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

特許第4048294号
(P4048294)

(45)発行日　平成20年2月20日(2008.2.20)　(24)登録日　平成19年12月7日(2007.12.7)

(51)Int.Cl.		F I		
C12N 15/02	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAC
A61K 39/395	(2006.01)	A61K	39/395	U
A61P 3/10	(2006.01)	A61P	3/10	
A61P 7/04	(2006.01)	A61P	7/04	
A61P 7/06	(2006.01)	A61P	7/06	

請求項の数 20　(全 62 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願平10-521633
(86)(22)出願日　平成9年10月29日(1997.10.29)
(65)公表番号　特表2001-504693(P2001-504693A)
(43)公表日　平成13年4月10日(2001.4.10)
(86)国際出願番号　PCT/US1997/019906
(87)国際公開番号　WO1998/019706
(87)国際公開日　平成10年5月14日(1998.5.14)
審査請求日　平成13年7月12日(2001.7.12)
(31)優先権主張番号　08/746,361
(32)優先日　平成8年11月8日(1996.11.8)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者
バイオジェン・アイデック・インコーポレイテッド
アメリカ合衆国０２１４２マサチューセッツ州ケンブリッジ、　ケンブリッジ・センター１４番
(74)代理人
弁理士　青山　葆
(74)代理人
弁理士　田村　恭生
(72)発明者　アンダーソン，ダレル・アール
アメリカ合衆国９２０２６カリフォルニア州　エスコンディド、ローレンス・ウェルク・レイン２９２４６番

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ある種の抗体とヒトＢ７．１およびＢ７．２コスティミュラトリー抗原との間の独特の結合相互作用の同定

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

ヒトＣＤ８０抗原に特異的に結合し、該ＣＤ８０抗原のＣＤ２８への結合は阻害するが、該ＣＤ８０抗原のＣＴＬＡ－４への結合は阻害せず、下記よりなる群から選ばれるモノクローナル抗体：

（ａ）配列番号２に示すアミノ酸配列を有するサルモノクローナル抗体７Ｃ１０の軽鎖可変領域および配列番号４に示すアミノ酸配列を有する該サルモノクローナル抗体の重鎖可変領域を有する抗体；

（ｂ）配列番号１０に示すアミノ酸配列を有するサルモノクローナル抗体１６Ｃ１０の軽鎖可変領域および配列番号１２に示すアミノ酸配列を有する該サルモノクローナル抗体の重鎖可変領域を有する抗体；および

（ｃ）ヒトＣＤ８０抗原への結合に対して（ａ）または（ｂ）の抗体と競合し、（ａ）または（ｂ）の抗体によっても結合されるヒトＣＤ８０抗原のエピトープに結合する抗体。

【請求項２】

サルの抗体の軽鎖可変領域および重鎖可変領域を含む、請求項１に記載のモノクローナル抗体。

【請求項３】

配列番号２に示すアミノ酸配列を有するサルモノクローナル抗体７Ｃ１０の軽鎖可変領域および配列番号４に示すアミノ酸配列を有する該サルモノクローナル抗体の重鎖可変領域を有する、請求項１に記載のモノクローナル抗体。

【請求項４】
配列番号１０に示すアミノ酸配列を有するサルモノクローナル抗体１６Ｃ１０の軽鎖可変領域および配列番号１２に示すアミノ酸配列を有する該サルモノクローナル抗体の重鎖可変領域を有する、請求項１に記載のモノクローナル抗体。
【請求項５】
ヒト軽鎖定常領域および重鎖定常領域を含む、請求項１ないし４のいずれかに記載のモノクローナル抗体。
【請求項６】
ヒトガンマ１定常領域、ヒトガンマ４定常領域、およびヒトガンマ４ＰＥ定常領域よりなる群から選ばれるヒト重鎖定常領域を含む、請求項５に記載のモノクローナル抗体。
【請求項７】
請求項１ないし４のいずれかに記載のモノクローナル抗体のフラグメントであって、ヒトＣＤ８０抗原に特異的に結合し、該ＣＤ８０抗原のＣＤ２８への結合は阻害するが、該ＣＤ８０抗原のＣＴＬＡ－４への結合は阻害しないモノクローナル抗体のフラグメント。
【請求項８】
Ｆａｂ、Ｆ（ａｂ’）$_2$、およびＦｖよりなる群から選ばれる、請求項７に記載のモノクローナル抗体のフラグメント。
【請求項９】
Ｔリンパ球によるＩＬ－２の産生をインビトロで阻害する、請求項１ないし６のいずれかに記載のモノクローナル抗体または請求項７または８に記載のモノクローナル抗体のフラグメント。
【請求項１０】
少なくとも１０μｇ／ｍｌの濃度でＴリンパによるＩＬ－２産生を阻害する、請求項９に記載のモノクローナル抗体またはモノクローナル抗体のフラグメント。
【請求項１１】
予防的または治療的有効量の請求項１ないし６のいずれかに記載のモノクローナル抗体または請求項７または８に記載のモノクローナル抗体のフラグメントおよび薬理学的に許容しうる担体を含む、ＣＤ８０のＣＤ２８への結合の阻害の結果としての免疫抑制により予防または治療することのできる疾患の予防または治療用医薬組成物。
【請求項１２】
該疾患が自己免疫疾患、移植片対宿主病、移植臓器または組織の拒絶、感染性疾患、炎症性疾患およびＢ細胞リンパ腫よりなる群から選ばれる、請求項１１に記載の医薬組成物。
【請求項１３】
該疾患が、移植片対宿主病、または移植臓器もしくは組織の拒絶であり、該移植片または移植臓器もしくは組織が、腎臓、心臓、肺、骨髄、皮膚、または角膜から選ばれる、請求項１２に記載の医薬組成物。
【請求項１４】
該疾患が、自己免疫疾患または炎症性疾患である、請求項１２に記載の医薬組成物。
【請求項１５】
該自己免疫疾患または炎症性疾患が、慢性関節リウマチ、エリテマトーデス、全身性エリテマトーデス、橋本甲状腺炎、多発性硬化症、重症筋無力症、再生不能性貧血、１型糖尿病、特発性血小板減少性紫斑病、ぶどう膜炎、ネフローゼ症候群、乾癬、アトピー性皮膚炎、接触皮膚炎、脂漏性皮膚炎、湿疹性皮膚炎、偏平苔せん、天疱瘡、水泡性天疱瘡、表皮水泡症、蕁麻疹、血管浮腫、脈管炎、紅斑、皮膚好酸球増加症、円形脱毛症、可逆性閉塞性気道疾患、偏頭痛、湿疹、鼻炎、並びに小児脂肪便症、直腸炎、好酸球増加性胃腸炎、肥満細胞症、クローン病および潰瘍性大腸炎を含む胃腸炎症に関連する疾患よりなる群から選ばれる、請求項１４に記載の医薬組成物。
【請求項１６】
該自己免疫疾患または炎症性疾患が、特発性血小板減少性紫斑病、全身性エリテマトーデス、１型糖尿病、慢性関節リウマチ、乾癬、再生不能性貧血、炎症性胆汁疾患、アレルギ

ーおよび多発性硬化症よりなる群から選ばれるものである、請求項１４に記載に医薬組成物。
【請求項１７】
該疾患が、ＨＩＶ感染に関連した疾患である、請求項１２に記載の医薬組成物。
【請求項１８】
組換えタンパク質または小分子であって免疫抑制剤であるかまたはＢ７：ＣＤ２８経路を調節するものをさらに含む、請求項１１に記載の医薬組成物。
【請求項１９】
該免疫抑制剤が、サイクロスポリンＡ、ＦＫ５０６、ＴＮＦａの可溶性レセプター、ＩＬ－１の可溶性レセプター、抗ＴＮＦａ抗体、抗ＣＤ５４抗体、抗ＣＤ１１抗体、および抗ＣＤ１１ａ抗体よりなる群から選ばれる、請求項１８に記載の医薬組成物。
【請求項２０】
該Ｂ７：ＣＤ２８経路を調節する組換えタンパク質または小分子が、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＣＴＬＡ４－Ｉｇ融合タンパク質、可溶性ＣＴＬＡ－４、および抗ＣＤ２８抗体およびそのＣＤ２８結合フラグメントよりなる群から選ばれる、請求項１８に記載の医薬組成物。
【発明の詳細な説明】
発明の技術分野
本発明は、ヒトＢ７．１抗原（ＣＤ８０）に特異的なモノクローナル抗体の同定および使用に関する。さらに詳しくは、本発明は、ヒトＢ７．１抗原のＣＤ２８受容体への結合は阻害し得るがＢ７．１のＣＴＬＡ－４受容体への結合は阻害し得ないモノクローナル抗体またはその霊長類化（primatized）形態の同定および使用に関する。それゆえ、本発明は、ＣＴＬＡ－４受容体結合を排除するＢ７．１抗原上の特定の部位を認識するモノクローナル抗体およびその霊長類化形態の同定および使用に関する。
本発明はさらに、ヒトＢ７．１抗原上の特定の部位を認識し、ＩＬ－２産生を阻害し得るモノクローナル抗体またはその霊長類化形態に関する。
本発明はまた、ヒトＢ７．１に特異的なモノクローナル抗体または霊長類化抗体を含む医薬組成物並びにＢ７：ＣＤ２８経路を調節することによる、たとえば自己免疫疾患の治療や臓器移植拒絶の防止のための免疫抑制剤としてのその使用に関する。
発明の要約
免疫学、血液学および腫瘍学の間での臨床的相互領域が長らく認識されている。血液学者または腫瘍学者によって処置される多くの状態は、その病理生理学に自己免疫または免疫不全要因のいずれかを有し、それが血液学者による免疫抑制剤療法の広範な採用となり、一方、腫瘍学者は腫瘍に対する内生の免疫を高めるための免疫アジュバントを探し求めていた。今日ではこれらの介入措置は、一般に非特異的なモードの免疫抑制および免疫刺激からなる。これら介入措置の効能が限られていることに加え、その非特異性による毒性もまた、その全的成功を制限していた。それゆえ、別の戦略が探し求められている。
迅速にその数を増している細胞表面分子の機能的役割の解明は、免疫学と臨床血液学および腫瘍学との統合に多大な貢献をしている。２００近い細胞表面抗原が免疫系および造血系の細胞で同定されている［シュロスマン（Ｓchlossman，ＳＦ）、ブムセル（Ｂoumsell，Ｌ.）、ジルクス（Ｇilks，ＪＭ）、ハーラン（Ｈarlan，Ｔ.）、キシモト（Ｋishimoto，Ｃ.）、モリモト（Ｍorimoto，Ｃ.）、リッツ（Ｒitz，Ｊ.）、ショー（Ｓhaw，Ｓ.）、シルバースタイン（Ｓilverstein，ＲＬ）、スプリンガー（Ｓpringer，ＴＡ）、テッダー（Ｔedder，ＴＦ）、トッド（Ｔodd，ＲＦ）：ＣＤ antigens（１９９３）、Blood ８３：８７９、１９９４］。これら抗原は、細胞認識、接着、増殖の誘発および維持、サイトカイン分泌、エフェクター機能、および細胞死さえも含む種々のプロセスに関与する、系統に限定された分子および広く分布する分子の両方を提示する。これら分子の機能的貢献の認識は、免疫応答を操作する新規な試みを呼び起こした。以前には細胞接着および抗原特異的な認識に関与する分子が治療用免疫学的介入の標的とされたが、最近ではコスティミュラトリー（co-stimulatory）分子と呼ばれる細胞表面分子のサブグループに関心

が集まっている［ブレッチャー（Bretcher, P.）：「２１年後のリンパ球活性化の２シグナルモデル」、Immunol. Today １３：７３（１９９２）；ジェンキンス（Jenkins, MK）、ジョンソン（Johnson, JG）：「T細胞コスティミュレーションに関与する分子」、Curr. Opin. Immunol. ５：３５１、１９９３；ゲッパート（Geppert, T.）、デービス（Davis, L.）、ガー（Gur, H.）、ワコルツ（Wacholtz, M.）、リプスキー（Lipsky, P.）：「T細胞活性化に関与するアクセサリー細胞」、Immunol. Rev. １１７：５（１９９０；ウィーバー（Weaver, CT）、ウナウエ（Unaue, ER）：「抗原提示細胞のコスティミュラトリー機能」、Immunol. Today １１：４９（１９９０）；ステナム（Stennam, RM）、ヤング（Young, JW）：「抗原提示細胞から生じるシグナル」、Curr. Opin. Immunol. ３：３６１（１９９１）］。コスティミュラトリー分子は、抗原特異的なT細胞応答およびエフェクター機能の生成および増幅を開始はしないが、むしろ可能にする［ブレッチャー：「２１年後のリンパ球活性化の２シグナルモデル」、Immunol. Today １３：７３（１９９２）；ジェンキンス、ジョンソン：「T細胞コスティミュレーションに関与する分子」、Curr. Opin. Immunol. ５：３５１、１９９３；ゲッパート、デービス、ガー、ワコルツ、リプスキー：「T細胞活性化に関与するアクセサリー細胞」、Immunol. Rev. １１７：５（１９９０）；ウィーバー、ウナウエ：「抗原提示細胞のコスティミュラトリー機能」、Immunol. Today １１：４９（１９９０）；ステナム、ヤング：「抗原提示細胞から生じるシグナル」、Curr. Opin. Immunol. ３：３６１（１９９１）；ジュン（June, CH）、ブルーストーン（Bluestone, JA）、リンスレイ（Linsley, PS）、トンプソン（Thompson, CD）：「T細胞活性化におけるCD２８受容体の役割」、Immunol. Today １５：３２１（１９９４）］。

最近、B７：CD２８と称する一つの特異的なコスティミュラトリー経路が、B細胞およびT細胞活性化におけるその有意の役割のために、異なる研究グループにより研究された［ジュン、ブルーストーン、リンスレイ、トンプソン：「T細胞活性化におけるCD２８受容体の役割」、Immunol. Today １５：３２１（１９９４）；ジュン、レッドベター（Ledbetter, JA）：「T細胞の抗原への応答の間のCD２８受容体の役割」、Ann. Rev. Immunol. １１：１９１（１９９３）；シュワルツ（Schwartz, RH）：「Tリンパ球のコスティミュレーション：インターロイキン２の産生および免疫療法におけるCD２８、CTLA－４およびB７／BB１の役割」、Cell ７１：１０６５（１９９２）；ジェンシキンス（Jenkins MK）、テイラー（Taylor PS）、ノートン（Norton SD）、アーダール（Urdhal KB）：「CD２８はヒトT細胞による抗原特異的なIL－２産生に関与するコスティミュラトリーシグナルを放出する」Journal of Immunology １４７：２４６１－２４６６（１９９１）］。このリガンド：受容体経路は４年前に発見されたので、B７：CD２８相互作用が免疫応答性とアレルギーとを決定するうえでの重大な接点の一つを代表することを示唆する膨大な証拠が得られてきている［ジュン、ブルーストーン、リンスレイ、トンプソン：「T細胞活性化におけるCD２８受容体の役割」、Immunol Today １５：３２１（１９９４）；ジュン、レッドベター：「T細胞の抗原への応答の際のCD２８受容体の役割」、Ann. Rev. Immunol. １１：１９１（１９９３）；シュワルツ：「Tリンパ球のコスティミュレーション：インターロイキン２の産生および免疫療法におけるCD２８、CTLA－４およびB７／BB１の役割」、Cell ７１：１０６５（１９９２）；コーエン（Cohen, J.）：「望んでいない免疫応答に対して開始される攻撃」（ニュースコメント）Science ２５７：７５１（１９９２）；コーエン：「“コスティミュレーター”として注目を浴びる新たなタンパク質」（ニュースコメント）Science ２６２：８４４（１９９３）］。

とりわけ、ヒトB７抗原、すなわちヒトB７．１およびB７．２は、T細胞活性化においてコスティミュラトリーな役割を果たすことが報告されている［たとえば、ギミ（Gimmi CD）、フリーマン（Freeman GJ）、グリッベン（Gribben JG）、スギタ（Sugita K）、フリードマン（Freedman AS）、モリモト（Morimoto C）、ナドラー（Nadler LM）：「B細胞表面抗原B７はT細胞の増殖およびインターロイキン２分泌を誘

発するコスティミュラトリーシグナルを提供する」Proc. Natl. Acad. Sci. （ＵＳＡ）８８：６５７５－６５７９（１９９１）を参照］。

１．Ｔ細胞活性化におけるＢ７．１およびＢ７．２のコスティミュラトリーな役割

首尾よい免疫応答の精巧さは、Ｔ細胞と抗原提示細胞との間の一連の特異的な相互作用に依存する。このプロセスにおける最初の必須のステップはＭＨＣクラスII分子との関連での抗原のＴ細胞受容体への結合に依存するが［レイン（Lane, Ｐ．Ｊ．Ｌ.）、マッコネル（Ｆ．Ｍ．McConnell）、シーベン（Ｇ．Ｌ．Schieven）、クラーク（Ｅ．Ａ．Clark）、およびレッドベター（１９９０）、「ヒトＢ細胞活性化におけるクラスII分子の役割」、The Journal of Immunology、１４４：３６８４－３６９２］、この相互作用だけでは所定の抗原に対する継続した応答に必要なすべての事象を引き起こすのに充分ではない［シュワルツ、「Ｔリンパ球クローナルアネルギーの細胞培養モデル」、Science ２４８：１３４９；ジェンキンス（１９９２）「クローナルアネルギーの誘発における細胞分裂の役割」、Immunology Today、１３：６９；アズマ（Azuma, M.）、カタビアブ（M. Catabyab）、バック（Ｄ．Buck）、フィリップス（Ｊ．Ｈ．Phillips）およびラニエ（Ｌ，Ｌ，Lanier）（１９９２）、「ヒトナチュラルキラー白血病細胞株により媒体されるＭＨＣ非制限細胞毒性へのＣＤ２８の関与」、The Journal of Immunology、１４９：１５５６－１５６１；アズマ、カタビアブ、バック、フィリップスおよびラニエ（１９９２）、「ＣＤ２８とＢ７との相互作用は、小さな静止Ｔリンパ球によって媒体される一次同種増殖応答および細胞毒性をコスティミュレートする」、Ｊ．Exp. Med．１７５：３５３－３６０；ノートン、ズッカーマン（Ｌ，Zuckerman）、アーダール、シェフナー（Ｒ．Shefner）、ミラー（Ｊ．Miller）およびジェンキンス（１９９２）、「ＣＤ２８リガンドであるＢ７はＴ細胞にコスティミュラトリーシグナルを提供することによりＩＬ－２産生を促進する」、The Journal of Immunology、２４９：１５５６－１５６１；シュワルツ（１９９２）、「Ｔリンパ球のコスティミュレーション：インターロイキン－２産生および免疫療法におけるＣＤ２８、ＣＴＬＡ－４、およびＢ７／ＢＢ１の役割」、Cell ７１：１０６５－１０６８］。

ある種の他のコスティミュラトリー分子の関与が必要である［ノートン（Norton, Ｓ．Ｄ.）、ズッカーマン、アーダール、シェフナー、ミラーおよびジェンキンス（１９９２）「ＣＤ２８リガンドであるＢ７はＴ細胞にコスティミュラトリーシグナルを提供することによりＩＬ－２産生を促進する」、The Journal of Immunology、１４９：１５５６～１５６１］。「Ｔ細胞上で発現されたホモダイマーＣＤ２８およびＣＴＬＡ－４」［ジューン、レッドベター、リンスレイおよびトンプソン（１９９０）「Ｔ細胞活性化におけるＣＤ２８受容体の役割」、Immunology Today、１１：２１１～２１６；リンスレイ、ブラディー、アーンズ、グロスメア（Ｌ．Ｓ．Grosmaire）、ダムル（Ｎ．Ｋ．Damle）およびレッドベター（１９９１）、「ＣＴＬＡ－４はＢ細胞活性化抗原Ｂ７の第二の受容体である」、Ｊ．Eex. Med．１７４：５６１］が、抗原提示細胞上で発現されたＢ７．１（ＣＤ８０）およびＢ７．２（ＣＤ８６）とともに、持続された免疫応答に必要なコスティミュラトリー分子の主要なペアである［アズマ、イッセル（Ｈ．Yssel）、フィリップス、スピッツ（Ｈ．Spits）およびラニエ（１９９３）、「活性化Ｔリンパ球上でのＢ７／ＢＢ１の機能的発現」、Ｊ．Exp. Med．１７７：８４５～８５０；フリーマン（Freeman, Ｇ．Ｊ.）、フリードマン（Ａ．Ｓ．Freedman）、セジル（Ｊ．Ｍ．Segil）、リー（Ｇ．Lee）、ホワイトマン（Ｊ．Ｆ．Whitman）およびナドラー（ＬＭ．Nadler）（１９８９）、「活性化された新生物Ｂ細胞上でのみ発現されるＩｇスーパーファミリーの新たな成員であるＢ７」、The Journal of Immunology、１４３：２７１４～２７２２；ハスコック（Hathcok, Ｋ．Ｓ.）、ラスロ（Ｇ．Laslo）、ディックラー（Ｈ．Ｂ．Dickler）、ブラッドショー（Ｊ．Bradshaw）、リンスレイおよびホーズ（Ｒ．Ｊ．Hodes）（１９９３）、「Ｔ細胞活性化のコスティミュラトリーの他のＣＴＬＡ－４リガンドの同定」、Science、２６２：９０５～９１１；ハート（Hart, Ｄ．Ｎ．Ｊ.）、スターリング（Ｇ．Ｃ．Starling）、カルダー（Ｖ．Ｌ．Calder）およびフェルナンド（Ｎ．Ｓ．Fernando）（１９９３）、「Ｂ７／ＢＢ１は、活性化により誘発されたヒト

樹状細胞上の白血球分化抗原である」、Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ、７９：６１６～６２０］。インビトロでは、これらコスティミュラトリーシグナルの不在が未発達のＴ細胞活性化経路および特定の抗原に対する応答の欠如すなわちアネルギーを導くことを示すことができる［たとえば、ハーディング（Ｈａｒｄｉｎｇ，Ｆ．Ａ．）、マッカーサー（Ｊ．Ｇ．ＭｃＡｒｔｈｕｒ）、グロス（Ｊ．Ａ．Ｇｒｏｓｓ）、ラウレット（Ｄ．Ｍ．Ｒａｕｌｅｔ）およびアリソン（Ｊ．Ｐ．Ａｌｌｉｓｏｎ）（１９９２）、「ＣＤ２８により媒体されたシグナル伝達は、マウスＴ細胞をコスティミュレートし、Ｔ細胞クローンにおけるアネルギーの誘発を防ぐ」、Ｎａｔｕｒｅ、３５６：６０７～６０９；ギミ、フリーマン、グリベン、グレイ（Ｇ．Ｇｒａｙ）およびナドラー（１９９３）、「ヒトＴ細胞クローナルアネルギーは、Ｂ７コスティミュレーションの不在下での抗原提示により誘発される」、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ.、９０：６５８６～６５９０；タン（Ｔａｎ，Ｐ.）、アナセフティ（Ｃ．Ａｎａｓｅｆｔｉ）、ハンセン（Ｊ．Ａ．Ｈａｎｓｅｎ）、メルローズ（Ｊ．Ｍｅｌｒｏｓｅ）、ブランバンド（Ｍ．Ｂｒｕｎｖａｎｄ）、ブラッドショー、レッドベターおよびリンスレイ（１９９３）、「ＣＤ２８とその天然リガンドであるＢ７／ＢＢ１との間の相互作用を阻止することによるヒトＴリンパ球でのアロ抗原特異的な低応答性の誘発」、Ｊ．Ｅｅｘ．Ｍｅｄ．１７７：１６５～１７３］。インビボの寛容の達成は、免疫抑制のメカニズムおよび臓器移植拒絶や自己免疫疾患の治療のための実行可能な療法を構成する。このことは、ＣＴＬＡ－４－Ｉｇ投与後の実験モデルでは達成されている［レンショー（Ｌｅｎｓｈｏｗ，Ｄ．Ｊ.）、ゼング（Ｙ．Ｚｅｎｇ）、ジスルスウェイト（Ｒ．Ｊ．Ｔｈｉｓｔｌｅｔｈｗａｉｔｅ）、モンタグ（Ａ．Ｍｏｎｔａｇ）、ブラディー、ギブソン（Ｍ．Ｇ．Ｇｉｂｓｏｎ）、リンスレイおよびブルーストーン（Ｊ．Ａ．Ｂｌｕｅｓｔｏｎｅ）（１９９２）、「ＣＴＬＡ４－Ｉｇにより誘発された異種個体膵臓島移植の長期生存］、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２５７：７８９～７９５］。

