1651)を用いた抗CCR4CDR移植抗体の一過性発現

(1) COS-7細胞での一過性発現

1 $\times 10^5$ 細胞/mlのCOS-7細胞を10%のFCSを含むDMEM培地(ギブコ社製)にて6ウェルプレート(岩城硝子社製)に2ml/ウェルずつ分注し、37°Cで一晩培養した。OPTI-MEM培地(ギブコ社製)100 μ lに対してFu-GENETM 6 Transfection Reagent(ロシュ社製)3 μ lを加え、さらに実施例1の2項(3)で得られた22種類の抗CCR4CDR移植抗体発現ベクター1 μ gをそれぞれ加えて室温で15分間放置し、DNA-リポソーム複合体を形成させた。該反応液を前述したCOS-7細胞にそれぞれ滴下し、よく混合した後に37°Cで培養した。培養後、72時間の時点で培養上清を回収し、培養上清中の抗CCR4CDR移植抗体の活性評価を行った。

【0110】

(2) 抗CCR4CDR移植抗体のヒトCCR4に対する反応性評価

得られた22種類の抗体の培養上清を以下の方法にて活性評価を行った。

参考例2で作製された形質転換体KM2760(FERM BP-7054)が生産する抗CCR4キメラ抗体KM2760が反応し得るヒトCCR4細胞外領域ペプチドとして化合物1(配列番号37)を選択した。ELISA法による活性測定に用いるため、以下の方法でBSA(Bovine Serum Albumin)(ナカライテスク社製)とのコンジュゲートを作製し、抗原として用いた。すなわち、10mgのBSAを含むPBS溶液900mlに、100mlの25mg/ml SMCC(4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサ-1-カルボキシリクアシッドN-ヒドロキシサクシンイミドエステル)(シグマ社製)-DM

SO溶液をvortex下で滴下し、30分間ゆっくりと攪拌した。25ml PBSで平衡化したNAP-10カラムなどのゲルろ過カラムに反応液1mlをアプライし、1.5mlのPBSで溶出させた溶出液をBSA-SMCC溶液とした (A_{280} 測定からBSA濃度を算出)。次に、0.5mgの化合物1に250ml PBSを加え、次いで250ml DMFを加えて完全に溶解させた後、前述のBSA-SMCC溶液 (BSA 1.25mg分) をvortex下で添加して3時間ゆっくり攪拌した。反応液をPBSに対して4℃、一晚透析し、最終濃度0.05%となるようにアジ化ナトリウムを添加して、0.22mmフィルターでろ過した後BSA-化合物1溶液とした。

【0111】

96穴のEIA用プレート (グライナー社) に、上述のように調製したコンジュゲートを0.05 μ g/ml、50 μ l/ウェルで分注し、4℃で一晩放置して吸着させた。PBSで洗浄後、1%BSAを含むPBS (以下、1%BSA-PBSと表記する) を100 μ l/ウェルで加え、室温で1時間反応させて残存する活性基をブロックした。各ウェルを0.05%Tween20を含むPBS (以下、Tween-PBSと表記する) で洗浄後、形質転換株の培養上清を50 μ l/ウェルで加え、室温で1時間反応させた。反応後、各ウェルをTween-PBSで洗浄後、1%BSA-PBSで6000倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒトIgG (γ) 抗体溶液 (American Qualex社製) を二次抗体溶液として、それぞれ50 μ l/ウェルで加え、室温で1時間反応させた。反応後、Tween-PBSで洗浄後、ABTS基質液 (2,2'-アジノ-ビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)アンモニウムの0.55gを1リットルの0.1Mクエン酸緩衝液 (pH4.2) に溶解し、使用直前に過酸化水素を1 μ l/mlで添加した溶液) を50 μ l/ウェルで加えて発色させ、20分後に5%SDS溶液を50 μ l/ウェル加えて反応を停止した。その後415nmの吸光度を測定した。

また、培養上清中のヒトIgG抗体の産生濃度を比較するためには抗原としてヤギ抗ヒトIgG (γ) 抗体 (American Qualex社製) をPBSで2000倍希釈したものを使用した。

その結果を第7図と第8図に示した。各ヒト型CCR4CDR移植抗体はヒト型キメラ抗体KM2760とほぼ同等の活性を示した。

【0112】

2. 抗CCR4CDR移植抗体の動物細胞を用いた安定発現

上記実施例1の2項 (3) で得られた抗CCR4CDR移植抗体発現ベクターを用いて抗CCR4CDR移植抗体の動物細胞での発現を以下の様に行った。

(1) ラットミエローマ細胞株YB2/0細胞 (ATCC CRL1581) での安定発現

各ヒト型CDR移植抗体発現プラスミドを制限酵素AatII (東洋紡績社製) で消化して直線状化した後、10 μ gを 4×10^6 細胞のラットミエローマ細胞株YB2/0細胞 (ATCC CRL1581) へエレクトロポレーション法 (Cytotechnology, 3, 133 (1990)) により導入後、40mlのH-SFM (GIBCO-BRL社製) 培地 (牛胎児血清 (FBS) を5%添加) に懸濁し、96ウェルマイクロタイタープレート (住友ベークライト社製) に200 μ l/ウェルずつ分注した。5%CO₂インキュベーター内で37℃で1~3日間培養した後、G418 (ナカライテスク社製) を1mg/mlになるように添加して1~2週間培養し、G418耐性の形質転換株を得た。

G418耐性を示す形質転換株のコロニーが、コンフルエントになったウェルより培養上清を回収し、上清中の抗CCR4ヒト型CDR移植抗体の抗原結合活性を実施例2の1項 (2) に示すELISA法により測定した。

【0113】

培養上清中に抗CCR4キメラ抗体の発現が認められたウェルの形質転換株については、dhfr遺伝子増幅系を利用して抗体発現量を増加させる目的で、G418を1mg/ml、dhfr遺伝子産物のジヒドロ葉酸還元酵素の阻害剤であるメソトレキセート (以下、MTXと表記する: Sigma社製) を50nM含むH-SFM培地に $1 \sim 2 \times 10^5$ 細胞/mlになる様に懸濁し、24ウェルプレート (Greiner社製) に1mlずつ分注した。5%CO₂インキュベーター内で37℃で1~2週間培養して、50nM MTX耐性を示す形質転換株を誘導した。形質転換株がウェルにコンフルエントになった時点で培養上清中の抗CCR4ヒト型CDR移植抗体の抗原結合活性を実施例2の1項 (2) に示すELISA法により測定した。培養上清中に抗CCR4ヒト型CDR移植抗体の発現が認められたウェルの形質転換株については、上記と同様の方法により、MTX濃度を100nM、200nMと順次上昇させ、最終的にG418を1mg/ml、MTXを200nMの濃度で含むH-SFM培地で増殖可能か

つ、抗CCR4ヒト型CDR移植抗体を高発現する形質転換株を得た。得られた形質転換株については、限界希釈法による単一細胞化（クローン化）を行い、抗CCR4ヒト型CDR移植抗体の発現の最も高い形質転換細胞クローンを得た。平成14年7月30日付で、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6）に、発現ベクターpKANTEX2160Gal1LV3を遺伝子導入して得た抗体生産細胞であるKM8760はFERM BP-8130として、また発現ベクターpKANTEX2160Gal2LV3を遺伝子導入して得た抗体生産細胞であるKM8759はFERM BP-8129としてそれぞれ国際寄託されている。

【0114】

(2) 抗CCR4CDR移植抗体の培養上清からの精製

G418耐性を示す形質転換株が出現し、コンフルエントになった時点でDaigo's GF21（和光純薬社製）を5%の濃度で含むH-SFM 300～1100mlのH-SFM培地に交換し、さらに3～5日間培養した。コンフルエントになった時点で培養上清を回収した。培養上清約300～1100mlよりProsep-A（ミリポア社製）カラムを用いて、添付の説明書に従い、抗CCR4CDR移植抗体を精製し、精製蛋白質を取得した。

【0115】

3. 精製抗CCR4CDR移植抗体の活性評価

Gal0LV0、Gal0LV1、Gal0LV3、Gal1LV1、Gal1LV3、Gal2LV1、Gal2LV3、Gal3LV1およびGal3LV3の発現ベクターをYB2/0へ導入して得られた抗体生産細胞由来の抗CCR4CDR移植抗体（以下、それぞれ単にGal0LV0、Gal0LV1、Gal0LV3、Gal1LV1、Gal1LV3、Gal2LV1、Gal2LV3、Gal3LV1およびGal3LV3と称する）を用いて活性評価を行った。

【0116】

(1) 抗CCR4CDR移植抗体のヒトCCR4に対する結合活性の測定（ELISA法）

実施例2の1項（2）に記載の方法と同様に行った。その結果を第9図に示した。どの抗CCR4CDR移植抗体もヒト型キメラ抗体KM2760とほぼ同程度の活性を示した。

【0117】

(2) 抗CCR4CDR移植抗体のヒトCCR4高発現細胞との反応性（蛍光抗体法）

参考例3で得られたCCR4高発現細胞であるCCR4/EL-4細胞を 2×10^5 個以上、96ウェルプレートに分注した。各精製抗体をFACS用緩衝液（1%BSA-PBS、0.02%EDTA、0.05%Na₃）にて10 μ g/mlに、さらに非特異的な染色を防ぐためにヒトイムノグロブリン（ウェルファイド社製）を3.75mg/mlにそれぞれ希釈した抗体溶液を100 μ l/ウェルとして加え、水中で30分間反応させた。陰性対照としては、10 μ g/mlの抗ヒトIL-5受容体 α 鎖抗体（W097/10354）を用いた。FACS用緩衝液にて200 μ l/ウェルで2回洗浄後、PE標識抗ヒトIgG抗体（コールター社製）を100倍希釈したものを50 μ l/ウェル加えた。遮光し水中で30分間反応後、FACS用緩衝液200 μ l/ウェルで3回洗浄した後、反応物を500 μ l FACS用緩衝液に懸濁して、フローサイトメーターで蛍光強度を測定した。その結果を第10図に示した。どの抗CCR4CDR移植抗体もヒト型キメラ抗体KM2760とほぼ同程度の活性を示した。

【0118】

(3) 抗CCR4CDR移植抗体のヒトCCR4に対する結合活性の測定（BIAcore法）

さらに詳細な結合活性を測定するために、精製した各種抗体の結合活性をBIAcore2000（BIACORE社製）を用いて以下のように測定した。なお、試料の希釈及び測定中の緩衝液としてはHBS-EP（BIACORE社製）を使用した。まずセンサーチップSA（BIACORE社製）にビオチン化したCCR4部分ペプチドである化合物1の0.05 μ g/mlの溶液5 μ lを5 μ l/分の流速で添加し、センサーチップに固定化した。

作製したビオチン化した化合物1の固定化センサーチップに、精製した抗体の4 μ g/mlの溶液の20 μ lを5 μ l/分の流速で添加し、添加終了後、4分間にわたり解離反応をモニターした後、10mMのHClの5 μ lを2回添加してセンサーチップ表面を再生した。こうして化合物1に対する結合反応曲線（センサーグラム）を得た。

【0119】

その結果を第11図に示した。縦軸は、レゾナンス（共鳴）ユニット（RU）を表し、センサーチップ上の質量変化を意味する。例えば、1000RUは蛋白質の約1ng/mm²の質量変化に

10

20

30

40

50

相当する。KM2760は、化合物1に対して時間依存的な結合活性を示し、その結合は、解離反応においてほとんど解離が認められないことから、極めて安定、かつ、高い結合活性を有することが示された。一方、各種抗CCR4CDR移植抗体は、ヒト型キメラ抗体KM2760とほぼ同程度の解離反応を示したが、CCR4部分ペプチドである化合物1への結合反応において若干の活性低下が認められた。CDRのみを移植した抗CCR4CDR移植抗体Gal0LV0は、最も低い結合活性を示し、FRのアミノ酸残基の改変により、結合活性は上昇した。以上の結果は、マウス抗体KM2160のCDRを適切なヒト抗体のFRに移植することにより、マウス抗体の抗原結合活性および結合特異性を維持した抗CCR4CDR移植抗体を作製可能であること、さらに、抗体V領域の三次元構造等を基に結合活性に重要なFRのアミノ酸残基を同定し、それらをCDRとともに移植することで、より結合活性の高い抗CCR4CDR移植抗体を作製できることを示したものである。本実施例で作製した抗CCR4CDR移植抗体は、CCR4に対する高い結合活性を有し、かつ、ヒトにおいてマウス抗体、さらには、ヒト型キメラ抗体よりも免疫原性が低下し、高い安全性と高い治療効果を示すことが期待される。

10

【0120】

4. 抗CCR4CDR移植抗体のin vitro細胞傷害活性 (ADCC活性)

上記実施例2の2項(2)で得られた精製抗CCR4CDR移植抗体のin vitro細胞傷害活性を評価するため、以下に示す方法に従い、ADCC活性を測定した。

(1) 標的細胞溶液の調製

参考例3で得られたヒトCCR4高発現細胞CCR4/EL-4を0.5mg/mlのG418を含む10%のFCSを含むRPMI1640培地 (GIBCO社製) で培養し、 1×10^6 細胞/0.5mlとなる様に調製し、放射性物質であるクロム酸ナトリウム ($\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$) (第一化学薬品社製) を1.85MBq当量加えて37℃で1.5時間反応させ、細胞を放射標識した。反応後、RPMI1640培地で懸濁及び遠心分離操作により3回洗浄し、培地に再懸濁し、4℃で30分間水中に放置して放射性物質を自然解離させた。遠心分離後、10%のFCSを含むRPMI1640培地を5ml加え、 2×10^5 細胞/mlに調製し、標的細胞溶液とした。

20

【0121】

(2) エフェクター細胞溶液の調製

ヘパリンナトリウム注射液 (武田薬品社製) を200単位 (200 μl) 入れた注射筒を用いて、健康人ヒト末梢血60mlを採取した。その全量を等量の生理食塩液 (大塚製薬社製) にて2倍に希釈し、120mlとした。15ml容量の遠心管 (住友ベークライト社製) 12本にリンフォプレップ (NYCOMED社製) を5mlずつ分注し、その上から希釈した末梢血を10mlずつ重層し、 $800 \times g$ 、20分間、室温で遠心分離した。血漿層とリンフォプレップ層の間にあるPBMC画分を全ての遠心管より採取して1%のFCSを含むRPMI1640培地 (以下1%FCS-RPMIと称す) に懸濁し、 $400 \times g$ 、5分間、4℃で2回遠心洗浄して 5×10^6 細胞/mlの濃度で再懸濁し、エフェクター細胞とした。

30

【0122】

(3) ADCC活性の測定

96ウェルU字底プレート (Falcon社製) の各ウェルに上記 (1) で調製した標的細胞溶液の50 μl (1×10^4 細胞/ウェル) を分注した。次いで (2) で調製したエフェクター細胞溶液を100 μl (5×10^5 細胞/ウェル、エフェクター細胞と標的細胞の比は50:1となる) 添加した。更に、各種抗CCR4CDR移植抗体を各最終濃度0.1ng/ml~0.1 μg /mlとなる様に加え、37℃で4時間反応させた。反応後、プレートを遠心分離し、上清の ^{51}Cr 量を γ -カウンターにて測定した。自然解離 ^{51}Cr 量は、エフェクター細胞溶液、抗体溶液の代わりに培地のみを用いて上記と同様の操作を行い、上清の ^{51}Cr 量を測定することにより求めた。全解離 ^{51}Cr 量は、抗体溶液の代わりに培地のみを、エフェクター細胞溶液の代わりに1規定塩酸を添加し、上記と同様の操作を行い、上清の ^{51}Cr 量を測定することにより求めた。ADCC活性は下式により求めた。

40

【0123】

【数1】

$$\text{ADCC活性 (\%)} = \frac{\text{検体上清中の}^{51}\text{Cr量} - \text{自然解離}^{51}\text{Cr量}}{\text{全解離}^{51}\text{Cr量} - \text{自然解離}^{51}\text{Cr量}} \times 100$$

【0124】

その結果を第12図に示した。第12図に示した様に、抗CCR4CDR移植抗体は抗体濃度依存的に強い細胞傷害活性を示した。

10

【0125】

5. ヒトPBMCからのサイトカイン産生抑制効果

抗CCR4CDR移植抗体であるGal11LV3、キメラ抗体であるKM2760について、サイトカイン産生抑制効果を検討した。陰性対照として抗IL-5R抗体を用いた。

実施例2、4項(2)と同様にしてPBMCを分離し、96ウェルU字底プレートに 1×10^6 細胞/ウェルで分注し、さらに評価抗体を最終濃度 $1 \mu\text{g/ml}$ となるように添加して、合計 $200 \mu\text{l}$ /ウェルとした。 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 気流下、24時間共培養することでADCC活性を誘導した。培養後、上清を $100 \mu\text{l}$ 除去し、代わりに 100ng/ml のPMA（ホルボール・ミリスレート・アセテート）と $2 \mu\text{g/ml}$ のイオノマイシン（SIGMA社製）を含んだ培地 $100 \mu\text{l}$ を加え、最終濃度をPMAが 50ng/ml 、イオノマイシンが $1 \mu\text{g/ml}$ とし、細胞を刺激してサイトカイン産生を誘導させた。各刺激剤導入後、24時間培養した後、培養上清を回収してサイトカイン測定キット（バイオソース社製）にてIL-4、IL-13、インターフェロン(IFN)- γ を測定した。産生抑制率は、抗体非添加の場合の各サイトカイン産生量を、抑制率0%として算出し、結果を第13図に示した。第13図に示すように、抗CCR4CDR移植抗体のGal11LV3抗体添加群では、キメラ抗体のKM2760と同様に、著明にTh2サイトカインであるIL-4、IL-13の産生を抑制し、Th1サイトカインであるIFN- γ にはほぼ影響しなかった。

20

以上の結果は、各抗CCR4CDR移植抗体が効率よくヒトのエフェクター細胞を活性化してCR4を発現したTh2細胞を減少もしくは除去でき、その結果Th2細胞からのTh2サイトカイン産生抑制効果を惹起でき、気管支喘息やアトピー性皮膚炎などのヒトのTh2介在性免疫疾患の診断もしくは治療に有用であることを示している。

30

【0126】

6. ヒト血小板に対する反応性の解析

(1) ヒト血小板の分離

ヒト健常人より採取した血液に3.2%クエン酸ナトリウムを1/10量添加し、よく混合した。該血液を5mlずつ15mlチューブ（グライナー社製）に分注し、 $90 \times g$ 、10分間、室温で遠心分離を行った。上清を採取し、更に $1950 \times g$ 、10分間、室温で遠心分離を行った。上清を除去し、ペレットをFACS用緩衝液に懸濁した後、 $1190 \times g$ 、5分間、室温で遠心分離を行い、ペレットを洗浄した。再度FACS用緩衝液にて懸濁し、同様に遠心操作を行った後、FACS用緩衝液にてペレット状の血小板を約 1×10^7 個/mlの濃度に調製した。

【0127】

40

(2) 血小板の染色

上記6項(1)で得られた血小板懸濁液 $100 \mu\text{l}$ に、実施例2の3で得られた精製抗CCR4ヒト型CDR移植抗体をそれぞれ $10 \mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ になるように添加し、室温、暗所で30分間反応させた。比較対照として抗CCR4ヒト型キメラ抗体であるKM2760、抗CCR4マウス抗体である1G1抗体（PharMingen社製）をそれぞれ同濃度で血小板懸濁液 100ml に反応させた。反応後、FACS用緩衝液 2ml をそれぞれの 15ml チューブへ添加し攪拌後、 $840 \times g$ 、5分間、 4°C で遠心分離を行い、洗浄した。上清を除去後、再度同様の操作を行った。各ヒト型CDR移植抗体とKM2760を反応させたサンプル入りチューブには、さらにFACS用緩衝液で50倍に希釈したPE標識抗ヒトIgG抗体（Coulter社製）をそれぞれ $20 \mu\text{l}$ 添加し、室温、暗所で30分間反応させた。1G1抗体を反応させたサンプル入りチューブについては、さらに50倍希釈したPE標

50

識抗マウスIgG抗体 (DAKO社製) をも20 μ l 添加し、室温、暗所で30分間反応させた。

【0128】

反応後、FACS用緩衝液をそれぞれ2ml 添加して攪拌した後、840 $\times$ g、5分間、4 $^{\circ}$ Cで遠心分離し、洗浄した。上清を除去後、再度同様の操作を行った。FACS用緩衝液で500 μ l に懸濁した後、フローサイトメーターEPICS XL-MCL (ベックマン・コールタ社製) で蛍光強度を測定した。

その結果を第14図に示した。比較対照である1G1抗体は血小板に反応性を示したが、いずれの抗CCR4ヒト型CDR移植抗体も抗CCR4ヒト型キメラ抗体KM2760と同様、ヒト血小板に対して特異的な反応性を示さなかった。

【0129】

10

参考例1

マウス抗CCR4モノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ細胞の作製：

以下の手順に従い、マウス抗CCR4モノクローナル抗体、KM2160 (Int. Immunol., 11, 81 (1999)) を産生するハイブリドーマ細胞を作製した。

(1) 抗原の調製

ヒトCCR4 (以下、hCCR4と表記する) 蛋白質のアミノ酸配列 (配列番号48) をGenetyx Macを用いて解析し、親水性の高い部分、N末端、C末端のなかから抗原として適当と考えられる部分配列として、化合物2 (配列番号36) を選択した。

【0130】

(2) 免疫原の調製

20

参考例1の (1) のhCCR4部分ペプチドは、免疫原性を高める目的で以下の方法でKLH (カルビオケム社) とのコンジュゲートを作製し、免疫原とした。すなわち、KLHをPBSに溶解して10mg/mlに調整し、1/10容量の25mg/ml MBS (ナカライテスク社) を滴下して、30分間攪拌反応させた。あらかじめPBSで平衡化したセファデックスG-25カラムなどのゲルろ過カラムでフリーのMBSを除いて得られたKLH-MB 2.5mgを0.1Mリン酸ナトリウムバッファー (pH7.0) に溶解したペプチド1mgと混合し、室温で3時間、攪拌反応させた。反応後、PBSで透析した。

【0131】

(3) 動物の免疫と抗体産生細胞の調製

参考例1の (2) で調製したペプチド-KLHコンジュゲート100 μ gをアルミニウムゲル2mg および百日咳ワクチン (千葉県血清研究所製) 1×10^9 細胞とともに5週令雌マウス (Balb/c) に投与し、2週間後より100 μ gのコンジュゲートを1週間に1回、計4回投与した。眼底静脈叢より採血し、その血清抗体価を以下に示す酵素免疫測定法で調べ、十分な抗体価を示したマウスから最終免疫3日後に脾臓を摘出した。最終投与後3日目のマウスより脾臓を摘出し、MEM培地 (日水製薬社製) 中で裁断し、ピンセットを用いて解した後、遠心分離 (1200rpm、5分間) して上清を除去後、3mlのトリス-塩化アンモニウム緩衝液 (pH7.65) で1~2分間処理し、赤血球を除いた。更に、MEM培地で3回洗浄した後、細胞融合に供した。

30

(4) マウス骨髓腫細胞の調製

8-アザグアニン耐性マウス骨髓腫細胞株P3X63Ag8U.1 (ATCC CRL1597) (以下、P3-U1と表記する) を培養し、細胞融合における親株として用いた。