Ｂ７．１分子およびＢ７．２分子はＣＤ２８かまたはＣＴＬＡ－４のいずれかに結合することができるが、Ｂ７．１はＣＤ２８には２００ＮｍのＫｄで結合し、ＣＴＬＡ－４には２０倍高い親和性で結合する［リンスレイ、クラークおよびレッドベター（１９９０）、「Ｔ細胞抗原ＣＤ２８は、活性化抗原Ｂ７／ＢＢ１と相互作用することによりＢ細胞との接着を媒体する」、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ.、８７：５０３１～５０３５；リンスレイら（１９９３）、「抗原へのＴ細胞応答の際のＣＤ２８受容体の役割」、Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｎｏｌ.、１１：１９１～１９２；リンスレイら（１９９３）、「Ｂ７／ＢＢ１とＣＤ２８との連動が、ＣＤ２８合成の一過性のダウンレギュレーションおよびＣＤ２８シグナル伝達に対する長期化した応答の欠如を誘発する」、Ｔｈｅ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ、１５０：３１５１～３１６９］。Ｂ７．１は活性化されたＢ細胞およびインターフェロン誘発された単球上では発現されるが、静止状態のＢ細胞では発現されない［フリーマン、グレイ、ギミ、ロマルド（Ｄ．Ｂ．Ｌｏｍａｒｒｄ）、ゾウ（Ｌ－Ｊ．Ｚｈｏｕ）、ホワイト、フィンゲロス（Ｊ．Ｄ．Ｆｉｎｇｅｒｏｔｈ）、グリベンおよびナドラー（１９９１）、「ヒトＢリンパ球活性化抗原Ｂ７のマウスホモログの構造、発現およびＴ細胞コスティミュラトリー活性」、Ｊ．Ｅｅｘ．Ｍｅｄ.、１７４：６２５～６３１］。一方、Ｂ７．２は、静止状態の単球、樹状細胞およびＢ細胞上で非常に低レベルではあるが構成的に発現され、その発現は活性化されたＴ細胞、ＮＫ細胞およびＢリンパ球では促進される［アズマ、イトー（Ｄ．Ｉｔｏ）、ヤギタ（Ｈ．Ｙａｇｉｔａ）、オクムラ（Ｋ．Ｏｋｕｍｕｒａ）、フィリップス、ラニエおよびゾモザ（Ｃ．Ｚｏｍｏｚａ）（１９９３）、「Ｂ７０抗原はＣＴＬＡ－４およびＣＤ２８の第二のリガンドである」、Ｎａｔｕｒｅ、３６６：７６～７９］。Ｂ７．１およびＢ７．２は同じ細胞型上で発現されうるが、Ｂ細胞上での発現は異なる動力学で起こる［レンショー、ス（Ｇ．Ｈ．Ｓｕ）、ズッカーマン、ナバビ（Ｎ．Ｎａｂａｖｉ）、ジェリス（Ｃ．Ｌ．Ｊｅｌｌｉｓ）、グレイ、ミラーおよびブルーストーン（１９９３）、「ＣＴＬＡ－４の別のリガンドの発現および機能的有意」、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、９０：１１０５４～１１０５８；ブショティス（Ｂｏｕｓｓｉｏｔｉｓ，Ｖ．Ａ.）、フリーマン、グリベン、ダリー（Ｊ．Ｄａｌｅｙ）、グレイおよびナドラー（１９９３）、「活性化されたヒトＢリンパ球は、Ｔ細胞活性化をコスティミュレートする３つのＣＴＬＡ－４対応受容体を発現する」、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、９０：１１０５９～１１０６３］。ＲＮＡレ

ベルでさらに分析したところ、Ｂ７．２ｍＲＮＡが構成的に発現されるのに対して、Ｂ７．１ＭＲＮＡは活性化の４時間後に検出され、初期低レベルのＢ７．１タンパク質は刺激から２４時間後までは検出できなかった［ブショテイス、フリーマン、グリベン、ダリー、グレイおよびナドラー（１９９３）、「活性化されたヒトＢリンパ球は、Ｔ細胞活性化をコスティミュレートする３つのＣＴＬＡ－４副受容体を発現する」、Proc. Natl. Acad. Sci.ＵＳＡ、９０：１１０５９～１１０６３］。それゆえ、ＣＴＬＡ－４／ＣＤ２８対応（counter）受容体は、Ｂ細胞活性化後の種々の時間に発現される。

さらに最近では、第二のＴ細胞関連副受容体ＣＴＬＡ－４が明らかにランナウエイ（runaway）免疫系を無効にし妨害する負のモデュレーターとして機能することが示唆されている［クラメル（Krummel Ｍ）、アリソン（Allison Ｊ）：「ＣＤ２８とＣＴＬＡ－４とは刺激に対するＴ細胞の応答に対して反対の作用を有する」、Ｊ．Eex. Med．１８２：４５９－４６６（１９９５）］。ＣＴＬＡ－４受容体は、ＣＴＬＡ－４ノックアウトマウスで証明されるように、免疫応答をダウンレギュレートするうえで重要な役割を果たしている。ＣＴＬＡ－４遺伝子を発現する能力をもたずに生まれてきたノックアウトマウスは、重篤なリンパ増殖性疾患のために３～４週間以内に死亡する［チボル（Ｔivol ＥＡ）、ボリエロ（Borriello Ｇ）、シュワイツァー（Ｓchweitzer ＡＮ）、リンチ（Lynch ＷＰ）、ブルーストーン（Ｂluestone ＪＡ）、シャープ（Ｓharpe ＡＨ）：「ＣＴＬＡ－４の喪失は広範囲のリンパ増殖および致死的な多臓器組織破壊に導き、ＣＴＬＡ－４の重要な負の制御的役割を明らかにする」、Ｉmmunity ３：５４１－５４７（１９９５）］。ＣＴＬＡ－４は、アポトーシスの誘発と連動したシグナル伝達機構により機能すると考えられており［グリッベン、フリーマン、ブシオチス（Boussiotis ＶＡ）、レナート（Remmert Ｐ）、ジェリス（Jellis ＣＬ）、グリーンフィールド（Greenfield Ｅ）、バーバー（Barber Ｍ）、レスティボ（Restivo Ｊr. ＶＡ）、ケ（Ke Ｘ）、グレイ（Gray ＧＳ）、ナドラー：「ＣＴＬＡ－４はヒトＴ細胞の抗原特異的なアポトーシスを媒介する」、Proc. Natl. Acad. Sci.（ＵＳＡ）９２：８１１－８２５（１９９５）］、該受容体上の特定部位への未だ定かでないリガンド結合により誘起される。Ｂ７．１／Ｂ７．２依存性コスティミュラトリーシグナルの種々の仕方での阻止は未発達の（aborted）Ｔ細胞活性化経路および特定の抗原に対する非応答性の発達を導くことがインビトロで示されている［レダーマン（Lederman Ｓ）、チェス（Chess Ｌ）、イェリン（Yellin ＭＪ）：「Ｔリンパ球の表面上のヒト糖タンパク質を認識するマウスモノクローナル抗体（５ｃ８）、それを含有する組成物」、米国特許第５，４７４，７７１（１９９５年１２月１２日）；リンズレイ（Linsley ＰＳ）、レッドベター、ダムル（Damle ＮＫ）、ブラディー（Brady Ｗ）：「キメラＣＴＬＡ４受容体およびその使用方法」、米国特許第５，４３４，１３１（１９９５年7月１８日）；ハーディング、１９９２；ギミ、フリーマン、ブリッベン、グレイ、ナドラー：「ヒトＴ細胞クローナルアネルギーはＢ７コスティミュレーションの不在下での抗原提示により誘発される」、Proc. Natl. Acad. Sci.（ＵＳＡ）９０：６５８６－６５９０（１９９３）；タン、アナセッティ、ハンセン、メルローズ、ブランバンド、ブラッドショー、レッドベター、リンスレイ：「ＣＤ２８とその天然リガンドＢ７／ＢＢ１との相互作用を阻止することによるアロ抗原特異的な過応答性の誘発」、Ｊ．Eex. Med.、１７７：１６５－１７３（１９９３）］。インビボ免疫寛容、アネルギー、または抗原特異的なＴ細胞の枯渇は、免疫抑制機構および臓器移植拒絶のための実行可能な療法または自己免疫疾患のもっともらしい治療を構成する。

Ｂ７．１およびＢ７．２の差異的な時間をずらした（differential temporal）発現は、これら２つの分子とＣＴＬＡ－４および／またはＣＤ２８との相互作用がＴ細胞への別個だが関連したシグナルを送達することを示唆している［ラサル（ＬａＳalle，Ｊ．Ｍ．）、トレンチーノ（Ｐ．Ｊ．Tolentino）、フリーマン、ナドラーおよびハフラー（Ｄ．Ａ．Hafler）（１９９２）、「ＣＤ２８およびＴ細胞抗原受容体シグナル伝達は、スーパー抗原刺激に応答したインターロイキン２遺伝子発現を共同的に制御する」、Ｊ．Eex. Med.、１７６：１７７～１８６；バンデンベルグ（Vandenberghe，Ｐ.）、フリーマン

、ナドラー、フレッチャー（Ｍ．Ｃ．Ｆletcher）、カモウン（Ｍ．Ｋamoun）、ツルカ（Ｌ．Ａ．Ｔurka）、レッドベター、トンプソンおよびジュン（１９９２）、「抗体およびＢ７／ＢＢ１媒体されたＣＤ２８受容体のライゲーションはヒトＴ細胞においてチロシンリン酸化を誘発する」、The Journal of Experimental Medicine、１７５：９５１～９６０］。Ｔ細胞に対するＣＴＬＡ－４およびＣＤ２８の正確なシグナル伝達機能は、現在のところ知られていない［ジェインウェイ（Ｊaneway，Ｃ．Ａ．，Ｊｒ．）およびボトムリー（Ｋ．Ｂottomly）（１９９４）、「リンパ球応答のシグナルおよび信号」、Cell、７６．２７５２８５］。しかしながら、１セットの受容体がＴ細胞活性化の初期刺激および第二の持続されたシグナルを提供し、該経路のさらなる精巧さ（elaboration）およびクローン拡張が起こるのを可能にしうる可能性がある［リンスレイ、グリーン（Ｊ．Ｌ．Ｇreene）、タン、ブラッドショー、レッドベター、アナセッティ（Ｃ．Ａnasetti）およびダムル（１９９２）、「活性化Ｔリンパ球上でのＣＴＬＡ－４およびＣＤ２８の同時発現および機能的協同」、Ｊ．Ｅex．Ｍed.、１７６：１５９５～１６０４］。現在のデータは、Ｔ細胞拡張、リンホカイン分泌およびエフェクター機能の完全な発達のためにＴＣＲとコスティミュラトリーシグナルの両者が必要である［グリーナン（Ｇreenan，Ｖ.）およびクレーマー（Ｇ．Ｋroemer）（１９９３）、「細胞免疫寛容への複数の経路」、Immunol Today、１４：５７３］というジェンキンスおよびシュワルツにより提唱された２シグナル仮説［シュワルツ（１９９０）、「Ｔリンパ球クローナルアネルギーのための細胞培養モデル」、Ｓcience、２４８：１３４９；ジェンキンス（１９９２）、「クローナルアネルギーの誘発における細胞分裂の役割」、Ｉmmunol Today、１３：６９］を支持している。第二のシグナルの送達ができないとＴ細胞がＩＬ－２を分泌できず、細胞は抗原に対して非応答性となる。

構造的には、Ｂ７．１およびＢ７．２の両者ともに、細胞外免疫グロブリンスーパーファミリーＶおよびＣ様ドメイン、疎水性膜貫通領域および細胞質テールを含む［フリーマン、グリベン、ブショティス、ング（Ｊ．Ｗ．Ng）、レスティボ（Ｖ．Ｒestivo，Ｊｒ.）、ロンバード（Ｌ．Ａ．Ｌombard）、グレイおよびナドラー（１９９３）、「Ｂ７．２のクローニング：ヒトＴ細胞増殖をコスティミュレートするＣＴＬＡ－４対応受容体」、Ｓcience、２６２：９０９］。Ｂ７．１およびＢ７．２はともに高程度にグリコシル化されている。Ｂ７．１は、２２３アミノ酸の細胞外ドメイン、２３アミノ酸の膜貫通ドメインおよび６１アミノ酸の細胞質テールからなる４４～５４ｋＤの糖タンパク質である。Ｂ７．１は、３つの潜在的なプロテインキナーゼリン酸化部位を含む［アズマ、イッセル、フィリップス、スピッツおよびラニエ（１９９３）、「活性化Ｔリンパ球上でのＢ７／ＢＢ１の機能的発現」、Ｊ．Ｅex．Ｍed.、１７７：８４５～８５０］。Ｂ７．２は、３０６アミノ酸の膜糖タンパク質である。Ｂ７．２は、２２０アミノ酸の細胞外領域、２３アミノ酸の疎水性膜貫通ドメインおよび６０アミノ酸の細胞質テールからなる［フリーマン、フリードマン、セジル、リー、ホワイトマンおよびナドラー（１９８９）、「活性化された新生物Ｂ細胞上でのみ発現されるＩｇスーパーファミリーの新たな成員であるＢ７」、The Journal of Ｉmmunology、１４３：２７１４～２７２２］。Ｂ７．１およびＢ７．２の両遺伝子は同じ染色体領域中に局在するが［フリーマン、ロンバード、ギミ、ブロッド（Ｓ．Ａ．Ｂrod）、リー、レイニング（Ｊ．Ｃ．Ｌaning）、ハフラー、ドーフ（Ｍ．Ｅ．Ｄorf）、グレイ、レイサー（Ｈ．Ｒeiser）、ジュン、トンプソンおよびナドラー（１９９２）、「ＣＴＬＡ－４およびＣＤ２８のＭＲＮＡは活性化後に大抵のＴ細胞で同時に発現される」、The Journal of Ｉmmunology、１４９：３７９５～３８０１；シュワルツ（１９９２）、「Ｔリンパ球のコスティミュレーション：ＣＤ２８、ＣＴＬＡ－４およびＢ７／ＢＢ１の役割」、セルバクマール（Ｓelvakumar，Ａ.）、モハンラジュ（Ｂ．Ｋ．Ｍohanraj）、エディ（Ｒ．Ｌ．Ｅddy）、ショーズ（Ｔ．Ｂ．Ｓhows）、ホワイト（Ｐ．Ｃ．Ｗhite）、ペリン（Ｃ．Ｐerrin）およびデュポン（Ｂ．Ｄupont）（１９９２）、「Ｂリンパ球活性化抗原Ｂ７をコードするヒト遺伝子のゲノム構成および染色体位置」、Ｉmmunogenetics、３６：１７５～１８１］、これら抗原は高レベルのホモロジーを共有してはいない。Ｂ７．１とＢ７．２との間の全体のホモロジーは２６％であり、マウス

Ｂ７．１とヒトＢ７．１との間の全体のホモロジーは２７％である［アズマ、イッセル、フィリップス、スピッツおよびラニエ（１９９３）、「活性化Ｔリンパ球上でのＢ７／ＢＢ１の機能的発現、Ｊ．Ｅex．Med.、１７７：８４５～８５０；フリーマン、フリードマン、セジル、リー、ホワイトマンおよびナドラー（１９８９）、「活性化された新生物Ｂ細胞上でのみ発現されるＩｇスーパーファミリーの新たな成員であるＢ７」、The Journal of Ｉmmunology、１４３：２７１４～２７２２］。ヒトＢ７．１、ヒトＢ７．２およびマウスＢ．１配列のアラインメントは、長いホモロジーを示す領域は殆どないことを示すが、これら３つの分子はすべてヒトＣＴＬＡ－４およびＣＤ２８に結合することが知られている。従って、これら３つの分子に共通する隣接しているかまたは立体配置的な共通した密接に関連した相同領域が存在する可能性が高い。この領域は、Ｂ７．１分子およびＢ７．２分子の対応受容体への結合部位を構成する。これらエピトープに対して産生された抗体は、Ｔ細胞上でのＢ７と対応受容体との相互作用を阻止する可能性がある。さらに、Ｂ７．１分子とＢ７．２分子との両者の上の該領域と交差反応する抗体は、Ｂ７．１またはＢ７．２に対して別々に向けられた抗体よりも実際的に有利である可能性がある。

２．Ｂ７／ＣＤ２８相互作用の阻止

Ｂ７／ＣＤ２８相互作用の阻止は特異的な免疫抑制の可能性を与え、長期間持続する抗原特異的な治療効果が得られる可能性がある。この相互作用を一時的に妨害する抗体または薬剤は、長期間の抗原特異的な治療効果を生成する効力を有する有用で特異的で安全な臨床免疫抑制剤となり得る。

Ｂ７．１かまたはＢ７．２のいずれかに対する抗体は、インビトロでのＩＬ－２産生の抑制により測定されるようにＴ細胞活性化を阻止することが示されている［デュボア（De Boer, M.）、パレン（Ｐ．Parren）、ドープ（Ｊ．Dove）、オッセンドープ（Ｆ．Ossendorp）、ファン・デア・ホルスト（van der Horst）およびリーダー（Ｊ．Reeder）（１９９２）、「新規な抗Ｂ７モノクローナル抗体の機能的特徴付け」、Eur．Journal of Ｉmmunology、２２：３０７１～３０７５；アズマ、イッセル、フィリップス、スピッツおよびラニエ（１９９３）、「活性化Ｔリンパ球上でのＢ７／ＢＢ１の機能的発現」、Ｊ．Ｅex．Med.、１７７：８４５～８５０］。しかしながら、種々の抗体が免疫抑制能においてさまざまであることが示されており、これは親和性かまたはエピトープ特異性のいずれかを反映しているかもしれない。このことの一つの可能な説明として、アポトーシスや活性化Ｔ細胞でのＣＴＬＡ－４受容体を介した幾つかの他の負のシグナル伝達は促進しながら、Ｂ７とＣＤ２８との結合のみを阻止する幾つかの抗体の能力がある。Ｂ７．１またはＢ７．２に対する幾つかの抗体は、実際、ＣＴＬＡ－４結合ドメインと交差反応することによりＣＴＬＡ－４の活性を妨害する。ＣＴＬＡ－４／Ｉｇ融合タンパク質および抗ＣＤ２８　Ｆａｂは、ＩＬ－２産生のダウンレギュレーションに対して同様の作用を有することが示された。

可溶性のＣＴＬＡ－４／Ｉｇ融合タンパク質のインビボ投与は、マウスにおいてＴ細胞依存性の抗体応答を抑制することが示されており［リンスレイ、グリーン、タン、ブラッドショー、レッドベター、アナセッティおよびダムル（１９９２）、「活性化Ｔリンパ球上でのＣＴＬＡ－４およびＣＤ２８の同時発現および機能的協同」、Ｊ．Ｅex．Med.、１７６：１５９５～１６０４；リン（Lin, H.）、ビリング（Ｓ．Ｆ．Builing）、リンスレイ、ウェイ（Ｒ．Ｏ．Wei）、トンプソンおよびツルカ（Ｌ．Ａ．Turka）（１９９３）、「ＣＴＬＡ－４－Ｉｇとドナー特異的な輸血によって誘発された主要組織適合複合体の不適合な心臓同種移植の長期受容」、Ｊ．Ｅex．Med.、１７８：１８０１］、さらに大用量の投与は第二の免疫に対する応答を抑制することができ、このアプローチが抗体に媒体された自己免疫疾患の治療に対して実行可能であることが示されている。さらに、ＣＴＬＡ－４－Ｉｇは、Ｔ細胞とＢ７．１／Ｂ７．２抗原提示細胞との間の相互作用を直接抑制することにより、マウスにおいて膵臓島細胞の拒絶を防ぐことができた［レンショー、ス、ズッカーマン、ナバビ、ジェリス、グレイ、ミラーおよびブルーストーン（１９９３）、「ＣＴＬＡ－４の別のリガンドの発現および機能的有意」、Proc．Natl．Acad．Sci．ＵＳＡ、９０：１１０５４～１１０５８］。この場合、長期のドナー特異的な

寛容が達成された。

３．抗体選択のための組換えファージ提示（Ｄisplay）法

今日まで、Ｂ７．１およびＢ７．２の両者に交差反応するモノクローナル抗体は報告されていない。さらに、Ｂ７．１またはＢ７．２に特異的で受容体ＣＤ２８結合を同時に活性化することに限定された抗原上の特定の部位を認識するモノクローナル抗体は報告されていない。または、Ｂ７．１またはＢ７．２に特異的でＣＴＬＡ－４受容体結合に限定された抗原上の特定の部位を認識するモノクローナル抗体は報告されていない。記載したように、かかる抗体は免疫抑制剤として非常に望ましいものである。

ファージ提示法は免疫応答の際に産生される抗体を単離するための従来法に置き換わりつつある。なぜなら、従来法を用いた場合に比べてはるかに高いパーセントの免疫範囲（immune repertoire）を評価することが可能であるからである。このことは、一部、ＰＥＧ融合の非効率性、染色体の不安定性、およびヘテロハイブリドーマ産生に伴う大量の組織培養およびスクリーニングによるものである。対照的にファージ提示法は、所定の抗原に応答した免疫グロブリン遺伝子の全範囲を潜在的に捕捉するための分子技術に依存している。

この技術はバーバー（Barber）らのProc. Natl. Acad. Sci. ＵＳＡ、８８、７９７８～７９８２（１９９１）に記載されている。本質的に、免疫グロブリンの重鎖遺伝子をＰＣＲ増幅し、繊維状ファージＭ１３のマイナーコートタンパク質をコードする遺伝子を含むベクター中に重鎖融合タンパク質が生成されるような仕方でクローニングする。重鎖融合タンパク質は、それが組み立てられるときに軽鎖遺伝子とともにＭ１３ファージ粒子中に取り込まれる。各組換えファージはそのゲノム内に異なる抗体Ｆａｂ分子の遺伝子を含み、これはファージの表面上に提示される。これらライブラリー内に10^6を越える異なる抗体がクローニングされ、提示されうる。ファージライブラリーを抗原をコーティングしたマイクロタイターウエル上でえり分け、非特異的なファージを洗い落とし、抗原結合したファージを溶出する。抗原特異的なクローンからのゲノムを単離し、さらに特徴付けるために可溶性のＦａｂ形態で抗体が発現できるように遺伝子IIIを切り出す。潜在的な治療候補として単一のＦａｂが一旦選択されたら、これを容易に全抗体に変換することができる。Ｆａｂ配列を全抗体に変換するために以前に記載された発現系は、ＩＤＥＣの哺乳動物発現ベクターＮＥＯＳＰＬＡである。このベクターは、ヒトガンマ１かまたはガンマ４のいずれかの定常領域遺伝子を含む。ＣＨＯ細胞をＮＥＯＳＰＬＡベクターでトランスフェクションし、増幅後、このベクター系は非常に高い発現レベル（＞３０ｐｇ／細胞／日）を達成できることが報告された。