40

【0132】

(5) ハイブリドーマ細胞の作製

参考例1の (3) および (4) で得られた脾細胞と骨髓腫細胞を10:1になる様に混合し、遠心分離 (1200rpm、5分間) して上清を除去後、沈殿した細胞群に37 $^{\circ}$ Cの条件下でポリエチレングリコール溶液 (2gのポリエチレングリコール-1000、2mlのMEM培地および0.7mlのDMSOからなる溶液) を 10^8 個の脾細胞あたり0.5ml加え、よく懸濁した。更に、1~2分間毎にMEM培地を1~2mlずつ数回加え、最終的にMEM培地で全量を50mlとした。遠心分離 (900rpm、5分間) して上清を除去後、100mlのHAT培地に懸濁し、96ウェルマイクロタイタープレート (住友ベークライト社製) に100 μ l/ウェルずつ分注して5%CO₂インキュベーター

50

内で37℃、10～14日間培養した。融合細胞の増殖が見られたウェルについて、培養上清中hCCR4部分ペプチド（化合物2）に対する結合活性をELISA法（Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14 (1988)、Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press Limited (1996)等）により測定した。活性の認められたウェルについては、培地をHT培地に変えて1回、更に、培地を正常培地に変えて1回、の計2回の限界希釈法によるクローン化を行った。この様にして、マウス抗体KM2160を生産するハイブリドーマ細胞KM2160を得た。KM2160はhCCR4部分ペプチド（化合物2）に特異的に反応した。

【0133】

参考例2

10

抗CCR4キメラ抗体の作製

1. 抗CCR4マウス抗体のV領域をコードするcDNAの単離、解析：

(1) 抗CCR4マウス抗体生産ハイブリドーマ細胞からのmRNAの調製

参考例1に記載されたハイブリドーマ細胞KM2160よりmRNAを回収した。mRNAの調製キットであるFast Track mRNA Isolation Kit (Invitrogen社製) を用いて、添付の使用説明書に従い、ハイブリドーマ細胞KM2160の 8×10^7 細胞よりmRNAを約48 μ g調製した。

【0134】

(2) 抗CCR4マウス抗体のH鎖およびL鎖cDNAライブラリーの作製

参考例2の1項 (1) で取得したKM2160のmRNAの5 μ gから、cDNA Synthesis Kit (Amersham Pharmacia Biotech社製) を用いて、添付の使用説明書に従い、両端にEcoRI-NotIアダプターを有するcDNAを合成した。作製したcDNAを20 μ lの滅菌水に溶解後、アガロースゲル電気泳動にて分画し、IgG型抗体のH鎖に対応する約1.5kbのcDNA断片と κ 型のL鎖に対応する約1.0 kbのcDNA断片をQIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製) を用いてそれぞれ回収した。次に、 λ ZAPII Predigested EcoRI/CIAAP-Treated Vector Kit (Stratagene社製) を用いて、各々の約1.5kbのcDNA断片0.1 μ gおよび約1.0kbのcDNA断片0.1 μ gと、制限酵素EcoRIで消化後、Calf Intestine Alkaline Phosphataseで末端を脱リン酸化した λ ZAPIIベクター1 μ gを、添付の使用説明書に従い、連結した。連結後の各々の反応液のうち2.5 μ lをGigapackIII Gold Packaging Extract (Stratagene社製) を用いて、添付の使用説明書に従い、 λ ファージにパッケージングした後、適量量を大腸菌株XL1-Blue (Biot techniques, 5, 376 (1987)) に感染させて、KM2160のH鎖cDNAライブラリーとして 9.3×10^4 個、L鎖cDNAライブラリーとして 7.4×10^4 個のファージクローンを取得した。次に各々のファージを、添付の使用説明書に従って、ナイロンメンブレンフィルターHybond-N+ (Amersham Pharmacia Biotech社製) 上に固定した。

20

30

【0135】

(3) 抗CCR4マウス抗体のH鎖およびL鎖cDNAのクローニング

参考例2の1項 (2) で作製したKM2160のH鎖cDNAライブラリーおよびL鎖cDNAライブラリーのナイロンメンブレンフィルターを、ECL Direct Nucleic Acid Labelling and Detection System (Amersham Pharmacia Biotech社製) を用いて、添付の使用説明書に従い、マウス抗体のC領域のcDNA (H鎖はマウスC γ 1cDNAのBamHI-EcoRI断片 (EMBO J., 3, 2047 (1984))、L鎖はマウスC κ cDNAのHpaI-EcoRI断片 (Cell, 22, 197 (1980)) をプローブとして検出し、プローブに強く結合したファージクローンをH鎖、L鎖各10クローン取得した。次に、 λ ZAPII Cloning Kit (Stratagene社製) の使用説明書に従い、*in vivo* excision法により各ファージクローンをプラスミドに変換した。こうして得られた各プラスミドに含まれるcDNAの塩基配列を、BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (PE Biosystems社製) を用いて、同社のDNAシーケンサABI PRISM 377により解析した。その結果、cDNAの5'末端に開始コドンと推定されるATG配列が存在する完全長の機能的なH鎖cDNAを含むプラスミドpKM2160H4およびL鎖cDNAを含むプラスミドpKM2160L6を得た。

40

【0136】

(4) 抗CCR4マウス抗体のV領域のアミノ酸配列の解析

プラスミドpKM2160H4に含まれていたH鎖V領域の全塩基配列を配列番号61に、それから

50

推定されたH鎖V領域の全アミノ酸配列を配列番号62に、プラスミドpKM2160L6に含まれていたL鎖V領域の全塩基配列を配列番号63に、それから推定されたL鎖V領域の全アミノ酸配列を配列番号64にそれぞれ示す。既知のマウス抗体の配列データ (Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991)) との比較および精製した抗CCR4マウス抗体KM2160のH鎖およびL鎖のN末端アミノ酸配列をプロテインシーケンサー (島津製作所社製: PPSQ-10) を用いて解析した結果との比較から、単離した各々のcDNAは分泌シグナル配列を含む抗CCR4マウス抗体KM2160をコードする完全長cDNAであり、H鎖については配列番号15に示したアミノ酸配列の1から19番目が、L鎖については配列番号25に示したアミノ酸配列の1から19番目が分泌シグナル配列であることが明らかとなった。

10

【0137】

次に、抗CCR4マウス抗体KM2160のH鎖およびL鎖のV領域のアミノ酸配列の新規性について検討した。配列解析システムとしてGCG Package (version 9.1, Genetics Computer Group社製) を用い、既存の蛋白質のアミノ酸配列データベースをBLASTP法 (Nucleic Acids Res., 25, 3389 (1997)) により検索した。その結果、H鎖、L鎖ともに完全に一致する配列は認められず、抗CCR4マウス抗体KM2160のH鎖V領域およびL鎖V領域は新規なアミノ酸配列であることが確認された。

また、抗CCR4マウス抗体KM2160のH鎖V領域およびL鎖V領域のCDRを、既知の抗体のアミノ酸配列と比較することにより同定した。抗CCR4マウス抗体KM2160のH鎖のV領域のCDR1、CDR2およびCDR3のアミノ酸配列を配列番号1、2および3に、L鎖のV領域のCDR1、CDR2およびCDR3のアミノ酸配列を配列番号5、6および7にそれぞれ示した。

20

【0138】

2. 抗CCR4キメラ抗体の動物細胞を用いた安定発現

(1) 抗CCR4キメラ抗体発現ベクターpKANTEX2160の構築

WO97/10354に記載のヒトIgG1、 κ 型の抗体を発現できるヒト化抗体発現用ベクターpKANTEX93と参考例2の1項(3)で得られたプラスミドpKM2160H4およびpKM2160L6を用いて抗CCR4キメラ抗体発現ベクターpKANTEX2160を以下の様にして構築した。

KM2160のH鎖V領域cDNAをPCR法によって得るために配列番号65と66に示した塩基配列を有する合成DNAを、L鎖V領域cDNAを得るために配列番号67と68に示した塩基配列を有する合成DNAを設計した。それぞれの合成DNAは5'末端にpKANTEX93へクローニングするための制限酵素認識配列を含んでおり、DNAの合成はジェンセット社に委託した。参考例2の1項(3)で得られたプラスミドpKM2160H4の20ngを50 μ lのKOD DNA Polymerase添付PCR Buffer #1 (東洋紡績社製)、0.2mM dNTPs、1 mM塩化マグネシウム、0.5 μ Mの配列番号11と12に示した塩基配列を有する合成DNAを含む緩衝液に添加し、DNAサーマルサイクラーGeneAmp PCR System 9600 (PERKIN ELMER社製) を用いて、94°Cにて3分間加熱した後、2.5単位のKOD DNA Polymerase (東洋紡績社製) を添加し、94°Cにて30秒間、58°Cにて30秒間、74°Cにて1分間のサイクルを25サイクル行った。同様に、参考例2の1項(3)で得られたプラスミドpKM2160L6の20ngを50 μ lのKOD DNA Polymerase添付PCR Buffer #1 (東洋紡績社製)、0.2mM dNTPs、1mM塩化マグネシウム、0.5 μ Mの配列番号67と68に示した塩基配列を有する合成DNAを含む緩衝液に添加し、上記の方法でPCR反応を行なった。該反応液10 μ lをアガロースゲル電気泳動した後、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製) を用いて、約0.46 kbのH鎖V領域PCR産物、約0.43 kbのL鎖V領域PCR産物をそれぞれ回収した。

30

40

【0139】

次に、プラスミドpBluescript SK(-) (Stratagene社製) を制限酵素SmaI (宝酒造社製) で消化して得られたDNA0.1 μ gと、上記で得られたそれぞれのPCR産物約0.1 μ gを滅菌水に加えて7.5 μ lとし、TAKARA DNA Ligation Kit Ver.2のsolution I (宝酒造社製) 7.5 μ l、制限酵素SmaI0.3 μ lを加えて22°Cで一晩反応させた。この様にして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌DH5 α 株 (東洋紡績社製) を形質転換した。形質転換株のクローンより各プラスミドDNAを調製し、BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (PE Biosystems社製) を用いて添付の説明書に従って反応後、同社のDNA

50

シーケンサABI PRISM 377により塩基配列を解析した。こうして目的の塩基配列を有する第15図に示したプラスミドpKM2160VH41およびpKM2160VL61を得た。

【0140】

次にヒト化抗体発現用ベクターpKANTEX93と上記で得られたpKM2160VH41の3 μ gをそれぞれ30 μ lの10mMトリス-塩酸 (pH7.5)、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTTからなる緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素ApaI (宝酒造社製) を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10 μ lの50mMトリス-塩酸 (pH 7.5)、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム、1mM DTT、100 μ g/ml BSAおよび0.01%トライトンX-100からなる緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素NotI (宝酒造社製) を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、pKANTEX93の約12.75 kb、pKM2160VH41の約0.44kbのApaI-NotI断片をそれぞれ回収した。得られた2種類の断片をTAKARA DNA Ligation Kit Ver.2を用いて添付の説明書に従って連結し、得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌DH5 α 株 (東洋紡績社製) を形質転換した。形質転換株のクローンより各プラスミドDNA各プラスミドDNAを調製して制限酵素処理により確認し、目的の約0.44kbのApaI-NotI断片が挿入された第16図に示したプラスミドpKANTEX2160Hを得た。

【0141】

次に上記で得られたpKANTEX2160HとpKM2160VL61の3 μ gを50mMトリス-塩酸 (pH7.5)、10mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム、1mM DTTおよび100 μ g/ml BSAからなる緩衝液に加え全量を30 μ lとし、10単位の制限酵素BsiWI (New England Biolabs社製) を加えて55°Cで1時間反応させた後、更に制限酵素EcoRI (宝酒造社製) を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、pKANTEX2160Hの約13.20kb、pKM2160VL61の約0.41kbのEcoRI-BsiWI断片をそれぞれ回収した。得られた2種類の断片をTAKARA DNA Ligation Kit Ver.2を用いて添付の説明書に従って連結し、得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌DH5 (株) (東洋紡績社製) を形質転換した。形質転換株のクローンより各プラスミドDNAを調製して制限酵素処理により確認し、目的の約0.41 kbのEcoRI-BsiWI断片が挿入された第17図に示したプラスミドpKANTEX2160を得た。該プラスミドに関して、BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (PE Biosystems社製) を用いて添付の説明書に従って反応後、同社のDNAシーケンサABI PRISM 377により塩基配列を解析した結果、目的のKM2160H鎖およびL鎖V領域cDNAがクローニングされたプラスミドが得られたことを確認した。