４．霊長類化抗体

組換え抗体を生成するための他の非常に効率的な手段がニューマン（Newman）によって開示されている［ニューマン（１９９２）、Biotechnology、１０、１４５５～１４６０］。さらに詳しくは、この技術によりサル可変ドメインおよびヒト定常配列を含む霊長類化抗体を得ることができる。上記文献を参照のためその全体を本明細書中に引用する。さらに、この技術はまた、本願と同一の出願人である１９９５年１月２５日に出願した米国特許出願第０８／３７９，０７２号（これは１９９２年７月１０日に出願した米国特許出願第０７／９１２，２９２号（これは１９９２年３月２３日に出願した米国特許出願第０７／８５６，２８１号（これは１９９１年７月２５日に出願した米国特許出願第０７／７３５，０６４号の一部継続出願である）の一部継続出願である）の継続出願である）にも記載されている。米国特許出願第０８／３７９，０７２号およびその親出願を参照のためその全体を本明細書中に引用する。

この技術は、抗体をヒトに投与したときに抗原的に拒絶されないように修飾するものである。この技術は、ヒト抗原または受容体でカニクイザルを免疫することによっている。この技術は、ヒト細胞表面抗原に向けられた高親和性のモノクローナル抗体を産生するために開発された。

ファージ提示ライブラリーまたはＢ７．１および／またはＢ７．２で免疫したサルからのＢリンパ球を用いて得られたサルヘテロハイブリドーマをスクリーニングすることによる

ヒトＢ７．１およびＢ７．２に対するマカークザル抗体の同定はまた、本願と同一出願人に係る米国特許出願第０８／４８７，５５０号（１９９５年６月７日出願；その全内容を参照のため本明細書中に引用する）に記載されている。さらに詳しくは、米国特許出願第０８／４８７，５５０号は、Ｂ７：ＣＤ２８経路を阻害し、それゆえ有効な免疫抑制剤として機能する４つのモノクローナル抗体７Ｂ６、１６Ｃ１０、７Ｃ１０および２０Ｃ９を提供している。

このようにしてこれら同一出願人に係る出願により記載された仕方で生成された抗体は、ヒトエフェクター機能を示すこと、免疫原性が低減していること、および長期の血清半減期を有することが以前に報告されている。この技術は、カニクイザルがヒトと系統発生的には類似しているという事実にもかかわらず、カニクイザルが依然として多くのヒト抗原を異物として認識し、それゆえ免疫応答を誘起するという事実によっている。さらに、カニクイザルがヒトに系統発生的に近接しているため、これらサルで産生された抗体はヒトで産生された抗体に対して高度のアミノ酸ホモロジーを有することが見出された。実際、マカークザルの免疫グロブリン軽鎖および重鎖可変領域遺伝子を配列決定したところ、各遺伝子ファミリーはヒトにおけるその対応遺伝子と８５～９８％相同であることがわかった［ニューマンら（１９９２）、上掲］。このようにして産生された最初の抗体である抗ＣＤ４抗体は、ヒト免疫グロブリンフレームワーク領域のコンセンサス配列に９１～９２％相同であった［ニューマンら、Ｂiotechnology、１０、１４５８～１４６０（１９９２）］。

ヒトＢ７抗原に特異的なモノクローナル抗体は、以前に文献に記載されている。たとえば、ワイル（Weyl）ら［Hum. Ｉmmunol.、３１（４）、２７１～２７６（１９９１）］は、天然および変異抗原変異体を用いたＨＬＡ－Ｂ－２７に対するヒトモノクローナル抗体のエピトープマッピングを記載している。また、トゥバート（Toubert）ら［Ｃlin. Exp. Ｉmmunol.、８２（１）、１６～２０（１９９０）］は、３５ＫＤの細菌外膜タンパク質とも反応するＨＬＡ－Ｂ－２７モノクローナル抗体のエピトープマッピングを記載している。また、バル（Valle）ら［Ｉmmunol.、６９（４）、５３１～５３５（１９９０）］は、活性化Ｂ細胞およびＨＴＬＶ－１形質転換Ｔ細胞で発現されたＢ７抗原を認識するＩｇＧ１サブクラスのモノクローナル抗体を記載している。さらに、トゥバートら［Ｊ．Ｉmmunol.、１４１（７）、２５０３～９（１９８８）］は、ＨＬＡ－Ｂ－２７およびＨＬＡ－Ｂ－７抗原遺伝子の対立遺伝子間でのハイブリッド遺伝子を大腸菌で作成することにより構築したドメイン内組換え体を用いたこれら抗原のエピトープマッピングを記載している。

Ｂ７抗原の高発現が自己免疫疾患と相関関係を有することが何人かの研究者によって示されている。たとえば、イオネスコーチルゴビスト（Ｉonesco－Ｔirgoviste）ら［Med. Ｉnterre、２４（１）、１１～１７（１９８６）］は、１型インスリン依存性糖尿病での増大したＢ７抗原発現を報告している。また、乾癬患者から得た皮膚樹状細胞上でのＢ７抗原の関与が報告されている［ネッスル（Nestle）ら、Ｊ．Ｃlin. Ｉnvest.、９４（１）、２０２～２０９（１９９４）］。

さらに、アフィニティー精製した可溶性ＨＬＡ－Ｂ７を用いた抗ＨＬＡ－Ｂ７同種反応性ＣＴＬの抑制が文献で報告されている［ザバザバ（Ｚavazava）ら、Ｔransplantation、５１（４）、８３８～４２（１９９１）］。さらに、動物モデルにおいてＢ７活性を阻止するためのＢ７受容体可溶性リガンドＣＴＬＡ－４－Ｉｇの使用［たとえば、レンショーら、Ｓcience、２５７、７８９、７９５５（１９９２）を参照］およびＢ７を抑制しうるＢ７－１－Ｉｇ融合タンパク質が報告されている。

この開示では、ＣＤ２８受容体結合に限定されたＢ７．１抗原上の特定の部位を認識するモノクローナル抗体の同定のための証拠が提供される。さらに、本明細書では、ＣＴＬＡ－４受容体結合を排除するＢ７．１抗原上の特定の部位を認識するモノクローナル抗体の同定のための証拠が提供される。それゆえ、本明細書では、ヒトＢ７．１（ＣＤ８０）コスティミュラトリー抗原上の独特の抗原結合部位の存在を支持する証拠が提供される。これら主張に係る部位は、抗Ｂ７．１PRIMATIZED^{R}抗体により認識され、同時活性化受容体

ＣＤ２８との結合に限定されたＢ７．１抗原上の相互作用部位への結合を確認する証拠が提供される。

発明の要約および目的

本発明の目的は、ヒトＢ７抗原に特異的な新規な抗体を同定することにある。より詳しくは、ヒトＢ７．１抗原に特異的であり、ＣＤ２８受容体へのＢ７．１の結合をも阻止し得る抗体を同定することが本発明の目的である。ヒトＢ７．１抗原に特異的であり、ＣＴＬＡ－４へのＢ７．１の結合を阻害し得る抗体を同定することもまた本発明の目的である。それゆえ、本発明の目的は、Ｂ７．１抗原上の特定の部位を認識する抗原を同定することであり、その際、認識される部位は、ＣＤ２８受容体結合に限定されＣＴＬＡ－４受容体結合を排除するものである。

本発明の他の目的は、ヒトＢ７．１抗原に特異的であるがヒトＢ７．２抗原を認識することはできない抗体を同定することである。

本発明の他の目的は、ヒトＢ７．１抗原上の特定の部位を認識し、ＩＬ－２産生およびＴ細胞増殖を阻害し、有効な免疫抑制剤として機能するモノクローナル抗体およびその霊長類化形態を同定することである。さらに詳しくは、本発明の目的は、Ｂ７．１に特異的であり、ＩＬ－２産生を阻害し得る抗体を同定することである。

本発明の他の目的は、ドナー脾臓細胞培養中での抗原誘発応答、たとえば、抗原特異的なＩｇＧ応答、ＩＬ－２産生および細胞増殖を阻害する、モノクローナル抗体およびその霊長類化形態を提供することにある。

本発明の他の特別の目的はまた、有利な特性、すなわち親和性、免疫抑制活性を有する、治療剤として有用な、ヒトＢ７．１抗原に特異的な特定のサルモノクローナル抗体およびその霊長類化形態を同定することにある。さらに詳しくは、これら抗体およびその霊長類化形態は、たとえば免疫抑制剤として、すなわち抗原誘発免疫応答を阻止するため、自己免疫疾患（乾癬、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）、１型糖尿病、特発性血小板減少性紫斑病（ＩＴＰ）、アレルギー、炎症性胆汁疾患など）を治療するため、および臓器移植拒絶を防ぐために用いることができる。

本発明の他の目的は、ヒトＢ７．１抗原に特異的な１またはそれ以上のモノクローナル抗体またはその霊長類化形態および薬理学的に許容しうる担体または賦形剤を含む医薬組成物を提供することにある。これら組成物は、たとえば、自己免疫疾患、たとえば、特発性血小板減少性紫斑病（ＩＴＰ）や全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）を治療するため、抗原誘発免疫応答を阻止するため、および移植受容者における臓器移植拒絶を防ぐための免疫抑制剤として用いられるであろう。

本発明の他の目的は、ヒトＢ７．１抗原に特異的に結合する１またはそれ以上の霊長類化モノクローナル抗体の治療学的有効量を投与することによる新規な治療方法を提供することにある。そのような治療方法は、Ｂ７：ＣＤ２８経路の阻害により治療可能な疾患、たとえば、特発性血小板減少性紫斑病（ＩＴＰ）、全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）、１型糖尿病、乾癬、慢性関節リウマチ、多発性硬化症、再生不能性貧血などの自己免疫疾患の治療、並びに移植患者において移植拒絶を防ぐために有用である。

本発明のさらに他の目的は、ヒトＢ７．１抗原に特異的なモノクローナル抗体の少なくとも可変重鎖および軽鎖ドメインを発現するトランスフェクタント、たとえばＣＨＯ細胞を提供することにある。

定義

本発明を一層明確に理解できるように下記術語を定義する。

枯渇（Depleting）抗体　－　活性化Ｂ細胞または他の抗原提示細胞を殺す抗体。

非枯渇（Non－depleting）抗体　－　Ｂ７とＴ細胞活性化リガンドＣＤ２８およびＣＴＬＡ－４とのコスティミュラトリー作用を阻止する抗体。それゆえ、この抗体は免疫性を減少させる（anergizes）が抗原提示細胞を排除はしない。

霊長類化抗体　－　サル抗体、とりわけカニクイザル抗体の可変重鎖および軽鎖ドメインを含み、ヒト定常ドメイン配列、好ましくはヒト免疫グロブリンガンマ１またはガンマ４定常ドメイン（またはＰＥ変異体）を含むように設計した組換え抗体。かかる抗体の調製

は、ニューマンら（１９９２）、「ヒト疾患の免疫療法のための組換え抗体の霊長類化：ヒトＣＤＨに対するマカークザル／ヒトキメラ抗体」、Ｂiotechnology、１０：１４５８～１４６０；および本願と同じ出願人に係る米国特許出願第０８／３７９，０７２号（両文献を参照のため本明細書中にその全体を引用する）に記載されている。これら抗体は、ヒト抗体と高程度のホモロジー、すなわち８５～９８％のホモロジーを示し、ヒトエフェクター機能を示し、免疫原性が減少しており、ヒト抗原に対して高い親和性を示すことが報告されている。

Ｂ７抗原　－　本願におけるＢ７抗原は、たとえばヒトＢ７．１抗原およびＢ７．２抗原を含む。これら抗原はＣＤ２８および／またはＣＴＬＡ－４に結合する。これら抗原はＴ細胞活性化においてコスティミュラトリー機能を有する。また、これら抗原はすべて、細胞外免疫グロブリンスーパーファミリーＶおよびＣ様ドメイン、疎水性膜貫通領域および細胞質テールを含み［フリーマンら、Ｓcience、２６２：９０９（１９９３）を参照］、高度にグリコシル化されている。

抗Ｂ７抗体　－　ヒトＢ７抗原、たとえばヒトＢ７．１抗原および／またはＢ７．２抗原に充分な親和性にて特異的に結合してＢ７：ＣＤ２８相互作用を阻止し、それによって免疫抑制を誘発するサルモノクローナル抗体またはその霊長類化形態。

【図面の簡単な説明】

図１は、マカークザル免疫グロブリン配列に基づくプライマーを含む、繊維状ファージの表面に示されたＢ７に対して産生された組換え免疫グロブリンライブラリーをスクリーニングするのに用いるｐＭＳベクターを示す。

図２は、本願発明のヒトＢ７．１抗原に特異的な霊長類化抗体を発現させるのに用いるＮＥＯＳＰＬＡ発現ベクターを示す。

図３ａは、７Ｃ１０の軽鎖の霊長類化形態のアミノ酸配列および核酸配列を示す。

図３ｂは、７Ｃ１０の重鎖の霊長類化形態のアミノ酸配列および核酸配列を示す。

図４ａは、７Ｂ６の軽鎖の霊長類化形態のアミノ酸配列および核酸配列を示す。

図４ｂは、７Ｂ６の重鎖の霊長類化形態のアミノ酸配列および核酸配列を示す。

図５ａは、１６Ｃ１０の霊長類化軽鎖のアミノ酸配列および核酸配列を示す。

図５ｂは、１６Ｃ１０の霊長類化重鎖のアミノ酸配列および核酸配列を示す。

図６は、Ｐ１６Ｃ１０がＢ７．１トランスフェクションＣＨＯ細胞へのＣＴＬＡ－４１ｇ－ビオチン結合を阻止できないことを示す。

図７は、ＣＴＬＡ－４ＩｇがＢ７．１トランスフェクションＣＨＯ細胞へのＰ１６Ｃ１０－ビオチン結合を阻止できないことを示す。

図８は、ＢＢ－１がＢ７．１トランスフェクションＣＨＯ細胞へのＣＴＬＡ－４Ｉｇ－ビオチンの結合を完全に阻止することを示しており、さらにＢＢ－１がＢ７．１トランスフェクションＣＨＯ細胞へのＰ１６Ｃ１０－ビオチン結合に有意の影響を及ぼすことができないことを示している。

図９は、ＣＴＬＡ－４Ｉｇ－ビオチンがＰ１６Ｃ１０以外のすべてのＢ７．１阻害剤により有効に阻止されることを示している。

図１０は、Ｐ１６Ｃ１０がＣＤ２８／Ｂ７－１Ｉｇ相互作用の結合を阻止する能力を示す。示したデータは、４つの別個の実験から得られた値の平均である。

発明の詳細な説明

上記のように、本発明は、ヒトＢ７．１抗原に特異的であり、ＣＤ２８受容体へのＢ７．１の結合を阻害することができ、ＣＴＬＡ－４受容体へのＢ７．１の結合を阻害することができないモノクローナル抗体またはその霊長類化形態の同定に関する。正のコスティミュレーションに対するアンタゴニスト作用と負のシグナル伝達に対するアゴニスト作用との組み合わせを可能としながら上記同定された抗体を用いてＣＤ２８とＢ７．１（ＣＤ８０）との間の主要な活性化部位を阻止することは、再発形態の自己免疫疾患に介入するための有用な治療学的アプローチであろう。同定された抗体の機能的な活性は、Ｔ細胞刺激性サイトカインＩＬ－２の産生の阻止により定められる。同定された抗体は、第二の作動リガンドＢ７．２の存在下にもかかわらず、ＩＬ－２の産生を５０％を超えて阻止する能

力を示し、他の文献において定められる他の抗Ｂ７．１抗体で観察される作用では一般に認められない別の作用機構が存在することを示唆していた。
ヒトＢ７．１および／またはＢ７．２抗原に特異的に結合する新規なサルモノクローナル抗体並びにそれから得られた霊長類化抗体の製造は、同時出願中の米国特許出願第０８／４８７，５５０号に記載されており、本明細書にも記載してある。これら抗体はヒトＢ７．１および／またはＢ７．２に対する高い親和性を有し、それゆえＢ７：ＣＤ８６経路を阻害する免疫抑制剤として用いることができる。
サルモノクローナル抗体の調製は、ファージ提示ライブラリーのスクリーニングにより、またはＢ７（たとえば、ヒトＢ７．１および／またはＢ７．２）で免疫したサルから得たＢリンパ球を用いたサルヘテロハイブリドーマの調製により、行うことができる。
記載のように、抗Ｂ７抗体の第一の製造方法は、組換えファージ提示技術を含む。この技術は一般に上記文献に記載されている。
本質的に、この技術は、繊維状ファージの表面上に提示されたＢ７抗原に対する組換え免疫グロブリンライブラリーを合成し、Ｂ７．１抗原および／またはＢ７．２抗原に対する高い親和性を有する抗体を分泌するファージを選択することを含むであろう。上記に記載したように、ヒトＢ７．１．およびＢ７．２の両者に結合する抗体を選択するのが好ましいであろう。かかる方法を行うため、本発明者らは組換えの可能性を減少させ安定性を改善したサルライブラリーのための独特のライブラリーを作成した。このベクターｐＭＳは以下に詳細に記載するが、図１に示してある。
本質的に、マカークザルライブラリーに使用するファージ提示を採用するため、このベクターはサル免疫グロブリン遺伝子をＰＣＲ増幅するための特定のプライマーを含んでいる。これらプライマーは、霊長類化技術を開発する際に得られるマカークザル配列およびヒト配列を含むデータベースに基づく。
適当なプライマーは、本願と同じ出願人に係る米国特許出願第０８／３７９，０７２号（参照のため本明細書中に引用する）に開示されている。
第二の方法は、ヒトＢ７抗原、好ましくはヒトＢ７．１抗原およびＢ７．２抗原に対してサル、すなわちマカークザルを免疫することを含む。マカークザルをモノクローナル抗体の再生に使用することの本来的な利点は上記に記載してある。とりわけ、かかるサル、すなわちカニクイザルはヒト抗原または受容体に対して免疫することができる。さらに、得られた抗体は、ニューマンら、Ｂiotechnology、１０、１４５５～１４６０（１９９２）およびニューマンらの本願と同じ出願人に係る米国特許出願第０８／３７９，０７２号（１９９５年1月２５日出願）（その全体を参照のため本明細書中に引用する）に記載の方法に従って霊長類化抗体を作成するのに用いることができる。
カニクイザルから得られる抗体の有意な利点は、これらサルが多くのヒトタンパク質を異物として認識し、それゆえ所望のヒト抗原、たとえばヒト表面タンパク質および細胞受容体に対して高い親和性を有する抗体を作成できることである。さらに、カニクイザルはヒトと系統発生的に近接しているため、それから得られる抗体はヒトで産生される抗体と高度のアミノ酸ホモロジーを示す。上記に記載したように、マカークザルの免疫グロブリン軽鎖および重鎖可変領域遺伝子の配列決定したところ、各遺伝子ファミリーの配列はヒトの対応配列と８５～８８％相同であることがわかった（ニューマンら（１９９２）、上掲）。
本質的に、カニクイザルにヒトＢ７抗原、たとえばヒトＢ７．１抗原および／またはヒトＢ７．２抗原を投与し、それからＢ細胞を単離し、たとえばリンパ節生検を該動物から採取し、ついでポリエチレングリコール（ＰＥＧ）を用いてＢリンパ球をＫＨ６／Ｂ５（マウス×ヒト）と融合させる。ついで、ヒトＢ７抗原、たとえばヒトＢ７．１抗原および／またはヒトＢ７．２抗原に結合する抗体を分泌するヘテロハイブリドーマを同定する。
Ｂ７．１およびＢ７．２の両者に結合する抗体が望ましい。なぜなら、そのような抗体は、Ｂ７と同様にＢ７．１およびＢ７．２とその対応受容体、すなわちヒトＣＴＬＡ－４およびＣＤ２８との相互作用を抑制するのに用いることができるからである。これらエピトープに対する抗体は、ヒトＢ７．１およびヒトＢ７．２の両者がＴ細胞上の対応受容体と

相互作用するのを抑制する。このことは、相乗作用を付与する可能性がある。
しかしながら、ヒトＢ７抗原、Ｂ７．１抗原またはＢ７．２抗原の一方のみに結合する抗体もまた、これら分子がともにＴ細胞活性化、クローン拡張、リンホカイン（ＩＬ－２）分泌、および抗原に対する応答性に関与することから非常に望ましい。ヒトＢ７．１およびＢ７．２の両者がヒトＣＴＬＡ－４およびＣＤ２８に結合するなら、おそらく、それに対してマカークザル抗体が潜在的に産生される少なくとも一つの共通したまたは相同な領域（おそらく、共通する立体配置エピトープ）が存在するに違いない。
開示した発明は、特定の抗体を産生するようにプライミングした動物の使用を含む。かかる手順に有用な動物には、これらに限られるものではないが、以下のものが挙げられる：マウス、ラット、モルモット、ハムスター、サル、ブタ、ヤギおよびウサギ。
ＳＣＩＤマウスを用いてヒト抗体を産生するための好ましい手段は、本願と同一出願人に係る同時出願中の米国特許出願第０８／４８８，３７６号に開示されている。
本発明者らは、マカークザルの免疫を、ＣＨＯ細胞中で産生されＬ３０７．４－セファロースアフィニティーカラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーにより精製した組換え可溶性Ｂ７．１抗原に対して行うことを選択した。しかしながら、特定の投与Ｂ７抗原および潜在的に他のＢ７抗原に対して特異的な抗体応答となるに充分な純度を有する限りにおいて、ヒトＢ７抗原、ヒトＢ７．１抗原またはヒトＢ７．２抗原の特定の採取源は重要ではない。
ヒトＢ７抗原、ヒトＢ７．１抗原（ＣＤ８０とも称される）遺伝子およびヒトＢ７．２抗原（ＣＤ８６とも称される）遺伝子はクローニングおよび配列決定されており、それゆえ組換え法により容易に製造することができる。
好ましくは、投与するヒトＢ７抗原、ヒトＢ７．１抗原および／またはヒトＢ７．２抗原は、たとえば膜貫通ドメインと細胞質ドメインを除去することによって細胞外部分、すなわち細胞外スーパーファミリーＶおよびＣ様ドメインのみを有するＢ７、Ｂ７．１またはＢ７．２遺伝子を発現させることにより、可溶性の形態で投与されるであろう［たとえば、グルメット（Ｇrumet）ら、Hum. Immunol.、４０（３）、２２８～２３４、１９９４（可溶性形態のＢ７の発現を教示する；参照のためその全体を本明細書中に引用する）を参照］。
マカークザルをＢ７抗原、Ｂ７．１抗原および／またはＢ７．２抗原、好ましくはその可溶性形態で、これら抗原に対する抗体が産生される条件下にて免疫するであろう。好ましくは、可溶性のヒトＢ７抗原、Ｂ７．１抗原またはＢ７．２抗原をアジュバント、たとえばフロントの完全アジュバント（ＣＦＡ）、アルミニウム、サポニンまたは他の公知のアジュバント並びにそれらの組み合わせとともに投与されるであろう。一般に、これには、たとえば繰り返し注射することにより数カ月にわたって繰り返し免疫することが必要であろう。たとえば、可溶性のＢ７．１抗原の投与をアジュバント中でブースター免疫とともに３～４カ月間行い、ヒトＢ７．１抗原に結合する抗体を含む血清を生成した。
免疫後、Ｂ細胞をたとえば免疫動物からリンパ節生検を採取することにより回収し、ポリエチレングリコールを用いてＢ細胞をＫＨ６／Ｂ５（マウス×ヒト）ヘテロハイブリドーマと融合させる。かかるヘテロハイブリドーマの作成方法は知られており、１９９５年１月２５日に出願されたニューマンらの米国特許出願第０８／３７９，０７２号（参照のため本明細書中に引用する）に記載されている。
ついで、ヒトＢ７、Ｂ７．１および／またはＢ７．２に結合する抗体を分泌するヘテロハイブリドーマを同定する。このことは公知技術により行うことができる。たとえば、このことは酵素または放射性核種で標識したヒトＢ７、Ｂ７．１および／またはＢ７．２を用いたＥＬＩＳＡまたはラジオイムノアッセイにより決定することができる。
ついで、ヒトＢ７、Ｂ７．１および／またはＢ７．２抗原に対する所望の特異性を有する抗体を分泌する細胞株をサブクローニングしてモノクローナル化する。
本発明においては、本発明者らは、ＥＬＩＳＡアッセイにおける可溶性Ｂ７．１抗原コーティングプレート、抗原陽性Ｂ７．１細胞、および細胞表面上にヒトＢ７．１抗原を発現するＣＨＯトランスフェクタントに結合する能力について精製抗体をスクリーニングした