【0142】

(2) 抗CCR4キメラ抗体の動物細胞を用いた安定発現

参考例2の2項 (1) で得られた抗CCR4キメラ抗体発現ベクターpKANTEX2160を用いて抗CCR4キメラ抗体の動物細胞での発現を以下の様に行った。

プラスミドpKANTEX2160を制限酵素AatII (東洋紡績社製) で消化して直線状化した後、10 μ gを4 $\times$ 10⁶細胞のラットミエローマ細胞株YB2/0細胞 (ATCC CRL1662) ヘエレクトロポレーション法 (Cytotechnology, 3, 133 (1990)) により導入後、40mlのH-SFM (GIBCO-BRL社製) 培地 (FCSを5%添加) に懸濁し、96ウェルマイクロタイタープレート (住友ベークライト社製) に200 μ l/ウェルずつ分注した。5%CO₂インキュベーター内で37°C、24時間培養した後、G418を1mg/mlになる様に添加して1~2週間培養した。G418耐性を示す形質転換株のコロニーが出現し、コンフルエントになったウェルより培養上清を回収し、上清中の抗CCR4キメラ抗体の抗原結合活性を参考例2の2項 (3) に示すELISA法 (二次抗体としてペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒトIgG(γ)抗体を使用) により測定した。

【0143】

培養上清中に抗CCR4キメラ抗体の発現が認められたウェルの形質転換株については、dhfr遺伝子増幅系を利用して抗体発現量を増加させる目的で、G418を1mg/ml、dhfr遺伝子産物のジヒドロ葉酸還元酵素の阻害剤であるメソトレキセート (以下、MTXと表記する: Sigma社製) を50nM含むH-SFM培地に1~2 $\times$ 10⁵細胞/mlになる様に懸濁し、24ウェルプレート (Greiner社製) に1mlずつ分注した。5%CO₂インキュベーター内で37°Cで1~2週間培養して、50nM MTX耐性を示す形質転換株を誘導した。形質転換株がウェルにコンフルエントに

なった時点で培養上清中の抗CCR4キメラ抗体の抗原結合活性を実施例2の2項 (3) に示すELISA法により測定した。培養上清中に抗CCR4キメラ抗体の発現が認められたウェルの形質転換株については、上記と同様の方法により、MTX濃度を100nM、200nMと順次上昇させ、最終的にG418を1mg/ml、MTXを200nMの濃度で含むH-SFM培地で増殖可能かつ、抗CCR4キメラ抗体を高発現する形質転換株を得た。得られた形質転換株については、2回の限界希釈法による単一細胞化（クローン化）を行い、抗CCR4キメラ抗体の発現の最も高い形質転換細胞クローンをKM2760と命名した。KM2760の抗CCR4キメラ抗体の発現量は約5 µg/10⁶細胞/24時間であった。また、KM2760の抗体H鎖C領域はヒトIgG1サブクラスである。なお、KM2760は平成12年2月24日付で、通商産業省 工業技術院生命工学工業技術研究所（現名称：独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター）（日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号（現住所：日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6））にFERM BP-7054として国際寄託されている。

10

【0144】

参考例3

hCCR4高発現細胞の確立：

(1) 動物細胞用発現ベクターCAG-pcDNA3の構築

動物細胞用発現ベクターpcDNA3（INVITROGEN社）のプロモーター領域をサイトメガロウイルス（CMV）からCAG（AG（モディファイド チキン β アクチン）プロモーター ウィズCMV-IEエンハンサー）に変更した発現ベクター（CAG-pcDNA3）を作製し、CCR4遺伝子を組み込むことで発現ベクターを以下のように構築した。

20

5 µgのpcDNA3を制限酵素NruI（宝酒造社製）で37℃、1時間反応させた後、エタノール沈殿によりDNA断片を回収した。次に制限酵素HindIII（宝酒造社製）で37℃、1時間反応させ、アガロースゲル電気泳動にて分画後、CMVプロモーター領域を含まない約5.8kbのDNA断片を回収した。3 µgのCAGプロモーター（Nuc. Acid. Res., 23, 3816 (1995)）領域を有するプラスミドCAG-pBluescript II KS (+) をSalI（宝酒造社製）で37℃、1時間反応後、エタノール沈殿によりDNA断片を回収した。DNA Blunting Kit（宝酒造社製）にて平滑末端化し、さらにHindIIIで37℃、1時間反応してアガロースゲル電気泳動にて分画し、CAGプロモーター領域を含む約1.8 kbのDNA断片を回収した。それぞれ回収したDNA断片をDNA Ligation Kit（宝酒造社製）を用いてligationし、得られた組換えプラスミドDNAを用いて大腸菌DH5（株）を形質転換し、プラスミドCAG-pcDNA3を得た。

30

【0145】

(2) hCCR4発現ベクターの構築

参考例3の (1) で得られたCAG-pcDNA3とhCCR4 DNAの組込まれたpcDNA3（CCR4/pcDNA3）とを用いて以下のようにhCCR4発現ベクターを構築した。CAG-pcDNA3、CCR4/pcDNA3共にHindIIIで37℃、1時間反応させ、エタノール沈殿によりDNA断片を回収した。次にBglII（宝酒造社製）で37℃、1時間反応させ、アガロースゲル電気泳動にて分画し、CAGプロモーター領域を含む約2.0kbのDNA断片とhCCR4遺伝子領域を含む約5.5kbのDNA断片を回収した。以下、両DNA断片を参考例3の (1) と同様の方法を用いて、プラスミドCAG-CCR4/pcDNA3を得た。

【0146】

40

(3) 動物細胞におけるhCCR4の発現

動物細胞へのプラスミドの導入は、参考例2の2項 (2) と同様にエレクトロポレーション法にて行った。EL-4細胞（ATCC TIB-39）をPBS（-）（GIBCO BRL社製）にて1×10⁷個/500 µlに懸濁し、参考例3の (2) で得られたCAG-CCR4/pcDNA3を10 µg加えて氷中で10分間放置した後、専用キューベット（バイオラッド社製）に入れ、260V、500 µFDで遺伝子導入を行った。さらに10分間氷中にて放置した後、10%FCS-RPMI培地200mlに懸濁し、96ウェル細胞培養用プレートに200 µl/ウェルずつ分注した。24時間後に培養上清を100 µl/ウェル除去し、1mg/mlのG418を含む10%FCS-RPMI培地を100 µl/ウェルずつ分注し、最終濃度0.5mg/mlとした。2週間後、数十株のシングルクローンを選択して拡大培養した。

【0147】

50

(4) hCCR4高発現細胞の選択

参考例1の(5)で作製されたハイブリドーマ細胞KM2160が生産するマウス抗体KM2160を用いて、蛍光抗体法で選択した。選択した数十株の遺伝子導入細胞各 2×10^5 個を96ウェルU字プレートに分注した。公知の方法(酵素抗体法:学際企画刊(1985))でビオチン標識したKM2160をFACS用緩衝液(1%BSA-PBS、0.02%EDTA、0.05%NaN₃、pH7.4)で5μg/mlに、また非特異的な染色を防ぐために、ヒトIgG(ウェルファイド社製)を3.75mg/mlにそれぞれ希釈した抗体溶液を200μl/ウェルとして加え、氷中で30分間反応させた。陰性対象としては、ビオチン化抗IL-5R抗体(WO97/10354)を同濃度で用いた。緩衝液にて200μl/ウェルで2回洗浄後、ストレプトアビジン-PE(日本ベクトン・ディッキンソン社製)を20μl/ウェル加えた。遮光し氷中で30分間反応後、200μl/ウェルで3回洗浄し、最終的に500μlに懸濁して、フローサイトメーターで蛍光強度を測定し、最も強い蛍光強度の株を1種類選択した。このhCCR4高発現細胞をCCR4/EL-4とする。

10

【産業上の利用可能性】

【0148】

本発明により、ヒトCCR4に特異的に結合し、CCR4に対する新規なCDRを含む、遺伝子組換え抗体およびその抗体断片が提供される。本発明の抗体はCCR4関連疾患の診断あるいは治療に有用である。とくに免疫細胞染色におけるヒトTh2細胞等のCCR4発現細胞の免疫学的検出、気管支喘息、アトピー性皮膚炎を始めとするすべてのTh2介在性免疫疾患等のCCR4関連疾患や異常なTh2細胞等のCCR4発現細胞のバランスにより病態が進行する疾患、白血病のような血液癌を始めとする癌疾患の診断あるいは治療に有用である。

20

【配列フリーテキスト】

【0149】

配列番号4—人工配列の説明:合成ペプチド
 配列番号8—人工配列の説明:合成ペプチド
 配列番号9—人工配列の説明:合成ペプチド
 配列番号10—人工配列の説明:合成ペプチド
 配列番号11—人工配列の説明:合成ペプチド
 配列番号12—人工配列の説明:合成ペプチド
 配列番号13—人工配列の説明:合成ペプチド
 配列番号14—人工配列の説明:合成ペプチド
 配列番号16—人工配列の説明:合成DNA
 配列番号17—人工配列の説明:合成DNA
 配列番号18—人工配列の説明:合成DNA
 配列番号19—人工配列の説明:合成DNA
 配列番号20—人工配列の説明:合成DNA
 配列番号21—人工配列の説明:合成DNA
 配列番号22—人工配列の説明:合成DNA
 配列番号23—人工配列の説明:合成DNA
 配列番号24—人工配列の説明:合成DNA
 配列番号26—人工配列の説明:合成DNA
 配列番号27—人工配列の説明:合成DNA
 配列番号28—人工配列の説明:合成DNA
 配列番号29—人工配列の説明:合成DNA
 配列番号30—人工配列の説明:合成DNA
 配列番号31—人工配列の説明:合成DNA
 配列番号32—人工配列の説明:合成DNA
 配列番号33—人工配列の説明:合成DNA
 配列番号34—人工配列の説明:合成DNA
 配列番号35—人工配列の説明:合成DNA
 配列番号38—人工配列の説明:合成ペプチド

30

40

50

配列番号39－人工配列の説明：合成ペプチド
 配列番号40－人工配列の説明：合成ペプチド
 配列番号41－人工配列の説明：合成ペプチド
 配列番号42－人工配列の説明：合成DNA
 配列番号43－人工配列の説明：合成DNA
 配列番号44－人工配列の説明：合成DNA
 配列番号45－人工配列の説明：合成DNA
 配列番号46－人工配列の説明：合成DNA
 配列番号47－人工配列の説明：合成DNA
 配列番号49－人工配列の説明：合成DNA
 配列番号50－人工配列の説明：合成DNA
 配列番号51－人工配列の説明：合成DNA
 配列番号52－人工配列の説明：合成DNA
 配列番号53－人工配列の説明：合成DNA
 配列番号54－人工配列の説明：合成DNA
 配列番号55－人工配列の説明：合成DNA
 配列番号56－人工配列の説明：合成DNA
 配列番号57－人工配列の説明：合成DNA
 配列番号58－人工配列の説明：合成DNA
 配列番号59－人工配列の説明：合成DNA
 配列番号60－人工配列の説明：合成DNA
 配列番号65－人工配列の説明：合成DNA
 配列番号66－人工配列の説明：合成DNA
 配列番号67－人工配列の説明：合成DNA
 配列番号68－人工配列の説明：合成DNA
 配列番号69－人工配列の説明：合成DNA
 配列番号70－人工配列の説明：合成ペプチド
 配列番号71－人工配列の説明：合成ペプチド
 配列番号72－人工配列の説明：合成ペプチド
 配列番号73－人工配列の説明：合成ペプチド
 配列番号74－人工配列の説明：合成ペプチド
 配列番号75－人工配列の説明：合成ペプチド
 配列番号76－人工配列の説明：合成ペプチド
 配列番号77－人工配列の説明：合成ペプチド
 配列番号78－人工配列の説明：合成ペプチド