。さらに、混合リンパ球反応（ＭＬＲ）におけるＩＬ－２産生およびトリチウム化チミジンの取り込みにより測定されるように（Ｂ７結合は^{125}Ｉ放射性標識した可溶性Ｂ７．１（ＳＢ７．１）を用いて検出）、Ｂ細胞／Ｔ細胞相互作用を阻止する能力について抗体をスクリーニングした。

また、マカークザルからのアフィニティー精製した抗体を、Ｂ７．１／Ｉｇ融合タンパク質を発現するＣＨＯトランスフェクタントに対する反応性、およびヒトＢ７．２抗原を産生するＣＨＯ細胞に対する反応性について試験した。これら結果は、Ｂ７．１免疫血清がＢ７．２トランスフェクトーマに結合することを示した。Ｂ７．２抗原への抗体の結合は、可溶性のＢ７．２－Ｉｇ試薬を用いて確認することができる。実施例に記載するように、このことは、Ｂ７．２－Ｉｇ－セファロースアフィニティーカラムを調製するのに充分な量でＢ７．２－ＩｇをＣＨＯトランスフェクトーマから調製および精製することにより行う。Ｂ７．２に交差反応する抗体はＢ７．２－Ｉｇ－セファロースカラムに結合するであろう。

ついで、ヒトＢ７抗原、Ｂ７．１抗原および／またはＢ７．２抗原に特異的に結合する抗体を発現する細胞株を用い、本質的にニューマンら（１９９２）、上掲、および１９９５年１月２５日に出願されたニューマンらの米国特許出願第０８／３７９，０７２号（ともに参照のため本明細書中に引用する）に記載されたようにして霊長類化抗体を作成するために可変ドメイン配列をクローニングする。本質的に、このことには、該細胞株からのＲＮＡの抽出、ｃＤＮＡへの変換、およびＩｇ特異的プライマーを用いたＰＣＲによる増幅が含まれる。適当なプライマーは、ニューマンら（１９９２）、上掲、および米国特許出願第０８／３７９，０７２号明細書（とりわけ、米国特許出願第０８／３７９，０７２号の図１を参照）に記載されている。

ついで、クローニングしたサル可変遺伝子を、ヒト重鎖および軽鎖定常領域遺伝子を含む発現ベクター中に挿入する。好ましくは、このことはＩＤＥＣ，Ｉnc.の特許発現ベクターであるＮＥＯＳＰＬＡを用いて行う。このベクターは図２に示してあり、サイトメガロウイルスプロモーター／エンハンサー、マウスβグロビン主要プロモーター、ＳＶ４０の複製起点、ウシ成長ホルモンポリアデニル化配列、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼエクソン１およびエクソン２、ヒト免疫グロブリンκまたはλ定常領域、ジヒドロ葉酸レダクターゼ遺伝子、ヒト免疫グロブリンγ１またはγ４ＰＥ定常領域およびリーダー配列を含む。このベクターは、サル可変領域遺伝子の導入、ＣＨＯ細胞中でのトランスフェクション、ついでＧ４１８含有培地中での選択およびメトトレキセート増幅の後に非常に高レベルの霊長類化抗体が発現されることがわかった。

たとえば、この発現系は、これまでにＣＤ４その他のヒト細胞表面受容体に対して高い結合活性（Ｋｄ≦１０$^{-10}$Ｍ）を有する霊長類化抗体が得られることが開示されている。さらに、これら抗体は、もともとのサル抗体と同じ親和性、特異性および機能的活性を示すことがわかっている。このベクター系は、本願と同じ出願人に係る米国特許出願第３７９，０７２号（参照のため本明細書中に引用する）、および１９９３年１１月３日に出願された米国特許出願第０８／１４９，０９９号（参照のためその全体を本明細書中に引用する）に実質的に開示されている。この系は高発現レベル、すなわち＞３０ｐｇ／細胞／日を提供する。

以下に記載するように、本発明者らは、Ｂ７．１抗原に特異的に結合する４つの先導（lead）候補サルモノクローナル抗体を選択した。これらサルモノクローナル抗体は、本明細書において７Ｂ６、１６Ｃ１０、７Ｃ１０および２０Ｃ９と称する。

以下にさらに詳細に記載するように、これら抗体を、Ｔ細胞結合についてのＴ細胞結合実験のための混合リンパ球反応中でのＩＬ－２産生およびトリチル化チミジンの取り込みによって測定されるように、Ｂ細胞／Ｔ細胞相互作用を阻止する能力について評価し、ヒト体コート（human body coat）末梢血リンパ球をＰＨＡ刺激物質の存在下で３～６日間培養した。Ｂ７結合を^{125}Ｉ－放射性標識した可溶性Ｂ７．１を用いてラジオアッセイした。観察した結果は、減少したＩＬ－２産生および混合リンパ球培養の減少した増殖により示されるように、これらすべての抗体がＢ７．１抗原と高い親和性にて結合し、Ｂ細胞／

Ｔ細胞相互作用を有効に阻止することを示す。
これら特定のサルモノクローナル抗体の特性は、まとめると以下のとおりである。
１．スキャッチャード分析は、Ｂ７－Ｉｇコーティングプレートへ結合するサル抗体のみかけの親和性定数（Ｋｄ）がおよそ以下のとおりであることを示した：
ａ：７Ｃ１０：　６．２　×　１０$^{-9}$Ｍ
ｂ：１６Ｃ１０：　８．１　×　１０$^{-9}$Ｍ
ｃ：７Ｂ６：　１０．７　×　１０$^{-9}$Ｍ
ｄ：２０Ｃ９：　１０．８　×　１０$^{-9}$Ｍ
２．抗体を混合リンパ球反応アッセイ（ＭＬＲ）においてインビトロで試験した。ＭＬＲは、４つのすべての抗Ｂ７．１抗体が下記ＩＣ$_{50}$値に示されように異なる程度にＩＬ－２産生を阻害することを示した：
ａ：７Ｂ６：　５．０μｇ／Ｍ
ｂ：１６Ｃ１０：　＜０．１μｇ／Ｍ
ｃ：２０Ｃ９：　２．０μｇ／Ｍ
ｄ：７Ｃ１０：　５．０μｇ／Ｍ
３．サル抗Ｂ７．１抗体を、ヒト末梢血リンパ球（ＰＢＬ）上のＢ７に結合する能力について試験した。ＦＡＣＳ分析は、４つのすべてのサル抗体が陽性であることを示した。
４．サル抗体１６Ｃ１０、７Ｂ６、７Ｃ１０および２０Ｃ９をＦＡＣＳ分析によりＣ１ｑ結合について試験した。その結果は、Ｂ７．１　ＣＨＯトランスフェクション細胞とともにインキュベートした後に７Ｃ１０サルＩｇが強いヒトＣ１ｑ結合を有することを示した。１６Ｃ１０は陽性であったが、２０Ｃ９および７Ｂ６サル抗体は陰性であった。
５．病理－毒性（path-tox）研究のための動物モデルを選択するため、異なる種からの動物血でサル抗体を試験した。サル抗Ｂ７．１抗体は、ヒト、チンパンジーと交差反応した。
これら特性に基づき、３つのサルモノクローナル抗体、１６Ｃ１０、７Ｃ１０および２０Ｃ９が最も有利な特性を備えていると思われ、そのうちでも１６Ｃ１０および７Ｃ１０は２０Ｃ９に比べて若干優れていた。
上記技術および本願と同じ出願人に係る米国特許出願第０８／３７９，０７２号に開示された技術を用い、本発明者らは７Ｃ１０、７Ｂ６および１６Ｃ１０の可変ドメインをクローニングし、７Ｃ１０軽鎖、７Ｃ１０重鎖、７Ｂ６軽鎖、７Ｂ６重鎖、１６Ｃ１０軽鎖および１６Ｃ１０重鎖の霊長類化形態のアミノ酸配列および核酸配列を提供する。これらアミノ酸配列および核酸配列は、図３ａおよび図３ｂ、図４ａおよび図４ｂ、および図５ａおよび図５ｂに示されている。ヒトガンマ１定常ドメインのＤＮＡ配列およびアミノ酸配列は米国特許出願第０８／３７９，０７２号に記載されている。
上記に記載したように、これら霊長類化抗体は図２に示したＮＥＯＳＰＬＡ発現ベクター（実質的に、本願と同じ出願人に係る米国特許出願第０８／３７９，０７２号および０８／１４９，０９９号（両出願を参照のため本明細書中に引用する）に記載されている）を用いて発現させるのが好ましい。
上記で記載したように、本発明の霊長類化抗体はヒト免疫グロブリンガンマ１またはガンマ４定常領域のいずれかを含むのが好ましく、ガンマ４は２つの位置にて突然変異させてガンマ４ＰＥを作成するのが好ましいであろう。このガンマ４ＰＥ変異体は２つの変異、すなわち残留ＦＣＲ結合を排除するために導入したＣＨ２領域中のグルタミン酸、および重鎖ジスルフィド結合相互作用の安定性を増大させることを意図したヒンジ領域におけるプロリン置換を含んでいる［アレグル（Ａlegre）ら、Ｊ．Ｉmmunol.、１４８、３４６１～３４６８（１９９２）；およびエンジェル（Angel）ら、Mol．Ｉmmunol.、３０、１０５～１５８（１９９３）；ともに参照のため本明細書中に引用する］。
本発明の霊長類化抗体がガンマ１、ガンマ４またはガンマ４ＰＥ定常領域のいずれを含むかは、特定の疾患標的にほぼ依存する。好ましくは、枯渇および非枯渇霊長類化ＩｇＧ１およびＩｇＧ４抗体を作成し、特定の疾患標的に対して試験する。
本発明のサルモノクローナル抗体が上記結合特性および機能的特性を有するとするなら、

これら抗Ｂ７．１モノクローナル抗体およびその霊長類化形態はＢ７：ＣＤ２８相互作用を阻止するための治療剤として充分に適しているに違いなく、かくして免疫抑制剤が提供される。とりわけ、混合リンパ球培養におけるＩＬ－２産生およびトリチウム化チミジンの取り込みによって測定されるようなＢ７．１抗原への高親和性およびＢ細胞／Ｔ細胞相互作用を阻止する能力、並びに減少した抗原特異的ＩｇＧ応答、ＩＬ－２産生および細胞増殖によって示されるようなドナー脾臓細胞培養において抗原誘発応答を有効に抑制する能力を有するとするなら、これらサルモノクローナル抗体およびその霊長類化形態はＢ７：ＣＤ２８経路を調節する有効な免疫抑制剤として機能するに違いない。このことは、免疫抑制が治療学上望ましい多くの疾患、たとえば自己免疫疾患を治療するため、望ましくない抗原特異的ＩｇＧ応答を抑制するため、および臓器移植拒絶および移植片対宿主病を防ぐために重要である。本質的に、本発明の抗体は、Ｂ７：ＣＤ２８経路の抑制が治療学上望ましいあらゆる疾患を治療するうえで有用であろう。

本発明の抗Ｂ７．１抗体の重要な治療適応症としては、例として、特発性血小板減少性紫斑病（ＩＴＰ）、全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）、１型糖尿病、多発性硬化症、再生不能性貧血、乾癬、アレルギー、炎症性胆汁疾患および慢性関節リウマチなどの自己免疫疾患が挙げられる。

本発明の抗Ｂ７．１抗体の他の治療適応症は、臓器移植および骨髄移植（ＢＭＴ）の際の移植片対宿主病（ＧＶＨＤ）を防ぐことである。本発明の抗体は、ドナー特異的な同種抗原に対する宿主寛容を誘発し、それによって移植を容易にし、移植拒絶の発生を低減するのに用いることができる。同種抗原心臓移植のマウスモデルにおいて、ＣＴＬＡ４－Ｉｇの静脈内投与が免疫抑制あるいは同種抗原に対する寛容の誘発とさえなりうることが示されている［リン（Ｌin）ら、Ｊ．Ｅex．Ｍed.１７８］１８０１、１９９３；トルカ（Ｔorka）ら、Ｐroc．Ｎatl．Ａcad．Ｓci．ＵＳＡ、８９：１１１０２、１９９２］。本発明の霊長類化抗Ｂ７．１抗体は同様またはそれ以上の活性を示すであろうことが期待される。

上記方法によりまたは同等の技術により産生した抗体は、機能的生物学的アッセイにおいて特徴付けるためにアフィニティークロマトグラフィーとサイズ排除クロマトグラフィーとの組み合わせにより精製することができる。これらアッセイには、特異性および結合親和性の決定並びに発現されたイソ型に伴うエフェクター機能、たとえばＡＤＣＣ、または補体固定化が含まれる。かかる抗体は、多くのヒト疾患、たとえば、Ｂ細胞リンパ腫、ＨＩＶ／ＡＩＤＳなどのウイルス性疾患を含む感染疾患、自己免疫疾患、炎症性疾患、および移植に対する受動および能動治療剤として用いることができる。これら抗体は、その天然型か、または抗体／キレート複合体、抗体／薬剤複合体もしくは抗体／毒素複合体の一部として用いることができる。さらに、全抗体または抗体フラグメントＦ（ａｂ’）$_2$、Ｆａｂ、Ｆｖ）を造影試薬として、または抗イディオタイプ応答を生成するための能動免疫療法における潜在的なワクチンまたは免疫原として用いることができる。

治療効果を得るのに有用な抗体の量は、当業者によく知られた標準法により決定することができる。これら抗体は一般に、標準法により薬理学的に許容しうる緩衝液中にて提供され、所望の経路にて投与できる。本願の請求に係る抗体の有効性およびヒトによる寛容のため、ヒトにおける種々の疾患または疾患状態を治療するためにこれら抗体を繰り返し投与することが可能である。

本発明の抗Ｂ７．１抗体（またはそのフラグメント）は、免疫抑制を誘発するのに、すなわちヒトまたは動物の免疫系の抑制を誘発するのに有用である。それゆえ、本発明は、本発明の抗体の有効な非毒性量を免疫抑制を必要とするヒトその他の動物に投与することによる、かかるヒトその他の動物において免疫抑制を予防的または治療的に誘発する方法に関する。

本発明の化合物が免疫抑制を誘発する能力は、この目的のために使用される標準的な試験、たとえば、混合リンパ球反応試験またはチミジンの取り込みにより測定されるＴ細胞増殖の抑制を測定する試験で示される。

本発明の抗体が免疫抑制を誘発するうえで有用性を有するという事実は、本発明の抗体が

移植臓器または組織（たとえば、腎臓、心臓、肺、骨髄、皮膚、角膜など）に対する抵抗または拒絶の治療または予防；自己免疫疾患、炎症疾患、増殖性および過増殖性疾患、および免疫学的に媒体された疾患の皮膚症状（たとえば、慢性関節リウマチ、エリテマトーデス、全身性エリテマトーデス、橋本甲状腺炎、多発性硬化症、重症筋無力症、１型糖尿病、ぶどう膜炎、ネフローゼ症候群、乾癬、アトピー性皮膚炎、接触皮膚炎、およびさらなる（further）湿疹性皮膚炎、脂漏性皮膚炎、偏平苔せん、天疱瘡、水泡性天疱瘡、表皮水泡症、蕁麻疹、血管浮腫、脈管炎、紅斑、皮膚好酸球増加症、円形脱毛症など）の治療または予防；可逆性閉塞性気道疾患（reversible obstructive airways disease）、胃腸炎症およびアレルギー（たとえば、炎症性胆汁疾患、小児脂肪便症、直腸炎、好酸球増加性胃腸炎、肥満細胞症、クローン病および潰瘍性大腸炎）、食物関連アレルギー（たとえば、偏頭痛、鼻炎および湿疹）および他のタイプのアレルギーの治療に有用であるに違いないことを示している。

当業者であれば日常的な実験により、免疫抑制を誘発する目的のための抗体の有効かつ非毒性の量を決定できるであろう。しかしながら、一般に、有効投与量は１日当たり体重１ｋｇ当たり約０．０５～１００ｍｇの範囲であろう。

本発明の抗体（またはそのフラグメント）はまた、哺乳動物において腫瘍を治療するうえでも有用であるに違いない。一層詳しくは、本発明の抗体は、腫瘍のサイズを小さくし、腫瘍の増殖を抑制し、および／または腫瘍を有する動物の生存時間を延ばすのに有用であるに違いない。さらに、本発明はまた、ヒトその他の動物に有効かつ非毒性量の抗体を投与することによるヒトその他の動物における腫瘍の治療方法にも関する。当業者であれば日常的な実験により、発癌性腫瘍を治療する目的のための抗Ｂ７抗体の有効かつ非毒性の量を決定できるであろう。しかしながら、一般に、有効投与量は１日当たり体重１ｋｇ当たり約０．０５～１００ｍｇの範囲であることが期待される。

本発明の抗体は、上記治療方法に従い、治療または予防効果が期待できる程度に充分な量にてヒトその他の動物に投与することができる。かかる本発明の抗体は、公知技術に従って本発明の抗体を通常の薬理学的に許容しうる担体または希釈液と混合することにより調製した通常の剤型にて、かかるヒトその他の動物に投与することができる。当業者であれば薬理学的に許容しる担体または希釈液の形態および特性が、混合する活性成分の量、投与経路および他のよく知られた変量によって決定されることが認識されるであろう。

本発明の抗体（またはそのフラグメント）の投与経路は、経口、非経口、吸入または局所投与であってよい。本明細書において用いる非経口なる術語は、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、直腸内または膣内投与を含む。皮下および筋肉内形態の非経口投与が一般に好ましい。

本発明の化合物を予防的または治療的に免疫抑制を誘発するためまたは発癌性腫瘍を治療するために用いる際の毎日の非経口および経口投与計画は、一般に１日当たり体重１ｋｇ当たり約０．０５～１００ｍｇの範囲だが、約０．５～１０ｍｇの範囲であるのが好ましいであろう。

本発明の抗体はまた吸入によっても投与することができる。「吸入」とは鼻内および経口吸入投与を意味する。かかる投与に適した剤型、たとえばエアロゾル製剤や定量吸入器（metered dose inhaler）などは通常の技術により製造できる。本発明の化合物の好ましい投与量は、一般に約１０～１００ｍｇの範囲である。

本発明の抗体はまた、局所投与することもできる。局所投与とは非全身投与をいい、本発明の抗体（またはそのフラグメント）化合物を表皮や頬面窩洞に外用したり、かかる抗体を眼、耳および鼻や血流に実質的に浸入しない場所に点滴注入することを含む。全身投与とは、経口、静脈内、腹腔内および筋肉内投与を意味する。治療または予防効果を得るのに必要な抗体の量は、もちろん、選択した抗体、治療しようとする状態の性質および重篤度および治療を受ける動物により変わるであろうが、最終的には医師の裁量による。本発明の抗体の局所投与の適当な投与量は、一般に１日当たり体重１ｋｇ当たり約１～１００ｍｇの範囲であろう。

製剤

本発明の抗体またはそのフラグメントは単独でも投与することが可能であるが、医薬製剤として投与することが好ましい。活性成分は、局所投与の場合、医薬製剤の０．００１～１０％ｗ／ｗ、たとえば１重量％～２重量％を構成してよいが、１０％ｗ／ｗを構成してもよく、好ましくは医薬製剤の５％ｗ／ｗを越えない量、さらに好ましくは０．１～１％ｗ／ｗである。
本発明の局所製剤は、活性成分を１またはそれ以上の許容しうる担体および任意の他の治療成分とともに含む。担体は、製剤の他の成分と適合し、適用者に有害でないという意味で「許容しうる」ものでなければならない。
局所投与に適した製剤としては、リニメント剤、ローション剤、クリーム剤、軟膏またはパスタ剤などの治療が必要な部位へ皮膚を通して浸透していくのに適した液状または半液状の製剤、および眼、耳または鼻に投与するのに適した滴剤が含まれる。
本発明による滴剤は滅菌した水性または油性の溶液または懸濁液を含み、殺菌剤および／または殺真菌剤および／または他の適当な保存剤の適当な水溶液（好ましくは表面活性剤を含む）中に活性成分を溶解することにより調製できる。ついで、得られた溶液を濾過により清澄化し、適当な容器に移し、ついでこれを密封し、９０～１００℃にて半時間オートクレーブまたは維持することにより滅菌する。別法として、溶液を濾過により滅菌し、無菌技術により容器に移す。滴剤中に含めるのに適した殺菌剤および殺真菌剤の例は、硝酸フェニル水銀または酢酸フェニル水銀（０．００２％）、塩化ベンザルコニウム（０．０１％）および酢酸クロルヘキシジン（０．０１％）である。油性溶液を調製するのに適した溶媒には、グリセリン、希アルコールおよびプロピレングリコールが含まれる。
本発明によるローション剤には、皮膚または眼に適用するのに適したものが含まれる。眼用ローション剤は、任意に殺菌剤を含む滅菌水溶液を含み、滴剤の調製と同様の方法により調製できる。皮膚に適用するローション剤またはリニメント剤はまた、アルコールやアセトンなどの乾燥促進剤や皮膚冷却剤、および／またはグリセリンなどの加湿剤またはヒマシ油や落花生油などの油をも含む。
本発明によるクリーム剤、軟膏またはパスタ剤は、活性成分の外用のための半固形製剤である。これら製剤は、微細に粉砕したまたは粉末形態の活性成分を単独で、または水性もしくは非水性流体中の溶液または懸濁液中にて、適当な機械の助けを借りて脂肪性（greasy）または非脂肪性（non－greasy）基剤を用いて混合することにより調製できる。基剤は、固形パラフィン、軟パラフィンまたは流動パラフィン、グリセリン、蜜蝋、金属石鹸などの炭水化物；粘漿薬；扁桃油、トウモロコシ油、落花生油、ヒマシ油またはオリーブ油などの天然起源の油；羊毛脂もしくはその誘導体、またはステアリン酸やオレイン酸などの脂肪酸をプロピレングリコールやマクロゴールなどのアルコールとともに含む。製剤は、陰イオン性、陽イオン性または非イオン性界面活性剤などの適当な界面活性剤、たとえば、ソルビタンエステルまたはそのポリオキシエチレン誘導体などを含んでいてよい。天然ゴム、セルロース誘導体または無機物質（シリカ（silicaceous silicas）などの懸濁化剤、およびラノリンなどの他の成分も含まれていてよい。
本発明の抗Ｂ７．１抗体またはそのフラグメントはまた、Ｂ７：ＣＤ２８経路を調節する他の分子（moieties）とともに投与することもできる。かかる分子としては、その例として、ＩＬ－７やＩＬ－１０などのサイトカイン、ＣＴＬＡ４－Ｉｇ、可溶性ＣＴＬＡ４および抗ＣＤ２８抗体およびそのフラグメントが挙げられる。本発明の抗体はまた、他の免疫抑制剤と併用して投与することができる。かかる免疫抑制剤としては、サイクロスポリンＡ（ＣＳＡ）およびＦＫ５０６などの小さな分子；抗腫瘍壊死因子ａ（抗ＴＮＦａ）、抗ＣＤ５４、抗ＣＤ１１、抗ＣＤ１１ａ、および抗ＩＬ－１などのモノクローナル抗体；およびｒＴＮＦａおよびｒＩＬ－１などの他の可溶性受容体が挙げられる。
当業者には、本発明の抗体またはそのフラグメントの個々の投与量の最適量および期間（spacing）が治療しようとする状態の性質および程度、投与の形態、経路および部位、および治療しようとする特定の動物により決定されるであろうこと、およびかかる最適量が通常の技術により決定されうることが認識されるであろう。当業者にはまた、治療の最適コース、すなわち所定日数の間の１日当たりに投与する本発明の抗体またはそのフラグメ