10

20

30

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

<120> Human CDR grafted antibody and antibody fragment thereof

<140> JP2003-523494

40

<141> 2002-08-30

<150> JP 2001-265144

<151> 2001-08-31

<160> 78

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

50

Asn Tyr Gly Met Ser
 1 5
 <210> 2
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 2
 Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly 10
 <210> 3
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 3
 His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr
 1 5 10
 <210> 4
 <211> 119
 <212> PRT 20
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic peptide
 <400> 4
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45 30
 Ala Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 40
 <210> 5
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 5
 Arg Ser Ser Arg Asn Ile Val His Ile Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu
 1 5 10 15
 <210> 6
 <211> 7
 <212> PRT 50

<213> Mus musculus
 <400> 6
 Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 1 5
 <210> 7
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 7
 Phe Gln Gly Ser Leu Leu Phe Trp Thr 10
 1 5
 <210> 8
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic peptide
 <400> 8
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly 20
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Asn Ile Val His Ile
 20 25 30
 Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly 30
 85 90 95
 Ser Leu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110
 <210> 9
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic peptide
 <400> 9
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Arg 40
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys 50

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

<210> 10

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

10

<223> Synthetic peptide

<400> 10

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

20

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

<210> 11

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 11

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

40

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

50

115	
<210> 12	
<211> 112	
<212> PRT	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic peptide	
<400> 12	
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly	
1 5 10 15	10
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Asn Ile Val His Ile	
20 25 30	
Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser	
35 40 45	
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro	
50 55 60	
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile	
65 70 75 80	
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly	
85 90 95	20
Ser Leu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	
100 105 110	
<210> 13	
<211> 112	
<212> PRT	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic peptide	
<400> 13	
Asp Ile Leu Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly	
1 5 10 15	30
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Asn Ile Val His Ile	
20 25 30	
Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser	
35 40 45	
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro	
50 55 60	
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile	
65 70 75 80	
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly	
85 90 95	40
Ser Leu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	
100 105 110	
<210> 14	
<211> 112	
<212> PRT	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic peptide	
<400> 14	50

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

<210> 15

<211> 19

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 15

Met Asn Leu Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Ala Leu Ile Leu Lys Gly
 1 5 10 15

Val Gln Cys

<210> 16

<211> 98

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 16

aacagctatg accatggcgg ccgcgacccc tcaccatgaa cctcgggctc agtttgattt 60
 tccttgccct cattttaaaa ggtgtccagt gtgaggtg 98

<210> 17

<211> 97

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 17

atgaatccag aggctgcaca ggagagtctc agggacctcc caggctgtac caagtctccc 60
 ccagactcca ccagctgcac ctcacactgg acacctt 97

<210> 18

<211> 98

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 18

tgtgcagcct ctggattcat tttcagtaat tatggcatgt cttgggtccg ccaggtccca 60
 gggaaggggc tggagtgggt cgcaaccatt agtagtgc 98

<210> 19

10

20

30

40

50

<211> 98
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic DNA
 <400> 19
 acaggagatt cttggcattg tctctggaga tggatgaatcg tcccttcaca ctgtctggat 60
 aataggaata agtgctagca ctactaatgg ttgcgacc 98
 <210> 20
 <211> 98 10
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic DNA
 <400> 20
 acaatgccaa gaactccctg tatctgcaga tgaacagcct gagagtcgag gacacggccc 60
 tgtattactg tgcgagacat agcgatggaa acttcgcg 98
 <210> 21
 <211> 96
 <212> DNA 20
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic DNA
 <400> 21
 gtaaaacgac ggccagtggg cccttggtgg aggctgagga gacggtgacc agggttccct 60
 ggccccaata accaaacgcg aagtttccat cgctat 96
 <210> 22
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence 30
 <220>
 <223> Synthetic DNA
 <400> 22
 gatggttcac gtagtgg 17
 <210> 23
 <211> 61
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic DNA 40
 <400> 23
 ctgtatctgc agatgaacag cctgagagtc gaggacacgg ccctgtatta ctgtggaaga 60
 c 61
 <210> 24
 <211> 56
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic DNA
 <400> 24 50

gaataagtgc tagcactact aatggttgcg acccactcca gcctcttctg tggagc 56
 <210> 25
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 25
 Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
 1 5 10 15
 Ser Ser Ser
 <210> 26 10
 <211> 92
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic DNA
 <400> 26
 aacagctatg accatggaat tcgcctcttc aaaatgaagt tgcctgttag gctgttggtg 60
 ctgatgttct ggattcctgc ttccagcagt ga 92
 <210> 27
 <211> 94 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic DNA
 <400> 27
 tagatctgca ggagatggag gccggctctc caggggtgac gggcagggag agtggagact 60
 gagtcatcac gatatactg ctggaagcag gaat 94
 <210> 28
 <211> 92
 <212> DNA 30
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic DNA
 <400> 28
 ctccatctcc tgcagatcta gtcggaacat tgttcatatt aatggtgaca catatttaga 60
 atggtacctg cagaagccag gccagctctc ac 92
 <210> 29
 <211> 93
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence 40
 <220>
 <223> Synthetic DNA
 <400> 29
 tgtgcctgac ccactgccac tgaacctgtc tgggacccca gaaaatcggg ttgaaacttt 60
 atagatcagg agctgtggag actggcctgg ctt 93
 <210> 30
 <211> 92
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220> 50

<223> Synthetic DNA
 <400> 30
 tggcagtggg tcaggcacag atttcacact gaaaatcagc agagtggagg ctgaggatgt 60
 tggggtttat tactgctttc aaggttcact tc 92
 <210> 31
 <211> 91
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic DNA 10
 <400> 31
 gtaaaacgac ggccagtctc gagcgtacgt ttgatttcca ccttggtccc ttggccgaac 60
 gtccacggaa gaagtgaacc ttgaaagcag t 91
 <210> 32
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic DNA
 <400> 32 20
 gtaaaacgac ggccagt 17
 <210> 33
 <211> 94
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic DNA
 <400> 33
 tagatctgca ggagatggag gccggctctc caggggtgac gggcagggag agtggagact 60
 gagtcatcac aacatcactg ctggaagcag gaat 94 30
 <210> 34
 <211> 94
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic DNA
 <400> 34
 tagatctgca ggagatggag gccggctctc caggggtgac gggcagggag agtggagact 60
 gagtcatcaa gatatcactg ctggaagcag gaat 94
 <210> 35 40
 <211> 94
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic DNA
 <400> 35
 tagatctgca ggagatggag gccggctctc caggggtgac gggcagggag agtggagact 60
 gagtcatcaa aacatcactg ctggaagcag gaat 94
 <210> 36
 <211> 28 50

<212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 36
 Asn Pro Thr Asp Ile Ala Asp Thr Thr Leu Asp Glu Ser Ile Tyr Ser
 1 5 10 15
 Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Ser Ile Pro Lys Pro Cys
 20 25

<210> 37

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 37

Asp Glu Ser Ile Tyr Ser Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Ser Ile Pro Lys
 1 5 10 15
 Pro Cys

<210> 38

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 38

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

<210> 39

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 39

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

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

10

115
 <210> 40
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic peptide
 <400> 40

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

20

<210> 41
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic peptide
 <400> 41

30

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

40

50

<400> 46

50

tgtgcagcct ctggattcat tttcagtaat tatggcatgt cttgggtccg ccaggctcca 60
 gggaaggggc tggagtgggt ctcaaccatt agtagtgc 98

<210> 47

<211> 98

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 47

acaattccaa gaacacgctg tatctgcaga tgaacagcct gagagccgag gacacggccg 60
 tgtattactg tggaagacat agcgatggaa acttcgcg 98

<210> 48

<211> 360

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 48

Met Asn Pro Thr Asp Ile Ala Asp Thr Thr Leu Asp Glu Ser Ile Tyr

1 5 10 15

Ser Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Ser Ile Pro Lys Pro Cys Thr Lys Glu

20 25 30

Gly Ile Lys Ala Phe Gly Glu Leu Phe Leu Pro Pro Leu Tyr Ser Leu

35 40 45

Val Phe Val Phe Gly Leu Leu Gly Asn Ser Val Val Val Leu Val Leu

50 55 60

Phe Lys Tyr Lys Arg Leu Arg Ser Met Thr Asp Val Tyr Leu Leu Asn

65 70 75 80

Leu Ala Ile Ser Asp Leu Leu Phe Val Phe Ser Leu Pro Phe Trp Gly

85 90 95

Tyr Tyr Ala Ala Asp Gln Trp Val Phe Gly Leu Gly Leu Cys Lys Met

100 105 110

Ile Ser Trp Met Tyr Leu Val Gly Phe Tyr Ser Gly Ile Phe Phe Val

115 120 125

Met Leu Met Ser Ile Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Ala Val Phe

130 135 140

Ser Leu Arg Ala Arg Thr Leu Thr Tyr Gly Val Ile Thr Ser Leu Ala

145 150 155 160

Thr Trp Ser Val Ala Val Phe Ala Ser Leu Pro Gly Phe Leu Phe Ser

165 170 175

Thr Cys Tyr Thr Glu Arg Asn His Thr Tyr Cys Lys Thr Lys Tyr Ser

180 185 190

Leu Asn Ser Thr Thr Trp Lys Val Leu Ser Ser Leu Glu Ile Asn Ile

195 200 205

Leu Gly Leu Val Ile Pro Leu Gly Ile Met Leu Phe Cys Tyr Ser Met

210 215 220

Ile Ile Arg Thr Leu Gln His Cys Lys Asn Glu Lys Lys Asn Lys Ala

225 230 235 240

Val Lys Met Ile Phe Ala Val Val Val Leu Phe Leu Gly Phe Trp Thr

245 250 255

Pro Tyr Asn Ile Val Leu Phe Leu Glu Thr Leu Val Glu Leu Glu Val

260 265 270

10

20

30

40

50

Leu Gln Asp Cys Thr Phe Glu Arg Tyr Leu Asp Tyr Ala Ile Gln Ala
 275 280 285
 Thr Glu Thr Leu Ala Phe Val His Cys Cys Leu Asn Pro Ile Ile Tyr
 290 295 300
 Phe Phe Leu Gly Glu Lys Phe Arg Lys Tyr Ile Leu Gln Leu Phe Lys
 305 310 315 320
 Thr Cys Arg Gly Leu Phe Val Leu Cys Gln Tyr Cys Gly Leu Leu Gln
 325 330 335
 Ile Tyr Ser Ala Asp Thr Pro Ser Ser Ser Tyr Thr Gln Ser Thr Met
 340 345 350
 Asp His Asp Leu His Asp Ala Leu
 355 360

10

<210> 49
 <211> 357
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(357)
 <223> Synthetic DNA
 <400> 49

20

gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga gac ttg gta cag cct ggg agg 48
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc att ttc agt aat tat 96
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30
 ggc atg tct tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtc 144
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 gca acc att agt agt gct agc act tat tcc tat tat cca gac agt gtg 192
 Ala Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60
 aag gga cga ttc acc atc tcc aga gac aat gcc aag aac tcc ctg tat 240
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 ctg cag atg aac agc ctg aga gtc gag gac acg gcc ctg tat tac tgt 288
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 gcg aga cat agc gat gga aac ttc gcg ttt ggt tat tgg ggc cag gga 336
 Ala Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 acc ctg gtc acc gtc tcc tca 357
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

30

40

<210> 50
 <211> 357
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>

50

<221> CDS

<222> (1)..(357)

<223> Synthetic DNA

<400> 50

gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga gac ttg gta cag cct ggg agg 48
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc att ttc agt aat tat 96
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30 10
 ggc atg tct tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtc 144
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 gca acc att agt agt gct agc act tat tcc tat tat cca gac agt gtg 192
 Ala Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60
 aag gga cga ttc acc atc tcc aga gac aat gcc aag aac tcc ctg tat 240
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 ctg cag atg aac agc ctg aga gtc gag gac acg gcc ctg tat tac tgt 288
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95 20
 gga aga cat agc gat gga aac ttc gcg ttt ggt tat tgg ggc cag gga 336
 Gly Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 acc ctg gtc acc gtc tcc tca 357
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 51

<211> 357 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(357)

<223> Synthetic DNA

<400> 51

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 ctg cag atg aac agc ctg aga gtc gag gac acg gcc ctg tat tac tgt 288
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 gcg aga cat agc gat gga aac ttc gcg ttt ggt tat tgg ggc cag gga 336
 Ala Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 acc ctg gtc acc gtc tcc tca 357
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

10

<210> 52
 <211> 357
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(357)
 <223> Synthetic DNA
 <400> 52

20

gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga gac ttg gta cag cct ggg agg 48
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc att ttc agt aat tat 96
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30
 ggc atg tct tgg gtc cgc cag gct cca gac aag agg ctg gag tgg gtc 144
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 gca acc att agt agt gct agc act tat tcc tat tat cca gac agt gtg 192
 Ala Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60
 aag gga cga ttc acc atc tcc aga gac aat gcc aag aac tcc ctg tat 240
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 ctg cag atg aac agc ctg aga gtc gag gac acg gcc ctg tat tac tgt 288
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 gga aga cat agc gat gga aac ttc gcg ttt ggt tat tgg ggc cag gga 336
 Gly Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 acc ctg gtc acc gtc tcc tca 357
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

30

40

<210> 53
 <211> 336
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <221> CDS

50

<222> (1)..(336)

<223> Synthetic DNA

<400> 53

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

10

20

<210> 54

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(336)

<223> Synthetic DNA

<400> 54

gat gtt gtg atg act cag tct cca ctc tcc ctg ccc gtc acc cct gga 48
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
gag ccg gcc tcc atc tcc tgc aga tct agt cgg aac att gtt cat att 96
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Asn Ile Val His Ile
20 25 30
aat ggt gac aca tat tta gaa tgg tac ctg cag aag cca ggc cag tct 144
Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
cca cag ctc ctg atc tat aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca 192
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60
gac agg ttc agt ggc agt ggg tca ggc aca gat ttc aca ctg aaa atc 240
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
agc aga gtg gag gct gag gat gtt ggg gtt tat tac tgc ttt caa ggt 288
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
90

30

40

50

85 90 95
 tca ctt ctt ccg tgg acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa 336
 Ser Leu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 55

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CDS

10

<222> (1)..(336)

<223> Synthetic DNA

<400> 55

gat atc ttg atg act cag tct cca ctc tcc ctg ccc gtc acc cct gga 48
 Asp Ile Leu Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

gag ccg gcc tcc atc tcc tgc aga tct agt cgg aac att gtt cat att 96
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Asn Ile Val His Ile
 20 25 30

aat ggt gac aca tat tta gaa tgg tac ctg cag aag cca ggc cag tct 144
 Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

20

cca cag ctc ctg atc tat aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca 192
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

gac agg ttc agt ggc agt ggg tca ggc aca gat ttc aca ctg aaa atc 240
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

agc aga gtg gag gct gag gat gtt ggg gtt tat tac tgc ttt caa ggt 288
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95

30

tca ctt ctt ccg tgg acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa 336
 Ser Leu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 56

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CDS

40

<222> (1)..(336)

<223> Synthetic DNA

<400> 56

gat gtt ttg atg act cag tct cca ctc tcc ctg ccc gtc acc cct gga 48
 Asp Val Leu Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

gag ccg gcc tcc atc tcc tgc aga tct agt cgg aac att gtt cat att 96
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Asn Ile Val His Ile
 20 25 30

aat ggt gac aca tat tta gaa tgg tac ctg cag aag cca ggc cag tct 144

50

Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 cca cag ctc ctg atc tat aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca 192
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 gac agg ttc agt ggc agt ggg tca ggc aca gat ttc aca ctg aaa atc 240
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 agc aga gtg gag gct gag gat gtt ggg gtt tat tac tgc ttt caa ggt 288
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95
 tca ctt ctt ccg tgg acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa 336
 Ser Leu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 57

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(357)

<223> Synthetic DNA

<400> 57

gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg 48
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttc agt aat tat 96
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30
 ggc atg tct tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtc 144
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 tca acc att agt agt gct agc act tat tcc tat tat cca gac agt gtg 192
 Ser Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60
 aag gga cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg tat 240
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 ctg cag atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gcc gtg tat tac tgt 288
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 gcg aga cat agc gat gga aac ttc gcg ttt ggt tat tgg ggc cag gga 336
 Ala Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 acc ctg gtc acc gtc tcc tca 357
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 58

<211> 357

<212> DNA

10

20

30

40

50

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(357)

<223> Synthetic DNA

<400> 58

gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg 48
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc att ttc agt aat tat 96
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30
 ggc atg tct tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtc 144
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 tca acc att agt agt gct agc act tat tcc tat tat cca gac agt gtg 192
 Ser Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60
 aag gga cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg tat 240
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 ctg cag atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gcc gtg tat tac tgt 288
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 gcg aga cat agc gat gga aac ttc gcg ttt ggt tat tgg ggc cag gga 336
 Ala Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 acc ctg gtc acc gtc tcc tca 357
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

10

20

30

<210> 59

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(357)

<223> Synthetic DNA

<400> 59

gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg 48
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttc agt aat tat 96
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30
 ggc atg tct tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtc 144
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 tca acc att agt agt gct agc act tat tcc tat tat cca gac agt gtg 192
 Ser Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50

40

50

50 55 60
 aag gga cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg tat 240
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 ctg cag atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gcc gtg tat tac tgt 288
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 gga aga cat agc gat gga aac ttc gcg ttt ggt tat tgg ggc cag gga 336
 Gly Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 acc ctg gtc acc gtc tcc tca 357
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 60

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(357)

<223> Synthetic DNA

<400> 60

gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg 48
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc att ttc agt aat tat 96
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30
 ggc atg tct tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtc 144
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 tca acc att agt agt gct agc act tat tcc tat tat cca gac agt gtg 192
 Ser Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60
 aag gga cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg tat 240
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 ctg cag atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gcc gtg tat tac tgt 288
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 gga aga cat agc gat gga aac ttc gcg ttt ggt tat tgg ggc cag gga 336
 Gly Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 acc ctg gtc acc gtc tcc tca 357
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 61

<211> 414

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (414)

<400> 61

atg aac ctc ggg ctc agt ttg att ttc ctt gcc ctc att tta aaa ggt 48

Met Asn Leu Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Ala Leu Ile Leu Lys Gly

1

5

10

15

gtc cag tgt gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga gac tta atg aag 96

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Met Lys

20

25

30

10

cct gga ggg tcc ctg aaa atc tcc tgt gca gcc tct gga ttc att ttc 144

Pro Gly Gly Ser Leu Lys Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe

35

40

45

agt aat tat ggc atg tct tgg gtt cgc cag act cca gac atg agg ctg 192

Ser Asn Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Met Arg Leu

50

55

60

gaa tgg gtc gca acc att agt agt gct agt act tat tcc tat tat cca 240

Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro

65

70

75

80

gac agt gtg aag gga cga ttc acc ata tcc agg gac aac gcc gag aac 288

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Glu Asn

85

90

95

20

tcc cta tat ctg caa atg aat agt ctg agg tct gag gac aca ggc ata 336

Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Gly Ile

100

105

110

tat tac tgt gga aga cat agc gat gga aac ttc gcg ttt ggt tat tgg 384

Tyr Tyr Cys Gly Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp

115

120

125

ggc cga ggg act ctg gtc act gtc tct gca 414

Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala

130

135

30

<210> 62

<211> 138

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 62

Met Asn Leu Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Ala Leu Ile Leu Lys Gly

1

5

10

15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Met Lys

20

25

30

40

Pro Gly Gly Ser Leu Lys Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe

35

40

45

Ser Asn Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Met Arg Leu

50

55

60

Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro

65

70

75

80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Glu Asn

85

90

95

Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Gly Ile

100

105

110

50

Tyr Tyr Cys Gly Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp
 115 120 125
 Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 130 135

<210> 63

<211> 396

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

10

<222> (1)..(396)

<400> 63

atg aag ttg cct gtt agg ctg ttg gtg ctg atg ttc tgg att cct gct 48
 Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
 1 5 10 15
 tcc agc agt gat gtt ttg atg acc caa act cca ctc tcc ctg cct gtc 96
 Ser Ser Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
 20 25 30
 agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tct agt cgg aac att 144
 Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Asn Ile
 35 40 45
 gtt cat att aat ggt gac aca tat tta gaa tgg tac ctg cag aga ccg 192
 Val His Ile Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Arg Pro
 50 55 60
 ggc cag tct cca aag ctc cta atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt tct 240
 Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 65 70 75 80
 ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca 288
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 85 90 95
 ctc aag atc agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga gtt tat tac tgc 336
 Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys
 100 105 110
 ttt caa ggt tca ctt ctt ccg tgg acg ttc ggt gga ggc acc agg ctg 384
 Phe Gln Gly Ser Leu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu
 115 120 125
 gaa atc aga cgg 396
 Glu Ile Arg Arg
 130

<210> 64

40

<211> 132

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 64

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

50

Val His Ile Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Arg Pro
 50 55 60
 Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 65 70 75 80
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 85 90 95
 Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys
 100 105 110
 Phe Gln Gly Ser Leu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu
 115 120 125

10

Glu Ile Arg Arg
 130

<210> 65

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 65

aaggaaaaaa gggcgcgca cccctcacca tgaacctcg

39

20

<210> 66

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 66

cgatgggccc ttggtggagg ctgcagagac agtgaccag

39

<210> 67

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 67

ccggaattcg cctcctcaaa atgaagttgc c

31

<210> 68

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 68

agccaccgta cgtctgattt ccagcctggt g

31

<210> 69

<211> 97

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

50

<400> 69
 atgaatccag aggctgcaca ggagagtctc agggaccccc caggctgtac caagcctccc 60
 ccagactcca ccagctgcac ctcacactgg acacctt 97
 <210> 70
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Synthetic peptide
 <400> 70 10
 Asn Pro Thr Asp Ile Ala Asp Thr Thr Leu Asp Glu Ser Ile Tyr Ser
 1 5 10 15
 Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Ser Ile Pro Lys Pro Cys
 20 25
 <210> 71
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Synthetic peptide 20
 <400> 71
 Asp Glu Ser Ile Tyr Ser Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Ser Ile Pro Lys
 1 5 10 15
 Pro Cys
 <210> 72
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Synthetic peptide 30
 <400> 72
 Glu Ser Ile Tyr Ser Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Ser Ile Pro Lys Pro
 1 5 10 15
 Cys
 <210> 73
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Synthetic peptide 40
 <400> 73
 Ser Ile Tyr Ser Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Ser Ile Pro Lys Pro Cys
 1 5 10 15
 <210> 74
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Synthetic peptide
 <400> 74 50

Ile Tyr Ser Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Ser Ile Pro Lys Pro Cys
 1 5 10 15

<210> 75

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 75

Glu Ser Ile Tyr Ser Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Ser Ile Cys