ントの投与の回数が治療決定試験（treatment determination tests）の通常のコースを用いて当業者により評価されうることも認識されるであろう。
さらに詳述するまでもなく、当業者であれば上記の記載を用いて本発明を最大限に活用することができると思われる。それゆえ、以下に記載する製剤例は例示的な態様を示すのであって、本発明の範囲をいかなる意味においても限定することを意図するものではない。

カプセル組成物

カプセル剤の形態の本発明の医薬組成物は、標準的な２片（two-piece）ハードゼラチンカプセルに粉末形態の本発明の抗体またはそのフラグメント（５０ｍｇ）、乳糖（１００ｍｇ）、タルク（３２ｍｇ）およびステアリン酸マグネシウム（８ｍｇ）を充填することにより調製する。

注射可能な非経口組成物

注射により投与するのに適した形態の本発明の医薬組成物は、本発明の抗体またはそのフラグメント（１．５重量％）を１０容量％のプロピレングリコールおよび水の中で撹拌することにより調製する。この溶液を濾過滅菌する。

軟膏組成物

本発明の抗体またはそのフラグメントを１．０ｇ
白色軟パラフィンを１００．０ｇまで。
本発明の抗体またはそのフラグメントを少量のビヒクル中に分散させて滑らかな均一な生成物を得る。ついで、この分散液を折り畳み式金属チューブに充填する。

局所クリーム組成物

本発明の抗体またはそのフラグメントを１．０ｇ
ポラワックスＧＰ２００を２０．０ｇ
無水ラノリンを２．０ｇ
白色蜜蝋を２．５ｇ
ヒドロキシ安息香酸メチルを０．１ｇ
蒸留水を１００．０ｇまで。
ポラワックス、蜜蝋およびラノリンをいっしょに６０℃で加熱する。ヒドロキシ安息香酸メチルの溶液を加え、高速で撹拌して均一な溶液とする。ついで、温度を５０℃まで下げる。ついで、本発明の抗体またはそのフラグメントを加え、充分に分散させ、ゆっくりとした速度で撹拌して組成物を冷却する。

局所ローション組成物

本発明の抗体またはそのフラグメントを１．０ｇ
ソルビタンモノラウレートを０．６ｇ
ポリソルベート２０を０．６ｇ
セトステアリルアルコールを１．２ｇ
グリセリンを６．０ｇ
ヒドロキシ安息香酸メチルを０．２ｇ
精製水Ｂ.Ｐ.を１００－００ｍｌ（Ｂ.Ｐ.＝英国薬局方）。
ヒドロキシ安息香酸メチルおよびグリセリンを７５℃の水（７０ｍｌ）中に溶解する。ソルビタンモノラウレート、ポリソルベート２０およびセトステアリルアルコールをいっしょに７５℃で溶融し、上記水溶液に加える。得られた乳濁液をホモジナイズし、連続撹拌しながら冷却させ、本発明の抗体またはそのフラグメントを残りの水中の懸濁液として加える。全懸濁液をホモジナイズされるまで攪拌する。

点眼組成物

本発明の抗体またはそのフラグメントを０．５ｇ
ヒドロキシ安息香酸メチルを０．０１ｇ
ヒドロキシ安息香酸プロピルを０．０４ｇ
精製水Ｂ.Ｐ.を１００－００ｍｌ
ヒドロキシ安息香酸メチルおよびヒドロキシ安息香酸プロピルを７０ｍｌの精製水中に７５℃にて溶解し、得られた溶液を冷却した。ついで、本発明の抗体またはそのフラグメン

トを加え、溶液をメンブランフィルター（０．０２２μｍの孔径）で濾過して滅菌し、適当な滅菌容器中に滅菌充填する。

吸入投与のための組成物

１５～２０ｍｌ容のエアロゾル容器用：

１０ｍｇの本発明の抗体またはそのフラグメントを０．２～０．５％の滑沢剤、たとえばポリソルベート８５またはオレイン酸と混合し、ついで該混合物を好ましくは（１，２ジクロロテトラフルオロエタン）とジフルオロクロロメタンとの組み合わせ中でフレオン等のプロペラント中に分散させ、鼻内かまたは口内投与のいずれかに適合させた適当なエアロゾル容器中に入れる。

吸入投与のための組成物

１５～２０ｍｌ容のエアロゾル容器用：

本発明の抗体またはそのフラグメント（１０ｍｇ）をエタノール（６～８ｍｌ）中に溶解し、ポリソルベート８５またはオレイン酸などの滑沢剤（０．１－０．２％）を加え、このものをフレオン（好ましくは（１，２ジクロロテトラフルオロエタン）とジフルオロクロロメタンとの組み合わせ）などのプロペラント中に分散し、鼻内かまたは経口吸入投与に適合させた適当なエアロゾル容器中に入れる。

本発明の抗体および医薬組成物は、非経口投与、すなわち皮下、筋肉内または静脈内投与に特に有用である。非経口投与用の組成物は一般に、許容しうる担体、好ましくは水性担体中に溶解した本発明の抗体またはそのフラグメントまたはその組み合わせの溶液を含むであろう。種々の水性担体、たとえば、水、緩衝水溶液、０．４％食塩水、０．３％グリシンなどを用いることができる。これらの溶液は滅菌してあり、一般に粒状物質を含まない。これら溶液は、通常のよく知られた滅菌法により滅菌することができる。本発明の組成物は、ｐＨ調節剤や緩衝剤など、適当な生理条件に必要とされる薬理学的に許容可能な補助物質を含んでいてよい。かかる医薬組成物中の本発明の抗体またはフラグメントの濃度は広範囲に変わりうる、すなわち約０．５重量％未満、通常少なくとも約１重量％から１５または２０重量％までであってよく、選択した特定の投与方法に従って主として流体容量、粘度などに基づいて選択されるであろう。

それゆえ、本発明の筋肉内投与用医薬組成物は、１ｍｌの滅菌緩衝水溶液および５０ｍｇの本発明の抗体またはそのフラグメントを含むように調製できる。同様に、本発明の静脈内投与用医薬組成物は、２５０ｍｌまでの滅菌リンゲル溶液および１５０ｍｇの本発明の抗体またはそのフラグメントを含むように調製できる。非経口投与可能な組成物の実際の調製法は当業者によく知られているかまたは当業者には明らかであり、たとえば、レミントンズ・ファーマシューティカル・サイエンス（Ｒemington's Ｐharmaceutical Ｓcience）、第１５版、マック・パブリシング・カンパニー（Mack Ｐublishing Ｃompany）、イーストン、ペンシルベニア（参照のため本明細書中に引用する）に一層詳細に記載されている。

本発明の抗体（またはそのフラグメント）は貯蔵のために凍結乾燥し、使用前に適当な担体中で再構成することができる。この技術は通常の免疫グロブリンにおいて有効であることが示されており、技術分野で公知の凍結乾燥および再構成法を用いることができる。

本発明の医薬組成物は、意図する結果に依存して予防および／または治療のために投与することができる。治療の目的で適用する場合には、すでに疾患を患っている患者に該疾患およびその合併症を治癒もしくは少なくとも部分的に寛解させるに充分な量の組成物を投与する。予防の目的で適用する場合には、未だ疾患状態にない患者に本発明の抗体またはその混合物を含む組成物を投与して患者の耐性を高める。

本発明の医薬組成物の単回投与または多回投与を、治療にあたった医師により選択された投与量レベルおよびパターンにて行うことができる。いずれの場合においても、本発明の医薬組成物は患者を有効に治療するのに充分な所定量の本発明の改変抗体（またはそのフラグメント）を提供できなくてはならない。

本発明の抗体はまた、該抗体と同じ療法において有用なペプチド性かまたは非ペプチド性の化合物（模倣物）の設計および合成に用いることができる［たとえば、サラゴビ（Ｓar

agovi）ら、Science、２５３、７９２～７９５（１９９１）を参照］。
本発明をさらに説明するため、下記実施例を記載する。これら実施例は本発明を限定することを意図するものではない。
実施例１
繊維状ファージの表面上に提示された組換え免疫グロブリンライブラリーは、マッカファーティー（McCafferty）ら、Nature、３４８：５５２～５５４、１９９０およびバーバス（Barbas）ら、Proc. Natl. Acad. Sci. ＵＳＡ ８８：７９７８～７９８２、１９９１に最初に記載された。この技術を用い、高親和性抗体を免疫ヒト組換えライブラリーから単離した［バーバスら、Proc. Natl. Acad. Sci. ＵＳＡ ５８９：１０１６４～１０１６８、１９９２］。本発明で使用したファージ提示の概念はバーバス（１９９１、上掲）によって記載されたものと実質的に同じであるが、組換えの可能性を低減し安定性を改善するため、サルライブラリーの独特のベクターを代用することにより該技術を修飾した。このベクター、ｐＭＳ（図１）は、ポリシストロン性の重鎖および軽鎖サルＤＮＡの効率的な転写および翻訳のための単一のｌａｃプロモーター／オペレーターを含む。このベクターは、２つの異なるリーダー配列、すなわち、軽鎖のためのｏｍｐＡ［モッバ（Movva）ら、Ｊ．Biol. Chem.、２５５：２７～２９（１９８０）］および重鎖ＦｄのためのｐｅｌＢ［レイ（Lei）ら、Ｊ．Bact.、４３７９～１０９：４３８３（１９８７）］を含む。両リーダー配列は、重鎖および軽鎖クローニング生成物の細胞周辺腔への分泌を指令する疎水性のシグナルペプチドに翻訳される。ペリプラスムの酸化的環境中では、これら２つの鎖は折り畳まれ、ジスルフィド結合を生成して安定なＦａｂフラグメントを形成する。本発明者らは、このベクターの骨格をファージミドであるbluescript（ストラタジーン、ラジョラ、カリフォルニア）から得た。それは、ｐＭＳ ＤＮＡを含む細菌にアンピシリン（カルベニシリン）耐性を付与する酵素β－ラクタマーゼの遺伝子を含む。本発明者らはまた、マルチコピープラスミドＣｏｌＥ１の複製起点および繊維状バクテリオファージｆ１の複製起点をbluescriptから得た。ファージｆ１の複製起点（いわゆる遺伝子内領域）は、一本鎖ｐＭＳ ＤＮＡの合成の開始、カプシド形成の開始およびウイルス酵素によるＲＮＡ合成の終止を指令する。ｐＭＳ ＤＮＡ鎖の複製およびファージ粒子への組み立てには、ヘルパーファージによって提供されなければならないウイルスタンパク質を必要とする。本発明者らはヘルパーファージＶＣＳＭ１３を用いたが、これはカナマイシン耐性をコードする遺伝子をも含んでいるため特にこの目的に適している。ＶＣＳＭ１３およびｐＭＳが感染した細菌は、増殖培地にカナマイシンおよびカルベニシリンの両者を加えることにより選択できる。これら細菌は、最終的にｐＭＳゲノムかまたはＶＣＳＭ１３ゲノムのいずれかを含有する繊維状ファージ粒子を生成するであろう。ヘルパーファージのパッケージングはｐＭＳのパッケージングに比べて効率が悪く、その結果、組換えｐＭＳファージを優勢に含む混合ファージ集団が得られる。このファージの両末端は各末端に特異的なマイナーコートタンパク質を拾い上げる（pick up）。本発明において特に興味深いのは、該ファージの一端に５コピーのうち３コピー中に存在する遺伝子III生成物である。この遺伝子III生成物は４０６アミノ酸残基からなり、Ｆ線毛を介した大腸菌のファージ感染に必要である。重鎖の最初の２つのドメイン、すなわち可変ドメインおよびＣＨ１ドメインは遺伝子IIIタンパク質のカルボキシ末端半分に融合している。この組換え線毛タンパク質（ｐｅｌＢリーダーにより指令される）はペリプラスムに分泌され、そこで蓄積し、ファージのコート中に組み込まれる前に軽鎖とジスルフィド結合を生成する。また、他のベクターは遺伝子IIIの下流に組み込んだＦＬＡＧ配列を含む。このＦＬＡＧは、Ｆｄタンパク質のカルボキシ末端にて発現される８アミノ酸ペプチドである。本発明者らは、ファージＦａｂの精製およびＥＬＩＳＡによる検出の両目的のために市販のモノクローナル抗ＦＬＡＧ Ｍ２を用いている［ブリザード（Brizzard）、Bio Technology、１６（４）：７３０－７３１（１９９４）］。
ベクターｐＭＳを構築した後、本発明者らは該ベクターがファージ結合Ｆａｂを産生する能力について対照の抗体遺伝子を用いて試験した。本発明者らは抗破傷風毒素抗体（カルロス・バーバス（Carlos Barbas）博士より入手）をｐＭＳ中にクローニングし、ＸＬ

Ｉ－blueを形質転換した。本発明者らはＶＣＳＭ１３および得られた抗破傷風毒素抗体を提示するファージで本発明者らの細胞を同時感染させた。本発明者らは効率実験を行い、その際、抗破傷風毒素ファージを関連のない抗体を結合した（beading）ファージと１：１００，０００にて組み合わせた。本発明者らは、混合ファージ（５０μｌ）を抗原（破傷風毒素）コーティングポリスチレンウエルに適用することにより３回のえり分けを行った。接着しなかったファージは洗い落とし、接着したファージは酸で溶出した。溶出したファージを用いてＸＬ１－Ｂlue細菌の新たなアリコートを感染させ、ヘルパーファージを加えた。一夜増幅させた後、ファージを調製し、抗原をコーティングしたプレート上で再びえり分けた。３回のえり分けの後、本発明者らは抗破傷風毒素ファージに首尾よく富むことを示すことができた。この技術が首尾よくいくかどうかはまた、最終のえり分け生成物の特徴付けのために可溶性のＦａｂを調製する能力にも依存する。このことは、制限酵素ＮｈｅＩを用いてｐＭＳ ＤＮＡから遺伝子IIIを切り出し、ついで再ライゲートすることにより行った。遺伝子IIIを切り出した後はＦａｂはもはやファージ表面上には提示されず、細胞周辺腔中に蓄積した。可溶性のＦａｂを発現する細菌から溶解液を調製し、ＥＬＩＳＡを用いて抗原特異性を試験した。高レベルの可溶性Ｆａｂが検出された。

ファージ提示法をマカークザルライブラリーに使用するため、本発明者らはサル免疫グロブリン遺伝子のＰＣＲ増幅のために特別のプライマーを開発した。これらプライマーは、霊長類化（PRIMATIZED™）抗体法（米国特許出願第０８／３７９，０７２号を参照；参照のため本明細書中に引用する）を開発する際に本発明者らが得たマカークザル配列およびヒト配列を含むデータベース（カバット（Kabat）ら（１９９１）、「免疫学的に興味のあるタンパク質の配列」、Ｕ．Ｓ．Dept. of Health and Human Services、National Institute of Health）に基づいていた。

本発明者らは、マカークザルの範囲（repertoire）の増幅をカバーするために３セットのプライマーを開発した。本発明者らの第一のプライマーのセットは、重鎖のＶＨおよびＣＨ１（Ｆｄ）ドメインの増幅のために設計したものであった。それは、３'ＣＨ１ドメインプライマーおよびフレームワーク１領域に結合する６つの５'ＶＨファミリー特異的プライマーからなっていた。本発明者らの第二のプライマーのセットは全ラムダ鎖を増幅するためのものであり、多くのラムダ鎖サブグループをカバーしている。それは、３'プライマーおよびＶＬフレームワーク１領域に結合する３つの５'縮重プライマーからなっている。本発明者らの第三のプライマーのセットは、カッパ鎖サブグループの増幅のために設計したものであった。それは、３'プライマーおよび５つのＶＫフレームワーク１プライマーからなる。これら各セットのプライマーを用い、ライブラリーのクローニングに利用するのに充分な物質を利用できるように各プライマーセットから充分に強いシグナルを得るべくＰＣＲパラメータを最適化した。本発明者らは最近、これら最適化ＰＣＲ条件を用いて本発明者らのｐＭＳベクターにおいてマカークザル組み合わせ（combinatorial）ライブラリーを作成した。免疫グロブリンＲＮ－Ａの採取源として骨髄生検をＣＤ４免疫サルから採取した。これらライブラリーは約10^6の成員を含んでおり、目下、抗原コーティングウエル上で特異的結合についてえり分けている。

実施例２

Ｂ７／ＣＴＬＡ－４試薬の開発

本発明者らは、サルの免疫、インビトロでの結合および機能アッセイの開発、ヘテロハイブリドーマのスクリーニングおよびファージライブラリーのえり分けの目的のために多くの試薬を作成した。表１には各試薬とその意図する目的を掲げてある。Ｂ７．１の場合には、ＲＮＡをＳＢ細胞から抽出し、逆転写酵素を用いてｃＤＮＡに変換した。第一鎖のｃＤＮＡをＢ７．１特異的プライマーを用いてＰＣＲ増幅し、ＩＤＥＣのＮＥＯＳＰＬＡ哺乳動物発現ベクター中にクローニングした。このＢ７．１ ＮＥＯＳＰＬＡ ＤＮＡでＣＨＯ細胞をトランスフェクションし、膜結合Ｂ７．１を発現するクローンを同定した。Ｂ７．１融合タンパク質も同様にして生成したが、ヒトＣＨ２およびＣＨ３免疫グロブリン遺伝子を含むＮＥＯＳＰＬＡカセットベクター中にＰＣＲ増幅Ｂ７．１遺伝子をクローニングした。このＢ７．１／Ｉｇ ＮＥＯＳＰＬＡ ＤＮＡでＣＨＯ細胞を形質転換し、Ｂ７．

１／Ｉｇ融合タンパク質を分泌する安定なクローンを増幅した。一般に、Ｂ７．２およびＣＴＬＡ－４試薬も同様にして生成したが、Ｂ７．２ではＲＮＡを抗ＩｇおよびＩＬ－４で２４時間刺激したヒト脾臓細胞から単離し、ＣＴＬＡ４構築物については遺伝子の採取源はＰＨＡ活性化したヒトＴ細胞であった。

表１

試薬	目的	ＣＨＯ発現
可溶性Ｂ７．１	免疫、イムノアッセイ	有
Ｂ７．１トランスフェクタント	スクリーニング、ＥＬＩＳＡ	有
Ｂ７．１／Ｉｇ融合タンパク質	抑制試験、えり分け	有
Ｂ７．２トランスフェクタント	スクリーニング、ＥＬＩＳＡ	有
Ｂ７．２／Ｉｇ融合タンパク質	抑制試験、えり分け	未完
ＣＴＬＡ４トランスフェクタント	抑制試験	未完
ＣＴＬＡ４／Ｉｇ	抑制試験	未完

これら試薬が、Ｂ７．１に対するモノクローナル抗体（Ｌ３０７４）［ベクトン・ディッキンソン（Becton Dickinson）、１９９４］、Ｂ７．２に対するモノクローナル抗体（Ｆｕｎ－１）［エンジェル（Engel）ら、Blood、８４、１４０２～１４０７（１９９４）］およびサルＦａｂフラグメントを検出すべく特別に開発した精製ヤギおよびウサギ血清とともに利用できることは、所望の特性を有する抗体の同定を容易にする。

実施例３

ファージ提示ライブラリーの作成

組換えファージ提示ライブラリーをＢ７．１およびＢ７．２免疫サルから作成する。免疫の７～１２日後にリンパ節および骨髄生検を採取し、ＲＮＡに富むＢ細胞および形質細胞を回収する。チョンチンスキー（Chomczynski）により記載された方法［Anal．Biochem.、１６２（１）、１５６～１５９（１９８７）］を用い、リンパ球からＲＮＡを単離する。オリゴｄＴプライマーおよび逆転写酵素を用いてＲＮＡをｃＤＮＡに変換する。第一鎖ｃＤＮＡをアリコートに分け、以前に記載されたカッパ、ラムダ、および重鎖Ｆｄ領域のプライマーセット並びにＰｆｕポリメラーゼ（ストラタジーン、サンジエゴ）かまたはＴａｑポリメラーゼ（プロメガ、マジソン）のいずれかを用い、ＰＣＲ増幅する。重鎖ＰＣＲ増幅生成物をプールし、Ｘｈｏ ＶＳｐｅＩ制限酵素で切断し、ベクターｐＭＳ中にクローニングする。その後、軽鎖ＰＣＲ生成物をクローニングし、ＳａｃＩ／ＸｂａＩ制限酵素で切断し、クローニングして組換えライブラリーを作成する。ＸＬＩ－Ｂlue大腸菌を該ライブラリーＤＮＡで形質転換し、ＶＣＳＭ１３で重感染させて抗体を提示するファージを生成させる。このライブラリーを、Ｂ７．１抗原またはＢ７．２抗原をコーティングしたポリスチレンウエル上で４回えり分ける。各回のえり分けからの個々のファージクローンを分析する。ｐＭＳベクターＤＮＡを単離し、遺伝子IIIを切り出す。可溶性のＦａｂフラグメントが生成し、Ｂ７．１およびＢ７．２への結合についてＥＬＩＳＡで試験する。

実施例４

ファージＦａｂフラグメントの特徴付け

サルファージＦａｂフラグメントを、その特異性、およびＣＴＬＡ－４－ＩｇまたはＣＴＬＡ－４トランスフェクション細胞へのＢ７．１－ＩｇおよびＢ７．２－Ｉｇ結合を阻止する能力について特徴付ける。ファージフラグメントはまた、高親和性のフラグメントを選択するため、免疫に使用したＢ７種上で４回行った最初のえり分け後の交差反応性について特徴付けを行う。Ｂ７．１抗原またはＢ７．２抗原のいずれかをコーティングした表面上で４回えり分けたものから同定したＦａｂフラグメントを、大腸菌の２４時間発酵培

養液中での感染および増殖によりスケールアップする。フラグメントを、抗ＦＬＡＧアフィニティーカラムへのコダックＦＬＡＧ結合により精製する。精製したファージＦａｂを、西洋ワサビペルオキシダーゼをコンジュゲートしたヤギ抗サルＦａｂ抗体または抗ＦＬＡＧ ＭＡｂを用いたＥＬＩＳＡベースの直接結合改変スキャッチャード分析［カトー（Katoh）ら、Ｊ．Chem. BioEng.、７６：４５１～４５４（１９９３）］により親和性を試験する。抗サルＦａｂ試薬は、ヒト重鎖定常領域Ｉｇに対して吸着され、Ｂ７－ＩｇへのＢ７．１－ＩｇまたはＢ７．２－Ｉｇをコーティングしたプレートへの直接結合の測定の後、各フラグメントについてＫｄ値を計算する。

実施例５

ファージＦａｂフラグメントによるＣＴＬＡ－４／Ｂ７結合の阻止

最も低い濃度でＢ７－Ｉｇの結合を最も有効に阻止するＦａｂフラグメントを先導候補として選択する。選択は、ＣＴＬＡ－４－ＩｇまたはＣＴＬＡ－４トランスフェクション細胞への^{125}Ｉ－Ｂ７－Ｉｇ結合を競合し尽くすことにより行う。他の選択基準には、応答細胞での３Ｈ－チミジンの取り込みの抑制［アズマら、Ｊ．Exp. Med.、１７７：８４５～８５０；アズマら、Nature、３０１：７６～７９（１９９３）］およびＩＬ－２アッセイキットを用いたＩＬ－２産生の直接分析により測定されるように、混合リンパ球反応（ＭＬＲ）の阻止が含まれる。ＭＬＲの抑制およびＣＴＬＡ－４結合アッセイにおいて最も有効な３または４の候補が、ＣＨＯ細胞へのトランスフェクションおよびキメラサル／ヒト抗体の発現のための上記哺乳動物発現ベクター中へクローニングするために選択される。

実施例６

サルヘテロハイブリドーマの生成

モノクローナル抗体を分泌するサルヘテロハイブリドーマを、その血清がＢ７．１および／またはＢ７．２に対して陽性と試験された生存（existing）免疫動物から作成する。いずれかまたは両方の抗原に対して陽性の動物からリンパ節生検を採取する。ハイブリドーマの産生方法は、サル抗ＣＤ４抗体の作成に使用する確立された方法［ニューマン、１９９２（上掲）］と同様である。高い血清力価を有するサルは、鼠蹊部のリンパ節の切片を麻酔下で取り除かれるであろう。組織からのリンパ球を洗浄し、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）を用いてＫＨ６／Ｂ５ヘテロハイブリドーマ細胞［キャロル（Carrol）ら、Ｊ．Immunol. Meth.、８９：６１～７２（１９８６）］と融合させる。ハイブリドーマをＨ．Ａ．Ｔ.培地上で選択し、９６ウエルプレート中で繰り返しサブクローニングすることにより安定化させる。

Ｂ７．１抗原に特異的なサルモノクローナル抗体をＢ７．２への交差反応性についてスクリーニングする。サル抗Ｂ７抗体は、^{125}Ｉ－Ｂ７－Ｉｇ結合アッセイを用いてＢ７／ＣＴＬＡ－４結合の阻止について特徴付けられるであろう。３Ｈ－チミジンの取り込みおよびＩＬ－２産生の直接測定によるＭＬＲの抑制を用い、３つの候補を選択する。２つの候補はフェーズIIの試験に持ち込まれ、すべての機能的研究を繰り返しながらＣＨＯ細胞中に発現されるであろう。インビボ薬理学のための動物モデルを開発する目的のため、抗Ｂ７抗体が幾つかの動物種の細胞上で試験されるであろう。動物モデルの確立は、選択した臨床適応のために前臨床研究を行うことを可能にするであろう。

実施例７

上記のように上記ヘテロハイブリドーマ法を用いて４つの先導サル抗Ｂ７．１抗体：１６Ｃ１０、７Ｂ６、７Ｃ１０および２０Ｃ９が同定された。これら抗体は以下のように特徴付けられた：

スキャッチャード分析は、Ｂ７－Ｉｇコーティングプレートへのサル抗体の結合の見かけの親和定数（Ｋｄ）がおよそ以下のとおりであることを示した：

ａ：７Ｃ１０：　６．２×１０$^{-9}$Ｍ
ｂ：１６Ｃ１０：　８．１×１０$^{-9}$Ｍ
ｃ：７Ｂ６：　１０．７×１０$^{-9}$Ｍ
ｄ：２０Ｃ９：　１６．８×１０$^{-9}$Ｍ

抗体を混合リンパ球反応アッセイ（ＭＬＲ）においてインビトロで試験した。ＭＬＲは、４つのすべての抗Ｂ７．１抗体が異なる程度にＩＬ－２産生を抑制することを示した：

ａ：７Ｂ６：　　５．０μｇ／Ｍ１
ｂ：１６Ｃ１０：　０．１μｇ／Ｍ１
ｃ：２０Ｃ９：　　２．０μｇ／Ｍ１
ｄ：７Ｃ１０：　　５．０μｇ／Ｍ１

サル抗Ｂ７．１抗体を、ヒト末梢血リンパ球（ＰＢＬ）上のＢ７に結合する能力について試験した。ＦＡＣＳ分析は、４つのすべてのサル抗体が陽性であることを示した。

サル抗体１６Ｃ１０、７Ｂ６、７Ｃ１０および２０Ｃ９をＦＡＣＳ分析によりＣ１ｑ結合について試験した。その結果は、７Ｃ１０サルＩｇがＢ７．１ＣＨＯトランスフェクション細胞とともにインキュベートした後に強いヒトＣ１ｑ結合を有することを示した。１６Ｃ１０もまた陽性であったが、２０Ｃ９および７Ｂ６サル抗体は陰性であった。

実施例８

本明細書中に参照のために引用した米国特許出願第０８／３７９，０７２号の霊長類化抗体法を用い、および図２に示すＮＥＯＳＰＬＡベクター系を用い、７Ｃ１０、７Ｂ６および１６Ｃ１０の重鎖および軽鎖可変ドメインをクローニングし、その霊長類化形態をＮＥＯＳＰＬＡベクター系を用いてＣＨＯ細胞中で合成した。霊長類化７Ｃ１０の軽鎖および重鎖、７Ｂ６の軽鎖および重鎖、および１６Ｃ１０の軽鎖および重鎖のアミノ酸配列および核酸配列を、それぞれ、図３ａ、図３ｂ、図４ａ、図４ｂ、図５ａおよび図５ｂに示す。

実施例９

ＣＴＬＡ－４とＢ７．１上のPRIMATIZED^{R}抗体結合部位との非交差反応性の確認実験

ビオチン化ＣＴＬＡ－４Ｉｇを用いた競合結合アッセイにおいて（図６）、非標識霊長類化１６Ｃ１０（すなわち、Ｐ１６Ｃ１０）はＢ７．１トランスフェクションＣＨＯ細胞へのＣＴＬＡ－４Ｉｇ結合を阻止することができなかった。非標識ＣＴＬＡ－４Ｉｇおよび非標識Ｂ７．１はこれら条件下で有効に競合することがわかる。

ビオチン化Ｐ１６Ｃ１０を用いた第二の実験において、同じ結論を得ることができる。図７に示す実験において、Ｐ１６Ｃ１０－ビオチンの結合は非標識Ｐ１６Ｃ１０およびＢ７．１Ｉｇの両者により阻害されるが、ＣＴＬＡ－４Ｉｇによっては阻害されない。ＣＴＬＡ－４Ｉｇは４～１０倍も高い親和性を示すことが報告されているが（Ｋｄ＝０．４ｎＭ；モートンら、Ｊ．Ｉmmunol．１５６：１０４７～１０５４（１９９６））、１００倍過剰もの高いＣＴＬＡ－４Ｉｇ濃度でもＰ１６Ｃ１０結合の有意な阻害はみられない。

同様の結果は、同実験でＰ１６Ｃ１０の代わりに霊長類化抗体７Ｃ１０（Ｐ７Ｃ１０）を用いても得られた（データは示していない）。

実施例１０

Ｌ３０７．４およびＢＢ－１マウス抗体がＣＴＬＡ－４Ｉｇの存在下でＢ７ＣＨＯ細胞へ結合する能力の比較

マウス抗体の結合部位がＣＴＬＡ－４の結合部位と重複するか否かを決定するため、ＣＴＬＡ－４Ｉｇの存在下でのＬ３０７．４およびＢＢ－１マウス抗体の結合を調べた。Ｐ１６Ｃ１０－ビオチン、Ｌ３０７．４－ビオチンおよびＣＴＬＡ－４Ｉｇ－ビオチンを用いた競合アッセイ実験を行い、親和性の相違が競合結合の検出を妨害しないことを保証した。その結果を図８および図９に示す。

図８の結果は、マウス抗体ＢＢ－１がＰ１６Ｃ１０と競合しないという以前の研究を確認している。これら結果はまた、Ｌ３０７．４に対する約５０％の若干の交差反応性が認められることを示している。図８の結果は、ＢＢ－１およびＬ３０７．４がともに互いに競合すること、およびＢＢ－１がＢ７．１トランスフェクションＣＨＯ細胞へのＣＴＬＡ－４Ｉｇ－ビオチンの結合を完全に阻止することを確認している。ＢＢ－１はＢ７．１陽性ＣＨＯ細胞へのＰ１６Ｃ１０結合に有意に影響を及ぼさない。

図９に示す結果は、結合実験においてＣＴＬＡ－４Ｉｇ－ビオチンを用いたときに５０％よりも良好な競合を示している。図９は、ＣＴＬＡ－４Ｉｇ－ビオチンがＰ１６Ｃ１０以外のすべてのＢ７．１インヒビターにより有効に阻害されることを示しており、それゆえ

Ｐ１６Ｃ１０は負のシグナルの生成において正常なＣＴＬＡ－４リガンド結合を可能にするＢ７．１上の独特の結合決定部位を認識する。以前の機能的研究（データは示していない）は、同種ＭＬＲにおいてＩＬ－２産生を阻止するＬ３０７．４の弱められた能力を示唆しており、このことはＬ３０７．４がＣＴＬＡ－４の負のシグナル伝達に介入するという仮設と相関している。文献に報告された他のマウス抗体の多くがいかにしてＣＴＬＡ－４結合の完全な阻害をもたらすのかは明らかではない；しかしながら、Ｂ７．１特異的抗体およびＢ７．２特異的抗体の真の機能的メカニズムを定めるうえで重要な問題である。これら結果は、Ｂ７．１トランスフェクションＣＨＯ細胞への結合に対してＰ１６Ｃ１０－ビオチンと競合するＢ７－Ｉｇを用いた以前の研究を確認している。これら研究はまた、ＣＴＬＡ－４ＩｇによりＰ１６Ｃ１０が阻害されないという以前の観察をも確認するものである。これらの結果は、霊長類抗体が、ＣＤ２８と主として相互作用するＣＴＬＡ－４結合部位とは独立に独特のＢ７．１エピトープに特異的であることを強く示唆している。このタイプの相互作用は、ＣＴＬＡ－４の負のシグナル伝達機能は依然として阻害されずに起こるようにしながら、ＣＤ２８へのＢ７．１の結合を阻止する能力を有するため、有益である。このように認められる相互作用は、Ｔｈ１かまたはＴｈ２のいずれかの表現型の優勢のいかんにかかわらず、全体としてのＴ細胞活性化応答のダウンレギュレーションに導く。

同様の結果は、同実験でＰ１６Ｃ１０の代わりにＰ７Ｃ１０を用いても得られた（データは示していない）。

実施例１１

Ｂ７．１に結合しＣＤ２８受容体とのＢ７．１の相互作用を阻止する能力を示す実験

Ｂ７．１のＰ１６Ｃ１０結合がＢ７．１とＣＤ２８との相互作用を阻止し得るか否かを決定する実験を、Ｂ７．１Ｉｇを^{125}Ｉで放射性標識し、ついでＣＤ２８陽性非活性化末梢血Ｔリンパ球への競合結合により行った。図１０に示す結果は、非標識Ｂ７．１Ｉｇでの阻害により確認されるように、放射性標識Ｂ７．１ＩｇがＴ細胞に特異的に結合することを示している。これら結果はまた、ＣＴＬＡ－４Ｉｇ、抗ＣＤ２８およびＰ１６Ｃ１０がすべてこの相互作用を阻止し得ることをも示している。これら結果はさらに、Ｐ１６Ｃ１０がＣＤ２８／Ｂ７相互作用の結合を＜１μｇ／ｍＬのＩＣ$_{50}$にて阻止することを確認している。

上記結果は、膜結合ＣＴＬＡ－４が発現されない条件下で得られ（リンスレイら、Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１７３：７２１～７３０（１９９１））、抗ＣＤ２８抗体での阻止により確認された。

同様の結果は、同実験でＰ１６Ｃ１０の代わりにＰ７Ｃ１０を用いても得られた（データは示していない）。

これら霊長類化抗体は、それがおそらく低い抗原性を有しヒトエフェクター機能を有するために治療剤として極めて適していることが期待される。実際、霊長類化１６Ｃ１０はヒトＣ１ｑ結合を示すことが最近示されている。

当業者であれば、本明細書に記載した本発明の特定の態様と等価な多くの等価物を日常的な実験を越えない実験を使用して認識もしくは確認し得るであろう。かかる等価物は以下の請求の範囲に包含されることを意図するものである。

配列表

配列番号：1
配列の長さ：705
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：Genomic DNA
配列の特徴：
特徴を表す記号：CDS
存在位置：1..705

配列

```
ATG AGG GTC CCC GCT CAG CTC CTG GGG CTC CTG CTG CTC TGG CTC CCA      48
Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
 1               5                  10                  15

GGT GCA CGA TGT GCC TAT GAA CTG ACT CAG CCA CCC TCG GTG TCA GTG      96
Gly Ala Arg Cys Ala Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val
            20                  25                  30

TCC CCA GGA CAG ACG GCC AGG ATC ACC TGT GGG GGA GAC AAC AGT AGA     144
Ser Pro Gly Gln Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asp Asn Ser Arg
        35                  40                  45

AAT GAA TAT GTC CAC TGG TAC CAG CAG AAG CCA GCG CGG GCC CCT ATA     192
Asn Glu Tyr Val His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Ala Arg Ala Pro Ile
    50                  55                  60

CTG GTC ATC TAT GAT GAT AGT GAC CGG CCC TCA GGG ATC CCT GAG CGA     240
Leu Val Ile Tyr Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg
65                  70                  75                  80
```

TTC TCT GGC TCC AAA TCA GGG AAC ACC GCC ACC CTG ACC ATC AAC GGG 288
Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Asn Gly
85 90 95

GTC GAG GCC GGG GAT GAG GCT GAC TAT TAC TGT CAG GTG TGG GAC AGG 336
Val Glu Ala Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Arg
100 105 110

GCT AGT GAT CAT CCG GTC TTC GGA GGA GGG ACC CGG GTG ACC GTC CTA 384
Ala Ser Asp His Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Arg Val Thr Val Leu
115 120 125

GGT CAG CCC AAG GCT GCC CCC TCG GTC ACT CTG TTC CCG CCC TCC TCT 432
Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser
130 135 140

GAG GAG CTT CAA GCC AAC AAG GCC ACA CTG GTG TGT CTC ATA AGT GAC 480
Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp
145 150 155 160

TTC TAC CCG GGA GCC GTG ACA GTG GCC TGG AAG GCA GAT AGC AGC CCC 528
Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro
165 170 175

GTC AAG GCG GGA GTG GAG ACC ACC ACA CCC TCC AAA CAA AGC AAC AAC 576
Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
180 185 190

AAG TAC GCG GCC AGC AGC TAC CTG AGC CTG ACG CCT GAG CAG TGG AAG 624
Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys
195 200 205

TCC CAC AGA AGC TAC AGC TGC CAG GTC ACG CAT GAA GGG AGC ACC GTG 672
Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val
210 215 220

GAG AAG ACA GTG GCC CCT ACA GAA TGT TCA TGA 705
Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
225 230 235

配列番号：2
配列の長さ：234

配列の型：アミノ酸
トポロジー：直鎖状
配列の種類：タンパク質
配列

Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1 5 10 15
Gly Ala Arg Cys Ala Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val
20 25 30
Ser Pro Gly Gln Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asp Asn Ser Arg
35 40 45
Asn Glu Tyr Val His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Ala Arg Ala Pro Ile
50 55 60
Leu Val Ile Tyr Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg
65 70 75 80
Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Asn Gly
85 90 95
Val Glu Ala Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Arg
100 105 110
Ala Ser Asp His Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Arg Val Thr Val Leu
115 120 125
Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser
130 135 140
Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp
145 150 155 160
Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro
165 170 175
Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
180 185 190
Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys
195 200 205
Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val
210 215 220
Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
225 230

配列番号：3
配列の長さ：1431

配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：Genomic DNA
配列の特徴：
特徴を表す記号：CDS
存在位置：1..1431
配列

```
ATG AAA CAC CTG TGG TTC TTC CTC CTC CTG GTG GCA GCT CCC AGA TGG      48
Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
                240                 245                 250

GTC CTG TCC GAG GTG AAG CTG CAG CAG TGG GGC GAA GGA CTT CTG CAG      96
Val Leu Ser Glu Val Lys Leu Gln Gln Trp Gly Glu Gly Leu Leu Gln
            255                 260                 265

CCT TCG GAG ACC CTG TCC CGC ACC TGC GTT GTC TCT GGT GGC TCC ATC     144
Pro Ser Glu Thr Leu Ser Arg Thr Cys Val Val Ser Gly Gly Ser Ile
        270                 275                 280

AGC GGT TAC TAC TAC TGG ACC TGG ATC CGC CAG ACC CCA GGG AGG GGA     192
Ser Gly Tyr Tyr Tyr Trp Thr Trp Ile Arg Gln Thr Pro Gly Arg Gly
    285                 290                 295
```

CTG GAG TGG ATT GGC CAT ATT TAT GGT AAT GGT GCG ACC ACC AAC TAC 240
Leu Glu Trp Ile Gly His Ile Tyr Gly Asn Gly Ala Thr Thr Asn Tyr
300 305 310 315

AAT CCC TCC CTC AAG AGT CGA GTC ACC ATT TCA AAA GAC ACG TCC AAG 288
Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys
320 325 330

AAC CAG TTC TTC CTG AAC TTG AAT TCT GTG ACC GAC GCG GAC ACG GCC 336
Asn Gln Phe Phe Leu Asn Leu Asn Ser Val Thr Asp Ala Asp Thr Ala
335 340 345

GTC TAT TAC TGT GCG AGA GGC CCT CGC CCT GAT TGC ACA ACC ATT TGT 384
Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Pro Arg Pro Asp Cys Thr Thr Ile Cys
350 355 360

TAT GGC GGC TGG GTC GAT GTC TGG GGC CCG GGA GAC CTG GTC ACC GTC 432
Tyr Gly Gly Trp Val Asp Val Trp Gly Pro Gly Asp Leu Val Thr Val
365 370 375

TCC TCA GCT AGC ACC AAG GGC CCA TCG GTC TTC CCC CTG GCA CCC TCC 480
Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
380 385 390 395

TCC AAG AGC ACC TCT GGG GGC ACA GCG GCC CTG GGC TGC CTG GTC AAG 528
Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
400 405 410

GAC TAC TTC CCC GAA CCG GTG ACG GTG TCG TGG AAC TCA GGC GCC CTG 576
Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
415 420 425

ACC AGC GGC GTG CAC ACC TTC CCG GCT GTC CTA CAG TCC TCA GGA CTC 624
Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
430 435 440

TAC TCC CTC AGC AGC GTG GTG ACC GTG CCC TCC AGC AGC TTG GGC ACC 672
Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
445 450 455

CAG ACC TAC ATC TGC AAC GTG AAT CAC AAG CCC AGC AAC ACC AAG GTG 720
Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
460 465 470 475

GAC AAG AAA GCA GAG CCC AAA TCT TGT GAC AAA ACT CAC ACA TGC CCA 768
Asp Lys Lys Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
480 485 490

CCG TGC CCA GCA CCT GAA CTC CTG GGG GGA CCG TCA GTC TTC CTC TTC 816
Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
495 500 505

CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACC CTC ATG ATC TCC CGG ACC CCT GAG GTC 864
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
510 515 520

ACA TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAC GAA GAC CCT GAG GTC AAG TTC 912
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
525 530 535

AAC TGG TAC GTG GAC GGC GTG GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG 960
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
540 545 550 555

CGG GAG GAG CAG TAC AAC AGC ACG TAC CGT GTG GTC AGC GTC CTC ACC 1008
Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
560 565 570

GTC CTG CAC CAG GAC TGG CTG AAT GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC 1056
Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
575 580 585

TCC AAC AAA GCC CTC CCA GCC CCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC 1104
Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
590 595 600

AAA GGG CAG CCC CGA GAA CCA CAG GTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC CGG 1152
Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
605 610 615

GAT GAG CTG ACC AAG AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC CTG GTC AAA GGC 1200
Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
620 625 630 635

TTC TAT CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG 1248
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
640 645 650

GAG AAC AAC TAC AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAC TCC GAC GGC TCC 1296
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
655 660 665

TTC TTC CTC TAC AGC AAG CTC ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG CAG CAG 1344
Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
670 675 680

GGG AAC GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC AAC CAC 1392
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
685 690 695

TAC ACG CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCT CCG GGT AAA TGA 1431
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
700 705 710

配列番号：４
配列の長さ：476
配列の型：アミノ酸
トポロジー：直鎖状
配列の種類：タンパク質
配列

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1 5 10 15

Val Leu Ser Glu Val Lys Leu Gln Gln Trp Gly Glu Gly Leu Leu Gln
20 25 30

Pro Ser Glu Thr Leu Ser Arg Thr Cys Val Val Ser Gly Gly Ser Ile

35 40 45

Ser Gly Tyr Tyr Tyr Trp Thr Trp Ile Arg Gln Thr Pro Gly Arg Gly

50 55 60

Leu Glu Trp Ile Gly His Ile Tyr Gly Asn Gly Ala Thr Thr Asn Tyr

65 70 75 80

Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys

85 90 95

Asn Gln Phe Phe Leu Asn Leu Asn Ser Val Thr Asp Ala Asp Thr Ala

100 105 110

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Pro Arg Pro Asp Cys Thr Thr Ile Cys

115 120 125

Tyr Gly Gly Trp Val Asp Val Trp Gly Pro Gly Asp Leu Val Thr Val

130 135 140

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

145 150 155 160

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys

165 170 175

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu

180 185 190

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu

195 200 205

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr

210 215 220

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val

225 230 235 240

Asp Lys Lys Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro

245 250 255

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe

260 265 270

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val

275 280 285

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe

290 295 300

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro

305 310 315 320

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr

325 330 335

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val

340 345 350

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala

355 360 365

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg

370 375 380

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly

385 390 395 400

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro

405 410 415

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser

420 425 430

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln

435 440 445

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His

450 455 460

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

465 470 475

配列番号：5
配列の長さ：720
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：Genomic DNA
配列の特徴：
特徴を表す記号：CDS
存在位置：1..720
配列

ATG AGC CTC CCT GCT CAG CTC CTC GGG CTG CTA TTG CTC TGC GTC CCC 48

Met Ser Leu Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Cys Val Pro

480 485 490

GGG TCC AGT GGG GAA GTT GTG ATG ACT CAG TCT CCA CTG TCC CTT CCC 96

Gly Ser Ser Gly Glu Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro

495 500 505

ATC ACA CCT GGA GAG CCG GCC TCC ATC TCC TGT AGG TCT AGT CAA AGC 144

Ile Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser

510 515 520 525

CTT AAA CAC AGT AAT GGA GAC ACC TTC CTG AGT TGG TAT CAG CAG AAG 192

Leu Lys His Ser Asn Gly Asp Thr Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys

530 535 540

CCA GGC CAA CCT CCA AGG CTC CTG ATT TAT AAG GTT TCT AAC CGG GAC 240

Pro Gly Gln Pro Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Asp

545 550 555

TCT GGG GTC CCA GAC AGA TTC AGC GGC AGT GGG GCA GGG ACA GAT TTC 288

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe

560 565 570

ACA CTG AAA ATC AGC GCA GTG GAG GCT GAA GAT GTT GGG GTT TAT TTC 336

Thr Leu Lys Ile Ser Ala Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Phe

575 580 585

TGC GGG CAA GGT ACA AGG ACT CCT CCC ACT TTC GGC GGA GGG ACC AAG 384

Cys Gly Gln Gly Thr Arg Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys

590 595 600 605

GTG GAA ATC AAA CGT ACG GTG GCT GCA CCA TCT GTC TTC ATC TTC CCG 432
Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
610 615 620

CCA TCT GAT GAG CAG TTG AAA TCT GGA ACT GCC TCT GTT GTG TGC CTG 480
Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
625 630 635

CTG AAT AAC TTC TAT CCC AGA GAG GCC AAA GTA CAG TGG AAG GTG GAT 528
Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
640 645 650

AAC GCC CTC CAA TCG GGT AAC TCC CAG GAG AGT GTC ACA GAG CAG GAC 576
Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
655 660 665