10

1 5 10

<210> 76

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 76

Glu Ser Ile Tyr Ser Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Ser Cys

20

1 5 10

<210> 77

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 77

Glu Ser Ile Tyr Ser Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Cys

30

1 5 10

<210> 78

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 78

Glu Ser Ile Tyr Ser Asn Tyr Tyr Leu Tyr Cys

1 5 10

【図面の簡単な説明】

第1図は、プラスミドpKM2160Gal0の造成工程を示した図である。

40

第2図は、プラスミドpKM2160Gal1の造成工程を示した図である。*は、アミノ酸残基を
 改変するための変異遺伝子コドンの位置を示している。

第3図は、プラスミドpKM2160Gal3の造成工程を示した図である。*は、アミノ酸残基を
 改変するための変異遺伝子コドンの位置を示している。

第4図は、プラスミドpKM2160LV0の造成工程を示した図である。

第5図は、プラスミドpKM2160LV1の造成工程を示した図である。*は、アミノ酸残基を
 改変するための変異遺伝子コドンの位置を示している。

第6図は、プラスミドpKANTEX2160LV0およびプラスミドpKANTEX2160Gal0LV0の造成工程
 を示した図である。

第7図は、各抗CCR4CDR移植抗体の発現ベクターをCOS-7細胞に一過性発現させ、得られ

50

た培養上清中のCCR4部分ペプチドへのELISA法における反応性を示した図である。

第8図は、別のFRを用いて作製した各抗CCR4CDR移植抗体の発現ベクターをCOS-7細胞に一過性発現させ、得られた培養上清中のCCR4部分ペプチドへのELISA法における反応性を示した図である。

第9図は、精製した抗CCR4CDR移植抗体のCCR4部分ペプチドへのELISA法における反応性を示した図である。

第10図は、精製した抗CCR4CDR移植抗体のCCR4高発現細胞（CCR4/EL-4）に対する反応性を示した図である。

第11図は、精製した抗CCR4CDR移植抗体のCCR4部分ペプチドに対する親和性を表面プラズモン共鳴センサーを用いて測定した図である。

第12図は、CCR4/EL-4細胞に対するADCC活性による細胞傷害性を示した図である。

第13図は、ヒトPBMCからのIL-4、IL-13、IFN- γ 産生抑制効果を示した図である。

第14図は、ヒト血小板に対する各抗体の結合活性を示した図である。

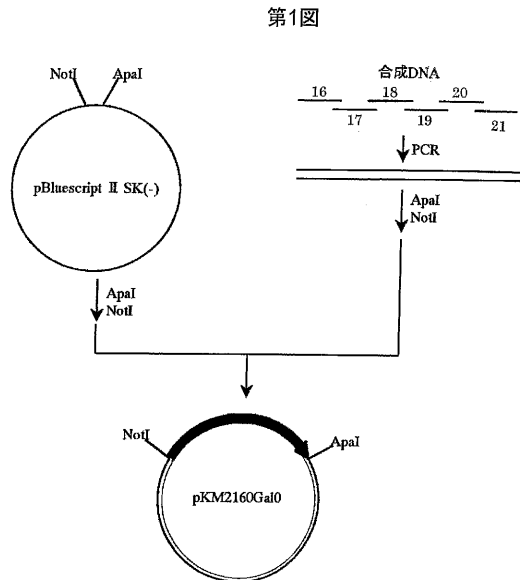
第15図は、プラスミドpKM2160VH41とpKM2160VL61の造成工程を示した図である。