AGC AAG GAC AGC ACC TAC AGC CTC AGC AGC ACC CTG ACG CTG AGC AAA 624
Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
670 675 680 685

GCA GAC TAC GAG AAA CAC AAA GTC TAC GCC TGC GAA GTC ACC CAT CAG 672
Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
690 695 700

GGC CTG AGC TCG CCC GTC ACA AAG AGC TTC AAC AGG GGA GAG TGT TGA 720
Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
705 710 715

配列番号：6
配列の長さ：239
配列の型：アミノ酸
トポロジー：直鎖状
配列の種類：タンパク質
配列

Met Ser Leu Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Cys Val Pro
1 5 10 15
Gly Ser Ser Gly Glu Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro
20 25 30
Ile Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser
35 40 45
Leu Lys His Ser Asn Gly Asp Thr Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys
50 55 60
Pro Gly Gln Pro Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Asp
65 70 75 80
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe
85 90 95
Thr Leu Lys Ile Ser Ala Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Phe
100 105 110
Cys Gly Gln Gly Thr Arg Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
115 120 125
Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
130 135 140
Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
145 150 155 160
Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
165 170 175
Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
180 185 190
Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
195 200 205
Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
210 215 220
Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

配列番号：7

配列の長さ：1437

配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：Genomic DNA
配列の特徴：
特徴を表す記号：CDS
存在位置：1..1437
配列

```
ATG GGT TGG AGC CTC ATC TTG CTC TTC CTT GTC GCT GTT GCT ACG CGT      48
Met Gly Trp Ser Leu Ile Leu Leu Phe Leu Val Ala Val Ala Thr Arg
                245                 250                 255

GTC CAG TGT GAG GTG CAA CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTC CAG      96
Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
            260                 265                 270

CCT GGC GGG TCC CTG AGA GTC TCC TGT GCA GTC TCT GGA TTC ACC TTC     144
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Val Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Thr Phe
        275                 280                 285

AGT GAC CAC TAC ATG TAT TGG TTC CGC CAG GCT CCA GGG AAG GGG CCG     192
Ser Asp His Tyr Met Tyr Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Pro
    290                 295                 300

GAA TGG GTA GGT TTC ATT AGA AAC AAA CCG AAC GGT GGG ACA ACA GAA     240
Glu Trp Val Gly Phe Ile Arg Asn Lys Pro Asn Gly Gly Thr Thr Glu
305                 310                 315                 320

TAC GCC GCG TCT GTG AAA GAC AGA TTC ACC ATC TCC AGA GAT GAT TCC     288
Tyr Ala Ala Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser
                325                 330                 335

AAA AGC ATC GCC TAT CTG CAA ATG AGC AGC CTG AAA ATC GAG GAC ACG     336
Lys Ser Ile Ala Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ile Glu Asp Thr
            340                 345                 350
```

GCC GTC TAT TAC TGT ACT ACA TCC TAC ATT TCA CAT TGT CGG GGT GGT 384
Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Thr Ser Tyr Ile Ser His Cys Arg Gly Gly
355 360 365

GTC TGC TAT GGA GGT TAC TTC GAA TTC TGG GGC CAG GGC GCC CTG GTC 432
Val Cys Tyr Gly Gly Tyr Phe Glu Phe Trp Gly Gln Gly Ala Leu Val
370 375 380

ACC GTC TCC TCA GCT AGC ACC AAG GGC CCA TCG GTC TTC CCC CTG GCA 480
Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
385 390 395 400

CCC TCC TCC AAG AGC ACC TCT GGG GGC ACA GCG GCC CTG GGC TGC CTG 528
Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
405 410 415

GTC AAG GAC TAC TTC CCC GAA CCG GTG ACG GTG TCG TGG AAC TCA GGC 576
Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
420 425 430

GCC CTG ACC AGC GGC GTG CAC ACC TTC CCG GCT GTC CTA CAG TCC TCA 624
Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
435 440 445

GGA CTC TAC TCC CTC AGC AGC GTG GTG ACC GTG CCC TCC AGC AGC TTG 672
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
450 455 460

GGC ACC CAG ACC TAC ATC TGC AAC GTG AAT CAC AAG CCC AGC AAC ACC 720
Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
465 470 475 480

AAG GTG GAC AAG AAA GCA GAG CCC AAA TCT TGT GAC AAA ACT CAC ACA 768
Lys Val Asp Lys Lys Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
485 490 495

TGC CCA CCG TGC CCA GCA CCT GAA CTC CTG GGG GGA CCG TCA GTC TTC 816
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
500 505 510

CTC TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACC CTC ATG ATC TCC CGG ACC CCT 864
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
515 520 525

GAG GTC ACA TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAC GAA GAC CCT GAG GTC 912
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
530 535 540

AAG TTC AAC TGG TAC GTG GAC GGC GTG GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA 960
Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
545 550 555 560

AAG CCG CGG GAG GAG CAG TAC AAC AGC ACG TAC CGT GTG GTC AGC GTC 1008
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
565 570 575

CTC ACC GTC CTG CAC CAG GAC TGG CTG AAT GGC AAG GAG TAC AAG TGC 1056
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
580 585 590

AAG GTC TCC AAC AAA GCC CTC CCA GCC CCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC 1104
Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
595 600 605

AAA GCC AAA GGG CAG CCC CGA GAA CCA CAG GTG TAC ACC CTG CCC CCA 1152
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
610 615 620

TCC CGG GAT GAG CTG ACC AAG AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC CTG GTC 1200
Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
625 630 635 640

AAA GGC TTC TAT CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG 1248
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
645 650 655

CAG CCG GAG AAC AAC TAC AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAC TCC GAC 1296
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
660 665 670

GGC TCC TTC TTC CTC TAC AGC AAG CTC ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG 1344

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp

675 680 685

CAG CAG GGG AAC GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC 1392

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His

690 695 700

AAC CAC TAC ACG CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCT CCG GGT AAA TGA 1437

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

705 710 715

配列番号：８
配列の長さ：478
配列の型：アミノ酸
トポロジー：直鎖状
配列の種類：タンパク質
配列

Met Gly Trp Ser Leu Ile Leu Leu Phe Leu Val Ala Val Ala Thr Arg

1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln

20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Val Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Thr Phe

35 40 45

Ser Asp His Tyr Met Tyr Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Pro

50 55 60

Glu Trp Val Gly Phe Ile Arg Asn Lys Pro Asn Gly Gly Thr Thr Glu

65 70 75 80

Tyr Ala Ala Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser

85 90 95

Lys Ser Ile Ala Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ile Glu Asp Thr

100 105 110

Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Thr Ser Tyr Ile Ser His Cys Arg Gly Gly
115 120 125
Val Cys Tyr Gly Gly Tyr Phe Glu Phe Trp Gly Gln Gly Ala Leu Val
130 135 140
Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
145 150 155 160
Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
165 170 175
Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
180 185 190
Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
195 200 205
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
210 215 220
Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
225 230 235 240
Lys Val Asp Lys Lys Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
245 250 255
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
260 265 270
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
275 280 285
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
290 295 300
Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
305 310 315 320
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
325 330 335
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
340 345 350

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
355 360 365

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
370 375 380

Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
385 390 395 400

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
405 410 415

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
420 425 430

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
435 440 445

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
450 455 460

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470 475

配列番号：9
配列の長さ：711
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：Genomic DNA
配列の特徴：
特徴を表す記号：CDS
存在位置：1..711
配列

ATG AGG GTC CCC GCT CAG CTC CTG GGG CTC CTG CTG CTC TGG CTC CCA 48
Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
480 485 490 495

GGT GCA CGA TGT GAG TCT GTC CTG ACA CAG CCG CCC TCA GTG TCT GGG 96
Gly Ala Arg Cys Glu Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly
500 505 510

GCC CCA GGG CAG AAG GTC ACC ATC TCG TGC ACT GGG AGC ACC TCC AAC 144
Ala Pro Gly Gln Lys Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Thr Ser Asn
515 520 525

ATT GGA GGT TAT GAT CTA CAT TGG TAC CAG CAG CTC CCA GGA ACG GCC 192
Ile Gly Gly Tyr Asp Leu His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala
530 535 540

CCC AAA CTC CTC ATC TAT GAC ATT AAC AAG CGA CCC TCA GGA ATT TCT 240
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ile Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Ser
545 550 555

GAC CGA TTC TCT GGC TCC AAG TCT GGT ACC GCG GCC TCC CTG GCC ATC 288
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ala Ala Ser Leu Ala Ile
560 565 570 575

ACT GGG CTC CAG ACT GAG GAT GAG GCT GAT TAT TAC TGC CAG TCC TAT 336
Thr Gly Leu Gln Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr
580 585 590

GAC AGC AGC CTG AAT GCT CAG GTA TTC GGA GGA GGG ACC CGG CTG ACC 384
Asp Ser Ser Leu Asn Ala Gln Val Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Thr
595 600 605

GTC CTA GGT CAG CCC AAG GCT GCC CCC TCG GTC ACT CTG TTC CCG CCC 432
Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro
610 615 620

TCC TCT GAG GAG CTT CAA GCC AAC AAG GCC ACA CTG GTG TGT CTC ATA 480
Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile
625 630 635

AGT GAC TTC TAC CCG GGA GCC GTG ACA GTG GCC TGG AAG GCA GAT AGC 528
Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser
640 645 650 655

AGC CCC GTC AAG GCG GGA GTG GAG ACC ACC ACA CCC TCC AAA CAA AGC 576
Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser
660 665 670

AAC AAC AAG TAC GCG GCC AGC AGC TAC CTG AGC CTG ACG CCT GAG CAG 624
Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln
675 680 685

TGG AAG TCC CAC AGA AGC TAC AGC TGC CAG GTC ACG CAT GAA GGG AGC 672
Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser
690 695 700

ACC GTG GAG AAG ACA GTG GCC CCT ACA GAA TGT TCA TGA 711
Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
705 710 715

配列番号：１０
配列の長さ：236
配列の型：アミノ酸
トポロジー：直鎖状
配列の種類：タンパク質
配列

Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1 5 10 15
Gly Ala Arg Cys Glu Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly
20 25 30
Ala Pro Gly Gln Lys Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Thr Ser Asn
35 40 45
Ile Gly Gly Tyr Asp Leu His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala
50 55 60
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ile Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Ser
65 70 75 80
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ala Ala Ser Leu Ala Ile
85 90 95
Thr Gly Leu Gln Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr
100 105 110
Asp Ser Ser Leu Asn Ala Gln Val Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Thr
115 120 125
Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro
130 135 140
Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile
145 150 155 160
Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser
165 170 175
Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser
180 185 190
Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln
195 200 205
Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser
210 215 220
Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
225 230 235

配列番号：１１
配列の長さ：1431

配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：Genomic DNA
配列の特徴：
特徴を表す記号：CDS
存在位置：1..1431
配列

ATG AAA CAC CTG TGG TTC TTC CTC CTC CTG GTG GCA GCT CCC AGA TGG 48
Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
240 245 250

GTC CTG TCC CAG GTG CAG CTG CAG GAG TCG GGC CCA GGA CTG GTG AAG 96
Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
255 260 265

CCT TCG GAG ACC CTG TCC CTC ACC TGC GCT GTC TCT GGT GGC TCC ATC 144
Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Gly Ser Ile
270 275 280 285

AGC GGT GGT TAT GGC TGG GGC TGG ATC CGC CAG CCC CCA GGG AAG GGG 192
Ser Gly Gly Tyr Gly Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly
290 295 300

CTG GAG TGG ATT GGG AGT TTC TAT AGT AGT AGT GGG AAC ACC TAC TAC 240
Leu Glu Trp Ile Gly Ser Phe Tyr Ser Ser Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr
305 310 315

AAC CCC TCC CTC AAG AGT CAA GTC ACC ATT TCA ACA GAC ACG TCC AAG 288
Asn Pro Ser Leu Lys Ser Gln Val Thr Ile Ser Thr Asp Thr Ser Lys
320 325 330

AAC CAG TTC TCC CTG AAG CTG AAC TCT ATG ACC GCC GCG GAC ACG GCC 336
Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Asn Ser Met Thr Ala Ala Asp Thr Ala
335 340 345

GTG TAT TAC TGT GTG AGA GAT CGT CTT TTT TCA GTT GTT GGA ATG GTT 384
Val Tyr Tyr Cys Val Arg Asp Arg Leu Phe Ser Val Val Gly Met Val
350 355 360 365

TAC AAC AAC TGG TTC GAT GTC TGG GGC CCG GGA GTC CTG GTC ACC GTC 432
Tyr Asn Asn Trp Phe Asp Val Trp Gly Pro Gly Val Leu Val Thr Val
370 375 380

TCC TCA GCT AGC ACC AAG GGC CCA TCG GTC TTC CCC CTG GCA CCC TCC 480
Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
385 390 395

TCC AAG AGC ACC TCT GGG GGC ACA GCG GCC CTG GGC TGC CTG CTC AAG 528
Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Leu Lys
400 405 410

GAC TAC TTC CCC GAA CCG GTG ACG GTG TCG TGG AAC TCA GGC GCC CTG 576
Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
415 420 425

ACC AGC GGC GTG CAC ACC TTC CCG GCT GTC CTA CAG TCC TCA GGA CTC 624
Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
430 435 440 445

TAC TCC CTC AGC AGC GTG GTG ACC GTG CCC TCC AGC AGC TTG GGC ACC 672
Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
450 455 460

CAG ACC TAC ATC TGC AAC GTG AAT CAC AAG CCC AGC AAC ACC AAG GTG 720
Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
465 470 475

GAC AAG AAA GCA GAG CCC AAA TCT TGT GAC AAA ACT CAC ACA TGC CCA 768
Asp Lys Lys Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
480 485 490

CCG TGC CCA GCA CCT GAA CTC CTG GGG GGA CCG TCA GTC TTC CTC TTC 816
Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
495 500 505

CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACC CTC ATG ATC TCC CGG ACC CCT GAG GTC 864
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
510 515 520 525

ACA TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAC GAA GAC CCT GAG GTC AAG TTC 912
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
530 535 540

AAC TGG TAC GTG GAC GGC GTG GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG 960
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
545 550 555

CGG GAG GAG CAG TAC AAC AGC ACG TAC CGT GTG GTC AGC GTC CTC ACC 1008
Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
560 565 570

GTC CTG CAC CAG GAC TGG CTG AAT GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC 1056
Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
575 580 585

TCC AAC AAA GCC CTC CCA GCC CCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC 1104
Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
590 595 600 605

AAA GGG CAG CCC CGA GAA CCA CAG GTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC CGG 1152
Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
610 615 620

GAT GAG CTG ACC AAG AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC CTG GTC AAA GGC 1200
Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
625 630 635

TTC TAT CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG 1248
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
640 645 650

GAG AAC AAC TAC AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAC TCC GAC GGC TCC 1296
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
655 660 665

TTC TTC CTC TAC AGC AAG CTC ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG CAG CAG 1344
Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
670 675 680 685

GGG AAC GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC AAC CAC 1392
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
690 695 700

TAC ACG CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCT CCG GGT AAA TGA 1431
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
705 710

配列番号：12
配列の長さ：476

配列の型：アミノ酸
トポロジー：直鎖状
配列の種類：タンパク質
配列

```
Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1               5                  10                  15
Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
            20                  25                  30
Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Gly Ser Ile
        35                  40                  45
Ser Gly Gly Tyr Gly Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly
    50                  55                  60
Leu Glu Trp Ile Gly Ser Phe Tyr Ser Ser Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr
65                  70                  75                  80
Asn Pro Ser Leu Lys Ser Gln Val Thr Ile Ser Thr Asp Thr Ser Lys
                85                  90                  95
Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Asn Ser Met Thr Ala Ala Asp Thr Ala
            100                 105                 110
Val Tyr Tyr Cys Val Arg Asp Arg Leu Phe Ser Val Val Gly Met Val
        115                 120                 125
Tyr Asn Asn Trp Phe Asp Val Trp Gly Pro Gly Val Leu Val Thr Val
    130                 135                 140
Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
145                 150                 155                 160
Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Leu Lys
                165                 170                 175
Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
```

180 185 190

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu

195 200 205

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr

210 215 220

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val

225 230 235 240

Asp Lys Lys Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro

245 250 255

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe

260 265 270

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val

275 280 285

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe

290 295 300

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro

305 310 315 320

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr

325 330 335

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val

340 345 350

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala

355 360 365

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg

370 375 380

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly

385 390 395 400

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro

405 410 415

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser

420 425 430

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln

435 440 445

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His

450 455 460

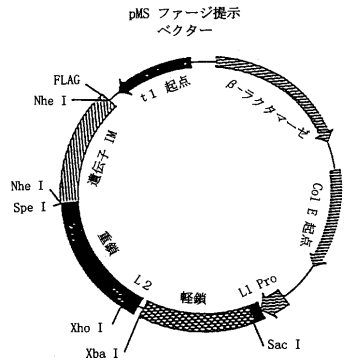
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

465 470 475

【図１】

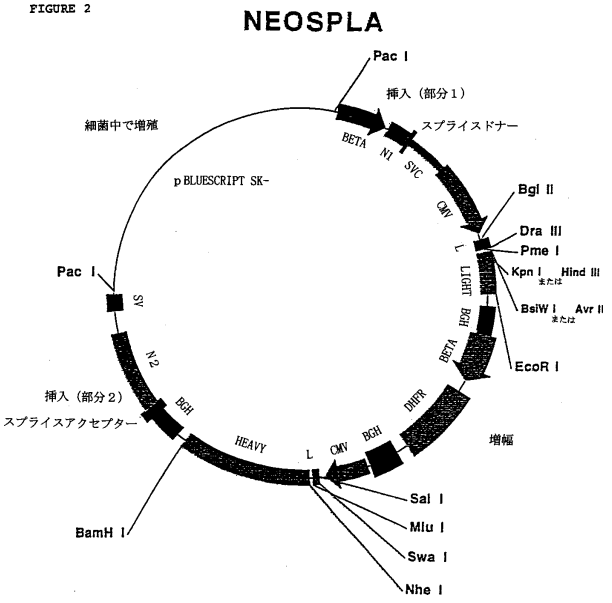
FIGURE 1

pMSファージ提示ベクター．Pro＝Lac Z プロモーター．L１＝Omp A リーダー．L２＝Pel B リーダー．



【図２】

FIGURE 2

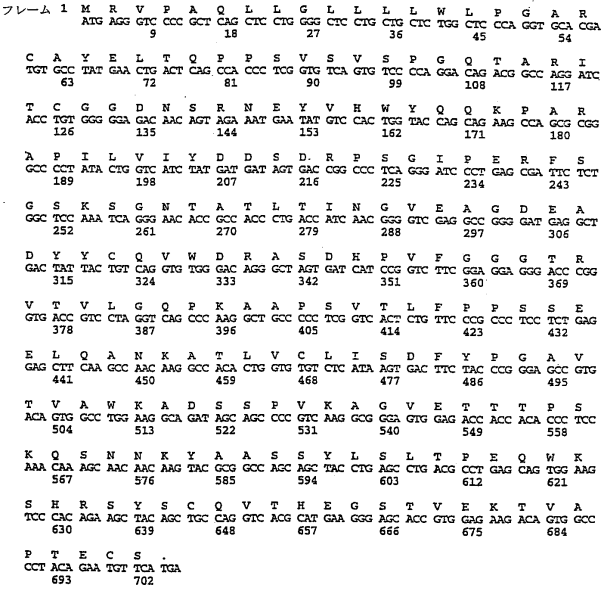


CMV = サイトメガロウイルスプロモーター/エンハンサー
BETA = マウスベータグロビン主要プロモーター
SVO = ＳＶ４０ 起点
BGH = ウシ成長ホルモンポリアデニル化
SV = ＳＶ４０ ポリアデニル化
N1 = ネオマイシンホスホトランスフェラーゼエクソン１
N2 = ネオマイシンホスホトランスフェラーゼエクソン２
LIGHT = ヒト免疫グロブリンカッパまたはラムダ定常領域
DHFR = ジヒドロ葉酸レダクターゼ
HEAVY = ヒト免疫グロブリンガンマ１またはガンマ４ＰＥ定常領域
L = リーダー

【図３ａ】

FIGURE 3a

７Ｃ１０ 軽鎖/重長類化の長さ：７０５ bp；１から７０５までを示す
１から７０３までを翻訳（全領域）；
使用した遺伝子コード：ユニバーサル；１９９５年５月２６日（金）１１：１１ AM



【図３ｂ】

FIGURE 3b

７Ｃ１０ 重鎖/重長類化の長さ：１４３１ bp；１から１４３１までを示す
１から１４２９までを翻訳（全領域）；
使用した遺伝子コード：ユニバーサル；１９９５年５月２６日（金）１１：１１ AM

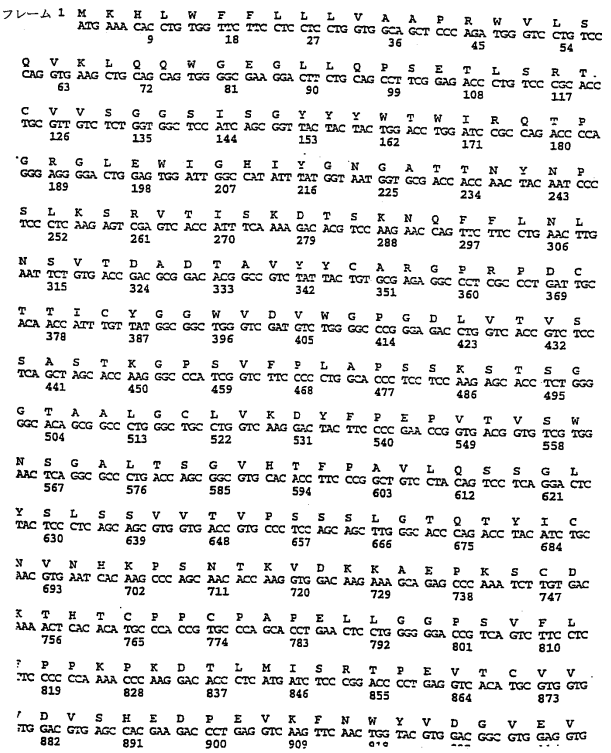
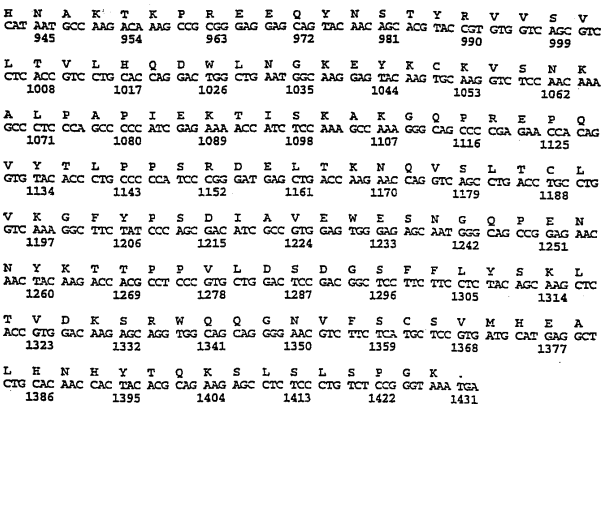


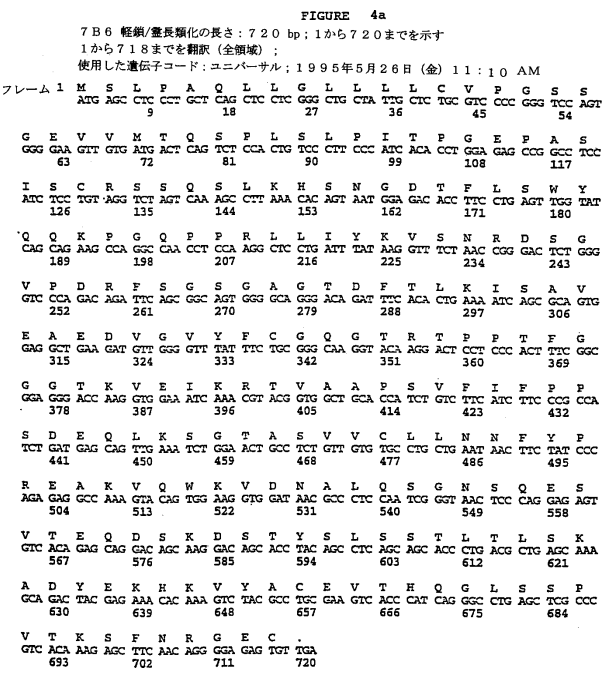
FIGURE 3b (続き)