第16図は、プラスミドpKANTEX2160Hの造成工程を示した図である。

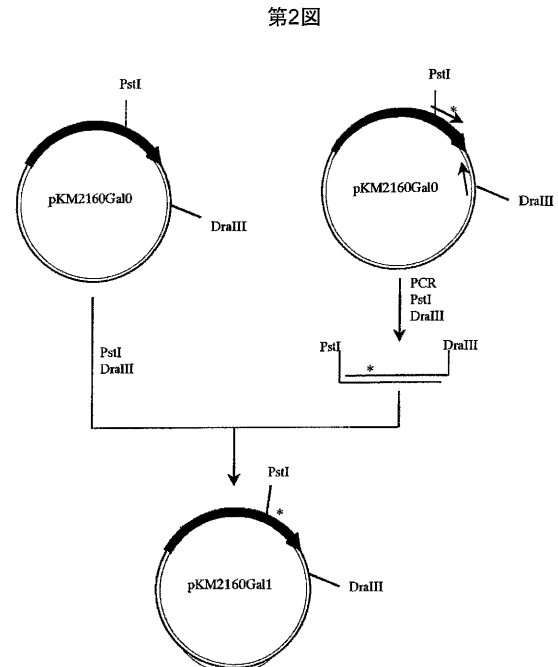
第17図は、プラスミドpKANTEX2160の造成工程を示した図である。

10

【図1】

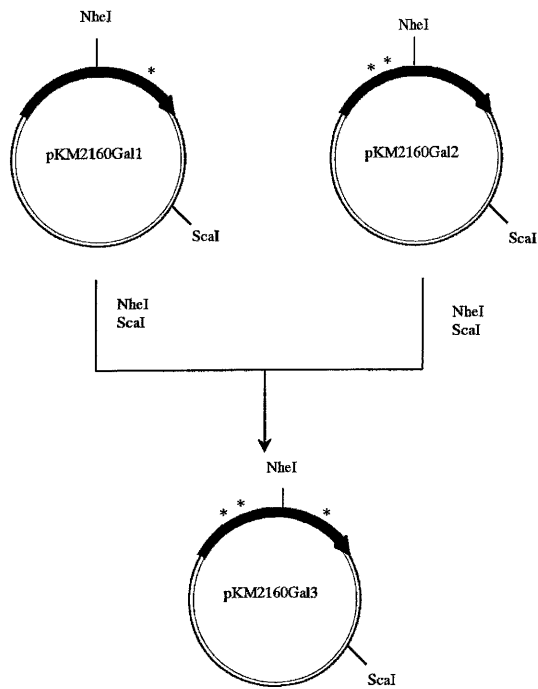


【図2】



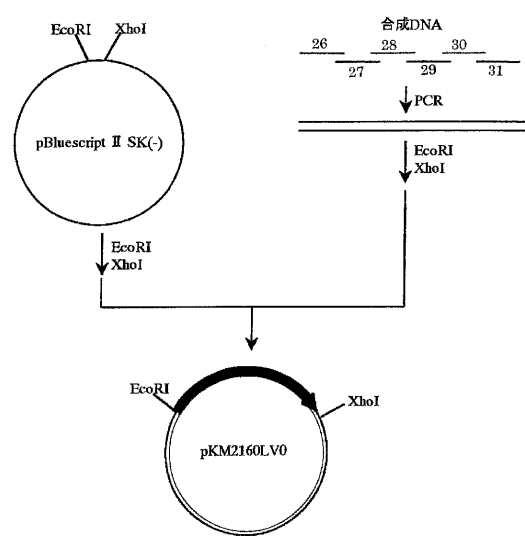
【図 3】

第3図



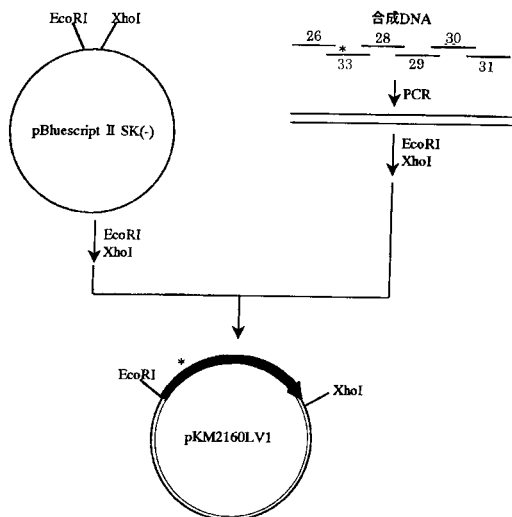
【図 4】

第4図



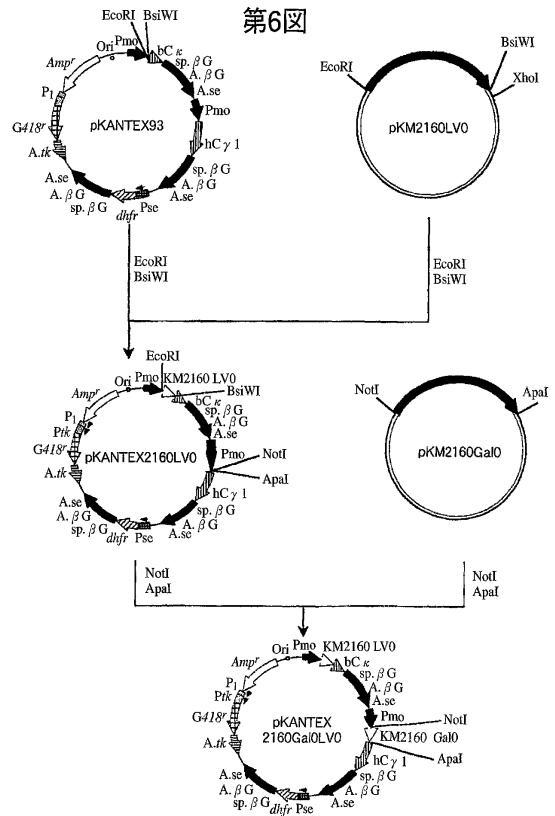
【図 5】

第5図



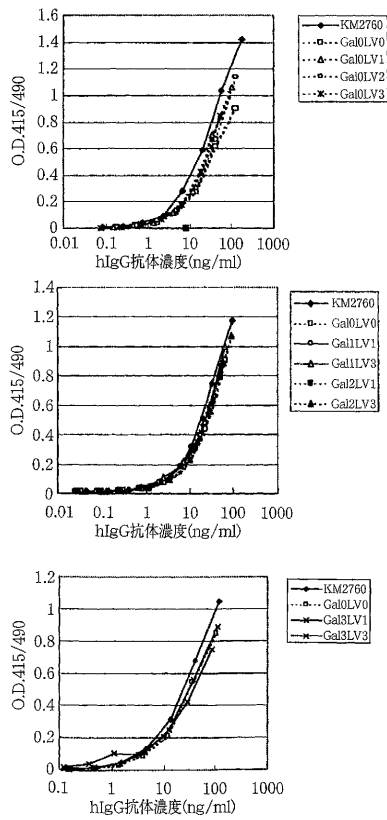
【図 6】

第6図



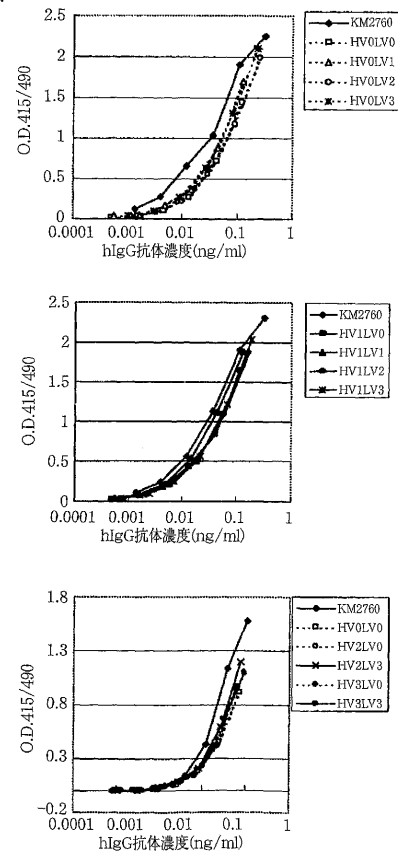
【図 7】

第7図



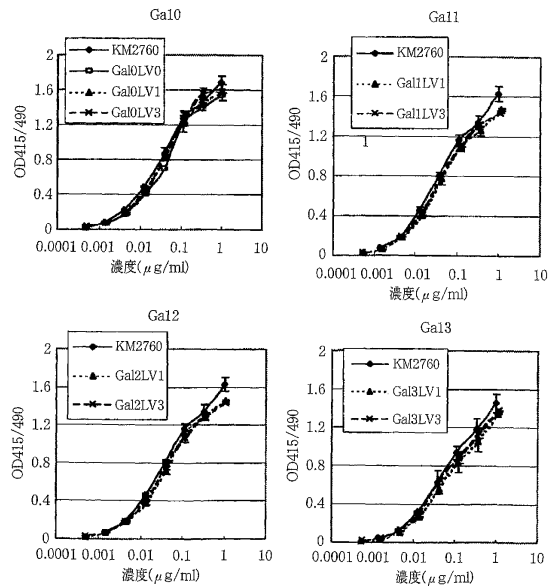
【図 8】

第8図



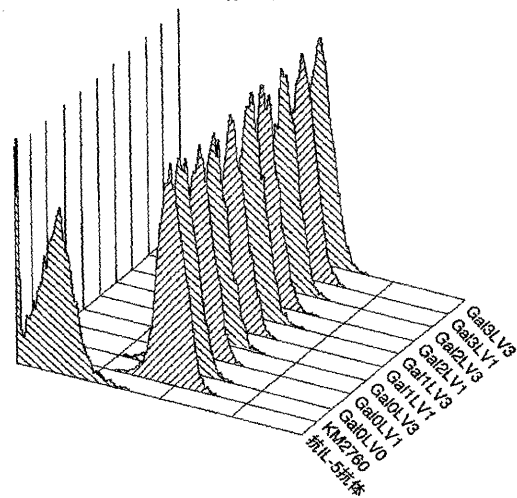
【図 9】

第9図



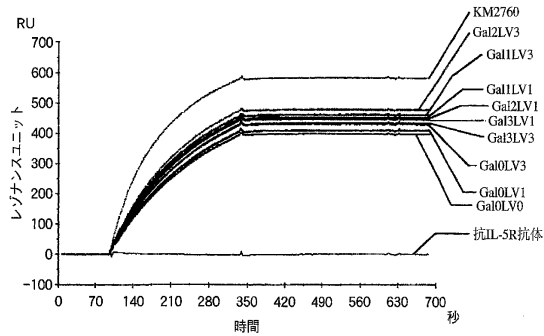
【図 10】

第10図



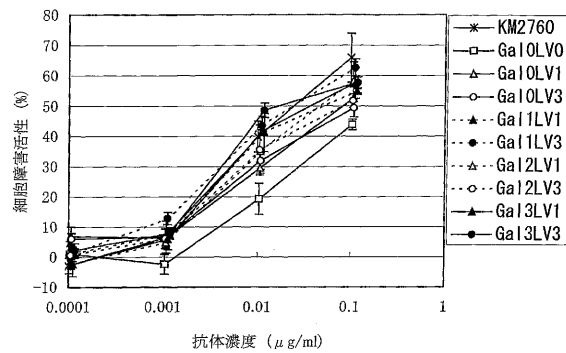
【図 1 1】

第11図



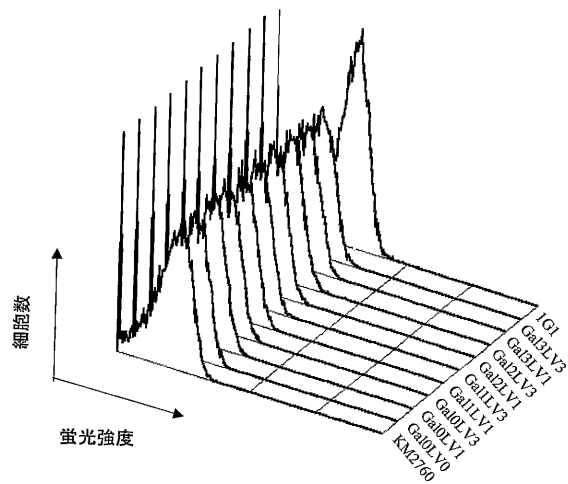
【図 1 2】

第12図



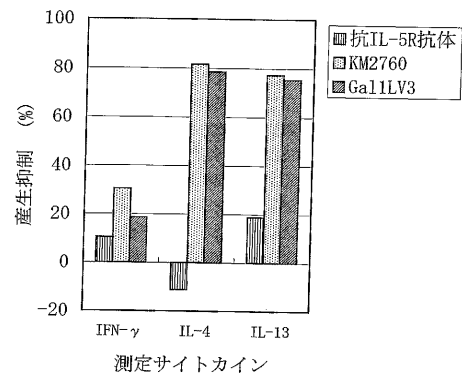
【図 1 4】

第14図



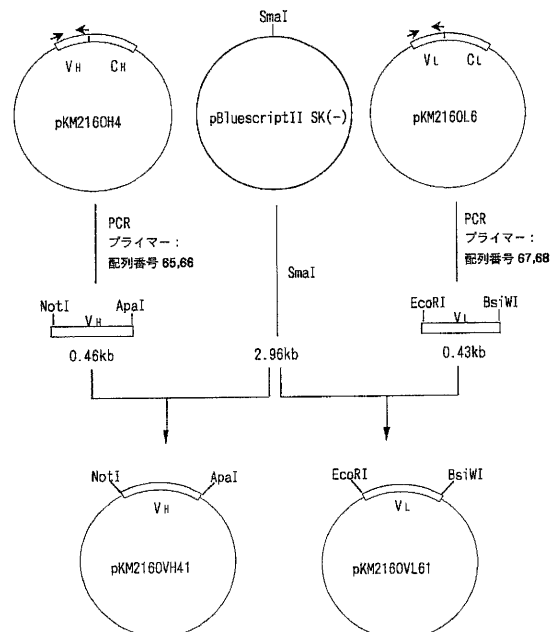
【図 1 3】

第13図



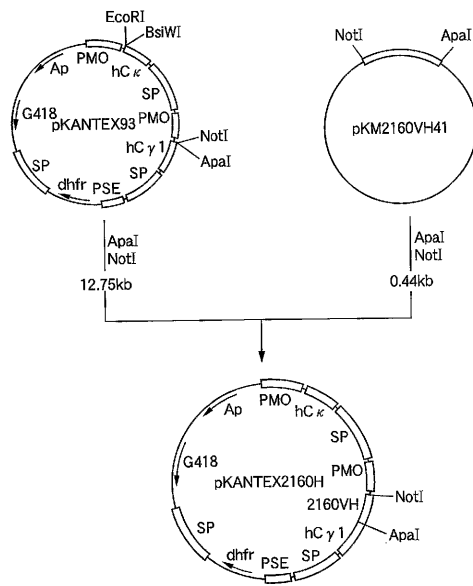
【図 1 5】

第15図



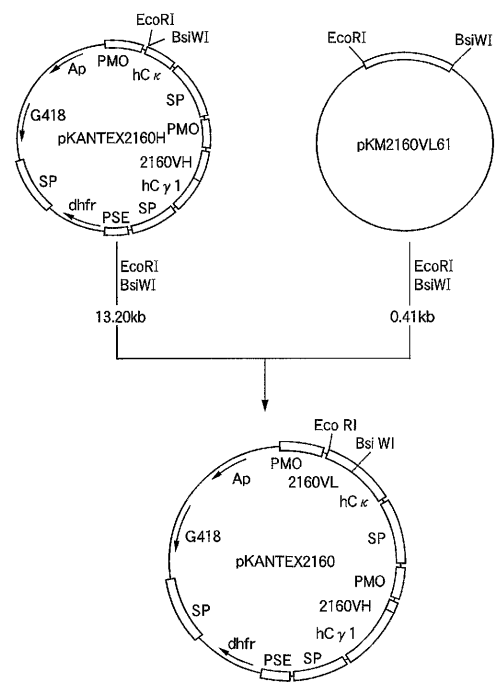
【図 16】

第16図



【図 17】

第17図



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P 29/00	(2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/02	(2006.01)	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 P 37/00	(2006.01)	A 6 1 P 37/00	
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
C 0 7 K 16/28	(2006.01)	C 0 7 K 16/28	
C 1 2 N 1/15	(2006.01)	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19	(2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21	(2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	(2006.01)	C 1 2 N 5/00	A
C 1 2 P 21/02	(2006.01)	C 1 2 P 21/02	C
G 0 1 N 33/53	(2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
		G 0 1 N 33/53	Y

微生物の受託番号 FERM BP-7715
 微生物の受託番号 FERM BP-7716
 微生物の受託番号 FERM BP-7718
 微生物の受託番号 FERM BP-7719
 微生物の受託番号 FERM BP-7720
 微生物の受託番号 FERM BP-7721
 微生物の受託番号 FERM BP-8129
 微生物の受託番号 FERM BP-8130

(72)発明者 設楽 研也
 東京都町田市旭町三丁目6番6号 協和醗酵工業株式会社 東京研究所内
 (72)発明者 中村 和靖
 東京都町田市旭町三丁目6番6号 協和醗酵工業株式会社 東京研究所内
 (72)発明者 保坂 絵美
 東京都町田市旭町三丁目6番6号 協和醗酵工業株式会社 東京研究所内
 (72)発明者 田中 晶子
 東京都町田市旭町三丁目6番6号 協和醗酵工業株式会社 東京研究所内
 (72)発明者 小池 正道
 東京都町田市旭町三丁目6番6号 協和醗酵工業株式会社 東京研究所内

審査官 富永 みどり

(56)参考文献 国際公開第00/042074 (WO, A1)
 国際公開第00/067791 (WO, A1)
 特許第3926153 (JP, B2)
 J.Immunol., 2001年 1月 1日, Vol.166, No.1p.103-111
 Int.Immunol., 1999年, Vol.11, No.1, p.81-88

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 BIOSIS/WPI(DIALOG)
 GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq
 SwissProt/PIR/Geneseq
 PubMed

JSTPlus(JDream2)

专利名称(译)	人CDR-移植抗体及其抗体片段		
公开(公告)号	JP4052515B2	公开(公告)日	2008-02-27
申请号	JP2003523494	申请日	2002-08-30
申请(专利权)人(译)	协和醯酵工业株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	协和醯酵工业株式会社		
[标]发明人	設楽研也 中村和靖 保坂絵美 田中晶子 小池正道		
发明人	設楽 研也 中村 和靖 保坂 絵美 田中 晶子 小池 正道		
IPC分类号	C12N15/09 A61K39/395 A61P11/02 A61P11/06 A61P17/00 A61P29/00 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/00 A61P43/00 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/02 G01N33/53 B65H31/30 B65H31/24 B65H31/26 B65H31/36 B65H37/04 C07K14/715 C12N15/13 C12P21/08 G01N33/68		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P11/02 A61P11/06 A61P17/00 A61P29/00 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/00 A61P37/08 A61P43/00 C07K14/7158 C07K16/2866 C07K2317/24 C07K2317/565 C07K2317/732 G01N33/6863 G01N2333/4719 C07K16/2896 G01N33/57492 G01N2333/7158		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K39/395.D A61P11/02 A61P11/06 A61P17/00 A61P29/00 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/00 A61P43/00.111 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.A C12P21/02.C G01N33/53.D G01N33/53.Y		
优先权	2001265144 2001-08-31 JP		
其他公开文献	JPWO2003018635A5 JPWO2003018635A1		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

人CDR-移植抗体或其抗体片段，其特异性地与人CC趋化因子受体4 (CCR4) 的细胞外区域反应但不与人血小板反应;人CDR转移抗体或其抗体片段，其特异性地与CCR4的细胞外区域反应，并具有针对表达CCR4的细胞的细胞毒性;和药物，治疗剂或诊断剂，其包含至少一种抗体及其抗体片段作为活性成分。

第2表

HSGI	HSGII	HSGIII	HSGIV
65.00%	82.50%	65.00%	72.50%