【図４ａ】

FIGURE 4a

７Ｂ６ 軽鎖/重長類化の長さ：７２０ bp；１から７２０までを示す
１から７１８までを翻訳（全領域）；
使用した遺伝子コード：ユニバーサル；１９９５年５月２６日（金）１１：１０ AM



【図４ｂ】

FIGURE 4b

7B6 重鎖/重長類化の長さ：１４３７ bp；1から１４３７までを示す
1から１４３５までを翻訳（全領域）；
使用した遺伝子コード：ユニバーサル；１９９５年5月２６日（金）１１：０９ AM

```
フレーム 1 M  G  W  S  L  I  L  L  F  L  V  A  V  A  T  R  V  Q  C
           ATG GGT TGG AGC CTC ATC TTG CTC TTC CTT GTC GCT GTT GCT ACG CGT GTC CAG TGT
                     9         18         27         36         45         54

           E  V  Q  L  V  E  S  G  G  G  L  V  Q  P  G  G  S  L  R  V  S
           GAG GTG CAA CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTC CAG CCT GGC GGG TCC CTG AGA GTC TCC
              63         72         81         90         99        108        117

           C  A  V  S  G  F  T  F  S  D  H  Y  M  Y  W  F  R  Q  A  P  G
           TGT GCA GTC TCT GGA TTC ACC TTC AGT GAC CAC TAC ATG TAT TGG TTC CGC CAG GCT CCA GGG
             126        135        144        153        162        171        180

           K  G  P  E  W  V  G  F  I  R  N  K  P  N  G  G  T  T  E  Y  A
           AAG GGG CCG GAA TGG GTA GGT TTC ATT AGA AAC AAA CCG AAC GGT GGG ACA ACA GAA TAC GCC
             189        198        207        216        225        234        243

           A  S  V  K  D  R  F  T  I  S  R  D  D  S  K  S  I  A  Y  L  Q
           GCG TCT GTG AAA GAC AGA TTC ACC ATC TCC AGA GAT GAT TCC AAA AGC ATC GCC TAT CTG CAA
             252        261        270        279        288        297        306

           M  S  S  L  K  I  E  D  T  A  V  Y  Y  C  T  T  S  Y  I  S  H
           ATG AGC AGC CTG AAA ATC GAG GAC ACG GCC GTC TAT TAC TGT ACT ACA TCC TAC ATT TCA CAT
             315        324        333        342        351        360        369

           C  R  G  G  V  C  Y  G  G  Y  F  E  F  W  G  Q  G  A  L  V  T
           TGT CGG GGT GGT GTC TGC TAT GGA GGT TAC TTC GAA TTC TGG GGC CAG GGC GCC CTG GTC ACC
             378        387        396        405        414        423        432

           V  S  S  A  S  T  K  G  P  S  V  F  P  L  A  P  S  S  K  S  T
           GTC TCC TCA GCT AGC ACC AAG GGC CCA TCG GTC TTC CCC CTG GCA CCC TCC TCC AAG AGC ACC
             441        450        459        468        477        486        495

           S  G  G  T  A  A  L  G  C  L  V  K  D  Y  F  P  E  P  V  T  V
           TCT GGG GGC ACA GCG GCC CTG GGC TGC CTG GTC AAG GAC TAC TTC CCC GAA CCG GTG ACG GTG
             504        513        522        531        540        549        558

           S  W  N  S  G  A  L  T  S  G  V  H  T  F  P  A  V  L  Q  S  S
           TCG TGG AAC TCA GGC GCC CTG ACC AGC GGC GTG CAC ACC TTC CCG GCT GTC CTA CAG TCC TCA
             567        576        585        594        603        612        621

           G  L  Y  S  L  S  S  V  V  T  V  P  S  S  S  L  G  T  Q  T  Y
           GGA CTC TAC TCC CTC AGC AGC GTG GTG ACC GTG CCC TCC AGC AGC TTG GGC ACC CAG ACC TAC
             630        639        648        657        666        675        684

           I  C  N  V  N  H  K  P  S  N  T  K  V  D  K  K  A  E  P  K  S
           ATC TGC AAC GTG AAT CAC AAG CCC AGC AAC ACC AAG GTG GAC AAG AAA GCA GAG CCC AAA TCT
             693        702        711        720        729        738        747

           C  D  K  T  H  T  C  P  P  C  P  A  P  E  L  L  G  G  P  S  V
           TGT GAC AAA ACT CAC ACA TGC CCA CCG TGC CCA GCA CCT GAA CTC CTG GGG GGA CCG TCA GTC
             756        765        774        783        792        801        810

           F  L  F  P  P  K  P  K  D  T  L  M  I  S  R  T  P  E  V  T  C
           TTC CTC TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACC CTC ATG ATC TCC CGG ACC CCT GAG GTC ACA TGC
             819        828        837        846        855        864        873

           V  V  V  D  V  S  H  E  D  P  E  V  K  F  N  W  Y  V  D  G  V
           GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAC GAA GAC CCT GAG GTC AAG TTC AAC TGG TAC GTG GAC GGC GTG
             882        891        900        909        918        927        936
```

FIGURE 4b（続き）

```
           E  V  H  N  A  K  T  K  P  R  E  E  Q  Y  N  S  T  Y  R  V  V
           GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG CGG GAG GAG CAG TAC AAC AGC ACG TAC CGT GTG GTC
             945        954        963        972        981        990        999

           S  V  L  T  V  L  H  Q  D  W  L  N  G  K  E  Y  K  C  K  V  S
           AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC CAG GAC TGG CTG AAT GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC
            1008       1017       1026       1035       1044       1053       1062

           N  K  A  L  P  A  P  I  E  K  T  I  S  K  A  K  G  Q  P  R  E
           AAC AAA GCC CTC CCA GCC CCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGG CAG CCC CGA GAA
            1071       1080       1089       1098       1107       1116       1125

           P  Q  V  Y  T  L  P  P  S  R  D  E  L  T  K  N  Q  V  S  L  T
           CCA CAG GTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC CGG GAT GAG CTG ACC AAG AAC CAG GTC AGC CTG ACC
            1134       1143       1152       1161       1170       1179       1188

           C  L  V  K  G  F  Y  P  S  D  I  A  V  E  W  E  S  N  G  Q  P
           TGC CTG GTC AAA GGC TTC TAT CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG
            1197       1206       1215       1224       1233       1242       1251

           E  N  N  Y  K  T  T  P  P  V  L  D  S  D  G  S  F  F  L  Y  S
           GAG AAC AAC TAC AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAC TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAC AGC
            1260       1269       1278       1287       1296       1305       1314

           K  L  T  V  D  K  S  R  W  Q  Q  G  N  V  F  S  C  S  V  M  H
           AAG CTC ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG CAG CAG GGG AAC GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT
            1323       1332       1341       1350       1359       1368       1377

           E  A  L  H  N  H  Y  T  Q  K  S  L  S  L  S  P  G  K  .
           GAG GCT CTG CAC AAC CAC TAC ACG CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCT CCG GGT AAA TGA
            1386       1395       1404       1413       1422       1431
```

【図５ａ】

FIGURE 5a

16C10 ラムダ/重長類化の長さ：７１１ bp；
1から７１１までを示す
1から７０９までを翻訳（全領域）；
使用した遺伝子コード：ユニバーサル；１９９５年5月２６日（金）１１：０８ AM

```
フレーム 1 M  R  V  P  A  Q  L  L  G  L  L  L  L  W  L  P  G  A  R
           ATG AGG GTC CCC GCT CAG CTC CTG GGG CTC CTG CTG CTC TGG CTC CCA GGT GCA CGA
                     9         18         27         36         45         54

           C  E  S  V  L  T  Q  P  P  S  V  S  G  A  P  G  Q  K  V  T  I
           TGT GAG TCT GTC CTG ACA CAG CCG CCC TCA GTG TCT GGG GCC CCA GGG CAG AAG GTC ACC ATC
             63         72         81         90         99        108        117

           S  C  T  G  S  T  S  N  I  G  G  Y  D  L  H  W  Y  Q  Q  L  P
           TCG TGC ACT GGG AGC ACC TCC AAC ATT GGA GGT TAT GAT CTA CAT TGG TAC CAG CAG CTC CCA
             126        135        144        153        162        171        180

           G  T  A  P  K  L  L  I  Y  D  I  N  K  R  P  S  G  I  S  D  R
           GGA ACG GCC CCC AAA CTC CTC ATC TAT GAC ATT AAC AAG CGA CCC TCA GGA ATT TCT GAC CGA
             189        198        207        216        225        234        243

           F  S  G  S  K  S  G  T  A  A  S  L  A  I  T  G  L  Q  T  E  D
           TTC TCT GGC TCC AAG TCT GGT ACC GCG GCC TCC CTG GCC ATC ACT GGG CTC CAG ACT GAG GAT
             252        261        270        279        288        297        306

           E  A  D  Y  Y  C  Q  S  Y  D  S  S  L  N  A  Q  V  F  G  G  G
           GAG GCT GAT TAT TAC TGC CAG TCC TAT GAC AGC AGC CTG AAT GCT CAG GTA TTC GGA GGA GGG
             315        324        333        342        351        360        369

           T  R  L  T  V  L  G  Q  P  K  A  A  P  S  V  T  L  F  P  P  S
           ACC CGG CTG ACC GTC CTA GGT CAG CCC AAG GCT GCC CCC TCG GTC ACT CTG TTC CCG CCC TCC
             378        387        396        405        414        423        432

           S  E  E  L  Q  A  N  K  A  T  L  V  C  L  I  S  D  F  Y  P  G
           TCT GAG GAG CTT CAA GCC AAC AAG GCC ACA CTG GTG TGT CTC ATA AGT GAC TTC TAC CCG GGA
             441        450        459        468        477        486        495

           A  V  T  V  A  W  K  A  D  S  S  P  V  K  A  G  V  E  T  T  T
           GCC GTG ACA GTG GCC TGG AAG GCA GAT AGC AGC CCC GTC AAG GCG GGA GTG GAG ACC ACA ACA
             504        513        522        531        540        549        558

           P  S  K  Q  S  N  N  K  Y  A  A  S  S  Y  L  S  L  T  P  E  Q
           CCC TCC AAA CAA AGC AAC AAC AAG TAC GCG GCC AGC AGC TAC CTG AGC CTG ACG CCT GAG CAG
             567        576        585        594        603        612        621

           W  K  S  H  R  S  Y  S  C  Q  V  T  H  E  G  S  T  V  E  K  T
           TGG AAG TCC CAC AGA AGC TAC AGC TGC CAG GTC ACG CAT GAA GGG AGC ACC GTG GAG AAG ACA
             630        639        648        657        666        675        684

           V  A  P  T  E  C  S  .
           GTG GCC CCT ACA GAA TGT TCA TGA
             693        702        711
```

【図５ｂ】

FIGURE 5b

16C10 重鎖/重長類化の長さ：１４３１ bp；
1から１４３１までを示す
1から１４２９までを翻訳（全領域）；
使用した遺伝子コード：ユニバーサル；１９９５年5月２６日（金）１１：０８ AM

```
フレーム 1 M  K  H  L  W  F  F  L  L  L  V  A  A  P  R  W  V  L  S
           ATG AAA CAC CTG TGG TTC TTC CTC CTG CTG GTG GCA GCT CCC AGA TGG GTC CTG TCC
                     9         18         27         36         45         54

           Q  V  Q  L  Q  E  S  G  P  G  L  V  K  P  S  E  T  L  S  L  T
           CAG GTG CAG CTG CAG GAG TCG GGC CCA GGA CTG GTG AAG CCT TCG GAG ACC CTG TCC CTC ACC
             63         72         81         90         99        108        117

           C  A  V  S  G  G  S  I  S  G  G  Y  G  W  G  W  I  R  Q  P  P
           TGC GCT GTC TCT GGT GGC TCC ATC AGC GGT GGT TAT GGC TGG GGC TGG ATC CGC CAG CCC CCA
             126        135        144        153        162        171        180

           G  K  G  L  E  W  I  G  S  F  Y  S  S  S  G  N  T  Y  Y  N  P
           GGG AAG GGG CTG GAG TGG ATT GGG AGT TTC TAT AGT AGT AGT GGG AAC ACC TAC TAC AAC CCC
             189        198        207        216        225        234        243

           S  L  K  S  Q  V  T  I  S  T  D  T  S  K  N  Q  F  S  L  K  L
           TCC CTC AAG AGT CAA GTC ACC ATT TCA ACA GAC ACG TCC AAG AAC CAG TTC TCC CTG AAG CTG
             252        261        270        279        288        297        306

           N  S  M  T  A  A  D  T  A  V  Y  Y  C  V  R  D  R  L  F  S  V
           AAC TCT ATG ACC GCC GCG GAC ACG GCC GTG TAT TAC TGT GTG AGA GAT CGT CTT TTT TCA GTT
             315        324        333        342        351        360        369

           V  G  M  V  Y  N  N  W  F  D  V  W  G  P  G  V  L  V  T  V  S
           GTT GGA ATG GTT TAC AAC AAC TGG TTC GAT GTC TGG GGC CCG GGA GTC CTG GTC ACC GTC TCC
             378        387        396        405        414        423        432

           S  A  S  T  K  G  P  S  V  F  P  L  A  P  S  S  K  S  T  S  G
           TCA GCT AGC ACC AAG GGC CCA TCG GTC TTC CCC CTG GCA CCC TCC TCC AAG AGC ACC TCT GGG
             441        450        459        468        477        486        495

           G  T  A  A  L  G  C  L  V  K  D  Y  F  P  E  P  V  T  V  S  W
           GGC ACA GCG GCC CTG GGC TGC CTG GTC AAG GAC TAC TTC CCC GAA CCG GTG ACG GTG TCG TGG
             504        513        522        531        540        549        558

           N  S  G  A  L  T  S  G  V  H  T  F  P  A  V  L  Q  S  S  G  L
           AAC TCA GGC GCC CTG ACC AGC GGC GTG CAC ACC TTC CCG GCT GTC CTA CAG TCC TCA GGA CTC
             567        576        585        594        603        612        621

           Y  S  L  S  S  V  V  T  V  P  S  S  S  L  G  T  Q  T  Y  I  C
           TAC TCC CTC AGC AGC GTG GTG ACC GTG CCC TCC AGC AGC TTG GGC ACC CAG ACC TAC ATC TGC
             630        639        648        657        666        675        684

           N  V  N  H  K  P  S  N  T  K  V  D  K  K  A  E  P  K  S  C  D
           AAC GTG AAT CAC AAG CCC AGC AAC ACC AAG GTG GAC AAG AAA GCA GAG CCC AAA TCT TGT GAC
             693        702        711        720        729        738        747

           K  T  H  T  C  P  P  C  P  A  P  E  L  L  G  G  P  S  V  F  L
           AAA ACT CAC ACA TGC CCA CCG TGC CCA GCA CCT GAA CTC CTG GGG GGA CCG TCA GTC TTC CTC
             756        765        774        783        792        801        810

           F  P  P  K  P  K  D  T  L  M  I  S  R  T  P  E  V  T  C  V  V
           TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACC CTC ATG ATC TCC CGG ACC CCT GAG GTC ACA TGC GTG GTG
             819        828        837        846        855        864        873

           V  D  V  S  H  E  D  P  E  V  K  F  N  W  Y  V  D  G  V  E  V
           GTG GAC GTG AGC CAC GAA GAC CCT GAG GTC AAG TTC AAC TGG TAC GTG GAC GGC GTG GAG GTG
```

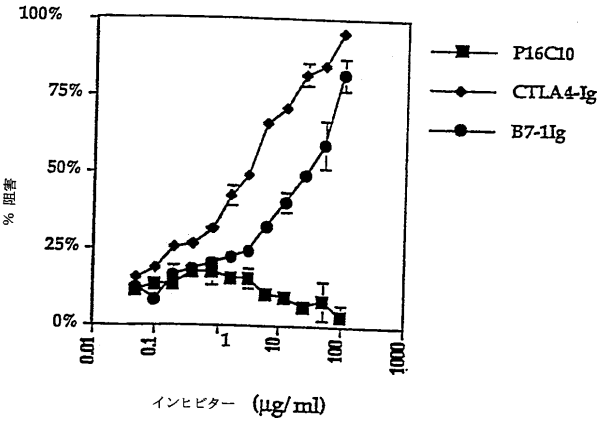
FIGURE 5b (続き)

```
      882         891         900         909         918         927         936
H  N  A  K  T  K  P  R  E  E  Q  Y  N  S  T  Y  R  V  V  S  V
CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG CGG GAG GAG CAG TAC AAC AGC ACG TAC CGT GTG GTC AGC GTC
      945         954         963         972         981         990         999
L  T  V  L  H  Q  D  W  L  N  G  K  E  Y  K  C  K  V  S  N  K
CTC ACC GTC CTG CAC CAG GAC TGG CTG AAT GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA
     1008        1017        1026        1035        1044        1053        1062
A  L  P  A  P  I  E  K  T  I  S  K  A  K  G  Q  P  R  E  P  Q
GCC CTC CCA GCC CCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGG CAG CCC CGA GAA CCA CAG
     1071        1080        1089        1098        1107        1116        1125
V  Y  T  L  P  P  S  R  D  E  L  T  K  N  Q  V  S  L  T  C  L
GTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC CGG GAT GAG CTG ACC AAG AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC CTG
     1134        1143        1152        1161        1170        1179        1188
V  K  G  F  Y  P  S  D  I  A  V  E  W  E  S  N  G  Q  P  E  N
GTC AAA GGC TTC TAT CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG GAG AAC
     1197        1206        1215        1224        1233        1242        1251
N  Y  K  T  T  P  P  V  L  D  S  D  G  S  F  F  L  Y  S  K  L
AAC TAC AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAC TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAC AGC AAG CTC
     1260        1269        1278        1287        1296        1305        1314
T  V  D  K  S  R  W  Q  Q  G  N  V  F  S  C  S  V  M  H  E  A
ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG CAG CAG GGG AAC GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT GAG GCT
     1323        1332        1341        1350        1359        1368        1377
L  H  N  H  Y  T  Q  K  S  L  S  L  S  P  G  K  .
CTG CAC AAC CAC TAC ACG CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCT CCG GGT AAA TGA
     1386        1395        1404        1413        1422        1431
```

【図６】

Figure 6

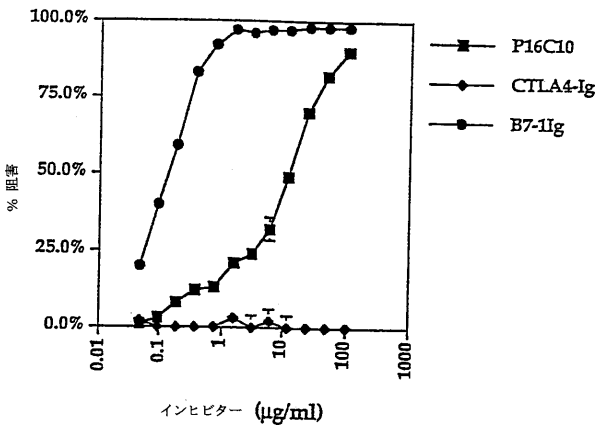
P16C10 MAb、CTLA-4IgおよびB7-1Ig融合タンパク質の存在下でのB7-1トランスフェクションCHO細胞へのCTLA-4 Ig-ビオチンの競合結合



【図７】

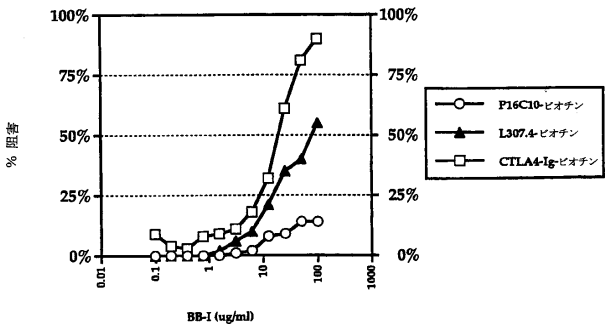
Figure 7

P16C10 MAb、CTLA-4IgおよびB7-1Ig融合タンパク質の存在下でのB7-1トランスフェクションCHO細胞へのP16C10-ビオチンの競合結合



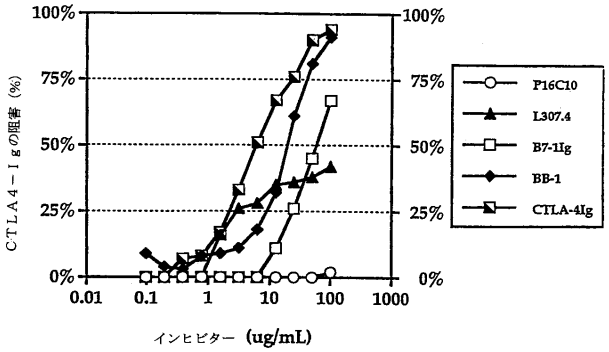
【図８】

Figure 8



【図９】

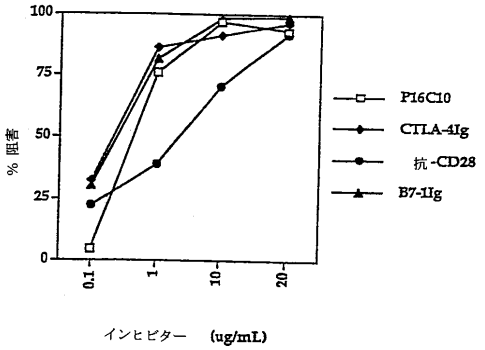
Figure 9



【図１０】

Figure 10

Ｂ７－１かまたはＣＤ２８のいずれかを認識する非標識結合タンパク質を用いた単離非活性化末梢血Ｔ細胞上のＣＤ２８受容体への放射性標識Ｂ７－１Ｉｇ結合の競合的阻害



インヒビター (ug/mL)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI	
Ａ６１Ｐ　17/06	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ　17/06	
Ａ６１Ｐ　19/02	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ　19/02	
Ａ６１Ｐ　25/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ　25/00	
Ａ６１Ｐ　27/14	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ　27/14	
Ａ６１Ｐ　29/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ　29/00	
Ａ６１Ｐ　37/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ　29/00	１０１
Ａ６１Ｐ　37/06	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ　37/00	
Ｃ０７Ｋ　16/28	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ　37/06	
		Ｃ０７Ｋ　16/28	

(72)発明者　ハンナ，ナビル
アメリカ合衆国９２０６７カリフォルニア州　ランチョ・サンタ・フェ、カミノ・デリシアダ　１６０１６番
(72)発明者　ブラムズ，ピーター
アメリカ合衆国９２１１６カリフォルニア州　サンディエゴ、プロクター、プレイス４３０３番
(72)発明者　ハード，シェリル
アメリカ合衆国９２０２４カリフォルニア州　エンシニタス、ビア・モントロ１２２５番

審査官　西　剛志

(56)参考文献　特表平１１－５０８７６４（ＪＰ，Ａ）
Blood, Vol.83,No.1(1994), p.176-183
Transplantation, Vol.60,No,10(1995), p.1171-1178
J.Exp.Med., Vol.174,No.3(1991), p.625-631

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
C12N 15/00 - 15/90
C07K 16/00 - 16/46
BIOSIS/WPI(DIALOG)